(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 111417648 A
(43)申请公布日 2020.07.14

(21)申请号 201880077146.2

(22)申请日 2018.10.04

(30)优先权数据
62/568,786 2017.10.05 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2020.05.28

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2018/054451 2018.10.04

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2019/071032 EN 2019.04.11

(71)申请人 河谷细胞有限公司
地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 派翠克·松吉翁 卡伊万·尼亚兹

(74)专利代理机构 北京柏杉松知识产权代理事务所(普通合伙) 11413
代理人 邱俊霞 刘继富

(51)Int.Cl.
*C07K 14/47*(2006.01)
*C12N 15/62*(2006.01)
*C12N 15/74*(2006.01)
*C12N 15/81*(2006.01)
*C12N 15/85*(2006.01)
*A61K 48/00*(2006.01)

权利要求书5页 说明书13页

(54)发明名称

# 刺激TH1和TH2的多价抗原

(57)摘要

呈现用于引发个体中Th1或Th2偏向的免疫应答的重组核酸的组合物、方法和用途。在一些实施例中,该核酸包括编码MHC-II运输信号的第一核酸区段和编码多表位肽和Th1特异性极化表位或Th2特异性极化表位的第二核酸区段。任选地,该Th1特异性极化表位或该Th2特异性极化表位任选地是该多表位肽的一部分。可以将该重组核酸插入病毒、细菌或酵母表达载体中,使得由该重组核酸编码的重组蛋白可以在个体的抗原呈递细胞中表达,以引发该个体中Th1或Th2偏向的免疫应答。

CN 111417648 A

1.一种重组核酸,其包含:

编码MHC-II运输信号的第一核酸区段;

编码多表位肽和Th1特异性极化表位或Th2特异性极化表位的第二核酸区段,其中该Th1特异性极化表位或该Th2特异性极化表位任选地是该多表位肽的一部分;以及

其中该第一和第二核酸区段存在于同一阅读框中。

2.如权利要求1所述的重组核酸,其中MHC-II运输信号是内体运输信号、晚期内体运输信号或溶酶体运输信号。

3.如前述权利要求中任一项所述的重组核酸,其中该溶酶体运输信号选自由以下组成的组:LAMP1跨膜结构域肽、MHC II类分子的β链的胞质尾区。

4.如前述权利要求中任一项所述的重组核酸,其中溶酶体运输信号是包含基序Tyr-X-X-疏水残基的肽。

5.如前述权利要求中任一项所述的重组核酸,其中该多表位包含多个过滤的新表位肽。

6.如权利要求5所述的重组核酸,其中对这些过滤的新表位肽进行过滤以具有等于或小于200nM的与个体的MHC-II复合体的结合亲和力。

7.如权利要求5或6所述的重组核酸,其中针对已知的人SNP和体细胞变异对这些过滤的新表位肽进行过滤。

8.如前述权利要求中任一项所述的重组核酸,其中该重组核酸进一步包含第三核酸区段,该第三核酸区段编码共刺激分子、免疫刺激细胞因子和对检查点抑制进行干扰或下调的蛋白质中的至少一种。

9.如权利要求8所述的重组核酸,其中该共刺激分子选自由以下组成的组:CD80、CD86、CD30、CD40、CD30L、CD40L、ICOS-L、B7-H3、B7-H4、CD70、OX40L、4-1BBL、GITR-L、TIM-3、TIM-4、CD48、CD58、TL1A、ICAM-1和LFA3。

10.如权利要求8或9中任一项所述的重组核酸,其中该免疫刺激细胞因子选自由以下组成的组:IL-2、IL-12、IL-15、IL-15超激动剂(ALT803)、IL-21、IPS1和LMP1。

11.如权利要求8-10中任一项所述的重组核酸,其中进行干扰的该蛋白质是CTLA-4、PD-1、TIM1受体、2B4或CD160的抗体或拮抗剂。

12.如前述权利要求中任一项所述的重组核酸,其中该Th1特异性极化表位或该Th2特异性极化表位存在于该多表位的N末端。

13.如前述权利要求中任一项所述的重组核酸,其中该Th1特异性极化表位或该Th2特异性极化表位存在于该多表位的C末端。

14.如前述权利要求中任一项所述的重组核酸,其中该Th1特异性极化表位或该Th2特异性极化表位存在于至少一个过滤的新表位肽中。

15.如权利要求5-14中任一项所述的重组核酸,其中对这些过滤的新表位肽进行过滤以具有该Th1特异性极化表位或该Th2特异性极化表位中的至少一个。

16.如权利要求5-15中任一项所述的重组核酸,其中修饰至少一个过滤的新表位以包括该Th1特异性极化表位或该Th2特异性极化表位中的至少一个。

17.如权利要求5-16中任一项所述的重组核酸,其中修饰至少一个过滤的新表位以去除该Th1特异性极化表位或该Th2特异性极化表位中的至少一个。

18.如前述权利要求中任一项所述的重组核酸，其中该多表位肽包含多个表位，并且其中该多表位肽中至少50％的表位是Th1特异性极化表位。

19.如前述权利要求中任一项所述的重组核酸，其中该多表位肽包含多个表位，并且其中该多表位肽中至少80％的表位是Th1特异性极化表位。

20.如前述权利要求中任一项所述的重组核酸，其中该Th1特异性极化表位是患者特异性新表位、患者和肿瘤特异性新表位或癌症相关表位。

21.一种用于免疫疗法的重组表达载体，该重组表达载体包含：

编码重组蛋白的核酸序列；

其中该重组蛋白包含MHC-II运输信号和具有Th1特异性极化表位或Th2特异性极化表位的多表位肽；

其中该Th1特异性极化表位或该Th2特异性极化表位任选地是该多表位肽的一部分；并且

其中第一和第二核酸区段存在于同一阅读框中。

22.如权利要求21所述的表达载体，其中MHC-II运输信号是内体运输信号、晚期内体运输信号或溶酶体运输信号。

23.如权利要求21-22中任一项所述的表达载体，其中溶酶体运输信号传导元件选自由以下组成的组：LAMP1跨膜结构域肽、MHC II类分子的β链的胞质尾区。

24.如权利要求21-23中任一项所述的表达载体，其中溶酶体运输信号传导元件是包含基序Tyr-X-X-疏水残基的肽。

25.如权利要求21-24中任一项所述的表达载体，其中该多表位包含多个过滤的新表位肽。

26.如权利要求25所述的表达载体，其中对这些过滤的新表位肽进行过滤以具有等于或小于200nM的与MHC-II复合体的结合亲和力。

27.如权利要求25-26中任一项所述的表达载体，其中针对已知的人SNP和体细胞变异对这些过滤的新表位肽进行过滤。

28.如权利要求21-27中任一项所述的表达载体，该重组核酸进一步包含第三核酸区段，该第三核酸区段编码共刺激分子、免疫刺激细胞因子和对检查点抑制进行干扰或下调的蛋白质中的至少一种。

29.如权利要求28所述的表达载体，其中该共刺激分子选自由以下组成的组：CD80、CD86、CD30、CD40、CD30L、CD40L、ICOS-L、B7-H3、B7-H4、CD70、OX40L、4-1BBL、GITR-L、TIM-3、TIM-4、CD48、CD58、TL1A、ICAM-1和LFA3。

30.如权利要求28-29中任一项所述的表达载体，其中该免疫刺激细胞因子选自由以下组成的组：IL-2、IL-12、IL-15、IL-15超激动剂(ALT803)、IL-21、IPS1和LMP1。

31.如权利要求28-30中任一项所述的表达载体，其中进行干扰的该蛋白质是CTLA-4、PD-1、TIM1受体、2B4或CD160的抗体或拮抗剂。

32.如权利要求21-31中任一项所述的表达载体，其中该Th1特异性极化表位或该Th2特异性极化表位存在于该多表位的N末端。

33.如权利要求21-32中任一项所述的表达载体，其中该Th1特异性极化表位或该Th2特异性极化表位存在于该多表位的C末端。

34.如权利要求21-33中任一项所述的表达载体，其中该Th1特异性极化表位或该Th2特异性极化表位存在于至少一个过滤的新表位肽中。

35.如权利要求21-34中任一项所述的表达载体，其中对这些过滤的新表位肽进行过滤以具有该Th1特异性极化表位或该Th2特异性极化表位中的至少一个。

36.如权利要求21-35中任一项所述的表达载体，其中修饰至少一个新表位以包括该Th1特异性极化表位或该Th2特异性极化表位中的至少一个。

37.如权利要求21-36中任一项所述的表达载体，其中修饰至少一个新表位以去除该Th1特异性极化表位或该Th2特异性极化表位中的至少一个。

38.如权利要求21-37中任一项所述的表达载体，其中该多表位肽包含多个表位，并且其中该多表位肽中至少50％的表位是Th1特异性极化表位。

39.如权利要求21-38中任一项所述的表达载体，其中该多表位肽包含多个表位，并且其中该多表位肽中至少80％的表位是Th1特异性极化表位。

40.如权利要求21-39中任一项所述的表达载体，其中该Th1特异性极化表位是患者特异性新表位、患者和肿瘤特异性新表位或癌症相关表位。

41.如权利要求21-40中任一项所述的表达载体，其中该表达载体选自由以下组成的组：病毒表达载体、细菌表达载体和酵母表达载体。

42.如权利要求41所述的表达载体，其中该病毒表达载体是缺失E1和E2b基因的腺病毒表达载体。

43.如权利要求41-42中任一项所述的表达载体，其中该细菌表达载体可在基因工程化细菌中表达，该基因工程化细菌以低水平表达内毒素，该低水平不足以诱导CD-14介导的败血症。

44.如权利要求41-43中任一项所述的表达载体，其中该酵母表达载体可在酿酒酵母中表达。

45.一种在个体中诱导Th1或Th2偏向的免疫应答的方法，所述方法包括：

向该个体的抗原呈递细胞递送或在该个体的抗原呈递细胞中产生重组疫苗组合物；

其中该重组疫苗组合物在重组核酸序列上编码，并且包含重组蛋白，该重组蛋白包含MHC-II运输信号和多表位肽以及Th1特异性极化表位或Th2特异性极化表位；并且

其中该Th1特异性极化表位或该Th2特异性极化表位任选地是该多表位肽的一部分。

46.如权利要求45所述的方法，其中MHC-II运输信号是内体运输信号、晚期内体运输信号或溶酶体运输信号。

47.如权利要求45-46中任一项所述的方法，其中溶酶体运输信号传导元件选自由以下组成的组：LAMP1跨膜结构域肽、MHC II类分子的β链的胞质尾区。

48.如权利要求45-47中任一项所述的方法，其中溶酶体运输信号传导元件是包含基序Tyr-X-X-疏水残基的肽。

49.如权利要求45-48中任一项所述的方法，其中该多表位包含多个过滤的新表位肽。

50.如权利要求49-50中任一项所述的方法，其中对这些过滤的新表位肽进行过滤以具有等于或小于200nM的与MHC-II复合体的结合亲和力。

51.如权利要求49-51中任一项所述的方法，其中针对已知的人SNP和体细胞变异对这些过滤的新表位肽进行过滤。

52.如权利要求45-51中任一项所述的方法，该重组核酸进一步包含第三核酸区段，该第三核酸区段编码共刺激分子、免疫刺激细胞因子和对检查点抑制进行干扰或下调的蛋白质中的至少一种。

53.如权利要求52所述的方法，其中该共刺激分子选自由以下组成的组：CD80、CD86、CD30、CD40、CD30L、CD40L、ICOS-L、B7-H3、B7-H4、CD70、OX40L、4-1BBL、GITR-L、TIM-3、TIM-4、CD48、CD58、TL1A、ICAM-1和LFA3。

54.如权利要求52-53中任一项所述的方法，其中该免疫刺激细胞因子选自由以下组成的组：IL-2、IL-12、IL-15、IL-15超激动剂(ALT803)、IL-21、IPS1和LMP1。

55.如权利要求52-54中任一项所述的方法，其中进行干扰的该蛋白质是CTLA-4、PD-1、TIM1受体、2B4或CD160的抗体或拮抗剂。

56.如权利要求45-55中任一项所述的方法，其中该Th1特异性极化表位或该Th2特异性极化表位存在于该多表位的N末端。

57.如权利要求45-56中任一项所述的方法，其中该Th1特异性极化表位或该Th2特异性极化表位存在于该多表位的C末端。

58.如权利要求45-57中任一项所述的方法，其中该Th1特异性极化表位或该Th2特异性极化表位存在于至少一个过滤的新表位肽中。

59.如权利要求49-58中任一项所述的方法，其中对这些过滤的新表位肽进行过滤以具有该Th1特异性极化表位或该Th2特异性极化表位中的至少一个。

60.如权利要求49-59中任一项所述的方法，其中修饰至少一种过滤的新表位肽修饰以包括该Th1特异性极化表位或该Th2极化表位中的至少一个。

61.如权利要求49-60中任一项所述的方法，其中修饰至少一种过滤的新表位肽以去除该Th1特异性极化表位或该Th2特异性极化信号传导元件中的至少一个。

62.如权利要求45-61中任一项所述的方法，其中该表达载体选自由以下组成的组：病毒表达载体、细菌表达载体和酵母表达载体。

63.如权利要求62所述的方法，其中该病毒表达载体是缺失E1和E2b基因的腺病毒表达载体。

64.如权利要求62-63中任一项所述的方法，其中该细菌表达载体可在基因工程化细菌中表达，该基因工程化细菌以低水平表达内毒素，该低水平不足以诱导CD-14介导的败血症。

65.如权利要求62-64中任一项所述的方法，其中该酵母表达载体可在酿酒酵母中表达。

66.如权利要求45-65中任一项所述的方法，其中当该个体患有肿瘤时，该核酸序列包括Th1特异性极化表位。

67.如权利要求45-66中任一项所述的方法，其中当该个体患有自身免疫性疾病或与器官移植排斥相关的症状时，该核酸序列包括Th2特异性极化表位。

68.如权利要求45-67中任一项所述的方法，其中该多表位肽包含多个表位，并且其中该多表位肽中至少80％的表位是Th1特异性极化表位。

69.如权利要求45-68中任一项所述的方法，其中该Th1特异性极化表位是患者特异性新表位、患者和肿瘤特异性新表位或癌症相关表位。

70.如权利要求1-20中任一项所述的重组核酸在诱导个体中Th1或Th2偏向的免疫应答中的用途。

71.如权利要求21-44中任一项所述的重组表达载体在诱导个体中Th1或Th2偏向的免疫应答中的用途。

72.一种抗原呈递细胞，该抗原呈递细胞包含如权利要求1-20中任一项所述的重组核酸。

73.一种抗原呈递细胞，该抗原呈递细胞包含如权利要求21-44中任一项所述的重组蛋白。

74.一种重组病毒、细菌细胞或酵母，该重组病毒、细菌细胞或酵母包含如权利要求1-20中任一项所述的重组核酸。

75.一种药物组合物，该药物组合物包含如权利要求74所述的重组病毒、细菌细胞或酵母。

# 刺激TH1和TH2的多价抗原

[0001] 本申请要求2017年10月5日提交的序列号为62/568,786的我们共同未决的美国临时专利申请的优先权。

## 技术领域

[0002] 本发明的领域是免疫疗法,特别是涉及触发Th-1或Th-2偏向的免疫应答。

## 背景技术

[0003] 背景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,也不承认具体地或隐含地提到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都通过引用并入,其程度如同每个单独的出版物或专利申请被具体地且单独地指明通过引用并入一样。在并入的参考文献中的术语的定义或用法与本文提供的该术语的定义不一致或相反时,适用本文提供的该术语的定义,而不适用该术语在该参考文献中的定义。

[0005] 与抗原呈递细胞上表达的MHC-II-抗原复合体结合后,辅助T(Th)细胞被极化为抗原特异性效应T辅助I型(Th-1)、2型(Th-2)、T调节($T_{reg}$)或17型(Th-17)细胞。在那些不同类型的Th细胞中,Th-1细胞通常通过施加对呈递靶抗原的细胞的细胞毒性,与巨噬细胞和/或CD8+T细胞一起引起细胞免疫应答。Th-2细胞通过刺激B细胞增殖并且通过诱导B细胞增加靶抗原特异性抗体的产生,与B细胞和/或肥大细胞协调体液免疫应答。Treg细胞通过例如抑制或下调效应子T细胞的诱导和增殖来调节免疫系统,维持对自身抗原的耐受性并且预防自身免疫疾病。将幼稚Th细胞极化为不同类型Th细胞中的任一种可由多种因素触发,这些因素包括与MHC-II抗原复合体结合后的细胞信号级联、各种细胞因子的平衡、装载在MHC-II分子上的抗原类型和/或多个共刺激分子的存在。在大多数情况下,那些因素通常触发一种类型的Th细胞的极化,并且同时抑制其他类型的Th细胞。

[0006] 最近,发现了特异性触发Th-1和Th-2极化的蛋白质的肽/表位序列(参见OncoImmunology[肿瘤免疫学]3:9,e954971;2014年10月1日)。在这里,鉴定主要诱导Th1极化的胰岛素样生长因子结合蛋白(IGFBP-2)中的一个表位,同时同一蛋白质中的另一个表位诱导Th-2极化。在那种情况下,表明蛋白质中那些表位之一的缺失可以移动Th细胞极化的平衡。然而,该研究仅限于单个靶分子。

[0007] 因此,尽管已知移动Th细胞极化的平衡的一些实例,但是在不同疾病条件中以及对于患者特异性、病症特异性调节,对Th细胞极化的调节仍有大部分未得到探索。因此,仍然需要改进的引发个体中Th1或Th2偏向的免疫应答Th-1或Th-2特异性表位的组合物、方法和用途。

## 发明内容

[0008] 本发明的主题涉及重组蛋白的各种组合物、方法和用途,该重组蛋白可以经由细

胞上的MHC-II表面表达选择性地引发Th-1偏向的免疫应答或Th-2偏向的免疫应答。因此，该主题的一个方面包括具有多个核酸区段的重组核酸。典型地，该重组核酸包括编码MHC-II运输信号的第一核酸区段和编码多表位肽和Th1特异性极化表位或Th2特异性极化表位的第二核酸区段。在一些实施例中，Th1特异性极化表位或Th2特异性极化表位是多表位肽的一部分。在其他实施例中，Th1特异性极化表位或Th2特异性极化表位可以位于多表位肽的N末端、C末端。优选地，MHC-II运输信号和多表位肽在同一阅读框中。

[0009] 在本发明主题的另一个方面，诸位发明人设想了用于免疫疗法的重组表达载体。该重组表达载体包括编码重组蛋白的核酸序列，该重组蛋白包含MHC-II运输信号和具有Th1特异性极化表位或Th2特异性极化表位的多表位肽。在一些实施例中，Th1特异性极化表位或Th2特异性极化表位是多表位肽的一部分。在其他实施例中，Th1特异性极化表位或Th2特异性极化表位可以位于多表位肽的N末端、C末端。优选地，MHC-II运输信号和多表位肽在同一阅读框中。可以将该核酸序列掺入病毒表达载体、细菌表达载体和酵母表达载体中。

[0010] 本发明主题的又另一方面涉及诱导个体中Th1或Th2偏向的免疫应答的方法。在此方法中，向个体的抗原呈递细胞递送或在个体的抗原呈递细胞中产生重组疫苗组合物。例如，重组疫苗组合物在重组核酸序列上编码，并且包含重组蛋白，该重组蛋白包含MHC-II运输信号和多表位肽以及Th1特异性极化表位或Th2特异性极化表位。在一些实施例中，Th1特异性极化表位或Th2特异性极化表位是多表位肽的一部分。在其他实施例中，Th1特异性极化表位或Th2特异性极化表位可以位于多表位肽的N末端、C末端。优选地，MHC-II运输信号和多表位肽在同一阅读框中。

[0011] 在本发明主题的又另一方面，诸位发明人设想了上述重组核酸和/或重组表达载体在诱导个体Th1或Th2偏向的免疫应答中的用途。另外，诸位发明人设想了用于诱导个体中Th1或Th2偏向的抗原呈递细胞的免疫应答，所述抗原呈递细胞包含上述重组核酸和/或重组蛋白。

[0012] 在本发明主题的又另一方面，诸位发明人还设想了包含上述重组核酸的重组病毒、细菌细胞或酵母，并且进一步设想了包含该重组病毒、细菌细胞或酵母的药物组合物。

[0013] 根据优选实施例的以下详细描述，本发明主题的各种目标、特征、方面和优点将变得更显而易见。

## 具体实施方式

[0014] 诸位发明人现在发现，通过选择性地触发Th1、Th2、Th17、Treg或CD4+细胞毒性T细胞偏向的免疫应答，可以进一步改善免疫疗法，尤其是基于新表位的免疫疗法。可以通过使抗原呈递细胞与(优选地多表位)肽接触或者对个体的抗原呈递细胞进行遗传修饰以表达所述(优选地多表位)肽，选择性地和特异性地引发个体(例如患者)中的这种Th1、Th2、Th17、Treg或CD4+细胞毒性T细胞偏向的免疫应答，所述(优选地多表位)肽与MHC-II运输信号和Th1、Th2、Th17、Treg或CD4+细胞毒性T细胞特异性极化表位偶联。尽管在本发明主题的一些方面，Th1、Th2、Th17、Treg或CD4+细胞毒性T细胞特异性极化表位可以是患者特异性表位和/或肿瘤特异性表位，但是极化表位也可以是已知引发Th1或Th2特异性极化的表位(并且通常并非作为新表位在癌细胞中被发现)。

[0015] 实际上，应当理解，通过将肽的表达引导至MHC II类呈递，可以引发所需的T细胞

免疫应答类型，其中所述肽是或包含极化表位(已知该极化表位产生特异性T细胞免疫应答类型)。因此，对于癌症免疫疗法，可以构建(例如，在体外重组表达或在体内抗原呈递细胞中表达)针对MHC II类呈递并且进一步包括Th1极化表位(其可能是癌症特异性新表位或已知引发Th1极化的表位)的重组蛋白。同样，对于自身免疫疾病的治疗，可以构建(例如，在体外重组表达或在体内抗原呈递细胞中表达)针对MHC II类呈递并且进一步包含Th2极化表位(其可能是疾病特异性新表位或已知引发Th2极化的表位)的重组蛋白。

[0016] 为此，诸位发明人设想可以产生重组核酸组合物或疫苗组合物以修饰抗原呈递细胞(例如，树突细胞等)，使得过表达具有Th1、Th2、Th17、Treg或CD4+细胞毒性T细胞特异性极化表位的(多表位)肽和MHC-II运输信号的抗原呈递细胞与幼稚Th细胞相互作用，并且导致Th细胞特异性极化为Th1、Th2、Th17、Treg或CD4+细胞毒性T细胞。然后Th1、Th2、Th17、Treg或CD4+细胞毒性T细胞的增殖可能会使T细胞介导的免疫应答的平衡向Th1、Th2、Th17、Treg或CD4+细胞毒性T细胞偏向的免疫应答移动。因此，应当认识到，可以设计重组嵌合蛋白，使得该蛋白的细胞内表达导致MHC II类呈递，并且在呈递时导致应答偏向，该应答偏向至少部分由已知会引发这种偏向的重组蛋白中的一部分指明。

[0017] 如本文所用，术语“肿瘤”是指以下项并且可与以下项互换使用：一种或多种癌细胞、癌组织、恶性肿瘤细胞或恶性肿瘤组织，它们可以位于或者发现于人体的一个或多个解剖位置中。

[0018] 如本文所用，术语“结合”是指术语“识别”和/或“检测”，并且可以与该术语互换使用，即具有高亲和力的两个分子之间的相互作用，$K_D$等于或小于$10^{-6}$M或等于或小于$10^{-7}$M。

[0019] 在本发明主题的一个示例性并且特别优选的方面，诸位发明人设想可以通过引入编码重组蛋白的重组核酸组合物，对患者的抗原呈递细胞进行遗传修饰，以在细胞表面上呈递该重组蛋白作为将由幼稚Th细胞识别的抗原。通常，该重组蛋白包括MHC-II运输信号、多表位肽和Th1特异性极化表位或Th2特异性极化表位。

[0020] 因此，在其中该重组蛋白由单个重组核酸编码的优选的实施例中，该重组核酸包括至少两个核酸区段：编码MHC-II运输信号的第一核酸区段(序列元件)；编码多表位肽和Th1特异性极化表位或Th2特异性极化表位(或Th17特异性极化表位、Treg特异性极化表位或CD4+细胞毒性T细胞极化表位)的第二核酸区段。最优选地，该两个核酸区段在同一阅读框中，使得可以将两个核酸区段翻译成具有两个肽区段的单个蛋白质。

[0021] 如本文所用，多表位是指表达为单一多肽的两种或更多种抗原的串联阵列。优选地，两种或更多种人类疾病相关抗原由接头或间隔子肽分开。可以使用接头或间隔子的肽序列的任何合适的长度和顺序。但是，优选地，接头肽的长度在3-30个氨基酸之间，优选在5-20个氨基酸之间，更优选在5-15个氨基酸之间。本发明人还设想富含甘氨酸的序列(例如，gly-gly-ser-gly-gly等)是优选的，以提供两种抗原之间的多表位的柔性。

[0022] 设想任何合适的MHC-II运输信号，其可以诱导将重组蛋白亚细胞运输至内体、晚期内体或溶酶体，并且借此可以将该重组蛋白与MHC-II复合体偶联。因此，在一些实施例中，MHC-II运输信号可以包括一个或多个分类的内体运输信号，例如分化簇1b(CD1b)前导肽、溶酶体相关膜蛋白(LAMP)的跨膜结构域、CD1c尾肽(或CD1c的C末端结构域)。在其他实施例中，MHC-II运输信号可以包括一个或多个晚期内体(再循环内体)运输信号，例如CD1b前导肽、LAMP的跨膜结构域、CD1a尾肽(或CD1a的C末端结构域)。在仍其他实施例中，MHC-II

运输信号可以包括一个或多个溶酶体运输信号，例如CD1b前导肽、LAMP的跨膜结构域、LAMP的胞质尾区(或LAMP的C末端结构域)或编码基序Tyr-X-X-疏水残基的核苷酸序列。

[0023] 序列排列和许多MHC-II运输信号可以根据MHC-II运输信号的类型、编码多表位肽的核酸区段的长度和/或多表位肽的序列而变化。例如，重组核酸可以在编码多表位的核酸区段的5'端、3'端或所述区段中包括一个MHC-II运输信号(例如，编码CD1b前导肽的核酸序列等)。在另一个实例中，重组核酸可以包括至少两个MHC-II运输信号，一个在编码多表位的核酸区段的5'端，另一个在编码多表位的核酸区段的3'端(例如，在编码多表位的核酸区段的5'端的编码CD1b前导肽的核酸序列，以及在编码多表位的核酸区段的3'端的编码LAMP的跨膜结构域的核酸序列等)。更多示例性的MHC-II信号及其与多表位的排列可以在国际申请WO/2017/222619(及其美国国家阶段对应申请)中发现，所述申请通过引用并入本文。

[0024] 关于编码多表位肽的第二核酸区段，诸位发明人设想多表位肽包含至少一种或多种抗原肽或肽片段。例如，抗原肽或肽片段可以是一种或多种炎症相关肽抗原、自身免疫疾病(例如系统性红斑狼疮、乳糜泻、1型糖尿病、格雷夫斯病、炎性肠病、多发性硬化症、银屑病、类风湿性关节炎等)相关肽抗原、与器官移植排斥相关的肽抗原、肿瘤相关肽抗原和癌症新表位。在一些实施例中，抗原肽或肽片段是通常对于病症或疾病常见的已知肽(例如，癌症相关或癌症特异性抗原、寄生虫抗原等)。优选地，抗原肽或肽片段是患者特异性的和/或组织特异性的。

[0025] 当然，应当理解，在个体的免疫反应是自身免疫反应的情况下，设想的组合物和方法将采用将免疫应答朝向致耐受应答极化的各种构建体，最典型地使用Th2和/或Treg极化。在另一方面，在个体的免疫反应是针对肿瘤的不足免疫反应(例如，由于免疫抑制、耐受性或无反应性)的情况下，组合物和方法将优选地采用将免疫应答朝向免疫原性应答极化的各种构建体，最典型地使用Th1和/或Th17极化。

[0026] 至少一些类型的自身免疫疾病、器官移植排斥(例如，急性或慢性排斥)和癌症的预后分别可以通过患有自身免疫疾病、器官移植排斥症状或肿瘤的患者中不同的抗原表达来预测或表示。例如，在患有自身免疫疾病(例如类风湿性关节炎，系统性红斑狼疮等)的患者中，一种或多种自身抗原的全身或局部表达可能导致攻击患者自身组织的自身抗体的产生。在患有器官移植排斥的患者中，由移植的器官产生的外来抗原诱导患者的免疫系统攻击所移植的器官。在患有肿瘤的患者中，肿瘤相关抗原或肿瘤特异性新表位可能标记免疫应答的靶标。

[0027] 如将容易理解的，可以通过患者的一种或多种患病的细胞与相应的一种或多种健康细胞的组学分析和比较，或移植的组织(或细胞)与相应患者组织(或细胞)的组学分析和比较，来选择多表位肽中设想的抗原和/或新表位。组学数据包括但不限于与细胞的基因组学、脂质组学、蛋白质组学、转录组学、代谢组学、营养基因组学和其他特征和生物学功能相关的信息。患病的细胞(例如癌细胞、自身免疫攻击细胞)、移植细胞或正常细胞(或组织)可以包括来自单个或多个不同组织或解剖区域的细胞、来自单个或多个不同宿主的细胞以及组合的任何排列。

[0028] 癌症和/或正常细胞的组学数据优选地包含包括基因组学序列信息的基因组学数据集。最典型地，基因组学序列信息包含从患者(例如，经由肿瘤活检)，最优选地从患者或健康个体的癌组织(患病组织)和匹配的健康组织获得的DNA序列信息。例如，可以从患者胰

腺(和/或转移细胞的附近区域)中的胰腺癌细胞以及患者的正常胰腺细胞(非癌细胞)或非患者健康个体的正常胰腺细胞获得DNA序列信息。

[0029] 在本发明主题的一个尤其优选的方面,通过患病(或移植)细胞和正常细胞的全基因组测序和/或外显子组测序(通常以至少10x、更典型地至少20x的覆盖深度)来进行DNA分析。可替代地,还可以从先前序列确定已建立的序列记录(例如,SAM、BAM、FASTA、FASTQ或VCF文件)提供DNA数据。因此,数据集可以包括未加工的或已加工的数据集,并且示例性数据集包括具有BAM格式、SAM格式、FASTQ格式或FASTA格式的那些。然而,尤其优选的是,以BAM格式或作为BAMBAM diff对象提供数据集(参见例如,US2012/0059670 A1和US 2012/0066001 A1)。此外,应当注意,数据集反映了同一患者的肿瘤和匹配的正常样品,以便如此获得患者和肿瘤特异性信息。因此,可以排除不产生患病细胞的遗传种系改变(例如,沉默突变、SNP等)。当然,应当认识到,患病的细胞样品可能来自初始肿瘤、来自治疗开始后的肿瘤、来自复发的肿瘤或转移部位等。还应当认识到,移植的细胞样品可能是在移植后1小时、6小时、24小时、3天、7天、1个月、6个月、1年获得。在大多数情况下,患者的匹配的正常样品可能是血液、或来自同一组织类型的未患病的组织、或在组织移植前从患者移除的组织。

[0030] 同样,可以按多种方式进行序列数据的计算分析。然而,在最优选的方法中,如例如在US 2012/0059670 A1和US 2012/0066001 A1中所披露,使用BAM文件和BAM服务器,通过对肿瘤和正常样品进行位置引导的同步比对在计算机中进行分析。这样的分析有利地减少假阳性抗原或新表位,并且显著地减少对存储器和计算资源的需求。

[0031] 关于患者的患病(或移植的)组织和匹配的正常组织的分析,认为许多方式适用于本文,只要此类方法能够在肿瘤和匹配的正常序列之间产生差异序列对象或位置特异性差异的其他识别即可。然而,特别优选的是,差异序列对象是通过BAM文件的增量同步比对产生的,这些BAM文件表示患病样品和匹配的正常样品的基因组学序列信息。例如,特别优选的方法包括如描述于US2012/0059670和US 2012/0066001中的基于BAMBAM的方法。

[0032] 另外,患病(或移植的)细胞和/或正常细胞的组学数据包含如下转录组数据集,所述转录组数据集包括从患者、最优选地从患者或健康个体的患病组织(或移植的组织)和匹配的健康组织(或患者自身组织)获得的一种或多种RNA(优选地细胞mRNA)的序列信息和表达水平(包括表达分析或剪接变体分析)。本领域已知许多转录组分析方法,并且所有已知方法都被认为适用于本文(例如,RNAseq、RNA杂交阵列、qPCR等)。因此,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多聚$A^+$-RNA获得,该逆转录的多聚$A^+$-RNA又是从同一患者的肿瘤样品和匹配的正常(健康的)样品获得。同样,应当注意,尽管多聚$A^+$-RNA作为转录组的表示典型地是优选的,但是其他形式的RNA(hn-RNA、非多聚腺苷酸化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,但是多种可替代的方法(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,转录组学分析可能适合于(单独地或与基因组学分析组合)具有疾病(例如,癌症、自身免疫疾病或移植)特异性突变和患者特异性突变的基因的鉴定和定量。

[0033] 除了关于细胞mRNA序列信息和表达水平的转录组学数据外,诸位发明人还设想,循环肿瘤RNA(ctRNA)和/或循环游离RNA(cfRNA)可用于鉴定自身免疫疾病相关、移植相关

或癌症相关抗原/新表位的存在和/或表达水平。在最典型的方面，ctRNA是从全血分离，所述全血是在保存细胞完整性并稳定ctRNA/cfRNA和/或ctDNA/cfDNA的条件下进行加工。一旦与非核酸组分分离，随后优选地使用实时定量PCR对循环核酸进行定量。在本发明主题的情况下，应当认识到，并不需要所有循环核酸都对患病组织、移植组织或肿瘤组织具有特异性。因此，患病细胞衍生的RNA和DNA分别被表示为ctRNA和ctDNA。并非衍生自患病细胞的循环核酸被表示为cfRNA(循环游离RNA)和cfDNA(循环游离DNA)。应当注意，如本文所用的术语“患者”包括被诊断患有病症(例如，癌症)的个体以及出于检测或鉴定病症的目的经历检查和/或测试的个体二者。

[0034] 因此，应当理解，可以针对特定疾病、疾病阶段、特定突变或甚至基于个人突变谱或所表达抗原和/或新表位的存在来选择一种或多种所需核酸。可替代地，在需要发现或扫描特定基因表达的新突变或变化的情况下，可以用RNAseq替代实时定量PCR，以便如此覆盖患者转录组的至少一部分。此外，应当理解，可以静态地进行分析，或者在一段时间过程中通过重复取样进行分析以获得动态图片，而无需对患病组织进行活检。

[0035] 最典型地，合适的组织来源包括全血，该全血优选地作为血浆或血清提供。可替代地，应注意，各种其他体液也被认为是适当的，只要此类体液中存在ctRNA即可。适当的体液包括唾液、腹水、脊髓液、尿液等，它们可以是新鲜的或保存的/冷冻的。例如，对于本文呈现的分析，接受如分别抽吸至含有RNA或DNA稳定剂的无细胞RNA BCT®管或无细胞DNA BCT®管中的10ml全血的样本。有利的是，ctRNA在无细胞RNA BCT管中在全血中稳定七天，而ctDNA在无细胞DNA BCT管中在全血中稳定十四天，因而有时间从世界各地运输患者样品而不发生ctRNA或ctDNA的降解。此外，通常优选使用RNA稳定剂分离ctRNA，所述RNA稳定剂不会或基本上不会(例如，等于或小于1％、或等于或小于0.1％、或等于或小于0.01％、或等于或小于0.001％)裂解血细胞。从不同的角度来看，在RNA稳定试剂与血液合并后，这些试剂不会导致血清或血浆中的RNA量显著增加(例如，总RNA增加不超过10％、或不超过5％、或不超过2％、或不超过1％)。同样，这些试剂也会保存血液中的细胞的物理完整性，以减少或甚至消除在血细胞中发现的细胞RNA的释放。此类保存可以呈可能已经被分离或可能未被分离的所收集血液的形式。在不太优选的方面，所设想的试剂将使并非血液的所收集组织中的ctDNA和/或ctRNA稳定至少2天，更优选至少5天，且最优选至少7天。当然，应当认识到，许多其他收集方式也被认为是适当的，并且可以将ctRNA和/或ctDNA至少部分地纯化或吸附到固相上，以便在进一步加工之前增加稳定性。合适的组合物和方法披露于2017年3月17日提交的序列号62/473273、2017年6月20日提交的序列号62/552509和2017年5月26日提交的序列号62/511849的共同未决的美国临时申请中。

[0036] 此外，患病(肿瘤、自身免疫攻击或移植)和/或正常细胞的组学数据包含蛋白质组学数据集，所述蛋白质组学数据集包括蛋白质表达水平(蛋白质分子的定量)、翻译后修饰、蛋白质-蛋白质相互作用、蛋白质-核苷酸相互作用、蛋白质-脂质相互作用等。因此，还应当理解，如本文呈现的蛋白质组学分析还可以包括选定的蛋白质的活性确定。可以从刚切除的组织、从冷冻或以其他方式保存的组织、甚至从FFPE组织样品进行这样的蛋白质组学分析。最优选地，蛋白质组学分析是定量的(即，提供表达的多肽的定量信息)和定性的(即，提供多肽的数值或定性指定活性)。设想任何合适的分析类型。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方法。此外，应当注意，蛋白质组学分析不仅可以提供有关

蛋白质本身的定性或定量信息,而且也可以包括蛋白质具有催化活性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通过引用并入本文的US 7473532中。蛋白质表达的鉴定和甚至定量其他合适的方法包括多种质谱分析(例如,选择反应监测(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患病组织特异性新表位,这些新表位可以依据包含抗原/新表位的蛋白质的亚细胞位置(例如,膜位置)、表达强度(例如,如与同一患者的匹配的正常蛋白质相比,是过表达的)等被进一步过滤。

[0037] 特别优选的是,将经由组学分析鉴定的抗原/新表位用一个或多个参数进一步过滤。例如,可以将鉴定的抗原/新表位针对已知的人SNP和体细胞变异进行过滤。在此实例中,可以将鉴定的抗原/新表位与包含已知人序列(例如,患者或患者集合的序列)的数据库进行比较,以此避免使用与人相同的序列。而且,过滤还可以包括去除由于患者中的SNP而被鉴定的抗原/新表位序列,其中这些SNP同时存在于患病的序列和匹配的正常序列中。例如,dbSNP(单核苷酸多态性数据库)是由美国国家生物技术信息中心(NCBI)与美国国家人类基因组研究所(NHGRI)合作开发和托管的关于不同物种内和不同物种之间的遗传变异的免费公共档案。尽管数据库的名称暗示仅一类多态性(单核苷酸多态性(SNP))的集合,事实上其含有相对宽范围的分子变异:(1)SNP、(2)短缺失或插入多态性(indel/DIP)、(3)微卫星标记物或短串联重复序列(STR)、(4)多核苷酸多态性(MNP)、(5)杂合序列以及(6)命名的变体。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。使用如上所述的这个数据库和其他过滤选项,可以过滤患者和患病细胞特异性抗原/新表位以去除那些已知序列,从而产生假阳性显著减少的具有多个抗原/新表位序列的序列集。

[0038] 应当认识到,并不是所有新表位都是免疫系统可见的,因为这些新表位在更大的背景中(例如,在多表位内)存在以及在患者的MHC复合体上被呈递的情况下也需要进行加工。在该情况下,必须认识到,所有新表位中仅一部分将具有足够用于呈递的亲和力。从另一个角度看,治疗成功将随着可以经由MHC复合体呈递的新表位数量的增加而增加,其中此类新表位对患者的HLA型具有最小的亲和力。因此,应当理解,有效的结合和呈递是新表位的序列与患者的特定HLA型的组合功能。因此,通常需要对患者组织进行的HLA型确定。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),优选地其中每种亚型被确定为至少2位或至少4位深度。然而,还设想更大的深度(例如,6位、8位)。

[0039] 一旦确定了患者的HLA类型(使用已知的化学或计算机确定),就可以根据数据库计算和/或获取HLA类型的结构解决方案,然后将其用于计算机中的对接模型中以确定(典型地是过滤的)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的系统包括NetMHC平台(参见例如,Nucleic Acids Res.[核酸研究]2008年7月1日;36(Web Server issue):W509-W512.)。然后结合对患者的MHCI-/II亚型的了解,选择对先前确定的HLA型具有高亲和力(例如,小于200nM、小于100nM、小于75nM、小于50nM)的新表位,并且尤其是MHC-II结合,用于创建疗法。

[0040] 可以使用本领域熟知的湿化学中的多种方法来进行HLA确定,并且所有这些方法均被认为适合用于本文。然而,在尤其优选的方法中,还可以使用包含大多数或所有已知和/或常见的HLA型的参考序列,在计算机中从组学数据预测HLA型。例如,在根据本发明主

题的一个优选的方法中，通过数据库或测序仪提供映射至染色体6p21.3(或在该处附近/该处发现HLA等位基因的任何其他位置)的相对大量的患者序列读段。最典型地，序列读段将具有约100-300个碱基的长度，并且包含元数据，包括读段质量、比对信息、取向、位置等。例如，合适的格式包括SAM、BAM、FASTA、GAR等。虽然不限于本发明的主题，但通常优选的是，患者的序列读段提供至少5x、更典型地至少10x、甚至更典型地至少20x，以及最典型地至少30x的覆盖深度。

[0041] 从不同的角度来看，应当理解，可以容易地鉴定(例如，从各种组学数据，并且尤其是全基因组测序和RNAseq数据)将以所需高亲和力与MHC-II结合的肿瘤和患者特异性新表位序列。然后此类新表位序列将适合用于如本文所呈现使用的组合物和方法中。优选地，典型地将在单个多肽链(具有任选的柔性G/S或其他肽间隔子元件)中使用多于一种新表位序列，以产生与如上所述的运输序列融合的多表位。同样如上所述，可以将如此鉴定的一种或多种多表位进一步过滤，以选择表现所需应答偏向(例如，Th1、Th2、Th17、Treg、应答偏差)和/或可以与一种或多种已知产生特异性应答偏向的肽序列偶联的那些多表位。

[0042] 因此，同样优选地，基于所鉴定的抗原/新表位在与幼稚T细胞结合后引发Th1、Th2、Th17、Treg或CD4+细胞毒性T细胞介导的免疫应答的偏好，对这些抗原/新表位进行过滤或分类。设想用于确定抗原特异性Th1、Th2、Th17、Treg或CD4+细胞毒性T细胞介导的免疫应答的任何合适的方法，包括本领域熟知的任何湿化学方法或计算机方法。例如，可以将来自供体(典型地是讨论中的患者)的PMBC暴露于合成的新表位序列，并且可以使用本领域已知的ELISPOT测定来监测抗原呈递细胞的细胞因子分泌(参见例如，Cancer Res[癌症研究]；74(10)2014年5月15日；第2710-2718页)。如将容易理解的，响应于新表位的特异性细胞因子分泌模式将揭示应答偏向的类型(例如，Th1偏向的IFN-γ、Th2偏向的IL-10、Th17偏向的IL-17、Treg偏向的TGF-β等)。

[0043] 可替代地，抗原/新表位的全部或片段可以在抗原呈递细胞(典型地来自从其获得新抗原的同一患者)中表达，并且可以使在其表面上表达抗原/新表位的抗原呈递细胞与幼稚T细胞在体外接触，最典型地使用将接受本文呈现的组合物的个体的细胞。基于接触后从极化的T细胞分泌的细胞因子的类型和/或量，可以将抗原/新表位再次分类为Th1特异性、Th2特异性、Th17特异性、Treg特异性或CD4+细胞毒性T细胞特异性或非特异性(例如，可以同时引发Th1、Th2极化等)之一。在又另一个实例中，可以经由与已知的Th1偏向的、Th2偏向的或非特异性抗原的序列比较，将鉴定的抗原/新表位确定为Th1偏向的、Th2偏向的或非特异性的。在这个实例中，可以基于与已知的Th1偏向的、Th2偏向的或非特异性抗原(尤其是已知的Th1偏向的、Th2偏向的极化表位(基序、结构域))的相似性(例如，序列相似性、具有共有序列、结构相似性、结构域位置相似性等)，确定Th1偏向的、Th2偏向的或非特异性的可能性。

[0044] 如本文所用，Th1、Th2、Th17、Treg或CD4+细胞毒性T细胞特异性极化表位是被预测或已经被证明，以至少60％、至少70％、至少80％或至少90％的概率，将Th1、Th2、Th17、Treg或CD4+细胞毒性T细胞特异性极化的平衡从幼稚Th细胞(或幼稚CD4+细胞)朝向单个方向(例如，更多的幼稚Th细胞被极化为Th1细胞，更高概率将幼稚Th细胞极化为Th1细胞等)移动的任何表位。例如，当通过抗原呈递细胞呈递表位，并且至少60％、至少70％、至少80％或至少90％的与呈递抗原/新表位的抗原呈递细胞结合的幼稚Th细胞被极化为Th1细胞时，则

可以将这些表位确定为Th1极化表位。如上所述，可以使用本领域已知的方案(如ELISPOT测定)在体内容易地确定表位或抗原序列的偏向作用(参见例如，Cancer Res[癌症研究]；74(10)2014年5月15日，第2710-2718页)。

[0045] 在本发明主题的其他方面，诸位发明人设想，当多表位包含关于抗原/新表位引发幼稚Th细胞的Th1、Th2、Th17、Treg或CD4+细胞毒性T细胞特异性极化的特异性更均质的抗原/新表位或其片段时，可以更有效地引发Th1、Th2、Th17、Treg或CD4+细胞毒性T细胞特异性免疫应答。因此，优选地，用于引发Th1特异性免疫应答的多表位包含至少50％、优选至少70％、更优选至少80％的Th1特异性抗原/新表位。当然，相同的考虑因素也应用于Th2、Th17、Treg偏向的表位。

[0046] 在一些实施例中，诸位发明人还设想，抗原/新表位或其片段可以被修饰为Th1、Th2、Th17、Treg或CD4+细胞毒性T细胞特异性的。例如，既不是Th1偏向也不是Th2偏向(例如，抗原/新表位中不存在Th1或Th2特异性基序)的抗原或新表位可以在其N末端、C末端或在抗原/新表位肽中与已知的Th1特异性或Th2特异性极化表位(肽基序，例如，IGFBP-2的N末端结构域、IGFBP-2的C末端结构域等)偶联或共表达。在另一个实例中，在抗原/新表位在其肽中包括Th1或Th2特异性极化表位二者的情况下，可以修饰抗原/新表位以去除Th1或Th2特异性结构域之一，使得在该肽中仅包括一个特异性结构域。在这些实施例中，特别优选不显著影响抗原/新表位的抗原性，优选从幼稚抗原/新表位降低小于30％、更优选小于20％、最优选小于10％。

[0047] 可替代地，多表位可以与一种或多种已知的Th1、Th2、Th17、Treg或CD4+细胞毒性T细胞特异性极化表位(基序、结构域)偶联。已知的Th1、Th2、Th17、Treg或CD4+细胞毒性T细胞特异性极化表位可能与多表位的抗原/新表位具有特异性的疾病/病症相关或无关。设想可以将已知的Th1、Th2、Th17、Treg或CD4+细胞毒性T细胞特异性极化表位置于多表位肽的任何合适的位置。例如，可以将一个或多个Th1特异性极化表位置于多表位的N末端或C末端(例如，一个Th1特异性极化表位在多表位的N末端中、一个Th1特异性极化表位在多表位的C末端中、一个Th1特异性极化表位在多表位的N末端和C末端的每一者中、多个Th1特异性极化表位在多表位的N末端中、多个Th1特异性极化表位在多表位的C末端中，等等)。对于另一实例，在多肽的抗原/新表位之间有一个或多个Th1特异性极化表位(例如，在多表位的第一与第二抗原之间、在多表位的第二与第三抗原之间有一个Th1特异性极化表位，在多表位的第一与第二抗原之间以及在第二与第三抗原之间各有一个Th1特异性极化表位等)。

[0048] 因此，应当认识到，设想的多肽包括具有两个或三个(或更多个)组分的嵌合多肽：运输组分，所述运输组分与抗原(例如新表位或多表位)组分偶联，所述抗原组分可以任选地与免疫应答(例如，Th1、Th2、Treg、Th17)偏向组分偶联。如前所述，抗原组分中的一个或多个肽序列也可以作为免疫应答(例如，Th1、Th2、Treg、Th17)偏向组分发挥作用。

[0049] 诸位发明人进一步设想，可以将编码这种嵌合多肽(例如，包括MHC-II运输信号、抗原/多表位和/或Th1特异性极化表位或Th2特异性极化表位)的核酸序列置于适于体内或体外表达重组蛋白的任何表达载体中。然后将重组核酸插入载体中，使得可以将该核酸递送到患者的抗原呈递细胞(例如树突细胞等)中，或递送到细菌或酵母细胞中，使得由该核酸序列编码的重组蛋白可以在这种细胞中表达，并且随后作为包含完整细菌或酵母细胞的疫苗或作为其片段被递送到个体。设想了可以用于表达蛋白质的任何合适的表达载体。尤

其优选的表达载体可以包括可携带至少1k、优选2k、更优选5k个碱基对的盒尺寸的那些表达载体。可替代地，重组核酸也可以是可以直接转染到抗原呈递细胞中的mRNA。

[0050] 因此，在一个实施例中，优选的表达载体包括病毒载体(例如，非复制性重组腺病毒基因组，该基因组任选地具有缺失或无功能的E1和/或E2b基因)。在表达载体是病毒载体(例如，腺病毒，并且尤其是E1和E2b缺失的AdV)的情况下，设想然后可以将包括重组核酸的重组病毒作为药物组合物中的治疗疫苗单独或组合使用，该药物组合物典型地被配制成无菌可注射组合物，其中病毒滴度在$10^{6}$-$10^{13}$个病毒粒子/剂量单位之间，并且更典型地在$10^{9}$-$10^{12}$个病毒粒子/剂量单位之间。可替代地，该病毒可以用于离体感染患者(或其他HLA匹配的)细胞，并且然后将如此感染的细胞输注给患者。在其他实例中，用病毒治疗患者可以伴随同种异体移植的或自体的自然杀伤细胞或T细胞，它们呈裸露形式或带有嵌合抗原受体且表达靶向新表位的抗体、新表位、肿瘤相关抗原或与该病毒相同的有效负载。包括患者衍生的NK-92细胞系的自然杀伤细胞还可以表达CD16，并且可以与抗体偶联。

[0051] 在仍其他实施例中，表达载体可以是可以在基因工程化细菌中表达的细菌载体，在引入人体时，该基因工程化细菌表达的内毒素的水平足够低而不会在人细胞中引起内毒素应答和/或不足以诱导CD-14介导的败血症。具有经修饰的脂多糖的一种示例性细菌菌株包括ClearColi®BL21(DE3)电感受态细胞。此细菌菌株是具有以下基因型的BL21:F-ompT hsdSB(rB-mB-)gal dcm lonλ(DE3[lacI lacUV5-T7基因1ind1 sam7 nin5])msbA148 ΔgutQΔkdsDΔlpxLΔlpxMΔpagPΔlpxPΔeptA。在该情况下，应理解，若干个特定的缺失突变(ΔgutQ ΔkdsD ΔlpxL ΔlpxMΔpagPΔlpxPΔeptA)编码LPS对脂质$IV_A$的修饰，而一个另外的补偿突变(msbA148)使得细胞能够在LPS前体脂质IVA的存在下维持活力。这些突变导致寡糖链从LPS中缺失。更具体地，六条酰基链中的两条发生缺失。LPS的六条酰基链是触发物，由与髓样分化因子2(MD-2)复合的Toll样受体4(TLR4)识别，从而引起NF-κB的激活和促炎细胞因子的产生。仅包含四条酰基链的脂质$IV_A$不被TLR4识别，并因此不会触发内毒素应答。尽管提供电感受态BL21细菌作为实例，诸位发明人设想经遗传修饰的细菌也可以是化学感受态细菌。可替代地或另外地，表达载体还可以是酵母载体，该酵母载体可以在酵母中，优选在酿酒酵母(Saccharomyces cerevisiae)(例如，GI-400系列重组免疫治疗酵母菌株等)中表达。

[0052] 当然，应当理解，本文设想的重组核酸不必限于病毒、酵母或细菌表达载体，但是还可以包括DNA疫苗载体、线性化的DNA和mRNA，它们都可以根据本领域熟知的方案被转染到合适的细胞中。

[0053] 另外，诸位发明人设想，与MHC-II运输信号和/或Th1、Th2、Th17、Treg或CD4+细胞毒性T细胞特异性的特异性极化表位偶联的多表位肽优选地与一种或多种共刺激分子、免疫刺激细胞因子和/或对检查点抑制进行干扰或下调的蛋白质共表达。因此，在一个实施例中，编码共刺激分子、免疫刺激细胞因子和/或对检查点抑制进行干扰或下调的蛋白质中的至少一种的第三核酸区段。第三核酸区段可以存在于不同的阅读框中，使得共刺激分子、免疫刺激细胞因子和/或对检查点抑制进行干扰或下调的蛋白质作为与多表位肽分开且不同的肽来表达。然而，还设想了第三核酸区段可以与第一和第二核酸区段存在于同一阅读框中，通过编码内部蛋白酶切割位点的核酸序列(例如，通过人金属蛋白酶等)分开。在又另一个实施例中，第三核酸区段与第一和第二核酸区段分开地位于表达载体中，使得它们的表

达可以通过两个单独的启动子(相同类型或不同类型)单独且不同地调节。

[0054] 适合的共刺激分子包括CD80、CD86、CD30、CD40、CD30L、CD40L、ICOS-L、B7-H3、B7-H4、CD70、OX40L、4-1BBL,而具有不太确定(或理解)的作用机制的其他刺激分子包括GITR-L、TIM-3、TIM-4、CD48、CD58、TL1A、ICAM-1、LFA3和SLAM家族成员。然而,用于与癌症相关序列协调表达的特别优选的分子包括CD80(B7-1)、CD86(B7-2)、CD54(ICAM-1)和CD11(LFA-1)。

[0055] 此外,虽然设想了任何合适类型的细胞因子来增强Th1、Th2、Th17、Treg或CD4+细胞毒性T细胞特异性极化和偏向的免疫应答,但是特别优选的细胞因子和细胞因子类似物包括IL-2、IL-15和IL-15超激动剂(ALT-803)。而且,应当理解,共刺激分子和/或细胞因子的表达将优选地是协调的,使得新表位或多表位与一种或多种共刺激分子和/或细胞因子同时表达。因此,典型地设想,例如,使用内部核糖体进入位点或2A序列,从单个转录物(其可以包括或可以不包括编码多表位的序列部分)或从多个转录物产生共刺激分子和/或细胞因子。

[0056] 另外地和可替代地,可以基于所需的免疫应答或CD4+T细胞/幼稚Th细胞极化的一个或多个方向来选择与多表位肽共表达的免疫刺激细胞因子。例如,在需要Treg细胞从幼稚CD4+T细胞极化的实施例中,可以选择免疫刺激细胞因子以包括IL-2和TGF-β。在需要Th17细胞从幼稚CD4+T细胞极化的另一个实施例中,可以选择免疫刺激细胞因子以包括IL-6和TGF-β。同样,用于Th1细胞极化的免疫刺激细胞因子可以包括IL-12和IFN-γ,并且用于Th2细胞极化的免疫刺激细胞因子可以包括IL-4。另外,用于Tfh细胞(卵泡辅助T细胞)极化的免疫刺激细胞因子可以包括IL-6和IL-12,并且用于CD4+细胞毒性T细胞极化的免疫刺激细胞因子可以包括IL-2。

[0057] 关于对检查点抑制进行干扰或下调的蛋白质,设想了与检查点受体结合的任何合适的肽配体。最典型地,结合将抑制或至少减少经由受体的信号传导,并且特别设想的受体包括CTLA-4(尤其是针对$CD8^+$细胞)、PD-1(尤其是针对$CD4^+$细胞)、TIM1受体、2B4和CD160。例如,适合的肽结合剂可包括特异性结合受体的抗体片段以及尤其是scFv,还有小分子肽配体(例如,经由RNA展示或噬菌体淘选分离)。还应当理解,肽分子的表达将优选地是协调的,使得新表位或多表位与一种或多种肽配体同时表达。因此,典型地设想,例如,使用内部核糖体进入位点或2A序列,从单个转录物(可以包括或可以不包括编码多表位的序列部分)或从多个转录物产生肽配体。

[0058] 本发明人还设想,可以将上述具有重组核酸的重组病毒、细菌或酵母配制在任何药学上可接受的载体中(例如,优选配制成无菌可注射组合物)以形成药物组合物。在药物组合物包括重组病毒的情况下,组合物的病毒滴度优选在$10^4$-$10^{12}$个病毒粒子/剂量单位之间。然而,可替代的配制品也被认为适用于本文,并且本文设想了所有已知的施用途径和方式。在药物组合物包括重组细菌的情况下,组合物的细菌滴度优选为$10^2$-$10^3$、$10^3$-$10^4$、$10^4$-$10^5$个细菌细胞/剂量单位。在药物组合物包括重组酵母的情况下,组合物的细菌滴度优选为$10^2$-$10^3$、$10^3$-$10^4$、$10^4$-$10^5$个酵母细胞/剂量单位。

[0059] 如本文所用,术语“施用”病毒、细菌或酵母配制品是指直接和间接施用病毒、细菌或酵母配制品,其中配制品的直接施用典型地由医疗保健专业人员(例如,医师、护士等)进行,并且其中间接施用包括将配制品提供给医疗保健专业人员或使医疗保健专业人员可获

得该配制品以直接施用(例如,经由注射、输注、口服递送、局部递送等)的步骤。

[0060] 在一些实施例中,病毒、细菌或酵母配制品是经由全身注射来施用,包括皮下(subcutaneous)、皮下(subdermal)注射或静脉内注射。在其他实施例中,在全身注射可能无效的情况下(例如,对于脑肿瘤等),设想经由肿瘤内注射来施用配制品。

[0061] 关于配制品施用的剂量和方案,设想剂量和/或方案可以根据以下而变:病毒、细菌或酵母的类型、疾病的类型和预后(例如,肿瘤类型、尺寸、位置)、患者的健康状况(例如,包括年龄、性别等)。虽然剂量和方案可以变化,但是可以对其进行选择和调节,从而使配制品不会对宿主正常细胞产生任何显著的毒性作用,但足以引发Th1偏向的或Th2偏向的免疫应答。因此,在优选的实施例中,可以基于预定的阈值确定施用配制品的最佳或所需的条件。例如,预定阈值可以是特定类型的细胞因子(例如,IFN-γ、TNF-β、IL-2、IL-4、IL-10等)的预定的局部或全身浓度。因此,典型地调节施用条件调节以使Th-1免疫应答特异性细胞因子(或Th-2免疫应答特异性细胞因子)的表达至少局部地或全身性地比Th-2免疫应答特异性细胞因子(或Th-1免疫应答特异性细胞因子)多至少20%、至少30%、至少50%、至少60%、至少70%。

[0062] 例如,在药物组合物包括重组病毒的情况下,溶瘤病毒配制品的设想剂量为至少$10^6$个病毒粒子/天、或至少$10^8$个病毒粒子/天、或至少$10^{10}$个病毒粒子/天、或至少$10^{11}$个病毒粒子/天。在一些实施例中,可以将单一剂量的病毒配制品每天至少一次或每天两次(每次施用一半剂量)施用至少一天、至少3天、至少一周、至少2周、至少一个月或任何其他所需方案。在其他实施例中,病毒配制品的剂量可以在方案期间逐渐增加,或在方案期间逐渐减少。在仍其他实施例中,病毒配制品的若干次连续施用可以分隔一定的间隔时间(例如,每连续3天施用一次,并且间隔7天,再每连续3天施用一次,等等)。

[0063] 在一些实施例中,药物配制品的施用可以分两个或更多个不同阶段:初次施用和加强施用。设想初次施用的剂量高于随后的加强施用(例如,至少20%,优选至少40%,更优选至少60%)。然而,还设想用于初次施用的剂量低于随后的加强施用。另外,在多次加强施用的情况下,每次加强施用具有不同的剂量(例如,增加的剂量,减少的剂量等)。

[0064] 不希望受任何具体理论的束缚,诸位发明人设想了向患者施用本文设想的药物组合物(例如,作为重组疫苗组合物、病毒、细菌或酵母)将导致将上述重组核酸或由这些重组核酸编码的重组蛋白递送到患者的抗原呈递细胞中。例如,可以将与遗传修饰的细菌或酵母产生的MHC-II信号偶联的多表位肽在抗原呈递细胞(例如树突细胞)中加工,以在抗原呈递细胞表面上作为与MHC-II复合体偶联的抗原来呈递。在另一个实例中,可以通过遗传修饰的病毒的感染,将编码与MHC-II信号偶联的多表位肽的核酸序列递送到抗原呈递细胞中,并且在抗原呈递细胞中编码。然后,可以将产生的与MHC-II信号偶联的多表位肽在抗原呈递细胞表面上作为与MHC-II复合体偶联的抗原来呈递。如果将多表位与Th1特异性极化表位偶联,或选择多表位的抗原/新表位触发Th1特异性极化,则预期与MHC-II多表位复合体结合的幼稚Th细胞可能使T细胞成熟极化为Th1细胞。此外,从Th1细胞分泌的细胞因子可能朝向Th1细胞进一步驱动其他幼稚Th细胞,以产生Th1占优势的免疫应答占优势的环境。应当理解,这种特异性Th1(或Th2)占优势的免疫应答至少局部可以提供疾病特异性免疫疗法。例如,对于患有自身免疫疾病或器官移植排斥的患者,增强Th2特异性免疫应答可以抑制针对患者自身组织和/或移植的器官的Th1特异性细胞毒性免疫应答。在另一个实例中,

对于患有癌症的患者，增强Th1特异性免疫应答可以增加针对表达癌症和患者特异性抗原或新表位的肿瘤细胞的细胞毒性介导的免疫应答。在又另一个实例中，对于患有自身免疫疾病的患者，增强Treg表达(或极化)可以抑制针对自身组织的过度反应性免疫应答。然而，应当认识到，免疫应答向Th1、Th2、Th178、Treg等的极化不是通用极化，而是在所表达抗原的特定情况下的极化。因此，应当理解，可以以抗原特异性方式针对特定CD4亚型高度有效地调节免疫应答。

[0065] 对于本领域技术人员应当清楚的是，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，更多修改是可能的。因此，本发明主题仅受限于所附权利要求的范围。此外，在解释说明书和权利要求时，所有术语应当以与上下文一致的尽可能广泛的方式解释。特别地，术语“包含”(“comprises”和“comprising”)应当被解释为以非排他性方式提及要素、组分或步骤，从而指示所提及的要素、组分或步骤可以与未明确提及的其他要素、组分或步骤一起存在、或使用、或组合。如本文的说明书和随后的整个权利要求中所使用，“一个/一种(a)”、“一个/一种(an)”以及“该(the)”的含义包括复数参照物，除非上下文清楚地另外指明。而且，如本文的说明书中所使用，“在……中(in)”的含义包括“在……中(in)”和“在……上(on)”，除非上下文另有明确说明。在说明书权利要求书提及选自由A、B、C…和N组成的组的某物的至少一种的情况下，该文字应当被解释为只需要该组中的一个要素，而不是A加N、或B加N等。