



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113396155 A

(43) 申请公布日 2021.09.14

(21) 申请号 201980089773.2

(22) 申请日 2019.12.26

(30) 优先权数据

62/785,502 2018.12.27 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.07.21

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2019/068619 2019.12.26

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/139978 EN 2020.07.02

(71) 申请人 维伊木恩股份有限公司

地址 美国马里兰州

(72) 发明人 J·W·王 N·英加瓦 K·松井

(74) 专利代理机构 北京市铸成律师事务所

11313

代理人 王珺 李文颖

(51) Int.Cl.

C07K 14/025 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/02 (2006.01)

A61K 35/17 (2015.01)

A61K 35/76 (2015.01)

A61K 35/768 (2015.01)

A61K 39/12 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

A61K 39/39 (2006.01)

A61K 47/64 (2017.01)

A61P 35/00 (2006.01)

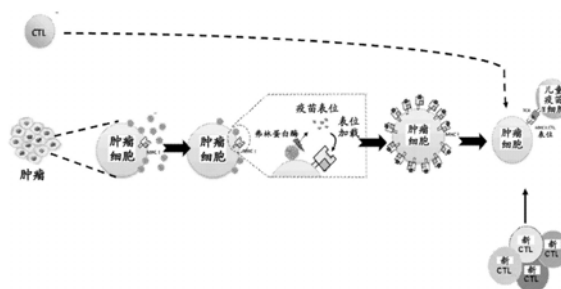
权利要求书5页 说明书61页 附图22页

(54) 发明名称

偶联病毒样颗粒及其作为抗肿瘤免疫重定向剂的用途

(57) 摘要

本发明公开了一类新的偶联病毒样颗粒(VLP)。这些偶联VLP与多种多样的肿瘤结合并且包含被宿主中已经存在的先前T细胞免疫应答识别的表位。这些表位来源于病原体或先前的疫苗接种(诸如儿童早期疫苗)。这激发身体通过先前的感染或先前的儿童疫苗接种获得的预先存在的细胞毒性免疫力被重新定向到肿瘤细胞以消除癌症,并且形成长期的抗肿瘤免疫力。所述偶联VLP可用于调整广泛范围的肿瘤,使其受到来自现有免疫力的应答的影响,从而回避了鉴定肿瘤抗原或产生肿瘤特异性免疫应答的需要,重要的是,本文所述的组合物和方法拓宽了治疗先前由于目前可用的免疫治疗药物的各种技术限制和生物学限制而患有不可靶向的癌症的受试者中的所有癌症类型的机会。



1. 一种偶联病毒样颗粒 (“VLP”), 其包括:
 - (a) 衣壳蛋白, 其中所述衣壳蛋白与癌细胞结合; 和
 - (b) 融合蛋白, 所述融合蛋白至少包含: i) 裂解肽序列, 其中所述裂解肽序列在肿瘤微环境中被蛋白酶裂解; 和 ii) 至少一种召回蛋白序列, 其中所述召回蛋白序列编码具有为能够被肿瘤细胞上的 I 类 MHC 分子结合并从而募集受试者中预先存在的 T 细胞的表位的序列的蛋白质或其片段, 其中所述裂解序列与所述衣壳蛋白偶联。
2. 如权利要求 1 所述的 VLP, 其中所述衣壳蛋白来自乳头瘤病毒。
3. 如权利要求 2 所述的 VLP, 其中所述乳头瘤病毒包含 L1 蛋白。
4. 如权利要求 1 所述的 VLP, 其中所述表位来自病原体。
5. 如权利要求 1 所述的 VLP, 其中所述 VLP 包含所述融合蛋白, 所述融合蛋白包含至少一种另外的召回蛋白, 或其中所述 VLP 包含至少两种融合蛋白, 所述至少两种融合蛋白各自包含不同的召回蛋白序列。
6. 如权利要求 5 所述的 VLP, 其中所述至少两种召回蛋白序列来自相同病原体的不同 T 细胞表位。
7. 如权利要求 5 所述的 VLP, 其中所述至少两种召回蛋白序列来自不同病原体。
8. 如权利要求 4 所述的 VLP, 其中所述病原体是病毒、细菌、真菌或寄生虫。
9. 如权利要求 1 所述的 VLP, 其中所述表位是人疫苗或来源于人疫苗。
10. 如权利要求 9 所述的 VLP, 其中所述人疫苗是儿童早期疫苗。
11. 如权利要求 1 所述的 VLP, 其中所述融合蛋白经由二硫键、马来酰亚胺键或酰胺键与所述衣壳蛋白的半胱氨酸、赖氨酸或精氨酸偶联。
12. 如权利要求 1 所述的 VLP, 其中所述衣壳蛋白和所述融合蛋白作为融合蛋白连续表达。
13. 如权利要求 9 所述的 VLP, 其中所述疫苗是针对病原体的疫苗。
14. 如权利要求 13 所述的 VLP, 其中所述病原体是病毒、细菌、真菌或寄生虫。
15. 如权利要求 13 所述的 VLP, 其中所述疫苗引发对下列病毒的免疫力: 牛痘病毒、水痘带状疱疹病毒、带状疱疹病毒、风疹病毒、肝炎病毒例如甲肝病毒或乙肝病毒或丙肝病毒、甲型或乙型流感病毒、麻疹病毒、腮腺炎病毒、脊髓灰质炎病毒、痘疮 (天花) 病毒、狂犬病病毒、登革热病毒、埃博拉病毒、西尼罗河病毒、黄热病病毒、寨卡病毒、巨细胞病毒或埃-巴二氏病毒。
16. 如权利要求 15 所述的 VLP, 其中所述疫苗引发对细菌的免疫力, 并且其中所述细菌为百日咳博德特氏杆菌、破伤风梭菌、沙眼衣原体、白喉、流感嗜血杆菌、脑膜炎球菌例如脑膜炎球菌 ACWY、肺炎球菌、霍乱弧菌、结核分枝杆菌、卡介苗 (BCG)、伤寒、大肠杆菌、沙门氏菌、嗜肺军团菌、立克次体、梅毒螺旋体苍白亚种、A 组或 B 组链球菌、肺炎链球菌、炭疽杆菌、肉毒杆菌或耶尔森氏菌属细菌。
17. 如权利要求 14 所述的 VLP, 其中所述寄生虫是溶组织内阿米巴、刚地弓形虫、毛形属例如旋毛虫、毛滴虫属例如阴道毛滴虫, 锥虫属例如布氏冈比亚锥虫、布氏罗得西亚锥虫、克氏锥虫, 疟原虫属例如恶性疟原虫、间日疟原虫或三日疟原虫。
18. 如权利要求 1 所述的 VLP, 其中所述 VLP 能够在所述受试者中以总 CD8⁺ T 细胞基线的至少 2 倍的阈值引发 T 细胞应答。

19. 如权利要求18所述的VLP,其中所述CD8⁺ T细胞包括CD69⁺细胞。
20. 如权利要求1所述的VLP,其中所述衣壳蛋白选择性地结合硫酸肝素蛋白聚糖(HSPG)。
21. 一种治疗受试者的癌症的方法,其包括将药学有效量的偶联病毒样颗粒(VLP)施用于对其有需要的受试者,其中所述偶联VLP包括:
 - (a) 衣壳蛋白,其中所述衣壳蛋白与癌细胞结合;和
 - (b) 融合蛋白,所述融合蛋白至少包含:i) 裂解肽序列,其中所述裂解肽序列在肿瘤微环境中被蛋白酶裂解;和ii) 至少一种召回蛋白序列,其中所述召回蛋白序列编码具有为能够被肿瘤细胞上的I类MHC分子结合并从而募集受试者中预先存在的T细胞的表位的序列的蛋白质或其片段,其中所述裂解序列与所述衣壳蛋白偶联。
22. 如权利要求21所述的方法,其中所述衣壳蛋白来自乳头瘤病毒。
23. 如权利要求22所述的方法,其中所述乳头瘤病毒包含L1蛋白。
24. 如权利要求21所述的方法,其中所述召回蛋白包含病原体的所述表位。
25. 如权利要求21所述的方法,其中所述VLP包含所述融合蛋白,所述融合蛋白包含至少一种另外的召回蛋白,或其中所述VLP包含至少两种融合蛋白,所述至少两种融合蛋白各自包含不同的召回蛋白序列。
26. 如权利要求25所述的方法,其中所述至少两种召回蛋白序列来自相同病原体的不同T细胞表位。
27. 如权利要求25所述的方法,其中所述至少两种召回蛋白序列来自不同病原体。
28. 如权利要求24所述的方法,其中所述病原体是病毒、细菌、真菌或寄生虫。
29. 如权利要求21所述的方法,其中所述表位是人疫苗或来源于人疫苗。
30. 如权利要求29所述的方法,其中所述人疫苗是儿童早期疫苗。
31. 如权利要求21所述的方法,其中所述融合蛋白经由二硫键、马来酰亚胺键或酰胺键与所述衣壳蛋白的半胱氨酸、赖氨酸或精氨酸偶联。
32. 如权利要求21所述的方法,其中所述衣壳蛋白和所述融合蛋白作为融合蛋白连续表达。
33. 如权利要求29所述的方法,其中所述疫苗是针对病原体的疫苗。
34. 如权利要求33所述的方法,其中所述病原体是病毒、细菌、真菌或寄生虫。
35. 如权利要求33所述的方法,其中所述疫苗引发对下列病毒的免疫力:牛痘病毒、水痘带状疱疹病毒、带状疱疹病毒、风疹病毒、肝炎病毒例如甲肝病毒或乙肝病毒或丙肝病毒、甲型或乙型流感病毒、麻疹病毒、腮腺炎病毒、脊髓灰质炎病毒、痘疮(天花)病毒、狂犬病病毒、登革热病毒、埃博拉病毒、西尼罗河病毒、黄热病病毒、寨卡病毒、巨细胞病毒或埃-巴二氏病毒。
36. 如权利要求35所述的方法,其中所述疫苗引发对细菌的免疫力,并且其中所述细菌为百日咳博德特氏杆菌、破伤风梭菌、沙眼衣原体、白喉、流感嗜血杆菌、脑膜炎球菌例如脑膜炎球菌ACWY、肺炎球菌、霍乱弧菌、结核分枝杆菌、卡介苗(BCG)、伤寒、大肠杆菌、沙门氏菌、嗜肺军团菌、立克次体、梅毒螺旋体苍白亚种、A组或B组链球菌、肺炎链球菌、炭疽杆菌、肉毒杆菌或耶尔森氏菌属细菌。
37. 如权利要求34所述的方法,其中所述寄生虫是溶组织内阿米巴、刚地弓形虫、毛形

属例如旋毛虫、毛滴虫属例如阴道毛滴虫,锥虫属例如布氏冈比亚锥虫、布氏罗得西亚锥虫、克氏锥虫,疟原虫属例如恶性疟原虫、间日疟原虫或三日疟原虫。

38.如权利要求21所述的方法,其中所述VLP能够在所述受试者中以总CD8⁺ T细胞基线的至少2倍的阈值引发T细胞应答。

39.如权利要求38所述的方法,其中所述CD8⁺ T细胞包括CD69⁺细胞。

40.如权利要求21所述的方法,其中所述衣壳蛋白选择性地结合硫酸肝素蛋白聚糖(HSPG)。

41.如权利要求21所述的方法,其还包括施用第二剂所述召回蛋白。

42.如权利要求41所述的方法,其中所述第二次施用的所述召回蛋白作为偶联VLP递送。

43.如权利要求41所述的方法,其中所述第二次施用的所述召回蛋白作为疫苗递送。

44.如权利要求41所述的方法,其中所述第二次施用的所述召回作为佐剂中的分离肽。

45.一种治疗受试者的疾病或病症的方法,其包括向所述受试者施用药学有效量的偶联病毒样颗粒(VLP),其中施用所述偶联VLP包括:

i.检测所述受试者中的预先存在的免疫应答的存在;

ii.制备用于施用于所述受试者的所述偶联VLP,其中所述偶联VLP包含:

(a)衣壳蛋白,其中所述衣壳蛋白与癌细胞结合;和

(b)融合蛋白,所述融合蛋白至少包含:i)裂解肽序列,其中所述裂解肽序列在肿瘤微环境中被蛋白酶裂解;和ii)至少一种召回蛋白序列,

其中所述召回蛋白序列编码具有为能够被肿瘤细胞上的I类MHC分子结合并从而募集受试者中预先存在的T细胞的表位的序列的蛋白质或其片段,

其中所述裂解序列与所述衣壳蛋白偶联,并且

其中所述T细胞表位是基于所述受试者中的所述预先存在的免疫应答而引发T细胞应答的表位。

46.如权利要求45所述的方法,其中所述衣壳蛋白来自乳头瘤病毒。

47.如权利要求46所述的方法,其中所述乳头瘤病毒包含L1蛋白。

48.如权利要求45所述的方法,其中所述召回蛋白包含病原体的所述表位。

49.如权利要求45所述的方法,其中所述VLP包含所述融合蛋白,所述融合蛋白包含至少一种另外的召回蛋白,或其中所述VLP包含至少两种融合蛋白,所述至少两种融合蛋白各自包含不同的召回蛋白序列。

50.如权利要求49所述的方法,其中所述至少两种召回蛋白序列来自相同病原体的不同T细胞表位。

51.如权利要求49所述的方法,其中所述至少两种召回蛋白序列来自不同病原体。

52.如权利要求48所述的方法,其中所述病原体是病毒、细菌、真菌或寄生虫。

53.如权利要求45所述的方法,其中所述表位是人疫苗或来源于人疫苗。

54.如权利要求53所述的方法,其中所述人疫苗是儿童早期疫苗。

55.如权利要求45所述的方法,其中所述融合蛋白经由二硫键、马来酰亚胺键或酰胺键与所述衣壳蛋白的半胱氨酸、赖氨酸或精氨酸偶联。

56.如权利要求45所述的方法,其中所述衣壳蛋白和所述融合蛋白作为融合蛋白连续

表达。

57. 如权利要求53所述的方法,其中所述疫苗是针对病原体的疫苗。

58. 如权利要求57所述的方法,其中所述病原体是病毒、细菌、真菌或寄生虫。

59. 如权利要求53所述的方法,其中所述疫苗引发对下列病毒的免疫力:牛痘病毒、水痘带状疱疹病毒、带状疱疹病毒、风疹病毒、肝炎病毒例如甲肝病毒或乙肝病毒或丙肝病毒、甲型或乙型流感病毒、麻疹病毒、腮腺炎病毒、脊髓灰质炎病毒、痘疮(天花)病毒、狂犬病病毒、登革热病毒、埃博拉病毒、西尼罗河病毒、黄热病病毒、寨卡病毒、巨细胞病毒或埃-巴二氏病毒。

60. 如权利要求53所述的方法,其中所述疫苗引发对细菌的免疫力,并且其中所述细菌为百日咳博德特氏杆菌、破伤风梭菌、沙眼衣原体、白喉、流感嗜血杆菌、脑膜炎球菌例如脑膜炎球菌ACWY、肺炎球菌、霍乱弧菌、结核分枝杆菌、卡介苗(BCG)、伤寒、大肠杆菌、沙门氏菌、嗜肺军团菌、立克次体、梅毒螺旋体苍白亚种、A组或B组链球菌、肺炎链球菌、炭疽杆菌、肉毒杆菌或耶尔森氏菌属细菌。

61. 如权利要求52所述的方法,其中所述寄生虫是溶组织内阿米巴、刚地弓形虫、毛形属例如旋毛虫、毛滴虫属例如阴道毛滴虫,锥虫属例如布氏冈比亚锥虫、布氏罗得西亚锥虫、克氏锥虫,疟原虫属例如恶性疟原虫、间日疟原虫或三日疟原虫。

62. 如权利要求45所述的方法,其中所述VLP能够在所述受试者中以总CD8⁺ T细胞基线的至少2倍的阈值引发T细胞应答。

63. 如权利要求62所述的方法,其中所述CD8⁺ T细胞包括CD69⁺细胞。

64. 如权利要求45所述的方法,其中所述衣壳蛋白选择性地结合硫酸肝素蛋白聚糖(HSPG)。

65. 如权利要求45所述的方法,其还包括第二次施用所述召回蛋白。

66. 如权利要求47所述的方法,其中第二次施用的所述召回蛋白在偶联VLP中递送。

67. 如权利要求45所述的方法,其还包括将选自权利要求1的步骤(ii)(b)的所述召回蛋白施用于对其有需要的患者。

68. 如权利要求46所述的方法,其中所述受试者接受所述召回蛋白的第二次施用。

69. 如权利要求47所述的方法,其中第二次施用的所述召回蛋白在偶联VLP中递送。

70. 如权利要求44至47中任一项所述的方法,其中向所述受试者递送加强疫苗。

71. 如权利要求70所述的方法,其中在施用所述偶联VLP后至少两周递送所述加强疫苗。

72. 如权利要求70所述的方法,其中所述疫苗是带状疱疹疫苗、prevenar疫苗、HEPLISA V-B疫苗、MMR-II疫苗、Zostavax或Energix。

73. 如权利要求72所述的方法,其中所述疫苗用于带状疱疹。

74. 如权利要求73所述的方法,其中所述受试者是至少50岁的人类患者。

75. 如权利要求72所述的方法,其中所述疫苗是Prevenar。

76. 如权利要求75所述的方法,其中所述受试者是至少50岁的人类患者。

77. 如权利要求72所述的方法,其中所述疫苗是HEPLISAV-B。

78. 如权利要求77所述的方法,其中所述受试者是至少50岁的人类患者。

79. 如权利要求45至47中任一项所述的方法,其中所述受试者之前用CAR-T、治疗性疫

苗、检查点抑制剂、溶瘤病毒、新抗原疫苗、新佐剂、化疗、放疗或手术治疗过,但之前并未显示具有抗肿瘤作用。

80. 如权利要求44至52中任一项所述的方法,其中所述召回蛋白不是肿瘤相关抗原。

81. 如权利要求45所述的方法,其中所述方法抑制肿瘤的生长、进展或转移。

82. 如权利要求81所述的方法,其中所述肿瘤是小细胞肺癌、肝细胞癌、肝癌、肝细胞癌、黑色素瘤、转移性黑色素瘤、肾上腺癌、肛门癌、再生障碍性贫血、胆管癌、膀胱癌、骨癌、脑癌/CNS癌、乳腺癌、原发部位不明癌症、卡斯特雷曼氏症、宫颈癌、结肠/直肠癌、子宫内膜癌、食道癌、尤因家族肿瘤、眼癌、胆囊癌、胃肠类癌肿瘤、胃肠道间质瘤(gist)、妊娠滋养细胞疾病、霍奇金氏病、卡波西氏肉瘤、肾癌、喉癌和下咽癌、白血病、肝癌、肺癌、淋巴瘤、恶性间皮瘤、多发性骨髓瘤、骨髓异常增生综合征、鼻腔癌和鼻窦癌、鼻咽癌、神经母细胞瘤、口腔癌和口咽癌、骨肉瘤、卵巢癌、胰腺癌、阴茎癌、垂体瘤、前列腺癌、视网膜母细胞瘤、横纹肌肉瘤、唾液腺癌、肉瘤、皮肤癌、胃癌、睾丸癌、胸腺癌、甲状腺癌、子宫肉瘤、阴道癌、外阴癌、华氏巨球蛋白血症、威尔姆氏肿瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、霍奇金氏淋巴瘤、伯基特氏淋巴瘤、淋巴母细胞性淋巴瘤、套细胞淋巴瘤(MCL)、多发性骨髓瘤(MM)、小淋巴细胞性淋巴瘤(SLL)、脾边缘区淋巴瘤、边缘区淋巴瘤(结外或淋巴结)、成人混合细胞型弥漫性侵袭性淋巴瘤、成人大细胞型弥漫性侵袭性淋巴瘤、成人大细胞免疫母细胞型弥漫性侵袭性淋巴瘤、成人小非裂解细胞弥漫性侵袭性淋巴瘤或滤泡性淋巴瘤、头颈癌、子宫内膜癌或子宫癌、非小细胞肺癌、骨肉瘤、胶质母细胞瘤或转移性癌症。

偶联病毒样颗粒及其作为抗肿瘤免疫重定向剂的用途

[0001] 优先权

[0002] 本申请要求2018年12月27日提交的美国临时专利申请序列号62/785,502的优先权和权益,该申请据此以引用方式整体并入本文。

[0003] 参考经由EFS-WEB提交的序列列表

[0004] 依据EFS-Web法律框架和37 CFR §§1.821-825 (参见MPEP §2442.03 (a)),为ASCII兼容文本文件(名称为“8002PCT_ST25.txt”,在2019年12月26日创建,大小为28,572字节)的形式的序列列表与本申请同时提交,并且该序列列表的全部内容以引用方式整体并入本文。

技术领域

[0005] 本发明涉及优选地结合肿瘤的偶联病毒样颗粒(VLP)。本发明的VLP包括能够使用选择性地攻击VLP所结合的肿瘤的预先存在的召回蛋白特异性T细胞来引发T细胞应答的召回蛋白。

背景技术

[0006] 根据美国国家癌症研究所的数据,癌症死亡的总体比率继续下降:男性的总体癌症发病率已下降,而女性的总体癌症发病率已稳定。大多数但并非所有的常见癌症的五年生存率也有所提高。然而,据估计,仅在美国,2017年就将新增1,688,780例新诊断癌症病例和600,920例癌症死亡病例。典型的癌症治疗方法包括化疗、放疗和手术。然而,手术是高度侵入性的并且经常失败——尤其是在转移之后。化疗和放疗可能是有效的,但会导致严重的副作用,从而大大降低生活质量。尽管有这些治疗方法,但许多癌症依然难以治疗,这些治疗方法即使在已成功地减轻或消除原发性肿瘤的情况下,对于对抗转移性癌症也可能无效。靶向递送已成为用于改善这些疾病的治疗的最有前途但也是最具挑战性的机会之一。开发递送媒介物的第一次尝试是抗体-药物偶联物。在几乎所有情况下,目标都是将细胞毒性T细胞(CTL)递送到癌细胞部位,以实现了对癌细胞的选择性杀伤。最近,已尝试使用这种免疫疗法来刺激免疫系统并且特异性靶向优选地存在于癌细胞表面上的蛋白质,从而导致靶向消除癌细胞。此类疗法的吸引力在于它们具有靶向特异性,并且潜在地毒性较低而没有非特异性的自身免疫。与手术、放疗或化疗相比,它们还被认为侵入性或创伤性较小。然而,基于癌症相关抗原的癌症疫苗可能由于例如临床免疫原性差、免疫耐受性和脱靶效应而成功率有限。另外,此类方法通常需要识别对特定患者的癌症具有特异性的癌症相关抗原,以实现了对癌症的有效靶向。

[0007] 因此,该方法已在许多情况下失败,因为大多数癌症相关抗原是免疫系统耐受的自身抗原,导致免疫应答差。重要的是,这些特定的癌症抗原特异性免疫疗法在黄金标准动物模型中所证明的成功并不总能转移到人类。最后但同样重要的是,并非所有患有癌症的患者都将在肿瘤上表达相同的抗原,因此在广泛适用性方面存在限制。最近,该领域现已转向关注患者体内可能导致癌症特异性新表位的个体肿瘤突变。使用这些新表位作为抗原(称为“新抗原”)已使癌症疫苗领域复兴。然而,这是高度个性化的疗法,需要漫长的开发时

间,既昂贵又难以广泛实施。基于偶联抗原受体T细胞(CAR-T细胞)的策略尽管有治愈性,但在其中也看到了类似的局限性。

[0008] 一类已获得青睐的治疗法是免疫检查点阻断疗法。这种治疗模式基于这样的前提:肿瘤的生长和进展是受其防止免疫系统的特异性靶向和破坏的能力驱使的。鉴于此,检查点抑制疗法用于逆转这种“免疫抑制”,从而重新启动免疫系统的适当和有效的抗肿瘤功能。事实上,这些疗法已显示出对以前预后极差的多种癌症(黑素瘤、结肠直肠癌)的显著益处。然而,已充分确定,肿瘤微环境会削弱内源性抗肿瘤免疫细胞根除癌症的能力。因此,靶向检查点途径成员程序性细胞死亡-1(PD-1)或程序性死亡配体1(PD-L1)的药物起到阻断免疫抑制途径的作用,并且已被证实有助于身体的免疫系统对抗癌症。遗憾的是,检查点抑制剂药物对大多数患者不起作用,具有不可忽视的70%无应答率。这主要是由于缺乏可以浸润肿瘤的预先存在的抗肿瘤CD8+T细胞免疫应答。因此,检查点抑制剂通常被认为在治疗经常缺乏显著的抗肿瘤免疫浸润(有时也被称为“冷肿瘤”或“非免疫原性”)的癌症时无效的,尤其是在肿瘤在起源部位发展时的发展早期期间。

[0009] 因此,目前的治疗方法保留了同样公认的毒性局限性、有限的应答者群体(不适用于多种癌症),并且最重要的是,它们还具有成本过高的开发途径,导致患者的医疗费用较高。因此,重要的是考虑一种替代性的免疫治疗策略,其可以规避免疫耐受性以及缺乏免疫浸润的问题,因此仍然需要产生强而持久的癌症特异性T细胞应答来抑制肿瘤生长、进展和转移,而无需对个体患者癌症类型进行过度表征的组合物和方法。

发明内容

[0010] 在各种实施方案中,提供了偶联病毒样颗粒(“VLP”),其中VLP包含衣壳蛋白,其中所述衣壳蛋白与癌细胞结合或能够与癌细胞结合;融合蛋白,该融合蛋白至少包含蛋白质裂解序列,其中该蛋白质裂解序列在存在肿瘤的情况下被优选地裂解;和至少一种召回蛋白,其中所述召回蛋白是具有下述序列的蛋白质或其片段:该序列为被患者体内存在的T细胞结合或能够被患者体内存在的T细胞结合的表位。

[0011] 在各种实施方案中,衣壳蛋白来自乳头瘤病毒。在各种实施方案中,乳头瘤病毒包含L1蛋白。在各种实施方案中,召回蛋白包含病原体的表位。在各种实施方案中,VLP包含至少一种融合蛋白,该融合蛋白包括至少两种召回蛋白。在各种实施方案中,VLP包含至少两种融合蛋白,每种融合蛋白包括不同的召回蛋白。在各种实施方案中,这些召回蛋白中的至少两种是具有来自相同病原体的不同T细胞表位的序列的蛋白质或其片段。在各种实施方案中,这些召回蛋白中的至少两种是具有来自不同病原体的不同T细胞表位的序列的蛋白质或其片段。

[0012] 在各种实施方案中,病原体是病毒、细菌、真菌或寄生虫。在各种实施方案中,表位来源于人疫苗的表位的序列或序列的子集,或者由人疫苗的表位的序列或序列的子集组成。在各种实施方案中,疫苗是儿童早期疫苗或批准用于成人的疫苗。在各种实施方案中,融合蛋白经由二硫键、马来酰亚胺键或酰胺键与衣壳蛋白的半胱氨酸、赖氨酸或精氨酸偶联。在各种实施方案中,衣壳蛋白和融合蛋白作为融合蛋白连续表达。在各种实施方案中,疫苗是针对病原体的疫苗。在各种实施方案中,病原体是病毒、细菌、真菌或寄生虫。在各种实施方案中,疫苗引发对下列病毒的免疫力:牛痘病毒、水痘带状疱疹病毒、带状疱疹病毒、

风疹病毒、肝炎病毒(例如,甲肝病毒,或乙肝病毒,或丙肝病毒)、甲型或乙型流感病毒、麻疹病毒、腮腺炎病毒、脊髓灰质炎病毒、痘疮(天花)病毒、狂犬病病毒、登革热病毒、埃博拉病毒、西尼罗河病毒、黄热病病毒或寨卡病毒、巨细胞病毒或埃-巴二氏病毒(Epstein-Barr virus)。在各种实施方案中,疫苗引发对细菌感染的免疫力,并且其中细菌是百日咳博德特氏杆菌(*Bordetella pertussis*)、破伤风梭菌(*Clostridium tetani*)、沙眼衣原体(*Chlamydia trachomatis*)、白喉、流感嗜血杆菌(*Hemophilus influenza*)、脑膜炎球菌(*Meningococcus*) (例如脑膜炎球菌ACWY)、肺炎球菌(*Pneumococcus*)、霍乱弧菌(*Vibrio cholera*)、结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)、卡介苗(BCG)、伤寒、大肠杆菌(*E.coli*)、沙门氏菌(*Salmonella*)、嗜肺军团菌(*Legionella pneumophila*)、立克次体(*Rickettsia*)、梅毒螺旋体苍白亚种(*Treponema pallidum pallidum*)、A组或B组链球菌(*Streptococcus*)、肺炎链球菌(*Streptococcus pneumonia*)、炭疽杆菌(*Bacillus anthracis*)、肉毒杆菌(*Clostridium botulinum*)或耶尔森氏菌属物种(*Yersinia sp.*)。在各种实施方案中,寄生虫是溶组织内阿米巴(*Entamoeba histolytica*)、刚地弓形虫(*Toxoplasma gondii*)、毛形属物种(*Trichinella sp.*) (例如旋毛虫(*Trichinella spiralis*))、毛滴虫属物种(*Trichomonas sp.*) (例如阴道毛滴虫(*Trichomonas vaginalis*))、锥虫属物种(*Trypanosoma sp.*) (例如布氏冈比亚锥虫(*Trypanosoma brucei gambiense*)、布氏罗得西亚锥虫(*Trypanosoma brucei rhodesiense*)或克氏锥虫(*Trypanosoma cruzi*))或者疟原虫属(*Plasmodium*) (例如恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*)、间日疟原虫(*Plasmodium vivax*)或三日疟原虫(*Plasmodium malariae*))。

[0013] 在各种实施方案中,VLP能够引发阈值为总CD8+T细胞基线的至少2倍的T细胞应答。在各种实施方案中,CD8+T细胞也是CD69+。在各种实施方案中,CD8+T细胞也是CD69+CD103+。在各种实施方案中,CD8+T细胞是源自非淋巴器官的组织常驻记忆T细胞(T_{RM} 细胞)。在各种实施方案中,衣壳蛋白能够选择性地结合硫酸肝素蛋白聚糖(“HSPG”)。

[0014] 在各种实施方案中,提供了用于治疗患有癌症的受试者的方法,包括施用偶联病毒样颗粒(VLP),其中该VLP包含:(a)衣壳蛋白,其中所述衣壳蛋白能够与癌细胞结合;和(b)融合蛋白,该融合蛋白至少包含:i)裂解序列,其中该裂解序列在存在肿瘤的情况下被优选地裂解;和ii)至少一种召回蛋白,其中所述召回蛋白是能够为能够被患者体内存在的T细胞结合的表位的序列的蛋白质或其片段,其中裂解序列与衣壳蛋白结合。在各种实施方案中,该方法还包括第二次施用所述召回蛋白。在各种实施方案中,第二次施用的召回蛋白作为偶联VLP递送。在各种实施方案中,第二次施用的召回蛋白作为疫苗递送。在各种实施方案中,第二次施用的召回蛋白作为佐剂中的分离肽递送。

[0015] 在各种实施方案中,提供了用于将偶联病毒样颗粒(VLP)提供给对其有需要的患者的方法,包括:(i)测量患者体内的预先存在的免疫力;以及(ii)选择适当的偶联VLP施用于对其有需要的患者,所述VLP包含:(a)衣壳蛋白,其中所述衣壳蛋白能够与癌细胞结合;和(b)融合蛋白,该融合蛋白至少包含:i)裂解序列,其中该裂解序列在存在肿瘤的情况下被优选地裂解;和ii)至少一种召回蛋白,其中所述召回蛋白是能够为能够被患者体内存在的T细胞结合的表位的序列的蛋白质或其片段,其中裂解序列与衣壳蛋白结合;其中T细胞表位可以引发T细胞作为总CD8+CD69+阳性T细胞的基线。

[0016] 在各种实施方案中,将加强疫苗递送给患者。在各种实施方案中,在施用偶联VLP

后至少两周递送加强疫苗。在各种实施方案中,在施用偶联VLP前两周递送加强疫苗。在各种实施方案中,疫苗是带状疱疹疫苗、PREVNAR13®疫苗、HEPLISAV-B®疫苗、MMR-II疫苗、ZOSTAVAX®或ENGERIX-B®。在各种实施方案中,疫苗用于带状疱疹。在各种实施方案中,疫苗是PREVNAR13®。在各种实施方案中,疫苗是HEPLISAV-B®。在各种实施方案中,受试者是至少50岁的人类患者。在各种实施方案中,患者之前用CAR-T、治疗性疫苗、检查点抑制剂、溶瘤病毒、新抗原疫苗、新佐剂、化疗、放疗、手术治疗过,但之前并未显示具有抗肿瘤作用。在各种实施方案中,召回蛋白不是肿瘤相关抗原。在各种实施方案中,该方法抑制肿瘤的生长、进展或转移。

[0017] 在各种实施方案中,肿瘤是小细胞肺癌、肝细胞癌、肝癌、肝细胞癌、黑素瘤、转移性黑素瘤、肾上腺癌、肛门癌、再生障碍性贫血、胆管癌、膀胱癌、骨癌、脑癌或中枢神经系统(CNS)癌、乳腺癌、原发部位不明癌症、卡斯特雷曼氏症(Castleman disease)、宫颈癌、结肠/直肠癌、子宫内膜癌、食道癌、尤因家族肿瘤(Ewing family of tumors)、眼癌、胆囊癌、胃肠类癌肿瘤、胃肠道间质瘤(GIST)、妊娠滋养细胞疾病、霍奇金氏病(Hodgkin disease)、卡波西氏肉瘤(Kaposi sarcoma)、肾癌、喉癌和下咽癌、白血病、肝癌、肺癌、淋巴瘤、恶性间皮瘤、多发性骨髓瘤、骨髓异常增生综合征、鼻腔癌和鼻窦癌、鼻咽癌、神经母细胞瘤、口腔癌和口咽癌、骨肉瘤、卵巢癌、胰腺癌、阴茎癌、垂体瘤、前列腺癌、视网膜母细胞瘤、横纹肌肉瘤、唾液腺癌、肉瘤、皮肤癌、胃癌、睾丸癌、胸腺癌、甲状腺癌、子宫肉瘤、阴道癌、外阴癌、华氏巨球蛋白血症(Waldenstrom macroglobulinemia)、威尔姆氏肿瘤(Wilms tumor)、非霍奇金氏淋巴瘤(non-Hodgkin lymphoma)、霍奇金氏淋巴瘤(Hodgkin lymphoma)、伯基特氏淋巴瘤(Burkitt's lymphoma)、淋巴母细胞性淋巴瘤、套细胞淋巴瘤(MCL)、多发性骨髓瘤(MM)、小淋巴细胞性淋巴瘤(SLL)、脾边缘区淋巴瘤、边缘区淋巴瘤(结外或淋巴结)、成人混合细胞型弥漫性侵袭性淋巴瘤、成人大细胞型弥漫性侵袭性淋巴瘤、成人大细胞免疫母细胞型弥漫性侵袭性淋巴瘤、成人小非裂解细胞弥漫性侵袭性淋巴瘤或滤泡性淋巴瘤、头颈癌、子宫内膜癌或子宫癌、非小细胞肺癌、骨肉瘤、胶质母细胞瘤或转移性癌症。在一个实施方案中,癌症是乳腺癌、宫颈癌、卵巢癌、胰腺癌或黑素瘤。

附图说明

[0018] 图1展示了所公开的偶联VLP的作用机制。

[0019] 图2A示出了C57BL/6小鼠的小鼠TC-1肿瘤随时间推移的生长,其中TC-1肿瘤表达绿色荧光蛋白(GFP)和荧光素酶两者。图2B示出了荧光激活流式细胞分选术(FACS)数据的图形表示,该数据是从用VLP处理(较浅的阴影峰)或未用VLP处理(较深的阴影峰)的C57BL/6小鼠激发的TC-1肿瘤的分析中产生的。左图针对GFP进行门控,右图针对通过藻红蛋白(PE)偶联的VLP特异性抗小鼠抗体检测的VLP进行门控。

[0020] 图3展示了在B16荧光素酶和ID8荧光素酶肿瘤细胞模型中,HPV16 E7偶联VLP在体外以时间依赖性方式的E7 T细胞介导的细胞毒性作用。特别地,图3A和图3B分别示出了与不同浓度的单独的E7肽或偶联至VLP的E7肽一起孵育的B16-LUC细胞在5.5小时和8.5小时的状态。同样地,图3C和图3D分别示出了与单独的E7肽或偶联至VLP的E7肽一起孵育的ID8细胞在5.5小时和8.5小时的状态。

[0021] 图4展示了在B16荧光素酶和ID8荧光素酶肿瘤细胞模型中,HPV16 E7偶联VLP在体

外以时间依赖性方式的E7 T细胞介导的细胞毒性作用。特别地,图4A和图4B示出,对于与B16-LUC细胞和鼠CD8+HPV16 E7特异性T细胞一起孵育的E7偶联VLP,细胞毒性分别在8.5小时与22.5小时之间得到改善。类似地,图4C和图4D示出,对于与ID8细胞和鼠CD8+HPV16 E7特异性T细胞一起孵育的E7偶联VLP,细胞毒性分别在8.5小时与22.5小时之间得到改善。

[0022] 图5展示了分别在23小时和23.5小时的时间点结束的两个单独的研究之后,HPV16 E7偶联VLP(批次F1至F3)对B16荧光素酶细胞和ID8荧光素酶细胞的E7 T细胞介导的细胞毒性作用的批次一致性。图5A和图5B示出了分别在23小时和23.5小时的时间点结束的两个单独的研究,涉及三个独立产生的批次的与E7肽偶联的偶联VLP在B16-LUC细胞中的E7 T细胞介导的细胞毒性作用。图5A和图5B示出了分别在23小时和23.5小时的时间点结束的两个单独的研究,涉及三个独立产生的批次的与E7肽偶联的偶联VLP在ID8细胞中的E7 T细胞介导的细胞毒性作用。

[0023] 图6展示了在分别在23小时或23.5小时的时间点结束的两个单独的研究之后,HPV16 E7偶联VLP对MC38细胞的E7 T细胞介导的细胞毒性作用的批次一致性。对于三个不同批次的偶联的E7偶联VLP。图6A代表来自23小时时间点研究的结果,并且图6B代表来自23.5小时时间点研究的结果。

[0024] 图7提供了体内功效数据,该数据是在注射了MHC限制性H-2D^b HPV16 E7肽、缓冲液对照、与E7偶联VLP或单独的未偶联VLP的C57BL/6小鼠模型中通过生物发光测量的。在每种情况下,小鼠之后都注射了鼠特异性H-2D^b HPV16 E7 T细胞。图7A示出了所有的对照小鼠和测试小鼠的结果。图7A中的各条线分别代表所有的对照小鼠和测试小鼠的平均肿瘤生长。图7B提供了缓冲液对照结果。图7C提供了未偶联VLP的结果。图7D提供了E7偶联VLP的结果。图7E提供了单独的E7肽的结果。图7B中的各条线代表每个组中的单独的小鼠。

[0025] 图8展示了E7偶联VLP抗肿瘤免疫重定向在具有急性免疫应答的B16.F10小鼠中的体内功效,所述小鼠即在肽RAHYNIVTF (SEQ ID NO:1) 疫苗接种后2周用HPV16 E7肽RAHYNIVTF (SEQ ID NO:1) 进行处理的小鼠,所述功效是通过评估肿瘤体积确定的。图8A提供了肿瘤大小数据相对于注射包括对照VLP(即未偶联VLP)和E7偶联VLP在内的各种样品后的天数的图形表示。图8B提供了在向B16.F10肿瘤细胞注射各种样品后的小鼠存活率的图形表示,这些样品包括对照VLP(即单独的未偶联VLP)和E7偶联VLP。图8C和图8D类似于图8A和图8B,不同之处在于HPV16 E7免疫应答处于记忆阶段,即在肽RAHYNIVTF (SEQ ID NO:1) 疫苗接种后6周对小鼠进行处理;并且治疗前的肿瘤体积介于50mm³至100mm³之间。然后用肿瘤攻击小鼠,将E7偶联VLP注射到小鼠体内并且对存活率进行定量。

[0026] 图9示出了在体外用OVA偶联VLP孵育的小鼠肿瘤细胞的SIINFEKL/K^b (SEQ ID NO:2) FACS分析。图9A示出了由ID8-LUC细胞(上图)、B16-LUC细胞(中图)和MC38细胞(下图)与单独的OVA肽或OVA偶联VLP一起孵育产生的FACS数据。图9B示出了相同的细胞,ID8-LUC(上图)、B16-LUC(中图)和MC38(下图),这些细胞通过结合与OVA肽复合的MHC-I特异性H-2D^b抗体进行了染色。

[0027] 图10提供了CMV偶联VLP触发的各种永生化人肿瘤细胞系的免疫重定向细胞毒性的柱形图数据,这些细胞系包括HLA.A2阳性HCT116细胞(图10A)、OVCAR3细胞(图10B)和MCF7细胞(图10C)。每个图中的柱从左到右代表使用下列各项执行的测试:未使用抗原;单独的CMV pp65 HLA-A*0201(NLVPMVATV) (SEQ ID NO:3) 肽(以下称为“CMV肽”),其浓度为1μ

g/mL;单独的VLP,即未偶联VLP,其浓度为2.51μg/mL;与VLP偶联的CMV肽,其浓度为2.5μg/mL;以及单独的CMV肽,其浓度为14pg/mL。

[0028] 图11是VLP偶联的还原条件的SDS-PAGE分析的照片。左侧泳道是分子量标准泳道。凝胶中接下来的泳道是利用三(2-羧基乙基)膦(TCEP)与RG1 VLP的不同比例的各种偶联反应条件。

[0029] 图12是通过透射电子显微镜(TEM)产生的有关利用TCEP与RG1 VLP的不同比例进行偶联反应后的偶联VLP的显微照片。左上图示出了TCEP与RG1以10:1的比例反应后的偶联结果。右上图示出了比例为3:1的相同反应,左下图示出了比例为5:1的相同反应,并且右下图示出了比例为1:1的相同反应。

[0030] 图13是如凝胶中所示的关于RG1 VLP的偶联水平的SDS-PAGE分析照片,其中该偶联水平在VLP偶联反应期间以与TCEP的各种比例降低。

[0031] 图14提供了与各种疫苗表位偶联的WT VLP(图14A)和RG1(图14B)的SDS-PAGE分析照片。

具体实施方式

[0032] 定义

[0033] 本说明书描述了本公开的示例性实施方案和应用。然而,本发明并不限于这些示例性实施方案和应用,也不限于示例性实施方案和应用操作的方式或者本文描述的方式。本发明教导内容的各种实施方案、特征、目标和优点将从说明书和附图以及从权利要求书中显而易见。如本文所用,术语“包括”、“包含”、“含有”和“具有”以及它们的变型形式不旨在是限制性的,而是包容性的或开放式的,并且不排除附加的、未列举的添加剂、组分、整体、要素或方法步骤。例如,包括一系列特征的过程、方法、系统、组合物、套件或设备不一定仅限于那些特征,而是可以包括未明确列出的或此类过程、方法、系统、组合物、套件或设备所固有的其他特征。

[0034] “约”用于指示某个值包括用于确定该值的装置或方法的误差标准偏差。

[0035] 如本文所用,“偶联病毒样颗粒”或“偶联VLP”是还包含与VLP的衣壳蛋白结合的融合蛋白的VLP。

[0036] 如本文所用,“裂解序列”可以包括特定的肽序列,或更常见的是,位点特异性蛋白酶在其处裂解或切割蛋白质的肽基序。例如,裂解位点可以用于切除亲和标签,从而恢复天然蛋白质序列或者使蛋白质失活或使蛋白质活化。在本发明中,裂解是指蛋白水解裂解。在各种实施方案中,蛋白水解裂解在蛋白质最终成熟之前,通过肽酶、蛋白酶或蛋白水解裂解酶进行。蛋白质也可以由于例如错误折叠蛋白质的细胞内加工而被裂解。蛋白质的蛋白水解加工的另一个实例是分泌性蛋白或靶向细胞器的蛋白质,它们在释放到细胞外环境或特定细胞器之前被特定的信号肽酶除去它们的信号肽。在本发明的一个实施方案中,裂解序列被弗林蛋白酶特异性识别,该弗林蛋白酶从偶联VLP裂解并且释放召回蛋白,使它们可用于加载到肿瘤表面上。在各种实施方案中,裂解序列由半胱氨酸、赖氨酸和/或精氨酸残基组成,其不仅允许从VLP裂解召回蛋白,而且还充当锚以将召回蛋白偶联至衣壳蛋白,直到被选择性地存在于肿瘤部位处的裂解蛋白(诸如弗林蛋白酶)释放。

[0037] “表位”是产生由特定免疫球蛋白进行的识别或被特定免疫球蛋白识别的一组氨

氨基酸残基,或者在T细胞的情况下,是由T细胞受体蛋白质和/或主要组织相容性(MHC)受体识别所必需的那些残基。表位的氨基酸残基不必是连续/连贯的。在免疫系统环境中,在体内或在体外,表位可以是分子的集合特征的复合物,这些集合特征诸如一级、二级和三级肽结构,以及电荷,它们一起形成由免疫球蛋白、T细胞受体和/或HLA分子识别的三维结构。

[0038] 本发明的“融合蛋白”至少包含:(1)裂解序列,其中该裂解序列优选地在肿瘤表面的位点处被裂解;和(2)至少一种召回蛋白,其中所述召回蛋白是具有为能够被患者体内存在的T细胞结合的表位的序列的蛋白质或其片段;并且(3)能够与VLP共价连接。偶联VLP优选地与肿瘤细胞结合。(如果仅仅是结合的偶联移除了上文针对VLP的编辑,否则移除先前的编辑)。

[0039] “HPV”和“人乳头瘤病毒”是指能够感染人类的乳头瘤病毒家族成员。有两个主要的HPV组,由它们的向性来限定(生殖器/粘膜组和皮肤组),每个组都包含多种病毒“类型”或“病毒株/基因型”(例如,HPV 16、HPV 18、HPV 31、HPV 32,等等)。

[0040] 如本文所用,“人疫苗”意味着提高人体内对特定疾病的免疫力的生物制剂。疫苗通常含有类似于致病因子(病原体)的抗原因子,并且通常由弱化或杀死形式的微生物、其毒素或者致病因子的一种或多种免疫遗传表面蛋白制成。抗原因子刺激身体的免疫系统将引起的疾病识别为外来疾病,将其摧毁并“记住”,以便在实际的感染/接触发生时,免疫系统可以更容易地识别和摧毁任何这些病原体。人疫苗包括针对病毒性疾病的疫苗和细菌性疾病的疫苗。在各种实施方案中,针对病毒性疾病的疫苗包括甲肝病毒疫苗、乙肝病毒疫苗、戊肝病毒疫苗、人乳头瘤病毒疫苗、流感病毒疫苗、日本脑炎病毒疫苗、麻疹病毒疫苗、腮腺炎病毒疫苗、脊髓灰质炎病毒疫苗、狂犬病病毒疫苗、轮状病毒疫苗、风疹病毒疫苗、蜱传脑炎病毒疫苗、水痘带状疱疹病毒疫苗、天花病毒疫苗和黄热病病毒疫苗。正在开发的针对病毒性疾病的疫苗包括登革热疫苗、东部马脑炎病毒疫苗、HTLV-1T淋巴细胞白血病疫苗和呼吸道合胞病毒疫苗。在一些实施方案中,这种疫苗包括目前正在开发的疫苗或目前已被美国食品与药物管理局(FDA)批准的接种疫苗。相容疫苗的实例在表2中列出。本发明的实施方案不限于所列的疫苗,并且可以应用于开发用于在人受试者中提供免疫力的任何疫苗。

[0041] 当在权利要求书和/或说明书中使用时,“抑制”、“减少”或“预防”或者这些术语的任何变型形式均包括任何可测量的降低或完全抑制/减少或消除以实现期望的结果,诸如抑制、减少或预防或减少肿瘤质量、进展和/或转移。

[0042] “MHC”或“主要组织相容性复合体”是编码在细胞表面发现的蛋白质的一组基因,其帮助免疫系统识别外来物质。MHC蛋白存在于所有高等脊椎动物中。有两种主要类型的MHC分子,分别为I类MHC和II类MHC。在人类中,存在编码I类MHC分子(人类的MHC分子也被称为人白细胞抗原(HLA))的三种不同的基因座:HLA-A、HLA-B和HLA-C。HLA-A*01、HLA-A*02和HLA-A*11是可以从这些基因座表达的不同I类MHC等位基因的实例。

[0043] “乳头瘤病毒”是指乳头瘤病毒家族(乳头瘤病毒科(Papillomaviridae))的所有成员。乳头瘤病毒类型的广泛列表和制造相应VLP的能力可以使用该出版物进行参考:“Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments”, de Villers等人,401(1):70-79,2010,PMID:20206957(所有表格)。

[0044] 如本文所用,“优选地裂解的蛋白质”意味着融合蛋白在肿瘤部位处优选地从衣壳

蛋白裂解。这种优选的肿瘤部位裂解可能是由于：(1) 融合蛋白上的独特裂解序列，和/或 (2) 独特的肿瘤微环境。例如，在一个实施方案中，融合蛋白包含优选地被已知在肿瘤细胞中以高浓度表达的弗林蛋白酶裂解的裂解序列。

[0045] 如本文所用，“蛋白质”、“多肽”和“肽”不限于任何特定数目的氨基酸；这些术语在本文中有时可互换使用。本发明的蛋白质和编码它们的核酸的特性和氨基酸序列是众所周知的，并且可以常规测定，也可以从各种已知的数据库下载。(参见例如，NCBI GenBank数据库)。本文提供了一些序列。然而，一些序列信息会定期更新(例如，为了更正先前条目中的错误)，因此本申请中包含有关蛋白质和编码它们的核酸的更新(更正)信息。本文所讨论的序列数据库中提供的信息以引用方式并入。

[0046] 如本文所用，“召回蛋白”是指来源于患者或受试者先前已接触过的疫苗或病原体的蛋白质或其片段，这种先前的接触已导致识别召回蛋白并且对于召回蛋白有特异性的持久T细胞。召回蛋白有别于肿瘤特异性抗原。

[0047] “召回应答”是一种免疫应答，其中由疫苗或患者体内存在的其他病原体引发的抗原引发细胞毒性T细胞、Th1 T细胞、Th2 T细胞和/或B细胞与所述召回蛋白结合。

[0048] 如本文所用，“受试者”或“对其有需要的受试者”包括患有肿瘤/癌症或者已患有肿瘤/癌症或者患有癌前医学病症或具有癌前细胞的任何动物。合适的受试者(患者)包括实验室动物，诸如小鼠、大鼠、兔子、豚鼠或猪、农场动物(诸如牛)、运动动物(诸如犬或马)、驯养动物或宠物(诸如马、犬或猫)、非人灵长类动物和人。

[0049] 如本文所用，“T细胞应答”是指T细胞在遇到抗原时引发的免疫应答。初始的成熟T细胞在遇到由B细胞、巨噬细胞和树突细胞呈递的抗原时被激活，并且产生武装效应T细胞。效应T细胞是分化为细胞毒性T细胞的CD8+T细胞，或主要诱导体液免疫应答的CD4+T细胞。T细胞免疫应答进一步产生免疫记忆，其提供保护以免受病原体的后续攻击。在各种实施方案中，T细胞应答处于总CD8+T细胞基线的至少2倍的阈值。在各种实施方案中，CD8+T细胞也是CD69+。

[0050] “治疗组合物”是被设计用于患者并且被施用于患者的组合物。治疗组合物(例如，含有治疗性偶联VLP的组合物)用于治疗良性肿瘤或恶性肿瘤，或者有患上此类肿瘤的风险的患者/受试者。在一些实施方案中，将偶联VLP施用于先前患有肿瘤并且目前似乎无肿瘤/癌症的受试者，以努力增强对肿瘤/癌症的复发的抑制。

[0051] “病毒样颗粒”或“VLP”是指由病毒结构蛋白(诸如包膜蛋白或衣壳蛋白)组成的多蛋白结构，其中病毒结构蛋白可以自组装成类似于病毒但缺乏病毒遗传物质的颗粒。VLP是非感染性和非复制性的，但在形态上与病毒相似。本文所公开的VLP与肿瘤细胞结合或具有对肿瘤细胞的固有向性。

[0052] “VLP疫苗”是指一种制剂，其含有1种、2种、3种、4种、5种或更多种本文所述的偶联VLP。在一个实施方案中，包含本文所述的偶联VLP的组合物为施用于受试者以便重定向受试者中已经存在的免疫力，并且从而抑制受试者中肿瘤的增殖、生长和/或转移的形式。通常，VLP疫苗包含常规的盐水或缓冲水性溶液介质，其中悬浮或溶解本文所述的组合物，但是也考虑了施用干粉，例如通过吸入，甚至与附加的佐剂(诸如明矾)一起配制。本发明的组合物可以用于抑制肿瘤的增殖、生长和/或转移。在引入宿主中之后，本发明的含有偶联VLP的组合物(例如，VLP疫苗)能够激发免疫应答，包括但不限于产生细胞因子和/或激活细胞

毒性T细胞、抗原呈递细胞、辅助性T细胞、树突细胞和/或其他细胞应答。

[0053] 偶联病毒样颗粒

[0054] 在各种实施方案中，公开了用于治疗受试者的癌症的偶联VLP。在各种实施方案中，本文所述的组合物包含衣壳蛋白，其中所述衣壳蛋白与癌细胞结合。在各种实施方案中，本文所述的组合物还包含融合蛋白，该融合蛋白至少包含：(1) 裂解序列，其中该裂解序列在存在肿瘤的情况下被优选地裂解；和(2) 至少一种召回蛋白，其中所述召回蛋白是具有为被患者体内存在的T细胞结合的表位的序列的蛋白质或其片段。在各种实施方案中，裂解序列与衣壳蛋白结合。

[0055] 衣壳蛋白。在各种实施方案中，提供了VLP。VLP由病毒结构颗粒组成，其中病毒结构颗粒即自组装成类似于病毒但缺乏病毒遗传物质的颗粒的衣壳蛋白。VLP是极好的递送分子，因为它们是非感染性的，并且可以被重新工程化以特异性靶向或结合肿瘤细胞。

[0056] 已经报道，HPV衣壳(VLP和假病毒颗粒(PsV))具有肿瘤向性，直接结合并且感染肿瘤细胞，包括例如卵巢癌细胞和肺癌细胞。在各种实施方案中，本文所述的偶联VLP优选地与肿瘤细胞结合，例如，它们与肿瘤细胞的结合多于与非肿瘤细胞的结合，并且偶联VLP的存在可以导致吸引浸润性CD8+T细胞的阳性促炎性肿瘤微环境。同时，VLP可以刺激适应性记忆T细胞的应答，这些适应性记忆T细胞是由先前的疫苗接种或感染引起的，并且识别召回蛋白的CD8+T细胞表位。在各种实施方案中，这些强应答能够绕过免疫耐受，并且使肿瘤细胞对这种预先存在的免疫力敏感，从而抑制肿瘤的生长、进展和转移。

[0057] 相对于正常细胞优选地结合肿瘤细胞的任何VLP均可以用于本发明。在各种实施方案中，VLP是基于动物病毒的VLP。在各种实施方案中，基于动物病毒的VLP来源于HBVc或HPV。在各种实施方案中，VLP是基于噬菌体的VLP，诸如MS2、Q β 或P22。在各种实施方案中，VLP是基于植物病毒的VLP，诸如豇豆褪绿斑驳病毒(CCMV)或豇豆花叶病毒(CPMV)。在各种实施方案中，VLP是目前商业化的基于VLP的预防性疫苗，包括GlaxoSmithKline的**ENGERIX®**(乙肝病毒)和**CERVARIX®**(人乳头瘤病毒)，以及Merck and Co., Inc.的**RECOMBIVAX HB®**(乙肝病毒)和**GARDASIL®**(人乳头瘤病毒)。VLP的其他实施方案包括临床试验或临床前评估中的基于VLP的候选疫苗，诸如流感病毒、细小病毒和诺沃克病毒。在各种实施方案中，VLP是仓鼠多瘤病毒、罗氏沼虾诺达病毒(Microbrachium Rosenbergi Nodavirus)、HBsAg、HCV、逆转录病毒或HBc。

[0058] 在一个实施方案中，VLP由来源于乳头瘤病毒的结构蛋白组成。乳头瘤病毒的病毒体含有72个L1蛋白五聚体(壳粒)。L1蛋白能够自组装成衣壳样结构，当在真核细胞中表达时，这种衣壳样结构在形态上与天然病毒体无法区分。L1单体含有12条 β 链、6个环(BC、CD、DE、EF、FG、HI)和5个螺旋(H1至H5)。大多数环高度暴露于衣壳的外表面，如本文所述，融合蛋白通过例如二硫键、马来酰亚胺键、通过“点击”化学或通过与聚离子对接位点结合而与这些环之一附接，在这些区域中将导致召回蛋白展示在VLP的外表面上。

[0059] 乳头瘤病毒VLP。在各种实施方案中，提供了包含乳头瘤(PV) L1蛋白或者PVL1蛋白和PVL2蛋白的偶联VLP。在一些实施方案中，VLP包含乳头瘤L1蛋白和乳头瘤L2蛋白两者。

[0060] 在一个实施方案中，偶联乳头瘤病毒VLP包含L1衣壳蛋白和融合蛋白。在其他实施方案中，偶联VLP包含L1衣壳蛋白、L2衣壳蛋白和融合蛋白。L1多肽可以是全长L1蛋白或L1多肽片段。在具体实施方案中，全长L1蛋白或L1多肽片段具有VLP组装能力；也就是说，L1多

肽将自组装形成壳粒,这些壳粒能够胜任自组装成高级组装体,从而形成VLP。在更具体的实施方案中,VLP包含完全组装的乳头瘤病毒衣壳,其为约50nm的结构并且由72个壳粒或360个L1蛋白拷贝组成。

[0061] 迄今为止识别的基本上所有的乳头瘤病毒基因型的L1序列都是已知的,并且这些L1序列或片段中的任一者都被考虑用于本发明的组合物中。L1多肽的实例包括但不限于全长L1多肽(例如HPV16 L1多肽)、SEQ ID NO:、缺少天然C端的L1截短物、缺少天然N端的L1截短物和缺少内部结构域的L1截短物。L1蛋白可以是例如经修饰的L1蛋白,例如经修饰的HPV16 L1蛋白,其中HPV16 L2氨基酸17-36 (RG1表位)插入HPV16 L1的DE表面环内。(参见Schellenbacher等人,2013,J.Invest Dermatol;133 (12):2706-2713;Slupetzky等人,2007,Vaccine.25:2001-2010;Kondo等人,2008,J.Med.Virol.,80:841-6;Schellenbacher等人,2009,Virol.,83:10085-10095;以及Caldeira等人,2010,Vaccine,28:4384-93)。

[0062] L2多肽可以是全长L2蛋白或L2多肽片段。迄今为止识别的基本上所有的乳头瘤病毒基因型的L2序列都是已知的,并且这些L2序列或片段中的任一者都可以用于本发明中。L2多肽的实例包括但不限于全长L2多肽(例如HPV16 L2多肽)、SEQ ID NO:、缺少天然C端的L2截短物、缺少天然N端的L2截短物和缺少内部结构域的L2截短物。

[0063] 乳头瘤病毒VLP可以使用来自任何动物乳头瘤病毒的L1多肽和任选的L2多肽或者它们的衍生物或片段形成。因此,人、牛、马、绵科动物、猪、鹿、犬科动物、猫科动物、啮齿动物、兔等的乳头瘤病毒的任何已知的(或下文识别的)L1序列和任选的L2序列可以用于制备本发明的VLP或壳粒。(参见de Villiers等人,Virology,324:17-27,2004,以获得乳头瘤病毒基因型及其相关性的近乎完整的列表,该文献以引用方式并入本文)。

[0064] 在各种实施方案中,VLP由乳头瘤病毒(PV)L1蛋白或者PV L1蛋白和PV L2蛋白组成。乳头瘤病毒是小型的双链环状DNA肿瘤病毒。乳头瘤病毒体的外壳含有L1主要衣壳蛋白和L2次要衣壳蛋白。已知L1蛋白单独或与L2蛋白组合在真核或原核表达系统中的表达导致壳粒和VLP的组装。如本文所用,术语“壳粒”旨在表示乳头瘤病毒L1多肽的五聚体组装,包括全长L1蛋白或其片段。天然L1衣壳蛋白可以经由分子间二硫键自组装形成五聚体(壳粒)。

[0065] 乳头瘤病毒的病毒体可以含有L1蛋白的72个五聚体(壳粒)。(参见Trus等人,Nat.Struct.Biol.,4:413-420,1997)。L1蛋白能够自组装成衣壳样结构,当在真核细胞中表达时,这种衣壳样结构在形态上与天然病毒体无法区分。(参见Buck等人,J.Virol.,5190-97,2008;和Roy等人,Hum.Vaccin.,5-12,2008,这两篇文献均以引用方式并入本文)。L1单体含有约12条链、6个环(BC、CD、DE、EF、FG、HI)和5个螺旋(H1至H5)。大多数环高度暴露于衣壳的外表面,如本文所述,融合蛋白通过例如二硫键、马来酰亚胺键、通过“点击”化学或通过与聚离子对接位点结合而与这些环之一附接,在这些区域中将导致融合蛋白展示在VLP的外表面上。

[0066] 在某些实施方案中,用于形成VLP的L1多肽和任选的L2多肽来自非人乳头瘤病毒或除HPV-6、HPV-11、HPV-16和HPV-18之外的人乳头瘤病毒基因型。例如,L1蛋白和/或L2蛋白可以来自HPV1、2、3、4、5、6、8、9、15、17、23、27、31、33、35、38、39、45、51、52、58、66、68、70、76或92。

[0067] 在各种实施方案中,本文所呈现的偶联VLP与一种或多种癌细胞结合。这部分是由

于VLP对肿瘤细胞特异性蛋白质和/或分子的选择性。在各种实施方案中,VLP与硫酸肝素蛋白聚糖(HSPG)结合,该HSPG优选地在肿瘤细胞上表达。如本文所用,“与癌细胞结合”是指在偶联VLP的衣壳蛋白与肿瘤细胞之间形成非共价相互作用,使得偶联VLP可以与肿瘤细胞紧密接近,并且融合蛋白可以从VLP上裂解,并且召回蛋白可以与肿瘤细胞上存在的MHC受体结合。

[0068] 基于动物病毒的VLP。除了本文别处描述的VLP之外,VLP可以来源于乙肝病毒。乙肝病毒由内部蛋白质衣壳和含有其他蛋白质的脂质包膜组成。两种不同的VLP可以由病毒产生,使用了形成内部衣壳的核心抗原或自发地与脂质结合形成纳米颗粒(NP)的表面抗原。乙肝核心(HBc)抗原由240个单一蛋白质拷贝形成。这些蛋白质首先形成二聚体,然后以T54二十面体几何形状与五聚体或假六聚体连接进行组装。VLP已使用多种技术生产,包括大肠杆菌(*Escherichia coli*)胞质聚积和无细胞蛋白质合成。组装的VLP通常使用尺寸排阻色谱法或差速离心法进行纯化。随后通过用尿素分解VLP获得了单独的外壳蛋白,这允许同时加载负荷和重新组装VLP。

[0069] 基于噬菌体病毒的VLP。在各种实施方案中,VLP来源于基于噬菌体的VLP。三种噬菌体MS2、Qb和鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*) P22都感染肠杆菌,最明显的是大肠杆菌(*E. coli*)。虽然这三者都仅由核酸填充的病毒衣壳组成,但是P22与MS2和Qb有很大的不同。MS2和Qb由90个同源二聚体组成,并且需要在它们的RNA基因组中具有特定的茎环发夹二级结构,以通过与外壳蛋白结合来触发VLP自组装。另一方面,P22由多达415种外壳蛋白、100种至300种支架蛋白和12种门户蛋白组成。然而,P22 VLP已被工程化为由420种外壳蛋白和仅100种至300种支架蛋白组成,这些支架蛋白随后可以用盐酸胍除去,仅留下外壳蛋白。与HBV VLP一样,这些VLP都用二十面体几何结构组装。所有这三者都可以在大肠杆菌中产生,但是Qb也可以在酵母中产生,并且Qb和MS2都可以使用无细胞蛋白质合成来产生。MS2 VLP已使用尺寸排阻色谱法、差速离心法或固定化金属亲和色谱法(对于含有六组氨酸标签的VLP)进行了纯化。酸或尿素可以用于分解经纯化的MS2 VLP以获得二聚体,这些二聚体然后可以在除去分解剂和添加茎环RNA之后重新组装。Qb VLP已使用尺寸排阻色谱法进行了纯化,并且二聚体可以通过使用酸分解VLP来获得,这些二聚体然后可以类似于MS2重新组装。P22 VLP已使用尺寸排阻色谱法或差速离心法进行了纯化,并且还可以使用酸进行分解以获得外壳蛋白。重新组装P22 VLP需要添加支架蛋白,但随后可以除去这些支架蛋白。这些来源于噬菌体的VLP与HBc VLP的主要区别在于组装刺激,使用了附加的生物分子(RNA或蛋白质)来引发自组装,而不是增加盐浓度。

[0070] 基于植物病毒的VLP。在各种实施方案中,VLP是基于植物病毒的VLP。在各种实施方案中,基于植物病毒的VLP来源于豇豆叶:CCMV和CPMV。两种病毒都没有脂质包膜。两种VLP都用二十面体几何结构组装。CCMV VLP由90个同源二聚体形成,并且可以在大肠杆菌或酵母中产生。它们已使用尺寸排阻色谱法或固定化金属亲和色谱法,使用了具有六组氨酸延伸的外壳蛋白进行了纯化。46,62二聚体可以通过对0.5M CaCl_2 透析组装的VLP或通过直接纯化带六组氨酸标签的二聚体来获得。将这些二聚体与RNA以1:6的质量比结合,并且将pH降低到4至5,由此诱导自组装。另一方面,CPMV由60个VP60蛋白质拷贝形成,VP60蛋白质必须首先被蛋白水解为L外壳蛋白和S外壳蛋白(各60个拷贝)。遗憾的是,VLP不能使用大肠杆菌或酵母产生;而是必须使用昆虫细胞或植物。VLP已使用差速离心法进行了纯化,但是

还不能获得可用量的外壳蛋白。不能在大肠杆菌中产生VLP或不能获得经纯化的外壳蛋白对靶向药物递送增加了另一个挑战;然而,由于CPMV能够轻松地在其表面上展示配体并且通过与其基因组的关联而加载负荷,因此已积极评估CPMV的治疗用途。在其他实施方案中,基于植物病毒的VLP是烟草花叶病毒(TMV)。

[0071] VLP的肿瘤特异性。在各种实施方案中,VLP优选地与肿瘤细胞结合。VLP的肿瘤优先性可能源自几个来源,包括VLP的电荷(正或负)、形状和大小(不同长径比的丝和不同直径的球)、屏蔽(自身蛋白/肽以及各种大小和密度的聚合物),以及靶向(以各种密度在不同接头上展示的受体或环境因子的配体)。

[0072] 就电荷而言,在各种实施方案中,VLP含有正表面电荷。带正电荷的VLP在循环中保持更长的时间。由于细胞膜中大量存在的蛋白聚糖赋予负电荷,而肿瘤间隙空间内大量存在的胶原蛋白赋予正电荷,所以带正电荷的颗粒更可能增强与哺乳动物细胞的结合,并且能够更好地避免聚集和穿透肿瘤组织。证明这些基于电荷的效应的一些实例包括发现在人宫颈癌中经聚精氨酸修饰的CPMV的吸收效率是天然CPMV的八倍。

[0073] 关于形状,VLP的形状和柔性将在VLP扩散遍及肿瘤的能力中发挥额外的作用。例如,使用回转椭球模型,用CPMV和TMV进行球形颗粒和棒状颗粒的扩散曲线之间的比较,结果表明,尽管CPMV(球体)经历了稳定的扩散曲线,但是TMV(棒状)却表现出两相扩散行为,这导致极快的早期加载阶段,这可以归因于其轴向运动,就像针一样。由细长颗粒赋予的一些其他有利特性包括对血管壁的更好的愈合以及由于用于相互作用的更大表面积而具有更强的粘附性,这不仅对肿瘤归巢有影响,而且对心血管疾病的靶向作用增强。

[0074] 除了被动的肿瘤归巢特性之外,还可以利用病毒与某些细胞的天然相互作用。CPMV(豇豆花叶病毒)在与表面波形蛋白相互作用方面表现出独特的特异性,其存在于内皮细胞、癌细胞和炎症细胞上。CPMV对表面波形蛋白的天然亲和力允许对高达500 μ m深度的微脉管系统进行高分辨率成像,这是通过使用其他纳米颗粒无法实现的,因为它们往往会聚集并且阻塞脉管系统。这种相互作用可以用于一系列应用,诸如递送至一组癌细胞,包括宫颈癌细胞系、乳腺癌细胞系和结肠癌细胞系、描绘动脉粥样硬化病变,以及肿瘤脉管系统和血管生成的活体成像。存在的内源性关联的另一个实例是CPV与转铁蛋白受体(TfR),转铁蛋白受体是铁转运到细胞中的重要受体,并且被许多癌细胞系高度上调。即使在染料标记之后,CPV仍保留其对TfR的特异性,并且显示与HeLa宫颈癌细胞、HT-29结肠癌细胞和MDA-MB-231乳腺癌细胞上发现的受体结合。

[0075] 在各种实施方案中,VLP能够靶向优选地在肿瘤细胞表面上表达的蛋白质。此类蛋白质通常在肿瘤细胞的表面上过度表达,但如果不是全部,有些也可能在血液(即血清)中被发现。此类表面标志物的非限制性实例包括:CEA(癌胚抗原)、E-钙粘蛋白、EMA(上皮膜抗原;又名MUC-1)、波形蛋白、纤连蛋白、Her2/neu(人表皮生长因子受体2型,也称为Erb b2)、 α v β 3整联蛋白、EpCAM(上皮细胞粘附分子)、FR- α (叶酸受体- α)、PAR(尿激酶型纤溶酶原激活物受体)和转铁蛋白受体(在肿瘤细胞中过表达)。

[0076] 肽通常基于对癌细胞的跨膜蛋白的识别来用于标记癌细胞。最常用的肽是由L-精氨酸、甘氨酸和L-天冬氨酸组成的精氨酰甘氨酰天冬氨酸(RGD)。RGD首先从纤连蛋白的细胞结合结构域分离,纤连蛋白是一种与整联蛋白结合的糖蛋白,并且通过结合胶原蛋白、纤维蛋白和蛋白聚糖参与细胞-细胞和细胞-细胞外基质(ECM)的附接和信号传导。RGD肽对一

类在肿瘤内皮细胞中高度表达但在正常内皮细胞中不表达的细胞表面整联蛋白 $\alpha v\beta$ 具有最高的亲和力。在各种实施方案中,这样的肽序列被掺入到偶联VLP中。

[0077] 融合蛋白。在各种实施方案中,融合蛋白包含裂解序列。裂解序列可以是能够优选地被肿瘤细胞裂解或优选地在肿瘤细胞附近裂解的任何序列。将该裂解序列插入融合蛋白中,使得该融合蛋白在进入肿瘤微环境之前保持无活性。通过利用特定蛋白酶在癌组织中的活性升高,召回蛋白不从VLP释放,并且能够主动包被MHC受体,直到召回蛋白进入肿瘤微环境。本领域已知几种蛋白酶在肿瘤微环境中具有活性。例如,已知几种金属蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶和丝氨酸蛋白酶。从癌症疗法的角度来看,额外的吸引力是,因为负责前药裂解的蛋白酶可能不仅来自癌细胞,而且还来自肿瘤的基质成分,因此活性药物向肿瘤微环境中释放不依赖于仅由癌细胞表达的靶标。相反,代表靶标的是整个肿瘤生态系统。

[0078] 召回蛋白。在各种实施方案中,召回蛋白是被已经存在于受试者中的T细胞或T细胞群识别的表位。在各种实施方案中,这种存在的T细胞或T细胞群由于先前的感染或疫苗接种而存在。在本发明的各种实施方案中,召回蛋白是能够被T细胞结合的表位。在各种实施方案中,召回蛋白是能够被受试者中已经存在的T细胞结合的表位。在该上下文中,“能够被结合”意味着“表位”存在于细胞表面上,在那里它直接与MHC分子结合。能够由MHC I呈递的T细胞表位可以被细胞毒性CD8 T淋巴细胞(CDS T细胞或CTL)的T细胞受体结合。能够由MHC I呈递的T细胞表位通常是长度为9个至12个氨基酸的肽。在各种实施方案中,提供了一种偶联VLP,其允许T细胞应答引发肽的释放,该肽能够经由I类MHC直接呈递。由于释放的召回蛋白不需要递送至胞质溶胶中的抗原加工机制,因此T细胞应答引发肽在短时间内呈递在靶细胞的表面上。因此,在本发明的一个实施方案中,在施用靶细胞之后不到8.5小时,T细胞应答引发肽经由I类MHC分子呈递在靶细胞的表面上。在本发明的另一个实施方案中,在将偶联VLP引入靶细胞之后不到23.5小时,T细胞应答引发肽经由I类MHC分子呈递在靶细胞的表面上。在本发明的另一个实施方案中,偶联VLP能够在将偶联VLP施用于靶细胞之后不到6小时内介导针对靶细胞的T细胞细胞毒性。

[0079] 在各种实施方案中,融合蛋白包括至少两种召回蛋白。这些召回蛋白可能是来源于不同蛋白质的表位,或者可能是同一蛋白质的表位。在各种实施方案中,病原体是病毒、细菌、真菌或寄生虫。

[0080] 在各种实施方案中,预先存在的T细胞对疫苗表位具有特异性。在各种实施方案中,该表位来源于儿童早期疫苗。在各种实施方案中,预先存在的免疫力是之前施用人疫苗的结果。

[0081] 病毒的非限制性实例包括牛痘病毒、水痘带状疱疹病毒、带状疱疹病毒、风疹病毒、肝炎病毒例如甲肝病毒或乙肝病毒或丙肝病毒、流感病毒例如甲型或乙型流感病毒、麻疹病毒、腮腺炎病毒、脊髓灰质炎病毒、痘疮(天花)病毒、狂犬病病毒、登革热病毒、埃博拉病毒、西尼罗河病毒、黄热病病毒或寨卡病毒。

[0082] 细菌的非限制性实例包括百日咳博德特氏杆菌、沙眼衣原体、破伤风梭菌、白喉、流感嗜血杆菌、脑膜炎球菌、肺炎球菌、霍乱弧菌、结核分枝杆菌、BCG、伤寒、大肠杆菌、沙门氏菌、嗜肺军团菌、立克次体、梅毒螺旋体苍白亚种、A组或B组链球菌、肺炎链球菌、炭疽杆菌、肉毒杆菌或耶尔森氏菌属物种细菌。

[0083] 寄生虫的非限制性实例包括溶组织内阿米巴、刚地弓形虫、毛形属物种(例如旋毛

虫)、毛滴虫属物种(例如阴道毛滴虫)、锥虫属物种(例如布氏冈比亚锥虫、布氏罗得西亚锥虫或克氏锥虫)或者疟原虫属(例如恶性疟原虫、间日疟原虫或三日疟原虫)。

[0084] 在各种实施方案中,召回蛋白选自表1中包括的列表:

[0085] 表1:召回蛋白表位

[0086]	表位序列	SEQ ID NO	病毒类型	MHC 等位 基因	病毒蛋白
	SLPRSRTPI	4	水痘 (VZV)	A*02:01	IE62

[0087]

SAPLPSNRV	5	水痘 (VZV)	A*02:01	IE62
GSAPLPSNRV	6	水痘 (VZV)	A*02:01	IE62
ALWALPHA	7	水痘 (VZV)	A*02:01	IE62
SLSGLYVFV	8	带状疱疹疫苗	A*02:01	糖蛋白 E
YLGVIWNM	9	带状疱疹疫苗	A*02:01	糖蛋白 E
KIHEAPFDL	10	带状疱疹疫苗	A*02:01	糖蛋白 E
LLCLVIFLI	11	带状疱疹疫苗	A*02:01	糖蛋白 E
DLLLEWLYV	12	带状疱疹疫苗	A*02:01	糖蛋白 E
SMYYAGLPV	13	带状疱疹疫苗	A*02:01	糖蛋白 E
ILHDGGTTL	14	带状疱疹疫苗	A*02:01	糖蛋白 E
WLYVPIDPT	15	带状疱疹疫苗	A*02:01	糖蛋白 E
VLMGFGIIT	16	带状疱疹疫苗	A*02:01	糖蛋白 E
CLVIFLICT	17	带状疱疹疫苗	A*02:01	糖蛋白 E
KEADQPWIV	18	带状疱疹疫苗	A*02:01	糖蛋白 E
VVSTVDHFV	19	带状疱疹疫苗	A*02:01	糖蛋白 E
FLICTAKRM	20	带状疱疹疫苗	A*02:01	糖蛋白 E
VLRTEKQYL	21	带状疱疹疫苗	A*02:01	糖蛋白 E
HMWNYHSHV	22	带状疱疹疫苗	A*02:01	糖蛋白 E
TVNKPVVG	23	带状疱疹疫苗	A*02:01	糖蛋白 E
FVVYFNGHV	24	带状疱疹疫苗	A*02:01	糖蛋白 E
WIVVNTSTL	25	带状疱疹疫苗	A*02:01	糖蛋白 E
VAYTVVSTV	26	带状疱疹疫苗	A*02:01	糖蛋白 E
FMYMSLLGV	27	麻疹	A*02:01	m50
SLWGSLLML	28	麻疹	A*02:01	C 蛋白
LLAVTFVMFL	29	麻疹	A*02:01	H38
SMYRVFEVGV	30	麻疹	A*02:01	H250-259
ILPGQDLQYV	31	麻疹	A*02:01	H516-525
KLWCRHFCV	32	麻疹	A*02:01	H576
KLWCRHFCVL	33	麻疹	A*02:01	H576
RLSDNGYYTV	34	麻疹	A*02:01	M164
KLLRYYTEI	35	麻疹	A*02:01	F205
KLWESPQEI	36	麻疹	A*02:01	C 84
RLLDRLVRL	37	麻疹	A*02:01	N50
KLMPNITLL	38	麻疹	A*02:01	F57
TLLNNCTRV	39	麻疹	A*02:01	F64
EMLTLATWV	40	Hep B	A*02:01	C64-72
FLPSDFFPSV	41	Hep B	A*02:01	Core 18
FLPADFFPSV	42	Hep B	A*02:01	Core 19
FLPSDFFPSI	43	Hep B	A*02:01	Core 20
WLSLLVPF	44	Hep B	A*02:01	ENV335
FLLTRILTI 或 FLLTRILTL	45 或 46	Hep B	A*02:01	ENV 183
GLSPTVWLSV	47	Hep B	A*02:01	ENV348
LLDYQGMLPV	48	Hep B	A*02:01	ENV260

[0088]

LLCLIFLLV	49	Hep B	A*02:01	ENV251
SIVSPFIPLL	50	Hep B	A*02:01	ENV370
FLLTKILTI	51	Hep B	A*02:01	ENV 183
ILSPFLPLL	52	Hep B	A*02:01	ENV371
FLLSLGIHL	53	Hep B	A*02:01	POL 575
GLSRYVARL	54	Hep B	A*02:01	POL 455
SLYADSPSV	55	Hep B	A*02:01	POL 816
YMDDVVLGA	56	Hep B	A*02:01	POL 551
ALMPYACI	57	Hep B	A*02:01	POL 655
VLHKRTLGL	58	Hep B	A*02:01	HBx 92
CLFKDWEEL	59	Hep B	A*02:01	Hbx115
STLPETTVVRR	60	Hep B	A*03, A*11	Core 141
EYLVSFQVW	61	Hep B	A*31, A*68	core 117
FFPSIRDLL	62	HepB	A*24	Core 23
SWLSLLVPF	63	HepB	A*24	Env 334
KYTSFPWLL	64	Hep B	A*24	Pol 756
HLSLRGLFV	65	Hep B	A*02:01	HBx 52-60
CLFKDWEEL	66	Hep B	A*02:01	HBx 115-123
LPSDFFPSV	67	Hep B	8*51	Core 19
GILGFVFTL	68	流感	HLA-A2	M1
ILGFVFTLTVPSERGLQRRF	69	流感		
LIRHENRMVLASTTAKA	70	流感		
LQA YQKRMGV QMQR	71	流感		
YVYDHSGEAVK	72			
WLSLLVPFV	73			
(K)GII.,GFVFT1..(T) (V)	74			
KLSTRGVQIASNEN	75			
RGLQRRRFVQNALNGNG	76			
FMYSDFHFI	77			
NLVPMVATV	3			
VAIIEVDNEQPTTRAQKL	78			
GACV AIIIEVDNEQPTTRAQKL.F AMWRITYKDTVQLRRKL 的任何 9 聚体序列	79			
SVRDRLARL	80			
LLDRVRFMGV	81			
CLGGLTMV	82			
GLCTLVAML	83			

[0089] 在各种实施方案中,该表位来源于人疫苗的表位。在各种实施方案中,疫苗是儿童早期疫苗。合适疫苗的某些非限制性实例在下表2中列出:

[0090] 表2:批准的含有召回蛋白表位的疫苗

[0091]

类型	商品名称	形式	来源	负责的国家监管机构
白喉-破伤风-百日咳(全细胞)-乙肝-b 型流感嗜血杆菌	Quinvaxem	液体：即用型	Janssen Vaccines Corp.	韩国食品药品安全部
白喉-破伤风	吸附型 DT 疫苗	液体：即用型	PT Bio Farma (Persero)	印度尼西亚国家药品与食品控制局
白喉-破伤风-百日咳(全细胞)	DTP 疫苗	液体：即用型	PT Bio Farma (Persero)	印度尼西亚国家药品与食品控制局
乙肝	重组乙肝疫苗	液体：即用型	PT Bio Farma (Persero)	印度尼西亚国家药品与食品控制局
三价口服脊髓灰质炎疫苗 (OPV)	Oral polio	液体：即用型	PT Bio Farma (Persero)	印度尼西亚国家药品与食品控制局
三价口服脊髓灰质炎疫苗 (OPV)	Oral polio	液体：即用型	PT Bio Farma (Persero)	印度尼西亚国家药品与食品控制局
破伤风类毒素	TT 疫苗	液体：即用型	PT Bio Farma (Persero)	印度尼西亚国家药品与食品控制局
破伤风类毒素	TT 疫苗	液体：即用型	PT Bio Farma (Persero)	印度尼西亚国家药品与食品控制局
破伤风类毒素	TT 疫苗	液体：即用型	PT Bio Farma (Persero)	印度尼西亚国家药品与食品控制局
麻疹	麻疹疫苗	在使用前用赋形剂稀释剂复溶的冻干活性组分	PT Bio Farma (Persero)	印度尼西亚国家药品与食品控制局
黄热病	黄热病	在使用前用赋形剂稀释剂复溶的冻干活性组分	Bio-Manguinhos/Fiocruz	Agenda Nacional da Vigilância Sanitária
黄热病	黄热病	在使用前用赋	Bio-	Agenda

[0092]

		形剂稀释剂复 溶的冻干活性 组分	Manguinhos/Fio cruz	Nacional da Vigilancia Sanitaria
黄热病	黄热病	在使用前用赋 形剂稀释剂复 溶的冻干活性 组分	Bio- Manguinhos/Fio cruz	Agenda Nacional da Vigilancia Sanitaria
乙肝	Heberbiovac HB	液体：即用型	Centro de Ingenieria Genetica y Biotecnologia	Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos
乙肝	Heberbiovac HB	液体：即用型	Centro de Ingenieria Genetica y Biotecnologia	Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos
狂犬病	Rabipur	在使用前用赋 形剂稀释剂复 溶的冻干活性 组分	Chiron Behring Vaccines Private Ltd.	印度中央药物 标准控制局
狂犬病	Rabipur	在使用前用赋 形剂稀释剂复 溶的冻干活性 组分	GlaxoSmithKlin e Vaccines GmbH	Paul-Ehrlich- Institut
b 型流感嗜血 杆菌	Vaxeni HIB	液体：即用型	Novartis Vaccines and Diagnostics S- r.f	Agenzia Italiana del Farmaco
乙肝	Engerix	液体：即用型	GlaxoSmit hKline Biologicals SA	比利时联邦药 品和保健品管 理局
乙肝	Engerix	液体：即用型	GlaxoSmit hKline Biologicals SA	比利时联邦药 品和保健品管 理局
乙肝	Engerix	液体：即用型	GlaxoSmit hKline Biologicals SA	比利时联邦药 品和保健品管 理局
三价口服脊髓 灰质炎疫苗 (OPV)	Polio sabin	液体：即用型	GlaxoSmit hKline Biologicals SA	比利时联邦药 品和保健品管 理局
三价口服脊髓 灰质炎疫苗 (OPV)	Polio sabin	液体：即用型	GlaxoSmit hKline Biologicals SA	比利时联邦药 品和保健品管 理局
麻疹、腮腺炎	Priorix	在使用前用赋	GlaxoSmit hKline	比利时联邦药

[0093]

和风疹		形剂稀释剂复溶的冻干活性组分	Biologicals SA	品和保健品管理局
轮状病毒	Rotarix	液体：即用型	GlaxoSmithKline Biologicals SA	比利时联邦药品和保健品管理局
三价口服脊髓灰质炎疫苗 (OPV)	Polioviral 疫苗	液体：即用型	Haffkine BioPharmaceutical Corporation Ltd	印度中央药物标准控制局
黄热病	稳定的黄热病疫苗	在使用前用赋形剂稀释剂复溶的冻干活性组分	Institut Pasteur de Dakar	Ministere de la Sante publique
黄热病	稳定的黄热病疫苗	在使用前用赋形剂稀释剂复溶的冻干活性组分	Institut Pasteur de Dakar	Ministere de la Sante publique
黄热病	稳定的黄热病疫苗	在使用前用赋形剂稀释剂复溶的冻干活性组分	Institut Pasteur de Dakar	Ministere de la Sante publique
BCG	BCG 冻干谷氨酸疫苗	在使用前用赋形剂稀释剂复溶的冻干活性组分	日本 BCG 实验室	千叶地方政府
乙肝	EuvaxB	液体：即用型	LG Chem Ltd	韩国食品药品安全部
乙肝	Euvax B	液体：即用型	LG Chem Ltd	韩国食品药品安全部
BCG	BCG 疫苗	在使用前用赋形剂稀释剂复溶的冻干活性组分	Bui Bio - National Center of Infectious and Parasitic Disease Ltd.	保加利亚药品管理局
BCG	BCG 疫苗	在使用前用赋形剂稀释剂复溶的冻干活性组分	Bui Bio - National Center of Infectious and Parasitic Disease Ltd.	保加利亚药品管理局
破伤风类毒素	Tetatox	液体：即用型	Bui Bio - National Center of Infectious and Parasitic Disease Ltd.	保加利亚药品管理局
破伤风类毒素	Tetatox	液体：即用型	Bui Bio -	保加利亚药品

[0094]

			National Center of Infectious and Parasitic Disease Ltd.	管理局
白喉-破伤风	Diftet	液体：即用型	Bui Bio - National Center of Infectious and Parasitic Disease Ltd.	保加利亚药品管理局
白喉-破伤风	Diftet	液体：即用型	Bui Bio - National Center of Infectious and Parasitic Disease Ltd.	保加利亚药品管理局
白喉-破伤风 (抗原含量减少)	Tetadif	液体：即用型	Bui Bio - National Center of Infectious and Parasitic Disease Ltd.	保加利亚药品管理局
白喉-破伤风 (抗原含量减少)	Tetadif	液体：即用型	Bui Bio - National Center of Infectious and Parasitic Disease Ltd.	保加利亚药品管理局
白喉-破伤风-百日咳(全细胞)-乙肝-b型流感嗜血杆菌	Easyfive-TT	液体：即用型	Panacea Biotec Ltd.	印度中央药物标准控制局
白喉-破伤风 (抗原含量减少)	IMOVAX dT 成人	液体：即用型	Sanofi Pasteur SA	Agence nationale de securite du medicament et des produits de sante
灭活脊髓灰质炎疫苗(IPV)	IMOVAX POLIO	液体：即用型	Sanofi Pasteur SA	Agence nationale de securite du medicament et des produits de sante
三价口服脊髓灰质炎疫苗(OPV)	OPVERO	液体：即用型	Sanofi Pasteur SA	Agence nationale de securite du medicament et des produits de sante
三价口服脊髓灰质炎疫苗(OPV)	OPVERO	液体：即用型	Sanofi Pasteur SA	Agence nationale de securite du

[0095]

				medicament et des produits de sante
三价口服脊髓灰质炎疫苗 (OPV)	OPVERO	液体: 即用型	Sanofi Pasteur SA	Agence nationale de securite du medicament et des produits de sante
破伤风类毒素	TETAVAX	液体: 即用型	Sanofi Pasteur SA	Agence nationale de securite du medicament et des produits de sante
破伤风类毒素	TETAVAX	液体: 即用型	Sanofi Pasteur SA	Agence nationale de securite du medicament et des produits de sante
b 型流感嗜血杆菌	Act-HIB	在使用前用赋形剂稀释剂复溶的冻干活性组分	Sanofi Pasteur SA	Agence nationale de securite du medicament et des produits de sante
狂犬病	VERORAB	在使用前用赋形剂稀释剂复溶的冻干活性组分	Sanofi Pasteur SA	Agence nationale de securite du medicament et des produits de sante
黄热病	STAMARIL	在使用前用赋形剂稀释剂复溶的冻干活性组分	Sanofi Pasteur SA	Agence nationale de securite du medicament et des produits de sante
脑膜炎球菌 A+C	多囊 HARIDE MENINGOC OCCAL A+C 疫苗	在使用前用赋形剂稀释剂复溶的冻干活性组分	Sanofi Pasteur SA	Agence nationale de securite du medicament et des produits de sante
单价口服脊髓灰质炎疫苗 (OPV) 1 型	口服单价 1 型脊髓灰质炎疫苗	液体: 即用型	Sanofi Pasteur SA	Agence nationale de securite du medicament et des produits de

[0096]

				sante
霍乱: 口服灭活	Dukoral	液体: 即用型	Valneva Sweden AB	瑞典医药产品署
BCG	BCG 疫苗	在使用前用赋形剂稀释剂复溶的冻干活性组分	Serum Institute of India Pvt. Ltd.	印度中央药物标准控制局
白喉-破伤风	吸附型白喉和破伤风疫苗(儿科)	液体: 即用型	Serum Institute of India Pvt. Ltd.	印度中央药物标准控制局
白喉-破伤风	吸附型白喉和破伤风疫苗(儿科)	液体: 即用型	Serum Institute of India Pvt. Ltd.	印度中央药物标准控制局
白喉-破伤风	吸附型白喉和破伤风疫苗(儿科)	液体: 即用型	Serum Institute of India Pvt. Ltd.	印度中央药物标准控制局
白喉-破伤风(抗原含量减少)	用于成人和青少年的吸附型白喉和破伤风疫苗	液体: 即用型	Serum Institute of India Pvt. Ltd.	印度中央药物标准控制局
白喉-破伤风(抗原含量减少)	用于成人和青少年的吸附型白喉和破伤风疫苗	液体: 即用型	Serum Institute of India Pvt. Ltd.	印度中央药物标准控制局
白喉-破伤风(抗原含量减少)	用于成人和青少年的吸附型白喉和破伤风疫苗	液体: 即用型	Serum Institute of India Pvt. Ltd.	印度中央药物标准控制局
白喉-破伤风-百日咳(全细胞)	吸附型白喉-破伤风-百日咳疫苗	液体: 即用型	Serum Institute of India Pvt. Ltd.	印度中央药物标准控制局
白喉-破伤风-百日咳(全细胞)	吸附型白喉-破伤风-百日咳疫苗	液体: 即用型	Serum Institute of India Pvt. Ltd.	印度中央药物标准控制局
白喉-破伤风-百日咳(全细胞)	吸附型白喉-破伤风-百日咳疫苗	液体: 即用型	Serum Institute of India Pvt. Ltd.	印度中央药物标准控制局
白喉-破伤风-百日咳(全细胞)-乙肝	吸附型白喉、破伤风、百日咳和乙肝疫苗	液体: 即用型	Serum Institute of India Pvt. Ltd.	印度中央药物标准控制局
白喉-破伤风-百日咳(全细胞)-乙肝	吸附型白喉、破伤风、百日咳和乙肝疫苗	液体: 即用型	Serum Institute of India Pvt. Ltd.	印度中央药物标准控制局
白喉-破伤风-	吸附型白喉、	液体: 即用型	Serum Institute	印度中央药物

[0097]

百日咳(全细胞)-乙肝	破伤风、百日咳和乙肝疫苗		of India Pvt. Ltd.	标准控制局
乙肝	乙肝疫苗 (rDNA) (成人)	液体: 即用型	Serum Institute of India Pvt. Ltd.	印度中央药物标准控制局
乙肝	乙肝疫苗 (rDNA) (成人)	液体: 即用型	Serum Institute of India Pvt. Ltd.	印度中央药物标准控制局
乙肝	乙肝疫苗 (rDNA) (儿科)	液体: 即用型	Serum Institute of India Pvt. Ltd.	印度中央药物标准控制局
乙肝	乙肝疫苗 (rDNA) (儿科)	液体: 即用型	Serum Institute of India Pvt. Ltd.	印度中央药物标准控制局
破伤风类毒素	吸附型破伤风类毒素疫苗	液体: 即用型	Serum Institute of India Pvt. Ltd.	印度中央药物标准控制局
破伤风类毒素	吸附型破伤风类毒素疫苗	液体: 即用型	Serum Institute of India Pvt. Ltd.	印度中央药物标准控制局
破伤风类毒素	吸附型破伤风类毒素疫苗	液体: 即用型	Serum Institute of India Pvt. Ltd.	印度中央药物标准控制局
麻疹和风疹	麻疹和风疹减毒活疫苗	在使用前用赋形剂稀释剂复溶的冻干活性组分	Serum Institute of India Pvt. Ltd.	印度中央药物标准控制局
麻疹和风疹	麻疹和风疹减毒活疫苗	在使用前用赋形剂稀释剂复溶的冻干活性组分	Serum Institute of India Pvt. Ltd.	印度中央药物标准控制局
麻疹和风疹	麻疹和风疹减毒活疫苗	在使用前用赋形剂稀释剂复溶的冻干活性组分	Serum Institute of India Pvt. Ltd.	印度中央药物标准控制局
麻疹和风疹	麻疹和风疹减毒活疫苗	在使用前用赋形剂稀释剂复溶的冻干活性组分	Serum Institute of India Pvt. Ltd.	印度中央药物标准控制局
麻疹、腮腺炎和风疹	麻疹、腮腺炎和风疹减毒活疫苗	在使用前用赋形剂稀释剂复溶的冻干活性组分	Serum Institute of India Pvt. Ltd.	印度中央药物标准控制局
麻疹、腮腺炎和风疹	麻疹、腮腺炎和风疹减毒活疫苗	在使用前用赋形剂稀释剂复溶的冻干活性组分	Serum Institute of India Pvt. Ltd.	印度中央药物标准控制局

[0098]

	疫苗	溶的冻干活性组分	Ltd.	
麻疹、腮腺炎和风疹	麻疹、腮腺炎和风疹减毒活疫苗	在使用前用赋形剂稀释剂复溶的冻干活性组分	Serum Institute of India Pvt. Ltd.	印度中央药物标准控制局
麻疹、腮腺炎和风疹	麻疹、腮腺炎和风疹减毒活疫苗	在使用前用赋形剂稀释剂复溶的冻干活性组分	Serum Institute of India Pvt. Ltd.	印度中央药物标准控制局
麻疹	麻疹减毒活疫苗	在使用前用赋形剂稀释剂复溶的冻干活性组分	Serum Institute of India Pvt. Ltd.	印度中央药物标准控制局
麻疹	麻疹减毒活疫苗	在使用前用赋形剂稀释剂复溶的冻干活性组分	Serum Institute of India Pvt. Ltd.	印度中央药物标准控制局
麻疹	麻疹减毒活疫苗	在使用前用赋形剂稀释剂复溶的冻干活性组分	Serum Institute of India Pvt. Ltd.	印度中央药物标准控制局
麻疹	麻疹减毒活疫苗	在使用前用赋形剂稀释剂复溶的冻干活性组分	Serum Institute of India Pvt. Ltd.	印度中央药物标准控制局
风疹	风疹减毒活疫苗	在使用前用赋形剂稀释剂复溶的冻干活性组分	Serum Institute of India Pvt. Ltd.	印度中央药物标准控制局
风疹	风疹减毒活疫苗	在使用前用赋形剂稀释剂复溶的冻干活性组分	Serum Institute of India Pvt. Ltd.	印度中央药物标准控制局
风疹	风疹减毒活疫苗	在使用前用赋形剂稀释剂复溶的冻干活性组分	Serum Institute of India Pvt. Ltd.	印度中央药物标准控制局
风疹	风疹减毒活疫苗	在使用前用赋形剂稀释剂复溶的冻干活性组分	Serum Institute of India Pvt. Ltd.	印度中央药物标准控制局
破伤风类毒素	ShanTT	液体：即用型	Shantha Biotechnics	印度中央药物标准控制局

[0099]

			Private Limited (Sanofi 子公司)	
破伤风类毒素	ShanTT	液体：即用型	Shantha Biotechnics Private Limited (Sanofi 子公司)	印度中央药物 标准控制局
白喉-破伤风- 百日咳(全细 胞)-乙肝-b 型 流感嗜血杆菌	Shan-5	液体：即用型	Shantha Biotechnics Private Limited (Sanofi 子公司)	印度中央药物 标准控制局
白喉-破伤风- 百日咳(全细 胞)-乙肝-b 型 流感嗜血杆菌	Shan-5	液体：即用型	Shantha Biotechnics Private Limited (Sanofi 子公司)	印度中央药物 标准控制局
BCG	BCG 疫苗 SSI	在使用前用赋 形剂稀释剂复 溶的冻干活性 组分	AJ Vaccines A/S	丹麦药品管理 局
轮状病毒	Rotateq	液体：即用型	Merck Vaccines	CBER/FDA
麻疹、腮腺炎 和风疹	rHA M-M-R II	在使用前用赋 形剂稀释剂复 溶的冻干活性 组分	Merck Vaccines	欧洲药品管理 局
轮状病毒	Rotarix	液体：即用型	GlaxoSmit hKline Biologicals SA	比利时联邦药 品和保健品管 理局
黄热病	-	在使用前用赋 形剂稀释剂复 溶的冻干活性 组分	联邦国家预算 科学机构«楚马 科夫联邦免疫 和生物产品研 究与开发科学 中心», 俄罗斯 科学院	俄罗斯联邦的 联邦医疗保健 监督服务 (ROSZDRAVN AD ZOR)
黄热病	-	在使用前用赋 形剂稀释剂复 溶的冻干活性 组分	联邦国家预算 科学机构«楚马 科夫联邦免疫 和生物产品研 究与开发科学 中心», 俄罗斯 科学院	俄罗斯联邦的 联邦医疗保健 监督服务 (ROSZDRAVN AD ZOR)
黄热病	-	在使用前用赋 形剂稀释剂复 溶的冻干活性 组分	联邦国家预算 科学机构«楚马 科夫联邦免疫 和生物产品研	俄罗斯联邦的 联邦医疗保健 监督服务 (ROSZDRAVN AD ZOR)

[0100]

			究与开发科学中心》。俄罗斯科学院	
人乳头瘤病毒(四价)	Gardasil	液体：即用型	Merck Vaccines	欧洲药品管理局
人乳头瘤病毒(二价)	Cervarix	液体：即用型	GlaxoSmit hKline Biologicals SA	比利时联邦药品和保健品管理局
人乳头瘤病毒(二价)	Cervarix	液体：即用型	GlaxoSmit hKline Biologicals SA	比利时联邦药品和保健品管理局
单价1型口服脊髓灰质炎疫苗(OPV)	Polio Sabin Mono T1	液体：即用型	GlaxoSmit hKline Biologicals SA	比利时联邦药品和保健品管理局
单价口服脊髓灰质炎疫苗(OPV) 1型	Polio Sabin Mono T1	液体：即用型	GlaxoSmit hKline Biologicals SA	比利时联邦药品和保健品管理局
二价1型和3型口服脊髓灰质炎疫苗(OPV)	Polio Sabin One and Three	液体：即用型	GlaxoSmit hKline Biologicals SA	比利时联邦药品和保健品管理局
二价1型和3型口服脊髓灰质炎疫苗(OPV)	Polio Sabin One and Three	液体：即用型	GlaxoSmit hKline Biologicals SA	比利时联邦药品和保健品管理局
b型流感嗜血杆菌	b型流感嗜血杆菌结合疫苗	在使用前用赋形剂稀释剂复溶的冻干活性组分	Serum Institute of India Pvt. Ltd.	印度中央药物标准控制局
单价1型口服脊髓灰质炎疫苗(OPV)	单价1型口服脊髓灰质炎疫苗, IP (mOPV1)	液体：即用型	Haffkine BioPharmaceutical Corporation Ltd	印度中央药物标准控制局
单价1型口服脊髓灰质炎疫苗(OPV)	单价1型口服脊髓灰质炎疫苗(mOPV1)	液体：即用型	PT BioFarma (Persero)	印度尼西亚国家药品与食品控制局
破伤风类毒素	没有用于标记以通过联合国机构供应的商品名称。另外以标记的商品名称 BEtt 销售。	液体：即用型	Biological E. Limited	印度中央药物标准控制局

[0101]

肺炎球菌 (结合)	Synflorix	液体: 即用型	GlaxoSmit hKline Biologicals SA	欧洲药品管理 局
白喉-破伤风- 百日咳(全细 胞)-乙肝-b 型 流感嗜血杆菌	白喉、破伤 风、百日咳、 乙肝和 b 型流 感嗜血杆菌结 合疫苗	在使用前用液 体活性组分复 溶的冻干活性 组分	Serum Institute of India Pvt. Ltd.	印度中央药物 标准控制局
二价 1 型和 3 型口服脊髓灰 质炎疫苗 (OPV)	二价口服 1 型和 3 型脊 髓灰质炎疫苗 (bOPV 1 和 3)	液体: 即用型	PT Bio Farrna (Persero)	印度尼西亚国 家药品与食品 控制局
脑膜炎球菌 A 结合疫苗 10 µg	脑膜炎球菌 A 结合疫苗 MenAfriVac	在使用前用赋 形剂稀释剂复 溶的冻干活性 组分	Serum Institute of India Pvt. Ltd.	印度中央药物 标准控制局
b 型流感嗜血 杆菌	Quimi-Hib	液体: 即用型	Centro de Ingenieria Genetica y Biotecnolo gia	Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos
肺炎球菌(结 合)	Synflorix	液体: 即用型	GlaxoSmit hKline Biologicals SA	欧洲药品管理 局
季节性流感	Fluvirin	液体: 即用型	Seqirus Vaccines Limited	CBER/FDA
二价 1 型和 3 型口服脊髓灰 质炎疫苗 (OPV)	二价 1 型和 3 型口服脊髓灰 质炎疫苗, IP (bOPV1 和 3)	液体: 即用型	Haffkine BioPharmaceuti cal Corporation Ltd	印度中央药物 标准控制局
季节性流感	Fluzone	液体: 即用型	Sanofi Pasteur- USA	CBER/FDA
季节性流感	Fluzone	液体: 即用型	Sanofi Pasteur- USA	CBER/FDA
白喉-破伤风- 百日咳(全细 胞)-乙肝-b 型 流感嗜血杆菌	白喉、破伤 风、百日咳、 乙肝和 b 型流 感嗜血杆菌结 合疫苗	在使用前用液 体活性组分复 溶的冻干活性 组分	Serum Institute of India Pvt. Ltd.	印度中央药物 标准控制局
季节性流感	GC FLU 多剂 量注射液	液体: 即用型	Green Cross Corporation	韩国食品药品 安全部
白喉-破伤风- 百日咳(全细 胞)-乙肝-b 型 流感嗜血杆菌	白喉、破伤 风、百日咳、 乙肝和 b 型流 感嗜血杆菌结	在使用前用液 体活性组分复 溶的冻干活性 组分	Serum Institute of India Pvt. Ltd.	印度中央药物 标准控制局

[0102]

	合疫苗			
大流行性流感 H1N1	Panvax	液体：即用型	Seqirus Limited	Therapeutic Goods Administration
大流行性 H1N1 流感	Green Flu-S	液体：即用型	Green Cross Corporation	韩国食品药品安全部
大流行性 H1N1 流感	2009 年甲型流感 (H1N1) 单价疫苗	液体：即用型	MedImmune	CBER/FDA
大流行性 H1N1 流感	Celtura	液体：即用型	Seqirus GmbH	Paul-Ehrlich-Institut
大流行性 H1N1 流感	Focetria	液体：即用型	Seqirus Vaccines Limited	
大流行性 H1N1 流感	Fluvirin-H1N1	液体：即用型	Seqirus Vaccines Limited	CBER/FDA
大流行性 H1N1 流感	Panenza	液体：即用型	Sanofi Pasteur SA	Agence nationale de securite du medicament et des produits de sante
大流行性 H1N1 流感	2009 年甲型流感 (H1N1) 单价疫苗	液体：即用型	Sanofi Pasteur-USA	CBER/FDA
大流行性 H1N1 流感	2009 年甲型流感 (H1N1) 单价疫苗	液体：即用型	Sanofi Pasteur-USA	CBER/FDA
白喉-破伤风-百日咳(全细胞)-b 型流感嗜血杆菌	白喉、破伤风、百日咳和 b 型流感嗜血杆菌结合疫苗	在使用前用液体活性组分复溶的冻干活性组分	Serum Institute of India Pvt. Ltd.	印度中央药物标准控制局
灭活脊髓灰质炎疫苗(IPV)	Poliorix	液体：即用型	GlaxoSmit hKline Biologicals SA	比利时联邦药品和保健品管理局
灭活脊髓灰质炎疫苗(IPV)	Poliorix	液体：即用型	GlaxoSmit hKline Biologicals SA	比利时联邦药品和保健品管理局
肺炎球菌(结合)	Prevenar13	液体：即用型	Pfizer	欧洲药品管理局
白喉-破伤风-百日咳(全细胞)-乙肝-b 型流感嗜血杆菌	吸附型白喉、破伤风、百日咳、乙肝和 b 型流感嗜血杆菌结合疫苗	液体：即用型	Serum Institute of India Pvt. Ltd.	印度中央药物标准控制局

[0103]

白喉-破伤风-百日咳(全细胞)-乙肝-b 型流感嗜血杆菌	吸附型白喉、破伤风、百日咳、乙肝和 b 型流感嗜血杆菌结合疫苗	液体：即用型	Serum Institute of India Pvt. Ltd.	印度中央药物标准控制局
白喉-破伤风-百日咳(全细胞)-乙肝-b 型流感嗜血杆菌	吸附型白喉、破伤风、百日咳、乙肝和 b 型流感嗜血杆菌结合疫苗	液体：即用型	Serum Institute of India Pvt. Ltd.	印度中央药物标准控制局
单价 3 型口服脊髓灰质炎疫苗(OPV)	Polio Sabin Mono Three (口服)	液体：即用型	GlaxoSmit hKline Biologicals SA	比利时联邦药品和保健品管理局
单价 3 型口服脊髓灰质炎疫苗(OPV)	Polio Sabin Mono Three (口服)	液体：即用型	GlaxoSmit hKline Biologicals SA	比利时联邦药品和保健品管理局
灭活脊髓灰质炎疫苗(IPV)	脊髓灰质炎疫苗	液体：即用型	Bilthoven Biologicals	荷兰药品评价委员会(MEB)
灭活脊髓灰质炎疫苗(IPV)	IPV 疫苗 SSI	液体：即用型	AJ Vaccines A/S	丹麦药品管理局
季节性流感	GC FLU 注射液	液体：即用型	Green Cross Corporation	韩国食品药品安全部
单价 2 型口服脊髓灰质炎疫苗(OPV)	Polio Sabin Mono Two (口服)	液体：即用型	GlaxoSmit hKline Biologicals SA	比利时联邦药品和保健品管理局
单价 2 型口服脊髓灰质炎疫苗(OPV)	Polio Sabin Mono Two (口服)	液体：即用型	GlaxoSmit hKline Biologicals SA	比利时联邦药品和保健品管理局
伤寒(多糖)	Typhim-Vi	液体：即用型	Sanofi Pasteur SA	Agence nationale de securite du medicament et des produits de sante
季节性流感	Vaxigrip	液体：即用型	Sanofi Pasteur SA	Agence nationale de securite du medicament et des produits de sante
二价 1 型和 3 型口服脊髓灰质炎疫苗(OPV)	BIOPOLIO B1/3	液体：即用型	Bharat Biotech International Limited	印度中央药物标准控制局
白喉-破伤风	无	液体：即用型	PT Bio Farma (Persero)	印度尼西亚国

[0104]

(抗原含量减少)				家药品与食品控制局
二价 1 型和 3 型口服脊髓灰质炎疫苗 (OPV)	无	液体：即用型	Sanofi Pasteur SA	Agence nationale de securite du medicament et des produits de sante
白喉-破伤风-百日咳(全细胞)-乙肝-b 型流感嗜血杆菌	没有用于标记以通过联合国机构供应的商品名称。另外以标记的商品名称 ComBE Five (复溶)销售。	在使用前用液体活性组分复溶的冻干活性组分	Biological E. Limited	印度中央药物标准控制局
白喉-破伤风-百日咳(全细胞)-乙肝-b 型流感嗜血杆菌	没有用于标记以通过联合国机构供应的商品名称。另外以标记的商品名称 ComBE Five (复溶)销售。	在使用前用液体活性组分复溶的冻干活性组分	Biological E. Limited	印度中央药物标准控制局
霍乱：口服灭活	Shanchol	液体：即用型	Shantha Biotechnics Private Limited (Sanofi 子公司)	印度中央药物标准控制局
麻疹、腮腺炎和风疹	Priorix	在使用前用赋形剂稀释剂复溶的冻干活性组分	GlaxoSmit hKline Biologicals SA	比利时联邦药品和保健品管理局
麻疹	麻疹疫苗	在使用前用赋形剂稀释剂复溶的冻干活性组分	PT Bio Farma (Persero)	印度尼西亚国家药品与食品控制局
二价 1 型和 3 型口服脊髓灰质炎疫苗 (OPV)	二价 1 型和 3 型脊髓灰质炎疫苗(口服)	液体：即用型	Serum Institute of India Pvt. Ltd.	印度中央药物标准控制局
大流行性 H1N1 流感	NASOVAC 冻干减毒活流感疫苗(人)	在使用前用赋形剂稀释剂复溶的冻干活性组分	Serum Institute of India Pvt. Ltd.	印度中央药物标准控制局
大流行性	NASOVAC	在使用前用赋	Serum Institute	印度中央药物

[0105]

H1N1 流感	冻干减毒活流感疫苗(人)	形剂稀释剂复溶的冻干活性组分	of India Pvt. Ltd.	标准控制局
破伤风类毒素	没有用于标记以通过联合国机构供应的商品名称。另外以标记的商品名称 BEtt 销售。	液体：即用型	Biological E. Limited	印度中央药物标准控制局
破伤风类毒素	没有用于标记以通过联合国机构供应的商品名称。另外以标记的商品名称 BEtt 销售。	液体：即用型	Biological E. Limited	印度中央药物标准控制局
日本脑炎疫苗(灭活) 6μg	JEEV®	液体：即用型	Biological E. Limited	印度中央药物标准控制局
甲肝(人二倍体细胞)，灭活(成人)	Havrix 1440 成人用	液体：即用型	GlaxoSmit hKline Biologicals SA	比利时联邦药品和保健品管理局
甲肝(人二倍体细胞)，灭活(儿科)	Havrix 720 青少年用	液体：即用型	GlaxoSmit hKline Biologicals SA	比利时联邦药品和保健品管理局
白喉-破伤风-百日咳(无细胞)	Boostrix	液体：即用型	GlaxoSmit hKline Biologicals SA	比利时联邦药品和保健品管理局
脑膜炎球菌 ACYW-135 (结合疫苗)	Menveo	在使用前用液体活性组分复溶的冻干活性组分	GlaxoSmit hKline Vaccines S.r.l.	欧洲药品管理局
脑膜炎球菌 ACYW-135 (结合疫苗)	Menactra	液体：即用型	Sanofi Pasteur-USA	CBER/FDA
白喉-破伤风-百日咳(全细胞)-乙肝-b 型流感嗜血杆菌	Easyflve-TT	液体：即用型	Panacea Biotec Ltd.	印度中央药物标准控制局
日本脑炎疫苗(活，减毒)	日本脑炎活疫苗(SA14-14-2)	在使用前用赋形剂稀释剂复溶的冻干活性组分	成都生物制品研究所有限责任公司	国家药品监督管理局
日本脑炎疫苗	日本脑炎活疫	在使用前用赋	成都生物制品	国家药品监督

[0106]

(活, 减毒)	苗(SA14-14-2)	形剂稀释剂复溶的冻干活性组分	研究所有限责任公司	管理局
白喉-破伤风-百日咳(全细胞)-乙肝-b 型流感嗜血杆菌	没有用于标记以通过联合国机构供应的商品名称。另外以标记的商品名称 ComBE Five (液体)销售。	液体: 即用型	Biological E. Limited	印度中央药物标准控制局
白喉-破伤风-百日咳(全细胞)-乙肝-b 型流感嗜血杆菌	没有用于标记以通过联合国机构供应的商品名称。另外以标记的商品名称 ComBE Five (液体)销售。	液体: 即用型	Biological E. Limited	印度中央药物标准控制局
日本脑炎疫苗(活, 减毒)	IMOJEV MD	在使用前用赋形剂稀释剂复溶的冻干活性组分	GPO-MBP Co., Ltd.	泰国食品药品管理局
白喉-破伤风-百日咳(全细胞)	没有用于标记以通过联合国机构供应的商品名称。另外以标记的商品名称 TRIPVAC 销售	液体: 即用型	Biological E. Limited	印度中央药物标准控制局
白喉-破伤风-百日咳(全细胞)	没有用于标记以通过联合国机构供应的商品名称。另外以标记的商品名称 TRIPVAC 销售	液体: 即用型	Biological E. Limited	印度中央药物标准控制局
白喉-破伤风(抗原含量减少)	没有用于标记以通过联合国机构供应的商品名称。另外以标记的商品	液体: 即用型	Biological E. Limited	印度中央药物标准控制局

[0107]

	名称 BE Td 销售			
白喉-破伤风 (抗原含量减少)	没有用于标记以通过联合国机构供应的商品名称。另外以标记的商品名称 BE Td 销售	液体：即用型	Biological E. Limited	印度中央药物标准控制局
二价 1 型和 3 型口服脊髓灰质炎疫苗 (OPV)	二价 1 型和 3 型脊髓灰质炎疫苗(口服)	液体：即用型	Serum Institute of India Pvt. Ltd.	印度中央药物标准控制局
灭活脊髓灰质炎疫苗(IPV)	多剂量脊髓灰质炎疫苗，注射用混悬剂 2.5 mL	液体：即用型	Bilthoven Biologicals	荷兰药品评价委员会(MEB)
季节性流感	Nasovac-S 减毒活流感疫苗(人)	在使用前用赋形剂稀释剂复溶的冻干活性组分	Serum Institute of India Pvt. Ltd.	印度中央药物标准控制局
白喉-破伤风-百日咳(无细胞)-乙肝-b 型流感嗜血杆菌-脊髓灰质炎(灭活)	Hexaxim	液体：即用型	Sanofi Pasteur SA	欧洲药品管理局
脑膜炎球菌 A 结合疫苗 5 µg	脑膜炎球菌 A 结合疫苗 5 微克 MenAfriV ac 5µg	在使用前用赋形剂稀释剂复溶的冻干活性组分	Serum Institute of India Pvt. Ltd.	印度中央药物标准控制局
白喉-破伤风-百日咳(全细胞)-乙肝-b 型流感嗜血杆菌	没有用于标记以通过联合国机构供应的商品名称。另外以标记的商品名称 Com BE Five 销售(液体)。	液体：即用型	Biological E. Limited	印度中央药物标准控制局
白喉-破伤风-百日咳(全细胞)-乙肝-b 型流感嗜血杆菌	没有用于标记以通过联合国机构供应的商品名称。另外	液体：即用型	Biological E. Limited	印度中央药物标准控制局

[0108]

	以标记的商品名称 CornBE Five (液体) 销售。			
灭活脊髓灰质炎疫苗(IPV)	脊髓灰质炎疫苗(灭活)	液体: 即用型	Serum Institute of India Pvt. Ltd.	印度中央药物标准控制局
三价口服脊髓灰质炎疫苗(OPV)	BIOPOLIO	液体: 即用型	Bharat Biotech International Limited	印度中央药物标准控制局
三价口服脊髓灰质炎疫苗(OPV)	BIOPOLIO	液体: 即用型	Bharat Biotech International Limited	印度中央药物标准控制局
季节性流感	流感疫苗(分裂病毒体, 灭活)	液体: 即用型	华兰生物疫苗股份有限公司	国家药品监督管理局
季节性流感	IL-YANG FLU 疫苗注射液	液体: 即用型	IL-YANG PHARMA CEUTICA LCO., LTD.	韩国食品药品安全部
BCG	BCG 疫苗(冻干)- 皮内注射	在使用前用赋形剂稀释剂复溶的冻干活性组分	GreenSignal Bio Pharma Limited	印度中央药物标准控制局
季节性流感, 四价	Fluzone Quadrivalent	液体: 即用型	Sanofi Pasteur-USA	CBER/FDA
季节性流感, 四价	Fluzone Quadrivalent	液体: 即用型	Sanofi Pasteur-USA	CBER/FDA
二价 1 型和 3 型口服脊髓灰质炎疫苗(OPV)	二价口服脊髓灰质炎 1 型和 3 型疫苗(bOPV 1 和 3)	液体: 即用型	PT Bio Farma (Persero)	印度尼西亚国家药品与食品控制局
霍乱: 口服灭活	Euvichol	液体: 即用型	EuBiologics Co., Ltd.	韩国食品药品安全部
单价 2 型口服脊髓灰质炎疫苗(OPV)	口服单价 2 型脊髓灰质炎疫苗(mOPV2)	液体: 即用型	Sanofi Pasteur SA	Agence nationale de securite du medicament et des produits de sante
单价 3 型口服脊髓灰质炎疫苗(OPV)	口服单价 3 型脊髓灰质炎疫苗	液体: 即用型	Sanofi Pasteur SA	Agence nationale de securite du medicament et

[0109]

				des produits de sante
脑膜炎球菌 ACYW-135 (结合疫苗)	Nimenrix	在使用前用赋形剂稀释剂复溶的冻干活性组分	Pfizer	欧洲药品管理局
白喉-破伤风-百日咳(全细胞)-乙肝-b型流感嗜血杆菌	Eupenta	液体: 即用型	LG Chem Ltd	韩国食品药品安全部
白喉-破伤风-百日咳(全细胞)-乙肝-b型流感嗜血杆菌	Eupenta	液体: 即用型	LG Chem Ltd	韩国食品药品安全部
人乳头瘤病毒(九价)	Gardasil 9	液体: 即用型	Merck Vaccines	欧洲药品管理局
季节性流感, 四价	GCFLU 四价注射液	液体: 即用型	Green Cross Corporation	韩国食品药品安全部
白喉-破伤风-百日咳(全细胞)-乙肝-b型流感嗜血杆菌	Pentabio	液体: 即用型	PT Bio Farma (Persero)	印度尼西亚国家药品与食品控制局
白喉-破伤风-百日咳(全细胞)-乙肝-b型流感嗜血杆菌	Pentabio	液体: 即用型	PT Bio Farma (Persero)	印度尼西亚国家药品与食品控制局
甲肝(人二倍体细胞), 灭活(成人)	HEALIVE	液体: 即用型	北京科兴生物制品有限公司	国家药品监督管理局
水痘	Varivax	在使用前用赋形剂稀释剂复溶的冻干活性组分	Merck Vaccines	CBER/FDA
轮状病毒(活, 减毒)	Rotavac	液体: 即用型	Bharat Biotech International Limited	印度中央药物标准控制局
白喉-破伤风-百日咳(无细胞)	Adacel	液体: 即用型	Sanofi Pasteur Limited	加拿大卫生部
季节性流感	AGRIFLU	液体: 即用型	Seqirus Vaccines Limited	加拿大卫生部
肺炎球菌(结合)	Prevenar13 多剂量小瓶	液体: 即用型	Pfizer	欧洲药品管理局
伤寒(结合)	Typbar-TVC	液体: 即用型	Bharat Biotech	印度中央药物

[0110]

			International Limited	标准控制局
二价 1 型和 3 型口服脊髓灰质炎疫苗 (OPV)	1 型和 3 型脊髓灰质炎疫苗 (活, 口服减毒, 人二倍体细胞)	液体: 即用型	北京生物制品研究所有限责任公司	国家药品监督管理局
日本脑炎疫苗 (灭活) (3 µg 儿科)	JEEV®	液体: 即用型	Biological E. Limited	印度中央药物标准控制局
轮状病毒 (活, 减毒)	ROTASHIL	在使用前用赋形剂稀释剂复溶的冻干活性组分	Serum Institute of India Pvt. Ltd.	印度中央药物标准控制局
灭活脊髓灰质炎疫苗 (IPV)	脊髓灰质炎疫苗 (灭活)	液体: 即用型	Serum Institute of India Pvt. Ltd.	印度中央药物标准控制局
灭活脊髓灰质炎疫苗 (IPV)	脊髓灰质炎疫苗 (灭活)	液体: 即用型	Serum Institute of India Pvt. Ltd.	印度中央药物标准控制局
季节性流感, 四价	GCFLU 四价多剂量注射液	液体: 即用型	Green Cross Corporation	韩国食品药品安全部
季节性流感	Serinflu	液体: 即用型	Abbott Biologicals BV	荷兰药品评价委员会 (MEB)
灭活脊髓灰质炎疫苗 (IPV)	ShanIPV	液体: 即用型	Shantha Biotechnics Private Limited (Sanofi 子公司)	印度中央药物标准控制局
二价 1 型和 3 型口服脊髓灰质炎疫苗 (OPV)	二价 OPV 1 型和 3 型脊髓灰质炎活疫苗 (口服)	液体: 即用型	Panacea Biotec Ltd.	印度中央药物标准控制局
霍乱: 口服灭活	Euvichol-Plus	液体: 即用型	EuBiologics Co., Ltd.	韩国食品药品安全部
二价 1 型和 3 型口服脊髓灰质炎疫苗 (OPV)	BIOPOLIO B1/3	液体: 即用型	Bharat Biotech International Limited	印度中央药物标准控制局
BCG	BCG 冻干谷氨酸疫苗	在使用前用赋形剂稀释剂复溶的冻干活性组分	日本 BCG 实验室	千叶地方政府
肺炎球菌 (结合)	Synflorix	液体: 即用型	GlaxoSmithKline Biologicals SA	欧洲药品管理局
轮状病毒 (活)	Rotavac	液体: 即用型	Bharat Biotech	印度中央药物

[0111]

减毒)			International Limited	标准控制局
甲肝(人二倍体细胞), 灭活(儿科)	HE ALIVE	液体: 即用型	北京科兴生物制品有限公司 (Sinovac Biotech Co. Ltd)	国家药品监督管理局
伤寒(结合)	Typbar-TVC	液体: 即用型	Bharat Biotech International Limited	印度中央药物标准控制局
轮状病毒(活, 减毒)	ROTASHIL	在使用前用赋形剂稀释剂复溶的冻干活性组分	Serum Institute of India Pvt. Ltd.	印度中央药物标准控制局
日本脑炎疫苗(灭活) 6 μ g	JEEV®	液体: 即用型	Biological E. Limited	印度中央药物标准控制局
日本脑炎疫苗(灭活) (3 μ g 儿科)	JEEV®	液体: 即用型	Biological E. Limited	印度中央药物标准控制局

[0112] 在各种实施方案中, 召回蛋白表位在蛋白水解裂解后释放并且该表位与I类MHC分子结合。I类MHC分子可以来自HLA-A、B和/或C家族。与I类MHC分子结合的具体表位可以是表1或表2中所列的那些表位中的任一者。I类MHC分子本身可以是以下非限制性实例中的一者或多者: HLA-A*02:01、HLA-A*03:01、HLA-A*11:01、HLA-A*201、HLA-A*020101、HLA-A*0203、HLA-A*0206、HLA-A2、HLA-A2.1或HLA-A*02。

[0113] 在本发明的一个方面, 召回蛋白为约8个氨基酸至约50个氨基酸的长度、或约8个氨基酸至约45个氨基酸的长度、或约8个氨基酸至约40个氨基酸的长度、约8个氨基酸至约35个氨基酸的长度、或约8个氨基酸至约30个氨基酸的长度、约8个氨基酸至约25个氨基酸的长度、约8个氨基酸至约20个氨基酸的长度、或约8个氨基酸至约15个氨基酸的长度。在本发明的一个方面, 融合蛋白为约13个氨基酸至约50个氨基酸的长度、或约13个氨基酸至约45个氨基酸的长度、或约13个氨基酸至约40个氨基酸的长度、约13个氨基酸至约35个氨基酸的长度、或约13个氨基酸至约30个氨基酸的长度、约13个氨基酸至约25个氨基酸的长度、约13个氨基酸至约20个氨基酸的长度、或约13个氨基酸至约15个氨基酸的长度。在本发明的一个方面, CD8+T细胞表位的长度可以为例如8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个或17个氨基酸。

[0114] 裂解序列。在各种实施方案中, 提供了裂解序列, 其允许召回蛋白从VLP释放, 使得召回蛋白可以与肿瘤细胞表面上的MHC结合。在各种实施方案中, VLP必须逃离核内体、分解, 并且以功能形式释放它们的治疗性负荷至胞质溶胶。在各种实施方案中, 偶联VLP和/或偶联VLP的融合蛋白易于被肿瘤细胞内的蛋白水解酶裂解, 并且VLP或融合蛋白中的靶裂解序列的位置使得靶位点的裂解从偶联VLP释放包含CD8+T细胞表位的召回蛋白的全部或一部分, 该召回蛋白与肿瘤细胞的I类MHC分子复合。技术人员容易确定足够量的偶联VLP, 并且应当理解, 该量将取决于例如受试者的特征, 例如受试者的年龄、体重、性别和/或医学状况, 以及肿瘤的特征, 例如类型、体积和发展状态。

[0115] 裂解序列可以被细胞中存在的任何蛋白酶识别。已经描述了至少569种已知的蛋

白酶(参见Lopez-Otin等人,Nature Reviews Cancer,7(10):800-808,2007)。所有已识别的人蛋白水解酶都被分成五个催化类别:金属蛋白酶、丝氨酸蛋白酶、苏氨酸蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶和天冬氨酸蛋白酶。表3中展示了可以靶向的潜在蛋白酶的非限制性列表,该表总结了被研究得最多的蛋白酶,这些蛋白酶被分为五个大类(以数量从最大到最小的顺序):金属蛋白酶、丝氨酸蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶、苏氨酸蛋白酶和天冬氨酸蛋白酶。已发现这些蛋白酶中的几种在癌细胞中相对于健康细胞过度表达。

[0116] 在各种实施方案中,裂解序列被以下各项识别:弗林蛋白酶,基质金属蛋白酶(MMP)例如MMP 1、2、3、7、8、9、11、13、14或19,ADAM(去整合素和金属蛋白酶)例如ADAMS 8、9、10、15、17或28,组织蛋白酶例如组织蛋白酶D、G、H或N,弹性蛋白酶、蛋白酶-3、天青杀素或ADAMTS-1。在各种实施方案中,裂解序列被弗林蛋白酶识别。在各种实施方案中,裂解序列包含至少4个氨基酸残基,其中至少三个是精氨酸残基。在各种实施方案中,裂解序列包含至少4个氨基酸残基,其中至少三个是精氨酸残基并且其中一个是赖氨酸残基或精氨酸残基。在各种实施方案中,裂解序列为R-X-R/K-R。在各种实施方案中,裂解序列包含附加的残基。在各种实施方案中,裂解序列还包含1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个或9个附加的精氨酸残基。已知的是,精氨酸带正电荷,并且更长的带正电荷的精氨酸残基链将使肽更靠近带更多负电荷的VLP的表面。

[0117] 表3:蛋白酶和与蛋白酶过度表达相关联的癌症

[0118]

家族	蛋白酶	位置	癌症	参考文献	其他疾病	参考文献
半胱氨酸 组织蛋白酶	通用	细胞内, 溶酶体	大多数	[121] 中的 表格	动脉粥样硬化症, 骨质疏松症	[179-182]
	组织蛋白酶 K	细胞外, 骨	乳腺癌	[178]		
	组织蛋白酶 B	在病理状态下, 细胞外和 细胞周	乳腺癌、宫颈癌、 结肠癌、结肠直肠癌、 胃癌、头颈癌、肝癌、 肺癌、黑色素瘤、卵巢癌、 胰腺癌、前列腺癌、 甲状腺癌	[31, 38, 81, 183-196]		
天冬氨酸 组织蛋白酶	组织蛋白酶 L		乳腺癌、结肠直肠癌	[28]	AD	[197]
	组织蛋白酶 E	核内体结构, ER, 高尔基体	宫颈癌、胃癌、肺癌、 胰腺腺癌	[51-55]		
	组织蛋白酶 D	溶酶体	乳腺癌、结肠直肠癌、 卵巢癌	[47-49, 198- 200]	动脉粥样硬化症	[121]
激肽释放酶 (hK)	通用	细胞内, 分泌的	大多数	[15, 58] 中的 表格		
	hK1				高血压, 炎症	[24]
	PSA (hK 3)		前列腺癌、卵巢癌	[201-202]		
	hK10		结肠癌、卵巢癌、 胰腺癌、头颈癌	[203-206]		
丝氨酸 蛋白酶	hK15		卵巢癌、前列腺癌	[207-208]		
	uPA, uPAR	膜, 细胞周	宫颈癌、结肠癌、胃癌、 前列腺癌	[86, 116, 209-210]		
胱天蛋白酶		细胞内			神经退行性疾病	[82]
MMP	通用	细胞外	大多数	[211] 中的 表格		
	MMP-1, -8, -13		乳腺癌	[85, 102-104, 211-212]	动脉粥样硬化症、RA	[213-214]
	MMP-2, -9		乳腺癌、结肠直肠癌、 肺癌、恶性胶质瘤、 卵巢癌	[91-94] [95- 98]	支气管扩张、 慢性哮喘、COPD、 囊性纤维化、HIV 相关 痴呆、高血压、卒中	[87, 113- 117]
ADAM	MMP-14	膜	乳腺癌	[212]		
		细胞外			AD	[105, 107, 112]

* 缩写: AD: 阿尔茨海默氏症; ADAM: 去整合素和金属蛋白酶结构域蛋白; COPD: 慢性阻塞性肺病; ER: 内质网;
RA: 类风湿性关节炎

[0119] 在各种实施方案中,融合蛋白必须与VLP的衣壳蛋白结合。有多种方法将融合蛋白与衣壳蛋白结合。在本发明的各种实施方案中,裂解序列通过马来酰亚胺键或酰胺键偶联(下文讨论)。融合蛋白可以与VLP的衣壳蛋白上的任何残基连接;然而,二硫键、马来酰亚胺键和酰胺键通过将召回蛋白与半胱氨酸、赖氨酸或精氨酸残基偶联而形成。

[0120] VLP的表面功能化

[0121] 本文所述的VLP必须被功能化以递送召回蛋白,该召回蛋白必须在偶联VLP的表面上呈递。在各种实施方案中,召回蛋白可以通过衣壳蛋白上的半胱氨酸残基与VLP偶联。这种半胱氨酸分子可以天然存在,或通过VLP表面上的突变存在。在各种实施方案中,VLP经受足以还原VLP表面上的半胱氨酸残基的巯基基团,同时保持VLP的衣壳样二十面体结构的还原条件。由于其游离的巯基基团,半胱氨酸在氧化条件下将容易且自发地与其他含巯基的配体形成二硫键。替代性地,在介于6.5与7.5之间的pH下,一系列化合物容易在马来酰亚胺上加成,并且不可逆地与半胱氨酸残基形成硫酯键。

[0122] 在各种实施方案中,融合蛋白也可以与VLP上的赖氨酸残基偶联。赖氨酸残基由于其伯胺而容易被修饰。使用称为n-羟基琥珀酰亚胺(NHS)酯反应的反应(因为NHS作为该反应的一部分被释放),在暴露于表面的赖氨酸残基处形成酰胺键。该反应在pH 7.2与pH 9之间自发地发生。这种附接化学已被用于在MS2上展示转铁蛋白,这可以允许VLP对血脑屏障进行胞吞转运,从而可以为神经障碍开辟新的疗法库。

[0123] 在各种实施方案中,融合蛋白还可以与天冬氨酸或谷氨酸残基偶联。与涉及半胱氨酸和赖氨酸的策略不同,与这些残基偶联需要多个步骤。首先,必须使用1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC)将羧酸活化。羧酸一旦被活化,就将与NHS反应形成NHS酯。既然羧酸侧链基本上已变成NHS酯,就可以使用具有暴露的伯胺的配体来形成稳定的酰胺键。

[0124] 在各种实施方案中,VLP在表面暴露区域上包含带负电荷的氨基酸的区域,该氨基酸区域能够与包含带正电荷的氨基酸的区域的融合蛋白结合。在各种实施方案中,带负电荷的氨基酸的区域可以在一侧或两侧侧接一个或多个半胱氨酸残基,称为聚阴离子:半胱氨酸,或更具体地,聚谷氨酸:半胱氨酸或聚天冬氨酸:半胱氨酸。在这种情况下,VLP与融合蛋白的偶联将由VLP和融合蛋白的互补氨基酸电荷之间的非共价结合以及半胱氨酸之间的二硫键引起。在各种实施方案中,半胱氨酸与带电荷的氨基酸的区域相距一个或多个氨基酸,使得任何二级/三级结构都将使带电荷的氨基酸的区域紧靠半胱氨酸。在本发明的各种实施方案中,融合蛋白包含至少一种召回蛋白和聚离子:半胱氨酸,用于将融合蛋白附接到下述VLP:该VLP包含互补聚离子:半胱氨酸序列以及定位在末端半胱氨酸与CD8+T细胞表位之间的酶裂解位点。在各种实施方案中,融合蛋白包含末端半胱氨酸、至少一种召回蛋白,以及定位在末端半胱氨酸与召回蛋白之间的酶裂解序列。

[0125] 可以用于产生偶联VLP的带负电荷的氨基酸包括例如谷氨酸和天冬氨酸。这些氨基酸可以单独使用,例如聚谷氨酸,或组合使用。在一个具体实施方案中,该区域包含谷氨酸。带负电荷的氨基酸的数量可以变化,并且可以包括约4个至约20个氨基酸、约6个至约18个氨基酸,或者约8个至约16个氨基酸,等等。在一个具体实施方案中,该区域包含约8个带负电荷的氨基酸。在更具体的实施方案中,该区域包含EEEEEEEC(E8C)(SEQ ID NO:84)。在另一个实施方案中,该区域包含CEEEEEEEEC(SEQ ID NO:85)。经由二硫键将融合蛋白偶联

至VLP的方法是已知的。例如,融合蛋白上聚精氨酸半胱氨酸部分的存在允许肽与L1颗粒的各种环中存在的聚阴离子位点(EEEEEEEEC,E8C,SEQ ID NO:84)对接。两个半胱氨酸残基之间的共价交联应当使这种关联在氧化条件下不可逆。对于偶联反应,将经纯化的HPV颗粒置于偶联缓冲液(20mM Tris/HCl,pH=7.5,150mM NaCl,5%甘油,0.5mM CaCl₂)中透析,然后添加肽和氧化剂,从而使反应在4℃处进行16小时。在孵育结束时,将反应混合物上样到尺寸排阻柱(SEPHADEX®G-100,Pharmacia,New Jersey,US,体积20ml,流速1ml/min,10mM Tris/HCl(pH约7.4),150mM NaCl,0.5mM CaCl₂),以去除未偶联肽和交换缓冲液。在空隙体积中洗脱的偶联颗粒通过SDS-PAGE上存在L1蛋白来识别。通过电子显微镜分析这些偶联颗粒。本领域的普通技术人员可以通过常规实验产生在表面暴露区域中包括聚离子区域(例如一个或多个环)并且具有VLP组装能力的VLP。

[0126] 在各种实施方案中,融合蛋白与外壳蛋白以遗传方式融合。在各种实施方案中,融合蛋白可以与VLP共价或非共价连接。不是经由例如结合带负电荷和带正电荷的氨基酸或者经由基于马来酰亚胺的偶联将召回蛋白附接到VLP,而是可以将编码融合蛋白的核酸序列插入到编码衣壳蛋白的核酸中,使得在表达时产生融合蛋白,其中召回蛋白被插入到衣壳蛋白的环中并且展示在VLP的表面上。

[0127] 在各种实施方案中,非天然氨基酸可以用于将融合蛋白与VLP偶联。除了20种天然氨基酸外,许多非天然氨基酸已用于位点特异性蛋白质偶联反应。例如,叠氮高丙氨酸(AHA)或对氨基苯丙氨酸(pAF)可以被掺入到VLP外壳蛋白中以用于偶联。这些氨基酸以两种方式被掺入到蛋白质中:全局甲硫氨酸置换和琥珀终止密码子抑制。由于AHA与甲硫氨酸非常相似,所以,如果甲硫氨酸的供应是限速的,则AHA将在每个AUG密码子处掺入,这被称为全局甲硫氨酸置换。甲硫氨酸或无细胞蛋白质合成的营养缺陷型细菌可以用于限制甲硫氨酸的可用性。琥珀终止密码子抑制将结合pAF。琥珀终止密码子抑制使用不与天然氨基酸反应的非天然合成酶和tRNA,以在琥珀终止密码子UAG处掺入非天然氨基酸。展示叠氮化物的AHA将参与铜(I)催化的叠氮化物-炔烃环加成(“点击”反应)并且与含炔烃的配体形成共价三唑环。

[0128] 在各种实施方案中,偶联VLP包含至少十分之一的病毒外壳蛋白,所述病毒外壳蛋白可以展示召回蛋白。在各种实施方案中,至少五分之一的病毒外壳蛋白可以展示召回蛋白。在各种实施方案中,约一半的病毒外壳蛋白可以展示召回蛋白。在各种实施方案中,约三分之二的病毒外壳蛋白可以展示召回肽。在各种实施方案中,几乎所有的病毒外壳蛋白都可以展示召回蛋白。

[0129] 治疗方法

[0130] 在本发明的各种实施方案中,公开了通过将偶联VLP施用于对其有需要的患者来治疗对其有需要的受试者的癌症的方法。本发明的方法包括以足以抑制肿瘤生长、进展或转移的量将本发明的偶联VLP施用于对其有需要的受试者。在本发明的各种实施方案中,以足以刺激细胞因子产生和/或细胞免疫力,特别是天然免疫力(包括刺激巨噬细胞和自然杀伤细胞的细胞毒性活性)的量,将偶联VLP施用于对其有需要的受试者。在本发明的各种实施方案中,对其有需要的受试者是先前已接受过肿瘤治疗并且根据医学标准目前被认为无癌症或无疾病的受试者。

[0131] 简言之,所述偶联VLP的作用机制在图1中描绘。VLP与肿瘤细胞特异性结合。(图1,

左侧,肿瘤细胞)。VLP上的召回蛋白表位随后被在肿瘤微环境中过度表达的弗林蛋白酶以蛋白水解方式裂解。这进而导致表位从偶联VLP释放,并且将表位加载到肿瘤1类MHC分子上(“表位涂层”)。(图1,中间分解图示出了载有来自VLP的表位的阻断MHI分子)。然后,表位包被的肿瘤细胞被一种或多种儿童疫苗T细胞和预先存在的CD8⁺ T细胞识别为病原体感染的细胞,从而产生触发的免疫重定向应答。(图1,图的最右侧)。也就是说,这种识别事件导致宿主预先存在的针对病原体和儿童疫苗的免疫记忆,从而在肿瘤微环境中针对肿瘤激活,攻击并破坏肿瘤。肿瘤细胞的破坏可以导致预先存在的免疫应答的成分暴露于癌细胞抗原。因此,从被杀死的肿瘤细胞释放的抗原将启动免疫应答以募集另外的肿瘤特异性CD8⁺ T细胞,或“第二波”T细胞,它们然后继续攻击该区域中的另外的肿瘤细胞。这可以导致引发针对癌细胞抗原的内源性免疫应答(通常称为“表位扩散”),并且导致抗肿瘤免疫记忆。

[0132] 因此,本文所公开的方法是通过利用个体自身预先存在的适应性记忆免疫系统攻击癌细胞来治疗个体中的癌症的方法。本文所述的方法利用了个体具有预先存在的免疫应答这一事实,这些免疫应答最初不是响应于癌症而引发的,而是通过常规疫苗接种计划或经由存在于自然环境中的微生物和病原体而引发的。因为癌细胞通常不会表达引发预先存在的免疫应答的微生物抗原,所以不会期望这种免疫应答会攻击癌症。然而,通过本发明的方法,可以募集此类预先存在的免疫应答来攻击、杀死和清除受试者中的癌症。这通过将一种或多种已知被受试者中预先存在的免疫应答识别的抗原引入到癌症表面之中或之上,导致免疫应答的细胞攻击展示抗原的癌细胞来实现。另外,癌细胞的破坏可以导致预先存在的免疫应答的成分暴露于另外的癌细胞抗原。因此,本发明的一般方法可以通过将个体中预先存在的微生物免疫应答或疫苗免疫应答募集到癌症的部位来实施,使得预先存在的免疫应答对癌症进行攻击。因此,该方法通常涉及四个步骤,包括:1) 将VLP与肿瘤细胞结合;从VLP裂解表位,导致表位与MHC结合以在肿瘤细胞表面上展示;通过受试者预先存在的针对表位的回忆免疫力来识别加载的MHC;然后触发第二波和长期的抗肿瘤免疫力。

[0133] 从细胞培养测定和动物研究获得的数据可以用于制定人用的剂量范围。此类组合物的剂量优选地在包括ED₅₀且几乎没有或完全没有毒性的循环浓度范围内。剂量可以取决于采用的剂型和利用的施用途径,而在该范围内变化。对于本发明的方法中所使用的任何组合物,治疗有效剂量可以从细胞培养测定初步估计。可以在动物模型中配制某个剂量以达到循环血浆浓度范围,该范围包括如在细胞培养中测定的IC₅₀(测试化合物实现症状半数最大抑制的浓度)。这种信息可以用于准确地测定人的可用剂量。例如,可以通过高效液相色谱法测量血浆中的水平。

[0134] 在许多情况下,将期望多次施用含有VLP的组合物,通常至多、至少或不超过1次、2次、3次、4次、5次、6次、7次、8次、9次、10次、11次、12次、13次、14次、15次或更多次疫苗接种,包括其间的所有范围。疫苗接种通常将以1、2、3、4、5、6至5、6、7、8、9、10、11至12周/月/年的间隔进行,包括其间的所有值和范围,更通常为三至五周的间隔。

[0135] 在各种实施方案中,提供了通过将有效量的本发明的偶联VLP施用于对其有需要的受试者来刺激巨噬细胞和自然杀伤细胞的细胞毒性活性的方法。巨噬细胞和自然杀伤细胞可以是存在于肿瘤微环境中的那些细胞。在本发明的一个方面,偶联VLP以能有效地刺激肿瘤微环境中已经存在的巨噬细胞和自然杀伤细胞的细胞毒性活性的量施用于受试者。在本发明的各种实施方案中,偶联VLP以能有效地将巨噬细胞和自然杀伤细胞吸引至肿瘤微

环境的量施用于受试者。

[0136] 在本发明的各种实施方案中,偶联VLP以能有效地将足够数量的抗体结合至召回蛋白以吸引和刺激巨噬细胞、中性粒细胞和自然杀伤细胞的量施用于受试者。

[0137] 在本发明的各种实施方案中,提供了通过将有效量的本发明的偶联VLP施用于对其有需要的受试者,来将存在的记忆CD8+T细胞的细胞毒性活性重定向至肿瘤细胞或肿瘤微环境的方法。优选地,偶联VLP的召回蛋白的T细胞表位来自受试者已针对其主动接种疫苗的病原体或来自先前已将受试者感染的病原体,并且受试者具有识别与肿瘤细胞上的I类MHC分子复合的T细胞表位的记忆CD8+T细胞。在本发明的一个方面,偶联VLP的有效量是足以将记忆CD8+T细胞吸引至肿瘤微环境的量。在本发明的一个方面,偶联VLP的有效量是足以刺激存在于肿瘤微环境中的记忆CD8+T细胞的量。

[0138] 在各种实施方案中,肿瘤是小细胞肺癌、肝细胞癌、肝癌、肝细胞癌、黑素瘤、转移性黑素瘤、肾上腺癌、肛门癌、再生障碍性贫血、胆管癌、膀胱癌、骨癌、脑癌/CNS癌、乳腺癌、原发部位不明癌症、卡斯特雷曼氏症、宫颈癌、结肠/直肠癌、子宫内膜癌、食道癌、尤因家族肿瘤、眼癌、胆囊癌、胃肠类癌肿瘤、胃肠道间质瘤(gist)、妊娠滋养细胞疾病、霍奇金氏病、卡波西氏肉瘤、肾癌、喉癌和下咽癌、白血病、肝癌、肺癌、淋巴瘤、恶性间皮瘤、多发性骨髓瘤、骨髓异常增生综合征、鼻腔癌和鼻窦癌、鼻咽癌、神经母细胞瘤、口腔癌和口咽癌、骨肉瘤、卵巢癌、胰腺癌、阴茎癌、垂体瘤、前列腺癌、视网膜母细胞瘤、横纹肌肉瘤、唾液腺癌、肉瘤、皮肤癌、胃癌、睾丸癌、胸腺癌、甲状腺癌、子宫肉瘤、阴道癌、外阴癌、华氏巨球蛋白血症、威尔姆氏肿瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、霍奇金氏淋巴瘤、伯基特氏淋巴瘤、淋巴母细胞性淋巴瘤、套细胞淋巴瘤(MCL)、多发性骨髓瘤(MM)、小淋巴细胞性淋巴瘤(SLL)、脾边缘区淋巴瘤、边缘区淋巴瘤(结外或淋巴结)、成人混合细胞型弥漫性侵袭性淋巴瘤、成人大细胞型弥漫性侵袭性淋巴瘤、成人大细胞免疫母细胞型弥漫性侵袭性淋巴瘤、成人小非裂解细胞弥漫性侵袭性淋巴瘤或滤泡性淋巴瘤、头颈癌、子宫内膜癌或子宫癌、非小细胞肺癌、骨肉瘤、胶质母细胞瘤或转移性癌症。在一个优选的实施方案中,癌症是乳腺癌、宫颈癌、卵巢癌、胰腺癌或黑素瘤。

[0139] 如本文所用,术语“癌症”是指增殖性疾病,诸如淋巴瘤、淋巴细胞白血病、肺癌、非小细胞肺(NSCL)癌、细支气管肺泡细胞肺癌、骨癌、胰腺癌、皮肤癌、头颈癌、皮肤或眼内黑素瘤、子宫癌、卵巢癌、直肠癌、肛门区癌、胃癌(stomach cancer)、胃癌(gastric cancer)、结肠癌、乳腺癌、子宫癌、输卵管癌、子宫内膜癌、宫颈癌、阴道癌、外阴癌、霍奇金氏病(Hodgkin's Disease)、食道癌、小肠癌、内分泌系统癌症、甲状腺癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、尿道癌、阴茎癌、前列腺癌、膀胱癌、肾癌或输尿管癌、肾细胞癌、肾盂癌、间皮瘤、肝细胞癌、胆道癌、中枢神经系统(CNS)肿瘤、脊髓轴线肿瘤、脑干胶质瘤、多形性胶质母细胞瘤、星形细胞瘤、神经鞘瘤、室管膜瘤、髓母细胞瘤、脑膜瘤、鳞状细胞癌、垂体腺瘤和尤文氏肉瘤(Ewing's sarcoma),包括任何上述癌症的难治性形式,或者一种或多种上述癌症的组合。

[0140] 本发明的一个方面是通过将本发明的偶联VLP施用于对其有需要的受试者来治疗该受试者的癌症的方法,其中召回蛋白的CD8+表位属于针对病毒诱发的癌症(例如HPV宫颈癌、HPV+口腔癌、EBV鼻咽癌)的失败的治疗癌症疫苗(“治疗性疫苗”)。该方法包括确定受试者是否已主动地针对该疫苗进行了疫苗接种,但对该治疗没有以抗肿瘤作用作出应答。然

后将有效量的本发明的偶联VLP施用于患者,其中召回蛋白的CD8+表位是先前施用于受试者的感染该受试者的疫苗中的抗原决定簇的表位。

[0141] 在各种实施方案中,提供了通过将本发明的偶联VLP施用于对其有需要的受试者来治疗该受试者的癌症的方法,其中召回蛋白的CD8+表位属于针对病毒诱发的癌症(例如HPV宫颈癌、HPV+口腔癌、EBV鼻咽癌)的失败的CAR-T细胞疗法(“CAR-T”)。该方法包括确定受试者是否已用CAR-T积极治疗,但对该治疗没有以抗肿瘤作用作出应答。然后将有效量的本发明的偶联VLP施用于患者,其中召回蛋白的CD8+表位是先前施用于受试者的感染该受试者的CAR-T中的抗原决定簇的表位。

[0142] 在各种实施方案中,提供了通过将本发明的偶联VLP施用于对其有需要的受试者来治疗该受试者的癌症的方法,其中召回蛋白的CD8+表位属于针对癌症的失败的疫苗或CAR-T细胞疗法(“CAR-T”)。该方法包括确定受试者是否已用CAR-T积极治疗,但对该治疗没有以抗肿瘤作用作出应答。然后将有效量的本发明的偶联VLP施用于患者,其中召回蛋白的CD8+表位是先前施用于受试者的感染该受试者的CAR-T中的抗原决定簇的表位。

[0143] VLP具有佐剂特性。在一些实施方案中,本发明的偶联VLP组合物的免疫原性可以通过使用附加的免疫应答非特异性刺激剂(称为佐剂)来增强。合适的佐剂包括所有可接受的免疫刺激化合物,诸如细胞因子、毒素或合成组合物(诸如明矾)。

[0144] 佐剂包括但不限于水包油型乳剂、油包水型乳剂、矿物盐、多核苷酸和天然物质。可以使用的具体佐剂包括IL-1、IL-2、IL-4、IL-7、IL-12、 γ -干扰素、GM-CSF、BCG、铝盐诸如氢氧化铝或其他铝化合物、MDP化合物诸如thur-MDP和nor-MOP、CGP(MTP-PE)、脂质A和单磷酸脂质A(MPL),或灭活的微生物制剂。RIBI,其在2%角鲨烯/吐温80乳液中含有三种从细菌提取的组分,分别为MPL、海藻糖二霉菌酸酯(TOM)和细胞壁骨架(CWS)。甚至可以使用MHC抗原。

[0145] 实现偶联VLP组合物的佐剂作用的各种方法包括使用试剂,诸如氢氧化铝或磷酸盐(明矾),通常以在磷酸盐缓冲盐水中的约0.05%至约0.1%的溶液使用,与作为约0.25%溶液使用的糖的合成聚合物(CARBOPOL®)混合,通过分别用介于约70°C至约101°C之间范围内的温度热处理30秒至2分钟的时段,来使组合物中的蛋白质聚集。还可以采用以下方式来产生佐剂作用:通过用经胃蛋白酶处理的(Fab)白蛋白抗体再活化来聚集;与革兰氏阴性菌的细菌细胞(例如,微小隐孢子虫(*C. parvum*))、内毒素或脂多糖成分混合;在生理上可接受的油媒介物(例如,二缩甘露醇单油酸酯(Aracel A™))中进行乳化,或使用用作封闭替代物的全氟化碳(FLUOSOL-DA®)的20%溶液进行乳化。典型的佐剂是完全弗氏佐剂(含有已杀灭的结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*))、不完全弗氏佐剂和氢氧化铝。

[0146] 对于施用于人,多种合适的佐剂对于技术人员将是显而易见的。这些包括例如作为佐剂的明矾-MPL,或类似的配制物AS04(其用于已批准的HPV疫苗CERVARIX®)、AS03、AS02、MF59,蒙塔尼德(montanide)、基于皂苷的佐剂诸如GPI-0100、基于CpG的佐剂,或咪喹莫特。在本发明的实施方案中,佐剂与VLP物理偶联,或被VLP包封,而不是简单地与其混合。除佐剂之外,可能需要共同施用生物应答调节剂(BRM)以增强免疫应答。BRM已被证明可上调T细胞免疫力或下调抑制细胞活性。此类BRM包括但不限于西咪替丁(CIM;1200毫

克/天) (Smith/Kline, PA, US); 或低剂量环磷酰胺 (CYP; 300mg/ml) (Johnson/Mead, NJ, US) 和细胞因子, 诸如 γ -干扰素、IL-2 或 IL-12, 或者编码参与免疫辅助功能的蛋白质的基因, 诸如 B-7。在本发明的实施方案中, 这些基因被 VLP 包封, 以促进它们递送到受试者中。

[0147] 包含多肽或肽序列作为活性成分的组合物的制备通常是本领域所熟知的。通常, 此类组合物被制备成可注射剂, 作为液体溶液剂或混悬剂; 也可以制备适于在注射前溶解或悬浮于液体中的固体形式。该制剂也可以被乳化。通常将活性免疫原性成分与药学上可接受并且与活性成分相容的赋形剂混合。合适的赋形剂是例如水、盐水、葡萄糖、甘油、乙醇等, 以及它们的组合。此外, 如果需要, 这些组合物可以含有一定量的辅助物质, 诸如润湿剂或乳化剂、pH 缓冲剂, 或者增强疫苗效果的佐剂。在具体的实施方案中, 疫苗是用多种物质的组合配制的。

[0148] 包含本发明的偶联 VLP 的组合物为适合体内施用于受试者的生物相容形式。这些药物组合物还包含药学上可接受的载剂。术语“药学上可接受的”意味着得到联邦监管机构或州政府批准, 或者在美国药典或其他公认的药典中列出适用于动物, 并且更确切地说适用于人类。术语“载剂”是指与 VLP 一起施用的稀释剂、佐剂、赋形剂或媒介物。此类药用载剂可以是无菌液体, 诸如水 and 油, 包括石油, 动物、植物或合成来源的那些油, 包括但不限于花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等等。当口服施用药物组合物时, 水可以是载剂。当静脉内施用药物组合物时, 盐水和右旋糖水溶液可以是载剂。盐水溶液和右旋糖水溶液和甘油溶液可以用作可注射溶液剂的液体载剂。合适的药物赋形剂包括淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、大米、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、滑石、氯化钠、干燥脱脂乳、甘油、丙二醇、水、乙醇等等。该药物组合物还可以包含微量的润湿剂或乳化剂, 或者 pH 缓冲剂。

[0149] 包含本发明的偶联 VLP 的药物组合物可以采用溶液剂、混悬剂、乳剂、片剂、丸剂、胶囊剂、粉剂、缓释制剂等的形式。口服制剂可以包括标准载剂, 诸如药用级的甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素、碳酸镁等。在一个具体实施方案中, 药物组合物包含有效量的本发明的偶联 VLP 连同适量的药学上可接受的载剂, 以便提供用于适当施用于患者的形式。该制剂应当适合施用模式。

[0150] 本发明的药物组合物可以通过任何特定的施用途径来施用, 包括但不限于静脉内、肌内、关节内、支气管内、腹腔内、囊内、软骨内、腔内、体腔内、小脑内、脑室内、结肠内、宫颈内、胃内、肝内、心肌内、骨内、骨髓腔内、骨盆内、心包内、腹膜内、胸膜内、前列腺内、肺内、直肠内、肾内、视网膜内、脊柱内、滑膜内、胸腔内、子宫内、膀胱内、推注、口服、肠胃外、皮下、阴道、直肠、颊、舌下、鼻内、离子电渗方式或透皮方式。最合适的途径是静脉内注射或口服施用。在具体实施方案中, 在靶区域处或附近施用组合物, 例如肿瘤内注射。

[0151] 例如, 对于以水性溶液进行的肠胃外施用, 如果需要, 溶液应当适当地缓冲, 并且首先用足够的盐水或葡萄糖使液体稀释剂等渗。这些特定的水性溶液特别适合于静脉内、肌内、肿瘤内、皮下和腹膜内施用。就这一点而言, 本领域的技术人员根据本公开将知道可以采用的无菌水性介质。例如, 可以将一个剂量溶解在等渗 NaCl 溶液中, 然后添加到皮下输液流体中或在建议的输注部位处注射 (参见例如 Remington's Pharmaceutical Sciences, 1990)。取决于受试者的状况, 剂量必然会发生一些变化。负责施用的人在任何情况下都将确定针对个体受试者的适当剂量。

[0152] 本发明的含有偶联VLP的组合物可以通过吸入施用。在某些实施方案中,组合物可以作为气雾剂施用。如本文所用,术语“气雾剂”或“气雾化组合物”是指在气体中悬浮的固体颗粒或液体颗粒。该术语通常可以用来指已被汽化、雾化或以其他方式从固体或液体形式转变为包括悬浮的固体或液体药物颗粒的可吸入形式的组合物。此类气雾剂可以用于经由呼吸系统递送组合物。如本文所用,“呼吸系统”是指体内负责摄入氧气和呼出二氧化碳的器官系统。该系统通常包括从鼻到肺泡的所有空气通道。在哺乳动物中,通常认为其包括肺、支气管、细支气管、气管、鼻道和膈。出于本公开的目的,将组合物递送至呼吸系统表示将药物递送至呼吸系统的一个或多个空气通道,特别是递送至肺。

[0153] 适用于其他施用方式的另外的制剂包括栓剂(用于肛门或阴道应用)和在一些情况下的口服制剂。对于栓剂,传统的粘结剂和载剂可以包括例如聚亚烷基二醇或甘油三酯:此类栓剂可以由含有在约0.5%至约10%、优选地约1%至约2%的范围内的活性成分的混合物形成。口服制剂包括通常采用的赋形剂,诸如药用级的甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素、碳酸镁等。这些组合物采取溶液剂、混悬剂、片剂、丸剂、胶囊剂、缓释制剂或粉剂的形式,并且含有约10%至约95%的活性成分,优选地约25%至约70%。

[0154] 可以将偶联VLP组合物配制成中性形式或盐形式的疫苗。药学上可接受的盐包括酸加成盐(与肽的游离氨基基团一起形成)和与无机酸(诸如盐酸或磷酸)或有机酸(诸如乙酸、草酸、酒石酸、扁桃酸)等一起形成的那些。与游离羧基基团一起形成的盐也可以衍生自无机碱,诸如氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化铵、氢氧化钙或氢氧化铁,以及有机碱,诸如异丙胺、三甲胺、2-乙氨基乙醇、组氨酸、普鲁卡因等。

[0155] 本发明的药物组合物还可以包含有效量的附加佐剂。如本文所指出的,乳头瘤病毒VLP具有佐剂特性。合适的附加佐剂包括但不限于弗氏完全或不完全佐剂、矿物凝胶诸如氢氧化铝、表面活性物质诸如溶血卵磷脂、普朗尼克多元醇、聚阴离子、肽、油乳剂、二硝基苯酚,以及潜在有用的人佐剂诸如卡介苗(BCG)、短小棒状杆菌(*Corynebacterium parvum*)和无毒霍乱毒素。

[0156] 在普通的储存条件和使用条件下,这些制剂含有防腐剂以防止微生物的生长。在所有情况下,药物形式都必须是无菌的,并且必须是可以易于注射的流体。它在制造条件和储存条件下也应当是稳定的,并且必须防止微生物(诸如细菌和真菌)的污染作用。

[0157] 载剂还可以是包含例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)、它们的合适混合物和植物油的溶剂或分散介质。可以维持适当的流动性,例如通过使用包衣(诸如卵磷脂)、在分散体的情况下通过维持所需的粒度,以及通过使用表面活性剂。微生物作用的防止可以通过各种抗细菌剂和抗真菌剂(例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞等)来实现。在许多情况下,将优选的是包含等渗剂,例如糖或氯化钠。可注射组合物的延长吸收可以通过在组合物中使用延迟吸收剂(例如单硬脂酸铝和明胶)来实现。

[0158] 无菌可注射溶液剂通过将所需量的偶联VLP掺入具有上文列举的各种成分的适当溶剂中来制备,根据需要,随后可以过滤除菌。一般来讲,分散体通过将各种灭菌的活性成分掺入到无菌媒介物中来制备,该无菌媒介物含有基本分散介质和来自以上列举的那些的所需其他成分。就用于制备无菌可注射溶液剂的无菌粉末而言,优选的制备方法是真空干燥技术和冷冻干燥技术,这些方法从其先前的无菌过滤溶液剂产生活性成分加上任何附加的期望成分的粉末。

[0159] 本发明的不同方面涉及将有效量的包含偶联VLP的组合物施用于对其有需要的受试者。在本发明的一些实施方案中,将包含含有CD8+T细胞表位的靶肽的偶联VLP施用于患者以治疗肿瘤或预防这种肿瘤的复发。此类组合物将通常溶解或分散在药学上可接受的载剂或水性介质中。

[0160] 提供适当VLP的方法

[0161] 在各种实施方案中,提供了用于将偶联VLP提供给对其有需要的患者的方法,包括:(1) 测量患者体内的预先存在的免疫力,和(2) 选择适当的偶联VLP施用于有需要的患者。施用于患者的适当的偶联VLP将取决于患者的T细胞谱。适当的偶联VLP将是能够引发为总CD8+细胞基线的至少两倍的T细胞应答的VLP。在各种实施方案中,适当的偶联VLP将是能够引发为总CD8+细胞或总CD8+CD69+T细胞基线的两倍的T细胞应答的VLP。目标是基于患者的疫苗接种史或先前接触病原体的情况选择适当的偶联VLP。可以通过以下方式确定哪种偶联VLP是适当的:(1) 患者访谈;(2) 查阅患者的医疗记录;和/或(3) 评估患者的T细胞谱。

[0162] 在各种实施方案中,多于一种召回蛋白可能适用于引发针对肿瘤的免疫应答。在各种实施方案中,携带任一种召回蛋白的偶联VLP将是适当的。在各种实施方案中,多于一种召回蛋白被表达并且与VLP结合。在各种实施方案中,单种融合蛋白将包含多于一种召回蛋白。在各种实施方案中,包含不同召回蛋白的多种融合蛋白将与VLP偶联。在各种实施方案中,本发明包括如本文所述的偶联VLP群和药学上可接受的赋形剂。在各种实施方案中,施用于受试者的偶联VLP是相同的。在各种实施方案中,将携带不同召回蛋白的偶联VLP施用于受试者。

[0163] 基于先前疫苗接种的选择。在本发明的各种实施方案中,提供了选择适当的偶联VLP以便施用于对其有需要的受试者的方法。在各种实施方案中,这涉及查明受试者是否已针对给定的病原体(例如寄生虫、细菌或病毒,例如麻疹或脊髓灰质炎)主动接种了疫苗,然后选择如本文所公开的偶联VLP并且将其施用于受试者,其中召回蛋白的CD8+T细胞表位来自受试者已针对其免疫的病原体。在各种实施方案中,受试者的疫苗接种史是通过查看受试者的医疗记录而获得的。在各种实施方案中,受试者的疫苗接种史是通过受试者进行访谈而获得的。

[0164] 基于先前感染的选择。在各种实施方案中,选择适当的偶联VLP以施用于对其有需要的受试者的方法涉及查明受试者先前是否已感染过给定的病原体(例如寄生虫、细菌或病毒,例如麻疹或脊髓灰质炎),并且克服了感染。在各种实施方案中,然后向受试者施用包含召回蛋白的偶联VLP,该召回蛋白包含受试者先前已感染过的所述病原体。

[0165] 可以通过查看受试者的医疗记录或对受试者进行访谈来查明受试者是否已感染过特定的病原体。与特定I类MHC分子结合的CD8+T细胞表位的非限制性实例在表1中列出。该方法还可以包括确定受试者的细胞表达哪种I类MHC决定簇,然后施用本发明的偶联VLP,其中召回蛋白的CD8+T细胞表位是疫苗中的病原体或先前感染受试者的病原体的抗原成分的CD8+T细胞表位,其与受试者的I类MHC决定簇形成复合物。

[0166] 测量T细胞应答。在各种实施方案中,使用本领域中已知的各种技术来评估患者的T细胞谱,以便选择适当的偶联VLP。然后使用该细胞谱来选择适当的偶联VLP进行施用。此类技术包括测量干扰素 γ 水平、使用流式细胞术来分离Ag特异性CD8+T细胞,和/或细胞毒性测定法。为了测量干扰素 γ (T细胞活化的标志物),对分离的T细胞进行细胞内染色。替

代性地,可以进行针对干扰素- γ 的酶联免疫吸附点(ELISPOT)测定。该技术允许对患者的T细胞谱进行高通量评估。该方法可以潜在地检测100,000个至300,000个细胞中的一个细胞。简言之,将针对特定细胞因子的单克隆抗体预包被到聚偏二氟乙烯(PVDF)背衬的微孔板上。将CD8+T细胞连同树突细胞和单个肽一起吸移到孔中,然后将微孔板置于加湿的37°C CO₂培养箱中,培养在从24小时至48小时的范围内的时段。在孵育期间,固定的抗体与从细胞分泌的细胞因子结合。洗涤之后,将对所选择的被分析物具有特异性的检测抗体添加到孔中。洗涤后,添加与链霉亲和素偶联的酶并且添加底物。根据所利用的底物,形成有色沉淀物,并且在细胞因子分泌位点处以斑点出现,每个单独的斑点代表单个生产细胞。

[0167] 在各种实施方案中,本文所描述的本发明提供了通过评估患者T细胞谱来确定施用于有需要的患者的适当偶联VLP的方法,包括:(1)从患者/参与者收集PBMC(疫苗接种前样品),(2)通过用抗IFN- γ 抗体包被(孵育过夜)来制备ELISPOT板,(3)将PBMC与感兴趣肽的池中的一种肽一起孵育,预期这些肽将引发T细胞应答(孵育1天至2天),(4)对板进行洗涤,添加生物素化的二抗(孵育数小时),(5)对板进行洗涤,添加亲和素偶联的辣根过氧化物酶并且孵育,(6)对板进行洗涤,添加氨基乙基咔唑(AEC),保持几分钟,(7)停止反应(水),以及(8)在ELISPOT读取器上可视化。该所公开的方法可以最多检测100,000个至300,000个细胞中的一个细胞。抗原特异性T细胞频率的两倍增加应当被视为信号。

[0168] 在各种实施方案中,T细胞增殖可以通过3H(氚化)-胸苷来测量。此类方法是灵敏的,并且可以用于高通量测定。此类技术还可以包括羧基荧光素琥珀酰亚胺酯(CFSE)和Ki64细胞内染色。

[0169] 基于向性选择召回蛋白。本领域已知一些病毒对特定类型的组织表现出向性。例如:对脑组织表现出向性的病毒包括但不限于JC病毒、麻疹病毒、LCM病毒、虫媒病毒和狂犬病病毒;对眼组织表现出向性的病毒包括但不限于单纯疱疹病毒、腺病毒和巨细胞病毒;对鼻组织表现出向性的病毒包括但不限于鼻病毒、副流感病毒和呼吸道合胞病毒;对口腔组织(例如口腔粘膜、牙龈、唾液腺、咽)表现出向性的病毒包括但不限于I型和II型单纯疱疹病毒、腮腺炎病毒、埃-巴二氏病毒和巨细胞病毒;对肺组织表现出向性的病毒包括但不限于甲型和乙型流感病毒、副流感病毒、呼吸道合胞病毒、腺病毒和SARS冠状病毒;对神经组织(例如脊髓)表现出向性的病毒包括但不限于脊髓灰质炎病毒和HTLV-1;对心脏组织表现出向性的病毒包括但不限于柯萨奇B病毒;对肝组织表现出向性的病毒包括但不限于甲型、乙型和丙型肝炎病毒;对胃肠组织(例如胃、大肠和小肠)表现出向性的病毒包括但不限于腺病毒、轮状病毒、诺如病毒、星状病毒和冠状病毒;对胰腺组织表现出向性的病毒包括但不限于柯萨奇B病毒;对皮肤组织表现出向性的病毒包括但不限于水痘带状疱疹病毒、单纯疱疹病毒6、天花病毒、传染性软疣、乳头瘤病毒、细小病毒B19、风疹病毒、麻疹病毒和柯萨奇A病毒;并且对生殖器组织表现出向性的病毒包括但不限于单纯疱疹2型、乳头瘤病毒、人类免疫缺陷病毒(HIV)。

[0170] 在各种实施方案中,提供了通过将本发明的偶联VLP施用于对其有需要的受试者来治疗该受试者的癌症的方法,其中召回蛋白是对作为癌症来源的组织(“源组织”)具有向性的病原体的CD8+表位。在各种实施方案中,适当的偶联VLP通过首先确定肿瘤细胞的源组织,然后选择以下召回蛋白来选择:(1)患者针对其已经存在CD8+T细胞,和(2)对于肿瘤的源组织具有向性。然后将所选择的偶联VLP施用于对其有需要的患者。

[0171] 在各种实施方案中,用于治疗肺癌的方法包括:确定受试者是否已针对感染肺细胞的病原体(例如流感病毒,例如甲型或乙型流感病毒)主动接种了疫苗,然后施用有效量的本发明的偶联VLP,其中召回蛋白的CD8+T细胞表位是疫苗中所包含的病原体的抗原决定簇,并且该T细胞表位与受试者的I类MHC分子形成复合物。在本发明的用于治疗肺癌的方法的一个方面,包括确定受试者是否已感染了感染肺细胞的病原体(例如流感病毒,例如甲型或乙型流感病毒),然后施用有效量的本发明的偶联VLP,其中召回蛋白的CD8+T细胞表位属于该病原体并且该T细胞表位与受试者的I类MHC分子形成复合物。

[0172] 本发明的一个方面是通过施用本发明的偶联VLP来治疗口腔癌的方法,所述口腔癌是通常称为头颈癌的癌症组的一部分,其中召回蛋白的CD8+表位属于对口腔组织具有向性的病原体,例如腮腺炎病毒、埃-巴二氏病毒、巨细胞病毒或单纯疱疹病毒1型。该方法包括确定对其有需要的受试者是否已针对例如腮腺炎病毒、埃-巴二氏病毒、巨细胞病毒或单纯疱疹病毒1型主动接种了疫苗或者感染过这些病毒,并且如果受试者之前已接种过疫苗或感染过,则将本发明的偶联VLP施用于受试者,其中召回蛋白的CD8+表位属于腮腺炎病毒或麻疹病毒,或者属于受试者接受过的疫苗的抗原成分,或者属于先前已感染过该受试者的病原体,即腮腺炎病毒、麻疹病毒、埃-巴二氏病毒、巨细胞病毒或单纯疱疹病毒1型。

[0173] 组合疗法

[0174] 在各种实施方案中,该偶联VLP可以与其他癌症治疗剂共同施用。另外,在一些实施方案中,将本文所述的偶联VLP与其他癌症治疗疗法(例如放射疗法、化学疗法、手术和/或免疫疗法)联合施用。在本发明的一些方面,本文所述的偶联VLP与检查点抑制剂联合施用。在各种实施方案中,嵌合VLP可以与免疫激动剂联合施用。在各种实施方案中,偶联VLP可以与用治疗性疫苗进行的治疗联合施用。在各种实施方案中,偶联VLP可以与用表达偶联抗原受体的T细胞(CAR-T细胞)进行的治疗联合施用。在各种实施方案中,偶联VLP可以与用另一种免疫肿瘤学产品进行的治疗联合施用。本发明的偶联VLP和其他的疗法或治疗剂可以通过相同或不同的施用途径同时或相继施用。确定在本发明的方法中使用的治疗剂的种类和量可以由普通技术的执业医师使用本领域中已知的标准技术容易地进行。

[0175] 实施例

[0176] 实施例1

[0177] 偶联VLP与体内的小鼠肿瘤结合

[0178] 所描述的偶联VLP结合肿瘤的能力是所提出的作用机制的重要的第一步(参见图1)。使用鼠宫颈癌模型TC-1评估VLP的体内结合。简言之,未偶联VLP是在Expi293F™人细胞(ThermoFisher Scientific,Waltham,MA,US)中使用Expi293F™表达系统产生的。在该方案中,在250mL摇瓶中,在120mL培养基中制备了 360×10^6 个细胞。在此之后,为了表达HPV16 L1 VLP,用HPV16 L1基因表达载体(目录号89910,Addgene,Cambridge,MA,US),经由制造商的方案(ThermoFisher Scientific,Waltham,MA,US)将细胞转染。将转染的细胞维持72小时,然后收获。通过去污剂裂解从Expi293F细胞释放HPV颗粒,并且在37℃处将裂解物与温和去污剂例如Brij58或Triton X-100一起孵育过夜。然后通过添加氯化钠,将来自过夜孵育裂解物的VLP溶解。然后通过低速离心使裂解物澄清。通过高盐提取,之后根据制造商的说明(Sigma-Aldrich,St Louis,MI,US)通过OPTIPREP™(碘克沙醇)步骤梯度超速离心,将衣壳从细胞碎片和去污剂分离。根据制造商的方案(Biorad Laboratories,Hercules,CA,

US)通过SDS-PAGE考马斯染色凝胶(4%至20%CRITERIONTM凝胶)染色确定VLP制剂的纯度,并且通过电子显微镜(EM)评估颗粒的形态。(还可参见WO 2018/237115)。

[0179] 如别处报道的HPV16 L1野生型蛋白质序列如下(SEQ ID NO:86):

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

[0180]

Asp Phe Thr Thr Leu Gln Ala Asn Lys Ser Glu Val Pro Leu Asp
 Ile
 Cys Thr Ser Ile Cys Lys Tyr Pro Asp Tyr Ile Lys Met Val Ser
 Glu
 Pro Tyr Gly Asp Ser Leu Phe Phe Tyr Leu Arg Arg Glu Gln Met
 Phe
 Val Arg His Leu Phe Asn Arg Ala Gly Thr Val Gly Glu Asn Val
 Pro
 Asp Asp Leu Tyr Ile Lys Gly Ser Gly Ser Thr Ala Asn Leu Ala
 Ser
 Ser Asn Tyr Phe Pro Thr Pro Ser Gly Ser Met Val Thr Ser Asp
 Ala
 Gln Ile Phe Asn Lys Pro Tyr Trp Leu Gln Arg Ala Gln Gly His
 Asn
 Asn Gly Ile Cys Trp Gly Asn Gln Leu Phe Val Thr Val Val Asp
 Thr
 Thr Arg Ser Thr Asn Met Ser Leu Cys Ala Ala Ile Ser Thr Ser
 Glu
 [0181] Thr Thr Tyr Lys Asn Thr Asn Phe Lys Glu Tyr Leu Arg His Gly
 Glu
 Glu Tyr Asp Leu Gln Phe Ile Phe Gln Leu Cys Lys Ile Thr Leu
 Thr
 Ala Asp Val Met Thr Tyr Ile His Ser Met Asn Ser Thr Ile Leu
 Glu
 Asp Trp Asn Phe Gly Leu Gln Pro Pro Pro Gly Gly Thr Leu Glu
 Asp
 Thr Tyr Arg Phe Val Thr Ser Gln Ala Ile Ala Cys Gln Lys His
 Thr
 Pro Pro Ala Pro Lys Glu Asp Pro Leu Lys Lys Tyr Thr Phe Trp
 Glu
 Val Asn Leu Lys Glu Lys Phe Ser Ala Asp Leu Asp Gln Phe Pro
 Leu
 Gly Arg Lys Phe Leu Leu Gln Ala Gly Leu Lys Ala Lys Pro Lys
 Phe
 Thr Leu Gly Lys Arg Lys Ala Thr Pro Thr Thr Ser Ser Thr Ser
 Thr
 Thr Ala Lys Arg Lys Lys Arg Lys Leu

[0182] 对于功能测定,对活的C57BL/6小鼠($n=5$,The Jackson Laboratory,Bar Harbor,MA,US)皮下注射表达荧光素酶/绿色荧光蛋白(GFP)的TC-1肿瘤细胞(2×10^5 个细胞)。对小鼠进行大约2周的监测以确保肿瘤生长的一致性,并且直到观察到可触知的肿瘤(直径约7mm)为止。(参见图2A)。用50 μ g VLP对三只小鼠进行静脉内注射。两只小鼠作为未经处理的对照。在注射VLP后的16小时至24小时之后,处死全部5只小鼠并且切除肿瘤。然后用胶原酶将肿瘤消化,之后在4 $^{\circ}$ C处在荧光激活细胞分选(FAC)染色缓冲液(含有1%牛血清白蛋白(BSA)的磷酸盐缓冲盐水(PBS))中,首先用VLP特异性HPV16抗V5抗小鼠抗体(Abeam,Burlingham.,CA,US),以1:100的稀释度进行处理。然后在一小时之后,将细胞用FAC染色缓冲液洗涤两次,并且在4 $^{\circ}$ C处用山羊藻红蛋白(PE)偶联的VLP特异性抗小鼠抗体(R&D systems,Minneapolis,MN,US),以1:100的稀释度再染色一小时。然后用FAC染色缓冲液再次将细胞洗涤两次,之后通过荧光激活细胞分选(FACS)细胞术进行分析:(1)首先,针对GFP

进行门控以仅分选肿瘤细胞;以及(2)接下来,评估分选的肿瘤细胞中VLP(抗L1 VLP抗体)的存在。(参见图2B,右图和左图是各自从不同小鼠产生的数据)。图2B证实了偶联VLP能够与肿瘤结合,如左图和右图的直方图上的右移所指示。

[0183] 实施例2

[0184] 偶联VLP与体外的人肿瘤结合

[0185] 为了测试偶联VLP在体外与人肿瘤结合的能力,将评估五种人肿瘤细胞系:OVCAR3、MDA-MB231、HCT116、PC-3和SKOV3(ATCC,Manassas,VA,US)。首先将各个细胞系接种在6孔板内的一个孔中。在16小时至24小时之后,将使用0.05%胰蛋白酶将细胞解离。然后对细胞计数,以获得 1×10^6 个细胞,离心,并且去除上清液,之后重悬在100 μ L的FACS缓冲液(1%FBS的PBS溶液)中。接下来,将0.3 μ g/mL的偶联VLP添加到体外的各个培养物中,并且将这些培养物在最佳生长条件下孵育24小时。为了证明该结合是HSPG特异性的,偶联VLP将与或将不与肝素(最终浓度为0.1mg/mL)一起预孵育,并且在4 $^{\circ}$ C处(以防止内吞作用)孵育1小时。在结合1小时之后,将用1mL的FACS缓冲液洗涤细胞两次,之后再次重悬在100 μ L的FACS缓冲液中。然后将样品与PE偶联的VLP特异性抗小鼠抗体在4 $^{\circ}$ C处孵育1小时。1小时之后,将细胞洗涤并且重悬在FACS缓冲液中,用于通过流式细胞术进行分析。然后以总PE+细胞的阳性百分比或几何平均荧光的百分比来评估结合,如实施例1以及图2A和图2B中的直方图上的右移所指示。

[0186] 实施例3

[0187] 偶联VLP与体内的人肿瘤结合

[0188] 将进一步测试所描述的偶联VLP以评估它们在体内与人肿瘤结合的能力。在第一个实验中,小鼠将被注射人卵巢癌细胞系的OVCAR3肿瘤细胞(3×10^6 个细胞)。注射后大约两周,预计平均肿瘤体积约为10mm³。注射后三周,对荷瘤小鼠施用Cu²⁺或Zn²⁺放射性标记的VLP。将在4小时、12小时、24小时和48小时评估VLP的生物分布和肿瘤特异性。然后取出肿瘤进行称重、放射性计数、病毒微分布和细胞共定位。除了肿瘤之外,还将使用成像方法以及组织学来评估各种主要器官(诸如肝、脾、肾)中的VLP的存在,以评估VLP归巢到肿瘤的功效。在进一步的实验中,将向小鼠注射其他肿瘤细胞系,诸如HCT116、PC-3或SKOV3,并且遵循相同的实验方案。

[0189] 实施例4

[0190] VLP诱导的T细胞介导的以时间依赖性方式杀伤体外的肿瘤细胞

[0191] 在体外测试了偶联VLP将表位递送至肿瘤细胞表面上的MHC蛋白质,并且随后将存在的T细胞重定向至受试者肿瘤细胞,导致肿瘤细胞的细胞毒性杀伤的能力。我们选择在鼠肿瘤模型中使用预先存在的对人乳头瘤病毒HPV16 E7抗原的鼠记忆应答来证明概念验证功效,因为这将更具有临床相关性。HPV16 E7是真正的人病毒抗原,与经常使用的人工抗原诸如卵清蛋白(OVA)大不相同。已知的是,在具有不同HLA-I(MHC-I)基因的健康人供体的外周血中发现了几种不同的E7抗原特异性CD8⁺T细胞。因此,E7的使用是相关的,提供了概念验证,显示了预先存在的CD8⁺T细胞应答的重定向以靶向非病毒相关的恶性肿瘤(肿瘤),并且作为将该系统扩展至其他人病毒抗原的坚实基础。

[0192] VLP的偶联。为了产生偶联VLP,将召回蛋白合成为纯度大于85%的聚阳离子18聚体至20聚体肽,其在N端处包含马来酰亚胺分子,之后是蛋白酶裂解位点,并且以CD8+召回

表位结束,即N端马来酰亚胺-RRRRRVKR-表位 (Genscript, New Jersey, US)。样品作为冻干材料送出,并且用二甲基亚砜 (DMSO) 稀释至1mM至20mM的浓度。将偶联VLP制备为经由以下方案进行偶联。首先,将浓度至少为1mg/mL的VLP透析到偶联反应缓冲液 (50mM磷酸钠, pH 6.5, 500mM NaCl, 2mM EDTA, 0.05% Tween 80) 中,将缓冲液交换3次 (在2℃至8℃处, 3+1h, 3+1h, 并且过夜16+3h)。第二天,然后在室温处,在不振摇的情况下,用TCEP以10:1摩尔比的TCEP:L1 (单体) 比率将VLP处理1小时,其中L1单体的浓度为0.77mg/mL。随后,通过以5:1的肽:L1单体的摩尔比添加18至20聚体肽来进行偶联,使L1单体的最终浓度达到0.58mg/mL。将该反应以200rpm振摇1小时。在偶联后,在冷室中 (2℃至8℃) 使用透析盒 (MWC0=1000kDa) 将来自该反应的内容物透析 (PBS, pH 7.0+0.1, 500mM NaCl, 0.05% Tween 80) 约3+1小时。接下来,在16℃处使内容物以40,000rpm经受密度梯度超速离心 (UC) OPTIPREP™ 梯度 (在DPBS中, 0.8M NaCl), 持续16小时。收集从介于33%至39%OPTIPREP™之间的界面开始的级分 (1至3), 然后使其在冷室中经受最终透析 (MWC0=1000kDa), 持续3+1小时、3+1小时, 以及16+3小时。在纯化后,在凝胶电泳/考马斯染色下分析样品,以经由L1带中的移动超过约55kDa来确定%偶联。

[0193] 偶联VLP的定量。通过还原SDS-PAGE (4-20%CRITERION™ TGX Stain-Free™ 预制凝胶, 18孔电泳梳, 30μL, 1.0mm, Bio-Rad, Hercules, CA, US) 测定产物浓度以及%融合蛋白偶联。此外,数量介于5μg至2.5μg之间的未偶联VLP对照以及五种已知的BSA标准品 (Sigma Life Science, St. Louis, MO, US) 将始终作为对照包含在内。按照制造商的方案运行凝胶, 然后按照制造商的方案进行考马斯凝胶染色 (考马斯亮蓝R-250染料, Bio-Rad, Hercules, CA, US)。根据制造商的方案,利用BioRad软件成像分析,经由测密度分析来确定偶联的量和/或百分比。

[0194] 肽的设计。肽被设计为包括N端马来酰亚胺-RRRRRVKR-表位,如上所述。因此,这些肽在召回蛋白的N端处包含马来酰亚胺分子,之后是在召回蛋白序列上游的弗林蛋白酶裂解序列:R X R/K R (SEQ ID NO:89)。示例性弗林蛋白酶裂解序列:ARG VAL LYS ARG (SEQ ID NO:90)。

[0195] 对于功能测定,使过表达荧光素酶基因 (B16-luc和ID8-luc) 的鼠B16 (黑素瘤/皮肤) 肿瘤细胞和ID8 (卵巢) 肿瘤细胞在培养物中生长。在正常情况下,这两种鼠肿瘤细胞系B16和ID8不会被鼠HPV16 E7特异性CD8+T细胞杀死,因为这些细胞系不表达HPV16 E7抗原。细胞在培养物中生长并且接种过夜。第二天,然后用以下任一者处理细胞: (1) 3种不同浓度的HPV16 E7肽RAHYNIVTF (SEQ ID NO:1) (1μg/mL、100pg/mL、1pg/mL), (2) HPV16 E7偶联VLP (2.5μg/mL), (3) 未偶联 (对照) VLP (2.5μg/mL), 或 (4) 未经处理。然后洗涤这些细胞,并且与鼠CD8+HPV16 E7特异性T细胞一起以不同的E:T比率 (效应物:靶标比率) 共培养。共培养之后的总最终体积为200μL。在共培养一定时间之后,通过测量荧光素酶的表达来测量细胞活力,由于这些细胞过度表达荧光素酶,所以荧光素酶被用作细胞活力的替代标志物。荧光素酶活性降低表明更多的细胞死亡,这暗示更大的免疫重定向和因此更大的细胞毒性。

[0196] 在这两种癌细胞系中,对HPV16 E7偶联VLP和HPV16 E7肽的应答是时间依赖性和浓度依赖性的。共培养5.5小时之后,单独的E7肽 (1μg/mL) 和偶联VLP (2.5μg/mL) 在B16-luc中均展示显著水平的T细胞介导的细胞毒性。(参见图3A的B16-LUC, 和图3C的ID8)。如果共培养进行了8.5小时,则观察到另外的细胞毒性,在为10的E:T比率下,在B16-LUC细胞中的

细胞毒性水平为大约50% (图4B), 并且在ID8-LUC细胞中的细胞毒性水平为38%至58% (图4D)。同样, 图4示出了在甚至更长的时间段22.5小时内获得的类似结果。具体地讲, 图4A和图4B示出, 对于与B16-LUC细胞和鼠CD8+HPV16 E7特异性T细胞一起孵育的E7偶联VLP, 细胞毒性分别在8.5小时与22.5小时之间得到改善。类似地, 图4C和图4D示出, 对于与ID8细胞和鼠CD8+HPV16 E7特异性T细胞一起孵育的E7偶联VLP, 细胞毒性分别在8.5小时与22.5小时之间得到改善。

[0197] 这些结果表明, 较高浓度 (1 μ g/mL) 的E7肽和E7偶联VLP均表现出时间依赖性的肿瘤细胞杀伤。这进一步表明E7偶联VLP在肿瘤细胞上经历弗林蛋白酶裂解和MHC受体的表位包被, 以便实现肿瘤细胞杀伤。

[0198] 实施例5

[0199] VLP诱导的E7 T细胞介导的以浓度依赖性方式杀伤肿瘤细胞

[0200] E7 T细胞介导的杀伤也被证实是E7偶联VLP浓度依赖性的。接种过表达荧光素酶基因 (B16-luc和ID8-luc) 的鼠B16 (黑素瘤/皮肤) 肿瘤细胞和ID8 (卵巢) 肿瘤细胞。24小时后, 然后用以下物质处理细胞: (1) HPV16 E7肽RAHYNIVTF (SEQ ID NO:1) (1 μ g/mL, 1ng/ml); (2) HPV16 E7偶联VLP (2.5 μ g/mL, 0.025 μ g/mL); (3) 未偶联 (对照, 2.5 μ g/mL) VLP; 或 (4) 未经处理。然后洗涤这些细胞, 并且与CD8+HPV16 E7特异性T细胞一起以不同的E:T比率 (效应物: 靶标比率) 共培养。共培养之后的总最终体积为200 μ L。在共培养一定时间之后, 通过测量荧光素酶的表达来测量细胞活力, 由于这些细胞过度表达荧光素酶, 所以荧光素酶被用作细胞活力的替代标志物。荧光素酶活性降低表明更大的免疫重定向和因此更大的细胞毒性。

[0201] 在这两种癌细胞系中, 对HPV16 E7偶联VLP和HPV16 E7肽的应答是浓度依赖性的。单独的E7肽 (1 μ g/mL) 和与VLP偶联的E7 (2.5 μ g/mL) 在两种细胞系中均展示显著水平的T细胞介导的细胞毒性。(参见图3A和图3B的B16-LUC, 以及图3C和图3D的ID8)。图3尤其示出了, 1 μ g/mL单独的E7肽无论在什么时间点均表现出几乎没有肿瘤细胞杀伤, 即使有也只有极少, 而100 μ g/mL和1 μ g/mL的E7肽无论在什么时间点均表现出显著的肿瘤细胞细胞毒性。类似地, 在图4中观察到E7偶联VLP的细胞毒性浓度依赖性。(参见图4A和图4B的B16-LUC, 以及图4C和图4D的ID8)。在图4中, 无论在什么时间点 (8.5小时或22.5小时), 这两种细胞系在0.025 μ g/mL偶联VLP与2.5 μ g/mL偶联VLP之间均观察到细胞毒性的显著增加。因此, 图3和图4示出, 对于与B16-LUC细胞和鼠CD8+HPV16 E7特异性T细胞一起孵育的E7肽和E7偶联VLP两者, 随着浓度增加, 细胞毒性得到改善。

[0202] 实施例6

[0203] VLP制剂的批次一致性。为了确保所描述的产生可以执行免疫重定向的偶联VLP的过程是一致的, 检查了几批单独产生的E7肽偶联VLP, 称为“F1、F2和F3”。接种过表达荧光素酶基因 (B16-luc和ID8-luc) 的鼠B16 (黑素瘤/皮肤) 肿瘤细胞和ID8 (卵巢) 肿瘤细胞。24小时后, 将细胞与以下物质一起孵育: (1) HPV16 E7肽RAHYNIVTF (SEQ ID NO:1) (1 μ g/mL); (2) HPV16 E7偶联VLP批次F1、F2或F3 (2.5 μ g/mL); (3) 未偶联 (对照, 2.5 μ g/mL) VLP; 或 (4) 未经处理。所有批次F1至F3都是一致的, 能够激活E7 T细胞, 并且在两个独立实验中, 分别在23小时或23.5小时的时间点之后示出对B16-luc细胞和ID8-luc细胞的杀伤。(分别参见图5A和图5B的B16-luc细胞; 分别参见图5C和图5D的ID8-luc细胞。)

[0204] 为了进一步证明在另一种肿瘤细胞系MC38鼠结肠肿瘤系中的批次一致性,按照制造商建议的条件使细胞在培养物中生长。在正常情况下,该细胞系不会被鼠HPV16 E7特异性T细胞杀死,因为MC38细胞系不表达鼠E7抗原。然后用以下物质处理MC38细胞:(1) E7肽RAHYNIVTF (SEQ ID NO:1) (1 μ g/mL); (2) HPV16 E7偶联VLP,来自批次F1、F2或F3 (2.5 μ g/mL); (3) 未偶联(对照,2.5 μ g/mL) VLP;或(4) 未经处理。然后洗涤这些细胞,并且与CD8+HPV16 E7特异性T细胞一起以不同的E:T比率(效应物:靶标比率)共培养。共培养之后的总最终体积为200 μ L。共培养一定时间之后测量细胞活力。在本实施例中,由于MC38不表达荧光素酶,因此使用建立细胞活力测定试剂**CELLTITER-GLO®** (PROMEGA, WI, US) 来测量细胞活力。该测定提供了表达荧光素酶的化学探针,该化学探针检测ATP并且与之结合,ATP是细胞活力的标志物。因此,荧光素酶活性降低表明更多的MC38细胞死亡,这暗示更大的免疫重定向和因此更大的细胞毒性。所有批次F1至F3具有一致的功能活性,能够激活E7 T细胞,并且在两个独立实验中,分别在23小时或23.5小时的时间点之后示出对MC38细胞的杀伤。(分别参见图6A和图6B)。

[0205] 实施例7

[0206] 用E7偶联VLP在C57BL/6小鼠中进行体内抗肿瘤免疫重定向

[0207] 体内评估了HPV16 E7偶联VLP(偶联至鼠MHC限制性H-2D^b HPV16 E7的偶联VLP)的功效。对总共20只C57BL/6小鼠腹膜内注射(I.P.) ID8-荧光素酶细胞(0.015×10^6 个细胞/小鼠)。在第6天,经由荧光素酶发光成像检查小鼠的肿瘤生长和建立。(IVIS®Spectrum体内成像系统,Perkin Elmer,Waltham,MA,US)。在第5天,将小鼠分成多个治疗组,然后用以下物质处理:(1) 仅缓冲液,(2) 未偶联VLP (100 μ g), (3) 鼠CD8+HPV16 E7特异性T细胞加E7肽偶联VLP (n=5,100 μ g), 和(4) 仅E7肽 (30 μ g, n=5)。1小时之后,对所有小鼠注射大约 1×10^6 个第4天刺激后的CD8+HPV16 E7特异性T细胞(每只小鼠200 μ L)。在第6天和第7天,向每只小鼠第二次施用处理,但没有添加额外的刺激性T细胞。然后对小鼠进行监测和成像。通过发光成像监测治疗的功效,该发光成像充当肿瘤生长和转移的替代物。

[0208] 结果在图7中提供,并且示出E7偶联VLP疗法即使在处理后60天后也能够将E7特异性T细胞重定向至ID8鼠肿瘤并且控制肿瘤形成。(图7A和图7D)。相比之下,对照诸如未偶联VLP(图7C)或仅缓冲液(图7B)未能示出任何肿瘤保护或控制。尽管仅由肽提供了一些保护(图7E),但重要的是说明E7偶联VLP上的肽相对于单独的肽的总摩尔浓度比单独的肽小。另外,肽提供了不完全的保护,这表明与注射单独的外源肽相比,VLP的肿瘤特异性靶向很重要。

[0209] 实施例8

[0210] 用E7偶联VLP在B16.F10小鼠中进行体内抗肿瘤免疫重定向

[0211] 在另一种鼠肿瘤模型(B16.F10,ATCC,Old Town Manassas,VA,USA)中评估HPV16 E7 VLP的功效。与肿瘤在腹膜内生长的ID8鼠卵巢模型不同,BL16.F10小鼠肿瘤模型是皮下肿瘤模型。在该实验中,首先用HPV16 E7肽RAHYNIVTF (SEQ ID NO:1) 对20只小鼠进行疫苗接种。2周之后,经由HPV16 E7四聚体(H-2D^b/HPV16 E7 (RAHYNIVTF) (SEQ ID NO:1) MHC四聚体染色)证实小鼠具有HPV 16 E7肽特异性免疫应答。简言之,从小鼠的尾静脉收集全血(2至3滴),并且通过流式细胞术使用E7四聚体(H-2D^b/HPV16 E7 (RAHYNIVTF) (SEQ ID NO:1) MHC四聚体,MBL International,Woburn MA,US)检查抗原特异性CD8⁺T细胞应答。然后在大

腿左侧对小鼠皮下注射B16.F10荧光素酶细胞(0.5×10^6 个细胞/小鼠)。使用游标卡尺测量肿瘤生长体积,并且使用公式 $(W^2 \times L) / 2$ 计算体积,其中W(宽度)是两个正交测量值中较短的一个,并且L(长度)是两个正交测量值中较长的一个。每2天监测一次小鼠,直到观察到可触知的肿瘤(直径约7mm)为止。随后,将小鼠分成如下的各种处理组:(1)仅缓冲液($n=5$);(2)未偶联VLP(“对照”VLP)($n=5$);(3)E7偶联VLP($n=5$);以及(4)单独的肽。所有治疗组每剂均接受5 μ g指示成分。每隔一天对小鼠总共施用四次治疗。然后监测小鼠以评估肿瘤体积。经由肿瘤体积生长和存活监测处理的功效,其中存活终点是当肿瘤生长体积达到1500mm³时。结果表明,在对照VLP组、E7偶联VLP组和E7肽组中观察到肿瘤生长的延迟效应。(参见图8A和图8B)。然而,最终全部肿瘤都达到了终点尺寸1500mm²(图8A)。所有对照小鼠到第17天为止均达到它们的存活终点(图8B)。经处理的小鼠最长存活至第19天至第22天。来自经E7偶联VLP处理的组的一只小鼠的所有肿瘤都完全消退,并且在超过80天内保持无肿瘤。(参见图8B)。

[0212] 为了进一步测试特定病毒记忆T细胞的重要性以及它们存在的增加是否会导致治疗结果改善,还将小鼠分为“高”和“低”T细胞频率组(参见下文的解释),即在其PBMC中具有更高频率的外周HPV16E7 T细胞的那些小鼠对比没有的那些小鼠。首先用HPV16 E7肽RAHYNIVTF(SEQ ID NO:1)对小鼠进行疫苗接种,以产生抗病毒免疫记忆应答。接种疫苗的小鼠被单独放置大约6周,以建立对HPV16E7的免疫记忆。为了检查免疫原性,将小鼠分为“高”T细胞频率和“低”T细胞频率。简言之,从小鼠的尾静脉收集全血(2至3滴),并且通过流式细胞术使用E7四聚体(H-2D^b/HPV16 E7(RAHYNIVTF)(SEQ ID NO:1)MHC四聚体,MBL International,Woburn MA,USA)检查抗原特异性CD8⁺T细胞应答。HPV16 E7四聚体特异性T细胞应答的频率介于1%至50%之间。T细胞频率在介于1%至14%之间的范围内的小鼠被认为是“低”,而T细胞频率在介于15%至50%之间的范围内的小鼠被认为是“高”。然后在大腿左侧对所有小鼠皮下注射B16.F10黑素瘤肿瘤细胞(0.5×10^6 个细胞/小鼠)。使用游标卡尺测量肿瘤生长体积,并且使用公式 $(W^2 \times L) / 2$ 计算体积,其中W(宽度)是两个正交测量值中较短的一个,并且L(长度)是两个正交测量值中较长的一个。在开始用E7偶联VLP或对照VLP(未偶联VLP)处理之前,允许肿瘤体积达到50至100mm³。

[0213] 结果描绘在图8C和图8D中,并且表明在用E7偶联VLP处理的小鼠中观察到肿瘤生长的延迟效应,但在用单独的VLP处理的对照组中却未观察到。(参见图8C)。然而,到第32天,最终全部肿瘤都达到了终点1500mm²(图8D)。所有对照小鼠到第17天为止均达到它们的存活终点。(参见图8B)。经处理小鼠的存活时间,对于具有“低”T细胞频率的小鼠,最长至第24天,而对于具有“高”T细胞频率的小鼠,最长至第32天。(图8D)。在没有进行处理的情况下,具有较高或较低频率的E7特异性记忆T细胞的小鼠的B16.F10肿瘤生长之间没有差异。(图8C)。相比之下,处理组中的肿瘤生长似乎表明具有较高E7 T频率的小鼠对于E7偶联VLP处理作出更好的应答,因为肿瘤生长得到更好的控制(图8D)。然而,对数据的进一步研究揭示,当仔细检查单只小鼠时,并没有明显的趋势。这可能是由于“可变的”肿瘤尺寸,因为一旦所有小鼠具有介于50至100mm³之间的肿瘤就施用处理。一般来讲,据观察肿瘤较小(接近50mm³)的小鼠对偶联VLP处理作出更好的应答,但这不一定与较高的预先存在的T细胞PBMC频率相关。这表明免疫重定向效应可能是由于其他潜在的E7特异性T细胞,即组织驻留记忆T细胞。尽管如此,这些数据表明,即使在已知是检查点难治性的困难B16.F10小鼠模型中,

免疫重定向也是可能的。

[0214] 实施例9

[0215] 在体外检测加载到小鼠肿瘤细胞上的MHC-I受体上的VLP肽

[0216] 开发了一种测定系统,来直接检测从偶联VLP加载到肿瘤细胞上的MHC I受体上的肽。该测定涉及使用OVA偶联VLP (OVA-VLP) 和抗体(荧光团偶联抗OVA (SIINFEKL) /K^b (SEQ ID NO:2) 抗体,MBL International,Woburn,MA,US),该抗体特异性地识别OVA (SIINFEKL) /K^b (SEQ ID NO:2) 复合物,但不识别任何其他肽/MHC-I复合物。

[0217] 为此,将靶细胞 (B16-LUC、ID8-LUC和MC38) 以 0.02×10^6 个细胞/孔铺板在96孔板上。第二天,将OVA偶联VLP (2.5 μ g/mL) 与靶肿瘤细胞一起在37℃处孵育1小时,然后充分洗涤以去除任何未结合的物质。接下来,将荧光团偶联抗OVA (SIINFEKL) /K^b (SEQ ID NO:2) 抗体以1:100 (总体积为100 μ L,即1 μ L) 的稀释度直接添加到细胞中,在4℃处维持30分钟。在该孵育之后,洗掉过量抗体并且通过FACS流式细胞术分析这些细胞中OVA (SIINFEKL) /K^b (SEQ ID NO:2) 复合物的存在。如预期的那样,在与OVA偶联VLP一起孵育之后,在三种不同的小鼠肿瘤细胞中检测到OVA (SIINFEKL) /K^b (SEQ ID NO:2) 复合物。(参见图9)。

[0218] 图9A示出了由ID8-LUC细胞(上图)、B16-LUC细胞(中图)和MC38细胞(下图)与单独的OVA肽或OVA偶联VLP一起孵育产生的FACS数据。这表明OVA偶联VLP与这些肿瘤细胞结合,并且它们的肽被裂解,随后裂解的肽与肿瘤MHC-I分子结合。因此,VLP的设计被验证执行预期的功能,即表位肽被弗林蛋白酶裂解,并且该肽被肿瘤细胞表面上的MHC I分子结合。这些发现应当适用于除OVA之外的其他病毒肽。同样重要的是要注意到鼠肿瘤中检测到了差异OVA (SIINFEKL) /K^b (SEQ ID NO:2) 复合物,并且进一步的研究表明加载可能取决于肿瘤表面上的表面I类MHC的可用性(未显示)。图9B示出了相同的细胞,ID8-LUC(上图)、B16-LUC(中图)和MC38(下图),这些细胞通过结合对于MHC-I复合物有特异性的H2-D^b抗体(PE抗小鼠H-2Db抗体,抗H-2D^b,Biolegend, San Diego, CA, US)进行了染色。

[0219] 实施例10

[0220] 使用与HCMV pp65抗原偶联的VLP来重定向针对人永生肿瘤细胞系的人CD8+T细胞病毒免疫力

[0221] 通过研究人巨细胞病毒 (HCMV) pp65抗原偶联VLP重定向免疫力的能力,进一步探索了所描述的偶联VLP系统使用其他抗原或表位触发免疫重定向的能力。如上所述产生偶联VLP。选择HCMV的基本原理是基于HCMV高度流行(感染50%至90%的人群)并且在健康个体中大部分无症状的知识。(参见Longmate等人,Immunogenetics,52(3-4):165-73,2001; Pardieck等人,F1000Res,7,2018;和van den Berg等人,Med.Microbiol.Immunol,208(3-4):365-373,2019)。重要的是,HCMV建立了终生持续感染,其需要长寿命的细胞免疫力来预防疾病。因此,有理由假设,多年来发展的用于强烈控制老年人的病毒感染的复杂适应性细胞介导的抗病毒免疫力可以被重新利用和用于治疗癌症。

[0222] 体外细胞毒性测定。将人靶细胞HTC112、人结肠癌MCF7、人乳腺癌或OVCAR 3、人卵巢癌(ATCC,Manassas,VA,US)以0.01至 0.2×10^6 个每孔每100 μ L每96孔板接种过夜。第二天(约20小时至22小时之后),将每个细胞系在37℃处在以下条件下孵育1小时:(1)最终浓度为1 μ g/mL的CMV肽,(2)最终浓度为2.5 μ g/mL的对照VLP(无肽),(3)最终浓度为2.5 μ g/mL的CMV偶联VLP,以及最终浓度为14 μ g/mL的CMV肽(相当于2.5 μ g/mL的肽偶联CMV-VLP)。1小时

之后,将细胞用200 μ L培养基剧烈洗涤三次,以去除非特异性结合。以10:1的E:T(效应细胞:靶细胞)比率添加人类患者供体CMV T细胞(ASTARTE Biologies,Seattle,WA,US),并且在组织培养箱中孵育24小时。共培养之后的总最终体积为200 μ L。共培养一定时间之后测量细胞活力。在本实施例中,由于上述人细胞不表达荧光素酶,因此使用建立细胞活力测定试剂**CELLTITER-GLO®**(PROMEGA,WI,US)来测量细胞活力。该测定提供了表达荧光素酶的化学探针,该化学探针检测ATP并且与之结合,ATP是细胞活力的标志物。因此,荧光素酶活性降低表明更多的人永生化细胞死亡,这暗示更大的免疫重定向和因此更大的细胞毒性。

[0223] 结果在图10中提供。CMV偶联VLP能有效地杀伤人健康供体CMV pp65特异性CD8+T细胞(Astarte Biologies,Inc.,Bothell,WA,US)、永生化HLA.A2阳性人结肠癌细胞(HCT116,图10A)、人卵巢癌细胞(OVCAR3,图10B)和人乳腺癌细胞(MCF7,图10C)。在小鼠和人这两者的系统中,对照VLP(即没有肽偶联)不诱导靶细胞的杀伤,CD8+T细胞也不与单独的肿瘤细胞一起共孵育。在使用人细胞系的这一系列的体外研究中,确定1 μ g/mL的CMV肽相当于1060nM肽,而与2.5 μ g/mL的CMV偶联VLP中的VLP的表面偶联的CMV肽的摩尔当量为约0.024nM。因此,偶联VLP触发了对肿瘤细胞的相当的T细胞重定向杀伤,尽管用量只有单独的CMV肽的1/44,000左右。重要的是,确定了与VLP偶联的单独的CMV(pp65)肽的该0.024nM摩尔当量浓度为14pg/mL。当以单独的14pg/mL的游离肽测试细胞毒性时,在所有三种人靶细胞中都几乎没有观察到或完全没有观察到对肿瘤细胞的杀伤(图10C)。这突出了与将单独的外源游离肽加载到肿瘤细胞上以促进免疫重定向相比,偶联VLP在增强肽加载方面的效力。

[0224] 实施例11

[0225] VLP偶联方法

[0226] 测试了两种偶联方法作为用于将VLP偶联到融合蛋白的候选方案:(1)野生型HPV疫苗(WT-VLP);以及(2)偶联HPV疫苗(RG1VLP,与WT VLP相比,其每个L1单体具有2个额外的半胱氨酸残基,因此在RG1 VLP表面上具有720个额外的半胱氨酸)。对于每个测试,首先通过与三(2-羧乙基)膦(TCEP)在室温处反应1小时来将VLP还原。该还原步骤是在VLP表面上“释放”游离半胱氨酸所需要的,以便进行下一步,即肽与VLP的马来酰亚胺偶联。进行还原和利用直接在召回蛋白上游合成的马来酰亚胺分子的马来酰亚胺偶联所遵循的方案如上所述。

[0227] 具有额外的RG1肽序列插入的RG1 VLP L1蛋白质序列如下(SEQ ID NO:87):

```
MSLWLPSEAT VYLPPVPVSK VVSTDEYVAR TNIYYHAGTS RLLAVGHYPF PIKKPNNNKI
LVFPKVSGLQY RVFRIHLPDP NKFGFPDTSF YNPDTQRLVW ACVGVEVGRG QPLGVGISGH
PLLNLKDDTE NASAYAQLYK TCKQAGTCPP DIIPKVANAG VDNRECISMD YKQTQLCLIG
CKPPIGEHWG KGSPCTNVAV NPGDCPPELE INTVIQDGDM VDTGFGAMDF TTLQANKSEV
[0228] PLDICTSICK YPDYIKMVSE PYGDSLFFYL RREQMFVRHL FNRAGAVGEN VPDDLYIKGS
GSTANLASSN YFPTPSGSMV TSDAQIFNKP YWLQRAQGHN NGICWGNQLF VTVVDITRST
NMSLCAAIST SETTYKNTNF KEYLRHGEEY DLQFIFQLCK ITLTADVMTY IHSMNSTILE
DWNFGLQPPP GGILEDTYRF VTSQAIACQK HTPPAPKEDP LKKYTFWEVN LKEKFSADLD
QFPLGRKFLF QAGLKAKPKF TLGKRKATPT TSSTSTAKR KKRKLSR
```

[0229] 如果没有还原步骤,则几乎没有至完全没有可检测的偶联发生(参见图13的泳道3)

和图14的泳道5)。偶联效率通过在SDS-PAGE (CRITERION™凝胶, 4%至20%丙烯酰胺, BioRad, Hercules, CA, US) 上对VLP进行考马斯染色以确定偶联VLP和未偶联VLP的相对量来确定。(参见图11)。如果没有发生偶联, 则将只有单个条带, 如在TCEP:RG1 VLP 1:1泳道中看到的。相比之下, TCEP:RG1比率从3:1至10:1的多个条带显示发生偶联, 因此也验证了还原步骤的重要性。还已知VLP通过二硫键固定, 因此添加TCEP可能损害VLP, 然而5:1和3:1的TCEP:RG1比率在TEM(透射电子显微镜)下显示完整的偶联VLP, 从而显示适用于RG1偶联而不影响颗粒完整性的TCEP量。(参见图12)

[0230] 在还原剂与VLP的额外比率(高达74:1)下, 进一步研究了TCEP浓度如何决定融合蛋白与VLP偶联的效率的关系。(参见图13)。在TCEP与RG1的最高比率(例如74:1)下, 单个L1单体上存在最多5个偶联位点。相比之下, 对于WT-VLP, 无论测试哪一种TCEP比率, 每个L1单体都仅产生一个偶联位点。

[0231] 实施例12

[0232] 人偶联VLP在体外和在体内触发肿瘤细胞毒性。

[0233] 将使用各种鼠科动物模型不但在体外而且在体内评估用可以容易被预先存在的免疫召回应答识别和消除的常见传染性病毒抗原肽选择性地加载肿瘤细胞的能力。如实施例1至实施例11中所见, 使用来自HPV(人乳头瘤病毒) 16型E7抗原的鼠MHC限制性H-2D^b HPV16 E7肽, 生成了HPV16 E7偶联VLP(E7-VLP), 其显示特异性结合肿瘤细胞ID8(卵巢)、B16(黑素瘤)和MC38(结肠)。从E7偶联VLP裂解E7肽导致特异性E7肽与肿瘤细胞上的I类MHC受体结合, 从而使那些肿瘤细胞对抗原特异性CTL介导的杀伤(在这种情况下为鼠CD8+ HPV16 E7特异性T细胞)敏感。如实施例10中所见, 在使用人巨细胞病毒(HCMV) pp65抗原偶联VLP的情况下, 该结果也已扩展至人健康供体CMV pp65特异性CD8+T细胞。

[0234] 由于大多数人类个体具有或可能具有针对流感、HPV16、CMV、EBV和其他儿童疫苗(MMR、水痘、HEPB)的预先存在的免疫力, 因此可以采用相同的实验方法将所描述的VLP偶联到其他免疫原性HLA-A2限制性肽。将选择HLA-A2限制性表位用于这些实验, 因为这些是美国最普遍的人I类MHC等位基因。如上所述, 各种VLP与HLA-A2限制性表位偶联, 该限制性表位在其N2端处具有弗林蛋白酶裂解位点。具体的表位在表4中提供。

[0235] 表4: 与包含弗林蛋白酶裂解位点的HLA-A2限制性表位偶联的VLP

[0236]

病毒	其中可以检测到表位的经批准的人疫苗	表位	SEQ ID NO
甲型流感	三价 Afluria 或四价 Flublok, 如果年龄为 18 岁至 64 岁; 高剂量 Fluzone 或 Fluad, 如果年龄为 65 岁及以上; 四价 Flucelvax, 用于 4 岁至 18 岁(实际上更大的年龄)	FMYSDFHFI GILGFVFTL	77
			68
乙肝	Engerix (GSK)	FLPSDFFPSV	41
麻疹	MMR-II (Merck)	KLWESPQEI	36
水痘	VariVax (Merck)	SLPRSRTPI	4
	VariVax (Merck)	SAPLPSNRV	5
巨细胞病毒	自然感染	NLVPMVATV	3
人乳头瘤病毒 16 E7	自然感染	YMLDLQPET	88

[0237] 如上通过SDS-PAGE分析每个构建体。(参见图14)。图14A描绘了WT HPV VLP与以下肽的偶联物:MOV A2 (SIINFELK (SEQ ID NO:2)、流感V1、HepB V1、麻疹V1和VZV V1。(融合蛋白由Genescript,NJ,US合成,纯度为80%,如上所述)。同样,图14B描绘了RG1 VLP的偶联物,包括MOVA2 (SIINFELK)、流感V1、HepB V1、麻疹V1和VZV V1。

[0238] 这些构建体将在体外测试它们定位于肿瘤细胞、与肿瘤细胞结合、使它们的表位以蛋白水解方式裂解以及释放的表位被肿瘤MHC I受体结合以触发T细胞介导的免疫应答的能力,就像上文的实施例一样。如上所述,将使用HLA-A2阳性的细胞系。此类细胞系包括例如人肿瘤,诸如MDA-MB231、HCT116和PC-3。此外,产生了过表达荧光素酶基因和过表达HLA-A2 (分别为B16-AAD、TC1-AAD和ID8-AAD) 的鼠B16 (黑素瘤/皮肤) 肿瘤细胞、TC-1 (宫颈) 肿瘤细胞和ID8 (卵巢) 肿瘤细胞的亚克隆。所有这些细胞系都可以在培养物中生长。在正常情况下,这些细胞系将不会被对上表中列出的表位具有特异性的病毒特异性CD8+T细胞杀死,因为这些细胞系不在其细胞表面上表达或展示相应的儿童疫苗抗原或自然感染抗原。然后将细胞与以下物质一起孵育: (1) 来自上表4的具体的病毒抗原肽,剂量为1μg/mL、100pg/mL和1pg/mL; (2) 具体的病毒抗原偶联VLP (2.5μg/mL); (3) 未偶联 (对照) VLP; 或 (4) 未经处理 (使用缓冲液)。然后洗涤这些细胞,并且与相应的抗原特异性T细胞一起以不同的E:T比率 (效应物:靶标比率) 共培养。细胞活力将通过CELLTITER-GLO®测定针对人肿瘤或者通过测量鼠肿瘤中的荧光素酶的表达来测量。荧光素酶活性降低将表明更大的细胞毒性,这暗示更大的免疫重定向。

[0239] 为了测试这种体内,将对初始的转基因HLA-A2或HLA-AAD小鼠接种儿童疫苗,诸如HepB、MMR和水痘 (参见上表2),以产生预先存在的细胞毒性T淋巴细胞 (CTL) 病毒应答。CTL应答将使用HLA-A2特异性四聚体对相应的病毒肽进行评估。一旦确认有足够的CTL应答,然后就向小鼠注射表达荧光素酶的HLA-A2阳性肿瘤系ID8-AAD (卵巢) 肿瘤细胞、B16-AAD (黑素瘤) 肿瘤细胞或TC-1AAD (宫颈) 肿瘤细胞。每天监测肿瘤生长。一旦小鼠产生平均体积为10mm³的可触知的肿瘤,就将肽偶联VLP以100μg/小鼠/周施用于荷瘤小鼠并且持续三周。使用偶联VLP的如本文所述的抗肿瘤免疫重定向疗法的功效经由相对于未经处理的组的肿瘤

体积和存活来测量。在单独的实验中,将进行与上述相同的研究,不同之处在于将用肽代替儿童疫苗直接对初始的HLA-A2或HLA-AAD小鼠进行疫苗接种。

[0240] 实施例13

[0241] 用人肿瘤处理的小鼠在接触偶联VLP之后的存活

[0242] 免疫缺陷小鼠将被注射过表达1类MHC HLA-A2的人肿瘤细胞。实例包括:PC-3、HCT112和MDA-MB231。同时,小鼠被注射人外周血单核细胞(PBMC) (10^6 个细胞),这些细胞先用偶联VLP刺激过,该偶联VLP偶联至包含以下表位(下表5)之一的融合蛋白:

[0243] 表5:来自经批准疫苗的召回蛋白表位

病毒	其中可以检测到表位的 经批准的人疫苗(来源)	表位	SEQ ID NO
甲型流感	三价 Afluria 或四价 Flublok, 如果年龄为 18 岁至 64 岁; 高剂量 Fluzone 或 Fluad, 如果 年龄为 65 岁及以上; 四价 Flucelvax, 用于 4 岁至 18 岁(实际上更大的 年龄)	FMYSDFHFI GILGFVFTL	77
			68
乙肝	Energix (GSK)	FLPSDFFPSV	41
麻疹	MMR-IL (Merck)	KLWESPQEI	36
水痘	VariVax (Merck)	SLPRSRTPI	4
	VariVax (Merck)	SAPLPSNRV	5
巨细胞病毒	自然感染	NLVPMVATV	3
人乳头瘤病毒 16 E7	自然感染	YMLDLQPET	88

[0245] 然后将包含如上所述的含有召回蛋白的融合蛋白的偶联VLP每周注射到小鼠中,持续三周。然后在第14天将用偶联VLP刺激的人PBMC第二次注射到小鼠中。预期与未被提供偶联VLP的对照相比,肿瘤形成将被抑制。

[0246] 实施例14

[0247] 偶联VLP免疫重定向特性取决于弗林蛋白酶裂解

[0248] 肿瘤特异性的部分成因是肿瘤细胞上弗林蛋白酶的存在增加。为了确认与含有弗林蛋白酶裂解位点的融合蛋白偶联的偶联VLP的特异性,将进行两个实验。在第一个实验中,将创建没有弗林蛋白酶裂解位点的偶联VLP。然后将进行细胞毒性测定,以证明在没有弗林蛋白酶裂解位点的情况下,肽不能加载到肿瘤细胞上。过表达荧光素酶基因(B16-luc和ID8-luc)的鼠B16(黑素瘤/皮肤)肿瘤细胞和ID8(卵巢)肿瘤细胞将在培养物中生长。然后将用以下物质处理细胞:(1)E7肽($1\mu\text{g/mL}$, 1ng/mL);(2)HPV16 E7(缺乏弗林蛋白酶裂解序列)偶联VLP($2.5\mu\text{g/mL}$, $0.025\mu\text{g/mL}$);或(3)未偶联(对照, $2.5\mu\text{g/mL}$) VLP。然后洗涤这些细胞,并且与CD8+HPV16 E7特异性T细胞一起以不同的E:T比率(效应物:靶标比率)共培养。然后将通过检测荧光素酶来测量细胞活力。荧光素酶活性降低表明更大的免疫重定向和因此更大的细胞毒性。

[0249] 在第二个实验中,FD11(弗林蛋白酶缺陷型细胞系)将被工程化为过表达HLA-A2 1

类MHC分子 (FD11/AAD)。然后将使用该细胞系进行细胞毒性测定,以进一步证明在没有弗林蛋白酶的情况下,肽不能加载到肿瘤细胞上。过表达荧光素酶基因的FD11/AAD肿瘤细胞将在培养物中生长。然后用以下物质处理细胞:(1) E7肽 (1 μ g/mL, 1ng/ml); (2) HPV16 E7偶联VLP (2.5 μ g/mL, 0.025 μ g/mL); 或 (3) 未偶联 (对照, 2.5 μ g/mL) VLP。然后洗涤这些细胞,并且与CD8+HPV16E7特异性T细胞一起以不同的E:T比率 (效应物:靶标比率) 共培养。通过测量荧光素酶的活性/表达来测量细胞活力。荧光素酶活性降低表明更大的免疫重定向和因此更大的细胞毒性

[0250] 实施例15

[0251] 肿瘤再攻击实验

[0252] 将评估先前通过所述偶联VLP治愈原发性肿瘤的小鼠在肿瘤再攻击中存活的能力。已在用偶联VLP处理肿瘤之后存活下来的小鼠 (n=20) 将在最后一个肿瘤消失后4周用相同的肿瘤 (1×10^5 个活细胞) 进行再攻击。一组尚未接触肿瘤或偶联VLP的空白小鼠 (n为约20) 将被注射相同的肿瘤作为对照。然后将在VLP疗法前、VLP后和再攻击后处死三只经处理的小鼠和三只空白小鼠。然后准备肿瘤和脾,以便通过ImmunoSEQ测定 (Adaptive Biotechnologies Corp., Seattle, WA) 进行TCRB高通量测序。预期先前通过偶联VLP治愈原发性肿瘤的小鼠将表现出对二次再攻击的抵抗力,这表明偶联VLP策略能够诱导针对肿瘤复发的保护性系统免疫应答。在各种阶段 (诸如VLP疗法前、VLP后和再攻击后) 将观察到小鼠的不同的TCR克隆谱。

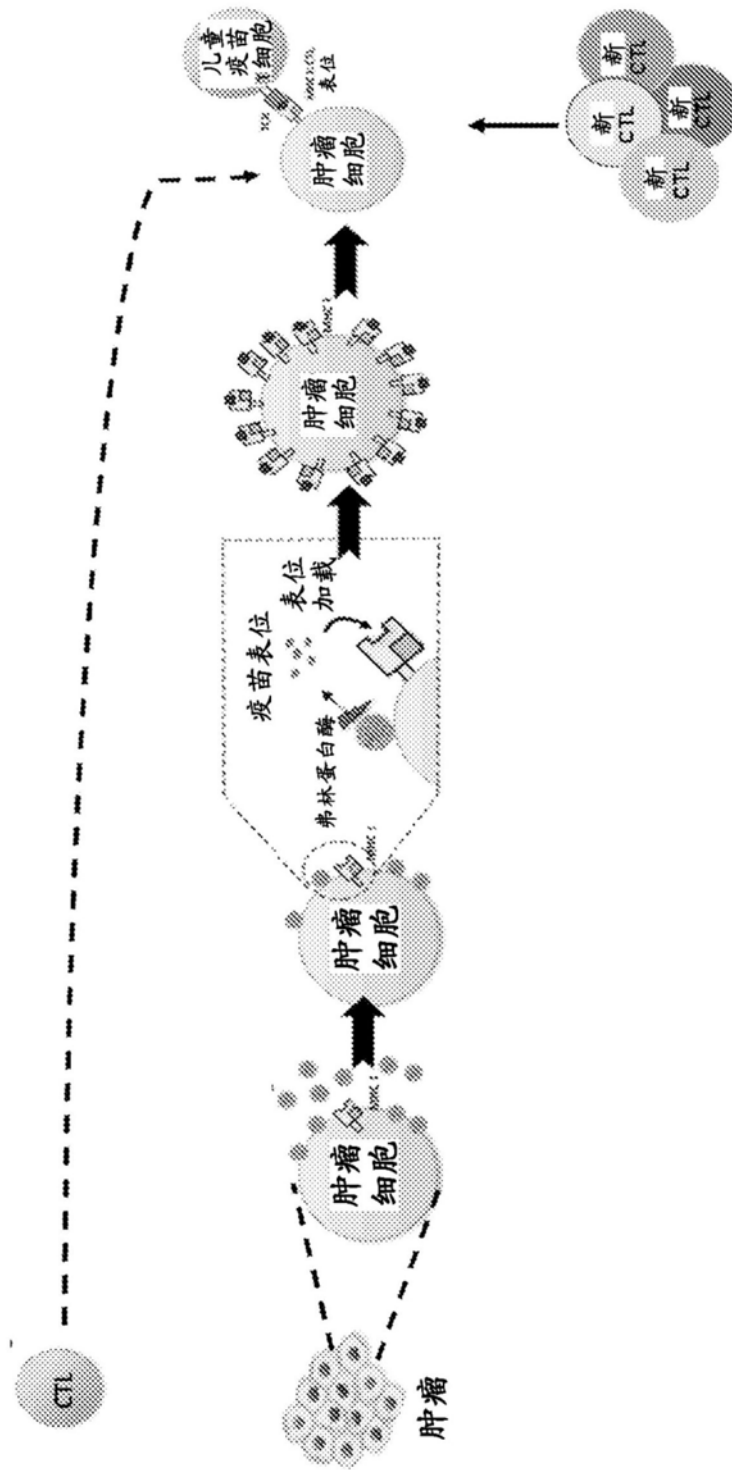


图1

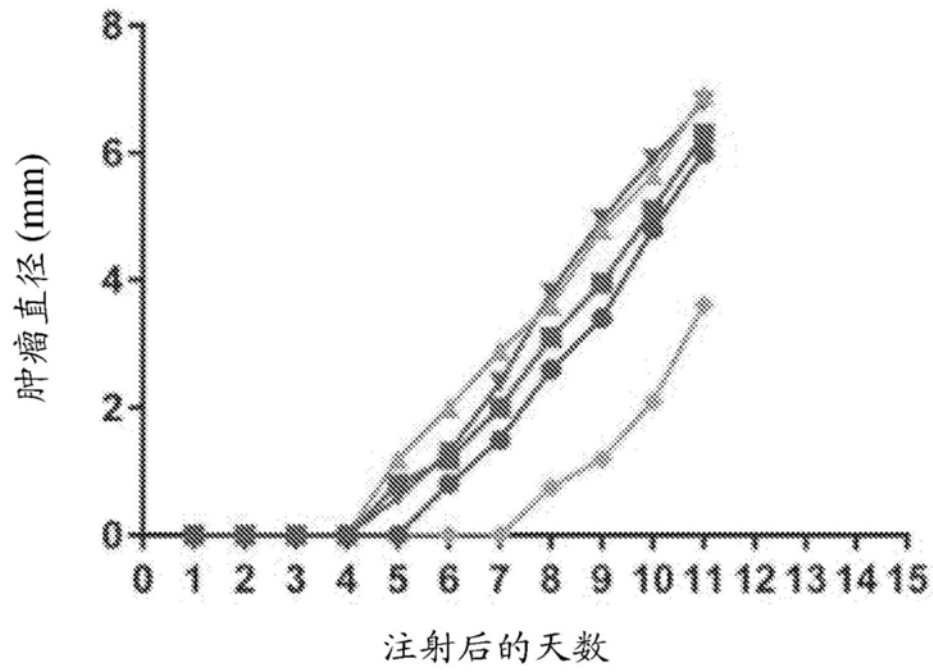


图2A

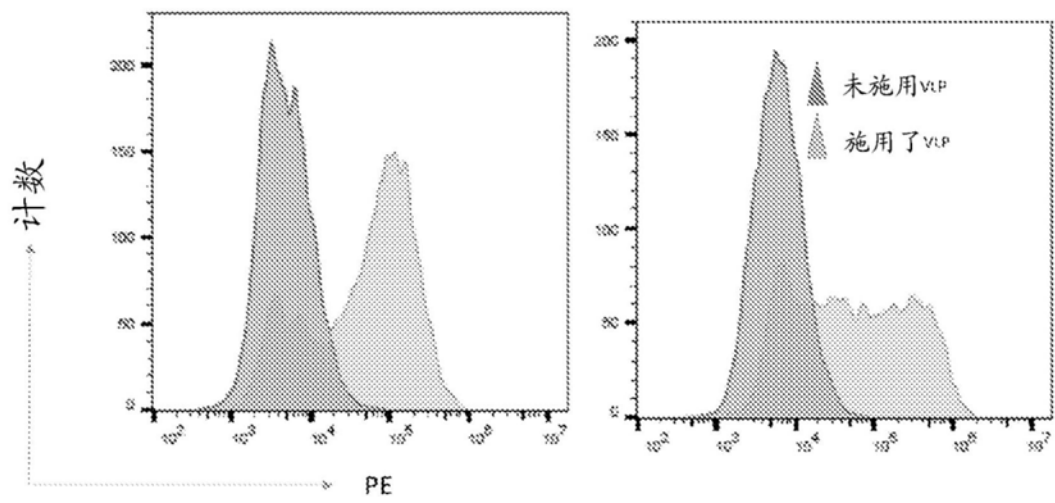


图2B

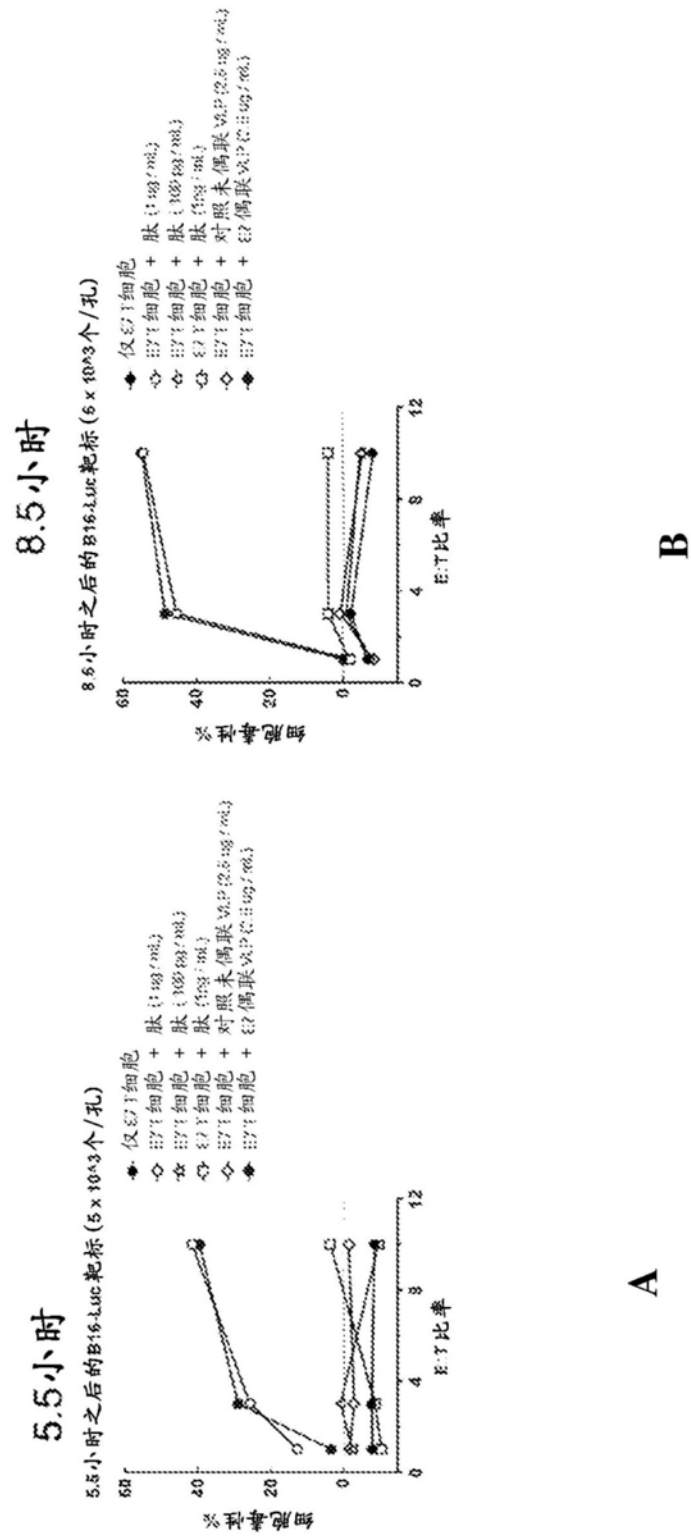
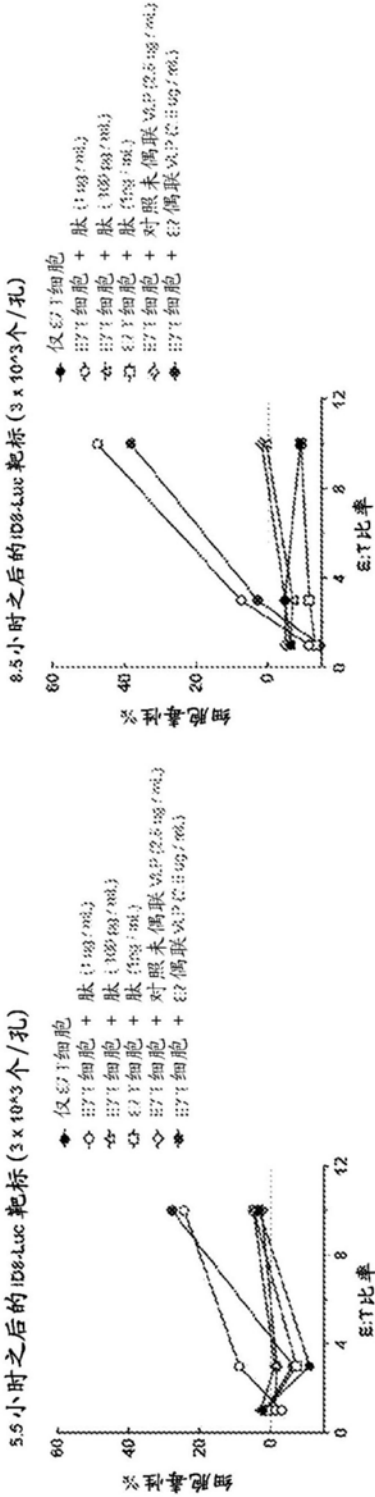


图3



D

C

图3

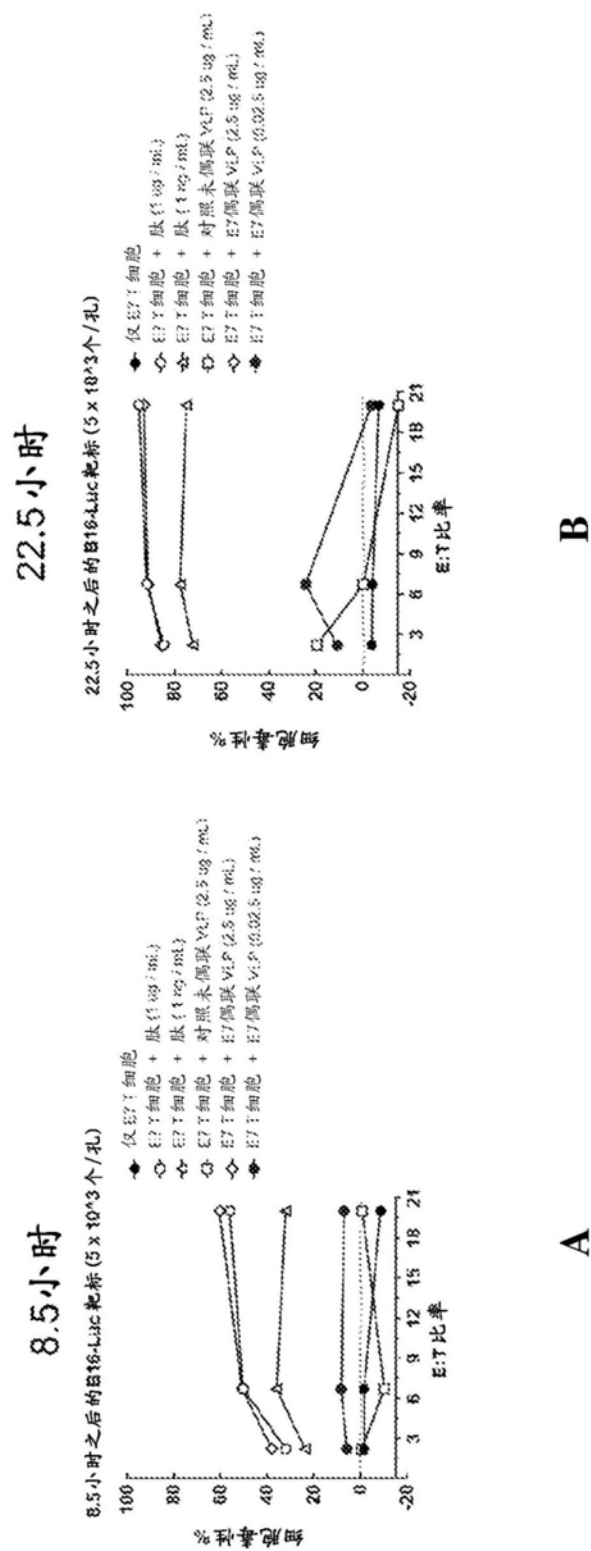


图4

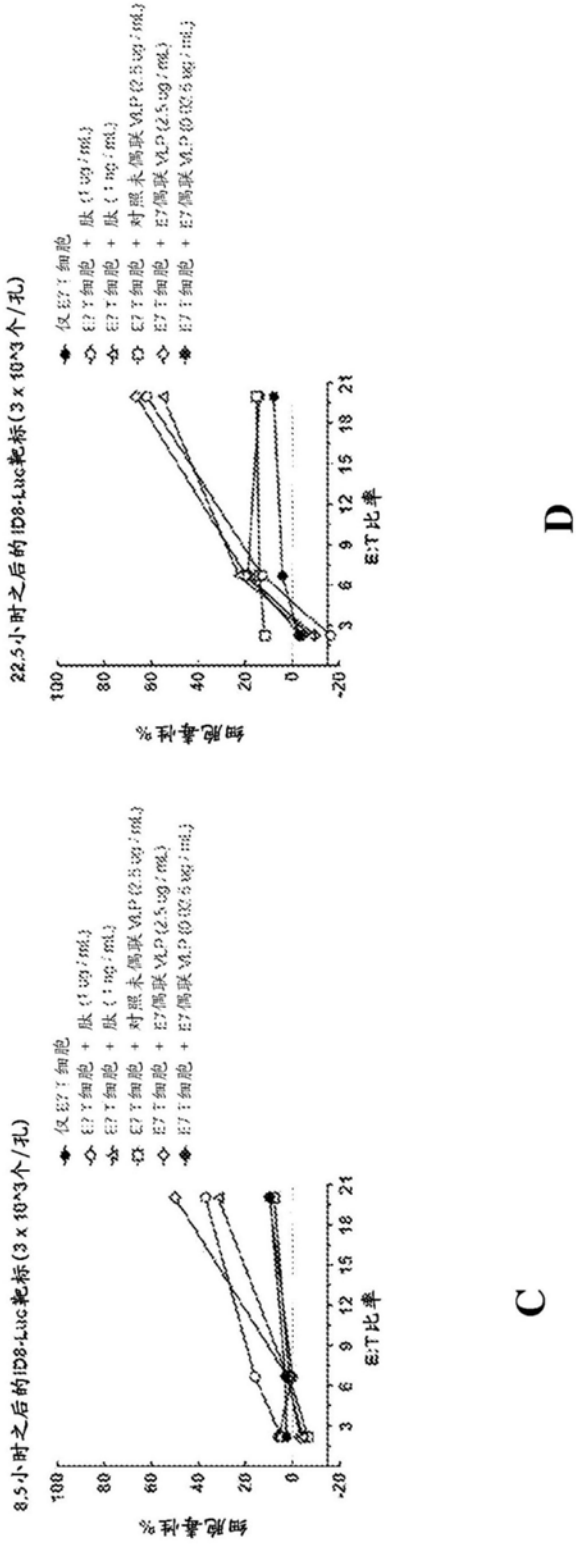


图4

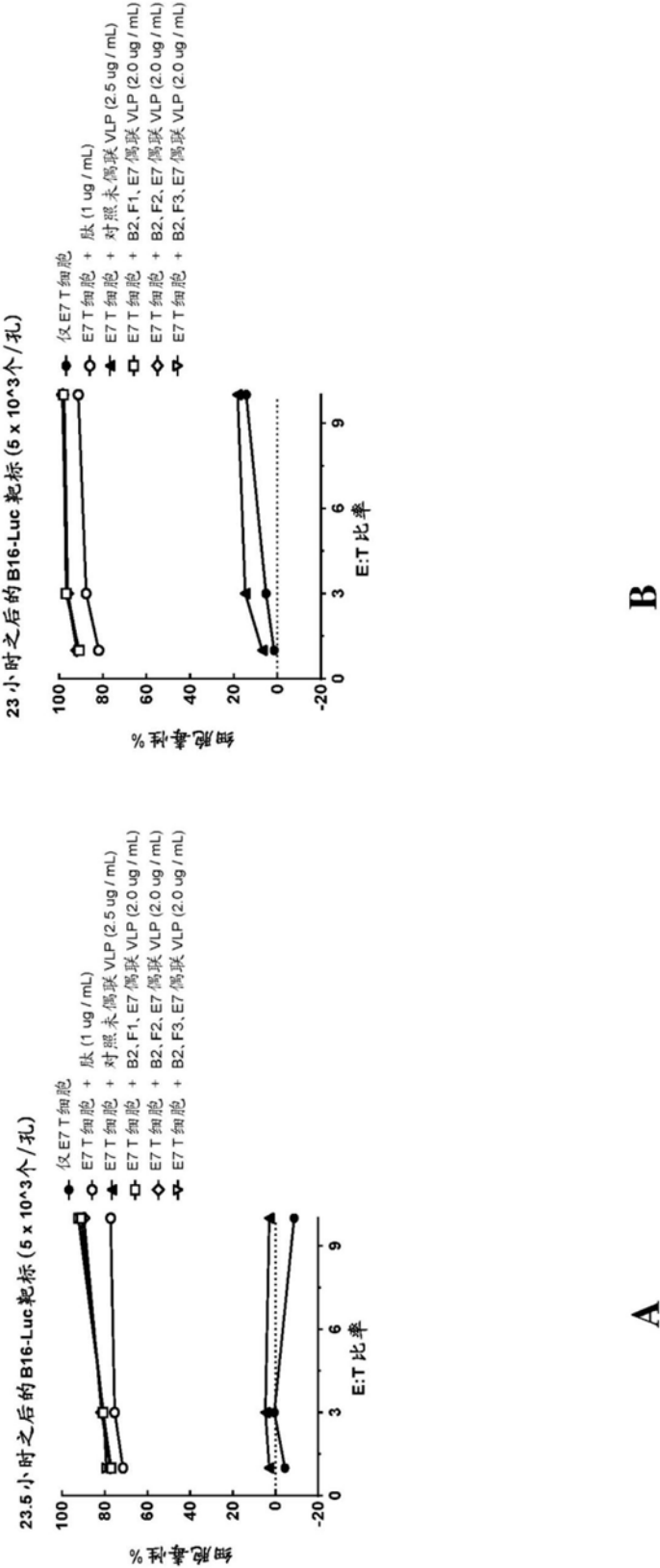
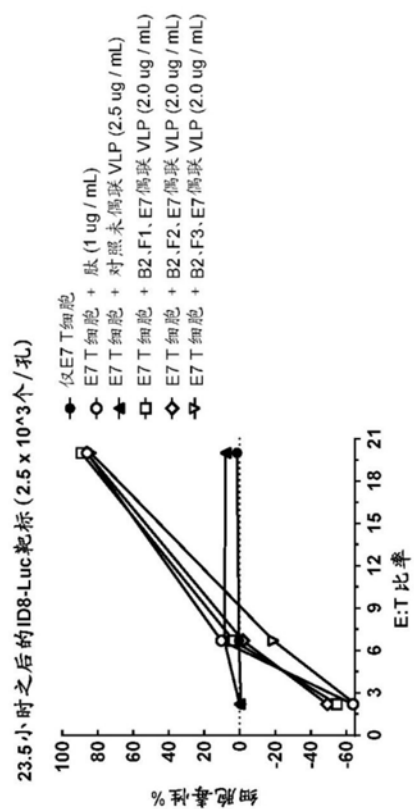
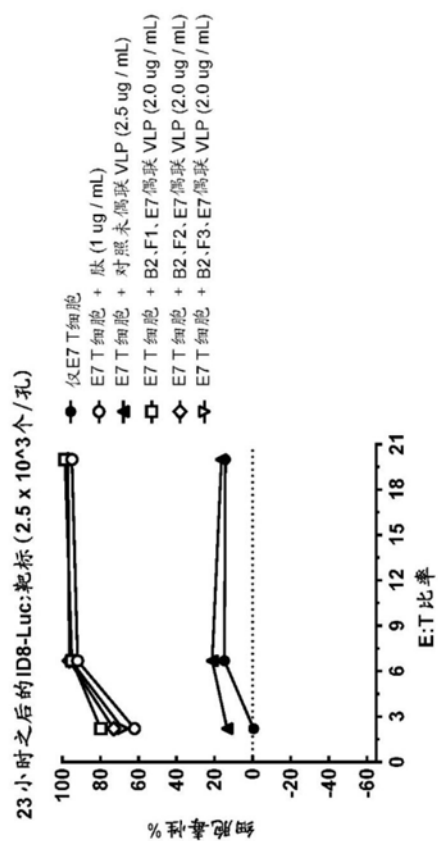


图5



U

图5

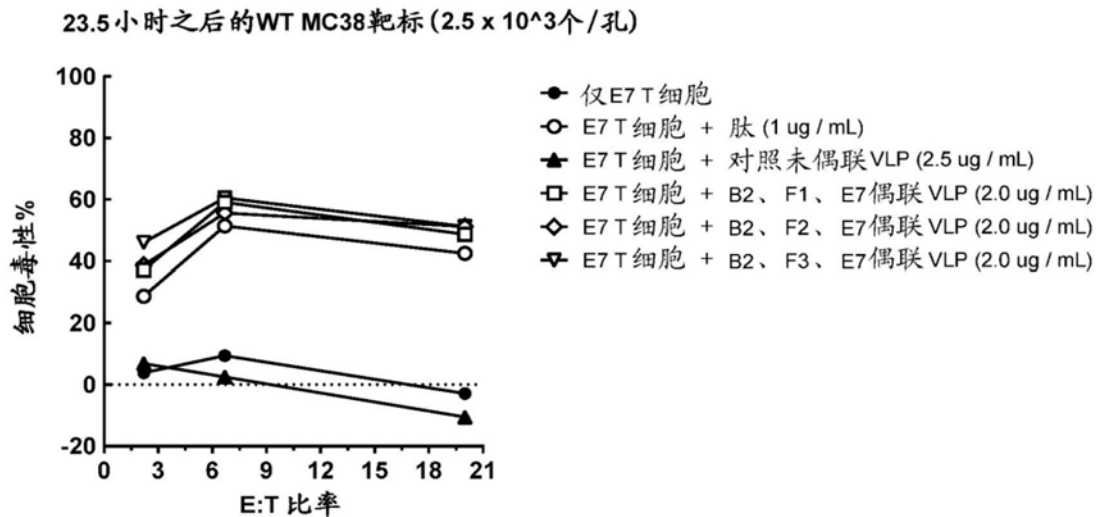


图6A

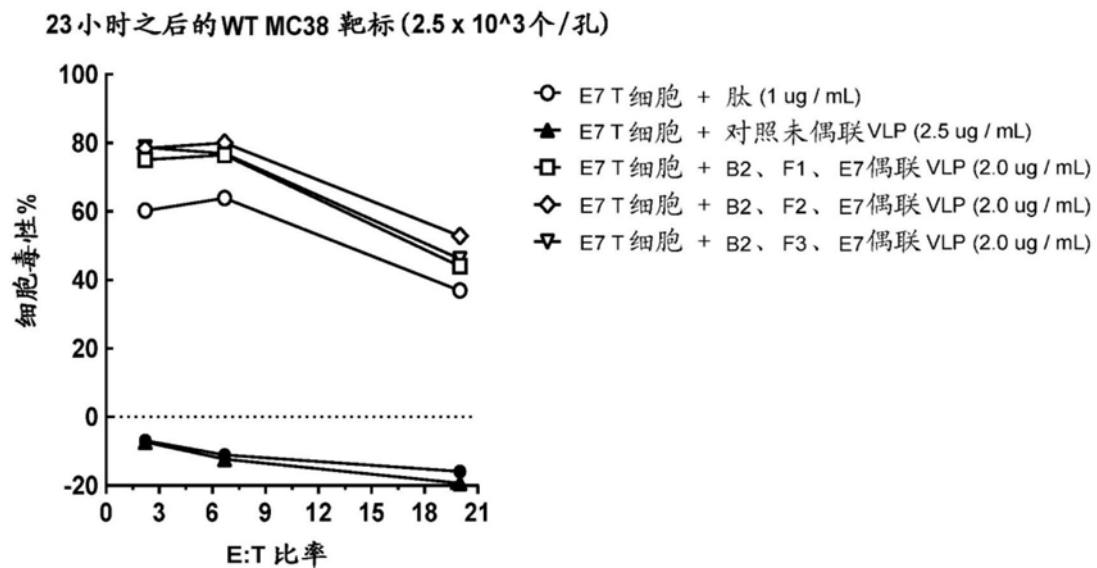


图6B

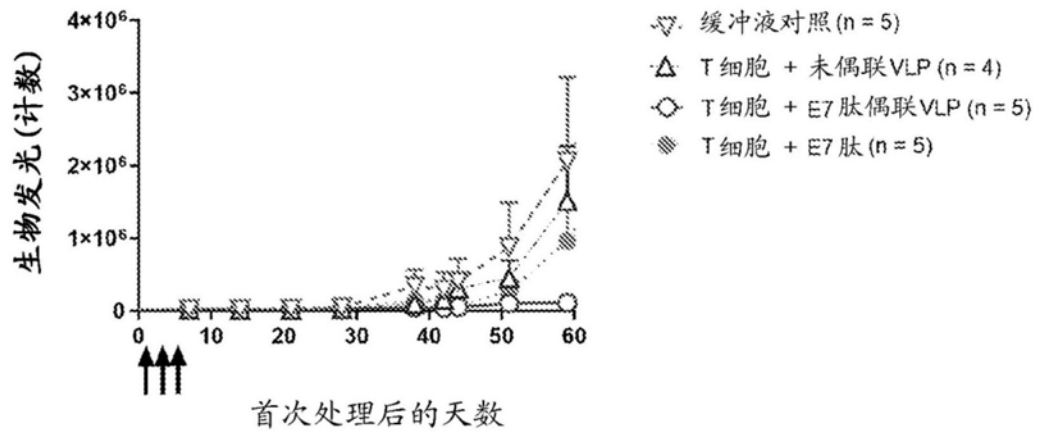


图7A

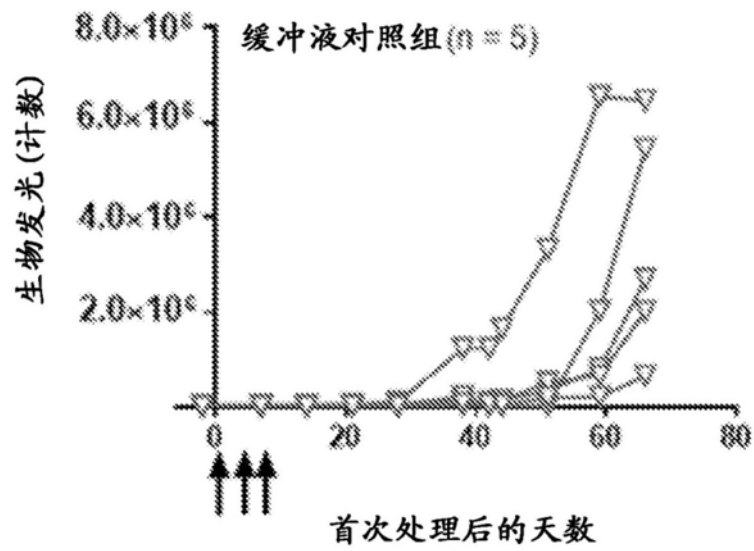


图7B

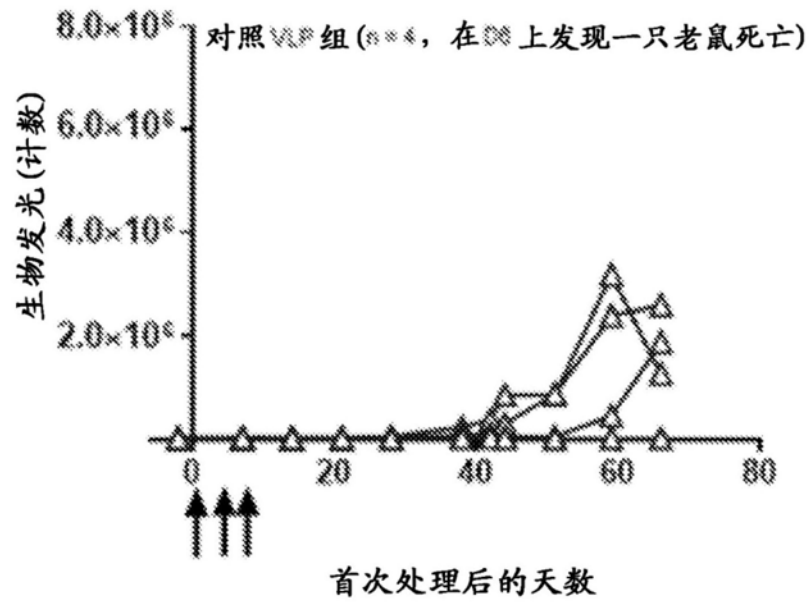


图7C

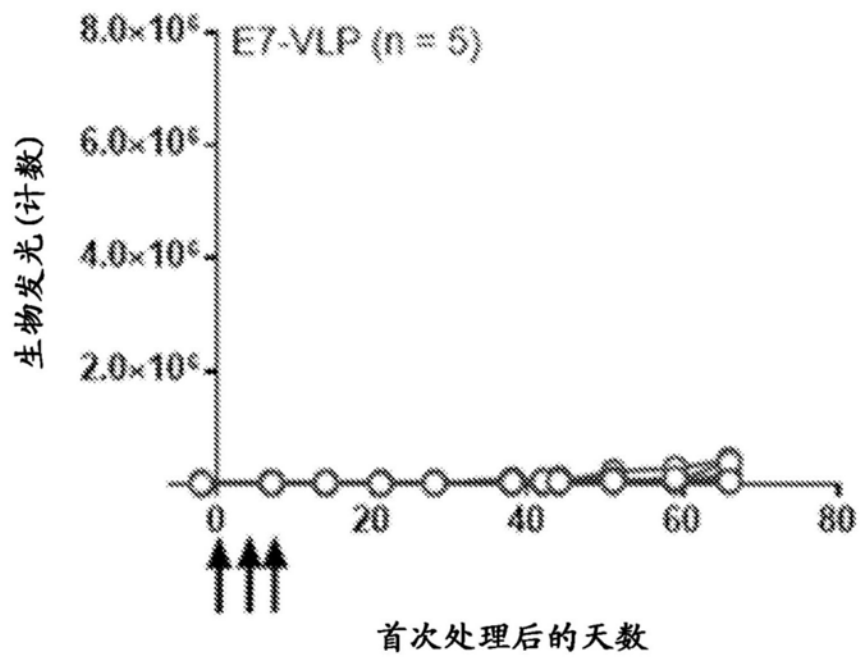


图7D

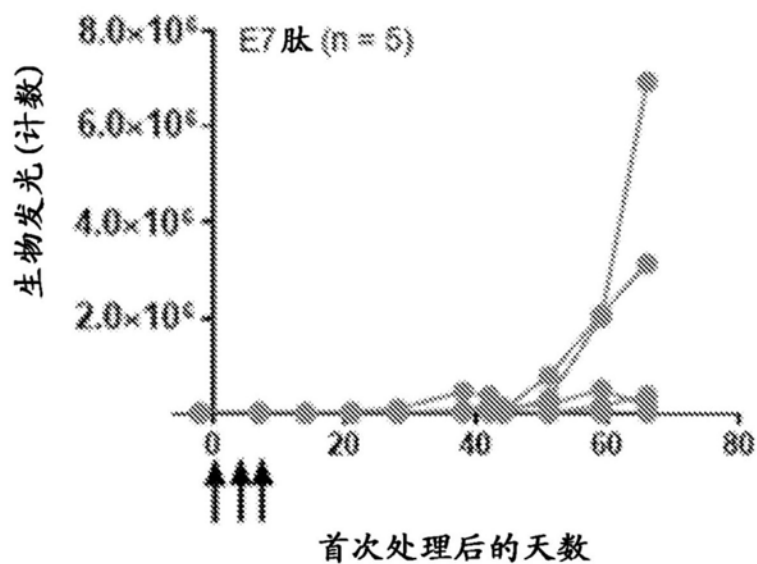


图7E

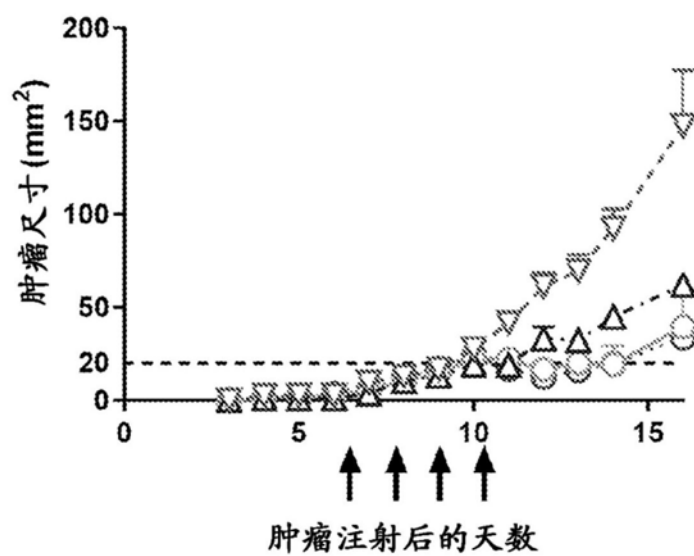


图8A

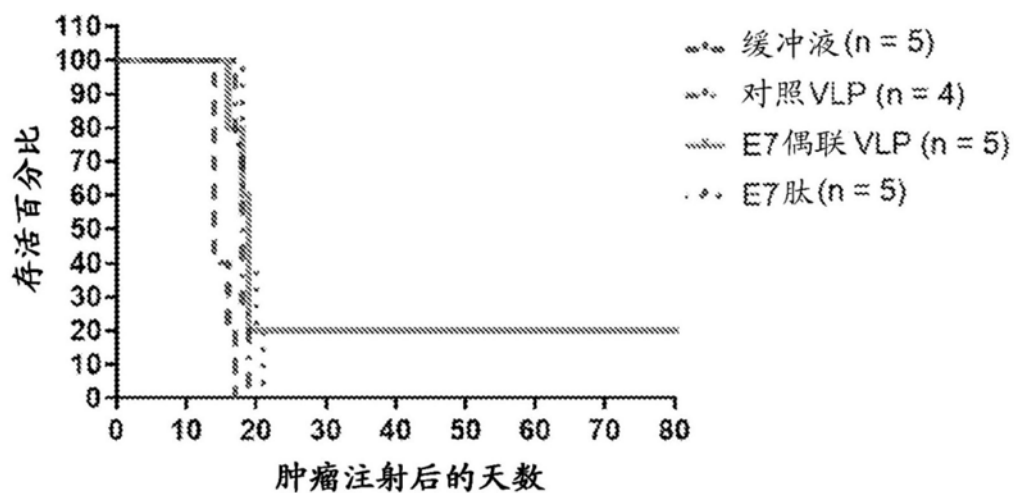


图8B

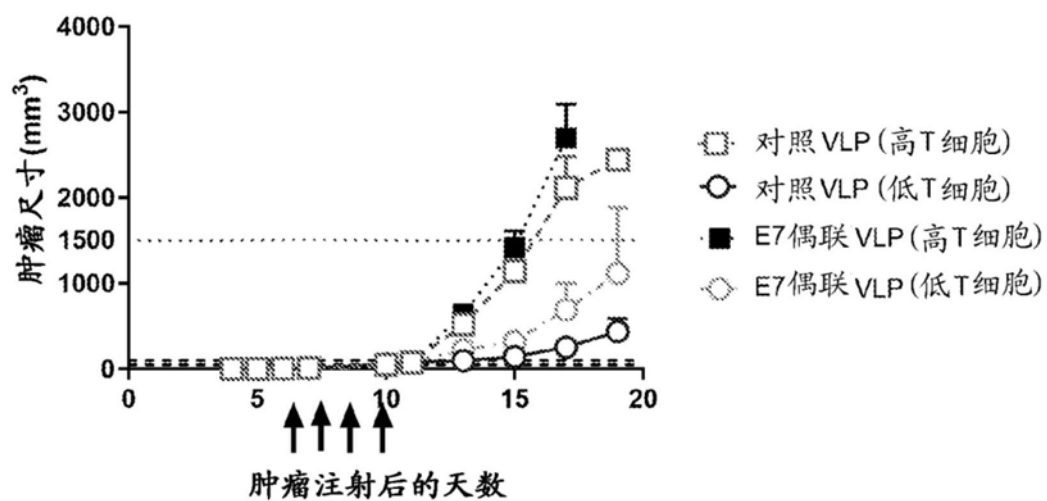


图8C

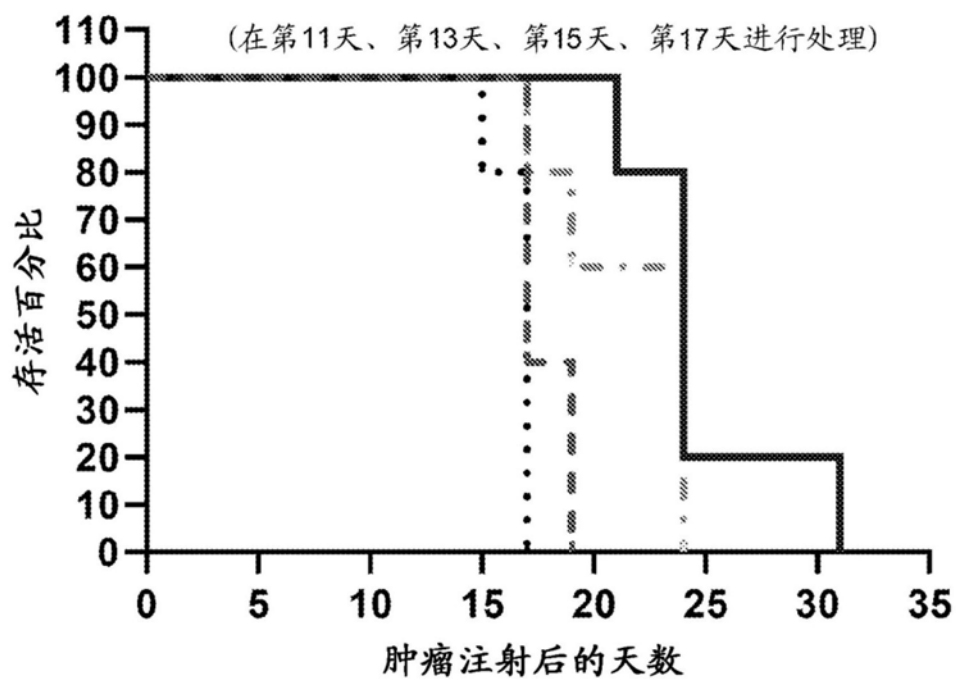


图8D

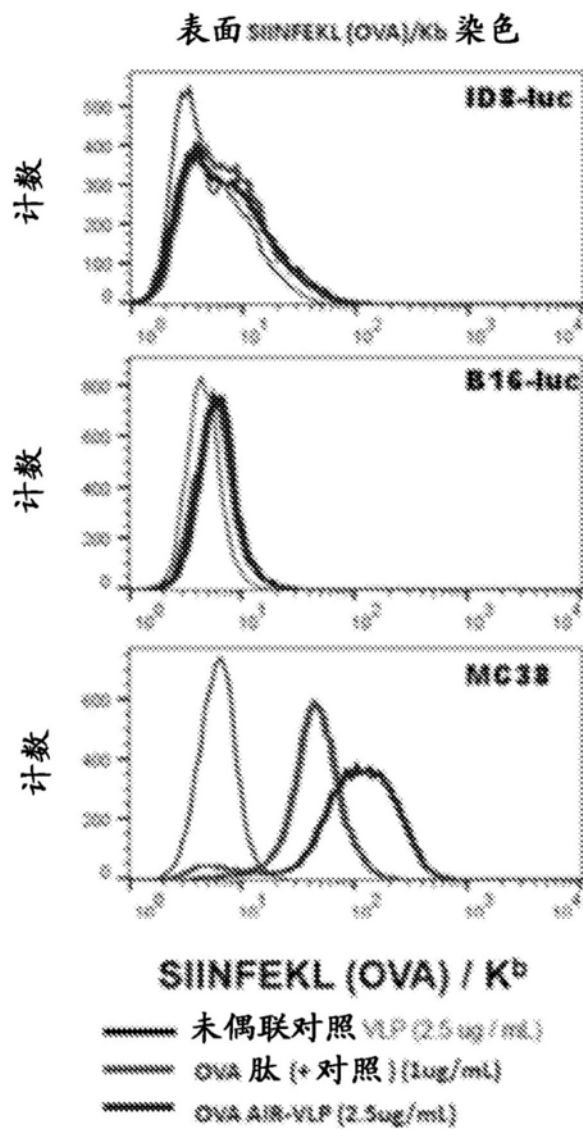


图9A

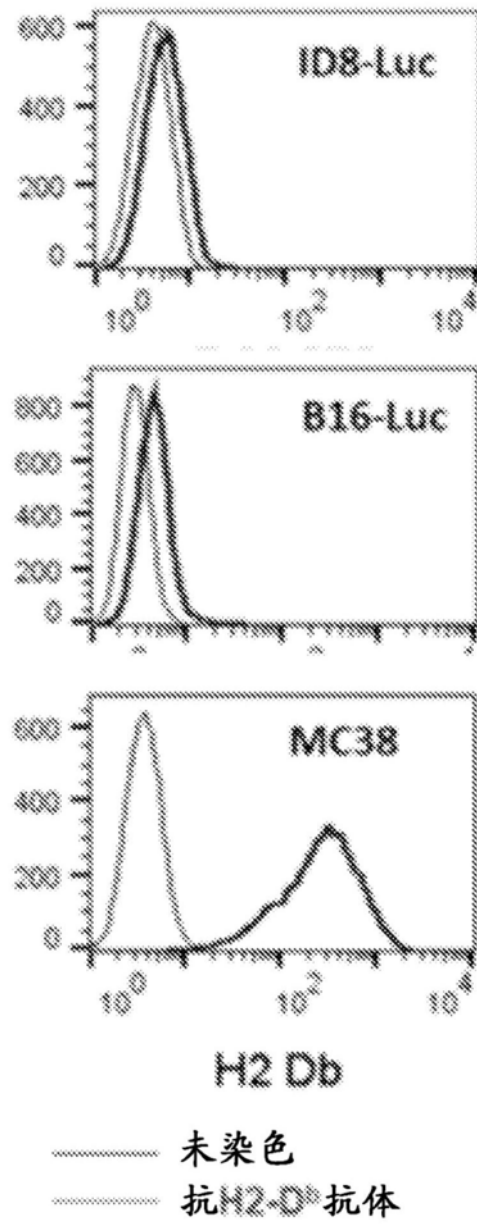


图9B

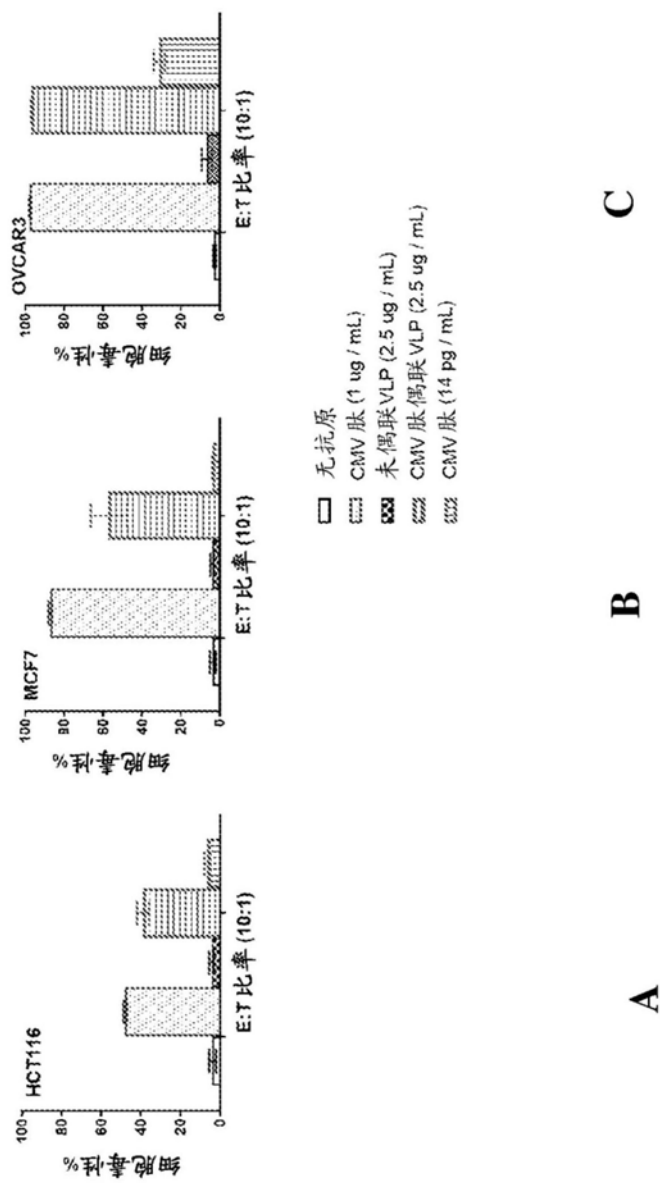


图10

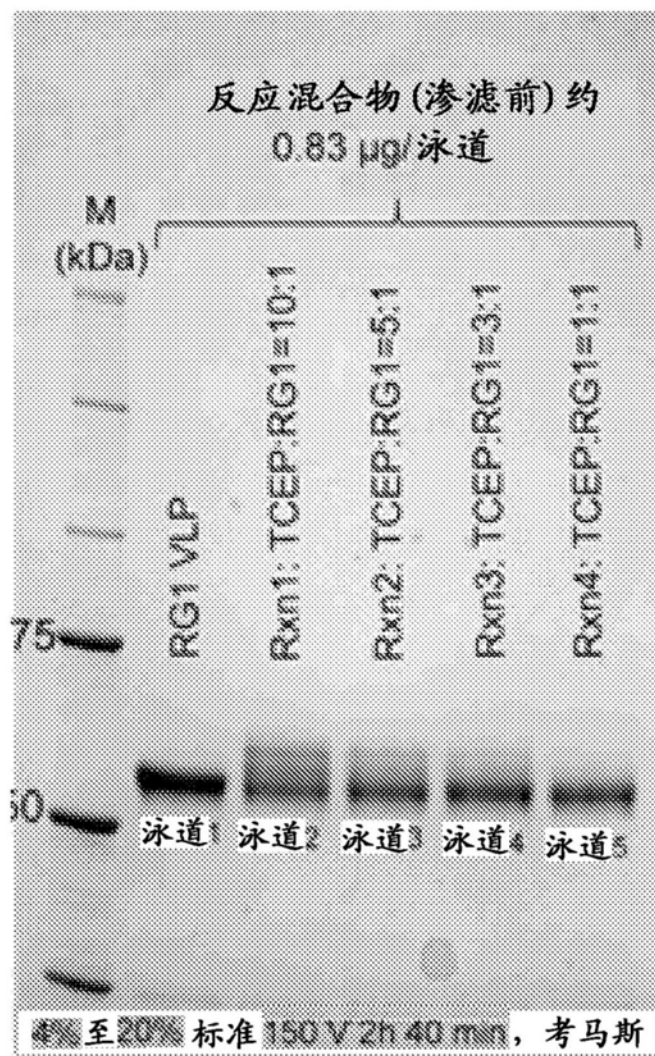


图11

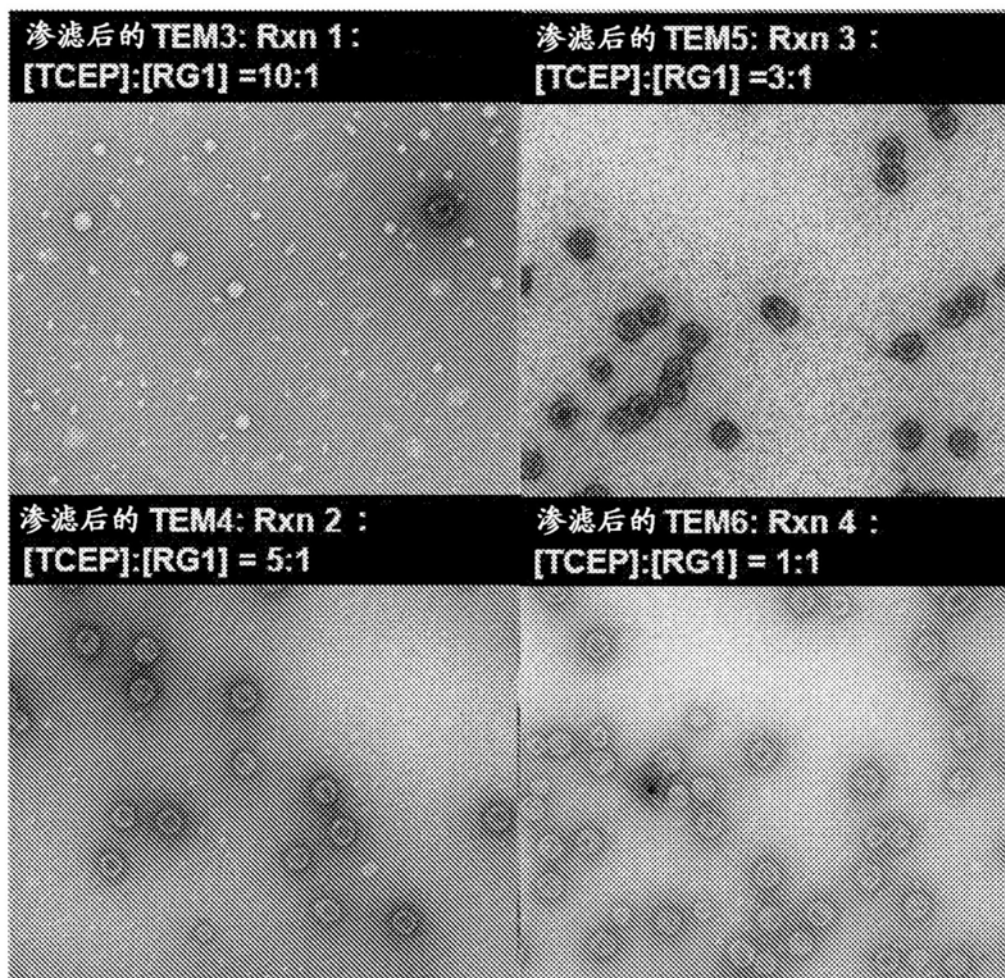


图12

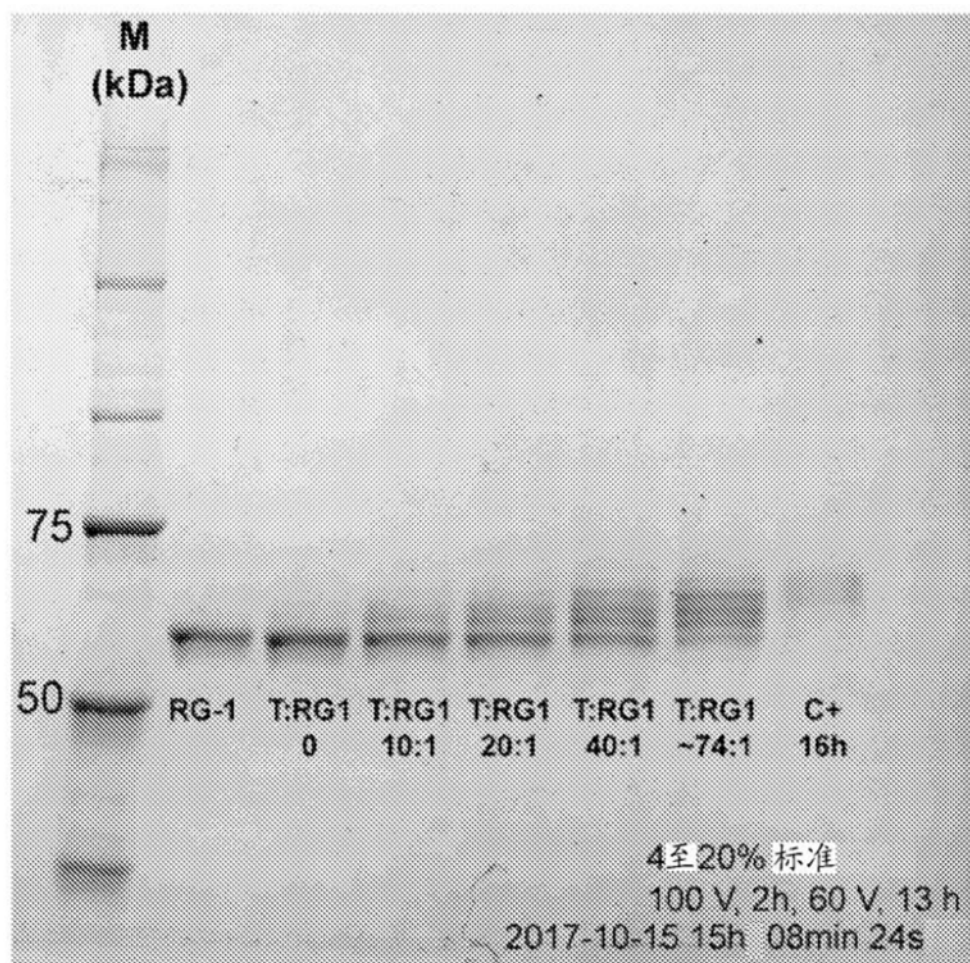


图13

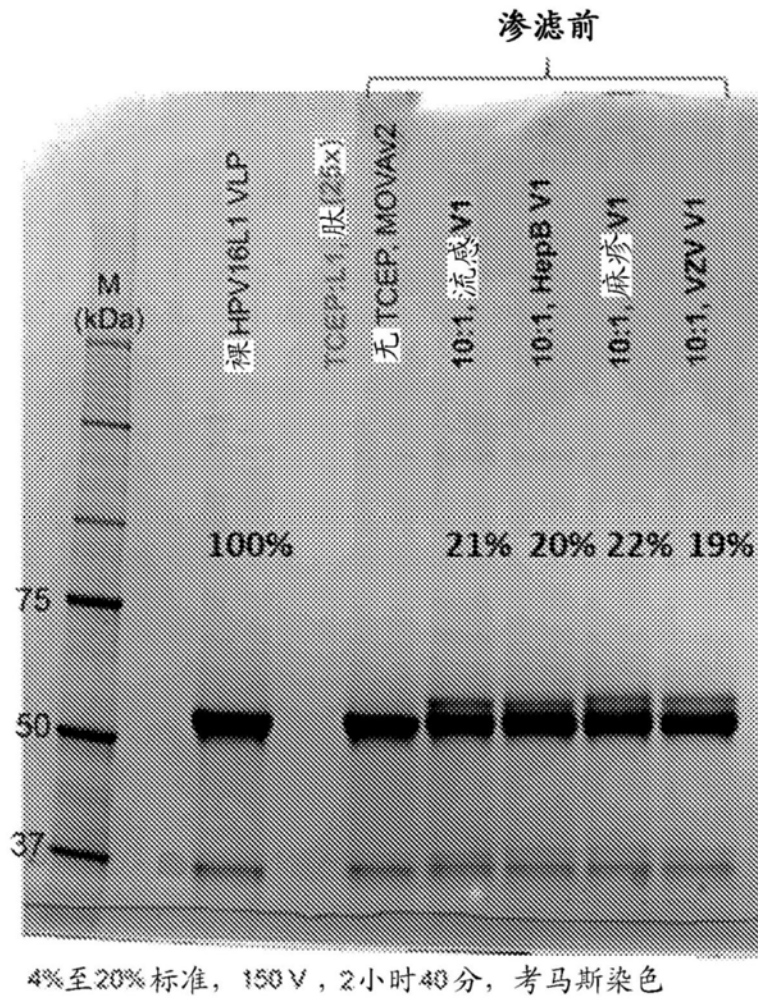


图14A

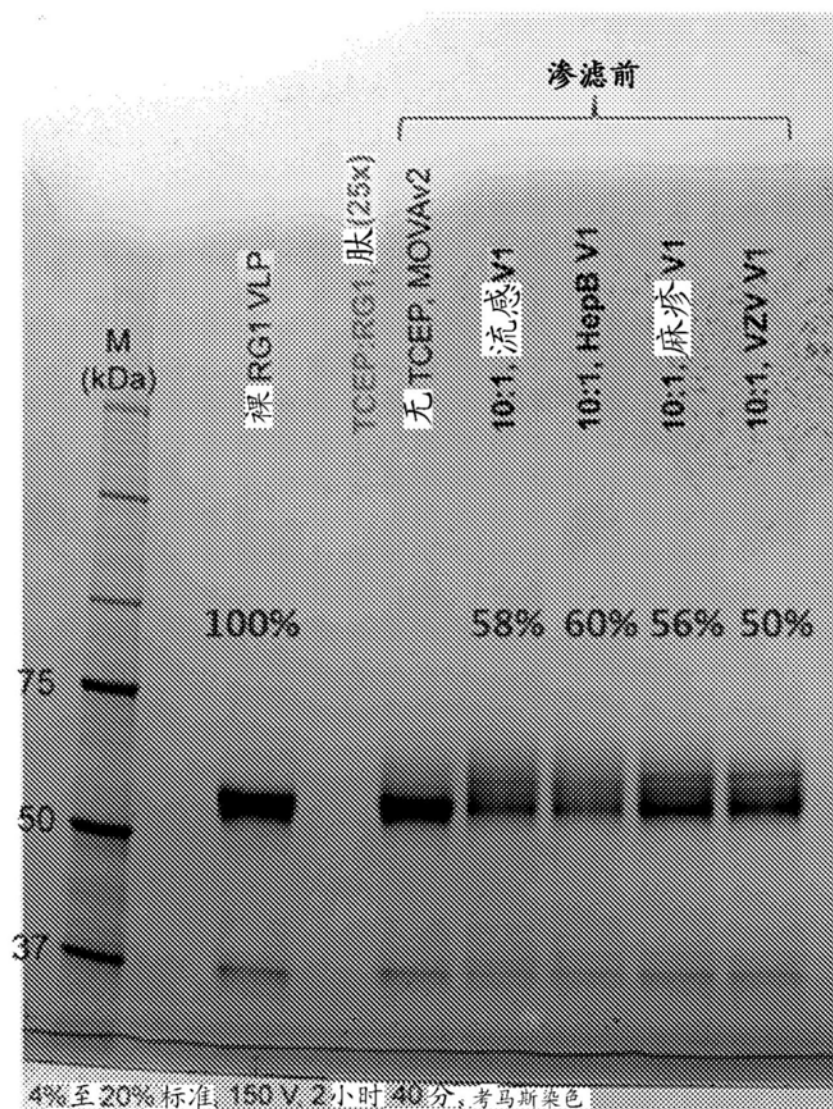


图14B