



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114929264 A

(43) 申请公布日 2022.08.19

(21) 申请号 202080083829.6

(22) 申请日 2020.10.08

(30) 优先权数据

62/912,903 2019.10.09 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.06.01

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2020/054785 2020.10.08

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/072075 EN 2021.04.15

(71) 申请人 E·弗里奇

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 E·弗里奇 D·巴特尔梅

C·怀特 L·张

(74) 专利代理机构 北京市君合律师事务所

11517

专利代理师 吴瑜 张璐

(51) Int.Cl.

A61K 39/00 (2006.01)

C07K 14/005 (2006.01)

权利要求书15页 说明书95页 附图30页

(54) 发明名称

多结构域蛋白疫苗

(57) 摘要

本文公开了一种允许将一个或多个癌症疫苗表位与支架结构域组合的蛋白质融合技术。本文还公开了所述蛋白质融合技术所涵盖的多肽和多核酸组合物和其使用方法。

1. 一种组合物,其包括融合多肽,所述融合多肽包括多肽序列,所述多肽序列包括:
  - (a) 一个或多个抗原多肽序列;以及
  - (b) 两个或更多个支架多肽序列,其中所述两个或更多个支架多肽序列中的每个支架多肽序列包括人多肽序列、其片段或其变体,并且  
其中(i)所述两个或更多个支架多肽序列的分子质量大于11kDa,或者(ii)所述两个或更多个支架多肽序列中的每个支架多肽序列包括至少21个氨基酸残基。
2. 一种组合物,其包括融合多肽,所述融合多肽包括多肽序列,所述多肽序列包括:
  - (a) 一个或多个抗原多肽序列;以及
  - (b) 一个或多个支架多肽序列,其中所述支架多肽序列选自Stefin A、肌联蛋白-I27、其片段和其变体。
3. 根据权利要求1或2所述的组合物,其中所述支架多肽序列中的至少一个支架多肽序列通过一个或多个接头序列与所述一个或多个抗原多肽序列中的至少一个抗原多肽序列连接。
4. 根据权利要求3所述的组合物,其中所述融合多肽被配置成促进接头的切割、一个或多个抗原多肽中的至少一个抗原多肽的切割或所述一个或多个抗原多肽中的至少一个抗原多肽的呈递。
5. 一种组合物,其包括融合多肽,所述融合多肽包括多肽序列,所述多肽序列包括:
  - (a) 一个或多个抗原多肽序列;以及
  - (b) 一个或多个非免疫原性的支架多肽序列,其中所述支架多肽序列中的至少一个支架多肽序列通过一个或多个接头序列与所述一个或多个抗原多肽序列中的至少一个抗原多肽序列连接,并且  
其中所述融合多肽被配置成促进接头的切割、一个或多个抗原多肽中的至少一个抗原多肽的切割或所述一个或多个抗原多肽中的至少一个抗原多肽的呈递。
6. 根据权利要求1到5中任一项所述的组合物,其中抗原多肽是癌抗原。
7. 根据权利要求1到5中任一项所述的组合物,其中所述抗原多肽与自身免疫性疾病相关或者是自身免疫性抗原或病毒抗原。
8. 根据权利要求1到7中任一项所述的组合物,其中所述支架多肽序列中的每个支架多肽序列包括人多肽序列、其片段或其变体。
9. 根据权利要求1到8中任一项所述的组合物,其中支架多肽包括重组人多肽。
10. 根据权利要求1或3到9中任一项所述的组合物,其中所述支架多肽未被配置成具有靶向结合特性。
11. 根据权利要求1或3到9中任一项所述的组合物,其中所述支架多肽各自独立地选自肌联蛋白I27、泛素、Stefin A、10FN-III、Ig-L细丝蛋白A、腱生蛋白、纤连蛋白、其片段和其变体。
12. 根据权利要求1或3到9中任一项所述的组合物,其中所述支架多肽各自独立地选自Stefin A、肌联蛋白I27、其片段和其变体。
13. 根据权利要求1到12中任一项所述的组合物,其中所述支架多肽缺乏以下:(i) 翻译后修饰;(ii) 肽内二硫键或两者。

14. 根据权利要求1到13中任一项所述的组合物,其中所述支架多肽是非免疫原性的。
15. 根据权利要求1到14中任一项所述的组合物,其中所述支架多肽未被配置成具有酶活性、不具有抑制剂活性、不具有结合活性或其任何组合。
16. 根据权利要求1到12中任一项所述的组合物,其中所述支架多肽中的每个支架多肽是Stefin A、其片段或其变体。
17. 根据权利要求1到16中任一项所述的组合物,其中所述一个或多个支架多肽序列包括两个或更多个相同或不同的支架多肽序列。
18. 根据权利要求1到17中任一项所述的组合物,其中所述融合多肽包括至少2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个或15个支架多肽。
19. 根据权利要求1到18中任一项所述的组合物,其中所述融合多肽包括至多5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个或20个支架多肽。
20. 根据权利要求1到19中任一项所述的组合物,其中所述融合多肽包括6个支架多肽。
21. 根据权利要求1到20中任一项所述的组合物,其中所述支架多肽序列的分子质量大于11kDa、20kDa、30kDa、35kDa、40kDa、45kDa、50kDa、55kDa、60kDa、65kDa、70kDa、75kDa、80kDa、85kDa、90kDa、100kDa、110kDa、120kDa、150kDa或200kDa。
22. 根据权利要求1到21中任一项所述的组合物,其中所述支架多肽序列的分子质量不大于15kDa、20kDa、30kDa、35kDa、40kDa、45kDa、50kDa、55kDa、60kDa、65kDa、70kDa、75kDa、80kDa、85kDa、90kDa、100kDa、110kDa、120kDa、150kDa、200kDa或500kDa。
23. 根据权利要求1到22中任一项所述的组合物,其中所述支架多肽序列中的每个支架多肽序列的分子质量大于5kDa、6kDa、7kDa、8kDa、9kDa、10kDa、11kDa、12kDa、13kDa、14kDa、15kDa、16kDa、17kDa、18kDa、19kDa、20kDa、30kDa、40kDa、50kDa、60kDa、70kDa或100kDa。
24. 根据权利要求1到23中任一项所述的组合物,其中所述支架多肽序列中的每个支架多肽序列的分子质量不大于6kDa、7kDa、8kDa、9kDa、10kDa、11kDa、12kDa、13kDa、14kDa、15kDa、16kDa、17kDa、18kDa、19kDa、20kDa、30kDa、40kDa、50kDa、60kDa、70kDa或250kDa。
25. 根据权利要求1到24中任一项所述的组合物,其中所述支架多肽序列中的每个支架多肽序列包括至少21个、至少30个、至少35个、至少40个、至少45个、至少50个、至少55个、至少60个、至少65个、至少70个、至少75个、至少80个、至少85个、至少90个、至少100个、至少125个、至少150个、至少175个、至少200个、至少500个、至少1000个或至少5000个氨基酸残基。
26. 根据权利要求1到25中任一项所述的组合物,其中所述支架多肽序列中的每个支架多肽序列包括至多30个、至多35个、至多40个、至多45个、至多50个、至多55个、至多60个、至多65个、至多70个、至多75个、至多80个、至多85个、至多90个、至多100个、至多125个、至多150个、至多175个或至多200个氨基酸残基。
27. 根据权利要求1到26中任一项所述的组合物,其中所述融合多肽的分子质量大于20kDa、30kDa、35kDa、40kDa、45kDa、50kDa、55kDa、60kDa、65kDa、70kDa、75kDa、80kDa、85kDa、90kDa、100kDa、110kDa、120kDa、150kDa或200kDa。
28. 根据权利要求27所述的组合物,其中所述融合多肽的分子质量大于75kDa。
29. 根据权利要求1到28中任一项所述的组合物,其中所述融合多肽的分子质量不大于20kDa、30kDa、35kDa、40kDa、45kDa、50kDa、55kDa、60kDa、65kDa、70kDa、75kDa、80kDa、

85kDa、90kDa、100kDa、110kDa、120kDa、150kDa、200kDa或500kDa。

30. 根据权利要求1到29中任一项所述的组合物,其中所述一个或多个抗原多肽序列中的每个抗原多肽序列包括少于100个、少于75个、少于50个或少于35个氨基酸残基。

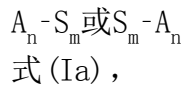
31. 根据权利要求1到30中任一项所述的组合物,其中所述一个或多个抗原多肽序列中的每个抗原多肽序列包括多于8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个或15个氨基酸残基。

32. 根据权利要求1到31中任一项所述的组合物,其中所述支架多肽序列中的至少一个支架多肽序列定位于所述融合多肽的N末端处或与所述融合多肽的所述N末端连接。

33. 根据权利要求1到31中任一项所述的组合物,其中所述支架多肽序列中的至少一个支架多肽序列定位于所述融合多肽的所述N末端处或与所述融合多肽的C末端连接。

34. 根据权利要求1到31中任一项所述的组合物,其中所述支架多肽序列中的至少两个支架多肽序列不被抗原序列或接头序列中断。

35. 根据权利要求1到34中任一项所述的组合物,其中所述融合多肽在所述N末端到所述C末端方向上包括具有式 (Ia) 结构的多肽序列,



式 (Ia),

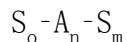
其中每个S独立地表示支架多肽序列,并且每个A独立地表示抗原多肽序列,并且

其中m是等于或大于2的整数,并且

n是等于或大于1的整数。

36. 根据权利要求35所述的组合物,其中n是选自1到5的整数,并且m是1或2。

37. 根据权利要求1到36中任一项所述的组合物,其中所述融合多肽在所述N末端到所述C末端方向上包括具有式 (Ib) 结构的多肽序列,



式 (Ib),

其中每个S独立地表示支架多肽序列,并且每个A独立地表示抗原多肽序列,并且

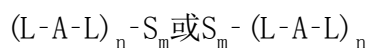
其中o、n、m中的每一个独立地是等于或大于1的整数。

38. 根据权利要求37所述的组合物,其中o是1或2或3,m是1或2或3,并且n是选自1到5的整数。

39. 根据权利要求37所述的组合物,其中所述融合多肽包括具有以下结构的多肽序列:  
S-A-S、A-S-A-S、S-A-S-A、S-A-S-A-S、S-A-S-A-S-A-S、S-A-S-A-S-A-S-A-S、S-A-S-S-S、S-S-S-A-S、S-S-A-S-S-S、S-S-S-A-S-S、S-S-A-S-S、S-S-S-A-S-S-S或S-A-S-A-S-A-S-A-S-A-S。

40. 根据权利要求1到39中任一项所述的组合物,其中融合多肽序列包括两个或更多个接头序列。

41. 根据权利要求1到40中任一项所述的组合物,其中所述融合多肽在所述N末端到所述C末端方向上包括具有式 (IIa) 结构的多肽序列,



式 (IIa),

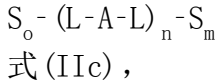
其中每个S独立地表示支架多肽序列,每个A独立地表示抗原多肽序列,并且每个L独立地表示接头序列或不存在,并且

其中m是等于或大于2的整数,并且

n是等于或大于1的整数。

42. 根据权利要求41所述的组合物,其中n是选自1到5的整数,并且m是1或2。

43. 根据权利要求1到42中任一项所述的组合物,其中所述融合多肽在所述N末端到所述C末端方向上包括具有式(IIc)结构的多肽序列,



其中每个S独立地表示支架多肽序列,每个A独立地表示抗原多肽序列,并且每个L独立地表示接头序列或不存在,并且

其中o、n、m中的每一个独立地是等于或大于1的整数。

44. 根据权利要求43所述的组合物,其中o是1或2或3,m是1或2或3,并且n是选自1到5的整数。

45. 根据权利要求43所述的组合物,其中所述融合多肽包括具有以下结构的多肽序列:  
S-L-A-L-S、A-L-S-L-A-L-S、S-L-A-L-S-L-A、S-L-A-L-S-L-A-L-S、S-L-A-L-S-L-A-L-S-L-A-L-S、S-L-A-L-S-L-A-L-S-L-A-L-S-L-A-L-S、S-S-S-L-A-L-S-S-S、S-S-L-A-L-S-S-S、S-L-A-L-S-S-S、S-S-S-L-A-L-S-S、S-S-S-L-A-L-S、S-S-L-A-L-S-S或S-L-A-L-S-L-A-L-S-L-A-L-S-L-A-S-L-A-L-S。

46. 根据权利要求37或43所述的组合物,其中支架多肽和抗原多肽以交替方式位于所述融合多肽中。

47. 根据权利要求1到46中任一项所述的组合物,其中所述融合多肽呈线性形式。

48. 根据权利要求1到47中任一项所述的组合物,其中所述融合多肽包括至少2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个或20个抗原多肽。

49. 根据权利要求1到48中任一项所述的组合物,其中所述融合多肽包括至多2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、20个、50个或100个抗原多肽。

50. 根据权利要求1到49中任一项所述的组合物,其中所述融合多肽包括1个、2个、3个、4个、5个或6个抗原多肽。

51. 根据权利要求3到50中任一项所述的组合物,其中所述支架多肽序列中的每个支架多肽序列通过所述接头序列中的至少一个接头序列与所述抗原多肽序列中的一个或两个抗原多肽序列连接。

52. 根据权利要求3到51中任一项所述的组合物,其中所述融合多肽被配置成促进接头的切割或一个或多个抗原多肽中的至少一个抗原多肽的切割。

53. 根据权利要求3到52中任一项所述的组合物,其中所述接头序列中的至少一个接头序列包括切割位点。

54. 根据权利要求53所述的组合物,其中所述切割位点可被肽酶或蛋白酶切割。

55. 根据权利要求3到54中任一项所述的组合物,其中所述融合多肽被配置成促进所述一个或多个抗原多肽中的至少一个抗原多肽的呈递。

56. 根据权利要求3到55中任一项所述的组合物,其中所述一个或多个抗原多肽是HLAI类抗原多肽,并且其中所述接头序列中的至少一个接头序列包括赖氨酸残基、精氨酸残基、丝氨酸残基、苏氨酸残基、天冬酰胺残基、组氨酸残基、丙氨酸残基、谷氨酰胺残基、天冬氨

酸残基、甲硫氨酸残基、酪氨酸残基、甘氨酸残基、脯氨酸残基、谷氨酸残基、色氨酸残基、苯丙氨酸残基、缬氨酸残基、异亮氨酸残基、亮氨酸残基或其任何组合。

57. 根据权利要求56所述的组合物,其中所述一个或多个抗原多肽是HLA I类抗原多肽,并且所述接头序列中的至少一个接头序列包括与所述抗原多肽中的至少一个抗原多肽的N末端直接连接的赖氨酸残基、精氨酸残基或丙氨酸残基。

58. 根据权利要求56到57所述的组合物,其中所述一个或多个抗原多肽是HLA I类抗原多肽,并且所述接头序列中的至少一个接头序列包括与所述抗原多肽中的至少一个抗原多肽的C末端直接连接的丝氨酸残基、赖氨酸残基、精氨酸残基或丙氨酸残基。

59. 根据权利要求3到58中任一项所述的组合物,其中所述一个或多个抗原多肽是HLA II类抗原多肽,并且所述接头序列中的至少一个接头序列包括天冬氨酸残基、甲硫氨酸残基、亮氨酸残基、缬氨酸残基、异亮氨酸残基、酪氨酸残基、苯丙氨酸残基、色氨酸残基或其任何组合。

60. 根据权利要求59所述的组合物,其中所述一个或多个抗原多肽是HLA II类抗原多肽,并且所述接头序列中的至少一个接头序列包括与所述抗原多肽中的至少一个抗原多肽的N末端直接连接的天冬氨酸残基、甲硫氨酸残基、亮氨酸残基、酪氨酸残基或苯丙氨酸残基。

61. 根据权利要求59到60所述的组合物,其中所述一个或多个抗原多肽是HLA II类抗原多肽,并且所述接头序列中的至少一个接头序列包括与所述抗原多肽中的至少一个抗原多肽的C末端直接连接的甲硫氨酸残基、亮氨酸残基、缬氨酸残基、异亮氨酸残基、酪氨酸残基、苯丙氨酸残基或色氨酸残基。

62. 根据权利要求3到61中任一项所述的组合物,其中所述接头序列中的每个接头序列包括至少2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、15个、20个、25个或50个氨基酸残基。

63. 根据权利要求3到62中任一项所述的组合物,其中所述接头序列中的每个接头序列包括至多2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、15个、20个、25个、50个或100个氨基酸残基。

64. 根据权利要求3到63中任一项所述的组合物,其中接头是柔性的。

65. 根据权利要求3到64中任一项所述的组合物,其中所述接头序列相同或不同。

66. 根据权利要求1到65中任一项所述的组合物,其中所述融合多肽在水性溶剂中的溶解度为其在同一溶剂中测量的缺乏支架多肽的对应多肽的溶解度的至少1.1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40或50倍。

67. 根据权利要求1到65中任一项所述的组合物,其中所述融合多肽在包括血清的溶剂中的溶解度为其在同一包括血清的溶剂中测量的缺乏所述支架多肽的对应多肽的溶解度的至少1.1、2、3、4、5、6、7、8、9或10倍。

68. 根据权利要求1到67和69中任一项所述的组合物,其中所述融合多肽的血清半衰期为其缺乏所述支架多肽的对应多肽的血清半衰期的至少1.1、2、3、4、5、6、7、8、9或10倍。

69. 根据权利要求1到68中任一项所述的组合物,其中在向受试者施用后,所述融合多肽在淋巴结中的累积为其缺乏所述支架多肽的对应多肽的累积的至少1.1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、75、100、150、200、250、500、1000、5000或10000倍,如通过平均辐射效率测量的。

70. 根据权利要求1到69中任一项所述的组合物,其中在向受试者施用后,所述融合多肽的抗原特异性T细胞应答为其缺乏所述支架多肽的对应多肽的抗原特异性T细胞应答的至少1.1、2、3、4、5、6、7、8、9或10、20、30、40、50、75、100、150、200、250或至少300倍,如通过抗原特异性T细胞的频率或IFN  $\gamma$  分泌的增加测量的。

71. 根据权利要求1到70中任一项所述的组合物,其中所述融合多肽包括一个或多个被配置成与抗原呈递细胞、佐剂或试剂结合的结合部分。

72. 根据权利要求1到70中任一项所述的组合物,其中多价融合多肽通过与和功能化药剂,如DC靶向结构域、佐剂或其它免疫调节剂偶联的抗支架抗体或其片段进行添加混合而功能化。

73. 根据权利要求71所述的组合物,其中所述抗原呈递细胞是树突细胞(DC)、巨噬细胞、朗格汉斯细胞(Langerhans cell)或B细胞。

74. 根据权利要求71所述的组合物,其中所述一个或多个结合部分被配置成与在树突细胞上表达的一个或多个受体结合。

75. 根据权利要求74所述的组合物,其中所述一个或多个受体包括C型凝集素受体、清道夫受体、趋化因子受体、F4/80受体、DC特异性跨膜蛋白(DC-STAMP)、Fc受体、内化受体或其任何组合。

76. 根据权利要求74所述的组合物,其中所述一个或多个受体包括C1ec9a或XCR1。

77. 根据权利要求71所述的组合物,其中所述结合部分中的至少一个结合部分包括在所述支架多肽中。

78. 根据权利要求71所述的组合物,其中所述结合部分中的至少一个结合部分与所述支架多肽之一的N末端或C末端直接连接。

79. 根据权利要求71所述的组合物,其中所述结合部分中的至少一个结合部分与所述抗原多肽之一的N末端或C末端或接头多肽直接连接。

80. 根据权利要求71所述的组合物,其中在所述N末端到所述C末端方向上,所述结合部分中的至少一个结合部分与所述支架多肽中的第一个或最后一个支架多肽末端连接。

81. 根据权利要求1到80中任一项所述的组合物,其中所述组合物包括一个或多个能够与所述融合多肽缀合的结合部分。

82. 根据权利要求81所述的组合物,其中所述一个或多个结合部分与所述融合多肽缀合。

83. 根据权利要求1到4或6到82中任一项所述的组合物,其中一个或多个癌抗原多肽包括多个抗原多肽。

84. 根据权利要求83所述的组合物,其中所述抗原多肽是新抗原肽或自身免疫肽。

85. 根据权利要求83或84所述的组合物,其中每个肽的新表位是唯一的。

86. 根据权利要求83到85中任一项所述的组合物,其中癌症新抗原肽中的每个癌症新抗原肽或其一部分与由所述受试者表达的HLA等位基因编码的蛋白质结合,并且由所述受试者的癌细胞的至少一个表达基因编码,并且其中所述癌症新抗原肽中的至少一个癌症新抗原肽或其一部分包括一个或多个在所述受试者的正常组织中不存在的突变。

87. 根据权利要求86所述的组合物,所述一个或多个突变中的至少一个突变是:

(A) 点突变,并且所述癌症新抗原肽与由所述受试者表达的HLA等位基因编码的所述蛋

白质结合,其中IC<sub>50</sub>小于500nM,并且亲和力高于对应的野生型肽的亲和力;

- (B) 剪接位点突变;
- (C) 移码突变;
- (D) 通读突变;或
- (E) 基因融合突变。

88. 根据权利要求86或87所述的组合物,其中所述多个癌症新抗原肽中的第一癌症新抗原肽与由所述受试者表达的第一HLA等位基因编码的蛋白质结合,并且所述多个癌症新抗原肽中的第二癌症新抗原肽与由所述受试者表达的第二HLA等位基因编码的蛋白质结合,其中所述受试者表达的所述第一HLA等位基因和所述第二HLA等位基因是不同的HLA等位基因。

89. 根据权利要求83到88中任一项所述的组合物,其中所述癌症新抗原肽中的至少一个癌症新抗原肽与由所述受试者表达的所述HLA等位基因编码的所述蛋白质结合,其中IC<sub>50</sub>小于150nM。

90. 根据权利要求1到89中任一项所述的组合物,其中所述组合物包括至少2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个或20个不同的融合多肽。

91. 根据权利要求1到89中任一项所述的组合物,其中所述组合物包括至多2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个或20个不同的融合多肽。

92. 一种核酸分子,其编码根据权利要求1到91中任一项所述的融合多肽。

93. 一种核酸分子,其编码以下:

- (a) 两个或更多个支架多肽,所述两个或更多个支架多肽被一个或多个接头间隔;以及
- (b) 一个或多个限制性位点,所述一个或多个限制性位点定位于所述接头中的至少一个接头上,

其中(i)所述两个或更多个支架多肽序列的分子质量大于11kDa,或者(ii)所述两个或更多个支架多肽序列中的每个支架多肽序列包括至少21个氨基酸残基。

94. 根据权利要求92或93所述的核酸分子,其中核酸是RNA或DNA。

95. 多种核酸分子,其包括:

(a) 第一核酸分子,所述第一核酸分子包括:

- (i) 编码第一抗原多肽的核酸序列;以及
- (ii) 编码第一支架多肽的核酸序列;以及

(b) 第二核酸分子,所述第二核酸分子包括:

- (i) 包括与编码第一抗原多肽的所述核酸序列互补的序列的核酸序列;以及
- (ii) 编码第二支架多肽的核酸序列。

96. 多种核酸分子,其包括:

(a) 第一核酸分子,所述第一核酸分子包括:

- (i) 编码第一抗原多肽的核酸序列;
- (ii) 编码第一支架多肽的核酸序列;以及
- (iii) 编码第二抗原多肽的核酸序列;

(b) 第二核酸分子,所述第二核酸分子包括:

- (i) 包括与编码第二抗原多肽的所述核酸序列互补的序列的核酸序列;以及

(ii) 编码第二支架多肽的核酸序列。

97. 多种核酸分子,其包括:

(a) 第一核酸分子,所述第一核酸分子包括:

(i) 编码第一抗原多肽的核酸序列;

(ii) 编码第一支架多肽的核酸序列;以及

(iii) 编码第二抗原多肽的核酸序列;

(b) 第二核酸构建体,所述第二核酸构建体包括:

(i) 包括与编码第二抗原多肽的所述核酸序列互补的序列的核酸序列;以及

(ii) 编码第二支架多肽的核酸序列;以及

(iii) 编码第三抗原多肽的核酸序列。

98. 根据权利要求95到97中任一项所述的多种核酸分子,其中第一支架序列和第二支架序列相同或不同。

99. 根据权利要求95到96所述的多种核酸分子,其中所述第一抗原多肽和所述第二抗原多肽不同。

100. 根据权利要求97所述的多种核酸分子,其中所述第一抗原多肽、所述第二抗原多肽和所述第三抗原多肽不同。

101. 根据权利要求95到100中任一项所述的多种核酸分子,其中所述核酸分子是RNA或DNA。

102. 一种药物组合物,其包括:

(a) 药学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂以及

(b) 根据权利要求1到91中任一项所述的组合物或根据权利要求92到94中任一项所述的核酸分子。

103. 根据权利要求102所述的药物组合物,其进一步包括佐剂。

104. 根据权利要求103所述的药物组合物,其中所述佐剂是polyIC:LC。

105. 根据权利要求102到104中任一项所述的药物组合物,其进一步包括pH调节剂。

106. 根据权利要求102到105中任一项所述的药物组合物,其进一步包括第二治疗剂。

107. 一种产生免疫原性融合多肽的方法,所述方法包括在遗传修饰的细胞中或通过体外翻译表达编码根据权利要求1到91中任一项所述的融合多肽的核酸分子,由此产生所述免疫原性融合多肽。

108. 一种产生免疫原性融合多肽的方法,所述方法包括:

(a) 提供根据权利要求93或94所述的核酸分子;

(b) 将编码一个或多个抗原多肽的一种或多种核酸分子插入所述限制性位点中的至少一个限制性位点,由此产生新的核酸分子;以及

(c) 通过体外翻译或在遗传修饰的细胞中表达所述新的核酸分子,由此产生所述免疫原性融合多肽。

109. 根据权利要求108所述的方法,其中通过基于限制酶的克隆插入编码一个或多个抗原多肽的所述一种或多种核酸分子。

110. 一种产生免疫原性融合多肽的方法,所述方法包括:

(a) 提供根据权利要求95到101中任一项所述的多种核酸分子;

(b) 通过杂交接合所述核酸分子;以及

(c) 通过体外翻译或在遗传修饰的细胞中表达所接合的核酸分子,由此产生所述免疫原性融合多肽。

111. 根据权利要求107到110中任一项所述的方法,所述融合多肽在细菌表达系统中表达。

112. 根据权利要求111所述的方法,其中所述细菌表达系统是大肠杆菌表达系统(*Escherichia coli* expression system)。

113. 根据权利要求107到110中任一项所述的方法,其中所述融合多肽通过体外翻译表达。

114. 根据前述权利要求所述的方法,其中所述方法进一步包括空位填充步骤和/或连接步骤。

115. 根据前述权利要求所述的方法,其中所述空位填充步骤包括聚合酶介导的空位填充步骤。

116. 一种治疗或预防有需要的人类受试者的癌症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用根据权利要求102到106中任一项所述的药物组合物。

117. 根据权利要求116所述的方法,其中所述药物组合物包括多个新抗原肽。

118. 根据权利要求116或117所述的方法,其中所述药物组合物包括多个融合多肽。

119. 根据权利要求116到118中任一项所述的方法,其中所述药物组合物静脉内或皮下施用。

120. 根据权利要求116到119中任一项所述的方法,其中所述融合多肽的剂量被分成至少2个、至少3个、至少4个或至少5个亚剂量。

121. 根据权利要求120所述的方法,其中所述融合多肽的每个亚剂量包括1个、2个、3个、4个、5个或更多个融合多肽。

122. 根据权利要求116到121中任一项所述的方法,其中以0.01到100 $\mu$ g的剂量施用每个融合多肽。

123. 根据权利要求116到122中任一项所述的方法,其中以100 $\mu$ g-10mg的剂量施用每个融合多肽。

124. 根据权利要求116到123中任一项所述的方法,其中所施用的融合多肽的总剂量为0.01-100mg。

125. 根据权利要求116到123中任一项所述的方法,其中所述癌症是实体瘤。

126. 根据权利要求116到125中任一项所述的方法,其中所述癌症是黑色素瘤、肺癌或膀胱癌。

127. 一种文库,其包括多个重组表达构建体,其中所述多个重组表达构建体中的每个表达构建体包括:

(a) 启动子序列;

(b) 编码融合多肽的序列,所述序列包括:

(i) 所述启动子序列下游的起始密码子;

(ii) 所述起始密码子下游的第一多核苷酸序列,其中所述第一多核苷酸序列包括不同的模板多核苷酸序列,其中与多核苷酸序列不同的模板(A)源自包括来自患有疾病的受试

者的患病细胞的样品,并且(B)编码由来自所述受试者的所述患病细胞编码的蛋白质的肽序列;以及

(iii)所述第一多核苷酸序列下游的第二多核苷酸序列,其中所述第二多核苷酸序列包括:

(A)框校验序列和编码所述框校验序列下游的一个或多个亲和标签的序列;或者

(B)包括编码亲和标签的序列的框校验序列。

128.根据权利要求1所述的组合物,其中当所述不同的模板多核苷酸序列或其拷贝与所述编码亲和标签的序列非同框时,所述框校验序列操作以终止所述融合多肽的翻译。

129.根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述框校验序列具有下式:

$N_1-N_2-N_3-N_4-N_5-N_6-N_7-N_8-N_9$ ;

其中:

每个N独立地是选自由以下组成的组的核酸:A、T、U、C和G;

$N_1-N_2-N_3$ 和 $N_4-N_5-N_6$ 以及 $N_7-N_8-N_9$ 中的每一个都不是终止密码子;并且

$N_2-N_3-N_4$ 和 $N_6-N_7-N_8$ 中的每一个是终止密码子。

130.根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述框校验序列编码Val-Gly-Ser。

131.根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述框校验序列编码将所述第一多核苷酸序列与所述编码所述亲和标签的序列连接的接头。

132.根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述编码亲和标签的序列是框校验序列。

133.根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述亲和标签是与Fc受体结合的片段可结晶区(Fc区)或肽序列、GST标签、His标签、与蛋白A结合的肽序列、与蛋白G或抗体表位或其结合片段结合的肽序列。

134.根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述亲和标签是非免疫原性的。

135.根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述亲和标签是人的。

136.根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其中(i)所述编码所述亲和标签的序列编码大小增强多肽;和/或(ii)所述文库的每个表达构建体包括编码大小增强多肽的序列。

137.根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述编码所述大小增强多肽的序列处于所述第一多核苷酸序列的下游和/或所述编码所述大小增强多肽的序列中的至少一个序列处于所述不同的模板多核苷酸序列的上游。

138.根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述亲和标签是大小增强多肽的表位。

139.根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述编码所述大小增强多肽的序列编码多个至少2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个或更多个大小增强多肽。

140.根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述多个大小增强多肽中的至少2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个或更多个大小增强多肽是相同的。

141.根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述编码所述大小增强多肽的序列编码所述大小增强多肽中的两个或更多个大小增强多肽之间的一个或多个接头。

142. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述多个大小增强多肽的分子量为至少15kDa。

143. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述多个大小增强多肽的分子量不超过200kDa。

144. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述多个大小增强多肽的分子量为40kDa到80kDa或50kDa到70kDa。

145. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述不同的模板多核苷酸序列编码由来自所述受试者的疾病细胞表达的蛋白质的肽序列。

146. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述受试者是人。

147. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述疾病是癌症。

148. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述癌症是黑色素瘤、膀胱癌或肺癌。

149. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述疾病是自体免疫性疾病。

150. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述样品包括活检、血液样品或外周血单核细胞(PBMC)样品,并且其中所述样品包括患有所述疾病的细胞。

151. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述多个表达构建体中的每个表达构建体包括相同的启动子、相同的起始密码子、相同的框校验序列、相同的编码所述大小增强多肽的序列或其任何组合。

152. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述不同的模板多核苷酸序列中的每个不同的模板多核苷酸序列的长度为至少24bps,长度为至少45bps,长度为至多450bps,长度为至多250bps,长度为24-300bps,长度为45-450bps或其任何组合。

153. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述不同的模板多核苷酸序列中的每个不同的模板多核苷酸序列是cDNA。

154. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述不同的模板多核苷酸序列中的每个不同的模板多核苷酸序列源自RNA分子。

155. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述不同的模板多核苷酸序列中的每个不同的模板多核苷酸序列源自基因组DNA(gDNA)。

156. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述文库包括表示至少5%到100%的外显子组的多个不同的模板多核苷酸。

157. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述文库包括编码至少5%到100%的肽序列蛋白质组的多个不同的模板多核苷酸。

158. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述文库包括编码源自至少5%的蛋白质组中蛋白质的肽序列的多个不同的模板多核苷酸。

159. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述外显子组或所述蛋白质组是所述患病细胞的外显子组或蛋白质组。

160. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其中由所述文库表达的约5%到约25%的多肽包括所述亲和标签。

161. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其中由所述文库表达的约20%到约40%的多肽包括所述大小增强多肽。

162. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其中由包括至少60个氨基酸残基的所述文库表达的约50%到约90%的多肽不包括所述亲和标签。

163. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其中由同框表达构建体表达的约85%到约95%的所述多肽包括与所述亲和标签连接的多肽。

164. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述文库包括至少100个、1000个、10000个、100000个、 $1 \times 10^6$ 个、 $1 \times 10^7$ 个、 $1 \times 10^8$ 个、 $1 \times 10^9$ 个或至多 $1 \times 10^{10}$ 个不同的模板多核苷酸序列。

165. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述不同的模板多核苷酸编码至少10个、50个、100个、500个、1000个、10000个或100000个不同蛋白质的肽序列。

166. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其中至少约10个、100个、500个、1000个、5000个或10000个所述不同的模板多核苷酸编码源自所述患病细胞中异常转录、剪接或翻译的mRNA或源自基因重排的突变肽序列或mRNA翻译产物。

167. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述突变肽序列是癌细胞特异性突变肽序列。

168. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述突变肽序列包括点突变或插入缺失。

169. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述多个表达构建体中的每个表达构建体进一步包括所述启动子下游和所述编码融合多肽的序列上游的接头序列。

170. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述第一多核苷酸序列进一步包括紧邻所述不同的模板多核苷酸序列上游的上游衔接子序列和/或紧邻所述不同的模板多核苷酸序列下游的下游衔接子序列。

171. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述融合蛋白是多价的。

172. 一种多肽文库,其由根据前述权利要求中任一项所述的文库编码。

173. 根据前述权利要求所述的多肽文库,其中所述文库的所述多肽在宿主细胞中表达,使用体外翻译系统表达和/或由噬菌体载体表达。

174. 根据前述权利要求所述的多肽文库,其中所述噬菌体载体是丝状噬菌体载体。

175. 根据前述权利要求所述的多肽文库,其中所述丝状噬菌体载体是M13、f1或fd噬菌体载体。

176. 根据前述权利要求中任一项所述的多肽文库,其中所述文库中的所述多肽表达为病毒样颗粒(VLP)的一部分。

177. 根据前述权利要求所述的多肽文库,其中所述VLP可在宿主细胞,如细菌细胞,如大肠杆菌细胞(*Escherichia coli* cell)中表达。

178. 根据前述权利要求所述的多肽文库,其中所述VLP在所述宿主细胞中自组装或在所述宿主细胞外自组装。

179. 根据前述权利要求所述的多肽文库,其中所述文库中的所述多肽中的一个或多个或每个多肽是细胞内多肽或分泌多肽。

180. 根据前述权利要求所述的多肽文库,其中所述宿主细胞是细菌。

181. 根据前述权利要求中任一项所述的多肽文库,其中所述文库中的所述多肽是体外翻译的多肽。

182. 根据前述权利要求所述的多肽文库,其中所述多肽文库包括多个分离的多肽。

183. 根据前述权利要求中任一项所述的多肽文库,其中至少通过所述亲和和标签分离或纯化或富集所述文库中的所述多肽。

184. 一种个性化重组蛋白质组文库,其包括在宿主细胞中表达的多个重组融合多肽,所述多个重组融合多肽包括由来自样品的多个至少10个不同的模板多核苷酸序列编码的多个多肽序列,所述样品包括来自患有疾病的受试者的患病细胞,并且

其中由所述多个至少10个不同的模板多核苷酸编码的所述多肽序列中的每个多肽序列在N到C方向上包括:

(i) 由所述至少10个不同的模板多核苷酸序列中的一个不同的模板多核苷酸编码的多肽序列;以及(ii):

(A) 框校验序列和编码所述框校验序列下游的亲和和标签的序列;或者

(B) 包括编码亲和和标签的序列的框校验序列和/或

(C) 至少40kDa的大小增强多肽序列。

185. 一种个性化重组蛋白质组文库,其包括在宿主细胞中表达的多个重组融合多肽,所述多个重组融合多肽包括由来自样品的多个至少1000个不同的模板多核苷酸序列编码的多个多肽序列,所述样品包括来自患有疾病的受试者的患病细胞。

186. 一种疫苗组合物,其包括根据前述权利要求中任一项所述的多肽文库或个性化重组蛋白质组文库。

187. 一种治疗方法,其包括将根据前述权利要求中任一项的多肽文库或个性化重组蛋白质组文库施用于所述受试者。

188. 一种药物组合物,其包括根据前述权利要求中任一项所述的多肽文库或个性化重组蛋白质组文库以及药学上可接受的赋形剂。

189. 一种治疗方法,其包括将根据前述权利要求所述的药物组合物施用于所述受试者。

190. 一种细胞群体,其包括根据前述权利要求中任一项所述的文库。

191. 根据前述权利要求所述的细胞群体,其中所述多个细胞中的每个细胞表达由所述多个不同的模板多核苷酸编码的单个不同的多肽序列。

192. 一种构建根据前述权利要求中任一项所述的文库的方法,所述方法包括将所述多个不同的模板多核苷酸序列插入到载体或质粒中。

193. 一种构建表达载体的方法,所述方法包括:

(a) 从包括来自患有疾病的受试者的患病细胞的样品中提供多个不同的模板多核苷酸;

(b) 将衔接子序列连接到所述多个不同的模板多核苷酸;由此形成多个不同的衔接子标记的模板多核苷酸;

(c) 扩增所述不同的衔接子标记的模板多核苷酸;

(d) 将经扩增的不同的衔接子标记的模板多核苷酸插入到载体中,由此形成重组表达构建体文库;

(e) 表达由所述重组表达构建体文库编码的多肽;以及

(f) 富集所表达的多肽。

194. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述方法包括使多个不同的多核苷酸与外显子组捕获寡核苷酸文库接触,其中所述捕获寡核苷酸包括靶序列。

195. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述外显子组捕获寡核苷酸固定在表面上。

196. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中扩增包括用随机引物扩增。

197. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中扩增包括无偏差扩增或不是靶特异性的。

198. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述方法包括将所述多个不同的模板多核苷酸序列与来自参考样品或来自患有疾病的所述受试者的非患病细胞的多个参考多核苷酸序列杂交。

199. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述方法进一步包括从不包括错配的双链体多核苷酸中选择性富集包括错配的双链体多核苷酸。

200. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中选择性富集包括使所述双链体多核苷酸与药剂接触,所述药剂与包括错配的所述双链体多核苷酸特异性结合。

201. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述药剂是DNA碱基错配识别药剂。

202. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述药剂是MutS蛋白或其功能片段。

203. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述错配包括单核苷酸变体、插入或缺失。

204. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述方法进一步包括将(i)选择性富集的包括错配的双链体多核苷酸与(ii)来自样品的多个不同的模板多核苷酸组合,所述样品包括来自患有疾病的受试者的尚未选择性富集的患病细胞。

205. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中多个不同的靶多核苷酸包括源自全外显子组和/或外显子-内含子边界序列的序列。

206. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述多个不同的靶多核苷酸包括源自基于一个或多个癌症类型的表达数据的外显子组子集的序列。

207. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述多个不同的靶多核苷酸包括源自全基因组的序列。

208. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述多个不同的靶多核苷酸包括源自一组富集外显子组捕获寡核苷酸文库的全基因组序列的序列。

209. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述方法进一步包括将所述多个不同的靶多核苷酸克隆到表达载体中。

210. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中一组参考多核苷酸包括参考基因组外显子捕获探针组或来自所述受试者的非肿瘤样品的多核苷酸。

211. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述外显子组捕获寡核苷酸文库包括已去除高频多态性的捕获寡核苷酸。

212. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述参考样品包括来自所述受试者的非肿瘤样品。

213. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述方法进一步包括进行逆转录。

214. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述方法不进一步包括测序。

215. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述方法不进一步包括预测或确定表位与由HLA等位基因编码的蛋白质的结合和/或由HLA等位基因编码的蛋白质对表位的呈递。

216. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中将衔接子序列连接到所述多个不同的模板多核苷酸包括连接链特异性衔接子序列。

217. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述不同的靶多核苷酸序列来自gDNA。

218. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述不同的靶多核苷酸序列来自mRNA或外显子组序列。

219. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中富集包括富集含有表达多肽的亲标签。

220. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述方法进一步包括使所述样品的多核酸片段化。

221. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述方法进一步包括剪切所述样品的基因组DNA。

222. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述样品为FFPE样品。

223. 一种治疗方法,其包括:执行根据前述权利要求中任一项所述的方法;以及向所述受试者施用所富集的表达多肽。

## 多结构域蛋白疫苗

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2019年10月9日提交的美国临时申请序列号62/912,903的权益;所述申请的全部内容通过引用整体并入本文。

### 背景技术

[0003] 癌症免疫疗法旨在利用患者的免疫系统来治疗癌症。癌症免疫疗法利用了这样一个事实:癌细胞通常在其表面具有可以被免疫系统检测到的分子,称为肿瘤抗原,所述肿瘤抗原通常是蛋白质或其它大分子(例如,碳水化合物)。主动免疫疗法通过靶向肿瘤抗原引导免疫系统攻击肿瘤细胞。被动免疫疗法增强现有的抗肿瘤应答,并且包含使用单克隆抗体、淋巴细胞和细胞因子。主动免疫疗法旨在诱导患者的新的免疫应答。肿瘤疫苗通常由肿瘤抗原和免疫刺激分子(例如佐剂、细胞因子或TLR配体)组成,它们共同作用以诱导识别和裂解肿瘤细胞的抗原特异性细胞毒性T细胞(CTL)。开发治愈性和肿瘤特异性免疫疗法的关键障碍中的一些障碍是有效地鉴定和选择高度特异性和限制性的肿瘤抗原,并且以某种方式将抗原递送到有需要的受试者,以便最大化受试者的T细胞激活以生成高抗肿瘤免疫原性。

[0004] 由于恶性细胞内的遗传变化(例如,倒位、易位、缺失、错义突变、剪接位点突变等)而产生的肿瘤新抗原表示最具肿瘤特异性的一类抗原,并且可以是患者特异性的或共享的。肿瘤新抗原是肿瘤细胞独有的,因为突变和其对应的蛋白质仅存在于肿瘤中。肿瘤新抗原还避免了中枢耐受,因此更有可能具有免疫原性。因此,肿瘤新抗原为免疫识别提供了极好的靶标,包含体液免疫和细胞免疫。然而,由于在鉴定肿瘤新抗原、选择优化的抗原和产生用于疫苗或免疫原性组合物的新抗原方面的技术困难,因此很少将肿瘤新抗原用于癌症疫苗或免疫原性组合中。因此,仍然需要开发另外的癌症治疗剂。

[0005] 通过引用并入

[0006] 本说明书中所提及的所有公开、专利以及专利申请在此通过引用结合,达到如同每一个单独的公开、专利或专利申请被专门地并且单独地指示通过引用结合的相同的程度。

### 发明内容

[0007] 在一些方面,本文提供了一种组合物,其包括编码融合多肽的核酸分子,所述融合多肽包括多肽序列,所述多肽序列包括:(a)一个或多个抗原多肽序列;以及(b)两个或更多个支架多肽序列,其中所述两个或更多个支架多肽序列中的每个支架多肽序列包括人多肽序列、其片段或其变体,并且其中(i)所述两个或更多个支架多肽序列的分子质量大于11kDa,或者(ii)所述两个或更多个支架多肽序列中的每个支架多肽序列包括至少21个氨基酸残基。

[0008] 在一些方面,本文提供了一种组合物,其包括融合多肽,所述融合多肽包括多肽序列,所述多肽序列包括:(a)一个或多个抗原多肽序列;以及(b)一个或多个支架多肽序列,

其中所述支架多肽选自Stefin A、肌联蛋白-I27、其片段和其变体。

[0009] 在一些实施例中,所述支架多肽序列中的至少一个支架多肽序列通过一个或多个接头序列与所述一个或多个抗原多肽序列中的至少一个抗原多肽序列连接。在一些实施例中,所述融合多肽被配置成促进接头的切割、一个或多个抗原多肽中的至少一个抗原多肽的切割或所述一个或多个抗原多肽中的至少一个抗原多肽的呈递。

[0010] 在一些方面,本文提供了一种组合物,其包括融合多肽和编码融合多肽的核酸分子,所述融合多肽包括多肽序列,所述多肽序列包括:(a)一个或多个抗原多肽序列;以及(b)一个或多个支架多肽序列,其中所述支架多肽序列中的至少一个支架多肽序列通过一个或多个接头序列与所述一个或多个抗原多肽序列中的至少一个抗原多肽序列连接,并且其中所述融合多肽被配置成促进接头的切割、一个或多个抗原多肽中的至少一个抗原多肽的切割或所述一个或多个抗原多肽中的至少一个抗原多肽的呈递。在一些实施例中,抗原多肽是癌抗原。在一些实施例中,每个支架多肽序列包括人多肽序列、其片段或其变体。

[0011] 在一些实施例中,支架多肽包括重组人多肽。

[0012] 在一些实施例中,支架多肽未被配置成具有靶向结合特性。

[0013] 在一些实施例中,支架多肽各自独立地选自肌联蛋白I27、泛素、Stefin A、10FN-III、Ig-L细丝蛋白A、腱生蛋白、其片段和其变体。

[0014] 在一些实施例中,支架多肽各自独立地选自Stefin A、肌联蛋白I27、其片段和其变体。

[0015] 在一些实施例中,支架多肽缺乏(i)翻译后修饰;(ii)肽内二硫键或两者。

[0016] 在一些实施例中,支架多肽是非免疫原性的。

[0017] 在一些实施例中,支架多肽未被配置成具有酶活性。

[0018] 在一些实施例中,支架多肽中的每个支架多肽包是Stefin A、其片段或其变体。

[0019] 在一些实施例中,支架多肽序列相同或不同。

[0020] 在一些实施例中,融合多肽包括至少2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个或15个支架多肽。

[0021] 在一些实施例中,融合多肽包括至多5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个或20个支架多肽。

[0022] 在一些实施例中,融合多肽包括6个支架多肽。

[0023] 在一些实施例中,支架多肽序列的分子质量为至少11kDa、20kDa、30kDa、35kDa、40kDa、45kDa、50kDa、55kDa、60kDa、65kDa、70kDa、75kDa、80kDa、85kDa、90kDa、100kDa、110kDa、120kDa、150kDa或200kDa。

[0024] 在一些实施例中,支架多肽序列的分子质量为至多15kDa、20kDa、30kDa、35kDa、40kDa、45kDa、50kDa、55kDa、60kDa、65kDa、70kDa、75kDa、80kDa、85kDa、90kDa、100kDa、110kDa、120kDa、150kDa、200kDa或500kDa。

[0025] 在一些实施例中,支架多肽序列中的每个支架多肽序列的分子质量为至少5kDa、6kDa、7kDa、8kDa、9kDa、10kDa、11kDa、12kDa、13kDa、14kDa、15kDa、16kDa、17kDa、18kDa、19kDa、20kDa、30kDa、40kDa、50kDa、60kDa、70kDa或100kDa。

[0026] 在一些实施例中,支架多肽序列中的每个支架多肽序列的分子质量为至多6kDa、7kDa、8kDa、9kDa、10kDa、11kDa、12kDa、13kDa、14kDa、15kDa、16kDa、17kDa、18kDa、19kDa、

20kDa、30kDa、40kDa、50kDa、60kDa、70kDa或250kDa。

[0027] 在一些实施例中,支架多肽序列中的每个支架多肽序列包括至少21个、至少30个、至少35个、至少40个、至少45个、至少50个、至少55个、至少60个、至少65个、至少70个、至少75个、至少80个、至少85个、至少90个、至少100个、至少125个、至少150个、至少175个或至少200个氨基酸残基。

[0028] 在一些实施例中,支架多肽序列中的每个支架多肽序列包括至多30个、至多35个、至多40个、至多45个、至多50个、至多55个、至多60个、至多65个、至多70个、至多75个、至多80个、至多85个、至多90个、至多100个、至多125个、至多150个、至多175个或至多200个氨基酸残基。

[0029] 在一些实施例中,所述融合多肽的分子质量为大于20kDa、30kDa、35kDa、40kDa、45kDa、50kDa、55kDa、60kDa、65kDa、70kDa、75kDa、80kDa、85kDa、90kDa、100kDa、110kDa、120kDa、150kDa或200kDa。

[0030] 在一些实施例中,融合多肽的分子质量大于75kDa。

[0031] 在一些实施例中,所述融合多肽的分子质量为不大于20kDa、30kDa、35kDa、40kDa、45kDa、50kDa、55kDa、60kDa、65kDa、70kDa、75kDa、80kDa、85kDa、90kDa、100kDa、110kDa、120kDa、150kDa、200kDa或500kDa。

[0032] 在一些实施例中,所述一个或多个抗原多肽序列中的每个抗原多肽序列包括少于100个、少于75个、少于50个或少于35个氨基酸残基。

[0033] 在一些实施例中,所述一个或多个抗原多肽序列中的每个抗原多肽序列包括大于8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个或15个氨基酸残基。

[0034] 在一些实施例中,支架多肽序列中的至少一个支架多肽序列通过其N末端与融合多肽的剩余序列连接。

[0035] 在一些实施例中,支架多肽序列中的至少一个支架多肽序列通过其C末端与融合多肽的剩余序列连接。

[0036] 在一些实施例中,支架多肽序列中的至少两个支架多肽序列不被抗原序列或接头序列中断。

[0037] 在一些实施例中,融合多肽在N末端到C末端方向上包括具有式(Ia)结构的多肽序列,

[0038]  $A_n-S_m$ 或 $S_m-A_n$

[0039] 式(Ia),

[0040] 其中每个S独立地表示支架多肽序列并且每个A独立地表示抗原多肽序列,并且其中m是等于或大于2的整数并且n是等于或大于1的整数。在一些实施例中,n是选自1到5的整数并且m是2。

[0041] 在一些实施例中,融合多肽在N末端到C末端方向上包括具有式(Ib)结构的多肽序列,

[0042]  $S_o-A_n-S_m$ 式(Ib),

[0043] 其中每个S独立地表示支架多肽序列并且每个A独立地表示抗原多肽序列,并且其中o、n和m中的每一个独立地是等于或大于1的整数。在一些实施例中,o为1或2,m为1或2,并且n为选自1到5的整数。在一些实施例中,融合多肽包括具有以下结构的多肽序列:S-A-S、

A-S-A-S、S-A-S-A、S-A-S-A-S、S-A-S-A-S-A-S、S-A-S-A-S-A-S-A-S或S-A-S-A-S-A-S-A-S-A-S。

[0044] 在一些实施例中,融合多肽序列包括两个或更多个接头序列。

[0045] 在一些实施例中,融合多肽在N末端到C末端方向上包括具有式(IIa)结构的多肽序列,

[0046]  $(L-A-L)_n - S_m$  或  $S_m - (L-A-L)_n$

[0047] 式(IIa),

[0048] 其中每个S独立地表示支架多肽序列,每个A独立地表示抗原多肽序列,并且每个L独立地表示接头序列或不存在,并且其中m是等于或大于2的整数并且n是等于或大于1的整数。在一些实施例中,n是选自1到5的整数并且m是2。

[0049] 在一些实施例中,融合多肽在N末端到C末端方向上包括具有式(IIb)结构的多肽序列,

[0050]  $S_o - (L-A-L)_n - S_m$

[0051] 式(IIb),

[0052] 其中每个S独立地表示支架多肽序列,每个A独立地表示抗原多肽序列,并且每个L独立地表示接头序列或不存在,并且其中o、n和m中的每一个独立地是等于或大于1的整数。在一些实施例中,o为1或2,m为1或2,并且n为选自1到5的整数。在一些实施例中,融合多肽包括具有以下结构的多肽序列:S-L-A-L-S、S-A-L-S-L-A-L-S、S-L-A-L-S-L-A、S-L-A-L-S-L-A-L-S、S-L-A-L-S-L-A-L-S-L-A-L-S、S-L-A-L-S-L-A-L-S-L-A-L-S-L-A-L-S或S-L-A-L-S-L-A-L-S-L-A-L-S-L-A-S-L-A-L-S。

[0053] 在一些实施例中,支架多肽和抗原多肽以交替方式位于融合多肽中。

[0054] 在一些实施例中,融合多肽呈线性形式。

[0055] 在一些实施例中,融合多肽包括至少2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个或20个抗原多肽。

[0056] 在一些实施例中,融合多肽包括至多2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、20个、50个或100个抗原多肽。

[0057] 在一些实施例中,融合多肽包括1个、2个、3个、4个、5个或6个抗原多肽。

[0058] 在一些实施例中,所述支架多肽序列中的每个支架多肽序列通过所述接头序列中的至少一个接头序列与所述抗原多肽序列中的一个或两个抗原多肽序列连接。

[0059] 在一些实施例中,所述融合多肽被配置成促进接头的切割或一个或多个抗原多肽中的至少一个抗原多肽的切割。

[0060] 在一些实施例中,接头序列中的至少一个接头序列包括切割位点。

[0061] 在一些实施例中,切割位点可被肽酶或蛋白酶切割。

[0062] 在一些实施例中,切割位点可被细胞肽酶或蛋白酶切割。

[0063] 在一些实施例中,所述融合多肽被配置成促进所述一个或多个抗原多肽中的至少一个抗原多肽的呈递。

[0064] 在一些实施例中,所述接头序列中的至少一个接头序列包括赖氨酸残基、精氨酸残基、丝氨酸残基、苏氨酸残基、天冬酰胺残基、组氨酸残基、丙氨酸残基、谷氨酰胺残基、天冬氨酸残基、甲硫氨酸残基、酪氨酸残基、甘氨酸残基、脯氨酸残基、谷氨酸残基、色氨酸残

基、苯丙氨酸残基、缬氨酸残基、异亮氨酸残基、半胱氨酸、亮氨酸残基或其任何组合。

[0065] 在一些实施例中,接头序列中的至少一个接头序列包括与抗原多肽中的至少一个抗原多肽的N末端直接连接的赖氨酸残基、精氨酸残基或丙氨酸残基。

[0066] 在一些实施例中,接头序列中的至少一个接头序列包括与抗原多肽中的至少一个抗原多肽的C末端直接连接的丝氨酸残基、赖氨酸残基、精氨酸残基或丙氨酸残基。

[0067] 在一些实施例中,所述一个或多个抗原多肽是HLA I类抗原多肽,并且其中所述接头序列中的至少一个接头序列包括赖氨酸残基、精氨酸残基、丝氨酸残基、苏氨酸残基、天冬酰胺残基、组氨酸残基、丙氨酸残基、谷氨酰胺残基、天冬氨酸残基、甲硫氨酸残基、酪氨酸残基、甘氨酸残基、脯氨酸残基、谷氨酸残基、色氨酸残基、苯丙氨酸残基、缬氨酸残基、异亮氨酸残基、亮氨酸残基、半胱氨酸残基或其任何组合。

[0068] 在一些实施例中,所述一个或多个抗原多肽是HLA I类抗原多肽,并且所述接头序列中的至少一个接头序列包括与所述抗原多肽中的至少一个抗原多肽的N末端直接连接的赖氨酸残基、精氨酸残基或丙氨酸残基。在一些实施例中,所述一个或多个抗原多肽是HLA I类抗原多肽,并且所述接头序列中的至少一个接头序列包括与所述抗原多肽中的至少一个抗原多肽的C末端直接连接的丝氨酸残基、赖氨酸残基、精氨酸残基或丙氨酸残基。在一些实施例中,所述一个或多个抗原多肽是HLA II类抗原多肽,并且所述接头序列中的至少一个接头序列包括天冬氨酸残基、甲硫氨酸残基、亮氨酸残基、缬氨酸残基、异亮氨酸残基、酪氨酸残基、苯丙氨酸残基、色氨酸残基或其任何组合。在一些实施例中,所述一个或多个抗原多肽是HLA II类抗原多肽,并且所述接头序列中的至少一个接头序列包括与所述抗原多肽中的至少一个抗原多肽的N末端直接连接的天冬氨酸残基、甲硫氨酸残基、亮氨酸残基、酪氨酸残基或苯丙氨酸残基。在一些实施例中,所述一个或多个抗原多肽是HLA II类抗原多肽,并且所述接头序列中的至少一个接头序列包括与所述抗原多肽中的至少一个抗原多肽的C末端直接连接的甲硫氨酸残基、亮氨酸残基、缬氨酸残基、异亮氨酸残基、酪氨酸残基、苯丙氨酸残基或色氨酸残基。

[0069] 在一些实施例中,接头序列中的至少一个接头序列包括天冬氨酸残基、甲硫氨酸残基、亮氨酸残基、缬氨酸残基、异亮氨酸残基、酪氨酸残基、苯丙氨酸残基、色氨酸残基或其任何组合。

[0070] 在一些实施例中,接头序列中的至少一个接头序列包括与抗原多肽中的至少一个抗原多肽的N末端直接连接的天冬氨酸残基、甲硫氨酸残基、亮氨酸残基、酪氨酸残基或苯丙氨酸残基。

[0071] 在一些实施例中,接头序列中的至少一个接头序列包括与抗原多肽中的至少一个抗原多肽的C末端直接连接的甲硫氨酸残基、亮氨酸残基、缬氨酸残基、异亮氨酸残基、酪氨酸残基、苯丙氨酸残基或色氨酸残基。

[0072] 在一些实施例中,接头序列中的每个接头序列包括至少2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、15个、20个、25个或50个氨基酸残基。

[0073] 在一些实施例中,接头序列中的每个接头序列包括至多2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、15个、20个、25个、50个或100个氨基酸残基。

[0074] 在一些实施例中,接头是柔性的。

[0075] 在一些实施例中,接头序列相同或不同。

[0076] 在一些实施例中,所述融合多肽在水性溶剂中的溶解度为其在同一溶剂中测量的缺乏所述支架多肽的对应多肽的溶解度的至少1.1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40或50倍。

[0077] 在一些实施例中,所述融合多肽在水性调配物中的溶解度为其在水性调配物中缺乏所述支架多肽的对应多肽的溶解度的至少1.1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40或50倍。

[0078] 在一些实施例中,所述融合多肽的血清溶解度为其缺乏所述支架多肽的对应多肽的血清溶解度的至少1.1、2、3、4、5、6、7、8、9、或10倍。

[0079] 在一些实施例中,所述融合多肽的血清半衰期为其缺乏所述支架多肽的对应多肽的血清半衰期的至少1.1、2、3、4、5、6、7、8、9或10倍。在一些实施例中,所述融合多肽的血清半衰期为其缺乏所述支架多肽的对应多肽的血清溶解度的至少10、50、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、5000或10000倍。

[0080] 在一些实施例中,在向受试者施用后,融合多肽在淋巴结中的累积为其缺乏支架多肽的对应多肽的累积的至少1.1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、75、100、150、200、250、500、1000、5000或10000倍,如通过平均辐射效率测量的。

[0081] 在一些实施例中,在向受试者施用后,抗原特异性T细胞对融合多肽的应答为抗原特异性T细胞对其缺乏所述支架多肽的对应多肽的应答的至少1.1、2、3、4、5、6、7、8、9或10、20、30、40、50、75、100、150、200、250或至少300倍,如通过抗原特异性T细胞的频率或IFN  $\gamma$  分泌的增加测量的。

[0082] 在一些实施例中,融合多肽包括一个或多个被配置成结合抗原呈递细胞、佐剂或试剂的结合部分。

[0083] 在一些实施例中,多价融合多肽通过与和功能化药剂如树突细胞(DC)-靶向结构域、佐剂或免疫调节剂偶联的抗支架抗体或其片段混合而功能化。

[0084] 在一些实施例中,抗原呈递细胞是树突细胞(DC)、巨噬细胞、朗格汉斯细胞(Langerhans cell)或B细胞。

[0085] 在一些实施例中,一个或多个结合部分被配置成结合一个或多个在树突细胞上表达的受体。

[0086] 在一些实施例中,一个或多个受体包括C型凝集素受体、清道夫受体、F4/80受体、DC特异性跨膜蛋白(例如,DC-STAMP)、Fc受体或其任何组合。

[0087] 在一些实施例中,一个或多个受体包括C1ec9a或XCR1。

[0088] 在一些实施例中,结合部分中的至少一个结合部分包括在支架多肽中。

[0089] 在一些实施例中,结合部分中的至少一个结合部分与支架多肽之一的N末端或C末端直接连接。

[0090] 在一些实施例中,结合部分中的至少一个结合部分与抗原多肽之一的N末端或C末端直接连接。

[0091] 在一些实施例中,结合部分中的至少一个结合部分与接头多肽连接。

[0092] 在一些实施例中,在所述N末端到所述C末端方向上,所述结合部分中的至少一个结合部分与支架多肽的第一个或最后一个支架多肽末端连接。在一些实施例中,所述组合物包括一个或多个能够与融合多肽结合的结合部分。在一些实施例中,一个或多个结合部分与融合多肽结合。在一些实施例中,一个或多个结合部分与融合多肽缀合。

[0093] 在一些实施例中,一种或多种癌症抗原多肽包括多种抗原多肽。在一些实施例中,一种或多种癌症抗原多肽是自身免疫性肽。

[0094] 在一些实施例中,抗原多肽是新抗原肽。

[0095] 在一些实施例中,每个肽的新表位是唯一的。在一些实施例中,癌症新抗原肽中的每个癌症新抗原肽或其一部分与由所述受试者表达的HLA等位基因编码的蛋白质结合,并且由所述受试者的癌细胞的至少一个表达基因编码,并且其中所述癌症新抗原肽中的至少一个癌症新抗原肽或其一部分包括一个或多个在所述受试者的正常组织中不存在的突变。

[0096] 在一些实施例中,所述一个或多个突变中的至少一个突变是:(A)点突变,并且所述癌症新抗原肽与由所述受试者表达的HLA等位基因编码的所述蛋白质结合,其中IC<sub>50</sub>小于500nM,并且亲和力高于对应的野生型肽的亲和力;(B)剪接位点突变;(C)移码突变;(D)通读突变;或(E)基因融合突变。

[0097] 在一些实施例中,所述多个癌症新抗原肽中的第一癌症新抗原肽与由所述受试者表达的第一HLA等位基因编码的蛋白质结合,并且所述多个癌症新抗原肽中的第二癌症新抗原肽与由所述受试者表达的第二HLA等位基因编码的蛋白质结合,其中所述受试者表达的所述第一HLA等位基因和所述第二HLA等位基因是不同的HLA等位基因。

[0098] 在一些实施例中,癌症新抗原肽中的至少一个癌症新抗原肽与由所述受试者表达的所述HLA等位基因编码的所述蛋白质结合,其中IC<sub>50</sub>小于250nM。

[0099] 在一些实施例中,融合多肽在宿主细胞中表达。在一些实施例中,融合多肽是合成构建体。

[0100] 在一些实施例中,核酸分子编码至少2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个或20个不同的融合多肽。

[0101] 在一些实施例中,核酸分子编码至多2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个或20个不同的融合多肽。

[0102] 在一些实施例中,核酸分子是RNA或DNA。

[0103] 一方面,本文公开了由所描述的核酸分子编码的融合多肽。

[0104] 一方面,本文公开了包括所描述的融合多肽的组合物。在一些实施例中,所述组合物包括一个或多个与融合多肽结合的结合部分。在一些实施例中,一个或多个结合部分与融合多肽缀合。

[0105] 一方面,本文公开了核酸分子,其编码以下:两个或更多个支架多肽,所述两个或更多个支架多肽被一个或多个接头间隔;以及一个或多个限制性位点,所述一个或多个限制性位点定位于所述接头中的至少一个接头上,其中(i)所述两个或更多个支架多肽序列的分子质量大于11kDa,或者(ii)所述两个或更多个支架多肽序列中的每个支架多肽序列包括至少21个氨基酸残基。在一些实施例中,支架多肽由RNA或DNA编码。

[0106] 一方面,本文公开了多种核酸分子,其包括:第一核酸分子,所述第一核酸分子包括:编码第一抗原多肽的核酸序列;以及编码第一支架多肽的核酸序列;以及第二核酸分子,所述第二核酸分子包括:包括与编码第一抗原多肽的所述核酸序列互补的序列的核酸序列和编码第二支架多肽的核酸序列。

[0107] 另一方面,本文公开了多种核酸分子,其包括:第一核酸分子,所述第一核酸分子包括:编码第一抗原多肽的核酸序列;编码第一支架多肽的核酸序列;以及编码第二抗原多

肽的核酸序列;以及第二核酸分子,所述第二核酸分子包括:包括与编码第二抗原多肽的所述核酸序列互补的序列的核酸序列和编码第二支架多肽的核酸序列。

[0108] 在又另一方面,本文公开了多种核酸分子,其包括:第一核酸分子,所述第一核酸分子包括:编码第一抗原多肽的核酸序列;编码第一支架多肽的核酸序列;以及编码第二抗原多肽的核酸序列;以及第二核酸分子,所述第二核酸分子包括:包括与编码第二抗原多肽的所述核酸序列互补的序列的核酸序列;编码第二支架多肽的核酸序列;以及编码第三抗原多肽的核酸序列。

[0109] 在一些实施例中,第一支架序列和第二支架序列相同。

[0110] 在一些实施例中,第一抗原多肽和第二抗原多肽不同。

[0111] 在一些实施例中,第一抗原多肽、第二抗原多肽、第三抗原多肽不同。

[0112] 在一些实施例中,核酸分子是RNA或DNA。

[0113] 一方面,本文公开了一种药物组合物,其包括:药学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂以及所描述的组合物或所描述的融合多肽。

[0114] 在一些实施例中,药物组合物包括佐剂。

[0115] 在一些实施例中,佐剂是polyIC:LC。

[0116] 在一些实施例中,药物组合物包括pH调节剂。

[0117] 在一些实施例中,药物组合物包括第二治疗剂。在一些实施例中,第二治疗剂是免疫调节剂、细胞因子或趋化因子或检查点抑制剂。在一些实施例中,在施用包括融合多肽或编码融合多肽的核酸的药物组合物之前,向有需要的受试者施用第二治疗剂。在一些实施例中,在施用包括融合多肽或编码融合多肽的核酸的药物组合物的同时施用第二治疗剂。在一些实施例中,在施用包括融合多肽或编码融合多肽的核酸的药物组合物之后,施用第二治疗剂。

[0118] 一方面,本文公开了一种产生免疫原性融合多肽的方法,所述方法包括:在遗传修饰的细胞中表达所描述的核酸分子,由此产生所述免疫原性融合多肽。

[0119] 另一方面,本文公开了一种产生免疫原性融合多肽的方法,所述方法包括:提供如本文所描述的核酸分子;将编码一个或多个抗原多肽的一种或多种核酸分子插入所述限制性位点中的至少一个限制性位点,由此产生新的核酸分子;以及在遗传修饰的细胞中表达所述新的核酸分子,由此产生所述免疫原性融合多肽。

[0120] 在一些实施例中,编码一种或多种抗原多肽的一种或多种核酸分子通过等温反应或通过基于限制酶的克隆插入。

[0121] 一方面,本文公开了一种产生免疫原性融合多肽的方法,所述方法包括:提供如本文所描述的多个核酸分子;通过杂交接合所述核酸分子;以及在遗传修饰的细胞中表达所接合的核酸分子,由此产生所述免疫原性融合多肽。

[0122] 在一些实施例中,融合多肽在细菌表达系统中表达。

[0123] 在一些实施例中,细菌表达系统是大肠杆菌表达系统(*Escherichia coli* expression system)。

[0124] 一方面,本文提供了一种产生免疫原性融合多肽的方法,所述方法包括:(a)提供上述段落中的任何段落或特别是段落89-96中描述的核酸分子;(b)将编码一个或多个抗原多肽的一种或多种核酸分子插入所述限制性位点中的至少一个限制性位点,由此产生新的

核酸分子;以及(c)通过体外翻译或在遗传修饰的细胞中表达所述新的核酸分子,由此产生所述免疫原性融合多肽。

[0125] 一方面,本文提供了一种产生免疫原性融合多肽的方法,所述方法包括:(a)提供如上文所描述的段落中的任何段落或特别是段落89-96中描述的多个核酸分子;(b)通过杂交接合所述核酸分子;以及(c)通过体外翻译或在遗传修饰的细胞中表达所接合的核酸分子,由此产生所述免疫原性融合多肽。在一些实施例中,融合多肽在细菌表达系统中表达。在某个实施例中,细菌表达系统是大肠杆菌表达系统。

[0126] 在一些实施例中,融合多肽通过体外翻译表达。在一些实施例中,所述方法进一步包括空位填充步骤和/或连接步骤。在一些实施例中,所述空位填充步骤包括聚合酶介导的空位填充步骤。

[0127] 一方面,本文公开了一种治疗或预防有需要的人类受试者的癌症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用如本文所描述的药物组合物。

[0128] 在一些实施例中,药物组合物包括多个新抗原肽。

[0129] 在一些实施例中,药物组合物包括多个融合多肽。

[0130] 在一些实施例中,药物组合物静脉内或皮下施用。

[0131] 在一些实施例中,融合多肽的剂量被分成至少2个、至少3个、至少4个或至少5个亚剂量。

[0132] 在一些实施例中,融合多肽的每个亚剂量包括1个、2个、3个、4个、5个或更多个融合多肽。

[0133] 在一些实施例中,每个融合多肽以0.01-100 $\mu$ g的剂量施用。

[0134] 在一些实施例中,每个融合多肽以100 $\mu$ g-10mg的剂量施用。

[0135] 在一些实施例中,施用的融合多肽的总剂量为0.1-100mg。

[0136] 在一些实施例中,癌症是实体瘤。

[0137] 在一些实施例中,所述癌症是黑色素瘤、肺癌或膀胱癌。

[0138] 一方面,本文提供了一种文库,其包括多个重组表达构建体,其中所述多个重组表达构建体中的每个表达构建体包括:(a)启动子序列;(b)编码融合多肽的序列,所述序列包括:(i)所述启动子序列下游的起始密码子;(ii)所述起始密码子下游的第一多核苷酸序列,其中所述第一多核苷酸序列包括不同的模板多核苷酸序列,其中与多核苷酸序列不同的模板(A)源自包括来自患有疾病的受试者的患病细胞的样品,并且(B)编码由来自所述受试者的所述患病细胞编码的蛋白质的肽序列;以及(iii)所述第一多核苷酸序列下游的第二多核苷酸序列,其中所述第二多核苷酸序列包括:(A)框校验序列和编码所述框校验序列下游的一个或多个亲和标签的序列;或者(B)包括编码亲和标签的序列的框校验序列。在一些实施例中,当所述不同的模板多核苷酸序列或其拷贝与所述编码亲和标签的序列非同框时,所述框校验序列操作以终止所述融合多肽的翻译。在一些实施例中,所述框校验序列具有下式:

[0139]  $N_1-N_2-N_3-N_4-N_5-N_6-N_7-N_8-N_9$ ;

[0140] 其中每个N独立地是选自由以下组成的组的核酸:A、T、U、C和G; $N_1-N_2-N_3$ 和 $N_4-N_5-N_6$ 以及 $N_7-N_8-N_9$ 中的每一个都不是终止密码子;并且

[0141]  $N_2-N_3-N_4$ 和 $N_6-N_7-N_8$ 中的每一个是终止密码子。在一些实施例中,所述框校验序列

编码Val-Gly-Ser。在一些实施例中,所述框校验序列编码将所述第一多核苷酸序列与所述编码所述亲和标签的序列连接的接头。

[0142] 在一些实施例中,所述编码亲和标签的序列是框校验序列。在一些实施例中,所述亲和标签是与Fc受体结合的片段可结晶区(Fc区)或肽序列、GST标签、His标签、与蛋白A结合的肽序列、与蛋白G或抗体表位或其结合片段结合的肽序列。在一些实施例中,所述亲和标签是非免疫原性的。在一些实施例中,所述亲和标签是人的。在一些实施例中,编码所述亲和标签的所述序列编码大小增强多肽;和/或(ii)所述文库的每个表达构建体包括编码大小增强多肽的序列。在一些实施例中,所述编码所述大小增强多肽的序列处于所述第一多核苷酸序列的下游和/或所述编码所述大小增强多肽的序列中的至少一个序列处于所述不同的模板多核苷酸序列的上游。在一些实施例中,所述亲和标签是大小增强多肽的表位。在一些实施例中,所述编码所述大小增强多肽的序列编码多个至少2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个或更多个大小增强多肽。在一些实施例中,所述多个大小增强多肽中的至少2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个或更多个大小增强多肽是相同的。在一些实施例中,所述编码所述大小增强多肽的序列编码所述大小增强多肽中的两个或更多个大小增强多肽之间的一个或多个接头。在一些实施例中,所述多个大小增强多肽的分子量为至少15kDa。在一些实施例中,所述多个大小增强多肽的分子量不超过200kDa。在一些实施例中,所述多个大小增强多肽的分子量为40kDa到80kDa或50kDa到70kDa。

[0143] 在一些实施例中,所述不同的模板多核苷酸序列编码由来自所述受试者的疾病细胞表达的蛋白质的肽序列,其中所述受试者是人;其中所述疾病是癌症。在一些实施例中,所述癌症是黑色素瘤、膀胱癌或肺癌。

[0144] 在一些实施例中,疾病是自体免疫性疾病。

[0145] 在一些实施例中,所述样品包括活检、血液样品或外周血单核细胞(PBMC)样品,并且其中所述样品包括患有所述疾病的细胞。在一些实施例中,所述多个表达构建体中的每个表达构建体包括相同的启动子、相同的起始密码子、相同的框校验序列、相同的编码所述大小增强多肽的序列或其任何组合。在一些实施例中,所述不同的模板多核苷酸序列中的每个不同的模板多核苷酸序列的长度为至少24bps,长度为至少45bps,长度为至多450bps,长度为至多250bps,长度为24-300bps,长度为45-450bps或其任何组合。

[0146] 在一些实施例中,所述不同的模板多核苷酸序列中的每个不同的模板多核苷酸序列是cDNA。

[0147] 在一些实施例中,所述不同的模板多核苷酸序列中的每个不同的模板多核苷酸序列源自RNA分子。

[0148] 在一些实施例中,所述不同的模板多核苷酸序列中的每个不同的模板多核苷酸序列源自基因组DNA(gDNA)。在一些实施例中,所述文库包括表示至少5%到100%的外显子组的多个不同的模板多核苷酸。

[0149] 在一些实施例中,其中所述文库包括编码至少5%到100%的肽序列蛋白质组的多个不同的模板多核苷酸。在一些实施例中,所述文库包括编码源自至少5%的蛋白质组中蛋白质的肽序列的多个不同的模板多核苷酸。在一些实施例中,所述外显子组或所述蛋白质组是所述患病细胞的所述外显子组或蛋白质组。在一些实施例中,由文库表达的约5%到约25%的多肽包括所述亲和标签。在一些实施例中,由文库表达的约20%到约40%的多肽包

括所述亲和标签。在一些实施例中,由包括至少60个氨基酸残基的所述文库表达的约50%到约90%的多肽不包括所述亲和标签。在一些实施例中,由同框表达构建体表达的约85%到约95%的所述多肽包括与所述亲和标签连接的多肽。在一些实施例中,所述文库包括至少100个、1000个、10000个、100000个、 $1 \times 10^6$ 个、 $1 \times 10^7$ 个、 $1 \times 10^8$ 个、 $1 \times 10^9$ 个或至多 $1 \times 10^{10}$ 个不同的模板多核苷酸序列。在一些实施例中,所述不同的模板多核苷酸编码至少10个、50个、100个、500个、1000个、10000个或100000个不同蛋白质的肽序列。

[0150] 在一些实施例中,至少约10个、100个、500个、1000个、5000个或10000个所述不同的模板多核苷酸编码源自所述患病细胞中异常转录、剪接或翻译的mRNA或源自基因重排的突变肽序列或mRNA翻译产物。

[0151] 在一些实施例中,所述突变肽序列是癌细胞特异性突变肽序列。在一些实施例中,所述突变肽序列包括点突变或插入缺失。

[0152] 在一些实施例中,表达构建体进一步包括一个或多个抗原多肽序列上游的一个或多个支架多肽序列。在一些实施例中,表达构建体进一步包括一个或多个支架多肽序列下游和一个或多个抗原多肽序列上游的接头序列。

[0153] 在一些实施例中,所述第一多核苷酸序列进一步包括紧邻所述不同的模板多核苷酸序列上游的上游衔接子序列和/或紧邻所述不同的模板多核苷酸序列下游的下游衔接子序列。

[0154] 在一些实施例中,所述融合蛋白是多价的。

[0155] 本文提供了由前述权利要求中任一项编码的多肽文库。

[0156] 在一些实施例中,所述多肽文库的所述多肽在宿主细胞中表达,使用体外翻译系统表达和/或由噬菌体载体表达。在一些实施例中,噬菌体载体是如M13噬菌体载体或f1噬菌体载体或fd噬菌体载体等丝状噬菌体载体。

[0157] 在一些实施例中,所述文库中的所述多肽表达为病毒样颗粒(VLP)的一部分。在一些实施例中,所述VLP样颗粒可在宿主细胞,如细菌细胞,如大肠杆菌细胞中表达。在一些实施例中,VLP在宿主细胞中自组装。在一些实施例中,所述宿主细胞是细菌。

[0158] 在一些实施例中,所述文库的所述多肽是体外翻译的多肽。

[0159] 在一些实施例中,所述多肽文库包括多个分离的多肽。

[0160] 在一些实施例中,至少通过所述亲和标签分离或纯化或富集所述文库的所述多肽。

[0161] 一方面,本文提供了一种个性化重组蛋白质组文库,其包括在宿主细胞中表达的多个重组融合多肽,所述多个重组融合多肽包括由来自样品的多个至少10个不同的模板多核苷酸序列编码的多个多肽序列,所述样品包括来自患有疾病的受试者的患病细胞,并且其中由所述多个至少10个不同的模板多核苷酸编码的所述多肽序列中的每个多肽序列在N到C方向上包括:(i)由所述至少10个不同的模板多核苷酸序列中的一个不同的模板多核苷酸编码的多肽序列;以及(ii):(A)框校验序列和编码所述框校验序列下游的亲和标签的序列;或者(B)包括编码亲和标签的序列的框校验序列和/或至少40kDa的大小增强多肽序列。

[0162] 一方面,本文提供了一种个性化重组蛋白质组文库,其包括在宿主细胞中表达的多个重组融合多肽,所述多个重组融合多肽包括由来自样品的多个至少1000个不同的模板多核苷酸序列编码的多个多肽序列,所述样品包括来自患有疾病的受试者的患病细胞。

[0163] 一方面,本文提供了一种疫苗组合物,其包括如上文所描述的多肽文库或个性化重组蛋白质组文库。

[0164] 一方面,本文提供了一种治疗方法,其包括将如上文所描述的多肽文库或个性化重组蛋白质组文库施用于所述受试者。

[0165] 一方面,本文提供了一种药物组合物,其包括如上文所描述的多肽文库或个性化重组蛋白质组文库以及药学上可接受的赋形剂。

[0166] 一方面,本文提供了一种治疗方法,其包括将上文所描述的药物组合物施用于所述受试者。

[0167] 一方面,本文提供了一种细胞群体,其包括本文所描述的多肽文库或个性化重组蛋白质组文库。在一些实施例中,所述细胞群体中的每个细胞表达由所述多个不同的模板多核苷酸编码的单个不同的多肽序列。

[0168] 本文提供了一种构建表达载体的方法,所述方法包括:(a)从包括来自患有疾病的受试者的患病细胞的样品中提供多个不同的模板多核苷酸;(b)将衔接子序列连接到所述多个不同的模板多核苷酸;由此形成多个不同的衔接子标记的模板多核苷酸;(c)扩增所述不同的衔接子标记的模板多核苷酸;(d)将经扩增的不同的衔接子标记的模板多核苷酸插入到载体中,由此形成重组表达构建体文库;(e)表达由所述重组表达构建体文库编码的多肽;以及富集所表达的多肽。

[0169] 在一些实施例中,所述方法包括使多个不同的多核苷酸与外显子组捕获寡核苷酸文库接触,其中所述捕获寡核苷酸包括靶序列。

[0170] 在一些实施例中,所述外显子组捕获寡核苷酸固定在表面上。

[0171] 在一些实施例中,扩增包括用随机引物扩增。

[0172] 在一些实施例中,扩增包括无偏差扩增或不是靶特异性的。

[0173] 在一些实施例中,所述方法包括将所述多个不同的模板多核苷酸序列与来自参考样品或来自患有疾病的所述受试者的非患病细胞的多个参考多核苷酸序列杂交。

[0174] 在一些实施例中,所述方法进一步包括从不包括错配的双链体多核苷酸中选择性富集包括错配的双链体多核苷酸。

[0175] 在一些实施例中,选择性富集包括使所述双链体多核苷酸与药剂接触,所述药剂与包括错配的所述双链体多核苷酸特异性结合。

[0176] 在一些实施例中,所述药剂是DNA碱基错配识别药剂。

[0177] 在一些实施例中,所述药剂是MutS蛋白或其功能片段。在一些实施例中,MutS蛋白衍生自细菌物种,包括但不限于大肠杆菌、沙门氏菌属(*Salmonella* sp.)、嗜血杆菌属(*Haemophilus* sp.)、固氮菌属(*Azotobacter* sp.)、不动杆菌属(*Acinetobacter* sp.)、芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.)、疏螺旋体菌属(*Borrelia* sp.)、衣原体菌属(*Chlamydia* sp.)、螺杆菌属(*Helicobacter* sp.)、奈瑟氏菌属(*Neisseria* sp.)、耐放射异常球菌(*Deinococcus radiodurans*)和链球菌属(*Streptococcus* sp)等。

[0178] 在一些实施例中,所述错配包括单核苷酸变体、插入或缺失。

[0179] 在一些实施例中,所述方法进一步包括将(i)选择性富集的包括错配的双链体多核苷酸与(ii)来自样品的多个不同的模板多核苷酸组合,所述样品包括来自患有疾病的受试者的尚未选择性富集的患病细胞。

- [0180] 在一些实施例中,多个不同的靶多核苷酸包括源自全外显子组和/或外显子-内含子边界序列的序列。
- [0181] 在一些实施例中,所述多个不同的靶多核苷酸包括源自基于一个或多个癌症类型的表达数据的外显子组子集的序列。
- [0182] 在一些实施例中,所述多个不同的靶多核苷酸包括源自全基因组的序列。
- [0183] 在一些实施例中,所述多个不同的靶多核苷酸包括源自一组富集外显子组捕获寡核苷酸文库的全基因组序列的序列。
- [0184] 在一些实施例中,所述方法进一步包括将所述多个不同的靶多核苷酸克隆到表达载体中。
- [0185] 在一些实施例中,一组参考多核苷酸包括参考基因组外显子捕获探针组或来自所述受试者的非肿瘤样品的多核苷酸。
- [0186] 在一些实施例中,外显子组捕获寡核苷酸文库包括高频人多态性序列。
- [0187] 在一些实施例中,所述参考样品包括来自所述受试者的非肿瘤样品。
- [0188] 在一些实施例中,所述方法进一步包括进行逆转录。
- [0189] 在一些实施例中,所述方法不进一步包括测序。
- [0190] 在一些实施例中,所述方法不进一步包括预测或确定表位与HLA等位基因编码的蛋白质的结合和/或HLA等位基因编码的蛋白质对表位的呈递。
- [0191] 在一些实施例中,将衔接子序列与所述多个不同的模板多核苷酸连接包括连接链特异性衔接子序列。
- [0192] 在一些实施例中,所述不同的靶多核苷酸序列来自gDNA。
- [0193] 在一些实施例中,所述不同的靶多核苷酸序列来自mRNA或外显子序列。
- [0194] 在一些实施例中,富集包括富集含有表达多肽的亲亲和标签。
- [0195] 在一些实施例中,所述方法进一步包括将所述样品的多核酸片段化。
- [0196] 在一些实施例中,所述方法进一步包括剪切所述样品的基因组DNA。
- [0197] 在一些实施例中,样品是FFPE样品。
- [0198] 本文提供了一种治疗方法,所述治疗方法包括进行上文所描述的方法以及向受试者施用富集的表达多肽。

## 附图说明

- [0199] 在所附权利要求书中对本公开的特征进行了具体阐述。通过参考阐述了说明性实施例的以下详细说明,将获得对本发明的特征和优点的更好理解,在所述实施例中利用了本公开的原理,并且在附图中:
- [0200] 图1展示了多肽构型的一个选项,即选项A。
- [0201] 图2展示了多肽构型的另一个选项,即选项B。
- [0202] 图3展示了多肽构型的又另一个选项,即选项C。
- [0203] 图4展示了支架结构域选择和六个示例性支架结构域的考虑因素中的一些。
- [0204] 图5A展示了示例性支架结构域在溶解度挑战测试和相对于六聚体多功能抗体的表达水平测试中的测试结果。
- [0205] 图5B展示了使用指示的支架结构域溶解A1g8肽的溶解度挑战测试结果。

[0206] 图5C展示了使用Stefin-A作为支架结构域以溶解指示的肽的溶解度挑战测试结果。S:可溶级分;I:不可溶级分。

[0207] 图6展示了为表达水平测试克隆的多功能抗体构建体。

[0208] 图7A-7C展示了具有一到六个支架结构域的多功能抗体构建体的淋巴结累积测试。图7A示出了用考马斯蓝(Coomassie Blue)染色的多功能抗体构建体的条带图案的图像;图7B示出了用于累积测试的注射和测量时间表;并且图7C示出了小鼠的注射部位。

[0209] 图8A-8D展示了与合成长肽相比荧光团标记的多功能抗体构建体的淋巴结累积。图8A示出了小鼠腹股沟淋巴结中荧光的累积;图8B示出了小鼠腋窝淋巴结中荧光的累积;并且图8C示出了与合成长肽相比的六聚体多功能抗体的荧光累积强度。图8D示出了淋巴结的FACS分析。

[0210] 图9展示了与小鼠左右腹股沟淋巴结(iLN)和腋窝淋巴结(aLN)中的合成长肽相比多功能抗体构建体的荧光团累积。

[0211] 图10A-10C展示了使用MC38肿瘤模型表位的多功能抗体构建体对合成长肽的体内免疫原性。图10A和图10B分别示出了对多功能抗体构建体和包括Reps1和Adpgk表位的合成长肽的免疫应答。图10C示出了多功能抗体1(PB1)、多功能抗体2(PB2)和多功能抗体3(PB3)的构型。

[0212] 图11A-11B展示了示例性多功能抗体构建体。图11A示出了包括非功能性支架结构域的示例性多功能抗体构建体,并且图11B示出了包括功能性和非功能性支架结构域的示例性多功能抗体构建体。

[0213] 图12A-12B展示了示例性多功能抗体构建体。图12A示出了包括非功能性支架结构域的示例性多功能抗体构建体,并且图12B示出了包括功能化肽标签的示例性多功能抗体构建体。

[0214] 图13展示了融合多肽的制造流水线。

[0215] 图14展示了用于制备随机引发的cDNA的外显子组捕获文库的方法的图示,所述外显子组捕获文库由从福尔马林固定石蜡包埋(FFPE)样品中提取的RNA制备,用于生成人工微型蛋白质组疫苗(AMPVax)。

[0216] 图15A展示了AmpVax富集的外显子组捕获方法的图示。图15B展示了使用MutS富集的外显子组捕获方法的图示。图15C展示了使用MutS诱饵的正常基因组DNA的AmpVax富集的外显子组捕获方法的图示。图15D展示了AmpVax富集的外显子组捕获方法和使用MutS富集的外显子组捕获方法的工作流程的图示。

[0217] 图16A展示了外显子组捕获文库的示例性多功能抗体融合构建体的图示。图16B展示了外显子组捕获文库的示例性多功能抗体融合构建体的图示。图16C展示了外显子组捕获文库的示例性多功能抗体融合构建体的图示。图16D展示了外显子组捕获文库的示例性多功能抗体融合构建体的图示。图16E展示了外显子组捕获文库的示例性多功能抗体融合构建体的图示。

[0218] 图17展示了构建用于表达多功能抗体融合物的质粒的示例性方法的图示。

[0219] 图18A展示了用1/5SNP和参考外显子组MutS捕获进行50x富集后分布/均匀度的图示。图18B展示了用1/5SNP和正常DNA MutS捕获进行50x富集后分布/均匀度的图示。图18C展示了没有SNP设计的参考外显子组与MutS捕获的正常DNA的图形比较。

## 具体实施方式

[0220] 本公开关注包括肽或编码治疗性肽的核酸的治疗开发的一个重要方面,其涵盖修饰肽以在治疗剂的接受者内获得稳定性和靶向递送。在一些方面,肽被修饰以增加免疫原性。在一些方面,肽是新抗原肽。在一些方面,肽是用于治疗受试者疾病的新抗原,其中所述疾病是免疫疾病。在一些方面,所述疾病是癌症。在一些方面,修饰包含肽融合。本文提供了与以融合形式递送新抗原有关的方法和药物组合物。另外,新抗原肽可以以融合的形式有效地递送到淋巴结,从而可以暴露大量的原初T淋巴细胞群体并且针对新抗原肽进行引发。

[0221] 一方面,本文描述了称为多功能抗体的高度模块化的蛋白质融合技术,所述蛋白质融合技术允许有效递送、组织吸收和新抗原肽的功能。在一些实施例中,多功能抗体保护新抗原肽免于皮下注射后血清中的酶消化。在一些实施例中,多功能抗体有助于将新抗原肽靶向淋巴结。在一些实施例中,多功能抗体有助于新抗原肽的淋巴结滞留。在一些实施例中,多功能抗体有助于T淋巴细胞的有效引发和激活。

[0222] 在一些实施例中,模块化蛋白质融合技术允许在单个蛋白质构建体上组合多个癌症疫苗表位(例如,新抗原、肿瘤相关抗原)。在一些实施例中,表位被支架结构域包围。在一些实施例中,这些支架结构域使抗原性肽更易溶解,并且防止抗原性肽因患者的循环蛋白酶和肽酶而过早降解。在一些实施例中,这些支架结构域被功能化以向多功能抗体添加期望的功能,从而进一步提高疫苗的免疫原性和抗肿瘤功效。

[0223] 本文描述了基于个体肿瘤特有的突变事件产生的新抗原的发现的新的免疫治疗药剂和其应用。因此,本文描述的本公开提供了肽、编码该肽的多核苷酸和肽结合剂,其可以用于例如刺激对肿瘤相关抗原或新表位的免疫应答,以产生用于治疗疾病的免疫原性组合物或癌症疫苗。

[0224] 以下描述和实例详细说明了本公开的实施例。应当理解,本公开不限于本文所描述的特定实施例并且因此可以变化。本领域技术人员将认识到,本公开的范围涵盖本公开的许多变化和修改。

[0225] 所有术语都旨在按照本领域技术人员所理解的方式来理解。除非另外定义,否则在此使用的所有技术术语和科学术语都具有与本公开所属领域的普通技术人员通常所理解相同的含义。

[0226] 本文中使用的章节标题仅出于组织目的,而不应被解释为对所描述的主题进行限制。

[0227] 尽管可以在单个实施例的上下文中描述本公开的各种特征,但是也可以单独地或以任何合适的组合来提供所述特征。相反,尽管为了清楚起见,可以在单个实施例的上下文中描述本公开,但是也可以在单个实施例中实施本公开。

[0228] 本文所使用的各种术语是出于仅描述特定情况的目的并且不旨在限制。在本申请中,除非另外特别说明,否则单数的使用包含复数。如本文所使用的,除非上下文另外清楚地指明,否则单数形式“一个/种(a/an)”和“所述(the)”旨在也包含复数形式。如本文所理解的,“或”意指“和/或”。如本文所使用的术语“和/或”和“其任何组合”以及其语法等价物可以互换使用。这些术语可以传达具体考虑任何组合。仅出于说明性目的,以下短语“A、B和/或C”或“A、B、C或其任何组合”可以意指“单独的A;单独的B;单独的C;A和B;B和C;A和C;以及A、B和C”。术语“或”可以连用或分离使用,除非上下文特别提及分离使用。

[0229] 术语“约 (about)”或“大约 (approximately)”可以意指在如由本领域普通技术人员确定的特定值的可接受误差范围内,这将部分地取决于所述值是如何测量或确定的,即,测量系统的局限性。例如,“约”可以意指根据本领域的实践在1个或大于1个标准差内。可替代地,“约”可以意指给定值的最多20%、最多10%、最多5%或最多1%的范围。可替代地,特别是对于生物系统或过程,所述术语可以意指在值的数量级内,在5倍内并且更优选地在2倍内。当在本申请和权利要求中描述特定值时,除非另有说明,否则应当假设术语“约”意指在特定值的可接受误差范围内。

[0230] 如本说明书和一项或多项权利要求中所使用的,词语“包括 (comprising)” (以及包括的任何形式,如“包括 (comprise)”和“包括 (comprises)”)、“具有 (having)” (和具有的任何形式,如“具有 (have)”和“具有 (has)”)、“包含 (including)” (和包含的任何形式,如“包含 (includes)”和“包含 (include)”)或“含有 (containing)” (和含有的任何形式,如“含有 (contains)”和“含有 (contain)”)是包含性或开放性的,且不排除另外未列出的要素或方法步骤。设想的是,本说明书中讨论的任何实施例可以关于本公开的任何方法或组合物实施,并且反之亦然。此外,本公开的组合物可以用于实现本公开的方法。

[0231] 在说明书中对“一些实施例”、“一实施例”、“一个实施例”或“其它实施例”的提及意指结合实施例描述的特定特征、结构或特性包含在至少一些实施例中,但不一定是本公开的所有实施例。为了便于理解本公开,下文对多个术语和短语进行了定义。

[0232] 主要组织相容性复合物或“MHC”是在控制负责生理免疫应答的细胞相互作用中发挥作用的一组基因。在人中,MHC复合物也称为人白细胞抗原 (HLA) 复合物。有关MHC和HLA复合物的详细描述,参见Paul,《基础免疫学 (Fundamental Immunology)》,第3版编辑,纽约雷文出版社 (Raven Press, New York) (1993)。“主要组织相容性复合物 (MHC) 的蛋白质或分子”、“MHC分子”、“MHC蛋白质”或“HLA蛋白质”理解为意指能够结合由蛋白质抗原的蛋白水解切割产生的肽并表示潜在淋巴细胞表位 (例如,T细胞表位和B细胞表位) 的蛋白质,将它们运输到细胞表面并将它们呈递给特定细胞,特别是细胞毒性T淋巴细胞、T辅助细胞或B细胞。基因组中的主要组织相容性复合物包括遗传区域,所述遗传区域在细胞表面上表达的基因产物对于结合和呈递内源性和/或外源抗原以及因此对于调节免疫过程很重要。主要组织相容性复合物分为编码不同蛋白质的两个基因组,即MHC I类分子和MHC II类分子。两种MHC类别的细胞生物学和表达模式适于这些不同作用。

[0233] 人白细胞抗原或“HLA”是人I类或II类主要组织相容性复合物 (MHC) 蛋白 (参见例如Stites等人,《免疫学 (Immunology)》,第8版,加利福尼亚州洛斯阿尔托斯兰格出版社 (Lange Publishing, Los Altos, Calif.) (1994))。

[0234] 如本文所使用的“多肽”、“肽”和其语法等同物是指氨基酸残基的聚合物。氨基酸残基的聚合物是一系列通常通过相邻氨基酸残基的 $\alpha$ -氨基与羧基之间的肽键相互连接的氨基酸残基。本文所公开的多肽 (包含其功能部分和功能变体) 可以包括代替一种或多种天然存在的氨基酸的合成氨基酸。此类合成氨基酸是本领域已知的,并且包含,例如,氨基环己烷甲酸、正亮氨酸、 $\alpha$ -氨基正癸酸、高丝氨酸、S-乙酰氨基甲基-半胱氨酸、反式-3-和反式-4-羟基脯氨酸、4-氨基苯丙氨酸、4-硝基苯丙氨酸、4-氯苯丙氨酸、4-羧基苯丙氨酸、 $\beta$ -苯基丝氨酸、 $\beta$ -羟基苯丙氨酸、苯基甘氨酸、 $\alpha$ -萘基丙氨酸、环己基丙氨酸、环己基甘氨酸、二氢吡啶-2-甲酸、1,2,3,4-四氢异喹啉-3-甲酸、氨基丙二酸、氨基丙二酸单酰胺、N'-苄

基-N'-甲基-赖氨酸、N',N'-二苄基-赖氨酸、6-羟基赖氨酸、鸟氨酸、 $\alpha$ -氨基环戊烷甲酸、 $\alpha$ -氨基环己烷甲酸、 $\alpha$ -氨基环庚烷甲酸、 $\alpha$ -(2-氨基-2-降冰片烷)-甲酸、 $\alpha$ ,  $\gamma$ -二氨基丁酸、 $\alpha$ ,  $\beta$ -二氨基丙酸、高苯丙氨酸和 $\alpha$ -叔丁基甘氨酸。本公开进一步考虑了本文所描述的多肽在工程化细胞中的表达可以与多肽构建体的一个或多个氨基酸的翻译后修饰相关。翻译后修饰的非限制性实例包含磷酸化、包含乙酰化和甲酰化的酰化、糖基化(包含N连接和O连接)、酰胺化、羟基化、包含甲基化和乙基化的烷基化、泛素化、添加吡咯烷酮羧酸、形成二硫键、硫酸化、豆蔻酰化、棕榈酰化、异戊二烯化、法尼基化、香叶基化、糖基磷脂酰肌醇化、蛋白脂化和碘化。

[0235] 免疫原性肽或免疫原性表位或肽表位是包括等位基因特异性基序的肽,使得所述肽将与HLA分子结合并诱导细胞介导的或体液应答,例如细胞毒性T淋巴细胞(CTL(例如,CD8<sup>+</sup>))、辅助T淋巴细胞(Th(例如,CD4<sup>+</sup>))和/或B淋巴细胞应答。因此,本文所描述的免疫原性肽能够与适当的HLA分子结合并且随后诱导对肽的CTL(细胞毒性)应答或HTL(和体液)应答。

[0236] 新抗原是一类由肿瘤特异性蛋白质变化产生的肿瘤抗原。新抗原涵盖但不限于由例如受试者的癌症特异性突变产生的肿瘤抗原,其包含但不限于置换突变、移码突变、基因融合、同框缺失或插入。新抗原还可以包含内源性逆转录病毒多肽和含有过度表达的肿瘤特异性突变的多肽。

[0237] 术语“肽”和“多肽”可互换使用,并且是指一系列通常通过相邻氨基酸的 $\alpha$ -氨基与羧基之间的肽键彼此连接的残基,通常是L-氨基酸。在一些实施例中,多肽包括包含多个离散表位的单个翻译产物。在一些实施例中,多肽包括单个翻译产物,所述翻译产物包括如表位或新表位等单个离散肽;和如一个或多个另外的支架蛋白等一个或多个另外的非离散元件。在一些实施例中,多肽包括多个表位。在一些实施例中,多肽可以是支化多肽结构。多肽或肽可以是各种长度,呈其中性(不带电荷)形式或盐形式,并且没有修饰,如糖基化、侧链氧化或磷酸化或者含有这些修饰,条件是修饰不会破坏如本文所描述的多肽的生物活性。在一些实施例中,肽或多肽包括至少一个侧翼序列。如本文所使用的术语“侧翼序列”是指不是新表位的一部分的新抗原肽的片段或区域。术语“突变多肽”、“新抗原多肽”、“新抗原性多肽”、“突变肽”、“新抗原肽”和“新抗原性肽”可互换使用并且指含有突变的肽或多肽。

[0238] 术语“残基”是指通过酰胺键或酰胺键模拟物或编码氨基酸或氨基酸模拟物的核酸(DNA或RNA)掺入肽或蛋白质中的氨基酸残基或氨基酸模拟物残基。

[0239] “新表位”、“肿瘤特异性新表位”或“肿瘤抗原”是指在参考中不存在的表位或抗原决定簇区域,如非患病细胞,例如非癌细胞或种系细胞,但存在于患病细胞中,例如癌细胞。如本文所使用的术语“新表位”是指肽或新抗原性肽内的抗原决定簇区域。新表位可以包括至少一个“锚定残基”和至少一个“锚定残基侧翼区”。新表位可以进一步包括“分离区”。术语“锚定残基”是指与HLA上的特定口袋结合的氨基酸残基,产生与HLA相互作用的特异性。在一些情况下,锚定残基可以位于规范的锚定位置。在其它情况下,锚定残基可以位于非规范锚定位置。新表位可以通过突出到肽结合槽口袋中的一级和二级锚定残基与HLA分子结合。在肽结合槽中,容纳所呈递的新表位的锚定残基的对应侧链的特定氨基酸组成口袋。HLA I和HLA II分子的不同等位基因之间存在肽结合偏好。HLA I类分子与短的新表位结合,短的新表位的N末端和C末端锚定在定位于新表位结合槽端处的口袋中。虽然大多数HLA

I类结合新表位具有约9个氨基酸,但较长的新表位可以通过其中心部分的凸出来容纳,从而产生约8到12个氨基酸的结合新表位。与HLA II类蛋白结合的新表位在大小上不受限制,并且可以从约16到25个氨基酸变化。HLA II类分子中的新表位结合槽在两个端处都是开放的,这使得能够与长度相对较长的肽结合。尽管约9个氨基酸残基的核心区段对新表位的识别作用最大,但此区域两侧的锚定残基对于肽对HLA II类等位基因的特异性也很重要。在一些情况下,有助于肽特异性的核心区侧翼的锚定残基存在于核心区残基的N末端处。在另一种情况下,核心区侧翼的锚定残基存在于核心区残基的C末端处。在又另一种情况下,有助于肽对HLA的特异性的核心区侧翼的锚定残基处于核心区残基的N末端和C末端处。

[0240] “参考”可以用于关联和比较在本公开的方法中从肿瘤样本获得的结果。通常,“参考”可以基于一个或多个正常样本,特别是不受癌症疾病影响的样本获得,从患者或一个或多个不同个体例如健康个体,特别是同一物种的个体中获得。“参考”可以通过测试足够多的正常样本凭经验确定。

[0241] “表位”是分子的集体特征,如一级、二级和三级肽结构和电荷,所述集体特征共同形成被例如免疫球蛋白、T细胞受体、HLA分子或嵌合抗原受体识别的位点。可替代地,表位可以定义为涉及特定免疫球蛋白的识别的一组氨基酸残基或在T细胞的情况下,那些被T细胞受体蛋白、嵌合抗原受体和/或主要组织相容性复合物(MHC)受体识别所必需的残基。“T细胞表位”应理解为意指肽序列,所述肽序列可以以肽呈递MHC分子或MHC复合物的形式被I类或II类MHC分子结合,然后以这种形式被T细胞(如T淋巴细胞或T辅助细胞)识别和结合。表位可以通过从天然来源分离来制备,或者表位可以根据本领域的标准方案合成。合成表位可以包括人工氨基酸残基、“氨基酸模拟物”,如天然存在的L氨基酸残基或如环己基丙氨酸等非天然存在的氨基酸残基的D异构体。在整个本公开中,表位在一些情况下可以称为肽或肽表位。应当理解,包括本文所描述的表位或类似物以及另外的氨基酸的蛋白质或肽仍在本公开的范围之内。在某些实施例中,肽包括抗原片段。在某些实施例中,本公开的肽的长度存在限制。当包括本文所描述的表位的蛋白质或肽包括与天然序列具有100%同一性的区域(即,连续的一系列氨基酸残基)时,出现长度受限的实施例。

[0242] 用于描述肽或蛋白质的命名法遵循常规做法,其中氨基位于每个氨基酸残基的左侧(氨基或N末端),并且羧基位于右侧(羧基或C末端)。当涉及肽表位中的氨基酸残基位置时,所述氨基酸残基位置以氨基到羧基方向编号,其中位置一是定位于表位的氨基末端的残基,或者它可以是其一部分的肽或蛋白质。在表示本公开的选择的具体实施例的式中,氨基端和羧基端基团,虽然没有具体示出,但除非另有说明,否则氨基端和羧基端基团呈在生理pH值下所假定的形式。在氨基酸结构式中,每个残基一般用标准的三字母或单字母名称表示,然而当三字母符号或全称在没有大写的情况下使用时,它们可以指L氨基酸残基。甘氨酸没有不对称碳原子,并且简称为“Gly”或“G”。本文所述的肽的氨基酸序列通常使用标准单字母符号表示。(A,丙氨酸;C,半胱氨酸;D,天冬氨酸;E,谷氨酸;F,苯丙氨酸;G,甘氨酸;H,组氨酸;I,异亮氨酸;K,赖氨酸;L,亮氨酸;M,甲硫氨酸;N,天冬酰胺;P,脯氨酸;Q,谷氨酰胺;R,精氨酸;S,丝氨酸;T,苏氨酸;V,缬氨酸;W,色氨酸;以及Y,酪氨酸)

[0243] 术语突变是指与参考相比核酸序列的变化(核苷酸取代、添加或缺失)。体细胞突变是细胞获得的遗传改变,所述遗传改变可以在细胞分裂过程中传递给突变细胞的后代。体细胞突变与种系突变不同,种系突变是发生在生殖细胞(即精子和卵子)中的遗传性的遗

传改变。在一些实施例中，突变是非同义突变。术语非同义突变是指确实导致氨基酸改变，如翻译产物中的氨基酸取代的突变，例如核苷酸取代。当突变破坏基因密码子周期性的正常阶段（也称为“阅读框”）时，就会发生移码，从而导致非天然蛋白质序列的翻译。基因中的不同突变有可能实现相同的改变阅读框。

[0244] “保守氨基酸取代”是一个氨基酸残基被具有类似侧链的另一个氨基酸残基替代的取代。具有类似侧链的氨基酸残基家族已在本领域中定义，所述侧链包含基本侧链（例如，赖氨酸、精氨酸、组氨酸）、酸性侧链（例如，天冬氨酸、谷氨酸）、不带电荷的极性侧链（例如，甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸）、非极性侧链（例如，丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸）、 $\beta$ 支化侧链（例如，苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸）以及芳香族侧链（例如，酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸）。例如，苯丙氨酸取代酪氨酸是保守取代。鉴定不消除肽功能的核苷酸和氨基酸保守取代的方法是本领域众所周知的。

[0245] 如本文所使用的，术语亲和力是指结合对的两个成员之间结合强度的量度，例如，HLA结合肽与I类或II类HLA。 $K_D$ 是解离常数，并且具有摩尔浓度单位。亲和力常数是解离常数的倒数。亲和力常数有时用作描述这种化学实体的通用术语。亲和力常数是结合能的直接量度。亲和力可以通过实验方式确定，例如通过使用可商购获得的Biacore SPR单元的表面等离子共振（SPR）。亲和力也可以表示为抑制浓度50（ $IC_{50}$ ），即50%的肽被置换时的所述浓度。同样， $\ln(IC_{50})$ 是指 $IC_{50}$ 的自然对数。 $K_{off}$ 指例如用于HLA结合肽和I类或II类HLA的解离的解离速率常数。在整个本公开中，“结合数据”结果可以用“ $IC_{50}$ ”表示。 $IC_{50}$ 是在结合测定中测试肽的浓度，在所述浓度下观察到标记的参考肽的结合抑制50%。鉴于运行测定的条件（即限制HLA蛋白和标记的参考肽浓度），这些值接近 $K_D$ 值。用于确定结合的测定在本领域中是众所周知的并且在例如以下中详细描述：PCT公开WO 94/20127和WO 94/03205以及其它公开如Sidney等人，《当代免疫学实验指南（Current Protocols in Immunology）》18.3.1（1998）；Sidney等人，《免疫学杂志（J. Immunol.）》154:247（1995）；以及Sette等人，《分子免疫学（Mol. Immunol.）》31:813（1994）。可替代地，结合可以相对于参考标准肽的结合来表达。例如，可以基于其 $IC_{50}$ ，相对于参考标准肽的 $IC_{50}$ 。结合也可以使用其它测定系统来确定，所述其它测定包含使用以下的那些：活细胞（例如，Ceppellini等人，《自然（Nature）》339:392（1989）；Christnick等人，《自然》352:67（1991）；Busch等人，《国际免疫学（Int. Immunol.）》2:443（1990）；Hill等人，《免疫学杂志》147:189（1991）；del Guercio等人，《免疫学杂志》154:685（1995））、使用去污剂裂解物的无细胞系统（例如，Cerundolo等人，《免疫学杂志》21:2069（1991））、固定化纯化MHC（例如，Hill等人，《免疫学杂志》152,2890（1994）；Marshall等人，《免疫学杂志》152:4946（1994））、ELISA系统（例如，Reay等人，《欧洲分子生物学学会杂志（EMBO J.）》11:2829（1992））、表面等离子共振（例如，Khilko等人，《生物化学杂志（J. Biol. Chem.）》268:15425（1993））、高通量可溶相测定（Hammer等人，《实验医学杂志（J. Exp. Med.）》180:2353（1994））和I类MHC稳定或组装的测量（例如，Ljunggren等人，《自然》346:476（1990）；Schumacher等人，《细胞（Cell）》62:563（1990）；Townsend等人，《细胞》62:285（1990）；Parker等人，《免疫学杂志》149:1896（1992））。“交叉反应结合”在一些肽中显而易见，即肽表现出与多于一个HLA分子的混杂结合。

[0246] 当用于讨论表位时，术语“衍生的”和其语法等同物是“制备的”和其语法等同物的

同义词。衍生的表位可以从天然来源中分离,或者衍生的表位可以根据本领域的标准方案合成。合成表位可以包括人工氨基酸残基、“氨基酸模拟物”,如天然存在的L氨基酸残基或如环己基丙氨酸等非天然氨基酸残基的D异构体。衍生的或制备的表位可以是天然表位的类似物。

[0247] 稀释剂包含无菌液体,如水和油,包含石油、动物、植物或合成来源的油,如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等。水也是药物组合物的稀释剂。盐水溶液以及右旋糖和甘油水溶液还可以用作稀释剂,例如在可注射溶液中。

[0248] “天然”或“野生型”序列是指在自然中发现的序列。此类序列实际上可以包括较长的序列。

[0249] “受体”应理解为意指能够与配体结合的生物分子或分子组。受体可以用于在细胞、细胞形成或生物体中传递信息。受体包括至少一个受体单元,例如,其中每个受体单元可以由蛋白质分子组成。受体具有与配体结构互补的结构,并且可以将配体复合为结合配偶体。所述信息特别是通过在细胞表面上的配体络合后的受体的构象变化进行传递。

[0250] 在一些实施例中,受体应理解为特别意指能够与配体,特别是合适长度的肽或肽片段形成受体/配体复合物的MHC I类和II类蛋白质。

[0251] “配体”应理解为具有与受体结构互补的结构并且能够与此受体形成复合物的分子。在一些实施例中,配体应理解为意指肽或肽片段,所述肽或肽片段在其氨基酸序列中具有合适的长度和合适的结合基序,使得肽或肽片段能够与MHC I或MHC II类的蛋白质形成复合物。

[0252] 在一些实施例中,“受体/配体复合物”也应理解为意指“受体/肽复合物”或“受体/肽片段复合物”,包含肽或肽片段呈递MHC I类或II类分子。

[0253] “合成肽”是指从非天然来源获得的肽,例如是人造的。可以使用如化学合成或重组DNA技术等方法产生此类肽。“合成肽”包含“融合蛋白”。

[0254] 术语“基序”是指定义长度的氨基酸序列中的残基模式,例如长度小于约15个氨基酸残基或长度小于约13个氨基酸残基的肽,例如I类HLA基序的约8到约13个氨基酸残基(例如,8、9、10、11、12或13)和II类HLA基序的约6到约25个氨基酸残基(例如,6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25),其被特定HLA分子识别。由给定人HLA等位基因编码的每种HLA蛋白的基序通常不同。这些基序的主要和次要锚定残基模式不同。在一些实施例中,MHC I类基序鉴定长度为9、10或11个氨基酸残基的肽。

[0255] 如本文所使用的术语“天然存在的”和其语法等价物是指物体可以在自然界中找到的事实。例如,存在于生物体(包含病毒)中并且可以从自然界来源中分离出来,并且在实验室中未经人为故意修饰的肽或核酸是天然存在的。

[0256] 根据本公开,术语“疫苗”涉及药物制剂(药物组合物)或产品,其在施用诱导免疫应答,例如识别和攻击病原体或如癌细胞等患病细胞的细胞或体液免疫应答。疫苗可以用于预防或治疗疾病。术语“个体化癌症疫苗”或“个性化癌症疫苗”涉及特定癌症患者,并且意指癌症疫苗适于个体癌症患者的需要或特殊情况。

[0257] “保护性免疫应答”或“治疗性免疫应答”是指对源自病原性抗原(例如,肿瘤抗原)的抗原的CTL和/或HTL应答,其以某种方式预防或至少部分阻止疾病症状、副作用或进展。免疫应答还可以包含通过刺激辅助T细胞促进的抗体应答。

[0258] “抗原处理”或“处理”和其语法等同物是指多肽或抗原降解成处理产物,所述处理产物是所述多肽或抗原的片段(例如,多肽降解成肽)以及将这些片段中的一个或多个片段(例如,通过结合)与MHC分子结合,以便由细胞例如抗原呈递细胞呈递给特定T细胞。

[0259] “抗原呈递细胞”(APC)是在其细胞表面上呈递与MHC分子结合的蛋白质抗原肽片段的细胞。一些APC可以激活抗原特异性T细胞。专业的抗原呈递细胞通过吞噬作用或通过受体介导的内吞作用在内化抗原方面非常有效,然后在其膜上展示与II类MHC分子结合的抗原片段。T细胞识别抗原呈递细胞膜上的抗原II类MHC分子复合物并且与之相互作用。然后抗原呈递细胞产生另外的共刺激信号,导致T细胞激活。共刺激分子的表达是专业抗原呈递细胞的定义性特征。专业抗原呈递细胞的主要类型是树突细胞,所述树突细胞的抗原呈递范围最广,并且可能是最重要的抗原呈递细胞、巨噬细胞、B细胞和某些激活的上皮细胞。树突细胞(DC)是白细胞群体,所述白细胞群体通过MHC II类和I类抗原呈递途径将外周组织中捕获的抗原呈递给T细胞。众所周知,树突细胞是免疫应答的有效诱导剂,并且这些细胞的激活是诱导抗肿瘤免疫的关键步骤。树突细胞方便地分为“未成熟”和“成熟”细胞,所述“未成熟”和“成熟”细胞可以用作区分两种已充分表征的表型的简单方法。然而,这种命名法不应被解释为排除所有可能的分化中间阶段。未成熟树突细胞的特征在于具有高的抗原摄取和处理能力的抗原呈递细胞,这与Fc受体(FcR)和甘露糖受体的高表达有关。成熟表型的典型特征在于这些标志物的表达较低,但负责T细胞激活的细胞表面分子,如I类和II类MHC、粘附分子(例如,CD54和CD11)和共刺激分子(例如,CD40、CD80、CD86和4-1BB)的表达高。

[0260] 在两个核酸序列或多肽的氨基酸序列的上下文中,如本文所使用的术语“相同”和其语法等同物或“序列同一性”是指当在指定的比较窗口上比对以获得最大对应性时两个序列中的残基是相同的。如本文所使用的,示例性“比较窗口”是指至少约20个,通常为约50到约200个,更通常为约100到约150个连续位置的片段,其中在两个序列最佳比对后序列可与相同连续位置数的参考序列进行比较。用于比较的序列比对方法是本领域公知的。用于比较的序列的最佳比对可以通过以下进行:Smith和Waterman的局部同源性算法,《高等应用数学(Adv. Appl. Math.)》,2:482(1981);Needleman和Wunsch的比对算法,《分子生物学杂志(J. Mol. Biol.)》,48:443(1970);Pearson和Lipman的相似性搜索方法,《美国国家科学院院刊(Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.)》,85:2444(1988);这些算法的计算机化实施方案(包括但不限于加利福尼亚州山景城Intelligentics公司(Intelligentics, Mountain View Calif.)的PC/基因项目中的CLUSTAL、美国威斯康星州麦迪逊科学大道575号遗传学计算机组(GCG)(Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis., U.S.A.)的威斯康星遗传学软件包中的GAP、BESTFIT、BLAST、FASTA和TFASTA; CLUSTAL程序在以下中详细描述:Higgins和Sharp,《基因(Gene)》,73:237-244(1988)以及Higgins和Sharp,《计算机在生物科学中的应用(CABIOS)》,5:151-153(1989);Corpet等人,《核酸研究(Nucleic Acids Res.)》,16:10881-10890(1988);Huang等人,《计算机在生物科学中的应用》,8:155-165(1992);以及Pearson等人,《分子生物学方法(Methods in Molecular Biology)》,24:307-331(1994)。比对通常还通过检查和手动比对来进行。在一类实施例中,本文中的多肽与参考多肽或其片段具有至少60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、

86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性,例如,如通过BLASTP(或CLUSTAL或任何其它可用的比对软件)使用默认参数测量的。类似地,核酸也可以参考起始核酸来描述,例如,核酸可以与参考核酸或其片段具有50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、98%、99%或100%序列统一性,例如,如使用默认参数通过BLASTN(或CLUSTAL或任何其它可获得的比对软件)测量的。当一个分子与较大分子具有一定百分比的序列一致性时,这意指当两个分子最佳比对时,根据两个分子最佳比对时的顺序较小分子中所述残基百分比在较大分子中找到匹配残基。

[0261] 应用于核酸或氨基酸序列的“基本上相同”和其语法等同物意指与使用标准参数使用上文所描述的程序例如BLAST的参考序列相比,核酸或氨基酸序列包括具有至少90%序列同一性或更多、至少95%、至少98%和至少99%的序列。例如,BLASTN程序(对于核苷酸序列)使用字长(W)为11,期望值(E)为10,M=5,N=-4,以及两条链的比较作为默认值。对于氨基酸序列,BLASTP程序使用字长(W)3、期望值(E)10和BLOSUM62评分矩阵作为默认值(参见Henikoff和Henikoff,《美国国家科学院院刊》89:10915(1992))。通过在比较窗口上比较两个最佳比对的序列来确定序列一致性的百分比,其中比较窗口中的多核苷酸序列的部分可以包括与参考序列(不包括添加或缺失)相比的添加或缺失(即,缺口)以使两个序列最佳比对。百分比通过以下计算:确定两个序列中出现相同核酸碱基或氨基酸残基的位置数以得到匹配的位置数,将匹配的位置数除以比较窗口中的总位置数并且将结果乘以100以得到序列同一性百分比。在各实施例中,基本同一性存在于长度为至少约50个残基的序列区域、至少约100个残基的区域上,并且在各实施例中,序列在至少约150个残基上基本上相同。在各实施例中,序列在编码区域的整个长度上基本上一致。

[0262] 载体通常意指能够在宿主细胞中递送并且通常表达一个或多个所关注的基因或序列的构建体。载体的实例包含但不限于病毒载体、裸DNA或RNA表达载体、质粒、粘粒或噬菌体载体、与阳离子缩合剂缔合的DNA或RNA表达载体以及包封在脂质体中的DNA或RNA表达载体。

[0263] “分离的”多肽、抗体、多核苷酸、载体、细胞或组合物是呈在自然界中未发现的形式多肽、抗体、多核苷酸、载体、细胞或组合物。分离的多肽、抗体、多核苷酸、载体、细胞或组合物包含已经纯化到不再处于其在自然界中存在的形式的程度的那些物质。在一些实施例中,分离的多肽、抗体、多核苷酸、载体、细胞或组合物基本上是纯的。在一些实施例中,“分离的多核苷酸”涵盖包括在PCR或定量PCR反应中扩增的多核苷酸的PCR或定量PCR反应。

[0264] 术语“分离的”、“生物学上纯的”或其语法等同物是指基本上或本质上不含在其天然状态下发现的通常伴随材料的成分的材料。因此,本文所描述的分离的肽不含有一些或所有通常与其原位环境中的肽相关的材料。“分离的”表位是指不包含衍生表位的抗原的整个序列的表位。通常,“分离的”表位不具有与其连接的氨基酸残基,所述氨基酸残基产生在天然序列的整个长度上具有100%同一性的序列。天然序列可以是如衍生表位的肿瘤相关抗原等序列。因此,术语“分离的”意指将材料从其原始环境(例如,如果其天然存在的话,自然环境)中去除。“分离的”核酸是从其自然环境中去除的核酸。例如,存在于活动物中的天然存在的多核苷酸或肽不是分离的,但是从天然系统中的一些或全部共存材料分离的相同的多核苷酸或肽是分离的。此类多核苷酸可以是载体的一部分和/或此类多核苷酸或肽可以是组合物的一部分,并且仍然是分离的,因为此类载体或组合物不是其天然环境的一部

分。分离的RNA分子包含本文所描述的DNA分子的体内或体外RNA转录物,并且进一步包含合成产生的此类分子。

[0265] 如本文所使用的术语“基本上纯化的”和其语法等同物是指核酸序列、多肽、蛋白质或其它化合物,其基本上不含,即超过约50%不含,超过约70%不含、超过约90%不含与核酸、多肽、蛋白质或其它化合物天然结合的多核苷酸、蛋白质、多肽和其它分子。

[0266] 如本文所使用的,术语“基本上纯的”是指至少50%纯的(即,不含污染物)、至少90%纯的、至少95%纯的、至少98%纯的或至少99%纯的材料。

[0267] 术语“多核苷酸”、“核苷酸”、“核酸”、“多核酸”或“寡核苷酸”和其语法等同物在本文可互换使用,并且指任何长度的核苷酸的聚合物并包含DNA和RNA,例如mRNA。因此,这些术语包含双链和单链DNA、三链体DNA以及双链和单链RNA。所述术语还包含经修饰的,例如通过甲基化和/或通过封端,以及未经修饰形式的多核苷酸。术语还意指包含分子,所述分子包含非天然存在的或合成的核苷酸以及核苷酸类似物。本文公开或考虑的核酸序列和载体可以通过例如转染、转化或转导引入细胞中。核苷酸可以是脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸、修饰的核苷酸或碱基和/或它们的类似物,或者可以通过DNA或RNA聚合酶并入聚合物中的任何取代物。在一些实施例中,多核苷酸和核酸可以是体外转录的mRNA。在一些实施例中,使用本公开的方法施用的多核苷酸是mRNA。

[0268] 转染、转化或转导通常是指通过使用物理或化学方法将一个或多个外源性多核苷酸引入宿主细胞。许多转染技术是本领域已知的并且包含例如磷酸钙DNA共沉淀(参见例如Murray E. J. (编辑),《分子生物学方法》,第7卷,《基因转移和表达方案(Gene Transfer and Expression Protocols)》,胡马纳出版社(Humana Press)(1991));DEAE-葡聚糖;电穿孔;阳离子脂质体介导的转染;钨粒促进的微粒轰击(Johnston,《自然》,346:776-777(1990));以及磷酸锶DNA共沉淀(Brash等人,《分子与细胞生物学(Mol. Cell Biol.)》,7:2031-2034(1987))。在感染性颗粒在合适的包装细胞中生长后,可以将噬菌体或病毒载体引入宿主细胞,所述包装细胞中的许多包装细胞可商购获得。

[0269] 当核酸和/或核酸序列天然地或人工地衍生自共同的祖先核酸或核酸序列时,它们是“同源的”。当蛋白质和/或蛋白质序列的编码DNA天然地或人工地衍生自共同的祖先核酸或核酸序列时,它们是“同源的”。同源分子可以称为同源物。例如,如本文所描述的任何天然存在的蛋白质可以通过任何可用的诱变方法进行修饰。当表达时,此诱变的核酸编码与原始核酸编码的蛋白质同源的多肽。通常从两种或更多种核酸或蛋白质(或其序列)之间的序列一致性推断同源性。可用于建立同源性的序列之间的精确一致性百分比随所讨论的核酸和蛋白质而变化,但是通常使用仅仅25%序列一致性来建立同源性。更高水平的序列一致性,例如30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或99%或更高也可用于建立同源性。用于确定序列一致性百分比的方法(例如,使用默认参数的BLASTP和BLASTN)在本文中进行了描述并且通常是可获得的。

[0270] 术语“受试者”是指任何动物(例如,哺乳动物),所述动物包含但不限于人、非人灵长类动物、犬科动物、猫科动物、啮齿动物等,其将成为特定治疗的受体。典型地,关于人类受试者,术语“受试者”和“患者”在此中可以互换使用。

[0271] 术语“有效量”或“治疗有效量”或“治疗效果”是指有效“治疗”受试者或哺乳动物的疾病或病症的治疗剂的量。治疗有效量的药物具有治疗效果,并且因此可以预防疾病或

病症的发展;减缓疾病或病症的发展;减缓疾病或病症的进展;在一定程度上缓解与疾病或病症相关的症状中的一种或多种症状;降低发病率和死亡率;提高生活质量;或此类效果的组合。

[0272] 术语“治疗(treating或treatment或to treat)”或“减轻(alleviating或to alleviate)”是指(1)治愈、减缓、减轻诊断的病理病状或病症的症状和/或停止诊断的病理病状或病症的进展的治疗性措施;和(2)预防或减缓靶向病理病状或病症发展的防备性或预防措施。因此,那些需要治疗的人包含那些已经患有所述病症的人;那些容易患有所述病症的人;以及那些要预防所述病症的人。

[0273] “药学上可接受的”是指通常无毒、惰性和/或生理相容的组合物或组合物的组分。

[0274] “药用赋形剂”或“赋形剂”包括如佐剂、载体、pH调节剂和缓冲剂、张力调节剂、润湿剂、防腐剂等材料。“药用赋形剂”是药学上可接受的赋形剂。

[0275] 如本文所使用的,术语“支架结构域(scaffold domain或scaffolding domain)”和“支架多肽”可互换使用。

[0276] 一方面,本文描述了融合多肽,所述融合多肽包括与支架蛋白融合的多个表位或抗原。表位是长度约为5-50个氨基酸的短肽。可以通过将多个表位组合成一个分子来生成融合多肽或融合多蛋白或“多功能抗体”。多功能抗体可用于生成包括表位的治疗剂,其中表位是例如用于免疫疗法的活性治疗成分。尽管单独的表位可以在生命系统内快速降解而没有达到其预期结果,但可以设计多功能抗体形式以提供优于单一表位形式的优势。在多功能抗体中,支架蛋白使新抗原稳定;提高表位的溶解度;增加分子量,例如大于50kDa以实现淋巴结靶向和保留,并且可以设计成执行特定的组织或细胞靶向或引入用于蛋白质纯化或鉴定的标签。

[0277] 从制造的角度来看,多功能抗体减少了单个肽的批量制造。不存在翻译后修饰允许在大肠杆菌中以较便宜的方式快速重组生产支架。支架大小相对较小,没有已知的毒性。在一些实施例中,支架蛋白是人蛋白,从而确保缺乏抗原性。在一些实施例中,可以并入功能性支架,如用于树突细胞靶向或激活。泛素支架可以增强蛋白酶体降解和抗原处理。在一些实施例中,可以进一步修饰支架蛋白,例如以包含细胞靶向部分。

#### [0278] 融合多肽

[0279] 一方面,本文公开了包括一个或多个抗原多肽和一个或多个支架多肽的融合多肽。本文还公开了编码融合多肽的核酸分子和包括融合多肽或核酸分子的组合物。在一些实施例中,融合多肽包括多肽序列,所述序列包括一个或多个抗原多肽序列和一个或多个支架多肽序列。在一些实施例中,融合多肽包括两个或更多个支架多肽序列。在一些实施例中,每个支架多肽序列包括人多肽序列、其片段或其变体。在一些实施例中,两个或更多个支架多肽序列的分子质量大于11kDa。在一些实施例中,两个或更多个支架多肽序列中的每一个包括至少21个氨基酸残基。在一些实施例中,支架多肽选自Stefin A、肌联蛋白-I27、其片段和其变体。在一些实施例中,所述支架多肽序列中的至少一个支架多肽序列通过一个或多个接头序列与所述一个或多个抗原多肽序列中的至少一个抗原多肽序列连接。在一些实施例中,所述融合多肽被配置成促进接头的切割、一个或多个抗原多肽中的至少一个抗原多肽的切割或所述一个或多个抗原多肽中的至少一个抗原多肽的呈递。在一些实施例中,抗原多肽是癌抗原。

[0280] 在一些实施例中,所述融合多肽的分子质量为至少20kDa、30kDa、35kDa、40kDa、45kDa、50kDa、55kDa、60kDa、65kDa、70kDa、75kDa、80kDa、85kDa、90kDa、100kDa、110kDa、120kDa、150kDa或200kDa。在一些实施例中,融合多肽的分子质量为至少75kDa。在一些实施例中,所述融合多肽的分子质量为至多20kDa、30kDa、35kDa、40kDa、45kDa、50kDa、55kDa、60kDa、65kDa、70kDa、75kDa、80kDa、85kDa、90kDa、100kDa、110kDa、120kDa、150kDa、200kDa或500kDa。在一些实施例中,融合多肽的分子质量为约50到80kDa。在一些实施例中,融合多肽的分子质量为约70到80kDa。融合多肽可以被配置成采用线性或支化形式。在一些实施例中,融合多肽呈线性形式。在一些实施例中,融合多肽具有多个分支。

[0281] 一个或多个支架多肽可以以各种方式与融合多肽的剩余序列或在它们之间连接。例如,支架多肽可以通过N末端或C末端或通过在N末端与C末端之间的插入连接。在一些实施例中,支架多肽序列中的至少一个支架多肽序列通过其N末端与融合多肽的剩余序列连接。在一些实施例中,支架多肽序列中的至少一个支架多肽序列通过其C末端与融合多肽的剩余序列连接。在一些实施例中,一个或多个支架多肽中的每个支架多肽通过其N末端、C末端或两个末端与融合多肽的剩余序列连接。在一些实施例中,支架多肽序列中的至少两个支架多肽序列不被抗原序列或接头序列中断。在一些实施例中,支架多肽不通过在它们相应的N末端与C末端之间的插入连接。

[0282] 在一些实施例中,融合多肽在N末端到C末端方向上包括具有式(Ia)结构的多肽序列,

[0283]  $A_n-S_m$ 或 $S_m-A_n$  式(Ia),

[0284] 其中每个S独立地表示支架多肽序列并且每个A独立地表示抗原多肽序列,并且其中m是等于或大于1的整数并且n是等于或大于1的整数。在一些实施例中,m和n中的每一个是独立地选自1到10的整数。在一些实施例中,m和n中的每一个是独立地选自1到5的整数。在一些实施例中,m和n中的每一个是独立地选自1到3的整数。在一些实施例中,m和n中的每一个独立地为1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。在一些实施例中,m是1并且n是2。在一些实施例中,n是1并且m是2。在一些实施例中,融合多肽包括在N末端到C末端方向上具有以下结构的多肽序列:A-A-S、A-A-A-S、A-A-A-A-S、A-A-A-A-A-S、A-A-A-A-A-A-S或A-A-A-A-A-A-A-S。在一些实施例中,融合多肽包括在N末端到C末端方向上具有以下结构的多肽序列:S-A-A、S-A-A-A、S-A-A-A-A、S-A-A-A-A-A、S-A-A-A-A-A-A或S-A-A-A-A-A-A-A。在一些实施例中,融合多肽包括在N末端到C末端方向上具有以下结构的多肽序列:A-S、A-S-S、A-S-S-S、A-S-S-S-S、A-S-S-S-S-S或A-S-S-S-S-S-S。在一些实施例中,融合多肽包括在N末端到C末端方向上具有结构的多肽序列:S-A、S-S-A、S-S-S-A、S-S-S-S-A、S-S-S-S-S-A或S-S-S-S-S-S-A。

[0285] 在一些实施例中,融合多肽在N末端到C末端方向上包括具有式(Ib)结构的多肽序列,

[0286]  $S_o-A_n-S_m$  式(Ib),

[0287] 其中每个S独立地表示支架多肽序列并且每个A独立地表示抗原多肽序列,并且其中o、n和m中的每一个独立地是等于或大于1的整数。在一些实施例中,o、n和m中的每一个独立地为1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。在一些实施例中,o、m和n中的每一个是独立地选自1到5的整数。在一些实施例中,o为1或2,m为1或2,并且n为选自1到5的整数。在一些实施例中,o和m等于1,并且n是1到5的整数。在一些实施例中,融合多肽包括在N末端到C末端方向上具有以

下结构的多肽序列：S-A-S、A-S-A-S、S-A-S-A、S-A-S-A-S、S-A-S-A-S-A-S、S-A-S-A-S-A-S-A-S或S-A-S-A-S-A-S-A-S-A-S。在一些实施例中，融合多肽包括在N末端到C末端方向上具有以下结构的多肽序列：S-A-A-S、S-A-A-A-S、S-A-A-A-A-S、S-A-A-A-A-A-S、S-A-A-A-A-A-A-S或S-A-A-A-A-A-A-A-S。

[0288] 在一些实施例中，融合多肽在N末端到C末端方向上包括具有式 (IIa) 结构的多肽序列，

[0289]  $(L-A-L)_n-S_m$  或  $S_m-(L-A-L)_n$  式 (IIa)，

[0290] 其中每个S独立地表示支架多肽序列，每个A独立地表示抗原多肽序列，并且每个L独立地表示接头序列或不存在，并且其中m是等于或大于1的整数并且n是等于或大于1的整数。在式 (IIa) 的一些实施例中，m是等于或大于2的整数。在式 (IIa) 的一些实施例中，n是选自1到5的整数并且m是2。在一些实施例中，融合多肽包括在N末端到C末端方向上具有以下结构的多肽序列：A-L-S、A-L-A-L-S、A-L-A-L-A-L-S、S-L-A、S-L-A-L-A或S-L-A-L-A-L-A。

[0291] 在一些实施例中，融合多肽在N末端到C末端方向上包括具有式 (IIb) 结构的多肽序列，

[0292]  $S_o-(L-A-L)_n-S_m$  式 (IIb)，

[0293] 其中每个S独立地表示支架多肽序列，每个A独立地表示抗原多肽序列，并且每个L独立地表示接头序列或不存在，并且其中o、n和m中的每一个独立地是等于或大于1的整数。在一些实施例中，o为1或2，m为1或2，并且n为选自1到5的整数。在一些实施例中，融合多肽包括在N末端到C末端方向上具有以下结构的多肽序列：S-L-A-L-S、S-A-L-S-L-A-L-S、S-L-A-L-S-L-A、S-L-A-L-S-L-A-L-S、S-L-A-L-S-L-A-L-S-L-A-L-S、S-L-A-L-S-L-A-L-S-L-A-L-S-L-A-L-S或S-L-A-L-S-L-A-L-S-L-A-L-S-L-A-S-L-A-L-S。

[0294] 在一些实施例中，支架多肽和抗原多肽以交替方式位于融合多肽中，之间有或没有接头序列。例如，在一些实施例中，融合多肽包括在N末端到C末端方向上具有以下结构的多肽序列：S-A-L-S-L-A-L-S、A-L-S-L-A-L-S-L-A、A-S-L-A-L-S-L-A-L-S、S-L-A-L-S-L-A-L-S-L-A-L-S-A、A-S-A-S-L-A-L-S或S-L-A-L-S-L-A-L-S-A-S-A。在一些实施例中，支架多肽序列中的每个支架多肽序列通过接头序列中的至少一个接头序列与抗原多肽序列中的一个或两个抗原多肽序列连接。

[0295] 与缺乏支架结构域的对应该多肽相比，所描述的融合多肽可以导致改善的淋巴结累积或保留。在一些实施例中，在向受试者施用后，融合多肽在淋巴结中的累积为其缺乏支架多肽的对应该多肽的累积的至少1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、3、4、5、6、7、8、9或10倍，如通过平均辐射效率测量的。在一些实施例中，在向受试者施用后，融合多肽在淋巴结中的累积为其缺乏支架多肽的对应该多肽的累积的至少1.1、2、3、4、5、6、7、8、9或10倍，如通过平均辐射效率测量的。例如，可以根据实例3.1中描述的方法测量淋巴结累积。

[0296] 与缺乏支架结构域的对应该多肽相比，所描述的融合多肽在水性溶剂中的溶解度可以提高。在一些实施例中，所述融合多肽在水性溶剂中的溶解度为其在同一溶剂中测量的缺乏所述支架多肽的对应该多肽的溶解度的至少1.1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40或50倍。

[0297] 在一些实施例中，所述融合多肽在水性调配物中的溶解度为其缺乏所述支架多肽的对应该多肽的溶解度的至少1.1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40或50倍。与缺乏支架结构

域的对应多肽相比,所描述的融合多肽可以具有改善的稳定性,例如血清稳定性。在一些实施例中,所述融合多肽的血清半衰期为其缺乏所述支架多肽的对应多肽的血清半衰期的至少1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、3、4、5、6、7、8、9或10倍。在一些实施例中,所述融合多肽的血清半衰期为其缺乏所述支架多肽的对应多肽的血清半衰期的至少1.1、2、3、4、5、6、7、8、9或10倍。与缺乏支架结构域的对应多肽相比,所描述的融合多肽的溶解度可以提高。在一些实施例中,所述融合多肽的血清溶解度为其缺乏所述支架多肽的对应多肽的血清溶解度的至少1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、3、4、5、6、7、8、9或10倍。

[0298] 与缺乏支架结构域的对应多肽相比,所描述的融合多肽可以引起增强的免疫应答。在一些实施例中,在向受试者施用后,所述融合多肽的抗原特异性T细胞应答为抗原特异性T细胞对其缺乏所述支架多肽的对应多肽的抗原特异性T细胞应答的至少1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、100、200或300倍,如通过脾细胞增殖的增加测量的。例如,可以根据实例3.2中的方法测量抗原特异性T细胞应答。

[0299] 支架多肽或支架结构域

[0300] 融合多肽可以包括一个或多个支架多肽序列。在一些实施例中,一个或多个支架多肽是相同的。在一些实施例中,一个或多个支架多肽包括至少两个不同的支架多肽序列。在某些实施例中,一个或多个支架多肽包括2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个不同的支架多肽序列。

[0301] 在一些实施例中,一个或多个支架多肽包括重组人多肽。在一些实施例中,一个或多个支架多肽包括源自人蛋白质的序列。在一些实施例中,一个或多个支架多肽包括与如人蛋白质等野生型哺乳动物蛋白质具有至少80%、85%、90%、95%、99%或100%序列同一性的序列。在一些实施例中,一个或多个支架多肽未被配置成具有靶向结合特性。在其它实施例中,支架多肽中的至少一个支架多肽被配置成与靶分子结合。在一些实施例中,支架多肽缺乏翻译后修饰。在一些实施例中,支架多肽缺乏肽内二硫键。在一些实施例中,一个或多个支架多肽是非免疫原性的。在其它实施例中,支架多肽中的至少一个支架多肽是免疫原性的。在一些实施例中,支架多肽未被配置成具有酶活性。在一些实施例中,一个或多个支架多肽缺乏信号序列。

[0302] 在一些实施例中,融合多肽包括至少2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个或15个支架多肽。在一些实施例中,融合多肽包括至多5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个或20个支架多肽。在一些实施例中,融合多肽包括2到6个支架多肽。在一些实施例中,融合多肽包括1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个支架多肽。在某些具体实施例中,融合多肽包括6个支架多肽。

[0303] 在一些实施例中,所述融合多肽中的支架多肽序列的分子质量为至少11kDa、20kDa、30kDa、35kDa、40kDa、45kDa、50kDa、55kDa、60kDa、65kDa、70kDa、75kDa、80kDa、85kDa、90kDa、100kDa、110kDa、120kDa、150kDa或200kDa。在一些实施例中,融合多肽中的支架多肽序列的分子质量为至少75kDa。在一些实施例中,所述融合多肽中的支架多肽序列的分子质量为至多15kDa、20kDa、30kDa、35kDa、40kDa、45kDa、50kDa、55kDa、60kDa、65kDa、70kDa、75kDa、80kDa、85kDa、90kDa、100kDa、110kDa、120kDa、150kDa、200kDa或500kDa。在一些实施例中,支架多肽序列中的每个支架多肽序列的分子质量为至少5kDa、6kDa、7kDa、

8kDa、9kDa、10kDa、11kDa、12kDa、13kDa、14kDa、15kDa、16kDa、17kDa、18kDa、19kDa、20kDa、30kDa、40kDa、50kDa、60kDa、70kDa或100kDa。在一些实施例中，支架多肽序列中的每个支架多肽序列的分子质量为至多6kDa、7kDa、8kDa、9kDa、10kDa、11kDa、12kDa、13kDa、14kDa、15kDa、16kDa、17kDa、18kDa、19kDa、20kDa、30kDa、40kDa、50kDa、60kDa、70kDa或250kDa。在一些实施例中，支架多肽中的至少一个支架多肽的分子质量为8到12kDa或10到12kDa。在一些实施例中，支架多肽中的至少一个支架多肽的分子质量为约11kDa。

[0304] 在一些实施例中，支架多肽序列中的每个支架多肽序列包括至少21个、至少30个、至少35个、至少40个、至少45个、至少50个、至少55个、至少60个、至少65个、至少70个、至少75个、至少80个、至少85个、至少90个、至少100个、至少125个、至少150个、至少175个或至少200个氨基酸残基。在一些实施例中，支架多肽序列中的每个支架多肽序列包括至多30个、至多35个、至多40个、至多45个、至多50个、至多55个、至多60个、至多65个、至多70个、至多75个、至多80个、至多85个、至多90个、至多100个、至多125个、至多150个、至多175个或至多200个氨基酸残基。在一些实施例中，支架多肽中的至少一个支架多肽具有至少80、至少85、至少90或至少95个氨基酸残基。在一些实施例中，支架多肽中的至少一个支架多肽具有约90个、91个、92个、93个、94个、95个、96个、97个、98个、99个、100个、101个、102个、110个或120个氨基酸序列。

[0305] 在一些实施例中，支架蛋白是哺乳动物蛋白，例如可以在细菌表达系统如大肠杆菌表达系统中适当表达的人蛋白，其中蛋白质是紧凑、稳定的，并且是分泌蛋白质或细胞质蛋白质。在一些实施例中，支架蛋白是人蛋白。哺乳动物细胞含有估计的十亿个蛋白质分子。这些蛋白质中有很一部分可以发现作为支架蛋白发挥作用，所述支架蛋白有助于提高效率并支持体内生物分子相互作用，其中相互作用促进细胞行为的一个方面，如施加信号转导、生物分子的细胞内运输、酶活性或促进细胞运动的结构重塑。在本公开中，提供了使用人支架蛋白将短表位肽转变为用于生成主动免疫应答的手段的有效且雅致的方式。在一些实施例中，选择支架蛋白以赋予表位肽稳定性。在一些实施例中，选择支架蛋白以赋予表位肽溶解度和增加的血清半衰期。在一些实施例中，选择支架蛋白以例如通过增加与同源MHC分子结合的可用性赋予在呈现免疫原性方面的结构优势。可以选择支架蛋白使得所述支架蛋白无毒。支架蛋白可以是具有适合这些目标中的任何或所有目标的支架功能或能力的任何蛋白质。

[0306] 例如，已知的细胞支架蛋白有助于其它功能蛋白降低反应的熵。在一些实施例中，支架蛋白有助于束缚一种或多种蛋白质、酶、肽或其它生物分子，增加局部浓度或暂时固定以获得功能性结果。例如，Cullin支架蛋白束缚E2泛素；T细胞激活接头 (LAT) 和含有SH2结构域的76kD白细胞蛋白 (SLP-76) 蛋白有助于组织TCR信号传导。

[0307] 在一些实施例中，一个或多个支架多肽中的至少一个支架多肽是胱抑素超家族的成员、其变体或其片段。在一些实施例中，胱抑素超家族的成员是1型胱抑素、2型胱抑素或3型胱抑素。在一些实施例中，一个或多个支架多肽中的至少一个支架多肽是如人Stefin A等Stefin A。在一些实施例中，所有的支架多肽都是Stefin A。在一些实施例中，一个或多个支架多肽包括与人Stefin A蛋白序列具有至少80%、85%、90%、95%、99%或100%序列同一性的序列。

[0308] 在一些实施例中，一个或多个支架多肽包括哺乳动物肌联蛋白、其变体或其片段

的序列。肌联蛋白的序列可以是肌联蛋白的任何结构域的序列，例如Ig样结构域、FnIII样结构域和假激酶结构域。在一些实施例中，肌联蛋白的序列是I-带的序列。在一些实施例中，一个或多个支架多肽包括与肌联蛋白Ig样结构域序列具有至少80%、85%、90%、95%、99%或100%序列同一性的序列。在一些实施例中，来自肌联蛋白的序列是I27结构域序列、I1结构域序列、Z1结构域序列、Z2结构域序列或M5结构域序列。在一些实施例中，来自肌联蛋白的序列是I27结构域序列。在一些实施例中，一个或多个支架多肽包括肌联蛋白I27、其变体或其片段。

[0309] 在一些实施例中，一个或多个支架多肽包括如纤连蛋白等糖蛋白、其变体或其片段的序列。在一些实施例中，糖蛋白是纤连蛋白。纤连蛋白的序列可以是来自其亚基中的任何亚基的序列，例如纤连蛋白I型、II型或II型结构域。在一些实施例中，一个或多个支架多肽包括与FnIII，例如1FNIII、9FNIII、10FNIII或11FNIII的序列具有至少80%、85%、90%、95%、99%或100%序列同一性的序列。在一些实施例中，FNIII的序列是10FN-III结构域序列。

[0310] 在一些实施例中，一个或多个支架多肽包括选自以下的多肽序列：硫氧还蛋白、10FNIII、脂质运载蛋白、腺相关病毒的衣壳多肽、 $\alpha$ -淀粉酶抑制剂、Stefin A、泛素、Ig-L细丝蛋白A、腱生蛋白、灭活葡萄球菌核酸酶、绿色荧光蛋白、如葡萄球菌蛋白A的Z结构域等分离的蛋白质折叠、锚蛋白重复序列、胆素结合蛋白、其片段和其变体。在一些实施例中，一个或多个支架多肽各自独立地选自肌联蛋白I27、泛素、Stefin A、10FN-III、Ig-L细丝蛋白A、腱生蛋白、其片段和其变体。在一些实施例中，支架多肽各自独立地选自Stefin A、肌联蛋白I27、其片段和其变体。在一些实施例中，支架多肽中的每个支架多肽包是Stefin A、其片段或其变体。

[0311] 支架蛋白可以是全长蛋白质或片段或特异性结构域。在一些实施例中，支架可以是蛋白质A结构域、Src同源结构域、PDZ结构域、WW结构域、锌指结构域或其衍生物。

[0312] 在一些实施例中，可以修饰支架蛋白以适应需要。在一些实施例中，支架在1个、2个、3个或更多个残基处突变以降低毒性、降低生物相互作用或降低免疫原性。在一些实施例中，支架在1个、2个、3个或更多个残基处突变以包含结合位点或特异性决定部分，例如靶向部分，如并入树突细胞(DC)靶向CLEC9A部分。

[0313] 抗原多肽

[0314] 本文所描述的融合多肽可以包括一个或多个抗原多肽。在一些实施例中，融合多肽包括至少2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个或20个抗原多肽。在一些实施例中，融合多肽包括至多2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、20个、50个或100个抗原多肽。在一些实施例中，融合多肽包括1个、2个、3个、4个、5个或6个抗原多肽。在一些实施例中，融合多肽包括5个或6个抗原多肽。

[0315] 在一些实施例中，融合多肽包括多个抗原多肽。在一些实施例中，抗原多肽序列中的每个抗原多肽序列与融合多肽上的其它抗原多肽序列不同。在一些实施例中，融合多肽的所有抗原多肽具有相同的序列。在一些实施例中，抗原多肽中的至少一个抗原多肽是合成多肽。

[0316] 一个或多个抗原多肽可以包括诱导免疫应答的任何抗原多肽，例如外源性抗原、内源性抗原、自身抗原、新抗原或其组合。在一些实施例中，至少一个抗原与I类HLA蛋白结

合以形成I类HLA-肽复合物。在一些实施例中,至少一个抗原与II类HLA蛋白结合以形成II类HLA-肽复合物。在一些实施例中,至少一个抗原激活CD8<sup>+</sup> T细胞。在一些实施例中,至少一个抗原激活CD4<sup>+</sup> T细胞。在一些实施例中,一个或多个抗原多肽包括第一抗原多肽和第二抗原多肽。在一些实施例中,第一抗原多肽与I类HLA蛋白结合以形成I类HLA-肽复合物。在一些实施例中,第二抗原多肽与II类HLA蛋白结合以形成II类HLA-肽复合物。在一些实施例中,第二抗原多肽与I类HLA蛋白结合以形成I类HLA-肽复合物。在一些实施例中,第一抗原多肽与II类HLA蛋白结合以形成II类HLA-肽复合物。在一些实施例中,单个多肽可以包括I类HLA结合表位和II类HLA结合表位。在一些实施例中,第一抗原多肽激活CD8<sup>+</sup> T细胞。在一些实施例中,第二抗原多肽激活CD4<sup>+</sup> T细胞。在一些实施例中,接头序列与支架多肽序列和抗原多肽序列直接连接。在一些实施例中,接头序列与支架多肽序列和另一个接头序列直接连接。在一些实施例中,接头序列与抗原多肽序列和另一个接头序列直接连接。在一些实施例中,接头序列与两个支架多肽序列直接连接。在一些实施例中,接头序列与两个抗原多肽序列直接连接。在一些实施例中,接头序列与两个其它接头序列直接连接。在一些实施例中,接头序列可以与以下中的三个或更多个直接连接:支架多肽序列、抗原多肽序列、接头序列或其任何组合。

[0317] 在一些实施例中,一个或多个接头序列相同。在一些实施例中,一个或多个接头序列中的每个接头序列是唯一的。在一些实施例中,融合多肽包括至少两个不同的接头序列。在一些实施例中,接头序列中的每个接头序列包括至少2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、15个、20个、25个或50个氨基酸残基。在一些实施例中,接头序列中的每个接头序列包括至多2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、15个、20个、25个、50个或100个氨基酸残基。在一些实施例中,一个或多个接头序列包括5到20个氨基酸残基。在一些实施例中,接头序列是非免疫原性的。在一些实施例中,接头序列未配置成形成二硫键。在一些实施例中,接头包括1到100个氨基酸残基、2到50个氨基酸残基或2到25个氨基酸残基。在一些实施例中,接头是柔性的。在一些实施例中,接头中的至少一个接头是柔性的。在一些实施例中,柔性接头包括小的非极性氨基酸,例如Gly、Ser和Thr。在一些实施例中,柔性接头包括Gly和Ser残基段,例如Gly-Gly-Gly-Gly-Ser。在一些实施例中,柔性接头包括序列KESGSVSSEQLAQFRSLD。在一些实施例中,柔性接头包括序列EGKSSGSGSESKST。在一些实施例中,柔性接头包括序列(Gly)<sub>z</sub>,并且z是5到10的整数。在一些实施例中,柔性接头包括序列(Gly)<sub>8</sub>。在一些实施例中,柔性接头包括序列GSAGSAAGSGEF。在一些实施例中,接头是刚性的。在一些实施例中,接头中的至少一个接头是刚性的。在一些实施例中,刚性接头可以形成 $\alpha$ 螺旋。在一些实施例中,刚性接头包括序列EAAAK。在一些实施例中,刚性接头包括序列Glu-Pro。在一些实施例中,刚性接头包括序列Lys-Pro。示例性接头序列可以包含Chen等人,《先进药物递送评论(Adv Drug Deliv Rev.)》2013年10月15日;65(10):1357-1369,“融合蛋白接头:特性、设计和功能(Fusion Protein Linkers:Property,Design and Functionality.)”中公开的接头序列。

[0318] 在一些实施例中,融合多肽被配置成促进接头的切割。在一些实施例中,所述融合多肽被配置成促进所述一个或多个抗原多肽中的至少一个抗原多肽的切割。在一些实施例中,接头是可切割的。在一些实施例中,接头中的至少一个接头是可切割的。可切割接头可以包括一个或多个可切割位点。在一些实施例中,接头序列中的至少一个接头序列包括切

割位点。在一些实施例中，切割位点可被细胞还原剂切割。例如，可切割位点可以包括二硫键，例如在接头上的两个半胱氨酸残基之间形成的二硫键。在一些实施例中，切割位点可被肽酶或蛋白酶切割。在一些实施例中，切割位点可被蛋白酶，例如Kex1、Ste13和Kex2切割。

[0319] 在一些实施例中，所述融合多肽被配置成促进所述一个或多个抗原多肽中的至少一个抗原多肽的呈递。在一些实施例中，接头包括可以促进抗原多肽呈递的上下文序列。在一些实施例中，接头序列中的至少一个接头序列包括赖氨酸残基、精氨酸残基、丝氨酸残基、天冬酰胺残基、组氨酸残基、丙氨酸残基、谷氨酰胺残基、天冬氨酸残基、甲硫氨酸残基、酪氨酸残基或其任何组合。在一些实施例中，接头序列中的至少一个接头序列包括与所述抗原多肽中的至少一个抗原多肽的N末端直接连接的赖氨酸残基、精氨酸残基或丙氨酸残基。在一些实施例中，接头序列中的至少一个接头序列包括与抗原多肽中的至少一个抗原多肽的C末端直接连接的丝氨酸残基、赖氨酸残基、精氨酸残基或丙氨酸残基。在一些实施例中，接头序列中的至少一个接头序列包括天冬氨酸残基、甲硫氨酸残基、亮氨酸残基、缬氨酸残基、异亮氨酸残基、酪氨酸残基、苯丙氨酸残基、色氨酸残基或其任何组合。在一些实施例中，接头序列中的至少一个接头序列包括与所述抗原多肽中的至少一个抗原多肽的N末端直接连接的天冬氨酸残基、甲硫氨酸残基、亮氨酸残基、酪氨酸残基或苯丙氨酸残基。在一些实施例中，接头序列中的至少一个接头序列包括与抗原多肽中的至少一个抗原多肽的C末端直接连接的甲硫氨酸残基、亮氨酸残基、缬氨酸残基、异亮氨酸残基、酪氨酸残基、苯丙氨酸残基或色氨酸残基。

[0320] 在一些实施例中，接头中的至少一个接头是功能性的。例如，接头可以被配置成提高融合多肽的表达水平，提高融合多肽的生物活性或使融合多肽能够靶向体内特定位点。再例如，接头可以被配置成影响融合多肽的PK和PD特性。

[0321] 靶向功能

[0322] 在一些实施例中，融合多肽被配置成靶向如体内靶位点等某些位点。例如，融合多肽可以具有一个或多个具有高亲和力或与靶位点结合的结合部分。示例性靶位点可以包含但不限于药剂、药物、蛋白质或多肽，以及如抗原呈递细胞等细胞。在一些实施例中，融合多肽包括一个或多个被配置成结合抗原呈递细胞、佐剂或试剂的结合部分。在一些实施例中，抗原呈递细胞是树突细胞(DC)、巨噬细胞、朗格汉斯细胞或B细胞。

[0323] 在一些实施例中，一个或多个结合部分被配置成结合一个或多个在如树突细胞等细胞上表达的受体。

[0324] 在一些实施例中，一个或多个受体包括钙依赖性(C型)凝集素受体、清道夫受体、F4/80受体、DC特异性跨膜蛋白(DC-STAMP)、Fc受体或其任何组合。

[0325] 在一些实施例中，C型凝集素受体是甘露糖受体、树突细胞特异性细胞间粘附分子-3-结合非整合素(DC-SIGN)受体、L-SIGN或DC-SIGNR受体、肝脏和淋巴结窦状细胞型凝集素(LSECTin)受体、C型凝集素免疫受体(CIRE)、langerin受体、人巨噬细胞半乳糖和N-乙酰半乳糖胺特异性C型凝集素受体、Dectin-1或 $\beta$ -葡聚糖受体、NK凝集素组受体-1、髓系抑制性C型凝集素受体、C型凝集素样受体2(CLEC2)、CLEC12B受体、氧化密度脂蛋白-1的凝集素样受体、DC免疫受体亚家族受体、DC免疫受体、Dectin-2受体或血液DC抗原。

[0326] 在一些实施例中，一个或多个受体包括Clec9a。

[0327] 在一些实施例中，一个或多个受体包括趋化因子受体。

- [0328] 在一些实施例中,一个或多个受体包括XCR1受体。
- [0329] 在一些实施例中,结合部分中的至少一个结合部分包括在支架多肽中。
- [0330] 在一些实施例中,结合部分中的至少一个结合部分与支架多肽之一的N末端或C末端直接连接。
- [0331] 在一些实施例中,结合部分中的至少一个结合部分与抗原多肽之一的N末端或C末端直接连接。
- [0332] 在一些实施例中,在所述N末端到所述C末端方向上,所述结合部分中的至少一个结合部分与支架多肽的第一个或最后一个支架多肽末端连接。
- [0333] 在一些实施例中,核酸分子编码至少2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个或20个不同的融合多肽。
- [0334] 在一些实施例中,核酸分子编码至多2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个或20个不同的融合多肽。
- [0335] 在一些实施例中,核酸分子是RNA或DNA。
- [0336] 一方面,本文公开了由所描述的核酸分子编码的融合多肽。
- [0337] 一方面,本文公开了包括所描述的融合多肽的组合物。在一些实施例中,所述组合物包括一个或多个能够与融合多肽缀合的结合部分。在一些实施例中,一个或多个结合部分与融合多肽缀合。
- [0338] 一方面,本文公开了核酸分子,其编码以下:两个或更多个支架多肽,所述两个或更多个支架多肽被一个或多个接头间隔;以及一个或多个限制性位点,所述一个或多个限制性位点定位于所述接头中的至少一个接头上,其中(i)所述两个或更多个支架多肽序列的分子质量大于11kDa,或者(ii)所述两个或更多个支架多肽序列中的每个支架多肽序列包括至少21个氨基酸残基。
- [0339] 一方面,本文公开了多种核酸分子,其包括:第一核酸分子,所述第一核酸分子包括:编码第一抗原多肽的核酸序列;以及编码第一支架多肽的核酸序列;以及第二核酸分子,所述第二核酸分子包括:包括与编码第一抗原多肽的所述核酸序列互补的序列的核酸序列和编码第二支架多肽的核酸序列。
- [0340] 另一方面,本文公开了多种核酸分子,其包括:第一核酸分子,所述第一核酸分子包括:编码第一抗原多肽的核酸序列;编码第一支架多肽的核酸序列;以及编码第二抗原多肽的核酸序列;以及第二核酸分子,所述第二核酸分子包括:包括与编码第二抗原多肽的所述核酸序列互补的序列的核酸序列和编码第二支架多肽的核酸序列。
- [0341] 在又另一方面,本文公开了多种核酸分子,其包括:第一核酸分子,所述第一核酸分子包括:编码第一抗原多肽的核酸序列;编码第一支架多肽的核酸序列;以及编码第二抗原多肽的核酸序列;以及第二核酸分子,所述第二核酸分子包括:包括与编码第二抗原多肽的所述核酸序列互补的序列的核酸序列;编码第二支架多肽的核酸序列;以及编码第三抗原多肽的核酸序列。
- [0342] 在一些实施例中,第一支架序列和第二支架序列相同。
- [0343] 在一些实施例中,第一抗原多肽和第二抗原多肽不同。
- [0344] 在一些实施例中,第一抗原多肽、第二抗原多肽、第三抗原多肽不同。
- [0345] 在一些实施例中,核酸分子是RNA或DNA。

[0346] 一方面,本文公开了一种药物组合物,其包括:药学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂以及所描述的组合物或所描述的融合多肽。

[0347] 在一些实施例中,药物组合物包括佐剂。

[0348] 在一些实施例中,佐剂是polyIC:LC。

[0349] 在一些实施例中,药物组合物包括pH调节剂。

[0350] 在一些实施例中,药物组合物包括第二治疗剂,如免疫调节剂、细胞因子、趋化因子或检查点抑制剂。

[0351] 一方面,本文公开了一种产生免疫原性融合多肽的方法,所述方法包括:在遗传修饰的细胞中表达所描述的核酸分子,由此产生所述免疫原性融合多肽。

[0352] 另一方面,本文公开了一种产生免疫原性融合多肽的方法,所述方法包括:提供如本文所描述的核酸分子;将编码一个或多个抗原多肽的一种或多种核酸分子插入所述限制性位点中的至少一个限制性位点,由此产生新的核酸分子;以及在遗传修饰的细胞中表达所述新的核酸分子,由此产生所述免疫原性融合多肽。

[0353] 在一些实施例中,编码一种或多种抗原多肽的一种或多种核酸分子通过等温反应或通过基于限制酶的克隆插入。

[0354] 一方面,本文公开了一种产生免疫原性融合多肽的方法,所述方法包括:提供如本文所描述的多个核酸分子;通过杂交接合所述核酸分子;以及在遗传修饰的细胞中表达所接合的核酸分子,由此产生所述免疫原性融合多肽。

[0355] 在一些实施例中,融合多肽在细菌表达系统中表达。

[0356] 在一些实施例中,细菌表达系统是大肠杆菌表达系统。

[0357] 一方面,本文公开了一种治疗或预防有需要的人类受试者的癌症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用如本文所描述的组合物。

[0358] 在一些实施例中,药物组合物包括多个新抗原肽。

[0359] 在一些实施例中,药物组合物包括多个融合多肽。

[0360] 在一些实施例中,药物组合物静脉内或皮下施用。

[0361] 在一些实施例中,融合多肽的剂量被分成至少2个、至少3个、至少4个或至少5个亚剂量。

[0362] 在一些实施例中,融合多肽的每个亚剂量包括1个、2个、3个、4个、5个或更多个融合多肽。

[0363] 在一些实施例中,每个融合多肽以0.01-100 $\mu$ g的剂量施用。

[0364] 在一些实施例中,每个融合多肽以100 $\mu$ g-10mg的剂量施用。

[0365] 在一些实施例中,施用的融合多肽的总剂量为0.1-100mg。

[0366] 新抗原和其用途

[0367] 开发治愈性和肿瘤特异性免疫疗法的关键障碍之一是鉴定和选择高度特异性和限制性的肿瘤抗原以避免自身免疫。由于恶性细胞内的遗传变化(例如,倒位、易位、缺失、错义突变、剪接位点突变等)而产生的肿瘤新抗原表示最具肿瘤特异性的一类抗原。由于在鉴定肿瘤新抗原、选择优化的抗原和产生用于疫苗或免疫原性组合物的新抗原方面的技术困难,因此很少将新抗原用于癌症疫苗或免疫原性组合物中。这些问题可以通过以下解决:鉴定瘤形成/肿瘤中的突变,所述突变以DNA水平存在于肿瘤中,但不存在于来自高比例的

患有癌症的受试者的匹配种系样品中；用一个或多个肽-MHC结合预测算法分析鉴定的突变，以生成多个新抗原T细胞表位，所述多个新抗原T细胞表位在瘤形成/肿瘤内表达并与高比例的患者HLA等位基因结合；以及合成选自所有新抗原肽组的多个新抗原性肽和预测的结合肽，用于适用于治疗高比例的患有癌症的受试者的癌症疫苗或免疫原性组合物。

[0368] 例如，将肽测序信息翻译为治疗性疫苗可以包含预测可以与高比例的个体的HLA分子结合的突变肽。有效地选择将哪些特定突变用作免疫原需要预测哪些突变肽将有效地与高比例的患者HLA等位基因结合的能力。最近，具有经过验证的结合和非结合肽的基于神经网络的学习方法提高了针对主要HLA-A和HLA-B等位基因的预测算法的准确性。然而，即使使用先进的基于神经网络的算法来编码HLA肽结合规则，也有若干个因素限制了预测HLA等位基因上呈递的肽的能力。

[0369] 将肽测序信息翻译为治疗性疫苗的另一个实例可以包含将药物调配成长肽的多表位疫苗。实际尽可能多地靶向突变表位利用了免疫系统的巨大容量，通过下调免疫靶向基因产物来防止免疫逃逸的机会，并且弥补已知的表位预测方法的不准确性。本文提供了包括多个表位的多肽，用于生成治疗性产物或疫苗，其中多肽在宿主细胞中由多核苷酸表达或通过体外翻译表达。在一些实施例中，可以合成制造多肽。如所描述的，包括多个表位的多肽可以进一步包括一个或多个支架蛋白。在一些实施例中，本文提供了包括多个表位、支架蛋白和接头的合成多功能抗体，用作治疗性疫苗。

[0370] 将肽测序信息翻译为治疗性疫苗的另一个实例可以包含与强疫苗佐剂的组合。有效的疫苗可能需要强佐剂来引发免疫应答。例如，poly-ICLC，即TLR3和MDA5和RIG3的RNA解旋酶结构域的激动剂，已示出疫苗佐剂的若干个期望特性。这些特性包含在体内诱导免疫细胞的局部和全身激活、刺激性趋化因子和细胞因子的产生以及通过DC刺激抗原呈递。此外，poly-ICLC可以在人中诱导持久的CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>应答。重要的是，在接种了poly-ICLC的受试者和接种了高效、具有复制能力的黄热病疫苗的志愿者中发现了转录和信号转导途径的上调有惊人的类似性。此外，在最近的1期研究中，用poly-ICLC组合NYESO-1肽疫苗(除了Montanide)免疫的>90%的卵巢癌患者示出CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup> T细胞的诱导，以及对肽的抗体应答。同时，迄今为止，poly-ICLC已在超过25项临床试验中进行了广泛测试，并且展现出相对良性的毒性特征。

[0371] 在一些方面，本文提供了一种组合物，其包括：包括蛋白质的第一新表位的第一肽和包括相同蛋白质的第二新表位的第二肽；编码第一肽和第二肽的多核苷酸；包括第一肽和第二肽的一个或多个APC或对与HLA蛋白复合的第一新表位具有特异性的第一T细胞受体(TCR)以及对与HLA蛋白复合的第二新表位具有特异性的第二TCR；其中第一肽不同于第二肽，并且其中第一新表位包括突变且第二新表位包括相同突变。

[0372] 在一些方面，本文提供了一种组合物，其包括：包括蛋白质区域的第一新表位的第一肽和包括相同蛋白质区域的第二新表位的第二肽，其中第一新表位和第二新表位包括相同区域的至少一个氨基酸；编码第一肽和第二肽的多核苷酸；包括第一肽和第二肽的一个或多个APC或对与HLA蛋白复合的第一新表位具有特异性的第一T细胞受体(TCR)以及对与HLA蛋白复合的第二新表位具有特异性的第二TCR；其中第一肽不同于第二肽，并且其中第一新表位包括第一突变且第二新表位包括第二突变。

[0373] 在一些实施例中，所述第一突变和所述第二突变是相同的。在一些实施例中，所述

第一肽和所述第二肽是不同的分子。在一些实施例中，第一新表位包括相同蛋白质区域的第一新表位，其中第二新表位包括相同蛋白质区域的第二新表位。在一些实施例中，第一新表位和第二新表位包括相同区域的至少一个氨基酸。在一些实施例中，蛋白质区域包括至少9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个、40个、50个、60个、70个、80个、90个、100个、150个、200个、250个、300个、350个、400个、450个、500个、600个、700个、800个、900或1,000个蛋白质的连续氨基酸。在一些实施例中，蛋白质区域包括至多10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个、40个、50个、60个、70个、80个、90个、100个、150个、200个、250个、300个、350个、400个、450个、500个、600个、700个、800个、900或1,000个蛋白质的连续氨基酸。在一些实施例中，第一新表位与I类HLA蛋白结合以形成I类HLA-肽复合物。在一些实施例中，第二新表位与II类HLA蛋白结合以形成II类HLA-肽复合物。在一些实施例中，第二新表位与I类HLA蛋白结合以形成I类HLA-肽复合物。在一些实施例中，第一新表位与II类HLA蛋白结合以形成II类HLA-肽复合物。在一些实施例中，第一新表位是由第一肽处理的第一新表位肽和/或第二新表位是由第二肽处理的第二新表位肽。在一些实施例中，第一新表位的长度短于第一肽的长度和/或第二新表位的长度短于第二肽的长度。在一些实施例中，第一新表位肽由包括第一肽的抗原呈递细胞 (APC) 处理和/或第二新表位肽由包括第二肽的APC处理。在一些实施例中，第一新表位激活CD8<sup>+</sup> T细胞。在一些实施例中，第二新表位激活CD4<sup>+</sup> T细胞。在一些实施例中，第二新表位激活CD8<sup>+</sup> T细胞。在一些实施例中，第一新表位激活CD4<sup>+</sup> T细胞。在一些实施例中，CD4<sup>+</sup> T细胞的TCR与包括第一肽或第二肽的II类HLA-肽复合物结合。在一些实施例中，CD8<sup>+</sup> T细胞的TCR与包括第一肽或第二肽的I类HLA-肽复合物结合。在一些实施例中，CD4<sup>+</sup> T细胞的TCR与包括第一肽或第二肽的I类HLA-肽复合物结合。在一些实施例中，CD8<sup>+</sup> T细胞的TCR与包括第一肽或第二肽的II类HLA-肽复合物结合。在一些实施例中，一个或多个APC包括包含第一肽的第一APC和包含第二肽的第二APC。在一些实施例中，突变选自以下组成的组：点突变、剪接位点突变、移码突变、通读突变、基因融合突变和其任何组合。

[0374] 在一些实施例中，单一多肽包括第一肽和第二肽，或者单一多核苷酸编码第一肽和第二肽。在一些实施例中，第一肽和第二肽由从相同转录起始位点转录的序列编码。在一些实施例中，第一肽由从第一转录起始位点转录的序列编码，并且第二肽由从第二转录起始位点转录的序列编码。在一些实施例中，单一多肽的长度为至少18;19;20;21;22;23;24;25;26;27;28;29;30;40;50;60;70;80;90;100;150;200;250;300;350;400;450;500;600;700;800;900;1,000;1,500;2,000;2,500;3,000;4,000;5,000;7,500;或10,000个氨基酸。在一些实施例中，多肽包括与第一对应的野生型序列具有至少60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的第一序列；以及与对应的第二野生型序列具有至少60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的第二序列。在一些实施例中，多肽包括至少8个或9个连续氨基酸的与对应的第一野生型序列具

有至少60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的第一序列；以及至少16个或17个连续氨基酸的与对应的第二野生型序列具有至少60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的第二序列。在一些实施例中，第二肽比第一肽长。在一些实施例中，第一肽比第二肽长。在一些实施例中，第一肽的长度为至少9；10；11；12；13；14；15；16；17；；18；19；20；21；22；23；24；25；26；27；28；29；30；40；50；60；70；80；90；100；150；200；250；300；350；400；450；500；600；700；800；900；1,000；1,500；2,000；2,500；3,000；4,000；5,000；7,500；或10,000个氨基酸。在一些实施例中，第二肽的长度为至少17；18；19；20；21；22；23；24；25；26；27；28；29；30；40；50；60；70；80；90；100；150；200；250；300；350；400；450；500；600；700；800；900；1,000；1,500；2,000；2,500；3,000；4,000；5,000；7,500；或10,000个氨基酸。在一些实施例中，第一肽包括至少9个连续氨基酸的与对应的野生型序列具有至少60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列。在一些实施例中，第二肽包括至少17个连续氨基酸的与对应的野生型序列具有至少60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列。在一些实施例中，第二新表位比第一新表位长。在一些实施例中，第一新表位的长度为至少8个氨基酸。在一些实施例中，第一新表位的长度为8到12个氨基酸。在一些实施例中，第一新表位包括至少8个连续氨基酸的序列，其中8个连续氨基酸中的至少2个在野生型序列的对应位置处不同。在一些实施例中，第二新表位的长度为至少16个氨基酸。在一些实施例中，第二新表位的长度为16到25个氨基酸。在一些实施例中，第二新表位包括至少16个连续氨基酸的序列，其中16个连续氨基酸中的至少2个在野生型序列的对应位置处不同。

[0375] 在一些实施例中，第一肽包括至少一个另外的突变。在一些实施例中，至少一个另外的突变中的一个或多个不是第一新表位中的突变。在一些实施例中，至少一个另外的突变中的一个或多个是第一新表位中的突变。在一些实施例中，第二肽包括至少一个另外的突变。在一些实施例中，至少一个另外的突变中的一个或多个不是第二新表位中的突变。在一些实施例中，至少一个另外的突变中的一个或多个是第二新表位中的突变。在一些实施例中，第一肽、第二肽或两者包括至少一个侧翼序列，其中至少一个侧翼序列处于新表位的上游或下游。在一些实施例中，至少一个侧翼序列与对应的野生型序列具有至少60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性。在一些实施例中，至少一个侧翼序列包括非野生型序列。在一些实施例中，至少一个侧翼序列是N末端侧翼序列。在一些实施例中，至少一个侧翼序列是C末端侧翼序列。在一些实施例中，第一肽的至少

一个侧翼序列与第二肽的至少一个侧翼序列具有至少60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性。在一些实施例中，第一肽的至少一个侧翼区不同于第二肽的至少一个侧翼区。在一些实施例中，至少一个侧翼残基包括突变。

[0376] 在一些实施例中，组合物包括一个或多个另外的肽，其中一个或多个另外的肽包括第三新表位。在一些实施例中，第一新表位和/或第二新表位以比对应的野生型序列更高的亲和力与HLA蛋白结合。在一些实施例中，第一新表位和/或第二新表位以小于1000nM、900nM、800nM、700nM、600nM、500nM、250nM、150nM、100nM、50nM、25nM或10nM的 $K_D$ 或 $IC_{50}$ 与HLA蛋白结合。在一些实施例中，第一新表位和/或第二新表位以小于1000nM、900nM、800nM、700nM、600nM、500nM、250nM、150nM、100nM、50nM、25nM或10nM的 $K_D$ 或 $IC_{50}$ 与HLA I类蛋白结合。在一些实施例中，第一新表位和/或第二新表位以小于1000nM、900nM、800nM、700nM、600nM、500nM、250nM、150nM、100nM、50nM、25nM或10nM的 $K_D$ 或 $IC_{50}$ 与HLA II类蛋白结合。在一些实施例中，第一新表位和/或第二新表位与由受试者表达的HLA等位基因编码的蛋白质结合。在一些实施例中，突变不存在于受试者的非癌细胞中。在一些实施例中，第一新表位和/或第二新表位由受试者癌细胞的基因或表达基因编码。

[0377] 在一些实施例中，包括具有多个表位的多功能抗体的组合物能够激活包括第一TCR的第一T细胞。在一些实施例中，具有多个表位的组合物能够激活包括第二TCR的第二T细胞。在一些实施例中，第一和/或第二T细胞是细胞毒性T细胞。在一些实施例中，第一和/或第二T细胞是 $\gamma$   $\delta$ T细胞。在一些实施例中，第一和/或第二T细胞是辅助T细胞。在一些实施例中，第一T细胞是用第一新表位刺激、扩增或诱导的T细胞和/或第二T细胞是用第二新表位刺激、扩增或诱导的T细胞。

[0378] 在一些实施例中，第一TCR和/或第二TCR以小于1000nM、900nM、800nM、700nM、600nM、500nM、250nM、150nM、100nM、50nM、25nM或10nM的 $K_D$ 或 $IC_{50}$ 与HLA肽复合物结合。在一些方面，本文提供了一种载体，其包括编码本文所描述的第一肽和第二肽的多核苷酸。在一些实施例中，多核苷酸与启动子可操作地连接。在一些实施例中，载体是自扩增的RNA复制子、质粒、噬菌体、转座子、粘粒、病毒或病毒粒子。在一些实施例中，载体是病毒载体。在一些实施例中，载体衍生自逆转录病毒、慢病毒、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒、痘病毒、 $\alpha$ 病毒、牛痘病毒、乙型肝炎病毒、人乳头瘤病毒或其假型。在一些实施例中，载体是非病毒载体。在一些实施例中，非病毒载体是纳米颗粒、阳离子脂质、阳离子聚合物、金属纳米聚合物、纳米棒、脂质体、胶束、微泡、细胞穿透肽或脂质球。

[0379] 在一些方面，本文提供了一种药物组合物，其包括：本文所描述的组合物或本文所描述的载体；以及药学上可接受的赋形剂。

[0380] 在一些实施例中，多个细胞是自体细胞。在一些实施例中，多个APC细胞是自体细胞。在一些实施例中，多个T细胞是自体细胞。在一些实施例中，药物组合物进一步包括免疫调节剂或佐剂。在一些实施例中，免疫调节剂是细胞因子。在一些实施例中，佐剂是Hiltonol。

[0381] 在一些方面，本文提供了一种治疗癌症的方法，所述方法包括向有需要的受试者施用本文所描述的药物组合物。

[0382] 在一些方面,本文提供了一种预防对癌症疗法产生抗性的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用本文所描述的药物组合物。

[0383] 在一些方面,本文提供了一种诱导免疫应答的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用本文所描述的药物组合物。

[0384] 在一些实施例中,所述免疫应答是体液应答。

[0385] 在一些实施例中,本文提供的了包括一个或多个表位肽的多肽和一起形成多功能抗体的支架蛋白。在一些实施例中,多功能抗体是均聚物。在一些实施例中,多功能抗体包括多个第一肽。在一些实施例中,多功能抗体包括多个第二肽。在一些实施例中,多功能抗体包括多个第三肽。在一些实施例中,第一肽和第二肽同时、分别或依次施用。在一些实施例中,第一肽在第二肽之后依次施用。在一些实施例中,第二肽在第一肽之后依次施用。在一些实施例中,第一肽在足以使第二肽激活T细胞的时间段后依次施用。在一些实施例中,第二肽在足以使第一肽激活T细胞的时间段后依次施用。在一些实施例中,第一肽在第二肽之后依次施用以重新刺激T细胞。在一些实施例中,第二肽在第一肽之后依次施用以重新刺激T细胞。在一些实施例中,施用第一肽以刺激T细胞并且在施用第一肽后施用第二肽以重新刺激T细胞。在一些实施例中,施用第二肽以刺激T细胞并且在施用第二肽后施用第一肽以重新刺激T细胞。

[0386] 在一些实施例中,本文提供的了包括一个或多个表位肽的多肽和一起形成多功能抗体的支架蛋白。在一些实施例中,多功能抗体是杂聚物。在一些实施例中,多功能抗体包括多个第一肽以及多个第二肽和/或第三肽和/或第四肽和/或第五肽和/或第六肽和/或超过六种肽。在一些实施例中,多功能抗体包括多个第三肽。在一些实施例中,受试者患有癌症,其中癌症选自由以下组成的组:黑色素瘤、卵巢癌、肺癌、前列腺癌、乳腺癌、结直肠癌、子宫内膜癌和慢性淋巴细胞白血病 (CLL)。在一些实施例中,受试者患有对抗雌激素疗法有抗性的乳腺癌。在一些实施例中,乳腺癌表达具有突变的雌激素受体。在一些实施例中,受试者患有对依鲁替尼 (ibrutinib) 疗法有抗性的CLL。在一些实施例中,CLL表达具有如C481S突变等突变的布鲁顿酪氨酸激酶 (Bruton tyrosine kinase)。在一些实施例中,受试者患有对酪氨酸激酶抑制剂有抗性的肺癌。在一些实施例中,肺癌表达具有如T790M、L792F或C797S突变等突变的表皮生长因子受体 (EGFR)。在一些实施例中,将包括第一肽的多个APC细胞和包括第二肽的多个APC细胞同时、分别或依次施用。在一些实施例中,所述方法进一步包括施用至少一种另外的治疗剂或模式。在一些实施例中,至少一种另外的治疗剂或模式是外科手术、检查点抑制剂、抗体或其片段、化学化疗剂、放射、疫苗、小分子、T细胞、载体和APC、多核苷酸、溶瘤剂病毒或其任何组合。在一些实施例中,至少一种另外的治疗剂是抗PD-1剂和抗PD-L1剂、抗CTLA-4剂或抗CD40剂。在一些实施例中,在施用根据本文所描述的药物组合物之前、同时或之后施用另外的治疗剂。在一些实施例中,另外的治疗剂是趋化因子或细胞因子。示例性细胞因子是白细胞介素,如IL-1、IL-12或多于两种细胞因子、多于三种细胞因子或多于四种细胞因子等的组合。

[0387] 肽

[0388] 多肽或肽可以是各种长度,呈其中性 (不带电荷) 形式或盐形式,并且没有修饰,如糖基化、侧链氧化或磷酸化或者含有这些修饰,条件是修饰不会破坏如本文所描述的多肽的生物活性。

[0389] 在一些实施例中,测序方法用于鉴定肿瘤特异性突变。根据本公开可以使用任何合适的测序方法,例如下一代测序(NGS)技术。第三代测序方法可能会在未来取代NGS技术,以加快所述方法的测序步骤。出于说明目的:在本公开的上下文中,术语“下一代测序”或“NGS”意指所有新型高通量测序技术,与称为桑格化学(Sanger chemistry)的“常规”测序方法相比,所述新型高通量测序技术通过将整个基因组分成小块,沿着整个基因组随机平行读取核酸模板。此类NGS技术(也称为大规模并行测序技术)能够在很短的时间段内,例如1到2周内,例如1到7天或不到24小时内递送全基因组、外显子组、转录组(基因组的所有转录序列)或甲基化组(基因组的所有甲基化序列)的核酸序列信息,并且允许单细胞测序方法。可以在本公开的上下文中使用可商购获得的或文献中提及的多个NGS平台,例如WO 2012/159643中详细描述的那些。

[0390] 在某些实施例中,本文所描述的肽可以包括但不限于约5、约6、约7、约8、约9、约10、约11、约12、约13、约14、约15、约16、约17、约18、约19、约20、约21、约22、约23、约24、约25、约26、约27、约28、约29、约30、约31、约32、约33、约34、约35、约36、约37、约38、约39、约40、约41、约42、约43、约44、约45、约46、约47、约48、约49、约50、约60、约70、约80、约90、约100、约110、约120、约150、约200、约300、约350、约400、约450、约500、约600、约700、约800、约900、约1,000、约1,500、约2,000、约2,500、约3,000、约4,000、约5,000、约7,500、约10,000个氨基酸或更多个氨基酸残基以及其中可衍生的任何范围。在具体实施例中,新抗原性肽分子等于或小于100个氨基酸。

[0391] 在一些实施例中,肽的长度可以为约8到约50个氨基酸残基或长度为约8到约30、约8到约20、约8到约18、约8到约15或约8到约12个氨基酸残基。在一些实施例中,肽的长度可以为约8到约500个氨基酸残基或长度为约8到约450、约8到约400、约8到约350、约8到约300、约8到约250、约8到约200、约8到约150、约8到约100、约8到约50或约8到约30个氨基酸残基。

[0392] 在一些实施例中,肽的长度可以为至少8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个、31个、32个、33个、34个、35个、36个、37个、38个、39个、40个、41个、42个、43个、44个、45个、46个、47个、48个、49个、50个或更多个氨基酸残基。在一些实施例中,肽的长度可以为至少8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个、31个、32个、33个、34个、35个、36个、37个、38个、39个、40个、41个、42个、43个、44个、45个、46个、47个、48个、49个、50个、55个、60个、70个、80个、90个、100个、150个、200个、250个、300个、350个、400个、450个、500个或更多个氨基酸残基。在一些实施例中,肽的长度可以为至多8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个、31个、32个、33个、34个、35个、36个、37个、38个、39个、40个、41个、42个、43个、44个、45个、46个、47个、48个、49个、50个或更少个氨基酸残基。在一些实施例中,肽的长度可以为至多8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个、31个、32个、33个、34个、35个、36个、37个、38个、39个、40个、41个、42个、43个、44个、45个、46个、47个、48个、49个、50个、55个、60个、70个、80个、90个、100个、150个、200个、250个、300个、350个、400个、450个、500个或更少个氨

氨基酸残基。

[0393] 在一些实施例中,肽的总长度为至少8、至少9、至少10、至少11、至少12个、至少13个、至少14个、至少15个、至少16个、至少17个、至少18个、至少19个、至少20个、至少21个、至少22个、至少23个、至少24个、至少25个、至少26个、至少27个、至少28个、至少29个、至少30个、至少40个、至少50个、至少60个、至少70个、至少80个、至少90个、至少100个、至少150个、至少200个、至少250个、至少300个、至少350个、至少400个、至少450个或至少500个氨基酸。

[0394] 在一些实施例中,肽的总长度为至多8、至多9、至多10、至多11、至多12个、至多13个、至多14个、至多15个、至多16个、至多17个、至多18个、至多19个、至多20个、至多21个、至多22个、至多23个、至多24个、至多25个、至多26个、至多27个、至多28个、至多29个、至多30个、至多40个、至多50个、至多60个、至多70个、至多80个、至多90个、至多100个、至多150个、至多200个、至多250个、至多300个、至多350个、至多400个、至多450个或至多500个氨基酸。

[0395] 可以通过若干种方式设计较长的肽。在一些实施例中,当预测或已知HLA结合肽时,较长的肽包括(1)向每个对应基因产物的N末端和C末端延伸2到5个氨基酸的单个结合肽;或(2)串联的各自具有延伸序列的结合肽中的一些或所有结合肽。在其它实施例中,当测序揭示了存在于肿瘤中的长的(>10个残基)新表位序列时(例如,由于移码、通读或导致新型肽序列的内含子包含),较长的肽可以由整段新型肿瘤特异性氨基酸作为单个较长的肽或若干个重叠的较长肽组成。在一些实施例中,假定使用较长的肽以允许患者细胞进行内源性处理并且可能导致更有效的抗原呈递和T细胞应答的诱导。在一些实施例中,可以使用两个或更多个肽,其中肽重叠并且平铺在长的新抗原性肽上。

[0396] 在一些实施例中,肽的pI值可以为约0.5到约12、约2到约10或约4到约8。在一些实施例中,肽的pI值可以为至少4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5或更大。在一些实施例中,肽的pI值可以为至多4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5或更小。

[0397] 在一些实施例中,本文所描述的肽可以呈溶液、冻干的或可以呈晶体形式。在一些实施例中,本文所描述的肽可以通过重组DNA技术或化学合成以合成方式制备或可以从如天然肿瘤或病原生物等天然来源中分离。新表位可以单独合成或直接或间接在肽中接合。尽管本文所描述的肽可以基本上不含其它天然存在的宿主细胞蛋白和其片段,但在一些实施例中,肽可以以合成方式缀合以与天然片段或颗粒接合。

[0398] 在一些实施例中,本文所描述的肽可以以多种方式制备。在一些实施例中,肽可以在如细菌等宿主细胞中表达。在一些实施例中,可以根据常规技术在溶液中或在固体支持物上合成肽。各种自动合成器可商购获得并且可以根据已知的方案使用。参见例如Stewart和Young,《固相肽合成(Solid Phase Peptide Synthesis)》,第2版编辑,皮尔斯化学品公司(Pierce Chemical Co.),1984。进一步地,可以使用化学连接来接合各个肽以产生仍在本公开范围内的较大的肽。

[0399] 可替代地,可以使用重组DNA技术,其中将编码肽的核苷酸序列插入表达载体中,转化或转染到合适的宿主细胞中,并且在适合表达的条件下培养。这些程序在本领域中通常是已知的,如Sambrook等人,《分子克隆:实验室手册(Molecular Cloning, A Laboratory Manual)》,纽约冷泉港的冷泉港出版社(Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y.) (1989)中总体描述的。因此,包括一个或多个本文所描述的新抗原性肽的重组肽可以用于呈递合适的T细胞表位。

[0400] 在一些实施例中，肽由具有导致天然肽的氨基酸取代的点突变的基因编码。在一些实施例中，肽由具有导致移码突变的点突变的基因编码。当突变破坏基因密码子周期性的正常阶段（也称为“阅读框”）时，就会发生移码，从而导致非天然蛋白质序列的翻译。基因中的不同突变有可能实现相同的改变阅读框。在一些实施例中，肽由具有突变的基因编码，所述突变导致融合多肽、同框缺失、插入、内源性逆转录病毒多肽的表达和多肽的肿瘤特异性过表达。在一些实施例中，肽由第一基因与第二基因的融合编码。在一些实施例中，肽由第一基因与第二基因的同框融合编码。在一些实施例中，肽由第一基因与第一基因的剪接变体的外显子的融合编码。在一些实施例中，肽由第一基因与第一基因的隐蔽外显子的融合编码。在一些实施例中，肽由第一基因与第二基因的融合编码，其中所述肽包括由融合产生的非同框序列编码的氨基酸序列。

[0401] 在一些方面，本公开提供了包括至少两个或多于两个肽的组合物。在一些实施例中，本文所描述的组合物含有至少两个不同的肽。在一些实施例中，本文所描述的组合物含有包括第一新表位的第一肽和包括第二新表位的第二肽。在一些实施例中，第一肽和第二肽衍生自相同蛋白质。至少两个不同的肽可以因长度、氨基酸序列或两者而异。肽可以衍生自任何已知或已被发现含有肿瘤特异性突变的蛋白质。在一些实施例中，本文所描述的组合物包括包含蛋白质的第一新表位的第一肽和包含相同蛋白质的第二新表位的第二肽，其中第一肽不同于第二肽，并且其中第一新表位包括突变且第二新表位包括相同突变。在一些实施例中，本文所描述的组合物包括包含蛋白质第一区域的第一新表位的第一肽和包含相同蛋白质第二区域的第二新表位的第二肽，其中第一区域包括第二区域的至少一个氨基酸，其中第一肽不同于第二肽，并且其中第一新表位包括第一突变并且第二新表位包括第二突变。在一些实施例中，所述第一突变和所述第二突变是相同的。在一些实施例中，突变选自自由以下组成的组：点突变、剪接位点突变、移码突变、通读突变、基因融合突变和其任何组合。

[0402] 在一些实施例中，肽可以衍生自具有取代突变的蛋白质，例如KRAS G12C、G12D、G12V、Q61H或Q61L突变或NRAS Q61K或Q61R突变。取代可以定位于沿着肽长度的任何位置。例如，取代可以定位于肽的N末端三分之一、肽的中央三分之一或肽的C末端三分之一中。在另一个实施例中，经取代的残基定位于距N末端2到5个残基或距C末端2到5个残基处。肽可以类似地衍生自肿瘤特异性插入突变，其中肽包括插入的残基的一个或多个或所有插入的残基。在一些实施例中，第一新表位和/或第二新表位以比没有取代的对应新表位更大的亲和力与HLA蛋白结合。在一些实施例中，第一新表位和/或第二新表位以比没有取代的对应野生型序列更大的亲和力与HLA蛋白结合。

[0403] 在一些实施例中，第一肽包括至少一个另外的突变。在一些实施例中，至少一个另外的突变中的一个或多个不是第一新表位中的突变。在一些实施例中，至少一个另外的突变中的一个或多个是第一新表位中的突变。在一些实施例中，第二肽包括至少一个另外的突变。在一些实施例中，至少一个另外的突变中的一个或多个不是第二新表位中的突变。在一些实施例中，至少一个另外的突变中的一个或多个是第二新表位中的突变。

[0404] 在一些方面中，本公开提供了包括单一多肽的组合物，所述单一多肽包括第一肽和第二肽，或者单一多核苷酸编码第一肽和第二肽。在一些实施例中，本文提供的组合物包括一个或多个另外的肽，其中一个或多个另外的肽包括第三新表位。在一些实施例中，第一

肽和第二肽由从相同转录起始位点转录的序列编码。在一些实施例中，第一肽由从第一转录起始位点转录的序列编码，并且第二肽由从第二转录起始位点转录的序列编码。在一些实施例中，其中多肽的长度为至少26;27;28;29;30;40;50;60;70;80;90;100;150;200;250;300;350;400;450;500;600;700;800;900;1,000;1,500;2,000;2,500;3,000;4,000;5,000;7,500;或10,000个氨基酸。在一些实施例中，多肽包括与对应的野生型序列具有至少60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的第一序列;以及与对应的野生型序列具有至少60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的第二序列。在一些实施例中，多肽包括至少8个或9个连续氨基酸的与对应的野生型序列具有至少60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的第一序列;以及至少16个或17个连续氨基酸的与对应的野生型序列具有至少60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的第二序列。

[0405] 在一些实施例中，第二肽比第一肽长。在一些实施例中，第一肽比第二肽长。在一些实施例中，第一肽的长度为至少9;10;11;12;13;14;15;16;17;18;19;20;21;22;23;24;25;26;27;28;29;30;40;50;60;70;80;90;100;150;200;250;300;350;400;450;500;600;700;800;900;1,000;1,500;2,000;2,500;3,000;4,000;5,000;7,500;或10,000个氨基酸。在一些实施例中，第二肽的长度为至少17;18;19;20;21;22;23;24;25;26;27;28;29;30;40;50;60;70;80;90;100;150;200;250;300;350;400;450;500;600;700;800;900;1,000;1,500;2,000;2,500;3,000;4,000;5,000;7,500;或10,000个氨基酸。在一些实施例中，第一肽包括至少9个连续氨基酸的与对应的野生型序列具有至少60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列。在一些实施例中，第二肽包括至少17个连续氨基酸的与对应的野生型序列具有至少60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的序列。

[0406] 在一些实施例中，第一肽、第二肽或两者包括至少一个侧翼序列，其中至少一个侧翼序列处于新表位的上游或下游。在一些实施例中，至少一个侧翼序列与对应的野生型序列具有至少60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性。

在一些实施例中,至少一个侧翼序列包括非野生型序列。在一些实施例中,至少一个侧翼序列是N末端侧翼序列。在一些实施例中,至少一个侧翼序列是C末端侧翼序列。在一些实施例中,第一肽的至少一个侧翼序列与第二肽的至少一个侧翼序列具有至少60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性。在一些实施例中,第一肽的至少一个侧翼区不同于第二肽的至少一个侧翼区。在一些实施例中,至少一个侧翼残基包括突变。

[0407] 在一些实施例中,肽包括包含至少一个突变氨基酸的新表位序列。在一些实施例中,肽包括新表位序列,所述新表位序列包括至少1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个或更多个突变氨基酸。在一些实施例中,肽包括新表位序列,所述新表位序列衍生自包括至少一个突变氨基酸和至少1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个或更多个非突变氨基酸的蛋白质。在一些实施例中,肽包括新表位序列,所述新表位序列衍生自包括至少一个突变氨基酸和至少一个突变氨基酸上游的至少1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个或更多个非突变氨基酸的蛋白质。在一些实施例中,肽包括新表位序列,所述新表位序列衍生自包括至少一个突变氨基酸和至少一个突变氨基酸下游的至少1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个或更多个非突变氨基酸的蛋白质。在一些实施例中,肽包括衍生自蛋白质的新表位序列,所述蛋白质包括至少一个突变氨基酸;至少一个突变氨基酸上游的至少1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个或更多个非突变氨基酸的蛋白质;以及至少一个突变氨基酸下游的至少1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个或更多个非突变氨基酸的蛋白质。

[0408] 在一些实施例中,肽包括衍生自包括至少一个突变氨基酸的蛋白质的新表位序列和与对应的野生型序列具有至少60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的至少一个突变氨基酸上游的序列。在一些实施例中,肽包括衍生自包括至少一个突变氨基酸的蛋白质的新表位序列和与对应的野生型序列具有至少60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的至少一个突变氨基酸下游的序列。在一些实施例中,肽包括衍生自包括至少一个突变氨基酸的蛋白质的新

表位序列、与对应野生型序列具有至少60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的至少一个突变氨基酸上游的序列以及与对应的野生型序列具有至少60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的至少一个突变氨基酸下游的序列。

[0409] 在一些实施例中,肽包括衍生自包括至少一个突变氨基酸的蛋白质的新表位序列和包括至少1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个或更多个连续氨基酸的至少一个突变氨基酸上游的序列,所述序列与对应的野生型序列具有至少60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性。在一些实施例中,肽包括衍生自包括至少一个突变氨基酸的蛋白质的新表位序列和包括至少1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个或更多个连续氨基酸的至少一个突变氨基酸下游的序列,所述序列与对应的野生型序列具有至少60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性。在一些实施例中,肽包括衍生自包括至少一个突变氨基酸的蛋白质的新表位序列;包括至少1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个或更多个连续氨基酸的至少一个突变氨基酸上游的序列,所述序列与对应的野生型序列具有至少60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性;包括至少1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个或更多个连续氨基酸的至少一个突变氨基酸下游的序列,所述序列与对应的野生型序列具有至少60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性。

#### [0410] 肽修饰

[0411] 在一些实施例中,本公开包含经修饰的肽。修饰可以包含不改变抗原性肽本身的一级氨基酸序列的共价化学修饰。修饰可以产生具有期望特性的肽,例如延长体内半衰期、增加稳定性、降低清除率、改变免疫原性或过敏原性、能够产生特定抗体、细胞靶向、抗原摄

取、抗原处理、HLA亲和力、HLA稳定性或抗原呈递。在一些实施例中，肽可以包括一个或多个序列，所述一个或多个序列增强APC对表位的处理和呈递，例如用于生成免疫应答。

[0412] 在一些实施例中，可以修饰肽以提供期望的属性。例如，肽诱导CTL活性的能力可以通过与含有至少一个能够诱导T辅助细胞应答的表位的序列连接来增强。在一些实施例中，免疫原性肽/T辅助缀合物通过间隔分子连接。在一些实施例中，间隔子包括相对较小的中性分子，如氨基酸或氨基酸模拟物，它们在生理条件下基本上不带电。间隔子可以选自例如Ala、Gly或非极性氨基酸或中性极性氨基酸的其它中性间隔子。应当理解，任选地存在的间隔子不需要包含相同的残基，因此可以是异源寡聚体或同源寡聚体。新抗原性肽可以直接或通过肽的氨基或羧基端处的间隔子与T辅助肽连接。新抗原性肽或T辅助肽的氨基端可以被酰化。T辅助肽的实例包含破伤风类毒素残基830-843、流感残基307-319和疟疾孢子残基382-398以及残基378-389。

[0413] 本公开的肽序列可以任选地通过在DNA水平上的改变而改变，特别是通过在预选碱基处使编码肽的DNA突变，从而生成将翻译成期望氨基酸的密码子。

[0414] 还可以通过延长或减少化合物的氨基酸序列来修饰肽，例如通过添加或缺失氨基酸。还可以通过改变某些残基的顺序或组成来修饰肽或类似物。本领域技术人员将理解，某些对生物活性至关重要的氨基酸残基，例如在关键接触位点或保守残基处的那些氨基酸残基，在不会对生物活性产生不利影响的情况下通常可能不会被改变。

[0415] 在一些实施例中，可以使用具有单个氨基酸取代的一系列肽来修饰肽以确定静电荷、疏水性等对HLA结合的影响。例如，可以沿着肽的长度进行一系列带正电（例如，Lys或Arg）或带负电（例如，Glu）的氨基酸取代，显示了对各种HLA分子和T细胞受体的不同敏感性模式。另外，可以采用使用小的、相对中性的部分如Ala、Gly、Pro或类似残基的多重取代。取代可以是同源寡聚体或异源寡聚体。取代或添加的残基的数量和类型取决于基本接触点之间必要的间距和所寻求的某些功能属性（例如，疏水性与亲水性）。与亲本肽的亲和力相比，此类取代也可以实现对HLA分子或T细胞受体的结合亲和力增加。在任何情况下，此类取代应采用氨基酸残基或其它分子片段，其被选择以避免例如可能破坏结合的空间和电荷干扰。氨基酸取代通常是单个残基。可以组合取代、缺失、插入或其任何组合以得到最终肽。

[0416] 在一些实施例中，本文所描述的肽可以通过端-NH<sub>2</sub>酰化，例如通过烷酰基（C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>）或巯基乙酰化、端-羧基酰胺化，例如氨、甲胺等来修饰。在一些实施例中，这些修饰可以提供用于与支持物或其它分子连接的位点。在一些实施例中，本文所描述的肽可以含有修饰，如但不限于糖基化、侧链氧化、生物素化、磷酸化、表面活性材料例如脂质的添加，或者可以进行化学修饰，例如乙酰化等。此外，肽中的键可以不是肽键，例如共价键、酯或醚键、二硫键、氢键、离子键等。

[0417] 在一些实施例中，本文所描述的肽可以包括如本领域熟知的那些等载体，例如甲状腺球蛋白、如人血清白蛋白等白蛋白、破伤风类毒素、如聚L-赖氨酸和聚L-谷氨酸等聚氨基酸残基、流感病毒蛋白、乙型肝炎病毒核心蛋白等。

[0418] 肽可以被进一步修饰成含有通常不属于蛋白质的另外的化学部分。那些衍生的部分可以提高溶解度、生物半衰期、蛋白质的吸收或结合亲和力。所述部分还可以减少或消除肽等的任何期望的副作用。那些部分的概述可见于《雷明顿药物科学 (Remington's Pharmaceutical Sciences)》，第20版，宾夕法尼亚州伊斯顿市马克出版公司 (Mack

Publishing Co., Easton, PA) (2000)。例如,可以根据需要对具有期望活性的新抗原性肽进行修饰以提供某些期望属性,例如改进的药理学特性,同时增加或至少保留基本上所有未经修饰的肽的生物活性以与期望的HLA分子结合并激活适当的T细胞。例如,肽可以进行如保守或非保守的取代等各种改变,其中此类改变可以在它们的使用中提供如改进的HLA结合等某些优势。此类保守取代可以涵盖用生物学和/或化学上类似的另一个氨基酸残基替换一个氨基酸残基,例如用一个疏水性残基替换另一个疏水性残基或用一个极性残基替换另一个极性残基。还可以使用D-氨基酸探测单个氨基酸取代的影响。可以使用众所周知的肽合成程序进行此类修饰,如例如Merrifield,《科学 (Science)》232:341-347 (1986), Barany和Merrifield,《肽 (The Peptides)》, Gross和Meienhofer, 编辑。(纽约学术出版社 (N.Y., Academic Press)), 第1-284页 (1979); 以及Stewart和Young,《固相肽合成》, (伊利诺伊州罗克福德皮尔斯公司), 第2版 (1984) 中描述的。

[0419] 在一些实施例中,本文所描述的肽可以与如蛋白质等大的、缓慢代谢的大分子;如琼脂糖凝胶、琼脂糖、纤维素、纤维素珠粒等多糖;如聚谷氨酸、聚赖氨酸等聚合氨基酸;氨基酸共聚物;灭活病毒颗粒;灭活细菌毒素,如来自白喉、破伤风、霍乱、白细胞毒素分子的一类毒素;灭活细菌;以及树突细胞缀合。

[0420] 肽的变化可以包含但不限于与载体蛋白的缀合、与配体的缀合、与抗体缀合、聚乙二醇化、聚唾液酸化、HES化、重组PEG模拟物、Fc融合、白蛋白融合、纳米颗粒连接、纳米颗粒封装、胆固醇融合、铁融合、酰化、酰胺化、糖基化、侧链氧化、磷酸化、生物素化、添加表面活性材料、添加氨基酸模拟物或添加非天然氨基酸。

[0421] 用于缀合的另外的合适的组分和分子包含例如用于靶向淋巴系统的分子、甲状腺球蛋白;如人血清白蛋白 (HAS) 等白蛋白;破伤风类毒素;白喉类毒素;如聚 (D-赖氨酸:D-谷氨酸) 等聚氨基酸;轮状病毒的VP6多肽;流感病毒血凝素、流感病毒核蛋白;钥孔虫戚血蓝蛋白 (KLH);以及乙型肝炎病毒核心蛋白和表面抗原;或上述任何组合。

[0422] 另一种类型的修饰是在多肽序列的N末端和/或C末端处缀合(例如,连接)一个或多个另外的组分或分子,如另一种蛋白质(例如,具有与主题蛋白质异源的氨基酸序列的蛋白质)或载体分子。因此,示例性多肽序列可以作为与另一个组分或分子的缀合物提供。在一些实施例中,白蛋白与本公开的肽或蛋白质的融合可以例如通过基因操作来实现,使得编码HSA或其片段的DNA与编码一个或多个多肽序列的DNA接合。此后,可以用例如合适的质粒形式的融合的核苷酸序列转化或转染合适的宿主,以表达融合多肽。表达可以在体外从例如原核或真核细胞进行,或者在体内从例如转基因生物体进行。在本公开的一些实施例中,融合蛋白的表达在哺乳动物细胞系,例如CHO细胞系中进行。此外,可以修饰白蛋白本身以延长其循环半衰期。经修饰的白蛋白与一个或多个多肽的融合可以通过上文所描述的基因操作技术或通过化学缀合来实现;所得融合分子的半衰期超过与未经修饰的白蛋白融合的半衰期(参见例如W02011/051489)。已经开发了若干种白蛋白结合策略作为直接融合替代方案,包含通过缀合脂肪酸链的白蛋白结合(酰化)。因为血清白蛋白是脂肪酸的转运蛋白,所以这些具有白蛋白结合活性的天然配体已被用于小蛋白治疗剂的半衰期延长。

[0423] 用于缀合的另外的候选组分和分子包含适合分离或纯化的那些组分和分子。非限制性实例包含如生物素(生物素-亲和素特异性结合对)、抗体、受体、配体、凝集素等结合分子或包括固体支持物的分子,所述固体支撑物包含例如塑料或聚苯乙烯珠粒、板或珠、磁性

珠粒、测试条和膜。如阳离子交换色谱法等纯化方法可以用于通过电荷差异分离缀合物,这有效地将缀合物分离成其各种分子量。通过阳离子交换色谱法获得的级分的含量可以使用常规方法通过分子量来鉴定,例如质谱法、SDS-PAGE或用于通过分子量分离分子实体的其它已知方法。

[0424] 在一些实施例中,本公开的肽或蛋白质序列的氨基端或羧基端可以与免疫球蛋白Fc区(例如,人Fc)融合以形成融合缀合物(或融合分子)。已示出Fc融合缀合物增加生物药物的全身性半衰期,因此生物药物产品可能需要较不频率的施用。Fc与排列在血管的内皮细胞中的新生儿Fc受体(FcRn)结合,并且结合后,Fc融合分子被保护免于降解并重新释放到循环中,从而使分子在循环中保持更长时间。此Fc结合被认为是内源性IgG保持其长血浆半衰期的机制。与传统的Fc融合缀合物相比,最近的Fc融合技术将生物药物的单拷贝与抗体的Fc区连接,以优化生物药物的药代动力学和药效学特性。

[0425] 本公开考虑使用肽的当前已知或未来开发的其它修饰来改善一种或多种特性。一种用于延长循环半衰期、增加稳定性、降低清除率或改变肽的免疫原性或过敏原性的此类方法。

[0426] 可以以多种方式测定肽稳定性。例如,肽酶和如人血浆和血清等各种生物介质已用于测试稳定性。参见例如Verhoef等人,《欧洲药物代谢和药代动力学杂志(Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinetics)》11:291(1986)。本文所描述肽的半衰期方便地使用25%人血清(v/v)测定确定。方案如下:合并的人血清(AB型,非热灭活)在使用前通过离心作用被破坏。然后用RPMI-1640或另一种合适的组织培养基将血清稀释到25%。在预定的时间间隔,取出少量反应溶液并添加到6%三氯乙酸(TCA)水溶液或乙醇中。将混浊的反应样品冷却(4°C)15分钟,然后旋转以使沉淀的血清蛋白集结。然后使用稳定性特异性色谱法条件通过反相HPLC确定肽的存在。

[0427] 与短血浆半衰期或对蛋白酶降解的易感性相关的问题可以通过各种修饰来解决,包含将肽或蛋白质序列与多种非蛋白质聚合物中的任何非蛋白质聚合物,例如聚乙二醇(PEG)、聚丙二醇或聚氧化烯缀合或连接(参见例如通常通过与蛋白质和非蛋白质聚合物,例如PEG共价结合的连接部分)。此类PEG缀合的生物分子已示出具有临床有用的特性,包含更好的物理和热稳定性、针对酶降解易感性的保护、增加的溶解度、较长的体内循环半衰期和降低的清除率、降低的免疫原性和抗原性以及降低的毒性。

[0428] 适合与多肽或蛋白质序列缀合的PEG在室温下通常可溶于水,并且具有通式 $R-(O-CH_2-CH_2)_n-O-R$ ,其中R是氢或如烷基或烷醇基等保护基团,并且其中n是1到1000的整数。当R是保护基团时,它通常具有1到8个碳。与多肽序列缀合的PEG可以是线性的或支化的。本公开考虑了支化PEG衍生物、“星形PEG”和多臂PEG。本公开还考虑了缀合物的组合物,其中PEG具有不同的n值,因此各种不同的PEG以特定比率存在。例如,一些组合物包括缀合物的混合物,其中n=1、2、3和4。在一些组合物中,其中n=1的缀合物百分比为18-25%,其中n=2的缀合物百分比为50-66%,其中n=3的缀合物百分比为12-16%,并且其中n=4的缀合物百分比高达5%。此类组合物可以通过本领域已知的反应条件和纯化方法产生。例如,阳离子交换色谱法可以用于分离缀合物,然后鉴定含有具有例如期望数量的连接的PEG的缀合物的级分,纯化不含未经修饰的蛋白质序列和具有其它数量的连接的PEG的缀合物。

[0429] PEG可以通过末端反应基团(“间隔子”)与本公开的肽或蛋白质结合。间隔子是例

如末端反应基团,所述末端反应基团介导多肽序列中的一个或多个多肽序列的游离氨基或羧基与PEG之间的键。具有可以与游离氨基结合的间隔子的PEG包含N-羧基琥珀酰亚胺PEG,其可以通过用N-羧基琥珀酰亚胺激活PEG的琥珀酸酯来制备。另一种可以与游离氨基结合的激活的PEG是2,4-双(0-甲氧基聚乙二醇)-6-氯-s-三嗪,其可以通过使PEG单甲醚与氰尿酸氯反应来制备。与游离羧基结合的激活的PEG包含聚氧乙二胺。

[0430] 本公开的肽或蛋白质序列中的一个或多个肽或蛋白质序列与具有间隔子的PEG的缀合可以通过各种常规方法进行。例如,可以使用4:1到30:1的试剂与肽/蛋白质的摩尔比,在pH为5到10下,在4°C到室温的温度下在溶液中进行缀合反应,持续30分钟到20小时。可以选择反应条件以引导反应主要产生期望的取代度。通常,低温、低pH(例如,pH=5)和短反应时间倾向于减少连接的PEG的数量,而高温、中性到高pH(例如,pH>7)和较长的反应时间倾向于增加连接的PEG的数量。可以使用本领域已知的各种方法来终止反应。在一些实施例中,通过酸化反应混合物并且在例如-20°C下冷冻来终止反应。

[0431] 本公开还考虑使用PEG模拟物。已经开发了重组PEG模拟物,所述模拟物保留PEG的属性(例如,增强的血清半衰期),同时赋予了若干个另外的有利特性。举例来说,能够形成类似于PEG的延伸构象的简单多肽链(包括例如Ala、Glu、Gly、Pro、Ser和Thr)可以重组产生,所述简单多肽链已经与所关注的肽或蛋白质药物融合(例如,加利福尼亚州山景城Amunix XTEN技术公司(Amunix XTEN technology,Mountain View,CA)。这消除了制造过程期间对另外缀合步骤的需要。此外,确立的分子生物学技术能够控制多肽链的侧链组成,从而优化免疫原性和制造特性。

[0432] 新表位

[0433] 新表位包括被免疫系统识别的新抗原性肽或新抗原性多肽的新抗原性决定簇部分。新表位是指在如非患病细胞等参考中不存在的表位,例如非癌细胞或种系细胞,但存在于患病细胞中,例如癌细胞。这包含在正常非患病细胞或种系细胞中发现对应表位但由于患病细胞,例如癌细胞中的一个或多个突变而改变表位序列从而产生新表位的情况。在本说明书中,术语“新表位”与“肿瘤特异性新表位”可互换使用以表示一系列通常通过相邻氨基酸的 $\alpha$ -氨基与羧基之间的肽键彼此连接的残基,通常是L-氨基酸。新表位可以是各种长度,呈其中性(不带电荷)形式或盐形式,并且没有修饰,如糖基化、侧链氧化或磷酸化或者含有这些修饰,条件是修饰不会破坏如本文所描述的多肽的生物活性。

[0434] 在一些实施例中,本文所描述的HLA I类新表位的长度为13个残基或更短,并且通常由约8到约12个残基,特别是9或10个残基组成。在一些实施例中,本文所描述的HLA II类新表位的长度为25个残基或更短,并且通常由约16到约25个残基组成。

[0435] 在一些实施例中,本文所描述的组合物包括包含蛋白质的第一新表位的第一肽和包含相同蛋白质的第二新表位的第二肽,其中第一肽不同于第二肽,并且其中第一新表位包括突变且第二新表位包括相同突变。在一些实施例中,本文所描述的组合物包括包含蛋白质第一区域的第一新表位的第一肽和包含相同蛋白质第二区域的第二新表位的第二肽,其中第一区域包括第二区域的至少一个氨基酸,其中第一肽不同于第二肽,并且其中第一新表位包括第一突变并且第二新表位包括第二突变。在一些实施例中,所述第一突变和所述第二突变是相同的。在一些实施例中,突变选自自由以下组成的组:点突变、剪接位点突变、移码突变、通读突变、基因融合突变和其任何组合。

[0436] 在一些实施例中,第一新表位与I类HLA蛋白结合以形成I类HLA-肽复合物。在一些实施例中,第二新表位与II类HLA蛋白结合以形成II类HLA-肽复合物。在一些实施例中,第二新表位与I类HLA蛋白结合以形成I类HLA-肽复合物。在一些实施例中,第一新表位与II类HLA蛋白结合以形成II类HLA-肽复合物。在一些实施例中,第一新表位激活CD8<sup>+</sup> T细胞。在一些实施例中,第一新表位激活CD4<sup>+</sup> T细胞。在一些实施例中,第二新表位激活CD4<sup>+</sup> T细胞。在一些实施例中,第二新表位激活CD8<sup>+</sup> T细胞。在一些实施例中,CD4<sup>+</sup> T细胞的TCR与II类HLA-肽复合物结合。在一些实施例中,CD8<sup>+</sup> T细胞的TCR与II类HLA-肽复合物结合。在一些实施例中,CD8<sup>+</sup> T细胞的TCR与I类HLA-肽复合物结合。在一些实施例中,CD4<sup>+</sup> T细胞的TCR与I类HLA-肽复合物结合。

[0437] 在一些实施例中,第二新表位比第一新表位长。在一些实施例中,第一新表位的长度为至少8个氨基酸。在一些实施例中,第一新表位的长度为8到12个氨基酸。在一些实施例中,第一新表位包括至少8个连续氨基酸的序列,其中8个连续氨基酸中的至少1个在野生型序列的对应位置处不同。在一些实施例中,第一新表位包括至少8个连续氨基酸的序列,其中8个连续氨基酸中的至少2个在野生型序列的对应位置处不同。在一些实施例中,第二新表位的长度为至少16个氨基酸。在一些实施例中,第二新表位的长度为16到25个氨基酸。在一些实施例中,第二新表位包括至少16个连续氨基酸的序列,其中16个连续氨基酸中的至少1个在野生型序列的对应位置处不同。在一些实施例中,第二新表位包括至少16个连续氨基酸的序列,其中16个连续氨基酸中的至少2个在野生型序列的对应位置处不同。

[0438] 在一些实施例中,新表位与HLA蛋白(例如,HLA I类或HLA II类)结合。在一些实施例中,新表位以比对应的野生型肽更高的亲和力与HLA蛋白结合。在一些实施例中,新表位的IC<sub>50</sub>小于5,000nM、小于1,000nM、小于500nM、小于100nM、小于50nM或更小。

[0439] 在一些实施例中,新表位的HLA结合亲和力可以介于约1pM与约1mM、约100pM与约500μM、约500pM与约10μM、约1nM与约1μM或约10nM与约1μM之间。在一些实施例中,新表位的HLA结合亲和力可以为至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、700、800、900或1,000nM或更大。在一些实施例中,新表位的HLA结合亲和力可以为至多2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、700、800、900或1,000nM。

[0440] 在一些实施例中,第一新表位和/或第二新表位以比对应的野生型新表位更高的亲和力与HLA蛋白结合。在一些实施例中,第一新表位和/或第二新表位以小于1,000nM、900nM、800nM、700nM、600nM、500nM、250nM、150nM、100nM、50nM、25nM或10nM的K<sub>D</sub>或IC<sub>50</sub>与HLA蛋白结合。在一些实施例中,第一新表位和/或第二新表位以小于1,000nM、900nM、800nM、700nM、600nM、500nM、250nM、150nM、100nM、50nM、25nM或10nM的K<sub>D</sub>或IC<sub>50</sub>与HLA I类蛋白结合。在一些实施例中,第一新表位和/或第二新表位以小于2,000nM、1,500nM、1,000nM、900nM、800nM、700nM、600nM、500nM、250nM、150nM、100nM、50nM、25nM或10nM的K<sub>D</sub>或IC<sub>50</sub>与HLA II类蛋白结合。

[0441] 一方面,第一新表位和/或第二新表位与由受试者表达的HLA等位基因编码的蛋白质结合。另一方面,突变不存在于受试者的非癌细胞中。在又另一方面,第一新表位和/或第二新表位由受试者癌细胞的基因或表达基因编码。

[0442] 多核苷酸

[0443] 可替代地,编码本公开的肽的核酸(例如,多核苷酸)可以用于使用宿主细胞或体外例如通过体外翻译产生多肽。在一些实施例中,体外翻译用于产生肽。还考虑了编码多肽的多核苷酸,例如包括新抗原性肽的多功能抗体,其可以用作治疗剂。多核苷酸可以是例如单链和/或双链的DNA、cDNA或RNA。

[0444] 本文提供了编码本公开中描述的新抗原性肽中的每种新抗原性肽的新抗原性多核苷酸。在本公开中,术语“多核苷酸”、“核苷酸”或“核酸”与“突变多核苷酸”、“突变核苷酸”、“突变核酸”、“新抗原性多核苷酸”、“新抗原性核苷酸”或“新抗原性突变核酸”可互换使用。由于基因密码的冗余,各种核酸序列可以编码相同的肽。这些核酸中的每个核酸都落入本公开的范围内。编码肽的核酸可以是DNA或RNA,例如mRNA或DNA和RNA的组合。在一些实施例中,编码肽的核酸是自扩增的mRNA(Brito等人,《遗传学进展(Adv.Genet.)》2015;89:179-233)。编码本文所描述的肽的任何合适的多核苷酸落入本公开的范围内。

[0445] 术语“RNA”包含并且在一些实施例中涉及“mRNA”。术语“mRNA”意指“信使-RNA”并且涉及通过使用DNA模板生成并编码肽或多肽的“转录物”。通常,mRNA包括5'-UTR、蛋白质编码区和3'-UTR。mRNA在细胞和体外仅具有有限的半衰期。在一些实施例中,mRNA是自扩增的mRNA。在本公开的上下文中,可以通过从DNA模板体外转录生成mRNA。体外转录方法是技术人员已知的。例如,有多种可商购获得的体外转录试剂盒。

[0446] RNA的稳定性和翻译效率可以根据需要进行修饰。例如,可以通过一种或多种具有稳定作用和/或增加的RNA翻译效率的修饰来稳定RNA并增加其翻译。例如,在PCT/EP2006/009448中描述了此类修饰,通过引用将其并入本文。为了增加根据本公开使用的RNA的表达,可以在不改变所表达的肽或蛋白质的序列的情况下,在编码区,即编码所表达的肽或蛋白质的序列内对其进行修饰,以增加GC含量,从而增加mRNA稳定性并进行密码子优化,并且从而增强细胞中的翻译。

[0447] 在本公开中使用的RNA的上下文中的术语“修饰”包含非天然存在于所述RNA中的RNA的任何修饰。在一些实施例中,RNA不具有未封端的5'-三磷酸酯。可以通过用磷酸酶处理RNA来去除此类未封端的5'-三磷酸酯。在其它实施例中,RNA可以具有经修饰的核糖核苷酸以增加其稳定性和/或降低细胞毒性。在一些实施例中,5-甲基胞苷可以在RNA中被部分或完全取代例如胞苷。可替代地,假尿苷被部分或完全取代例如尿苷。

[0448] 在一些实施例中,术语“修饰”涉及提供具有5'-帽或5'-帽类似物的RNA。术语“5'-帽”是指在mRNA分子的5'端上发现的帽结构,并且通常由通过不寻常的5'到5'三磷酸酯连接与mRNA连接的鸟苷核苷酸组成。在一些实施例中,此鸟苷在7-位置处被甲基化。术语“常规5'-帽”是指天然存在的RNA 5'-帽,即7-甲基鸟苷帽(m<sup>7</sup>G)。在本公开的上下文中,术语“5'-帽”包含类似于RNA帽结构的5'-帽类似物并且被修饰成具有在体内和/或在细胞中稳定RNA和/或增强RNA(如果与其连接)的翻译的能力。

[0449] 在某些实施例中,将编码本公开的新抗原性肽的mRNA施用于有需要的受试者。在一些实施例中,本公开提供了包括经修饰的核苷的RNA、寡核糖核苷酸和多核糖核苷酸分子、包括RNA、寡核糖核苷酸和多核糖核苷酸分子的基因疗法载体、基因疗法方法和包括所述基因疗法方法的基因转录沉默方法。在一些实施例中,要施用的mRNA包括至少一种经修饰的核苷。

[0450] 编码本文所描述的肽的多核苷酸可以通过化学技术合成,例如,Matteucci等人,《美国化学会志(J. Am. Chem. Soc.)》103:3185 (1981)的磷酸三酯方法。编码包括类似物或由其组成的肽的多核苷酸可以简单地通过用适当且期望的核酸碱基取代编码天然表位的那些来制备。

[0451] 本文所描述的多核苷酸可以包括转录的区域中的一个或多个合成或天然存在的内含子。还可以考虑包含mRNA稳定序列和用于在哺乳动物细胞中复制的序列以增加多核苷酸表达。另外,本文所描述的多核苷酸可以包括免疫刺激序列(ISS或CpG)。这些序列可以包含在载体中、在多核苷酸编码序列之外以增强免疫原性。

[0452] 在一些实施例中,多核苷酸可以包括在相同的阅读框中与多核苷酸融合的肽或蛋白质的编码序列,所述多核苷酸有助于例如肽或蛋白质由宿主细胞中表达和/或分泌(例如,作为分泌序列用于控制多肽从细胞中的转运的前导序列)。具有前导序列的多肽是前蛋白,并且可以具有被宿主细胞切割的前导序列以形成成熟形式的多肽。

[0453] 在一些实施例中,多核苷酸可以包括在相同的阅读框中与标志序列融合的肽或蛋白质的编码序列,所述标志序列允许例如纯化经编码的肽,然后将所述经编码的肽掺入个性化疾病疫苗或免疫原性组合中。例如,标志序列可以由pQE-9载体提供的六组氨酸标签,以在细菌宿主的情况下使与标志物融合的成熟多肽纯化,或者当使用哺乳动物宿主(例如,COS-7细胞)时,标志序列可以是衍生自流感血凝素蛋白的血凝素(HA)标签。另外的标签包含但不限于钙调蛋白标签、FLAG标签、Myc标签、S标签、SBP标签、Softag 1、Softag 3、V5标签、Xpress标签、Isoeptag、SpyTag、生物素羧基载体蛋白(BCCP)标签、GST标签、荧光蛋白标签(例如,绿色荧光蛋白标签)、麦芽糖结合蛋白标签、Nus标签、Strep-标签、硫氧还蛋白标签、TC标签、Ty标签等。编码本文所描述的新抗原性肽的多核苷酸还可以包括编码泛素化信号序列的序列和/或用于促进所得肽移动到内质网中的如内质网(ER)信号序列等靶向序列。

[0454] 在一些实施例中,多核苷酸可以包括一个或多个当前所描述的肽或蛋白质的编码序列,所述肽或蛋白质在相同的阅读框中融合以产生能够产生多个新抗原性肽的单一多联体化新抗原性肽构建体。

[0455] 在一些实施例中,使用重组技术通过分离或合成编码所关注的野生型蛋白质的DNA序列来构建DNA序列。任选地,可以通过定点诱变来使序列诱变以提供其功能类似物。参见例如Zoeller等人,《美国国家科学院院刊》81:5662-5066 (1984)和美国专利第4,588,585号。在一些实施例中,编码所关注的肽或蛋白质的DNA序列将通过使用寡核苷酸合成仪的化学合成来构建。可以基于期望肽的氨基酸序列和选择在产生所关注的重组多肽的宿主细胞中偏好的那些密码子来设计此类寡核苷酸。可以应用标准方法来合成编码分离的所关注多肽的分离的多核苷酸序列。例如,完整的氨基酸序列可以用于构建反向翻译的基因。进一步地,可以合成含有编码特定分离的多肽的核苷酸序列的DNA寡聚物。例如,可以合成若干个编码期望多肽部分的小寡核苷酸,然后连接。单个寡核苷酸通常含有用于互补组装的5'或3'突出端。

[0456] 一旦组装(例如,通过合成、定点诱变或另一种方法),编码特定分离的所关注多肽的多核苷酸序列被插入表达载体并且任选可操作地与适于在期望宿主中表达蛋白质的表达控制序列连接。可以通过核苷酸测序、限制性作图和生物活性多肽在合适宿主中的表达

来确认适当的组装。如本领域众所周知的,为了在宿主中获得转染基因的高表达水平,可以将基因可操作地与在所选表达宿主中起作用的转录和翻译表达控制序列连接。

[0457] 因此,本公开还涉及用于产生和施用本文所描述的新抗原性肽和新表位的载体和表达载体,并且涉及包括此类载体的宿主细胞。

[0458] 载体

[0459] 在一些实施例中,还可以制备能够表达如本文所描述的肽或蛋白质的表达载体。用于不同细胞类型的表达载体在本领域中是众所周知的并且可以在没有过度实验的情况下进行选择。通常,将DNA以适当朝向和正确的阅读框插入如质粒等表达载体中以进行表达。如有必要,可以将DNA与期望宿主(例如,细菌)识别的适当转录和翻译调节控制核苷酸序列连接,但是此类控制通常在表达载体中可用。然后将载体引入宿主细菌以使用标准技术进行克隆(参见例如Sambrook等人(1989)《分子克隆:实验室手册》,纽约冷泉港的冷泉港实验室(Cold Spring Harbor Laboratory,Cold Spring Harbor,N.Y.)。

[0460] 适用于产生和施用本文所描述的新抗原性肽的大量载体和宿主系统是本领域技术人员已知的,并且可商购获得。通过举例提供了以下载体。细菌:pQE70、pQE60、pQE-9(凯杰公司(Qiagen))、pBS、pD10、phagescript、psiX174、pBluescript SK、pbsks、pNH8A、pNH16a、pNH18A、pNH46A(Stratagene公司(Stratagene));ptrc99a、pKK223-3、pKK233-3、pDR540、pRIT5(法玛西亚公司(Pharmacia));pCR(英杰公司(Invitrogen))。真核:pWLN0、pSV2CAT、pOG44、pXT1、pSG(Stratagene公司)、pSVK3、pBPV、pMSG、pSVL(法玛西亚公司);p75.6(瓦伦蒂斯公司(Valentis));pCEP(英杰公司);pCEI(Epimmune公司(Epimmune))。然而,可以使用任何其它质粒或载体,只要其在宿主中是可复制且有活力的。

[0461] 对于本文所描述的新抗原性肽的表达,编码序列将被提供可操作地连接的起始和终止密码子、启动子和终止子区域,并且在一些实施例中,以及复制系统以提供用于在期望细胞宿主中表达的表达载体。例如,与细菌宿主相容的启动子序列被提供在含有方便的限制性位点的质粒中,用于插入期望的编码序列。将所得表达载体转化到合适的细菌宿主中。

[0462] 哺乳动物表达载体将包括复制起点、合适的启动子和增强子,以及还包括任何必要的核糖体结合位点、聚腺苷酸化位点、剪接供体和受体位点、转录终止序列和5'侧翼非转录序列。此类启动子还可以源自病毒来源,例如人巨细胞病毒(CMV-IE启动子)或单纯疱疹病毒1型(HSV TK启动子)。源自SV40剪接和多腺苷酸化位点的核酸序列可以用于提供所需的非转录基因元件。

[0463] 重组表达载体可以用于扩增和表达编码如本文所描述的肽或蛋白质的DNA。重组表达载体是可复制的DNA构建体,所述可复制的DNA构建体具有编码肽或生物等效类似物的合成的或cDNA衍生的DNA片段,其与源自哺乳动物、微生物、病毒或昆虫基因的合适的转录或翻译调节元件可操作地连接。转录单元通常包括以下的组装:(1)在基因表达中具有调节作用的一个或多个遗传元件,例如转录启动子或增强子;(2)被转录成mRNA并被翻译成蛋白质的结构或编码序列;(3)适当的转录和翻译起始和终止序列,如本文详细描述。此类调节元件可以包含控制转录的操纵子序列。可以另外并入通常由复制起点和选择基因赋予的在宿主中进行复制以促进识别转化体的能力。当DNA区在功能上相互关联时,所述DNA区被操作性地连接。例如,如果信号肽(分泌前导序列)的DNA作为参与多肽分泌的前体表达,则其与多肽的DNA可操作地连接;如果启动子控制序列的转录,则所述启动子与编码序列操作

性地连接；或者如果核糖体结合位点被定位以便允许翻译，则所述核糖体结合位点与编码序列操作性地连接。通常，可操作地连接意指连续，并且在分泌前导序列的情况下，意指连续且在阅读框中。旨在用于酵母表达系统的结构元件包含实现宿主细胞翻译的蛋白质的细胞外分泌的前导序列。可替代地，在表达重组蛋白而没有前导序列或转运序列的情况下，其可以包含N末端甲硫氨酸残基。此残基可以任选地随后从所表达的重组蛋白上切割下来以提供最终产物。

[0464] 通常，重组表达载体将包含复制起点和允许宿主细胞转化的可选择标记，例如，大肠杆菌和酿酒酵母 (*S. cerevisiae*) TRP1基因的氨苄青霉素抗性基因，以及源自高表达基因的启动子，以指导下游结构序列的转录。此类启动子可以源自对糖酵解酶进行编码的操纵子，如3-磷酸甘油酸激酶 (PGK)、酸性磷酸酶或热休克蛋白等。异源结构序列的组装与翻译起始和终止序列以及在一些实施例中能够指导经过翻译的蛋白质分泌到周质空间或细胞外培养基中的前导序列的组装适当同步。任选地，异源序列可以编码融合蛋白，所述融合蛋白包含赋予期望特征的N末端鉴定肽，例如表达重组产物的稳定化或简化纯化。

[0465] 在一些实施例中，本文所描述的新抗原性肽还可以由细菌载体表达。细菌表达载体的实例包含最常用的大肠杆菌表达系统。大肠杆菌 (*E. coli*) 是用于产生异源蛋白质最广泛使用的宿主之一，并且相较于任何其它微生物的遗传学，大肠杆菌的遗传学更好地表征。融合蛋白可以在大肠杆菌表达载体中表达并且在各种宿主菌株中生长。大肠杆菌菌株DH5 $\alpha$ 、JM101、RRI、DH5c、S17-1 $\lambda$ /pir、K12、Top10和BL21 (DE3) 是可以用于异源基因表达宿主的示例性菌株。在许多实施例中，合适的细菌将包括一种或多种增加表达水平的突变或其它基因修饰。

[0466] 实现这些目的分子克隆技术是本领域已知的。适于构建如表达载体等重组核酸的多种克隆和体外扩增方法是本领域技术人员众所周知的。这些通过许多克隆练习足以指导技术人员的技术和说明的实例可见于Sambrook J.等人,《分子克隆:实验室手册》,第4版,冷泉港实验室出版社;Berger和Kimmel,《分子克隆技术指南 (Guide to Molecular Cloning Techniques)》,《酶学方法 (Methods in Enzymology)》第152卷加利福尼亚州圣地亚哥学术出版社公司 (Berger);以及《当代分子生物学实验指南 (Current Protocols in Molecular Biology)》,F.M.Ausubel等人编辑,《当今方案 (Current Protocols)》,格林出版协会公司 (Greene Publishing Associates, Inc.) 与约翰威立父子公司 (John Wiley Sons, Inc.) 合资企业 (1994年补充版) (Ausubel)。通过包含聚合酶链反应 (PCR)、连接酶链反应 (LCR)、Q $\phi$ 复制酶扩增和其它RNA聚合酶介导的技术的体外扩增方法足以指导技术人员的方案的实例可见于Berger、Sambrook和Ausubel以及Mullis等人 (1987) 美国专利第4,683,202号;

[0467] 简而言之,在大肠杆菌系统中表达蛋白质的方法包含以下步骤:将编码所关注的蛋白质或多肽的核酸克隆到期望的质粒中。然后将质粒掺入与质粒的生长相容的细菌宿主中 (例如通过转染或电穿孔或本领域技术人员已知的任何其它合适的方法)。细菌在细菌培养基中培养和扩增,同时所述细菌扩增由细菌内的核酸编码的蛋白质产物 (或者如果经编码的蛋白质是分泌蛋白质,则在培养基中分泌。然后从扩增的细菌 (用于内源性蛋白质) 或培养上清液 (用于分泌蛋白质) 中采集蛋白质。为所述目的主要选择高拷贝数表达质粒。用于细菌克隆的任何质粒的基本元件尤其包括ORI (复制起点) 位点;5'端处的如启动子、增强

子等控制元件;3'端处的一种或多种表达稳定剂,以及如抗生素抗性等选择标志基因。大多数大肠杆菌菌株可以用于繁殖质粒。表达质粒通常包括用于纯化蛋白质的标签。当编码所关注的蛋白质的核酸被克隆到具有合适标签的可商购获得载体的指定克隆位点内时,所表达的蛋白质是包括所述标签的融合蛋白质。例如,质粒pDEST-HisMBP包括MBP和六组氨酸标签。在此情况下,MBP蛋白和His标签用于从大肠杆菌细胞中分离和纯化蛋白质。各种此类质粒和表达系统是商购获得并且是本领域技术人员已知的。如 $P_{lac}$ 、 $P_{trp}$ 、 $P_{tac}$ 、 $\lambda P_L$ 、 $P_{T7}$ 和 $P_{BAD}$ 等许多启动子通常用于构建表达载体。其中, $lacUV5$ 、 $tac$ 以及 $P_{T7}$ 与 $lacUV5$ 的组合系统被广泛使用,因为可以通过改变诱导剂异丙基- $\beta$ -D-硫代吡喃半乳糖苷(IPTG)的浓度来轻松调节表达。称为 $\lambda PL$ 和 $\lambda PR$ 的其它启动子通常由温度变化诱导。为了获得克隆基因的高水平表达,表达盒可以包含其它序列,如用于翻译起始的核糖体结合位点和转录/翻译终止子序列。通过使用含有双启动子的细菌表达载体,可以实现期望肽或多肽的高水平表达。细胞可以在摇瓶或其它容器中生长,但对于多肽的大规模制备,在发酵罐中生长是优选的。为了获得最高水平的表达,在生长周期的适当时间将半乳糖添加到营养培养基中以诱导期望多肽的表达增加。例如,宿主细胞的生长可以在含有果糖(0.25%最终浓度)作为碳源的培养基中开始;引起细胞内cAMP(腺苷3',5'-环状单磷酸)浓度增加的其它糖类(甘油、乙酸)也可以用作碳源。

[0468] 为了允许选择包括构建体的细胞,表达载体中方便地包含如抗生素抗性基因等一个或多个可选择标志基因。这些基因编码对在选择性培养基中生长的经过转化的宿主细胞的存活或生长所必需的蛋白质。未用含有选择基因的载体转化的宿主细胞不会在培养基中存活。典型的选择基因编码赋予抗生素或其它毒素抗性的蛋白质,如氨苄青霉素、新霉素、卡那霉素、氯霉素或四环素。

[0469] 可替代地,可选择的标志物可以编码补充营养缺陷型的缺陷的蛋白质或提供复合培养基中无法获得的关键营养物质,即编码芽孢杆菌纲的D-丙氨酸消旋酶的基因。许多可选择的标志物是本领域技术人员已知的并且例如在Sambrook等人(同上)中描述。用于使用双 $tac-lac$ 启动子表达期望的多肽的优选可选择的标志物是卡那霉素抗性标志物(Vieira和Messing,《基因(Gene)》19:259(1982))。使用卡那霉素选择比例如氨苄青霉素选择更有利,因为氨苄青霉素在培养基中被p-内酰胺酶快速降解,从而消除选择性压力并且使培养物长满不含载体的细胞。

[0470] 包括上述列出的组分中的一个或多个列出的组分的合适载体的构建可以采用如上文引用的参考文献中所描述的标准连接技术。载体可以包括允许载体在原核宿主中克隆的其它序列。本领域技术人员将认识到,这些载体组分中的每个载体组分都可以被修改而不显著影响它们的功能。

[0471] 分离的质粒或DNA片段被切割、剪裁和重新连接成所期望的形式,以生成所需的质粒。为了确认构建的质粒中的正确序列,通过如通过限制性核酸内切酶消化和/或根据已知方法的测序等标准技术分析质粒。

[0472] 亲和标签和其它类型的基因工程化融合配偶体被广泛用作分子生物学中的工具。亲和标签对于纯化所表达的蛋白质非常有用。纯化的基本步骤包含蛋白质裂解、蛋白质与基质的结合、洗涤和洗脱。作为实例,在克隆时,多组氨酸(His6)标签通常放置在蛋白质的N末端或C末端处,相应所关注的蛋白质用标签表达,并且最终His可以被金属捕获,因为多组

氨酸的咪唑部分中的氮与金属相互作用。通常,金属被固定以支持捕获。通过合适的缓冲液进行洗涤和洗脱。因此可以将标签设计成从纯化后表达的蛋白质中切除。同样地,用于所述目的的各种其它标签,如GST-标签、Halo标签、HA-标签等为本领域技术人员所众所周知。标签部分通常很小,并且不会干扰所表达的蛋白质结构。尽管这些最初是为了促进重组蛋白的检测和纯化而开发的,但近年来已经清楚的是,某些标签还可以提高产率、增强溶解性,并且甚至促进其融合配偶体的正确折叠。重组蛋白的不溶性特别是在大肠杆菌中在产生用于结构和功能研究的生物活性材料时可能是一个主要问题,使用溶解性增强标签来避免形成不可溶蛋白质聚集体已迅速普及。尽管已报告许多在大肠杆菌中过度产生时高度可溶的蛋白质作为融合配偶体具有溶解性增强的特性,但在大多数情况下,支持这些说法的证据很少。在已知的溶解性增强的融合配偶体中,MBP的独特之处在于它也是天然的亲和标签。可以使用直链淀粉亲和色谱法纯化MBP融合蛋白。另外的实例包含His标签、FLAG标签、HA标签等。

[0473] 可以感染哺乳动物细胞的表达载体的实例包含如牛痘或鸡痘等减毒病毒宿主。作为这种方法的实例,牛痘病毒被用作表达编码本文所描述的新抗原性肽的核苷酸序列的载体。可用于免疫方案的痘苗病毒载体和方法描述于例如美国专利第4,722,848号中。另一个载体是BCG(卡介苗(Bacille Calmette Guerin))。Stover等人,《自然》351:456-460(1991)描述了BCG载体。

[0474] 可用于治疗性施用或免疫本文所描述的新抗原性多肽的多种其它载体,例如腺病毒和腺相关病毒载体、逆转录病毒载体、鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella Typhimurium*)载体、解毒炭疽毒素载体、仙台病毒载体(Sendai virus vector)、痘病毒载体、金丝雀痘载体和鸡痘载体等,对于本领域技术人员而言,根据本文描述将是显而易见的。在一些实施例中,载体是经修饰的安卡拉牛痘(VA)(例如,巴伐利亚北欧公司(Bavarian Nordic)(MVA-BN))。

[0475] 在可以用于实施本公开的载体中,通过逆转录病毒基因转移方法可以整合到细胞的宿主基因组中,通常导致插入的转基因的长期表达。在一些实施例中,所述逆转录病毒是慢病毒。另外,已在许多不同的细胞类型和靶组织中观察到高转导效率。逆转录病毒的嗜性可以通过掺入外源包膜蛋白来改变,从而扩大靶细胞的潜在靶标群体。还可以对逆转录病毒进行工程化,以允许插入的转基因有条件地表达,使得只有某些细胞类型会被慢病毒感染。细胞类型特异性启动子可以用于靶向特定细胞类型中的表达。慢病毒载体是逆转录病毒载体(并且因此慢病毒和逆转录病毒载体可以用于实施本公开)。此外,慢病毒载体能够转导或感染非分裂细胞,并且通常会产生产高病毒滴度。因此,逆转录病毒基因转移系统的选择可能取决于靶组织。逆转录病毒载体包含具有至多6-10kb外源序列包装能力的顺式作用长末端重复序列。最小的顺式作用LTR足以复制和包装载体,然后所述载体用于将期望的核酸整合到靶细胞中以提供永久表达。可以用于实施本公开的广泛使用的逆转录病毒载体包含基于鼠白血病病毒(MuLV)、长臂猿白血病病毒(GaLV)、猿免疫缺陷病毒(SIV)、人免疫缺陷病毒(HIV)和其组合的那些逆转录病毒载体(参见例如Buchscher等人,(1992)《病毒学杂志(J. Virol.)》66:2731-2739;Johann等人,(1992)《病毒学杂志》66:1635-1640;Sommerfelt等人,(1990)《病毒学(Virol.)》176:58-59;Wilson等人,(1998)《病毒学杂志》63:2374-2378;Miller等人,(1991)《病毒学杂志》65:2220-2224;PCT/US94/05700)。

[0476] 还可用于实施本公开的是如基于马传染性贫血病毒 (EIAV) 的慢病毒载体等最小的非灵长类慢病毒载体。载体可以具有驱动靶基因表达的巨细胞病毒 (CMV) 启动子。因此, 本公开考虑了可用于实施本公开的载体: 包含逆转录病毒载体和慢病毒载体的病毒载体。

[0477] 还可用于实施本公开的是腺病毒载体。一个优点是重组腺病毒能够在体外和体内在多种哺乳动物细胞和组织中有效转移和表达重组基因, 从而导致转移的核酸的高表达。进一步地, 有效感染静止细胞的能力扩大了重组腺病毒载体的用途。另外, 高表达水平确保核酸产物将表达成生成免疫应答的足够水平 (参见例如美国专利第7,029,848号, 特此通过引用并入)。

[0478] 关于可用于实施本公开的腺病毒载体, 提及美国专利第6,955,808号。使用的腺病毒载体可以选自由以下组成的组: Ad5、Ad35、Ad11、C6和C7载体。已公布了腺病毒5 (“Ad5”) 基因组序列。(Chroboczek, J.、Bieber, F. 和Jacrot, B. (1992) 5型腺病毒基因组序列和其与2型腺病毒基因组的比较 (The Sequence of the Genome of Adenovirus Type 5 and Its Comparison with the Genome of Adenovirus Type 2), 《病毒学》186,280-285; 所述文献的内容特此通过引用并入)。Ad35载体描述于美国专利第6,974,695号、第6,913,922号和第6,869,794号中。Ad11载体描述于美国专利第6,913,922号中。C6腺病毒载体描述于美国专利第6,780,407号; 第6,537,594号; 第6,309,647号; 第6,265,189号; 第6,156,567号; 第6,090,393号; 第5,942,235号和第5,833,975号中。C7载体描述于美国专利第6,277,558号中。还可以使用E1缺陷型或缺失、E3缺陷型或缺失和/或E4缺陷型或缺失的腺病毒载体。某些在E1区域具有突变的腺病毒具有改进的安全裕度, 因为E1缺陷型腺病毒突变体在非许可细胞中是复制缺陷型的或者至少是高度减毒的。在E3区域具有突变的腺病毒可以通过破坏腺病毒下调MHC I类分子的机制而增强了免疫原性。由于抑制晚期基因表达, 具有E4突变的腺病毒可能具有降低的腺病毒载体的免疫原性。当期望使用相同载体的重复再疫苗接种时, 此类载体可能特别有用。在E1、E3、E4; E1和E3; 以及E1和E4中缺失或突变的腺病毒载体可以根据本公开使用。

[0479] 此外, 其中所有病毒基因都缺失的“无肠”腺病毒载体还可以根据本公开使用。此类载体需要辅助病毒以进行其复制, 并且需要表达E1a和Cre的特殊人293细胞系, 这是自然环境中不存在的条件。此类“无肠”载体是非免疫原性的, 因此可以多次接种载体以进行再疫苗接种。“无肠”腺病毒载体可以用于插入如本公开的转基因等异源插入物/基因, 并且甚至可以用于大量异源插入物/基因的共同递送。

[0480] 在一些实施例中, 递送是通过腺病毒进行的, 所述腺病毒可以是以单次加强剂量。在一些实施例中, 腺病毒通过多剂量递送。在体内递送方面, 由于毒性低和引起插入诱变的可能性低, AAV优于其它病毒载体, 因为AAV没有整合到宿主基因组中。AAV的包装限制为4.5或4.75Kb。大于4.5或4.75Kb的构建体会导致病毒产量显著降低。有许多可以用于驱动核酸分子表达的启动子。AAV ITR可以作为启动子, 并且有利于消除对另外启动子元件的需要。

[0481] 对于普遍存在的表达, 可以使用以下启动子: CMV、CAG、CBh、PGK、SV40、铁蛋白重链或轻链等。对于脑表达, 可以使用以下启动子: 所有神经元的Synapsin I、兴奋性神经元的CaMK II $\alpha$ 、GABA能神经元的GAD67或GAD65或VGAT等。用于驱动RNA合成的启动子可以包含: 如U6或H1等Pol III启动子。Pol II启动子和内含子盒的使用可以用于表达向导RNA (gRNA)。关于可用于实施本公开的AAV载体, 提及美国专利第5658785号、第7115391号、第

7172893号、第6953690号、第6936466号、第6924128号、第6893865号、第6793926号、第6537540号、第6475769号和第6258595号和其中引用的文件。对于AAV, AAV可以是AAV1、AAV2、AAV5或其任何组合。可以针对要靶向的细胞选择AAV;例如,可以选择AAV血清型1、2、5或混合衣壳AAV1、AAV2、AAV5或其任何组合用于靶向脑或神经元细胞;并且可以选择AAV4用于靶向心脏组织。AAV8可用于递送到肝脏。在一些实施例中,递送是通过AAV。可以调整剂量以平衡治疗益处与任何副作用。

[0482] 在一些实施例中,痘病毒用于目前所描述的组合物中。这些包含正痘病毒、禽痘、牛痘、MVA、NYVAC、金丝雀痘、ALVAC、鸡痘、TROVAC等(参见例如Verardiet等人,《人疫苗免疫治疗学(Hum.Vaccin.Immunother.)》2012年7月;8(7):961-70;以及Moss,《疫苗(Vaccine.)》2013;31(39):4220-4222)。痘病毒表达载体描述于1982年,并且迅速广泛用于疫苗开发以及众多领域的研究。载体的优点包含结构简单、能够容纳大量外源DNA和高表达水平。关于可以用于实施本公开的痘病毒,如脊索痘病毒亚科痘病毒(脊椎动物的痘病毒),例如正痘病毒和禽痘病毒,例如牛痘病毒(例如,惠氏菌株(Wyeth Strain)、WR菌株(例如,ATCC®VR-1354)、哥本哈根菌株(Copenhagen Strain)、NYVAC、NYVAC.1、NYVAC.2、MVA、MVA-BN)、金丝雀痘病毒(例如,Wheatley C93菌株、ALVAC)、鸡痘病毒(例如,FP9菌株、韦伯斯特菌株(Webster Strain)、TROVAC)、鸽痘(dovepox)、鸽痘(pigeonpox)、鹌鹑痘和浣熊痘,尤其是其合成或非天然存在的重组体、其用途以及制备和使用此类重组体的方法的信息可见于科学和专利文献中。

[0483] 在一些实施例中,牛痘病毒用于疾病疫苗或免疫原性组合物中以表达抗原。(Rolph等人,重组病毒作为疫苗和免疫工具(Recombinant viruses as vaccines and immunological tools.)《当前免疫学观点(Curr.Opin.Immunol.)》9:517-524,1997)。重组牛痘病毒能够在受感染宿主细胞的细胞质内复制,并且因此所关注的多肽可以诱导免疫应答。此外,痘病毒已被广泛用作疫苗或免疫原性组合物载体,因为痘病毒能够通过直接感染免疫细胞,特别是抗原呈递细胞,靶向经编码的抗原以通过主要组织相容性复合物I类途径进行处理,而且还由于痘病毒能够自我辅助。

[0484] 在一些实施例中,ALVAC用作疾病疫苗或免疫原性组合物中的载体。ALVAC是金丝雀痘病毒,所述金丝雀痘病毒可以被修饰成表达外源转基因,并且已被用作针对原核和真核抗原的疫苗接种方法(Horig H、Lee DS、Conkright W等人表达人癌胚抗原和B7.1共刺激分子的重组金丝雀痘病毒(ALVAC)疫苗的I期临床试验(Phase I clinical trial of a recombinant canarypoxvirus (ALVAC) vaccine expressing human carcinoembryonic antigen and the B7.1 co-stimulatory molecule.)《癌症免疫学免疫疗法(Cancer Immunol.Immunother.)》2000;49:504-14;von Mehren M、Arlen P、Tsang KY等人在患有复发性表达CEA的腺癌的患者中对含有癌胚抗原(CEA)和B7.1转基因的双基因重组禽痘疫苗进行初步研究(Pilot study of a dual gene recombinant avipox vaccine containing both carcinoembryonic antigen(CEA) and B7.1 transgenes in patients with recurrent CEA-expressing adenocarcinomas.)《临床癌症研究(Clin.Cancer.Res.)》2000;6:2219-28;Musey L、Ding Y、Elizaga M等人肌肉内施用HIV-1疫苗接种可以在未感染HIV-1的个体中诱导全身性和粘膜T细胞免疫(HIV-1vaccination administered intramuscularly can induce both systemic and mucosal T cell immunity in HIV-

l-uninfected individuals.)《免疫学杂志》2003;171:1094-101;Paoletti E.痘病毒载体应用于疫苗接种:更新(Applications of pox virus vectors to vaccination:an update.)《美国国家科学院院刊》1996;93:11349-53;美国专利第7,255,862号)。在I期临床试验中,表达肿瘤抗原CEA的ALVAC病毒表现出极好的安全性特征,并且导致所选择患者的CEA特异性T细胞应答增加;然而,未观察到客观的临床应答(Marshall JL、Hawkins MJ、Tsang KY等人表达人癌胚抗原的复制缺陷型禽痘重组疫苗在癌症患者中的I期研究(Phase I study in cancer patients of a replication-defective avipox recombinant vaccine that expresses human carcinoembryonic antigen.)《临床肿瘤学杂志(J.Clin.Oncol.)》1999;17:332-7)。

[0485] 在一些实施例中,经修饰的安卡拉牛痘(MVA)病毒可以用作抗原疫苗或免疫原性组合物的病毒载体。MVA是正痘病毒家族的成员,并且由安卡拉牛痘病毒菌株(CVA)的鸡胚成纤维细胞的约570次连续传代产生(参见例如Mayr,A.等人,《感染(Infection)》3,6-14,1975)。由于这些传代,与CVA相比,所得MVA病毒含有的基因组信息少31千碱基,并且受到宿主细胞的高度限制(Meyer,H.等人,《普通病毒学杂志(J.Gen.Virol.)》72,1031-1038,1991)。MVA的特征在于其极度减毒,即毒力或感染能力降低,但仍具有极好的免疫原性。在各种动物模型中进行测试时,MVA被证明是无毒的,即使在免疫抑制个体中也是如此。此外,MVA-BN®-HER2是设计用于治疗HER-2阳性乳腺癌的候选免疫疗法,并且目前正处于临床试验阶段。(Mandl等人,《癌症免疫学免疫疗法》2012年1月;61(1):19-29)。已经描述了制造和使用重组MVA的方法(例如参见美国专利第8,309,098号和第5,185,146号,所述美国专利特此整体并入)。

[0486] 用于表达多肽的合适的宿主细胞包含在适当启动子控制下的原核生物、酵母、昆虫或高等真核细胞。原核生物包含革兰氏阴性或革兰氏阳性生物,例如大肠杆菌或芽孢杆菌纲。高等真核细胞包含哺乳动物来源的已建立细胞系。还可以采用无细胞翻译系统。与细菌、真菌、酵母和哺乳动物细胞宿主一起使用的适当的克隆和表达载体是本领域众所周知的(参见Pouwels等人,克隆载体:实验室手册(Cloning Vectors:A Laboratory Manual),纽约爱思唯尔出版(Elsevier,N.Y.),1985)。

[0487] 不同哺乳动物或昆虫细胞培养系统也有利地用于表达重组蛋白。可以在哺乳动物细胞中表达重组蛋白,因为此类蛋白质通常被正确折叠、适当修饰并且完全功能化。合适的哺乳动物宿主细胞系的实例包含Gluzman(《细胞》23:175,1981)描述的猴肾细胞的COS-7系和能够表达适当载体的其它细胞系,包含例如L细胞、C127、3T3、中国仓鼠卵巢(CHO)、293、HeLa和BHK细胞系。哺乳动物表达载体可以包括非转录元件如复制起点、与待表达的基因连接的合适启动子和增强子,以及其它5'或3'侧非转录序列,以及5'或3'非翻译序列,如必要的核糖体结合位点、聚腺苷酸化位点、剪接供体和受体位点以及转录终止序列。用于在昆虫细胞中产生外源蛋白的杆状病毒系统由Luckow和Summers,《生物/技术(Bio/Technology)》6:47 1988)综述。

[0488] 宿主细胞用可以是例如克隆载体或表达载体的载体进行基因工程化(转导或转化或转染)。载体可以呈例如质粒、病毒颗粒、噬菌体等的形式。可以在常规的营养培养基中培养经工程化的宿主细胞,所述营养培养基被修饰以适用于激活启动子、选择转化体或扩增多核苷酸。培养条件(如温度、pH等)是先前与所选的用于表达的宿主细胞一起使用的那些

条件,并且对于普通技术人员而言将是显而易见的。

[0489] 作为适当的宿主的代表性实例,可能提及:细菌细胞,如大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、鼠伤寒沙门氏菌和假单胞菌属、链霉菌属和葡萄球菌属中的各种物种;如酵母等真菌细胞;如果蝇属(*Drosophila*)和Sf9等昆虫细胞;动物细胞,如Gluzman,《细胞》23:175(1981)描述的猴肾成纤维细胞的COS-7系和其它能够表达相容载体的细胞系,例如C127、3T3、CHO、HeLa和BHK细胞系或鲍斯黑色素瘤(*Bowes melanoma*);植物细胞等。根据本文的教导,适当宿主的选择被认为处于本领域的技术人员的范围内。

[0490] 还可以使用酵母、昆虫或哺乳动物细胞宿主,采用合适的载体和控制序列。哺乳动物表达系统的实例包含Gluzman,《细胞》23:175(1981)描述的猴肾成纤维细胞的COS-7系和其它能够表达相容载体的细胞系,例如C127、3T3、CHO、HeLa和BHK细胞系。

[0491] 本文所描述的多核苷酸可以在人细胞(例如,包含树突细胞的免疫细胞)中施用和表达。人密码子使用表可以用于指导每个氨基酸的密码子选择。此类多核苷酸包括在表位和/或类似物之间的间隔氨基酸残基,如上文所描述的那些或者可以包括与表位和/或类似物(和/或CTL(例如,CD8<sup>+</sup>)、Th(例如,CD4<sup>+</sup>)和B细胞表位)相邻的天然存在的侧翼序列。

[0492] 本领域技术人员众所周知的标准调节序列可以包含在载体中以确保在人靶细胞中的表达。期望若干个载体元件:具有用于多核苷酸的下流克隆位点的启动子,例如小基因插入;用于有效转录终止的多腺苷酸化信号;大肠杆菌复制起点;和大肠杆菌可选择的标志物(例如,氨苄青霉素或卡那霉素抗性)。许多启动子可以用于此目的,例如人巨细胞病毒(hCMV)启动子。参见例如针对其它合适的启动子序列的美国专利第5,580,859号和第5,589,466号。在一些实施例中,启动子是CMV-IE启动子。

[0493] 用于真核宿主,尤其是哺乳动物或人的有用的表达载体包含例如包括来自SV40、牛乳头瘤病毒、腺病毒和巨细胞病毒的表达控制序列的载体。用于细菌宿主的有用的表达载体包含已知的细菌质粒,如来自大肠杆菌的质粒,包含pCR1、pBR322、pMB9和其衍生物、更广泛的宿主范围质粒,如M13和丝状单链DNA噬菌体。

[0494] 可以通过多种不同的方法将载体引入动物组织。两种最流行的方法是使用标准皮下注射针注射含DNA的盐水以及基因枪递送。《科学美国人(Scientific American)》(Weiner等人,(1999)《科学美国人》281(1):34-41)展示了DNA疫苗质粒的构建和其随后通过这两种方法递送到宿主中的示意图。盐水注射通常在骨骼肌中肌内(IM)或皮内(ID)进行,其中DNA被递送到细胞外空间。这可以通过电穿孔通过用如布比卡因(bupivacaine)等肌毒素暂时破坏肌肉纤维;或使用盐水或蔗糖的高渗溶液来辅助(Alarcon等人,(1999)《寄生虫学进展(Adv.Parasitol.)》《寄生虫学进展》42:343-410)。对这种递送方法的免疫应答可能受到许多因素的影响,包含针类型、针排列、注射速度、注射体积、肌肉类型以及被注射动物的年龄、性别和生理状况(Alarcon等人,(1999)《寄生虫学进展》《寄生虫学进展》42:343-410)。

[0495] 基因枪递送,即其它常用的递送方法,使用压缩氦作为促进剂,将吸附在金或钨微粒上的质粒DNA(pDNA)弹道加速进入靶细胞(Alarcon等人,(1999)《寄生虫学进展》《寄生虫学进展》42:343-410;Lewis等人,(1999)《病毒研究进展(Advances in Virus Research)》(学术出版社)54:129-88)。

[0496] 替代性递送方法可以包含将裸DNA气溶胶滴注到如鼻和肺黏膜等黏膜表面(Lewis

等人, (1999).《病毒研究进展》(学术出版社) 54:129-88) 和将pDNA局部施用于眼睛和阴道粘膜(Lewis等人, (1999)《病毒研究进展》(学术出版社) 54:129-88)。使用阳离子脂质体-DNA制剂、可生物降解的微球、用于肠粘膜口服施用的减毒志贺氏菌属(*Shigella*)或李斯特菌属(*Listeria*)载体以及重组腺病毒载体也已实现粘膜表面递送。DNA或RNA也可以在细胞膜的轻微机械破坏后被递送到细胞,暂时使细胞透化。此类温和的膜机械破坏可以通过轻轻地迫使细胞通过小孔来完成(Sharei等人,功能性大分子离体胞质递送到免疫细胞(*Ex Vivo Cytosolic Delivery of Functional Macromolecules to Immune Cells*),《公共科学图书馆期刊(PLOS ONE)》(2015))。

[0497] 用于将多核苷酸引入宿主细胞的化学手段包含胶态分散系统,例如大分子复合物、纳米胶囊、微球、珠、和基于脂质的系统(包含水包油乳剂、微团、混合胶束、和脂质体)。用作体外和体内递送媒介剂的示例性胶态系统是脂质体(例如人工膜囊泡)。在利用非病毒递送系统的情况下,示例性递送媒介物是脂质体。“脂质体”是涵盖由封闭的脂质双层或聚集体的生成而形成的各种单层和多层脂质媒介剂的通用术语。脂质体可以表征为具有带有磷脂双层膜和内部水性介质的囊泡结构。多层脂质体具有由水性介质隔开的多个脂质层。当磷脂悬浮在过量的水溶液中时,磷脂会自发形成。脂质成分在形成封闭结构之前进行自我重排,并且在脂质双层之间截留水和溶解的溶质(Ghosh等人,《糖生物学(*Glycobiology*)》5:505-10(1991))。然而,还涵盖在溶液中具有不同于正常囊泡结构的结构的组合物。例如,脂质可能呈现胶束结构或仅作为脂质分子的不均匀聚集体存在。还考虑了脂质转染胺-核酸复合物。

[0498] 考虑使用脂质调配物将核酸引入宿主细胞(体外、离体或体内)。另一方面,核酸可以与脂质缔合。可以将与脂质缔合的核酸包封在脂质体的含水内部、散布在脂质体的脂质双层、经由与脂质体和寡核苷酸二者缔合的连接分子连接至脂质体、捕获在脂质体中、与脂质体复合、分散在含有脂质的溶液中、与脂质混合、与脂质合并、作为脂质中的悬浮液而含有、含有微团或与微团复合、或以其它方式与脂质缔合。与脂质、脂质/DNA或脂质/表达载体缔合的组合物分不限于溶液中的任何具体结构。例如,它们可以按以下存在:双层结构、微团、或“塌陷”结构。它们还可以简单地散布在溶液中,可能形成大小或性状并不均匀的聚集体。脂质是可以是天然存在的脂质或合成脂质的脂肪物质。例如,脂质包含在细胞质中天然存在的脂肪滴,以及含有长链脂肪烃的化合物及其衍生物(例如脂肪酸、醇、胺、氨基醇、和醛)的类别。

[0499] 适合使用的脂质可以从商业来源获得。例如,二肉豆蔻基磷脂酰胆碱(“DMPC”)可以从密苏里州圣路易斯西格玛公司(Sigma, St. Louis, Mo.)获得;磷酸二鲸蜡脂(“DCP”)可以从K&K实验室(K&K Laboratories)(纽约州普莱恩维尤(Plainview, N.Y.))获得;胆固醇(“Choi”)可以从Calbiochem-Behring公司(Calbiochem-Behring)获得;二肉豆蔻基磷脂酰甘油(“DMPG”)和其它脂质可以从Avanti极性脂质公司(Avanti Polar Lipids, Inc.)(阿拉巴马州伯明翰(Birmingham, Ala.))获得。氯仿或氯仿/甲醇中的脂质储备溶液可以储存在约-20°C下。氯仿被用作唯一的溶剂,因为氯仿比甲醇更容易蒸发。在一些实施例中,脂质对于将编码所关注的蛋白质的核酸递送到细胞中是必需的。编码如本文所描述的融合多肽的核酸构建体可以通过脂质组合物递送,例如细胞内的脂质体,用于表达融合多肽。在一些实施例中,脂质体包括一个或多个阳离子脂质。在一些实施例中,脂质体包括至少一个阳离子

脂质和至少一个非阳离子脂质。

[0500] 在一些实施例中,载体包括编码包括第一新表位的第一肽和包括第二新表位的第二肽的多核苷酸。在一些实施例中,第一肽和第二肽衍生自相同蛋白质。至少两个不同的肽可以因长度、氨基酸序列或两者而异。肽衍生自任何已知或已被发现含有肿瘤特异性突变的蛋白质。在一些实施例中,载体包括包含蛋白质的第一新表位的第一肽和包含相同蛋白质的第二新表位的第二肽,其中第一肽不同于第二肽,并且其中第一新表位包括突变且第二新表位包括相同突变。在一些实施例中,载体包括包含蛋白质第一区域的第一新表位的第一肽和包含相同蛋白质第二区域的第二新表位的第二肽,其中第一区域包括第二区域的至少一个氨基酸,其中第一肽不同于第二肽,并且其中第一新表位包括第一突变并且第二新表位包括第二突变。在一些实施例中,所述第一突变和所述第二突变是相同的。在一些实施例中,突变选自由以下组成的组:点突变、剪接位点突变、移码突变、通读突变、基因融合突变和其任何组合。

[0501] 在一些实施例中,载体包括与启动子可操作地连接的多核苷酸。在一些实施例中,载体是自扩增的RNA复制子、质粒、噬菌体、转座子、粘粒、病毒或病毒粒子。在一些实施例中,载体衍生自逆转录病毒、慢病毒、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒、痘病毒、 $\alpha$ 病毒、牛痘病毒、乙型肝炎病毒、人乳头瘤病毒或其假型。在一些实施例中,载体是非病毒载体。在一些实施例中,非病毒载体是纳米颗粒、阳离子脂质、阳离子聚合物、金属纳米聚合物、纳米棒、脂质体、胶束、微泡、细胞穿透肽或脂质球。

#### [0502] T细胞和T细胞受体

[0503] T细胞是T淋巴细胞,在胸腺中成熟并产生T细胞受体(TCR)的免疫系统细胞。T细胞可以是原初的,即它们不暴露于抗原;与具有抗原暴露和记忆的更成熟的T细胞相比,展现出CD62L、CCR7、CD28、CD3、CD127和CD45RA的表达增加,而CD45RO的表达减少;记忆T细胞( $T_M$ ) (经历过抗原且寿命长)和效应细胞(经历过抗原,具有细胞毒性)。 $T_M$ 可以进一步分为中央记忆T细胞亚群( $TC_M$ ,与原初T细胞相比,CD62L、CCR7、CD28、CD127、CD45RO和CD95的表达增加,而CD54RA的表达减少)和效应记忆T细胞( $T_{EM}$ ,与原初T细胞或 $TC_M$ 相比,CD62L、CCR7、CD28、CD45RA的表达减少,而CD127的表达增加)——效应T细胞( $T_E$ )是指经历过抗原的CD8+细胞毒性T淋巴细胞,与 $TC_M$ 相比,CD62L、CCR7、CD28的表达减少,并且颗粒酶和穿孔素呈阳性——其它示例性T细胞包含调节性T细胞,如CD4+CD25+ (Foxp3+) 调节性T细胞和Treg17细胞以及Tr1、Th3、CD8+CD28-和Qa-1限制性T细胞。

[0504] 一方面,本公开提供了用于靶向新抗原以暴露原初T细胞的机制。淋巴结具有原初T细胞。将抗原肽靶向到淋巴结有助于将驻留的原初T细胞暴露于抗原,因此会生成新的引发T细胞。当用富含新抗原的肽制备多功能抗体时,随后在淋巴结中引发的T细胞针对新抗原引发并且对肿瘤或癌症具有免疫原性。

[0505] 在另一个实施例中,本公开提供了一种组合物,所述组合物包括包含蛋白质第一区域的第一新表位的第一肽和包含相同蛋白质第二区域的第二新表位的第二肽,其中第一区域包括第二区域的至少一个氨基酸,其中第一肽不同于第二肽,并且其中第一新表位包括第一突变并且第二新表位包括第二突变。在一些实施例中,第一新表位与I类HLA蛋白结合以形成I类HLA-肽复合物。在一些实施例中,第一新表位与II类HLA蛋白结合以形成II类HLA-肽复合物。在一些实施例中,第二新表位与II类HLA蛋白结合以形成II类HLA-肽复合

物。在一些实施例中，第二新表位与I类HLA蛋白结合以形成I类HLA-肽复合物。在一些实施例中，第一新表位激活CD8<sup>+</sup> T细胞。在一些实施例中，第一新表位激活CD4<sup>+</sup> T细胞。在一些实施例中，第二新表位激活CD4<sup>+</sup> T细胞。在一些实施例中，第二新表位激活CD8<sup>+</sup> T细胞。在一些实施例中，CD4<sup>+</sup> T细胞的TCR与II类HLA-肽复合物结合。在一些实施例中，CD8<sup>+</sup> T细胞的TCR与II类HLA-肽复合物结合。在一些实施例中，CD8<sup>+</sup> T细胞的TCR与I类HLA-肽复合物结合。在一些实施例中，CD4<sup>+</sup> T细胞的TCR与I类HLA-肽复合物结合。

[0506] 在一些实施例中，第一TCR是对第一新表位具有特异性的第一嵌合抗原受体，并且第二TCR是对第二新表位具有特异性的第二嵌合抗原受体。在一些实施例中，第一T细胞是细胞毒性T细胞。在一些实施例中，第一T细胞是 $\gamma$   $\delta$ T细胞。在一些实施例中，第二T细胞是辅助T细胞。在一些实施例中，第一TCR和/或第二TCR以小于1,000nM、900nM、800nM、700nM、600nM、500nM、250nM、150nM、100nM、50nM、25nM或10nM的K<sub>D</sub>或IC<sub>50</sub>与HLA肽复合物结合。在一些实施例中，第一TCR和/或第二TCR以小于1,000nM、900nM、800nM、700nM、600nM、500nM、250nM、150nM、100nM、50nM、25nM或10nM的K<sub>D</sub>或IC<sub>50</sub>与HLA I类肽复合物结合。在一些实施例中，第一TCR和/或第二TCR以小于2,000、1,500、1,000nM、900nM、800nM、700nM、600nM、500nM、250nM、150nM、100nM、50nM、25nM或10nM的K<sub>D</sub>或IC<sub>50</sub>与HLA II类肽复合物结合。

[0507] 抗原呈递细胞

[0508] 新抗原性肽或蛋白质可以作为含有如本文所描述的肽、蛋白质或多核苷酸的抗原呈递细胞(例如,树突细胞)提供。在其它实施例中,此类抗原呈递细胞用于刺激T细胞以用于患者。因此,本公开的一个实施例是含有至少一个抗原呈递细胞(例如,树突细胞)的组合物,所述抗原呈递细胞被脉冲或装载有本文所描述的一个或多个新抗原性肽或多核苷酸。在一些实施例中,此类APC是自体的(例如,自体树突细胞)。可替代地,从患者分离的外周血单核细胞(PBMC)可以离体装载新抗原性肽或多核苷酸。在相关实施例中,将此类APC或PBMC注射回患者体内。在一些实施例中,抗原呈递细胞是树突细胞。在相关实施例中,树突细胞是用新抗原性肽或核酸脉冲的自体树突细胞。新抗原性肽可以是引起适当T细胞应答的任何合适的肽。使用来自肿瘤相关抗原的肽脉冲的自体树突细胞的T细胞疗法公开于Murphy等人(1996)《前列腺(The Prostate)》29,371-380和Tjua等人(1997)《前列腺(The Prostate)》32,272-278。在一些实施例中,T细胞是CTL(例如,CD8<sup>+</sup>)。在一些实施例中,T细胞是辅助T淋巴细胞(Th(例如,CD4<sup>+</sup>))。

[0509] 在一些实施例中,本公开提供了一种组合物,所述组合物包括基于细胞的免疫原性药物组合物,所述组合物还可以施用于受试者。例如,基于抗原呈递细胞(APC)的免疫原性药物组合物可以使用如合适的和本领域理解的众所周知的技术、载体和赋形剂中的任何一种来调配。APC包含单核细胞、单核细胞衍生细胞、巨噬细胞和树突细胞。有时,基于APC的免疫原性药物组合物可以是基于树突细胞的免疫原性药物组合物。

[0510] 基于树突细胞的免疫原性药物组合物可以通过本领域众所周知的任何方法制备。在一些情况下,可通过离体或体内方法制备基于树突细胞的免疫原性药物组合物。离体方法可以包括使用用本文所描述的多肽离体脉冲的自体DC,以在施用于患者之前激活或装载DC。体内方法可以包括使用与本文所描述的多肽偶联的抗体靶向特定DC受体。基于DC的免疫原性药物组合物可以进一步包括如TLR3、TLR-7-8和CD40激动剂等DC激活剂。基于DC的免疫原性药物组合物可以进一步包括佐剂和药学上可接受的载体。

[0511] 抗原呈递细胞 (APC) 可以由多种来源制备, 包含人和非人灵长类动物、其它哺乳动物和脊椎动物。在某些实施例中, APC可以由人或非人脊椎动物的血液中制备。APC也可以从富集的血细胞群体中分离出来。血细胞群体可以通过本领域技术人员已知的方法制备。此类方法通常包含收集肝素化血液、单采或血细胞分离、血沉棕黄层的制备、玫瑰花结、离心、密度梯度离心 (例如, 使用聚蔗糖、胶体二氧化硅颗粒和蔗糖)、差异裂解非血细胞和过滤。还可以通过从受试者收集血液、除颤以去除血小板和溶解红细胞来制备血细胞群体。血细胞群体可以任意地富集单核树突细胞前体。

[0512] 根据富集的血细胞群体的期望用途, 可以从各种受试者获得血细胞群体。受试者可以是健康的受试者。可替代地, 可以从需要免疫刺激的受试者获得血细胞, 例如癌症患者或免疫刺激将对其有益的其它患者。同样, 血细胞可以从需要免疫抑制的受试者获得, 例如患有自身免疫性疾病 (例如, 类风湿性关节炎、糖尿病、狼疮、多发性硬化症等) 的患者。血细胞群体还可以从HLA匹配的健康个体中获得。

[0513] 当血液用作APC的来源时, 可以使用保持其活力的常规方法获得血液血细胞。根据本公开的一个方面, 可以将血液稀释到可以含有或不含肝素或其它合适的抗凝剂的培养基中。血液与培养基的体积可以为约1:1。可以通过在4°C下以约1,000rpm (150g) 在培养基中离心血液来浓缩细胞。可以通过将细胞重新悬浮于本领域已知的任何数量的溶解红细胞的溶液例如氯化铵中来耗尽血小板和红细胞。例如, 混合物可以是按体积计约1:1的培养基与氯化铵。可以通过离心浓缩细胞并且在期望的溶液中洗涤直到获得基本上不含血小板和红细胞的血细胞群体。组织培养中常用的任何等渗溶液都可以用作将血液血细胞与血小板和红细胞分离的培养基。此类等渗溶液的实例可以是磷酸盐缓冲盐水、汉克斯平衡盐溶液 (Hanks balanced salt solution) 和完全生长培养基。还可以通过淘析纯化APC和/或APC前体细胞。

[0514] 在一些实施例中, APC可以是在炎性或以其它方式激活的条件下的非标称APC。例如, 非标称APC可以包含用干扰素- $\gamma$  刺激的上皮细胞、T细胞、B细胞和/或被诱导APC活性的因子或条件激活的单核细胞。可以根据本领域已知的方法制备此类非标称APC。

[0515] 根据APC的类型, APC可以根据需要进行培养、扩增、分化和/或成熟。APC可以在任何合适的培养容器, 例如培养板、烧瓶、培养袋和生物反应器中培养。

[0516] 在某些实施例中, APC可以在合适的培养基或生长培养基中培养以维持和/或扩增制剂中APC的数量。培养基可以根据分离的APC类型进行选择。例如, 如成熟树突细胞等成熟APC可以在适合其维持和扩增的生长培养基中培养。培养基可以补充有氨基酸、维生素、抗生素、二价阳离子等。另外, 细胞因子、生长因子和/或激素可以包含在生长培养基中。例如, 为了维持和/或扩增成熟树突细胞, 可以添加细胞因子, 如粒细胞/巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 和/或白细胞介素4 (IL-4)。在其它实施例中, 可以培养和/或扩增未成熟APC。未成熟树突细胞可以保留摄取靶mRNA和处理新抗原的能力。在一些实施例中, 未成熟树突细胞可以在适合其维持和培养的培养基中培养。培养基可以补充有氨基酸、维生素、抗生素、二价阳离子等。另外, 细胞因子、生长因子和/或激素可以包含在生长培养基中。

[0517] 其它未成熟APC也可以类似地进行培养或扩增。未成熟APC的制剂可以成熟以形成成熟APC。APC的成熟可以在暴露于新抗原性肽期间或之后发生。在某些实施例中, 未成熟树突细胞的制剂可以成熟。合适的成熟因子包含例如细胞因子TNF- $\alpha$ 、细菌产物 (例如, BCG)

等。另一方面,分离的APC前体可以用于制备未成熟APC的制剂。APC前体可以培养、分化和/或成熟。在某些实施例中,单核细胞树突细胞前体可以在存在补充有氨基酸、维生素、细胞因子和/或二价阳离子的合适培养基的情况下培养,以促进单核细胞树突细胞前体分化为未成熟树突细胞。在一些实施例中,APC前体从PBMC中分离。PBMC可以从供体例如人类供体获得,并且可以新鲜使用或冷冻以备将来使用。在一些实施例中,APC由一种或多种APC制剂制备。在一些实施例中,APC包括装载有包括第一新表位和第二新表位的第一新抗原性肽和第二新抗原性肽或编码包括第一新表位和第二新表位的第一新抗原性肽和第二新抗原性肽的多核苷酸的APC。在一些实施例中,APC是自体APC、同种异体APC或人工APC。

[0518] 在一实施例中,本公开提供了一种组合物,所述组合物包括APC,所述APC包括包含第一新表位的第一肽和包含第二新表位的第二肽,其中第一肽不同于第二肽,并且其中第一新表位包括突变且第二新表位包括相同突变。在一些实施例中,第一肽和第二肽衍生自相同蛋白质。在另一个实施例中,本公开提供了一种组合物,所述组合物包括APC,所述APC包括包含蛋白质第一区域的第一新表位的第一肽和包含相同蛋白质第二区域的第二新表位的第二肽,其中第一区域包括第二区域的至少一个氨基酸,其中第一肽不同于第二肽,并且其中第一新表位包括第一突变并且第二新表位包括第二突变。在一些实施例中,所述第一突变和所述第二突变是相同的。

[0519] 佐剂

[0520] 佐剂可以用于增强在接受如本文提供的组合物的患者中引发的免疫应答(体液和/或细胞)。组合物中的活性成分包括抗原肽。佐剂掺入可以进一步增强组合物的抗原应答。有时,佐剂可以引发Th1型应答。其它时间,佐剂可以引发Th2型应答。Th1型应答的特征可以在于产生如IFN- $\gamma$ 等细胞因子,与之相反,Th2型应答的特征可以在于产生如IL-4、IL-5和IL-10等细胞因子。

[0521] 在一些方面,如MPLA和MDP等基于脂质的佐剂可以与本文所公开的免疫原性药物组合物一起使用。例如,单磷酸脂质A (MPLA) 是导致脂质体抗原向特定T淋巴细胞的呈递增加的佐剂。另外,胞壁酰二肽 (MDP) 也可以作为合适的佐剂与本文所描述的免疫原性药物调配物结合使用。

[0522] 合适的佐剂是本领域已知的(参见,WO 2015/095811)并且包含但不限于poly(I:C)、poly-ICLC、Hiltonol、STING激动剂、1018ISS、铝盐、Amplivax、AS15、BCG、CP-870,893、CpG7909、CyaA、dSLIM、GM-CSF、IC30、IC31、咪喹莫特(Imiquimod)、ImuFact IMP321、IS贴片、ISS、ISCOMATRIX、JuvImmune、LipoVac、MF59、单磷酸脂质A、Montanide IMS 1312、Montanide ISA 206、Montanide ISA 50V、Montanide ISA-51、OK-432、OM-174、OM-197-MP-EC、ONTAK、PepTel®载体系统、PLG微粒、瑞喹莫德(resiquimod)、SRL172、病毒体和其它病毒样颗粒、YF-17D、VEGF trap、R848、 $\beta$ -葡聚糖、Pam3Cys、Pam3CSK4、阿奎拉的QS21刺激元(美国马萨诸塞州伍斯特阿奎拉生物技术公司(Aquila Biotech,Worcester,Mass.,USA)),其源自皂甙、分枝杆菌提取物和合成细菌细胞壁模拟物,以及其它专有佐剂,如里比公司(Ribi)的Detox、Quil或Superfos。佐剂还包含不完全弗氏(Freund's)或GM-CSF。先前已描述了若干种对树突细胞具有特异性的免疫佐剂(例如,MF59)和其制备方法(Dupuis M等人,《细胞免疫学(Cell Immunol.)》1998;186(1):18-27;Allison A C;《生物标准化的发展(Dev.Biol.Stand.)》1998;92:3-11)(Mosca等人《生物科学前沿(Frontiers in

Bioscience)》,2007;12:4050-4060) (Gamvrellis等人《免疫学和细胞生物学 (Immunol& Cell Biol.)》2004;82:506-516)。还可以使用细胞因子。若干种细胞因子与影响树突细胞向淋巴组织的迁移直接相关(例如, TNF- $\alpha$ ),加速树突细胞成熟为T淋巴细胞的有效抗原呈递细胞(例如, GM-CSF、PGE1、PGE2、IL-1、IL-1b、IL-4、IL-6和CD40L) (美国专利第5,849,589号,所述专利通过引用整体并入本文)并且充当免疫佐剂(例如, IL-12) (Gabrilovich D I等人,《以肿瘤免疫学为重点的免疫疗法杂志 (J. Immunother. Emphasis Tumor Immunol.)》1996 (6) :414-418)。

[0523] 佐剂还可以包括如细胞因子等刺激分子。细胞因子的非限制性实例包含: CCL20、 $\alpha$ -干扰素 (IFN- $\alpha$ )、 $\beta$ -干扰素 (IFN- $\beta$ )、 $\gamma$ -干扰素、血小板衍化生长因子 (PDGF)、TNF $\alpha$ 、TNF $\beta$  (淋巴毒素 $\alpha$  (LT $\alpha$ ))、GM-CSF、表皮生长因子 (EGF)、皮肤T细胞吸引趋化因子 (CTACK)、上皮胸腺表达趋化因子 (TECK)、黏膜相关上皮趋化因子 (MEC)、IL-12、IL-15、IL-28、MHC、CD80、CD86、IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-18、MCP-1、MIP-1a、MIP-1 $\beta$ 、IL-8、L-选择素、P-选择素、E-选择素、CD34、GlyCAM-1、MadCAM-1、LFA-1、VLA-1、Mac-1、p150.95、PECAM、ICAM-1、ICAM-2、ICAM-3、CD2、LFA-3、M-CSF、G-CSF、IL-18的突变形式、CD40、CD40L、血管生长因子、成纤维细胞生长因子、IL-7、神经生长因子、血管内皮生长因子、Fas、TNF受体、Fit、Apo-1、p55、WSL-1、DR3、TRAMP、Apo-3、AIR、LARD、NGRF、DR4、DR5、KILLER、TRAIL-R2、TRICK2、DR6、Caspase ICE、Fos、c-jun、Sp-1、Ap-1、Ap-2、p38、p65Rel、MyD88、IRAK、TRAF6、I $\kappa$ B、无活性NIK、SAP K、SAP-I、JNK、干扰素应答基因、NF $\kappa$ B、Bax、TRAIL、TRAILrec、TRAILrecDRC5、TRAIL-R3、TRAIL-R4、RANK、RANK LIGAND、Ox40、Ox40 LIGAND、NKG2D、MICA、MICB、NKG2A、NKG2B、NKG2C、NKG2E、NKG2F、TAPI和TAP2。

[0524] 另外的佐剂包含: MCP-1、MIP-1a、MIP-1 $\beta$ 、IL-8、RANTES、L-选择素、P-选择素、E-选择素、CD34、GlyCAM-1、MadCAM-1、LFA-1、VLA-1、Mac-1、p150.95、PECAM、ICAM-1、ICAM-2、ICAM-3、CD2、LFA-3、M-CSF、G-CSF、IL-4、IL-18的突变形式、CD40、CD40L、血管生长因子、成纤维细胞生长因子、IL-7、IL-22、神经生长因子、血管内皮生长因子、Fas、TNF受体、Fit、Apo-1、p55、WSL-1、DR3、TRAMP、Apo-3、AIR、LARD、NGRF、DR4、DR5、KILLER、TRAIL-R2、TRICK2、DR6、胱天蛋白酶ICE、Fos、c-jun、Sp-1、Ap-1、Ap-2、p38、p65Rel、MyD88、IRAK、TRAF6、I $\kappa$ B、无活性NIK、SAP K、SAP-1、JNK、干扰素应答基因、NF $\kappa$ B、Bax、TRAIL、TRAILrec、TRAILrecDRC5、TRAIL-R3、TRAIL-R4、RANK、RANK配体、Ox40、Ox40配体、NKG2D、MICA、MICB、NKG2A、NKG2B、NKG2C、NKG2E、NKG2F、TAP1、TAP2和其功能片段。

[0525] 在一些方面,佐剂可以是toll样受体调节剂。toll样受体调节剂的实例包含TLR-9激动剂,并且不限于如咪喹莫特等toll样受体的小分子调节剂。与本文所描述的免疫原性药物组合物组合使用的佐剂的其它实例可以包含但不限于皂苷、CpG ODN等。有时,佐剂选自细菌类毒素、聚氧丙烯-聚氧乙烯嵌段聚合物、铝盐、脂质体、CpG聚合物、水包油乳液或其组合。有时,佐剂是水包油乳剂。水包油乳剂可以包含至少一种油和至少一种表面活性剂,其中油和表面活性剂是可生物降解的(可代谢的)和生物相容的。乳剂中的油滴直径可以小于5 $\mu$ m,并且甚至可以具有亚微米直径,其中这些小尺寸是通过微流化器实现的,以提供稳定的乳剂。大小小于220nm的液滴可以经受过滤灭菌。

[0526] 用于用表位肽生成多功能抗体的方法

[0527] 多功能抗体可以通过克隆生成。在一种方法中,首先生成包括抗原肽的亲本支架

组装体。可以用限制酶消化亲本支架,然后将包括所述表位的肽或多肽克隆到限制性位点以获得肽-支架单元,然后将所述肽-支架单元插入线性化的表达载体中。肽可以包括侧翼接头序列。可替代地,可以合成带有接头的肽序列;或可以通过PCR生成。为了便于将载体与插入物(要插入载体中的肽或多肽)接合,可以使用Gibson组装。Gibson克隆方法提供了快速且灵活的克隆策略,其中任何片段都可以在没有特定限制性位点的情况下接合,并且与序列无关。它涉及在(插入物中)DNA片段的5'和3'端处生成单链突出端的T5核酸外切酶回嚼,而载体通常具有交错端。这样产生的插入突出端在接触时与载体的交错端杂交,并且使用合适的连接酶进行填充连接。在一些情况下,可以生成较大的突出端,并且载体的突出端区域和插入物通过突出端的杂交接合,然后使用合适的连接酶连接以形成完整的载体。上文所描述的方案的变体是本领域技术人员可想到的并且被考虑在本公开的范围之内。

#### [0528] 人工微型蛋白质组疫苗

[0529] 积极的肿瘤根除免疫疗法需要高效、可以快速生成和广泛采用的治疗产物。使用受试者自己的新抗原肽激活T细胞的个性化医疗是免疫肿瘤学中新的且有前途的领域,但要注意的,制备新抗原疫苗可能需要数天到数周或甚至数月。另外,所述方法是昂贵的。因此寻求更高效且时间和成本有效的方法。目的是在短时间内鉴定和开发包括大多数新抗原以及还来自受试者的其它潜在有用抗原的快速且廉价的疫苗。此类产物应该很容易与任何已批准和正在开发的免疫疗法的现成组合集成;在复发后由另外的肿瘤样品重复制备或减少肿瘤间异质性的影响应该是廉价的;应该并入显著更广泛的潜在有用表位表示,应该激活受试者的CD8+和CD4+细胞等。本文提供了满足如上文所描述的特定未满足需求的用于疫苗产生的组合物和方法。

[0530] 一方面,本文提供了用于生成受试者特异性癌症疫苗的高效方法,所述方法绕过了新抗原预测的步骤。所述方法涉及人工微型蛋白质组疫苗(AmpVax)的生成。在此方法中,可以通过制备来自肿瘤细胞的全外显子组捕获RNA片段或来自受试者的新鲜冷冻石蜡包埋(FFPE)组织切片的文库来生成个性化癌症疫苗,所述文库编码由肿瘤细胞表达的全部或选择部分的蛋白质,包含所有或几乎所有新抗原以及肿瘤相关抗原和靠近内含子的另外区域和未翻译区域,所述区域可能含有不容易通过核酸测序和使用抗原预测算法可确定的新抗原翻译产物。cDNA是由全外显子组捕获RNA片段文库制备的。来自RNA片段的cDNA产物中的每种cDNA产物可以克隆到合适的表达载体中,并且在如细菌系统(例如,大肠杆菌表达系统)等合适的系统中表达。然后可以分离所表达的肽,将所述肽用作疫苗。在一些实施例中,由患有疾病的受试者的全外显子组捕获RNA文库表达的分离的肽是人工微型蛋白质组,其中外显子组捕获RNA来自受试者的患病细胞。然后可以纯化所表达的肽,并且无需进一步修饰即可用作疫苗。

[0531] 在一些实施例中,编码来自全外显子组捕获RNA片段文库(或换言之,全外显子组cDNA文库)的所表达的肽的多核苷酸被分离,并且亚克隆到蛋白质或蛋白质片段(例如,如说明书中其它地方所描述的支架蛋白)的上游以生成如多功能抗体等肽融合构建体,并且生成肽融合文库,所述文库可以容易地在如大肠杆菌系统等快速生物表达系统中以高产率表达。来自肽融合文库的所表达的蛋白质可以被分离、纯化并且作为人工微型蛋白质组(AmpVax)疫苗整体使用。

[0532] 一方面,与受试者的未患病细胞或标准未患病参考细胞相比,受试者的外显子组

捕获RNA进一步富集患病细胞中差异表达的RNA。癌细胞在一个或多个基因中积累体细胞突变,并且受试者的非癌细胞或健康个体的类似细胞中不存在此类突变。在一些实施例中,当与受试者的非癌症或健康细胞或非癌症参考细胞相比时,从癌细胞中的突变基因转录的RNA在核酸序列上是不同的。来自突变基因的此类RNA可以被认为是与参考相比差异表达的基因。差异表达的RNA包括例如突变基因产物,如点突变等或一个或多个核苷酸的插入或缺失。差异表达的RNA包括例如富含新抗原编码序列的RNA。在一些实施例中,选择在患病细胞或组织(例如,癌细胞或肿瘤)中相对于参考(例如,由非患病细胞或组织表达的RNA)差异表达的RNA用作AmpVax疫苗。

[0533] 从本质上讲,所述技术允许泛外显子组新抗原捕获和富集。

[0534] 上文所描述的差异表达的RNA可以通过用于富集差异表达基因的技术获得,例如涉及癌细胞衍生的RNA与参考RNA杂交,然后分离非杂交/错配区域的技术。示例性方法包含Mut S介导的错配DNA二聚体的分离。

[0535] 在一些实施例中,疫苗生成过程不需要测序。

[0536] 因此,文库的组成表示肿瘤细胞内所表达的蛋白质的含量,所述蛋白质与载体蛋白融合,以进行有效产生和抗原递送。

[0537] 所表达的蛋白质或蛋白质片段可以设计成(1)有利于良好的淋巴结保留的大尺寸(>约50-60kD);(2)模块化并且允许并入功能结构域(例如,并入CLEC9A;如用于表位交叉呈递和靶向树突细胞,尤其是期望的树突细胞亚群)并且(3)多价的(例如,含有肽序列的多个拷贝(例如,新抗原或功能结构域或支架结构域)以允许通过简单的基于添加-混合的功能化与携带佐剂、DC靶向或其它疫苗功能增强基团的抗支架表位定向抗体或抗体片段进行进一步的功能添加,其中每个分子具有多个添加的组分拷贝。例如,疫苗产物在大肠杆菌中表达并使用常规亲和技术、离子交换和/或大小排阻色谱法步骤进行纯化。疫苗可以在不需要测序或生物信息学,并且不需要合成多个定义序列寡核苷酸的情况下制备,因此可以快速制备。

[0538] 在一些实施例中,生物样品从患有疾病,例如癌症的受试者获得;生物样品可以是以下任何一种或多种:肿瘤活检、来自单采柱的细胞、来自外周血的细胞、石蜡包埋的组织切片或冷冻的石蜡包埋的组织样品。在一些实施例中,总细胞RNA从受试者的细胞获得。在某个实施例中,总细胞RNA从受试者的患病细胞获得,其中患病细胞是癌细胞或受感染细胞。在一些实施例中,总细胞RNA从受试者的患病细胞(例如,癌细胞)和受试者的未患病(例如,非癌细胞)获得,其可以用于相对于未患病细胞富集患病细胞中差异表达的RNA。在一些实施例中,

[0539] 本文所描述方法的一个优点是疫苗涵盖了潜在抗原的广泛代表性。

[0540] 本文所描述方法的另一个优点是它有利于表位扩散。

[0541] 本文所描述方法的另一个优点是它是安全的,没有毒性或副作用。

[0542] 本文所描述方法的另一个优点是它相对较快。在一些实施例中,在获得包括总细胞RNA的生物样品后少于2周内制备疫苗。在一些实施例中,在少于一周内制备疫苗。在一些实施例中,在少于12天、少于10天、少于9日、少于8日、少于7日、少于6日、少于5日、少于4日或少于3日内制备的疫苗。下文给出了所述方法的示例性简化工作流程,所述工作流程示出了从受试者分离细胞制备疫苗所需的大约时间:

[0543] (a) 全外显子组捕获RNA分离和cDNA文库制备:2天

[0544] (b) 质粒中的克隆:1天

[0545] (c) 蛋白质表达:扩增4到5天

[0546] (d) 纯化和疫苗组合物:1到2天;因此,所述过程可以在大约10天内完成。所述过程可以通过优化和进一步改进方案来加快。

[0547] 可以通过使用内部生成和优化的方案和表达系统进行来自外显子组捕获RNA的cDNA文库的克隆和表达。在示例性方案中,简言之,从受试者的生物样品中提取总RNA。生物样品可以包括来自受试者的癌症或肿瘤的细胞。在一些实施例中,生物样品可以包括第一生物样品,所述第一生物样品包括来自受试者的癌症或肿瘤的细胞或组织(新鲜的或固定的、保存的);并且包括第二生物样品,所述第二生物样品包括来自如受试者的非肿瘤细胞等非患病细胞的细胞或组织(新鲜的或固定的、保存的)。从生物样品中提取的RNA可以以机械方式、化学方式或酶促方式消化成长度为约24到约300个核苷酸碱基或长度为约45到450个核苷酸碱基;或长度为100到300个核苷酸碱基;或长度为约250个碱基的片段。一些保存的样品可以具有自然降解或剪切的RNA。可以使用随机引物,用逆转录酶从总RNA中制备cDNA。在一些实施例中,可以采用步骤来捕获转录组的编码区,例如RNA或cDNA外显子组捕获步骤。例如,RNA或cDNA文库可以与进而被生物素化的外显子特异性DNA或RNA诱饵杂交。杂交后,生物素化的DNA或RNA诱饵可以用链霉亲和素包被的磁性珠粒捕获。与外显子特异性诱饵结合的RNA或cDNA片段可以被拉下,并且未结合的RNA或cDNA片段可以被洗掉。然后例如在从捕获探针变性之后可以扩增剩余的捕获的RNA或cDNA片段。接下来可以将生成的cDNA片段克隆到表达载体中,以生成全外显子组捕获cDNA文库。在一些实施例中,使cDNA文库经受变性,任选地与链特异性衔接子连接;与参考外显子组文库或基因组文库杂交,并且通过穿过包括固定MutS蛋白的柱而经受含有DNA片段的突变的富集,所述固定MutS蛋白可以与具有至少一个核苷酸错配的DNA双链体结合。在一些实施例中,杂交的外显子组/参考文库可以通过与溶液中的MutS相互作用然后在柱上捕获MutS来经受含有DNA片段的突变的富集。表达质粒包括(a) 启动子序列;(b) 包括多核苷酸片段(在此情况下,来自cDNA文库的cDNA片段)的序列;以及(c) 理想情地,至少一个亲和和标签和/或允许从克隆的cDNA序列片段中鉴定所表达的肽的标签。示例性亲和和标签是:与Fc受体结合的肽序列、GST标签、His标签、与蛋白A结合的肽序列、与蛋白G或抗体表位或其结合片段结合的肽序列。在一些实施例中,可以包含用于容易鉴定所表达的肽序列的标签。用于所述目的的示例性标签除了还应该有助于所述目的的上文所描述的亲和和标签外,还包含HA标签、FLAG标签、His6-标签、荧光标签,如GFP、RFP或YFP。亲和和标签还可以是在多核苷酸片段下游表达的人支架蛋白区域。

[0548] 当表达载体在如细菌细胞表达系统等合适的细胞中表达时,亲和和标签可以用于分离和纯化翻译的肽。

[0549] 可以使用标准方法进行cDNA文库克隆。另外,可以包含若干修改来定制肽生成的过程。在克隆RT酶系统之前,使用cDNA作为第一链(或模板链)来生成双链,然后将所得双链DNA克隆到载体中。通常,反应管中的单个RT反应生成包括用于克隆的cDNA的插入双链DNA。简言之,插入物与表达载体连接,处于启动子序列的下游,并且所述载体可以在正链的3'端处或附近包括起始密码子。插入物可以直接连接在起始密码子的下游或起始密码子下游的1、2、3或更多个核苷酸。在一些实施例中,插入物可以通过接头序列与载体连接。

[0550] 在一些实施例中,cDNA片段可以在5'端处、3'端处或5'端和3'端处与接头融合。接头是短的多核苷酸序列。在一些实施例中,接头可以编码多肽或寡肽。接头可以被配置成促进接头的切割,即接头包括切割序列。在一些实施例中,切割序列可以是蛋白水解切割序列。切割可以是翻译后切割事件。在一些实施例中,接头多核苷酸可以包括用于消化核酸并促进克隆的限制性消化位点。

[0551] 在3'端处,插入物可以与包括框校验序列的序列连接。在一些实施例中,插入物的3'端可以与编码框校验序列下游的一个或多个亲和标签的序列连接。在一些实施例中,框校验序列包括编码亲和标签的序列。示例性框校验序列编码Val-Gly-Ser。

[0552] 在一些实施例中,框校验序列具有式 $N_1-N_2-N_3-N_4-N_5-N_6-N_7-N_8-N_9$ ;其中每个N独立地是选自由以下组成的组的核苷酸:A、T、U、C和G; $N_1-N_2-N_3$ 和 $N_4-N_5-N_6$ 以及 $N_7-N_8-N_9$ 中的每一个都不是终止密码子;并且 $N_2-N_3-N_4$ 和 $N_6-N_7-N_8$ 中的每一个是终止密码子。

[0553] 示例性克隆技术包含但不限于:TA克隆、Topo PCR克隆、平端克隆、捷威克隆(gateway cloning)等。

[0554] 在一些实施例中,将cDNA片段和5'-和/或3'-接头(如果存在)预连接在一起或作为PCR产物生成。在一些实施例中,包括cDNA片段的插入物;或者具有接头的cDNA片段作为一个整体与编码支架蛋白的多核苷酸序列连接;使得至少一种支架蛋白与至少一种cDNA片段在相同的阅读框中。在一些实施例中,亲本支架蛋白序列可以通过限制酶消化以连接插入物,其中插入物还包括在包括接头序列的侧翼区域中的限制性消化位点。在一些实施例中,侧翼为接头并且在每个DNA的任一侧上包括一个或多个支架肽序列的多个此类cDNA序列可以构成用于在合适的表达系统中克隆和表达的插入物。

[0555] 合适的表达系统可以是细菌表达系统。实例是如pTC7载体系统等大肠杆菌表达系统。然而,还可以考虑其它表达系统。实例包含基于哺乳动物细胞的表达系统、基于酵母的表达系统、基于昆虫细胞的表达系统或无细胞表达系统。

[0556] 在一些实施例中,使用杆状病毒表达系统(BAC)。

[0557] 在一些实施例中,使用噬菌体表达系统。

[0558] 正如本领域技术人员所很好理解的,克隆和表达允许一种载体在如大肠杆菌等细胞中表达。在一些实施例中,在将cDNA片段掺入支架盒之前首先检测插入物的表达。在某个实施例中,在从受试者大规模制造疫苗之前,对肽表达片段进行小规模分析。在一些实施例中,纯化步骤仅分离表达cDNA片段,这是从cDNA插入物表达的简单证明。克隆全外显子组捕获cDNA文库可能会出现多种情况。例如,(i)一些克隆的cDNA片段可以同框进入并同框退出,并且肽和亲和标签都被表达;(ii)一些克隆的cDNA片段可以同框进入,但非同框退出,在此类情况下,肽被表达但亲和标签不被表达;(iii)一些克隆的cDNA片段可以同框进入,并同框退出,并且部分肽被表达但亲和标签不被表达;(iv)一些克隆的cDNA片段可以非同框进入,并同框退出,并且没有肽被表达但亲和标签被表达;或者(v)一些克隆的cDNA片段可以非同框进入,并非同框退出,在此类情况下,既不是肽也不是亲和标签被表达。

[0559] 在一些实施例中,工作流程包含至少通过亲和标签的表达或亲和纯化标签的分离来首先鉴定肽,然后可以将纯化产物的一部分存档以供将来使用,如鉴定和从文库中表达更多相同的克隆;而其余用于生成肽疫苗。

[0560] 可以根据需要优化表达系统以扩大规模。

[0561] 在一些实施例中,生成了AmpVax全外显子组(AmpVax-外显子组)疫苗。通过此方法生成的疫苗包括疫苗中的全外显子组RNA生成的cDNA,如上文所描述的或基于肿瘤类型预期在肿瘤细胞中表达的全外显子组的选择部分。在一些实施例中,生成富含AmpVax的外显子组疫苗。与参考外显子组相比,通过此方法生成的疫苗包括在受试者患病细胞中针对表达富集的cDNA,如下文部分所描述。在描述这两种过程的示例性方案中,首先,将全外显子组捕获RNA片段化并且在两种方法中制备双链cDNA连接文库,其中每个cDNA片段与链特异性引物连接。然后使文库经受诱饵杂交,其中在AmpVax外显子组程序的情况下,外显子组被照此捕获;而在富含AmpVax的外显子组疫苗生成的情况下,使异源双链体经受MutS富集,然后是外显子组捕获步骤。MutS富集选择性地富集双链中的错配,从而富集cDNA序列中的突变。然后将全外显子组cDNA或MutS捕获的富集cDNA克隆到质粒中。

[0562] 用于外显子组分析和富集包括点突变的多核苷酸的方法:外显子组可以定义为基因组中在生物体中表达的所有基因。通常,信使RNA库反映了在特定时间在生物体的特定细胞或组织中表达的所有基因以及细胞或组织正在经历的一组条件。在人中,有占人基因组的约1%的约180,000个外显子或大约3000万个碱基对。从细胞中提取的总RNA包括总信使RNA储存库,可以使用合适的逆转录酶(RT)酶、合适的引物和必要的试剂,如含核苷酸(dNTP)、盐和缓冲液的无核酸酶溶液将所述总信使RNA储存库在体外转化为cDNA。在一些实施例中,然后将接头或衔接子与cDNA片段连接,然后将其与设计成仅捕获外显子的多核苷酸文库杂交。然后可以选择性地分离杂交的DNA片段并且克隆到表达载体中。如早前所描述的,通过使杂交的DNA与MutS蛋白接触并使用MutS柱捕获,可以实现选择性分离包括如点突变等突变的DNA片段。可以使用MutS分离来分离杂交的DNA中包含1个或几个核苷酸(例如,少于五个)错配的突变。

[0563] “参考基因组”是用作基因组比较或测序读数比对的基础的定义的基因组。参考基因组可以是特定基因组的子集或全部;例如,基因组序列的子集,如外显子组序列或完整的基因组序列。

[0564] 可以从由受试者组织中提取的总RNA进行全外显子组分析。从受试者获得的生物组织样品可以以各种形式保存以供将来分析,例如,以新鲜组织分离物、从新鲜组织中提取和储存的总RNA、新鲜快速冷冻组织或福尔马林固定石蜡包埋组织(FFPE)的形式,后者是最常见的样品形式,适用于组织学分析以及RNA提取。然而,本领域技术人员知道并理解,虽然FFPE样品易于保存和获得,但难以从FFPE样品中提取优质mRNA。在大多数情况下,需要离液溶液来去除石蜡并提取RNA。可以通过用有机溶剂提取、氯仿提取、苯酚-氯仿提取、用乙醇、异丙醇或任何其它低级醇沉淀,通过包含离子交换色谱法、大小排阻色谱法、硅胶色谱法和反向色谱法的色谱法或通过包含聚丙烯酰胺凝胶电泳和琼脂糖凝胶电泳的电泳方法,可以从离液溶液中回收RNA,如本领域技术人员将显而易见的。优选地使用苯酚氯仿萃取从离液溶液中回收RNA。在RNA回收之后,可以任选地进一步纯化RNA。进一步纯化得到基本上不含污染DNA或蛋白质的RNA。进一步纯化可以通过上述用于RNA回收的技术中的任何技术来完成。RNA优选地通过使用低级醇,尤其是乙醇或异丙醇沉淀来纯化。沉淀优选地在存在促进沉淀的如糖原等载体的情况下进行。

[0565] 简言之,可以如下从石蜡包埋的组织中分离RNA。将石蜡化组织的单个5 $\mu$ m切片置于艾本德(Eppendorf)管中,并且通过用二甲苯洗涤两次来脱蜡。将组织通过用分级醇

(100%、95%、80%和70%)连续洗涤来再水化。将所得沉淀悬浮于含0.5%肌氨酸和20mM二硫苏糖醇(DTT)的4M异硫氰酸胍中。将悬浮液均质化,然后加热到约50到约95℃,持续0到60分钟;包含零加热时间点作为每个样品的对照。添加乙酸钠(pH4.0)到0.2M,并且将溶液用苯酚/氯仿萃取,并且用异丙醇和10mg糖原沉淀。离心(13000rpm,4℃,15分钟)后,将RNA沉淀用1mL 75%乙醇洗涤两次,然后重悬于不含RNA酶的水中。

[0566] 使用随机六聚体将总RNA转化为cDNA。RT条件如先前已针对冷冻组织所描述的(Horikoshi等人,1992)。

[0567] 患有癌症的受试者通常在整个基因组中展现出大量的突变。突变可以是点突变,所述点突变是最丰富的并且可以解释癌症基因组中大量改变的肽或蛋白质。其它突变可以是段处一个或多个核苷酸的插入或缺失,影响基因较长区域的移码突变,通过链断裂和重新接合生成新ORF等。在本文所描述的方法中,受试者的癌细胞或组织的外显子组与参考外显子组的比较最适合于捕获癌细胞外显子组内的大量点突变。

[0568] 在一些实施例中,由患有癌症的受试者的癌症组织样品制备cDNA样品用于外显子组分析。在一些实施例中,将来自癌症样品的cDNA与参考cDNA样品进行比较。在一些实施例中,参考样品表示参考外显子组探针。在一些实施例中,参考cDNA由来自受试者的非癌细胞或组织制备。

[0569] 在一些实施例中,癌症样品外显子组与参考外显子组的比较通过杂交步骤进行。在一些实施例中,生成包括一组富集的多核苷酸序列的多核苷酸,其中所述一组富集的多核苷酸序列包括一组含有点突变体的多核苷酸的全外显子组,所述多核苷酸从患有癌症的受试者的肿瘤样品中富集;并且其中含有点突变体的多核苷酸中的每个与参考多核苷酸杂交,其和与之杂交的对应的含有点突变体的多核苷酸具有小于100%的序列互补性。在一些实施例中,在杂交步骤之后,将来自受试者癌症样品的特定外显子组克隆到表达克隆载体中,从而创建相对于参考外显子组在癌症外显子组中携带点突变的癌症样品外显子组文库。此处考虑了各种选择性杂交和克隆程序。这些程序包含消减杂交、抑制消减杂交、选择性杂交,并且此类方法是本领域技术人员已知的。

[0570] 本文考虑了使用链特异性衔接子将癌症外显子组克隆到表达载体中的方法。在一些实施例中,第一链特异性衔接子与来自癌症外显子组的cDNA片段连接,其中第二链特异性衔接子与来自参考外显子组的cDNA片段连接,其中第一链特异性衔接子被指定用于与载体的正链连接以用于表达。在一些实施例中,第一链特异性衔接子是这样的:当第一链特异性衔接子和连接的cDNA与载体连接时,cDNA链置于启动子和启动和控制表达的其它调节元件的下游,而与参考外显子组连接的第二链特异性衔接子与未表达的载体链连接。在一些实施例中,含有点突变的多核苷酸中的每个包括在含有点突变的多核苷酸的5'端或含有点突变的多核苷酸的3'端上的衔接子,并且其中参考多核苷酸中的每个包括在参考多核苷酸的5'端上的衔接子或在参考多核苷酸的3'端上的衔接子。

[0571] 一方面,本文考虑并公开了一种用于从受试者的癌细胞中分离和克隆富含突变的DNA的简短且有效的方法。所述方法包括由受试者的生物样品制备核酸;富集编码癌症突变的多核苷酸,因此富集编码新表位的序列;克隆富集的多核苷酸;表达克隆的多核苷酸以生成可以用于治疗目的的肽(例如,通过在细菌表达系统中表达克隆的多核苷酸)。从富含编码癌症突变的序列的克隆多核苷酸翻译而来的肽具有可用于癌症免疫疗法的新表位。所表

达的肽可以用作如免疫疗法疫苗以激活受试者中针对癌症或肿瘤的免疫应答。

[0572] 在一些实施例中,本文所描述的方法包括以下优点:

[0573] (i) 对于作为癌症免疫疗法疫苗的高效性,所述方法包括生成具有广泛新表位覆盖的泛外显子组突变;并且所述疫苗能够激活CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup> T细胞。

[0574] (ii) 所述方法简单,并且程序步骤比常用方法少。

[0575] (iii) 所述方法旨在减少从受试者分离包括肿瘤细胞的生物样品到制备治疗组分的时间。

[0576] (iv) 所述方法旨在减少(优选地消除)鉴定新表位编码序列的步骤,但同时富集潜在的新表位编码序列。

[0577] (v) 所述方法具有成本效益。

[0578] 在一些实施例中,所述方法涵盖以下的步骤:(a) 将癌细胞外显子组衍生的DNA片段与跨越代表性人基因组的参考DNA杂交;

[0579] (b) 在错配DNA捕获步骤中利用MutS柱分离错配的DNA片段(即包括突变的DNA片段,例如点突变),产生富含癌症突变的DNA片段;

[0580] (c) 洗脱和克隆MutS柱捕获的DNA片段;

[0581] (d) 在细菌克隆和表达系统中表达克隆的DNA,并且纯化蛋白质产物。

[0582] 在一些实施例中,外显子组衍生的DNA是cDNA。在一些实施例中,外显子组衍生的DNA(或cDNA)被处理成约200个核苷酸长的片段。在一些实施例中,外显子组衍生的DNA从分离自FFPE样品的RNA获得。在一些实施例中,所述方法包含链特异性衔接子连接的癌症外显子组与链特异性衔接子连接的参考外显子组的杂交。杂交的异二聚体多核苷酸将含有至少一个对应于癌症外显子组中每个突变的核苷酸错配。为了减少与癌症无关的自然发生的多态性的富集,仔细选择参考基因组或外显子组。在一些实施例中,参考外显子组被优化以防止天然存在的多态性的富集。

[0583] 接下来,可以使用如错配特异性蛋白质等试剂来结合并鉴定包括至少一个错配的核苷酸的多核苷酸。因此,含有点突变体的多核苷酸中的一个或多个与药剂结合,所述药剂与含有错配的双链多核苷酸特异性结合。在一些实施例中,药剂是DNA错配修复酶。在一些实施例中,药剂是MutS蛋白。MutS(增变基因S)蛋白在原核细胞和真核细胞的DNA修复系统中发挥重要作用。MutS蛋白是大肠杆菌蛋白,所述大肠杆菌蛋白是充分研究的MutHLS错配识别和修复(MMR)途径的一部分,并且MutS家族蛋白的同源物见于包含真核生物的许多物种。MutS蛋白参与了复制期间错配的DNA识别和修复的第一步。MutS蛋白可以用作鉴定和捕获具有DNA错配的杂交DNA产物的有效手段。错配结合蛋白MutS可以通过不同的亲和力和独立于其它蛋白质或辅因子的功能特异性识别和结合所有可能的单碱基错配以及1~5个碱基插入或缺失环。在本文所描述的过程中,杂交的DNA片段中的DNA错配表示癌症外显子组衍生的DNA中的突变。MutS蛋白识别双链DNA中未配对和错配的碱基,并且可以用于体外检测点突变。MutS的N末端结构域负责错配识别,并且形成由两个 $\alpha$ 螺旋包围的6链混合 $\beta$ 片层。然后可以在MutS结合柱中捕获MutS结合的异二聚体并且洗脱以获得包括点突变的癌症外显子组。这些多核苷酸构成一组富集的多核苷酸,用于制备疫苗。这些多核苷酸被克隆用于如上文所描述的癌症外显子组链的选择表达,以获得包括受试者的癌症组织或细胞中相对于合适的非癌症对照的差异表达基因的外显子组文库。

[0584] 在一些实施例中,富集是用靶特异性探针完成的。探针可以是特定的核酸序列,所述特定的核酸序列可以与能够分离和采集富集的多核苷酸的标签缀合。标签可以是亲和标签,例如生物素、His、HA等。分离可以通过使探针结合的和未结合的杂交DNA穿过如亲和柱等固定的探针捕获床来完成,其中杂交的探针被与标签结合的组分捕获。

[0585] 在一些实施例中,如此富集的多核苷酸被进一步修饰,例如与多功能抗体连接。

[0586] 在一些实施例中,包括受试者的癌症外显子组突变的富集的多核苷酸被进一步修饰,用于细胞特异性靶向。在一些实施例中,包括受试者癌症外显子组突变的富集的多核苷酸与编码一种或多种多肽的多核苷酸连接,所述一种或多种多肽具有例如增加翻译产物的免疫应答的效应功能。在一些实施例中,如早前所描述的,富集的多核苷酸可以与具有专门功能的多功能抗体连接。代表性方法步骤被描绘为图14、15A、15B、15C和15D的图解表示。

[0587] 在一些实施例中,载体被设计成包括编码支架蛋白的多核苷酸,所述支架蛋白包括在与富集的多核苷酸共转录的多功能抗体中。在一些实施例中,可以进一步修饰编码支架蛋白的多核苷酸序列以增强功能。

[0588] 在一些实施例中,如前面部分所描述的,将富含MutS的多核苷酸片段克隆并且与具有特定靶向机制的多功能抗体连接。在一些实施例中,多功能抗体包括靶向树突细胞(DC)的机制。靶向机制可以特异性靶向DC上的Clec9A蛋白。在一些实施例中,因此可以靶向由表达富含MutS的多核苷酸片段制备的并且进一步包括如本文所描述的多功能抗体的疫苗用于淋巴结累积。

[0589] 治疗方法和药物组合物

[0590] 本文所描述的新抗原治疗剂可用于多种应用,包括但不限于如癌症治疗等治疗性治疗方法。在一些实施例中,治疗性治疗方法包括免疫疗法。在某些实施例中,新抗原性肽可用于激活、促进、增加和/或增强免疫应答,将现有免疫应答重定向到新靶标,增加肿瘤的免疫原性,抑制肿瘤生长,减少肿瘤体积,增加肿瘤细胞凋亡和/或降低肿瘤的致癌性。使用方法可以是体外法、离体法或体内法。

[0591] 在一些方面,本文提供了一种治疗方法,所述方法包括从包括来自患有疾病的受试者的患病细胞的样品中提供多个不同的模板多核苷酸;将衔接子序列连接到所述多个不同的模板多核苷酸;由此形成多个不同的衔接子标记的模板多核苷酸;扩增所述不同的衔接子标记的模板多核苷酸;将经扩增的不同的衔接子标记的模板多核苷酸插入到载体中,由此形成重组表达构建体文库;表达由所述重组表达构建体文库编码的多肽;富集所表达的多肽;以及向所述受试者施用所富集的表达多肽。

[0592] 在一些方面,本公开提供了用于使用本文所描述的新抗原性肽或蛋白质激活受试者的免疫应答的方法。在一些实施例中,本公开提供了用于使用本文所描述的新抗原性肽促进受试者的免疫应答的方法。在一些实施例中,本公开提供了用于使用本文所描述的新抗原性肽增加受试者的免疫应答的方法。在一些实施例中,本公开提供了用于使用新抗原性肽增强免疫应答的方法。在一些实施例中,免疫应答的激活、促进、增加和/或增强包括增加细胞介导的免疫。在一些实施例中,免疫应答的激活、促进、增加和/或增强包括增加T细胞活性或体液免疫。在一些实施例中,免疫应答的激活、促进、增加和/或增强包括增加CTL或Th活性。在一些实施例中,免疫应答的激活、促进、增加和/或增强包括增加NK细胞活性。在一些实施例中,免疫应答的激活、促进、增加和/或增强包括增加T细胞活性以及增加NK细

胞活性。在一些实施例中，免疫应答的激活、促进、增加和/或增强包括抑制或降低T调节(Treg)细胞的抑制活性。在一些实施例中，免疫应答是抗原刺激的结果。

[0593] 在一些实施例中，本公开提供了使用包括本文所描述的新抗原性肽的多功能抗体来激活、促进、增加和/或增强免疫应答的方法。在一些实施例中，一种方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的包括将新抗原性肽递送到肿瘤细胞的新抗原性肽的多功能抗体。在一些实施例中，一种方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的包括被如肿瘤细胞等抗原呈递细胞内化的新抗原性肽的多功能抗体。在一些实施例中，一种方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的包括多功能抗体的疫苗，所述多功能抗体包括被抗原呈递细胞内化的新抗原性肽，并且新抗原性肽由所述细胞处理。

[0594] 在一些实施例中，所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的包括肽的疫苗，所述肽富集在本文所描述的新抗原性肽或多核苷酸中，其将包括至少一个新抗原性肽的外源性多肽递送到受试者，其中至少一个衍生自新抗原性肽的新表位与MHC I类分子复合呈递在肿瘤细胞表面上。在一些实施例中，新表位与MHC II类分子复合呈递在肿瘤细胞表面上。在一些实施例中，所述方法导致诱导或增强受试者对衍生自新抗原性肽的至少一个新表位的免疫应答。

[0595] 在一些实施例中，一种方法包括使肿瘤细胞与包括本文所描述的新抗原性多肽的多功能抗体接触，所述新抗原性多肽将包括至少一个新抗原性肽的外源性多肽递送到肿瘤细胞，其中至少一个衍生自多功能抗体的新表位呈递在肿瘤细胞表面上。在一些实施例中，新表位与MHC I类分子复合呈递在肿瘤细胞表面上。在一些实施例中，新表位与MHC II类分子复合呈递在肿瘤细胞表面上。

[0596] 在一些实施例中，一种方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的本文所描述的新抗原性多肽或多核苷酸，所述新抗原性多肽或多核苷酸将包括至少一个抗原肽的外源性多肽递送到肿瘤细胞，其中新表位呈递在肿瘤细胞表面上，并且诱导针对肿瘤细胞的免疫应答。在一些实施例中，针对肿瘤细胞的免疫应答增强。在一些实施例中，新抗原性多肽或多核苷酸将包括至少一个新抗原性肽的外源性多肽递送到肿瘤细胞，其中新表位呈递在肿瘤细胞表面上，并且抑制肿瘤生长。

[0597] 在一些实施例中，一种方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的本文所描述的新抗原性多肽或多核苷酸，所述新抗原性多肽或多核苷酸将包括至少一个新抗原性肽的外源性多肽递送到肿瘤细胞，其中衍生自至少一个新抗原性肽的新表位呈递在肿瘤细胞表面上，并且诱导针对肿瘤细胞的T细胞杀伤。在一些实施例中，针对肿瘤细胞的T细胞杀伤增强。在一些实施例中，针对肿瘤细胞的T细胞杀伤增加。

[0598] 本公开还提供了用于使用本文所描述的多功能抗体疫苗抑制肿瘤生长的方法。在某些实施例中，抑制肿瘤生长的方法包括在体外使细胞混合物与多功能抗体疫苗接触。例如，将永生化细胞系或与免疫细胞(例如，T细胞)混合的癌细胞系在添加了多功能抗体疫苗的培养基中培养。在一些实施例中，包括新抗原的多功能抗体疫苗激活肿瘤细胞的杀伤。

[0599] 在某些实施例中，受试者是人。在某些实施例中，受试者患有肿瘤或受试者患有至少部分地切除的肿瘤。

[0600] 在一些实施例中，一种抑制肿瘤生长的方法包括将现有的免疫应答重定向到新的靶标，包括向受试者施用治疗有效量的多功能抗体治疗剂，其中现有的免疫应答是针对递

送到受试者的抗原性肽。

[0601] 在某些实施例中,肿瘤包括癌症干细胞。在某些实施例中,通过施用多功能抗体降低肿瘤中癌症干细胞的频率。在一些实施例中,提供了一种降低受试者肿瘤中癌症干细胞频率的方法,所述方法包括向受试者施用治疗有效量的多功能抗体治疗剂。

[0602] 另外,在一些方面,本公开提供了一种降低受试者中肿瘤的致瘤性的方法,所述方法包括向受试者施用治疗有效量的本文所描述的新抗原治疗剂。在某些实施例中,肿瘤包括癌症干细胞。在一些实施例中,通过降低肿瘤中癌症干细胞的频率来降低肿瘤的致瘤性。在一些实施例中,所述方法包括使用本文所描述的新抗原治疗剂。在某些实施例中,通过施用本文所描述的新抗原性治疗剂降低肿瘤中癌症干细胞的频率。

[0603] 在一些实施例中,肿瘤是实体瘤。在某些实施例中,肿瘤是选自以下组成的组的肿瘤:结直肠肿瘤、胰腺肿瘤、肺肿瘤、卵巢肿瘤、肝肿瘤、乳腺肿瘤、肾肿瘤、前列腺肿瘤、神经内分泌肿瘤、胃肠肿瘤、黑色素瘤、宫颈肿瘤、膀胱肿瘤、胶质母细胞瘤、头颈肿瘤。在某些实施例中,肿瘤是结直肠肿瘤。在某些实施例中,所述肿瘤是卵巢肿瘤。在一些实施例中,肿瘤是乳腺肿瘤。在一些实施例中,肿瘤是肺肿瘤。在某些实施例中,肿瘤是胰腺肿瘤。在某些实施例中,肿瘤是黑色素瘤。在一些实施例中,肿瘤是实体瘤。

[0604] 本公开进一步提供了用于治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括向受试者施用治疗有效量的本文所描述的新抗原治疗剂。

[0605] 在一些实施例中,一种治疗癌症的方法包括将现有的免疫应答重定向到新的靶标,所述方法包括向受试者施用治疗有效量的新抗原治疗剂,其中现有的免疫应答针对由新抗原性肽递送到癌细胞的抗原性肽。

[0606] 本公开提供了治疗癌症的方法,所述方法包括向受试者(例如,需要治疗的受试者)施用治疗有效量的本文所描述的新抗原治疗剂。在某些实施例中,受试者是人。在某些实施例中,受试者患有癌性肿瘤。在某些实施例中,受试者患有被至少部分切除的肿瘤。

[0607] 受试者可以是例如哺乳动物、人、孕妇、老年人、成人、青少年、青春期前的儿童、儿童、幼儿、婴儿、小儿或新生儿。受试者可以是患者。在一些情况下,受试者可以是人。在一些情况下,受试者可以是儿童(即青春期以下的年轻人)。在一些情况下,受试者可以是婴儿。在一些情况下,受试者可以是配方喂养的婴儿。在一些情况下,受试者可以是参加临床研究的个人。在一些情况下,受试者可以是实验动物,例如哺乳动物或啮齿动物。在一些情况下,受试者可以是小鼠。在一些情况下,受试者可以是肥胖或超重受试者。

[0608] 在一些实施例中,受试者先前已经用一种或多种不同的癌症治疗方式治疗过。在一些实施例中,受试者先前已经用放射疗法、化学疗法或免疫疗法中的一种或多种治疗。在一些实施例中,受试者已经用一、二、三、四或五线先前疗法。在一些实施例中,先前疗法是细胞毒性疗法。

[0609] 在某些实施例中,癌症是选自以下组成的组的癌症:结直肠癌、胰腺癌、肺癌、卵巢癌、肝癌、乳腺癌、肾癌、前列腺癌、胃肠道癌、黑色素瘤、宫颈癌、神经内分泌癌、膀胱癌、成胶质细胞瘤和头颈癌。在某些实施例中,癌症是胰腺癌。在某些实施例中,癌症是卵巢癌。在某些实施例中,癌症是结直肠癌。在某些实施例中,癌症是乳腺癌。在某些实施例中,癌症是前列腺癌。在某些实施例中,癌症是肺癌。在某些实施例中,癌症是黑色素瘤。在一些实施例中,癌症是实体瘤。在一些实施例中,癌症包括实体瘤。

[0610] 在一些实施例中,癌症是血液癌。在某个实施例中,癌症选自由以下组成的组:急性髓性白血病(AML)、霍奇金淋巴瘤(Hodgkin lymphoma)、多发性骨髓瘤、急性T淋巴细胞白血病(T-ALL)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、毛细胞白血病、慢性粒细胞白血病(CML)、非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkin lymphoma)、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、套细胞淋巴瘤(MCL)和皮肤T细胞淋巴瘤CTCL)。

[0611] 在一些实施例中,新抗原治疗剂作为组合疗法施用。与两种或更多种治疗剂的组合疗法使用通过不同作用机制起作用的药剂,但这不是必需的。使用具有不同作用机制的药剂的组合疗法可以产生累加或协同作用。与单一疗法相比,组合疗法可以允许使用较低剂量的每种药剂,从而减少毒副作用和/或增加药剂的治疗指数。组合疗法可以降低抗性癌细胞将发展的可能性。在一些实施例中,组合疗法包括影响免疫应答(例如,增强或激活应答)的治疗剂和影响(例如,抑制或杀死)肿瘤/癌细胞的治疗剂。

[0612] 在一些情况下,免疫原性药物组合物可以与另外的药剂一起施用。另外的药剂的选择可以至少部分取决于所治疗的病状。另外的药剂可以包含例如检查点抑制剂,如抗PD1、抗CTLA4、抗PD-L1、抗CD40或抗TIM3药剂(例如,抗PD1、抗CTLA4、抗PD-L1、抗CD40或抗TIM3抗体);或对病原体感染(例如,病毒感染)具有治疗效果的任何药剂,包含例如,如NSAID等用于治疗炎性病状的药物,例如布洛芬(ibuprofen)、萘普生(naproxen)、对乙酰氨基酚(acetaminophen)、酪洛芬(ketoprofen)或阿司匹林(aspirin)。例如,检查点抑制剂可以是选自由以下组成的组的PD-1/PD-L1拮抗剂:纳武单抗(nivolumab)(ONO-4538/BMS-936558、MDX1 106、欧狄沃(OPDIVO))、派姆单抗(pembrolizumab)(MK-3475、健菴得(KEYTRUDA))、皮立珠单抗(pidilizumab)(CT-011)和MPDL3280A(罗氏公司(ROCHE))。作为另一个实例,调配物可以另外含有一种或多种补充剂,如维生素C、E或其它抗氧化剂。

[0613] 本公开的方法可以用于治疗本领域已知的任何类型的癌症。要通过本公开的方法治疗的癌症的非限制性实例可以包含黑色素瘤(例如,转移性恶性黑色素瘤)、肾癌(例如,透明细胞癌)、前列腺癌(例如,激素难治性前列腺腺癌)、胰腺癌、乳腺癌、结肠癌、肺癌(例如,非小细胞肺癌)、食道癌、头颈部鳞状细胞癌、肝癌、卵巢癌、宫颈癌、甲状腺癌、胶质母细胞瘤、神经胶质瘤、白血病、淋巴瘤和其它肿瘤性恶性肿瘤。

[0614] 另外,本文提供的疾病或病状包含使用本公开的治疗方法可以抑制其生长的难治性或复发性恶性肿瘤。在一些实施例中,要通过本公开的治疗方法治疗的癌症选自由以下组成的组:癌、鳞状癌、腺癌、恶性毒瘤、子宫内膜癌、乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、输卵管癌、原发性腹膜癌、结肠癌、结直肠癌、肛门生殖器区鳞状细胞癌、黑色素瘤、肾细胞癌、肺癌、非小细胞肺癌、肺鳞状细胞癌、胃癌、膀胱癌、胆囊癌、肝癌、甲状腺癌、喉癌、唾液腺癌、食道癌、头颈癌、胶质母细胞瘤、神经胶质瘤、头颈部鳞状细胞癌、前列腺癌、胰腺癌、间皮瘤、肉瘤、血液学癌症、白血病、淋巴瘤、神经瘤和其任何组合。在一些实施例中,要通过本公开的方法治疗的癌症包含例如癌、鳞状癌(例如,宫颈管、眼睑、结膜、阴道、肺、口腔、皮肤、膀胱、舌、喉和食道)和腺癌(例如,前列腺癌、小肠癌、子宫内膜癌、宫颈管癌、大肠癌、肺癌、胰腺癌、食道癌、直肠癌、子宫癌、胃癌、乳腺癌和卵巢癌)。在一些实施例中,要通过本公开的方法治疗的癌症进一步包含恶性毒瘤(例如,肌源性肉瘤)、白血病、神经瘤、黑色素瘤和淋巴瘤。在一些实施例中,要通过本公开的方法治疗的癌症是乳腺癌。在一些实施例中,要通过本公开的治疗方法治疗的癌症是三阴性乳腺癌(TNBC)。在一些实施例中,要通过本公开的治疗方法

法治疗的癌症是卵巢癌。在一些实施例中,要通过本公开的治疗方法治疗的癌症是结直肠癌。

[0615] 在一些实施例中,用本公开的药物组合物治疗的患者或患者群体患有实体瘤。在一些实施例中,实体瘤是黑色素瘤、肾细胞癌、肺癌、膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、结肠癌、胆囊癌、喉癌、肝癌、甲状腺癌、胃癌、唾液腺癌、前列腺癌、胰腺癌或默克尔细胞癌(Merkel cell carcinoma)。在一些实施例中,用本公开的药物组合物治疗的患者或患者群体患有血液学癌症。在一些实施例中,患者患有血液学癌症,如弥漫性大B细胞淋巴瘤(“DLBCL”)、霍奇金淋巴瘤(“HL”)、非霍奇金淋巴瘤(“NHL”)、滤泡性淋巴瘤(“FL”)、急性髓性白血病(“AML”)或多发性骨髓瘤(“MM”)。在一些实施例中,患有选自由以下组成的组的癌症的要治疗的患者或患者群体:卵巢癌、肺癌和黑色素瘤。

[0616] 可以根据本公开预防和/或治疗的癌症的具体实例包含但不限于以下:肾癌(renal cancer/kidney cancer)、多形性成胶质细胞瘤、转移性乳腺癌;乳腺癌(breast carcinoma);乳腺肉瘤;神经纤维瘤;神经纤维瘤病;儿童肿瘤;神经母细胞瘤;恶性黑色素瘤;表皮癌;白血病,如但不限于急性白血病、急性淋巴细胞白血病、急性髓细胞白血病如成髓细胞、早幼粒细胞、粒单核细胞、单核细胞、红白血病白血病和骨髓增生异常综合征、慢性白血病如但不限于慢性髓细胞(粒细胞)白血病、慢性淋巴细胞白血病、毛细胞白血病;真性红细胞增多症;淋巴瘤,如但不限于霍奇金病、非霍奇金病;多发性骨髓瘤,如但不限于郁积型多发性骨髓瘤、非分泌性骨髓瘤、骨硬化性骨髓瘤、浆细胞白血病、孤立性浆细胞瘤和髓外浆细胞瘤;瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症(Waldenstrom's macroglobulinemia);意义不明的单克隆丙种球蛋白病;良性单克隆丙种球蛋白病;重链病;骨癌和结缔组织肉瘤,如但不限于骨肉瘤、骨髓瘤骨病、多发性骨髓瘤、胆脂瘤诱导的骨肉瘤、骨佩吉特氏病(Paget's disease of bone)、骨肉瘤、软骨肉瘤、尤文氏肉瘤(Ewing's sarcoma)、恶性巨细胞瘤、骨纤维肉瘤、脊索瘤、骨膜肉瘤、软组织肉瘤、血管肉瘤(血管内皮瘤)、纤维肉瘤、卡波济氏肉瘤(Kaposi's sarcoma)、平滑肌肉瘤、脂肪肉瘤、淋巴管肉瘤、神经鞘膜瘤、横纹肌肉瘤和滑膜肉瘤;脑肿瘤,如但不限于神经胶质瘤、星形细胞瘤、脑干神经胶质瘤、室管膜瘤、少突神经胶质瘤、非神经胶质瘤、听神经瘤、颅咽管瘤、成神经管细胞瘤、脑膜瘤、松果体细胞瘤、松果体母细胞瘤和原发性脑淋巴瘤;乳腺癌,包含但不限于腺癌、小叶(小细胞)癌、导管内癌、髓样乳腺癌、粘液性乳腺癌、管式乳腺癌、乳头状乳腺癌、佩吉特氏病(包含青少年佩吉特氏病)和炎性乳腺癌;肾上腺癌,如但不限于嗜铬细胞瘤和肾上腺皮质癌;甲状腺癌,如但不限于乳头状或滤泡状甲状腺癌、甲状腺髓样癌和未分化甲状腺癌;胰腺癌,如但不限于胰岛素瘤、胃泌素瘤、胰高血糖素瘤、舒血管肠肽瘤、生长激素抑制素分泌肿瘤和类癌或胰岛细胞瘤;垂体癌,如但不限于库欣氏病(Cushing's disease)、催乳激素分泌肿瘤、肢端肥大症和尿崩症;眼癌,如但不限于眼黑色素瘤(如虹膜黑色素瘤、脉络膜黑色素瘤和睫状体黑色素瘤)和视网膜母细胞瘤;阴道癌,如鳞状细胞癌、腺癌和黑色素瘤;外阴癌,如鳞状细胞癌、黑色素瘤、腺癌、基底细胞癌、肉瘤和佩吉特氏病;宫颈癌,如但不限于鳞状细胞癌和腺癌;子宫癌,如但不限于子宫内膜癌和子宫肉瘤;卵巢癌,如但不限于卵巢上皮癌、交界性肿瘤、生殖细胞肿瘤和间质瘤;宫颈癌;食道癌,如但不限于鳞状癌、腺癌、腺样囊性癌、粘液表皮样癌、腺鳞癌、肉瘤、黑色素瘤、浆细胞瘤、疣状癌和燕麦细胞(小细胞)癌;胃癌,如但不限于腺癌、真菌性(息肉状)胃癌、溃疡性胃癌、浅表性扩散性胃癌、弥散性扩散性胃癌、恶性淋巴

瘤、脂肪肉瘤、纤维肉瘤和癌肉瘤；结肠癌(colon cancer)；结直肠癌，KRAS突变结直肠癌；结肠癌(colon carcinoma)；直肠癌；肝癌，如但不限于肝细胞癌和肝母细胞瘤、胆囊癌，如腺癌；胆管癌，如但不限于乳头状胆管癌、结节状胆管癌和弥漫性胆管癌；肺癌(lung cancer)，如KRAS突变的非小细胞肺癌、非小细胞肺癌、鳞状细胞癌(表皮样癌)、腺癌、大细胞癌和小细胞肺癌；肺癌(lung carcinoma)；睾丸癌，如但不限于胚组织瘤、精原细胞瘤、间变性、经典(典型)、精母细胞性非精原细胞瘤、胚胎癌、畸胎瘤癌、绒毛膜癌(卵黄囊瘤)、前列腺癌，如但不限于雄激素非依赖性前列腺癌、雄激素依赖性前列腺癌、腺癌、平滑肌肉瘤和横纹肌肉瘤；阴茎癌；口腔癌，如但不限于鳞状细胞癌；基底癌；唾液腺癌，如但不限于腺癌、粘液表皮样癌和腺样囊性癌；舌咽癌，如但不限于鳞状细胞癌和疣状舌咽癌；皮肤癌，如但不限于基底细胞癌、鳞状细胞癌和黑色素瘤、浅表扩散性黑色素瘤、结节性黑色素瘤、扁桃体恶性黑色素瘤、肢端雀斑样痣性黑色素瘤；肾癌(kidney cancer)，如但不限于肾细胞癌、腺癌、肾上腺样瘤、纤维肉瘤、移行细胞癌(肾盂和/或输尿管)；肾癌(renal carcinoma)；威尔姆斯瘤(Wilms'tumor)；膀胱癌，如但不限于移行细胞癌、鳞状细胞癌、腺癌、癌肉瘤。另外，癌症包含粘液肉瘤、成骨肉瘤、内皮肉瘤、淋巴管内皮肉瘤、间皮瘤、滑膜瘤、成血管细胞瘤、上皮癌、囊腺癌、支气管癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳头状癌和乳头状腺癌。

[0617] 癌症包含但不限于B细胞癌例如多发性骨髓瘤、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症、重链疾病例如 $\alpha$ 链病、 $\gamma$ 链病和 $\mu$ 链病、良性单克隆丙球蛋白病和免疫细胞淀粉样变性、黑色素瘤、乳腺癌、肺癌、支气管癌、结直肠癌、前列腺癌(例如，转移性激素难治性前列腺癌)、胰腺癌、胃癌、卵巢癌、膀胱癌、脑或中枢神经系统癌、外周神经系统癌、食道癌、宫颈癌、子宫或子宫内膜癌、口腔或咽癌、肝癌、肾癌、睾丸癌、胆管癌、小肠或阑尾癌、唾液腺癌、甲状腺癌、肾上腺癌、骨肉瘤、软骨肉瘤、血液组织癌等。适用于本公开所涵盖的方法的癌症类型的其它非限制性实例包含人肉瘤和癌例如纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、骨源性肉瘤、脊索瘤、血管肉瘤、内皮肉瘤、淋巴管肉瘤、淋巴管内皮肉瘤、滑膜瘤、间皮瘤、尤文氏瘤(Ewing's tumor)、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、结肠癌、结直肠癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、鳞状细胞癌、基底细胞癌、腺癌、汗腺瘤、皮脂腺癌、乳头状癌、乳头状腺癌、囊腺癌、髓样癌、支气管癌、肾细胞癌、肝细胞癌、胆管癌、肝癌、绒毛膜癌、精原细胞瘤、胚胎性癌、威尔姆斯瘤、宫颈癌、骨癌、脑瘤、睾丸癌、肺癌、小细胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神经胶质瘤、星形细胞瘤、成神经管细胞瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤、松果体瘤、成血管细胞瘤、听神经瘤、少突胶质细胞瘤、脑膜瘤、黑色素瘤、成神经细胞瘤、视网膜母细胞瘤；白血病，例如急性淋巴细胞白血病和急性髓细胞白血病(成髓细胞、早幼粒细胞、粒单核细胞、单核细胞和红白血病)；慢性白血病(慢性髓细胞(粒细胞)白血病和慢性淋巴细胞白血病)；以及真性红细胞增多症、淋巴瘤(霍奇金氏病(Hodgkin's disease)和非霍奇金氏病(non-Hodgkin's disease))、多发性骨髓瘤、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症和重链病。在一些实施例中，通过本公开的方法确定其表型的癌症是上皮癌，如但不限于膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、结肠癌、妇科癌症、肾癌、喉癌、肺癌、口腔癌、头颈癌、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌或皮肤癌。在其它实施例中，癌症是乳腺癌、前列腺癌、肺癌或结肠癌。在仍其它实施例中，上皮癌是非小细胞肺癌、非乳头状肾细胞癌、宫颈癌、卵巢癌(例如浆液性卵巢癌)或乳腺癌。可以以各种其它方式表征上皮癌，包含但不限于浆液性、子宫内膜样、粘液性、透明细胞、布伦纳(brenner)或未分化。在一些实施例中，本公开用于淋巴瘤或其亚型的治疗、诊断和/或预后，包含但不限于套细胞淋巴瘤。淋

巴增生性病征也被认为是增生性疾病。

[0618] 在一些实施例中,本文所描述的药剂与至少一种另外的治疗剂的组合导致累加或协同的结果。在一些实施例中,组合疗法导致药剂的治疗指数增加。在一些实施例中,组合疗法导致另外的治疗剂的治疗指数增加。在一些实施例中,组合疗法导致药剂的毒性和/或副作用降低。在一些实施例中,组合疗法导致另外的治疗剂的毒性和/或副作用降低。

[0619] 在某些实施例中,除了施用本文所描述的新抗原治疗剂之外,所述方法或治疗进一步包括施用至少一种另外的治疗剂。可以在施用药剂之前、并行和/或之后施用另外的治疗剂。在一些实施例中,至少一种另外的治疗剂包括1、2、3或更多种另外的治疗剂。

[0620] 可以与本文所描述的新抗原治疗剂组合施用的治疗剂包含化学治疗剂。因此,在一些实施例中,所述方法或治疗涉及施用本文所描述的药剂与化学治疗剂组合或与化学治疗剂的混合物组合。用药剂进行的治疗可以在化疗疗法之前、并行或之后进行。组合施用可以包含以单一药物调配物或使用单独调配物的共同施用或以任一顺序但通常在一段时间内连续施用,使得所有活性剂可以同时发挥其生物活性。此类化学治疗剂的制备和给药方案可以根据制造商的说明使用或由熟练的从业人员凭经验确定。《化学疗法资料书(The Chemotherapy Source Book)》,第4版,2008,M.C.Perry,编辑,宾夕法尼亚州费城利平科特、威廉姆斯与威尔金斯出版公司(Lippincott,Williams&Wilkins,Philadelphia,PA.)中还描述了此类化学疗法的制备和给药方案。

[0621] 有用的化学治疗剂类别包含,例如抗微管蛋白剂、澳瑞他汀(auristatin)、DNA小沟结合剂、DNA复制抑制剂、烷化剂(例如,铂复合物如顺铂(cisplatin)、单(铂)、双(铂)和三核铂复合物和卡铂(carboplatin))、蒽环类药物、抗生素、叶酸拮抗物、抗代谢物、化疗增敏剂、多卡霉素(duocarmycin)、依托泊苷(etoposide)、氟化嘧啶、离子载体、莱西若普森(lexitropsin)、亚硝基脲、顺铂(platinol)、嘌呤拮抗物、嘌呤霉素(puromycin)、放射增敏剂、类固醇、紫杉烷(taxane)、拓扑异构酶抑制剂、长春花生物碱(vinca alkaloid)等。在某些实施例中,第二治疗剂是烷化剂、抗代谢物、抗有丝分裂剂、拓扑异构酶抑制剂或血管生成抑制剂。

[0622] 可用于本公开的化学治疗剂包含但不限于烷化剂,如噻替派(thiotepa)和环磷酰胺(cyclophosphamide)(癌得星(CYTOXAN));烷基磺酸盐,如白消安(busulfan)、英丙舒凡(improsulfan)和哌泊舒凡(piposulfan);氮丙啶类,如苯佐多巴(benzodopa)、卡波醌(carboquone)、美妥多巴(meturedopa)和脲多巴(uredopa);亚乙基亚胺和甲基胺类,包含六甲蜜胺(altretamine)、三亚乙基蜜胺(triethylenemelamine)、三亚乙基磷酰胺(triethylenephosphoramidate)、三亚乙基硫代磷酰胺(triethylenethiophosphoramidate)和三羟甲密胺(trimethylolomelamine);氮芥(nitrogen mustard),如苯丁酸氮芥(chlorambucil)、萘氮芥(chlornaphazine)、氯磷酰胺(cholophosphamide)、雌氮芥(estramustine)、异环磷酰胺(ifosfamide)、二氯甲基二乙胺(mechlorethamine)、盐酸甲氧氮芥(mechlorethamine oxide hydrochloride)、美法仑(melphalan)、新恩比兴(novembichin)、苯芥胆甾醇(phenesterine)、泼尼莫司汀(prednimustine)、曲洛磷胺(trofosfamide)、乌拉莫司汀(uracil mustard);亚硝基脲(nitrosurea),如卡莫司汀(carmustine)、氯脲霉素(chlorozotocin)、福莫司汀(fotemustine)、洛莫司汀(lomustine)、尼莫司汀(nimustine)、雷莫司汀(ranimustine);抗生素,如阿克拉霉素

(aclacinomycin)、放线菌素(actinomycin)、安曲霉素(authramycin)、重氮丝氨酸(azaserine)、博来霉素(bleomycin)、放线菌素C(cactinomycin)、卡奇霉素(calicheamicin)、卡拉比星(carabycin)、洋红霉素(caminomycin)、嗜癌菌素(carzinophilin)、色霉素(chromomycin)、放线菌素D(dactinomycin)、柔红霉素(daunorubicin)、地托比星(detorubicin)、6-二氮-5-氧代-L-正亮氨酸、阿霉素(doxorubicin)、表柔比星(epirubicin)、依索比星(esorubicin)、伊达比星(idarubicin)、麻西罗霉素(marcellomycin)、丝裂霉素(mitomycin)、菌酚酸(mycophenolic acid)、诺加霉素(nogalamycin)、橄榄霉素(olivomycin)、培洛霉素(peplomycin)、泊非霉素(potfiromycin)、嘌呤霉素(puromycin)、三铁阿霉素(quelamycin)、罗多比星(rodorubicin)、链黑菌素(streptonigrin)、链脲菌素(streptozocin)、杀结核菌素(tubercidin)、乌苯美司(ubenimex)、净司他丁(zinostatin)、佐柔比星(zorubicin); 抗代谢物,如氨甲蝶呤和5-氟尿嘧啶(5-FU); 叶酸类似物,如二甲叶酸(denopterin)、氨甲蝶呤(methotrexate)、蝶罗呤(pteropterin)、三甲曲沙(trimetrexate); 嘌呤类似物,如氟达拉滨(fludarabine)、6-巯基嘌呤、硫咪嘌呤、硫鸟嘌呤; 嘧啶类似物,如安西他滨(ancitabine)、阿扎胞苷(azacitidine)、6-氮杂尿苷、卡莫氟(carmofur)、阿糖胞苷(cytosine arabinoside)、双脱氧尿苷(dideoxyuridine)、去氧氟尿苷(doxifluridine)、依诺他滨(enocitabine)、氟尿苷(floxuridine)、5-FU; 雄激素类,如卡普睾酮(calusterone)、丙酸屈他雄酮(dromostanolone propionate)、环硫雄醇(epitiostanol)、美雄烷(mepitiostane)、睾内酯(testolactone); 抗肾上腺例,如氨鲁米特(aminoglutethimide)、米托坦(mitotane)、曲洛司坦(trilostane); 叶酸补充剂,如亚叶酸; 醋葡醛内酯(aceglatone); 醛磷酰胺糖苷(aldophosphamide glycoside); 氨基乙酰丙酸(aminolevulinic acid); 安吡啶(amsacrine); 百垂布西(bestrabucil); 比生群(bisantrene); 依达曲沙(edatraxate); 地磷酰胺(defofamine); 地美可辛(demecolcine); 地吡醌(diaziquone); 依氟鸟氨酸(elformithine); 依利醋铵(elliptinium acetate); 依托格鲁(etoglucid); 硝酸镓(gallium nitrate); 羟基脲(hydroxyurea); 香菇多糖(lentinan); 氯尼达明(lonidamine); 米托胍脘(mitoguanzone); 米托蒽醌(mitoxantrone); 莫哌达醇(mopidamol); 二胺硝吡啶(nitracrine); 喷司他丁(pentostatin); 蛋氨酸芥(phenamet); 吡柔比星(pirarubicin); 鬼臼酸(podophyllinic acid); 2-乙基酰肼; 丙卡巴肼(procarbazine); PSK; 丙亚胺(razoxane); 西佐喃(sizofuran); 螺锗(spirogermanium); 细交链孢菌酮酸(tenuazonic acid); 三环乙亚胺醌(triaziquone); 2,2',2''-三氯三乙胺; 乌拉坦(urethan); 长春地辛(vindesine); 达卡巴嗪(dacarbazine); 甘露莫司汀(mannomustine); 二溴甘露醇(mitobronitol); 二溴卫矛醇(mitolactol); 哌泊溴烷(pipobroman); 盖克托辛(gacytosine); 阿拉伯糖苷(Ara-C); 紫杉烷(taxoid), 例如紫杉醇(他克唑(TAXOL))和多西他赛(docetaxel)(泰索帝(TAXOTERE)); 苯丁酸氮芥(chlorambucil); 吉西他滨(gemcitabine); 6-巯鸟嘌呤; 巯基嘌呤(mercaptopurine); 铂类似物,如顺铂和卡铂; 长春碱(vinblastine); 铂; 依托泊苷(VP-16); 异环磷酰胺; 丝裂霉素C; 米托蒽醌; 长春新碱(vincristine); 长春瑞滨(vinorelbine); 诺维本(navelbine); 诺安托(novantrone); 替尼泊苷(teniposide); 道诺霉素(daunomycin); 氨蝶呤(aminopterin); 伊班膦酸盐(ibandronate); CPT11; 拓扑异构酶抑制剂RFS 2000; 二氟甲基鸟氨酸(DMFO);

视黄酸;拉霉素(esperamicin);卡培他滨(capecitabine)(希罗达(XELODA));和以上中的任何一种的药学上可接受的盐、酸或衍生物。化学治疗剂还包含用于调节或抑制对肿瘤的激素作用的抗激素剂,如抗雌激素类,包含例如它莫西芬(tamoxifen)、雷洛昔芬(raloxifene)、芳香酶抑制性4(5)-咪唑、4-羟基它莫西芬、曲沃昔芬(trioxifene)、雷洛西芬(keoxifene)、LY117018、奥那司酮(onapristone)和托瑞米芬(toremifene)(法乐通(FARESTON));和抗雄激素类,如氟他胺(flutamide)、尼鲁米特(nilutamide)、比卡鲁胺(bicalutamide)、亮丙瑞林(leuprolide)和戈舍瑞林(goserelin);和以上中的任何一种的药学上可接受的盐、酸或衍生物。在某些实施例中,另外的治疗剂是顺铂。在某些实施例中,另外的治疗剂是卡铂。

[0623] 在某些实施例中,化学治疗剂是拓扑异构酶抑制剂。拓扑异构酶抑制剂是干扰拓扑异构酶(例如,拓扑异构酶I或II)作用的化学疗法药剂。拓扑异构酶抑制剂包含但不限于盐酸多柔比星、柠檬酸柔红霉素、盐酸米托蒽醌、放线菌素D、依托泊苷、盐酸拓扑替康(topotecan HCl)、替尼泊苷(VM-26)和伊立替康(irinotecan)以及这些中的任何一种的药学上可接受的盐、酸或衍生物。在一些实施例中,另外的治疗剂是伊立替康。

[0624] 在某些实施例中,化学治疗剂是抗代谢物。抗代谢物是结构类似于正常生化反应所需的代谢物的化学物质,但差异足以干扰如细胞分裂等细胞的一种或多种正常功能。抗代谢物包含但不限于吉西他滨、氟尿嘧啶、卡培他滨、甲氨蝶呤钠、雷替曲塞(ralitrexed)、培美曲塞(pemetrexed)、替加氟(tegafur)、阿糖胞苷、硫鸟嘌呤、5-氮杂胞苷、6巯基嘌呤、硫唑嘌呤(azathioprine)、6-硫鸟嘌呤、喷司他丁、磷酸氟达拉滨(fludarabine phosphate)和克拉屈滨(cladribine)以及这些中的任何一种的药学上可接受的盐、酸或衍生物。在某些实施例中,另外的治疗剂是吉西他滨。

[0625] 在某些实施例中,化学治疗剂是抗有丝分裂剂,包含但不限于与微管蛋白结合的药剂。在一些实施例中,药剂是紫杉烷。在某些实施例中,药剂是紫杉醇或多西他赛或紫杉醇或多西他赛的药学上可接受的盐、酸或衍生物。在某些实施例中,药剂是紫杉醇(他克唑)、多西他赛(泰索帝)、白蛋白结合型紫杉醇(亚伯杉(ABRAXANE))、DHA-紫杉醇或PG-紫杉醇。在某些替代性实施例中,抗有丝分裂剂包括长春花生物碱,如长春新碱、长春碱、长春瑞滨或长春地辛或其药学上可接受的盐、酸或衍生物。在一些实施例中,抗有丝分裂剂是驱动蛋白Eg5的抑制剂或如Aurora A或Plk1等有丝分裂激酶的抑制剂。在某些实施例中,另外的治疗剂是紫杉醇。在一些实施例中,额外治疗剂是白蛋白结合型紫杉醇。

[0626] 在一些实施例中,另外的治疗剂包括如小分子等药剂。例如,治疗可以涉及本公开的药剂与作为针对肿瘤相关抗原的抑制剂的小分子的组合施用,所述肿瘤相关抗原包含但不限于EGFR、HER2(ErbB2)和/或VEGF。在一些实施例中,本公开的药剂与选自以下组成的组的蛋白激酶抑制剂组合施用:吉非替尼(gefitinib)(易瑞沙(IRESSA))、埃罗替尼(erlotinib)(它赛瓦(TARCEVA))、舒尼替尼(sunitinib)(索坦(SUTENT))、拉帕替尼(lapatinib)、凡德他尼(vandetanib)(扎克帝玛(ZACTIMA))、AEE788、CI-1033、西地尼布(cediranib)(瑞塞汀(RECENTIN))、索拉非尼(sorafenib)(多吉美(NEXAVAR))和帕唑帕尼(pazopanib)(GW786034B)。在一些实施例中,另外的治疗剂包括mTOR抑制剂。在另一个实施例中,另外的治疗剂是化学疗法或减少Treg细胞数量的其它抑制剂。在某些实施例中,治疗剂是环磷酰胺或抗CTLA4抗体。在另一个实施例中,另外的治疗剂减少了骨髓衍生的抑制细

胞的存在。在另外的实施例中，另外的治疗剂是卡波紫杉醇(carbotaxol)。在另一个实施例中，另外的治疗剂将细胞转变为T辅助1应答。在另外的实施例中，另外的治疗剂是依鲁替尼。

[0627] 在一些实施例中，另外的治疗剂包括如抗体等生物分子。例如，治疗可以涉及本公开的药剂与针对肿瘤相关抗原的抗体的组合施用，所述肿瘤相关抗原包含但不限于与EGFR、HER2/ErbB2和/或VEGF结合的抗体。在某些实施例中，另外的治疗剂是对癌症干细胞标志物具有特异性的抗体。在某些实施例中，另外的治疗剂是作为血管生成抑制剂的抗体(例如，抗VEGF或VEGF受体抗体)。在某些实施例中，另外的治疗剂是贝伐单抗(bevacizumab)(安维汀(AVASTIN))、雷莫芦单抗(ramucirumab)、曲妥珠单抗(trastuzumab)(赫塞汀(HERCEPTIN))、帕妥珠单抗(pertuzumab)(奥密塔克(OMNITARG))、帕尼单抗(panitumumab)(维克替比(VECTIBIX))、尼妥珠单抗(nimotuzumab)、扎芦木单抗(zalutumumab)或西妥昔单抗(cetuximab)(爱必妥(ERBITUX))。

[0628] 本文提供的药剂和组合物可以单独使用或与常规治疗方案组合使用，如外科手术、辐照、化学疗法和/或骨髓移植(自体、同基因、同种异体或无关的)。一组肿瘤抗原可以用于例如在大部分癌症患者。

[0629] 在一些实施例中，除了包括免疫原性疫苗的组合物之外，还可以施用至少一种或多种化学治疗剂。在一些实施例中，一种或多种化学治疗剂可以属于不同类别的化学治疗剂。

[0630] 化学治疗剂的实例包含但不限于烷化剂，如氮芥(例如二氯甲基二乙胺(氮芥)、苯丁酸氮芥、环磷酰胺(Cytosan®)、异环磷酰胺和美法仑)；亚硝基脲(例如，N-亚硝基-N-甲基脲、链脲菌素、卡莫司汀(BCNU)、洛莫司汀和司莫司汀(semustine))；烷基磺酸盐(例如，白消安)；四嗪(例如，达卡巴嗪(DTIC)、米托唑胺和替莫唑胺(Temodar®))；氮丙啶类(例如，噻替哌、丝裂霉素和二嗪酮)；和铂类药物(例如，顺铂、卡铂和奥沙利铂(oxaliplatin))；非经典烷化剂，如丙卡巴肼和六甲蜜胺(六甲基三聚氰胺)；抗代谢药剂，如5-氟尿嘧啶(5-FU)、6-巯基嘌呤(6-MP)、卡培他滨(Xeloda®)、克拉屈滨、氯法拉滨(clofarabine)、阿糖胞苷(Ara-C®)、地西他滨(decitabine)、氟尿苷、氟达拉滨、奈拉滨(nelarabine)、吉西他滨(Gemzar®)、羟基脲、氨甲蝶呤、培美曲塞(Alimta®)、喷司他丁、硫鸟嘌呤、维达扎(Vidaza)；如长春花生物碱等抗微管剂(例如，长春新碱、长春碱、长春瑞滨、长春地辛和长春氟宁(vinflunine))；紫杉烷(例如，紫杉醇(Taxol®)、多西他赛(Taxotere®))；鬼臼毒素(podophyllotoxin)(例如，依托泊苷和替尼泊苷)；埃坡霉素(epothilone)(例如，伊沙匹隆(ixabepilone)(Ixempra®))；雌氮芥(Emcyt®)；抗肿瘤抗生素，如蒽环类药物(例如，柔红霉素、多柔比星(Adriamycin®)、表柔比星、伊达比星)；放线菌素D；和博来霉素；拓扑异构酶I抑制剂，如拓扑替康和伊立替康(CPT-11)；拓扑异构酶II抑制剂，如依托泊苷(VP-16)、替尼泊苷、米托蒽醌、新生霉素、美巴隆(merbarone)和阿柔比星(aclarubicin)；皮质类固醇，如泼尼松、甲基强的松龙(Solumedrol®)和地塞米松(Decadron®)；L-天冬酰胺酶；硼替佐米(bortezomib)(Velcade®)；免疫治疗剂，如利妥昔单抗(rituximab)(Rituxan®)、阿仑单抗(alemtuzumab)(Campath®)、沙利度胺

(thalidomide)、来那度胺(lenalidomide)(Revlimid®)、BCG、白细胞介素-2、干扰素- $\alpha$ 和如Provenge®等癌症疫苗;激素治疗剂,如氟维司群(fulvestrant)(Faslodex®)、它莫西芬、托瑞米芬(Fareston®)、阿那曲唑(anastrozole)(Arimidex®)、依西美坦(exemestan)(Aromasin®)、来曲唑(letrozole)(Femara®)、醋酸甲地孕酮(megestrol acetate)(Megace®)、雌激素、比卡鲁胺(Casodex®)、氟他胺(Eulexin®)、尼鲁米特(Nilandron®)、亮丙瑞林(Lupron®)和戈舍瑞林(Zoladex®);分化剂,如类视黄醇、维甲酸(ATRA或Atralin®)、蓓萨罗丁(bexarotene)(Targretin®)和三氧化二砷(Arsenox®);以及靶向治疗剂,如伊马替尼(imatinib)(Gleevec®)、吉非替尼(Iressa®)和舒尼替尼(Sutent®)。在一些实施例中,化学疗法是鸡尾酒疗法。鸡尾酒疗法的实例包含但不限于CHOP/R-CHOP(美罗华(rituxan)、环磷酰胺、羟基多柔比星、长春新碱和泼尼松)、EPOCH(依托泊苷、泼尼松、长春新碱、环磷酰胺、羟基多柔比星)、超CVAD(环磷酰胺、长春新碱、羟基多柔比星、地塞米松)、FOLFOX(氟尿嘧啶(5-FU)、甲酰四氢叶酸、奥沙利铂)、ICE(异环磷酰胺、卡铂、依托泊苷)、DHAP(高剂量阿糖胞苷[ara-C]、地塞米松、顺铂)、ESHAP(依托泊苷、甲基强的松龙、阿糖胞苷[ara-C]、顺铂)和CMF(环磷酰胺、氨甲蝶呤、氟脲嘧啶)。

[0631] 在某些实施例中,另外的治疗剂包括第二免疫治疗剂。在一些实施例中,另外的免疫治疗剂包含但不限于集落刺激因子、白细胞介素、阻断免疫抑制功能的抗体(例如,抗CTLA-4抗体、抗CD28抗体、抗CD3抗体、抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、抗TIGIT抗体)、增强免疫细胞功能的抗体(例如,抗GITR抗体、抗OX-40抗体、抗CD40抗体或抗4-1BB抗体)、toll样受体(例如,TLR3 TLR7、TLR9)、可溶配体(例如,GITRL、GITRL-Fc、OX-40L、OX-40L-Fc、CD40L、CD40L-Fc、4-1BB配体或4-1BB配体-Fc)或B7家族的成员(例如,CD80、CD86)。在一些实施例中,另外的免疫治疗剂靶向CTLA-4、CD28、CD3、PD-1、PD-L1、TIGIT、GITR、OX-40、CD-40或4-1BB。

[0632] 在一些实施例中,另外的治疗剂是免疫检查点抑制剂。在一些实施例中,免疫检查点抑制剂是抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、抗CTLA-4抗体、抗CD28抗体、抗TIGIT抗体、抗LAG3抗体、抗TIM3抗体、抗GITR抗体、抗4-1BB抗体或抗OX-40抗体。在一些实施例中,另外的治疗剂是抗TIGIT抗体。在一些实施例中,另外的治疗剂选自自由以下组成的组的抗PD-1抗体:纳武单抗(欧狄沃)、派姆单抗(健菴得)、匹地利珠单抗(pidilizumab)、MEDI0680、REGN2810、BGB-A317和PDR001。在一些实施例中,另外的治疗剂选自自由以下组成的组的抗PD-L1抗体:BMS935559(MDX-1105)、阿特珠单抗(atexolizumab)(MPDL3280A)、德瓦鲁单抗(durvalumab)(MEDI4736)和阿维单抗(avelumab)(MSB0010718C)。在一些实施例中,另外的治疗剂选自自由以下组成的组的抗CTLA-4抗体:易普利姆玛(Ipilimumab)(耶沃伊(Yervoy))和替西利姆单抗(tremelimumab)。在一些实施例中,另外的治疗剂选自自由以下组成的组的抗LAG-3抗体:BMS-986016和LAG525。在一些实施例中,另外的治疗剂选自自由以下组成的组的抗OX-40抗体:MEDI6469、MEDI0562和MOXR0916。在一些实施例中,另外的治疗剂选自自由以下组成的组的抗4-1BB抗体:PF-05082566。

[0633] 在一些实施例中,新抗原治疗剂可以与选自自由以下组成的组的生物分子组合施用:FLT3配体、肾上腺髓质素(AM)、血管生成素(Ang)、BMP、BDNF、EGF、红细胞生成素(EPO)、FGF、GDNF、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、巨噬细

胞集落刺激因子 (M-CSF)、干细胞因子 (SCF)、GDF9、HGF、HDGF、IGF、迁移刺激因子、肌骨素 (GDF-8)、NGF、神经营养索、PDGF、血小板生成素、TGF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、VEGF、PlGF、 $\gamma$ -IFN、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-12、IL-15、IL-18或减少骨髓衍生的抑制细胞 (MDSC) 的药剂或免疫抑制性巨噬细胞群体。

[0634] 在一些实施例中,用本文所描述的新抗原治疗剂进行的治疗可以伴随外科手术切除肿瘤、切除癌细胞或主治医师认为必要的任何其它外科手术疗法。

[0635] 在某些实施例中,治疗涉及与放射疗法组合施用本文所描述的新抗原治疗剂。用药剂进行的治疗可以在放射疗法之前、并行或之后进行。此类放射疗法的给药方案可以由熟练的执业医师确定。

[0636] 组合施用可以包含以单一药物调配物或使用单独调配物的共同施用或以任一顺序但通常在一段时间内连续施用,使得所有活性剂可以同时或依次发挥其生物活性,这取决于药剂。

[0637] 应当理解,本文所描述的新抗原治疗剂和至少一种另外的治疗剂的组合可以以任何顺序或并行施用。在一些实施例中,药剂将施用于先前已经用第二治疗剂进行治疗的患者。在某些其它实施例中,新抗原治疗剂和第二治疗剂将基本上同时或并行施用。例如,受试者可以在用第二治疗剂(例如,化学疗法)进行治疗的疗程的同时给予药剂。在某些实施例中,新抗原治疗剂将在用第二治疗剂治疗的1年内施用。还应理解,可以在数小时或数分钟内(即,基本上同时)将两种(或更多种)药剂或治疗施用于受试者。

[0638] 对于疾病的治疗,本文所描述的新抗原治疗剂的适当剂量取决于要治疗的疾病的类型、疾病的严重程度和病程、疾病的应答性、药剂是否用于治疗目的或预防目的、既往疗法、患者的临床病史等,均由主治医师酌情决定。新抗原治疗剂可以施用一次或持续数天到数月的一系列治疗,或直到实现治愈或实现疾病状态的消减(例如,肿瘤大小的减小)为止。最佳给药时间表可以根据对患者的身体中的药物累积的测量结果计算,并且将根据单独的药剂的相对效价而变化。施用医师可以确定最佳剂量、给药方法和重复率。

[0639] 在一些实施例中,可以以较高的初始“装载”剂量,然后以一个或多个较低剂量施用新抗原治疗剂。在一些实施例中,施用频率也可以改变。在一些实施例中,给药方案可以包括施用初始剂量,随后每周一次、每两周一次、每三周一次或每月一次施用另外的剂量(或“维持”剂量)。例如,给药方案可以包括施用初始装载剂量,然后施用例如初始剂量的二分之一的每周维持剂量。或者给药方案可以包括施用初始装载剂量,然后施用例如每隔一周初始剂量的二分之一的维持剂量。或者给药方案可以包括施用三个初始剂量,持续3周,然后施用例如每隔一周的相同量的维持剂量。

[0640] 如本领域技术人员所知,施用任何治疗剂都可能导致副作用和/或毒性。在一些情况下,副作用和/或毒性非常严重,以至于无法以治疗有效剂量排除特定药剂的施用。在一些情况下,必须停止疗法,并且可以尝试其它药剂。然而,同一治疗类别中的许多药剂表现出类似的副作用和/或毒性,这意味着患者必须停止疗法或者如果可能的话,会遭受与治疗剂相关的令人不快的副作用。

[0641] 在一些实施例中,给药方案可以限于特定数量的施用或“周期”。在一些实施例中,药剂被施用3、4、5、6、7、8或更多个周期。例如,每2周施用一次药剂,持续6个周期;每3周施用一次药剂,持续6个周期;每2周施用一次药剂,持续4个周期;每3周施用一次药剂,持续4

个周期等。给药方案可以由本领域技术人员决定并随后修改。

[0642] 本公开提供了向受试者施用本文所描述的新抗原治疗剂的方法,所述方法包括使用用于施用一种或多种药剂的间歇给药策略,这可以减少与药剂、化学治疗剂等的施用相关的副作用和/或毒性。在一些实施例中,用于治疗人类受试者癌症的方法包括向受试者施用治疗有效剂量的新抗原治疗剂组合治疗有效剂量的化学治疗剂,其中药剂中的一种或两种药剂根据间歇给药策略施用。在一些实施例中,用于治疗人类受试者癌症的方法包括向受试者施用治疗有效剂量的新抗原治疗剂组合治疗有效剂量的第二免疫治疗剂,其中药剂中的一种或两种药剂根据间歇给药策略施用。在一些实施例中,间歇给药策略包括向受试者施用初始剂量的新抗原治疗剂,以及约每2周一次施用后续剂量的药剂。在一些实施例中,间歇给药策略包括向受试者施用初始剂量的新抗原治疗剂,以及约每3周一次施用后续剂量的药剂。在一些实施例中,间歇给药策略包括向受试者施用初始剂量的新抗原治疗剂,以及约每4周一次施用后续剂量的药剂。在一些实施例中,使用间歇给药策略施用药剂,并且每周施用另外的治疗剂。

[0643] 本公开提供了包括本文所描述的新抗原治疗剂的组合物。本公开还提供了包括本文所描述的新抗原治疗剂和药学上可接受的媒剂的药物组合物。在一些实施例中,药物组合物可用于免疫疗法。在一些实施例中,组合物可用于抑制肿瘤生长。在一些实施例中,药物组合物可用于抑制受试者(例如,人患者)的肿瘤生长。在一些实施例中,组合物可用于治疗癌症。在一些实施例中,药物组合物可用于治疗受试者(例如,人患者)的癌症。

[0644] 通过将本公开的新抗原治疗剂与药学上可接受的媒剂(例如,载体或赋形剂)组合来制备用于储存和使用的调配物。本领域技术人员通常认为药学上可接受的载体、赋形剂和/或稳定剂是调配物或药物组合物的非活性成分。WO 2015/095811列出了示例性调配物。

[0645] 合适的药学上可接受的媒剂包含但不限于:无毒缓冲液如磷酸盐、柠檬酸盐和其它有机酸;如氯化钠等盐;抗氧化剂,包含抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂,如十八烷基二甲基苄基氯化铵、六甲氯铵、苯扎氯铵、苜索氯铵、苯酚、丁醇或苯甲醇、对羟基苯甲酸烷基酯诸如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯、儿茶酚、间苯二酚、环己醇、3-戊醇以及间甲酚;低分子量多肽(例如,小于约10个氨基酸残基);如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白等蛋白质;如聚乙烯吡咯烷酮等亲水性聚合物;氨基酸,如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;碳水化合物,如单糖、二糖、葡萄糖、甘露糖或糊精;如EDTA等螯合剂;糖,如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇;如钠等成盐反离子;如Zn-蛋白复合物等金属复合物;以及如TWEEN或聚乙二醇(PEG)等非离子型表面活性剂。《雷明顿:药学科学与实践(Remington: The Science and Practice of Pharmacy)》,第22版,2012,伦敦制药出版社(Pharmaceutical Press,London.)。在一些实施例中,媒剂是含5%葡萄糖的水。

[0646] 本文所描述的药物组合物可以以多种方式施用,用于局部或全身性治疗。施用可以是通过表皮或透皮贴剂、油膏剂、洗剂、乳膏剂、凝胶、滴剂、栓剂、喷剂、液体以及粉末局部的;通过吸入或吹入粉末或气溶胶(包含通过喷雾器)肺部、气管内以及鼻内的;口服的;或肠胃外的,包含静脉内、动脉内、肿瘤内、皮下、腹膜内、肌内(例如,注射或输注)或颅内(例如,鞘内或心室内)。

[0647] 治疗调配物可以是单位剂型。此类调配物包含片剂、丸剂、胶囊剂、粉剂、颗粒剂、在水或非水性介质中的溶液或悬浮液或栓剂。

[0648] 本文所描述的新抗原性肽也可以包埋在微胶囊中。此类微胶囊例如通过凝聚技术或通过界面聚合制备,例如分别在胶体药物递送系统(例如脂质体、白蛋白微球、微乳液、纳米颗粒以及纳米胶囊)或在粗乳液中的羟甲基纤维素或明胶-微胶囊以及聚-(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊,如《雷明顿:药学科学与实践》,第22版,2012,伦敦制药出版社中所描述的。

[0649] 在某些实施例中,药物调配物包含本文所描述的与脂质体复合的新抗原治疗剂。产生脂质体的方法是本领域技术人员已知的。例如,可以用包括磷脂酰胆碱、胆固醇和PEG衍生化磷脂酰乙醇胺(PEG-PE)的脂质组合物来通过反相蒸发生成特别一些脂质体。可以通过具有限定孔径的过滤器将脂质体挤出以产生具有期望直径的脂质体。

[0650] 在某些实施例中,可以产生包括本文所描述的新抗原性肽的缓释制剂。持续释放制剂的适合的实例包含含有药剂的固体疏水性聚合物的半渗透基质,其中所述基质采用成型物品的形式(例如,薄膜或微胶囊)。持续释放基质的实例包含聚酯、水凝胶,如聚(2-羟乙基-甲基丙烯酸酯)或聚(乙烯醇)、聚乳酸、L-谷氨酸和7-乙基-L-谷氨酸盐的共聚物、不可降解的乙烯-乙酸乙烯酯、如LUPRON DEPOT™(由乳酸-乙醇酸共聚物和醋酸亮丙瑞林构成的可注射微球)等可降解的乳酸-乙醇酸共聚物、乙酸异丁酸蔗糖酯和聚-D-(-)-3-羟基丁酸。

[0651] 本公开提供了包括免疫原性疫苗的治疗方法。提供了治疗疾病(如癌症或病毒感染)的方法。一种方法可以包括向受试者施用有效量的包括免疫原性抗原的组合物。在一些实施例中,抗原包括病毒抗原。在一些实施例中,抗原包括肿瘤抗原。

[0652] 可以制备的疫苗的非限制性实例包含基于肽的疫苗、基于核酸的疫苗、基于抗体的疫苗、基于T细胞的疫苗和基于抗原呈递细胞的疫苗。

[0653] 可以使用一种或多种生理学上可接受的载体来调配疫苗组合物,所述生理学上可接受的载体包含促进将活性剂处理成可以在药学上使用的制剂的赋形剂和助剂。适当的调配物可以取决于所选的施用途径。众所周知的技术、载体和赋形剂中的任何一种都可以在本领域合适和理解的情况下使用。

[0654] 在一些情况下,疫苗组合物被调配成基于肽的疫苗、基于蛋白质的疫苗、基于核酸的疫苗、基于抗体的疫苗或基于细胞的疫苗。例如,疫苗组合物可以包含阳离子脂质调配物中裸露cDNA;脂肽(例如,Vitiello,A.等人,《临床研究杂志(J.Clin.Invest.)》95:341,1995)、裸cDNA或肽,包封在例如聚(DL-丙交酯-共-乙交酯) (“PLG”)微球中(参见例如Eldridge等人,《分子免疫学》28:287-294,1991;Alonso等人,《疫苗》12:299-306,1994;Jones等人,《疫苗》13:675-681,1995);免疫刺激复合物(ISCMS)中所含的肽组合物(例如,Takahashi等人,《自然》344:873-875,1990;Hu等人,《临床与实验免疫学(Clin.Exp.Immunol.)》113:235-243,1998);或多抗原肽系统(MAP)(参见例如Tam,J.P.,《美国国家科学院院刊》85:5409-5413,1988;Tarn,J.P.,《免疫学方法杂志(J.Immunol.Methods)》196:17-32,1996)。有时,疫苗被调配成基于肽的疫苗或基于核酸的疫苗,其中核酸编码多肽。有时,疫苗被调配成基于抗体的疫苗。有时,疫苗被配制成基于细胞的疫苗。

[0655] 鉴定的疾病特异性免疫原性新抗原肽的氨基酸序列可以用于开发药学上可接受的组合物。抗原来源可以是但不限于天然或合成蛋白质,包含糖蛋白、肽和超抗原;抗体/抗原复合物;脂蛋白;RNA或其翻译产物;以及DNA或由DNA编码的多肽。抗原来源还可以包括未转化的、转化的、转染的或转导的细胞或细胞系。可以使用本领域普通技术人员已知的可以

用于表达重组抗原的多种表达或逆转录病毒载体中的任何一种来转化、转染或转导细胞。表达也可以在已经用含有编码重组抗原的DNA分子的表达或逆转录病毒载体转化、转染或转导的任何合适的宿主细胞中实现。可以使用本领域技术人员已知的任何数量的转染、转化和转导方案。重组牛痘载体和被牛痘载体感染的细胞可以用作抗原来源。

[0656] 组合物可以包括合成的疾病特异性免疫原性新抗原肽。组合物可以包括两种或更多种疾病特异性免疫原性新抗原肽。组合物可以包括疾病特异性免疫原性肽(如蛋白质、肽、DNA和RNA)的前体。疾病特异性免疫原性肽的前体可以生成或被生成鉴定的疾病特异性免疫原性新抗原肽。在一些实施例中,治疗组合物包括免疫原性肽的前体。疾病特异性免疫原性肽的前体可以是前药。在一些实施例中,包括疾病特异性免疫原性新抗原肽的组合物可以进一步包括佐剂。例如,新抗原肽可以用作疫苗。在一些实施例中,免疫原性疫苗可以包括药学上可接受的免疫原性新抗原肽。在一些实施例中,免疫原性疫苗可以包括免疫原性新抗原肽(如蛋白质、肽、DNA和RNA)的药学上可接受的前体。在一些实施例中,治疗方法包括向受试者施用有效量的特异性识别免疫原性新抗原肽的抗体。在一些实施例中,治疗方法包括向受试者施用有效量的特异性识别免疫原性新抗原肽的可溶TCR或TCR类似物。

[0657] 本文所描述的方法特别用于个性化医疗环境中,其中免疫原性新抗原肽用于为同一个体开发治疗剂(如疫苗或治疗性抗体)。因此,治疗受试者疾病的方法可以包括根据本文所描述的方法鉴定受试者体内的免疫原性新抗原肽;以及合成肽(或其前体);和向受试者施用肽或特异性识别肽的抗体。在一些实施例中,免疫原性新抗原的表达模式可以作为生成患者特异性疫苗的重要基础。在一些实施例中,免疫原性新抗原的表达模式可以作为患有特定疾病的一组患者生成疫苗的重要基础。因此,可以在患者组中选择性地治疗特定疾病,例如特定类型的肿瘤。

[0658] 在一些实施例中,本文所描述的肽是结构上正常的抗原,所述抗原可以被大量患者组中的自体抗疾病T细胞识别。在一些实施例中,确定其疾病表达结构上正常的新抗原的一组患病受试者的抗原表达模式。

[0659] 在一些实施例中,本文所描述的肽包括包含蛋白质的第一新表位的第一肽和包含相同蛋白质的第二新表位的第二肽,其中第一肽不同于第二肽,并且其中第一新表位包括突变且第二新表位包括相同突变。在一些实施例中,本文所描述的肽包括包含蛋白质第一区域的第一新表位的第一肽和包含相同蛋白质第二区域的第二新表位的第二肽,其中第一区域包括第二区域的至少一个氨基酸,其中第一肽不同于第二肽,并且其中第一新表位包括第一突变并且第二新表位包括第二突变。在一些实施例中,所述第一突变和所述第二突变是相同的。在一些实施例中,突变选自以下组成的组:点突变、剪接位点突变、移码突变、通读突变、基因融合突变和其任何组合。

[0660] 有多种可以产生免疫原性新抗原的方法。蛋白质或肽可以通过本领域技术人员已知的任何技术制备,包含通过标准分子生物学技术表达蛋白质、多肽或肽、从天然来源分离蛋白质或肽、体外翻译或化学合成蛋白质或肽。一般而言,此类疾病特异性新抗原可以在体外或体内产生。免疫原性新抗原可以作为肽或多肽在体外产生,所述肽或多肽然后可以被调配成个性化疫苗或免疫原性组合物并施用于受试者。免疫原性新抗原的体外产生可以包括在多种细菌、真核或病毒重组表达系统中的任何一种中由DNA或RNA分子进行肽合成或肽/多肽的表达,然后纯化所表达的肽/多肽。可替代地,可以通过将编码免疫原性新抗原的

分子(例如,DNA、RNA和病毒表达系统)引入受试者体内产生免疫原性新抗原,然后表达经编码的免疫原性新抗原。在一些实施例中,编码免疫原性新抗原肽的多核苷酸可以用于在体外产生新抗原肽。

[0661] 在一些实施例中,多核苷酸包括与编码免疫原性新抗原的多核苷酸具有至少60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的序列。

[0662] 多核苷酸可以是例如DNA、cDNA、PNA、CNA、RNA、单链和/或双链、天然或稳定形式的多核苷酸或其组合。编码免疫原性新抗原肽的核酸可以含有或不含有内含子,只要它编码肽。在一些实施例中,体外翻译用于产生肽。

[0663] 还考虑了包括编码新抗原的序列的表达载体,以及含有表达载体的宿主细胞。适用于本公开的表达载体可以包括至少一种与核酸序列可操作连接的表达控制元件。将表达控制元件插入载体中以控制和调节核酸序列的表达。表达控制元件的实例是本领域众所周知的并且包含例如lac系统、噬菌体 $\lambda$ 的操纵子和启动子区域、酵母启动子和衍生自多瘤、腺病毒、逆转录病毒或SV40的启动子。另外的操作元件包含但不限于前导序列、终止密码子、多腺苷酸化信号和任何其它对于核酸序列在宿主系统中的适当转录和随后翻译所必需或优选的序列。本领域技术人员将理解表达控制元件的正确组合将取决于所选择的宿主系统。将进一步理解的是,表达载体应含有在宿主系统中转移和随后复制含有核酸序列的表达载体所必需的另外的元件。此类元件的实例包含但不限于复制起点和可选择标志物。

[0664] 新抗原肽可以以编码期望的新抗原肽的RNA或cDNA分子的形式提供。本公开的一种或多种新抗原肽可以由单一表达载体编码。通常,将DNA以适当朝向和正确的阅读框插入如质粒等表达载体中以进行表达,如有必要,可以将DNA与期望宿主(例如,细菌)识别的适当转录和翻译调节控制核苷酸序列连接,但是此类控制通常在表达载体中可用。然后将载体引入宿主细菌以使用标准技术进行克隆。用于真核宿主,尤其是哺乳动物或人的有用的表达载体包含例如包括来自SV40、牛乳头瘤病毒、腺病毒和巨细胞病毒的表达控制序列的载体。用于细菌宿主的有用的表达载体包含已知的细菌质粒,如来自大肠杆菌的质粒,包含pCR 1、pBR322、pMB9和其衍生物、更广泛的宿主范围质粒,如M13和丝状单链DNA噬菌体。

[0665] 在各实施例中,编码所关注的多肽的DNA序列可以通过使用寡核苷酸合成仪的化学合成来构建。可以基于期望多肽的氨基酸序列和选择在产生所关注的重组多肽的宿主细胞中偏好的那些密码子来设计此类寡核苷酸。可以应用标准方法来合成编码分离的所关注多肽的分离的多核苷酸序列。

[0666] 用于表达多肽的合适的宿主细胞包含在适当启动子控制下的原核生物、酵母、昆虫或高等真核细胞。原核生物包含革兰氏阴性或革兰氏阳性生物,例如大肠杆菌或芽孢杆菌纲。高等真核细胞包含哺乳动物来源的已建立细胞系。还可以采用无细胞翻译系统。与细菌、真菌、酵母和哺乳动物细胞宿主一起使用的适当的克隆和表达载体是本领域众所周知的。不同哺乳动物或昆虫细胞培养系统可以用于表达重组蛋白。示例性哺乳动物宿主细胞系包含但不限于COS-7、L细胞、C127、3T3、中国仓鼠卵巢(CHO)、293、HeLa和BHK细胞系。哺乳动物表达载体可以包括非转录元件如复制起点、与待表达的基因连接的合适启动子和增强子,以及其它5'或3'侧非转录序列,以及5'或3'非翻译序列,如必要的核糖体结合位点、聚

腺苷酸化位点、剪接供体和受体位点以及转录终止序列。

[0667] 可以根据任何合适的方法纯化由转化宿主产生的蛋白质。此类标准方法包含色谱法(例如,离子交换、亲和以及大小柱色谱法等)、离心、差异溶解度或通过用于蛋白质纯化的任何其它标准技术。如六组氨酸、麦芽糖结合结构域、流感外壳序列、谷胱甘肽-S-转移酶等亲和标签可以与蛋白质连接,以便通过合适的亲和柱简单纯化。分离的蛋白质也可以使用如蛋白水解、核磁共振和x射线晶体学等技术进行物理表征。另外,可以使用能够与免疫原或其片段特异性结合的特异性抗体或其片段或其它结合结构域。

[0668] 疫苗可以包括与本文所描述的多肽序列结合的实体。所述实体可以是抗体。基于抗体的疫苗可以使用如合适的和本领域理解的众所周知的技术、载体和赋形剂中的任何一种来调配。在一些实施例中,本文所描述的肽可以用于制备如抗体治疗剂等新抗原特异性治疗剂。例如,新抗原可以用于产生和/或鉴定特异性识别新抗原的抗体。这些抗体可以用作治疗剂。抗体可以是天然抗体、嵌合抗体、人源化抗体,或者可以是抗体片段。抗体可以识别本文所描述的一种或多种多肽。在一些实施例中,抗体可以识别多肽,所述多肽与本文所描述的多肽具有至多40%、50%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性。在一些实施例中,抗体可以识别多肽,所述多肽与本文所描述的多肽具有至少40%、50%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性。在一些实施例中,抗体可以识别多肽序列,所述多肽序列是本文所描述的多肽的长度的至少30%、40%、50%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%。在一些实施例中,抗体可以识别多肽序列,所述多肽序列是本文所描述的多肽的长度的至多30%、40%、50%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%。

[0669] 本公开还考虑使用核酸分子作为媒介,用于以例如DNA/RNA疫苗的形式在体内将新抗原肽/多肽递送到有需要的受试者。

[0670] 在一些实施例中,疫苗是核酸疫苗。在一些实施例中,可以通过使用质粒将新抗原施用于受试者。可以通过多种不同的方法将质粒引入动物组织,例如将裸DNA注射或气溶胶滴注到如鼻和肺粘膜等粘膜表面。在一些实施例中,可以使用如用“基因枪”的物理递送。表达载体的准确选择可以取决于要表达的肽/多肽,并且完全在普通技术人员的技能范围内。

[0671] 在一些实施例中,核酸编码免疫原性肽或肽前体。在一些实施例中,核酸疫苗包括位于编码免疫原性肽或肽前体的序列侧翼的序列。在一些实施例中,核酸疫苗包括多于一种免疫原性表位。在一些实施例中,核酸疫苗是基于DNA的疫苗。在一些实施例中,核酸疫苗是基于RNA的疫苗。在一些实施例中,基于RNA的疫苗包括mRNA。在一些实施例中,基于RNA的疫苗包括裸mRNA。在一些实施例中,基于RNA的疫苗包括经修饰的mRNA(例如,使用鱼精蛋白

免受降解的mRNA、含有经修饰的5'CAP结构的mRNA或含有经修饰的核苷酸的mRNA)。在一些实施例中,基于RNA的疫苗包括单链mRNA。

[0672] 多核苷酸可以是基本上纯的或包含在合适的载体或递送系统中。合适的载体和递送系统包含病毒,如基于腺病毒、痘苗病毒、逆转录病毒、疱疹病毒、腺相关病毒或含有一种以上病毒元件的杂合体的系统。非病毒递送系统包含阳离子脂质和阳离子聚合物(例如,阳离子脂质体)。

[0673] 可以使用基于病毒的系统在体内编码和表达一种或多种新抗原肽。病毒载体可以用作本公开中的重组载体,其中病毒基因组的一部分被缺失以引入新基因而不破坏病毒的传染性。本公开的病毒载体是非致病性病毒。在一些实施例中,病毒载体对哺乳动物中的特定细胞类型具有嗜性。在另一个实施例中,本公开的病毒载体能够感染如树突细胞和巨噬细胞等专业抗原呈递细胞。在本公开的又一个实施例中,病毒载体能够感染哺乳动物的任何细胞。病毒载体也可以感染肿瘤细胞。本公开使用的病毒载体包含但不限于痘病毒,如痘苗病毒、禽痘病毒、鸡痘病毒和高度减毒的痘苗病毒(安卡拉或MVA)、逆转录病毒、腺病毒、杆状病毒等。

[0674] 疫苗可以通过多种途径递送。递送途径可以包含口服(包含口腔和舌下)、直肠、鼻腔、局部、透皮贴剂、肺部、阴道、栓剂或肠胃外(包含肌内、动脉内、鞘内、皮内、腹膜内、皮下和静脉内)施用或以适用于通过雾化、吸入或吹入施用的形式。有关药物递送系统的一般信息可见于Ansel等人,《药物剂型和药物递送系统(Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems)》(马里兰州巴尔的利平科特、威廉姆斯与威尔金斯出版公司(1999))。本文所描述的疫苗可以施用于肌肉或可以通过皮内或皮下注射或经皮,如通过离子电渗疗法施用。可以采用疫苗的表皮施用。

[0675] 在一些情况下,疫苗也可以调配成通过鼻道施用。其中载体是固体的适用于鼻腔施用的调配物可以包含粒度例如在约10到约500微米范围内的粗粉,所述粗粉以吸鼻烟的方式施用,即通过鼻道从靠近鼻子的粉末容器中快速吸入。调配物可以是鼻喷雾剂、滴鼻剂或通过喷雾器的气雾剂施用。调配物可以包含疫苗的水性或油性溶液。

[0676] 疫苗可以是如悬浮液、糖浆或酏剂等液体制剂。疫苗还可以是用于肠胃外、皮下、皮内、肌内或静脉内施用(例如,可注射施用)的制剂,如无菌悬浮液或乳剂。

[0677] 疫苗可以包含用于单次免疫的材料或可以包含用于多次免疫的材料(即“多剂量”试剂盒)。在多剂量布置中优选包含防腐剂。作为在多剂量组合物中包含防腐剂的替代(或另外),组合物可以包含在具有用于去除材料的无菌适配器的容器中。

[0678] 可以以约0.5mL的剂量体积施用疫苗,但可以向儿童施用半剂量(即约0.25mL)。有时,疫苗可以以更高的剂量,例如约1ml施用。

[0679] 疫苗可以作为1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个剂量疗程方案施用。有时,疫苗作为1、2、3或4个剂量疗程方案施用。有时,疫苗作为1个剂量疗程方案施用。有时,疫苗作为2个剂量疗程方案施用。

[0680] 第一剂和第二剂的施用可以间隔约0天、1天、2天、5天、7天、14天、21天、30天、2个月、4个月、6个月、9个月、1年、1.5年、2年、3年、4年或更长时间。

[0681] 本文所描述的疫苗可以每1、2、3、4、5、6、7、8、9、10年或更长时间施用一次。有时,本文所描述的疫苗每2、3、4、5、6、7年或更长时间施用一次。有时,本文所描述的疫苗每4、5、

6、7年或更长时间施用一次。有时，本文所描述的疫苗施用一次。

[0682] 剂量实例不是限制性的并且仅用于举例说明用于施用本文所描述的疫苗的特定给药方案。用于人的有效量可以根据动物模型确定。例如，用于人的剂量可以被调配成达到已发现对动物有效的循环、肝脏、局部和/或胃肠道浓度。基于动物数据和其它类型的类似数据，本领域技术人员可以确定适合人的疫苗组合物的有效量。

[0683] 当提及药剂或药剂组合时，有效量将通常意指已被医学或制药领域（例如，FDA、AMA）中的各种监管或咨询组织中的任何一种或制造商或供应商推荐或批准的剂量范围、施用方式、调配物。

[0684] 在一些方面，本文所描述的疫苗和试剂盒可以在2℃与8℃之间下储存。在一些情况下，疫苗不是冷冻储存的。在一些情况下，疫苗储存在如-20℃或-80℃等温度下。在一些情况下，疫苗远离阳光储存。

#### [0685] 试剂盒

[0686] 本文所描述的新抗原治疗剂可以与施用说明一起以试剂盒形式提供。通常，试剂盒将包含单位剂型的容器中期望的新抗原治疗剂和用于施用的说明。另外的治疗剂，例如细胞因子、淋巴因子、检查点抑制剂、抗体，也可以包含在试剂盒中。还可以期望的其它试剂盒组件包含例如无菌注射器、加强剂和其它期望的赋形剂。

[0687] 本文还提供了与本文所描述的一种或多种方法一起使用的试剂盒和制品。试剂盒可以含有一种或多种新抗原多肽，所述新抗原多肽包括一种或多种新表位。试剂盒还可以含有编码本文所描述的肽或蛋白质中的一种或多种的核酸、识别本文所描述的肽中的一种或多种的抗体或用本文所描述的肽中的一种或多种激活的基于APC的细胞。试剂盒可以进一步含有配制和递送疫苗所必需的佐剂、试剂和缓冲液。

[0688] 试剂盒还可以包含被分隔开以容纳一个或多个容器（如小瓶、管等）的载体、包装或容器，所述容器中的每个容器包括用于本文所描述方法中的如肽或佐剂等单独元件之一。适合的容器包含例如瓶子、小瓶、注射器和试管。容器可以由各种材料如玻璃或塑料形成。

[0689] 本文提供的制品含有包装材料。药物包装材料的实例包含但不限于泡罩包装、瓶、管、袋、容器、瓶以及适合于所选制剂和预期的施用和治疗方式的任何包装材料。试剂盒通常包含列出内容和/或使用说明的标签，以及带有使用说明的包装插页。通常还将包含一组说明书。

[0690] 将通过具体的实例对本公开进行更详细的描述。以下实例是出于说明性目的而提供，并非旨在以任何方式限制本公开。本领域的技术人员将容易识别出可被改变或修改以产生根据本公开的替代性实施例。本文列出的所有专利、专利申请以及印刷的公开物通过引用整体并入本文。

#### [0691] 实例

[0692] 这些实例仅出于说明性目的提供，而非旨在限制本文所提供的权利要求的范围。

#### [0693] 实例1-多功能抗体设计

##### [0694] 1.1. 支架结构域的选择标准

[0695] 为了鉴定合适的支架结构域来设计多结构域多功能抗体，在一些情况下，可以考虑若干个选择标准（图4）。在一些实施例中，期望最小化不需要的免疫应答的风险，并且在

这些情况下,内源性人蛋白质/蛋白质结构域或已知为非免疫原性的外源蛋白质是优选的。在一些实施例中,这些支架不具有酶活性,并且允许在细菌(如大肠杆菌)或用于个性化癌症免疫疗法的体外翻译系统中快速且具有成本效益地生产。在一些实施例中,考虑在细菌或酵母或其它宿主细胞表达系统中具有高表达的支架结构域。在一些实施例中,考虑结构和生化表征的支架以及用作疫苗时没有毒性的支架。在一些实施例中,支架结构域不需要用于校正折叠的翻译后修饰。在一些实施例中,支架结构域不需要二硫键形成。对于第二代多功能抗体的生成,在一些情况下,考虑允许工程化功能的支架结构域。在一些情况下,这些结构域可以用于选择针对分子靶标的结合剂(激动剂和/拮抗剂)并且能够像抗体模拟物一样发挥作用。

#### [0696] 1.2. 选择具有最高溶解能力的支架结构域

[0697] 在某个实施例中,能够溶解并携带多种不同表位的结构域是可优选的。为了测试溶解具有挑战性的表位的功效,对来自T3小鼠肿瘤模型的Alg8表位进行了压力测试,所述模型在水溶液中具有很强的聚集和沉淀倾向。Alg8表位在C末端与不同的单体支架结构域融合,并且测试它们在细菌表达系统中的可溶表达。几乎所有的支架结构域都表达良好。在所述条件下,Stefin A和肌联蛋白-I27结构域作为可溶Alg8-融合蛋白表达,并且Stefin A具有更好的增溶能力(图5A-5B)。另外,各种肽在C末端与Stefin A支架结构域融合,并且测试它们在细菌表达系统中的可溶表达。结果表明,与Stefin A的融合能够溶解多种难以合成或单独溶解的不同肽(图5C)。

#### [0698] 1.3. 测试各种多功能抗体构型

[0699] 多功能抗体可以以多种构型生成,所述多种构型可以作为疫苗技术具有不同的特征和益处,以诱导有效的抗肿瘤免疫。例如,多功能抗体可以具有多个通过接头区域融合在一起的支架结构域。生成了仅具有连接在一起的一个、两个、四个或6个支架的构建体。多个支架的融合生成了具有更大分子量的分子,这可能是期望的疫苗功能,因为这些分子可以大到足以在皮下注射后进入淋巴系统,因此优先积聚在淋巴结中,在所述淋巴结中所述分子会遇到高密度专业抗原呈递细胞。在某些条件下,肌联蛋白-I27和Stefin A结构域能够以高效的多价结构配置。对于另一个实例,在C末端或N末端处,表位可以插入多功能抗体的每个结构域之间或者作为一串表位插入两个结构域之间。在一些情况下,将5个表位并入到具有6个支架结构域的多功能抗体中的可靠方法之一是将每个单个表位插入两个结构域之间,而不是在多功能抗体的端或中间处插入一串5个表位。

[0700] 在一些情况下,其它因素可以影响生成这些多功能抗体的能力和其作为疫苗技术的免疫原性。例如,每个支架与表位之间的接头区域可以被设计成使得接头区域支持柔性和溶解性。此外,这些接头区域可以针对表位的有效切割和呈递进行优化,例如通过在抗原呈递途径中含有肽酶的切割位点或通过添加良好呈递的表位的序列背景或基于来自HLA免疫肽组研究的光谱数据的共有序列(参见例如Abelin等人,《免疫(Immunity)》,2017)。

#### [0701] 实例2-克隆多功能抗体

[0702] 在一些实施例中,多功能抗体结构的设计包含重复的支架结构域,所述重复的支架结构域通过接头区域串在一起,作为沿着细绳的珠粒。这些结构域可以有助于多功能抗体溶解性、稳定性和/或功能性,并且可以保护所关注的表位免于过度不希望的降解。以下方法说明了示例性的低通量多功能抗体克隆。创建了主构建体,所述主构建体含有六个支

架结构域基因,所述支架结构域基因由柔性接头区域隔开,在接头中心具有独特的限制酶位点。这些限制酶位点能够使用经典的基于限制的克隆或Gibson组装分子克隆技术以逐步方式插入新表位DNA序列。

[0703] 在一些情况下,相同Stefin A结构域的重复可以用于在高通量应用所需的单个反应中克隆多功能抗体构建体。在一些情况下,连接有接头和可变表位序列(在5'和3'端处)的单个Stefin A结构域是可合成的,并且可以用于开发快速克隆方法。例如,如图6所展示的,表位中的序列差异用于与另一个DNA片段的5'端上的互补区粘接,所述另一个DNA片段在其3'端上编码第二表位,所述第二表位然后与下一个DNA片段上的互补5'序列粘接。

[0704] 实例3-免疫学测试

[0705] 3.1. 淋巴结靶向

[0706] 有效疫苗开发的主要挑战之一是将抗原递送到次级淋巴器官,在所述次级淋巴器官,抗原呈递细胞可以遇到并引发T细胞。例如,皮下或皮内递送并不总是导致递送组分的有效生物分布。对于有效触发强烈T细胞应答的疫苗,抗原可以特异性定位于淋巴结,例如腋窝和腹股沟淋巴结。实现淋巴结保留的一种方法是增加抗原的分子大小。为了有效地吸收淋巴结,抗原可以与大载体分子融合或修饰,使得其可以与足够大小的内源性蛋白质结合。融合蛋白、纳米颗粒或白蛋白搭便车可以用于增强疫苗淋巴结靶向。

[0707] 因此,本文公开了具有足够大小优势的多功能抗体,所述多功能抗体被设计成保留在淋巴结(LN)中并且用于溶解和稳定新表位,尤其是难以合成或溶解的新表位。为了确认多功能抗体确实保留在LN中,实验被设计成比较多功能抗体与合成长肽(SLP)抗原,从而确定LN中是否存在优先累积(图7A-图7C、表1)。

[0708] 表1

组	动物数 C57BL/6J 8-12 周约 25 g	处理	剂量浓度	剂量体 积	途径	端点	端点收集 /IVIS
[0709]	1	5/雌性	调配的肽 Gp100-alexa647	1.0 nmol/ 注射	0.1 mL/ 注射	双侧皮下注射 到左右尾根部	- 给药 后 12 小时  对于所有组 织,在冰上收 集完整的新 鲜组织,以便 立即提取
	2	5/雌性	调配的牛血清 白蛋白 BSA-alexa647	1.0 nmol/ 注射	0.1 mL/ 注射	双侧皮下注射 到左右尾根部	
	3	5/雌性	测试蛋白质编 号 1-Alexa647	1.0 nmol/ 注射	0.1 mL/ 注射	双侧皮下注射 到左右尾根部	
	4	5/雌性	测试蛋白质编 号 2-Alexa647	1.0 nmol/ 注射	0.1 mL/ 注射	双侧皮下注射 到左右尾根部	
	5	5/雌性	测试蛋白质编 号 3-Alexa647	1.0 nmol/ 注射	0.1 mL/ 注射	双侧皮下注射 到左右尾根部	
	6	5/雌性	测试蛋白质编 号 4-Alexa647	1.0 nmol/ 注射	0.1 mL/ 注射	双侧皮下注射 到左右尾根部	
	7	2/雌性	仅调配缓冲液	--	0.1 mL/ 注射	双侧皮下注射 到左右尾根部	

[0710] 使用来自赛默飞世尔公司(ThermoFisher)的牛血清白蛋白(BSA) Alexa Fluor™ 647 缀合物制备荧光团标记的抗原肽和蛋白质单体、二聚体、四聚体和六聚体。用Alexa Fluor™ 647 NHS酯(琥珀酰亚胺酯)活性染料标记纯化的Stefin A蛋白并且用Zeba脱盐柱清洗,并且进行HPLC(280nm和647nm处的OD)。

[0711] 将荧光团标记的抗原肽和蛋白质单体、二聚体、四聚体和六聚体皮下注射到小鼠的左右尾根部,其中Alexa647\_BSA作为阳性对照。给药后十二(12)小时,通过CO<sub>2</sub>对动物实施安乐死。通过Lumina系列III体内成像系统(IVIS;珀金埃尔默公司(PerkinElmer))分离左右腋窝和腹股沟淋巴结(aLN-L、aLN-R; iLN-L、iLN-R)并且进行离体成像。如图8A-图8C和图9所展示的,多功能抗体中结构域的数量与腹股沟和辅助LN中LN累积的程度呈正相关。随着多功能抗体中结构域数量的增加,LN累积也增加。六聚体多功能抗体示出明显高于阳性对照BSA的LN累积,这可能是由于较大的大小或其独特的链状构型。下表2示出了多功能抗体、SLP和BSA的分子量。

[0712] 表2. 多功能抗体、SLP和BSA的分子量

[0713] MW (kD)	SLP 3.6	阳性对照		多功能抗体构型		
		BSA 68	单体 13	二聚体 26	四聚体 52	六聚体 78

[0714] 然后处理淋巴结,并且将细胞重悬并根据下表3用FACS进行分析。图8D示出了FACS分析的结果。

[0715] 表3

目的	标志物	荧光团	克隆	公司	目录号	激光	测试量(μl)
活力	活/死 IR	APC-Cy7	不适用	生命技术公司 (Life Technologies)	L10119	红色	染色缓冲液中 1:1000
DC	CD11c	FITC	HL3	BD 公司 (BD)	553801	蓝色	2
染料标记	多功能抗体	Alexa-647	不适用	Neon 公司 (Neon)	不适用	红色	
[0716] DC	CD8a	BUV395	53.6-7	BD 公司	563786	UV	2
DC	CD11b	BV711	M1/70	BD 公司	563168	紫色	2
巨噬细胞	F4/80	海水蓝	BM8	百进生物公司 (Biolegend)	123124	紫色	2
T 细胞	CD3	PE-Cy7	17A2	BD 公司	560591	YG	2
B 细胞	CD45R/B220	PerCP-Cy5.5	RA3-6B2	百进生物公司	103236	蓝色	2
巨噬细胞	CD169 (Siglec-1)	PE	3D6.112	百进生物公司	142404	蓝色 /YG	2

[0717] 3.2. 免疫原性

[0718] 为了比较包括多功能抗体与合成长肽 (SLP) 的构建体中编码的新抗原的免疫原性,将10ug的SLP或摩尔等量的携带相同表位的多功能抗体连同佐剂一起皮下注射到C57BL/6J小鼠两侧的尾根部中。在第0天和第14天进行了初免和加强两轮注射。在第21天处死小鼠,并且收集小鼠脾脏用于免疫细胞因子检测。还在第0、7、14和21天抽血用于表位特异性CD8<sup>+</sup>细胞多聚体染色。研究中使用的肽包含:GIPVHLELASMTN MELMSSIVHQQVFPT (adpgk) 和GRVLELFRAAQLANDVVLQIMELCGATR (Reps1),两者均来自小鼠MC38结肠癌肿瘤模型。

[0719] 如图10A-图10C所展示的,与用相同SLP免疫的小鼠相比,用含有Reps1的多功能抗体进行免疫的小鼠表现出更强的特异性T细胞应答。与SLP相比,用中间含有Reps1的多功能抗体疫苗接种诱导抗原特异性T细胞应答增加2倍,而与SLP相比,用端处含有Reps1的多功

能抗体疫苗接种诱导抗原特异性T细胞应答增加约300倍。也没有观察到与来自携带两个表位的多功能抗体的adpgk的交叉反应性。另一方面,在用SLP或携带adpgk的多功能抗体免疫的小鼠中观察到的adpgk特异性T细胞应答是类似的。可能是由于端剪切,在端处单独编码adpgk的多功能抗体往往比其它多功能抗体或甚至SLP引发更低的免疫应答。

#### [0720] 实例4-功能化多功能抗体

[0721] 多功能抗体可以被配置成具有单独或与其它功能组合的功能。在无需另外的功能特化的情况下可以生成包括表位的多功能抗体构建体(例如,图11A和图12A)。图11B和图12B展示了示例性功能化多功能抗体构型。功能可以包含但不限于树突细胞靶向、与佐剂形成复合物以及促进内体逃逸、交叉呈递与其它药物共同递送的试剂形成复合物。图13展示了表示融合多功能抗体制造流水线的通用示意图。

[0722] 树突细胞(DC)是专业抗原呈递细胞,所述专业抗原呈递细胞对于捕获、处理和呈递细胞表面上的抗原以引发T细胞,然后控制T细胞扩增和促进其效应功能至关重要。C1ec9A是在DC的选择性组表面上表达的表型凝集素样分子。在人中,C1ec9A由对于抗原交叉呈递至关重要的BDCA3+髓样树突细胞(mDC)表达。在动物模型中,与C1ec9A或C1ec9A靶向分子的抗体缀合的抗原可以引起免疫应答增加,并且可以增强抗肿瘤免疫。C1ec9A可以是用于提高癌症疫苗的效率的抗原DC靶向的靶标。

[0723] DC靶向功能可以以多种方式添加到多功能抗体中。例如,支架结构域中的一个或多个支架结构域可以被工程化使得所述支架结构域与DC受体如C1ec9a结合。在一些实施例中,DC靶向肽序列可以在多功能抗体内编码(在N末端或C末端处或在正常表位位置中的一些正常表位位置处)。在一些实施例中,DC靶向肽可以例如使用交联剂靶向支架结构域上的赖氨酸残基而与多功能抗体缀合。在一些实施例中,DC靶向肽序列可以与肽序列融合,所述肽序列与多功能抗体的支架结构域结合,然后此双功能肽可以在调配期间与多功能抗体混合。在一些实施例中,多功能抗体的多价性质将允许此DC靶向肽通过支架部分(例如,在六个位点处)高亲和力结合,因此展示多个DC靶向肽。

#### [0724] 实例5-制备富集的人工微型蛋白质组疫苗的方法

[0725] 在此实例中,描述了生成人工微型蛋白质组疫苗(AmpVax)的简化方法。简言之,从FFPE样品中提取总RNA。由于FFPE储存或RNA提取步骤期间,信使RNA可以被部分地片段化。使用随机引物,表示整个外显子组的cDNA链(每条链大约200bp长)使用商业试剂盒生成。每条cDNA链都与链特异性衔接子连接,所述链特异性衔接子选择性地允许编码链的表达(图14和图15)。然后将衔接子连接的纯化cDNA与参考外显子组捕获探针杂交。

[0726] 任选地,然后通过与MutS蛋白结合并且穿过MutS捕获柱来分离错配的异二聚体。(图15,在底部处的扩展方形部分中详述)。MutS柱捕获双链DNA中具有错配的链(图中用实心粗箭头描绘),而同源双链体则贯穿其中。MutS柱洗脱的异二聚体表示从包括至少一个点突变的癌症外显子组中富集的多肽。将富集的cDNA克隆到质粒中进行表达。

[0727] 对富集的多肽的进一步修饰通过与编码肽的多核苷酸融合以生成多功能抗体来进行。图16A和图16B以图形表示通过创建支架蛋白实现的各种修饰,所述支架蛋白进一步与DC靶向部分或如TLR或STING蛋白等免疫原性蛋白融合。

多肽构型变化

选项A: 更多结构域增加可能的有效载荷, 在未封端的N末端或C末端处没有表位

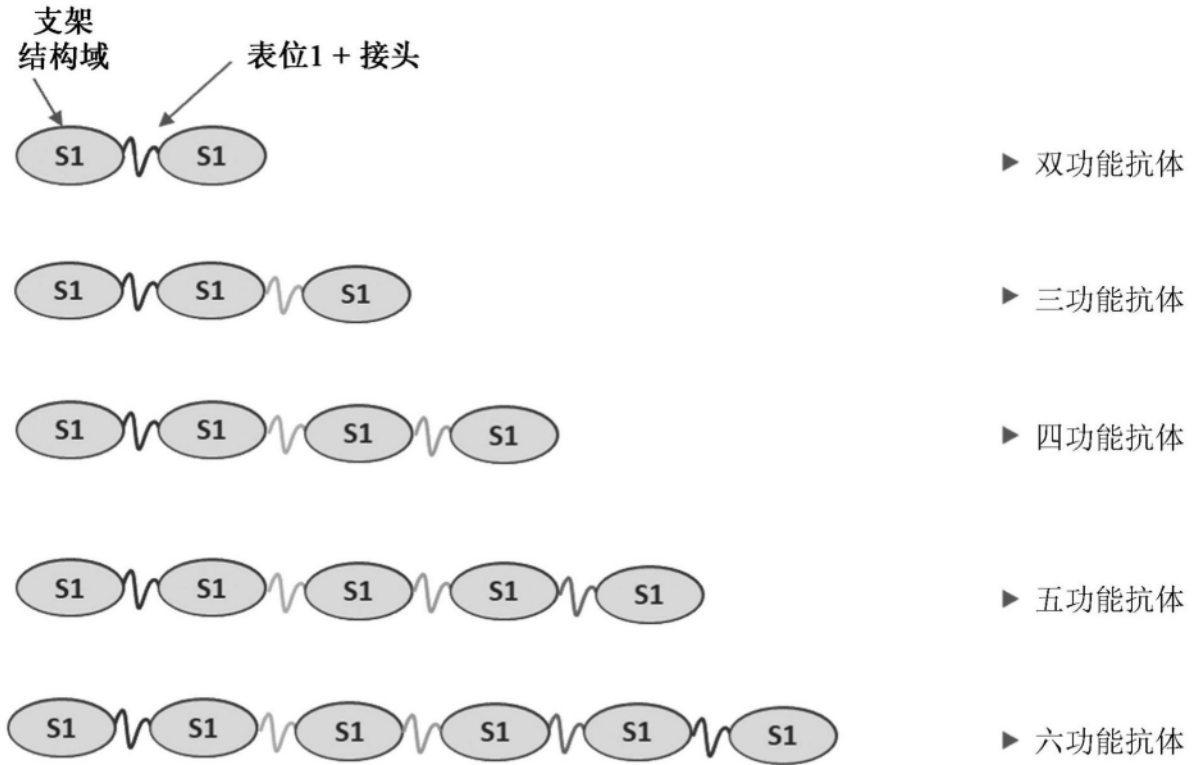


图1

选项B: 支架结构域之间的表位串, 在未封端的N末端或C末端处没有表位

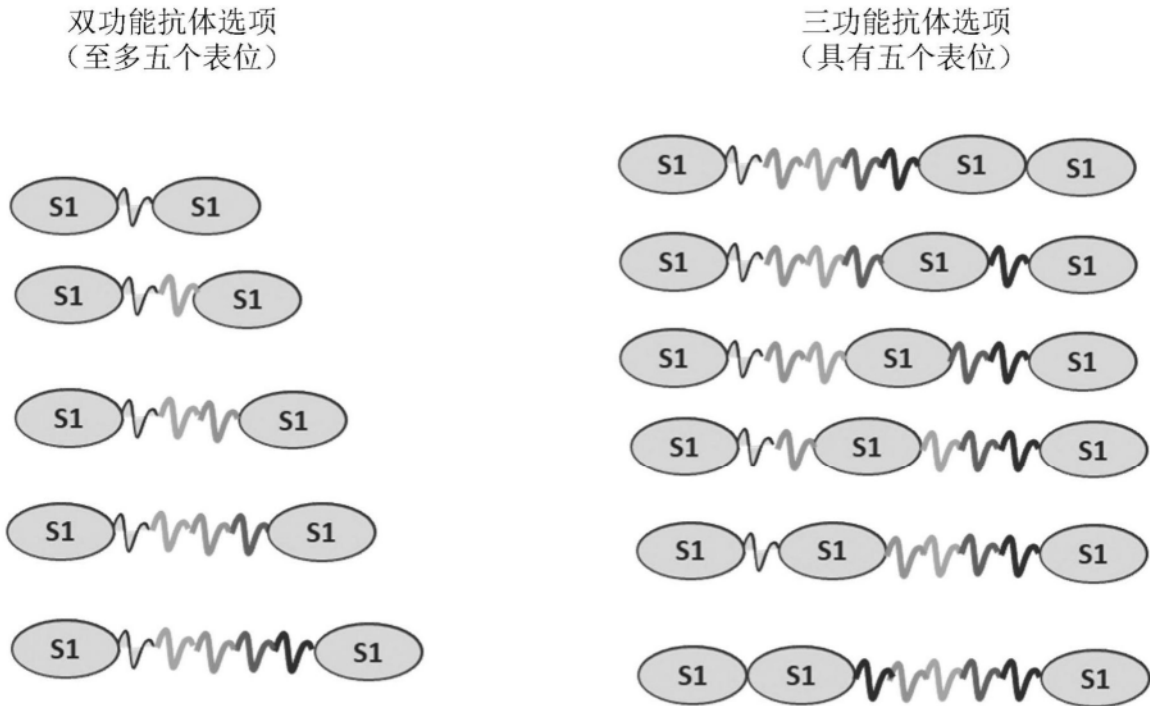


图2

选项C：定位成在N或C末端处未封端的表位

► 双功能抗体选项（具有2个表位）

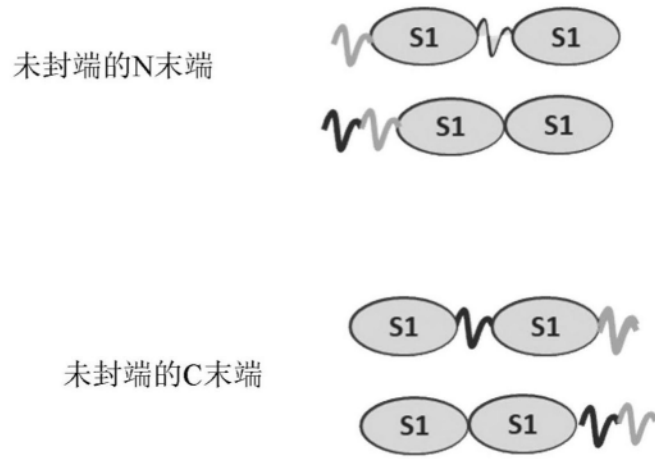


图3

支架结构域候选物的标准

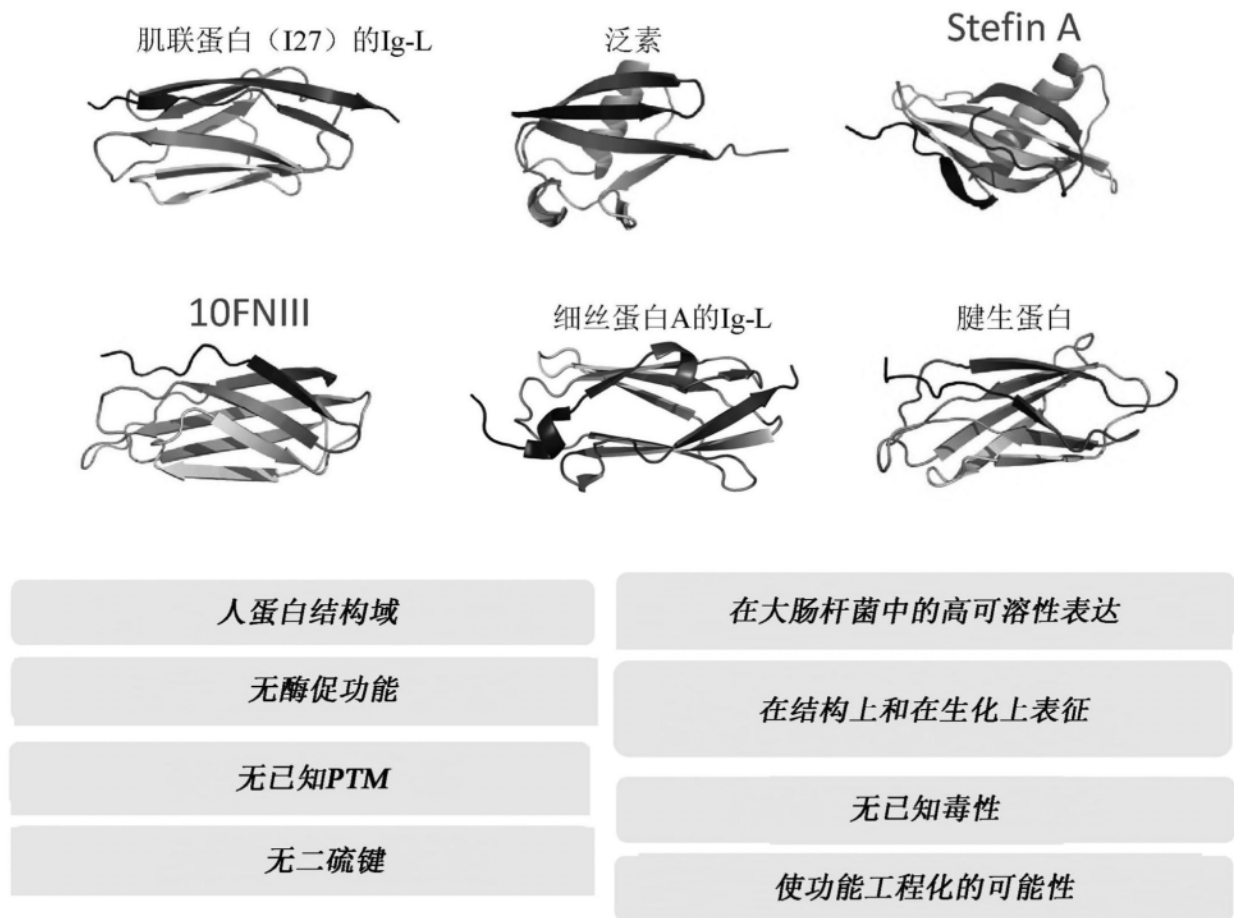


图4

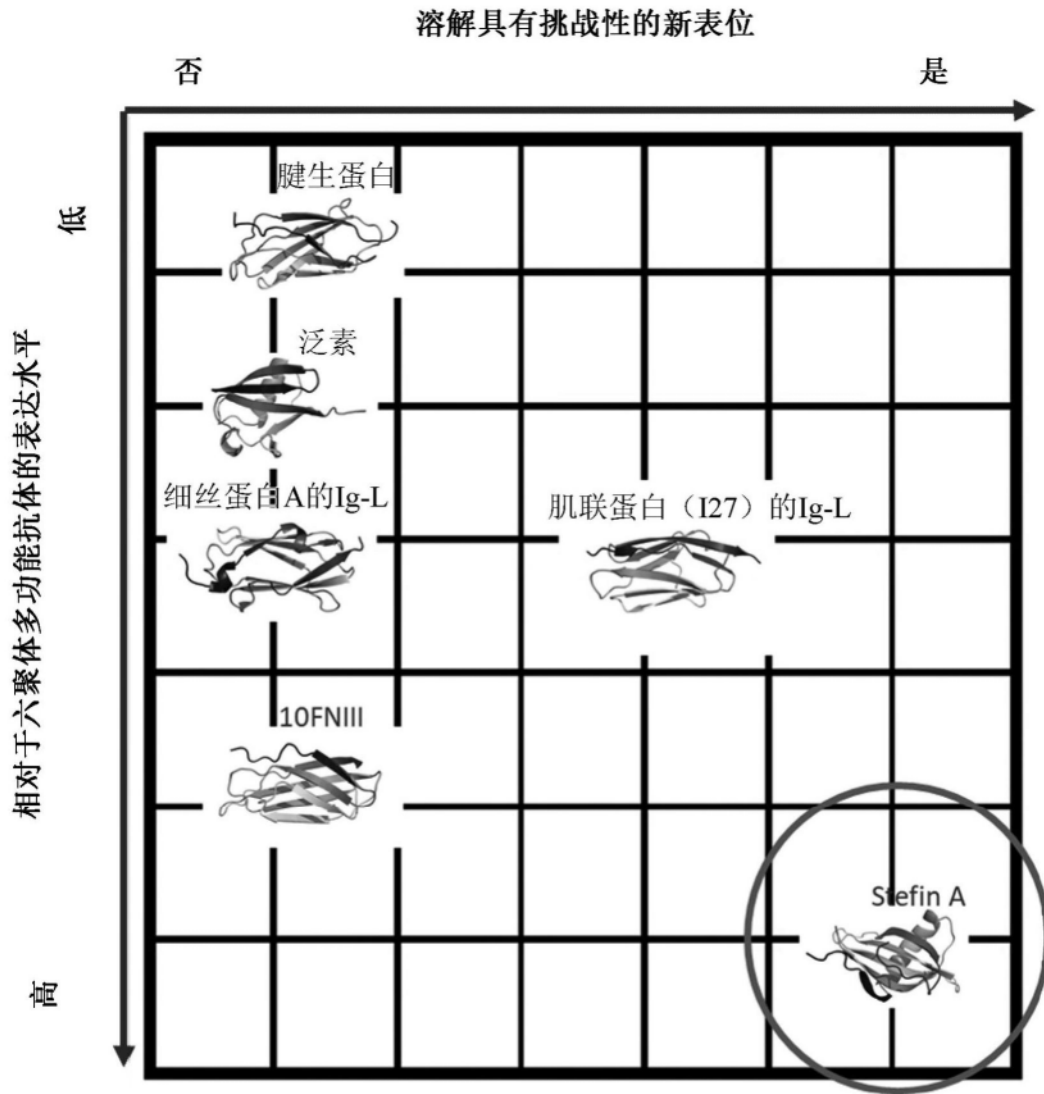


图5A

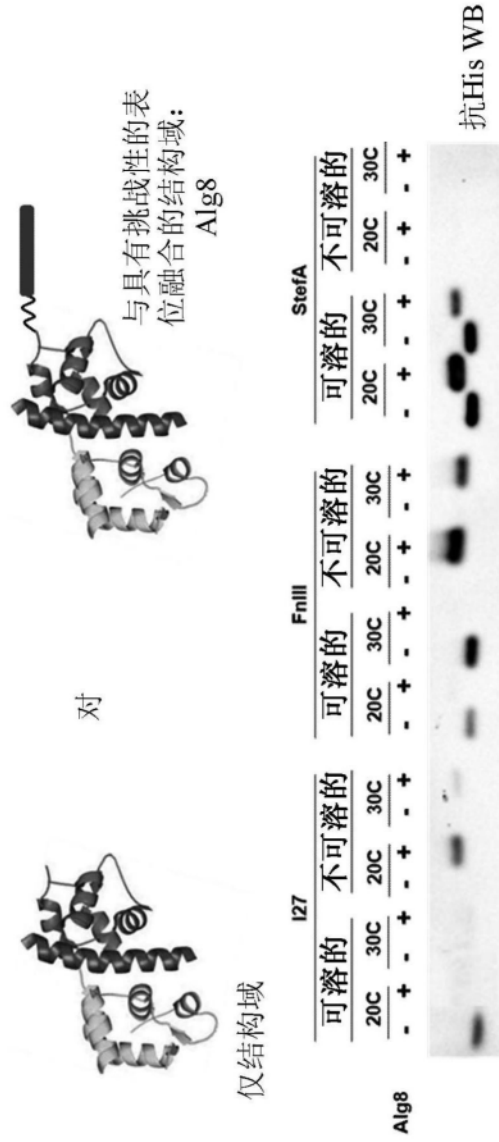


图5B

肽	序列	失败理由
1	WALWLDDSYWTPYM	合成
2	MAYMICQLFHMDFWLLII	合成
3	TWTEFDEPFLIRNVQSVSI	溶解度
4	SEELNIFRCFKDFLQRANK	溶解度
5	LEYVAFSQRFIPEL	溶解度
6	TPYLKETLNFIVNVEDHINPK	溶解度

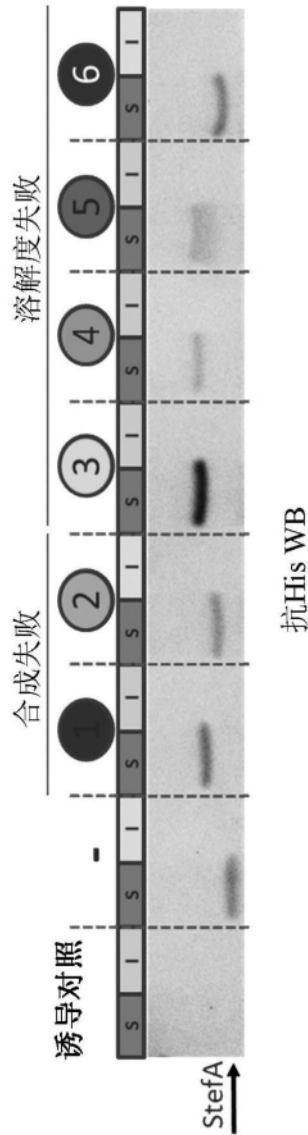


图5C

多肽的克隆

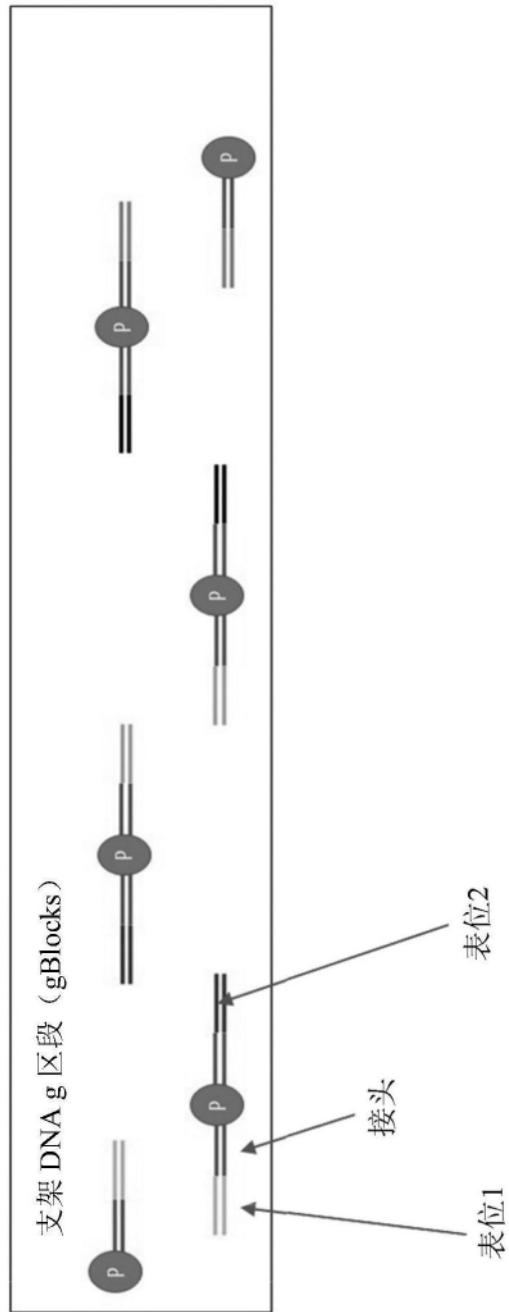


图6

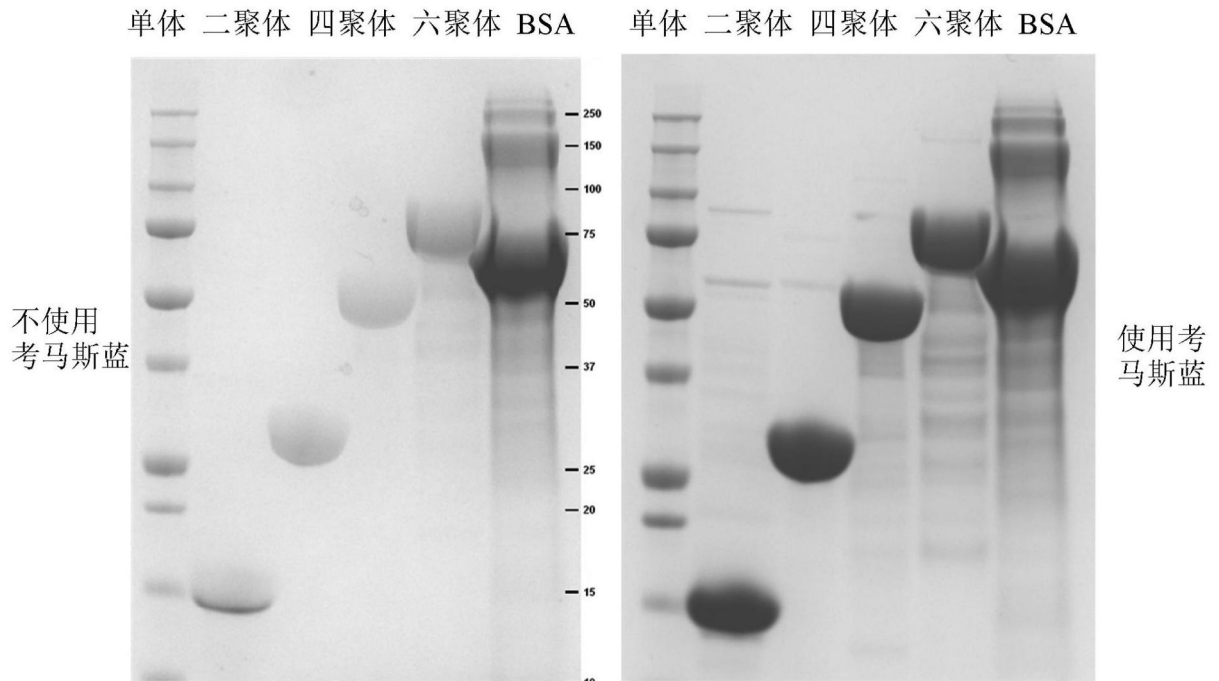


图7A



图7B

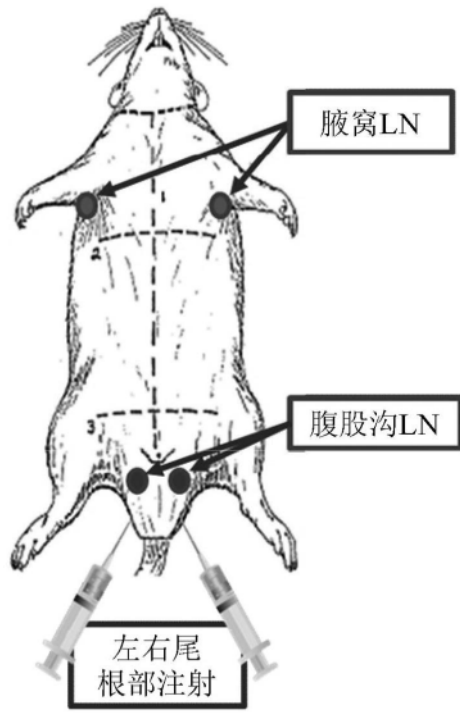


图7C

荧光团标记的多肽构型对SLP的LN累积

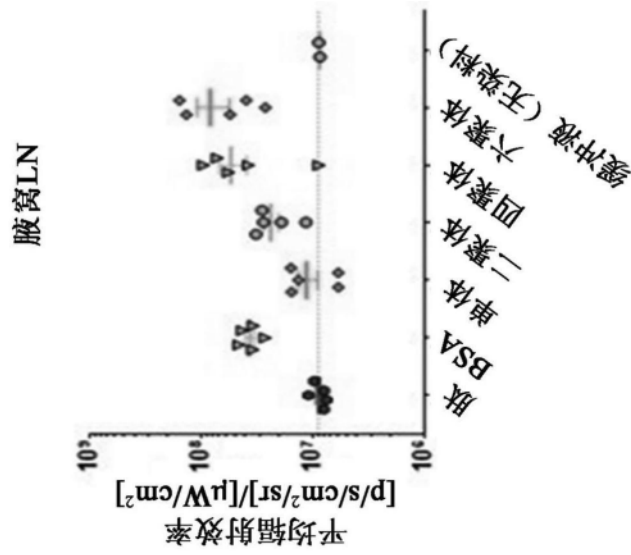


图8B

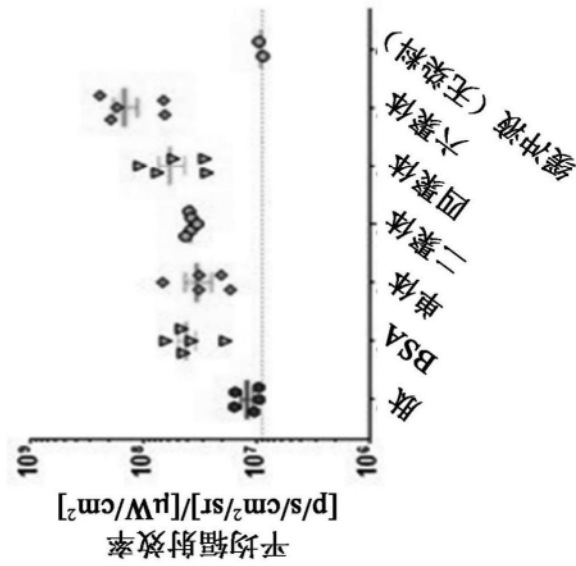


图8A

荧光团标记的多肽构型对SLP的LN累积

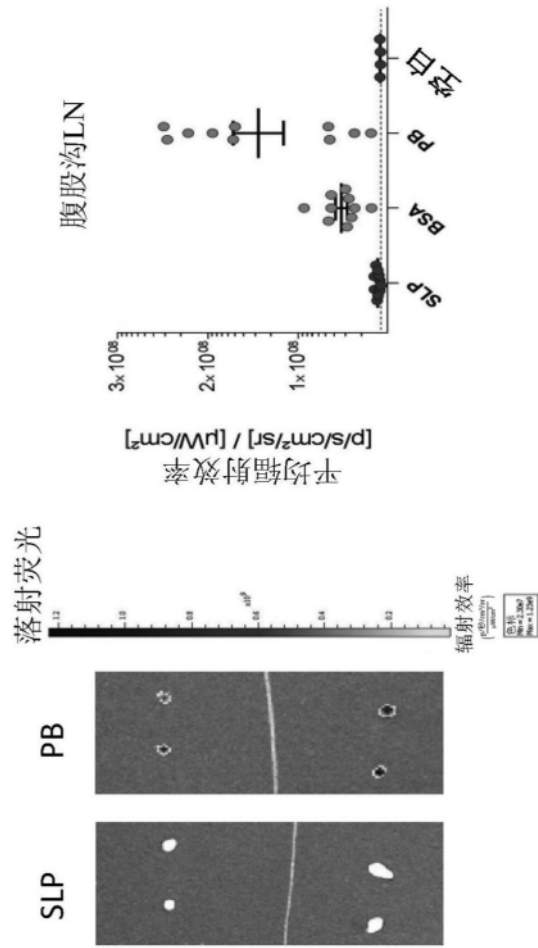


图8C

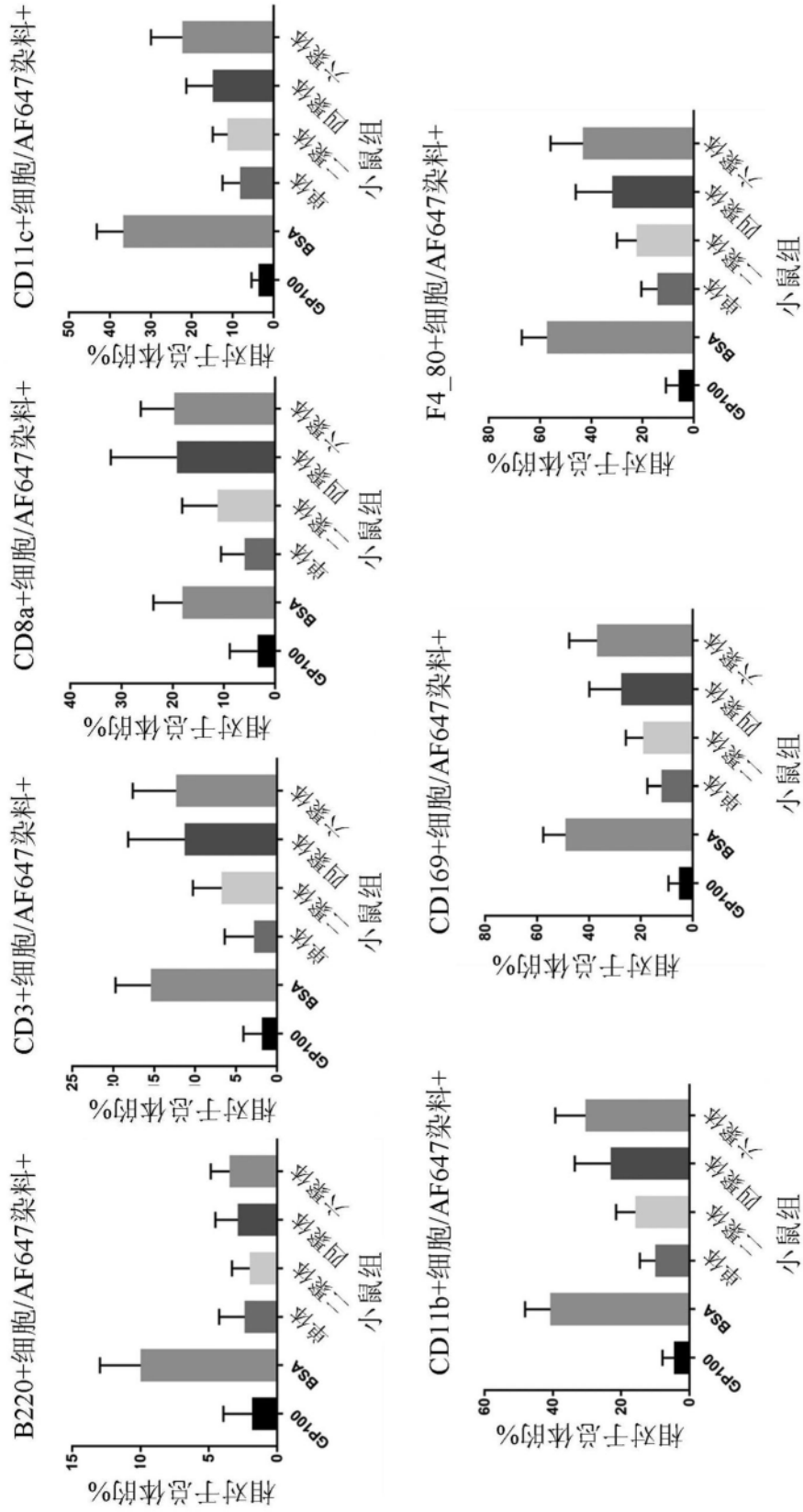


图8D

荧光团标记的多肽构型对SLP的LN累积

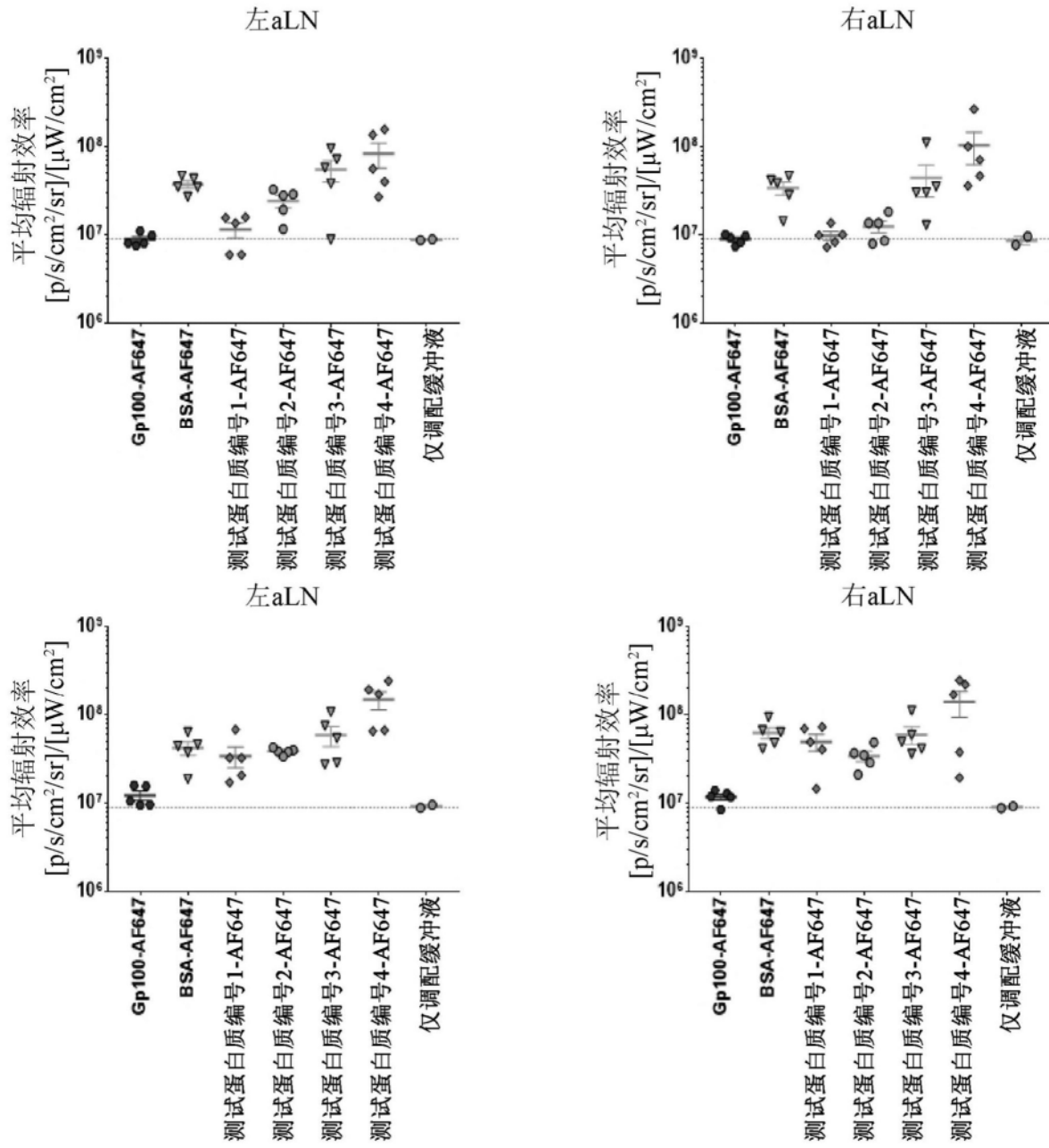
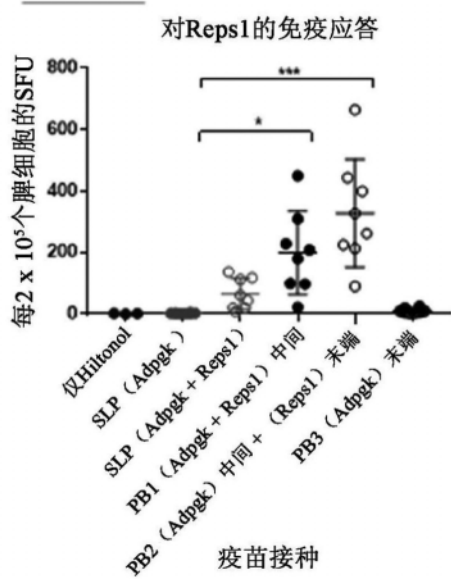


图9

使用MC38肿瘤模型表位的多肽对SLP的体内免疫原性



- SLP (Adpgk + Reps1)
- SLP (Adpgk)
- 多功能抗体1 (Adpgk + Reps1) 中间
- 多功能抗体2 (Adpgk) 中间 + (Reps1) 末端
- 多功能抗体3 (Adpgk) 末端

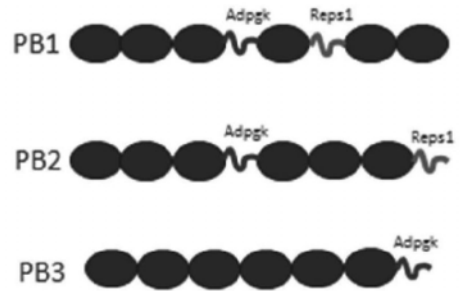
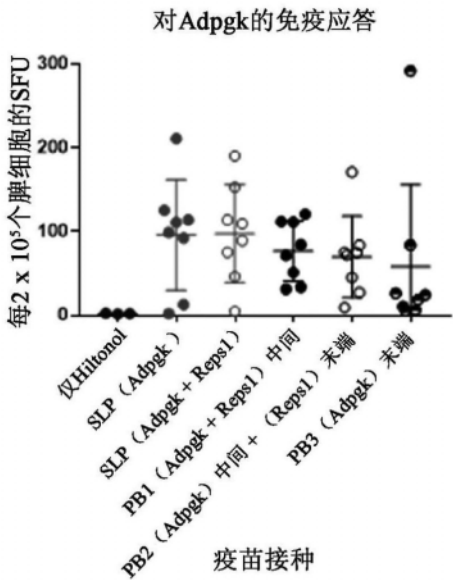


图10A



- SLP (Adpgk + Reps1)
- SLP (Adpgk)
- 多功能抗体1 (Adpgk + Reps1) 中间
- 多功能抗体2 (Adpgk) 中间 + (Reps1) 末端
- 多功能抗体3 (Adpgk) 末端

图10C

图10B

非功能化多功能抗体构建体对功能化多功能抗体构建体

非功能化多功能抗体

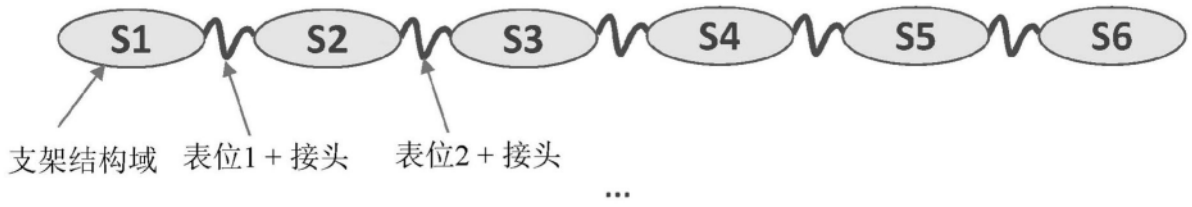


图11A

功能化多功能抗体

(此示例性构建体具有两个功能性(F)-结构域，但每个支架(S)-结构域都可以是F结构域。)

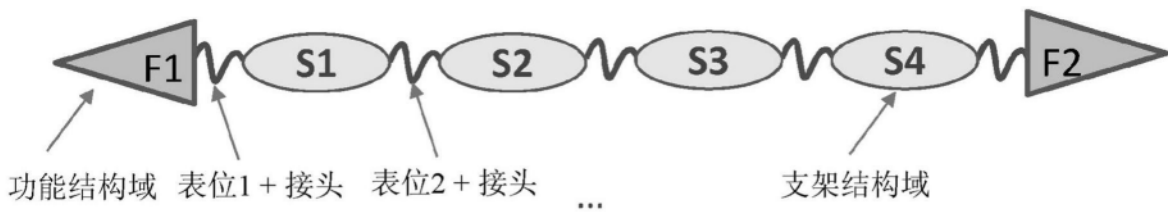


图11B

非功能化PB对功能化PB

非功能化多功能抗体

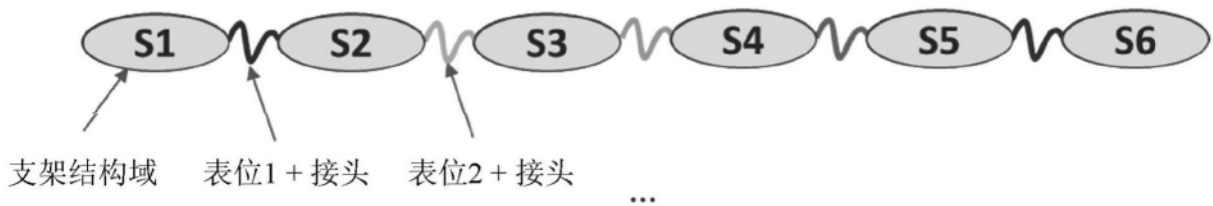


图12A

## 功能化多功能抗体

(示例性构建体具有N末端肽标签，但肽标签也可以在C末端处或甚至类似于表位-接头位置，在S结构域之间。)

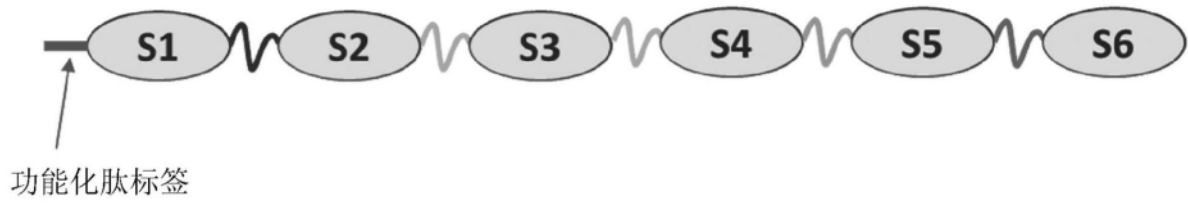


图12B

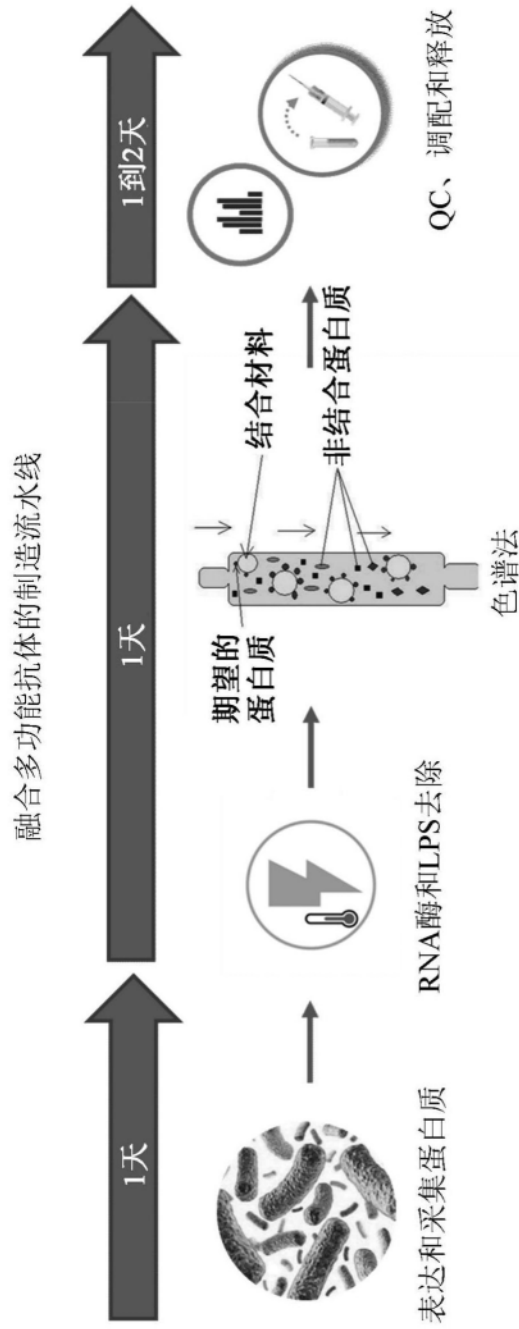


图13

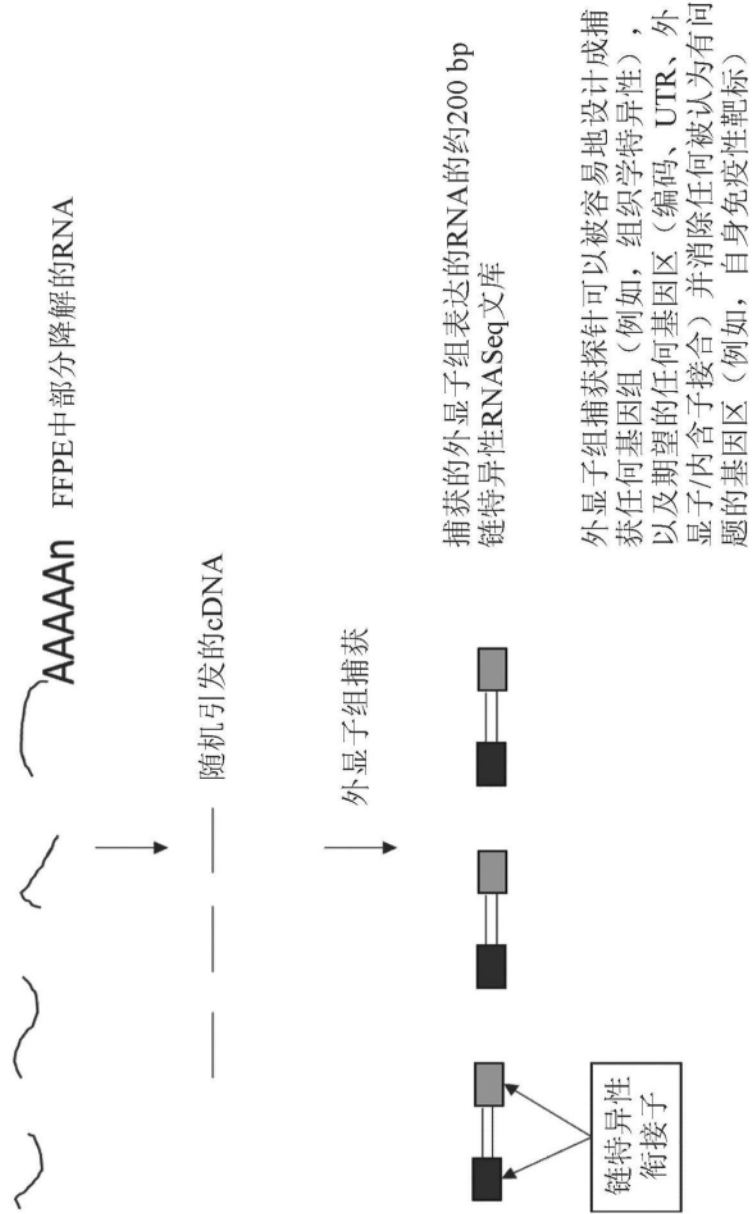


图14

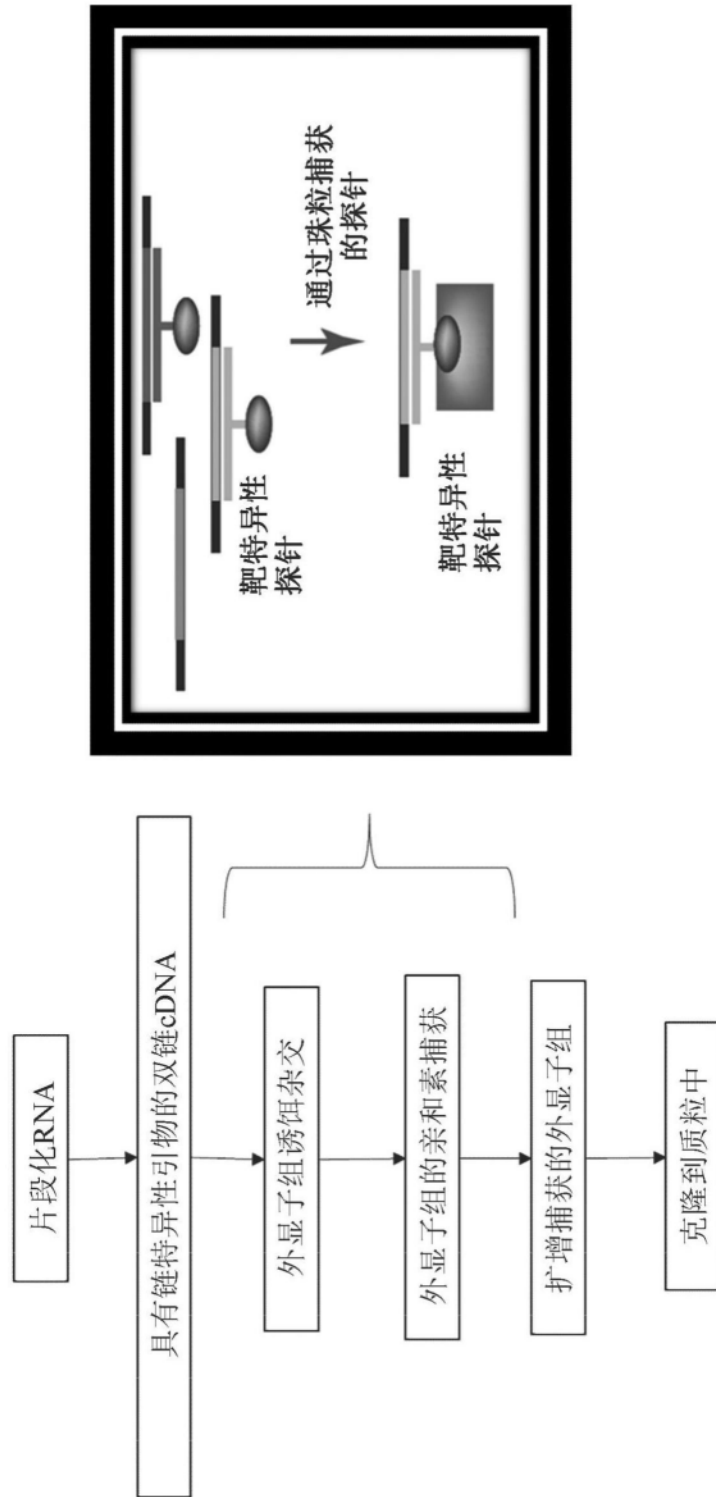


图15A

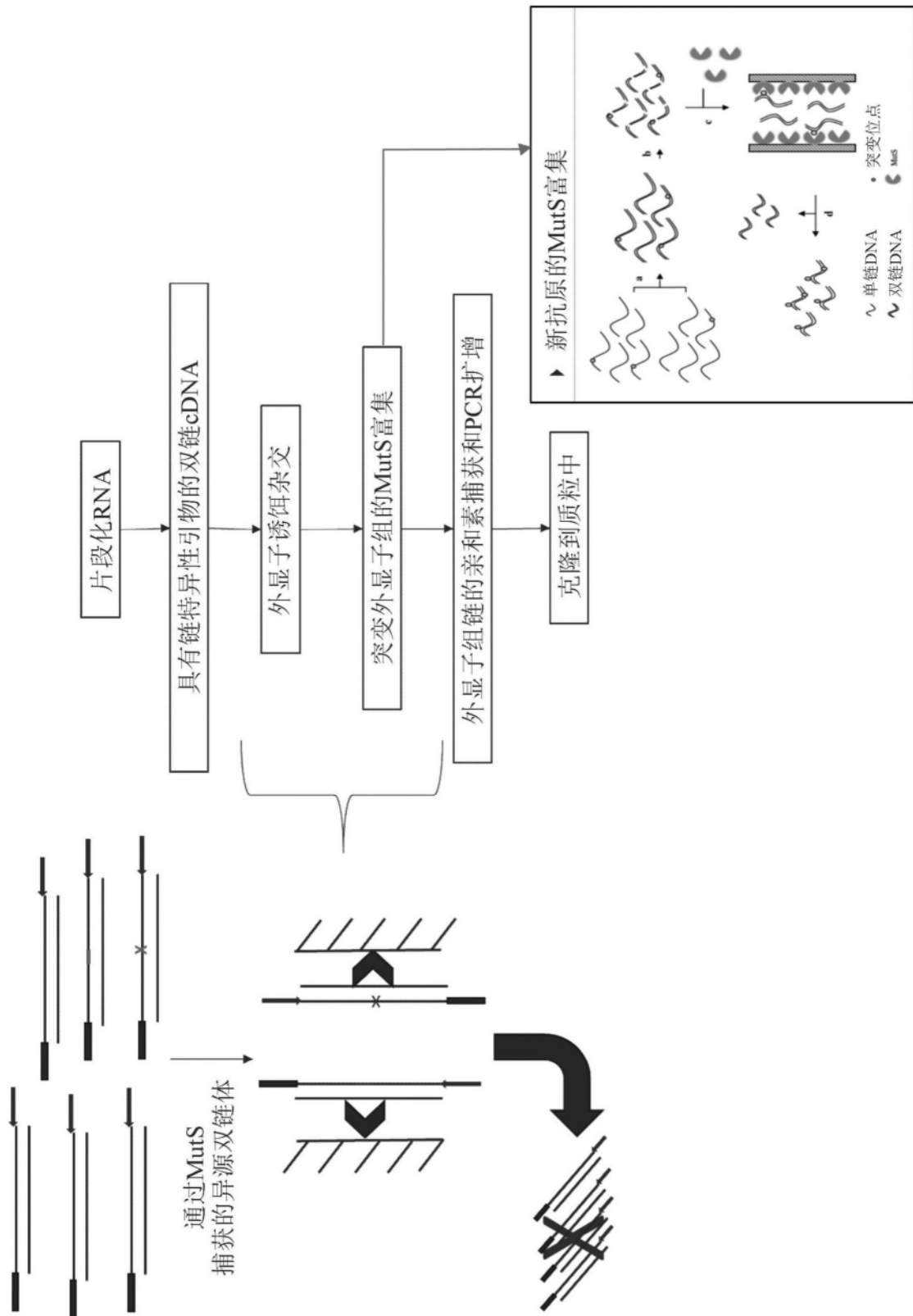


图15B

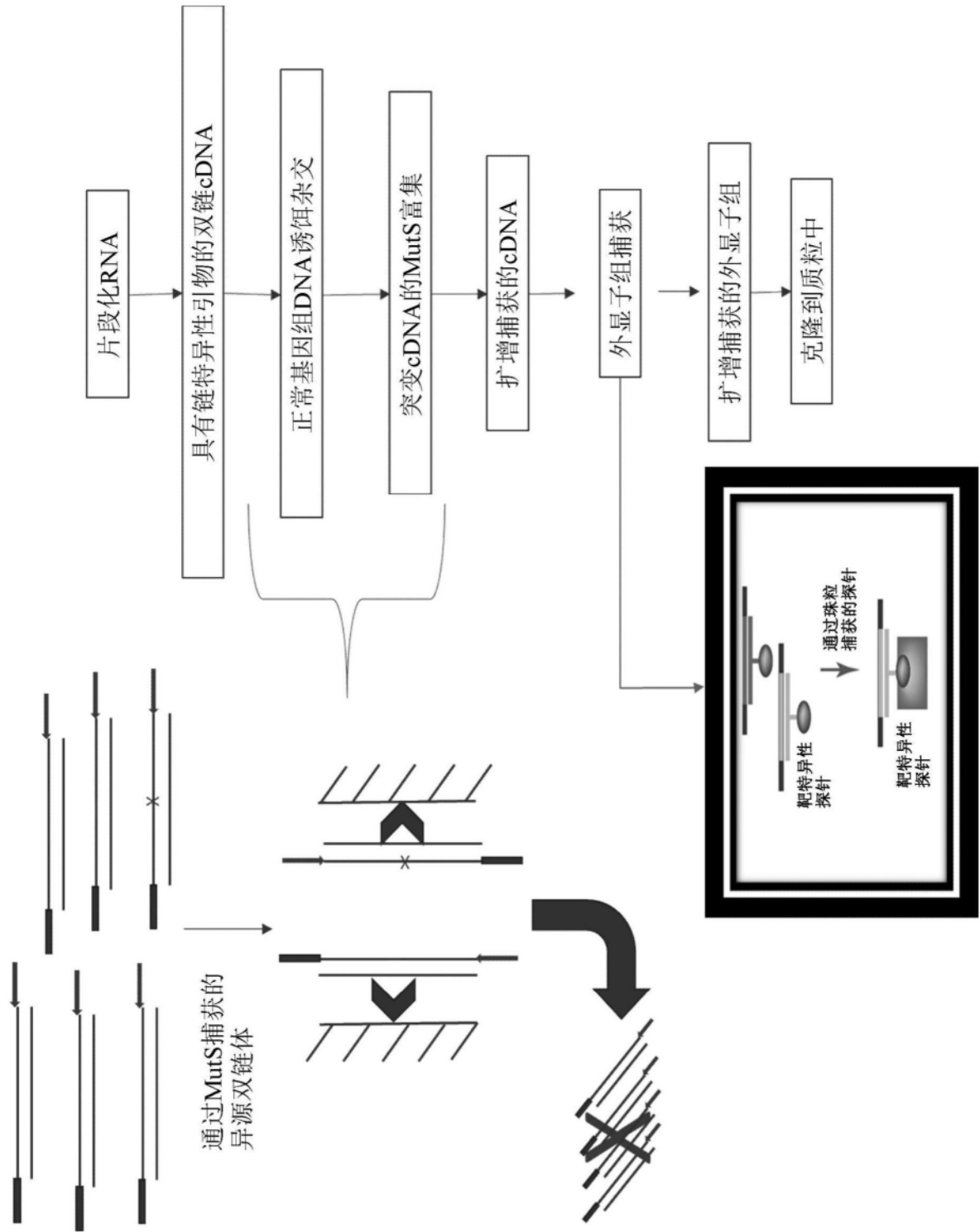


图15C

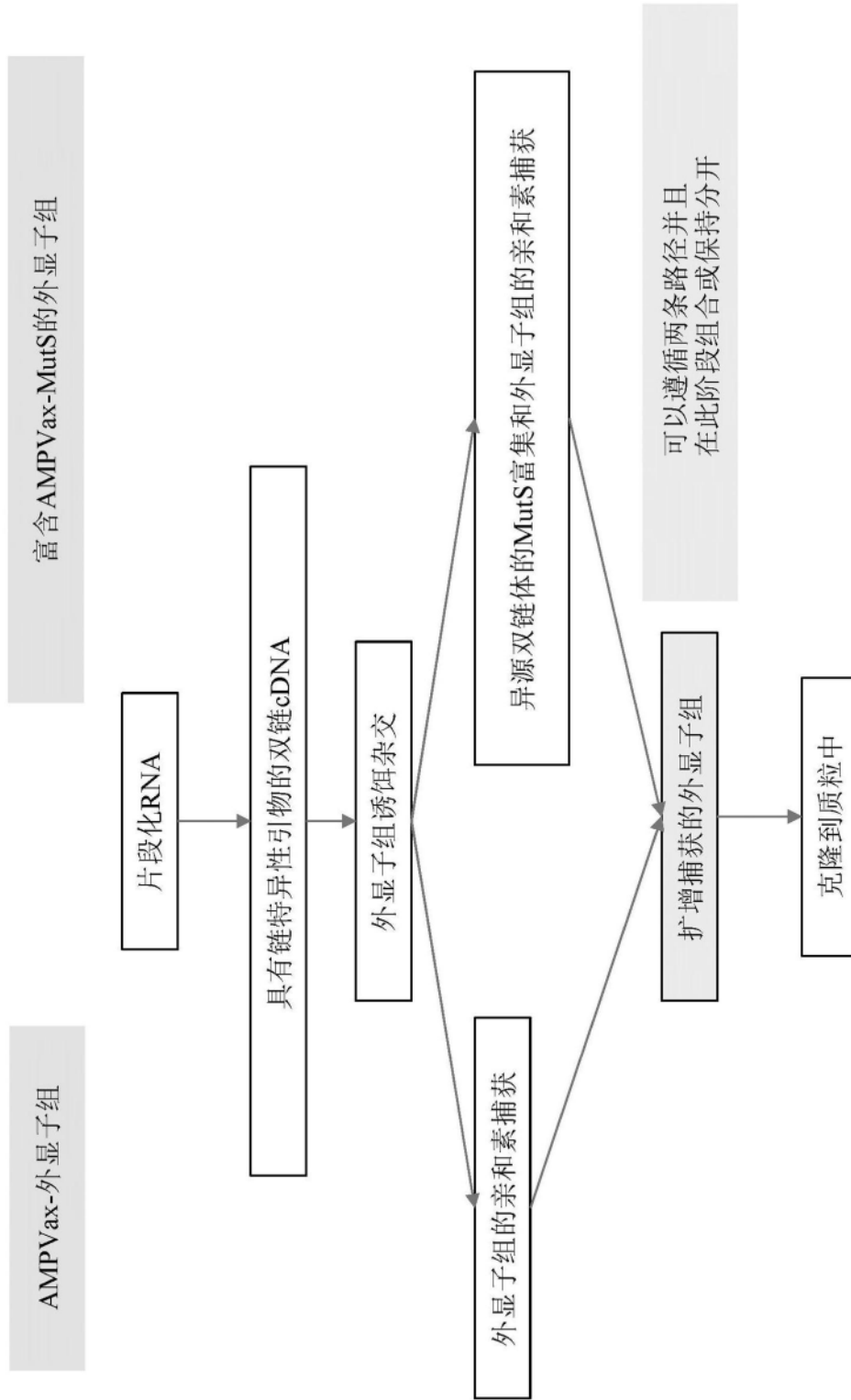


图15D

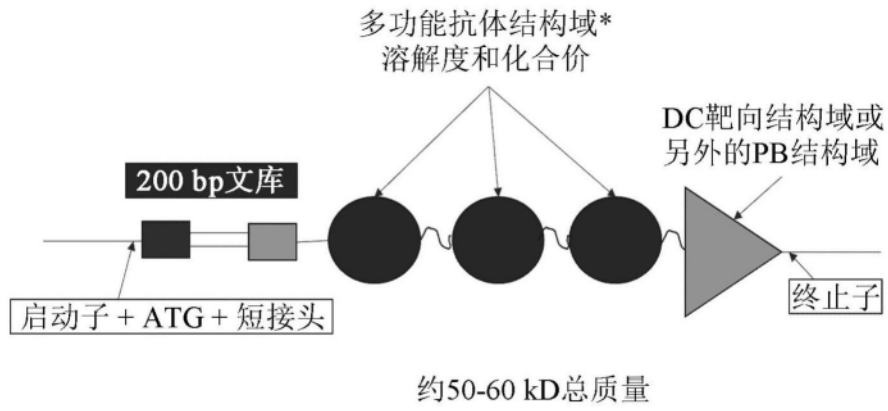


图16A

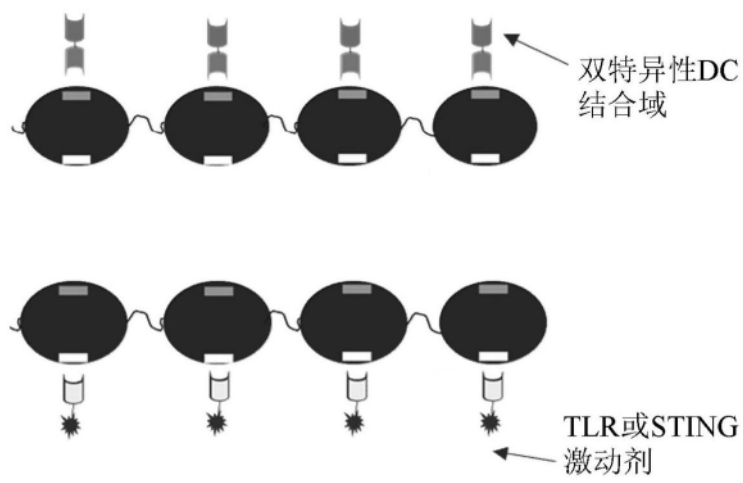
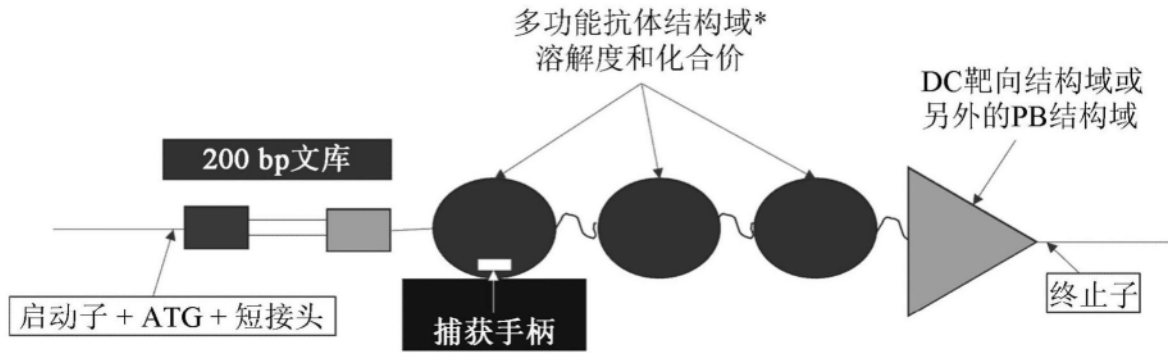


图16B



10%同框进入和离开

约50-60 kD总质量

如果非同框进入，则每约18aa有非同框终止密码子

插入后的接头被设计成仅允许同框高效退出

Val	Gly	Ser
[GUA]	[GGU]	[AGU]...
-1 GU]	[AGG]	[UAG]U...
-2 G]	[UAG]	GUAGU

图16C

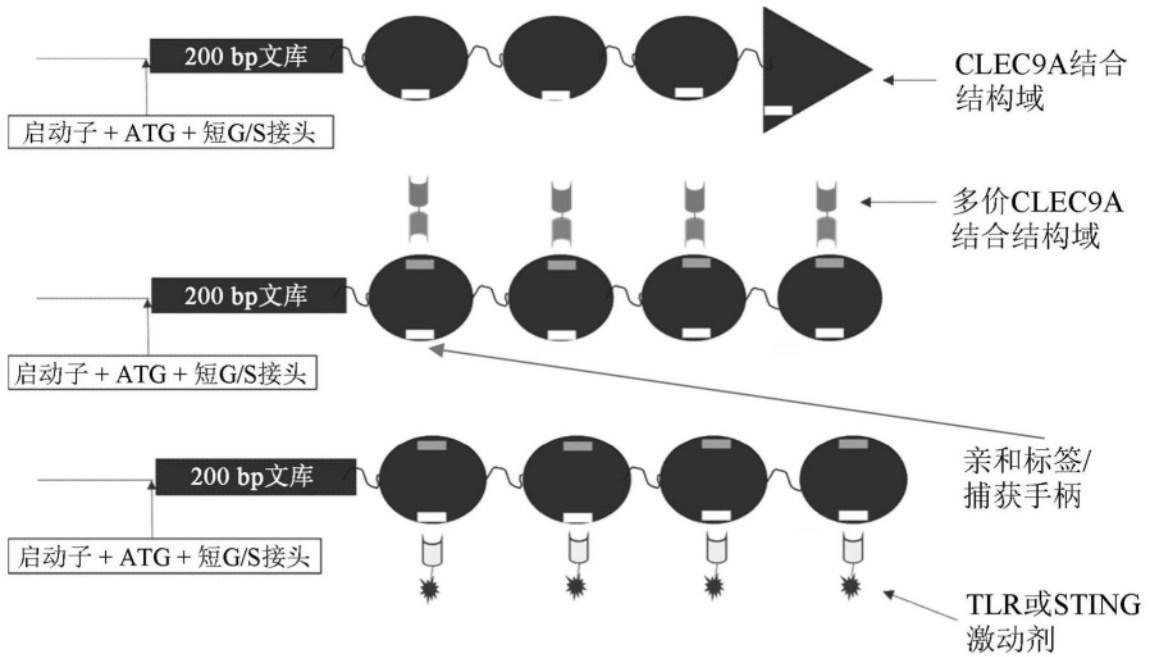


图16D

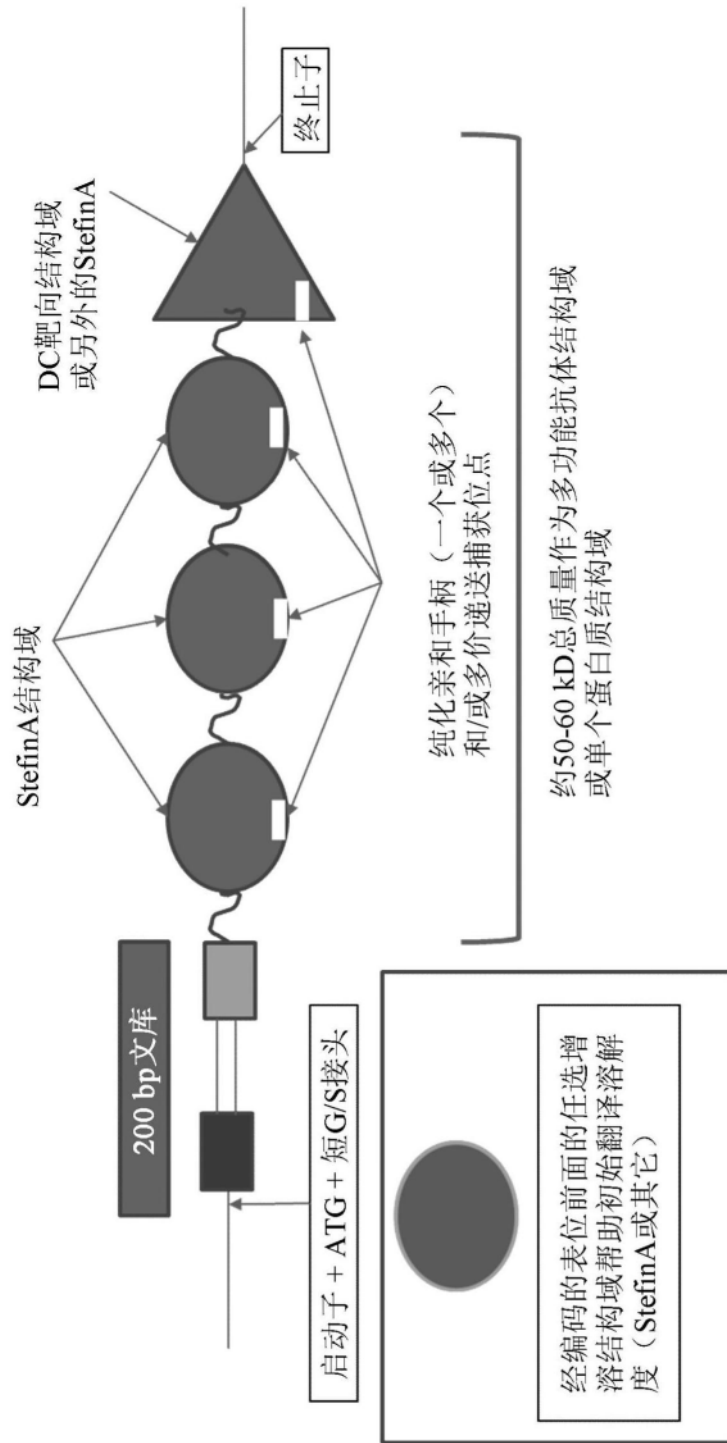


图16E

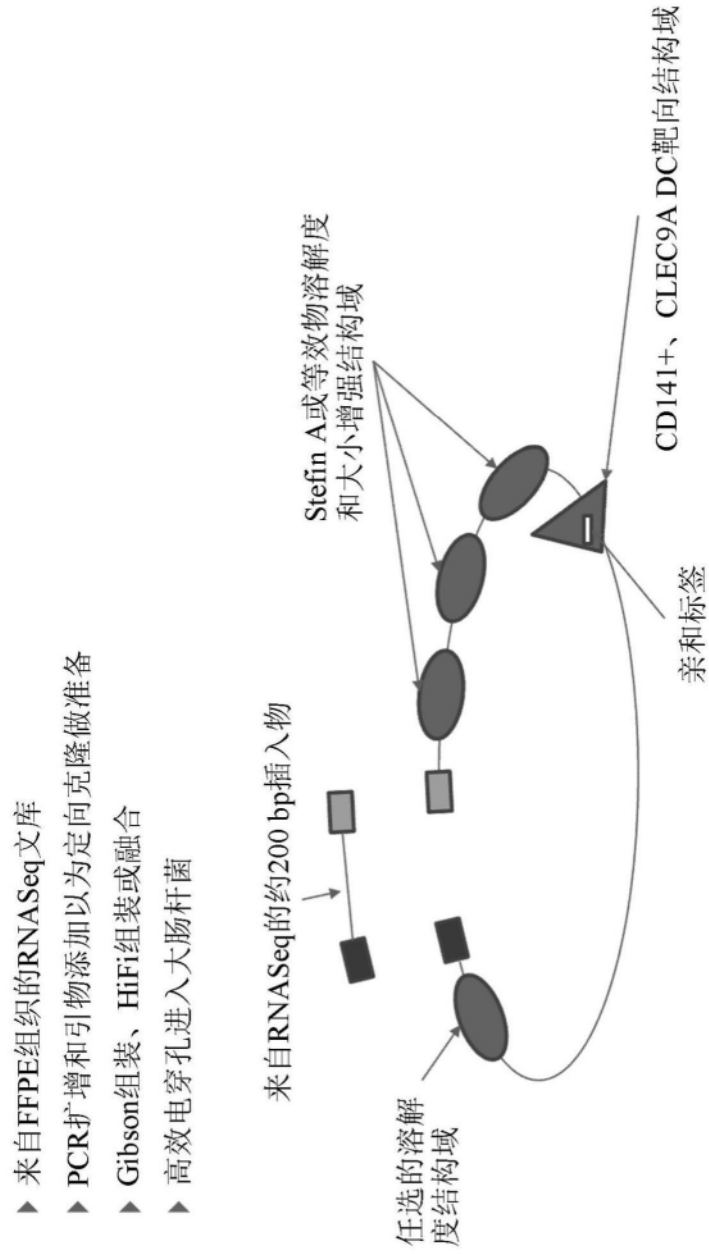


图17

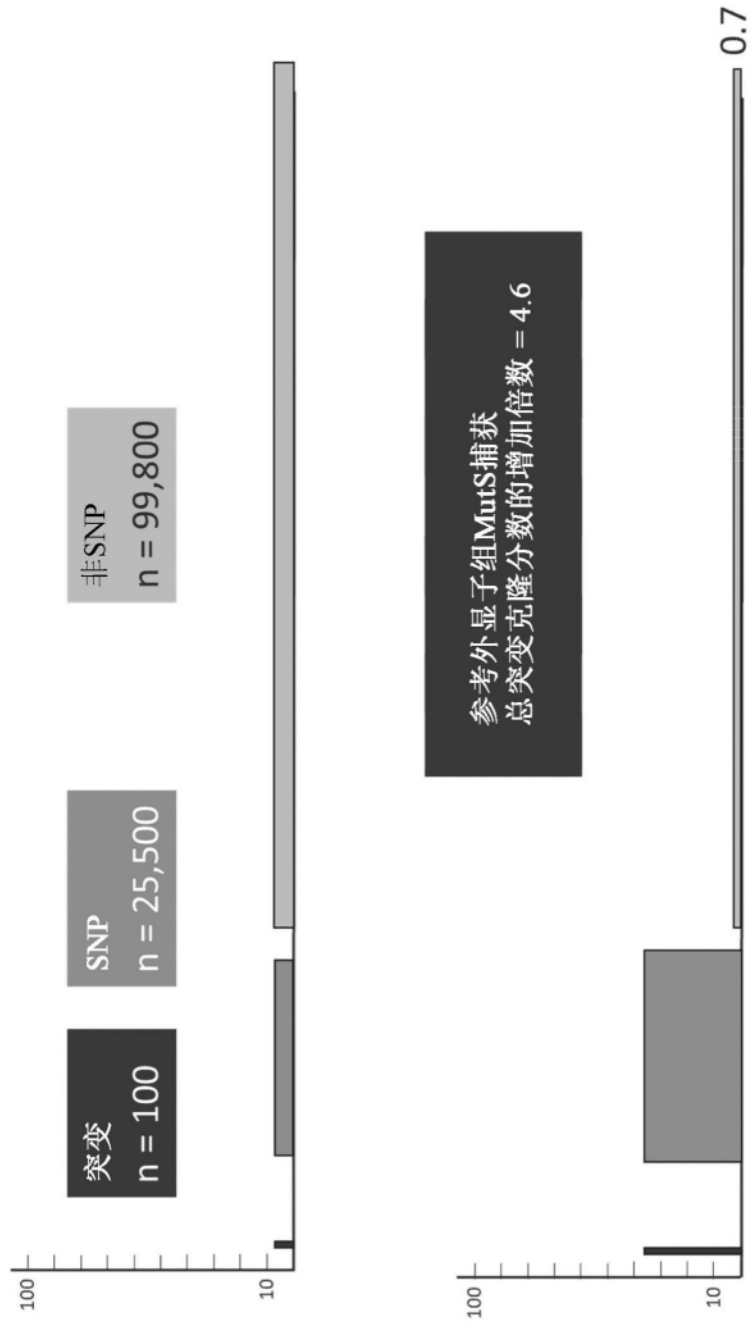


图18A

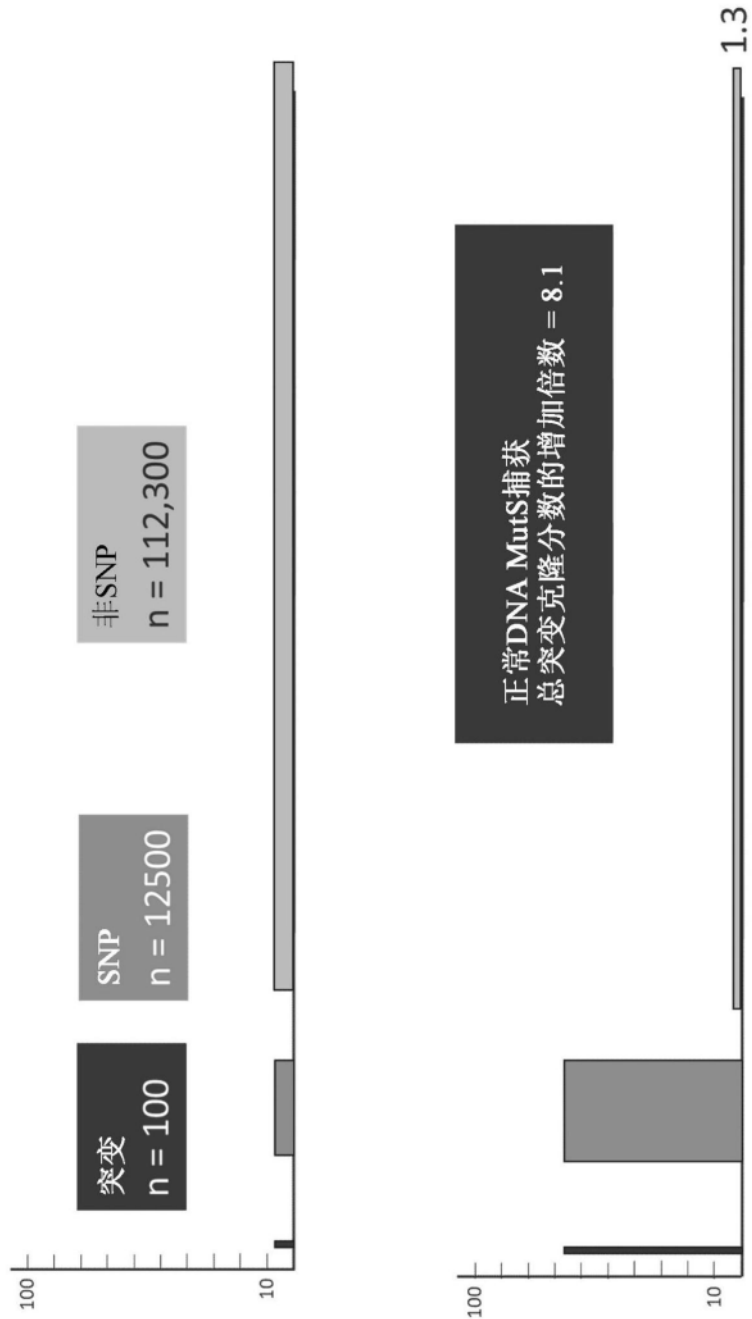


图18B

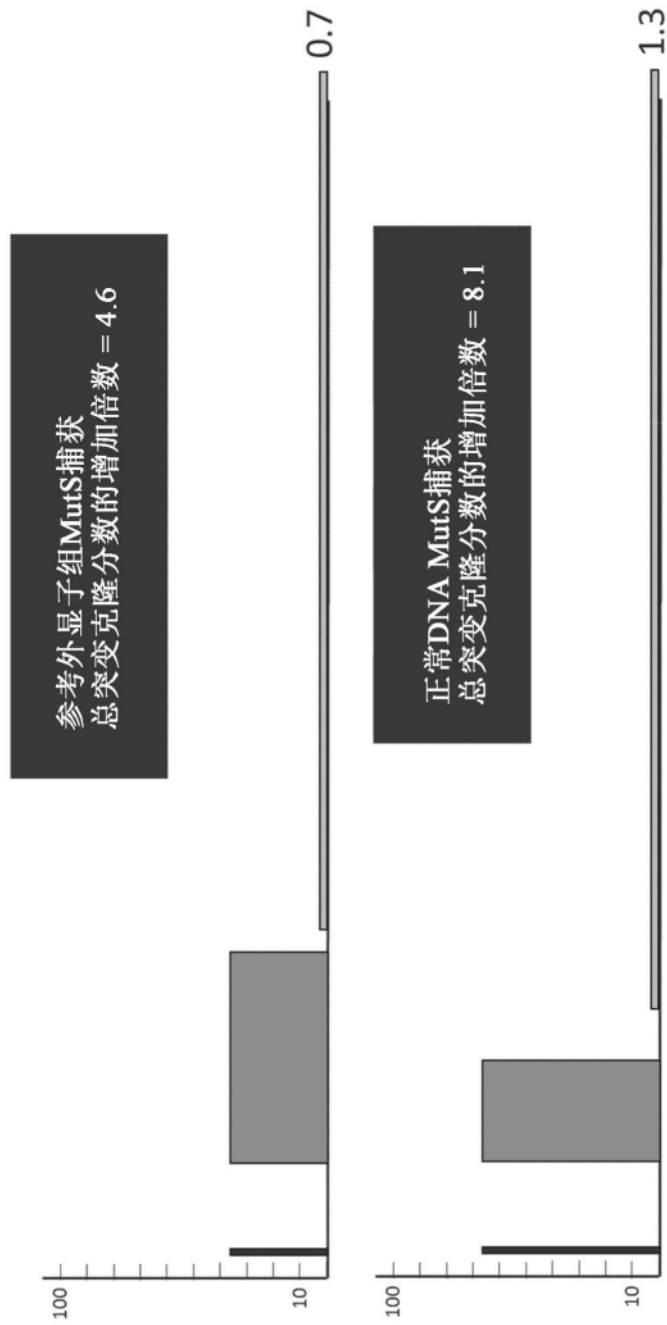


图18C