



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105744950 A

(43)申请公布日 2016.07.06

(21)申请号 201480060569.5

(74)专利代理机构 隆天知识产权代理有限公司
72003

(22)申请日 2014.10.31

代理人 王芝艳 吴小瑛

(30)优先权数据

61/900,226 2013.11.05 US

(51)Int.Cl.

A61K 39/00(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2016.05.05

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2014/063516 2014.10.31

(87)PCT国际申请的公布数据

W02015/069571 EN 2015.05.14

(71)申请人 巴法里安诺迪克有限公司

地址 丹麦克维斯特加德

(72)发明人 瑞安·朗特里 S·福伊

斯蒂法尼·曼德尔

阿兰·德尔凯尔

权利要求书3页 说明书28页

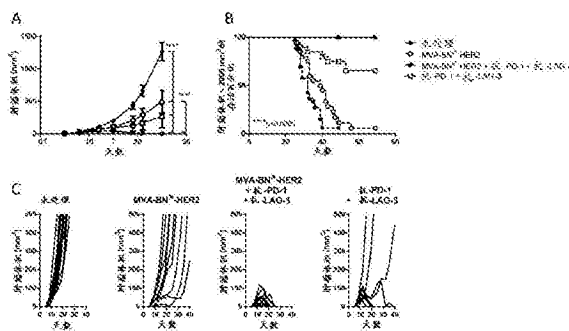
序列表5页 附图22页

(54)发明名称

用于使用表达肿瘤抗原的痘病毒和免疫检查点抑制剂的拮抗剂和/或激动剂治疗癌症的组合物

(57)摘要

本公开涵盖用于使用编码肿瘤相关抗原的重组痘病毒与免疫检查点抑制剂的一种或多种激动剂或拮抗剂的组合治疗人癌症患者的疗法、组合物和方法。



1. 一种用于治疗人癌症患者的疗法,其包含:(a)包含编码至少一种肿瘤抗原的多肽的核酸的重组正痘病毒;和(b)抗PD-1拮抗剂、抗LAG-3拮抗剂或抗ICOS激动剂中的至少一种;其中(a)和(b)作为组合治疗施用。

2. 如权利要求1所述的疗法,其中所述重组正痘病毒选自牛痘病毒、经修饰的安卡拉牛痘(MVA)病毒或MVA-BN。

3. 如权利要求1-2所述的疗法,其还包含:(a)包含编码至少一种肿瘤抗原的多肽的核酸的重组禽痘病毒;和(b)抗PD-1拮抗剂、抗LAG-3拮抗剂或抗ICOS激动剂中的至少一种;其中(a)和(b)作为组合治疗施用。

4. 如权利要求1-3所述的疗法,其中所述重组禽痘病毒和拮抗剂或激动剂组合在如权利要求3所述的所述重组正痘病毒和拮抗剂或激动剂组合之后施用。

5. 如权利要求3-4所述的疗法,其中所述禽痘病毒为鸡痘病毒。

6. 如权利要求1-2所述的疗法,其还包含:(a)包含编码至少一种肿瘤抗原的多肽的核酸的两种或更多种重组正痘病毒;和(b)抗PD-1拮抗剂、抗LAG-3拮抗剂或抗ICOS激动剂中的至少一种;其中(a)和(b)作为组合治疗施用。

7. 如权利要求1-6所述的组合疗法,其中所述抗PD-1拮抗剂、抗LAG-3拮抗剂或抗ICOS激动剂包括抗体

8. 如权利要求1-7所述的组合疗法,其中所述至少一种肿瘤抗原选自CEA、MUC-1、PAP、PSA和HER-2抗原。

9. 如权利要求1-8所述的组合疗法,其中所述癌症为乳腺癌、肺癌、结直肠癌、胃癌、胰腺癌、前列腺癌、膀胱癌或卵巢癌。

10. 如权利要求1-7所述的组合疗法,其中所述至少一种肿瘤抗原为PAP抗原。

11. 如权利要求1-7所述的组合疗法,其中所述至少一种肿瘤抗原为PSA抗原。

12. 如权利要求10-11所述的组合疗法,其中所述癌症为前列腺癌。

13. 如权利要求1-7所述的组合疗法,其中所述至少一种肿瘤抗原选自MUC-1和CEA抗原。

14. 如权利要求13所述的组合疗法,其中所述癌症选自乳腺癌、结直肠癌、肺癌、胃癌、胰腺癌、膀胱癌和卵巢癌。

15. 如权利要求1-7所述的组合疗法,其中所述至少一种肿瘤抗原为HER-2抗原。

16. 如权利要求15所述的组合疗法,其中所述癌症为乳腺癌。

17. 一种用于治疗人癌症患者的方法,其包括:

(a)向所述患者施用包含编码至少一种肿瘤抗原的多肽的核酸的重组正痘病毒;以及

(b)向所述患者施用抗PD-1拮抗剂、抗LAG-3拮抗剂或抗ICOS激动剂中的至少一种。

18. 如权利要求17所述的方法,其还包括:

(a)向所述患者施用包含编码至少一种肿瘤抗原的多肽的核酸的重组禽痘病毒;以及

(b)抗PD-1拮抗剂、抗LAG-3拮抗剂或抗ICOS激动剂中的至少一种。

19. 如权利要求18所述的方法,其中所述禽痘病毒为鸡痘病毒。

20. 如权利要求17所述的方法,其还包括向所述患者施用一次或多次随后的包含编码至少一种肿瘤抗原的多肽的核酸的重组正痘病毒和抗PD-1拮抗剂、抗LAG-3拮抗剂或抗ICOS激动剂中的至少一种。

21. 如权利要求17和20所述的方法,其中所述正痘病毒为牛痘病毒。
22. 如权利要求21的方法,其中所述牛痘病毒选自经修饰的安卡拉牛痘(MVA)病毒和MVA-BN。
23. 如权利要求17-22所述的方法,其包括向所述患者施用抗PD-1拮抗剂抗体。
24. 如权利要求17-22所述的方法,其包括向所述患者施用抗LAG-3拮抗剂抗体。
25. 如权利要求17-22所述的方法,其包括向所述患者施用抗ICOS激动剂抗体。
26. 如权利要求17-22所述的方法,其包括向所述患者施用抗PD-1拮抗剂抗体和抗LAG-3拮抗剂抗体
27. 如权利要求17-26所述的方法,其中所述至少一种肿瘤抗原为CEA、MUC-1、PAP、PSA或HER-2抗原。
28. 如权利要求17-27所述的方法,其中所述癌症治疗针对前列腺癌、乳腺癌、肺癌、胃癌、胰腺癌、膀胱癌或卵巢癌。
29. 如权利要求17-26所述的方法,其中所述至少一种肿瘤抗原为CEA或MUC-1抗原。
30. 如权利要求29所述的方法,其中所述癌症治疗针对乳腺癌、结直肠癌、肺癌、胃癌、胰腺癌、膀胱癌或卵巢癌。
31. 如权利要求17-26所述的方法,其中所述至少一种肿瘤抗原为PAP抗原。
32. 如权利要求17-26所述的方法,其中所述至少一种肿瘤抗原为PSA抗原。
33. 如权利要求31-32所述的方法,其中所述癌症治疗针对前列腺癌。
34. 如权利要求17-26所述的方法,其中所述至少一种肿瘤抗原为HER-2抗原。
35. 如权利要求34所述的方法,其中所述癌症治疗针对乳腺癌。
36. 如权利要求17-18和23-35所述的方法,其中所述重组正痘病毒和所述重组禽痘病毒与抗PD-1拮抗剂、抗LAG-3拮抗剂或抗ICOS激动剂中的所述至少一种的组合作为异源初免-加强方案的一部分施用;
其中所述异源初免-加强方案包括第一初免剂量的所述重组正痘病毒与所述拮抗剂或激动剂的组合和一次或多次随后的加强剂量的所述重组禽痘病毒与所述拮抗剂或激动剂的组合。
37. 如权利要求36所述的方法,其中所述是异源初免-加强方案为PROSTVAC或CV301。
38. 如权利要求17-35所述的方法,其中所述重组正痘病毒与抗PD-1拮抗剂、抗LAG-3抗体或抗ICOS激动剂中的所述至少一种的组合作为同源初免-加强方案的一部分施用;
其中所述同源初免-加强方案包括第一初免剂量的所述重组正痘病毒与所述拮抗剂或激动剂的组合和一次或多次随后的加强剂量的相同重组正痘病毒与所述拮抗剂或激动剂的组合。
39. 一种用于治疗人癌症患者的组合疗法,所述组合包含:
 - (a) 重组正痘病毒或重组禽痘病毒,所述重组正痘病毒或重组禽痘病毒各自包含编码至少一种肿瘤抗原的多肽的核酸;以及
 - (b) 抗PD-1拮抗剂、抗LAG-3拮抗剂或抗ICOS激动剂。
40. 如权利要求40所述的组合疗法,其中所述重组正痘病毒选自牛痘病毒、经修饰的安卡拉牛痘(MVA)病毒或MVA-BN。
41. 如权利要求39所述的组合方法,其中所述重组禽痘病毒为鸡痘病毒。

42. 如权利要求39-41所述的组合疗法,其中(b)包括抗PD-1拮抗剂抗体。

43. 如权利要求39-41所述的组合疗法,其中(b)包括抗LAG-3拮抗剂抗体。

44. 如权利要求39-41所述的组合疗法,其中(b)包括抗PD-1拮抗剂抗体和抗LAG-3拮抗剂抗体。

45. 如权利要求39-44所述的组合疗法,其中所述至少一种肿瘤抗原选自CEA、MUC-1、PAP、PSA和HER-2抗原。

46. 如权利要求39-45所述的组合疗法,其还包括一次或多次随后的各自包含编码至少一种肿瘤抗原的多肽的核酸的重组正痘病毒或禽痘病毒与抗PD-1拮抗剂抗体、抗LAG-3拮抗剂抗体或抗ICOS激动剂抗体中的至少一种的组合。

47. 一种用于治疗人癌症患者的癌症的试剂盒,所述试剂盒包含:(a)包含编码至少一种肿瘤抗原的多肽的核酸的重组正痘病毒;和(b)抗PD-1拮抗剂抗体、抗LAG-3拮抗剂抗体或抗ICOS激动剂抗体中的至少一种。

48. 如权利要求47所述的试剂盒,其还包含含有编码至少一种肿瘤抗原的多肽的核酸的重组禽痘病毒。

49. 如权利要求47-48所述的试剂盒,其中所述至少一种肿瘤抗原选自CEA、MUC-1、PAP、PSA和HER-2抗原。

50. 一种用于治疗人癌症患者的药剂或组合物,其包含:包含编码至少一种肿瘤抗原的多肽的核酸的第一重组正痘病毒;和(b)抗PD-1拮抗剂、抗LAG-3拮抗剂或抗ICOS激动剂中的至少一种;其中(a)和(b)作为组合施用。

51. 如权利要求50所述的药剂或组合物,其还包含:(a)包含编码至少一种肿瘤抗原的多肽的核酸的重组禽痘病毒;和(b)抗PD-1拮抗剂、抗LAG-3拮抗剂或抗ICOS激动剂中的至少一种;其中(a)和(b)作为组合施用。

52. 组合物在制备用于治疗人癌症患者的药物组合物或药剂中的用途,所述组合物包含:a)包含编码至少一种肿瘤抗原的多肽的核酸的重组正痘病毒;和(b)抗PD-1拮抗剂、抗LAG-3拮抗剂或抗ICOS激动剂。

53. 如权利要求52所述的用途,其中所述组合物还包含:(a)包含编码至少一种肿瘤抗原的多肽的核酸的重组禽痘病毒;和(b)抗PD-1拮抗剂、抗LAG-3拮抗剂或抗ICOS激动剂中的至少一种;其中(a)和(b)作为组合施用。

54. 如权利要求50-51所述的药剂或组合物或如权利要求52-53所述的用途,其中所述重组正痘病毒选自牛痘病毒、经修饰的安卡拉牛痘(MVA)和MVA-BN。

55. 如权利要求51所述的药剂或组合物或如权利要求53所述的用途,其中所述重组禽痘病毒为鸡痘病毒。

56. 如权利要求50-55所述的药剂或组合物,其中所述至少一种肿瘤抗原选自CEA、MUC-1、PAP、PSA和HER-2抗原。

用于使用表达肿瘤抗原的痘病毒和免疫检查点抑制剂的拮抗剂和/或激动剂治疗癌症的组合疗法

发明领域

[0001] 本发明涉及使用编码肿瘤抗原的重组痘病毒治疗癌症。更具体地,本发明涉及使用编码肿瘤抗原的一种或多种重组痘病毒与免疫检查点抑制剂的一种或多种激动剂和/或拮抗剂的组合治疗癌症。

[0002] 发明背景

[0003] 重组痘病毒已用作用于传染性生物体并最近用于肿瘤的疫苗。Mastrangelo等J Clin Invest.2000;105(8):1031-1034。所述痘病毒组中的两种即禽痘病毒和正痘病毒已显示出在对抗肿瘤方面的有效性并且已涉及潜在的癌症治疗。

[0004] 一个示例性禽痘病毒种类鸡痘已显示为用于人施用的安全媒介物,因为鸡痘病毒进入哺乳动物细胞并表达蛋白质,但是复制失败。Skinner等Expert Rev Vaccines.2005年2月;4(1):63-76。另外,鸡痘病毒作为媒介物用于表达的用途正在于针对癌症、疟疾、肺结核和AIDS的疫苗的众多临床试验中加以评估。同前。

[0005] 已显示正痘病毒为用于将抗原施用给患者以诱导针对抗原的免疫应答的有用载体。最为熟知的正痘病毒牛痘被用于天花的全球根除中并且显示了作为载体和/或疫苗的有用性。重组牛痘载体被工程化改造以表达多种插入基因,所述基因包括若干种肿瘤相关基因诸如p97、HER-2/neu、p53和ETA(Paoletti等,1993)。

[0006] 另一已知正痘病毒为经修饰的安卡拉牛痘(MVA)病毒。MVA与痘病毒科家族中的正痘病毒属的成员牛痘病毒有关。MVA通过牛痘病毒的安卡拉毒株(CVA)在鸡胚胎成纤维细胞上连续516次传代来产生(相关综述,参见Mayr,A.等Infection 3,6-14(1975))。由于所述的长期传代,所得MVA病毒的基因组缺失了其基因组序列的约31千碱基并因此被描述为对于禽细胞的复制宿主细胞高度受限(Meyer,H.等,J.Gen.Virol.72,1031-1038(1991))。已表明在多种动物模型中所得MVA是明显无毒性的(Mayr,A.和Danner,K.,Dev.Biol.Stand.41:225-34(1978))。另外,所述MVA毒株已经在临床试验中作为针对人天花病免疫的疫苗进行了测试(Mayr等,Zbl.Bakt.Hyg.I,Abt.Org.B 167,375-390(1987);Stickl等,Dtsch.med.Wschr.99,2386-2392(1974))。在这些人研究中,与基于牛痘的疫苗相比,MVA具有减小的毒性或感染性,同时MVA仍诱导良好的特异性免疫应答。

[0007] 在接下来的数十年中,MVA被工程化改造用作用于重组基因表达的病毒载体或用作重组疫苗(Sutter,G.等,Vaccine 12:1032-40(1994))。

[0008] 尽管在二十世纪七十年代期间Mayr等已证明MVA在人和哺乳动物中是高度减毒和无毒性的,但是某些研究者已报道MVA在哺乳动物和人细胞系中并未完全减毒,因为在这些细胞中可能发生残余的复制。(Blanchard等,J Gen Virol 79,1159-1167(1998);Carroll和Moss,Virology 238,198-211(1997);Altenberger,美国专利号5,185,146;Ambrosini等,J Neurosci Res 55(5),569(1999))。假定这些出版物中所报道的结果是用MVA的不同的已知毒株获得的,因为所用的病毒在它们的特性、尤其在它们在各种细胞系中的生长行为方面有本质上的差异。出于各种原因(包括与在人中使用有关的安全考虑),所述残余的

复制是不希望的。

[0009] 已描述了具有用于开发更安全产品(诸如疫苗或药物)的增强的安全特性的MVA的毒株。参见,美国专利号6,761,893和6,193,752。所述毒株能够在非人细胞和细胞系中,特别是在鸡胚胎成纤维细胞(CEF)中进行繁殖性复制,但是不能在某些已知允许已知牛痘毒株复制的人细胞系中进行明显的繁殖性复制。所述细胞系包括人角化细胞细胞系HaCat(Boukamp等J Cell Biol 106(3):761-71(1988))、人宫颈腺癌细胞系HeLa(ATCC号CCL-2)、人胚胎肾细胞系293(ECACC号85120602)、和人骨骼骨肉瘤细胞系143B(ECACC号91112502)。所述毒株还不能够在体内例如在某些小鼠品系(诸如免疫功能严重受损并且对复制病毒非常敏感的转基因小鼠模型AGR 129)中进行明显的繁殖性复制。参见,美国专利号6,761,893。已描述了一种所述MVA毒株及其衍生物和重组体(称之为“MVA-BN”)。参见,美国专利号6,761,893和6,193,752,所述专利在此以引用方式并入。

[0010] MVA和MVA-BN已各自被工程化改造以用作用于重组基因表达的病毒载体或用作重组疫苗。参见例如Sutter,G.等,Vaccine 12:1032-40(1994)、美国专利号6,761,893和6,193,752。

[0011] 癌症免疫疗法的某些途径包括使用肿瘤相关抗原的疫苗接种。在某些情况下,所述途径包括使用递送系统以促进宿主对肿瘤相关抗原的免疫应答。在某些情况下,所述递送系统包括重组病毒载体。参见,例如Harrop等,Front.Biosci.11:804-817(2006);Arlen等,Semin.Oncol.32:549-555(2005);Liu等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 101(增刊2):14567-14571(2004)。

[0012] HER-2是过表达于许多癌症患者的肿瘤细胞中的肿瘤相关抗原。用各种HER-2多肽进行的免疫已被用来产生针对表达所述抗原的肿瘤细胞的免疫应答。参见,例如Renard等,J.Immunology 171:1588-1595(2003);Mittendorf等,Cancer 106:2309-2317(2006)。

[0013] 已表明尽管在肺中存在特征为高频率的调节性T细胞(T_{reg})的强烈的肿瘤介导的免疫抑制性环境,但是编码HER-2抗原的MVA(MVA-BN-HER2)在实验性肺转移的鼠模型中发挥了强有力的抗肿瘤功效。Mandl等,Cancer Immunol Immunother(2012)61:19-29。据报道重组MVA诱导了强烈的Th1-主导的HER-2-特异性抗体和T细胞应答。同前。抗肿瘤活性特征为增加了高度活化的HER-2-特异性、CD8+CD11c+T细胞对肺的浸润,并且伴随肺中的 T_{reg} 细胞频率的降低,从而使得效应T细胞与 T_{reg} 细胞的比例明显增加。同前。

[0014] 还已表明MVA-BN-HER2在转移情形下在人临床研究中是安全的并且破坏耐受性以诱导特异性T和B细胞应答。Guardino等,Cancer Research:2009年12月15日;第69卷,第24期,增刊3。

[0015] 曲妥珠单抗(trastuzumab)(赫赛汀(Herceptin))是靶向HER2的细胞外结构域的人源化单克隆抗体(mAb),并且已在HER2阳性乳腺癌中显示出临床功效。Wang等,Cancer Res.2012年9月1日;72(17):4417-4428。然而,大量患者对初始的曲妥珠单抗治疗没有响应并且在连续治疗之后许多曲妥珠单抗响应的肿瘤发展出抗性。同前。

[0016] 免疫细胞上的抑制性受体是癌症中免疫逃逸的关键调控因子。Woo等,Cancer Res;72(4):917-27,2011。在这些抑制性受体之中,CTLA-4(细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4)充当主导性关闭开关而其他受体诸如PD-1(程序性死亡1,CD279)和LAG-3(淋巴细胞活化基因,CD223)似乎执行更微妙的变阻器(rheostat)功能。同前。

[0017] CTLA-4是免疫检查点分子,其在活化的T细胞上被上调。Mackiewicz, *Wspolczesna onkol* 2012;16(5):363-370。抗CTLA4mAb可阻断CTLA-4与CD80/86的相互作用并且切断免疫抑制的机制并且能够通过DC连续刺激T细胞。针对CTLA-4的两种IgG mAb即伊匹单抗(ipilimumab)和特利姆单抗(tremelimumab)已经用于患有黑素瘤的患者的临床试验中。然而,用抗CTLA-4抗体的治疗已显示出高水平的免疫相关不良事件。同前。

[0018] 调节免疫系统的另一人mAb是针对死亡-1受体(PD-1R)的BMS-936558(MDX-1106),所述受体的配体(PD-1L)可直接表达于黑素瘤细胞上。同前。PD-1R是调节性T细胞活化和耐受性的共刺激分子的B7:CD28家族的一部分,因此抗PD-1R可在破坏耐受性中起作用。同前。

[0019] PD-1/PD-L1路径的占用产生对T细胞效应功能即细胞因子分泌和增殖的抑制。Turnis等, *OncoImmunology* 1:7,1172-1174;2012。高水平的PD-1与耗竭或长期刺激的T细胞相关。同前。此外,PD-1表达增加与癌症患者的存活率降低相关。同前。

[0020] 虽然所述最近研究已表明PD-1表达可与癌症的存活率联系起来,但是通过抑制PD-1治疗癌症的早期研究已显示出多种不良副作用。Mellman等 *Nature* 2011;480(7378):480-489;还参见Chow, *Am Soc Clin Oncol Educ Book*,2013,“Exploring novel immune-related toxicities and endpoints with immune-checkpoint inhibitors in non-small cell lung cancer”。

[0021] LAG-3是在活化各种淋巴细胞类型后所表达的负调控分子。同前。LAG-3是天然和诱导的免疫抑制性Treg细胞的最佳功能所需的。同前。

[0022] 使用单克隆抗体对PD-1和LAG-3的组合阻断协同地限制已建立肿瘤的生长。Woo等, *Cancer Res*;72(4):917-27,2011。尽管抗LAG-3/抗PD-1组合免疫疗法有效地清除了已形成的Sa1N和MC38肿瘤,但是所述疗法不能有效地对抗已建立的B16肿瘤。同前。Turnis等报道了他们的研究“highlighted the difficulty in predicting the outcome of combination treatments。”Turnis等, *OncoImmunology* 1:7,1172-1174;2012。

[0023] 据报道可诱导的共刺激分子(ICOS)高度低表达于浸润各种肿瘤(包括黑素瘤和卵巢癌)的Treg上。Faget等, *OncoImmunology* 2:3,e23185;2013年3月。还据报道在乳腺癌中在TA-Treg与TA-pDC的相互作用的过程中发生ICOS/ICOSL相互作用。同前。针对ICOS的拮抗剂抗体已用于抑制ICOS:ICOS-L相互作用并且消除由pDC诱导的Treg的增殖。WO 2012/131004。拮抗剂抗体用于乳腺肿瘤的鼠模型中以减小肿瘤进展。同前。

[0024] 已提出针对ICOS的激动剂抗体与用于治疗肿瘤的阻断性抗CTLA-4抗体和阻断性抗PD-1抗体组合使用。WO 2011/041613。

[0025] 对另外的癌症治疗(包括活性免疫疗法和癌症疫苗)存在明显未满足的医学需求。在许多方面,本公开的实施方案通过提供增加并改进当前可利用的癌症治疗的组合疗法而解决了所述需求。

[0026] 发明概述

[0027] 在一个总体方面,本发明涵盖用于使用编码至少一种肿瘤抗原的重组痘病毒与免疫检查点抑制剂的一种或多种拮抗剂或激动剂组合治疗癌症患者的疗法、组合物和方法。

[0028] 在更具体的方面,本发明涵盖利用表达肿瘤抗原的正痘病毒和/或禽痘病毒与PD-1、LAG-3的拮抗剂和/或ICOS的激动剂中的一种或多种组合的用途、方法和组合物。

[0029] 在一个实施方案中,本发明包括用于治疗人癌症患者的疗法。所述疗法包含:(a)

包含编码至少一种肿瘤抗原的多肽的核酸的重组正痘病毒；和(b)抗PD-1拮抗剂、抗LAG-3拮抗剂或抗ICOS激动剂中的至少一种。根据本发明可预期的是，(a)和(b)作为组合施用。

[0030] 在另一个实施方案中，本发明包括用于治疗人癌症患者的方法，所述方法包括：(a)向患者施用包含编码至少一种肿瘤抗原的多肽的核酸的重组正痘病毒；和(b)向患者施用抗PD-1拮抗剂、抗LAG-3拮抗剂或抗ICOS激动剂中的至少一种。

[0031] 在又一实施方案中，用于治疗人癌症患者的疗法和方法还包括包含编码至少一种肿瘤抗原的多肽的核酸的重组禽痘病毒和将其与以下各项中的至少一种组合向人癌症患者施用：抗PD-1拮抗剂、抗LAG-3拮抗剂或抗ICOS激动剂。

[0032] 在再一实施方案中，用于治疗人癌症患者的疗法和方法还包括包含编码至少一种肿瘤抗原的多肽的核酸的两种或更多种重组正痘病毒和将其与以下各项中的至少一种组合向人癌症患者施用：抗PD-1拮抗剂、抗LAG-3拮抗剂或抗ICOS激动剂。

[0033] 在另外的实施方案中，本发明涵盖用于治疗人癌症患者的药剂或组合物。所述药剂或组合物包含：(a)包含编码至少一种肿瘤抗原的多肽的核酸的重组正痘病毒；和(b)抗PD-1拮抗剂、抗LAG-3拮抗剂或抗ICOS激动剂中的至少一种。在另外的实施方案中，所述药剂或组合物另外包含：(a)包含编码至少一种肿瘤抗原的多肽的核酸的重组禽痘病毒；和(b)抗PD-1拮抗剂、抗LAG-3拮抗剂或抗ICOS激动剂中的至少一种。

[0034] 在又一实施方案中，本发明包括组合物在制备用于治疗人癌症患者的药物组合物或药剂中的用途，所述组合物包含：(a)包含编码至少一种肿瘤抗原的多肽的核酸的重组正痘病毒；和(b)抗PD-1拮抗剂、抗LAG-3拮抗剂或抗ICOS激动剂中的至少一种。在另外的实施方案中，所述药剂或组合物另外包含：(a)包含编码至少一种肿瘤抗原的多肽的核酸的重组禽痘病毒；和(b)抗PD-1拮抗剂、抗LAG-3拮抗剂或抗ICOS激动剂中的至少一种。

[0035] 在某些实施方案中，如本文所述，重组正痘病毒选自牛痘病毒、经修饰的安卡拉牛痘(MVA)病毒和/或MVA-BN。在某些另外的实施方案中，重组禽痘病毒为鸡痘病毒。

[0036] 在某些实施方案中，如本文所述，抗PD-1拮抗剂、抗LAG-3拮抗剂和抗ICOS激动剂各自包括抗体。

[0037] 在某些实施方案中，如本文所述，由重组正痘病毒和重组禽痘病毒编码的至少一种肿瘤抗原可选自CEA、MUC-1、PAP、PSA和HER-2抗原。在优选的实施方案中，至少一种肿瘤抗原选自PAP和PSA。在另一个优选实施方案中，至少一种肿瘤抗原选自CEA和MUC-1。在又一个优选实施方案中，至少一种肿瘤抗原为HER-2抗原。

[0038] 在某些另外的实施方案中，人癌症患者的治疗涵盖选自以下各项的癌症：乳腺癌、结直肠癌、肺癌、胃癌、胰腺癌、前列腺癌、膀胱癌和/或卵巢癌。

[0039] 本发明另外的目的和优点将会在接下来的描述中部分阐明，部分将会从描述中显而易见，或可通过本发明的实践而了解。凭借所附权利要求书中特别指出的元素和组合，本发明的目的和优点将会实现并获得。

[0040] 应理解，以上概述和以下详述都仅是示例性和解释性的，并且不限制要求保护的本发明。

[0041] 附图简述

[0042] 并入本说明书中并构成本说明书一部分的附图示出本发明的一个或多个实施方案，并与描述一起用来解释本发明的原理。

[0043] 图1. 示出了用MVA-BN-HER2处理之后的肺、脾脏和血液中的T细胞上的ICOS表达。在第1天(A和B)或第1和第15天(C和D)用MVA-BN-HER2处理初始(无肿瘤)小鼠。CD8+T细胞上(A和C)和CD4+T细胞上(B和D)的ICOS表达。显示的数据是每组的三只小鼠在各时间点的平均值±SEM。

[0044] 图2. 示出了MVA-BN-HER2与抗ICOS激动剂组合施用之后的肿瘤体积。在第1和第15天用MVA-BN-HER2、并在第1、4、8、11、15、18、22、25天用抗ICOS(腹膜内)处理具有实体CT26-HER-2肿瘤的小鼠。A)平均肿瘤生长。B)个别小鼠中的肿瘤生长。

[0045] 图3. 显示在实验性肺转移模型中MVA-BN-HER2与抗CTLA-4协同作用来消除肿瘤并增加存活率。在第4和第18天用MVA-BN-HER2、并在第3和第17天用抗CTLA-4处理肺中具有CT26-HER-2肿瘤的小鼠。

[0046] 图4. 显示肿瘤移植后25天单独的MVA-BN-HER2和与抗CTLA-4组合减小了CT26-HER2肺肿瘤负荷。在第4和第18天用MVA-BN-HER2、并在第3和第17天用抗CTLA-4处理肺中具有CT26-HER-2肿瘤的小鼠；在第25天对肿瘤负荷进行分析。A)来自各组的代表性肺显示在未处理和抗CTLA-4处理的肺中可看见为小块的肿瘤。在用MVA-BN-HER2处理的小鼠中没有可见肿瘤。比例尺等于1cm。B)在第25天用MVA-BN-HER2处理的小鼠具有与初始小鼠类似的肺重量,而在第25天在未处理和抗CTLA-4处理的小鼠中肺重量明显较大。

[0047] 图5. 显示来自用MVA-BN-HER2处理的小鼠中的肿瘤/肺和外周中的T细胞上的ICOS表达增加,并且在小鼠的肿瘤/肺中具有高肿瘤负荷。在第4和第18天用MVA-BN-HER2、并在第3和第17天用抗CTLA-4处理肺中具有CT26-HER-2肿瘤的小鼠。A)在第11和第25天时CD4+T细胞上的ICOS表达。B)在第11和第25天时CD8+T细胞上的ICOS表达。C)在第25天时来自三个独立实验的CD4+T细胞上的平均ICOS表达,其中每组有3-4只小鼠。D)在第25天时来自三个独立实验的CD8+T细胞上的平均ICOS表达,其中每组有3-4只小鼠。

[0048] 图6. 显示在具有肿瘤的小鼠中ICOS+CD4+T细胞与FoxP3+具有大约相等的比例,但是小鼠中响应于处理的主要是FoxP3-。在第4和第18天用MVA-BN-HER2、并在第3和第17天用抗CTLA-4处理肺中具有CT26-HER-2肿瘤的小鼠；并且在肿瘤移植后第24或25天进行FACS分析。A)FoxP3+Treg上的ICOS表达。B)FoxP3-CD4T细胞上的ICOS表达。C)来自三个独立实验的FoxP3+Treg细胞上的平均ICOS表达,其中每组有3-4只小鼠。D)来自三个独立实验的FoxP3-CD4T细胞上的ICOS表达,其中每组有3-4只小鼠。

[0049] 图7. 显示MVA-BN-HER2和与抗CTLA-4的组合治疗增加了效应T细胞与调节性T细胞的比率。在第4和第18天用MVA-BN-HER2、并在第3和第17天用抗CTLA-4处理肺中具有CT26-HER-2肿瘤的小鼠；并且在肿瘤移植后第24或25天进行FACS分析。A)来自单次实验的CD8Teff:Treg比率(CD8+ICOS+FoxP3-/CD4+ICOS+FoxP3+)和B)CD4Teff:Treg比率(CD4+ICOS+FoxP3-/CD4+ICOS+FoxP3),其中每组有3-4只小鼠。C)来自三个单独实验的平均CD8Teff:Treg比率和D)平均CD4Teff:Treg比率,其中每组有3-4只小鼠。

[0050] 图8. 示出了用MVA-BN-HER2处理之后肺、脾脏和血液中的T细胞上的PD-1表达。在第1天(A和B)或第1和第15天(C和D)用MVA-BN-HER2处理初始(无肿瘤)小鼠。CD8+T细胞(A和C)和CD4+T细胞(B和D)上的PD-1表达。显示的数据是每组的三只小鼠在各时间点的平均值±SEM。

[0051] 图9. 显示MVA-BN-HER2处理和抗PD-1减缓肿瘤生长并且增加存活率。对小鼠植入

实体CT26-HER-2实体肿瘤并且在第1和第15天用MVA-BN-HER2和抗PD-1对其进行处理。A)小鼠中的平均肿瘤体积。B)基于肿瘤体积 $<2000\text{mm}^3$ 的小鼠的存活百分比。C)小鼠中的个别肿瘤生长。

[0052] 图10.示出了用MVA-BN-HER2处理之后肺、脾脏和血液中的T细胞上的LAG-3表达。在第1天(A和B)或第1和第15天(C和D)用MVA-BN-HER2处理初始(无肿瘤)小鼠。CD8+T细胞(A和C)和CD4+T细胞(B和D)上的LAG-3表达。显示的数据是每组的三只小鼠在各时间点的平均值 \pm SEM。

[0053] 图11.显示MVA-BN-HER2和抗LAG-3减缓肿瘤生长并且增加存活率。在第1天对小鼠植入实体CT26-HER-2肿瘤并且在第1和第15天用MVA-BN-HER2和抗LAG-3对其进行处理。A)小鼠中的平均肿瘤体积。B)基于肿瘤体积 $<2000\text{mm}^3$ 的小鼠的存活百分比。C)小鼠中的个别肿瘤生长。

[0054] 图12.显示MVA-BN-HER2、抗PD-1和抗LAG-3处理使得小鼠产生完全的肿瘤消退。在第1天对小鼠植入实体CT26-HER-2肿瘤并且在第1和第15天用MVA-BN-HER2、抗PD-1和抗LAG-3对其进行处理。A)小鼠中的平均肿瘤体积。B)基于肿瘤体积 $<2000\text{mm}^3$ 的小鼠的存活百分比。C)小鼠中的个别肿瘤生长。

[0055] 图13.显示MVA-BN-HER2、抗PD-1和抗LAG-3处理使得小鼠产生肿瘤消退。在第1天对小鼠植入实体CT26-HER-2肿瘤并且在第4和第18天用MVA-BN-HER2、抗PD-1和抗LAG-3对其进行处理。(与图12相比,将处理延迟至第4和第18天(图12,第1和第15天))。A)小鼠中的平均肿瘤体积。B)基于肿瘤体积 $<2000\text{mm}^3$ 的小鼠的存活百分比。C)小鼠中的个别肿瘤生长。

[0056] 图14.显示在实验性肺转移模型中单独的MVA-BN-HER2和与抗PD-1和抗LAG-3组合增加了存活率。在第4和第18天用MVA-BN-HER2、抗PD-1和抗LAG-3处理肺中具有CT26-HER-2肿瘤的小鼠。

[0057] 图15.显示用MVA-BN-HER2、抗PD-1和抗LAG-3抗体处理的小鼠的HER2特异性T细胞应答在三联疗法的情况下更高。在第1天对小鼠植入实体CT26-HER-2肿瘤并且在第4和第18天用MVA-BN-HER2、抗PD-1和抗LAG-3对其进行处理,并且最后处理后四周通过ELISPOT测定抗LAG-3和IFN- γ 。用HER-2ECD重叠肽库(A,重叠15mer的166)或K^d结合HER-2肽p63(B)重新刺激来自无肿瘤小鼠的脾细胞。

[0058] 图16.显示在所有处理组之中生长的CT26-HER-2肿瘤诱导了类似的HER2特异性抗体。在第1天对小鼠植入实体CT26-HER-2肿瘤并且在第4和第18天用MVA-BN-HER2、抗PD-1和抗LAG-3对其进行处理。在第25天从小鼠收集血清并且通过ELISA测定HER-2效价。

[0059] 图17.显示MVA-BN-CV301和抗PD-1减缓了肿瘤生长。对小鼠植入MC38-CEA实体肿瘤并且在第1和第15天用MVA-BN-CV301和抗PD-1对其进行处理。A)小鼠中的平均肿瘤体积。B)小鼠中的个别肿瘤生长。

[0060] 图18.示出了施用MVA-BN-CV301和抗LAG-3之后的肿瘤体积。对小鼠植入MC38-CEA实体肿瘤并且在第1和第15天用MVA-BN-CV301和抗LAG-3对其进行处理。A)小鼠中的平均肿瘤体积。B)小鼠中的个别肿瘤生长。

[0061] 图19.示出了MVA-BN-CV301和抗PD-1以及抗LAG-3组合施用之后的肿瘤体积。对小鼠植入MC38-CEA实体肿瘤并且在第1和第15天用MVA-BN-CV301、抗PD-1和抗LAG-3对其进行处理。A)小鼠中的平均肿瘤体积。B)小鼠中的个别肿瘤生长。

[0062] 图20.示出了施用PROSTVAC和抗PD-1之后的肿瘤体积。对小鼠植入E6(RM11-PSA)实体肿瘤并且在第1天用PROSTVAC-V、并在第8和第15天用PROSTVAC-F对其进行处理。在第1和第15天给予抗PD-1。A)小鼠中的平均肿瘤体积。B)小鼠中的个别肿瘤生长。

[0063] 图21.示出了施用PROSTVAC和抗LAG-3之后的肿瘤体积。对小鼠植入E6(RM11-PSA)实体肿瘤并且在第1天用PROSTVAC-V、并在第8和第15天用PROSTVAC-F对其进行处理。在第1和第15天给予抗LAG-3。A)小鼠中的平均肿瘤体积。B)小鼠中的个别肿瘤生长。

[0064] 图22.示出了施用PROSTVAC、抗PD-1和抗LAG-3之后的肿瘤体积。对小鼠植入E6(RM11-PSA)实体肿瘤并且在第1天用PROSTVAC-V、并在第8和第15天用PROSTVAC-F对其进行处理。在第1和第15天给予抗PD-1和抗LAG-3。A)小鼠中的平均肿瘤体积。B)小鼠中的个别肿瘤生长。

[0065] 图23.示出了施用CV301和抗PD-1之后的肿瘤体积。对CEA转基因小鼠植入MC38-CEA实体肿瘤并且在第4天用CV301-V、在第11和第18天用CV301-F对其进行处理。在第4、11、和18天给予鸡痘GM-CSF(与CV301-V/F混合)和抗PD-1。A)小鼠中的平均肿瘤体积。B)小鼠中的个别肿瘤生长。

[0066] 序列简述

[0067] SEQ ID NO:1为编码包含源自破伤风毒素的两种T_H细胞表位的HER2蛋白的构建体的核苷酸序列。

[0068] SEQ ID NO:2为由SEQ ID NO:1的核苷酸序列编码的经修饰的HER2蛋白的氨基酸序列。

[0069] 发明详述

[0070] 许多当前的临床试验涉及采用被工程化改造来表达一种或多种肿瘤相关抗原(TAA)的基于牛痘、经修饰的安卡拉牛痘(MVA)和鸡痘的载体的疗法。将这些载体单独地使用或用于初免-加强策略(prime-boost strategies)中以产生针对多种癌症的主动免疫应答。**PROSTVAC®**采用使用表达PSA和TRICOM™的牛痘和鸡痘的异源初免-加强策略,并且目前处在用于去势抵抗性转移性前列腺癌(castration-resistant metastatic prostate cancer)的全球性III期临床试验(PROSPER)中。

[0071] MVA-BN-HER2(Mandl等,2012)处在用于治疗HER-2⁺-乳腺癌的I期临床试验中。所述重组载体源自高度减毒的经修饰的安卡拉牛痘病毒原种,称作MVA-BN。MVA-BN表达HER-2(命名为HER2)的由HER-2的细胞外结构域组成的经修饰形式,所述经修饰形式被工程化改造以包含来自破伤风毒素的两种通用的T细胞表位(TTp2和TTp30),从而有利于诱导针对HER-2的有效的免疫应答。

[0072] 为了进一步增强基于痘病毒的免疫疗法的抗肿瘤功效,将MVA-BN-HER2与阻断CTLA-4的活性的单克隆抗体即下调T细胞活化的免疫检查点蛋白质组合。在CT26-HER-2实验性肺转移性模型中,中值存活时间从未处理小鼠的30天增加至使用MVA-BN-HER2处理的49.5天,而单独的抗CTLA-4处理显示出几乎没有存活益处(中值存活35天)。相反,MVA-BN-HER2与抗CTLA-4的组合明显将超过50%的小鼠的存活时间增加至大于100天(p<0.0001)。在第100天时,检查存活小鼠的肺,并且没有可见肿瘤。在单独的实验中,进行表型分析。MVA-BN-HER2疗法使得初始小鼠(没有肿瘤)的肺中的CD8⁺T细胞上的可诱导共刺激分子(ICOS)显著增加。在具有肿瘤的小鼠中,在第25天,在未处理和抗CTLA-4处理的小鼠的肺中

调节性T细胞(CD4⁺FoxP3⁺)的数目存在增加,这与增加的肺肿瘤负荷相关联。调节性T细胞是ICOS阳性的。用MVA-BN-HER2处理的小鼠具有增加的为FoxP3阴性的ICOS⁺CD4⁺T细胞。

[0073] 在各种肿瘤模型中将MVA-BN-HER2与针对PD-1、LAG-3和ICOS的各种激动剂和拮抗剂抗体组合进行测试。发现所述组合增强了MVA-BN-HER2的作用。

[0074] 另外,将针对PD-1和LAG-3的各种拮抗剂抗体与利用重组正痘病毒和重组禽痘病毒的异源初免加强给药方案组合进行测试。例如,将包含牛痘病毒和鸡痘病毒(各自表达PSA和TRICOM)的PROSTVAC®与各种拮抗剂抗体组合进行测试。还将包含牛痘病毒和鸡痘病毒(各自表达CEA、MUC-1和TRICOM)的CV301(也称作PANVAC)与各种拮抗剂抗体组合进行测试。当与各种拮抗剂抗体组合施用,异源初免-加强给药方案的有效性增加。

[0075] 另外在MVA-CV301的异源初免-加强方案中测试了针对PD-1和LAG-3的各种拮抗剂抗体。当与针对PD-1和/或LAG-3的抗体组合测试时,发现MVA-CV301(包括表达CEA、MUC-1和TRICOM的MVA病毒的初免和加强剂量)的有效性得以改善。

[0076] 编码组成肿瘤抗原的多肽的正痘病毒和/或禽痘病毒

[0077] 在各个方面,本公开包括各自编码和/或表达肿瘤抗原的重组正痘病毒和/或重组禽痘病毒。在一个或多个优选方面,正痘病毒和禽痘病毒分别是牛痘病毒和鸡痘病毒。

[0078] 术语“禽痘病毒”是指任何禽痘病毒,诸如鸡痘病毒、金丝雀痘病毒、异常痘病毒、八哥痘病毒、鸽痘病毒、鸚鵡痘病毒、鹌鹑痘病毒、孔雀痘病毒、企鵝痘病毒、麻雀痘病毒、棕鸟痘病毒和火鸡痘病毒。优选的禽痘病毒是金丝雀痘病毒和鸡痘病毒。

[0079] 金丝雀痘病毒的实例是Rentschler毒株。蚀斑纯化的金丝雀痘毒株(称为ALVAC)(美国专利号5,766,598)根据布达佩斯条约的条款通过美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection)(ATCC)寄存,登记号为VR-2547。另一种金丝雀痘毒株是命名为LF2CEP 524 24 10 75的市售金丝雀痘疫苗毒株,可购自Institute Merieux, Inc。

[0080] 鸡痘病毒的实例包括但不限于毒株FP-1、FP-5、TROVAC(美国专利号5,766,598)和POXVAC-TC(美国专利7,410,644)。FP-1是经修饰以作为疫苗用于一日龄小鸡的Duvette毒株。所述毒株是命名为ODCEP 25/CEP67/2309(1980年10月)的市售鸡痘病毒疫苗毒株并且可购自Institute Merieux, Inc。FP-5是源于鸡胚的市售鸡痘病毒疫苗毒株,其可购自American Scientific Laboratories(Schering Corp.的分部)(Madison,Wis.),美国兽医许可证号165,序列号30321。

[0081] 在一个或多个实施方案中,重组正痘病毒优选地选自牛痘病毒、经修饰的安卡拉牛痘(MVA)病毒和MVA-BN。

[0082] 牛痘病毒毒株的实例包括但不限于毒株Temple of Heaven、Copenhagen、Paris、Budapest、Dairen、Gam、MRIVP、Per、Tashkent、TBK、Tom、Bern、Patwadangar、BIEM、B-15、Lister、EM-63、New York City Board of Health、Elstree、Ikeda和WR。优选的牛痘病毒(VV)毒株是Wyeth(DRYVAX)毒株(美国专利7,410,644)。

[0083] 另一优选的VV毒株是经修饰的安卡拉牛痘(MVA)病毒(Sutter,G.等[1994], Vaccine 12:1032-40)。可用于本发明的实践中并已遵循布达佩斯条约寄存的MVA病毒毒株的实例包括但不限于毒株MVA 572,其于1994年1月27日以寄存编号ECACC 94012707寄存于欧洲动物细胞培养物收藏中心(European Collection of Animal Cell Cultures)

(ECACC)、疫苗研究和生产实验室(Vaccine Research and Production Laboratory)、公共卫生实验室(Public Health Laboratory Service)、应用微生物学研究中心(Centre for Applied Microbiology and Research)(Porton Down,Salisbury,Wiltshire SP4 0JG, United Kingdom)以及MVA 575,其于2000年12月7日以ECACC 00120707寄存。另外的示例性毒株是MVA-BN(其于2000年8月30以编号V00083008寄存于欧洲细胞培养物收藏中心(ECACC))及其衍生物。

[0084] 尽管MVA-BN出于其较高安全性(较低的复制能力)而被优选,但是所有MVA是适用于本发明的。根据本发明的实施方案,MVA毒株是MVA-BN和其衍生物。MVA-BN和其衍生物的定义在PCT/EP01/13628中给出,所述专利以引用的方式并入本文。

[0085] 在某些实施方案中,MVA是MVA-BN,其于2000年8月30日以编号V00083008寄存于欧洲细胞培养物收藏中心(ECACC),并且描述于国际PCT公布W02002042480(还参见例如美国专利号6,761,893和6,913,752)中,所有内容均以引用的方式并入本文。如所述专利公布中所述,MVA-BN不能在细胞系293、143B、HeLa和HaCat中繁殖性复制。具体地,在人胚胎肾细胞系293中,MVA-BN表现出0.05至0.2的扩增比率。在人骨骼骨肉瘤细胞系143B中,MVA-BN表现出0.0至0.6的扩增比率MVA-BN在人宫颈腺癌细胞系HeLa中表现出0.04至0.8的扩增比率,并且在人角化细胞系HaCat中表现出0.02至0.8的扩增比率。在非洲绿猴肾细胞MVA-BN(CV1:ATCC号CCL-70)中具有0.01至0.06的扩增比率。

[0086] 在鸡胚胎成纤维细胞(CEF:初级培养物)中,MVA-BN的扩增比率高于1,如PCT公布W02002042480(还参见例如美国专利号6,761,893和6,913,752)中所述。在CEF初级培养物中病毒可以高于500的比率容易地进行增殖和扩增。

[0087] 在某些实施方案中,重组MVA是MVA-BN的衍生物。所述“衍生物”包括表现出与寄存毒株(ECACC号V00083008)基本上相同的复制特性,但在其基因组中表现出一处或多处的差异的病毒。具有与寄存的病毒相同的“复制特性”的病毒是以与CEF细胞和细胞系HeLa、HaCat和143B中的寄存毒株类似的扩增比率复制;并且在体内表现出类似的复制特性(如例如在AGRI29转基因小鼠模型中所测定的)的病毒。

[0088] 在某些实施方案中,正痘病毒是含有与正痘病毒异源的另外的核苷酸序列的重组牛痘病毒。在某些所述实施方案中,异源序列编码通过免疫系统诱导应答的表位。因此,在某些实施方案中,使用重组正痘病毒来针对包含所述表位的蛋白质或物质进行疫苗接种。

[0089] 在某些实施方案中,根据本公开的正痘病毒和禽痘病毒包含至少一种肿瘤相关抗原。在优选的实施方案中,肿瘤相关抗原包括,但不限于HER-2、PSA、PAP、CEA或MUC-1抗原,其为单独形式或组合形式(例如,CEA和MUC-1或PAP和PSA)。

[0090] 在另一实施方案中,肿瘤相关抗原被修饰成包含一种或多种外来 T_H 表位。所述癌症免疫治疗剂描述于本文的非限制性实例中并且称之为“MVA-BN-mHER2”。如本文所述,所述癌症免疫治疗剂(包括但不限于MVA-BN-mHER2)可用于治疗癌症。本发明允许所述药剂在人和其他哺乳动物(包括免疫功能受损的患者)的初免/加强疫苗接种方案中的使用;并且允许诱导体液和细胞免疫应答两者,诸如在预先存在的 Th_2 环境中诱导 Th_1 免疫应答。

[0091] 在某些实施方案中,肿瘤相关抗原体现为插入到病毒基因组的非必需区中的异源核苷酸序列。在某些所述实施方案中,异源核苷酸序列插在MVA基因组的天然存在的缺失位点处,如PCT/EP96/02926中所述。用于将异源序列插入到痘病毒基因组中的方法是本领域技

术人员已知的。

[0092] 在某些实施方案中,药物组合物包含一种或多种药学上可接受的和/或认可的载体、添加剂、抗生素、防腐剂、佐剂、稀释剂和/或稳定剂。所述添加剂包括例如但不限于水、盐水、甘油、乙醇、润湿剂或乳化剂,以及pH缓冲物质。示例性载体通常为大的、缓慢代谢的分子诸如蛋白质、多糖、聚乳酸、聚羟基乙酸、聚合氨基酸、氨基酸共聚物、脂质聚集体等。

[0093] 为了制备疫苗,可将正痘病毒转化成生理上可接受的形式。在某些实施方案中,所述制备是基于制备用于针对天花的疫苗接种的痘病毒疫苗的经验,如例如Stickl,H.等,Dtsch.med.Wschr.99,2386-2392(1974)中所述。

[0094] 示例性制备如下所述。将纯化的病毒以在10mM Tris、140mM NaCl(pH 7.4)中配制的 5×10^8 TCID₅₀/ml的效价存储在-80℃下。对于制备疫苗注射剂,例如,可将 10^2 - 10^8 个病毒粒子在安瓿(优选玻璃安瓿)中的2%蛋白胨和1%人白蛋白的存在下,在磷酸盐缓冲盐水(PBS)中冻干。或者,疫苗注射剂可通过将制剂中的病毒逐步地冷冻干燥来制备。在某些实施方案中,制剂含有另外的添加剂诸如甘露醇、葡聚糖、糖、甘氨酸、乳糖、聚乙烯吡咯烷酮或适合于体内施用的其他添加剂诸如(包括但不限于)抗氧化剂或惰性气体、稳定剂或重组蛋白(例如人血清白蛋白)。然后,将安瓿密封并且可将其在4℃与室温之间的合适温度下存储几个月。然而,只要不存在需求,则安瓿优选地存储在低于-20℃的温度下。

[0095] 在涉及疫苗接种或疗法的各种实施方案中,冻干物溶解于0.1至0.5ml的水溶液(优选生理盐水或Tris缓冲液)中,并且以全身或局部,即通过肠胃外、皮下、静脉内、肌肉内、鼻内、皮内或本领域技术人员已知的任何其他施用途径来施用。施用方式、剂量和施用次数的优化在本领域技术人员的技能和知识范围内。

[0096] 在某些实施方案中,减毒的牛痘病毒毒株可用于诱导免疫功能受损的动物(例如,感染有SIV的猴(CD4<400/ μ l血液)或免疫功能受损的人)的免疫应答。术语“免疫功能受损的”描述的是个体免疫系统的状态,其仅表现出不完全的免疫应答或防御传染性病原体的效力减小。

[0097] 某些示例性肿瘤相关抗原

[0098] 在某些实施方案中,在受试者中产生了针对细胞相关多肽抗原的免疫应答。在某些所述实施方案中,细胞相关多肽抗原为肿瘤相关抗原。

[0099] 术语“多肽”是指通过肽键或经修饰肽键彼此连接的两个或更多个氨基酸的聚合物。氨基酸可以是天然存在的和非天然存在的、或天然存在的氨基酸的化学类似物。所述术语还指蛋白质,即包含至少一个多肽的功能性生物分子;当包含至少两个多肽时,这些多肽可形成复合物,共价连接的或非共价连接。蛋白质中的多肽可以是糖基化的和/或脂化的并且/或者包含辅基。

[0100] 如本文所述,优选地,肿瘤相关抗原为HER-2、PSA、PAP、CEA或MUC-1,其为单独形式或组合形式(例如CEA和MUC-1或PAP和PSA)。

[0101] 众多肿瘤相关抗原是本领域已知的。示例性肿瘤相关抗原包括但不限于5 α 还原酶、 α -胎蛋白、AM-1、APC、April、BAGE、 β -联蛋白、Bel12、ber-ab1、CA-125、CASP-8/FLICE、组织蛋白酶、CD19、CD20、CD21、CD23、CD22、CD33CD35、CD44、CD45、CD46、CD5、CD52、CD55、CD59、CDC27、CDK4、CEA、c-myc、Cox-2、DCC、DcR3、E6/E7、CGFR、EMBP、Dna78、法尼基转移酶、FGF8b、FGF8a、FLK-1/KDR、叶酸受体、G250、GAGE家族、胃泌素17、胃泌素释放激素、GD2/GD3/GM2、

GnRH、GnTV、GP1、gp100/Pmel17、gp-100-in4、gp15、gp75/TRP-1、hCG、类肝素酶(heparanase)、Her2/neu、HMTV、Hsp70、hTERT、IGFR1、IL-13R、iNOS、Ki67、KIAA0205、K-ras、H-ras、N-ras、KSA、LKLR-FUT、MAGE家族、乳腺珠蛋白(mammaglobin)、MAP17、melan-A/MART-1、间皮素(mesothelin)、MIC A/B、MT-MMPs、粘蛋白、NY-ESO-1、骨粘连蛋白、p15、P170/MDR1、p53、p97/黑素转铁蛋白、PAI-1、PDGF、uPA、PRAME、probasin、progenipointin、PSA、PSM、RAGE-1、Rb、RCAS1、SART-1、SSX家族、STAT3、STn、TAG-72、TGF- α 、TGF- β 、胸腺素- β -15、TNF- α 、TRP-1、TRP-2、酪氨酸酶、VEGF、ZAG、p16INK4和谷胱甘肽-S-转移酶。

[0102] 优选的PSA抗原包含在位置155处的异亮氨酸至亮氨酸的氨基酸变化,如美国专利7,247,615中所述,所述专利以引用的方式并入本文。

[0103] 一种或多种优选的CEA抗原包括但不限于美国专利7,723,096和PCT申请号PCT/US2004/037810和PCT/US2004/038643中所述的CEA抗原;所有所述专利均以引用的方式并入本文。

[0104] 一种或多种优选的MUC-1抗原包括但不限于美国专利7,118,738和PCT申请号PCT/US2013/020058、PCT/US2004/037810和PCT/US2004/038643中所述的MUC-1抗原;所有所述专利均以引用的方式并入本文。

[0105] 另一示例性肿瘤相关抗原是HER-2。HER-2是表皮生长因子受体家族(c-erbB)的成员,所述家族至今由四种不同的受体组成:c-erbB-1(EGFr)、c-erbB-2(HER-2,c-Neu)、c-erbB-3和c-erbB-4(Salomon等,1995)。与EGFr和HER-2相比,c-erbB-3和c-erbB-4表征不太充分。HER-2是整体膜糖蛋白。成熟蛋白质具有185kD的分子量并具有高度类似EGFr受体的结构特征(Prigent等,1992)。EGFr也是由一个亚基组成的整体膜糖蛋白。其具有170kD的表观分子量并且由621个氨基酸的表面配体结合结构域、23个氨基酸的单次疏水性跨膜结构域和542个氨基酸的高度保守性胞质酪氨酸激酶结构域组成。蛋白质是N-糖基化的(Prigent等,1994)。

[0106] 此家族中的所有蛋白质是酪氨酸激酶。与配体的相互作用导致受体二聚化,这增大了酪氨酸激酶的催化作用(Bernard.1995,Chantry 1995)。所述家族内的蛋白质能够同二聚或异二聚,这对其活性是重要的。EGFr传达生长促进作用并且刺激细胞对葡萄糖和氨基酸的摄取(Prigent等1992)。HER-2也传达生长促进信号。

[0107] 表皮生长因子受体以低量表达在正常组织上,但是其过表达于许多类型的癌症中。EGFr过表达于乳腺癌(Earp等,1993,Eppenberger 1994)、神经胶质瘤(Schlegel等,1994)、胃癌(Tkunaga等,1995)、皮肤鳞状细胞癌(Fujii 1995)、卵巢癌(van Dam等,1994)以及其他中。HER-2也以低量表达在少数正常人组织上、最典型是在分泌上皮细胞上。HER-2在约30%的乳腺癌、胃癌、胰腺癌、膀胱癌和卵巢癌中发生过表达。

[0108] 这些受体的表达取决于肿瘤的分化程度和癌症类型而不同,例如在乳腺癌中,原发性肿瘤过表达两种受体;而在胃癌中,过表达在转移性肿瘤的后期发生(Salomon等,1995)。对从患者分离的若干头颈癌、外阴癌、乳腺癌和卵巢癌细胞系,癌细胞上的过表达的受体的数目大于 10^6 /细胞,(Dean等,1994)。

[0109] 受体的EGFr家族之所以构成用于肿瘤免疫疗法的合适靶标存在若干原因。第一,其过表达于许多类型的癌症中,从而可能将免疫应答导向肿瘤。第二,肿瘤常常表达或过表达针对此家族受体的配体并且一些受体对由所述配体介导的增殖作用是超敏感的。第三,

具有过表达生长因子受体的肿瘤的患者常常具有不良预后。过表达特别是在乳腺癌、肺癌和膀胱癌中与不良预后紧密联系并且可与浸润/转移性表型相关联,所述表型对常规疗法是相当不敏感的(Eccles等,1994)。

[0110] 可预期的是,编码肿瘤抗原(或肿瘤相关抗原)的核酸可操作地连接至表达控制序列。可操作地连接至编码序列的表达控制序列经过连接使得在与表达控制序列相容的条件下完成编码序列的表达。表达控制序列包括但不限于适当的启动子、增强子、转录终止子、在蛋白质编码开放阅读框的开始处的起始密码子、内含子剪接信号和同框终止密码子。合适的启动子包括但不限于SV40早期启动子、RSV启动子、逆转录病毒LTR、腺病毒主要晚期启动子、人CMV立即早期I启动子,以及各种痘病毒启动子,所述痘病毒启动子包括但不限于以下的牛痘病毒或MVA源的启动子:ATI启动子、30K启动子、I3启动子、PrS启动子、Pr7.5K、40K启动子、PrSynII启动子、PrLE1启动子和PrSSL启动子(如PCT申请PCT/EP2009/008459中所述)。

[0111] 另外的表达控制序列包括但不限于前导序列、终止密码子、聚腺苷酸化信号和所需宿主系统中编码所需重组蛋白(例如,HER-2、PSA、PAP、CEA或MUC-1)的核酸序列的适当转录和随后的翻译所需的任何其他序列。痘病毒载体还可含有所需宿主系统中含有核酸序列的表达载体的转移和随后的复制所需的另外的元件。本领域的技术人员应当进一步理解,所述载体易于使用常规方法构建(Ausubel等,(1987)“Current Protocols in Molecular Biology,” John Wiley and Sons, New York, N.Y.)并且可商购获得。

[0112] 经修饰的肿瘤相关抗原

[0113] 在某些实施方案中,细胞相关多肽抗原被修饰使得当其与APC表面上的MHC I类分子缔合而递呈时,针对在其表面上递呈源自多肽抗原的表位的细胞的CTL应答得以诱导。在某些所述实施方案中,当递呈时,至少一种第一外来 T_H 表位与APC表面上的MHC II类分子缔合。在某些所述实施方案中,细胞相关抗原为肿瘤相关抗原(TAA)。

[0114] 示例性的能够递呈表位的APC包括树突细胞和巨噬细胞。另外的示例性APC包括任何胞饮或吞噬APC,其能够同时递呈1)结合MHC I类分子的CTL表位和2)结合MHC II类分子的 T_H 表位。

[0115] 在某些实施方案中,对本文所提供的肿瘤相关抗原(TAA)(诸如但不限于CEA、MUC-1、PAP、PSA、HER2)中的一种或多种进行修饰,使得施用给受试者之后,引发出主要与本文所述的TAA中的一种或多种反应的多克隆抗体。所述抗体可攻击并消除肿瘤细胞并且预防转移性细胞发展成转移。所述抗肿瘤效应的效应子机制将通过补体和抗体依赖性细胞的细胞毒性介导。此外,所诱导的抗体还可通过抑制受体的生长因子依赖性寡-二聚化和内化来抑制癌细胞生长。在某些实施方案中,所述经修饰的多肽抗原可诱导针对已知和/或预测的、由肿瘤细胞展示的TAA表位的CTL应答。

[0116] 在某些实施方案中,经修饰的TAA多肽抗原包含细胞相关多肽抗原的CTL表位和变型,其中所述变型包含外来 T_H 表位的至少一种CTL表位。在一个非限制性实例中,某些所述经修饰的TAA可包括包含至少一种CTL表位的一种或多种经修饰的HER-2多肽抗原和包含外来 T_H 表位的至少一种CTL表位的变型。其产生方法描述于美国专利号7,005,498和美国专利公布号2004/0141958和2006/0008465中。

[0117] 在某些实施方案中,外来表位 T_H 是天然存在的“混杂”T细胞表位。所述混杂T细胞

表位在动物物种或动物群体的较大比例的个体中是有活性的。在某些实施方案中,疫苗包含所述混杂T细胞表位。在某些所述实施方案中,混杂T细胞表位的使用降低对同一疫苗中有很大大数的不同CTL表位的需要。示例性混杂T细胞表位包括但不限于来自破伤风毒素(P2和P30表位(Panina-Bordignon等,1989))、白喉毒素、流感病毒血凝素(HA)和恶性疟原虫(*P.falciparum*)CS抗原的表位。

[0118] 另外的混杂T细胞表位包括能够结合较大比例的由不同HLA-DR编码的HLA-DR分子的肽。参见,例如W0 98/23635(Frazer IH等,assigned to The University of Queensland);Southwood S等,1998,*J.Immunol.*160:3363-3373;Sinigaglia F等,1988,*Nature* 336:778-780;Rammensee HG等,1995,*Immunogenetics* 41:417-228;Chicz RM等,1993,*J.Exp.Med* 178:27-47;Hammer J等,1993,*Cell* 74:197-203;以及Falk K等,1994,*Immunogenetics* 39:230-242。后一篇参考文献还涉及HLA-DQ和-DP配体。这些参考文献中所列出的所有表位作为如本文所述的候选天然表位是相关的,与这些共享共同基序的表位也是如此。

[0119] 在某些其他实施方案中,混杂T细胞表位是人工T细胞表位,其能够结合大比例的单倍型(haplotype)。在某些所述实施方案中,人工T细胞表位是泛DR表位肽("PADRE"),如W0 95/07707和相应的论文Alexander J等,1994,*Immunity* 1:751-761中所述。

[0120] mHER2

[0121] 各种经修饰的HER-2多肽抗原和其产生方法描述于美国专利号7,005,498和美国专利公布号2004/0141958和2006/0008465中,所述专利在此以引用的方式并入。所述文件描述了各种的经修饰的HER-2多肽抗原,所述抗原包含在HER-2多肽中的不同位置处的混杂T细胞表位。

[0122] 人HER-2序列仅基于蛋白质的一级结构就可划分为许多结构域。所述结构域如下所述。细胞外(受体)结构域自氨基酸1-654延伸并且含有如下所述的若干亚结构域:自氨基酸1-173延伸的结构域I(成熟多肽的N-端结构域);自氨基酸174-323延伸的结构域II(富含半胱氨酸的结构域,24个半胱氨酸残基);自氨基酸324-483延伸的结构域III(同源EGF受体中的配体结合结构域);以及自氨基酸484-623延伸的结构域IV(富含半胱氨酸的结构域,20个半胱氨酸残基)。跨膜残基自氨基酸654-675延伸。细胞内(激酶)结构域自氨基酸655-1235延伸并且含有酪氨酸激酶结构域,其自氨基酸655-1010延伸(核心TK结构域自725-992延伸);以及C-端结构域,其自氨基酸1011-1235延伸。

[0123] 由P2或P30人T辅助表位取代的HER-2的氨基酸序列中位点的选择描述于美国专利号7,005,498和美国专利公布号2004/0141958和2006/0008465中。总而言之,考虑了以下参数:

[0124] 1. 已知和预测的CTL表位;

[0125] 2. 与相关受体(尤其是EGFR)的同源性;

[0126] 3. 半胱氨酸残基的保守性;

[0127] 4. 预测的环、 α -螺旋和 β -折叠结构;

[0128] 5. 潜在的N-糖基化位点;

[0129] 6. 对暴露和包埋的氨基酸残基的预测;

[0130] 7. 结构域的结构组成。

[0131] CTL表位似乎簇集在结构域I、结构域III、TM结构域中,和TK结构域中的两个或三个“热点”中。如美国专利号7,005,498和美国专利公布号2004/0141958和2006/0008465中所述,这些应该大部分保留。

[0132] 与其他受体具有高度同源性的区域可能是对于HER-2的“总体”三级结构来说,并且因此对于抗体识别来说是结构上重要的,而具有低同源性的区域可能可被替换,结果是只造成结构的局部改变。

[0133] 半胱氨酸残基常常参与分子内二硫桥的形成,且由此包含在三级结构中并且不应发生改变。被预测形成 α -螺旋或 β -折叠结构的区域应当避免作为外来表位的插入点,因为认为这些区域参与蛋白质的折叠。

[0134] 如果需要蛋白质的甘露糖基化,则潜在的N-糖基化位点应当保留。

[0135] 预测处于分子内部的区域(根据它们的疏水特性)应当保留,因为这些区域可能参与折叠。相反,溶剂暴露的区域可作为插入 T_H 表位P2和P30模型的候选位置。

[0136] 最后,也应考虑到蛋白质结构域的结构组成,因为它与蛋白质结构和功能相关。

[0137] 如美国专利号7,005,498和美国专利公布号2004/0141958和2006/0008465中所述,策略已经集中于尽可能地保留HER-2的细胞外部分的结构,因为这是蛋白质作为中和抗体的靶标的相关部分。相反,癌细胞表面上的天然膜结合HER-2的细胞内部分是不能进入体液免疫系统的。

[0138] 使用破伤风毒素的插入在HER-2的各种结构域中的P2和P30表位的各种示例性构建体提供于美国专利号7,005,498和美国专利公布号2004/0141958和2006/0008465中。一种示例性经修饰的HER-2多肽抗原(称之为“mHER2”)包含细胞外结构域和九个氨基酸的跨膜结构域;P2表位,其插入在结构域II中于经修饰的HER-2多肽的氨基酸残基273至287之间;以及P30表位,其插入在结构域IV中于经修饰的HER-2多肽的氨基酸残基655至675之间。

[0139] 重组的MVA-BN-mHER2

[0140] 在非限制性实施方案中,如下构建包含肿瘤相关抗原的重组MVA(例如MVA-BN-mHER2)。初始的病毒原种是使用允许复制的细胞类型(例如CEF细胞)在细胞培养物中通过重组产生的。将细胞既用减毒的牛痘病毒(例如MVA-BN)接种,又用编码肿瘤相关抗原(例如mHER2)序列和病毒基因组侧翼(flanking)区的重组质粒(例如PBN279)转染。在一个非限制性实施方案中,质粒pBN279含有也在MVA-BN中存在的序列(ORF 64和65、IGR 64/65之间的侧翼基因间隔区)。将mHER2序列插入在MVA-BN序列之间,以允许重组入MVA-BN病毒基因组中。在某些实施方案中,质粒还含有包含一种或多种选择基因的选择盒,以允许在CEF细胞中选择重组构建体。在优选的实施方案中,重组MVA编码包含SEQ ID NO:2的多肽。

[0141] 同时感染和转染培养物允许在病毒基因组和重组质粒之间发生同源重组。然后分离携带插入物的病毒、对其表征,并制备病毒原种。在某些实施方案中,在没有选择的情况下将病毒在CEF细胞培养物中传代,以使得编码选择基因GPT和mRFP1的区域丢失。

[0142] PD-1和LAG-3的拮抗剂

[0143] 在某些实施方案中,本发明涵盖PD-1和LAG-3的拮抗剂。PD-1和LAG-3的拮抗剂分别干扰PD-1和LAG-3。

[0144] 所述拮抗剂包括:特异性结合PD-1或LAG-3并且抑制PD-1或LAG-3生物活性的抗体;干扰PD-1或LAG-3表达的反义核酸RNA;干扰PD-1、LAG-3表达的小干扰RNA;PD-1或LAG-3

的小分子抑制剂。

[0145] 可通过多种本领域已知和/或本申请内公开的技术针对功能来筛选PD-1或LAG-3的候选拮抗剂,所述功能为诸如在体外或小鼠模型中干扰由PD-1或LAG-3功能产生的抑制的能力。

[0146] ICOS的激动剂

[0147] 本发明还涵盖ICOS的激动剂。ICOS的激动剂活化ICOS。在一个实施方案中,激动剂是ICOS-L,即ICOS天然配体。激动剂可以是ICOS-L的保留结合和活化特性的突变形式。可在体外针对刺激ICOS的活性来筛选ICOS-L的突变形式。

[0148] 优选地,ICOS的激动剂是抗体。

[0149] 抗体

[0150] 在一个实施方案中,PD-1或LAG-3的拮抗剂或ICOS的激动剂是抗体。抗体可以是合成的、单克隆的或多克隆的,并且可通过本领域熟知的技术来制得。所述抗体通过抗体的抗原结合位点特异性地结合PD-1、LAG-3或ICOS(与非特异性结合相反)。可采用PD-1、LAG-3或ICOS多肽、片段、变体、融合蛋白等作为产生与其发生免疫反应的抗体的免疫原。更具体地,多肽、片段、变体、融合蛋白等含有引起抗体的形成的抗原决定簇或表位。

[0151] 所述抗原决定簇或表位可以是线性的或是具有构象的(不连续的)。线性表位由多肽的单个氨基酸段组成,而具有构象或不连续的表位由来自多肽链的不同区域的氨基酸段组成,所述氨基酸段在蛋白质折叠后紧密接近(C.A. Janeway, Jr. 和P. Travers, *Immuno Biology* 3:9(Garland Publishing Inc., 第二版1996))。因为折叠的蛋白质具有复杂的表面,所以可利用的表位数目的是相当多的;然而,由于蛋白质的构象和空间位阻,实际上结合表位的抗体数目小于可利用的表位数(C.A. Janeway, Jr. 和P. Travers, *Immuno Biology* 2:14(Garland Publishing Inc., 第2版1996))。可通过本领域已知的任何方法来鉴别表位。

[0152] 本发明涵盖了特异性结合PD-1、LAG-3或ICOS并且阻断其功能(“拮抗剂抗体”)或活化其功能(激动剂抗体)的抗体(包括scFV片段)。可通过常规手段生成此类抗体。

[0153] 本发明涵盖针对PD-1、LAG-3或ICOS的、阻断其功能(“拮抗剂抗体”)或活化其功能(激动剂抗体)的单克隆抗体。针对PD-1、LAG-3和ICOS的示例性阻断性单克隆抗体描述于WO 2012/131004和WO 2011/041613中,所述专利在此以引用的方式并入。

[0154] 抗体能够以高亲和力和特异性结合其靶标。它们是相对较大的分子(约150kDa),当抗体结合位点落入蛋白质-蛋白质相互作用位点的近端时,其可在空间上抑制两种蛋白质(例如PD-1、LAG-3或ICOS与其靶标配体)的相互作用。本发明还涵盖结合紧密接近PD-1、LAG-3或ICOS配体结合位点内的表位的抗体。

[0155] 在各个实施方案中,本发明涵盖干扰分子间相互作用(例如蛋白质-蛋白质相互作用)的抗体,以及扰乱分子内相互作用(例如分子内的构象变化)。可针对阻断PD-1或LAG-3的生物活性、或PD-1或LAG-3与配体的结合的能力、和/或针对其他特性来筛选抗体。还可针对活化ICOS的生物活性的能力来筛选激动剂抗体。

[0156] 多克隆抗体和单克隆抗体均可通过常规技术来制备。

[0157] 可利用PD-1、LAG-3和ICOS和基于PD-1、LAG-3和ICOS的氨基酸序列的肽来制备特异性结合PD-1、LAG-3或ICOS的抗体。术语“抗体”意指包括多克隆抗体、单克隆抗体、其片段

(诸如F(ab')₂和Fab片段、单链可变片段(scFv)、单结构域抗体片段(VHH或纳米抗体)、二价抗体片段(双体(diabodies))、以及任何重组和合成产生的结合配偶体。

[0158] 如果抗体以大于或等于约 10^7M^{-1} 的 K_a 结合PD-1、LAG-3或ICOS多肽,则定义其为特异性结合的。可使用常规技术(例如,由Scatchard, Ann. N. Y. Acad. Sci., 51:660(1949)所述的那些)来容易地测定结合配偶体或抗体的亲和力。

[0159] 可使用本领域熟知的程序由多种来源(例如马、牛、山羊、绵羊、狗、鸡、兔、小鼠或大鼠)容易地生成多克隆抗体。一般来说,通常通过肠胃外注射将适当缀合的纯化的PD-1、LAG-3或ICOS或基于PD-1、LAG-3或ICOS的氨基酸序列的肽施用给宿主动物。可通过使用佐剂例如弗氏完全佐剂或不完全佐剂来增强PD-1、LAG-3或ICOS的免疫原性。加强免疫进行之后,收集小的血清样本并且测试其与PD-1、LAG-3或ICOS多肽的反应性。用于所述测定的各种测定的实例包括:Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow and Lane(编), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988中所述的那些;以及下述程序,诸如逆流免疫电泳(CIEP)、放射免疫测定、放射免疫沉淀、酶联免疫吸附测定(ELISA)、斑点印迹测定和夹心测定。参见,美国专利号4,376,110和4,486,530。

[0160] 可使用熟知的程序容易地制备单克隆抗体。参见,例如美国专利号RE 32,011、4,902,614、4,543,439和4,411,993; Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses, Plenum Press, Kennett, McKeam和Bechtol(编), 1980中所述的程序。

[0161] 例如,可以约3周为间隔、任选地在佐剂存在下用分离的和纯化的PD-1、LAG-3或ICOS或缀合的PD-1、LAG-3或ICOS肽对宿主动物(诸如小鼠)腹膜内注射至少一次、并优选至少两次。然后通过常规的斑点印迹技术或抗体捕获法(ABC)测定小鼠血清以确定哪只动物是最佳融合的。大约两至三周后,向小鼠给予PD-1、LAG-3或ICOS或缀合的PD-1、LAG-3或ICOS肽的静脉内加强。稍后将小鼠处死并且根据已建立的方案将脾细胞与可商购获得的骨髓瘤细胞(诸如Ag8.653(ATCC))融合。简而言之,将骨髓瘤细胞在培养基中洗涤若干次并且以约三个脾细胞:一个骨髓瘤细胞的比率融合至小鼠脾细胞。融合剂可以是本领域使用的任何合适试剂,例如聚乙二醇(PEG)。将融合物平铺到含有允许融合细胞选择性生长的培养基的板中。然后可使融合细胞生长大约八天。收集来自所得杂交瘤的上清液并且将其添加到首先涂布有山羊抗小鼠Ig的板。洗涤之后,将标记物诸如标记的PD-1、LAG-3或ICOS添加到每个孔,然后进行温育。随后可检测阳性孔。可使阳性克隆在大量培养物中生长并且随后经蛋白质A柱(Pharmacia)纯化上清液。

[0162] 本发明的单克隆抗体可使用替代性技术来产生,所述替代性技术为诸如由Alting-Mees等, "Monoclonal Antibody Expression Libraries: A Rapid Alternative to Hybridomas", Strategies in Molecular Biology 3:1-9(1990)中所述的那些,所述文献以引用的方式并入本文。类似地,可使用重组DNA技术来并入编码特异性结合抗体的基因的可变区来构建结合配偶体。所述技术描述于Larrick等, Biotechnology, 7:394(1989)中。

[0163] 本发明还涵盖了所述抗体的抗原结合片段,其可通过常规技术来产生。所述片段的实例包括但不限于Fab和F(ab')₂片段。还提供了通过基因工程技术产生的抗体片段和衍生物。

[0164] 本发明的单克隆抗体包括嵌合抗体,例如鼠单克隆抗体的人源化形式。所述人源

化抗体可通过已知技术制备,并且在将抗体施用给人时,提供降低免疫原性的优点。在一个实施方案中,人源化单克隆抗体包含鼠抗体的可变区(或仅其抗原结合位点)和源自人抗体的恒定区。可替代地,人源化抗体片段可包含鼠单克隆抗体的抗原结合位点和源自人抗体的可变区片段(缺少抗原结合位点)。用于产生嵌合的和进一步工程化改造的单克隆抗体的程序包括Riechmann等(Nature 332:323,1988)、Liu等(PNAS 84:3439,1987)、Larrick等(Bio/Technology 7:934,1989)、和Winter和Harris(TIPS 14:139,May,1993)中所述的那些。以转基因方式产生抗体的程序可见于GB 2,272,440、美国专利号5,569,825和5,545,806中。

[0165] 可使用通过基因工程方法产生的抗体,诸如可使用标准重组DNA技术制得的嵌合和人源化单克隆抗体(包含人和非人部分)。所述嵌合和人源化单克隆抗体可使用本领域已知的标准DNA技术,例如使用以下文献中所述的方法通过基因工程产生:Robinson等国际公布号W0 87/02671;Akira等欧洲专利申请0184187;Taniguchi,M.,欧洲专利申请0171496;Morrison等欧洲专利申请0173494;Neuberger等PCT国际公布号W0 86/01533;Cabilly等美国专利号4,816,567;Cabilly等欧洲专利申请0125023;Better等,Science 240:1041 1043,1988;Liu等,PNAS 84:3439 3443,1987;Liu等,J.Immunol.139:3521 3526,1987;Sun等PNAS 84:214 218,1987;Nishimura等,Canc.Res.47:999 1005,1987;Wood等,Nature 314:446 449,1985;和Shaw等,J.Natl.Cancer Inst.80:1553 1559,1988);Morrison,S.L.,Science 229:1202 1207,1985;Oi等,BioTechniques 4:214,1986;Winter美国专利号5,225,539;Jones等,Nature 321:552 525,1986;Verhoeyan等,Science 239:1534,1988以及Beidler等,J.Immunol.141:4053 4060,1988。

[0166] 关于合成和半合成抗体,所述术语旨在覆盖但不限于抗体片段、同种型转换抗体、人源化抗体(例如,小鼠-人、人-小鼠)、杂合体、具有多种特异性的抗体,以及完全合成的抗体样分子。

[0167] 对于治疗性应用,常常优选具有人恒定域和可变域的“人”单克隆抗体,以便使患者针对抗体的免疫应答最小化。可通过免疫含有人免疫球蛋白基因的转基因动物来生成所述抗体。参见Jakobovits等Ann NY Acad Sci 764:525-535(1995)。

[0168] 还可通过使用由源自受试者的淋巴细胞的mRNA制备的免疫球蛋白轻链和重链cDNA来构建组合免疫球蛋白文库(诸如Fab噬菌体展示文库或scFv噬菌体展示文库)来制备针对PD-1、LAG-3或ICOS多肽的人单克隆抗体。参见,例如McCafferty等PCT公布W0 92/01047;Marks等(1991)J.Mol.Biol.222:581 597;以及Griffiths等(1993)EMBO J 12:725 734。此外,可通过使已知的人抗体突变来产生抗体可变区的组合文库。例如,可通过例如使用随机改变、诱变的寡核苷酸来使已知结合PD-1、LAG-3或ICOS的人抗体的可变区突变,以便产生然后可被筛选来结合PD-1、LAG-3或ICOS的突变可变区的文库。在免疫球蛋白重链和/或轻链的CDR区内诱导随机突变的方法、使随机化的重链和轻链杂交形成配对的方法以及筛选方法可见于例如Barbas等PCT公布W0 96/07754;Barbas等(1992)Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 89:4457 4461中。

[0169] 可通过优选源自丝状噬菌体的展示包装群体来表达免疫球蛋白文库,以便形成抗体展示文库。特别适合用于产生抗体展示文库的方法和试剂的实例可见于以下文献中:例如Ladner等美国专利号5,223,409;Kang等PCT公布W0 92/18619;Dower等PCT公布W0 91/

17271;Winter等PCT公布WO 92/20791;Markland等PCT公布WO 92/15679;Breitling等PCT公布WO 93/01288;McCafferty等PCT公布WO 92/01047;Garrard等PCT公布WO 92/09690;Ladner等PCT公布WO 90/02809;Fuchs等(1991)Bio/Technology 9:1370 1372;Hay等(1992)Hum Antibod Hybridomas 3:81 85;Huse等(1989)Science 246:1275 1281;Griffths等(1993)同上;Hawkins等(1992)J Mol Biol 226:889 896;Clackson等(1991)Nature 352:624 628;Gram等(1992)PNAS 89:3576 3580;Garrad等(1991)Bio/Technology 9:1373 1377;Hoogenboom等(1991)Nuc Acid Res 19:4133 4137;以及Barbas等(1991)PNAS 88:7978 7982。一旦抗体文库在展示包装(例如,丝状噬菌体)的表面上展示,就对其进行筛选以鉴定并分离表达结合PD-1、LAG-3或ICOS多肽的抗体的包装。在优选的实施方案中,文库的初级筛选涉及用固定的PD-1、LAG-3或ICOS多肽的淘选并且对表达结合固定的PD-1、LAG-3或ICOS多肽的抗体的展示包装进行选择。

[0170] 使用表达肿瘤抗原的重组正痘病毒与PD-1、LAG-3和ICOS的激动剂/拮抗剂的示例性组合疗法

[0171] 在至少一个方面,本发明涵盖采用各自包含编码肿瘤抗原的核酸的重组正痘病毒和/或禽痘病毒与根据本发明的一种或多种抗体、激动剂或拮抗剂的组合的治疗方法。

[0172] 在一个示例性实施方案中,患有由过表达肿瘤相关抗原HER-2的细胞介导的癌症(例如乳腺癌)的患者可通过下述的组合来治疗:1)编码HER-2抗原的一种或多种重组正痘病毒,例如牛痘病毒(例如Wyeth或MVA)或2)编码HER-2抗原的重组正痘病毒和重组禽痘病毒(例如鸡痘病毒POXVAC-TC)的组合;其中组合1)或2)与根据本发明的一种或多种抗体、激动剂和/或拮抗剂一起施用。在优选的实施方案中,MVA是MVA-BN。在特别优选的实施方案中,MVA编码包含SEQ ID NO:2的多肽。

[0173] 在另外的示例性实施方案中,患有前列腺癌的患者可通过编码PSA和/或PAP抗原的重组正痘病毒(例如牛痘病毒(例如,Wyeth或MVA))和重组禽痘病毒(例如鸡痘病毒POXVAC-TC)与根据本发明的一种或多种抗体、激动剂或拮抗剂的组合来治疗。在特别优选的实施方案中,重组牛痘病毒和鸡痘病毒的组合是PROSTVAC[®](牛痘病毒和鸡痘病毒,各自表达PSA和TRICOM)并且与根据本发明的一种或多种抗体、激动剂或拮抗剂一起来施用。

[0174] 在再一另外的实施方案中,患有由过表达肿瘤相关抗原CEA和/或MUC-1的细胞介导的癌症的患者可通过各自编码CEA和MUC-1抗原的重组正痘病毒(例如牛痘病毒(例如,Wyeth、MVA或MVA-BN))和重组禽痘病毒(例如鸡痘病毒POXVAC-TC)与根据本发明的一种或多种抗体、激动剂或拮抗剂的组合来治疗。由过表达CEA和MUC-1的细胞介导的癌症的一些非限制性实例包括但不限于乳腺癌、结直肠癌、肺癌、胃癌、胰腺癌、膀胱癌和卵巢癌。在一个或更多个优选实施方案中,组合疗法包括CV301(牛痘病毒和鸡痘病毒,各自表达CEA、MUC-1和TRICOM)。在另一个优选实施方案中,组合疗法包括MVA/鸡痘-CV301即异源初免-加强,所述异源初免-加强包含MVA(或MVA-BN)和鸡痘(各自表达CEA、MUC-1和TRICOM)。

[0175] 在又一个实施方案中,患有由过表达肿瘤相关抗原CEA和/或MUC-1的细胞介导的癌症的患者可通过编码CEA和/或MUC-1抗原的异源初免-加强与根据本发明的一种或多种抗体、激动剂或拮抗剂的组合来治疗。可预期的是,两种或更多种重组正痘病毒可以是牛痘病毒(例如,Wyeth、MVA或MVA-BN)。由过表达CEA和MUC-1的细胞介导的癌症的一些非限制性

实例包括但不限于乳腺癌、结直肠癌、肺癌、胃癌、胰腺癌、膀胱癌和卵巢癌。在一个或多个优选实施方案中,治疗可以是MVA-CV301,其包含作为同源初免-加强进行施用的两种或更多种MVA(或MVA-BN)病毒(各自表达CEA、MUC-1和TRICOM)。

[0176] 重组正痘病毒和/或禽痘病毒可以全身或局部施用,即通过肠胃外、皮下、静脉内、肌内、鼻内、皮内、划痕法、或本领域技术人员已知的任何其他施用途径来施用。优选地,施用通过划痕法进行。更优选地,施用通过皮下或肌内进行。在一个实施方案中,向患者施用 10^5 - 10^{10} TCID₅₀的重组正痘病毒和/或禽痘病毒。优选地,向患者施用 10^7 - 10^{10} TCID₅₀的重组正痘病毒和/或禽痘病毒。更优选地,向患者施用 10^8 - 10^{10} TCID₅₀的重组正痘病毒和/或禽痘病毒。最优选地,向患者施用 10^8 - 10^9 TCID₅₀的重组正痘病毒和/或禽痘病毒。

[0177] 用以上所定义的重组正痘病毒和/或禽痘病毒的单次施用来诱导免疫应答是可能的。还可将根据本发明的正痘病毒和/或禽痘病毒用于第一次疫苗接种并且通过施用与第一次疫苗接种中使用的重组正痘病毒和/或禽痘病毒相同或相关的重组正痘病毒和/或禽痘病毒来加强第一次疫苗接种中生成的免疫应答。还可将根据本发明的重组正痘病毒和/或禽痘病毒用于异源初免-加强方案中,其中使用如上所定义的正痘病毒来进行一次或多次初免疫苗接种并且其中用另一种类型的疫苗(例如如本文所定义的禽痘疫苗或另一病毒疫苗、蛋白质或核酸疫苗)进行一次或多次加强的疫苗接种。

[0178] 癌症优选地包括但不限于乳腺癌、结直肠癌、肺癌、胃癌、胰腺癌、膀胱癌、前列腺癌和卵巢癌。

[0179] 癌症患者可以是任何哺乳动物,包括小鼠或大鼠。优选地,癌症患者是灵长类动物,更优选是人。

[0180] 在一个实施方案中,根据本发明的一种或多种抗体、激动剂或拮抗剂和编码组成肿瘤抗原的多肽的正痘病毒同时施用。组合治疗优于每一种单独治疗。

[0181] 在优选的实施方案中,在激动剂和/或拮抗剂施用的1、2、3、4、5、6或7天内施用正痘病毒。可在激动剂和/或拮抗剂之前或之后施用正痘病毒。

[0182] 向患者施用的激动剂或拮抗剂的剂量通常是0.1mg/kg患者体重至约100mg/kg患者体重。优选地,向患者施用的剂量为在0.1mg/kg患者体重与20mg/kg患者体重之间、更优选1mg/kg患者体重至10mg/kg患者体重、最优选3mg/kg患者体重至10mg/kg患者体重。通常来说,由于对外来多肽的免疫应答,人和人源化抗体在人体内具有比来自其他物种的抗体更长的半衰期。因此,较低剂量的人抗体和较低频率的施用常常是可能的。

[0183] 有效疗法所需的活性分量将取决于许多不同因素,包括施用手段、靶标位点、患者的生理状态和施用的其他药剂。因此,应当滴定治疗剂量以使安全性和功效最优化。通常,体外使用的剂量可为活性成分原位施用的使用量提供有用的指导。特定疾病的治疗有效剂量的动物实验将进一步提供人用剂量的预测指示。各种考虑描述于例如Goodman and Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics,第7版(1985),MacMillan Publishing Company,New York;和Remington's Pharmaceutical Sciences第18版,(1990)Mack Publishing Co,Easton Pa中。这些文献讨论了施用方法,包括口服、静脉内、腹膜内、肌内、经皮、鼻内、离子电渗施用等。

[0184] 本发明的组合物可取决于施用方法以多种单位剂型施用。例如,适用于口服施用的单位剂型包括固体剂型诸如粉末、片剂、丸剂、胶囊和糖衣丸,和液体剂型诸如酞剂、糖浆

剂和混悬剂。活性成分还可以无菌液体剂型进行肠胃外施用。明胶胶囊含有活性成分和作为非活性成分的粉末载体,诸如葡萄糖、乳糖、蔗糖、甘露糖、淀粉、纤维素或纤维素衍生物、硬脂酸镁、硬脂酸、糖精钠、滑石粉、碳酸镁等。可添加来提供所需颜色、口味、稳定性、缓冲能力、分散性或其他已知所述特征的另外的非活性成分的实例是红氧化铁、硅胶、月桂基硫酸钠、二氧化钛、可食用白色墨等。可使用类似的稀释剂来制备压制片剂。片剂和胶囊都可制备成缓释产品以便在数小时内提供药物的连续释放。压制片剂可进行糖包衣或薄膜包衣以掩蔽任何不愉快的味道并使片剂避免接触空气,或者可进行肠溶包衣以便在胃肠道中选择性崩解。用于口服施用的液体剂型可含有着色剂和调味剂以增加患者接受度。

[0185] 本发明的组合物在药物制剂中的浓度可以广泛变化,即从小于约0.1重量%,通常在或至少约2重量%至多达约20重量%至50重量%或更多,并且将根据所选择的具体施用方式主要通过流体体积、粘度等来选择。

[0186] 对于固体组合物,可使用常规的无毒固体载体,所述载体包括,例如,药物级的甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、滑石粉、纤维素、葡萄糖、蔗糖、碳酸镁等。对于口服施用,药学上可接受的无毒组合物是通过将任一正常采用的赋形剂(诸如先前所列出的那些载体)和大体上10-95%、且更优选25%-75%浓度的活性成分(即,一种或多种本发明组合物)掺合形成的。

[0187] 对于气溶胶施用,本发明的组合物优选以微细分形式、与表面活性剂和推进剂一起供给。本发明的组合物的优选百分比为0.01重量%-20重量%,优选1-10%。当然,表面活性剂必须是无毒的并且优选可溶于推进剂中。所述试剂的代表形式是含有6至22个碳原子的脂肪酸(诸如己酸(caproic)、辛酸、月桂酸、棕榈酸、硬脂酸、亚油酸、亚麻酸、油硬脂酸(olestERIC)和油酸)与脂族多元醇或其环酐的酯或部分酯。可采用诸如混合的或天然甘油酯的混合酯。表面活性剂可占组合物重量的0.1%-20%,优选0.25-5%。组合物的余量通常是推进剂。如果需要,还可包含载体,例如用于鼻内递送的卵磷脂。

[0188] 另外本发明的构建体可于储存型系统、胶囊化形式或移植物中通过本领域熟知的技术递送。类似地,可通过泵向目的组织递送构建体。

[0189] 任何前述制剂都可适于根据本发明的治疗和疗法,前提是制剂中的活性剂不因配制而失活且制剂是生理相容的。

[0190] 治疗性组合物和用途

[0191] 本发明还涉及根据本发明的正痘病毒和禽痘病毒用于制备能够诱导针对肿瘤表位的免疫反应或有利于所述免疫反应的发生或改善的治疗性组合物或疫苗的用途。因此,本发明提供了用作药剂或疫苗的病毒或载体。

[0192] 因此,本发明涉及一种免疫原性组合物,其包含与根据本发明的一种或多种抗体、激动剂或拮抗剂组合的根据本发明的重组正痘病毒载体(诸如牛痘、MVA或MVA-BN)和/或重组禽痘病毒载体。

[0193] 因此,根据本发明的重组正痘病毒载体和重组禽痘病毒载体可用于制备用于治疗癌症的治疗性组合物或药剂。

[0194] 本发明涵盖用于预防性和/或治疗性疫苗接种方案中的组合物,所述组合物用于治疗肿瘤,并且特别是用作抗癌治疗。

[0195] 在一个实施方案中,本发明涵盖用于向癌症患者施用或治疗所述癌症患者的组合

物,所述癌症患者是诸如但不限于前列腺癌患者、乳腺癌患者、结直肠癌患者、肺癌患者、胃癌患者、胰腺癌患者、膀胱癌患者或卵巢癌患者。

[0196] 在一个或多个优选实施方案中,本发明涵盖用于向癌症患者(特别是乳腺癌患者或前列腺癌患者)施用或治疗所述癌症患者的组合物的用途。

[0197] 在一个实施方案中,用于同时施用或依序施用的组合物包含根据本发明的MVA载体和根据本发明的一种或多种抗体、激动剂或拮抗剂。

[0198] 本文所述的组合物和方法另外或替代地可包含一种或多种免疫刺激性/调节分子。可使用任何合适的免疫刺激性/调节分子,诸如白介素(IL)-2、IL-4、IL-6、IL-12、IL-15、IL-15/IL-15Ra、IL-15/IL-15Ra-Fc、干扰素(IFN)- γ 、肿瘤坏死因子(TNF)- α 、B7.1、B7.2、ICAM-1、ICAM-2、LFA-1、LFA-2、LFA-3、CD70、CD-72、RANTES、G-CSF、GM-CSF、OX-40L、41BBL、抗CTLA-4、IDO抑制剂、抗PDL1、抗PD1及其组合。优选地,组合物包含B7.1、ICAM-1和LFA-3(也称之为TRICOM)的组合。一种或多种免疫刺激性/调节分子可以包含编码一种或多种免疫刺激性/调节分子的核酸的载体(例如,重组病毒载体,诸如痘病毒载体)的形式来施用。例如,一种或多种免疫刺激性/调节分子(例如,IL-12)可以伴有或不伴有壳聚糖的DNA质粒的形式来施用。

[0199] 在更优选的实施方案中,除包含至少一种肿瘤抗原之外,重组正痘病毒和/或重组禽痘病毒包含编码B7.1、ICAM-1和/或LFA-3(也称之为TRICOM)的组合的一种或多种核酸。

实施例

[0200] 实施例1

[0201] MVA-BN-mHER2的构建

[0202] 同时感染和转染培养物允许在病毒基因组和重组质粒之间发生同源重组。分离携带插入物的病毒、对其表征,并制备病毒原种。

[0203] 质粒pBN279含有也在MVA-BN中存在的序列(ORF 64和65、IGR 64/65之间的基因间隔区)。将mHER2序列插在MVA-BN序列之间,以允许重组进入MVA-BN病毒基因组中。因此,质粒经过构建而含有痘病毒启动子(特别是合成的牛痘病毒启动子(PrS))下游的mHER2序列。质粒还含有包含抗药性基因(黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶;EcoGPT)上游的PrS启动子和单体红色荧光蛋白1(mRFP1)上游的PrS启动子的选择盒。

[0204] 通过添加编码p2和p30的破伤风毒素表位的核苷酸序列来修饰HER-2序列以增加针对所述序列(mHER2)的免疫应答。将mHER2插入MVA-BN基因组中并将选择盒移除之后,病毒“插入区”具有以下结构(与周围的病毒阅读框相比以相反方向显示):

[0205] PrS启动子-mHER2序列。插入区由如在细菌重组质粒pBN279中的MVA-BN因间隔区序列64/65(侧翼1(64)和侧翼2(65))侧接。下面示出了构建体的核苷酸序列。

```

1      AAAAAAATAK TAATTAACCA ATCCACCC CAACAACCG TATTATTGGY TGATGTAAT GTTTTCTGKY
71     CACTTAGAAE AGATTTAACA ATTTTATAA AGTTGTGCA ATCATTTTC GGAGAGCCCA TAATAAGACC
141    AATATAACG GGTACCACT ATTCATTTA TACATTGAAT ATGGGTTTT CTTAAACCT ATTTTCATCA
211    TATTCATCAT CAATATCAAC AGTCCCGCA TTAGAGGCA GAATCTTTC TACATTTTCA GTCAATGATA

281     GAGGTTCAT ATGTCCAGG AGTCCGATA GGTAGGCA CAGTTCTCA TCAATATTA ATTTCTGAG
351    YGGGAAATTA ATTTTGTGT CGTTTCCGA TCTATAGAG AGAAAGGCG TGAAATTTTC CTTGGCCAAI
421    GGTGTTCG TTTTACTGAG GGATTCGAT TACCTTCTA TGATATGAG ATCCAGATTA TTCGAGGCG
491    AATCATATTC TACCAAGGAT CGTTTAAAT TTTAAAGAA GGTAAATTA TCTTAAATTA TTTCTTCTT
561    AAATATTTTC AGCAAGGAC TATCCAGCA ATTTGGAATG CGTTCTTGT CTTAAATTTT TGAAATAGG
631    CTTCTTAA CTTCTATAA CATATATTA ATTTGGAATTA CGTTTAAATTA TAAATATTA CTATCTTTC
701    TATTTGTTT AGATTTATTT TTTAAATTT TAGTCTCTG TCTTAACTA ATTAAGGTTG AGTCTATTT
771    ACTAATAA CTTCTAGTAA CTTTTAAATTA ATTAAGGAA CAATTAATTT ATTAAGGTTG ATTTAGGTTA
841    ACTTATTTCA TACTTTTTC ATTTGTTTAA CTAATATTT TCTTATCTC TATAAGGTTG ATCCAGGTTT
911    ATAGAGATTC GGTAAATTA ATTTTAAATTA ATTTGGAATTA AGTTCTTCT TCTTAAATTT TACTTAAAT
981    TAATTTAA TAATTTTTC TTTAAATTT ATTTGGAATTA ATTTGGAATTA ATTTGGAATTT ATTTGGAATTT
1051   EGGATTTCT CTTCTGCGG GGATCTTAA TTACTTGGT AGCAAGGTT ATTTGGAATTT GGATCTTAA
1121   ATTAAGTTG TAGTGGGCG CGCTTGGCG TCTGGGTTAT CGTAAAGCTT GGTGGGCGG ACTGTGTTG
1191   ATATCTGCA ATTTCCAGCA CATTTGGCTA GTGATCCCA CTTCTGTTAG ATCTTCTTAC AGAAATGCCAA
1261   CCACCCGAGA GACGATCTCC AGGTGGCTG CGCTCACCTT GGGCACGGCG AGCCAGAGC TCCAGGGTAA
1331   GTTGTTGAG GACGTCAGAG GGCTGGCTCT CTCTCGGCG GGGCAGCCCT TGTCACGAG GTCCACACAG
1401   GAGTGGGTTG AGTTGATGGG GCAAGGCTGG CATCGGCCCT CCTCATCTGG AACTTCTCAG ATGGGCGATG
1471   AGGAGAGGTC AGGTTTACA CCCTGGGGC AGCGGGCCAC GCAGAAGGGA GGTCTCTTAT AGTGGGCGCA
1541   GGCCACACAC TGGTCCGCT CGGTTCCAA ACAGGTCAT GAGCCATCT GGGGCTGACA CTCAGGTTG
1611   CACTCCAAAC AGTCTCTGG ATTCATATA CTCTCGGGA CGCCCTGCG TACTCGCCAT TCCACACGC
1681   ACTCTCTGG CGAAAGGAC TGGCTGCGAT TGACACACTG GGTGGGCCCT GGACCCGAG AGTGGCCCTG
1751   GGCCACACAC TGGTGGCAG CCAGGCCCTC GGCCACACAC TCTCTCTCTG GGCGTTTGG AGTGTGGAGC
1821   AGAGCTTGGT GGGGTTCCG AAAGAGCTGG TCCAGGGCA CGTGTGCA GAAGCAGAG TGGGTTTAT
1891   GGTGGATGAG GGCCAGTCCA CTGCCAGTAT CTCTGAGTGA GGCAGGCC TGCTCAGTGA TGCCAGGCC
1961   TTGCGAGGTC AGCGAGTAG CGCCATTTG CAGATTTCT CGCCGATTA CTTGCAGGTT CTGGAAAGC
2031   CTGAGGTCAG GCAGGCTGTC CGCCATTTCT GAGTGTATA GGTAACTCT GATCTCTTCC AGAGTCTCAA
2101   ACACTTGGAG CTGCTCTGG TGGAGCGGG CAGTGTGGA GGTGGGTTCC CGTCAAAGC TCTCCGGCAG
2171   AAATGCGAGG CTCCAAAGA CTTCTTCCA CTCAGCAAAC TCTGGGATAT TGCTCAGTGA CTCTCCCTC
2241   ACCTCTGCA AGTCTCTCAT GCCAGACCA TAGCACACTC GGGCACAGGG CTTGTCTCAC TTCTCACACC
2311   GCTGTGTTCC ATCTCTGCT GTCACTCTCT GGTGTGCA GGGGCAGAG AGGGTGCAG ATCCAGCTC
2381   CGTACAAAG TAGTGTAGG GACAGGCACT CACACAGCTG GGCCCAATG TATACCCAG CTGGGTATA
2451   CGATGAAT TGGATTAGC TTTATGATC TGGACAGGG CTGGGCACTG CAGCTCACAG ATGCGCTGCT
2521   GGTTGAAATG GAGCAGGCC AGGCACTCAG AGTCTTGGG GGCCGTCTAG CGGGCAGAC ATGCTCTATG
2591   GCAGCAGTCA GTGGGCACTG CGCCCTTCCA GGGGCAGAG CGCCCGGAC AGACAGTGG CTTCAAGCTC
2661   TGACAACTCT CAGAACTCTC TCCCCAGCAG CGGGAGCCCT TACACATGG AGAACAGGG TGGCAGGCC
2731   GAGAGCGGTT GGTGTCTATC AGTGTGAGAG CGAGCTGGTT GTCTTGTGG AGATGTCTCT TCCACAAAT
2801   CGTCTCTGG TAGCAGACT GGGGTTTCC CTGATCAAG ACCCCTCTCT TCAAGATCTC TGTGAGGCTT
2871   CGAAGCTGCA GCTCCCGCAG GCTCTCTGG GAGGCCCTG TGACAGGGGT GGTATTGTTT AGCGGGTCTC
2941   CATGTCTAG CACGGCCAG GCATAGTGT CTTCAAAGAG CTGGGTGCT CGCACAACTC GCAGCTCTG
3011   CAGTGGGACC TGCTCACTT GGTGTGAGC GATGAGCAG TAGCCCTGCA CTTCTGGAT ATCTCTCAG
3081   AAACTTAACT TGGCATTGTT GGGCAGTAT GTGATTTCCA GGTTTCCCTG CACCACTTGG CAGCCCTGCT
3151   AGAGGTGGCG GAGCATGTCC AGTGGGTTCT CGGACTGGC AGGGAGCCGC AGCTTCACTG CTGTGCGGTT
3221   GCACACTTGG GTGCTCGCGG CTCCGGGGGG CAGAGGGCG AGGAGGAGCC CGCAGCGGCA CAAGGCCGCC
3291   AGCTCCAT TGGGCGTAG ATGAAATTC TCCAGCCCA AGCAATTTA ATTTGGGCC GGTACGGAG
3361   ATTTGAAATG TCTAGGGGC CGCAATATC AGCTAGTCTG GATATTTT TTTCAAATA AAAAAATAA
3431   KTTTCAATTT TTTTTAAAC AGGGTTCTA ATTTTCTTT ATCACCTCA TATTTTAA ATTTCTAAI
3501   CGCAACTTAC CGTATTTT ATTTAACTT TGCAATTT GAATTAATA CGAGGAAATG CGATTTGAT
3571   AGTAAATTA TGCTTCTCT ATTTAACTT AGCAATTT CGTAAATTA CGTAACTT ATTTTAAI
3641   TAATTTGAT CTGATTAAG GAATTTTAA ATTTGATTT GAATTAATA CGAGGAAATG CGATTTGAT
3711   TTTTTAAAT CTTCTTTT GAATTTTAA AGAAATTTT ATTAATTTT ATTTTAAI ATTTTAAI
3781   TTATTTCTA ATGATTTCT ATTTTAACT AGCTTAACT TGATTTCTA ATTTTAAI ATTTTAAI
3851   TTTTAAAT TAATTTAACT ATTTTAACT ATTTTAAAT CGCAATTTA ATTTTAAI ATTTTAAI
3921   TACTTAAI CGTCTTCT AGCTTAAI ATTTTAAAT ATTTTAAI ATTTTAAI ATTTTAAI
3991   CGCAATTTA ATTTTAAI ATTTTAAI ATTTTAAI ATTTTAAI ATTTTAAI ATTTTAAI
4061   AGCTTAAI ATTTTAAI ATTTTAAI ATTTTAAI ATTTTAAI ATTTTAAI ATTTTAAI
4131   ATTTTAAI ATTTTAAI ATTTTAAI ATTTTAAI ATTTTAAI ATTTTAAI ATTTTAAI
4201   ATTTTAAI ATTTTAAI ATTTTAAI ATTTTAAI ATTTTAAI ATTTTAAI ATTTTAAI
4271   YGAGCACC TACTTAAI ATTTTAAI ATTTTAAI ATTTTAAI ATTTTAAI ATTTTAAI
4341   TACTTAAI ATTTTAAI ATTTTAAI ATTTTAAI ATTTTAAI ATTTTAAI ATTTTAAI
4411   CGCAATTTA ATTTTAAI ATTTTAAI ATTTTAAI ATTTTAAI ATTTTAAI ATTTTAAI
4481   TATTTAA

```

[0206]

[0207] (SEQ ID NO:1)

[0208] HER2起始密码子和终止密码子以粗体指示。侧翼序列以斜体指示。侧翼1(64): 451-1052, 加下划线的HER2:3298-1247(粗体), 起始密码子:3298-3296(粗体+加下划线), 终止密码子:1249-1247(粗体+加下划线), PrS启动子:3442-3403(斜体+加下划线), 侧翼

(65):3463-4065(加下划线)。

[0209] 下面示出了编码的mHER2多肽的翻译:

[0210]

MELAALCRWGLLLALLPPGAASTQVCTGTMKLRRLPASPETHLDMLRHL YQGCQVVQGNLELTYLPTNASLSFLQDI
 QEVQGYVLI AHNQVRQVPLQRLRIVRGTQLFEDNYALAVLDNGDPLNNTTPVTGASPGGLRELQLRSLTEILKGGVL
 IQRNPQLCYQDTILWKDIFHKNNQLALTLIDTNRSRACHPCSPMCKGSRCWGESSEDCQSLTRTV CAGGCARCKGPL
 P T D C C H E Q C A A G C T G P K H S D C L A C L H F N H S G I C E L H C P A L V **QYIKANSKFIGITEL**
 RYTFGASCVTACPYNYLSTDVGSCTLVCP LHNQEVT AEDGTQRCEKCSKPCARVCYGLGMEHLREVRVTSANIQEF
 AGCKKIFGSLAFLPESFDGDPASNTAPLQPEQLQVFETLEEITGYLYISAWPDSL PDL SVFQNLQVIRGRILHNGAY
 SLTLQGLGISWLGLRSLRELGSGLALIHNTHLCFVHTVPWDQLFRNPHQALLHTANRPEDECVGEGLACHQLCARG
 HCWGPPTQCVNCSQFLRGQECVVEECRVLQGLPREYV NARHCLPCHPECQPQNGSVTCFGPEADQCVACAHYKDPFP
 CVARCP SGVKPDL SYMPIWKFPDEEGACQPCP INCTHSCVDLDDKGC PAEQRASPLTS **FNNFTVS**
FWLRVFKVSASHLEIVSAVVGIL.

[0211] (SEQ ID NO:2)。

[0212] p2和p30序列的破伤风毒素表位以粗体指示。

[0213] 用MVA-BN接种CEF培养物并且还用pBN279质粒DNA转染。进而,将来自这些细胞培养物的样本接种到于含有选择药物的培养基中的CEF培养物中,并且通过蚀斑纯化来分离表达mRFP1的病毒克隆。将在选择药物存在下生长并表达mRFP1的病毒原种命名为MVA-BN-mHER2。MVA-BN-mHER2的产生和病毒原种的制备涉及九(9)次连续传代,所述传代包括四(4)次蚀斑纯化。

[0214] 在不存在选择药物条件下使MVA-BN-mHER2在CEF细胞培养物中传代。不存在选择药物使得编码选择基因gpt和mRFP1的区域和来自插入序列的相关启动子(选择盒)丢失。导致选择盒丢失的重组由侧接质粒pBN279中的选择盒的侧翼1(F1)区和所述区的子部分F1重复序列(F1rpt)介导。包含这些重复序列以介导导致选择盒丢失的重组,从而仅留下插在64/65基因间隔区中的mHER2序列。

[0215] 制备蚀斑纯化的缺少选择盒的病毒。所述制备涉及十五(15)次传代,所述传代包括五(5)次蚀斑纯化。

[0216] 通过PCR分析证实了MVA-BN-mHER2原种中存在mHER2序列而不存在亲本MVA-BN病毒,并且使用巢式PCR来验证选择盒(gpt和mRFP1基因)的不存在。

[0217] mHER2蛋白的表达在用MVA-BN-mHER2体外接种的细胞中得到证明。

[0218] 实施例2

[0219] 抗肿瘤应答在用MVA-BN-HER2和抗体处理的小鼠中的诱导

[0220] 雌性BALB/c小鼠(6-8周龄,约20g)购自Simonsen Laboratories,Gilroy,CA。对于实验性肺转移性模型,对小鼠静脉内植入于300 μ L DPBS中的 5.0×10^4 个CT26-HER-2细胞,其在肺中形成肿瘤。在实体肿瘤模型中,将于100 μ L DPBS中的 1.0×10^5 个CT26-HER-2细胞皮内植入小鼠背部中。每周测量肿瘤两次并且根据以下公式计算肿瘤体积:肿瘤体积(mm^3)=(长 \times 宽²)/2。

[0221] 以下抗体购自Bio X Cell(West,Lebanon,NH):抗ICOS(克隆17G9)、抗CTLA-4(9D9)、抗PD-1(RMP1-14)和抗LAG-3(C9B7W)。按在图例中指出的天数,所有抗体于100 μ L

PBS中、以200 μ g/小鼠进行腹膜内注射。对于病毒处理,通过尾部划痕法(t.s.,由Bavarian Nordic[BN],Martinsried,Germany产生)用7.1 μ L的 1.0×10^7 感染单位(Inf.U.)MVA-BN-mHER2处理小鼠。

[0222] 通过ELISA和由ELISPOT测定的IFN- γ 来测定血清抗体效价,如Mandl等,Cancer Immunol Immunother(2012)61:19-29中所述。收集全血、脾脏和肺以用于FACS分析。将肺切割成1-2mm块并且将其在37 $^{\circ}$ C下于具有10%FBS、50U/mL DNA酶I和250U/mL胶原酶I(Worthington Biochemical Corporation,Lakewood,NJ)的DMEM中温育1h。将来自肺、脾细胞和全血的红细胞裂解并且根据标准方案用购自Biolegend(San Diego,CA)的以下抗体对单细胞悬液染色:CD3e(145-2c11或500A2)、CD4(RM4-5)、CD8(53-6.7)、CD278(ICOS,7E.17G9)、CD279(PD-1,29F.1AA12)和CD223(LAG-3,C9B7W)。根据制造商说明(eBioscience,San Diego,CA)使用FoxP3/转录因子染色缓冲器组套件(Transcription Factor Staining Buffer Set)和FoxP3抗体(FJK-16s)鉴定调节性T细胞。

[0223] 使用针对Windows的GraphPad Prism版本6.01(GraphPad Software,La Jolla,CA)如图例中所述进行所有统计分析。

[0224] 实施例3

[0225] MVA-BN-HER2处理增加CD8 $^{+}$ 和CD4 $^{+}$ T细胞上的ICOS

[0226] 将初始无肿瘤小鼠在第1天或第1和第15天用MVA-BN-mHER2(1E7感染单位t.s.)处理。在每个时间点从3只小鼠中获取器官。如图1所示,用MV-BN-mHER2的处理增加了CD8 $^{+}$ 和CD4 $^{+}$ T细胞上的ICOS表达。

[0227] 实施例4

[0228] 抗肿瘤应答在用MVA-BN-HER2与抗ICOS处理的小鼠中的诱导

[0229] 在第1天将1E5CT26-HER2细胞皮内植入Ba1b/c小鼠。在第1和第15天通过尾部划痕法(t.s.)用1E7感染单位MVA-BN-mHER2、并在第1、4、8、11、15、18、22和25天用抗ICOS(200, μ g腹膜内)处理小鼠。**, $p < 0.01$,**** $p < 0.0001$,重复测量双因素ANOVA和Tukey多重比较事后检验。如图2所示,与单独MVA-BN-mHER2相比,用MVA-BN-mHER2和抗ICOS明显降低了肿瘤体积。

[0230] 实施例5

[0231] 抗肿瘤应答在用MVA-BN-HER2和抗CTLA-4处理的小鼠中的诱导

[0232] 在CT26-HER-2实验性肺转移性模型中,在第1天将5E4CT26-HER-2细胞静脉内植入小鼠,其在肺中形成肿瘤。在第4和第18天用MVA-BN-mHER2(1E7感染单位t.s.)并在第3和第17天用抗CTLA-4(200 μ g,腹膜内)处理小鼠。**** $p < 0.0001$,对数秩检验。如图3所示,在增加总体存活率方面,用MVA-BN-mHER2和抗CTLA-4的处理是有效的。

[0233] 实施例6

[0234] 在第25天MVA-BN-HER2明显降低肺肿瘤负荷

[0235] 在第1天将5E4CT26-HER-2细胞静脉内植入小鼠,其在肺中形成肿瘤。在第4和第18天用MVA-BN-mHER2(1E7感染单位t.s.)并在第3和第17天用抗CTLA-4(200 μ g,腹膜内)处理小鼠。A)在第25天,使小鼠安乐死并且用台盼蓝通过导管灌注小鼠。将肺除去并将其在过氧化氢中短暂浸没并且在PBS中进行洗涤。在未处理和抗CTLA-4处理小鼠中可看见为小块的肿瘤。在用MVA-BN-mHER2处理的小鼠的肺中没有可见肿瘤。比例尺等于1cm。B)在第25天的

肺重量。**** $p < 0.0001$, 单因素ANOVA和Dunnett多重比较检验。测试结果在图4中示出。

[0236] 实施例7

[0237] 在MVA-BN-HER2处理或肺肿瘤情况下肺ICOS增加

[0238] 在第1天将5E4CT26-HER-2细胞静脉内植入小鼠,其在肺中形成肿瘤。在第4和第18天用MVA-BN-mHER2($1E7$ 感染单位t.s.)并在第3和第17天用抗CTLA-4($200\mu\text{g}$,腹膜内)处理小鼠。将在每个时间点从3只小鼠中获取的器官汇集以用于分析(A和B)。将来自使用每组的3-4只小鼠的三次独立实验的数据显示为平均值 \pm SEM(C和D)。如图5所示,在用MVA-BN-mHER2处理后肺ICOS增加。

[0239] 实施例8

[0240] 在具有肿瘤的小鼠中,ICOS⁺CD4⁺T细胞是FoxP3⁺

[0241] 在第1天将5E4CT26-HER-2细胞静脉内植入小鼠,其在肺中形成肿瘤。在第4和第18天用MVA-BN-mHER2($1E7$ 感染单位t.s.)并在第3和第17天用抗CTLA-4($200\mu\text{g}$,腹膜内)处理小鼠。将在每个时间点从3只小鼠中获取的器官汇集以用于分析(A和B)。将来自使用每组的3-4只小鼠的三次独立实验的数据显示为平均值 \pm SEM(C和D)。如图6所示,在具有肿瘤的对照和抗CTLA-4处理的小鼠中ICOS表达在FoxP3⁺Treg和FoxP3⁻Teff细胞中均增加,其中肿瘤负荷较高。ICOS在MVA-BN-mHER2处理后仅在FoxP3⁻Teff细胞上增加并且与抗CTLA-4组合后增加的更显著。

[0242] 实施例9

[0243] MVA-BN-HER2和抗CTLA-4增加效应子与调节性T细胞的比率

[0244] 在第1天将5E4CT26-HER-2细胞静脉内植入小鼠,其在肺中形成肿瘤。在第4和第18天用MVA-BN-mHER2($1E7$ 感染单位t.s.)并在第3和第17天用抗CTLA-4($200\mu\text{g}$,腹膜内)处理小鼠。将在每个时间点从3只小鼠中获取的器官汇集以用于分析(A和B)。将来自使用每组的3-4只小鼠的三次独立实验的数据显示为平均值 \pm SEM(C和D)。如图7所示,用MVA-BN-mHER2和抗CTLA-4的处理增加了肿瘤位点以及脾脏和血液中的CD8和CD4效应子两者与调节性T细胞的比。

[0245] 实施例10

[0246] 在MVA-BN-HER2处理情况下PD-1表达增加

[0247] 将初始无肿瘤小鼠在第1天或第1和第15天用MVA-BN-HER2($1E7$ 感染单位,t.s.)处理。在每个时间点从3只小鼠中获取器官。如图8所示,用MV-BN-mHER2的处理增加了CD8⁺和CD4⁺T细胞上的PD-1表达。

[0248] 实施例11

[0249] 抗肿瘤应答在用MVA-BN-HER2和抗PD1处理的小鼠中的诱导

[0250] 在第1天将1E5CT26-HER-2细胞皮内植入Ba1b/c小鼠。在第1和第15天通过尾部划痕法(t.s.)用 $1E7$ 感染单位MVA-BN-mHER2,并在第1和第15天($200\mu\text{g}$ 腹膜内)用抗PD1处理小鼠。**** $p < 0.0001$,重复测量双因素ANOVA和Tukey多重比较事后检验。如图9所示,与用单独抗PD-1的处理相比,用MVA-BN-mHER2和抗PD1明显减小了肿瘤体积,并且与单独MVA-BN-mHER2相比存活率明显增加。

[0251] 实施例12

[0252] 对MVA-BN-HER2的LAG-3免疫应答

[0253] 将初始无肿瘤小鼠在第1天或第1和第15天用MVA-BN-mHER2(1E7感染单位t.s.)处理。在每个时间点从3只小鼠中获取器官。如图10所示,LAG-3表达于CD8⁺和CD4⁺T细胞上。

[0254] 实施例13

[0255] 抗肿瘤应答在用MVA-BN-HER2和抗LAG-3处理的小鼠中的诱导

[0256] 在第1天将1E5CT26-HER-2细胞皮内植入Ba1b/c小鼠。在第1和第15天通过尾部划痕法(t.s.)用1E7感染单位MVA-BN-mHER2、并在第1和第15天(200μg腹膜内)用抗LAG-3处理小鼠。****p<0.0001,重复测量双因素ANOVA和Tukey多重比较事后检验。如图11所示,与单独MVA-BN-mHER2和单独抗LAG3相比,用MVA-BN-mHER2与抗LAG3的组合的处理增加了总体存活率。

[0257] 实施例14

[0258] 抗肿瘤应答在用MVA-BN-HER2与抗PD-1和抗LAG-3处理的小鼠中的诱导

[0259] 在第1天将1E5CT26-HER-2细胞皮内植入Ba1b/c小鼠。在图12中,在第1和第15天通过尾部划痕法(t.s.)用1E7感染单位MVA-BN-mHER2、并在第1和第15天用抗PD1和抗LAG-3(各自200μg,腹膜内)处理小鼠。在图13中,在第4和第18天通过t.s.用1E7感染单位MVA-BN-mHER2、并在第4和第18天用抗PD-1和抗LAG-3(200μg,腹膜内)处理小鼠。****p<0.0001,重复测量双因素ANOVA和Tukey多重比较事后检验。如图12和13所示,与单独MVA-BN-mHER2和单独抗PD1和抗LAG3相比,用MVA-BN-mHER2与抗PD1和抗LAG3两者的组合降低了肿瘤体积(图12A和13A)并且增加了总体存活率(图12B和13B)。

[0260] 实施例15

[0261] 抗肿瘤应答在用MVA-BN-HER2与抗PD-1和抗LAG-3处理的小鼠中的诱导

[0262] 在CT26-HER-2实验性肺转移性模型中,在第1天将5E4CT26-HER-2细胞静脉内植入小鼠,其在肺中形成肿瘤。在第4和第18天用MVA-BN-mHER2(1E7感染单位t.s.)并在第4和第18天用抗PD-1和抗LAG-3(各自200μg,腹膜内)处理小鼠。*P<0.05,***p<0.001,对数秩检验。如图14所示,与单独抗PD1和抗LAG3相比,用MVA-BN-mHER2与抗PD1和抗LAG3的组合的处理增加了总体存活率。

[0263] 实施例16

[0264] ELISPOT MVA应答

[0265] 在第1天将1E5CT26-HER-2细胞皮内植入Ba1b/c小鼠。在第4和第18天通过尾部划痕法(t.s.)用4E7感染单位MVA-BN-mHER2、并在第4和第18天用抗PD1和抗LAG-3(200μg腹膜内)处理小鼠。最后处理后四周,通过IFN-γ ELISPOT测定特异性T细胞应答,如Mandl等,Cancer Immunol Immunother(2012)61:19-29中所述。如图15所示,与单独抗PD1和抗LAG3相比,用MVA-BN-mHER2与抗PD1和抗LAG3的组合的处理增加了肿瘤抗原特异性IFN-γ水平。

[0266] 实施例17

[0267] 抗体效价

[0268] 在第1天将1E5CT26-HER-2细胞皮内植入Ba1b/c小鼠。在第4和第18天通过尾部划痕法(t.s.)用4E7感染单位MVA-BN-mHER2、并在第4和第18天用抗PD1和抗LAG-3(200μg腹膜内)处理小鼠。通过ELISA测定血清抗体效价,如Mandl等,Cancer Immunol Immunother(2012)61:19-29中所述。2.结果示于图16中。

[0269] 实施例18

[0270] 抗肿瘤应答在用MVA-BN-CV301和抗PD-1处理的小鼠中的诱导

[0271] 在第1天将MC38-CEA细胞(2×10^5 ,皮内背侧腹中)植入雌性C57/BL6小鼠(6-8周龄,约20g,Simonsen Laboratories,Gilroy CA)。在第1和第15天用MVA-BN-CV301(1E7感染单位,皮下尾部根部以上)处理小鼠。在第1和第15天用抗PD-1(200 μ g腹膜内)处理小鼠。测试结果在图17中示出。 $*p < 0.05$, $***p < 0.0001$,重复测量双因素ANOVA和Tukey多重比较事后检验。

[0272] 实施例19

[0273] 抗肿瘤应答在用MVA-BN-CV301和抗LAG-3处理的小鼠中的诱导

[0274] 在第1天将MC38-CEA细胞(2×10^5 ,皮内背侧腹中)植入雌性C57BL/6小鼠(6-8周龄,约20g,Simonsen Laboratories,Gilroy CA)。在第1和第15天用MVA-BN-CV301(1E7感染单位,皮下尾部根部以上)处理小鼠。在第1和第15天用抗LAG-3(200 μ g腹膜内)处理小鼠。结果在图18中示出。 $**p < 0.01$, $***p < 0.001$,重复测量双因素ANOVA和Tukey多重比较事后检验。

[0275] 实施例20

[0276] 抗肿瘤应答在用MVA-BN-CV301与抗PD-1和抗LAG-3处理的小鼠中的诱导

[0277] 在第1天将MC38-CEA细胞(2×10^5 ,皮内背侧腹中)植入雌性C57BL/6小鼠(6-8周龄,约20g,Simonsen Laboratories,Gilroy CA)。在第1和第15天用MVA-BN-CV301(1E7感染单位,皮下尾部根部以上)处理小鼠。在第1和第15天用抗PD1和抗LAG-3(各自200 μ g腹膜内)处理小鼠。 $**p < 0.01$, $***p < 0.0001$,重复测量双因素ANOVA和Tukey多重比较事后检验。如图19所示,与单独抗PD1和抗LAG3或单独MVA-BN-CV301相比,MVA-BN CV301与抗PD1和抗LAG3的组合治疗使得肿瘤体积减小。

[0278] 实施例21

[0279] 抗肿瘤应答在用PROSTVAC和抗PD-1处理的小鼠中的诱导

[0280] 在第1天将E6细胞(RM11-PSA, 1.5×10^5 ,皮内背侧腹中)植入雄性BALB/c小鼠(6-8周龄,约20g,Simonsen Laboratories,Gilroy CA)。在第1天用PROSTVAC-V(2E7感染单位,皮下在尾部根部处)、并在第8和第15天用PROSTVAC-F(1E8感染单位,皮下在尾部根部处)处理小鼠。在第1和第15天用抗PD-1(200 μ g腹膜内)处理小鼠。将处理结果示于图20中。

[0281] 实施例22

[0282] 抗肿瘤应答在用PROSTVAC和抗LAG-3处理的小鼠中的诱导

[0283] 在第1天将E6细胞(RM11-PSA, 1.5×10^5 ,皮内背侧腹中)植入雄性BALB/c小鼠(6-8周龄,约20g,Simonsen Laboratories,Gilroy CA)。在第1天用PROSTVAC-V(2E7感染单位,皮下在尾部根部处)、并在第8和第15天用PROSTVAC-F(1E8感染单位,皮下在尾部根部处)处理小鼠。在第1和第15天用抗LAG-3(200 μ g腹膜内)处理小鼠。将处理结果示于图21中。

[0284] 实施例23

[0285] 抗肿瘤应答在用PROSTVAC与抗PD-1和抗LAG-3处理的小鼠中的诱导

[0286] 在第1天将E6细胞(RM11-PSA, 1.5×10^5 ,皮内背侧腹中)植入雄性BALB/c小鼠(6-8周龄,约20g,Simonsen Laboratories,Gilroy CA)。在第1天用PROSTVAC-V(2E7感染单位,皮下在尾部根部处)、并在第8和第15天用PROSTVAC-F(1E8感染单位,皮下在尾部根部处)处理小鼠。在第1和第15天用抗PD-1和抗LAG-3(各自200 μ g,腹膜内)处理小鼠。如图22所示,与

单独抗PD-1和抗LAG-3或单独PROSTVAC相比,PROSTVAC与抗PD-1和抗LAG-3的组合治疗使得肿瘤体积减小。

[0287] 实施例24

[0288] 抗肿瘤应答在用PANVAC(CV301-V/F)和抗PD-1处理的小鼠中的诱导

[0289] 第1天将MC38-CEA细胞(3.0×10^5 ,皮内在背侧腹中)植入针对人CEA((Tg(CEA)18/B6j,可购自City of Hope National Medical Center的Jack Shively,还参见Clarke等Cancer Research,58:1469ff.,1998)转基因的雌性C57/BL6小鼠。在第4天用CV301-牛痘(CV301-V)(也称作PANVAC-V)($2E7$ 感染单位,皮下在尾部根部处)、并在第11和第18天用CV301-鸡痘(CV-301-F)(也称作PANVAC-F)($1E8$ 感染单位,皮下在尾部根部处)处理小鼠。在第4、11和18天将CV301-V/F处理与鸡痘GM-CSF($1E7$ 感染单位)混合。在第4、11和18天用抗PD-1($200\mu\text{g}$ 腹膜内)处理小鼠。 $**p < 0.01$, $****p < 0.0001$,重复测量双因素ANOVA和Tukey多重比较事后检验。如图23所示,与对照小鼠相比,CV301-V/F与抗PD-1的组合治疗延迟了肿瘤生长。

[0290] 将显而易见的是,本文所述的方法或组合物的精确细节可在不脱离所述发明的精神的情况下加以改变或修改。我们要求保护在以下权利要求书的范围和精神内的所有此类修改和改变。

序列表

- <110> 巴法里安诺迪克有限公司
- <120> 用于使用表达肿瘤抗原的痘病毒和免疫检查点抑制剂的拮抗剂和/或激动剂治疗癌症的组合疗法
- <130> BNIT0007PCT
- <150> US 61/900,226
- <151> 2013-11-05
- <160> 2
- <170> PatentIn 3.5 版
- <210> 1
- <211> 4487
- <212> DNA
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> 编码包含源自破伤风毒素的两种表位的经修饰的HER2蛋白的构建体的核苷酸序列

[0001]

```

<400> 1
aaaaaaaaa taattaacca ataccaaccc caacaaccgg tattattagt tgaatgtact      60
gttttctcat cactfagaac agatttaaca atttctataa agtctgtcaa atcatcttcc      120
ggagacccca taatacaacc aaatatagcg gcgtacaact tatccattta tacattgaat      180
attggetttt cttatocgt atcttcatca tattcatcat caatatcaac aagtcacaga      240
tiacgagcca gacttcttc tacatttca gtcattgata cacgttccact atctccagag      300
agtccgataa cgttagccac cacttctcta tcaatgatta gtttcttgag tgcgaatgta      360
atthttgttt ccgttccgga tctatagaag acgatagggt tgataattgc ctggccaat      420
tgctttctc ttttactgag tgattctagt tcaccttcta tagatctgag aatggatgat      480
tctccagteg aaacatattc taccatggat ccgtttaatt tgttgatgaa gatggattca      540
tccttaaatg ttttctctgt aatagtttcc accgaaagac tatgcaaaga atttggaatg      600
cgttcttftg gcttaatgft tccatagacg gcttctagaa gttgatacaa cataggacta      660
gccgcgtaa cttttattht tagaaagfat ccatcgttcc tatcttgttt agatttattt      720
ttataaagtt tagtctctcc ttccaacata ataaaagttg aagtcatttg actagataaa      780
ctatcagtaa gttttataga gatagacgaa caattagcgt attgagaagc atttagtgta      840
acgtattcga tacattttgc attagattta ctaatcgatt ttgcatactc tataacaccc      900
gcacaagfct gtagagaate gctagatgca gtaggtcttg gigaagtthc aactctcttc      960
ttgattacct tactcatgat taaacctaaa taattgfaet ttgfaatata atgatatata      1020
ttttcacttt atctcatttg agaataaaaa tggaaftcct gcagcccggg ggatccttaa      1080
ttaactgggt acccaaggec ttgggtttgg gggatcetta attaactggg taccgggccc      1140
ccccctgagg tcgaaggfat cgataagctt gatggcgecc acigtctctg atatctgcag      1200
aatccacca cactggacta gggatccga gctcggtaac aagcttctac agaatgcca      1260
ccaccgcaga gaagatctcc aggtgctctg cctcaccctt gggcacgcgc agccagaagc      1320
tcacggtgaa gttgttgaag gacgtcagag gctgtgctct ctgctcggcg ggcagccct      1380
tgcatccag gtccacacag gactgggtgc agttgatggg gcaaggcttg catgcgccct      1440
cctcatctgg aaacttccag atgggcatgt aggagaggtc aggttccaca ccgctgggce      1500
agcggccca cgcagaaggga gggtccttat agtgggeaca ggcacacac tggtcagcct      1560
    
```

	ccggtccaaa acaggtcact gagccattct ggggctgaca ctccagggtgg cacggcaaac	1620
	agtgcctggc attcacatac tccctgggga gccctcgcag factcggcat tectccacgc	1680
	actcctggcc ccgaaggaac tgctcgcagt tgacacactg ggtgggacct ggaccaccgc	1740
	agtgcctcgc ggcgcacacg tggctggcagg ccaggccctc gccacacacac tctcctctcg	1800
	gccggttggc agtctggagc agagcttggc gccggttccg aaagagctgg tcccagggea	1860
	ccgtgtgcac gaagcagagg tgggtgttat ggtggatgag ggccagteca ctgccagtt	1920
	ccctcagtga gcgcagcccc agccagctga tgcaccagccc ttgcagggtc agcgagtagg	1980
	cgccattgtg cagaattcgt ccccgatta cttgcagtt ctggaagacg ctgaggtcag	2040
	gcaggtctgc cgcccaigt gagatgtata ggtaacctgt gatctctcc agagtctca	2100
	acacttggag ctgctctggc tggagcgggg cagtgttga ggtgggtcc ccatcaaacg	2160
	ttcccgagcag aanaigccag ctcccaanga tcttcttga gccagcaaac tcttggatat	2220
	tggcactggc aactgcctc acctctcga agtctccat gccacagaca tagcacactc	2280
	gggcacaggg cttgctgcac ttctcacacc gctgtgttcc atctctgct gtcacctctt	2340
	ggtgtgtcag ggggcagacc aggtgtcagg atcccacgtc cgtagaaagg tagttgtagg	2400
	gacagccagt cacacagctg gcgccaatg tataaccgag ctccgtgata ccgatgaatt	2460
	tggagttagc ttgatgtac tggaccaggg ctgggcagtg cagctcacag atgccactgt	2520
	ggttgaagtg gaggcagccc aggcagtcag agtgcctggg gccctgcag ccggcagcac	2580
	actgctcatg gcagcagtca gtggcagtg gcccttga gccggcacag ccaccggcac	2640
	agacagtgcg cgtcaggctc tgacaatcct cagaactctc tcccagcag cggagccct	2700
[0002]	tacacatcgg agaacagggg tggcagcccc gagagcggtt ggtgtctatc agtctgagag	2760
	ccagctggtt gttcttggg aagatgtcct tccacaaaat cgtgtcctgg tagcagagct	2820
	gggggttccg ctggatcaag accctcctt tcaagatctc tgtgaggtt cgaagctgca	2880
	gtccccgag gccctctggg gaggccccg tgacaggggt ggtattgttc agcgggtctc	2940
	cattgtctag cacggccagg gcatagtgt cctcaaagag ctgggtgcct cgcacaatcc	3000
	gcagcctctg cagtgggacc tgcctcactt ggtgtgagc gatgagcag tagcctgca	3060
	ctcctggat atcctgcagg aaacttaagc tggcattggc ggcaggtag gtgagttcca	3120
	ggtttccctg caccacctgg cagccctggt agaggtggcg gagcatgtcc aggtgggtct	3180
	cgggactggc agggagccgc agcttcatgt ctgtgccggt gcacacttgg gtgctcggc	3240
	ctccggggcg caagaggcgc aggaggacc cccagcgca caaggccgcc agctccatgg	3300
	tggcggctag atcgaattcc tgcagcccaa acccgattta aattggcgcc cgtacggaag	3360
	atcttcgacg tetaagcggc cgcaatagct agetagtccg gataattata ttccaaaaaa	3420
	aaaaaataaa atttcaattt ttgtttaaac acgcgttcta gattttgttt aaccactgca	3480
	tgatgtacag atttcggaat cgcaaacac cagtggtttt attttatcct tctccaatgt	3540
	gaattgaatg ggagcggatg cgggtttcgt acgtagatag tacattcccg tttttagacc	3600
	gagactccat ccgtaaaaa gcatactcgt tagtttgaa taactcggat ctgctatatg	3660
	gatattcata gatigacttt gatcgatgaa ggctccccg tctgcagcca tttttatgat	3720
	cgtcttttgt ggaatttccc aaatagtttt ataaactcgc ttaatatctt ctggaaggtt	3780
	tgtattctga atggatccac catctgccat aatcctatc ttgatctcat cattccataa	3840

```

ttttctctcg gttaaaactc taaggagaig cggattaact acttgaaatt ctccagacaa 3900
tactctecga gtgtaaataat tactggataa cggttccacc gactcattat tteccaaaat 3960
ttgagcagtt gatgcagtcg gcataggtgc caccaataaa ctattttctaa gaccgtatgt 4020
ctgatittha tcttttagag gticcacaatt ccaaagatcc gacggtagaa cattccaaag 4080
atcalatigt agaataccgt tactggcgla cgatcctaca talgtaicgt atggicelle 4140
cttctcagct agttcacaac tcgectctaa tgcaccgtaa taaatggttt cgaagatctt 4200
cttatttaga tcttgtgett ccaggctatc aaatggataa ttttaagagaa taaaocgctc 4260
cgetaatcet tgaacaccaa taccgatagg tetatgtctc ttattagaga ttccagcttc 4320
tggaatagga taataattaa tatctataat tttattgaga ttctcgacaa ttactttgac 4380
cacatccttc agtttgagaa aateaaatcg cccatctatt acaaacatgt tcaaggcaac 4440
agatgccaga ttacaaacgg ctacctcatt agcatccgca tattgta 4487

```

<210> 2
 <211> 683
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 由SEQ ID NO:1编码的经修饰的HER2蛋白的氨基酸序列

<220>
 <221> P2
 <222> (273)..(287)
 <223> 源自破伤风毒素的T辅助细胞表位P2

[0003]

<220>
 <221> P30
 <222> (654)..(674)
 <223> 源自破伤风毒素的T辅助细胞表位P30

<400> 2

```

Met Glu Leu Ala Ala Leu Cys Arg Trp Gly Leu Leu Leu Ala Leu Leu
1           5           10          15
Pro Pro Gly Ala Ala Ser Thr Gln Val Cys Thr Gly Thr Asp Met Lys
20          25          30
Leu Arg Leu Pro Ala Ser Pro Glu Thr His Leu Asp Met Leu Arg His
35          40          45
Leu Tyr Gln Gly Cys Gln Val Val Gln Gly Asn Leu Glu Leu Thr Tyr
50          55          60
Leu Pro Thr Asn Ala Ser Leu Ser Phe Leu Gln Asp Ile Gln Glu Val
65          70          75          80
Gln Gly Tyr Val Leu Ile Ala His Asn Gln Val Arg Gln Val Pro Leu
85          90          95
Gln Arg Leu Arg Ile Val Arg Gly Thr Gln Leu Phe Glu Asp Asn Tyr
100         105        110
Ala Leu Ala Val Leu Asp Asn Gly Asp Pro Leu Asn Asn Thr Thr Pro
115        120        125

```

Val Thr Gly Ala Ser Pro Gly Gly Leu Arg Glu Leu Gln Leu Arg Ser
 130 135 140
 Leu Thr Glu Ile Leu Lys Gly Gly Val Leu Ile Gln Arg Asn Pro Gln
 145 150 155 160
 Leu Cys Tyr Gln Asp Thr Ile Leu Trp Lys Asp Ile Phe His Lys Asn
 165 170 175
 Asn Gln Leu Ala Leu Thr Leu Ile Asp Thr Asn Arg Ser Arg Ala Cys
 180 185 190
 His Pro Cys Ser Pro Met Cys Lys Gly Ser Arg Cys Trp Gly Glu Ser
 195 200 205
 Ser Glu Asp Cys Gln Ser Leu Thr Arg Thr Val Cys Ala Gly Gly Cys
 210 215 220
 Ala Arg Cys Lys Gly Pro Leu Pro Thr Asp Cys Cys His Glu Gln Cys
 225 230 235 240
 Ala Ala Gly Cys Thr Gly Pro Lys His Ser Asp Cys Leu Ala Cys Leu
 245 250 255
 His Phe Asn His Ser Gly Ile Cys Glu Leu His Cys Pro Ala Leu Val
 260 265 270
 [0004] Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu Arg
 275 280 285
 Tyr Thr Phe Gly Ala Ser Cys Val Thr Ala Cys Pro Tyr Asn Tyr Leu
 290 295 300
 Ser Thr Asp Val Gly Ser Cys Thr Leu Val Cys Pro Leu His Asn Gln
 305 310 315 320
 Glu Val Thr Ala Glu Asp Gly Thr Gln Arg Cys Glu Lys Cys Ser Lys
 325 330 335
 Pro Cys Ala Arg Val Cys Tyr Gly Leu Gly Met Glu His Leu Arg Glu
 340 345 350
 Val Arg Ala Val Thr Ser Ala Asn Ile Gln Glu Phe Ala Gly Cys Lys
 355 360 365
 Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu Pro Glu Ser Phe Asp Gly Asp
 370 375 380
 Pro Ala Ser Asn Thr Ala Pro Leu Gln Pro Glu Gln Leu Gln Val Phe
 385 390 395 400
 Glu Thr Leu Glu Glu Ile Thr Gly Tyr Leu Tyr Ile Ser Ala Trp Pro
 405 410 415
 Asp Ser Leu Pro Asp Leu Ser Val Phe Gln Asn Leu Gln Val Ile Arg
 420 425 430

Gly Arg Ile Leu His Asn Gly Ala Tyr Ser Leu Thr Leu Gln Gly Leu
435 440 445

Gly Ile Ser Trp Leu Gly Leu Arg Ser Leu Arg Glu Leu Gly Ser Gly
450 455 460

Leu Ala Leu Ile His His Asn Thr His Leu Cys Phe Val His Thr Val
465 470 475 480

Pro Trp Asp Gln Leu Phe Arg Asn Pro His Gln Ala Leu Leu His Thr
485 490 495

Ala Asn Arg Pro Glu Asp Glu Cys Val Gly Glu Gly Leu Ala Cys His
500 505 510

Gln Leu Cys Ala Arg Gly His Cys Trp Gly Pro Gly Pro Thr Gln Cys
515 520 525

Val Asn Cys Ser Gln Phe Leu Arg Gly Gln Glu Cys Val Glu Glu Cys
530 535 540

Arg Val Leu Gln Gly Leu Pro Arg Glu Tyr Val Asn Ala Arg His Cys
545 550 555 560

[0005]

Leu Pro Cys His Pro Glu Cys Gln Pro Gln Asn Gly Ser Val Thr Cys
565 570 575

Phe Gly Pro Glu Ala Asp Gln Cys Val Ala Cys Ala His Tyr Lys Asp
580 585 590

Pro Pro Phe Cys Val Ala Arg Cys Pro Ser Gly Val Lys Pro Asp Leu
595 600 605

Ser Tyr Met Pro Ile Trp Lys Phe Pro Asp Glu Glu Gly Ala Cys Gln
610 615 620

Pro Cys Pro Ile Asn Cys Thr His Ser Cys Val Asp Leu Asp Asp Lys
625 630 635 640

Gly Cys Pro Ala Glu Gln Arg Ala Ser Pro Leu Thr Ser Phe Asn Asn
645 650 655

Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser Ala Ser His
660 665 670

Leu Glu Ile Val Ser Ala Val Val Gly Ile Leu
675 680

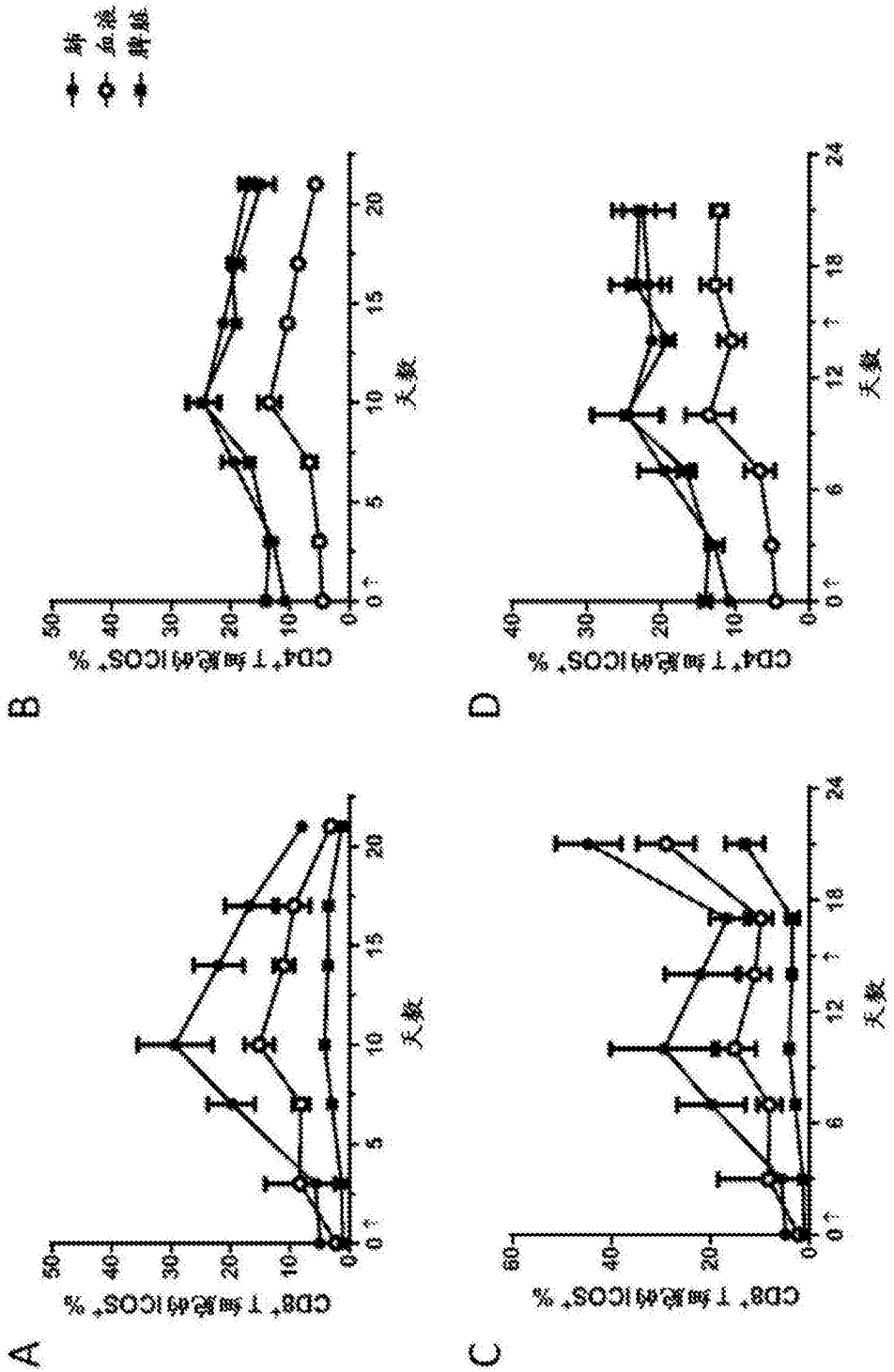


图1

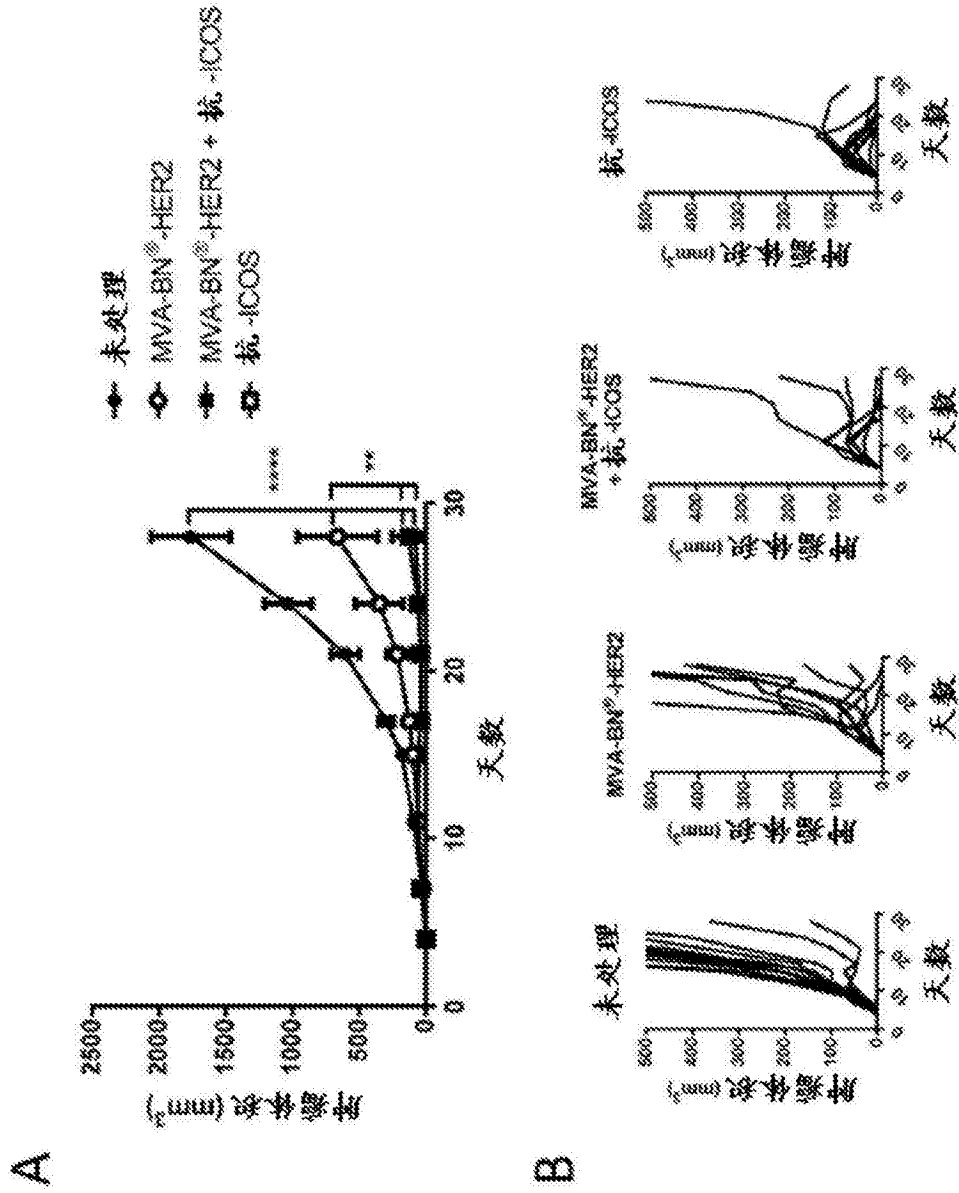


图2

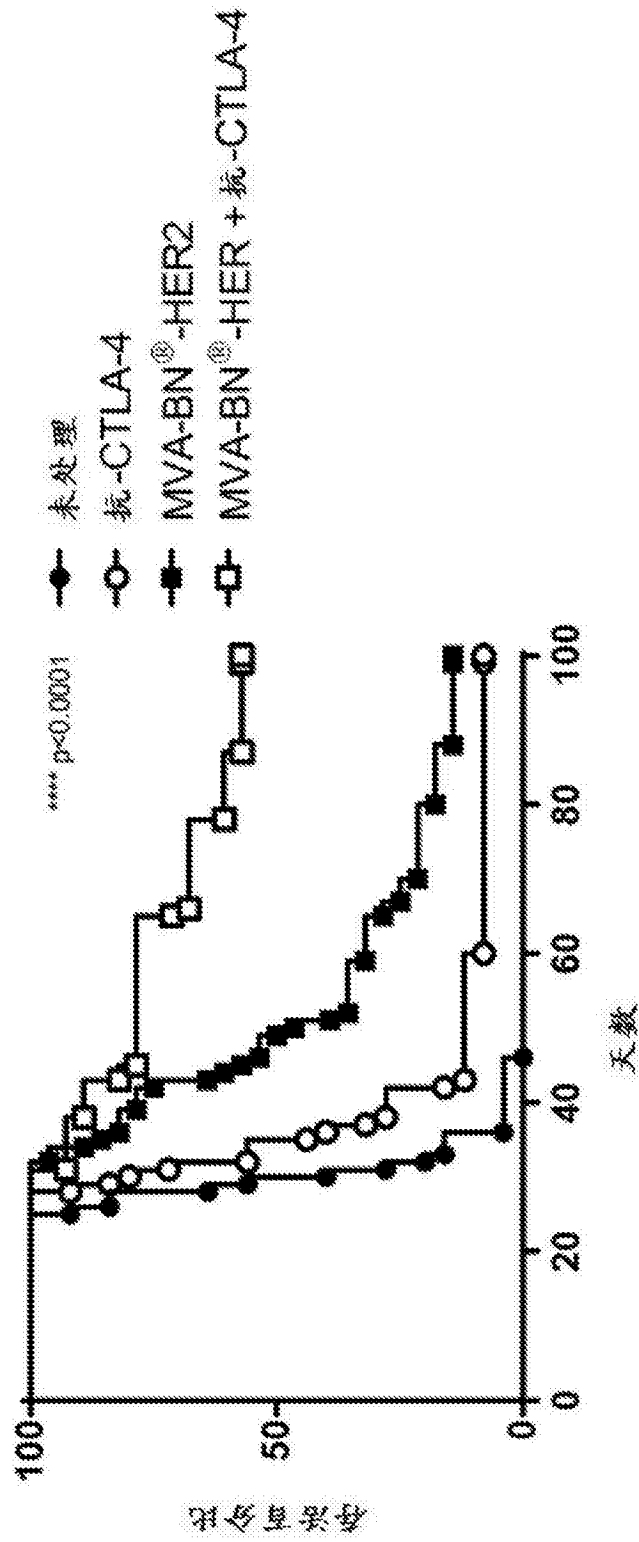


图3

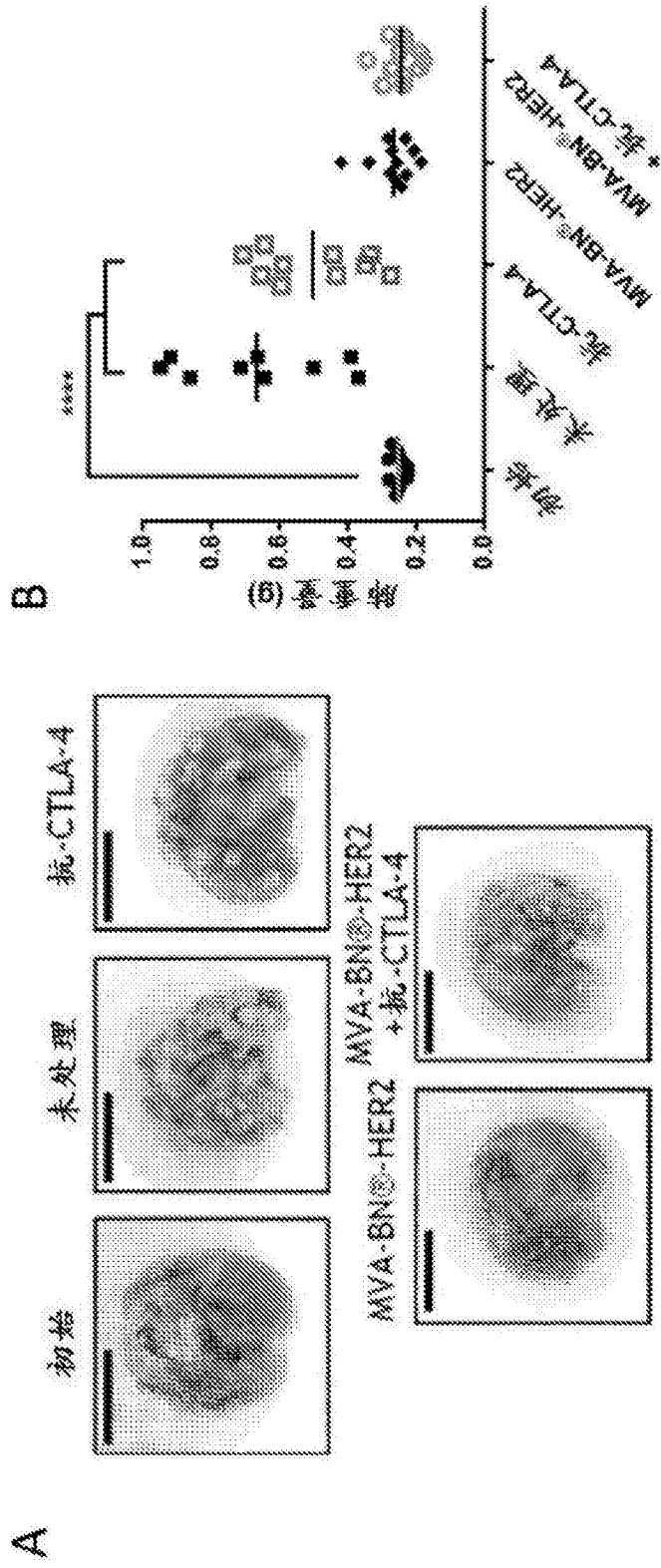


图4

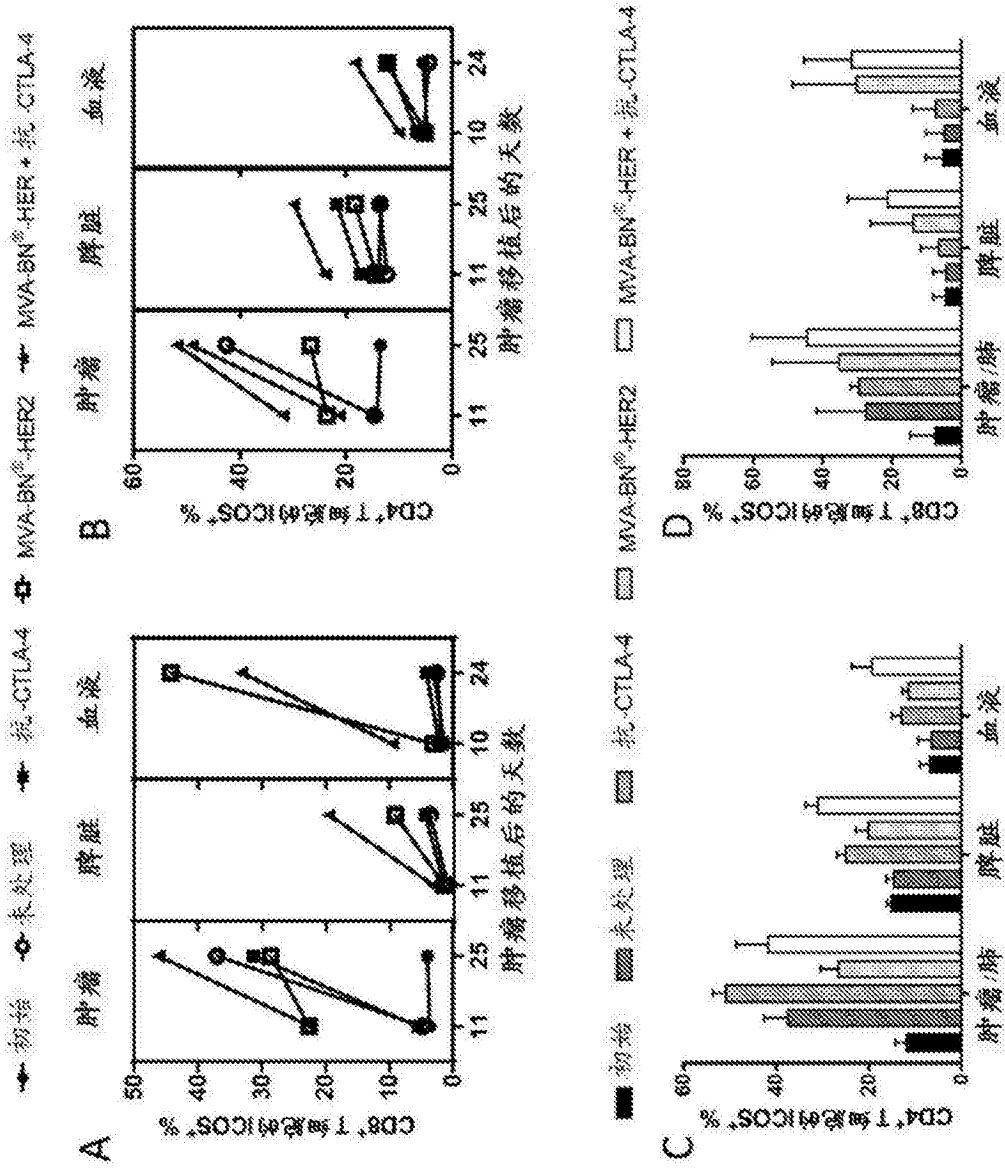


图5

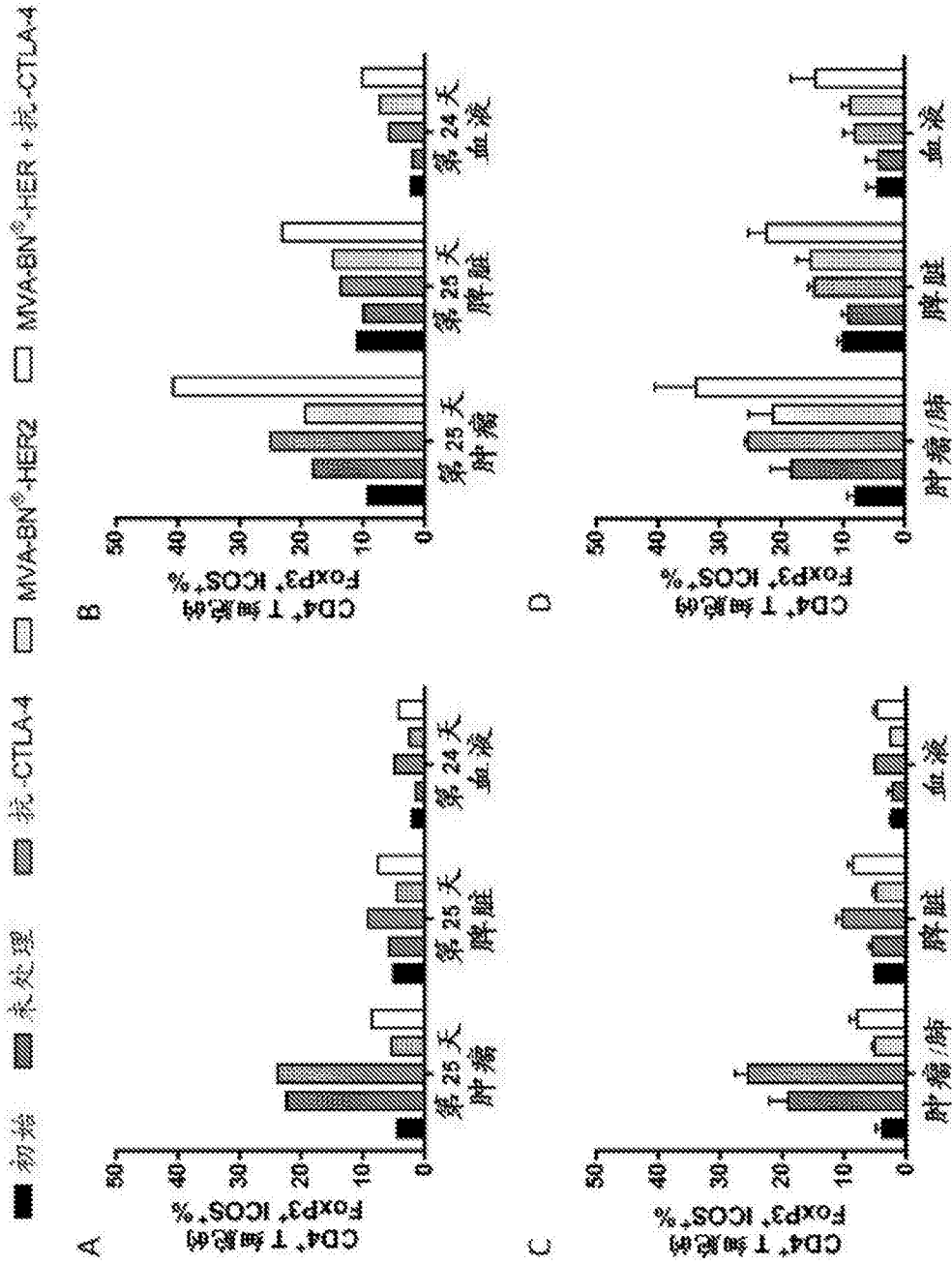


图9

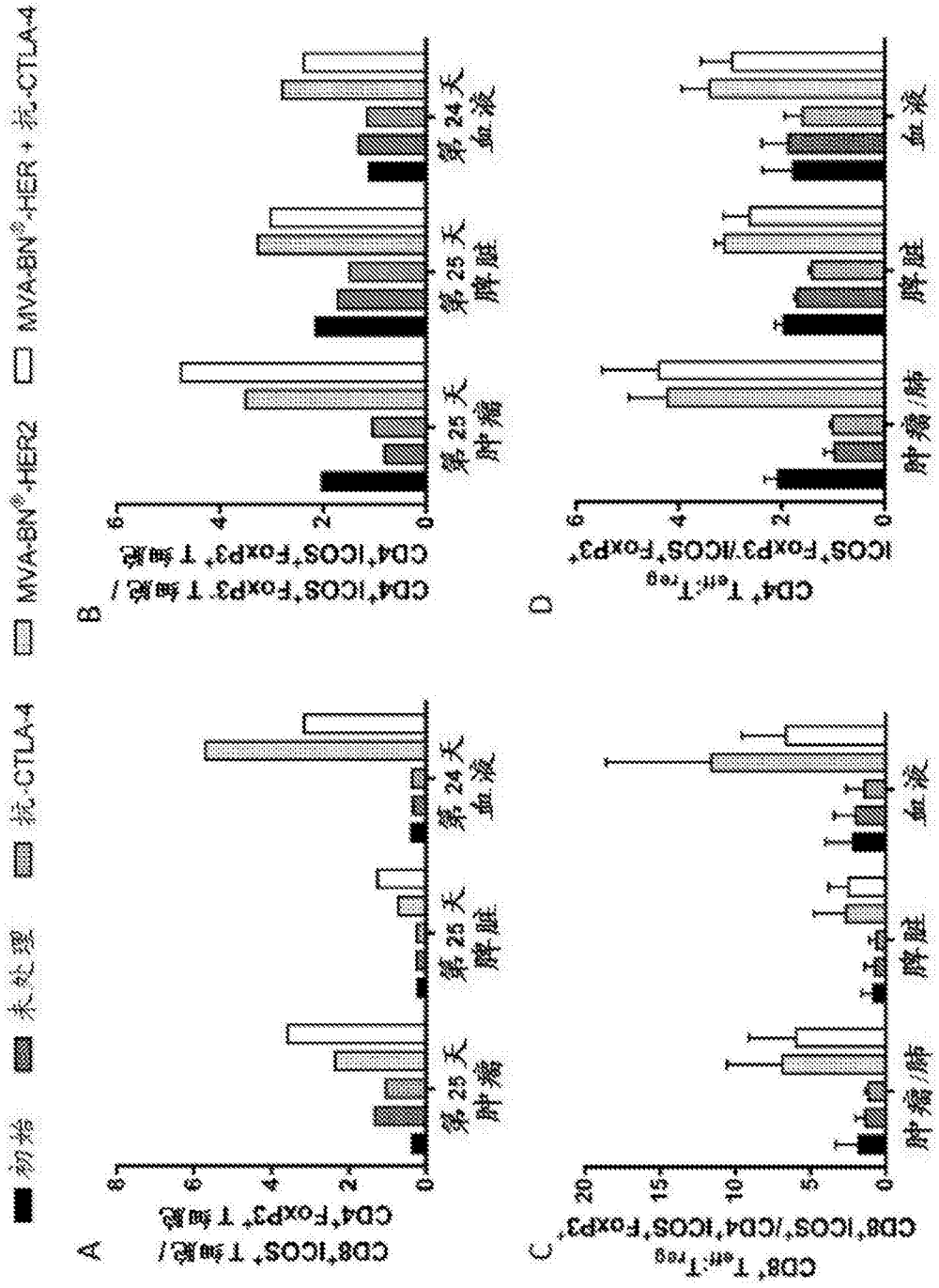


图7

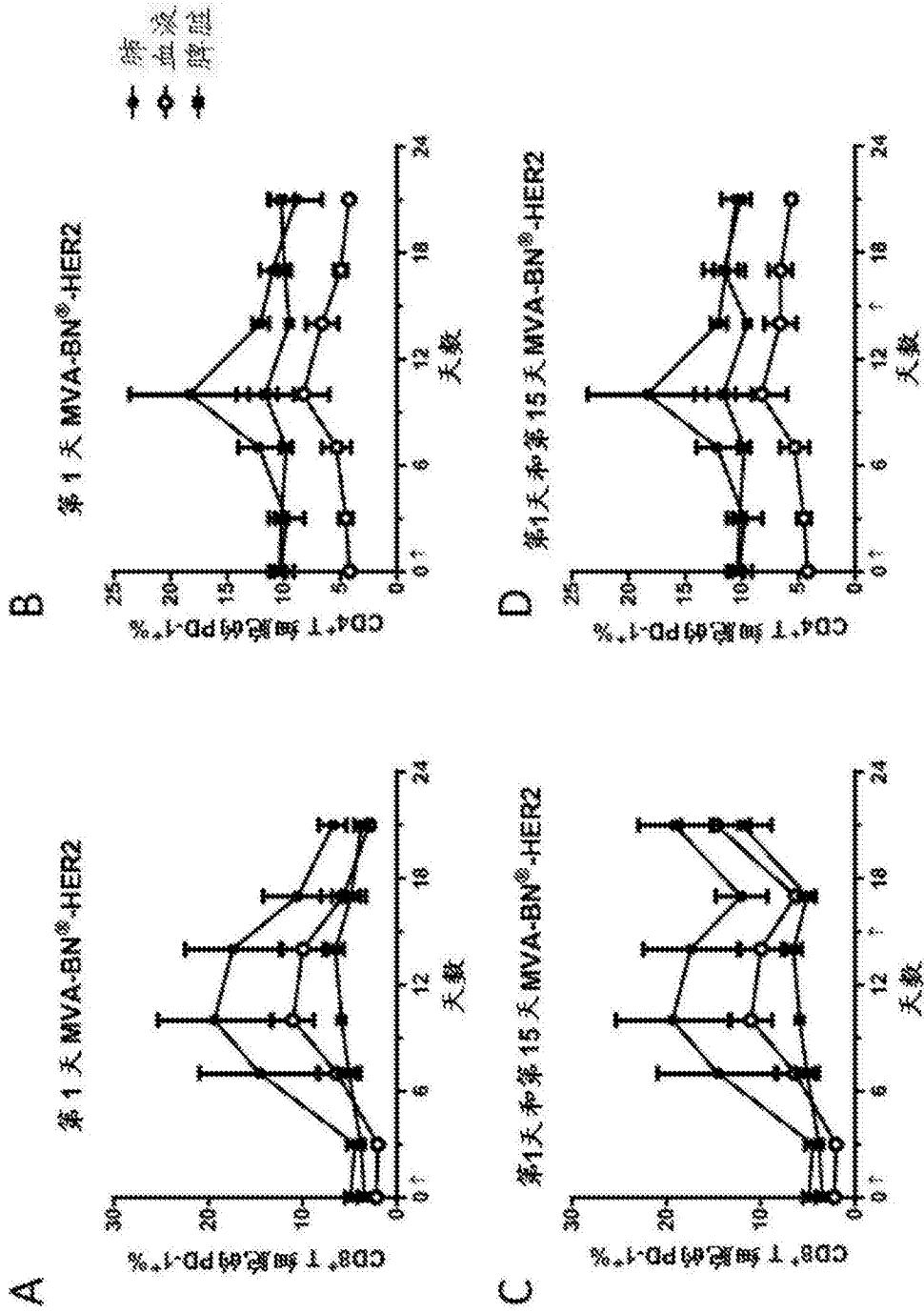


图8

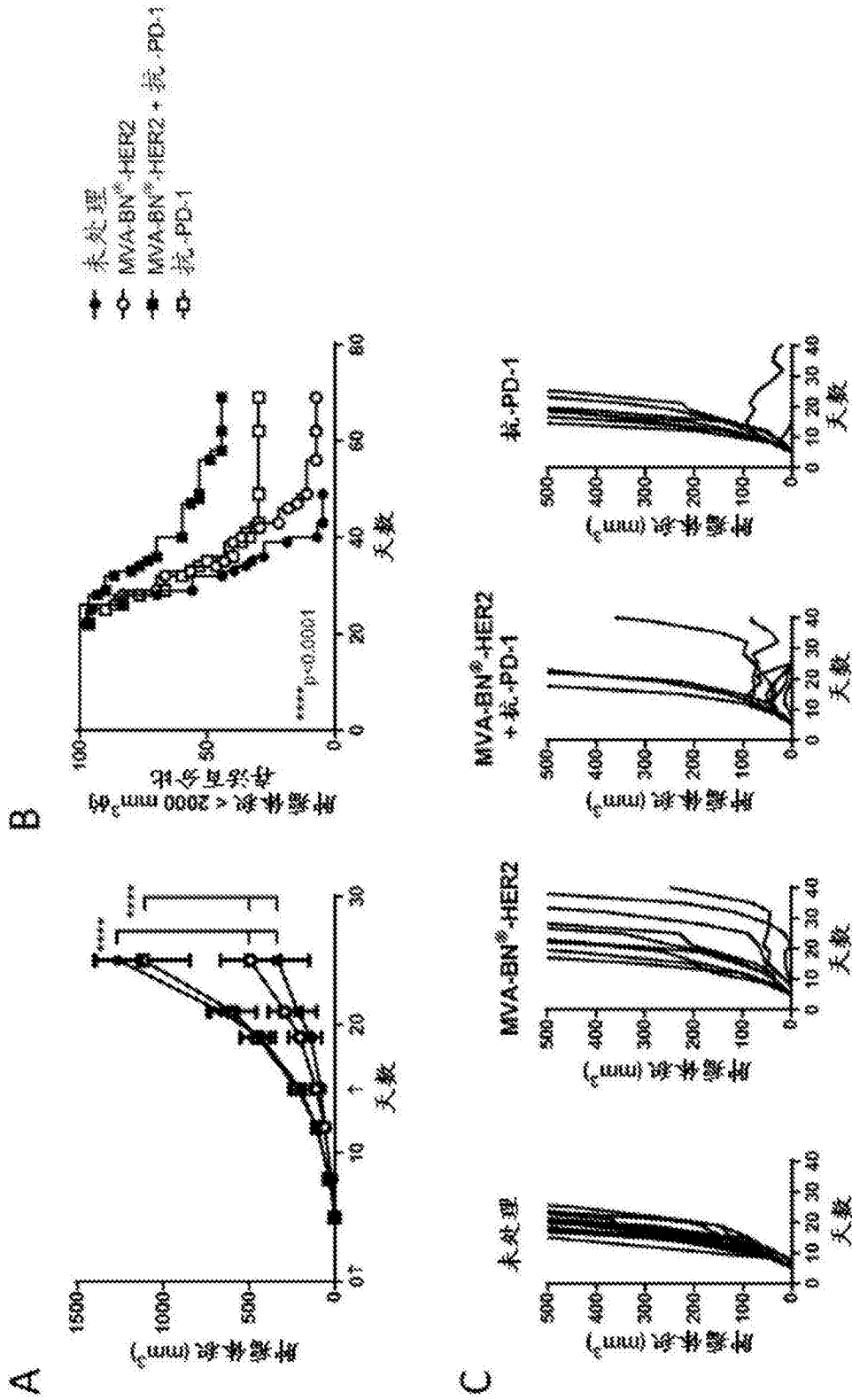


图9

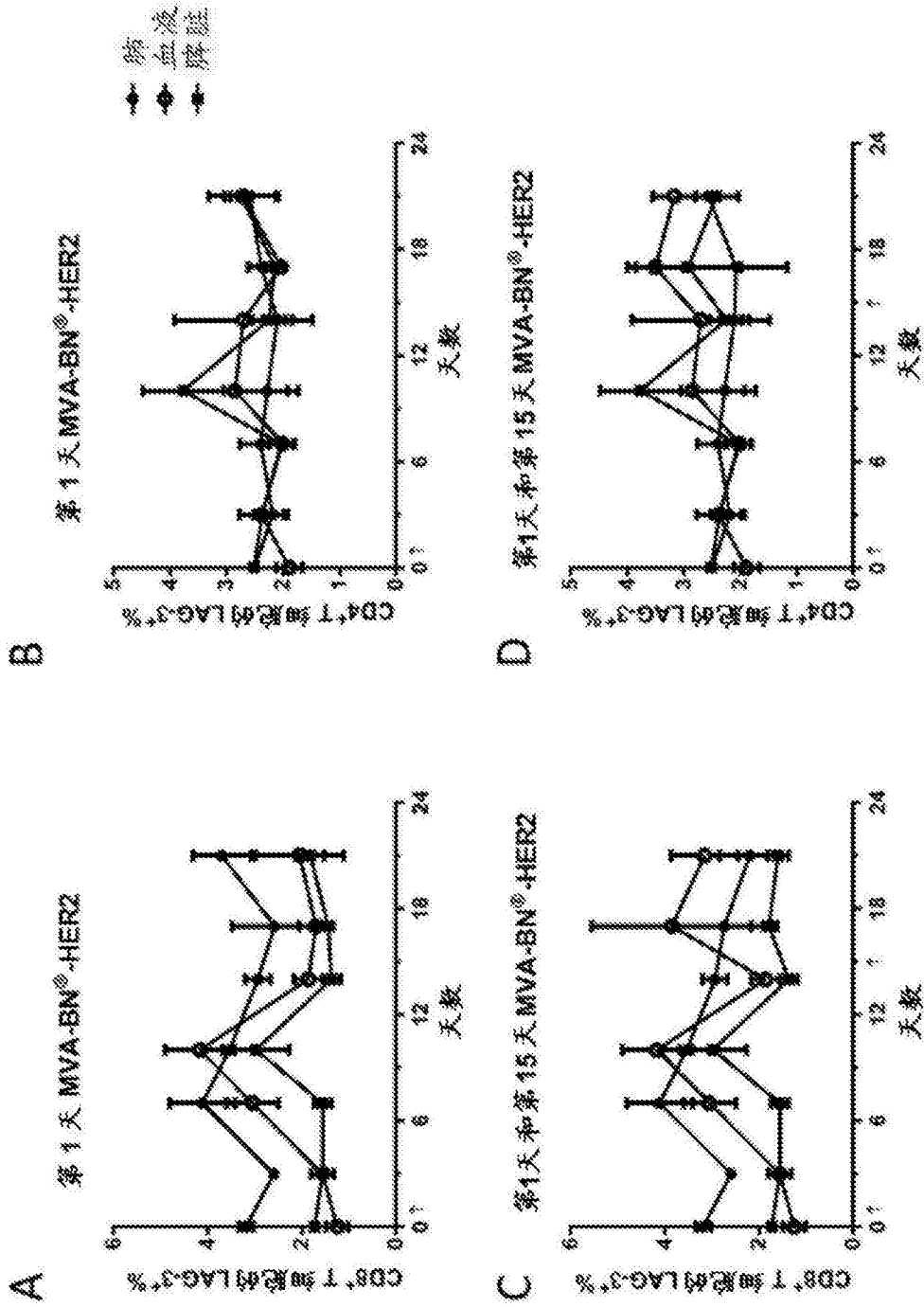


图10

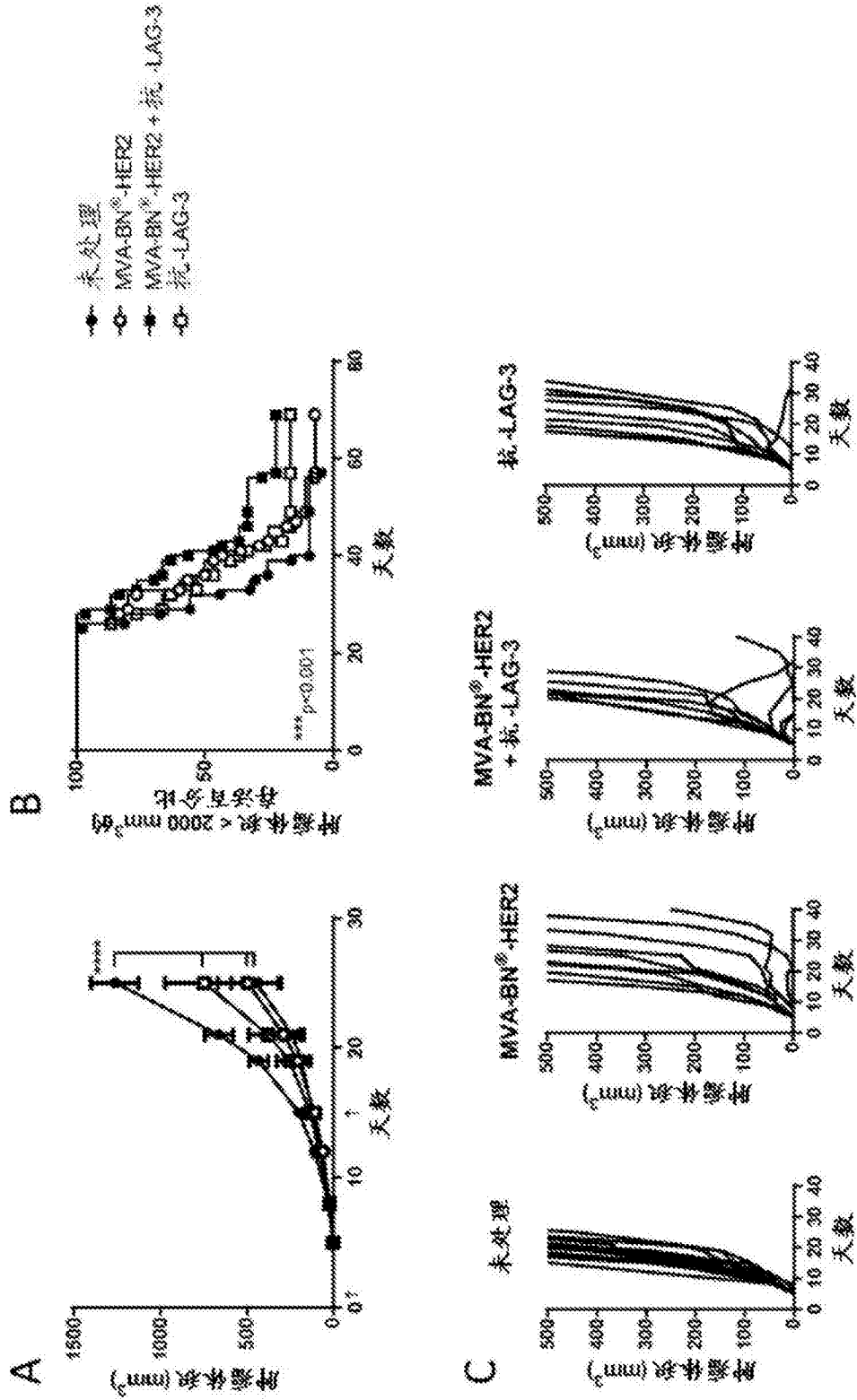


图11

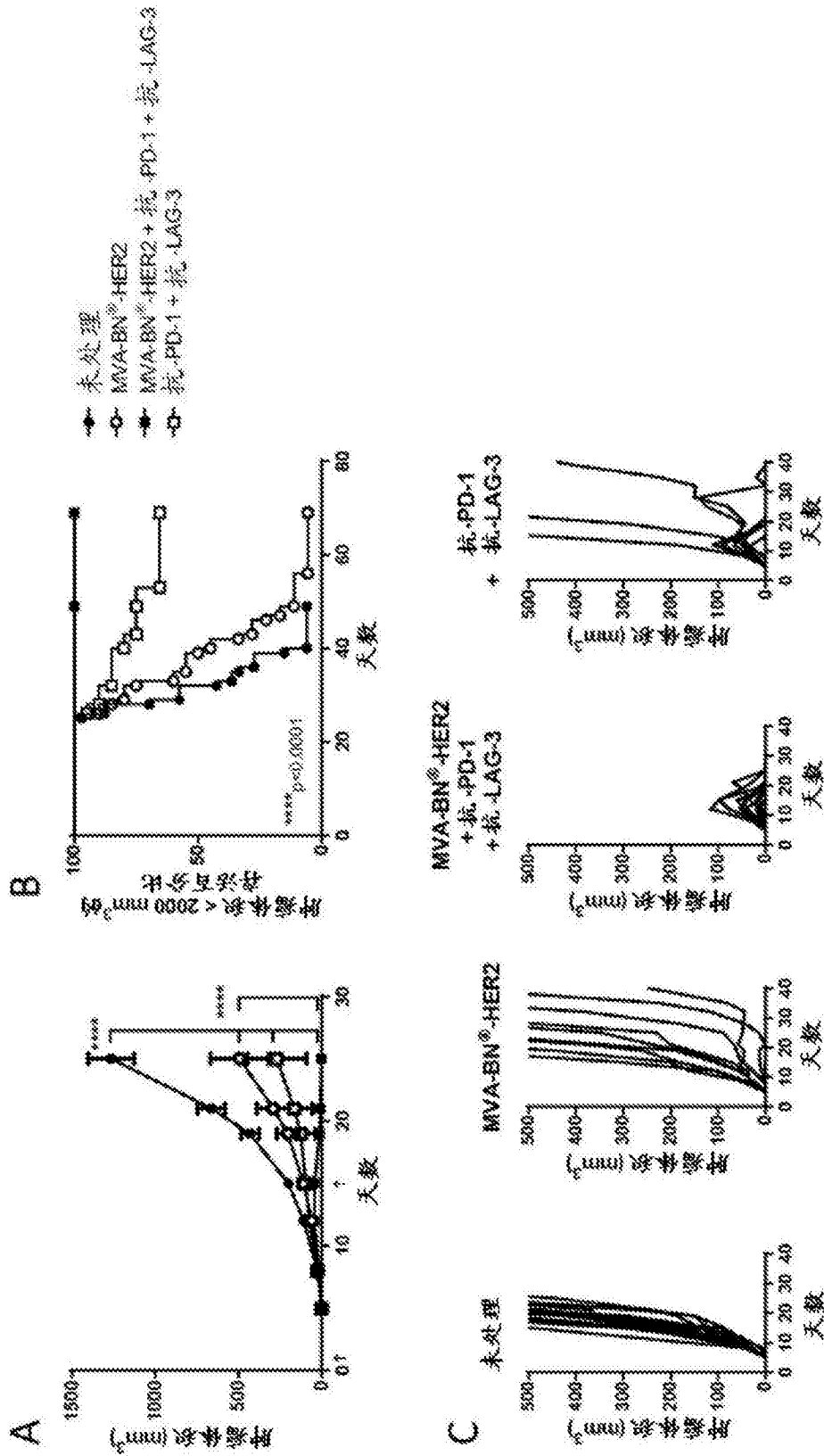


图12

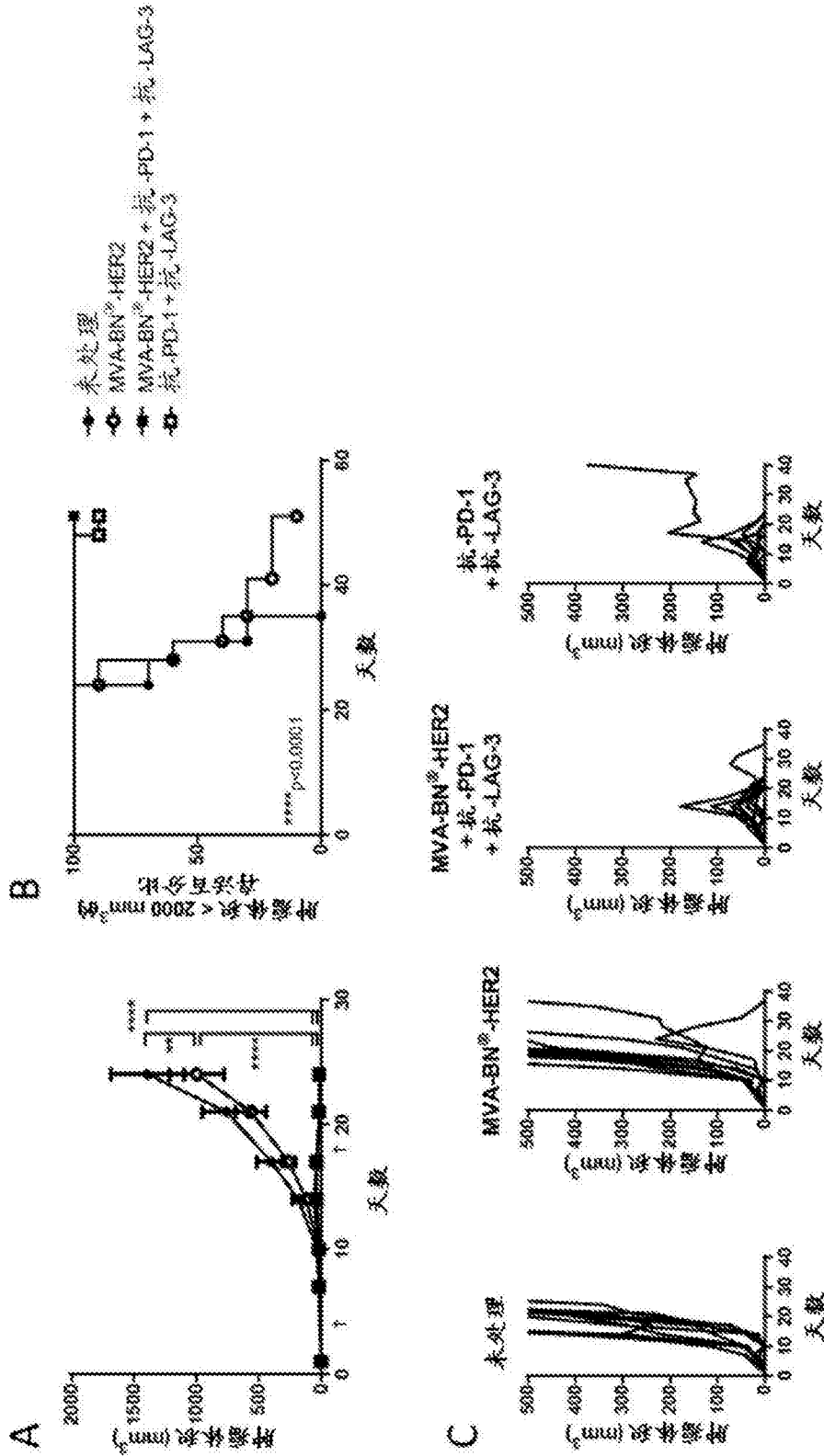


图13

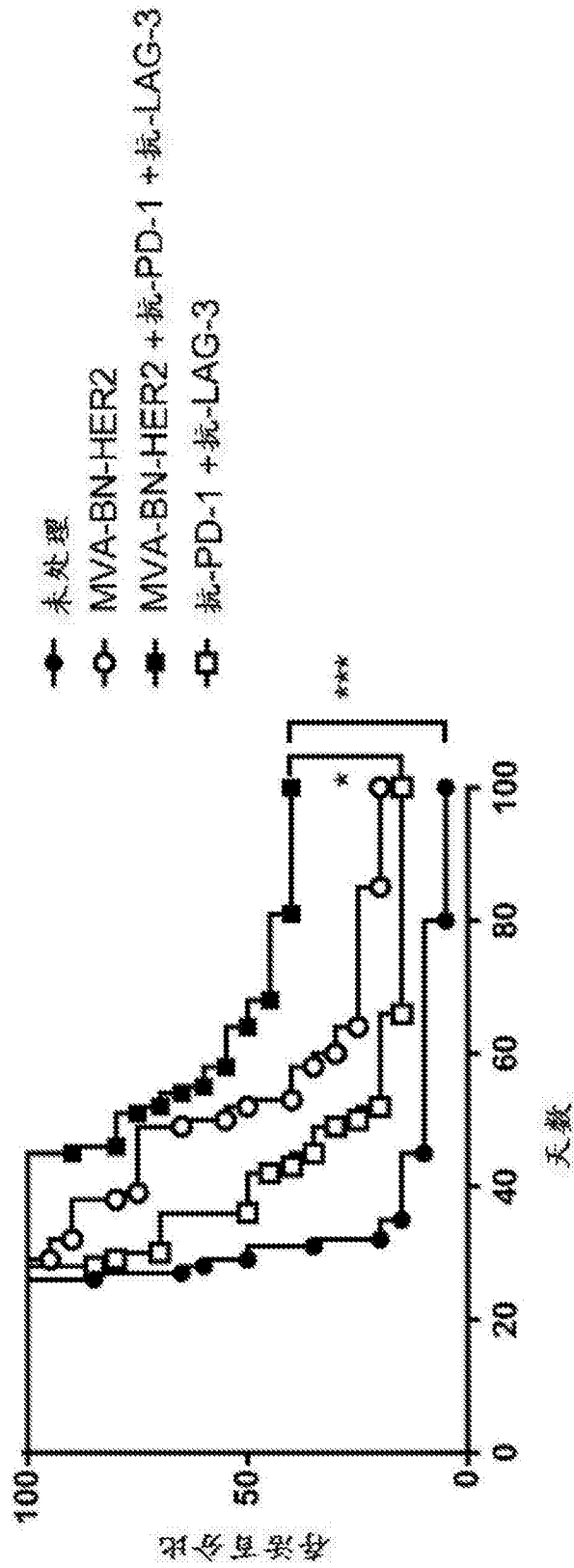


图14

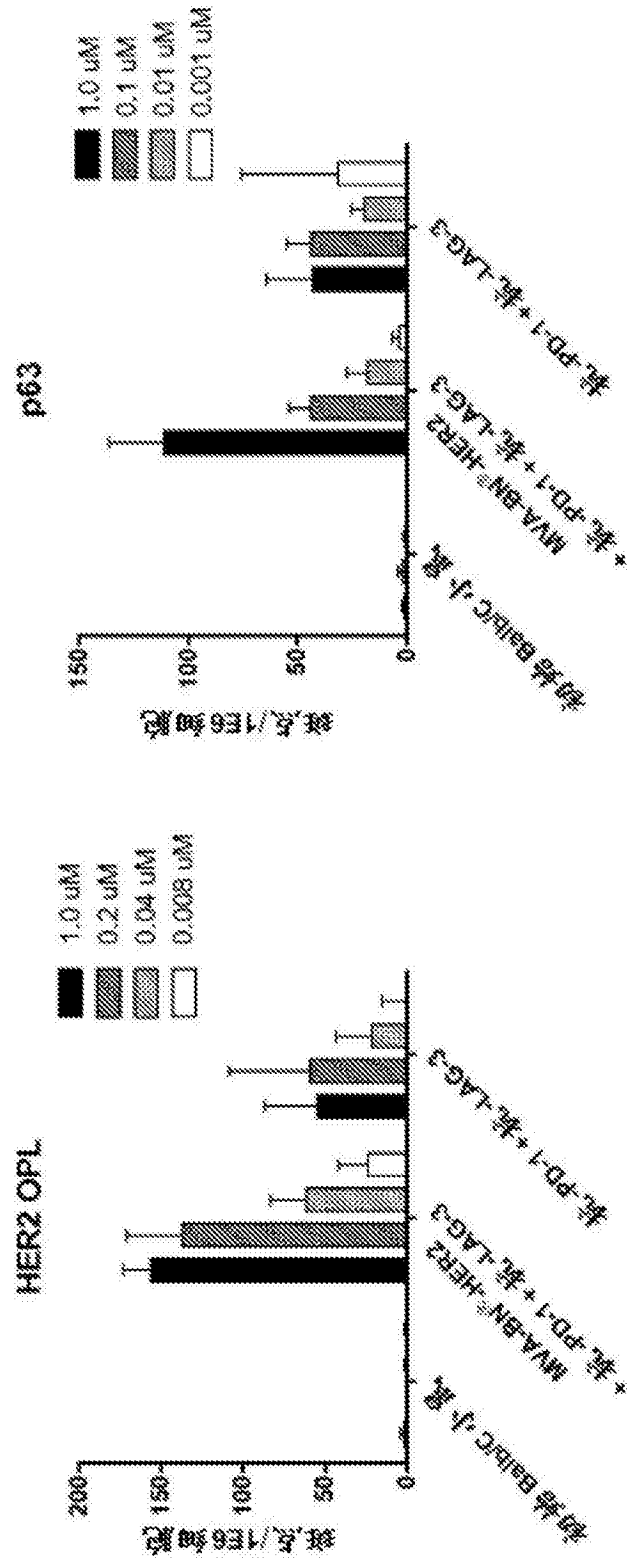


图15

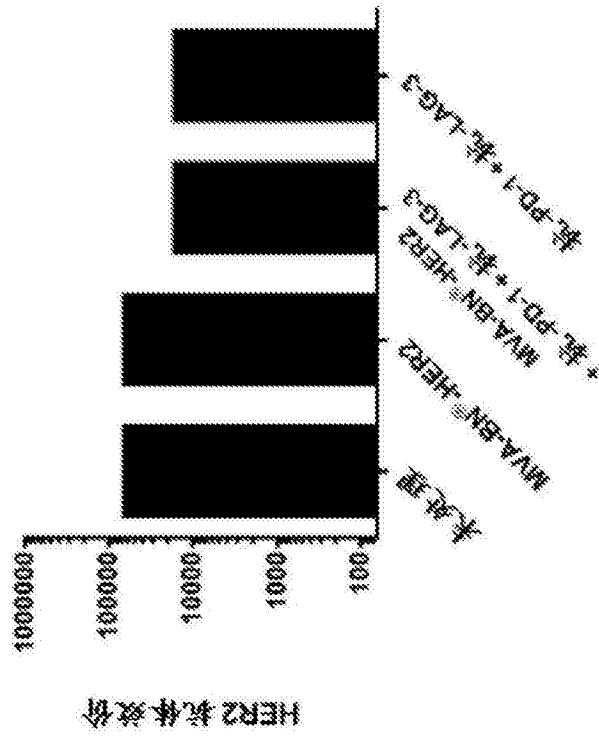


图16

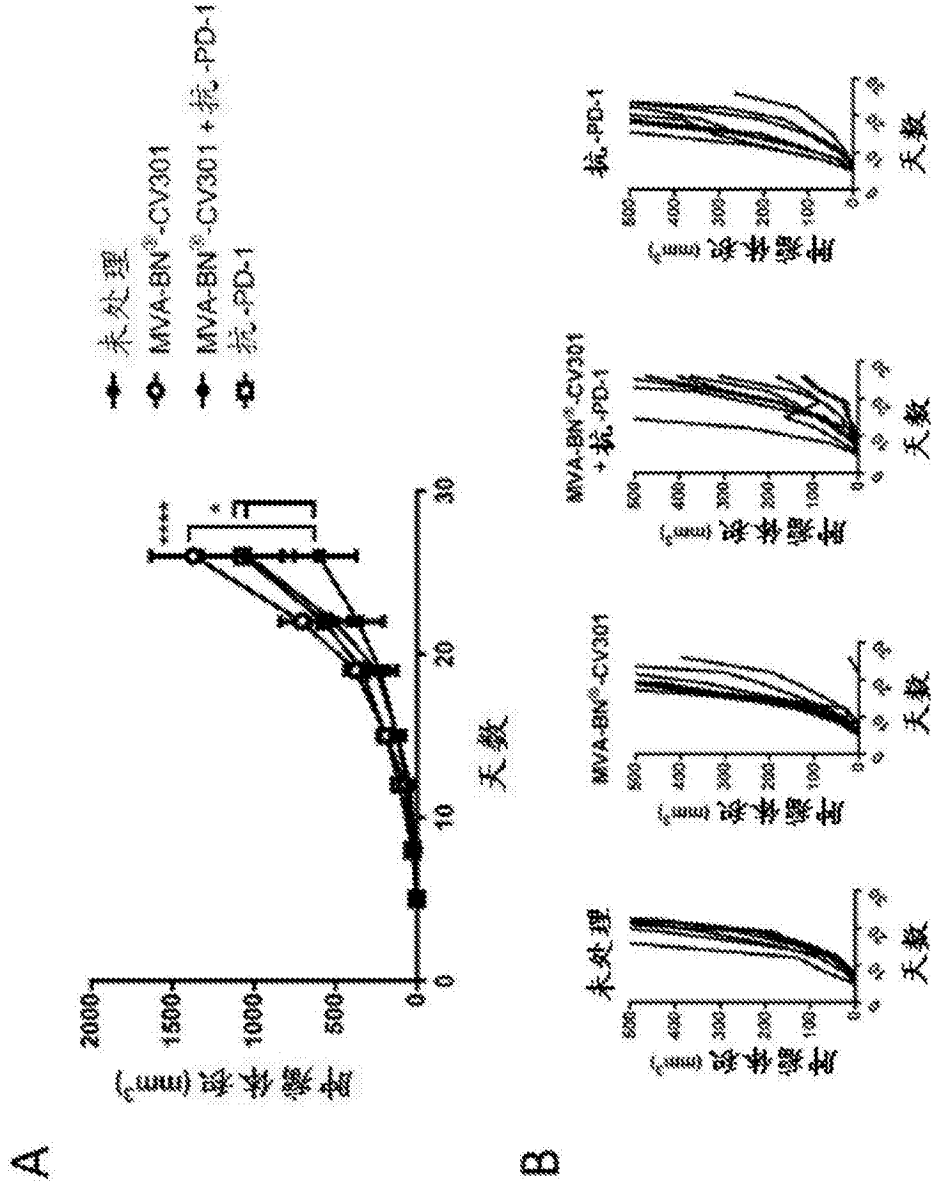


图17

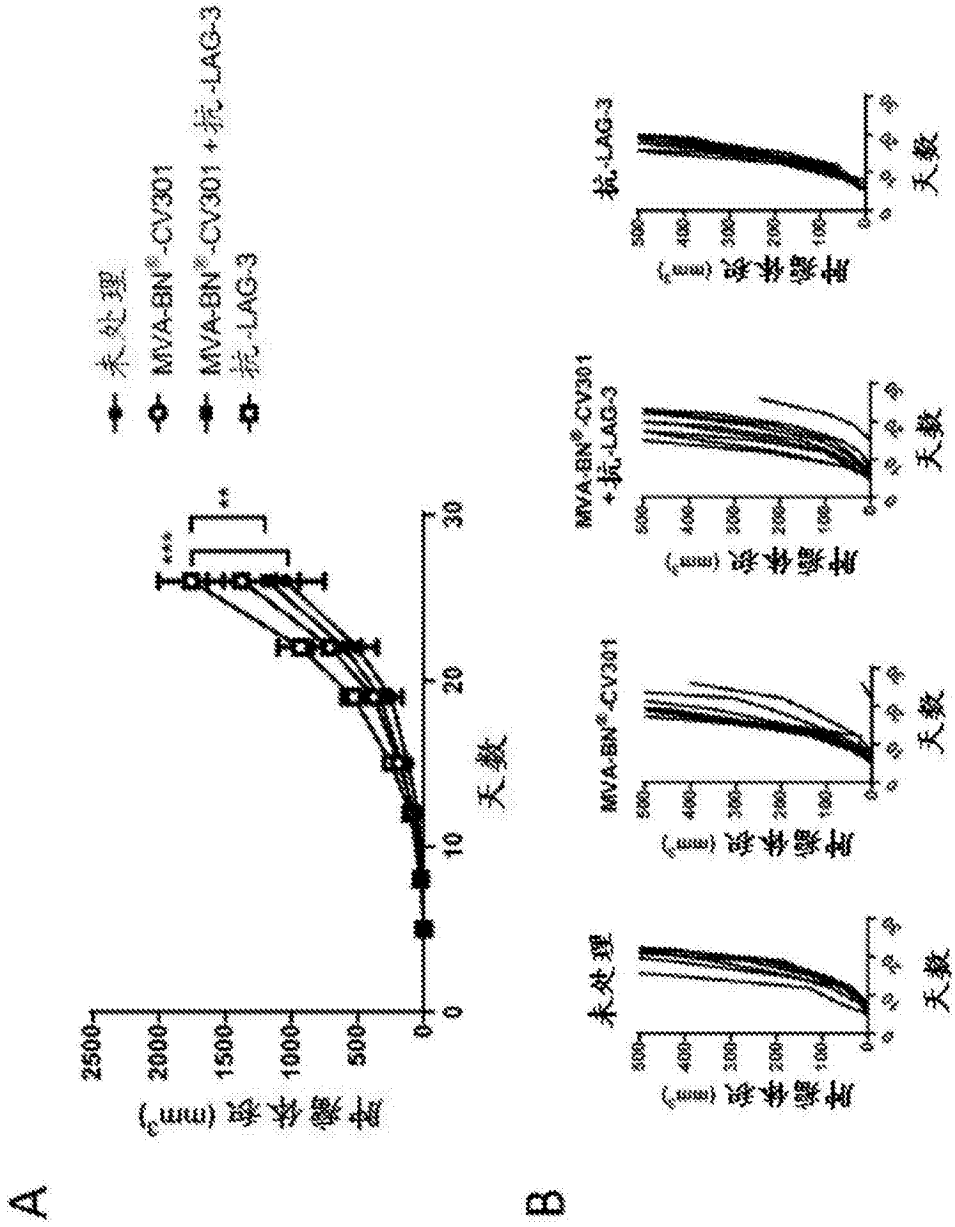


图18

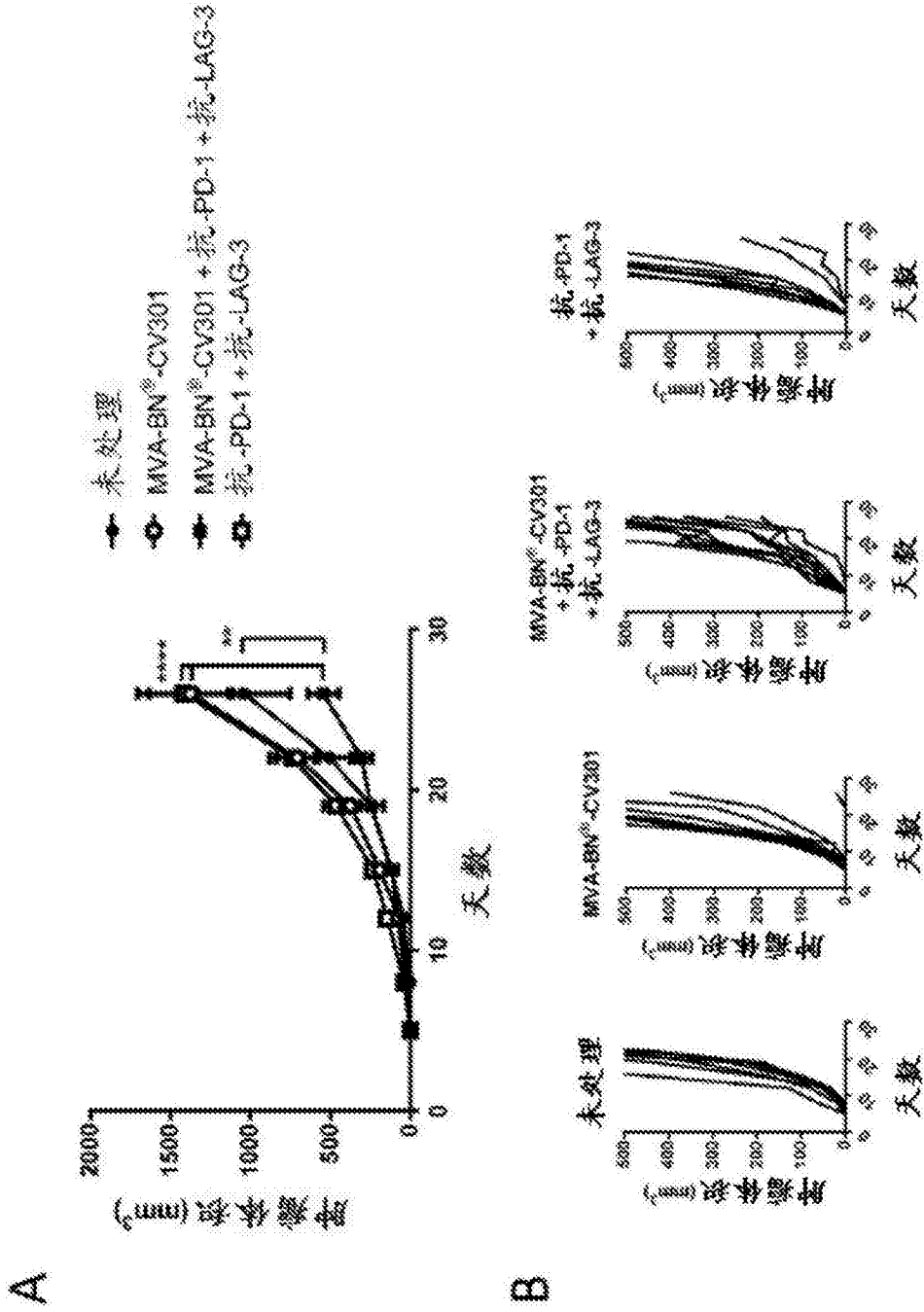


图19

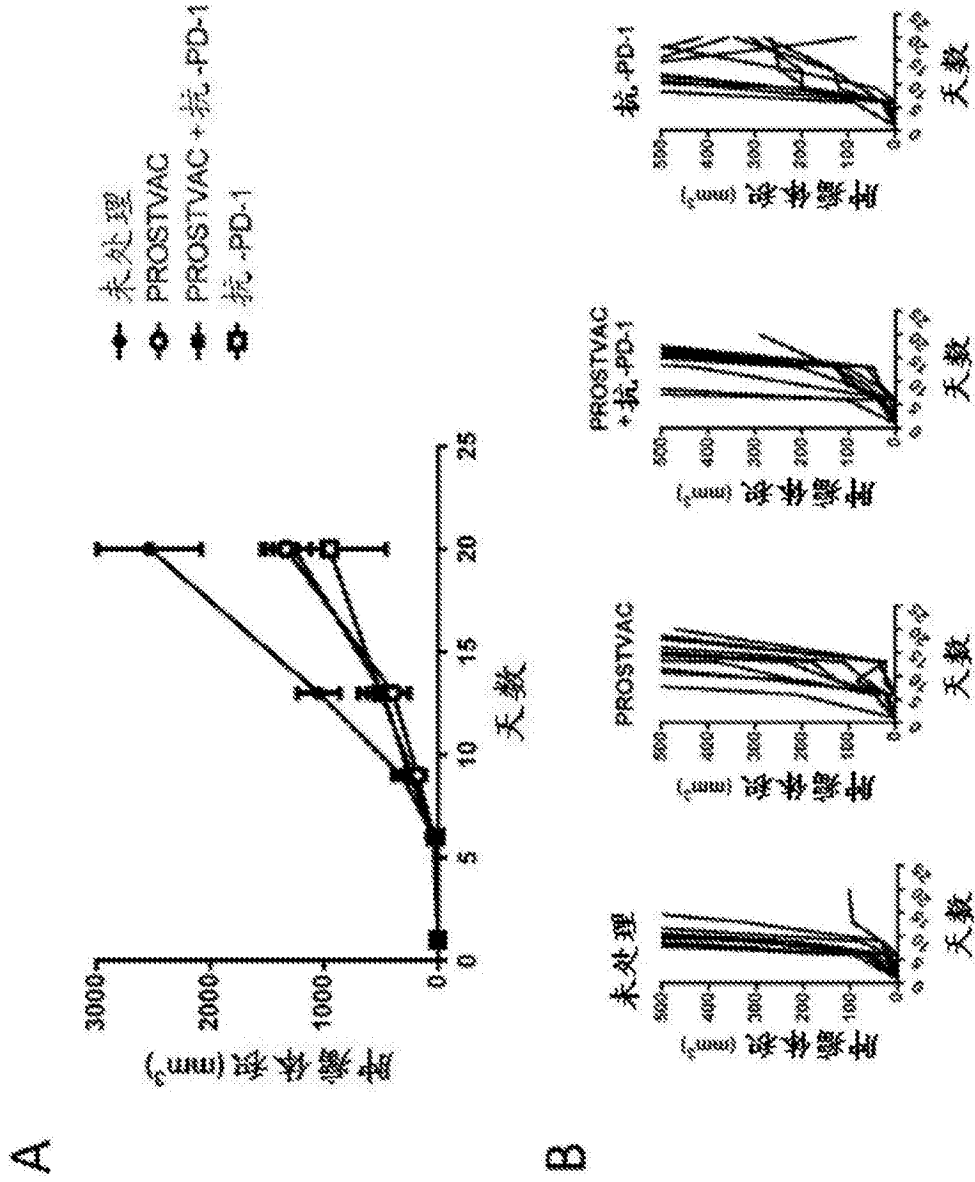


图20

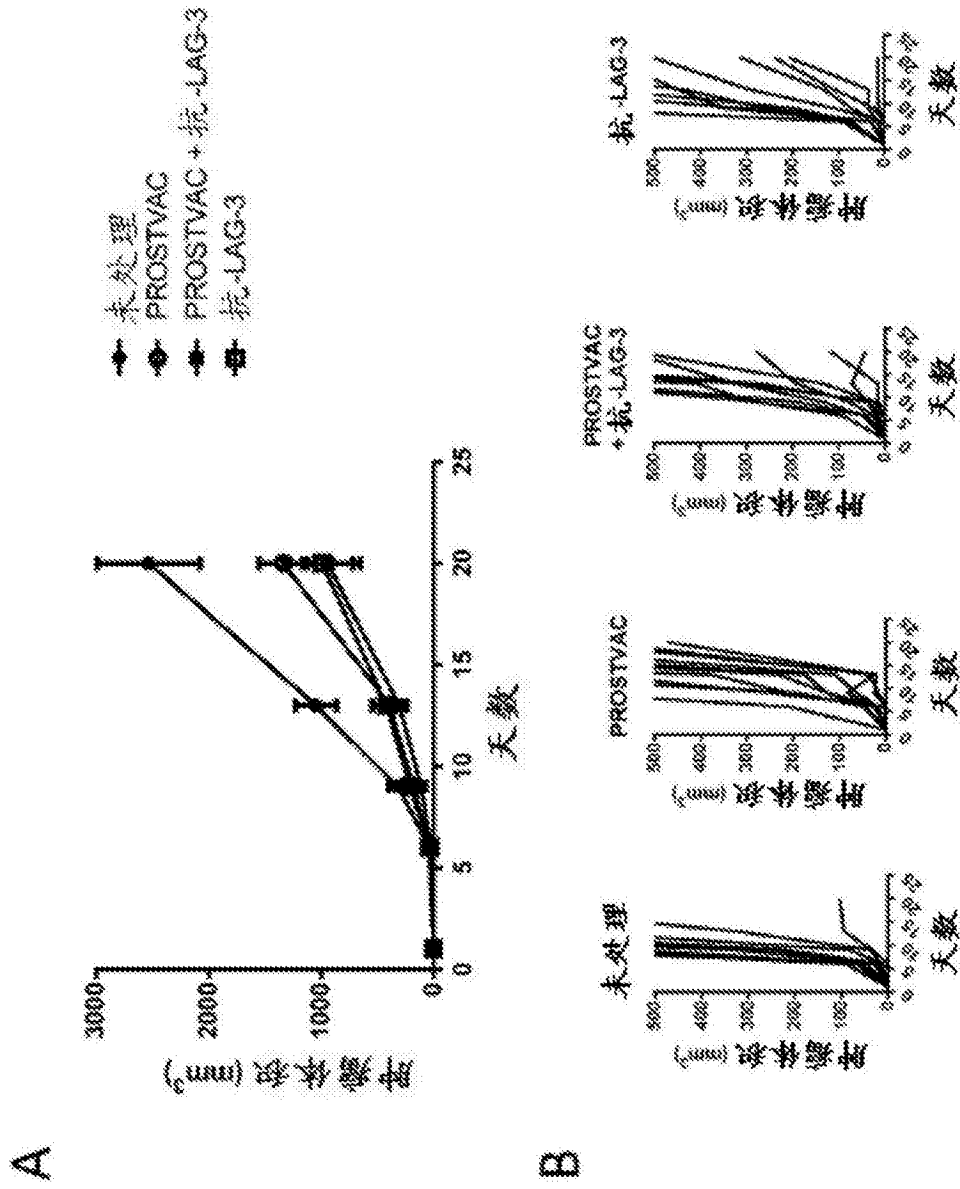


图21

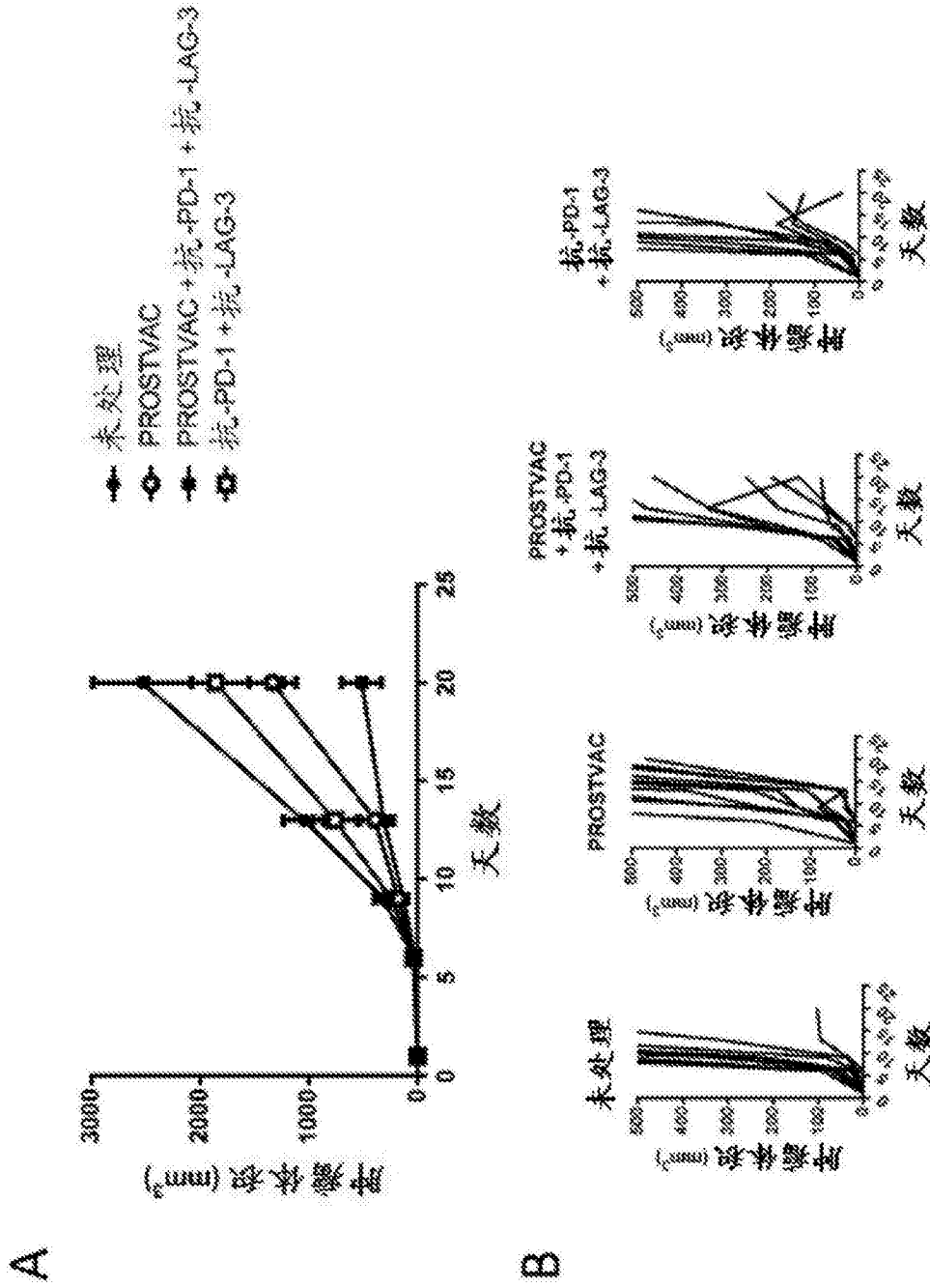


图22

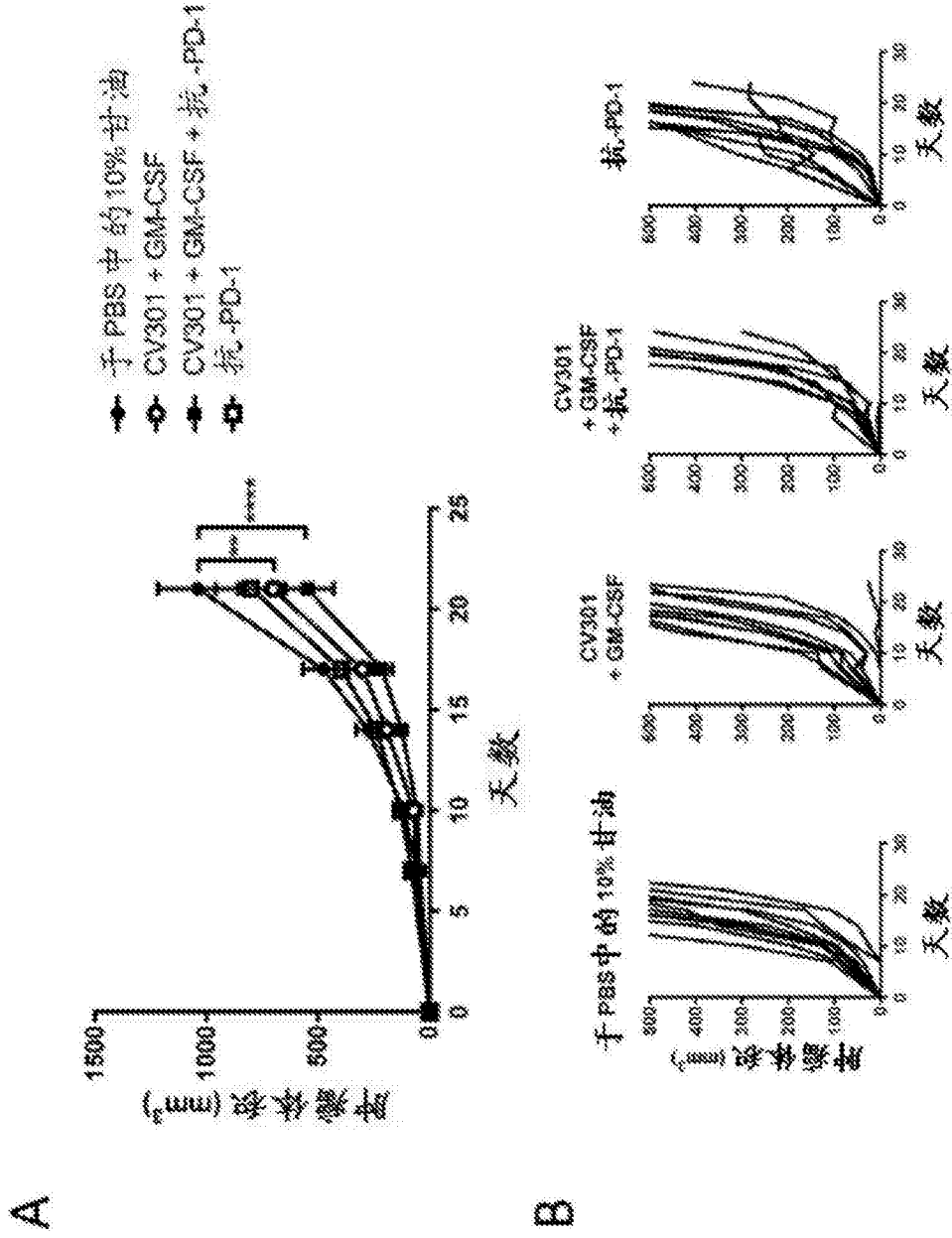


图23