(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 109069598 A
(43)申请公布日 2018.12.21

(21)申请号 201780011041.2

(22)申请日 2017.02.12

(30)优先权数据
62/294,251 2016.02.11 US
62/294,987 2016.02.12 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2018.08.10

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2017/017588 2017.02.12

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2017/139725 EN 2017.08.17

(71)申请人 河谷控股IP有限责任公司
地址 美国加利福尼亚州
申请人 南特塞尔有限责任公司

(72)发明人 P·颂雄 K·尼亚齐
S·拉比扎德

(74)专利代理机构 余姚德盛专利代理事务所（普通合伙）33239
代理人 郑洪成

(51)Int.Cl.
*A61K 39/00*(2006.01)
*A61K 39/235*(2006.01)

权利要求书5页 说明书14页

(54)发明名称

双靶向腺病毒皮下递送

(57)摘要

考虑了免疫治疗方法和组合物，其中新表位和/或肿瘤相关抗原通过靶向MHC-I和/或MHC-II呈递系统的腺病毒表达系统递送至树突细胞，并进一步提供一种或多种重组肽以刺激T细胞活化并干扰检查点抑制。通过输入NK细胞进一步支持治疗，NK细胞可以被修饰为具有高亲和力CD16受体和/或与一种或多种新表位和/或肿瘤相关抗原结合的嵌合抗原受体。

CN 109069598 A

1.治疗患有肿瘤的患者的方法,包括:

皮下施用包含对以下进行编码的核酸的重组病毒

(a)患者肿瘤的至少一种肿瘤相关表位;

(b)至少一种共刺激分子;以及

(c)与检查点受体结合的肽;

其中核酸还包括用于将由核酸编码的肽产物引导到细胞质、内体区室或溶酶体区室的运输信号;以及

给患者施用NK细胞。

2.如权利要求1所述的方法,其中所述重组病毒是腺病毒,任选地具有缺失的或非功能的E2b基因。

3.如前述权利要求中任一项所述的方法,其中肿瘤相关表位是HLA匹配的肿瘤相关表位。

4.如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述肿瘤相关表位是癌症相关表位、癌症特异性表位或患者和肿瘤特异性新表位。

5.如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述共刺激分子是B7.1(CD80),B7.2(CD86),ICAM-1(CD54),ICOS-L,LFA-3(CD58),4-1BBL,CD30L,CD40,CD40L,CD48,CD70,CD112,CD155,GITRL,OX40L或TL1A。

6.如前述权利要求中任一项所述的方法,其中与检查点受体结合的肽结合CTLA-4(CD152)或PD-1(CD279)。

7.如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述运输信号将所述肽产物引导至细胞质。

8.如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述运输信号将肽产物引导至内体区室或溶酶体区室。

9.如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述运输信号包括细胞质保留序列、内体靶向序列或溶酶体靶向序列。

10.如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述核酸具有将第一肽产物引导至细胞质的第一运输信号,以及将第二肽产物引导至内体或溶酶体区室的第二运输信号。

11.如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述肽产物进一步包含增强肽产物的细胞内周转的序列部分。

12.如前述权利要求中任一项所述的方法,其中NK细胞是基因修饰的NK细胞,其(1)具有减少或消除的至少一种杀伤细胞免疫球蛋白样受体的表达,(2)表达高亲和力的Fcγ受体,(3)表达嵌合T细胞受体,和/或(4)在NKG2A中具有缺失。

13.如前述权利要求中任一项所述的方法,其中施用NK细胞的步骤在皮下施用重组病毒后1至14天进行。

14.如权利要求1所述的方法,其中肿瘤相关表位是HLA匹配的肿瘤相关表位。

15.如权利要求1所述的方法,其中肿瘤相关表位是癌症相关表位、癌症特异性表位或患者和肿瘤特异性新表位。

16.如权利要求1所述的方法,其中共刺激分子是B7.1(CD80),B7.2(CD86),ICAM-1(CD54),ICOS-L,LFA-3(CD58),4-1BBL,CD30L,CD40,CD40L,CD48,CD70,CD112,CD155,

GITRL,OX40L或TL1A。

17.如权利要求1所述的方法,其中与检查点受体结合的肽结合CTLA-4(CD152)或PD-1(CD279)。

18.如权利要求1所述的方法,其中所述运输信号将肽产物引导至细胞质。

19.如权利要求1所述的方法,其中所述运输信号将肽产物引导至内体区室或溶酶体区室。

20.如权利要求1所述的方法,其中所述运输信号包括细胞质保留序列、内体靶向序列或溶酶体靶向序列。

21.如权利要求1所述的方法,其中所述核酸具有将第一肽产物引导至细胞质的第一运输信号和将第二肽产物引导至内体或溶酶体区室的第二运输信号。

22.如权利要求1所述的方法,其中所述肽产物还包含增强所述肽产物的细胞内周转的序列部分。

23.如权利要求1所述的方法,其中NK细胞是基因修饰的NK细胞,其(1)具有减少或消除的至少一种杀伤细胞免疫球蛋白样受体的表达,(2)表达高亲和力的Fcγ受体,(3)表达嵌合T细胞受体,和/或(4)在NKG2A中具有缺失。

24.如权利要求1所述的方法,其中施用NK细胞的步骤在皮下施用重组病毒后1至14天进行。

25.在患有肿瘤的患者中刺激CD8+T细胞应答的方法,包括:

皮下施用包含对以下进行编码的核酸的重组病毒

(a)患者肿瘤的至少一种肿瘤相关表位,其可操作地与运输信号偶联,所述运输信号在细胞质中保留至少一种肿瘤相关表位;

(b)多种共刺激分子,其中至少一种是B7.1(CD80)或B7.2(CD86);

(c)与PD-1和CTLA-4中的至少一种结合的肽;以及

给患者施用NK细胞。

26.如权利要求25所述的方法,其中重组病毒是腺病毒,任选地具有缺失的或非功能的E2b基因。

27.如权利要求25-26中任一项所述的方法,其中所述肿瘤相关表位还包含增强肿瘤相关表位的细胞内周转的序列部分。

28.如权利要求25-27中任一项所述的方法,其中所述肿瘤相关表位是HLA匹配的癌症相关表位、HLA匹配的癌症特异性表位或HLA匹配的患者和肿瘤特异性新表位。

29.如权利要求25-28中任一项所述的方法,其中所述多种共刺激分子还包含至少一种选自由ICAM-1(CD54),ICOS-L,LFA-3(CD58),4-1BBL,CD30L,CD40,CD40L,CD48,CD70,CD112,CD155,GITRL,OX40L和TL1A组成的组的另外的共刺激分子。

30.如权利要求25-29中任一项所述的方法,其中与PD-1和CTLA-4中的至少一种结合的肽是膜结合的抗体片段。

31.如权利要求25-30中任一项所述的方法,其中所述NK细胞是基因修饰的NK细胞,其(1)具有减少或消除的至少一种杀伤细胞免疫球蛋白样受体的表达,(2)表达高亲和力Fcγ受体,(3)表达嵌合T细胞受体,和/或(4)在NKG2A中具有缺失。

32.如权利要求25所述的方法,其中肿瘤相关表位还包含增强肿瘤相关表位的细胞内

周转的序列部分。

33.如权利要求25所述的方法，其中肿瘤相关表位是HLA匹配的癌症相关表位、HLA匹配的癌症特异性表位或HLA匹配的患者和肿瘤特异性新表位。

34.如权利要求25所述的方法，其中进一步包括多种共刺激分子还包含至少一种选自由ICAM-1(CD54)，ICOS-L，LFA-3(CD58)，4-1BBL，CD30L，CD40，CD40L，CD48，CD70，CD112，CD155，GITRL，OX40L和TL1A组成的组的另外的共刺激分子。

35.如权利要求25所述的方法，其中与PD-1和CTLA-4中的至少一种结合的肽是膜结合的抗体片段。

36.如权利要求25所述的方法，其中NK细胞是遗传修饰的NK细胞，其(1)具有减少或消除的至少一种杀伤细胞免疫球蛋白样受体的表达，(2)表达高亲和力的Fcγ受体，(3)表达嵌合T细胞受体，和/或(4)在NKG2A中具有缺失。

37.在患有肿瘤的患者中刺激CD4+T细胞应答的方法，包括：

皮下施用包含对以下进行编码的核酸的重组病毒

(a)患者肿瘤的至少一种肿瘤相关表位，其可操作地与运输信号偶联，所述运输信号将至少一种肿瘤相关表位引导至细胞质或内体或溶酶体区室；

(b)多种共刺激分子，其中至少一种是B7.1(CD80)或B7.2(CD86)；以及

(c)与PD-1和CTLA-4中的至少一种结合的肽；

给患者施用NK细胞。

38.如权利要求25所述的方法，其中所述重组病毒是腺病毒，任选地具有缺失的或非功能的E2b基因。

39.如权利要求37-38中任一项所述的方法，其中所述肿瘤相关表位进一步包含增强肿瘤相关表位的细胞内周转的序列部分。

40.如权利要求37-39中任一项所述的方法，其中所述肿瘤相关表位是HLA匹配的癌症相关表位、HLA匹配的癌症特异性表位或HLA匹配的患者和肿瘤特异性新表位。

41.如权利要求37-40中任一项所述的方法，其中所述多种共刺激分子还包含至少一种选自由ICAM-1(CD54)，ICOS-L，LFA-3(CD58)，4-1BBL，CD30L，CD40，CD40L，CD48，CD70，CD112，CD155，GITRL，OX40L和TL1A组成的组的另外的共刺激分子。

42.如权利要求37-41中任一项所述的方法，其中与PD-1和CTLA-4中的至少一种结合的肽是膜结合的抗体片段。

43.如权利要求37-42中任一项所述的方法，其中NK细胞是遗传修饰的NK细胞，其(1)具有减少或消除的至少一种杀伤细胞免疫球蛋白样受体的表达，(2)表达高亲和力Fcγ受体，(3)表达嵌合T细胞受体，和/或(4)在NKG2A中具有缺失。

44.如权利要求37所述的方法，其中肿瘤相关表位还包含增强肿瘤相关表位的细胞内周转的序列部分。

45.如权利要求37所述的方法，其中肿瘤相关表位是HLA匹配的癌症相关表位、HLA匹配的癌症特异性表位或HLA匹配的患者和肿瘤特异性新表位。

46.如权利要求37所述的方法，其中多种共刺激分子进一步包含至少一种选自由ICAM-1(CD54)、ICOS-L、LFA-3(CD58)、4-1BBL、CD30L、CD40、CD40L、CD48、CD70、CD112、CD155、GITRL、OX40L和TL1A组成的组的另外的共刺激分子。

47.如权利要求37所述的方法，其中与PD-1和CTLA-4中的至少一种结合的肽是膜结合的抗体片段。

48.如权利要求37所述的方法，其中NK细胞是经遗传修饰的NK细胞，其(1)具有减少或消除的至少一种杀伤细胞免疫球蛋白样受体的表达，(2)表达高亲和力的Fcγ受体，(3)表达嵌合T细胞受体，和/或(4)在NKG2A中具有缺失。

49.如前述权利要求中任一项所述的方法，还包括在有效触发肿瘤细胞上NKG2D配体的表达或增加表达的方案下向患者施用低剂量化学疗法的步骤。

50.如权利要求1、25或37中任一项所述的方法，还包括在有效触发肿瘤细胞上NKG2D配体的表达或增加表达的方案下向患者施用低剂量化学疗法的步骤。

51.如前述权利要求中任一项所述的方法，还包括在有效触发肿瘤细胞上NKG2D配体的表达或增加表达的方案下向患者施用放射疗法的步骤。

52.如权利要求1、25或37中任一项所述的方法，还包括在有效触发肿瘤细胞上NKG2D配体的表达或增加表达的方案下向患者施用放射疗法的步骤。

53.如前述权利要求中任一项所述的方法，还包括鉴定残留肿瘤细胞中新的新表位和修饰病毒载体的核酸以包括至少一种新的新表位的步骤。

54.如权利要求1、25或37中任一项所述的方法，还包括鉴定残留肿瘤细胞中新的新表位和修饰所述病毒载体的核酸以包括至少一种新的新表位的步骤。

55.病毒载体，其包含对以下进行编码的核酸：

(a)患者肿瘤的至少一种肿瘤相关表位；

(b)至少一种共刺激分子；以及

(c)与检查点受体结合的肽；

其中核酸还包括用于将由核酸编码的肽产物引导到细胞质、内体区室或溶酶体区室的运输信号；以及

其中肽产物还包含增强肽产物的细胞内周转的序列部分。

56.如权利要求55所述的病毒载体，其中所述病毒载体是重组腺病毒基因组，任选地具有缺失或非功能性E2b基因。

57.如权利要求55-56中任一项所述的病毒载体，其中所述肿瘤相关表位是HLA匹配的肿瘤相关表位。

58.如权利要求55-57中任一项所述的病毒载体，其中所述肿瘤相关表位是癌症相关表位、癌症特异性表位或患者和肿瘤特异性新表位。

59.如权利要求55-58中任一项所述的病毒载体，其中所述共刺激分子是B7.1(CD80)，B7.2(CD86)，ICAM-1(CD54)，ICOS-L，LFA-3(CD58)，4-1BBL，CD30L，CD40，CD40L，CD48，CD70，CD112，CD155，GITRL，OX40L或TL1A。

60.如权利要求55-59中任一项所述的病毒载体，其中与检查点受体结合的肽结合CTLA-4(CD152)或PD-1(CD279)，任选地包含膜结合的抗体片段。

61.如权利要求55所述的病毒载体，其中所述肿瘤相关表位是HLA匹配的肿瘤相关表位。

62.如权利要求55所述的病毒载体，其中肿瘤相关表位是癌症相关表位、癌症特异性表位或患者和肿瘤特异性新表位。

63.如权利要求55所述的病毒载体，其中共刺激分子是B7.1(CD80)、B7.2(CD86)、ICAM-1(CD54)、ICOS-L、LFA-3(CD58)、4-1BBL、CD30L、CD40、CD40L、CD48、CD70、CD112、CD155、GITRL、OX40L或TL1A。

64.如权利要求55所述的病毒载体，其中与检查点受体结合的肽结合CTLA-4(CD152)或PD-1(CD279)，任选地包含膜结合的抗体片段。

65.重组病毒，其包含权利要求55-60中任一项所述的病毒载体。

66.重组病毒，其包含权利要求61-64中任一项所述的病毒载体。

67.药物组合物，其包含权利要求65所述的重组病毒。

68.药物组合物，其包含权利要求66所述的重组病毒。

# 双靶向腺病毒皮下递送

[0001] 本申请要求于2016年2月11日提交的美国临时申请序列号62/294251的优先权，并且还要求于2016年2月12日提交的美国临时申请序列号62/294987的优先权，这两个申请均通过引用方式并入本文。

## 技术领域

[0002] 本发明的领域是免疫治疗组合物和方法，尤其是涉及靶向MHC-I和/或MHC-II呈递途径的癌症疫苗制备，特别是同时调节检查点抑制。

## 背景技术

[0003] 背景技术描述包括可用于理解本发明的信息。并不承认本文提供的任何信息是现有技术或与当前要求保护的发明相关，或者具体或隐含地引用的任何出版物是现有技术。

[0004] 本文中的所有出版物和专利申请均通过引用并入，其程度如同每个单独的出版物或专利申请被具体和单独地指出通过引用并入一样。如果并入的参考文献中术语的定义或用法与本文提供的术语的定义不一致或相反，则适用本文提供的该术语的定义，并且该术语在该参考文献中的定义不适用。

[0005] 癌症疫苗显示出很多希望，但由于各种因素，包括病毒载体的免疫原性和/或重组抗原的不良表现，在实践中通常受到限制。值得注意的是，不良表现可能不仅来自抗原本身，而且来自与患者特定HLA类型的不良匹配。此外，特别是在使用重组病毒产生治疗性抗原的情况下，全身递送和低感染性以及患者对病毒的清除往往会阻碍对患者免疫系统的各种组分(例如，树突细胞，CD8+T细胞，CD4+辅助T细胞，B细胞)的有效和普遍的训练通常不会或很难实现。此外，即使至少在某种程度上实现抗原呈递，各种调节机制，尤其是免疫检查点抑制，通常也会给有效治疗带来额外的障碍。

[0006] 例如，US 7118738教导了携带携带编码MUC1的重组DNA的痘病毒作为癌症相关抗原的用途，并报道了使用B7.1和/或B7.2作为佐剂可以增强免疫反应。然而，尚未证实此类病毒始终引发治疗上有效的免疫应答。类似地，CEA/TRICOM由重组痘病毒表达(参见例如Clin Cancer Res 2005，第11卷，2416-2426)。然而，TRICOM的免疫刺激不如预期。此外，CEA也在除癌细胞以外的细胞上表达，并且已经显示作为递送系统的痘病毒在第一次施用后具有免疫原性。另外，这种系统中的免疫刺激对CEA没有最强烈的作用，而是在抗原级联中促成针对其他蛋白质的免疫应答。因此，虽然刺激性佐剂至少在概念上具有承诺，但它们的实际成功往往是有限的。

[0007] 在更进一步已知的方法中，用于表达抗原(例如，CEA，MUC1，鼠短尾突变体表型)的病毒载体与检查点抑制剂共同施用以增强免疫应答，如WO 2016/172249，US 2016/0101170和US 2016/0339090中所述。检查点抑制剂的使用已经在至少一些癌症中显示出显着的成功。然而，由于通常全身施用检查点抑制剂，不希望的副作用通常是重大风险。

[0008] 无论具体的递送如何，应当理解，持久免疫应答的产生不仅需要适当的抗原加工和呈递，还需要适当形成免疫突触和通过免疫系统的各种组分传播抗原刺激物，从而产生

治疗上有效的体液和细胞反应。目前已知的系统和方法通常不能提供这种协调的活动。

[0009] 因此，尽管本领域已知许多产生免疫应答的方法和组合物，但它们中的全部或几乎全部都存在各种缺点。因此，仍然需要用于免疫疗法，特别是用于癌症免疫疗法的改进的组合物和方法。

[0010] 发明概述

[0011] 本发明的主题涉及通过皮下施用感染抗原呈递细胞(例如，树突细胞)的重组和优选非免疫原性病毒以驱动癌症相关表位的生产、加工和呈递来产生解决上述问题的免疫应答的组合物和方法，其中表位特异性地针对MHC-I和MHC-II呈递途径以改善抗原呈递。此外，为了获得更强大的免疫应答，受感染的细胞将进一步表达各种共刺激分子以及干扰免疫感受态细胞(尤其是T细胞和NK细胞)的检查点受体的肽。如果需要，检查点抑制剂也可以在重组病毒的施用部位或其附近皮下注射，并且因此不能编码在病毒重组核酸中。由于使用MHC-I和MHC-II呈递途径的靶向抗原呈递，免疫应答分别通过CD8+和CD4+T细胞繁殖，这些细胞是指导NK细胞和B细胞以及细胞毒性T细胞的产生的物质。通过随后或之后施用NK细胞以及最优选遗传工程NK细胞仍可进一步增强免疫应答，如下文更详细地描述。

[0012] 在本发明主题的一个方面，发明人考虑了治疗患有肿瘤的患者的方法。特别考虑的方法包括皮下施用重组病毒的步骤，所述重组病毒包含对以下进行编码的核酸：(a)患者肿瘤的至少一种肿瘤相关表位的核酸；(b)至少一种共刺激分子；(c)与检查点受体结合的肽。最典型地，核酸还包括运输信号，用于将由核酸编码的肽产物引导至细胞质、内体区室和/或溶酶体区室。在又一步骤中，将NK细胞施用于患者。

[0013] 优选但非必要地，重组病毒是腺病毒，任选地具有缺失或非功能性E2b基因以降低免疫原性。还进一步考虑肿瘤相关表位是HLA匹配的肿瘤相关表位，其可以是癌症相关表位、癌症特异性表位或患者和肿瘤特异性新表位。

[0014] 关于共刺激分子，预期共刺激分子是B7.1(CD80)，B7.2(CD86)，ICAM-1(CD54)，ICOS-L，LFA-3(CD58)，4-1BBL，CD30L，CD40，CD40L，CD48，CD70，CD112，CD155，GITRL，OX40L或TL1A，以及与检查点受体结合的优选肽将与CTLA-4(CD152)和/或PD-1(CD 279)结合。

[0015] 在进一步考虑的方法中，运输信号将肽产物引导至细胞质，引导至内体区室，和/或引导至溶酶体区室。因此，合适的运输信号包括细胞质保留序列、内体靶向序列和/或溶酶体靶向序列。例如，核酸可具有将第一肽产物引导至细胞质的第一运输信号和将第二肽产物引导至内体或溶酶体区室的第二运输信号，其中第一和第二肽产物相同或不同。另外，预期肽产物可进一步包括增强肽产物的细胞内周转的序列部分。

[0016] 关于合适的NK细胞，通常考虑对NK细胞进行遗传修饰，使得NK细胞(1)具有减少或消除的至少一种杀伤细胞免疫球蛋白样受体的表达，(2)表达高亲和力Fc γ受体，(3)表达嵌合T细胞受体，和/或(4)在NKG2A中具有缺失。最典型地，在皮下施用重组病毒后1至14天施用NK细胞。

[0017] 在本发明主题的另一方面，发明人考虑了在患有肿瘤的患者中刺激CD8+T细胞应答的方法，该方法通常包括皮下施用包含对以下进行编码的核酸的重组病毒的步骤：(a)患者肿瘤的至少一种肿瘤相关表位，其可操作地与运输信号偶联，所述运输信号在细胞质中保留至少一种肿瘤相关表位；(b)多种共刺激分子，其中至少一种是B7.1(CD80)或B7.2(CD86)；以及(c)与PD-1和CTLA-4中的至少一种结合的肽。在另一步骤中，将NK细胞施用于

患者。

[0018] 可选地，在本发明主题的又一个方面，发明人考虑了在患有肿瘤的患者中刺激CD4+T细胞应答的方法，该方法包括皮下给予包含对以下进行编码的核酸的重组病毒的步骤：(a)患者肿瘤的至少一种肿瘤相关表位，其可操作地与运输信号偶联，所述运输信号将至少一种肿瘤相关表位引导至细胞质或内体或溶酶体区室；(b)多种共刺激分子，其中至少一种是B7.1(CD80)或B7.2(CD86)；(c)与PD-1和CTLA-4中的至少一种结合的肽。在另一个步骤中，将NK细胞施用于患者。

[0019] 最典型地，此类方法中的重组病毒是腺病毒，任选地具有缺失的或非功能的E2b基因以降低免疫原性。如上所述，合适的肿瘤相关表位将进一步包括增强肿瘤相关表位的细胞内周转的序列部分。例如，此类表位可以是HLA匹配的癌症相关表位、HLA匹配的癌症特异性表位或HLA匹配的患者和肿瘤特异性新表位。

[0020] 另外，预期多种共刺激分子可进一步包括选自由ICAM-1(CD54)，ICOS-L，LFA-3(CD58)，4-1BBL，CD30L，CD40，CD40L，CD48，CD70，CD112，CD155，GITRL，OX40L和TLIA组成的组的至少一种另外的共刺激分子，和/或与PD-1和CTLA-4中的至少一种结合的肽是膜结合的抗体片段。此外，预期NK细胞是遗传修饰的NK细胞，其(1)具有减少或消除的至少一种杀伤细胞免疫球蛋白样受体的表达，(2)表达高亲和力的Fcγ受体，(3)表达嵌合T细胞受体，和/或(4)在NKG2A中具有缺失。

[0021] 此外，本发明人还考虑到本文提供的所有方法可以进一步包括有效触发肿瘤细胞上NKG2D配体的表达或增加表达的方案下向患者施用低剂量化学疗法和/或低剂量放射疗法的步骤。肿瘤的细胞。期望的预期方法可以进一步包括鉴定残留肿瘤细胞中新的新表位并修饰重组病毒以包括至少一种新的新表位的步骤。

[0022] 因此，并且从不同的角度来看，本发明人还考虑了病毒载体(例如，重组腺病毒基因组，任选地具有缺失的或无功能的E2b基因)，其包含对以下进行编码的核酸：(a)患者肿瘤的至少一种肿瘤相关表位；(b)至少一种共刺激分子；(c)与检查点受体结合的肽。最典型地，核酸将进一步包括运输信号以将由核酸编码的肽产物引导至细胞质、内体区室或溶酶体区室，并且肽产物将进一步包含增强肽产物的细胞内周转的序列部分。如前所述，肿瘤相关表位优选是HLA匹配的肿瘤相关表位(例如，癌症相关表位、癌症特异性表位或患者和肿瘤特异性新表位)。类似地，优选共刺激分子是B7.1(CD80)，B7.2(CD86)，ICAM-1(CD54)，ICOS-L，LFA-3(CD58)，4-1BBL，CD30L，CD40，CD40L，CD48，CD70，CD112，CD155，GITRL，OX40L或TL1A，和/或与检查点受体结合的肽结合CTLA-4(CD152)或PD-1(CD279)，任选地包含膜结合的抗体片段。

[0023] 因此，本发明人还考虑了包含如上所述的病毒载体的重组病毒。同样，发明人还考虑了包含如本文所述的重组病毒的药物组合物。

[0024] 从以下优选实施例的详细描述中，本发明主题的各种目的、特征、方面和优点将变得更加明显。

[0025] 发明详述

[0026] 本发明人现已发现，通过使用优选皮下施用的重组病毒和免疫调节剂与基于NK细胞的疗法相结合，可以显着改善癌症免疫疗法。

[0027] 更具体地，使用本文提供的预期方法和组合物，预期通过将一种或多种肿瘤相关

表位靶向一种或多种MHC呈递途径，可以通过CD8+和CD4+T细胞群体繁殖免疫应答，这反过来将有助于产生体液和基于细胞的适应性免疫应答。另外，预期的方法还使用(优选遗传修饰的)NK细胞来增强先天免疫应答，如下文更详细描述的。在皮下施用时，预期病毒递送在感染树突细胞方面特别有效，并且在病毒注射部位处或附近皮下施用检查点抑制剂(例如，通过从病毒感染的细胞表达或通过注射)将进一步增强免疫应答，同时大大降低了阳性细胞因子反馈回路(即细胞因子风暴)的风险。

[0028] 认为抗原、共刺激分子和检查点抑制剂的共表达/协调存在促进免疫突触的形成持续足以激活T细胞，特别是CD8+和CD4+T细胞的持续时间。在特别优选的方面，通过来自感染抗原呈递细胞，尤其是树突细胞的病毒的抗原和共刺激分子的共表达来确保这些实体的存在，这些抗原呈递细胞，尤其是树突细胞也可以共表达一种或多种与CTLA-4和/或PD-1结合的分子，如下面更详细地讨论。可选地/另外，可以在病毒递送位点处或附近注射一种或多种检查点抑制剂(ipilimumab，nivolimumab等)。最典型地，这种递送将通过皮下用或皮下注射。为了进一步增强抗原加工和呈递，预期表达的抗原将包括有目的地将表达的蛋白质引导至所需区室(例如，用于MHC-I呈递的细胞溶质区室，或用于MHC-II呈递的内体或溶酶体区室)的运输序列。此外，为了增强抗原加工，通常优选包括一个或多个遍在蛋白化位点或包括不可切割的遍在蛋白。

[0029] 因此，认为免疫疗法引发针对特定表达的抗原的强适应性免疫应答，进一步预期免疫应答也将有助于抗原级联和对新呈递的抗原的额外免疫应答。为了进一步补充适应性免疫应答，通常优选先天免疫应答的组分可以给予患者，尤其是遗传修饰的NK细胞。例如，并且如下面进一步详细讨论的，NK细胞可以是具有CD16的高亲和力变体的遗传修饰的NK92细胞，以用具有特异于一种或多种肿瘤相关抗原的结合结构域的嵌合抗原受体增强体液应答和/或基因修饰的NK92细胞。

[0030] 关于预期的肿瘤相关表位，应当理解，与癌症相关的，对特定类型的癌症特异的或对患者和肿瘤特异的任何表位(新表位)适用于本文，特别是在表达表位的情况下(优选高于同一患者的健康组织的表达水平)并且表位对患者HLA系统具有所需的亲和力的情况下。在本文中，术语肿瘤相关表位包括短肽(例如，8-30个氨基酸)，以及蛋白质片段，甚至整个蛋白质。

[0031] 例如，存在许多已知与癌症相关的抗原，并且所有这些抗原被认为适用于本文，包括CEA，MUC-1，EphA3和CYPB1及其部分。类似地，本领域已知有许多癌症特异性抗原，例如Her-2，PSA，brachyury等，并且所有这些抗原和其部分都被认为适用于本文。然而，在特别优选的方面，肿瘤相关表位将包括患者和肿瘤特异性新表位。因此，应当理解，重组病毒或病毒核酸构建体(或用于在宿主细胞中表达的核酸构建体)将包括编码至少一个(例如，至少两个，三个，四个等)肿瘤相关表位加上至少一种共刺激分子的重组片段，优选(但不一定)是干扰检查点信号传导的蛋白质。当然，应当理解，当肿瘤相关表位、共刺激分子和其他蛋白质的序列长度超过重组核酸的病毒能力时，可以使用多种不同的重组病毒。

[0032] 预期的肿瘤相关表位的序列信息可以从各种公知的来源(例如，TCGA，COSMIC等)获得，或者可以从患者获得，例如，使用遵循标准组织处理方案和测序方案的活组织检查样品。虽然不限制本发明的主题，但通常优选的是，序列数据是患者和肿瘤特异性新表位的患者匹配的肿瘤数据(例如，肿瘤与相同患者正常)，并且数据格式为SAM、BAM、GAR或VCF格式。

然而，非匹配或匹配与其他参考(例如，先前相同患者正常或先前相同患者肿瘤或同源统计)也被认为适合用于本文。因此，组学数据可以是“新鲜”组学数据或从先前程序(或甚至不同患者)获得的组学数据。

[0033] 新表位可以表征为肿瘤细胞中表达的随机突变，其产生独特的和肿瘤特异性抗原。因此，从不同的角度来看，可以通过考虑突变的类型(例如，删除，插入，颠换，转换，易位)和突变的影响(例如，无意义，错义，移码等)来识别新表位，这可以作为第一内容过滤器，通过该过滤器消除沉默和其他非相关(例如，非表达)突变。还应当理解，新表位序列可以定义为具有相对短的长度(例如7-11聚体)的序列段，其中这样的段将包括氨基酸序列中的变化。最典型地，改变的氨基酸将位于中心氨基酸位置处或附近。例如，典型的新表位可具有$A_4$-N-$A_4$，或$A_3$-N-$A_5$，或$A_2$-N-$A_7$，或$A_5$-N-$A_3$或$A_7$-N-$A_2$的结构，其中A是蛋白原性的氨基酸和N是改变的氨基酸(相对于野生型或相对于匹配的正常)。然而，改变的氨基酸也可位于新表位序列的末端。例如，本文考虑的新表位序列包括具有相对短的长度的序列段(例如，5-30个聚体，更通常7-11个聚体，或12-25个聚体)，其中此类区段包括氨基酸序列中的改变。

[0034] 因此，应当理解，根据改变的氨基酸的位置，可以在包括改变的氨基酸的许多新表位序列中呈现单个氨基酸改变。有利地，这种序列可变性允许多个新表位的选择，因此增加了潜在有用靶标的数量，然后可以基于一种或多种期望的性状(例如，对患者HLA型的最高亲和力，最高结构稳定性，等等)来选择靶标。最典型地，新表位的计算长度为2-50个氨基酸，更典型为5-30个氨基酸，最通常为9-15个氨基酸，改变的氨基酸优选位于中心或以确保或改善其与MHC结合的方式以其他方式安置。例如，当表位由MHC-I复合物呈递时，典型的新表位长度将为约8-11个氨基酸，而通过MHC-II复合物呈递的典型新表位长度将具有约13至17个氨基酸的长度。如将容易理解的，由于新表位中改变的氨基酸的位置可以不是位于中心，因此实际的肽序列和新表位的实际拓扑结构可以显着变化。

[0035] 当然，应该理解的是，新表位的鉴定或发现可以从各种生物材料开始，包括新鲜活组织检查、冷冻或以其他方式保存的组织或细胞样品、循环肿瘤细胞、外泌体、各种体液(尤其是血液)等。因此，合适的组学分析方法包括核酸测序，特别是在DNA上操作的NGS方法(例如，Illumina测序，离子流测序，454焦磷酸测序，纳米孔测序等)，RNA测序(例如，RNAseq，基于反向转录的测序等)，以及基于蛋白质测序或基于质谱的测序(例如，SRM、MRM、CRM等)。

[0036] 因此，特别是对于基于核酸的测序，应该特别认识到肿瘤组织的高通量基因组测序将允许快速鉴定新表位。然而，必须理解的是，在如此获得的序列信息与标准参考进行比较的情况下，正常发生的患者间变异(例如，由于SNP、短插入缺失、不同重复数目等)以及杂合性将导致相对大量潜在的假阳性新表位。值得注意的是，当将患者的肿瘤样品与同一患者的匹配的正常(即，非肿瘤)样品进行比较时，可以消除这种不准确性。

[0037] 在本发明主题的一个特别优选的方面，通过肿瘤和匹配的正常样品的全基因组测序和/或外显子组测序(通常在至少10x的覆盖深度，更通常至少20x的覆盖深度)来进行DNA分析。可选地，也可以从先前序列确定的已建立的序列记录(例如，SAM，BAM，FASTA，FASTQ或VCF文件)提供DNA数据。因此，数据集可以包括未处理或已处理的数据集，并且示例性数据集包括具有BAMBAM格式、SAMBAM格式、FASTQ格式或FASTA格式的数据集。然而，特别优选的是，数据集以BAMBAM格式或BAMBAM diff对象提供(参见例如US2012/0059670A1和US2012/0066001A1)。此外，应该注意的是，数据集反映了肿瘤和同一患者的匹配的正常样本，从而

获得患者和肿瘤特异性信息。因此，可以排除不产生肿瘤的遗传种系改变(例如，沉默突变、SNP等)。当然，应该认识到肿瘤样本可能来自初始肿瘤，治疗开始时的肿瘤，复发性肿瘤或转移部位等。在大多数情况下，患者的匹配的正常样本可能是血液或来自与肿瘤相同组织类型的非患病组织。

[0038] 同样地，序列数据的计算分析可以以多种方式执行。然而，在最优选的方法中，使用BAM文件和BAM服务器通过肿瘤和正常样品的位置引导的同步对准在计算机中进行分析，例如，在US2012/0059670A1和US2012/0066001A1中公开。这种分析有利地减少了假阳性新表位并显着降低了对存储器和计算资源的需求。

[0039] 应当注意，应该读取针对计算机的任何语言以包括计算设备的任何合适组合，包括服务器、接口、系统、数据库、代理、对等设备、引擎、控制器或单独或统一操作的其他类型的计算设备。应当理解，计算设备包括处理器，该处理器被配置为执行存储在有形的非暂时性计算机可读存储介质(例如，硬盘驱动器、固态驱动器、RAM、闪存、ROM等)上的软件指令。软件指令优选地配置计算设备以提供角色、职责或其他功能，如下面关于所公开的装置所讨论的。此外，所公开的技术可以体现为计算机程序产品，其包括存储软件指令的非暂时性计算机可读介质，该软件指令使得处理器执行与基于计算机的算法、过程、方法或其他指令的实现方式相关联的所公开的步骤。在特别优选的实施例中，各种服务器、系统、数据库或接口使用标准化协议或算法交换数据，可能基于HTTP、HTTPS、AES、公钥-私钥交换、web服务API、已知金融交易协议或其他电子信息交换方法。设备之间的数据交换可以通过以下来进行：分组交换网络、因特网、LAN、WAN、VPN或其他类型的分组交换网络；电路交换网络；小区交换网络；或其他类型的网络。

[0040] 从不同的角度来看，可以建立患者和癌症特异性的计算机模块序列集合，其具有5-25个氨基酸的预定长度并且包括至少一个改变的氨基酸。对于每个改变的氨基酸，这种集合通常包括至少两个，至少三个，至少四个，至少五个或至少六个成员，其中改变的氨基酸的位置不相同。然后可以将这种集合用于进一步过滤(例如，通过亚细胞定位，转录/表达水平，MHC-I和/或II亲和力等)，如下文更详细描述的。

[0041] 根据癌症的类型和阶段，应该注意的是，并非所有鉴定的新表位都必然导致患者在治疗上同样有效的反应。实际上，本领域众所周知，只有一小部分新表位会产生免疫应答。为了增加治疗上所需的应答的可能性，可以进一步过滤新表位。当然，应当理解，为了本文提供的方法的目的，下游分析不需要考虑沉默突变。然而，优选的突变分析除了突变类型(例如，缺失、插入、颠换、转换、易位)之外还将提供突变影响的信息(例如，无意义、错义等)并且因此可以作为第一内容过滤器，通过它可以消除沉默突变。例如，可以选择新表位用于进一步考虑，其中突变是移码、无义和/或错义突变。

[0042] 在进一步的过滤方法中，还可以对新表位进行亚细胞定位参数的详细分析。例如，如果新表位被鉴定为具有膜相关位置(例如，位于细胞的细胞膜外部)和/或如果计算机结构计算确认了新表位可能是溶剂暴露的，或呈现结构稳定的表位(例如，J Exp Med 2014)等，则可以选择新表位序列用于进一步考虑。

[0043] 关于过滤新表位，通常预期新表位特别适用于本文，其中组学(或其他)分析揭示实际表达新表位。可以以本领域已知的所有方式进行新表位的表达和表达水平的鉴定，优选的方法包括定量RNA(hnRNA或mRNA)分析和/或定量蛋白质组学分析。最典型地，包含新表

位的阈值水平将是相应匹配的正常序列的表达水平的至少20％，至少30％，至少40％或至少50％的表达水平，从而确保(新)表位至少对免疫系统是“可见的”。因此，通常优选组学分析还包括基因表达分析(转录组学分析)，以帮助鉴定具有突变的基因的表达水平。

[0044] 本领域已知有许多转录组学分析方法，并且认为所有已知方法都适用于本文。例如，优选的材料包括mRNA和初级转录物(hnRNA)，并且RNA序列信息可以从逆转录的polyA$^+$-RNA获得，其又从肿瘤样品和相同患者的匹配的正常(健康)样品获得。同样地，应当注意，虽然polyA$^+$-RNA通常优选作为转录组的代表，但其他形式的RNA(hn-RNA，非多腺苷酸化RNA，siRNA，miRNA等)也被认为适用于本文。优选的方法包括定量RNA(hnRNA或mRNA)分析和/或定量蛋白质组学分析，尤其包括RNAseq。在其他方面，使用基于RNA-seq、qPCR和/或rtPCR的方法进行RNA定量和测序，尽管各种替代方法(例如，基于固相杂交的方法)也被认为是合适的。从另一个角度来看，转录组学分析可能是合适于(单独或与基因组分析组合)鉴定和定量具有癌症和患者特异性突变的基因。

[0045] 类似地，可以以多种方式进行蛋白质组学分析以确定新表位的RNA的实际翻译，并且本文考虑了所有已知的蛋白质组学分析方式。然而，特别优选的蛋白质组学方法包括基于抗体的方法和质谱法。此外，应该注意的是，蛋白质组学分析不仅可以提供关于蛋白质本身的定性或定量信息，还可以包括蛋白质具有催化或其他功能活性的蛋白质活性数据。用于进行蛋白质组学测定的一种示例性技术描述于US 7473532中，其通过引用并入本文。进一步合适的鉴定和甚至定量蛋白质表达的方法包括各种质谱分析(例如，选择性反应监测(SRM)，多反应监测(MRM)和连续反应监测(CRM))。因此，应当理解，上述方法将提供患者和肿瘤特异性新表位，其可以按含有新表位的蛋白质的亚细胞位置(例如，膜位置)、表达强度(例如，与匹配同一患者的正常情况相比过表达)等进一步过滤。

[0046] 在过滤的另一个方面，可以将新表位与包含已知人类序列(例如患者或患者集合)的数据库进行比较，以避免使用人类相同序列。此外，过滤还可以包括去除由于患者中的SNP引起的新表位序列，其中SNP存在于肿瘤和匹配的正常序列中。例如，dbSNP(单核苷酸多态性数据库)是由国家生物技术信息中心(NCBI)与国家人类基因组研究所(NHGRI)合作开发和主持的不同物种内和跨越不同物种的遗传变异的免费公共档案。虽然数据库的名称仅暗示一类多态性的集合(单核苷酸多态性(SNP))，但它实际上包含相对广泛的分子变异：(1)SNP，(2)短缺失和插入多态性(indels/DIPs)，(3)微卫星标记或短串联重复(STR)，(4)多核苷酸多态性(MNP)，(5)杂合序列，以及(6)命名变体。dbSNP接受明显中性的多态性，对应于已知表型的多态性和无变异的区域。使用如上所述的这种数据库和其他过滤选项，可以过滤患者和肿瘤特异性新表位以除去那些已知序列，产生具有多个具有显着减少的假阳性的新表位序列的序列集合。

[0047] 尽管如此，尽管过滤，但应该认识到并非所有新表位都对免疫系统可见，因为新表位也需要呈递在患者的MHC复合物上。实际上，只有一小部分新表位具有足够的亲和性以便呈递，并且大量多样的MHC复合物将排除使用大多数(如果不是全部)常见的新表位。因此，在免疫治疗的背景下，应当显而易见的是，新表位在新表位与MHC复合物结合并由MHC复合物呈递的情况下更有效。从另一个角度来看，用检查点抑制剂治疗成功需要通过MHC复合物呈递多个新表位，其中新表位必须对患者的HLA型具有最小亲和力。因此，应当理解，有效结合和呈递是新表位序列和患者的特定HLA类型的组合功能。最典型地，HLA型确定包括至少

三种MHC-I亚型(例如,HLA-A、HLA-B、HLA-C)和至少三种MHC-II亚型(例如,HLA-DP、HLA-DQ、HLA-DR),优选地,每个亚型被确定为至少2位深度或至少4位深度。然而,本文还预期更大的深度(例如,6位,8位)。可以使用本领域熟知的湿化学中的各种方法进行HLA测定,并且认为所有这些方法都适用于本文。可选地,还可以使用包含大多数或所有已知和/或常见HLA型的参考序列通过计算机中根据患者组学数据来预测HLA型,如PCT/US16/48768中所示。

[0048] 一旦确定患者的HLA型(使用已知的化学或计算机模拟测定),就从数据库计算或获得HLA型的结构解决方案,然后将其用于计算机中的对接模型以确定(通常过滤的)新表位与HLA结构解决方案的结合亲和力。用于确定结合亲和力的合适系统包括NetMHC平台(参见例如,Nucleic Acids Res.2008年7月1日;36(Web服务器问题):W509-W512.)。然后选择对先前确定的HLA型具有高亲和力(例如,小于100nM,小于75nM,小于50nM)的新表位以及MHC-I/II亚型的知识用于治疗创建。

[0049] 更具体地,一旦鉴定出患者和肿瘤特异性新表位和HLA型,可以通过将新表位与HLA对接并确定最佳结合物(例如,最低$K_D$,例如,小于500nM,或小于250nM,或小于150nM,或小于50nM)来进行计算分析,例如,使用NetMHC。当然,应该理解的是,患者的HLA类型与患者和癌症特异性新表位的匹配可以使用除NetMHC之外的系统来完成,并且合适的系统包括NetMHC II,NetMHCpan,IEDB分析资源(URL immuneepitope.org),RankPep,PREDEP,SVMHC,Epipredict,HLABinding等(参见例如J Immunol Methods 2011;374:1-4)。

[0050] 在计算最高亲和力时,应当注意,可以使用其中移动改变的氨基酸的位置(上文)的新表位序列的集合。可选地或另外地,可以通过添加N-和/或C末端修饰来实现对新表位的修饰,以进一步增加表达的新表位与患者的HLA型的结合。因此,新表位可以是天然的,如鉴定或进一步修饰以更好地匹配特定的HLA型。此外,如果需要,可以计算相应野生型序列(即没有氨基酸改变的新表位序列)的结合,以确保高差异亲和力。例如,新表位与其相应的野生型序列之间的MHC结合中特别优选的高差异亲和力是至少2倍,至少5倍,至少10倍,至少100倍,至少500倍,至少1000倍等)。

[0051] 应该认识到,这种方法不仅可以鉴定对患者和肿瘤是真实的特定新表位,而且还可以鉴定最有可能在细胞上呈现并且因此最有可能引发具有治疗效果的免疫应答的新表位。当然,还应当理解,在将包含编码表位的核酸作为有效负载包含在病毒中之前,可以在体外对所鉴定的HLA匹配的新表位进行生物化学验证,如下面进一步讨论的。另外,应当理解,新表位的HLA匹配将允许有意地靶向新表位序列朝向MHC-I和/或MHC-II呈递,这反过来将允许控制关于CD8+和CD4+T细胞的激活的免疫应答(至少在某种程度上影响体液和细胞免疫应答之间的平衡)。例如,当特定的新表位不会通过MHC-I途径的呈递引起有效的免疫应答时,可以替代(或另外)靶向相同的新表位以通过MHC-II途径呈递。更进一步地,预期新表位的表达可以排他性或主要(例如,所有新表位的至少50%,或60%,或70%,或80%)针对一种呈递系统。例如,当需要更多细胞免疫应答(例如,通过T细胞应答的ADCC)时,可以向MHC-I呈递推动呈递。另一方面,在需要更体液应答的情况下(例如,抗体/补体应答),可以向MHC-II呈递推动呈递。

[0052] 关于将如此鉴定和表达的新表位路由至所需的MHC系统,应当理解,MHC-I呈递的肽通常通过蛋白酶体加工和通过内质网递送而来自细胞质。因此,用于MHC-I呈递的表位的表达通常将针对细胞质,如下面更详细地进一步讨论的。另一方面,MHC-II呈递的肽通常在

递送至细胞膜之前通过酸性蛋白酶(例如,legumain,组织蛋白酶L和组织蛋白酶S)的降解和加工从内体和溶酶体区室产生。因此,用于MHC-II呈递的表位的表达通常将针对内体和溶酶体区室,这也在下面更详细地讨论。

[0053] 在优选的方面,信号肽可用于运输至内体和溶酶体区室,或用于保留在细胞质空间中。例如,在将肽输出到内体和溶酶体区室的情况下,可以使用选择的靶向前序列和内部靶向肽。优选将靶向肽的前序列添加到N末端,并且通常包含6-136个碱性和疏水性氨基酸。在过氧化物酶体靶向的情况下,靶向序列可以在C末端。可以使用其他信号(例如,信号贴片)并且包括在肽序列中分开并且在适当的肽折叠时变得有功能的序列元件。此外,蛋白质修饰如糖基化可以诱导靶向。在其他合适的靶向信号中,发明人考虑过氧化物酶体靶向信号1(PTS1)、C末端三肽和过氧化物酶体靶向信号2(PTS2),PTS2是位于N-末端附近的九肽。此外,蛋白质分选到内体和溶酶体也可以通过蛋白质的胞质结构域内的信号介导,通常包括短的线性序列。一些信号被称为基于酪氨酸的分选信号,并符合NPXY或YXXØ共识基序。称为基于二亮氨酸的信号的其他信号符合[DE]XXXL[LI]或DXXLL共识基序。所有这些信号都被外周与膜的胞质面相关的蛋白质外壳的成分识别。YXXØ和[DE]XXXL[LI]信号被衔接蛋白(AP)复合物AP-1,AP-2,AP-3和AP-4识别出具有特征性的精细特异性,而DXXLL信号被称为GGA的另一系列的衔接体识别。还可以添加FYVE结构域,其与液泡蛋白分选和内体功能相关。在更进一步的方面,还可以使用人CD1尾序列靶向内体区室(参见例如Immunology,122,522-531)。

[0054] 向细胞溶质区室中的运输或保留可能不一定需要一种或多种特定的序列元件。然而,在至少一些方面,可以添加N或C末端细胞质保留信号,包括膜锚定蛋白或膜锚定蛋白的膜锚定结构域。例如,膜锚定蛋白包括SNAP-25,突触蛋白,突触素,突触结合蛋白,囊泡相关膜蛋白(VAMP),突触小泡糖蛋白(SV2),高亲和力胆碱转运蛋白,Neurexins,电压门控钙通道,乙酰胆碱酯酶和NOTCH。

[0055] 除了将蛋白质特异性靶向MHC-I和/或MHC-II系统之外,应当理解,可以通过一种或多种有助于加速细胞内蛋白质周转的信号进一步增强加工和呈递,例如,通过适当选择重组抗原或新表位的N-末端氨基酸。例如,为了增加周转,预期N末端氨基酸可以是去稳定氨基酸。因此,合适的N末端氨基酸尤其包括Arg,His,Ile,Leu,Lys,Phe,Trp和Tyr,并且在某种程度上还包括Asn Asp,Gln和Glu。可以将这些氨基酸添加到靶向MHC-I和/或MHC-II呈递途径的肽中。此外,应当理解,蛋白质周转也可以使用蛋白质末端的遍在蛋白增强,优选通过不可切割的接头偶联。

[0056] 因此,用合适的信号序列将肽寻址到合适的区室,并任选地用去稳定的N末端氨基酸修饰肽,将有助于增加抗原加工和呈递,这也将最终导致抗原级联和表位扩散。

[0057] 当然,应该认识到,可以在重组核酸中编码一种以上肿瘤相关抗原,并且多种抗原的排列可以显着变化。例如,预期的转录或翻译单元可具有多个表位的多联体排列,通常由短接头(例如,具有4-20个氨基酸的柔性接头)分开,其可进一步包括蛋白酶切割位点。将设计特别合适的接头序列,使得接头以及接头和肿瘤相关抗原之间的融合部分不会形成通常存在于患者体内的蛋白质序列。此类多联体可具有1至20个新表位(通常受到可通过病毒递送的重组核酸的大小的限制),并且应当注意,多联体可以是相同的以递送至MHC-I和MHC-II复合物,或者不同。因此,应当理解,可以将各种肽路由至特定的细胞区室,从而通过MHC-

I和/或MHC-II实现优先或甚至特异性呈递。从另一个角度来看，应该认识到肿瘤相关抗原和新表位可以通过呈递途径呈现，或者同时或在随后的治疗轮次中选择性地呈递给一个或另一个途径。

[0058] 另外，优选病毒重组核酸还编码至少一种，更通常至少两种，甚至更通常至少三种，最通常至少四种共刺激分子，以增强感染的树突状细胞和T细胞之间的相互作用。例如，合适的共刺激分子包括ICAM-1(CD54)，ICOS-L和LFA-3(CD58)，尤其是与B7.1(CD80)和/或B7.2(CD86)组合。进一步考虑的共刺激分子包括4-1BBL，CD30L，CD40，CD40L，CD48，CD70，CD112，CD155，GITRL，OX40L和TL1A。此外，应当理解，优选协调共刺激分子的表达，使得抗原和/或新表位与一种或多种共刺激分子的表达一起呈递。因此，通常考虑使用内部核糖体进入位点或2A序列或从多个转录物从单个转录物产生共刺激分子。

[0059] 用于增强免疫原性的刺激因子的其他实例包括以下：(a)CD27和CD70：阳性激动剂CD27和/或模拟CD27与T细胞上的CD70相互作用的生物制剂(例如，抗体，配体等)；(b)CD40和CD40L：阳性激动剂CD40和/或模拟T细胞上CD40与CD40L相互作用的生物制剂；(c)OX40L和OX40：阳性激动剂OX40L和/或模拟T细胞上OX40L与OX40相互作用的生物制剂；(d)GITRL和GITR：阳性激动剂GITRL和/或模拟T细胞上GITRL与GITR相互作用的生物制剂；(e)IL-2和CD122：阳性激动剂IL-2和/或模拟T细胞上IL-2与IL-2受体相互作用的生物制剂(例如CD122等)；(f)CD137或模拟CD137对T细胞活性的抗体；以及(g)ICOSL和ICOS：阳性激动剂ICOSL和/或模拟T细胞上ICOSL与ICOS相互作用的生物制剂。

[0060] 另外，应该认识到，任何共刺激分子的表达可以与干扰检查点抑制的任何其他蛋白质的表达配对。例如，共刺激蛋白CD28的表达可以与CTLA-4抑制剂的表达配对。申请人进一步考虑通过病毒的有效负载可以影响额外的刺激或抑制因子。病毒可以包括可以定制以模仿天然免疫应答的有效负载。例如，可以向患者施用具有帮助刺激T细胞的激动剂(例如，模拟CD28)的第一病毒。具有拮抗剂(例如，CTLA-4抑制剂)的第二病毒可以在稍后施用于患者，这可以防止抑制反应。还预期可以切换递送的顺序。此外，可以构建单一病毒，同时支持刺激因子和抑制因子。可选地，共刺激分子可以与肿瘤相关抗原共表达，而检查点抑制剂可以(皮下)注射。

[0061] 因此，还预期重组病毒将进一步包括编码一种或多种与检查点受体结合的肽配体的序列部分。最典型地，结合将抑制或至少减少通过受体的信号传导，并且特别考虑的受体包括CTLA-4(特别是对于CD8+细胞)和PD-1(尤其对于CD4+细胞)。例如，肽结合剂可包括抗体片段，尤其是scFv，而且还包括特异性结合受体的小分子肽配体。再一次，应当理解，肽分子的表达将优选地被协调，使得抗原和/或新表位与一种或多种肽分子一起呈递。因此，通常考虑使用内部核糖体进入位点或2A序列从单个转录物或从多个转录物产生肽分子。

[0062] 可以通过适当构建的病毒增强的抑制因子的其他实例被认为包括以下：(a)抑制T细胞活化的CD276/B7-H3抑制的天然存在的或工程化的配体；(b)抑制T细胞活化的B7-H4/VTCN1抑制的天然存在的或工程化的配体；(c)抑制T细胞活化的CD272/HVEM抑制的天然存在的或工程化的配体；(d)抑制T细胞活化的LAG3抑制天然存在的或工程化的配体(例如MHC-II等)；(e)抑制T细胞活化的PD-1抑制的天然存在的或工程化的配体(例如PD-L1)；(f)抑制T细胞活化的CTLA-4抑制的天然存在的或工程化的配体(例如生物制剂、可溶性CD28等)；(g)抑制T细胞活化的TIM-3抑制的天然存在的或工程化的配体(例如，半乳糖凝集素-

9、生物制剂、抗体等)；(h)抑制T细胞活化的VISTA抑制的天然存在的或工程化的配体(例如抗体等)；(i)抑制NK细胞的MIC抑制的天然存在的或工程化的配体(例如抗体、生物制剂等)。

[0063] 最典型地，重组基因的表达由组成型活性调节序列驱动。然而，在本发明主题的其他方面，调节序列可以是诱导型的，优选使用一种或多种内源于癌组织或合成诱导物的调节信号以选择性方式进行。例如，可以使用合成诱导物或天然存在的诱导物结合适当的反应元件进行诱导型表达。在大多数情况下，进一步优选转录物包括IRES(内部核糖体进入位点)或2A序列(可切割的2A样肽序列)以再次允许肿瘤相关抗原、共刺激分子和/或检查点抑制剂的协调表达。

[0064] 因此，应当理解，使用预期的系统和方法，可以通过在抗原呈递细胞尤其是树突细胞中表达一种或多种肿瘤相关抗原和共刺激分子来进行免疫治疗，其进一步在检测点抑制的抑制剂的存在的情况下进行(可能同样在抗原呈递细胞中表达)。这种协调事件，特别是针对特定MHC呈递时，被认为产生增强的适应性免疫应答，可通过施用细胞组分，特别是NK细胞来进一步补充。

[0065] 如将容易理解的，肿瘤相关抗原、共刺激分子和/或检查点抑制剂将在重组核酸上编码，所述重组核酸可以作为DNA疫苗或RNA施用，但通常优选重组核酸是病毒基因组的一部分。然后可以使用如此基因修饰的病毒，这在基因治疗中是众所周知的。因此，对于重组病毒，预期所有已知的制备重组病毒的方式都被认为适用于本文，然而，特别优选的病毒是已经在治疗中建立的病毒，包括腺病毒、腺相关病毒、甲病毒、疱疹病毒、慢病毒等。在其他合适的选择中，特别优选腺病毒。

[0066] 此外，通常优选病毒是复制缺陷型和非免疫原性病毒，其通常通过所选病毒蛋白(例如E1，E3蛋白)的靶向缺失来实现。通过删除E2b基因功能可以进一步增强这种期望的性质，并且可以使用最近报道的基因修饰的人293细胞实现高滴度的重组病毒(例如，J Virol.1998Feb;72(2)：926-933)。如前所述，所需的核酸序列(用于从病毒感染的细胞中表达)处于本领域熟知的适当调节元件的控制之下。鉴于上述情况，应该理解，所提出的组合物和方法不仅适用于将病毒表达的抗原特异性地导向一种或另一种(或两种)MHC系统，而且还通过包含各种共刺激分子(例如，ICAM-1(CD54)，ICOS-L，LFA-3(CD58)以及B7.1(CD80)和B7.2(CD86)中的至少一种)，以及通过检查点抑制剂的分泌或膜结合呈递来将对CD8+和/或CD4+细胞提供增强的刺激作用。

[0067] 因此，所产生的重组病毒可以单独或组合用作药物组合物中的治疗性疫苗，通常配制成无菌可注射组合物，其病毒滴度为每剂量单位$10^4$-$10^{11}$个病毒颗粒。然而，替代制剂也被认为适用于本文，并且本文考虑了所有已知的施用途径和方式。如本文所用，术语“施用”药物组合物或药物是指药物组合物或药物的直接和间接施用，其中药物组合物或药物的直接施用通常由医疗保健专业人员(例如，医师、护士等)执行，并且其中间接施用包括向医疗保健专业人员提供或供给药物组合物或药物以直接给药(例如，通过注射，输注，口服给药，局部给药等)的步骤。最优选地，重组病毒通过皮下用或皮下注射施用。然而，在其他预期的方面，施用也可以是静脉内注射。可选地或另外地，抗原呈递细胞可以从患者的细胞中分离或生长，在体外感染，然后输注给患者。

[0068] 此外，预期重组病毒的预防性或治疗性施用可伴随与一种或多种检查点抑制剂共

同施用，特别是当重组病毒不包括编码靶向检查点受体的肽的核酸序列时。例如，特别优选的检查点抑制剂包括目前可用的抑制剂(例如，pembrolizumab，nivolumab，ipilimumab)，其(最优选地)在病毒载体的皮下施用位点处或附近皮下施用。

[0069] 因此，当重组病毒被递送至真皮层中的树突细胞和其他抗原呈递细胞并通过MHC-I和/或MHC-II途径呈递时，应该认识到通过免疫系统的处理将导致CD8+和CD4+细胞的刺激，将导致形成经训练的B细胞以形成$IgG_1$，T细胞，以及经训练的NK细胞和相应的记忆细胞。此外，应该注意的是，$IgG_1$分子还将使NK细胞具有肿瘤特异性作用。

[0070] 因此，预期治疗优选还包括向患者输注自体或异源NK细胞，特别是经遗传修饰以显示较少抑制的NK细胞。例如，经遗传修饰的NK细胞可以是NK-92衍生物，其被修饰为具有至少一种杀伤细胞免疫球蛋白样受体(KIR)的表达降低或消除，这将使这些细胞组成型活化。当然，应该注意的是，可以删除一个或多个KIR或者可以抑制它们的表达(例如，通过miRNA、siRNA等)，包括KIR2DL1，KIR2DL2，KIR2DL3，KIR2DL4，KIR2DL5A，KIR2DL5B，KIR2DS1，KIR2DS2，KIR2DS3，KIR2DS4，KIR2DS5，KIR3DL1，KIR3DL2，KIR3DL3和KIR3DS1。可以使用本领域熟知的方案制备这种修饰的细胞。可选地，此类细胞也可以从NantKwest商购获得，作为aNK细胞('活化的天然杀伤细胞)。然后可以进一步修饰这些细胞以表达共刺激分子，如下面进一步讨论的。此外，适用于本文的预期的NK细胞还包括已消除或沉默NKG2A表达的NK细胞，其是对Treg和MDSC的激活信号。

[0071] 在本发明主题的另一个优选方面，遗传工程NK细胞也可以是经修饰以表达高亲和力Fcγ受体(CD16)的NK-92衍生物。Fcγ受体的高亲和力变体的序列是本领域熟知的，并且所有产生和表达的方式都被认为适用于本文。据信这种受体的表达允许使用患者响应本文考虑的治疗产生的抗体特异性靶向肿瘤细胞，或作为治疗性抗体提供，其中这些抗体对患者的肿瘤细胞(例如，新表位)、特定肿瘤类型(例如，her2neu、PSA、PSMA等)或与癌症相关的抗原(例如，CEA-CAM)具有特异性。有利地，这样的细胞可以作为haNK细胞('高亲和力天然杀伤细胞)从NantKwest商业获得，然后可以进一步修饰(例如，如上所述表达共刺激分子)。

[0072] 可选地，也可以对遗传工程改造的NK细胞进行遗传工程改造以表达嵌合T细胞受体。在特别优选的方面，嵌合T细胞受体将具有scFv部分或其他具有针对肿瘤相关抗原、肿瘤特异性抗原和/或新表位的结合特异性的胞外域。如前所述，这些细胞可以从NantKwest商购获得作为taNK细胞('靶活化的天然杀伤细胞')并根据需要进一步修饰。当细胞具有经工程改造以对癌症相关抗原或新表位具有亲和力的嵌合T细胞受体时，预期所有已知的癌症相关抗原和新表位被认为适合使用。例如，肿瘤相关抗原包括CEA，MUC-1，CYPB1，PSA，Her-2，PSA，brachyury等。

[0073] 此外，应当注意，本文考虑的组合物和方法还包括用NK细胞以外的细胞(或除NK细胞外还包括的细胞)进行的基于细胞的治疗。例如，合适的基于细胞的治疗包括基于T细胞的治疗。在其他选择中，预期可以检测与T细胞相关的一种或多种特征(例如，CD4+T细胞、CD8+T细胞等)。更具体地说，GPS癌症测试可以提供特定的新表位(例如，对于MHC I为8聚体至12聚体，对于MHC II为12聚体至25聚体，等等)，其可用于鉴定具有针对新表位/MHC蛋白复合物的特异性T细胞受体的新表位反应性T细胞。因此，该方法可包括收获新表位反应性T细胞。收获的T细胞可以离体生长或扩增，以准备重新引入患者体内。可选地，可以分离收获的T细胞中的T细胞受体基因并将其转移到病毒或其他过继细胞疗法系统(例如CAR-T、CAR-

TANK等)中。除了新表位之外,GPS癌症测试还可以提供一种或多种肿瘤相关抗原(TAA)。因此,人们还可以收获具有对测试中鉴定的TAA敏感的受体的T细胞。这些也可以离体生长或培养,并以与上述类似的治疗方式使用。可以通过产生肽的合成形式并将它们与商业上生产的MHC或MHC样蛋白结合,然后使用这些离体复合物结合靶T细胞来鉴定T细胞。应当理解,收获的T细胞可以包括已经被患者对疾病的免疫应答、耗尽的T细胞或响应于所讨论的特征的其他T细胞激活的T细胞。

[0074] 可以通过几种不同的途径重新激活用尽的T细胞。一种途径包括使用外源添加细胞因子(例如,IL-2、IL-12、IL-15等)至收获的耗尽的T细胞以重新活化细胞。然后可以将重新活化的T细胞重新引入患者,可能还有检查点抑制剂(例如,ipilimumab等)。另一种途径是通过阻断检查点抑制来防止疲劳,这可以通过施用具有目标新表位和适当的抑制剂(如LAG3等)的定制的病毒来实现。

[0075] 申请人进一步认识到,患者的大量白细胞(WBC)可以与来自GPS癌症测试的发现的肽(例如,TAA、新表位等)一起培养。预计这种方法会导致大量WBC中抗原呈递细胞产生所需的MHC/新表位复合物。因此,患者的巨噬细胞、树突细胞和B细胞向NK细胞和T细胞提供指导,使得它们具有所需的特性以靶向患病组织。

[0076] 另一个有趣的考虑因素涉及肠道生物群系对患者免疫应答的影响。预期的发明主题还包括鉴定微生物组产生的表位的方法,其被预测引发调节或免疫抑制性免疫应答。可以从通过GPS癌症测试发现的一组新表位中除去一组鉴定的表位。据认为,与微生物组的表位相似的新表位在靶向疾病组织方面不太有用,因为患者的身体已经可能对这种类似的肽具有耐受性。

[0077] 鉴于肠道生物群系可以影响患者对疾病的免疫应答,申请人还考虑了通过向患者施用抗生素来治疗患者的方法,其中抗生素靶向肠道微生物群系。例如,如上所述,可以给患者施用抗生素以在引入免疫疗法的同时抑制或阻抑引入抑制性T细胞(例如,上调Th2,Th17和调节性T细胞)的微生物组的元件。在其他实施方案中,可以给患者开出抑制或阻抑微生物群系的元素的饮食。

[0078] 另一个考虑因素是申请人开创了全面的“组学”测试作为参考为GPS Cancer™测试或伴随诊断的单个测试。该单一测试提供了关于患者病变组织状态的许多见解,包括以下类型的信息:全基因组序列,RNA,RNAseq,蛋白质组学,表达水平和新表位等。应当理解,这些结果是患者特异性的以及疾病特异性的。此外,这些结果为针对该疾病的大量治疗提供了患者特异性和疾病特异性指导。例如,结果可以影响以下一种或多种疗法以产生高度个性化的治疗:化学疗法,单克隆抗体疗法,抗体疗法,小分子疗法,免疫疗法,针对肿瘤相关抗原的疗法,或任何疗法的组合。更具体地,基因组序列可以告知哪种类型的化学疗法可能是最相关的,而新表位通知一种或多种病毒的构建,当病毒施用于患者时,如前所述,增强患者对疾病的免疫应答。在一些实施方案中,单个GPS癌症测试可以随时间重复进行。然后,每项测试的结果都可以用于修改个性化疗法以更好地适应患者的疾病。

[0079] 如本文的描述和随后的权利要求中所使用的,“一”、“一个”和“该”的含义包括复数指代,除非上下文另有明确说明。此外,如在本文的描述中所使用的,除非上下文另有明确规定,否则“在...中”的含义包括“在...中”和“在.....上”。如本文所使用的,并且除非上下文另有指示,否则术语“耦合到”旨在包括直接耦合(其中两个彼此耦合的元件彼此接

触)和间接耦合(其中至少一个另外的元件位于两个元件之间)。因此,术语“耦合到”和“与.....耦合”同义使用。最后,除非上下文指示相反,否则本文所述的所有范围应解释为包括其端点,并且开放式范围应解释为包括商业实用值。同样,除非上下文指出相反的情况,否则应将所有值列表视为包含中间值。

[0080] 对于本领域技术人员显而易见的是,在不脱离本文的发明构思的情况下,除了已经描述的那些之外的更多修改是可能的。因此,除了所附权利要求的范围之外,本发明的主题不受限制。此外,在解释说明书和权利要求时,所有术语应以与上下文一致的最广泛的方式解释。特别地,术语“包括”和“包含”应该被解释为以非排他的方式指代元件、组件或步骤,指示所引用的元件、组件或步骤可以存在,或者被利用,或与未明确引用的其他元素、组件或步骤组合。如果说明书权利要求涉及选自由A,B,C.....和N组成的组中的至少一种,则该文本应被解释为仅需要来自该组的一个元素,而不是A加N或B加N,等等。