(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 110636855 B
(45)授权公告日 2024.08.09

(21)申请号 201880022159.X
(22)申请日 2018.03.28
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 110636855 A
(43)申请公布日 2019.12.31
(30)优先权数据
62/477,895 2017.03.28 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2019.09.27
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2018/024831 2018.03.28
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2018/183488 EN 2018.10.04
(73)专利权人 俄亥俄州创新基金会
地址 美国俄亥俄州
专利权人 梅奥医学教育和研究基金会
(72)发明人 P·T·P·库玛雅
T·贝卡伊-萨布
(74)专利代理机构 北京三友知识产权代理有限公司 11127
专利代理师 李栋修 庞东成
(51)Int.Cl.
A61K 39/00(2006.01)
C07K 14/71(2006.01)
C07K 14/705(2006.01)
C07K 16/28(2006.01)
(56)对比文件
WO 2015005500 A1,2015.01.15
US 7691396 B2,2010.04.06
WO 2016106159 A1,2016.06.30
审查员 胡百灵

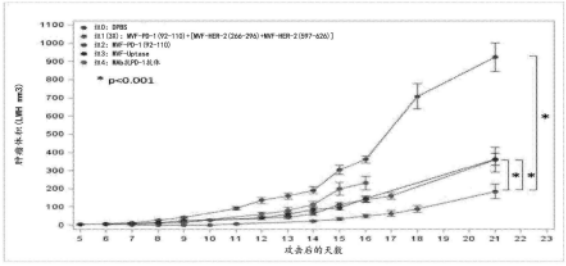
权利要求书2页 说明书38页
序列表10页 附图21页

(54)发明名称

人PD1肽疫苗及其用途

(57)摘要

本发明公开了与合成PD-1肽、嵌合PD-1肽、抗PD-1抗体有关的组合物以及使用所述肽或抗体治疗癌症、自身免疫疾病和阿尔茨海默病的方法。



CN 110636855 B

1.一种用于刺激对PD-1蛋白的免疫应答的PD-1嵌合肽,所述PD-1嵌合肽包含一个或多个PD-1B细胞表位、辅助性T细胞(Th)表位以及将所述PD-1B细胞表位连接到所述Th表位的接头,其中所述一个或多个PD-1B细胞表位由SEQ ID NO:5组成,并且其中所述Th表位包含麻疹病毒融合蛋白肽;其中所述Th表位由SEQ ID NO:6组成;并且其中所述接头由SEQ ID NO:7组成。

2.根据权利要求1所述的嵌合肽,其中所述肽包含如SEQ ID NO:11中所示的氨基酸序列。

3.一种药物组合物,所述药物组合物包含一种或多种根据权利要求1或2所述的嵌合肽以及药学上可接受的载体。

4.根据权利要求3所述的药物组合物,其中一种或多种嵌合肽作为第一组分包含在所述药物组合物中,所述药物组合物还包含含有一个或多个HER-2B细胞表位的第二组分。

5.根据权利要求4所述的药物组合物,其中所述HER-2B细胞表位包含如SEQ ID NO:27或29中所示的序列中的一者或多者。

6.根据权利要求4所述的药物组合物,其中所述HER-2B细胞表位包含如SEQ ID NO:28或30中所示的一个或多个合成HER-2B细胞表位。

7.根据权利要求4所述的药物组合物,其中所述载体是可生物降解的,并且选自包含药学上可接受的油/水乳液的乳液以及包含聚乳酸-聚乙醇酸聚合物的可生物降解微球或纳米球。

8.权利要求1或2中任一项所述的嵌合肽在制备用于治疗受试者的癌症的药物中的应用。

9.PD-1嵌合肽在制备用于治疗受试者的癌症的药物中的应用,其中所述嵌合肽包含一个或多个PD-1B细胞表位、辅助性T细胞(Th)表位以及将所述PD-1B细胞表位连接到所述Th表位的接头,其中所述一个或多个PD-1B细胞表位由SEQ ID NO:5的序列组成;其中所述Th表位由SEQ ID NO:6组成;并且其中所述接头由SEQ ID NO:7组成。

10.PD-1嵌合肽在制备用于治疗受试者的癌症的药物中的应用,其中所述PD-1嵌合肽包含由SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:7组成的序列。

11.根据权利要求9或10所述的应用,其中所述癌症选自由以下组成的癌症:淋巴瘤、蕈样霉菌病、膀胱癌、脑癌、神经系统癌、头颈癌、肺癌、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、皮肤癌、肝癌、黑色素瘤、口腔、咽喉、喉和肺的鳞状细胞癌、结肠癌、宫颈癌、乳腺癌、上皮癌、肾癌、泌尿生殖系统癌、食管鳞癌、大肠癌或造血系统癌。

12.根据权利要求11所述的应用,其中所述癌症选自由以下组成的癌症:B细胞淋巴瘤、T细胞淋巴瘤、霍奇金病、骨髓性白血病、头颈部鳞状细胞癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、成神经细胞瘤、胶质母细胞瘤、宫颈鳞癌或睾丸癌。

13.根据权利要求11所述的应用,其中所述癌症为头颈部鳞癌。

14.根据权利要求11所述的应用,其中所述癌症是乳腺癌。

15.根据权利要求11所述的应用,其中所述应用还包括向所述受试者施用一个或多个HER-2B细胞表位。

16.根据权利要求15所述的应用,其中所述HER-2B细胞表位包含如SEQ ID NO:27或29中所示的序列中的一者或多者。

17.根据权利要求15所述的应用,其中所述HER-2B细胞表位包含如SEQ ID NO:28或30中所示的一个或多个合成HER-2B细胞表位。

18.根据权利要求15所述的应用,其中所述HER-2B细胞表位以具有所述PD-1表位的相同组合物施用。

人PD1肽疫苗及其用途

I.背景技术

[0001] 癌症目前是发达国家和全世界的主要死因。该疾病的经济负担、更重要的是其带来的痛苦很巨大。明显且迫切需要加快更有效的新抗癌疗法的开发和应用。肿瘤学领域很广阔并包括若干适应症,包括一些罕见/孤儿形式。虽然肿瘤学仍旧是药物开发方面最活跃的领域之一,但仍存在大量未满足的需求。

[0002] 癌症免疫学的最近进展已证明了抵抗人癌症的T细胞介导的抗肿瘤免疫的重要性,并且T细胞所表达的抑制性受体已成为癌症免疫疗法的重要靶标。通过免疫检查点程序性细胞死亡蛋白-1(PD-1)的信号转导是通过抑制抗肿瘤免疫应答来实现肿瘤进展的。使用单克隆抗体来治疗性阻断PD-1与其配体程序性细胞死亡配体-1(PD-L1)之间的信号轴已显示出癌症治疗方面显著的临床成功,并且即使在疾病晚期和转移期,也能在一组广泛的癌症亚型中表现出出色的活性。靶向该途径的治疗剂当前正处于临床试验中。派姆单抗和纳武单抗是该检查点抑制剂抗PD-1途径家族中最先获得美国食品药品监督管理局(FDA)加速审批的用于治疗伊匹单抗难治性黑色素瘤的药物。

[0003] 近年来,靶向免疫检查点、尤其是PD-1/PD-L1轴的单克隆抗体在癌症治疗方面取得了令人惊叹的结果。尽管已证明了其效用,但抗体具有作为治疗剂的特定缺点,包括较差的组织/肿瘤外显率,这在靶向PD-1:PD-L1信号转导途径时可尤其相关。例如,已发现表达PD-1的效应性T细胞浸润在表达PD-L1的肿瘤的实体组织内。这对于抗体是有问题的,抗体会因为其较大的尺寸而受阻,不能进入肿瘤。由此得出结论,抗体可因此无法完全拮抗肿瘤内的预期治疗位点处的PD-1:PD-L1信号转导,从而导致疗效欠佳。

[0004] 检查点阻断开启了癌症免疫疗法的新范式转变。然而,许多癌症患者在响应于PD-1/PD-L1检查点阻断后病情未有改善。需要的是用于治疗癌症、病毒感染、自身免疫疾病和阿尔茨海默病的新PD-1/PD-L1检查点抑制剂。

II.发明内容

[0005] 本发明公开了与合成PD-1肽有关的方法和组合物。

[0006] 在一个方面,本文公开了用于刺激对PD-1蛋白的免疫应答的PD-1嵌合肽,该PD-1嵌合肽包含一个或多个PD-1B细胞表位、辅助性T细胞(Th)表位(例如,麻疹病毒融合蛋白肽,诸如SEQ ID NO:6)以及将PD-1B细胞表位连接到Th表位的接头(诸如,例如SEQ ID NO:7),其中所述一个或多个PD-1B细胞表位由选自SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:5的序列组成。

[0007] 本文还公开了任何前述方面的嵌合肽,其中该肽包含如SEQ ID NO:8、SEQI DNO:9、SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:11中所示的氨基酸序列。

[0008] 在一个方面,本文公开了用于刺激对PD-1蛋白的免疫应答的合成PD-1肽,所述合成PD-1肽包含如SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:15中所示的序列中的一者或多者,包括所公开的序列的D对映体。在一个方面,合成肽可为乙酰化的。

[0009] 本文还公开了包含任何前述方面的合成肽的嵌合肽,所述嵌合肽还包含Th表位

(例如,麻疹病毒融合蛋白肽,诸如SEQ ID NO:6)以及将合成PD-1肽连接到Th表位的接头(诸如,例如SEQ ID NO:7)。

[0010] 本文还公开了任何前述方面的嵌合肽,其中该肽包含如SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18或SEQ ID NO:19中所示的氨基酸序列。

[0011] 在一个方面,本文公开了药物组合物,所述药物组合物包含任何前述方面的一个或多个嵌合肽或合成肽和药学上可接受的载体。

[0012] 本发明还公开了任何前述方面的药物组合物,所述药物组合物还包含一个或多个HER-2B细胞表位(诸如例如,SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29或SEQ ID NO:30)和/或一个或多个抗Her-2抗体。

[0013] 在一个方面,本文公开了治疗受试者的癌症、阿尔茨海默病或自身免疫疾病的方法,所述方法包括向受试者施用任何前述方面的肽或组合物中的任一者。

III.附图说明

[0014] 并入并构成本说明书的一部分的附图示出了若干实施方案,并且连同说明书一起示出了所公开的组合物和方法。

[0015] 图1示出了分别由蓝丝带和绿丝带表示的hPD-1/hPD-L1界面hPD-1和hPD-L1的近距离视图。所有对相互作用重要的残基均以棍的形式突出显示。形成疏水核的残基被涂成黄色。水分子以红球的形式示出。氢键被描绘为黑色虚线。(A)正面视图,Zak等人,2015年,Structure23,2341-2348。(B)建模的PD-1肽。

[0016] 图2A、图2B和图2C示出了按照构象表位对PD-1肽的建模。图2A示出了PD-1(32-50)(SEQ ID NO:2)。图2B示出了PD-1(73-90)(SEQ ID NO:4)。图2C示出了PD-1(92-110)(SEQ ID NO:5)。

[0017] 图3A、图3B、图3C、图3D和图3E示出了对人hPD-L1的胞外结构域的结合实验的表面等离子共振光谱。rhPD-L1(图3A)、纳武单抗(图3B)、人IgG(图3C)的所得固定化水平分别为2345RU、12264RU和11651RU。通过测量fhPD-1和纳武单抗结合的特异性来说明传感器芯片的验证。1μM(17.3μg/ml)rhPD-1以10μl/min在3min内注射到芯片上(图3D)。1μM BSA用作阴性对照。由10mM甘氨酸盐酸盐(pH 2.5)再生该芯片(图3E)。

[0018] 图4A、图4B、图4C、图4D、图4E和图4F示出了MVF肽和乙酰化的肽结合于rhPD-L1和纳武单抗。MVF-PD-1(45-64)、MVF-PD-1(73-90)、MVF-PD-1(92-110)结合于固定的rhPD-L1(图4A)或纳武单抗(图4B)。Ac-PD-1(45-64)、Ac-PD-1(73-90)、Ac-PD-1(92-110)结合于固定的rhPD-L1(图4C和图4D)或纳武单抗(图4E和图4F)。

[0019] 图5A示出了通过200ng/孔的MVF-肽上的ELISA来测试第1(1Y+3)、第3(2Y+3)和第6(3Y+3)试验放血。首先将血清稀释到1:2000,然后在平板上连续稀释到最大1:250,000。ABTS用作该测定法中的底物。滴度被定义为在415λ下读取时仍具有>0.200吸光度的最终稀释度。

[0020] 图5B示出了通过200ng/孔的各种肽构建体(MVF-肽、乙酰化的肽、游离肽和重组人PD-1蛋白)上的ELISA来测试终末放血血清。首先将血清稀释到1:2000,然后在平板上连续稀释到最大1:250,000。ABTS用作该测定法中的底物。滴度被定义为在415λ下读取时仍具有>0.200吸光度的最终稀释度。

[0021] 图5C示出了通过200ng/孔的肽上的ELISA来测试从终末血清纯化的抗体。首先将抗体稀释到20μg/ml,然后在平板上连续稀释到最大625ng/ml。ABTS用作该测定法中的底物。滴度被定义为在415λ下读取时仍具有>0.200吸光度的最终稀释度。

[0022] 图6示出了用MBP Ac1-11活化取自初始TCR转基因小鼠的脾细胞3天。通过流式细胞术确定PD-1表达。如所标注的那样用α-mPD-1或α-hPD-1抗体对细胞进行染色。细胞设门于CD4+T细胞。

[0023] 图7示出了纯化的α-hPD-1多克隆抗体改变髓鞘特异性CD4T细胞的抗原特异性增殖。(A)用CFSE标记取自初始TCR转基因小鼠的脾细胞,并且在存在50mg/ml的αhPD-1抗体或对照兔IgG的情况下用MBP Ac1-11活化这些脾细胞4天。细胞设门于CD4+细胞。(B)(A)中用特异性αhPD-1抗体处理的细胞(蓝色)与用对照兔IgG处理的细胞(红色)的CFSE直方图的叠加。

[0024] 图8示出了小鼠疫苗接种和肿瘤移植的方案。小鼠以3周间隔接受总计3次疫苗接种。第3次疫苗接种后的10天,在右胁腹部皮下用1×10^5个鼠结肠癌CT26肿瘤细胞攻击小鼠。为对照小鼠接种CT26细胞系,并且每3天用小鼠pD-1单克隆抗体进行治疗。

[0025] 图9示出了PD-1疫苗的免疫原性。通过200ng/孔的MVF-肽上的ELISA来测试血清池。测试1:100-1:250,000的血清浓度。ABTS用作该测定法中的底物。滴度被定义为在415λ下读取时仍具有>0.200吸光度的最终稀释度。

[0026] 图10示出了从所有5组经治疗的小鼠分离的脾细胞(A)和肿瘤浸润细胞(B)。通过流式细胞术(设门于CD45+CD3+细胞)确定CD4和CD8细胞。通过胞内染色确定Foxp3+CD25+CD4调节性T细胞。所有CD4和CD8T细胞设门于CD45+CD3+细胞。Treg设门于CD45+CD3+CD4+细胞。组A=对照肽,组B=32-50;组C=45-64;组D=73-90;组E=92-110;组F=α-小鼠PD-1(阳性对照)。

[0027] 图11A、图11B、图11C、图11D、图11E、图11F、图11G和图11H示出了接受四种PD-1构建体A:(PD-1(32-50)、B:PD-1(45-64)、C:PD-1(73-90)和D:PD-1(92-110)中的每一者、对照肽(E:无关肽)免疫的Balb/c小鼠(5只/组)以及用抗小鼠PD-1单克隆抗体治疗的阳性对照组(F)中肿瘤生长的单独曲线图。图11G和图11H示出了用PD-1疫苗构建体免疫且在第3次疫苗接种后10天用CT26癌细胞(1×10^5)攻击的同系Balb/c的单独曲线图。每周两次监测荷瘤小鼠并且对可触及的肿瘤的形成进行评分,然后于第19天处死。

[0028] 图12A、图12B、图12C和图12D示出了MVF-PD-1(32-50)、MVF-PD-1(45-64)、MVF-PD-1(73-90)和MVF-PD-1(92-110)在第14天的LWW和LWH量度的分布。示出了MVF-PD-1(92-110)的LWW(12A)和LWH(12B)。图12C示出了MVF-PD-1(32-50)、MVF-PD-1(45-64)、MVF-PD-1(73-90)和MVF-PD-1(92-110)中的每一者的LWW14的分布。图12D示出了MVF-PD-1(32-50)、MVF-PD-1(45-64)、MVF-PD-1(73-90)和MVF-PD-1(92-110)中的每一者的LWH14的分布。

[0029] 图13A和图13B示出了αhPD1-45和αhPD1-73抑制髓鞘特异性增殖。在存在50μg/ml的αhPD-1抗体或对照兔IgG的情况下用MBP Ac1-11活化取自初始Vα2.3/Vβ8.2TCR转基因小鼠的对MBP Ac1-11具有特异性的CFSE标记脾细胞。通过流式细胞术分析CFSE(13A)。细胞设门于CD4+细胞。13B中总结了每增殖一代的细胞量。

[0030] 图14示出了PD-1疫苗的免疫原性。通过200ng/孔的MVF-肽上的ELISA来测试混合血清。测试1:100-1:250,000的血清浓度。滴度被定义为在415λ下读取时仍具有>0.200吸光

度的最终稀释度。

[0031] 图15示出了用四种PD-1MVF-疫苗构建体A:(PD-1(32-50)、B:PD-1(45-64)、C:PD-1(73-90)和D:PD-1(92-110)、E:-ve对照(无关肽)免疫的同系Balb/c小鼠(5只/组)中肿瘤生长的平均曲线图;F:+ve对照抗小鼠PD-1单克隆抗体(29F.1A12)。在第3次疫苗接种后15天用CT26癌细胞(1×105)攻击小鼠。每周两次监测小鼠并且对可触及的肿瘤的形成进行评分,使用卡尺测量肿瘤。在第19天处死动物。

[0032] 图16示出了BALB/c中的联合疫苗接种、之后用CT26/HER-2癌细胞攻击的时间表。Balb/c中的CT-26-HER-2肿瘤模型用于测试抗PD1免疫疗法与抗HER2免疫疗法联用的协同效应。如所指出的那样单独或联合给予肽疫苗。将疫苗溶解于水中,并且在Montanide ISA 720(1:1)和50μg nor-MDP(N-乙酰葡糖胺-3基-乙酰-l-丙氨酰-d-异谷氨酰胺)中乳化。小鼠以3周间隔接受总计3次疫苗接种。以3周间隔用100μg的每种肽疫苗对5至6周龄的雌性Balb/c小鼠(查尔斯河实验室(Charles River Laboratories))免疫三次,并且在第三次免疫后的2周,在右胁腹部皮下(s.c)用CT-26-HER-2neu肿瘤细胞(1×10^5个细胞/每只小鼠)攻击小鼠。每周两次用抗小鼠PD-1MAb 29F.1A12(Bio X Cell,West Lebanon,NH)治疗Balb/c小鼠。200μg/剂量用作阳性对照或pbs用作阴性对照。每周两次监测小鼠并且对可触及的肿瘤的形成进行评分,最多持续21天,然后在肿瘤坏死或超过2,000mm3预定尺寸时处死小鼠。肿瘤体积(单位为立方毫米)使用卡尺测量并使用下式计算:A×B2×0.5,其中A是最大直径,且B是最小直径。

[0033] V=[(长度×宽度2)/2]。

[0034] 在免疫期间,每两周一次抽取血液并将其用于ELISA以监测Ab滴度。在治疗结束时对小鼠实施安乐死,提取并称量肿瘤,保存肿瘤的样品以供进一步研究和组织学检查。还收集脾以供进一步检查。所有实验均依照美国公共卫生署人道管理和使用实验动物政策(U.S.Public Health Service Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals)执行,并且已获得俄亥俄州立大学实验动物管理与使用委员会(Ohio State University Institutional Animals Care and Use Committee)的批准,并且在接受的方案中详述。

[0035] 图17示出了经三联疫苗治疗的小鼠中的单独抗原的免疫原性。通过200ng/孔的MVF-肽上的ELISA来测试取自用3种肽(HER-2(266-296)、HER-2(597-626)和PD-1(92-110))免疫的小鼠的血清池。测试1:100-1:512,000的血清浓度。ABTS用作该测定法中的底物,10分钟后用0.1%SDS溶液停止酶反应。滴度被定义为在415nm下读取时仍具有>0.200吸光度的最终稀释度。在CT-26HER-2neu肿瘤攻击之前采集血清样品1Y+3、2Y+1、2Y+3和3Y+2。分别在攻击后1周和3周采集样品3Y+3和3Y+5。

[0036] 图18示出了与阳性对照α-小鼠PD-1mAb(29F.1A12)、MVF-PD-1(92-110)、阴性对照PBS或无关肽相比,三联HER-2(266)+HER-2(597)+PD-1(92)疫苗接种引起了用结肠癌细胞系CT26/HER-2攻击的BALB/c中显著的($p<0.001$)肿瘤生长抑制。

[0037] 图19A和图19B示出了联合HER-2和PD-1疫苗显示出增强的免疫原性和肿瘤生长抑制。以3周间隔单独用PD-1(92-110)、联用两种HER-2肽免疫原的免疫、或单独用HER-2免疫原来免疫3次的同系Balb/c小鼠(10只/组)中的肿瘤生长的曲线图。在第3次疫苗接种后15-18天用CT-26HER-2癌细胞(1×10^5)攻击小鼠。用肿瘤攻击PBS(阴性对照),然后每周两次采

用IP注射PBS来治疗。监测小鼠并且对可触及的肿瘤的形成进行评分,然后定期使用卡尺测量。误差条是该组小鼠的标准误差的表示,并且p值将各个组与阴性对照经PBS治疗的小鼠进行比较。

[0038] 图20A、图20B、图20C和图20D示出了从4组中的每只小鼠分离TIL。通过流式细胞术(设门于CD45+细胞)确定CD4(20A)和CD8(20B)T细胞。通过胞内染色(设门于CD45+CD4+细胞)确定Foxp3+CD25+CD4Treg(0C)。图20D示出了$CD8^+$T细胞与T reg的比率。计算了组平均值并使用方差分析进行了比较。

[0039] 图21A和图21B示出了取自肽疫苗接种的小鼠的肿瘤浸润性淋巴细胞的分析。图21A示出了从第1次体内实验以及第2次体内实验的组5和组6得出的组合数据。从第一次体内实验中5组(组A至F)经治疗的小鼠的组合肿瘤组织分离肿瘤浸润细胞。从第二次体内实验的组5和组6中的每只小鼠分离肿瘤浸润细胞。通过流式细胞术(设门于CD45+浸润细胞)确定CD4和CD8细胞。通过胞内染色(设门于CD45+CD4+细胞)确定CD25+CD4+T细胞上的FoxP3表达。图21B示出了从第二次体内实验的组1-4中的每只小鼠分离肿瘤浸润细胞。通过流式细胞术(设门于CD45+浸润细胞)确定CD4和CD8细胞。通过胞内染色(设门于CD45+CD4+细胞)确定CD25+CD4+T细胞上的FoxP3表达。计算了组平均值并使用方差分析进行了比较。误差条表示均值标准误(s.e.m.)。

IV.具体实施方式

[0040] 应当理解,在公开和描述本发明化合物、组合物、制品、装置和/或方法之前,应当理解,除非另有说明,否则它们不限于特定合成方法或特定重组生物技术方法,或者除非另有说明,否则不限于特定试剂,因此当然可以改变。另外应当理解,本文所用的术语只是为了描述特定实施方案的目的,并非旨在进行限制。

[0041] A.定义

[0042] 如本说明书和所附权利要求书中所使用的,单数形式“a”、“an”和“the”包括复数指代,除非上下文另有明确说明。因此,例如,对“药物载体”的提及包括两种或更多种这样的载体的混合物等。

[0043] 在本文中,范围可被表达为从“约”一个特定值,和/或到“约”另一个特定值。当表示此类范围时,另一个实施方案包括从一个特定值和/或到其他特定值。相似地,当前面用“约”将值表示为近似值时,应当理解,该特定值构成了另一个实施方案。还应当理解,每个范围的端值相对于另一个端值以及独立于另一个端值都是有意义的。还应当理解,本文公开了许多值,并且除了值本身之外,每个值在本文中也被公开为“约”该特定值。例如,如果公开了值“10”,则还公开了“约10”。还应当理解,当公开一个值时,“小于或等于”该值、“大于或等于该值”和在值之间的可能范围也被公开,如本领域技术人员适当理解的。例如,如果公开了值“10”,则还公开了“小于或等于10”以及“大于或等于10”。还应当理解,在整个申请中,数据以多种不同格式提供,并且该数据表示端点和起点,以及数据点的任何组合的范围。例如,如果公开了特定数据点“10”和特定数据点15,则应当理解,认为公开了大于、大于或等于、小于、小于或等于、以及等于10和15以及介于10和15之间。还应当理解,还公开了在两个特定单元之间的每个单元。例如,如果公开了10和15,则还公开了11、12、13和14。

[0044] 在本说明书和随后的权利要求书中,将提及的许多术语将被定义为具有下列含

义：

[0045] “任选的”或“任选地”意指随后描述的事件或情况可发生或可不发生，并且该描述包括所述事件或情况发生的实例和不发生的实例。

[0046] 术语“施用”是指通过吸入或经由植入的贮存器口服、局部、静脉内、皮下、经皮、透皮、肌内、关节内、肠胃外、小动脉内、皮内、心室内、颅内、腹膜内、病灶内、鼻内、直肠、阴道施用。术语“肠胃外”包括皮下、静脉内、肌内、关节内、滑膜内、胸骨内、鞘内、肝内、病灶内和颅内注射或输注技术。

[0047] 如本文所用，术语“包括”旨在意指组合物和方法包括所列举的要素，但不排除其他要素。“基本上由…组成”在用于定义组合物和方法时，应意指排除对该组合有任何本质意义的其他要素。因此，基本上由如本文所定义的要素组成的组合物不会将来自分离和纯化方法的痕量污染物和药学上可接受的载体(诸如磷酸盐缓冲盐水、防腐剂等)排除在外。通过这些过渡术语中的每一者定义的实施方案均在本发明的范围内。

[0048] “有效量”是足以实现有利或期望的结果的量。有效量可在一次或多次施用、应用或给药中施用。

[0049] 如本文所用，术语“治疗”(“treat”、“treating”、“treatment”)及其语法变异包括部分或完全延迟、缓解、减轻障碍或病症的一种或多种伴随症状或降低其强度，和/或缓解、减轻或阻碍障碍或病症的一种或多种病因。根据本发明的治疗可预防性地(preventively)、预防地(prophylactically)、姑息性地或治疗性地应用。在一些情况下，术语“治疗”(“treat”、“treating”、“treatment”)及其语法变异包括与受试者的治疗之前相比或与这种症状在普通群体或研究群体中的发生率相比，部分或完全减小肿瘤的尺寸，减少肿瘤的数量，以及降低肿瘤的严重性/转移能力。

[0050] 术语“抑制”是指活性、响应、病症、疾病或其它生物参数有所下降。这可包括但不限于活性、响应、病症或疾病的完全消融。例如，这也可包括相比于天然或对照水平，活性、响应、病症或疾病降低10％。因此，相比于天然或对照水平，所述降低可为10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％、100％、或其间的任何降低量。

[0051] 如本文所用，“受试者”意指个体。因此，“受试者”可包括驯养的动物(例如猫、狗等)、牲畜(例如牛、马、猪、绵羊、山羊等)、实验动物(例如小鼠、兔、大鼠、豚鼠等)和鸟。“受试者”也可包括哺乳动物，诸如灵长类或人。

[0052] “降低”或其它形式的词，诸如“减少”或“减小”意指使事件或特征(例如肿瘤生长)下降。应当理解，这通常与一些标准或预期值相关，换言之，这是相对的，但对将提及的标准或相对值并非总是必须的。例如，“降低肿瘤生长”意指相对于标准或对照，肿瘤的生长速率有所降低。

[0053] “预防(prevent)”或其它形式的词，诸如“preventing”或“prevention”意指停止特定事件或特征，以稳定或延缓特定事件或特征的发展或进展，或使特定事件或特征发生的可能性最小化。预防不需要与对照比较，原因是其通常例如比降低要更绝对。如本文所用，可减少但不预防某些事物，但也可预防在减少的某些事物。同样，可预防但不减少某些事物，但也可减少在预防的某些事物。应当理解，除非另外明确指明，否则在使用减少或预防的情况下，也明确公开了其它词语的使用。

[0054] 在说明书和最后的权利要求中提到组合物中特定成分或组分的重量份表示使用

重量份数表达的组合物或制品中的该成分或组分与任何其他成分或组分之间的重量关系。因此,在包含2重量份的组分X和5重量份的组分Y的化合物中,X和Y以2:5的重量比存在,并且不管该化合物中是否含有其他组分,都以该比率存在。如本文所用,除非明确地指出相反的情况,否则组分的"重量%"或"重量百分比"是指该组分的重量与包含该组分的组合物的总重量的比率,表示为百分比。

[0055] 多种出版物的引用贯穿于本申请。这些出版物的公开内容据此全文以引用方式并入本申请中以便更全面地描述其所属领域的现状。所公开的参考文献所含有的材料也单独且具体地通过引用方式并入本文,这些材料在引用文献所依据的句子中进行了讨论。

[0056] B.组合物

[0057] 公开了用于制备所公开的组合物的组分以及在本文所公开的方法内使用的组合物本身。本文公开了这些及其他材料,并且应当理解,当公开这些材料的组合、子组、交互、组等时,尽管可能没有明确公开对这些化合物的各种单独和集合组合和排列中每一者的特定引用,但本文对每一者都进行了具体地设想和描述。例如,如果公开和讨论了特定的合成或嵌合PD-1肽,并且讨论了可以对包括合成或嵌合PD-1肽的许多分子进行的许多修饰,则具体地设想合成或嵌合PD-1肽的每种组合和排列以及可能的修饰,除非明确地指出相反的情况。因此,如果公开了一类分子A、B和C以及一类分子D、E和F,并且公开了组合分子的一个示例A-D,则即使没有单独地列举每一个,每一个都是单独且全部地设想的意义组合,也认为公开了A-E、A-F、B-D、B-E、B-F、C-D、C-E和C-F。同样,还公开了这些的任何子组或组合。因此,例如,将考虑公开A-E、B-F和C-E的子组。该概念适用于本申请的所有方面,包括但不限于制备和使用所公开的组合物的方法中的步骤。因此,如果存在可进行的各种另外的步骤,则应当理解,这些另外的步骤中的每一个步骤可利用所公开的方法的任何特定实施方案或实施方案的组合来进行。

[0058] 属于免疫球蛋白超家族的PD-1基因编码55kDa I型跨膜蛋白。小鼠PD-1和人PD-1均由288个氨基酸组成,并且具有N端的信号肽(20个氨基酸)和中间部分中的疏水区(其是跨膜区)。人和鼠PD-1蛋白具有约60%-80%氨基酸同一性,并且四个潜在N-糖基化位点及限定Ig-V结构域的残基具有保守性。PD-1表达于T细胞、B细胞和巨噬细胞上。PD-1的配体是B7家族成员PD-L1(B7-H1)和PD-L2(B7-DC)。通过免疫检查点程序性细胞死亡蛋白-1(PD-1)的信号转导是通过抑制抗肿瘤免疫应答来实现肿瘤进展的。使用单克隆抗体来治疗性阻断PD-1与其配体程序性细胞死亡配体-1(PD-L1)之间的信号转导轴已显示出癌症治疗方面显著的临床成功,并且在一组广泛的癌症亚型中表现出出色的活性。本文公开了使用较小的非抗体肽治疗剂和肽疫苗对传统PD-1/PD-L1阻断所作的改进,这些较小的非抗体肽治疗剂和肽疫苗直接阻断PD-1和PD-L1的相互作用,或可刺激宿主免疫应答以产生阻断PD-1/PD-L1相互作用的针对PD-1的抗体。

[0059] 使用PD-1B细胞表位的计算机辅助分析,得出了与PD-1(SEQ ID NO:1)残基32-50、45-64、73-90和92-110相对应的序列。因此,在一个方面,本文公开了用于刺激对PD-1蛋白的免疫应答的合成PD-1肽,所述合成PD-1肽包含PD-1的残基32-50、45-64、73-90和/或92-100。例如,本文公开了用于刺激对PD-1蛋白的免疫应答的合成PD-1肽,所述合成PD-1肽包含VLNWYRMSPSNQTDKLAAF(SEQ ID NO:2)、KLAAFPEDRSQPGQDCRFR(SEQ ID NO:3)、DFHMSVVRARRNDSGTYL(SEQ ID NO:4)、和/或GAISLAPKAQIKESLRAEL(SEQ ID NO:5)。在一个

方面,这些肽可为酰化的和/或酰胺化的。因此,本文公开了用于刺激对PD-1蛋白的免疫应答的合成PD-1肽,所述合成PD-1肽包含(SEQ ID NO:2)、(SEQ ID NO:3)、(SEQ ID NO:4)和/或(SEQ ID NO:5);其中该合成肽是酰化的和/或酰胺化的。

[0060] 在一些情况下,L-氨基序列的类似物的使用可具有优于基本序列的优点,诸如降解抗性、稳定性、合成便利性,或具有更大疗效。在一个方面,应当理解且本文设想,所公开的合成序列从氨基端到羧基端可包含反转顺序的L-氨基序列。例如,SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:5的反向序列分别是FAALKDTQNSPSMRYWNLV(SEQ ID NO:12)、RFRCDQGPQSRDEPFAALK(SEQ ID NO:13)、LYTGSDNRRARVVSMHFD(SEQ ID NO:14)和LEARLSEKIQAKPALSIAG(SEQ ID NO:15)。这些反向序列还可具有基本序列的镜像构象。因此,本文公开了合成PD-1肽,所述合成PD-1肽包含如SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14和/或SEQ ID NO:15中所示的序列中的一者或多者。与SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:5一样;包含SEQ ID NO 12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14和/或SEQ ID NO:15的合成肽可为乙酰化的和/或酰胺化的。

[0061] 除了SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:5中所示的L-氨基酸序列的反向类似物(其在SEQ ID NO 12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:15中示出),还有正向L-氨基(SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:5)和反向L-氨基序列(SEQ ID NO 12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:15)的D对映体类似物,这些D对映体类似物对降解和蛋白水解可具有增强的抗性而允许更佳的口服施用、延长的疗效和增加的合成便利性。因此,在一个方面,本文公开了合成PD-1肽,所述合成PD-1肽包含SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO 12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14和/或SEQ ID NO:15中的一者或多者;其中构成该序列的氨基酸是D氨基酸。

[0062] 在一个方面,应当理解且本文设想,所公开的合成PD-1肽可通过以下方式具有增强的B细胞刺激:将合成PD-1肽连接到促进释放有助于绕过MHC限制作用的细胞因子的辅助性T(Th)细胞表位(即,混杂型Th细胞表位)以形成嵌合PD-1肽。例如,在一个方面,本文公开了用于刺激对PD-1蛋白的免疫应答的PD-1嵌合肽,所述PD-1嵌合肽包含一个或多个PD-1B细胞表位,还包含辅助性T细胞(Th)表位(例如,麻疹病毒融合蛋白肽,诸如SEQ ID NO:6),其中所述一个或多个PD-1B细胞表位由选自SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14和/或SEQ ID NO:15的序列组成。应当理解且本文设想,B细胞表位(即,PD-1合成肽)可包含D氨基酸。

[0063] Th表位的长度可为约14至约22、更优选地约15至21、最优选地16个氨基酸。优选地,Th细胞表位具有表1中提供的下列氨基酸序列之一。

[0064] 表1

[0065]

肽名称	序列	SEQ ID NO:
MVF	KLLSLIKGVIVHRLEGVE	6
TT	NSVDDALINSTIYSYFPSV	20
TT1	PGINGKAIHLVNNQSSE	21
P2	QYIKANSKFIGITEL	22
P30	FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE	23

MVF(天然)	LSEIKGVIVHRLEGV	24
HBV	FFLLTRILTIPQSLN	25
CSP	TCGVGVRVRSRVNAANKKPE	26

[0066] 为了连接合成PD-1肽和Th细胞表位,可使用氨基酸接头。优选地,接头是长度为约2至约15个氨基酸、更优选地约2至约10个氨基酸、最优选地约2至约6个氨基酸的肽。最优选的接头包含氨基酸序列Gly-Pro-Ser-Leu(SEQ ID NO:7)。因此,在一个方面,本文还公开了包含任何前述方面的合成肽的嵌合肽,所述嵌合肽还包含Th表位(例如,麻疹病毒融合蛋白肽,诸如SEQ ID NO:6)以及将合成PD-1肽连接到Th表位的接头(诸如例如,SEQ ID NO:7)。例如,在一个方面,本文公开了用于刺激对PD-1蛋白的免疫应答的嵌合PD-1肽,所述嵌合PD-1肽包含一个或多个PD-1B细胞表位、辅助性T细胞(Th)表位(例如,麻疹病毒融合蛋白肽,诸如SEQ ID NO:6)以及将PD-1B细胞表位连接到Th表位的接头(诸如例如,SEQ ID NO:7);其中嵌合PD-1肽包含如KLLSLIKGVIVHRLEGVEGPSLVLNWYRMSPSNQTDKLAAF(SEQ ID NO:8)、KLLSLIKGVIVHRLEGVEGPSLKLAAFPEDRSQPGQDCRFR(SEQ ID NO:9)、KLLSLIKGVIVHRLEGVEGPSLDFHMSVVRARRNDSGTYL(SEQ ID NO:10)、KLLSLIKGVIVHRLEGVEGPSLGAISLAPKAQIKESLRAEL(SEQ ID NO:11)、KLLSLIKGVIVHRLEGVEGPSLFAALKDTQNSPSMRYWNLV(SEQ ID NO:16)、KLLSLIKGVIVHRLEGVEGPSLRFRCDQGPQSRDEPFAALK(SEQ ID NO:17)、KLLSLIKGVIVHRLEGVEGPSLLYTGSDNRRARVVSMHFD(SEQ ID NO:18)和/或KLLSLIKGVIVHRLEGVEGPSLLEARLSEKIQAKPALSIAG(SEQ ID NO:19)中所示的氨基酸序列。

[0067] 与合成肽一样,应当理解且本文设想,嵌合PD-1肽内包含的合成PD-1肽的氨基酸可为该序列中的L-氨基酸的D氨基酸类似物。因此,在一个方面,本文公开了包含本文所公开的任何一种合成PD-1肽的嵌合肽,所述嵌合肽还包含Th表位(例如,麻疹病毒融合蛋白肽,诸如SEQ ID NO:6)以及将合成PD-1肽连接到Th表位的接头(诸如例如,SEQ ID NO:7)。例如,在一个方面,本文公开了嵌合PD-1肽,所述嵌合PD-1肽包含如SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18和/或SEQ ID NO:19中所示的氨基酸序列;其中合成PD-1肽序列(即,B细胞表位)包含D氨基酸。

[0068] 1.序列相似性

[0069] 应当理解,如本文所讨论,术语同源性和同一性的使用是与相似性相同的。因此,例如,如果在两个非天然序列之间使用单词同源性,则应理解,这不一定表示这两个序列之间的进化关系,而是在研究它们的核酸序列之间的相似性或相关性。用于确定在两个进化相关分子之间的同源性的许多方法通常应用于任何两种或更多种核酸或蛋白质,以便测量序列相似性,而不管它们是否是进化相关的。

[0070] 一般来讲,应当理解,本文公开的基因和蛋白质的任何已知变体和衍生物或可能出现的任何已知变体和衍生物的一种定义方法是通过在与特定已知序列的同源性方面定义变体和衍生物。本文所公开的特定序列的这种同一性也在本文别处讨论。一般来讲,本文公开的基因和蛋白质的变体通常与所述序列或天然序列具有至少约70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%的同源性。本领域技术人员容易理解如何确定两种蛋白质或核酸诸如基因的同源性。例如,可以在比对两个序列后计算同源性,使得同源性处于其最高水平。

[0071] 计算同源性的另一种方法可以通过公开的算法来进行。用于比较的序列的最佳比对可以通过“Smith和Waterman,Adv.Appl.Math.2:482(1981)”的局部同源性算法,通过“Needleman和Wunsch,J.MoL Biol.48:443(1970)”的同源性比对算法,通过“Pearson和Lipman,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.85:2444(1988)”的搜索相似性方法,通过这些算法的计算机化实现方式(威斯康星遗传学软件包(Wisconsin Genetics Software Package)中的GAP、BESTFIT、FASTA和TFASTA,Genetics Computer Group,575Science Dr.,Madison,WI),或通过检查进行。

[0072] 应当理解,通常可以使用任何方法,并且在某些情况下,这些不同方法的结果可以不同,但是本领域技术人员应当理解,如果这些方法中的至少一种发现了同一性,则可以说序列具有所述的同一性,并在本文中公开。

[0073] 例如,如本文所用,所述与另一序列具有特定百分比同源性的序列是指具有通过上述任何一种或多种计算方法计算的所述同源性的序列。例如,如果使用Zuker计算方法计算出第一序列与第二序列具有80%的同源性,则第一序列与第二序列具有80%的同源性(如本文所定义),即使根据任何其他计算方法计算的第一序列与第二序列不具有80%的同源性。又如,如果使用Zuker计算方法与Pearson和Lipman计算方法两者计算出第一序列与第二序列具有80%的同源性,则第一序列与第二序列具有80%的同源性(如本文所定义),即使根据Smith和Waterman计算方法、Needleman和Wunsch计算方法、Jaeger计算方法或任何其他计算方法计算的第一个序列与第二个序列不具有80%的同源性。又如,如果使用每种计算方法计算出第一序列与第二序列具有80%的同源性,则第一序列与第二序列具有80%的同源性(如本文所定义)(尽管实际上,不同的计算方法通常将得出不同的计算同源性百分比)。

[0074] 2.肽

[0075] a)蛋白和肽变体

[0076] 如本文所讨论,存在许多已知且本文设想的合成PD-1肽和嵌合PD-1肽的变体。除了已知的功能性PD-1株系变体之外,还存在合成PD-1肽和嵌合PD-1肽的衍生物,其也在所公开的方法和组合物中起作用。蛋白质变体和衍生物是本领域技术人员熟知的,并且可以涉及氨基酸序列修饰。例如,氨基酸序列修饰通常属于取代变体、插入变体或缺失变体这三类中的一种或多种。插入包括氨基和/或羧基末端融合以及单个或多个氨基酸残基的序列内插入。插入通常是比氨基或羧基末端融合体的那些更小的插入,例如,大约一至四个残基。免疫原性融合蛋白衍生物,诸如示例中描述的那些,是通过融合足够大的多肽以通过体外交联或通过用编码融合体的DNA转化的重组细胞培养物赋予靶序列免疫原性来制备的。缺失的特征在于从蛋白质序列中去除一个或多个氨基酸残基。通常,在蛋白质分子内的任何一个位点缺失不超过约2至6个残基。这些变体通常通过编码蛋白质的DNA中核苷酸的位点特异性诱变来制备,从而产生编码变体的DNA,然后在重组细胞培养物中表达DNA。在具有已知序列的DNA中的预定位点处进行取代突变的技术是众所周知的,例如M13引物诱变和PCR诱变。氨基酸取代通常是单个残基,但可以同时发生在多个不同的位置;插入通常将为大约约1至10个氨基酸残基;并且缺失将在约1至30个残基的范围内。缺失或插入优选在相邻对中进行,即缺失2个残基或插入2个残基。取代、缺失、插入或其任何组合可以组合以得到最终构型。突变不得将序列置于阅读框之外,并且优选将不形成可产生二级mRNA结构的

互补区。取代变体是其中已去除至少一个残基并在其位置插入不同残基的变体。这些取代通常根据下表2和表3进行,并称为保守取代。

[0077] 表2:氨基酸缩写

氨基酸	缩写	
丙氨酸	Ala	A
别异亮氨酸	AIle	
精氨酸	Arg	R
天冬酰胺	Asn	N
天冬氨酸	Asp	D
半胱氨酸	Cys	C
谷氨酸	Glu	E
谷氨酰胺	Gln	Q
甘氨酸	Gly	G
组氨酸	His	H
异亮氨酸	Ile	I
亮氨酸	Leu	L
赖氨酸	Lys	K
苯丙氨酸	Phe	F
脯氨酸	Pro	P
焦谷氨酸	pGlu	
丝氨酸	Ser	S
苏氨酸	Thr	T
酪氨酸	Tyr	Y
色氨酸	Trp	W
缬氨酸	Val	V

[0078]

[0079] 表3:氨基酸取代

[0080] 原始残基示例性保守取代,其他是本领域已知的。

Ala	Ser
Arg	Lys；Gln
Asn	Gln；His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn、Lys
Glu	Asp
Gly	Pro
His	Asn；Gln
Ile	Leu；Val
Leu	Ile；Val
Lys	Arg；Gln
Met	Leu；Ile
Phe	Met；Leu；Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp；Phe
Val	Ile；Leu

[0081]

[0082] 通过选择比表3中的取代更不保守的取代来进行功能或免疫同一性的显著变化，即选择在维持(a)取代区域中多肽骨架的结构(例如片状或螺旋构象)、(b)靶位点处分子的电荷或疏水性或(c)侧链的大部分等方面效果更显著不同的残基。通常预期会在蛋白质性质中产生最大变化的取代是其中(a)亲水残基(例如丝氨酰或苏氨酰)被(或由)疏水残基(例如亮氨酰、异亮氨酰、苯丙氨酰、缬氨酰或丙氨酰)取代；(b)半胱氨酸或脯氨酸被(或由)任何其他残基取代；(c)具有带正电荷的侧链的残基(例如赖氨酰、精氨酰或组氨酰)被(或由)带负电荷的残基(例如谷氨酰或天冬氨酰)取代；或者(d)具有庞大侧链的残基(例如苯丙氨酸)被(或由)不具有侧链的残基(例如甘氨酸)取代，在这种情况下，(e)通过增加用于硫酸化和/或糖基化的位点的数量的取代。

[0083] 例如，用生物学上和/或化学上相似的一个氨基酸残基取代另一个氨基酸残基是本领域技术人员已知的保守取代。例如，保守取代将一个疏水残基取代为另一个疏水残基，或将一个极性残基取代为另一个极性残基。取代包括组合，诸如例如Gly、Ala；Val、Ile、Leu；Asp、Glu；Asn、Gln；Ser、Thr；Lys、Arg；以及Phe、Tyr。每种明确公开的序列的这种保守取代的变体包括在本文提供的镶嵌多肽内。

[0084] 可以采用取代或缺失诱变来插入用于N-糖基化(Asn-X-Thr/Ser)或O-糖基化(Ser或Thr)的位点。也可能需要缺失半胱氨酸或其他不稳定残基。潜在蛋白水解位点(例如Arg)的缺失或取代例如通过缺失一个碱性残基或用谷氨酰胺酰或组氨酰残基取代一个碱性残基来完成。

[0085] 某些翻译后衍生化是重组宿主细胞对表达多肽的作用的结果。谷氨酰胺酰和天冬酰胺酰残基经常在翻译后脱酰胺成相应的谷氨酰和天冬酰残基。另选地，这些残基在温和的酸性条件下脱酰胺。其他翻译后修饰包括脯氨酸和赖氨酸的羟基化，丝氨酰或苏氨酰残基的羟基的磷酸化，赖氨酸、精氨酸和组氨酸侧链的o-氨基的甲基化(T.E.Creighton，Proteins:Structure and Molecular Properties,W.H.Freeman&Co.,San Francisco pp

79-86[1983]),N端胺的乙酰化以及在一些情况下,C端羧基的酰胺化。

[0086] 应当理解,定义本文公开的蛋白质的变体和衍生物的一种方法是通过在与特定已知序列的同源性/同一性方面定义变体和衍生物。具体公开了本文公开的这些和其他蛋白质的变体,这些变体与所述序列具有至少70%或75%或80%或85%或90%或95%的同一性。本领域技术人员容易理解如何确定两种蛋白质的同源性。例如,可以在比对两个序列后计算同源性,使得同源性处于其最高水平。

[0087] 计算同源性的另一种方法可以通过公开的算法来进行。用于比较的序列的最佳比对可以通过“Smith和Waterman,Adv.Appl.Math.2:482(1981)”的局部同源性算法,通过“Needleman和Wunsch,J.MoL Biol.48:443(1970)”的同源性比对算法,通过“Pearson和Lipman,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.85:2444(1988)”的搜索相似性方法,通过这些算法的计算机化实现方式(威斯康星遗传学软件包(Wisconsin Genetics Software Package)中的GAP、BESTFIT、FASTA和TFASTA,Genetics Computer Group,575Science Dr.,Madison,WI),或通过检查进行。

[0088] 通过例如“Zuker,M.,Science244:48-52,1989”、“Jaeger等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86:7706-7710,1989”、“Jaeger等人,Methods Enzymol,183:281-306,1989”中公开的算法可以获得相同类型的核酸同源性。

[0089] 应当理解,保守突变和同源性的描述可以以任何组合组合在一起,诸如与特定序列具有至少70%同源性的实施方案,其中变体是保守突变。

[0090] 由于本说明书讨论了各种蛋白质和蛋白质序列,因此应当理解,还公开了可编码那些蛋白质序列的核酸。这将包括与特定蛋白质序列相关的所有简并序列,即具有编码一种特定蛋白质序列的序列的所有核酸以及编码所公开的蛋白质序列的变体和衍生物的所有核酸,包括简并核酸。因此,虽然本文中可能没有写出每个特定的核酸序列,但应当理解,实际上通过公开的蛋白质序列在本文公开和描述了每个序列。还应当理解,虽然没有氨基酸序列指示什么特定DNA序列编码生物体内的该蛋白,但在本文公开了所公开的蛋白的特定变体的情况下,编码该肽或蛋白的已知核酸序列也是已知的并且在本文中公开和描述。

[0091] 应当理解,存在许多氨基酸和肽类似物可以掺入所公开的组合物中。例如,存在许多D氨基酸或具有与表2和表3中所示的氨基酸不同的功能取代基的氨基酸。公开了天然存在的肽的相反立体异构体,以及肽类似物的立体异构体。通过用所选择的氨基酸加入tRNA分子并利用例如琥珀密码子以位点特异性方式将类似物氨基酸插入肽链的工程化基因构建体,可以容易地将这些氨基酸掺入多肽链中。

[0092] 可以产生类似肽但不经由天然肽键连接的分子。例如,氨基酸或氨基酸类似物的键可包括CH_2NH-、-CH_2S-、-CH_2-CH_2-、-CH=CH-(顺式和反式)、-$COCH_2$-、-CH(OH)CH_2-和-CHH_2SO-(这些键和其他键可以在以下参考文献中看到:Spatola,A.F.,“Chemistry and Biochemistry of Amino Acids,Peptides,and Proteins”,B.Weinstein编辑,Marcel Dekker,New York,第267页,1983年;Spatola,A.F.,Vega Data,1983年3月,第1卷第3期,“Peptide Backbone Modifications(general review)”;Morley,Trends Pharm Sci,1980年,第463-468页;Hudson,D.等人,Int J Pept Prot Res,第14期,第177-185页,1979年(-CH_2NH-、CH_2CH_2-);Spatola等人,Life Sci,第38期,第1243-1249页,1986年(-CH H_2-S);Hann,J.Chem.Soc Perkin Trans.,第I期,第307-314页,1982年(-CH-CH-,顺式和反式);

Almquist等人,J.Med.Chem.,第23期,第1392-1398页,1980年(-$COCH_2$-);Jennings-White等人,Tetrahedron Lett,第23期,第2533页,1982年(-$COCH_2$-);Szelke等人,European Appln,EP 45665CA,1982年,第97期,第39405页,1982年(-CH(OH)CH_2-);Holladay等人,Tetrahedron.Lett,第24期,第4401-4404页,1983年(-C(OH)CH_2-);以及Hruby,Life Sci,第31期,第189-199页,1982年(-CH_2-S-);其中每一篇都以引用方式并入本文。特别优选的非肽键是-CH_2NH-。应当理解,肽类似物可在键原子之间具有多于一个原子,诸如b-丙氨酸、g-氨基丁酸等。

[0093] 氨基酸类似物和类似物和肽类似物通常具有增强的或期望的性质,诸如更经济的生产、更好的化学稳定性、增强的药理学性质(半衰期、吸收、效力、疗效等)、改变的特异性(例如,广谱的生物活性)、降低的抗原性等。

[0094] D-氨基酸可用于产生更稳定的肽,因为D氨基酸不被肽酶等识别。用相同类型的D-氨基酸(例如,用D-赖氨酸代替L-赖氨酸)系统地取代共有序列的一个或多个氨基酸可用于产生更稳定的肽。换句话讲,本文设想了任何所公开的序列的翻转(即,D-氨基酸取代)。半胱氨酸残基可用于将两个或更多个肽环化或连接在一起。这有利于将肽限制为特定构象。在一个方面,本文公开了合成PD-1肽,所述合成PD-1肽包含如SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5中所示的序列中的一者或多者;其中该肽的氨基酸是D对映体。

[0095] 在一个方面,所公开的合成肽可呈反转顺序,使得该肽的氨基端至羧基端反转(即,反向序列)。在一个方面,本文公开了SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:5的反向序列,这些反向序列分别包含SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:15。这些反向序列还可具有基本序列的镜像构象。在一个方面,反向序列还可包含D氨基酸取代(即,反向-翻转)序列。因此,本文公开了合成PD-1肽,所述合成PD-1肽包含如SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:15中所示的序列中的一者或多者;其中该肽的氨基酸是D对映体。

[0096] 应当理解,本文所公开的任何D氨基酸取代的合成肽可用作所公开的PD-1嵌合肽中的PD-1表位。例如,本文公开了嵌合PD-1肽,所述嵌合PD-1肽包含一个或多个PD-1B细胞表位、辅助性T细胞(Th)表位以及将PD-1B细胞表位连接到Th表位的接头,其中所述一个或多个PD-1B细胞表位由选自SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:15的序列组成;并且其中该肽的氨基酸是D对映体。在一个方面,本文公开了嵌合PD-1肽,其中该肽包含如SEQ ID NO:8、SEQI DNO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18或SEQ ID NO:19中所示的氨基酸序列;并且其中合成PD-1肽的氨基酸是D对映体。

[0097] 3.药物载体/药物产品递送

[0098] 如上所述,本文所公开的合成PD-1肽和嵌合PD-1肽还可以在药学上可接受的载体中体内施用。因此,在一个方面,本文公开了药物组合物,该药物组合物包含如SEQ ID NO:2、SEQID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQID NO:5、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18和/或SEQ ID NO:19中所示的PD-1肽中的任一者或多者。

[0099] 所谓“药学上可接受”是指不是在生物学上或其他方面不期望的材料,即,该材料可以与核酸或媒介物一起施用于受试者,而不引起任何不期望的生物效应或不与含有其的

药物组合物中的任何其他组分以有害的方式相互作用。自然地选择载体以使活性成分的任何降解最小化,并且使对受试者的任何不良副作用最小化,如本领域的技术人员所熟知的。

[0100] 应当理解且本文设想,构成药物组合物的所公开的PD-1肽特别可用于治疗发生PD-1介导的免疫抑制的疾病或病症。因此,在一个方面,包含本文所公开的一种或多种PD-1肽的所公开的药物组合物可与疾病特异性治疗或疫苗联用以进一步提高PD-1肽的疗效。例如,包含一种或多种PD-1肽的药物组合物可与抗HER2抗体或HER-2B细胞表位联用以用于治疗、抑制和/或预防乳腺癌。因此,在一个方面,本文公开了药物组合物,所述药物组合物包含本文所公开的PD-1肽、合成肽或嵌合肽中的一者或多者(例如,SEQ ID NO:2、SEQID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQID NO:5、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18和/或SEQ ID NO:19),还包含一个或多个HER-2B细胞表位(例如SEQ ID NO:27或29或者嵌合表位SEQ ID NO:28或30)和/或抗Her-2抗体。在一个方面,本文具体公开了药物组合物,所述药物组合物包含如SEQ ID NO:11中所示的MVF-PD1(92-110);MVF-HER-2(266-296)肽(例如,如SEQ ID NO:28中所示)和MVF-HER-2(597-626)肽(例如,如SEQ ID NO:30中所示)。

[0101] 组合物可以口服、非肠道(例如,静脉内)、通过肌内注射、通过腹膜内注射、透皮、体外、局部等施用,包括局部鼻内施用或通过吸入剂施用。如本文所用,“局部鼻内施用”意指通过两个鼻孔中的一个或两个将组合物递送到鼻和鼻腔通道中,并且可以包括通过喷涂机制或液滴机制进行递送,或通过核酸或媒介物的雾化。通过吸入剂施用组合物可以是通过用喷雾或液滴机制经由递送而经鼻或经口的。也可以经由插管法直接递送到呼吸系统的任何区域(例如肺)。所需的组合物的确切的量将因受试者而异,取决于受试者的种类、年龄、体重和一般状况、所治疗的过敏性障碍的严重程度,所用的特定核酸或媒介物、其施用模式等。因此,不可能为每种组合物指定确切的量。但是,在给定本文的教导的情况下,本领域的普通技术人员可以仅使用常规实验来确定适当量。

[0102] 如果使用的话,非肠道施用组合物通常以注射为特征。注射剂可以以常规形式制备,可以是液体溶液或悬浮液,适于在注射前在液体中溶解悬浮液的固体形式,或者是乳液。最近改进的非肠道施用方法涉及使用缓慢释放或持续释放系统使得保持恒定的剂量。参见例如美国专利号3,610,795,该专利以引用方式并入本文。

[0103] 材料可以是溶液、悬浮液(例如,掺入微粒、脂质体或细胞中)。这些可以经由抗体、受体或受体配体靶向特定细胞类型。以下参考文献是使用该技术将特定蛋白质靶向肿瘤组织的示例(Senter等人,Bioconjugate Chem,2:447-451,(1991);Bagshawe,K.D.,Br.J.Cancer,60:275-281,(1989);Bagshawe等人,Br.J.Cancer,58:700-703,(1988);Senter等人,Bioconjugate Chem.,4:3-9,(1993);Battelli等人,Cancer Immunol.Immunother.,35:421-425,(1992);Pietersz和McKenzie,Immunolog.Reviews,129:57-80,(1992);以及Roffler等人,Biochem.Pharmacol,42:2062-2065,(1991))。载体诸如“stealth”和其他抗体缀合脂质体(包括靶向结肠癌的脂质介导的药物),受体介导的DNA通过细胞特异性配体靶向,淋巴细胞定向肿瘤靶向和体内小鼠神经胶质瘤细胞的高度特异性治疗性逆转录病毒靶向。以下参考文献是使用该技术将特定蛋白质靶向肿瘤组织的示例(Hughes等人,Cancer Research,49:6214-6220,(1989);以及Litzinger和Huang,

Biochimica et Biophysica Acta,1104:179-187,(1992))。通常,受体涉及组成型或配体诱导的内吞作用途径。这些受体聚集在披网格蛋白小窝中,经由披网格蛋白小泡进入细胞,通过其中受体被分选的酸化内体,并且然后再循环到细胞表面,在细胞内储存,或在溶酶体中降解。内化途径具有多种功能,诸如营养摄取、除去活化蛋白、清除大分子、机会性进入病毒和毒素、解离和降解配体、以及调节受体水平。许多受体遵循超过一种的细胞内途径,这取决于细胞类型、受体浓度、配体类型、配体化合价和配体浓度。综述了受体介导的内吞作用的分子和细胞机制(Brown和Greene,DNA and Cell Biology,10:6,399-409(1991))。

[0104] a)药学上可接受的载体

[0105] 包含抗体的组合物可与药学上可接受的载体在治疗学上结合使用。

[0106] 合适的载体及其制剂描述于Remington:The Science and Practice of Pharmacy(第19版),编辑A.R.Gennaro,Mack Publishing Company,Easton,PA,1995年。通常,在制剂中使用适当量的药学上可接受的盐以使制剂等渗。药学上可接受的载体的示例包括但不限于盐水、林格氏溶液和右旋糖溶液。溶液的pH优选地为约5至约8,并且更优选地约7至约7.5。其他载体包括缓释制剂,诸如含有抗体的半透性固体疏水性聚合物基质,所述基质为成型制品形式,例如膜、脂质体或微粒。对于本领域的技术人员将显而易见的是,根据例如施用途径和所施用组合物的浓度,某些载体可能是更优选的。

[0107] 药物载体是本领域的技术人员已知的。这些药物载体最典型地将是用于向人类施用药物的标准载体,包括溶液诸如生理pH下的无菌水、盐水以及缓冲溶液等。组合物可以肌内或皮下施用。其他化合物将根据本领域的技术人员所使用的标准工序施用。

[0108] 除了所选择的分子之外,药物组合物还可以包含载体、增稠剂、稀释剂、缓冲剂、防腐剂、表面活性剂等。药物组合物还可以包含一种或多种活性成分,诸如抗微生物剂、消炎药、麻醉剂等。

[0109] 药物组合物可以多种方式施用,取决于是否需要局部或全身治疗,并且取决于待治疗的区域。可以局部地(包括经眼地、经阴道地、经直肠地、鼻内给药)、口服、通过吸入或非肠道地施用,所述非肠道施用为例如通过静脉滴注、皮下、腹膜内或肌内注射。所公开的抗体可以静脉内、腹膜内、肌内、皮下、腔内或透皮施用。

[0110] 用于非肠道施用的制剂包括无菌水性溶液或非水性溶液、悬浮液和乳液。非水性溶剂的示例是丙二醇、聚乙二醇、植物油诸如橄榄油,以及可注射的有机酯诸如油酸乙酯。水性载体包括水、醇/水性溶液、乳液或包括盐水和缓冲介质的悬浮液。非肠道载体包括氯化钠溶液、林格氏葡萄糖、葡萄糖和氯化钠、乳酸林格氏液或固定油。静脉内载体包括流体和营养补充剂,电解质补充剂(诸如基于林格氏葡萄糖的那些)等等。还可以存在防腐剂和其他添加剂,诸如例如抗微生物剂、抗氧化剂、螯合剂和惰性气体等。

[0111] 用于局部施用的制剂可以包括膏剂、洗剂、霜剂、凝胶剂、滴剂、栓剂、喷剂、液体和粉剂。常规的药物载体、水性、粉剂或油性基质、增稠剂等可能是必需或期望的。

[0112] 用于口服施用的组合物包括粉剂或颗粒剂、悬浮液或者水或非水性介质中的溶液、胶囊、小袋或片剂。可能需要增稠剂、调味剂、稀释剂、乳化剂、分散助剂或粘结剂。

[0113] 组合物中的一些可以潜在地作为药学上可接受的酸或碱加成盐施用,所述酸或碱加成盐是通过与无机酸(诸如盐酸、氢溴酸、高氯酸、硝酸、硫氰酸、硫酸和磷酸)和有机酸(诸如甲酸、乙酸、丙酸、乙醇酸、乳酸、丙酮酸、草酸、丙二酸、琥珀酸、马来酸和富马酸)反

应,或通过与无机碱(诸如氢氧化钠、氢氧化铵、氢氧化钾)和有机碱(诸如单烷基胺、二烷基胺、三烷基胺和芳基胺以及取代的乙醇胺)反应形成的。

[0114] b)治疗用途

[0115] 用于施用组合物的有效剂量和时间表可凭经验确定,并且使此类确定在本领域技术范围内。用于施用组合物的剂量是范围大到足以产生障碍症状受到影响的所需的效应的那些。剂量不应大到引起不良副作用,诸如不希望的交叉反应、过敏反应等。一般来讲,剂量将随患者的年龄、状况、性别和疾病程度、施用途径或是否包括在该方案中的其他药物而变化,并且可由本领域的技术人员确定。在任何禁忌症的情况下,个体医师可以调整剂量。剂量可以变化,并且可在一天或几天内每天给予一次或多次剂量施用。对于给定类别的药物产品,可以在文献中找到关于适当剂量的指导。例如,可以在关于抗体的治疗用途的文献中找到关于选择抗体的适当剂量的指导,例如,Handbook of Monoclonal Antibodies,Ferrone等人编辑,Noges Publications,Park Ridge,N.J.,1985年,第22章,第303-357页;Smith等人,Antibodies in Human Diagnosis and Therapy,Haber等人编辑,Raven Press,New York,1977年,第365-389页。根据上述因素,单独使用的抗体的典型日剂量可以在每天约1μg/kg至多达100mg/kg体重或更多的范围内。

[0116] 本文所公开的抑制PD-1和PD-L1相互作用的合成PD-1肽、嵌合体和抗体预防性地施用给处于患上癌症、自身免疫疾病或阿尔茨海默病的风险的患者或受试者,或者治疗性地(即,在疾病诊断或症状发作之后)施用以便治疗癌症、自身免疫疾病或阿尔茨海默病。

[0117] 与PD-1或PD-L1相互作用而抑制PD-1/PD-L1相互作用的其他分子或抗体(例如,派姆单抗和纳武单抗)可与所公开的合成PD-1肽、嵌合PD-1肽或抗PD-1抗体联用以治疗受试者的癌症、自身免疫疾病或阿尔茨海默病。

[0118] 4.抗体1

[0119] (1)抗体概述

[0120] 术语“抗体”在本文中以广义使用,并且包括多克隆抗体和单克隆抗体两者。除完整免疫球蛋白分子外,术语“抗体”中还包括那些免疫球蛋白分子的片段或聚合物,以及免疫球蛋白分子或其片段的人或人源化形式,只要它们因与PD-1相互作用的能力而被选择,使得抑制PD-1与PD-L1相互作用。还公开了结合参与PD-1与PD-L1之间的相互作用的SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQID NO:5、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18和/或SEQ ID NO:19的抗体。可使用本文所述的体外测定法或通过类似方法测试这些抗体的所需活性,之后根据已知的临床测试方法测试其体内治疗和/或预防活性。存在人免疫球蛋白的五大类:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,其中几种类别可进一步分为亚型(同种型),例如IgG-1、IgG-2、IgG-3和IgG-4;IgA-1和IgA-2。本领域技术人员将认识到可比较的小鼠类别。对应于不同类别的免疫球蛋白的重链恒定结构域分别称为α、δ、ε、γ和μ。

[0121] 如本文所用,术语“单克隆抗体”是指从基本上同质的抗体群体获得的抗体,即除了可能存在于抗体分子的小子集中的可能天然发生的突变之外,该群体内的各抗体是相同的。本文中的单克隆抗体具体包括“嵌合”抗体以及此类抗体的片段(只要它们表现出所需的拮抗活性),其中重链和/或轻链的一部分与来源于特定物种或属于特定抗体类或亚类的

抗体中的相应序列相同或同源,而链的其余部分与来源于另一物种或属于另一抗体类或亚类的抗体中的相应序列相同或同源。

[0122] 可使用产生单克隆抗体的任何工序制备所公开的单克隆抗体。例如,可使用杂交瘤方法制备所公开的单克隆抗体,诸如Kohler和Milstein,Nature,256:495(1975)所述的那些方法。在杂交瘤方法中,通常用免疫剂免疫小鼠或其他合适的宿主动物以引发产生或能够产生特异性结合免疫剂的抗体的淋巴细胞。另选地,可以在体外免疫淋巴细胞。

[0123] 还可通过重组DNA方法制备单克隆抗体。编码所公开的单克隆抗体的DNA可以使用常规工序容易地进行分离和测序(例如,通过使用能够与编码鼠抗体的重链和轻链的基因特异性结合的寡核苷酸探针)。还可使用噬菌体展示技术生成并筛选抗体或活性抗体片段的文库,例如,如授予Burton等人的美国专利号5,804,440以及授予Barbas等人的美国专利号6,096,441中所述。

[0124] 体外方法也适用于制备单价抗体。消化抗体以产生其抗体片段,尤其是Fab片段,这可以使用本领域已知的常规技术完成。例如,可以使用木瓜蛋白酶进行消化。木瓜蛋白酶消化的示例描述于1994年12月22日公布的WO 94/29348以及美国专利号4,342,566中。木瓜蛋白酶消化抗体通常产生两个相同的抗原结合片段(称为Fab片段,每个片段具有单个抗原结合位点)和残留的Fc片段。胃蛋白酶处理产生具有两个抗原结合位点并且仍然能够交联抗原的片段。

[0125] 如本文所用,术语“抗体或其片段”涵盖具有双或多抗原或表位特异性的嵌合抗体和杂合抗体,以及片段诸如F(ab')2、Fab'、Fab、Fv、sFv等(包括杂合片段)。因此,提供了保留结合抗体的特异性抗原的能力的抗体片段。例如,保持PD-1结合活性或结合SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQID NO:5、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9,SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18,和/或SEQ ID NO:19的抗体片段包括在术语“抗体或其片段”的含义内。此类抗体和片段可以通过本领域已知的技术制备,并且可以根据实施例中所示的方法以及用于产生抗体并筛选抗体的特异性和活性的一般方法来筛选特异性和活性(参见Harlow和Lane,Antibodies,A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Publications,New York,(1988))。

[0126] 在“抗体或其片段”的含义中还包括抗体片段和抗原结合蛋白(单链抗体)的缀合物。

[0127] 无论是否连接到其他序列,片段还可以包括特定区域或特定氨基酸残基的插入、缺失、取代或其他选择的修饰,条件是与未修饰的抗体或抗体片段相比,抗体或抗体片段的活性没有显著改变或受损。这些修饰可以提供一些附加的性质,诸如能够去除/添加氨基酸的二硫键、增加其生物寿命、改变其分泌特征等。在任何情况下,抗体或抗体片段必须具有生物活性,诸如与其同源抗原的特异性结合。可以通过诱变蛋白质的特定区域,然后表达和测试表达的多肽来识别抗体或抗体片段的功能区域或活性区域。此类方法对于本领域技术人员来说是显而易见的,并且可以包括编码抗体或抗体片段的核酸的位点特异性诱变。(Zoller,M.J.,Curr.Opin.Biotechnol.,3:348-354,1992)。

[0128] 如本文所用,术语“抗体”还可指人抗体和/或人源化抗体。许多非人抗体(例如,来源于小鼠、大鼠或兔的那些)在人类体内天然具有抗原性,因此在施用给人类时可产生不期

望的免疫应答。因此,所述方法中使用人或人源化抗体用于减少施用给人的抗体将引发不期望的免疫应答的机会。

[0129] (2)人抗体

[0130] 可使用任何技术制备所公开的人抗体。还可从转基因动物获得所公开的人抗体。例如,已描述了能够对免疫作出应答而产生完整的人抗体组库的转基因突变小鼠(参见例如Jakobovits等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,90:2551-255(1993);Jakobovits等人,Nature,362:255-258(1993);Bruggermann等人,Year in Immunol.,7:33(1993))。具体地讲,这些嵌合和种系突变小鼠中抗体重链连接区(J(H))基因的纯合缺失会引起内源抗体产生的完全抑制,并且人种系抗体基因阵列成功转移到此类种系突变小鼠中会使得在抗原攻击后产生人抗体。使用如本文所述的Env-CD4协同受体复合物来选择具有所需活性的抗体。

[0131] (3)人源化抗体

[0132] 抗体人源化技术一般涉及使用重组DNA技术来操纵编码抗体分子的一个或多个多肽链的DNA序列。因此,非人抗体(或其片段)的人源化形式是嵌合抗体或抗体链(或其片段,诸如sFv、Fv、Fab、Fab'、F(ab')2或抗体的其他抗原结合部分),其包含整合到人(受体)抗体框架中的非人(供体)抗体的抗原结合位点的一部分。

[0133] 为了生成人源化抗体,受体(人)抗体分子的一个或多个互补决定区(CDR)的残基被替换为已知具有所需抗原结合特性(例如,对靶抗原的一定水平的特异性和亲和力)的供体(非人)抗体分子的一个或多个CDR的残基。在一些情况下,人抗体的Fv框架(FR)残基被替换为相应的非人残基。人源化抗体还可包含既不在受体抗体中也不在导入的CDR或框架序列中发现的残基。通常,人源化抗体具有从非人源引入的一个或多个氨基酸残基。实际上,人源化抗体通常是人抗体,其中一些CDR残基和可能的一些FR残基被来自啮齿动物抗体中类似位点的残基取代。人源化抗体一般包含抗体恒定区(Fc)(通常是人抗体的抗体恒定区)的至少一部分。

[0134] (4)抗体的施用

[0135] 可如本文所公开的那样进行抗体的施用。还存在用于抗体递送的核酸方法。广谱中和抗PD1抗体和抗体片段(包括结合于SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQID NO:5、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9,SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18,和/或SEQ ID NO:19的任何抗体)也可作为编码抗体或抗体片段的核酸制剂(例如,DNA或RNA)施用给患者或受试者,使得患者或受试者自身的细胞吸收核酸并且产生和分泌所编码的抗体或抗体片段。例如,核酸的递送可采取如本文所公开的任何方式。

[0136] C.治疗疾病的方法

[0137] 应当理解且本文设想,所公开的组合物、合成PD-1肽和嵌合PD-1肽可用于治疗其中程序性细胞死亡的免疫抑制和预防对疾病有利的任何疾病,诸如阿尔茨海默病、自身免疫疾病或其中发生细胞增殖失控的任何疾病诸如癌症。

[0138] 可使用本文所公开的嵌合肽或合成肽或药物组合物治疗的不同类型的自身免疫疾病的非限制性列表包括但不限于银屑病、斑秃、原发性胆汁性肝硬化、自身免疫性多内分泌腺病综合征、糖尿病1型、自身免疫性甲状腺炎、系统性红斑狼疮、多发性硬化症、格林-巴利综合征、格雷夫斯病、干燥综合征、溃疡性结肠炎、自身免疫性溶血性贫血、恶性贫血、银

屑病性关节炎、类风湿性关节炎、复发性多软骨炎、重症肌无力、急性播散性脑脊髓炎以及肉芽肿性血管炎。

[0139] 可使用本文所公开的嵌合肽或合成肽或药物组合物治疗的不同类型的癌症的非限制性列表包括但不限于淋巴瘤(霍奇金和非霍奇金)、白血病、癌、实体组织癌、鳞状细胞癌、腺癌、肉瘤、胶质瘤、高级别胶质瘤、胚细胞瘤、成神经细胞瘤、浆细胞瘤、组织细胞瘤、黑色素瘤、腺瘤、缺氧肿瘤、骨髓瘤、AIDS相关淋巴瘤或肉瘤、转移癌或一般的癌。

[0140] 所公开的组合物、嵌合肽和合成肽可用于治疗的癌症的代表性但非限制性列表如下:淋巴瘤、B细胞淋巴瘤、T细胞淋巴瘤、蕈样霉菌病、霍奇金病、骨髓性白血病、膀胱癌、脑癌、神经系统癌、头颈癌、头颈部鳞状细胞癌、肾癌(kidney cancer)、肺癌(lung cancer)诸如小细胞肺癌和非小细胞肺癌、成神经细胞瘤/胶质母细胞瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、皮肤癌、肝癌、黑色素瘤、口腔、咽喉、喉和肺的鳞状细胞癌、结肠癌、宫颈癌、宫颈鳞癌、乳腺癌和上皮癌、肾癌(renal cancer)、泌尿生殖系统癌、肺癌(pulmonary cancer)、食管鳞癌、头颈部鳞癌、大肠癌、造血系统癌;睾丸癌;结肠癌和直肠癌、前列腺癌、伊匹单抗难治性黑色素瘤或胰腺癌。

[0141] 因此,在一个方面,本文公开了治疗受试者的癌症、阿尔茨海默病或自身免疫疾病的方法,所述方法包括向受试者施用PD-1合成肽,其中PD-1合成肽包含如SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:15中所示的序列中的一者或多者。应当理解且本文设想,这些合成肽可为乙酰化的、酰胺化的和/或D对映体。因此,在一个方面,本文公开了治疗受试者的癌症、阿尔茨海默病或自身免疫疾病的方法,所述方法包括向受试者施用PD-1合成肽,其中PD-1合成肽包含SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:11的D对映体和/或D对映体反向-翻转形式,如分别在SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:19中示出。

[0142] 在一个方面,应当理解,所公开的组合物可与其他治疗联合用于治疗给定疾病或病症。例如,在一个方面,本文公开了治疗癌症的方法,所述方法包括向受试者施用PD-1肽、PD-1合成肽或PD-1嵌合肽;其中疾病或病症是乳腺癌,并且其中该方法还包括向该受试者施用一个或多个HER-2B细胞表位(例如,如SEQ ID NO:27或29中所示的HER-2肽或如SEQ ID NO:28或30中所示的嵌合MVF-HER-2肽中的一者或多者)和/或一个或多个抗HER-2抗体。应当理解,在向受试者施用HER-2B细胞表位或抗HER-2抗体的情况下,该施用可作为单独的同时施用,HER-2B细胞表位或抗HER-2抗体居先施用,HER-2B细胞表位或抗HER-2抗体随后施用,或HER-2B细胞表位或抗HER-2抗体作为与PD-1肽、PD-1合成肽或PD-1嵌合肽相同的药物制剂中的组分。例如,治疗乳腺癌的方法可包括向受试者施用药物组合物,该药物组合物包含SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:5中所示的PD-1肽中的一者或多者;如SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10和SEQ ID NO:11中所示的嵌合PD-1肽;和/或如SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:19中所示的反向-翻转PD-1肽;该方法还包括向该受试者施用如SEQ ID NO:27中所示的一个或多个HER-2B细胞表位HER-2(266-296)和/或如SEQ ID NO:29中所示的HER-2(597-626)和/或嵌合表位MVF-HER-2(266-296)肽(例如,如SEQ ID

NO:28中所示)以及MVF-HER-2(597-626)肽(例如,如SEQ ID NO:30中所示)。因此,在一个方面,本文公开了治疗乳腺癌的方法,该方法包括向患有乳腺癌的受试者施用药物组合物,该药物组合物包含如SEQ ID NO:11中所示的MVF-PD1(92-110);MVF-HER-2(266-296)肽(例如,如SEQ ID NO:28中所示)和MVF-HER-2(597-626)肽(例如,如SEQ ID NO:30中所示)。

[0143] 还应当理解且本文设想,用于治疗癌症、自身免疫疾病或阿尔茨海默病的合成肽可为嵌合肽的组分。因此,在一个方面,本文公开了治疗受试者的癌症、阿尔茨海默病或自身免疫疾病的方法,所述方法包括向受试者施用PD-1嵌合肽,其中嵌合肽包含一个或多个PD-1B细胞表位、辅助性T细胞(Th)表位以及将PD-1 B细胞表位连接到Th表位的接头,其中所述一个或多个PD-1B细胞表位由选自SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:15的序列组成。应当理解且本文设想,嵌合肽中使用的合成PD-1肽(即,PD-1B细胞表位)可为乙酰化的、酰胺化的和/或D对映体。在一个方面,例如,本文公开了治疗受试者的癌症、阿尔茨海默病或自身免疫疾病的方法,所述方法包括向受试者施用PD-1嵌合肽,其中嵌合肽包含SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18或SEQ ID NO:19。

[0144] D.实施例

[0145] 提出以下实施例以便向本领域的普通技术人员提供如何制备和评价本文要求保护的复合物、组合物、制品、设备和/或方法的完整公开内容和描述,并且预期这些实施例仅仅是示例性的,并非旨在限制本公开。已经努力确保关于数字(例如,量、温度等)的准确性,但是应当考虑一定的误差和偏差。除非另有说明,否则份数是重量份,温度是℃或为环境温度,并且压力是大气压或接近大气压。

[0146] 1.实施例1:PD-1的肽表位的选择、设计和建模

[0147] 使用由Kaumaya等人综述的抗原性的六个相关性通过内部(Peptide Companion™,5x.com)计算机辅助分析来完成PD-1表面上表达的候选B细胞表位的选择:(a)根据Karplus和Schultz计算单独序列的链柔性和活动性的分布图;(b)在七残基跨度设置内生成亲水性分布图(Hydropathy profile),然后使用Kyte和Doolittle标度以三残基跨度进行平滑;(c)使用Hopp和Woods的程序生成六残基窗口内的亲水性分布图(Hydrophilicity profile);(d)通过Rose等人的溶剂暴露算法进行氨基酸残基对水的暴露的分析(1.4A探针);(e)通过Thornton等人的方法计算突出性指数,该方法预测溶剂可及且突出到溶剂中的蛋白质的部分;(f)通过Welling等人的方法确定五残基序列有抗原性的概率;基于序列相应指数值为序列给予1至6的分数并且对序列进行排名:排名最高的序列对于所检查的分析具有最高单独分数(6/6),并且接下来的候选物具有次高分数(5/6)等。通过与其二级结构属性的相关性来进一步对最佳得分的表位进行排名;例如,两亲性α-螺旋序列或β-转角环区优于无规卷曲片段。Chou和Fasman及Novotny等人的计算机程序用于预测二级结构(α-螺旋、β-链/折叠、β-转角/环、无规卷曲)和α-螺旋两亲矩。最后,考虑单独的氨基酸序列。还考虑了螺旋段中的静电离子对和螺旋偶极相互作用(例如,疏水/亲水平衡)。表4中展示了得到最高分数的序列。采用该方法,使人PD-1的十二个最高得分B细胞表位序列中的四个按优先级排序。与来自PD-1:PDL1(20)晶体结构的信息相结合,选择氨基酸32-50、45-64、73-90和92-110进行评估。已确定人PD-1(PDB 3RRQ)和人PD-L1(PDB 3BIS、3FN3、4Z18、5C3T)的

结构,但这些结构未继而考虑复合物形成后人PD-1内的显著塑性,这点最近才由完整人PD-1/PD-L1复合物(20)的结构证实。虽然上述结构提供了相互作用的完整描述,但若不存在有关与PD-1或PD-L1中任一者络合的小分子抑制剂的结构信息以指导进一步的理性药物开发,蛋白-蛋白界面的平坦表面仍会使药物设计工作复杂化。晶体结构证实了受体-配体相互作用在其主要部分中由PD-1和PDL1两者内的COCFG链的残基(图1)介导。蛋白-蛋白接触涉及疏水相互作用和极性相互作用,并且隐埋1,970Å2的总表面积。在由两个配偶体贡献且由PD-1前片层中的非极性残基(Val64、Ile126、Leu128、Ala132、Ile134)以及PD-L1前片层的非极性残基(LIle54、LTyr56、LMet115、LAla121、LTyr123)构成的中心疏水核周围建立相互作用,包括Ile134和LTyr123的侧链的特征性烷基-p相互作用。该疏水区通向准抗原结合位点上的溶剂,并且与该分子的相对侧面上的混合极性/非极性相互作用的隐埋区毗邻。这两个区域由极性残基的外围网络围绕(CDR环侧上安全),从而提供受体与配体之间的附加氢键介导相互作用。该结构表明,hPD-1(包含成熟多肽的残基16-127)由具有IgSF结构域拓扑的双层夹心结构组成(即,由二硫键(Cys34-Cys103)稳定的两个β折叠(GFCC和ABED))。图2A、图2B和图2C示出了按照构象表位对PD-1肽的建模。

[0148] 表4:人PD-1预测B细胞表位

[0149]

残基	序列	二级结构
32-50	VLNWYRMSPSNQTDKLAAF(SEQ ID NO:2)	反向平行β-折叠/环
45-64	KLAAFPEDRSQPGQDCRFR(SEQ ID NO:3)	
73-90	DFHMSVVRARRNDSGTYL(SEQ ID NO:4)	
92-110	GAISLAPKAQIKESLRAEL(SEQ ID NO:5)	

[0150] 图2A、图2B和图2C示出了按照构象表位对PD-1肽的建模。

[0151] 2.实施例2:PD-1肽和MVF-PD-1肽的合成、纯化和表征

[0152] 使用9600Milligen/Biosearch固相肽合成仪(Millipore,Bedford,MA)利用Fmoc/Boc化学品进行肽合成。Clear amide树脂(0.50mmol/gm)(Peptide International,Louisville,KY)和受Fmoc保护的氨基酸(P3BioSystems,Louisville,KY)用于所有肽的合成。就嵌合肽而言,使用区域选择性侧链保护和GPSL接头使B细胞表位与混杂型Th MVF(残基288-302)表位共线性地合成。使用DMF中的乙酰咪唑(Sigma-Aldrich St.Louis,MO)使B细胞表位中的一些表位乙酰化。使这些肽反应过夜,然后在裂解之前用DMF洗涤。使用试剂R(三氟乙酸:TFA:Thiansole:EDT:苯甲醚,90:5:3:2)(Sigma-Aldrich,St.Louis,MO)裂解肽。在Waters系统上使用C-4vydac柱在水/乙腈(0.1%三氟乙酸)的梯度体系中通过反相HPLC纯化粗肽。在纯化结束时,接着在分析型HPLC中分析纯级分,并且将所关注的级分合并在一起并在10%乙酸溶液中冻干。然后使用质谱法(Campus Chemical Instrumentation Center,The Ohio State University,Columbus,OH)鉴定表5中所列的最终纯化肽。

[0153] 表5:PD-1的肽序列

[0154]

肽	PD-1肽的氨基酸序列
PD-1 (32-50)	H_2N-VLNWYRMSPSNQTDKLAAF-$CONH_2$ (SEQ ID NO: 2)
AC- PD-1 (32-50)	CH_3CONH-VLNWYRMSPSNQTDKLAAF-$CONH_2$ (SEQ ID NO: 2)
MVF-PD-1 (32-50)	KLLSLIKGVIVHRLEGVE-GPSL-VLNWYRMSPSNQTDKLAAF-$CONH_2$ (SEQ ID NO: 8)
PD-1 (45-64)	H_2N- KLAAFPEDRSQPGQDCRFR-$CONH_2$ (SEQ ID NO: 3)
AC- PD-1 (45-64)	CH_3CONH-KLAAFPEDRSQPGQDCRFR-$CONH_2$ (SEQ ID NO: 2)
MVF-PD-1 (45-64)	KLLSLIKGVIVHRLEGVE-GPSL-KLAAFPEDRSQPGQDCRFR-$CONH_2$ (SEQ ID NO: 9)
PD-1 (73-90)	H_2N-DFHMSVVRARRNDSGTYL-$CONH_2$ (SEQ ID NO: 4)
AC- PD-1 (73-90)	CH_3CONH-DFHMSVVRARRNDSGTYL-$CONH_2$ (SEQ ID NO: 4)
MVF-PD-1 (73-90)	KLLSLIKGVIVHRLEGVE-GPSL-DFHMSVVRARRNDSGTYL-$CONH_2$ (SEQ ID NO: 10)
PD-1 (92-110)	H_2N-GAISLAPKAQIKESLRAEL-$CONH_2$ (SEQ ID NO: 5)
AC- PD-1 (92-110)	CH_3CONH-GAISLAPKAQIKESLRAEL-$CONH_2$ (SEQ ID NO: 5)
MVF-PD-1 (92-110)	KLLSLIKGVIVHRLEGVE-GPSL-GAISLAPKAQIKESLRAEL-$CONH_2$ (SEQ ID NO: 11)

[0155] 3.实施例3:通过BIACORE确定PD-1肽的结合特异性

[0156] a)Biacore固定化

[0157] 为了测试所有所选择的肽的活性,使用表面等离子共振(SPR)光谱法(Biacore T200,在258℃下)测量其对人PD-L1(hPD-L1)胞外结构域的结合亲和力。通过直接的胺偶联将重组hPD-L1胞外域固定到CM5传感器芯片的金表面上。为了确认固定的hPD-L1胞外域有功能,检查其对重组人PD-1(hPD-1)胞外域的亲和力。

[0158] 为了在肽结合后获得理论最大应答,所计算的rhPD-L1、纳武单抗和人IgG的固定化量分别为9790RU、14286RU和14286RU。在用EDC/NHS活化之后,将20μg/ml处于10mM NaAc pH 5.5中的rhPD-L1,处于10mM HEPES,pH 7.5中的纳武单抗以及处于10mM HEPES,pH 7.0中的人IgG以10μl/min在7min内注射到芯片上。rhPD-L1(图3A)、纳武单抗(图3B)、人IgG(图3C)的所得固定化水平分别为2345RU、12264RU和11651RU。

[0159] b)rhPD-1和纳武单抗结合测试的特异性

[0160] 为了验证所制备的传感器芯片,将1μM(17.3μg/ml)rhPD-1以10μl/min在3min内注射到芯片上(图3D)。1μM BSA用作阴性对照。由10mM甘氨酸盐酸盐(pH 2.5)再生该芯片(图3E)。可以看出,在rhPD-1注射后纳武单抗生成了强应答信号(3740RU),并且rhPD-L1引起了弱信号(461RU),而人IgG未显示出任何结合信号。BSA未引起任何结合,这指示PD-1与纳武单抗和rhPD-L1的结合是特异性的。

[0161] c)通过Biacore确定PD-1肽与rPD-L1和纳武单抗结合的特异性

[0162] 每次运行时将1μM的各种PD-1肽以10μl/min在1min内注射到芯片上,然后进行1min解离,随后用10mM甘氨酸盐酸盐,pH 2.5进行1min再生。图4A示出了MVF-PD-1(45-64)、MVF-PD-1(73-90)、MVF-PD-1(92-110)结合于固定的rhPD-L1,产生约110RU。相比之下,MVF-PD-1(32-50)表现出与阴性对照MVF-HER-2(266-296)(20RU)类似的极弱结合(11RU)。相同的三种阳性MVF-肽显示出与纳武单抗的更强结合,分别为1030RU、1000RU、970RU(图4B)。同样,MVF-PD-1(32-50)显示出可忽略不计的结合能力(20RU),这指示该序列不代表可行的表位。得出的结论是,MVF-PD-1(45-64、73-90和92-110)能够识别rhPD-L1和纳武单抗两者,而MVF-PD-1(31-49)不能识别。另外,乙酰化的肽也结合于rhPD-L1和纳武单抗,尽管比嵌合

MVF肽更弱(图4C至图4D)。游离肽也结合PD-L1和纳武单抗两者,与PD-1(45-64)和PD-1(92-110)相比,PD-1(73-90)显示出强得多的与rhPD-L1和纳武单抗的结合(图4E、图4F)。PD-1(45-64)是第二强的结合剂。因此游离肽的结合效率可排名如下:73-90>46-64>92-110。根据这些结合研究,可以得出结论:PD-1肽46-64、73-90和92-110可识别rPD-L1并且可充当PD-1:PD-L1相互作用的小肽抑制剂。

[0163] 4.实施例4:兔中PD-1肽的免疫原性测试

[0164] a)MVF-PD-1肽引发高滴度抗肽抗体。

[0165] 这四个PD-1序列被合成为具有来源于麻疹病毒融合蛋白(MVF,氨基酸288-302)的混杂型辅助性T细胞表位的嵌合构建体。将疫苗构建体1mg肽在Montanide ISA 720(Seppic,Paris,France)和nor-MDP辅助剂(N-乙酰葡糖胺-3基-乙酰L-丙氨酰-D-异谷氨酰胺)中乳化并且用于免疫新西兰白兔,这些新西兰白兔购自马萨诸塞州威尔明顿的查尔斯河实验室(Charles River Laboratories,Wilmington,Massachusetts)并且圈养在俄亥俄州立大学的大学实验动物资源(The Ohio State University's University Laboratory Animal Resources(ULAR))设施中。以三周间隔对兔进行总计三次的疫苗接种。每周对动物进行放血并于九周时处死,并且在最后一次测试放血时通过心脏穿刺进行终末放血。所有实验均依照美国公共卫生署人道管理和使用实验动物政策(U.S.Public Health Service Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals)执行,已获得俄亥俄州立大学实验动物管理与使用委员会(Ohio State University Institutional Animals Care and Use Committee)的批准,并且在接受的方案中详述。使用蛋白A/G柱通过亲和色谱法纯化肽疫苗抗体,并且通过考马斯蛋白测定法测量浓度。

[0166] 所有四个表位都引发了抗免疫疫苗的高滴度抗体>250,000,图5A。终末放血抗体也识别重组人PD-1蛋白以及免疫肽MVF-PD-1、乙酰化的肽和游离肽,图5B。

[0167] b)(ii)所选表位的人和小鼠PD-1序列之间的同源性。

[0168] 人和小鼠PD-1序列之间存在65%总同源性。所选表位显示出人和小鼠序列之间的67%-74%同源性。因此,重要的是查看所选人表位是否可结合小鼠PD-1以验证小鼠研究。

[0169] c)(iii)α-hPD-1兔多克隆抗体结合于小鼠PD-1

[0170] 为了确定α-hPD-1兔多克隆抗体是否识别鼠PD-1,用MBP Ac1-11活化取自初始髓鞘碱性蛋白(MBP)特异性TCR转基因小鼠的脾细胞72h。通过流式细胞术分析PD-1表达。如图6中所示,所有四种多克隆α-hPD-1抗体均结合于小鼠PD-1,从而验证了人PD-1在肿瘤小鼠研究中的用途。

[0171] d)(iv)α-hu PD-1抗体对T细胞增殖的调控

[0172] 抗原特异性T细胞增殖反映了效应性T细胞的重要效应子功能。为了确定这四种α-huPD-1抗体是否能通过活化或抑制PD-1信号转导途径来改变T效应子功能,执行基于CFSE的增殖测定法(图7)。简而言之,用CFSE标记取自初始MBP特异性TCR转基因小鼠的脾细胞,并且在存在50mg/mlα-huPD-1抗体或对照兔IgG的情况下用MBP Ac1-11活化这些脾细胞4天。通过流式细胞术分析CFSE表达。数据表明,81%的经α-hPD-1-92-110处理的CD4T细胞是高度增殖的,相比之下,在对照IgG处理组中仅70%的T细胞是高度增殖的,这指示α-hPD-1-92-110阻断PD-1/PD-L1相互作用并且引起以髓鞘特异性CD4T细胞的抗原特异性增殖增加为代表的增强T效应子功能。相反,经α-hPD-1(45-64)或α-hPD-1(73-90)处理的T细胞显示

出增殖减少,这指示它们活化PD-1信号转导并且抑制髓鞘特异性CD4T细胞的效应子功能。另外,α-hPD-1(32-50)对T效应子功能没有影响,因为用α-huPD-1(32-50)处理的细胞增殖的水平与用对照IgG处理的细胞相同。这些数据一起表明,α-hPD-1(92-110)增强了T效应子功能并且具有抑制体内肿瘤生长方面的治疗能力。45-64和73-90表位由于其具有活化PD-1信号转导的特性,可用作自身免疫疾病的靶标。

[0173] 5.实施例5:免疫感受态小鼠中的PD-1肽的免疫原性测试和肿瘤攻击实验

[0174] a)小鼠疫苗接种和肿瘤攻击方案。

[0175] 6-8周龄的免疫感受态Balb/c小鼠购自马萨诸塞州威尔明顿的查尔斯河实验室(Charles River Laboratories,Wilmington,Massachusetts)并且圈养在俄亥俄州立大学的大学实验动物资源(The Ohio State University's University Laboratory Animal Resources(ULAR))设施中。在细胞注射和处死之前使用异氟烷麻醉这些动物。从小鼠采集免疫前血清样品,然后使用在Montanide ISA 720(Seppic,Paris,France)和nor-MDP辅助剂(N-乙酰葡糖胺-3基-乙酰L-丙氨酰-D-异谷氨酰胺)中乳化的100μg肽免疫这些小鼠。小鼠在首次免疫后3周和6周接受加强免疫。从小鼠采集若干测试血清样品(图8)。

[0176] b)肿瘤攻击:

[0177] 二次加强免疫后10天,在右胁腹部皮下用$1\times10_5$个鼠结肠癌CT26肿瘤细胞接种小鼠。每周三次监测肿瘤生长,并且每周及在处死动物后采集血清样品。在第0天,在对照小鼠皮下移植$1\times10_5$个CT26肿瘤细胞并且使它们接受抗体。这些动物接受150μg针对PD-1的抗小鼠抗体注射剂。每周两次监测小鼠并且对可触及的肿瘤的形成进行评分,然后在肿瘤坏死或超过2,000mm3的预定尺寸时处死小鼠。每周两次测量肿瘤直径。根据下式计算肿瘤尺寸:V=[(长度×宽度2)/2]。肿瘤体积(单位为立方毫米)使用卡尺测量并使用下式计算:A×B2×0.5,其中A是最大直径,且B是最小直径。所有实验均依照美国公共卫生署人道管理和使用实验动物政策(U.S.Public Health Service Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals)执行,并且已获得俄亥俄州立大学实验动物管理与使用委员会(Ohio State University Institutional Animals Care and Use Committee)的批准,并且在接受的方案中详述。

[0178] c)小鼠中的PD-1疫苗构建体的免疫原性。

[0179] 所有单独小鼠都产生了对所有4种疫苗的强效抗体应答。以各种间隔(2Y+1、2Y+3、3Y+1、3Y+2、3Y+3)监测抵抗疫苗构建体的对混合血清的免疫应答(图9和表6)。

[0180] 表6:兔和小鼠中抵抗重组hu PD-1蛋白的终末放血的抗原性

[0181]

	终末小鼠血清1:100	终末小鼠血清1:200	终末兔血清1:100	终末兔血清1:200	纯化的抗体100μg/ml	纯化的抗体50μg/ml
对照肽	-	-	-	-		
PD-1 (32-50)	-	-	+++	++		
PD-1 (45-64)	+++++	++++	++++	+++		
PD-1 (73-90)	+++	++	-	-		
PD-1 (93-110)	++	+ +/-	++++	+++		
尔必得舒（Erbetux）					-	-
纳武单抗					+++	+++
帕妥珠单抗（Pertuzumab）					++++	++++

[0182] 测试终末小鼠和兔血清对重组huPD1蛋白(600ng/孔)的反应性。以1:100和1:200稀释度测试血清。ABTS用作该测定法中的底物。在415λ下读取样品并进行评分

[0183] d)小鼠组织中的免疫细胞检测

[0184] 为后续FACS分析收集肿瘤和肿瘤引流淋巴结以便研究小鼠中的免疫应答。通过机械离解或通过酶消化来从组织制备细胞悬液。使用配备有波长为405、488和633nm的3个激发激光器的LSR II流式细胞仪(BD Biosciences)来分析染色的细胞。在MACS柱或FACSAria上纯化取自肿瘤白细胞的CD8+T细胞和CD4+CD25+T细胞。

[0185] e)经治疗的小鼠中T细胞应答的免疫谱分析

[0186] 执行流式细胞分析以评估脾细胞和肿瘤浸润性T细胞中的表面标记物(CD45、CD3、CD4、CD8和CD25)和转录因子FoxP3的表达。简而言之,从小鼠体内摘除脾并将脾挤压通过细胞滤网,之后与红细胞裂解缓冲液一起短暂温育以裂解红细胞。然后将细胞收集、洗涤并重悬于染色缓冲液(PBS中的1%BSA)。类似地,从小鼠体内摘除肿瘤并将肿瘤挤压通过细胞滤网,之后用37%percoll洗涤一次。然后用PBS洗涤肿瘤细胞并将肿瘤细胞重悬于染色缓冲液。将脾细胞和肿瘤细胞与细胞表面标记物的mAb一起在4℃下温育30min。在用染色缓冲液洗涤两次之后,使用Cytofix/Cytoperm溶液在4℃下固定并透化细胞60min。在4℃下对细胞的FoxP3染色30min。在FACSCanto(BD)上获取了80,000-100,000个活细胞事件,并且使用FlowJo软件(Tree Star,Inc.)进行分析。为了区分浸润细胞和肿瘤细胞,首先将肿瘤细胞设门于CD45+细胞。然后分析CD3+CD4+和CD3+CD8+细胞。Treg由CD4+CD25+FoxP3+细胞表示。如图10A中所示,CD4和CD8亚群在脾中处于类似水平,而与组A(阴性对照)相比,组C、E和F显示出脾中增加的Treg群体。在肿瘤中,与其他四组相比,组C具有最高Treg(图10B),这指示肽PD1-45-64疫苗接种引起了肿瘤微环境中增强的Treg发育。组E具有最低Treg。

[0187] f)用PD-1构建体免疫并用$1\times10_5$鼠结肠癌CT26肿瘤细胞攻击的同系Balb/c小鼠中的疗效研究

[0188] 图11示出了接受四种PD-1构建体A:(PD-1(32-50)、B:PD-1(45-64)、C:PD-1(73-90)和D:PD-1(92-110)中的每一者、对照肽(E:无关肽)免疫的小鼠(5只/组)以及用抗小鼠PD-1单克隆抗体治疗的阳性对照组(F)中肿瘤生长的单独曲线图。

[0189] g)小鼠肿瘤生长数据初步统计分析

[0190] 为了评估4种不同疫苗治疗对肿瘤生长的性能,定期测量小鼠的肿瘤尺寸,并且将结果与阳性对照和阴性对照的结果进行比较。每个治疗组中有5只小鼠,每只小鼠接受所分

配的MVF-肽,然后在该治疗的末次加强免疫后10天接种1e5CT26(结肠)肿瘤细胞。第14天被视为所关注的主要时间点,因为研究者认为一直等待到第19天会让肿瘤有太多时间生长,从而在该实验时间点产生类似的尺寸。以三种方式测量肿瘤尺寸:所有时间点的LWW(1/2*长度*宽度*宽度)、所有时间点的LWH(1/2*长度*宽度*高度)以及研究结束时的终末肿瘤重量。用MVF-PD-a(45)治疗的组C小鼠在第19天之前由于一只小鼠死亡而被处死,因此仅可在第14天进行肿瘤尺寸的比较。肿瘤尺寸对于LWW和LWH的单位为mm3,而对于终末肿瘤重量的单位为克。

[0191] 由于每组的样本量较少且不能呈现正态性,使用精确Wilcoxon秩和检验来检查14天和19天时肿瘤尺寸分布的系统化差异(图12A至图12D和表7-10)。所给出的P值用于检验比较该列的对照与相应治疗,并且是双侧的以考虑肿瘤尺寸在治疗与对照之间系统性偏大或偏小的可能性。由于这是初步数据,未针对多重比较调节p值。总的来说,对照和治疗的分布之间只有少数几例显著差异。

[0192] 表7:MVF-PD-1(32-50)中值尺寸与对照尺寸的比较

[0193]

量度	MVF-PD(32-50)	MVF Uptase（对照）	抗 PD-1 Mab（+对照）
LWW，第 14 天	486	405 (p=0.5873)	445.5 (p=0.2698)
LWH，第 14 天	420	367.5 (p=1.0000)	297 (p=0.6429)
LWW，第 19 天	1080	850.5 (p=0.2381)	1183 (p=1.0000)
LWH，第 19 天	900	850.5 (p=0.3095)	1056 (p=1.0000)
终末重量	0.92	1.4 (p=0.3095)	1.04 (p=0.4524)

[0194] 对于MVF-PD-a(32)而言,治疗与阳性对照或阴性对照之间不存在肿瘤尺寸分布的显著差异。

[0195] 表8:MVF-PD-1(45-64)中值尺寸与对照尺寸的比较

[0196]

量度	MVF-PD (45-64)	MVF Uptase（对照）	抗 PD-1 Mab（+对照）
LWW，第 14 天	550	405 (p=0.4524)	445.5 (p=0.2619)
LWH，第 14 天	448	367.5 (p=0.8889)	297 (p=0.2857)

[0197] 对于MVF-PD-1(45-64)而言,如先前指出的,只能对第14天的数据进行比较。此处,未在该治疗与任一对照之间发现肿瘤尺寸分布的显著差异。

[0198] 表9:MVF-PD-1(73-90)中值尺寸与对照尺寸的比较

[0199]

量度	MVF-PD(73-90)	MVF Uptase（对照）	抗 PD-1 Mab（+对照）
LWW，第 14 天	405	405 (p=1.0000)	445.5 (p=0.3413)
LWH，第 14 天	346.5	367.5 (p=0.8413)	297 (p=0.8968)
LWW，第 19 天	968	850.5 (p=0.8889)	1183 (p=0.1746)
LWH，第 19 天	768	850.5 (p=1.0000)	1056 (p=0.0556)
终末重量	0.93	1.4 (p=0.3095)	1.04 (p=0.4206)

[0200] 对于MVF-PD-1(73-90)而言,在第14天,该治疗与任一对照之间不存在肿瘤尺寸分布的显著差异。当将治疗与阳性对照比较时,第19天的LWH存在明显较小的p值(<0.1),这指示肿瘤尺寸分布的可能差异。

[0201] 表10:MVF-PD-1(92-110)中值尺寸与对照尺寸的比较

[0202]

量度	MVF-PD(92-110)	MVF Uptase（对照）	抗 PD-1 Mab（+对照）
LWW，第 14 天	384	405 (p=0.6667)	445.5 (p=0.0952)
LWH，第 14 天	270	367.5 (p=0.2302)	297 (p=0.0794)
LWW，第 19 天	1080	850.5 (p=0.4603)	1183 (p=0.3333)
LWH，第 19 天	819	850.5 (p=1.0000)	1056 (p=0.2222)
终末重量	1.1	1.4 (p=0.4127)	1.04 (p=0.9841)

[0203] 对于MVF-PD-1(92-110)而言,当使用LWW和LWH这两种量度比较该治疗与阳性对照时,也存在明显较小的p值。与阳性对照相比,该治疗表现出具有系统性偏小的肿瘤尺寸的分布。

[0204] 6.实施例6:PD-1肽抗体是抑制或活化的

[0205] 抗原特异性T细胞增殖反映了效应性T细胞的重要效应子功能。为了确定这四种α-huPD-1抗体是否能通过活化或抑制PD-1信号转导途径来改变T效应子功能,执行基于CFSE的增殖测定法。在增殖测定法中,用CFSE标记取自初始MBP特异性TCR转基因小鼠的脾细胞,并且在存在50mg/ml的α-huPD-1抗体或对照兔IgG的情况下用MBP Ac1-11活化这些脾细胞4天。通过流式细胞术分析CFSE表达(图13)。数据表明,81％的经α-hPD-1-92-110处理的CD4T细胞是高度增殖的,相比之下,在对照IgG处理组中仅70％的T细胞是高度增殖的,这指示α-hPD-1-92-110阻断PD-1/PD-L1相互作用并且引起以髓鞘特异性CD4T细胞的抗原特异性增殖增加为代表的增强T效应子功能。相反,经α-hPD-1(45-64)或α-hPD-1(73-90)处理的T细胞显示出增殖减少,这指示它们活化PD-1信号转导并且抑制髓鞘特异性CD4T细胞的效应子功能。这些数据一起表明,α-hPD-1(92-110)增强了T效应子功能并且可具有抑制体内肿瘤生长方面的治疗潜力。45-64和73-90表位由于其具有活化PD-1信号转导的特性,可用作自身免疫疾病的靶标。

[0206] 7.实施例7:用不同PD-1构建体免疫并用1×10^5鼠结肠癌CT26肿瘤细胞攻击的同系Balb/c小鼠中的初步筛选疗效研究

[0207] 使用在Montanide ISA 720(Seppic,Paris,France)和nor-MDP辅助剂(N-乙酰葡糖胺-3基-乙酰L-丙氨酰-D-异谷氨酰胺)中乳化的100μg肽免疫6-8周龄的免疫感受态Balb/c小鼠(5只小鼠/组)。小鼠在肿瘤攻击后3周和6周接受加强免疫:二次加强免疫后10天,用1×10^5个鼠结肠癌CT26肿瘤细胞皮下接种小鼠,并且每周三次监测肿瘤生长。在第0天,在对照小鼠皮下移植1×10^5个CT26肿瘤细胞,并且这些对照小鼠接受150μg针对PD-1的抗小鼠抗体注射剂。以各种间隔(2Y+1、2Y+3、3Y+1、3Y+2、3Y+3)监测抵抗疫苗构建体以及抵抗重组PD-1蛋白的对混合血清的免疫应答(图14)(表11)。所有单独小鼠都产生了对所有4种疫苗的强效抗体应答。

[0208] 表11

[0209]

小鼠/兔血清	小鼠 1:100	小鼠 1:200	兔 1:100	兔 1:200
对照肽	-	-	-	-
PD-1(32-50)	-	-	+++	++
PD-1(45-64)	+++++	++++	++++	+++
PD-1(73-90)	+++	++	-	-
PD-1(92-110)	++	++/-	++++	+++

[0210] 测试终末小鼠和兔血清对重组huPD1蛋白(600ng/孔)的反应性。以1:100和1:200稀释度测试血清。ABTS用作该测定法中的底物。在415Å下读取样品并进行评分。

[0211] 8.实施例8:PD-1(92-110)表位作为疫苗候选物的验证:

[0212] 所有经疫苗接种的小鼠均表现出高免疫原性,从而形成对相应免疫原的高滴度抗体。只有用MVF-PD-1(92-110)疫苗接种的小鼠在第14天表现出肿瘤生长的显著抑制(图15),这指示该表位是有用的抑制性疫苗。显示出表位45-64和73-90无抑制性并因此增强肿瘤生长的研究进一步验证了这一结论。另一方面,作为阳性对照的小鼠PD1mAb(29F.1A12)应具有受抑制的肿瘤生长。得出的结论是,只有PD-1(92-110)表位是疫苗的最适合候选物,因为该表位是基于与纳武单抗的结合特性来设计的。

[0213] 9.实施例9:用1×10^5个鼠结肠癌CT26/HER-2肿瘤细胞攻击的同系Balb/c小鼠中联合PD-1和HER-2疫苗构建体的疗效(图16方案)。

[0214] 该研究的基本原理是明确的HER-2疫苗与PD-1(92-110)疫苗联用是否可加强/增加免疫原性,增强抗肿瘤应答并且提供抑制同系癌模型中的肿瘤生长方面的协同有益效果。使用以nor-MDP和ISA 720乳化的MVF-PD-1(92-110)、MVF-HER-2(266-296)和MVF-HER-2(597-626)肽疫苗构建体的组合来免疫Balb/c小鼠(10只小鼠/组)。以3周间隔对动物进行两次加强免疫。通过200ng/孔的MVF-肽上的ELISA来确定抗体滴度。

[0215] 在末次加强免疫后两周,皮下移植CT26/HER-2肿瘤细胞系的1×10^5个肿瘤细胞。用1×10^5肿瘤细胞攻击对照小鼠并且在实验的持续时间内每周两次用抗PD-1抗体(29F.1A12)治疗对照小鼠。一旦肿瘤达到可触及的尺寸,就使用卡尺测量肿瘤,由此确定肿瘤负荷。在移植后21天处死CT-26/HER-2荷瘤小鼠。在处死时从这些小鼠收集血液和组织样品,并且得出切除的肿瘤团块的最终重量。测试1:100-1:512,000的血清浓度。ABTS用作该测定法中的底物,10分钟后用0.1%SDS溶液停止酶反应。滴度被定义为在415nm下读取时仍具有>0.200吸光度的最终稀释度。在CT-26HER-2neu肿瘤攻击之前采集血清样品1Y+3、2Y+1、2Y+3和3Y+2。分别在攻击后1周和3周采集样品3Y+3和3Y+5。所有疫苗接种的小鼠中都引发了强效HER-2和PD-1抗体应答(图17)。

[0216] 以3周间隔单独用PD-1(92-110)或联用两种Her2肽免疫原的免疫来免疫3次的同系Balb/c小鼠(10只/组)中的肿瘤生长的单独曲线图。包括用无关肽免疫的免疫对照组。在第3次疫苗接种后15天用CT-26Her2neu癌细胞(1×10^5)攻击小鼠。还用CT-26Her2neu癌细胞攻击对照小鼠。每周两次通过腹腔注射抗Ms PD-1 MAb(阳性对照)或PBS(阴性对照)来治疗对照小鼠。监测小鼠并且对可触及的肿瘤的形成进行评分,然后定期使用卡尺测量肿瘤尺寸。在肿瘤细胞移植后21天处死动物。误差条是该组小鼠的标准误差的表示,并且p值将

各个组与三联疫苗小鼠进行比较。结果表明,相比于PD-1疫苗或更重要地阳性对照金标准:抗小鼠PD-1单克隆抗体(29F.1A12),三联疫苗接种能有效降低结肠癌的Balb/c同系模型中的肿瘤生长(图18)。

[0217] 数据表明,与阳性对照抗小鼠PD-1Mab(29F.1A12)或单独用MVF-PD-1的疫苗接种相比,三联疫苗接种组MVF-PD-1(92-110)+MVF-HER-2(266+296)+MVF-HER-2(597-626)能更有效地防止肿瘤生长(图19A和图19B)。因此,用联合HER-2和PD-1肽的三联疫苗接种的策略是展现协同性/加和性的可行提议,最终增强免疫原性并抑制肿瘤生长。

[0218] 10.实施例10:PD-1疫苗安全且未表现出毒性或自身免疫

[0219] 所有疫苗接种的小鼠在9周的时间段内均未表现出肮脏、病变和嗜睡的迹象。从小鼠收集用联合肽(HER-2和PD-1)疫苗接种的Balb/c小鼠的器官(脾、肝、心脏、肺、肾和肿瘤)并且送交兽医生物科学综合癌症中心部门的比较病理学与小鼠表型分型核心机构(Comparative Pathology&Mouse.Phenotyping Core facility of the Comprehensive cancer center department of Veterinary Biosciences)进行分析(病理学家:Krista M.D.La Perle,兽医学博士,ACVP认证)。未在送交进行组织学评价的任何器官中发现明显病变。也未发现明显的生化异常。所有小鼠具有与糖原病相符的肝细胞空泡化。肝中的糖原积累被解释为是一种正常表现,并且会随动物的生理状态而改变。糖原积累也可作为毒性表现或在发生糖原贮积病时观察到。

[0220] 11.实施例11:联合肽疫苗显著增加了肿瘤浸润细胞(TIL)中的CD8/Treg比率

[0221] $CD25^{+}FoxP3^{+}$ CD4调节性T细胞(Treg)是对免疫抑制性肿瘤微环境(TME)的形成起到重要作用的肿瘤微环境中的主要抑制性群体之一。另一方面,肿瘤位点处的大量T细胞(尤其是CD8T细胞)是癌症患者总生存期(OS)的关键要素。高CD8/Treg比率与癌症的良好预后相关联。因此,确定了用联合肽或对照肽(上文所述)疫苗接种的荷瘤小鼠的TIC中的CD8/Treg比率。从四组小鼠(上文所述)体内摘除肿瘤并将肿瘤挤压通过细胞滤网,之后用37%percoll洗涤两次。将这些细胞与细胞表面标记物(CD45、CD4、CD8、CD25)的mAb一起温育。然后使用Cytofix/Cytoperm溶液(ebioscience)在4℃下固定并透化这些细胞60min,之后在4℃下对FoxP3染色30min。在FACSCantoII(BD)上获取了80,000-100,000个活细胞事件,并且使用FlowJo软件(Tree Star,Inc.)进行分析。为了区分TIL和肿瘤细胞,首先将这些细胞设门于$CD45^{+}$细胞。然后分析$CD4^{+}$(图20A)和$CD8^{+}$(图20B)细胞。Treg由$CD4^{+}CD25^{+}FoxP3^{+}$细胞表示(图20C)。GraphPad软件(GraphPad Prism Software,Inc.,San Diego,CA,USA)用于统计分析。计算了组平均值并使用方差分析进行了比较。与对照肽疫苗接种组相比,联合疫苗组(HER-2/PD1-92疫苗接种组)中CD8+T细胞明显更高(图20B)。CD4T细胞或Treg细胞在所有组之间没有显著差异(图20A和图20B)。然而,与对照肽疫苗接种组相比,联合疫苗组中CD8/Treg比率明显更高(图20D)。因此,这些数据表明,与对照肽疫苗接种组相比,HER-2/PD-1疫苗接种组中的CD8/Treg比率增加。

[0222] 12.实施例12:取自肽疫苗接种的小鼠的肿瘤浸润性淋巴细胞的分析

[0223] 高CD8/Treg比率与癌症的良好预后相关联。为了确定肽疫苗是否会增加CD8/Treg比率,在肽疫苗接种的小鼠中分析CD8+、CD4+和调节性T细胞(FoxP3+CD25+CD4+)肿瘤浸润性淋巴细胞。执行流式细胞分析以评估表面标记物(CD45、CD4、CD8和CD25)的表达,并且通过胞内染色确定转录因子FoxP3的表达(图21A)。简而言之,从小鼠体内摘除肿瘤并将肿瘤

挤压通过细胞滤网,之后用37％percoll洗涤两次。然后将这些细胞重悬于染色缓冲液,并且与细胞表面标记物的mAb一起在4℃下温育30min。在用染色缓冲液洗涤两次之后,使用Cytofix/Cytoperm溶液(ebioscience)在4℃下固定并透化细胞60min。然后在4℃下对细胞的FoxP3染色30min。在FACSCanto II(BD)上获取了80,000-100,000个活细胞事件,并且使用FlowJo软件(Tree Star,Inc.)进行分析。为了区分浸润细胞(CD45+)和肿瘤细胞(CD45-),首先将所有细胞设门于CD45+细胞。然后分析CD45+肿瘤浸润性群体中的CD4+和CD8+细胞的百分比。Treg由FoxP3+CD25+CD4+细胞表示。GraphPad软件(GraphPad Prism Software,Inc.,San Diego,CA,USA)用于统计分析。计算了组平均值并使用方差分析进行了比较。如图21B所示,与对照肽疫苗接种组(组3)相比,PD-1肽或PD-1/Her-2疫苗接种组(组1和组2)中CD8+T细胞明显更高。然而,Treg细胞在PD-1肽、PD-1/Her-2疫苗接种组和对照肽疫苗接种组之间没有显著差异。这些数据一起表明,与对照肽疫苗接种组相比,PD-1肽或PD-1/Her-2疫苗接种组中的CD8/Treg比率增加。

[0224] E.参考文献

[0225] Allen SD,Rawale SV,Whitacre CC,Kaumaya PT.Therapeutic peptidomimetic strategies for autoimmune diseases:costimulation blockade.J Pept Res.2005;65(6):591-604.

[0226] Allen,S.D.,等人,Peptide vaccines of the HER-2/neu dimerization loop are effective in inhibiting mammary tumor growth in vivo.J Immunol,2007.179(1):p.472-82.

[0227] Arteaga CL,Engelman JA.ERBB receptors:from oncogene discovery to basic science to mechanism-based cancer therapeutics.Cancer cell.2014;25(3):282-303.Epub 2014/03/22.

[0228] Baras,A.S.,等人,The ratio of CD8to Treg tumor-infiltrating lymphocytes is associated with response to cisplatin-based neoadjuvant chemotherapy in patients with muscle invasive urothelial carcinoma of the bladder.Oncoimmunology,2016.5(5):p.e1134412.

[0229] Baselga J,Arteaga CL.Critical update and emerging trends in epidermal growth factor receptor targeting in cancer.J Clin Oncol.2005;23(11):2445-59.Epub 2005/03/09.

[0230] Baselga J,Swain SM.Novel anticancer targets:revisiting ERBB2and discovering ERBB3.Nature reviews Cancer.2009;9(7):463-75.Epub 2009/06/19.

[0231] Baselga J.Targeting tyrosine kinases in cancer:the second wave.Science.2006;312(5777):1175-8.Epub 2006/05/27.

[0232] Brahmer JR,Tykodi SS,Chow LQ,Hwu WJ,Topalian SL,Hwu P,Drake CG,Camacho LH,Kauh J,Odunsi K,Pitot HC,Hamid O,Bhatia S,Martins R,Eaton K,Chen S,Salay TM,Alaparthy S,Grosso JF,Korman AJ,Parker SM,Agrawal S,Goldberg SM,Pardoll DM,Gupta A,Wigginton JM.Safety and activity of anti-PD-L1antibody in patients with advanced cancer.The New England journal of medicine.2012;366(26):2455-65.

[0233] Chames P,Van Regenmortel M,Weiss E,Baty D.Therapeutic antibodies: successes,limitations and hopes for the future.Br J Pharmacol.2009;157(2): 220-33.

[0234] Chou PY,Fasman GD.Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence.Advances in enzymology and related areas of molecular biology.1978;47:45-148.

[0235] Cobleigh MA,Langmuir VK,Sledge GW,Miller KD,Haney L,Novotny WF, Reimann JD,Vassel A.A phase I/II dose-escalation trial of bevacizumab in previously treated metastatic breast cancer.Seminars in oncology.2003;30 (5Suppl 16):117-24.

[0236] Dakappagari NK,Douglas DB,Triozzi PL,Stevens VC,Kaumaya PT.Prevention of mammary tumors with a chimeric HER-2B-cell epitope peptide vaccine.Cancer Res.2000;60(14):3782-9.

[0237] Dakappagari NK,Lute KD,Rawale S,Steele JT,Allen SD,Phillips G,Reilly RT,Kaumaya PT.Conformational HER-2/neu B-cell epitope peptide vaccine designed to incorporate two native disulfide bonds enhances tumor cell binding and antitumor activities.J Biol Chem.2005;280(1):54-63.

[0238] Dakappagari NK,Pyles J,Parihar R,Carson WE,Young DC,Kaumaya PT.A chimeric multi-human epidermal growth factor receptor-2B cell epitope peptide vaccine mediates superior antitumor responses.J Immunol.2003;170(8):4242-53.Epub 2003/04/12.

[0239] Dakappagari NK,Sundaram R,Rawale S,Liner A,Galloway DR,Kaumaya PT.Intracellular delivery of a novel multiepitope peptide vaccine by an amphipathic peptide carrier enhances cytotoxic T-cell responses in HLA-A* 201mice.J Pept Res.2005;65(2):189-99.Epub 2005/02/12.

[0240] deLeeuw,R.J.,等人,The prognostic value of FoxP3+tumor-infiltrating lymphocytes in cancer:a critical review of the literature.Clin Cancer Res, 2012.18(11):p.3022-9.

[0241] Eskens FA,Verweij J.The clinical toxicity profile of vascular endothelial growth factor(VEGF)and vascular endothelial growth factor receptor(VEGFR)targeting angiogenesis inhibitors;a review.European journal of cancer.2006;42(18):3127-39.Epub 2006/11/14.

[0242] Folkman J.Tumor angiogenesis:therapeutic implications.The New England journal of medicine.1971;285(21):1182-6.

[0243] Foy KC,Liu Z,Phillips G,Miller M,Kaumaya PT.Combination treatment with HER-2and VEGF peptide mimics induces potent anti-tumor and anti-angiogenic responses in vitro and in vivo.J Biol Chem.2011;286(15):13626-37.Epub 2011/02/18.

[0244] Foy KC,Miller MJ,Moldovan N,Carson WE,Kaumaya PTP.Combined

vaccination with HER-2peptide followed by therapy with VEGF peptide mimics exerts effective anti-tumor and anti-angiogenic effects in vitro and in vivo.OncoImmunology.2012;1(7):0-1.

[0245] Foy KC,Vicari D,Kaumaya PTP.Therapeutic Peptides Targeting HER-2/neu and VEGF Signaling Pathways in Breast Cancer.Handbook of Biologically Active Peptides2013.p.612-6.

[0246] Garrett,J.T.,等人,Novel engineered trastuzumab conformational epitopes demonstrate in vitro and in vivo antitumor properties against HER-2/neu.J Immunol,2007.178(11):p.7120-31.

[0247] Grothey A.Recognizing and managing toxicities of molecular targeted therapies for colorectal cancer.Oncology(Williston Park).2006;20(14Suppl 10):21-8.Epub 2007/03/16.

[0248] Hadrup,S.,M.Donia,and P.Thor Straten,Effector CD4and CD8T cells and their role in the tumor microenvironment.Cancer Microenviron,2013.6(2):p.123-33.

[0249] Hamid O,Robert C,Daud A,Hodi FS,Hwu WJ,Kefford R,Wolchok JD,Hersey P,Joseph RW,Weber JS,Dronca R,Gangadhar TC,Patnaik A,Zarour H,Joshua AM,Gergich K,Elassaiss-Schaap J,Algazi A,Mateus C,Boasberg P,Tumeh PC,Chmielowski B,Ebbinghaus SW,Li XN,Kang SP,Ribas A.Safety and tumor responses with lambrolizumab(anti-PD-1)in melanoma.The New England journal of medicine.2013;369(2):134-44.

[0250] Harding FA,Stickler MM,Razo J,DuBridge RB.The immunogenicity of humanized and fully human antibodies:residual immunogenicity resides in the CDR regions.mAbs.2010;2(3):256-65.

[0251] Hoeben A,Landuyt B,Highley MS,Wildiers H,Van Oosterom AT,De Bruijn EA.Vascular endothelial growth factor and angiogenesis.Pharmacol Rev.2004;56(4):549-80.

[0252] Hopp TP,Woods KR.Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences.Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.1981;78(6):3824-8.

[0253] Houck KA,Ferrara N,Winer J,Cachianes G,Li B,Leung DW.The vascular endothelial growth factor family:identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA.Molecular endocrinology.1991;5(12):1806-14.Epub 1991/12/01.

[0254] Hynes NE,Lane HA.ERBB receptors and cancer:the complexity of targeted inhibitors.Nature reviews Cancer.2005;5(5):341-54.

[0255] Ishida Y,Agata Y,Shibahara K,Honjo T.Induced expression of PD-1,a novel member of the immunoglobulin gene superfamily,upon programmed cell death.The EMBO journal.1992;11(11):3887-95.

[0256] Iwai Y,Ishida M,Tanaka Y,Okazaki T,Honjo T,Minato N.Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade.Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.2002;99(19):12293-7.

[0257] Jain RK,Duda DG,Clark JW,Loeffler JS.Lessons from phase III clinical trials on anti-VEGF therapy for cancer.Nat Clin Pract Oncol.2006;3(1):24-40.

[0258] Karplus PA,Schulz GE.Refined structure of glutathione reductase at 1.54 A resolution.Journal of molecular biology.1987;195(3):701-29.

[0259] Kaumaya PT,Foy KC,Garrett J,Rawale SV,Vicari D,Thurmond JM,Lamb T,Mani A,Kane Y,Balint CR,Chalupa D,Otterson GA,Shapiro CL,Fowler JM,Grever MR,Bekaii-Saab TS,Carson WE,3rd.Phase I active immunotherapy with combination of two chimeric,human epidermal growth factor receptor 2,B-cell epitopes fused to a promiscuous T-cell epitope in patients with metastatic and/or recurrent solid tumors.J Clin Oncol.2009;27(31):5270-7.

[0260] Kaumaya PT.A paradigm shift:Cancer therapy with peptide-based B-cell epitopes and peptide immunotherapeutics targeting multiple solid tumor types:Emerging concepts and validation of combination immunotherapy.Human vaccines&immunotherapeutics.2015;11(6):1368-86.

[0261] Kaumaya PT.Could precision-engineered peptide epitopes/vaccines be the key to a cancer cure?Future Oncol.2011;7(7):807-10.

[0262] Kaumaya PTP,Kobs-Conrad S,DiGeorge AM,Stevens V.Denovo Engineering of Protein Immunogenic&Antigenic Determinants.In:Anantharamaiah GMB,C.,editor.PEPTIDES:Springer-Verlag.;1994.p.133-64.

[0263] Kaumaya PTP.HER-2/neu cancer vaccines:Present status and future prospects.International Journal of Peptide Research and Therapeutics.2006;12(1):65-77.

[0264] Kyte J,Doolittle RF.A simple method for displaying the hydropathic character of a protein.Journal of molecular biology.1982;157(1):105-32.

[0265] Li B,Ogasawara AK,Yang R,Wei W,He GW,Zioncheck TF,Bunting S,de Vos AM,Jin H.KDR(VEGF receptor 2)is the major mediator for the hypotensive effect of VEGF.Hypertension.2002;39(6):1095-100.Epub 2002/06/08.

[0266] Lynch MP,Kaumaya PTP.Advances in HTLV-1peptide vaccines and therapeutics.Current Protein and Peptide Science.2006;7(2):137-45.

[0267] Miller MJ,Foy KC,Kaumaya PT.Cancer immunotherapy:present status,future perspective,and a new paradigm of peptide immunotherapeutics.Discovery medicine.2013;15(82):166-76.Epub 2013/04/03.

[0268] Miller MJ,Foy KC,Kaumaya PTP.Cancer immunotherapy:Present status,future perspective,and a new paradigm of peptide immunotherapeutics.Discovery medicine.2013;15(82):166-76.

[0269] Motzer RJ,Rini BI,McDermott DF,Redman BG,Kuzel TM,Harrison MR,Vaishampayan UN,Drabkin HA,George S,Logan TF,Margolin KA,Plimack ER,Lambert AM,Waxman IM,Hammers HJ.Nivolumab for Metastatic Renal Cell Carcinoma:Results of a Randomized Phase II Trial.Journal of clinical oncology:official journal of the American Society of Clinical Oncology.2015;33(13):1430-7.

[0270] Nelson AL,Dhimolea E,Reichert JM.Development trends for human monoclonal antibody therapeutics.Nature reviews Drug discovery.2010;9(10):767-74.

[0271] Novotny J,Handschumacher M,Haber E,Bruccoleri RE,Carlson WB,Fanning DW,Smith JA,Rose GD.Antigenic determinants in proteins coincide with surface regions accessible to large probes(antibody domains).Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.1986;83(2):226-30.

[0272] Oshima RG,Lesperance J,Munoz V,Hebbard L,Ranscht B,Sharan N,Muller WJ,Hauser CA,Cardiff RD.Angiogenic acceleration of Neu induced mammary tumor progression and metastasis.Cancer Res.2004;64(1):169-79.Epub 2004/01/20.

[0273] Preston,C.C.,等人,The ratios of CD8+T cells to CD4+CD25+ FOXP3+ and FOXP3-T cells correlate with poor clinical outcome in human serous ovarian cancer.PLoS One,2013.8(11):p.e80063.

[0274] Rizvi NA,Mazieres J,Planchard D,Stinchcombe TE,Dy GK,Antonia SJ,Horn L,Lena H,Minenza E,Mennecier B,Otterson GA,Campos LT,Gandara DR,Levy BP,Nair SG,Zalcman G,Wolf J,Souquet PJ,Baldini E,Cappuzzo F,Chouaid C,Dowlati A,Sanborn R,Lopez-Chavez A,Grohe C,Huber RM,Harbison CT,Baudelet C,Lestini BJ,Ramalingam SS.Activity and safety of nivolumab,an anti-PD-1 immune checkpoint inhibitor,for patients with advanced,refractory squamous non-small-cell lung cancer (CheckMate 063):a phase 2,single-arm trial.The Lancet Oncology.2015;16(3):257-65.

[0275] Rose GD,Geselowitz AR,Lesser GJ,Lee RH,Zehfus MH.Hydrophobicity of amino acid residues in globular proteins.Science.1985;229(4716):834-8.

[0276] Roskoski R,Jr.The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer.Pharmacological research:the official journal of the Italian Pharmacological Society.2014;79:34-74.Epub 2013/11/26.

[0277] Sharma P,Allison JP.The future of immune checkpoint therapy.Science.2015;348(6230):56-61.

[0278] Shinohara T,Taniwaki M,Ishida Y,Kawaichi M,Honjo T.Structure and chromosomal localization of the human PD-1 gene(PDCD1).Genomics.1994;23(3):704-6.

[0279] Srinivasan M,Gienapp IE,Stuckman SS,Rogers CJ,Jewell SD,Kaumaya PT,Whitacre CC.Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis using

peptide mimics of CD28.J Immunol.2002;169(4):2180-8.Epub 2002/08/08.

[0280] Srinivasan M,Wardrop RM,Gienapp IE,Stuckman SS,Whitacre CC,Kaumaya PT.A retro-inverso peptide mimic of CD28 encompassing the MYPPPY motif adopts a polyproline type II helix and inhibits encephalitogenic T cells in vitro.J Immunol.2001;167(1):578-85.

[0281] Steele JT,Allen SD,Kaumaya PTP.Cancer Immunotherapy with Rationally Designed Synthetic Peptides.Handbook of Biologically Active Peptides2006.p.491-8.

[0282] Sundaram R,Dakappagari NK,Kaumaya PTP.Synthetic peptides as cancer vaccines.Biopolymers-Peptide Science Section.2002;66(3):200-16.

[0283] Thornton JM,Edwards MS,Taylor WR,Barlow DJ.Location of'continuous' antigenic determinants in the protruding regions of proteins.The EMBO journal.1986;5(2):409-13.

[0284] Topalian SL,Drake CG,Pardoll DM.Immune checkpoint blockade:a common denominator approach to cancer therapy.Cancer cell.2015;27(4):450-61.

[0285] Topalian SL,Hodi FS,Brahmer JR,Gettinger SN,Smith DC,McDermott DF,Powderly JD,Carvajal RD,Sosman JA,Atkins MB,Leming PD,Spigel DR,Antonia SJ,Horn L,Drake CG,Pardoll DM,Chen L,Sharfman WH,Anders RA,Taube JM,McMiller TL,Xu H,Korman AJ,Jure-Kunkel M,Agrawal S,McDonald D,Kollia GD,Gupta A,Wigginton JM,Sznol M.Safety,activity,and immune correlates of anti-PD-1antibody in cancer.The New England journal of medicine.2012;366(26):2443-54.

[0286] Vicari D,Foy KC,Liotta EM,Kaumaya PT.Engineered Conformation-dependent VEGF Peptide Mimics Are Effective in Inhibiting VEGF Signaling Pathways.J Biol Chem.286(15):13612-25.Epub 2011/02/16.

[0287] Wang B,Kaumaya PT,Cohn DE.Immunization with synthetic VEGF peptides in ovarian cancer.Gynecol Oncol.2010;119(3):564-70.

[0288] Welling GW,Weijer WJ,van der Zee R,Welling-Wester S.Prediction of sequential antigenic regions in proteins.FEBS letters.1985;188(2):215-8.

[0289] Yarden Y,Sliwkowski MX.Untangling the ErbB signalling network.Nature reviews Molecular cell biology.2001;2(2):127-37.Epub 2001/03/17.

[0290] Zak KM,Kitel R,Przetocka S,Golik P,Guzik K,Musielak B,Domling A,Dubin G,Holak TA.Structure of the Complex of Human Programmed Death 1,PD-1,and Its Ligand PD-L1.Structure.2015;23(12):2341-8.

[0291] Zhu Z,Witte L.Inhibition of tumor growth and metastasis by targeting tumor-associated angiogenesis with antagonists to the receptors of vascular endothelial growth factor.Investigational new drugs.1999;17(3):195-212.Epub 2000/02/09.

[0292] F.序列

[0293] SEQ ID NO:1人PD1残基1-128

[0294] PPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAFPEDRSQPGQDCRFRVTQLPN GRDFHMSVVRARRNDSGTYLCGAISLAPKLQIKESLRAERVTERRAEVPTAHPSPSP

[0295] SEQ ID NO:2PD1(32-50)

[0296] VLNWYRMSPSNQTDKLAAF

[0297] SEQ ID NO:3PD1(45-64)

[0298] KLAAFPEDRSQPGQDCRFR

[0299] SEQ ID NO:4PD1(73-90)

[0300] DFHMSVVRARRNDSGTYL

[0301] SEQ ID NO:5PD1(92-110)

[0302] GAISLAPKAQIKESLRAEL

[0303] SEQ ID NO:6麻疹病毒融合蛋白(MVF)

[0304] KLLSLIKGVIVHRLEGVE

[0305] SEQ ID NO:7接头

[0306] GPSL

[0307] SEQ ID NO:8MVF-PD1(32-50)

[0308] KLLSLIKGVIVHRLEGVEGPSLVLNWYRMSPSNQTDKLAAF

[0309] SEQ ID NO:9MVF-PD1(45-64)

[0310] KLLSLIKGVIVHRLEGVEGPSLKLAAFPEDRSQPGQDCRFR

[0311] SEQ ID NO:10MVF-PD1(73-90)

[0312] KLLSLIKGVIVHRLEGVEGPSLDFHMSVVRARRNDSGTYL

[0313] SEQ ID NO:11MVF-PD1(92-110)

[0314] KLLSLIKGVIVHRLEGVEGPSLGAISLAPKAQIKESLRAEL

[0315] SEQ ID NO:12PD1(32-50)D肽反向-翻转形式

[0316] FAALKDTQNSPSMRYWNLV

[0317] SEQ ID NO:13PD1(45-64)D肽反向-翻转形式

[0318] RFRCDQGPQSRDEPFAALK

[0319] SEQ ID NO:14PD1(73-90)D肽反向-翻转形式

[0320] LYTGSDNRRARVVSMHFD

[0321] SEQ ID NO:15PD1(92-110)D肽反向-翻转形式

[0322] LEARLSEKIQAKPALSIAG

[0323] SEQ ID NO:16MVF PD1(32-50)D肽反向-翻转形式

[0324] KLLSLIKGVIVHRLEGVEGPSLFAALKDTQNSPSMRYWNLV

[0325] SEQ ID NO:17MVF PD1(45-64)D肽反向-翻转形式

[0326] KLLSLIKGVIVHRLEGVEGPSLRFRCDQGPQSRDEPFAALK

[0327] SEQ ID NO:18MVF PD1(73-90)D肽反向-翻转形式

[0328] KLLSLIKGVIVHRLEGVEGPSLLYTGSDNRRARVVSMHFD

[0329] SEQ ID NO:19MVF PD1(92-110)D肽反向-翻转形式

[0330] KLLSLIKGVIVHRLEGVEGPSLLEARLSEKIQAKPALSIAG

[0331] SEQ ID NO:20TT

[0332] NSVDDALINSTIYSYFPSV

[0333] SEQ ID NO:21TT1

[0334] PGINGKAIHLVNNQSSE

[0335] SEQ ID NO:22P2

[0336] QYIKANSKFIGITEL

[0337] SEQ ID NO:23P30

[0338] FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE

[0339] SEQ ID NO:24MVF(天然)

[0340] LSEIKGVIVHRLEGV

[0341] SEQ ID NO:25HBV

[0342] FFLLTRILTIPQSLN

[0343] SEQ ID NO:26CSP

[0344] TCGVGVRVRSRVNAANKKPE

[0345] SEQ ID NO:27HER-2(266-296)

[0346] LHCPALVTYNTDTFESMPNPEGRYTFGASCV

[0347] SEQ ID NO:28MVF HER-2(266-296)

[0348] KLLSLIKGVIVHRLEGVEGPSLLHCPALVTYNTDTFESMPNPEGRYTFGASCV

[0349] SEQ ID NO:29HER-2(597-626)

[0350] VARCPSGVKPDLSYMPIWKFPDEEGACQPL

[0351] SEQ ID NO:30MVF HER-2(597-626)

[0352] KLLSLIKGVIVHRLEGVEGPSLVARCPSGVKPDLSYMPIWKFPDEEGACQPL

[0001] 序列表

[0002] <110> 俄亥俄州创新基金会(Ohio State Innovation Foundation)

[0003] <120> 人PD1肽疫苗及其用途

[0004] <130> 10336-315WO1

[0005] <160> 30

[0006] <170> PatentIn 3.5版

[0007] <210> 1

[0008] <211> 126

[0009] <212> PRT

[0010] <213> 人工序列

[0011] <220>

[0012] <223> 合成构建体

[0013] <400> 1

[0014] Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn

[0015] 1 5 10 15

[0016] Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu

[0017] 20 25 30

[0018] Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala Ala

[0019] 35 40 45

[0020] Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg Val

[0021] 50 55 60

[0022] Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg Ala

[0023] 65 70 75 80

[0024] Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu Ala

[0025] 85 90 95

[0026] Pro Lys Leu Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Arg Val Thr Glu

[0027] 100 105 110

[0028] Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro

[0029] 115 120 125

[0030] <210> 2

[0031] <211> 19

[0032] <212> PRT

[0033] <213> 人工序列

[0034] <220>

[0035] <223> 合成构建体

[0036] <400> 2

[0037] Val Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu

[0038] 1 5 10 15

[0039] Ala Ala Phe

[0040] <210> 3

[0041] <211> 19

[0042] <212> PRT

[0043] <213> 人工序列

[0044] <220>

[0045] <223> 合成构建体

[0046] <400> 3

[0047] Lys Leu Ala Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys

[0048] 1 5 10 15

[0049] Arg Phe Arg

[0050] <210> 4

[0051] <211> 18

[0052] <212> PRT

[0053] <213> 人工序列

[0054] <220>

[0055] <223> 合成构建体

[0056] <400> 4

[0057] Asp Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr

[0058] 1 5 10 15

[0059] Tyr Leu

[0060] <210> 5

[0061] <211> 19

[0062] <212> PRT

[0063] <213> 人工序列

[0064] <220>

[0065] <223> 合成构建体

[0066] <400> 5

[0067] Gly Ala Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg

[0068] 1 5 10 15

[0069] Ala Glu Leu

[0070] <210> 6

[0071] <211> 18

[0072] <212> PRT

[0073] <213> 人工序列

[0074] <220>

[0075] <223> 合成构建体

[0076] <400> 6

[0077] Lys Leu Leu Ser Leu Ile Lys Gly Val Ile Val His Arg Leu Glu Gly

[0078] 1 5 10 15

[0079] Val Glu

[0080] <210> 7

[0081] <211> 4

[0082] <212> PRT

[0083] <213> 人工序列

[0084] <220>

[0085] <223> 合成构建体

[0086] <400> 7

[0087] Gly Pro Ser Leu

[0088] 1

[0089] <210> 8

[0090] <211> 41

[0091] <212> PRT

[0092] <213> 人工序列

[0093] <220>

[0094] <223> 合成构建体

[0095] <400> 8

[0096] Lys Leu Leu Ser Leu Ile Lys Gly Val Ile Val His Arg Leu Glu Gly

[0097] 1 5 10 15

[0098] Val Glu Gly Pro Ser Leu Val Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser

[0099] 20 25 30

[0100] Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala Ala Phe

[0101] 35 40

[0102] <210> 9

[0103] <211> 41

[0104] <212> PRT

[0105] <213> 人工序列

[0106] <220>

[0107] <223> 合成构建体

[0108] <400> 9

[0109] Lys Leu Leu Ser Leu Ile Lys Gly Val Ile Val His Arg Leu Glu Gly

[0110] 1 5 10 15

[0111] Val Glu Gly Pro Ser Leu Lys Leu Ala Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser

[0112] 20 25 30

[0113] Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg

[0114] 35 40

[0115] <210> 10

[0116] <211> 40

[0117] <212> PRT

[0118] <213> 人工序列

[0119] <220>

[0120] <223> 合成构建体

[0121] <400> 10

[0122] Lys Leu Leu Ser Leu Ile Lys Gly Val Ile Val His Arg Leu Glu Gly

[0123] 1 5 10 15

[0124] Val Glu Gly Pro Ser Leu Asp Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Arg

[0125] 20 25 30

[0126] Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Leu

[0127] 35 40

[0128] <210> 11

[0129] <211> 41

[0130] <212> PRT

[0131] <213> 人工序列

[0132] <220>

[0133] <223> 合成构建体

[0134] <400> 11

[0135] Lys Leu Leu Ser Leu Ile Lys Gly Val Ile Val His Arg Leu Glu Gly

[0136] 1 5 10 15

[0137] Val Glu Gly Pro Ser Leu Gly Ala Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ala Gln

[0138] 20 25 30

[0139] Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu

[0140] 35 40

[0141] <210> 12

[0142] <211> 19

[0143] <212> PRT

[0144] <213> 人工序列

[0145] <220>

[0146] <223> 合成构建体

[0147] <400> 12

[0148] Phe Ala Ala Leu Lys Asp Thr Gln Asn Ser Pro Ser Met Arg Tyr Trp

[0149] 1 5 10 15

[0150] Asn Leu Val

[0151] <210> 13

[0152] <211> 19

[0153] <212> PRT

[0154] <213> 人工序列

[0155] <220>

[0156] <223> 合成构建体

[0157] <400> 13

[0158] Arg Phe Arg Cys Asp Gln Gly Pro Gln Ser Arg Asp Glu Pro Phe Ala

[0159] 1 5 10 15

[0160] Ala Leu Lys

[0161] <210> 14

[0162] <211> 18

[0163] <212> PRT

[0164] <213> 人工序列

[0165] <220>

[0166] <223> 合成构建体

[0167] <400> 14

[0168] Leu Tyr Thr Gly Ser Asp Asn Arg Arg Ala Arg Val Val Ser Met His

[0169] 1 5 10 15

[0170] Phe Asp

[0171] <210> 15

[0172] <211> 19

[0173] <212> PRT

[0174] <213> 人工序列

[0175] <220>

[0176] <223> 合成构建体

[0177] <400> 15

[0178] Leu Glu Ala Arg Leu Ser Glu Lys Ile Gln Ala Lys Pro Ala Leu Ser

[0179] 1 5 10 15

[0180] Ile Ala Gly

[0181] <210> 16

[0182] <211> 41

[0183] <212> PRT

[0184] <213> 人工序列

[0185] <220>

[0186] <223> 合成构建体

[0187] <400> 16

[0188] Lys Leu Leu Ser Leu Ile Lys Gly Val Ile Val His Arg Leu Glu Gly

[0189] 1 5 10 15

[0190] Val Glu Gly Pro Ser Leu Phe Ala Ala Leu Lys Asp Thr Gln Asn Ser

[0191] 20 25 30

[0192] Pro Ser Met Arg Tyr Trp Asn Leu Val

[0193] 35 40

[0194] <210> 17

[0195] <211> 41

[0196] <212> PRT

[0197] <213> 人工序列

[0198] <220>

[0199] <223> 合成构建体

[0200] <400> 17

[0201] Lys Leu Leu Ser Leu Ile Lys Gly Val Ile Val His Arg Leu Glu Gly

[0202] 1 5 10 15

[0203] Val Glu Gly Pro Ser Leu Arg Phe Arg Cys Asp Gln Gly Pro Gln Ser

[0204] 20 25 30

[0205] Arg Asp Glu Pro Phe Ala Ala Leu Lys

[0206] 35 40

[0207] <210> 18

[0208] <211> 40

[0209] <212> PRT

[0210] <213> 人工序列

[0211] <220>

[0212] <223> 合成构建体

[0213] <400> 18

[0214] Lys Leu Leu Ser Leu Ile Lys Gly Val Ile Val His Arg Leu Glu Gly

[0215] 1 5 10 15

[0216] Val Glu Gly Pro Ser Leu Leu Tyr Thr Gly Ser Asp Asn Arg Arg Ala

[0217] 20 25 30

[0218] Arg Val Val Ser Met His Phe Asp

[0219] 35 40

[0220] <210> 19

[0221] <211> 41

[0222] <212> PRT

[0223] <213> 人工序列

[0224] <220>

[0225] <223> 合成构建体

[0226] <400> 19

[0227] Lys Leu Leu Ser Leu Ile Lys Gly Val Ile Val His Arg Leu Glu Gly

[0228] 1 5 10 15

[0229] Val Glu Gly Pro Ser Leu Leu Glu Ala Arg Leu Ser Glu Lys Ile Gln

[0230] 20 25 30

[0231] Ala Lys Pro Ala Leu Ser Ile Ala Gly

[0232] 35 40

[0233] <210> 20

[0234] <211> 19

[0235] <212> PRT

[0236] <213> 人工序列

[0237] <220>

[0238] <223> 合成构建体

[0239] <400> 20

[0240] Asn Ser Val Asp Asp Ala Leu Ile Asn Ser Thr Ile Tyr Ser Tyr Phe

[0241] 1 5 10 15

[0242] Pro Ser Val

[0243] <210> 21

[0244] <211> 17

[0245] <212> PRT

[0246] <213> 人工序列

[0247] <220>

[0248] <223> 合成构建体

[0249] <400> 21

[0250] Pro Gly Ile Asn Gly Lys Ala Ile His Leu Val Asn Asn Gln Ser Ser

[0251] 1 5 10 15

[0252] Glu

[0253] <210> 22

[0254] <211> 15

[0255] <212> PRT

[0256] <213> 人工序列

[0257] <220>

[0258] <223> 合成构建体

[0259] <400> 22

[0260] Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu

[0261] 1 5 10 15

[0262] <210> 23

[0263] <211> 21

[0264] <212> PRT

[0265] <213> 人工序列

[0266] <220>

[0267] <223> 合成构建体

[0268] <400> 23

[0269] Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser

[0270] 1 5 10 15

[0271] Ala Ser His Leu Glu

[0272] 20

[0273] <210> 24

[0274] <211> 15

[0275] <212> PRT

[0276] <213> 人工序列

[0277] <220>

[0278] <223> 合成构建体

[0279] <400> 24

[0280] Leu Ser Glu Ile Lys Gly Val Ile Val His Arg Leu Glu Gly Val

[0281] 1 5 10 15

[0282] <210> 25

[0283] <211> 15

[0284] <212> PRT

[0285] <213> 人工序列

[0286] <220>

[0287] <223> 合成构建体

[0288] <400> 25

[0289] Phe Phe Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile Pro Gln Ser Leu Asn

[0290] 1 5 10 15

[0291] <210> 26

[0292] <211> 20

[0293] <212> PRT

[0294] <213> 人工序列

[0295] <220>

[0296] <223> 合成构建体

[0297] <400> 26

[0298] Thr Cys Gly Val Gly Val Arg Val Arg Ser Arg Val Asn Ala Ala Asn

[0299] 1 5 10 15

[0300] Lys Lys Pro Glu

[0301] 20

[0302] <210> 27

[0303] <211> 31

[0304] <212> PRT

[0305] <213> 人工序列

[0306] <220>

[0307] <223> 合成构建体

[0308] <400> 27

[0309] Leu His Cys Pro Ala Leu Val Thr Tyr Asn Thr Asp Thr Phe Glu Ser

[0310] 1 5 10 15

[0311] Met Pro Asn Pro Glu Gly Arg Tyr Thr Phe Gly Ala Ser Cys Val

[0312] 20 25 30

[0313] <210> 28

[0314] <211> 53

[0315] <212> PRT

[0316] <213> 人工序列

[0317] <220>

[0318] <223> 合成构建体

[0319] <400> 28

[0320] Lys Leu Leu Ser Leu Ile Lys Gly Val Ile Val His Arg Leu Glu Gly

[0321] 1 5 10 15

[0322] Val Glu Gly Pro Ser Leu Leu His Cys Pro Ala Leu Val Thr Tyr Asn

[0323] 20 25 30

[0324] Thr Asp Thr Phe Glu Ser Met Pro Asn Pro Glu Gly Arg Tyr Thr Phe

[0325] 35 40 45

[0326] Gly Ala Ser Cys Val

[0327] 50

[0328] <210> 29

[0329] <211> 30

[0330] <212> PRT

[0331] <213> 人工序列

[0332] <220>

[0333] <223> 合成构建体

[0334] <400> 29

[0335] Val Ala Arg Cys Pro Ser Gly Val Lys Pro Asp Leu Ser Tyr Met Pro

[0336] 1 5 10 15

[0337] Ile Trp Lys Phe Pro Asp Glu Glu Gly Ala Cys Gln Pro Leu

[0338] 20 25 30

[0339] <210> 30

[0340] <211> 52

[0341] <212> PRT

[0342] <213> 人工序列

[0343] <220>

[0344] <223> 合成构建体

[0345] <400> 30

[0346] Lys Leu Leu Ser Leu Ile Lys Gly Val Ile Val His Arg Leu Glu Gly

[0347] 1 5 10 15

[0348] Val Glu Gly Pro Ser Leu Val Ala Arg Cys Pro Ser Gly Val Lys Pro

[0349] 20 25 30

[0350] Asp Leu Ser Tyr Met Pro Ile Trp Lys Phe Pro Asp Glu Glu Gly Ala

[0351] 35 40 45

[0352] Cys Gln Pro Leu

[0353] 50

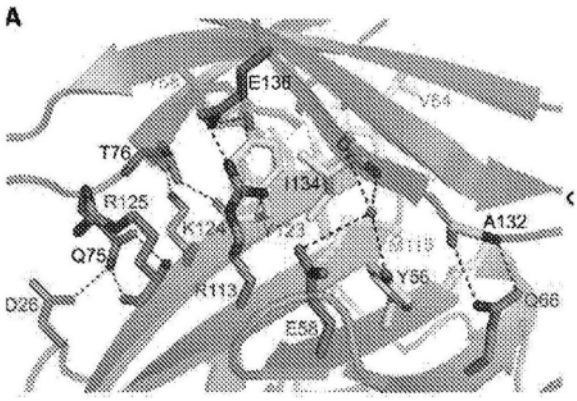

A
E136
T76
I134
R125
A132
Q75
Y56
R113
D26
Q66
E58

图1A

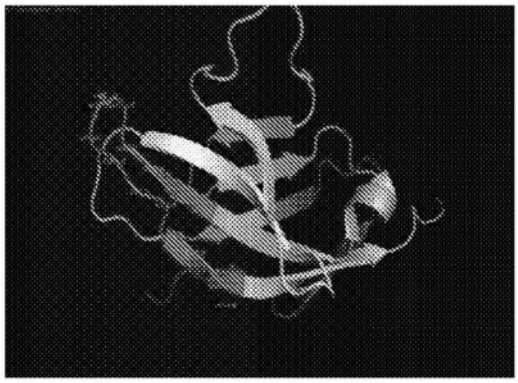


图1B

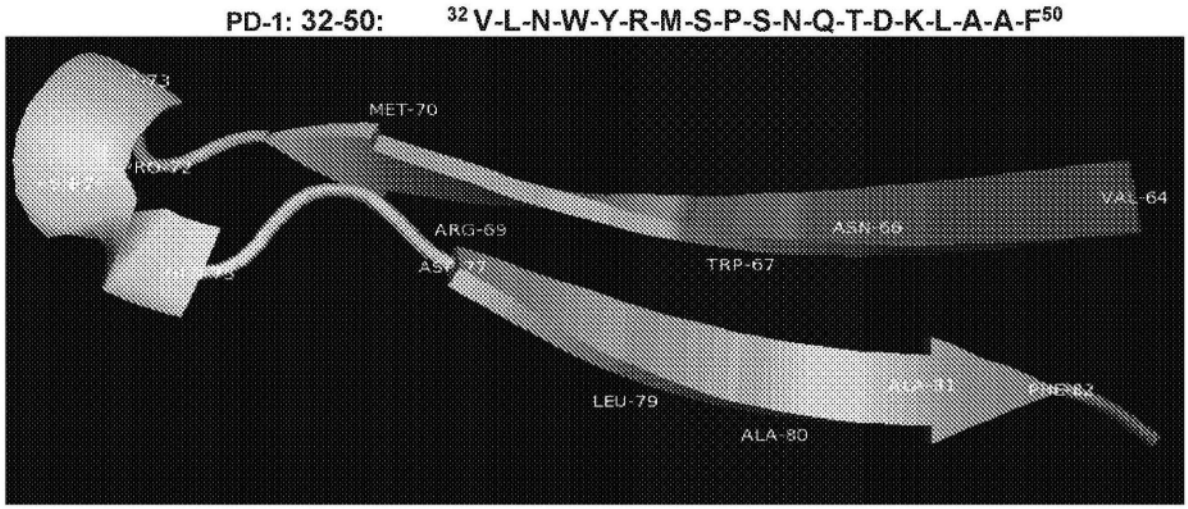

PD-1: 32-50: 32 V-L-N-W-Y-R-M-S-P-S-N-Q-T-D-K-L-A-A-F 50
MET-70
ARG-69
ASN-68
TRP-67
LEU-79
ALA-80

图2A

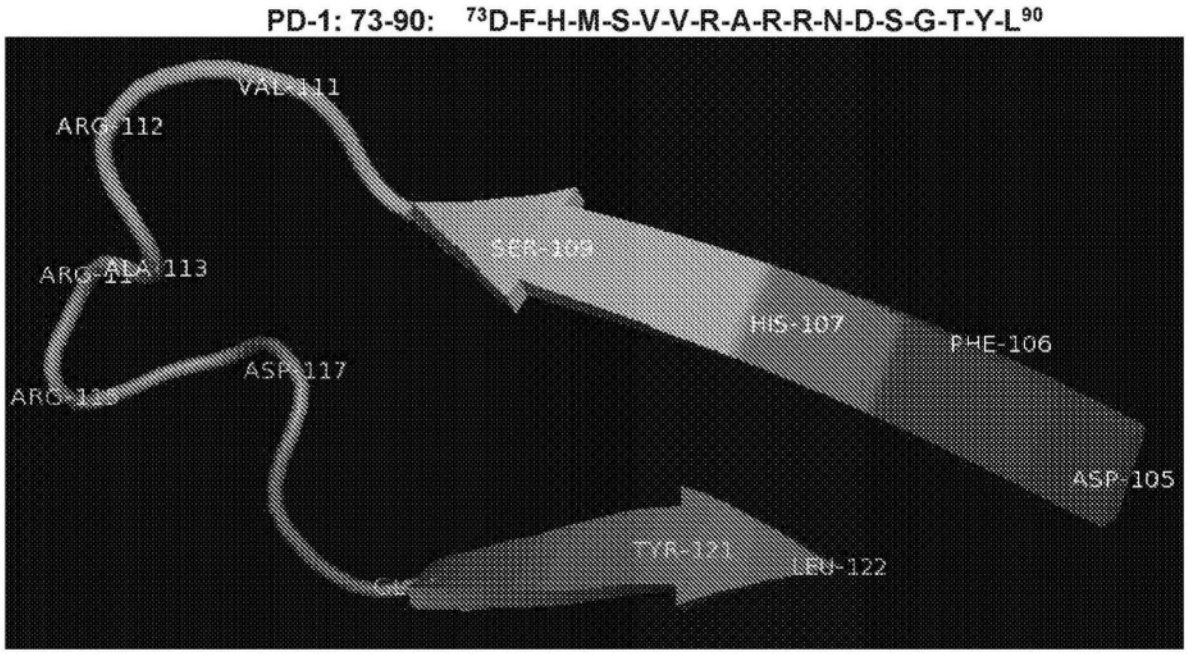

PD-1: 73-90: 73D-F-H-M-S-V-V-R-A-R-R-N-D-S-G-T-Y-L90
VAL-111
ARG-112
SER-109
ARG-113
HIS-107
PHE-106
ASP-117
ASP-105
TYR-121
LEU-122

图2B

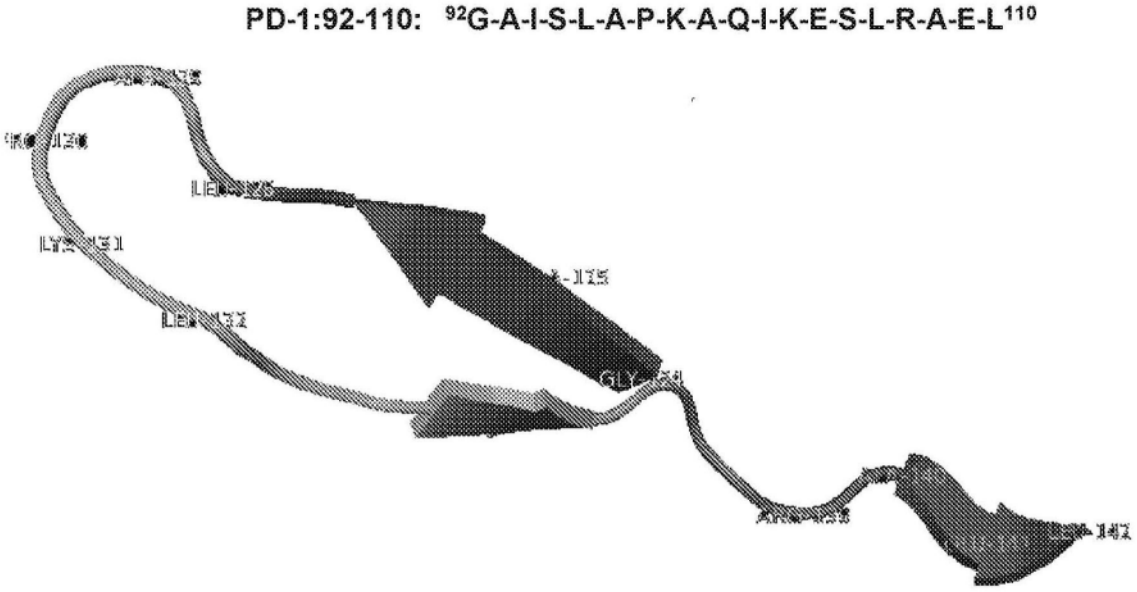

PD-1:92-110: 92G-A-I-S-L-A-P-K-A-Q-I-K-E-S-L-R-A-E-L110

图2C

图3A

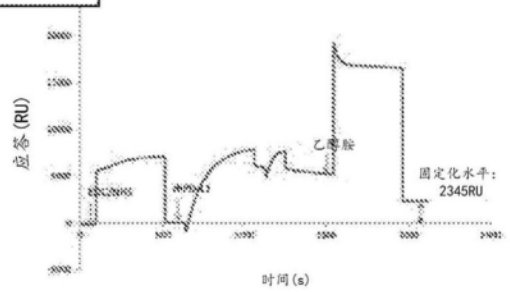


图3B

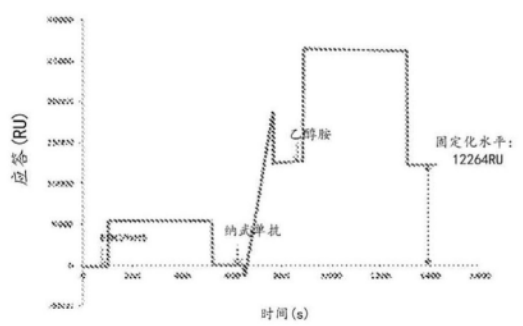


图3C

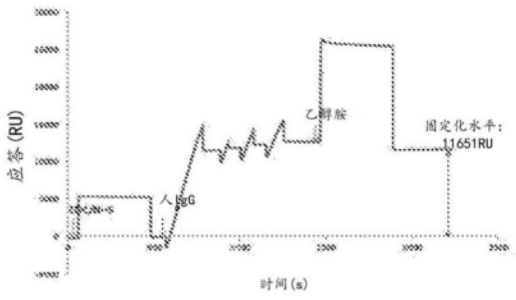


图3D

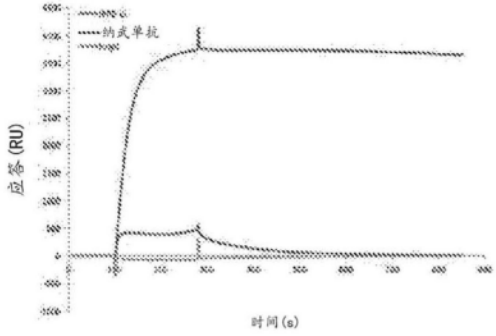


图3E

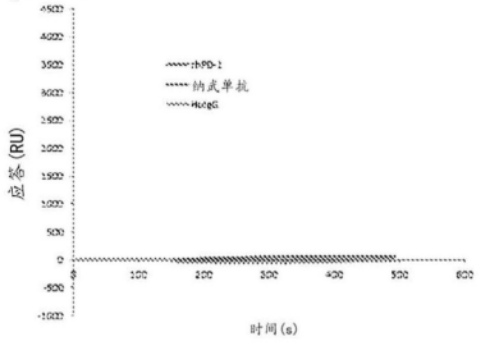


图4A

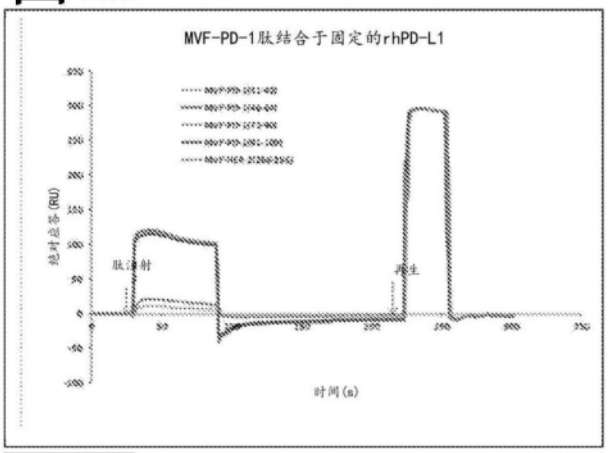


图4B

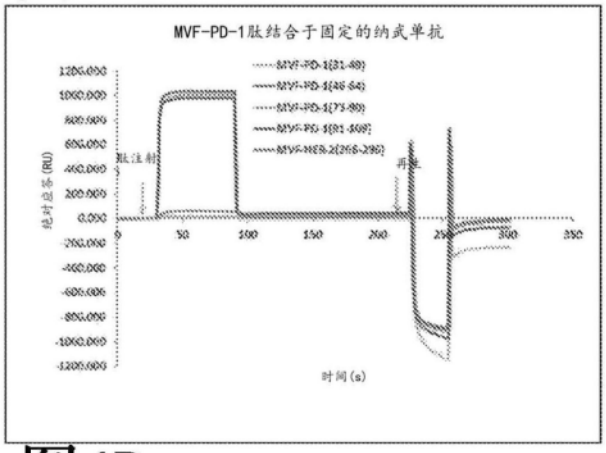


图4C

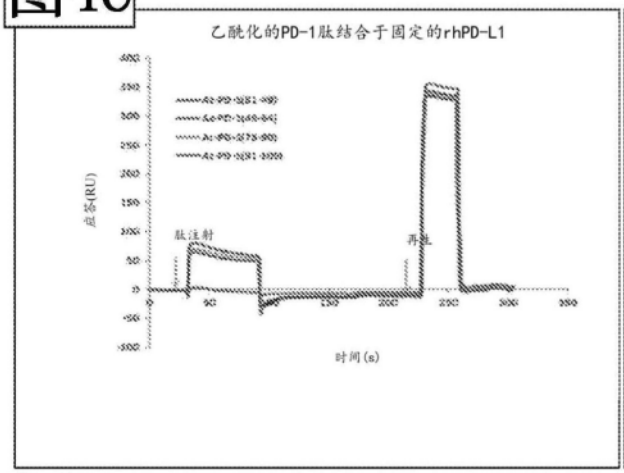


图4D

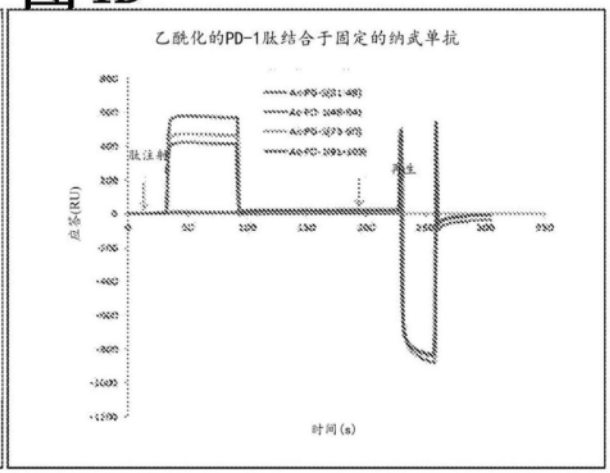


图4E

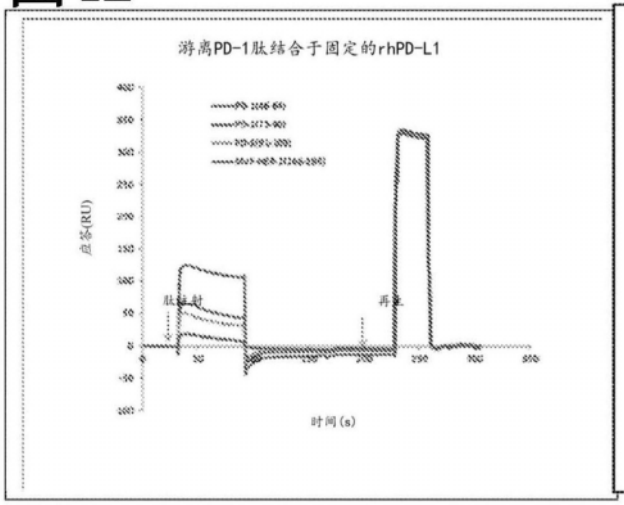
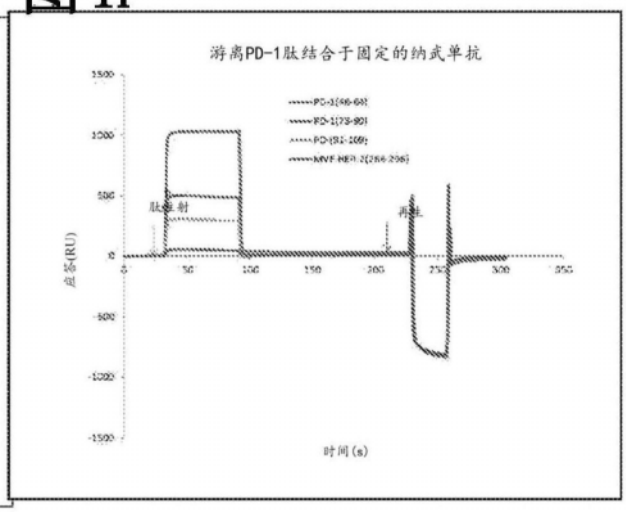


图4F



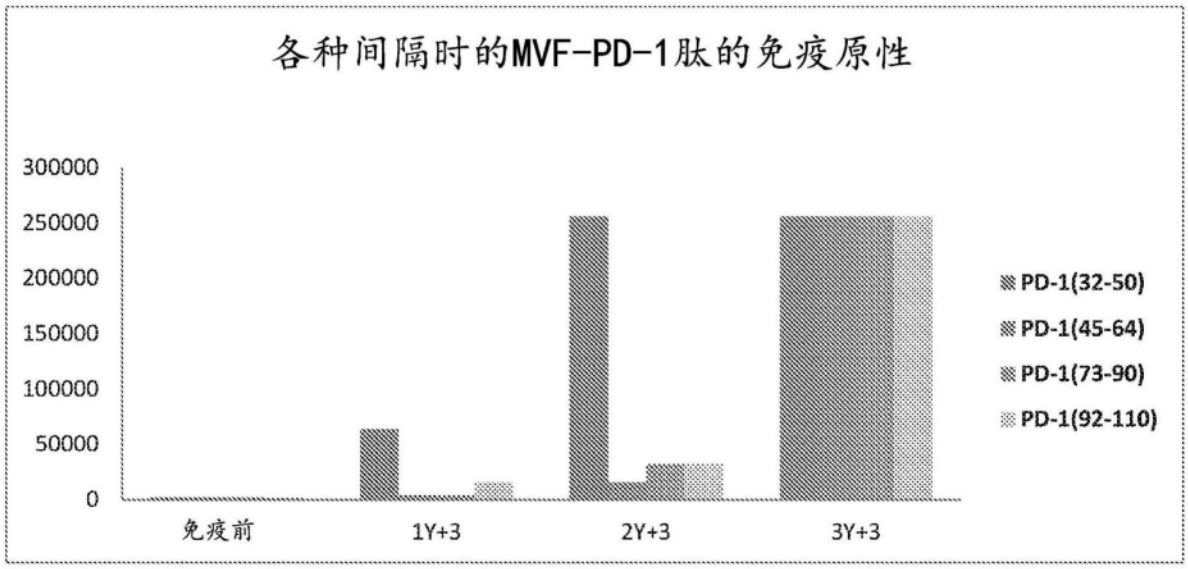

各种间隔时的MVF-PD-1肽的免疫原性
300000
250000
200000
150000
100000
50000
0
免疫前
1Y+3
2Y+3
3Y+3
PD-1(32-50)
PD-1(45-64)
PD-1(73-90)
PD-1(92-110)

图5A

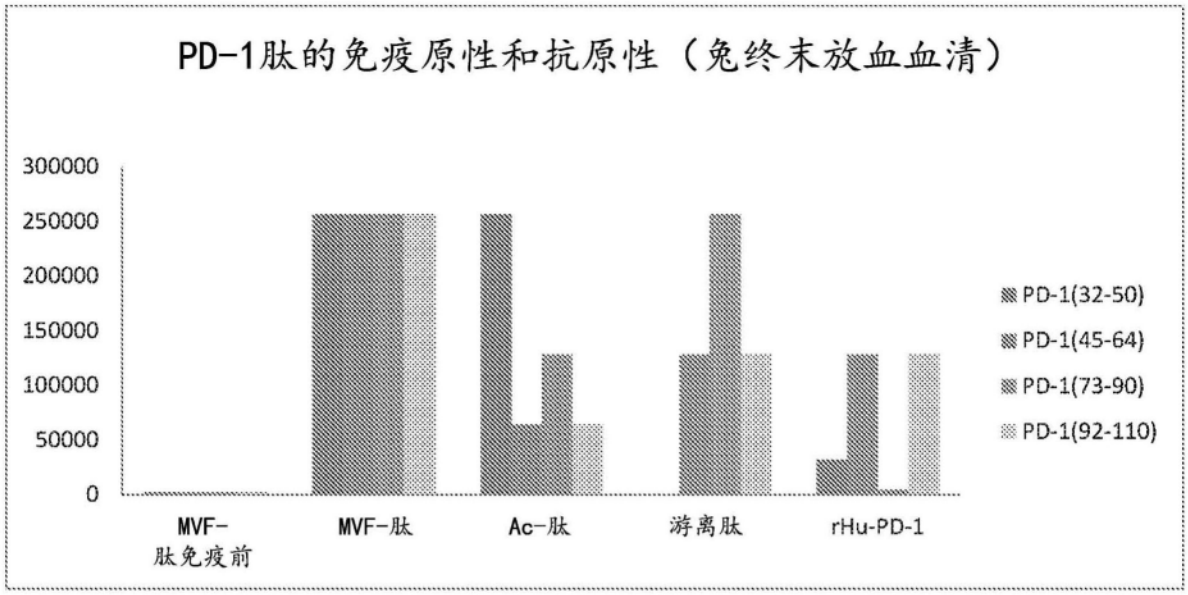

PD-1肽的免疫原性和抗原性（兔终末放血血清）
300000
250000
200000
150000
100000
50000
0
MVF-肽免疫前
MVF-肽
Ac-肽
游离肽
rHu-PD-1
PD-1(32-50)
PD-1(45-64)
PD-1(73-90)
PD-1(92-110)

图5B

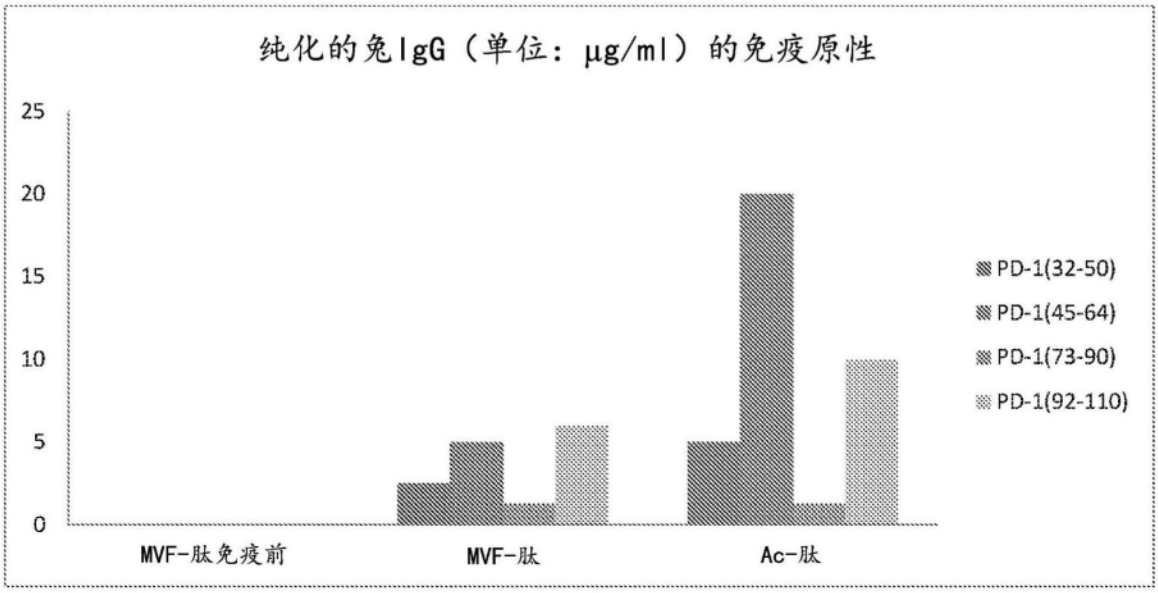

纯化的兔IgG（单位：μg/ml）的免疫原性
25
20
15
10
5
0
MVF-肽免疫前
MVF-肽
Ac-肽
PD-1(32-50)
PD-1(45-64)
PD-1(73-90)
PD-1(92-110)

图5C

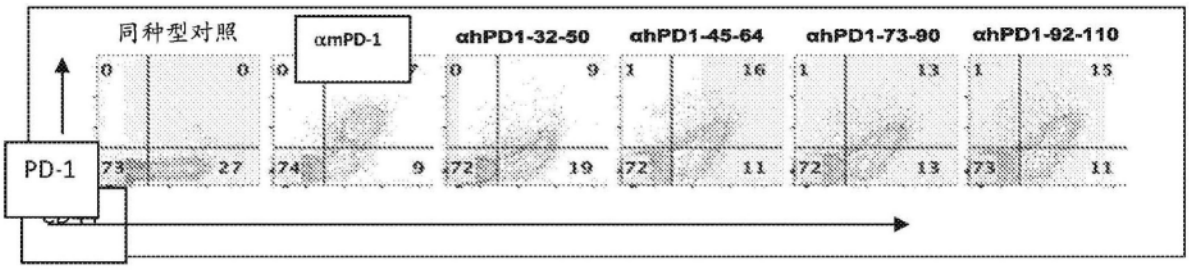

同种型对照
αmPD-1
αhPD1-32-50
αhPD1-45-64
αhPD1-73-90
αhPD1-92-110
PD-1
73
27
74
9
72
19
72
11
72
13
73
11

图6

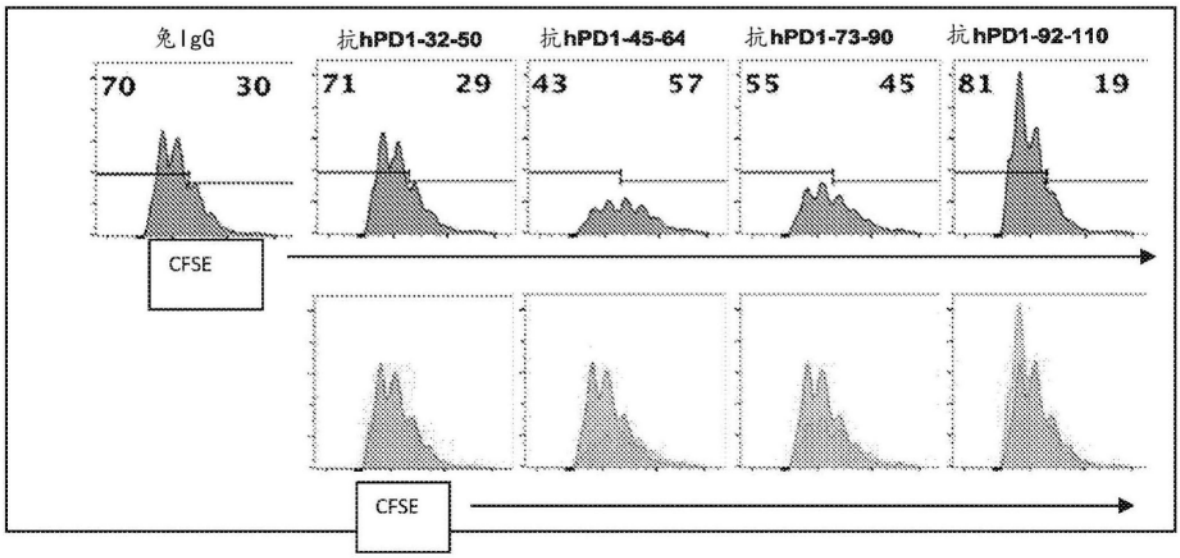

兔IgG
抗hPD1-32-50
抗hPD1-45-64
抗hPD1-73-90
抗hPD1-92-110
70
30
71
29
43
57
55
45
81
19
CFSE
CFSE

图7

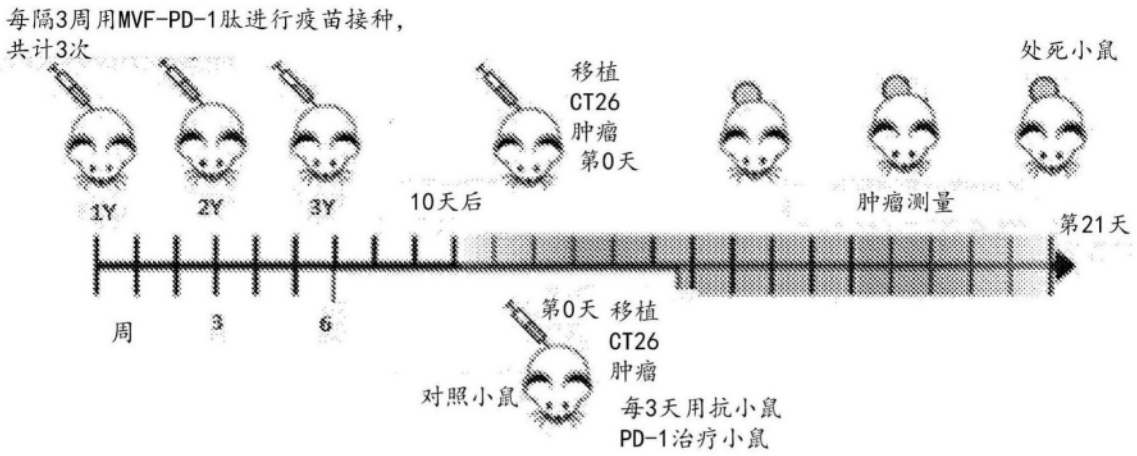

每隔3周用MVF-PD-1肽进行疫苗接种，
共计3次
1Y
2Y
3Y
移植
CT26
肿瘤
第0天
10天后
肿瘤测量
处死小鼠
第21天
周
3
6
第0天 移植
CT26
肿瘤
对照小鼠
每3天用抗小鼠
PD-1治疗小鼠

图8

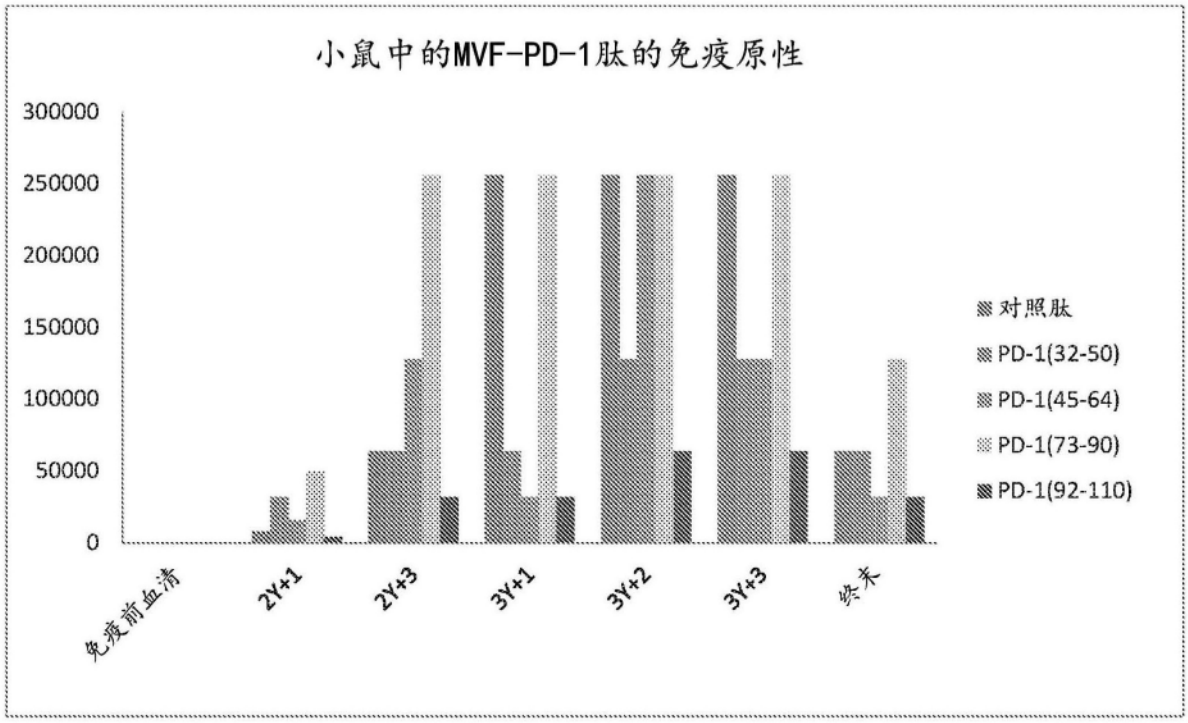


图9

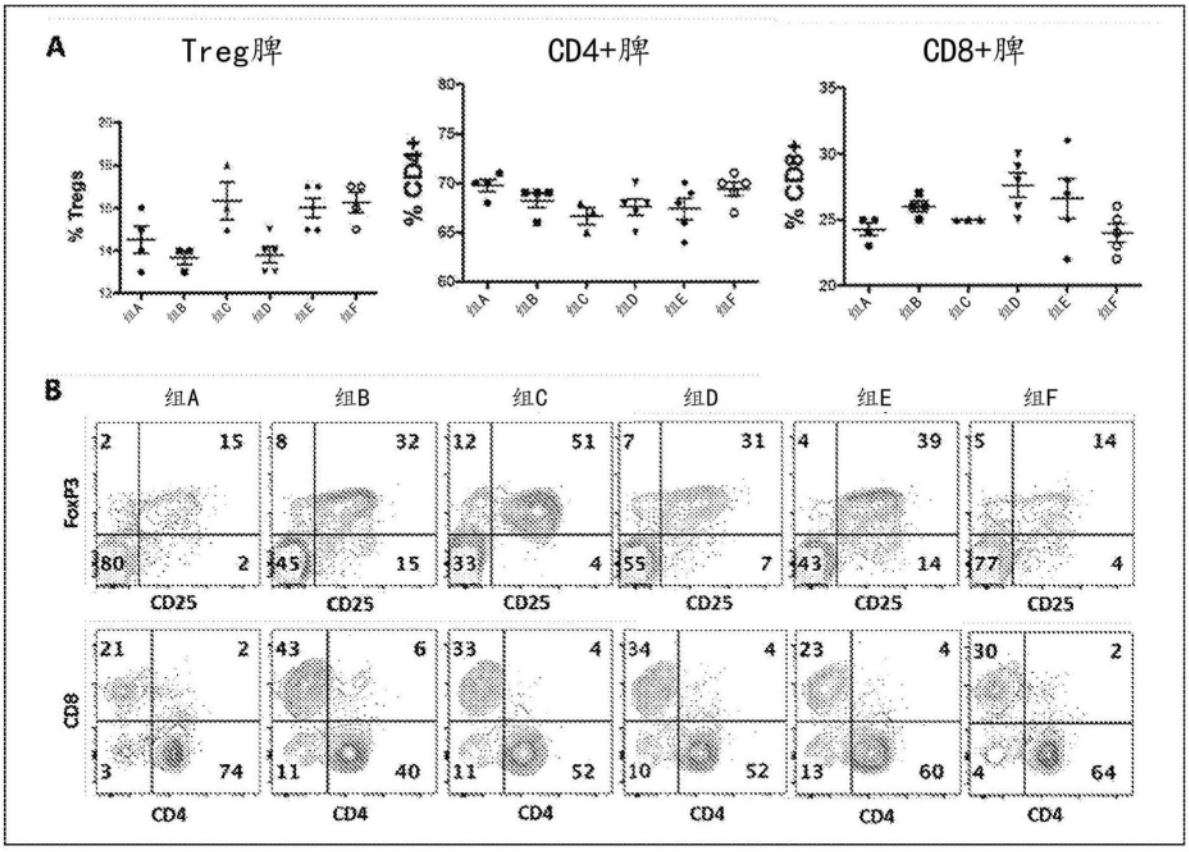


图10A至图10B

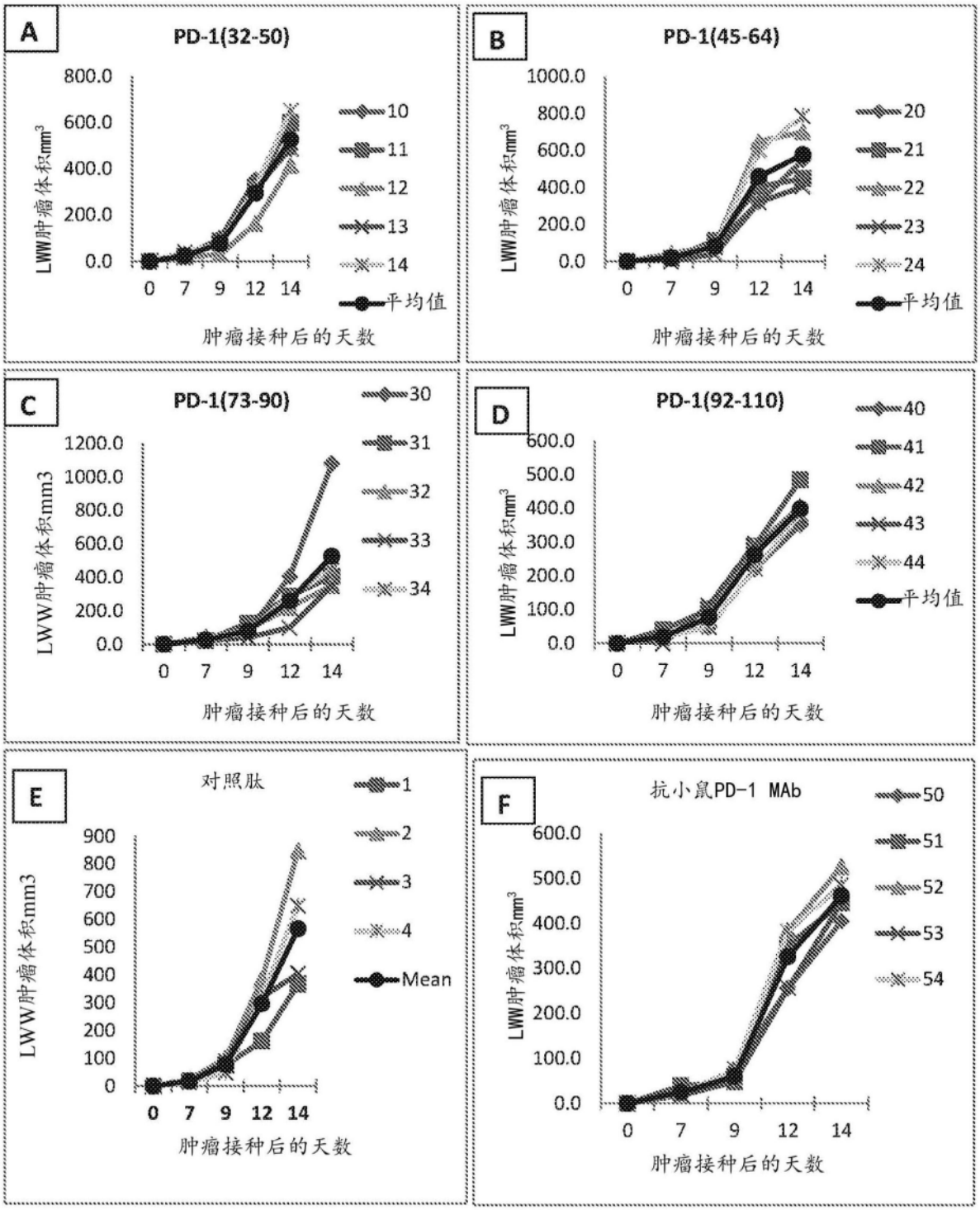

A
PD-1(32-50)
LWW肿瘤体积mm³
800.0
600.0
400.0
200.0
0.0
0 7 9 12 14
肿瘤接种后的天数
10
11
12
13
14
平均值
B
PD-1(45-64)
1000.0
800.0
600.0
400.0
200.0
0.0
20
21
22
23
24
平均值
C
PD-1(73-90)
LWW肿瘤体积mm3
1200.0
1000.0
800.0
600.0
400.0
200.0
0.0
30
31
32
33
34
D
PD-1(92-110)
600.0
500.0
400.0
300.0
200.0
100.0
0.0
40
41
42
43
44
平均值
E
对照肽
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
1
2
3
4
Mean
F
抗小鼠PD-1 MAb
50
51
52
53
54

图11A至图11F

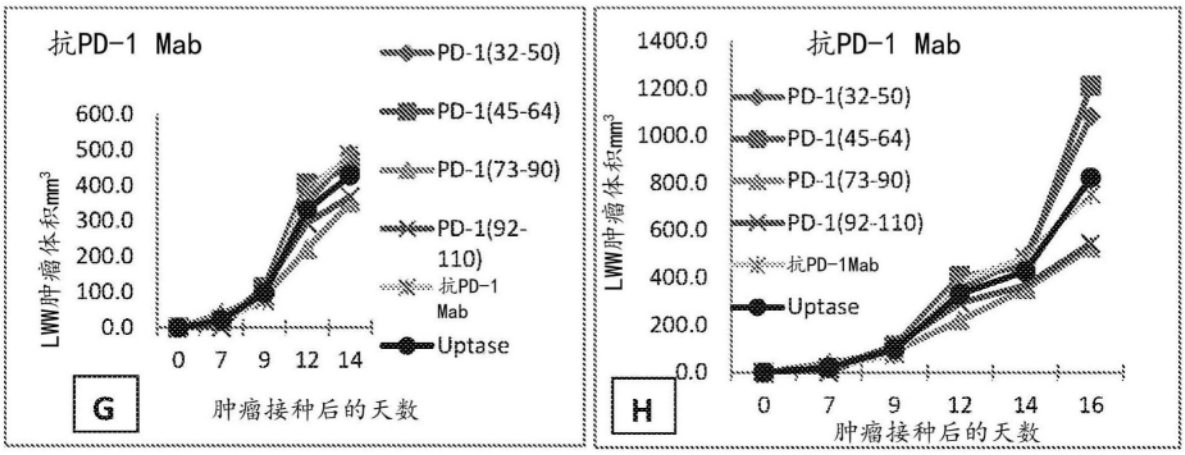


图11G至图11H

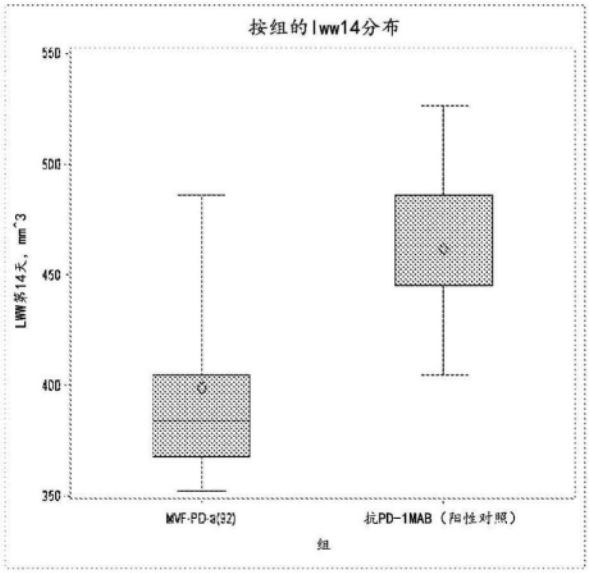


图12A

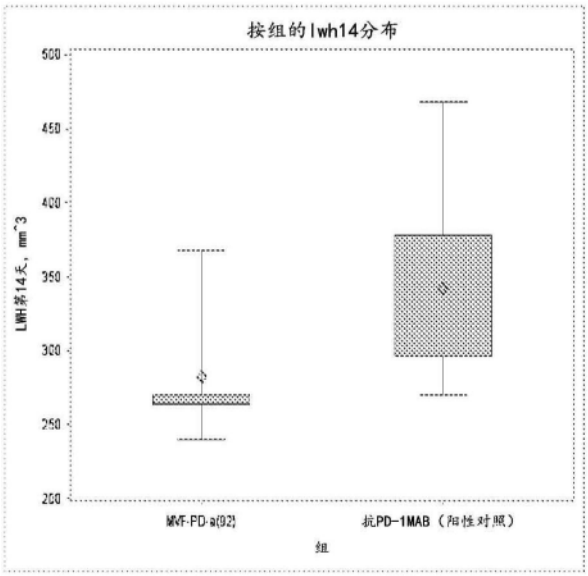

按组的lwh14分布
LWH第14天, mm^3
500
450
400
350
300
250
200
MVF-PD-a(92)
抗PD-1MAB（阳性对照）
组

图12B

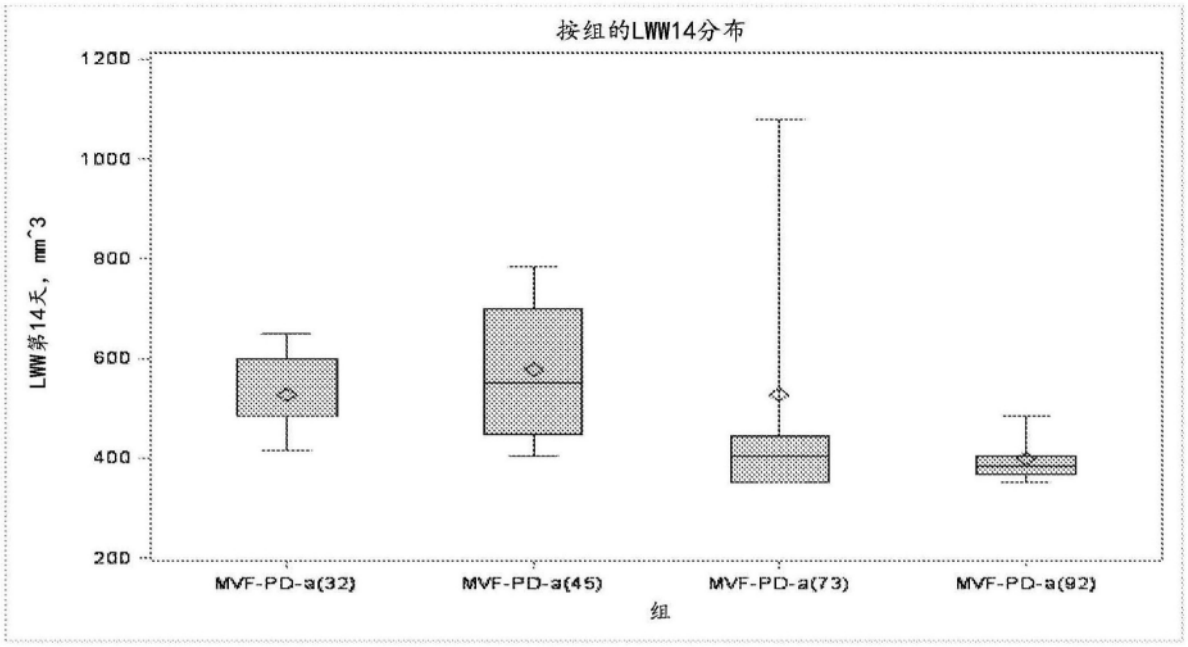

按组的LWW14分布
LWW第14天, mm^3
1200
1000
800
600
400
200
MVF-PD-a(32)
MVF-PD-a(45)
MVF-PD-a(73)
MVF-PD-a(92)
组

图12C

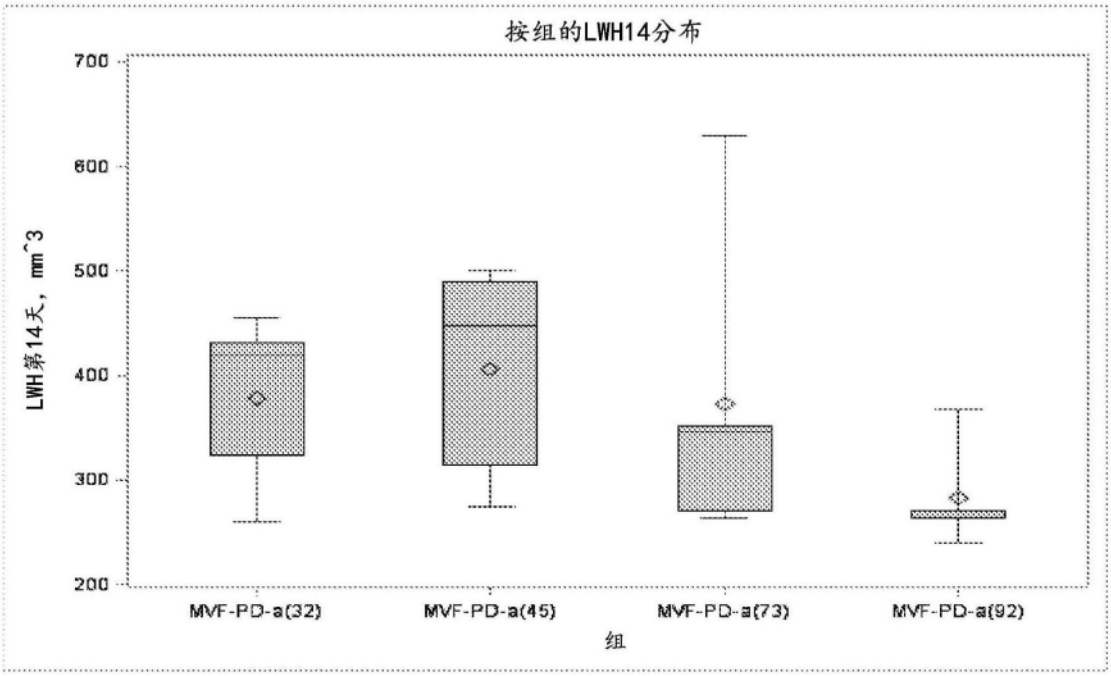

按组的LWH14分布
700
600
500
400
300
200
LWH第14天，mm^3
MVF-PD-a(32)
MVF-PD-a(45)
MVF-PD-a(73)
MVF-PD-a(92)
组

图12D

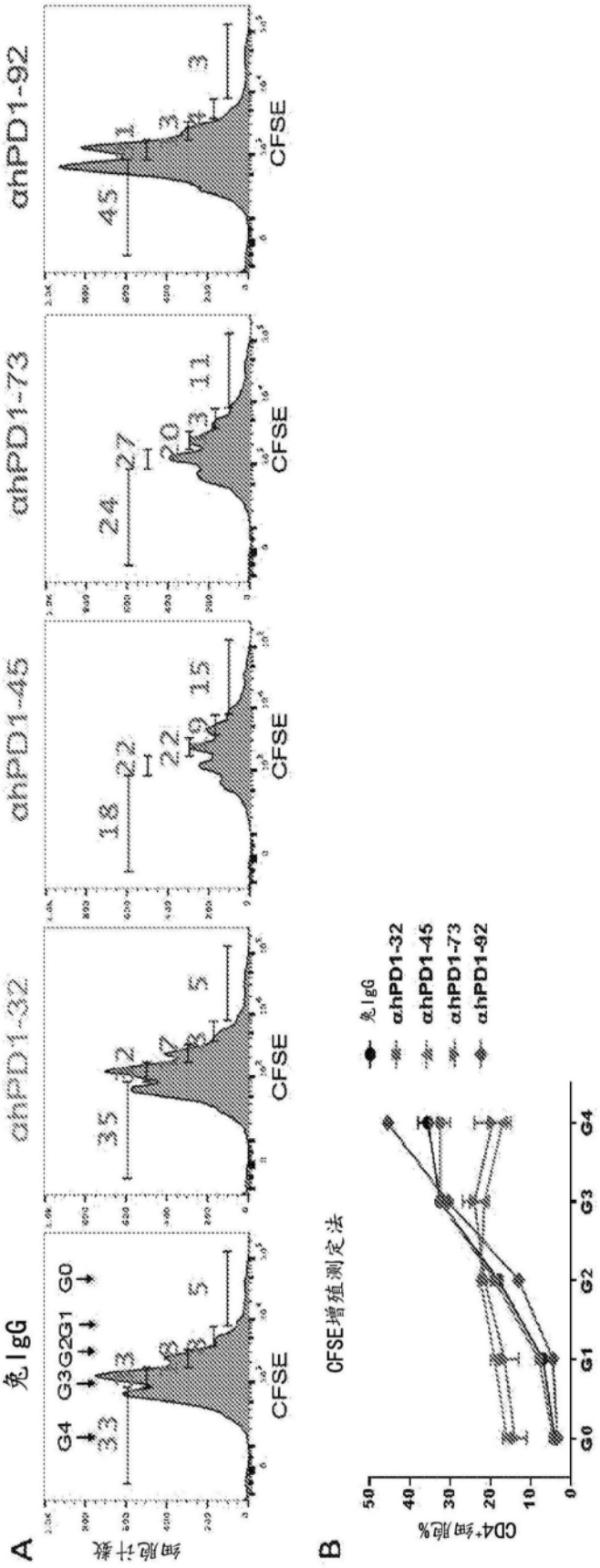

A
兔IgG
αhPD1-32
αhPD1-45
αhPD1-73
αhPD1-92
细胞计数
CFSE
G4
G3
G2
G1
G0
33
3
3
3
5
35
2
7
3
5
18
22
22
12
15
24
27
20
3
11
45
1
3
3
B
CFSE增殖测定法
兔IgG
αhPD1-32
αhPD1-45
αhPD1-73
αhPD1-92
CD4+细胞%
0
10
20
30
40
50
G0
G1
G2
G3
G4

图13A和图13B

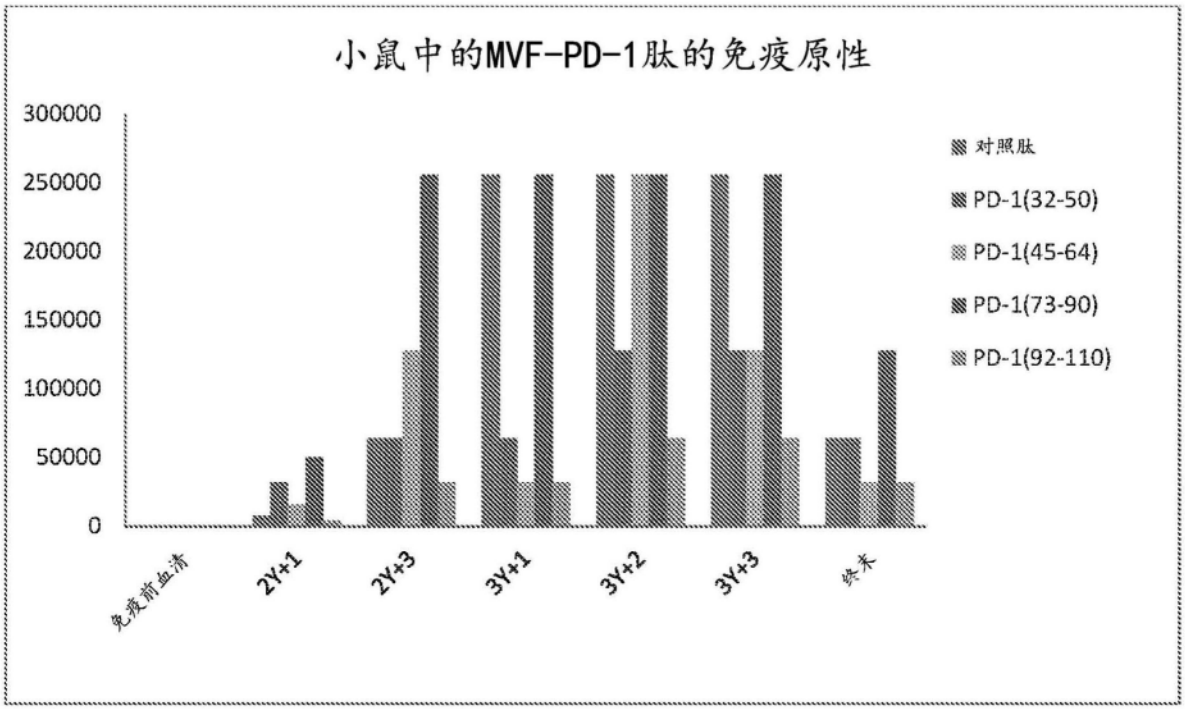

小鼠中的MVF-PD-1肽的免疫原性
300000
250000
200000
150000
100000
50000
0
免疫前血清
2Y+1
2Y+3
3Y+1
3Y+2
3Y+3
终末
对照肽
PD-1(32-50)
PD-1(45-64)
PD-1(73-90)
PD-1(92-110)

图14

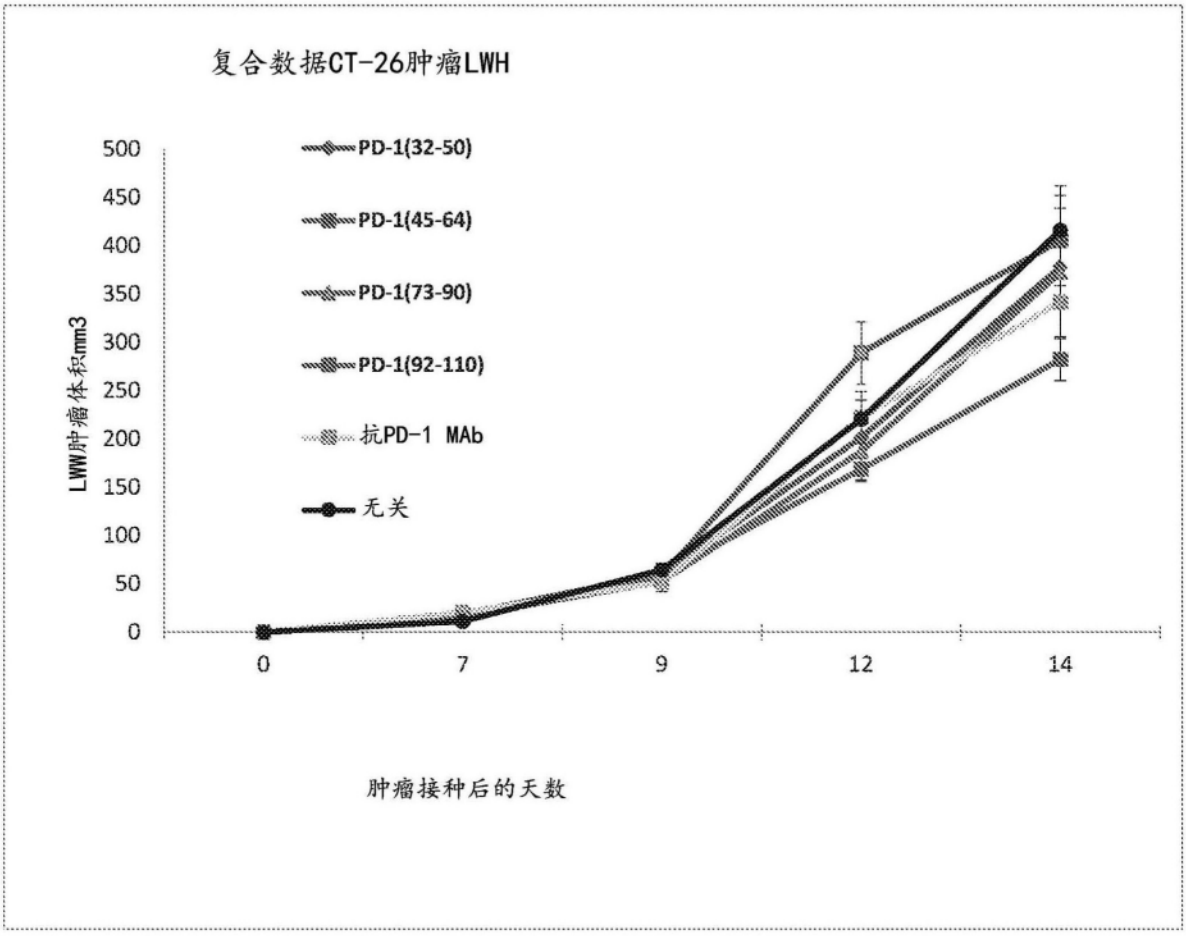

复合数据CT-26肿瘤LWH
LWW肿瘤体积mm3
500
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
PD-1(32-50)
PD-1(45-64)
PD-1(73-90)
PD-1(92-110)
抗PD-1 MAb
无关
0
7
9
12
14
肿瘤接种后的天数

图15

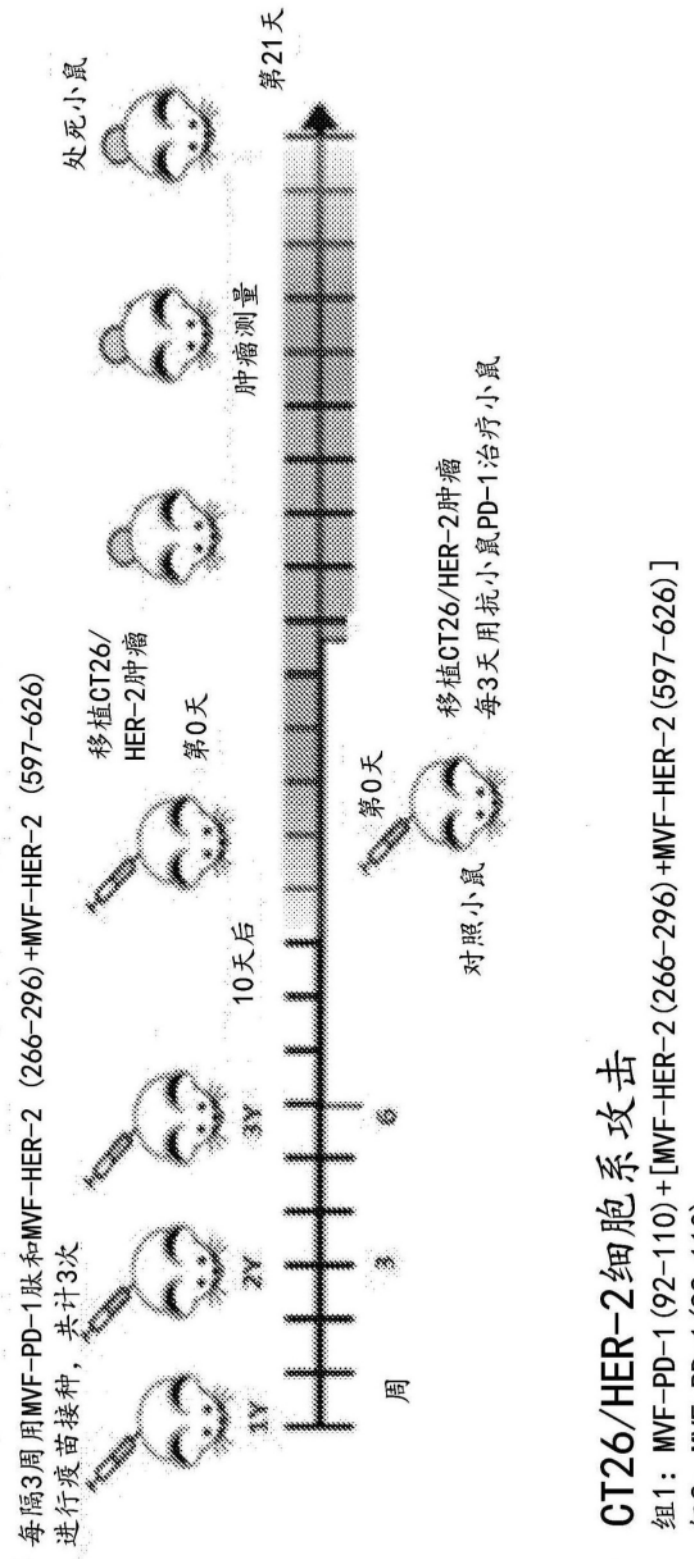

每隔3周用MVF-PD-1肽和MVF-HER-2 (266-296)+MVF-HER-2 (597-626)
进行疫苗接种，共计3次
1Y
2Y
3Y
周
3
6
10天后
移植CT26/
HER-2肿瘤
第0天
肿瘤测量
第21天
处死小鼠
第0天
对照小鼠
移植CT26/HER-2肿瘤
每3天用抗小鼠PD-1治疗小鼠
CT26/HER-2细胞系攻击
组1：MVF-PD-1 (92-110)+[MVF-HER-2 (266-296)+MVF-HER-2 (597-626)]
组2：MVF-PD-1 (92-110)
组3：MVF-Uptase（-ve对照）
组4：大鼠-α小鼠PD-1（+对照）
组0：PBS治疗（-ve对照）

图16

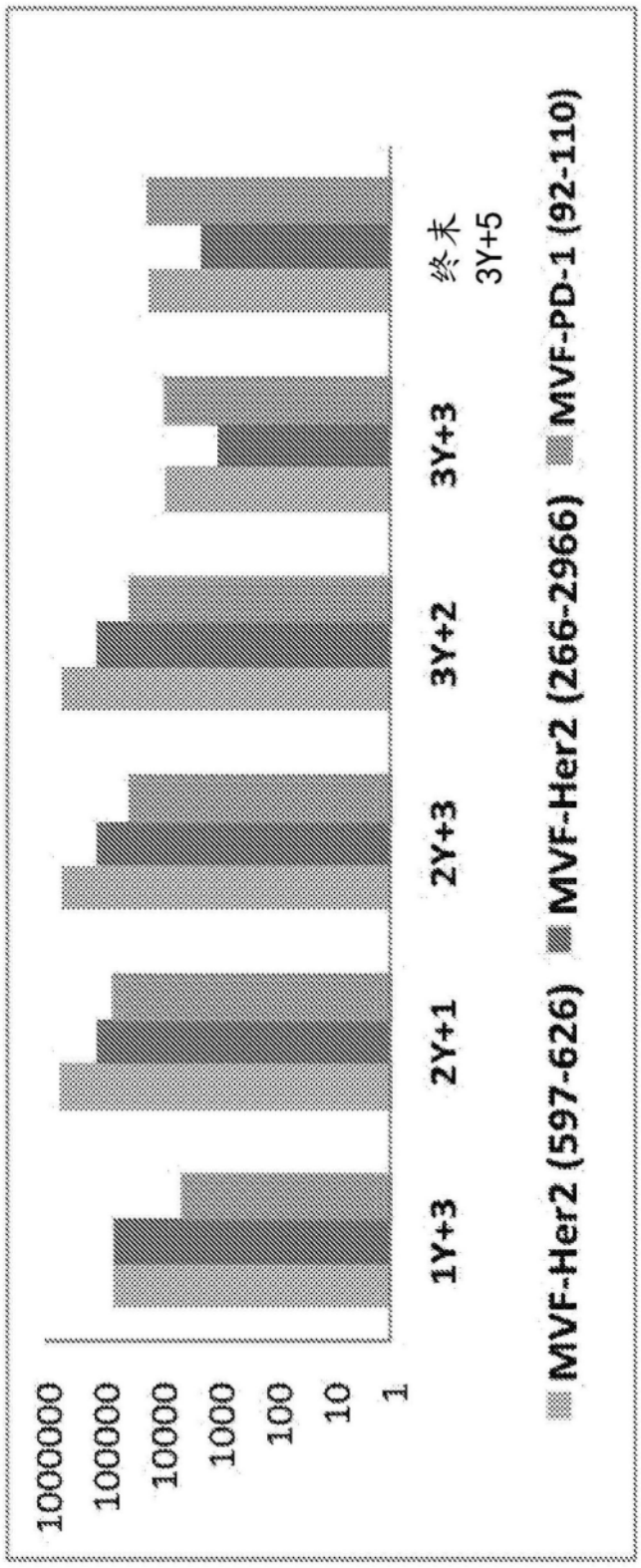

1000000
100000
10000
1000
100
10
1
1Y+3
2Y+1
2Y+3
3Y+2
3Y+3
终末
3Y+5
MVF-Her2 (597-626)
MVF-Her2 (266-2966)
MVF-PD-1 (92-110)

图17

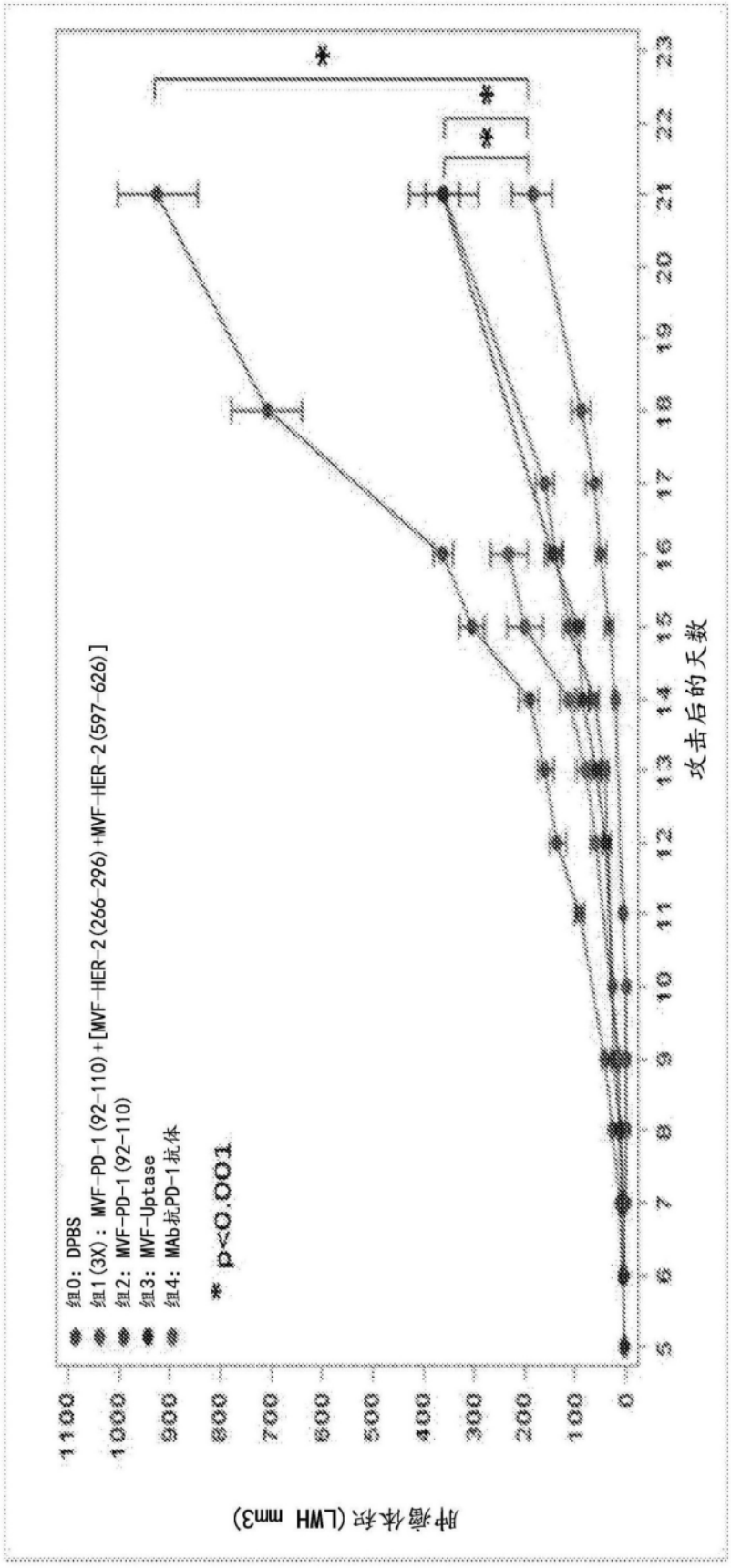

肿瘤体积 (LWH mm3)
攻击后的天数
组0: DPBS
组1 (3X): MVF-PD-1 (92-110) + [MVF-HER-2 (266-296) +MVF-HER-2 (597-626)]
组2: MVF-PD-1 (92-110)
组3: MVF-Uptase
组4: MAb抗PD-1抗体
* p<0.001

图18

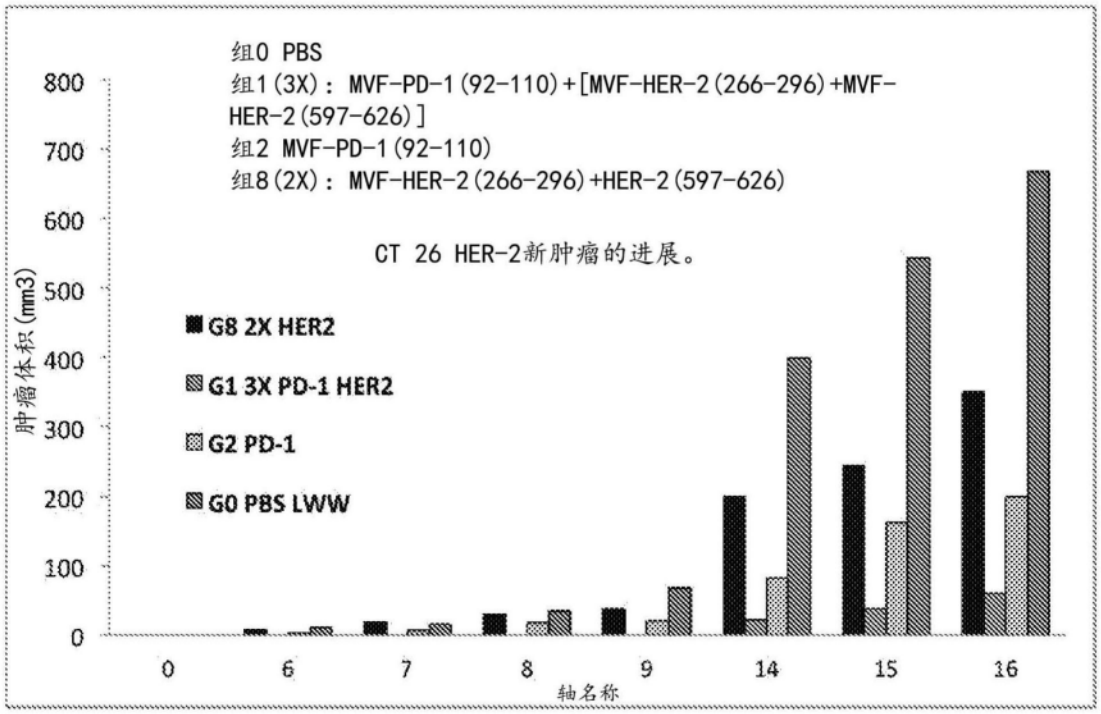

组0 PBS
组1 (3X)： MVF-PD-1 (92-110) +[MVF-HER-2 (266-296) +MVF-HER-2 (597-626)]
组2 MVF-PD-1 (92-110)
组8 (2X)： MVF-HER-2 (266-296) +HER-2 (597-626)
CT 26 HER-2新肿瘤的进展。
G8 2X HER2
G1 3X PD-1 HER2
G2 PD-1
G0 PBS LWW
肿瘤体积 (mm3)
800
700
600
500
400
300
200
100
0
0
6
7
8
9
14
15
16
轴名称

图19A

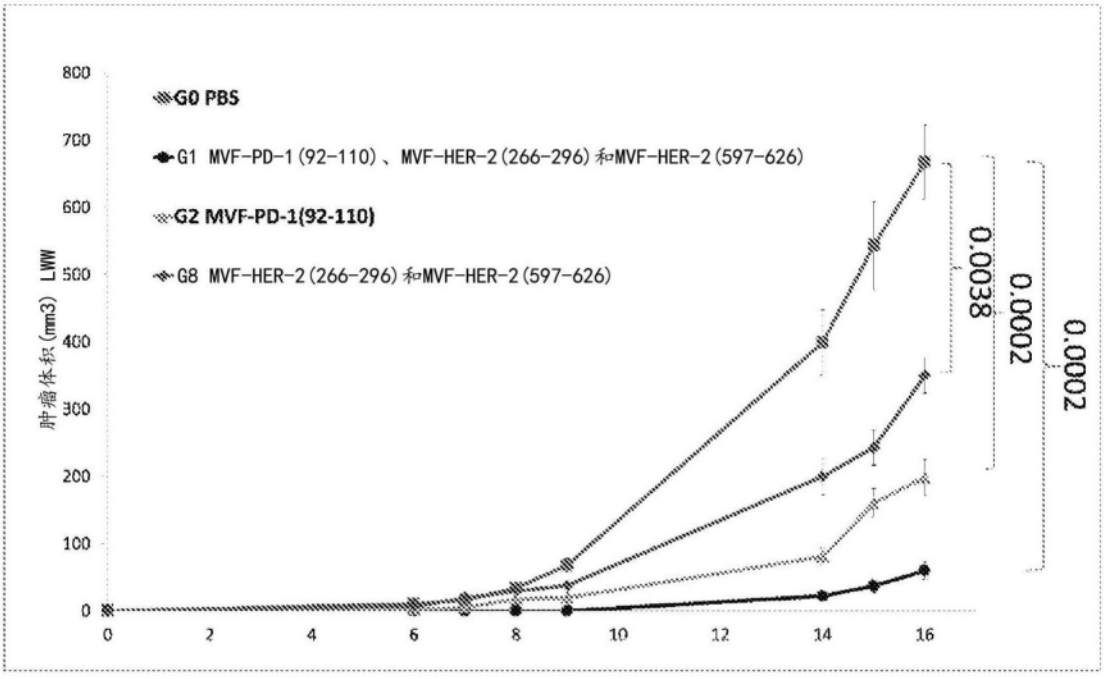

G0 PBS
G1 MVF-PD-1 (92-110) 、MVF-HER-2 (266-296) 和MVF-HER-2 (597-626)
G2 MVF-PD-1(92-110)
G8 MVF-HER-2 (266-296) 和MVF-HER-2 (597-626)
肿瘤体积 (mm3) LWW
800
700
600
500
400
300
200
100
0
0
2
4
6
8
10
12
14
16
0.0038
0.0002
0.0002

图19B

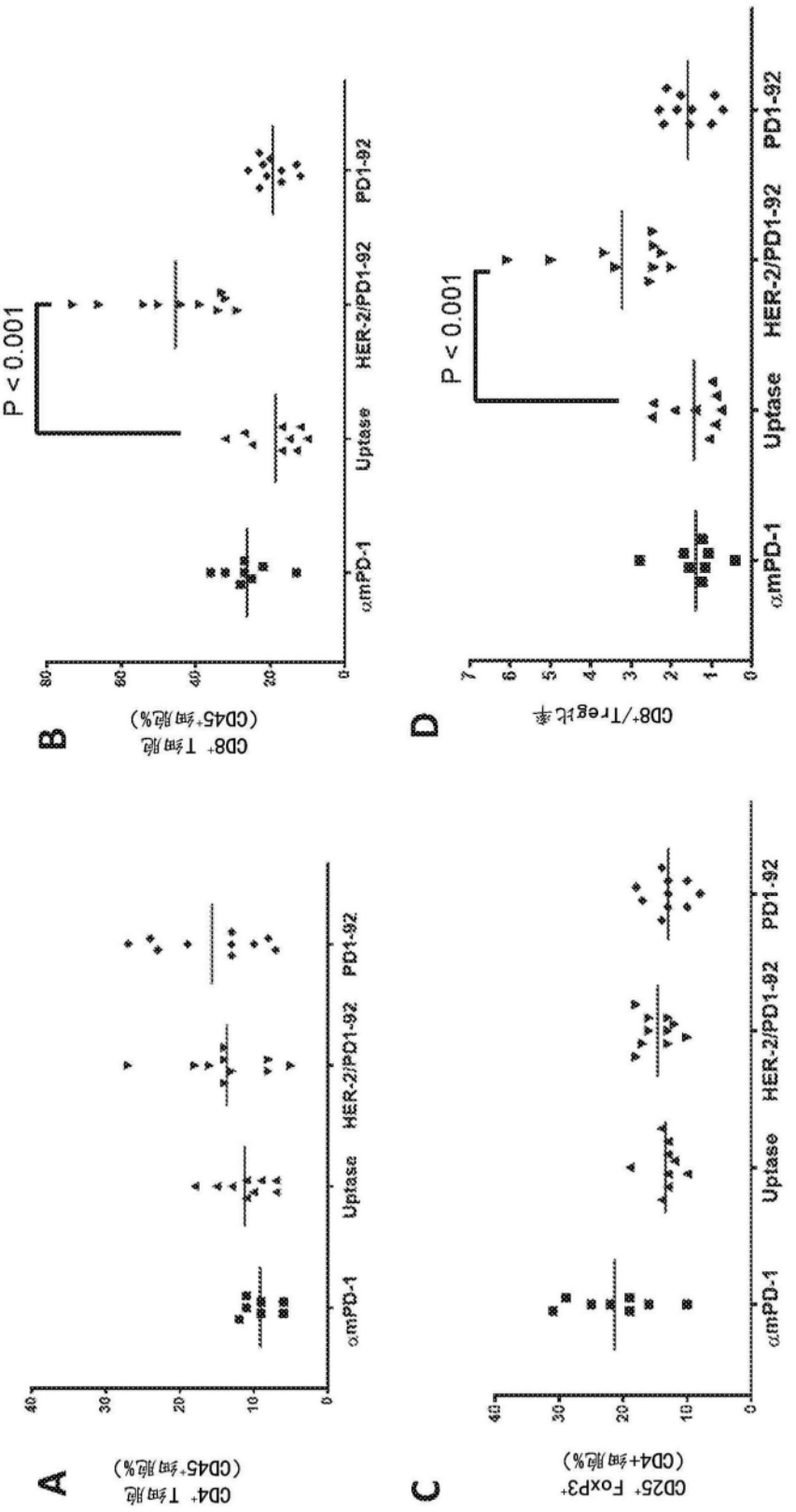


图20A,图20B,图20C和图20D

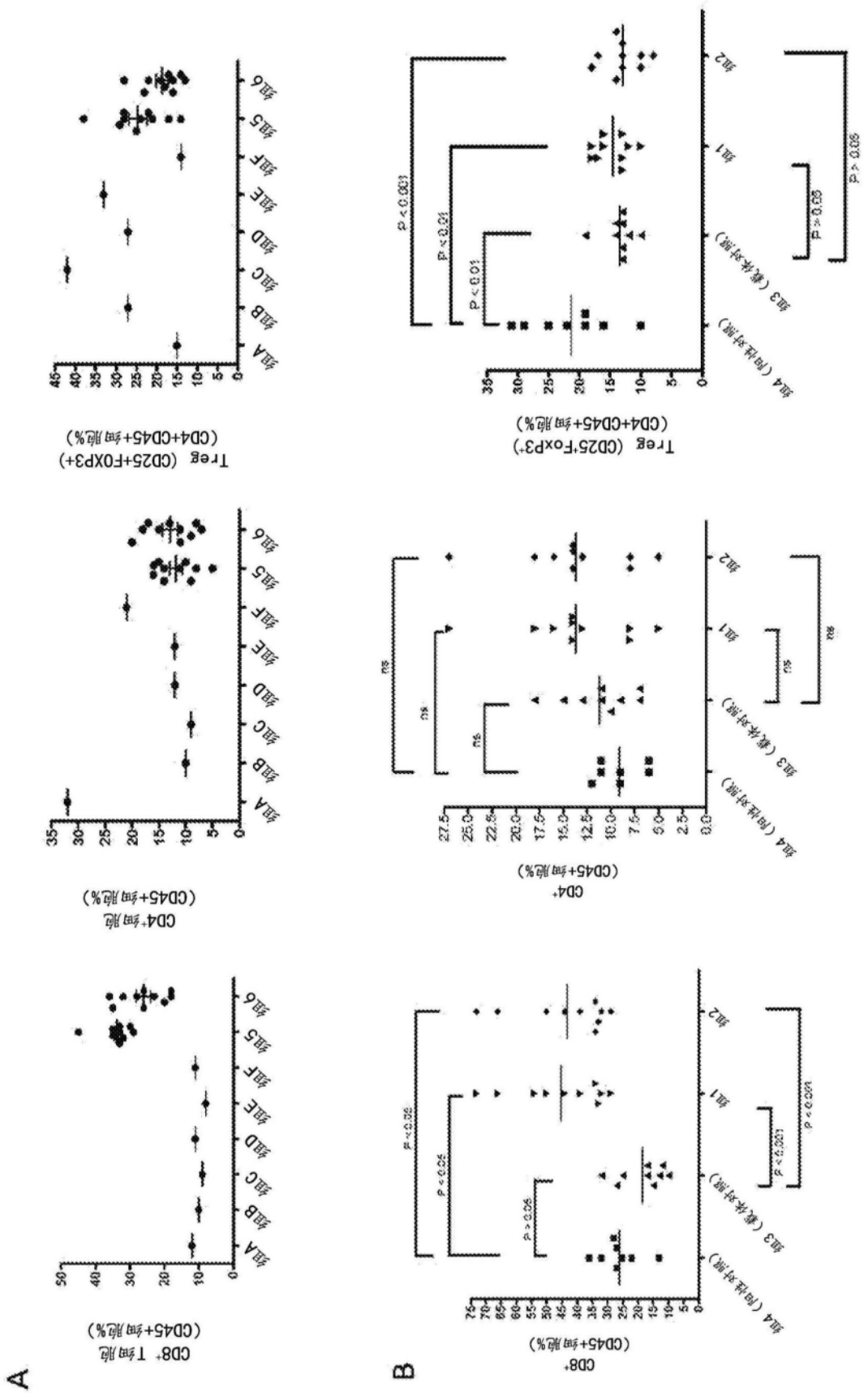

A
CD8+ T细胞
(CD45+细胞%)
CD4+细胞
(CD45+细胞%)
Treg (CD25+FOXP3+)
(CD4+CD45+细胞%)
B
CD8+
(CD45+细胞%)
CD4+
(CD45+细胞%)
Treg (CD25+FoxP3+)
(CD4+CD45+细胞%)
组A
组B
组C
组D
组E
组F
组5
组6
组4 (肺炎对照)
组3 (癌体对照)
组1
组2
ns

图21A和图21B