(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 113383006 B
(45)授权公告日 2024.07.02

(21)申请号 201980025974.6
(22)申请日 2019.02.18
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 113383006 A
(43)申请公布日 2021.09.10
(30)优先权数据
10-2018-0019123 2018.02.19 KR
10-2019-0018119 2019.02.15 KR
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2020.10.15
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/KR2019/001898 2019.02.18
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2019/160383 KO 2019.08.22
(73)专利权人 阿斯顿科学公司
地址 韩国首尔特别市
(72)发明人 朴京花 姜镇镐
(74)专利代理机构 北京银龙知识产权代理有限公司 11243
专利代理师 钟海胜 宋琴芝
(51)Int.Cl.
C07K 7/08(2006.01)
C07K 16/18(2006.01)
A61K 45/00(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
A61K 38/00(2006.01)
A61K 39/00(2006.01)
(56)对比文件
WO 2013134116 A1,2013.09.12
CN 102985094 A,2013.03.20
审查员 程珂

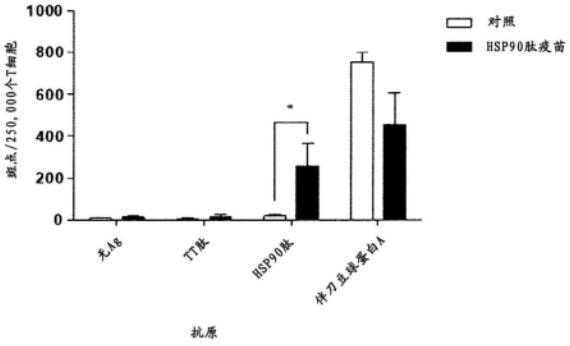
权利要求书1页 说明书15页
序列表4页 附图5页

(54)发明名称

包含热休克蛋白表位的疫苗及其用途

(57)摘要

本发明涉及包含热休克蛋白的表位的疫苗及其组合疗法。包含本发明的多肽的疫苗组合物可以普遍地用于大多数患者,可以容易地工业化,并且具有非常优异的抗肿瘤作用,从而可经济地用于预防和治疗癌症,所述多肽为由SEQ ID NO:1或2的氨基酸序列表示的热休克蛋白90的表位。



CN 113383006 B

1.一种多肽疫苗,包含由SEQ ID NO:1的氨基酸序列表示的表位肽和由SEQ ID NO:2的氨基酸序列表示的表位肽。

2.根据权利要求1所述的多肽疫苗,包含由多表位疫苗基因产生的重组多表位蛋白,所述多表位疫苗基因包含编码由SEQ ID NO:1的氨基酸序列表示的表位肽的核酸和由SEQ ID NO:2的氨基酸序列表示的表位肽的核酸。

3.根据权利要求1所述的多肽疫苗,其预防或治疗癌症。

4.根据权利要求1所述的多肽疫苗,其诱导抗体的产生和/或免疫细胞的活化,所述免疫细胞识别作为抗原的热休克蛋白90。

5.根据权利要求4所述的多肽疫苗,其中,所述抗体和/或免疫细胞靶向在细胞膜表面表达热休克蛋白90的靶细胞。

6.一种多表位疫苗基因,包含编码由SEQ ID NO:1的氨基酸序列表示的表位肽的核酸和编码由SEQ ID NO:2的氨基酸序列表示的表位肽的核酸。

7.根据权利要求6所述的多表位疫苗基因,其用于制备根据权利要求1至5中任一项所述的多肽疫苗。

8.根据权利要求6所述的多表位疫苗基因,其中,所述核酸为重组载体或表达载体的形式。

9.根据权利要求6所述的多表位疫苗基因,其中,所述编码由SEQ ID NO:1的氨基酸序列表示的表位肽的核酸由SEQ ID NO:3的核苷酸序列表示和所述编码由SEQ ID NO:2的氨基酸序列表示的表位肽的核酸由SEQ ID NO:4的核苷酸序列表示。

10.一种疫苗组合物,包含:

(1)多肽疫苗,其包含由SEQ ID NO:1的氨基酸序列表示的表位肽和由SEQ ID NO:2的氨基酸序列表示的表位肽;或

(2)多表位疫苗基因,其包含编码由SEQ ID NO:1的氨基酸序列表示的表位肽的核酸和编码由SEQ ID NO:2的氨基酸序列表示的表位肽的核酸;和

佐剂。

11.一种用于预防或治疗癌症的组合物,包含:

(1)多肽疫苗,其包含由SEQ ID NO:1的氨基酸序列表示的表位肽和由SEQ ID NO:2的氨基酸序列表示的表位肽;或

(2)多表位疫苗基因,其包含编码由SEQ ID NO:1的氨基酸序列表示的表位肽的核酸和编码由SEQ ID NO:2的氨基酸序列表示的表位肽的核酸。

12.根据权利要求11所述的组合物,还包含STING(干扰素基因刺激蛋白)激动剂。

13.根据权利要求11所述的组合物,还包含针对选自由以下组成的组中的任一种的免疫检查点抑制剂:CTLA-4(细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4)、PD-1(程序性细胞死亡蛋白1)、LAG-3(淋巴细胞活化基因3)、TIM-3(T细胞免疫球蛋白及黏蛋白域分子-3)、TIGIT(具有IG和ITIM域的T细胞免疫受体)和VISTA(T细胞活化的V域Ig抑制剂)。

包含热休克蛋白表位的疫苗及其用途

技术领域

[0001] 本发明涉及包含热休克蛋白90的表位的疫苗及其组合疗法。更详细地,本发明涉及由SEQ ID NO:1或2的氨基酸序列表示的热休克蛋白90的表位的多肽、包含该多肽的疫苗组合物、使用该组合物治疗或预防癌症的方法。

背景技术

[0002] 在现代,许多疾病已经可以容易地治疗,无法治愈的疾病几乎消失了。然而,与其他疾病治疗不同,癌症非常困难并且需要复杂的治疗,并且复杂的治疗也不是完全有效的。最近,免疫疗法的方法正在兴起。免疫疗法是通过利用患者体内的免疫应答来治疗癌症的方法。通过这种免疫疗法可以预防癌症。根据疫苗的原理,癌症免疫疗法是通过施用引起癌症的抗原来活化癌症特异性免疫细胞,然后使活化的免疫细胞特异性攻击体内癌症的方法。此外,当将癌症特异性抗原施用至没有癌症的体内时,尚未活化的免疫细胞被活化为癌症特异性记忆免疫细胞,从而在有癌症的情况下特异性攻击癌细胞。

[0003] 热休克蛋白90(Hsp90)是许多“客户”蛋白的构象形式的蛋白折叠、成熟和稳定所必需的ATP酶依赖性分子伴侣(Young等人,2000;Kamal等人,2003)。Hsp90与参与CRPC的数种蛋白相互作用,包括生长因子受体、细胞周期调节剂和类似于Akt的信号激酶、雄激素受体(AR)或Raf-1(Whitesell等人,2005;Takayama等人,2003)。与良性细胞相比,肿瘤细胞表达更高的Hsp90水平(Kamal等人,2003;Chiosis等人,2003),并且Hsp90抑制作为CRPC和其他癌症中的重要靶标而发生。通过靶向Hsp90抑制剂的ATP结合口袋,已经开发了许多Hsp90抑制剂,包括天然化合物(例如格尔德霉素及其类似物)或合成化合物。在结肠癌、乳腺癌、PCa和其他癌症的临床前研究中,已经显示这些药剂抑制Hsp90功能,导致细胞凋亡(Kamal等人,2003;Solit等人,2003;Solit等人,2002)。

[0004] 最近,含有自体肿瘤细胞来源的gp96 HSP肽复合物的HSPPC-96(Oncophage®,Antigenics,纽约,NY,美国)在与IL-2联合用于4期转移性肾癌患者时具有优异的治疗效果。与4期黑素瘤患者的常规治疗相比,在3期临床试验中没有延长生存期的作用,但是已经报道了安全性、有效诱导免疫应答和长期免疫记忆。然而,由于它来源自自体肿瘤细胞,因此不适用于难以获得肿瘤细胞的患者。由于疫苗生产成本高并且制造过程和效果的标准化困难,并且肿瘤特异性蛋白的表位未知,因此难以商业化。存在无法进行监视的困难问题。

[0005] 由此,本发明人已全力寻找可在大多数患者中普遍使用并且具有优异的抗肿瘤作用的疫苗组合物。通过确认当使用包含由SEQ ID NO:1或2的氨基酸序列表示的热休克蛋白90的表位的多肽的疫苗组合物时可以广泛地用于大多数患者,工业化容易,并且抗肿瘤作用优异,从而完成了本发明。

发明内容

[0006] 技术问题

[0007] 本发明的目的是提供一种多肽,其是热休克蛋白90的表位。

[0008] 本发明的另一个目的是提供用于治疗或预防癌症的疫苗组合物,其包含该多肽作为活性成分。

[0009] 本发明的另一个目的是提供抗癌组合物,其包含该多肽作为活性成分。

[0010] 本发明的另一个目的是提供治疗或预防癌症的方法,其包括将该疫苗组合物施用至癌症患者。

[0011] 本发明的另一个目的是提供特异性识别该多肽的抗体。

[0012] 技术方案

[0013] 为了实现上述目的,本发明提供了一种多肽,其是由SEQ ID NO:1或2的氨基酸序列表示的热休克蛋白90的表位。

[0014] 本发明还提供了编码该多肽的基因、包含该基因的重组载体和其中已经导入该基因或该重组载体的重组微生物。

[0015] 本发明还提供了制备多肽的方法,该方法包括以下步骤:(a)培养重组微生物以产生多肽;(b)获得产生的多肽。

[0016] 本发明还提供了包含多肽作为有效成分的用于治疗或预防癌症的疫苗组合物,以及包括对癌症患者施用该疫苗组合物的用于治疗或预防癌症的方法。

[0017] 本发明还提供了特异性识别由SEQ ID NO:1或2的氨基酸序列表示的热休克蛋白90的表位的抗体。

[0018] 有益效果

[0019] 本发明的包含热休克蛋白90的表位的疫苗组合物可在大多数患者中普遍使用,易于工业化,并且具有显著优异的抗肿瘤作用,因此可以经济地用于预防和治疗癌症。

附图说明

[0020] 图1是在本发明中使用计算机算法程序预测Hsp 90蛋白的表位的结果。

[0021] 图2是确认本发明的Hsp 90多肽疫苗的免疫原性的结果。

[0022] 图3是确认在小鼠模型中本发明的Hsp 90多肽疫苗的抗肿瘤作用的结果。

[0023] 图4是确认在小鼠模型中HSP90多肽疫苗、STING激动剂和CTLA-4抑制剂的联合治疗的抗肿瘤作用的结果。

具体实施方式

[0024] 在本发明中,确认了包含由SEQ ID NO:1或2的氨基酸序列表示的热休克蛋白90(Hsp90)的表位多肽的疫苗组合物诱导Th1免疫应答并且具有优异的抗肿瘤作用。

[0025] 因此,在一个方面,本发明涉及一种多肽,该多肽是由SEQ ID NO:1或2的氨基酸序列表示的热休克蛋白90的表位。

[0026] 在本发明中,术语“表位”是指被特异性抗体或被T细胞中的T细胞受体蛋白和/或主要组织相容性复合体(MHC)受体识别的、抗原结合位点处的一组氨基酸残基。表位是形成被抗体、T细胞受体或HLA分子识别的位点的分子,并且是指一级、二级和三级肽结构或电荷。

[0027] 在本发明的实施方式中,使用针对Hsp 90全序列的5种算法程序,选择了预期与最常见的MHC II类等位基因具有良好结合亲和力的12个15聚体肽序列。然后,获得了对MHC

II类等位基因具有良好结合亲和力并具有优异的抗肿瘤作用的两种表位。

[0028] 另一方面,本发明涉及编码多肽的基因。

[0029] 在本发明中,基因的特征在于其由SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4的核苷酸序列表示。

[0030] 在另一方面,本发明涉及包含该基因的重组载体和其中已经导入该基因或该重组载体的重组微生物。

[0031] 另一方面,本发明涉及一种生产多肽的方法,该方法包括以下步骤:(a)培养重组微生物以产生多肽;(b)获得产生的多肽。

[0032] 在本发明中,载体是指与合适的控制序列连接使得可以在合适的宿主细胞中表达靶蛋白的DNA序列。控制序列可以包括能够启动转录的启动子、用于调节这样的转录的任何操纵子序列、编码合适的mRNA核糖体结合位点的序列以及控制转录和翻译的终止的序列。载体可以根据目的以各种方式制造。载体的启动子可以是组成型的或诱导型的。可以将载体转化到合适的宿主中,然后独立于宿主基因组进行复制或发挥作用,或者可以将载体整合到自身基因组中。

[0033] 对本发明中使用的载体没有特别限制,只要该载体可以在宿主细胞中复制即可,并且可以使用本领域已知的任何载体。常用载体的实例包括天然或重组质粒、噬菌粒、粘粒、病毒和噬菌体。例如,可以使用pWE15、M13、λMBL3、λMBL4、λIXII、λASHII、λAPII、λt10、λt11、Charon4A和Charon21A作为噬菌体载体或粘粒载体,而作为质粒载体,可以使用pBR系统、pUC系统、pBluescript II系统、pGEM系统、pTZ系统、pCL系统和pET系统。本发明中可用的载体没有特别限制,可以使用已知的表达载体。

[0034] 术语“表达控制序列”的意思是对于在特定宿主生物体中可操作地连接的编码序列的表达必不可少的DNA序列。这样的调控序列包括用于实现转录的启动子、用于调节这样的转录的任何操纵子序列、编码合适的mRNA核糖体结合位点的序列和调节转录和翻译的终止的序列。例如,适用于原核生物的调控序列包括启动子、任选的操纵子序列和核糖体结合位点。适用于真核细胞的调控序列包括启动子、聚腺苷酸化信号和增强子。对质粒中基因表达量影响最大的因子是启动子。作为高表达的启动子,优选使用SRα启动子、巨细胞病毒来源的启动子等。

[0035] 为了表达本发明的DNA序列,可以在载体中使用多种表达控制序列中的任一种。有用的表达控制序列的实例包括SV40或腺病毒的早期和晚期启动子、lac系统、trp系统、TAC或TRC系统、T3和T7启动子、噬菌体λ的主要操纵子和启动子区、FD蛋白的调节区、3-磷酸甘油酸激酶或其他糖酵解酶的启动子、磷酸酶的启动子(例如Pho5)、酵母α穿越系统的启动子、和其他已知调节原核或真核细胞或它们的病毒的基因表达的组成和诱导序列及其各种组合。T7 RNA聚合酶启动子Φ10可以有用地用于在大肠杆菌(E.coli)中表达蛋白质NSP。

[0036] 当核酸与另一核酸序列处于功能关系时为“可操作地连接”。它可以是当适当的分子(例如转录活化蛋白)与调控序列结合时以允许基因表达的方式连接的基因和调控序列。例如,如果前序列或分泌型前导序列的DNA表达为参与多肽分泌的完整蛋白质,则前序列或分泌型前导序列的DNA为可操作地连接至多肽的DNA;如果启动子或增强子影响序列的转录,则启动子或增强子为可操作地连接至编码序列;如果核糖体结合位点影响序列的转录,则核糖体结合位点为可操作地连接至编码序列;或如果核糖体结合位点被配置为促进翻

译,则核糖体结合位点为可操作地连接至编码序列。通常,“可操作地连接”的意思是连接的DNA序列是接触的,并且在分泌型前导序列的情况下,是接触的并且在阅读框内。但是,增强子不需要接触。这些序列的连接通过在方便的限制性酶切位点处的连接反应(连接)进行。如果不存在这样的位点,则使用根据常规方法的合成寡核苷酸衔接子或接头。

[0037] 如本文所用,术语“表达载体”是其中插入异源DNA的片段的重组载体,并且通常是指双链DNA的片段。在此,异源DNA是指在不天然存在于宿主细胞中的DNA。一旦在宿主细胞中,表达载体就可以独立于宿主染色体DNA复制,并且可以产生该载体及其插入的(异源)DNA的多个拷贝。

[0038] 如本领域众所周知的,为了增加宿主细胞中转染的基因的表达水平,该基因必须可操作地连接至在选择的表达宿主中发挥功能的转录和翻译表达控制序列。优选地,表达控制序列和相应的基因被包含在含有细菌选择标记和复制起点的单个表达载体中。当表达宿主是真核细胞时,表达载体还应包含可用于真核表达宿主的表达标记。

[0039] 为了表达编码本发明多肽的基因,可以使用多种表达宿主/载体组合。适于真核宿主的表达载体包含来源于例如SV40、牛乳头瘤病毒、腺病毒、腺相关病毒、巨细胞病毒和逆转录病毒的表达控制序列。可用于细菌宿主的表达载体包括:从大肠杆菌获得的细菌质粒,例如pBluescript、pGEX2T、pUC载体、colE1、pCR1、pBR322、pMB9及其衍生物;具有更广的宿主范围的质粒,例如RP4;噬菌体DNA,可以例示为多种噬菌体λ衍生物,如λgt10和λgt11、NM989;以及其他DNA噬菌体,如M13和丝状单链DNA噬菌体。可用于酵母细胞的表达载体是2μ质粒及其衍生物。可用于昆虫细胞的载体是pVL 941。

[0040] 用上述表达载体转化或转染的宿主细胞构成本发明的另一方面。如本文所用,术语“转化”的意思是将DNA导入宿主中,使得DNA可作为染色体外因子或通过完成染色体整合而变得可复制。如本文所用,术语“转染”的意思是表达载体被宿主细胞接受,无论实际上是否表达任何编码序列。

[0041] 本发明的宿主细胞是其中导入了具有编码一种或多种靶蛋白的多核苷酸的载体的重组微生物;或其中导入了编码一种或多种靶蛋白的多核苷酸并且将该多核苷酸整合到染色体中以表达靶蛋白的重组微生物。它可以是原核或真核细胞。另外,通常使用DNA导入效率高和导入的DNA表达效率高的宿主。已知的真核和原核宿主,例如大肠杆菌、假单胞菌(Pseudomonas)、芽孢杆菌(Bacillus),链霉菌(Streptomyces)、真菌、酵母、昆虫细胞(如草地贪夜蛾(Spodoptera frugiperda)(SF9))、动物细胞(如CHO和小鼠细胞)、非洲绿猴细胞(如COS 1、COS 7、BSC 1、BSC 40和BMT 10)和组织培养的人细胞是可以使用的宿主细胞的实例。在使用COS细胞的情况下,由于SV40大T抗原在COS细胞中表达,因此具有SV40的复制起始点的质粒应作为多拷贝的附加体存在于细胞中。可以预期比平常的表达更高。导入的DNA序列可以从与宿主细胞相同的物种中获得,可以是与宿主细胞不同的物种,或者其可以是包含任何异源或同源DNA的杂合DNA序列。

[0042] 当然,应当理解,并不是所有的载体和表达控制序列在表达本发明的DNA序列中都起相同的作用。同样,并非所有宿主对于同一表达系统都起相同的作用。但是,本领域技术人员可以在没有过度的实验负担的情况下在各种载体、表达控制序列和宿主中进行适当的选择,而不背离本发明的范围。例如,选择载体时,必须考虑宿主,因为载体必须在其中复制。还应考虑载体的拷贝数、调节拷贝数的能力以及由载体编码的其他蛋白质(如抗生素标

记)的表达。在选择表达控制序列时,必须考虑数个因素。例如,应该考虑序列的相对强度、可控制性以及与本发明的DNA序列的相容性等,特别是在可能的二级结构方面考虑。应考虑以下的因素来选择单细胞宿主:选择的载体、由本发明的DNA序列编码的产物的毒性、分泌特性、准确折叠蛋白质的能力、培养和发酵要求、从宿主纯化由本发明DNA序列编码的产物的容易性。在这些变量的范围内,本领域普通技术人员可以选择能够在发酵或大规模动物培养中表达本发明的DNA序列的各种载体/表达控制序列/宿主的组合。作为通过表达克隆来克隆本发明的多肽的cDNA的筛选方法,可以使用结合方法、淘选方法、膜乳化方法等。

[0043] 在本发明中,作为将基因插入宿主细胞的染色体的方法,可以使用公知的基因操作方法。非病毒递送方法的实例包括细胞穿孔法、脂质体转染、显微注射、基因枪法(ballistic method)、病毒体、脂质体、免疫脂质体、多价阳离子或脂质:核酸缀合物、裸露DNA、人造病毒粒和化学促进DNA引入。声孔效应(sonoporation),例如使用Sonitron 2000系统(Rich-Mar)的方法也可用于核酸的递送,其他代表性的核酸递送系统包括诸如Amaxa Biosystems(德国科隆)、Maxcyte,ATx(马里兰州罗克维尔)和BTX Molesular Syetem(马塞诸塞州霍利斯顿)的方法。脂质体转染法记载于美国专利第5,049,386号、美国专利第4,946,787号及美国专利第4,897,355号中,脂质体转染试剂可从例如TransfectamTM和LipofectinTM商业地获得。适合于多核苷酸的有效受体识别脂质体转染的阳离子或中性脂质包括Felgner脂质(WO91/17424和WO91/16024),并且可通过离体导入递送至细胞或者通过体内导入递送至靶组织。用于制备包含靶脂质体如免疫脂质复合物的脂质:核酸复合物的方法是本领域熟知的(Crystal,科学(Science.),270:404-410,1995;Blaese等人,Cancer Gene Ther.,2:291-297,1995;Behr等人,Bioconjugate Chem.,5:382389,1994;Remy等人,Bioconjugate Chem.,5:647-654,1994;Gao等人,基因疗法(Gene Therapy.),2:710-722,1995;Ahmad等人,Cancer Res.,52:4817-4820,1992;美国专利第4,186,183号;美国专利第4,217,344号;美国专利第4,235,871号;美国专利第4,261,975号;美国专利第4,485,054号;美国专利第4,501,728号;美国专利第4,774,085号;美国专利第4,837,028号;美国专第第4,946,787号)。

[0044] 逆转录病毒的亲和力可通过与外部包膜蛋白整合而被改变,从而扩大靶细胞的种类。慢病毒载体是转导或感染非分裂期细胞而产生高病毒滴度的逆转录病毒载体。靶组织决定逆转录病毒基因递送系统。逆转录病毒载体包含能够包装6-10kb外部序列的顺式作用长末端重复序列。足以克隆和包装载体的最小顺式作用LTR可用于将治疗基因整合到靶细胞中,用于永久性的转基因表达。广泛使用的逆转录病毒载体包括鼠白血病病毒(MuLV)、长臂猿白血病病毒(GaLV)、猴免疫缺陷病毒(SIV),人免疫缺陷病毒(HIV)及其组合病毒(Buchscher等人,J.Virol.,66:2731-2739,1992;Johann等人,J.Virol.,66:1635-1640 1992;Sommerfelt等人,Virol.,176:58-59,1990;Wilson等人,J.Virol.,63:2374-2378,1989;Miller等人,J.Virol.,65:2220-2224,1991;PCT/US94/05700)。

[0045] 在蔗糖磷酸化酶瞬时表达的情况下,基于腺病毒的系统被更广泛地使用。基于腺病毒的载体在许多细胞中引起高效转导,但不需要细胞分裂。使用该载体,可以获得高滴度和高水平的表达,并且可以在简单的系统中大量生产。另外,使用腺相关病毒(AAV)载体用靶核酸转导细胞。例如,AAV用于体外核酸和肽的生产以及体内和离体的基因治疗(West等人,病毒学(Virology.),160:38-47,1987;美国专利第4,797,368号;WO93/24641;Kotin,

HumanGene疗法(Therapy.),5:793-801,1994;Muzyczka,J.Clin.Invest.,94:1351,1994)。重组AAV载体的构建是已知的(美国专利第5,173,414号;Tratschin等人,Mol.Cell.Biol.,5:3251-3260,1985;Tratschin等人,Mol.Cell.Biol.,4:20722081,1984;Hermonat&Muzyczka,PNAS.,81:6466-6470,1984;Samulski等人,J Virol.,63:038223828,1989)。在临床试验中,使用了使用至少六个病毒载体的基因转移方法,该方法是通过将基因插入产生转导体(transducer)的辅助细胞系中来补充缺陷载体的方法。pLASN和MFG-S是在临床试验中使用的逆转录病毒的实例(Dunbar等人,血液(Blood.),85:3048-305,1995;Kohn等人,Nat.Med.,1:1017-102,1995;Malech等人,PNAS.,94:(22)12133-12138,1997)。PA317/pLASN是用于基因治疗的第一种治疗载体(Blaese等人,Science.,270:475-480,1995)。MFG-S包装载体的转导效率为50％或更高(Ellem等人,Immunol Immunother.,44(1):10-20,1997;Dranoff等人,Hum.Gene Ther.,1:111-2,1997)。

[0046] 重组腺相关病毒载体(rAAV)是基于缺陷型非致病性2型细小病毒腺相关病毒的有前途的替代基因递送系统。所有载体均来源于具有在转基因表达盒两侧的AAV 145bp反向末端重复序列的质粒。由于整合到转导细胞的基因组中而有效的基因递送和稳定的转基因递送是该载体系统的巨大优势(Wagner等人,柳叶刀(Lancet.),351:9117-17023,1998;Kearns等人,Gene Ther.,9:748-55,1996)。

[0047] 在另一方面,本发明涉及一种用于治疗或预防癌症的疫苗组合物,其包含多肽作为活性成分。

[0048] 在本发明中,所述疫苗组合物诱导Th1免疫应答。

[0049] 在本发明中,术语“Th1细胞”是指辅助T细胞淋巴细胞的亚类,其表征体现在基因表达,蛋白质分泌和功能活性方面。例如,Th1细胞表现出可以合成IL-2和IFN-γ,但不能合成IL-4、IL-5、IL-10和IL-13的细胞因子表达模式。Th1细胞参与细胞介导的针对各种胞内病原体、器官特异性自身免疫疾病和迟发型超敏反应的免疫应答。

[0050] 在本发明中,“CTLA-4(细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4)”也被称为CD152(分化簇152),为免疫调节抑制剂,并且其作为充当免疫检查点的蛋白受体而降低免疫应答。

[0051] 在本发明中,“STING(干扰素基因刺激蛋白,干扰素基因的启动子)”是指通过活化与STING有关的信号传导途径以诱导产生包括干扰素的炎性细胞因子而表现出抗癌作用的物质。

[0052] 在本发明中,癌症是选自由以下组成的组中的至少一种:例如鳞状细胞癌(例如上皮鳞状细胞癌)、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺癌、腹膜癌、结肠癌、胆道肿瘤、鼻咽癌、喉癌、支气管癌、口腔癌、骨肉瘤、胆囊癌、肾癌、白血病、膀胱癌、黑色素瘤、脑癌、神经胶质瘤、脑瘤、皮肤癌、胰腺癌、乳腺癌、肝癌、骨髓癌、食道癌、结肠癌、胃癌、子宫颈癌、前列腺癌、卵巢癌、头颈癌和直肠癌,但不限于此。

[0053] 本发明的疫苗组合物可应用于早期癌症。

[0054] 在本发明中,术语“抗癌佐剂”可以用于增加抗癌剂的抗癌作用,抑制或改善抗癌剂的副作用,并且可以与抗癌剂组合施用于患者。

[0055] 在本发明中,术语“预防”是指通过施用表达本发明的Hsp 90表位的转化体或包含该转化体作为活性成分的组合物来抑制或延迟癌症的任何作用。

[0056] 在本发明中,术语“治疗”是指通过施用表达本发明的Hsp 90表位的转化体或包含

该转化体作为活性成分的组合物来使癌症或肿瘤停止分裂或不受益而不永生化的任何作用。

[0057] 在本发明中,该组合物的特征在于其包含由SEQ ID NO:1和/或2的氨基酸序列表示的热休克蛋白90的表位。

[0058] 在本发明中,术语“多肽疫苗(multi-peptide vaccine)”被定义为是指含有两个或更多个如上所述的多肽表位的疫苗。

[0059] 在本发明中,该组合物的特征在于其还包含免疫抗癌剂。

[0060] 在本发明中,免疫抗癌剂是针对选自由以下组成的组中的任一种的免疫检查点抑制剂:CTLA-4(细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4)、PD-1(程序性细胞死亡蛋白1)、LAG-3(淋巴细胞活化基因3)、TIM-3(T细胞免疫球蛋白及黏蛋白域分子-3(T-cell Immunoglobulin and Mucin-domain containing-3))、TIGIT(具有IG和ITIM域的T细胞免疫受体)和VISTA(T细胞活化的V域Ig抑制剂),更优选是CTLA-4抑制剂,但不限于此。

[0061] 在本发明中,该组合物还可以包括抗癌佐剂,更优选地,抗癌佐剂可以是STING(干扰素基因刺激蛋白),但不限于此。

[0062] 在本发明中,术语“免疫抗癌剂”是通过将人工免疫蛋白注入体内并刺激免疫系统来诱导免疫细胞选择性地仅攻击癌细胞的治疗剂,这与现有的攻击癌症本身的抗癌剂不同。它是一种抗癌药物,具有恢复或增强免疫系统识别或破坏肿瘤的能力的机制,从而克服癌细胞中获得的免疫抑制或免疫逃逸机制。免疫抗癌剂包括但不限于免疫检查点抑制剂、免疫细胞疗法和免疫病毒疗法。

[0063] 在本发明中,术语“免疫检查点抑制剂”是指当一些癌细胞逃避身体免疫检查点系统时支持活化CTL(细胞毒性淋巴细胞)的一类免疫调节抗癌药物。其实例包括但不限于CTLA-4抑制剂、PD-1抑制剂、LAG-3抑制剂、TIM-3抑制剂、TIGIT抑制剂和VISTA抑制剂。

[0064] 当使用表位肽作为疫苗组合物时,优选以与药学上可接受的载体混合的形式使用活性成分,而不是单独使用。在此,药学上可接受的载体包括药学领域中常用的载体、赋形剂和稀释剂。

[0065] 可以用于本发明的疫苗组合物中的药学上可接受的载体为但不限于乳糖、右旋糖、蔗糖、山梨糖醇、甘露糖醇、木糖醇、赤藓糖醇、麦芽糖醇、淀粉、阿拉伯胶、藻酸盐、明胶、磷酸钙、硅酸钙、纤维素、甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、水、羟苯甲酯、羟苯丙酯、滑石、硬脂酸镁和矿物油。

[0066] 本发明的疫苗组合物可以根据常规方法以口服剂型(例如粉剂、颗粒剂、片剂、胶囊剂、混悬剂、乳剂、糖浆剂、气雾剂等)、外用制剂、栓剂或无菌注射液的形式配制和使用。就配制而言,它可以使用稀释剂或赋形剂如常用的填充剂、增量剂、粘合剂、润湿剂、崩解剂和表面活性剂来制备。用于口服施用的固体制剂包括片剂、丸剂、粉剂、颗粒剂、胶囊剂等,并且这样的固体制剂包含活性成分和至少一种赋形剂如淀粉、碳酸钙、蔗糖、乳糖、明胶等。除了简单的赋形剂以外,也可以使用润滑剂如硬脂酸镁和滑石粉。口服使用的液体制剂包括混悬剂、液体溶液、乳剂、糖浆等。除了常用的稀释剂如水和液体石蜡以外,也可以包含各种赋形剂如润湿剂、甜味剂、香料和防腐剂。用于肠胃外施用的制剂包括无菌水溶液、非水溶液、混悬剂、乳剂、冻干制剂和栓剂。可以使用丙二醇、聚乙二醇、植物油(如橄榄油)、可注射酯(例如油酸乙酯)等作为非水溶剂和混悬剂。作为栓剂的基质,可以使用witepsol、吐温

61、可可脂、月桂酸酯、甘油明胶等。特别地,在液体制剂的情况下,优选通过经细菌捕获过滤器等过滤或掺入灭菌剂进行灭菌。灭菌的组合物可以通过例如冻干来固化,并且当使用时,将其溶解在无菌水或无菌稀释剂中。

[0067] 根据本发明的疫苗组合物可以通过各种途径施用至哺乳动物,例如牛、大鼠、小鼠、家畜、狗、人等。可以预期所有施用方式,例如通过口服、静脉内、肌肉内、皮下、腹膜内注射。

[0068] 考虑到动物的年龄、体重、性别和身体状况来选择根据本发明的疫苗组合物的剂量。在没有明显副作用的情况下诱导动物免疫保护反应所需的量可能取决于用作免疫原的表位和任何赋形剂的存在而变化。通常,在每个剂量下,本发明的多肽的免疫原量含有每ml灭菌溶液0.1至1000μg蛋白质,优选0.1至100μg蛋白质。在疫苗组合物的情况下,如果需要,可以在最初剂量之后任选地进行重复抗原刺激。

[0069] 在另一方面,本发明涉及用于治疗或预防癌症的方法,其包括将该疫苗组合物施用至癌症患者。

[0070] 在本发明中,该疫苗组合物的特征可以为其与免疫抗癌剂组合施用,并且该疫苗组合物的特征可以为其与抗体治疗剂组合施用。

[0071] 与本发明的疫苗组合物组合使用的免疫抗癌剂或抗体治疗剂可以同时或以一定时间差依次施用,并且可以根据适当的时间和周期进行选择。

[0072] 在本发明中,该疫苗组合物可以与抗癌剂组合施用。免疫抗癌剂是针对选自由以下组成的组中的任一种的免疫检查点抑制剂:CTLA-4(细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4)、PD-1(程序性细胞死亡蛋白1)、LAG-3(淋巴细胞活化基因3)、TIM-3(T细胞免疫球蛋白及黏蛋白域分子-3)、TIGIT(具有IG和ITIM域的T细胞免疫受体)和VISTA(T细胞活化的V域Ig抑制剂),更优选是CTLA-4抑制剂,但不限于此。

[0073] 在本发明中,该疫苗组合物可以另外与抗癌佐剂组合施用抗癌佐剂可以是STING(干扰素基因刺激蛋白),但不限于此。

[0074] 在本发明中,癌症是选自由以下组成的组中的至少一种:例如鳞状细胞癌(例如上皮鳞状细胞癌)、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺癌、腹膜癌、结肠癌、胆道肿瘤、鼻咽癌、喉癌、支气管癌、口腔癌、骨肉瘤、胆囊癌、肾癌、白血病、膀胱癌、黑色素瘤、脑癌、神经胶质瘤、脑瘤、皮肤癌、胰腺癌、乳腺癌、肝癌、骨髓癌、食道癌、结肠癌、胃癌、子宫颈癌、前列腺癌、卵巢癌、头颈癌和直肠癌,但不限于此。

[0075] 另外,本发明提供了一种抗癌组合物,其包含由SEQ ID NO:1和/或2的氨基酸序列表示的热休克蛋白90的表位。

[0076] 除了表位以外,组合物还可包含用于稳定活性成分的其他成分。

[0077] 在本发明中,术语“注射”或“施用”可以取决于要施用的受试者的年龄、性别、体重等而变化,并且疫苗的剂量可以取决于施用途径、疾病的程度、性别、体重、年龄等而变化。

[0078] 在本发明中,伴刀豆球蛋白A(阳性对照)活化T细胞,但不活化B细胞(当不溶时,B细胞也被活化)。此外,它被用作研究癌细胞膜结构的特异性的手段,因为许多癌细胞表现出比正常细胞更高的对ConA的聚集性。

[0079] 在另一方面,本发明涉及特异性识别由SEQ ID NO:1或2的氨基酸序列表示的热休克蛋白90的表位的抗体。

[0080] 在本发明中,抗体可以是单克隆或多克隆抗体。

[0081] 在本发明中,术语“抗体”是通过在免疫系统中抗原的刺激而产生的物质,也称为免疫球蛋白,并且特异性结合特定抗原以在淋巴和血液周围漂浮,从而引起抗原-抗体反应。抗体表现出对特定抗原的特异性,而免疫球蛋白包括抗体和缺乏抗原特异性的抗体样物质。例如,后者的多肽在淋巴系统中以低水平产生,而在骨髓瘤中水平升高。在本发明中,它可以为针对由包含编码Hsp 90表位蛋白的一部分的序列的基因序列所制备的抗原的抗体,优选为针对含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列、SEQ ID NO:2的氨基酸序列或融合形式的SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2的氨基酸序列的抗原的抗体。

[0082] 与本发明中的活性成分组合使用的术语“治疗有效量”是指有效预防或治疗目标疾病的量。本发明的组合物的治疗有效量可以取决于各种因素而变化,例如施用方法、靶部位和患者的病症。因此,当用于人体中时,应考虑安全性和有效性将剂量确定为适当的量。也可以根据通过动物实验确定的有效量来估计用于人的量。

[0083] 在下文中,将通过实施例更详细地描述本发明。这些实施例仅用于说明目的,并且对于本领域普通技术人员将显而易见的是,本发明的范围不被解释为受这些实施例的限制。

[0084] 实施例1:使用计算机模拟算法预测HSP90-特异性MHC II类结合表位(也称为抗原决定簇)

[0085] 为了从热休克蛋白90(Hsp 90)中选择预期与人类中最常见的MHC II类等位基因具有良好结合亲和力的15聚体肽序列,使用了以下5种计算机算法:SYFPEITHI(细胞生物学研究所),SYFPEITHI(细胞生物学研究所,海德堡,德国),Propred(微生物技术研究所,昌迪加尔,印度),MHC-Thread(阿伯丁大学,AFPberdeen,英国),平均结合矩阵法,Rankpep(哈佛大学,波士顿,MA,美国)(图1)。15种最常见的MHC II类等位基因如下:DRB1*0101、DRB1*1501、DRB1*0301、DRB1*0401、DRB1*0404、DRB1*0405、DRB1*0701、DRB1*0802、DRB1*0901、DRB1*1101、DRB1*1201、DRB1*1302、DRB3*0101、DRB4*0101、DRB5*0101。

[0086] 基于预测的结合亲和力的等级顺序,在下表1中选择了前12种HSP90特异性肽序列。通过请求肽合成公司,将获得的12种肽序列合成为15聚体肽。

[0087] 此后,选择了由SEQ ID NO:1和2的氨基酸序列表示的两种(p485、p527)肽用于多肽疫苗。

[0088] 下表1显示了选择的Hsp 90 15聚体肽序列。

[0089] [表1]

[0090]

HSP90 15聚体肽	氨基酸序列
p485-499	LYVRRVFIMDNCEEL(SEQ ID NO.1)
p527-541	QSKILKVIRKNLVKK(SEQ ID NO.2)
p109-123	LYKDLQPFILLRLLM(SEQ ID NO.5)
p145-159	QAEIAQLMSLIINTF(SEQ ID NO.6)
p160-174	YSNKEIFLRELISNS(SEQ ID NO.7)
p220-234	MTKADLINNLGTIAK(SEQ ID NO.8)
p255-269	QFGVGFYSAYLVAEK(SEQ ID NO.9)
p296-310	TDTGEPMGRGTKVIL(SEQ ID NO.10)

p328-342	IVKKHSQFIGYPITL(SEQ ID NO.11)
p457-471	LEFRALLFVPRRAPF(SEQ ID NO.12)
p582-596	SELLRYYTSASGDEM(SEQ ID NO.13)
p780-794	SVKDLVILLYETALL(SEQ ID NO.14)

[0091] 实施例2:小鼠模型中Hsp90多肽疫苗的Hsp90特异性免疫原性

[0092] 为了评估鼠模型中Hsp 90多肽疫苗的免疫原性,将6至8周龄的雌性FVB小鼠分分组为每组5只小鼠,并各自用作为在完全弗氏佐剂(CFA)/不完全弗氏佐剂(IFA)中的混合物的磷酸缓冲盐溶液(PBS)或Hsp 90多肽疫苗皮下注射免疫。以10天为间隔进行3次免疫。第三次接种疫苗后十天,从每只小鼠中取出脾脏以分离脾细胞。Hsp 90多肽疫苗特异性T细胞应答通过IFN-γ酶联免疫吸附斑点(ELISPOT)测定进行评估。

[0093] 当制备和冷冻鼠脾细胞时,所使用的装置和材料如下表2所示。

[0094] [表2]

[0095]

15ml 和 50ml Falcon 管，无菌	各种		--	RT
500ml 玻璃瓶，无菌	内部的		--	RT
瓶顶过滤器，0.22μm	Millipore	SCGPS05RE	--	RT
细胞筛网	BD	352350	--	RT
血清移液管，无菌	各种		--	RT
移液器和无菌移液器枪头	各种		--	RT
3ml 移液管	BD	357575	--	RT
18G 1.5"皮下注射器针	BD		--	RT
无菌方形培养皿	各种		--	RT
离心机	各种		--	RT
Mr. Frosty 容器 w/异丙醇	Nalgene		--	RT 至-80℃
-80 度冰箱	各种		--	-80℃
水浴	各种		--	37℃
液氮储存罐	各种		--	
小鼠 T 细胞培养基	内部的		*	4℃
冷冻培养基	内部的		**	4℃
ACK 裂解缓冲液	内部的		***	室温

[0096] 为了制备小鼠T细胞培养基,使用500mL RPMI-1640(L-Glut+Hepes)[Mediatech Cellgro]、5mL青霉素-链霉素溶液[Mediatech Cellgro,#30-002-CI]、50mL热灭活胎牛血清[SAFC Biosciences,如果确认,也可使用其他]、0.5mL1000X 2-巯基乙醇[GIBCO,#21985],并用塑料制品进行过滤。冷冻培养基包含45ml热灭活的FBS和5ml DMSO,过滤后在4℃下储存。ACK裂解缓冲液(RBC溶液)包含1L ddH_2O、8.29g NH_4Cl(最终浓度为150mM)和1g

$KHCO_3$(最终浓度为10mM),pH值为7.2-7.4,并且是经过滤的。

[0097] 无菌技术用于测定的每个步骤。所有实验均在超净工作台(tissue culture hood)中进行。

[0098] 从取出的脾脏中分离脾细胞的方法是将适量的小鼠T细胞培养基放入50ml管中,在37℃水浴中加热,然后仅将3ml培养基和新鲜脾脏置于p100皿中。之后,用刀片将脾脏切成碎块。将切碎的脾脏和培养基放入装有细胞筛网的50ml管中。用1.5ml管的末端在细胞筛网上研磨脾脏,然后将所得物分配到具有10ml温的T细胞培养基的细胞筛网上,然后过滤细胞。另外,还获得了p100培养皿的细胞。此后,以1200rpm离心8分钟。小心地除去上清液后,添加10ml温的小鼠T细胞培养基重悬沉淀物。然后,以1200rpm离心8分钟后,小心地除去上清液。用5ml ACK裂解缓冲液悬浮后,温育5分钟。此后,添加10ml小鼠T细胞培养基,以1200rpm离心8分钟,并尽可能小心地除去上清液。然后,添加10ml温的小鼠T细胞培养基,并将15ul转移至新管中,然后进行细胞计数。以1200rpm离心8分钟,并小心地除去上清液。

[0099] 当在同一天使用脾细胞时,将培养基以所需浓度添加到细胞中,然后悬浮。冷冻脾细胞时,加入2ml冷冻培养基并重悬,然后将每种1ml等分到两个试管中。之后,将其在-80℃的冰箱中保存过夜,并于第二天转移到LN2中。

[0100] 对于IFN-γ酶联免疫吸附斑点(ELISPOT)测定,所使用的装置和材料示于下表3中。

[0101] [表3]

[0102]

15ml 和 50ml Falcon 管，无菌	各种		--	
500ml 玻璃瓶，无菌	内部的		--	
瓶顶过滤器，0.22μm	Millipore	SCGPS05RE	--	
塑料包裹膜	各种		--	
血清移液管，无菌	各种		--	
移液器和无菌移液器枪头	各种		--	
AID 酶标仪和软件	AID		--	
洗板机	各种		--	
37℃+5% CO_2 培养箱	Nuaire		--	
多通道抽吸器（乙醇灭菌）	各种		--	
小鼠 T 细胞培养基	内部的		*	4℃
96 孔 MAIPS 板，无菌	MilliPore	MAIPS4510	--	
1×PBS，0.22 μm 过滤	内部的		--	

[0103]

35% EtOH(v/v)的去离子水溶液，过滤器灭菌	内部的		--	
1×PBS+0.05%吐温 20，0.22 μm 过滤	内部的		--	
链霉亲和素-HRP	MabTech	3310-9	--	4℃
AEC 染色试剂盒或 AEC 底物试剂盒	Sigma 或 BD Pharmingen	AEC101-KT 或 551015		-20℃
抗小鼠 IFNγ 包被抗体，1 mg/ml	MabTech	AN18		4℃
抗小鼠 IFNγ 生物素化抗体，1 mg/ml	MabTech	R46A2		4℃
抗原（TT 肽、HSP90 肽、伴刀豆球蛋白 A）	各种		--	4℃
Conclavin A	Sigma		C5275	-80℃

[0104] 与上述相同地使用小鼠T细胞培养基。

[0105] 在第0天,将30μl 35%的乙醇在Prewet MAIPS 96孔板中温育1分钟,然后分配200μl 1×PBS并洗涤3次(超纯水和35%乙醇购自Merck;PBS通过购买1xPBS使用)。使用1×PBS(10ul/ml)将抗小鼠IFNγ抗体(1mg/ml,在4℃下保存,绿色盖子)稀释至10ug/ml。将制备的溶液以50μl分配到每孔中。每个96孔板需要5ml的量。关闭板盖,用包裹膜覆盖,并在4℃下温育16至24小时(此时,必须覆盖包裹膜)。

[0106] 在第1天取出板后,使用多通道移液管除去抗体。各自分配200μl 1×PBS并洗涤3次。在最后一次洗涤中,完全去除PBS而不损坏板中的膜。将200μl小鼠T细胞培养基分配到每孔中并封闭。在37℃培养箱中培养2小时后,在盖和内部标注板。

[0107] 样品板布局:

[0108] A1-A6孔(无抗原)＝100μL细胞+100μL小鼠T细胞培养基

[0109] A7-A12孔(非特异性肽)＝100μL细胞+100μL 2×HIV p17

[0110] B1-B6孔(阳性对照)＝100μL细胞+100μL 2×Conclavin A

[0111] B7-B12孔(疫苗肽)＝100μL细胞+100μL 2×肽

[0112] (对于每只小鼠或细胞池继续)

[0113] 在小鼠T细胞培养基中将肽的浓度加倍后,每孔可分配100μl并制成n+1(表4)

[0114] [表4]

[0115]

抗原	储备液浓度	2×工作液浓度	最终浓度
无ag			
Conclavin A	1mg/ml	5μg/ml	2.5μg/ml
肽	10mg/ml	20μg/ml	10μg/ml
肽	5mg/ml	20μg/ml	10μg/ml

[0116] 此后,除去封闭培养基,并将100μl制备的抗原样品各自分配到适当的孔中。使用冷冻或新鲜的脾细胞来测定。分离脾细胞的方法参照SOP IV-101(小鼠脾细胞制备和冷冻方案)进行。将细胞以3.0×10^6至3.5×10^6个/ml的最终浓度重悬于小鼠T细胞培养基。使用多通道移液管,将计数的细胞以每孔100μl(3.0×10^5至3.5×10^5)进行分配。但是,对于无抗原孔则分配了100μl的小鼠T细胞培养基。将板在37℃培养箱中温育70至72小时。当细胞反应时(第1天结束),确认培养基的颜色变为深黄色。

[0117] 在第4天,温育70至72小时后,在37℃下将板从培养箱中移出,并用多通道移液管小心地除去板的培养基。用200μl的1×PBS洗涤两次,并用200μl的1×PBS+0.05%吐温20洗涤3次。但是,在最后一次洗涤中,小心地完全除去了1×PBS+0.05%吐温20。

[0118] 使用1×PBS+0.05%吐温20(5μl/ml)将生物素化抗小鼠IFNγ抗体(1mg/ml,在4℃下保存,黄色盖子)稀释至5μg/ml。将制备的溶液以50μl分配到每孔中。每个96孔板需要5ml的量。关上板盖,用包裹膜覆盖,并在4℃下温育16至24小时(必须用包裹膜覆盖)(第4天结束)。

[0119] 在第5天,用多通道移液管小心地从板中除去培养基。分配200μl 1×PBS并洗涤4次。在最后一次洗涤中,完全去除PBS而不损坏板中的膜。将链霉亲和素-HRP在1×PBS(4μl/ml)中以1:250稀释。将制备的溶液每孔中分配50μl。每个96孔板需要5ml的量。关闭板盖,用包裹膜覆盖,在室温下温育60分钟(在HRP反应期间将ABC试剂盒取出至室温)。

[0120] 温育后,用多通道移液管小心地除去板中的培养基。分配200μl 1×PBS并洗涤4次。在最后一次洗涤中,完全去除PBS而不损坏板中的膜。分离板的下部,并用纸巾除去PBS的水。

[0121] 将50μl ABC试剂盒显色溶液(在1ml大瓶中的小滴混合物)分配到每孔中。每个96孔板需要5ml的量。检查阳性对照孔的颜色。显色时间不应超过45分钟。通常,斑点在5到10分钟可见,但是如果斑点不可见,则延长到20到30分钟。为了终止反应,将其在冷自来水下仔细洗涤。在室温下,在黑暗处自然干燥(此时,终止对光敏感,因此不暴露于光线)。

[0122] 结果,确认了在FVB小鼠模型的HSP90肽反应中,与对照组相比,Hsp 90多肽疫苗组通过干扰素γ(IFN-γ)的分泌表现出更高的特异性反应性(图2)。

[0123] 实施例3:小鼠模型中HSP90多肽疫苗的抗肿瘤作用的确认

[0124] 为了确认抗肿瘤作用,使用了小鼠乳腺癌细胞系(小鼠乳腺癌细胞-FVB/N-Tg(MMTVneu)-202Mul小鼠来源的过表达HER-2的乳腺癌细胞系)。将6周龄MMTVneu转基因小鼠分为生理盐水/免疫佐剂组和HSP90肽/免疫佐剂组,每组10只小鼠,每10天施用共3次,最后一次施用后10天,将小鼠乳腺癌细胞系皮下注射到小鼠侧部。每3到4天观察肿瘤的生长,并测量肿瘤的大小以确认HSP90多肽疫苗的抗肿瘤作用。实验方法与实施例2相同。

[0125] 实验的结果确认了,在小鼠模型中,与对照组相比,Hsp90多肽疫苗组的肿瘤大小显著减小了(图3A)。另外,在HSP90肽反应中,确认了与对照组相比,HSP90多肽疫苗组通过干扰素γ(IFN-γ)的分泌表现出更高的特异反应性(图3B)。

[0126] 因此,可以看出本发明的Hsp90多肽疫苗组合物表现出免疫原性并且具有优异的抗肿瘤作用。

[0127] 实施例4:小鼠模型中联合施用HSP90多肽疫苗/STING激动剂/CTLA-4阻滞剂的抗肿瘤作用的确认

[0128] 4.1肿瘤形成和抗肿瘤测量

[0129] 将5×10^5个小鼠来源的乳腺癌细胞皮下注射到6周龄雌性MMTVneu转基因小鼠的侧腹。10天后,每10天注射1个对照组(PBS+免疫佐剂:完全弗氏佐剂/不完全弗氏佐剂)和4个实验组(第1组HSP90多肽疫苗组(HSP90疫苗+免疫佐剂)、第2组(HSP90疫苗+CTLA-4抑制剂;HSP90疫苗+CTLA-4抑制剂+免疫佐剂)、第3组(STING激动剂+CTLA-4抑制剂;STING激动剂+CTLA-4抑制剂+免疫佐剂)、第4组(HSP90疫苗+STING激动剂+CTLA-4抑制剂)。皮下注射三次并腹膜内注射HSP90疫苗和STING激动剂(DMXAA,5,6-二甲基呫吨酮-4-乙酸,Invivogen公司制造)。每周两次腹膜内注射抗小鼠CTLA-4(CD152,由Bioxcell制造),直到实验结束。在实验过程中,每隔3到4天测量一次肿瘤生长。最后一次给药后十天,切除小鼠的脾脏以分离脾细胞,并使用干扰素γ(IFNγ)固定化酶抗体法确认了HSP90多肽特异性T细胞应答(酶联免疫SPOT测定,ELISPOT)。制备小鼠脾细胞,冷冻,并以与实施例2相同的方式进行ELISPOT实验方法。

[0130] 4.2HSP90多肽疫苗有效性的生物学标记物的测定

[0131] 作为HSP90多肽疫苗效果的生物学标记物,通过酶免疫测定(酶联免疫吸附测定,ELISA)分析了血液HER2 ECD(2型人表皮生长因子受体胞外域)的变化。具体的分析方法如下。

[0132] A.实验材料

[0133] a.碳酸盐缓冲液:在1L烧杯中添加0.8g Na_2CO_3和1.47g $NAHCO_3$,添加400ml一级蒸馏水并溶解,调节pH至9.6,并加满至500ml一级蒸馏水。过滤后,将其在4℃下储存。

[0134] b.稀释缓冲液(1×PBS/1%BSA):添加10g BSA到100ml 10×PBS中,溶解后,添加一级蒸馏水至1L。过滤后在4℃下储存。

[0135] c.封闭缓冲液(1×PBS/5%BSA):添加50g BSA到100ml 10×PBS中,溶解后,添加一级蒸馏水至1L。过滤后在4℃下储存。

[0136] d.洗涤缓冲液(1×PBS/0.1%吐温20):将100ml 10xPBS、1ml吐温20和899ml一级蒸馏水混合以制备洗涤缓冲液。

[0137] e.二抗:山羊抗小鼠IgG(H+L)HRP二抗购自ThermoFisher scientific(cat#62-6520,体积1ml)并在4℃下保存,使用时用洗涤缓冲液稀释至1:10,000。

[0138] f.小鼠IgG标准抗体:小鼠IgG标准抗体购自Sigma(cat#I-4506)。购买后,使用150mM NaCl作为稀释缓冲液使抗体最终浓度为2mg/ml,并在-20℃下保存。

[0139] g.TMB溶液:TMB溶液购自Sigma(目录号T0440),并在4℃下保存。

[0140] h.1N HCl终止溶液:将18.2ml 38%HCl小心地渐渐添加到481.8ml一级蒸馏水中,以制备储备溶液并在室温下保存。

[0141] B.实验方法和结果

[0142] ELISA实验通过以下步骤进行。步骤1和2在冰条件下进行。

[0143] 将2.5ml碳酸盐缓冲液分配到管A中,并将1ml碳酸盐缓冲液分配到其余的管中。然后,将10μl的小鼠IgG储备溶液(2mg/ml)添加到管A中。进行涡旋,并将1ml从管A转移至管B(1:1稀释)中。依次地,以B→C、C→D的顺序进行1:1稀释直到L(步骤1)。

[0144] 管

[0145] 使用新鲜的碳酸盐缓冲液制备浓度为1μg/ml的HSP90重组蛋白。将HSP90重组蛋白每孔分配50μl到包被的列(column)#1至#10中。仅将碳酸盐缓冲液分配到列#11中,并将板用微密封垫覆盖,然后在4℃下过夜进行抗原-抗体反应(步骤2)。

[0146] 使用200μl洗涤缓冲液进行3次洗涤,并且在第三次洗涤期间,用纸巾小心地摇动板以完全去除洗涤缓冲液(步骤3)。然后,每孔分配100μl的封闭溶液,并在室温下反应1-2小时(步骤4)。进行与步骤3相同的洗涤(步骤5)。稀释缓冲液:将血清以1:1的比例在新的1.5ml管中混合,涡旋,然后将50μl分配到每个孔中(步骤6)。将50μl稀释缓冲液分配至板的列#11和#12(步骤7)。将板用微密封垫覆盖后,将其在4℃下反应过夜(步骤8)。进行与步骤3相同的洗涤(步骤9)。使用稀释缓冲液将HRP缀合抗体稀释至1:10,000,每孔分配50μl,然后在室温搅拌下反应45分钟(步骤10)。进行与步骤3相同的洗涤(步骤11)。在将TMB溶液取出至室温并制备后,每孔分配100μl的TMB溶液,并在室温下无光条件下反应20分钟(步骤12)。每孔分别分配50μl反应终止溶液(步骤13)。使用酶标仪在450nm处测量荧光强度(步骤14)。

[0147] 作为通过酶免疫测定(酶联免疫吸附测定,ELISA)检测施用HSP90多肽疫苗后的HER2 ECD的血浓度变化的结果,使用根据本发明的HSP90疫苗的结果是HER2 ECD偏低。

[0148] 4.3HSP90多肽疫苗组合施用的效果

[0149] 实验的结果是,与小鼠模型中的对照组、第1组(HSP90多肽疫苗组)、第2组(HPS90多肽疫苗+CTLA-4抑制剂)和第3组(STING激动剂+CTLA-4抑制剂)相比,第4组(HPS90多肽疫苗+STING激动剂+CTLA-4抑制剂)被确认在组合治疗时肿瘤尺寸显著减少(图4A)。另外,确认了与对照组相比,所有实验组中的HER2-ECD反应性都降低了(图4B)。在第4组中,HSP90肽的添加通过干扰素γ(IFN-γ)的分泌表现出更特异性的反应性(HSP90多肽疫苗+STING激动剂+CTLA-4抑制剂)(图4C至G)。由此可见,由于通过用STING激动剂/CTLA-4外植体组合治疗增加或降低了本发明的HSP90肽疫苗的效果,因此可以将HSP90肽用作疫苗。

[0150] 如上所述,已经详细描述了本发明的特定部分,并且对于本领域的普通技术人员将显而易见的是,这些特定技术仅是优选的实施方式,并且本发明的范围不限于此。因此,可以说,本发明的实际范围由所附权利要求书及其等同物限定。

<110> 高丽大学校产学协力团（Korea University Research and Business Foundation）

<120> 包含热休克蛋白表位的疫苗及其用途

<130> OPP19-0103-PCT

<150> KR 18/019,123
<151> 2018-02-19

<150> KR 19/018119
<151> 2019-02-15

<160> 14

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列（Artificial Sequence）

<220>
<223> HSP90 p485-499

<400> 1
[0001] Leu Tyr Val Arg Arg Val Phe Ile Met Asp Asn Cys Glu Glu Leu
1 5 10 15

<210> 2
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列（Artificial Sequence）

<220>
<223> HSP90 p527-541

<400> 2
Gln Ser Lys Ile Leu Lys Val Ile Arg Lys Asn Leu Val Lys Lys
1 5 10 15

<210> 3
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial Sequence）

<220>
<223> HSP90 p485-499

<400> 3
ttgtatgtac gcagagtttt catcatggat aactgtgagg agcta 45

<210> 4
<211> 47
<212> DNA
<213> 人工序列（Artificial Sequence）

<220>
<223> HSP90 p527-541

<400> 4
caaagcaaaa ttttgaaagt tatcaggaag aatttggtca aaaaatg 47

<210> 5
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列（Artificial Sequence）

<220>
<223> HSP90 p109-123

<400> 5
Leu Tyr Lys Asp Leu Gln Pro Phe Ile Leu Leu Arg Leu Leu Met
1 5 10 15

[0002]

<210> 6
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列（Artificial Sequence）

<220>
<223> HSP90 p145-159

<400> 6
Gln Ala Glu Ile Ala Gln Leu Met Ser Leu Ile Ile Asn Thr Phe
1 5 10 15

<210> 7
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列（Artificial Sequence）

<220>
<223> HSP90 p160-174

<400> 7
Tyr Ser Asn Lys Glu Ile Phe Leu Arg Glu Leu Ile Ser Asn Ser
1 5 10 15

<210> 8
<211> 15
<212> PRT

<213> 人工序列（Artificial Sequence）

<220>
<223> HSP90 p220-234

<400> 8
Met Thr Lys Ala Asp Leu Ile Asn Asn Leu Gly Thr Ile Ala Lys
1 5 10 15

<210> 9
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列（Artificial Sequence）

<220>
<223> HSP90 p255-269

<400> 9
Gln Phe Gly Val Gly Phe Tyr Ser Ala Tyr Leu Val Ala Glu Lys
1 5 10 15

<210> 10
<211> 15
<212> PRT
[0003] <213> 人工序列（Artificial Sequence）

<220>
<223> HSP90 p296-310

<400> 10
Thr Asp Thr Gly Glu Pro Met Gly Arg Gly Thr Lys Val Ile Leu
1 5 10 15

<210> 11
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列（Artificial Sequence）

<220>
<223> HSP90 p328-342

<400> 11
Ile Val Lys Lys His Ser Gln Phe Ile Gly Tyr Pro Ile Thr Leu
1 5 10 15

<210> 12
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列（Artificial Sequence）

<220>
<223> HSP90 p457-471

<400> 12
Leu Glu Phe Arg Ala Leu Leu Phe Val Pro Arg Arg Ala Pro Phe
1 5 10 15

<210> 13
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列（Artificial Sequence）

<220>
<223> HSP90 p582-596

[0004]
<400> 13
Ser Glu Leu Leu Arg Tyr Tyr Thr Ser Ala Ser Gly Asp Glu Met
1 5 10 15

<210> 14
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列（Artificial Sequence）

<220>
<223> HSP90 p780-794

<400> 14
Ser Val Lys Asp Leu Val Ile Leu Leu Tyr Glu Thr Ala Leu Leu
1 5 10 15

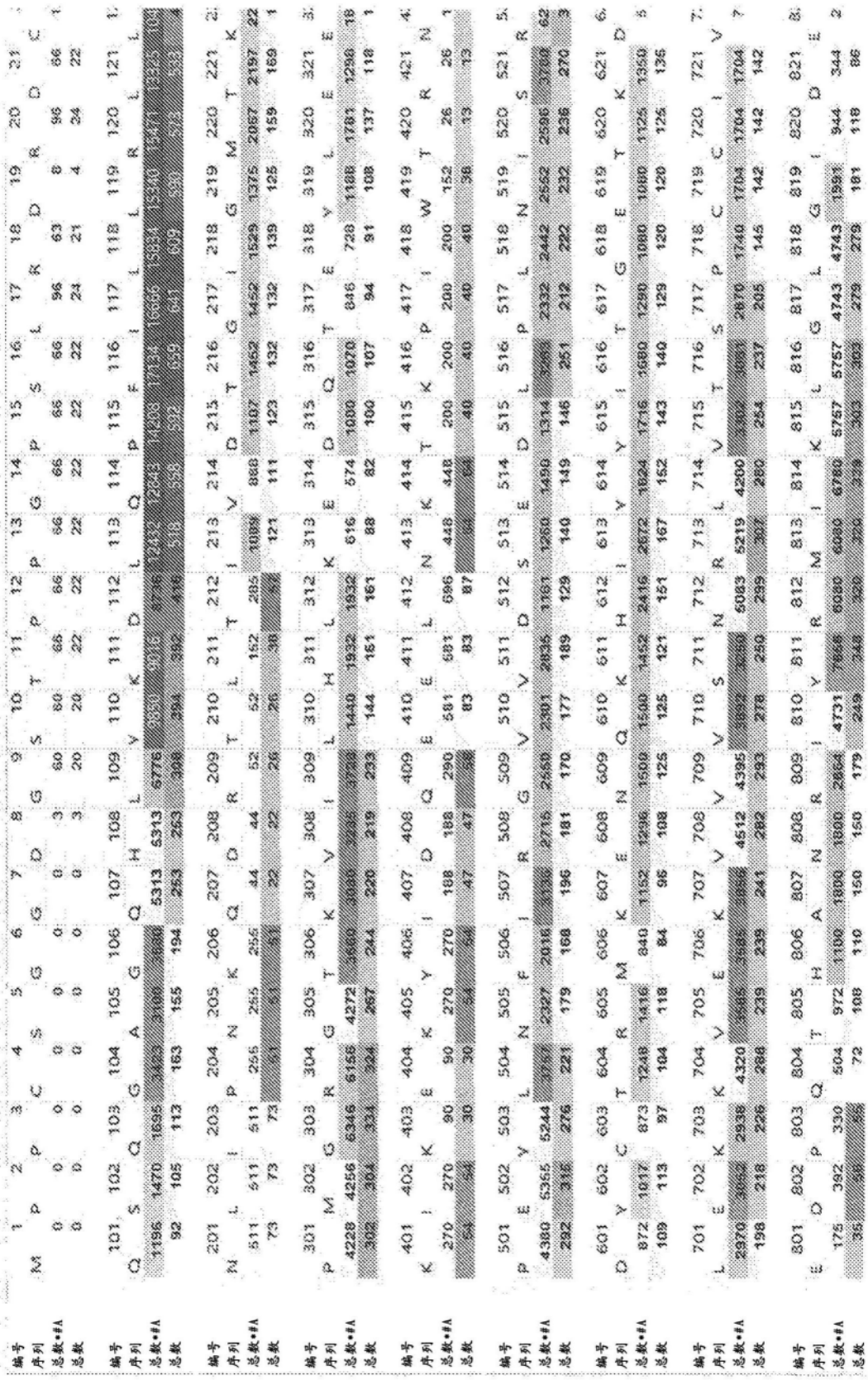


图1

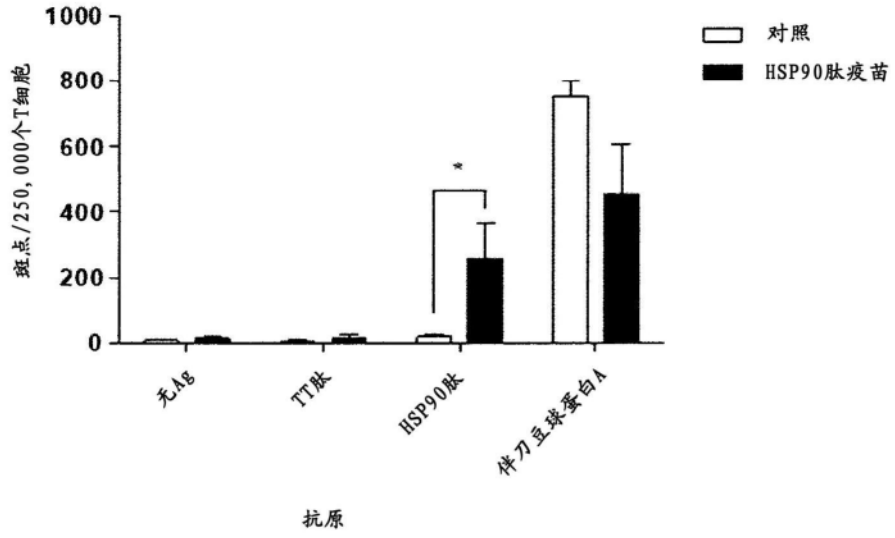

1000
800
600
400
200
0
斑点/250,000个T细胞
对照
HSP90肽疫苗
*
无Ag
TT肽
HSP90肽
伴刀豆球蛋白A
抗原

图2

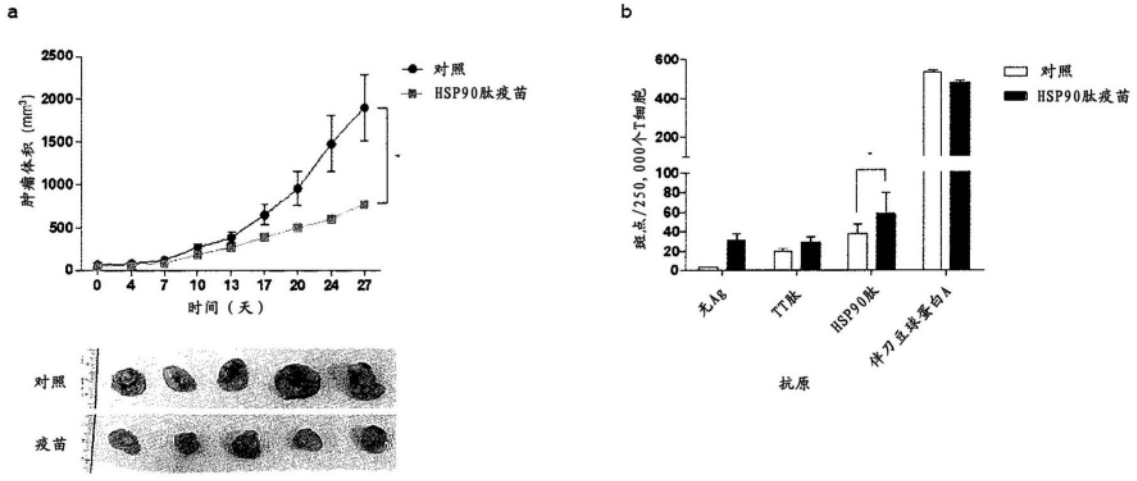

a
2500
2000
1500
1000
500
0
肿瘤体积 (mm³)
对照
HSP90肽疫苗
0 4 7 10 13 17 20 24 27
时间（天）
对照
疫苗
b
600
400
200
100
80
60
40
20
0
斑点/250,000个T细胞
对照
HSP90肽疫苗
无Ag
TT肽
HSP90肽
伴刀豆球蛋白A
抗原

图3

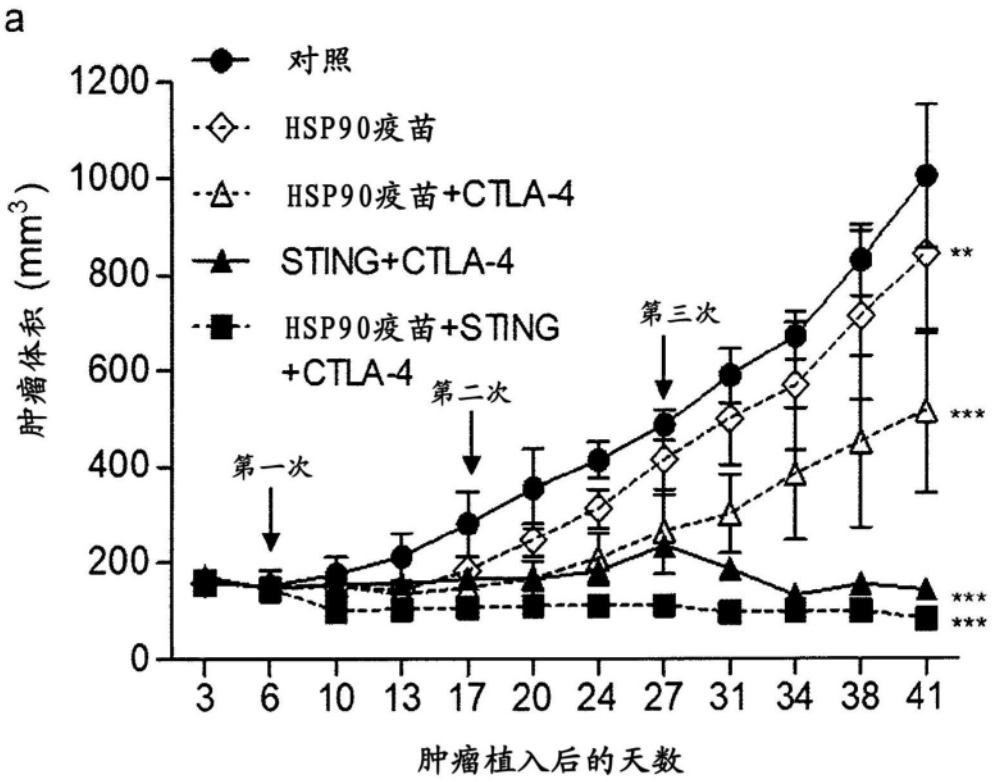

a
对照
HSP90疫苗
HSP90疫苗+CTLA-4
STING+CTLA-4
HSP90疫苗+STING
+CTLA-4
肿瘤体积 (mm3)
1200
1000
800
600
400
200
0
第一次
第二次
第三次
**
***
***
***
3 6 10 13 17 20 24 27 31 34 38 41
肿瘤植入后的天数

图4a

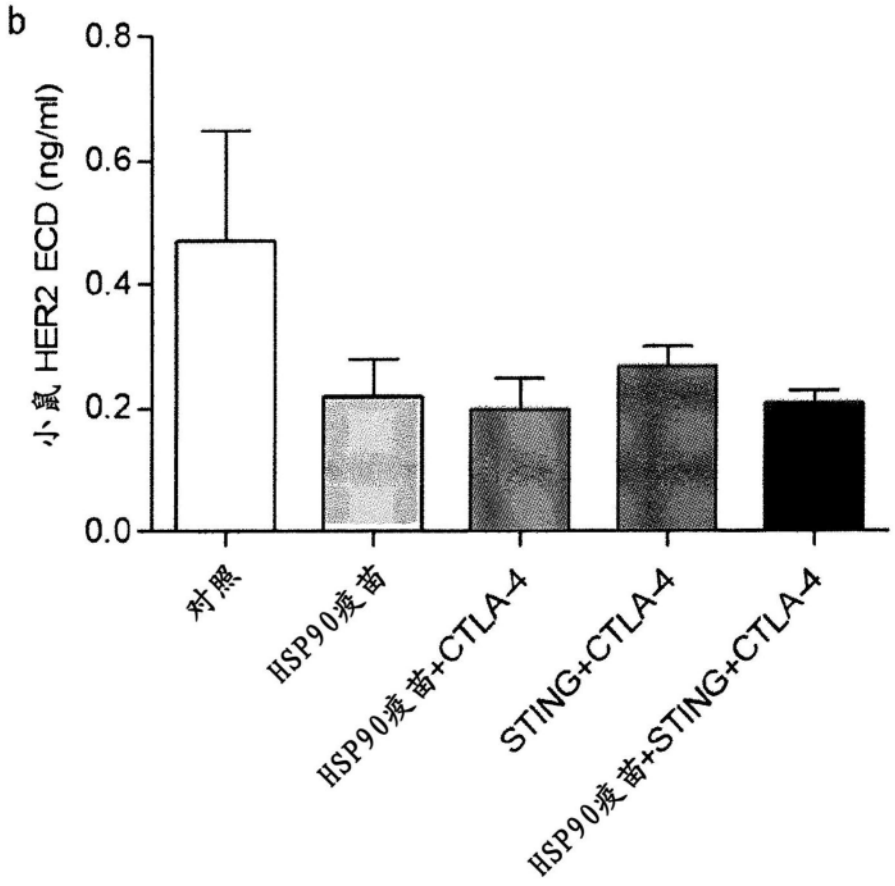

b
小鼠 HER2 ECD (ng/ml)
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
对照
HSP90疫苗
HSP90疫苗+CTLA-4
STING+CTLA-4
HSP90疫苗+STING+CTLA-4

图4b

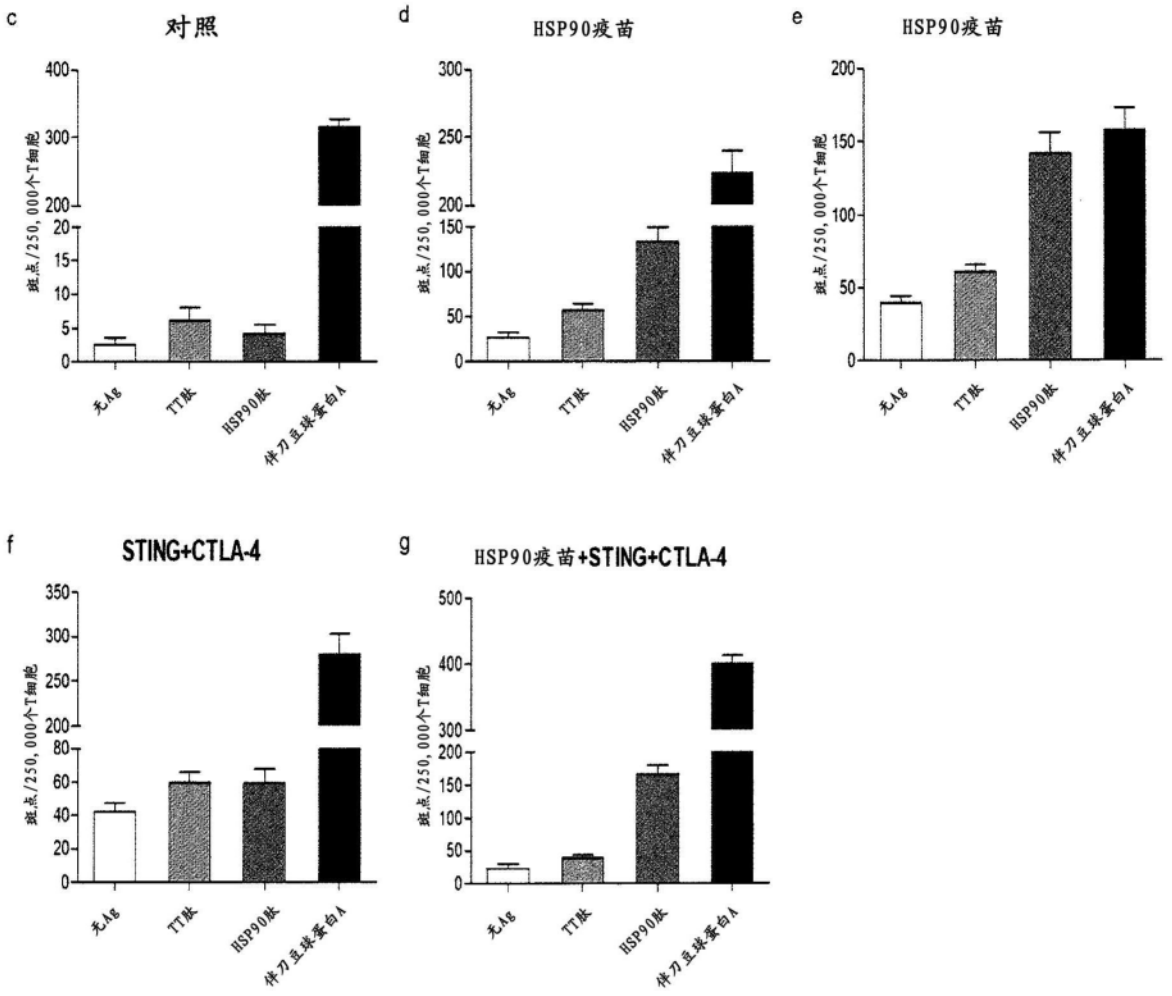

c
对照
d
HSP90疫苗
e
HSP90疫苗
f
STING+CTLA-4
g
HSP90疫苗+STING+CTLA-4
斑点/250,000个T细胞
无Ag
TT肽
HSP90肽
伴刀豆球蛋白A

图4c