(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 114929268 A
(43)申请公布日 2022.08.19

(21)申请号 202080092410.7
(22)申请日 2020.11.20
(30)优先权数据
19210369.5 2019.11.20 EP
20191226.8 2020.08.14 EP
20193706.7 2020.08.31 EP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2022.07.07
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2020/082888 2020.11.20
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2021/099572 EN 2021.05.27
(71)申请人 巴法里安诺迪克有限公司
地址 丹麦海勒鲁普
(72)发明人 M•欣特贝格尔 J•梅迪纳埃切韦尔斯 M•哈比扬 于尔根•豪斯曼 M•卡拉
(74)专利代理机构 隆天知识产权代理有限公司 72003
专利代理师 吴小瑛
(51)Int.Cl.
A61K 39/00(2006.01)
C07K 14/705(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
C12N 15/86(2006.01)
C07K 14/82(2006.01)
A61P 35/04(2006.01)

权利要求书2页 说明书33页
序列表17页 附图12页

(54)发明名称

4-1BBL辅助的重组修饰的安卡拉痘苗病毒(MVA)的医疗用途

(57)摘要

本发明涉及表达TAA和共刺激分子4-1BBL的重组修饰的安卡拉痘苗病毒(MVA),用于(i)预防实体肿瘤复发,其中将所述重组MVA肿瘤内施用至所述实体肿瘤,或(ii)治疗、预防和/或预防肿瘤复发,其中将所述重组MVA肿瘤内施用至另一实体肿瘤。

CN 114929268 A

1.一种重组修饰的安卡拉痘苗病毒(MVA),其包括:

(a)编码肿瘤相关抗原(TAA)的第一核酸,和

(b)编码4-1BB配体(4-1BBL)的第二核酸,

用于预防实体肿瘤在其缓解时或缓解后在受试者中的复发,其中所述缓解是由向所述实体肿瘤局部、优选肿瘤内施用所述重组MVA诱导的。

2.一种重组修饰的安卡拉痘苗病毒(MVA),其包括:

(a)编码肿瘤相关抗原(TAA)的第一核酸,和

(b)编码4-1BB配体(4-1BBL)的第二核酸,

用于在受试者中诱导全身抗肿瘤免疫反应,其中将所述重组MVA局部、优选肿瘤内施用至实体肿瘤。

3.一种重组修饰的安卡拉痘苗病毒(MVA),其包括:

(a)编码肿瘤相关抗原(TAA)的第一核酸,和

(b)编码4-1BB配体(4-1BBL)的第二核酸,

用于治疗、预防和/或预防受试者中继发性肿瘤的复发,其中所述重组MVA局部、优选肿瘤内施用至相关的原发性实体肿瘤,但不施用至所述继发性肿瘤;或

用于治疗和/或预防受试者中原发性实体肿瘤的复发,其中所述重组MVA局部、优选肿瘤内施用至相关的继发性实体肿瘤,但不施用至所述原发性实体肿瘤;或

用于治疗、预防和/或预防受试者中继发性肿瘤的复发,其中所述重组MVA局部、优选肿瘤内施用至另一相关的继发性实体肿瘤,但不施用至首先提及的继发性肿瘤。

4.如权利要求1至3中任一项所述使用的重组MVA,其中所述重组MVA包括:

(a)编码肿瘤相关抗原(TAA)的第一核酸,和

(b)编码4-1BB配体(4-1BBL)的第二核酸,和

(c)至少一种另外的编码TAA的核酸。

5.如权利要求1至4中任一项所述使用的重组MVA,其中所述TAA是新抗原或内源性自身抗原。

6.如权利要求1至5中任一项所述使用的重组MVA,其中所述TAA选自由以下组成的组:内源性逆转录病毒(ERV)蛋白、内源性逆转录病毒(ERV)肽、癌胚抗原(CEA)、粘蛋白1细胞表面相关(MUC-1)、前列腺酸性磷酸酶(PAP)、前列腺特异性抗原(PSA)、人表皮生长因子受体2(HER-2)、存活素、酪氨酸相关蛋白1(TRP1)、酪氨酸相关蛋白1(TRP2)、Brachyury、叶酸受体α(FOLR1)、黑色素瘤优先表达抗原(PRAME)和内源性逆转录病毒肽MEL;以及其组合。

7.如权利要求6所述使用的重组MVA,其中所述ERV蛋白来自人内源性逆转录病毒K(HERV-K)家族,优选地选自HERV-K包膜(HERV-K-env)蛋白和HERV-K gag蛋白。

8.如权利要求6所述使用的重组MVA,其中所述ERV肽来自人内源性逆转录病毒K(HERV-K)家族,优选地选自HERV-K包膜蛋白的假基因(HERV-K-env/MEL)。

9.如权利要求1至8中任一项所述使用的重组MVA,其中所述实体肿瘤是恶性肿瘤,优选黑色素瘤或癌性乳腺、结肠或卵巢肿瘤。

10.如权利要求3至9中任一项所述使用的重组MVA,其中所述继发性肿瘤是转移瘤。

11.如权利要求3至10中任一项所述使用的重组MVA,其中未局部、优选肿瘤内施用所述重组MVA的肿瘤不可通过手术切除或手术不可及。

12.如权利要求1至11中任一项所述使用的重组MVA,其中所述重组MVA不能在人细胞系中进行生殖复制。

13.如权利要求12所述使用的重组MVA,其中所述重组MVA衍生自如以编号V00083008保藏在欧洲细胞培养物保藏中心(ECACC)的MVA-BN。

14.一种在具有多个肿瘤的受试者中刺激免疫反应的方法,所述方法包括向所述受试者中的少于所有肿瘤局部施用包含至少一个编码TAA的第一核酸和编码4-1-BBL的第二核酸的重组MVA的步骤,其中在所述受试者中刺激了对所述TAA的免疫反应。

15.一种治疗具有至少一个不可及肿瘤和至少一个可及肿瘤的受试者的方法,所述方法包括向所述受试者中的至少一个可及肿瘤局部施用重组MVA,所述重组MVA包含至少一个编码TAA的第一核酸和编码4-1-BBL的第二核酸,从而减少或停止所述不可及肿瘤的生长。

4-1BBL辅助的重组修饰的安卡拉痘苗病毒(MVA)的医疗用途

技术领域

[0001] 本发明涉及癌症免疫疗法,特别是溶瘤病毒疗法的领域。更具体地,本发明涉及表达肿瘤相关抗原(TAA)和共刺激分子4-1BBL的重组修饰的安卡拉痘苗病毒(MVA),用于治疗、预防和/或预防肿瘤的复发和转移,其中将重组MVA肿瘤内施用至实体肿瘤。本发明还涉及相应的治疗方法。

背景技术

[0002] 就肿瘤抗原表达和免疫浸润和组成而言,人类癌症具有非凡的异质性。然而,一个共同特征是宿主无法发起有效阻止肿瘤生长的有效免疫反应。通常,由于不利的肿瘤微环境,天然引发的针对实体肿瘤的$CD8^+$ T细胞缺乏足够的刺激和对肿瘤组织的有效渗透。

[0003] 由于免疫细胞在不利的肿瘤微环境(TME)中浸润或发挥效应功能的能力差,因此缺乏针对实体肿瘤的有效免疫反应是癌症免疫疗法的主要挑战[1]。通过肿瘤定向疗法将免疫抑制性TME重编程为炎症性TME的概念近年来备受关注[2]。目标是激活已经归巢于肿瘤和局部淋巴结的免疫细胞,或将新的免疫细胞募集到TME,同时最大限度地减少免疫系统其余部分的无关激活[3]。为了实现这一目标,正在临床前模型以及临床中探索几种策略,要么采用局部释放和激活源自病原体识别和非程序性细胞破坏的生化信号,要么局部施用免疫刺激性单克隆抗体和细胞因子[2]。

[0004] 局部溶瘤病毒疗法依赖于通过特异性感染和破坏肿瘤细胞以及调节TME的肿瘤靶向疗法的概念。最近,美国食品药品管理局(FDA)批准了用于III期黑色素瘤患者的首创溶瘤剂IMLYGIC,一种编码人类GM-CSF的改良单纯疱疹病毒1[4],强调了溶瘤病毒(OV)的巨大潜力。已经研究了广泛的病毒家族的溶瘤作用,包括疱疹病毒、痘病毒和腺病毒等[5]。

[0005] 虽然历史上,OV病毒的肿瘤细胞特异性复制和直接杀伤活性被认为是主要的作用方式,但现在已知宿主抗肿瘤免疫反应的启动或增强对于溶瘤病毒疗法至关重要[6]。因此,局部病毒疗法可以被视为一种原位疫苗,它导致损伤或病原体相关分子模式的释放和伴随肿瘤抗原释放的免疫原性细胞死亡,最终引起先天性和适应性抗肿瘤免疫反应的启动[7]。

[0006] 大多数OV的一个显著特征是它们的肿瘤特异性以及它们通过病毒复制和伴随的肿瘤细胞裂解在肿瘤组织中扩散的能力[8]。尽管它们对肿瘤细胞具有工程化组织嗜性,但在患者中使用具有复制能力的病毒仍然引起安全问题。MVA-BN是经FDA(JYNNEOS®)批准作为针对天花和猴痘的非复制疫苗的高度减毒痘苗菌株[9]。另外,一种重组MVA-BN疫苗载体最近已被欧洲药品管理局(EMA)批准作为埃博拉疫苗的一部分,且其它载体用于针对各种传染性病原体的临床试验[10]。MVA是I型干扰素(IFN)的强效诱导剂[11、12、13]并引发针对载体编码的异源抗原的强大体液和细胞免疫反应[14、16]。重要的是,MVA不能在人类细胞中复制,因为它的复制能力仅限于胚胎鸟类细胞[15]。因此,MVA出色的安全性和免疫刺激特性使其成为治疗干预的主要候选者。

[0007] MVA可以容纳大型转基因插入物,促进异源抗原和免疫刺激分子的掺入,以引发抗

原特异性T细胞反应并增强某些免疫激活途径。CD40L辅助的MVA在IV注射后显著增强先天和适应性免疫反应[16、17]。此外，用共刺激分子或炎性细胞因子进行基因改变的OV在肿瘤内(IT)疗法后提高了治疗功效[18]。因此，使用编码肿瘤相关抗原(TAA)的MVA连同共刺激分子进行IT治疗可能会增强TME中的抗肿瘤免疫反应。

[0008] 肿瘤坏死因子受体(TNFR)家族成员4-1BB或CD137被定义为T细胞中真正的共刺激分子。4-1BB在TCR刺激后被瞬时诱导，且随后此共刺激受体的参与导致细胞因子分泌水平升高以及抗凋亡分子Bcl-2和Bcl-xl的上调。这使得增殖增加且防止活化诱导的T细胞死亡，其对于免疫记忆的形成也很关键[19、20]。4-1BB在肿瘤浸润性T细胞(TIL)中的表达[21]，加上其促进活化T细胞存活、扩增和增强效应功能的能力，使其成为癌症免疫疗法的诱人靶标。事实上，刺激共刺激途径4-1BB/4-1BBL在许多治疗性癌症环境中是有益的，包括使用激动性4-1BB抗体或表达4-1BBL的病毒载体的单一或组合疗法[22]。4-1BB共刺激也是第三代嵌合抗原受体(CAR)T细胞疗法的核心，因为其内域被并入肿瘤结合嵌合受体中以增强信号传导并因此杀死肿瘤细胞[23]。

[0009] 尽管如此，尽管迄今为止取得了显著进展，但仍需要溶瘤病毒疗法的进一步医疗用途。

[0010] 发明概述

[0011] 本发明的一个目标是提供使用溶瘤病毒的局部，即肿瘤定向病毒疗法的进一步医疗用途。

[0012] 简而言之，本发明的目标通过表达TAA和共刺激分子4-1BBL的重组MVA来解决，所述重组MVA用于

[0013] (i)预防实体肿瘤复发，其中将重组MVA肿瘤内施用至实体肿瘤，或

[0014] (ii)治疗、预防和/或预防肿瘤复发，其中将重组MVA肿瘤内施用至另一实体肿瘤。

[0015] 特别地，本发明由所附权利要求书和以下方面以及其实施方案定义。

[0016] 在一个方面，本发明提供重组MVA，其包括：

[0017] (a)编码肿瘤相关抗原(TAA)的第一核酸，和

[0018] (b)编码4-1BB配体(4-1BBL)的第二核酸，

[0019] 用于治疗和预防受试者的实体肿瘤的复发，其中将重组MVA局部地，优选地肿瘤内施用至实体肿瘤。

[0020] 在另一方面，本发明提供重组MVA，其包括：

[0021] (a)编码肿瘤相关抗原(TAA)的第一核酸，和

[0022] (b)编码4-1BB配体(4-1BBL)的第二核酸，

[0023] 用于预防实体肿瘤在其缓解时或缓解后在受试者中的复发，其中所述缓解是由向所述实体肿瘤局部、优选肿瘤内施用所述重组MVA诱导的或在所述施用之后。

[0024] 在另一方面，本发明提供重组MVA，其包括：

[0025] (a)编码肿瘤相关抗原(TAA)的第一核酸，和

[0026] (b)编码4-1BB配体(4-1BBL)的第二核酸，

[0027] 用于治疗、预防和/或预防受试者中继发性肿瘤的复发，其中所述重组MVA局部、优选肿瘤内施用至相关的原发性实体肿瘤，但不施用至所述继发性肿瘤；或

[0028] 用于治疗和/或预防受试者中原发性实体肿瘤的复发，其中所述重组MVA局部、优

选肿瘤内施用至相关的继发性实体肿瘤,但不施用至所述原发性实体肿瘤;或

[0029] 用于治疗、预防和/或预防受试者中继发性肿瘤的复发,其中所述重组MVA局部、优选肿瘤内施用至另一相关的继发性实体肿瘤,但不施用至首先提及的继发性肿瘤。

[0030] 在另一方面,本发明提供重组MVA,其包括:

[0031] (a)编码肿瘤相关抗原(TAA)的第一核酸,和

[0032] (b)编码4-1BB配体(4-1BBL)的第二核酸,

[0033] 用于治疗、预防和/或预防受试者中肿瘤的复发,所述肿瘤不可通过手术切除或手术不可及,其中所述重组MVA局部、优选肿瘤内施用至另一相关的实体肿瘤,但不局部、优选肿瘤内施用至首先提及的肿瘤。

[0034] 在另一方面,本发明提供重组MVA,其包括:

[0035] (a)编码肿瘤相关抗原(TAA)的第一核酸,和

[0036] (b)编码4-1BB配体(4-1BBL)的第二核酸,

[0037] 用于在受试者中诱导全身抗肿瘤免疫反应,其中将所述重组MVA局部、优选肿瘤内施用至实体肿瘤。

[0038] 在另一方面,本发明提供重组MVA,其包括:

[0039] (a)编码肿瘤相关抗原(TAA)的第一核酸,和

[0040] (b)编码4-1BB配体(4-1BBL)的第二核酸,

[0041] 用于全身抗肿瘤疗法,其中将所述重组MVA局部、优选肿瘤内施用至实体肿瘤。

[0042] 在另一方面,本发明提供重组MVA,其包括:

[0043] (a)编码肿瘤相关抗原(TAA)的第一核酸,和

[0044] (b)编码4-1BB配体(4-1BBL)的第二核酸,

[0045] 用于新辅助抗肿瘤疗法,其中将所述重组MVA局部、优选肿瘤内施用至实体肿瘤。

[0046] 在另一方面,本发明提供重组MVA,其包括:

[0047] (a)编码肿瘤相关抗原(TAA)的第一核酸,和

[0048] (b)编码4-1BB配体(4-1BBL)的第二核酸,

[0049] 用于在受试者中诱导抗肿瘤免疫记忆,其中将所述重组MVA局部、优选肿瘤内施用至实体肿瘤。

[0050] 在另一方面,本发明提供重组MVA,其包括:

[0051] (a)编码肿瘤相关抗原(TAA)的第一核酸,和

[0052] (b)编码4-1BB配体(4-1BBL)的第二核酸,

[0053] 用于治疗受试者的多个肿瘤,其中将所述重组MVA局部、优选肿瘤内施用至所述多个肿瘤中的至少一个,但不是全部。

[0054] 本发明还提供治疗具有多个肿瘤的患者的方法,所述方法包括向所述多个肿瘤中的至少一个但不是全部局部(优选肿瘤内)施用重组MVA,其中所述重组MVA包含编码肿瘤相关抗原(TAA)的第一核酸和编码4-1-BB配体(4-1-BBL)的第二核酸。

[0055] 这些方面和其实施方案将结合本发明的描述进行更详细的描述。

附图说明

[0056] 图1显示了在不相关的大肿瘤模型中肿瘤内施用MVA-TAA-4-1BBL的治疗效果与抗

原的选择无关。

[0057] C57BL/6(A-D)或Balb/c小鼠(E-F)在侧腹皮下(SC)接受5×10^5个B16.OVA(A-B)、5×10^5个B16.F10(C-D)或5×10^5个CT26.WT(E-F)细胞。七至十四天后,当肿瘤大于60mm^3时,用PBS或用指定的MVA构建体对小鼠进行肿瘤内(IT)免疫。在第一次免疫后的第4天或第5天和第8天重复IT免疫(虚线)。注射PBS、2×$10^8$$TCID_{50}$MVA-OVA或2×$10^8$$TCID_{50}$ MVA-OVA-4-1BBL的B16.OVA荷瘤小鼠的(A)肿瘤大小追踪(n=5只小鼠/组)和(B)总体存活率(n=20只小鼠/组);注射PBS、5×$10^7$$TCID_{50}$ MVA-Gp70或5×$10^7$$TCID_{50}$MVA-Gp70-4-1BBL的B16.F10荷瘤小鼠的(C)肿瘤大小追踪(n=5只小鼠/组)和(D)总体存活率(n=15只小鼠/组);注射PBS、5×$10^7$$TCID_{50}$MVA-Gp70或5×$10^7$$TCID_{50}$ MVA-Gp70-4-1BBL的CT26.WT荷瘤小鼠的(E)肿瘤大小追踪(n=5只小鼠/组)和(F)总体存活率(n=10只小鼠/组)。(A、C和E)数据代表至少两个独立实验。(B、D和F)代表至少2个合并的独立实验的总体存活率。图B、D和F对小鼠存活率进行了对数秩检验。*,p<0.05;**,p<0.005;****,p<0.0001。

[0058] 图2显示了MVA-TAA-4-1BBL免疫的荷瘤小鼠中的外周血$CD8^+$T细胞反应增加。

[0059] (A)B16.OVA荷瘤小鼠(n=5只小鼠/组)最后一次IT PBS、MVA-OVA或MVA-OVA-4-1BBL免疫后3天,外周血$CD44^+OVA_{257-264}$ Dex^+CD8^+ T细胞的代表性点图和频率。(B)B16.F10荷瘤小鼠(n=5只小鼠/组)最后一次IT PBS、MVA-Gp70或MVA-Gp70-4-1BBL免疫后3天,$p15E_{604-611}$肽再刺激的外周血$CD44^+IFN\gamma^+CD8^+$ T细胞的代表性点图和频率。(C)CT26.WT荷瘤小鼠(n=5只小鼠/组)在最后一次IT PBS、MVA-Gp70或MVA-Gp70-4-1BBL免疫后3天,$AH1_{6-14}$肽再刺激的外周血$CD44^+IFN\gamma^+CD8^+$ T细胞的代表性点图和频率。(D)IT MVA-TAA-4-1BBL治愈的C57BL/6小鼠的白癜风发展的代表性图片。(E)分别显示IT MVA-TAA(从MVA-OVA和MVA-Gp70组合的数据)和MVA-TAA-4-1BBL(从组合的MVA-OVA-4-1BBL和MVA-Gp70-4-1BBL组合的数据)治愈的C57BL/6小鼠的白癜风发病率的饼图。(A-E)数据代表至少两个独立实验。(A-C)数据表示为平均值±SEM。进行了单因素ANOVA。***p<0.005,****p<0.001。

[0060] 图3显示了IT MVA注射后的MVA定位以及MVA-OVA和MVA-OVA-4-1-BBL对炎症细胞因子的诱导。

[0061] (A)C57BL/6小鼠SC接受5×10^5个B16.OVA细胞。当肿瘤达到60mm^3时,将小鼠分组(n=3只小鼠/组)并IT施用PBS或2×$10^8$$TCID_{50}$MVA(不编码TAA或4-1-BBL的MVA)。IT注射肿瘤后6小时,快速冷冻TdLN、NdLN、脾脏和血液,并从组织裂解物中提取病毒DNA。显示了不同器官中MVA基因MVA082L的基因拷贝(gcs)。数据表示为平均值±SEM。进行了双因素ANOVA。*,p<0.05;***,p<0.005;****,p<0.0001。(B)C57BL/6小鼠接受5×10^5个B16.OVA细胞。当肿瘤达到60mm^3时,将小鼠分组(n=3只小鼠/组)并IT施用PBS或2×$10^8$$TCID_{50}$ MVA、MVA-OVA或MVA-OVA-4-1BBL。IT注射后6小时,提取肿瘤并处理肿瘤裂解物。显示了肿瘤裂解物中指示的细胞因子/趋化因子的浓度(pg/ml)。数据表示为平均值±SEM。进行了单因素ANOVA。*,p<0.05;**,p<0.01;****,p<0.0001。

[0062] 图4显示肿瘤内MVA免疫疗法诱导对未治疗病变的排斥反应。

[0063] (A-D)双侧肿瘤模型。(A)实验布局。Balb/c小鼠分别在右侧腹和左侧腹SC接受5×10^5和1×10^5个CT26.WT肿瘤细胞。5天后,用PBS或用指定的MVA构建体对右侧腹肿瘤进行IT免疫。在第一次免疫后的第5天和第8天重复IT免疫(箭头)。(B)在PBS IT注射后,治疗和未治疗的肿瘤的肿瘤大小追踪(n=10只小鼠/组)。(C)在5×$10^7$$TCID_{50}$MVA-gp70 IT注射后,治

疗和未治疗的肿瘤的肿瘤大小追踪(n＝10只小鼠/组)。(D)在5×$10^7$$TCID_{50}$ MVA-Gp70-4-1BBL IT注射后,治疗和未治疗的肿瘤的肿瘤大小追踪(n＝10只小鼠/组)。

[0064] 图5显示肿瘤内MVA-TAA-4-1BBL治疗的小鼠对随后的局部和全身性肿瘤再激发具有抗性。

[0065] (A)实验布局。图1A和1B的初始C57BL/6小鼠或长期幸存者(肿瘤清除后12-36周)用5×10^5个B16.OVA细胞对治愈小鼠的未患肿瘤侧腹进行SC再激发。在再激发之前(第-6天)和之后(第7天)通过流式细胞术分析外周血。在肿瘤细胞接种后第41天分析血液、脾脏、非dLN和TdLN单核细胞。(B)显示随时间变化的无肿瘤小鼠的百分比(n＝5-11只小鼠/组)。括号中显示了每组无肿瘤小鼠的数量。(C)在IT MVA-OVA或MVA-OVA-4-1BBL治疗后,初始小鼠和长期幸存者在进行B16.OVA再激发之前和之后,外周血$CD44^+OVA_{257-264}$ Dex^+CD8^+的频率。(D)血液、脾脏、NdLN和TdLN中的$CD44^+OVA_{257-264}Dex^+CD8^+$ T的频率。(E)在用$OVA_{257-264}$肽再刺激后,脾$CD44^+IFN\gamma^+TNF\alpha^+IL2^+CD8^+$ T细胞的频率。(F)血液、脾脏、NdLN和TdLN中的$CD62L^-CD127^+CD69^-OVA_{257-264}$ Dex^+细胞(T_{EM})的频率(左)。血液、脾脏、NdLN和TdLN中的$CD62L^+CD127^+OVA_{257-264}$ Dex^+细胞(T_{CM})的频率(中)。在B16.OVA细胞激发41天后,血液、脾脏、NdLN和TdLN中的$CD62L^-CD127^+CD69^+OVA_{257-264}$ Dex^+(T_{RM})的频率(右)。(G-I)全身性肿瘤再激发。(G)实验布局。图1C的初始Balb/c小鼠或长期幸存者用2×10^5个CT26.WT细胞进行IV再激发。在肿瘤细胞注射后第19天分析脾脏和肺。(H)在肿瘤细胞转移到初始或治愈的小鼠后第19天,在布安液(Bouin′s solution)中固定后肺部的代表性照片。评估宏观肺转移的总数(n＝2-9只小鼠/组)。(I)在再激发后19天,在用$AH1_{6-14}$肽再刺激后,脾$CD44^+IFN\gamma^+TNF\alpha^+IL2^+CD8^+$ T细胞的频率。(A-H)n＝5-11只小鼠/组。(C-H)数据表示为平均值±SEM。进行了双因素ANOVA*,$p<0.05$;**,$p<0.01$;***,$p<0.005$。(I)数据表示为平均值±SEM。进行了单因素ANOVA*,$p<0.05$;**,$p<0.005$;***,$p<0.0005$。

[0066] 图6显示肿瘤内MVA-Gp70-4-1BBL免疫疗法赋予对局部肿瘤再激发的保护。

[0067] 图1C和1D的初始C57BL/6小鼠或长期幸存者用5×10^5个B16.F10细胞对治愈小鼠的未患肿瘤侧腹进行SC再激发。在再激发之前(第-6天)和之后(第7天)通过流式细胞术分析外周血。在肿瘤细胞接种后第42天分析血液、脾脏、NdLN和TdLN。(A)显示随时间变化的无肿瘤小鼠的百分比(n＝5-11只小鼠/组)。括号中显示了每组无肿瘤小鼠的数量。(B)在B16.F10细胞再激发之前和之后,外周血$CD44^+p15E_{604-611}$ $Pent^+CD8^+$T细胞的频率。(C)血液、脾脏、NdLN和TdLN中的$CD62L^+CD127^+p15E_{604-611}$ $Pent^+CD8^+$T细胞(T_{CM})的频率。(D)血液、脾脏、NdLN和TdLN中的$CD62L^-CD127^+p15E_{604-611}Pent^+CD8^+$T细胞($T_{EM}$)的频率。(E)血液、脾脏、NdLN和TdLN中的$CD62L^-CD127^+CD69^+p15E_{604-611}$ $Pent^+CD8^+$T细胞(T_{EM})的频率。(A-E)n＝5-11只小鼠/组。(B-E)数据表示为平均值±SEM。(C-E)进行了单因素ANOVA**,$p<0.005$;***,$p<0.0005$。

[0068] 图7显示了复制病毒诱导感染的肿瘤细胞和免疫细胞的死亡[33-35]。

[0069] MVA、MVA-TAA或MVA-TAA-4-1BBL感染增强体外B16.OVA和CT26.WT肿瘤细胞死亡(图7A)。已证明优先被MVA感染的巨噬细胞[36]被有效地杀死,其中4-1BBL佐剂显著增加了这种作用(图7A)。细胞死亡导致细胞内蛋白质,例如高分子族盒1(HMGB1)的释放,所述蛋白质被先天免疫细胞感知并有助于启动免疫反应[37、38]。在肿瘤细胞或巨噬细胞的MVA感染后检测到HMGB1的显著增加,与4-1BBL无关(图7B)。

[0070] 图8说明基于MVA的载体MVA-HERV-FOLR1-PRAME-h4-1-BBL(“MVA-mBN494”或“MVA-BN-4IT”)(图8A),且另外显示载体将TAA负载到感染细胞的HLA中的能力(图8B)以及以功能性,即h4-1-BB受体结合形式表达h4-1-BBL的能力(图8C)。有关更多详细信息,参见实施例7。

[0071] 图9说明基于MVA的载体“MVA-mBN502”(图9C),且另外显示ERVK-env/MEL(图9A;如在MVA-mBN494中使用)和ERVK-env/MEL_03(图9B;如在MVA-mBN502中使用)的示意图。

具体实施方式

[0072] 在这项研究中,我们将编码TAA的MVA的免疫刺激特性与4-1BBL的精细T细胞增强潜力相结合,并评估了对实体肿瘤的治疗功效。我们发现,IT注射MVA-TAA-4-1BBL在各种不相关的肿瘤模型中发挥了强烈的客观治疗反应。所述疗法是由于强烈再激活的肿瘤特异性$CD8^+$ T细胞和TME中多种促炎趋化因子和细胞因子的有利诱导。此外,IT MVA-TAA-4-1BBL注射液诱导了全身抗肿瘤免疫反应,抑制远处的肿瘤沉积物的生长。重要的是,IT MVA-TAA-4-1BBL触发了多种肿瘤特异性记忆反应的产生,可防止局部和转移性复发。

[0073] 我们将肿瘤相关抗原(TAA)和免疫刺激辅助物4-1BBL克隆到修饰的安卡拉痘苗(MVA)的基因组中,用于肿瘤内病毒疗法。用MVA-TAA-4-1BBL进行局部治疗可控制已建立的肿瘤。肿瘤内注射后,MVA主要定位于肿瘤,极少渗漏至肿瘤引流淋巴结。MVA-TAA-4-1BBL的原位感染引发了肿瘤微环境的深刻变化,包括诱导多种促炎分子和免疫原性细胞死亡。这导致经历过抗原的、产生细胞因子的肿瘤特异性细胞毒性T细胞的再激活和扩增。引人注目的是,我们报告了通过局部MVA-TAA-4-1BBL治疗诱导全身抗肿瘤免疫反应,控制了远处的未治疗病变处的肿瘤生长,并赋予对局部和全身性肿瘤再激发的保护。在所有情况下,4-1BBL辅助的MVA均优于MVA。因此,肿瘤内4-1BBL辅助的MVA免疫疗法诱导了有效的肿瘤特异性$CD8^+$ T细胞的扩增以及肿瘤微环境中有利的促炎变化,引起肿瘤消除和保护性免疫记忆。

[0074] 定义

[0075] 必须注意,除非上下文另外明确指出,否则如在本文中使用,单数形式“一(a/an)”和“所述”包括多个指示物。因此,例如,提及“一个核酸序列”包括一个或多个核酸序列。

[0076] 如本文所用,多个列举的要素之间的连接术语“和/或”被理解为包括单独的和组合的选项。例如,在两个要素由“和/或”连接的情况下,第一个选项是指第一个要素在没有第二个要素的情况下的适用性。第二个选项是指第二个要素在没有第一个要素的情况下的适用性。第三个选项是指第一个和第二个要素在一起的适用性。这些选项中的任何一个都被理解为落入所述含义内,且因此满足本文所用术语“和/或”的要求。超过一个选项的同时适用性也被理解为落入所述含义内,且因此满足术语“和/或”的要求。

[0077] 在整个说明书和随附权利要求书中,除非上下文另外要求,否则词语“包含(comprise)”和诸如“包含(comprises)”和“包含(comprising)”的变型应理解为包含规定的整数或步骤或整数或步骤的组但不排除任何其它整数或步骤或整数或步骤的组。当在本发明的描述中的一个方面或实施方案的上下文中使用时,术语“包含”可以被修改并因此被术语“含有”或“包括”替换,或者当在本文中使用时被术语“具有”替换。类似地,任何上述术语(包含、含有、包括、具有)无论何时在本发明的描述中的一个方面或实施方案的上下文中

使用,都借以包括术语“由……组成”或“基本上由……组成”,其各自表示取决于管辖权的特定法律含义。

[0078] 当在本文中使用时,“由.....组成”不包括权利要求要素中未指定的任何要素、步骤或成分。当在本文中使用时,“基本上由……组成”不排除不会实质影响权利要求书的基本和新颖特征的材料或步骤。

[0079] 术语“重组MVA”是指在其基因组中插入并非天然存在于亲本病毒中的外源核酸序列的MVA。因此,重组MVA是指通过人工组合MVA核酸序列与合成或半合成来源的核酸序列的片段而产生的MVA,所述组合在自然界中不存在或排列方式不同。人工组合最常见通过使用成熟的基因工程技术对分离的核酸片段进行人工操纵来完成。通常,如本文所述的“重组MVA”是指通过标准基因工程改造方法产生的MVA,例如重组MVA因此是基因工程改造或基因修饰的MVA。术语“重组MVA”因此包括在其基因组中整合了至少一种重组核酸,优选呈转录单位形式的MVA(例如MVA-BN)。转录单位可包括启动子、增强子、终止子和/或沉默子。本发明的重组MVA被设计成在诱导调节元件,例如启动子后表达异源抗原决定簇、多肽或蛋白质(抗原)。

[0080] 如本文所用,术语“受试者”是指重组MVA的接受者,其典型地是哺乳动物,例如非灵长类动物或灵长类动物(例如猴或人),并且优选是人。所述术语包括人或动物“患者”和实验动物。术语“受试者”和“患者”可互换使用。

[0081] 术语“实体肿瘤”是指可定位或固定的赘瘤组织,与例如白血病或血液癌症形成对比。

[0082] 术语“原发性肿瘤”是指赘瘤细胞可能从其扩散到身体其它部位并可能形成新的(“继发性”)肿瘤的初始或首先的肿瘤。

[0083] 如本文所用,术语“继发性肿瘤”是指由从“原发性肿瘤”或从另一“继发性肿瘤”扩散的赘瘤细胞形成的肿瘤。特别地,所述术语包括“转移瘤”。

[0084] 术语“转移瘤”是指源自癌性原发性或继发性肿瘤的肿瘤沉积物。

[0085] 如本文所用,措辞“相关”意指假定两个肿瘤对相同的重组MVA或TAA有反应。例如,它们属于相同的肿瘤类型。

[0086] 如本文所用,术语“空间上远离”涉及例如通过光学方式可清楚地辨别为个体肿瘤并且彼此间隔开的肿瘤。

[0087] 术语“局部”施用包括例如对实体肿瘤的肿瘤内或局部施用。因此,局部意味着原位。施用可以例如通过局部或局部应用或通过重组MVA的肿瘤内注射来实现。在一些实施方案中,例如,在靠近皮肤或为皮肤细胞的肿瘤(如黑色素瘤)的肿瘤中,可以通过在肿瘤附近的皮下注射来实现局部施用。相比之下,“远端”或“全身”等术语意指不在原位。

[0088] 如本文所用,术语“全身”意指“局部”的反义词。因此,全身可能意指效果是局部不受限制的,即更确切地说与整个身体有关。

[0089] 如本文所用,术语“肿瘤定向病毒疗法”意指与全身肿瘤病毒疗法相反的局部病毒疗法。

[0090] 如本文所用,术语“全身抗肿瘤疗法”意指将重组MVA局部施用于实体肿瘤,但抗肿瘤活性延伸至未局部治疗的其它肿瘤。

[0091] 如本文所用,术语“全身抗肿瘤免疫反应”是指可能发生在身体任何部位的抗肿瘤

免疫反应。

[0092] 如本文所用,术语“复发”是指肿瘤的复发或重现。

[0093] 如本文所用,术语“预防复发”意指预防或抑制缓解的肿瘤(即缓解中或缓解后的肿瘤,例如根除的肿瘤)的复发。至少抑制了肿瘤的完全复发,例如至少50%。

[0094] 相反,术语“预防”意指防止肿瘤的首次出现。

[0095] 如本文所用,术语“缓解”涉及例如减少或根除的肿瘤。更一般地说,“缓解”是例如肿瘤等疾病的体征和症状的减少或消失。缓解可以被认为是部分缓解或完全或全部缓解。例如,肿瘤的部分缓解可以定义为肿瘤生长的可测量参数减少50%或更多,如在体检、放射学研究中或由血液或尿液测试的生物标志物水平所发现。另一方面,完全缓解是肿瘤完全消失,尽管有复发的可能性。

[0096] 术语“新辅助疗法”是指在主要疗法之前的治疗。此处,使用重组MVA的新辅助疗法旨在在例如手术切除之前减小肿瘤的大小或范围。

[0097] 选定的缩写 IT 肿瘤内(i.t.)

[0098] MVA 修饰的安卡拉痘苗病毒(MVA)

[0099] OV 溶瘤病毒

[0100] TAA 肿瘤相关抗原

[0101] TME 肿瘤微环境

[0102] 实施方案

[0103] 在一个实施方案中,重组MVA是非复制型或复制缺陷型MVA。优选地,重组MVA不能在人细胞系中进行生殖复制。

[0104] 在一个实施方案中,重组MVA衍生自如以编号V00083008保藏在欧洲细胞培养物保藏中心(ECACC)的MVA-BN,或衍生自MVA-BN衍生物。

[0105] 在一个实施方案中,重组MVA包括:

[0106] (a)编码肿瘤相关抗原(TAA)的第一核酸;和

[0107] (b)编码4-1BB配体(4-1BBL)的第二核酸;和

[0108] (c)至少一种另外的编码TAA的核酸。

[0109] 在一个实施方案中,编码TAA的第一核酸和编码TAA的至少一种另外的核酸相同或不同。

[0110] 在一个实施方案中,重组MVA包括两个、三个、四个、五个、六个或更多个各自编码不同TAA的核酸。

[0111] 在一个实施方案中,TAA是新抗原(neoantigen)或内源性自身抗原。

[0112] 在一个实施方案中,TAA是转座元件(TE)。

[0113] 在一个实施方案中,TAA是内源性逆转录病毒蛋白(HERV)。

[0114] 在一个实施方案中,TAA是长散布核元件(LINE)。

[0115] 在一个实施方案中,TAA是短散布核元件(SINE)。

[0116] 在一个实施方案中,TAA选自由以下组成的组:内源性逆转录病毒(ERV)蛋白、内源性逆转录病毒(ERV)肽、癌胚抗原(CEA)、粘蛋白1细胞表面相关(MUC-1)、前列腺酸性磷酸酶(PAP)、前列腺特异性抗原(PSA)、人表皮生长因子受体2(HER-2)、存活素、酪氨酸相关蛋白1(TRP1)、酪氨酸相关蛋白1(TRP2)、Brachyury、叶酸受体α(FOLR1)、黑色素瘤优先表达抗原

(PRAME)和内源性逆转录病毒肽MEL;以及其组合。任何TAA都适用于本发明的组合物和/或方法中,只要它是与已知肿瘤或待治疗患者中的肿瘤相关的抗原,并且在表达时能够引起或刺激免疫反应。

[0117] 在一个实施方案中,ERV蛋白来自人内源性逆转录病毒K(HERV-K)家族,优选地选自HERV-K包膜(HERV-K-env)蛋白和HERV-K gag蛋白。

[0118] 在一个实施方案中,ERV肽来自人内源性逆转录病毒K(HERV-K)家族,优选地选自HERV-K包膜蛋白的假基因(HERV-K-env/MEL)。

[0119] 在一个实施方案中,重组MVA包括:

[0120] (i)编码HERV-K-env/MEL的核酸;

[0121] (ii)编码HERV-K gag的核酸;

[0122] (iii)编码优选表达为融合蛋白的FOLR1和PRAME的核酸;和

[0123] (iv)编码4-1BBL的核酸。

[0124] 在一个实施方案中,(i)中的核酸编码包括HERV-K env表面(SU)单元和HERV-K跨膜(TM)单元的HERV-K-env/MEL,其中HERV-K TM单元发生突变,优选地其中HERV-K TM单元发生突变以使得免疫抑制域失活。优选地,HERV-K-MEL被插入突变的HERV-K TM单元内。更优选地,HERV-K-MEL取代HERV-K TM的一部分免疫抑制域。

[0125] 在一个实施方案中,(i)中的核酸序列编码包括如SEQ ID NO:7中所示的氨基酸序列或由其组成的氨基酸序列。

[0126] 在一个实施方案中,(i)中的核酸序列包括如SEQ ID NO:8中所示的核酸序列或由其组成。

[0127] 在一个实施方案中,(i)中的核酸编码包括HERV-K env表面(SU)单元和HERV-K跨膜(TM)单元的HERV-K-env/MEL,其中HERV-K TM单元缩短至少于20个氨基酸,优选少于10个氨基酸,更优选少于8个氨基酸,最优选6个氨基酸。

[0128] 在一个实施方案中,(i)中的核酸编码包括HERV-K-env表面(SU)单元的HERVK-env/MEL,其中HERV-K-env SU单元的RSKR弗林蛋白酶裂解位点缺失。优选地,HERV-K-MEL连接到HERV-K-env SU单元的C端。

[0129] 在一个实施方案中,(i)中的核酸编码包括异源膜锚的HERVK-env/MEL,优选源自人PDGF(血小板源性生长因子)受体。

[0130] 在一个实施方案中,(i)中的核酸序列编码包括如SEQ ID NO:11中所示的氨基酸序列或由其组成的氨基酸序列。

[0131] 在一个实施方案中,(i)中的核酸序列包括如SEQ ID NO:12中所示的核酸序列或由其组成。

[0132] 在一个实施方案中,实体肿瘤、原发性实体肿瘤和/或继发性肿瘤是癌性或恶性肿瘤。

[0133] 在一个实施方案中,实体肿瘤、原发性实体肿瘤和/或继发性肿瘤是黑色素瘤或恶性乳腺、结肠或卵巢肿瘤。

[0134] 在一个实施方案中,继发性肿瘤是转移瘤。

[0135] 在一个实施方案中,继发性肿瘤是实体肿瘤。或者,继发性肿瘤是例如漂浮在体液如血淋巴液中的肿瘤细胞的聚集体,或存在于体腔,例如腹膜腔内。然而,局部或肿瘤内施

用重组MVA的原发性或继发性肿瘤总是实体肿瘤。

[0136] 在一个实施方案中，未局部或肿瘤内施用重组MVA的肿瘤不可通过手术切除或手术不可及。

[0137] 在一个实施方案中，原发性和继发性肿瘤在空间上彼此远离。

[0138] 在一个实施方案中，继发性肿瘤和另一继发性肿瘤在空间上彼此远离。

[0139] 在一个实施方案中，原发性和继发性肿瘤位于受试者身体的相同组织或器官内。

[0140] 在一个实施方案中，继发性肿瘤和另一继发性肿瘤位于受试者的相同组织或器官内。

[0141] 在一个实施方案中，原发性和继发性肿瘤位于受试者身体的不同组织或器官内。

[0142] 在一个实施方案中，继发性肿瘤和另一继发性肿瘤位于受试者身体的不同组织或器官内。在一个实施方案中，继发性肿瘤是初始的，即之前未用重组MVA进行局部、优选肿瘤内治疗。

[0143] 在一个实施方案中，肿瘤处于至少部分缓解，例如至少超过50％的缓解，优选处于完全缓解。

[0144] 在一个实施方案中，重组MVA除了局部施用、优选肿瘤内施用外不施用。因此，重组MVA例如不全身、静脉内、腹膜、胃肠外、皮下或鼻内施用至受试者。

[0145] 在一个实施方案中，抗肿瘤免疫记忆是长期的，即持续数天、数周、数月、数年或数十年。

[0146] 治疗方法

[0147] 本发明提供了治疗具有多于一个肿瘤的受试者的方法，其中通过局部施用重组MVA来治疗受试者中少于所有的肿瘤。也就是说，本发明提供了治疗具有多个肿瘤的受试者的方法，所述方法包括将重组MVA局部施用至所述多个肿瘤中的至少一个但不是全部。在一些实施方案中，局部施用重组MVA的步骤包括肿瘤内注射。以这种方式，治疗方法可以说产生了已经局部或肿瘤内施用或注射重组MVA的“治疗的肿瘤”或“注射的肿瘤”，和未局部施用重组MVA或未注射重组MVA的“未治疗的肿瘤”或“未注射的肿瘤”。所述治疗方法也可以说提供了一种通过对所述受试者中的至少一个其它肿瘤局部施用或肿瘤内注射重组MVA来治疗受试者中未注射的肿瘤的方法。在本发明方法的一些实施方案中，受试者是人类患者。

[0148] 在一些实施方案中，治疗方法包括通过将重组MVA局部施用(在一些实施方案中，通过肿瘤内注射)至第一或原发性肿瘤中来治疗所述第一或原发性肿瘤的转移或复发。在一些实施方案中，不可能确定受试者的多个肿瘤中的哪个是第一个发生的(即，“原发性肿瘤”)，并且所述方法包括通过局部施用或肿瘤内注射MVA来治疗多个肿瘤中的至少一个。因此，在一些实施方案中，“转移瘤”或“继发性肿瘤”意指肿瘤与指定为“第一肿瘤”或“原发性肿瘤”的肿瘤处于不同位置或具有不同边界。

[0149] 本发明的方法包括通过局部施用或肿瘤内注射来治疗受试者的多个肿瘤中的至少一个，或治疗至少两个肿瘤、至少三个、至少四个或更多个所述肿瘤，或治疗受试者的所述多个肿瘤中除一个以外的所有肿瘤。在一些实施方案中，本发明的方法规定，可以通过局部施用或肿瘤内注射重组MVA对受试者中任何数量的肿瘤进行注射或治疗，只要受试者中少于所有的肿瘤被如此注射或治疗即可。

[0150] 尽管本发明不受任何特定机制或作用方式束缚，但任何方法都适用于本发明的实

践，只要所述方法在所述受试者或其细胞中刺激针对至少一个TAA或肿瘤的免疫反应，或产生至少一个继发性或未注射肿瘤的体积或大小的减小。“刺激免疫反应”意指可以在受试者中鉴定新的或增加的免疫反应的标志，例如如本文工作实例所示，受试者中CD8+ T细胞群的增加和/或由CD8+ T细胞产生的IFN-γ、TNF-α和/或IL-2的量的增加。以这种方式，本发明还提供了刺激对TAA的免疫反应的方法，所述方法包括将本发明的重组MVA肿瘤内施用至受试者的步骤。

[0151] 在一些实施方案中，重组MVA包含：(a)编码肿瘤相关抗原(TAA)的第一核酸；和(b)编码4-1BB配体(4-1BBL)的第二核酸。重组MVA可进一步包含编码额外TAA的额外核酸。本发明的方法适用于编码至少一个TAA和4-1-BBL的重组MVA。在一些实施方案中，重组MVA表达至少一个TAA和4-1-BBL，这可以使用本领域已知的技术来证明。

[0152] 可用于本发明的方法和组合物的各种TAA和4-1-BBL的序列是本领域已知的并且描述于例如PCT/EP2019/081942(公布为WO2020/104531)和欧洲专利申请第19210369.5号中，其全部以引用方式整体并入本文中。示例性4-1-BBL序列在NCBI RefSeq NP_003802.1中列出(以及在SEQ ID NO:3中列出的氨基酸序列中，和/或由SEQ ID NO:4中列出的核酸序列编码)。可用于本发明的用途和方法的重组MVA也描述于例如以引用方式并入本文中的欧洲专利申请第19210369.5号中。

[0153] 在某些实施方案中，编码4-1-BBL的核酸序列编码与SEQ ID NO:3具有至少95％、96％、97％、98％、99％或100％氨基酸序列同一性的4-1-BBL。在某些实施方案中，核酸序列是SEQ ID NO:4中列出的序列，或编码具有SEQ ID NO:3中列出的氨基酸序列的4-1-BBL。

[0154] 在某些实施方案中，编码TAA的核酸序列编码与先前已知的TAA具有至少95％、96％、97％、98％、99％或100％氨基酸序列同一性的TAA，例如本文所提供的序列表中列出的序列。在某些实施方案中，核酸序列编码具有序列表中所列的氨基酸序列的TAA，或具有本领域已知的氨基酸序列的TAA。

[0155] 在一些实施方案中，在局部施用(例如，肿瘤内注射)重组MVA之前和之后测量至少一个单独的肿瘤，以确定施用后肿瘤是否继续生长，或大小增加或减小。在一些方法中，可以在施用后每隔一段时间进行额外测量，以追踪至少一个单独的肿瘤的反应。此类测量可以通过任何合适的技术进行，并且可以包括视觉评估或外部测量以及X射线、超声成像、活体显微镜检查或本领域已知的任何其它合适的方法。用于评估肿瘤对治疗的反应和/或治疗有效性的肿瘤量度可包括例如肿瘤的至少一个直径和/或肿瘤体积的估计。

[0156] 在一些实施方案中，治疗具有一个或多个肿瘤的受试者的方法包括以下步骤：(a)获得所述受试者中肿瘤的第一测量值；(b)将表达至少一个TAA的重组MVA施用至所述受试者中的一个或多个但不是全部的肿瘤，以产生治疗或注射的肿瘤和未治疗或未注射的肿瘤；(c)获得至少一个所述未治疗或未注射的肿瘤的第二测量值；以及(d)将所述第二测量值与所述未治疗或未注射的肿瘤的第一测量值进行比较，其中所述测量值的减少或所述测量值没有增加表明肿瘤已退化或体积减小，或肿瘤生长已延迟。在一些实施方案中，在这些方法中使用的重组MVA表达至少一种TAA和4-1-BBL，如在本文别处所进一步论述。

[0157] 在一些实施方案中，治疗具有原发性肿瘤和一个或多个转移瘤或转移瘤可能性(即具有恶性肿瘤)的受试者的方法旨在预防新的或额外的转移瘤，并且包括以下步骤：(a)在受试者中鉴定出一个或多个具有转移风险的肿瘤；(b)将表达TAA的重组MVA局部施用至

所述受试者中的至少一个但不是所有肿瘤(在一些实施方案中,通过肿瘤内注射);(c)检测所述受试者中的肿瘤以确认在所述受试者中不可检测到新的肿瘤或转移瘤。在一些实施方案中,在这些方法中使用的重组MVA表达TAA和4-1-BBL,如在本文别处所进一步论述。在一些实施方案中,在这些方法中使用的重组MVA包含编码TAA的异源核酸和编码4-1-BBL的异源核酸,但不包含由异源核酸编码的以下任何额外基因:当用于作为MVA的组成部分或单独治疗受试者时,可影响受试者的免疫反应的或预期会影响受试者的免疫反应。

[0158] 在一些实施方案中,本发明提供一种治疗具有多个肿瘤的受试者中的不可及肿瘤的方法,所述方法包括将重组MVA局部施用至所述多个肿瘤中的至少一个可及肿瘤中的步骤,其中所述重组MVA包含编码肿瘤相关抗原(TAA)的第一核酸和编码4-1-BB配体(4-1-BBL)的第二核酸。在一些实施方案中,重组MVA包含至少一个额外核酸,其编码至少一种额外TAA,或至少两个、三个或四个或更多个额外核酸,其编码至少两个、三个或四个或更多个额外TAA。在一些实施方案中,局部施用重组MVA的步骤包括肿瘤内注射。

[0159] "不可及肿瘤"意指难以通过局部施用重组MVA,例如通过肿瘤内注射和/或使用其它技术直接治疗的肿瘤。"不可及肿瘤"或不可切除的肿瘤可能位于身体的敏感区域,例如靠近或围绕重要的神经或血管,或位于大脑中,或位于手术和/或重组MVA的局部施用可能对受试者造成损害风险和/或将难以施用的另一个位置。本发明提供了治疗具有多个肿瘤的受试者中的不可及或不可切除肿瘤的方法,所述方法包括对更可及和/或局部施用不太可能对受试者造成损害的不同肿瘤进行局部施用的步骤。在一些实施方案中,本发明提供一种治疗受试者中的不可及肿瘤的方法,所述方法包括:(a)鉴定受试者中的至少一个不可及肿瘤和至少一个可及肿瘤;和(b)将表达TAA的重组MVA局部施用至所述受试者中的至少一个可及肿瘤。任选地,此方法进一步包括监测所述不可及肿瘤以确认肿瘤的生长已减缓或停止,和/或确定所述受试者在施用重组MVA后是否具有增强的免疫反应或新的免疫反应的步骤。

[0160] 在一些实施方案中,本发明提供一种治疗具有多个恶性肿瘤的受试者的方法,所述方法包括将表达TAA的重组MVA局部施用至所述肿瘤中的至少一个以产生治疗的肿瘤,其中所述治疗使得治疗的肿瘤和至少一个未用重组MVA进行直接治疗或注射的其它肿瘤(也称为"未治疗的肿瘤"或"未注射的肿瘤")的肿瘤体积减小。

[0161] 在一些实施方案中,"肿瘤内注射"意指在肿肿瘤内或在肿瘤边界内进行施用。在一些实施方案中,"局部施用"意指在肿瘤附近进行施用。本领域技术人员知道,此类注射也可以巧合地表征为另一种类型的施用,例如胃肠外或皮下施用,具体取决于肿瘤的位置。

[0162] 进一步说明

[0163] 修饰的安卡拉痘苗病毒(MVA)

[0164] 在过去,MVA是通过516次连续传代对安卡拉痘苗病毒株的鸡胚成纤维细胞(CVA)产生的(综述参见Mayr等人1975)。此病毒在第570段从CVA重命名为MVA,以说明其特性发生了重大变化。MVA进行了进一步传代,直至传代次数超过570次。由于这些长期传代,产生的MVA病毒的基因组缺失了约31kb的基因组序列,且因此被描述为高度限制复制到鸟类细胞的宿主细胞(Meyer等人1991)。在多种动物模型中表明,与完全可复制的起始物质相比,由此产生的MVA是显著无毒的(Mayr和Danner 1978)。

[0165] 在本发明的实践中有用的MVA包括MVA-572(1994年1月27日作为ECACC V94012707

保藏);MVA-575(2000年12月7日作为ECACC V00120707保藏)、MVA-I721(在Suter等人2009中引用)、NIH克隆1(2003年3月27日作为ATCC®PTA-5095保藏)和MVA-BN(2000年8月30日以编号V00083008保藏在欧洲细胞培养物保藏中心(ECACC))。

[0166] 更优选地,根据本发明使用的MVA包括MVA-BN和MVA-BN衍生物。MVA-BN已在WO 02/042480中进行了描述。如本文所述,"MVA-BN衍生物"是指任何表现出与MVA-BN基本相同的复制特征但在其基因组的一个或多个部分中表现出差异的病毒。

[0167] MVA-BN以及MVA-BN衍生物不能复制,意味着不能在体内和体外进行生殖复制。更具体地说,在体外,MVA-BN或MVA-BN衍生物已被描述为能够在鸡胚成纤维细胞(CEF)中进行生殖复制,但不能在人角质形成细胞系HaCat(Boukamp等人1988)、人骨骨肉瘤细胞系143B(ECACC保藏号91112502)、人胚肾细胞系293(ECACC保藏号85120602)和人宫颈腺癌细胞系HeLa(ATCC保藏号CCL-2)中进行生殖复制。另外,MVA-BN或MVA-BN衍生物在Hela细胞和HaCaT细胞系中的病毒扩增率比MVA-575小至少两倍,更优选地小三倍。MVA-BN和MVA-BN衍生物的这些特性的测试和分析描述于WO 02/42480和WO 03/048184中。

[0168] 如上文所述的术语在体外人类细胞系中"不能进行生殖复制"例如描述于WO 02/42480中,其还教导了如何获得具有如上所述的所需特性的MVA。所述术语适用于使用WO 02/42480或US 6,761,893中所述的分析在感染后4天具有小于1的体外病毒扩增率的病毒。

[0169] 重组MVA病毒的示例性产生

[0170] 对于如本文公开的重组MVA的产生,可应用不同的方法。可将待插入至病毒中的DNA序列置于大肠杆菌质粒构建体中,其中插入了与痘病毒DNA片段同源的DNA。另外,可将待插入的DNA序列与启动子连接。启动子-基因连接可定位在质粒构建体中,使得启动子-基因连接的两端侧接与DNA序列同源的DNA,所述DNA序列侧接含有非必需基因座的痘病毒DNA区域。所得质粒构建体可以通过在大肠杆菌中的繁殖进行扩增并分离。可将含有待插入的DNA基因序列的分离质粒转染到例如鸡胚成纤维细胞(CEF)细胞培养物中,同时用MVA感染培养物。质粒中的同源MVA病毒DNA与病毒基因组之间的重组分别可以产生被外源DNA序列,即编码SARS-CoV-2抗原的核苷酸序列的存在修饰的MVA。

[0171] 根据一个优选的实施方案,合适的细胞培养物的细胞,例如CEF细胞可以被MVA病毒感染。随后可以用第一质粒载体转染被感染的细胞,所述第一质粒载体包括一个或多个外源或异源基因,例如本文中提供的一种或多种核酸;优选在痘病毒表达控制元件的转录控制下。如上所阐述,质粒载体还包括能够引导外源序列插入至MVA病毒基因组的选定部分中的序列。任选地,质粒载体还含有一个盒,所述盒包括与痘病毒启动子可操作地连接的标记和/或选择基因。选择或标记盒的使用简化了产生的重组MVA的鉴定和分离。然而,重组痘病毒也可以通过PCR技术进行鉴定。随后,另一细胞可以用如上所述获得的重组MVA感染,并用包括一个或多个第二外源或异源基因的第二载体转染。如果将此基因引入至MVA基因组的不同插入位点中,则第二载体在引导一个或多个第二外源基因整合到痘病毒基因组中的痘病毒同源序列方面也不同。在发生同源重组后,可以分离包括两个或更多个外源或异源基因的重组病毒。为了将额外的外源基因引入至重组病毒中,感染和转染的步骤可以通过使用在先前步骤中分离的重组病毒进行感染和通过使用包含另外一个或多个外源基因的另外的载体进行转染来重复。已知有大量其它技术来产生重组MVA。

[0172] 如果没有另外说明,本发明的实践将采用免疫学、分子生物学、微生物学、细胞生

物学和重组技术的常规技术,所述技术都在本领域的技术范围内。参见例如Sambrook、Fritsch和Maniatis,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第2版,1989;Current Protocols in Molecular Biology,Ausubel FM等人编,1987;丛书Methods in Enzymology(Academic Press,Inc.);PCR2:A Practical Approach,MacPherson MJ,Hams BD,Taylor GR编,1995;Antibodies:A Laboratory Manual,Harlow和Lane编,1988。

[0173] 实施例

[0174] 以下实施例用于进一步说明本发明。它们不应被理解为限制本发明,本发明的范围由所附权利要求书确定。

[0175] 实施例1:材料和方法

[0176] 1.1 MVA重组体的产生

[0177] 如先前所述地进行MVA重组体的产生[1]。MVA-BN®由Bavarian Nordic开发,并保藏在欧洲细胞培养物保藏中心(ECACC)(V00083008)。先前描述了表达卵白蛋白的重组MVA(MVA-OVA)的产生[1、2]。合成编码4-1BBL的基因(Geneart,Life Technologies)并克隆到MVA-OVA基因组中以产生MVA-OVA-4-1BBL。合成编码小鼠白血病病毒衍生的包膜糖蛋白Gp70的基因(Geneart,Life Technologies)并分别克隆到MVA和MVA-4-1BBL基因组中,以产生MVA-Gp70和MVA-Gp70-4-1BBL。动物实验中使用的所有病毒都通过蔗糖垫纯化两次。

[0178] 1.2道德声明

[0179] 动物实验得到了上巴伐利亚州政府动物伦理委员会(Regierung von Oberbayern,Sachgebiet 54,Tierschutz)的批准,并根据Bavarian Nordic GmbH批准的动物实验指南进行。遵照国际实验室动物护理评估和认证协会(AAALAC),双侧CT26.WT肿瘤实验在CIMA,University of Navarra(Pamplona,Spain)进行。

[0180] 1.3小鼠和肿瘤细胞系

[0181] 6至8周龄雌性C57BL/6J(H-2^b)和Balb/cJ(H-2^d)小鼠购自Janvier Labs。根据机构指南,所有小鼠都在Bavarian Nordic GmbH、University of Zurich或University of Navarra的动物设施中进行处理、喂养、繁殖和维护。

[0182] B16.OVA黑色素瘤细胞系是Roman Spörri(University of Zürich)的慷慨捐赠。B16.F10(ATCC®CRL-6475™)和CT26.WT(ATCC®CRL-2638™)细胞系购自美国典型培养物保藏中心(ATCC)。肿瘤细胞在37℃5%CO_2下的培养箱中在补充有10%FCS、1%NEAA、1%丙酮酸钠和1%青霉素/链霉素(所有试剂均来自Gibco)的DMEM Glutamax培养基中培养。在Bavarian Nordic进行的实验中使用的所有肿瘤细胞系定期通过PCR测试为支原体阴性。

[0183] 1.4肿瘤细胞注射

[0184] 在小鼠的侧腹皮下注射5×10^5个肿瘤细胞。关于B16.OVA和B16.F10,在注射前将细胞与7mg/ml Matrigel(Trevigen)混合。对于皮下双侧肿瘤实验,分别在右侧腹和左侧腹注射5×10^5和1×10^5个CT26.WT肿瘤细胞。在肿瘤清除后的3至6个月之间进行肿瘤再激发实验。使用5×10^5个肿瘤细胞在对侧腹进行皮下再激发。注射2×10^5个CT26.WT细胞进行静脉内再激发。每周两次使用卡尺定期测量肿瘤直径。

[0185] 1.5免疫

[0186] 向实体肿瘤块给予总体积为50μl的含有各自的MVA重组体的肿瘤内注射。在肿瘤分组后的第0、5和8天进行重复的肿瘤内注射,并在图中用垂直虚线表示。当指示时,在最后

一次肿瘤内免疫后3天收集血液用于外周血免疫细胞表型分型。

[0187] 1.6细胞分离

[0188] 当指示时，从小鼠身上采集脾脏和淋巴结。脾脏和淋巴结单细胞悬液通过经由40-μm细胞过滤器(Falcon)机械破坏组织而制备。对脾脏样品进行红细胞裂解(Sigma-Aldrich)。

[0189] 将血液收集在含有2％FCS、0.1％叠氮化钠和2.5U/ml肝素的PBS中。通过用红细胞裂解缓冲液裂解红细胞制备外周血单个核细胞(PBMC)。将来自上述器官的单核细胞洗涤，重悬于RPMI+2％FCS中，计数并保持在冰上直至进一步分析。将100μl TrueCount计数珠(BD Biosciences)添加到肿瘤细胞悬液中。

[0190] 1.7肽再刺激

[0191] 当指示时，单核细胞与2.5μg/ml MHC I类限制性肽[$OVA_{257-264}$(SIINFEKL)；$p15E_{604-611}$(KSPWFTTL)；$AH1_{6-14}$(SPSYVYHQF)]一起在37℃5％CO_2下在T细胞培养基和10μg/ml BFA中培育5-6小时。肽购自GenScript。

[0192] 1.8流式细胞术

[0193] 单核细胞悬液、BMDM或肿瘤细胞在染色前使用可固定的存活/死亡活力试剂盒(Life Technologies)在4℃下在黑暗中染色30分钟。使用来自BD Biosciences、eBioscience或Biolegend的抗体对单核细胞进行染色。当指示时，使用H-$2k^b$ $OVA_{257-264}$-dextramer(Immudex)、H-$2K^b$ $p15E_{604-611}$-五聚体(ProImmune)或H-$2L^d$ $AH1_{6-14}$五聚体(ProImmune)对细胞悬液进行染色。对于FoxP3转录因子和Ki67染色细胞，使用FoxP3染色试剂盒(eBioscience)进行固定。对于细胞内细胞因子染色，使用IC固定和透化染色试剂盒(eBioscience)对细胞悬液进行染色和固定以用于细胞内细胞因子检测。使用数字流式细胞仪(LSR II,BD Biosciences)获取所有细胞，并使用FlowJo软件10.3版(Tree Star)分析数据。

[0194] 1.9用于定量MVA特异性DNA基因组拷贝的定量实时PCR

[0195] 根据制造商说明书(Qiagen)使用QIAamp DNA微型试剂盒从组织中分离基因组DNA(gDNA)，并在NanoVue分光光度计(Biochrom)中进行定量。简而言之，使用表达MVA的开放阅读框082L的质粒制备从5×10^7个基因组拷贝(gcs)开始的标准曲线，所述质粒是用于检测MVA骨架DNA的靶标。接着，使用特异性引物MVA082L有义5'-acgtttagccgcctttaatagag-3'、MVA082L反义5'-tggtcagaactatcgtcgttgg-3'和荧光素探针6FAM-aatcccaccgcctttctggatctc-BBQ，用TaqMan基因表达预混液(Thermo-Fisher)进行定量实时PCR。通过实时PCR系统(Applied Biosystems)的7500软件进行计算。所述软件确定每个标准稀释液、对照和复制物的阈值循环(C_T)，它与特定DNA的gcs数量的对数成反比。基于标准曲线，软件通过使用对于每个重复物测量的C_T值确定目标基因的相应gcs数。样品的数量(gcs)通过其重复测定的平均数量计算。

[0196] 1.10统计学分析

[0197] 使用适用于Windows的GraphPad Prism 7.02版(GraphPad Software,La Jolla,CA)，按照图例中的描述进行统计分析。对于免疫学数据，结果呈现为“平均值”和“平均值的标准误差”(SEM)。使用多重比较检验的方差分析(ANOVA)或单尾非配对学生t检验(Student's t test)来确定治疗组之间的统计学显著性。对于治疗后荷瘤的小鼠的存活

率,进行对数秩检验以确定治疗组之间的统计学显著性。

[0198] 实施例2:4-1BBL增强肿瘤内MVA免疫疗法

[0199] 痘病毒的IT应用已被证明可在各种肿瘤模型中有效诱导抗肿瘤反应[24-28]。然而,这些研究中的大多数都是用复制病毒进行的。此处,我们测试了使用编码肿瘤相关抗原(上文定义的TAA)的非复制痘病毒MVA和共刺激分子4-1BBL对已建立的肿瘤进行局部治疗是否会表现出有效的抗肿瘤作用。

[0200] IT注射编码TAA卵清蛋白的MVA(本文中称为MVA-OVA)可控制肿瘤生长并延长已建立的B16.OVA黑色素瘤荷瘤小鼠的存活期(图1A和1B)。值得注意的是,MVA-OVA-4-1BBL的IT施用将肿瘤排斥反应增加至B16.OVA肿瘤荷瘤小鼠的50%(图1B)。最后一次IT注射后外周血淋巴细胞(PBL)的分析揭示,MVA-OVA-4-1BBL IT施用增加了局部MVA-OVA治疗引发的TAA特异性$CD8^+$ T细胞的全身扩增(图2A)。

[0201] 接下来,我们评估了其它独立的、已建立的肿瘤模型。编码内源性逆转录病毒抗原Gp70的MVA[29 30](本文中称为MVA-Gp70)的IT施用在B16.F10黑色素瘤中产生抗肿瘤作用(图1C和1D)。有趣的是,IT MVA-Gp70-4-1BBL显著延长了肿瘤生长控制并显著提高了小鼠存活率(图1C和1D)。在用MVA-Gp70或MVA-Gp70-4-1BBL进行IT免疫后,在CT26.WT肿瘤荷瘤小鼠中观察到类似的结果(图1E和1F)。MVA-Gp70-4-1BBL的局部施用导致超过80%的CT26.WT肿瘤排斥反应。用Gp70衍生肽再刺激PBL揭示了在B16.F10和CT26.WT肿瘤荷瘤小鼠中进行MVA-Gp70-4-1BBL IT方案后,分别由p15E(H-$2K^b$限制性Gp70肽)和AH1(H-$2K^d$限制性Gp70肽)特异性$CD8^+$ T细胞强烈诱导干扰素γ(IFN-γ)(分别为图2B和2C)。值得注意的是,在MVA-OVA-4-1BBL或MVA-Gp70-4-1BBL IT治疗后治愈的C57BL/6小鼠中,超过70%患上白癜风(图2D和E)。总之,4-1BBL辅助的MVA的IT施用增强了MVA介导的抗肿瘤免疫反应,与所使用的肿瘤抗原或肿瘤模型的类型无关。

[0202] 实施例3:IT注射的MVA定位于肿瘤并诱导肿瘤微环境(TME)的变化

[0203] 确定T细胞在IT MVA注射后在TdLN中迅速扩增提出了一个问题:复制缺陷型MVA将仅存在于注射部位还是转移到其它器官。为了解决这个问题,我们在IT注射后6小时确定了肿瘤、TdLN、NdLN、脾脏和血液中是否存在MVA衍生的基因组DNA(gDNA)。重要的是,MVAgDNA在B16.F10肿瘤中被大量检测到,在TdLN中极少出现(图3A)。

[0204] 我们证明,在IT应用后,MVA感染主要局限于肿瘤,且因此病毒诱导的抗肿瘤免疫反应最有可能起源于肿瘤。因此,我们假设IT注射MVA-TAA-4-1BBL可能会诱导TME的变化。与PBS相比,用MVA或MVA-OVA对B16.OVA肿瘤进行IT注射导致促炎分子IFNγ和TNFα上调。MVA-OVA-4-1BBL显著增加了这种效果(图3B)。有趣的是,例如IFNγ和GM-CSF等细胞因子几乎完全由4-1BBL辅助的MVA诱导(图3B)。

[0205] 复制病毒诱导感染的肿瘤细胞和免疫细胞的死亡[33-35]。MVA、MVA-TAA或MVA-TAA-4-1BBL感染增强体外B16.OVA和CT26.WT肿瘤细胞死亡(图7A)。已证明优先被MVA感染的巨噬细胞[36]被有效地杀死,其中4-1BBL佐剂显著增加了这种作用(图7A)。细胞死亡导致细胞内蛋白质,例如高分子族盒1(HMGB1)的释放,所述蛋白质被先天免疫细胞感知并有助于启动免疫反应[37、38]。在肿瘤细胞或巨噬细胞的MVA感染后检测到HMGB1的显著增加,与4-1BBL无关(图7B)。

[0206] 我们的研究结果表明,局部注射MVA导致MVA编码基因的IT表达,导致炎症的诱导、

感染细胞的细胞死亡和TME中免疫原性介质的释放。

[0207] 实施例4:局部MVA免疫疗法控制远处未治疗病灶的肿瘤生长

[0208] 肿瘤定向免疫疗法的目的是产生同时根除远处转移瘤的全身抗肿瘤免疫反应。由于用MVA-TAA-4-1BBL进行局部治疗不仅在TME中而且还在血液中诱导了强大的肿瘤特异性T细胞反应,因此我们接下来评估了IT MVA免疫疗法对远处肿瘤沉积物的全身抗肿瘤潜力。CT26.WT肿瘤细胞被皮下植入到Balb/c小鼠的右侧腹和左侧腹(图4A)。与PBS相比,IT注射MVA-Gp70延迟了肿瘤生长(图4B和4C)。IT MVA-Gp70-4-1BBL注射使得在7/10只CT26.WT肿瘤的荷瘤小鼠中清除治疗的肿瘤(图4D)。重要的是,MVA-Gp70和MVA-Gp70-4-1BBL的局部施用均使得肿瘤生长延迟,且在一些情况下,使得未治疗的肿瘤病变完全清除肿瘤(图4C和4D)。此数据证明了通过IT MVA-Gp70-4-1BBL免疫疗法有效诱导针对远处未治疗的肿瘤病变的抗肿瘤免疫反应。

[0209] 实施例5:IT MVA-TAA-4-1BBL治疗可防止局部和全身肿瘤再激发

[0210] 癌症疫苗的主要目标之一是实现长期保护性免疫记忆以防止肿瘤复发。因此,我们首先评估了IT MVA-TAA-4-1BBL诱导的抗肿瘤反应是否会产生防止局部肿瘤再激发的免疫记忆(图5A)。用作对照的初始小鼠肿瘤生长迅速,而先前在IT MVA-OVA治疗后治愈的小鼠在再激发后肿瘤再生的盛行率很高。相比之下,80%先前接受过IT MVA-OVA-4-1BBL的小鼠对继发性肿瘤生长有抵抗力(9/11)(图5B)。在MVA-Gp70-4-1BBL治疗和用B16.F10细胞局部再激发后治愈的小鼠中获得了类似的结果。在B16.F10肿瘤细胞植入后,60%的预治疗小鼠保持无肿瘤(图6A)。因此,IT MVA-TAA-4-1BBL治疗诱导了对局部肿瘤再激发的强烈保护性免疫记忆。

[0211] 在用MVA-OVA-4-1BBL但未用MVA-OVA进行IT治疗后排斥肿瘤的小鼠中,在再激发之前可以容易地检测到OVA特异性$CD8^+$ T细胞(图5C)。肿瘤细胞注射七天后,OVA特异性T细胞群显著扩增,表明有效的肿瘤识别(图5C)。脾细胞$OVA_{257-264}$肽再刺激显示,IT MVA-OVA-4-1BBL疗法诱导大量产生多细胞因子的抗原特异性$CD8^+$ T细胞(图5E)。肿瘤再激发后第41天的脾脏、血液、TdLN和NdLN分析显示OVA特异性$CD8^+$ T细胞在所有分析器官中的积累(图5D)。记忆亚群检查[31]揭示OVA特异性T_{CM}细胞均匀分布在所有器官中,而T_{EM}细胞主要存在于血液、脾脏和TdLN中,但不存在于NdLN中(图5F)。接下来,我们分析了已被证明在抗肿瘤免疫中起关键作用的组织常驻记忆T细胞(T_{RM})[32,33]。引人注目的是,我们还可以检测到大量仅位于TdLN中的常驻记忆T细胞(T_{RM})(图5F)[34]。同样,在IT MVA-Gp70-4-1BBL治疗后清除原发性B16.F10肿瘤的小鼠在再激发之前和之后检测到血液中的p15E特异性$CD8^+$ T细胞(图6B)。此外,我们可以在B16.F10再激发后第42天鉴定p15E特异性T_{CM}、T_{EM}和T_{RM}细胞(图6C-E),其中后者仅存在于TdLN中(图6E)。我们的结果表明,IT MVA-TAA-4-1BBL免疫疗法导致诱导多样化的肿瘤特异性记忆$CD8^+$ T细胞群体,包括T_{CM}、T_{EM}以及T_{RM}细胞。

[0212] IT MVA-TAA-4-1BBL注射诱导全身免疫反应,其介导对局部复发肿瘤和未治疗病变的控制。我们推断,IT MVA注射产生的肿瘤特异性T细胞记忆也可能防止转移性复发(图5G)。IV CT26.WT肿瘤细胞注射后肺部肿瘤结节的宏观定量显示,在初始小鼠中出现了多处病变。在先前用IT MVA-Gp70或MVA-Gp70-4-1BBL治愈的小鼠的肺中未发现肉眼可见的转移病灶(图5H)。T细胞分析揭示了MVA-Gp70-4-1BBL治愈小鼠中的多功能AH1特异性$CD8^+$ T细胞群(图5I)。

[0213] 总之,使用经过基因修饰的MVA与共刺激分子4-1BBL一起表达肿瘤抗原的局部免疫疗法通过结合先天性和适应性免疫激活而表现出强大的抗肿瘤活性。这不仅诱导了全身抗肿瘤作用,而且还产生了有效的肿瘤特异性记忆反应,防止局部和全身肿瘤再激发。

[0214] 实施例6:结果的进一步论述

[0215] 在本研究中,我们采用一种肿瘤定向病毒疗法的新方法,并使用一种经过基因修饰以表达TAA和共刺激分子4-1BBL的非复制型MVA。这结合了MVA出色的免疫刺激特性[12]和其高安全性[35]与4-1BBL的免疫激活潜力[22]。IT MVA-TAA-4-1BBL注射激活一系列即刻和长期免疫事件,最终导致肿瘤根除。通过IT MVA治疗诱导多种促炎介质表明先前免疫抑制TME发生了根本性改变,促进了肿瘤特异性T细胞的再激活和扩增。MVA编码的4-1BBL引发了细胞毒性抗肿瘤免疫反应的剧烈定性和定量变化,这对于治疗功效和针对原发性肿瘤的局部和全身长期免疫记忆的形成都是必不可少的。

[0216] 我们首次表明,非复制型MVA的IT注射表现出有效的治疗性抗肿瘤作用。有趣的是,据报道,IT递送热灭活的MVA而不是MVA诱导了主要取决于细胞毒性T细胞的激活的强抗肿瘤作用[25]。与本研究相比,我们使用编码TAA且另外表达以及不表达4-1BBL的主动MVA。重要的是,单独的MVA-TAA已经有效地延缓了肿瘤的生长,并且辅以4-1BBL显著提高了治疗功效,导致在多个模型中排斥已建立的肿瘤。此外,抗肿瘤作用与肿瘤抗原的选择无关。除了模型抗原OVA,我们还研究了内源性逆转录病毒蛋白Gp70作为TAA的免疫原性潜力。内源性逆转录病毒元件在健康组织中表观遗传沉默,但在各种癌症中被重新激活和表达[36]。同样,Gp70在几种鼠类肿瘤细胞系中高度表达[37]。在人类中,越来越多的证据表明这些非编码区可能具有强大的免疫原性,并因此代表了癌症免疫疗法的优秀TAA靶标[38-40]。鉴于Gp70的自身性质[41],通过IT MVA-Gp70-4-1BBL治疗在表达Gp70的肿瘤模型中获得的强治疗效果意味着局部MVA疗法不仅可以诱导表达新抗原的肿瘤的排斥,而且可以破坏对内源性自身抗原的耐受性。

[0217] IT病毒疗法重新利用病毒诱导的炎症和细胞死亡来改变免疫抑制性TME[50]。这一系列事件将增强抗肿瘤特异性免疫。同样,我们的数据显示,MVA感染会促进肿瘤细胞死亡,并从而促进HMGB1的释放(图7A、7B),类似于溶瘤痘苗病毒[51]。此外,IT注射MVA在TME内引发强烈的炎症反应,伴随有多种MVA相关的细胞因子和趋化因子的诱导[52]。4-1BBL辅助的MVA的IT应用显著增加了B16.OVA肿瘤中IFNγ和GM-CSF的浓度(图3B)。这表明这些分子的诱导在4-1BB信号传导的下游。事实上,MVA感染的肿瘤细胞对OVA特异性$CD8^+$ T细胞的体外激活导致仅在MVA编码的4-1BBL存在下产生大量IFNγ和GM-CSF(图3B)。我们研究了IT rMVA施用后TdLN和其它器官中MVA编码的抗原分布和潜在的T细胞启动。我们通过对IT注射后rMVA在不同器官内的定位进行全面分析来解决这个问题。MVA gDNA主要局限于肿瘤部位。然而,在TdLN中也检测到MVA gDNA,尽管与肿瘤相比量明显较低。因此,TdLN也可以作为肿瘤特异性T细胞的启动位点。我们的结果与表明在足垫注射MVA后,MVA定位于引流LN的副皮质区的先前工作一致[42]。与此一致,在NdLN中未发现蛋白质或gDNA。

[0218] 肿瘤定向免疫疗法的一个重要方面是产生根除远端转移瘤并诱导长期肿瘤免疫的全身抗肿瘤免疫反应。我们证明了局部MVA-TAA-4-1BBL治疗不仅在TME内引发免疫反应,而且还在血液中引起全身抗原特异性$CD8^+$ T细胞反应。此外,在许多单独的实验和使用的不同TAA中,在IT MVA-TAA-4-1BBL治疗后排斥黑色素瘤的小鼠患上白癜风。白癜风是由靶

向皮肤中的毛发色素黑素细胞的自身反应性CD8 T细胞引起的。这些细胞已被IT MVA-TAA-4-1BBL病毒疗法激活，很可能是通过抗原扩散，所述现象描述了表位特异性从最初的集中、显性表位特异性免疫反应(例如Gp70或OVA)的多样化。肿瘤抗原扩散是癌症免疫疗法的一个理想特征，因为它扩大了抗肿瘤反应并防止肿瘤因TAA损失而逃逸的可能性。

[0219] 此外，我们从双侧肿瘤模型中获得的数据明确表明，IT MVA-TAA-4-1BBL注射在未治疗的病变中产生了显著抗肿瘤作用。因此，这些结果有力地表明，由局部MVA-TAA-4-1BBL施用引发的抗肿瘤反应与针对原发性肿瘤的全系统免疫有关。

[0220] 免疫系统维持对先前抗原相遇的记忆的能力是长期免疫的基础。此处，我们定义了IT MVA施用后诱导的免疫记忆的成分。无论使用何种肿瘤模型或小鼠品系，都在肿瘤清除后数月在小鼠中检测到循环TAA特异性$CD8^+$ T细胞。当使用4-1BBL辅助的MVA时，$CD8^+$ T细胞频率显著增加。我们发现，先前用IT MVA-TAA-4-1BBL治愈的小鼠比MVA-TAA治疗的小鼠更能抵抗B16.OVA或B16.F10的皮下肿瘤再激发。对这些小鼠组织的分析表明，T细胞记忆亚群不仅存在于循环中，而且存在于多个解剖部位，这表明免疫监视。在对先前接受编码4-1BBL的MVA的治愈小鼠进行局部肿瘤再激发后，在脾脏和血液中检测到抗原特异性$CD8^+$ T_{CM}和T_{EM}亚群的频率增加。众所周知，4-1BBL/4-1BB信号在增强CD8效应和记忆T细胞的扩增和维持方面特别有效[43-45]。同样，MVA编码的4-1BBL共刺激增强了肿瘤特异性细胞毒性T细胞的激活和效应功能，从而形成了有效且多样化的记忆区室。

[0221] 除了循环$CD8^+$ T_{CM}和T_{EM}亚群，也已显示常驻$CD8^+$ T_{RM}细胞在抗肿瘤免疫中协同作用[32、33、46]。有趣的是，在IT 4-1BBL辅助的MVA后治愈的小鼠在用B16.OVA或B16.F10进行局部再激发后，仅在TdLN中显示出肿瘤特异性T_{RM}细胞的频率增加。虽然$CD8^+$ T_{RM}细胞首先在组织中被鉴定，但它们也可以从组织中迁移并在抗原再相遇后积聚在小鼠的引流LN中[34、46、47]。根据我们的结果，4-1BB已被证明可以促进鼻内免疫后肺中流感特异性$CD8^+$ T_{RM}池的建立[48]。我们假设TdLN中肿瘤特异性$CD8^+$ T_{RM}细胞的扩增与治愈小鼠在IT 4-1BBL辅助的MVA后对局部继发性肿瘤再激发的更好反应之间存在关系。

[0222] 在癌症中，记忆$CD8^+$ T细胞由于次优的分化或维持条件以及慢性抗原暴露而通常功能失调[49]。这种现象与不能分泌IL-2和TNFα有关[50、51]。重要的是，IT 4-1BBL辅助的MVA产生了一个高度胜任的$CD8^+$ T细胞记忆池，在所有测试的再激发模型中，与IT MVA相比，在再遇到肿瘤抗原时，所述记忆池会扩增并产生大量的IFNγ、TNFα和IL-2。

[0223] 总之，我们描述了一种基于局部注射表达肿瘤抗原的非复制MVA连同4-1BBL的新型治疗平台。IT病毒注射在TME中诱导了深刻的促炎变化，导致肿瘤特异性$CD8^+$ T细胞的再激活和扩增。另外，我们证明了多样化$CD8^+$ T细胞记忆群体的产生，防止局部和全身肿瘤再激发。连同MVA出色的安全性，我们的临床前数据为在临床中探索这种方法提供了强有力的理论基础。

[0224] 最后的备注：在本说明书的全文中引用了几个文件。本文引用的每个文件(包括所有专利、专利申请、科学出版物、制造商说明书、说明等)均以引用方式整体并入本文。在某种程度上，以引用方式并入的材料与本说明书相矛盾或不一致，本说明书将取代任何此类材料。本文中的任何内容都不应被解释为承认本发明无权因在先发明而早于此类公开。

[0225] 实施例7：用于医疗用途的MVA重组体

[0226] 7.1 MVA重组体的构建

[0227] 包含本公开的元件的重组MVA病毒的产生是通过将指定转基因与其启动子插入到载体MVA-BN中来完成的。使用含有转基因和选择盒的重组质粒以及与MVA-BN内的目标基因座同源的序列插入转基因。通过将重组质粒转染到MVA-BN感染的CEF细胞中来实现病毒基因组与重组质粒之间的同源重组。然后在第二步中,在表达CRE重组酶的质粒的帮助下删除了选择盒,所述质粒特异性针对侧接选择盒的loxP位点,因此切除了中间序列。或者,选择盒的删除是通过使用MVA衍生的内部重复序列进行MVA介导的重组来实现的。

[0228] 为了产生重组MVA-mBN病毒,CEF细胞培养物分别用MVA-BN接种并分别用对应的重组质粒转染。转而将来自这些细胞培养物的样品接种到含有诱导选择压力的药物的培养基中的CEF培养物中,并通过噬斑纯化分离表达荧光的病毒克隆。这些病毒克隆中含有荧光蛋白的选择盒的丢失在第二步中由CRE介导的重组(涉及每个构建体中选择盒两侧的两个loxP位点)或MVA介导的内部重组介导。在第二重组步骤之后,只有启动子插入MVA-BN的靶向位点中的转基因序列(例如4-1BBL)被保留。制备缺乏选择盒的噬斑纯化病毒的储备液。在用所述构建体接种的细胞中证实了所鉴定转基因的表达。

[0229] 7.2包括HERV-K抗原的重组MVA

[0230] 设计了一种基于MVA的载体(“MVA-mBN489”,也称为“MVA-HERV-Prame-FOLR1-4-1-BBL-CD40L”),其包括TAA,所述TAA为人内源性逆转录病毒K超家族蛋白质(HERV-K),特别是ERV-K-env和ERV-K-gag。MVA还被设计以编码人类FOLR1和PRAME,并表达h4-1BBL和hCD40L。

[0231] 一种类似的基于MVA的载体称为“MVA-HERV-Prame-FOLR1-4-1-BBL”,被设计成表达TAA ERV-K-env和ERV-K-gag以及人类FOLR1和PRAME,并表达h4-1BBL。具体地,载体“MVA-BN-4IT”(“MVA-mBN494”或“MVA-HERV-FOLR1-PRAME-h4-1-BBL”)在图8A中示意性地示出。编码包膜(env)和组特异性抗原(gag)蛋白的HERV-K基因通常在健康人体组织中处于休眠状态,但在许多肿瘤中被活化。FOLR1和PRAME是在乳腺癌和卵巢癌细胞中特异性上调的基因。共刺激分子4-1-BBL的额外表达旨在增强针对TAA的免疫反应。

[0232] 另一种基于MVA的载体称为“MVA-HERV-Prame-FOLR-CD40L”,被设计成表达TAA ERV-K-env和ERV-K-gag以及人类FOLR1和PRAME,并表达hCD40L。这些构建体中的每一个都可用于本发明的方法中。

[0233] 示例性序列是本领域中已知的并且也在所提供的序列表中列出。任何序列都可以用于本发明的组合物和方法中,只要它为相关MVA提供必要的功能。

[0234] 对于上述ERV-K env和gag序列,由至少10个代表性序列产生氨基酸共有序列,且潜在的免疫抑制域因突变而失活并部分替换为免疫显性T细胞表位HERV-K-mel,如下所示。合适的序列列于SEQ ID NO:5(ERV-K-gag合成蛋白共有序列);SEQ ID NO:6(ERV-K-gag合成核苷酸序列);SEQ ID NO:7(ERV-K-env/MEL合成蛋白序列);和SEQ ID NO:8(ERV-K-env/MEL核苷酸序列)中。

[0235]

MNPSEMQRKAPPRRRRHRNRAPLTHKMNKMVTSEEQMKLPSTKKAEPPTWAQLKKLTQL
ATKYLENTKVTQTPESMLLAALMIVSMVVSLPMPAGAAAANYTYWAYVPFPPMIRAVTWMD
NPIEVYVNDSVWVPGPIDDRCPAKPEEEGMMINISIGYRYPPICLGRAPGCLMPAVQNWLVE
VPTVSPISRFTYHMVSGMSLRPRVNYLQDFSYQRSLKFRPKGKPCPKEIPKESKNTEVLVW
EECVANSAVILQNNEFGTIIDWAPRGQFYHNCSGQTQSCPSAQVSPAVDSDLTESLDKHKH
KKLQSFYPWEWGEKGISTPRPKIISPVSGPEHPELWRLTVASHHIRIWSGNQTLETRDRKPF
YTVDLNSSLTVPLQSCVKPPYMLVVGNIVIKPDSQTITCENCRLLTCIDSTFNWQHRILLVRAR
EGVWIPVSMDRPWEASPSVHILTEVLKGVLNRSKRFIFTLIAVIMGLIAVTATAAVAGVALHSS
VQSVNFVNDWQKNSTRLWNSQSSIDQK**MLAVISCAVQTVIW**MGDRLMSLEHRFQLQCDW
NTSDFCITPQIYNESEHHWDMVRRHLQGREDNLTLDISKLKEQIFEASKAHLNLVPGTEAIAG
VADGLANLNPVTWVKTIGSTTIINLILILVCLFCLLLVCRCTQQLRRDSDHRERAMMTMAVLSK
RKGGNVGKSKRDQIVTVSV

[0236] 修饰的ERVK-env共有氨基酸序列(上文)：

[0237] 潜在的免疫抑制域因突变而失活。引入的突变用免疫显性T细胞表位HERV-K-mel取代了大部分免疫抑制域。

[0238] 对于这些MVA中的一些,hFOLR1和PRAME被设计成作为融合蛋白产生。FOLR1(叶酸受体α)属于叶酸受体家族。它对叶酸和其衍生物具有高亲和力,并作为膜蛋白在细胞表面上分泌或表达。跨膜蛋白通过GPI(糖基磷脂酰肌醇)锚锚定在质膜上,所述锚很可能通过蛋白质C端区域中的丝氨酸(Ser)残基附着在内质网(ER)中。为了避免用GPI锚对FOLR1进行修饰和在ER中完全加工hFOLR1-hPRAME融合蛋白,删除了从aa 234到257的C端区域(包括Ser残基)。

[0239] PRAME(黑色素瘤优先表达抗原)是一种转录调节蛋白。它最初被描述为人类黑色素瘤中的抗原,可触发自体细胞毒性T细胞介导的免疫反应,并在多种实体和血液癌症中表达。PRAME通过与视黄酸受体结合来抑制视黄酸信号传导,且从而可能为癌细胞提供生长优势。PRAME的功能需要核定位,因此PRAME中的潜在核定位信号(NLS)通过hFOLR1-hPRAME融合蛋白中的靶向突变进行修饰。

[0240] 因此,对于hFOLR1-hPRAME融合蛋白的氨基酸序列,FOLR1通过删除C端GPI锚信号进行修饰,而在PRAME中,两个潜在的核定位信号因氨基酸取代而失活。在这种融合蛋白中,hFOLR1的N末端信号序列应导致ER靶向和融合蛋白的不完全加工,以作为避免PRAME核定位的额外保障。

[0241] 人FOLR1和人PRAME的蛋白质序列分别基于NCBI RefSeq NP_000793.1和NP_001278644.1。除上述修饰外,融合蛋白的核苷酸序还列针对人类密码子使用进行了优化,且去除了多核苷酸伸长段、重复元件和负顺式作用元件,且核苷酸序列在SEQ ID NO:10(“hFOLR1Δ_hPRAMEΔ融合”核苷酸序列)中列出,而融合蛋白序列在SEQ ID NO:9中列出。

MAQRMTTQLLLLLVWVAVVGEAQTRIAWARTELLNVCMNAKHHKEKPGPEDKLHEQCRPW
RKNACCSTNTSQEAHKDVSYLYRFNWNHCGEMAPACKRHFIQDTCLYECSPNLGPWIQQV
DQSWRKERVLNVPLCKEDCEQWWEDCRTSYTCKSNWHKGWNWTSGFNKCAVGAACQP
FHFYFPTPTVLCNEIWTHSYKVSNYSRGSGRCIQMWFDPAQGNPNEEVARFYAAAM**SGAG**
~~PWAAWPFLLSLALMLLWLLSM~~ERRRLWGSIQSRYISMSVWTSPRRLVELAGQSLLKDEAL
AIAALELLPRELFPPLFMAAFDGRHSQTLKAMVQAWPFTCLPLGVLMKGQHLHLETFKAVLD
[0242] GLDVLLAQEVRPRRWKLQVLDLRKNSHQDFWTVWSGNRASLYSFPEPEAAQPMT**T**K**A**KV
DGLSTEAEQPFIPVEVLVDLFLKEGACDELFSYLIEKV**AA**KKNVLRLCCKKLKIFAMPMQDIK
MILKMVQLDSIEDLEVTCTWKLPTLAKFSPYLGQMINLRRLLLSHIHASSYISPEKEEQYIAQF
TSQFLSLQCLQALYVDSLFFLRGRLDQLLRHVMNPLETLSITNCRLSEGDVMHLSQSPSVSQ
LSVLSLSGVMLTDVSPEPLQALLERASATLQDLVFDECGITDDQLLALLPSLSHCSQLTTLSF
YGNSISISALQSLLQHLIGLSNLTHVLYPVPLESYEDIHGTLHLERLAYLHARLRELLCELGRP
SMVWLSANPCPHCGDRTFYDPEPILCPCFMPN

[0243] hFOLR1-hPRAME融合蛋白的序列(上文)：

[0244] hFOLR1-hPRAME融合蛋白(修饰的人FOLR1(N末端部分)和PRAME(C端部分)的融合物)的氨基酸序列。FOLR1通过删除C端GPI锚信号(删除线字母)进行了修饰。在PRAME(带下划线的字母)中，最初的甲硫氨酸被删除，且两个潜在的核定位信号因氨基酸取代(粗体，带下划线的字母)而灭活。

[0245] 此MVA中使用的膜结合人4-1BBL的蛋白质序列显示与NCBI RefSeq NP_003802.1具有100％同一性，且使用的膜结合人CD40L的蛋白质序列显示与NCBI RefSeq NP_000065.1具有100％同一性。对于4-1BBL和CD40L，核苷酸序列均针对人类密码子使用进行了优化，并且去除了多核苷酸伸长段、重复元件和负顺式作用元件。

[0246] 来自NCBI RefSeq NP_000065.1.的hCD40L氨基酸序列在SEQ ID NO:1中列出，而hCD40L的核苷酸序列在SEQ ID NO:2中所示。来自NCBI RefSeq NP_003802.1的h4-1BBL氨基酸序列在SEQ ID NO:3中列出，而h4-1BBL的核苷酸序列在SEQ ID NO:4中列出。

[0247] 每个编码区都处于不同启动子的控制下，除了ERV-K-gag和h4-1BBL均处于Pr1328启动子的控制下。Pr1328启动子(长度为100bp)是痘苗病毒启动子PrB2R的精确同源物。它驱动强烈的即刻早期表达以及较低水平的晚期表达。在重组MVA-mBN489中，Pr13.5长启动子驱动ERVK-env/MEL的表达。此启动子破坏了014L/13.5L之间124bp的基因间区域，驱动天然MVA13.5L基因的表达，并表现出由两个早期启动子核心序列引起的非常强的早期表达(参见Wennier等人(2013)PLoS One 8(8):e73511)。此处用于驱动hCD40L表达的MVA1-40k启动子最初是在1986年从痘苗病毒Wyeth Hind III H区中分离出来的161bp片段。它破坏了094L/095R基因间区域内158bp的痘苗病毒Wyeth和MVA基因组，驱动晚期基因转录因子VLTF-4。此处用于驱动hFOLR1-hPRAME融合蛋白表达的启动子PrH5m是痘苗病毒H5基因启动子的修饰形式。它由强大的早期和晚期元件组成，使得在重组MVA感染的早期和晚期内都表达(参见Wyatt等人(1996)Vaccine 14:1451-58)。

[0248] 基于MVA-mBN494(见上文)，还设计了另一个载体以包含ERVK-env/MEL中的修饰。所得载体被称为“MVA-mBN502”并且在图9C中示意性地示出。除了修饰的ERVK-env/MEL，MVA-mBN502还编码ERVK-gag、hFOLR1-hPRAME融合蛋白以及h4-1BBL。

[0249] 天然地,HERV-K-env由一个在翻译后被裂解的信号肽、一个表面(SU)和一个跨膜单元(TM)组成。通过细胞蛋白酶实现裂解成两个结构域。RSKR裂解基序对于将全长90kDa蛋白质裂解成SU(约60kDa)和TM(约40kDa)结构域是必需并且足够的。如上文针对MVA-mBN494的制备所述,产生了源自至少十个代表性序列的env氨基酸共有序列,并且TM中潜在的免疫抑制域因突变而失活。引入的突变用免疫显性T细胞表位HERV-K-mel取代了大部分免疫抑制域。这种转基因(用于MVA-mBN494)被称为ERVK-env/MEL(图9A)。

[0250] 与MVA-mBN494相比,ERVK-env/MEL中的TM结构域在MVA-mBN502中缺失。此ERVK-env/MEL变体被命名为“ERVK-env/MEL_03”,且由整个SU结构域组成,除了缺失RSKR弗林蛋白酶裂解位点。MEL肽插入在C端,然后是TM结构域的6个氨基酸(不包括具有强疏水性的融合肽序列)。另外,通过添加源自人PDGF(血小板源性生长因子)受体的膜锚,这种修饰的ERVK-env/MEL靶向质膜。此膜锚通过柔性的含甘氨酸接头连接到SU结构域(图9B)。所得ERVK-env/MEL变体,即ERVK-env/MEL_03包含于MVA-mBN502中(图9C)。变体的合适序列在SEQ ID NO:11(ERV-K-env/MEL_03合成蛋白质序列)和SEQ ID NO:12(ERV-K-env/MEL_03核苷酸序列)中列出。

[0251] 7.3MVA-HERV-FOLR1-PRAME-h4-1-BBL(MVA-BN-4IT)的生物活性

[0252] 研究了用MVA-BN-4IT(即,MVA-HERV-FOLR1-PRAME-h4-1-BBL;也参见上文)感染是否会导致HLA分子将疫苗衍生的肿瘤抗原呈递于人类细胞上。为此,对抗原呈递细胞上的HLA-ABC肽复合物进行免疫沉淀,并分析哪些HLA结合的肽可以通过质谱进行鉴定。

[0253] 首先,人类单核细胞系THP-1分化成巨噬细胞(Daigneault等人PLoS One,2010),其发挥抗原呈递能力,因为抗原可以负载到HLA I类(Nyambura L.等人J.Immunol 2016)。事实上,THP-1细胞表达HLA-A*0201^{+},它是美国和欧洲最常见的单倍型之一(大约30%的人口)。除HLA-A*02:01:01G外,据报道THP-1细胞表达HLA-B*15和HLA-C*03(Battle R.等人,Int.J.of Cancer)。此处,将8×10^{5}/ml THP-1细胞在200ng/ml PMA(佛波醇-12-肉豆蔻酸酯-13-乙酸酯)存在下培养3天,然后更换培养基并在不存在PMA的情况下再培养细胞2天。在第5天,细胞用InfU(感染单位)为4的MVA-BN-4IT感染12小时。如图8B中所示,在用MVA-BN-4IT(图8B中的“mBN494”)感染THP-1细胞后,HERVK-env/MEL、HERVK-gag和融合蛋白FOLR1-PRAME表达。相反,抗原不在未感染的THP-1细胞(图8B中的“ctr”)中内源性表达。

[0254] 接下来,进行了“ProPresent”HLA-ABC配体分析(ProImmune)。在MVA-BN-4IT感染的细胞中,鉴定出四种肿瘤抗原衍生肽:HERV-K env肽ILTEVLKGV、HERV-K gag肽YLSFIKILL以及PRAME肽ALQSLLQHL和SLLQHLIGL。两种鉴定的PRAME肽在很大程度上是重叠的,并且很可能共享一个共同的核心表位。预计这两种肽都与HLA-A*02:01非常强烈地结合,由此ALQSLLQHL具有与HLA-B*15几乎相似的结合等级。值得注意的是,PRAME肽SLLQHLIGL已被描述为人类免疫原性HLA-A*0201呈递的细胞毒性T淋巴细胞表位(Kessler JH.等人,J Exp Med.,2001)。总之,数据表明由MVA-BN-4IT表达的抗原可以加载到感染细胞的HLA中。

[0255] 此外,已测试MVA-BN-4IT以与其受体4-1-BB结合的功能形式表达4-1-BBL的能力。为此,使用了商业试剂盒(“4-1BB Bioassay”,Promega)。所述分析由表达h4-1-BB的基因工程化Jurkat T细胞系和由可响应4-1-BB配体刺激的响应元件(RE)驱动的荧光素酶报告基因组成。当h4-1-BB被h4-1-BBL刺激时,RE会活化细胞内的细胞荧光素酶产生。在细胞裂解和添加“Bio-Glo”试剂(Promega)后,使用光度计测量发光并量化。简而言之,将HeLa细胞铺

板(1×10^6)并各自用图8C中所示的基于MVA的构建体感染($TCID_{50}$=2),培养过夜(37℃,5%CO_2),且接着与Jurkat-h4-1-BB细胞共培养(HeLa:Jurkat的比率=4:1)6小时。将与Fc交联的带His标签的h4-1BBL用作参考(阳性对照),并将与1μg/ml交联的h4-1BBl一起培养的Jurkat-h4-1BB细胞的荧光素酶表达设置为1(图8C,虚线)。MVA-BN(即不编码h4-1-BBL)用作主干对照。如图8C中所示,用基于MVA的表达h4-1-BBL的载体感染的HeLa细胞诱导的荧光素酶产生(通过共培养的Jurkat-h4-1-BB细胞)比参考高6倍以上。值得注意的是,由MVA-BN-4IT介导的荧光素酶产生甚至高于由其它两种表达h4-1-BBL的MVA载体介导的荧光素酶产生。因此,MVA-mBN494表达有效结合至其4-1BB受体的功能性h4-1-BBL。

[0256] 序列表

[0257] 如37C.F.R.1.822中所定义,随附序列表中列出的核酸和氨基酸序列使用标准字母缩写显示核苷酸碱基,且使用单字母代码或三字母代码显示氨基酸。仅显示每个核酸序列的一个股,但互补股应理解为包括在对显示股的任何引用中。

[0258] 序列表中的序列:

[0259] SEQ ID NO:1:来自NCBI RefSeq NP_000065.1的hCD40L氨基酸序列。(261个氨基酸)

[0260] SEQ ID NO:2:来自NCBI RefSeq NP_000065.1的hCD40L(792个核苷酸)

[0261] SEQ ID NO:3:来自NCBI RefSeq NP_003802.1的h4-1BBL(254个氨基酸)

[0262] SEQ ID NO:4:来自NCBI RefSeq NP_003802.1的h4-1BBL

[0263] SEQ ID NO:5:ERV-K-gag(666个氨基酸)合成共有序列

[0264] SEQ ID NO:6:ERV-K-gag;nt序列

[0265] SEQ ID NO:7:ERV-K-env/MEL(699个氨基酸)合成序列

[0266] SEQ ID NO:8:ERV-K-env/MEL nt序列

[0267] SEQ ID NO:9:hFOLR1Δ_hPRAMEΔ融合物(741个氨基酸)

[0268] SEQ ID NO:10:hFOLR1Δ_hPRAMEΔ融合物(741个氨基酸)nt序列

[0269] SEQ ID NO:11:ERV-K-env/MEL_03(517个氨基酸)合成序列

[0270] SEQ ID NO:12:ERV-K-env/MEL_03nt序列

[0271] SEQ ID NO:1

[0272] 来自NCBI RefSeq NP_000065.1的hCD40L。(261个氨基酸)

[0273] MIETYNQTSPRSAATGLPISMKIFMYLLTVFLITQMIGSALFAVYLHRRLDKIEDERNLHEDFV
FMKTIQRCNTGERSLSLLNCEEIKSQFEGFVKDIMLNKEETKKENSFEMQKGDQNPQIAAHV
ISEASSKTTSVLQWAEKGYYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCSNREASSQA
PFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQSIHLGGVFELQPGASVFVNVTDPSQVSH
GTGFTSFGLLKL

[0274] SEQ ID NO:2

[0275] 来自NCBI RefSeq NP_000065.1的hCD40L。(792个核苷酸)

[0276] nt序列:

[0277] atgatcgagacatacaaccagacaagccctagaagcgccgccacaggactgcctatcagcatgaagatcttcatgtacctgct gaccgtgttcctgatcacccagatgatcggcagcgccctgtttgccgtgtacctgcacagacggctggacaagatcgaggacga gagaaacctgcacgaggacttcgtgttcatgaagaccatccagcggtgcaacaccggcgagagaagtctgagcctgctgaac tgcgaggaaatcaagagccagttcgagggcttcgtgaaggacatcatgctgaacaaagaggaaacgaagaaagagaactc cttcgagatgcagaagggcgaccagaatcctcagatcgccgctcacgtgatcagcgaggccagcagcaagacaacaagcgt gctgcagtgggccgagaagggctactacaccatgagcaacaacctggtcaccctggagaacggcaagcagctgacagtga agcggcagggcctgtactacatctacgcccaagtgaccttctgcagcaacagagaggccagctctcaggctcctttcatcgcca gcctgtgcctgaagtctcctggcagattcgagcggattctgctgagagccgccaacacacacagcagcgccaaaccttgtggcc agcagtctattcacctcggcggagtgtttgagctgcagcctggcgcaagcgtgttcgtgaatgtgacagaccctagccaggtgtcc cacggcaccggctttacatctttcggactgctgaagctgtgatgatag

[0278] SEQ ID NO:3

[0279] 来自NCBI RefSeq NP_003802.1的h4-1BBL。(254个氨基酸)

[0280] MEYASDASLDPEAPWPPAPRARACRVLPWALVAGLLLLLLLAAACAVFLACPWAVSGARA SPGSAASPRLREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLT GGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALT VDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTP EIPAGLPSPRSE

[0281] SEQ ID NO:4

[0282] 来自NCBI RefSeq NP_003802.1的h4-1BBL。

[0283] nt序列：

[0284] atggaatacgccagcgacgcctctctggaccctgaagctccttggcctccagctcctagagccagggcttgtagagtgctgccttg ggctcttgtggctggacttctgcttctgttgctcctggctgctgcctgcgcagtgtttcttgcttgtccatgggctgtgtcaggagccaga gcatctcctggatctgccgcttctcccagactgagagagggacctgaactgagccctgatgatcctgctggactgctcgacctgag acagggcatgtttgcccagctggtggcccagaatgtgctgctgattgatggccctctgagctggtacagcgatcctggacttgctgg cgttagcctgactggaggcctgagctacaaggaggacaccaaagaactggtggtggccaaggctggcgtgtactacgtgttcttt cagctggaactgcggagagtggtggcaggcgaaggatctggatccgtgtctctggcactgcatctgcagcctctgagatctgctg ctggtgcagctgccctggctctgacagttgatctgcctcctgcctccagcgaagccagaaacagcgcctttggcttccaaggcag actgctgcacctgtctgctggccagagactgggagtgcacctccacacagaagcaagagcaagacacgcctggcagcttaca caaggcgctacagtgctgggcctgttcagagtgacacctgagattccagctggcttgccatctcctcgcagcgagtaatga

[0285] SEQ ID NO:5

[0286] ERV-K-env/MEL(699个氨基酸)

[0287] MNPSEMQRKAPPRRRRHRNRAPLTHKMNKMVTSEEQMKLPSTKKAEPPTWAQLKKLTQL ATKYLENTKVTQTPESMLLAALMIVSMVVSLPMPAGAAAANYTYWAYVPFPPMIRAVTWMD NPIEVYVNDSVWVPGPIDDRCPAKPEEEGMMINISIGYRYPPICLGRAPGCLMPAVQNWLV EVPTVSPISRFTYHMVSGMSLRPRVNYLQDFSYQRSLKFRPKGKPCPKEIPKESKNTEVLV WEECVANSAVILQNNEFGTIIDWAPRGQFYHNCSGQTQSCPSAQVSPAVDSDLTESLDKH KHKKLQSFYPWEWGEKGISTPRPKIISPVSGPEHPELWRLTVASHHIRIWSGNQTLETRDR KPFYTVDLNSSLTVPLQSCVKPPYMLVVGNIVIKPDSQTITCENCRLLTCIDSTFNWQHRILL VRAREGVWIPVSMDRPWEASPSVHILTEVLKGVLNRSKRFIFTLIAVIMGLIAVTATAAVAGV ALHSSVQSVNFVNDWQKNSTRLWNSQSSIDQKMLAVISCAVQTVIWMGDRLMSLEHRFQL QCDWNTSDFCITPQIYNESEHHWDMVRRHLQGREDNLTLDISKLKEQIFEASKAHLNLVPG TEAIAGVADGLANLNPVTWVKTIGSTTIINLILILVCLFCLLLVCRCTQQLRRDSDHRERAMMT MAVLSKRKGGNVGKSKRDQIVTVSV

[0288] SEQ ID NO:6

[0289] ERV-K-env/MEL

[0290] nt序列

[0291]
atgaaccctagcgagatgcagagaaaggctccacctagacggagaagacacagaaacagggctcctctgacacacaagat
gaacaagatggtcaccagcgaggaacagatgaaactgcccagcaccaagaaggccgagcctccaacatgggctcagctga
agaaactgacccagctggccaccaagtacctggagaacaccaaagtgacccagacacctgagagcatgctgctggcagctc
tgatgatcgtgtccatggtggtgtccctgcctatgcctgctggtgctgccgctgccaactacacatactgggcctacgtgccctttcct
cctatgatcagagccgtgacctggatggacaaccctattgaggtgtacgtgaacgacagcgtgtgggtgccaggacctatcgac
gatagatgtcctgccaaacctgaggaagagggcatgatgatcaacatcagcatcggctaccggtatcctccaatctgcctgggc
agagcacctggctgtcttatgccagctgtgcagaattggctggtggaagtgcctaccgtgtctcccatcagccggttcacctaccac
atggtgtccggcatgagcctcagacctagagtgaactacttgcaggacttcagctatcagcggagcctgaagttcagacccaag
ggaaagccctgtcctaaagagattcccaaagagtccaagaacaccgaggtgctcgtgtgggaagagtgcgtggccaattctgc
cgtgatcctgcagaacaacgagttcggcaccatcattgactgggctcctagaggccagttctaccacaattgcagcggacagac
acagagctgtcctagcgcacaagtgtcaccagccgtggatagcgatctgaccgagagcctggacaagcacaaacacaagaa
acttcagagcttctatccctgggagtggggagagaagggcatctctacaccaaggcctaagatcattagccctgtgtctggacca
gaacatcccgaactttggagactgacagtggccagccaccacatcagaatctggagcggcaatcagaccctggaaacacgg
gacagaaagcccttctacaccgtcgatctgaacagcagcctgaccgtgcctctccagagctgtgtgaagcctccttacatgctggt
cgtgggcaacattgtgatcaagcccgactcccagaccatcacatgcgagaactgcagactgctgacctgcatcgacagcacctt
caactggcagcaccggatcctgctcgtgcgagctagagaaggcgtgtggatccctgtctctatggacaggccttgggaagccag
ccctagcgtgcacattctgacagaggtgctgaagggcgtgctcaacagatccaagcggttcatcttcaccctgatcgccgtcatca
tgggcctgattgctgtgacagccacagctgctgttgctggcgtggccctgcatagctctgtgcagagcgtgaacttcgtgaacgatt
ggcagaagaacagcacacggctgtggaacagccagagcagcatcgaccagaagatgctggccgtgatctcctgtgccgtgc
agacagttatctggatgggcgacagactgatgagcctggaacaccggttccagctgcagtgcgactggaataccagcgacttct
gcatcacacctcagatctacaacgagagcgagcaccactgggatatggtccgaaggcatctgcagggcagagaggacaacc
tgacactggacatcagcaagctgaaagagcagatcttcgaggccagcaaggctcacctgaatctggtgcctggaaccgaagc
tattgctggagttgcagatggcctggccaatctgaatcctgtgacctgggtcaagaccatcggcagcaccacaatcatcaacctg
atcctgatcctcgtgtgcctgttttgcctgctgcttgtgtgcagatgcacccagcagctgagaagagacagcgaccatagagaaa
gagccatgatgaccatggccgtcctgagcaagagaaagggaggcaacgtgggcaagagcaagcgggatcagatcgtgacc
gtgtccgtttgataa

[0292] SEQ ID NO:7

[0293] ERV-K-gag(666个氨基酸)

[0294]
MGQTKSKIKSKYASYLSFIKILLKRGGVKVSTKNLIKLFQIIEQFCPWFPEQGTLDLKDWKRIG
KELKQAGRKGNIIPLTVWNDWAIIKAALEPFQTEEDSVSVSDAPGSCIIDCNENTRKKSQKET
ESLHCEYVAEPVMAQSTQNVDYNQLQEVIYPETLKLEGKGPELVGPSESKPRGTSPLPAG
QVPVTLQPQKQVKENKTQPPVAYQYWPPAELQYRPPPESQYGYPGMPPAPQGRAPYPQ
PPTRRLNPTAPPSRQGSELHEIIDKSRKEGDTEAWQFPVTLEPMPPGEGAQEGEPPTVEA
RYKSFSIKMLKDMKEGVKQYGPNSPYMRTLLDSIAHGHRLIPYDWEILAKSSLSPSQFLQFK
TWWIDGVQEQVRRNRAANPPVNIDADQLLGIGQNWSTISQQALMQNEAIEQVRAICLRAW
EKIQDPGSTCPSFNTVRQGSKEPYPDFVARLQDVAQKSIADEKARKVIVELMAYENANPEC
QSAIKPLKGKVPAGSDVISEYVKACDGIGGAMHKAMLMAQAITGVVLGGQVRTFGGKCYNC
GQIGHLKKNCPVLNKQNITIQATTTGREPPDLCPRCKKGKHWASQCRSKFDKNGQPLSGN
EQRGQPQAPQQTGAFPIQPFVPQGFQGQQPPLSQVFQGISQLPQYNNCPPPQAAVQQ

[0295] SEQ ID NO:8

[0296] ERV-K-gag

[0297] nt序列

atgggacagaccaagagtaagatcaagtctaagtacgccagctacctcagcttcatcaagatcctgctgaagagaggaggcgt
gaaagtgtccaccaagaacctgatcaagctgttccagatcatcgagcagttctgtccctggtttcctgagcagggcaccctggatc
tgaaggactggaagcggatcggcaaagagctgaagcaggctggcagaaagggcaacatcatccctctgaccgtgtggaacg
actgggccatcatcaaagcagctctggaacccttccagaccgaagaggatagcgtgtccgtgtctgatgctcctggcagctgcat
catcgactgcaacgagaacacccggaagaagtcccagaaagagacagagagcctgcactgcgagtacgtggccgaacctg
tgatggctcagagcacccagaacgtggactacaaccagctccaagaagtgatctatcccgaaacactgaagctggaaggca
agggacctgaactcgtgggtccttctgagtctaagcccagaggcacatctcctctgcctgcaggacaggtgccagtgacactgc
agcctcagaaacaagtgaaagagaacaagacccagcctcctgtggcctaccagtattggcctccagccgagctgcagtacag
acctcctccagagagccagtacggctaccctggaatgcctcctgctcctcaaggcagagctccttatcctcagcctcctaccaga
cggctgaaccctacagctcctcctagcagacagggctctgagctgcacgagatcattgacaagagccggaaagagggcgac
accgaggcttggcagtttcccgttacactggaacccatgcctccaggcgaaggcgctcaagaaggcgaacctcctacagtgga
agccaggtacaagagcttcagcatcaagatgctgaaggacatgaaggaaggcgtcaagcagtacggacctaacagcccata
[0298] catgcggaccctgctggattctattgcccacggccaccggctgatcccttacgattgggagatcctggctaagtcctctctgagccc
tagccagttcctgcagttcaagacctggtggatcgacggcgtgcaagaacaagtgagacggaacagagctgccaatcctcctg
tgaacatcgacgccgaccagctcctcggaatcggccagaattggagcaccatctctcagcaggctctgatgcagaacgaggcc
attgaacaagtcagagccatctgcctgagagcttgggagaagattcaggacccaggcagcacatgtcccagcttcaataccgtt
cggcagggcagcaaagagccctatcctgactttgtggctagactgcaggatgtggcccagaagtctattgccgacgagaaggc
tcggaaagtgatcgtggaactgatggcctacgagaacgctaatccagagtgccagagcgccatcaagcccttgaagggcaaa
gtgcctgccggatccgatgtgatcagcgagtatgtgaaggcctgcgacggaatcggaggtgccatgcacaaagccatgctgat
ggcacaggccatcactggcgttgtgctcggaggacaagttcggacctttggaggcaagtgctacaactgtggccagatcggac
acctgaagaagaactgccctgtgctgaacaagcagaacatcaccatccaggccaccaccaccggcagagaacctccagatc
tgtgccctagatgcaagaagggcaagcactgggccagccagtgcagaagcaagttcgacaagaacggccagcctctgagc
ggcaacgaacaaagaggacagcctcaggctcctcagcagactggcgcatttccaatccagcccttcgtgcctcaaggcttcca
gggacaacagcctccactgtctcaggtgttccagggcattagccagctccctcagtacaacaactgccctccacctcaggctgct
gtgcagcagtgatga

[0299] SEQ ID NO:9

[0300] hFOLR1Δ_hPRAMEΔ融合物(741个氨基酸)

MAQRMTTQLLLLLVWVAVVGEAQTRIAWARTELLNVCMNAKHHKEKPGPEDKLHEQCRP
WRKNACCSTNTSQEAHKDVSYLYRFNWNHCGEMAPACKRHFIQDTCLYECSPNLGPWIQ
QVDQSWRKERVLNVPLCKEDCEQWWEDCRTSYTCKSNWHKGWNWTSGFNKCAVGAAC
QPFHFYFPTPTVLCNEIWTHSYKVSNYSRGSGRCIQMWFDPAQGNPNEEVARFYAAAMER
RRLWGSIQSRYISMSVWTSPRRLVELAGQSLLKDEALAIAALELLPRELFPPLFMAAFDGRH
SQTLKAMVQAWPFTCLPLGVLMKGQHLHLETFKAVLDGLDVLLAQEVRPRRWKLQVLDLR
[0301] KNSHQDFWTVWSGNRASLYSFPEPEAAQPMTTKAKVDGLSTEAEQPFIPVEVLVDLFLKE
GACDELFSYLIEKVAAKKNVLRLCCKKLKIFAMPMQDIKMILKMVQLDSIEDLEVTCTWKLPT
LAKFSPYLGQMINLRRLLLSHIHASSYISPEKEEQYIAQFTSQFLSLQCLQALYVDSLFFLRGR
LDQLLRHVMNPLETLSITNCRLSEGDVMHLSQSPSVSQLSVLSLSGVMLTDVSPEPLQALLE
RASATLQDLVFDECGITDDQLLALLPSLSHCSQLTTLSFYGNSISISALQSLLQHLIGLSNLTH
VLYPVPLESYEDIHGTLHLERLAYLHARLRELLCELGRPSMVWLSANPCPHCGDRTFYDPE
PILCPCFMPN

[0302] SEQ ID NO:10

[0303] hFOLR1Δ_hPRAMEΔ融合物(741个氨基酸)

[0304] nt序列

tggcccagagaatgaccacacaactgctgctgctcctggtgtgggttgccgttgttggagaggcccagaccagaattgcctgggc
cagaaccgagctgctgaacgtgtgcatgaacgccaagcatcacaaagagaagcctggacctgaagacaagctgcatgaac
agtgtcggccttggagaaagaatgcttgctgtagcaccaacaccagccaagaggcccacaaggacgtgtcctacctgtaccgg
ttcaactggaaccactgcggagaaatggctcctgcctgcaagagacacttcatccaggatacctgcctgtacgagtgctctccca
atctcggaccttggatccagcaagtggaccagagctggcggaaagaacgggtgctgaatgtgcccttgtgcaaagaggattgc
gagcagtggtgggaagattgccggaccagctacacatgtaagagcaactggcacaaaggctggaactggaccagcggcttc
aacaagtgtgccgtgggagctgcctgccagcctttccacttctacttcccaacacctaccgtgctgtgcaacgaaatctggaccca
cagctacaaggtgtccaactacagcagaggcagcggcaggtgtatccagatgtggttcgatcccgctcagggcaatcccaatg
aggaagtggctagattctacgctgctgccatggaaagaagaaggctctggggcagcatccagagccggtacattagcatgagc
gtgtggacaagccctagacggctggttgaactggctggacagagcctgctcaaggatgaggccctggccattgctgctctggag
ctgctgcctagagagctgttccctcctctgttcatggctgccttcgacggcagacacagccagacactgaaagccatggtgcagg
cctggcctttcacctgtctgcctctgggagtgctgatgaagggccagcatctgcacctggaaaccttcaaggccgtgctggacggc
ctggatgttctcctggctcaagaggtgaggcctcggcgttggaaactgcaggttctggatctgcggaagaactctcaccaggattt
[0305] ctggaccgtttggtccggcaacagagccagcctgtacagctttcctgaacctgaggctgcccagcccatgaccacaaaggcca
aagtggatggcctgagcacagaggccgagcagcctttcattcccgtcgaagtgctggtggacctgttcctgaaagaaggagcct
gcgatgagctgttcagctacctgattgagaaggtggcagccaagaagaacgtgctgcggctgtgctgcaagaagctgaagatc
tttgccatgcctatgcaggatatcaagatgatcctgaagatggtgcagctggacagcatcgaggacctggaagtgacctgtacct
ggaagctgcccacactggccaagttcagcccttacctgggacagatgattaacctgcggaggctgctgctgtctcacatccacgc
cagctcctacatcagccctgagaaagaggaacagtatatcgcccagttcacaagccagtttctgagcctgcagtgtctgcaggc
cctgtacgtggacagcctgttctttctgagaggcaggctggatcagctgctgcggcacgtgatgaaccctctggaaaccctgagc
atcaccaactgtagactgagcgagggcgacgtgatgcacctgtctcagagcccatctgtgtctcagctgagcgtgctgtctctgtct
ggcgtgatgctgaccgatgtgagccctgaacctctgcaggcactgctggaaagagcctccgctactctgcaggacctggtgttcg
atgagtgcggcatcaccgatgaccagctgcttgctctgctgccaagcctgagccactgtagccagctgacaaccctgtccttctac
ggcaacagcatctccatctctgccctgcagtctctcctgcagcatctgatcggcctgtccaatctgacccacgtgctgtaccctgtgc
cactggaaagctacgaggacatccacggaaccctgcacctcgagagactggcctatctgcatgctcggctgagagaactgctg
tgcgaactgggcagacccagcatggtttggctgagcgccaatccatgtcctcactgtggcgaccggaccttctacgaccctgagc
ctatcctgtgtccttgcttcatgcccaactaatag

[0306] SEQ ID NO:11

[0307] ERV-K-env/MEL_03(517个氨基酸)

MNPSEMQRKAPPRRRRHRNRAPLTHKMNKMVTSEEQMKLPSTKKAEPPTWAQLKKLTQL
ATKYLENTKVTQTPESMLLAALMIVSMVVSLPMPAGAAAANYTYWAYVPFPPMIRAVTWMD
NPIEVYVNDSVWVPGPIDDRCPAKPEEEGMMINISIGYRYPPICLGRAPGCLMPAVQNWLV
EVPTVSPISRFTYHMVSGMSLRPRVNYLQDFSYQRSLKFRPKGKPCPKEIPKESKNTEVLV
[0308] WEECVANSAVILQNNEFGTIIDWAPRGQFYHNCSGQTQSCPSAQVSPAVDSDLTESLDKH
KHKKLQSFYPWEWGEKGISTPRPKIISPVSGPEHPELWRLTVASHHIRIWSGNQTLETRDR
KPFYTVDLNSSLTVPLQSCVKPPYMLVVGNIVIKPDSQTITCENCRLLTCIDSTFNWQHRILL
VRAREGVWIPVSMDRPWEASPSVHILTEVLKGVLNMLAVISCAVAGVALHGSAGSAAGSGE
FVVISAILALVVLTIISLIILIMLWQKKPR

[0309] SEQ ID NO:12

[0310] ERV-K-env/MEL_03

[0311] nt序列

[0312] atgaaccctagcgagatgcagagaaaggctccacctagacggagaagacacagaaacagggctcctctgacacacaagat
gaacaagatggtcaccagcgaggaacagatgaaactgcccagcaccaagaaggccgagcctccaacatgggctcagctga
agaaactgacccagctggccaccaagtacctggagaacaccaaagtgacccagacacctgagagcatgctgctggcagctc
tgatgatcgtgtccatggtggtgtccctgcctatgcctgctggtgctgccgctgccaactacacatactgggcctacgtgccctttcct
cctatgatcagagccgtgacctggatggacaaccctattgaggtgtacgtgaacgacagcgtgtgggtgccaggacctatcgac
gatagatgtcctgccaaacctgaggaagagggcatgatgatcaacatcagcatcggctaccggtatcctccaatctgcctgggc
agagcacctggctgtcttatgccagctgtgcagaattggctggtggaagtgcctaccgtgtctcccatcagccggttcacctaccac
atggtgtccggcatgagcctcagacctagagtgaactacttgcaggacttcagctatcagcggagcctgaagttcagacccaag
ggaaagccctgtcctaaagagattcccaaagagtccaagaacaccgaggtgctcgtgtgggaagagtgcgtggccaattctgc
cgtgatcctgcagaacaacgagttcggcaccatcattgactgggctcctagaggccagttctaccacaattgcagcggacagac
acagagctgtcctagcgcacaagtgtcaccagccgtggatagcgatctgaccgagagcctggacaagcacaaacacaagaa
acttcagagcttctatccctgggagtggggagagaagggcatctctacaccaaggcctaagatcattagccctgtgtctggacca
gaacatcccgaactttggagactgacagtggccagccaccacatcagaatctggagcggcaatcagaccctggaaacacgg
gacagaaagcccttctacaccgtcgatctgaacagcagcctgaccgtgcctctccagagctgtgtgaagcctccttacatgctggt
cgtgggcaacattgtgatcaagcccgactcccagaccatcacatgcgagaactgcagactgctgacctgcatcgacagcaccctt
caactggcagcaccggatcctgctcgtgcgagctagagaaggcgtgtggatccctgtctctatggacaggccttgggaagccag
ccctagcgtgcacattctgacagaggtgctgaagggcgtgctcaacatgctggccgtgatctcctgtgccgtggctggcgtggcc
ctgcatggctctgctggatctgctgctggaagcggcgagttcgtggtcatctctgccattctggctctggtggtgctgaccatcatcag
cctgatcatcctgattatgctgtggcagaagaagccccggtgataa

[0313] 参考文献

[0314] 1.Pardoll DM.The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy.Nat Rev Cancer 2012;12(4):252-64.doi:10.1038/nrc3239[published Online First:2012/03/23]

[0315] 2.Aznar MA,Tinari N,Rullan AJ,et al.Intratumoral Delivery of Immunotherapy-Act Locally,Think Globally.J Immunol 2017;198(1):31-39.doi:10.4049/jimmunol.1601145[published Online First:2016/12/21]

[0316] 3.Ellmark P,Mangsbo SM,Furebring C,et al.Tumor-directed immunotherapy can generate tumor-specific T cell responses through localized co-stimulation.Cancer Immunol Immunother 2017;66(1):1-7.doi:10.1007/s00262-016-1909-3[published Online First:2016/10/08]

[0317] 4.Pol J,Kroemer G,Galluzzi L.First oncolytic virus approved for melanoma immunotherapy.Oncoimmunology 2016;5(1):e1115641.doi:10.1080/2162402X.2015.1115641[published Online First:2016/03/05]

[0318] 5.Kaufman HL,Kohlhapp FJ,Zloza A.Oncolytic viruses:a new class of immunotherapy drugs.Nat Rev Drug Discov 2015;14(9):642-62.doi:10.1038/nrd4663

[0319] 6.Davola ME,Mossman KL.Oncolytic viruses:how"lytic"must they be for therapeutic efficacy?Oncoimmunology 2019;8(6):e1581528.doi:10.1080/2162402X.2019.1596006[published Online First:2019/05/10]

[0320] 7.Russell SJ,Barber GN.Oncolytic Viruses as Antigen-Agnostic Cancer Vaccines.Cancer Cell 2018;33(4):599-605.doi:10.1016/j.ccell.2018.03.011

[0321] 8.Russell SJ,Peng KW,Bell JC.Oncolytic virotherapy.Nat Biotechnol 2012;30(7):658-70.doi:10.1038/nbt.2287

[0322] 9.Pittman PR,Hahn M,Lee HS,et al.Phase 3 Efficacy Trial of Modified Vaccinia Ankara as a Vaccine against Smallpox.N Engl J Med 2019;381(20):1897-908.doi:10.1056/NEJMoa1817307[published Online First:2019/11/14]

[0323] 10.Anywaine Z,Whitworth H,Kaleebu P,et al.Safety and Immunogenicity of a 2-Dose Heterologous Vaccination Regimen With Ad26.ZEBOV and MVA-BN-Filo Ebola Vaccines:12-Month Data From a Phase 1 Randomized Clinical Trial in Uganda and Tanzania.J Infect Dis 2019;220(1):46-56.doi:10.1093/infdis/jiz070[published Online First:2019/02/24]

[0324] 11.Waibler Z,Anzaghe M,Frenz T,et al.Vaccinia virus-mediated inhibition of type I interferon responses is a multifactorial process involving the soluble type I interferon receptor B18 and intracellular components.J Virol 2009;83(4):1563-71.doi:10.1128/JVI.01617-08[published Online First:2008/12/17]

[0325] 12.Price PJ,Torres-Dominguez LE,Brandmuller C,et al.Modified Vaccinia virus Ankara:innate immune activation and induction of cellular signalling.Vaccine 2013;31(39):4231-4.doi:10.1016/j.vaccine.2013.03.017[published Online First:2013/03/26]

[0326] 13.Samuelsson C,Hausmann J,Lauterbach H,et al.Survival of lethal poxvirus infection in mice depends on TLR9,and therapeutic vaccination provides protection.J Clin Invest 2008;118(5):1776-84.doi:10.1172/JCI33940[published Online First:2008/04/10]

[0327] 14.Harrer E,Bauerle M,Ferstl B,et al.Therapeutic vaccination of HIV-1-infected patients on HAART with a recombinant HIV-1 nef-expressing MVA:safety,immunogenicity and influence on viral load during treatment interruption.Antivir Ther2005;10(2):285-300.[published Online First:2005/05/04]

[0328] 15.Suter M,Meisinger-Henschel C,Tzatzaris M,et al.Modified vaccinia Ankara strains with identical coding sequences actually represent complex mixtures of viruses that determine the biological properties of each strain.Vaccine 2009;27(52):7442-50.doi:10.1016/j.vaccine.2009.05.095[published Online First:2009/06/23]

[0329] 16.Lauterbach H,Patzold J,Kassub R,et al.Genetic Adjuvantation of Recombinant MVA with CD40L Potentiates CD8 T Cell Mediated Immunity.Front Immunol 2013;4:251.doi:10.3389/fimmu.2013.00251[published Online First:2013/08/30]

[0330] 17.Medina-Echeverz J,Hinterberger M,Testori M,et al.Synergistic cancer immunotherapy combines MVA-CD40L induced innate and adaptive immunity with tumor targeting antibodies.Nat Commun 2019;10(1):5041.doi:10.1038/s41467-019-12998-6[published Online First:2019/11/07]

[0331] 18.Lawler SE,Speranza MC,Cho CF,et al.Oncolytic Viruses in Cancer Treatment:A Review.JAMA Oncol 2017;3(6):841-49.doi:10.1001/jamaoncol.2016.2064

[0332] 19.Watts CWGHYLAJMTH.Immune regulation by 4-1BB and 4-1BBL: complexities and challenges.Immunological Reviews 2009

[0333] 20.Hendriks J,Xiao Y,Rossen JW,et al.During viral infection of the respiratory tract,CD27,4-1BB,and OX40 collectively determine formation of CD8 +memory T cells and their capacity for secondary expansion.J Immunol 2005;175 (3):1665-76.doi:10.4049/jimmunol.175.3.1665

[0334] 21.Palazon A,Martinez-Forero I,Teijeira A,et al.The HIF-1alpha hypoxia response in tumor-infiltrating T lymphocytes induces functional CD137 (4-1BB)for immunotherapy.Cancer Discov 2012;2(7):608-23.doi:10.1158/2159-8290.CD-11-0314[published Online First:2012/06/22]

[0335] 22.Bartkowiak T,Curran MA.4-1BB Agonists:Multi-Potent Potentiators of Tumor Immunity.Front Oncol 2015;5:117.doi:10.3389/fonc.2015.00117[published Online First:2015/06/25]

[0336] 23.Imai C,Mihara K,Andreansky M,et al.Chimeric receptors with 4-1BB signaling capacity provoke potent cytotoxicity against acute lymphoblastic leukemia.Leukemia 2004;18(4):676-84.doi:10.1038/sj.leu.2403302

[0337] 24.Nakao S,Arai Y,Tasaki M,et al.Intratumoral expression of IL-7 and IL-12 using an oncolytic virus increases systemic sensitivity to immune checkpoint blockade.Sci Transl Med 2020;12(526)doi:10.1126/scitranslmed.aax7992[published Online First:2020/01/17]

[0338] 25.Dai P,Wang W,Yang N,et al.Intratumoral delivery of inactivated modified vaccinia virus Ankara(iMVA)induces systemic anti-tumor immunity via STING and Batf3-dependent dendritic cells.Sci Immunol 2017;2(11)doi:10.1126/sciimmunol.aal1713[published Online First:2017/08/02]

[0339] 26.Kudo-Saito C,Schlom J,Hodge JW.Intratumoral vaccination and diversified subcutaneous/intratumoral vaccination with recombinant poxviruses encoding a tumor antigen and multiple costimulatory molecules.Clin Cancer Res 2004;10(3):1090-9.doi:10.1158/1078-0432.ccr-03-0145[published Online First: 2004/02/12]

[0340] 27.Rivadeneira DB,DePeaux K,Wang Y,et al.Oncolytic Viruses Engineered to Enforce Leptin Expression Reprogram Tumor-Infiltrating T Cell Metabolism and Promote Tumor Clearance.Immunity 2019;51(3):548-60 e4.doi:10.1016/j.immuni.2019.07.003[published Online First:2019/09/01]

[0341] 28.Kim HS,Kim-Schulze S,Kim DW,et al.Host lymphodepletion enhances the therapeutic activity of an oncolytic vaccinia virus expressing 4-1BB ligand.Cancer Res 2009;69(21):8516-25.doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-2522

[0342] 29.Huang AY,Gulden PH,Woods AS,et al.The immunodominant major histocompatibility complex class I-restricted antigen of a murine colon tumor derives from an endogenous retroviral gene product.Proc Natl Acad Sci U S A

1996;93(18):9730-5.doi:10.1073/pnas.93.18.9730[published Online First:1996/09/03]

[0343] 30.Risser R,Horowitz JM,McCubrey J.Endogenous mouse leukemia viruses.Annu Rev Genet 1983;17:85-121.doi:10.1146/annurev.ge.17.120183.000505[published Online First:1983/01/01]

[0344] 31.Kaech SM,Tan JT,Wherry EJ,et al.Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells.Nat Immunol 2003;4(12):1191-8.doi:10.1038/ni1009[published Online First:2003/11/20]

[0345] 32.Enamorado M,Iborra S,Priego E,et al.Enhanced anti-tumour immunity requires the interplay between resident and circulating memory CD8(+)T cells.Nat Commun 2017;8:16073.doi:10.1038/ncomms16073[published Online First:2017/07/18]

[0346] 33.Nizard M,Roussel H,Diniz MO,et al.Induction of resident memory T cells enhances the efficacy of cancer vaccine.Nat Commun 2017;8:15221.doi:10.1038/ncomms15221[published Online First:2017/05/26]

[0347] 34.Beura LK,Wijeyesinghe S,Thompson EA,et al.T Cells in Nonlymphoid Tissues Give Rise to Lymph-Node-Resident Memory T Cells.Immunity 2018;48(2):327-38 e5.doi:10.1016/j.immuni.2018.01.015[published Online First:2018/02/22]

[0348] 35.Overton ET,Lawrence SJ,Wagner E,et al.Immunogenicity and safety of three consecutive production lots of the non replicating smallpox vaccine MVA:A randomised,double blind,placebo controlled phase III trial.PLoS One 2018;13(4):e0195897.doi:10.1371/journal.pone.0195897[published Online First:2018/04/14]

[0349] 36.Kassiotis G,Stoye JP.Immune responses to endogenous retroelements:taking the bad with the good.Nat Rev Immunol 2016;16(4):207-19.doi:10.1038/nri.2016.27

[0350] 37.Scrimieri F,Askew D,Corn DJ,et al.Murine leukemia virus envelope gp70 is a shared biomarker for the high-sensitivity quantification of murine tumor burden.Oncoimmunology 2013;2(11):e26889.doi:10.4161/onci.26889

[0351] 38.Attermann AS,Bjerregaard AM,Saini SK,et al.Human endogenous retroviruses and their implication for immunotherapeutics of cancer.Ann Oncol 2018;29(11):2183-91.doi:10.1093/annonc/mdy413

[0352] 39.Wang-Johanning F,Radvanyi L,Rycaj K,et al.Human endogenous retrovirus K triggers an antigen-specific immune response in breast cancer patients.Cancer Res 2008;68(14):5869-77.doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-6838

[0353] 40.Kong Y,Rose CM,Cass AA,et al.Transposable element expression in tumors is associated with immune infiltration and increased antigenicity.Nat Commun 2019;10(1):5228.doi:10.1038/s41467-019-13035-2

[0354] 41.McWilliams JA,Sullivan RT,Jordan KR,et al.Age-dependent tolerance to an endogenous tumor-associated antigen.Vaccine 2008;26(15):1863-73.doi:10.1016/j.vaccine.2008.01.052[published Online First:2008/03/11]

[0355] 42.Reynoso GV,Weisberg AS,Shannon JP,et al.Lymph node conduits transport virions for rapid T cell activation.Nat Immunol 2019;20(5):602-12.doi:10.1038/s41590-019-0342-0[published Online First:2019/03/20]

[0356] 43.Sanchez-Paulete AR,Labiano S,Rodriguez-Ruiz ME,et al.Deciphering CD137(4-1BB)signaling in T-cell costimulation for translation into successful cancer immunotherapy.Eur J Immunol 2016;46(3):513-22.doi:10.1002/eji.201445388[published Online First:2016/01/17]

[0357] 44.Bertram EM,Lau P,Watts TH.Temporal segregation of 4-1BB versus CD28-mediated costimulation:4-1BB ligand influences T cell numbers late in the primary response and regulates the size of the T cell memory response following influenza infection.J Immunol 2002;168(8):3777-85.doi:10.4049/jimmunol.168.8.3777[published Online First:2002/04/09]

[0358] 45.Willoughby JE,Kerr JP,Rogel A,et al.Differential impact of CD27 and 4-1BB costimulation on effector and memory CD8 T cell generation following peptide immunization.J Immunol 2014;193(1):244-51.doi:10.4049/jimmunol.1301217[published Online First:2014/05/27]

[0359] 46.Park SL,Buzzai A,Rautela J,et al.Tissue-resident memory CD8(+)T cells promote melanoma-immune equilibrium in skin.Nature 2019;565(7739):366-71.doi:10.1038/s41586-018-0812-9[published Online First:2019/01/02]

[0360] 47.Schenkel JM,Fraser KA,Masopust D.Cutting edge:resident memory CD8 T cells occupy frontline niches in secondary lymphoid organs.J Immunol2014;192(7):2961-4.doi:10.4049/jimmunol.1400003[published Online First:2014/03/07]

[0361] 48.Zhou AC,Wagar LE,Wortzman ME,et al.Intrinsic 4-1BB signals are indispensable for the establishment of an influenza-specific tissue-resident memory CD8 T-cell population in the lung.MucosalImmunol 2017;10(5):1294-309.doi:10.1038/mi.2016.124[published Online First:2017/01/05]

[0362] 49.Reading JL,Galvez-Cancino F,Swanton C,et al.The function and dysfunction of memory CD8(+)T cells in tumor immunity.Immunol Rev 2018;283(1):194-212.doi:10.1111/imr.12657[published Online First:2018/04/18]

[0363] 50.Wherry EJ,Blattman JN,Murali-Krishna K,et al.Viral persistence alters CD8 T-cell immunodominance and tissue distribution and results in distinct stages of functional impairment.J Virol 2003;77(8):4911-27.doi:10.1128/jvi.77.8.4911-4927.2003[published Online First:2003/03/29]

[0364] 51.Appay V,Nixon DF,Donahoe SM,et al.HIV-specific CD8(+)T cells produce antiviral cytokines but are impaired in cytolytic function.J Exp Med 2000;192(1):63-75.doi:10.1084/jem.192.1.63[published Online First:2000/07/06]

序列表

<110> 巴法里安诺迪克有限公司(Bavarian Nordic A/S)

<120> 4-1BBL辅助的重组修饰的安卡拉痘苗病毒(MVA)的医疗用途

<130> BNIT0016PCT

<150> EP 20191226.8

<151> 2020-08-14

<160> 12

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 261

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 1

Met Ile Glu Thr Tyr Asn Gln Thr Ser Pro Arg Ser Ala Ala Thr Gly
1 5 10 15

Leu Pro Ile Ser Met Lys Ile Phe Met Tyr Leu Leu Thr Val Phe Leu
20 25 30

Ile Thr Gln Met Ile Gly Ser Ala Leu Phe Ala Val Tyr Leu His Arg
35 40 45

Arg Leu Asp Lys Ile Glu Asp Glu Arg Asn Leu His Glu Asp Phe Val
50 55 60

Phe Met Lys Thr Ile Gln Arg Cys Asn Thr Gly Glu Arg Ser Leu Ser
65 70 75 80

Leu Leu Asn Cys Glu Glu Ile Lys Ser Gln Phe Glu Gly Phe Val Lys
85 90 95

Asp Ile Met Leu Asn Lys Glu Glu Thr Lys Lys Glu Asn Ser Phe Glu
100 105 110

Met Gln Lys Gly Asp Gln Asn Pro Gln Ile Ala Ala His Val Ile Ser
115 120 125

Glu Ala Ser Ser Lys Thr Thr Ser Val Leu Gln Trp Ala Glu Lys Gly
130 135 140

Tyr Tyr Thr Met Ser Asn Asn Leu Val Thr Leu Glu Asn Gly Lys Gln
145 150 155 160

Leu Thr Val Lys Arg Gln Gly Leu Tyr Tyr Ile Tyr Ala Gln Val Thr
165 170 175

Phe Cys Ser Asn Arg Glu Ala Ser Ser Gln Ala Pro Phe Ile Ala Ser
180 185 190

Leu Cys Leu Lys Ser Pro Gly Arg Phe Glu Arg Ile Leu Leu Arg Ala

195 200 205

Ala Asn Thr His Ser Ser Ala Lys Pro Cys Gly Gln Gln Ser Ile His
210 215 220

Leu Gly Gly Val Phe Glu Leu Gln Pro Gly Ala Ser Val Phe Val Asn
225 230 235 240

Val Thr Asp Pro Ser Gln Val Ser His Gly Thr Gly Phe Thr Ser Phe
245 250 255

Gly Leu Leu Lys Leu
260

<210> 2
<211> 792
<212> DNA
<213> 智人(Homo sapiens)
<400> 2

atgatcgaga catacaacca gacaagccct agaagcgccg ccacaggact gcctatcagc 60
atgaagatct tcatgtacct gctgaccgtg ttcctgatca cccagatgat cggcagcgcc 120
ctgtttgccg tgtacctgca cagacggctg gacaagatcg aggacgagag aaacctgcac 180
gaggacttcg tgttcatgaa gaccatccag cggtgcaaca ccggcgagag aagtctgagc 240
ctgctgaact gcgaggaaat caagagccag ttcgagggct tcgtgaagga catcatgctg 300
aacaaagagg aaacgaagaa agagaactcc ttcgagatgc agaagggcga ccagaatcct 360
cagatcgccg ctcacgtgat cagcgaggcc agcagcaaga caacaagcgt gctgcagtgg 420
gccgagaagg gctactacac catgagcaac aacctggtca ccctggagaa cggcaagcag 480
ctgacagtga agcggcaggg cctgtactac atctacgccc aagtgacctt ctgcagcaac 540
agagaggcca gctctcaggc tcctttcatc gccagcctgt gcctgaagtc tcctggcaga 600
ttcgagcgga ttctgctgag agccgccaac acacacagca gcgccaaacc ttgtggccag 660
cagtctattc acctcggcgg agtgtttgag ctgcagcctg gcgcaagcgt gttcgtgaat 720
gtgacagacc ctagccaggt gtcccacggc accggcttta catctttcgg actgctgaag 780
ctgtgatgat ag 792

<210> 3
<211> 254
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)
<400> 3

Met Glu Tyr Ala Ser Asp Ala Ser Leu Asp Pro Glu Ala Pro Trp Pro
1 5 10 15

Pro Ala Pro Arg Ala Arg Ala Cys Arg Val Leu Pro Trp Ala Leu Val
20 25 30

Ala Gly Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ala Ala Ala Cys Ala Val Phe
35 40 45

Leu Ala Cys Pro Trp Ala Val Ser Gly Ala Arg Ala Ser Pro Gly Ser
50 55 60
Ala Ala Ser Pro Arg Leu Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp
65 70 75 80
Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val
85 90 95
Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp
100 105 110
Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu
115 120 125
Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe
130 135 140
Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser
145 150 155 160
Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala
165 170 175
Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala
180 185 190
Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala
195 200 205
Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His
210 215 220
Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val
225 230 235 240
Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu
245 250

<210> 4
<211> 768
<212> DNA
<213> 智人(Homo sapiens)
<400> 4
atggaatacg ccagcgacgc ctctctggac cctgaagctc cttggcctcc agctcctaga 60
gccagggctt gtagagtgct gccttgggct cttgtggctg gacttctgct tctgttgctc 120
ctggctgctg cctgcgcagt gtttcttgct tgtccatggg ctgtgtcagg agccagagca 180
tctcctggat ctgccgcttc tcccagactg agagagggac ctgaactgag ccctgatgat 240
cctgctggac tgctcgacct gagacagggc atgtttgccc agctggtggc ccagaatgtg 300
ctgctgattg atggccctct gagctggtac agcgatcctg gacttgctgg cgttagcctg 360
actggaggcc tgagctacaa ggaggacacc aaagaactgg tggtggccaa ggctggcgtg 420
tactacgtgt tctttcagct ggaactgcgg agagtggtgg caggcgaagg atctggatcc 480

gtgtctctgg cactgcatct gcagcctctg agatctgctg ctggtgcagc tgccctggct 540
ctgacagttg atctgcctcc tgcctccagc gaagccagaa acagcgcctt tggcttccaa 600
ggcagactgc tgcacctgtc tgctggccag agactgggag tgcacctcca cacagaagca 660
agagcaagac acgcctggca gcttacacaa ggcgctacag tgctgggcct gttcagagtg 720
acacctgaga ttccagctgg cttgccatct cctcgcagcg agtaatga 768

<210> 5
<211> 666
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial sequence)
<220>
<223> 合成ERV-K-gag序列
<400> 5

Met Gly Gln Thr Lys Ser Lys Ile Lys Ser Lys Tyr Ala Ser Tyr Leu
1 5 10 15
Ser Phe Ile Lys Ile Leu Leu Lys Arg Gly Gly Val Lys Val Ser Thr
20 25 30
Lys Asn Leu Ile Lys Leu Phe Gln Ile Ile Glu Gln Phe Cys Pro Trp
35 40 45
Phe Pro Glu Gln Gly Thr Leu Asp Leu Lys Asp Trp Lys Arg Ile Gly
50 55 60
Lys Glu Leu Lys Gln Ala Gly Arg Lys Gly Asn Ile Ile Pro Leu Thr
65 70 75 80
Val Trp Asn Asp Trp Ala Ile Ile Lys Ala Ala Leu Glu Pro Phe Gln
85 90 95
Thr Glu Glu Asp Ser Val Ser Val Ser Asp Ala Pro Gly Ser Cys Ile
100 105 110
Ile Asp Cys Asn Glu Asn Thr Arg Lys Lys Ser Gln Lys Glu Thr Glu
115 120 125
Ser Leu His Cys Glu Tyr Val Ala Glu Pro Val Met Ala Gln Ser Thr
130 135 140
Gln Asn Val Asp Tyr Asn Gln Leu Gln Glu Val Ile Tyr Pro Glu Thr
145 150 155 160
Leu Lys Leu Glu Gly Lys Gly Pro Glu Leu Val Gly Pro Ser Glu Ser
165 170 175
Lys Pro Arg Gly Thr Ser Pro Leu Pro Ala Gly Gln Val Pro Val Thr
180 185 190
Leu Gln Pro Gln Lys Gln Val Lys Glu Asn Lys Thr Gln Pro Pro Val
195 200 205
Ala Tyr Gln Tyr Trp Pro Pro Ala Glu Leu Gln Tyr Arg Pro Pro Pro

210 215 220

Glu Ser Gln Tyr Gly Tyr Pro Gly Met Pro Pro Ala Pro Gln Gly Arg
225 230 235 240

Ala Pro Tyr Pro Gln Pro Pro Thr Arg Arg Leu Asn Pro Thr Ala Pro
245 250 255

Pro Ser Arg Gln Gly Ser Glu Leu His Glu Ile Ile Asp Lys Ser Arg
260 265 270

Lys Glu Gly Asp Thr Glu Ala Trp Gln Phe Pro Val Thr Leu Glu Pro
275 280 285

Met Pro Pro Gly Glu Gly Ala Gln Glu Gly Glu Pro Pro Thr Val Glu
290 295 300

Ala Arg Tyr Lys Ser Phe Ser Ile Lys Met Leu Lys Asp Met Lys Glu
305 310 315 320

Gly Val Lys Gln Tyr Gly Pro Asn Ser Pro Tyr Met Arg Thr Leu Leu
325 330 335

Asp Ser Ile Ala His Gly His Arg Leu Ile Pro Tyr Asp Trp Glu Ile
340 345 350

Leu Ala Lys Ser Ser Leu Ser Pro Ser Gln Phe Leu Gln Phe Lys Thr
355 360 365

Trp Trp Ile Asp Gly Val Gln Glu Gln Val Arg Arg Asn Arg Ala Ala
370 375 380

Asn Pro Pro Val Asn Ile Asp Ala Asp Gln Leu Leu Gly Ile Gly Gln
385 390 395 400

Asn Trp Ser Thr Ile Ser Gln Gln Ala Leu Met Gln Asn Glu Ala Ile
405 410 415

Glu Gln Val Arg Ala Ile Cys Leu Arg Ala Trp Glu Lys Ile Gln Asp
420 425 430

Pro Gly Ser Thr Cys Pro Ser Phe Asn Thr Val Arg Gln Gly Ser Lys
435 440 445

Glu Pro Tyr Pro Asp Phe Val Ala Arg Leu Gln Asp Val Ala Gln Lys
450 455 460

Ser Ile Ala Asp Glu Lys Ala Arg Lys Val Ile Val Glu Leu Met Ala
465 470 475 480

Tyr Glu Asn Ala Asn Pro Glu Cys Gln Ser Ala Ile Lys Pro Leu Lys
485 490 495

Gly Lys Val Pro Ala Gly Ser Asp Val Ile Ser Glu Tyr Val Lys Ala
500 505 510

Cys Asp Gly Ile Gly Gly Ala Met His Lys Ala Met Leu Met Ala Gln
515 520 525

Ala Ile Thr Gly Val Val Leu Gly Gly Gln Val Arg Thr Phe Gly Gly
530 535 540
Lys Cys Tyr Asn Cys Gly Gln Ile Gly His Leu Lys Lys Asn Cys Pro
545 550 555 560
Val Leu Asn Lys Gln Asn Ile Thr Ile Gln Ala Thr Thr Thr Gly Arg
565 570 575
Glu Pro Pro Asp Leu Cys Pro Arg Cys Lys Lys Gly Lys His Trp Ala
580 585 590
Ser Gln Cys Arg Ser Lys Phe Asp Lys Asn Gly Gln Pro Leu Ser Gly
595 600 605
Asn Glu Gln Arg Gly Gln Pro Gln Ala Pro Gln Gln Thr Gly Ala Phe
610 615 620
Pro Ile Gln Pro Phe Val Pro Gln Gly Phe Gln Gly Gln Gln Pro Pro
625 630 635 640
Leu Ser Gln Val Phe Gln Gly Ile Ser Gln Leu Pro Gln Tyr Asn Asn
645 650 655
Cys Pro Pro Pro Gln Ala Ala Val Gln Gln
660 665

<210> 6
<211> 2004
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial sequence)
<220>
<223> 合成ERV-K-gag序列
<400> 6

atgggacaga ccaagagtaa gatcaagtct aagtacgcca gctacctcag cttcatcaag 60
atcctgctga agagaggagg cgtgaaagtg tccaccaaga acctgatcaa gctgttccag 120
atcatcgagc agttctgtcc ctggtttcct gagcagggca ccctggatct gaaggactgg 180
aagcggatcg gcaaagagct gaagcaggct ggcagaaagg gcaacatcat ccctctgacc 240
gtgtggaacg actgggccat catcaaagca gctctggaac ccttccagac cgaagaggat 300
agcgtgtccg tgtctgatgc tcctggcagc tgcatcatcg actgcaacga gaacacccgg 360
aagaagtccc agaaagagac agagagcctg cactgcgagt acgtggccga acctgtgatg 420
gctcagagca cccagaacgt ggactacaac cagctccaag aagtgatcta tcccgaaaca 480
ctgaagctgg aaggcaaggg acctgaactc gtgggtcctt ctgagtctaa gcccagaggc 540
acatctcctc tgcctgcagg acaggtgcca gtgacactgc agcctcagaa acaagtgaaa 600
gagaacaaga cccagcctcc tgtggcctac cagtattggc ctccagccga gctgcagtac 660
agacctcctc cagagagcca gtacggctac cctggaatgc ctcctgctcc tcaaggcaga 720
gctccttatc ctcagcctcc taccagacgg ctgaacccta cagctcctcc tagcagacag 780
ggctctgagc tgcacgagat cattgacaag agccggaaag agggcgacac cgaggcttgg 840

cagtttcccg ttacactgga acccatgcct ccaggcgaag gcgctcaaga aggcgaacct 900
cctacagtgg aagccaggta caagagcttc agcatcaaga tgctgaagga catgaaggaa 960
ggcgtcaagc agtacggacc taacagccca tacatgcgga ccctgctgga ttctattgcc 1020
cacggccacc ggctgatccc ttacgattgg gagatcctgg ctaagtcctc tctgagccct 1080
agccagttcc tgcagttcaa gacctggtgg atcgacggcg tgcaagaaca agtgagacgg 1140
aacagagctg ccaatcctcc tgtgaacatc gacgccgacc agctcctcgg aatcggccag 1200
aattggagca ccatctctca gcaggctctg atgcagaacg aggccattga acaagtcaga 1260
gccatctgcc tgagagcttg ggagaagatt caggacccag gcagcacatg tcccagcttc 1320
aataccgttc ggcagggcag caaagagccc tatcctgact ttgtggctag actgcaggat 1380
gtggcccaga agtctattgc cgacgagaag gctcggaaag tgatcgtgga actgatggcc 1440
tacgagaacg ctaatccaga gtgccagagc gccatcaagc ccttgaaggg caaagtgcct 1500
gccggatccg atgtgatcag cgagtatgtg aaggcctgcg acggaatcgg aggtgccatg 1560
cacaaagcca tgctgatggc acaggccatc actggcgttg tgctcggagg acaagttcgg 1620
acctttggag gcaagtgcta caactgtggc cagatcggac acctgaagaa gaactgccct 1680
gtgctgaaca agcagaacat caccatccag gccaccacca ccggcagaga acctccagat 1740
ctgtgcccta gatgcaagaa gggcaagcac tgggccagcc agtgcagaag caagttcgac 1800
aagaacggcc agcctctgag cggcaacgaa caaagaggac agcctcaggc tcctcagcag 1860
actggcgcat ttccaatcca gcccttcgtg cctcaaggct tccagggaca acagcctcca 1920
ctgtctcagg tgttccaggg cattagccag ctccctcagt acaacaactg ccctccacct 1980
caggctgctg tgcagcagtg atga 2004

<210> 7
<211> 699
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial sequence)
<220>
<223> 合成ERV-K-env/MEL序列
<400> 7

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

Ala Ala Ala Asn Tyr Thr Tyr Trp Ala Tyr Val Pro Phe Pro Pro Met
100 105 110
Ile Arg Ala Val Thr Trp Met Asp Asn Pro Ile Glu Val Tyr Val Asn
115 120 125
Asp Ser Val Trp Val Pro Gly Pro Ile Asp Asp Arg Cys Pro Ala Lys
130 135 140
Pro Glu Glu Glu Gly Met Met Ile Asn Ile Ser Ile Gly Tyr Arg Tyr
145 150 155 160
Pro Pro Ile Cys Leu Gly Arg Ala Pro Gly Cys Leu Met Pro Ala Val
165 170 175
Gln Asn Trp Leu Val Glu Val Pro Thr Val Ser Pro Ile Ser Arg Phe
180 185 190
Thr Tyr His Met Val Ser Gly Met Ser Leu Arg Pro Arg Val Asn Tyr
195 200 205
Leu Gln Asp Phe Ser Tyr Gln Arg Ser Leu Lys Phe Arg Pro Lys Gly
210 215 220
Lys Pro Cys Pro Lys Glu Ile Pro Lys Glu Ser Lys Asn Thr Glu Val
225 230 235 240
Leu Val Trp Glu Glu Cys Val Ala Asn Ser Ala Val Ile Leu Gln Asn
245 250 255
Asn Glu Phe Gly Thr Ile Ile Asp Trp Ala Pro Arg Gly Gln Phe Tyr
260 265 270
His Asn Cys Ser Gly Gln Thr Gln Ser Cys Pro Ser Ala Gln Val Ser
275 280 285
Pro Ala Val Asp Ser Asp Leu Thr Glu Ser Leu Asp Lys His Lys His
290 295 300
Lys Lys Leu Gln Ser Phe Tyr Pro Trp Glu Trp Gly Glu Lys Gly Ile
305 310 315 320
Ser Thr Pro Arg Pro Lys Ile Ile Ser Pro Val Ser Gly Pro Glu His
325 330 335
Pro Glu Leu Trp Arg Leu Thr Val Ala Ser His His Ile Arg Ile Trp
340 345 350
Ser Gly Asn Gln Thr Leu Glu Thr Arg Asp Arg Lys Pro Phe Tyr Thr
355 360 365
Val Asp Leu Asn Ser Ser Leu Thr Val Pro Leu Gln Ser Cys Val Lys
370 375 380
Pro Pro Tyr Met Leu Val Val Gly Asn Ile Val Ile Lys Pro Asp Ser
385 390 395 400
Gln Thr Ile Thr Cys Glu Asn Cys Arg Leu Leu Thr Cys Ile Asp Ser

405 410 415
Thr Phe Asn Trp Gln His Arg Ile Leu Leu Val Arg Ala Arg Glu Gly
420 425 430
Val Trp Ile Pro Val Ser Met Asp Arg Pro Trp Glu Ala Ser Pro Ser
435 440 445
Val His Ile Leu Thr Glu Val Leu Lys Gly Val Leu Asn Arg Ser Lys
450 455 460
Arg Phe Ile Phe Thr Leu Ile Ala Val Ile Met Gly Leu Ile Ala Val
465 470 475 480
Thr Ala Thr Ala Ala Val Ala Gly Val Ala Leu His Ser Ser Val Gln
485 490 495
Ser Val Asn Phe Val Asn Asp Trp Gln Lys Asn Ser Thr Arg Leu Trp
500 505 510
Asn Ser Gln Ser Ser Ile Asp Gln Lys Met Leu Ala Val Ile Ser Cys
515 520 525
Ala Val Gln Thr Val Ile Trp Met Gly Asp Arg Leu Met Ser Leu Glu
530 535 540
His Arg Phe Gln Leu Gln Cys Asp Trp Asn Thr Ser Asp Phe Cys Ile
545 550 555 560
Thr Pro Gln Ile Tyr Asn Glu Ser Glu His His Trp Asp Met Val Arg
565 570 575
Arg His Leu Gln Gly Arg Glu Asp Asn Leu Thr Leu Asp Ile Ser Lys
580 585 590
Leu Lys Glu Gln Ile Phe Glu Ala Ser Lys Ala His Leu Asn Leu Val
595 600 605
Pro Gly Thr Glu Ala Ile Ala Gly Val Ala Asp Gly Leu Ala Asn Leu
610 615 620
Asn Pro Val Thr Trp Val Lys Thr Ile Gly Ser Thr Thr Ile Ile Asn
625 630 635 640
Leu Ile Leu Ile Leu Val Cys Leu Phe Cys Leu Leu Leu Val Cys Arg
645 650 655
Cys Thr Gln Gln Leu Arg Arg Asp Ser Asp His Arg Glu Arg Ala Met
660 665 670
Met Thr Met Ala Val Leu Ser Lys Arg Lys Gly Gly Asn Val Gly Lys
675 680 685
Ser Lys Arg Asp Gln Ile Val Thr Val Ser Val
690 695

<210> 8

<211> 2103

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial sequence)

<220>

<223> 合成ERV-K-env/MEL序列

<400> 8

atgaacccta gcgagatgca gagaaaggct ccacctagac ggagaagaca cagaaacagg 60
gctcctctga cacacaagat gaacaagatg gtcaccagcg aggaacagat gaaactgccc 120
agcaccaaga aggccgagcc tccaacatgg gctcagctga agaaactgac ccagctggcc 180
accaagtacc tggagaacac caaagtgacc cagacacctg agagcatgct gctggcagct 240
ctgatgatcg tgtccatggt ggtgtccctg cctatgcctg ctggtgctgc cgctgccaac 300
tacacatact gggcctacgt gccctttcct cctatgatca gagccgtgac ctggatggac 360
aaccctattg aggtgtacgt gaacgacagc gtgtgggtgc caggacctat cgacgataga 420
tgtcctgcca aacctgagga agagggcatg atgatcaaca tcagcatcgg ctaccggtat 480
cctccaatct gcctgggcag agcacctggc tgtcttatgc cagctgtgca gaattggctg 540
gtggaagtgc ctaccgtgtc tcccatcagc cggttcacct accacatggt gtccggcatg 600
agcctcagac ctagagtgaa ctacttgcag gacttcagct atcagcggag cctgaagttc 660
agacccaagg gaaagccctg tcctaaagag attcccaaag agtccaagaa caccgaggtg 720
ctcgtgtggg aagagtgcgt ggccaattct gccgtgatcc tgcagaacaa cgagttcggc 780
accatcattg actgggctcc tagaggccag ttctaccaca attgcagcgg acagacacag 840
agctgtccta gcgcacaagt gtcaccagcc gtggatagcg atctgaccga gagcctggac 900
aagcacaaac acaagaaact tcagagcttc tatccctggg agtggggaga gaagggcatc 960
tctacaccaa ggcctaagat cattagccct gtgtctggac cagaacatcc cgaactttgg 1020
agactgacag tggccagcca ccacatcaga atctggagcg gcaatcagac cctggaaaca 1080
cgggacagaa agcccttcta caccgtcgat ctgaacagca gcctgaccgt gcctctccag 1140
agctgtgtga agcctcctta catgctggtc gtgggcaaca ttgtgatcaa gcccgactcc 1200
cagaccatca catgcgagaa ctgcagactg ctgacctgca tcgacagcac cttcaactgg 1260
cagcaccgga tcctgctcgt gcgagctaga gaaggcgtgt ggatccctgt ctctatggac 1320
aggccttggg aagccagccc tagcgtgcac attctgacag aggtgctgaa gggcgtgctc 1380
aacagatcca agcggttcat cttcaccctg atcgccgtca tcatgggcct gattgctgtg 1440
acagccacag ctgctgttgc tggcgtggcc ctgcatagct ctgtgcagag cgtgaacttc 1500
gtgaacgatt ggcagaagaa cagcacacgg ctgtggaaca gccagagcag catcgaccag 1560
aagatgctgg ccgtgatctc ctgtgccgtg cagacagtta tctggatggg cgacagactg 1620
atgagcctgg aacaccggtt ccagctgcag tgcgactgga ataccagcga cttctgcatc 1680
acacctcaga tctacaacga gagcgagcac cactgggata tggtccgaag gcatctgcag 1740
ggcagagagg acaacctgac actggacatc agcaagctga aagagcagat cttcgaggcc 1800
agcaaggctc acctgaatct ggtgcctgga accgaagcta ttgctggagt tgcagatggc 1860
ctggccaatc tgaatcctgt gacctgggtc aagaccatcg gcagcaccac aatcatcaac 1920
ctgatcctga tcctcgtgtg cctgttttgc ctgctgcttg tgtgcagatg cacccagcag 1980
ctgagaagag acagcgacca tagagaaaga gccatgatga ccatggccgt cctgagcaag 2040

agaaagggag gcaacgtggg caagagcaag cgggatcaga tcgtgaccgt gtccgtttga taa 2100 2103

<210> 9

<211> 741

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial sequence)

<220>

<223> 合成hFOLR1-hPRAME融合序列

<400> 9

Met Ala Gln Arg Met Thr Thr Gln Leu Leu Leu Leu Val Trp Val
1 5 10 15
Ala Val Val Gly Glu Ala Gln Thr Arg Ile Ala Trp Ala Arg Thr Glu
20 25 30
Leu Leu Asn Val Cys Met Asn Ala Lys His His Lys Glu Lys Pro Gly
35 40 45
Pro Glu Asp Lys Leu His Glu Gln Cys Arg Pro Trp Arg Lys Asn Ala
50 55 60
Cys Cys Ser Thr Asn Thr Ser Gln Glu Ala His Lys Asp Val Ser Tyr
65 70 75 80
Leu Tyr Arg Phe Asn Trp Asn His Cys Gly Glu Met Ala Pro Ala Cys
85 90 95
Lys Arg His Phe Ile Gln Asp Thr Cys Leu Tyr Glu Cys Ser Pro Asn
100 105 110
Leu Gly Pro Trp Ile Gln Gln Val Asp Gln Ser Trp Arg Lys Glu Arg
115 120 125
Val Leu Asn Val Pro Leu Cys Lys Glu Asp Cys Glu Gln Trp Trp Glu
130 135 140
Asp Cys Arg Thr Ser Tyr Thr Cys Lys Ser Asn Trp His Lys Gly Trp
145 150 155 160
Asn Trp Thr Ser Gly Phe Asn Lys Cys Ala Val Gly Ala Ala Cys Gln
165 170 175
Pro Phe His Phe Tyr Phe Pro Thr Pro Thr Val Leu Cys Asn Glu Ile
180 185 190
Trp Thr His Ser Tyr Lys Val Ser Asn Tyr Ser Arg Gly Ser Gly Arg
195 200 205
Cys Ile Gln Met Trp Phe Asp Pro Ala Gln Gly Asn Pro Asn Glu Glu
210 215 220
Val Ala Arg Phe Tyr Ala Ala Ala Met Glu Arg Arg Arg Leu Trp Gly
225 230 235 240

Ser Ile Gln Ser Arg Tyr Ile Ser Met Ser Val Trp Thr Ser Pro Arg
245 250 255
Arg Leu Val Glu Leu Ala Gly Gln Ser Leu Leu Lys Asp Glu Ala Leu
260 265 270
Ala Ile Ala Ala Leu Glu Leu Leu Pro Arg Glu Leu Phe Pro Pro Leu
275 280 285
Phe Met Ala Ala Phe Asp Gly Arg His Ser Gln Thr Leu Lys Ala Met
290 295 300
Val Gln Ala Trp Pro Phe Thr Cys Leu Pro Leu Gly Val Leu Met Lys
305 310 315 320
Gly Gln His Leu His Leu Glu Thr Phe Lys Ala Val Leu Asp Gly Leu
325 330 335
Asp Val Leu Leu Ala Gln Glu Val Arg Pro Arg Arg Trp Lys Leu Gln
340 345 350
Val Leu Asp Leu Arg Lys Asn Ser His Gln Asp Phe Trp Thr Val Trp
355 360 365
Ser Gly Asn Arg Ala Ser Leu Tyr Ser Phe Pro Glu Pro Glu Ala Ala
370 375 380
Gln Pro Met Thr Thr Lys Ala Lys Val Asp Gly Leu Ser Thr Glu Ala
385 390 395 400
Glu Gln Pro Phe Ile Pro Val Glu Val Leu Val Asp Leu Phe Leu Lys
405 410 415
Glu Gly Ala Cys Asp Glu Leu Phe Ser Tyr Leu Ile Glu Lys Val Ala
420 425 430
Ala Lys Lys Asn Val Leu Arg Leu Cys Cys Lys Lys Leu Lys Ile Phe
435 440 445
Ala Met Pro Met Gln Asp Ile Lys Met Ile Leu Lys Met Val Gln Leu
450 455 460
Asp Ser Ile Glu Asp Leu Glu Val Thr Cys Thr Trp Lys Leu Pro Thr
465 470 475 480
Leu Ala Lys Phe Ser Pro Tyr Leu Gly Gln Met Ile Asn Leu Arg Arg
485 490 495
Leu Leu Leu Ser His Ile His Ala Ser Ser Tyr Ile Ser Pro Glu Lys
500 505 510
Glu Glu Gln Tyr Ile Ala Gln Phe Thr Ser Gln Phe Leu Ser Leu Gln
515 520 525
Cys Leu Gln Ala Leu Tyr Val Asp Ser Leu Phe Phe Leu Arg Gly Arg
530 535 540
Leu Asp Gln Leu Leu Arg His Val Met Asn Pro Leu Glu Thr Leu Ser

545 550 555 560
Ile Thr Asn Cys Arg Leu Ser Glu Gly Asp Val Met His Leu Ser Gln
565 570 575
Ser Pro Ser Val Ser Gln Leu Ser Val Leu Ser Leu Ser Gly Val Met
580 585 590
Leu Thr Asp Val Ser Pro Glu Pro Leu Gln Ala Leu Leu Glu Arg Ala
595 600 605
Ser Ala Thr Leu Gln Asp Leu Val Phe Asp Glu Cys Gly Ile Thr Asp
610 615 620
Asp Gln Leu Leu Ala Leu Leu Pro Ser Leu Ser His Cys Ser Gln Leu
625 630 635 640
Thr Thr Leu Ser Phe Tyr Gly Asn Ser Ile Ser Ile Ser Ala Leu Gln
645 650 655
Ser Leu Leu Gln His Leu Ile Gly Leu Ser Asn Leu Thr His Val Leu
660 665 670
Tyr Pro Val Pro Leu Glu Ser Tyr Glu Asp Ile His Gly Thr Leu His
675 680 685
Leu Glu Arg Leu Ala Tyr Leu His Ala Arg Leu Arg Glu Leu Leu Cys
690 695 700
Glu Leu Gly Arg Pro Ser Met Val Trp Leu Ser Ala Asn Pro Cys Pro
705 710 715 720
His Cys Gly Asp Arg Thr Phe Tyr Asp Pro Glu Pro Ile Leu Cys Pro
725 730 735
Cys Phe Met Pro Asn
740

<210> 10
<211> 2228
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial sequence)
<220>
<223> 合成hFOLR1-hPRAME融合核苷酸序列
<400> 10
tggcccagag aatgaccaca caactgctgc tgctcctggt gtgggttgcc gttgttggag 60
aggcccagac cagaattgcc tgggccagaa ccgagctgct gaacgtgtgc atgaacgcca 120
agcatcacaa agagaagcct ggacctgaag acaagctgca tgaacagtgt cggccttgga 180
gaaagaatgc ttgctgtagc accaacacca gccaagaggc ccacaaggac gtgtcctacc 240
tgtaccggtt caactggaac cactgcggag aaatggctcc tgcctgcaag agacacttca 300
tccaggatac ctgcctgtac gagtgctctc ccaatctcgg accttggatc cagcaagtgg 360
accagagctg gcggaaagaa cgggtgctga atgtgccctt gtgcaaagag gattgcgagc 420

agtggtggga agattgccgg accagctaca catgtaagag caactggcac aaaggctgga 480
actggaccag cggcttcaac aagtgtgccg tgggagctgc ctgccagcct ttccacttct 540
acttcccaac acctaccgtg ctgtgcaacg aaatctggac ccacagctac aaggtgtcca 600
actacagcag aggcagcggc aggtgtatcc agatgtggtt cgatcccgct cagggcaatc 660
ccaatgagga agtggctaga ttctacgctg ctgccatgga aagaagaagg ctctggggca 720
gcatccagag ccggtacatt agcatgagcg tgtggacaag ccctagacgg ctggttgaac 780
tggctggaca gagcctgctc aaggatgagg ccctggccat tgctgctctg gagctgctgc 840
ctagagagct gttccctcct ctgttcatgg ctgccttcga cggcagacac agccagacac 900
tgaaagccat ggtgcaggcc tggcctttca cctgtctgcc tctgggagtg ctgatgaagg 960
gccagcatct gcacctggaa accttcaagg ccgtgctgga cggcctggat gttctcctgg 1020
ctcaagaggt gaggcctcgg cgttggaaac tgcaggttct ggatctgcgg aagaactctc 1080
accaggattt ctggaccgtt tggtccggca acagagccag cctgtacagc tttcctgaac 1140
ctgaggctgc ccagcccatg accacaaagg ccaaagtgga tggcctgagc acagaggccg 1200
agcagccttt cattcccgtc gaagtgctgg tggacctgtt cctgaaagaa ggagcctgcg 1260
atgagctgtt cagctacctg attgagaagg tggcagccaa gaagaacgtg ctgcggctgt 1320
gctgcaagaa gctgaagatc tttgccatgc ctatgcagga tatcaagatg atcctgaaga 1380
tggtgcagct ggacagcatc gaggacctgg aagtgacctg tacctggaag ctgcccacac 1440
tggccaagtt cagcccttac ctgggacaga tgattaacct gcggaggctg ctgctgtctc 1500
acatccacgc cagctcctac atcagccctg agaaagagga acagtatatc gcccagttca 1560
caagccagtt tctgagcctg cagtgtctgc aggccctgta cgtggacagc ctgttctttc 1620
tgagaggcag gctggatcag ctgctgcggc acgtgatgaa ccctctggaa accctgagca 1680
tcaccaactg tagactgagc gagggcgacg tgatgcacct gtctcagagc ccatctgtgt 1740
ctcagctgag cgtgctgtct ctgtctggcg tgatgctgac cgatgtgagc cctgaacctc 1800
tgcaggcact gctggaaaga gcctccgcta ctctgcagga cctggtgttc gatgagtgcg 1860
gcatcaccga tgaccagctg cttgctctgc tgccaagcct gagccactgt agccagctga 1920
caaccctgtc cttctacggc aacagcatct ccatctctgc cctgcagtct ctcctgcagc 1980
atctgatcgg cctgtccaat ctgacccacg tgctgtaccc tgtgccactg gaaagctacg 2040
aggacatcca cggaaccctg cacctcgaga gactggccta tctgcatgct cggctgagag 2100
aactgctgtg cgaactgggc agacccagca tggtttggct gagcgccaat ccatgtcctc 2160
actgtggcga ccggaccttc tacgaccctg agcctatcct gtgtccttgc ttcatgccca 2220
actaatag 2228

<210> 11
<211> 517
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial sequence)
<220>
<223> 合成ERV-K-env/MEL_03序列
<400> 11

Met Asn Pro Ser Glu Met Gln Arg Lys Ala Pro Pro Arg Arg Arg Arg

1 5 10 15
His Arg Asn Arg Ala Pro Leu Thr His Lys Met Asn Lys Met Val Thr
20 25 30
Ser Glu Glu Gln Met Lys Leu Pro Ser Thr Lys Lys Ala Glu Pro Pro
35 40 45
Thr Trp Ala Gln Leu Lys Lys Leu Thr Gln Leu Ala Thr Lys Tyr Leu
50 55 60
Glu Asn Thr Lys Val Thr Gln Thr Pro Glu Ser Met Leu Leu Ala Ala
65 70 75 80
Leu Met Ile Val Ser Met Val Val Ser Leu Pro Met Pro Ala Gly Ala
85 90 95
Ala Ala Ala Asn Tyr Thr Tyr Trp Ala Tyr Val Pro Phe Pro Pro Met
100 105 110
Ile Arg Ala Val Thr Trp Met Asp Asn Pro Ile Glu Val Tyr Val Asn
115 120 125
Asp Ser Val Trp Val Pro Gly Pro Ile Asp Asp Arg Cys Pro Ala Lys
130 135 140
Pro Glu Glu Glu Gly Met Met Ile Asn Ile Ser Ile Gly Tyr Arg Tyr
145 150 155 160
Pro Pro Ile Cys Leu Gly Arg Ala Pro Gly Cys Leu Met Pro Ala Val
165 170 175
Gln Asn Trp Leu Val Glu Val Pro Thr Val Ser Pro Ile Ser Arg Phe
180 185 190
Thr Tyr His Met Val Ser Gly Met Ser Leu Arg Pro Arg Val Asn Tyr
195 200 205
Leu Gln Asp Phe Ser Tyr Gln Arg Ser Leu Lys Phe Arg Pro Lys Gly
210 215 220
Lys Pro Cys Pro Lys Glu Ile Pro Lys Glu Ser Lys Asn Thr Glu Val
225 230 235 240
Leu Val Trp Glu Glu Cys Val Ala Asn Ser Ala Val Ile Leu Gln Asn
245 250 255
Asn Glu Phe Gly Thr Ile Ile Asp Trp Ala Pro Arg Gly Gln Phe Tyr
260 265 270
His Asn Cys Ser Gly Gln Thr Gln Ser Cys Pro Ser Ala Gln Val Ser
275 280 285
Pro Ala Val Asp Ser Asp Leu Thr Glu Ser Leu Asp Lys His Lys His
290 295 300
Lys Lys Leu Gln Ser Phe Tyr Pro Trp Glu Trp Gly Glu Lys Gly Ile
305 310 315 320

Ser Thr Pro Arg Pro Lys Ile Ile Ser Pro Val Ser Gly Pro Glu His
325 330 335
Pro Glu Leu Trp Arg Leu Thr Val Ala Ser His His Ile Arg Ile Trp
340 345 350
Ser Gly Asn Gln Thr Leu Glu Thr Arg Asp Arg Lys Pro Phe Tyr Thr
355 360 365
Val Asp Leu Asn Ser Ser Leu Thr Val Pro Leu Gln Ser Cys Val Lys
370 375 380
Pro Pro Tyr Met Leu Val Val Gly Asn Ile Val Ile Lys Pro Asp Ser
385 390 395 400
Gln Thr Ile Thr Cys Glu Asn Cys Arg Leu Leu Thr Cys Ile Asp Ser
405 410 415
Thr Phe Asn Trp Gln His Arg Ile Leu Leu Val Arg Ala Arg Glu Gly
420 425 430
Val Trp Ile Pro Val Ser Met Asp Arg Pro Trp Glu Ala Ser Pro Ser
435 440 445
Val His Ile Leu Thr Glu Val Leu Lys Gly Val Leu Asn Met Leu Ala
450 455 460
Val Ile Ser Cys Ala Val Ala Gly Val Ala Leu His Gly Ser Ala Gly
465 470 475 480
Ser Ala Ala Gly Ser Gly Glu Phe Val Val Ile Ser Ala Ile Leu Ala
485 490 495
Leu Val Val Leu Thr Ile Ile Ser Leu Ile Ile Leu Ile Met Leu Trp
500 505 510
Gln Lys Lys Pro Arg
515

<210> 12
<211> 1557
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial sequence)
<220>
<223> ERV-K-env/MEL_03核苷酸序列
<400> 12

atgaacccta gcgagatgca gagaaaggct ccacctagac ggagaagaca cagaaacagg 60
gctcctctga cacacaagat gaacaagatg gtcaccagcg aggaacagat gaaactgccc 120
agcaccaaga aggccgagcc tccaacatgg gctcagctga agaaactgac ccagctggcc 180
accaagtacc tggagaacac caaagtgacc cagacacctg agagcatgct gctggcagct 240
ctgatgatcg tgtccatggt ggtgtccctg cctatgcctg ctggtgctgc cgctgccaac 300
tacacatact gggcctacgt gccctttcct cctatgatca gagccgtgac ctggatggac 360

aaccctattg aggtgtacgt gaacgacagc gtgtgggtgc caggacctat cgacgataga 420
tgtcctgcca aacctgagga agagggcatg atgatcaaca tcagcatcgg ctaccggtat 480
cctccaatct gcctgggcag agcacctggc tgtcttatgc cagctgtgca gaattggctg 540
gtggaagtgc ctaccgtgtc tcccatcagc cggttcacct accacatggt gtccggcatg 600
agcctcagac ctagagtgaa ctacttgcag gacttcagct atcagcggag cctgaagttc 660
agacccaagg gaaagccctg tcctaaagag attcccaaag agtccaagaa caccgaggtg 720
ctcgtgtggg aagagtgcgt ggccaattct gccgtgatcc tgcagaacaa cgagttcggc 780
accatcattg actgggctcc tagaggccag ttctaccaca attgcagcgg acagacacag 840
agctgtccta gcgcacaagt gtcaccagcc gtggatagcg atctgaccga gagcctggac 900
aagcacaaac acaagaaact tcagagcttc tatccctggg agtggggaga gaagggcatc 960
tctacaccaa ggcctaagat cattagccct gtgtctggac cagaacatcc cgaactttgg 1020
agactgacag tggccagcca ccacatcaga atctggagcg gcaatcagac cctggaaaca 1080
cgggacagaa agcccttcta caccgtcgat ctgaacagca gcctgaccgt gcctctccag 1140
agctgtgtga agcctcctta catgctggtc gtgggcaaca ttgtgatcaa gcccgactcc 1200
cagaccatca catgcgagaa ctgcagactg ctgacctgca tcgacagcac cttcaactgg 1260
cagcaccgga tcctgctcgt gcgagctaga gaaggcgtgt ggatccctgt ctctatggac 1320
aggccttggg aagccagccc tagcgtgcac attctgacag aggtgctgaa gggcgtgctc 1380
aacatgctgg ccgtgatctc ctgtgccgtg gctggcgtgg ccctgcatgg ctctgctgga 1440
tctgctgctg gaagcggcga gttcgtggtc atctctgcca ttctggctct ggtggtgctg 1500
accatcatca gcctgatcat cctgattatg ctgtggcaga agaagccccg gtgataa 1557

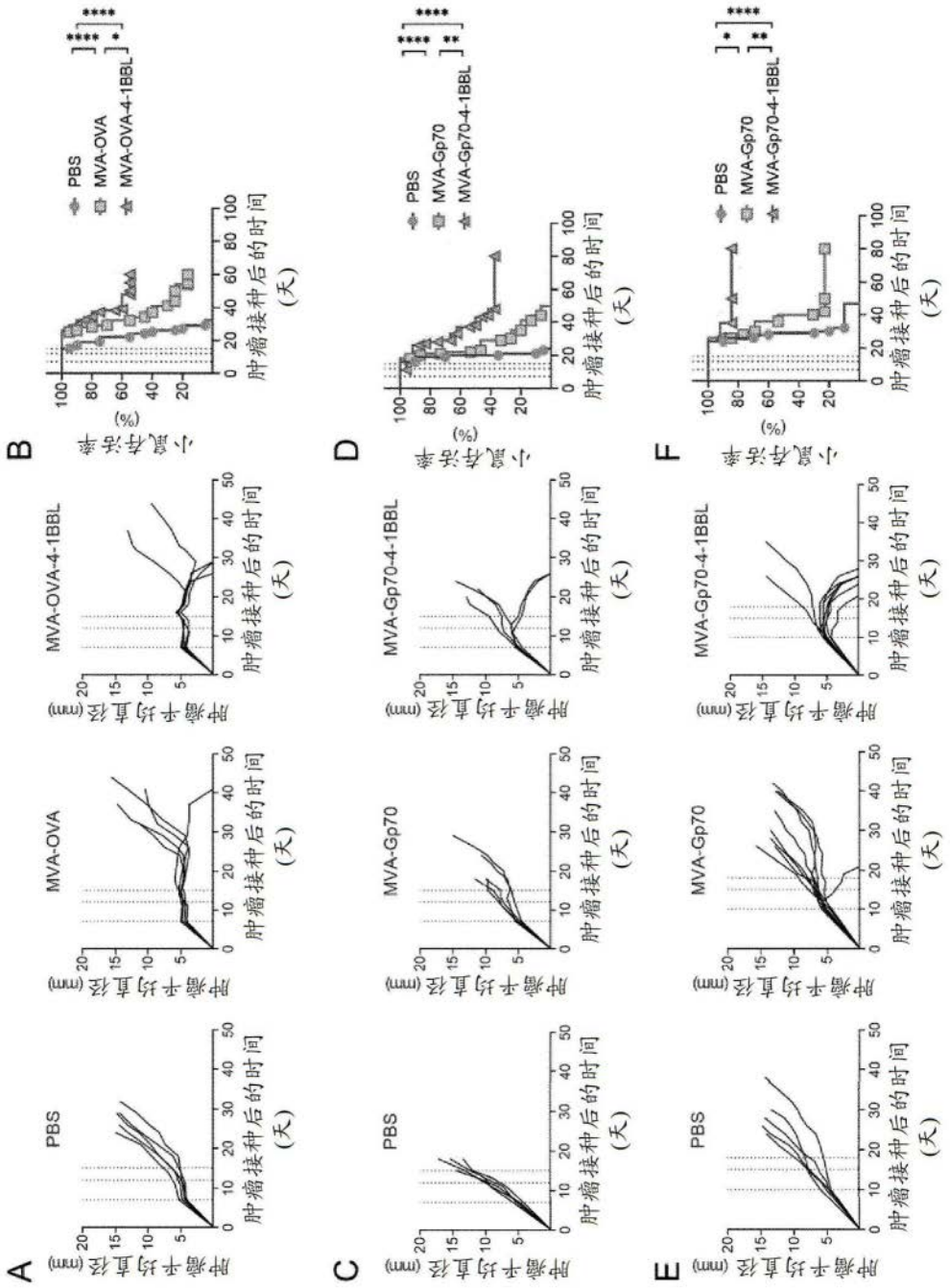

A
PBS
肿瘤平均直径 (mm)
肿瘤接种后的时间 (天)
B
小鼠存活率 (%)
PBS
MVA-OVA
MVA-OVA-4-1BBL
肿瘤接种后的时间 (天)
C
MVA-OVA
D
MVA-Gp70
MVA-Gp70-4-1BBL
E
MVA-OVA-4-1BBL
F

图1

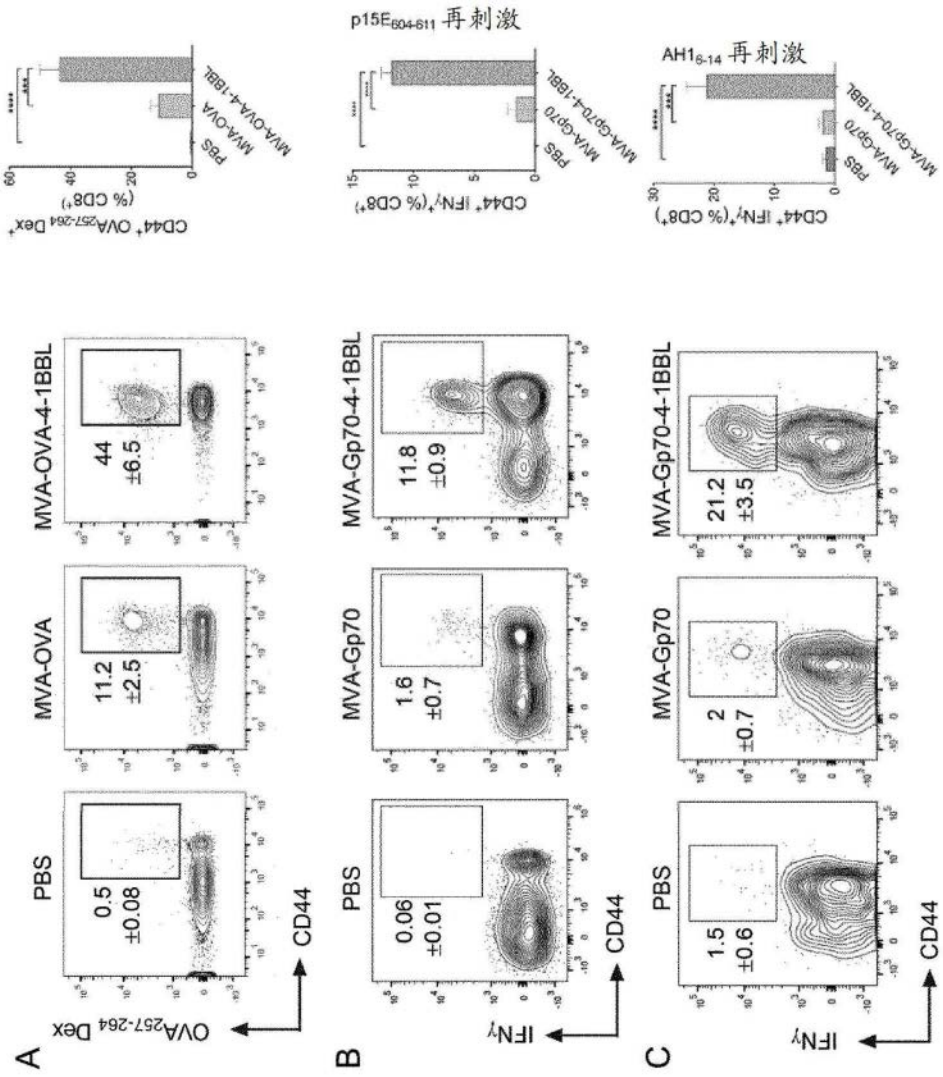

A
B
C
PBS
MVA-OVA
MVA-OVA-4-1BBL
MVA-Gp70
MVA-Gp70-4-1BBL
CD44
IFNγ
OVA257-264 Dex
0.5 ±0.08
11.2 ±2.5
44 ±6.5
0.06 ±0.01
1.6 ±0.7
11.8 ±0.9
1.5 ±0.6
2 ±0.7
21.2 ±3.5
p15E604-611 再刺激
AH1 6-14 再刺激
CD44+ IFNγ+(% CD8+)
CD44+ OVA257-264 Dex+ (% CD8+)

图2A-C

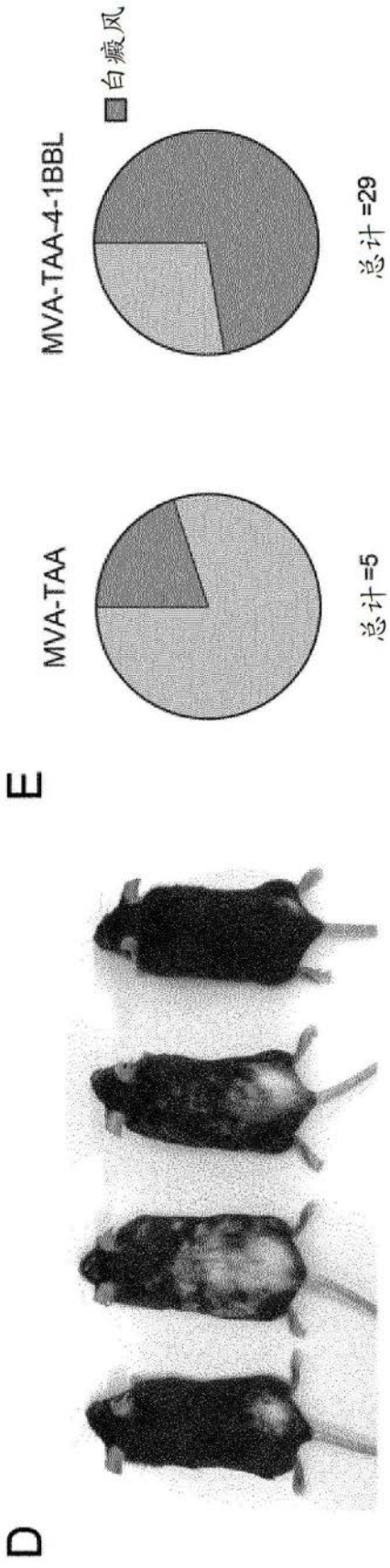


图2D-E

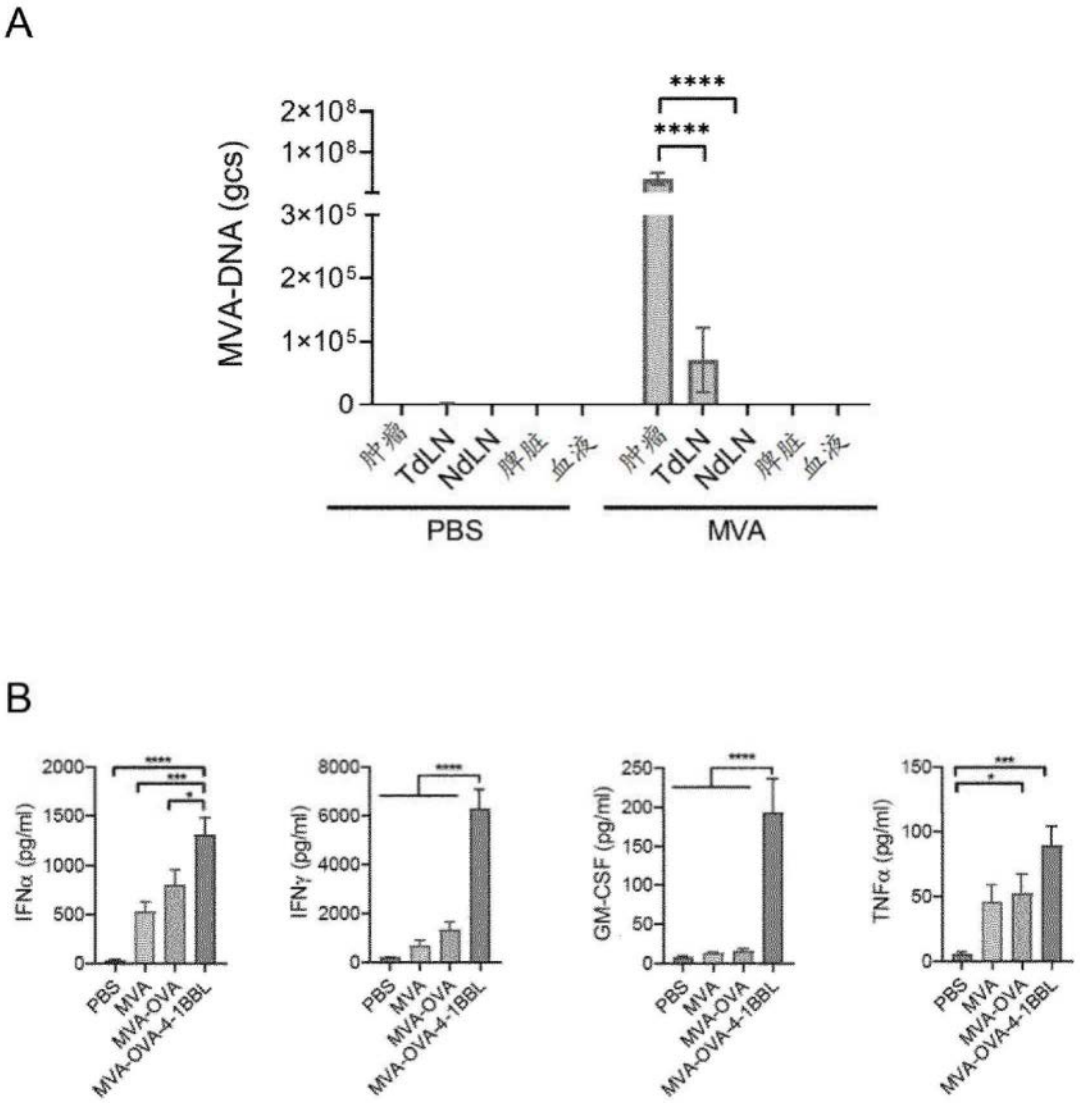

A
MVA-DNA (gcs)
2×10^8
1×10^8
3×10^5
2×10^5
1×10^5
0
****
****
肿瘤
TdLN
NdLN
脾脏
血液
肿瘤
TdLN
NdLN
脾脏
血液
PBS
MVA
B
IFNα (pg/ml)
IFNγ (pg/ml)
GM-CSF (pg/ml)
TNFα (pg/ml)
PBS
MVA
MVA-OVA
MVA-OVA-4-1BBL

图3

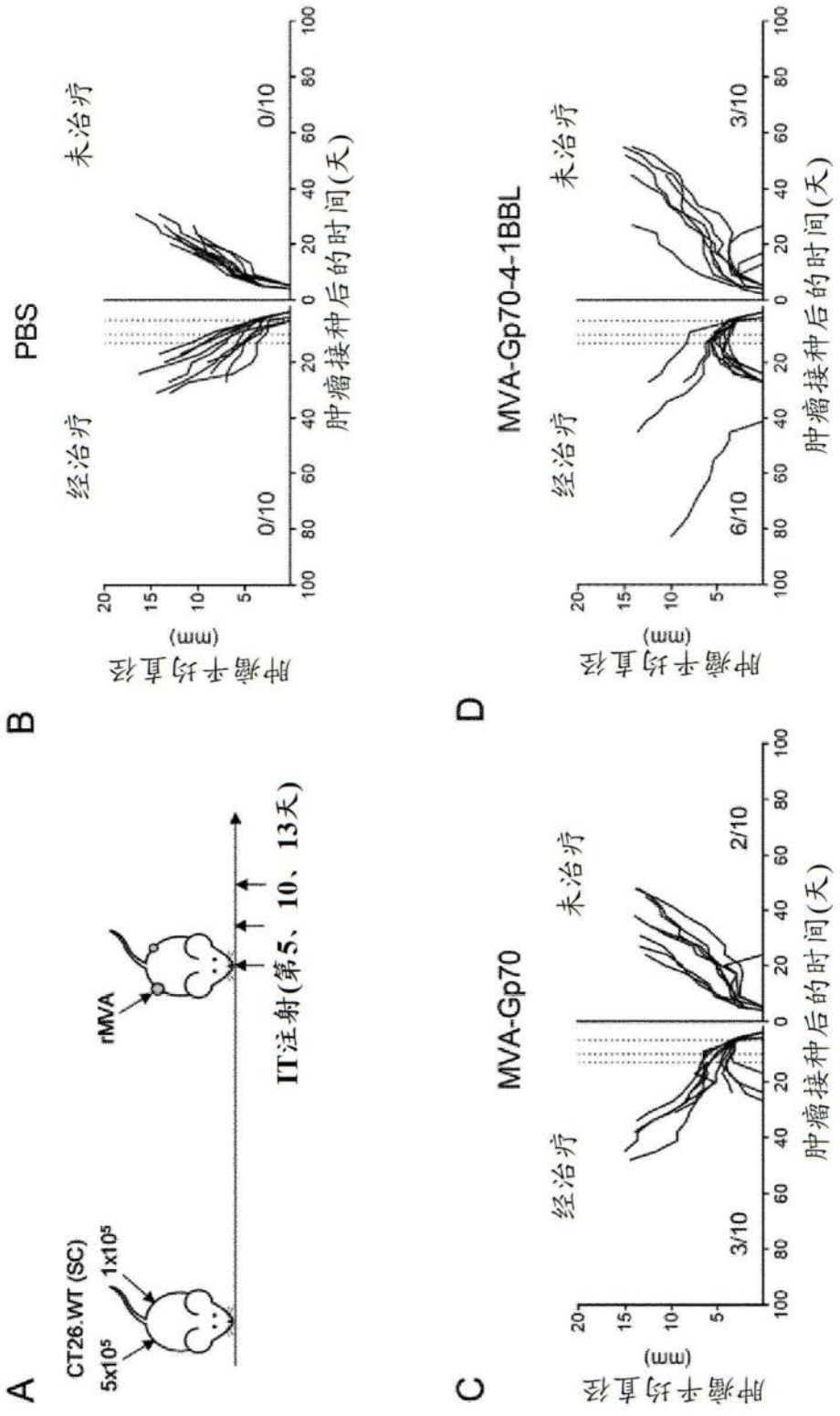

A
CT26.WT (SC)
5x10⁵
1x10⁵
rMVA
IT注射(第5、10、13天)
B
PBS
经治疗
未治疗
0/10
0/10
肿瘤平均直径(mm)
肿瘤接种后的时间(天)
C
MVA-Gp70
经治疗
未治疗
3/10
2/10
肿瘤平均直径(mm)
肿瘤接种后的时间(天)
D
MVA-Gp70-4-1BBL
经治疗
未治疗
6/10
3/10
肿瘤平均直径(mm)
肿瘤接种后的时间(天)

图4

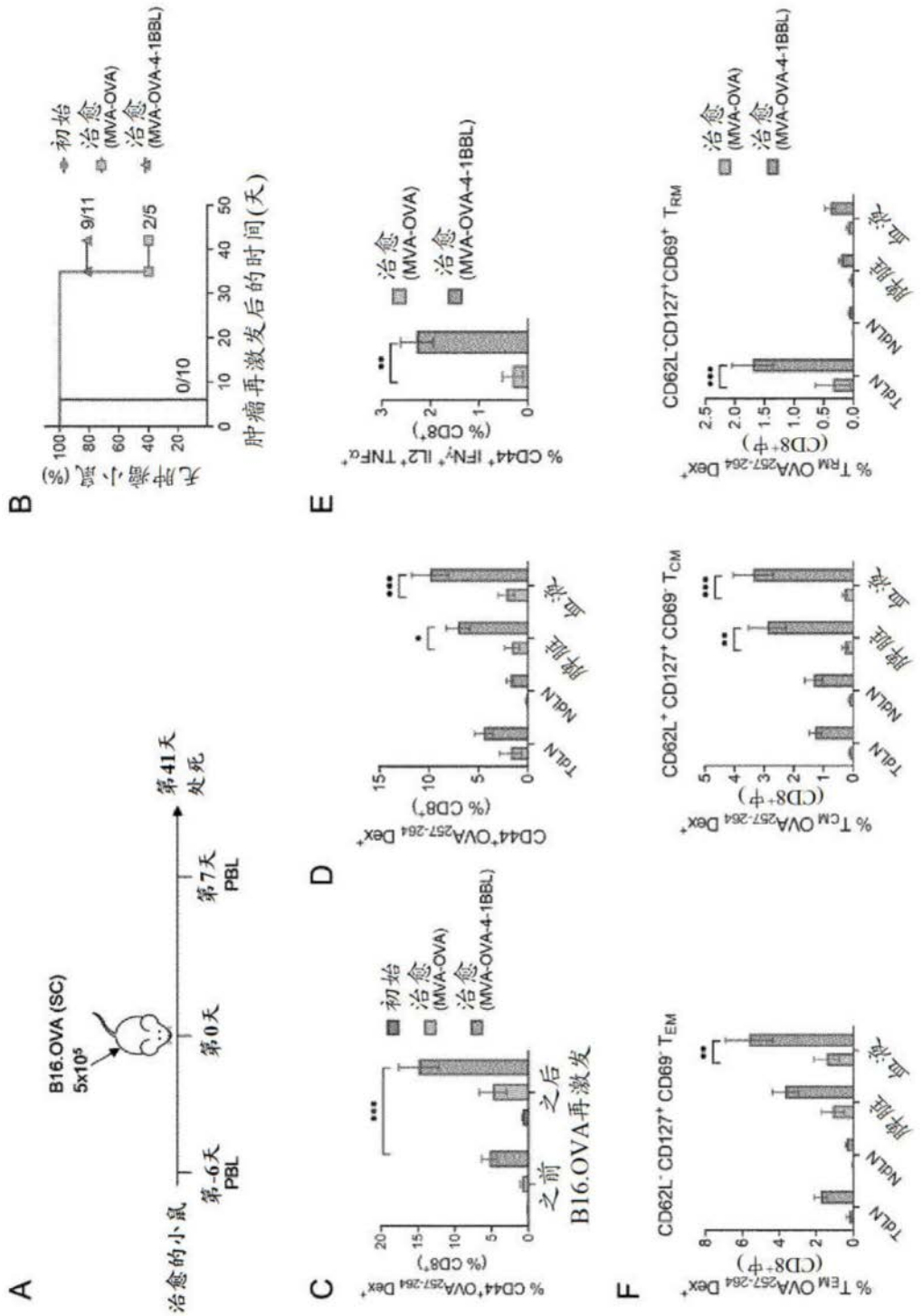

A
治愈的小鼠
B16.OVA (SC)
5x10^5
第-6天
PBL
第0天
第7天
PBL
第41天
处死
B
肿瘤再激发后的时间(天)
无肿瘤小鼠 (%)
初始
治愈 (MVA-OVA)
治愈 (MVA-OVA-4-1BBL)
9/11
2/5
0/10
C
之前
之后
B16.OVA再激发
% CD44+OVA257-264 Dex+
(% CD8+)
D
CD44+OVA257-264 Dex+
(% CD8+)
E
% CD44+ IFNγ+ IL2+ TNFα+
(% CD8+)
F
CD62L- CD127+ CD69- TEM
CD62L+ CD127+ CD69- TCM
CD62L- CD127+ CD69+ TRM
% TEM OVA257-264 Dex+ (CD8+中)
% TCM OVA257-264 Dex+ (CD8+中)
% TRM OVA257-264 Dex+ (CD8+中)
tdLN
NdLN
脾脏
血液

图5A-F

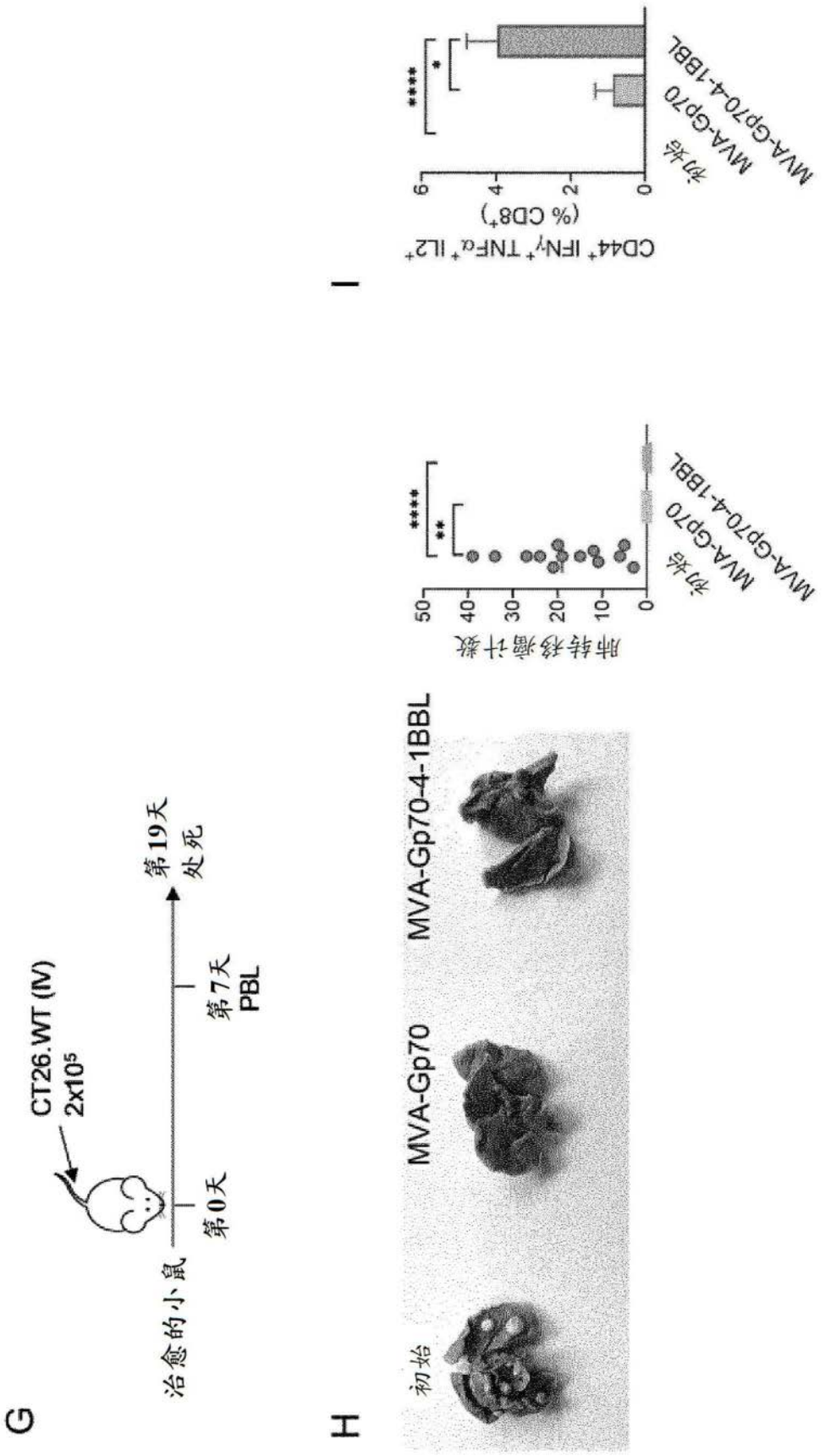

G
治愈的小鼠
CT26.WT (M)
2x10⁵
第0天
第7天
PBL
第19天
处死
H
初始
MVA-Gp70
MVA-Gp70-4-1BBL
肺转移瘤计数
初始
MVA-GP70
MVA-GP70-4-1BBL
I
CD44⁺ IFNγ⁺ TNFα⁺ IL2⁺
(% CD8⁺)
初始
MVA-GP70
MVA-GP70-4-1BBL

图5G-I

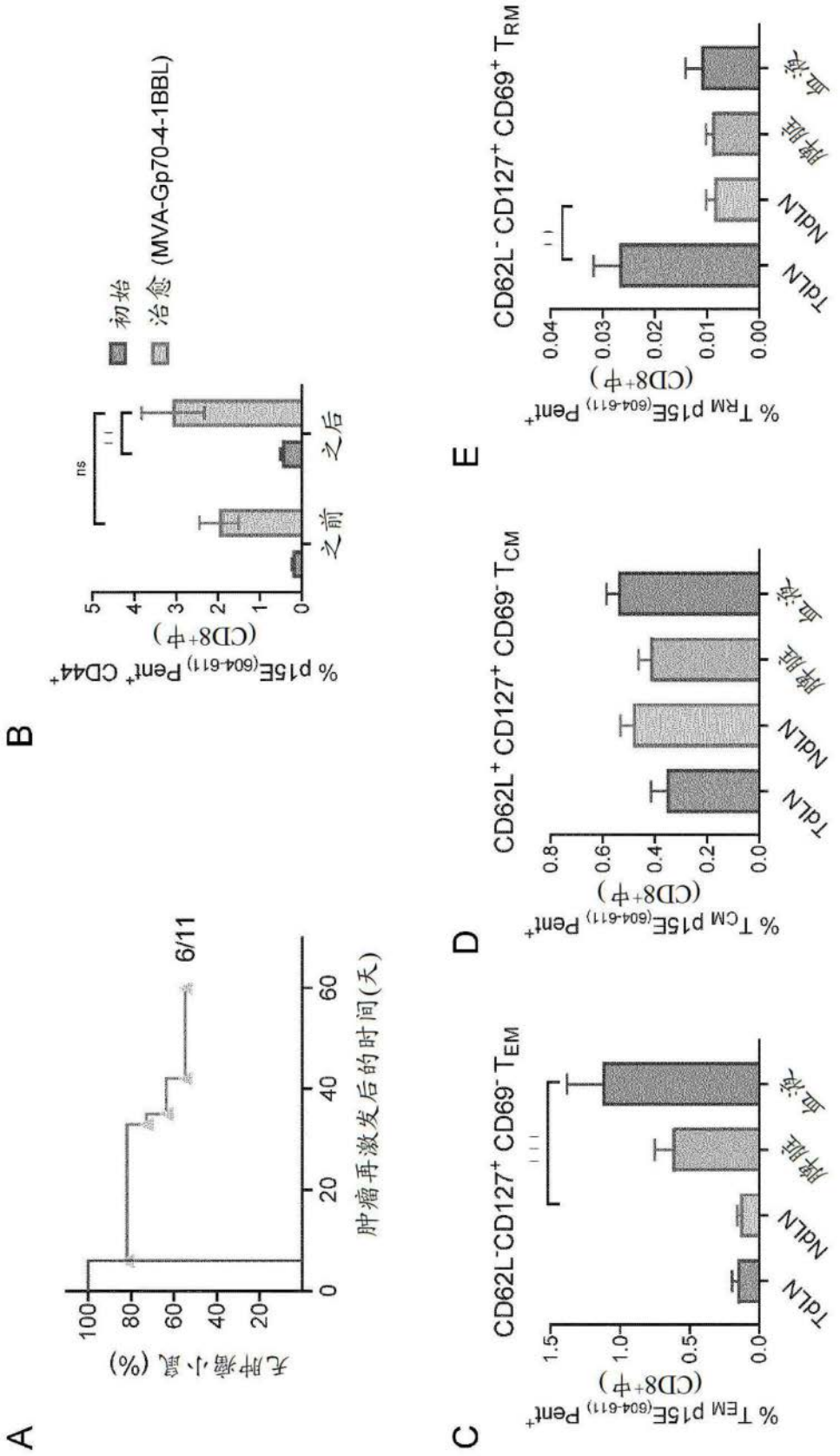

A
无肿瘤小鼠 (%)
肿瘤再激发后的时间(天)
6/11
B
初始
治愈 (MVA-Gp70-4-1BBL)
之前
之后
ns
C
D
E
TdLN
NdLN
脾脏
血液

图6

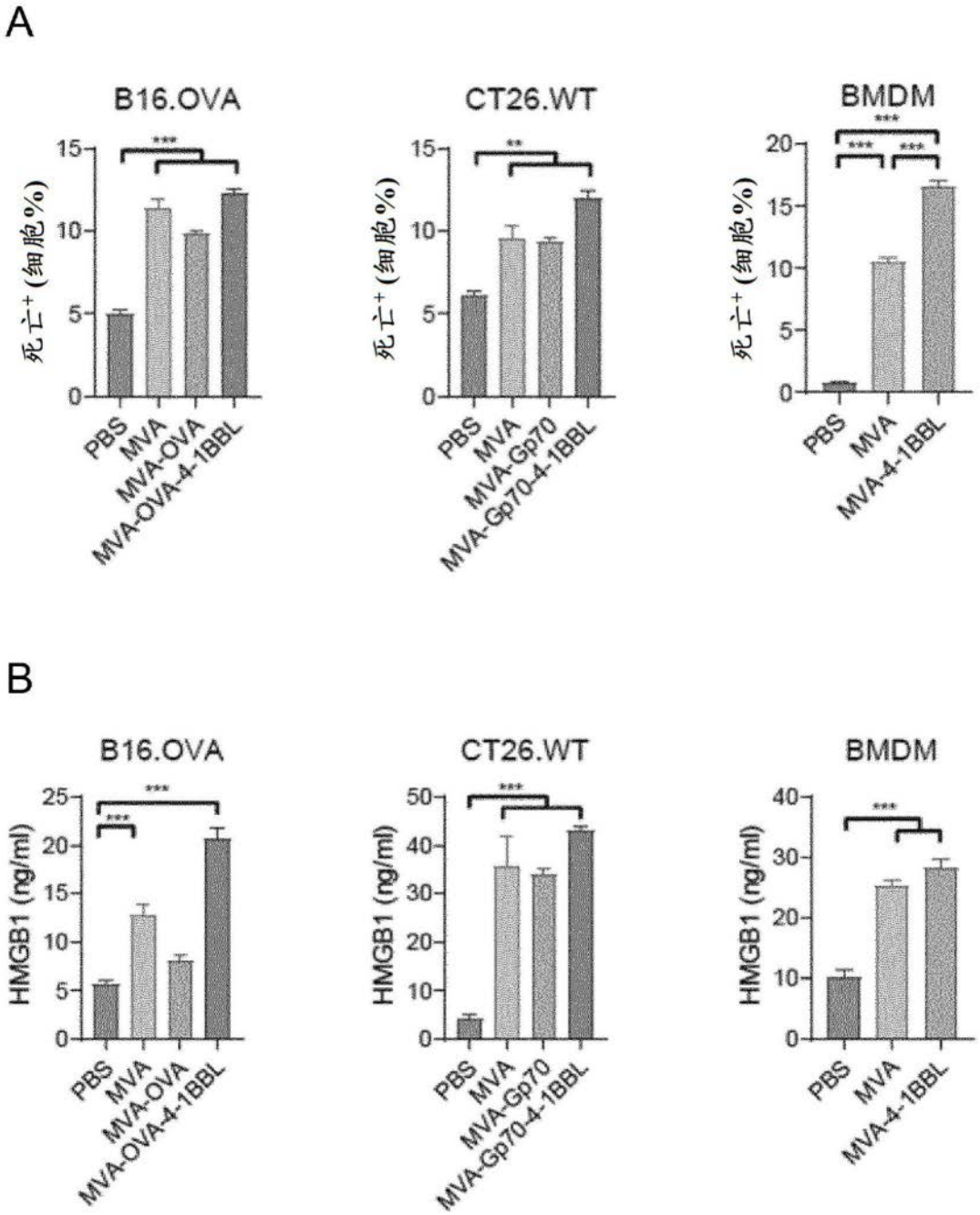
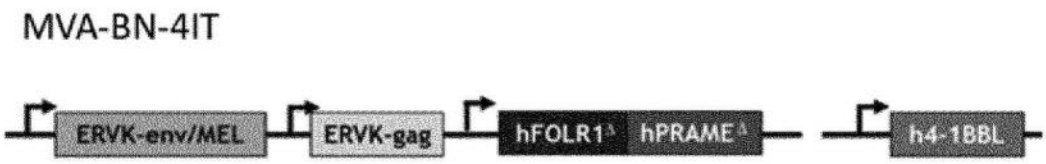
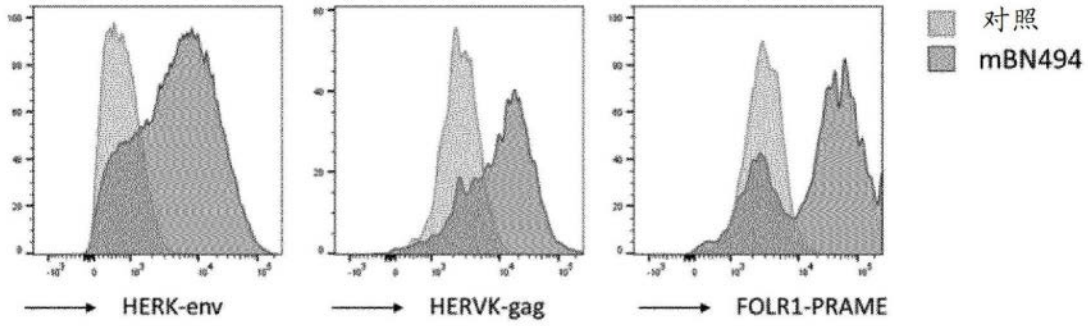

A
B16.OVA
CT26.WT
BMDM
死亡+(细胞%)
PBS
MVA
MVA-OVA
MVA-OVA-4-1BBL
MVA-Gp70
MVA-Gp70-4-1BBL
MVA-4-1BBL
B
HMGB1 (ng/ml)

图7

A


MVA-BN-4IT
ERVK-env/MEL
ERVK-gag
hFOLR1Δ
hPRAMEΔ
h4-1BBL

B


对照
mBN494
HERK-env
HERVK-gag
FOLR1-PRAME

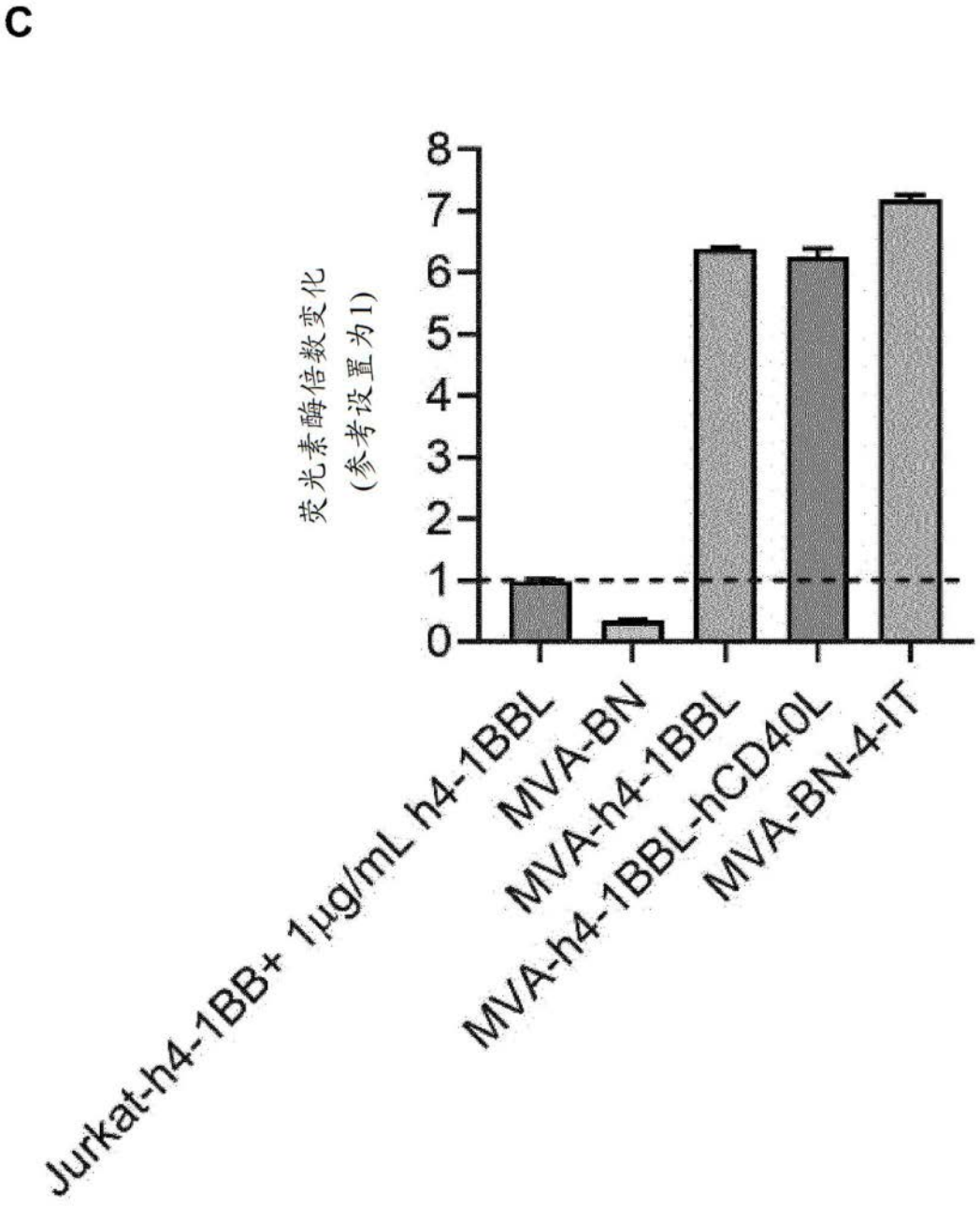

C
荧光素酶倍数变化
(参考设置为1)
0
1
2
3
4
5
6
7
8
Jurkat-h4-1BB+ 1μg/mL h4-1BBL
MVA-BN
MVA-h4-1BBL
MVA-h4-1BBL-hCD40L
MVA-BN-4-IT

图8

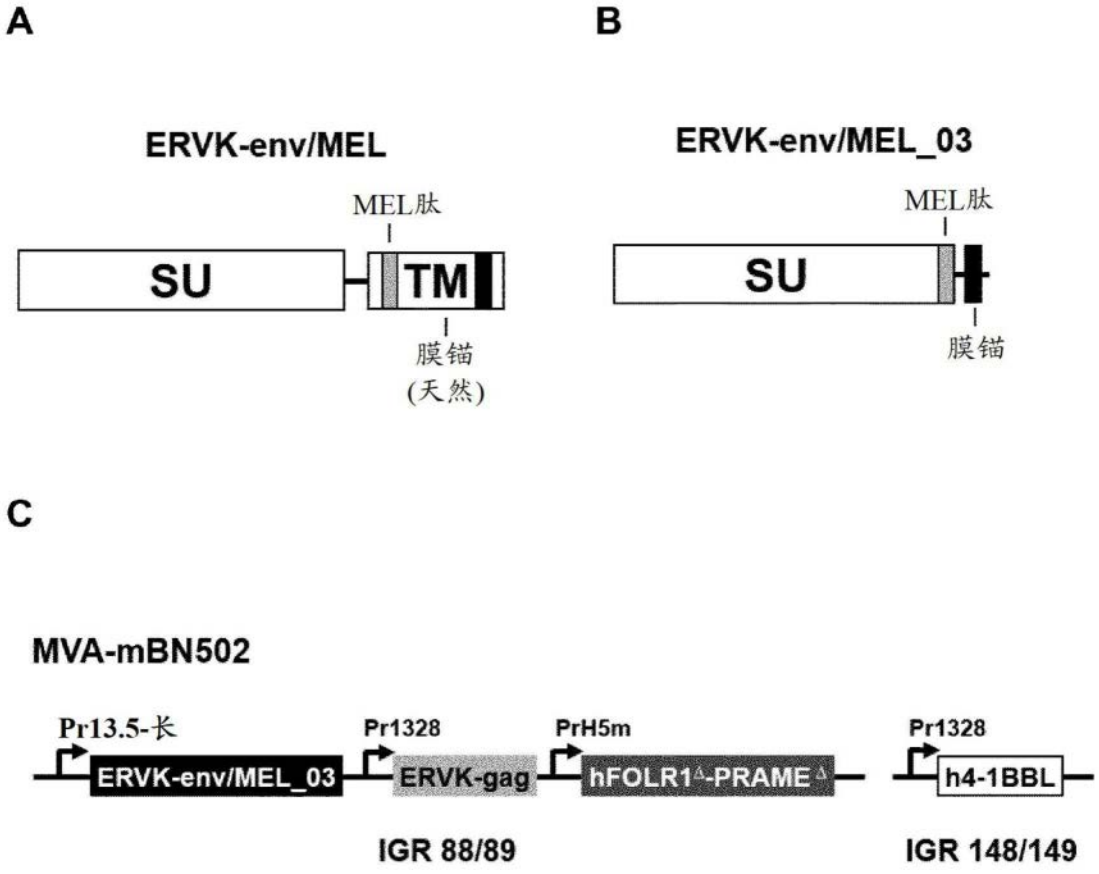

A
ERVK-env/MEL
MEL肽
SU
TM
膜锚
(天然)
B
ERVK-env/MEL_03
MEL肽
SU
膜锚
C
MVA-mBN502
Pr13.5-长
ERVK-env/MEL_03
Pr1328
ERVK-gag
PrH5m
hFOLR1Δ-PRAMEΔ
Pr1328
h4-1BBL
IGR 88/89
IGR 148/149

图9