



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102884194 B

(45) 授权公告日 2015. 07. 22

(21) 申请号 201180013504. 1

(22) 申请日 2011. 03. 11

(30) 优先权数据

61/312, 982 2010. 03. 11 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2012. 09. 11

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2011/028070 2011. 03. 11

(87) PCT国际申请的公布数据

W02011/112915 EN 2011. 09. 15

(73) 专利权人 健康研究股份有限公司

地址 美国纽约州

(72) 发明人 D·科兹博

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司

司 31100

代理人 韦东

(51) Int. Cl.

C12N 15/62(2006. 01)

(56) 对比文件

US 2005002939 A1, 2005. 01. 06,

Eugene H. Huang et al. A CXCR4

Antagonist CTCE-9908 Inhibits Primary Tumor Growth and Metastasis of Breast Cancer.

《Journal of Surgical Research》. 2009,

Elizabeth Bolesta et al. DNA vaccine expressing the mimotope of GD2 ganglioside induces protective GD2 cross-reactive antibody responses. 《Cancer Res》. 2005, 第 65 卷 (第 8 期),

J. Andrea McCart et al. Systemic Cancer Therapy with a Tumor-selective Vaccinia Virus Mutant Lacking Thymidine Kinase and Vaccinia Growth Factor Genes. 《CANCER RESEARCH》. 2001,

Margaret Gil et al. Targeting a mimotope vaccine to activating Fcγ receptors empowers dendritic cells to prime specific CD8⁺ T cell responses in tumor-bearing mice. 《The Journal of Immunology》. 2009,

Margaret Gil et al. Targeting a mimotope vaccine to activating Fcγ receptors empowers dendritic cells to prime specific CD8⁺ T cell responses in tumor-bearing mice. 《The Journal of Immunology》. 2009,

审查员 王溯铭

权利要求书1页 说明书20页

序列表8页 附图9页

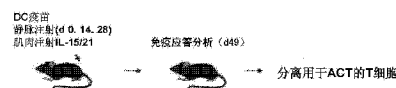
(54) 发明名称

含增强免疫应答的 Fc 融合蛋白的方法和组合物

(57) 摘要

本发明提供了抑制细胞生长的组合物和方法。所述被本发明组合物和方法靶向的细胞表达抗原、所述抗原的模拟表位、或 CXCR4 趋化因子受体。所述方法必须是将编码免疫球蛋白 Fc 和由所述细胞表达的抗原或所述抗原的模拟表位的多核苷酸给予个体。所述方法还涉及将含编码免疫球蛋白 Fc 和由所述细胞表达的 CXCR4 趋化因子受体的拮抗肽的多核苷酸给予所述个体。本发明还提供了由所述多核苷酸编码的蛋白。

A. 用 47-LDA-或 47-LDA-Fc γ 2a-DC 诱导抗肿瘤免疫应答



B. ACT和DC疫苗抑制NXS2肿瘤生长



C. ACT和DC疫苗抑制转移性疾病



1. 编码蛋白的多核苷酸在制备用于抑制肿瘤细胞生长的药物中的应用, 其中由所述多核苷酸编码的蛋白包括:

免疫球蛋白 Fc 和由所述肿瘤细胞表达的受体的拮抗肽, 其中所述拮抗肽由序列 KGVSLSYR (SEQ ID NO:6) 组成且其中所述编码蛋白的多核苷酸存在于重组溶瘤性痘苗病毒中;

从而表达所述受体的肿瘤细胞生长在给予后受到抑制。

2. 如权利要求 1 所述的应用, 其特征在于, 所述 Fc 是人 IgG1 Fc 或人 IgG3 Fc。

3. 如权利要求 1 所述的应用, 其特征在于, 所述药物用于全身给药。

4. 如权利要求 1 所述的应用, 其特征在于, 所述免疫球蛋白 Fc 不包括免疫球蛋白的抗原结合部分。

5. 如权利要求 1 所述的应用, 其特征在于, 编码所述蛋白的多核苷酸存在于抗原呈递细胞中。

6. 一种含编码蛋白的多核苷酸的组合物, 其特征在于, 所述蛋白包括免疫球蛋白 Fc 和由肿瘤细胞表达的受体的拮抗肽, 其中所述拮抗肽由序列 KGVSLSYR (SEQ ID NO:6) 组成且其中所述编码蛋白的多核苷酸存在于重组溶瘤性痘苗病毒中。

7. 一种含权利要求 6 所述多核苷酸编码的蛋白的组合物。

含增强免疫应答的 Fc 融合蛋白的方法和组合物

[0001] 关联申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于 2010 年 3 月 11 日递交的美国专利申请号 61/312,982 的优先权,其说明书通过引用全文纳入本文。

[0003] 关于联邦赞助研究的声明

[0004] 本发明是在美国国立卫生研究院授予的项目号为 R21EB008071 的政府支持下完成的。政府享有本发明一部分权利。

发明领域

[0005] 本发明通常涉及调节免疫应答,且更具体地用 Fc 融合蛋白增强个体中细胞介导的免疫应答。

[0006] 发明背景

[0007] 成功应用癌症疫苗治疗病人还是较为困难,并且不断需要改善刺激针对癌细胞表达抗原的细胞介导和其他免疫应答的组合物和方法的效力。本发明满足了此类和其他相关的需求。

[0008] 发明概述

[0009] 本发明提供了抑制个体中的细胞生长的组合物和方法。被本发明组合物和方法靶向的细胞表达抗原、抗原的模拟表位或 CXCR4 趋化因子受体。

[0010] 在一个实施方式中,所述方法包括将含编码免疫球蛋白(Ig)Fc 和由所述细胞表达的抗原或该抗原的模拟表位的多聚核苷酸的组合物给予所述个体。在另一个实施方式中,该方法包括将含编码免疫球蛋白 Fc 和由所述细胞表达的 CXCR4 趋化因子受体的拮抗肽的多聚核苷酸的组合物给予所述个体。在各种实施方式中,本发明抑制癌细胞的生长,但不限于肿瘤细胞。

[0011] 编码所述 IgFc 的多聚核苷酸在一个实施方式中是重组溶瘤性细胞痘苗病毒。

[0012] 所述多聚核苷酸编码的融合蛋白可包括人 IgG1 Fc 或人 IgG3 Fc,且还可包括 T 辅助细胞表位。本发明也提供了包括编码所述蛋白的多核苷酸和/或所述编码蛋白的组合物。所述蛋白包括免疫球蛋白 Fc 和抗原或所述抗原的肽模拟物,或者免疫球蛋白 Fc 和由癌细胞表达的受体的拮抗肽。

[0013] 附图简述

[0014] 图 1. 在荷瘤小鼠中疫苗接种 47-LDA- 或 47-LDA-Fc γ 2a 致敏的树突状细胞(DCs)和过继性细胞转移(ACT)的示意图。A,疫苗接种 47-LDA- 或 47-LDA-Fc γ 2a 致敏的 DC。在 IL-15 和 IL-21 载体存在下,每两周用 47-LDA- 或 47-LDA-Fc γ 2a 致敏的 DC 免疫 A/J 小鼠(n=5)。第三次免疫后三周,通过阴性选择获取 CD8⁺脾细胞,并将其用于 NXS2 荷瘤小鼠的 ACT。B,ACT 和 DC 疫苗对原发性肿瘤生长的抑制。用 2×10^6 NXS2 细胞攻击 A/J 小鼠。15 天后,ACT 和 DC 疫苗接种前一天通过 5Gy TBI 或 9Gy TBI 加上 BM 转移(10^7 细胞)诱导荷瘤小鼠中的淋巴细胞减少。第 16 天,与 DC 疫苗一起,递送接触过抗原的 CD8⁺T 细胞(2×10^7)的过继性转移。通过每周 1-3 次用测微计测量皮下肿瘤和测定肿瘤体积(宽 $\times$ 长 $\times$ 宽/2=mm³)

来监测肿瘤生长。C, ACT 和 DC 疫苗对转移性疾病的抑制。NXS2 荷瘤小鼠在肿瘤切除时经历了非清髓性(nonmyeloablative)或清髓性 TBI。一天后,该小鼠接受了 DC 疫苗和自免疫小鼠的 CD8⁺T 细胞(2×10^7)或自未免疫未经免疫小鼠的未分离的脾细胞的 ACT。存活时间定义为小鼠因扩展性肿瘤生长或转移发生而处死的时间点。

[0015] 图 2. 47-LDA-Fc γ 2a 融合蛋白及其与 DC 相互作用的表征。A, 47-LDA-Fc γ 2a 融合蛋白和 47-LDA 多肽与生物素化的 14G2 单抗和链霉亲和素-HRP 的蛋白印迹。B, 47-LDA-Fc γ 2a 融合蛋白和 47-LDA 多肽与未成熟 CD11c⁺DC 的结合。源于骨髓(BM)的 DC 用 FITC-偶联的 CD11c 特异性 mAb 联合生物素化的 47-LDA-Fc γ 2a 融合蛋白或 47-LDA 多肽染色,然后用链霉亲和素-PE 染色并通过流式细胞术分析。用抗 CD86-PE mAb 染色的 DC 作为特异性对照涵盖于其中。给定 CD11c 阳性 DC 上的 47-LDA-Fc γ 2a、47-LDA 和 CD86 分子的百分数和平均荧光强度(MFI)。箭头表示直方图中细胞的来源。数据源于所进行三次实验中的一次代表性实验。C, LPS 刺激后,由 47-LDA-Fc γ 2a⁺、47-LDA⁺、CD86⁺DC 和其阴性对应物细胞内表达的 IL-12p70。未成熟 DC 用生物素化的 47-LDA-Fc γ 2a 融合蛋白、47-LDA 多肽或 CD86 特异性单抗染色,然后用链霉亲和素-PE 染色。在 BD FACS AriaTM流式细胞仪上分选阳性和阴性细胞群,用 1 μ g/ml LPS 孵育过夜,并通过用对 IL-12p35 亚单位特异的大鼠抗小鼠 IL-12p70 单抗,然后用羊抗大鼠二抗的细胞内染色分析 IL-12p70 表达。用同型对照抗体估计本底染色(MFI<2.6)。所有流式细胞术评价都在 FACScan 或 FACSCalibur 流式细胞仪上进行。在前向角和侧向角散射参数上设门后,用 CellQuest 软件常规获取并分析至少 10,000 个门内事件。数据源于所进行三次实验中的一次代表性实验。

[0016] 图 3. LPS 刺激后, CCL22 在 47-LDA⁺和 47-LDA-Fc γ 2a⁺DC 中的分化表达和由 47-LDA- 和 47-LDA-Fc γ 2a-DC 疫苗对 CD4⁺脾细胞中的 IFN- γ 和 TNF- 的诱导。未成熟 DC 用生物素化的 47-LDA-Fc γ 2a 融合蛋白、47-LDA 多肽或 CD86 特异性单抗染色,然后用链霉亲和素-PE 染色。在 BD FACS AriaTM流式细胞仪上分选 BD 47-LDA⁺ (A) 和 47-LDA-Fc γ 2a⁺ (B) DC, 用 1 μ g/ml LPS 孵育 24 小时,并通过用大鼠抗小鼠 CCL22 单抗,然后羊抗大鼠二抗的细胞内染色分析 CCL2 表达。CCL22 表达阳性的细胞的 MFI 和百分数如图所示。浅灰色区域指用同型对照抗体估计的本底染色。数据源于所进行三次实验中的一次代表性实验。C, 47-LDA-DC 和 47-LDA-Fc γ 2a-DC 疫苗(分别为黑色和阴影柱)免疫小鼠的脾细胞中的 IFN- γ 和 TNF- α 的表达(分别为黑色和阴影柱)。在 IL-15 和 IL-21 载体存在下,用 LPS 诱导成熟后的,包被 47-LDA 多肽或 47-LDA-Fc γ 2a 融合蛋白的 DC 免疫 A/J 小鼠(n=5)三次。从用 LPS 处理过的 DC 免疫的小鼠中分离的细胞作为对照(空心柱)。最后一次免疫后三周,通过用表达 47-LDA 模拟表达的 DC 过夜刺激后的细胞内染色分析 IFN- γ 和 TNF- α 在 CD4⁺脾细胞中的表达。D, NXS2 神经母细胞瘤特异性的 CTL 应答。通过阴性选择获取源自 47-LDA-DC (●) 和 47-LDA-Fc γ 2a-DC (■) 疫苗免疫小鼠的 CD8⁺脾细胞。如材料和方法部分所述,用表达 47-LDA 的 DC (黑色图标)或空质粒转染的 DC (空心图标)以 20:1 的比例培养细胞。在标准 ⁵¹Cr 释放试验中分析对 NXS2 细胞的 CTL 活性。所有测定为三重样品所测, SD 且 SD<10%。结果表述为四次独立实验的均值 $\pm$ SDSD。

[0017] 图 4. 47-LDA-DC 和 47-LDA-Fc γ 2a-DC 疫苗免疫小鼠中的调节性 T (Treg)细胞诱导和功能的分析。最后一次 47-LDA-DC (A)或 47-LDA-Fc γ 2a-DC (C)免疫后三周,摘除腋窝淋巴结,并通过抗 CD4-PE、抗 CD25-FITC 和抗 FoxP3-AlexaFluor 647 单抗,或相关同型对

照染色分析其 Treg 细胞表达。直方图说明门内群(CD4⁺CD25⁺细胞)中表达 FoxP3。为分析 Treg 细胞对 Teff 细胞增殖的影响,来自 47-LDA-DC (B) 或 47-LDA-Fc γ 2a-DC (D) 疫苗免疫小鼠的 CD8⁺细胞装载 CFSE,并在有或无 Treg 细胞(比例 1:1)的条件下,用表达 47-LDA 的同系 DC (比例 20:1)培养 72 小时。细胞用 PE 偶联的抗 CD8mAb 染色,并用流式细胞术分析。标示经历一轮以上细胞分化的细胞百分比。数据源于所进行三次实验中的一次代表性实验。

[0018] 图 5. 47-LDA- 和 47-LDA-Fc γ 2a-DC 疫苗和 ACT 对 NXS2 原发性和转移性肿瘤生长的抑制。上图, ACT 和 47-LDA-DC 疫苗(A) 和 47-LDA-Fc γ 2a-DC 疫苗(B) 针对原发性肿瘤生长的保护。A/J 小鼠(n=8-10)皮下注射 2×10^6 NXS2 细胞,并在 15 天后,用静脉过继性转移分离自 47-LDA 或 47-LDA-Fc γ 2a 疫苗免疫的同系小鼠的富集 CD8⁺的脾细胞治疗。如材料和方法部分所述,通过 TBI (5Gy ;●) 或(9Gy ;■) 加上 CD8⁺T 细胞转移前一天的 BM (10^7 细胞)移植诱导荷瘤小鼠的淋巴细胞减少。在 IL-15 和 IL-21 载体存在下,小鼠每两周免疫所述 DC 疫苗。5Gy (○) 或 9Gy (□) 辐射加上 BM 移植的 NXS2 荷瘤小鼠作为对照。下图,过继转移的 CD8⁺脾细胞和 47-LDA-DC (C) 和 47-LDA-Fc γ 2a-DC (D) 疫苗对转移性疾病的控制。对于扩散性疾病的免疫治疗,在肿瘤切除时,经历非骨髓性(5Gy ;●)或骨髓性(9Gy ;■) TBI 的 NXS2 荷瘤 A/J 小鼠接受来自免疫小鼠的 CD8⁺脾细胞(2×10^7 细胞)的 ACT 以及 47-LDA- 或 47-LDA-Fc γ 2a-DC 疫苗。5Gy (○) 或 9Gy (□) 辐射加上 BM 移植的 NXS2 攻瘤小鼠作为对照。E, NXS2 攻瘤小鼠接受来自未免疫 A/J 小鼠的 ACT 以及 DC 疫苗。在 IL-15 和 IL-21 载体存在下,小鼠每两周免疫所述 DC 疫苗。对照小鼠具有有用有(○)或无(□) TBI 和 BM 移植所切除的原发性肿瘤。存活时间定义为小鼠因扩展性肿瘤生长或转移发生而处死的时间点。绘制 Kaplan-Meier 生存曲线,并用对数秩 Mantel-Cox 方法确定显著性。

[0019] 图 6. ACT 和 DC 疫苗接种后,荷瘤和无瘤小鼠的细胞应答分析。上图,NXS2 荷瘤小鼠的脾细胞中缺乏增殖性应答(A) 和 CTL 活性(B)。A, 未免疫小鼠脾细胞的 ACT 和 47-LDA 多肽 -DC 疫苗免疫后,进展为渐进性生长肿瘤的小鼠中分离的脾细胞装载 CFSE,并用表达 47-LDA 的同系 DC (比例 20:1)培养 72 小时。细胞用 PE 偶联的抗 CD4 或抗 CD8 单抗染色,并用流式细胞术分析。标示经历一轮以上细胞分化的细胞百分比。数据源于所进行四次实验中的一次代表性实验。B, 用标准 ⁵¹Cr 释放试验分析荷瘤小鼠的刺激或对照 CD8⁺脾细胞针对 NXS2 细胞的 CTL 活性。所有测定为三重样品测得,且结果表述为三次独立实验的均值 $\pm$ SD。下图,接受来自未免疫小鼠的 ACT 和 47-LDA-Fc γ 2a-DC 疫苗后,无瘤小鼠中的增殖性应答(C) 和对 NXS2 的 CTL 活性(D) 分析。如上图中所述进行实验。

[0020] 图 7. 带有 rOVV-EGFP 或 rOVV-47-LDA-Fc γ 2a 融合蛋白的基于溶瘤性病毒疗法的治疗性癌症疫苗。A, rOVV-47-LDA-Fc γ 2a 载体对肿瘤生长的抑制。A/J 小鼠(n=10)皮下注射 2×10^6 NXS2 细胞,并在 15 天后静脉注射 10^8 PFU rOVV-47-LDA-Fc γ 2a (▲) 或 rOVV-EGFP (■) 载体治疗。PBS 治疗的荷瘤小鼠作为对照(○)。存活时间定义为小鼠因扩展性肿瘤生长或转移发生而处死的时间点。绘制 Kaplan-Meier 生存曲线,并用对数秩 Mantel-Cox 方法确定显著性。B, 肿瘤特异性免疫记忆保护小鼠免受 NXS2 再次攻击。rOVV-47-LDA-Fc γ 2a (▲) 或 rOVV-EGFP (■) 载体治疗的无瘤小鼠用 NXS2 再次攻击。NXS2 肿瘤攻击的未治疗小鼠作为对照(○)。每天检查动物,直至肿瘤可触,其后通过每周测量皮下肿瘤 1-3 次监测肿瘤生长。

[0021] 图 8 提供了图形化表示的数据, 显示出本发明有效抑制临床相关的小鼠模型中的 FADU 和 4T1 肿瘤的生长。为获取图 8 中总结的数据, 小鼠皮下(s.c)植入 FACU 或 4T1 肿瘤细胞。每天通过静脉注射递送转染细胞上清的蛋白 G 柱上纯化的 CTCE-9908-Fc 融合蛋白(200 毫克/小鼠)。通过每周用测微计测量皮下肿瘤 1-3 次和测定肿瘤体积(宽 × 长 / 宽 / 2=mm³) 监测肿瘤生长。

[0022] 图 9. CXCR4-A-Fc 融合蛋白及其与 CXCR4 的相互作用的表征。A, 非还原(NRC)和还原(RC)条件下分离自病毒感染细胞上清的 CXCR4-A-Fc 的蛋白印迹。B, CTCE-9908 肽对 CXCR4-A-Fc 与 SUPT-1 细胞上的 CXCR4 结合的抑制。用生物素化的 CXCR4-A-Fc (300 μg/ml) 孵育细胞, 并分析其与链霉亲和素-PE 的结合。对于抑制试验, 用 CTCE-9908 肽(100 μg/ml) 孵育所述细胞, 然后用融合蛋白染色。用同型对照估计本底染色。C. 融合蛋白对迁移的抑制。4T1 细胞(5×10⁴)种在仅有培养基或含 CXCR4-A-Fc 或 CTCE-9908 肽(100 μg/ml) 的培养基中的 8 μm transwell (转移室) 系统的上室中。下室加入 1ml 含 SDF-1 (1,000ng/ml) 的培养基。经 transwell 膜迁移 10 小时后, 固定细胞, 染色并在 6 个观察视野中计数, 以量化迁移。结果为每显微镜视野下的迁移细胞数量的均值 ± SD。实验值减去对照培养物中的迁移细胞数量。数据为三次实验中的一次代表性实验。D. CXCR4-A-Fc 对 SDF-1 诱导钙动员的抑制。在 37℃ 下避光, 将 10 μM 吲哚-1AM 装载细胞(1×10⁶) 45 分钟。3 至 5 分钟的基底荧光检测后, 将 CTCE-9908 或 CXCR4-A-Fc (300 μg/ml) 加至装载吲哚-1 的细胞中, 然后加入 SDF-1 (50ng/ml)。记录作为时间函数的荧光变化值, 并通过测量 410nm 发射光(钙结合吲哚-1)与 490nm 发射光的比值而确定。收集 SDF-1 和抑制剂给药前后一段时间(0-5 分钟)内的 410 和 490nm 发射光以及 410:490 比值。数据为两次实验中的一次代表性实验。***, P<0.0001。

[0023] 图 10. 单独或联合递送 OVV-CXCR4-A-Fc 或 ASA404 对 4T1 原发性和转移性肿瘤生长的抑制。A. 接种 BALB/c(n=8-12)和 7×10⁴4T1 细胞到胸乳腺脂肪垫中。带有 100-150mm³ 肿瘤体积(V)的 4T1 荷瘤小鼠静脉注射 OVV-EGFP 或 OVV-CXCR4A-Fc (10⁸PFU) 或最大耐受剂量的 ASA404 (20mg/kg)。B. 单独或联合递送 OVV-CXCR4-A-Fc 或 ASA404 对 4T1 原发性和转移性肿瘤生长的抑制。绘制 Kaplan-Meier 生存曲线且确定肿瘤攻击组小鼠的中位生存时间。用对数秩 Mantel-Cox 方法估计生存时间的组间统计学差异。C. 对于转移性疾病疗法, 4T1 荷瘤小鼠经历单独或联合 ASA404 的溶瘤性病毒疗法(V= 约 200mm³), 且肿瘤八天后切除。对照小鼠未经治疗切除肿瘤。存活时间定义为小鼠因扩展性肿瘤生长或转移发生而处死的时间点。D. 单细胞悬液免疫荧光染色处理后 4 天, 通过流式细胞术确定 MDSC (Gr1⁺, CD11b⁺, Ly6G⁺) 在肿瘤微环境中的百分数。E. 通过 ELISA 试验测定由肿瘤制得的细胞裂解液中的 SDF-1 水平(*, P<0.05 ;***, P<0.0001)。数据表示为三次独立实验的算术均值 ± SD。

[0024] 发明详述

[0025] 本发明利用了我们的发现, 即含抗体 Fc 区和 i) 模拟存在于抗原中表位的模拟表位; 或 ii) 癌细胞上表达的受体的肽拮抗剂的融合蛋白能用于增强对表达该抗原的细胞的免疫应答, 且抑制通过该肽拮抗剂结合的受体的信号转导。本发明涵盖含此类融合蛋白的组合物、含编码此类融合蛋白的多核苷酸的组合物和使用此类组合物预防和治疗疾病的方法。所述方法包括将本发明组合物给予个体, 以使表达所述抗原的细胞或表达所述肽拮抗

剂结合的受体的细胞的生长受到抑制。

[0026] 本文所用的“模拟表位”是指模拟表位结构的肽序列。对所述模拟表位产生的免疫应答会指向其模拟的所述表位,还因此会识别含所述表位的抗原。在一个实施方式中,认为所述模拟表位自身能作为抗原起作用。

[0027] 我们证明了包括含活化性 Fc 融合蛋白和模拟表位或癌细胞上表达的受体的肽拮抗剂的融合蛋白的治疗性疫苗产生了抗肿瘤应答,所述应答的特征部分在于刺激抗原特异性 T 细胞。

[0028] 在本发明的具体证明中,我们显示出活性 Fc 融合蛋白环境中表达的含 GD2 神经节苷脂的 CD166 交叉反应性模拟表位(本文称为“47-LDA”)的治疗性疫苗在荷瘤同系小鼠中产生了肿瘤特异性 T 细胞。所述模拟表位表达为与通用 T 辅助细胞表位和小鼠 IgG2a Fc 片段相连的融合蛋白(47-LDA-Fc γ 2a),以递送所述抗原性盒至树突状细胞(DC)上的活化性 Fc γ 受体。

[0029] 47-LDA 模拟表位的序列是 GP GPGEDPSHSLGLDAALFM (SEQ ID NO:1)。SEQ ID NO:2 提供包括通用 T 辅助细胞表位和 47-LDA 模拟表位的示范性氨基酸序列,其为:

[0030] KCKRQCGPGGAKFVAAWTLKAAAGPGPGCKRKIHIGPGQAFYTGPG PGEDPSHSLGLDAALFM。SEQ ID NO:2 中 1-6 位氨基酸组成间隔。7-11 位和 25-29 位氨基酸组成接头。虽然认为任意 T 辅助细胞表位可与本发明结合, T 辅助细胞表位的非限制实施方式包括称为非天然泛(pan) DR 表位(PADRE)的通用 Th 肽 [AKFVAAWTLKAAA SEQ ID NO:3] 和 HIV gp120 糖蛋白的 V3 环 [CKRKIHIGPGQAFYT SEQ ID NO:4]。这些代表性的 T 辅助细胞表位也各显示于 SEQ ID NO:X 中。

[0031] 我们也显示出,用 47-LDA-Fc γ 2a 融合蛋白免疫荷瘤小鼠诱导出比 47-LDA 多肽-树突状细胞(DC)疫苗更高水平的抗肿瘤免疫应答和保护。治疗性 47-LDA-Fc γ 2a-DC 疫苗的抗肿瘤效力与通过使用表达 47-LDA-Fc γ 2a 融合蛋白的重组溶瘤细胞痘苗病毒(rOVV)的病毒疗法相关癌症疫苗所得到的效力相当。然而,后者治疗不需要全身照射(TBI)或过继性细胞转移(ACT),且在已建立的耐受环境中导致抗肿瘤免疫应答的诱导。

[0032] 在本发明另一个实施方式中,我们运用了作为 CXCR4 趋化因子受体拮抗剂的抗癌试剂(CTCE-9908)。该 CXCR4 的肽拮抗剂包括氨基酸序列:KGVSLSYR-K-RYSLSVGK (SEQ ID NO:5)。因而,在一个实施方式中,CXCR4 的肽拮抗剂包括序列 KGVSLSYR (SEQ ID NO:6)。

[0033] CTCE-9908 阻断 CXCR4 受体与 CXCL12 的在转移性细胞浸润器官组织中至关重要的相互作用,从而减少了肿瘤转移。多种肿瘤细胞类型表达 CXCR4 受体。CTCE-9908 肽已由加拿大温哥华的趋化因子治疗公司(Chemokine Therapeutics)开发,并已用于晚期癌症病人中的 I/II 期临床试验。通过进行本发明的方法,我们利用了 Fc 片段天然存在的二硫键以保持 CTCE-9908 肽的二聚体结构。我们在 DNA 载体中,在活化性小鼠和人 Fc γ 片段(分别为 IgG2a 和 IgG1)的环境中,表达了 CTCE-9908 肽,并证实了该构建体在具有小鼠版 CTCE 融合蛋白的小鼠同系(T41 乳癌)和异种移植(FADU 人头颈癌)模型中的抗肿瘤效果。我们相信其通过调动抗体依赖性细胞毒性(ADCC)肿瘤杀伤机制放大了该治疗效果。因而,本发明提供了各种增强对抗原的免疫应答的组合物和方法,其中所述抗原为与优选结合活化的 Fc γ 受体的免疫球蛋白(Ig)Fc 区组合的融合构建体。因此,在一个实施方式中,本发明提供了包括融合构建体的组合物,其中所述融合构建体包括小鼠 IgG2a 或人 IgG1 的 Fc 区或此类

Fc 区的片段。在各种实施方式中,尽管也可使用来自其他抗体类型的 Fc 区,或合成 / 人造的 Fc 区,Fc 区是来自 IgA、IgG 或 IgE 抗体的 Fc 区或其片段。所述 Fc 区可包括或由与哺乳动物,如人产生的 Fc 区相同的氨基酸序列组成。在各种实施方式中,所述 Fc 区可具有与由小鼠和 / 或人产生的 Fc 区 80% 至 100% 之间(涵盖其间的所有整数)的氨基酸序列相似性。所述 Fc 区可以是完整 Fc 区,意指整个 Fc 区,或者可以是所述 Fc 区的片段。Fc 区的片段优选包括特异性结合 Fc γ 受体的氨基酸序列。本领域普通技术人员知道,抗体的所述“Fc 区”是指所述抗体的“可结晶的片段”区,其包括取决于抗体的种类而构成两或三种恒定结构域(CD)的两条重链。本领域熟知编码 Fc 区的核苷酸序列,以及小鼠和人免疫球蛋白的 Fc 区氨基酸序列。在一个实施方式中,用作本发明中的 Ig 区的合适的智人 Ig γ -1C 区具有序列 ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKVEP KSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSD HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK (SEQ ID NO:7)。

[0034] 在另一个实施方式中,合适的人 Ig γ -3 链 C 区具有 ASTKGPSVFP LAPCSRSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YTCNVNHKPS NTKVDKRVEL KTPLGDTTHT CPRCPEPKSC DTPPPCPRCP EPKSCDTPPP CPRCPEPKSC DTPPPCPRCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVQFKWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTFRVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKTK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESSGQPENN YNTTPPMLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NIFSCSV MHEALHNRYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:8)。

[0035] 因为个别抗体同种型拥有对 Fc γ 受体(带有对小鼠 IgG2a 和 IgG2b 同种型或人 IgG1 和 IgG3 同种型较高亲和力的活化性 Fc γ 受体)的不同亲和力,所以由所呈递的抗原复合物结合的活化性-抑制性受体之比的差异可预测 DC 诱导免疫应答的能力。控制此通路可募集通过抗体疗法或癌症疫苗的获得性免疫力和免疫记忆。

[0036] 在一个实施方式中,所述融合蛋白的 Fc 部分仅包括抗体重链。

[0037] 本领域技术人员知道为使用小鼠动物模型证实本发明,所述融合蛋白的 Fc 部分优选为 IgG2a 或 IgG2b Fc 小鼠 Ig 部分,而为了人疾病的治疗和 / 或预防,所述 Fc 部分优选为 IgG1 或 IgG3Fc 部分。

[0038] 在某些实施方式中,本文提供的所述融合蛋白的 Fc 部分不涵盖抗原识别部分(即所述融合蛋白的抗体部分不含抗体可变区)。因而,所述融合蛋白不同于含抗原结合部分的抗体,且这还可能涵盖交叉链接的或以其他方式连接的模拟表位、抗原或肽受体配体。

[0039] 编码所述 Fc 融合蛋白的 DNA 构建体能用本领域技术人员熟知的任意常规技术制得。例如,所述 Fc 融合编码构建体能用商购试剂制得。比如,英杰公司(INVIVOGEN)提供的 pFUSE-Fc 系列质粒,其开发以便于通过将编码给定蛋白序列融合至免疫球蛋白(Ig) Fc 区来构建 Fc 融合蛋白。在此构建体中,所述 Fc 区包括 IgG 重链和铰链区的 CH2 和 CH3 结构域。所述铰链作为所述 Fc 融合蛋白两部分之间的灵活间隔起作用,这允许所述融合蛋白的每一部分独立地行使功能。一般地,活化 Fc γ 受体的任意 Fc 区(和相应地,编码此 Fc 区的任意多核苷酸)能用于进行本发明。

[0040] 编码该融合蛋白的 DNA 构建体能够通过使用任意适当的蛋白表达系统表达产生用于分离和 / 或纯化,或用于治疗性目的的融合蛋白。各类标签或其他部分能添加至该融合蛋白,使得用例如各种亲和层析的方法易于将其纯化。

[0041] 对于治疗性目的,可制取包括该融合蛋白,和 / 或包括编码该融合蛋白的多核苷酸的组合物,如药制剂。用于治疗性目的的组合物可通过将该 Fc 融合蛋白和 / 或编码它们的多核苷酸与任意适当的药学可接受的载体、赋形剂和 / 或稳定剂混合而制取。适于与所述试剂混合的组合物的一些实例可见于:Remington:The Science and Practice of Pharmacy(《雷明登:药物科学与实践》)(2005)21 世纪版,宾西法利亚州费城,Lippincott Williams 和 Wilkins。该组合物还可包括任意适当的佐剂。

[0042] 如果用于本发明方法的治疗性物质为多核苷酸,该多核苷酸可作为裸多核苷酸、联合递送试剂、或作为包括和 / 或表达该多核苷酸试剂的重组质粒或病毒载体给予个体。适当的给药递送试剂包括密如斯 M(Mirus)Transit TKO 亲脂试剂、脂质转染试剂、脂质转染胺试剂、细胞转染试剂(cellfectin)、或阳离子聚合物(例如聚赖氨酸)、或脂质体。在一个实施方式中,该 Fc-Ag/ 拮抗剂融合物由重组溶瘤性重组痘苗病毒(rOVV)编码。就此而言,溶瘤性病毒选择性地在癌细胞中复制并破坏之。这种作用的一级机制由包括该病毒在细胞裂解位点表达免疫原性 / 治疗性蛋白的二级机制补充。尽管评价溶瘤性病毒活性的大量临床试验利用了局部(例如肿瘤内)或区域(例如腔内或动脉内)途径,我们认为浸润性和转移性癌症的有效治疗将优选使用病毒的系统给药进行[例如见 Hu, J. C., 等 Clin Cancer Res 2006. 12:6737-6747]。

[0043] 因为细胞外包膜痘苗病毒覆盖自身于源自宿主细胞的含若干宿主补体控制蛋白和少数外露的病毒蛋白的包膜中,使其抵抗补体中和,所以痘病毒特征在于其能通过血液全身扩散。在临床前模型和早期临床试验中,已证明工程化的溶瘤性痘苗病毒(OVV)在癌症治疗中有前景的结果[Kirn, D. H. 和 Thorne, S. H., Nat Rev Cancer 2009. 9:64-71, Mastrangelo, M. J. 等. Cancer Gene Ther 1999. 6:409-422; Park, B. H. 等. Lancet Oncol 2008. 9:533-542; Thorne, S. H. 等. Curr Gene Ther 2005. 5:429-443; Zeh, H. J. 和 Bartlett, D. L., Cancer Gene Ther 2002. 9:1001-1012; Zhu, J. 等. Blood 2007. 109:619-625], 且已证实,患有广泛分布转移性肿瘤的病人中存在全身病毒扩散[Park, B. H. 等. Lancet Oncol 2008. 9:533-542, 47-49; Mastrangelo, M. J. 等 J Clin Invest 2000. 105:1031-1034; Mastrangelo, M. J. 等. Adv Exp Med Biol 2000. 465:391-400; DiPaola, R. S. 等. J Transl Med 2006. 4:1]。然而,多数病人未能有效治疗,因而预计 OVV 在人上的效果能从与本发明提供的组合物和方法的组合中受益。

[0044] 在一个实施方式中,将所述多核苷酸通过如树突状细胞的抗原呈递细胞给药途径给予所述个体,所述抗原呈递细胞包括表达该 Fc-Ag/ 拮抗剂融合蛋白的多核苷酸。“Fc-Ag/ 拮抗剂”是指该 Fc 区存在于具有抗原、其模拟表位或癌细胞特异性肽受体拮抗剂之一的嵌合蛋白或编码这样的嵌合蛋白的核酸序列中。在一个实施方式中,该 Fc-Ag/ 拮抗剂可表达为与通用 T 辅助细胞表位和 Fc 片段相连的融合蛋白,以将抗原性表达盒送至所述抗原呈递细胞上的活化的 Fc γ 受体,以诱导抗原特异性 T 细胞。

[0045] 在另一个实施方式中,本发明提供了增强对抗原免疫应答的方法,所述方法包括

将所述 Fc-Ag 融合蛋白 - 树突状细胞扩增的 T 细胞过继性转移至个体。在一个实施方式中,所述过继性转移的 T 细胞为 CD8⁺T 细胞。“CD8⁺”T 细胞是指表达 CD8 (分化群 8)的 T 细胞。CD8 是良好表征的跨膜糖蛋白,用作 T 细胞受体(TCR)的共受体。CD8 结合人抗原呈递细胞表面的 I 类主要组织相容性复合体(MHC-I)蛋白。在一个实施方式中,本发明提供了将疫苗诱导的 CD8⁺T 细胞和表达 Fc-Ag 融合蛋白的树突状细胞的分离群过继性转移到带瘤宿主,以促进过继性转移的 T 细胞体内扩增与肿瘤生长的抑制,或编码 Fc-Ag 融合的多核苷酸。

[0046] 在一个实施方式中,本发明诱发了对所述抗原的增强的 T 细胞应答,呈递(或被模拟)本发明 Fc-Ag 融合物中的抗原。所述增强的 T 细胞应答包括但不必定限于显示出对携带所述抗原的细胞的细胞毒活性的 T 细胞的增加,或显示出增强的对所述抗原的生存力和 / 或抗原记忆应答的 T 细胞的增加,或抗原特异性的效应 T 细胞的数量和 / 或活力的增加,或前述类型的细胞介导的免疫应答的组合增加。本发明方法引发的 T 细胞应答可伴有体液和 / 或先天免疫应答中的有益变化。在一个实施方式中,可通过抑制个体中表达所述抗原的肿瘤细胞的生长,和 / 或通过延长个体生存时间证明免疫应答增强。

[0047] 预计包括能被肽(模拟表位)模拟的表位的任意抗原适用于本发明。抗原优选包括适于被抗原呈递细胞呈递的并与 MHC I 类分子连接的表位。因而,当其存在于所述融合蛋白中时,所述抗原可以是或可包括蛋白或肽。所述抗原可以是重组抗原,其可以是化学合成的,其可以是从小培养物中分离的,或者其可以是从小培养物中分离的。所述抗原可以呈递在感染性物种中的细胞上,或者所述抗原可以由病变或感染的细胞、组织或器官表达。

[0048] 在一个实施方式中,所述抗原是肿瘤抗原。肿瘤抗原可以是可商购的抗原,或者其可以通过常规技术获取,如通过重组法,或通过制备肿瘤细胞裂解液以鉴定用于本发明组合物和方法中的新抗原。

[0049] 在各种实施方式中,所述癌细胞抗原可以由癌细胞表达,其具体实例包括但不限于纤维肉瘤、黏液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、骨源性肉瘤脊索瘤、血管肉瘤、内皮肉瘤、淋巴管肉瘤、腹膜假黏液瘤、淋巴管内皮肉瘤、滑膜瘤、间皮瘤、尤因瘤(Ewing's tumor)、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、结肠癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、鳞状细胞癌、基底细胞癌、腺癌、头颈癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳头状癌、乳头状腺癌、囊腺癌、骨髓瘤、支气管癌、肾细胞癌、肝癌、胆管癌、绒膜癌、精原细胞瘤、胚胎瘤、维尔姆斯瘤(Wilms' tumor)、宫颈癌、睾丸癌、肺癌、肺小细胞癌、膀胱癌、上皮癌、神经胶质瘤、星形细胞瘤、成神经管细胞瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤、松果体瘤、成血管细胞瘤、听觉神经瘤、少枝胶质瘤(oligodendroglioma)、脑膜瘤、黑色素瘤、神经母细胞瘤、成视网膜细胞瘤、白血病、淋巴瘤、多发性骨髓瘤、胸腺瘤、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症(Waldenstrom's macroglobulinemia)和重链病。

[0050] 在一个实施方式中,所述抗原是 GD2 神经节苷脂的 CD166 交叉反应性模拟表位。在另一个实施方式中,所述抗原是 CTCE-9908。

[0051] 所述抗原可能是由感染性物质或感染性物种表达的抗原,其非限制性的实例包括病毒、细菌、真菌、原虫、或任意其他寄生虫或其他感染性物质。

[0052] 考虑如抗原的分子组成、所述治疗个体的大小和年龄和所述个体可能疑似有或可能已经诊断的疾病类型和阶段的因素,本领域技术人员知道如何制备实施本发明方法的剂

量方案。本发明可能用于诱发增强的预防性或治疗性的免疫应答。所述组合物给药的个体可以是需要治疗的个体,和 / 或已经诊断为、疑似有、或有风险进展为与所述抗原表达相关的疾病或其他紊乱的个体。

[0053] 本领域技术人员可确定涵盖于本发明组合物中和 / 或用于本发明方法的 Fc-Ag/ 拮抗剂融合蛋白、或编码所述 Fc-Ag/ 拮抗剂融合蛋白的表达载体、或细胞如包括所述 Fc-Ag/ 拮抗剂融合蛋白或编码所述 Fc-Ag/ 拮抗剂融合蛋白的表达载体或其他表达盒的抗原呈递细胞的量。因而,在一个实施方式中,以本发明组合物的有效剂量给药。有效剂量可以是抑制所述个体中表达所述抗原的细胞生长的组合物的量,或延长所述个体存活时间或缓解个体中与所述抗原表达相关的疾病症状的量。

[0054] 本发明方法可联合常规疗法进行,所述常规疗法旨在治疗与所述抗原相关的疾病或紊乱。例如,如果所述方法用于增强个体中对肿瘤抗原的免疫应答,包括但不限于化疗、手术干预和放疗的治疗形式能先于、同时或晚于本发明方法进行。

[0055] 正如本文表述的实施例所证,为开发一种限制肿瘤疫苗在荷瘤小鼠中与 Treg 细胞相互作用能力的方法,我们首先比较了由呈递给 DC 的 47-LDA 肽模拟物作为与通用 Th 表位联用的线性多肽或作为与小鼠 IgG2a Fc 片段的融合蛋白所产生的功能性肿瘤特异性细胞应答。我们显示出 47-LDA-Fc γ 2a 融合蛋白-DC 疫苗不仅扩增了肿瘤特异性 CD8⁺T 细胞,还在将未免疫脾细胞 ACT 至经历清髓性 TBI 和 BM 移植的荷瘤小鼠后诱导了初次免疫应答。47-LDA-Fc γ 2a 疫苗诱导的 CD8⁺T 细胞抑制了原发性肿瘤生长,并保护了所述荷瘤小鼠免于发展出最轻的残留疾病。另一方面,由 47-LDA 多肽-DC 疫苗诱发的保护导致了肿瘤生长延迟,这仅在清髓性条件下的 ACT 后显著。此研究的结果与治疗性疫苗接种于荷瘤小鼠期间 Fc γ R 能调节 T 细胞介导的免疫应答的发现一致。

[0056] 47-LDA-Fc γ 2a⁺DC 比 47-LDA⁺DC 诱导产生更高水平的肿瘤特异性免疫应答的能力更强的机制仍不清楚。可能是由于表达 IL-12 的抗原呈递细胞起始 1 型而非 Treg 细胞应答能力更强,所以 LPS 诱导成熟后,47-LDA-Fc γ 2a⁺DC 群内比 47-LDA⁺对应物中表达 IL-12 的细胞数量上升有助于产生此效果。与接受 47-LDA-DC 疫苗的动物相比,47-LDA-Fc γ 2a⁺DC 中 CCL22 趋化因子表达的减少和 47-LDA-Fc γ 2a⁺DC 免疫小鼠中更低比例的 Treg 细胞进一步支持该观察现象。我们的结果与之前的发现一致,所述发现即炎症环境的特性通过指导所述成熟 DC 采取与每种这样的 T 细胞类型相互作用的稳定倾向,能影响 Teff 和 Treg 细胞活化之间的平衡。然而值得注意的是,尽管在癌症疫苗的设计中已经表明了 DC 功能的改变,但在用肿瘤相关抗原模拟表位的治疗性疫苗接种期间,为抵消与肿瘤进展相关的免疫抑制而协调 DC 应答已经被广泛评价。因而,这些发现突出了肽模拟表位的用于癌症免疫治疗的新应用。

[0057] 已经确定的是,活化和抑制低亲和力 Fc γ R 对调节效应细胞免疫应答至关重要。其在诱导获得性免疫中的作用显示出抗原以免疫复合物的形式给予 DC 期间,活化 / 抑制受体的功能中的改变能影响 DC 在体内的活化并增强抗肿瘤 T 细胞应答。此概念被抑制性 Fc γ RIIb 受体的选择性阻断使人 DC 成熟并产生对抗体包被的肿瘤细胞的免疫力,和来自 Fc γ RIIb 缺陷小鼠的 DC 显示出共刺激分子更高的表达(能解释启动抗原特异性 T 细胞的能力的增加)的观察现象所支持。然而,在可危及疫苗有效性和 / 或实际的可行性的所述抗原结合的再生性方面,大蛋白载体的使用产生诸多困难。因此,包含所述抗原和辅助细胞表位

以及具有对活化性 Fc γ R 结合亲和力增加的 IgG 抗体的 Fc 区的合成构建体应该提供在制造和表征方面与免疫复合物不同的优势。这也表明了, 47-LDA-Fc γ 2a 融合蛋白使 DC 能在荷瘤小鼠中有效地启动和扩增特异性的 CD8⁺CTL 应答的能力可产生肿瘤免疫疗法改进的效果。

[0058] DC 疫苗或手术后抗肿瘤免疫应答的研究已显示出 Treg 细胞是携带弱免疫原性肿瘤的宿主中 T 细胞记忆发育的根本障碍。尽管手术当前仍是对固体肿瘤的主要疗法, 但还是需要记忆 T 细胞应答以对术后肿瘤复发和转移的持续预防。如多数癌症病人中所见, 我们的结果显示了仅手术或疫苗不会诱导对弱免疫原性的肿瘤相关抗原的保护。然而, 在我们的模型中, 手术联合淋巴删除、ACT 和 DC 疫苗接种能使长期的肿瘤保护的进展成为可能。尽管我们不能排除在术后免疫力的诱导期间, 没有 Treg 时肿瘤自身作为抗原的来源可能启动针对多种肿瘤抗原的 T 细胞应答的可能性, 但没有所述 47-LDA 模拟表位 DC 疫苗接种时所产生的抗肿瘤免疫力仅延伸了荷瘤小鼠的存活。相反, 在骨髓性荷瘤小鼠宿主中, 用靶向活化性 Fc γ Rs 的 47-LDA-Fc γ 2a 融合蛋白主动免疫导致了对原发性肿瘤的显著性抑制, 并对发生自发转移疾病的保护。

[0059] 虽然使用离体产生的 DC 提供了独特的机会以避免肿瘤诱导的 DC 功能异常, 并允许了对 DC 特性的精确操作, 用于对病人细胞离体操作的专业细胞培养设施的需求促进了试图开发能靶向荷瘤宿主身体内的内源性 DC 的无细胞疫苗。经工程改造以选择性递送肿瘤抗原或其模拟表位到 DC 的疫苗可与诱导 DC 体内极化的策略偶联而无需任何体外处理。我们使用 rOVV-47-LDA-Fc γ 2a 载体的病毒治疗方法将转基因直接递送到肿瘤损伤处(数据未显示)用于 DC 的分泌和交叉呈递, 得到的结果表明了没有任何外援细胞因子治疗、ACT、TBI 或体外操作时保护性 Teff 以及记忆 T 细胞的诱导。需要进一步研究, 以更好的定义病毒递送的 47-LDA-Fc γ 2a 融合蛋白在肿瘤微环境中交叉呈递对 Teff 和 Treg 之前的平衡以及病毒疗法诱导的抗肿瘤免疫应答的有效性和持续时间的影响。就此而言, 若干系列的证据指出, VV 通过产生促炎症反应细胞因子的 TLR2/MyD88 依赖性通路和使体外和体内的 IFN- β 活化的 TLR 独立通路诱发的天然免疫应答。因为持续的天然免疫的 TLR 刺激需要打破体内已建立的 Treg 介导的耐受, 且 VV 能提供 TLR 信号, 所以 VV 作为疫苗载体的这种独特的能力能导致宿主防御的活化并保护小鼠免受肿瘤攻击。因而, 在 CD4+CD25+Treg 存在下, 通过基于病毒疫苗打破 CD8+T 细胞耐受的可能性表明表达所述 47-LDA-Fc γ 2a 融合蛋白或其他肿瘤相关抗原的 rOVV 可证明是 DC 疫苗很好的替代, 以克服体内 CD4+CD25+T 细胞介导的 CD8 耐受。总之, 该工作强调了开发 DC 对肿瘤 / 自身抗原的摄取和处理以活化免疫效应细胞和限制所吸引的抗炎症 Treg 细胞的能力的重要性。我们的发现阐明了旨在选择性活化炎性与调节性型免疫细胞的癌症免疫疗法的新模式。

[0060] 以下实施例旨在用于说明但不限制本发明。

[0061] 实施例 1

[0062] 本实施例提供了获取本文所述数据所用材料和方法的记载。

[0063] 动物和细胞系

[0064] 雌性 A/J 小鼠, 6-8 周龄, 购自杰克逊实验室 (Jackson Laboratory) (缅因州巴港)。遵循 Roswell Park 癌症研究院动物保护与使用委员会批准的方案进行实验。小鼠 NXS2 神经母瘤细胞系 (由加利福利亚州拉霍亚的 Scripps 研究院 R. A. Reisfeld 博士提供)

是 GD2 阴性的 C1300 小鼠神经母瘤细胞(A/J 背景)和 GD2 阳性的小鼠背根神经节瘤细胞的杂交产物。该杂交细胞系通过其 H-2K^b阳性/H-2K^b阴性表型显示出与 A/J 小鼠同系的 MHC I 类(Lode, H. N., R. Xiang, T. Dreier, N. M. Varki, S. D. Gillies, 和 R. A. Reisfeld. 1998. Natural killer cell-mediated eradication of neuroblastoma metastases to bone marrow by targeted interleukin-2 therapy. (骨髓神经母细胞瘤转移灶通过靶向白介素-2 治疗由天然杀伤细胞介导的消除)Blood 91:1706-1715.)。14G2a 杂交瘤细胞系分泌 GD2 特异性 mAb (Mujoo, K., T. J. Kipps, H. M. Yang, D. A. Cheresh, U. Wargalla, D. J. Sander, 和 R. A. Reisfeld. 1989. Functional properties and effect on growth suppression of human neuroblastoma tumors by isotype switch variants of monoclonal antiganglioside GD2 antibody 14.18. (单克隆抗神经节苷脂 GD2 抗体 14.18. 的同型切换变体对人成神经细胞瘤的生长抑制的功能特性和影响)Cancer Res 49:2857-2861) 由 R. A. Reisfeld 博士(Scripps 研究院)提供。

[0065] 47-LDA-Fc γ 2a 融合蛋白的产生

[0066] 包括组织型纤溶酶原激活蛋白(tPA)分泌信号肽序列、两种通用 Th 肽 PADRE 的 47-LDA[AKFVAAWTLKAAA SEQ ID NO:3; (Alexander, J., M. F. del Guercio, A. Maewal, L. Qiao, J. Fikes, R. W. Chesnut, J. Paulson, D. R. Bundle, S. DeFrees, 和 A. Sette. 2000. Linear PADRE T helper epitope and carbohydrate B cell epitope conjugates induce specific high titer IgG antibody responses. (线性 PADRE T 辅助表位和糖 B 细胞表位偶联物诱导特异高效价 IgG 抗体应答)J Immunol 164:1625-1633) 和 HIV gp120 糖蛋白的 V3 环 [CKRKIHIGPGQAFYT SEQ ID NO:4; (Ahluwalia, A., K. Gokulan, I. Nath, 和 D. N. Rao. 1997. Modification of delivery system enhances MHC nonrestricted immunogenicity of V3 loop region of HIV-1 gp120. (递送系统的改良增强 V3 loop region of HIV-1gp120 的 MHC 非限制性免疫原性)Microbiol Immunol 41:779-784) 连同 47-LDA 模拟肽的表达载体的构建已广泛报道 (Bolesta, E., A. Kowalczyk, A. Wierzbicki, P. Rotkiewicz, B. Bambach, C. Y. Tsao, I. Horwacik, A. Kolinski, H. Rokita, M. Brecher, X. Wang, S. Ferrone, 和 D. Kozbor. 2005. DNA vaccine expressing the mimotope of GD2 ganglioside induces protective GD2 cross-reactive antibody responses. (表达 GD2 神经节苷脂模拟表位的 DNA 疫苗诱导保护型 GD2 交叉反应抗体应答)Cancer Res 65:3410-3418.)。小鼠 47-LDA-Fc γ 2a 融合蛋白通过使用 EcoRI 和 BglIII 限制性酶切位点在 pFUSE-mIgG2Aa-Fc1 载体(英韦沃基公司(InvivoGen), 加利福尼亚州圣地亚哥)的 hEF1-HTLV 启动子与小鼠 IgG2a Fc 区之间插入 47-LDA 多肽编码序列而产生。利用 Lipofectamine 试剂(英杰公司, 加利福尼亚州卡尔斯巴德)将 47-LDA-Fc γ 2a 融合蛋白构建体和空载稳定转染 293T 细胞, 然后在含博来霉素的培养基中选择。在蛋白 G 柱(GE 健康公司(GE Healthcare), 生物科学公司(Bio-Sciences Corp), 新泽西州皮斯卡特维)上, 从转染细胞上清培养物中纯化 47-LDA-Fc γ 2a 融合蛋白。根据厂家说明书, 通过 SDS-15% PAGE、14G2a mAb 免疫印迹、然后 ECL 加上蛋白印迹检测系统(安法马西亚生物技术公司(Amersham Pharmacia Biotech))分析该融合蛋白。

[0067] 免疫

[0068] 如前所述(Brinker, K. G., H. Garner, 和 J. R. Wright. 2003. Surfactant protein

A modulates the differentiation of murine bone marrow-derived dendritic cells. (表面活性剂蛋白 A 调控小鼠骨髓衍生的树突细胞分化) *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 284:L232-241), 从 BM 前体细胞中体外产生 DC。简言之, 从 6 到 8 周龄的雌性 A/J 小鼠 ($n=5$) 的胫骨和股骨中采集 BM 细胞, 然后在补有 10 ng/ml GM-CSF 的完全培养基中 37°C 培养 6 天。每 2-3 天补充培养基。第 7 天, 多数非贴壁细胞已获得 DC 形态学, 且通过流式细胞术分析确定为 CD11c 高和 CD80、CD86、CD40 和 MHC II 类低。DC 以 10 μ g/ml 47-LDA-Fc γ 2a 融合蛋白或 47-LDA 多肽 (新英格兰肽有限公司 (New England Peptide, LLC,) 马萨诸塞州加德纳) 致敏 5 小时, 用 LPS (1.0 μ g/ml) 孵育 1 小时以诱导成熟, 洗涤并静脉注射 (2×10^6) 至小鼠 (图 1A)。在疫苗接种时和五天后分别肌肉注射 20 μ g 编码 IL-15 和 IL-21 细胞因子的 DNA 质粒。

[0069] 流式细胞术

[0070] 用生物素标记的 47-LDA-Fc γ 2a 融合蛋白或 47-LDA 多肽孵育未成熟 DC, 然后用链霉亲和素-偶联 PE 孵育。对于某些实验, DC 用以下单抗染色: 抗 CD11c-FITC、抗 CD80-PE、抗 CD86-PE、抗 CD40-PE 或抗 MHC II 类-PE (BD 生物科学公司, 加利福尼亚州圣何塞)。脾细胞用抗 CD4-PE、抗 CD8-PE、抗 CD25-FITC (BD 生物科学公司) 或相关的同种对照标记。特异性抗体染色前, 细胞用 Fc 阻断剂 (抗 CD16/CD32 单抗) 孵育 10 分钟。细胞用含 0.01% 叠氮化钠和 1% FCS 的 HBSS 洗涤两遍, 用 1% 多聚甲醛固定, 并在分析前 4°C 避光保存。本底染色用包括适当的荧光染料偶联的或非偶联的小鼠 IgG1、IgG2a 或 IgG2b (BD 生物科学公司) 的同种对照估计。根据该厂家操作手册用抗 FoxP3-AlexaFluor 647 mAb (e 生物科学公司 (eBioscience), 加利福尼亚州圣地亚哥) 的 CD4⁺CD25⁺ 淋巴细胞的细胞内染色确定腋窝、淋巴结和脾脏中 Treg 细胞的数量。分泌 IFN- γ 或 TNF- α 的 CD4⁺ 和 CD8⁺ 脾细胞的数量使用抗 CD4-FITC 和抗 CD8-FITC mAb 联合抗 IFN- γ -PE 或抗 TNF- α -PE mAb (BD 生物科学公司) 确定。通过用检测 IL-12p35 亚单位内的表位且不与 IL-12p40 交叉反应的大鼠抗小鼠 IL-12p70 mAb (R&D 系统公司 (R&D Systems, Inc.)) 染色测量 IL-12p70 在 LPS 刺激的 DC 中的细胞内表达。通过用大鼠抗小鼠 CCL22 mAb (R&D 系统公司) 染色测定 CCL22 在 LPS 刺激的 DC 中的细胞内表达。47-LDA-Fc γ 2a⁺、47-LDA 多表位 (polytope)⁺ 或 CD86⁺ DC 的分选在 BD FACSAria™ 流式细胞仪上进行 (BD 公司, 新泽西州富兰克林湖市)。所有流式细胞术评价都在 FACScan 或 FACSCalibur 流式细胞仪上进行。在前向角和侧向角散射参数上设门后, 用 CellQuest 软件 (BD 生物科学公司) 获取并分析至少 10,000 个门内事件。

[0071] T 细胞的过继性转移和 DC 疫苗

[0072] A/J 小鼠 (每组 $n=8-10$) 皮下注射 2×10^6 NXS2 神经母细胞瘤细胞, 15 天后, 通过静脉注射从 47-LDA-Fc γ 2a- 或 47-LDA 多表位-DC 免疫小鼠中分离的富集 CD8⁺ 的脾细胞治疗, 如图 1A 中所述。根据厂家说明书, 使用偶联抗小鼠 CD4 的磁珠 (L3T4) 和抗小鼠 CD45R (B220) mAb (MACS; 美天旎生物科学公司 (Miltenyi Biotec)) 阴性选择 CD8⁺ 脾细胞。所分离的 CD8⁺ 脾细胞 (2×10^7) 用 LPS 刺激成熟的包被 47-LDA 多肽或 47-LDA-Fc 融合蛋白的 DC 孵育。在 rmIL-2 (1 μ g/剂量) 存在下, T 细胞与 DC 的混合物 (20:1 比例) 静脉注射至清除淋巴细胞的 NXS2 荷瘤小鼠, 如文献所述 (Zeng, R., R. Spolski, S. E. Finkelstein, S. Oh, P. E. Kovanen, C. S. Hinrichs, C. A. Pise-Masison, M. F. Radonovich, J. N. Brady, N. P. Restifo, J. A. Berzofsky, 和 W. J. Leonard. 2005. Synergy of IL-21 and IL-15 in

regulating CD8⁺ T cell expansion and function. (IL-21 和 IL-15 在调控 CD8⁺T 细胞表达和功能中的协同作用) J Exp Med 201:139-148)。荷瘤小鼠中的淋巴细胞减少由所述 ACT 和疫苗接种前一天的 5Gy 非清髓性 TBI 或 9Gy 清髓性 TBI 加上 BM 转移(10^7 细胞)诱导(图 1B)。携带已建立的皮下 NXS2 肿瘤的对照小鼠用 5Gy 或 9Gy 辐射加上 BM 移植。在 IL-15 和 IL-21 载体存在下,小鼠每两周免疫 DC 疫苗,如文献所述(Kowalczyk, A., A. Wierzbicki, M. Gil, B. Bambach, Y. Kaneko, H. Rokita, E. Repasky, R. Fenstermaker, M. Brecher, M. Ciesielski, 和 D. Kozbor. 2007. Induction of protective immune responses against NXS2 neuroblastoma challenge in mice by immunotherapy with GD2 mimotope vaccine and IL-15 and IL-21 gene delivery. (通过 GD2 模拟表位疫苗和 IL-15 和 IL-21 基因递送,在 mice 中诱导针对 NX32 神经母细胞瘤攻击的保护性免疫应答) Cancer Immunol Immunother 56:1443-1458)。通过每周 1 到 3 次用测微计测量皮下肿瘤和测定肿瘤体积(宽 × 长 × 宽 / 2 = mm³)来监测肿瘤生长。

[0073] 对于扩散性疾病的免疫治疗,在肿瘤切除时, NXS2 荷瘤小鼠经历了非清髓性(5Gy)或清髓性(9Gy)TBI (图 1C)。肿瘤切除一天后,所述小鼠接受来自免疫或未免疫小鼠的脾细胞(2×10^7 细胞)的 ACT 以及 DC 疫苗。在 IL-15 和 IL-21 载体存在下,小鼠每两周免疫 DC 疫苗,如文献所述(Kowalczyk, A., A. Wierzbicki, M. Gil, B. Bambach, Y. Kaneko, H. Rokita, E. Repasky, R. Fenstermaker, M. Brecher, M. Ciesielski, 和 D. Kozbor. 2007. Induction of protective immune responses against NXS2 neuroblastoma challenge in mice by immunotherapy with GD2 mimotope vaccine and IL-15 and IL-21 gene delivery. (通过 GD2 模拟表位疫苗和 IL-15 和 IL-21 基因递送,在 mice 中诱导针对 NX32 神经母细胞瘤攻击的保护性免疫应答) Cancer Immunol Immunother 56:1443-1458)。对照小鼠具有用有或无 TBI 和 BM 移植切除的原发性肿瘤。存活时间定义为小鼠因扩展性肿瘤生长或转移发生而处死的时间点。绘制 Kaplan-Meier 生存曲线,并用对数秩 Mantel-Cox 方法确定显著性。

[0074] 疫苗诱导的 IFN- γ 和 TNF- α 的表达和 T 细胞增殖的体外分析。

[0075] 分析来自免疫 47-LDA-Fc γ 2a 或 47-LDA 多肽包被的 DC 的 A/J 小鼠的脾细胞在用表达 47-LDA 的 DC 以 20:1 的比例过夜刺激后的 IFN- γ 和 TNF- α 的表达。从免疫空载的小鼠中分离的细胞作为对照。为研究 47-LDA-DC 和 47-LDA-Fc γ 2a-DC 疫苗免疫小鼠中的 Treg 细胞的诱导,最后一次免疫三周后,从免疫小鼠中摘除脾脏、腋窝和淋巴结并通过用抗 CD4-PE、抗 CD25-FITC 和抗 FoxP3-Alexa Fluor 647 mAb 或相关的同种对照染色分析其 Treg 细胞的数量。为分析 Treg 细胞对 Teff 细胞增殖的影响,在 37°C 下,将来自 47-LDA-DC 或 47-LDA-Fc γ 2a-DC 疫苗免疫小鼠的 CD8⁺T 细胞装载 25 μ M 羧基荧光素琥珀酰亚胺酯(CFSE; Molecular Probes (分子探针公司), 俄勒冈州尤金市)10 分钟,并在有或无 Treg 细胞(比例 1:1)的条件下,用表达 47-LDA 的同系 DC (比例 20:1)培养 72 小时。细胞用 PE 偶联的抗 CD8 mAb 染色,并用流式细胞术分析。根据厂家说明书,用 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞分离试剂盒(美天旎公司)分离所述 Treg 细胞群。

[0076] 为分析 ACT 和 DC 疫苗接种后的荷瘤小鼠和无瘤小鼠中的 CD4⁺和 CD8⁺T 细胞应答,脾细胞用 25 μ M CFSE 标记,并用表达 47-LDA 的 DC 孵育 72 小时。细胞用 PE 偶联的抗 CD4 或抗 CD8 mAb 染色,并通过流式细胞术分析。

[0077] CTL 试验

[0078] 用表达 47-LDA 的 DC 以 20:1 的比例,以 15%T 细胞刺激因子(T-STIMTM 培养补充剂,协作生物医药产品公司(Collaborative Biomedical Products),马萨诸塞州贝德福德)作为外源 IL-2 来源培养脾细胞。刺激三天后,细胞分瓶并培养在补有小鼠 rIL-2 (0.3ng/ml) (BD 生物科学公司)的培养基中。刺激前,根据厂家说明书,通过使用 T 细胞富集柱(美天旎公司)的阴性选择分离 CD8⁺T 细胞。5 天后,通过标准 4 小时 ⁵¹Cr 释放试验分析对 NXS2 肿瘤细胞的 CTL 细胞裂解活性。特异性裂解的百分比计算为:([实验释放 cpm- 自发释放 cpm]/[最大释放 cpm- 自发释放 cpm])×100。从通过加入 5% 曲通 X-100 裂解的细胞的上清中确定最大释放。从仅用培养基孵育的靶细胞中确定自发释放。

[0079] 生产用于基于溶瘤性病毒疗法癌症疫苗的表达式增强型绿色荧光蛋白(EGFP)和 47-LDA-Fc γ 2a 融合蛋白的 rOVV。

[0080] 有各种制作适用于本发明的 rOVV 的方法。在具体的说明中,表达 EGFP 和 47-LDA-Fc γ 2a 融合蛋白的 rOVV 通过分别使用 VSC20 痘苗病毒与痘苗穿梭质粒 pSEL-EGFP 和 pCB023-47-LDA-Fc γ 2a 在 CV-1 细胞中的同源重组而产生。母代痘苗病毒是带有克隆于 VGF 基因位置的 lacZ 基因的 VSC20。所述 VSC20 痘苗病毒如美国专利公开号 20070154458 所述,其中所述 VSC20 病毒的记载通过引用并入本文。

[0081] 通过将 47-LDA-Fc γ 2a 融合蛋白基因克隆至 pCB023 的 EcoRI 和 SmaI 限制性酶切位点来产生 pCB023-47-LDA-Fc γ 2a 穿梭质粒。DNA 序列鉴定后,通过用 14G2a mAb 的免疫印迹确认 47-LDA-Fc γ 2a 融合蛋白分泌至 293T 细胞转染子的培养上清中。通过 BrdU 选择,从 TK 细胞中挑出所述重组病毒的多个噬斑。在 HeLa 细胞上扩增后,所述 rOVV-EGFP 和 rOVV-47-LDA-Fc γ 2a 病毒通过蔗糖梯度纯化,滴定并用于 NXS2 细胞的体外和体内研究。rOVV-EGFP 感染的 NXS2 细胞中的 EGFP 的表达通过免疫荧光显微镜确认,从 rOVV-47-LDA-Fc γ 2a 感染的 NXS2 细胞中分泌的 47-LDA-Fc γ 2a 融合蛋白通过用 14G2a mAb 的免疫杂交确定。

[0082] 对于基于溶瘤性病毒疗法的疫苗,A/J 小鼠(n=10)皮下注射 2×10⁶NXS2 细胞,并在 15 天后静脉注射 10⁸噬斑形成单位(PFU)的 rOVV-47-LDA-Fc γ 2a 或 rOVV-EGFP 载体治疗。用 PBS 治疗的荷瘤小鼠作为对照。存活时间定义为小鼠因扩展性肿瘤生长或转移发生而处死的时间点。绘制 Kaplan-Meier 生存曲线,并用对数秩 Mantel-Cox 方法确定显著性。

[0083] 统计学分析

[0084] 组间差异的统计学显著用等方差的双尾斯氏 t 检验进行。平均肿瘤生长的配对组比较的 P 值用非参数韦氏(Wilcoxon)秩和检验计算。绘制 Kaplan-Meier 生存曲线并确定 NXS2 攻击组小鼠的存活时间中值。组间存活时间上的统计学差异用对数秩 Mantel-Cox 方法估计。数据表述为算术均值 ±SD,且用基于 Windows 平台的 JMP 程序(SAS 研究所公司(SAS Institute Inc.),北卡罗来纳州卡雷)分析。

[0085] 实施例 2

[0086] 小鼠 47-LDA-Fc γ 2a 融合蛋白的表征

[0087] 通过用 EcoRI 和 BglIII 限制性酶切位点在所述 pFUSE-mIgG2Aa-Fc1 载体的 hEF1-HTLV 启动子和小鼠 IgG2a Fc 区之间框内插入相关编码序列[包括所述组织型纤溶酶原激活蛋白(tPA)信号序列,两个通用 Th 肽和 47-LDA 模拟表位]产生小鼠 47-LDA-Fc γ 2a

融合蛋白。47-LDA-Fc γ 2a 构建体测序确认未破坏的开放阅读框存在后,转染 48 小时后,用 14G2a mAb 对 47-LDA-Fc γ R2 转染的 293T 细胞的免疫荧光染色,然后通过流式细胞术分析确定该融合蛋白的表达(未显示)。从含博来霉素的培养基中筛选的 47-LDA-Fc γ 2a 稳定转染物中的融合蛋白分泌通过用 14G2a mAb 对培养上清的免疫杂交确认。如图 2A 所示,用 14G2a mAb 在从 47-LDA-Fc γ 2a 转染物中收集的培养上清中检测到 31.9kDa 的明显条带。空载转染的细胞中制备的上清中不存在条带。分子量为 6.6kDa 的 47-LDA 多肽(作为阳性对照包括在所述分析中)明显被 14G2a mAb 识别。总之,这些结果表明在 47-LDA-Fc γ 2a 融合蛋白环境中表达的 GD2 模拟表位保留其被 14G2a 所识别的合成肽的天然抗原决定簇。

[0088] 47-LDA-Fc γ 2a 融合蛋白和 47-LDA 多肽与 BM 来源的未成熟 DC 的结合通过流式细胞术分析确定。如图 2B 所示,超过 50% 的 CD11c⁺DC 与生物素化的 47-LDA-Fc γ 2a 融合蛋白或生物素标记的 47-LDA 多肽反应。47-LDA-Fc γ 2a 融合蛋白的结合,但非 47-LDA 多肽,被 Fc 阻断抗体 CD16/32 抑制,表明了 47-LDA-Fc γ 2a 融合蛋白与其细胞配体间的特异性相互作用。然而值得注意的是,因为上调 CD86、CD40 和 CD86 抗原的表面表达必须添加 LPS (未显示),所以 47-LDA-Fc γ 2a 融合蛋白与 Fc γ RR 的结合对 DC 成熟无影响,

[0089] 因为将抗原以免疫复合物的形式给予 DC 期间,活化性或抑制性 Fc γ RR 对调节效应细胞免疫应答至关重要,并且 IL-12 是涉及 1 型免疫力的产生的关键细胞因子,所以我们研究了与 47-LDA 多肽或 47-LDA-Fc γ 2a 融合蛋白相互作用的 DC 在其经 LPS 刺激后表达 IL-12p70 的能力上是否有所不同。对于此类实验,47-LDA⁺和 47-LDA-Fc γ 2a⁺DC 以及其阴性对应物通过细胞分选获得。CD86 表达阳性或阴性的 DC 作为特异性对照包括其中(图 2B 和 C)。分选的 DC 群用 1 μ g/ml 的 LPS 刺激过夜,并通过细胞内染色和流式细胞分析其 IL-12p70 的表达。图 2C 显示出 47-LDA-Fc γ 2a⁺DC 在用 LPS 刺激后,表达显著高于其阴性对应物的 IL-12p70 水平(P=0.008),而 47-LDA⁺和 47-LDA⁻DC 群或以 CD86 抗原表达是否存在而分选的那些中测量到水平相当的 IL-12p70。募集 Treg 的 CCL22 趋化因子在分选的和 LPS 刺激的 47-LDA⁺和 47-LDA-Fc γ 2a⁺DC 中的平行表达研究揭示了在前者 DC 群中有近两倍多的 CCL22 阳性细胞数量(图 3A 和 B ;P=0.037)。

[0090] 47-LDA-Fc γ 2a 致敏 DC 在体内增强的免疫刺激活性

[0091] LPS 刺激的 47-LDA-Fc γ 2a⁺DC 和 47-LDA⁺DC 间的 IL-12 和 CCL22 表达水平上的差异表明这些细胞与 Teff 和 Treg 细胞在体内相互作用的能力可能有所不同。因此,我们研究了 A/J 小鼠免疫 47-LDA-Fc γ 2a- 和 47-LDA-DC 疫苗后的肿瘤特异性 Th1 和 CTL 应答的诱导。每种 DC 疫苗通过每 2 周的三次静脉注射投递,同时分别在疫苗接种时和五天后肌肉注射递送编码 IL-15 和 IL-21 的 DNA 质粒。(Kowalczyk, A., A. Wierzbicki, M. Gil, B. Bambach, Y. Kaneko, H. Rokita, E. Repasky, R. Fenstermaker, M. Brecher, M. Ciesielski, 和 D. Kozbor. 2007. Induction of protective immune responses against NXS2 neuroblastoma challenge in mice by immunotherapy with GD2 mimotope vaccine and IL-15 and IL-21 gene delivery. (通过 GD2 模拟表位疫苗和 IL-15 和 IL-21 基因递送,在小鼠中诱导针对 NX32 神经母细胞瘤攻击的保护性免疫应答) Cancer Immunol Immunother 56:1443-1458)。最后一次免疫三周后,来自免疫小鼠的 CD4⁺脾细胞通过用表达 47-LDA 的 DC 过夜刺激后的细胞内染色和流式细胞术分析其 IFN- γ 和 TNF- α 的产生。从 DC 和 IL-15 和 IL-21 载体免疫小鼠中分离的细胞作为对照包括其中。所图 3C 所示,产生 IFN- γ

和 TNF- α 的 CD4⁺ 细胞数量在 47-LDA-Fc γ 2a 融合蛋白包被的 DC 免疫的小鼠中比对照小鼠中多四倍以上, 且比 47-LDA-DC 疫苗诱导的应答多两倍以上(分别是 $P=0.002$ 和 $P=0.003$)。比起 47-LDA 多肽包被的 DC 诱导的那些, 47-LDA-Fc γ 2a 融合蛋白疫苗免疫后, 产生 IFN- γ 的 CD⁺T 细胞应答上的增加与 CD8⁺T 细胞介导的针对 NXS2 神经母细胞肿瘤在宽范围的 E:T 比例(图 3D) 上更高的细胞毒活性相关。

[0092] 我们也通过对腋窝、淋巴结和脾脏中的 CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ 淋巴细胞的流式细胞术分析检查了 47-LDA 和 47-LDA-Fc γ 2a-DC 疫苗后的 Treg 细胞的诱导。在 47-LDA 免疫小鼠的腋窝淋巴结中, CD4⁺CD25⁺ 群内 FoxP3⁺ 细胞的绝对数量范围在自 0.31×10^6 至 0.42×10^6 之间(图 4A), 且比 47-LDA-Fc γ 2a-DC 疫苗免疫的动物多约 2 倍(0.36 ± 0.06 对 0.19 ± 0.04 ; $P=0.03$)。在后一组小鼠中, 细胞内 FoxP3 表达阳性的 CD4⁺CD25⁺ 淋巴细胞数量范围在自 0.17×10^6 至 0.24×10^6 之间(图 4C)。在免疫小鼠的淋巴结和脾脏中检测到在 Treg 细胞频数上的相似差异(数据未显示)。当从 47-LDA-DC 和 47-LDA-Fc γ 2a-DC 免疫小鼠中制备的 CFSE 标记的 CD8⁺ 淋巴细胞和 Treg 细胞以 1:1 比例混合, 并分别用 LPS 刺激成熟的 47-LDA⁺DC 和 47-LDA-Fc γ 2a⁺DC 共培养时, 两者的 Treg 细胞群都抑制 Teff 细胞的扩增(分别为图 4B 和 D)。然而, 47-LDA-Fc γ 2a⁺DC 刺激培养物中的 Teff 细胞的增值率显著高于 47-LDA⁺DC 诱发的刺激($P=0.02$)。

[0093] 骨髓性 TBI 联合 47-LDA-Fc γ 2a-DC 疫苗增强了 ACT 疗法。

[0094] 为比较 47-LDA- 和 47-LDA-Fc γ 2a-DC 疫苗的治疗效果, 我们在 NXS2 荷瘤 A/J 小鼠中用接触过抗原的 CD8⁺ 脾细胞进行了 ACT 实验。所述 CD8⁺T 细胞与 47-LDA- 或 47-LDA-Fc γ 2a-DC 疫苗一起静脉注射至所述 NXS2 荷瘤小鼠, 以诱导 Teff 细胞的增殖并提高过继性转移至所述淋巴细胞删除的宿主后的次级应答。图 5A 显示出 ACT 和 47-LDA 多肽包被的 DC 疫苗前, 用非骨髓性(5Gy) 方案的淋巴细胞删除对肿瘤生长抑制有本底影响($P=0.28$)。过继性转移的 CD8⁺T 细胞的抗肿瘤效果在骨髓性(9Gy) TBI 后增强, 如通过治疗小鼠的总体存活时间从 25 延长至 70 天所确定(图 5A; $P=0.007$)。我们发现, 骨髓性方案联合与 47-LDA-Fc γ 2a-DC 一起递送的过继性转移 CD8⁺ 脾细胞 2a 特别有效。如图 5B 所示, 后者治疗导致了接受骨髓性剂量的 TBI 伴随自未免疫小鼠同系 BM 移植的 NXS2 荷瘤动物中的 22% 的肿瘤生长完全缓解($P=0.0003$)。值得注意的是, 尽管 2a 在非骨髓性环境下用 47-LDA-Fc γ 2a-DC 疫苗刺激 CD8⁺T 细胞的疗法并未显示出完全的肿瘤清除, 但是治疗小鼠的存活时间比对照组有显著的延长(图 5B; $P=0.015$)。由于所有对照小鼠进展为渐进性生长的肿瘤且直到 25 天必须处死, 所以 ACT 抗肿瘤效果是特异性的。

[0095] 过继性转移 CD8⁺ 脾细胞和 47-LDA-Fc γ 2a-DC 疫苗对转移性疾病的控制

[0096] 原发性肿瘤切除后, NXS2 神经母细胞进展为自发的转移瘤的能力为研究过继性转移 CD8⁺ 脾细胞控制扩散性疾病的效果提供了模型(图 1C)。根据越来越多的证据, 即治愈性手术联合 Treg 细胞的删除使长期存活的肿瘤保护和 CD8⁺T 细胞记忆的发展成为可能(9), NXS2 荷瘤小鼠在肿瘤切除和接触过抗原的 CD8⁺ 脾细胞的 ACT 时, 经历了非骨髓性(5Gy) 或骨髓性(9Gy) TBI。如图 5C 所示, 47-LDA 多肽包被的 DC 扩增的 CD8⁺T 细胞的转移延迟了仅在骨髓性小鼠中观察到的转移性疾病的进展($P=0.024$)。在该组动物中, 未观察到无瘤存活。

[0097] 过继性转移 CD8⁺T 细胞的抗肿瘤效果通过 ACT 和 47-LDA-Fc γ 2a-DC 疫苗接种显著

增强,而 ACT 和 47-LDA-Fc γ 2a-DC 疫苗前接受 5Gy TBI 的六只 NXS2 攻击小鼠中仅有两只 在 50 天治疗期内进展为自发转移瘤(图 5D ; $P=0.003$)。该组中的剩余小鼠显示出转移性疾病 进展的延迟,最长存活时间为 90 天。正如所预计的,骨髓性方案和用 47-LDA-Fc γ 2a-DC 疫苗的 ACT 后,观察到过继性转移脾细胞的最高抗肿瘤效果,120 天时间内有超过 80% 的无 瘤存活(图 5D ; $P<0.001$)。另一方面,到第 40 天时,切除原发性肿瘤的和接受 TBI 的对照小 鼠因疾病进展必须处死。如通过用与 NXS2 反应的 14G2a mAb 染色和 RT-PCR 分析所确定, 转移性损伤主要发生在肱和腋窝淋巴结中,且不常在肝、脾和 BM (数据未显示)。

[0098] 47-LDA-Fc γ 2a-DC 疫苗诱导的初级免疫应答对转移性疾病的抑制

[0099] 我们接下来研究了 47-LDA- 和 47-LDA-Fc γ 2a-DC 疫苗诱导抗肿瘤免疫应答,在未 免疫脾细胞过继性转移至原发性肿瘤在治疗启动前被切除的骨髓小鼠后抑制转移性疾病 的能力(图 5E)。对于这些实验,由于 CD4⁺T 细胞对给 CD8⁺T 细胞提供生长因子和诱发抗肿 瘤应答是必需的,所以未免疫脾细胞群全部用于 ACT。图 5E 显示出,尽管 NXS2 荷瘤小鼠中 体内刺激的未免疫 T 细胞的可测量治疗性影响低于接触过抗原的 CD8⁺T 细胞所介导的,仍 有 20% 的治疗小鼠在用 47-LDA-Fc γ 2a-DC 疫苗的 ACT 后,保持无瘤状态 100 天($P=0.007$)。 虽然程度更小,47-LDA⁺DC 疫苗也能诱导抗肿瘤 T 细胞应答。原发性肿瘤切除的对照小鼠在 治疗头 2 个月内进展为转移性疾病,表明了 47-LDA-Fc γ 2a-DC 疫苗的主动免疫诱导的肿瘤 特异性 T 细胞在 NXS2 荷瘤小鼠中的显著效果。

[0100] ACT 和 DC 疫苗接种后,荷瘤和无瘤小鼠中的细胞应答

[0101] 我们接下来研究了 ACT 和 DC 疫苗后,荷瘤和无瘤小鼠中的细胞应答。在原发性 NXS2 肿瘤切除后,治疗性 47-LDA- 和 47-LDA-Fc γ 2a-DC 疫苗与过继性转移的未免疫脾细 胞一起递送至骨髓小鼠并分析 Teff 细胞的诱导。由于 ACT 和 47-LDA⁺DC 疫苗免疫后没有 观察到无瘤小鼠的存活,检查带有淋巴结中可见的转移性损伤的动物脾中的抗肿瘤免疫应 答。如图 6A 中所示,荷瘤小鼠中低于 15% 的 CD4⁺或 CD8⁺脾细胞在用表达 47-LDA 的 DC 刺 激 72 小时后经历了体外分化,且对 NXS2 细胞的 CTL 应答处于本底水平(图 6B)。相反,在 接受 ACT 和 47-LDA-Fc γ 2a-DC 疫苗后的无瘤小鼠中检测到强烈的 CD4⁺和 CD8⁺脾细胞增殖 (范围分别为 55%-69% 和 39%-46%) (图 6C)。该增殖性应答也与对 NXS2 细胞的抗肿瘤 CTL 活性相关(图 6D)。

[0102] 带有表达 47-LDA-Fc γ 2a 融合蛋白的 rOVV 的基于病毒疗法的肿瘤疫苗

[0103] 为确定 47-LDA-Fc γ 2a-DC 疫苗的抗肿瘤效果不限于辐射过的荷瘤宿主中的 ACT, 我们进一步检查了 rOVV 痘苗病毒表达的 47-LDA-Fc γ 2a 融合蛋白的治疗效果。因为痘苗 rOVV-47-LDA-Fc γ 2a 的溶瘤性 TK⁻/VGF⁻突变展示出肿瘤特异性复制,预期该融合蛋白会从 所感染的细胞中分泌,并在溶瘤位点被肿瘤浸润的 DC 交叉呈递。在平行研究中,额外的一 组 NXS2 荷瘤小鼠注射 rOVV-EGFP 载体,作为特异性对照以确定病毒感染的 NXS2 细胞释放 的肿瘤相关抗原诱发的保护程度。通过每周测量皮下肿瘤一到三次监测肿瘤生长来检查动 物的肿瘤生长。如图 7A 中所示,用对照 rOVV-EGFP 载体治疗的 NXS2 荷瘤小鼠近 25% 变成 无瘤。相反,用 PBS 替代病毒载体治疗的荷瘤小鼠进展为渐进性生长的肿瘤,并到第 20 天 时必须处死。在用 rOVV-47-LDA-Fc γ 2a 载体溶瘤性免疫病毒治疗后的荷瘤小鼠中观察到 最好的抗肿瘤效果,其特征为在超过 60% 无瘤存活 100 天(图 7A ; $P=0.0004$)

[0104] 为了更为全面地理解溶瘤性病毒疗法治疗对荷瘤宿主中的记忆细胞发育的影

响,在 rOVV-EGFP 或 rOVV-47-LDA-Fc γ 2a 治疗后至少保持 40 天无瘤的 NXS2 攻击小鼠 (n=6) 用 10^6 NXS2 细胞再次攻击。图 7B 显示出所有 rOVV-EGFP 治疗的小鼠经 NXS2 肿瘤再次攻击后进展为渐进性生长的肿瘤。然而,与未治疗动物相比,在 rOVV-EGFP 治疗的小鼠中肿瘤生长的起始有 20 天的延迟。该发现与溶瘤性病毒疗法期间 rOVV 因 DC 对凋亡细胞的摄取和肿瘤抗原的交叉呈递而诱导抗肿瘤免疫应答的能力一致 (Li, Q. X., G. Liu, 和 F. Wong-Staal. 2008. Oncolytic virotherapy as a personalized cancer vaccine. (溶瘤性病毒疗法作为个性化癌症疫苗) Int J Cancer 123:493-499.)。另一方面,在肿瘤接种后 35 天,六只 rOVV-47-LDA-Fc γ 2a 治疗的和 NXS2 再次攻击的小鼠中仅一只缓慢进展为渐进性肿瘤,反映了与 rOVV-EGFP 或 PBS 治疗的小鼠相比,47-LDA-Fc γ 2a 诱导的免疫有显著的抗肿瘤影响 (图 7B ;P<0.001)。

[0105] 实施例 3

[0106] 本实施例提供了所述方法用于在临床相关小鼠模型中抑制两种不同的肿瘤的生长一种实施方式的说明。

[0107] 我们表达了新抗肿瘤物质 CTCE-9908, CXCR4 趋化因子受体拮抗剂。该 CXCR4 的肽拮抗剂 (氨基酸序列 :KGVSLSYR-K-RYSLSVGK ;SEQ ID NO:5) 是 SDF-1 (CXCL12) 趋化因子 N 末端的二聚体。CTCE-9908 阻断了 CXCR4 受体与在转移性细胞浸润器官组织中至关重要的 CXCL12 的相互作用,从而减少了肿瘤转移。CXCR4 受体表达在许多肿瘤细胞类型上。CTCE-9908 肽由加拿大温哥华的化学运动治疗公司 (Chemokine Therapeutics) 开发,并已用于晚期癌症病人的 I/II 期临床试验。

[0108] 我们使用 DNA 质粒或溶瘤性重组痘苗病毒分别在在活化性小鼠和人 IgG2a 和 IgG1 Fc 片段的环境中表达了 CTCE-9908 肽 (SEQ ID NO:6)。带有天然存在的二硫键的 Fc 受体用于保持 CTCE-9908 肽的二聚体结构。因而,本发明利用了 Fc 重链间形成的天然存在的二硫键以使各由 SEQ ID NO:6 组成的单体单位空间靠近。这模拟了 CTCE-9908 肽 (SEQ ID NO:5) 的二聚体化,且不需要在同一肽 (如在 SEQ ID NO:5 中,其中 C 末端单位与 N 末端单位相比,具有相反的方向) 中提供两份拷贝的单体单位。这也消除了 CTCE-9908 肽中对链接氨基酸的需求,如 R-K-R 序列中的 K。优点还包括但不必定限于与 T 辅助细胞表位物理结合 (即在同一肽中) 的二聚体的呈递,如本文进一步所述。

[0109] 如图 8 中所见,我们的实验在小鼠同系 (T41 乳癌) 和异种移植 (FADU 人头颈癌) 模型中进行,且小鼠版的 CTCE 融合蛋白 (200 μ g/ 小鼠) 显示出活性 Fc 融合蛋白环境中 CTCE-9908 肽的抗肿瘤效果。

[0110] 实施例 4

[0111] 为了靶向乳癌和基质细胞 (癌相关成纤维细胞 (CAF)、血管内皮细胞和髓源抑制细胞 (myeloid-derived suppressor cell, MDSC) 上的 CXCR4,我们设计了一种导致同系小鼠中的高度浸润性三倍阴性小鼠 4T1 肿瘤原发性和转移性生长的抑制的策略。已导致无瘤存活 (即我们未检测到任何残余肿瘤) 的所述策略是用表达 CXCR4 拮抗剂的 OVV 溶瘤性病毒疗法,然后用靶向滋养肿瘤的血管的肿瘤血管阻断剂 (肿瘤 -VDA) (ASA404 ; (瓦帝莫泽 (vadimezan))) 治疗的组合。因而,在一个实施方式中,本发明方法包括将肿瘤血管阻断剂给予个体。在一个实施方式中,所述肿瘤血管阻断剂是本领域称作 ASA404 (瓦帝莫泽) 的化合物,该化合物记载于 Tozer, G. M., Kanthou, C. 和 Baguley, B. C., Disrupting tumour

blood vessels. (阻断肿瘤血管) Nat Rev Cancer 2005. 5:423-435。ASA404 是可商购的化合物。例如, 歇洛克公司(Selleck)(休斯顿, 美国德克萨斯州) 供应产品名为 DMXAA, 目录号为 S1537 的 ASA404。

[0112] ASA404 诱导血管关闭的主要机制被认为是导致体液外渗的血管渗透性增加、血浆损失和导致血流最终损失的肿瘤内的主要压差。在这方面, 我们使用了对比增强的 MRI 以分析 4T1 对 ASA404 的血管应答。一系列图像显示出治疗 2 小时后, 可见的对比物质外渗增加(与预处理测量相比)。由于血管渗透性的改变, 对比物质浓度进一步的增加是在 4 小时后(数据未显示)。

[0113] 我们分别使用 VSC20 痘苗病毒与痘苗穿梭质粒 pSEL-EGFP 和 pCB023-CXCR4A-Fc 通过在 CV-1 细胞中的同源重组产生出 OVV-EGFP (表达用作对照的增强型绿色荧光蛋白) 和 OVV-CXCR4A-Fc [McCart, J. A., Ward, J. M., Lee, J., Hu, Y., Alexander, H. R., Libutti, S. K., Moss, B. 和 Bartlett, D. L., Systemic cancer therapy with a tumor-selective vaccinia virus mutant lacking thymidine kinase and vaccinia growth factor genes. (用缺少胸苷激酶和痘苗生长因子基因的肿瘤选择性痘苗病毒变体治疗全身癌症) Cancer Res 2001. 61:8751-8757]。所述融合蛋白从 OVV-CXCR4A-Fc 感染的 TK 细胞培养上清中纯化, 并通过在还原和非还原条件下的蛋白印迹分析, 揭示了所述融合蛋白是由 28.9kDa 的单体组成的二聚体(图 9A)。所述融合蛋白能结合表达在 SupT-1 细胞上 CXCR4 受体, 并且该结合被这些细胞与 CTCE-9908 肽的预孵育而抑制, 说明了两种配体都与 CXCR4 的同一表位结合(图 9B)。4T1 细胞在带有 8.0 μm 孔径滤器的 24mm 直径的小室中的体外迁移试验揭示 CXCR4A-Fc 融合蛋白或者 CTCE-9908 肽(100 $\mu\text{g/ml}$; AAPPTec LLC, Louisville, KY) 的添加抑制了肿瘤细胞向 1,000ng/ml 浓度使用的 SDF1 的 >80% 的迁移(图 9C; $P < 0.0001$)。两种拮抗剂也都能抑制 SUPT-1 细胞中 SDF1 诱导的钙动员(图 9D)。

[0114] BALB/c 小鼠中, 对 4T1 原发性和转移性生长的抑制。雌性 BALB/c ($n=8-12$) 和 50 μL PBS 中的 7×10^4 4T1 细胞接种于胸腺脂肪垫中。带有 100-150 mm^3 肿瘤体积(V)的 4T1 荷瘤小鼠单独静脉注射 OVV-EGFP 或 OVV-CXCR4A-Fc (10^8PFU)或在病毒后 24 小时联合腹腔内递送最大耐受剂量的 ASA404 (20mg/kg)。与用 4 小时前或同时与病毒递送的药物治疗的动物相比, 该 ASA404 递送时间显示出最佳的抗肿瘤效果(未显示)。图 10A 显示出, 尽管用 OVV-CXCR4A-Fc 或 ASA404 的单一疗法显著性抑制了肿瘤生长($P < 0.05$), 但仅在组合疗法治疗的动物中实现了无瘤存活(图 10B)。用 OVV-EGFP 和 ASA404 治疗产生 13% 的存活, 而 OVV-CXCR4A-Fc 和 ASA404 产生 42% 的无瘤动物。对于转移性疾病的疗法, 4T1 荷瘤小鼠($V \approx 200\text{mm}^3$) 经历了单独或联合使用 ASA404 的溶瘤性病毒疗法, 且肿瘤在八天后切除(病毒感染因宿主天然和获得性免疫力而被清除的时间; 数据未显示)。对照小鼠不经治疗切除其原发性肿瘤。如图 10C 中所示, 在用 OVV-CXCR4A-Fc 和 ASA404 联合治疗的动物中观察到对转移性疾病最好的保护(80% 存活)。单独的溶瘤性病毒疗法或 ASA404 的治疗保护性较弱。与存活概况的变化一致, 在治疗后 4 天切除的 4T1 肿瘤中的 $\text{Gr1}^+\text{CD11b}^+(\text{Ly6G}^+)\text{MDSC}$ 数量与对照动物中的那些不同。

[0115] 如图 10D 中所示, OVV-CXCR4A-Fc 治疗后的 MDSC ($\text{CD11b}^+\text{Ly6G}^+$) 数量比对照肿瘤少约 4 倍。相反, ASA404 治疗后的肿瘤积累的 MDSC 最多(比对照增加了 3 倍)。这可能是因为药物介导的炎症引起 MDSC 从外周的迁移增加, 或因为这些细胞因血管受损而不

能离开肿瘤。ASA404 治疗的肿瘤中的高水平的 SDF-1 和其 OVV-CXCR4-A-Fc 疗法后表达减少支持了前述可能性(图 10E)。因而,本领域技术人员知道,因为存在于肿瘤微环境中的癌相关成纤维细胞中 SDF-1 的表达通过旁分泌(直接刺激肿瘤 CXCR4)和内分泌(从骨髓中募集 MDSC)两种机制诱导肿瘤血管新生而促进了原发性肿瘤生长,所以根据本发明方法靶向 CXCR4 预计将有效抑制恶性肿瘤生长以及远距离转移。

[0116] 本领域技术人员从前面所讲中知道,本发明在各种实施方式中利用了至少三种独特的试剂,且每种在通过直接或间接的作用机制抑制肿瘤生长中发挥不同的作用。不希望受理论所限制,可认为破坏肿瘤生长主要通过由溶瘤性痘苗病毒对恶性细胞的细胞裂解性效应和由 ASA404 对肿瘤血管的关闭而实现,而所述间接的抗肿瘤效应通过部分通过炎症和靶向 CXCR4 受体来干扰肿瘤与基质细胞间的交叉通讯而实现。我们显示出该策略对同系小鼠中高度转移性小鼠 4T1 乳癌的存活,特别是术后转移性模式有深远的影响。我们预期攻击恶性细胞核基质细胞的组合疗法将更为有效,并也能诱发对所转化细胞的长久的获得性免疫力。

[0117] 前述实施例旨在用于说明本发明。本领域技术人员知道可做出少量改变而不偏离本发明精神。

[0001]

序列表

<110> 健康研究股份有限公司(Health Research, Inc.)

<120> 含增强免疫应答的 Fc 融合蛋白的方法和组合物

<130> 003551.00422

<150> 61/312,982

<151> 2010-03-11

<160> 8

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> LDA 模拟表位氨基酸序列

<400> 1

Gly	Pro	Gly	Pro	Gly	Glu	Asp	Pro	Ser	His	Ser	Leu	Gly	Leu	Asp	Ala
1				5				10					15		

Ala	Leu	Phe	Met
			20

<210> 2

<211> 64

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 融合免疫球蛋白 Fc 和 T 辅助表位的 LDA-模拟表位

[0002]

<400> 2

Lys	Cys	Lys	Arg	Gln	Cys	Gly	Pro	Gly	Pro	Gly	Ala	Lys	Phe	Val	Ala
1				5					10					15	

Ala	Trp	Thr	Leu	Lys	Ala	Ala	Ala	Gly	Pro	Gly	Pro	Gly	Cys	Lys	Arg
			20					25					30		

Lys	Ile	His	Ile	Gly	Pro	Gly	Gln	Ala	Phe	Tyr	Thr	Gly	Pro	Gly	Pro
		35					40					45			

Gly	Glu	Asp	Pro	Ser	His	Ser	Leu	Gly	Leu	Asp	Ala	Ala	Leu	Phe	Met
	50						55				60				

<210> 3

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 13 个氨基酸的非天然泛 DR 表位 (PADRE)

<400> 3

Ala	Lys	Phe	Val	Ala	Ala	Trp	Thr	Leu	Lys	Ala	Ala	Ala
1				5					10			

<210> 4

<211> 15

<212> PRT

<213> HIV

<400> 4

Cys	Lys	Arg	Lys	Ile	His	Ile	Gly	Pro	Gly	Gln	Ala	Phe	Tyr	Thr
1				5					10				15	

[0003]

<210> 5
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽 CXCR4 趋化因子受体拮抗剂

<400> 5

Lys Gly Val Ser Leu Ser Tyr Arg Lys Arg Tyr Ser Leu Ser Val Gly
1 5 10 15

Lys

<210> 6
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTCE-9908 的部分

<400> 6

Lys Gly Val Ser Leu Ser Tyr Arg
1 5

<210> 7
<211> 330
<212> PRT
<213> 人类 (human)

<400> 7

[0004]

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu

[0005]

	165		170		175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu					
	180		185		190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn					
	195		200		205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly					
	210		215		220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu					
	225		230		235
					240
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr					
	245		250		255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn					
	260		265		270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe					
	275		280		285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn					
	290		295		300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr					
	305		310		315
					320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys					
	325				330

[0006]

<210> 8
<211> 377
<212> PRT
<213> 人类 (human)

<400> 8

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro
100 105 110

Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg
115 120 125

[0007]

Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys
130 135 140

Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro
145 150 155 160

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
165 170 175

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
180 185 190

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr
195 200 205

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
210 215 220

Gln Tyr Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
225 230 235 240

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
245 250 255

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln
260 265 270

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
275 280 285

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro

[0008]

290	295	300	
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn			
305	310	315	320
Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu			
	325	330	335
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile			
	340	345	350
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln			
	355	360	365
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys			
370	375		

A. 用47-LDA-或47-LDA-Fc γ 2a-DC诱导抗肿瘤免疫应答**DC疫苗**

静脉注射(d 0. 14. 28)

肌肉注射IL-15/21

免疫应答分析 (d49)



分离用于ACT的T细胞

B. ACT和DC疫苗抑制NXS2肿瘤生长NXS2
皮下注射(D 0)5 Gy 或
9 Gy + BM
(d 15)ACT + DC疫苗
静脉注射(d 16)
肌肉注射IL-15/21

疫苗接种+保护

C. ACT和DC疫苗抑制转移性疾病NXS2
皮下注射(D 0)肿瘤
切除
(d 15)5 Gy 或
9 Gy + BM
(d 15)ACT + DC疫苗
静脉注射(d 16)
肌肉注射IL-15/21

疫苗接种+保护

图 1

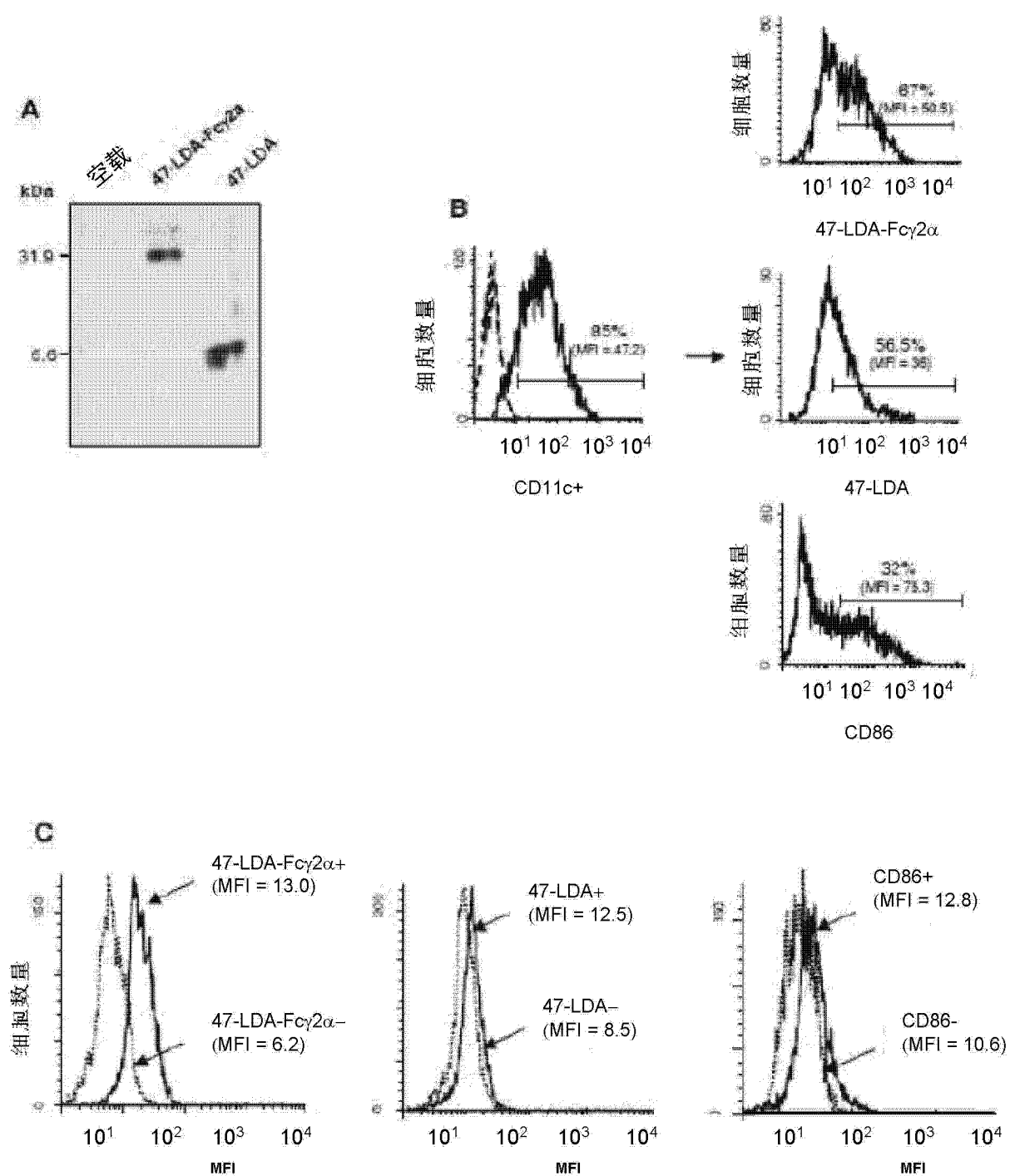


图 2

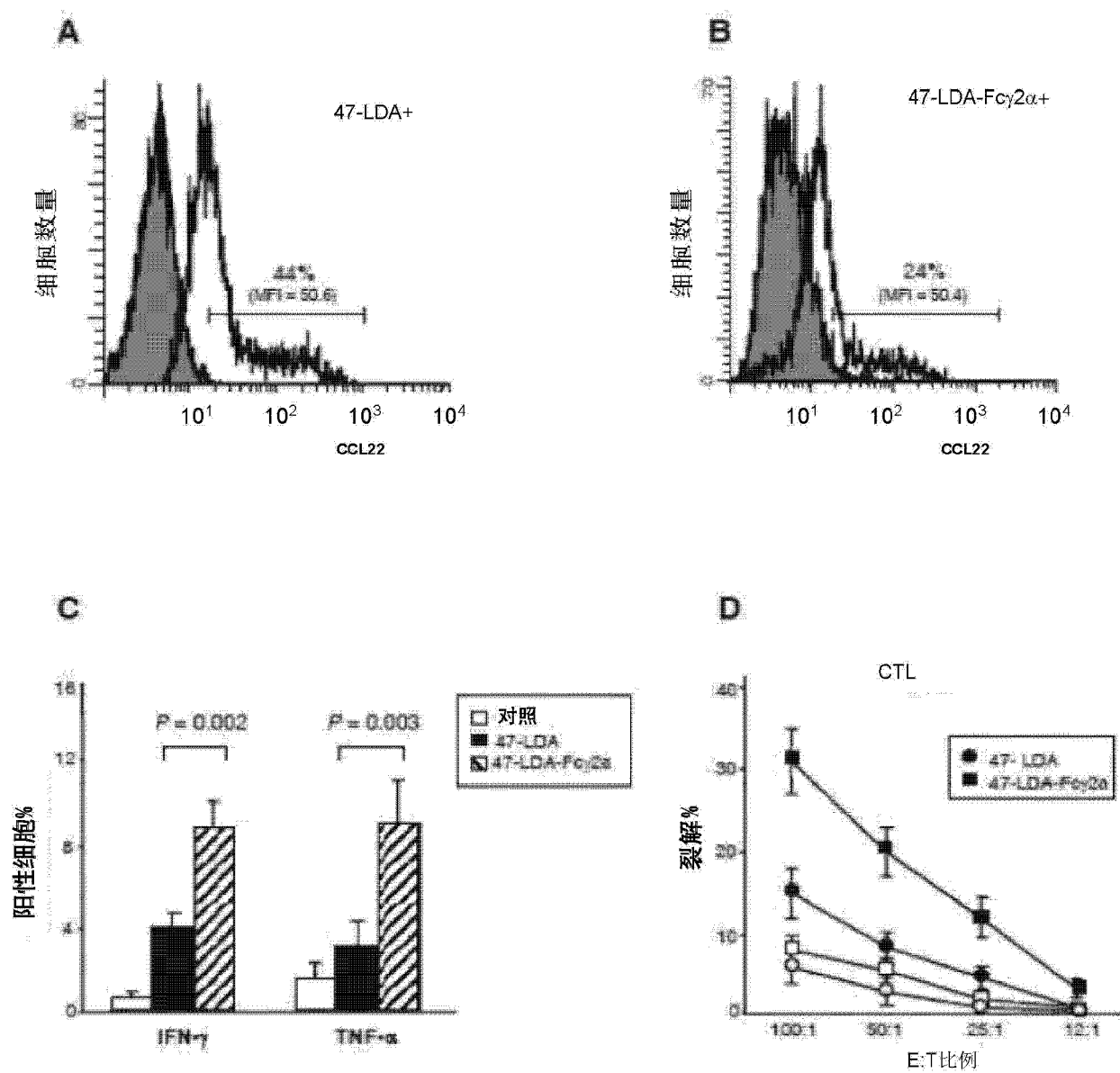


图 3

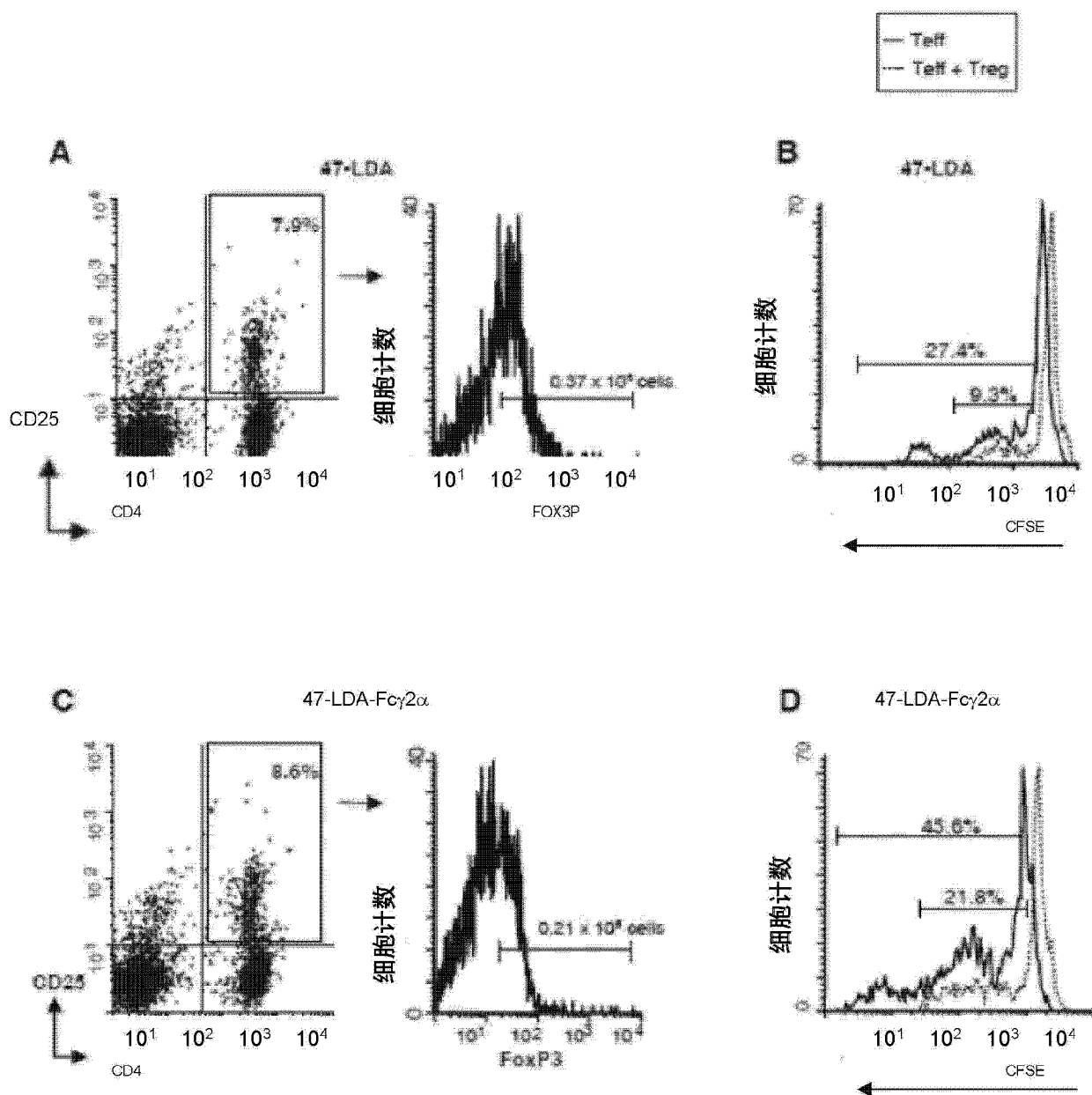


图 4

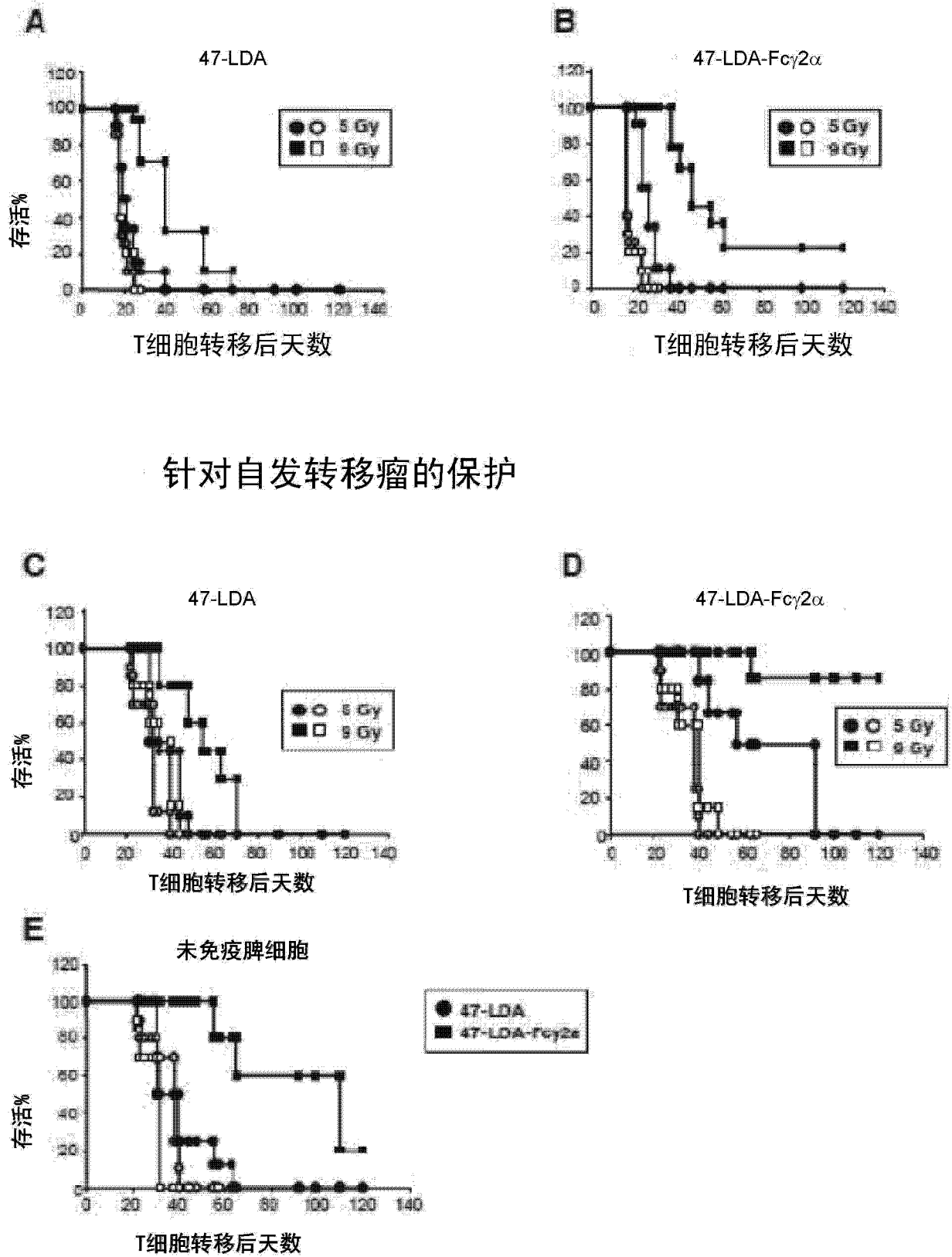


图 5

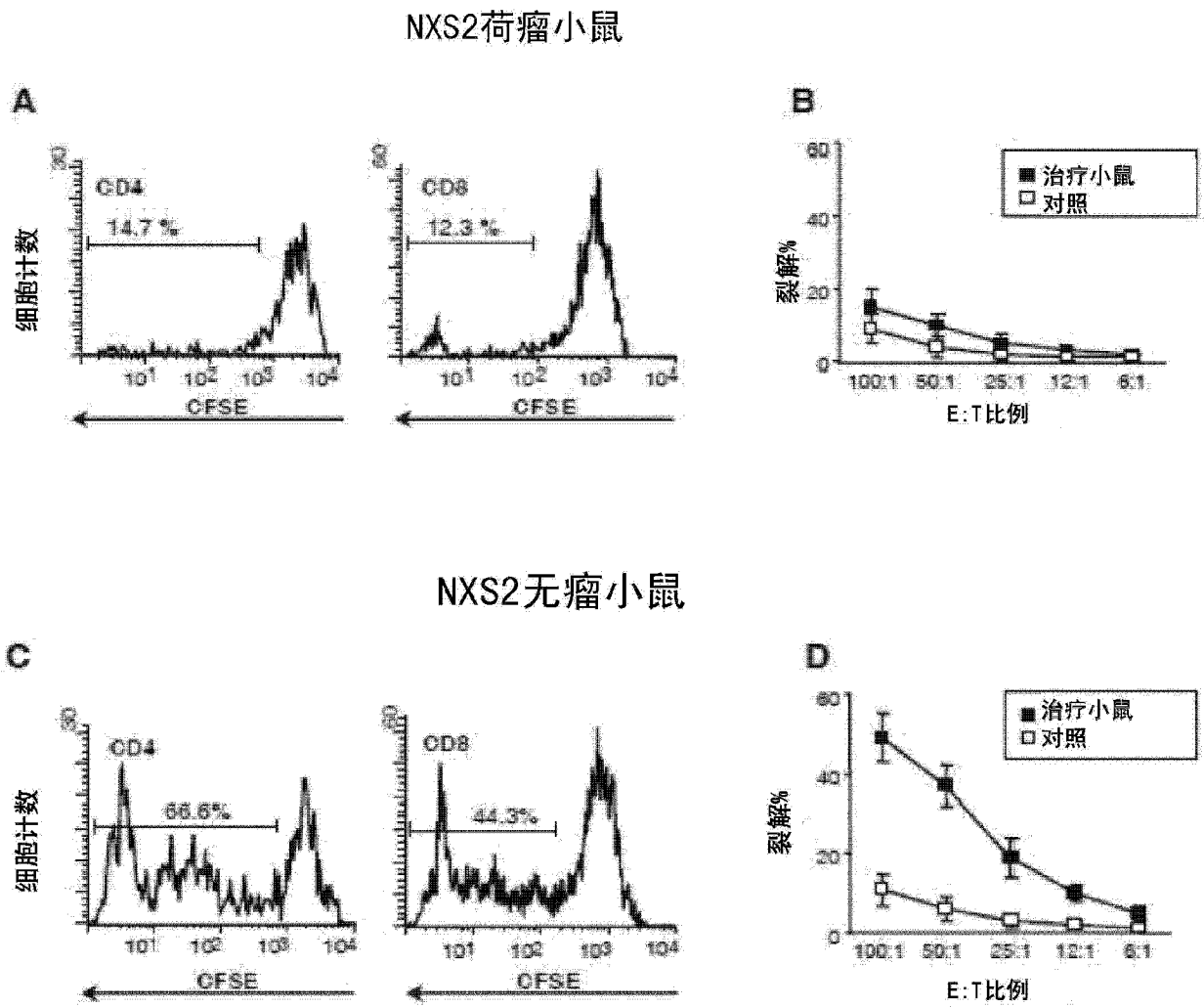


图 6

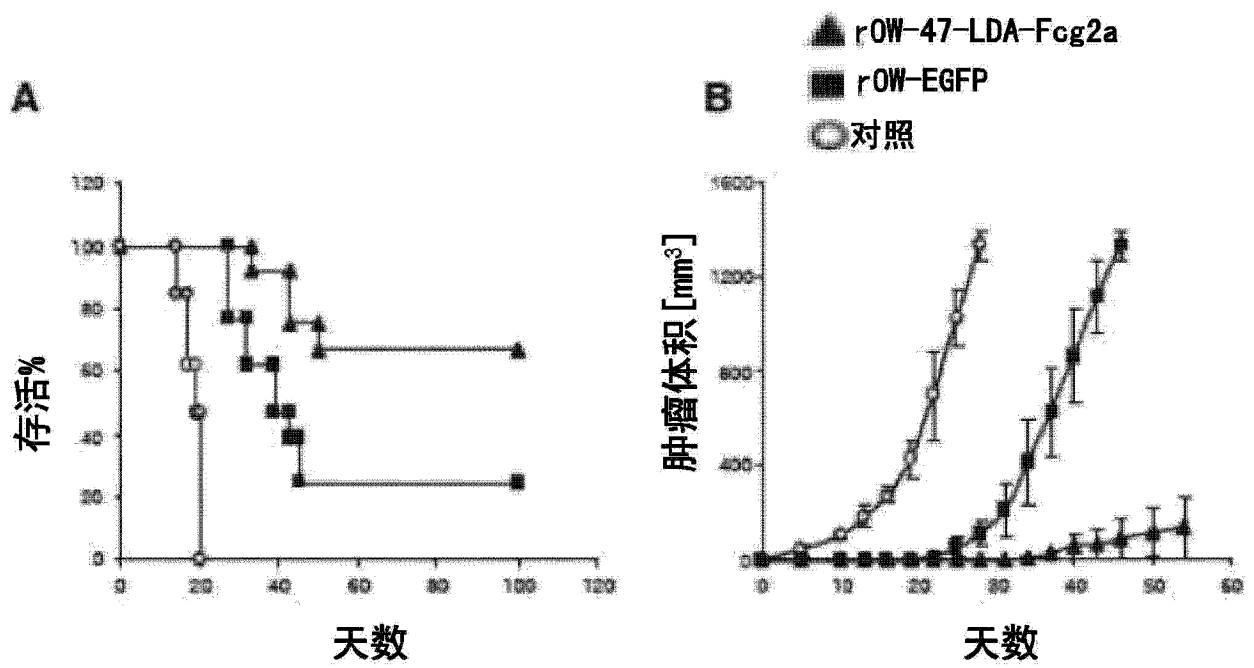


图 7

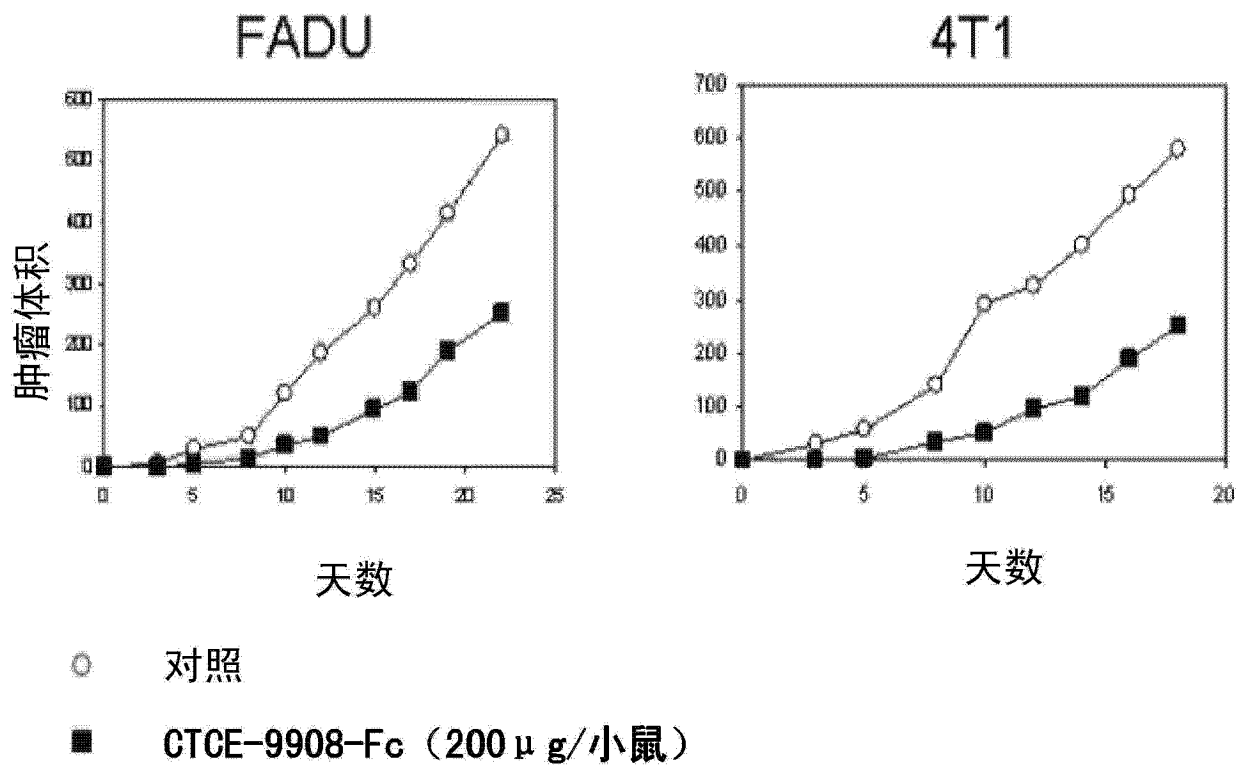


图 8

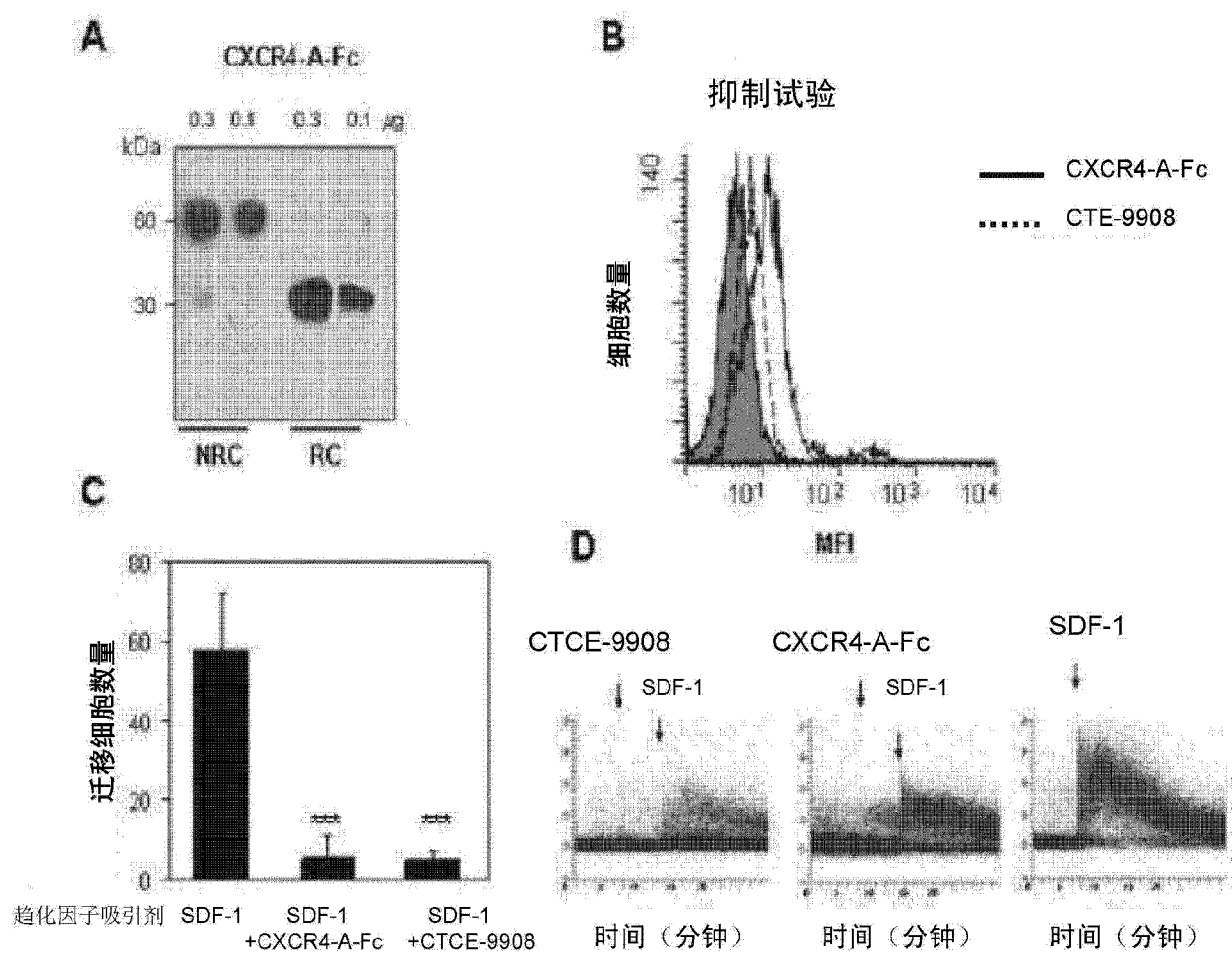


图 9

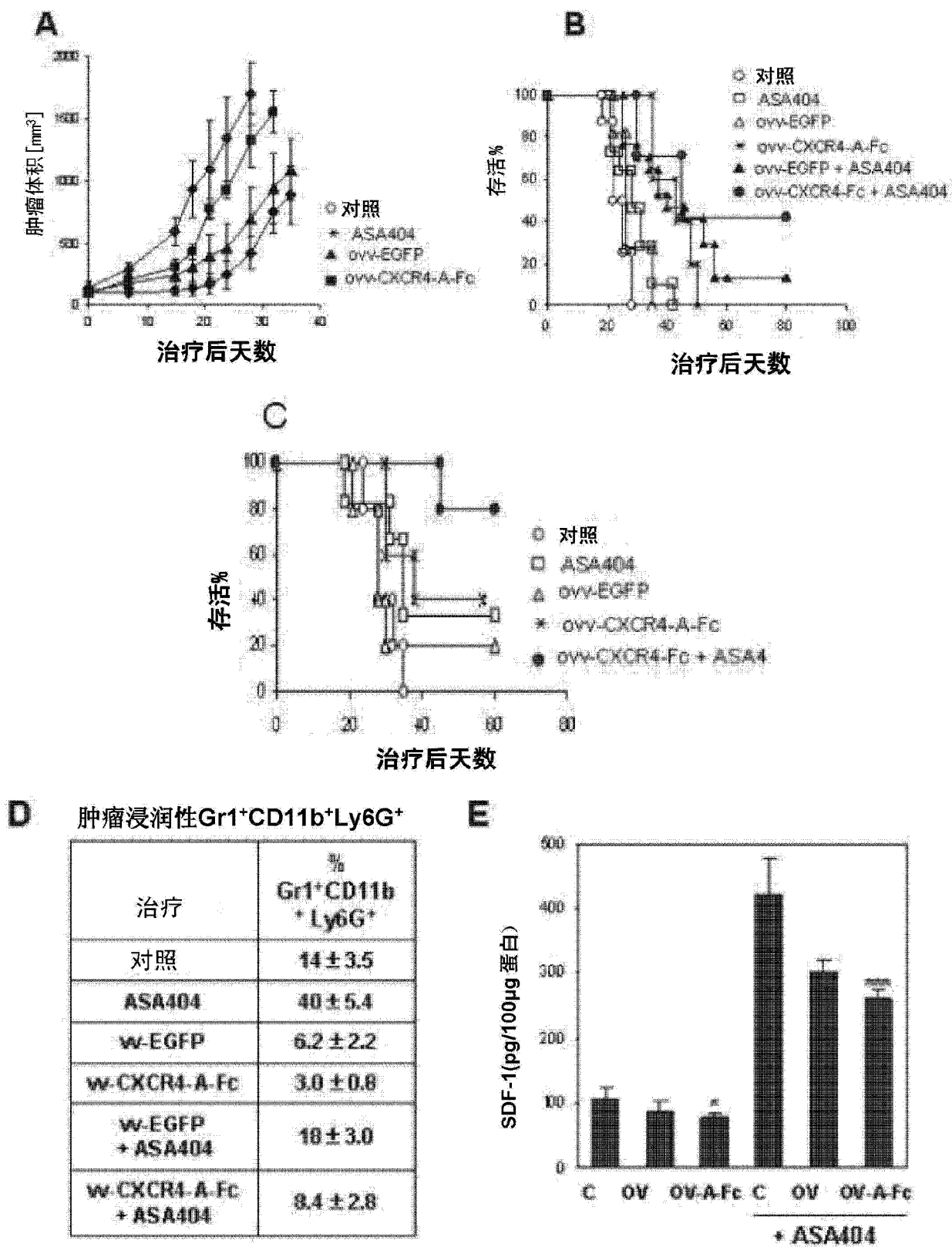


图 10