(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109890957 A
(43)申请公布日 2019.06.14

(21)申请号 201780056649.7

(22)申请日 2017.09.06

(30)优先权数据
1616365.1 2016.09.27 GB

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2019.03.14

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2017/072366 2017.09.06

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2018/059896 EN 2018.04.05

(71)申请人 瓦洛治疗公司
地址 芬兰赫尔辛基

(72)发明人 文森佐·史汝乐
克里斯蒂安·卡帕索
埃尔科·耶洛玛基

(74)专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理有限责任公司 11204
代理人 王达佐 洪欣

(51)Int.Cl.
C12N 7/00(2006.01)
A61K 39/00(2006.01)

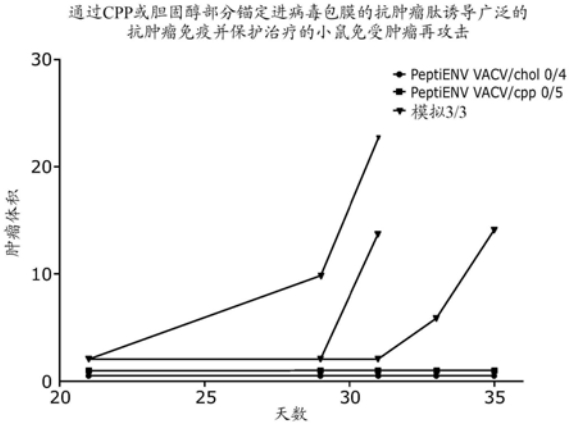
权利要求书3页 说明书10页
序列表14页 附图15页

(54)发明名称

非遗传修饰的包膜病毒

(57)摘要

本发明涉及修饰的包膜病毒，其中所述病毒包含至少一种非遗传地连接至或者插入/穿过所述病毒包膜的抗肿瘤、肿瘤特异性肽；包含所述病毒的药物组合物；以及利用所述病毒治疗癌症的方法。



CN 109890957 A

1.修饰的包膜病毒，其选自包括以下的组：单纯疱疹病毒1(HSV-1)、单纯疱疹病毒2(HSV-2)、牛痘病毒、印第安纳型水疱性口炎病毒(VSV)、麻疹病毒(MeV)、马拉巴病毒和新城疫(NDV)病毒，其中所述病毒包含至少一种非遗传地连接至或者插入/穿过病毒包膜的抗肿瘤、肿瘤特异性肽。

2.根据权利要求1所述的修饰的包膜病毒，其中所述肽具有选自包括以下长度的组：8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49以及50个氨基酸。

3.根据权利要求1或2所述的修饰的包膜病毒，其中多种所述肽非遗传地连接至或插入/穿过所述病毒包膜。

4.根据权利要求3所述的修饰的包膜病毒，其中所述肽是相同的；所述肽彼此之间具有大于90％、91％、92％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％的序列同一性；或者所述肽代表多种不同的抗原。

5.根据前述权利要求中任一项所述的修饰的包膜病毒，其中所述肽是MHC-I限制性的。

6.根据前述权利要求中任一项所述的修饰的包膜病毒，其中所述肽是MHC-II限制性的。

7.根据权利要求3-6中任一项所述的修饰的包膜病毒，其中所述肽包含MHC-I限制性肽和MHC-II限制性肽的混合物。

8.根据前述权利要求中任一项所述的修饰的包膜病毒，其中所述肽包含含有多种不同抗原的融合分子。

9.根据权利要求1-8中任一项所述的修饰的包膜病毒，其中所述肽还包含至少一个切割位点。

10.根据权利要求1-9中任一项所述的修饰的包膜病毒，其中所述肽还包含至少一个免疫蛋白酶体加工位点。

11.根据权利要求1-10中任一项所述的修饰的包膜病毒，其中所述肽位于一对免疫蛋白酶体加工位点之间，并且其上游或下游是至少一个切割位点。

12.根据前述权利要求中任一项所述的修饰的包膜病毒，其中所述肽非共价连接至或插入/穿过所述病毒包膜。

13.根据前述权利要求中任一项的修饰的包膜病毒，其中使用细胞穿透肽或胆固醇缀合肽将所述肽非遗传地连接至或插入/穿过所述病毒包膜。

14.根据前述权利要求中任一项所述的修饰的包膜病毒，其中使用选自包括以下的组的细胞穿透肽或胆固醇缀合肽将所述肽非遗传地连接至或插入/穿过所述病毒包膜：

GRKKRRQRRRPQ(SEQ ID NO:1)，CPP序列位于所述抗肿瘤、肿瘤特异性肽的N或C末端；

RQIKIWFQNRRMKWKK(SEQ ID NO:2)，CPP序列位于所述抗肿瘤、肿瘤特异性肽的N或C末端；

KLALKLALKALKAALKLA(SEQ ID NO:3)，CPP序列位于所述抗肿瘤、肿瘤特异性肽的N或C末端；

RRRRRRRRR(SEQ ID NO:4)，CPP序列位于所述抗肿瘤、肿瘤特异性肽的N或C末端；

KETWWETWWTEWSQPKKKRKV(SEQ ID NO:5)，CPP序列位于所述抗肿瘤、肿瘤特异性肽的N或C末端；

AGYLLGKINLKALAALAKKIL(SEQ ID NO:6),CPP序列位于所述抗肿瘤、肿瘤特异性肽的N或C末端;

AGLWRALWRLLRSLWRLLWRA(SEQ ID NO:7),CPP序列位于所述抗肿瘤、肿瘤特异性肽的N或C末端;以及

胆固醇部分位于所述抗肿瘤、肿瘤特异性肽的N或C末端。

15.根据权利要求14所述的修饰的包膜病毒,其中所述肽选自包括以下的组:

GRKKRRQRRRPQRVRRALISLEQLESIINFEKLTEW(SEQ ID NO:8);

RQIKIWFQNRRMKWKKRWEKISIINFEKLYKLK(SEQ ID NO:9);

KLALKLALKALKAALKLARWEKISIINFEKLYKLK(SEQ ID NO:10);

RRRRRRRRRRWEKISIINFEKLYKLK(SEQ ID NO:11);

RWEKISIINFEKLYKLRRRRRRRRR(SEQ ID NO:12);

RWEKISIINFEKLYKLKETWWETWWTEWSQPKKKRKV(SEQ ID NO:13);

RWEKISIINFEKLYKLAGYLLGKINLKALAALAKKIL(SEQ ID NO:14);

AGLWRALWRLLRSLWRLLWRA RWEKISIINFEKLYKLK(SEQ ID NO:15);

GRKKRRQRRRPQRWEKISIINFEKLYKL(SEQ ID NO:16);

GRKKRRQRRRPQRWEKISIINFEKL(SEQ ID NO:17);

GRKKRRQRRRPQRWEKISIINFEKLYKLRWEKISIINFEKL(SEQ ID NO:18);

LEQLESIINFEKLTEWRVRRALISC-胆固醇(SEQ ID NO:19);

胆固醇-CRVRRALISLEQLESIINFEKLTEW(SEQ ID NO:20);

胆固醇-CSIINFEKL(SEQ ID NO:21);

胆固醇-CRWEKISIINFEKL(SEQ ID NO:22);

胆固醇-CRWEKISVYDFFVWLYKLRWEKISIINFEKL(SEQ ID NO:23);

GRKKRRQRRRPQRVRRALISLEQLESIINFEKLTEW-FITC(SEQ ID NO:24);

RQIKIWFQNRRMKWKKRWEKISIINFEKLYKLK-FITC(SEQ ID NO:25);

KLALKLALKALKAALKLARWEKISIINFEKLYKLK-FITC(SEQ ID NO:26);

RRRRRRRRRRWEKISIINFEKLYKLK-FITC(SEQ ID NO:27);

FITC-RWEKISIINFEKLYKLRRRRRRRRR(SEQ ID NO:28);

FITC-RWEKISIINFEKLYKLKETWWETWWTEWSQPKKKRKV(SEQ ID NO:29);

FITC-RWEKISIINFEKLYKLAGYLLGKINLKALAALAKKIL(SEQ ID NO:30);以及

GLWRALWRLLRSLWRLLWRARWEKISIINFEKLYKLK-FITC(SEQ ID NO:31)。

16.根据前述权利要求中任一项所述的修饰的包膜病毒,其中提供选自包括以下的组的不同的非遗传修饰的包膜病毒的组合:单纯疱疹病毒1(HSV-1)、单纯疱疹病毒2(HSV-2)、牛痘病毒、印第安纳型水疱性口炎病毒(VSV)、麻疹病毒(MeV)、马拉巴病毒和新城疫(NDV)病毒。

17.根据权利要求16所述的修饰的包膜病毒,其中所述组合包含任意2、3、4、5、6或7种前述病毒,其被修饰以包含至少一种非遗传地连接至或插入/穿过所述病毒的病毒包膜的抗肿瘤、肿瘤特异性肽。

18.药物组合物,其包含:根据权利要求1-17中任一项所述的修饰的包膜病毒和合适的载体。

19.治疗癌症的方法，其包括：将个体暴露于选自包括以下的组的修饰的包膜病毒：单纯疱疹病毒1(HSV-1)、单纯疱疹病毒2(HSV-2)、牛痘病毒、印第安纳型水疱性口炎病毒(VSV)、麻疹病毒(MeV)、马拉巴病毒和新城疫(NDV)病毒，其中所述病毒具有至少一种非遗传地连接至或插入/穿过所述病毒包膜的抗肿瘤、肿瘤特异性肽。

20.根据权利要求19所述的方法，其中所述方法包括：在选定时间段之后，将所述个体暴露于选自包括以下的组的另一修饰的包膜病毒：单纯疱疹病毒1(HSV-1)、单纯疱疹病毒2(HSV-2)、牛痘病毒、印第安纳型水疱性口炎病毒(VSV)、麻疹病毒(MeV)、马拉巴病毒和新城疫(NDV)病毒，其中所述病毒具有至少一种非遗传地连接至或插入/穿过所述病毒包膜的抗肿瘤、肿瘤特异性肽，并且其中所述病毒不同于用于在先暴露的病毒。

21.根据权利要求20所述的方法，其中所述另一修饰的包膜病毒用与第一修饰的包膜病毒相同的肽或相同的肽的大部分进行包被。

22.根据权利要求19-21中任一项所述的方法，其中在暴露于所述一种或多种病毒后，将所述个体进一步暴露于检查点抑制剂。

23.治疗癌症的方法，其包括：将个体暴露于表达至少一种抗肿瘤、肿瘤特异性肽的修饰的病毒，然后在选定时间段之后，将所述个体暴露于选自以下的组的的包膜病毒：单纯疱疹病毒1(HSV-1)、单纯疱疹病毒2(HSV-2)、牛痘病毒、印第安纳型水疱性口炎病毒(VSV)、麻疹病毒(MeV)、马拉巴病毒和新城疫(NDV)病毒，其中所述病毒具有非遗传地连接至或插入/穿过所述病毒包膜的与所述肽相同的肽或相同的肽的大部分。

24.根据权利要求23所述的方法，其中在将个体暴露于表达至少一种抗肿瘤、肿瘤特异性肽的修饰的病毒之后或者在将所述个体暴露于选自包括以下的组的包膜病毒之后将所述个体暴露于检查点抑制剂：单纯疱疹病毒1(HSV-1)、单纯疱疹病毒2(HSV-2)、牛痘病毒、印第安纳型水疱性口炎病毒(VSV)、麻疹病毒(MeV)、马拉巴病毒和新城疫(NDV)病毒，其中所述病毒具有非遗传地连接至或插入/穿过所述病毒包膜的与所述肽相同的肽或相同的肽的大部分。

25.基本上如本文所述的根据权利要求1-17所述的修饰的包膜病毒、根据权利要求18所述的药物组合物以及根据权利要求19-24所述的方法。

非遗传修饰的包膜病毒

发明领域

[0001] 本发明涉及修饰的包膜病毒，其中所述病毒包含至少一种非遗传地连接至或插入/穿过所述病毒包膜的抗肿瘤、肿瘤特异性肽；包含所述病毒的药物组合物；以及使用所述病毒治疗癌症的方法。

[0002] 发明背景

[0003] 当前用于有效癌症治疗的范例是增强肿瘤浸润性肿瘤特异性T效应细胞的活性以及增加它的量。这些被称为CD8+T细胞的T效应细胞，特别是细胞毒性T细胞淋巴细胞(CTL)是针对肿瘤的保护性免疫应答的关键组分。这些肿瘤特异性CTL存在于肿瘤组织，并且肿瘤浸润性CTL的量与患者存活率之间存在明显的相关性。

[0004] 最近批准的靶向诸如PD-1、PD-L1和CTLA-4的免疫检查点分子的抗体在临床上已极大的令人兴奋，其功能是中断肿瘤微环境中的负反馈系统以增强在先存在的抗肿瘤免疫应答。使用这些免疫检查点抑制剂抗体可在10-20％的癌症患者中产生持久的应答。然而，由于缺乏抗肿瘤免疫应答或者肿瘤微环境方面的其他免疫抑制，其余80-90％的患者无应答。为了扩大响应检查点抑制剂疗法的患者群体，我们开发了名为PeptiENV的包膜病毒载体平台，用于增强或产生广泛的抗肿瘤免疫并将肿瘤特异性T效应细胞招募到肿瘤微环境中。

[0005] 有利地，通过用免疫刺激性PeptiENV病毒和免疫检查点抑制剂抗体的组合治疗患者，我们期望增加免疫检查点抑制剂疗法的应答者数量。

[0006] 本专利申请描述了PeptiENV平台，其包括以下新方法：将免疫调节肽包被并插入病毒包膜上，接着可以容易地在抗原呈递细胞上交叉呈递。目前，没有以激活免疫系统为目的将肽非遗传地连接至病毒包膜上的方法。WO2005/060541教导了被插入至病毒外壳中以干扰病毒膜并破坏病毒膜的抗病毒肽。

[0007] 一些病毒具有覆盖其保护性蛋白质衣壳的病毒包膜。包膜通常来源自宿主细胞膜的部分(磷脂和蛋白质)，但包括一些病毒糖蛋白。它们可以帮助病毒避开宿主免疫系统。包膜表面的糖蛋白用于鉴定和结合宿主膜上的受体位点。然后病毒包膜与宿主膜融合，允许衣壳和病毒基因组进入并感染宿主。可选地，除了通过病毒和宿主细胞膜的融合进入宿主细胞之外，一些病毒可以使用内吞作为进入机制。

[0008] 实质上，我们已经发现了使用已知的治疗和临床批准的病毒，以抗病毒免疫为代价来增强抗肿瘤免疫的新方法。

发明内容

[0009] 根据第一方面，提供选自下述的修饰的包膜病毒：单纯疱疹病毒1(HSV-1)、单纯疱疹病毒2(HSV-2)、牛痘病毒、印第安纳型水疱性口炎病毒(VSV)、麻疹病毒(MeV)、马拉巴病毒和新城疫(NDV)病毒，其中所述病毒包含至少一种非遗地传连接至或插入/穿过病毒包膜的抗肿瘤、肿瘤特异性肽。

[0010] 本文提到的修饰的包膜病毒是指非遗传修饰以将所述至少一种抗肿瘤、肿瘤特异

性肽包含于其病毒包膜中的病毒。为避免疑义，所述病毒可能包含或不包含使其适于除非遗传性进行将所述至少一种抗肿瘤、肿瘤特异性肽连接至或穿过病毒包膜之外的目的任何其他遗传修饰。

[0011] 本领域技术人员将认识到，一些病毒具有覆盖其保护性蛋白质衣壳的病毒包膜。包膜通常来源于宿主细胞膜的部分(磷脂和蛋白质)，但包括一些病毒糖蛋白。它们可以帮助病毒避开宿主免疫系统。包膜表面的糖蛋白用于鉴定和结合宿主膜上的受体位点。在感染期间，病毒包膜与宿主膜融合，允许衣壳和病毒基因组进入并感染宿主。因此，连接至或插入或穿过病毒包膜的肽可用作抗原以引发免疫应答。

[0012] 本文提及的抗肿瘤肽是指可以引发针对肿瘤的免疫应答的肽。

[0013] 本文提及的肿瘤特异性肽是指可以引发针对特定一种或多种肿瘤的免疫应答的肽。

[0014] 在优选实施方案中，所述肽是患者识别的或患者特异性的。

[0015] 对于本领域技术人员显而易见的是，肽的确切性质可以根据待治疗的肿瘤的性质而变化，实际上该技术的特异性意味着将使用不同的抗肿瘤、肿瘤特异性肽来治疗呈现不同类型癌症的个体，甚至不同的抗肿瘤、肿瘤特异性肽可用于治疗呈现相同类型癌症的个体。

[0016] 在本发明的又一实施方案中，所述肽长度为8-50个氨基酸，理想长度为15-35个氨基酸。最理想地，所述肽的长度选自:8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49以及50个氨基酸。

[0017] 最理想地，多个所述肽连接至或插入/穿过病毒包膜。这些肽可以是相同的或代表仅含有较少修饰的相同抗原，即彼此具有大于90％的序列同一性，并且最理想的是彼此具有大于92％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％的序列同一性。可选地，许多不同的抗肿瘤、肿瘤特异性肽非遗传地连接至或插入/穿过病毒包膜。

[0018] 更优选地，所述肽还包含至少一个切割位点，例如但不限于组织蛋白酶切割位点或弗林蛋白酶切割位点。更优选地，所述肽包含至少一个免疫蛋白酶体加工位点。这些位点的实例及其相对于缀合肽结构的相对定位如图7所示。理想地，一种抗肿瘤、肿瘤特异性肽位于一对免疫蛋白酶体加工位点之间，并且其上游是至少一个切割位点，理想地，弗林蛋白酶切割位点(上游)之后有组织蛋白酶切割位点。

[0019] 有利地，我们发现这些肽在连接至或插入/穿过选定的包膜病毒(HSV-1和-2、牛痘病毒、VSV、MeV、马拉巴病毒和NDV)时，可以通过将抗病毒免疫转化为抗肿瘤免疫而引发增加的肿瘤特异性免疫应答并显著增强抗肿瘤效力。

[0020] 与其他平台相比，该平台的优势在于通过将患者识别的诱导抗肿瘤、肿瘤特异性肽非遗传地连接至或插入/穿过病毒包膜，我们可以在临床上使用医疗批准的病毒。这意味着只需通过用来自所述患者的一组新的肿瘤特异性肽包被病毒，就可以非常快速地对MHC-I上呈递的患者肿瘤抗原的变化作出反应。

[0021] 本发明的另一个重要特征在于，选择用于该平台的病毒只需要经过一次严格的质量控制和批准阶段，因此与其他平台相比节省了时间和金钱，所述其他平台中的具有遗传上引入修饰的病毒在每次引入新的修饰或肽时都需要经过检查阶段，因而几乎不可能在个

体化用药中使用这些平台。

[0022] 在本发明的又一优选实施方案中，使用细胞穿透肽或胆固醇缀合肽(购自PepScan或Ontores)将所述肽连接至或插入/穿过所述病毒包膜。

[0023] 如本领域技术人员已知的，细胞穿透肽(CPP)是促进细胞吸收/摄取多种分子组件(从纳米尺寸颗粒到小的化学分子和大的DNA片段)的短肽。这种“货物”通过经共价键的化学连接或通过非共价相互作用与肽结合。CPP的功能是将货物运送到细胞中，这一过程通常通过胞吞发生。

[0024] CPP通常具有下述氨基酸组成：含有高相对丰度的带正电荷的氨基酸(如赖氨酸或精氨酸)，或者具有含有极性/带电荷的氨基酸和非极性疏水氨基酸的交替模式的序列。这两种类型的结构分别被称为聚阳离子或两性的。第三类CPP是疏水肽，其仅含有非极性残基，具有低净电荷或具有对细胞摄取非常重要的疏水氨基酸基团。

[0025] 当与所述抗肿瘤、肿瘤特异性肽连接时，本发明设想使用任何已知的CCP。

[0026] 在不希望受到对作用机制的解释的束缚的情况下，我们认为尽管CPP通常通过脂质双分子层运送其货物，出于我们的目的，如果不是全部，则由CPP序列与我们的免疫原性肽组成的肽部分地穿过脂质双层，而其他部分似乎可以通过物理性疏水/亲水相互作用足以粘附于其上。

[0027] 与所述肽缀合时的CPP的实例显示在图7B中。

[0028] 如本领域技术人员所知，胆固醇缀合肽是与胆固醇连接的短肽。我们发现它们可以进入病毒包膜，从而将缀合的肽锚定在病毒外壳内。这些肽可以是N-或C-末端胆固醇缀合的。

[0029] 再次，在不希望受到作用机制的解释的束缚的情况下，我们认为由于胆固醇是脂质膜的组分，胆固醇缀合肽在膜中发现它们的“正常”位置。事实上，我们推测胆固醇上的羟基与膜磷脂和鞘脂的极性头部基团相互作用，而大体积的类固醇和烃链嵌入膜中，在其它脂质的非极性脂肪酸链旁边。

[0030] 胆固醇缀合肽的实例显示在图7A中。

[0031] 在本发明的优选实施方案中，用于连接至或插入/穿过所述包膜的肽包括：

[0032] GRKKRRQRRRPQ(SEQ ID NO:1)，CPP序列位于所述抗肿瘤、肿瘤特异性肽的N-或C-末端；

[0033] RQIKIWFQNRRMKWKK(SEQ ID NO:2)，CPP序列位于所述抗肿瘤、肿瘤特异性肽的N-或C-末端；

[0034] KLALKLALKALKAALKLA(SEQ ID NO:3)，CPP序列位于所述抗肿瘤、肿瘤特异性肽的N-或C-末端；

[0035] RRRRRRRRR(SEQ ID NO:4)，CPP序列位于所述抗肿瘤、肿瘤特异性肽的N-或C-末端；

[0036] KETWWETWWTEWSQPKKKRKV(SEQ ID NO:5)，CPP序列位于所述抗肿瘤、肿瘤特异性肽的N-或C-末端；

[0037] AGYLLGKINLKALAALAKKIL(SEQ ID NO:6)，CPP序列位于所述抗肿瘤、肿瘤特异性肽的N-或C-末端；

[0038] AGLWRALWRLLRSLWRLLWRA(SEQ ID NO:7)，CPP序列位于所述抗肿瘤、肿瘤特异性肽

的N-或C-末端;以及

[0039] 胆固醇部分位于所述抗肿瘤、肿瘤特异性肽的N-或C-末端。

[0040] 在本发明的又一优选实施方案中,用于连接至或插入/穿过所述包膜的肽包括下列之一,其中序列SIINFEKL仅代表MHC-I限制性表位或肽:

[0041] CPP肽:

[0042] GRKKRRQRRRPQRVRRALISLEQLESIINFEKLTEW(SEQ ID NO:8)

[0043] RQIKIWFQNRRMKWKKRWEKISIINFEKLYKLK(SEQ ID NO:9)

[0044] KLALKLALKALKAALKLARWEKISIINFEKLYKLK(SEQ ID NO:10)

[0045] RRRRRRRRRRWEKISIINFEKLYKLK(SEQ ID NO:11)

[0046] RWEKISIINFEKLYKLRRRRRRRRR(SEQ ID NO:12)

[0047] RWEKISIINFEKLYKLKETWWETWWTEWSQPKKKRKV(SEQ ID NO:13)

[0048] RWEKISIINFEKLYKLAGYLLGKINLKALAALAKKIL(SEQ ID NO:14)

[0049] AGLWRALWRLLRSLWRLLWRARWEKISIINFEKLYKLK(SEQ ID NO:15)

[0050] GRKKRRQRRRPQRWEKISIINFEKLYKL(SEQ ID NO:16)

[0051] GRKKRRQRRRPQRWEKISIINFEKL(SEQ ID NO:17)

[0052] GRKKRRQRRRPQRWEKISIINFEKLYKLRWEKISIINFEKL(SEQ ID NO:18)(其中RWEKI和YKLRWEKI是免疫蛋白酶体加工位点)。

[0053] 胆固醇缀合肽:

[0054] LEQLESIINFEKLTEWRVRRALISC-胆固醇(SEQ ID NO:19)

[0055] 胆固醇-CRVRRALISLEQLESIINFEKLTEW(SEQ ID NO:20)

[0056] 胆固醇-CSIINFEKL(SEQ ID NO:21)

[0057] 胆固醇-CRWEKISIINFEKL(SEQ ID NO:22)或

[0058] 胆固醇-CRWEKISVYDFFVWLYKLRWEKISIINFEKL(SEQ ID NO:23)

[0059] 因此,最优选地,使用细胞穿透肽或胆固醇缀合肽将所述抗肿瘤、肿瘤特异性肽连接至或插入/穿过所述病毒包膜。

[0060] 通常,通过在37℃下孵育约15分钟,将病毒颗粒与所述CPP-肽或胆固醇缀合肽复合。

[0061] 在另一优选实施方案中,所述修饰的包膜病毒具有至少一种MHC-I特异性的抗肿瘤、肿瘤特异性肽,因此理想地通过抗原呈递细胞(APC)上的MHC-I呈递引发免疫应答,以激活被称为CD8+T细胞的T效应细胞,特别是细胞毒性T细胞淋巴细胞(CTL)。

[0062] 另外或可选地,所述修饰的包膜病毒具有至少一种MHC-II特异性的抗肿瘤、肿瘤特异性肽,因此理想地通过抗原呈递细胞(APC)上的MHC-II呈递引发免疫应答,以激活$CD4^+$(T辅助细胞)细胞应答。

[0063] 因此,本发明还能够使用包被在病毒包膜上的不同MHC-II表位来单独或与MHC-I表位组合增强个体的免疫应答。

[0064] 另外或可选地,本发明还使得能够使用包含含有多种不同抗原的融合分子的肽。

[0065] 更优选地,提供不同的所述修饰的包膜病毒的组合,其中所述病毒选自:单纯疱疹病毒1(HSV-1)、单纯疱疹病毒2(HSV-2)、牛痘病毒、印第安纳水疱性口炎病毒(VSV)、麻疹病毒(MeV)、马拉巴病毒和新城疫(NDV)病毒。因此,本发明涉及至少两种任何前述病毒的使

用,并且还涉及前述病毒中任何3、4、5、6或7种的组合的使用。

[0066] 因此,本发明涉及两种不同的病毒类型或病毒骨架的使用,其能够实现引发-增强(Prime-Boost)免疫病毒治疗方法,其中用由所述肽包被的特定物种/属的引发型(Prime/priming)病毒治疗之后,用由相同的所述肽包被的另一特定物种/属的增强型(Boost/boosting)病毒(免疫学上不同的病毒)进行治疗。引发-增强免疫治疗方法可以通过将引发-增强方法产生的大部分免疫应答导向所述肽而显著进一步增加肿瘤特异性T细胞免疫应答。

[0067] 当实施本发明时,如本文所述修饰的包膜病毒可以在引发-增强免疫病毒疗法中与如本文所述修饰的但呈现相同肽的另一包膜病毒或者也已被修饰(包括遗传或非遗传地)以呈现相同肽的任何其他病毒(如腺病毒)组合使用。

[0068] 本领域技术人员将理解,由于包膜病毒即单纯疱疹病毒1(HSV-1)是研究最多的溶瘤包膜病毒,并且被称为T-VEC(Imlygic)的工程化形式的HSV-1是第一种在III期临床试验中显示效力的溶瘤病毒,并且是第一种FDA和EMEA均批准用于治疗不能手术的黑素瘤的溶瘤病毒,其对于引入以这些治疗和临床批准的病毒的抗病毒免疫为代价而增强抗肿瘤免疫的新方法至关重要。

[0069] 因此根据本发明的第二方面,提供药物组合物,其包含:

[0070] 1)修饰的包膜病毒,其选自:单纯疱疹病毒1(HSV-1)、单纯疱疹病毒2(HSV-2)、牛痘病毒、印第安纳型水疱性口炎病毒(VSV)、麻疹病毒(MeV)、马拉巴病毒和新城疫(NDV)病毒,其中所述病毒包含至少一种非遗传地连接至或插入/穿过病毒包膜的抗肿瘤、肿瘤特异性肽;和

[0071] 2)合适的载体。

[0072] 因此根据本发明的第三方面,提供治疗癌症的方法,其包括将个体暴露于选自下述的修饰的包膜病毒:单纯疱疹病毒1(HSV-1)、单纯疱疹病毒2(HSV-2)、牛痘病毒、印第安纳型水疱性口炎病毒(VSV)、麻疹病毒(MeV)、马拉巴病毒和新城疫(NDV)病毒,其中所述病毒包含至少一种非遗传地连接至或插入/穿过病毒包膜的抗肿瘤、肿瘤特异性肽。

[0073] 更优选地,所述方法包括,在选定的时间段后,将所述个体暴露于选自下述的另一修饰的包膜病毒:单纯疱疹病毒1(HSV-1)、单纯疱疹病毒2(HSV-2)、牛痘病毒、印第安纳型水疱性口炎病毒(VSV)、麻疹病毒(MeV)、马拉巴病毒和新城疫毒(NDV)病毒,其中所述病毒包含至少一种非遗传地连接至或插入/穿过病毒包膜的抗肿瘤、肿瘤特异性肽,并且其中所述病毒与在先暴露的病毒不同。可选地,在引发-增强免疫病毒疗法中,所述方法包括在选定时间段后,将所述个体暴露于同样已被修饰(包括遗传或非遗传)以提供相同的肽的任何另一病毒,如腺病毒。可选地,再一次,所述方法可以通过以下实施:先使用以任何方式(包括遗传或非遗传方式)修饰以表达所选择的肽的任何病毒,然后使用包含相同肽的本发明的修饰的病毒来提供增强治疗。

[0074] 通过这种方式,可以实施引入-增强免疫病毒疗法。

[0075] 理想地,所述将个体暴露于病毒的步骤包括瘤内、结内、腹膜内或静脉内注射。

[0076] 最优选地,本文提及的癌症包括以下癌症中的任何一种或多种:鼻咽癌、滑膜癌、肝细胞癌、肾癌(renal cancer)、结缔组织癌、黑素瘤、肺癌、肠癌、结肠癌、直肠癌、结肠直肠癌、脑癌、喉癌、口腔癌(oral cancer)、肝癌、骨癌、胰腺癌、绒毛膜癌、胃泌素瘤、嗜铬细

胞瘤、催乳素瘤、T细胞白血病/淋巴瘤、神经瘤、希佩尔-林道综合征、佐林格-埃利森综合征、肾上腺癌、肛门癌、胆管癌、膀胱癌、输尿管癌、脑癌、少突神经胶质瘤、成神经细胞瘤、脑膜瘤、脊髓肿瘤、骨癌、骨软骨瘤、软骨肉瘤、尤因氏肉瘤、原发部位不明癌、类癌、胃肠道类癌、纤维肉瘤、乳腺癌、佩吉特氏病、宫颈癌、结肠直肠癌、直肠癌、食道癌、胆囊癌、头部癌症、眼癌、颈癌、肾癌(kidney cancer)、维尔姆斯瘤、肝癌、卡波西肉瘤、前列腺癌、肺癌、睾丸癌、霍奇金氏病、非霍奇金氏淋巴瘤、口腔癌、皮肤癌、间皮瘤、多发性骨髓瘤、卵巢癌、内分泌胰腺癌、胰高血糖素瘤、胰腺癌、甲状旁腺癌、阴茎癌、垂体癌、软组织肉瘤、视网膜母细胞瘤、小肠癌、胃癌、胸腺癌、甲状腺癌、滋养细胞癌、水泡状胎块、子宫癌、子宫内膜癌、阴道癌、外阴癌、听神经瘤、蕈样真菌病、胰岛素瘤、类癌综合征、生长抑素瘤、牙龈癌、心脏癌、唇癌、脑膜癌、口腔癌(mouth cancer)、神经癌、腭癌、腮腺癌、腹膜癌、咽癌、胸膜癌、唾液腺癌、舌癌以及扁桃体癌。

[0077] 在本发明的又一实施方案中,在将个体暴露于表达至少一种抗肿瘤、肿瘤特异性肽的修饰的病毒之后或者在将所述个体暴露于选自下述的包膜病毒之后,使所述个体暴露于检查点抑制剂:单纯疱疹病毒1(HSV)-1)、单纯疱疹病毒2(HSV-2)、牛痘病毒、印第安纳型水疱性口炎病毒(VSV)、麻疹病毒(MeV)、马拉巴病毒和新城疫(NDV)病毒,其中所述病毒包含非遗传地连接至或插入/穿过病毒包膜的与所述肽相同的肽或与所述肽相同的肽的大部分。检查点抑制剂抑制免疫检查点分子,如PD-1、PD-L1和CTLA-4。

[0078] 在本发明前述描述之后以及其内的权利要求中,除了由于表述语言或必要含义之外上下文要求的情况之外,单词“包括(comprises/comprises/comprising)”的变体以包含的含义使用,即指定所述特征的存在但不排除在本发明的多种实施方案中存在或添加其他特征。

[0079] 在此通过引用将本说明书中引用的所有参考文献,包括任何专利或专利申请并入。不承认任何参考文献构成现有技术。此外,不承认任何现有技术构成本领域公知常识的一部分。

[0080] 本发明的每个方面的优选特征可以如与任何其他方面结合所描述。

[0081] 根据以下实施例,本发明的其他特征将变得显而易见。一般而言,本发明扩展至本说明书(包括所附权利要求和附图)中公开的特征的任何新颖的特征或任何新颖的组合。因此,与本发明的特定方面、实施方案或实例结合描述的特征、整数、特性、化合物或化学部分应理解为适用于本文描述的任何其他方面、实施方案或实例,除非与其不相容。

[0082] 此外,除非另有说明,否则本文公开的任何特征可以由用于相同或类似目的的替代特征代替。

[0083] 在本说明书的整个说明书和权利要求书中,除非上下文另有要求,否则单数形式包含复数形式。具体地,当使用不定冠词时,除非上下文另有要求,否则说明书应被理解为考虑复数以及单数。

[0084] 现在将通过仅参考以下的实例来描述本发明的实施方案,其中:

[0085] 图1是当使用CPP或胆固醇缀合肽将抗肿瘤、肿瘤特异性肽连接至不同病毒包膜时我们获得的数据总结;

[0086] 图2显示含有CPP的肽可以连接至单纯疱疹病毒1的包膜。含有CPP和FITC标记的肽与HSV-1复合,并且使用夹心ELISA检测复合物。将抗HSV-1抗体包被在96孔板的底部,并在

孔中孵育PeptiENV复合物。洗涤未结合的级分后，使用抗FITC HRP-缀合的抗体检测PeptiENV复合物。图2下图显示当与HSV-1复合时，含CPP的肽具有减少的扩散时间。使用荧光相关光谱分析与HSV-1复合的肽的扩散动力学。

[0087] 图3上图显示含有胆固醇的肽可以连接至牛痘病毒的包膜。含有胆固醇和FITC标记的肽与牛痘病毒复合。通过36％蔗糖垫和超速离心纯化PeptiENV复合物后，通过流式细胞术分析纯化的复合物。A.无复合肽的牛痘病毒，和B.与含有胆固醇的FITC标记的肽复合的牛痘病毒。图3中图显示含有胆固醇的肽可以连接至牛痘病毒的包膜。含有胆固醇和FITC标记的肽与牛痘病毒复合，并使用夹心ELISA检测复合物。将抗牛痘病毒抗体包被在96孔板的底部，并在孔中孵育PeptiENV复合物。洗涤未结合的级分后，使用抗FITC HRP缀合抗体检测PeptiENV复合物。图3下图显示树突细胞容易地呈递含有胆固醇的SIINFEKL-肽。用含有胆固醇的SIINFEKL-肽脉冲小鼠脾细胞，并通过流式细胞术测定CD11c阳性DC群对MHCI表位SIINFEKL的呈递。

[0088] 图4上图显示含有CPP的肽可以连接至牛痘病毒的包膜上。含有CPP和FITC标记的肽与牛痘病毒复合。通过36％蔗糖垫和超速离心纯化PeptiENV复合物后，通过流式细胞术分析纯化的复合物。A.无复合肽的HSV-1，和B.与含CPP的FITC标记的肽复合的HSV-1。图4中图显示含CPP的肽可以连接至包膜牛痘病毒。将含CPP和FITC标记的肽与牛痘病毒复合，并使用夹心ELISA检测复合物。将抗牛痘病毒抗体包被在96孔板的底部，并在孔中孵育PeptiENV复合物。洗涤未结合的级分后，使用抗FITC HRP-缀合抗体检测PeptiENV复合物。图4下图显示树突细胞易于呈递含有CPP的SIINFEKL-肽。用含有CPP的SIINFEKL-肽脉冲小鼠脾细胞，并通过流式细胞术测定CD11c阳性DC群对MHCI表位SIINFEKL的呈递。

[0089] 图5上图显示即使病毒量非常低，PeptiENV也可诱导DC活化。将牛痘病毒与含CPP或胆固醇的SIINFEKL-肽复合并用于感染小鼠脾细胞。感染后2小时，通过流式细胞术分析树突细胞DC活化标记物的表达。图5下图显示，即使病毒量非常低，PeptiENV也可诱导CD11c阳性DC呈递特异性抗肿瘤MHC I类表位。将牛痘病毒与含CPP或胆固醇的SIINFEKL-肽复合并用于感染小鼠脾细胞。两小时后，通过流式细胞术测定CD11c阳性DC群对MHCI表位SIINFEKL的呈递。

[0090] 图6显示PeptiENV病毒-肽复合对病毒感染性没有影响。将PeptiENV的感染性与正常的非复合病毒进行比较，并在感染后3天测量细胞活力。

[0091] 图7显示A)胆固醇缀合的免疫调节肽和B)含有N-末端细胞穿透肽序列的免疫调节肽的示意图。实体不同功能序列的颜色代码：深灰色：胆固醇(A.)或细胞穿透序列(B.)。红色：组织蛋白酶D/E切割位点。蓝色：弗林蛋白切割位点。绿色：免疫蛋白酶体加工位点。黑色：MHC-I限制性表位。

[0092] 图8显示可以使用多种不同的CPP序列将抗肿瘤肽连接到病毒包膜中。将含有CPP和FITC标记的肽与牛痘病毒复合，并使用夹心ELISA检测复合物。将抗牛痘病毒抗体包被在96孔板的底部，并在孔中孵育PeptiENV复合物。洗涤未结合的级分后，使用抗FITC HRP缀合抗体检测PeptiENV复合物。

[0093] 图9显示含CPP的肽不具有任何抗病毒作用，并且可以安全地连接至病毒包膜而不丧失感染性或溶瘤作用。测试四种不同的细胞系A549、MDMBA436、B16F10和B16-OVA的病毒感染性，并将PeptiENV与非修饰的病毒进行比较。

[0094] 图10显示通过CPP-或胆固醇部分锚定到病毒包膜中的抗肿瘤肽诱导广泛的抗肿瘤免疫,导致增强的肿瘤生长控制和更长的存活。A.模拟组(仅用注射介质进行处理)、仅牛痘病毒、用胆固醇部分将抗肿瘤肽连接至病毒包膜的PeptiENV(PeptiENV VACV/chol)以及用CPP部分将抗肿瘤连接至病毒包膜的PeptiENV(PeptiENV VACV/cpp)之间肿瘤生长的比较。B.用PeptiENV VACV/cpp、仅牛痘病毒、仅抗肿瘤肽(无病毒)或模拟处理的小鼠组的Kaplan-Meier生存曲线。C.治疗的肿瘤中肿瘤特异性T细胞的流式细胞术分析。PeptiENV可以诱导肿瘤特异性效应T细胞大量过滤到肿瘤微环境中。D.肿瘤微环境中病毒特异性T细胞的流式细胞术分析。PeptiENV诱导与非修饰的牛痘病毒相当的抗病毒免疫,同时特异性诱导非修饰的牛痘病毒未呈现的广泛的抗肿瘤免疫。

[0095] 图11显示PeptiENV VACV/chol和PeptiENV VACV/cpp处理的小鼠引发强烈的抗肿瘤免疫应答并且保护免受肿瘤再攻击,而模拟处理的小鼠未受到保护。将500,000个B16-OVA细胞注射到在先肿瘤植入的相对侧腹,然后将小鼠饲养14天。在用PeptiENV处理的小鼠中未观察到肿瘤生长,而在模拟处理组中肿瘤发生率为100%。

[0096] 图12显示通过CPP部分锚定到单纯疱疹病毒1(HSV-1)包膜中的抗肿瘤肽诱导强的抗肿瘤免疫,导致增强的肿瘤生长控制。A.PeptiENV HSV-1/cpp、仅HSV-1和模拟处理组的肿瘤生长曲线。B.处理的肿瘤中肿瘤特异性T细胞的流式细胞术分析。PeptiENV可以诱导肿瘤特异性效应T细胞大量过滤到肿瘤微环境中。

[0097] 图13显示表面等离子体共振(SPR)测量以证实含CPP的抗肿瘤肽对病毒包膜的高亲和力。将双位点结合动力学拟合模型用于SPR数据的分析。

[0098] 具体描述

[0099] 材料和方法:

[0100] 肽:

[0101] 以下列出了用于本研究的肽,并且其均购自PepScan:

[0102] CPP肽:

[0103] GRKKRRQRRRPQRVRRALISLEQLESIINFEKLTEW(SEQ ID NO:8)

[0104] GRKKRRQRRRPQRVRRALISLEQLESIINFEKLTEW-FITC(SEQ ID NO:24)

[0105] RQIKIWFQNRRMKWKKRWEKISIINFEKLYKLK-FITC(SEQ ID NO:25)

[0106] KLALKLALKALKAALKLARWEKISIINFEKLYKLK-FITC(SEQ ID NO:26)

[0107] RRRRRRRRRRWEKISIINFEKLYKLK-FITC(SEQ ID NO:27)

[0108] FITC-RWEKISIINFEKLYKLRRRRRRRRR(SEQ ID NO:28)

[0109] FITC-RWEKISIINFEKLYKLKETWWETWWTEWSQPKKKRKV(SEQ ID NO:29)

[0110] FITC-RWEKISIINFEKLYKLAGYLLGKINLKALAALAKKIL(SEQ ID NO:30)

[0111] GLWRALWRLLRSLWRLLWRARWEKISIINFEKLYKLK-FITC(SEQ ID NO:31)

[0112] GRKKRRQRRRPQRWEKISIINFEKL(SEQ ID NO:17)

[0113] GRKKRRQRRRPQRWEKISIINFEKLYKLRWEKISIINFEKL(SEQ ID NO:18)

[0114] 胆固醇缀合肽:

[0115] LEQLESIINFEKLTEWRVRRALISC-胆固醇(SEQ ID NO:19)

[0116] FITC-LEQLESIINFEKLTEWRVRRALISC-胆固醇(SEQ ID NO:32)

[0117] 胆固醇-CRVRRALISLEQLESIINFEKLTEW(SEQ ID NO:20)

[0118] 胆固醇-CRVRRALISLEQLESIINFEKLTEW-FITC(SEQ ID NO:33)

[0119] 胆固醇-CSIINFEKL(SEQ ID NO:21)

[0120] 胆固醇-CRWEKISIINFEKL(SEQ ID NO:22)

[0121] 胆固醇-CRWEKISVYDFFVWLYKLRWEKISIINFEKL(SEQ ID NO:23)

[0122] 细胞系

[0123] 将人肺癌细胞系A549、非洲绿猴肾上皮细胞系Vero(B)以及鼠黑素瘤细胞系B16/OVA和B16-F10在含有10％胎牛血清(FBS)(Life Technologies)、1％L-谷氨酰胺和1％青霉素/链霉素的DMEM中，于37℃/5％CO2下培养。将人三阴性乳腺癌细胞系MDMBA436在含有10％胎牛血清(FBS)(Life Technologies)、1％L-谷氨酰胺和1％青霉素/链霉素的RPMI中，于37℃/5％CO2下培养。

[0124] 病毒产生

[0125] 单纯疱疹病毒1在Vero细胞中产生并用蔗糖梯度超速离心纯化，且在20mM MES、100mM NaCl、30mM Tris-HCl(pH7.2)中洗脱。

[0126] 牛痘病毒西部保留株(Western reserve strain)(VVDD-mDAI-RFP)在A549细胞中产生，并通过36％蔗糖垫超速离心纯化，且在1mM Tris(pH9.0)中洗脱。

[0127] ELISA

[0128] 将2.5x10^7个牛痘病毒颗粒与8μg CPP-肽-FITC或胆固醇缀合肽-FITC在100μl DMEM中于37℃下复合15分钟。复合后，通过在1mM Tris(pH9.0)中经36％蔗糖垫超速离心(20,000g，40-80分钟)除去未结合的肽。对于ELISA，将抗牛痘病毒多克隆抗体(Abcam)在4℃下以2μg/ml的浓度包被在maxisorb 96孔免疫板中。将牛痘病毒-肽复合物在37℃或室温下孵育30-60分钟并用1xPBS洗涤三次。用缀合辣根过氧化物酶(Abcam)的抗FITC抗体(在2％BSA-PBS中以1:5000稀释)检测复合物。

[0129] 将2.5x10^7个单纯疱疹1病毒颗粒与8μg CPP-肽-FITC或胆固醇缀合肽-FITC在100μl DMEM中于37℃下复合15分钟。对于ELISA，将抗HSV-1多克隆抗体(Abcam)在4℃下以2μg/ml的浓度包被在maxisorb 96孔免疫板中。将HSV-1-肽复合物在37℃或室温下孵育30-60分钟并用1xPBS洗涤三次。用缀合辣根过氧化物酶(Abcam)的抗FITC抗体(在2％BSA-PBS中以1:5000稀释)检测复合物。

[0130] 流式细胞术

[0131] 将5x10^7个牛痘病毒颗粒与24μg CPP-肽-FITC或胆固醇缀合肽-FITC在200μl DMEM中于37℃下复合15分钟。复合后，通过在1mM Tris(pH9.0)中经36％蔗糖垫超速离心(20,000g，40-80分钟)除去未结合的肽，并洗脱至含2％福尔马林的PBS中。固定后，通过用另外的经36％蔗糖垫超速离心(20,000g，40-80分钟)除去福尔马林，并将沉淀物洗脱至1x超纯PBS(Gibco)。用Apogee A50微流式细胞仪(Apogee)进行流式细胞术，并使用FITC检测来评估复合物。

[0132] 交叉呈递实验

[0133] 将800μL 10％RPMI-1640培养基中的2×10^6个脾细胞与200μL GRKKRRQRRRPQRVRRALISLEQLESIINFEKLTEW(SEQ ID NO:8)、LEQLESIINFEKLTEWRVRRALISC-胆固醇(SEQ ID NO:19)或胆固醇-CRVRRALISLEQLESIINFEKLTEW(SEQ ID NO:20)肽稀释物(0.19μg/μL)孵育。

[0134] 如用于ELISA所述，制备牛痘病毒-肽复合物。在孵育2小时之后，将细胞洗涤，并用结合SIINFEKL的APC抗小鼠H-2Kb或APC小鼠IgG1、κ同种型Ctrl(BioLegend,San Diego,CA,USA)染色，以及通过流式细胞术分析样品。

[0135] 细胞活力分析

[0136] 使用CellTiterGlo 96AQueous One Solution细胞增殖分析仪(Promega)和多孔板读数器(Varioscan;ThermoLabsystems)来测量细胞活力，以确定样品的发光。

[0137] 表面等离子体共振

[0138] 使用多参数SPR Navi™ 220A仪(Bionavis Ltd,Tampere,Finland)进行测量。使用磷酸盐缓冲盐水(PBS)(pH 7.4)作为运行缓冲液。在整个实验中使用20μL/min的恒定流速，并将温度设定为+20℃。使用波长为670nm的激光进行表面等离子体激发。

[0139] 通过等离子体处理5分钟激活具有二氧化硅表面的传感器载玻片，随后通过在含50mM APTES((3-氨基丙基)三乙氧基硅烷)的异丙醇中孵育传感器4小时来用APTES包被。然后将传感器洗涤并放入SPR装置中，以及通过注射含$1.1x10^7$pfu VACV的PBS(pH 7.4)约12分钟，将病毒原位固定于两个测试通道的传感器表面上，随后用PBS洗涤3分钟。然后将含有CPP的抗肿瘤肽或不含CPP序列的肽(无相互作用对照)平行注入流动池的两个流动通道中，其中肽浓度范围从1.23μM增加至100μM。

[0140] 动物实验

[0141] 在所有动物实验中均使用C57BL/6JlalaHsd-小鼠品系。在小鼠的右侧腹注射350000个B16-OVA细胞(在再攻击实验中，将细胞注射到左侧腹)，并且当肿瘤大小达到约$50mm^3$时(注射后10-12天)，用非修饰的病毒、PeptiENV平台、仅肽或仅注射培养基(模拟)处理小鼠。在第0天、第2天处理小鼠，然后在第8-10天给予加强处理。每两天测量肿瘤直至肿瘤大小达到允许的最大值。

序列表
<110> 瓦洛治疗公司
<120> 非遗传修饰的包膜病毒
<130> 4599P/WO
<150> GB1616365.1
<151> 2016-09-27
<160> 33
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> PEPTIDE
<222> ()...()
<223> 细胞穿透肽
<400> 1
Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Gln
1 5 10
<210> 2
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> PEPTIDE
<222> ()...()
<223> 细胞穿透肽
<400> 2
Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys
1 5 10 15
<210> 3
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> PEPTIDE
<222> ()...()
<223> 细胞穿透肽

<400> 3
Lys Leu Ala Leu Lys Leu Ala Leu Lys Ala Leu Lys Ala Ala Leu Lys
1 5 10 15
Leu Ala
<210> 4
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> PEPTIDE
<222> ()...()
<223> 细胞穿透肽
<400> 4
Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
1 5
<210> 5
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> PEPTIDE
<222> ()...()
<223> 细胞穿透肽
<400> 5
Lys Glu Thr Trp Trp Glu Thr Trp Trp Thr Glu Trp Ser Gln Pro Lys
1 5 10 15
Lys Lys Arg Lys Val
20
<210> 6
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> PEPTIDE
<222> ()...()
<223> 细胞穿透肽
<400> 6
Ala Gly Tyr Leu Leu Gly Lys Ile Asn Leu Lys Ala Leu Ala Ala Leu
1 5 10 15

Ala Lys Lys Ile Leu
20

<210> 7
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> PEPTIDE
<222> ()...()
<223> 细胞穿透肽
<400> 7

Ala Gly Leu Trp Arg Ala Leu Trp Arg Leu Leu Arg Ser Leu Trp Arg
1 5 10 15
Leu Leu Trp Arg Ala
20

<210> 8
<211> 36
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> PEPTIDE
<222> ()...()
<223> 细胞穿透肽
<400> 8

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Gln Arg Val Arg Arg
1 5 10 15
Ala Leu Ile Ser Leu Glu Gln Leu Glu Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys
20 25 30
Leu Thr Glu Trp
35

<210> 9
<211> 33
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> PEPTIDE
<222> ()...()
<223> 细胞穿透肽
<400> 9

Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys
1 5 10 15
Arg Trp Glu Lys Ile Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu Tyr Lys Leu
20 25 30
Lys

<210> 10
<211> 35
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> PEPTIDE
<222> ()...()
<223> 细胞穿透肽
<400> 10
Lys Leu Ala Leu Lys Leu Ala Leu Lys Ala Leu Lys Ala Ala Leu Lys
1 5 10 15
Leu Ala Arg Trp Glu Lys Ile Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu Tyr
20 25 30
Lys Leu Lys
35

<210> 11
<211> 26
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> PEPTIDE
<222> ()...()
<223> 细胞穿透肽
<400> 11
Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Trp Glu Lys Ile Ser Ile
1 5 10 15
Ile Asn Phe Glu Lys Leu Tyr Lys Leu Lys
20 25

<210> 12
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> PEPTIDE

<222> ()...()
<223> 细胞穿透肽
<400> 12
Arg Trp Glu Lys Ile Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu Tyr Lys Leu
1 5 10 15
Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
20 25
<210> 13
<211> 37
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> PEPTIDE
<222> ()...()
<223> 细胞穿透肽
<400> 13
Arg Trp Glu Lys Ile Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu Tyr Lys Leu
1 5 10 15
Lys Glu Thr Trp Trp Glu Thr Trp Trp Thr Glu Trp Ser Gln Pro Lys
20 25 30
Lys Lys Arg Lys Val
35
<210> 14
<211> 37
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> PEPTIDE
<222> ()...()
<223> 细胞穿透肽
<400> 14
Arg Trp Glu Lys Ile Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu Tyr Lys Leu
1 5 10 15
Ala Gly Tyr Leu Leu Gly Lys Ile Asn Leu Lys Ala Leu Ala Ala Leu
20 25 30
Ala Lys Lys Ile Leu
35
<210> 15
<211> 38

<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> PEPTIDE
<222> ()...()
<223> 细胞穿透肽
<400> 15
Ala Gly Leu Trp Arg Ala Leu Trp Arg Leu Leu Arg Ser Leu Trp Arg
1 5 10 15
Leu Leu Trp Arg Ala Arg Trp Glu Lys Ile Ser Ile Ile Asn Phe Glu
20 25 30
Lys Leu Tyr Lys Leu Lys
35
<210> 16
<211> 28
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> PEPTIDE
<222> ()...()
<223> 细胞穿透肽
<400> 16
Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Gln Arg Trp Glu Lys
1 5 10 15
Ile Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu Tyr Lys Leu
20 25
<210> 17
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> PEPTIDE
<222> ()...()
<223> 细胞穿透肽
<400> 17
Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Gln Arg Trp Glu Lys
1 5 10 15
Ile Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu
20 25

<210> 18
<211> 41
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> PEPTIDE
<222> ()...()
<223> 细胞穿透肽
<400> 18
Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Gln Arg Trp Glu Lys
1 5 10 15
Ile Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu Tyr Lys Leu Arg Trp Glu Lys
20 25 30
Ile Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu
35 40
<210> 19
<211> 26
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> PEPTIDE
<222> ()...()
<223> 细胞穿透肽
<220>
<221> SITE
<222> (26)..(26)
<223> 胆固醇
<400> 19
Leu Glu Gln Leu Glu Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu Thr Glu Trp
1 5 10 15
Arg Val Arg Arg Ala Leu Ile Ser Cys Xaa
20 25
<210> 20
<211> 26
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> PEPTIDE
<222> ()...()

<223> 细胞穿透肽
<220>
<221> SITE
<222> (1)..(1)
<223> 胆固醇
<400> 20
Xaa Cys Arg Val Arg Arg Ala Leu Ile Ser Leu Glu Gln Leu Glu Ser
1 5 10 15
Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu Thr Glu Trp
20 25
<210> 21
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> PEPTIDE
<222> ()...()
<223> 细胞穿透肽
<220>
<221> SITE
<222> (1)..(1)
<223> 胆固醇
<400> 21
Xaa Cys Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu
1 5 10
<210> 22
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> PEPTIDE
<222> ()...()
<223> 细胞穿透肽
<220>
<221> SITE
<222> (1)..(1)
<223> 胆固醇
<400> 22
Xaa Cys Arg Trp Glu Lys Ile Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu

1 5 10 15

<210> 23

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> PEPTIDE

<222> ()...()

<223> 细胞穿透肽

<220>

<221> SITE

<222> (1)..(1)

<223> 胆固醇

<400> 23

Xaa Cys Arg Trp Glu Lys Ile Ser Val Tyr Asp Phe Phe Val Trp Leu
1 5 10 15

Tyr Lys Leu Arg Trp Glu Lys Ile Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu
20 25 30

<210> 24

<211> 37

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> PEPTIDE

<222> ()...()

<223> 细胞穿透肽

<220>

<221> SITE

<222> (37)..(37)

<223> FITC

<400> 24

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Gln Arg Val Arg Arg
1 5 10 15

Ala Leu Ile Ser Leu Glu Gln Leu Glu Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys
20 25 30

Leu Thr Glu Trp Xaa
35

<210> 25

<211> 34

<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> PEPTIDE
<222> ()...()
<223> 细胞穿透肽
<220>
<221> SITE
<222> (34)..(34)
<223> FITC
<400> 25
Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys
1 5 10 15
Arg Trp Glu Lys Ile Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu Tyr Lys Leu
20 25 30
Lys Xaa
<210> 26
<211> 36
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> PEPTIDE
<222> ()...()
<223> 细胞穿透肽
<220>
<221> SITE
<222> (36)..(36)
<223> FITC
<400> 26
Lys Leu Ala Leu Lys Leu Ala Leu Lys Ala Leu Lys Ala Ala Leu Lys
1 5 10 15
Leu Ala Arg Trp Glu Lys Ile Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu Tyr
20 25 30
Lys Leu Lys Xaa
35
<210> 27
<211> 27
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> PEPTIDE
<222> ()...()
<223> 细胞穿透肽
<220>
<221> SITE
<222> (27)..(27)
<400> 27
Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Trp Glu Lys Ile Ser Ile
1 5 10 15
Ile Asn Phe Glu Lys Leu Tyr Lys Leu Lys Xaa
20 25
<210> 28
<211> 26
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> PEPTIDE
<222> ()...()
<223> 细胞穿透肽
<220>
<221> SITE
<222> (1)..(1)
<223> FITC
<400> 28
Xaa Arg Trp Glu Lys Ile Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu Tyr Lys
1 5 10 15
Leu Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
20 25
<210> 29
<211> 38
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> PEPTIDE
<222> ()...()
<223> 细胞穿透肽
<220>
<221> SITE

<222> (1)..(1)
<223> FITC
<400> 29
Xaa Arg Trp Glu Lys Ile Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu Tyr Lys
1 5 10 15
Leu Lys Glu Thr Trp Trp Glu Thr Trp Trp Thr Glu Trp Ser Gln Pro
20 25 30
Lys Lys Lys Arg Lys Val
35
<210> 30
<211> 38
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> PEPTIDE
<222> ()...()
<223> 细胞穿透肽
<220>
<221> SITE
<222> (1)..(1)
<223> FITC
<400> 30
Xaa Arg Trp Glu Lys Ile Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu Tyr Lys
1 5 10 15
Leu Ala Gly Tyr Leu Leu Gly Lys Ile Asn Leu Lys Ala Leu Ala Ala
20 25 30
Leu Ala Lys Lys Ile Leu
35
<210> 31
<211> 38
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> PEPTIDE
<222> ()...()
<223> 细胞穿透肽
<220>
<221> SITE
<222> (38)..(38)

<223> FITC
<400> 31
Gly Leu Trp Arg Ala Leu Trp Arg Leu Leu Arg Ser Leu Trp Arg Leu
1 5 10 15
Leu Trp Arg Ala Arg Trp Glu Lys Ile Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys
20 25 30
Leu Tyr Lys Leu Lys Xaa
35
<210> 32
<211> 27
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> PEPTIDE
<222> ()...()
<223> 细胞穿透肽
<220>
<221> SITE
<222> (1)..(1)
<223> FITC
<220>
<221> SITE
<222> (27)..(27)
<223> 胆固醇
<400> 32
Glx Leu Glu Gln Leu Glu Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu Thr Glu
1 5 10 15
Trp Arg Val Arg Arg Ala Leu Ile Ser Cys Xaa
20 25
<210> 33
<211> 27
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> PEPTIDE
<222> ()...()
<223> 细胞穿透肽
<220>
<221> SITE

<222> (1)..(1)
<223> 胆固醇
<220>
<221> SITE
<222> (27)..(27)
<223> FITC
<400> 33

Glx Cys Arg Val Arg Arg Ala Leu Ile Ser Leu Glu Gln Leu Glu Ser
1 5 10 15
Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu Thr Glu Trp Xaa
20 25

数据总结：

病毒	肽锚定类型	抗肿瘤肽	复合物形成评估	复合物形成评估	复合物形成评估	肽免疫原性评估	(PeptiENV平台的)MHCI呈递和DC11+的成熟	Pepti ENV对A549细胞的感染性	PeptiENV对A549、B16-OVA、B16-F10、4T1.MDMBA癌细胞的感染性	Pepti ENV平台的体内免疫原性	Pepti ENV平台的体内抗肿瘤效果
牛痘病毒	胆固醇N-末端	SIINFEKL	ELISA		Apogee	CD11c+呈递SIINFEKL	CD86和CD101	与野生型类似的感染性	与野生型类似的感染性	已测试	已测试
牛痘病毒	GRKKRRQRRRPQ N-末端	SIINFEKL	ELISA		Apogee	CD11c+呈递SIINFEKL	CD86和CD103			已测试	已测试
牛痘病毒	GLWRALWRLLRSL WRLLWRA N-末端	SIINFEKL	ELISA								
牛痘病毒	AGYLLGKINLKAL AALAKKIL C-末端	SIINFEKL	ELISA								
牛痘病毒	RQIKIWFQNRRMK WKK N-末端	SIINFEKL	ELISA								
牛痘病毒	KLALKLALKALKA ALKLA N-末端	SIINFEKL	ELISA								
牛痘病毒	RRRRRRRRR N-末端	SIINFEKL	ELISA								
牛痘病毒	RRRRRRRRR C-末端	SIINFEKL	ELISA								
牛痘病毒	KETWWETWWTE WSQPKKKRKV C-末端	SIINFEKL	ELISA								
疱疹病毒	CPP	SIINFEKL	ELISA	荧光相关光谱		CD11c+呈递SIINFEKL				已测试	已测试

图1

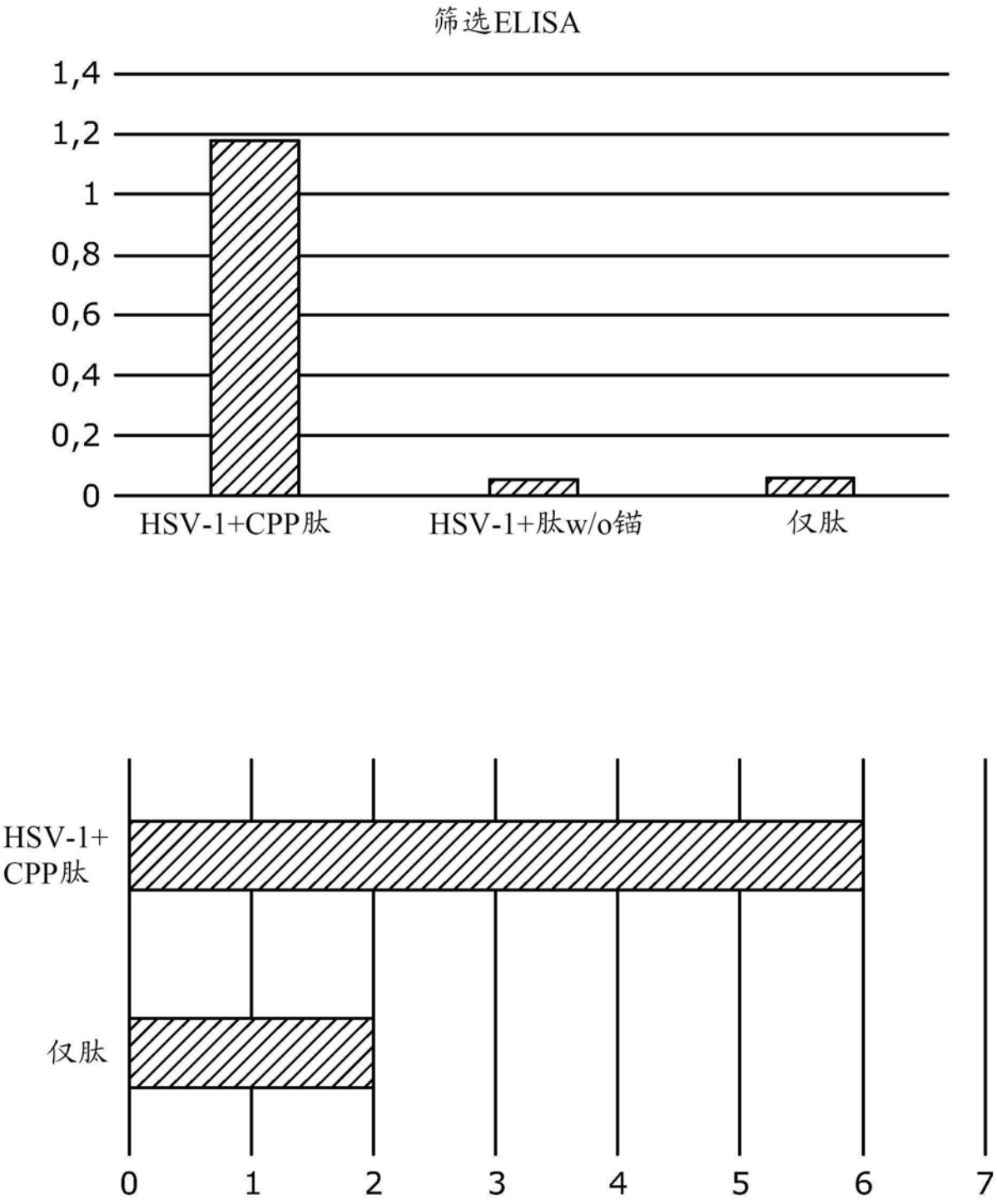

筛选ELISA
1,4
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
HSV-1+CPP肽
HSV-1+肽w/o锚
仅肽
HSV-1+
CPP肽
仅肽
0
1
2
3
4
5
6
7

图2

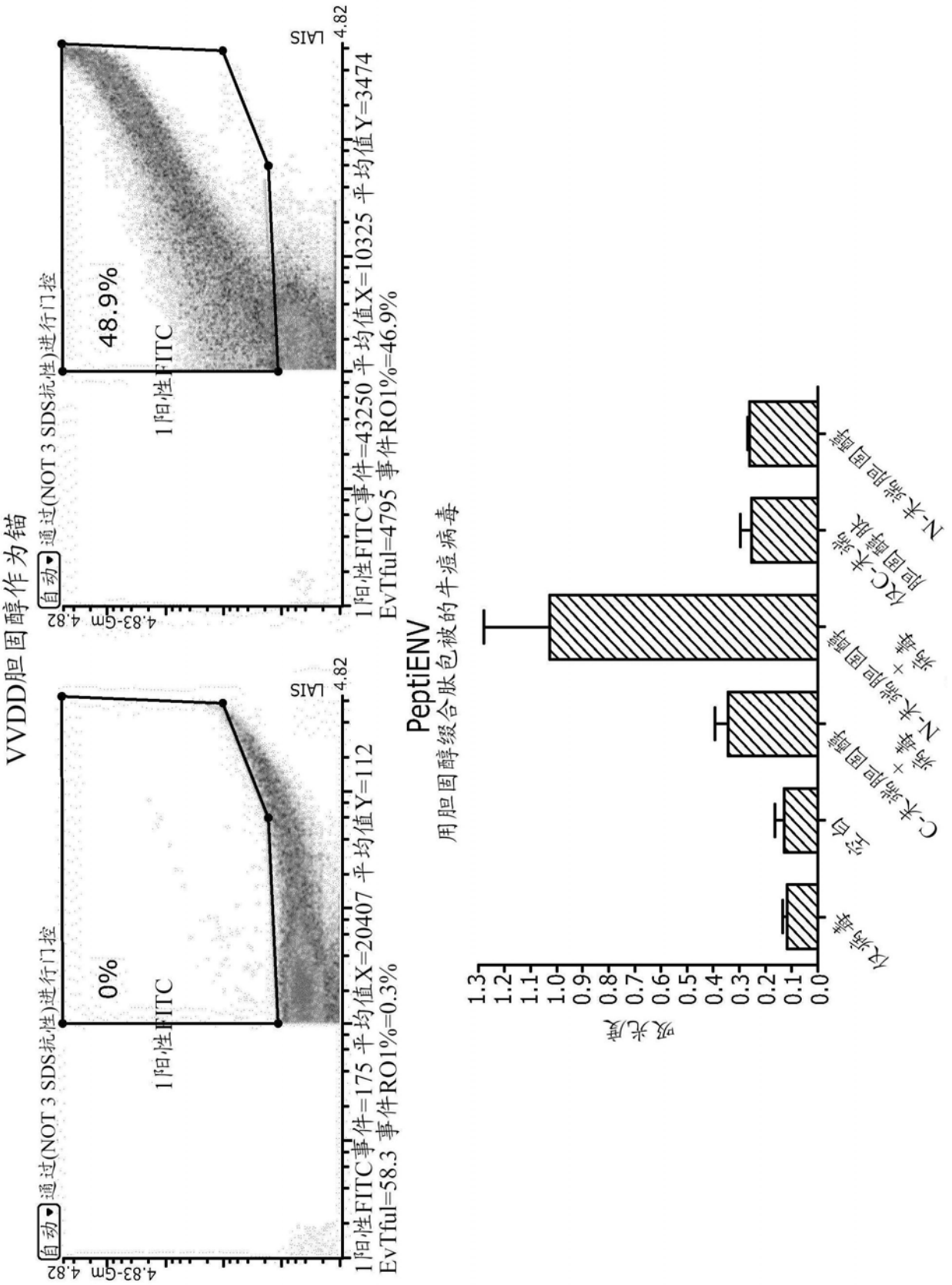

VVDD胆固醇作为锚
自动 通过(NOT 3 SDS抗性)进行门控
0%
1阳性FITC
1阳性FITC事件=175 平均值X=20407 平均值Y=112
EvTful=58.3 事件RO1%=0.3%
48.9%
1阳性FITC事件=43250 平均值X=10325 平均值Y=3474
EvTful=4795 事件RO1%=46.9%
4.83-Gm 4.82
LAIS
PeptiENV
用胆固醇缀合肽包被的牛痘病毒
吸光度
仅病毒
空白
C-末端胆固醇+病毒
N-末端胆固醇+病毒
仅C-末端胆固醇
N-末端胆固醇

图3

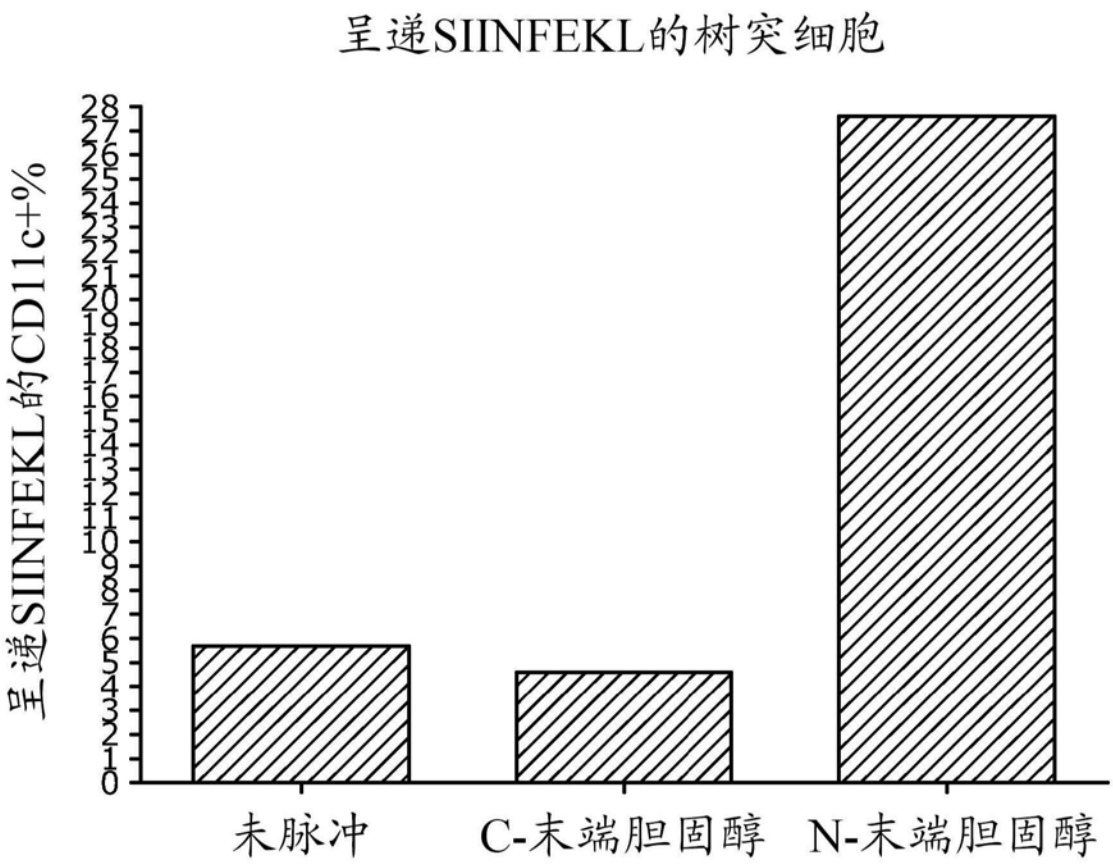


图3续

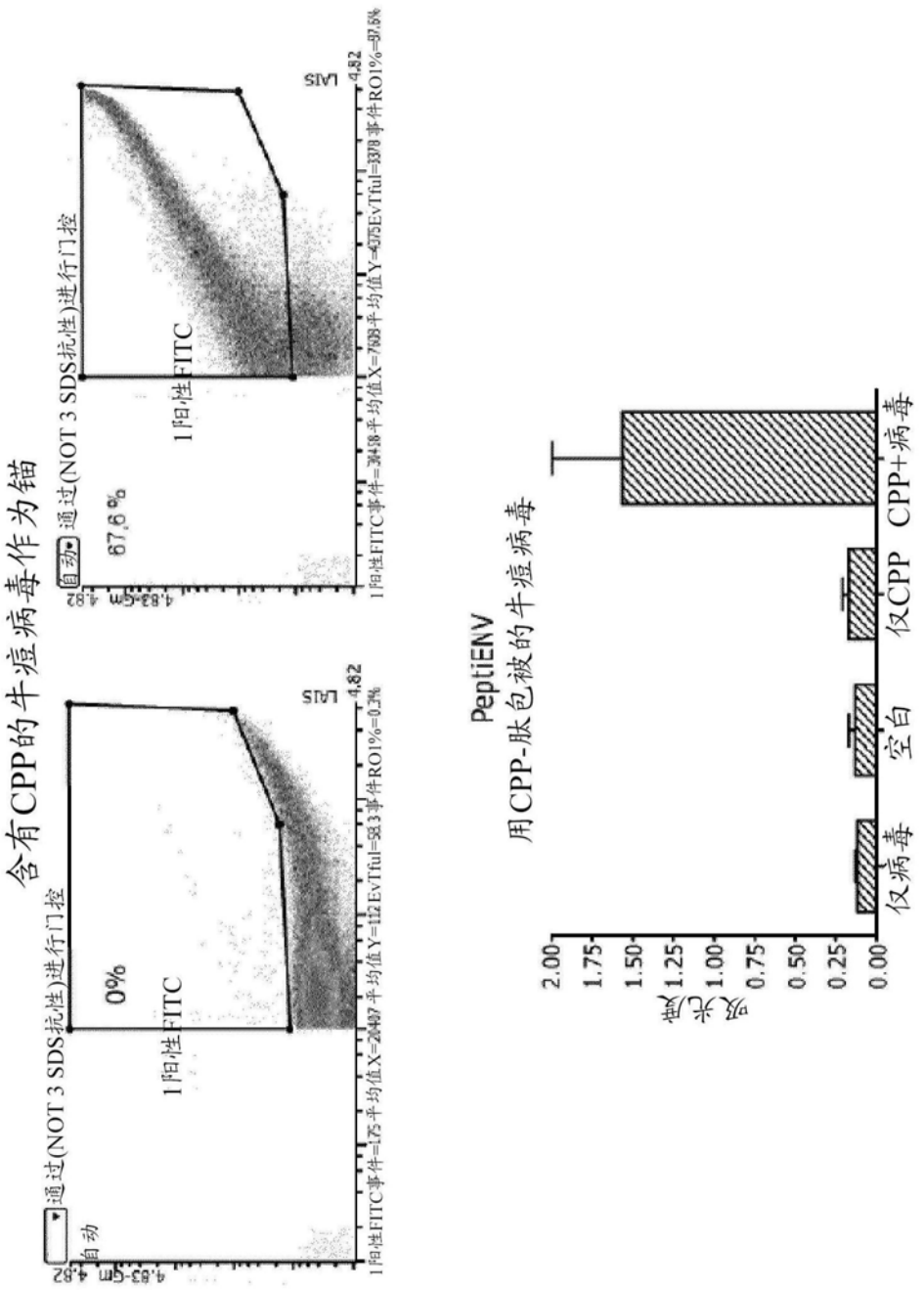

含有CPP的牛痘病毒作为锚
通过(NOT 3 SDS抗性)进行门控
自动
0%
1阳性FITC
SDS
1阳性FITC事件=175 平均值X=20407 平均值Y=112 EvTful=583 事件RO1%=0.3%
通过(NOT 3 SDS抗性)进行门控
自动
67.6 %
1阳性FITC
SDS
1阳性FITC事件=3458 平均值X=7603 平均值Y=4575 EvTful=3378 事件RO1%=97.6%
PeptiENV
用CPP-肽包被的牛痘病毒
荧光强度
2.00
1.75
1.50
1.25
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
仅病毒
空白
仅CPP
CPP+病毒

图4

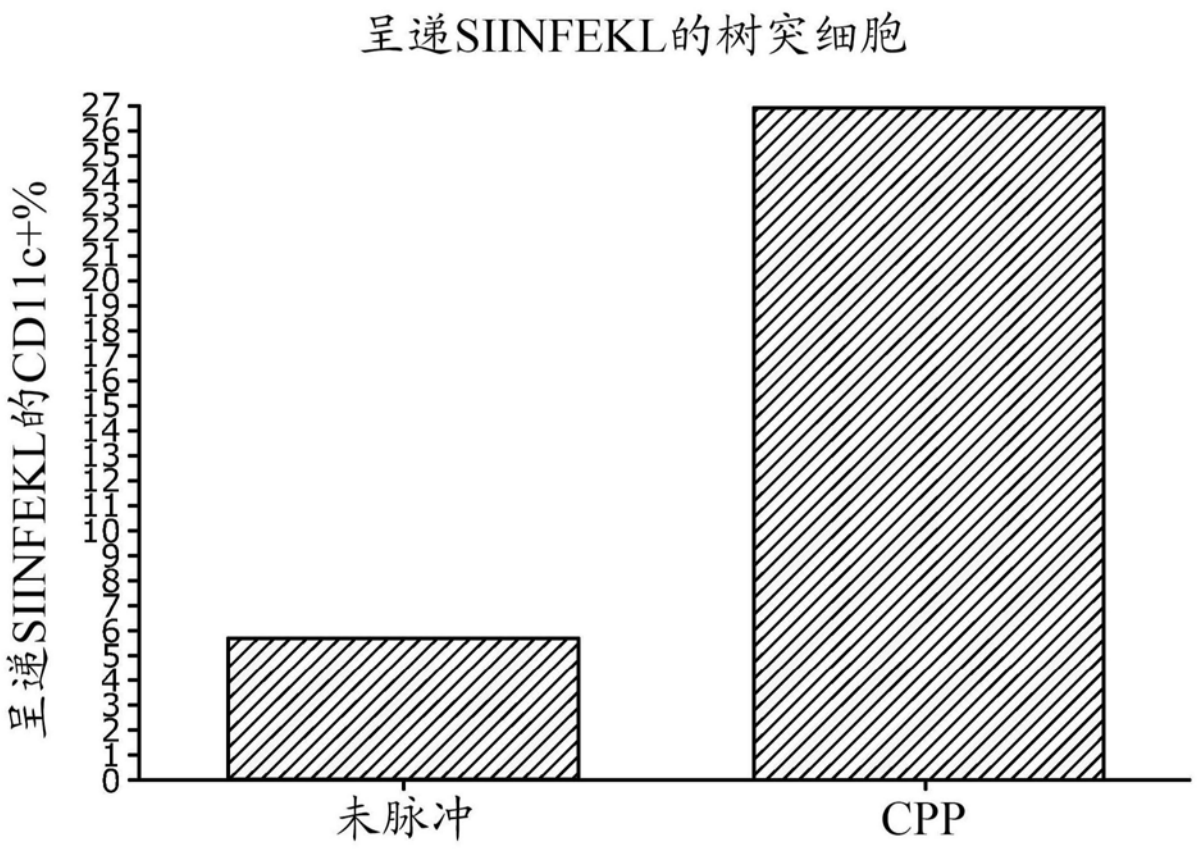

呈递SIINFEKL的树突细胞
呈递SIINFEKL的CD11c+%
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
未脉冲
CPP

图4续

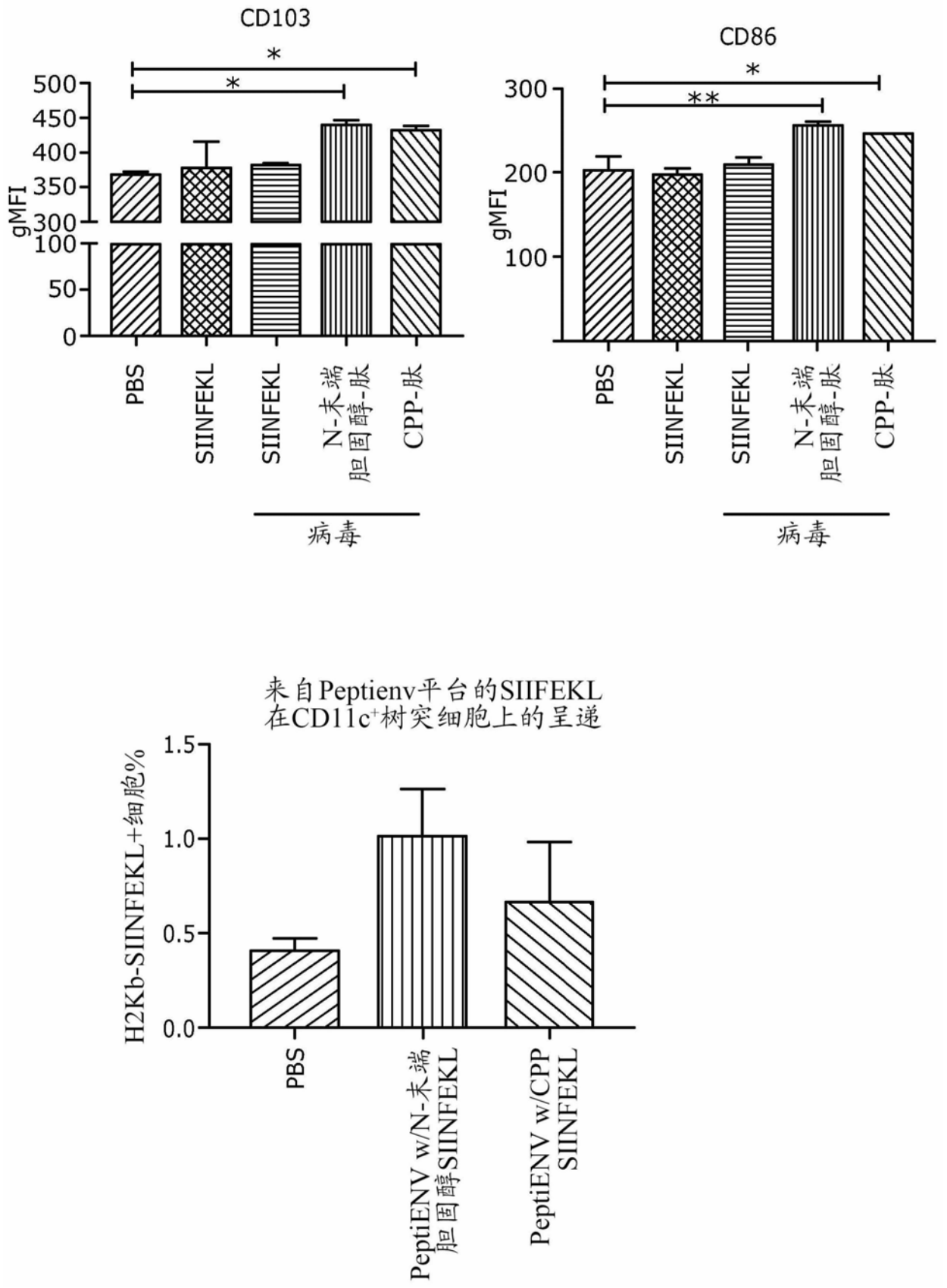

CD103
gMFI
500
450
400
350
300
100
50
0
*
*
PBS
SIINFEKL
SIINFEKL
N-末端
胆固醇-肽
CPP-肽
病毒
CD86
gMFI
300
200
100
*
**
PBS
SIINFEKL
SIINFEKL
N-末端
胆固醇-肽
CPP-肽
病毒
来自Peptienv平台的SIIFEKL
在CD11c+树突细胞上的呈递
H2Kb-SIINFEKL+细胞%
1.5
1.0
0.5
0.0
PBS
PeptiENV w/N-末端
胆固醇SIINFEKL
PeptiENV w/CPP
SIINFEKL

图5

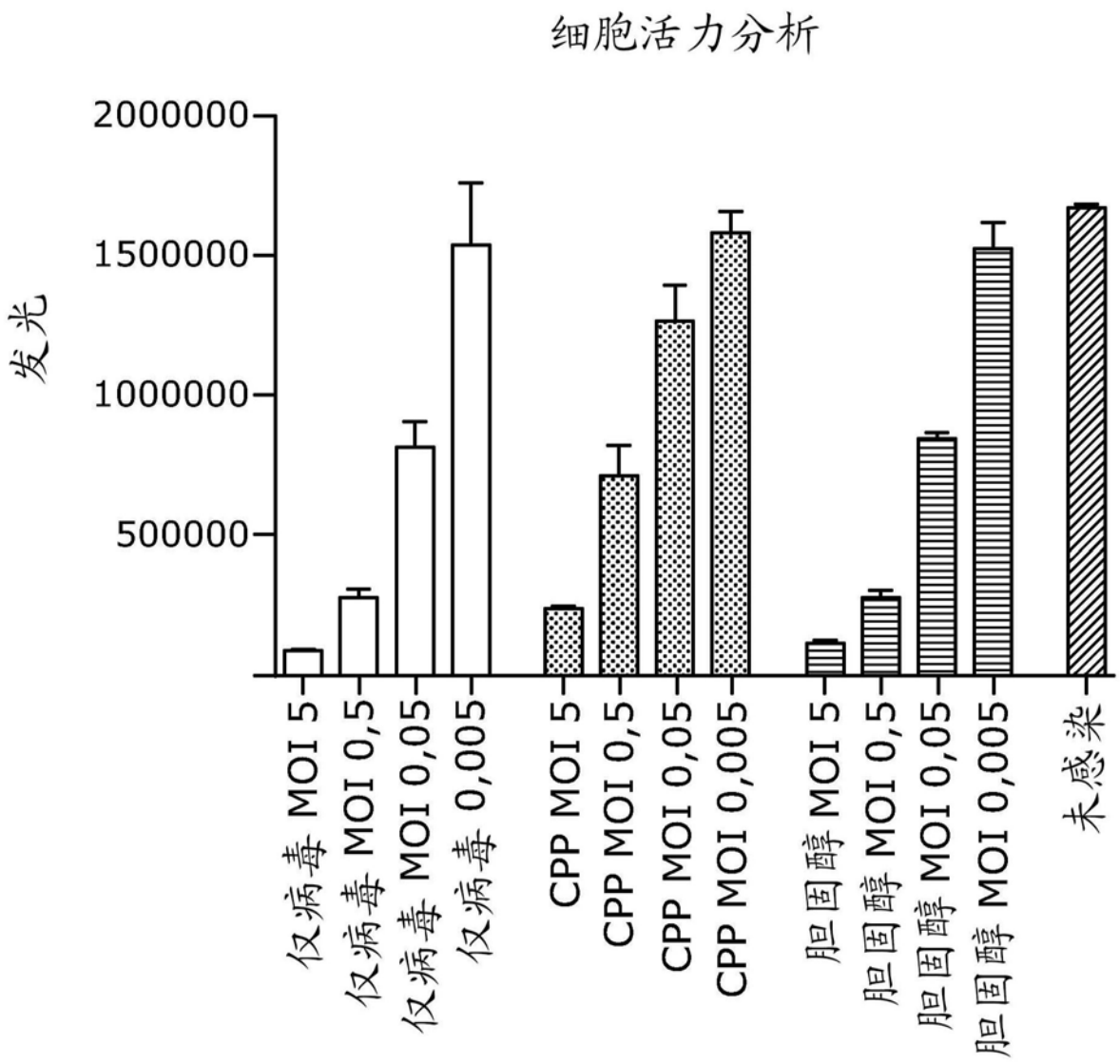

细胞活力分析
发光
2000000
1500000
1000000
500000
仅病毒 MOI 5
仅病毒 MOI 0,5
仅病毒 MOI 0,05
仅病毒 0,005
CPP MOI 5
CPP MOI 0,5
CPP MOI 0,05
CPP MOI 0,005
胆固醇 MOI 5
胆固醇 MOI 0,5
胆固醇 MOI 0,05
胆固醇 MOI 0,005
未感染

图6

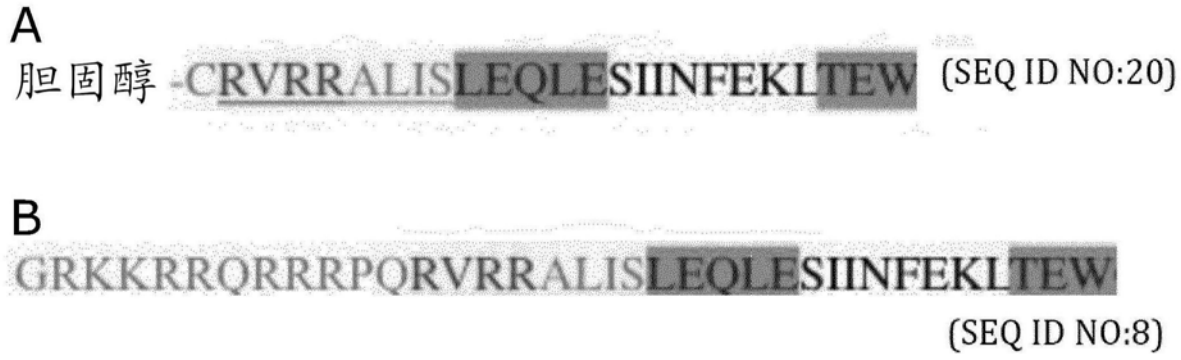

A
胆固醇 -CRVRRALISLEQLESIINFEKLTEW (SEQ ID NO:20)
B
GRKKRRQRRRPQRVRRALISLEQLESIINFEKLTEW
(SEQ ID NO:8)

图7

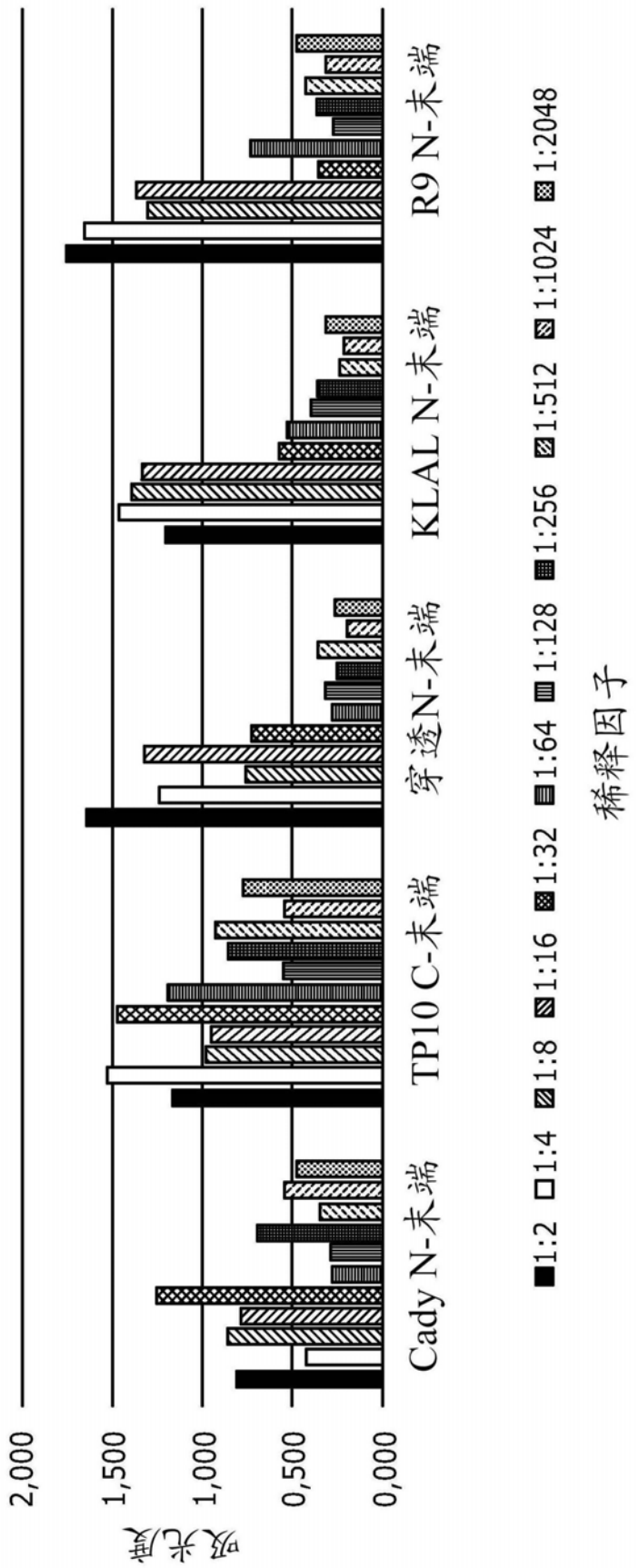

多种不同的细胞穿透肽(CPP)序列可用于将肽连接至病毒包膜
吸光度
2,000
1,500
1,000
0,500
0,000
Cady N-末端
TP10 C-末端
穿透N-末端
KLAL N-末端
R9 N-末端
1:2
1:4
1:8
1:16
1:32
1:64
1:128
1:256
1:512
1:1024
1:2048
稀释因子

图8

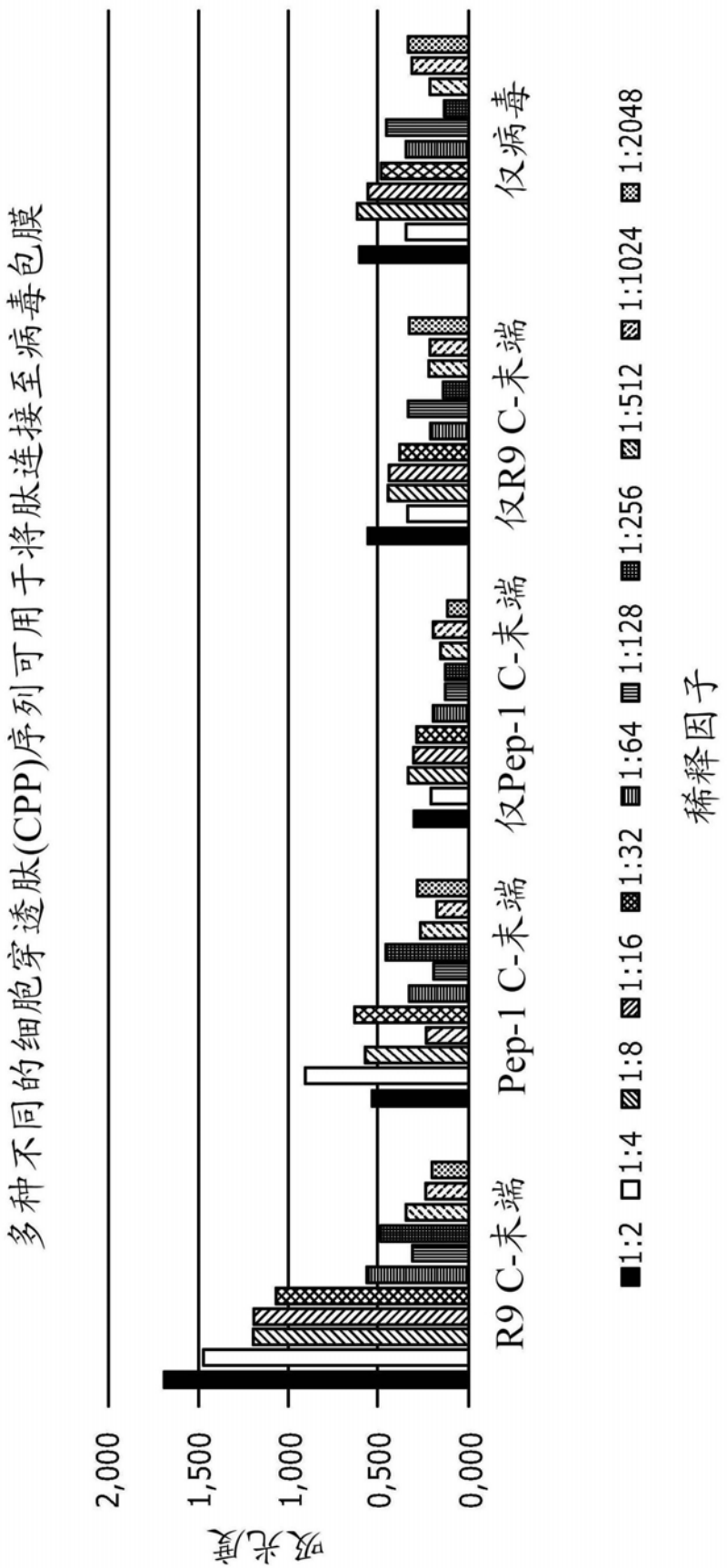

多种不同的细胞穿透肽(CPP)序列可用于将肽连接至病毒包膜
吸光度
2,000
1,500
1,000
0,500
0,000
R9 C-末端
Pep-1 C-末端
仅Pep-1 C-末端
仅R9 C-末端
仅病毒
1:2
1:4
1:8
1:16
1:32
1:64
1:128
1:256
1:512
1:1024
1:2048
稀释因子

图8续

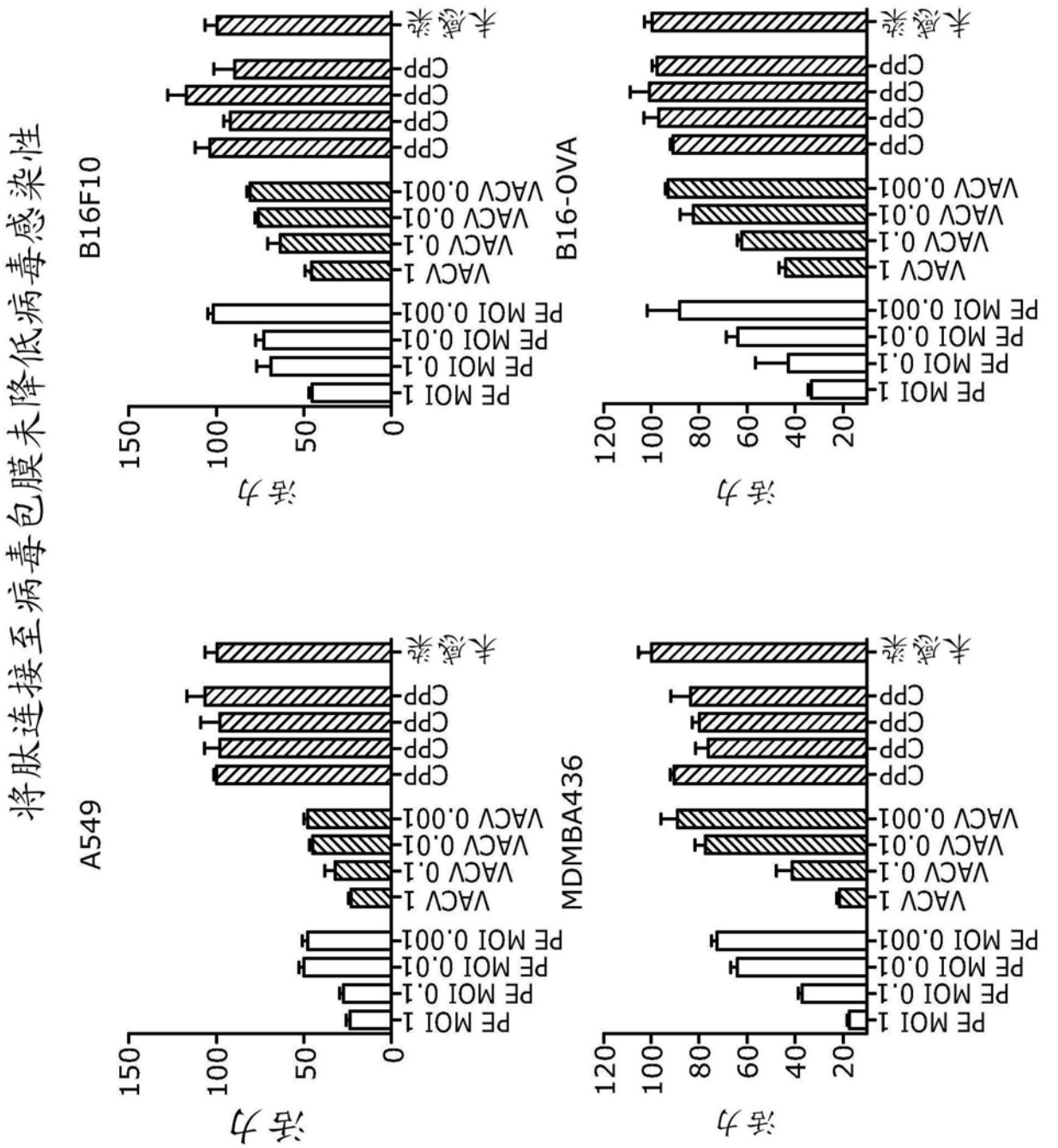

将肽连接至病毒包膜未降低病毒感染性
B16F10
B16-OVA
A549
MDMBA436
活力
PE MOI 1
PE MOI 0.1
PE MOI 0.01
PE MOI 0.001
VACV 1
VACV 0.1
VACV 0.01
VACV 0.001
CPP
CPP
CPP
CPP
未感染

图9

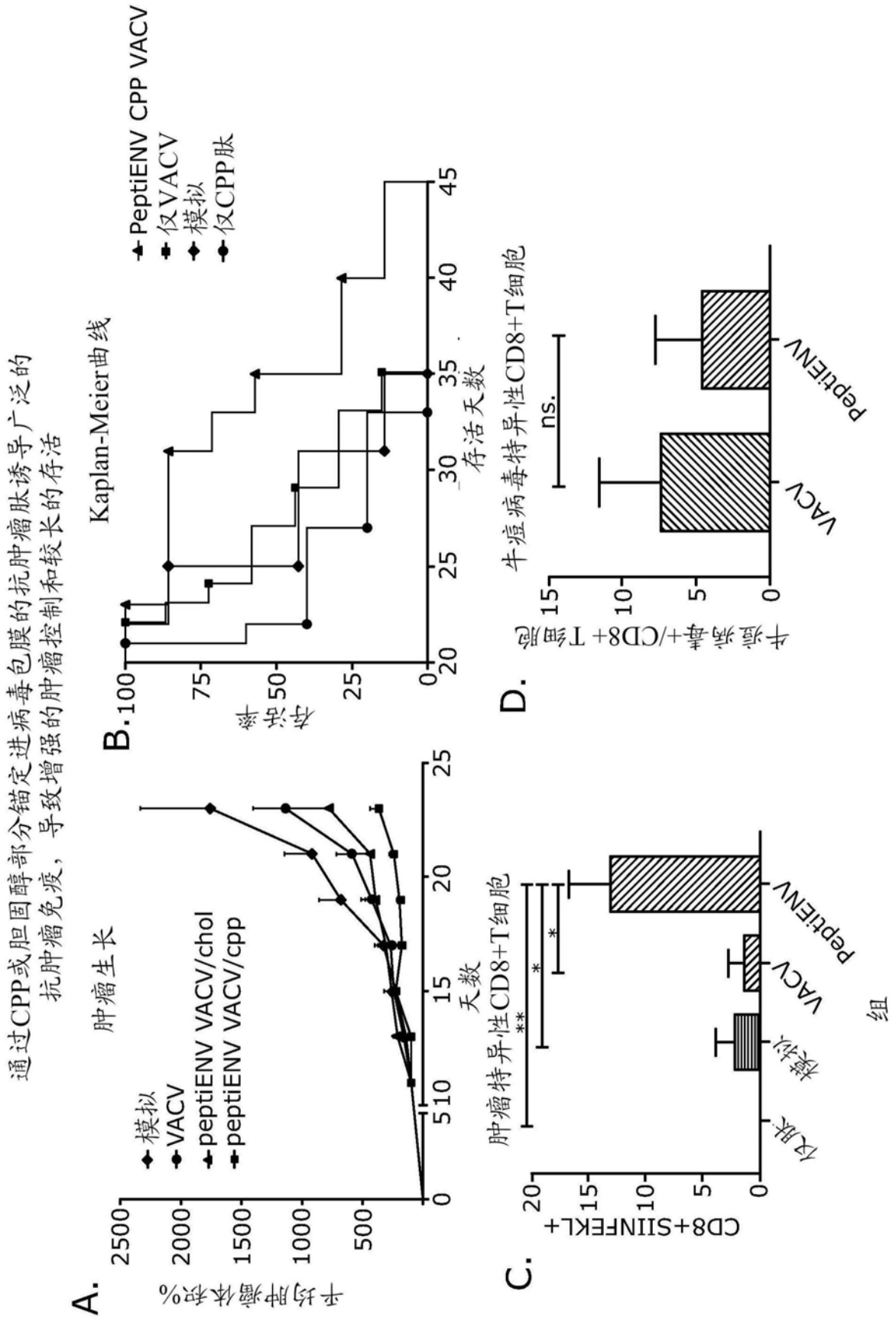

通过CPP或胆固醇部分锚定进病毒包膜的抗肿瘤肽诱导广泛的
抗肿瘤免疫，导致增强的肿瘤控制和较长的存活
A.
肿瘤生长
模拟
VACV
peptiENV VACV/chol
peptiENV VACV/cpp
平均肿瘤体积%
天数
B.
Kaplan-Meier曲线
PeptiENV CPP VACV
仅VACV
模拟
仅CPP肽
存活%
存活天数
C.
肿瘤特异性CD8+T细胞
CD8+SIINFEKL+
天数
D.
牛痘病毒特异性CD8+T细胞
ns.
牛痘病毒+/CD8+ T细胞
组

图10

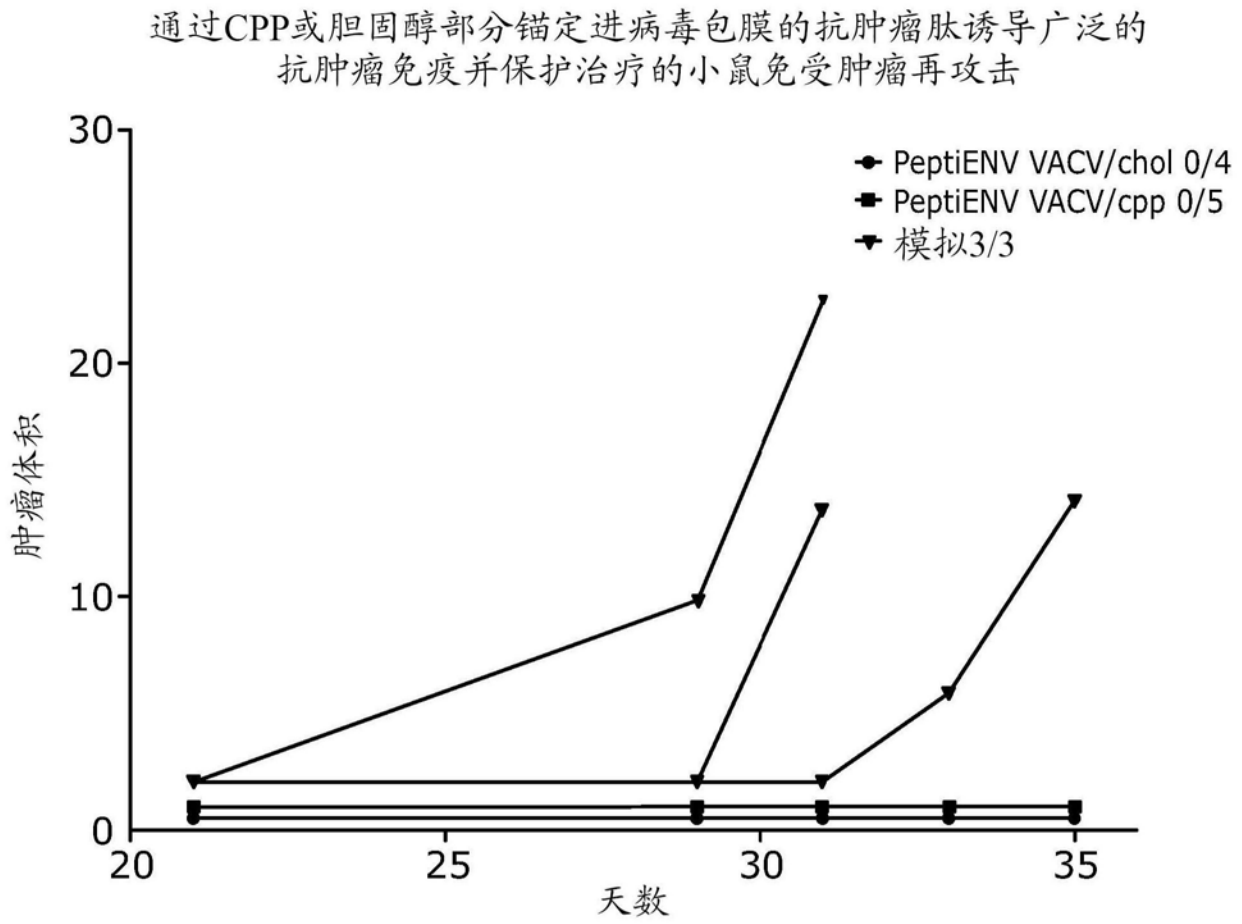

通过CPP或胆固醇部分锚定进病毒包膜的抗肿瘤肽诱导广泛的
抗肿瘤免疫并保护治疗的小鼠免受肿瘤再攻击
PeptiENV VACV/chol 0/4
PeptiENV VACV/cpp 0/5
模拟3/3
肿瘤体积
天数
0
10
20
30
20
25
30
35

图11

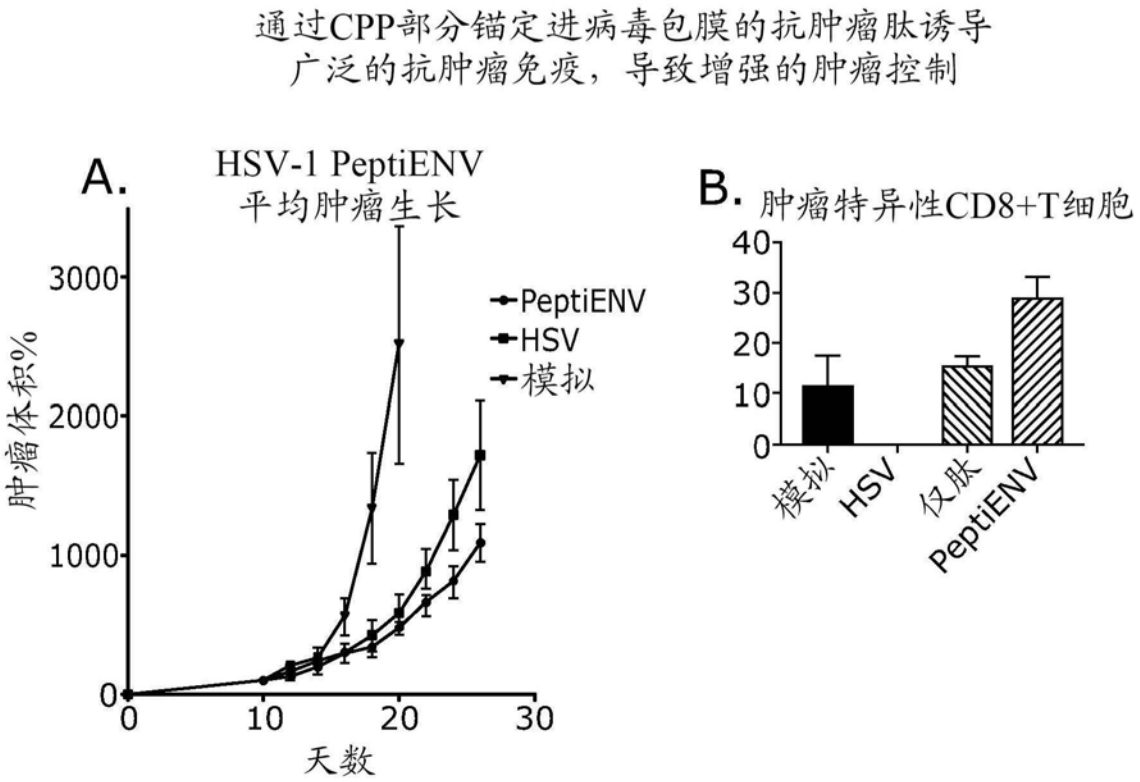

通过CPP部分锚定进病毒包膜的抗肿瘤肽诱导
广泛的抗肿瘤免疫，导致增强的肿瘤控制
A.
HSV-1 PeptiENV
平均肿瘤生长
肿瘤体积%
3000
2000
1000
0
0
10
20
30
天数
PeptiENV
HSV
模拟
B.
肿瘤特异性CD8+T细胞
40
30
20
10
0
模拟
HSV
仅肽
PeptiENV

图12

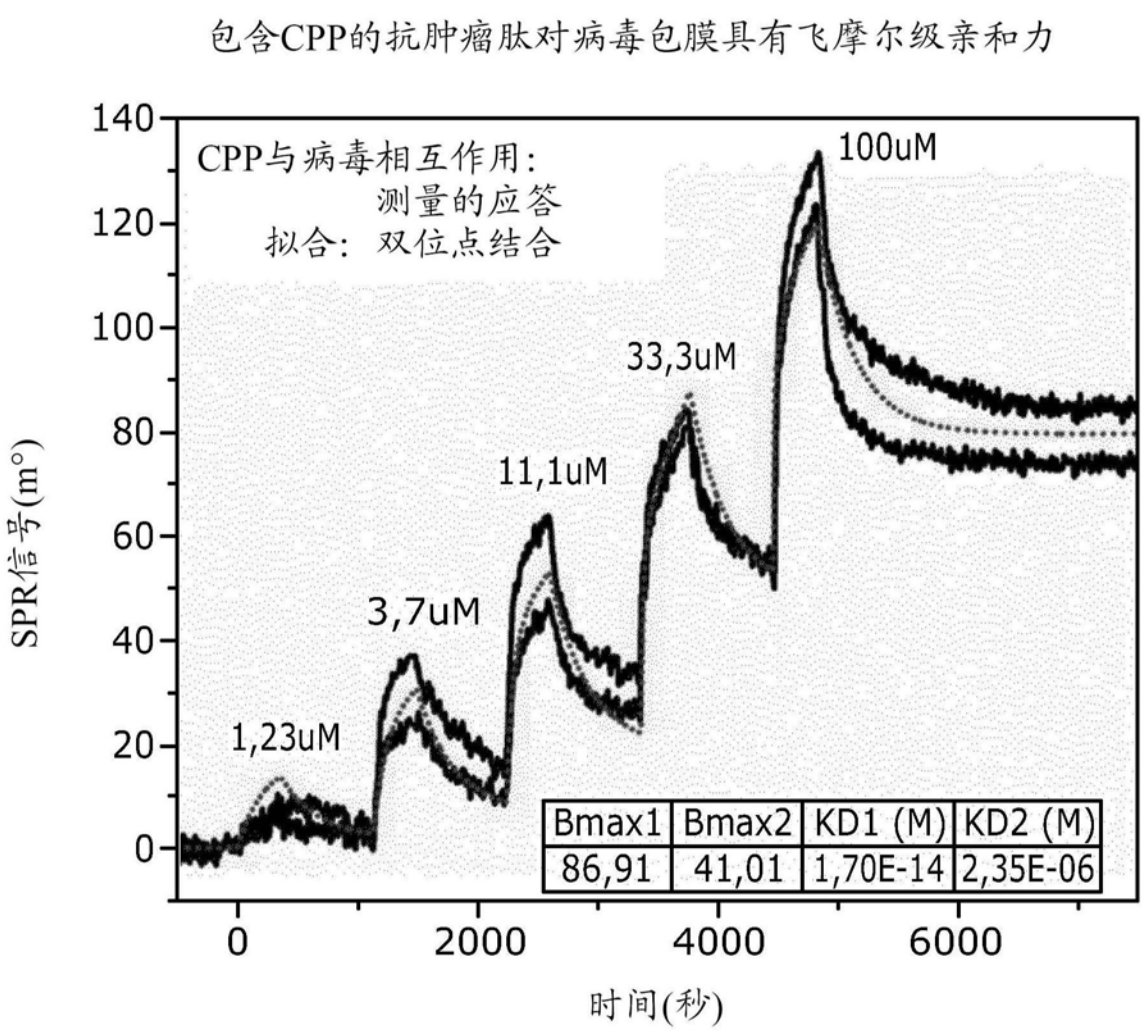

包含CPP的抗肿瘤肽对病毒包膜具有飞摩尔级亲和力
CPP与病毒相互作用:
测量的应答
拟合: 双位点结合
100uM
33,3uM
11,1uM
3,7uM
1,23uM
Bmax1 Bmax2 KD1 (M) KD2 (M)
86,91 41,01 1,70E-14 2,35E-06
SPR信号(m°)
时间(秒)
0
20
40
60
80
100
120
140
0
2000
4000
6000

图13