



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113056284 A

(43) 申请公布日 2021.06.29

(21) 申请号 201980076127.2

(74) 专利代理机构 隆天知识产权代理有限公司  
72003

(22) 申请日 2019.11.20

代理人 吴小瑛 付文川

(30) 优先权数据

18207238.9 2018.11.20 EP

62/807,720 2019.02.19 US

(51) Int.Cl.

A61K 39/00 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.05.19

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2019/081942 2019.11.20

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/104531 EN 2020.05.28

(71) 申请人 巴法里安诺迪克有限公司

地址 丹麦克维斯特加德

(72) 发明人 H·劳特巴赫 M·欣特贝格尔

J·梅迪纳埃切韦尔斯

权利要求书3页 说明书50页

序列表4页 附图35页

(54) 发明名称

通过肿瘤内和/或静脉内施用编码4-1BBL  
(CD137L) 和/或CD40L的重组MVA治疗癌症的疗法

(57) 摘要

本发明涉及用于减小癌症患者的肿瘤体积和/或提高癌症患者的存活率的组合物和相关方法。所述组合物包含编码肿瘤相关抗原(“TAA”)以及4-1BBL和/或CD40L的重组MVA,并且可按照任何合适的方式,包括通过静脉内施用和/或肿瘤内施用向受试者施用。

1. 一种用于减小患有癌性肿瘤的受试者的肿瘤大小和/或提高患有癌性肿瘤的受试者的存活率的方法,所述方法包括向所述受试者肿瘤内施用重组修饰的安卡拉痘苗(MVA),所述重组修饰的安卡拉痘苗(MVA)包含编码肿瘤相关抗原(TAA)的第一核酸和编码4-1BBL的第二核酸,其中与非肿瘤内注射包含编码TAA和4-1BBL抗原的第一核酸和第二核酸的重组MVA病毒相比,肿瘤内施用所述重组MVA增强所述癌性肿瘤中的炎症应答,增加肿瘤减小程度和/或提高所述受试者的总体存活率。

2. 一种用于减小患有癌性肿瘤的受试者的肿瘤大小和/或提高患有癌性肿瘤的受试者的存活率的方法,所述方法包括向所述受试者静脉内施用重组修饰的安卡拉痘苗(MVA),所述重组修饰的安卡拉痘苗(MVA)包含编码肿瘤相关抗原(TAA)的第一核酸和编码4-1BBL的第二核酸,其中与非静脉内注射包含编码TAA和4-1BBL抗原的第一核酸和第二核酸的重组MVA病毒相比,静脉内施用所述重组MVA增强自然杀伤(NK)细胞应答并且增强对所述TAA具有特异性的CD8T细胞应答。

3. 一种用于减小患有癌性肿瘤的受试者的肿瘤大小和/或提高患有癌性肿瘤的受试者的存活率的方法,所述方法包括向所述受试者施用重组修饰的安卡拉痘苗(MVA),所述重组修饰的安卡拉痘苗(MVA)包含编码肿瘤相关抗原(TAA)的第一核酸和编码4-1BBL的第二核酸,其中与单独施用重组MVA和4-1BBL抗原相比,施用所述重组MVA增加肿瘤减小程度和/或提高所述受试者的总体存活率。

4. 一种在受试者的癌性肿瘤中诱导增强的炎症应答的方法,所述方法包括向所述受试者肿瘤内施用重组修饰的安卡拉痘苗(MVA),所述重组修饰的安卡拉痘苗(MVA)包含编码第一异源肿瘤相关抗原(TAA)的第一核酸和编码4-1BBL抗原的第二核酸,其中与非肿瘤内注射包含编码异源肿瘤相关抗原和4-1BBL抗原的第一核酸和第二核酸的重组MVA病毒所产生的炎症应答相比,肿瘤内施用所述重组MVA在所述肿瘤中产生增强的炎症应答。

5. 如权利要求1所述的方法,其中所述受试者是人。

6. 如权利要求1所述的方法,其中所述TAA是在肿瘤细胞中表达的内源性逆转录病毒(ERV)蛋白。

7. 如权利要求6所述的方法,其中所述ERV蛋白来自人内源性逆转录病毒K(HERV-K)家族,并且选自HERV-K包膜蛋白和HERV-K gag蛋白。

8. 如权利要求1所述的方法,其中所述TAA选自由以下组成的组:癌胚抗原(CEA)、细胞表面相关的粘蛋白1(MUC-1)、前列腺酸性磷酸酶(PAP)、前列腺特异性抗原(PSA)、人表皮生长因子受体2(HER-2)、存活素、酪氨酸相关蛋白1(TRP1)、酪氨酸相关蛋白1(TRP2)、Brachyury、PRAME、FOLR1、HERV-K-env、HERV-K-gag、p15、MEL以及它们的组合。

9. 一种减小患有癌性肿瘤的受试者的肿瘤大小和/或提高患有癌性肿瘤的受试者的存活率的方法,所述方法包括向所述受试者施用重组修饰的安卡拉痘苗(MVA),所述重组修饰的安卡拉痘苗(MVA)包含编码内源性逆转录病毒(ERV)蛋白的第一核酸和编码4-1BBL的第二核酸,其中与单独施用重组MVA和4-1BBL抗原相比,施用所述重组MVA增加肿瘤减小程度和/或提高所述受试者的总体存活率。

10. 如权利要求9所述的方法,其中所述ERV蛋白来自人内源性逆转录病毒蛋白K(HERV-K)家族。

11. 如权利要求10所述的方法,其中所述逆转录病毒蛋白K选自HERV-K包膜蛋白和

HERV-K-gag蛋白。

12. 如权利要求1所述的方法,其中所述重组MVA还包含编码CD40L抗原的第三核酸。

13. 如权利要求1所述的方法,所述方法还包括向所述受试者施用至少一种免疫检查点分子拮抗剂或激动剂。

14. 如权利要求13所述的方法,其中所述免疫检查点分子拮抗剂或激动剂选自CTLA-4、PD-1、PD-L1、LAG-3、TIM-3和ICOS的拮抗剂或激动剂。

15. 如权利要求14所述的方法,其中所述免疫检查点分子拮抗剂是抗体。

16. 一种用于治疗癌症的重组修饰的安卡拉痘苗(MVA),所述重组修饰的安卡拉痘苗(MVA)包含:a) 编码肿瘤相关抗原(TAA)的第一核酸;和b) 编码4-1BBL的第二核酸;其中与非肿瘤内注射所述重组MVA相比,肿瘤内施用所述重组MVA增强癌性肿瘤中的炎症应答,减小所述癌性肿瘤的大小和/或提高人患者的总体存活率。

17. 如权利要求16所述的供使用的重组MVA,所述重组MVA还包含c) 编码CD40L的第三核酸。

18. 如权利要求16所述的供使用的重组MVA,其中所述TAA是内源性逆转录病毒(ERV)蛋白。

19. 如权利要求18所述的供使用的重组MVA,其中所述ERV蛋白来自人内源性逆转录病毒K(HERV-K)家族,并且选自HERV-K-env和HERV-K-gag。

20. 如权利要求16所述的供使用的重组MVA,其中所述TAA选自由以下组成的组:癌胚抗原(CEA)、细胞表面相关的粘蛋白1(MUC-1)、前列腺酸性磷酸酶(PAP)、前列腺特异性抗原(PSA)、人表皮生长因子受体2(HER-2)、存活素、酪氨酸相关蛋白1(TRP1)、酪氨酸相关蛋白1(TRP2)、Brachyury、FOLR1、PRAME、HERV-K-env、HERV-K-gag、p15、MEL以及它们的组合。

21. 一种用于治疗患有癌症的受试者的重组修饰的安卡拉痘苗(MVA),所述重组MVA包含:(a) 编码肿瘤相关抗原(TAA)的第一核酸和(b) 编码4-1BBL的第二核酸。

22. 如权利要求21所述的重组MVA,其中所述TAA是来自人内源性逆转录病毒K(HERV-K)家族的ERV蛋白。

23. 如权利要求22所述的重组MVA,其中所述ERV蛋白选自HERV-K env蛋白和HERV-K gag蛋白。

24. 如权利要求23所述的重组MVA,所述重组MVA还包含c) 编码CD40L的第三核酸。

25. 一种药物组合,所述药物组合包含:(a) 如权利要求24所述的重组MVA;和(b) 至少一种免疫检查点分子拮抗剂或激动剂。

26. 如权利要求25所述的药物组合,其中所述免疫检查点分子拮抗剂或激动剂选自CTLA-4、PD-1、PD-L1、LAG-3、TIM-3和ICOS的拮抗剂或激动剂。

27. 一种用于减小患有癌性肿瘤的受试者的肿瘤大小和/或提高患有癌性肿瘤的受试者的存活率的方法,所述方法包括向所述受试者施用重组修饰的安卡拉痘苗(MVA),所述重组修饰的安卡拉痘苗(MVA)包含编码肿瘤相关抗原(TAA)的第一核酸、编码4-1BBL的第二核酸和编码CD40L的第三核酸,其中与单独施用重组MVA、4-1BBL抗原和CD40L抗原相比,施用所述重组MVA增加肿瘤减小程度和/或提高所述受试者的总体存活率。

28. 一种在受试者的癌性肿瘤中诱导增强的炎症应答的方法,所述方法包括向所述受试者肿瘤内施用重组修饰的安卡拉痘苗(MVA),所述重组修饰的安卡拉痘苗(MVA)包含编码

第一异源肿瘤相关抗原 (TAA) 的第一核酸、编码4-1BBL抗原的第二核酸和编码CD40L抗原的第三核酸,其中与非肿瘤内注射包含编码异源肿瘤相关抗原的第一核酸、编码4-1BBL抗原的第二核酸和编码CD40L抗原的第三核酸的重组MVA病毒所产生的炎症应答相比,肿瘤内施用所述重组MVA在所述肿瘤中产生增强的炎症应答。

29. 如权利要求27所述的方法,所述方法包括通过静脉内施用向所述受试者施用所述重组修饰的安卡拉痘苗 (MVA)。

30. 如权利要求27所述的方法,所述方法包括通过肿瘤内施用向所述受试者施用所述重组修饰的安卡拉痘苗 (MVA)。

31. 如权利要求27所述的方法,所述方法包括通过静脉内施用和肿瘤内施用向所述受试者施用所述重组修饰的安卡拉痘苗 (MVA)。

32. 如权利要求31所述的方法,其中所述静脉内施用和所述肿瘤内施用在不同的时间进行。

## 通过肿瘤内和/或静脉内施用编码4-1BBL (CD137L) 和/或CD40L的重组MVA治疗癌症的疗法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种用于治疗癌症的疗法,所述治疗包括静脉内或肿瘤内施用的重组修饰的安卡拉痘苗(MVA)病毒,所述病毒包含编码4-1BBL (CD137L)的核酸。如本文所用的重组修饰的安卡拉痘苗(MVA)病毒(也称为“重组MVA”或“rMVA”)是指包含至少一种编码肿瘤相关抗原(TAA)的多核苷酸的MVA。在更具体的方面,本发明包括静脉内或肿瘤内施用的重组MVA,所述重组MVA包含编码TAA的核酸和编码4-1BBL的核酸。在另外的方面,本发明包括静脉内或肿瘤内施用的重组MVA,所述重组MVA包含编码TAA的核酸和编码CD40L的核酸。在另外的方面,本发明包括静脉内或肿瘤内施用的重组MVA,所述重组MVA包含编码TAA、4-1BBL (CD137L)和CD40L的核酸。

[0002] 发明背景

[0003] 重组痘病毒已被用作针对感染性生物体,以及最近针对肿瘤的免疫疗法疫苗(Mastrangelo等人(2000) *J Clin Invest.*105 (8):1031-1034)。

[0004] 已证明可用作针对感染性疾病和癌症的免疫疗法疫苗的一种痘病毒株是修饰的安卡拉痘苗(MVA)病毒(有时简称为“MVA”)。MVA是通过痘苗病毒(CVA)安卡拉株在鸡胚成纤维细胞上连续516次传代而生成的(关于综述参见Mayr等人(1975) *Infection* 3:6-14)。作为这些长期传代的结果,所得MVA病毒的基因组缺失了其基因组序列的约31千碱基,因此就在禽类细胞中复制而言被描述为宿主细胞高度受限的(Meyer等人(1991) *J.Gen.Virol.*72:1031-1038)中所描述的。在多种动物模型中显示所得MVA明显无毒(Mayr&Danner (1978) *Dev.Biol.Stand.*41:225-34)。已描述了具有增强的安全性特征以开发更安全的产品(诸如疫苗或药物)的MVA毒株(参见国际PCT公布W02002042480;另见例如美国专利第6,761,893号和第6,913,752号)。此类变体能够在非人细胞和细胞系中,尤其在鸡胚成纤维细胞(CEF)中进行生殖性复制,但在人细胞系中,尤其在HeLa、HaCat和143B细胞系中,是不能复制的。此类毒株也不能在体内,例如在某些小鼠品系(诸如转基因小鼠模型AGR 129)中进行生殖性复制,所述小鼠品系严重免疫受损并且对复制病毒高度敏感(参见美国专利第6,761,893号)。已描述了此类MVA变体及其衍生物,包括重组体(称为“MVA-BN”) (参见国际PCT公布W02002/042480;另见例如美国专利第6,761,893号和第6,913,752号)。

[0005] 已显示使用编码肿瘤相关抗原(TAA)的痘病毒载体可成功减小肿瘤大小以及提高癌症患者的总体存活率(参见,例如,W0 2014/062778)。已证明,当向癌症患者施用编码TAA(诸如HER2、CEA、MUC1和/或Brachyury)的痘病毒载体时,所述患者会产生强效而特异的T细胞应答以抵抗癌症。(同上;另见Guardino等人((2009) *Cancer Res.*69 (24), doi 10.1158/0008-5472.SABCS-09-5089), Heery等人(2015) *JAMA Oncol.*1:1087-95)。

[0006] 已发现在许多癌症和肿瘤细胞上表达的一种TAA是内源性逆转录病毒(ERV)蛋白。ERV是侵入宿主种系的前外源形式的残留物,自那以后已通过遗传种群垂直传播(参见Bannert等人(2018) *Frontiers in Microbiology*,第9卷,第178条)。已证明ERV诱导的基因组重组事件和正常细胞基因失调对肿瘤形成有促进作用(同上)。此外,有证据表明某些ERV

蛋白具有致癌特性(同上)。已发现ERV在多种癌症中表达,这些癌症包括例如乳腺癌、卵巢癌、黑色素瘤、前列腺癌、胰腺癌和淋巴瘤。(参见,例如,Bannert等人(2018) *Front.Microbiol.* 9:178;Cegolon等人(2013) *BMC Cancer* 13:4;Wang-Johanning等人(2003) *Oncogene* 22:1528-35;Wang-Johanning等人(2007) *Int.J.Cancer* 120:81-90;Wang-Johanning等人(2008) *Cancer Res.* 68:5869-77;Wang-Johanning等人(2018) *Cancer Res.* 78(13增刊),AACR Annual Meeting April 2018,Abstract 1257;Contreras-Galindo等人(2008) *J.Virol.* 82:9329-36;Schiavetti等人(2002) *Cancer Res.* 62:5510-16;Maliniemi等人(2013) *PLoS One* 8:e76281;Fava等人(2017) *Genes Dev.* 31:34-45,Muster等人(2003) *Cancer Res.* 63:8735-41;Buscher等人(2005) *Cancer Res.* 65:4172-80;Serafino等人(2009) *Expt'l.Cell Res.* 315:849-62;Iramaneerat等人(2011) *Int.J.Gynecol.Cancer* 21:51-7;Ishida等人(2006) *Cancer Sci.* 97:1139-46;Goering等人(2011) *Carcinogenesis* 32:1484-92;Agoni等人(2013) *Front.Oncol.* 9:180;Li等人(2017) *J.Mol.Diagn.* 19:4-23)。

[0007] 除了利用TAA的有效性以外,已显示痘病毒(诸如MVA),当与CD40激动剂(诸如CD40配体(CD40L))组合使用时,具有增强的功效(参见WO 2014/037124),或当与4-1BB激动剂(诸如4-1BB配体(4-1BBL))组合使用时,具有增强的功效(Spencer等人(2014) *PLoS One* 9:e105520)。

[0008] CD40/CD40L是肿瘤坏死因子受体/肿瘤坏死因子(“TNFR/TNF”)超家族的成员。尽管CD40在许多细胞类型(包括B细胞、巨噬细胞和DC)上组成性表达,但其配体CD40L主要在激活的CD4+T细胞上表达(Lee等人(2002) *J.Immunol.* 171(11):5707-5717;Ma和Clark(2009) *Semin.Immunol.* 21(5):265-272)。感染或免疫后DC与CD4+T细胞之间的同源相互作用`许可`DC引发CD8+T细胞应答(Ridge等人(1998) *Nature* 393:474-478)。DC许可导致共刺激分子的上调、提高的存活率和更好的DC交叉呈递能力。该过程主要是通过CD40/CD40L相互作用介导的(Bennet等人(1998) *Nature* 393:478-480;Schoenberger等人(1998) *Nature* 393:480-483),但不依赖于CD40/CD40L的机制也存在(CD70,LT.beta.R)。有趣的是,还提出了DC上表达的CD40L与CD8+T细胞上表达的CD40之间的直接相互作用,这为产生辅助细胞非依赖CTL应答提供了可能的解释(Johnson等人(2009) *Immunity* 30:218-227)。

[0009] 4-1BB/4-1BBL是TNFR/TNF超家族的成员。4-1BBL是在激活的B细胞、单核细胞和DC中表达的共刺激配体。4-1BB由自然杀伤(NK)和自然杀伤T(NKT)细胞、Treg和一些先天免疫细胞群(包括DC、单核细胞和嗜中性粒细胞)组成性表达。有趣的是,4-1BB在激活的而非静息的T细胞上表达(Wang等人(2009) *Immunol.Rev.* 229:192-215)。4-1BB连接诱导干扰素 $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )和白介素2(IL-2)的增殖和产生,并通过上调抗凋亡分子(诸如Bcl-xL)来提高T细胞存活率(Snell等人(2011) *Immunol.Rev.* 244:197-217)。重要的是,4-1BB刺激通过增强抗体依赖性细胞毒性(ADCC)来增强NK细胞增殖、IFN- $\gamma$ 产生和细胞溶解活性(Kohrt等人(2011) *Blood* 117:2423-32)。

[0010] 目前正在通过不同的免疫治疗策略探索4-1BB/4-1BBL免疫轴。例如,嵌合抗原受体(CAR)T细胞的自体转移在大B细胞淋巴瘤中显示出临床益处,并于2017年获得FDA批准。用CAR转导患者的自体T细胞,CAR结合了源自肿瘤特异性抗体的细胞外结构域、CD3 $\zeta$ 细胞内信号传导结构域和4-1BB共刺激基序。4-1BB的添加对于CAR T细胞的体内持久性和抗肿瘤

毒性至关重要 (Song等人 (2011) *Cancer Res.* 71:4617e27)。目前正在研究靶向4-1BB的抗体。

[0011] 数项研究表明,靶向4-1BB/4-1BBL途径的激动性抗体在用作单一疗法时显示出抗肿瘤活性 (Palazón等人 (2012) *Cancer Discovery* 2:608-23)。靶向4-1BB的激动性抗体 (Urelumab, BMS; Utolimumab, Pfizer) 目前正在临床开发中。近年来,将4-1BBL与其他疗法相结合的研究显示出了不同程度的成功。例如,当向患有先前存在的MC38 (鼠腺癌) 肿瘤但未患B16黑素瘤肿瘤的小鼠施用抗CTLA-4抗体和抗4-1BB时,观察到CD8+T细胞依赖性肿瘤显著消退,且对这些肿瘤的免疫力持久。在另一个实例中,用抗4-1BB治疗 (Bristol-Myers Squibb (BMS) -469492) 仅使M109肿瘤轻度消退,但显著延迟了EMT6肿瘤的生长。

[0012] 肿瘤微环境由多种细胞类型组成,从免疫细胞浸润物到癌细胞、细胞外基质、内皮细胞和其他影响肿瘤进展的细胞参与者不等。这种复杂且混乱的平衡不仅在患者之间有变化,而且在同一受试者不同病灶内有变化 (Jiménez-Sánchez等人 (2017) *Cell* 170 (5) :927-938)。基于肿瘤浸润淋巴细胞 (TIL) 和程序性死亡配体1 (PD-L1) 表达的肿瘤分层强调了炎症环境对于实现针对癌症的客观应答的重要性 (Teng等人 (2015) *Cancer Res.* 75 (11) :2139-45)。癌症基因组图谱 (TCGA) 的基因表达谱的全癌分析支持肿瘤炎症特征与对免疫疗法的客观应答相关 (Danaher等人 (2018) *J. Immunother. Cancer* 6 (1) :63)。

[0013] 近年来,改善癌症疗法的疫苗施用途径的尝试已经从皮下注射扩展到静脉内施用途径。例如,已证明静脉内施用编码异源抗原的MVA疫苗能够诱导针对该抗原的强特异性免疫应答 (参见WO 2014/037124)。此外,当MVA疫苗包含CD40L时,产生了增强的免疫应答。

[0014] 早已报道过将细菌衍生的材料 (Coley毒素) 接种到肿瘤病灶实现了治愈性应答,突出了局部感染在促进抗肿瘤应答方面的作用 (Coley (1906) *Proc. R. Soc. Med.* 3 (Surg Sect) :1-48)。将病原体相关分子模式 (PAMP)、细菌产物和病毒局部施用到肿瘤病灶中会诱导抗微生物程序,这种程序在施用后会导出一系列事件,包括:i) 分泌促炎性细胞因子如I型、II型和III型干扰素和肿瘤坏死因子 $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ); ii) 危险信号,诸如警报素和热休克蛋白;以及iii) 释放肿瘤抗原 (Aznar等人 (2017) *J. Immunol.* 198:31-39)。将免疫疗法局部施用到肿瘤中可诱导全身免疫应答,因为在未治疗的肿瘤病灶中评估到了消退 ((2018) *Cancer Discov.* 8 (6) :67)。

[0015] 在过去几年中已经报道了MVA疫苗的肿瘤内施用。发现肿瘤内注射表达GM-CSF的MVA以及用DNA疫苗进行免疫延长了携带HPV16 E7肿瘤的小鼠的存活期 (Nemeckova等人 (2007) *Neoplasia* 54:4)。对肿瘤内注射MVA进行的其他研究无法证明可抑制胰腺肿瘤生长 (White等人 (2018) *PLoS One* 13 (2) :e0193131)。肿瘤内注射热灭活的MVA可诱导抗肿瘤免疫应答,这依赖于危险信号的产生, I型干扰素的产生,和树突状细胞的抗原交叉呈递 (Dai等人 (2017) *Sci. Immunol.* 2 (11) :eaal1713)。

[0016] 显然,对其他癌症治疗,包括主动免疫疗法和癌症疫苗的医疗需求仍未得到满足。另外,需要可以在患者的免疫应答的多个区域中诱导增强的免疫应答的疗法。在许多方面,本公开的实施方案通过提供增加和改善当前可用的癌症治疗的疫苗、疗法和组合疗法来满足这些需求。

## 发明内容

[0017] 在本发明的各个实施方案中,已确定编码肿瘤相关抗原(TAA)和4-1BB配体(在本文中也称为41BBL、4-1BBL或CD137L)的重组MVA当肿瘤内或静脉内施用增加癌症患者的治疗的有效性和/或增强癌症患者的治疗。更具体地,已确定本与单独施用重组MVA相比,本公开的各个实施方案使得肿瘤中的炎症增加,肿瘤中的调节性T细胞(Treg)和T细胞耗尽减少,肿瘤特异性T细胞扩增和NK细胞激活,肿瘤体积减小程度增加,和/或癌症受试者的存活率提高。

[0018] 在本发明的各个实施方案中,已确定编码肿瘤相关抗原(TAA)和CD40配体(CD40L)的重组MVA当肿瘤内或静脉内施用增强癌症患者的治疗。更具体地,已确定本与单独施用重组MVA相比,本公开的各个实施方案使得肿瘤中的炎症增加,肿瘤中的调节性T细胞(Treg)和T细胞耗尽减少,肿瘤特异性T细胞扩增和NK细胞激活,肿瘤体积减小程度增加,和/或癌症受试者的存活率提高。

[0019] 在另外的实施方案中,本发明包括重组修饰的安卡拉痘苗(MVA)病毒,所述重组修饰的安卡拉痘苗(MVA)病毒包含编码4-1BBL(CD137L)的核酸和编码CD40L的核酸,所述病毒当肿瘤内或静脉内施用增强癌症患者的治疗。

[0020] 因此,在一个实施方案中,本发明包括一种用于减小患有癌性肿瘤的受试者的肿瘤大小和/或提高患有癌性肿瘤的受试者的存活率的方法,所述方法包括向所述受试者肿瘤内施用重组修饰的安卡拉痘苗(MVA),所述重组修饰的安卡拉痘苗(MVA)包含编码肿瘤相关抗原(TAA)的第一核酸和编码4-1BBL的第二核酸,其中与非肿瘤内注射包含编码TAA和4-1BBL抗原的第一核酸和第二核酸的重组MVA病毒相比,肿瘤内施用所述重组MVA增强所述癌性肿瘤中的炎症应答,增加肿瘤减小程度和/或提高所述受试者的总体存活率。

[0021] 在另一个实施方案中,本发明包括一种用于减小患有癌性肿瘤的受试者的肿瘤大小和/或提高患有癌性肿瘤的受试者的存活率的方法,所述方法包括向所述受试者肿瘤内施用重组修饰的安卡拉痘苗(MVA),所述重组修饰的安卡拉痘苗(MVA)包含编码肿瘤相关抗原(TAA)的第一核酸和编码CD40L的第二核酸,其中与非肿瘤内注射包含编码TAA和CD40L抗原的第一核酸和第二核酸的重组MVA病毒相比,肿瘤内施用所述重组MVA增强所述癌性肿瘤中的炎症应答,增加肿瘤减小程度和/或提高所述受试者的总体存活率。

[0022] 在另一个实施方案中,本发明包括一种用于减小患有癌性肿瘤的受试者的肿瘤大小和/或提高患有癌性肿瘤的受试者的存活率的方法,所述方法包括向所述受试者肿瘤内和/或静脉内施用重组修饰的安卡拉痘苗(MVA),所述重组修饰的安卡拉痘苗(MVA)包含编码肿瘤相关抗原(TAA)的第一核酸、编码CD40L的第二核酸和编码4-1BBL(CD137L)的第三核酸,其中与通过不同注射途径(即,非肿瘤内或非静脉内注射)注射包含编码TAA、CD40L抗原和4-1BBL抗原的第一核酸和第二核酸的重组MVA病毒相比,施用所述重组MVA增强所述癌性肿瘤中的炎症应答,增加肿瘤减小程度和/或提高所述受试者的总体存活率。

[0023] 在另一个实施方案中,本发明包括一种用于减小患有癌性肿瘤的受试者的肿瘤大小和/或提高患有癌性肿瘤的受试者的存活率的方法,所述方法包括向所述受试者静脉内施用重组修饰的安卡拉痘苗(MVA),所述重组修饰的安卡拉痘苗(MVA)包含编码肿瘤相关抗原(TAA)的第一核酸和编码4-1BBL的第二核酸,其中与非静脉内注射包含编码TAA和4-1BBL抗原的第一核酸和第二核酸的重组MVA病毒相比,静脉内施用所述重组MVA增强自然杀伤

(NK) 细胞应答并且增强对所述TAA具有特异性的CD8 T细胞应答。

[0024] 在另一个实施方案中,本发明包括一种用于减小患有癌性肿瘤的受试者的肿瘤大小和/或提高患有癌性肿瘤的受试者的存活率的方法,所述方法包括向所述受试者静脉内施用重组修饰的安卡拉痘苗(MVA),所述重组修饰的安卡拉痘苗(MVA)包含编码肿瘤相关抗原(TAA)的第一核酸和编码CD40L的第二核酸,其中与非静脉内注射包含编码TAA和CD40L抗原的第一核酸和第二核酸的重组MVA病毒相比,静脉内施用所述重组MVA增强自然杀伤(NK)细胞应答并且增强对所述TAA具有特异性的CD8 T细胞应答。

[0025] 在另一个实施方案中,本发明包括一种用于减小患有癌性肿瘤的受试者的肿瘤大小和/或提高患有癌性肿瘤的受试者的存活率的方法,所述方法包括向所述受试者静脉内和/或肿瘤内施用重组修饰的安卡拉痘苗(MVA),所述重组修饰的安卡拉痘苗(MVA)包含编码肿瘤相关抗原(TAA)的第一核酸、编码CD40L的第二核酸和编码4-1BBL的第三核酸,其中与非静脉内或非肿瘤内注射包含编码TAA的第一核酸、编码CD40L抗原的第二核酸和编码4-1BBL抗原第三核酸的重组MVA病毒相比,静脉内和/或肿瘤内施用所述重组MVA增强自然杀伤(NK)细胞应答并且增强对所述TAA具有特异性的CD8 T细胞应答。

[0026] 在另一个实施方案中,本发明包括一种在受试者的癌性肿瘤中诱导增强的炎症应答的方法,所述方法包括向所述受试者肿瘤内施用重组修饰的安卡拉痘苗(MVA),所述重组修饰的安卡拉痘苗(MVA)包含编码第一异源肿瘤相关抗原(TAA)的第一核酸和编码4-1BBL抗原的第二核酸,其中与非肿瘤内注射包含编码异源肿瘤相关抗原和4-1BBL抗原的第一核酸和第二核酸的重组MVA病毒所产生的炎症应答相比,肿瘤内施用所述重组MVA在所述肿瘤中产生增强的炎症应答。

[0027] 在另一个实施方案中,本发明包括一种在受试者的癌性肿瘤中诱导增强的炎症应答的方法,所述方法包括向所述受试者肿瘤内施用重组修饰的安卡拉痘苗(MVA),所述重组修饰的安卡拉痘苗(MVA)包含编码第一异源肿瘤相关抗原(TAA)的第一核酸和编码CD40L抗原的第二核酸,其中与非肿瘤内注射包含编码异源肿瘤相关抗原和CD40L抗原的第一核酸和第二核酸的重组MVA病毒所产生的炎症应答相比,肿瘤内施用所述重组MVA在所述肿瘤中产生增强的炎症应答。

[0028] 在另一个实施方案中,本发明包括一种在受试者的癌性肿瘤中诱导增强的炎症应答的方法,所述方法包括向所述受试者肿瘤内和/或静脉内施用重组修饰的安卡拉痘苗(MVA),所述重组修饰的安卡拉痘苗(MVA)包含编码第一异源肿瘤相关抗原(TAA)的第一核酸、编码CD40L抗原的第二核酸和编码4-1BBL抗原的第三核酸,其中与非肿瘤内或非静脉内注射包含编码异源肿瘤相关抗原的第一核酸、编码CD40L抗原的第二核酸和编码4-1BBL抗原的第三核酸的重组MVA病毒所产生的炎症应答相比,肿瘤内和/或静脉内施用所述重组MVA在所述肿瘤中产生增强的炎症应答。

[0029] 在各个另外的实施方案中,本发明提供了一种用于治疗患有癌症的受试者的重组修饰的安卡拉痘苗(MVA),所述重组MVA包含:a) 编码肿瘤相关抗原(TAA)的第一核酸和b) 编码4-1BBL的第二核酸。

[0030] 在各个另外的实施方案中,本发明包括一种用于治疗患有癌症的受试者的重组修饰的安卡拉痘苗(MVA),所述重组MVA包含:a) 编码肿瘤相关抗原(TAA)的第一核酸和b) 编码CD40L的第二核酸。

[0031] 在各个另外的实施方案中,本发明包括一种用于治疗患有癌症的受试者的重组修饰的安卡拉痘苗(MVA),所述重组MVA包含:a)编码肿瘤相关抗原(TAA)的第一核酸;b)编码CD40L的第二核酸;和c)编码4-1BBL的第三核酸。

[0032] 在另一个实施方案中,编码4-1BBL抗原的重组MVA,当肿瘤内施用至患者并与检查点抑制剂拮抗剂结合施用时,增强对癌症患者的治疗,更特别地,增加肿瘤体积减小程度和/或提高癌症患者的存活率。

[0033] 在另一个实施方案中,编码CD40L抗原的重组MVA,当肿瘤内施用至患者并与检查点抑制剂拮抗剂结合施用时,增强对癌症患者的治疗,更特别地,增加肿瘤体积减小程度和/或提高癌症患者的存活率。

[0034] 在另一个实施方案中,编码CD40L和4-1BBL抗原的重组MVA,当肿瘤内和/或静脉内施用至患者并与检查点抑制剂拮抗剂结合施用时,增强对癌症患者的治疗,更特别地,增加肿瘤体积减小程度和/或提高癌症患者的存活率。

[0035] 在另一个实施方案中,本发明的重组MVA与抗体施用同时施用或在抗体施用之后施用。在更优选的实施方案中,重组MVA在抗体之后施用。

[0036] 在另一个实施方案中,本发明的重组MVA通过一种或多种相同的施用途径与抗体施用同时施用或在抗体施用之后施用。在另一个实施方案中,重组MVA通过一种或多种不同的施用途径施用或在抗体施用之后施用。

[0037] 在另一个实施方案中,本发明包括一种用于在癌症患者中增强抗体疗法的方法,所述方法包括向癌症患者施用本发明的药物组合,其中与单独施用抗体疗法相比,施用所述药物组合增强由抗体疗法诱导的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)。

[0038] 在优选的实施方案中,所述第一核酸编码TAA,所述TAA为内源性逆转录病毒(ERV)蛋白。在更优选的实施方案中,所述ERV蛋白来自人内源性逆转录病毒蛋白K(HERV-K)家族。在更优选的实施方案中,所述ERV蛋白选自HERV-K包膜蛋白和HERV-K gag蛋白。

[0039] 在优选的实施方案中,所述第一核酸编码TAA,所述TAA为内源性逆转录病毒(ERV)肽。在更优选的实施方案中,所述ERV肽来自人内源性逆转录病毒蛋白K(HERV-K)家族。在更优选的实施方案中,所述ERV肽选自HERV-K包膜蛋白(HERV-K-MEL)的假基因。

[0040] 在其他优选的实施方案中,所述第一核酸编码选自由以下组成的组的TAA:癌胚抗原(CEA)、细胞表面相关的粘蛋白1(MUC-1)、前列腺酸性磷酸酶(PAP)、前列腺特异性抗原(PSA)、人表皮生长因子受体2(HER-2)、存活素、酪氨酸相关蛋白1(TRP1)、酪氨酸相关蛋白1(TRP2)、Brachyury、优先在黑素瘤中表达的抗原(PRAME)、叶酸受体1(FOLR1)以及它们的组合。

[0041] 在一个或多个优选的实施方案中,所述重组MVA是MVA-BN或其衍生物。

[0042] 在各个另外的实施方案中,将本文所述的重组MVA和方法与免疫检查点分子拮抗剂或激动剂组合施用至癌症受试者。在另外的实施方案中,将本文所述的重组MVA和方法与对TAA具有特异性的抗体组合施用至癌症受试者,以治疗患有癌症的受试者。在更优选的实施方案中,将本文所述的重组MVA和方法与选自CTLA-4、PD-1、PD-L1、LAG-3、TIM-3和ICOS的免疫检查点分子拮抗剂或激动剂组合施用。在最优选的实施方案中,所述免疫检查点分子拮抗剂或激动剂包含抗体。在最优选的实施方案中,所述免疫检查点分子拮抗剂或激动剂包含PD-1或PD-L1抗体。

[0043] 本发明的另外的目的和有利方面将在下面的描述中部分地阐述,并且部分地从描述中将变得显而易见,或者可以通过本发明的实施而获知。本发明的目的和优势将通过所附权利要求中特别指出的要素和组合来实现和获得。

[0044] 并入本说明书中并构成本说明书一部分的附图说明了本发明的一个或多个实施方案,并且与说明书一起用于解释本发明的原理。

## 附图说明

[0045] 图1A、图1B、图1C和图1D说明,MVA-OVA-4-1BBL感染的肿瘤细胞的4-1BBL介导的CD8<sup>+</sup> T细胞共刺激影响细胞因子产生而无需DC。相比之下,MVA-OVA-CD40L仅在存在DC的情况下增强细胞因子产生。如实施例2所述,将来自C57BL/6小鼠的骨髓细胞在存在重组Flt3L的情况下培养14天之后,产生了树突状细胞(DC)。用MVA-OVA、MVA-OVA-CD40L或MVA-OVA-4-1BBL感染B16.F10细胞,收集感染的肿瘤细胞,并且在指示时在存在DC的情况下进行共培养。从OT-I小鼠磁纯化出幼稚OVA(257-264)特异性CD8<sup>+</sup>T细胞,并添加至共培养物中。培养细胞,收集上清液用于通过Luminex进行细胞因子浓度分析。示出上清液浓度:IL-6(图1A);GM-CSF(图1B);IL-2(图1C);和IFN- $\gamma$ (图1D)。数据显示为平均值 $\pm$ SEM。

[0046] 图2A和图2B显示,MVA-OVA-4-1BBL感染的肿瘤细胞直接(即,无需DC)驱动抗原特异性CD8<sup>+</sup> T细胞分化成激活的效应T细胞,而CD40L介导的MVA-OVA-CD40L感染的肿瘤细胞的共刺激依赖于DC的存在。如实施例3所述,将来自C57BL/6小鼠的骨髓细胞在存在重组Flt3L的情况下培养14天之后,产生了树突状细胞(DC)。用MVA-OVA、MVA-OVA-CD40L或MVA-OVA-4-1BBL感染B16.F10(黑素瘤模型)细胞。第二天,收获被感染的肿瘤细胞并在存在DC的情况下共培养(当指示时)。从OT-I小鼠磁纯化出幼稚OVA(257-264)特异性CD8<sup>+</sup>T细胞,并以1:5的比例添加至共培养物中。将细胞在37 $^{\circ}$ C 5%CO<sub>2</sub>下培养48小时。然后对细胞进行染色并通过流式细胞术进行分析。图2A示出了OT-I CD8<sup>+</sup>T细胞上T-bet的GMFI(在图中表示为“CD8<sup>+</sup>”);图2B示出了OT-I CD8<sup>+</sup>T细胞的CD44<sup>+</sup>粒酶B+IFN $\gamma$ +TNF $\alpha$ 的百分比。数据显示为平均值 $\pm$ SEM。

[0047] 图3A、图3B、图3C、图3D和图3E说明,用编码CD40L或4-1BBL的MVA感染在肿瘤细胞系和巨噬细胞中诱导肿瘤细胞死亡。如实施例4所述,将肿瘤细胞系B16.OVA(图3A和图3B)、MC38(图3C)和B16.F10(图3D)用载体以指示的MOI感染20小时。通过流式细胞术分析细胞的活力;图3A、图3C、图3D和图3E示出了死细胞的百分比(“活细胞/死细胞<sup>+</sup>”)。图3B:通过ELISA对图3A中的上清液中的HMGB1进行定量。图3E:将骨髓来源的巨噬细胞(BMDM)以指示的MOI感染20小时。通过流式细胞术分析细胞的活力。数据表示为平均值 $\pm$ SEM。

[0048] 图4A和图4B显示,rMVA-4-1BBL在体内诱导NK细胞激活。如实施例5所述,给C57BL/6小鼠(n=5/组)静脉内免疫接种盐水或 $5 \times 10^7$  TCID<sub>50</sub>“rMVA”(=MVA-OVA)、“rMVA-4-1BBL”(=MVA-OVA-4-1BBL)或 $5 \times 10^7$  TCID<sub>50</sub> rMVA与200 $\mu$ g抗4-1BBL抗体的组合(克隆TKS-1)。24小时后,处死小鼠并处理脾脏供流式细胞术分析用。示出了CD69(A)和CD70(B)的几何平均荧光强度(GMFI)。数据显示为平均值 $\pm$ SEM。

[0049] 图5A和图5B显示,静脉内rMVA-4-1BBL免疫在体内促进血清IFN- $\gamma$ 分泌。如实施例6所述,给C57BL/6小鼠(n=5/组)静脉内免疫接种盐水或 $5 \times 10^7$  TCID<sub>50</sub>“rMVA”(=MVA-OVA)、“rMVA-4-1BBL”(=MVA-OVA-4-1BBL)或 $5 \times 10^7$  TCID<sub>50</sub> rMVA与200 $\mu$ g抗4-1BBL抗体的

组合(克隆TKS-1)。图5A:6小时后,取小鼠血液,从全血分离血清并通过Luminex测定血清中的IFN- $\gamma$ 浓度。图5B:3、21和45小时后,向小鼠静脉内注射布雷菲德菌素A以终止蛋白质分泌。免疫后6、24和48小时处死小鼠,并通过流式细胞术分析脾细胞。数据显示为平均值 $\pm$ SEM。

[0050] 图6显示,静脉内“rMVA-4-1BBL”(=MVA-OVA-4-1BBL)免疫促进携带B16.OVA肿瘤的小鼠的血清IFN- $\gamma$ 分泌。如实施例7所述,将携带B16.OVA肿瘤的C57BL/6小鼠( $n=5$ /组)分组,并在肿瘤接种后第7天接受i.v.(静脉内)PBS或 $5 \times 10^7$  TCID50 rMVA(=MVA-OVA)或rMVA-4-1BBL。6小时后,取小鼠血液,从全血分离血清并通过Luminex测定血清中的IFN- $\gamma$ 浓度。数据显示为平均值 $\pm$ SEM。

[0051] 图7A、图7B、图7C和图7D示出了静脉内“rMVA-4-1BBL”(=MVA-OVA-4-1BBL)初免和加强免疫后的抗原和载体特异性CD8+T细胞扩增。如实施例8所述,C57BL/6小鼠( $n=4$ /组)在第0天接受盐水或 $5 \times 10^7$  TCID50“rMVA”(=MVA-OVA)、rMVA-4-1BBL或 $5 \times 10^7$ TCID50 rMVA与200 $\mu$ g抗4-1BBL抗体的组合(克隆TKS-1)的静脉内初免,并且在第41天接受加强免疫。在初次免疫后第6、21、35、48、64天取小鼠血液,并通过流式细胞术分析外周血。图7A示出了外周血白细胞(PBL)中抗原(OVA)特异性CD8+T细胞的百分比;图7B示出了PBL中载体(B8R)特异性CD8+T细胞的百分比。在初次免疫后第70天将小鼠处死。收集脾脏并进行流式细胞术分析。图7C示出了活细胞中抗原(OVA)特异性CD8+T细胞的百分比;并且图7D示出了活细胞中载体(B8R)特异性CD8+T细胞的百分比。数据显示为平均值 $\pm$ SEM。

[0052] 图8示出了与不含4-1BBL的重组MVA相比,静脉内注射编码4-1BBL的MVA病毒的增强的抗肿瘤效应。如实施例9所述,将携带B16.OVA肿瘤的C57BL/6小鼠( $n=5$ /组)分组,并在肿瘤接种后第7天(黑色点线)静脉内施用PBS或 $5 \times 10^7$  TCID50 MVA-OVA(图中的“rMVA”)或MVA-OVA-4-1BBL(图中的“rMVA-4-1BBL”)。定期测量肿瘤生长。

[0053] 图9A、图9B、图9C和图9D示出了肿瘤内注射编码4-1BBL或CD40L的MVA病毒的增强的抗肿瘤效应。如实施例10所述,将携带B16.OVA肿瘤的C57BL/6小鼠( $n=4-5$ /组)分组,并在肿瘤接种后第7天(黑色点线)、第12天和第15天(灰色虚线)肿瘤内施用PBS或 $5 \times 10^7$ TCID50 MVA-OVA(图中标示为“rMVA”)、MVA-OVA-CD40L(图中标示为“rMVA-CD40L”)或MVA-OVA-4-1BBL(图中标示为“rMVA-4-1BBL”)。定期测量肿瘤生长。

[0054] 图10A、图10B和图10C示出了肿瘤内注射编码CD40L的MVA病毒针对已确立结肠癌的抗肿瘤效应。如实施例11所述,将携带MC38肿瘤的C57BL/6小鼠( $n=5$ /组)分组,并在肿瘤接种后第14天(黑色点线)、第19天和第22天(黑色虚线)肿瘤内(i.t.)施用PBS或 $5 \times 10^7$ TCID50 MVA-TAA(图中标示为“rMVA”)或MVA-TAA-CD40L(图中标示为“rMVA-CD40L”)。定期测量肿瘤生长。在这些实验中,由重组MVA编码的TAA包含抗原AH1A5、p15E和TRP2。

[0055] 图11说明,检查点阻断物和靶向肿瘤的抗体与肿瘤内(i.t.)rMVA-4-1BBL(在本文中也称“MVA-OVA-4-1BBL”)施用协同作用。如实施例12所述,将携带B16.OVA肿瘤的C57BL/6小鼠( $n=5$ /组)分组,并在指示时(标记)腹膜内接受200 $\mu$ g IgG2a、抗TRP-1或抗PD-1。在肿瘤接种后第13天(黑色点线)、第18天和第21天(灰色虚线)给小鼠肿瘤内(i.t.)免疫接种PBS或 $5 \times 10^7$  TCID50 MVA-OVA-4-1BBL。定期测量肿瘤生长。

[0056] 图12说明,与抗CD137抗体治疗相比,肿瘤内MVA-OVA-4-1BBL注射产生优异的抗肿瘤效应。如实施例13所述,C57BL/6小鼠s.c.皮下接受 $5 \times 10^5$  B16.OVA细胞。7天后,当测得肿

瘤超过5x5mm时,将小鼠分组并肿瘤内注射PBS、 $5 \times 10^7$  TCID50MVA-OVA-4-1BBL或10 $\mu$ g抗4-1BB(3H3)抗体。定期测量肿瘤生长。在图12A中,示出了肿瘤平均体积。图12B:在初免后第12天,外周血淋巴细胞用OVA-dextramer染色并通过FACS进行分析。示出了CD8+T细胞中OVA-dextramer+CD44+T细胞的百分比。

[0057] 图13示出了静脉内注射编码内源性逆转录病毒抗原Gp70的MVA病毒的抗肿瘤效应。如实施例14所述,Balb/c小鼠s.c.皮下接受 $5 \times 10^5$  CT26.wt细胞。当测得肿瘤超过5x5mm时,将携带CT26.wt肿瘤的小鼠(n=5/组)分组,并在肿瘤接种后第12天接受i.v.(静脉内)PBS或 $5 \times 10^7$  TCID50 MVA、rMVA-Gp70或rMVA-Gp70-CD40L。定期测量肿瘤生长。示出了肿瘤平均直径(图13A)和肿瘤平均体积(图13B)。图13C:免疫后7天,再刺激血细胞,示出了刺激后血液中CD8+CD44+IFN- $\gamma$ +细胞的百分比。

[0058] 图14示出了静脉内注射编码内源性逆转录病毒抗原Gp70加CD40L的MVA病毒的抗肿瘤效应。如实施例15所述,C57BL/6小鼠s.c.皮下接受 $5 \times 10^5$  B16.F10细胞。7天后,当测得肿瘤超过5x5mm时,将携带B16.F10肿瘤的C57BL/6小鼠(n=5/组)分组,并接受i.v.(静脉内)PBS或 $5 \times 10^7$  TCID50 MVA、rMVA-Gp70或rMVA-Gp70-CD40L。定期测量肿瘤生长。示出了免疫后7天用p15e肽刺激后的肿瘤平均体积(图14A)和血液中的CD8+CD44+IFN- $\gamma$ +细胞的百分比(图14B)。

[0059] 图15:4-1BBL辅佐可以增强针对IT免疫的细胞因子/趋化因子MVA-BN骨架应答本文中所谓“辅佐”是指重组MVA的特定编码蛋白或组分增强了由重组MVA的其他一种或多种编码蛋白或组分产生的免疫应答。在此,将 $5 \times 10^5$ B16.OVA细胞皮下(s.c.)植入C57BL/6小鼠中(参见实施例23)。在第10天,给小鼠肿瘤内(i.t.)免疫接种PBS或 $2 \times 10^8$ TCID50 MVA-BN、MVA-OVA或MVA-OVA-4-1BBL(n=6只小鼠/组)。6小时后,提取肿瘤并处理肿瘤裂解液。通过Luminex分析细胞因子/趋化因子谱。图15显示在免疫小鼠中细胞因子/趋化因子被上调。

[0060] 图16:MVA-OVA-4-1BBL增强了针对肿瘤内(i.t.)免疫的细胞因子/趋化因子促炎应答。将 $5 \times 10^5$ B16.OVA细胞皮下(s.c.)植入C57BL/6小鼠中(参见实施例23和实施例24)。在第10天,给小鼠肿瘤内(i.t.)免疫接种PBS或 $2 \times 10^8$ TCID50 MVA-BN、MVA-OVA或MVA-OVA-4-1BBL(n=6只小鼠/组)。6小时后,提取肿瘤并处理肿瘤裂解液。通过Luminex分析细胞因子/趋化因子谱。图16显示,与MVA-BN相比,在MVA-OVA-4-1BBL免疫的小鼠中那些细胞因子/趋化因子被上调。

[0061] 图17:肿瘤内注射MVA-OVA-4-1BBL后对肿瘤微环境(TME)和肿瘤引流淋巴结(TdLN)进行的定量和定性T细胞分析。C57BL/6小鼠皮下(s.c.)接受 $5 \times 10^5$  B16.OVA细胞。9至13天后,当测得肿瘤超过5x5mm时,将小鼠分组并肿瘤内注射PBS、 $2 \times 10^8$  TCID50MVA-OVA或MVA-OVA-4-1BBL(参见实施例25)。免疫后1、3和7天,将小鼠处死,用胶原酶/DNA酶消化肿瘤以及肿瘤引流淋巴结(TdLN),并通过流式细胞术进行分析。示出了每mg肿瘤和每TdLN的CD45+细胞、CD8+T细胞、CD4+T细胞和OVA特异性CD8+T细胞的数量。

[0062] 图18:肿瘤内注射MVA-OVA-4-1BBL后对TME和引流LN进行的定量和定性T细胞分析。C57BL/6小鼠皮下(s.c.)接受 $5 \times 10^5$ B16.OVA细胞。9至13天后,当测得肿瘤超过5.5x5.5mm时,将小鼠分组并肿瘤内注射PBS或 $2 \times 10^8$  TCID50 MVA-OVA或MVA-OVA-4-1BBL(参见实施例26)。免疫后1、3和7天,将小鼠处死,用胶原酶/DNA酶消化肿瘤以及TdLN(肿瘤引流淋巴结),并通过流式细胞术进行分析。图18A:示出了肿瘤(左图)和TdLN(右图)中OVA特异性CD8+T细

胞中Ki67+细胞的百分比。图18B:示出了i.t.免疫后7天肿瘤中OVA特异性CD8+T细胞中PD1的GMFI。图18C:示出了i.t.免疫7天后肿瘤中的OVA特异性Teff/Treg比率。

[0063] 图19:肿瘤内注射MVA-OVA-4-1BBL后对TME和肿瘤引流淋巴结(TdLN)进行的定量和定性NK细胞分析。C57BL/6小鼠皮下(s.c.)接受 $5 \times 10^5$  B16.OVA细胞。9至13天后,当测得肿瘤超过 $5.5 \times 5.5$ mm时,将小鼠分组并肿瘤内注射PBS或 $2 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub> MVA-OVA或MVA-OVA-4-1BBL(参见实施例27)。免疫后1、3和7天,将小鼠处死,用胶原酶/DNA酶消化肿瘤以及肿瘤引流淋巴结(TdLN),并通过流式细胞术进行分析。示出了每mg肿瘤和每TdLN的NK细胞数量以及肿瘤和TdLN中NK细胞的CD69、粒酶B和Ki67表面标志物的GMFI。

[0064] 图20:MVA-OVA-4-1BBL介导的抗肿瘤效应的CD8 T细胞依赖性。C57BL/6小鼠皮下(s.c.)接受 $5 \times 10^5$  B16.OVA细胞。7天后,将小鼠分组并肿瘤内注射PBS或 $2 \times 10^8$ TCID<sub>50</sub> MVA-OVA-4-1BBL(参见实施例28)。在第一次注射后第5天和第8天,重复这些肿瘤内(i.t.)注射(竖直虚线)。另外,在第一次免疫前第-1天和之后第1、4、7、11天静脉内(i.p.)注射IgG2b同种型对照抗体(左图和中图)或抗CD8抗体(2.43;右图)(100 $\mu$ g/老鼠)。定期测量肿瘤生长,并示出肿瘤平均直径。

[0065] 图21:MVA-OVA和MVA-OVA-4-1BBL介导的抗肿瘤效应的Batf3+DC依赖性C57BL/6小鼠或Batf3<sup>-/-</sup>小鼠皮下(s.c.)接受 $5 \times 10^5$ B16.OVA细胞。7天后(竖直虚线),将小鼠分组并肿瘤内注射PBS或 $2 \times 10^8$ TCID<sub>50</sub> MVA、MVA-OVA或MVA-OVA-4-1BBL(参见实施例29)。在第一次肿瘤内注射后第5天和第8天,重复i.t.注射(竖直虚线)。定期测量肿瘤生长。图21A:示出了肿瘤平均直径。图21B:在第一次免疫后11天,抽取血液并分析抗原特异性T细胞(即, OVA<sub>257-264</sub>特异性T细胞)的存在。示出了CD8+T细胞中OVA特异性T细胞的百分比。

[0066] 图22:NK细胞在携带B16.OVA黑素瘤的小鼠中肿瘤内施用MVA-OVA-4-1BBL中的作用。C57BL/6或IL15R $\alpha$ <sup>-/-</sup>小鼠皮下(s.c.)接受 $5 \times 10^5$  B16.OVA细胞。7天后,将小鼠分组并肿瘤内注射PBS或 $2 \times 10^8$ TCID<sub>50</sub> MVA-OVA或MVA-OVA-4-1BBL(参见实施例30)。在第一次注射后第5天和第8天重复治疗。定期测量肿瘤生长。示出了肿瘤平均直径(图22A)和存活率百分比(图22B)。在第一次免疫后11天,抽取血液并分析抗原特异性T细胞的存在(图22C)。示出了CD8+T细胞中OVA<sub>257-264</sub>-dextramer+(SIINFEKL+) CD44+T细胞的百分比。

[0067] 图23示出了响应于IT MVA-OVA-4-1BBL免疫的NK细胞依赖性细胞因子/趋化因子谱。将 $5 \times 10^5$ B16.OVA细胞皮下(s.c.)植入C57BL/6和IL15R $\alpha$ <sup>-/-</sup>小鼠中(参见实施例31)。在第7天,给小鼠肿瘤内(i.t.)免疫接种PBS或 $2 \times 10^8$ TCID<sub>50</sub> MVA-OVA或MVA-OVA-4-1BBL(n=2-3只小鼠/组)。6小时后,提取肿瘤并处理肿瘤裂解液。通过Luminex分析细胞因子/趋化因子谱。图23示出了在不存在IL15R $\alpha$ 的情况下在MVA-OVA-4-1BBL肿瘤内(i.t.)免疫后减少的那些细胞因子/趋化因子。

[0068] 图24示出了在携带B16.F10黑素瘤的小鼠中,肿瘤内MVA-gp70-CD40L免疫相比MVA-gp70-4-1BBL的抗肿瘤功效。C57BL/6小鼠皮下(s.c.)接受 $5 \times 10^5$  B16.F10细胞。7天后,将小鼠分组并肿瘤内注射PBS或 $5 \times 10^7$ TCID<sub>50</sub> MVA-gp70、MVA-gp70-4-1BBL、MVA-gp70-CD40L、MVA-4-1BBL或MVA-CD40L(参见实施例32)。在第一次注射后第5天和第8天重复治疗。定期测量肿瘤生长。图24A示出了肿瘤平均直径,并且图24B示出了用MVA-gp70-4-1BBL治疗的小鼠中的白癜风外观。在第一次免疫后11天,抽取血液并分析抗原特异性T细胞的存在。图24C示出了p15E再刺激后CD8+T细胞中产生IFN $\gamma$ 的CD44+T细胞的百分比。

[0069] 图25:携带B16.F10黑素瘤的小鼠中肿瘤内MVA-gp70-4-1BBL-CD40L施用的抗肿瘤功效。C57BL/6小鼠皮下(s.c.)接受 $5 \times 10^5$  B16.F10细胞。7天后,将小鼠分组并肿瘤内注射PBS或 $5 \times 10^7$  TCID<sub>50</sub>:MVA-gp70、MVA-gp70-4-1BBL、MVA-gp70-CD40L、MVA-gp70-4-1BBL-CD40L、MVA-4-1BBL、MVA-CD40L或MVA-4-1BBL-CD40L(参见实施例33)。在第一次注射后第5天和第8天重复治疗。定期测量肿瘤生长。图25A示出了肿瘤平均直径。在第一次免疫后11天,抽取血液并用p15e肽再刺激。图25B示出了CD8<sup>+</sup>T细胞中IFN $\gamma$ +CD44<sup>+</sup>T细胞的百分比。

[0070] 图26:携带CT26肿瘤的小鼠中MVA-gp70佐以CD40L或4-1BBL的抗肿瘤功效。Ba1b/c小鼠皮下(s.c.)接受 $5 \times 10^5$  Ct26wt细胞。13天后,将小鼠分组并肿瘤内注射PBS或 $5 \times 10^7$  TCID<sub>50</sub>:MVA-gp70、MVA-gp70-4-1BBL、MVA-gp70-CD40L、MVA-gp70-4-1BBL-CD40L、MVA-4-1BBL、MVA-CD40L和MVA-4-1BBL-CD40L(参见实施例34)。在第一次注射后第5天和第8天重复治疗。定期测量肿瘤生长。图26A示出了肿瘤平均直径,并且图26B示出了存活率百分率。图26C:在第一次免疫后11天,抽取血液并用AH1肽再刺激;示出了CD8<sup>+</sup>T细胞中IFN $\gamma$ +CD44<sup>+</sup>T细胞的百分比。

[0071] 图27:肿瘤内注射还包含4-1BBL和/或CD40L的MVA-gp70后对肿瘤微环境(TME)和肿瘤引流淋巴结(TdLN)进行的定量和定性T细胞分析。C57BL/6小鼠皮下(s.c.)接受 $5 \times 10^5$  B16.F10细胞。9天后,当测得肿瘤超过5x5mm时,将小鼠分组并肿瘤内注射PBS或 $5 \times 10^7$ TCID<sub>50</sub> MVA-gp70、MVA-gp70-4-1BBL、MVA-gp70-CD40L或MVA-gp70-4-1BBL-CD40L(参见实施例35)。免疫后3天,将小鼠处死,收集肿瘤以及肿瘤引流淋巴结(TdLN),用胶原酶/DNA酶消化,并通过流式细胞术进行分析。图27示出了每mg肿瘤和每TdLN的CD8<sup>+</sup>T细胞、p15E特异性CD8<sup>+</sup>T细胞和Ki67<sup>+</sup>p15E特异性CD8<sup>+</sup>T细胞的数量。数据表示平均值 $\pm$ SEM。

[0072] 图28示出了肿瘤内注射还表达4-1BBL和/或CD40L的MVA-gp70后对肿瘤微环境(TME)和肿瘤引流淋巴结(TdLN)进行的定量和定性T细胞分析。C57BL/6小鼠皮下(s.c.)接受 $5 \times 10^5$  B16.F10细胞(参见实施例36)。9天后,当测得肿瘤超过5.5x5.5mm时,将小鼠分组并肿瘤内注射PBS或 $5 \times 10^7$  TCID<sub>50</sub>:MVA-Gp70、MVA-gp70-4-1BBL、MVA-gp70-CD40L和MVA-gp70-4-1BBL-CD40L。在免疫后3天,将小鼠处死,收集肿瘤以及TdLN并用胶原酶/DNA酶消化,并通过流式细胞术分析所得单个细胞。示出了每mg肿瘤和每TdLN的NK细胞、Ki67<sup>+</sup>NK细胞和粒酶B<sup>+</sup>NK细胞的数量。数据显示为平均值 $\pm$ SEM。

[0073] 图29:携带CT26.WT肿瘤的小鼠中静脉内施用MVA-gp70佐以4-1BBL和/或CD40L的抗肿瘤功效。Ba1b/c小鼠皮下(s.c.)接受 $5 \times 10^5$ CT26.WT细胞。12天后,将小鼠分组并肿瘤内注射PBS或 $5 \times 10^7$ TCID<sub>50</sub> MVA-Gp70、MVA-Gp70-4-1BBL、MVA-Gp70-CD40L、MVA-Gp70-4-1BBL-CD40L和MVA-4-1BBL-CD40L(参见实施例37)。图29A示出了肿瘤平均直径,并且图29B示出了存活率百分率。在第一次免疫后7天,抽取血液并用AH1肽再刺激;图29C示出了CD8<sup>+</sup>T细胞中IFN $\gamma$ +CD44<sup>+</sup>T细胞的百分比,显示为平均值 $\pm$ SEM。

### 具体实施方式

[0074] 应当理解,以上概述和以下详述都仅是示例性和解释性的,并且不限制要求保护的本发明。

[0075] 如本申请中所描述和说明的,本发明的重组MVA和方法增强了癌症患者的免疫应答的多个方面。在各个方面,本发明证明,当将包含肿瘤相关抗原(TAA)和4-1BBL抗原的重

组MVA肿瘤内或静脉内施用至癌症受试者时,在所述受试者中实现了增加的抗肿瘤效应。如本文中更详细地描述的,这种增加的抗肿瘤效应包括更大的肿瘤体积减小,增大的总体存活率,增强的对TAA的CD8 T细胞应答以及增强的炎性应答(诸如增加的NK细胞活性),细胞因子产生增加等等。

[0076] 如本申请中所描述和说明的,本发明的重组MVA和方法增强了癌症患者的免疫应答的多个方面。在各个方面,本发明证明了当将包含肿瘤相关抗原(TAA)和CD40L抗原的重组MVA肿瘤内或静脉内施用至癌症受试者时,在所述受试者中实现了增加的抗肿瘤效应。如本文中更详细地描述的,这种增加的抗肿瘤效应包括更大的肿瘤体积减小,增大的总体存活率,增强的对TAA的CD8 T细胞应答以及增强的炎性应答(诸如增加的NK细胞活性),细胞因子产生增加等等。

[0077] 在另外的方面,本发明的各个实施方案证明,当将包含肿瘤相关抗原(TAA)和4-1BBL抗原的重组MVA与至少一种免疫检查点分子拮抗剂/激动剂组合肿瘤内施用,癌症受试者的肿瘤减小增加且总体存活率增大。

[0078] 在另外的方面,本发明的各个实施方案证明,当将包含肿瘤相关抗原(TAA)和4-1BBL抗原的重组MVA与肿瘤特异性抗体组合肿瘤内施用,癌症受试者的肿瘤减小增加且总体存活率增大。

[0079] 尽管重组MVA病毒先前已经编码了4-1BBL抗原,但是尚不清楚编码4-1BBL的MVA的免疫原性益处(参见,例如,Spencer等人(2014) PLoS One 9(8):e105520)。在Spencer中,在MVA载体或腺病毒载体中共表达4-1BBL和转基因抗原导致小鼠CD8 T细胞应答增加;但是,在肌肉内施用编码4-1BBL的腺病毒载体后,在非人灵长类动物中未见到任何IFN- $\gamma$  应答增加(同上,第2页、第6页)。此外,利用编码4-1BBL的MVA作为治疗癌症和破坏肿瘤和/或肿瘤细胞的一部分的免疫原性益处是未知的。

[0080] 本公开的各个实施方案证明,编码4-1BBL和TAA的MVA(在本文中称为MVA-TAA-4-1BBL)可以有效治疗受试者诸如人类的癌症。如本文中所显示和描述的,施用MVA-TAA-4-1BBL可以增强癌症受试者的免疫应答的多个方面,并且可以有效地减少和杀死肿瘤细胞。本公开的各个实施方案的一种或多种增强的抗肿瘤效应总结如下。

[0081] 静脉内施用编码4-1BBL的重组MVA产生了增强的抗肿瘤效应。在至少一个方面,本发明包括静脉内施用的编码TAA和4-1BBL抗原的重组MVA(rMVA-TAA-4-1BBL),其中与静脉内施用不含4-1BBL的重组MVA相比,或与非静脉内施用编码4-1BBL的重组MVA(例如,皮下施用编码4-1BBL的重组MVA)相比,静脉内施用增强了抗肿瘤效应。这些增强的抗肿瘤效应包括增强的NK细胞应答(如图4所示),增强的炎症应答(如IFN- $\gamma$  分泌增加所示)(如图5和图6所示),增加的抗原和载体特异性CD8 T细胞扩增(如图7所示),以及增加的肿瘤减小(如图8所示)。

[0082] 肿瘤内施用编码4-1BBL的重组MVA增强了肿瘤的炎症。在本发明的另一方面,确定在不存在抗原交叉呈递DC的情况下,用MVA-OVA-4-1BBL而不是用MVA-OVA-CD40L感染肿瘤细胞使抗原特异性CD8+T细胞激活而产生T细胞衍生的细胞因子,诸如GM-CSF、IL-2和IFN- $\gamma$  (图1A至图1D)。就GM-CSF而言,这是出乎意料的,GM-CSF是由幼稚的T细胞在激活时产生的诱导树突状细胞和髓样细胞亚群成熟的生长因子(Min等人(2010) J. Immunol. 184:4625-4629)。在存在抗原交叉呈递DC的情况下,被rMVA-CD40L感染的肿瘤细胞刺激的抗原特异性

CD8+T细胞产生IFN- $\gamma$ ，但在rMVA-4-1BBL情况下未产生IL-2或GM-CSF(图1A至图1D)。有趣的是，检测到了大量的IL-6(由DC产生的关键细胞因子)(图1A)。

[0083] 在一个有利的方面，肿瘤中炎症的增强可使得有大量TIL(肿瘤浸润淋巴细胞)杀死肿瘤部位的肿瘤细胞(参见，例如，Lanitis等人(2017) *Annals Oncol.* 28(增刊12): xii18-xii32)。鉴于TIL、细胞因子和其他炎性分子的数量增加，这些发炎的肿瘤(也称为“热”肿瘤)使肿瘤细胞破坏增强。

[0084] 肿瘤内施用编码4-1BBL的重组MVA减小了肿瘤体积并提高了总体存活率。在一个方面，本发明包括肿瘤内施用的编码4-1BBL抗原的重组MVA(MVA-4-1BBL)，其中与肿瘤内施用不含4-1BBL的重组MVA相比，所述肿瘤内施用增强了癌症受试者中的抗肿瘤效应。

[0085] 尽管先前在肿瘤内施用过重组MVA病毒(参见例如White等人(2018) *PLoS One* 13: e0193131和Nemeckova等人(2007) *Neoplasma* 54:326-33)，但这些研究产生了不同的结果。例如，在Nemeckova中，发现肿瘤内注射表达GM-CSF的MVA以及用DNA疫苗进行免疫延长了携带HPV16诱导的肿瘤的小鼠的存活期(参见Nemeckova的文摘)。另外，White等人在肿瘤内注射MVA后，无法证明对胰腺肿瘤生长有抑制作用(参见White的文摘)。

[0086] 作为本公开的一部分，将包含一种或多种编码TAA和4-1BBL的核酸的重组MVA肿瘤内施用至受试者。如图9所示，与重组MVA TAA相比，肿瘤内注射MVA-TAA-4-1BBL证明肿瘤体积显著减小。

[0087] 肿瘤内施用编码4-1BBL的重组MVA与免疫检查点分子拮抗剂或激动剂的组合产生了增加的抗肿瘤效应。在各个实施方案中，本发明包括将MVA-TAA-4-1BBL与免疫检查点拮抗剂或激动剂组合施用。优选地，MVA-TAA-4-1BBL的施用是静脉内或肿瘤内的。本发明的MVA与免疫检查点拮抗剂或激动剂的组合是有利的，因为该组合提供了更有效的癌症治疗。例如，本发明的组合和/或组合疗法增强了癌症患者的免疫应答的多个方面。在至少一个方面，所述组合协同地增强先天性免疫应答和适应性免疫应答两者，并且当与免疫检查点分子拮抗剂或激动剂组合时，减小肿瘤体积并增加癌症患者的存活率。

[0088] 本申请中呈现的数据证明，MVA-TAA-4-1BBL在与免疫检查点拮抗剂或激动剂组合时，产生增加的抗肿瘤效应。实际上，如图11所示，当将肿瘤内施用MVA-OVA-4-1BBL与腹膜内施用PD-1抗体结合时，与单独PD-1相比，肿瘤体积减小。

[0089] 肿瘤内施用编码4-1BBL的重组MVA与对肿瘤相关抗原(TAA)具有特异性的抗体的组合产生了增加的抗肿瘤效应。在各个实施方案中，本发明包括将MVA-TAA-4-1BBL与对TAA具有特异性的抗体组合施用。优选地，MVA-TAA-4-1BBL的施用是静脉内或肿瘤内的。本发明的MVA与TAA特异性抗体的组合是有利的，并且可以一起发挥作用以提供更有效的癌症治疗。

[0090] 在一个示例性方面，通过施用MVA-TAA-4-1BBL诱导的增强的NK细胞应答与TAA特异性抗体协同作用，以增强受试者中的抗体依赖性细胞毒性(ADCC)。在癌症受试者中这种增强的ADCC导致肿瘤细胞杀伤和肿瘤破坏的增加。

[0091] 本申请中呈现的数据证明，MVA-TAA-4-1BBL在与TAA特异性抗体组合时，会产生增加的抗肿瘤效应。实际上，如图11所示，当将肿瘤内施用MVA-OVA-4-1BBL与腹膜内施用TRP-1抗体结合时，与单独TRP-1相比，肿瘤体积减小。

[0092] 根据本发明将MVA-TAA-4-1BBL作为初免和加强免疫的一部分施用，增加了抗原和

载体特异性CD8+T细胞的扩增。在其他方面,本发明提供了一种将MVA-TAA-4-1BBL作为同源和/或异源初免-加强方案的一部分施用的方法。优选地,MVA-TAA-4-1BBL的施用是静脉内或肿瘤内的。如图7所示,在通过静脉内施用MVA-TAA-4-1BBL进行初免和加强免疫的过程中,抗原和载体特异性CD8+T细胞的扩增增加。

[0093] 定义

[0094] 除非上下文另外明确指出,否则如在本文中所用,单数形式“一个(种)”和“所述”包括多个指示物。因此,例如,提及“一个/种核酸”包括一个/种或多个/种核酸,并且提及“所述方法”包括提及本领域普通技术人员已知的可被修改或替代本文所述的方法的等效步骤和方法。

[0095] 除非另外指明,否则一系列要素之前的术语“至少”应当理解为是指该系列中的每个要素。本领域技术人员仅仅使用常规试验将认识到或者能够确定本文所述的发明的具体实施方案的很多等效方案。此类等效方案旨在被本发明所涵盖。

[0096] 在整个说明书和权利要求书中,除非上下文另外要求,否则词语“包含”和诸如“包括”和“含有”的变型应当理解为包含规定的整数或步骤或整数或步骤的组但不排除任何其他整数或步骤或整数或步骤的组。当在本文中使用术语“包含”可用术语“含有”或“包括”代替,或者有时在本文中使用术语“具有”代替。每当在本文中用于本发明的方面或实施方案的上下文中时,任何上述术语(包含、含有、包括、具有),尽管不太优选,但都可用术语“由...组成”代替。当在本文中使用术语“由...组成”不包括未在所述要素中指定的任何要素、步骤或成分。当在本文中使用术语“基本上由...组成”不排除不会实质上影响权利要求的基本和新颖特征的材料或步骤。

[0097] 如本文中所用,多个列举的要素之间的连接术语“和/或”应当理解为涵盖单个的和组合的选项。例如,在两个要素由“和/或”连接的情况下,第一个选项是指在无第二要素的情况下第一要素的适用性。第二选项是指在无第一要素的情况下第二要素的适用性。第三选项是指第一要素和第二要素一起的适用性。这些选项中的任何一个都应被理解为落入该含义内,并因此满足本文所用的术语“和/或”的要求。不止一个选项的并行适用性也应被理解为落在该含义内,因此满足术语“和/或”的要求。

[0098] 如本文所述的“突变的”或“修饰的”蛋白或抗原如本文所定义,是对核酸或氨基酸的任何修饰,诸如缺失、添加、插入和/或取代。

[0099] 关于本文所述的核酸序列的“序列同源性或同一性百分比(%)”被定义为在比对序列和引入缺口(如有必要)以实现最大百分比序列同一性,并且不考虑将任何保守取代作为序列同一性的一部分后,候选序列中与参考序列(即,其所源自的核酸序列)中的核苷酸相同的核苷酸的百分比。出于确定核苷酸序列同一性或同源性百分比的目的的比对可以以本领域技术范围内的各种方式,例如,使用诸如BLAST、ALIGN或Megalign(DNASTAR)软件等可公开获得的计算机软件来实现。本领域技术人员可以确定用于测量比对的适当参数,包括在所比较的序列的全长上实现最大比对所需的任何算法。

[0100] 例如,Smith和Waterman((1981)Advances in Applied Mathematics2:482-489)的局部同源性算法提供了核酸序列的适当比对。通过使用由Dayhoff,Atlas of Protein Sequences and Structure,M.O.Dayhoff编辑,增刊5 3:353-358,National Biomedical Research Foundation,Washington,D.C.,USA开发的并由Gribskov((1986)Nucl.Acids

Res.14 (6) :6745-6763) 标准化的评分矩阵可将该算法应用于氨基酸序列。由“BestFit”实用应用程序中的Genetics Computer Group (Madison,Wisconsin,USA) 提供了该算法确定序列的同一性百分比的示例性实现。该方法的默认参数描述于Wisconsin Sequence Analysis Package Program Manual, 第8版(1995) (可从Genetics Computer Group, Madison,Wisconsin,USA获得) 中。在本发明的上下文中建立同一性百分比的优选方法是使用由University of Edinburgh拥有版权的MPSRCH程序包, 所述程序包由Collinshe Sturrok开发, 并由IntelliGenetics, Inc. (Mountain View,California,USA) 发布。从这套软件包中, 可使用Smith-Waterman算法, 其中将默认参数用于评分表(例如, 缺口开放罚分为12、缺口延伸罚分为且缺口为6)。从生成的数据中, “匹配”值反映“序列同一性”。用于计算序列之间的同一性或相似性百分比的其他合适的程序在本领域中通常是已知的, 例如, 另一种比对程序是BLAST, 以默认参数使用。例如, 可使用以下默认参数来使用BLASTN和BLASTP: 遗传密码=标准; 过滤器=无; 链=两条; 截止值=60; 期望值=10; 矩阵=BLOSUM62; 说明=50个序列; 排序方式=高分; 数据库=非冗余的, GenBank+EMBL+DDBJ+PDB+GenBank CDS翻译库+Swiss蛋白数据库+Spupdate+PIR。这些程序的详细信息可见于以下网址:blast.ncbi.nlm.nih.gov/。

[0101] 术语“初免-加强疫苗接种”或“初免-加强方案”是指使用靶向特定抗原的疫苗的第一初免注射, 相隔一定时间后继以一次或多次相同疫苗的加强注射的疫苗接种策略或方案。初免-加强疫苗接种可以是同源的或异源的。同源初免-加强疫苗接种使用包含用于所述初免注射和所述一次或多次加强注射的相同抗原和载体的疫苗。异源初免-加强疫苗接种使用包含用于所述初免注射和所述一次或多次加强注射的相同抗原但用于所述初免注射和所述一次或多次加强注射的不同载体的疫苗。例如, 同源初免-加强疫苗接种可以使用包含表达用于所述初免注射的一种或多种抗原的核酸的重组痘病毒和表达用于所述一次或多次加强注射的一种或多种抗原的相同重组痘病毒。相反地, 异源初免-加强疫苗接种可以使用包含表达用于所述初免注射的一种或多种抗原的核酸的重组痘病毒和表达用于所述一次或多次加强注射的一种或多种抗原的不同的重组痘病毒。

[0102] 术语“重组体”意指半合成或合成来源的多核苷酸、病毒或载体, 所述多核苷酸、病毒或载体不是天然存在的, 或者以自然界中不存在的排列方式与另一多核苷酸连接。如本文所用的“重组MVA”或“rMVA”通常是指包含至少一种编码肿瘤相关抗原(TAA)的多核苷酸的修饰的安卡拉痘苗(MVA)。

[0103] 如本文中所用, 肿瘤体积的消滅或减小可以被表征为肿瘤体积和/或大小的减小, 但还可以根据本领域理解的临床试验终点来表征。与肿瘤体积和/或大小的减小相关的一些示例性临床试验终点可以包括但不限于应答率(RR)、客观应答率(ORR)等。

[0104] 如本文所用, 存活率的提高可以被表征为癌症患者的存活率的提高, 但也可以根据本领域理解的临床试验终点来表征。与存活率的提高相关的一些示例性临床试验终点包括但不限于总体存活率(OS)、无进展存活期(PFS)等。

[0105] 如本文中所用, “转基因”或“异源”基因应被理解为在野生型痘病毒基因组(例如, 痘苗病毒、禽痘病毒或MVA)中不存在的核酸或氨基酸序列。本领域技术人员理解, 当存在于痘病毒(诸如痘苗病毒)中时, “转基因”或“异源基因”将以这样的方式整合到痘病毒基因组中, 所述方式使得在将重组痘病毒施用至宿主细胞后, 其表达为相应的异源基因产物, 即表

达为“异源抗原”和/或“异源蛋白”。通常通过将异源基因可操作地连接至允许在痘病毒感染的细胞中表达的调控元件来实现表达。优选地,调控元件包括天然或合成的痘病毒启动子。

[0106] “载体”是指可包含异源多核苷酸的重组DNA或RNA质粒或病毒。出于预防或治疗的目的,异源多核苷酸可以包含目标序列,并且可以任选地以表达盒的形式存在。如本文中所示,载体不必能够在最终的靶细胞或受试者中复制。该术语包括克隆性载体和病毒载体。

[0107] 组合和方法

[0108] 在各个实施方案中,本发明包括重组MVA,所述重组MVA包含编码肿瘤相关抗原(TAA)的第一核酸和编码4-1BBL的第二核酸,所述重组MVA当肿瘤内施用,诱导与通过非肿瘤内施用包含编码TAA的第一核酸和编码4-1BBL的第二核酸的重组MVA病毒诱导的炎症应答和T细胞应答相比增强的炎症应答和T细胞应答。

[0109] 在各种另外的实施方案中,本发明包括包含编码肿瘤相关抗原(TAA)的第一核酸和编码4-1BBL的第二核酸,所述核酸当肿瘤内施用,诱导与通过肿瘤内施用包含编码TAA的第一核酸的重组MVA病毒诱导的肿瘤内炎症应答和T细胞应答相比增强的肿瘤内炎症应答和增强的T细胞应答。

[0110] 肿瘤中增强的炎症应答.在本公开的各个方面,确定了与单独施用重组MVA相比,肿瘤内施用编码TAA和4-1BBL的重组MVA在肿瘤中诱导增强的炎症应答。在至少一个方面,根据本公开的肿瘤中“增强的炎症应答”的特征在于以下一项或多项:1) IFN- $\gamma$  表达的增加和/或2) 肿瘤和/或肿瘤细胞中粒酶B(GraB)的表达的增加。因此,可以通过测量确定一种或多种分子的表达是否增加来确定根据本公开的肿瘤和/或肿瘤细胞中的炎症应答是否增强,所述细胞因子的表达指示增加的炎症应答,包括如本领域已知的趋化因子和细胞因子的分泌。示例性的炎症应答标志物包括一种或多种可用于测量NK细胞频率和/或活性的标志物,包括以下一项或多项:IFN- $\gamma$  和/或粒酶B(GraB)。这些分子及其测量是本领域理解的经验证的测定,并且可根据已知技术来进行。参见,例如,Borrego等人((1999) Immunology 7(1):159-165)。

[0111] 增强的NK细胞应答.在本公开的各个其他方面,确定了与单独施用重组MVA相比,肿瘤内施用或静脉内施用编码TAA和4-1BBL的重组MVA在肿瘤或肿瘤环境中诱导增强的NK细胞应答。在一个方面,根据本公开的“增强的NK细胞应答”的特征在于以下一项或多项:1) NK细胞频率的增加,2) NK细胞激活的增强,和/或3) NK细胞增殖的增加。因此,可以通过测量一种或多种分子的表达来确定根据本公开的NK细胞应答是否增强,所述一种或多种分子的表达指示增加的NK细胞频率、增加的NK细胞激活和/或增加的NK细胞增殖。可用于测量NK细胞频率和/或活性的示例性标志物包括以下一项或多项:NKp46、IFN- $\gamma$ 、CD69、CD70、NKG2D、FasL、粒酶B、CD56和/或Bc1-XL。可用于测量NK细胞激活的示例性标志物包括以下一项或多项:IFN- $\gamma$ 、CD69、CD70、NKG2D、FasL、粒酶B和/或Bc1-XL。可用于测量NK细胞增殖的示例性标志物包括:Ki67。这些分子及其测量是本领域理解的经验证的测定,并且可根据已知技术来进行(参见,例如,Borrego等人(1999) Immunology 7(1):159-165)。另外,可以在本公开的实施例5和实施例6中找到用于测量分子的测定。至少在一个方面,1) NK细胞频率的增加可被定义为与治疗前/基线相比,CD3-NKp46+细胞的至少2倍的增加;2) NK细胞激活的增强可被定义为与治疗前/基线表达相比,IFN- $\gamma$ 、CD69、CD70、NKG2D、FasL、粒酶B和/或Bc1-XL

表达的至少2倍的增加;和/或3)NK细胞增殖的增加被定义为与治疗前/基线表达相比,Ki67表达的至少1.5倍的增加。

[0112] 增强的T细胞应答.根据本申请,“增强的T细胞应答”通过以下一项或多项来表征:1)CD8 T细胞频率的增加,2)CD8 T细胞激活的增强,和/或3)CD8 T细胞增殖的增加。因此,可以通过测量一种或多种分子的表达来确定根据本申请的T细胞应答是否增强,所述一种或多种分子的表达指示1)CD8 T细胞频率的增加,2)CD8 T细胞激活的增强和/或3)CD8 T细胞增殖的增加。可用于测量CD8 T细胞频率、激活和增殖的示例性标志物分别包括CD3、CD8、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-2、CD69和/或CD44和Ki67。如本申请所示,还可以通过MHC多聚体(诸如五聚体或dextramer)来测量抗原特异性T细胞频率。此类测量和测定以及适用于评估本发明的方法和组合物的其他测量和测定在本领域中得到验证和理解。

[0113] 在一个方面,CD8 T细胞频率的增加通过与治疗前/基线相比,IFN- $\gamma$ 和/或dextramer+CD8 T细胞的至少2倍的增加来表征。CD8 T细胞激活的增强被表征为与治疗前/基线表达相比,CD69和/或CD44表达的至少2倍的增加。CD8 T细胞增殖的增加被表征为与治疗前/基线表达相比,Ki67表达的至少2倍的增加。

[0114] 在替代方面,增强的T细胞应答通过效应细胞因子的CD8 T细胞表达的增加和/或细胞毒性效应功能的增强来表征。可以通过与治疗前/基线相比IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 和/或IL-2中的一种或多种的表达来测量效应细胞因子的表达的增加。细胞毒性效应功能的增强可以通过CD107a、粒酶B和/或穿孔素的一种或多种的表达和/或靶细胞的抗原特异性杀伤来测量。

[0115] 本文所述的测定、细胞因子、标志物和分子及其测量在本领域中已被验证和理解,并且可以根据已知技术来进行。另外,用于测量T细胞应答的测定可见于其中分析了T细胞应答的工作实施例中,包括但不限于实施例2、3、8、13和14。

[0116] 通过本发明实现的增强的T细胞应答与增强的NK细胞应答和增强的炎症应答组合是特别有利的,因为增强的T细胞有效地靶向并杀伤癌症患者中的那些已逃避初始先天性免疫应答和/或在初始先天性免疫应答后存活下来的肿瘤细胞。

[0117] 在另外的实施方案中,本文所述的组合和方法用于治疗人癌症患者中。在优选的实施方案中,所述癌症患者患有和/或被诊断出患有选自由以下组成的组的癌症:乳腺癌、肺癌、头颈癌、甲状腺癌、黑素瘤、胃癌、膀胱癌、肾癌、肝癌、黑素瘤、胰腺癌、前列腺癌、卵巢癌、尿路上皮癌、宫颈癌或结直肠癌。在另外的实施方案中,本文所述的组合和方法用于治疗患有和/或被诊断出患有乳腺癌、结直肠癌或黑素瘤,优选为黑素瘤,更优选为结直肠癌或最优选为结直肠癌的人癌症患者。

[0118] 某些示例性肿瘤相关抗原.在某些实施方案中,在受试者中产生针对细胞相关多肽抗原的免疫应答。在某些此类实施方案中,细胞相关多肽抗原是肿瘤相关抗原(TAA)。

[0119] 术语“多肽”是指通过肽键或修饰的肽键彼此连接的两个或更多个氨基酸的聚合物。氨基酸可以是天然存在的和非天然存在的,或天然存在的氨基酸的化学类似物。该术语还指蛋白质,即包含至少一种多肽的功能性生物分子;当包含至少两种多肽时,它们可以形成复合物,是共价连接的或可以是非共价连接的。蛋白质中的所述一种或多种多肽可以被糖基化和/或脂化和/或包含辅基。

[0120] 内源性逆转录病毒蛋白(ERV).优选地,TAA体现在内源性逆转录病毒蛋白(ERV)中。更优选地,ERV是来自人HERV-K蛋白家族的ERV。最优选地,HERV-K蛋白选自HERV-K包膜

(env) 蛋白、HERV-K组特异性抗原(gag) 蛋白和HERV-K“黑素瘤风险标志物”(me1) 蛋白(参见,例如,Cegolon等人(2013) BMC Cancer 13:4)。

[0121] ERV占人类基因组的8%,源自数百万年前的种系感染。插入我们基因组的大部分元件都发生了严重突变,因此不会被转录或翻译。但是,一小部分最近获得的ERV仍有功能并能翻译,且在一些情况下甚至会产生病毒颗粒。ERV的转录非常受限制,因为该基因座通常高度甲基化,因此不会在体细胞中转录(Kassiotis(2016) Nat.Rev.Immunol.16:207-19)。仅在某些情况,诸如细胞应激(化学物质、紫外线辐射、激素、细胞因子)下,ERV才能被重新激活。重要的是,ERV还在许多不同类型的癌症中表达,但在正常组织中不表达(Cegolon等人(2013) BMC Cancer 13:4;Wang-Johanning等人(2003) Oncogene 22:1528-35)。这种非常受限制的表达模式确保ERV不会或很少暴露于免疫耐受机制,这可能会产生胜任型ERV特异性T细胞库。以这种方式,ERV可以在MVA中用作肿瘤抗原(“TAA”)。

[0122] 在各种另外的实施方案中,TAA包括但不限于单独或组合的HER2、PSA、PAP、CEA、MUC-1、FOLR1、PRAME、存活素、TRP1、TRP2或Brachyury。这样的示例性组合可以包括CEA和MUC-1,例如在MVA中也称为CV301。其他示例性组合可以包括PAP和PSA。

[0123] 在另外的实施方案中,其他TAA可以包括但不限于5 $\alpha$ 还原酶、甲胎蛋白、AM-1、APC、April、BAGE、 $\beta$ -连环蛋白、Bcl12、bcr-abl、CA-125、CASP-8/FLICE、组织蛋白酶类、CD19、CD20、CD21、CD23、CD22、CD33 CD35、CD44、CD45、CD46、CD5、CD52、CD55、CD59、CDC27、CDK4、CEA、c-myc、Cox-2、DCC、DcR3、E6/E7、CGFR、EMBP、Dna78、法呢基转移酶、FGF8b、FGF8a、FLK-1/KDR、叶酸受体、G250、GAGE家族、胃泌素17、胃泌素释放激素、GD2/GD3/GM2、GnRH、GnTV、GP1、gp100/Pmel17、gp-100-in4、gp15、gp75/TRP1、hCG、乙酰肝素酶、Her2/neu、HMTV、Hsp70、hTERT、IGFR1、IL-13R、iNOS、Ki67、KIAA0205、K-ras、H-ras、N-ras、KSA、LKLR-FUT、MAGE家族、乳腺珠蛋白、MAP17、melan-A/MART-1、间皮素、MIC A/B、MT-MMP、粘蛋白、NY-ESO-1、骨粘连蛋白、p15、P170/MDR1、p53、p97/黑素转铁蛋白、PAI-1、PDGF、uPA、PRAME、前列腺碱性蛋白、祖细胞生成素(progenipoinetin)、PSA、PSM、RAGE-1、Rb、RCAS1、SART-1、SSX-家族、STAT3、STn、TAG-72、TGF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 、胸腺素- $\beta$ -15、TNF- $\alpha$ 、TRP1、TRP2、酪氨酸酶、VEGF、ZAG、p16INK4和谷胱甘肽-S-转移酶。

[0124] 优选的PSA抗原在位置155处包含异亮氨酸至亮氨酸的氨基酸变化(参见美国专利第7,247,615号,其以引用方式并入本文)。

[0125] 在本发明的一个或多个优选的实施方案中,异源TAA选自HER2和Brachyury。

[0126] 可以使用任何TAA,只要其完成本发明的至少一个目的或期望目标,例如,在施用含有它的MVA后刺激免疫应答。TAA(包括本文提及的TAA)的示例性序列在本领域中是已知的,并且适用于本发明的组合物和方法中。用于本发明的组合物和方法中的TAA的序列可以与本领域已知的或本文所公开的序列相同,或者它们可以与本领域已知的或本文所公开的核苷酸或氨基酸序列享有小于100%的同一性,诸如至少90%、91%、92%、95%、97%、98%或99%或更高的序列同一性。因此,用于本发明的组合物或方法中的TAA的序列可以与本领域已知的和/或本文所公开的参考序列相差少于20或少于19、18、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个核苷酸或氨基酸,只要其可以完成本发明的至少一个目的或期望目标即可。本领域技术人员熟悉用于评估TAA以确保其适用于本发明的MVA或方法的技术和测定。

[0127] 修饰的肿瘤相关抗原。在某些实施方案中,对细胞相关多肽抗原进行修饰,使得当

在APC表面上与MHC I类分子结合呈递时,诱导针对细胞的CTL应答,所述细胞在其表面上呈递源自多肽抗原的表位。在某些此类实施方案中,当呈递时,至少一个第一外源TH表位与APC表面上的MHC II类分子缔合。在某些此类实施方案中,细胞相关抗原是肿瘤相关抗原。

[0128] 能够呈递表位的示例性APC包括树突状细胞和巨噬细胞。另外的示例性APC包括能够同时呈递以下各项的吞饮性或吞噬性APC:1) 与MHC I类分子结合的CTL表位;和2) 与MHC II类分子结合的TH表位。

[0129] 在某些实施方案中,对一种或多种TAA,诸如但不限于HERV-Kenv、HERV-K gag、HERV-K mel、CEA、MUC-1、PAP、PSA、PRAME、FOLR1、HER2、存活素、TRP1、TRP2或Brachyury进行修饰,使得在施用至受试者后,引起主要与本文所述的一种或多种TAA反应的多克隆抗体。此类抗体可以攻击并消除肿瘤细胞,并防止转移性细胞发展成转移灶。这种抗肿瘤效应的效应机制将通过补体和抗体依赖性细胞毒性来介导。另外,诱导的抗体还可以通过抑制生长因子依赖性寡二聚和受体内化来抑制癌细胞生长。在某些实施方案中,此类修饰的TAA可以诱导针对已知和/或预测的由肿瘤细胞展示的TAA表位的CTL应答。

[0130] 在某些实施方案中,修饰的TAA多肽抗原包含细胞相关多肽抗原和变异体的CTL表位,其中所述变异体包含至少一个CTL表位或外源TH表位。某些此类修饰的TAA在一个非限制性实例中可以包括一种或多种包含至少一个CTL表位的HER2多肽抗原,和包含至少一个CTL表位或外源TH表位的变异体,并且产生所述抗原的方法描述于美国专利第7,005,498号和美国专利公布第2004/0141958号和第2006/0008465号中。

[0131] 某些此类修饰的TAA在一个非限制性实例中可以包括一种或多种包含至少一个CTL表位的MUC-1多肽抗原,和包含至少一个CTL表位或外源表位的变异体,并且产生所述抗原的方法描述于美国专利公布第2014/0363495中。

[0132] 其他混杂的T细胞表位包括能够结合由不同的HLA-DR编码的大部分HLA-DR分子的肽。参见,例如,WO 98/23635 (Frazer IH等人,转让给The University of Queensland); Southwood等人(1998) J. Immunol. 160:3363-3373; Sinigaglia等人(1988) Nature 336:778-780; Rammensee等人(1995) Immunogenetics 41:178-228; Chicz等人(1993) J. Exp. Med. 178:27-47; Hammer等人(1993) Cell 74:197-203; 和Falk等人(1994) Immunogenetics 39:230-242。后一参考文献还涉及HLA-DQ和-DP配体。这些参考文献中列出的所有表位均与本文所述的候选天然表位相关,与这些天然表位共享共同基序的表位也相关。

[0133] 在某些其他实施方案中,混杂T细胞表位是能够结合大部分单倍型的人工T细胞表位。在某些此类实施方案中,人工T细胞表位是如WO 95/07707和相应的论文Alexander等人(1994) Immunity 1:751-761中所述的泛DR表位肽(“PADRE”)。

[0134] 4-1BBL(在本文中也称为“41BBL”或“4-1BB配体”)。如本公开所说明的,将4-1BBL作为重组MVA和相关方法的一部分包括在内,使得在肿瘤内或静脉内施用后在癌症受试者中诱导增加的和增强的抗肿瘤效应。因此,在各个实施方案中,除编码TAA之外,还存在编码4-1BBL抗原的重组MVA。

[0135] 4-1BB/4-1BBL是TNFR/TNF超家族的成员。4-1BBL是在激活的B细胞、单核细胞和DC中表达的共刺激配体。4-1BB由自然杀伤(NK)和自然杀伤T(NKT)细胞、Treg和一些先天免疫细胞群(包括DC、单核细胞和嗜中性粒细胞)组成性表达。有趣的是,4-1BB在激活的而非静

息的T细胞上表达 (Wang等人 (2009) Immunol.Rev.229:192-215)。4-1BB连接诱导干扰素  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) 和白介素2 (IL-2) 的增殖和产生,并通过上调抗凋亡分子 (诸如Bcl-xL) 来提高T细胞存活率 (Snell等人 (2011) Immunol.Rev.244:197-217)。重要的是,4-1BB刺激通过增强抗体依赖性细胞细胞毒性 (ADCC) 来增强NK细胞增殖、IFN- $\gamma$  产生和细胞溶解活性 (Kohrt等人 (2011) Blood 117:2423-32)。

[0136] 在一个或多个优选的实施方案中,4-1BBL由本发明的MVA编码。在一个或多个其他优选的实施方案中,4-1BBL是人4-1BBL。在更优选的实施方案中,4-1BBL包含编码氨基酸序列的核酸,所述氨基酸序列的序列与SEQ ID NO:3具有至少90%、95%、97%、98%或99%的同一性,即,与SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列相差少于10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个氨基酸。在甚至更优选的实施方案中,4-1BBL包含编码包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的核酸。在另外的实施方案中,编码4-1BBL的核酸的核酸序列与SEQ ID NO:4具有90%、95%、97%、98%或99%的同一性,即,与SEQ ID NO:4所示的核酸序列相差少于20、10、5、4、3、2或1个核酸序列。在更优选的实施方案中,4-1BBL包含含有SEQ ID NO:4的核酸。

[0137] CD40L.如本公开所说明的,包含CD40L作为组合和相关方法的一部分进一步增强了肿瘤体积的减小,延长了无进展生存期以及提高了通过本发明实现的存活率。因此,在各个实施方案中,所述组合还包括向癌症患者施用CD40L。在优选的实施方案中,CD40L被编码为如本文所述的重组MVA的一部分。

[0138] 尽管CD40在许多细胞类型 (包括B细胞、巨噬细胞和树突状细胞) 上组成性表达,但其配体CD40L主要在激活的T辅助细胞上表达。感染或免疫后早期,树突状细胞与T辅助细胞之间的同源相互作用“许可”树突状细胞引发CTL应答。树突状细胞许可导致共刺激分子的上调、提高的存活率和更好的交叉呈递能力。该过程主要是通过CD40/CD40L相互作用介导的。然而,描述了CD40L的各种构型 (从膜结合的到可溶的 (单体到三聚体)),这些构型诱导多种刺激,诱导或遏制APC的激活、增殖和分化。

[0139] 在一个或多个优选的实施方案中,CD40L由本发明的MVA编码。在一个或多个其他优选的实施方案中,CD40L是人CD40L。在更优选的实施方案中,CD40L包含编码氨基酸的核酸,所述氨基酸的序列与SEQ ID NO:1具有至少90%、95%、97%、98%或99%的同一性,即,与SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列相差少于10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个氨基酸。在甚至更优选的实施方案中,CD40L包含编码包含SEQ ID NO:1的氨基酸的核酸。在另外的实施方案中,编码CD40L的核酸的核酸序列与SEQ ID NO:2具有90%、95%、97%、98%或99%的同一性,即,与SEQ ID NO:2所示的核酸序列相差少于20、10、5、4、3、2或1个核酸序列。在更优选的实施方案中,CD40L包含含有SEQ ID NO:2的核酸。

[0140] 免疫检查点分子的拮抗剂.如本文所述,至少在一个方面,本发明包括使用免疫检查点拮抗剂。此类免疫检查点拮抗剂的作用是干扰免疫检查点分子和/或阻断免疫检查点分子的功能。一些优选的免疫检查点拮抗剂包括:细胞毒性T淋巴细胞抗原4 (CTLA-4)、程序性细胞死亡蛋白1 (PD-1)、程序性死亡配体1 (PD-L1)、淋巴细胞激活基因3 (LAG-3) 和T细胞免疫球蛋白和粘蛋白结构域3 (TIM-3)。

[0141] 另外,示例性的免疫检查点拮抗剂可以包括但不限于CTLA-4、PD-1、PD-L1、PD-L2、LAG-3、TIM-3、具有Ig和ITIM结构域的T细胞免疫受体 (TIGIT) 和T细胞激活V结构域Ig抑制因子 (VISTA)。

[0142] 免疫检查点分子的此类拮抗剂可以包括特异性地结合至免疫检查点分子并抑制免疫检查点分子和/或阻断免疫检查点分子的生物活性和功能的抗体。

[0143] 免疫检查点分子的其他拮抗剂可以包括干扰免疫检查点分子表达的反义核酸RNA;以及干扰免疫检查点分子表达的小干扰RNA。

[0144] 拮抗剂还可以是抑制免疫检查点或阻断免疫检查点的功能的小分子形式。这些小分子形式的一些非限制性实例包括NP12 (Aurigene);清华大学的(D)PPA-1;高亲和力PD-1 (Stanford);BMS-202和BMS-8 (Bristol Myers Squibb (BMS));和CA170/CA327 (Curis/Aurigene);以及CTLA-4、PD-1、PD-L1、LAG-3和TIM-3的小分子抑制剂。

[0145] 拮抗剂还可以是抑制免疫检查点或阻断免疫检查点的功能的 **Anticalins®** 的形式。参见,例如,Rothe等人((2018)BioDrugs 32 (3):233-243)。

[0146] 预期拮抗剂可以另外是 **Affimers®** 的形式。Affimer是抑制免疫检查点或阻断免疫检查点的功能的Fc融合蛋白。可以用作免疫检查点拮抗剂的其他融合蛋白是免疫检查点融合蛋白(例如,抗PD-1蛋白AMP-224)和抗PD-L1蛋白(诸如US2017/0189476中所述的那些)。

[0147] 可以通过本领域已知的和/或本申请中公开的多种技术来筛选免疫检查点分子的候选拮抗剂的功能,例如筛选在体外或小鼠模型中干扰免疫检查点分子功能的能力。

[0148] ICOS的激动剂. 本发明还涵盖ICOS的激动剂。ICOS的激动剂激活ICOS。ICOS是在激活的T细胞上表达的阳性共刺激分子,其与配体的结合促进了它们的增殖(Dong (2001) Nature 409:97-101)。

[0149] 在一个实施方案中,激动剂是ICOS-L,ICOS的天然配体。激动剂可以是ICOS-L的突变形式,其保留了结合和激活特性。可以筛选ICOS-L的突变形式的在体外刺激ICOS方面的活性。

[0150] 免疫检查点拮抗剂或激动剂的抗体. 在优选的实施方案中,免疫检查点分子的拮抗剂和/或激动剂均包含抗体。如本文所述,在各个实施方案中,抗体可以是合成的、单克隆的或多克隆的,并且可以通过本领域中众所周知的技术制备。此类抗体通过抗体的抗原结合位点与免疫检查点分子特异性结合(与非特异性结合相反)。免疫检查点肽、片段、变体、融合蛋白等可以用作产生与之具有免疫反应性的抗体中的免疫原。更具体地,多肽、片段、变体、融合蛋白等含有引发抗体形成的抗原决定簇或表位。

[0151] 在更优选的实施方案中,本发明的抗体是经主权国家政府批准或正获得主权国家政府批准用于治疗人癌症患者的抗体。这些已获批准或正在批准过程中的抗体的非限制性实例包括:CTLA-4 (**Ipilimumab®**和曲美木单抗(Tremelimumab));PD-1(派姆单抗(Pembrolizumab)、兰罗利珠单抗(Lambrolizumab)、Amplimmune-224 (AMP-224))、Amplimmune-514 (AMP-514)、纳武单抗(Nivolumab)、MK-3475 (Merck)、BI 754091 (Boehringer Ingelheim);以及PD-L1(阿特朱单抗(Atezolizumab)、Avelumab、德瓦鲁单抗(Durvalumab)、MPDL3280A (Roche)、MED14736 (AZN)、MSB0010718C (Merck));LAG-3 (IMP321、BMS-986016、BI754111 (Boehringer Ingelheim)、LAG525 (Novartis)、MK-4289 (Merck)、TSR-033 (Tesar))。

[0152] 在一个示例性方面,免疫检查点分子CTLA-4、PD-1、PD-L1、LAG-3、TIM-3和ICOS以

及基于CTLA-4、PD-1、PD-L1、LAG-3、TIM-3和ICOS的氨基酸序列的肽可以用于制备特异性地结合至CTLA-4、PD-1、PD-L1、LAG-3、TIM-3或ICOS的抗体。术语“抗体”旨在包括多克隆抗体、单克隆抗体、其片段,诸如F(ab')<sub>2</sub>和Fab片段、单链可变片段(scFv)、单结构域抗体片段(VHH或纳米抗体)、二价抗体片段(双抗体),以及任何重组地和合成地产生的结合配偶体。

[0153] 肿瘤相关抗原(TAA)特异性抗体.在本发明的各个实施方案中,本文所述的重组MVA和方法与TAA特异性抗体组合或与之组合施用。在更具体的实施方案中,本文所述的重组MVA和方法与对在肿瘤细胞的细胞膜上表达的抗原具有特异性的抗体组合或与之组合施用。在本领域中应当理解,在许多癌症中,一种或多种抗原在肿瘤细胞膜上表达或过表达。参见,例如,Durig等人(2002) *Leukemia* 16:30-5;Mocellin等人(2013) *Biochim.Biophys.Acta* 1836:187-96;Arteaga(2011) *Nat.Rev.Clin.Oncol.*,doi:10.1038/nrclinonc.2011.177;Finn(2017) *Cancer Immunol.Res.*5:347-54;Ginaldi等人(1998) *J.Clin.Pathol.*51:364-9。用于确定抗原是否在肿瘤细胞上表达或过表达的测定以及用于产生针对特定抗原的抗体的方法在本领域中是容易理解的(同上)。

[0154] 在更具体的实施方案中,药物组合和相关方法包括抗体,其中所述抗体a)对在肿瘤的细胞膜上表达的抗原具有特异性并且b)包含Fc结构域。在至少一个方面,抗体的特征(例如,a)和b))使抗体能够结合至效应细胞(诸如NK细胞、巨噬细胞、嗜碱性粒细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、单核细胞、肥大细胞和/或树突状细胞)并与其相互作用,并且使得抗体能够结合在肿瘤细胞上表达的肿瘤抗原。在优选的实施方案中,抗体包含Fc结构域。在另外的优选的实施方案中,抗体能够结合NK细胞并与其相互作用。

[0155] 一些示例性的本公开所涵盖的针对肿瘤细胞上表达的抗原的抗体包括但不限于抗CD20(例如,利妥昔单抗;奥法木单抗;托西莫单抗)、抗CD52(例如,阿仑单抗 **Campath®**)、抗EGFR(例如,西妥昔单抗 **Erbix®**,帕尼单抗)、抗CD2(例如,西利珠单抗)、抗CD37(例如,BI836826)、抗CD123(例如,JNJ-56022473)、抗CD30(例如,XmAb2513)、抗CD38(例如,达雷木单抗 **Darzalex®**)、抗PDL1(例如,阿维单抗、阿特朱单抗、德瓦鲁单抗)、抗GD2(例如,3F8、ch14.18、KW-2871、达妥昔单抗)、抗CEA、抗MUC1、抗FLT3、抗CD19、抗CD40、抗SLAMF7、抗CCR4、抗B7-H3、抗ICAM1、抗CSF1R、抗CA125(例如奥戈伏单抗)、抗FR $\alpha$ (例如MOv18-IgG1、米维妥昔单抗索拉文辛(Mirvetuximab soravtansine)(IMGN853)、MORAb-202)、抗间皮素(例如MORAb-009)、抗TRP2和抗HER2(例如,曲妥珠单抗、Herzuma、ABP 980和/或帕妥珠单抗)。

[0156] 在更优选的实施方案中,作为本发明的一部分包括的抗体包括这样的抗体,所述抗体在施用至患者时与肿瘤细胞上的相应抗原结合并诱导抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)。在甚至更优选的实施方案中,所述抗体包括已被批准或预先批准用于治疗癌症的抗体。

[0157] 在甚至更优选的实施方案中,所述抗体是抗HER2抗体、抗EGFR抗体和/或抗CD20抗体。

[0158] 在最优选的实施方案中,抗HER2抗体选自帕妥珠单抗、曲妥珠单抗、Herzuma、ABP 980和Ado-曲妥珠单抗艾美坦辛。

[0159] 在最优选的实施方案中,抗EGFR抗体和抗CD20分别是西妥昔单抗和利妥昔单抗。

[0160] 如本文所述,在各个实施方案中,所述抗体可以是合成的、单克隆的或多克隆的,

并且可以通过本技术中众所周知的技术制备。此类抗体通过抗体的抗原结合位点与TAA特异性结合(与非特异性结合相反)。TAA肽、片段、变体、融合蛋白等可以用作产生与之具有免疫反应性的抗体中的免疫原。更具体地,多肽、片段、变体、融合蛋白等含有引发抗体形成的抗原决定簇或表位。

[0161] 抗体.在本发明的各个实施方案中,本文所述的重组MVA和方法与1)免疫检查点拮抗剂或激动剂抗体或2)TAA特异性抗体组合和/或与之组合施用。

[0162] 预期所述抗体可以是合成的、单克隆的或多克隆的,并且可以通过本技术中众所周知的技术制备。此类抗体通过抗体的抗原结合位点与免疫检查点分子或TAA特异性结合(与非特异性结合相反)。免疫检查点和/或TAA肽、片段、变体、融合蛋白等可以用作产生与之具有免疫反应性的抗体中的免疫原。更具体地,多肽、片段、变体、融合蛋白等含有引发抗体形成的抗原决定簇或表位。

[0163] 这些抗原决定簇或表位可以是线性的或构象的(不连续的)。线性表位由多肽的单个氨基酸区段组成,而构象表位或不连续表位由来自多肽链不同区域的多个氨基酸区段组成,这些氨基酸区段在蛋白质折叠后会非常接近(Janeway, Jr.和Travers, *Immuno Biology* 3:9 (Garland Publishing Inc., 第2版1996))。由于折叠蛋白具有复杂的表面,因此可用表位的数量相当大;然而,由于蛋白质的构象和位阻,实际与表位结合的抗体的数量少于可用表位的数量(Janeway, Jr.和Travers, *Immuno Biology* 2:14 (Garland Publishing Inc., 第2版1996))。可以通过本领域中已知的任何方法来鉴定表位。

[0164] 特异性地结合TAA或免疫检查点分子(诸如CTLA-4、PD-1、PD-L1、LAG-3、TIM-3或ICOS)并阻断其功能(“拮抗剂抗体”)或增强/激活其功能(“激动剂抗体”)的抗体,包括scFv片段,都涵盖在本发明中。此类抗体可以通过常规方式产生。

[0165] 在一个实施方案中,本发明涵盖针对TAA或免疫检查点分子的单克隆抗体,或阻断(“拮抗剂抗体”)或增强/激活(“激动剂抗体”)免疫检查点分子或TAA的功能的单克隆抗体。

[0166] 抗体能够以高亲合力和特异性结合其靶标。它们是相对较大的分子(约150kDa),当抗体结合位点落在蛋白质-蛋白质相互作用位点附近时,它们可以在空间上抑制两种蛋白质(例如,PD-1及其靶配体)之间的相互作用。本发明还涵盖与免疫检查点分子配体结合位点紧密接近的表位结合的抗体。

[0167] 在各个实施方案中,本发明涵盖干扰分子间相互作用(例如,蛋白质-蛋白质相互作用)的抗体,以及干扰分子内相互作用(例如,分子内构象变化)的抗体。可以筛选抗体阻断或增强/激活免疫检查点分子的生物活性的能力。多克隆抗体和单克隆抗体均可以通过常规技术制备。

[0168] 在一个示例性方面,TAA或免疫检查点分子CTLA-4、PD-1、PD-L1、LAG-3、TIM-3和ICOS以及基于TAA或CTLA-4、PD-1、PD-L1、LAG-3、TIM-3和ICOS的氨基酸序列的肽可以用于制备特异性地结合至TAA或CTLA-4、PD-1、PD-L1、LAG-3、TIM-3或ICOS的抗体。术语“抗体”旨在包括多克隆抗体、单克隆抗体、其片段,诸如F(ab')<sub>2</sub>和Fab片段、单链可变片段(scFv)、单结构域抗体片段(VHH或纳米抗体)、二价抗体片段(双抗体),以及任何重组地和合成地产生的结合配偶体。在另一个示例性方面,如果抗体以大于或等于约 $10^7 M^{-1}$ 的Kd结合免疫检查点分子,则抗体被定义为与免疫检查点分子特异性结合。结合配偶体或抗体的亲和力可以使用常规技术,例如Scatchard等人((1949) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 51:660)描述的技术容易地确

定。

[0169] 使用本领域中众所周知的程序,可以容易地从多种来源例如马、牛、山羊、绵羊、狗、鸡、兔、小鼠或大鼠产生多克隆抗体。一般来讲,适当缀合的纯化的TAA或CTLA-4、PD-1、PD-L1、LAG-3、TIM-3和ICOS或基于CTLA-4、PD-1、PD-L1、LAG-3、TIM-3和ICOS的氨基酸序列的肽通过肠胃外注射施用至宿主动物。加强免疫后,收集少量血清样品并测试其对CTLA-4、PD-1、PD-L1、LAG-3、TIM-3和ICOS多肽的反应性。可用于这种测定的各种测定的实例包括描述于Antibodies:A Laboratory Manual,Harlow and Lane(eds.),Cold Spring Harbor Laboratory Press,1988中的那些测定;以及诸如逆流免疫电泳(CIEP)、放射免疫测定、放射免疫沉淀、酶联免疫吸附测定(ELISA)、斑点印迹测定和夹心测定等程序。参见美国专利第4,376,110号和第4,486,530号。

[0170] 单克隆抗体可以使用众所周知的程序容易地制备。参见,例如描述于以下文献中的程序:美国专利第RE 32,011号、第4,902,614号、第4,543,439号和第4,411,993号;Monoclonal Antibodies,Hybridomas:A New Dimension in Biological Analyses,Plenum Press,Kennett,McKeam,and Bechtol(eds.)(1980)。

[0171] 例如,可以以约3周的间隔给宿主动物(诸如小鼠)腹膜内注射分离的和纯化的免疫检查点分子至少一次,优选至少两次。然后通过常规斑点印迹技术或抗体捕获(ABC)分析小鼠血清,以确定哪种动物最适合融合。大约两到三周后,给小鼠静脉内推注免疫检查点分子。稍后遵循既定规程,处死小鼠,并将脾细胞与可商购获得的骨髓瘤细胞诸如Ag8.653(ATCC)融合。简而言之,将骨髓瘤细胞在培养基中洗涤数次,并以约三个脾细胞与一个骨髓瘤细胞的比例与小鼠脾细胞融合。融合剂可以是本领域中使用的任何合适的试剂,例如,聚乙二醇(PEG)。将融合物铺板到含有允许融合细胞选择性生长的培养基的平中。然后可以使融合的细胞生长大约八天。收集来自所得杂交瘤的上清液并将其添加至首先用山羊抗小鼠Ig包被的板中。洗涤后,将标记,诸如标记的免疫检查点分子多肽,添加至每个孔中,随后进行孵育。随后可以检测到阳性孔。可以使阳性克隆在批量培养物中生长,随后将上清液通过蛋白A柱(Pharmacia)纯化。

[0172] 本发明的单克隆抗体可以使用替代技术,诸如Alting-Mees等人((1990)Strategies in Mol.Biol.3:1-9,"Monoclonal Antibody Expression Libraries:A Rapid Alternative to Hybridomas")描述的技术产生,所述文献以引用方式并入本文。相似地,可以使用重组DNA技术构建结合配偶体,以并入编码特异性结合抗体的基因的可变区。这样的技术描述于Larrick等人((1989)Biotechnology 7:394)中。

[0173] 可以通过常规技术产生的此类抗体的抗原结合片段也涵盖在本发明中。此类片段的实例包括但不限于Fab和F(ab')<sub>2</sub>片段。还提供了通过基因工程技术产生的抗体片段和衍生物。

[0174] 本发明的单克隆抗体包括嵌合抗体,例如鼠单克隆抗体的人源化型式。此类人源化抗体可以通过已知技术制备,并且当将抗体施用至人时提供降低免疫原性的优点。在一个实施方案中,人源化单克隆抗体包含鼠抗体的可变区(或仅其抗原结合位点)和源自人抗体的恒定区。或者,人源化抗体片段可以包含鼠单克隆抗体的抗原结合位点和源自人抗体的可变区片段(缺少抗原结合位点)。嵌合的和进一步工程化的单克隆抗体的产生程序包括描述于以下文献中的那些:Riechmann等人((1988)Nature 332:323),Liu等人((1987)

Proc.Nat'l.Acad.Sci.84:3439),Larrick等人((1989)Bio/Technology 7:934)以及Winter和Harris((1993)TIPS 14:139)。转基因产生抗体的程序可见于GB 2,272,440、美国专利第5,569,825号和第5,545,806号中,所述文献均以引用方式并入本文。

[0175] 可以使用通过基因工程方法产生的抗体,诸如包括人和非人部分的嵌合和人源化单克隆抗体,这些抗体可以使用标准重组DNA技术制备。此类嵌合和人源化单克隆抗体可以通过使用本领域中已知的标准DNA技术,例如使用描述于以下文献中的方法进行基因工程来产生:Robinson等人的国际公布第W0 87/02671号;Akira等人欧洲专利申请0184187;Taniguchi,M.的欧洲专利申请0171496;Morrison等人的欧洲专利申请0173494;Neuberger等人的PCT国际公布第W0 86/01533号;Cabilly等人的美国专利第4,816,567号;Cabilly等人的欧洲专利申请0125023;Better等人,(1988)Science 240:1041-1043;Liu等人(1987)Proc.Nat'l.Acad.Sci.84:3439-3443;Liu等人(1987)J.Immunol.139:3521-3526;Sun等人(1987)Proc.Nat'l.Acad.Sci.84:214-218;Nishimura等人(1987)Cancer Res.47:999-1005;Wood等人(1985)Nature 314:446-449;和Shaw等人(1988)J.Natl.Cancer Inst.80:1553-1559);Morrison(1985)Science 229:1202-1207;Oi等人(1986)BioTechniques 4:214;Winter的美国专利第5,225,539号;Jones等人(1986)Nature 321:552-525;Verhoeyan等人(1988)Science 239:1534;以及Beidler等人(1988)J.Immunol.141:4053-4060。

[0176] 结合合成和半合成抗体,这些术语旨在涵盖但不限于抗体片段、同种型转换抗体、人源化抗体(例如,小鼠-人,人-小鼠)、杂交体、具有多种特异性的抗体和完全合成的抗体样分子。

[0177] 对于治疗应用,通常优选具有人恒定和可变区的“人”单克隆抗体,以使患者对抗体的免疫应答最小化。此类抗体可以通过使含有人免疫球蛋白基因的转基因动物免疫来产生。参见Jakobovits等人Ann NY Acad Sci 764:525-535(1995)。

[0178] 针对TAA或免疫检查点分子的人单克隆抗体还可以通过使用从源自受试者淋巴细胞的mRNA制备的免疫球蛋白轻链和重链cDNA构建组合免疫球蛋白文库(诸如Fab噬菌体展示文库或scFv噬菌体展示文库)来制备。参见,例如,McCafferty等人的PCT公布W0 92/01047;Marks等人(1991)J.Mol.Biol.222:581-597;以及Griffiths等人(1993)EMBO J.12:725-734。另外,抗体可变区的组合文库可以通过使已知的人抗体突变来产生。例如,可以通过例如使用随机改变的诱变的寡核苷酸使已知结合免疫检查点分子的人抗体的可变区突变,从而产生突变的可变区的文库,然后可以对所述突变的可变区的文库进行筛选以与免疫检查点分子结合。在免疫球蛋白重链和/或轻链的CDR区域内诱导随机诱变的方法,使随机的重链和轻链交叉以形成配对的方法以及筛选方法可见于例如Barbas等人的PCT公布W0 96/07754;Barbas等人(1992)Proc.Natl Acad.Sci.USA 89:4457-4461中。

[0179] 免疫球蛋白文库可以通过优选地源自丝状噬菌体的展示包群来表达,以形成抗体展示文库。特别适合用于产生抗体展示文库的方法和试剂的实例可见于例如Ladner等人的美国专利第5,223,409号;Kang等人的PCT公布W0 92/18619;Dower等人的PCT公布W0 91/17271;Winter等人的PCT公布W0 92/20791;Markland等人的PCT公布W0 92/15679;Breitling等人的PCT公布W0 93/01288;McCafferty等人的PCT公布W0 92/01047;Garrard等人的PCT公布W0 92/09690;Ladner等人PCT公布W0 90/02809;Fuchs等人(1991)Bio/Technology 9:1370-1372;Hay等人(1992)Hum Antibod Hybridomas 3:81-85;Huse等人

(1989) Science 246:1275-1281;Griffths等人(1993)同上;Hawkins等人(1992) J.Mol.Biol.226:889-896;Clackson等人(1991) Nature 352:624-628;Gram等人(1992) Proc.Nat'l.Acad.Sci.89:3576-3580;Garrad等人(1991) Bio/Technology 9:1373-1377; Hoogenboom等人(1991) Nucl. Acid Res.19:4133-4137;以及Barbas等人(1991) Proc.Nat'l.Acad.Sci.88:7978-7982中。一旦在展示包装(例如,丝状噬菌体)的表面上展示,就筛选抗体文库以鉴定和分离表达结合TAA或免疫检查点分子的抗体的包。

[0180] 重组MVA.在本发明的更优选的实施方案中,本文所公开的一种或多种蛋白质和核苷酸包括在重组MVA中。如本公开所描述和说明的,静脉内施用本公开的重组MVA在癌症患者中在各个方面诱导了增强的免疫应答。因此,在一个或多个优选的实施方案中,本发明包括重组MVA,所述重组MVA包含编码本文所述的一种或多种TAA的第一核酸和编码CD40L的第二核酸。

[0181] 在本发明的实践中有用的并且已经按照布达佩斯条约的要求保藏的MVA病毒株的实例是1994年1月27日以保藏号ECACC94012707保藏在Porton Down,Salisbury,Wiltshire SP4 0JG,United Kingdom的欧洲动物细胞培养物保藏中心(ECACC)、疫苗研究和生产实验室、公共卫生实验室服务、应用微生物学与研究中心的MVA 572毒株;和2000年12月7日以ECACC 00120707保藏的MVA 575毒株;2000年8月30日以保藏号V00083008保藏在欧洲细胞培养物保藏中心(ECACC)的MVA-BN毒株及其衍生物是另外的示例性毒株。

[0182] MVA-BN的“衍生物”是指表现出与MVA-BN基本上相同的复制特征(如本文所述的)但在其基因组的一个或多个部分中表现出差异的病毒。MVA-BN及其衍生物不能复制,这意味着不能在体内和体外进行生殖复制。更具体地,在体外,MVA-BN或其衍生物已被描述为能够在鸡胚成纤维细胞(CEF)中进行生殖复制,但不能在人角质形成细胞系HaCat (Boukamp等人(1988) J.Cell Biol.106:761-771)、人骨肉瘤细胞系143B (ECACC保藏号91112502)、人胚胎肾细胞系293 (ECACC保藏号85120602) 和人宫颈癌细胞系HeLa (ATCC保藏号CCL-2) 中进行生殖复制。另外,在HeLa细胞和HaCaT细胞系中,MVA-BN或其衍生物的病毒扩增率为MVA-575的至多1/2,更优选1/3。MVA-BN及其衍生物的这些性质的测试和测定描述于WO 02/42480 (美国专利申请第2003/0206926号) 和WO 03/048184 (美国专利申请第2006/0159699号) 中。

[0183] 如先前段落中所述的术语在体外在人细胞系中“不能生殖复制”或“无生殖复制的能力”例如描述于WO 02/42480中,所述文献还教导了如何获得具有上述所需特性的MVA。该术语适用于在感染后4天具有小于1的体外病毒扩增率(使用WO 02/42480或美国专利第6,761,893号中所述的测定)的病毒。

[0184] 术语“不能生殖复制”是指在感染后4天如先前段落所述在体外在人细胞系中的病毒扩增率小于1的病毒。WO 02/42480或美国专利第6,761,893号中描述的测定适用于测定病毒扩增率。

[0185] 如先前段落所述,病毒在体外在人细胞系中的扩增或复制通常表示为从感染的细胞产生的病毒(输出)与最初用于感染第一位置中的细胞的量(输入)之比(称为“扩增率”)。为“1”的扩增率定义了其中从被感染的细胞产生的病毒量与最初用于感染细胞的量相同(这意味着感染的细胞允许病毒感染和繁殖)的扩增状态。相反地,小于1的扩增率,即,与输入水平相比,输出降低,表明缺乏生殖复制,因此弱化了病毒。

[0186] 本文中所谓“辅佐”是指重组MVA的特定编码蛋白或组分增强了由重组MVA的其他一种或多种编码蛋白或组分产生的免疫应答。

[0187] 表达盒/控制序列. 在各个方面, 本文所述的一种或多种核酸体现在一种或多种表达盒中, 在所述表达盒中一种或多种核酸与表达控制序列可操作地连接。“可操作地连接的”意指所描述的组分在关系上允许它们以其预期的方式(例如, 转录待表达的核酸的启动子)起作用。联接与编码序列可操作地连接的表达控制序列, 使得在与表达控制序列相容的条件下实现编码序列的表达。表达控制序列包括但不限于适当的启动子、增强子、转录终止子、编码蛋白质的开放阅读框起始处的起始密码子、内含子的剪接信号和框内终止密码子。合适的启动子包括但不限于SV40早期启动子、RSV启动子、逆转录病毒LTR、腺病毒主要晚期启动子、人CMV立即早期I启动子和各种痘病毒启动子, 包括但不限于以下痘苗病毒或MVA衍生和FPV衍生的启动子: 30K启动子、I3启动子、PrS启动子、PrS5E启动子、Pr7.5K、PrHyb启动子、Pr13.5长启动子、40K启动子、MVA-40K启动子、FPV 40K启动子、30k启动子、PrSynIIIm启动子、PrLE1启动子和PR1238启动子。在WO 2010/060632、WO 2010/102822、WO 2013/189611、WO 2014/063832和WO 2017/021776(其以引用方式)中进一步描述了另外的启动子。

[0188] 另外的表达控制序列包括但不限于前导序列、终止密码子、多腺苷酸化信号以及在所需宿主系统中适当地转录和随后翻译编码所需重组蛋白(例如, HER2、Brachyury和/或CD40L)的核酸序列所必需的任何其他序列。痘病毒载体还可以包含在所需宿主系统中转移和随后复制含有核酸序列的表达载体所必需的另外的元件。本领域技术人员将进一步理解, 此类载体可以使用常规方法(Ausubel等人, (1987)的“Current Protocols in Molecular Biology,” John Wiley and Sons, New York, N.Y.)来容易地构建, 并且可商购获得。

[0189] 用于施用组合的方法和给药方案. 在一个或多个方面, 本发明的组合可以作为同源和/或异源初免-加强方案的一部分施用。如图7所示的数据部分地说明, 同源初免加强方案增强受试者的特异性CD8和CD4 T细胞应答。因此, 在一个或多个实施方案中, 是用于减小癌症患者的肿瘤大小和/或提高癌症患者的存活率的组合和/或方法, 所述方法包括向所述癌症患者施用本公开的组合, 其中将所述组合作为同源或异源初免-加强方案的一部分施用。

[0190] 包含转基因的重组MVA病毒的产生

[0191] 本文提供的重组MVA病毒可以通过本领域中已知的常规方法产生。获得重组痘病毒或将外源编码序列插入痘病毒基因组的方法是本领域技术人员所公知的。例如, 用于标准分子生物学技术的方法诸如DNA的克隆、DNA和RNA分离、蛋白质印迹分析、RT-PCR和PCR扩增技术描述于Molecular Cloning, A Laboratory Manual(第2版, Sambrook等人, Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989))中, 并且用于病毒的处理和操作的技術描述于Virology Methods Manual(Mahy等人(编辑), Academic Press(1996))中。类似地, 用于MVA的处理、操纵和遗传工程的技术和诀窍描述于Molecular Virology: A Practical Approach(Davison&Elliott(编辑), The Practical Approach Series, IRL Press at Oxford University Press, Oxford, UK(1993)(参见, 例如, “第9章: Expression of genes by Vaccinia virus vectors”))和Current Protocols in Molecular Biology(John

Wiley&Son, Inc. (1998) (参见, 例如, 第16章, 第IV节: “Expression of proteins in mammalian cells using vaccinia viral vector”)) 中。

[0192] 为了产生本文所公开的各种重组MVA病毒, 不同的方法可能是适用的。可以将待插入病毒中的DNA序列放入大肠杆菌质粒构建体中, 所述质粒构建体中已插入了与痘病毒的DNA区段同源的DNA。单独地, 可以将待插入的DNA序列与启动子连接。可以将启动子-基因键联置于质粒构建体中, 使得启动子-基因键联的两端侧接有DNA, 所述DNA与侧接含有非必需基因座的痘病毒DNA的区域的DNA序列同源。可以通过在大肠杆菌中繁殖来扩增所得质粒构建体并分离所得质粒构建体。可以在用MVA病毒感染培养物的同时, 将含有待插入的DNA基因序列的分离的质粒转染到例如鸡胚成纤维细胞 (CEF) 的细胞培养物中。质粒中的同源MVA病毒DNA与病毒基因组之间的重组分别可以产生因外源DNA序列的存在而修饰的痘病毒。

[0193] 根据优选的实施方案, 可以用MVA病毒感染合适的细胞培养物的细胞, 例如CEF细胞。随后可以用包含一种或多种外源或异源基因 (诸如本公开中提供的一种或多种核酸) 的第一质粒载体转染感染的细胞; 所述基因优选在痘病毒表达控制元件的转录控制下。如上文中所解释的, 质粒载体还包含能够指导将外源序列插入MVA病毒基因组的选定部分中的序列。任选地, 质粒载体还包含盒, 所述盒包含与痘病毒启动子可操作地连接的标志物和/或选择基因。合适的标志物或选择基因是例如编码绿色荧光蛋白、 $\beta$ -半乳糖苷酶、新霉素-磷酸核糖基转移酶或其他标志物的基因。选择盒或标志物盒的使用简化了所产生的重组痘病毒的鉴定和分离。然而, 重组痘病毒还可以通过PCR技术鉴定。随后, 可以用如上所述获得的重组痘病毒感染另外的细胞, 并用包含一种或多种第二外源或异源基因的第二载体转染。如果该基因应被引入痘病毒基因组的不同插入位点, 则第二载体在痘病毒同源序列上也不相同, 所述痘病毒同源序列指导所述一种或多种第二外源基因整合到痘病毒基因组中。发生同源重组后, 可以分离出包含两种或更多种外源或异源基因的重组病毒。为了将另外的外源基因引入重组病毒中, 可以通过使用在先前的步骤中分离的重组病毒 (用于转染) 并通过使用包含另外的一种或多种外源基因的另外的载体 (用于转染) 来重复感染和转染的步骤。

[0194] 或者, 如上所述的感染和转染的步骤是可互换的, 即, 可以首先用包含外源基因的质粒载体转染合适的细胞, 然后用痘病毒将其感染。作为另外的替代方案, 还可能将每个外源基因引入不同的病毒中, 与所有获得的重组病毒共感染细胞, 并筛选包括所有外源基因的重组体。第三替代方案是在体外连接DNA基因组和外源序列, 并使用辅助病毒重建重组痘苗病毒DNA基因组。第四替代方案是大肠杆菌或另一细菌物种中的克隆为细菌人工染色体 (BAC) 的MVA病毒基因组与侧接DNA序列的线性外源序列之间的同源重组, 所述DNA序列与侧接MVA病毒基因组中所需整合位点的序列同源。

[0195] 可以将本公开的一种或多种核酸插入MVA病毒或MVA病毒载体的任何合适的部分中。MVA病毒的合适部分是MVA基因组的非必需部分。MVA基因组的非必需部分可以是MVA基因组的基因间区域或已知的缺失位点1-6。可选地或另外地, 重组MVA的非必需部分可以是MVA基因组的对于病毒生长是非必需的编码区。然而, 插入位点不限于MVA基因组中的这些优选插入位点, 因为在本发明的范围内的是: 只要可能获得可以在至少一种细胞培养系统 (诸如鸡胚成纤维细胞 (CEF细胞)) 中扩增和繁殖的重组体, 就可以将本发明的核酸 (例如, HER2、Brachyury、HERV-K-env、HERV-K-gag、PRAME、FOLR1和CD40L和/或4-1BBL) 和如本文所

述的任何伴随的启动子插入病毒基因组中的任何位置。

[0196] 优选地,可以将本发明的核酸插入MVA病毒的一个或多个基因间区域(IGR)中。术语“基因间区域”优选地是指病毒基因组中位于MVA病毒基因组的两个相邻的开放阅读框(ORF)之间,优选地在MVA病毒基因组的两个必需ORF之间的那些部分。对于MVA,在某些实施方案中,IGR选自IGR 07/08、IGR 44/45、IGR 64/65、IGR88/89、IGR 136/137和IGR 148/149。

[0197] 对于MVA病毒,可以将核苷酸序列另外地或可选地插入一个或多个已知的缺失位点,即,MVA基因组的缺失位点I、II、III、IV、V或VI中。术语“已知的缺失位点”是指通过对CEF细胞连续传代而进行缺失的MVA基因组的那些部分,所述CEF细胞的特征为相对于所述MVA所源自的亲本病毒(特别是亲本绒毛膜尿囊安卡拉痘苗病毒(CVA))的基因组的传代516,例如,如Meisinger-Henschel等人((2007) J.Gen.Virol.88:3249-3259)中所描述的。

[0198] 疫苗

[0199] 在某些实施方案中,可以将本公开的重组MVA配制为疫苗的一部分。为了制备疫苗,可以将MVA病毒转化成生理上可接受的形式。

[0200] 以下是示例性制备。将纯化的病毒以 $5 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>/ml的滴度(配制于10mM Tris, 140mM NaCl, pH 7.4中)在-80°C下储存。为了制备疫苗注射剂(vaccine shot),例如,可以在安瓿(优选玻璃安瓿)中将 $1 \times 10^8$ - $1 \times 10^9$ 个颗粒的病毒在2%蛋白胍和1%人白蛋白存在的情况下于磷酸缓盐缓冲盐水(PBS)中冻干。或者,可以通过逐步冷冻干燥制剂中的病毒来制备疫苗注射剂。在某些实施方案中,制剂包含另外的添加剂,诸如甘露醇、葡聚糖、糖、甘氨酸、乳糖、聚乙烯吡咯烷酮或适合体内施用的其他添加剂,诸如但不限于抗氧化剂或惰性气体、稳定剂或重组蛋白(例如,人血清白蛋白)。然后将安瓿密封,并且可以在适当的温度(例如,4°C至室温)下储存数月。然而,只要不需要,优选将安瓿在低于-20°C,最优选在约-80°C的温度下储存。

[0201] 在涉及疫苗接种或疗法的各个实施方案中,将冻干物溶解在0.1至0.5ml的水溶液,优选生理盐水或Tris缓冲液(诸如10mM Tris,140mM NaCl pH 7.7)中。预期可以将本公开的重组MVA、疫苗或药物组合物以 $10^4$ 至 $10^{10}$  TCID<sub>50</sub>/ml、 $10^5$ 至 $5 \times 10^9$  TCID<sub>50</sub>/ml、 $10^6$ 至 $5 \times 10^9$  TCID<sub>50</sub>/ml或 $10^7$ 至 $5 \times 10^9$  TCID<sub>50</sub>/ml的浓度范围配制在溶液中。用于人的优选剂量包括 $10^6$ 至 $10^{10}$  TCID<sub>50</sub>,包括 $10^6$  TCID<sub>50</sub>、 $10^7$  TCID<sub>50</sub>、 $10^8$  TCID<sub>50</sub>、 $5 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>、 $10^9$  TCID<sub>50</sub>、 $5 \times 10^9$  TCID<sub>50</sub>或 $10^{10}$  TCID<sub>50</sub>的剂量。剂量和施用次数的优化在本领域技术人员的技术和知识之内。

[0202] 在一个或多个优选的实施方案中,如本文所述,将重组MVA静脉内施用至癌症患者。在其他实施方案中,将重组MVA肿瘤内施用至癌症患者。在其他实施方案中,将重组MVA在同一时间或在不同时间静脉内和肿瘤内施用至癌症患者。

[0203] 在另外的实施方案中,可以将免疫检查点拮抗剂或激动剂,或优选抗体全身性或局部施用,即,通过腹膜内、肠胃外、皮下、静脉内、肌内、鼻内、真皮内或本领域技术人员已知的任何其他施用途径施用。

[0204] 药盒、组合物和使用方法. 在各个实施方案中,本发明涵盖药盒、药物组合、药物组合物和/或免疫原性组合,其包含a)含有本文所述的核酸的重组MVA和/或b)本文所述的一种或多种抗体。

[0205] 预期所述药盒和/或组合物可以包含一个或多个容器或小瓶的本公开的重组痘病毒、一个或多个容器或小瓶的本公开的抗体以及用于施用重组MVA和抗体的说明书。预期在更具体的实施方案中,所述药盒可以包括用于在第一初免施用中施用重组MVA和抗体,然后施用重组MVA和抗体的一次或多次后续加强施用的说明书。

[0206] 本文所提供的药盒和/或组合物通常可以包括一种或多种药学上可接受和/或批准的载体、添加剂、抗生素、防腐剂、稀释剂和/或稳定剂。此类辅助物质可以是水、盐水、甘油、乙醇、润湿剂或乳化剂、pH缓冲物质等。合适的载体通常是大的、缓慢代谢的分子,诸如蛋白质、多糖、聚乳酸、聚乙醇酸、多聚氨基酸、氨基酸共聚物、脂质聚集体等。

#### [0207] 某些示例性实施方案

[0208] 实施方案1是一种用于减小患有癌性肿瘤的受试者的肿瘤大小和/或提高患有癌性肿瘤的受试者的存活率的方法,所述方法包括向所述受试者肿瘤内施用重组修饰的安卡拉痘苗(MVA),所述重组修饰的安卡拉痘苗(MVA)包含编码肿瘤相关抗原(TAA)的第一核酸和编码4-1BBL的第二核酸,其中与非肿瘤内注射包含编码TAA和4-1BBL抗原的第一核酸和第二核酸的重组MVA病毒相比,肿瘤内施用所述重组MVA增强所述癌性肿瘤中的炎症应答,增加肿瘤减小程度和/或提高所述受试者的总体存活率。

[0209] 实施方案2是一种用于减小患有癌性肿瘤的受试者的肿瘤大小和/或提高患有癌性肿瘤的受试者的存活率的方法,所述方法包括向所述受试者静脉内施用重组修饰的安卡拉痘苗(MVA),所述重组修饰的安卡拉痘苗(MVA)包含编码肿瘤相关抗原(TAA)的第一核酸和编码4-1BBL的第二核酸,其中与非静脉内注射包含编码TAA和4-1BBL抗原的第一核酸和第二核酸的重组MVA病毒相比,静脉内施用所述重组MVA增强自然杀伤(NK)细胞应答并且增强对所述TAA具有特异性的CD8 T细胞应答。

[0210] 实施方案3是一种用于减小患有癌性肿瘤的受试者的肿瘤大小和/或提高患有癌性肿瘤的受试者的存活率的方法,所述方法包括向所述受试者施用重组修饰的安卡拉痘苗(MVA),所述重组修饰的安卡拉痘苗(MVA)包含编码肿瘤相关抗原(TAA)的第一核酸和编码4-1BBL的第二核酸,其中与单独施用重组MVA和4-1BBL抗原相比,施用所述重组MVA增加肿瘤减小程度和/或提高所述受试者的总体存活率。

[0211] 实施方案4是一种在受试者的癌性肿瘤中诱导增强的炎症应答的方法,所述方法包括向所述受试者肿瘤内施用重组修饰的安卡拉痘苗(MVA),所述重组修饰的安卡拉痘苗(MVA)包含编码第一异源肿瘤相关抗原(TAA)的第一核酸和编码4-1BBL抗原的第二核酸,其中与非肿瘤内注射包含编码异源肿瘤相关抗原和4-1BBL抗原的第一核酸和第二核酸的重组MVA病毒所产生的炎症应答相比,肿瘤内施用所述重组MVA在所述肿瘤中产生增强的炎症应答。这种增强的炎症应答在本文其他地方讨论,并且可以包括例如NK细胞和T细胞的诱导。

[0212] 实施方案5是一种用于减小患有癌性肿瘤的受试者的肿瘤大小和/或提高患有癌性肿瘤的受试者的存活率的方法,所述方法包括向所述受试者施用重组修饰的安卡拉痘苗(MVA),所述重组修饰的安卡拉痘苗(MVA)包含编码内源性逆转录病毒抗原(ERV)的第一核酸和编码4-1BBL的第二核酸,其中与单独施用重组MVA和4-1BBL抗原相比,施用所述重组MVA增加肿瘤减小程度和/或提高所述受试者的总体存活率。

[0213] 实施方案6是根据实施方案1-5中任一项的方法,其中所述受试者是人。

[0214] 实施方案7是根据实施方案1-4中任一项的方法,其中所述TAA是内源性逆转录病毒(ERV)蛋白。

[0215] 实施方案8是根据实施方案7的方法,其中所述ERV是在肿瘤细胞中表达的ERV蛋白。

[0216] 实施方案9是根据实施方案7-8中任一项的方法,其中所述ERV来自人内源性逆转录病毒蛋白K(HERV-K)家族。

[0217] 实施方案10是根据实施方案9的方法,其中所述HERV-K蛋白选自HERV-K包膜蛋白、HERV-K gag蛋白和HERV-K mel蛋白。

[0218] 实施方案11是根据实施方案9的方法,其中所述HERV-K蛋白选自HERV-K包膜蛋白、HERV-K gag蛋白、HERV-K mel蛋白及其免疫原性片段。

[0219] 实施方案12是根据实施方案1-6中任一项的方法,其中所述TAA选自由以下组成的组:癌胚抗原(CEA)、细胞表面相关的粘蛋白1(MUC-1)、前列腺酸性磷酸酶(PAP)、前列腺特异性抗原(PSA)、人表皮生长因子受体2(HER-2)、存活素、酪氨酸相关蛋白1(TRP1)、酪氨酸相关蛋白1(TRP2)、Brachyury、FOLR1、PRAME、p15以及它们的组合。

[0220] 实施方案13是根据实施方案1-6和12中任一项的方法,其中所述TAA选自由以下组成的组:癌胚抗原(CEA)和细胞表面相关的粘蛋白1(MUC-1)。

[0221] 实施方案14是根据实施方案1-6和12中任一项的方法,其中所述TAA选自由以下组成的组:PAP或PSA。

[0222] 实施例15是根据实施例1-6、12和14中任一项的方法,其中所述TAA是PSA。

[0223] 实施方案16是根据实施方案1-6中任一项的方法、其中所述TAA选自由以下组成的组:5- $\alpha$ 还原酶、甲胎蛋白(AFP)、AM-1、APC、April、B黑素瘤抗原基因(BAGE)、 $\beta$ -连环蛋白、Bcl12、bcr-abl、Brachyury、CA-125、半胱天冬酶8(CASP-8,也称为FLICE)、组织蛋白酶类、CD19、CD20、CD21/补体受体2(CR2)、CD22/BL-CAM、CD23/Fc $\epsilon$ R11、CD33、CD35/补体受体1(CR1)、CD44/PGP-1、CD45/白细胞共同抗原("LCA")、CD46/膜辅因子蛋白(MCP)、CD52/CAMPATH-1、CD55/促衰变因子(DAF)、CD59/保护素、CDC27、CDK4、癌胚抗原(CEA)、c-myc、环加氧酶2(cox-2)、结直肠癌缺失基因("DCC")、Dcr3、E6/E7、CGFR、EMBP、Dna78、法呢基转移酶、成纤维细胞生长因子8a(FGF8a)、成纤维细胞生长因子8b(FGF8b)、FLK-1/KDR、叶酸受体、G250、G黑素瘤抗原基因家族(GAGE家族)、胃泌素17、胃泌素释放激素、神经节苷脂2(GD2)/神经节苷脂3(GD3)/神经节苷脂单唾液酸2("GM2")、促性腺激素释放激素(GnRH)、UDP-GlcNAc:R1Man( $\alpha$ 1-6)R2[GlcNAc:Man( $\alpha$ 1-6)] $\beta$ 1,6-N-乙酰氨基葡萄糖氨基转移酶V(GnT V)、GP1、gp100/Pme117、gp-100-in4、gp15、gp75/酪氨酸相关蛋白1(gp75/TRP-1)、人绒毛膜促性腺激素(hCG)、乙酰肝素酶、HER2、人乳腺肿瘤病毒(HMTV)、70千道尔顿的热休克蛋白("HSP70")、人端粒酶逆转录酶(hTERT)、胰岛素样生长因子受体1(IGFR-1)、白介素13受体(IL-13R)、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)、Ki67、KIAA0205、K-ras、H-ras、N-ras、KSA、LKLR-FUT、黑素瘤抗原编码基因1(MAGE-1)、黑素瘤抗原编码基因2(MAGE-2)、黑素瘤抗原编码基因3(MAGE-3)、黑素瘤抗原编码基因4(MAGE-4)、乳腺珠蛋白、MAP17、T细胞1识别的Melan-A/黑素瘤抗原(MART-1)、间皮素、MIC A/B、MT-MMP、粘蛋白、睾丸特异性抗原NY-ESO-1、骨粘连蛋白、p15、P170/MDR1、p53、p97/黑素转铁蛋白、PAI-1、血小板衍生生长因子(PDGF)、 $\mu$ PA、PRAME、前列腺碱性蛋白、祖细胞生成素、前列腺特异性抗原(PSA)、前列腺特异

性膜抗原 (PSMA)、RAGE-1、Rb、RCAS1、SART-1、SSX家族、STAT3、STn、TAG-72、转化生长因子- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ )、转化生长因子- $\beta$  (TGF- $\beta$ )、胸腺素- $\beta$ -15、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、TP1、TRP-2、酪氨酸酶、血管内皮生长因子 (VEGF)、ZAG、p16INK4和谷胱甘肽-S-转移酶 (GST),由以下组成的组:细胞表面相关的粘蛋白1 (MUC-1)、前列腺酸性磷酸酶 (PAP)、前列腺特异性抗原 (PSA)、人表皮生长因子受体2 (HER-2)、存活素、酪氨酸相关蛋白1 (TRP1)、酪氨酸相关蛋白1 (TRP2)、Brachyury以及它们的组合。

[0224] 实施方案17是根据实施方案1-16中任一项的方法,其中所述重组MVA还包含编码CD40L抗原的第三核酸。

[0225] 实施方案18是根据实施方案1-17中任一项的方法,所述方法还包括向所述受试者施用至少一种免疫检查点分子拮抗剂或激动剂。

[0226] 实施方案19是根据实施方案18的方法,其中所述免疫检查点分子拮抗剂或激动剂选自CTLA-4、PD-1、PD-L1、LAG-3、TIM-3和ICOS。

[0227] 实施方案20是根据实施方案18-19中任一项的方法,其中所述免疫检查点分子拮抗剂是PD-1和/或PD-L1。

[0228] 实施方案21是根据实施方案20的方法,其中所述免疫检查点分子拮抗剂还包含LAG-3。

[0229] 实施方案22是根据实施方案18-21中任一项的方法,其中所述免疫检查点分子拮抗剂包含抗体。

[0230] 实施方案23是根据实施方案1-17中任一项的方法,所述方法还包括向所述受试者施用对第二TAA具有特异性的抗体。

[0231] 实施方案24是根据实施方案23的方法,其中所述对第二TAA具有特异性的抗体对在肿瘤的细胞膜上表达的抗原具有特异性。

[0232] 实施方案25是根据实施方案23的方法,其中所述对第二TAA具有特异性的抗体a)对在肿瘤的细胞膜上表达的抗原具有特异性并且b)包含Fc结构域。

[0233] 实施方案26是用于根据实施方案1-25中任一项的方法的药物组合物。

[0234] 实施方案27是用于根据实施方案1-25中任一项的方法的疫苗。

[0235] 实施方案28是一种用于治疗患有癌症的受试者的重组修饰的安卡拉痘苗 (MVA),所述重组MVA包含:a)编码肿瘤相关抗原 (TAA)的第一核酸和b)编码4-1BBL的第二核酸。

[0236] 实施方案29是根据实施方案28的重组MVA,其中所述TAA是内源性逆转录病毒 (ERV) 蛋白。

[0237] 实施方案30是根据实施方案29的重组MVA,其中所述ERV蛋白来自人内源性逆转录病毒蛋白K (HERV-K) 家族。

[0238] 实施方案31是根据实施方案30的重组MVA,其中所述逆转录病毒蛋白K选自HERV-K包膜蛋白、HERV-K gag蛋白和HERV-Kme1蛋白。

[0239] 实施方案32是根据实施方案28-31中任一项的重组MVA,所述重组MVA还包含编码CD40L的第三核酸。

[0240] 实施方案33是一种药物组合,所述药物组合包含:a)实施方案28-32中任一项的重组MVA和b)至少一种免疫检查点分子拮抗剂或激动剂中的至少一者。

[0241] 实施方案34是根据实施方案33的药物组合,其中所述免疫检查点分子拮抗剂或激

动剂选自CTLA-4、PD-1、PD-L1、LAG-3、TIM-3和ICOS。

[0242] 实施方案35是根据实施方案34的药物组合,其中所述免疫检查点分子拮抗剂是PD-1和/或PD-L1。

[0243] 实施方案36是根据实施方案35的药物组合,其中所述免疫检查点分子拮抗剂还包含LAG-3。

[0244] 实施方案37是根据实施方案33-36中任一项的药物组合,其中所述免疫检查点分子拮抗剂包含抗体。

[0245] 实施方案38是一种药物组合,所述药物组合包含:a) 实施方案28-32中任一项的重组MVA,b) 对第二TAA具有特异性的抗体。

[0246] 实施方案39是根据实施方案38的药物组合,其中所述对第二TAA具有特异性的抗体对在肿瘤的细胞膜上表达的抗原具有特异性。

[0247] 实施方案40是根据实施方案39的药物组合,其中所述对第二TAA具有特异性的抗体a) 对在肿瘤的细胞膜上表达的抗原具有特异性并且b) 包含Fc结构域。

[0248] 实施方案41是根据实施方案28-32中任一项的重组MVA、根据实施方案27的疫苗、根据实施方案26的药物组合物、根据实施方案33-40中任一项的药物组合,其用于减小患有癌性肿瘤的受试者的肿瘤大小和/或提高患有癌性肿瘤的受试者的存活率。

[0249] 实施方案42是根据实施方案28-32中任一项的重组MVA、根据实施方案27的疫苗、根据实施方案26的药物组合物、根据实施方案33-40中任一项的药物组合,其用于减小患有癌性肿瘤的受试者的肿瘤大小和/或提高患有癌性肿瘤的受试者的存活率的方法中,所述方法包括向所述受试者肿瘤内施用实施方案28-32的重组MVA、根据实施方案27的疫苗、根据实施方案26的药物组合物或根据实施方案33-40中任一项的药物组合,其中与非肿瘤内注射包含编码TAA和4-1BBL抗原的第一核酸和第二核酸的重组MVA病毒相比,肿瘤内施用增强所述癌性肿瘤中的炎症应答,增加肿瘤减小程度和/或提高所述受试者的总体存活率。

[0250] 实施方案43是根据实施方案28-32中任一项的重组MVA、根据实施方案27的疫苗、根据实施方案26的药物组合物、根据实施方案33-40中任一项的药物组合,其用于减小患有癌性肿瘤的受试者的肿瘤大小和/或提高患有癌性肿瘤的受试者的存活率的方法中,所述方法包括向所述受试者静脉内施用实施方案28-32的重组MVA、根据实施方案27的疫苗、根据实施方案26的药物组合物或根据实施方案33-40中任一项的药物组合,其中与静脉内施用包含编码TAA和4-1BBL抗原的第一核酸和第二核酸的重组MVA病毒相比,静脉内施用增强增加肿瘤减小程度和/或提高所述受试者的总体存活率。

[0251] 实施方案44是根据实施方案28-32中任一项的重组MVA、根据实施方案27的疫苗、根据实施方案26的药物组合物、根据实施方案33-40中任一项的药物组合,其用于在受试者的癌性肿瘤中诱导增强的炎症应答的方法中,所述方法包括向所述受试者肿瘤内施用实施方案28-32的重组MVA、根据实施方案27的疫苗、根据实施方案26的药物组合物或根据实施方案33-40中任一项的药物组合,其中与非肿瘤内注射包含编码TAA和4-1BBL抗原的第一核酸和第二核酸的重组MVA病毒相比,肿瘤内施用增强所述癌性肿瘤中的炎症应答。

[0252] 实施方案45是根据实施方案28-32中任一项的重组MVA、根据实施方案27的疫苗、根据实施方案26的药物组合物、根据实施方案33-40中任一项的药物组合,其用于治疗受试者的癌症的方法中。

[0253] 实施方案46是根据实施方案28-32中任一项的重组MVA、根据实施方案27的疫苗、根据实施方案26的药物组合物、根据实施方案33-40中任一项的药物组合,其用于治疗癌症的方法中,其中所述癌症选自由以下组成的组:乳腺癌、肺癌、头颈癌、甲状腺癌、黑素瘤、胃癌、膀胱癌、肾癌、肝癌、黑素瘤、胰腺癌、前列腺癌、卵巢癌、尿路上皮癌、子宫颈癌或结直肠癌。

[0254] 实施方案47是根据实施方案44的重组MVA,其中所述增强的炎症应答定位于所述肿瘤。

[0255] 实施方案48是一种用于减小患有癌性肿瘤的受试者的肿瘤大小和/或提高患有癌性肿瘤的受试者的存活率的方法,所述方法包括向所述受试者肿瘤内施用重组修饰的安卡拉痘苗(MVA),所述重组修饰的安卡拉痘苗(MVA)包含编码肿瘤相关抗原(TAA)的第一核酸和编码CD40L的第二核酸,其中与非肿瘤内注射包含编码TAA和CD40L的第一核酸和第二核酸的重组MVA病毒相比,肿瘤内施用所述重组MVA增强所述癌性肿瘤中的炎症应答,增加肿瘤减小程度和/或提高所述受试者的总体存活率。

[0256] 实施方案49是一种用于减小患有癌性肿瘤的受试者的肿瘤大小和/或提高患有癌性肿瘤的受试者的存活率的方法,所述方法包括向所述受试者静脉内施用重组修饰的安卡拉痘苗(MVA),所述重组修饰的安卡拉痘苗(MVA)包含编码肿瘤相关抗原(TAA)的第一核酸和编码CD40L的第二核酸,其中与非静脉内注射包含编码TAA和CD40L抗原的第一核酸和第二核酸的重组MVA病毒相比,静脉内施用所述重组MVA增强自然杀伤(NK)细胞应答并且增强对所述TAA具有特异性的CD8 T细胞应答。

[0257] 实施方案50是一种用于减小患有癌性肿瘤的受试者的肿瘤大小和/或提高患有癌性肿瘤的受试者的存活率的方法,所述方法包括向所述受试者施用重组修饰的安卡拉痘苗(MVA),所述重组修饰的安卡拉痘苗(MVA)包含编码肿瘤相关抗原(TAA)的第一核酸和编码CD40L的第二核酸,其中与单独施用重组MVA和CD40L抗原相比,施用所述重组MVA增加肿瘤减小程度和/或提高所述受试者的总体存活率。

[0258] 实施方案51是根据实施方案28-32中任一项的重组MVA、根据实施方案27的疫苗、根据实施方案26的药物组合物、根据实施方案33-40中任一项的药物组合,其用于减小患有癌性肿瘤的受试者的肿瘤大小和/或提高患有癌性肿瘤的受试者的存活率的方法中,所述方法包括向所述受试者静脉内和/或肿瘤内施用实施方案28-32的重组MVA、根据实施方案27的疫苗、根据实施方案26的药物组合物或根据实施方案33-40中任一项的药物组合,其中与非静脉内或非肿瘤内施用选自下组的任何MVA相比,所述静脉内和/或肿瘤内施用增加肿瘤减小程度和/或提高所述受试者的总体存活率:1) 包含编码TAA的第一核酸和编码4-1BBL抗原的第二核酸的重组MVA病毒;2) 包含编码TAA的第一核酸和编码CD40L抗原的第二核酸的重组MVA病毒;或3) 包含编码TAA的第一核酸、编码4-1BBL抗原的第二核酸和编码CD40L抗原的第三核酸的重组MVA病毒。

[0259] 实施方案52是根据实施方案28-32中任一项的重组MVA、根据实施方案27的疫苗、根据实施方案26的药物组合物、根据实施方案33-40中任一项的药物组合,其用于减小患有癌性肿瘤的受试者的肿瘤大小和/或提高患有癌性肿瘤的受试者的存活率的方法中,所述方法包括向所述受试者静脉内和肿瘤内施用实施方案28-32的重组MVA、根据实施方案27的疫苗、根据实施方案26的药物组合物或根据实施方案33-40中任一项的药物组合,其中与非

静脉内或非肿瘤内施用选自下组的任何MVA相比,所述静脉内和肿瘤内施用增加肿瘤减小程度和/或提高所述受试者的总体存活率:1) 包含编码TAA的第一核酸和编码4-1BBL抗原的第二核酸的重组MVA病毒;2) 包含编码TAA的第一核酸和编码CD40L抗原的第二核酸的重组MVA病毒;或3) 包含编码TAA的第一核酸、编码4-1BBL抗原的第二核酸和编码CD40L抗原的第三核酸的重组MVA病毒。如对于本领域技术人员显而易见的,所述静脉内施用和肿瘤内施用可以在同一时间或在不同时间进行。

[0260] 实施例

[0261] 以下实施例说明了本发明但不应解释为以任何方式限制权利要求的范围。

[0262] 实施例1:重组MVA-TAA-4-1BBL和MVA-TAA-CD40L的构建

[0263] 通过将所示的转基因及其启动子插入载体MVA-BN中来实现体现本公开的元件的重组MVA病毒的产生。使用含有转基因和选择盒以及与MVA-BN内的靶向基因座同源的序列的重组质粒插入转基因。通过将重组质粒转染到MVA-BN感染的CEF细胞中来实现病毒基因组与重组质粒之间的同源重组。然后在第二步骤中借助表达CRE重组酶的质粒删除选择盒,所述CRE重组酶特异性地靶向侧接选择盒的loxP位点,从而切除间插序列。

[0264] 为了构建MVA-OVA和MVA-OVA-4-1BBL,重组质粒包括转基因OVA或OVA和4-1BBL,每个转基因前面都有启动子序列以及与MVA-BN内的靶向插入位点相同的序列,从而允许病毒基因组中进行同源重组。

[0265] 为了构建MVA-OVA-CD40L,重组质粒包括转基因OVA和CD40L,每个转基因前面都有启动子序列以及与MVA-BN内的靶向插入位点相同的序列,从而允许病毒基因组中进行同源重组。

[0266] 为了构建MVA-gp70-4-1BBL,重组质粒包括转基因gp70和4-1BBL,每个转基因前面都有启动子序列以及与MVA-BN内的靶向插入位点相同的序列,从而允许病毒基因组中进行同源重组。相似地,为了构建MVA-gp70-CD40L,重组质粒包括两个转基因gp70和CD40L,每个转基因前面都有启动子序列,当需要构建MVA-gp70-4-1-BBL-CD40L时对重组质粒进行适当的改变。

[0267] 为了构建MVA-HERV-K、MVA-HERV-K-4-1BBL和MVA-HERV-K-4-1BBL-CD40L,重组质粒分别包括HERV-K、HERV-K和4-1BBL,以及HERV-K、4-1BBL和CD40L转基因。每个转基因或转基因组前面都有启动子序列以及与MVA-BN内的靶向插入位点相同的序列,从而允许病毒基因组中进行同源重组。

[0268] 为了产生上述mBN MVA,将CEF细胞培养物各自用MVA-BN接种,并各自用相应的重组质粒转染。继而,将来自这些细胞培养物的样品接种在包含诱导选择压力的药物的培养基中的CEF培养物中,并通过斑块纯化分离表达荧光的病毒克隆。在第二步骤中,通过CRE介导的重组介导中含荧光蛋白选择盒的丢失,所述重组涉及在每个构建体中侧接选择盒的两个loxP位点。在第二重组步骤之后,仅保留启动子插入MVA-BN的靶向基因座中的转基因序列(例如,OVA、4-1BBL、gp70、HERV-K和/或CD40L)。制备缺少选择盒的斑块纯化的病毒原液。

[0269] 在用所述构建体接种的细胞中证明了所鉴定的转基因的表达。

[0270] 通过在细菌人工染色体(BAC)中使用MVA-BN的克隆型式进行本文所述构建体的产生。重组质粒包含所述转基因序列,每个转基因序列在启动子的下游。质粒包括也存在于MVA中的序列,因此允许特异性靶向整合位点。简而言之,通过将BAC DNA转染到BHK-21细胞

中并用Shope纤维瘤病毒作为辅助病毒对其进行超感染,从BAC重建感染性病毒。在CEF细胞培养物中再传代三次之后,获得了构建体的无辅助病毒型式。Baur等人((2010) Virol.84: 8743-52,“Immediate-early expression of a recombinant antigen by modified vaccinia virus Ankara breaks the immunodominance of strong vector-specific B8R antigen in acute and memory CD8 T-cell responses”)中也发现了示例性的MVA产生。

[0271] 实施例2:MVA-OVA-4-1BBL感染的肿瘤细胞的4-1BBL介导的CD8 T细胞共刺激影响细胞因子产生而无需DC

[0272] 将来自C57BL/6小鼠的骨髓细胞在存在重组Flt3L的情况下培养14天之后,产生了树突状细胞(DC)。将B16.F10(黑素瘤模型)细胞用MVA-OVA、MVA-OVA-CD40L或MVA-OVA-4-1BBL以10MOI感染,并在37℃与5%CO<sub>2</sub>下培养过夜。第二天,收获被感染的肿瘤细胞并在指示时将其在存在DC的情况下以1:1的比例在37℃与5%CO<sub>2</sub>下共培养4小时。从OT-I小鼠磁纯化出幼稚OVA(257-264)特异性CD8<sup>+</sup>T细胞,并以1:5的比例添加至共培养物中。将细胞在37℃与5%CO<sub>2</sub>下培养48小时。然后,收集培养上清液用于通过Luminex进行细胞因子浓度分析。结果于图1中显示为上清液浓度:IL-6(图1A);GM-CSF(图1B);IL-2(图1C);和IFN- $\gamma$ (图1D)。数据表示为平均值 $\pm$ SEM。

[0273] 与之前的报道一致,MVA-OVA-CD40L对DC的激活及其抗原呈递能力有很大的影响。因此,MVA-OVA-CD40L感染的FLDC产生了大量的IL-6(图1A)。重要的是,OVA特异性T细胞应答可以在存在DC的情况下专门诱导,但不是由MVA-CD40L感染的B16.F10细胞本身直接诱导的(图1B和图1C)。这些结果表明,明确需要DC展示MVA-OVA-CD40L的益处。相比之下,MVA-OVA-4-1BBL在DC中不诱导IL-6产生,但是MVA-OVA-4-1BBL感染的B16.F10细胞以DC非依赖性方式引发T细胞激活细胞因子IFN- $\gamma$ 、IL-2和GM-CSF的分泌(图1A至图1D)。

[0274] 实施例3:MVA-OVA-4-1BBL感染的肿瘤细胞直接(即,无需DC)驱动抗原特异性CD8T细胞分化成激活的效应T细胞

[0275] 将来自C57BL/6小鼠的骨髓细胞在存在重组Flt3L的情况下培养14天之后,产生了树突状细胞(DC)。将B16.F10(黑素瘤模型)细胞用MVA-OVA、MVA-OVA-CD40L或MVA-OVA-4-1BBL以10MOI感染,并在37℃与5%CO<sub>2</sub>下培养过夜。第二天,收获被感染的肿瘤细胞并在指示时将其在存在DC的情况下以1:1的比例在37℃与5%CO<sub>2</sub>下共培养4小时。同时,从OT-I小鼠磁纯化出幼稚OVA(257-264)特异性CD8<sup>+</sup>T细胞,并按1:5的比例添加至共培养物中。将细胞在37℃5%CO<sub>2</sub>下孵育48小时。然后对细胞进行染色并通过流式细胞术进行分析。结果于图2中显示为OT-I CD8<sup>+</sup>T细胞上T-bet的GMFI(图2A)和OT-I CD8<sup>+</sup>T细胞的CD44<sup>+</sup>粒酶B<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ +TNF $\alpha$ <sup>+</sup>的百分比(图2B)。数据显示为平均值 $\pm$ SEM。

[0276] 结果表明,在不存在交叉呈递DC的情况下,粒酶B<sup>+</sup>和IFN $\gamma$ <sup>+</sup>细胞毒性效应T细胞的诱导依赖于4-1BBL(图2B)。与图1所示的结果一起,这些发现证明,与通过DC激活操作的MVA编码的CD40L相反,由MVA编码的4-1BBL以DC非依赖性方式直接作用于T细胞。

[0277] 实施例4:用编码CD40L或4-1BBL的MVA感染在肿瘤细胞系和巨噬细胞中诱导肿瘤细胞死亡

[0278] 将肿瘤细胞系B16.OVA(图3A和图3B)、MC38(图3C)和B16.F10(图3D)以指示的MOI感染20小时。然后,通过流式细胞术分析细胞的活力。通过ELISA定量图3A的样品中的血清

HMGB1 (图3B)。将骨髓来源的巨噬细胞 (BMDM) 以指示的MOI感染20小时。然后通过流式细胞术分析细胞的活力。结果示于图3A至图3E中。数据表示为平均值±SEM。

[0279] 如图3A和图3B所示,与PBS处理的肿瘤细胞相比,用MVA-OVA或MVA-OVA-CD40L感染导致轻度诱导细胞死亡。有趣的是,用MVA-OVA-4-1BBL感染在感染后18小时,显著增强了肿瘤细胞死亡。

[0280] 为了在非抗原细胞系中进一步证实这些结果,我们使用MVA、MVA-CD40L和MVA-4-1BBL(无一编码TAA)感染的MC38 (图3C) 和B16.F10 (图3D) 肿瘤细胞进行了相似的测定。一致地,用这些MVA感染在这些肿瘤细胞系中诱导细胞死亡,并有效杀死骨髓来源的巨噬细胞 (BMDM) (图3E)。总之,这些数据证明,当重组MVA表达CD40L或4-1BBL时,MVA感染导致肿瘤细胞和巨噬细胞死亡增加。

[0281] 对肿瘤细胞的溶瘤病毒感染导致诱导所谓的免疫原性细胞死亡 (ICD) (Workenhe 等人 (2014) Mol. Ther. 22:251-56)。ICD包括释放充当免疫系统的警报蛋白的细胞内蛋白质 (诸如钙网蛋白、ATP或HMGB1),导致增强的抗原呈递,从而诱导抗肿瘤免疫力。我们测试了MVA感染是否会借助于分泌的HMGB1导致诱导ICD。出乎意料的是,我们发现与MVA-OVA相比,MVA-OVA-4-1BBL和MVA-OVA-CD40L诱导HMGB1显著增加 (图3B)。

[0282] 实施例5:编码4-1BBL的MVA在体内诱导NK细胞激活

[0283] 给C57BL/6小鼠 (n=5/组) 静脉内免疫接种盐水或 $5 \times 10^7$  TCID<sub>50</sub>MVA-OVA (“rMVA”, 图4)、 $5 \times 10^7$  TCID<sub>50</sub> MVA-OVA-4-1BBL (“rMVA-4-1BBL”, 图4) 或 $5 \times 10^7$  TCID<sub>50</sub> MVA-OVA与200 μg抗4-1BBL抗体的组合 (克隆TKS-1)。24小时后,处死小鼠并处理脾脏供流式细胞术分析用。结果示于图4A和图4B中。示出了CD69 (图4A) 和CD70 (图4B) 的几何平均荧光强度 (GMFI)。数据显示为平均值±SEM,代表两次独立实验。

[0284] 结果表明,与IV施用不含4-1BBL的MVA-OVA相比,向MVA-OVA中添加4-1BBL增强了NK细胞应答的质量,并且与MVA-OVA相比,两种NK细胞激活标志物CD69和CD70都被显著上调 (图4A和图4B)。共注射阻断4-1BBL抗体显示,MVA-OVA诱导的NK细胞激活完全不依赖于4-1BBL,但当MVA-OVA-4-1BBL传递过多4-1BBL信号时,应答增强。

[0285] 实施例6:用编码4-1BBL的MVA进行静脉内免疫在体内促进血清IFN-γ分泌

[0286] 给C57BL/6小鼠 (n=5/组) 静脉内免疫接种盐水或 $5 \times 10^7$  TCID<sub>50</sub>“rMVA” (=MVA-OVA)、 $5 \times 10^7$  TCID<sub>50</sub>“rMVA-4-1BBL” (=MVA-OVA-4-1BBL) 或 $5 \times 10^7$  TCID<sub>50</sub> MVA-OVA与200 μg抗4-1BBL抗体的组合 (克隆TKS-1)。结果示于图5A和图5B中。数据显示为平均值±SEM。图5A:6小时后,取小鼠血液,从全血分离血清并通过Luminex测定血清中的IFN-γ浓度。图5B:3、21和45小时后,向小鼠静脉内注射布雷菲德菌素A以终止蛋白质分泌。免疫后6、24和48小时处死小鼠,并通过流式细胞术分析脾细胞。

[0287] 4-1BB介导的NK细胞激活与NK效应细胞因子IFN-γ的血清水平升高相吻合 (图5A)。已知NK细胞在激活后产生大量的IFN-γ。为了确定血清中升高的IFN-γ水平是否源于NK细胞,在静脉内注射指示的重组MVA载体后的不同时间点测定产生IFN-γ的NK细胞的比例。注射后6小时,当测量到高血清IFN-γ水平时,IFN-γ+NK细胞的百分比最高,此后缓慢下降 (图5B)。当使用MVA-OVA-4-1BBL时,观察到IFN-γ阳性NK细胞的最高频率。综上所述,这些数据表明,rMVA-4-1BBL的静脉内免疫导致NK细胞的强烈激活和NK细胞效应细胞因子IFN-γ的产生增加。

[0288] 实施例7:静脉内rMVA-4-1BBL免疫促进携带B16.OVA肿瘤的小鼠的血清IFN- $\gamma$ 分泌

[0289] 将携带B16.OVA肿瘤的C57BL/6小鼠 ( $n=5$ /组) 分组,并在肿瘤后接种第7天接受 i.v. (静脉内) PBS或 $5 \times 10^7$  TCID50 MVA-OVA (图中的“rMVA”)或MVA-OVA-4-1BBL (图中的“rMVA-4-1BBL”)。6小时后,取小鼠血液,从全血分离血清并通过Luminex测定血清中的IFN- $\gamma$  浓度。结果示于图6中。数据显示为平均值 $\pm$ SEM。

[0290] 图6所示的数据证明,在黑素瘤肿瘤模型中也可以获得与其他实验中报告的相似的对NK细胞的效应。免疫后6小时,在MVA-OVA-4-1BBL免疫的荷瘤小鼠中,血清IFN- $\gamma$  水平显著升高,表明强NK细胞激活 (图6)。

[0291] 实施例8:静脉内rMVA-4-1BBL初免和加强免疫增强抗原和载体特异性CD8+T细胞扩增

[0292] 图7A至图7D示出了静脉内rMVA-4-1BBL初免和加强免疫后的抗原和载体特异性。C57BL/6小鼠 ( $n=4$ /组) 在第0天接受盐水或 $5 \times 10^7$  TCID50 rMVA (=MVA-OVA)、 $5 \times 10^7$  TCID50 rMVA-4-1BBL (=MVA-OVA-4-1BBL) 或 $5 \times 10^7$  TCID50 rMVA与200 $\mu$ g抗4-1BBL抗体的组合 (克隆TKS-1) 的静脉内初免,并且在第41天接受加强免疫。在初次免疫后第6、21、35、48、64天取小鼠血液,并通过流式细胞术分析外周血。在初次免疫后第70天将小鼠处死。收集脾脏并进行流式细胞术分析。

[0293] 结果示于图7A至图7D中。图7A示出了外周血白细胞 (PBL) 中抗原 (OVA) 特异性CD8+T细胞的百分比,且图7B示出了PBL中载体 (B8R) 特异性CD8+T细胞的百分比。图7C说明了活细胞中抗原 (OVA) 特异性CD8+T细胞的百分比。图7D示出了活细胞中载体 (B8R) 特异性CD8+T细胞的百分比。数据显示为平均值 $\pm$ SEM。

[0294] 结果表明,B8特异性和OVA特异性CD8 T细胞在第一次免疫后第7天达到最大值,并且在第41天第二次免疫后进一步扩大 (图7A和图7B)。在第41天的时间点,与rMVA相比,无论对于B8还是OVA,rMVA-4-1BBL在抗原特异性T细胞应答方面均具有明显的益处。有趣的是,共注射阻断4-1BBL抗体显示,rMVA诱导的T细胞应答完全不依赖于4-1BBL,但当rMVA-4-1BBL传递过多4-1BBL信号时,应答增强 (图7A和图7B)。与这些结果一致,rMVA-4-1BBL初免/加强免疫也导致第一次免疫后70天脾脏中的OVA和B8特异性T细胞应答得到改善 (图7C和图7D)。

[0295] 实施例9:静脉内注射编码TAA和4-1BBL的MVA病毒的抗肿瘤效应增强

[0296] 将携带B16.OVA肿瘤的C57BL/6小鼠 ( $n=5$ /组) 分组,并在肿瘤接种后第7天 (黑色点线) 接受 i.v. (静脉内) PBS或 $5 \times 10^7$  TCID50MVA-OVA或 $5 \times 10^7$  TCID50 MVA-OVA-4-1BBL。定期测量肿瘤生长。如图8所示,与MVA或对照 (PBS) 相比,静脉内注射编码4-1BBL的MVA病毒导致肿瘤体积减小,因为肿瘤生长长期延迟。

[0297] 实施例10:肿瘤内注射编码4-1BBL或CD40L的MVA病毒的抗肿瘤效应增强

[0298] 将携带B16.OVA肿瘤的C57BL/6小鼠 ( $n=4-5$ /组) 分组并在肿瘤接种后第7天 (黑色点线)、第12天和第15天 (灰色虚线) 接受肿瘤内 (i.t.) PBS或 $5 \times 10^7$  TCID50 MVA-OVA (图中的“rMVA”)、MVA-OVA-CD40L (图中的“rMVA-CD40L”) 或MVA-OVA-4-1BBL (图中的“rMVA-4-1BBL”)。定期测量肿瘤生长。如图9A至图9D所示,通过肿瘤内注射编码TAA和4-1BBL或CD40L的MVA病毒,实现了抗肿瘤效应增强。更特别地,如图9D所示,利用编码4-1BBL的MVA病毒观

观察到显著更大程度的肿瘤生长减少。尽管本发明不受任何特定作用机制或作用方式的束缚,但关于在4-1BBL与CD40L之间观察到的差异的一种假设是4-1BBL旨在激活NK细胞和T细胞,而CD40L旨在激活DC。B16黑素瘤肿瘤被T细胞浸润的程度更大(Moseley等人(2016) Cancer Immunol. Res. 5 (1) :29-41);因此,在此情境下,编码4-1BBL的MVA比编码CD40L的MVA更有效。

[0299] 无论4-1BBL和CD40L对肿瘤生长或直径产生影响的确切机制或途径如何,图9中的数据表明,肿瘤内注射编码4-1BBL的MVA可以延长对肿瘤生长的控制,在某些情况下甚至完全排斥肿瘤。

[0300] 实施例11:肿瘤内注射编码TAA和CD40L的MVA病毒针对已确立结肠癌的抗肿瘤效应增强

[0301] 将携带MC38肿瘤的C57BL/6小鼠( $n=5$ /组)分组并在肿瘤接种后第14天(黑色点线)、第19天和第22天(黑色虚线)接受肿瘤内(i.t.)PBS或 $5 \times 10^7$  TCID<sub>50</sub> MVA-TAA(图中的“rMVA”)或MVA-TAA-CD40L(图中的“rMVA-CD40L”)。定期测量肿瘤生长。图10A、图10B和图10C示出了非抗原性的已确立MC38结肠癌的结果。在这些实验中,由MVA表达的TAA包括抗原AH1A5、p15E和TRP2。

[0302] 这些结果表明,在MC38结肠癌模型中,肿瘤内注射编码CD40L以及一种或多种TAA的MVA可以显著延迟肿瘤生长。

[0303] 实施例12:免疫检查点阻断物和肿瘤抗原特异性抗体与肿瘤内MVA-OVA-4-1BBL施用协同作用

[0304] 将B16.OVA黑素瘤细胞( $5 \times 10^5$ 个)皮下注射到C57BL/6小鼠中。当肿瘤直径达到约5mm时,将小鼠分组( $n=5$ /组),并在指示时(标记)腹膜内(i.p.)接受200 $\mu$ g IgG2a、抗TRP-1或抗PD-1。在肿瘤接种后第13天(黑色点线)、第18天和第21天(灰色虚线)给小鼠肿瘤内(i.t.)免疫接种PBS或 $5 \times 10^7$  TCID<sub>50</sub> MVA-OVA-4-1BBL。定期测量肿瘤生长。结果示于图11中。当将对肿瘤相关抗原(TAA)Trp1具有特异性的抗体(抗Trp1)与肿瘤内施用MVA-OVA-4-1BBL结合使用时,与单独抗PD-1相比,肿瘤体积减少程度增加(图11,中间一排)。当将免疫检查点分子抗体PD-1与肿瘤内施用MVA-OVA-4-1BBL结合时,与单独抗PD-1相比,肿瘤体积减少程度增加(图11,下面一排)。

[0305] 这些实验证明,抗PD-1和抗TRP-1抗体作为单药剂可以增强肿瘤生长控制,但任一抗体与MVA-OVA-4-1BBL的组合可提高MVA-OVA-4-1BBL所发挥的治疗效应。在此,肿瘤内MVA-4-1BBL与检查点阻断物或靶向TAA的抗体的组合疗法比任何单一疗法都具有更大的治疗活性。该数据还表明,潜在诱导ADCC的肿瘤特异性抗体可以与肿瘤内注射表达4-1BBL的MVA组合以产生协同效应。

[0306] 实施例13:与激动性抗CD137抗体治疗相比,肿瘤内MVA-OVA-4-1BBL注射的优异抗肿瘤效应

[0307] 将携带B16.OVA肿瘤的C57BL/6小鼠( $n=5$ /组)分组,并在肿瘤接种后第7天、第12天和第15天(黑色点线)肿瘤内注射PBS、 $5 \times 10^7$  TCID<sub>50</sub> MVA-OVA-4-1BBL或10 $\mu$ g抗4-1BB(3H3, BioXcell)。定期测量肿瘤生长。

[0308] 图12A示出了与激动性抗4-1BBL抗体(3H3)相比,MVA-OVA-4-1BBL的优异抗肿瘤效应。图12B示出了用MVA-OVA-4-1BBL进行的肿瘤内免疫在血液中专门诱导了OVA特异性T细

胞应答,而激动性抗4-1BBL抗体在血液中未诱导任何OVA特异性T细胞。

[0309] 因此,这些数据表明,就肿瘤特异性T细胞应答以及肿瘤生长控制而言,肿瘤内MVA-OVA-4-1BBL治疗比激动性抗CD137抗体更有效。

[0310] 实施例14:在CT26肿瘤模型中静脉内注射编码内源性逆转录病毒(ERV)抗原Gp70与CD40L的MVA的抗肿瘤效应增强

[0311] 将携带CT26肿瘤的Balb/c小鼠(n=5/组)分组,并在将肿瘤引入小鼠体内后第12天(黑色点线)接受静脉内(i.v.)PBS或 $5 \times 10^7$  TCID50 MVA-BN、MVA-Gp70或MVA-Gp70-CD40L。定期测量肿瘤生长。如图13A和图13B所示,与MVA或对照(PBS)相比,静脉内施用编码内源性逆转录病毒抗原Gp70的MVA病毒导致肿瘤体积减小。当MVA-Gp70-CD40L另外编码CD40L时,抗肿瘤效应进一步提高。

[0312] 图13C示出了静脉内注射MVA-Gp70或MVA-Gp70-CD40L后,血液中Gp70特异性CD8 T细胞的诱导。

[0313] 因此,在这些实验中,构建了编码模型ERV(其为鼠蛋白gp70,即鼠白血病病毒的包膜蛋白)的MVA(“MVA-gp70”)。还产生了另外包含共刺激分子CD40L的MVA(“MVA-gp70-CD40L”)。使用CT26.wt结肠癌模型测试这些新构建体的抗肿瘤潜力。已经显示CT26.wt细胞表达高水平的gp70(参见,例如,Scrimieri (2013) *Oncoimmunol* 2:e26889)。产生了携带CT26.wt肿瘤的小鼠,当肿瘤为至少5mmx5mm时,如上所指示进行静脉内免疫。仅用MVA免疫诱导肿瘤生长的轻度延迟。相比之下,用MVA-gp70免疫引起对3/5肿瘤的完全排斥(图13A和图13B)。用MVA-Gp70-CD40L免疫获得了更加惊人的结果,引起对4/5肿瘤的排斥(图13A和图13B)。

[0314] 为了确定这些抗肿瘤应答是否与免疫后gp70特异性T细胞的诱导有关,使用H-2Kd限制性gp70表位AH1进行血液重新刺激。这些结果(图13C)显示,在MVA-Gp70和MVA-Gp70-CD40L治疗的小鼠中强烈诱导gp70特异性CD8 T细胞应答(图13C)。

[0315] 实施例15:在B16.F10肿瘤模型中静脉内注射编码内源性逆转录病毒抗原Gp70与CD40L的MVA的抗肿瘤效应增强

[0316] 将携带B16.F10肿瘤的C57BL/6小鼠(n=5/组)分组,并在肿瘤接种后第7天(黑色点线)当测得肿瘤为约5x5mm时接受静脉内(i.v.)PBS或 $5 \times 10^7$  TCID50 MVA-BN、MVA-Gp70或MVA-Gp70-CD40L。定期测量肿瘤生长。如图14A所示,与MVA或对照(PBS)相比,静脉内施用编码内源性逆转录病毒抗原Gp70和CD40L的MVA病毒导致肿瘤体积减小。

[0317] 图14B示出了静脉内注射MVA-Gp70或MVA-Gp70-CD40L后,血液中Gp70特异性CD8 T细胞的诱导。

[0318] 因此,在这些实验中,在另外的独立肿瘤模型中证明了用MVA-Gp70和MVA-Gp70-CD40L治疗的功效。B16.F10是源自C57BL/6的黑素瘤细胞系,表达高水平的Gp70(Scrimieri (2013) *Oncoimmunol* 2:e26889)。单独使用MVA(“MVA-BN”)进行治疗导致B16.F10肿瘤某种程度的肿瘤生长延迟,与无佐剂MVA-Gp70的效应相当(图14A)。但是,MVA-Gp70-CD40L比单独的MVA骨架对照产生更强的抗肿瘤效应(图14A)。其他实验证明,接受编码Gp70抗原的MVA的两组均表现出对H-2Kb限制性gp70表位p15e具有特异性的CD8 T细胞应答,但是当MVA也编码CD40L时,未观察到外周T细胞应答的显著增加(图14B)。

[0319] 实施例16:静脉内注射编码gp70和4-1BBL的MVA病毒的抗肿瘤效应增强[预示实施

例]

[0320] 将携带B16.OVA肿瘤的C57BL/6小鼠 (n=5/组) 分组,并在肿瘤接种后第7天(黑色点线)接受静脉内PBS或 $5 \times 10^7$  TCID50 MVA-OVA或MVA-gp70-4-1BBL。定期测量肿瘤生长。由于人内源性逆转录病毒(ERV)蛋白的小鼠同源物既不在正常小鼠组织中高度表达也不在小鼠肿瘤组织中主要表达,因此无法在小鼠模型中有效研究人ERV的功效。Gp70是已经得到充分研究的小鼠ERV蛋白(参见,例如,Bronte等人(2003) *J Immunol.* 171 (12):6396-6405; Bashratyan等人(2017) *Eur. J. Immunol.* 47:575-584;和Nilsson等人(1999) *Virus Genes* 18:115-120)。因此,在小鼠中研究gp70特异性癌症疫苗极有可能对ERV特异性癌症疫苗在人体中的功效有很强的预测价值。

[0321] 实施例17:肿瘤内注射编码gp70和4-1BBL或CD40L的MVA病毒的抗肿瘤效应增强  
[预示实施例]

[0322] 将携带B16.OVA肿瘤的C57BL/6小鼠 (n=4-5/组) 分组,并在肿瘤接种后第7天(黑色点线)、第12天和第15天(灰色虚线)接受肿瘤内(i.t.)PBS或 $5 \times 10^7$  TCID50 MVA-OVA、MVA-OVA-CD40L或MVA-OVA-4-1BBL。定期测量肿瘤生长。

[0323] 实施例18:施用rMVA-HERV-K-4-1BBL通过感染的肿瘤细胞的直接抗原呈递而影响细胞因子产生  
[预示实施例]

[0324] 将来自C57BL/6小鼠的骨髓细胞在存在重组F1t3L的情况下培养14天之后,产生了树突状细胞(DC)。将B16.F10细胞用MVA-HERV-K、MVA-HERV-K-CD40L、MVA-HERV-K-4-1BBL或MVA-HERV-K-4-1BBL-CD40L以10MOI感染,并放置过夜。第二天,收获被感染的肿瘤细胞并在指示时将其在存在DC的情况下以1:1的比例在37°C 5%CO<sub>2</sub>下共培养4小时。从HERV-K免疫的小鼠磁纯化HERV-K特异性CD8+T细胞,并以1:5的比例添加至共培养物中。将细胞在37°C 5%CO<sub>2</sub>下培养48小时。然后,收集培养上清液用于通过Luminex进行细胞因子浓度分析。细胞因子水平量度包括(A) IL-6、(B) GM-CSF、(C) IL-2和(D) IFN  $\gamma$ 。数据表示为平均值 $\pm$ SEM。

[0325] 实施例19:施用rMVA-HERV-K-4-1BBL通过感染的肿瘤细胞的直接抗原呈递而将抗原特异性CD8+T细胞导向激活的效应T细胞  
[预示实施例]

[0326] 将来自C57BL/6小鼠的骨髓细胞在存在重组F1t3L的情况下培养14天之后,产生了树突状细胞(DC)。将B16.F10细胞用MVA-HERV-K、MVA-HERV-K-CD40L、MVA-HERV-K-4-1BBL或MVA-HERV-K-4-1BBL-CD40L以10MOI感染,并放置过夜。第二天,收获被感染的肿瘤细胞并在指示时将其在存在DC的情况下以1:1的比例在37°C 5%CO<sub>2</sub>下共培养4小时。同时,从HERV-K免疫的小鼠磁纯化HERV-K特异性CD8+T细胞,并以1:5的比例添加至共培养物中。将细胞在37°C 5%CO<sub>2</sub>下培养48小时。然后对细胞进行染色并通过流式细胞术进行分析。进行细胞因子分析:(A) OT-I CD8+T细胞上T-bet的GMFI和(B) OT-I CD8+T细胞的CD44+粒酶B+IFN  $\gamma$  + TNF $\alpha$ 的百分比。数据显示为平均值 $\pm$ SEM。

[0327] 实施例20:用编码CD40L或4-1BBL的rMVA-HERV-K感染在肿瘤细胞系和巨噬细胞中诱导肿瘤细胞死亡  
[预示实施例]

[0328] 将肿瘤细胞系B16.OVA(A和B)、MC38(C)和B16.F10(D)以指定的MOI感染20小时。然后,通过流式细胞术分析细胞的活力。通过ELISA定量来自(A)的样品中的血清HMGB1。将骨髓来源的巨噬细胞(BMDM)以指示的MOI感染20小时。然后通过流式细胞术分析细胞的活力。数据表示为平均值 $\pm$ SEM。

[0329] 实施例21:肿瘤内施用编码4-1BBL的重组MVA导致肿瘤中Treg细胞减少和T细胞耗竭减少[预示实施例]

[0330] 将携带B16.OVA肿瘤的C57BL/6小鼠 (n=5/组) 分组,并在肿瘤接种后第7天(黑色点线)接受肿瘤内(i.t.) PBS或 $5 \times 10^7$  TCID<sub>50</sub> MVA-OVA或MVA-OVA-4-1BBL。五天后,处死小鼠,收集脾脏和肿瘤并染色,以用荧光染料缀合的抗体评估Treg浸润和T细胞耗竭。(A) CD45+肿瘤浸润白细胞中CD4+FoxP3+T细胞的百分比;肿瘤浸润CD8<sup>+</sup> T细胞上PD-1 (B) 和Lag-3 (C) 的几何平均荧光强度。数据表示为平均值±SEM。

[0331] 实施例22:免疫检查点阻断物和肿瘤抗原特异性抗体与rMVA gp-70-4-1BBL肿瘤内施用协同作用[预示实施例]

[0332] 将携带B16.OVA肿瘤的C57BL/6小鼠 (n=5/组) 分组,并在有指示时(标记)接受200 μg IgG2a、抗TRP-1或抗PD-1。在肿瘤接种后第13天(黑色点线)、第18天和第21天(灰色虚线)给小鼠肿瘤内免疫接种PBS或 $5 \times 10^7$  TCID<sub>50</sub> MVA-gp70-4-1BBL。定期测量肿瘤生长。

[0333] 实施例23:4-1BBL辅佐可以增强针对IT免疫的细胞因子/趋化因子MVA-BN骨架应答

[0334] 为了评估重组MVA在肿瘤微环境(TME)内诱导炎症的潜力,分析了B16.OVA肿瘤组织中的细胞因子和趋化因子。首先,将 $5 \times 10^5$  B16.OVA细胞皮下(s.c.)植入C57BL/6小鼠中。在第10天,给小鼠肿瘤内(i.t.)免疫接种PBS或 $2 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub> MVA-BN、MVA-OVA或MVA-OVA-4-1BBL (n=5至6只小鼠/组)。

[0335] 注射后六小时,测量细胞因子和趋化因子的表达(图15)。经PBS治疗的组织中细胞因子/趋化因子的表达代表了通过将针头插入肿瘤中以及盐水剪切压力诱导的基础炎症谱。细胞因子(包括IL-6、IFN-α、IL-15和TNF-α),以及趋化因子(诸如CXCL1、CCL2和MIP2)被上调(图15)。还检测到IL-25(也称为IL-17E),其由NF-κβ激活诱导并刺激人IL-8产生(Lee等人(2001) J.Biol.Chem.276:1660-64)。有趣的是,与注射MVA-BN或MVA-OVA的肿瘤病灶相比,注射MVA-OVA-4-1BBL的肿瘤显示出明显的促炎细胞因子(诸如IL-6、IFN-α或IL-15/IL15Rα)增加。

[0336] 实施例24:MVA-OVA-4-1BBL增强了针对肿瘤内(i.t.)免疫的细胞因子/趋化因子促炎应答

[0337] 如实施例23中所述治疗小鼠和肿瘤。令人惊讶的是,仅在用MVA-OVA-4-1BBL进行肿瘤内免疫后才产生包括IFN-γ和GM-CSF在内的几种促炎细胞因子(图16)。用MVA-OVA或MVA-OVA-4-1BBL进行肿瘤内(i.t.)免疫可以增强包括IL-18、CCL5、CCL3和IL-22在内的其他促炎细胞因子的产生,但单独使用MVA-BN或PBS则不会。

[0338] 总之,该数据证明,肿瘤内(i.t.) MVA免疫可以在肿瘤微环境(TME)中诱导炎性细胞因子/趋化因子转变,从而增强炎症应答。与MVA或MVA-OVA相比,使用MVA-OVA-4-1BBL进行肿瘤内免疫观察到效应增强。如此一来,可以说添加4-1BBL“辅佐”了重组MVA。

[0339] 实施例25:肿瘤内注射MVA-OVA-4-1BBL后对TME和引流LN进行定量和定性T细胞分析

[0340] 为了更好地理解肿瘤内注射MVA-OVA和MVA-OVA-4-1BBL后炎症诱导的细胞过程,我们在肿瘤内(i.t.)注射后的不同时间点对先天性和适应性免疫浸润物进行了深入分析。给携带B16.OVA肿瘤的小鼠肿瘤内(i.t.)注射PBS或 $2 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub> MVA-OVA或MVA-OVA-4-

1BBL。在初次免疫后第1、3和7天将小鼠处死。除去肿瘤和肿瘤引流淋巴结 (TdLN), 用胶原酶和DNA酶处理, 并通过流式细胞术分析单细胞。分析免疫细胞群, 以确定它们的大小、增殖行为和功能状态。

[0341] 结果显示, 在肿瘤内 (i. t.) 免疫后7天, 用MVA-OVA或MVA-OVA-4-1BBL注射B16.OVA肿瘤诱导CD45<sup>+</sup>白细胞浸润到肿瘤中 (图17, 上面一排, 左直方图)。有趣的是, 在i. t. (肿瘤内) 免疫后3天, 已经观察到TdLN中CD45<sup>+</sup>白细胞数量的扩大 (图17, 上面一排, 右直方图), 尤其是在注射表达4-1BBL的MVA之后。肿瘤内 (i. t.) 免疫后7天, 这种差异在TdLN中进一步扩大, 表明MVA免疫介导的抗肿瘤效应在免疫后第3天在TdLN中就开始了。

[0342] 基于疫苗接种的抗肿瘤疗法的一方面是肿瘤特异性CD8<sup>+</sup>和CD4<sup>+</sup>T细胞的扩增和恢复以及它们在肿瘤中的富集。免疫后一周, 在肿瘤中CD4<sup>+</sup>T细胞和CD8<sup>+</sup>T细胞均增加 (图17, 第二排和第三排, 左直方图)。在i. t. 免疫接种MVA-OVA-4-1BBL后第7天, 肿瘤中的CD4<sup>+</sup>T细胞增加, 且在第3天开始在TdLN中增加, 并在第7天达到峰值。到第7天时, CD8<sup>+</sup>T细胞在很大程度上促进了肿瘤中CD45<sup>+</sup>细胞的增加。与注射MVA-OVA相比, 注射MVA-OVA-4-1BBL进一步扩大了肿瘤 (第7天) 和dLN (第3天和第7天) 中的CD8<sup>+</sup>T细胞群。

[0343] 对OVA特异性CD8<sup>+</sup>T细胞的定量显示出在肿瘤内 (i. t.) 免疫后7天肿瘤微环境中的增加, 特别是在用MVA-OVA-4-1BBL治疗组中 (图17, 左下)。令人惊讶的是, TdLN中的OVA特异性CD8<sup>+</sup>T细胞的扩增在免疫后第3天达到峰值, 在MVA-OVA-4-1BBL治疗组中更高 (图17, 右下)。总之, 这些数据表明, 用MVA-OVA, 尤其是MVA-OVA-4-1BBL进行的肿瘤内免疫使得肿瘤引流淋巴结中在治疗后3天开始的适应性免疫应答产生增强, 从而使得到第7天时肿瘤微环境中的抗原特异性CD8<sup>+</sup>T细胞显著增加。

[0344] 实施例26: 肿瘤内注射MVA-OVA-4-1BBL诱导抗原特异性CD8<sup>+</sup>T细胞

[0345] 肿瘤内注射MVA-OVA-4-1BBL诱导的肿瘤引流淋巴结 (TdLN) 中的OVA特异性CD8<sup>+</sup>T细胞具有很高的增殖能力。与PBS相比, MVA-OVA治疗后TdLN中的表达Ki67 (细胞增殖的指标) 的OVA特异性CD8<sup>+</sup>T细胞的百分比更高, 并且在用MVA-OVA-4-1BBL免疫的小鼠中进一步增加 (图18A)。此外, 在用MVA-OVA以及MVA-OVA-4-1BBL免疫后第7天, 肿瘤中的OVA特异性CD8<sup>+</sup>T细胞下调了耗竭标志物PD-1, 表明功能恢复 (图18B)。

[0346] Treg细胞 (也称为“调节性T细胞”) 是抗肿瘤免疫应答的有效抑制剂 (参见, 例如, Tanaka等人 (2017) Cell Res. 27:109-118)。肿瘤内注射MVA-OVA使肿瘤中的OVA特异性Teff/Treg比率 (即, “Teff” 细胞或“效应T细胞” 与Treg细胞的比率) 增加, 并在MVA-OVA-4-1BBL治疗后第7天进一步增加 (图18C)。因此, 用MVA-OVA特别是用MVA-OVA-4-1BBL进行肿瘤内治疗降低了有利于CD8<sup>+</sup>T效应细胞的肿瘤内Treg的频率, 这对于抗肿瘤免疫应答是有益的。

[0347] 实施例27: 肿瘤内注射MVA-OVA-4-1BBL后对TME和引流LN进行定量和定性NK细胞分析

[0348] 用MVA-OVA i. t. 免疫后对NK细胞的定量显示肿瘤内免疫后第1天肿瘤中NK细胞减少 (图19, 上面一排, 左直方图)。当使用MVA-OVA-4-1BBL时, 这些变化更为明显。同时, 用MVA-OVA和MVA-OVA-4-1BBL免疫后第3天和第7天, 肿瘤引流淋巴结 (TdLN) 中的NK细胞都增加 (图19, 上面一排, 右直方图), 但MVA-OVA-4-1BBL诱导的TdLN中NK细胞的增加程度最高。

[0349] CD69是早期NK细胞激活的标志物。病毒载体MVA-OVA和MVA-OVA-4-1BBL均导致肿

瘤以及引流淋巴结 (TdLN; 图19, 第二排) 中的激活标志物CD69立即上调。此外, *i. t.* 免疫导致在肿瘤和TdLN中在不同时间点诱导NK细胞中的粒酶B, 这指示增强的细胞毒性NK细胞功能(图19, 第三排)。

[0350] 最后, 借助于Ki67表达分析了NK细胞的增殖能力。在第3天, 在用MVA-OVA或MVA-OVA-4-1BBL肿瘤内治疗的小鼠的肿瘤和TdLN中, 在NK细胞上的Ki67表达显著增加(图19, 最后一排)。

[0351] 这些结果证明, 与MVA-OVA相比, 肿瘤内注射后4-1BBL辅佐的MVA-OVA (即, MVA-OVA-4-1BBL) 进一步增加了NK细胞上CD69、粒酶B和Ki67表面标志物的表达。这些实验还揭示了在肿瘤内免疫治疗后, 引流淋巴结 (TdLN) 在增加抗肿瘤T细胞和NK细胞应答中的重要作用。

[0352] 尽管本发明不受任何特定操作机制的束缚, 但在第3天TdLN中T细胞的扩增以及及在第7天肿瘤中T细胞的浸润延迟 (参见图17) 表明, 存在以下情况: 肿瘤特异性T细胞在TdLN中被引发和扩增, 然后迁移至肿瘤以杀死肿瘤细胞。肿瘤内注射病毒载体也可能直接导致TdLN中的NK细胞激活, 从而诱导进一步的DC激活。

[0353] 实施例28: CD8 T细胞在肿瘤内MVA癌症疗法中的作用

[0354] 对肿瘤和TdLN中T细胞应答的分析 (例如, 图17) 显示, 在肿瘤内 (*i. t.*) 治疗后, 在两个位点均存在肿瘤特异性T细胞扩增。进行实验以检查T细胞对MVA-OVA-4-1BBL介导的抗肿瘤效应的贡献。在这些实验中, 给C57BL/6小鼠注射B16.OVA黑素瘤细胞 ( $5 \times 10^5$  个细胞), 并在其中一个治疗后监测肿瘤生长。治疗包括在存在或不存在100 $\mu$ g耗尽CD8-T细胞的抗体 (“ $\alpha$ CD8”, 克隆2.43) 或同种型对照抗体的情况下, 肿瘤内 (*i. t.*) 注射PBS或MVA-OVA-4-1BBL。当肿瘤直径达到5mm时, 进行MVA-OVA-4-1BBL注射, 并在一周内重复两次。在第一次注射MVA-OVA-4-BBL的前一天, 给小鼠 *i. p.* 注射抗CD8或IgG2b抗体, 此治疗在接下来的两周内重复四次。图20所示的数据表明, CD8 T细胞对于有效MVA肿瘤疗法至关重要。总之, 这些数据表明MVA诱导的肿瘤和TdLN中肿瘤特异性CD8 T细胞的激活和扩增是肿瘤生长控制的重要事件。

[0355] 实施例29: MVA-OVA和MVA-OVA-4-1BBL介导的抗肿瘤效应的Batf3+DC依赖性

[0356] 为了阐明有助于MVA-OVA-4-1BBL诱导的抗肿瘤免疫应答的基础细胞和分子实体, 我们研究了各种免疫细胞参与者的作用。树突状细胞 (DC) 能够有效采样并向适应性免疫系统细胞呈递抗原和共刺激信号, 被认为是抗肿瘤免疫力的关键因素。DC的各种亚型参与针对肿瘤的有效免疫应答的激活, 包括CD8 $\alpha$ +DC (也称为“cDC1”)。该DC亚群具有在免疫应答过程中交叉呈递抗原的独特能力, 并且CD8 $\alpha$ +DC是响应于感染 (Hochrein等人 (2001) *J. Immunol.* 166:5448-55; Martínez-López等人 (2014) *Eur. J. Immunol.* 45:119-29) 和癌症 (Broz等人 (2014) *Cancer Cell* 26:638-52) IL-12的主要生产者。通过交叉呈递肿瘤相关抗原, CD8 $\alpha$ +DC还是抗肿瘤CD8+T细胞的有效诱导剂 (Sánchez-Paulete等人, (2015) *Cancer Discovery* 6:71-79; Salmon等人 (2016) *Immunity* 44:924-38)。CD8 $\alpha$ +DC发育关键取决于转录因子Batf3 (Hildner等人 (2008) *Science* 322:1097-1100)。

[0357] 为了评估该DC亚群对于肿瘤内MVA癌症疗法的重要性, 我们利用了野生型和Batf3缺陷型 (Batf3 $^{-/-}$ ) 的携带B16.OVA肿瘤的小鼠。图21A显示, 在不存在交叉呈递DC (Batf3 $^{-/-}$ ) 的情况下, B16.OVA肿瘤的生长速度显著加快, 这表明该抗原呈递细胞 (APC) 亚

群在诱导肿瘤定向的免疫应答中起着重要作用。与先前的实验一致,在野生型小鼠中,肿瘤内注射MVA-OVA导致肿瘤生长延迟,在一种情况下导致肿瘤完全清除。当给小鼠注射MVA-OVA-4-1BBL时,这种效应得以提高;用MVA-OVA-4-1BBL治疗的5只小鼠中有3只排斥肿瘤(图21A)。有趣的是,与WT组相比,在不存在交叉呈递DC(Batf3<sup>-/-</sup>)的情况下,肿瘤内MVA免疫疗法完全没有受到损害(图21A)。但是,Batf3-DC似乎参与了4-1BBL诱导的抗肿瘤应答(图21A,底部)。

[0358] 在第一次免疫后11天对外周血中CD8<sup>+</sup>T淋巴细胞的流式细胞术分析(图21B)显示,与野生型对应者相比,MVA-OVA-4-1BBL免疫的Batf3<sup>-/-</sup>肿瘤携带者中的OVA特异性CD8<sup>+</sup>T细胞频率仅轻微降低。尽管本发明不受任何特定操作机制束缚或不依赖于任何特定操作机制,但是这些数据表明,Batf3依赖性DC对于肿瘤内MVA癌症疗法的作用是多余的。

[0359] 实施例30:NK细胞在肿瘤内施用MVA-OVA-4-1BBL中的作用

[0360] 已知NK细胞表达4-1BB,并且4-1BB在NK细胞上的连接已显示可以导致这些细胞的增殖和细胞毒性增加(Muntasell等人(2017)Curr.Opin.Immunol.45:73-81)。在较早的实验中(参见图19),我们发现肿瘤内注射MVA-OVA-4-1BBL强烈上调了NK细胞上的激活标志物CD69以及细胞毒性标志物粒酶B,并伴随着增殖的增强。

[0361] 为了研究NK细胞在4-1BBL诱导的抗肿瘤免疫应答中的作用,我们利用了IL15Rα<sup>-/-</sup>小鼠。IL-15受体α亚基(IL-15Rα)介导IL-15的高亲和力结合,IL-15是显示对于NK细胞的发育至关重要的多效性细胞因子(Lodolce等人(1998)Immunity 9:669-76)。产生野生型和IL15Rα缺陷型(IL15Rα<sup>-/-</sup>)的携带B16.OVA肿瘤的小鼠,并用MVA-OVA或MVA-OVA-4-1BBL进行肿瘤内免疫。无论是否存在IL-15Rα,用MVA-OVA治疗的小鼠均显示出相似的治疗功效(图22A)。有趣的是,在使用MVA-OVA-4-1BBL治疗的野生型小鼠(在5只小鼠中有3只排斥肿瘤)中观察到的益处用MVA-OVA-4-1BBL治疗的IL15Rα缺陷型的荷瘤小鼠(在5只小鼠中有1只排斥肿瘤;参见图22A)中完全消失了。这些结果也反映在肿瘤接种后小鼠的存活率中(图22B)。

[0362] 已知的是,不存在IL15Rα不仅影响NK细胞的发育,而且还削弱T细胞稳态和LN迁移,并选择性地减少小鼠中的CD8记忆T细胞(Lodolce等人(1998)Immunity 9:669-76)。因此,我们还研究了针对这些治疗的T细胞应答。与我们先前的数据一致,我们在野生型动物中观察到MVA-OVA肿瘤内(i.t.)免疫后对OVA特异性CD8<sup>+</sup>T细胞的诱导,利用MVA-OVA-4-1BBL进一步增强了这种诱导的(图22C)。但是,IL15Rα<sup>-/-</sup>小鼠中的OVA特异性T细胞应答与野生型小鼠中发现的应答相似。

[0363] 尽管本发明不受任何特定操作机制或操作方式的束缚,但这些发现表明,IL15Rα<sup>-/-</sup>荷瘤小鼠可以加强肿瘤特异性T细胞应答,并由此支持了4-1BBL增强的NK细胞激活和功能有助于肿瘤内MVA-OVA-4-1BBL治疗的治疗功效这一见解。

[0364] 实施例31:响应于肿瘤内MVA-OVA-4-1BBL免疫的NK细胞依赖性细胞因子/趋化因子谱

[0365] 为了鉴定NK细胞上4-1BBL-4-1BB相互作用所选择性诱导的细胞因子,分析用PBS或5x10<sup>7</sup> TCID<sub>50</sub> MVA-OVA或MVA-OVA-4-1BBL治疗的携带B16.OVA肿瘤的野生型或IL15Rα<sup>-/-</sup>小鼠的肿瘤组织中的细胞因子和趋化因子。

[0366] 先前的实验表明,肿瘤内注射重组MVA后六小时,大量的细胞因子和趋化因子增加

(图15和图16)。在这些实验中,用MVA-OVA-4-1BBL注射肿瘤比用MVA-OVA注射显著增加了已知在4-1BBL刺激后由NK细胞产生的促炎细胞因子或趋化因子(诸如IFN- $\gamma$ 、CCL3和CCL5)的产生(图23)。4-1BBL诱导的这种增加在IL15R $\alpha^{-/-}$ 小鼠中完全消除,表明肿瘤内注射rMVA-OVA-4-1BBL在注射6小时后在肿瘤微环境中诱导不同的源于NK细胞的细胞因子和趋化因子谱。

[0367] 实施例32:肿瘤内MVA-gp70-CD40L免疫相比MVA-gp70-4-1BBL的抗肿瘤功效

[0368] Gp70是在多种同系肿瘤模型(B16.F10、CT26、MC38、4T1、EL4等)中表达的肿瘤自身抗原,这些肿瘤模型在基质和免疫细胞组成方面均代表不同的肿瘤微环境(TME)。在这里,我们测试了编码肿瘤抗原gp70以及CD40L或4-1BBL的MVA在携带B16.F10肿瘤的小鼠的肿瘤内免疫中的效力。

[0369] 将B16.F10黑素瘤细胞皮下注射到C57BL/6小鼠中。当肿瘤大小达到约50mm<sup>3</sup>时,用PBS、MVA-gp70、MVA-gp70-4-1BBL、MVA-gp70-CD40L、MVA-4-1BBL或MVA-CD40L对小鼠进行肿瘤内免疫;结果示于图24中。

[0370] 用MVA-gp70免疫诱导短暂且轻微的肿瘤生长控制。当病毒表达CD40L时,这种抗肿瘤效应会增强。但是,用MVA-gp70-4-1BBL进行的肿瘤内免疫产生最强的治疗效应,使得在治疗5只动物中有2只完全清除肿瘤(图24A)。

[0371] 令人惊讶的是,用MVA-gp70-4-1BBL治疗后肿瘤得以治愈的小鼠在肿瘤所在的部位出现了色素消失(图24B)。这种脱色素指示自身免疫性疾病白癜风,这是自身反应性T细胞破坏黑素细胞的结果。这种黑素细胞破坏表明重组MVA对免疫系统的激活不限于MVA编码的TAA(此处为gp70)。相反,针对其他抗原的免疫系统的这种扩展激活(一种称为表位扩散的现象)导致了更广泛的免疫应答,这可能会提供更好的治疗效果。

[0372] 为了评估由免疫诱导的抗原特异性T细胞应答,在第一次免疫后11天抽血并分析抗原特异性T细胞的存在。用MVA-gp70和MVA-gp70-CD40L以及MVA-CD40L和MVA-4-1BBL免疫均诱导可测量的p15E特异性T细胞应答,范围为1%-2%(图24C)。重要的是,在接受MVA-gp70-4-1BBL的小鼠中,这种应答大幅增加(>5倍)。这种针对p15E肽再刺激的抗原特异性T细胞应答与不同治疗组中的治疗功效有关。

[0373] 实施例33:肿瘤内MVA-gp70-4-1BBL-CD40L免疫的抗肿瘤功效

[0374] 产生达肿瘤抗原gp70以及4-1BBL和CD40L的重组MVA,并在B16黑素瘤模型中进行肿瘤内测试。将B16.F10黑素瘤细胞皮下注射到C57BL/6小鼠中。当肿瘤达到约50mm<sup>3</sup>时,用PBS、MVA-gp70、MVA-gp70-4-1BBL、MVA-gp70-CD40L、MVA-gp70-4-1BBL-CD40L或相应的不表达gp70的MVA构建体对小鼠进行肿瘤内免疫。

[0375] 用MVA-gp70免疫诱导短暂且显著的肿瘤生长控制(图25A)。当病毒表达CD40L或4-1BBL时,这种抗肿瘤效应会增强。但是,用MVA-gp70-4-1BBL-CD40L进行的肿瘤内免疫产生最强的治疗效应--在治疗5只动物中有4只完全清除肿瘤(图25A)。令人惊讶的是,用MVA-gp70-4-1BBL-CD40L治疗的四只治愈的小鼠中有三只肿瘤曾经所在的部位出现了色素消失,这指示自身免疫性疾病白癜风,如上文实施例32中所讨论。

[0376] 另外,在第一次免疫后11天,在血液中测量gp70特异性T细胞应答。用MVA-gp70和MVA-gp70-CD40L以及MVA-CD40L和MVA-4-1BBL进行免疫诱导可测量的肿瘤特异性T细胞应答,范围为1%-2%;在接受MVA-gp70-4-1BBL的小鼠中,这种应答大幅增加(>5倍)(图25B)。

[0377] 综上所述,在B16.F10黑素瘤模型中,将MVA-gp70佐以CD40L抑或4-1BBL可以增强抗肿瘤功效,但当4-1BBL和CD40L在MVA-gp70-4-1BBL-CD40L中共同表达时,观察到甚至更强的效应。

[0378] 实施例34:CT26.WT肿瘤中的肿瘤内MVA-gp70-4-1BBL-CD40L免疫疗法

[0379] 然后使用CT26结肠癌模型测试构建体,所述模型被描述为富含T细胞和髓样细胞并被认为具有免疫原性(参见,例如,Mosely等人(2016) *Cancer Immunol. Res.* 5:29-41)。给Balb/c小鼠皮下(s.c.)注射CT26.wt结肠癌细胞。当肿瘤达到约60mm<sup>3</sup>时,用PBS、MVA-gp70、MVA-gp70-4-1BBL、MVA-gp70-CD40L、MVA-gp70-4-1BBL-CD40L或MVA-4-1BBL-CD40L对小鼠进行肿瘤内免疫。

[0380] 用MVA-gp70 i.t.免疫诱导短暂且显著的肿瘤生长控制。当MVA表达CD40L时,这种抗肿瘤效应并未增强,但惊人的是,用MVA-gp70-4-1BBL免疫导致最强的治疗效应,使得所有经治疗的动物的肿瘤完全清除(图26A)。但是,用MVA-gp70-4-1BBL-CD40L进行治疗并没有产生更好的治疗功效。值得注意的是,仅包含共刺激分子但不包含gp70的病毒也导致明显的肿瘤生长延迟,但是不能与MVA-gp70-4-1BBL相竞争。这些发现反映在治疗小鼠的总体存活率中(图26B)。

[0381] 在用MVA-gp70和MVA-gp70-CD40L肿瘤的动物的血液中可容易地检测到针对H2-Ld CD8+T细胞表位AH-1的Gp70特异性T细胞应答(图26C)。在接受MVA-gp70-4-1BBL的小鼠中,这种应答大幅增加(>10倍),这与图26A和图26B所示的治疗功效有关。用MVA-gp70-4-1BBL-CD40L治疗还增强了血液中的AH-1特异性T细胞应答(图26C)。

[0382] 实施例35:向携带B16.F10肿瘤的小鼠IT注射MVA-gp70-4-1BBL-CD40L后,对肿瘤微环境和肿瘤引流LN的综合分析

[0383] 上文提供的数据表明,用MVA-gp70-4-1BBL-CD40L对携带B16.F10肿瘤的小鼠进行肿瘤内治疗导致80%的经治疗小鼠出现肿瘤排斥(参见图26)。为了研究该肿瘤模型中的肿瘤微环境(TME)和TdLN,携带B16.F10肿瘤的小鼠肿瘤内(i.t.)接受PBS或 $5 \times 10^7$  TCID50MVA-gp70、MVA-gp70-4-1BBL、MVA-gp70-CD40L或MVA-gp70-4-1BBL-CD40L。在初次免疫后3天将小鼠处死。选择第3天是基于先前在OVA系统中的实验,这些实验显示在该时间点免疫系统的先天性组分和适应性组分均出现变化(参见图17)。除去肿瘤和TdLN,并用胶原酶/DNA酶消化,以便使用流式细胞术分析单细胞。评估了免疫细胞群的丰度以及它们的增殖行为和功能状态。

[0384] 如通过五聚体染色测定的,肿瘤内注射4-1BBL和CD40L辅助的MVA在第3天时间点未能赋予肿瘤中CD8 T细胞或p15E特异性T细胞数量方面的优势。但是,在TdLN中,MVA-gp70和MVA-gp70-CD40L导致CD8 T细胞扩增,而4-1BBL的加入产生了更大的效应(图27,右上)。加入4-1BBL使得TdLN中p15E特异性CD8 T细胞的增加更为明显,对于所述TdLN进行MVA-gp70-4-1BBL或MVA-gp70-4-1BBL-CD40L i.t.免疫使肿瘤特异性CD8 T细胞增加(图27,右中)。p15E特异性CD8 T细胞的数量也与这些细胞的增殖状态有关;例如,向MVA中添加4-1BBL以及gp70和任选的CD40L在TdLN中诱导出最多数量的Ki67+gp70-p15E CD8 T细胞(图27,右下)。

[0385] 这些数据证明,用MVA-gp70进行肿瘤内(i.t.)免疫在治疗后第3天增强肿瘤和肿瘤引流淋巴结中的适应性免疫应答的产生,而佐以4-1BBL或4-1BBL加CD40L则特别地增加

TdLN中的p15E特异性CD8<sup>+</sup> T细胞应答。

[0386] 实施例36:肿瘤内注射MVA后肿瘤和TdLN中的NK细胞诱导

[0387] 肿瘤内(i.t.)注射MVA-OVA分别在第1天和第3天造成NK细胞的激活和扩增(图19)。然后,我们在注射不同MVA构建体后的第3天检查了NK细胞的浸润、激活和扩增。用重组MVA i.t.免疫后对NK细胞的定量显示了浸润肿瘤(图28,左上)和TdLN(图28,右上)的NK细胞的增加。当MVA编码4-1BBL时(例如,MVA-gp70-4-1BBL和MVA-gp70-4-1BBL-CD40L),浸润增加。肿瘤内(i.t.)注射MVA-gp70在肿瘤(参见图28,左中)和TdLN(图28,右中)中诱导NK细胞(Ki67<sup>+</sup>)增殖,而佐以4-1BBL或4-1BBL和CD40L在TdLN中增强了这种效应。

[0388] 粒酶B是NK细胞的细胞毒性的标志物(参见,例如,Ida等人(2005) Mod.Rheumatol.15:315-22)。肿瘤内注射重组MVA后,在肿瘤和TdLN中诱导了粒酶B<sup>+</sup>NK细胞(图28,左下)。同样,向重组MVA中添加4-1BBL或4-1BBL-CD40L轻微增加TdLN中细胞毒性NK细胞的数量(图28,右下)。

[0389] 总之,这些数据突出了肿瘤内(i.t.)免疫疗法后MVA编码的4-1BBL-CD40L在NK细胞和TAA特异性T细胞的扩增和功能中的重要作用。因此,用编码gp70和4-1BBL,或gp70、4-1BBL和CD40L的重组MVA进行肿瘤内治疗可以增强针对内源性逆转录病毒自身抗原(诸如gp70)的T细胞应答。

[0390] 实施例37:携带CT26.WT肿瘤的小鼠中的静脉内MVA-gp70-4-1BBL-CD40L免疫疗法

[0391] 上文讨论的实验表明,编码肿瘤抗原gp70以及共刺激分子4-1BBL和CD40L的新颖MVA构建体在肿瘤内应用时具有很高的效力(图25和图26)。此外,Lauterbach等人((2013) Front.Immunol.4:251)发现,MVA编码的CD40L在静脉内给予时可以增强先天性和适应性免疫应答。在这里,我们询问用MVA-gp70-4-1BBL-CD40L进行静脉内(i.v.)是否也能实现肿瘤生长控制。

[0392] 将CT26.WT结肠癌细胞皮下注射到Ba1b/c小鼠中。当肿瘤达到约60mm<sup>3</sup>时,用PBS或MVA-Gp70、MVA-Gp70-4-1BBL、MVA-Gp70-CD40L、MVA-gp70-4-1BBL-CD40L和MVA-4-1BBL-CD40L(其缺少gp70)对小鼠进行静脉内免疫。用MVA-gp70进行i.v.免疫导致2/5的动物出现肿瘤清除(图29A)。用含有4-1BBL或CD40L的表达gp70的病毒治疗的小鼠显示出大大改善的抗肿瘤应答,分别导致3/5和4/5的小鼠被治愈。重要的是,用MVA-gp70-4-1BBL-CD40L进行i.v.治疗导致所有经治疗小鼠的肿瘤生长控制得到延长,并且3/5的小鼠排斥肿瘤(图29A)。值得注意的是,仅包含共刺激分子但不包含gp70的重组MVA也导致明显的肿瘤生长延迟,但未导致与针对MVA-gp70-4-1BBL、MVA-gp70-CD40L或MVA-gp70-4-1BBL-CD40L观察到的结果相同的肿瘤排斥(图29A)。这些发现反映在治疗小鼠的总体存活率中(图29B)。

[0393] 通过PBL的肽再刺激分析血液中的肿瘤定向CD8<sup>+</sup> T细胞应答,显示在所有MVA治疗组中均显著诱导AH1特异性CD8<sup>+</sup> T细胞,由此在存在CD40L时(即,MVA-gp70-CD40L和MVA-gp70-4-1BBL-CD40L)这种诱导会被进一步增强(图29C)。

[0394] 实施例38:包含HERV-K抗原的重组MVA

[0395] 基于MVA的载体(“MVA-mBN489”,也称为“MVA-HERV-Prme-FOLR1-4-1-BBL-CD40L”)被设计成包含TAA,TAA是人内源性逆转录病毒K超家族(HERV-K)的蛋白,具体是ERV-K-env和ERV-K-gag。MVA还被设计成编码人FOLR1和PRAME,并表达h4-1BBL或表达hCD40L;或者同时h4-1BBL和hCD40L两者。

[0396] 实施例39:用编码brachyury抗原的MVA进行肿瘤内免疫

[0397] 高度减毒的非复制型牛痘病毒MVA-BN-Brachyury被设计成由四个人转基因组成,以引发针对多种癌症的特异性的且稳健的免疫应答。所述载体共表达brachyury人TAA和三种人共刺激分子:B7.1(也称为CD80)、细胞间粘附分子1(ICAM-1,也称为CD54)和白细胞功能相关抗原3(LFA-3,也称为CD58)。将三种共刺激分子(或共刺激分子的TRIad,TRICOM™)包括在内以使对brachyury人TAA的免疫应答最大化。

[0398] Brachyury是T-box家族中的转录因子,是EMT(与癌症进展相关的过程)的驱动者。与正常组织相比,它在癌细胞中过表达,并与癌细胞对几种治疗方式的耐药性和转移潜能有关。已知表达brachyury的癌症包括肺癌、乳腺癌、卵巢癌、脊索瘤、前列腺癌、结直肠癌和胰腺腺癌。

[0399] 进行了体外和临床研究,以证明编码brachyury的MVA的安全性和潜在治疗功效;参见,例如,Hamilton等人(2013)Oncotarget 4:1777-90(“Immunological targeting of tumor cells undergoing an epithelial-mesenchymal transition via a recombinant brachyury-yeast vaccine”);Heery等人(2015a)J.Immunother.Cancer 3:132(“Phase I, dose escalation,clinical trial of MVA-brachyury-TRICOM vaccine demonstrating safety and brachyury-specific T cell responses”);Heery等人(2015b)Cancer Immunol.Res.3:1248-56(“Phase I trial of a yeast-based therapeutic cancer vaccine(GI-6301)targeting the transcription factor brachyury”))

[0400] 进行一项GLP顺应性重复剂量毒性研究以评估MVA-BN-Brachyury(MVA-mBN240B)在NHP(食蟹猴)中的任何潜在毒性,支持在1期临床开发中使用静脉内途径。毒性研究包括评估NHP中MVA-BN-Brachyury的时空分布的生物分布部分。

[0401] 将MVA-BN-Brachyury用于III期临床试验,在所述试验中通过肿瘤内注射MVA治疗肿瘤患者,任选地结合另一种治疗,例如放射和/或检查点抑制剂。

[0402] 显而易见的是,在不脱离所描述的本发明的精神的情况下,可以改变或修改本文所述的方法或组合物的精确细节。我们要求保护落入权利要求书的范围和精神内的所有此类修改和变型。

[0403] 序列表

[0404] 如37C.F.R.1.822中所定义的,使用核苷酸碱基的标准字母缩写和氨基酸的一字母代码或三字母代码显示随附的序列表中列出的核酸和氨基酸序列。仅示出每个核酸序列的一条链,但互补链应理解为通过对显示的链的任何引用而包括在内。

[0405] 序列表中的序列:

[0406] SEQ ID NO:1:来自NCBI RefSeq NP\_000065.1的hCD40L氨基酸序列(261个氨基酸)

[0407] SEQ ID NO:2:来自NCBI RefSeq NP\_000065.1的hCD40L(792个核苷酸)

[0408] SEQ ID NO:3:来自NCBI RefSeq NP\_003802.1的h4-1BBL(254个氨基酸)

[0409] SEQ ID NO:4:来自NCBI RefSeq NP\_003802.1的h4-1BBL

[0410] SEQ ID NO:1

[0411] 来自NCBI RefSeq NP\_000065.1的hCD40L(261个氨基酸)

[0412] MIETYNQTSRPAATGLPISMKIFMYLLTVFLITQMIGSALFAVYLRRLDKIEDERNLHEDFVFMKTI

QRCNTGERSLSLLNCEEIKSQFEGFVKDIMLNKEETKKENSFEMQKGDQNPQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGY  
TMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCSNREASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQSI  
HLGGVFELQPGASVFNVTDPSSQVSHGTGFTSFGLLKL

[0413] SEQ ID NO:2

[0414] 来自NCBI RefSeq NP\_000065.1的CD40L (792个核苷酸)

[0415] nt序列:

[0416] atgatcgagacatacaaccagacaagccctagaagcgcgccacaggactgcctatcagcatgaagat  
cttcatgtacctgctgaccgtgttctctgatcaccagatgatcggcagcgcctgtttgccgtgtacctgcacaga  
cggctggacaagatcgaggacgagagaaacctgcacgaggacttcgtgttcatgaagaccatccagcgggtgcaaca  
ccggcgagagaagtctgagcctgctgaactgcgaggaatcaagagccagttcgagggttcgtgaaggacatcat  
gctgaacaaagaggaaacgaagaagagaactccttcgagatgcagaaggcgaccagaatcctcagatcgccgct  
cacgtgatcagcagggccagcagcaagacaacaagcgtgctgcagtgggccgagaagggtactacacatgagca  
acaacctggtcaccctggagaacggcaagcagctgacagtggaagcggcagggcctgtactacatctacgccaagt  
gaccttctgcagcaacagagaggccagctctcaggctcctttcatcgccagcctgtgctgaagtctcctggcaga  
ttcgagcggattctgctgagagccccaacacacacagcagcgcgcaaaccttgaggccagcagctattcacctcg  
gaggagtgtttgagctgcagcctggcgcaagcgtgttcgtgaatgtgacagaccctagccaggtgtcccacggcac  
cggctttacatctttcggactgctgaagctgtgatgatag

## 序列表

<110> 巴法里安诺迪克有限公司 (Bavarian Nordic A/S)

<120> 通过肿瘤内和/或静脉内施用编码4-1BBL (CD137L) 和/或CD40L的重组MVA治疗癌症的疗法

<130> BNIT0014PCT

<150> EP 18207238.9

<151> 2018-11-20

<150> US 62/807,720

<151> 2019-02-19

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 261

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 1

```

Met Ile Glu Thr Tyr Asn Gln Thr Ser Pro Arg Ser Ala Ala Thr Gly
1           5           10           15
Leu Pro Ile Ser Met Lys Ile Phe Met Tyr Leu Leu Thr Val Phe Leu
           20           25           30
Ile Thr Gln Met Ile Gly Ser Ala Leu Phe Ala Val Tyr Leu His Arg
           35           40           45
Arg Leu Asp Lys Ile Glu Asp Glu Arg Asn Leu His Glu Asp Phe Val
           50           55           60
Phe Met Lys Thr Ile Gln Arg Cys Asn Thr Gly Glu Arg Ser Leu Ser
65           70           75           80
Leu Leu Asn Cys Glu Glu Ile Lys Ser Gln Phe Glu Gly Phe Val Lys
           85           90           95
Asp Ile Met Leu Asn Lys Glu Glu Thr Lys Lys Glu Asn Ser Phe Glu
           100          105          110
Met Gln Lys Gly Asp Gln Asn Pro Gln Ile Ala Ala His Val Ile Ser
           115          120          125
Glu Ala Ser Ser Lys Thr Thr Ser Val Leu Gln Trp Ala Glu Lys Gly
           130          135          140
Tyr Tyr Thr Met Ser Asn Asn Leu Val Thr Leu Glu Asn Gly Lys Gln
145          150          155          160
Leu Thr Val Lys Arg Gln Gly Leu Tyr Tyr Ile Tyr Ala Gln Val Thr
           165          170          175

```

Phe Cys Ser Asn Arg Glu Ala Ser Ser Gln Ala Pro Phe Ile Ala Ser  
 180 185 190  
 Leu Cys Leu Lys Ser Pro Gly Arg Phe Glu Arg Ile Leu Leu Arg Ala  
 195 200 205  
 Ala Asn Thr His Ser Ser Ala Lys Pro Cys Gly Gln Gln Ser Ile His  
 210 215 220  
 Leu Gly Gly Val Phe Glu Leu Gln Pro Gly Ala Ser Val Phe Val Asn  
 225 230 235 240  
 Val Thr Asp Pro Ser Gln Val Ser His Gly Thr Gly Phe Thr Ser Phe  
 245 250 255  
 Gly Leu Leu Lys Leu  
 260

<210> 2

<211> 792

<212> DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 2

atgatcgaga catacaacca gacaagccct agaagcgccg ccacaggact gcctatcagc 60  
 atgaagatct tcatgtacct gctgaccgtg ttctgatca cccagatgat cggcagcgcc 120  
 ctgtttgccg tgtacctgca cagacggctg gacaagatcg aggacgagag aaacctgcac 180  
 gaggacttgc tgttcatgaa gaccatccag cggtgcaaca ccggcgagag aagtctgagc 240  
 ctgctgaact gcgaggaaat caagagccag ttcgagggtc tegtgaagga catcatgctg 300  
 aacaaagagg aaacgaagaa agagaactcc ttcgagatgc agaaggcgca ccagaatcct 360  
 cagatcgccg ctcacgtgat cagcgaggcc agcagcaaga caacaagcgt gctgcagtgg 420  
 gccgagaagg gctactacac catgagcaac aacctggtca ccctggagaa cggcaagcag 480  
 ctgacagtga agcggcaggg cctgtactac atctacgcc aagtgacctt ctgcagcaac 540  
 agagaggcca gctctcaggc tcctttcatt gccagcctgt gcctgaagtc tcctggcaga 600  
 ttcgagcgga ttctgctgag agccgccaac acacacagca gcgccaacc ttgtggccag 660  
 cagtctattc acctcggcgg agtgtttgag ctgcagcctg gcgcaagcgt gttcgtgaat 720  
 gtgacagacc ctagccaggt gtcccacggc accggttta catctttcgg actgctgaag 780  
 ctgtgatgat ag 792

<210> 3

<211> 254

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 3

Met Glu Tyr Ala Ser Asp Ala Ser Leu Asp Pro Glu Ala Pro Trp Pro  
 1 5 10 15  
 Pro Ala Pro Arg Ala Arg Ala Cys Arg Val Leu Pro Trp Ala Leu Val

20	25	30
Ala Gly Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ala Ala Ala Cys Ala Val Phe		
35	40	45
Leu Ala Cys Pro Trp Ala Val Ser Gly Ala Arg Ala Ser Pro Gly Ser		
50	55	60
Ala Ala Ser Pro Arg Leu Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp		
65	70	75
Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val		
85	90	95
Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp		
100	105	110
Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu		
115	120	125
Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe		
130	135	140
Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser		
145	150	155
Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala		
165	170	175
Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala		
180	185	190
Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala		
195	200	205
Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His		
210	215	220
Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val		
225	230	235
Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu		
245	250	

<210> 4

<211> 768

<212> DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 4

```

atggaatacg ccagcgacgc ctctctggac cctgaagctc cttggcctcc agctcctaga 60
gccagggctt gtagagtget gccttgggct cttgtggctg gacttctgct tctgttgctc 120
ctggctgctg cctgcgcagt gtttcttget tgtccatggg ctgtgtcagg agccagagca 180
tctctggat ctgcccttc tcccagactg agagaggac ctgaactgag ccctgatgat 240
cctgctggac tgctcgacct gagacagggc atgtttgccc agctggtggc ccagaatgtg 300

```

ctgctgattg atggccctct gagctggtac agcgatcctg gacttgctgg cgttagcctg 360  
actggaggcc tgagctacaa ggaggacacc aaagaactgg tggtaggcaa ggctggcgtg 420  
tactacgtgt tctttcagct ggaactgcgg agagtgggtg caggcgaagg atctggatcc 480  
gtgtctctgg cactgcatct gcagcctctg agatctgctg ctggtgcagc tgcctggct 540  
ctgacagttg atctgcctcc tgcctccagc gaagccagaa acagcgcctt tggcttcaa 600  
ggcagactgc tgcacctgtc tgctggccag agactgggag tgcacctcca cacagaagca 660  
agagcaagac acgcctggca gcttacacaa ggcgctacag tgctgggcct gttcagagtg 720  
acacctgaga ttccagctgg cttgcatct cctgcagcg agtaatga 768

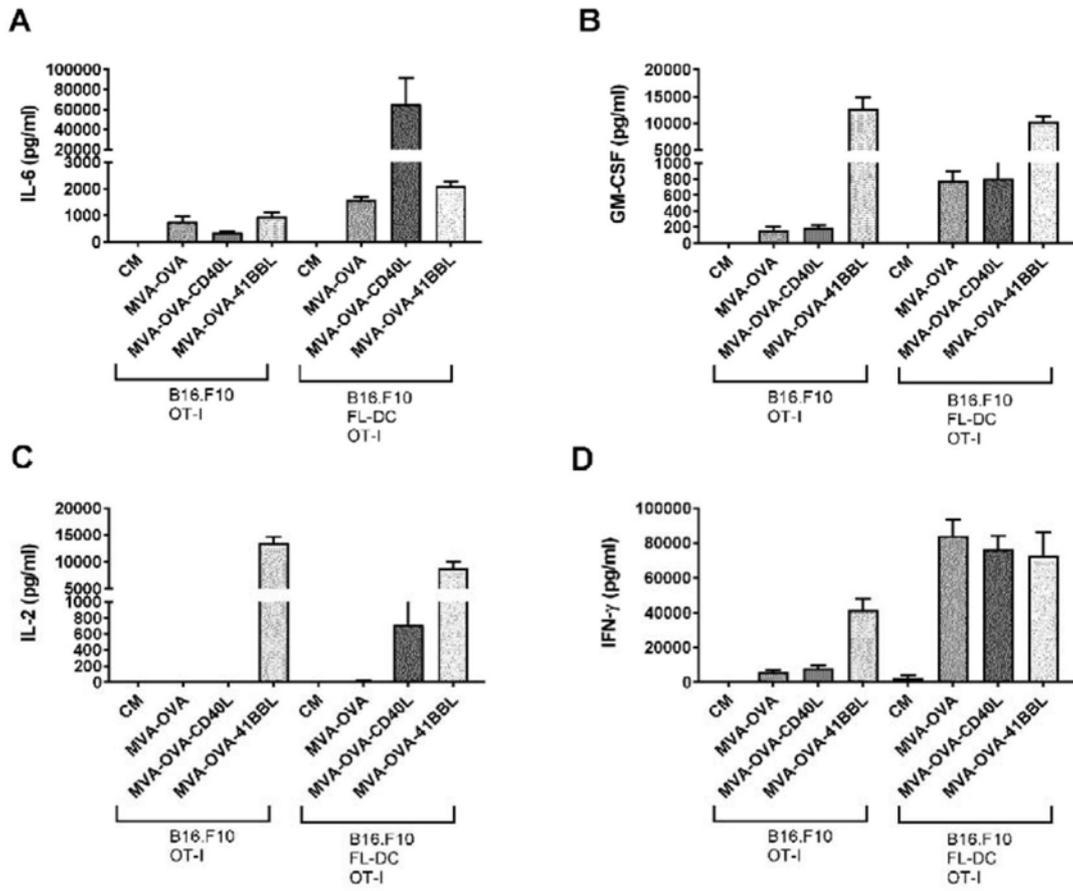


图1

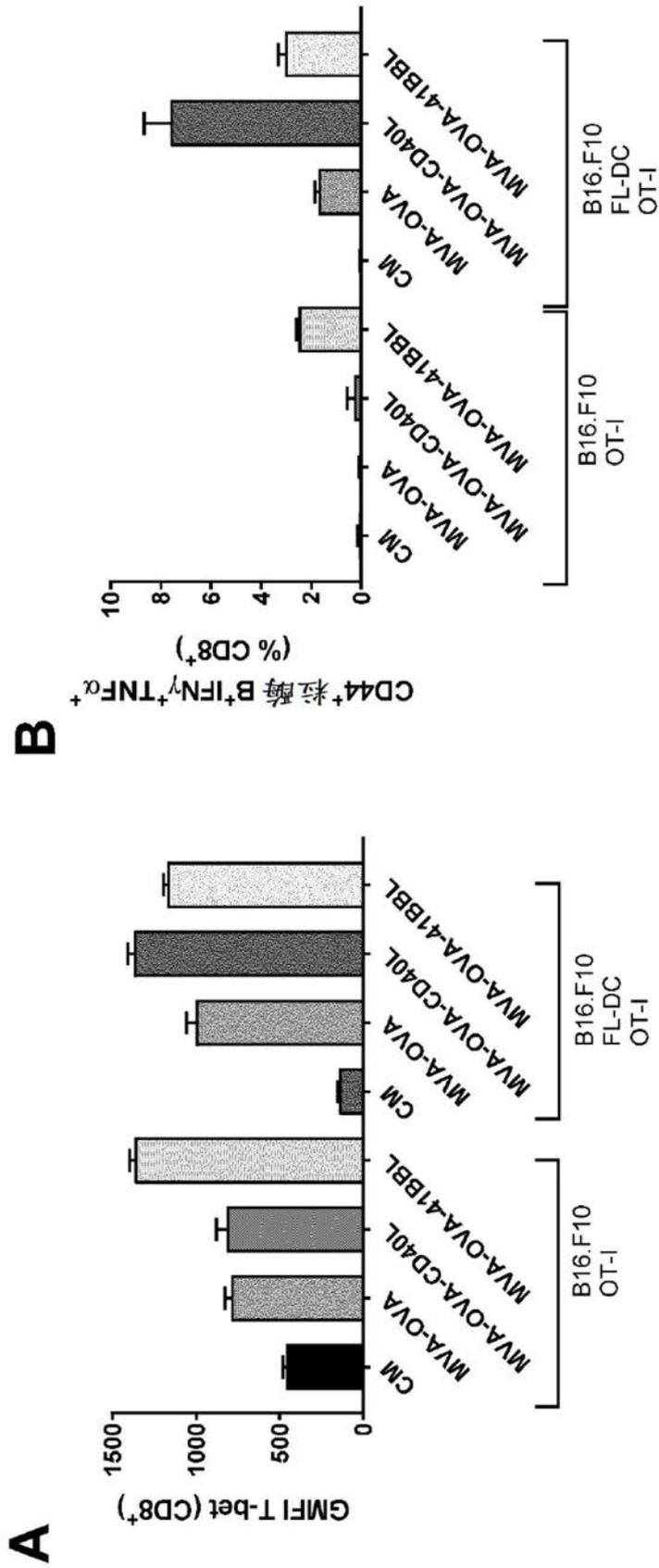


图2

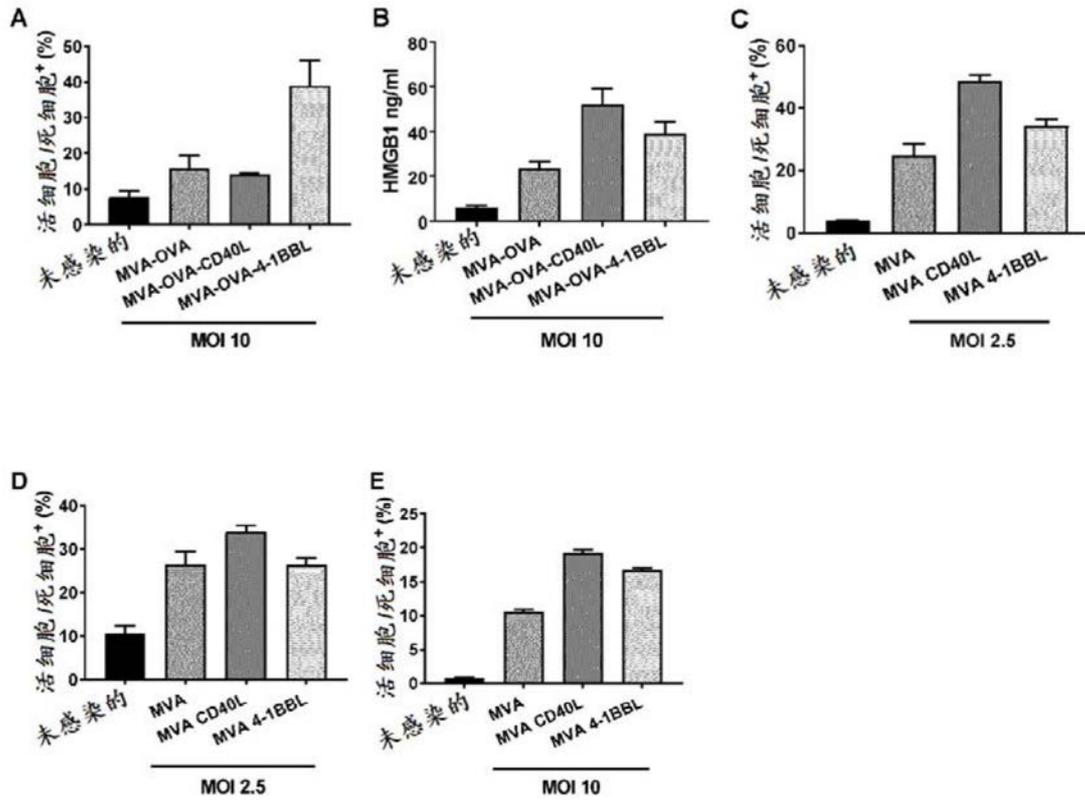


图3

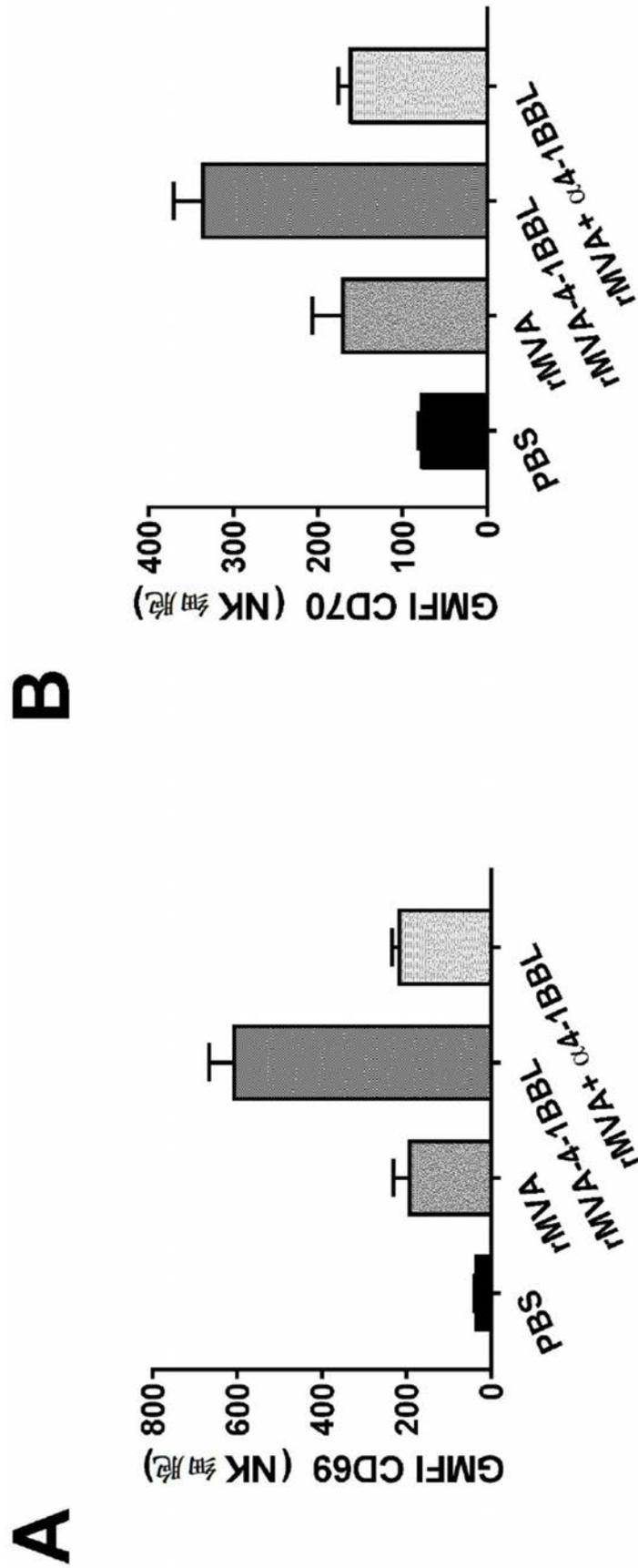


图4

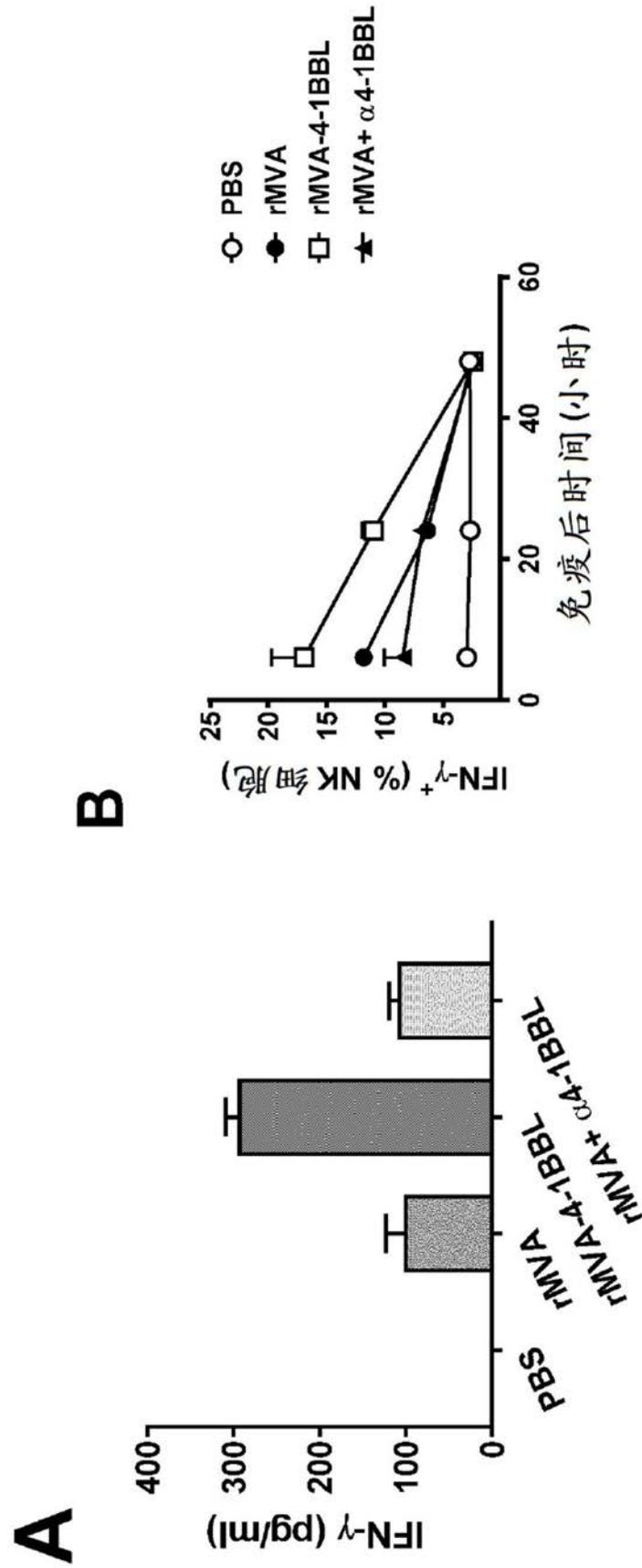


图5

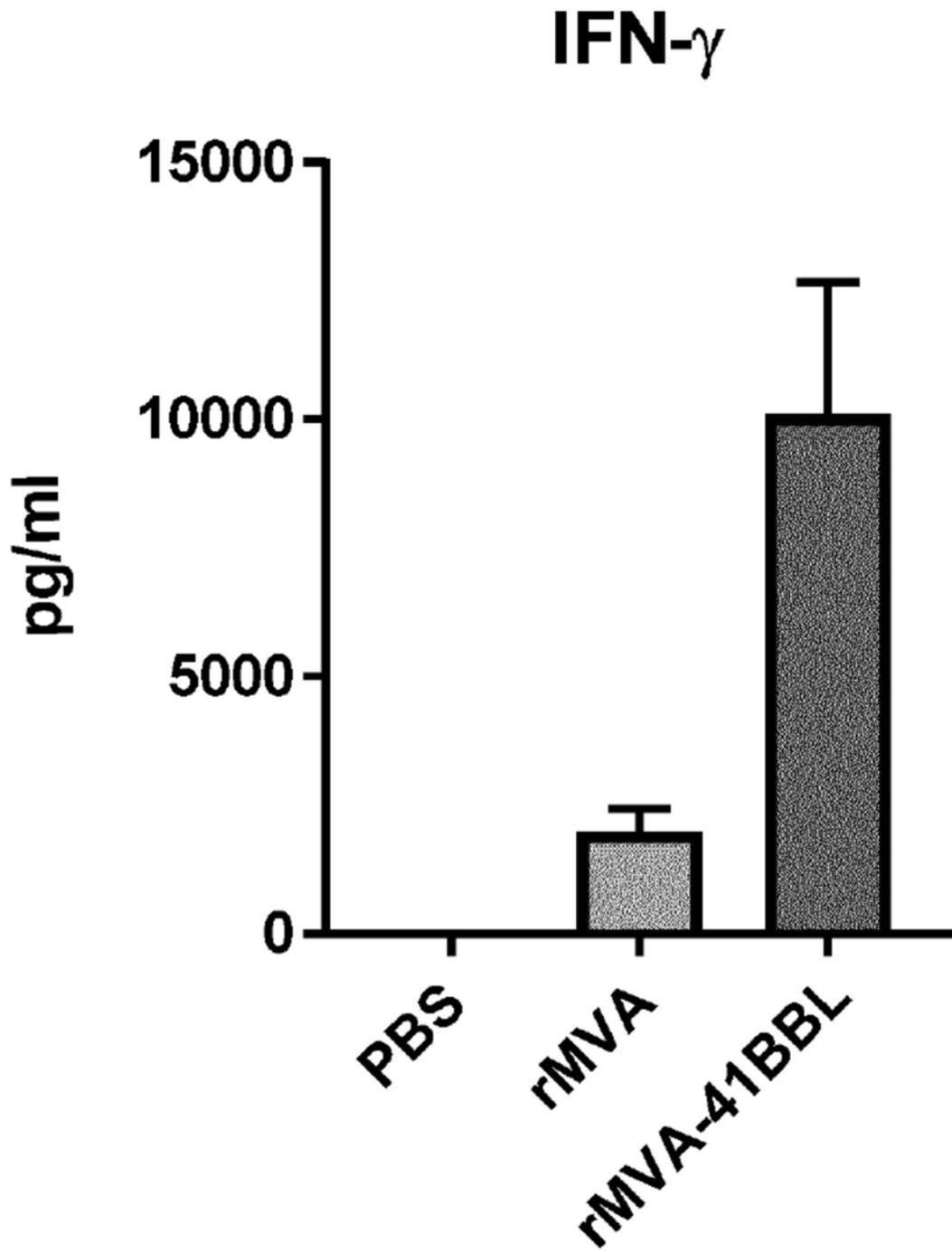


图6

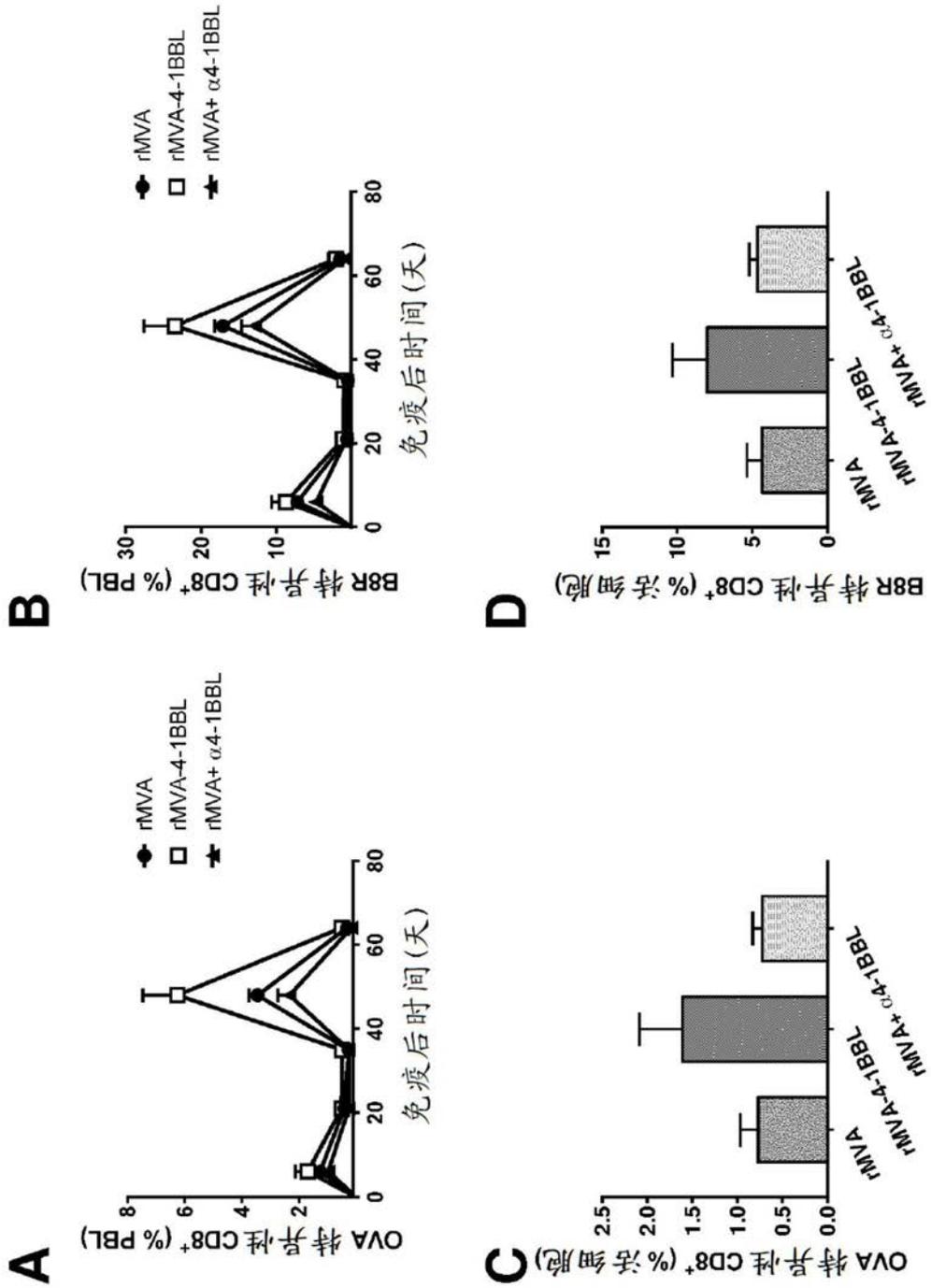


图7

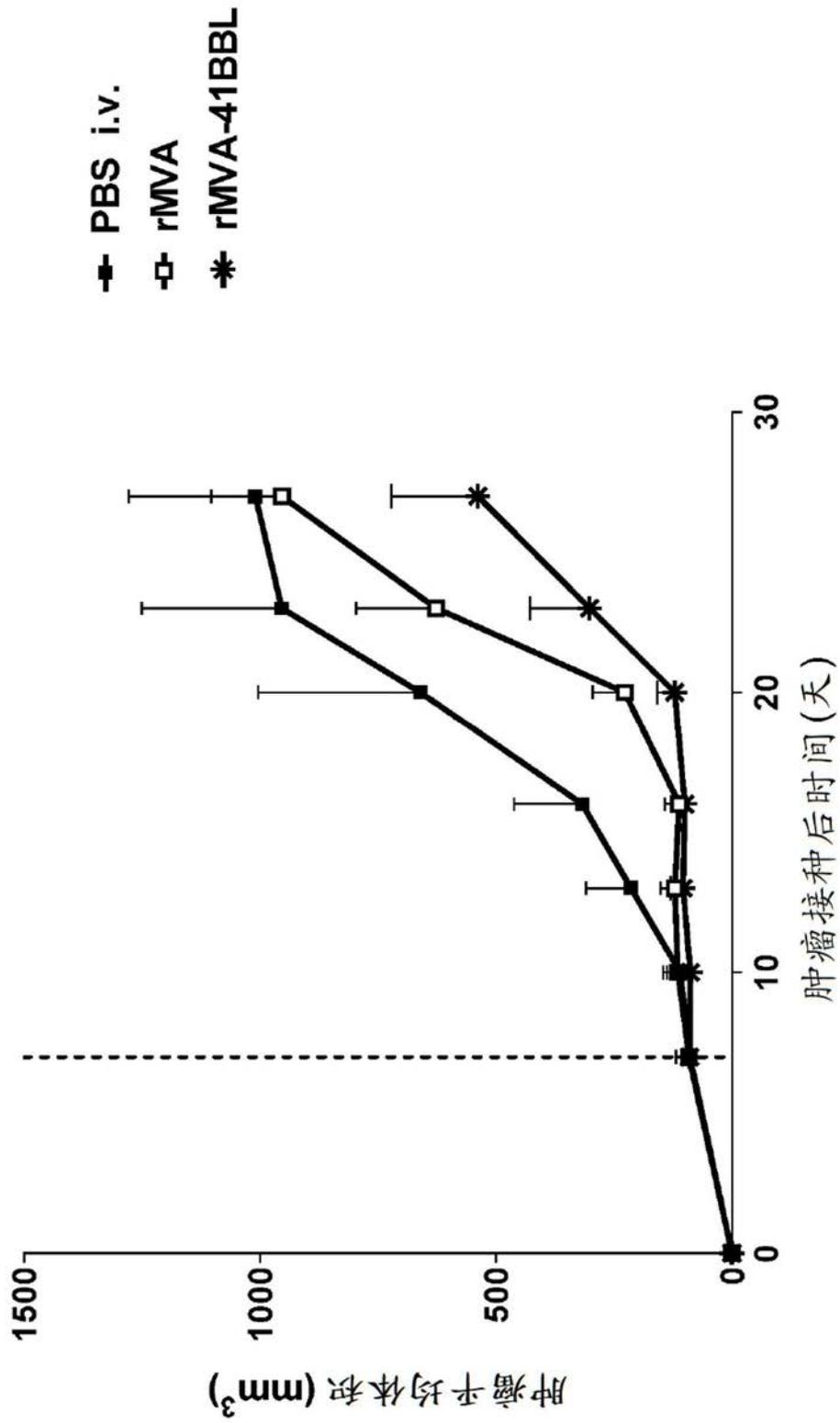


图8

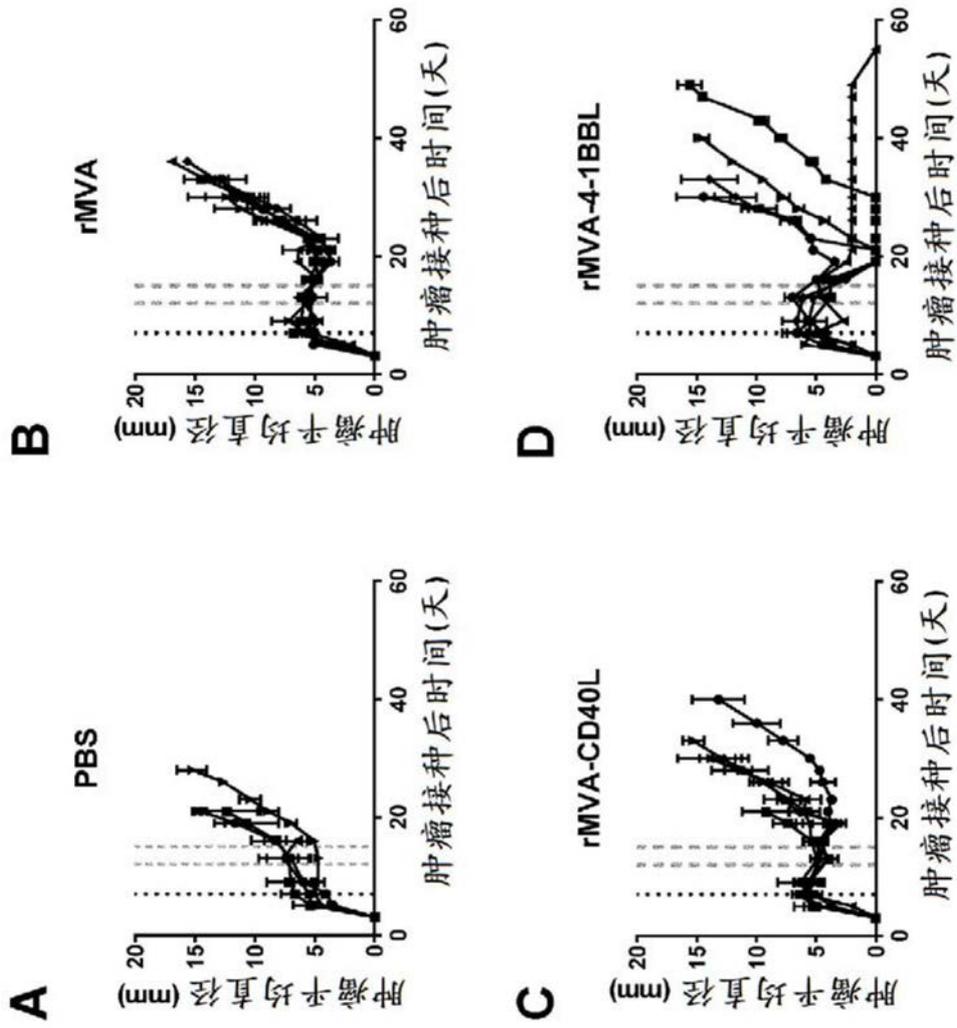


图9

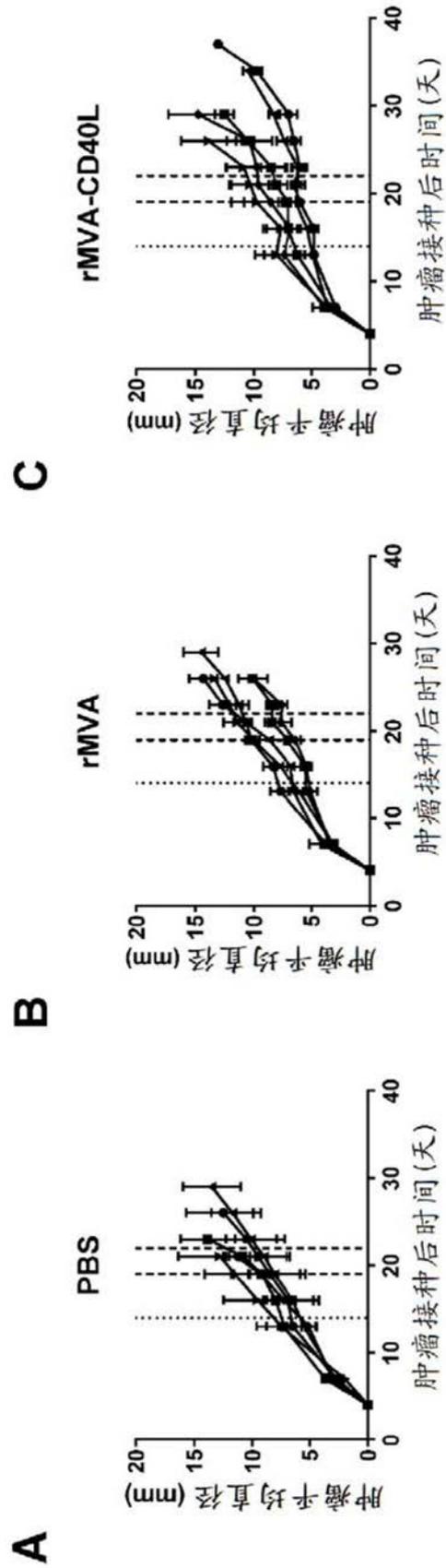


图10

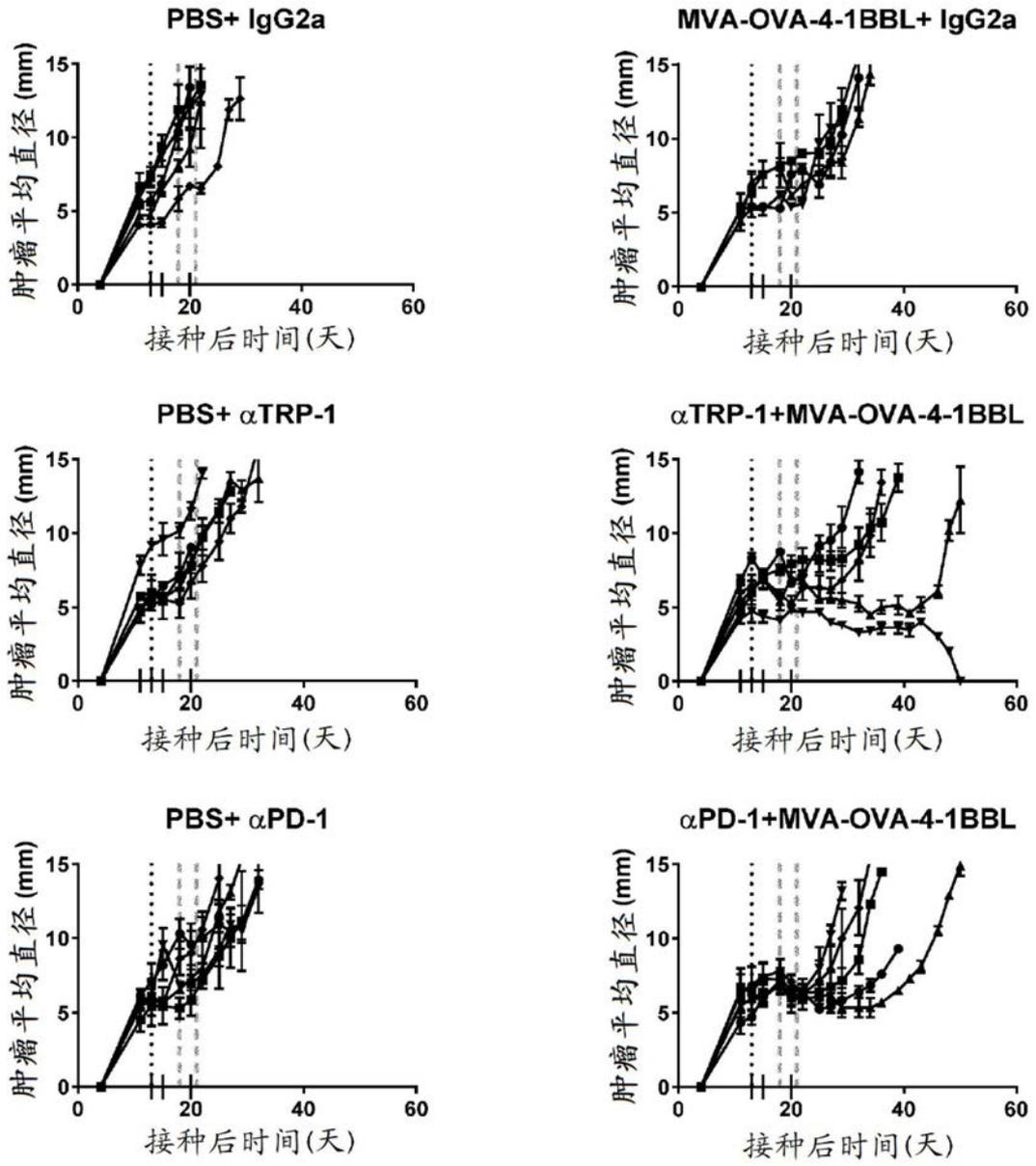


图11

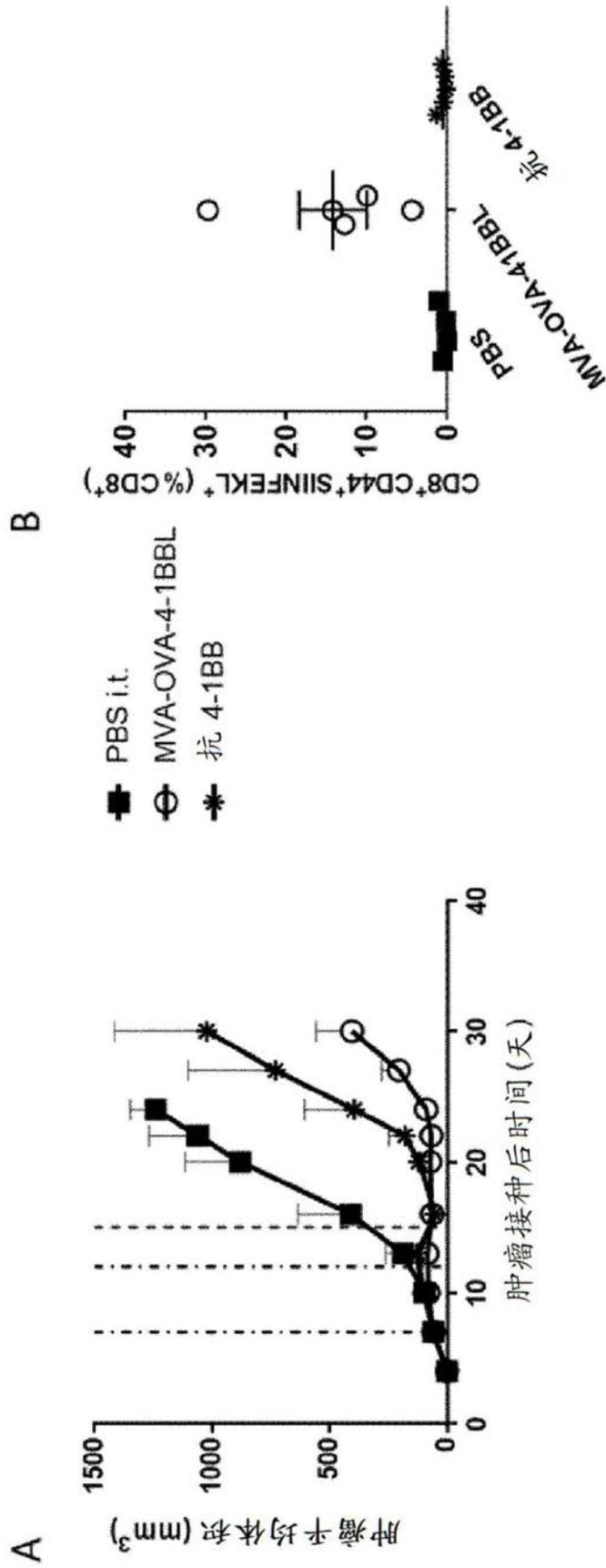
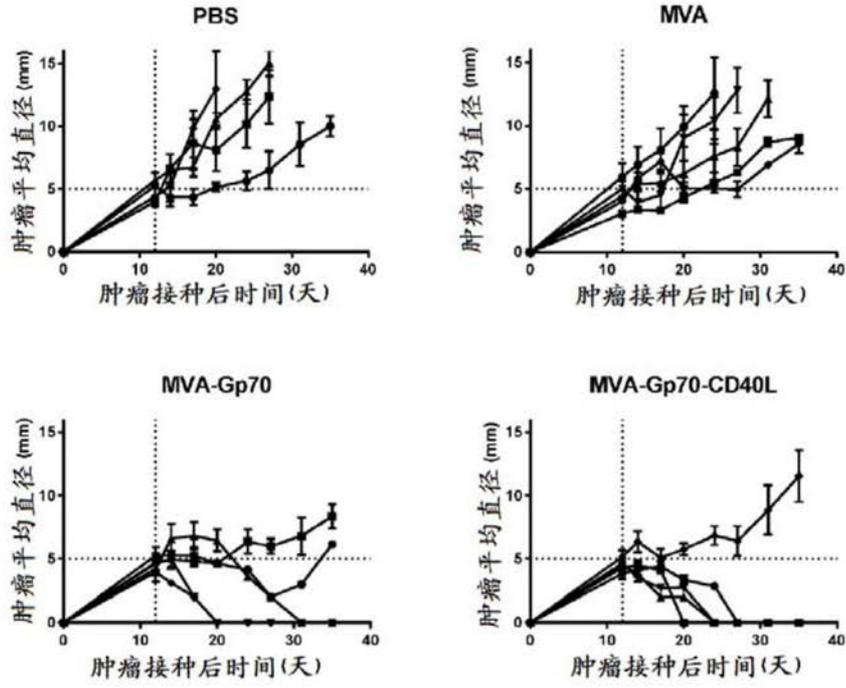
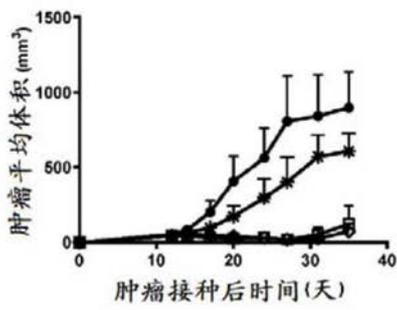


图12

A



B



C

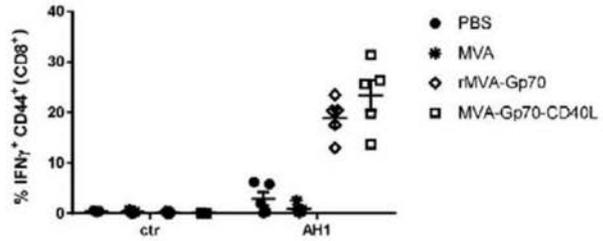
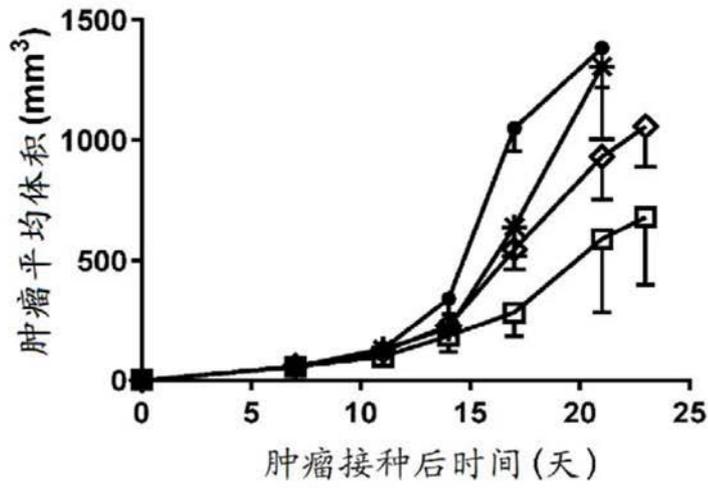


图13

A



B

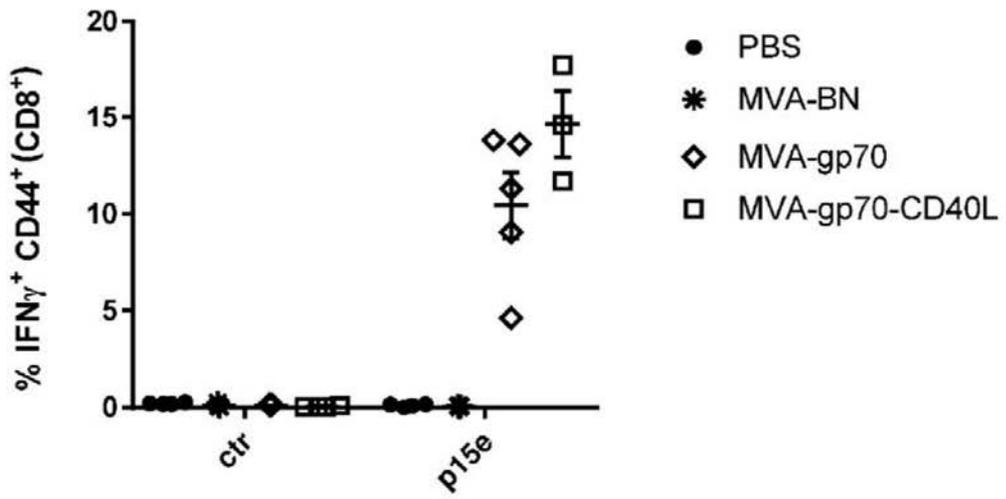


图14

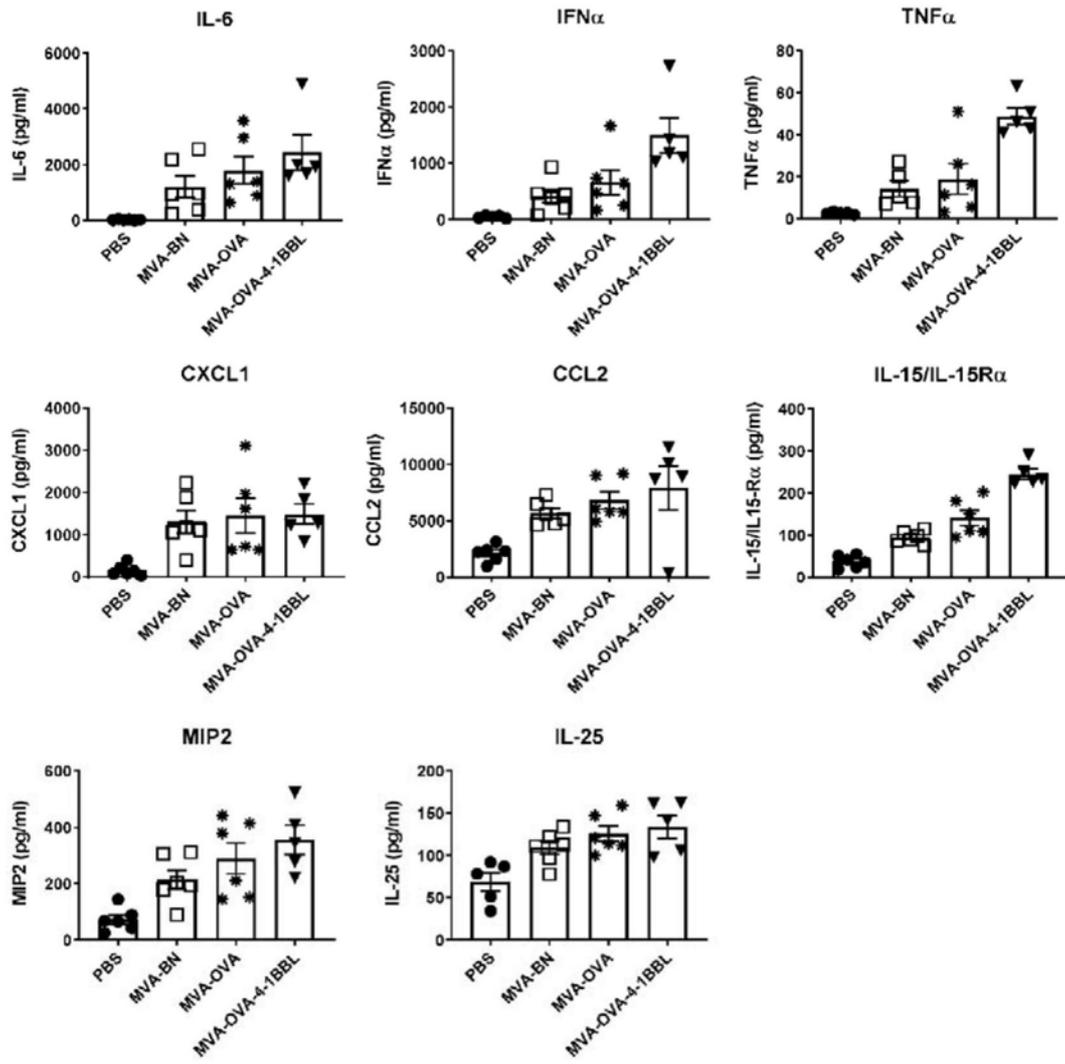


图15

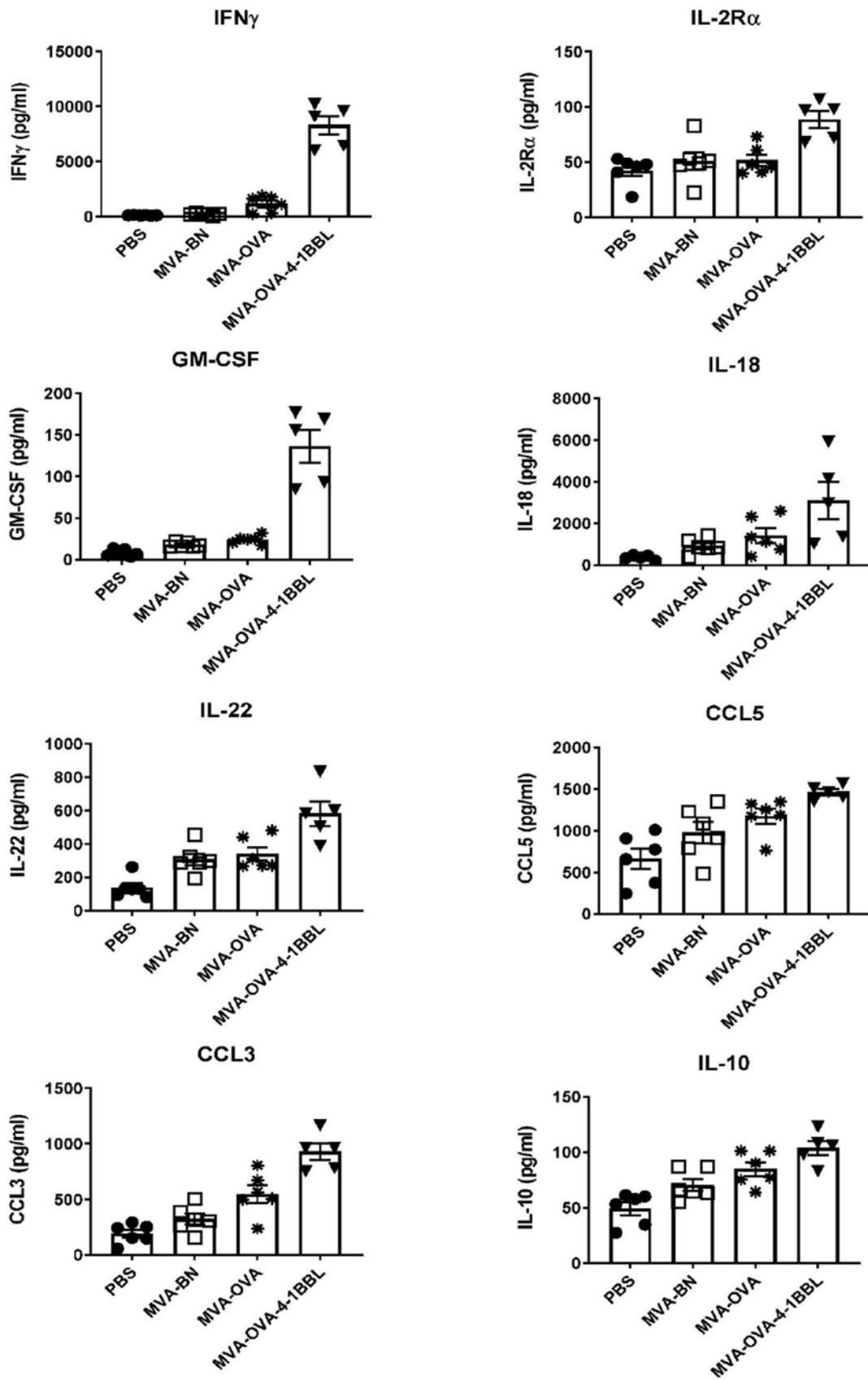


图16

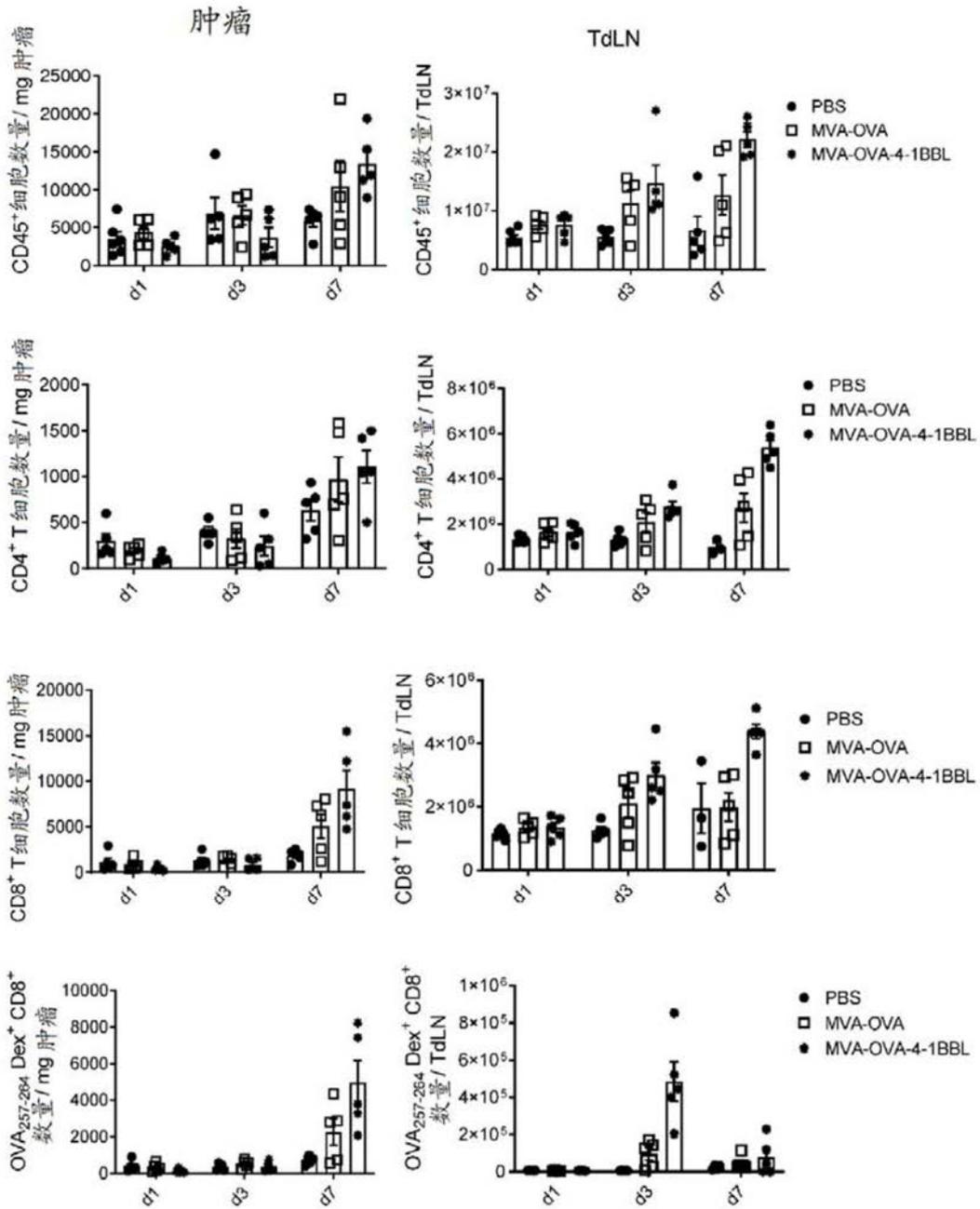


图17

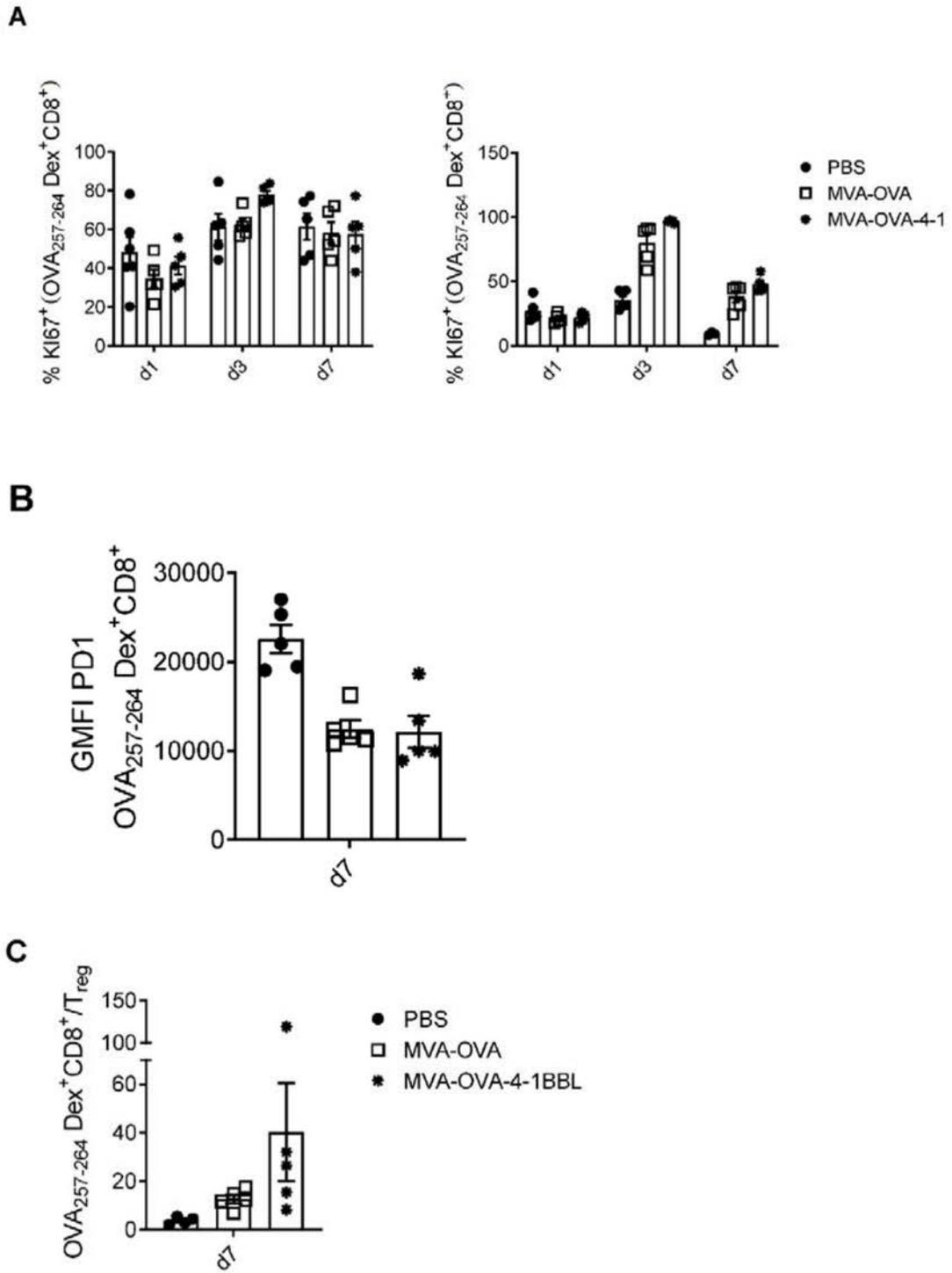


图18

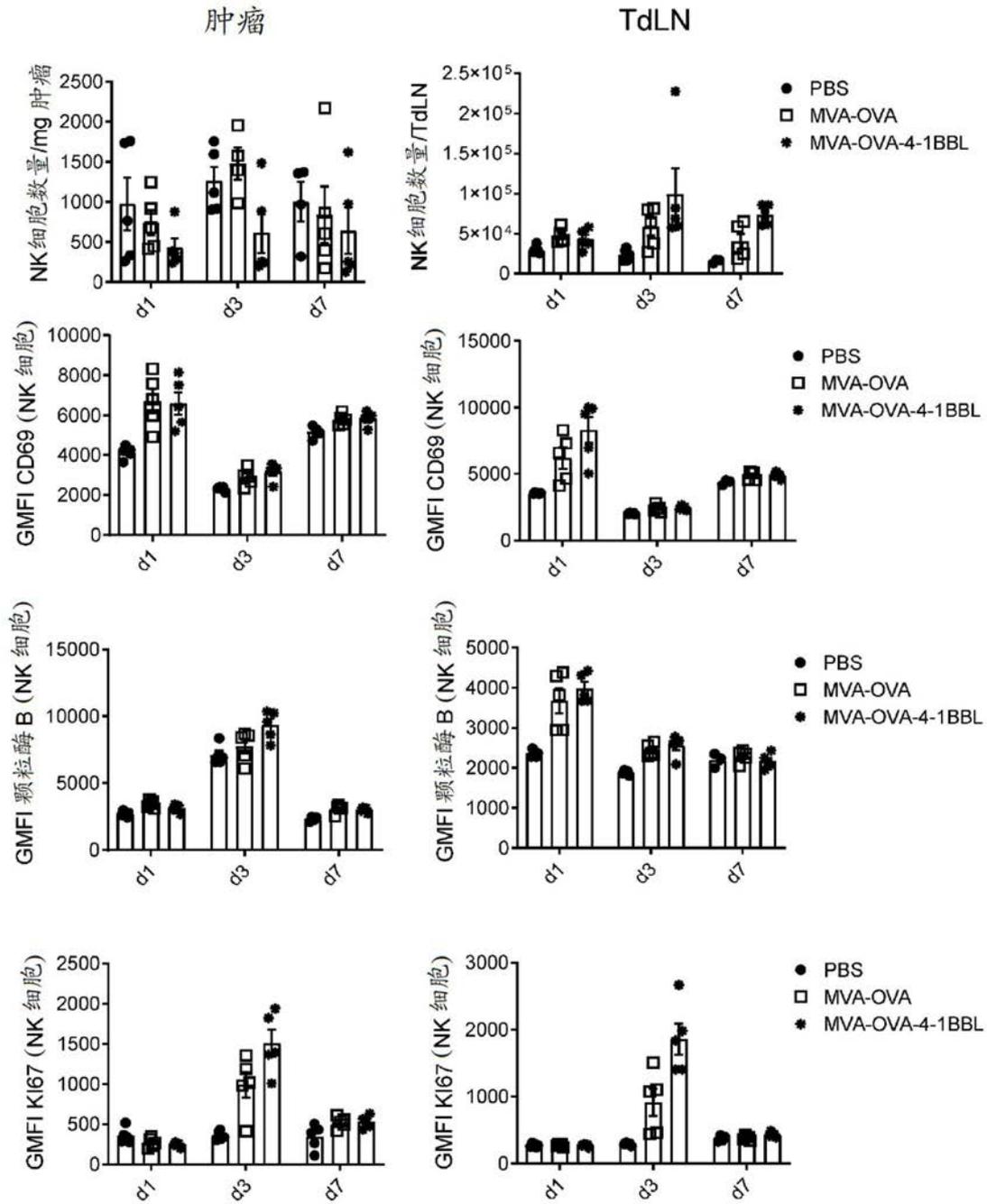


图19

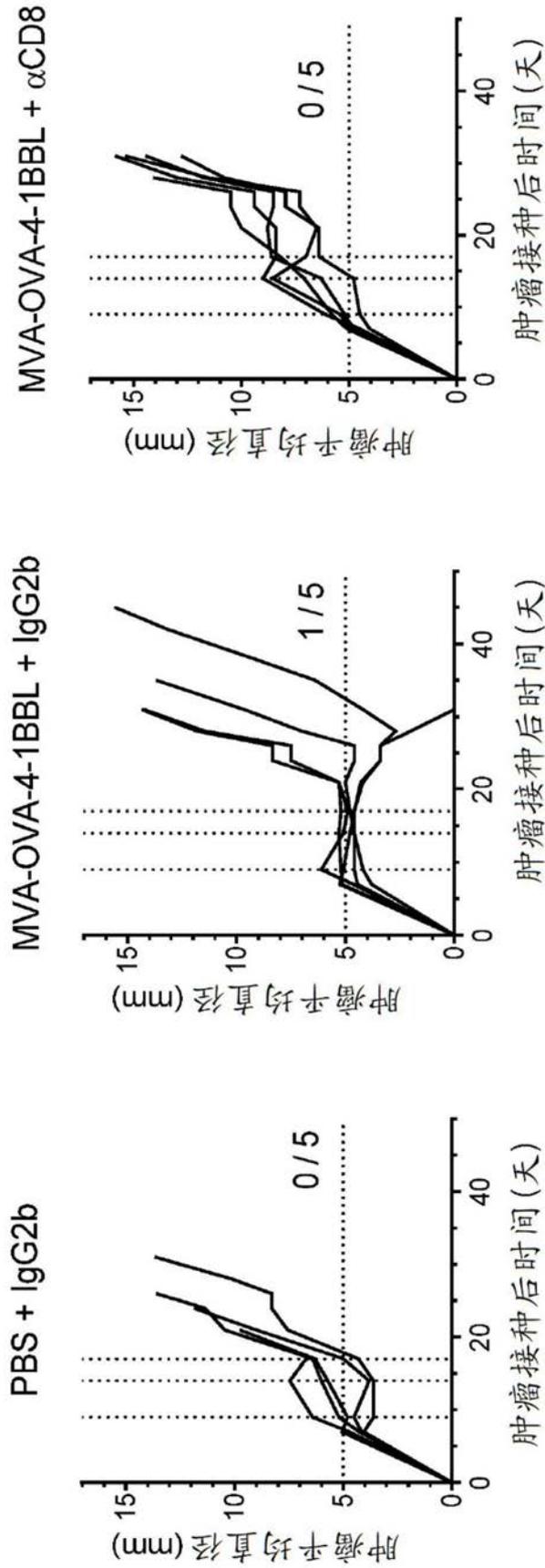


图20

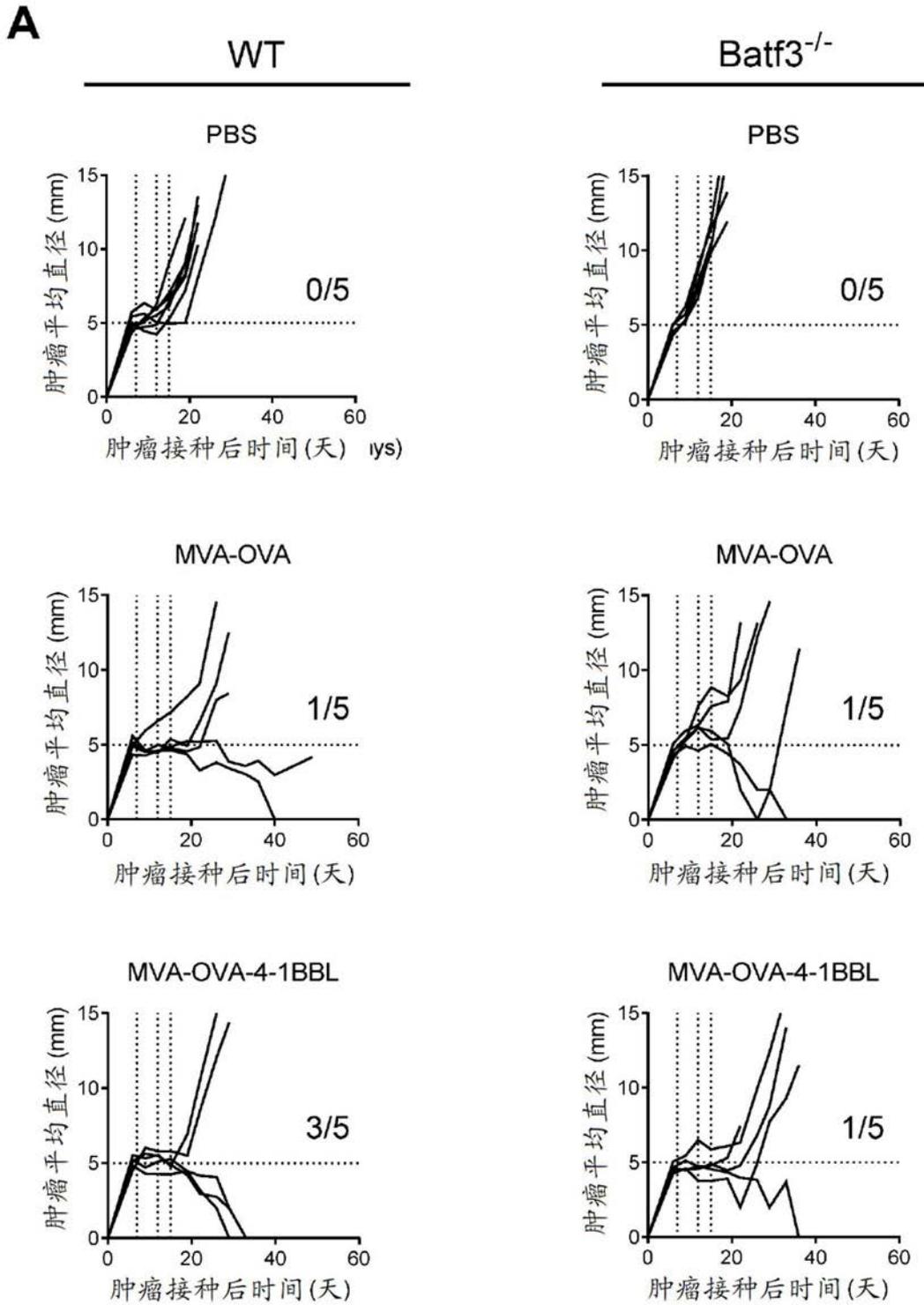


图21

**B**

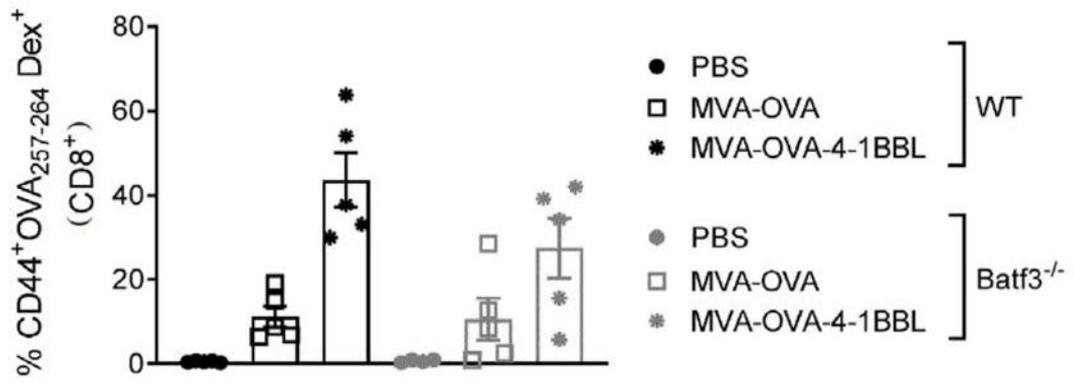


图21 (续)

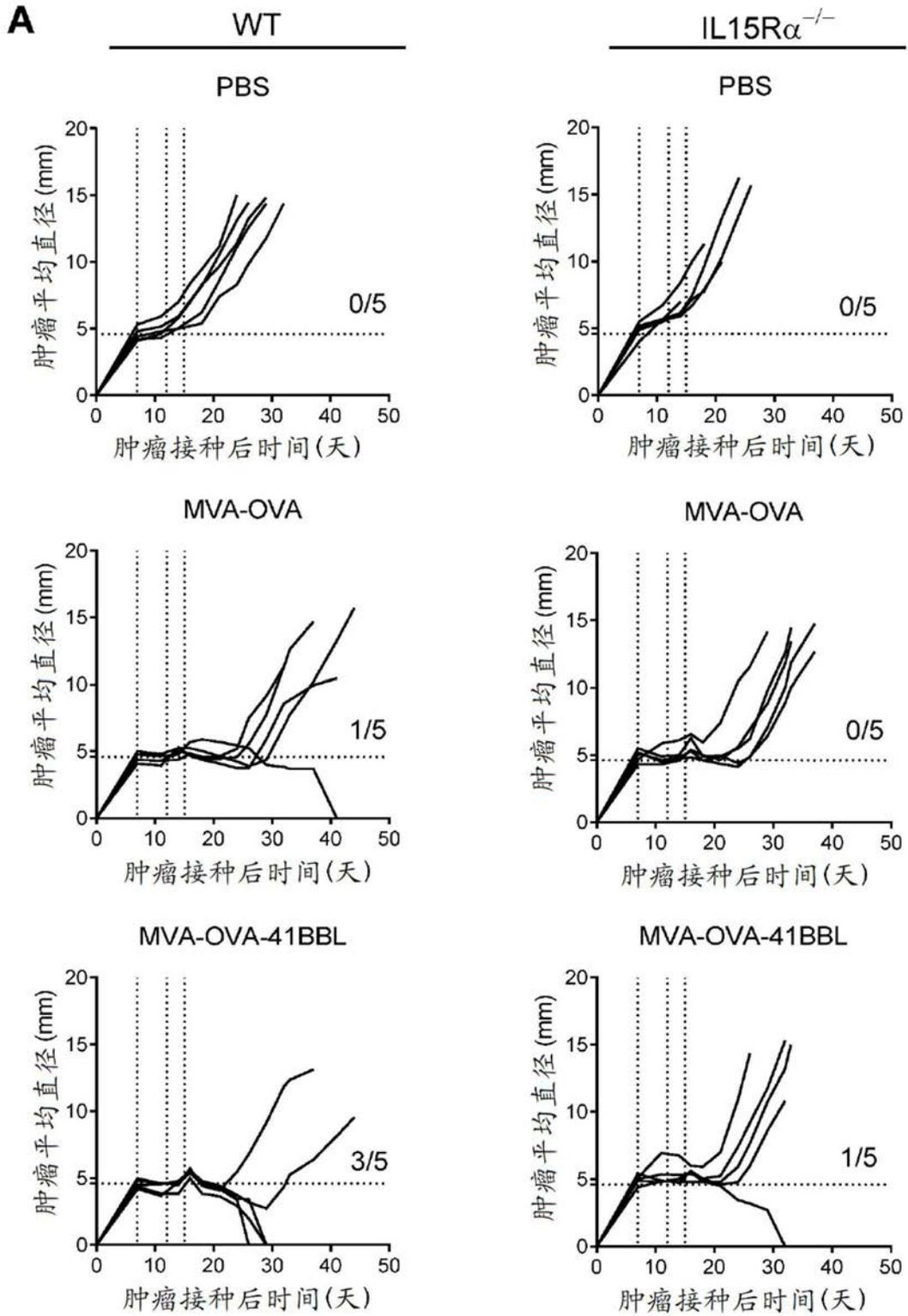
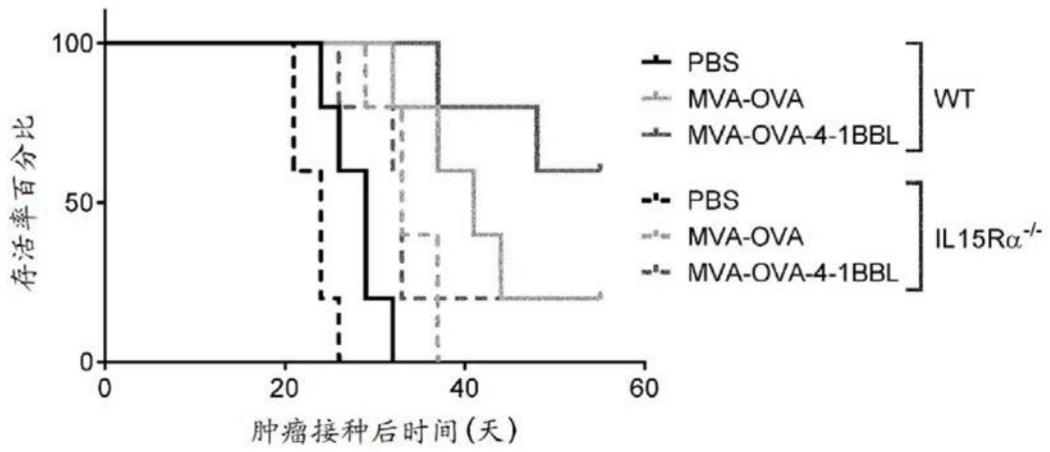


图22

**B**



**C**

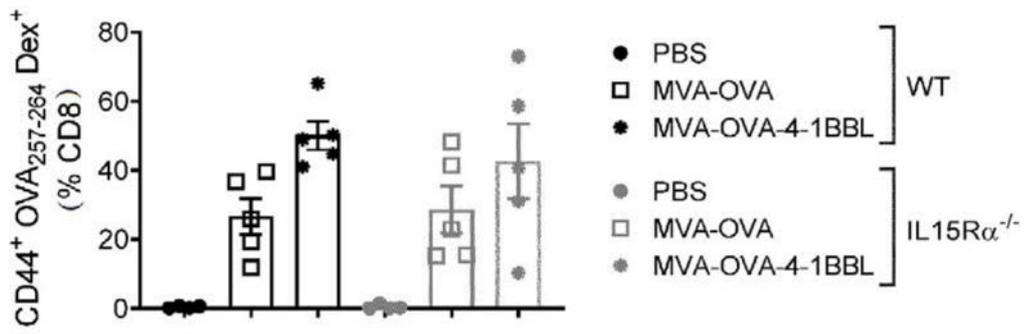


图22续

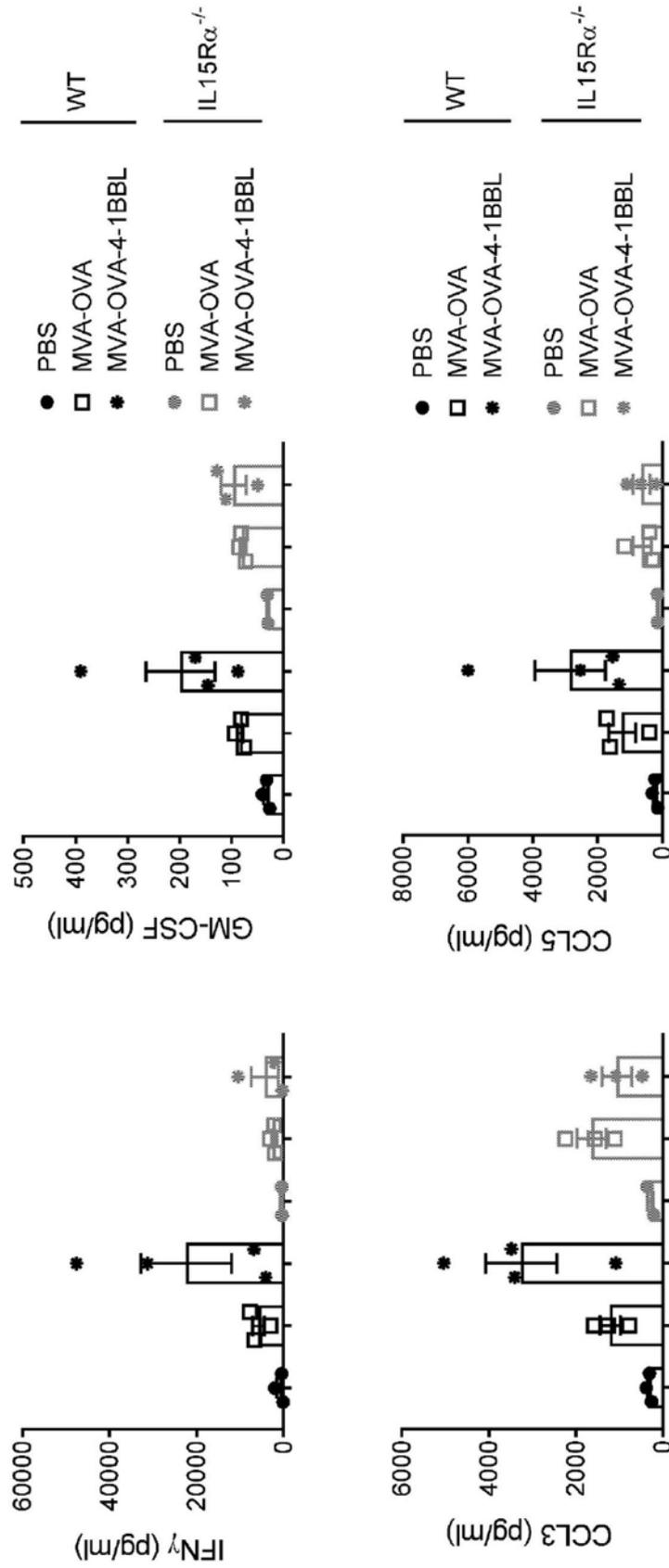


图23

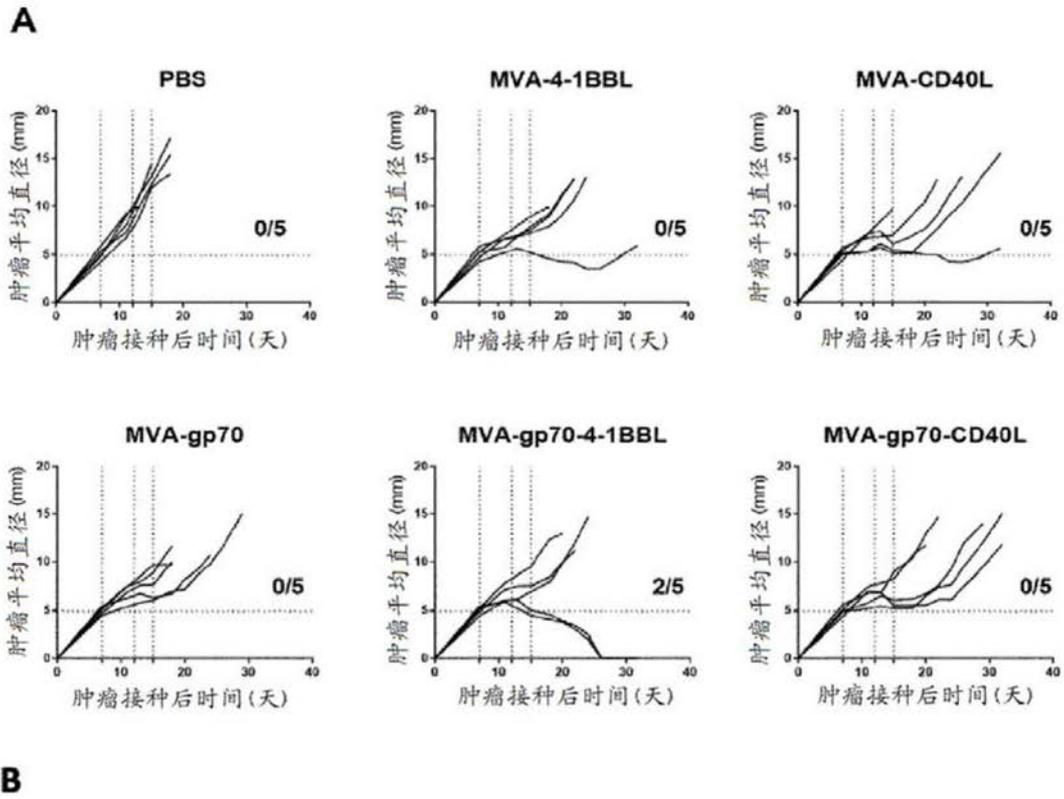


图24



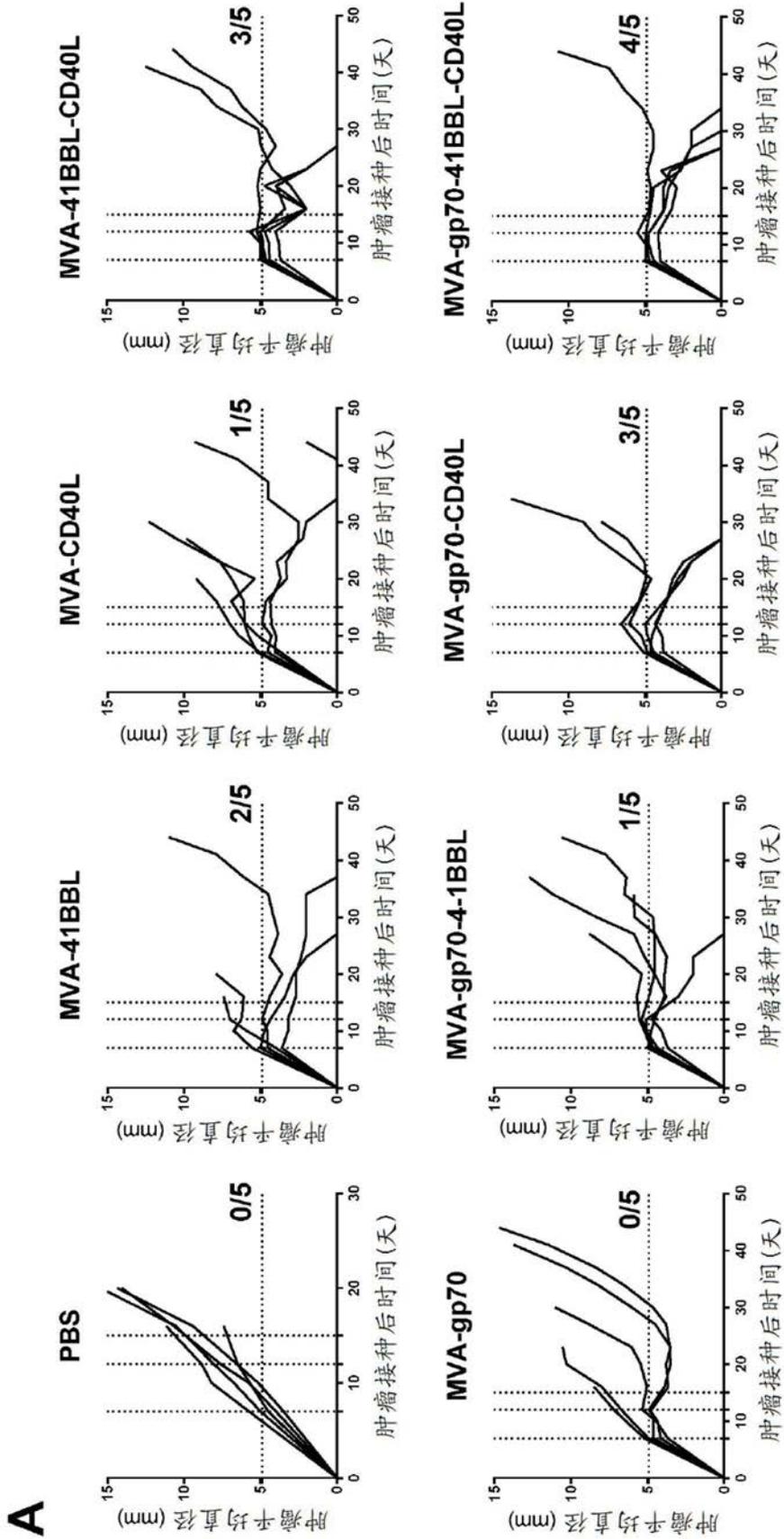


图25



图25续

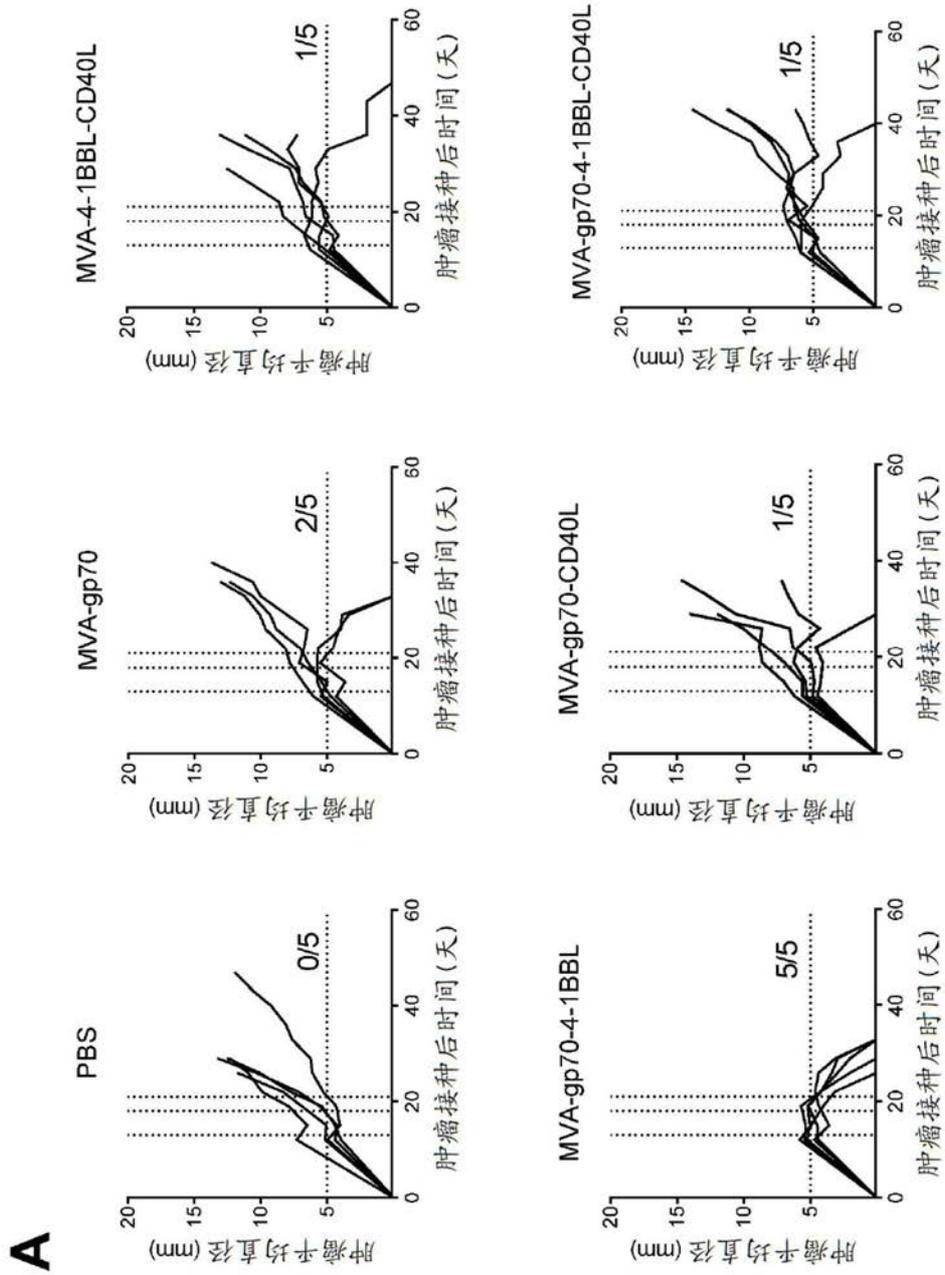
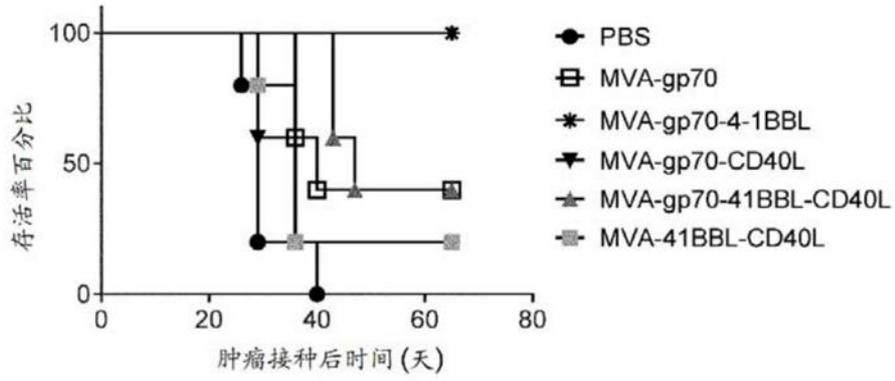


图26

**B**



**C**

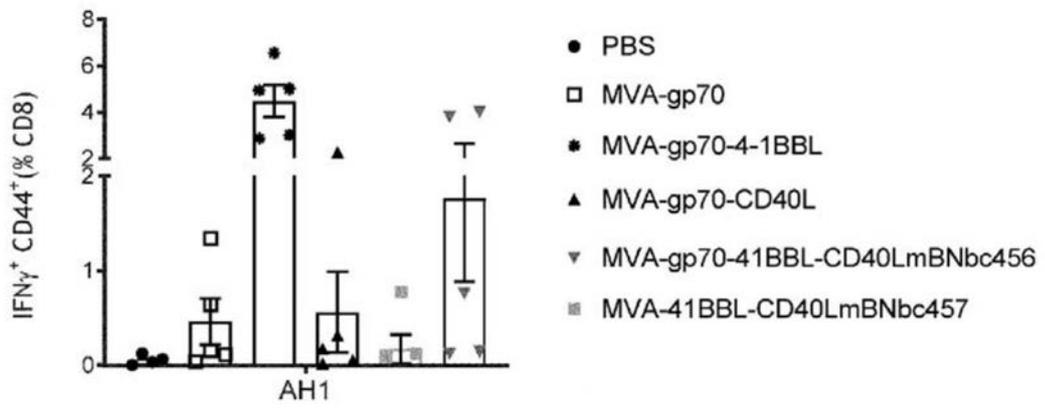


图26续

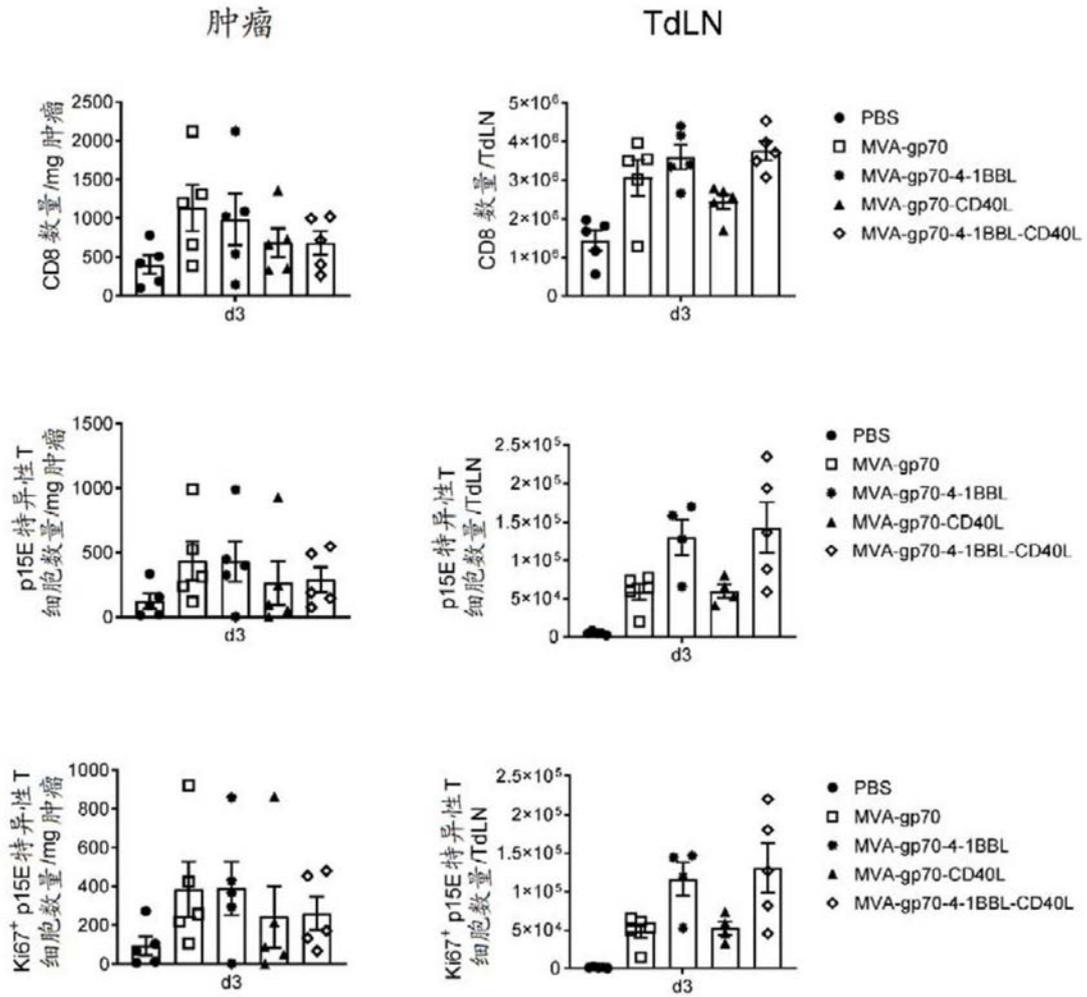


图27

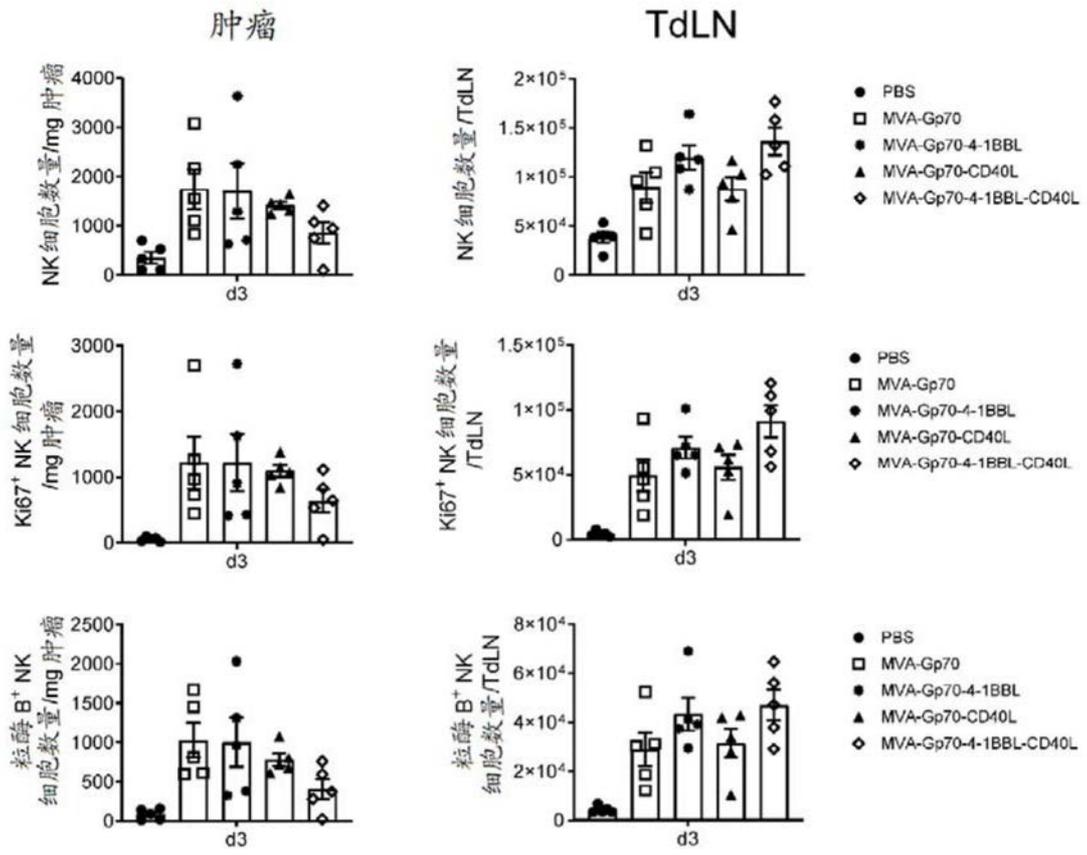


图28

A

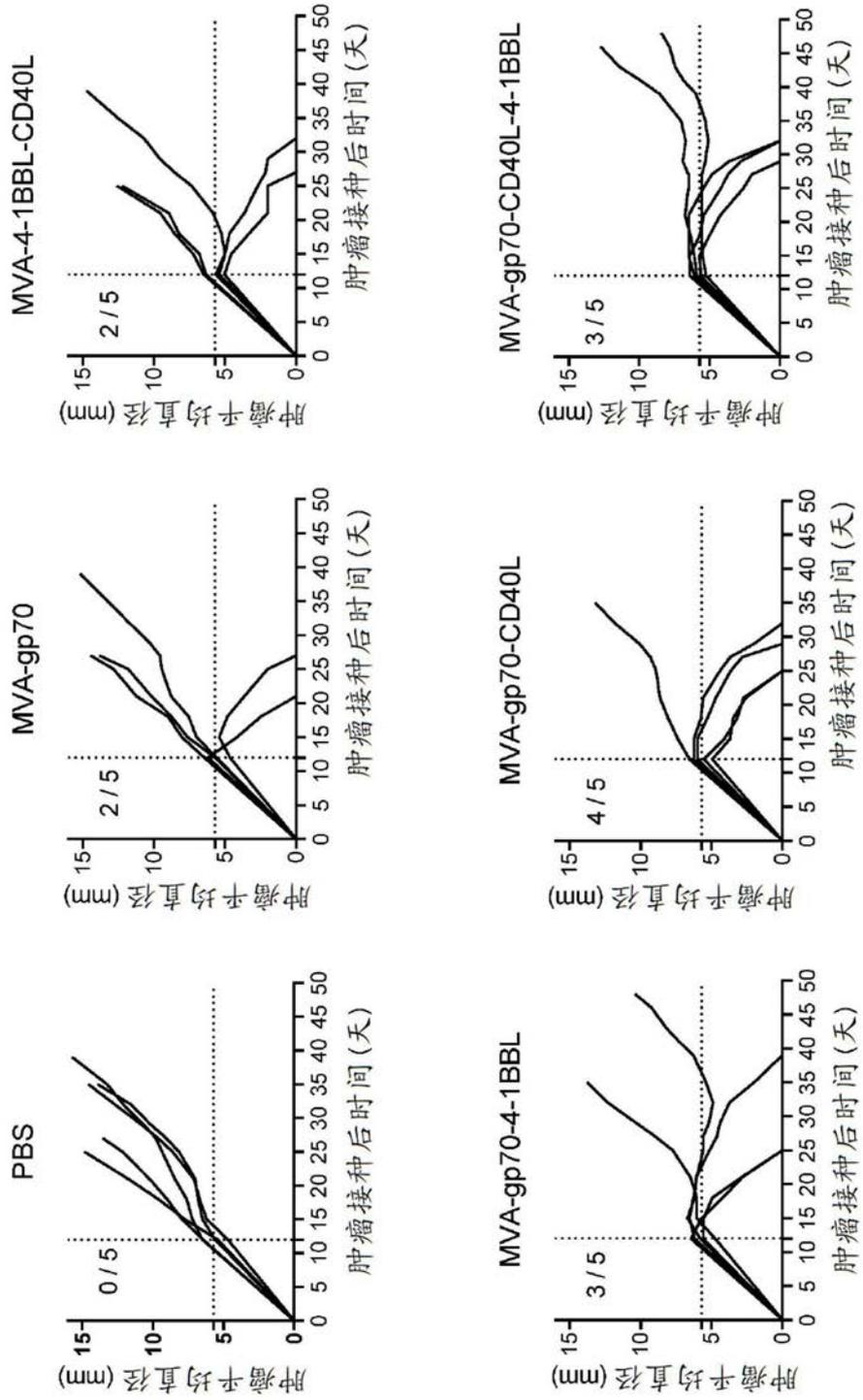


图29

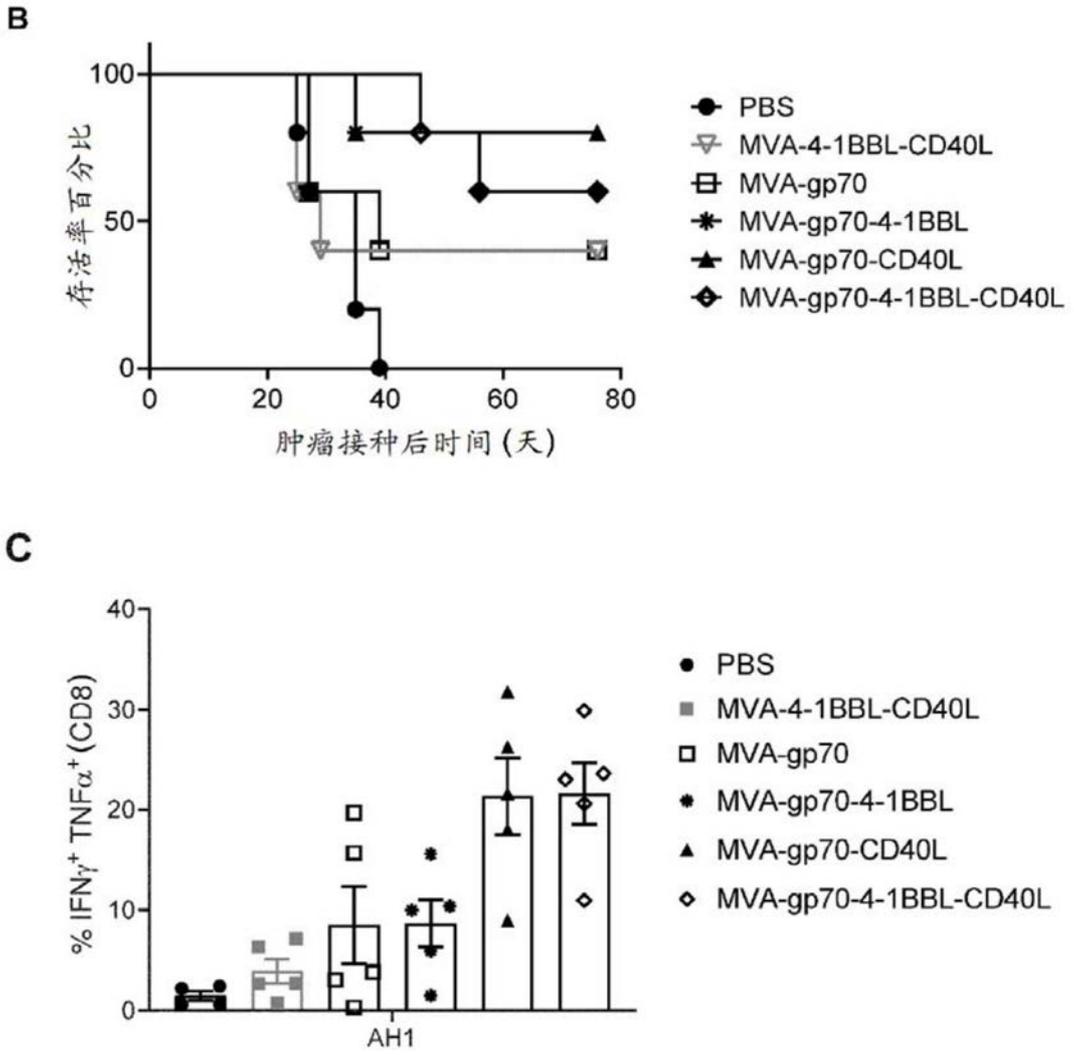


图29续