



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111655280 B
(45) 授权公告日 2025. 01. 14

(21) 申请号 201880067594.4
(22) 申请日 2018.08.31
(65) 同一申请的已公布的文献号
 申请公布号 CN 111655280 A
(43) 申请公布日 2020.09.11
(30) 优先权数据
 62/553,669 2017.09.01 US
(85) PCT国际申请进入国家阶段日
 2020.04.16
(86) PCT国际申请的申请数据
 PCT/US2018/049260 2018.08.31
(87) PCT国际申请的公布数据
 W02019/046818 EN 2019.03.07
(73) 专利权人 达纳-法伯癌症研究所股份有限公司
 地址 美国马萨诸塞州
(72) 发明人 J. 裴 N.C. 芒希 K.C. 安德森
(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所
 11105
 专利代理师 张文辉
(51) Int.Cl.
 A61K 39/00 (2006.01)
 C07K 14/705 (2006.01)
(56) 对比文件
 W0 1999045954 A1, 1999.09.16
 W0 2011119484 A1, 2011.09.29
 审查员 杨莽嘉

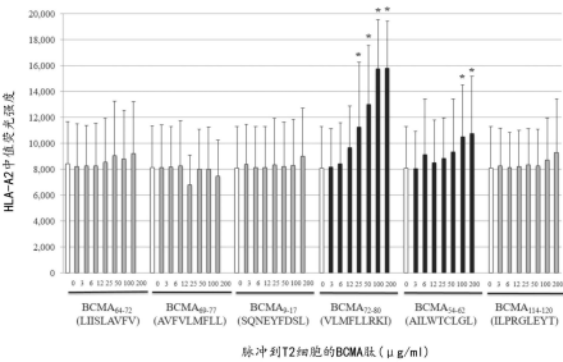
权利要求书4页 说明书71页
序列表11页 附图91页

(54) 发明名称

用于治疗癌症的BCMA和TACI抗原特异的免疫原性肽

(57) 摘要

本公开内容涉及对B细胞成熟抗原 (BCMA) 以及跨膜激活物和CAML相互作用物 (TACI) 特异性的免疫原性肽及其使用方法。



1. 肽,其由抗原组成,所述抗原由SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列组成,其中所述肽的长度为9至30个氨基酸,并且其中所述肽增加B细胞成熟抗原 (BCMA) 特异性应答。

2. 权利要求1的肽,其中所述抗原由SEQ ID NO:13中所示的氨基酸序列组成。

3. 权利要求1的肽,其中所述抗原由SEQ ID NO:14中所示的氨基酸序列组成。

4. 肽,其由第一氨基酸序列和与所述第一氨基酸序列异源的第二氨基酸序列组成,所述第一氨基酸序列由SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列组成的抗原组成;其中所述肽增加B细胞成熟抗原 (BCMA) 特异性应答。

5. 权利要求1的肽,其中所述肽:与MHC分子缔合,被T细胞上的抗原特异性T细胞受体识别。

6. 权利要求4的肽,其中所述肽:与MHC分子缔合,被T细胞上的抗原特异性T细胞受体识别。

7. 权利要求5的肽,其中所述MHC分子是:(a) I类MHC分子,(b) II类MHC分子,(c) HLA-A2分子,或(d) HLA-A24分子。

8. 权利要求6的肽,其中所述MHC分子是:(a) I类MHC分子,(b) II类MHC分子,(c) HLA-A2分子,或(d) HLA-A24分子。

9. 组合物,其包含权利要求1-8中任一项的肽和第二试剂。

10. 权利要求9的组合物,其中所述第二试剂是免疫刺激剂。

11. 权利要求9的组合物,其中所述第二试剂是T辅助细胞表位。

12. 权利要求11的组合物,其中所述T辅助细胞表位是PADRE序列或通用破伤风类毒素T辅助细胞(TT Th)表位。

13. 权利要求9的组合物,其中所述第二试剂是佐剂。

14. 权利要求13的组合物,其中所述佐剂选自下组:弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂、明矾、Toll受体的配体、QS21、RIBI、霍乱毒素(CT)、大肠杆菌热不稳定性毒素(LT)、突变体CT(MCT)和突变体大肠杆菌热不稳定性毒素(MLT)。

15. 权利要求9的组合物,其中所述第二试剂是toll样受体-3、干扰素 α (IFN α)、干扰素 γ (IFN γ),抗OX40抗体、抗GITR抗体或粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)。

16. 药物组合物,其包含权利要求1-8中任一项的肽和药学上可接受的载体。

17. 核酸,其编码权利要求1-8中任一项的肽。

18. 载体,其包含编码权利要求1-8中任一项的肽的核酸。

19. 权利要求18的载体,其中所述核酸与启动子、调节元件或表达控制序列可操作连接。

20. 培养的细胞,其包含权利要求19的载体。

21. 权利要求20的培养的细胞,其中所述细胞是哺乳动物细胞。

22. 权利要求20的培养的细胞,其中所述细胞是人细胞。

23. 权利要求20的培养的细胞,其中所述细胞是免疫细胞。

24. 病毒,其包含编码权利要求1-8中任一项的肽的核酸。

25. 权利要求24的病毒,其中所述病毒是慢病毒或腺病毒。

26. 权利要求24的病毒,其中所述病毒是腺伴随病毒(adeno-associated virus)。

27. 第一肽与第二肽的组合产品,其中所述第一肽由SEQ ID NO:13所示的氨基酸序列组成,和所述第二肽由SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列组成,其中所述肽增加B细胞成熟抗原(BCMA)特异性应答。

28. 药物组合物,其包含

权利要求27的组合产品;和

药学上可接受的载体。

29. 权利要求28的药物组合物,其中所述药物组合物还包含免疫激动剂。

30. 权利要求29的药物组合物,其中所述免疫激动剂是抗OX40抗体或抗GITR抗体。

31. 权利要求1-8中任一项的肽、或权利要求9-15中任一项的组合物或权利要求16、28-30中任一项的药物组合物在制备药物中的用途,所述药物用于在人受试者中诱导针对多发性骨髓瘤细胞的免疫应答。

32. 权利要求31的用途,其中所述人受试者患有多发性骨髓瘤。

33. 权利要求31的用途,其中所述药物与免疫激动剂组合使用。

34. 权利要求33的用途,其中所述免疫激动剂是抗OX40抗体或抗GITR抗体。

35. 权利要求31的用途,其中所述药物与以下组合使用:在对所述人受试者施用所述药物后,测定在所述人受试者中是否发生针对多发性骨髓瘤的免疫应答。

36. 权利要求1-8中任一项的肽或权利要求9-15中任一项的组合物或权利要求16和28-30中任一项的药物组合物在制备药物中的用途,所述药物用于治疗患有多发性骨髓瘤的人受试者。

37. 权利要求36的用途,其中所述药物与以下组合使用:

检测所述人受试者中的一个或多个癌细胞表达或过表达BCMA。

38. 权利要求36的用途,其中所述人受试者具有一个或多个表达MHC分子的癌细胞。

39. 权利要求36的用途,其中所述药物与免疫激动剂组合使用。

40. 权利要求39的用途,其中所述免疫激动剂是抗OX40抗体或抗GITR抗体。

41. 权利要求36的用途,其中所述药物与化学疗法或放射疗法组合使用。

42. 产生和/或增殖BCMA特异性细胞毒性T细胞的方法,所述方法包括使一个或多个细胞毒性T细胞与一个或多个用权利要求1所述的肽脉冲的抗原呈递细胞接触。

43. 权利要求42的方法,其中所述细胞毒性T细胞是记忆细胞毒性T细胞。

44. 权利要求42的方法,其中所述细胞毒性T细胞是效应细胞毒性T细胞。

45. 权利要求42的方法,其中所述抗原呈递细胞是树突细胞。

46. 一个或多个多发性骨髓瘤特异性细胞毒性T细胞在制备用于杀死多发性骨髓瘤靶细胞的药物中的用途,其中所述靶细胞表达或过表达BCMA,并表达HLA-A,

其中所述一个或多个多发性骨髓瘤特异性细胞毒性T细胞通过以下获得:使一个或多个细胞毒性T细胞与一个或多个用权利要求1所述的肽脉冲的抗原呈递细胞接触。

47. 权利要求46的用途,其中所述用途还包括使所述一个或多个多发性骨髓瘤特异性细胞毒性T细胞与免疫激动剂接触。

48. 权利要求47的用途,其中所述免疫激动剂是OX40激动剂或GITR激动剂。

49. 权利要求47的用途,其中所述免疫激动剂是抗OX40抗体或抗GITR抗体。

50. 多个BCMA特异性细胞毒性T细胞在制备药物中的用途,所述药物用于在有此需要的

人受试者中治疗多发性骨髓瘤，

其中所述BCMA特异性细胞毒性T细胞通过以下获得：使一个或多个细胞毒性T细胞与一个或多个用权利要求1所述的肽脉冲的抗原呈递细胞接触。

51. 权利要求50的用途，其中所述药物与免疫激动剂组合使用。

52. 权利要求51的用途，其中所述免疫激动剂是OX40激动剂或GITR激动剂。

53. 权利要求51的用途，其中所述免疫激动剂是抗OX40抗体或抗GITR抗体。

54. 权利要求50的用途，其中所述一个或多个细胞毒性T细胞衍生自所述人受试者的细胞。

55. 权利要求50的用途，其中所述一个或多个细胞毒性T细胞衍生自诱导的多能干细胞。

56. 一种产生在主要组织相容性复合物(MHC)分子上呈递肽的抗原呈递细胞的方法，其包括

(a) 从受试者获得骨髓衍生的单个核细胞(mononuclear cell)；

(b) 在单个核细胞粘附于培养容器的条件下体外培养所述单个核细胞；

(c) 选择粘附的单个核细胞；

(d) 在存在一种或多种细胞因子的情况中在所述细胞分化为抗原呈递细胞的条件下培养所述粘附的单个核细胞；并且

(e) 使所述抗原呈递细胞与权利要求1-8中任一项的肽接触，从而产生在主要组织相容性复合物(MHC)分子上呈递所述肽的抗原呈递细胞。

57. 权利要求56的方法，其中所述主要组织相容性复合物分子是MHC I类分子。

58. 权利要求56的方法，其中所述一种或多种细胞因子包括粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)和白介素-4(IL-4)。

59. 权利要求56的方法，其中所述一种或多种细胞因子包括肿瘤坏死因子- α (TNF- α)。

60. 权利要求56的方法，其中所述骨髓衍生的细胞获自诊断为多发性骨髓瘤的受试者。

61. 鉴定BCMA的T细胞抗原受体序列的方法，所述方法包括

(a) 通过权利要求42的方法产生和/或增殖BCMA特异性细胞毒性T细胞；和

(b) 测定所述BCMA特异性细胞毒性T细胞中BCMA的T细胞抗原受体序列。

62. 组合物，其包含：

纳米颗粒和权利要求1-8中任一项的肽。

63. 权利要求62的组合物，其中所述肽包囊在所述纳米颗粒中。

64. 权利要求62的组合物，其中所述纳米颗粒包含生物可降解的聚合物。

65. 权利要求62的组合物，其中所述纳米颗粒包含聚(D,L-丙交酯-共-乙交酯)(PLGA)。

66. 权利要求62的组合物，其中所述纳米颗粒包含聚(乳酸-共-乙醇酸)-聚(乙二醇)(PLGA-PEG)共聚物。

67. 权利要求62的组合物，其中所述纳米颗粒是脂质体。

68. 权利要求62-66中任一项的组合物，其中所述纳米颗粒包含佐剂。

69. 权利要求65-66中任一项的组合物，其中所述纳米颗粒包含Toll样受体激动剂。

70. 权利要求62-66中任一项的组合物，其还包含佐剂、免疫激动剂、检查点抑制剂、来那度胺或它们的任何组合。

71. 权利要求62-70中任一项的组合物在制备药物中的用途, 所述药物用于在有此需要的人受试者中治疗多发性骨髓瘤。

72. 权利要求71的用途, 其中所述药物与下列一种或多种组合使用: 选自SEQ ID NO: 13-17的肽; BCMA特异性CTL和TACI特异性CTL。

73. 权利要求71的用途, 其中所述药物与肽组合使用, 所述肽由SEQ ID NO: 13或16所示的氨基酸序列组成。

74. 权利要求71的用途, 其中所述药物与以下组合使用: 通过用肽刺激CTL产生的BCMA特异性CTL, 所述肽由以SEQ ID NO: 13所示的氨基酸序列组成。

75. 权利要求71的用途, 其中所述药物与以下组合使用: 通过用肽刺激CTL产生的TACI特异性CTL, 所述肽由以SEQ ID NO: 16所示的氨基酸序列组成。

76. 权利要求1的肽, 其中所述肽结合HLA-A2分子。

用于治疗癌症的BCMA和TACI抗原特异的免疫原性肽

[0001] 对相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2017年9月1日提交的美国临时申请号62/553,669的权益。上述全部内容通过引用并入本文。

[0003] 联邦资助研究声明

[0004] 本发明是在国立卫生研究院授予的拨款号P50-100007、P01-78378和R01-50947下得到政府支持完成的。政府拥有本发明的某些权利。

技术领域

[0005] 本公开内容涉及对B细胞成熟抗原 (BCMA) 以及跨膜激活物和CAML相互作用物 (TACI) 特异性的免疫原性肽及其使用方法。

背景技术

[0006] 癌症当前是具有最高人死亡率的疾病之一。根据世界卫生组织的统计数据,2012年全球癌症发生和死亡病例的数目分别达到1400万和820万。在美国,癌症占有所有死亡的至少25%。

[0007] 近年来,已经开发出用于治疗各种类型的癌症的新疗法。患有癌症的患者通常通过使用例如手术、化学疗法和/或免疫疗法来治疗。这些患者的预后有时仍不能令人满意。因此,迫切需要用于治疗癌症的有效的疗法和/或预防方案。

发明内容

[0008] 本公开内容部分地涉及对B细胞成熟抗原 (B-cell maturation antigen, BCMA) 以及跨膜激活物和CAML相互作用物 (Transmembrane activator and CAML interactor, TACI) 特异性的免疫原性肽、T细胞 (例如, CD8⁺细胞毒性T细胞 (CTL) 和/或CD4⁺辅助T细胞) 和包囊肽的纳米颗粒 (例如, 聚合物纳米载体或脂质体纳米颗粒) 及其使用方法。

[0009] 在一方面, 本公开内容涉及肽, 该肽包含氨基酸序列, 基本上由氨基酸序列组成或由氨基酸序列组成, 所述氨基酸序列与SEQ ID NO:13-17中任一项所示的氨基酸序列相同或相差1至6个氨基酸残基。在一些实施方案中, SEQ ID NO:13-17的位置1处的氨基酸是未改变的。在一些实施方案中, SEQ ID NO:13-17的位置1、2或9中的一处或多处的氨基酸用另一个氨基酸取代。例如, 位置1、2或9被取代; 位置1和2被取代; 位置2和9被取代; 位置1和9被取代; 或位置1、2和9被取代。在某些实施方案中, 肽的长度为9至30个氨基酸 (即9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30)。

[0010] 在一些实施方案中, 氨基酸序列是SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:17。

[0011] 在一些实施方案中, 肽包含SEQ ID NO:13-17中任一项所示的氨基酸序列, 其中肽包含氨基酸序列的N和/或C端的1至15 (即1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15) 个氨基酸。

[0012] 在另一方面,本公开内容涉及肽,该肽包含第一氨基酸序列和与第一氨基酸序列异源的第二氨基酸序列,基本上由第一氨基酸序列和与第一氨基酸序列异源的第二氨基酸序列组成或由第一氨基酸序列和与第一氨基酸序列异变的第二氨基酸序列组成,该第一氨基酸序列由与SEQ ID NO:1-17中任一项至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%相同的氨基酸序列组成。在一些实施方案中,SEQ ID NO:1-17的位置1、2或9中的一处或多处的氨基酸用另一个氨基酸取代。例如,位置1、2或9被取代;位置1和2被取代;2和9位被取代;1和9位被取代;或者位置1、2和9被替换。在某些实施方案中,肽的长度为9至30个氨基酸(即9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30)。

[0013] 在另一方面,本公开内容涉及肽,其包含氨基酸序列,基本上由氨基酸序列组成或由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列与SEQ ID NO:1-17中任一项至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%相同。在一些实施方案中,SEQ ID NO:1-17的位置3、4、5、6、7或8中的一处或多处的氨基酸用另一种氨基酸取代。例如,位置3、4、5、6、7或8被取代;位置3和4被取代;位置3和5被取代;位置3和6被取代;位置3和7被取代;位置3和8被取代;位置4和5被取代;位置4和6被取代;位置4和7被取代;位置4和8被取代;位置5和6被取代;位置5和7被取代;位置5和8被取代;位置6和7被取代;位置6和8被取代;位置7和8被取代;或选自位置3、4、5、6、7和8的组的3、4、5或6个不同位置的任意组合被取代。

[0014] 在一些实施方案中,肽结合主要组织相容性复合物(MHC)分子。在一些实施方案中,其中与MHC分子缔合的肽被T细胞上的抗原特异性T细胞受体识别。在一些实施方案中,MHC分子是I类MHC分子或II类MHC分子。在一些实施方案中,I类MHC分子是HLA-A(例如,HLA-A2,HLA-A24,HLA-A1,HLA-A3,HLA-A30,HLA-A26,HLA-A68或HLA-A11)、HLA-B或HLA-C。在一些实施方案中,MHC分子是HLA-A2分子或HLA-A24分子。

[0015] 本公开内容还提供了包含本文所述的肽和第二试剂的组合物。在一些实施方案中,第二试剂选自增强BCMA和TACI特异性应答的化合物,如(1)细胞因子和趋化因子;(2)检查点抑制剂,包括抗PD1、抗PDL1、抗CTLA4、抗LAG3和抗TIM3;(2)免疫激动剂,包括抗CD28、抗CD40L(CD154)、抗41BB(CD137)、抗OX40和抗GITR;(3)免疫调节剂,包括来那度胺(lenalidomide)、泊马度胺(pomalidomide)、沙利度胺(Thalidomide)类似物、IMiDS化合物和/或HDAC抑制剂(例如ACY241),作为单一试剂和/或与地塞米松组合;(4)佐剂;(5)增加BCMA和TACI特异性应答的治疗剂,包括疫苗、细胞疗法和/或抗体;(6)改变BCMA和TACI特异性应答的治疗剂,包括基于肽的疫苗、不同类型的疫苗(RNA疫苗,DNA疫苗)、细胞疗法、特异性调节剂和/或特异性抑制剂;和(7)具有广泛涵盖针对疾病的免疫应答的不依赖于BCMA和TACI靶向疗法的方法的治疗剂,所述方法包括生物学和非生物学方法。在一些实施方案中,第二试剂是免疫刺激剂(例如,细胞因子或T辅助细胞表位(T helper epitope))。在一些实施方案中,第二试剂是T辅助细胞表位。在一些实施方案中,T辅助细胞表位是PADRE序列或通用破伤风类毒素T辅助(TT Th)表位。在一些实施方案中,第二试剂是佐剂。佐剂可以选自下组:弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂、明矾、Toll受体的配体、QS21、RIBI、霍乱毒素(CT)、大肠杆菌热不稳定性毒素(LT)、突变体CT和突变体大肠杆菌热不稳定性毒素(MLT)。在一些实施方案中,第二试剂是Toll样受体3配体(例如,Poly ICLC)、干扰素alpha(IFN α)、干扰素

gamma (IFN γ)、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF)、抗白介素6 (IL-6)、IL-6抑制剂、抗OX40抗体、抗GITR抗体。在一些实施方案中,第二试剂是检查点抑制剂(例如抗LAG3抗体)。在一些实施方案中,第二试剂是免疫调节剂,其包括来那度胺、泊马度胺、沙利度胺类似物、IMiDS化合物和/或HDAC抑制剂(例如ACY241),作为单一试剂和/或与地塞米松组合。

[0016] 在一方面,本公开内容还涉及包含如本文所述的肽和药学上可接受的载体的药物组合物。在一些实施方案中,药物组合物包含选自下组的试剂:增强BCMA和TACI特异性应答的化合物,如(1)细胞因子和趋化因子;(2)检查点抑制剂,包括抗PD1、抗PDL1、抗CTLA4、抗LAG3和抗TIM3;(3)免疫激动剂,包括抗CD28、抗CD40L (CD154)、抗41BB (CD137)、抗OX40和抗GITR;(4)免疫调节剂,包括来那度胺、泊马度胺、沙利度胺类似物、IMiDS化合物和/或HDAC抑制剂(例如ACY241),作为单一试剂和/或与地塞米松组合;(5)佐剂;(6)增加BCMA和TACI特异性应答的治疗剂,包括疫苗、细胞疗法和/或抗体;和(7)具有广泛涵盖针对疾病的免疫应答的不依赖于BCMA和TACI靶向疗法的方法的治疗剂。在一些情况中,药物组合物包含下列一种或多种:佐剂(弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂、明矾、Toll受体的配体、QS21、RIBI、霍乱毒素(CT)、大肠杆菌热不稳定性毒素(LT)、突变体CT和突变体大肠杆菌热不稳定性毒素(MLT));免疫激动剂(例如抗OX40抗体、抗GITR抗体);检查点抑制剂(例如抗LAG3抗体);或免疫调节剂(例如来那度胺、泊马度胺、沙利度胺类似物、IMiDS化合物和/或HDAC抑制剂(例如ACY241),作为单一试剂和/或与地塞米松组合)。

[0017] 在一些实施方案中,药物组合物还包含检查点抑制剂。在一个实施方案中,检查点抑制剂是抗LAG3抗体。在一些实施方案中,药物组合物还包含来那度胺。在一些实施方案中,药物组合物还包含来那度胺、泊马度胺、沙利度胺类似物、IMiDS化合物和/或HDAC抑制剂(例如,ACY241),作为单一试剂和/或与地塞米松组合。

[0018] 在一些实施方案中,药物组合物还包含对BCMA特异性的T细胞(例如CTL)。在一些实施方案中,药物组合物还包含对TACI特异性的T细胞(例如CTL)。CTL是通过暴露于肽获得的CTL,所述肽包含SEQ ID NO:13或14中的一个或多个或由SEQ ID NO:13或14中的一个或多个组成。在其他情况中,CTL是通过暴露于肽获得的CTL,所述肽包含SEQ ID NO:15-17中任一项或多项或由SEQ ID NO:15-17中任一项组成。在某些情况中,CTL是记忆CD8⁺CTL。在某些情况中,CTL是记忆CD8⁺CD45RO⁺CTL。在某些情况中,CTL是非记忆CD8⁺CTL。在某些情况中,CTL是效应CD8⁺CTL。在某些情况中,CTL是激活的CD8⁺CTL。在某些情况中,CTL是Tetramer阳性CD8⁺CTL。在某些情况中,CTL是具有上调的共刺激分子表达的CD8⁺CTL。在某些情况中,CTL是具有上调的检查点分子表达的CD8⁺CTL。在某些情况中,CTL是产生细胞因子和/或具有上调的关键的溶细胞性标志物(例如CD107、粒酶、穿孔蛋白)表达和/或产生的CD8⁺CTL。在某些情况中,CTL是具有针对肿瘤或其他靶标的活性的CD8⁺CTL。

[0019] 在一方面,本公开内容涉及编码如本文所述的肽的核酸。在某些情况中,核酸是RNA(例如,mRNA)。在其他实施方案中,核酸是DNA。在某些情况中,RNA或DNA包囊在纳米载体(例如,聚合体的诸如PLGA,或脂质体的)中。RNA和DNA可以包含其他调节序列(例如起始密码子、终止密码子、polyA尾)。

[0020] 在一方面,本公开内容还涉及包含编码如本文所述的肽的核酸的载体。在一些实施方案中,核酸序列与启动子、调节元件或表达控制序列可操作连接。

[0021] 在另一方面,本公开内容还涉及包含如本文所述的载体的培养的细胞。在一些实

施方案中,细胞是哺乳动物细胞、人细胞或免疫细胞。

[0022] 在另一方面,本公开内容提供了病毒,其包含编码如本文所述的肽的核酸。在一些实施方案中,病毒是慢病毒、腺病毒、腺伴随病毒、人泡沫病毒、细小病毒、粘液瘤病毒、新城疫病毒、呼肠孤病毒、塞内加谷病毒(Seneca valley virus)、麻疹病毒、脊髓灰质炎病毒、痘苗病毒、单纯疱疹病毒或水泡性口炎病毒。

[0023] 在一方面,本公开内容涉及至少两种不同的肽的组合,其中至少两种不同的肽选自具有SEQ ID NO:13-17所示的氨基酸序列的肽的组。该组合可以包括在SEQ ID NO:13-17的一项或多项中具有1-4个取代的肽。在某些情况中,取代是在位置1、2或9的一处或多处。在某些情况中,位置1是未改变的。在某些情况中,肽的长度为9至30个氨基酸。在一些实施方案中,组合包含具有SEQ ID NO:13-17所示的氨基酸序列的至少2、3、4或全部5个肽。在一些情况中,组合包含SEQ ID NO:13-17所示的两个或更多个肽,其中两个或更多个肽具有氨基酸序列的N和/或C端的1至15(即1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15)个氨基酸。

[0024] 在一方面,本公开内容还涉及药物组合物,其包含如本文所述的肽的组合。在一些实施方案中,药物组合物包含选自下组的试剂:增强BCMA和TACI特异性应答的化合物,如(1)细胞因子和趋化因子;(2)检查点抑制剂,包括抗PD1、抗PDL1、抗CTLA4、抗LAG3和抗TIM3;(3)免疫激动剂,包括抗OX40和抗GITR;(4)免疫调节剂,包括来那度胺、泊马度胺、沙利度胺类似物、IMiDS化合物和/或HDAC抑制剂(例如ACY241),作为单一试剂和/或与地塞米松组合;(5)佐剂;(6)增加BCMA和TACI特异性应答的治疗剂,包括疫苗、细胞疗法和/或抗体;和(7)具有广泛涵盖针对疾病的免疫应答的不依赖于BCMA和TACI靶向疗法的方法的治疗剂。在一些情况中,药物组合物包含下列一种或多种:佐剂(弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂、明矾、Toll受体的配体、QS21、RIBI、霍乱毒素(CT)、大肠杆菌热不稳定性毒素(LT)、突变体CT和突变体大肠杆菌热不稳定性毒素(MLT));免疫激动剂(例如抗OX40抗体、抗GITR抗体);检查点抑制剂(例如抗LAG3抗体);和/或来那度胺、泊马度胺、沙利度胺类似物、IMiDS化合物和/或HDAC抑制剂(例如ACY241),作为单一试剂和/或与地塞米松组合。

[0025] 在一些实施方案中,药物组合物还包含免疫激动剂。在一些情况中,免疫激动剂可以是抗OX40抗体或抗GITR抗体。在一些实施方案中,药物组合物还包含检查点抑制剂。在一个情况中,检查点抑制剂是抗LAG3抗体。在一些实施方案中,药物组合物还包含来那度胺、泊马度胺、沙利度胺类似物、IMiDS化合物和/或HDAC抑制剂(例如ACY241),作为单一试剂和/或与地塞米松组合。在一方面,本公开内容还提供了包含分离的树突细胞的组合物,其中树突细胞在其表面上呈递肽序列,其中肽序列包含BCMA抗原(SEQ ID NO:18)和TACI抗原(SEQ ID NO:19)之一或两者的至少一个主要组织相容性复合物(MHC) I类肽表位。

[0026] 在一些实施方案中,MHC I类肽表位是HLA-A2肽表位。

[0027] 在一些实施方案中,MHC I类肽表位是HLA-A24肽表位。

[0028] 在一些实施方案中,树突细胞通过暴露于包含肽序列的肽在体外获得肽序列。

[0029] 在一些实施方案中,肽序列是合成的肽序列。在一些实施方案中,肽序列是SEQ ID NO:1-12和SEQ ID NO:13-17中任一项所示的序列。在一些情况中,肽序列是SEQ ID NO:13-17中所示但是具有1-4个氨基酸取代的序列。在某些情况中,取代是在位置1、2或9位的一处或多处。在一个具体的实施方案中,肽序列是SEQ ID NO:13。在另一个实施方案中,肽是SEQ ID NO:13但具有1个至4个氨基酸取代。在某些情况中,取代是在位置1、2或9的一处或多处。

在另一个具体的实施方案中,肽序列是SEQ ID NO:16。在另一个实施方案中,肽是SEQ ID NO:16但具有1个至4个氨基酸取代。在某些情况中,取代在位置1、2或9的一处或多处。

[0030] 在一些实施方案中,组合物包含 10^5 至 10^8 个树突细胞。

[0031] 在一些实施方案中,组合物还包含SEQ ID NO:1-12和SEQ ID NO:13-17中任一项所示的肽。在一个具体的实施方案中,肽序列是SEQ ID NO:13。在另一个具体的实施方案中,肽序列是SEQ ID NO:16。在一些实施方案中,组合物包含选自下组的试剂:增强BCMA和TACI特异性应答的化合物,如(1)细胞因子和趋化因子;(2)检查点抑制剂,包括抗PD1、抗PDL1、抗CTLA4、抗LAG3和抗TIM3;(2)免疫激动剂,包括抗CD28、抗CD40L (CD154)、抗41BB (CD137)、抗OX40和抗GITR;(3)免疫调节剂,包括来那度胺、泊马度胺、沙利度胺类似物、IMiDS化合物和/或HDAC抑制剂(例如ACY241),作为单一试剂和/或与地塞米松组合;(4)佐剂;(5)增加BCMA和TACI特异性应答的治疗剂,包括疫苗、细胞疗法和/或抗体;(6)改变BCMA和TACI特异性应答的治疗剂,包括基于肽的疫苗、不同类型的疫苗(RNA疫苗,DNA疫苗)、细胞疗法、特异性调节剂和/或特异性抑制剂;和(7)具有广泛涵盖针对疾病的免疫应答的不依赖于BCMA和TACI靶向疗法的方法(包括生物和非生物方法)的治疗剂。在一些实施方案中,组合物还包含免疫激动剂(例如,抗OX40抗体,抗GITR抗体)。在一些实施方案中,组合物还包含检查点抑制剂(例如,抗LAG3抗体)。

[0032] 在一方面,本公开内容涉及在有此需要的人受试者中诱导针对BCMA和/或TACI表达细胞(例如,癌细胞)的免疫应答的方法,该方法包括对人受试者施用如本文中所述的肽(例如,包含SEQ ID NO:13-17或由SEQ ID NO:13-17组成的肽)或如本文中所述的组合物(例如,药物组合物)。在另一个实施方案中,肽是SEQ ID NO:13,但是具有1-4个氨基酸取代。在某些情况中,取代是在位置1、2或9的一处或多处。在另一个具体实施方案中,肽序列是SEQ ID NO:16。在另一个实施方案中,肽是SEQ ID NO:16,但是具有1至4个氨基酸取代。在某些情况中,取代在位置1、2或9的一处或多处。

[0033] 在一些实施方案中,受试者患有表达BCMA和/或TACI的癌症,并且免疫应答针对此类癌细胞。

[0034] 在一些实施方案中,受试者具有表达BCMA和/或TACI的非癌细胞,并且免疫应答针对此类非癌细胞。

[0035] 在一些实施方案中,癌症是血液学癌症(例如,多发性骨髓瘤)。在一些实施方案中,癌细胞是浆细胞(例如癌性浆细胞)。在一些实施方案中,人受试者患有难治性多发性骨髓瘤。在一些实施方案中,人受试者患有异基因移植后复发的难治性多发性骨髓瘤。

[0036] 在一些实施方案中,癌细胞表达BCMA,并且癌细胞中BCMA的水平比健康人受试者的浆细胞多至少5%,至少10%,至少15%,至少20%,至少25%,至少30%,至少40%或至少50%。

[0037] 在一些实施方案中,癌细胞表达TACI,并且癌细胞中TACI的水平比健康人受试者的浆细胞多至少5%,至少10%,至少15%,至少20%,至少25%,至少30%,至少40%或至少50%。

[0038] 在一些实施方案中,方法还包括对人受试者施用对BCMA特异性的CTL。在一些实施方案中,方法还包括对人受试者施用对TACI特异性的CTL。在某些情况中,CTL是通过暴露于肽获得的CTL,所述肽包含SEQ ID NO:13或14中的一个或多个或由SEQ ID NO:13或14中的

一个或多个组成。在某些情况中,CTL暴露于SEQ ID NO:13或14但具有1-4个取代的肽。在某些情况中,取代是在位置1、2或9的一处或多处。在某些情况中,肽的长度为9至30个氨基酸。在其他情况中,CTL是通过暴露于肽获得的CTL,所述肽包含SEQ ID NO:15-17中的任何一个或多个或者由SEQ ID NO:15-17中的任何一个或多个组成。在一些情况中,CTL暴露于SEQ ID NO:15、16或17但具有1至4个取代的肽。在某些情况中,取代是在位置1、2或9的一处或多处。在某些情况中,肽的长度为9至30个氨基酸。在某些情况中,CTL是记忆CD8⁺CTL。在某些情况中,CTL是记忆CD8⁺CD45RO⁺CTL。在某些情况中,CTL是效应CD8⁺CTL。在某些情况中,CTL是激活的CD8⁺CTL。在某些情况中,CTL是Tetramer阳性CD8⁺CTL。在一些情况中,CD8⁺CTL是当用本文所述的肽刺激时上调共刺激分子表达的CTL。在一些情况中,CD8⁺CTL是当用本文所述的肽刺激时上调检查点分子表达的CTL。在一些情况中,CTL是产生细胞因子和/或具有上调的关键溶细胞性标志物(例如CD107、粒酶、穿孔蛋白)表达和/或产生的CD8⁺CTL。在某些情况中,CTL是具有针对肿瘤或其他靶标的活性的CD8⁺CTL。

[0039] 在一些实施方案中,方法还包括对人受试者施用免疫激动剂。在一些实施方案中,免疫激动剂是抗CD28、抗CD40L(CD154)、抗41BB(CD137)、抗OX40和抗GITR。

[0040] 在一些实施方案中,方法还包括对人受试者施用检查点抑制剂(例如抗LAG3抗体)。在某些实施方案中,方法还包括对人受试者施用来那度胺。在一些实施方案中,方法还包括对人受试者施用下列一种或多种:免疫激动剂(例如抗OX40抗体,抗GITR抗体)、检查点抑制剂(例如抗LAG3抗体)或免疫调节剂。

[0041] 在一些实施方案中,方法还包括在对人受试者施用肽或组合物之后,测定在人受试者中是否发生针对BCMA和/或表达TACI的癌症的免疫应答。

[0042] 在一方面,本公开内容涉及治疗患有癌症或恶性前疾病(pre-malignant disease)的人受试者的方法,该方法包括对人受试者施用如本文所述的肽或如本文所述的组合物。

[0043] 在一些实施方案中,癌症是血液学癌症。在某些实施方案中,癌症是多发性骨髓瘤、白血病、淋巴瘤或任何B细胞或浆细胞恶性。

[0044] 在某些实施方案中,恶性前疾病是意义未明单克隆丙种球蛋白病(MGUS)或郁积型多发性骨髓瘤。

[0045] 在某些实施方案中,方法还包括检测人受试者中的一个或多个癌细胞表达或过表达BCMA和/或TACI。

[0046] 在某些实施方案中,人受试者具有一个或多个过表达BCMA和/或TACI的癌细胞,其中癌细胞中BCMA和/或TACI的水平比正常细胞(例如健康受试者中的浆细胞)大至少20%。

[0047] 在某些实施方案中,受试者具有一个或多个表达MHC分子的癌细胞。

[0048] 在某些实施方案中,方法还包括对人受试者施用对BCMA特异性的CTL。在某些实施方案中,方法还包括对人受试者施用对TACI特异性的CTL。在某些情况中,CTL是通过暴露于肽获得的CTL,所述肽包含SEQ ID NO:13或14中的一个或多个或由SEQ ID NO:13或14中的一个或多个组成,在某些情况中,CTL暴露于SEQ ID NO:13或14但具有1-4个取代的肽。在某些情况中,取代是在位置1、2或9的一处或多处。在某些情况中,肽的长度为9至30个氨基酸。在其他情况中,CTL是通过暴露于肽获得的CTL,所述肽包含SEQ ID NO:15-17中的任何一个或多个或由SEQ ID NO:15-17中的任何一个或多个组成。在某些情况中,CTL暴露于SEQ ID

N0:15、16或17但具有1至4个取代的肽。在某些情况中,取代是在位置1、2或9的一处或多处。在某些情况中,肽的长度为9至30个氨基酸。在某些情况中,CTL是记忆CD8+CTL。在某些情况中,CTL是记忆CD8+CD45RO+CTL。在某些情况中,CTL是效应CD8+CTL。在某些情况中,CTL是激活的CD8+CTL。在某些情况中,CTL是Tetramer阳性CD8+CTL。在某些情况中,CTL是具有上调的共刺激分子表达的CD8+CTL。在某些情况中,CTL是具有上调的检查点分子表达的CD8+CTL。

[0049] 在一些实施方案中,方法包括对人受试者施用选自下组的试剂:增强BCMA和TACI特异性应答的化合物,如(1)细胞因子和趋化因子;(2)检查点抑制剂,包括抗PD1、抗PDL1、抗CTLA4、抗LAG3和抗TIM3;(3)免疫激动剂,包括抗OX40和抗GITR;(4)免疫调节剂,包括来那度胺、泊马度胺、HDAC抑制剂(例如ACY241);(5)佐剂;(6)增加BCMA和TACI特异性应答的治疗剂,包括疫苗、细胞疗法和/或抗体;和(7)具有广泛涵盖针对疾病的免疫应答的不依赖于BCMA和TACI靶向疗法的方法的治疗剂。在一些实施方案中,方法还包括对人受试者施用免疫激动剂。在一些实施方案中,免疫激动剂是抗OX40抗体或抗GITR抗体。

[0050] 在一些实施方案中,方法还包括对人受试者施用检查点抑制剂(例如抗LAG3抗体)。在某些实施方案中,方法还包括对人受试者施用来那度胺。在一些实施方案中,方法还包括对人受试者施用下列一种或多种:免疫激动剂(例如抗OX40抗体,抗GITR抗体)、检查点抑制剂(例如抗LAG3抗体)或免疫调节剂。

[0051] 在一些实施方案中,方法还包括对人受试者进行化学疗法或放射疗法。

[0052] 在一方面,本公开内容涉及产生和/或增殖BCMA特异性细胞毒性T细胞的方法,该方法包括使一个或多个细胞毒性T细胞与一个或多个抗原呈递细胞接触,所述抗原呈递细胞用包含选自SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:14的氨基酸序列的肽脉冲。在某些情况中,CTL暴露于SEQ ID NO:13或14但具有1-4个取代的肽。在某些情况中,取代是在位置1、2或9的一处或多处。在某些情况中,肽的长度为9至30个氨基酸。

[0053] 在一些实施方案中,细胞毒性T细胞是记忆细胞毒性T细胞。在一些实施方案中,细胞毒性T细胞是效应细胞毒性T细胞。在某些情况中,CD8+CTL是当用本文所述的肽刺激时上调共刺激分子表达的CTL。在某些情况中,CD8+CTL是当用本文所述的肽刺激时上调检查点分子表达的CTL。在某些情况中,CTL是产生细胞因子和/或具有上调的关键溶细胞标志物(例如,CD107、粒酶、穿孔蛋白)表达和/或产生的CD8+CTL。在某些情况中,CTL是具有抗肿瘤或其他靶标活性的CD8+CTL。

[0054] 在一些实施方案中,抗原呈递细胞是树突细胞(DC)。在一个具体的实施方案中,肽包含SEQ ID NO:13或由SEQ ID NO:13组成。另一方面,本公开内容涉及产生TACI特异性细胞毒性T细胞的方法,该方法包括使一个或多个细胞毒性T细胞与一个或多个用包含选自SEQ ID NO:15-17的氨基酸序列的肽脉冲的抗原呈递细胞接触。在某些情况中,CTL暴露于SEQ ID NO:15、16或17但具有1-4个取代的肽。在某些情况中,取代是在位置1、2或9的一处或多处。在某些情况中,肽的长度为9至30个氨基酸。

[0055] 在一个具体的实施方案中,肽包含SEQ ID NO:16或由SEQ ID NO:16组成。

[0056] 在一方面,本公开内容还涉及杀死靶细胞的方法,该方法包括使靶细胞与一个或多个BCMA特异性细胞毒性T细胞接触,其中靶细胞表达或过表达BCMA。在某些实施方案中,靶细胞表达HLA-A。

[0057] 在一些实施方案中,方法还包括使一个或多个BCMA特异性细胞毒性T细胞与选自下组的试剂接触:增强BCMA和TACI特异性应答的化合物,如(1)细胞因子和趋化因子;(2)检查点抑制剂,包括抗PD1、抗PDL1、抗CTLA4、抗LAG3和抗TIM3;(2)免疫激动剂,包括抗OX40和抗GITR;(3)免疫调节剂,包括来那度胺、泊马度胺、沙利度胺类似物、IMiDS化合物和/或HDAC抑制剂(例如ACY241),作为单一试剂和/或与地塞米松组合;(4)佐剂;(5)增加BCMA和TACI特异性应答的治疗剂,包括疫苗、细胞疗法和/或抗体;和(6)具有广泛涵盖针对疾病的免疫应答的不依赖于BCMA和TACI靶向疗法的方法的治疗剂。

[0058] 在一些实施方案中,方法还包括使一个或多个BCMA特异性细胞毒性T细胞与免疫激动剂接触。

[0059] 在一些实施方案中,方法包括进一步施用肽,该肽包含SEQ ID NO:13或14所示的氨基酸序列或由SEQ ID NO:13或14所示的氨基酸序列组成。在某些情况中,肽可以具有SEQ ID NO.:13或14的氨基酸序列的N端和/或C端添加的1至15个(即1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15)个氨基酸。

[0060] 在一些实施方案中,免疫激动剂是OX40激动剂或GITR激动剂。在一些实施方案中,免疫激动剂是抗OX40抗体或抗GITR抗体。

[0061] 在一些实施方案中,方法还包括对人受试者施用检查点抑制剂(例如抗LAG3抗体)。在某些实施方案中,方法还包括对人受试者施用来那度胺。在一些实施方案中,方法还包括对受试者施用来那度胺。在某些实施方案中,方法还包括对人受试者施用下列一种或多种:免疫激动剂(例如抗OX40抗体,抗GITR抗体)、检查点抑制剂(例如抗LAG3抗体)或来那度胺。

[0062] 在另一方面,本公开涉及杀死靶细胞的方法,该方法包括使靶细胞与一个或多个TACI特异性细胞毒性T细胞接触,其中靶细胞表达或过表达TACI。在一些实施方案中,靶细胞表达HLA-A。

[0063] 在一些实施方案中,方法包括进一步施用肽,所述肽包含SEQ ID NO:15-17中任一项所示的氨基酸序列或由SEQ ID NO:15-17中任一项所示的氨基酸序列组成。在一些情况中,肽可以具有SEQ ID NO.:15-17的氨基酸序列的N端和/或C端添加的1至15个(即1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15)个氨基酸。

[0064] 在一些实施方案中,方法还包括使一个或多个TACI特异性细胞毒性T细胞与选自下组的试剂接触:增强BCMA和TACI特异性应答的化合物,如(1)细胞因子和趋化因子;(2)检查点抑制剂,包括抗PD1、抗PDL1、抗CTLA4、抗LAG3和抗TIM3;(2)免疫激动剂,包括抗OX40和抗GITR;(3)免疫调节剂,包括来那度胺、泊马度胺、HDAC抑制剂(例如ACY241);(4)佐剂;(5)增加BCMA和TACI特异性应答的治疗剂,包括疫苗、细胞疗法和/或抗体;和(6)具有广泛涵盖针对疾病的免疫应答的不依赖于BCMA和TACI靶向疗法的方法的治疗剂。

[0065] 在一些实施方案中,方法还包括使一个或多个TACI特异性细胞毒性T细胞与免疫激动剂接触。

[0066] 在一些实施方案中,免疫激动剂是OX40激动剂或GITR激动剂。

[0067] 在一些实施方案中,免疫激动剂是抗OX40抗体或抗GITR抗体。在一些实施方案中,方法还包括对人受试者施用检查点抑制剂(例如抗LAG3抗体)。在某些实施方案中,方法还包括对人受试者施用来那度胺。在一些实施方案中,方法还包括对人受试者施用下列一个

或多个:免疫激动剂(例如,抗OX40抗体,抗GITR抗体)、检查点抑制剂(例如,抗LAG3抗体)或来那度胺。

[0068] 在一方面,本公开内容涉及治疗患有表达BCMA或TACI的疾病或癌症的人受试者的方法,该方法包括对人受试者施用多种BCMA特异性细胞毒性T细胞或TACI特异性细胞毒性T细胞。

[0069] 在一些实施方案中,方法还包括对人受试者施用肽,该肽包含SEQ ID NO:13-17中任一项所示的序列或由SEQ ID NO:13-17中任一项所示的序列组成。在一些情况中,肽具有SEQ ID NO:13-17之一所示的序列,只是它具有1-4个取代。在某些情况中,取代可以在位置1、2或9的一处或多处。在某些情况中,肽的长度为9至30个氨基酸。

[0070] 在一些实施方案中,方法还包括对人受试者施用选自下组的试剂:增强BCMA和TACI特异性应答的化合物,如(1)细胞因子和趋化因子;(2)检查点抑制剂,包括抗PD1、抗PDL1、抗CTLA4、抗LAG3和抗TIM3;(2)免疫激动剂,包括抗OX40和抗GITR;(3)免疫调节剂,包括来那度胺、泊马度胺、HDAC抑制剂(例如ACY241);(4)佐剂;(5)增加BCMA和TACI特异性应答的治疗剂,包括疫苗、细胞疗法和/或抗体;和(6)具有广泛涵盖针对疾病的免疫应答的不依赖于BCMA和TACI靶向疗法的方法的治疗剂。

[0071] 在一些实施方案中,方法还包括对受试者施用免疫激动剂。在一些实施方案中,免疫激动剂是OX40激动剂或GITR激动剂。在一些实施方案中,免疫激动剂是抗OX40抗体或抗GITR抗体。

[0072] 在一些实施方案中,方法还包括对人受试者施用检查点抑制剂(例如抗LAG3抗体)。在某些实施方案中,方法还包括对人受试者施用来那度胺。在一些实施方案中,方法还包括对受试者施用来那度胺。在一些实施方案中,方法还包括对人受试者施用下列一种或多种:免疫激动剂(例如抗OX40抗体,抗GITR抗体)、检查点抑制剂(例如抗LAG3抗体)或来那度胺。

[0073] 在一些实施方案中,细胞毒性T细胞衍生自人受试者的细胞。在一些实施方案中,细胞毒性T细胞衍生自诱导的多能干细胞。

[0074] 在一些实施方案中,癌症表达BCMA和/或TACI。在一些实施方案中,人受试者患有多发性骨髓瘤。

[0075] 在一方面,本公开内容涉及一种方法,包括:

[0076] (a) 从受试者获得骨髓衍生的单个核细胞;

[0077] (b) 在单个核细胞粘附于培养容器的条件下体外培养单个核细胞;

[0078] (c) 选择粘附的单个核细胞;

[0079] (d) 在存在一种或多种细胞因子的情况下在细胞分化为抗原呈递细胞的条件下培养粘附的单个核细胞;并且

[0080] (e) 使抗原呈递细胞与如本文所述的肽(例如,SEQ ID NO:13-17)接触,从而产生在主要组织相容性复合物(MHC)分子上呈递肽的抗原呈递细胞。

[0081] 在一些实施方案中,主要组织相容性复合物分子是MHC I类分子。

[0082] 在一些实施方案中,一种或多种细胞因子包括粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)和白介素4(IL-4)。

[0083] 在一些实施方案中,一种或多种细胞因子包含肿瘤坏死因子- α (TNF- α)。

[0084] 在一些实施方案中,骨髓衍生的细胞获自诊断为多发性骨髓瘤的受试者。

[0085] 在一方面,本发明涉及鉴定BCMA的T细胞抗原受体序列的方法,该方法包括

[0086] (a) 通过如本文所述的方法产生和/或增殖BCMA特异性细胞毒性T细胞;

[0087] (b) 测定BCMA特异性细胞毒性T细胞中BCMA的T细胞抗原受体序列。

[0088] 在另一方面,本公开内容涉及用于治疗患有表达BCMA的疾病或癌症的人受试者的方法,所述方法包括:对人受试者施用包含嵌合抗原受体T细胞(CAR-T细胞)的组合物,其中所述CAR-T细胞表达嵌合抗原受体,其中嵌合抗原受体结合BCMA。

[0089] 在一些实施方案中,癌症表达BCMA。在一些实施方案中,人受试者患有多发性骨髓瘤。

[0090] 在一些实施方案中,方法还包括对人受试者施用肽,该肽包含SEQ ID NO.:13或14中任一项所示的序列或由SEQ ID NO.:13或14中任一项所示的序列组成。在一些情况中,肽具有SEQ ID NO:13或14所示的序列,只是它具有1-4个氨基酸取代。在某些情况中,取代是在位置1、2或9的一处或多处。在一些情况中,肽的长度为9至30个氨基酸。在一些实施方案中,方法还包括对人受试者施用选自下组的试剂:增强BCMA和TACI特异性应答的化合物,如(1) 细胞因子和趋化因子;(2) 检查点抑制剂,包括抗PD1、抗PDL1、抗CTLA4、抗LAG3和抗TIM3;(2) 免疫激动剂,包括抗OX40和抗GITR;(3) 免疫调节剂,包括来那度胺、泊马度胺、HDAC抑制剂(例如ACY241);(4) 佐剂;(5) 增加BCMA和TACI特异性应答的治疗剂,包括疫苗、细胞疗法和/或抗体;和(6) 具有广泛涵盖针对疾病的免疫应答的不依赖于BCMA和TACI靶向疗法的方法的治疗剂。

[0091] 在一些实施方案中,该方法还包括对受试者施用免疫激动剂。在一些实施方案中,免疫激动剂是OX40激动剂或GITR激动剂。在一些实施方案中,免疫激动剂是抗OX40抗体或抗GITR抗体。

[0092] 在一些实施方案中,方法还包括对人受试者施用检查点抑制剂(例如抗LAG3抗体)。在某些实施方案中,方法还包括对人受试者施用来那度胺。在一些实施方案中,方法还包括对受试者施用下列一种或多种:免疫激动剂(例如抗OX40抗体,抗GITR抗体),检查点抑制剂(例如抗LAG3抗体)或来那度胺。

[0093] 在一方面,本公开内容涉及鉴定TACI的T细胞抗原受体序列的方法,该方法包括

[0094] (a) 通过如本文所述的方法产生和/或增殖TACI特异性细胞毒性T细胞;

[0095] (b) 测定TACI特异性细胞毒性T细胞中TACI的T细胞抗原受体序列。

[0096] 在另一方面,本公开内容涉及用于治疗患有表达TACI的疾病或癌症的人受试者的方法,其包括:对人受试者施用包含嵌合抗原受体T细胞(CAR-T细胞)的组合物,其中所述CAR-T细胞表达嵌合抗原受体,其中该嵌合抗原受体结合TACI。

[0097] 在一些实施方案中,癌症表达TACI。在一些实施方案中,人受试者患有多发性骨髓瘤。

[0098] 在一些实施方案中,方法还包括对人受试者施用肽,该肽包含SEQ ID NO:15-17中任一项所示的序列或由SEQ ID NO:15-17中任一项所示的序列组成。

[0099] 在一些实施方案中,方法还包括对人受试者施用选自下组的试剂:增强BCMA和TACI特异性应答的化合物,如(1) 细胞因子和趋化因子;(2) 检查点抑制剂,包括抗PD1、抗PDL1、抗CTLA4、抗LAG3和抗TIM3;(2) 免疫激动剂,包括抗OX40和抗GITR;(3) 免疫调节剂,包

括来那度胺、泊马度胺、HDAC抑制剂(例如ACY241);(4)佐剂;(5)增加BCMA和TACI特异性应答的治疗剂,包括疫苗、细胞疗法和/或抗体;和(6)具有广泛涵盖针对疾病的免疫应答的不依赖于BCMA和TACI靶向疗法的方法的治疗剂。

[0100] 在一些实施方案中,该方法还包括对受试者施用免疫激动剂。在一些实施方案中,免疫激动剂是OX40激动剂或GITR激动剂。在一些实施方案中,免疫激动剂是抗OX40抗体或抗GITR抗体。

[0101] 在一些实施方案中,方法还包括对人受试者施用检查点抑制剂(例如抗LAG3抗体)。在某些实施方案中,方法还包括对人受试者施用来那度胺。在一些实施方案中,方法还包括对受试者施用来那度胺。在一些实施方案中,方法还包括对人受试者下列一种或多种:免疫激动剂(例如抗OX40抗体,抗GITR抗体),检查点抑制剂(例如抗LAG3抗体)或来那度胺。

[0102] 在一个方面,本公开内容提供了组合物,其包含纳米颗粒和肽,所述肽包含与SEQ ID NO:1-17中任一项至少60%相同的序列。在一些实施方案中,该肽包含SEQ ID NO:13的序列或由SEQ ID NO:13的序列组成。在某些情况中,肽具有SEQ ID NO:13的序列,但是具有1-4个氨基酸取代。在某些情况中,取代是在位置1、2或9的一处或多处。肽的长度可以是9至30个氨基酸。在其他实施方案中,序列包含SEQ ID NO:16的序列或由SEQ ID NO:16的序列组成。在某些情况中,肽具有SEQ ID NO:16的序列,但具有1-4个氨基酸取代。在某些情况中,取代是在位置1、2或9的一处或多处。肽的长度可以是9至30个氨基酸。

[0103] 在一些实施方案中,肽被包囊在纳米颗粒中。在一些实施方案中,纳米颗粒是脂质体。

[0104] 在一些实施方案中,纳米颗粒包含可生物降解的聚合物。在一些实施方案中,纳米颗粒包含聚(D,L-丙交酯-共-乙交酯)(PLGA)。在一些实施方案中,纳米颗粒包含聚(乳酸-共-乙醇酸)-聚(乙二醇)(PLGA-PEG)共聚物。

[0105] 在一些实施方案中,氨基酸序列是SEQ ID NO:13。在一些实施方案中,氨基酸序列是SEQ ID NO:14。在一些实施方案中,氨基酸序列是SEQ ID NO:15。氨基酸序列是SEQ ID NO:16。在一些实施方案中,氨基酸序列是SEQ ID NO:17。在某些情况中,该肽具有SEQ ID NO:13至17中任一项的序列,但具有1至4个氨基酸取代。在某些情况中,取代是在位置1、2或9的一处或多处。肽的长度可以是9至30个氨基酸。

[0106] 在一些实施方案中,纳米颗粒包含佐剂。在一些实施方案中,纳米颗粒包含Toll样受体激动剂(例如,R848或未甲基化的CpG寡脱氧核苷酸)。

[0107] 在一方面,本公开内容提供了用于治疗患有癌症的人受试者的方法。方法包括对人受试者施用如本文所述的组合物(例如,纳米颗粒)。在一些实施方案中,人受试者患有多发性骨髓瘤。

[0108] 在一些实施方案中,癌症表达BCMA。在其他实施方案中,癌症表达TACI。

[0109] 在一些实施方案中,该方法还包括对人受试者施用肽,该肽包含SEQ ID NO:15-17中任一项所示的序列或由SEQ ID NO:15-17中任一项所示的序列组成。在某些情况中,除了具有1-4个氨基酸取代之外,肽具有SEQ ID NO:15-17之一所示的序列。取代可以在位置1、2或9的一处或多处。肽的长度可以是9至30个氨基酸。

[0110] 在一些实施方案中,方法还包括对人受试者施用对BCMA特异性的CTL。在某些情况中,CTL是通过暴露于

肽获得的CTL,所述肽包含SEQ ID NO:13或14的一个或多个或由SEQ ID NO:13或14的一个或多个组成。在其他情况中,CTL是通过暴露于肽获得的CTL,所述肽包含SEQ ID NO:15-17的一个或多个或由SEQ ID NO:15-17的一个或多个组成。在某些情况中,CTL是记忆CD8+CTL。在某些情况中,CTL是记忆CD8+CD45RO+CTL。在某些情况中,CTL是效应CD8+CTL。在某些情况中,CTL是激活的CD8+CTL。在某些情况中,CTL是Tetramer阳性CD8+CTL。在某些情况中,CTL是已经上调共刺激分子表达的CD8+CTL。在一些情况中,CTL是已经上调检查点分子表达的CD8+CTL。在一些实施方案中,方法还包括对受试者施用免疫激动剂。在一些实施方案中,免疫激动剂是OX40激动剂或GITR激动剂。在一些实施方案中,免疫激动剂是抗OX40抗体或抗GITR抗体。

[0111] 在一些实施方案中,方法还包括对人受试者施用检查点抑制剂(例如抗LAG3抗体)。在某些实施方案中,方法还包括对人受试者施用来那度胺。在一些实施方案中,方法还包括对受试者施用来那度胺。在一些实施方案中,方法还包括对受试者使用下列一种或多种:免疫激动剂(例如抗OX40抗体,抗GITR抗体),检查点抑制剂(例如抗LAG3抗体)或来那度胺。

[0112] 除非另有定义,否则本文中使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的含义相同的含义。本文描述了用于本发明的方法和材料;还可以使用本领域已知的其他合适的方法和材料。材料、方法和实施例仅是说明性的,而无意为限制的。本文提及的所有出版物、专利申请、专利、序列、数据库条目和其他参考文献通过引用完整并入。在冲突的情况中,以本说明书(包括定义)为准。

[0113] 根据以下详细描述和附图以及权利要求书,本发明的其他特征和优点将变得显而易见。

[0114] 附图简述

[0115] 图1A-1I显示了多发性骨髓瘤细胞系上的BCMA表达。

[0116] 图2显示了天然BCMA肽对HLA-A2的结合亲和力。

[0117] 图3显示了天然TACI肽对HLA-A2的结合亲和力。

[0118] 图4显示了BCMA肽对HLA-A2的结合亲和力:天然肽对异变肽(heteroclitic peptide)。

[0119] 图5显示了TACI肽对HLA-A2的结合亲和力:天然肽对异变肽。

[0120] 图6显示了BCMA#4和#5肽的HLA-A2稳定性:天然肽对异变肽(50ug/ml)。

[0121] 图7显示了TACI#1、#3和#4肽的HLA-A2稳定性:天然肽对异变肽(50ug/ml)。

[0122] 图8A-8C显示了在用异变BCMA#4肽刺激的情况下增加的CD8⁺细胞毒性T细胞(CTL)。

[0123] 图9A-9C显示了用异变BCMA#4肽刺激的情况下降低的幼稚CTL。

[0124] 图10A-10C显示了用异变BCMA#4肽刺激的情况下增加的记忆CTL。

[0125] 图11A-11C显示了用异变BCMA#4肽刺激的情况下CM相对于效应细胞的动力学。

[0126] 图12显示了异变BCMA#4肽诱导记忆CD8+CTL。

[0127] 图13显示了异变TACI#3肽诱导记忆CD8+CTL。

[0128] 图14显示了异变BCMA#4肽-CTL的抗肿瘤活性(N=5)。

[0129] 图15显示了异变TACI#3肽-CTL的抗肿瘤活性(n=4)。

- [0130] 图16显示了异变BCMA#4肽-CTL的HLA-A2特异性增殖。
- [0131] 图17显示了经 α -OX40或 α -GITR处理的BCMA特异性CTL的中央记忆细胞的增强的 α -肿瘤活性。。
- [0132] 图18A-18C显示了用异变BCMA肽刺激的BCMA肽特异性CTL上的关键T细胞标志物的上调。
- [0133] 图19A-19F显示了通过异变BCMA₇₂₋₈₀特异性CTL对HLA-A2⁺MM细胞系的HLA-A2限制性和抗原特异性免疫应答。
- [0134] 图20A-20H显示了异变BCMA₅₄₋₆₂特异性CTL或异变BCMA₇₂₋₈₀特异性CTL对患者的MM细胞的抗肿瘤活性。
- [0135] 图21A-21C。BCMA₇₂₋₈₀特异的Tetramer⁺CTL表现出独特的表型和针对MM细胞的高水平抗肿瘤活性。
- [0136] 图22A-22E。用异变BCMA₇₂₋₈₀肽刺激后,BCMA特异性CTL的记忆CD8⁺T细胞分化。
- [0137] 图23A-23C。表征BCMA特异性记忆CTL的高抗肿瘤活性(图23A)和中央记忆CTL的最高水平(图23B,图23C)。
- [0138] 图24A。与25个U266细胞共培养(7天)的BCMA肽特异性CTL的结果。
- [0139] 图24B-24C。在用抗LAG3或抗OX40的处理中[从一个HLA-A2⁺个体产生的]异变BCMA₇₂₋₈₀ CTL的记忆CD8⁺T细胞的增强的抗骨髓瘤活性。
- [0140] 图24D。在针对骨髓瘤细胞用抗OX40以HLA-A2限制性方式的处理中[从HLA-A2⁺供体1、供体2或供体3产生的]异变BCMA₇₂₋₈₀ CTL的增强的抗肿瘤活性。
- [0141] 图25A-25B。用异变BCMA₇₂₋₈₀刺激肽后CD3+CD8⁺T细胞的百分比。
- [0142] 图26A-26B。用异变BCMA₇₂₋₈₀刺激肽后CD3+CD4⁺T细胞的百分比。
- [0143] 图27A-27C显示了在H929、MMIS、U266和OPM1细胞系上,而非在乳腺癌细胞系(MDA-MB231)上的高BCMA表达。
- [0144] 图28A-28B显示了用异变BCMA₇₂₋₈₀肽刺激后表达PD-1和LAG-3的CD3+CD8⁺T细胞的百分比。
- [0145] 图29A-29C显示了在用异变TACI₁₅₄₋₁₆₂肽刺激后幼稚细胞分化成记忆CTL。
- [0146] 图30A-30F显示了异变TACI₁₅₄₋₁₆₂特异性CTL对HLA-A2⁺多发性骨髓瘤细胞(McCAR)的抗肿瘤活性。
- [0147] 图31A-31E显示了异变TACI₁₅₄₋₁₆₂特异性CTL对HLA-A2⁺多发性骨髓瘤细胞的抗肿瘤活性。
- [0148] 图31F显示了针对HLA-A2⁺多发性骨髓瘤细胞的异变TACI₁₅₄₋₁₆₂肽的肽特异性Tetramer⁺CTL的诱导以及抗肿瘤活性和增殖。
- [0149] 图32A显示了BCMA肽加载的PLGA纳米颗粒的形态。
- [0150] 图32B显示了BCMA肽加载的脂质体纳米颗粒的形态。
- [0151] 图32C显示了BCMA肽定量。
- [0152] 图33A显示了以时间依赖性方式在包裹在纳米颗粒(PLGA,脂质体)中时树突细胞上BCMA肽的更高的加载效率。
- [0153] 图33B显示了以时间依赖性方式在包裹在纳米颗粒(PLGA,脂质体)中时树突细胞上BCMA肽-FITC的更高的加载效率。

- [0154] 图33C显示树突细胞的更高的PLGA/肽摄取。
- [0155] 图33D显示了以时间依赖性方式在包裹在PLGA中时树突细胞的BCMA肽-FITC的更高的摄取。
- [0156] 图33E显示了以时间依赖性方式在包裹在PLGA中时T2细胞的BCMA肽-FITC的更高的摄取。
- [0157] 图34A显示了以HLA-A2限制性方式针对MM细胞系用PLGA/BCMA肽产生的BCMA-CTL的最高抗MM活性。
- [0158] 图34B显示了以HLA-A2限制性方式针对MM细胞系用PLGA/BCMA肽产生的BCMA-CTL的最高IFN- γ 生成。
- [0159] 图34C显示了以HLA-A2限制性方式针对MM细胞系用PLGA/BCMA肽产生的BCMA-CTL的最高IL-2生成。
- [0160] 图34D显示了以HLA-A2限制性方式针对MM细胞系用PLGA/BCMA肽产生的BCMA-CTL的最高TNF- α 生成。
- [0161] 图34E显示了以HLA-A2限制性方式针对MM细胞系用PLGA/BCMA肽从不同的HLA-A2⁺个体(N=3)产生的BCMA-CTL的最高抗MM活性和Th1型细胞因子(IFN- γ , IL-2, TNF- γ)生成。
- [0162] 图35A显示了在没有肿瘤细胞的情况中用BCMA肽本身、PLGA/BCMA肽或脂质体/BCMA肽产生的BCMA特异性CTL的基线活性。
- [0163] 图35B显示了响应来自HLA-A2⁺骨髓瘤患者#1的原代HLA-A2⁺CD138⁺肿瘤细胞,由用PLGA/BCMA肽产生的BCMA-CTL的最高抗MM活性。
- [0164] 图35C显示了响应来自HLA-A2⁺骨髓瘤患者#2的原代HLA-A2⁺CD138⁺肿瘤细胞,由用PLGA/BCMA肽产生的BCMA-CTL的最高抗MM活性。
- [0165] 图35D显示了以HLA-A2限制性方式针对骨髓瘤患者的肿瘤细胞用PLGA/BCMA肽产生的BCMA-CTL的最高的抗MM活性和Th1型细胞因子(IFN- γ , IL-2, TNF- γ)生成。
- [0166] 图36A显示了用PLGA/BCMA肽比用BCMA肽自身产生的BCMA-CTL的更高频率的Tetramer⁺CD8⁺T细胞和共刺激分子表达(CD28⁺)CD8⁺T细胞。
- [0167] 图36B显示了用PLGA/BCMA肽比用BCMA肽自身产生的BCMA-CTL的更高的肽特异性CD8⁺T细胞增殖增加。
- [0168] 图36C显示了用PLGA/BCMA肽比用BCMA肽自身产生的BCMA-CTL的更高的肽特异性IFN- γ 生成增加。
- [0169] 图37A显示了用PLGA/BCMA肽比用BCMA肽自身产生的BCMA-CTL的最高的骨髓瘤特异性CD8⁺T细胞增殖的诱导。
- [0170] 图37B显示了用PLGA/BCMA肽比用BCMA肽自身重复刺激后,BCMA-CTL中的CD45RO⁺记忆/CD3⁺CD8⁺T细胞子集的更高增加[代表性结果]。
- [0171] 图37C显示了用PLGA/BCMA肽比用BCMA肽自身重复刺激后,BCMA-CTL中CD45RO⁺记忆/CD3⁺CD8⁺T细胞子集的更高增加[N=3个结果]。
- [0172] 图37D显示了用PLGA/BCMA肽比用BCMA肽自身重复刺激后,BCMA-CTL中的中央记忆/CD3⁺CD8⁺T细胞子集的更高诱导和维持。
- [0173] 图38A显示了用PLGA/BCMA肽比用BCMA肽自身产生的BCMA-CTL,以HLA-A2限制性方

式针对骨髓瘤细胞更高诱导中央记忆和效应记忆CTL及其抗MM活性。

[0174] 图38B显示了用PLGA/BCMA肽比用BCMA肽自身产生的BCMA-CTL,以HLA-A2限制性方式针对骨髓瘤细胞更高诱导中央记忆和效应记忆CTL及其IFN- γ 生成。

[0175] 图38C显示了用PLGA/BCMA肽比用BCMA肽自身产生的BCMA-CTL,以HLA-A2限制性方式针对骨髓瘤细胞更高诱导中央记忆和效应记忆CTL及其抗MM活性和IFN- γ , IL-2, TNF- α 生成。

[0176] 发明详述

[0177] B细胞成熟抗原 (BCMA)、跨膜激活物和CAML相互作用物 (TACI) 是许多癌症特有的关键抗原,所述癌症包括例如多发性骨髓瘤和其他血液系统恶性。本公开内容至少部分地基于自BCMA和TACI抗原衍生的HLA-A2特异性免疫原性肽的鉴定,所述肽可用于产生例如多发性骨髓瘤 (MM) 特异性T细胞免疫应答。因此,本公开内容涉及BCMA衍生的肽和TACI衍生的肽(及其药物组合物),其可用于例如在受试者中诱导针对肿瘤细胞的免疫应答(例如,刺激细胞毒性T细胞 (CTL) 应答),或刺激细胞因子或抗体的产生。该肽可用于多种应用中,例如诱导免疫应答的方法,产生抗体的方法,产生参与抗肿瘤免疫应答的细胞因子的方法以及治疗癌症(例如多发性骨髓瘤)的方法。肽也可以包含在MHC分子多聚体组合物中,并用于例如检测细胞群体中的T细胞(例如抗原特异性T细胞)的方法中。

[0178] 本公开内容还提供了用于各种类型治疗应用的信息,包括在癌症患者中,基于肽的疫苗接种,构成疫苗的各种方法的肽(包括基于纳米颗粒和基于病毒的肽),用工程化技术离体产生的BCMA特异性T细胞或TACI特异性T细胞和抗原特异性T细胞的过继转移(包括基于CAR-TCR疗法和诱导的多能干细胞的技术)或输注肽脉冲的树突细胞,作为本文所述的单一疗法或联合疗法,所述癌症患者包括多发性骨髓瘤、其恶变前疾病或其他癌症,或任何独特表达和/或过表达BCMA和TACI抗原的疾病。

[0179] BCMA衍生的肽和TACI衍生的肽

[0180] B细胞成熟抗原 (BCMA) (NM_001192.2→NP_001183.2),也称为肿瘤坏死因子受体超家族成员17 (TNFRSF17),是一种在人中由TNFRSF17基因编码的蛋白质。BCMA是TNF受体超家族的细胞表面受体,其识别B细胞活化因子 (BAFF)。BCMA在成熟的B淋巴细胞中表达。此受体已显示与肿瘤坏死因子(配体)超家族成员13b (TNFSF13B/TALL-1/BAFF) 特异性结合,并导致NF- κ B和MAPK8/JNK活化。此受体还与各种TRAF家族成员结合,因此可以转导细胞存活和增殖的信号。BCMA通常在各种癌细胞中过表达,例如在患有白血病、淋巴瘤和多发性骨髓瘤的受试者中。

[0181] 跨膜激活物和CAML相互作用物 (TACI) (NM_012452.2→NP_036584.1),也称为肿瘤坏死因子受体超家族成员13B (TNFRSF13B),是人中由TNFRSF13B基因编码的蛋白质。TACI是主要在B细胞表面上发现的TNF受体超家族的跨膜蛋白。TACI识别三个配体:APRIL, BAFF和CAML。TACI也经常在各种癌细胞中过表达,例如在患有白血病、淋巴瘤和多发性骨髓瘤的受试者中。

[0182] 人BCMA和人TACI的氨基酸序列如下所示。

[0183] 人BCMA (NP_001183.2; SEQ ID NO:18)

[0184] 1 mlqmagqcsq neyfdslha cipcqlrcss ntppltcqry cnasvtnsvk gtnailwtcl

[0185] 61 glsliislav fvlfmllrki nseplkdefk ntgsgllgma nidleksrtg deilprgle

[0186] 121 ytveectced cikskpkvds dhcflpame egatilvttk tndyckslpa alsateieks
[0187] 181 isar
[0188] 人TACI(NP_036584.1;SEQ ID NO:19)
[0189] 1 msglgrsrrg grsrvdqeer fpqglwtgva mrsceeqyw dpllgctmsc kticnhqsqr
[0190] 61 tcaafcrsls crkeqgkfyd hllrdcisca sicgqhpqkc ayfcenklrs pvnlppeirr
[0191] 121 qrsgevenns dnsgryygle hrgseaspal pglklsadqv alvystlglc lcavlcclfv
[0192] 181 avacflkkrq dpcscqprsr prqspakssq dhameagspv stspepvetc sfcfpecrap
[0193] 241 tqesavtpgt pdptcagrwg chtrttvlqp cphipdsdglg ivcvpaqegg pga

[0194] 本公开内容提供了衍生自BCMA或TACI抗原的肽(例如原生肽)和衍生自该肽(原生肽)的异变肽。这些肽可以是BCMA或TACI肽的任何部分或片段。在一些实施方案中,这些肽的长度大于5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个氨基酸残基。在一些实施方案中,这些肽的长度小于6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个氨基酸残基。在一些实施方案中,这些肽的长度为8至12个氨基酸残基,8至15个氨基酸残基,9至13个氨基酸残基,9至12个氨基酸残基或11至30个氨基酸残基。在一些实施方案中,肽的长度是9、10、11或12个氨基酸残基(例如9个氨基酸残基)。

[0195] 在一些实施方案中,衍生自BCMA或TACI的肽包括以下:

[0196] #1.BCMA₆₄₋₇₂(LIISLAVFV)(SEQ ID NO:1)
[0197] #2.BCMA₆₉₋₇₇(AVFVLMFLL)(SEQ ID NO:2)
[0198] #3.BCMA₉₋₁₇(SQNEYFDSL)(SEQ ID NO:3)
[0199] #4.BCMA₇₂₋₈₀(VLMFLLRKI)(SEQ ID NO:4)
[0200] #5.BCMA₅₄₋₆₂(AILWTCLGL)(SEQ ID NO:5)
[0201] #6.BCMA₁₁₄₋₁₂₂(ILPRGLEYT)(SEQ ID NO:6)
[0202] #1.TACI₁₇₈₋₁₈₆(FLVAVACFL)(SEQ ID NO:7)
[0203] #2.TACI₁₇₄₋₁₈₂(VLCCFLVAV)(SEQ ID NO:8)
[0204] #3.TACI₁₅₄₋₁₆₂(KLSADQVAL)(SEQ ID NO:9)
[0205] #4.TACI₁₆₆₋₁₇₄(TLGLCLCAV)(SEQ ID NO:10)
[0206] #5.TACI₁₆₁₋₁₆₉(ALVYSTLGL)(SEQ ID NO:11)
[0207] #6.TACI₁₅₅₋₁₆₃(LSADQVALV)(SEQ ID NO:12)

[0208] 这些肽可以结合主要组织相容性复合体(MHC)分子。MHC是一个在免疫系统、自身免疫和生殖中具有重要作用的大基因家族。MHC分子在肽(包括在其表面上的自身和非自身(抗原性))对T细胞的呈递中发挥作用。MHC I类分子结合短肽,其N和C末端锚定到位于肽结合槽末端的袋中。尽管许多这些肽的长度为9,但较长的肽可以通过其中心部分的凸起来容纳,从而形成长度为例如8至15的结合肽。与II类蛋白质结合的肽的大小不受限制,并且可以变化,例如长11至30个氨基酸。MHC II类分子中的肽结合槽在两端均开开,这实现具有相对较长长度的肽的结合。尽管“核心”的九个残基长链段对肽的识别贡献最大,但是侧翼区对于肽对II类等位基因的特异性也是重要的。

[0209] 因此,本发明还提供了具有以下序列的肽,该序列包含本公开内容中描述的任何序列,由本公开内容中描述的任何序列组成或基本上由本公开内容中描述的任何序列组

成。在一些实施方案中,肽可以结合I类MHC分子和/或II类MHC分子。在一些实施方案中,MHC I类分子是HLA-A(例如,HLA-A2、HLA-A24、HLA-A1、HLA-A3、HLA-A30、HLA-A26、HLA-A68或HLA-A11),HLA-B或HLA-C。

[0210] 为了改善肽与MHC分子(例如,MHC I类分子,HLA-A2)分子结合的稳定性,增加免疫原性,和/或增加免疫应答,可以对肽进行各种修饰。例如,为了增加免疫原性,可以通过改变例如本文所述的任何肽(例如,SEQ ID NO:1-17)的位置3、4、5、6、7和/或8中的TCR相互作用位点来增强对T细胞受体(TCR)的亲合力来修饰氨基酸残基。

[0211] 也可以将二碱性氨基酸残基(例如,Arg-Arg,Arg-Lys,Lys-Arg或Lys-Lys)添加至肽的N和C末端。在一些实施方案中,氨基酸被取代以通过修饰锚残基(“固定锚表位”)来增强主要组织相容性复合体(MHC)结合,或通过修饰TCR相互作用位点(例如,SEQ ID NO:1-17的位置1、2和/或9)来增强与T细胞受体(TCR)的结合。在一些实施方案中,本文所述的表位可以在任何位置(例如在一个,两个,三个,四个,五个或六个位置)处修饰。肽还可以包含内部突变,所述突变使它们成为T细胞刺激的“超抗原”或“超激动剂”。可以通过用位置扫描合成肽组合文库(PS-CSL)筛选T细胞来产生超抗原肽,如Pinilla et al,Biotechniques,13(6):901-5,1992;Borras et al,J.Immunol.Methods,267(1):79-97,2002;美国公开文本No.2004/0072246;和Lustgarten et al.,J.Immun.176:1796-1805,2006所述。在一些实施方案中,超激动剂肽是具有一个,两个,三个或四个氨基酸取代的如本文所述的肽,所述取代使肽称为更有力的免疫原性。在一些实施方案中,可以将自BCMA或TACI衍生的肽的第一个氨基酸残基改变为酪氨酸。

[0212] 自BCMA或TACI衍生的一些异变肽包括:

[0213] 异变#4.BCMA₇₂₋₈₀(YLMFLLRKI)(SEQ ID NO:13)

[0214] 异变#5.BCMA₅₄₋₆₂(YILWTCLGL)(SEQ ID NO:14)

[0215] 异变#1.TACI₁₇₈₋₁₈₆(YLVAVACFL)(SEQ ID NO:15)

[0216] 异变#3.TACI₁₅₄₋₁₆₂(YLSADQVAL)(SEQ ID NO:16)

[0217] 异变#4.TACI₁₆₆₋₁₇₄(YLGLCLCAV)(SEQ ID NO:17)

[0218] 如本文所用,术语“异变”(例如,异变肽)是指肽的形式,其中一个或多个氨基酸残基已经从野生型或原始序列修饰以便产生比具有野生型序列或原始序列的相应肽更具免疫原性。

[0219] 本公开内容进一步提供了如本文所述的肽的变体(例如,SEQ ID NO:1-17)。本文所述的肽的变体可以包括具有不超过五个,不超过四个,不超过三个,不超过两个,不超过一个氨基酸取代(例如5、4、3、2,或1个氨基酸取代)的肽的形式。在一些实施方案中,本文描述的肽的变体可以包括具有至少一个,至少两个,至少三个或至少四个取代的肽的形式。

[0220] 在一些实施方案中,SEQ ID NO:1-17的位置1、2和/或9处的氨基酸有助于HLA结合亲和力,因此可以被取代而不影响肽特异性T细胞应答。因此,肽的免疫原性仍可以通过在SEQ ID NO:1-17的位置1、2和/或9处的取代来维持。在一些实施方案中,在SEQ ID NO:1-17(例如,SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:16)的位置1处的氨基酸被取代。在一些实施方案中,在SEQ ID NO:1-17(例如,SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:16)的位置2处的氨基酸被取代。在一些实施方案中,在SEQ ID NO:1-17(例如,SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:16)的位置9处的氨基酸被取代。在一些实施方案中,SEQ ID NO:1-17的位置1和2、位置1和9、位置2和9或位置1、2和

9处的氨基酸被取代。在一些实施方案中,本公开内容提供了肽,其包含如本文所述的序列(例如,SEQ ID NO:1-17之一,具有或不具有如本文所述的取代),并且具有至多9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40个氨基酸。因此,在一些实施方案中,肽的长度可以在9至20个氨基酸之间,9至30个氨基酸之间或9至40个氨基酸之间。

[0221] 取代可以是任何类型的氨基酸取代,例如保守或非保守。保守取代包括以下组中的取代:(1) 缬氨酸、丙氨酸和甘氨酸;亮氨酸、缬氨酸和异亮氨酸;(2) 天冬氨酸和谷氨酸;(3) 天冬酰胺和谷氨酰胺;(4) 丝氨酸、半胱氨酸和苏氨酸;赖氨酸和精氨酸;(5) 苯丙氨酸和酪氨酸。非极性疏水氨基酸包括丙氨酸,亮氨酸,异亮氨酸,缬氨酸,脯氨酸,苯丙氨酸,色氨酸和甲硫氨酸。极性中性氨基酸包括甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、酪氨酸、天冬酰胺和谷氨酰胺。带正电的(碱性)氨基酸包括精氨酸、赖氨酸和组氨酸。带负电荷的(酸性)氨基酸包括天冬氨酸和谷氨酸。上述极性、碱性或酸性基团的一个成员被同一基团的另一成员的任何取代可被认为是保守取代。相反,非保守取代是一个氨基酸被具有不同特性的另一个氨基酸取代,例如用另一组内的另一个氨基酸取代一个氨基酸。

[0222] 在一些实施方案中,任何肽的位置三、四、五、六、七和八的一个或多个(例如一个,两个,三个,四个或全部五个)未被取代。在一些实施方案中,肽的位置三、四、五、六、七和八的一个或多个(例如,一个,两个,三个,四个或全部五个)与选自SEQ ID NO:1-17的序列相同。如本文所用,术语位置是指从肽的N端开始的位置。例如,肽的位置3是指从肽的N端开始的第三个氨基酸残基。在一些实施方案中,SEQ ID NO:1-17的位置三、四、五、六、七和八处的残基对肽的识别贡献最大。

[0223] 本公开内容进一步提供了氨基酸序列或核苷酸序列,该氨基酸序列或核苷酸序列包含以下序列或由以下序列组成或基本上由以下序列组成,所述序列与如本公开内容中所述的任何序列,例如SEQ ID NO:1-17、SEQ ID NOs:18和19,和编码SEQ ID NO:1-17的核苷酸序列是至少50%(例如60%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%)相同的。

[0224] 为了测定两个氨基酸序列或两个核酸序列的同一性百分比,为了最佳比较目的而对序列进行比对(例如,可以在第一和第二氨基酸或核酸序列之一或两者中引入缺口以用于最佳比对,并且可以忽略非同源序列以用于比较目的)。为了比较目的而比对的参考序列的长度为参考序列的长度的至少80%,并且在一些实施方案中为至少90%,95%或100%。然后比较相应氨基酸位置或核苷酸位置处的氨基酸残基或核苷酸。当第一序列中的位置被与第二序列中相应位置相同的氨基酸残基或核苷酸占据时,则分子在该位置处是相同的(如本文所用,氨基酸或核酸的“同一性”等同于氨基酸或核酸“同源性”)。考虑到缺口数和每个缺口的长度(它们需要被引入以实现两个序列的最佳比对),两个序列之间的同一性百分比是序列共享的相同位置的数目的函数。为了本公开内容的目的,序列的比较和两个序列之间的同一性百分数的测定可以使用具有缺口罚分12、缺口延伸罚分4和移码缺口罚分5的Blossum 62评分矩阵来完成。

[0225] 本文还提供了肽,其包含第一氨基酸序列和与第一氨基酸序列异源的第二氨基酸序列或者由第一氨基酸序列和与第一氨基酸序列异源的第二氨基酸序列组成。与第一氨基

酸序列“异源”的氨基酸序列或术语“异源氨基酸序列”是在第一氨基酸序列侧翼的氨基酸序列,其中该侧翼序列在自然界中不存在(例如,侧翼序列在自然界中不与第一氨基酸序列连接)。第一氨基酸序列可包含如本文所述的任何序列,基本上由如本文所述的任何序列组成或由如本文所述的任何序列组成,例如SEQ ID NO:1-17,或衍生自SEQ ID NO:1-17的任何序列(例如,具有SEQ ID NO:1-17的不超过四个取代的序列)。具有异源侧翼氨基酸序列的肽通常不会(并且被选择为使得不会)不利地影响细胞中SEQ ID NO:1-17的免疫原性肽的产生。预期细胞机器将去除肽中的任何其他序列,以产生SEQ ID NO:1-17的免疫原性肽,该肽由I类或II类MHC分子呈递以刺激针对表达BCMA或TACI的癌细胞的免疫应答。

[0226] 异源侧翼序列可以是例如用于纯化重组蛋白的序列(例如,FLAG,多组氨酸(例如,六组氨酸),血凝素(HA),谷胱甘肽-S-转移酶(GST)或麦芽糖结合蛋白(MBP))。异源序列也可以是可用作诊断或可检测标志物的蛋白质,例如,萤光素酶,绿色荧光蛋白(GFP)或氯霉素乙酰基转移酶(CAT)。在一些实施方案中,肽可包含全部或部分的免疫球蛋白分子(例如,全部或部分免疫球蛋白重链恒定区)。

[0227] 在一些实施方案中,异源序列可包含治疗或免疫刺激性多肽序列(例如,T辅助细胞表位(例如PADRE表位或破伤风类毒素通用T辅助细胞表位)或细胞因子或趋化因子的全部或部分)和/或可用于例如引发免疫应答(例如用于抗体产生)的载体(例如KLH)。在一些实施方案中,肽可包含一个或多个接头肽序列。肽还可以包含靶向多肽。异源序列可以具有不同的长度,并且在某些情况中可以比与异源氨基酸序列附接的第一氨基酸序列更长的序列。应当理解,含有第一氨基酸序列和与第一氨基酸序列异源的第二氨基酸序列的肽在序列上不对应于天然存在的蛋白质。

[0228] 如本文所用,靶向多肽是如下的多肽,其将与它们附接的部分(或多个部分)(例如,第一氨基酸序列)靶向到特定组织(例如,到淋巴结)或细胞(例如,到抗原呈递细胞或其他免疫细胞)或在体外的情况下特定分离的分子或分子复合物。靶向多肽可以是例如抗体(免疫球蛋白)或其抗原结合片段或细胞表面受体的配体。抗体(或其抗原结合片段)可以是例如单克隆抗体、多克隆抗体、人源化抗体、完全人抗体、单链抗体、嵌合抗体或抗体的Fab片段、F(ab')₂片段、Fab'片段、Fv片段或scFv片段。包含或作为Fc区(具有或不具有抗原结合区)的抗体片段也可以用于将试剂靶向到Fc受体表达细胞(例如,抗原呈递细胞,例如交错突树突细胞、巨噬细胞、单个核细胞或B细胞)。细胞表面受体的配体可以是例如趋化因子、细胞因子(例如白介素1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或16)或死亡受体配体(例如FasL或TNF α)。

[0229] 在一些实施方案中,异源序列可以包含例如“转运序列”,其帮助将肽递送至细胞或细胞的特定区室(例如,内质网或高尔基体)。转运序列可以包括例如膜移位序列、转运蛋白序列、antennapedia序列、环状整联蛋白结合肽和Tat介导的肽或其修饰形式。

[0230] 接头肽可以将第一氨基酸序列与一个或多个异源氨基酸序列连接。例如,接头肽可以将第一氨基酸序列与第二氨基酸序列连接。在某些实施方案中,接头肽可以将SEQ ID NO:1-17中任一项的肽与选自SEQ ID NO:1-17的第二肽联结/连接。接头肽可以是或包含例如氨基酸区段,其中至少四到六个氨基酸是甘氨酸。(参见例如Mancebo et al. (1990) *Mol. Cell. Biol.* 10:2492-2502)。接头也可以是或含有六个或更多(例如七个、八个、九个、十个、十一个或十二个或更多)组氨酸残基。接头肽可包含或是至少一个(例如一个、两个、

三个、四个、五个、六个、七个或八个或更多)蛋白酶切割位点。蛋白酶位点可以是例如胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶或因因子Xa切割位点。此类蛋白酶位点可用于例如将第一氨基酸序列与异源序列分开。例如,在表达和纯化包含通过胰蛋白酶蛋白酶切割位点与多组氨酸序列(例如,用于纯化)连接的第一氨基酸序列的肽之后,可以通过使肽与胰蛋白酶接触来从第一氨基酸序列中除去多组氨酸序列。

[0231] 在一些实施方案中,本公开内容提供了肽(例如,SEQ ID NO:1-17中的任一个),其可以具有原生蛋白异源或者原生蛋白中存在的氨基端和/或羧基末端处直至200个(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、或200)个氨基酸。

[0232] 在一些实施方案中,肽可以包含序列,该序列与如本文中所述的任何序列(例如,SEQ ID NO:1-17中的任一个)是至少40%,至少50%,至少60%,70%,80%,81%,82%,83%,84%,85%,86%,87%,88%,89%,90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,或99%相同的。在一些实施方案中,序列可以具有等于或至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19,或20个氨基酸,其选自如本文所述的任何序列(例如,SEQ ID NO:1-17中的任一个)。在一些实施方案中,序列是SEQ ID NO:13。在一些实施方案中,序列是SEQ ID NO:14。在一些实施方案中,序列是SEQ ID NO:16。

[0233] 在一些实施方案中,肽可以具有另外的序列。另外的序列可以位于肽的氨基末端或羧基末端。在一些实施方案中,另外的序列可以具有至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190或200个氨基酸。在一些实施方案中,另外的序列可以具有多达1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、或200个氨基酸。

[0234] 在某些情况中,本公开内容涵盖选自SEQ ID NO:13-17的2个或更多个肽的任何组合。

[0235] 本文所述的肽可以结合主要组织相容性复合物(MHC)分子(例如,MHC I类分子或MHC II类分子)。在人中,MHC被称为HLA复合物。如本文所用,“HLA超型或家族”是指基于共享的肽结合特异性而分组的HLA分子的集合。对带有某些氨基酸基序的肽具有相似的结合亲和力的HLA I类分子分组为HLA超型。术语HLA超家族、HLA超型家族、HLA家族和HLA xx样分子(其中xx表示特定的HLA类型)是同义词。HLA I类分子的类型包括例如HLA-A1、HLA-A2、HLA-A3、HLA-A24、HLA-B7、HLA-B27、HLA-B44、HLA-B58或HLA-B62。此类HLA分子在美国专利号7,026,443中有详细描述,其全部公开内容通过引用整体并入本文。

[0236] 肽可以以高亲和力或中等亲和力与MHC分子结合。如本文所用,肽与HLA I类分子的“高亲和力”结合定义为解离常数(KD)小于50(例如45、40、35、30、25、20、15、10、5、1、0.5、0.1、或小于0.05)nM的结合。“中等亲和力”是肽以约50nM-约500nM(例如55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、115、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、

250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、或500nM)的KD与HLA I类分子的结合。肽与HLA II类分子的“高亲和力”结合定义为以小于100(例如95、90、85、80、75、70、65、60、55、50、45、40、35、30、25、20、15、10、5、1、0.5、0.1、或小于0.05)nM的KD结合。肽对HLA II类分子的“中等亲和力”以约100和约1000nM之间的KD结合(例如100、110、115、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990、或1000nM)。测定肽和MHC分子的结合亲和力的方法是本领域已知的。合适的方法也在例如美国专利号7,026,443中描述。

[0237] 本文所述的肽还可以与MHC分子结合,被T细胞上的抗原特异性T细胞受体识别。可以使用多种合适的方法来测定与MHC分子结合的肽是否被T细胞上的T细胞受体识别。例如,可以在存在抗原呈递细胞的情况中在数周的时间段内在体外用测试肽培养来自正常受试者的外周血淋巴细胞(PBL)。对肽特异性的T细胞在此时间期间被活化,并且可以使用例如增殖测定法(H-胸苷测定法的羧基荧光素琥珀酰亚胺酯(CFSE)测定法),有限稀释测定法,细胞毒性测定法(例如钙黄绿素释放测定法),或细胞因子(例如IFN γ),淋巴因子释放或⁵¹Cr释放测定法进行检测(参见例如Wentworth,P.A.et al.,*MoI. Immunol.*32:603,1995; Celis,E.et al,*Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 91:2105,1994;Tsai,V.et al.,*J.Immunol.*158:1796,1997;Kawashima,I.et al.,*Human Immunol.*59:1,1998,每篇通过引用整体并入)。合适的体内方法包括免疫HLA转基因小鼠,其中将佐剂中的肽皮下注射到HLA转基因小鼠中,并且在免疫后数周,取出脾细胞,并在存在测试肽的情况中在体外培养约1周,使用例如⁵¹Cr-释放测定法检测肽特异性T细胞(参见例如Wentworth,P.A.et al.,*J.Immunol.*26:97,1996;Wentworth,P.A.et al.,*Int.Immunol.*8:651,1996;Alexander,J.et al.,*J.Immunol.*159:4753,1997,每篇的公开内容通过引用整体并入)。

[0238] 另外,可以通过用可检测标记的MHC复合物如本文所述的任何MHC分子多聚体组合物或HLA-I四聚体对T细胞进行染色来进行抗原特异性T细胞的直接定量(例如,如记载于Altman,J.D.et al.,*Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 90:10330,1993和Altman,J.D.et al.,*Science* 274:94,1996,每篇的公开内容通过引用整体并入)。

[0239] 在一些实施方案中,可以进一步修饰肽(例如,可以取代肽的氨基酸),以调节(例如,增加或减少)肽的一种或多种特性。例如,可以取代本文描述的肽之一的一个或多个(例如,两个,三个或四个)氨基酸,以增加肽对MHC分子的亲和力。在一些实施方案中,可以修饰本文所述的肽之一的氨基酸(例如,接触肽的氨基酸残基的T细胞受体),以增强T细胞受体和该肽(在MHC分子的背景中)的结合相互作用。此类经修饰的肽通常称为“改变的肽配体”。(参见例如Kalergis et al.(2000)*J Immunol.*165(1):280;Conlon et al.(2002)*Science* 1801;和国际公开文本No.W002070003,其各自的公开内容通过引用完整并入)。修饰肽以及测定修饰效果的合适方法记载于例如Collins et al.(*Immunological Reviews*(1998)163:151-160,其公开内容通过引用整体并入)。

[0240] 本公开内容进一步提供了包含如本文所述的任何肽的组合物。此外,为了对抗肿

瘤逃避针对它的疗法的能力,组合物可以包含多种特异性肽以诱导免疫应答。例如,来自相同蛋白质的超过一个表位可以包括在组合物中,例如,组合物可以含有至少一个、至少两个、至少三个、至少四个、至少五个、至少六个或至少一七个衍生自BCMA或TACI的肽。另外,也可以使用衍生自BCMA的至少一种(例如,至少两个、三个、四个、五个)肽和衍生自TACI的至少一种(例如,至少两个、三个、四个、五个)肽的组合或混合物。因此,在一些实施方案中,本公开内容提供了组合物,其包含至少2、3、4、5、6、7或8个BCMA衍生的肽(例如,选自例如SEQ ID NO:1-6和13-14的至少两个BCMA衍生的肽)。在一些实施方案中,本公开内容提供了组合物,其包含至少2、3、4、5、6、7或8个TACI衍生的肽(例如,至少两个TACI衍生的肽,其选自例如SEQ ID NO:7-12和16-17)。在一些实施方案中,本公开内容提供了组合物,其包含至少一种(例如,至少2、3、4、5、6、7或8种)BCMA衍生的肽和至少一种(例如,至少2、3、4、5、6、7或8)TACI衍生的肽。

[0241] 在一些实施方案中,组合物还包含免疫刺激剂(例如,细胞因子或T辅助细胞表位)。T辅助细胞表位可以是PADRE序列或通用破伤风类毒素T辅助(TT_{Th})表位。在一些实施方案中,组合物包含佐剂,例如弗氏完全佐剂,弗氏不完全佐剂,明矾,Toll受体的配体,QS21,RIBI或类似的免疫刺激剂。佐剂还包括例如霍乱毒素(CT),大肠杆菌热不稳定性毒素(LT),突变体CT(MCT)(Yamamoto et al. (1997) J. Exp. Med. 185:1203-1210)和突变体大肠杆菌热不稳定性毒素(MLT)(Di Tommaso et al. (1996) Infect. Immunity 64:974-979)。在一些实施方案中,组合物包含toll样受体-3配体(例如, Poly ICLC),干扰素 α (IFN α),干扰素 γ (IFN γ)或粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)。在一些实施方案中,组合物还包含免疫激动剂,例如抗OX40抗体或抗GITR抗体。

[0242] 在一些实施方案中,组合物包含化学治疗剂(例如来那度胺)。在一些实施方案中,组合物包含组蛋白脱乙酰基酶6(HDAC6)抑制剂(例如,ACY241;参见Niesvizky, et al. "ACY-241, a novel, HDAC6 selective inhibitor: synergy with immunomodulatory (IMiD®) drugs in multiple myeloma (MM) cells and early clinical results (ACE-MM-200 Study)." (2015): 3040-3040; Bae et al. "Histone deacetylase (HDAC) inhibitor ACY241 enhances anti-tumor activities of antigen-specific central memory cytotoxic T lymphocytes against multiple myeloma and solid tumors." Leukemia (2018): 1)。在一些实施方案中,组合物包含检查点抑制剂(例如抗LAG3抗体)或免疫激动剂(例如抗OX40)。在一些实施方案中,组合物包含与PD-1、CTLA-4、LAG-3、BTLA、PD-L1、CD27、CD28、CD40、CD47、4-1BB(CD137)、CD154、TIGIT、TIM-3、GITR(CD357)、OX40、CD20、EGFR、或CD319特异性结合的抗体(例如人抗体)。

[0243] 在一些实施方案中,组合物包含肽和来那度胺,该肽包含SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:16所示的序列。在一些实施方案中,组合物包含肽和抗OX40抗体、抗LAG3抗体和/或抗GITR抗体,所述肽包含SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:16所示的序列。

[0244] 用于产生肽的核酸和方法

[0245] 本公开内容的特征还在于编码本文描述的任何肽的一个或多个(例如,1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13或14)的核酸序列(以及包含核酸序列的核酸载体),以及产生本文描述的任何肽一个或多个(例如,1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13或14)的核酸序列(以及

包含核酸序列的核酸载体)的方法。此类方法可包括以下步骤:任选地,提供包含核酸载体的细胞(或细胞组),所述核酸载体包含编码本文所述的任何肽的一个或多个的核酸序列,所述核酸序列可操作地连接至表达控制序列,并在允许肽表达的条件下培养细胞。方法还可包括从细胞或从培养细胞的培养基中分离一个或多个肽的步骤。因此,在一方面,本公开内容提供了基于RNA的治疗剂和基于DNA的治疗剂,包括例如癌症疫苗。在一些实施方案中,癌症疫苗可具有如本文所述的多核苷酸(例如,编码SEQ ID NO:1-17的多核苷酸)。在一些情况中,多核苷酸编码肽,该肽与SEQ ID NO:1-17之一相同,只是具有1-4个氨基酸取代。在某些情况中,取代是在位置1、2或9的一处或多处。在某些情况中,该肽的长度为2至30个氨基酸。在某些情况中,核酸可包含调节序列(例如起始密码子,终止密码子,polyA尾)。在一些实施方案中,可以将RNA/DNA癌症疫苗配制在聚合物或脂质体纳米载体(例如,纳米颗粒)内。

[0246] 构建用于重组表达本文所述的一个或多个肽的核酸序列和载体(例如表达载体)的合适方法是本领域技术人员公知的,并且描述于例如Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 第二版第1,2和3卷. Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, New York, USA, Nov. 1989, 其公开内容通过引用完整并入。核酸和载体可用于例如在极其多种宿主细胞中表达肽,所述宿主细胞包括例如细菌、酵母或哺乳动物细胞。核酸和载体还可以用于例如如下文所述的体内和离体方法。肽编码序列可以可操作地连接至启动子、调节元件或表达控制序列。启动子和/或增强子元件可以指导核酸编码的肽的表达。增强子在时间、位置和水平方面提供表达特异性。与启动子不同,若存在启动子,则增强子在位于距转录起始位点可变距离处时可以发挥功能。增强子也可以位于转录起始位点的下游或相关基因的外显子中。为了使编码序列处于启动子的控制下,必需将肽翻译阅读框的翻译起始位点定位在启动子下游(3')的1个和约50个核苷酸之间。感兴趣的启动子包括但不限于巨细胞病毒hCMV立即早期基因、SV40腺病毒的早期或晚期启动子、lac系统、trp系统、TAC系统、TRC系统、噬菌体A的主要操纵基因和启动子区域、fd壳体蛋白的控制区、3磷酸甘油酸激酶的启动子、酸性磷酸酶的启动子和酵母 α 匹配因子的启动子、腺病毒E1b最小启动子或胸苷激酶最小启动子。

[0247] 肽编码序列或包含肽编码序列的载体可包含编码信号肽的前导序列。前导序列可以在编码本文所述的一个或多个肽的序列的5'端。信号肽可以直接位于给定肽的N端,或者可以被一个或多个(例如2、3、4、6、8、10、15或20个)氨基酸与其隔开,条件是前导序列与编码肽的核酸序列符合读码框。信号肽通常在分泌前从肽上切割下来(除非当然信号肽指导跨膜蛋白的插入),该信号肽在翻译过程中将与其附接的肽引导到宿主细胞内质网(ER)的腔中,然后通过分泌小泡将肽分泌到宿主细胞的环境中。有用的信号肽包括例如细胞因子或生长因子的天然前导序列,KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu), 或例如在美国专利号5,827,516(其公开内容通过引用并入本文)中描述的任何信号序列。

[0248] 在一些实施方案中,肽编码序列的5'末端可以包括非天然ATG“起始序列”。即,例如,可以将ATG序列添加至编码肽的核酸,以确保适当地转录和翻译该肽。尽管前导序列通常包含ATG起始序列,但是在它不包含ATG起始序列的实施方案中,可以将ATG序列添加到编码前导序列的核酸的5'端。

[0249] 构建肽编码序列和表达载体的合适方法是本领域技术人员公知的,并描述于例如

Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual 第二版第1, 2和3卷. Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, New York, USA, Nov. 1989; 其公开内容通过引用整体并入本文。

[0250] 可以使用多种方法将重组载体引入细胞, 所述方法可以至少部分取决于引入核酸的细胞的类型。例如, 可以使用诸如电穿孔或热休克的方法来转化细菌细胞。用于转染酵母细胞的方法包括例如原生质球技术或全细胞氯化锂酵母转化方法 (参见例如美国专利号4, 929, 555; Hinnen et al. (1978) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 75:1929; Ito et al. (1983) J. Bacteriol. 153:163; 美国专利号4, 879, 231; 和Sreekrishna et al. (1987) Gene 59: 115, 其各自的公开内容通过引用整体并入本文)。动物细胞的转染可具有以下特征: 例如, 使用磷酸钙、电穿孔、热休克、脂质体或转染试剂 (如FUGENE®或LIPOFECTAMINE®) 或通过使裸核酸载体与溶液中的细胞接触将载体导入细胞中 (参见例如Sambrook等, 同上)。

[0251] 可用于小规模或大规模生产本文所述肽的表达系统包括但不限于微生物, 例如用重组噬菌体DNA、质粒DNA、或粘粒DNA表达载体转化的细菌 (例如, 大肠杆菌和枯草芽孢杆菌); 用重组酵母表达载体转化的真菌 (例如酵母 (例如, 酵母属和毕赤酵母属)); 用重组病毒表达载体 (例如杆状病毒) 感染的昆虫细胞系统; 用重组病毒表达载体 (例如花椰菜花叶病毒 (CaMV) 和烟草花叶病毒 (TMV)) 感染或用重组质粒表达载体 (例如Ti质粒) 转化的植物细胞系统; 或含有重组表达构建体的哺乳动物细胞系统 (例如COS, CHO, BHK, 293, VERO, HeLa, MDCK, WI38, 和NIH 3T3细胞), 该重组表达构建体包含源自哺乳动物细胞基因组的启动子 (例如金属硫蛋白启动子) 或源自哺乳动物病毒的启动子 (例如, 腺病毒晚期启动子、CMV启动子、SV40启动子或痘苗病毒7.5K启动子)。也可用作宿主细胞的是直接从哺乳动物获得, 用质粒载体转染或用病毒载体 (例如, 病毒载体, 例如疱疹病毒、逆转录病毒、痘苗病毒、减毒的痘苗病毒、金丝雀痘病毒、腺病毒和腺伴随病毒等) 感染的原代或次级细胞。

[0252] 表达本文所述的任何肽后, 可以使用标准技术从培养的细胞或从培养细胞的培养基中分离肽。分离蛋白质的方法是本领域已知的, 并且包括例如液相层析 (例如HPLC)、亲和层析 (例如金属螯合或免疫亲和层析)、离子交换层析、疏水相互作用层析、沉淀或差异增溶。

[0253] 较小的肽 (例如, 具有小于200 (例如, 小于175、小于150、小于125、小于100、小于90、小于80、小于70或小于60) 个氨基酸的肽) 可以通过标准化学手段 (例如FMOC固相合成) 进行化学合成。

[0254] 本文所述的肽可以但不需要进行分离。如应用于本文所述的任何肽, 术语“分离的”是指已经与天然伴随它的组分 (例如蛋白质或其他天然存在的生物或有机分子) 分离或纯化的肽, 其片段 (或对于组合物而言, 大分子复合物)。应当理解, 重组分子 (例如, 重组肽) 将总是“分离的”。通常, 当肽 (或片段或大分子复合物) 占制剂中相同类型的总分子的按重量计至少60%, 70%, 80%或90%, 例如样品中相同类型的总分子的至少60%, 70%, 80%或90%时它是分离的。例如, 当本文所述的肽占制剂或样品中总蛋白的按重量计至少60%, 70%, 80%或90%时认为它是分离的。在一些实施方案中, 制剂中的分子由制剂中相同类型的总分子的按重量计至少75%, 至少90%或至少99%组成。

[0255] 类似地, 还可以分离肽编码序列或包含本文描述的肽编码序列的载体。如应用于

本文所述的任何肽编码序列或载体,术语“分离的”是指已经与天然伴随它的组分(例如核酸、蛋白质或其他天然存在的生物或有机分子)分离或纯化的肽编码序列或载体,其片段。应当理解,重组分子(例如,重组载体或肽编码序列)将总是“分离的”。通常,当肽编码序列或载体(或其片段)占制剂中相同类型的总分子的按重量计至少60%,70%,80%或90%,例如样品中相同类型的总分子的至少60%,70%,80%或90%时它是分离的。例如,当本文所述的肽编码序列或载体占制剂或样品中总核酸的按重量计至少60%,70%,80%或90%时认为它是分离的。在一些实施方案中,制剂中的分子由制剂中相同类型的总分子的按重量计至少75%,至少90%或至少99%组成。

[0256] 在一些实施方案中,分离的肽、肽编码序列或载体可以在适当的条件下冷冻、冻干或固定化并储存,所述条件允许分子保留活性(例如,肽结合MHC分子如I类MHC分子或II类MHC分子的能力,或载体在细胞中支持肽表达的能力)。

[0257] 肽的加工

[0258] 在表达或合成本文所述的任何肽之后,可以进一步加工肽。进一步的加工可以包括对肽的化学或酶促修饰,或者在修饰肽的情况中,该加工可以包括对现有修饰的酶促或化学改变或两者。肽的额外加工可包括添加(共价或非共价连接)异源氨基酸序列,例如但不限于本文所述的任何异源氨基酸序列。酶促处理可涉及在允许肽被修饰的条件下使肽与例如一个或多个蛋白酶、磷酸酶或激酶接触。酶促处理可涉及使肽与能够使肽糖基化或修饰肽的糖基化的一种或多种酶(例如寡糖基转移酶或甘露糖苷酶)接触。

[0259] 加工可以包括向肽添加例如可检测的标记物。例如,可以用酶(例如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶或乙酰胆碱酯酶)、荧光物质(例如伞形酮、荧光素、异硫氰酸荧光素、罗丹明、二氯三嗪基胺、荧光素、丹磺酰氯、藻蓝蛋白(APC)或藻红蛋白)、发光材料(例如镧系元素或其螯合物)、生物发光材料(例如萤光素酶、萤光素或水母荧光素)或放射性核素(例如 ^3H 、 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{125}I 、或 ^{35}S)对肽进行可检测的标记。

[0260] 加工还可以涉及将肽偶联至聚合物(例如,聚亚烷基二醇部分,例如聚乙二醇部分)或纳米颗粒。在一些实施方案中,聚合物在肽的N末端的位点上与多肽偶联。在一些实施方案中,肽可含有一个或多个内部氨基酸插入,其提供可以与聚合物缀合的内部聚合物缀合位点。

[0261] 诱导免疫应答的方法

[0262] 本公开内容还提供了用于在受试者中诱导免疫应答的多种方法(例如,基于肽的疫苗接种、基于纳米颗粒的免疫疗法、基于APC的免疫疗法、基于T细胞的免疫疗法、基于CAR T细胞的免疫疗法或诱导的多能干细胞方法)。在受试者中诱导免疫应答的方法可以包括例如对受试者施用本文所述的一个或多个组合物(例如,本文所述的任何肽(或包含编码该肽的核酸序列的表达载体)(或包含本文所述的一个或多个肽(或载体)的任何药物组合物))的步骤。在一些实施方案中,本文所述的组合物用作疫苗。

[0263] 可以使用本文所述的任何肽以通过使用编码本文所述的一个或多个肽的核酸表达系统来刺激免疫应答。即,用于在受试者中诱导免疫应答的方法可以包括以下步骤:对受试者施用包含编码一个或多个本文所述肽的核酸序列的表达载体(或包含表达载体的药物组合物)。免疫应答可以是CD8⁺T细胞、CD4⁺T细胞、细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、TH1应答、TH2应答或两种类型应答的组合。

[0264] 以上任何方法也可以是例如在受试者中治疗或预防(防范)癌症(例如浆细胞病症,例如多发性骨髓瘤,或表达BCMA和/或TACI的任何其他癌症)的方法。当本文结合给定病况的给定治疗使用术语“预防”,“预防”或“预防”时,它们指所治疗的受试者根本没有形成病况的临床可观察水平(例如,受试者没有表现出病况的一个或多个症状,或者在癌症的情况下,受试者没有形成可检测的癌症水平),或者病况比其在缺乏治疗的情况下在受试者中更缓慢和/或在更小程度上形成(例如,在受试者中更少的症状或更少数目的癌细胞)。这些术语不仅限于受试者没有经历任何状况的情况。例如,如果在例如癌症的早期诊断期间(例如,从受试者的样品中检测几个癌细胞)给予治疗,则认为该疾病已经“预防”该状况,所述癌症预期已经产生状况(晚期癌症)的给定表现,并且导致受试者经历比其它情况下预期者更少和/或更轻的病况症状。当受试者仅显示出癌症的轻度明显症状时,治疗可以“预防”癌症(例如浆细胞病症,例如多发性骨髓瘤)。“预防”并不意味着如此治疗的受试者必须没有甚至单个癌细胞的形成。

[0265] 通常,递送至受试者的肽将悬浮在药学上可接受的载体(例如,生理盐水)中,并经口服,直肠或肠胃外施用,例如静脉内、皮下、肌肉内、鞘内、腹膜内、直肠内、阴道内、鼻内、胃内、气管内或肺内注射。

[0266] 施用可以通过药物组合物的推注的定期注射来进行或者可以通过从外部(例如,IV袋)或内部(例如,可生物降解的植入物、生物人工器官、或植入的试剂生产细胞的集落)的储库的静脉内或腹膜内施用是未中断的或连续的。参见例如美国专利号4,407,957,5,798,113和5,800,828,每篇通过引用整体并入本文。

[0267] 治疗性核酸的常规且药学上可接受的施用途径包括但不必限于肌肉内、皮下、皮内、经皮、静脉内、直肠(例如灌肠,栓剂)、口服、胃内、鼻内和其他有效途径吸入途径的途径和其他胃肠外施用途径。如果想要的话,可以组合施用途径,或者根据核酸分子和/或对免疫应答的期望作用来调整施用途径。对受试者施用核酸的方法可以包括多种公知的技术,例如载体介导的基因转移(例如,病毒感染/转染,或各种其他基于蛋白质或基于脂质的基因递送复合物)以及促进“裸”多核苷酸递送的技术(例如电穿孔、“基因枪”递送、以及用于将多核苷酸引入受试者或受试者细胞的各种其他技术)。

[0268] 通常,所需要的肽或核酸的剂量取决于施用途径的选择;配制剂的性质;受试者疾病的性质或严重程度;受试者的免疫状态;受试者的体格、体重、表面积、年龄和性别;正在施用的其他药物;和主治医学专家的判断。

[0269] 用于诱导免疫应答的肽的合适剂量在每kg受试者0.000001至10mg试剂或抗原/免疫原性组合物的范围内。考虑到试剂的种类和各种施用途径的不同效率,应当预期所需剂量的广泛变化。例如,鼻或直肠施用可以需要比静脉内注射的施用更高的剂量。这些剂量水平的变化可以使用本领域公知的用于优化的标准经验程序来调节。施用可以是单次或多次(例如2倍、3倍、4倍、6倍、8倍、10倍、20倍、50倍、100倍、150倍或更多倍)。例如,肽可以作为初始免疫施用,然后随后作为加强免疫施用一次或多次。

[0270] 在本文描述的方法的背景中,对受试者施用的核酸剂量应足以随着时间在受试者中实现有益的治疗应答,或减轻症状。尽管所使用的剂量将根据例如受试者或要达到的临床目标而变化。合适的剂量范围是如下的范围,其提供单剂量中每ml载体的至多约1 μ g、至多约1,000 μ g、至多约5,000 μ g、至多约10,000 μ g、至多约25,000 μ g或约50,000 μ g核酸。

[0271] 为了优化治疗功效(例如,一个或多个肽或编码肽的核酸在受试者中诱导免疫应答的功效),可以首先以不同给药方案施用包含肽或核酸的组合物。单位剂量和方案取决于因素,其包括例如哺乳动物的物种、其免疫状态、哺乳动物的体重。药物组合物(例如,包含一个或多个肽或编码本文所述的一个或多个肽的一个或多个核酸序列的药物组合物)的给药频率在医学从业人员(例如医生或护士)的技能和临床判断内。通常,通过临床试验建立施用方案,该临床试验可以建立最佳施用参数。但是,从业人员可以根据受试者的年龄、健康状况、体重、性别和医学状况来改变此类施用方案。

[0272] 在一些实施方案中,可以至少两次(例如,3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、15或20或更多次)对受试者施用药物组合物。例如,可以将一月一次达3个月;一周一次达1个月;一年一次达3年;一年一次达5年;每五年一次;每十年一次;或每三年一次达终生对受试者施用药物组合物。

[0273] 如本文所定义,肽或编码肽的核酸的“治疗有效量”是能够在治疗的受试者中产生免疫应答的肽或核酸的量。肽的治疗有效量(即有效剂量)包括每千克受试者或样品重量的试剂的毫克、微克、纳克或皮克量(例如,每千克约1纳克至每千克约500微克、每千克1微克至每千克约500毫克、每千克约100微克至每千克约5毫克、或每千克约1微克至每千克约50微克)。核酸的治疗有效量还包括每千克受试者或样品重量的试剂的微克、纳克或皮克量(例如,每千克约1纳克至每千克约500微克、每千克约1微克至每千克约500微克、每千克约100微克至每千克约500微克、或每千克约1微克至每千克约50微克)。

[0274] 如本文所定义,肽或编码肽的核酸的“预防有效量”是指能够在治疗的受试者中产生针对癌细胞(例如多发性骨髓瘤)的免疫应答的肽或核酸的量,该免疫应答能够预防受试者中癌症的形成,或者能够实质上减少受试者形成癌症或继续形成癌症的机会。肽的预防有效量(即有效剂量)包括每千克受试者或样品重量的试剂的毫克、微克、纳克或皮克量(例如,每千克约1纳克至每千克约500微克、每千克1微克至每千克约500毫克、每千克约100微克至每千克约5毫克、或每千克约1微克至每千克约50微克)。核酸的预防有效量还包括每千克受试者或样品重量的试剂的微克、纳克或皮克量(例如,每千克约1纳克至每千克约500微克、每千克约1微克至每千克约500微克、每千克约100微克至每千克约500微克、或每千克约1微克至每千克约50微克)。

[0275] 在一些实施方案中,方法还可包括在将组合物施用于受试者后测定受试者中是否发生免疫应答。用于测定受试者中是否发生免疫应答的合适方法包括使用免疫测定法来检测例如来自受试者的生物样品中对肽特异性的抗体的存在。例如,在将肽施用于受试者后,可以从受试者获得生物学样品(例如血液样品),并测试对肽特异性的抗体的存在。还可以通过测定样品中活化的T细胞的存在或量来检测免疫应答。此类测定法包括例如增殖测定法、有限稀释测定法、细胞毒性测定法(例如,淋巴因子释放或⁵¹Cr释放测定法)。

[0276] 在一些实施方案中,本文所述的方法(例如,增加BCMA和TACI特异性应答的治疗剂、疫苗、细胞疗法、抗体和/或靶向除BCMA和TACI以外的一些靶标的治疗方法)还可包括对受试者施用增强BCMA和TACI特异性应答的各种类型的化合物(例如细胞因子和趋化因子)、检查点抑制剂(例如抗PD1、抗PDL1、抗CTLA4、抗LAG3和/或抗TIM3抗体)、免疫激动剂(例如抗OX40或抗GITR抗体)、免疫调节剂(例如来那度胺、泊马度胺、HDAC抑制剂,例如ACY241)和/或佐剂。

[0277] 方法还可包括如下的步骤：对受试者施用一种或多种化学治疗剂、一种或多种形式的电离辐射或一种或多种免疫调节剂。一种或多种形式的电离辐射可以是 γ 辐射、X辐射或 β 辐射。一种或多种形式化学治疗剂可以选自下组：顺铂、卡铂、丙卡巴肼、氮芥、环磷酰胺、喜树碱、阿霉素、异环磷酰胺、美法仑、苯丁酸氮芥、白消安(bisulfan)、亚硝基脲(nitrosurea)、放线菌素D、柔红霉素、多柔比星、博来霉素、普卡霉素(plicomycin)、丝裂霉素、依托泊苷、verampil、鬼臼毒素、他莫昔芬、泰素、沙利度胺、来那度胺、蛋白体抑制剂(例如硼替佐米)、hsp90抑制剂(例如tenespinmycin)、反铂、5-氟尿嘧啶、新长春碱、长春碱、甲氨蝶呤或前述物质的类似物。免疫调节剂包括例如多种趋化因子和细胞因子，例如白介素2(IL-2)、粒细胞/巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)和白介素12(IL-12)。在一些实施方案中，可以将肽或编码该肽的核酸与免疫调节剂例如Toll受体配体或佐剂一起施用。

[0278] 在一些实施方案中，另外的治疗剂是组蛋白脱乙酰基酶6(HDAC6)抑制剂(例如，ACY241)。

[0279] 在一些实施方案中，一种或多种另外的治疗剂可以是免疫调节剂、检查点抑制剂(例如抗LAG3抗体)或免疫激动剂(例如抗OX40抗体，抗GITR抗体)。

[0280] 在一些实施方案中，另外的治疗剂可以包含一种或多种选自下组的抑制剂：B-Raf的抑制剂、EGFR抑制剂、MEK的抑制剂、ERK的抑制剂、K-Ras的抑制剂、c-Met抑制剂、退行性淋巴瘤(anaplastic lymphoma)激酶(ALK)抑制剂、磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)抑制剂、Akt抑制剂、mTOR抑制剂、双重PI3K/mTOR抑制剂、Bruton酪氨酸激酶(BTK)抑制剂和异柠檬酸脱氢酶1(IDH1)和/或异柠檬酸脱氢酶2(IDH2)的抑制剂。在一些实施方案中，另外的治疗剂是吡咯胺2,3-双加氧酶-1(IDO1)的抑制剂(例如epacadostat)。

[0281] 在一些实施方案中，另外的治疗剂可以包含一种或多种选自下组的抑制剂：HER3抑制剂、LSD1抑制剂、MDM2抑制剂、BCL2抑制剂、CHK1抑制剂、激活的hedgehog信号传导途径的抑制剂和选择性降解雌激素受体的药剂。

[0282] 在一些实施方案中，组合疗法包括以下一种或多种：

[0283] (A) 可以增强BCMA和TACI特异性应答的化合物，例如(1) 细胞因子和趋化因子，(2) 检查点抑制剂，包括例如抗PD1，抗PDL1，抗CTLA4，抗LAG3和/或抗TIM3抗体；(3) 免疫激动剂，包括例如抗OX40和/或抗GITR抗体；(4) 免疫调节剂，包括例如来那度胺，泊马度胺，HDAC抑制剂，例如ACY241；(5) 佐剂；

[0284] (B) 可以增加BCMA和TACI特异性应答的治疗剂，包括如本文所述的任何治疗剂(例如疫苗，细胞疗法和/或抗体)或靶向其他靶标的独立方法(例如非BCMA或非TACI-靶向疗法)；和

[0285] (C) 其他化合物，例如一种或多种选自下组的抑制剂：B-Raf的抑制剂、EGFR抑制剂、MEK的抑制剂、ERK的抑制剂、K-Ras的抑制剂、c-Met抑制剂、退行性淋巴瘤激酶(ALK)抑制剂、磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)抑制剂、Akt抑制剂、mTOR抑制剂、双重PI3K/mTOR抑制剂、Bruton酪氨酸激酶(BTK)抑制剂和异柠檬酸脱氢酶1(IDH1)和/或异柠檬酸脱氢酶2(IDH2)的抑制剂。在一些实施方案中，另外的治疗剂是吡咯胺2,3-双加氧酶-1(IDO1)的抑制剂(例如epacadostat)。

[0286] 在一些实施方案中，另外的治疗剂可以包含一种或多种选自下组的治疗剂：曲贝替定(Trabectedin)、nab-紫杉醇、曲巴尼布(Trebananib)、帕唑帕尼(Pazopanib)、西地尼

布 (Cediranib)、帕博西尼 (Palbociclib)、依维莫司、氟嘧啶、IFL、瑞格菲尼 (regorafenib)、Reolysin、力比泰 (Alimta)、赛立替尼 (Zykadia)、舒尼替尼 (Sutent)、西罗莫司 (temsirolimus)、阿西替尼 (axitinib)、依维莫司、索拉非尼、Votrient、帕唑帕尼 (Pazopanib)、IMA-901、AGS-003、卡博替尼 (cabozantinib)、长春氟宁、Hsp90抑制剂、Ad-GM-CSF、替莫唑胺 (Temazolomide)、IL-2、IFN α 、长春碱、Thalomid、达卡巴嗪、环磷酰胺、来那度胺、氮胞苷、来那度胺、硼替佐米 (bortezomid)、氨柔比星 (amrubicine)、卡非佐米 (carfilzomib)、普拉曲沙 (pralatrexate) 和 lenzastaurin。

[0287] 在一些实施方案中,另外的治疗剂可以包含一种或多种选自下组的治疗剂:佐剂、TLR激动剂、肿瘤坏死因子 (TNF) α 、IL-1、HMGB1、IL-10拮抗剂、IL-4拮抗剂、IL-13拮抗剂、IL-17拮抗剂、HVEM拮抗剂、ICOS激动剂、靶向CX3CL1的治疗、靶向CXCL9的治疗、靶向CXCL10的治疗、靶向CCL5的治疗、LFA-1激动剂、ICAM1激动剂和选择蛋白激动剂。

[0288] 在一些实施方案中,将卡铂、nab-紫杉醇、紫杉醇、顺铂、培美曲塞、吉西他滨、FOLFOX或FOLFIRI施用于受试者。

[0289] 在一些实施方案中,另外的治疗剂是与PD-1、CTLA-4、LAG-3、BTLA、PD-L1、CD27、CD28、CD40、CD47、4-1BB (CD137)、CD154、TIGIT、TIM-3、GITR (CD357)、OX40、CD20、EGFR、或CD319特异性结合的抗体 (例如人抗体)。在一些实施方案中,另外的治疗剂是抗OX40抗体,抗PD-L1抗体,抗PD-L2抗体,抗LAG-3抗体,抗TIGIT抗体,抗BTLA抗体,抗CTLA-4抗体或抗GITR抗体。

[0290] 本公开内容还提供了包含编码如本文所述的一个或多个肽的核酸的病毒或包含如本文所述的一个或多个肽的病毒颗粒。可以使用各种病毒,例如逆转录病毒、慢病毒、腺病毒、腺伴随病毒、 α 病毒等。这些病毒可用于将肽或其编码肽的核酸递送至受试者以诱导免疫应答。类似地,包含一个或多个如本文所述的肽和/或其编码肽的核酸的脂质体也可以用于将肽或核酸递送至有此需要的受试者以诱导免疫应答。

[0291] 在一些实施方案中,本文描述的方法可以将免疫应答、活性 (例如,产生细胞因子、IFN- γ 、IL-2或TNF- α) 或免疫细胞 (例如,T细胞,CD8+T细胞,细胞毒性T细胞和/或CD4+T细胞) 的数量增加至少10%,20%,30%,40%,50%,60%,70%,80%,90%,100%,2倍,3倍,5倍,10倍,20倍或50倍。在一些实施方案中,本文所述的方法可以将CD107a脱粒增加至少10%,20%,30%,40%,50%,60%,70%,80%,90%,100%,2倍,3倍,5倍,10倍,20倍或50倍。在一些实施方案中,如本文所述的方法可以将特异性靶向癌细胞或识别本文所述的肽的CD8+效应T细胞的数量 (例如,CD8+效应T细胞的总数,或例如CD45+细胞中CD8+的百分比) 增加至少50%,60%,70%,80%,90%,100%,2倍,3倍,5倍,10倍,20倍或50倍。

[0292] 纳米颗粒

[0293] 本公开内容进一步提供了纳米颗粒或纳米载体,其包含一个或多个如本文所述的肽 (例如,SEQ ID NO:1-17) 或一个或多个如本文所述的多核苷酸 (例如,编码SEQ ID NO:1-17的序列)。在一些情况中,纳米载体包含与SEQ ID NO:1-17的氨基酸序列相同但具有1-4个氨基酸取代的肽。在某些情况中,取代是在位置1、2和9的一处或多处。编码此类肽的多核苷酸 (例如,mRNA,DNA) 也可以被包裹在纳米载体中。可以将纳米颗粒或纳米载体施用于有此需要的受试者以诱导免疫应答。

[0294] 肽可以通过各种附着机制附着于纳米颗粒或纳米载体。此附着机制可以是静电吸

引、共价偶联或疏水相互作用。在一些实施方案中,纳米颗粒可以加载有佐剂。佐剂可以是树突细胞靶向分子,例如Toll样受体激动剂,例如R-848(其认为是TLR7/TLR8的有效合成激动剂),或者未甲基化的CpG寡脱氧核苷酸(它是一种TLR-9免疫刺激性激动剂)或单磷酸脂质A(它是TLR-4的免疫刺激性激动剂),或内体膜靶向剂,例如Endo-Porter肽。

[0295] 形成纳米颗粒的聚合物可以是任何可生物降解或不可生物降解的合成或天然聚合物。优选地,聚合物是可生物降解的聚合物。有用的可生物降解的聚合物的例子包括聚乳酸(PLA)、聚乙醇酸(PGA)或聚(乳酸-共-乙醇酸)(PLGA)。这些聚合物具有建立的安全性记录,并且可以用于人受试者(Jiang, et al., Adv. Drug Deliv. Rev., 57(3):391-410, 2005; Aguado and Lambert, Immunobiology, 184(2-3):113-25, 1992; Bramwell, et al., Adv. Drug Deliv. Rev., 57(9):1247-65, 2005)。其他两亲性聚(氨基酸)纳米颗粒、两亲性多糖纳米颗粒或聚离子纳米颗粒可用于本文公开的疫苗组合物中(参见Akagi et al., Adv. Polym. Sci. 247:31-64, 2012)。前述聚合物可以单独、作为物理混合物或通过形成共聚物使用。在某些实施方案中,纳米颗粒由聚(乳酸-共-乙醇酸)-嵌段-聚(L-组氨酸)-嵌段-聚(乙二醇)(PLGA-PLH-PEG)三嵌段共聚物;PLGA-PEG二嵌段共聚物和PLA的混合物形成。这些共聚物可以使用标准技术合成。例如,可以使用嵌段末端接枝策略来合成共聚物PLGA-PLH-PEG。

[0296] 如本文所用,“纳米颗粒”是在500nm至0.5nm之间,例如具有在50至500nm之间的直径,具有在100至400nm之间的直径或具有在200至400nm之间的直径的范围内的颗粒。

[0297] 纳米颗粒以及如何制备和使用纳米颗粒在本领域中是已知的,并且例如在US 2016/0008451, US 2010/0129439, US2018/0021258中进行了描述,每篇通过引用整体并入本文。在一些实施方案中,纳米颗粒是脂质体。在一些实施方案中,纳米颗粒是聚合物颗粒。

[0298] 形成纳米颗粒的聚合物可以是任何可生物降解或不可生物降解的合成或天然聚合物。在一些实施方案中,聚合物是可生物降解的聚合物。有用的可生物降解的聚合物的例子包括聚乳酸(PLA)、聚乙醇酸(PGA)或聚(乳酸-共-乙醇酸)(PLGA)。这些聚合物具有建立的安全性记录,并且可用于人受试者(Jiang, et al., Adv. Drug Deliv. Rev., 57(3):391-410, 2005; Aguado and Lambert, Immunobiology, 184(2-3):113-25, 1992; Bramwell, et al., Adv. Drug Deliv. Rev., 57(9):1247-65, 2005)。其他两亲性聚(氨基酸)纳米颗粒、两亲性多糖纳米颗粒或聚离子纳米颗粒可用于本文公开的组合物中(参见Akagi et al., Adv. Polym. Sci. 247:31-64, 2012)。

[0299] 这些聚合物可以单独、作为物理混合物或通过形成共聚物使用。在一些实施方案中,纳米颗粒由聚(乳酸-共-乙醇酸)-嵌段-聚(L-组氨酸)-嵌段-聚(乙二醇)(PLGA-PLH-PEG)三嵌段共聚物;PLGA-PEG二嵌段共聚物和PLA的混合物形成。这些共聚物可以使用标准技术合成。例如,可以使用嵌段末端接枝策略来合成共聚物PLGA-PLH-PEG。线性结构(例如,PLGA-PLH-PEG)可以为纳米颗粒提供与延长的循环和电荷介导的靶向相容的几个特征。

[0300] 在一些实施方案中,可以使用天然聚合物。天然聚合物的实例包括藻酸盐和其他多糖、胶原蛋白、白蛋白和其他亲水蛋白、玉米醇溶蛋白和其他谷醇溶蛋白和疏水蛋白、其共聚物和混合物。通常,这些材料通过酶水解或体内暴露于水、或通过表面或整体(bulk)侵蚀而降解。

[0301] 其他合适的可生物降解的聚合物包括但不限于聚(羟基酸),例如乳酸和乙醇酸的

聚合物和共聚物、聚酸酐、聚(原酸)酯、聚酯、聚氨酯、聚(丁酸)、聚((戊酸)、聚(己内酯)、聚(羟基链烷酸酯)和聚(丙交酯-共-己内酯)。

[0302] 聚合物可以是亲水或疏水的生物粘附聚合物。亲水聚合物包括CARBOPOL™(高分子量,交联的丙烯酸基聚合物,由Noveon制造)、聚卡波非、纤维素酯和右旋糖酐。

[0303] 这些聚合物可得自诸如Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.; Polysciences, Warrenton, Pa.; Aldrich, Milwaukee, Wis.; Fluka, Ronkonkoma, N.Y.; 和BioRad, Richmond, Calif的来源,或者可以使用标准技术从自这些或其他供应商处获得的单体合成。

[0304] 传统上已知极其多种聚合物和从其形成聚合物基质的方法。通常,聚合物基质包含一个或多个聚合物。聚合物可以是天然或非天然(合成)聚合物。聚合物可以是包含两种或更多种单体的均聚物或共聚物。就序列而言,共聚物可以是无规、嵌段或包含无规和嵌段序列的组合。通常,根据本发明的聚合物是有机聚合物。

[0305] 适用于本文所述组合物中的聚合物的实例包括但不限于聚乙烯、聚碳酸酯(例如聚(1,3-二恶烷-2酮)(poly(1,3-dioxan-2-one)))、聚酸酐(例如聚(癸二酸酐))、聚延胡索酸丙酯、聚酰胺(例如,聚己内酰胺)、聚缩醛、聚醚、聚酯(例如聚丙交酯、聚乙交酯、聚丙交酯-共-乙交酯、聚己内酯、聚羧基酸(例如聚(-羟基链烷酸酯)))、聚(原酸酯)、聚氰基丙烯酸酯、聚乙烯醇、聚氨酯、聚磷腈、聚丙烯酸酯、聚甲基丙烯酸酯、聚脲、聚苯乙烯和多胺、聚赖氨酸、聚赖氨酸-PEG共聚物和聚(乙烯亚胺)、聚(乙烯亚胺)-PEG共聚物。

[0306] 在一些实施方案中,根据本发明的聚合物包括美国食品和药物管理局(FDA)在21C.F.R. §177.2600下批准用于人的聚合物,包括但不限于聚酯(例如,聚乳酸、聚(乳酸-共-乙醇酸)、聚己内酯、聚戊内酯、聚(1,3-二恶烷-2酮));聚酸酐(例如聚(癸二酸酐));聚醚(例如聚乙二醇);聚氨酯;聚甲基丙烯酸酯;聚丙烯酸酯和聚氰基丙烯酸酯。

[0307] 在一些实施方案中,聚合物可以是亲水的。例如,聚合物可包含阴离子基团(例如磷酸根基团、硫酸根基团、羧酸根基团);阳离子基团(例如季胺基团);或极性基团(例如,羟基、硫醇基、胺基)。在一些实施方案中,聚合物可以是疏水的。聚合物的亲水性或疏水性的选择可对在合成纳米颗粒内掺入(例如,偶联)的材料性质具有影响。

[0308] 在一些实施方案中,聚合物可以用一个或多个部分和/或官能团修饰。根据本发明,可以使用多种部分或官能团。在一些实施方案中,可以用聚乙二醇(PEG)、碳水化合物和/或衍生自多糖的无环聚缩醛(Papisov, 2001, ACS Symposium Series, 786:301)对聚合物进行修饰。可以使用Gref等人的美国专利号5,543,158或Von Andrian等人的W0公开W02009/051837的一般教导来完成某些实施方案。

[0309] 在一些实施方案中,可以用脂质或脂肪酸基团修饰聚合物。在一些实施方案中,脂肪酸基团可以是以下一种或多种:丁酸、己酸、辛酸、癸酸、月桂酸、肉豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸、花生酸、山酸或木蜡酸。在一些实施方案中,脂肪酸基团可以是以下一种或多种:棕榈油酸、油酸、异油酸、亚油酸、 α -亚油酸、 γ -亚油酸、花生四烯酸、鳕烯酸、花生四烯酸、二十碳五烯酸、二十二碳六烯酸或芥酸。

[0310] 在一些实施方案中,聚合物可以是聚酯,包括共聚物,其包含乳酸和乙醇酸单元,例如聚(乳酸-共-乙醇酸)和聚(丙交酯-共-乙交酯),在本文中统称为“PLGA”;和均聚物,其包含乙醇酸单元,在本文中称为“PGA”和乳酸单元如聚-L-乳酸、聚-D-乳酸、聚-D,L-乳酸、聚-L-丙交酯、聚-D-丙交酯和聚-D,L-丙交酯,在本文中统称为“PLA”。在一些实施方案中,

示例性聚酯包括例如聚羟基酸;PEG共聚物和丙交酯和乙交酯的共聚物(例如PLA-PEG共聚物、PGA-PEG共聚物、PLGA-PEG共聚物及其衍生物。在一些实施方案中,聚酯包括例如聚(己内酯)、聚(己内酯)-PEG共聚物、聚(L-丙交酯-共-L-赖氨酸)、聚(丝氨酸酯)、聚(4-羟基-L-脯氨酸酯)、聚[α -(4-氨基丁基)-L-乙醇酸]及其衍生物。可以通过改变乳酸:乙醇酸比率来调节PLGA的降解速率。在一些实施方案中,要根据本发明使用的PLGA的特征在于乳酸:乙醇酸的比率为约85:15、约75:25、约60:40、约50:50、约40:60、约25:75或约15:85。

[0311] 在一些实施方案中,聚合物可以是一个或多个丙烯酸聚合物。在某些实施方案中,丙烯酸聚合物包括例如丙烯酸和甲基丙烯酸共聚物、甲基丙烯酸甲酯共聚物、甲基丙烯酸乙氧基乙酯、甲基丙烯酸氰乙酯、甲基丙烯酸氨基烷基酯共聚物、聚(丙烯酸)、聚(甲基丙烯酸)、甲基丙烯酸烷基酰胺共聚物、聚(甲基丙烯酸甲酯)、聚(甲基丙烯酸酐)、甲基丙烯酸甲酯、聚甲基丙烯酸酯、聚(甲基丙烯酸甲酯)共聚物、聚丙烯酰胺、甲基丙烯酸氨基烷基酯共聚物、甲基丙烯酸缩水甘油酯共聚物、聚氰基丙烯酸酯和包含一个或多个前述聚合物的组合。丙烯酸聚合物可包含具有低含量季铵基团的丙烯酸和甲基丙烯酸酯的全聚合共聚物。

[0312] 在一些实施方案中,聚合物可以是阳离子聚合物。通常,阳离子聚合物能够缩合和/或保护核酸的带负电荷的链(例如DNA或其衍生物)。含胺的聚合物,例如聚(赖氨酸)(Zauner et al., 1998, Adv. Drug Del. Rev., 30:97;和Kabanov et al, 1995, Bioconjugate Chem., 6:7)、聚(乙烯亚胺(PEI; Boussif et al, 1995, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 1995, 92:7297)和聚(酰胺基胺)树枝状聚合物(Kukowska-Latallo et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 93:4897; Tang et al., 1996, Bioconjugate Chem., 7:703;和Haensler et al, 1993, Bioconjugate Chem., 4:372)在生理pH下带正电,与核酸形成离子对,并介导多种细胞系中的转染。

[0313] 在一些实施方案中,聚合物可以是带有阳离子侧链的可降解聚酯(Putnam et al, 1999, Macromolecules, 32:3658; Barrera et al, 1993, J. Am. Chem. Soc, 115:11010; Kwon et al, 1989, Macromolecules, 22:3250; Lim et al, 1999, J. Am. Chem. Soc, 121:5633;和Zhou et al., 1990, Macromolecules, 23:3399)。这些聚酯的实例包括聚(L-丙交酯-共-L-赖氨酸)(Barrera et al, 1993, J. Am. Chem. Soc, 115:11010)、聚(丝氨酸酯)(Zhou et al, 1990, Macromolecules, 23:3399)、聚(4-羟基-L-脯氨酸酯)(Putnam et al, 1999, Macromolecules, 32:3658;和Lim et al, 1999, J. Am. Chem. Soc, 121:5633)和聚(4-羟基-L-脯氨酸酯)(Putnam et al, 1999, Macromolecules, 32:3658;和Lim et al, 1999, J. Am. Chem. Soc, 121:5633)。

[0314] 这些和其他聚合物的性质及其制备方法是本领域公知的(参见例如美国专利6,123,727;5,804,178;5,770,417;5,736,372;5,716,404;6,095,148;5,837,752;5,902,599;5,696,175;5,514,378;5,512,600;5,399,665;5,019,379;5,010,167;4,806,621;4,638,045;和4,946,929;Wang et al, 2001, J. Am. Chem. Soc, 123:9480;Lim et al, 2001, J. Am. Chem. Soc, 123:2460;Langer, 2000, Acc. Chem. Res., 33:94;Langer, 1999, J. Control. Release, 62:7;和Uhrich et al, 1999, Chem. Rev., 99:3181)。更一般地,用于合成某些合适的聚合物的多种方法记载于Concise Encyclopedia of Polymer Science and Polymeric Amines and Ammonium Salts, Goethals编, Pergamon Press, 1980; Principles of Polymerization, Odian, John Wiley & Sons, 第四版, 2004; Contemporary Polymer

Chemistry, Allcock et al, Prentice-Hall, 1981; Deming et al., 1997, Nature, 390:386; 和美国专利6,506,577, 6,632,922, 6,686,446和6,818,732。前述每篇通过引用整体并入本文。

[0315] 在一些实施方案中,聚合物可以是线性或支化聚合物。在一些实施方案中,聚合物可以是树枝状聚合物。在一些实施方案中,聚合物可以彼此基本上交联。在一些实施方案中,聚合物可以基本上没有交联。在一些实施方案中,可根据本发明使用聚合物而无需经历交联步骤。还应理解,本发明的合成纳米颗粒可包含任何前述聚合物和其他聚合物的嵌段共聚物、接枝共聚物、共混物、混合物和/或加合物。本领域技术人员将认识到,本文列出的聚合物代表了可根据本发明使用的聚合物的示例性而非全面列表。

[0316] 在一些实施方案中,合成纳米颗粒可以任选地包含一个或多个两亲实体。在一些实施方案中,两亲实体可以促进具有增加的稳定性、改善的均匀性或增加的粘度的合成纳米颗粒的产生。在一些实施方案中,两亲实体可以与脂质膜的内表面(例如,脂质双层,脂质单层等)缔合。本领域已知的许多两亲实体适合用于制备根据本发明的合成纳米颗粒。此类两亲实体包括但不限于磷酸甘油酯;磷脂酰胆碱;二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC);二油基磷脂酰乙醇胺(DOPE);二油酰氧基丙基三乙铵(DOTMA);二油酰基磷脂酰胆碱;胆固醇;胆固醇酯;二酰基甘油;二酰基甘油琥珀酸酯;二磷脂酰甘油(DPPG);己癸醇;脂肪醇,如聚乙二醇(PEG);聚氧乙烯-9-月桂基醚;表面活性脂肪酸,如棕榈酸或油酸;脂肪酸;脂肪酸甘油单酯;脂肪酸甘油二酯;脂肪酸酰胺;三油酸山梨坦(Span®85)甘胆酸盐;月桂山梨坦(Span®20);Polysorbate 20(Tween®20);Polysorbate 60(Tween®60);Polysorbate 65(Tween®65);Polysorbate 80(Tween®80);Polysorbate 85(Tween®85);聚氧乙烯单硬脂酸酯;枯草菌表面活性素(surfactin);poloxomer;脱水山梨糖醇脂肪酸酯,例如脱水山梨糖醇三油酸酯;卵磷脂;溶血卵磷脂;磷脂酰丝氨酸;磷脂酰肌醇;鞘磷脂;磷脂酰乙醇胺(脑磷脂);心磷脂;磷脂酸;脑苷脂;磷酸鲸蜡酯(dicetylphosphate);二棕榈酰磷脂酰甘油;硬脂胺;十二烷胺;十六烷胺;棕榈酸乙酯;蓖麻油酸甘油酯;硬脂酸十六酯;肉豆蔻酸异丙酯;泰洛沙泊;聚(乙二醇)5000-磷脂酰乙醇胺;聚(乙二醇)400-单硬脂酸酯;磷脂;具有高表面活性剂性质的合成和/或天然洗涤剂;脱氧胆酸盐;环糊精;离液盐;离子配对剂;及其组合。两亲实体组分可以是不同两亲实体的混合物。本领域技术人员将认识到,这是具有表面活性剂活性的物质的示例性而非全面列表。任何两亲实体都可以用于生产要根据本发明使用的合成纳米颗粒。

[0317] 在一些实施方案中,合成纳米颗粒可任选地包含一个或多个碳水化合物。碳水化合物可以是天然的或合成的。碳水化合物可以是衍生化的天然碳水化合物。在某些实施方案中,碳水化合物包含单糖或二糖,包括但不限于葡萄糖、果糖、半乳糖、核糖、乳糖、蔗糖、麦芽糖、海藻糖、纤维素二糖、甘露糖、木糖、阿拉伯糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、甘露糖醛酸、葡萄糖胺、半乳糖胺和神经氨酸。在某些实施方案中,碳水化合物是多糖,包括但不限于支链淀粉(pullulan)、纤维素、微晶纤维素、羟丙基甲基纤维素(HPMC)、羟纤维素(HC)、甲基纤维素(MC)、右旋糖酐、环状糊精、糖原、羟乙基淀粉、角叉菜胶(carageenan)、糖基、直链淀粉、壳聚糖、N,O-羧甲基壳聚糖、藻胶和海藻酸、淀粉、几丁质、菊粉、魔芋(konjac)、葡甘露聚糖、石耳素、肝素、透明质酸、可德兰多糖(curdlan)和黄原胶。在实施方案中,本发明的合成

纳米颗粒不包含(或明确地排除)碳水化合物,例如多糖。在某些实施方案中,碳水化合物可包含碳水化合物衍生物,例如糖醇,包括但不限于甘露醇、山梨糖醇、木糖醇、赤藓醇、麦芽糖醇和拉克替醇。

[0318] 在一些实施方案中,纳米颗粒包含肽,该肽包含SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:16所示的序列(例如,SEQ ID NO:13)。在某些情况中,本文公开的纳米颗粒可以与下文所述的另一种疗法(例如,基于APC的疗法、基于CTL的疗法、肽疫苗疗法)组合施用。在一些情况中,可以与免疫激动剂(例如,抗OX40抗体;抗GITR抗体)、检查点抑制剂(例如,抗LAG3抗体)和/或来那度胺组合对人受试者施用本文公开的纳米颗粒。

[0319] 基于抗原呈递细胞(APC)的免疫疗法

[0320] 在受试者中诱导免疫应答的离体策略可以牵涉使从受试者获得的合适的抗原呈递细胞(例如树突细胞、单核细胞(monocyte)或巨噬细胞)与本文所述的任何肽接触。或者,可用编码一个或多个肽的核酸(例如表达载体)转染细胞,并任选地在允许肽表达的条件下培养一段时间。转染方法将取决于细胞的类型和被转染到细胞中的核酸。接触或转染后,随后将细胞返回到受试者。

[0321] 细胞可以是表达MHC I或II类分子的一大批类型中的任一种。例如,细胞可包括骨髓细胞、巨噬细胞、单核细胞、树突细胞、T细胞(例如,T辅助细胞、CD4+细胞、CD8+细胞或细胞毒性T细胞)或B细胞。

[0322] 因此,本公开内容提供了包含APC(例如树突细胞)的组合物,其中所述APC在其表面上呈递肽序列,其中肽序列包含BCMA抗原(SEQ ID NO:18)和TACI抗原(SEQ ID NO:19)之一或两者的至少一个主要组织相容性复合体(MHC) I类或II类肽表位。在一些实施方案中,APC是树突细胞。在一些实施方案中,MHC肽表位是MHC I类肽表位(例如,HLA-A2或HLA-A24肽表位)。在一些实施方案中,APC通过暴露于包含肽序列的合成肽而在体外获得肽序列。

[0323] 在任何离体方法的一些实施方案中,可使自受试者或自受试者以外的相同物种的受试者(同种异体)获得的细胞与试剂(或免疫原性/抗原性组合物)接触并对受试者施用。

[0324] 在一些实施方案中,组合物包含至少 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、或 10^9 个APC(例如树突细胞)。在一些实施方案中,组合物包含小于 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、或 10^{10} 个APC(例如树突细胞)。

[0325] a. 抗原呈递细胞的制备

[0326] 适合于对受试者(例如,多发性骨髓瘤患者)施用的抗原呈递细胞(APC)如树突细胞(DC)可以从发现此类细胞的任何组织中分离或获得,或者可以以其它方式培养并且提供。例如,APC(例如DC)可以在哺乳动物的骨髓或外周血单个核细胞(PBMC),哺乳动物的脾脏中或哺乳动物的皮肤中(即在皮肤中可以找到朗格汉斯细胞,其拥有与DC的特质类似的某些特质)中找到。例如,可以从哺乳动物中收获骨髓,然后在促进DC生长的培养基中培养。GM-CSF、IL-4和/或其他细胞因子(例如TNF- α)、生长因子和补充剂可以包含在此培养基中。在含有适当细胞因子(例如,适合于将DC扩增和分化为成熟DC,例如4、6、8、10、12或14天)的培养基中培养适当的时间量后,在存在感兴趣的抗原的情况下(例如,在存在BCMA或TACI的一个或多个肽表位,或SEQ ID NO:13-17的至少两个肽的组合的情况下)培养DC簇,并使用标准技术收获以用于癌症疫苗。抗原(例如,分离或纯化的肽或合成肽)可以以每种抗原1 μ g/ml-50 μ g/ml(例如每种抗原2、5、10、20、30或40 μ g/ml)的浓度添加到培养物。

[0327] 在一些实施方案中,自受试者(例如,人)分离APC。使用白细胞单采术(leukapheresis)(例如,使用COBE Spectra Apheresis System)从血液中分离单个核细胞。通过在组织培养瓶中于37℃温育2小时,使单个核细胞粘附。通过洗涤除去非粘附细胞。在添加有粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)(800单位/ml,临床级,Immunex,Seattle,Wash.)和白介素4(IL-4)(500单位/ml,R&D Systems,Minneapolis,Minn.)的培养基中培养粘附细胞达五天。在第五天,将TNF- α 添加到培养基,再持续3-4天。在第8或9天,收获细胞并洗涤,并与肽抗原在组织旋转器上温育16-20小时。将肽抗原以约10 μ g/ml(每种抗原)的浓度添加到培养物中。

[0328] 如本领域技术人员将认识到的,可以使用各种其他方法来分离APC。DC在它们驻留的所有组织中少量存在,需要DC的分离和富集。常规使用许多需要重复密度梯度分离、荧光激活细胞分选技术、正选择、负选择或其组合的程序的任一种来获得分离的DC的富集体。关于用于分离DC的此类方法的引导可以参见O'Doherty,U. et al.,J.Exp.Med.,178:1067-1078,1993;Young and Steinman,J.Exp.Med.,171:1315-1332,1990;Freudenthal and Steinman,Proc.Nat.Acad.Sci.USA,57:7698-7702,1990;Macatonia et al.,Immunol.,67:285-289,1989;Markowicz and Engleman,J.Clin.Invest.,85:955-961,1990;Mehta-Damani et al.,J.Immunol.,153:996-1003,1994;和Thomas et al.,J.Immunol.,151:6840-6852,1993。一种从人外周血中分离DC的方法记载于美国专利No.5,643,786。

[0329] 根据本文描述的方法制备的树突细胞以比暴露于肿瘤裂解物(例如神经肿瘤裂解物)的树突细胞上存在的表位更高的平均密度呈现与抗原相对应的表位。抗原呈递细胞上一个或多个抗原的相对密度可以通过间接和直接手段两者测定。未处理的动物的初次免疫应答与抗原呈递细胞的抗原密度大致成正比(Bullock et al.,J.Immunol.,170:1822-1829,2003)。因此,可以通过用每个群体免疫动物,分离B或T细胞,并通过例如四聚体测定法、ELISPOT或定量PCR监测针对特定抗原的特异性免疫应答,来估计两个抗原呈递细胞群体之间的相对抗原密度。

[0330] 相对抗原密度也可以直接测量。在一种方法中,抗原呈递细胞用与MHC-抗原复合物特异性结合的抗体染色,然后分析细胞以测定与每个细胞结合的抗体的相对量(参见例如Gonzalez et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,102:4824-4829,2005)。分析抗体结合的示例性方法包括流式细胞术和荧光激活细胞分选。分析结果可以报告为例如对于个别MHC-抗原复合物染色呈阳性的细胞比例或每个细胞的平均染色相对量。在一些实施方案中,可以创建每个细胞的相对染色量的直方图。

[0331] 在一些实施方案中,可以通过对与MHC结合的肽的直接分析,例如通过质谱法直接测量抗原密度(参见例如Purcell and Gorman,Mol.Cell.Proteomics,3:193-208,2004)。通常,通过几种方法之一分离MHC结合的肽。在一种方法中,通常在超滤以富集小肽后分析抗原呈递细胞的细胞裂解物(参见例如Falk et al.,J.Exp.Med.,174:425-434,1991;Rotzshke et al.,Nature,348:252-254,1990)。在另一种方法中,MHC结合的肽直接在细胞表面分离,例如通过酸洗脱(参见例如Storkus et al.,J.Immunother.,14:94-103,1993;Storkus et al.,J.Immunol.,151:3719-27,1993)。在另一种方法中,从抗原呈递细胞裂解物中免疫亲和纯化MHC-肽复合物,然后通过酸处理洗脱MHC结合的肽(参见例如Falk et al.,Nature,351:290-296)。分离MHC结合的肽后,通常在分离步骤(例如液相层析、毛细管

凝胶电泳或二维凝胶电泳)之后通过质谱法分析肽。可以使用质谱法既鉴定又定量个别肽抗原,以测定抗原呈递细胞群体中每种抗原的相对平均比例。在一些方法中,使用一个群体的稳定同位素标记,随后通过质谱法比较两个抗原呈递细胞群体中肽的相对量(参见 Lemmel et al., Nat. Biotechnol., 22:450-454, 2004)。

[0332] b. 抗原呈递细胞的施用

[0333] 基于APC的癌症疫苗可以通过任何合适的递送途径递送至患者或测试动物,所述递送途径可以包括注射、输注、接种、直接手术递送或其任意组合。在一些实施方案中,在三角肌区域或腋窝区域中对人施用癌症疫苗。例如,将疫苗作为皮内注射剂施用到腋窝区域中。在一些实施方案中,静脉内施用疫苗。

[0334] 本领域技术人员可以通过常规技术选择用于施用细胞的合适载体。例如,药物载体可以是缓冲盐溶液,例如细胞培养基,并且可以包括用于保存细胞存活力的DMSO。

[0335] 适合作为癌症疫苗施用于患者以实现本发明方法的APC的量以及此类施用的最方便的途径可以基于多种因素,疫苗本身的配制也可以如此。这些因素中的一些因素包括患者的身体特征(例如年龄、体重和性别)、肿瘤的物理特征(例如位置、大小、生长速度和可及性)以及正在结合整体治疗方案实施其他治疗方法(例如化学疗法和放射线疗法)的程度。尽管在实施本发明的方法来治疗疾病状况时应考虑多种因素,但是可以在约0.05mL至约2mL溶液(例如盐水)中在单次施用中对哺乳动物施用约 10^5 至约 10^8 个APC(例如 10^7 个APC)。取决于上述和其他因素,例如肿瘤病理的严重程度,可以进行额外的施用。在一个实施方案中,以两周的间隔进行约 10^6 个APC的约1至约5次施用。

[0336] DC疫苗接种可以伴有其他治疗。例如,接受DC疫苗接种的患者也可以同时接受化学疗法、放射和/或外科疗法。结合化学疗法使用DC疫苗接种治疗癌症的方法记载于Wheeler等人,美国专利公开文本No. 2007/0020297。在一些实施方案中,接受DC疫苗接种的患者已经接受了针对癌症的化学疗法、放射疗法和/或外科治疗。在一个实施方案中,如Yu和Akasaki, WO 2005/037995中所述,用COX-2抑制剂治疗接受DC疫苗接种的患者。

[0337] 基于T细胞的免疫疗法

[0338] 用于刺激免疫应答的离体方法还可以包括在体外使T细胞(例如,从受试者获得的淋巴细胞群体中)与表达与本文所述的肽之一结合的MHC分子的抗原呈递细胞(APC)接触一定时间量(且在一定的条件下),其足以激活T细胞(例如,细胞毒性T细胞和/或CD4+辅助T细胞)。因此,本公开内容提供了产生和/或增殖BCMA特异性和/或TACI特异性T细胞(例如,细胞毒性T细胞和/或CD4+辅助T细胞)的方法。方法牵涉使一个或多个T细胞(例如,细胞毒性T细胞和/或CD4+辅助T细胞)与一个或多个用如本文所述的肽脉冲的抗原呈递细胞接触。这些T细胞可以是细胞毒性T细胞,例如记忆细胞毒性T细胞、效应细胞毒性T细胞或CD4+辅助T细胞。

[0339] 活化的T细胞可用于杀死靶细胞。在一些实施方案中,方法牵涉使靶细胞与一个或多个BCMA特异性细胞毒性T细胞接触,其中靶细胞表达或过表达BCMA,并表达HLA-A。在一些实施方案中,方法牵涉使靶细胞与一个或多个TACI特异性细胞毒性T细胞接触,其中靶细胞表达或过表达TACI,并表达HLA-A。

[0340] 在一些实施方案中,将BCMA或TACI特异性T细胞(例如,细胞毒性T细胞和/或CD4+辅助T细胞)与本文公开的肽(例如,SEQ ID NO:13-17中的一种或多种)、呈递BCMA(例如SEQ

ID NO:13或14) 或TACI (SEQ ID NO:16) 肽的APC、来那度胺、免疫调节剂、检查点抑制剂(例如抗LAG3抗体) 或免疫激动剂(例如抗OX40, 抗GITR) 组合施用。在一些实施方案中, 与BCMA或TACI特异性CTL T细胞一起施用的另外的治疗剂是特异性结合PD-1、CTLA-4、LAG-3、BTLA、PD-L1、CD27、CD28、CD40、CD47、4-1BB (CD137)、CD154、TIGIT、TIM-3、GITR (CD357)、OX40、CD20、EGFR、或CD319的抗体(例如人抗体)。在一些实施方案中, 另外的治疗剂是抗OX40抗体、抗PD-L1抗体、抗PD-L2抗体、抗LAG-3抗体、抗TIGIT抗体、抗BTLA抗体、抗CTLA-4抗体或抗GITR抗体。在一些实施方案中, T细胞与免疫激动剂, 例如抗OX40或抗GITR抗体组合施用。

[0341] 活化的T细胞也可以重新引入获得细胞的受试者中。在一些实施方案中, T细胞可以从受试者以外的相同物种的受试者获得(同种异体), 可以与试剂(或免疫原性/抗原性组合物) 接触并施用于受试者。

[0342] 在一些实施方案中, 从患者衍生的外周血单个核细胞(PBMC) 中的体外诱导衍生T细胞。以下方案可用于从患者衍生的PBMC体外产生抗原特异性CTL。为了产生树突细胞, 将来自PBMC的塑性粘附细胞在补充有重组人GM-CSF和重组人IL-4的AIM-V培养基中于37°C在湿润的CO₂ (5%) 培养箱中培养。6天后, 为了成熟用重组人TNF- α 刺激培养物中的未成熟树突细胞。然后在第8天收获成熟的树突细胞, 以 1×10^6 /mL在具有肽(2 μ g/mL) 的情况下重悬于PBS中, 并在37°C温育2小时。使用磁性微珠(Miltenyi Biotech, Auburn, Calif.) 从PBMC中富集自体CD8+T细胞。在24孔组织培养板的每个孔中在2mL/孔的AIM-V培养基中将CD8+T细胞(每孔 2×10^6) 与每孔 2×10^5 个经肽脉冲的树突细胞共培养, 所述AIM-V培养基补充有5%人AB血清和10单位/mL rhIL-7 (Cell Sciences)。每次再刺激后2天, 24小时后定期添加约20U/ml的IL-2。在第七天, 在补充有5%人AB血清、rhIL-2和rhIL-7 (各10单位/mL) 的AIM-V培养基中, 用经肽脉冲的自体树突细胞再刺激淋巴细胞。每次再刺激后2天, 24小时后定期添加约20U/ml的IL-2。在第七天, 第三轮再刺激后收获细胞并测试CTL的活性。将经刺激的CD8+培养细胞(CTL) 与T2细胞(人TAP缺陷型细胞系) 共培养, 所述T2细胞用2 μ g/ml Her-2、gp100、AIM-2、MAGE-1或IL13受体 α 2肽脉冲。温育24小时后, 通过ELISA测定法测量培养基中的IFN- γ 。

[0343] 基于嵌合抗原受体(CAR) T细胞的免疫疗法

[0344] 本公开内容进一步提供了用于表达嵌合抗原受体的T细胞的过继转移以治疗癌症的方法。可以对CAR修饰的T细胞进行工程化改造, 以靶向几乎任何肿瘤相关抗原(例如BCMA和/或TACI)。通常, 对T细胞进行遗传工程化改造, 以表达特异性针对患者肿瘤细胞上抗原的CAR, 然后输注回患者中。

[0345] CAR的常见形式是与CD3-zeta跨膜域和胞内域融合的单链可变片段(scFv) 的融合物。scFV可以衍生自T细胞的抗原特异性受体(例如, BCMA特异性细胞毒性T细胞或TACI特异性细胞毒性T细胞) 或特异性结合抗原的抗体。

[0346] 在一些实施方案中, 例如通过测序来测定BCMA特异性细胞毒性T细胞或TACI特异性细胞毒性T细胞中的T细胞受体的序列。BCMA特异性细胞毒性T细胞和/或TACI特异性细胞毒性T细胞中T细胞受体的序列可用于产生CAR。

[0347] 在一些实施方案中, 从患者收集这些T细胞。在一些实施方案中, 自诱导的多能干细胞(iPSC) 获得这些T细胞。

[0348] 病毒载体诸如逆转录病毒、慢病毒或转座子通常用于将转基因(例如,CAR)整合到宿主细胞基因组中。或者,可以使用非整合载体如质粒或mRNA将CAR基因转移至T细胞,并在适当条件下使T细胞表达CAR。

[0349] 诱导的多能干细胞方法

[0350] 施用大量靶向肿瘤特异性抗原的离体扩增活化抗原特异性细胞毒性T淋巴细胞(CTL)的过继性T细胞疗法已诱导了选定恶性疾病中的持久缓解。尽管利用主要识别已经被加工并与MHC分子一起呈递为肽复合物的胞内抗原的TCR(Johnson et al.2009;Morgan et al.2006)可以进一步增强肿瘤的选择性,但是引入外源TCR基因可以导致转移的且内源的 α 和 β 链的错配,导致严重的自身免疫不利事件(Bendle et al.2010,Hinrichs et al.2013)。相反,CAR-T以非MHC限制性方式识别在细胞表面上表达的抗原。迄今为止,靶向B细胞抗原CD19的最成功的CAR-T疗法在复发性和化学难治性B细胞恶性疾病患者中实现了最小的残留疾病阴性完全响应(Kochenderfer et al.2010,Grupp et al.2013)。然而,正在进行的努力涉及使包括细胞因子释放综合征在内的不利效应最小化,并改善响应的持久性(Brentjens et al.2011,Kalos et al.2011,Kochenderfer et al.2012,Porter et al.2011)。重要的是,CTL在长期扩充过程中持续暴露于肿瘤抗原中,以用于基于TCR的或基于CAR的疗法,可能随着终末分化而丧失其增殖能力(“耗尽”)和其功能活性。

[0351] 为了克服这些限制,当前正在开发的技术是利用从“诱导多能干细胞(iPSC)”完全复苏的CTL。这些iPSC是一种特殊类型的多能细胞,其在异位表达一组限定的转录因子后自成本体的体细胞衍生。重要的是,可以通过iPSC技术从抗原特异性CTL重新编程肿瘤抗原特异性CTL(Vizcardo et al.2013,Ando et al.2015,Timmermans et al.2009,Kennedy et al.2012)。这些iPSC-CTL在功能上复苏,并表明比它们起源的初始CTL更长的端粒(增长1.5倍)和更高的增殖能力(增长5至50倍)(Nishimura et al.2013)。此种强大的重编程治疗方法具有明显提高抗原特异性癌症免疫疗法的功效和持久性的潜力。因此,本公开内容提供了复苏细胞毒性T细胞的方法。在一些实施方案中,方法可以将增殖能力提高至少5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90或100倍。

[0352] 肿瘤特异性CTL的激活是许多癌症免疫疗法的主要目标。从癌症患者中分离肿瘤特异性T细胞,体外制备(激活和扩增)以及将这些T细胞输注给患者是用T细胞的适应性免疫疗法的基本步骤。iPSC技术可用于改善过继细胞转移免疫疗法(ACT)的功效。

[0353] 可以从经由Yamanaka因子(Oct3/4、Sox2、Klf4和c-Myc的组合)逆转录病毒转染诱导的分化细胞(例如成纤维细胞、免疫细胞、T细胞、B细胞)中获得iPSC,并通过在Flt-3配体和IL-7之外在单层OP9-DL1细胞系统上培养它而分化为T细胞谱系。

[0354] 在一些实施方案中,可以从T细胞产生iPSC。扩增后,这些细胞再次分化为T细胞。人T淋巴细胞可起iPSC产生的细胞来源的作用。可通过白细胞单采术或静脉穿刺术从全血分离外周血单个核细胞(PBMC),然后可通过用IL-2和抗CD3抗体刺激扩增CD3+T细胞。当暴露于重编程因子的逆转录病毒转导时,可以从活化的T细胞产生T细胞衍生的iPSC(TiPS)。这些T-iPSC保留了其初始T细胞受体(TCR)基因重排,因此它们可以用作携带内源性肿瘤特异性TCR基因的造血干细胞的无限来源,用于癌症ACT疗法。

[0355] 因此,在一些实施方案中,从抗原特异性细胞毒性T细胞产生iPSC。这些抗原特异性T细胞通过如本文丧失的方法产生,例如,通过使一个或多个T细胞与一个或多个用包含

如本文所述的氨基酸序列(例如,SEQ ID NO:1-17)的肽脉冲的抗原呈递细胞接触。当T-iPSC保留其初始T细胞受体(TCR)基因重排时,在这些T-iPSC分化为T细胞后,这些T细胞可以识别癌细胞上的BCMA和/或TACI。

[0356] 在一些实施方案中,可以将编码特异性识别BCMA和/或TACI的CAR的核酸引入T-iPSC。这些T-iPSC分化为T细胞后,这些T细胞可以识别癌细胞上的BCMA和/或TACI。

[0357] 在一些实施方案中,将分化的T细胞施用于受试者。在一些实施方案中,将T-iPSC施用于受试者,然后将这些细胞在受试者身体内分化为细胞毒性T细胞。

[0358] 受试者

[0359] 受试者可以是能够产生针对抗原的免疫应答的任何动物。术语“受试者”和“患者”在整个说明书中可互换使用,并且描述了根据本公开内容的方法向其提供治疗的动物、人或非人。本发明考虑了兽医和非兽医应用。人患者可以是成年人类或青少年人(例如年龄18岁龄以下的人)。除人外,受试者包括但不限于小鼠、大鼠、仓鼠、豚鼠、兔、雪貂、猫、狗和灵长类。包括例如非人灵长类(例如猴、黑猩猩、大猩猩等)、啮齿类(例如大鼠、小鼠、沙鼠、仓鼠、雪貂、兔)、兔形目、猪(例如猪,迷你猪)、马、犬、猫、牛和其他家养、农场和动物园动物。

[0360] 受试者可以是患有,怀疑患有或有风险形成癌症的受试者。如本文所用,术语“癌症”指具有自主生长能力的细胞,即以快速增殖细胞生长为特征的异常状态或状况。该术语旨在包括所有类型的癌性生长或致癌过程、转移组织或恶性转化的细胞、组织或器官,而与组织病理学类型或侵入性阶段无关。如本文所用,术语“肿瘤”是指癌性细胞,例如大量癌细胞。可以使用本文所述的方法治疗或诊断的癌症包括各种器官系统的恶性疾病,例如影响肺、乳腺、甲状腺、淋巴样、胃肠道和生殖泌尿道,以及腺癌,包括恶性疾病,如大多数结肠癌、肾细胞癌、前列腺癌和/或睾丸肿瘤、非小细胞肺癌、小肠癌和食道癌。在一些实施方案中,本文所述的试剂设计用于治疗或诊断受试者中的癌症。术语“癌瘤”是本领域公认的,并且指上皮或内分泌组织的恶性疾病,包括呼吸系统癌、胃肠系统癌、泌尿生殖系统癌、睾丸癌、乳腺癌、前列腺癌、内分泌系统癌和黑素瘤。在一些实施方案中,癌症是肾癌或黑素瘤。示例性癌瘤包括从宫颈、肺、前列腺、乳腺、头和颈、结肠和卵巢的组织形成的那些。该术语还包括癌肉瘤,例如,包括由癌组织和肉瘤组织组成的恶性肿瘤。“腺癌”指从腺组织衍生或其中肿瘤细胞形成可识别的腺结构的癌瘤。术语“肉瘤”是本领域公认的,并且是指间充质衍生的恶性肿瘤。在一些实施方案中,受试者患有血液学癌症,例如多发性骨髓瘤、白血病、非何杰金淋巴瘤或何杰金淋巴瘤。

[0361] 在一些实施方案中,受试者患有表达/过表达BCMA的疾病或表达/过表达TACI的疾病,包括例如多发性骨髓瘤、B细胞相关的恶性疾病、浆细胞相关的恶性疾病、恶性前疾病(例如MM的恶变前疾病,例如SMM或MGUS)。在一些实施方案中,受试者可以是患有,怀疑患有或有风险形成浆细胞病症的受试者。如本文所用,术语“浆细胞病症”指以克隆浆细胞(PC)增殖和副蛋白(例如,单克隆免疫球蛋白和/或游离轻链(FLC)的分泌过多)为特征的一组疾病或病症。

[0362] 浆细胞病症的非限制性实例包括意义未明单克隆丙种球蛋白病(MGUS)、多发性骨髓瘤(MM)、**Waldenström**巨球蛋白血症(WM)、轻链淀粉样变性(AL)、孤立性浆细胞瘤(例如,孤立性骨浆细胞瘤或髓外浆细胞瘤)、多神经病、器官巨大症(organomegaly)、内分泌病、单克隆丙种球蛋白病和皮肤变化综合征(POEMS)以及重链疾病。其他浆细胞病症包括例

如肾意义的单克隆丙种球蛋白病 (Monoclonal Gammopathy of Renal Significance, MGRS)、MGUS 相关的神经病和其他副蛋白血症神经病。

[0363] MGUS, 郁积型MM (SMM) 和症状性MM 代表一批相同疾病。症状性或活动性多发性骨髓瘤的特征是在以下以外, 克隆浆细胞的超过10% BM 浸润和/或活组织检查证实的浆细胞瘤: 任何水平的单克隆蛋白和存在终末器官损伤, 其由任何CRAB 标准表中的骨髓瘤定义事件 (高血钙、肾功能不全、贫血或认为与浆细胞克隆有关的骨损伤) 组成, 或任何新的恶性疾病生物标志物 (BM 累及达等于或大于60% 克隆浆细胞; 累及相对于未累及的FLC 的比率等于或超过100; 和/或MRI 上存在超过一个骨损伤 (Kyle R.A. et al., *Leukemia*, 23:3-9 (2009); Rajkumar V.S. et al., *Lancet Oncology*, 15:12, 2014)。MM 是浆细胞恶性疾病, 其特征性牵涉广泛浸润骨髓 (BM), 偶尔形成浆细胞瘤, 作为BM 空间内部或外部的恶性浆细胞离散簇 (Kyle R.A. et al., *N. Engl. J. Med.*, 351:1860-73 (2004))。此种疾病的后果很多, 并且涉及多个器官系统。BM 和正常浆细胞功能的破坏导致贫血、白细胞减少症、低丙球蛋白血症和血小板减少症, 其不同地导致疲劳、感染易感性增加和不太常见地出血趋势增加。骨骼中的疾病参与产生溶骨性损伤, 产生骨疼痛, 并可以与高钙血症有关 (Kyle R.A. et al., *Blood*, 111:2962-72 (2008))。

[0364] 郁积型MM (SMM) 的特征是在骨髓中具有30g/L 或更高和/或10% 或更多的浆细胞的血清免疫球蛋白 (Ig) G 或IgA 单克隆蛋白, 但没有终末器官损害或恶性疾病定义生物标志物的证据 (Rajkumar et al., *Lancet*, 2014)。SMM 的自然史的研究表明, 有2种不同的类型: 进化性郁积型MM 和非进化性郁积型MM (Dimopoulos M. et al., *Leukemia*, 23 (9):1545-56 (2009))。进化性SMM 的特征在于M 蛋白的逐渐增加, 活动性多发性骨髓瘤前的较短的中值进展前时间 (TTP), 为1.3年。非进化性SMM 具有更稳定的M 蛋白, 其然后在进展为活动性多发性骨髓瘤时可能突然变化, 中值TTP 为3.9年。

[0365] 意义未明单克隆丙种球蛋白病 (MGUS) 是一种在标准实验室血液测试过程中在血液中发现异常免疫球蛋白 (称为副蛋白) 的疾病。MGUS 类似于多发性骨髓瘤和类似疾病, 但抗体水平较低, 骨髓中的浆细胞 (分泌抗体的白细胞) 数量较少, 并且它没有症状或重大问题。

[0366] 在一些实施方案中, 受试者患有多发性骨髓瘤、SMM 或MGUS。在一些实施方案中, 受试者可以是处于从多发性骨髓瘤缓解的受试者。在一些实施方案中, 受试者患有恶性前疾病 (例如, MM 的恶性前疾病, 例如SMM 或MGUS)。

[0367] 在一些实施方案中, 受试者可以患有表达或过表达BCMA 或TACI 的癌症。因此, 方法还可以包括以下步骤: 在对受试者施用一个或多个肽 (或核酸) 之前, 测定受试者的癌症 (例如, 多发性骨髓瘤) 的一个或多个癌细胞是否表达或过表达BCMA 或TACI。这些蛋白质的表达包括mRNA 和蛋白质表达两者。用于检测细胞中蛋白质和mRNA 表达的方法是本领域已知的, 包括例如酶联免疫吸附测定法 (ELISA)、western 印迹和点印迹技术或用于检测蛋白质的免疫组织化学技术和逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 或用于检测mRNA 的Northern 印迹技术。在一些实施方案中, 癌细胞中BCMA 或TACI 的平均表达水平比正常细胞 (例如, 同一受试者中的正常组织细胞, 同一受试者中的正常浆细胞或健康受试者中的组织细胞或浆细胞) 中BCMA 或TACI 的平均表达水平高至少20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%。在一些实施方案中, 癌细胞中BCMA 或TACI 的平均表达水平比正常细胞 (例如, 同一受试者中

的正常组织细胞,同一受试者中的正常浆细胞,或健康受试者中的组织细胞或浆细胞)中BCMA或TACI的平均表达水平高至少2倍,3倍,5倍,10倍,20倍或50倍。

[0368] 受试者可以患有,怀疑患有或有风险形成癌症(例如,多发性骨髓瘤)。“怀疑患有癌症”的受试者是具有一个或多个癌症症状的受试者。癌症的症状是本领域技术人员公知的,并且通常包括但不限于疼痛、体重减轻、虚弱、过度疲劳、进食困难、食欲不振、慢性咳嗽、恶化的呼吸困难、咳血、尿血、便血、恶心、呕吐、腹痛下坠(abdominal fullness)、胃气胀、腹腔积液、阴道出血、便秘、腹胀、结肠穿孔、急性腹膜炎(感染、发烧、疼痛)、疼痛、呕吐血、大量出汗、发烧、高血压、贫血、腹泻、黄疸、头晕、发冷、肌肉痉挛,吞咽困难等。多发性骨髓瘤的症状特别包括例如骨痛(例如,背部或肋骨中)、血液中钙水平高、过度口渴或排尿、便秘、恶心、食欲不振、意识错乱、腿部无力或麻木、体重减轻或反复感染。

[0369] 如本文所用,“有风险形成癌症”的受试者是具有形成癌症的素因,即形成癌症的遗传素因,例如肿瘤抑制基因中的突变(例如,BRCA1、p53、RB或APC中的突变),已经暴露于可导致癌症的条件或目前受到该条件影响的受试者。因此,受试者也可以是当受试者已经暴露于某些化合物(例如香烟烟雾中的致癌化合物,如丙烯醛、4-氨基联苯、芳香胺、苯(并)蒽、苯(并)芘、甲醛、胍、钋-210(氡),乌拉坦或氯乙烯)的诱变或致癌水平时“有风险形成癌症”的受试者。当受试者已暴露于例如大剂量的紫外线或X射线或暴露于(例如感染)致肿瘤/相关病毒(如乳头瘤病毒、埃巴病毒、乙型肝炎病毒或人T细胞白血病-淋巴瘤病毒)时,该受试者可以“有风险形成癌症”。另外,当受试者患有炎症(例如,慢性炎症)时,受试者可以“有风险形成癌症”。若例如受试者患有意义不明的单克隆丙种球蛋白病(MGUS),则受试者可以有风险形成多发性骨髓瘤。因此,应当理解的是,“怀疑患有癌症”或“有风险形成癌症”的受试者并非目的物种内的所有受试者。

[0370] 在一些实施方案中,方法还可包括测定受试者是否患有癌症的步骤。用于此类测定的合适方法取决于受试者中要检测的癌症类型,但是在本领域中是已知的。此类方法可以是定性的或定量的。例如,当受试者表现出多发性骨髓瘤的两种或更多种(例如,三、四、五或六种或更多种)症状(例如本文所述症状的任一种)时,医学从业人员可以诊断该受试者患有多发性骨髓瘤。也可以通过测量血液钙水平、白细胞或红细胞计数或受试者尿液中的蛋白质量来测定受试者患有多发性骨髓瘤。

[0371] MHC分子多聚体

[0372] 本公开内容还特征在于包含以下的组合物:(i) 本文所述的任何一个或多个肽,和(ii) 主要组织相容性复合物(MHC) 分子多聚体。多聚体包含两个或更多个(例如3、4、5、6、7、8、9、10个或更多)完整的MHC分子或MHC分子的肽结合区。一个或多个肽可以与MHC分子多聚体缔合(例如,共价或非共价结合)。

[0373] 多聚体的MHC分子可以是I类MHC分子(例如,HLA-A2分子)或II类MHC分子。MHC分子可以是哺乳动物(例如,啮齿类、非人灵长类、人或本文所述的任何其他哺乳动物)MHC分子。

[0374] 多聚体中的两个或更多个MHC分子(或MHC分子的肽结合区)可以来自相同的MHC分子或来自不同的MHC分子。例如,MHC分子多聚体可包含五个MHC分子,其中三个是相同的MHC分子,并且其中两个不同于前三个。在另一个实例中,多聚体的每个MHC分子是不同的。MHC分子中的至少一个可以结合至少一种肽。

[0375] 在一些实施方案中,以上组合物可包含本文中描述的任何肽中的至少两个(例如,

2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或15个或更多个)。

[0376] 组合物也可以与可检测标记物缔合。例如,多聚体的一个或多个MHC分子可以与可检测标记共价或非共价结合。还提供了合适的可检测标记物(例如酶、荧光材料、发光材料、生物发光材料或放射性核素),以及将可检测标记物连接到肽或MHC分子的方法。

[0377] 可以如下使用本文所述肽来产生MHC多聚体组合物:与HLA分子结合的肽在相应的HLA重链和 β 2-微球蛋白的存在下重折叠以产生三分子复合物。然后,在重链的羧基末端处在先前被工程化改造到重链中的位点处将复合物生物素化。然后,通过添加链霉亲和素诱导多聚体形成。

[0378] 由于T细胞受体能够识别极其多种其他肽-MHC复合物中靶细胞上的特定肽-MHC复合物,因此本文所述的MHC多聚体组合物可用于例如检测无关T细胞群体中的抗原特异性T细胞。对于此类测定法,多聚体通常会是可检测标记的。

[0379] 例如,多聚体MHC分子/肽复合物可用于测定法中,以在暴露于免疫原后对外周血单个核细胞评估抗原特异性CTL的存在。MHC多聚体复合物可用于直接显现抗原特异性CTL(参见例如Ogg et al., Science 279:2103-2106, 1998; and Altman et al., Science 174: 94-96, 1996)并测定外周血单个核细胞样本中抗原特异性CTL群体的频率。在一些实施方案中,用于使MHC多聚体多聚的可检测标记的链霉亲和素可以用于标记与多聚体的MHC分子/肽复合物结合的T细胞。为此,将用多聚体处理的细胞暴露于例如标记物(例如缀合至生物素的荧光团)。然后可以例如使用流式细胞术容易地分离或检测细胞。

[0380] 本文所述的肽(及其药物组合物)、含MHC多聚体的组合物、试剂盒和制品可用于多种方法。例如,肽可用于:(i)在受试者(例如患有癌症的受试者)中诱导免疫应答;(ii)激活培养中的T细胞;和/或(iii)治疗或预防癌症,例如多发性骨髓瘤。如本文所述,含MHC多聚体的组合物可用于例如检测无关T细胞群体中的抗原特异性T细胞。

[0381] 在受试者中产生抗体的方法

[0382] 产生对免疫原(例如,本文所述的任何肽中的一个或多个)特异性的抗体的方法是本领域已知的。例如,可以通过例如使用动物的免疫或通过体外方法例如噬菌体展示来产生对本文所述的肽特异性的抗体或抗体片段。本文所述的肽的全部或部分可用于产生抗体或抗体片段。

[0383] 可以使用肽通过用肽免疫合适的受试者(例如,兔、山羊、小鼠或其他哺乳动物,例如人)来制备抗体。合适的免疫原性制剂可包含例如本文所述的任何组合物。该制剂可以还包含佐剂,例如弗氏完全或不完全佐剂、明矾、RIBI或类似的免疫刺激剂。佐剂还包括例如霍乱毒素(CT)、大肠杆菌热不稳定性毒素(LT)、突变体CT(MCT)(Yamamoto et al. (1997) J. Exp. Med. 185:1203-1210)和突变体大肠杆菌热不稳定性毒素(MLT)(Di Tommaso et al. (1996) Infect. Immunity 64:974-979)。MCT和MLT包含点突变,相对于亲本分子而言,所述点突变实质性降低毒性,而没有实质性损害佐剂活性。用免疫原性肽制剂(例如,本文所述的任何组合物)免疫合适的受试者诱导多克隆抗肽抗体应答。在一些实施方案中,可以向受试者施用toll样受体-3配体(例如, Poly ICLC)、干扰素 α (IFN α)、干扰素 γ (IFN γ)或粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF),例如,以增强免疫应答。

[0384] 如本文所用,术语抗体是指免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子的免疫学活性部分(即,具有与肽(例如,本文所述的肽)特异性结合的抗原结合位点的分子)。与本文所述的肽

特异性结合的抗体是结合肽但基本上不结合样品中的其他分子的抗体。免疫球蛋白分子的免疫活性部分的实例包括例如,F(ab)片段、F(ab')₂片段或本文所述的任何其他抗体片段。

[0385] 通过本文所述的方法产生的分离的抗体或其抗原结合片段可以选择性结合SEQ ID NO:1-17中任一项的氨基酸序列内或与该氨基酸序列重叠的表位。抗体也可以是交叉阻断结合SEQ ID NO:1-17中任一项的氨基酸序列之内或与该氨基酸序列重叠的表位的抗体结合的抗体。通常,当抗体以小于 10^{-6} M的KD结合时,认为抗体与表位的结合是选择性的。如果必要的话,可以通过改变结合条件来减少非特异性结合,而基本上不影响选择性结合。“交叉阻断”的抗体或“交叉阻断抗体”是指当与表位(例如,包含在SEQ ID NO:1-17中的任一项内或与SEQ ID NO:1-17中的任一项重叠的表位)结合时,降低或消除第二抗体与肽结合的能力(相对于在没有第一抗体的情况中发生的第二抗体与肽结合)的第一抗体。应当理解,通过本文描述的方法产生的抗体(例如,对本文描述的一个或多个肽特异性的抗体)可用于例如检测表达BCMA或TACI的癌细胞,因此可用于本文描述的许多示例性的方法。

[0386] 免疫测试

[0387] 可以通过许多不同的测定法,例如四聚体测定法、ELISPOT和定量PCR来监测接种疫苗的受试者的抗原特异性细胞免疫应答。这些方法和方案记载于例如Current Protocols in Immunology,Coligan,J.等编(John Wiley&Sons,Inc.;New York,N.Y.)。

[0388] 四聚体测定法可用于检测和定量对血液样品中给定抗原特异性的T细胞。由与肽复合的重组MHC分子组成的四聚体可用于鉴定抗原特异性T细胞群体。为了检测对抗原特异性的T细胞,由Beckman Coulter(San Diego,Calif.)合成并提供含有来自这些抗原的肽的荧光染料标记的特异性肽四聚体复合物(例如藻红蛋白(PE)-tHLA)。将特异性CTL克隆CD8细胞以 10^5 个细胞/50 μ l FACS缓冲液(磷酸盐缓冲液加1%灭活的FCS缓冲液)重悬。在室温下将细胞与1 μ l tHLA一起温育30分钟,并在4℃与10 μ l抗CD8 mAb(Becton Dickinson, San Jose, Calif.)继续温育30分钟。将细胞在2ml冷FACS缓冲液中洗涤两次,然后通过FACS(Becton Dickinson)进行分析。

[0389] ELISPOT测定法可用于检测分泌细胞因子的细胞,例如,测定接种疫苗的患者中的细胞是否响应抗原而分泌细胞因子,从而证明是否已引发抗原特异性应答。ELISPOT测定试剂盒从R&D Systems(Minneapolis,Minn.)提供,并如制造商的说明描述进行操作。将来自疫苗接种之前和之后的响应者(R) 1×10^5 个患者PBMC细胞接种在96孔板中,该板具有用捕获Ab包被硝酸纤维素膜插入物。以1:1的R:S比率添加刺激(S)细胞(用抗原脉冲的TAP缺陷型T2细胞)。温育24小时后,通过将板洗涤4次除去细胞。将检测抗体添加到每个孔中。将板在4℃温育过夜,并且重复洗涤步骤。与链霉亲和素-AP温育2小时后,将板洗涤。将BCIP/NBT色原体的等分试样(100 μ l)添加到每个孔以形成斑点。60分钟后通过用水洗涤终止反应。使用计算机辅助图像分析(Cellular Technology Ltd,Cleveland,Ohio)对斑点进行扫描和计数。当实验值与针对非脉冲T2细胞的平均斑点数(背景值)显著不同时(如通过两尾Wilcoxon秩和检验测定),从实验值中减去背景值。

[0390] 定量PCR是评估免疫应答的另一种手段。为了通过定量PCR检查患者中的IFN- γ 产生,将来自患者的疫苗接种前和疫苗接种后样品的冻存的PBMC以及自体树突细胞在具有10%患者血清的RPMI DC培养基中融化,洗涤并计数。将PBMC以 3×10^6 个PBMC在24孔板中的2ml培养基中分配;将树突细胞以 1×10^6 /ml分配,并在24孔板的每个孔中以2ml的10 μ g/ml肿

瘤肽脉冲24小时。收集树突细胞,洗涤并计数,并稀释至 $1 \times 10^6/\text{ml}$,然后将 3×10^5 (即 $300 \mu\text{l}$ 溶液)添加至具有PBMC (DC:PBMC=1:10)的孔。每3-4天添加 $2.3 \mu\text{l}$ IL-2 (300IU/mL),并在培养开始后的第10天到第13天之间收获细胞。然后将收获的细胞用肿瘤细胞或用 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 肿瘤肽脉冲的自体PBMC在 37°C 刺激4小时。在第11-13天,收获培养物,洗涤两次,然后分为四个不同的孔,两个孔用于对照(无靶标);并且若可用肿瘤细胞,则另两孔与肿瘤细胞(1:1)共培养CTL。若不可用肿瘤细胞,则将 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 肿瘤裂解液添加到CTL中。刺激4小时后,收集细胞,提取RNA,并用热循环仪/荧光照相系统评估IFN- γ 和CD8 mRNA的表达。PCR扩增效率遵循自然对数进展,线性回归分析证明超过0.99的关联系数。基于经验分析,将1个循环差异解释为mRNA数量的两倍差异,并测定CD8标准化的IFN- γ 数量。相对于疫苗前的IFN- γ ,疫苗后的 >1.5 倍增加是I型阳性疫苗响应性的建立的标准。

[0391] 用于选择疗法的方法

[0392] 为患有癌症(例如浆细胞病症,如多发性骨髓瘤或任何表达或过表达BCMA或TACI的癌症)的受试者选择疗法的方法包括以下步骤:任选地,测定受试者的一个或多个癌细胞是否表达或过表达BCMA或TACI;并且若一个或多个细胞表达BCMA或TACI,则选择含有至少一种如本文所述肽(包含SEQ ID NO:1-17中任一项的氨基酸序列的肽,包含与SEQ ID NO:1-17至少50%,60%,70%,80%或90%相同的氨基酸序列的肽,或具有SEQ ID NO:1-17中任一项的氨基酸序列的不超过4个取代)的组合物作为受试者的疗法,条件是氨基酸序列能够:(i)在受试者中诱导免疫应答;(ii)与MHC分子结合;并且(iii)在MHC分子的背景下,被T细胞上的T细胞受体识别。

[0393] 在一些实施方案中,方法还包括测定受试者的一个或多个癌细胞是否表达MHC分子,例如MHC I类分子(例如HLA-A2)或MHC II类分子的步骤。

[0394] 应当理解,在受试者的癌症的一个或多个细胞(例如浆细胞)表达或过表达BCMA和TACI两者的情况中,可以将合适的肽的组合递送于受试者。例如,在测定受试者的癌症的一个或多个细胞(例如浆细胞)表达或过表达BCMA和TACI两者的情况中,用于选择疗法的方法可以包括选择以下项作为受试者的疗法:含有至少一种包含SEQ ID NO:1-6和13-14中任一项的氨基酸序列的肽的组合物和含有至少一种含有SEQ ID NO:7-12和15-17中任一项的氨基酸序列的肽的组合。

[0395] 测定一个或多个细胞是否表达BCMA、TACI和/或MHC分子的方法是本领域已知的。例如,可以使用通过本文描述的方法制备的BCMA和/或TACI特异性抗体来测试获自受试者的生物学样品(例如血液样品或淋巴结组织样品),以检测由细胞(细胞裂解物)表达的BCMA和TACI多肽的存在或量。用于对生物样品测定多肽的存在或含量的方法包括例如ELISA、免疫组织化学、流式细胞术、western印迹法或斑点印迹测定法。在一些实施方案中,本文描述的任何方法还可包括提供来自受试者的生物样品和/或自受试者获得生物样品的步骤。用于本文描述的方法的合适的生物样品包括任何生物流体、细胞、组织或其级份,其包括目的分析物蛋白。生物样品可以是例如从受试者获得的标本,或者可以从此类受试者衍生。例如,样品可以通过活组织检查获得的组织切片,或者是置于组织培养中或适于组织培养的细胞。生物样品也可以是含细胞的生物液体,例如尿液、血液、血浆、血清、唾液、精液、痰、脑脊液、泪液、粘液或抽吸物(例如肺或乳头抽吸物),或此类样品吸收到纸或聚合物基底上。若想要的话,可以将生物样品进一步分级成含有特定细胞类型的级份。例如,可以将血

液样品分级成血清或含有特定类型的血细胞(如红细胞或白细胞(白血球))的级份。若想要的话,样品可以是来自受试者的样品类型的组合,例如组织和生物流体的组合。

[0396] 生物样品可获自受试者,例如患有、怀疑患有或有风险形成癌症(例如,多发性骨髓瘤)的受试者。可以采用任何用于获得生物学样品的合适的方法,尽管示例性方法包括例如静脉切开术、拭子(例如颊拭子)、抽吸或细针抽吸活组织检查程序。易于进行细针抽吸的组织非限制性实例包括淋巴结、肺、甲状腺、乳房和肝脏。还可以例如通过显微解剖(例如,激光捕获显微解剖(LCM)或激光显微解剖(LMD))、膀胱洗液、涂片(PAP涂片)或导管灌洗来收集样品。

[0397] 医学从业人员还可以选择,规定和/或施用一个或多个其他治疗剂来治疗癌症,或者一个或多个药物来治疗抗癌剂的副作用。用于治疗多发性骨髓瘤的合适化学治疗剂包括例如美法仑、环磷酰胺、长春新碱、多柔比星、泼尼松、地塞米松、蛋白体抑制剂(例如硼替佐米)、沙利度胺或来那度胺。抗癌药的副作用包括例如贫血、胃肠道症状(例如恶心、呕吐、腹泻)、白细胞减少症(白细胞数量减少,其可以导致感染)、暂时性脱发或血小板减少症(例如血小板数量减少,其可以导致出血)。因此,医学从业人员可以规定或者对受试者施用化学治疗剂诸如长春新碱以及抗贫血药物诸如阿法依伯汀(epoetin alpha)(例如Procrit®或Epogen®)。

[0398] 核酸疫苗

[0399] 本公开内容提供了核酸疫苗(NAV),其包含编码一个或多个如本文所述的多肽的一个或多个多核苷酸,例如多核苷酸构建体。示例性的多核苷酸包括例如多核苷酸构建体,包括DNA、RNA、编码抗原的RNA多核苷酸,例如mRNA。在一些实施方案中,多核苷酸,例如编码抗原的RNA多核苷酸,可包括至少一种化学修饰。在一些实施方案中,可以将核酸疫苗配制在聚合物或脂质体纳米载体(例如,纳米颗粒)内。

[0400] 在一些实施方案中,佐剂或免疫增强剂也可以与一个或多个NAV一起或与一个或多个NAV组合施用。在一些实施方案中,佐剂作用为引发T细胞和/或B细胞和/或NK细胞的共信号。

[0401] NAV在其价上可以有所变化。价是指NAV或NAV多核苷酸(例如RNA多核苷酸)或多肽中抗原性成分的数目。在一些实施方案中,NAV是单价的。在一些实施方案中,NAV是二价的。在一些实施方案中,NAV是三价的。在一些实施方案中,NAV是多价的。多价疫苗可包含2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或更多种抗原或抗原部分(例如,抗原性肽等)。NAV的抗原性成分可以在单一多核苷酸上或在分开的多核苷酸上。

[0402] NAV可用作治疗剂或预防剂。提供它们以用于医学和/或用于引发免疫效应细胞,例如离体刺激/转染外周血单个核细胞(PBMC)并再输注活化的细胞。例如,可以对受试者施用本文所述的NAV,其中在体内翻译多核苷酸以产生抗原。提供了用于诊断、治疗或预防人和其他哺乳动物中的疾病或状况的组合物、方法、试剂盒和试剂。活性治疗剂可以包括NAV、含有NAV的细胞或从所述NAV中所含的多核苷酸翻译的多肽。

[0403] 本文提供了使用本文所述的NAV的多核苷酸在细胞、组织或生物体中诱导多肽(例如抗原或免疫原)翻译的方法。此类翻译可以在体内、离体、培养或体外。使细胞、组织或生物体与有效量的含有NAV的组合物接触,所述NAV含有多核苷酸,所述多核苷酸具有至少一个编码目的多肽(例如抗原或免疫原)的可翻译区。

[0404] 至少部分地基于靶组织、靶细胞类型、施用手段、多核苷酸的物理特性(例如,经修饰的核苷的大小和程度)和NAV的其他组分和其它决定因素来提供NAV组合物的“有效量”。通常,NAV组合物的有效量作为细胞中抗原产生的函数提供诱导的或增强的免疫应答,优选比含有编码相同抗原的相应未修饰的多核苷酸的组合物更有效。增加的抗原产生可以通过增加的细胞转染(即,用NAV转染的细胞的百分比)、增加的从多核苷酸的蛋白质翻译、降低的核酸降解(如例如通过从经修饰的多核苷酸的蛋白质翻译持续时间的增加证明),或宿主细胞的改变的先天免疫应答来证明。

[0405] 本公开内容还提供了在有此需要的哺乳动物受试者中诱导多肽抗原的体内翻译的方法。其中,使用本文所述的递送方法将有效量的含有多核苷酸的NAV组合物施用于受试者,所述多核苷酸具有至少一种结构或化学修饰和编码该多肽(例如,抗原或免疫原)的可翻译区。以一定量和在其他条件下提供多核苷酸,以使在细胞中翻译多核苷酸。多核苷酸定位于其中的细胞或存在细胞的组织可以用一轮或超过一轮的NAV施用来靶向。

[0406] 可以对本文描述的蛋白质进行工程化改造以在细胞内定位,潜在地在诸如细胞质或细胞核的特定区室中,或者可以进行工程化改造以从细胞分泌或转运至细胞的质膜。

[0407] 在一些实施方案中,核酸(例如DNA,RNA)可以具有一个或多个修饰。在一些实施方案中,如本文所定义的核酸分子(例如,RNA分子)可以含有核苷酸类似物/修饰,例如,主链修饰、糖修饰或碱基修饰。结合本发明的主链修饰是其中化学修饰如本文所定义的核酸分子中含有的核苷酸主链的磷酸酯的修饰。结合本发明的糖修饰是如本文所定义的核酸分子的核苷酸的糖的化学修饰。此外,结合本发明的碱基修饰是核酸分子的核苷酸的碱基部分的化学修饰。在本上下文中,核苷酸类似物或修饰优选选自适用于转录和/或翻译的核苷酸类似物。

[0408] 可以掺入核酸分子的经修饰的核苷和核苷酸可以在糖部分中被修饰。例如,可以将RNA分子的2' 羟基(OH)修饰或替换为许多不同的“氧基”或“脱氧”取代基。“氧基”-2' 羟基修饰的实例包括但不限于烷氧基或芳氧基(-OR,例如R=H、烷基、环烷基、芳基、芳烷基、杂芳基或糖);聚乙二醇(PEG)、 $O(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2OR$;“锁定”核酸(LNA),其中2' 羟基例如通过亚甲基桥连接到同一核糖的4' 碳;和氨基基团(-O-氨基,其中氨基,例如NRR可以是烷基氨基、二烷基氨基、杂环基、芳基氨基、二芳基氨基、杂芳基氨基或二杂芳基氨基、乙二胺、聚氨基)或氨基烷氧基。

[0409] 糖基团也可以含有一个或多个碳,其拥有与核糖中相应碳的立体化学构型相反的立体化学构型。因此,经修饰的核酸分子可以包括含有例如阿拉伯糖作为糖的核苷酸。

[0410] 磷酸主链可以进一步在经修饰的核苷和核苷酸中进行修饰,它们可以如本文所述掺入核酸分子(例如,RNA)中。可以通过用不同的取代基取代一个或多个氧原子来修饰主链的磷酸酯基团。此外,经修饰的核苷和核苷酸可包括用如本文所述的经修饰的磷酸酯完全替换未修饰的磷酸酯部分。经修饰的磷酸酯基团的实例包括但不限于硫代磷酸酯、硒代磷酸酯(phosphoroselenate)、硼烷磷酸酯(borano phosphates)、硼烷磷酸酯(borano phosphate esters)、膦酸氢酯(hydrogen phosphonates)、氨基磷酸酯(phosphoroamidates),膦酸烷基或芳基酯和磷酸三酯。二硫代磷酸酯的两个非连接氧都被硫取代。磷酸酯接头也可以通过用氮(桥连的氨基磷酸酯),硫(桥连的硫代磷酸酯)和碳(桥连的亚甲基膦酸酯)替换连接氧来修饰。

[0411] 可以如本文所述掺入核酸分子(例如,RNA分子)中的经修饰的核苷和核苷酸可以在核碱基部分中进一步修饰。RNA中发现的核碱基的实例包括但不限于腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶和尿嘧啶。例如,本文所述的核苷和核苷酸可以在大沟表面上被化学修饰。在一些实施方案中,大沟化学修饰可包括氨基、硫醇基、烷基或卤素基团。

[0412] 在一些实施方案中,核苷酸类似物/修饰选自碱基修饰,其可以选自例如2-氨基-6-氯嘌呤核糖苷-5'-三磷酸(2-amino-6-chloropurineriboside-5'-triphosphate)、2-氨基嘌呤-核糖苷-5'-三磷酸;2-氨基腺苷-5'-三磷酸、2'-氨基-2'-脱氧胞苷-三磷酸、2-硫胞苷-5'-三磷酸、2-硫尿苷-5'-三磷酸、2'-氟胸苷-5'-三磷酸、2'-O-甲基肌苷-5'-三磷酸、4-硫尿苷-5'-三磷酸、5-氨基烯丙基胞苷-5'-三磷酸、5-氨基烯丙基尿苷-5'-三磷酸、5-溴胞苷-5'-三磷酸、5-溴尿苷-5'-三磷酸、5-溴-2'-脱氧胞苷-5'-三磷酸、5-溴-2'-脱氧尿苷-5'-三磷酸、5-碘胞苷-5'-三磷酸、5-碘-2'-脱氧胞苷-5'-三磷酸、5-碘尿苷-5'-三磷酸、5-碘-2'-脱氧尿苷-5'-三磷酸、5-甲基胞苷-5'-三磷酸、5-甲基尿苷-5'-三磷酸、5-丙炔基-2'-脱氧胞苷-5'-三磷酸、5-丙炔基-2'-脱氧尿苷-5'-三磷酸、6-氮杂胞苷-5'-三磷酸、6-氮杂尿苷-5'-三磷酸、6-氯嘌呤核糖苷-5'-三磷酸、7-脱氮腺苷-5'-三磷酸、7-脱氮鸟苷-5'-三磷酸、8-氮杂腺苷-5'-三磷酸、8-叠氮基腺苷-5'-三磷酸、苯并米唑-核糖苷-5'-三磷酸、N1-甲基腺苷-5'-三磷酸、N1-甲基鸟苷-5'-三磷酸、N6-甲基腺苷-5'-三磷酸、O6-甲基鸟苷-5'-三磷酸、假尿苷-5'-三磷酸、或嘌呤霉素-5'-三磷酸、黄苷-5'-三磷酸。

[0413] 在一些实施方案中,可以通过添加所谓的“5'帽”结构来修饰核酸分子。5'-帽是通常对成熟mRNA的5'-端“加帽”的实体,通常是经修饰的核苷酸实体。5'-帽通常可以由经修饰的核苷酸,特别是鸟嘌呤核苷酸的衍生物形成。优选地,5'-帽通过5'-5'-三磷酸连接与5'-末端连接。5'-帽可以被甲基化,例如m7GpppN,其中N是携带5'帽的核酸的末端5'核苷酸,通常是RNA的5'端。m7GpppN是5'-帽结构,其自然存在于聚合酶II转录的mRNA中,因此认为不是在根据本发明的经修饰的RNA中包含的修饰。

[0414] 如何制备和使用核酸疫苗记载于例如US20070269451、US20160317647、US9872900和US2017002984,每篇通过引用整体并入本文。

[0415] 药物组合物

[0416] 可以将本文所述的任何肽、编码肽的核酸、纳米颗粒和细胞掺入药物组合物中。组合物可以包含一个或多个肽(和/或编码肽的核酸)和药学上可接受的载体。如本文所用,词语“药学上可接受的载体”包括与药物施用相容的溶剂、分散介质、包衣、抗菌和抗真菌剂、等张剂和吸收延迟剂等。可以将一个或多个肽配制为糖浆剂、酞剂、悬浮液、粉剂、颗粒剂、片剂、胶囊、锭剂、含锭(troche)、水溶液、霜剂、软膏、洗剂、凝胶、乳剂等形式的药物组合物。也可以将补充活性化合物(例如一个或多个化学治疗剂)掺入组合物中。

[0417] 通常将药物组合物配制为与其目的施用途径相容。施用途径的例子包括口服、直肠和胃肠外,例如,静脉内、肌内、皮内、皮下、吸入、透皮或经粘膜。用于胃肠外应用的溶液或悬浮液可包括以下的组分:无菌稀释剂诸如注射用水、盐水溶液、不挥发性油、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其他合成溶剂;抗菌剂诸如苯甲醇或对羟基苯甲酸甲酯;抗氧化剂诸如抗坏血酸或亚硫酸氢钠;螯合剂诸如乙二胺四乙酸;缓冲液诸如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐和用于调节张力的试剂诸如氯化钠或右旋糖。可利用酸或碱,如氢氯酸或氢氧化钠调节pH。可将组合物封入由玻璃或塑料制成的安瓿、一次性注射器或多剂量小瓶中。

[0418] 适用于注射用途的药物组合物包括无菌水溶液(在水溶性的情况下)或分散体和以及用于临时制备无菌注射溶液或分散体的无菌粉剂。对于静脉内施用,合适的载体包括生理盐水、抑菌水、Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, NJ.) 或磷酸盐缓冲盐水(PBS)。在所有情况下,药物组合物必须是无菌的,并且应以存在容易可注射性的程度流动。它在制造和储存条件下应当是稳定的,并且必须进行防腐以免受微生物如细菌和真菌的任何污染。载体可以是溶剂或分散介质,其含有例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇和液态聚乙二醇等)及其合适的混合物。可以例如通过使用诸如包衣如卵磷脂,在分散体的情况下通过维持所需的粒径以及通过使用表面活性剂来维持适当的流动性。可以通过各种抗细菌和抗真菌剂,例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、酚、抗坏血酸、硫柳汞等实现微生物污染的防止。在许多情况下,希望在组合物中包括等张剂,例如糖、多元醇如甘露醇、山梨糖醇、氯化钠。可以通过在组合物中包括延迟吸收的试剂,例如单硬脂酸铝和明胶来促进可注射组合物的延长吸收。

[0419] 可通过将所需量的一种或多种肽(或一种或多种编码肽的核酸)掺入根据需要具有成分之一或组合的合适溶剂中,然后过滤灭菌来制备无菌注射溶液。通常,通过将一种或多种肽(或编码一种或多种肽的核酸)掺入无菌媒介物中来制备分散体,所述无菌媒介物包含基本的分散介质和来自上文列举的那些成分的需要其他成分。在用于制备无菌注射溶液的无菌粉末的情况下,制备方法可包括真空干燥或冷冻干燥,其从其先前无菌过滤的溶液中产生活性成分加上任何其他期望成分的粉末。

[0420] 口服组合物通常包含惰性稀释剂或可食用载体。为了口服治疗施用的目的,可以将一种或多种肽与赋形剂一起掺入并以片剂、含锭或胶囊剂(例如明胶胶囊剂)的形式使用。口服组合物也可以使用流体载体制备以用作漱口水。药学上相容的粘合剂和/或佐剂材料可以作为组合物的一部分包括在内。片剂、丸剂、胶囊剂、含锭等可以含有以下任何成分或类似性质的化合物:粘合剂,例如微晶纤维素、黄蓍胶或明胶;赋形剂,例如淀粉或乳糖,崩解剂,例如藻酸,Primogel或玉米淀粉;润滑剂,例如硬脂酸镁或固醇(sterotes)镁;助流剂,例如胶体二氧化硅;甜味剂,例如蔗糖或糖精;或调味剂诸如薄荷、水杨酸甲酯或橙调味剂。

[0421] 粉末和片剂可含有1%至95%(w/w)个别肽或两种或更多种肽的混合物。在某些实施方案中,肽的范围可以为约5%至70%(w/w)。合适的载体是碳酸镁、硬脂酸镁、滑石、糖、乳糖、果胶、糊精、淀粉、明胶、黄蓍胶、甲基纤维素、羧甲基纤维素钠、低熔点蜡、可可脂等。术语“制剂”旨在包括具有包囊材料作为提供胶囊的载体的肽(或核酸)的制剂,在所述胶囊中具有或没有其他载体的肽被载体包围,因此该载体与它缔合。类似地,包括扁囊剂和锭剂。片剂、粉末、胶囊剂、丸剂、扁囊剂和锭剂可以用作适合口服施用的固体剂型。

[0422] 适于口服使用的水溶液可以通过将活性成分溶解在水中并根据需要添加合适的着色剂、调味剂、稳定剂和增稠剂来制备。可以通过将细分的活性成分与粘性物质(例如天然或合成胶、树脂、甲基纤维素、羧甲基纤维素钠和其他公知的悬浮剂)分散在水中制备适合口服使用的水悬浮液。

[0423] 为了通过吸入施用,肽或核酸可以以气溶胶喷雾的形式从压力容器或分配器或喷雾器中递送,所述压力容器或分配器含有合适的推进剂,例如气体诸如二氧化碳。

[0424] 系统性施用也可以通过透粘膜或透皮手段进行。对于透粘膜或透皮施用,在制剂

中使用适合于要渗透的屏障的渗透剂。此类渗透剂在本领域中通常是已知的,并且包括例如用于透粘膜施用的去污剂、胆汁盐和夫西地酸衍生物。透粘膜施用可以通过使用鼻喷雾剂或栓剂来完成。对于透皮施用,可以将肽或核酸配制成软膏剂、油膏剂、凝胶或乳膏,如本领域通常已知的。

[0425] 肽或核酸也可以以栓剂的形式(例如,与常规栓剂基质如可可脂和其他甘油酯一起)或保留灌肠形式制备,用于直肠递送。

[0426] 在一些实施方案中,肽或核酸可以与载体一起制备,所述载体将保护肽免于从体内快速消除,例如控释制剂,包括植入物和微囊化的递送系统。可以使用可生物降解的生物相容性聚合物,例如乙烯乙酸乙烯酯、聚酸酐、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯和聚乳酸。此类制剂的制备方法对本领域技术人员而言是显而易见的。材料也可以从Alza Corporation和Nova Pharmaceuticals, Inc. 商购获得。脂质体悬浮液(包括脂质体,其例如用针对APC特异性抗原的单克隆抗体靶向到APC)也可用作药学上可接受的载体。这些可以根据本领域技术人员已知的方法来制备,例如,如美国专利No. 4,522,811中所述。

[0427] 以剂量单位形式配制口服或肠胃外组合物以易于施用和剂量均匀可以是有利的。如本文所用,剂量单位形式是指物理上离散的单位,其适合作为待治疗受试者的单位剂量;每个单位包含肽(或核酸)的预定量,其经计算与需要的药物载体结合产生期望的治疗效果。剂量单位还可以随附使用说明。

[0428] 可以将编码肽的核酸分子插入载体中并用作基因治疗载体。基因疗法载体可以通过例如静脉内注射,局部施用(参见例如美国专利号No. 5,328,470)或通过立体定向注射(参见例如Chen, et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:3054-3057)来递送至受试者。基因疗法载体的药物制剂可以包含可接受稀释剂中的基因疗法载体,或者可以包含缓释基质,其中嵌入基因递送载体。或者,在完整的基因递送载体可以完整地自重组细胞产生,例如逆转录病毒载体的情况下,药物制剂可以包括一个或多个产生基因递送系统的细胞。

[0429] 基因递送媒介物的其他实例包括但不限于脂质体,生物相容性聚合物,包括天然聚合物和合成聚合物;脂蛋白;多肽;多糖;脂多糖;人工病毒包膜;金属颗粒;细菌;病毒,诸如杆状病毒,腺病毒和逆转录病毒;噬菌体粘粒;质粒;真菌载体和本领域通常使用的其他重组媒介物,其已经描述用于在多种真核和原核宿主中表达并且可以用于基因疗法以及简单的蛋白表达。

[0430] 病毒载体的实例包括逆转录病毒载体、慢病毒载体、腺病毒载体、腺伴随病毒载体、 α 病毒载体等。包含靶向部分如抗体或其片段的脂质体也可以用于制备核酸的药物组合物以递送至受试者。

[0431] 本文所述的任何药物组合物可与如下所述的施用说明一起被包括在容器、包装或分配器中。

[0432] 试剂盒和制品

[0433] 本公开内容特征还在于多个试剂盒。试剂盒可以包括例如本文描述的任何肽(或含有编码一个或多个肽的核酸序列的表达载体)的一种或多种(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9或10种或更多种);和用于对受试者施用肽的用法说明。试剂盒可以包括一个或多个药学上可接受的载体和/或一个或多个免疫刺激剂。免疫刺激剂可以是例如T辅助细胞表位、改变的肽配体或佐剂。试剂盒还可包含一个或多个治疗剂、诊断剂或预防剂。一个或多个治疗

剂、诊断剂或预防剂包括但不限于：(i) 调节炎症应答的试剂(例如,阿司匹林、吲哚美辛、布洛芬、萘普生、类固醇、色甘酸钠、或茶碱)；(ii) 影响肾和/或心血管功能的试剂(例如,呋塞米、噻嗪类、阿米洛利(amiloride)、螺内酯、卡托普利(captopril)、依那普利(enalapril)、赖诺普利(lisinopril)、地尔硫卓、硝苯地平、维拉帕米、地高辛、isordil、多巴酚丁胺、利多卡因、奎尼丁、腺苷、洋地黄、美伐他汀、洛伐他汀、辛伐他汀或甲羟戊酸)；(iii) 影响胃肠功能的药物(例如,奥美拉唑(omeprazole)或硫糖铝)；(iv) 抗生素(例如,四环素、克林霉素、两性霉素B、奎宁、甲氧西林、万古霉素、青霉素G、阿莫西林、庆大霉素、红霉素、环丙沙星、多西环素、链霉素、庆大霉素、妥布霉素、氯霉素、异烟肼、氟康唑、或金刚烷胺)；(v) 抗癌剂(例如、环磷酰胺、甲氨蝶呤、氟尿嘧啶、阿糖胞苷、巯嘌呤、长春碱、长春新碱、多柔比星、博来霉素、丝裂霉素C、羟基脲、泼尼松、他莫昔芬、顺铂或氮烯咪胺)；(vi) 免疫调节剂(例如,白介素、干扰素(例如,干扰素gamma (IFN- γ)、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、肿瘤坏死因子alpha (TNF α)、肿瘤坏死因子beta (TNF β)、环孢霉素、FK506、硫唑嘌呤、类固醇)；(ix) 对血液和/或血液形成器官起作用的药物(例如,白介素、G-CSF、GM-CSF、促红细胞生成素、肝素、华法林(warfarin)或香豆素)；或(vii) 激素(例如,生长激素(GH)、促乳素、促黄体生成激素、TSH、ACTH、胰岛素、FSH、CG、促生长素抑制素、雌激素、雄激素、孕酮、促性腺激素释放激素(GnRH)、甲状腺素、三碘甲腺原氨酸)；激素拮抗剂；影响钙化和骨周转的试剂(例如,钙、磷酸、甲状旁腺激素(PTH)、维生素D、二膦酸盐(bisphosphonate)、降钙素、氟化物)。

[0434] 在一些实施方案中,试剂盒可以包含一种或多种(例如,一种、两种或三种或更多种)本文所述的BCMA和/或TACI抗体。在一些实施方案中,试剂盒可包含两种抗体,每种抗体对不同的蛋白质具有特异性。例如,试剂盒可以含有一种BCMA特异性抗体(本文描述)和一种TACI特异性抗体(本文描述)。试剂盒可以任选地包括用于对生物样品测定BCMA和/或TACI蛋白中的一种或多种的存在或量的用法说明。特征还在于制品,其包含:容器;以及在容器内含有的组合物,其中组合物包含用于在哺乳动物(例如人)中诱导免疫应答的活性成分,其中活性成分包含本文所述的任何肽的一种或多种(例如2、3、4、5、6、7、8、9或10或更多种),其中容器具有标签,该标签指示该组合物用于诱导哺乳动物(例如,本文所述的任何哺乳动物)中的免疫应答。标签可以进一步指示该组合物将被施用于患有、怀疑患有或有风险形成多发性骨髓瘤的哺乳动物。制品的组合物可以被干燥或冻干,并且可以包括例如用于溶解干燥或冻干的组合物的一个或多个溶液(和/或用法说明)。

[0435] 制品还可以包括将组合物施用于哺乳动物的用法说明。

实施例

[0436] 在以下实施例中进一步描述本发明,这些实施例不限制权利要求书中描述的本发明的范围。

[0437] 实施例1:多发性骨髓瘤细胞系上的BCMA表达

[0438] 通过用对以下各克隆特异性的抗体染色对包括11个MM细胞系和1个乳腺癌细胞系(MDA-MB231)在内的总共12个癌细胞系评价其BCMA抗原的表达水平;#1.ANC3B1(LifeSpan Biosciences,目录号LS-C357630),#2.VICKY1(LifeSpan Biosciences,目录号LS-C18662)和#3.19F2(BioLegend,目录号357506)。在这些细胞系中,H929(MM细胞系)显示了最高水平

的BCMA表达,而MDA-MB231(乳腺癌细胞系;BCMA阴性)显示了最小水平的BCMA表达。(图1A-1I)

[0439] 实施例2:对HLA-A2特异性的BCMA和TACI天然肽的选择

[0440] 分别如下鉴定出六种分别衍生自BCMA或TACI抗原的天然肽:

[0441] #1.BCMA₆₄₋₇₂(LIISLAVFV)(SEQ ID NO:1)

[0442] #2.BCMA₆₉₋₇₇(AVFVLMFLL)(SEQ ID NO:2)

[0443] #3.BCMA₉₋₁₇(SQNEYFDSL)(SEQ ID NO:3)

[0444] #4.BCMA₇₂₋₈₀(VLMFLLRKI)(SEQ ID NO:4)

[0445] #5.BCMA₅₄₋₆₂(AILWTCLGL)(SEQ ID NO:5)

[0446] #6.BCMA₁₁₄₋₁₂₂(ILPRGLEYT)(SEQ ID NO:6)

[0447] #1.TACI₁₇₈₋₁₈₆(FLVAVACFL)(SEQ ID NO:7)

[0448] #2.TACI₁₇₄₋₁₈₂(VLCCFLVAV)(SEQ ID NO:8)

[0449] #3.TACI₁₅₄₋₁₆₂(KLSADQVAL)(SEQ ID NO:9)

[0450] #4.TACI₁₆₆₋₁₇₄(TLGLCLCAV)(SEQ ID NO:10)

[0451] #5.TACI₁₆₁₋₁₆₉(ALVYSTLGL)(SEQ ID NO:11)

[0452] #6.TACI₁₅₅₋₁₆₃(LSADQVALV)(SEQ ID NO:12)

[0453] 实施例3:BCMA或TACI天然肽与HLA-A2分子的结合亲和力

[0454] 使用T2细胞系评价列出的BCMA肽的HLA-A2特异性结合能力。在测定法中,洗涤T2细胞,重悬于无血清的AIM-V培养基中至终浓度为 1×10^6 个细胞/ml,并转移至24孔组织培养板的孔中。用不同浓度的相应BCMA肽(0-200 μ g/ml)和3 μ g/ml人 β 2-微球蛋白(Sigma)脉冲细胞,并在37 $^{\circ}$ C,5%CO₂的潮湿空气中温育。过夜温育后,洗涤细胞,在4 $^{\circ}$ C用小鼠抗人HLA-A2-FITC mAb染色15分钟,洗涤并使用FACSort™流式细胞仪用CellQuest™v2.1软件(Becton Dickinson, San Jose, CA)进行分析。通过HLA-A2特异性肽结合引起的T2细胞上HLA-A2分子的上调来测定肽与HLA-A2的结合,并通过流式细胞术分析测量平均荧光强度(MFI)来证明。在评估的BCMA肽中,“#4.BCMA₇₂₋₈₀(VLMFLLRKI)(SEQ ID NO:4)”显示最高水平的HLA-A2特异性,“#5.BCMA₅₄₋₆₂(AILWTCLGL)(SEQ ID NO:5)”显示出第二高的特异性水平。(图2)。在评估的TACI肽中,TACI#5外的所有肽显示HLA-A2特异性,但通过#4.TACI₁₆₆₋₁₇₄(TLGLCLCAV)(SEQ ID NO:10)测量到最高水平(图3)。

[0455] 实施例4.BCMA或TACI天然肽对HLA-A2分子的稳定性

[0456] 为了改善与HLA-A2分子结合的肽的稳定性,设计了以下异变BCMA或TACI肽:

[0457] 异变#4.BCMA₇₂₋₈₀(YLMFLLRKI)(SEQ ID NO:13)

[0458] 异变#5.BCMA₅₄₋₆₂(YILWTCLGL)(SEQ ID NO:14)

[0459] 异变#1.TACI₁₇₈₋₁₈₆(YLVAVACFL)(SEQ ID NO:15)

[0460] 异变#3.TACI₁₅₄₋₁₆₂(YLSADQVAL)(SEQ ID NO:16)

[0461] 异变#4.TACI₁₆₆₋₁₇₄(YLGLCLCAV)(SEQ ID NO:17)

[0462] 使用T2细胞系对天然BCMA和异变BCMA和TACI肽检查HLA-A2结合稳定性。用相应的肽脉冲T2细胞。过夜温育后,洗涤细胞以去除未结合的肽;如上所述评估它们的结合亲和力并且如下评估稳定性。将细胞与10 μ g/ml布雷菲德菌素(Brefeldin A)(Sigma)在37 $^{\circ}$ C和5%CO₂温育1小时,以阻止新合成的HLA-A2分子的细胞表面表达。在布雷菲德菌素A处理后0、2、

4、6和18小时评估肽/HLA-A2结合稳定性。温育期后,收获细胞,洗涤,用小鼠抗人HLA-A2-FITC mAb染色并通过流式细胞术分析。“异变#4BCMA₇₂₋₈₀(YLMFLLRKI (SEQ ID NO:13))”、“异变#5BCMA₅₄₋₆₂(YILWTCLGL (SEQ ID NO:14))”和“异变#3TACI₁₅₄₋₁₆₂(YLSADQVAL (SEQ ID NO:16))”的HLA-A2结合亲和力从其天然肽增加(图4和5)。就结合稳定性而言,“异变#4BCMA₇₂₋₈₀(YLMFLLRKI (SEQ ID NO:13))”和“异变#3TACI₁₅₄₋₁₆₂(YLSADQVAL (SEQ ID NO:16))”肽与天然肽相比在评估的所有时间点时显示显著改善,所述时间点包括0、2、4、6和18小时(图6和7)。因此,选择异变#4BCMA₇₂₋₈₀(YLMFLLRKI (SEQ ID NO:13))和异变#3.TACI₁₅₄₋₁₆₂(YLSADQVAL (SEQ ID NO:16))肽,用于进一步评估其产生MM特异性细胞毒性T细胞(CTL)的免疫原性潜力。

[0463] 实施例5. 诱导BCMA或TACI肽特异性CD3⁺CD8⁺CTL

[0464] 从不同的HLA-A2⁺正常供体产生肽特异性CTL,用于评估靶向MM细胞系的功能活性。为了产生肽特异性CTL,将从同一供体产生的成熟树突细胞(mDC)重悬于无血清AIM-V培养基中,并用50μg/ml的异变#4BCMA₇₂₋₈₀(YLMFLLRKI (SEQ ID NO:13))肽或“异变#3TACI₁₅₄₋₁₆₂(YLSADQVAL (SEQ ID NO:16))”肽,在37℃,5%CO₂的潮湿空气中脉冲过夜。洗涤经肽脉冲的mDC,计数,以10Gy照射,并用于在补充有10%人AB血清的AIM-V培养基中以1:20抗原呈递细胞/肽与CD3⁺T细胞的比率引发CD3⁺T细胞。每七天用经肽脉冲的照射T2细胞对培养物进行再刺激,共进行4个循环。为了离体维持T细胞,在第二次刺激后两天将IL-2(50U/ml)添加到培养物中。在存在IL-2(50U/ml)但是没有肽刺激的情况下在相同的培养条件下维持对照T细胞培养物。每个肽刺激循环后一周评估所得CTL的表型。流式细胞术分析显示,随着群体中的逐渐增加,用异变#4BCMA₇₂₋₈₀(YLMFLLRKI (SEQ ID NO:13))刺激的CD3⁺CD8⁺T细胞亚组的表型的明显变化。由异变BCMA肽实现的CD3⁺CD8⁺T细胞增加与用免疫原性CD138₂₆₀₋₂₆₈(GLVGLIFAV (SEQ ID NO:20))实现的CD3⁺CD8⁺T细胞增加相似,所述免疫原性CD138₂₆₀₋₂₆₈先前已被鉴定为免疫原性肽,表明BCMA肽的潜在免疫原性。与无肽刺激的对照T细胞(约20%)相比,在肽刺激的4个循环后,BCMA肽特异性CTL培养物含有更高百分比的CD8⁺T细胞(约80%)(图8A-8C)。

[0465] 实施例6:通过异变BCMA₇₂₋₈₀肽刺激降低幼稚CD3⁺CD8⁺CTL和增加记忆CD3⁺CD8⁺CTL

[0466] 抗原特异性CTL在表型上可以通过其表达独特的细胞表面抗原而从幼稚T细胞鉴定为活化/记忆T细胞。通过分析幼稚和记忆细胞的表型,检查了BCMA-CTL的表型作为潜在的效应细胞。通过每周用经50μg/ml异变BCMA₇₂₋₈₀(YLMFLLRKI (SEQ ID NO:13))脉冲的抗原呈递细胞重复刺激HLA-A2⁺正常供体的CD3⁺T细胞产生BCMA肽特异性CTL。每个肽刺激后一周,通过流式细胞术对所得CTL评估其表型概况。与对照T细胞相比,BCMA-CTL显示幼稚CD3⁺CD8⁺T细胞的频率降低(供体1:80%未刺激者到在4个刺激循环后2%;供体2:83%未刺激者到4个刺激循环后2%)。观察到用异变BCMA₇₂₋₈₀(YLMFLLRKI (SEQ ID NO:13))肽实现的记忆CD3⁺CD8⁺T细胞的频率的相应增加(供体1:18%未刺激者到4个刺激循环后的86%;供体2:10%未刺激者到4个刺激循环后的92%)。这些表型变化证明,用异变BCMA₇₂₋₈₀(YLMFLLRKI (SEQ ID NO:13))重复刺激CD3⁺T细胞导致具有记忆细胞表型的CD8⁺CTL扩充,指示BCMA肽的免疫原性(图9和10)。

[0467] 实施例7:通过异变BCMA₇₂₋₈₀肽刺激实现的中央记忆和效应CD3⁺CD8⁺CTL频率的变化

[0468] 在用异变BCMA₇₂₋₈₀ (YLMFLLRKI (SEQ ID NO:13)) 肽刺激T细胞后,对中央记忆和效应细胞进行了进一步评估。在3个刺激循环后,检测到通过BCMA肽实现的中央记忆CTL扩充,这与效应CTL的减少一致。在4个肽刺激循环后,还检测到中央记忆CTL的减少和包括效应记忆细胞的效应CTL的增加。在用异变BCMA₇₂₋₈₀ (YLMFLLRKI (SEQ ID NO:13)) 肽刺激的CD8⁺T细胞中的此种表型变化的模式与用CD138₂₆₀₋₂₆₈ (GLVGLIFAV (SEQ ID NO:20)) 刺激的细胞相似(图11A-11C)。

[0469] 实施例8:用异变BCMA₇₂₋₈₀ (YLMFLLRKI-SEQ ID NO:13) 肽或异变TACI₁₅₄₋₁₆₂ (YLSADQVAL-SEQ ID NO:16) 肽刺激的特异性CTL显示代表特定T细胞亚型的独特表型。

[0470] 我们还观察到用肽刺激的CD3⁺T细胞培养物中CD3⁺T细胞亚组内的幼稚(CD45RO⁻/CCR7⁺)、中央记忆(CD45RO⁺/CCR7⁺)、效应器记忆(CD45RO⁺/CCR7⁻)和末端效应器(CD45RO⁻/CCR7⁻)细胞的频率中用异变BCMA₇₂₋₈₀ (YLMFLLRKI (SEQ ID NO:13)) 肽或异变TACI₁₅₄₋₁₆₂ (YLSADQVAL (SEQ ID NO:16)) 肽刺激的CTL中CD3⁺CD8⁺T细胞亚组的明显表型变化。4个肽刺激循环后,效应记忆CD3⁺CD8⁺T细胞的频率增加,与幼稚T细胞(CD45RO⁻CCR7⁺/CD3⁺CD8⁺)和中央记忆T细胞(CD45RO⁺CCR7⁺/CD3⁺CD8⁺)的相应降低有关。因此,这些结果证明用所选的异变BCMA或TACI肽重复刺激CD3⁺T细胞导致明显的表型改变和抗原特异性CTL特征的CD3⁺CD8⁺T细胞亚组的扩充。(图12和图13)。

[0471] 实施例9:BCMA特异性CTL和TACI特异性CTL以HLA-A2限制性方式对MM细胞诱导细胞毒性活性,产生Th1型细胞因子(IFN- γ 、IL-2、TNF- α)并上调41BB表达。

[0472] 通过流式细胞术对用异变BCMA₇₂₋₈₀ (YLMFLLRKI (SEQ ID NO:13)) 肽或异变TACI₁₅₄₋₁₆₂ (YLSADQVAL (SEQ ID NO:16)) 刺激的肽特异性CTL分析其裂解骨髓瘤细胞和产生关键的细胞因子的能力,所述细胞因子参与抗肿瘤活性。BCMA-CTL和TACI特异性CTL表明在识别HLA-A2⁺U266细胞(其高于HLA-A2⁻OPM2细胞)后表达CD107a脱粒标志物(一种细胞毒性活性的测量)的细胞频率的显著增加。在针对HLA-A2⁺MM细胞而非针对HLA-A2⁻MM细胞的BCMA特异性CTL和TACI特异性CTL中检测到IFN- γ 、IL-2和TNF- α 的水平升高,这证明了免疫应答为HLA-A2限制性方式(图14和图15)。

[0473] 实施例10:BCMA特异性CTL以HLA-A2限制性和抗原特异性方式响应MM细胞而增殖。

[0474] 使用CFSE-增殖测定法进一步分析了用异变BCMA₇₂₋₈₀ (YLMFLLRKI (SEQ ID NO:13)) 刺激的肽特异性CTL的功能活性。在第4天测量BCMA肽特异性CTL中CD8⁺T细胞的增殖,其由用HLA-A2⁺MM(U266)、HLA-A2⁺乳腺癌(MDA-MB231)或HLA-A2⁻MM(MM1S)细胞刺激后CFSE标记的CTL荧光减少(门控CFSE低)证明。BCMA-CTL响应HLA-A2⁺U266 MM细胞系而诱导显著的CD8⁺T细胞增殖(增殖细胞:46%)。然而,未响应MDA-MB231或MM1S诱导CD8⁺T细胞增殖,并且由于仅在培养基中培养细胞(10%)而处于低水平(11%-14%)。这些结果共同提示BCMA-CTL特异性响应骨髓瘤细胞,并且它们的CD8⁺T细胞增殖是HLA-A2限制性的且抗原特异性的(图16)。

[0475] 实施例11:与免疫激动剂组合通过BCMA特异性CTL实现较高水平的细胞毒性

[0476] 在用抗-OX40或抗-GITR处理细胞48小时中测量用异变BCMA₇₂₋₈₀ (YLMFLLRKI (SEQ ID NO:13)) 刺激的肽特异性CTL的活性。通过门控的CD3⁺CD8⁺T细胞中的CD107a脱粒测量细胞毒性水平。观察到与未处理组(43%)相比,用抗OX40(92%)或抗GITR(55%)处理BCMA肽特异性CTL后CD107a脱粒增加,提示了与免疫激动剂的组合处理有助于诱导BCMA-CTL的抗

肿瘤活性(图17)。

[0477] 实施例12:通过BCMA特异性中央记忆CD8⁺细胞毒性T淋巴细胞对多发性骨髓瘤的选择性靶向

[0478] 尽管在将新型疗法并入干细胞移植范例中的多发性骨髓瘤(MM)的治疗方面取得了新进展,但进行中的DNA损伤和基因组进化成为许多患者中复发的基础。因此,需要具有不同作用机制的新颖治疗方法。组成性或进化性的遗传复杂性,再加上B细胞恶性疾病的免疫响应性,刺激了MM中免疫治疗选项的发展,包括单克隆抗体、双特异性抗体、免疫毒素和CAR T细胞。尽管MM患者特异性CAR T细胞疗法已实现明显的深层响应,但尚未建立响应的持久性,并且它们是劳动密集的、耗时且昂贵的。为了克服这些限制,本实施例提供了基于免疫原性肽的癌症疫苗作为现成的免疫疗法,用于更广泛且更有效地治疗患者。基于肽的治疗方法没有基于重组蛋白、mRNA或DNA的疫苗的限制,所述疫苗需要内在化、将蛋白降解为针对HLA的最佳免疫原性肽、以及适当翻译(对于mRNA)或转录(对于DNA)所需要的其他步骤的过程。为了克服MHC限制并使用免疫原性表位疫苗方法治疗更多样的患者群体,将肽混合物合并以包括主要HLA亚型。此外,来那度胺可增强肽疫苗特异性免疫应答和记忆细胞毒性T细胞(CTL)活性,为与检查点抑制剂和/或免疫激动剂的联合治疗设定舞台。另外,由免疫原性肽触发的抗肿瘤功效可通过其在效应细胞生成时诱导“表位扩散”的能力而增强,由此靶向的裂解的癌细胞释放新的抗原表位,其随后被抗原呈递细胞摄取,加工和呈递到CTL的新全集。

[0479] B细胞成熟抗原(BCMA)是TNF受体超家族17(TNFRSF17)的成员,并且表征为III型跨膜蛋白,其含有在调节B细胞成熟和分化为浆细胞中具有中心作用的富含半胱氨酸的胞外域。作为MM细胞生长和存活因子B细胞活化因子(BAFF)和增殖诱导配体(APRIL)的受体,BCMA对于MM细胞的存活是需要的,使其成为有希望的治疗靶标。几乎所有的MM肿瘤细胞表达BCMA,并且已提出其作为鉴定肿瘤细胞的标志物。它在成熟B细胞和长寿浆细胞亚组上的选择性表达进一步提示了BCMA定向治疗方法的有利治疗指数。目前,几种免疫治疗策略正在靶向BCMA,包括抗体(裸抗体、抗体-药物缀合物和双特异性抗体)和细胞疗法(嵌合抗原受体T细胞),即使在复发的难治性MM中具有有希望的临床结果。此外,MM和慢性淋巴细胞性白血病患者中的血清可溶性BCMA升高,并且可充当预后标志物和响应监测。最后,新近研究指示,BCMA在非造血组织中表达:BCMA在非小细胞肺癌细胞系中异常表达,并可以通过ERK1/2信号传导途径在肿瘤中发挥作用。这些数据支持在MM以及还有潜在表达BCMA的实体瘤中免疫治疗策略中靶向BCMA。

[0480] 本实施例通过产生具有针对MM细胞的有效且持久的免疫力的抗原特异性CD8⁺CTL,提供了靶向BCMA的基于肽的免疫治疗方法。鉴定了能够引发具有高效抗肿瘤活性的MM特异性响应的新型免疫原性天然和异变HLA-A2特异性BCMA肽。重要的是,异变BCMA₇₂₋₈₀(YLMFLLRKI (SEQ ID NO:13))肽表明最高的免疫原性水平,对HLA-A2分子具有最大的亲和力/稳定性,并且稳健诱导BCMA特异性记忆CTL,针对HLA-A2⁺患者的MM细胞和MM细胞系具有多功能活性。实验显示了此种新型工程化免疫原性BCMA₇₂₋₈₀肽在癌症疫苗和过继免疫治疗方案中的临床应用框架,并为表达MM或BCMA的癌症患者提供了持久的记忆抗肿瘤免疫力。

[0481] 特别地,此结果显示了从新诊断的MM患者(N=616)获得的CD138⁺肿瘤细胞上的肿瘤相关抗原可用于扩充当前多发性骨髓瘤(MM)特异性免疫疗法的广度和范围。这些实验设

计为通过产生BCMA特异性记忆CD8⁺CTL来靶向B细胞成熟抗原(BCMA),其促进MM细胞的生长和存活,所述BCMA特异性记忆CD8⁺CTL介导针对MM细胞的有效且持久的免疫应答。在此,实验显示了与其天然肽相比,对BCMA、BCMA₇₂₋₈₀(YLMFLLRKI (SEQ ID NO:13))和BCMA₅₄₋₆₂(YILWTCLGL (SEQ ID NO:14))特异性的新型工程化肽对HLA-A2显示改善的亲和力/稳定性,并在增加的激活(CD38,CD69)和共刺激(CD40L,OX40,GITR)分子表达的情况下诱导BCMA特异性CTL。重要的是,异变BCMA₇₂₋₈₀特异性CTL表明针对MM的多功能Th1特异性免疫活性[IFN- γ /IL-2/TNF- α 生成、增殖、细胞毒性],它们与四聚体⁺和记忆CD8⁺CTL群体的扩充直接相关。当与抗OX40或抗LAG3组合时,异变BCMA₇₂₋₈₀特异性CTL表现出针对MM的增加的细胞毒性,尤其是通过中央记忆CTL。这些结果提供了在具有MM和其他表达BCMA的肿瘤的患者中产生持久的自体抗肿瘤免疫力的疫苗接种和过继免疫治疗策略中,单独或与抗-LAG3和/或抗-OX40组合使用的异变BCMA₇₂₋₈₀肽的临床应用的框架。

[0482] 在此实施例中使用了以下材料和方法。

[0483] 材料和方法

[0484] 细胞系

[0485] MM细胞系MM1S、OPM2、OPM1、H929、OCIMY5、RPMI、U266、KMS1、HSB2、McCAR和ANBL6以及乳腺癌细胞系MDA-MB-231获自ATCC(Manassas,VA)。T2细胞系(一种表达HLA-A2分子的人B和T细胞杂合物)由J.Molldrem博士(University of Texas M.D.Anderson Cancer Center,Houston,TX)提供。将细胞系在补充有10%胎牛血清(FCS;BioWhittaker,Walkersville,MD),100IU/ml青霉素和100 μ g/ml链霉素(Gibco-Life Technologies)的DMEM(用于MM和T2细胞;Gibco-Life Technologies,Rockville,MD)或Leibovitz's L-15(用于MDA-MB231;ATCC,Manassas,VA)培养基中培养。

[0486] 试剂

[0487] 荧光染料缀合的抗人BCMA、HLA-A2、CD3、CD8、CD38、CD40L、CD69、41BB、CCR7、CD45RO、CD107a、IFN- γ 、IL-2、TNF-、PD1、LAG3、OX40和GITR单克隆抗体(mAb)购自Becton Dickinson(BD)(San Diego,CA)、LifeSpan Bioscience(Seattle,WA)或BioLegend(San Diego,CA)。活/死Aqua染色试剂盒购自Molecular Probes(Grand Island,NY)。重组人GM-CSF获自Immunex(Seattle,WA);人IL-2、IL-4、IFN- γ 和TNF- β 购自R&D Systems(Minneapolis,MN)。BCMA肽特异性四聚体-PE由MBL International Corporation(Woburn,MA)合成。Bristol-Myers Squibb(New York,NY)提供了针对LAG3或OX40的临床级mAb。

[0488] 合成肽

[0489] 天然BCMA肽[BCMA₆₄₋₇₂(LIISLAVFV (SEQ ID NO:1))、BCMA₆₉₋₇₇(AVFVLMFLL (SEQ ID NO:2))、BCMA₉₋₁₇(SQNEYFDSL (SEQ ID NO:3))、BCMA₇₂₋₈₀(VLMFLLRKI (SEQ ID NO:4))、BCMA₅₄₋₆₂(AILWTCLGL (SEQ ID NO:5))、BCMA₁₁₄₋₁₂₀(ILPRGLEYT (SEQ ID NO:6))],异变BCMA peptides[hBCMA₇₂₋₈₀(YLMFLLRKI (SEQ ID NO:13))、hBCMA₅₄₋₆₂(YILWTCLGL (SEQ ID NO:14))、hBCMA₉₋₁₇(YQNEYFDSL (SEQ ID NO:22))]和HIV-Gag₇₇₋₈₅(SLYNTVATL (SEQ ID NO:21))通过标准fmoc(9-苄基甲基-氧羰基)化学合成,使用反相层析纯化至>95%,并通过质谱法验证分子量(Biosynthesis,Lewisville,TX)。

[0490] HLA-A2亲和力和稳定性测定法

[0491] 用各种剂量的肽加 β 2-微球蛋白(3 μ g/ml)(Sigma,St Louis,MO)将T2细胞脉冲过

夜。过夜温育后,将细胞用HLA-A2-PE mAb染色,并使用FACSCanto™流式细胞仪(BD)进行分析。在布雷菲德菌素A处理后的0、2、4、6和14小时,通过用HLA-A2-PE mAb染色和流式细胞术分析,在加载有肽的T2细胞上测量肽/HLA-A2复合物的稳定性。

[0492] 树突细胞的产生

[0493] 在添加有10%FCS的RPMI-1640培养基(Gibco-Life Technologies)中在存在1,000单位/ml GM-CSF和1,000单位/ml IL-4的情况下将从外周血单个核细胞(PBMC)分离的单核细胞培养7天。每隔一天将新鲜培养基加上GM-CSF和IL-4添加到培养物中。在与1,000单位/ml IFN- α 加10ng/ml TNF- α 温育3天后,在第7天获得成熟的DC(mDC)。

[0494] BCMA肽特异性CTL的诱导

[0495] 通过用经肽脉冲的抗原呈递细胞(APC)重复刺激从HLA-A2⁺供体获得的CD3⁺T细胞离体产生BCMA肽特异性CTL(BCMA-CTL)。简言之,照射经肽(50 μ g/ml)脉冲的APC(10Gy),并用于以1APC/肽:20T细胞比率刺激T细胞。每7天再刺激T细胞培养物,并在存在IL-2(50单位/ml)的情况下,在补充有10%人AB血清(BioWhittaker)的AIM-V培养基中进行维持。

[0496] BCMA肽特异性CTL或肿瘤细胞的表型分析

[0497] 在用活/死Aqua染色试剂盒和荧光染料缀合的抗人mAb和四聚体-PE染色后,在BCMA-CTL上进行表型鉴定。或者,将MM和乳腺癌细胞系用荧光染料缀合的BCMA或HLA-A2 mAb染色。染色后,将细胞洗涤,在2%多聚甲醛中固定,并通过流式细胞仪进行分析。

[0498] 通过羧基荧光素琥珀酰亚胺酯(CFSE)跟踪的细胞增殖

[0499] 用CFSE(Molecular Probes)标记BCMA-CTL,并在IL-2(10单位/ml)的存在下与经照射的(10Gy)肿瘤细胞或经肽脉冲的APC共温育。在共培养的第4、5、6或8天,收获细胞并用活/死Aqua染色试剂盒和CD3/CD8/CD45RO/CCR7mAb染色。如通过流式细胞术测量,将CD3⁺CD8⁺CTL增殖水平测定为CFSE荧光强度降低。

[0500] CD107a脱粒和细胞内IFN- γ /IL-2/TNF- α 细胞因子产生

[0501] 通过流式细胞术通过CD107a脱粒和Th1细胞因子的产生测量BCMA-CTL的功能性细胞溶解活性。简言之,在存在CD107a mAb的情况下,将BCMA-CTL与肿瘤细胞或T2/肽共温育。温育1小时后,再添加CD28/CD49d mAb、布雷菲德菌素A和莫能菌素(BD)5小时。收获细胞,在PBS中洗涤,并与对T细胞抗原特异性的mAb一起温育。表面染色后,将细胞固定/透化,用抗IFN- γ /IL-2/TNF- α mAb染色,用透化/洗涤溶液(BD)洗涤,在2%多聚甲醛中固定,并通过流式细胞术进行分析。

[0502] 统计分析

[0503] 结果表示为平均值 $\pm$ SE。使用未配对的学生t检验比较组。当 $p < 0.05$ 时,认为差异是显著的。

[0504] BCMA肽与HLA-A2分子的结合亲和力和稳定性。

[0505] 使用各种搜索软件程序(包括BIMAS和NetCTL),对BCMA全长蛋白质序列进行了评估,以预测具有HLA-A2亲和力、延长的半衰期解离速率、蛋白酶体C末端裂解和TAP转运的表位。在选择的6种天然肽中[BCMA₆₄₋₇₂(LIISLAVFV)、BCMA₆₉₋₇₇(AVFVLMFLL)、BCMA₉₋₁₇(SQNEYFDSL)、BCMA₇₂₋₈₀(VLMFLLRKI)、BCMA₅₄₋₆₂(AILWTCLGL)、BCMA₁₁₄₋₁₂₀(ILPRGLEYT)]、BCMA₇₂₋₈₀(VLMFLLRKI)和BCMA₅₄₋₆₂(AILWTCLGL)以剂量依赖性方式显示出最高的HLA-A2结合亲和力。在设计的异变肽中,与它们的天然肽($n = 3$, $p < 0.05$)相比,异变BCMA₇₂₋₈₀

(YLMFLLRKI (SEQ ID NO:13)) 和异变hBCMA₅₄₋₆₂ (YILWTCLGL (SEQ ID NO:14)) 显示最高的HLA-A2结合亲和力增加。相反,将非HLA-A2特异性BCMA₉₋₁₇ (SQNEYFDSL) 中的锚定基序替换为杂变BCMA₉₋₁₇ (YQNEYFDSL (SEQ ID NO:22)) 不会改变其HLA-A2亲和力状态,指示通过仅在HLA-A2特异性肽内的修饰改善的A2亲和力。

[0506] 评估在布雷菲德菌素A处理用肽脉冲的T2细胞后BCMA₇₂₋₈₀和BCMA₅₄₋₆₂HLA-A2特异性肽的HLA-A2稳定性。天然BCMA₇₂₋₈₀和BCMA₅₄₋₆₂肽显示延长的HLA-A2稳定性达大于6小时,其通过工程化改造为异变BCMA₇₂₋₈₀ (YLMFLLRKI (SEQ ID NO:13)) 和BCMA₅₄₋₆₂ (YILWTCLGL (SEQ ID NO:14)) 进一步增强。总体而言,在每个测试的时间点用BCMA₇₂₋₈₀ (YLMFLLRKI (SEQ ID NO:13)) 检测到最高水平的HLA-A2亲和力和稳定性,其高于HLA-A2阳性对照HIV-Gag₇₇₋₈₅肽。

[0507] 用异变BCMA₇₂₋₈₀ (YLMFLLRKI (SEQ ID NO:13)) 或BCMA₅₄₋₆₂ (YILWTCLGL (SEQ ID NO:14)) 生成的BCMA特异性CTL显示增加的T细胞活化和共刺激分子表达。

[0508] 使用流式细胞术在第四轮肽刺激后进行异变BCMA₇₂₋₈₀肽特异性CTL (hBCMA₇₂₋₈₀CTL) 或异变hBCMA₅₄₋₆₂肽特异性CTL (hBCMA₅₄₋₆₂CTL) 的表型表征。这两个CTL群体显示增加的活化标志物 (CD69, CD38) 表达,在hBCMA₇₂₋₈₀CTL上检测到最高的上调:CD38从基线的23%增加到80%;CD69和CD69从基线7%增加到38% (图18A)。另外,hBCMA₇₂₋₈₀CTL显示与hBCMA₅₄₋₆₂CTL相比更高的41BB、CD40L、OX30和GITR共刺激分子的表达 (图18B和18C)。

[0509] 在图18A-18C中,每周用照射的APC刺激从HLA-A2+个体获得的CD3+T细胞,所述APC用相应的BCMA肽BCMA₇₂₋₈₀ (YLMFLLRKI (SEQ ID NO:13)) 或BCMA₅₄₋₆₂ (YILWTCLGL (SEQ ID NO:14)) 脉冲。在第4个刺激循环后一周,通过流式细胞术分析CD3+CD8+T细胞。在CD8+T细胞上评估T细胞活化标志物 (CD69, CD38) 和共刺激分子 (41BB, CD40L, OX30, GITR) 的表达。以代表 (图18A和18B) 或者使用从不同个体 (N=3) 产生的BCMA-CTL的三个独立实验的总结 (图18C) 表明结果。

[0510] 异变BCMA₇₂₋₈₀特异性CTL响应MM细胞系显示抗原特异性抗肿瘤活性。

[0511] 每轮肽刺激后评估hBCMA₇₂₋₈₀CTL的表型和活性。在生成的特异性CTL (n=3) 中在用异变BCMA₇₂₋₈₀ (YLMFLLRKI (SEQ ID NO:13)) 刺激后,观察到%CD3⁺CD8⁺T细胞的逐渐增加 (图25A-25B) 和%CD3⁺CD4⁺T细胞的相应减少 (图26A-26B)。平行地,用BCMA mAb克隆 (ANC3B1, VICKY1、19F2) 染色的靶细胞的表型分析显示H929、MMIS、U266和OPM1细胞系上而非乳腺癌细胞系 (MDA-MB231) 上的高BCMA表达 (图27A-27C)。在功能活性评估中,与HLA-A2⁻BCMA⁺MM1S (7%)、HLA-A2⁺BCMA⁻MDA-MB231 (9%) 或仅培养基 (6%) 相比,hBCMA₇₂₋₈₀CTL响应HLA-A2⁺BCMA⁺U266 (49%) 显示显著 (*p<0.05) 更高的CD3⁺CD8⁺T细胞增殖 (图19A-19D;直方图)。在从三个HLA-A2⁺个体产生的hBCMA₇₂₋₈₀CTL中一致地观察到此种HLA-A2限制性和MM特异性的CD8⁺CTL增殖 (图19E;条形图)。此外,hBCMA₇₂₋₈₀CTL证明响应HLA-A2⁺U266,而非HLA-A2⁺MDA-MB231细胞,表达CD107a脱粒标志物 (47.1%) 并且产生粒酶B (32.6%) 和穿孔蛋白 (29.9%) 的CD8⁺T细胞增加 (图19F)。在来自其他HLA-A2⁺个体 (N=5) 产生的hBCMA₇₂₋₈₀CTL中观察到抗肿瘤活性的一致结果,如通过以HLA-A2限制性方式针对BCMA⁺MM细胞的IFN- γ /IL-2/TNF- β 产生、41BB上调和CD107a脱粒测量。这些数据进一步证明了异变BCMA₇₂₋₈₀肽诱导的MM特异性免疫应答。

[0512] 在图19A-9F中,对通过用异变BCMA₇₂₋₈₀ (YLMFLLRKI (SEQ ID NO:13)) 肽的重复刺激

产生的BCMA特异性CTL检查其抗原特异性和HLA-A2限制性CD8⁺T细胞,其通过响应BCMA⁺MM细胞或BCMA⁻乳腺癌细胞的增殖、CD107a脱粒、粒酶B/穿孔蛋白产生、IFN- γ /IL-2/TNF- β 产生和41BB上调进行。以代表(图19A-19F)或者使用从不同个体(N=3)产生的BCMA-CTL的三个独立实验的总结表明结果。

[0513] 针对HLA-A2⁺患者MM细胞的异变BCMA₇₂₋₈₀CTL功能免疫应答。

[0514] MM患者的CD138⁺肿瘤细胞用作靶细胞以评估由相应的异变肽产生的BCMA特异性CTL。与异变BCMA₅₄₋₆₂相比,BCMA₇₂₋₈₀肽诱发更稳健的针对患者MM细胞的抗原特异性CTL和抗肿瘤活性,如通过CD107a脱粒(hBCMA₅₄₋₆₂CTL 13.8%相对于hBCMA₇₂₋₈₀CTL 21.5%)和IL-2产生(分别为4.4%对16.3%)测量(图20A)。hBCMA₇₂₋₈₀CTL始终以HLA-A2限制性方式证明针对患者细胞的更高的抗MM活性,包括CD107a脱粒、粒酶B/IFN- γ /TNF- β 上调(图20B)和穿孔蛋白/IL-2产生(n=3)(图20C-20H)。因此,在hBCMA₇₂₋₈₀CTL中检测到的抗MM应答与更高的活化(CD69,CD38)和共刺激分子表达(41BB,CD40L,OX40,GITR)一致(图18A-18C)。这些数据提供了关于异变BCMA₇₂₋₈₀免疫原性的其他证据,并支持其在新型MM治疗中的潜在临床应用。

[0515] 在图20A-20H中,对异变BCMA肽特异性CTL评估其针对患者MM细胞的功能活性。相对于基线响应(无肿瘤细胞刺激),测量响应从HLA-A2阴性或HLA-A2阳性MM患者获得的CD138⁺肿瘤细胞的BCMA-CTL的特异性活性。以代表(图20A,图20B)或者使用从不同个体(N=3)产生的BCMA-CTL的三个独立实验的总结(图20C-20H)表明结果。

[0516] 异变BCMA₇₂₋₈₀特异性CTL富含具有稳健的抗MM活性的CD8⁺四聚体⁺T细胞。

[0517] 进一步对hBCMA₇₂₋₈₀CTL表征其在四聚体阳性群体内的表型和抗肿瘤活性。四聚体阳性CTL显示显著增加CD8⁺T细胞,具有活化(CD38⁺:四聚体⁺相对于四聚体⁻:49.4%对3.2%)和共刺激分子表达(CD40L⁺:38.0%对1.2%,41BB:24.7%对1.9%,OX40:46.2%对1.7%和GITR:34.9%对1.5%)(图21A)。从几个HLA-A2⁺个体(n=3)产生的hBCMA₇₂₋₈₀CTL始终表明与四聚体阴性细胞(6%,18%,13%;供体A、B或C BCMA-CTL)相比,四聚体阳性细胞(83%,97%,97%;供体A、B或C BCMA-CTL)实现的更高的针对U266 MM细胞的抗MM活性水平(图21B)。进一步评估了CD107a阳性或CD107a阴性CD8⁺CTL中四聚体阳性细胞的频率。观察到与CD107a阴性CTL(1%,2%,1%;供体A、B或C BCMA-CTL)相比,脱粒CD107a-阳性CTL(82%,98%,98%;供体A、B或C)内显著更高的四聚体⁺细胞的频率(图21C)。因此,这些结果证实,hBCMA₇₂₋₈₀CTL的特异性抗MM活性包含在BCMA肽特异性四聚体阳性细胞内,该细胞显示CTL激活和共刺激分子的上调。

[0518] 在图21A-21C中,对识别四聚体阳性CTL或不识别四聚体阴性CTL的异变BCMA₇₂₋₈₀分析在CD8⁺T细胞上的CD38、CD40L、41BB、OX40和GITR的表达(图21A)。通过测量在四聚体阳性的CTL或四聚体阴性的CTL亚组内的CD107上调(图21B);以及通过评估CD107a阳性CTL或CD107a阴性CTL内的四聚体阳性状态(图21C),进一步表征了异变BCMA₇₂₋₈₀特异性CTL(N=3)的抗肿瘤活性。

[0519] 异变BCMA₇₂₋₈₀肽诱导MM特异性记忆CD8⁺CTL。

[0520] 为了表征BCMA特异性CTL活性,进行了实验以评估与基线相比在肽刺激的2个循环后和4个循环后的幼稚:记忆CTL亚组的组成。在CD8⁺T细胞内检测到逐渐进行性的表型变化:在基线时从幼稚(CD45RO⁻CCR7⁺)[供体1-幼稚:83.0%,CM:0.4%,供体2-幼稚:84.1%];进展到2个肽刺激循环后中央记忆(CM;CD45RO⁺CCR7⁺)[供体1-幼稚:37.4%,CM:32.1%,供

体2-幼稚:19.0%,CM:49.6%];然后进展到4个刺激循环后效应记忆(EM;CD45RO⁺CCR7⁻) (供体1-CM:44.2%,EM:54.6%,供体2-CM:18.3%,EM:77.6%) (图22A)。总体而言,在每轮异变BCMA₇₂₋₈₀肽刺激之后(1、2、3、4个循环后),记忆CD8⁺CTL形成逐渐增加(图22B-22C),与幼稚T细胞的相应减少相关(图22D-22E)。因此,这些结果证明了在用异变BCMA₇₂₋₈₀肽刺激T细胞后记忆CTL的诱导和逐渐形成。

[0521] 在图22A-22E中,在基线(无肽刺激)或在肽刺激的每个循环后一周,分析异变BCMA₇₂₋₈₀CTL(供体1,供体2)的幼稚:记忆表型。在BCMA肽刺激的每个循环后,在点图(图22A)和条形图(图22B-22E)中证明了表型改变的模式、从幼稚CD8⁺T细胞分化为记忆CD8⁺T细胞以及记忆CTL的扩充。

[0522] 中央记忆hBCMA₇₂₋₈₀ CTL表明最大的抗MM活性

[0523] 接下来,对由八个(N=8)个不同的HLA-A2⁺个体产生的BCMA特异性CTL内的特异性记忆T细胞亚组表征其抗MM活性。与CD45RO⁻非记忆CTL相比,CD45RO⁺记忆CTL表明响应HLA-A2⁺U266 MM细胞(非记忆对记忆:7.25%对28.2%) and HLA-A2⁺McCAR MM细胞(非记忆对记忆:4.14%对13.2%)的增加的CD107a脱粒(图23A;供体BCMA-CTL)。hBCMA₇₂₋₈₀特异性四聚体⁺细胞主要且始终显示从不同个体产生的BCMA-CTL中的CM表型(四聚体⁺细胞内的%CM-供体B:88.2%,供体C:97.4%,供体D:100%) (图23B)。还对CM CTL评估其针对U266 MM细胞的功能活性。重要的是,CD107a脱粒的水平与CM细胞的频率直接相关(CD107a⁺细胞内%CM-供体E:81.0%,供体F:82.6%,供体G:67.0%,供体H:41.5%) (图23C)。另外,与中水平响应者(供体G)或低水平响应者(供体H)相比,显示较高抗MM活性的高响应者(供体E,供体F)显示BCMA肽特异性CM CTL的频率增加。因此,这些结果进一步指示由异变BCMA₇₂₋₈₀肽产生的CM亚组诱导的独特的肽特异性和抗MM活性。

[0524] 在图23A-23C中,响应HLA-A2⁺MM细胞(U266,McCAR;图23A)在幼稚:记忆CD3⁺CD8⁺T细胞亚组内评估了异变BCMA₇₂₋₈₀CTL的抗MM活性。在异变BCMA₇₂₋₈₀CTL(N=3)的不同CTL亚组中;在四聚体阳性或四聚体阴性CTL亚组内(图23B)和在CD107a阳性或CD107a阴性CTL亚组内(图23C)分析了中央记忆CD8⁺T细胞的频率。

[0525] 抑制LAG3或刺激OX40增强hBCMA₇₂₋₈₀ CTL的增殖和抗MM活性

[0526] 最后,进行实验以表征对MM细胞高度响应的BCMA-CTL的特定T细胞亚组。对CD8⁺T细胞亚组进行门控,证明了HLA-A2限制性MM特异性CTL增殖,并表征其幼稚:记忆亚组。针对U266 MM细胞的最稳健的响应和最高增殖的hBCMA₇₂₋₈₀ CTL主要在CM亚组内(供体1:97.4%,供体2:100%) (图24A),证实了BCMA抗原特异性CTL内CM亚组在MM活性中的主要作用。接下来,进行了实验以研究检查点抑制剂(抗LAG3)或免疫激动剂(抗OX40)对这些记忆T细胞的影响。用抗LAG3或抗OX40处理的hBCMA₇₂₋₈₀ CTL表明增强的细胞毒活性,尤其是通过针对HLA-A2⁺U266 MM细胞(未处理的28.2%对抗LAG3处理的35.8%对抗OX40处理的39.5%);以及针对HLA-A2⁺McCAR MM细胞的记忆CTL(未处理的13.2%对抗LAG3处理的14.5%对抗OX40处理的20.0%) (图24B)。令人感兴趣的是,检查点抑制剂和免疫激动剂并未诱导增强BCMA-CTL内非记忆细胞的抗MM响应。最后,在hBCMA₇₂₋₈₀ CTL的CM和EM亚组中进一步研究了抗LAG3和抗OX40的有益作用。与EM细胞相比,任一处理对BCMA特异性CM细胞诱导更大的影响,其通过响应抗LAG3或抗OX40处理的较高的CD107a脱粒所证明(图24C)。因此,这些结果支持抗LAG3或抗OX40抗体与hBCMA₇₂₋₈₀肽组合诱导CTL以进一步增强BCMA特异性CM亚组内的抗MM活

性的效用。

[0527] 在图24A-24C中,响应U266细胞在异变BCMA₇₂₋₈₀特异性CTL内鉴定诱导MM特异性CD8⁺T细胞增殖的特异性亚组(图24A)。此外,与抗LAG3或抗OX40组合对异变BCMA₇₂₋₈₀CTL评估其对记忆T细胞(图24B)或中央记忆T细胞亚组(图24C)的抗骨髓瘤活性的修饰。

[0528] 讨论

[0529] 即使在异体移植后复发的难治性MM的患者中,也已经通过输注供体淋巴细胞(DLI)实现持久的响应。DLI的这些早期令人鼓舞的结果为评估用于治疗MM的主动特异性免疫疗法提供了框架。癌症靶向疫苗(一种此类主动特异性免疫疗法)已证明诱导具有抗肿瘤活性的高效CD8⁺CTL的能力。疫苗接种的成功取决于合适的患者群体的选择、靶向在肿瘤上选择性表达的抗原以及利用组合方法有效诱导和维持抗原特异性记忆抗肿瘤免疫应答。本公开内容提供了自MM和实体瘤(包括乳腺癌、胰腺癌和结肠癌)中高度过表达的XBP1、CD138和CS1抗原衍生的免疫原性HLA-A2和HLA-A24特异性肽,并在临床前和临床研究两者中证明了它们诱导针对HLA-A2⁺或HLA-A24⁺肿瘤细胞具有抗肿瘤活性的肽特异性CD8⁺CTL的能力。此外,与免疫调节药物诸如来那度胺或与组蛋白脱乙酰基酶6抑制剂ACY241的肽刺激/疫苗接种的组合研究增强了对肿瘤细胞的肽特异性CTL活性。实验证明了肽刺激与来那度胺或ACY241的组合增强抗原特异性CD8⁺T细胞活性,其与转录调节物(如T-bet/Eomes)的上调相关并与AKT激活相关,所述AKT激活将抗原特异性CTL分化与FOXO、mTOR和Wnt/ β -连环蛋白信号传导途径联系起来。重要的是,这些效应主要限于抗原特异性CD45RO⁺记忆CTL,主要在特异性CM亚组中观察到响应肿瘤细胞的IFN- γ 和粒酶B的产生以及CD8⁺T细胞增殖的最稳健的增加。

[0530] 由于令人鼓舞的临床前结果,已经在治疗郁积型MM(SMM)患者的临床前试验中单独评估并与来那度胺组合评估,以及在治疗三阴性乳腺癌患者的临床前试验中与抗PD1组合评估XBP1/CD138/CS1多个肽的疫苗。在SMM患者中,多个肽的疫苗是耐受良好的,并且作为单一疗法具有免疫原性,其通过增强的四聚体⁺CD8⁺CTL的频率与IFN- γ 产生来证明;此外,与来那度胺组合触发更高的CD8⁺T细胞的平均倍数增加与四聚体阳性和IFN- γ 产生。重要的是,该肽疫苗诱导了对XBP1/CD138/CS1肽特异性的CD45RO⁺记忆CTL,并与来那度胺组合进一步增强该CTL。尽管在SMM中已观察到稳定的疾病和响应,但仍需要进行随机化试验来评估通过肽疫苗接种是否可以延长从SMM进展到活动性疾病的时间。

[0531] 为了将MM特异性免疫疗法扩展到XBP1/CD138/CS1抗原之外,本公开内容还鉴定了来自新诊断的MM患者(N=616)的CD138⁺肿瘤细胞上的其他肿瘤相关抗原。在此,本公开内容提供了靶向BCMA的免疫治疗策略的鉴定和表征,所述BCMA选择性表达在正常和恶性浆细胞上,并且是MM中几种当前免疫治疗的靶标。实施例提供了高度免疫原性的工程化BCMA特异性纳米肽,异变BCMA₇₂₋₈₀(YLMFLLRKI (SEQ ID NO:13))和BCMA₅₄₋₆₂(YILWTCLGL (SEQ ID NO:14)),从它们的天然BCMA肽高度改善的HLA-A2亲和力/稳定性。这些肽以HLA-A2限制性方式对MM细胞引起BCMA特异性CTL,增加的BCMA特异性四聚体⁺细胞,增强的CD107脱粒,Th1型细胞因子(IFN- γ /IL-2/TNF- α)的产生以及增殖。最重要的是,BCMA特异性记忆CD8⁺CTL(CM和EM细胞两者)的增加,以及自我更新和对MM细胞响应的能力,强烈支持异变BCMA肽在MM的新型疫苗接种和/或免疫治疗方法中的潜力。实际上,本公开内容提供了以下治疗方案:用异变BCMA₇₂₋₈₀肽疫苗接种,进行BCMA特异性CM细胞的离体收获和扩充,这些CM细胞作

为过继免疫疗法再输注,然后根据需要用BCMA肽进行疫苗接种以确保其有效治疗MM患者的持久性。

[0532] 已经观察到,BCMA特异性记忆CD8⁺CTL表达调节T细胞功能(既用于共同刺激又用于免疫抑制)的关键分子。在hBCMA₇₂₋₈₀肽特异性CTL内的CM亚组上检测到最高的共刺激和免疫检查点分子诱导,所述CM亚组是表明针对MM的高度有效的多功能活性的群体。重要的是,这些发现指示BCMA-CTL与检查点抑制剂或免疫激动剂的组合疗法增强其功能性抗MM活性的潜力。考虑到将PD-1检查点抑制剂与免疫调节药物来那度胺或泊马度胺或与Ab达雷木单抗(Daratumumab)组合(其中毒性已经使研究缩短)时的最近的顾虑,这可以是特别相关的。在此,实施例试图靶向MM肿瘤微环境内的替代抑制受体和抑制机制。特别地,LAG3 (CD223)是继CTLA和PD1/PD-L1之后在临床上靶向的第三种抑制受体,并在BCMA特异性CM CTL上表达。平行地,免疫激动剂,尤其是靶向OX40 (CD134)、41BB (CD137)和GITR (CD357)的共刺激性肿瘤坏死因子受体,因其在增强抗肿瘤免疫应答中的治疗效用而受到了广泛关注;其中,抗OX40 mAb最近通过在几项临床前研究中增强效应T细胞扩充和功能性抗肿瘤活性,证明在诱导肿瘤消退中的令人鼓舞的功效。重要的是,临床级抗LAG3和抗OX40 (由Bristol-Myers Squibb; New York, NY提供)用于评估异变BCMA₇₂₋₈₀特异性CTL对MM细胞的功能活性。离体实验证明了抗LAG3和抗OX40两者特异性增加针对MM细胞的BCMA-CTL内记忆CTL的功能活性,而不影响非记忆CTL的活性。对自多个HLA-A2⁺个体的T细胞产生的BCMA-CTL的影响在用OX40处理后比用抗LAG3处理后更大,并且在BCMA特异性CTL内的CM亚组上大于在EM亚组上。这些研究为BCMA肽特异性免疫疗法与免疫激动剂或检查点抑制剂的有科学信息的组合临床试验提供了框架。

[0533] 总之,这些实验鉴定并验证了新型的免疫原性HLA-A2特异性工程化BCMA肽,它们能够诱导具有针对MM细胞的功能性抗肿瘤活性的抗原特异性CD8⁺CTL。这些结果为这些高度免疫原性异变BCMA肽在MM患者中作为疫苗和/或作为自体抗原特异性记忆CTL扩充的刺激物的治疗性应用提供了框架。它们进一步支持并入BCMA肽疫苗或BCMA特异性过继T细胞免疫疗法的与抗OX40和/或抗LAG3的组合以增强BCMA指导的抗MM响应的潜在用途。

[0534] 实施例13:用于引发TACI特异性CD8⁺细胞毒性T淋巴细胞的HLA-A2特异性免疫原性TACI肽

[0535] 进行实验以证明新型的免疫原性工程化的异变TACI₁₅₄₋₁₆₂ (YLSADQVAL (SEQ ID NO:16))肽可以诱导具有针对MM的稳健的多功能免疫应答的抗原特异性记忆CD8⁺CTL。在本实施例中的这些结果提供了在MM患者中治疗性应用异变TACI肽的框架,并支持了TACI肽特异性疫苗或TACI肽特异性过继T细胞免疫疗法治疗患有骨髓瘤或表达TACI的其他疾病的患者的治疗应用。

[0536] 在实施例中使用以下材料和方法。

[0537] 材料和方法

[0538] 细胞系

[0539] HLA-A2⁺ (U266和McCAR)和HLA-A2⁻ (OPM2和RPMI) MM细胞系获自ATCC (Manassas, VA)。T2细胞系(表达HLA-A2的人B和T细胞杂合物)由J. Mollidrem博士(University of Texas M.D. Anderson Cancer Center, Houston, TX)提供。在补充有10%胎牛血清(FCS; BioWhittaker, Walkersville, MD)、100IU/ml青霉素和100μg/ml链霉素(Gibco-Life

Technologies)的DMEM(用于MM和T2细胞;Gibco-Life Technologies,Rockville,MD)培养基中培养细胞系。

[0540] 试剂种类

[0541] 荧光染料缀合的抗人单克隆抗体(mAb)购自Becton Dickinson(BD)(San Diego, CA)、LifeSpan Bioscience(Seattle,WA)或BioLegend(San Diego,CA)。活/死Aqua染色试剂盒购自(Grand Island,NY)。重组人GM-CSF购自Immunex(Seattle,WA),并且人IL-2、IL-4、IFN- α 和TNF- α 购自R&D Systems(Minneapolis,MN)。TACI肽特异性四聚体-PE由MBL International Corporation(Woburn,MA)合成。

[0542] 合成肽

[0543] 天然TACI肽[TACI₁₇₈₋₁₈₆(FLVAVACFL(SEQ ID NO:7))、TACI₁₇₄₋₁₈₂(VLCCFLVAV(SEQ ID NO:8))、TACI₁₅₄₋₁₆₂(KLSADQVAL(SEQ ID NO:9))、TACI₁₆₆₋₁₇₄(TLGLCLCAV(SEQ ID NO:10))、TACI₁₆₁₋₁₆₉(ALVYSTLGL(SEQ ID NO:11))、TACI₁₅₅₋₁₆₃(LSADQVALV(SEQ ID NO:12))]、异变TACI肽[TACI₁₇₈₋₁₈₆(YLAVACFL(SEQ ID NO:15))、TACI₁₅₄₋₁₆₂(YLSADQVAL(SEQ ID NO:16))、TACI₁₆₆₋₁₇₄(YLGLCLCAV(SEQ ID NO:17))]和HIV-Gag₇₇₋₈₅(SLYNTVATL(SEQ ID NO:21))肽(HLA-A2特异性阳性对照肽)通过标准fmoc(9-苄基甲基-氧羰基)化学合成,使用反相层析纯化至>95%,并通过质谱法验证分子量(Biosynthesis,Lewisville,TX)。

[0544] HLA-A2亲和力和稳定性测定法

[0545] 用各种浓度的肽加 β 2-微球蛋白(3 μ g/ml)(Sigma,St Louis,MO)将T2细胞脉冲过夜。过夜温育后,将细胞用HLA-A2-PE mAb染色,并使用FACSCanto™流式细胞仪(BD)进行分析。在布雷菲德菌素A处理后的0、2、4、6和14小时,通过用HLA-A2-PE mAb染色和流式细胞术分析,在加载有肽的T2细胞上测量肽/HLA-A2结合的稳定性。

[0546] 树突细胞的产生

[0547] 在添加有10%FCS的RPMI-1640培养基(Gibco-Life Technologies)中在存在1,000单位/ml GM-CSF和1,000单位/ml IL-4的情况下将从外周血单个核细胞(PBMC)分离的单核细胞培养7天。每隔一天将新鲜培养基加上GM-CSF和IL-4添加到培养物中。在与1,000单位/ml IFN- α 加10ng/ml TNF- α 温育3天后,在第7天获得成熟的DC(mDC)。

[0548] TACI肽特异性CTL的诱导

[0549] 通过用经肽脉冲的抗原呈递细胞(APC)重复刺激从HLA-A2⁺供体获得的富集的CD3⁺T细胞离体产生TACI肽特异性CTL(TACI-CTL)。简言之,照射经肽(50 μ g/ml)脉冲的APC(10Gy),并用于以1:20APC/肽比T细胞比率刺激T细胞。每7天再刺激T细胞培养物,并在存在IL-2(50单位/ml)的情况中,在补充有10%人AB血清(BioWhittaker)的AIM-V培养基中进行维持。

[0550] TACI肽特异性CTL或刺激性肿瘤细胞的表型分析

[0551] 对MM靶细胞进行表型表征以确认TACI表达。在用活/死Aqua染色试剂盒和荧光染料缀合的抗人mAb染色后,在TACI-CTL上进行表型鉴定。染色后,将细胞洗涤,在2%多聚甲醛中固定,并通过流式细胞仪进行分析。

[0552] 通过羧基荧光素琥珀酰亚胺酯(CFSE)跟踪的细胞增殖

[0553] 用CFSE(Molecular Probes)标记TACI-CTL,并在IL-2(10单位/ml)的存在下与经照射的(10Gy)MM细胞或经肽脉冲的APC共温育。在共培养的第4、5、6或8天,收获细胞并用

活/死Aqua染色试剂盒和荧光染料缀合的对CD3、CD8、CD45RO和CCR7特异性的抗人mAb染色。如通过流式细胞术测量,将CD3⁺CD8⁺CTL增殖水平测定为CFSE荧光强度降低。

[0554] CD107a脱粒和细胞内IFN- γ /IL-2/TNF- α 细胞因子产生

[0555] 通过流式细胞术通过CD107a脱粒(细胞毒性)和Th1细胞因子的产生测量TACI-CTL的功能性细胞溶解活性。简言之,在存在CD107a mAb的情况下,将TACI-CTL与肿瘤细胞或T2/肽共温育。1小时后,添加CD28/CD49d mAb、布雷菲德菌素A和莫能菌素(BD),再温育5小时。收获细胞,在PBS中洗涤,并与荧光染料缀合的针对关键T细胞标志物的mAb一起温育。表面染色后,将细胞固定/透化,用抗IFN- γ /IL-2/TNF- α mAb染色,用透化/洗涤溶液(BD)洗涤,在2%多聚甲醛中固定,并通过流式细胞术进行分析。

[0556] 统计分析

[0557] 结果表示为平均值 $\pm$ SE。使用未配对的学生t检验比较组。当 $p < 0.05$ 时,认为差异是显著的。

[0558] 结果

[0559] 鉴定对HLA-A2分子具有最高结合亲和力和稳定性的异变TACI₁₅₄₋₁₆₂肽

[0560] 使用各种搜索软件程序(包括BIMAS和NetCTL),对TACI全长蛋白质序列进行了评估,以预测具有HLA-A2亲和力、延长的半衰期解离速率、蛋白酶体C末端裂解和TAP转运的表位。在选择六个天然肽[TACI₁₇₈₋₁₈₆(FLVAVACFL(SEQ ID NO:7))、TACI₁₇₄₋₁₈₂(VLCCFLVAV(SEQ ID NO:8))、TACI₁₅₄₋₁₆₂(KLSADQVAL(SEQ ID NO:9))、TACI₁₆₆₋₁₇₄(TLGLCLCAV(SEQ ID NO:10))、TACI₁₆₁₋₁₆₉(ALVYSTLGL(SEQ ID NO:11))、TACI₁₅₅₋₁₆₃(LSADQVALV(SEQ ID NO:12))]中,除TACI₁₆₁₋₁₆₉以外的所有肽显示HLA-A2特异性,但是TACI₁₆₆₋₁₇₄检测到最高水平的亲和力。为了改善肽与HLA-A2分子的结合和稳定性,设计了三种异变肽,包括TACI₁₇₈₋₁₈₆(YLVAVACFL(SEQ ID NO:15))、TACI₁₅₄₋₁₆₂(YLSADQVAL(SEQ ID NO:16))和TACI₁₆₆₋₁₇₄(YLGCLCAV(SEQ ID NO:17))肽,合成并评估它们的HLA-A2亲和力。在50 μ g/ml和100 μ g/ml的肽剂量下,异变TACI₁₅₄₋₁₆₂肽显示从其天然形式的极大增强的亲和力。异变TACI₁₅₄₋₁₆₂肽的HLA-A2亲和力类似于HIV-Gag₇₇₋₈₅(SLYNTVATL(SEQ ID NO:21))的亲和力,所述HIV-Gag₇₇₋₈₅充当HLA-A2特异性阳性对照肽。然而,与它们的天然肽相比,工程化的异变TACI₁₇₈₋₁₈₆和TACI₁₆₆₋₁₇₄肽没有显示HLA-A2亲和力的显著改善。进一步评估了选定的TACI肽(50 μ g/ml)对HLA-A2分子的亲和力和稳定性。与其天然肽相比,用异变TACI₁₅₄₋₁₆₂看到最高的HLA-A2结合亲和力(时间=0)和稳定性(2、4、6和18小时)。总体而言,在各个时间点,异变TACI₁₅₄₋₁₆₂的HLA-A2亲和力稳定性类似于HLA-A2阳性对照HIV-Gag₇₇₋₈₅肽。基于所研究的TACI肽中最高水平的HLA-A2亲和力和稳定性,选择异变TACI₁₅₄₋₁₆₂进一步评估其诱导针对MM的抗原特异性效应T细胞的免疫原性潜力。

[0561] 通过从幼稚CD8⁺细胞分化的抗原特异性记忆CD8⁺细胞的发育和扩充,异变TACI₁₅₄₋₁₆₂肽特异性CTL的抗肿瘤活性。

[0562] 在每周用异变TACI₁₅₄₋₁₆₂(YLSADQVAL(SEQ ID NO:16))刺激来自HLA-A2⁺供体的富集CD3⁺T细胞后,在幼稚:记忆亚组中评估CD8⁺T细胞的表型变化。在基线[肽刺激之前],发现大多数(84.1%)CD8⁺T细胞为幼稚(CD45RO⁻CCR7⁺)细胞亚组。在用异变TACI₁₅₄₋₁₆₂肽刺激后,观察到幼稚CTL逐渐分化为异变TACI₁₅₄₋₁₆₂肽特异性CTL(hTACI₁₅₄₋₁₆₂ CTL)内的中央记忆CTL(CM;CD45RO⁺CCR7⁺/CD3⁺CD8⁺),然后是效应记忆CTL(EM;CD45RO⁺CCR7⁻/CD3⁺CD8⁺)。用异变

TACI₁₅₄₋₁₆₂肽的3个肽刺激循环后检测到记忆CTL的形成[幼稚:2.2%,CM:47.8%,EM:52.4%]。在4个肽刺激循环之后[幼稚:0.72%,CM:24.4%,EM:74.1%]和5个刺激循环后[幼稚:0.57%,CM:7.36%,EM:69.7%]观察到从幼稚CTL进一步分化为记忆CTL亚组(图29A),支持肽形成记忆T细胞的潜力。在从另外的HLA-A2⁺供体(N=3)获得的T细胞中进一步评估了异变TACI₁₅₄₋₁₆₂肽的免疫原性(图29B)。在用异TACI₁₅₄₋₁₆₂肽刺激后,在所有测试的个体的T细胞中证实幼稚CD8⁺CTL的逐渐减少和记忆CD8⁺CTL(中央记忆和效应记忆CTL两者)的逐渐降低。因此,这些结果证实了异变TACI₁₅₄₋₁₆₂肽形成记忆CD8⁺T细胞的能力。

[0563] 接下来,进行实验以评估异变TACI₁₅₄₋₁₆₂特异性CTL响应骨髓瘤细胞的免疫功能能力。与HLA-A2⁺U266 MM细胞共培养后,在异变TACI₁₅₄₋₁₆₂肽特异性CTL中,尤其是在包括中央记忆和效应记忆CTL亚组的记忆CTL中检测到CD8⁺CTL的增殖。在更多的TACI154-162肽刺激循环[2'刺激:增殖CM-38.1%,增殖EM-19.2%;第3次刺激:增殖CM-54.4%,增殖EM-85.2%;第4次刺激:增殖CM-64.4%,增殖EM-86.9%]后,TACI-CTL的增殖能力继续增加(图29C)。因此,这些结果进一步支持了通过响应于骨髓瘤细胞的记忆CD8⁺T细胞的形成和连续扩充,异变TACI₁₅₄₋₁₆₂肽特异性CTL的免疫功能。

[0564] 在异变TACI₁₅₄₋₁₆₂特异性CTL中TACI特异性四聚体⁺CTL的增殖,证明了以HLA-A2限制性方式的多功能和Th1特异性抗骨髓瘤活性。

[0565] 对hTACI₁₅₄₋₁₆₂ CTL的功能活性检查其针对骨髓瘤细胞的多功能免疫应答。与HLA-A2⁺RPMI(8.24%)或单独的培养基(5.03%)相比,hTACI₁₅₄₋₁₆₂ CTL表明针对HLA-A2⁺McCAR MM细胞的HLA-A2限制性脱粒(CD107a上调),其与针对肿瘤细胞的细胞毒性活性直接相关(图30A)。另外,与HLA-A2⁺RPMI(IFN-8.26%,TNF-7.80%,IL-2 6.42%)或单独的培养基(IFN-5.76%,TNF-5.52%,IL-2 6.24%)相比,hTACI₁₅₄₋₁₆₂ CTL表明响应HLA-A2⁺McCAR,更高的Th1型细胞因子、IFN-(15.0%)、TNF-(17.5%)和IL-2(14.9%)的产生。与MHC错配HLA-A2⁺MM细胞(RPMI)相比,针对HLA-A2⁺MM细胞(McCAR),如通过CD107a脱粒和IFN- γ 产生测量的特异性抗MM活性在从不同HLA-A2⁺个体(N=5)产生的hTACI₁₅₄₋₁₆₂ CTL中一致观察到(图30B,3C)。为了确认异变hTACI₁₅₄₋₁₆₂ CTL的HLA-A2特异性抗MM活性,进行了实验以评估其针对其他骨髓瘤细胞系(包括HLA-A2⁺U266和HLA-A2⁺OPM2细胞)的免疫功能活性。在从HLA-A2⁺供体1(图31A),以及总共五个不同的HLA-A2⁺个体(图31B-31E)产生的hTACI₁₅₄₋₁₆₂ CTL中针对骨髓瘤细胞观察到HLA-A2限制性功能抗肿瘤活性的相同模式。此外,hTACI154-162 CTL对TACI₁₅₄₋₁₆₂肽特异性四聚体⁺CTL染色呈阳性,并且这些四聚体⁺细胞响应HLA-A2⁺U266骨髓瘤细胞表明高水平的CD107a脱粒和增殖(图31F)。因此,这些结果证明了异变TACI₁₅₄₋₁₆₂肽的HLA-A2限制性免疫原性引发针对MM细胞且具有多功能活性(细胞毒性,Th-1型细胞因子产生)的抗原特异性CTL,这支持了免疫原性异变TACI₁₅₄₋₁₆₂ (YLSADQVAL (SEQ ID NO:16))肽在骨髓瘤患者中的潜在治疗应用。

[0566] 实施例14.BCMA异变肽包裹的纳米颗粒增强了针对多发性骨髓瘤的抗原刺激能力和肿瘤特异性CD8⁺细胞毒性T淋巴细胞。

[0567] B细胞成熟抗原(BCMA)(肿瘤坏死因子(TNF)受体超家族的成员和B细胞活化因子(BAFF)和增殖诱导配体(APRIL)结合的受体)是一种针对MM的有希望的治疗靶标。BCMA在MM细胞和浆细胞上具有限制性表达模式,并在促进MM细胞生长、存活和耐药性中具有作用。

[0568] 本公开内容已经鉴定靶向BCMA的基于纳米药物的治疗剂是有效引发并且增强MM

患者中抗肿瘤响应的转化研究的有希望的领域。几种纳米药物是可用的,并且更高级的纳米颗粒构建体正在开发用于抗原包囊。为此,本实施例提供了对BCMA特异性的新型工程化肽,并使用异变BCMA₇₂₋₈₀(YLMFLLRKI (SEQ ID NO:13))肽包囊的基于纳米颗粒的癌症疫苗,以克服游离肽疫苗的局限性,包括较差的肽稳定性、对酶降解的易感性以及低的抗原摄取和递送。此外,开发了基于纳米技术的癌症疫苗以在MM患者中诱导更稳健的BCMA特异性CD8⁺细胞毒性T淋巴细胞(CTL)活性,具有更持续的抗原释放和增加的生物利用度以及免疫原性肽的呈递。在此,进行实验以检查对BCMA抗原特异性的新型基于纳米药物的治疗传递系统治疗MM患者的潜力。本实施例的目的是设计最佳的纳米颗粒包囊的BCMA抗原构建体,以有效引发具有功能性抗骨髓瘤活性的BCMA特异性CD8⁺CTL。

[0569] 结果显示了具有不同抗原释放动力学的纳米颗粒[脂质体或聚(D,L-丙交酯-共-乙交酯)(PLGA)]证明了它们有效地将异变BCMA肽递送至抗原呈递细胞并引发具有抗MM活性的BCMA抗原特异性CTL的能力。异变BCMA肽包囊的纳米颗粒表明比游离肽被人树突细胞的更高的摄取,其中基于脂质体的纳米颗粒介导最高摄取。相反,用基于PLGA的纳米颗粒诱导的BCMA特异性CTL表明最高的功能活性和针对MM细胞的特异性免疫应答。重要的是,与用游离BCMA肽或脂质体/BCMA肽纳米颗粒产生的BCMA-CTL相比,PLGA/BCMA肽纳米颗粒诱导的BCMA特异性CTL表明响应MM患者的肿瘤细胞和MM细胞系的更大的CD107a脱粒、抗原特异性CD8⁺CTL增殖和Th-1型细胞因子(IFN- γ 、IL-2、TNF- α)产生。由PLGA/BCMA纳米颗粒生成的BCMA-CTL内CD28共刺激分子上调、四聚体⁺CTL生成以及肽特异性应答也大于用游离BCMA肽或脂质体/BCMA肽纳米颗粒生成的BCMA-CTL。此外,PLGA/BCMA纳米颗粒触发了抗原特异性记忆CD8⁺T细胞的更稳健的诱导,这证明了比BCMA-CTL内的非记忆CD8⁺T细胞显著更高的抗肿瘤活性,其由CD107a脱粒和IFN- γ 产生所证明。由PLGA/BCMA肽诱导具有抗肿瘤活性的中央记忆CTL与最佳的肽释放动力学和增强的免疫原性有关。

[0570] 因此,这些结果证明,异变BCMA肽包囊的纳米颗粒策略增强了肽向树突细胞以及随后向T细胞的递送,从而诱导具有针对MM的多功能活性的BCMA特异性中央记忆CTL。

[0571] 这些结果还证明了使用包囊的异变BCMA肽的纳米技术增强针对MM的BCMA肽特异性治疗剂的免疫原性的效用。重要的是,观察结果为以下的治疗应用提供了框架:基于PLGA纳米颗粒的异变BCMA肽递送以增强BCMA特异性记忆T细胞免疫应答,克服目前基于肽的癌症疫苗和过继免疫疗法的局限性以及改善MM中的患者结果。

[0572] 在此实施例中使用了以下方法和材料。

[0573] 材料和方法

[0574] 材料

[0575] 聚(D,L-丙交酯-共-乙交酯)(PLGA,分子量23,000,共聚物比率50:50)购自Birmingham Polymers(Birmingham,AL)。聚乙烯醇(PVA,平均分子量30,000-70,000)、三氟乙酸、乙腈、脂多糖和L-15(Leibovitz)培养基购自Sigma-Aldrich(St Louis,MO)。

[0576] BCMA肽加载的PLGA-NP的配制和表征。

[0577] 使用免疫原性异变hBCMA₇₂₋₈₀(YLMFLLRKI (SEQ ID NO:13))肽产生BCMA抗原特异性纳米颗粒制剂,以产生BCMA特异性细胞毒性T淋巴细胞(CTL)。使用双重乳液-溶剂技术,用PLGA-NP以及聚(乙烯醇)(PVA)一起配制hBCMA₇₂₋₈₀肽以稳定乳液。具有PLGA-NP的异变hBCMA₇₂₋₈₀肽基本上如先前所述进行配制(Sahoo SK,et al.2004)。简而言之,将PLGA(50:50

丙交酯-共-乙交酯比率)和肽或空白PLGA自身在二氯甲烷(DCM)中乳化,并将混合物重悬于2%PVA中,形成油和水乳液。在冰桶中以55瓦特使用微尖端探针超声仪达10分钟来完成乳化过程。将乳液在室温搅拌3小时,以使DCM蒸发并形成PLGA-NP。通过在4℃以30,000rpm超速离心30分钟以消减PVA和游离肽来回收肽加载的PLGA-NP,洗涤并重悬于PBS中。为了评估PLGA-NP结构,将纳米颗粒制剂冻干24小时并使用扫描电子显微镜(Hitachi S-4800显微镜, Schaumburg, IL)显现。

[0578] BCMA肽加载的脂质体-NP的配制和表征。

[0579] 使用薄膜水化方法合成BCMA肽加载的脂质体-NP。用胆固醇(MW=386.654)、DOPC(MW=786.113)和DOTAP(MW=698.542)(Avanti Polar, Alabaster, AL)的混合物制备脂质体脂质双层。简而言之,在氯仿中制备来自3mM胆固醇、5mM DOPC和5mM DOTAP的混合物的1ml储备溶液。使用旋转蒸发仪(RV 10, IKA, Wilmington, NC)蒸发溶剂,以在烧瓶底部产生薄脂质膜。使脂质膜经受真空干燥过夜,以除去任何残留的有机溶剂。次日,使用溶解在磷酸氢二钠(二元;pH 11)缓冲液和1%DMSO中的hBCMA₇₂₋₈₀肽,使用10次冻融循环(-80℃和37℃)将脂质膜水合,然后在冰上进行1分钟的探针超声处理将粒径减小至期望的范围。通过超速离心回收肽加载的脂质体-NP,并重悬于PBS中。除了水合步骤外,按照相同的程序制备空白脂质体,在所述水合步骤中在没有任何肽的情况下使用含1%DMSO的二元缓冲液。使用透射电子显微术(TEM)表征BCMA肽加载的脂质体-NP的表面形态。乙酸铀酰(2%)用作使用TEM(JEM-1000, JEOL, Tokyo, Japan)显现BCMA肽加载的脂质体-NP的阴性染色。

[0580] 在PLGA-NP或脂质体-NP中的BCMA肽包裹。

[0581] 使用定量荧光测量肽测定试剂盒(Thermo Fisher)根据制造商建议的方案测量PLGA-NP或脂质体-NP上肽包裹的水平。简而言之,将等量的悬浮液中的BCMA肽,加载在PLGA-NP中的BCMA肽(10μl)或加载在脂质体-NP中的BCMA肽(10μl)一式三份地加载到96孔荧光相容微板中。空白PLGA或空白脂质体用作阴性对照。接下来,将1:1乙腈:DMSO(70μl)和FluoroBrite™ DMEM(20μl)的溶液添加到每个孔,并在黑暗中于室温温育5分钟。乙腈:DMSO溶液用作对照以测量背景荧光。温育后,使用分光光度计以390nm/475nm的Ex/Em测量荧光。根据以线性拟合产生的标准曲线(0-1,000μg/ml)测定肽浓度。

[0582] 单核细胞衍生的树突细胞的产生

[0583] 基本上如先前所述产生单核细胞衍生的树突细胞(DC)(Bae et al.2011,Bae et al.2012)。简而言之,将从HLA-A2⁺正常供体的外周血单个核细胞(PBMC)中分离出的单核细胞在补充有10%FCS的RPMI-1640培养基(Gibco-Life Technologies)中在存在1,000U/ml GM-CSF和1,000U/ml IL-4的情况下培养7天。每隔一天更换含有细胞因子的新鲜培养基。在第7天从培养物中收集未成熟的树突细胞用于摄取研究。在第7天未成熟的树突细胞生成时,通过在10%FCS-RPMI中添加1,000U/ml IFN-α加10ng/ml TNF-α以及新鲜的GM-CSF和IL-4来获得成熟的DC,然后再温育三天。未成熟或成熟的DC用作抗原呈递细胞(APC)。

[0584] 树突细胞对BCMA肽包裹的纳米颗粒的结合和摄取。

[0585] 收获未成熟的人树突细胞(immDC),洗涤,重悬于无血清培养基(1x 10⁶个细胞/ml)中,以终浓度5x10⁵个细胞/孔等分到48孔TC-板的孔中。在存在3μg/ml人β2-微球蛋白的情况下,用50ug/ml的BCMA肽-FITC肽或BCMA肽-FITC包裹的纳米颗粒对细胞进行脉冲,然后在37℃温育。通过流式细胞术以时间依赖性方式(0、30分钟,1小时,2小时,6小时,18小时)

评估immDC的肽加载。另外,在2小时肽脉冲后,通过共聚焦显微术(Nikon widefield Microscope;Tokyo,Japan)在树突细胞上成像BCMA肽-FITC摄取。温育后,洗涤ImmDC,用2%多聚甲醛(Electron Microscopy Sciences,Hatfield,PA)固定,并用300nM的DAPI(Sigma)染色以鉴定细胞核。

[0586] 从新诊断的多发性骨髓瘤患者中分离原代CD138⁺肿瘤细胞。

[0587] 在适当的知情同意后,使用RoboSep®CD138阳性免疫磁选择技术(StemCell Technologies)从自HLA-A2⁺和HLA-A2⁻新诊断的多发性骨髓瘤患者获得的骨髓单个核细胞(BMMC)中分离原代CD138⁺细胞。

[0588] 生成BCMA肽特异性CTL。

[0589] 通过用以下项重复刺激从HLA-A2⁺正常供体分离的外周血单个核细胞离体产生BCMA肽特异性CTL(BCMA-CTL):(1)HLA-A2特异性BCMA免疫原性肽(50ug/ml);(2)没有肽的空白纳米颗粒(PLGA或脂质体),或(3)BCMA肽(50ug/ml)包裹的纳米颗粒(PLGA/肽或脂质体/肽)。在补充有10%人AB血清的DMEM培养基(BioWhittaker)中培养PBMC,并且每周用适当的BCMA肽脉冲,共进行4或5个循环。第二次刺激后两天将IL-2(50U/ml)添加到T细胞培养物中。

[0590] 由BCMA肽包裹的纳米颗粒刺激产生的BCMA-CTL的表型表征。

[0591] 通过流式细胞术评估BCMA肽特异性CD8⁺CTL的幼稚:记忆细胞形成和CD28共刺激分子的表达。另外,通过用BCMA肽特异性四聚体-PE染色在培养物中评估BCMA肽特异性CD8⁺CTL。在37℃的四聚体染色30分钟后,洗涤细胞并用CD8-FITC和CD28-APC mAb染色。染色后,将细胞洗涤,在2%多聚甲醛中固定,使用LSRII Fortessa™流式细胞仪进行采集,并使用FACS DIVA™ v8.0(BD)或FlowJo v10.0.7(Tree star,Ashland,OR)软件进行分析。分析了BCMA-CTL的总门控CD3⁺CD8⁺T细胞群体内特异性记忆(中央记忆,效应记忆)/非记忆群体的存在/频率。

[0592] 评估用BCMA肽包裹的纳米颗粒产生的BCMA-CTL的抗骨髓瘤特异性功能活性。

[0593] 对用以下项产生的BCMA特异性CTL(N=3)评估其针对HLA-A2⁺和HLA-A2⁻骨髓瘤细胞系或原代CD138⁺肿瘤细胞的增殖响应和抗肿瘤活性:(1)BCMA免疫原性肽(50μg/ml),(2)没有肽的空白纳米颗粒,或(3)BCMA肽(50μg/ml)PGLA/肽或脂质体/肽纳米颗粒。简而言之,通过将CFSE(Molecular Probes)标记的CTL与经照射的(10Gy)骨髓瘤细胞共培养来测量BCMA抗原特异性CTL(5x 10⁵细胞)的增殖。在CFSE测定法的第3、4、5或6天,收集细胞,用活/死aqua和荧光染料偶联的抗CD3和抗CD8 mAb染色,并通过流式细胞术进行分析。响应骨髓瘤细胞系或原代CD138⁺肿瘤细胞,分析了BCMA-CTL功能性CD107a脱粒(细胞毒性)和Th1IFN-γ/IL-2/TNF-α细胞因子产生。简而言之,将相应的BCMA-CTL(5x10⁵个细胞)在荧光染料缀合的抗CD107a mAb存在下与靶细胞共温育。共培养1小时后,添加布雷菲德菌素A和莫能菌素(BD)的混合物,并且再温育5小时。然后将细胞用活/死aqua和荧光染料缀合的对各种细胞表面抗原特异性的mAb染色,固定并透化,并在细胞内用对IFN-γ,IL-2或TNF-α特异性的mAb染色。最后,将细胞洗涤,在2%多聚甲醛中固定,使用LSRII Fortessa™流式细胞仪进行采集,并使用FACS DIVA™ v8.0或FlowJo v10.0.7软件进行分析。

[0594] 结果

[0595] 多发性骨髓瘤(MM)是一种B细胞恶性疾病,其特征是骨髓中恶性浆细胞的克隆增

殖和积累,血清和/或尿液中的单克隆蛋白以及溶骨性骨损伤的形成。尽管最近在使用新型治疗剂的治疗方面取得了进展,但是MM仍然无法治愈。临床前研究显示了可以用靶向各种肿瘤相关抗原(TAA)(包括XBP1、CD138和CS1)的免疫原性HLA-A2或HLA-A24肽产生抗骨髓瘤CD8⁺CTL。此外,如在临床试验中检测到的,用这些肽进行疫苗接种可产生MM特异性免疫应答。为了将骨髓瘤中的抗原特异性免疫疗法和过继免疫疗法的宽度和程度扩展到这些抗原之外,本公开内容提供了对从新诊断的MM患者(N=616)获得的肿瘤细胞上的另外的TAA。在此,本公开内容提供了对BCMA(结合B细胞活化因子(BAFF)和增殖诱导配体(APRIL)的受体)特异性的新型异变肽。由于其在MM细胞和浆细胞上的限制性表达模式以及其在促进MM细胞生长、存活和耐药性中的关键作用,BCMA抗原目前正被抗体、免疫毒素和CAR T靶向;然而,仍然迫切需要设计新颖的递送系统,其能够诱导具有有利治疗指数的更有效的骨髓瘤特异性效应细胞。为了促进BCMA肽递送到骨髓微环境中并增强患者的抗肿瘤免疫应答,设计使用纳米颗粒的方法,所述纳米颗粒为BCMA肽提供潜在保护而免于酶降解,并通过增加肽的稳定性、摄取和递送克服游离肽疫苗的局限性。基于纳米技术的癌症疫苗的目标是经由持续的抗原释放和免疫原性肽的呈递,通过更长且更好的T细胞刺激,在MM患者中引发更稳健的BCMA特异性CD8⁺CTL免疫应答和抗肿瘤活性。进行实验以评估包裹BCMA肽的两种不同类型的纳米颗粒,PLGA和脂质体。与单独的肽或脂质体/肽相比,PLGA/肽引发具有最大抗肿瘤活性的BCMA特异性CD8⁺T细胞,与抗原特异性记忆CTL诱导相关。这些结果为使用PLGA纳米载体以有效诱导BCMA肽特异性抗肿瘤活性并改善骨髓瘤的患者结果的治疗性疫苗接种和/或过继免疫治疗策略提供了框架,该PLGA纳米载体已被美国食品药品监督管理局(FDA)批准用于人,具有生物降解性和生物相容性。

[0596] BCMA肽包裹的纳米颗粒的表征和定量。

[0597] 双重乳液溶剂技术是配制PLGA NP以稳定乳液的最常用方法。将冻干的颗粒重悬于蒸馏水中,以使用动态光散射进行尺寸和zeta电势测量。空白PLGA显示 $309.0 \pm 4.0\text{nm}$ ($n=3$)的大小,而肽加载的PLGA-NP的大小较小($257.7 \pm 11.5\text{nm}$, $n=3$),这可以归因于PLGA聚合物与肽之间的相互作用。空白和PLGA-NP两者的zeta电势为-0.06至-1.1mV。PLGA-NP的多分散指数(PDI) < 0.2,指示均匀的大小分布。用金/钨溅射包被空白PLGA或BCMA肽包裹的PLGA-NP,并使用扫描电子显微镜在20kV以50X成像,以进一步显示均匀的大小分布(图32A)。平行地,使用脂质DOTAP合成脂质体制剂以允许与BCMA肽相互作用。脂质体加载的BCMA肽纳米颗粒的尺寸约为 $172 \pm 0.7\text{nm}$ (直径,纳米) ($n=3$)并且显示0.2的PDI,指示均匀的大小分布(图32B)。使用用乙酸铀酰的负染色,使用TEM显现肽加载的脂质体,其也揭示均匀的大小分布。基于在390nm/475nm处的Ex/Em测量的荧光,使用定量荧光测量肽测定法评估这两种NP制剂的肽加载和包裹效率。肽包裹效率(%) (其指示PLGA-NP或脂质体-NP中加载的肽相对于加载肽的初始量的百分比)在PLGA的情况下为 $51\% \pm 1.15\%$ ($n=3$)或在脂质体的情况下为 $49\% \pm 1.32\%$ ($n=3$) (图32C)。空白PLGA和空白脂质体具有如预期的零肽加载。在确认\标准化肽包裹后,PLGA/肽和脂质体/肽NP用作BCMA抗原来源,以产生抗原特异性细胞毒性T淋巴细胞(CTL)。

[0598] 树突细胞摄取BCMA包裹的纳米颗粒。

[0599] 使用从HLA-A2⁺供体的单核细胞产生的ImmDC评估BCMA肽摄取。通过流式细胞术随时间测量每种BCMA-纳米颗粒类型或单独的肽的对ImmDC的肽加载效率。与单独的肽相比,

用BCMA包裹的纳米颗粒检测到更高的ImmDC肽加载效率。在所评估的两种纳米颗粒中,与PLGA/肽相比,脂质体/肽随时间显示更快并且维持更高水平的肽加载(100%摄取30分钟)(图33A)。相比之下,PLGA/肽显示随时间的肽加载的逐渐增加,在1小时检测到(无载体/肽,PLGA/肽相对于脂质体/肽:10+4%,22+4%对100+0%),在6小时增加(无载体/肽,PLGA/肽对脂质体/肽:42+4%,59+2%对100+0%),并在18小时达到峰值(无载体/肽,PLGA/肽对脂质体/肽:55+8%,83+5%对100+0%)(图33B)。在18小时脉冲后,通过共聚焦显微术进一步评估了ImmDC对PLGA/肽的加载效率。与单独的肽相比,用PLGA/肽观察到更高的ImmDC BCMA肽加载(图33C),证实了PLGA/肽制剂增强了BCMA肽的递送。进一步的评估证明如通过流式细胞术测量的,PLGA/肽以时间依赖性的方式改善ImmDC肽加载(无载体/肽对PLGA/肽:0小时脉冲(基线)-4%对3%,2小时脉冲-22%对36%,4小时脉冲-28%对46%,6小时脉冲-43%对62%)(图33D)。此外,使用T2细胞作为抗原呈递细胞,可以检测到时间依赖性方式的改善的APC肽加载的相同模式(无载体/肽对PLGA/肽:30分钟脉冲-1%对4%,2小时脉冲-8%对11%,24小时脉冲-13%对41%)(图33E)。在两种抗原呈递细胞类型之间,原代ImmDC比T2细胞显示更高的肽摄取效率。因此,这些结果证明了PLGA/肽或脂质体/肽两者通过抗原呈递细胞增强BCMA肽加载的有益效应。

[0600] PLGA/肽CTL针对多种骨髓瘤细胞显示最高的功能性免疫应答。

[0601] 在与HLA-A2⁺BCMA⁺(U266,McCAR)或HLA-A2⁻BCMA⁺(RPMI)骨髓瘤细胞温育后,第四次刺激后一周对BCMA特异性CTL评估其肿瘤特异性活性。由(1)BCMA肽本身、(2)PLGA/肽或(3)脂质体/肽产生的BCMA-CTL的代表性流式细胞术分析证明了针对HLA-A2⁺U266骨髓瘤细胞而非HLA-A2⁻RPMI骨髓瘤细胞,HLA-A2限制抗骨髓瘤活性,包括CD107a脱粒(图34A),IFN- γ 产生(图34B)、IL-2产生(图34C)和TNF- α 产生(图34D)。在纳米颗粒产生的BCMA-CTL中,PLGA/肽诱导卓越的抗原特异性CTL,通过其比脂质体/BCMA肽诱导的CTL的更高的抗肿瘤活性水平[CD107a上调和IFN- γ /IL-2/TNF- α 产生]证明。进一步的分析证实,从其他HLA-A2⁺供体(n=3)产生的PLGA/肽CTL显示响应HLA-A2⁺BCMA⁺U266和HLA-A2⁺BCMA^{+(low)}McCAR而非MHC错配的HLA-A2⁻BCMA⁺RPMI骨髓瘤细胞的最高抗骨髓瘤活性(图34E)。相比之下,与BCMA肽CTL相比,脂质体/肽CTL具有略高水平的抗MM活性,它们都低于PLGA/肽CTL。因此,这些结果指示,在PLGA包裹后,BCMA肽的免疫原性增强,导致以HLA-A2限制性方式有效诱导针对多个骨髓瘤细胞的多功能CTL。

[0602] 由用PLGA包裹的BCMA肽刺激产生的BCMA-CTL具有对来自骨髓瘤患者的原代CD138⁺肿瘤细胞最高的抗MM活性。

[0603] 针对来自HLA-A2⁺或HLA-A2⁻骨髓瘤患者的原代CD138⁺肿瘤细胞进一步评估了在有或没有NP包裹的情况下产生的BCMA特异性CTL的骨髓瘤特异性功能活性。通过用单独的BCMA肽、PLGA/BCMA肽或脂质体/BCMA肽刺激产生的三种不同的效应细胞均显示效应细胞中CD107a脱粒和IFN- γ /IL-2/TNF- α 产生的最小背景水平(图35A)。在效应CTL中,PLGA/肽CTL对原代HLA-A2⁺CD138⁺(MM患者1)肿瘤细胞表明最高的抗MM活性[BCMA肽CTL对PLGA/肽CTL对脂质体/肽CTL:CD107a⁺CTL-15.0%对31.7%对16.2%,IFN- γ ⁺CTL-1.9%对7.4%对3.7%,IL-2⁺CTL-14.3%对32.3%对17.9%,TNF- α ⁺CTL-16.4%对36.8%对19.1%](图35B)。尽管具有DC的最高的肽摄取,但针对原发HLA-A2⁺CD138⁺肿瘤细胞,脂质体/肽-CTL的抗MM活性小于PLGA/肽-CTL。在针对从HLA-A2⁺MM患者#2获得的原代CD138⁺肿瘤细胞的效应CTL中检测到

类似的功能性抗MM活性模式,其中PLGA/肽-CTL具有最高活性(图35C)。相反,不同的BCMA-CTL无一具有针对HLA-A2⁺CD138⁺肿瘤细胞的抗肿瘤活性,从而证明了HLA-A2限制性免疫应答(图35D)。这些结果共同指示用PLGA/BCMA肽-CTL以HLA-A2限制性方式针对原代CD138⁺MM细胞观察到最高水平的抗骨髓瘤活性。结果还突出显示了通过在PLGA中包裹肽后产生BCMA特异性CTL增加的抗肿瘤活性的潜力。

[0604] 通过用PLGA包裹产生的BCMA-CTL增加CD28共刺激分子表达和肽特异性T细胞增殖。

[0605] 为了更好地了解PLGA介导的BCMA特异性CTL中高抗肿瘤活性的机制,进行了实验以评估它们在CD8⁺T细胞和BCMA肽特异性四聚体⁺CTL上共刺激分子的表达。与BCMA肽CTL相比,PLGA/肽CTL表明在CD8⁺T细胞上具有上调的CD28⁺⁺表达的独特细胞亚组(肽CTL对PLGA/肽CTL:15.6%对32.0%;图36A上图)。另外,与BCMA肽CTL相比,PLGA/肽CTL含有更高的BCMA四聚体⁺肽特异性CTL的比例(肽-CTL对PLGA/肽-CTL:16.5%对35.0%;图36A下图)。此外,与四聚体阴性的CD8⁺T细胞相比,在四聚体阳性的细胞内检测到更高频率的亮CD28⁺⁺细胞。与BCMA肽四聚体⁺CTL相比,PLGA/肽四聚体⁺CTL显示更高频率的CD28⁺⁺亮细胞(51.8%对30.3%)。因此,这些结果证明PLGA/肽诱导的CTL具有更大比例的具有独特的亮CD28⁺⁺BCMA特异性CTL群体的BCMA特异性四聚体⁺细胞。接下来,进行实验以证明在识别由APC呈递的其关联BCMA肽时,BCMA肽CTL和PLGA/肽CTL的增殖。与非BCMA特异性CD8⁺T细胞的基线增殖(第3天,第4天对第5天:0%,1%对4%)相比,BCMA肽CTL和PLGA/肽CTL两者表明以时间依赖性方式在识别其关联BCMA肽后增加的增殖(第3天,第4天对第5天:11%,18%对33%)。重要的是,PLGA/肽-CTL中在所有时间点(第3天,第4天对第5天:25%,45%对69%)均较早发生增殖(图36B),指示识别和响应关联BCMA肽的能力增加。最后,在每个效应细胞群体中测量响应关联BCMA肽产生的Th1细胞因子产生。与BCMA肽CTL(两天温育-31.5%,四天温育-42.1%)相比,PLGA/肽CTL具有更高的IFN- γ 产生水平(两天温育-33.8%,四天温育-60.6%)(图36C)。因此,这些结果证明了响应PLGA/肽-CTL而增强的肽特异性CD8⁺T细胞免疫应答、增殖和IFN- γ 产生,指示PLGA/肽包裹可以提高BCMA肽的免疫原性,从而产生具有更高抗肿瘤活性的CTL。

[0606] 响应用PLGA/BCMA肽刺激的与增强的抗骨髓瘤活性有关的记忆CD8⁺CTL的有效生成。

[0607] 进一步进行实验以表征和比较记忆细胞形成和PLGA/肽、空白PLGA(对照)和单独的肽诱导的CTL的免疫功能活性。在CFSE测定法中,PLGA/肽CTL在评估的所有时间点时比BCMA肽-CTL(第4天:12.20%,第6天:29.20%)显示更高的响应HLA-A2⁺U266细胞的增殖(第4天:28.90%,第6天:44.70%)(图37A)。用PLGA本身作为媒介物刺激的效应细胞在4天和6共培养后显示最小的增殖(小于7%)。另外,在培养基对照中未见增殖,提供了CTL增殖对骨髓瘤细胞特异性的证据。接下来,进行实验以表征BCMA肽CTL和PLGA/肽CTL内的记忆细胞形成。总体而言,观察到每轮肽刺激后CTL记忆细胞形成的逐渐增加:与BCMA肽(3'刺激:15.3%,4'刺激:19.5%,5'刺激:79.0%)相比,PLGA/BCMA肽刺激后,总CD45RO⁺记忆CTL更高(3'刺激:20.7%,4'刺激:32.8%,5'刺激:93.5%)(图37B)。PLGA/肽CTL和BCMA肽CTL中记忆细胞发育的此种模式在肽刺激的2或4个循环后仍得到保持(图37C)。还进行了实验以表征PLGA/肽CTL和BCMA肽CTL中特异性中枢和效应记忆亚组形成。与总CD45RO⁺记忆形成一

致,1个刺激循环后,中央记忆(CM)和效应记忆(EM)CD8⁺T细胞亚组两者逐渐增加(PLGA/肽-CM 5.3%,EM 8.1%,肽-CM 2.9%,EM 5.7%),并在3个刺激循环后进一步增加(PLGA/肽-CM 14.8%,EM 13.2%,肽-CM 12.4%,EM 11.0%)。在5个肽刺激循环后,观察到中央记忆和效应记忆细胞形成比例的主要差异(PLGA/肽-CM 42.4%,EM 32.6%,肽-CM 3.5%,EM 95.4%)。另外,PLGA/肽CTL维持较高比例的具有最高抗肿瘤活性的中央记忆T细胞,而没有进一步分化为效应记忆细胞(图37D)。

[0608] 通过PLGA/BCMA肽维持与有效抗骨髓瘤活性相关的中央记忆CD8⁺CTL。

[0609] 在每个记忆CTL亚组中进一步研究了特异性抗MM活性。在此,确认了通过用PLGA/肽或BCMA肽的刺激从不同的HLA-A2⁺个体产生的BCMA特异性CTL的HLA-A2限制性抗骨髓瘤活性。在由PLGA/肽诱导的CTL中一致地看到响应于HLA-A2⁺U266骨髓瘤细胞的最高的免疫功能活性(CD107a上调和Th1型细胞因子产生)(图38A,38B,38C)。重要的是,与效应记忆亚组相比,在中央记忆中发现最高的抗MM活性,如CD107a脱粒(图38A,38C)、IFN- γ 产生(图38B,38C)和IL-2/TNF- α 产生(图38C)显示。因此,这些指示PLGA包裹的BCMA肽比BCMA肽诱导更稳健的肿瘤特异性CTL应答,这由PLGA/肽BCMA抗原特异性CTL内中央记忆细胞的产生和维持证明。

[0610] 这些结果支持使用PLGA/BCMA肽在骨髓瘤的新型疫苗接种和/或过继免疫疗法治疗方案中诱导具有抗肿瘤活性的有效BCMA CTL。

[0611] 其他实施方式

[0612] 应当理解,尽管本发明已经结合其详细描述进行了描述,但是前述描述意图例示而不是限制本发明的范围,本发明的范围由所附权利要求书的范围限定。其他方面、优点和修改在所附权利要求书的范围内。

序列表

	<110> 达纳-法伯癌症研究所股份有限公司 (DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC.)
	<120> 用于治疗癌症的 BCMA 和 TACI 抗原特异的免疫原性肽
	<130> 00530-0337W01
	<140> PCT/US2018/049260
	<141> 2018-08-31
	<150> 62/553,669
	<151> 2017-09-01
	<160> 24
	<170> PatentIn version 3.5
	<210> 1
	<211> 9
	<212> PRT
[0001]	<213> 人工序列
	<220>
	<221> 来源
	<223> /注释="人工序列的描述: 合成肽"
	<400> 1
	Leu Ile Ile Ser Leu Ala Val Phe Val
	1 5
	<210> 2
	<211> 9
	<212> PRT
	<213> 人工序列
	<220>
	<221> 来源
	<223> /注释="人工序列的描述: 合成肽"
	<400> 2
	Ala Val Phe Val Leu Met Phe Leu Leu
	1 5

<210> 3
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述：合成肽"

<400> 3
Ser Gln Asn Glu Tyr Phe Asp Ser Leu
1 5

<210> 4
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

[0002]

<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述：合成肽"

<400> 4
Val Leu Met Phe Leu Leu Arg Lys Ile
1 5

<210> 5
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述：合成肽"

<400> 5
Ala Ile Leu Trp Thr Cys Leu Gly Leu
1 5

	<210> 6 <211> 9 <212> PRT <213> 人工序列 <220> <221> 来源 <223> /注释="人工序列的描述：合成肽" <400> 6 Ile Leu Pro Arg Gly Leu Glu Tyr Thr 1 5
[0003]	<210> 7 <211> 9 <212> PRT <213> 人工序列 <220> <221> 来源 <223> /注释="人工序列的描述：合成肽" <400> 7 Phe Leu Val Ala Val Ala Cys Phe Leu 1 5 <210> 8 <211> 9 <212> PRT <213> 人工序列 <220> <221> 来源 <223> /注释="人工序列的描述：合成肽" <400> 8 Val Leu Cys Cys Phe Leu Val Ala Val 1 5 <210> 9 <211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成肽"

<400> 9

Lys Leu Ser Ala Asp Gln Val Ala Leu

1 5

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成肽"

[0004]

<400> 10

Thr Leu Gly Leu Cys Leu Cys Ala Val

1 5

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成肽"

<400> 11

Ala Leu Val Tyr Ser Thr Leu Gly Leu

1 5

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述：合成肽"

<400> 12
Leu Ser Ala Asp Gln Val Ala Leu Val
1 5

<210> 13
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述：合成肽"

<400> 13
Tyr Leu Met Phe Leu Leu Arg Lys Ile
1 5

[0005]

<210> 14
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述：合成肽"

<400> 14
Tyr Ile Leu Trp Thr Cys Leu Gly Leu
1 5

<210> 15
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成肽"

<400> 15

Tyr Leu Val Ala Val Ala Cys Phe Leu
1 5

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成肽"

<400> 16

Tyr Leu Ser Ala Asp Gln Val Ala Leu
1 5

[0006]

<210> 17

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成肽"

<400> 17

Tyr Leu Gly Leu Cys Leu Cys Ala Val
1 5

<210> 18

<211> 184

<212> PRT

<213> 智人

<400> 18

Met Leu Gln Met Ala Gly Gln Cys Ser Gln Asn Glu Tyr Phe Asp Ser
1 5 10 15

<210> 19
<211> 293
<212> PRT
<213> 智人

<400> 19
Met Ser Gly Leu Gly Arg Ser Arg Arg Gly Gly Arg Ser Arg Val Asp
1 5 10 15

Gln Glu Glu Arg Phe Pro Gln Gly Leu Trp Thr Gly Val Ala Met Arg
20 25 30

Ser Cys Pro Glu Glu Gln Tyr Trp Asp Pro Leu Leu Gly Thr Cys Met
35 40 45

[0008] Ser Cys Lys Thr Ile Cys Asn His Gln Ser Gln Arg Thr Cys Ala Ala
50 55 60

Phe Cys Arg Ser Leu Ser Cys Arg Lys Glu Gln Gly Lys Phe Tyr Asp
65 70 75 80

His Leu Leu Arg Asp Cys Ile Ser Cys Ala Ser Ile Cys Gly Gln His
85 90 95

Pro Lys Gln Cys Ala Tyr Phe Cys Glu Asn Lys Leu Arg Ser Pro Val
100 105 110

Asn Leu Pro Pro Glu Leu Arg Arg Gln Arg Ser Gly Glu Val Glu Asn
115 120 125

Asn Ser Asp Asn Ser Gly Arg Tyr Gln Gly Leu Glu His Arg Gly Ser
130 135 140

Glu Ala Ser Pro Ala Leu Pro Gly Leu Lys Leu Ser Ala Asp Gln Val
145 150 155 160

Ala Leu Val Tyr Ser Thr Leu Gly Leu Cys Leu Cys Ala Val Leu Cys
165 170 175

Cys Phe Leu Val Ala Val Ala Cys Phe Leu Lys Lys Arg Gly Asp Pro
180 185 190

Cys Ser Cys Gln Pro Arg Ser Arg Pro Arg Gln Ser Pro Ala Lys Ser
195 200 205

Ser Gln Asp His Ala Met Glu Ala Gly Ser Pro Val Ser Thr Ser Pro
210 215 220

Glu Pro Val Glu Thr Cys Ser Phe Cys Phe Pro Glu Cys Arg Ala Pro
225 230 235 240

[0009]

Thr Gln Glu Ser Ala Val Thr Pro Gly Thr Pro Asp Pro Thr Cys Ala
245 250 255

Gly Arg Trp Gly Cys His Thr Arg Thr Thr Val Leu Gln Pro Cys Pro
260 265 270

His Ile Pro Asp Ser Gly Leu Gly Ile Val Cys Val Pro Ala Gln Glu
275 280 285

Gly Gly Pro Gly Ala
290

<210> 20

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述：合成肽"

<400> 20
Gly Leu Val Gly Leu Ile Phe Ala Val
1 5

<210> 21
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述：合成肽"

<400> 21
Ser Leu Tyr Asn Thr Val Ala Thr Leu
1 5

[0010]

<210> 22
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述：合成肽"

<400> 22
Tyr Gln Asn Glu Tyr Phe Asp Ser Leu
1 5

<210> 23
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

[0011]

<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述: 合成 6xHis 标签"

<400> 23
His His His His His His
1 5

<210> 24
<211> 4
<212> PRT
<213> Unknown

<220>
<221> 来源
<223> /注释="未知者的描述:KDEL 序列"

<400> 24
Lys Asp Glu Leu
1

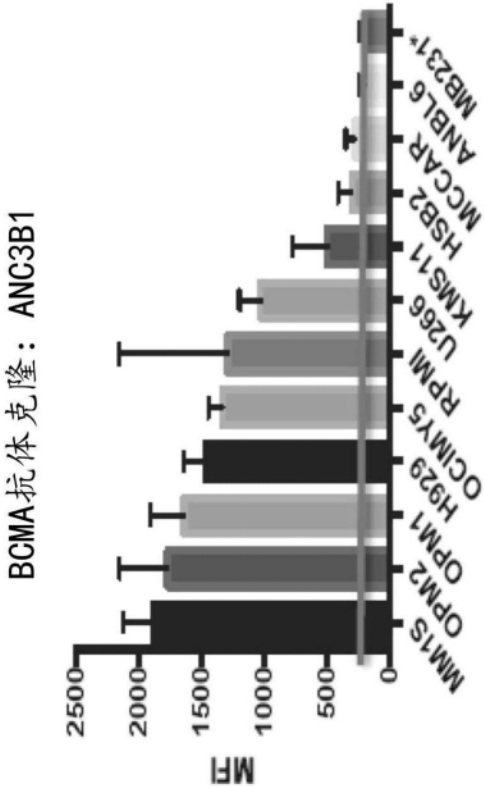


图1A

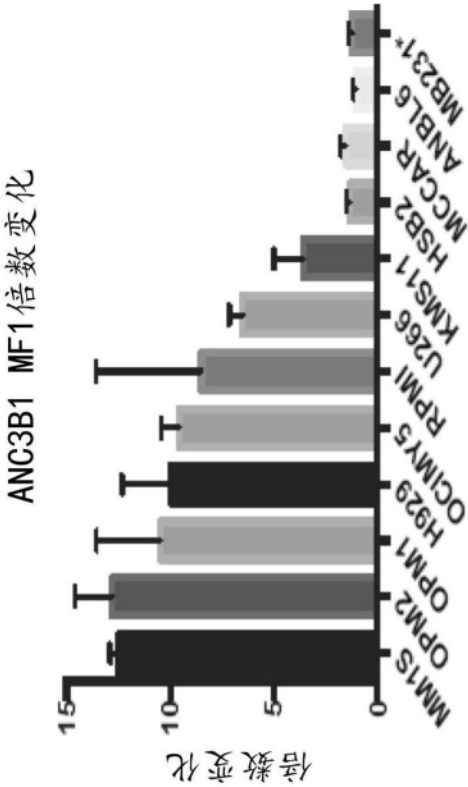


图1B

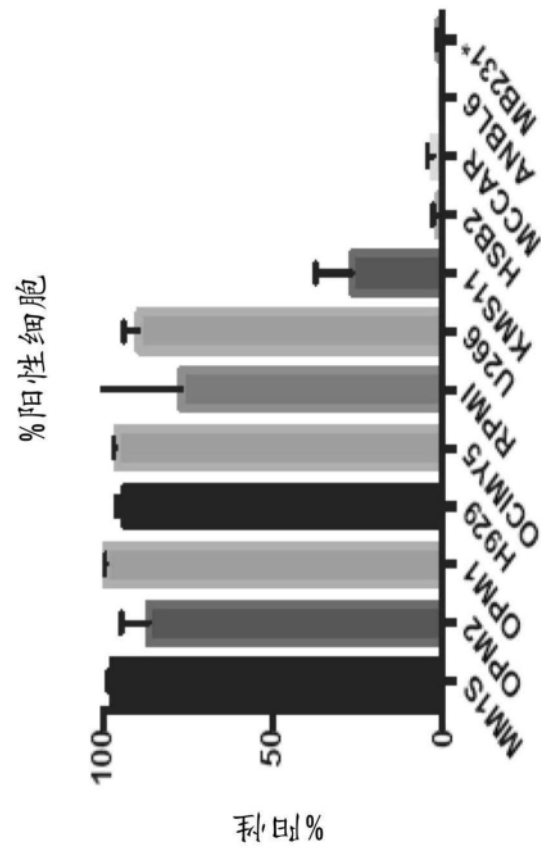


图1C

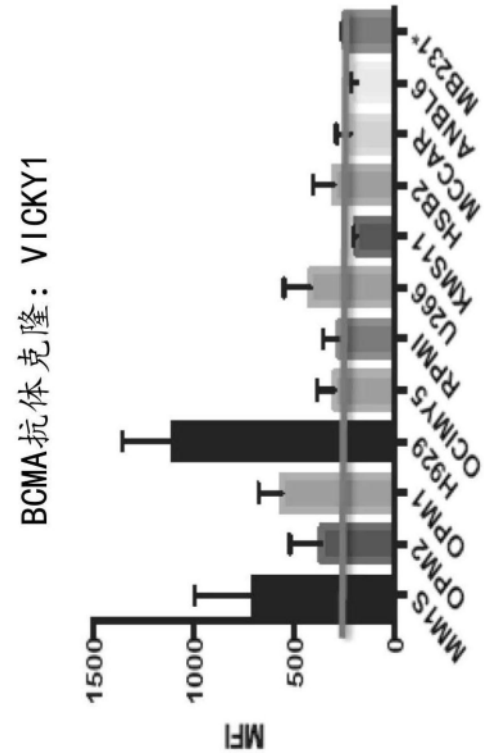


图1D

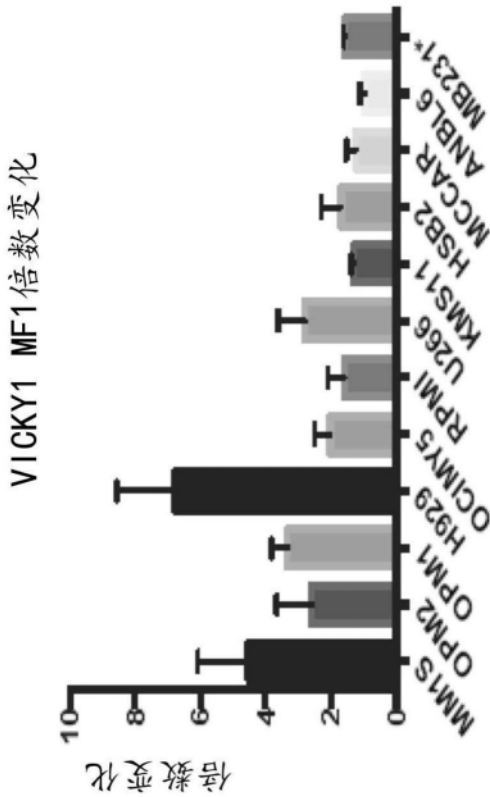


图1E

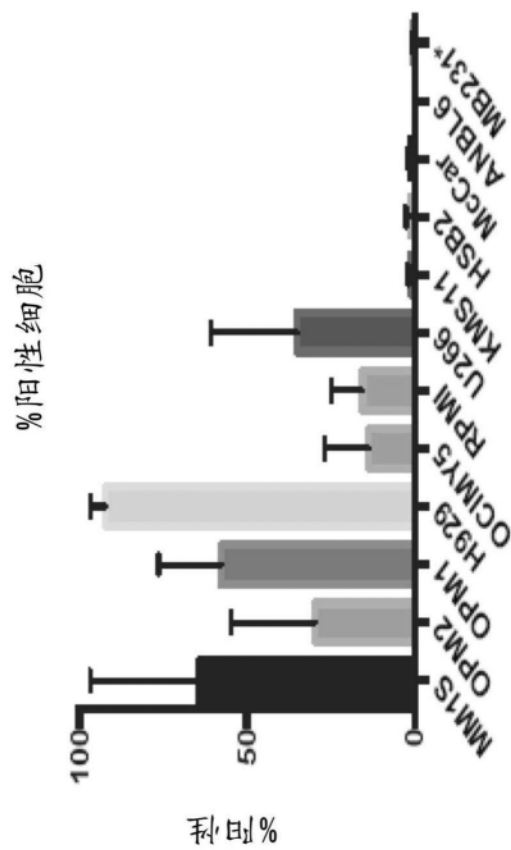


图1F

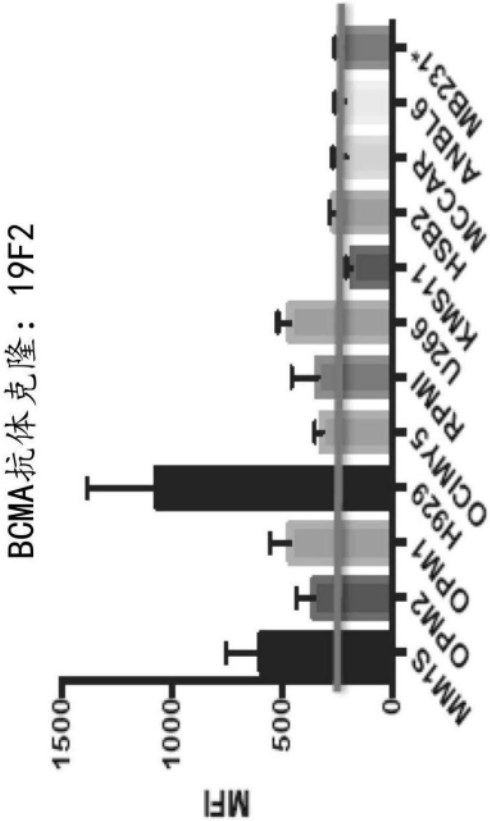


图1G

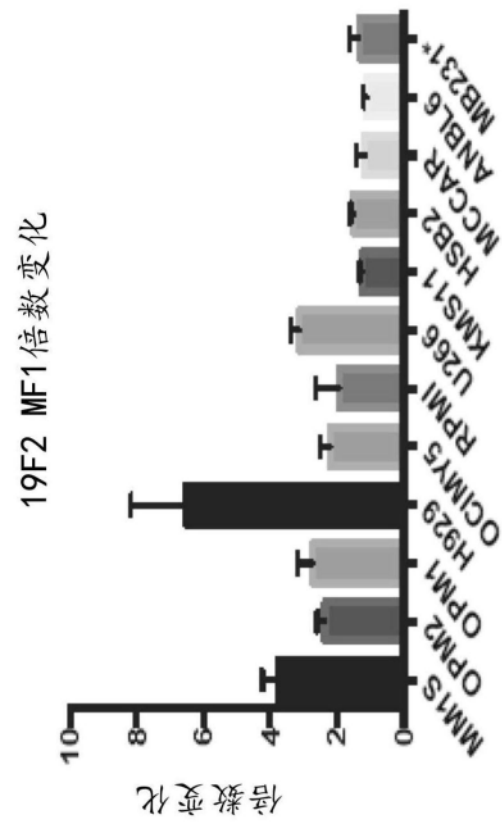


图1H

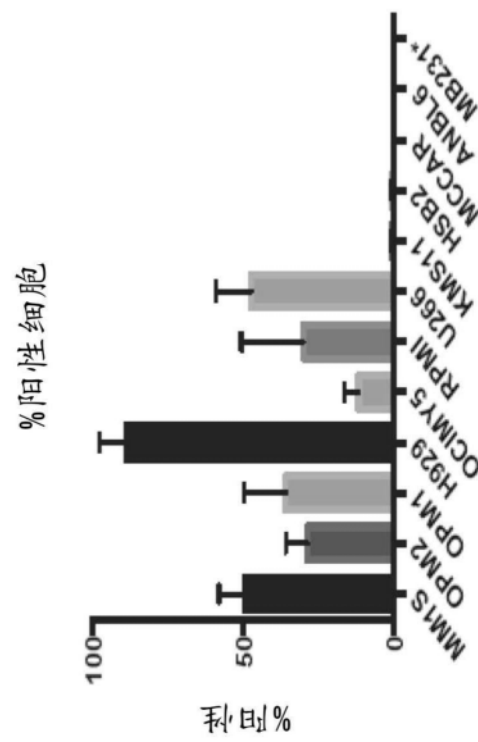


图1I

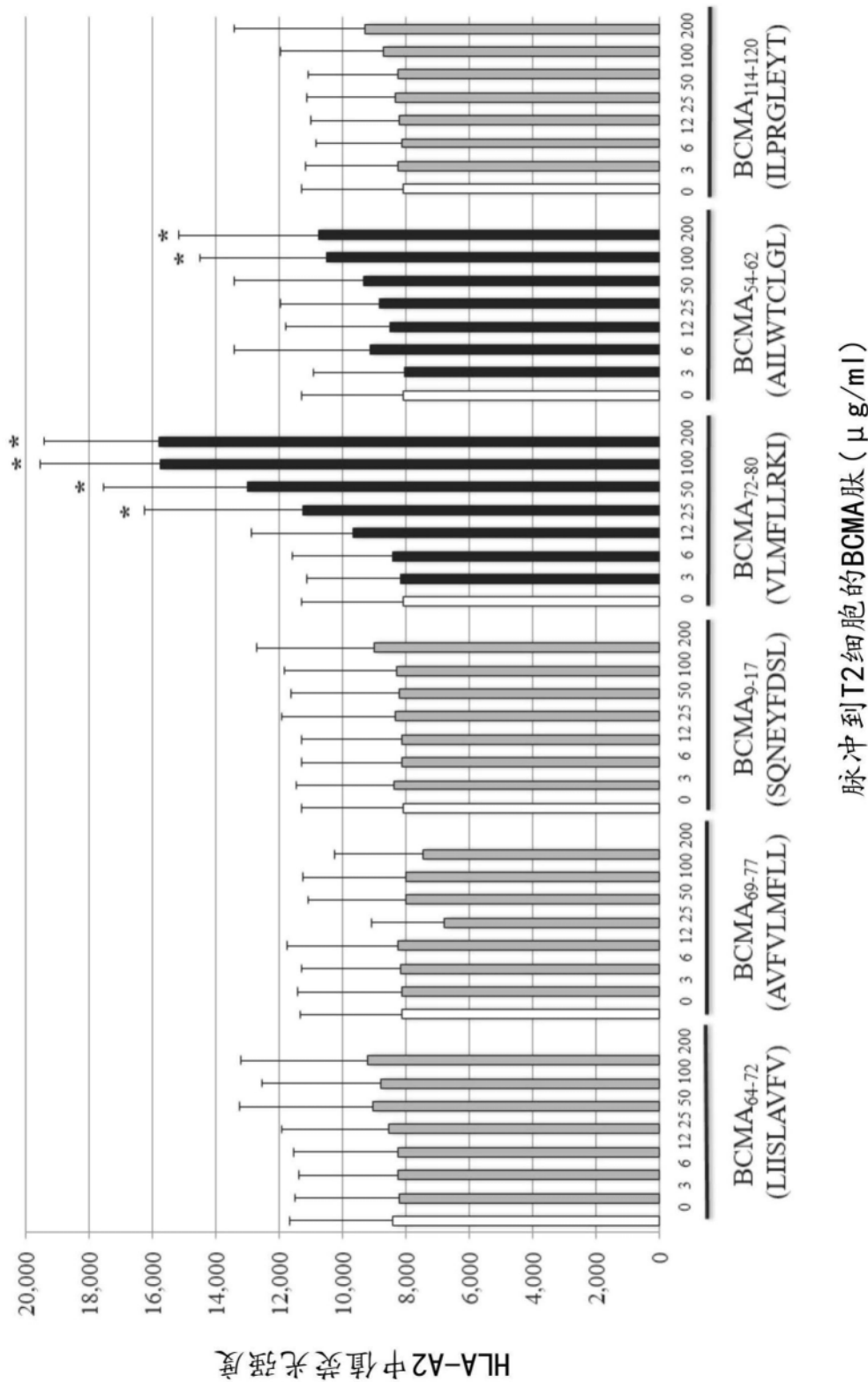


图2

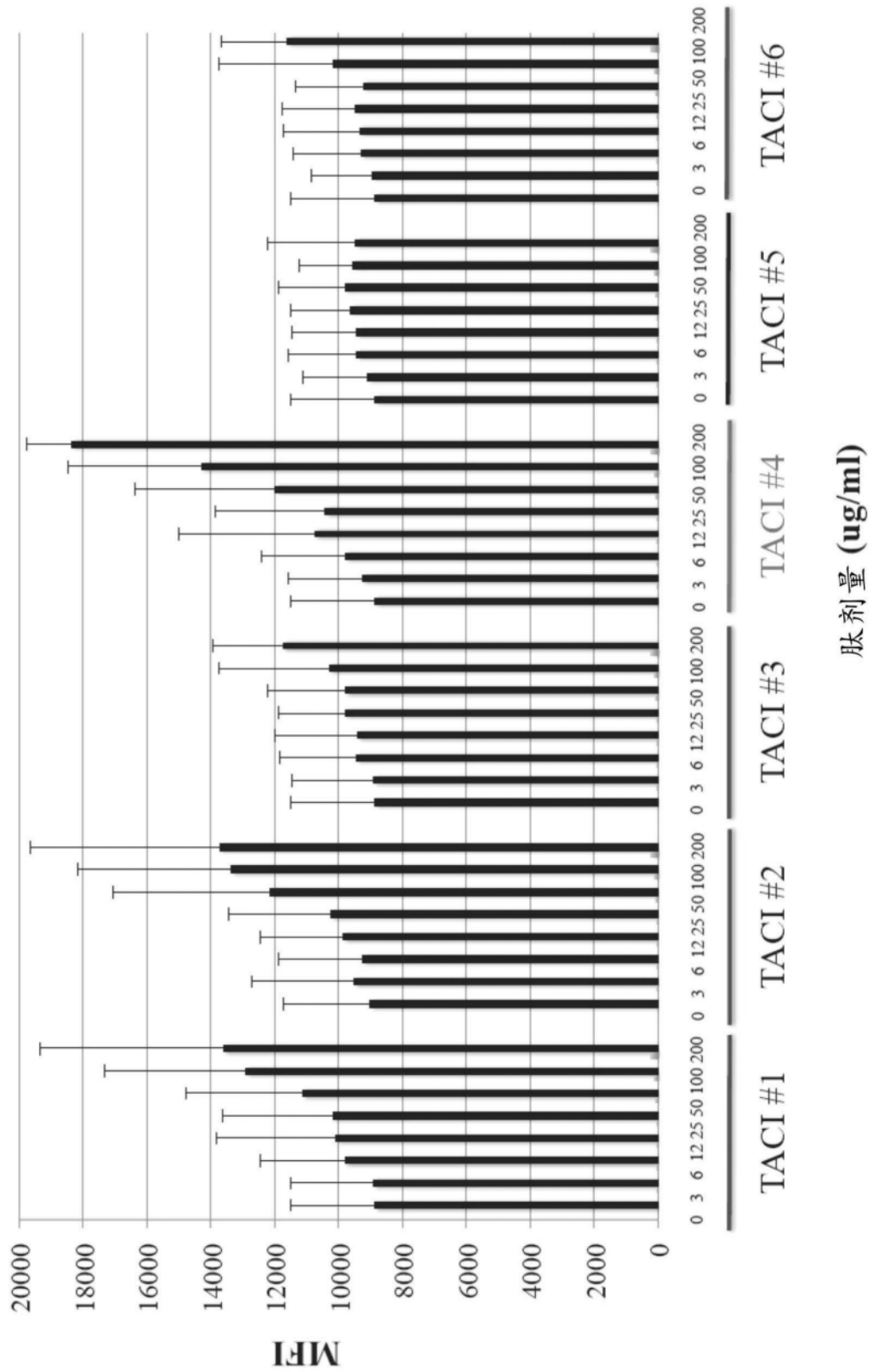


图3

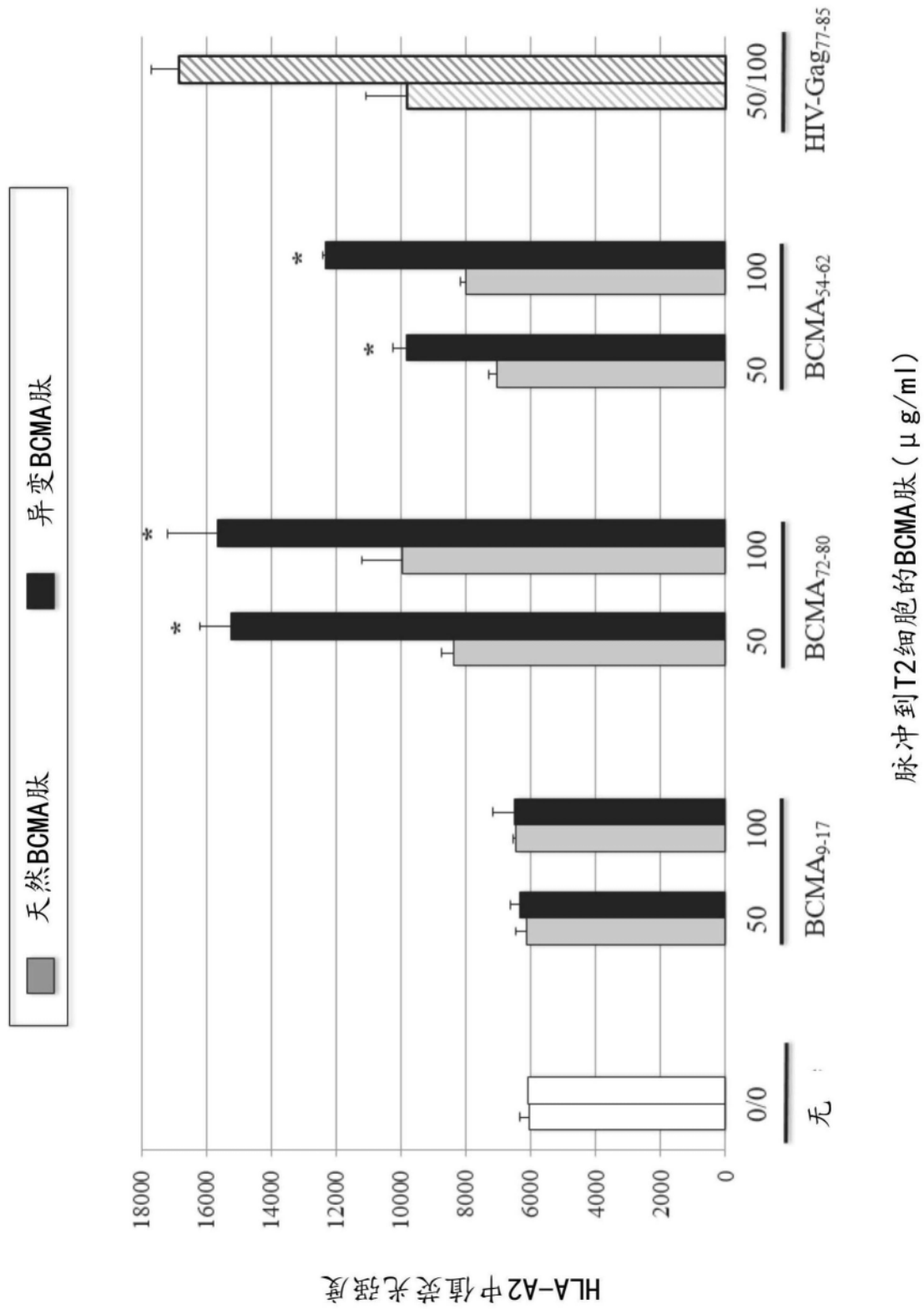


图4

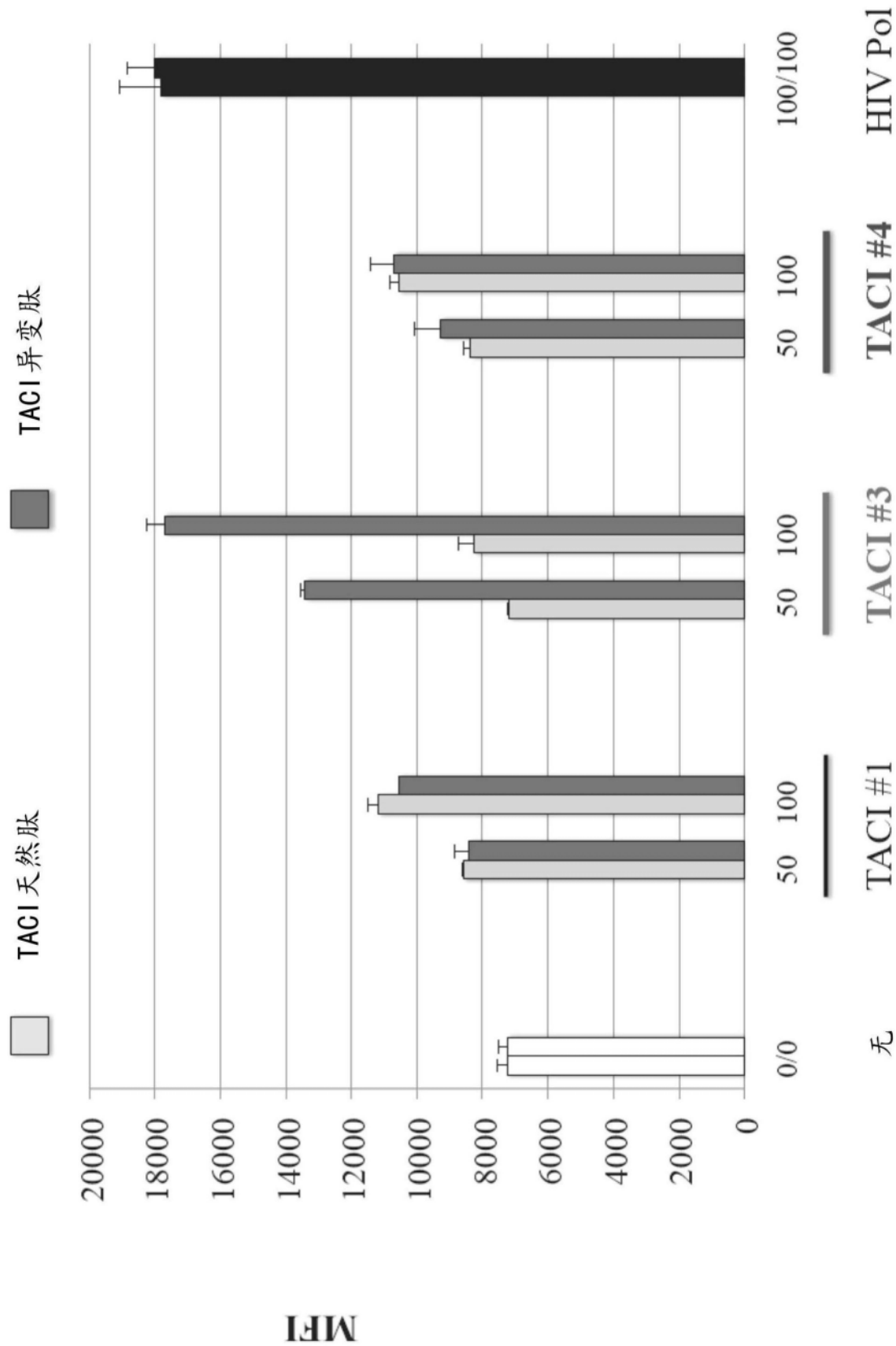


图5

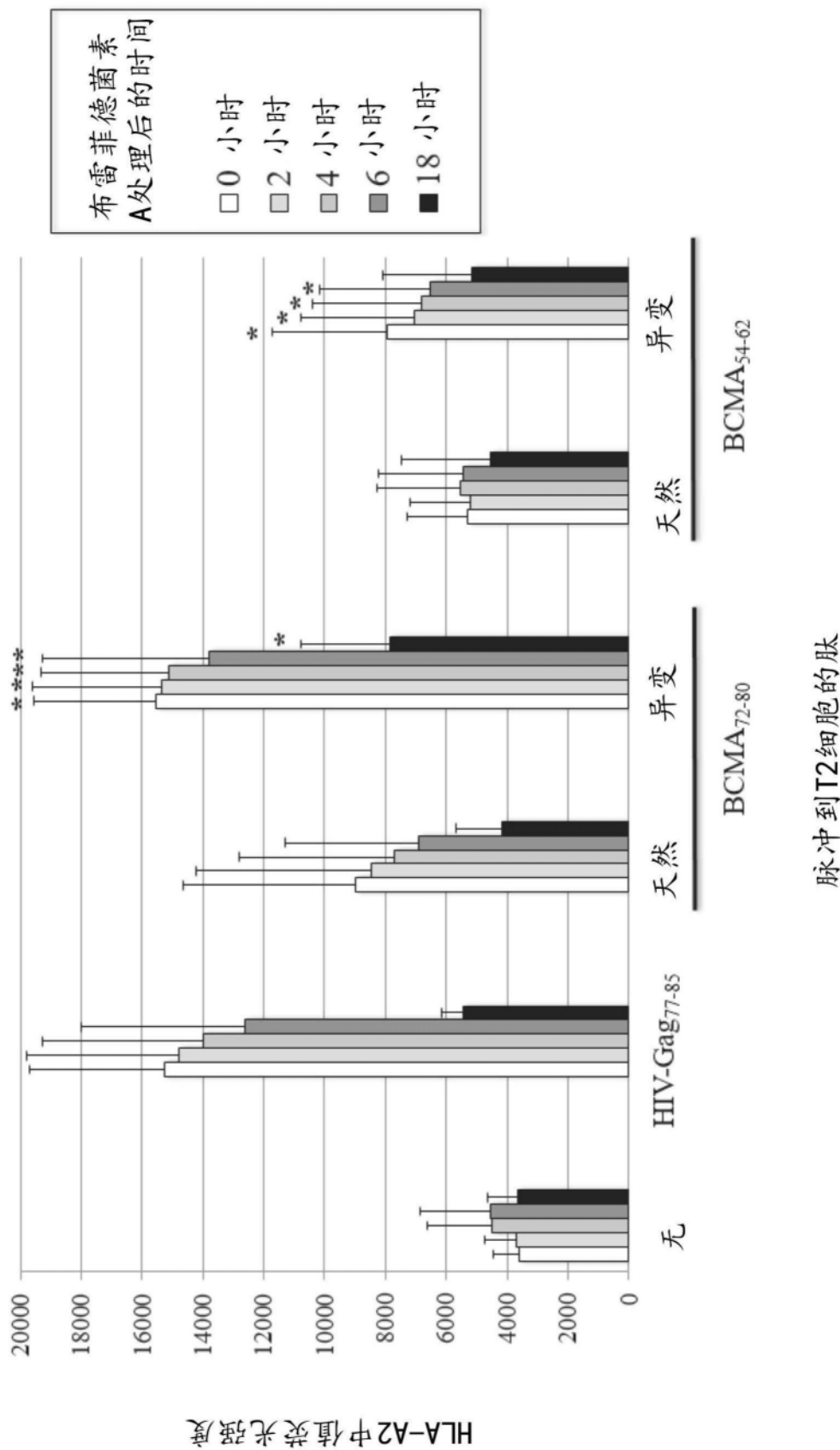


图6

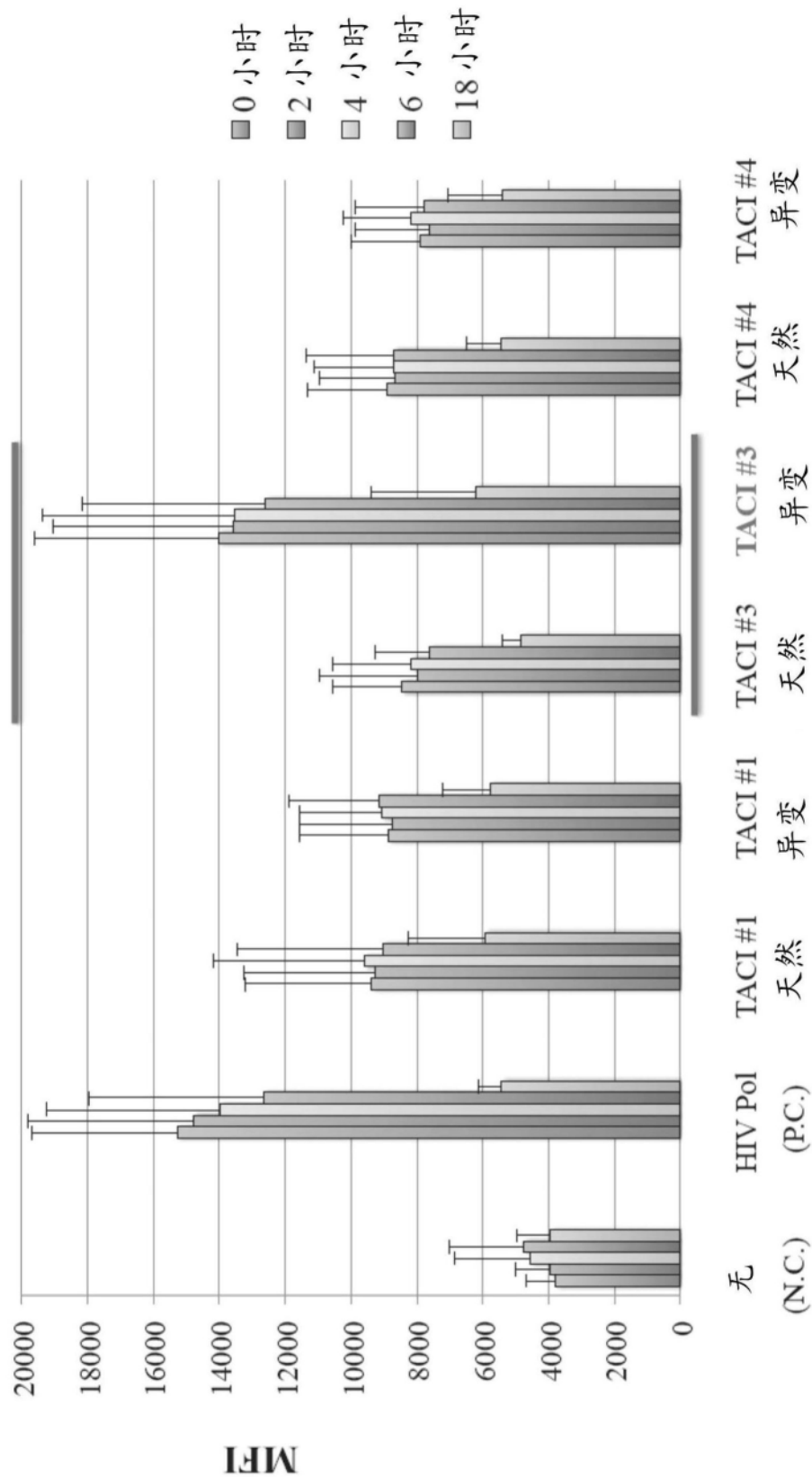


图7

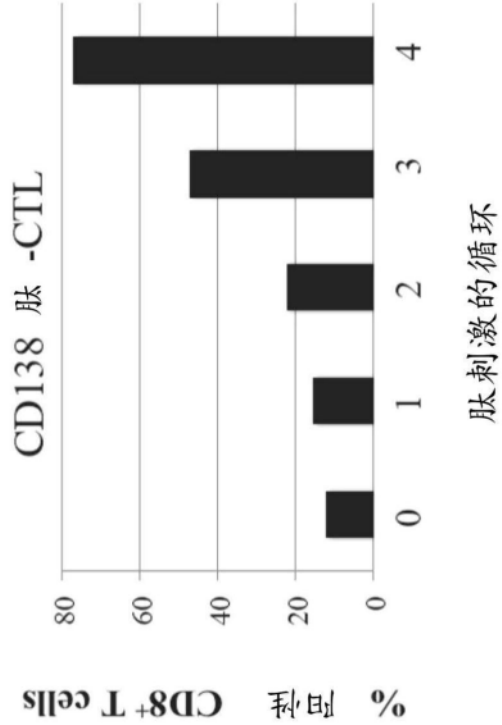


图8A

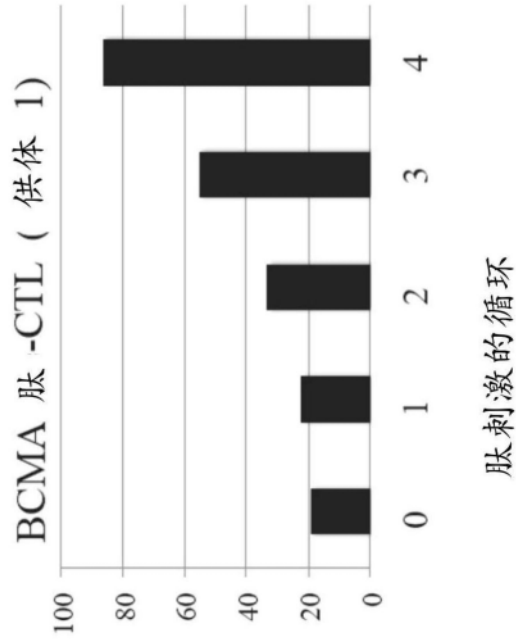


图8B

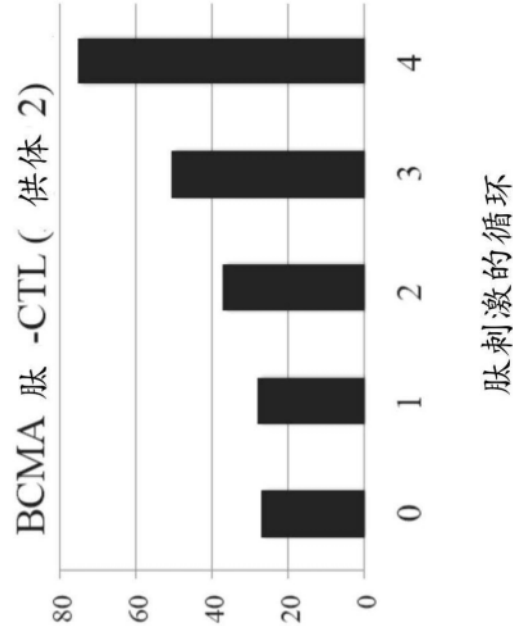


图8C

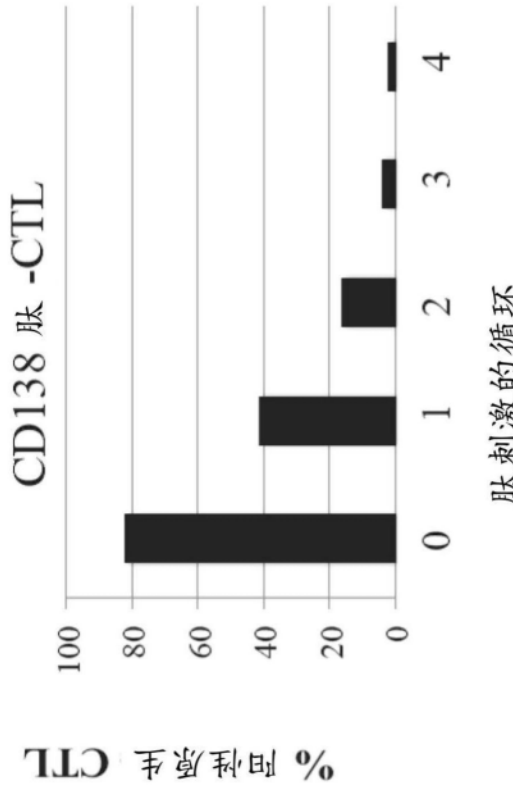


图9A

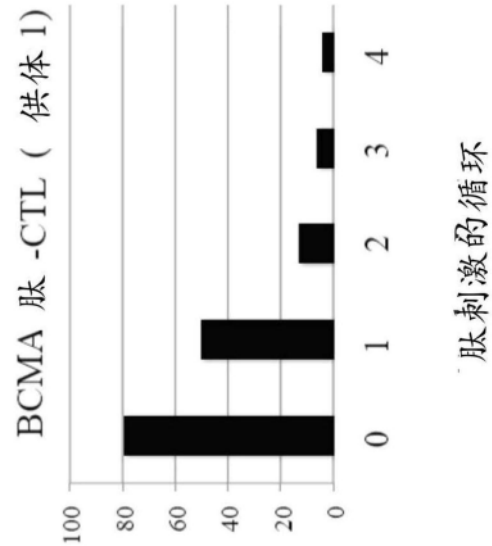


图9B

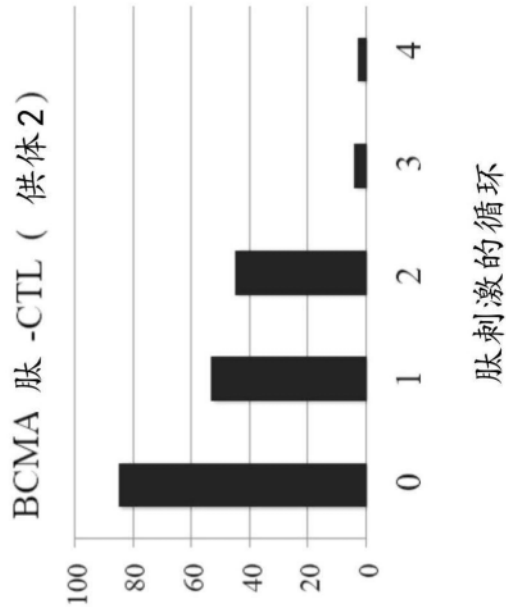


图9C

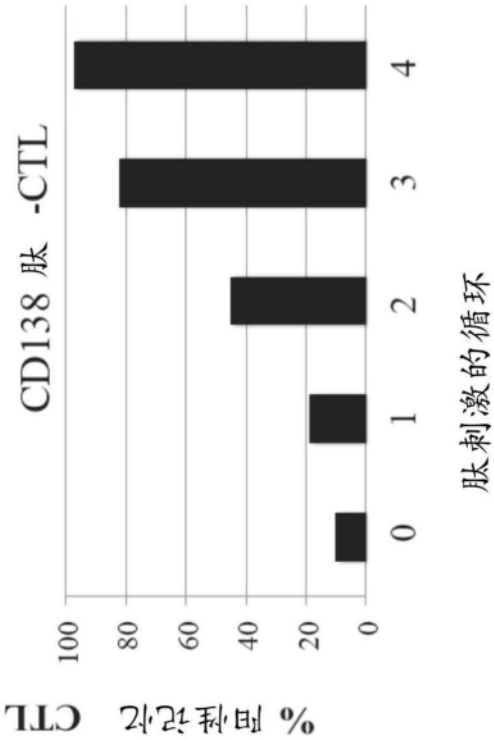


图10A

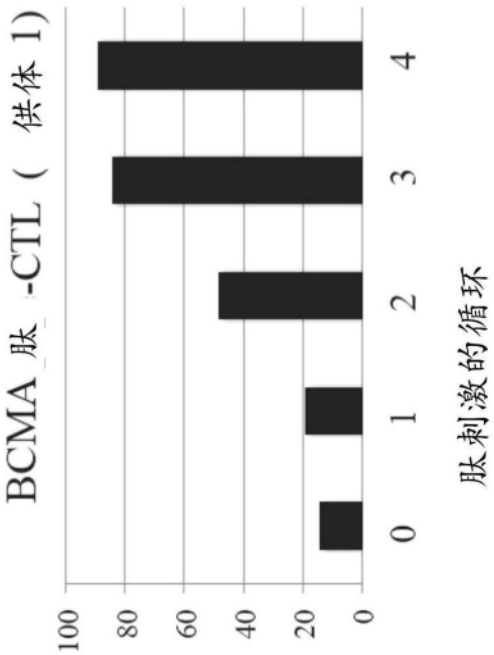


图10B

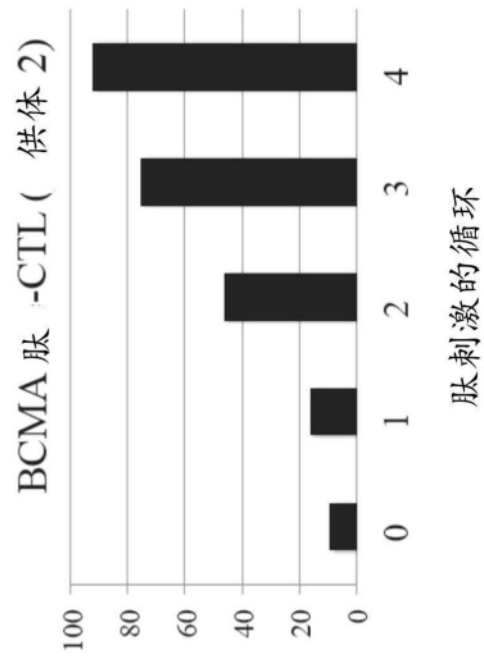


图10C

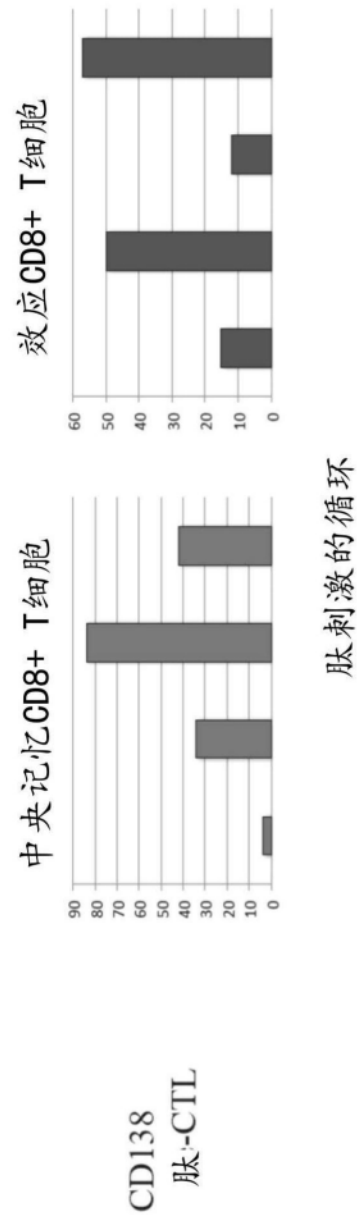


图11A

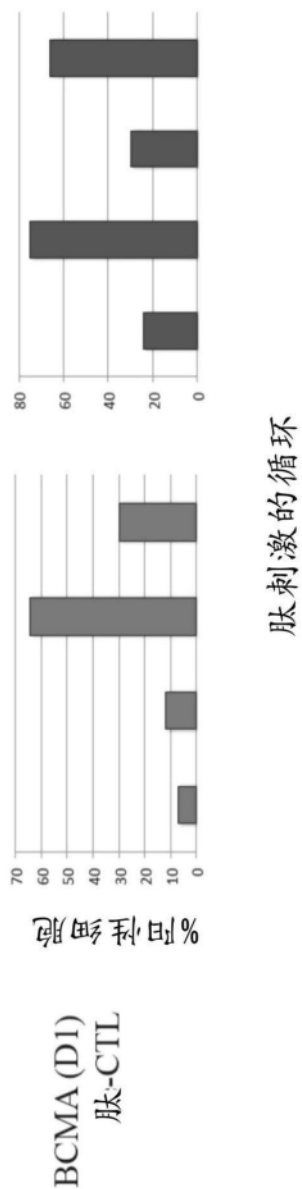


图11B

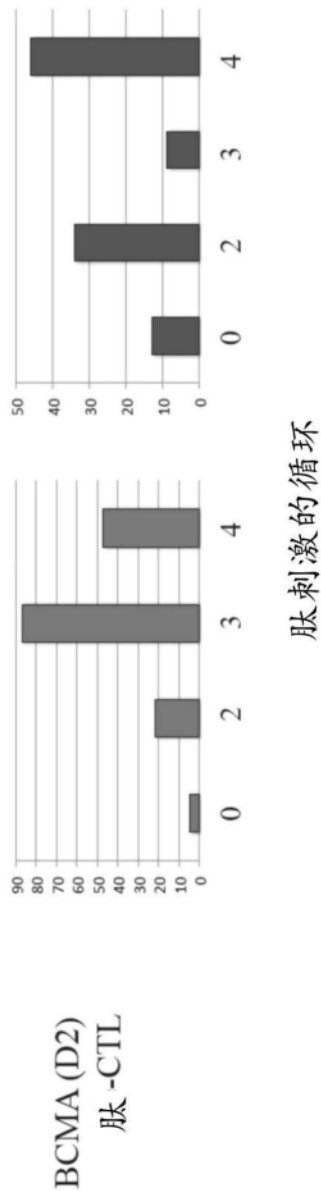


图11C

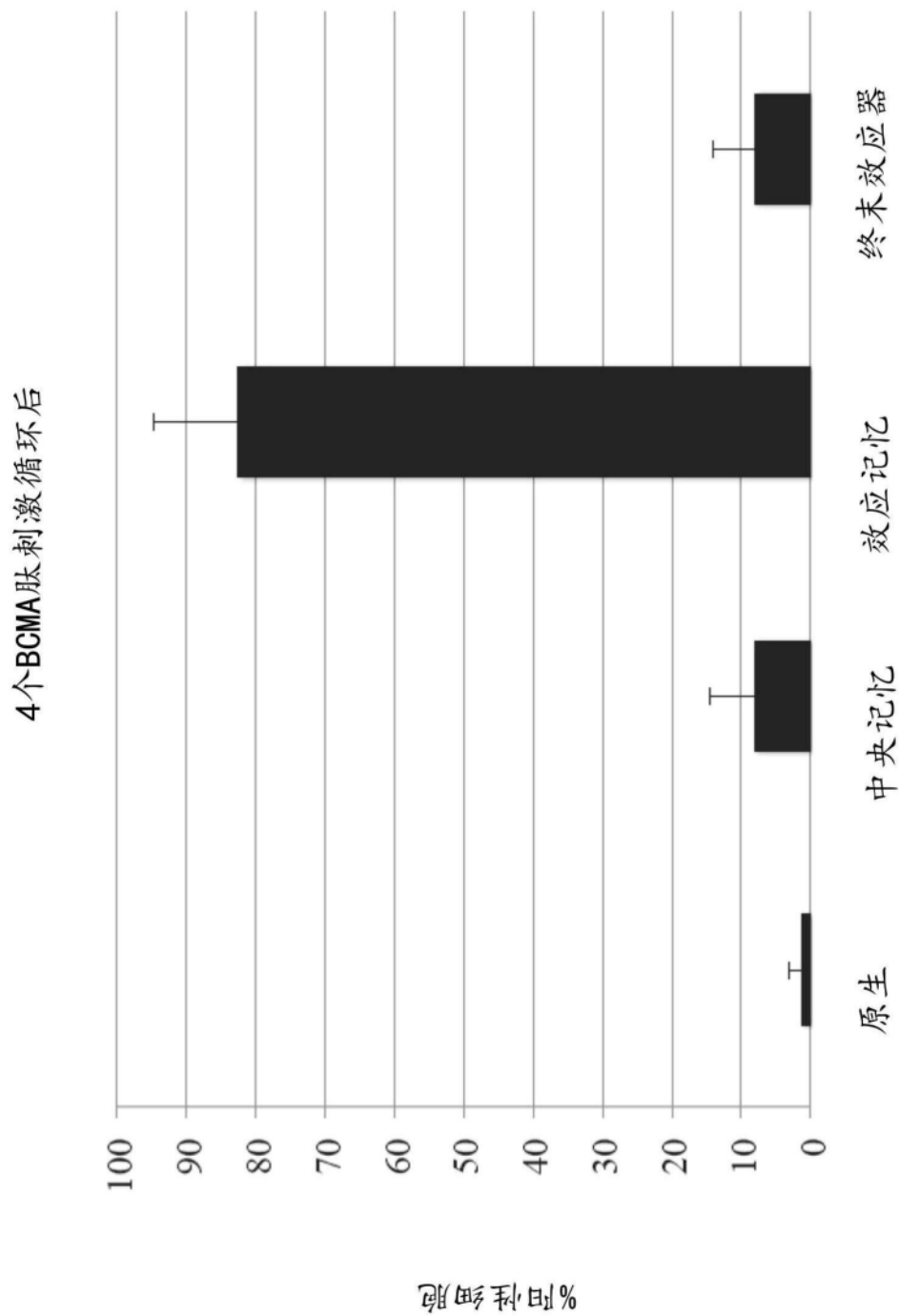


图12

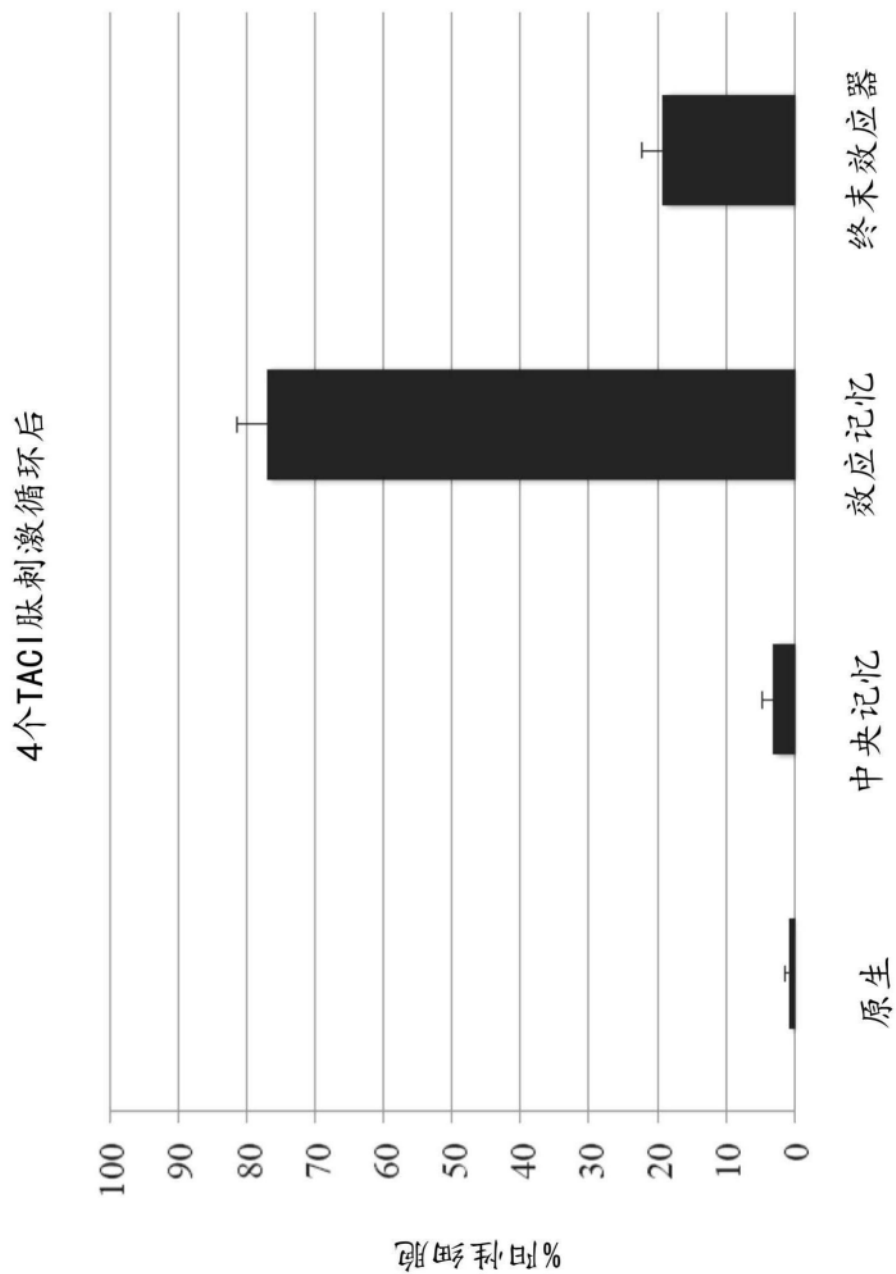


图13

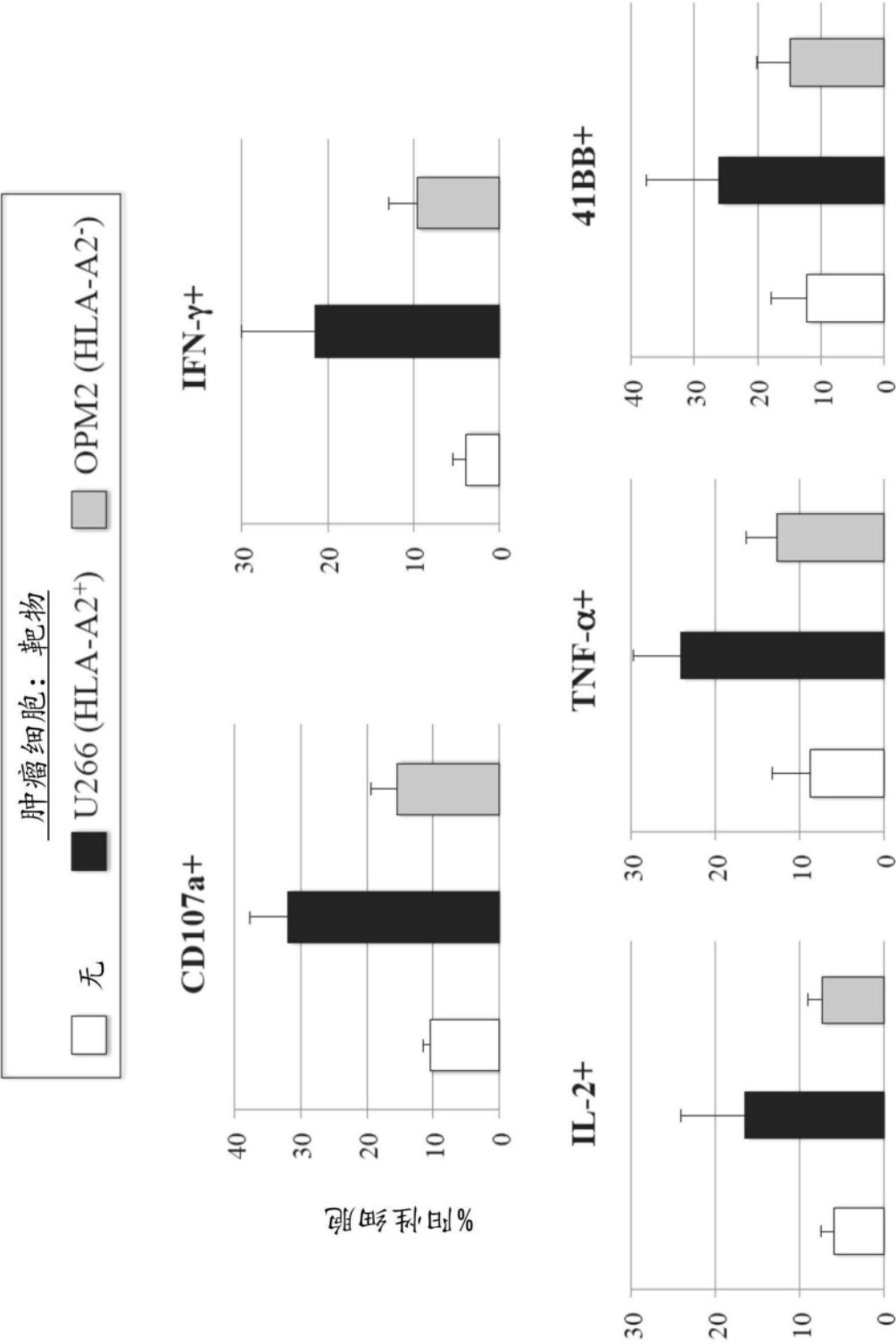


图14

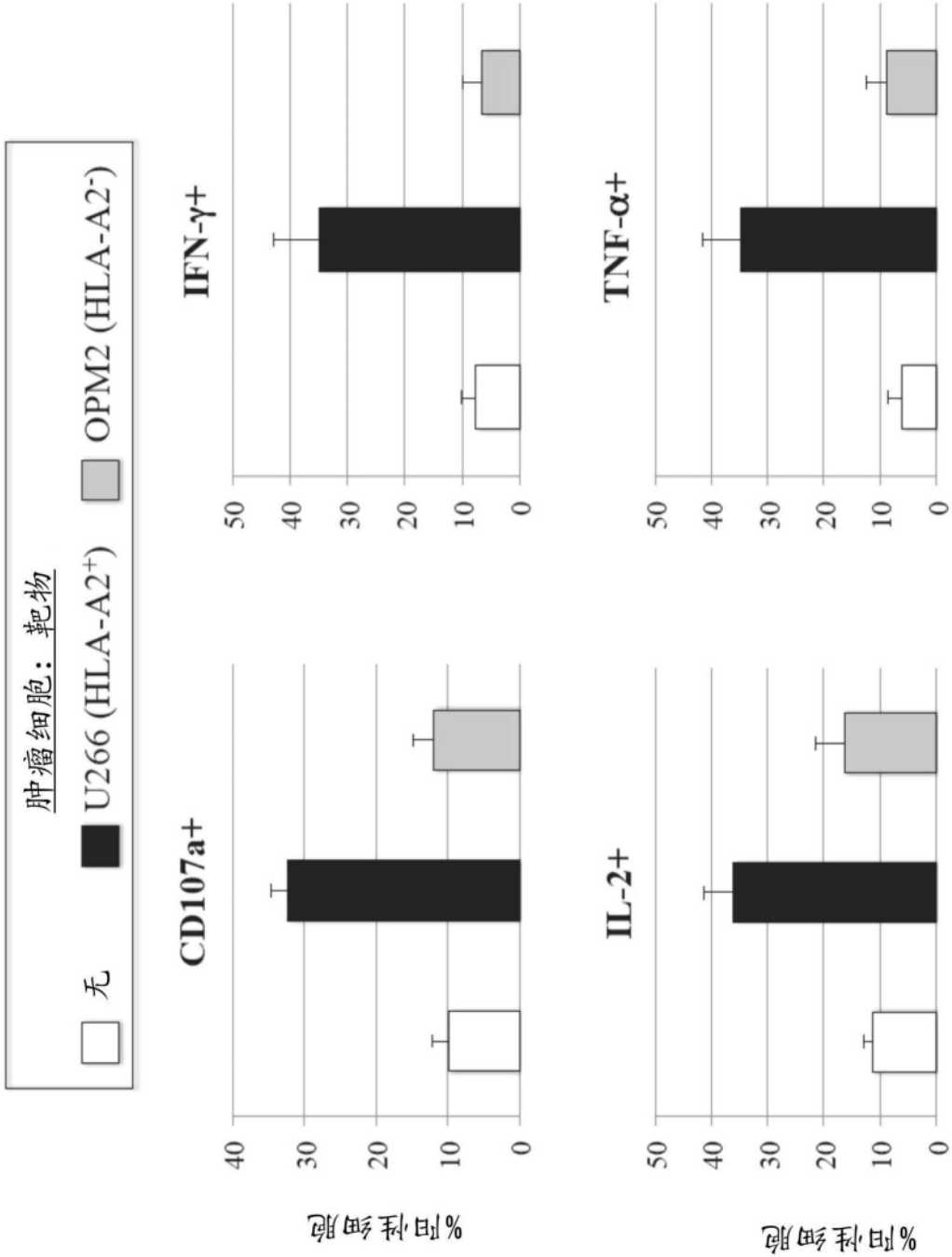


图15

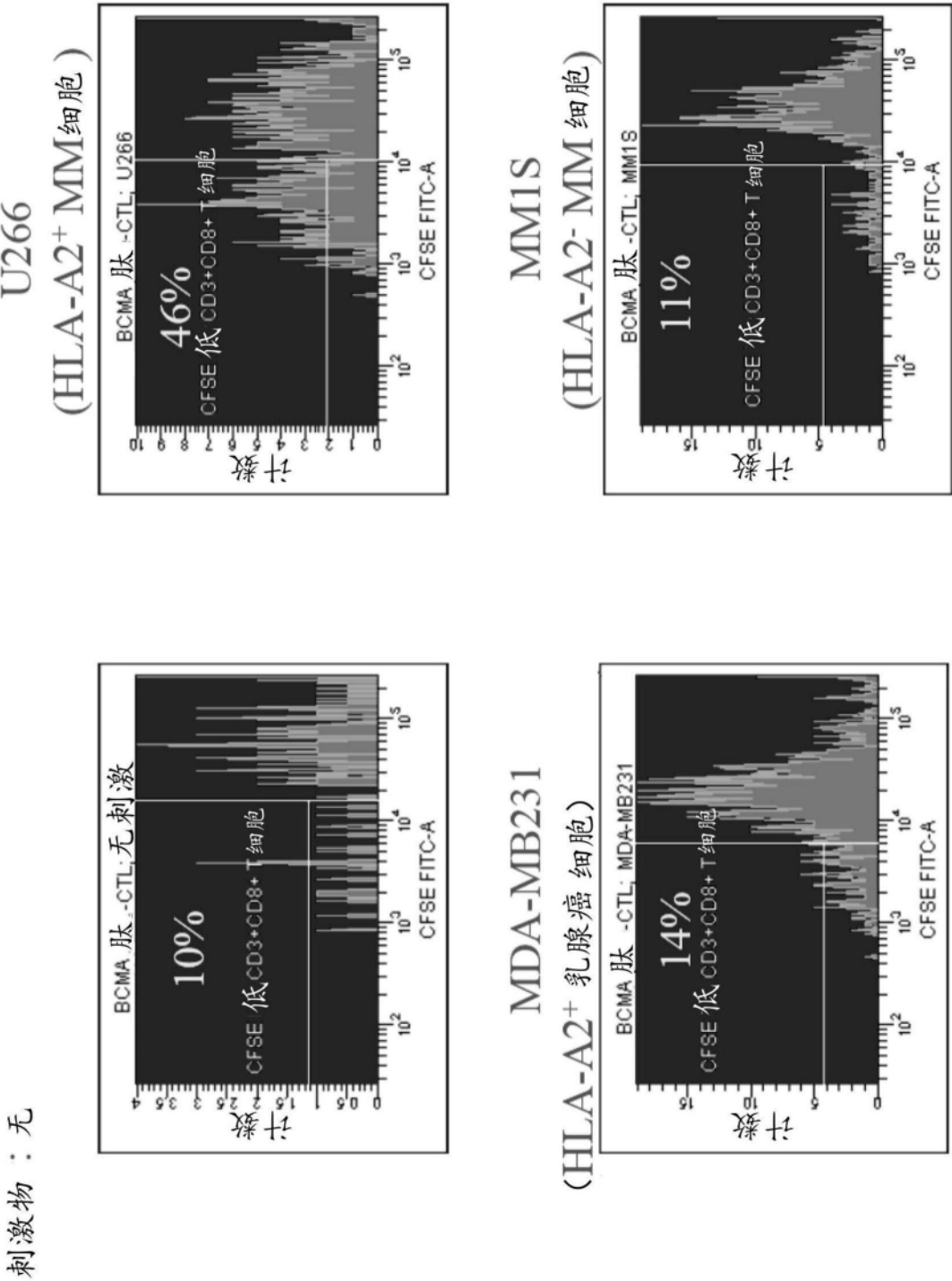


图16

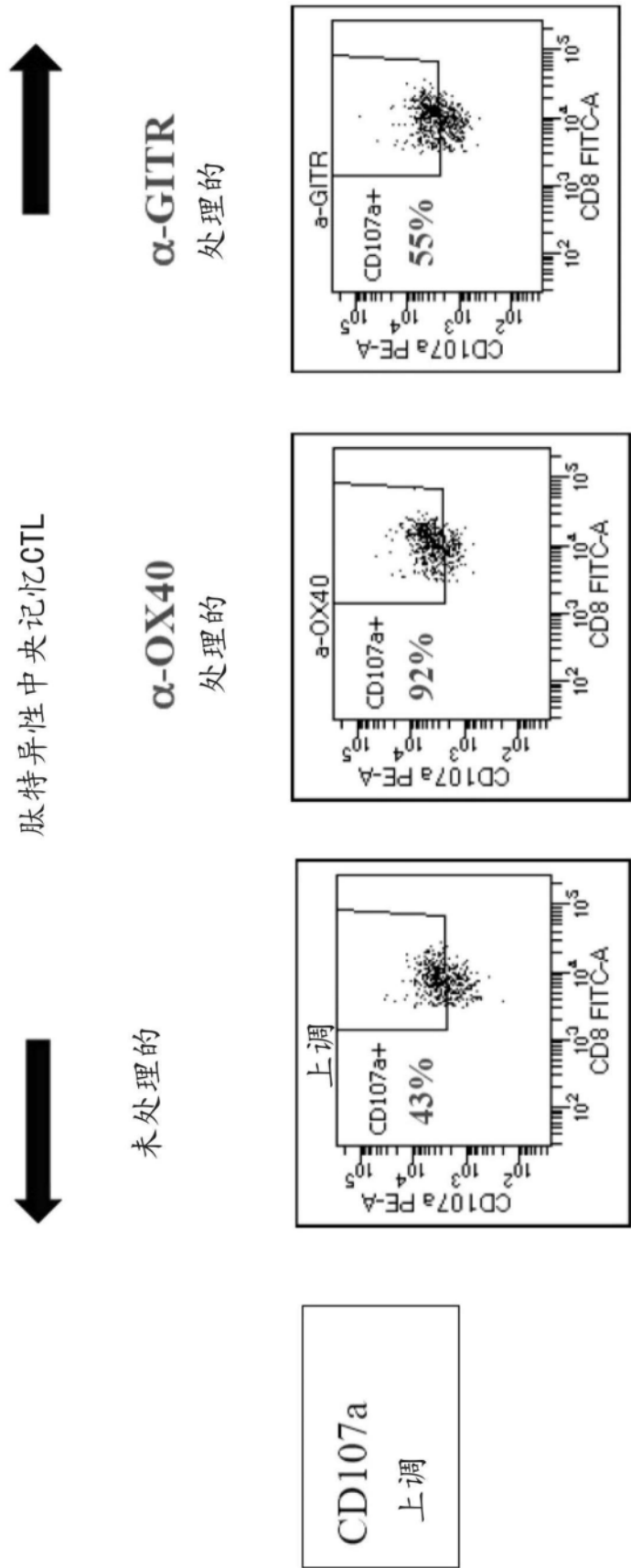


图17

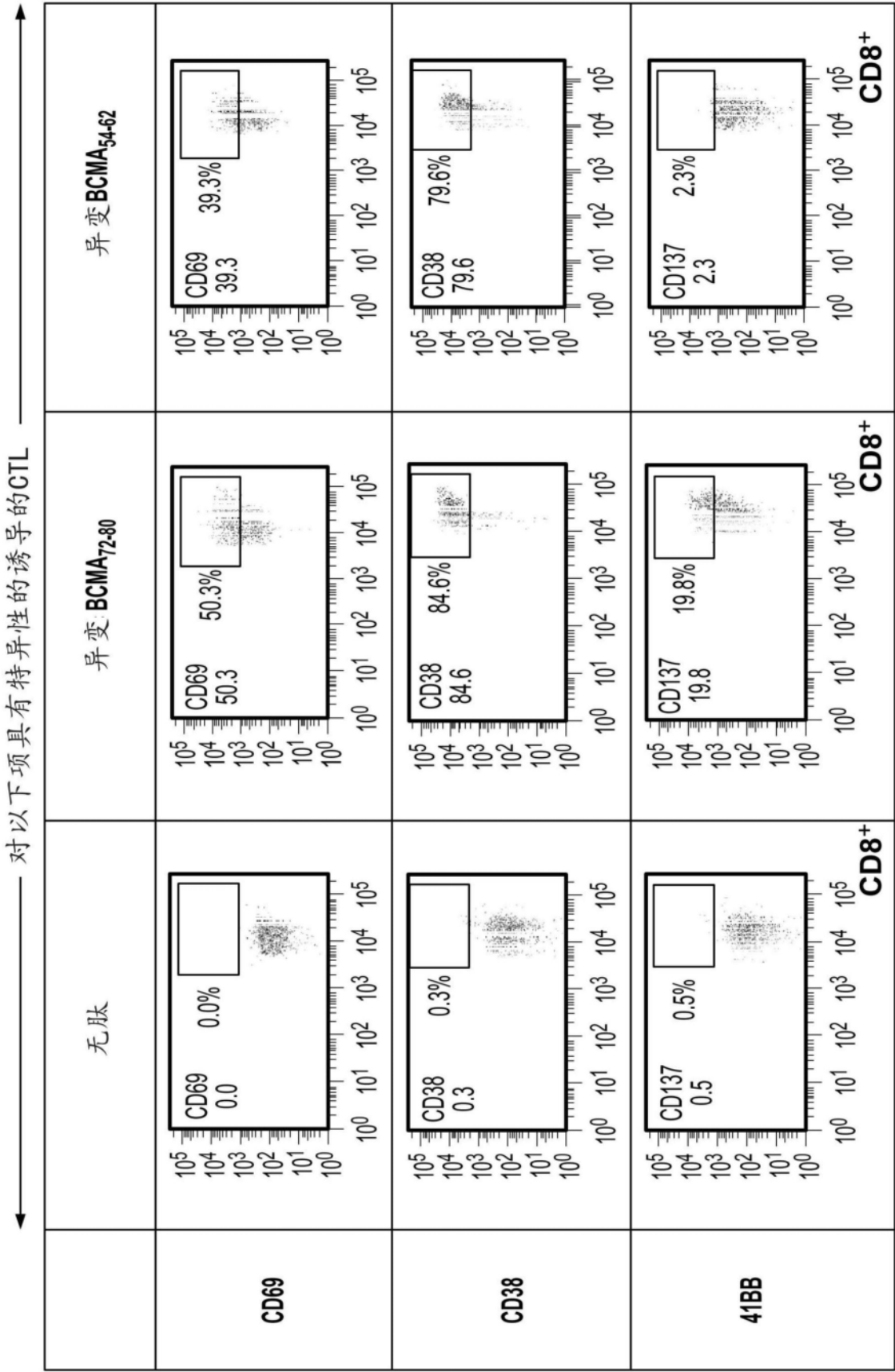


图18A

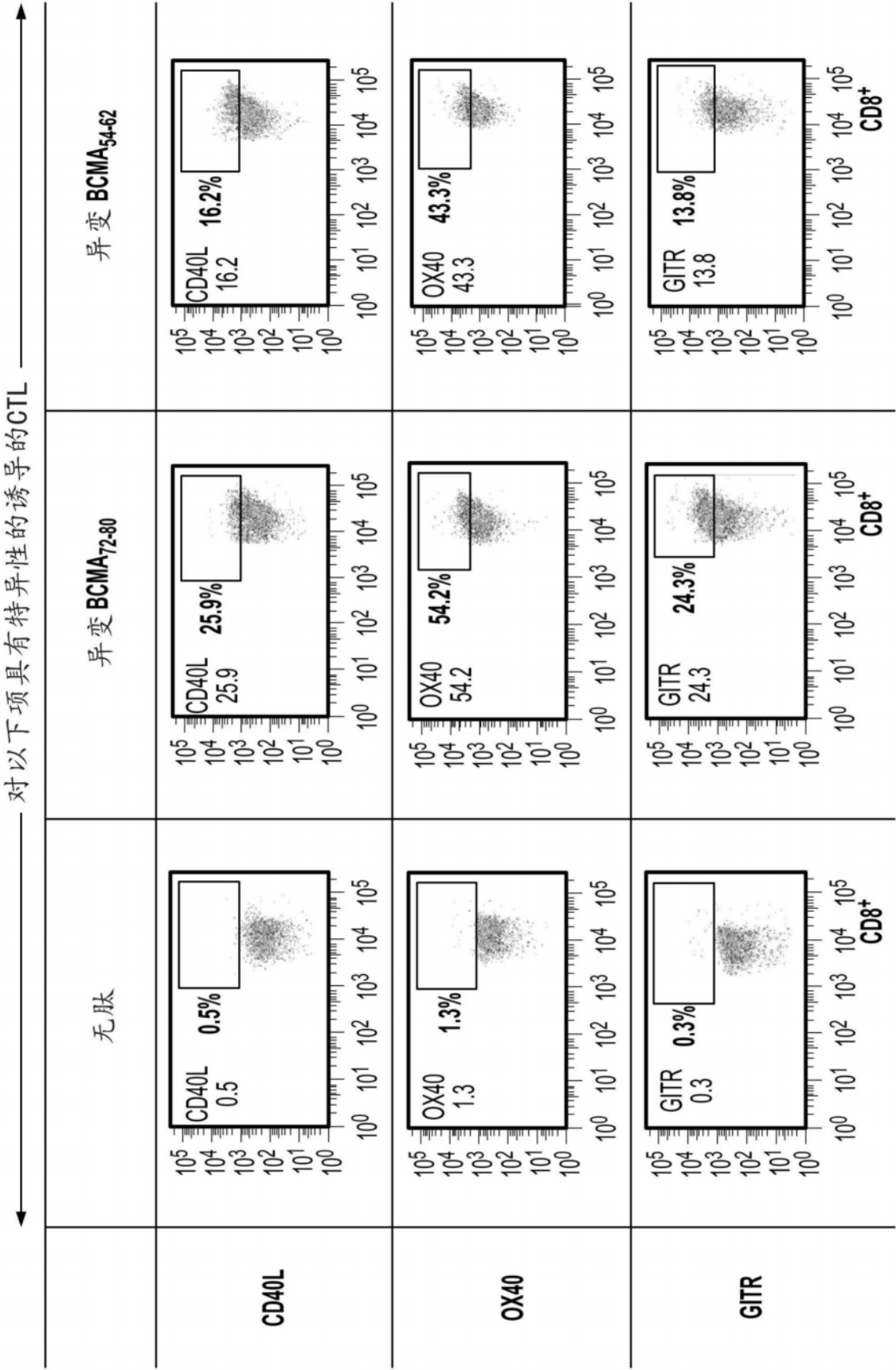


图18B

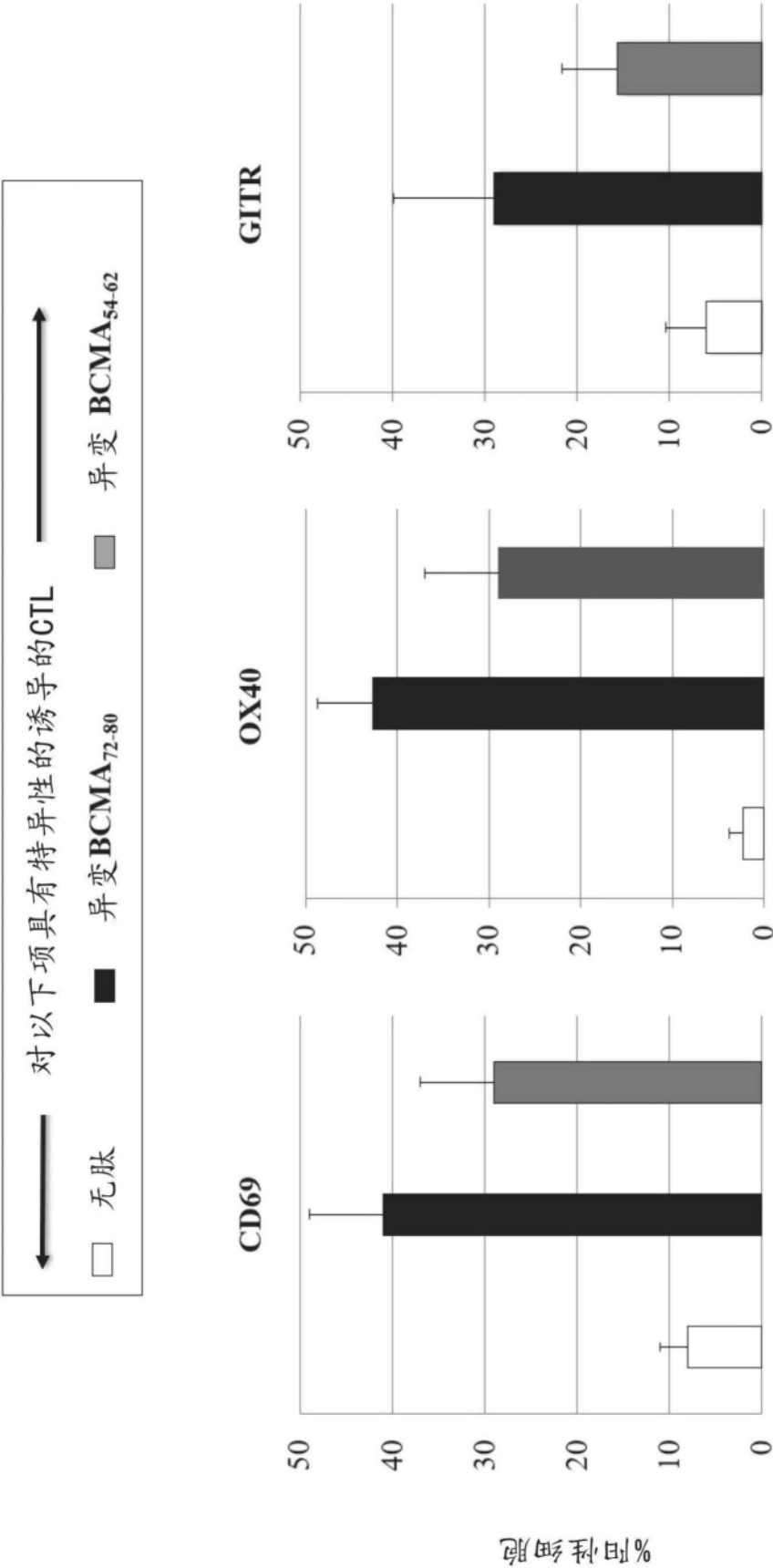


图18C

与肿瘤细胞共培养(5天)的异变BCMA72-80肽特异性CTL:

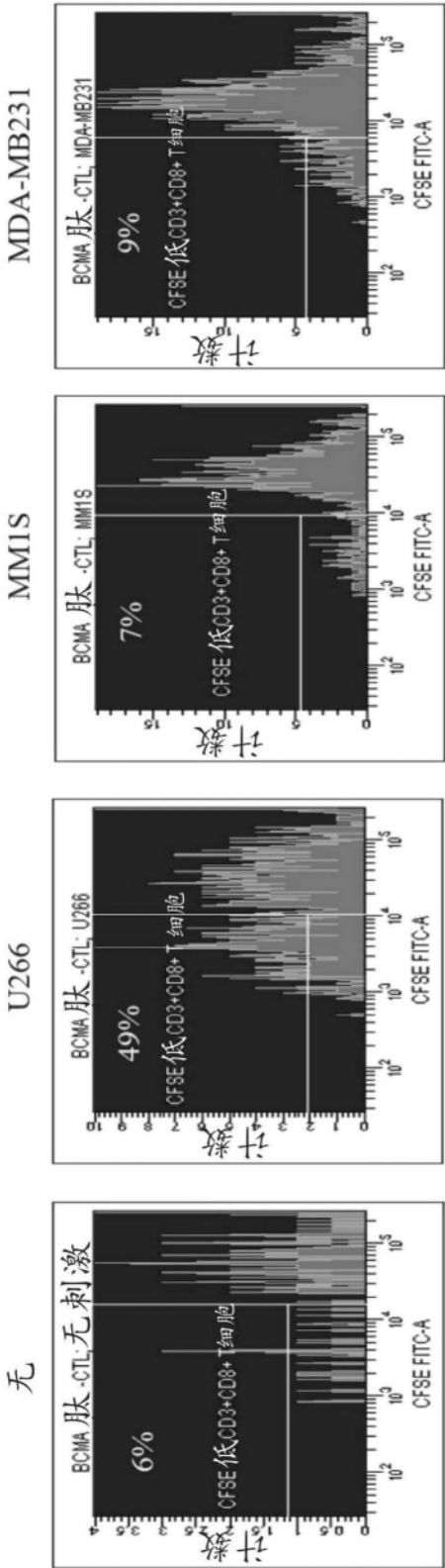


图 19A

图 19B

图 19C

图 19D

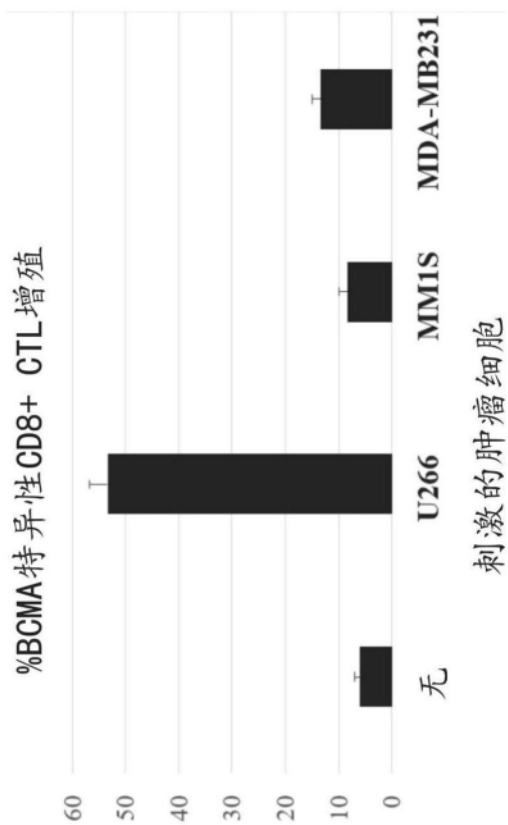


图19E

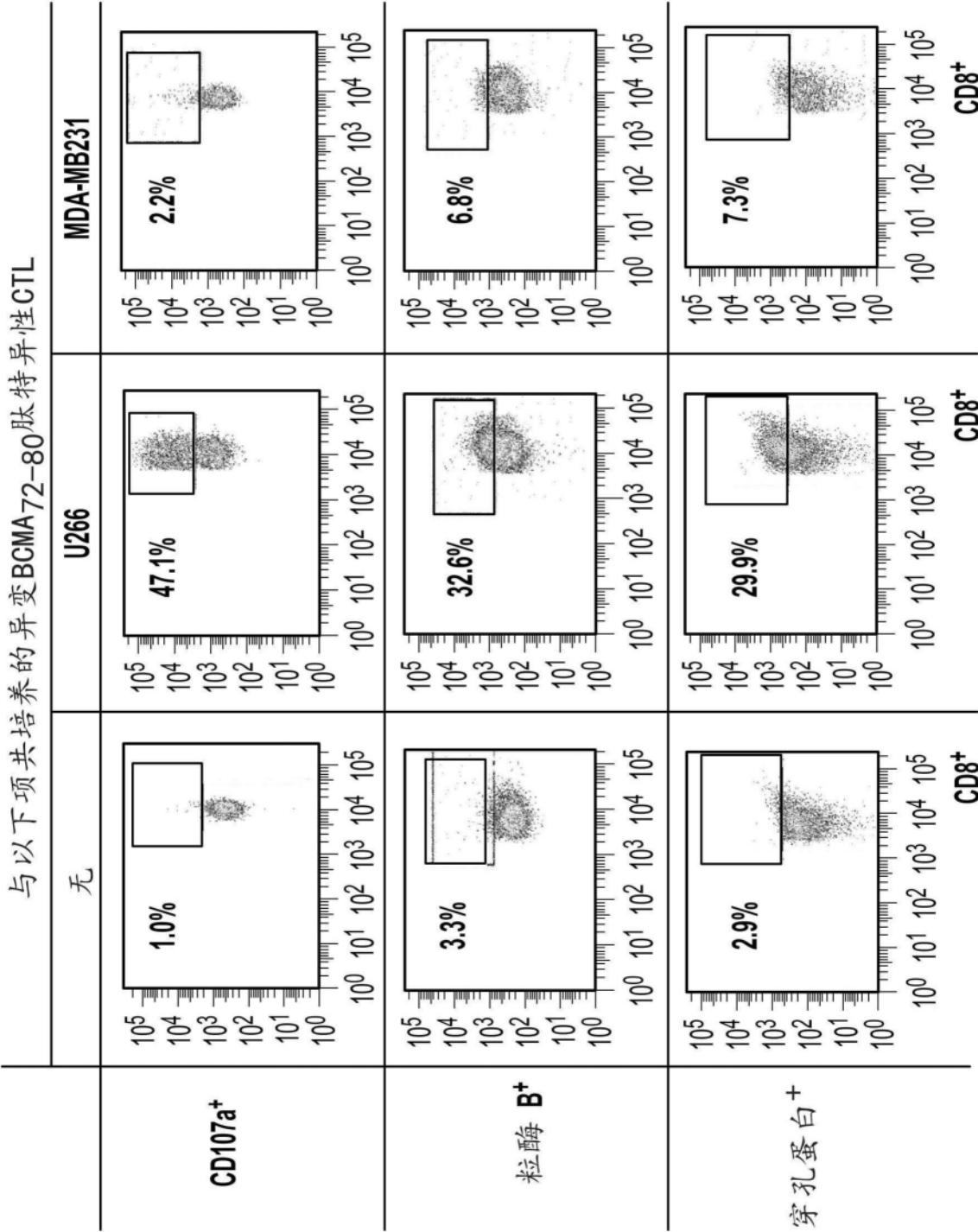


图19F

靶物：HLA-A2⁺MM患者的骨髓细胞

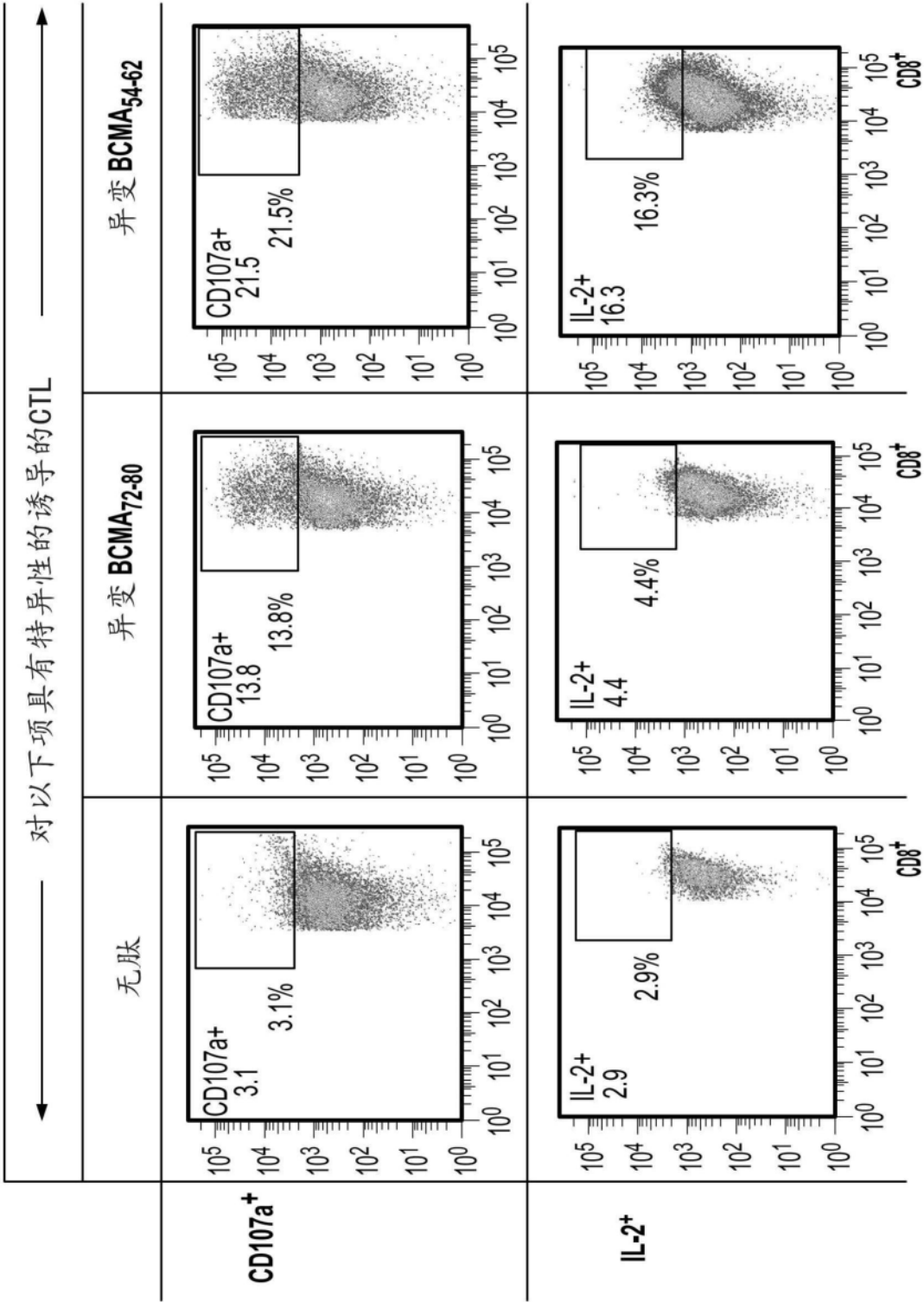


图20A

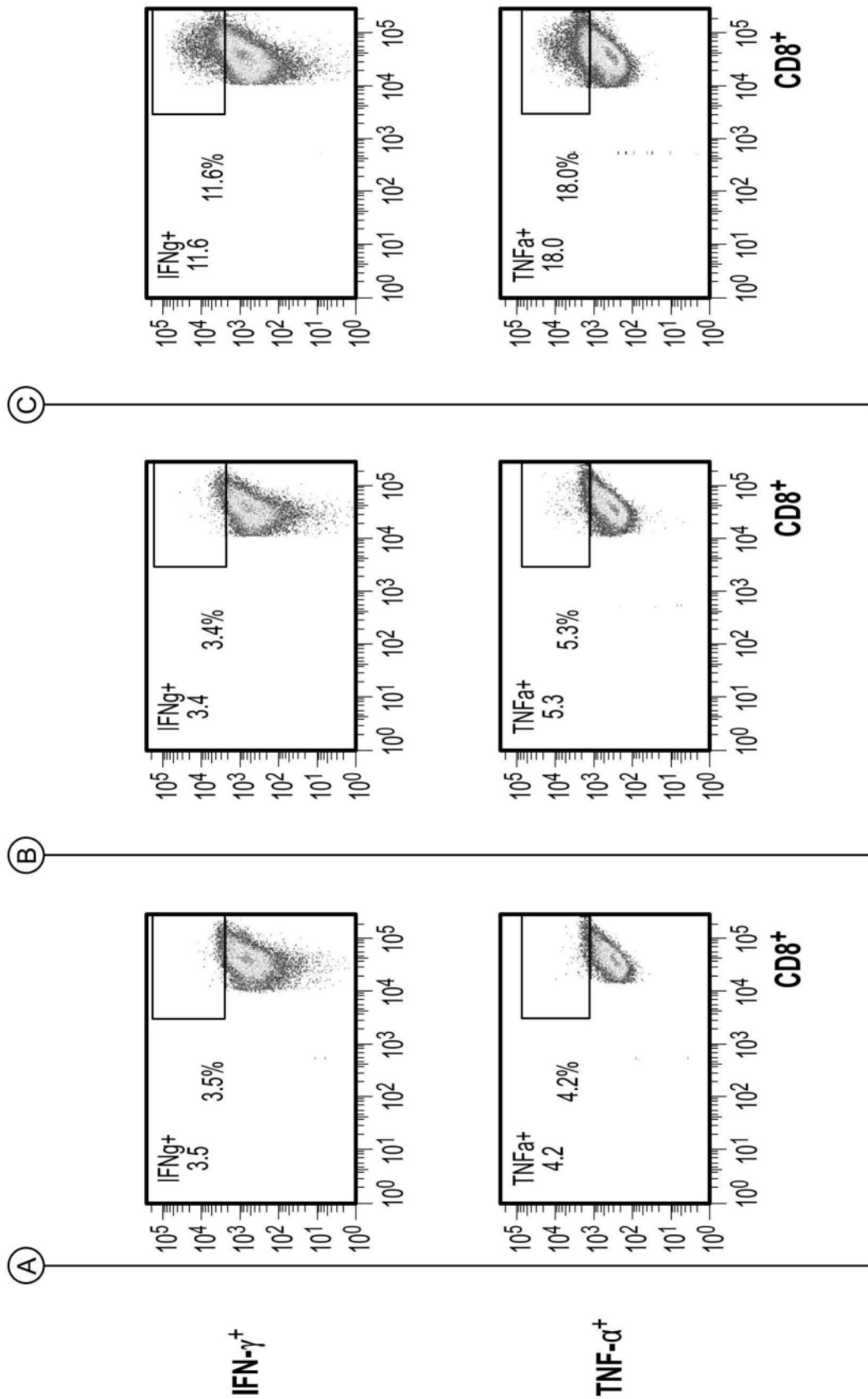


图20B (续)

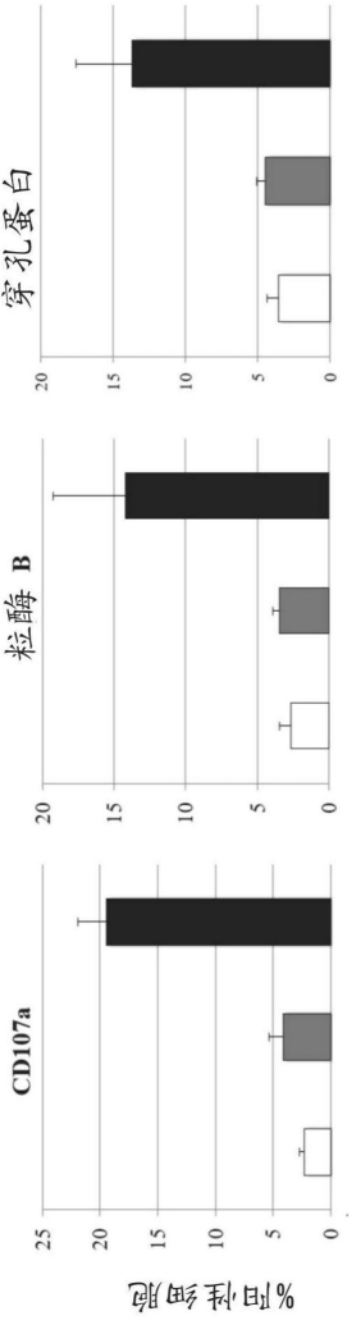
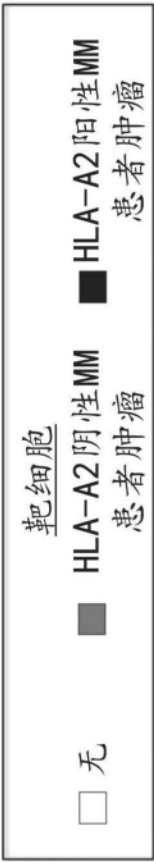


图 20C

图 20D

图 20E

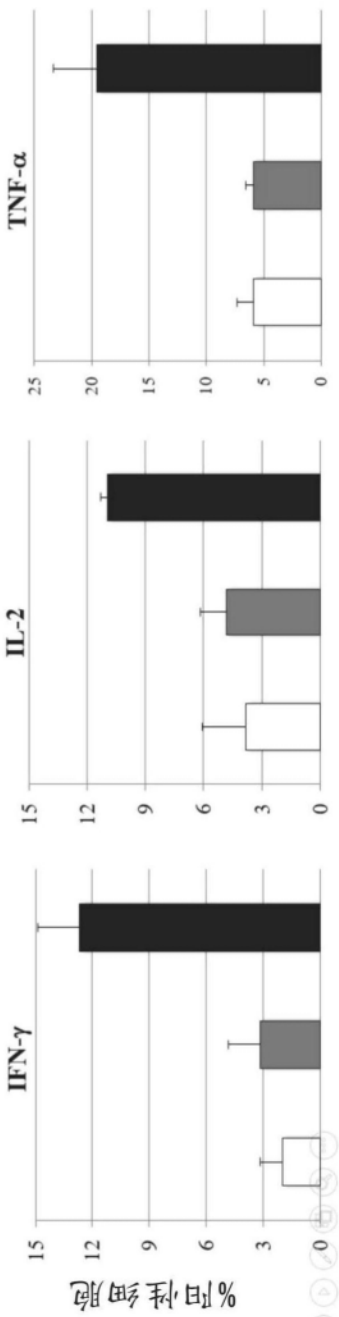


图 20F

图 20G

图 20H

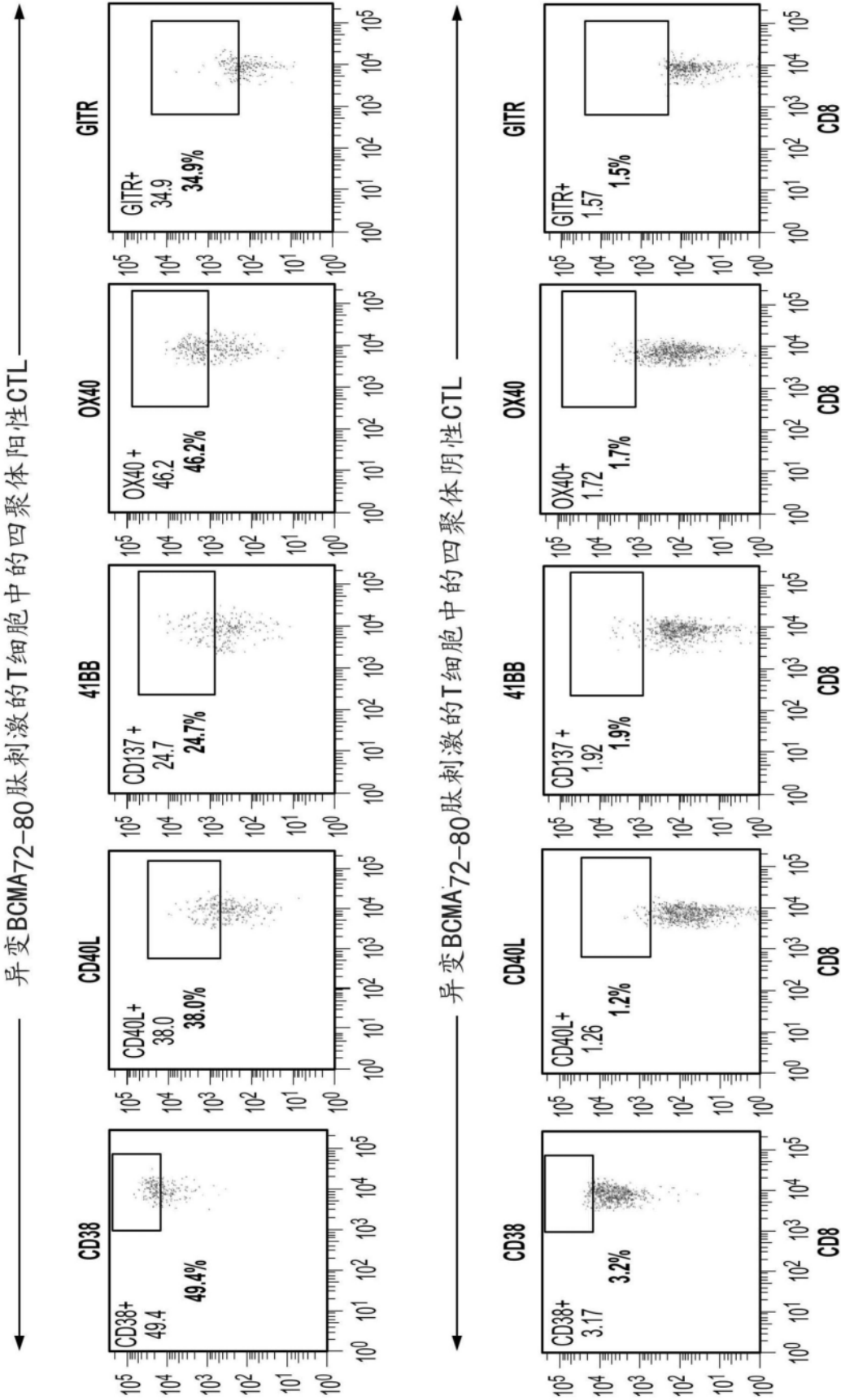


图21A

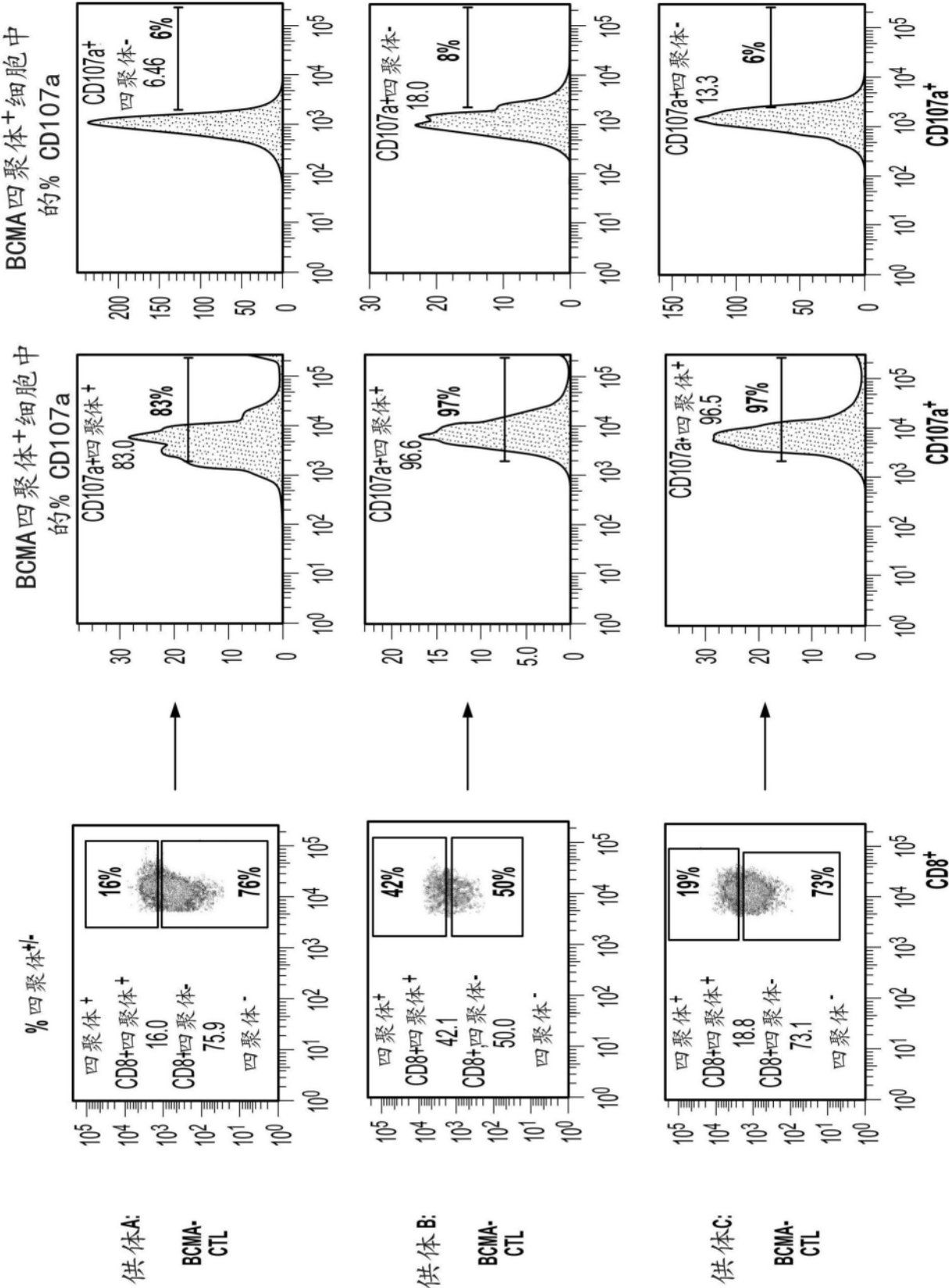


图21B

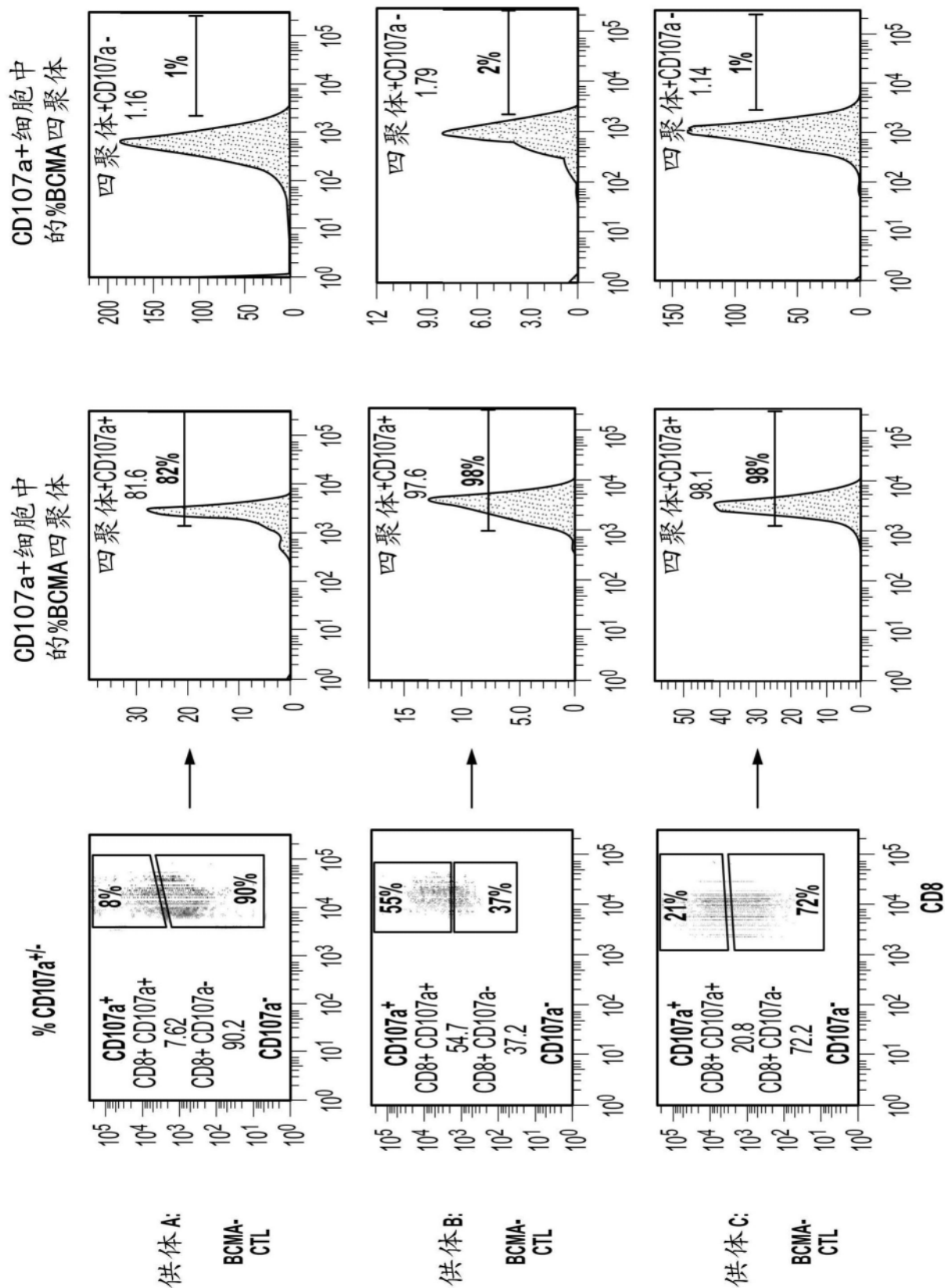


图21C

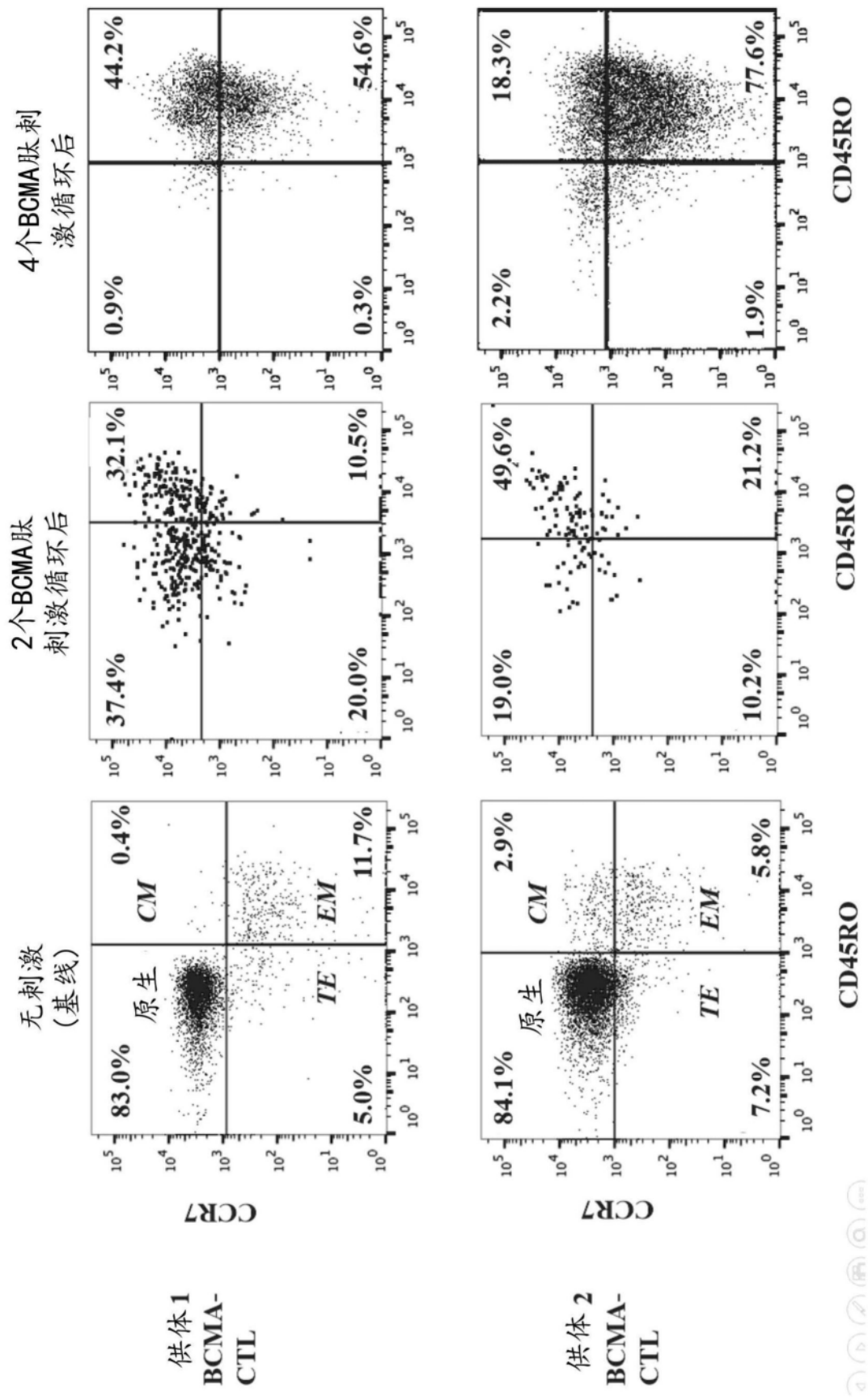


图22A

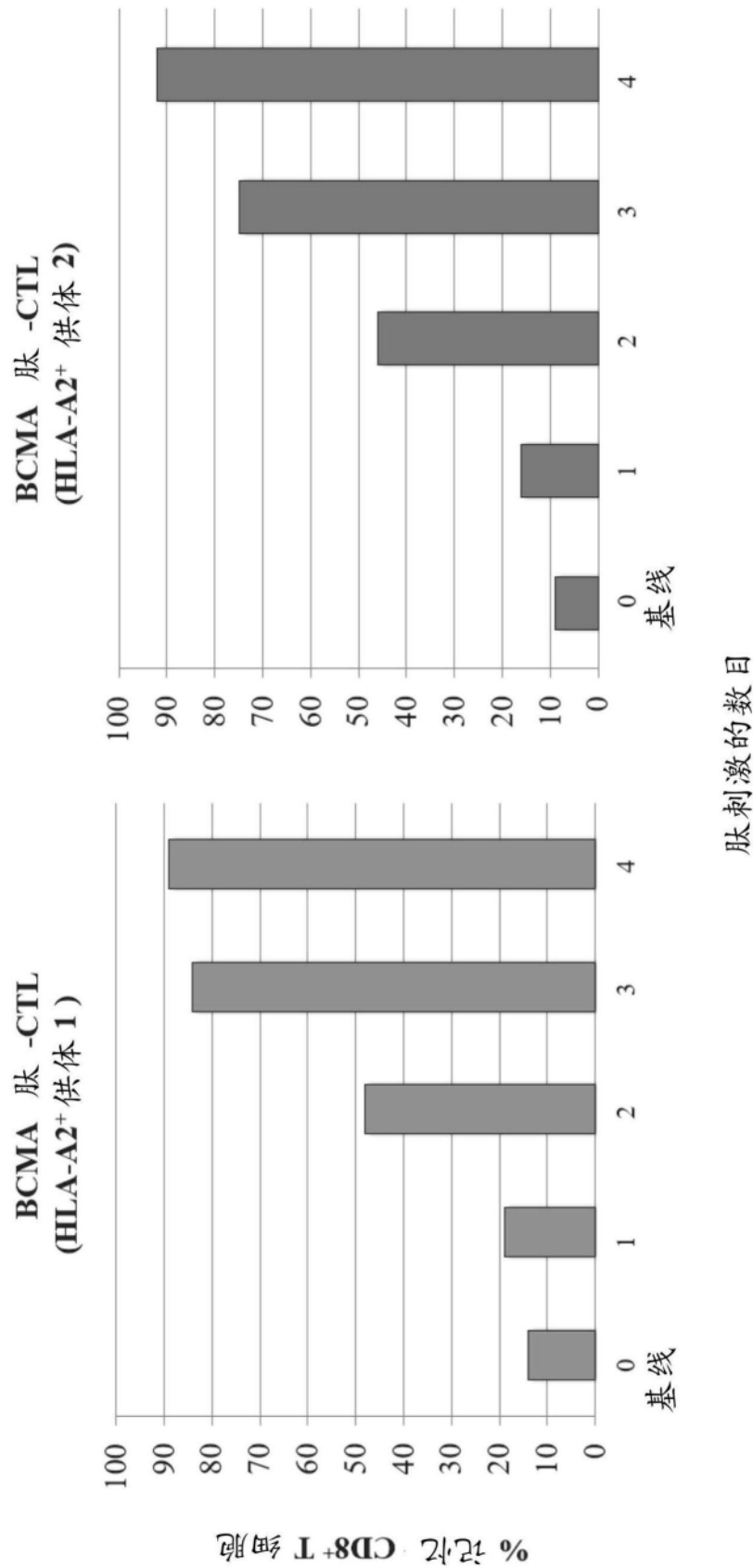


图 22C

图 22B

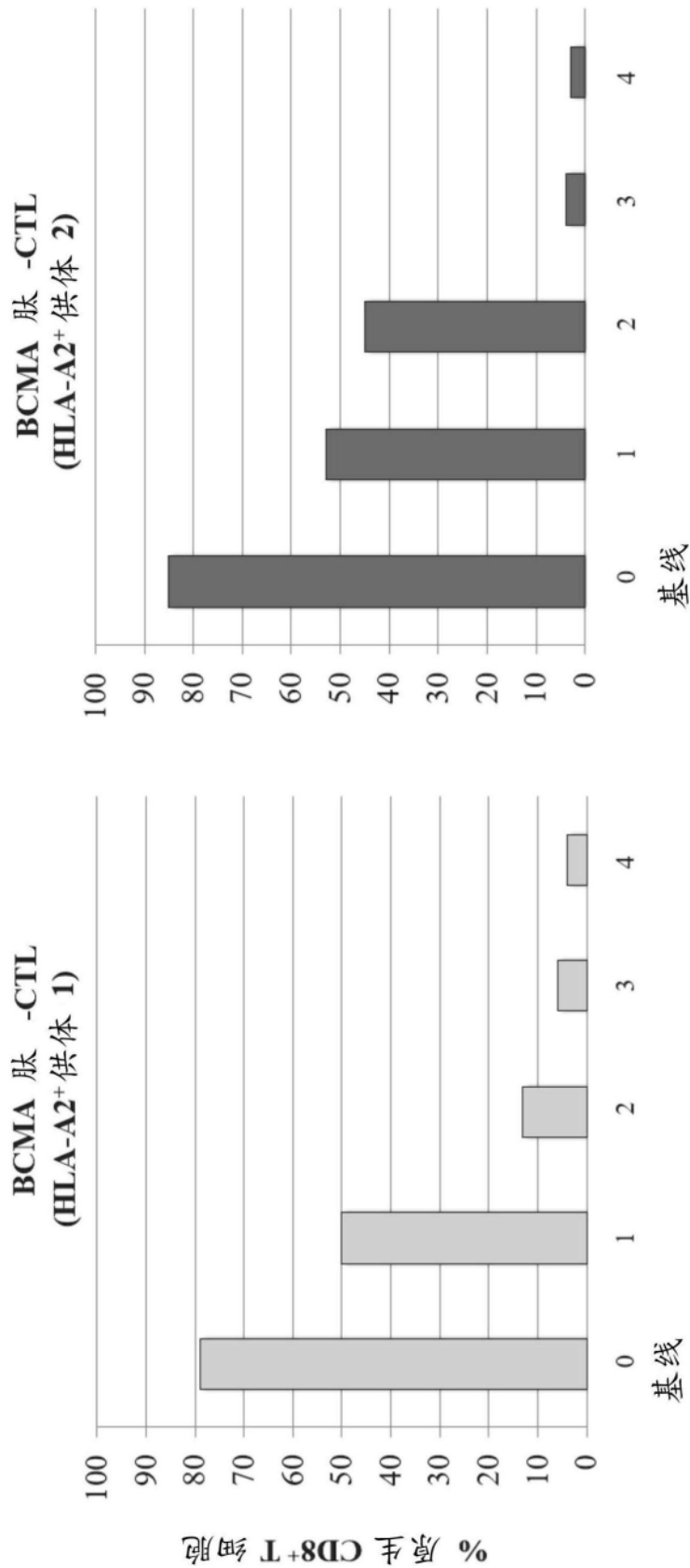


图 22D

图 22E

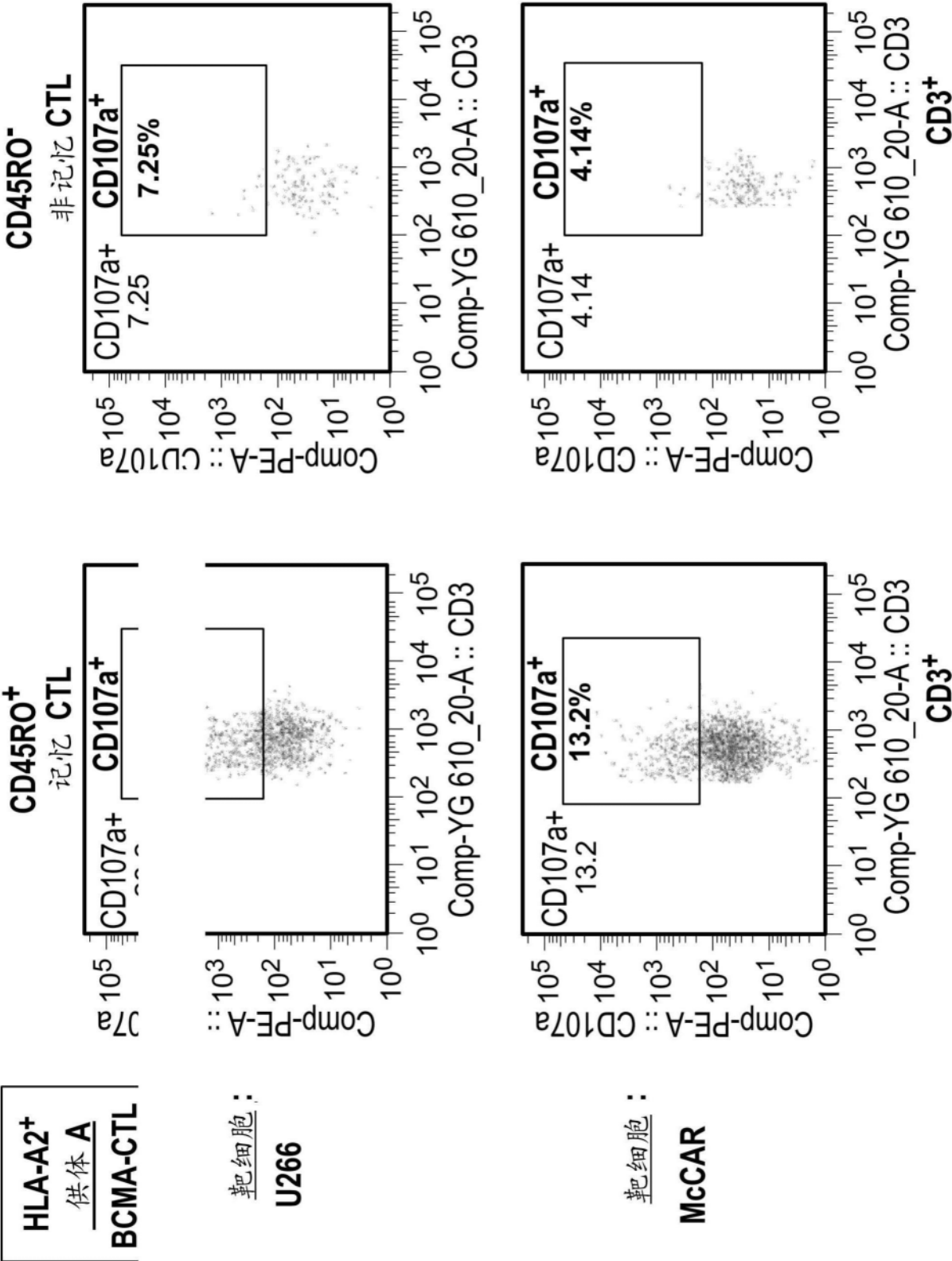


图23A

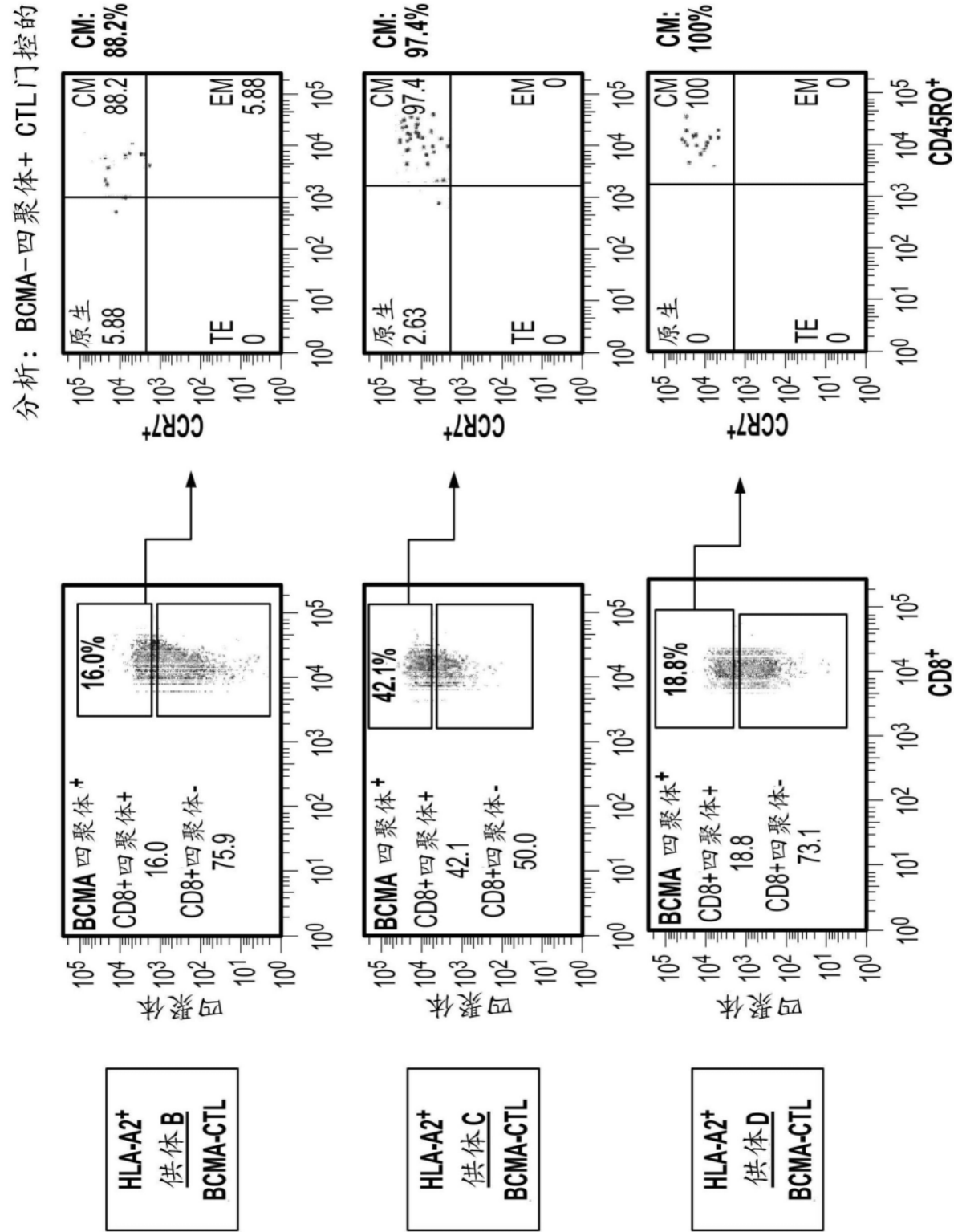


图23B

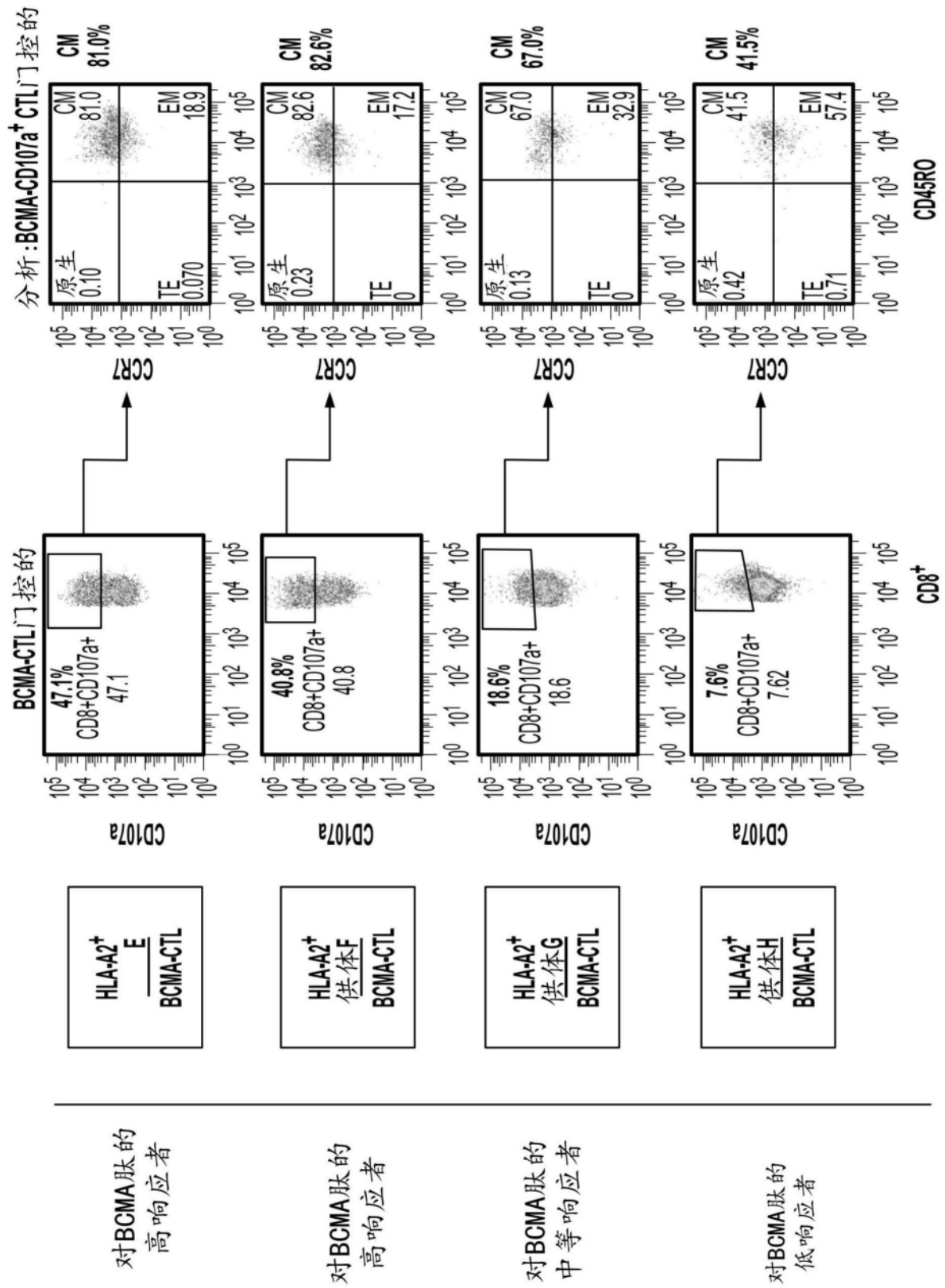


图23C

与U266细胞共培养(7天)的BCMA肽特异性CTL

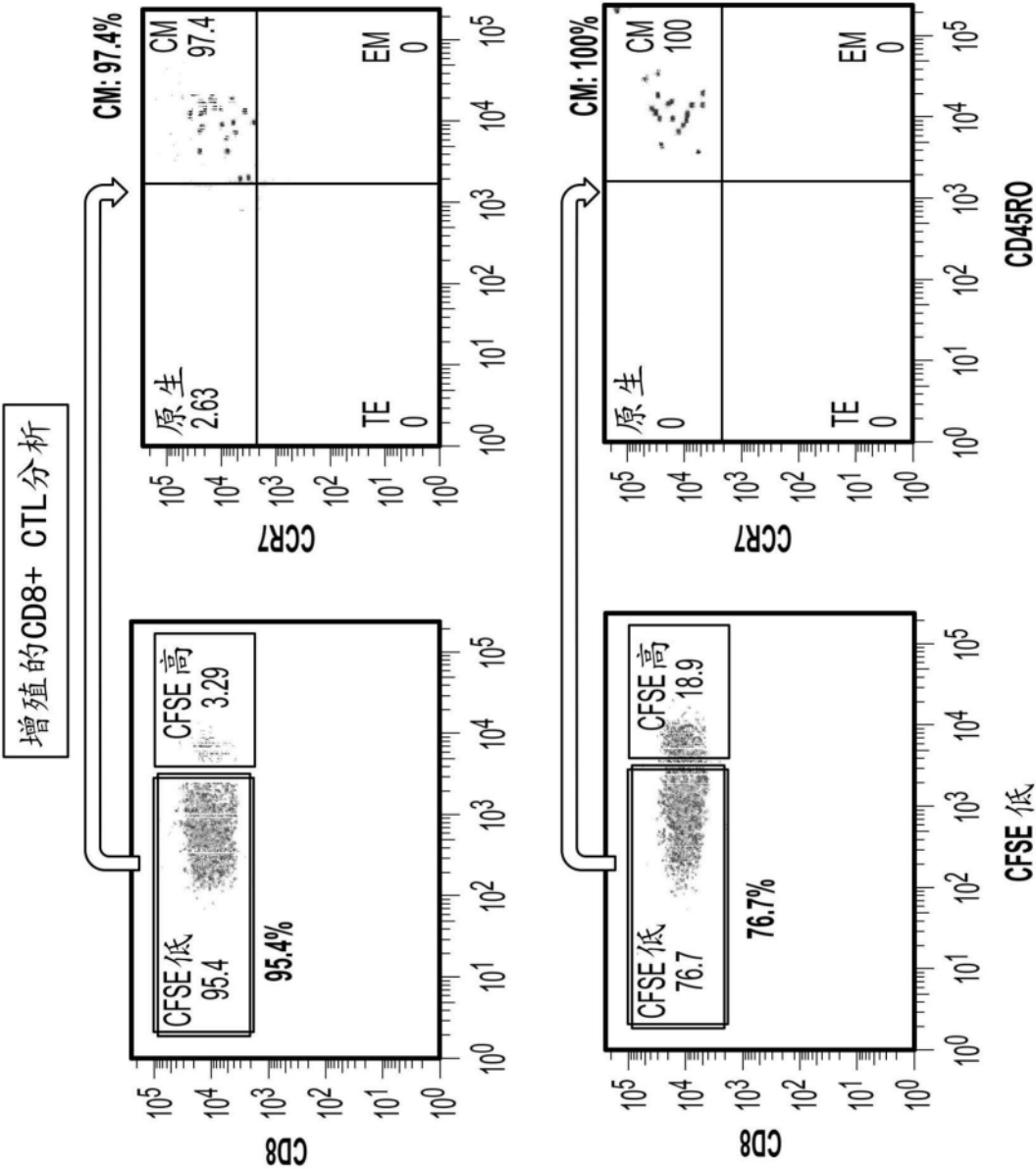


图24A

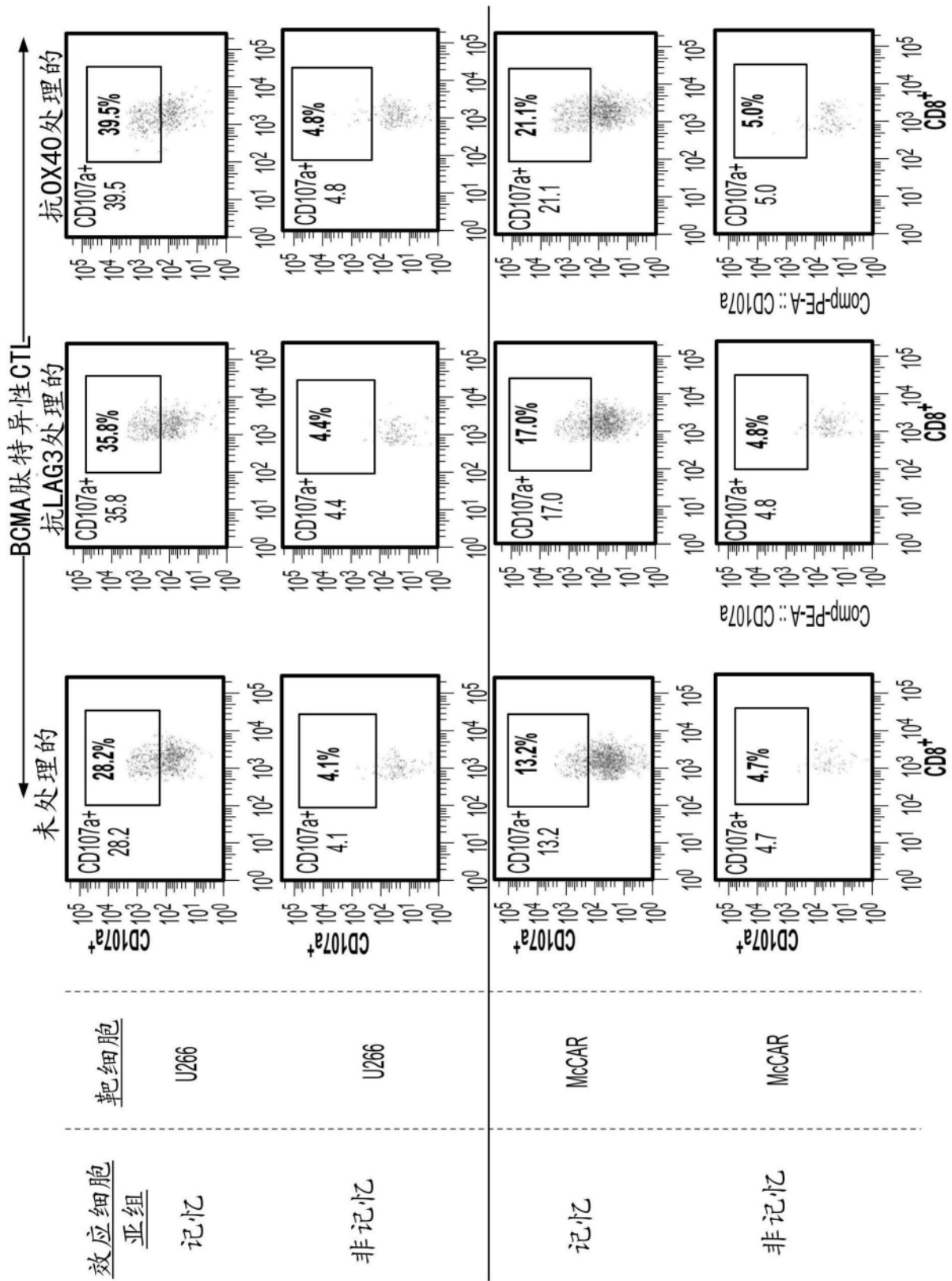


图24B

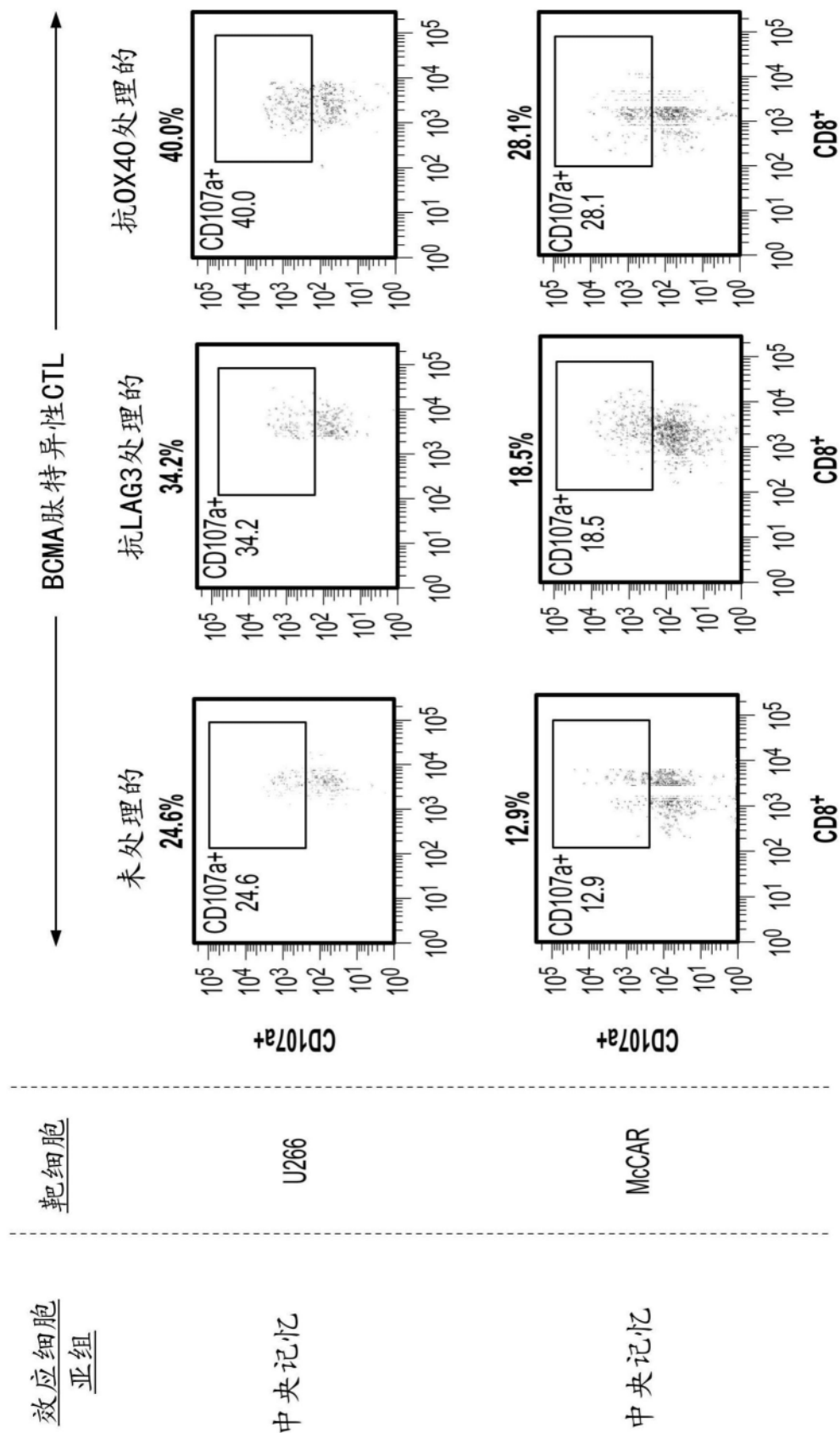


图24C

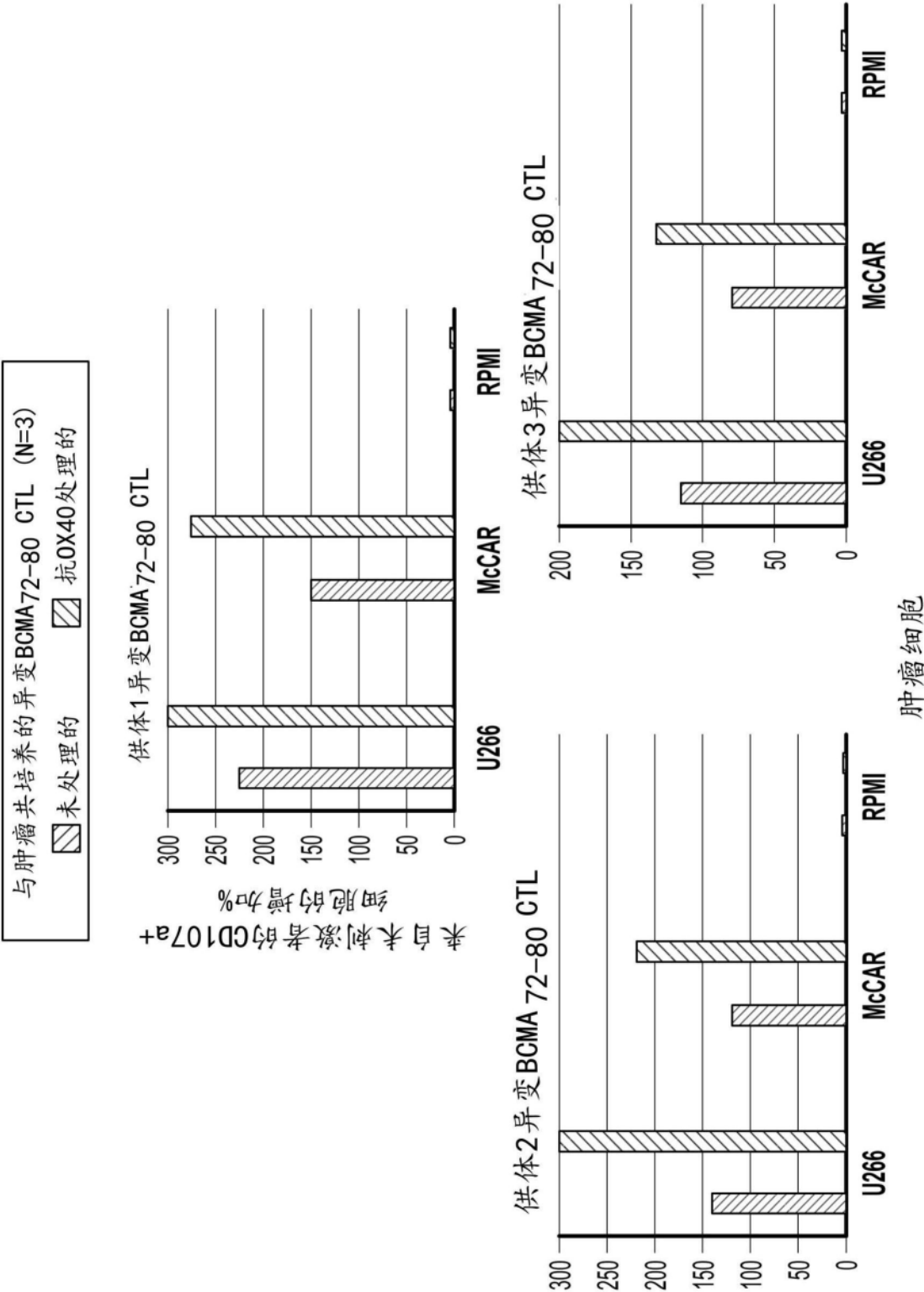


图24D

用变异肽BCMA72-8进行的肽刺激的数目

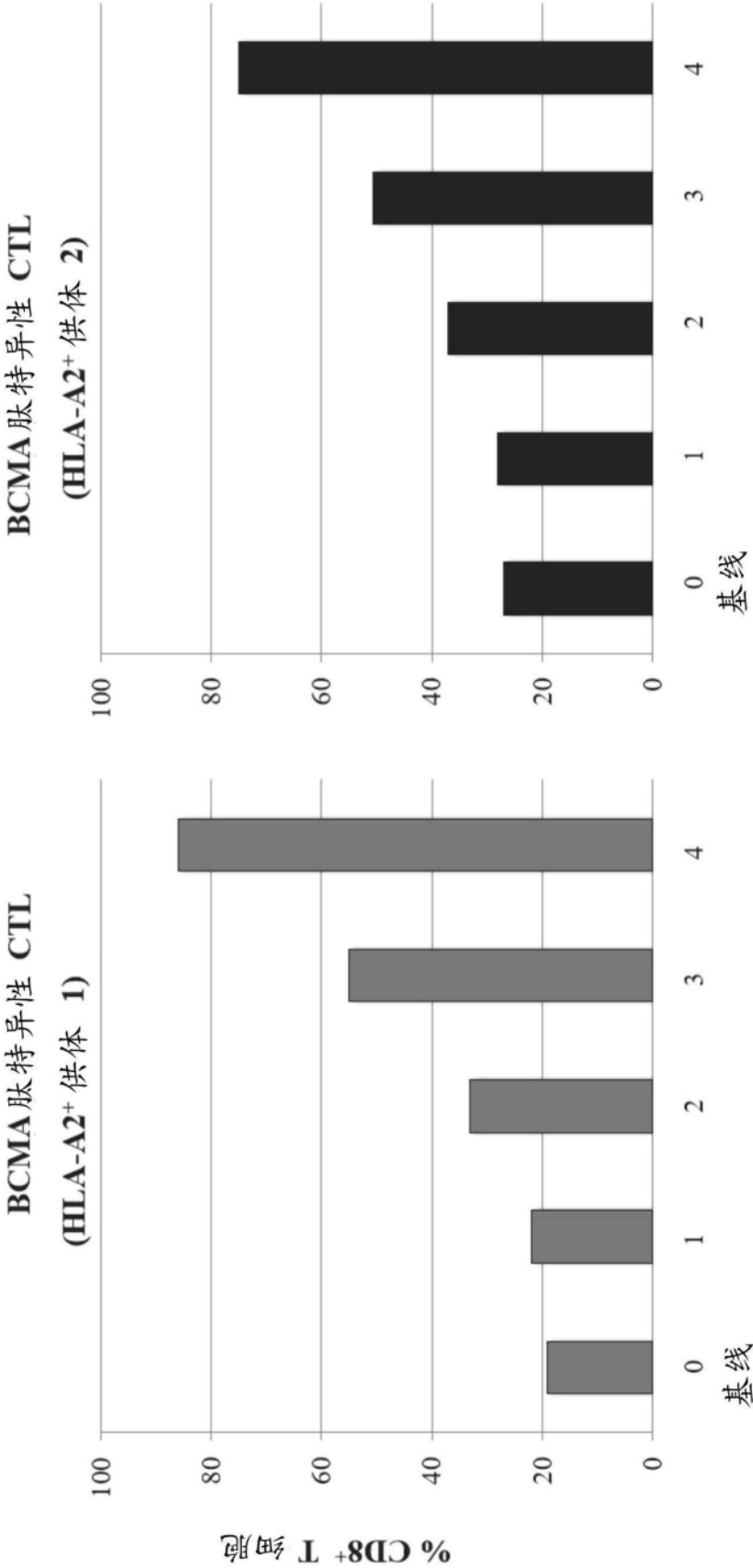


图 25A

图 25B

用异变肽BCMA72-8进行的肽刺激的数目

BCMA 肽特异性 CTL
(HLA-A2⁺ 供体 1)

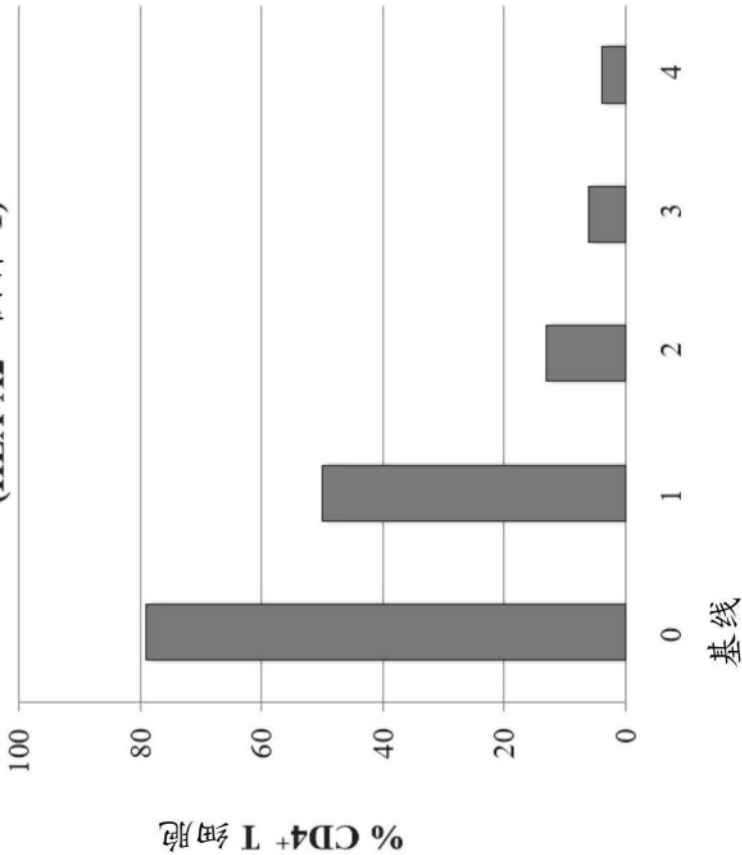


图 26A

BCMA 肽特异性 CTL
(HLA-A2⁺ 供体 2)

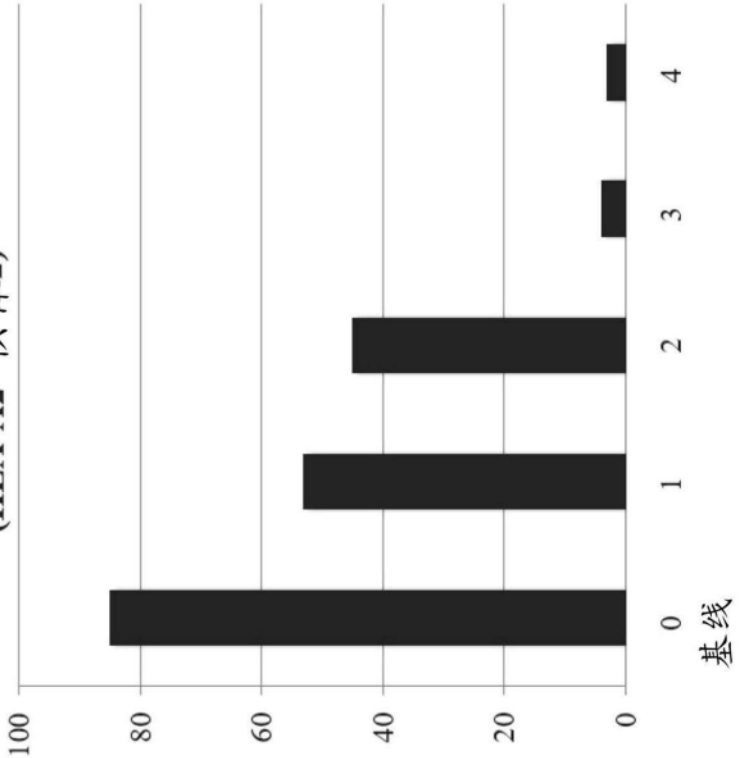


图 26B

BCMA 抗体: 克隆 ID

ANC3B1

VICKY1

19F2

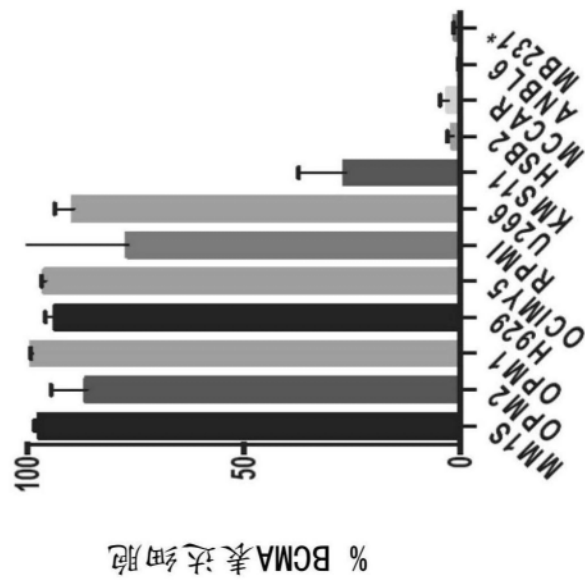


图 27A

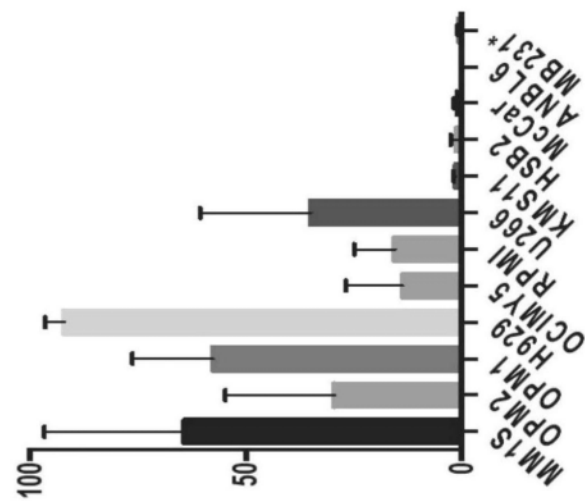


图 27B

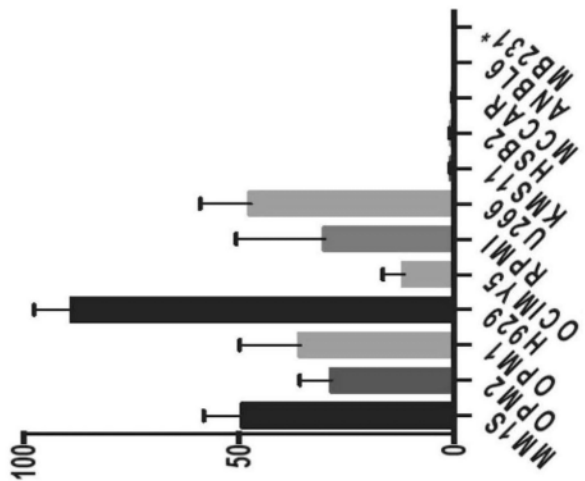


图 27C

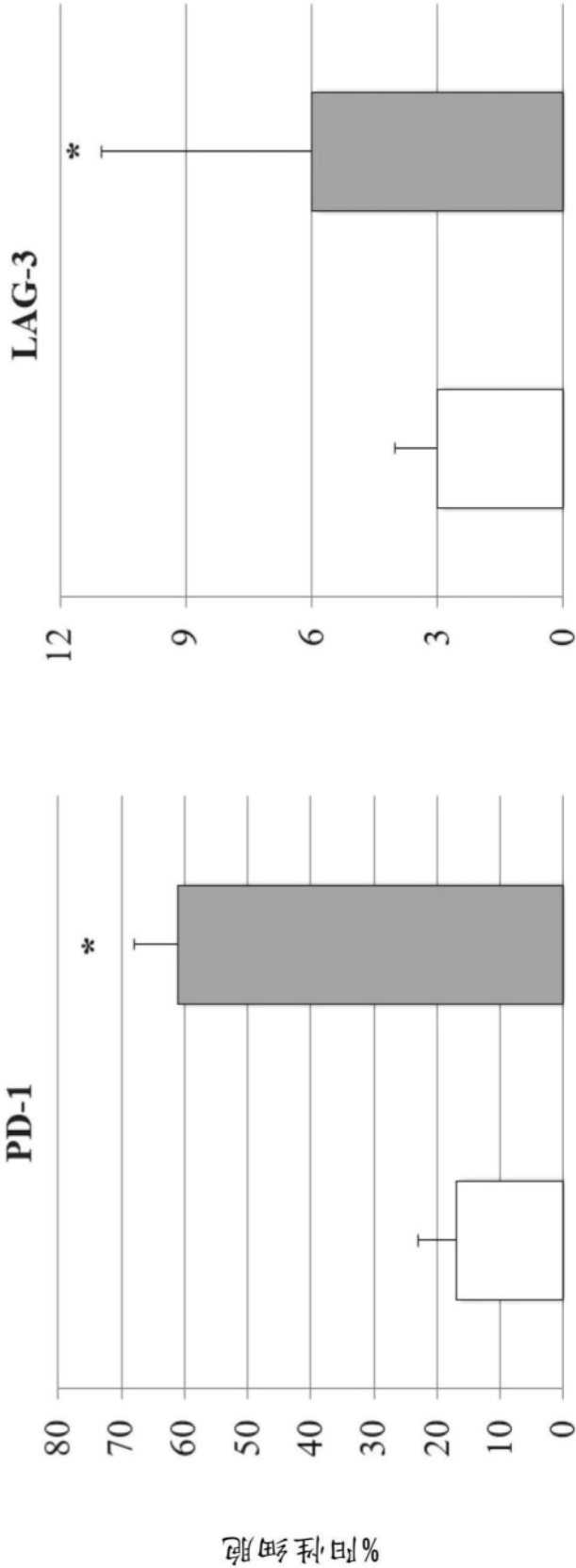
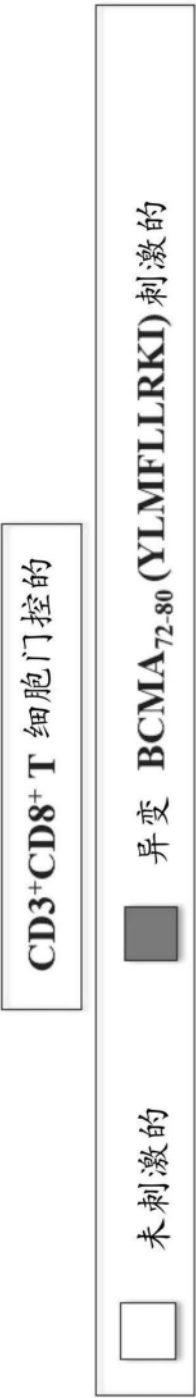


图 28A

图 28B

在用异变TACI154-162肽刺激后原生细胞分化成记忆CTL

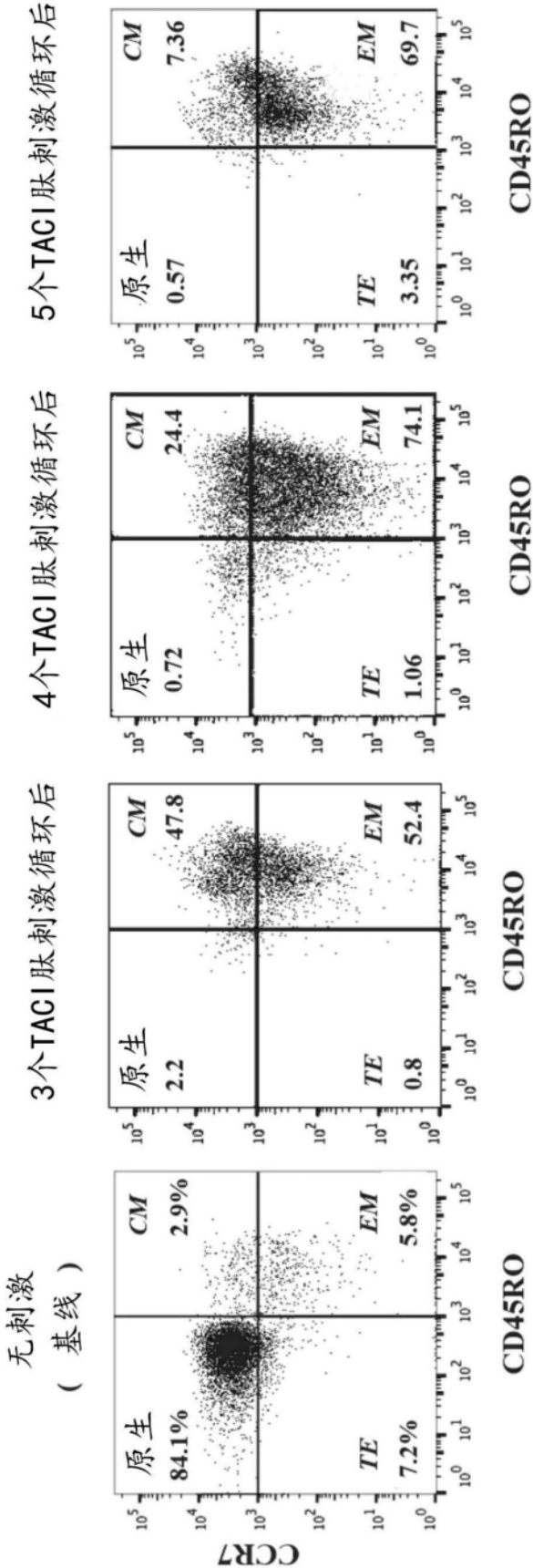
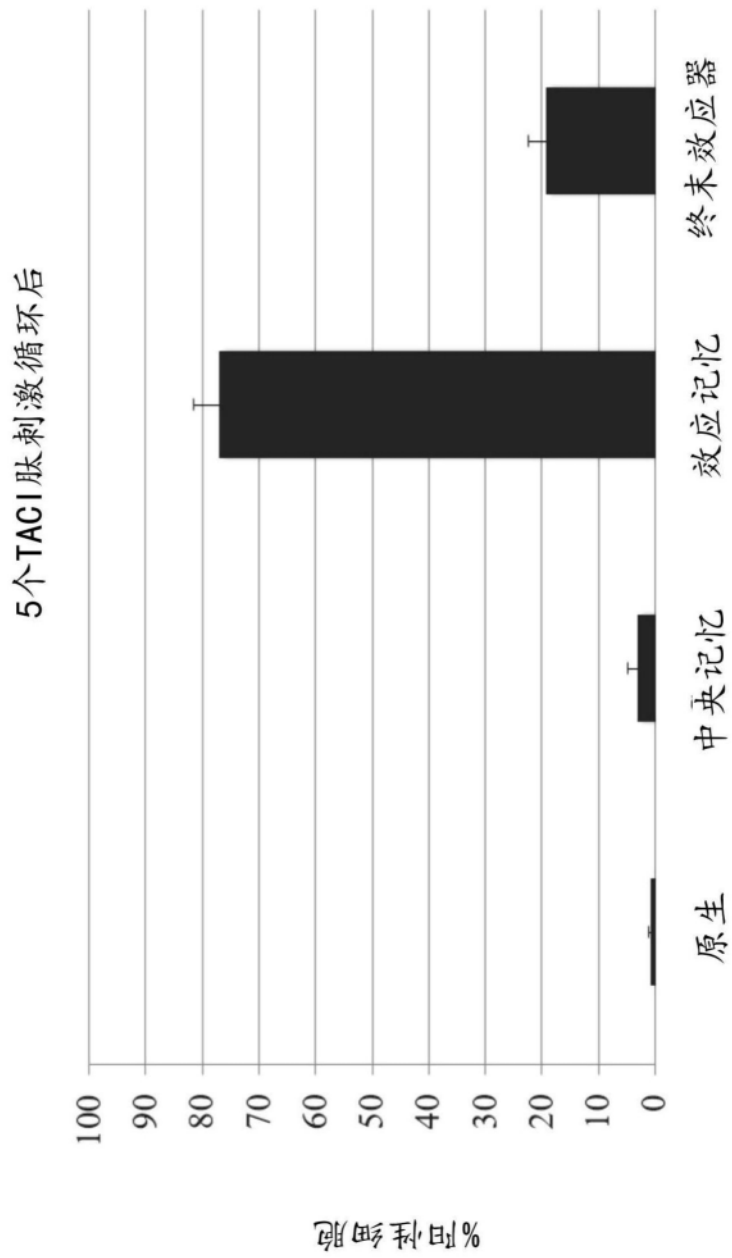


图29A

异变TACI154-162特异性记忆CTL的诱导



原生：诱导的记忆CD8⁺ CTL亚组

图29B

响应HLA-A2⁺多发性骨髓瘤细胞(U266)的异变TACI154-162特异性记忆CTL的增殖

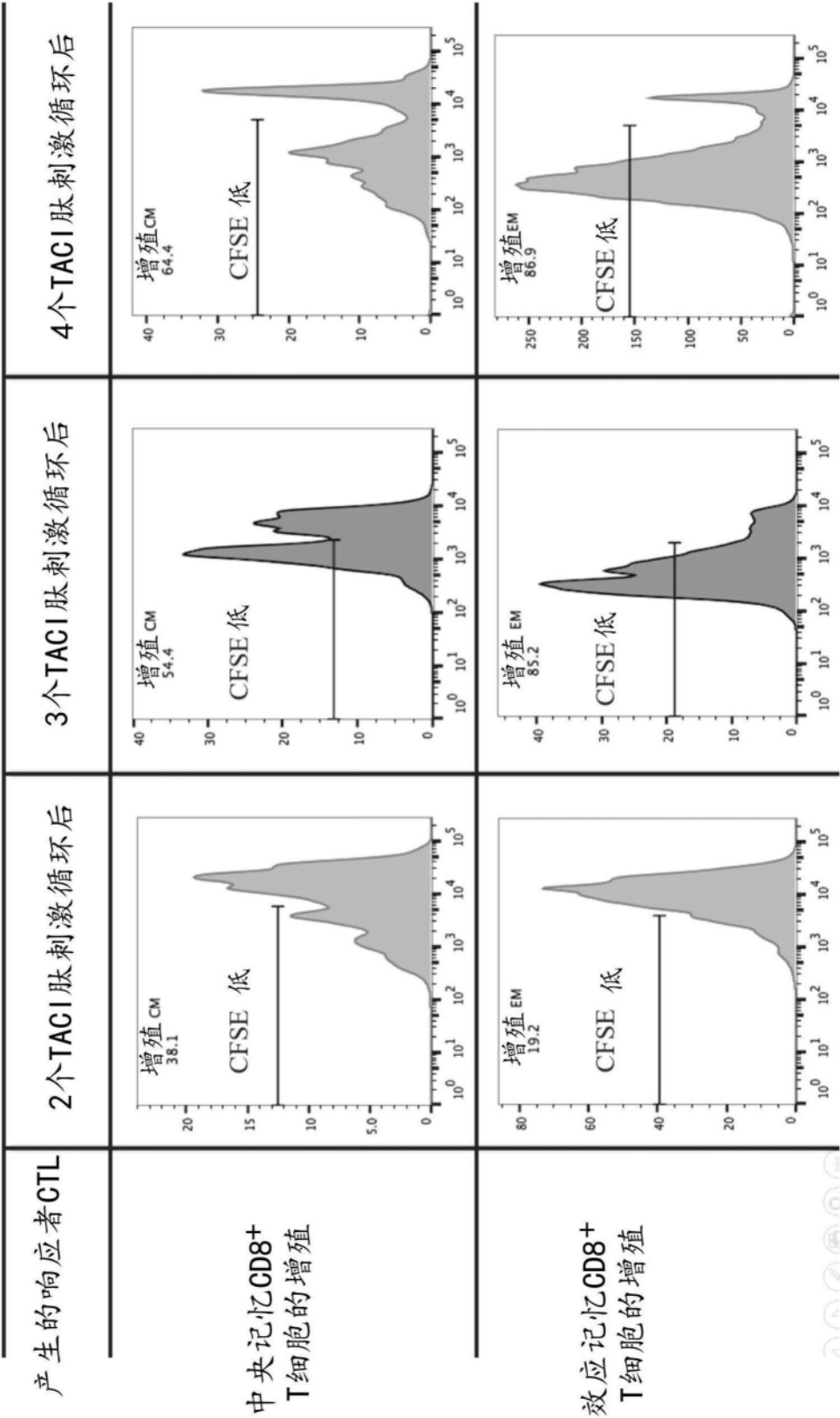


图29C

针对HLA-A2⁺多发性骨髓瘤细胞 (McCAR)
的异变TACI₁₅₄₋₁₆₂ 特异性CTL [供体1]
的抗肿瘤活性

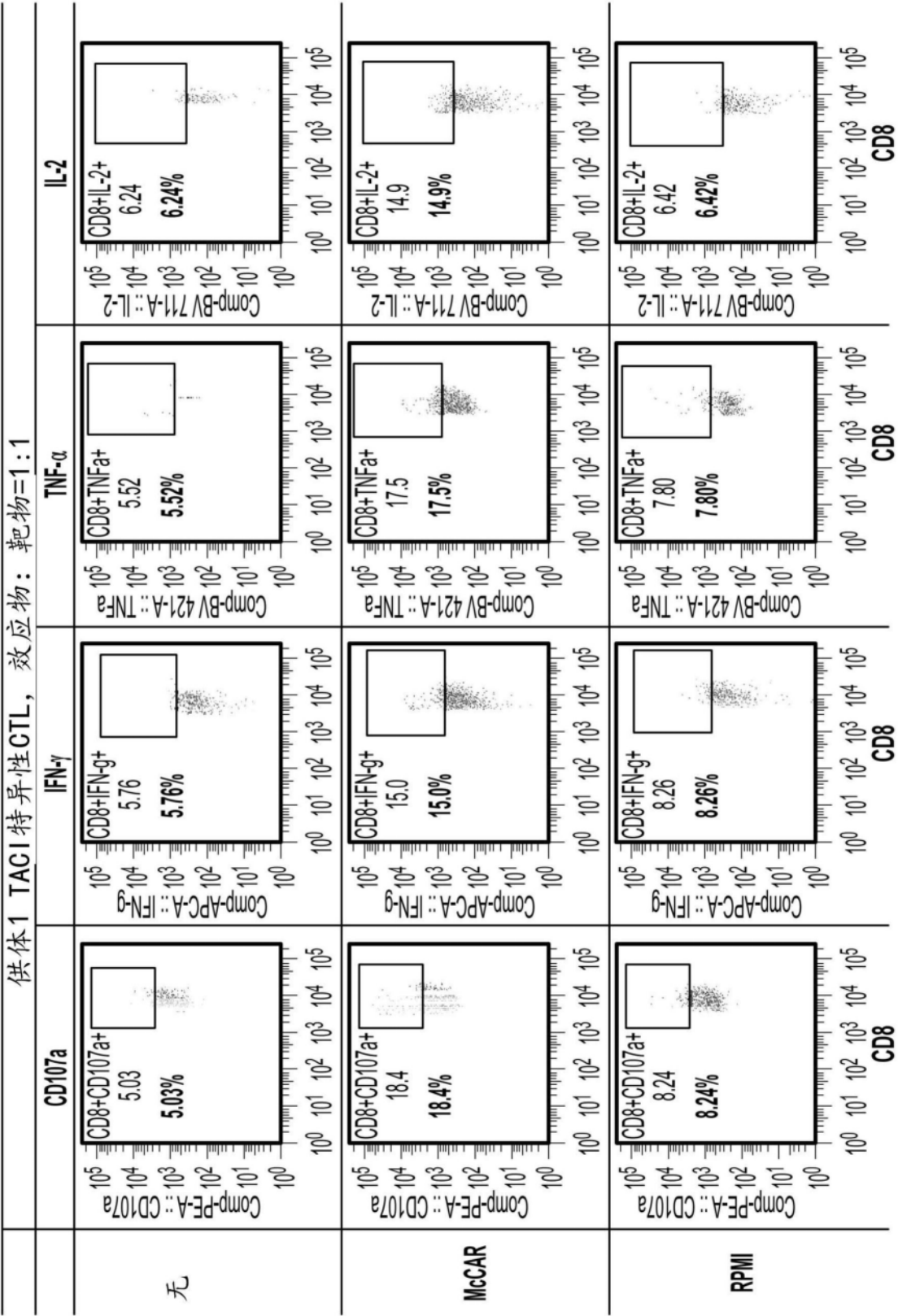


图30A

针对HLA-A2⁺多发性骨髓瘤细胞 (McCAR) 的
异变TACI154-162 特异性CTL [供体2] 的抗肿瘤活性

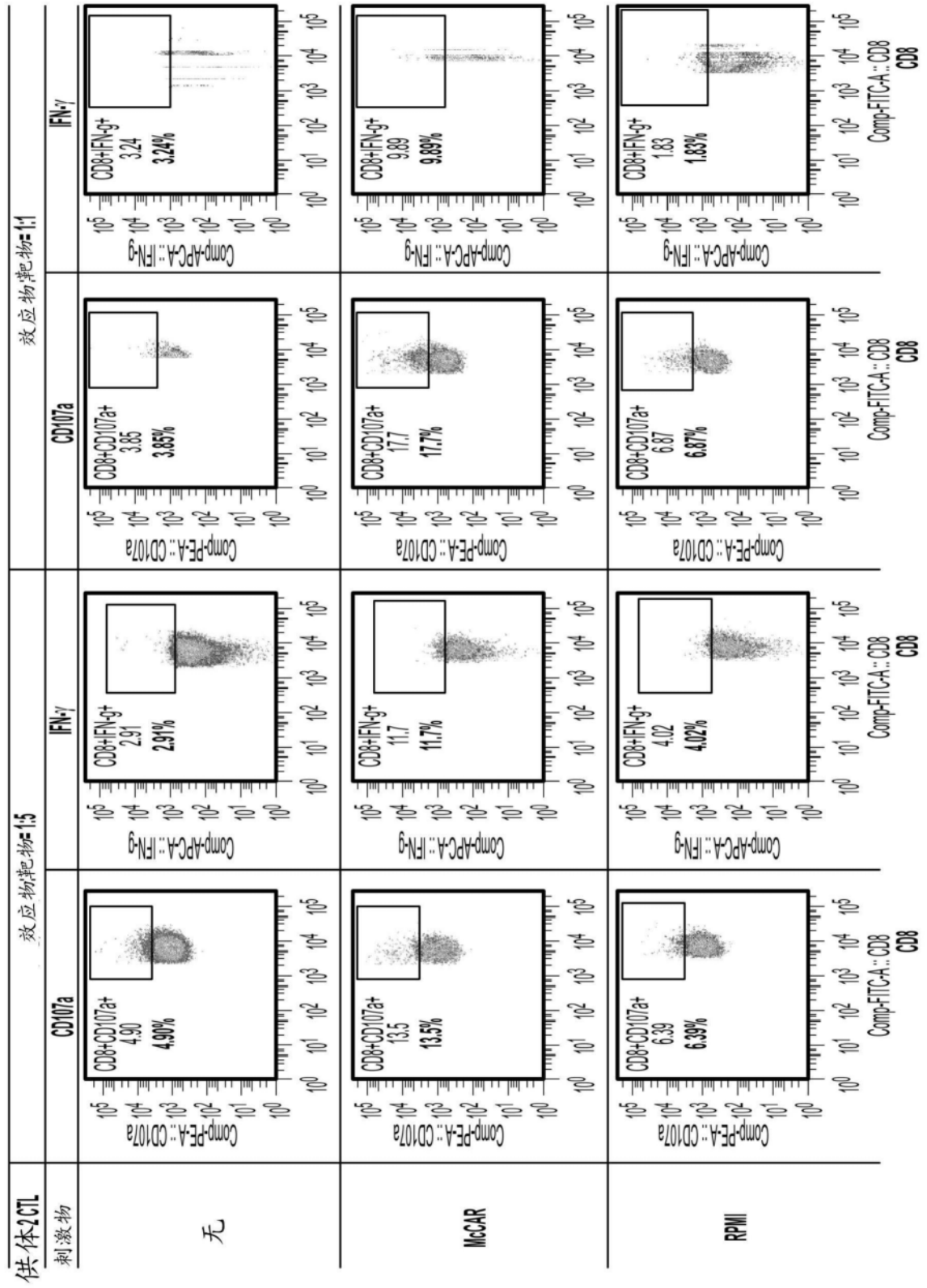


图30B

针对HLA-A2⁺多发性骨髓瘤细胞(McCAR)的异变TACI154-162
特异性CTL [N=5]的抗肿瘤活性

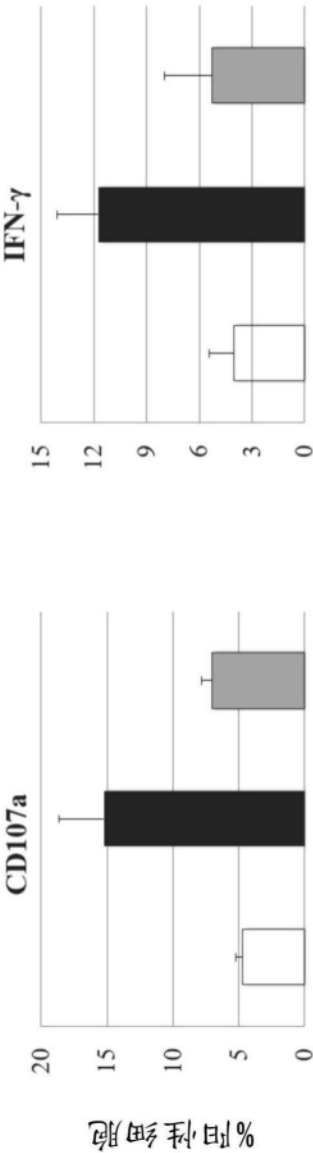
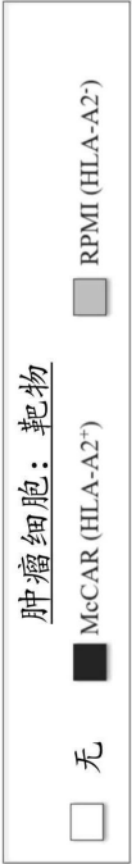


图 30C

图 30D

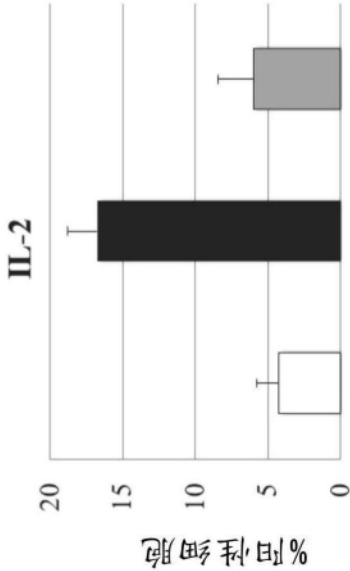


图 30E

图 30F

针对HLA-A2⁺多发性骨髓瘤细胞(McCAR)
的异变TACI₁₅₄₋₁₆₂特异性CTL [供体1]
的抗肿瘤活性

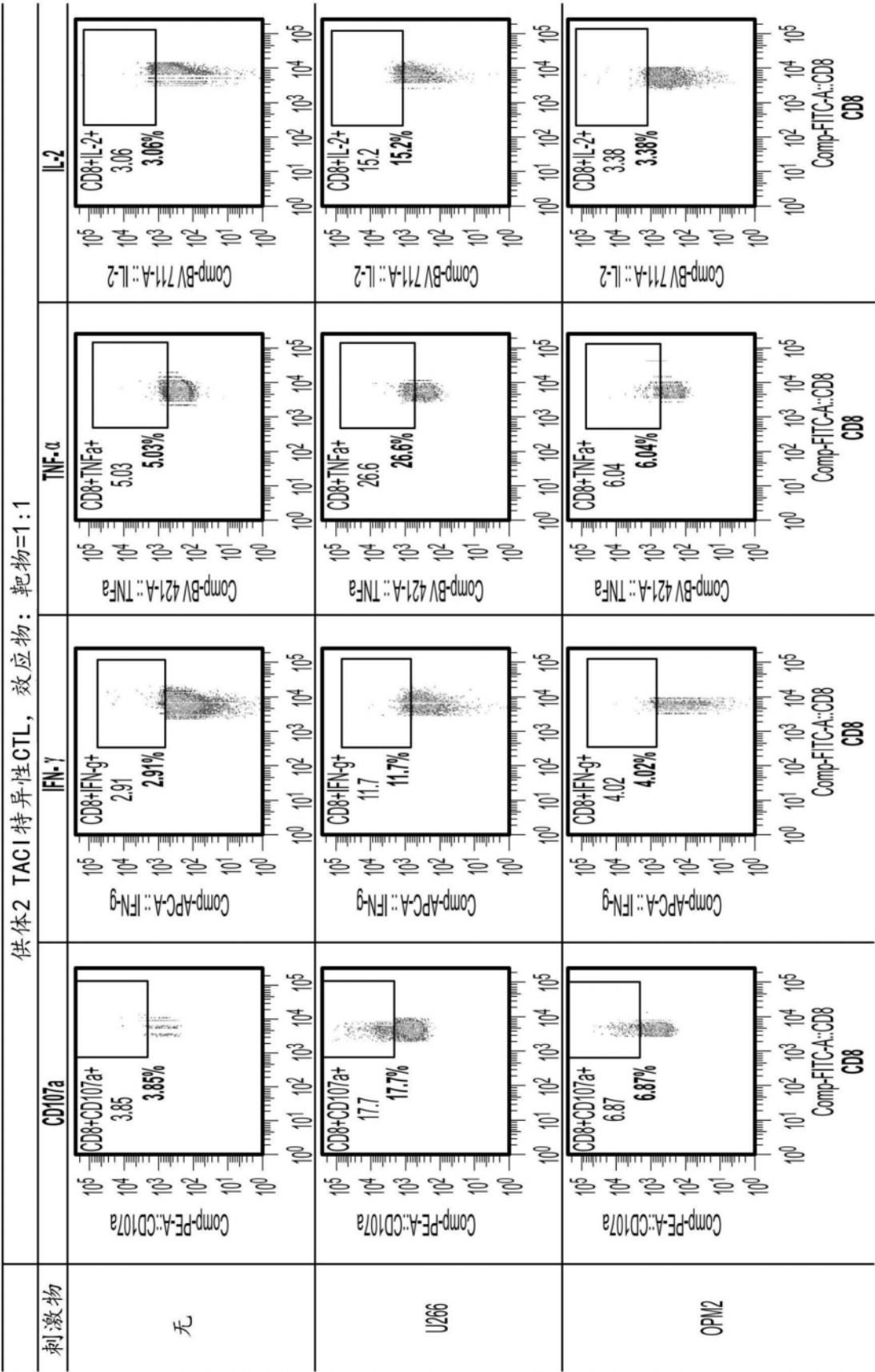


图31A

针对HLA-A2⁺多发性骨髓瘤细胞(U266)的异变TAC154-162
特异性CTL [N=5]的抗肿瘤活性

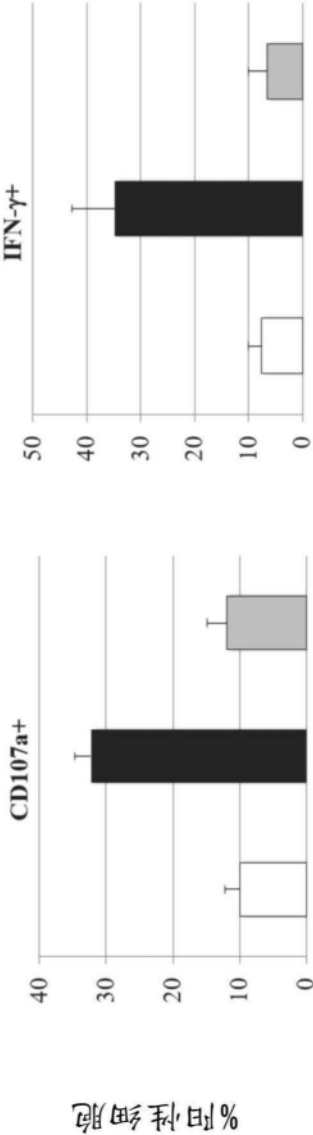
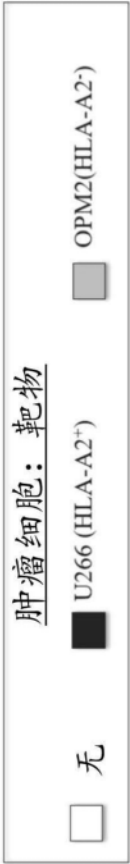


图 31B

图 31C

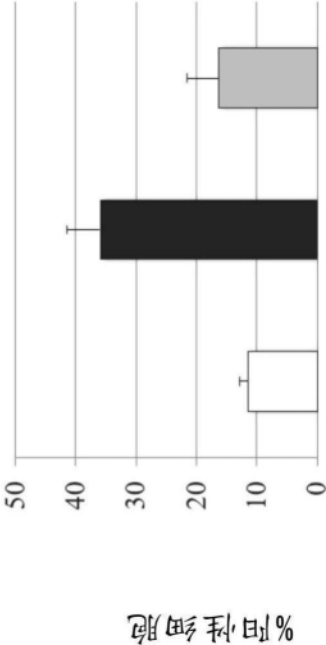


图 31D

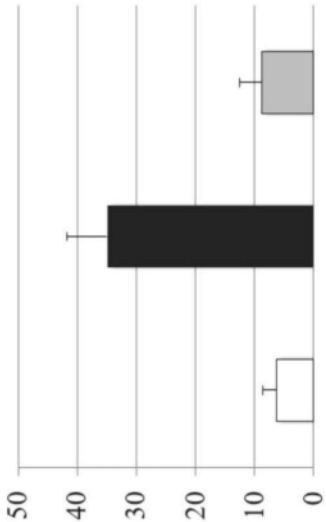


图 31E

通过针对HLA-A2⁺多发性骨髓瘤细胞的异变TAC154-162
肽产生四聚体⁺细胞并且诱导抗肿瘤活性和增殖

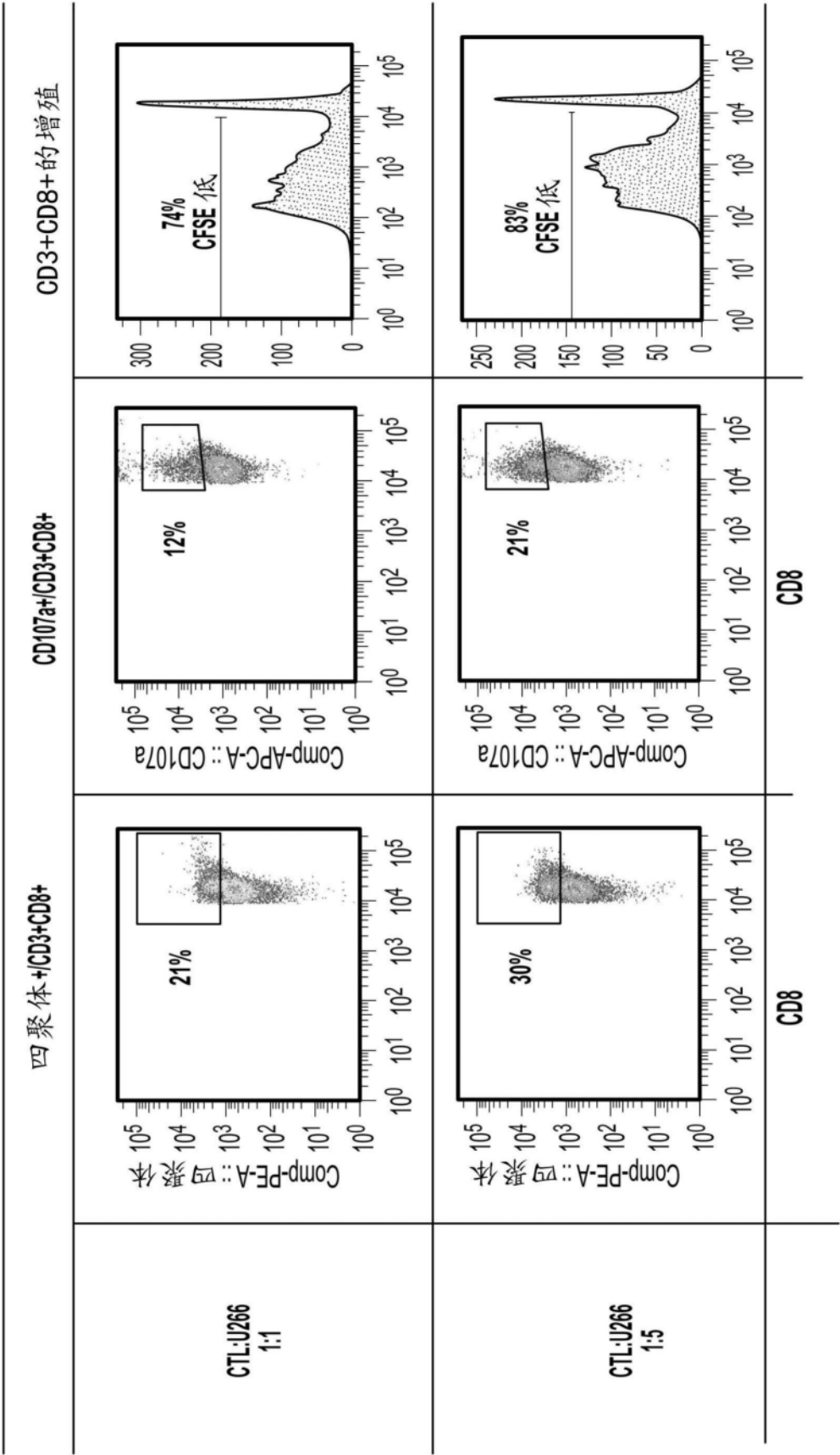


图31F

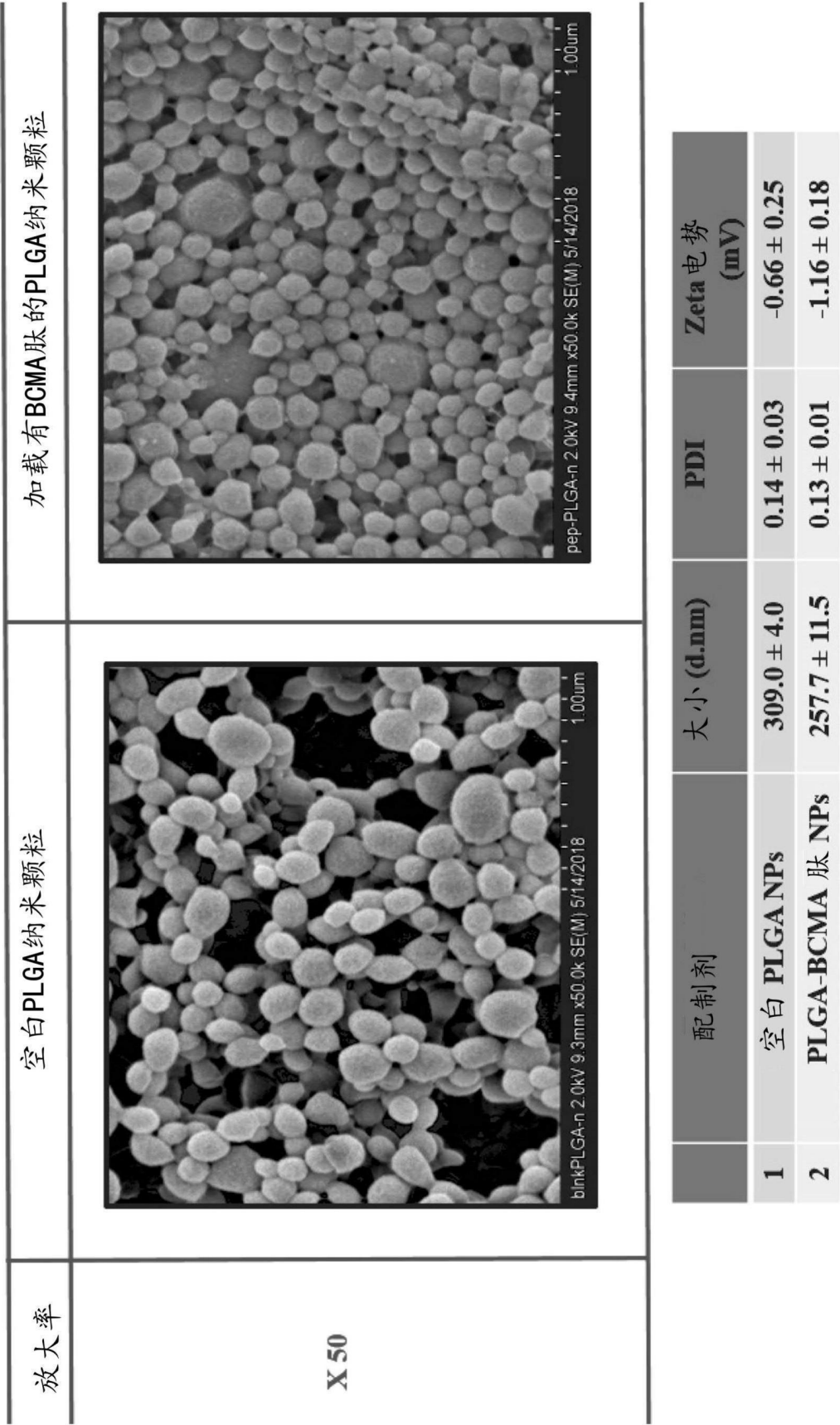
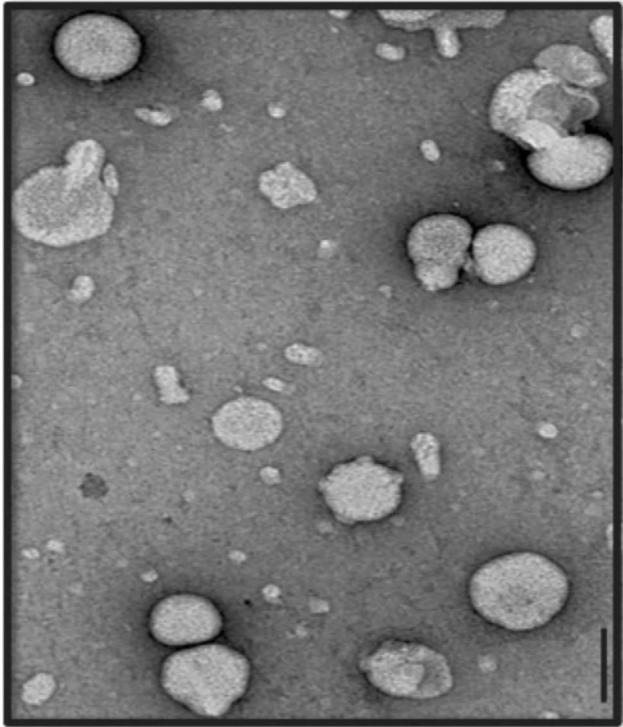


图32A

加载有BCMA肽的脂质体纳米颗粒



代表 100 nm

	配制剂	大小 (d.nm)	PDI
1	脂质体-肽	172 ± 0.7	0.204 ± 0.005

图32B

BCMA肽量化

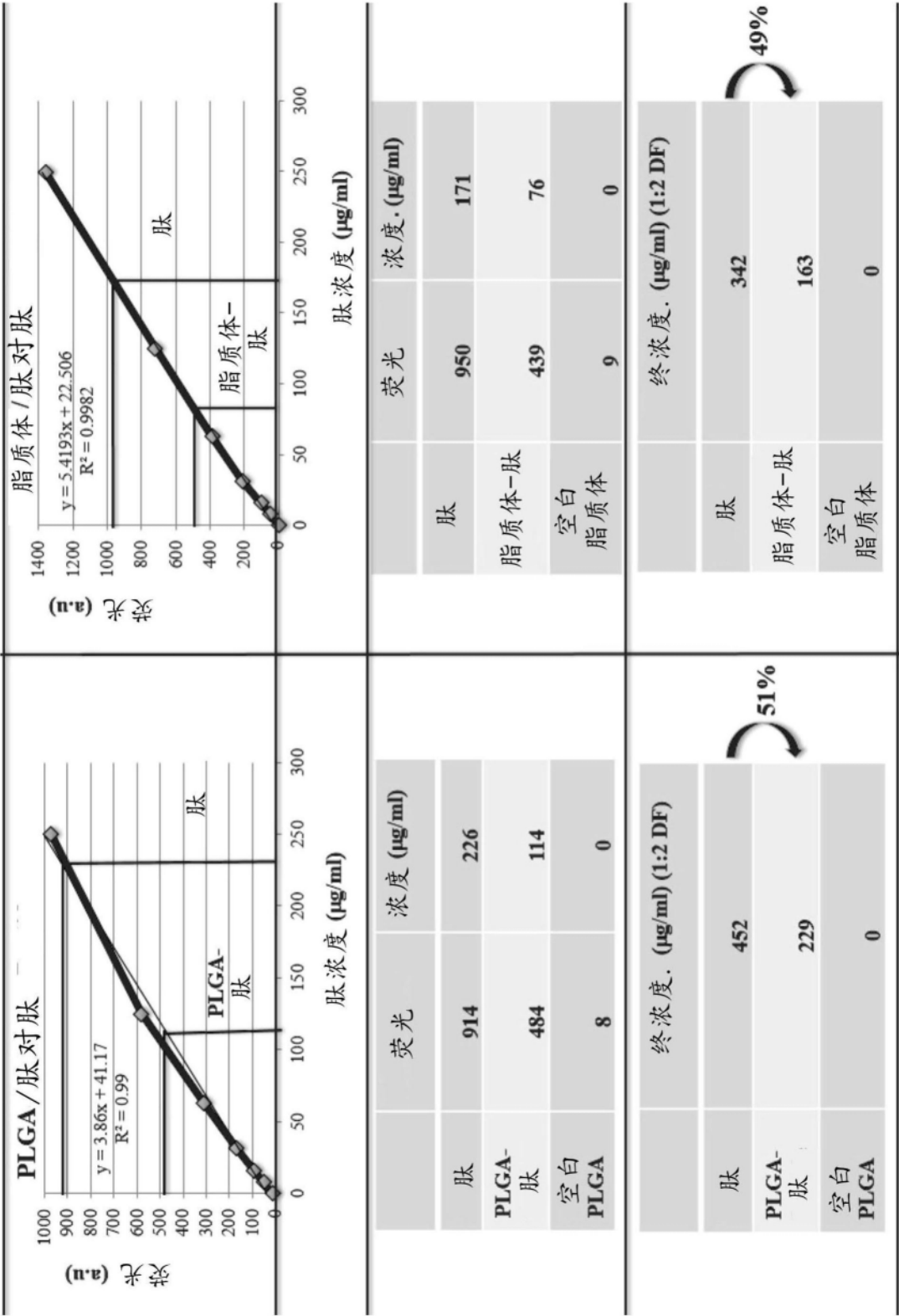


图32C

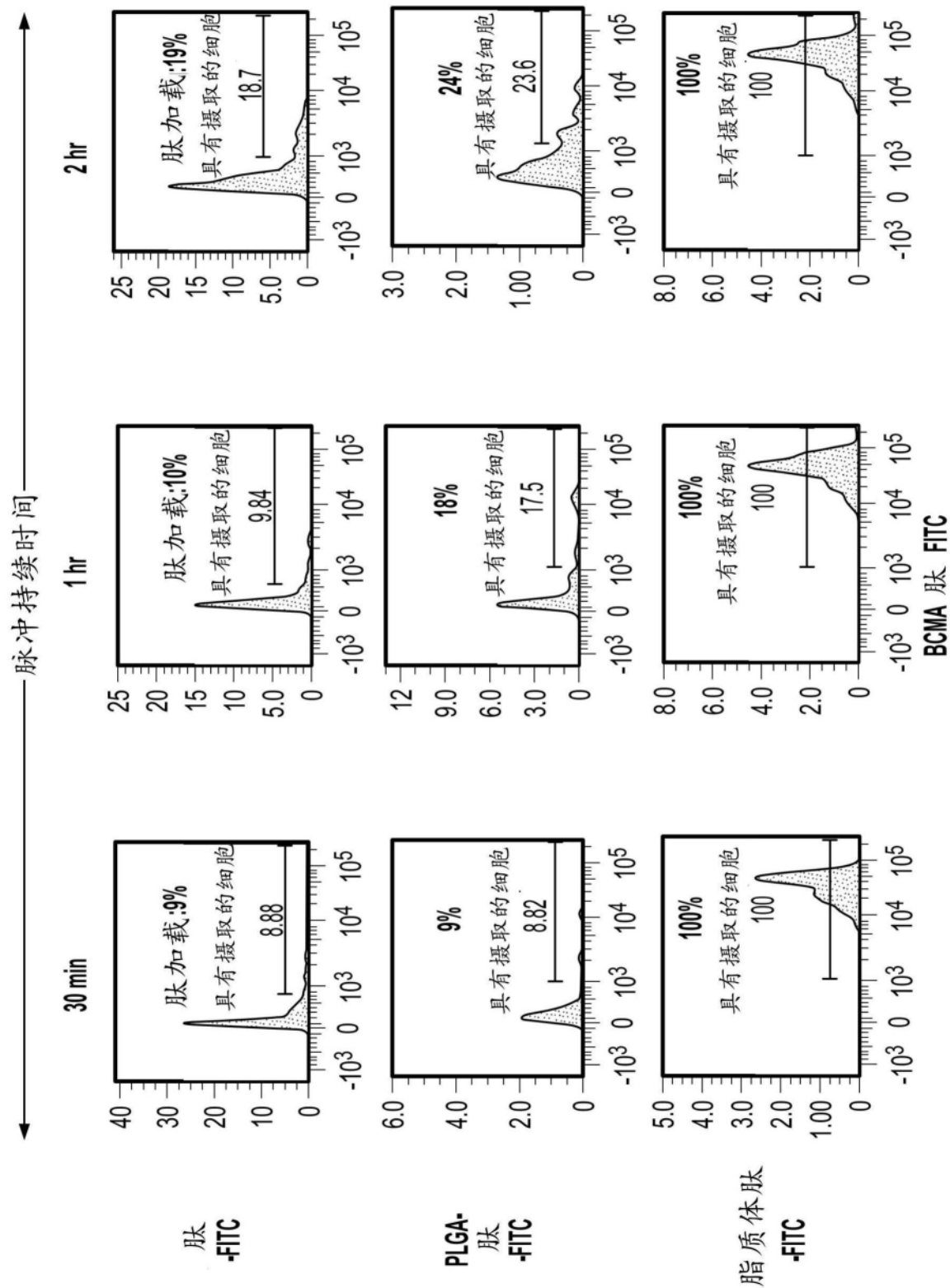


图33A

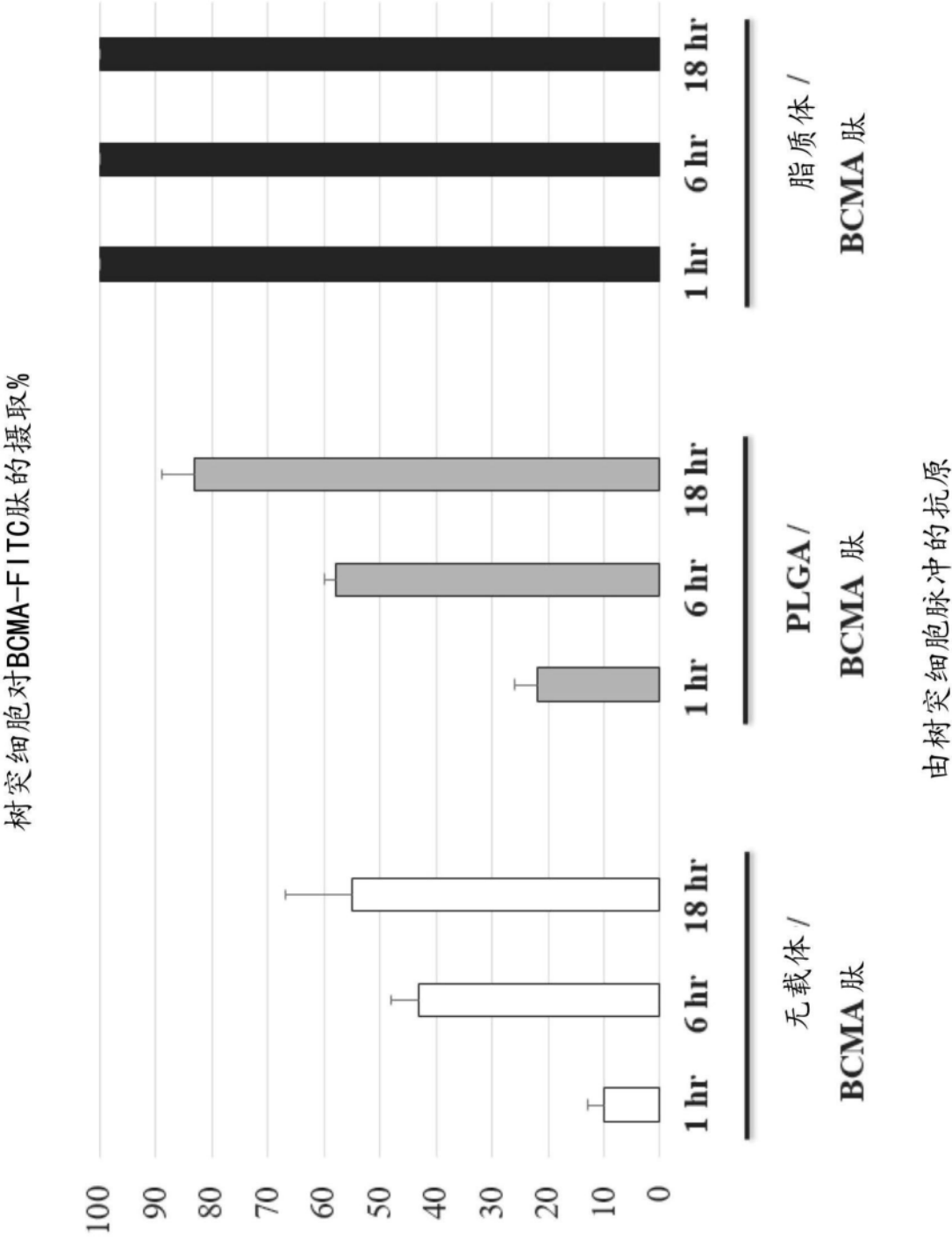


图33B

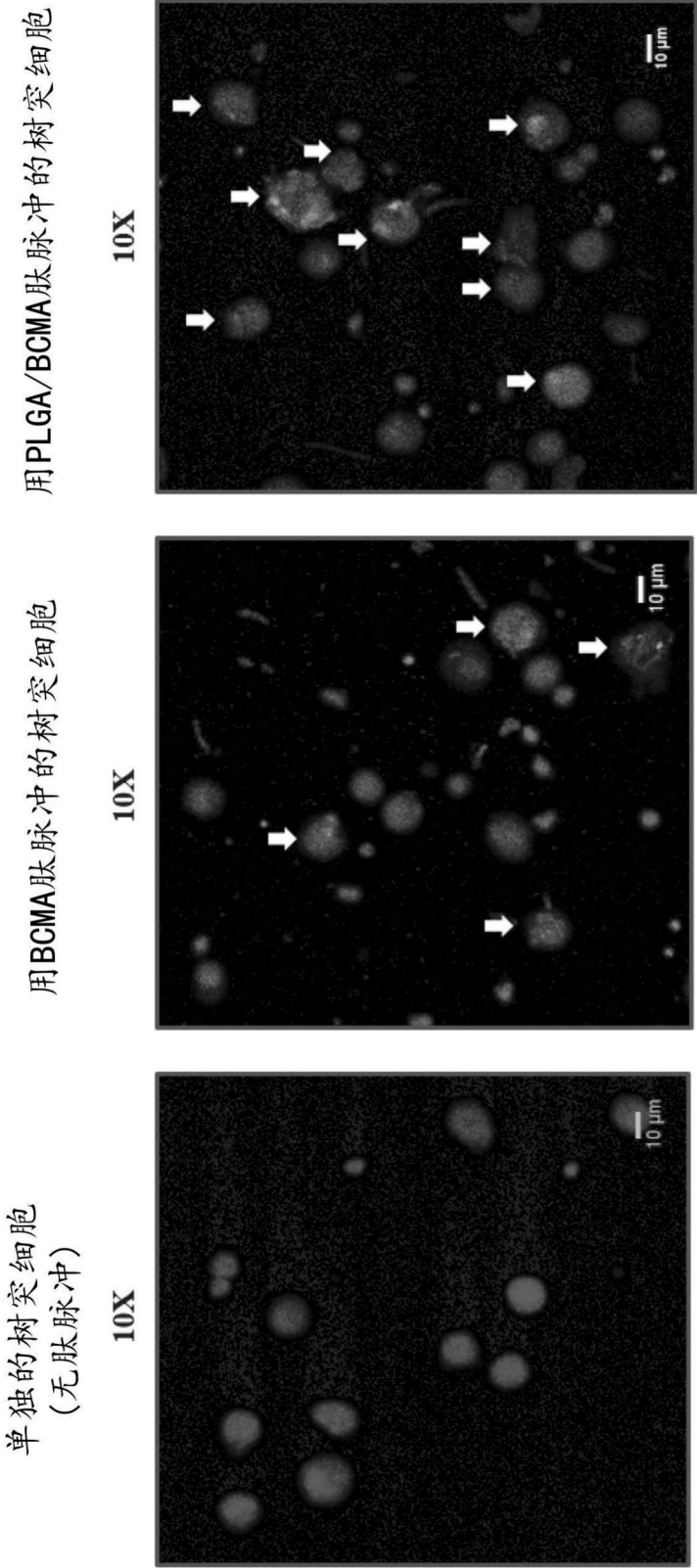
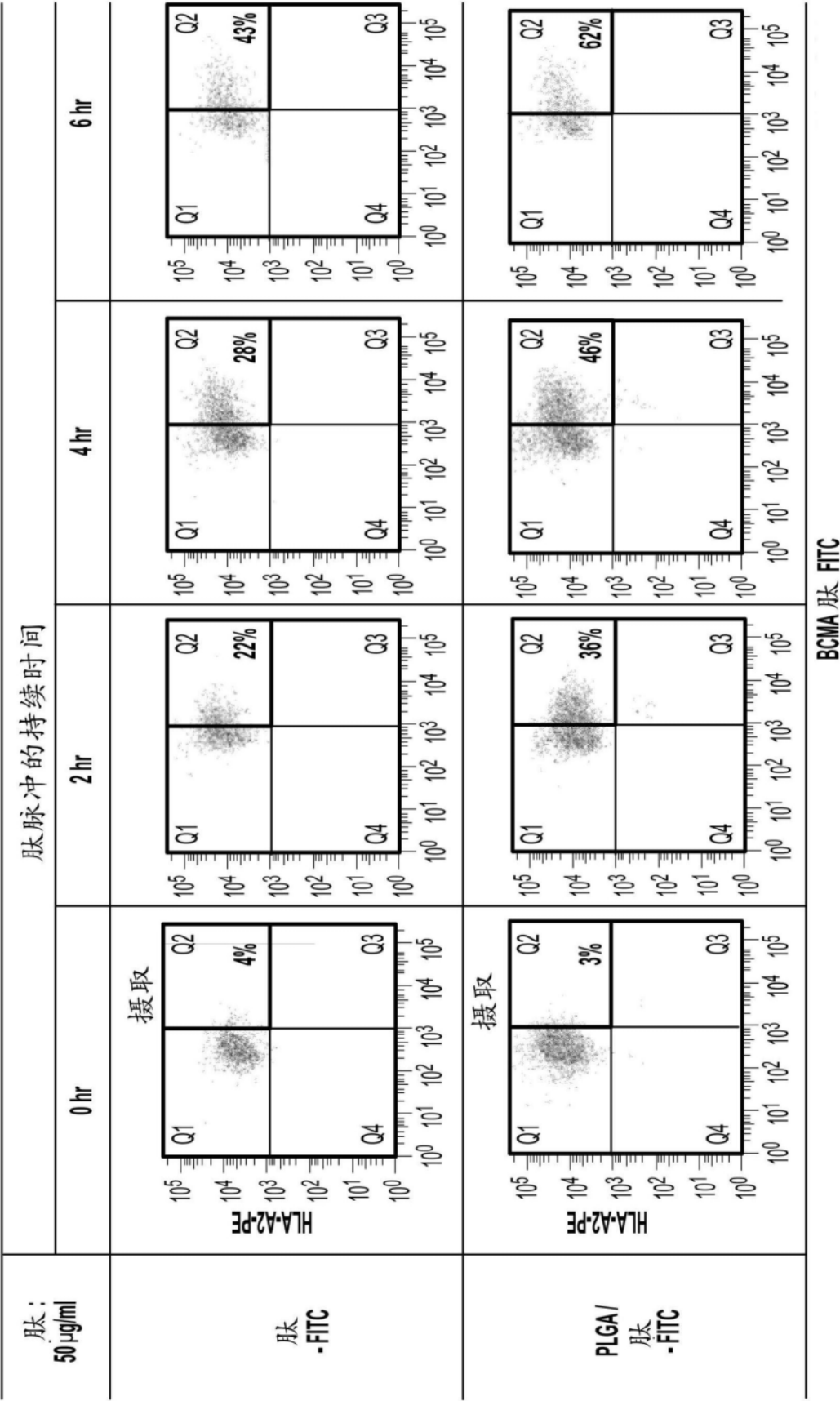


图33C

树突细胞的时间依赖性BCMA肽-FITC摄取



BCMA 肽 FITC

图33D

156

T2细胞的时间依赖性BCMA肽-FITC摄取

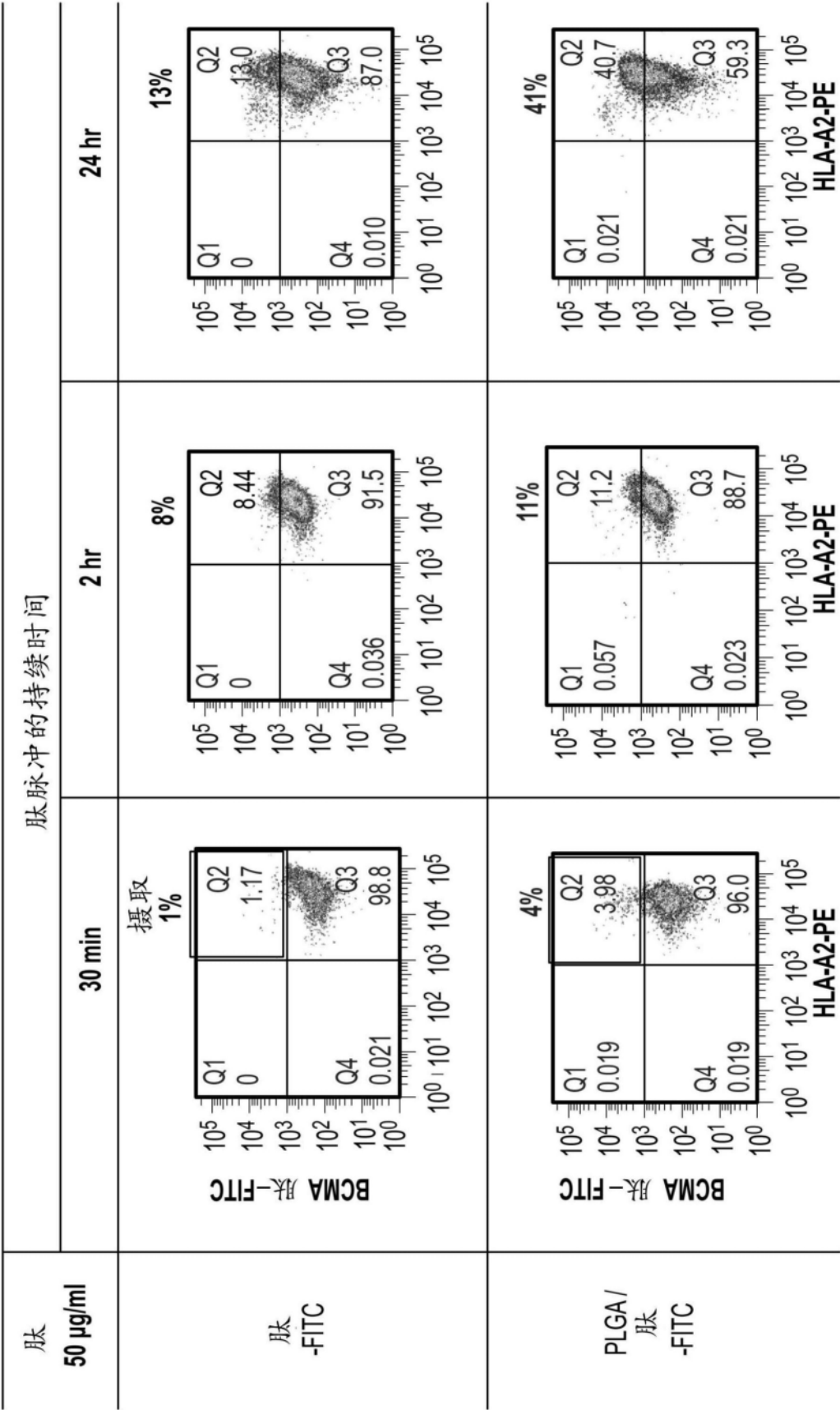


图33E

BCMA特异性CTL的抗肿瘤活性

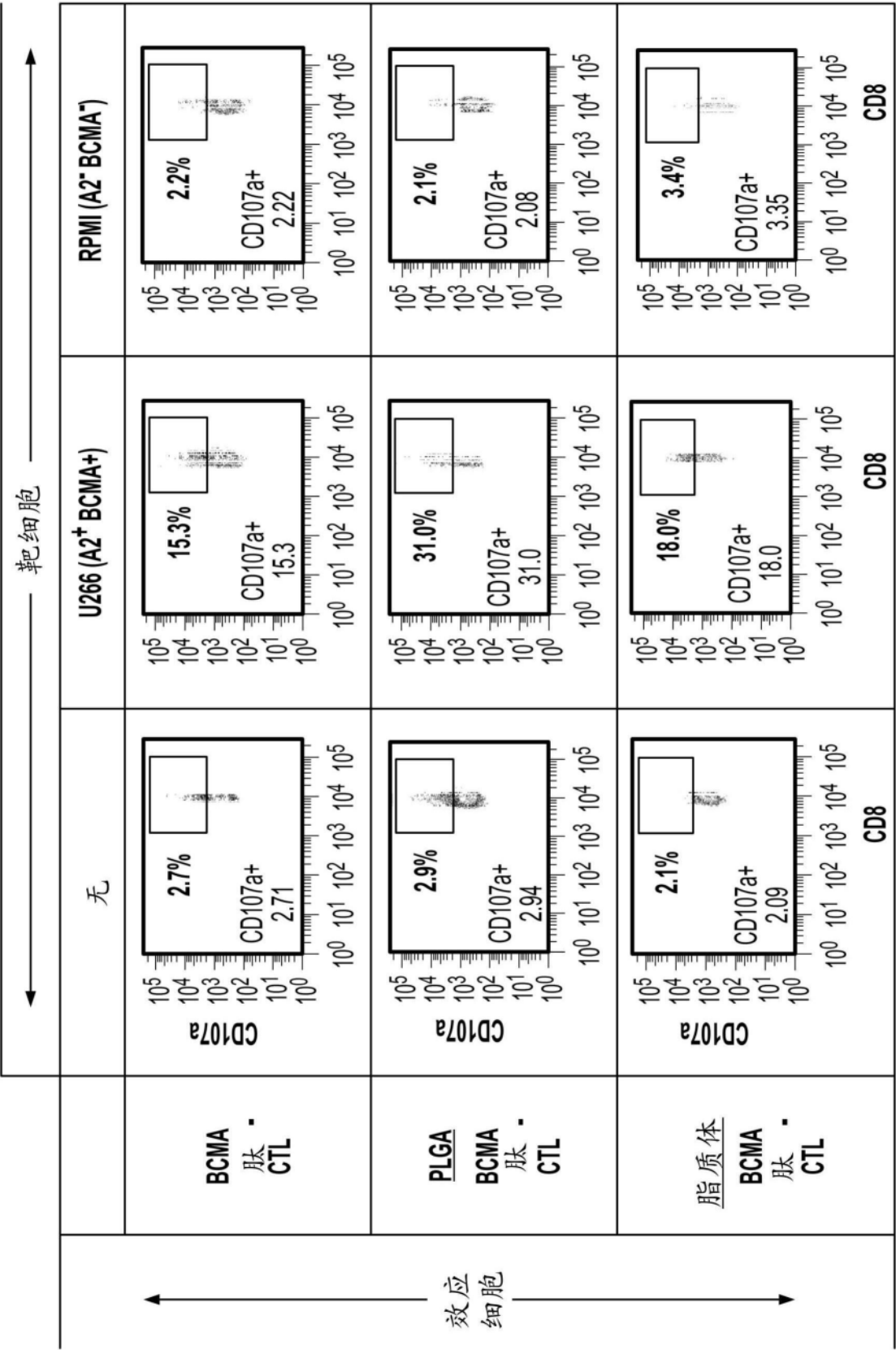


图34A

BCMA 特异性CTL的细胞因子生成

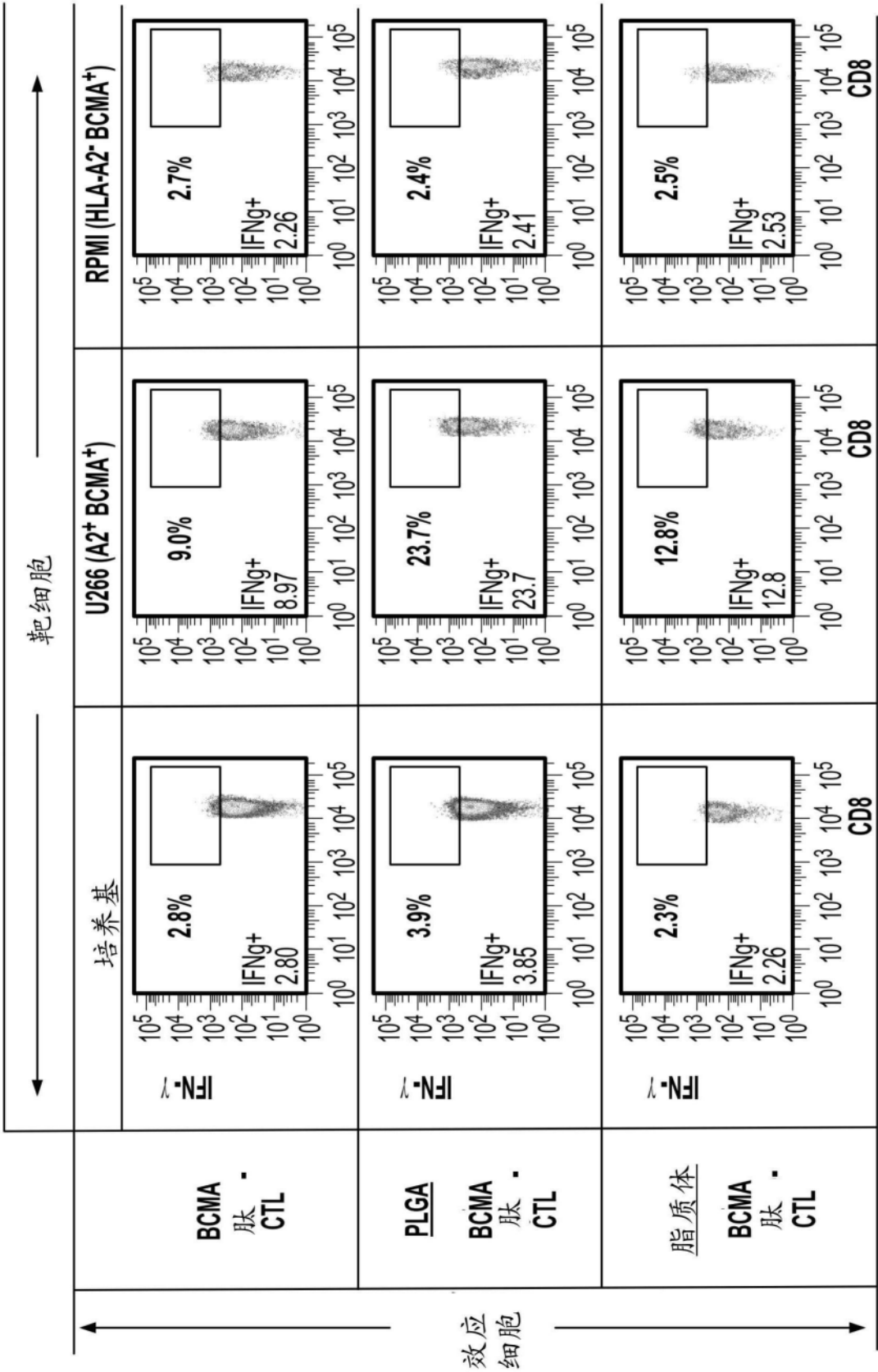


图34B

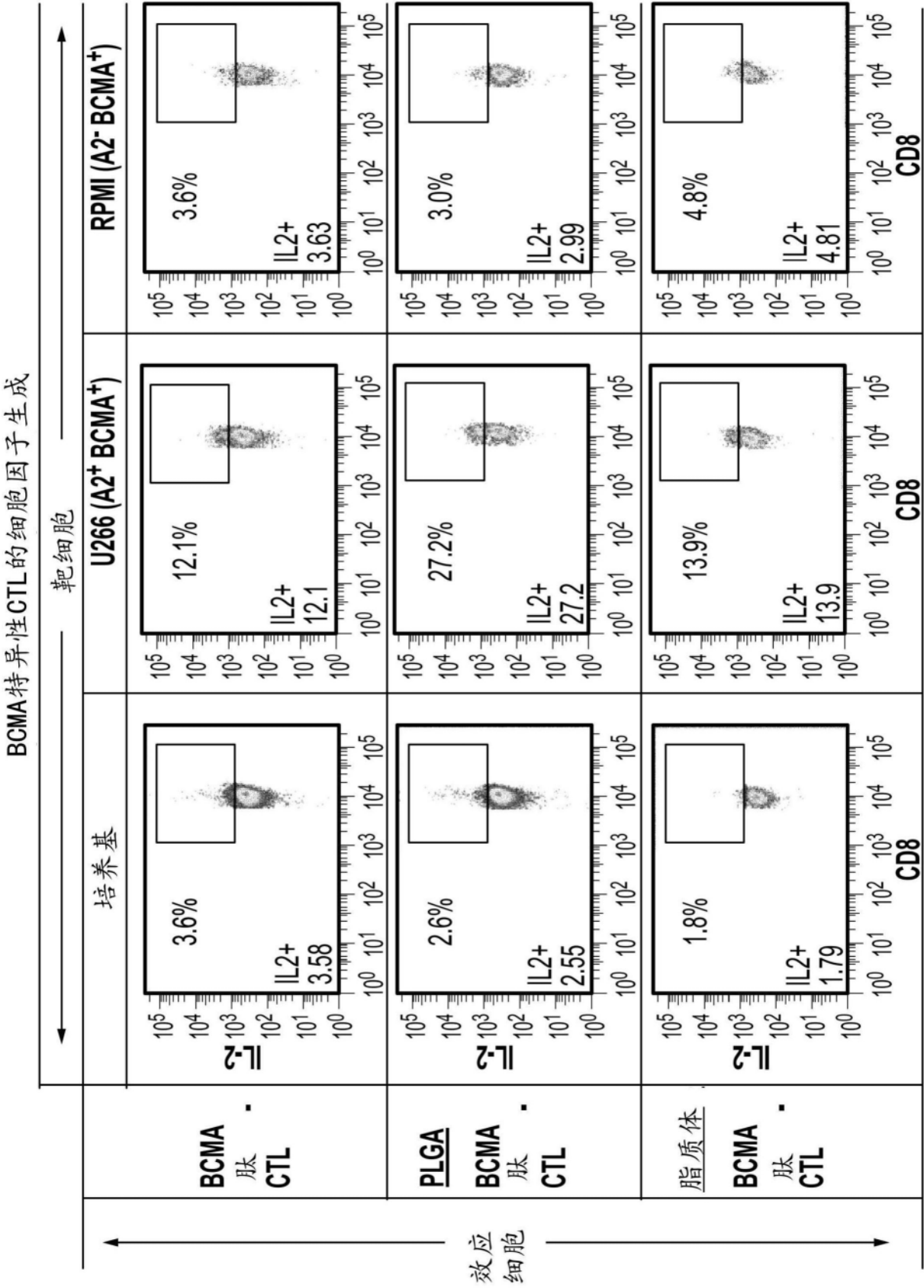


图34C

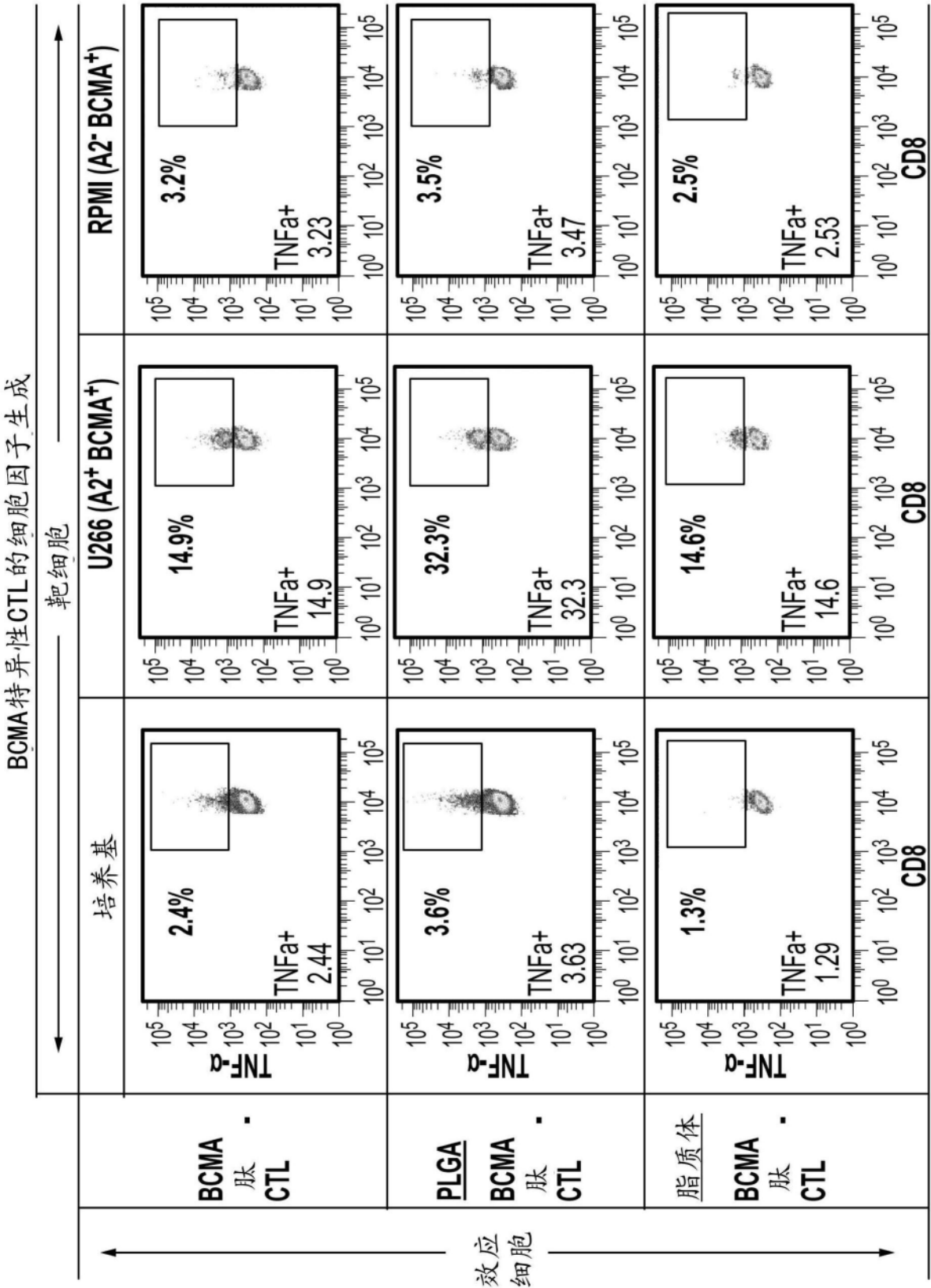


图34D

BCMA特异性CTL的抗肿瘤活性

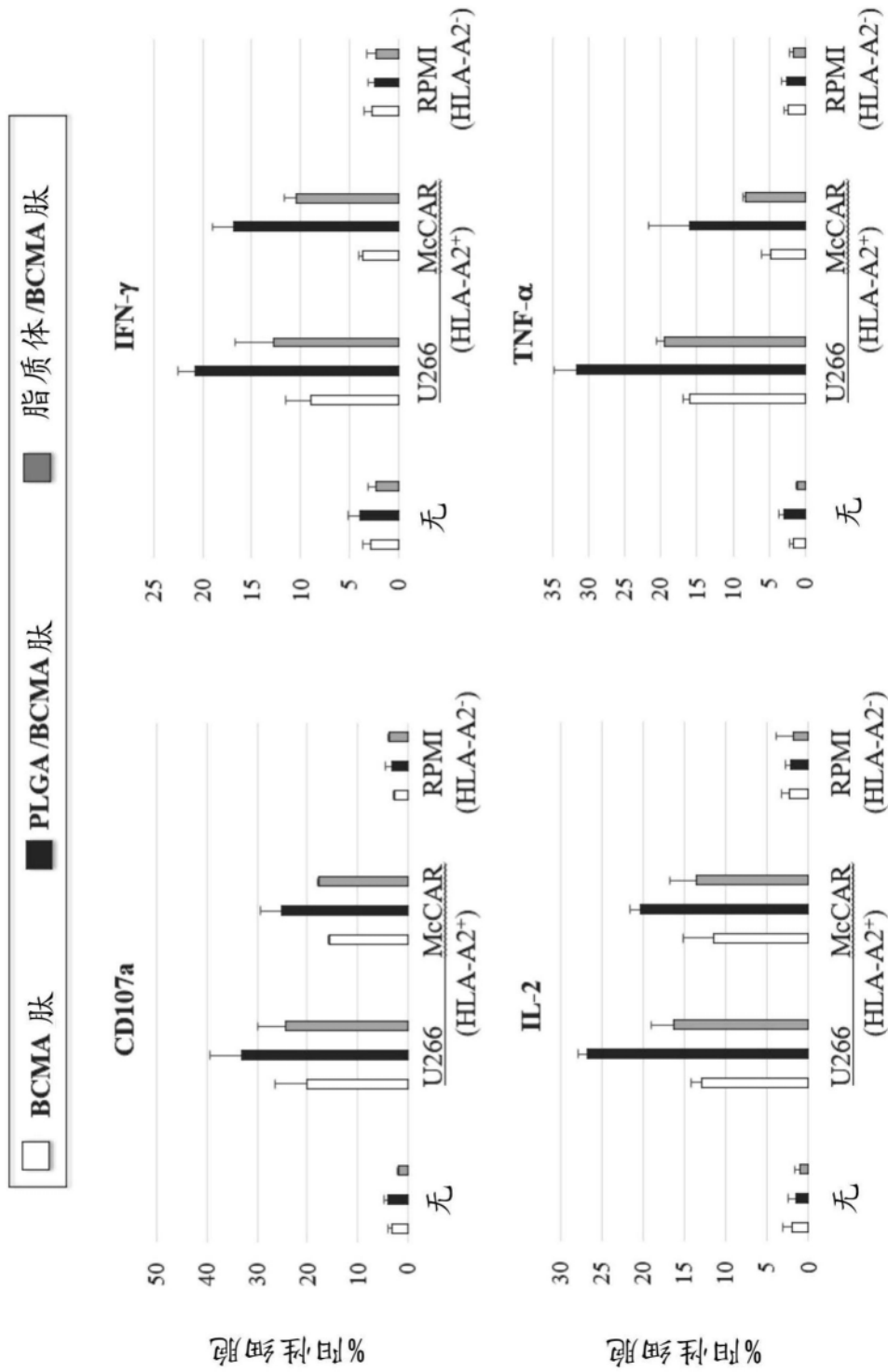


图34E

BCMA特异性CTL的抗肿瘤活性

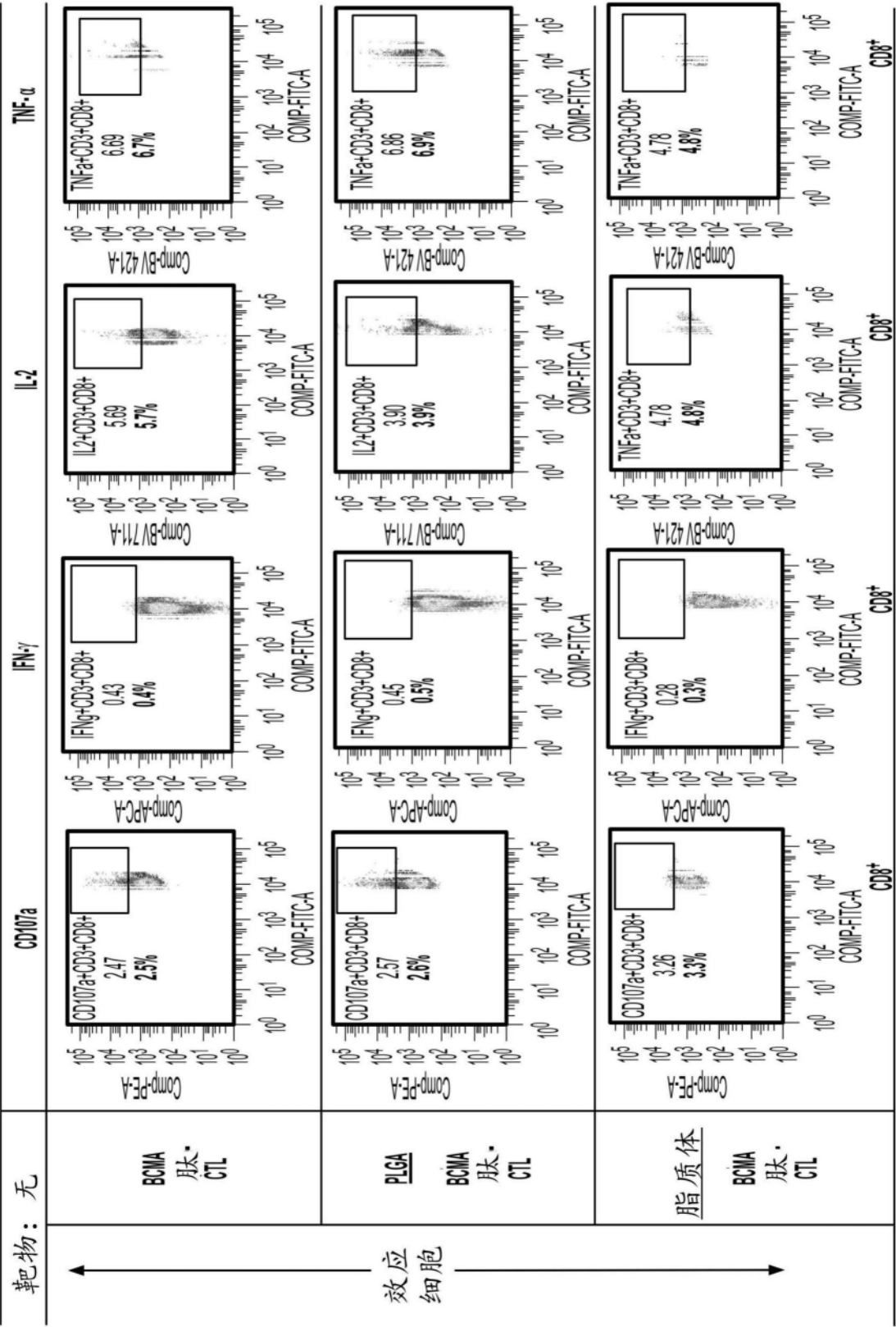


图35A

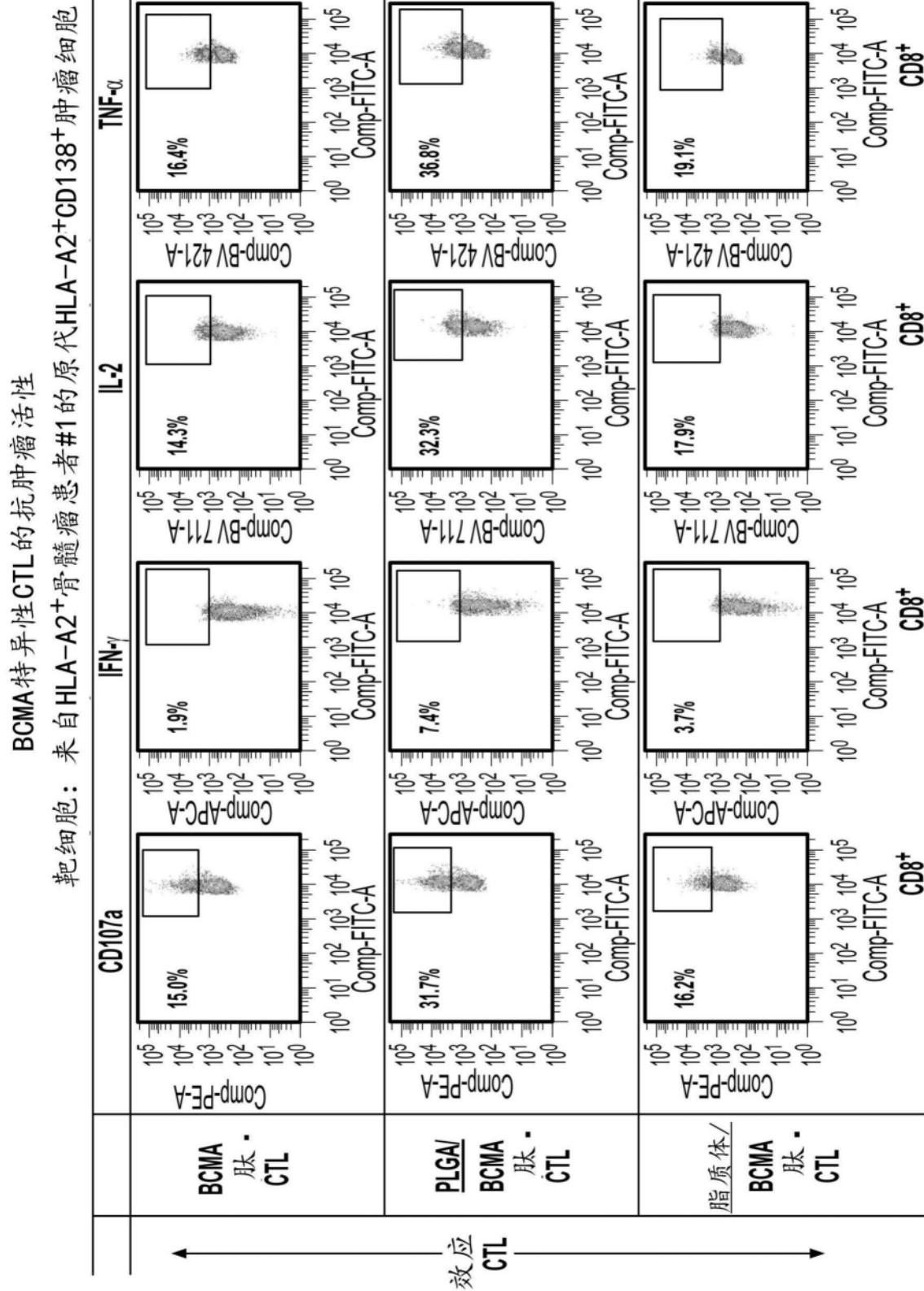


图35B

BCMA特异性CTL的抗肿瘤活性
靶细胞：来自HLA-A2⁺骨髓瘤患者#2的原代HLA-A2⁺CD138⁺肿瘤细胞

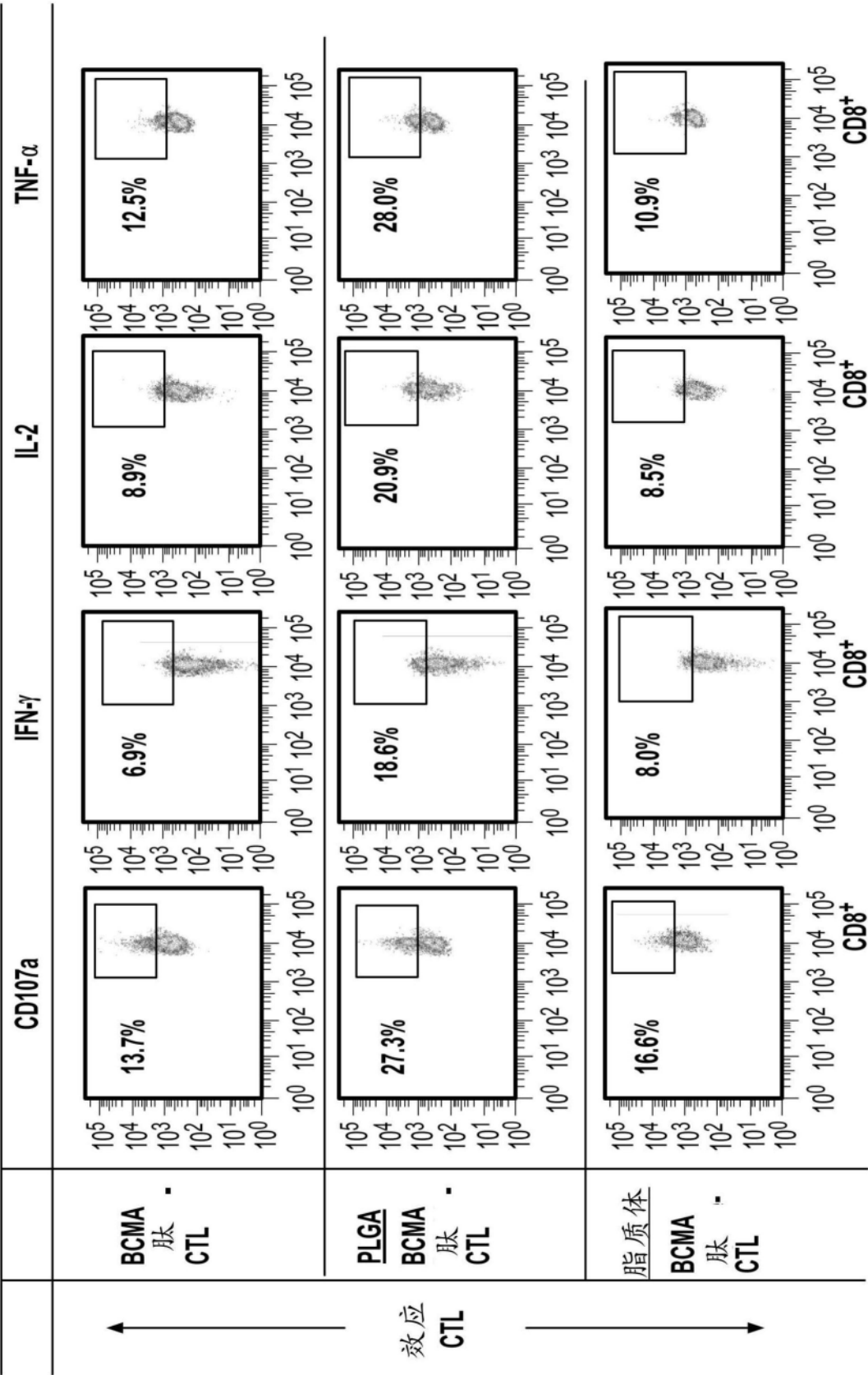


图35C

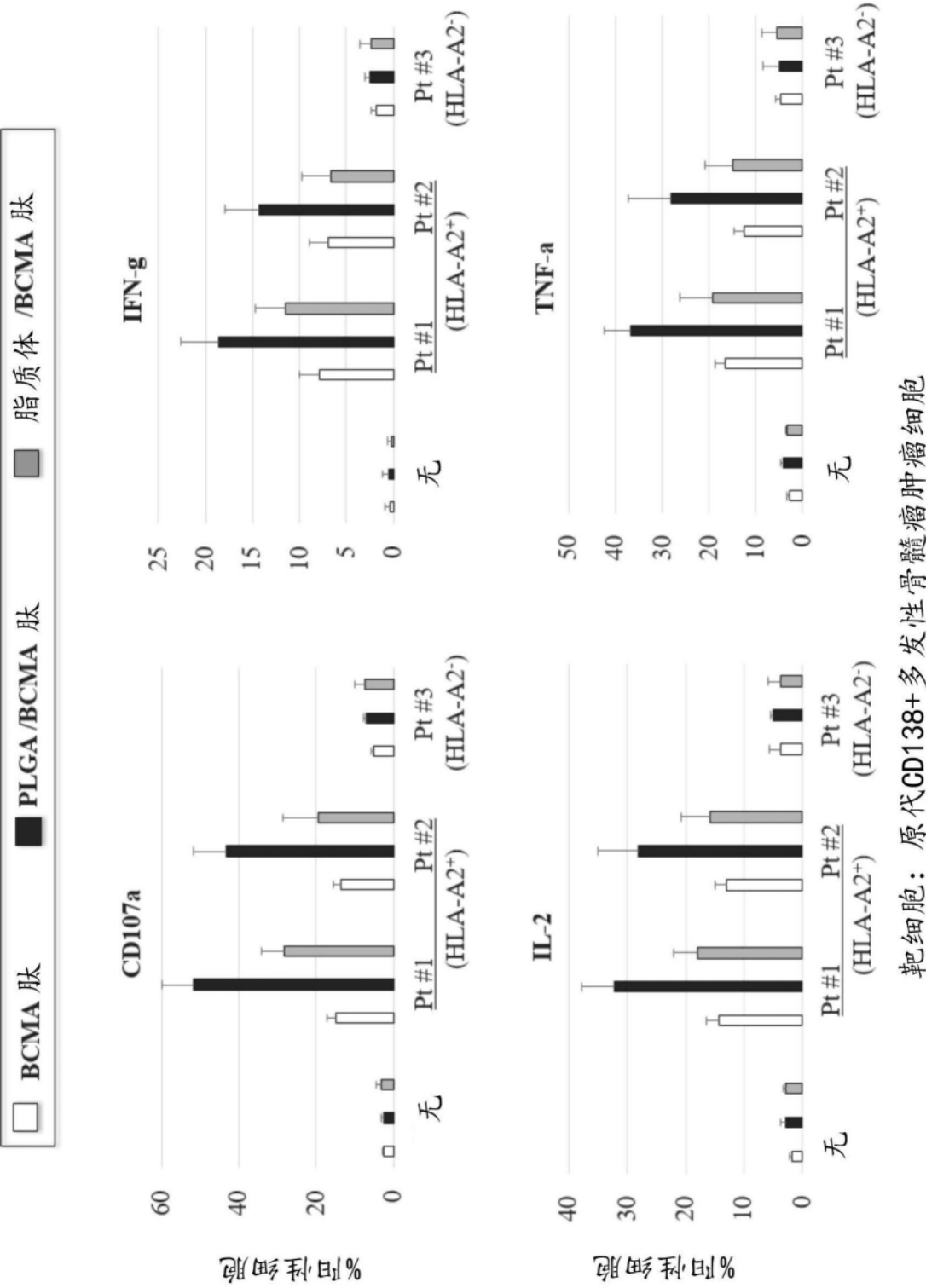


图35D

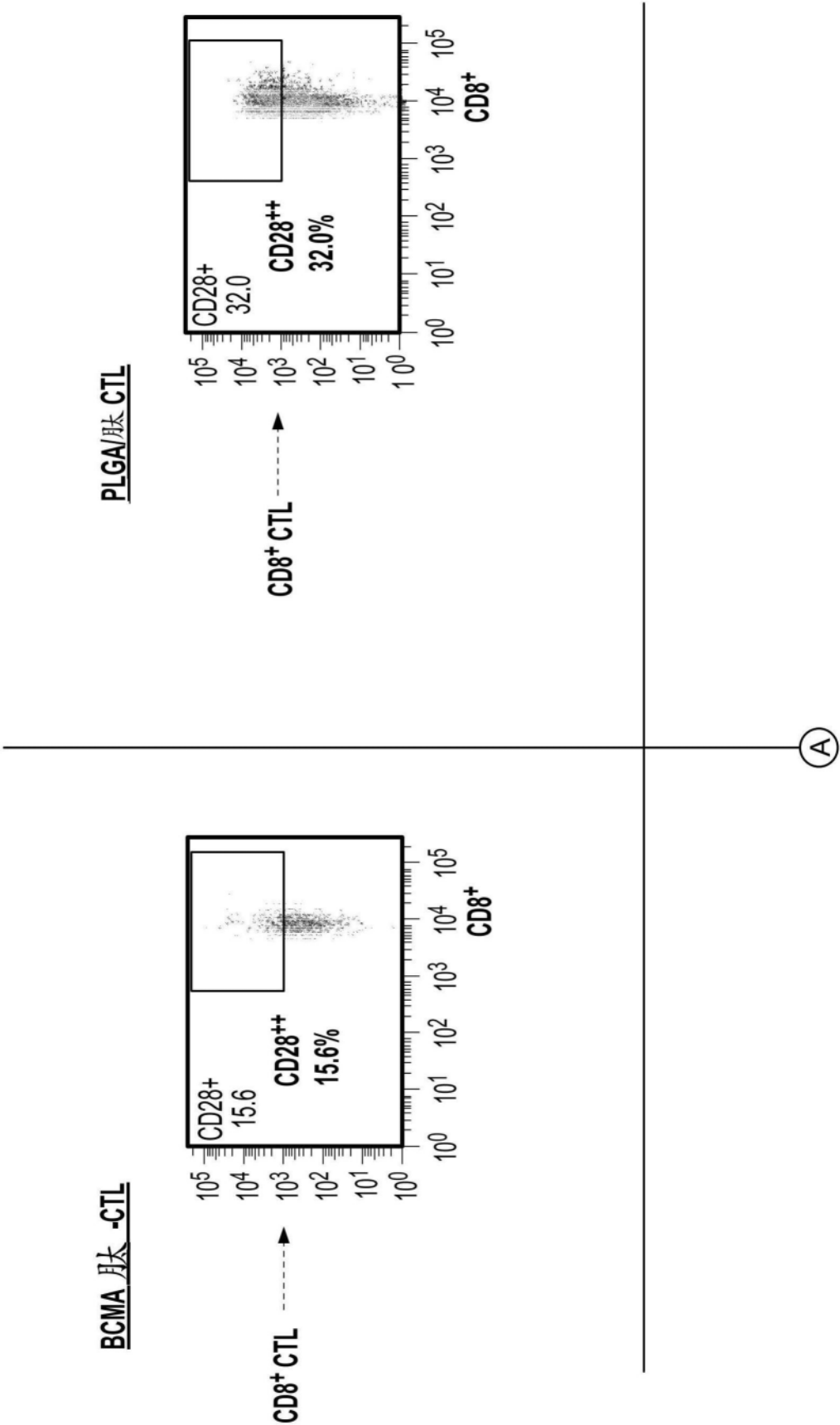


图36A

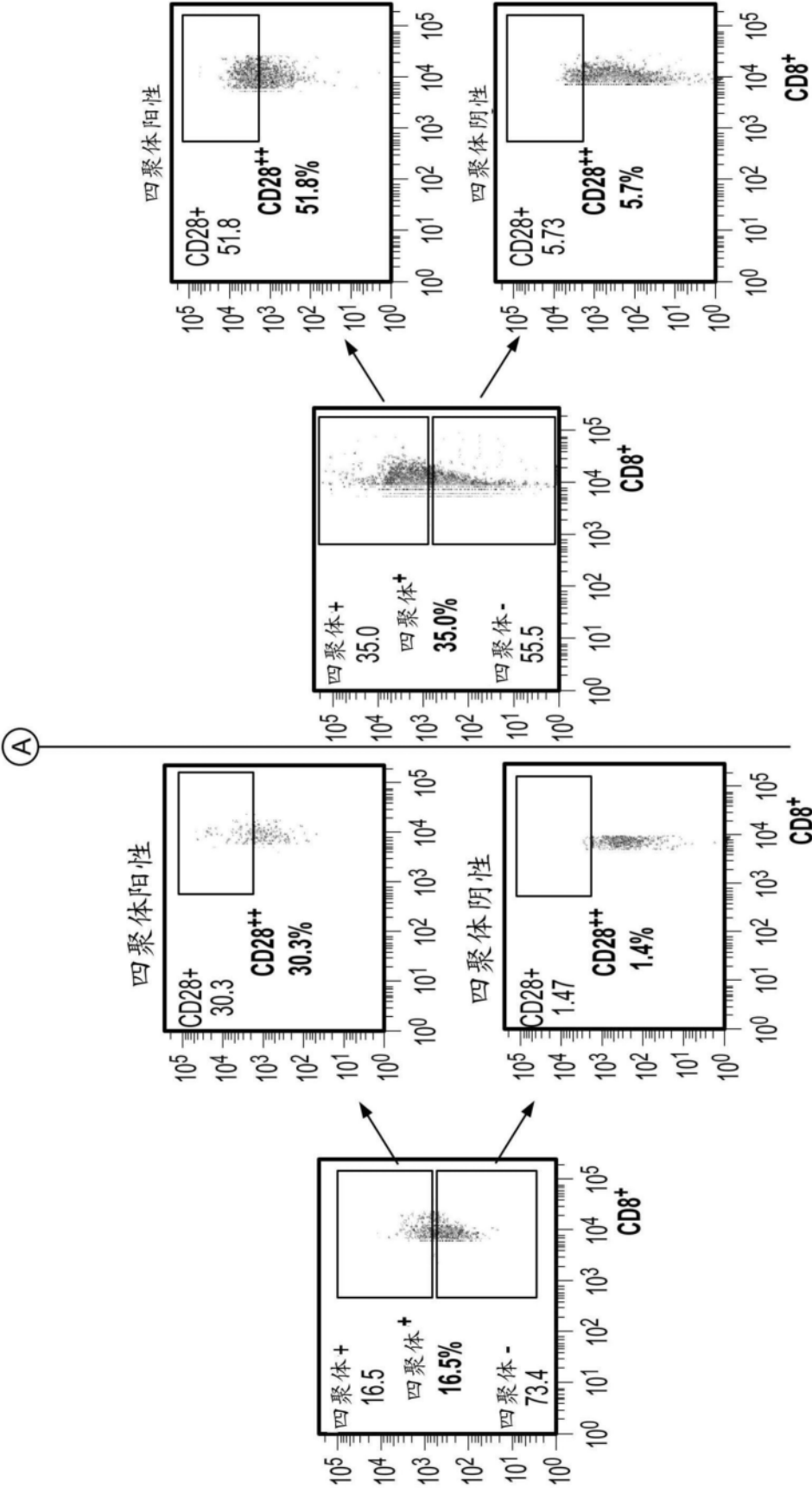


图36A续

响应关联BCMA肽的BCMA-CTL生成

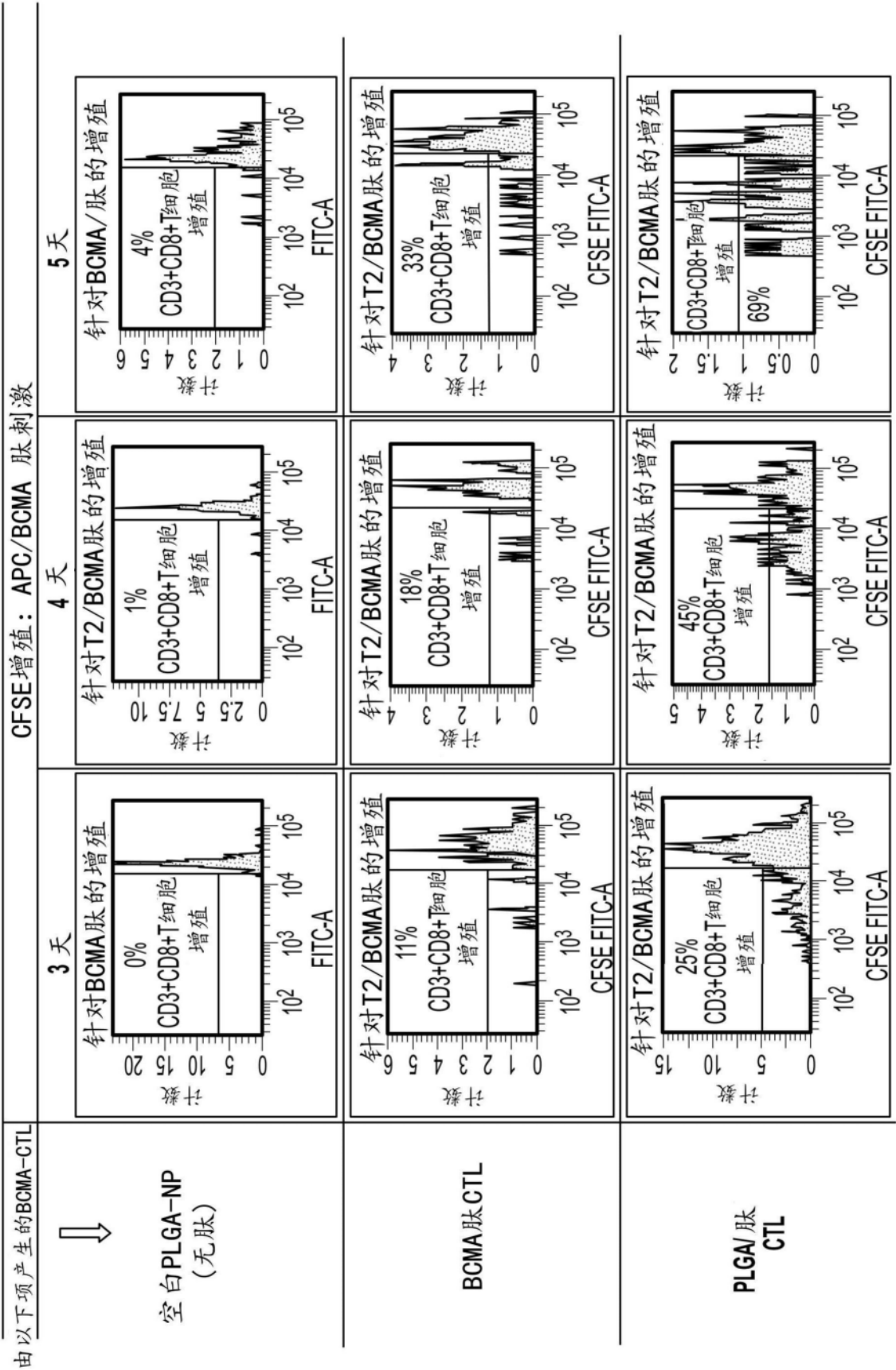


图36B

响应关联BCMA肽的IFN- γ 生成

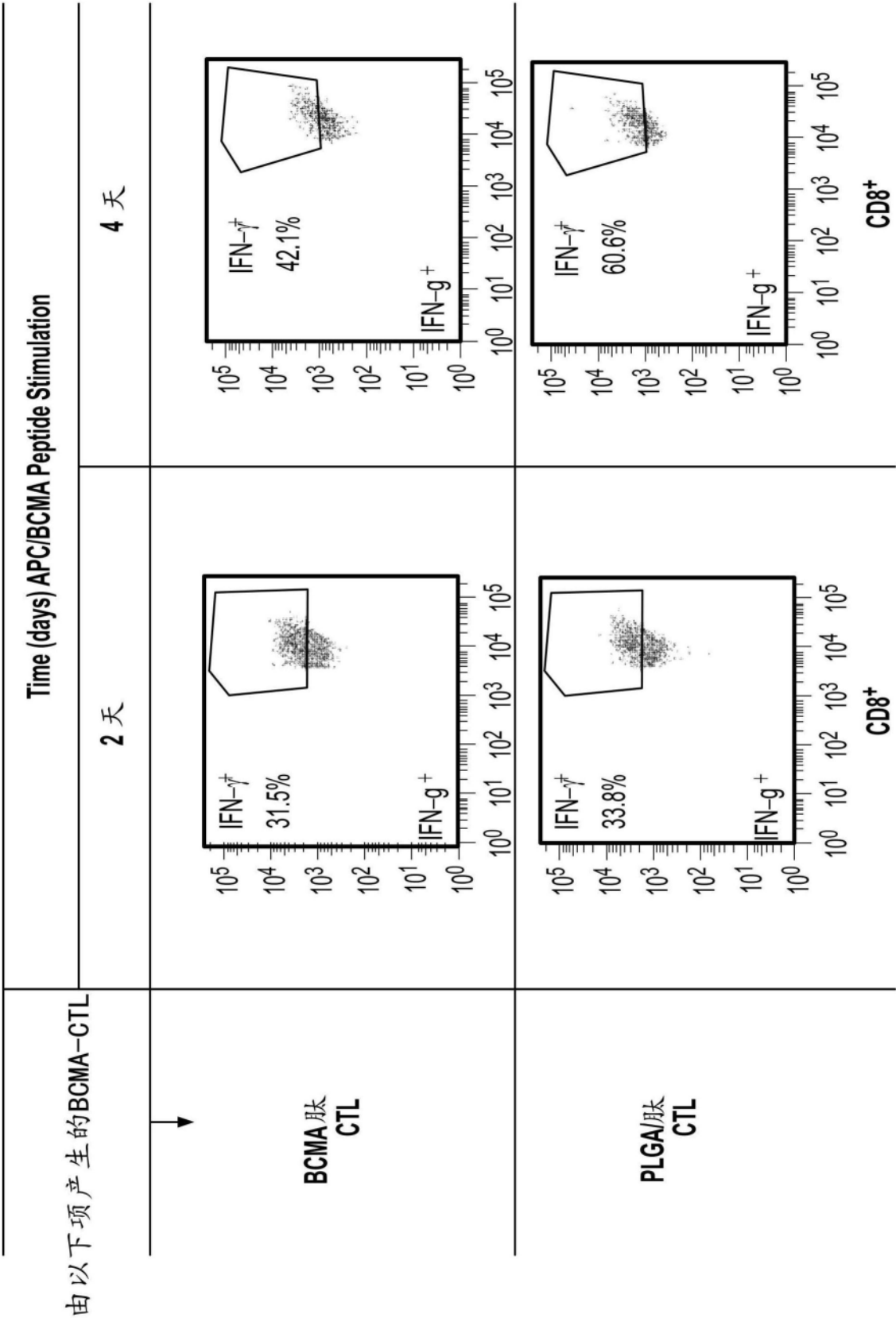


图36C

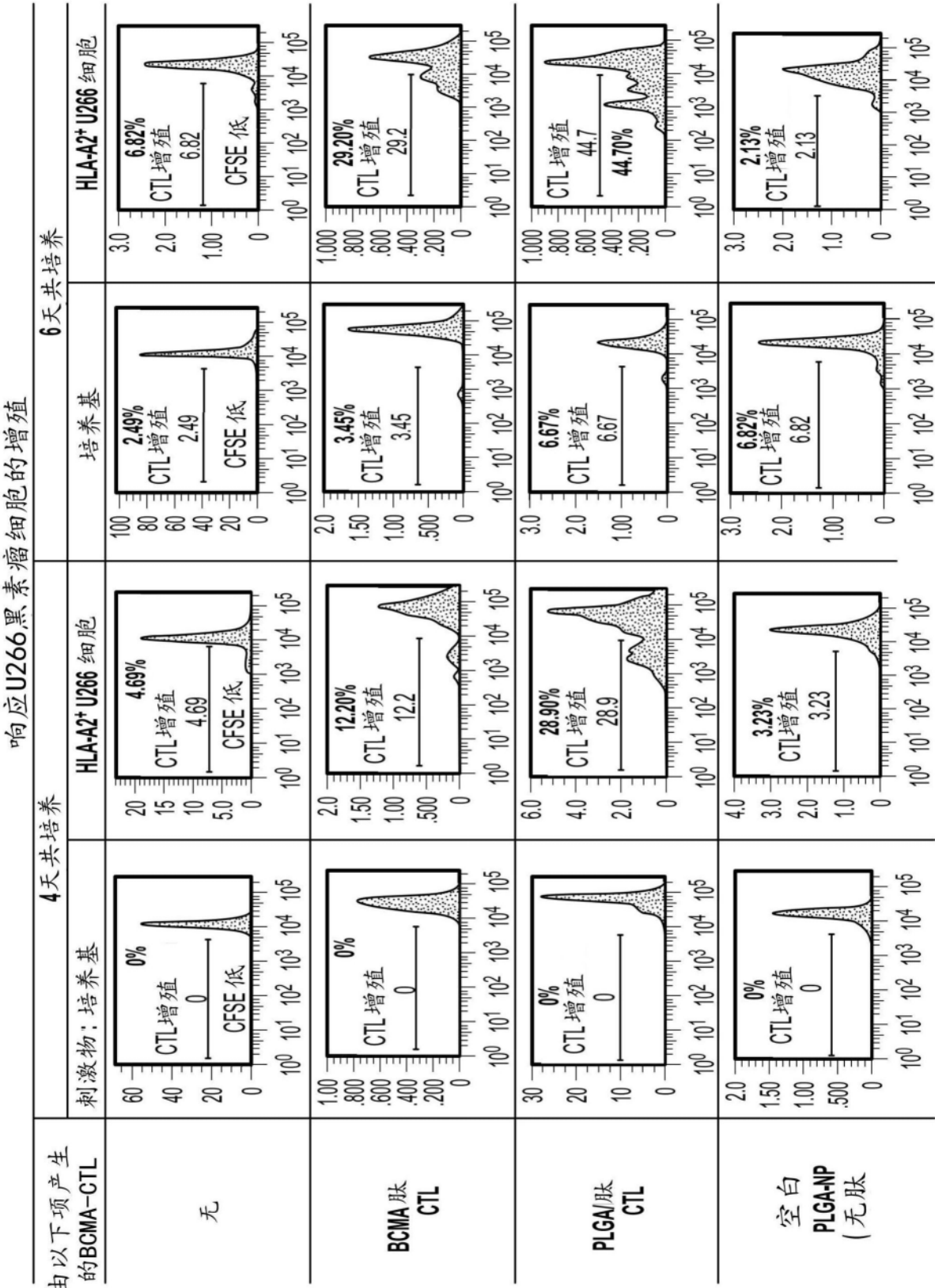


图37A

总的CD45RO+记忆/CD3+CD8+ T细胞', -供体1

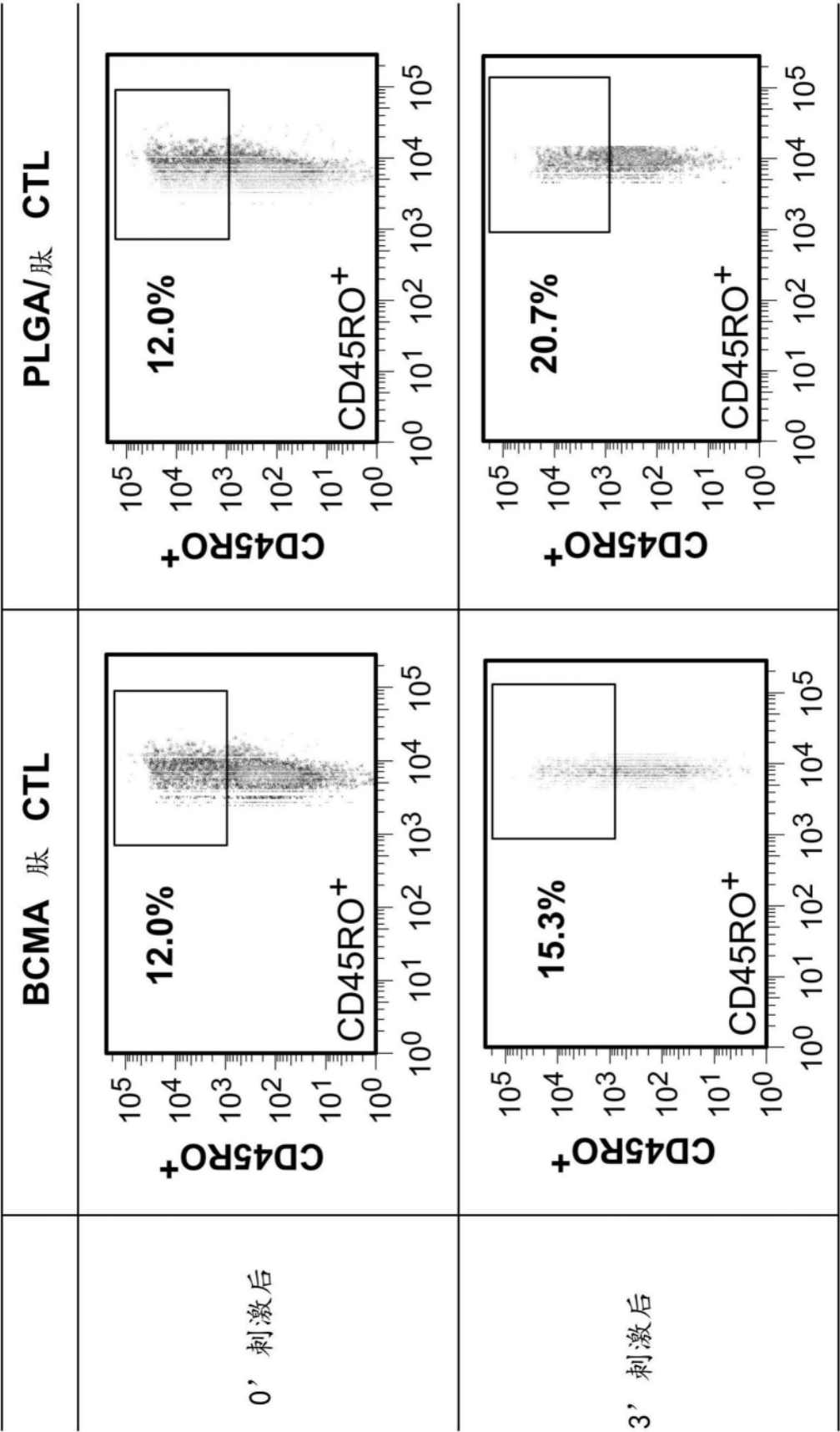


图37B

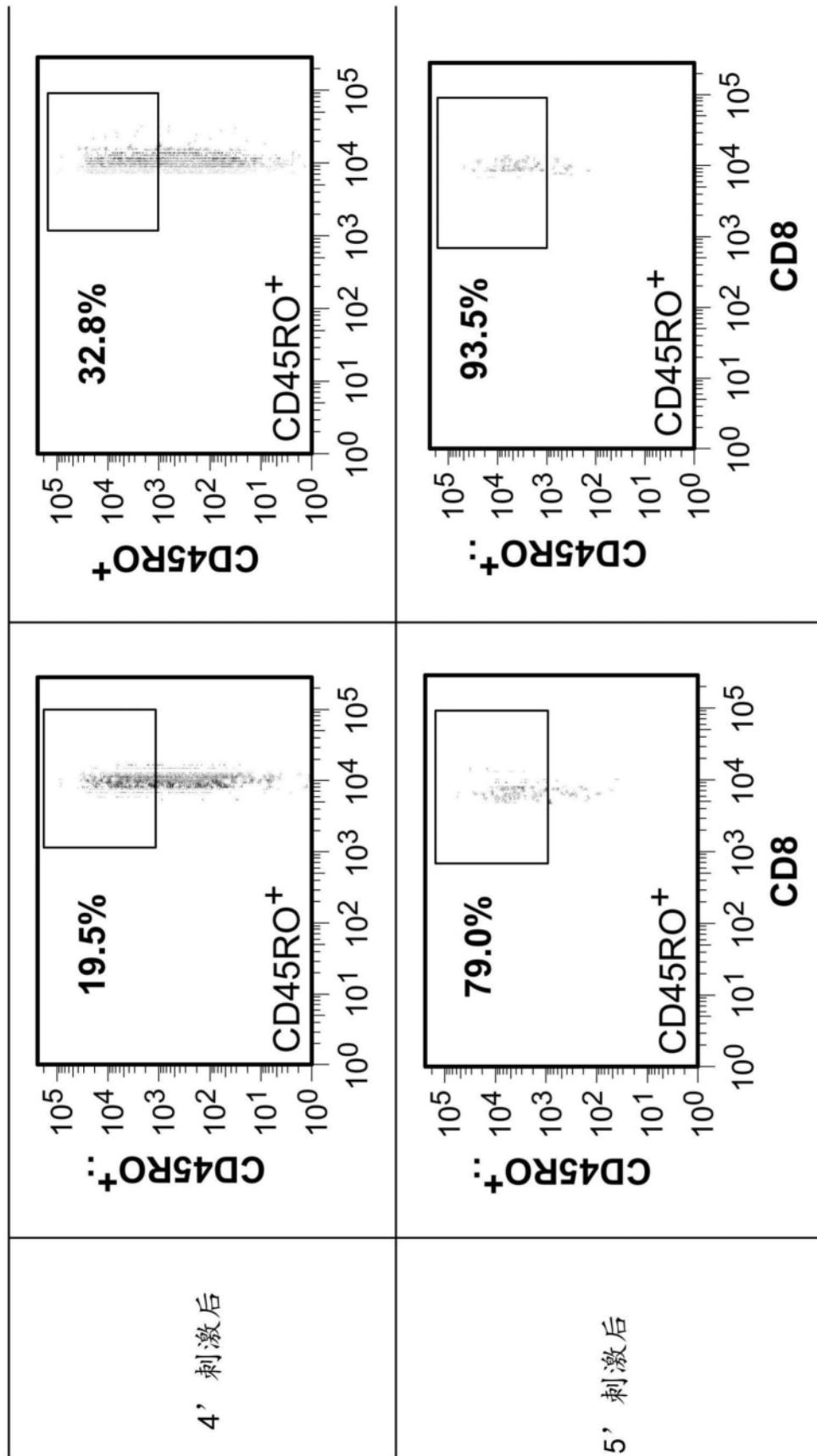


图37B(续)

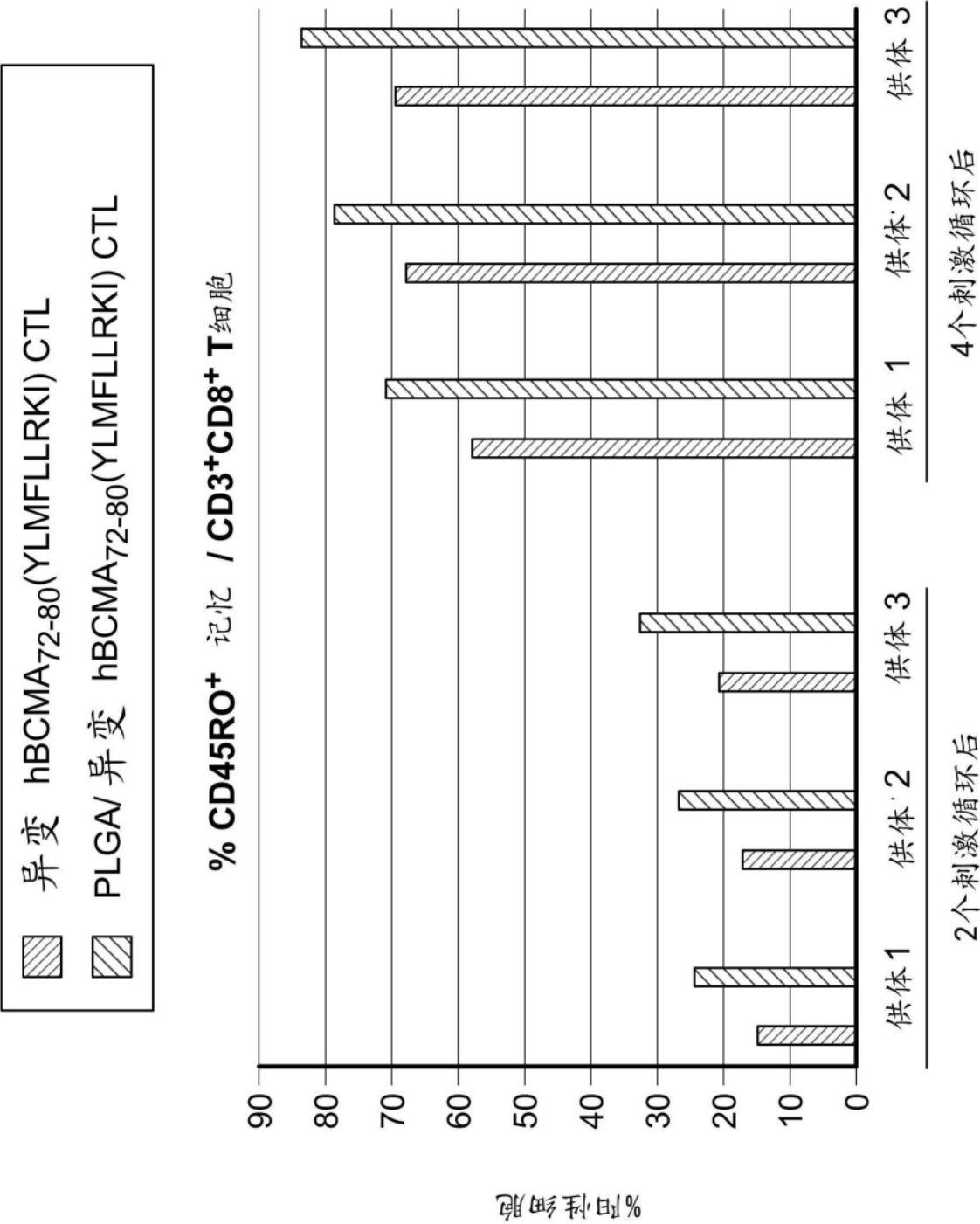


图37C

PLGA/肽-CTL 中央记忆和效应记忆细胞形成 (CD3⁺CD8⁺) 供体1

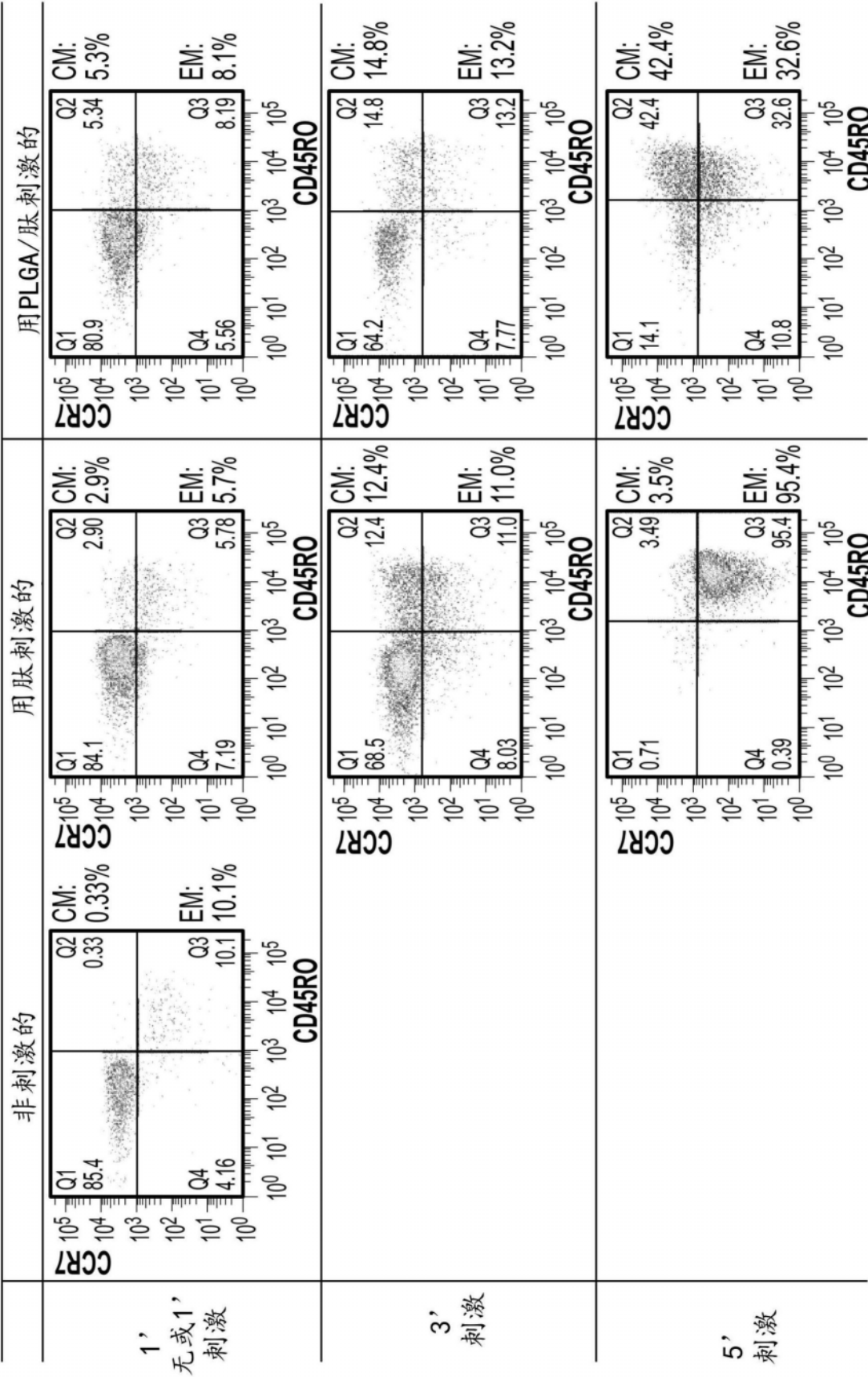


图37D

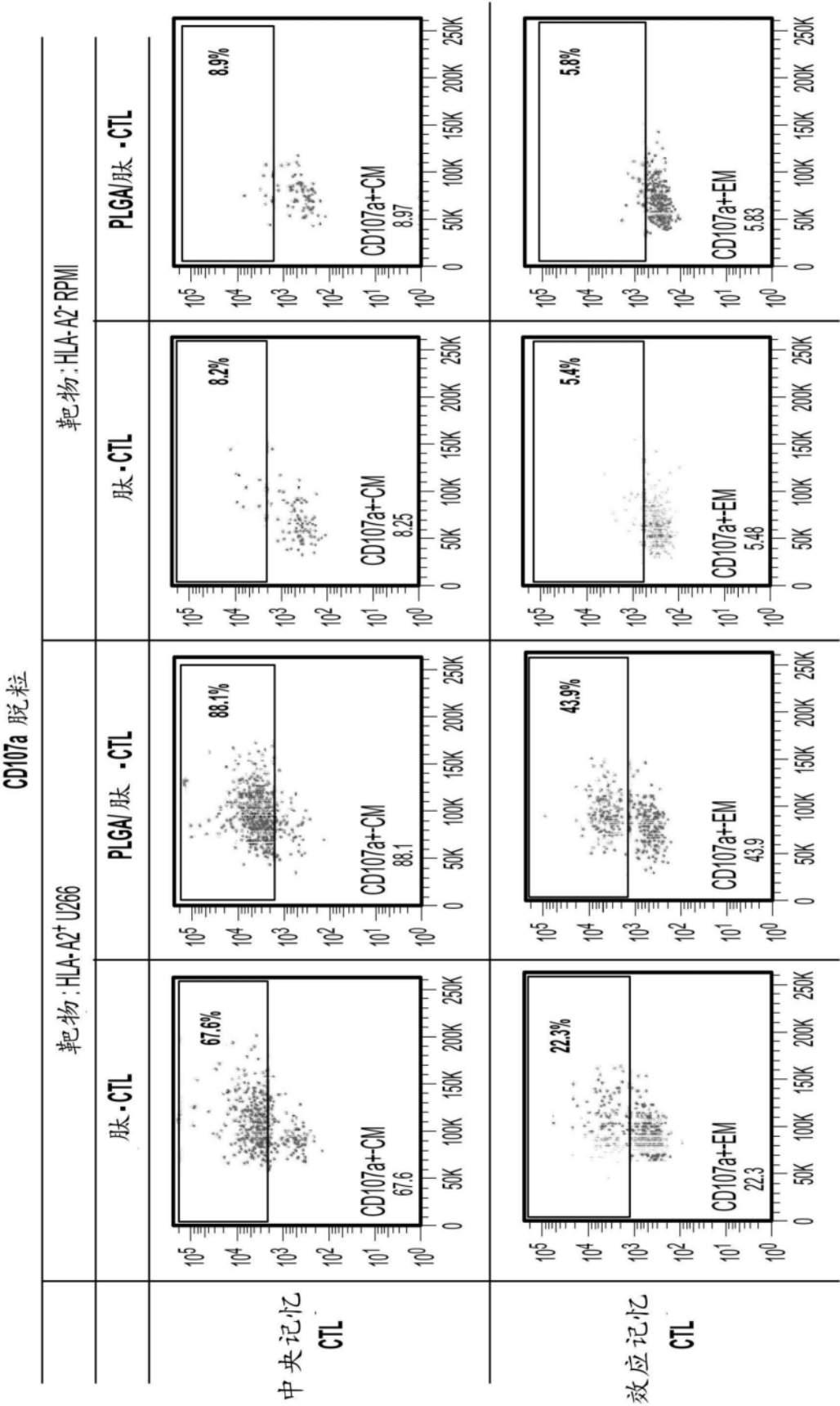


图38A

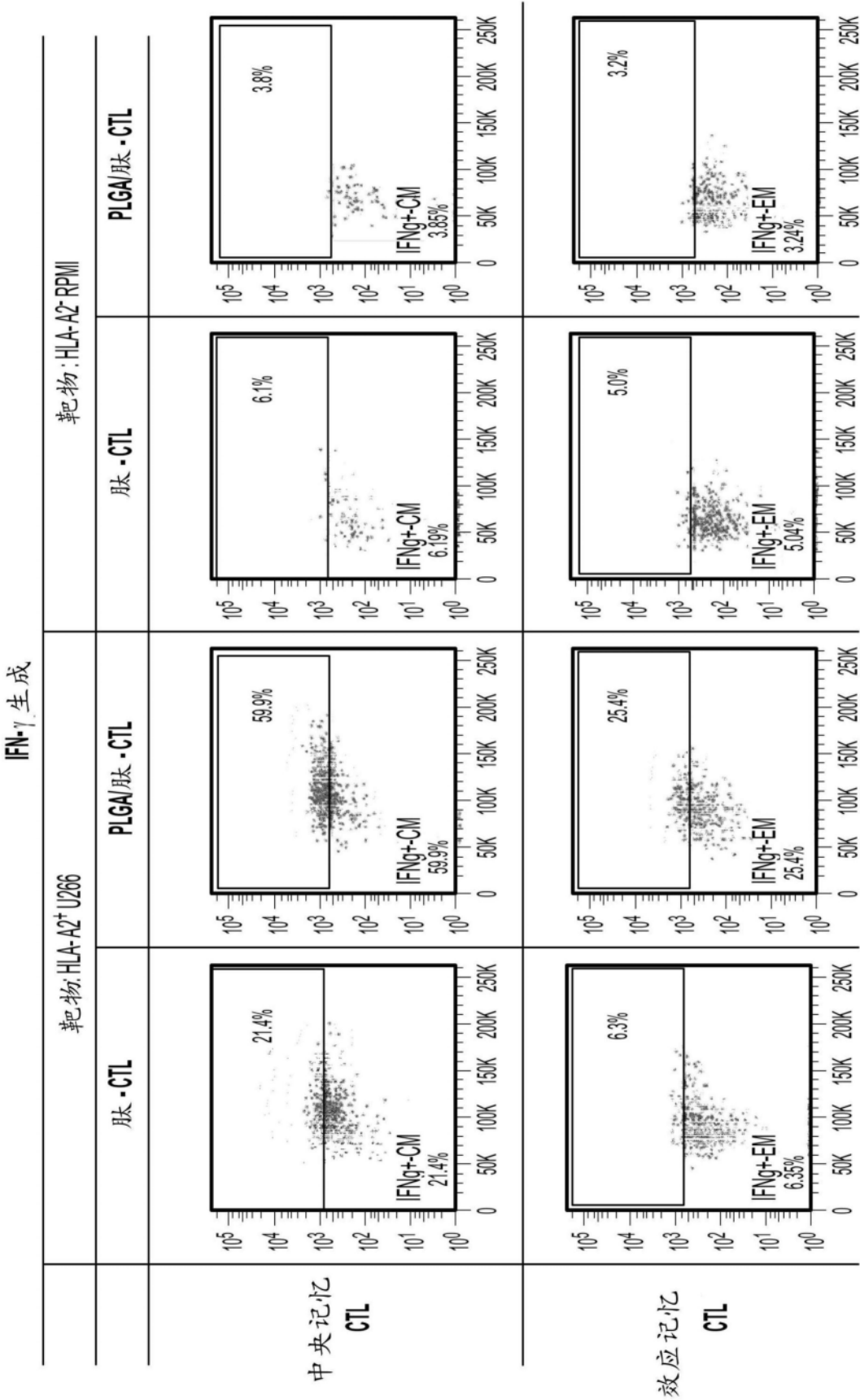


图38B

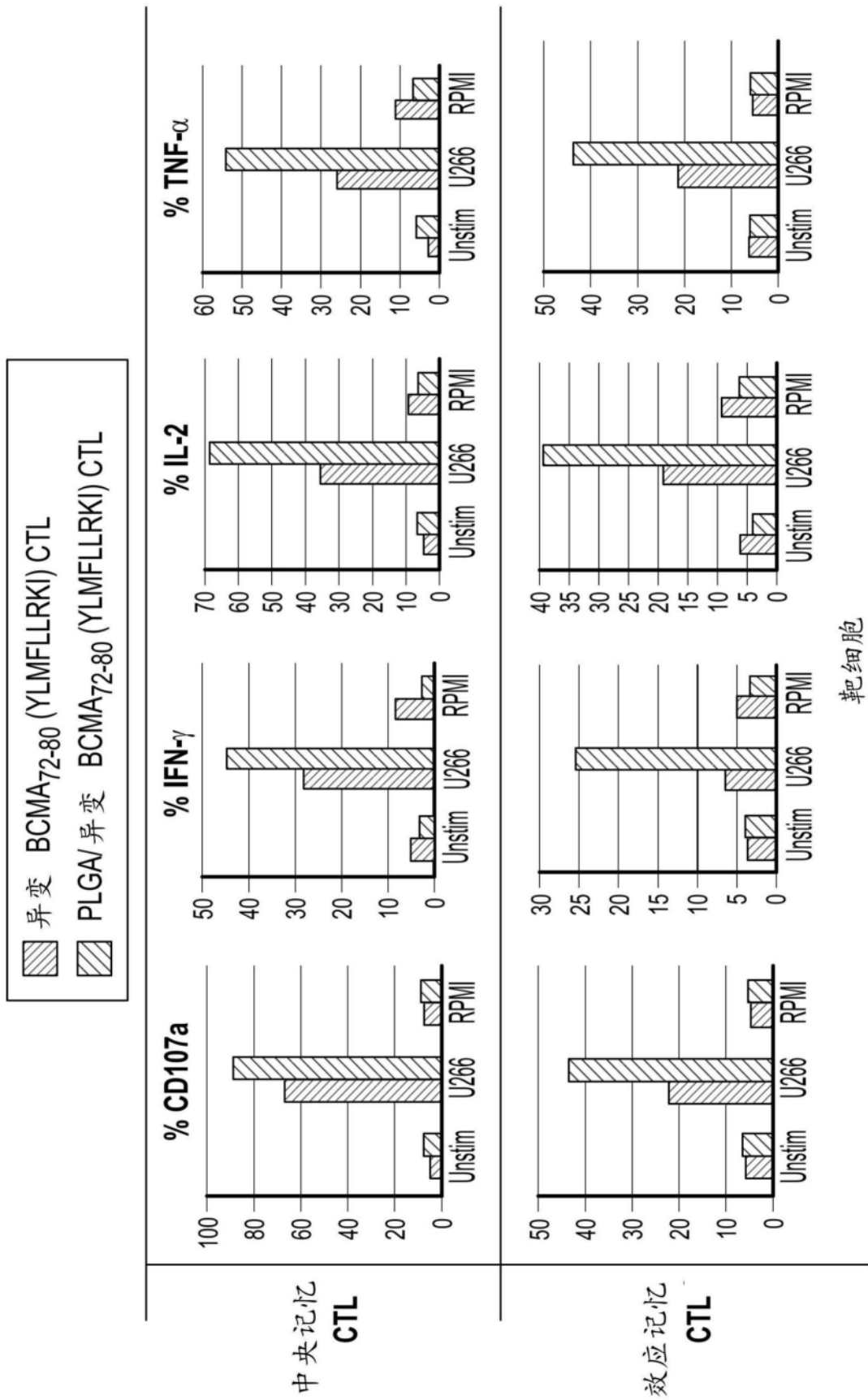


图38C