



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117479951 A

(43) 申请公布日 2024. 01. 30

(21) 申请号 202280037941.5

(22) 申请日 2022.03.26

(30) 优先权数据

63/166,697 2021.03.26 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.11.24

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2022/022074 2022.03.26

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/204583 EN 2022.09.29

(71) 申请人 转化基因组学研究所

地址 美国亚利桑那州

(72) 发明人 S·夏尔马 R·索尔迪

J·阿尔丁 J·特伦特

(74) 专利代理机构 北京戈程知识产权代理有限公司 11314

专利代理师 程伟 程云

(51) Int.Cl.

A61K 39/00 (2006.01)

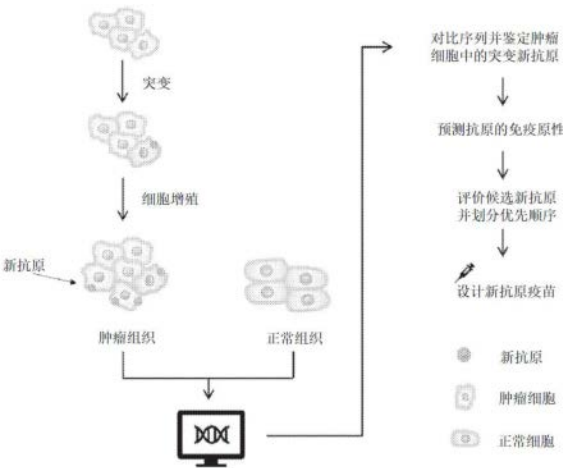
权利要求书6页 说明书32页
序列表8页 附图17页

(54) 发明名称

用于新抗原疫苗的方法和化合物

(57) 摘要

本公开包括用于治疗患有疾病(如癌症)的受试者的化合物和方法。治疗方法包括向患者施用治疗有效量的一种或多种对应于肿瘤新抗原的肽,或向患者施用治疗有效量的一种或多种寡核苷酸,每种寡核苷酸具有编码对应于肿瘤新抗原的肽的核酸序列。可以从患者肿瘤细胞中的患者特异性肿瘤突变中鉴定肿瘤新抗原。



1. 一种治疗患者的癌症的方法,所述方法包括:
从切除自患者的肿瘤获得肿瘤细胞;
对来自患者的肿瘤DNA和/或RNA以及正常DNA和/或RNA进行基因组分析,来检测肿瘤细胞中的多个患者特异性肿瘤突变;
鉴定由体细胞突变产生的新抗原,所述新抗原显示出与对应于患者基因型的人白细胞抗原(HLA)蛋白或其片段的特异性结合;
基于所述新抗原生成一种或多种肽;以及
向所述患者施用治疗有效量的所述一种或多种肽。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中检测多个患者特异性肿瘤突变包括基因组谱分析与靶标基因盘的下一代测序。
3. 根据权利要求2所述的方法,其中所述基因组谱分析包括全基因组谱分析、全外显子组谱分析和/或转录组谱分析。
4. 根据权利要求1至3中任一项所述的方法,其中所述基因组分析包括通过对来自患者的肿瘤和正常样品进行核酸测序来鉴定表达基因中的多个患者特异性肿瘤突变,并且所述突变存在于患者的癌细胞基因组中,但不存在于来自受试者的正常细胞中。
5. 根据权利要求1至4中任一项所述的方法,其中
所述多个患者特异性肿瘤突变包括点突变、剪接位点突变、移码突变、通读突变、基因融合突变、插入、缺失或其组合;并且
所述多个患者特异性肿瘤突变编码至少一种具有肿瘤特异性新表位的突变多肽,相较于野生型多肽,其以更高的亲和力结合至HLA蛋白或其片段。
6. 根据权利要求1至5中任一项所述的方法,其进一步包括鉴定患者的主要组织相容性复合体(MHC)1类和2类基因型。
7. 根据权利要求6所述的方法,其中鉴定患者的MHC 1类和2类基因型包括分析来自肿瘤和/或正常组织的全外显子组测序(WES)和/或RNA测序。
8. 根据权利要求1至7中任一项所述的方法,其中鉴定新抗原包括:
 - (i) 提供肽构建体文库,其中
所述文库的每种肽构建体包含肽部分和鉴定肽部分的鉴定核酸部分,并且
至少一种肽构建体的肽部分能够特异性结合HLA蛋白或其片段;
 - (ii) 使HLA蛋白或其片段与所述肽构建体文库接触;
 - (iii) 将包含能够特异性结合至HLA蛋白或其片段的肽部分的至少一种肽构建体与包含不能特异性结合至HLA蛋白或其片段的肽部分的肽构建体分离;以及
 - (iv) 对能够特异性结合至HLA蛋白或其片段的至少一种肽构建体的鉴定核酸部分的全部或部分进行测序。
9. 根据权利要求8所述的方法,其中所述肽构建体文库包含通过分析多个患者特异性肿瘤突变而设计的变体肽,所述分析预测每个突变对相应蛋白质的影响,并排除沉默突变和非编码区域中的突变。
10. 根据权利要求9所述的方法,其中所述变体肽包含预测影响相应蛋白质的结构的突变。
11. 根据权利要求1至7中任一项所述的方法,其中鉴定新抗原包括:

(i) 使用噬菌体展示、核糖体展示、mRNA展示、双顺反子DNA展示、P2ADNA展示、CIS展示、酵母展示、或细菌展示来生成遗传编码的多肽组合文库,其中所述组合文库包含连接至编码多肽的相应核酸分子的多肽;

(ii) 使所述组合文库与HLA蛋白或其片段接触;

(iii) 分离显示出与所述组合文库特异性结合的HLA蛋白或其片段;以及

(iv) 对结合至HLA蛋白或其片段的组合文库的核酸分子的全部或部分进行测序,以鉴定新抗原。

12. 根据权利要求11所述的方法,其中所述多肽组合文库包含通过分析多个患者特异性肿瘤突变而设计的变体肽,所述分析预测每个突变对相应蛋白质的影响,并排除沉默突变和非编码区域中的突变。

13. 根据权利要求12所述的方法,其中所述变体肽包含预测影响相应蛋白质的结构的突变。

14. 根据权利要求1至13中任一项所述的方法,其进一步包括向患者同时施用佐剂与所述治疗有效量的一种或多种肽。

15. 根据权利要求1至14中任一项所述的方法,其中将所述一种或多种肽施用于患者是静脉内、腹膜内、皮下、肌肉内或肿瘤内的。

16. 根据权利要求1至13中任一项所述的方法,其中新抗原与HLA蛋白或其片段之间的特异性结合由以下步骤确定:

(i) 培养用至少一种核酸分子转化的细胞,所述核酸分子包含编码以下的核苷酸序列:

MHC II类组分,其包含至少一部分MHC II类 α 链和至少一部分MHC II类 β 链,使得MHC II类 α 链和MHC II类 β 链形成肽结合槽;以及

空间占位物分子和第一可加工接头,其中所述空间占位物分子通过所述可加工接头连接至MHC II类组分,并且所述空间占位物分子在肽结合槽内结合,从而阻碍任何其他肽在肽结合槽内结合;进行培养步骤以产生MHC II类组分;

(ii) 回收MHC II类组分;

(iii) 处理可加工接头,从而从肽结合槽中释放空间占位物分子;

(iv) 在新抗原存在下孵育MHC II类组分,其中所述孵育促进新抗原结合至肽结合槽;

(v) 回收已结合新抗原的MHC II类组分。

17. 根据权利要求16所述的方法,其中所述空间占位物分子具有共有序列AAXAAAAAAXAA (SEQ ID NO:30)。

18. 根据权利要求17所述的方法,其中所述空间占位物分子选自PVSKMRMATPLLMQA (SEQ ID NO:25); AAMAAAAAAMAA (SEQ ID NO:26); AAMAAAAAAMAAA (SEQ ID NO:27); AAFAAAAAAAMAAA (SEQ ID NO:28); 和ASMSAASAASMAA (SEQ ID NO:29)。

19. 根据权利要求16至18中任一项所述的方法,其中所述可加工接头连接至MHC II类组分的MHC II类 α 链。

20. 根据权利要求17至19中任一项所述的方法,其中用结合的新抗原回收MHC II类组分包括用识别MHC II类组分的抗体进行亲和层析。

21. 根据权利要求1至13中任一项所述的方法,其中通过噬菌体展示来确定新抗原与HLA蛋白或其片段之间的特异性结合,在噬菌体表面表达HLA蛋白或其片段,并将新抗原与

噬菌体孵育,以测定特异性结合。

22. 根据权利要求1至21中任一项所述的方法,其进一步包括计算机分析以确定新抗原与MHC I类蛋白或其片段之间的特异性结合,其中所述计算机分析包括应用计算算法基于新抗原的肽序列来预测与MHC I蛋白的相对结合。

23. 一种治疗患有疾病的患者的方法,所述方法包括以下步骤:

从切除自患者的肿瘤获得肿瘤细胞;

对来自患者的肿瘤DNA和/或RNA以及正常DNA和/或RNA进行基因组分析,来检测肿瘤细胞中的多个患者特异性肿瘤突变;

鉴定由体细胞突变产生的新抗原,所述新抗原显示出与对应于患者基因型的人白细胞抗原(HLA)蛋白或其片段的特异性结合;

基于所述新抗原设计肽;

生成编码所述肽的核酸序列;以及

向患者施用治疗有效量的具有编码所述肽的核酸序列的寡核苷酸。

24. 根据权利要求23所述的方法,其中检测多个患者特异性肿瘤突变包括基因组谱分析与靶标基因盘的下一代测序。

25. 根据权利要求24所述的方法,其中所述基因组谱分析包括全基因组谱分析、全外显子组谱分析和/或转录组谱分析。

26. 根据权利要求23至25中任一项所述的方法,其中所述基因组分析包括通过对来自患者的肿瘤和正常样品进行核酸测序来鉴定表达基因中的多个患者特异性肿瘤突变,并且所述突变存在于患者的癌细胞基因组中,但不存在于来自受试者的正常细胞中。

27. 根据权利要求23至26中任一项所述的方法,其中

所述多个患者特异性肿瘤突变包括点突变、剪接位点突变、移码突变、通读突变、基因融合突变、插入、缺失或其组合;并且

所述多个患者特异性肿瘤突变编码至少一种具有肿瘤特异性新表位的突变多肽,相较于野生型多肽,其以更高的亲和力结合至HLA蛋白或其片段。

28. 根据权利要求23至27中任一项所述的方法,其进一步包括鉴定患者的主要组织相容性复合体(MHC) I类和2类基因型。

29. 根据权利要求28所述的方法,其中鉴定患者的MHC I类和2类基因型包括分析来自肿瘤和/或正常组织的全外显子组测序(WES)和/或RNA测序。

30. 根据权利要求23至29中任一项所述的方法,其中鉴定新抗原包括:

(i) 提供肽构建体文库,其中

所述文库的每种肽构建体包含肽部分和鉴定肽部分的鉴定核酸部分,并且

至少一种肽构建体的肽部分能够特异性结合HLA蛋白或其片段;

(ii) 使HLA蛋白或其片段与所述肽构建体文库接触;

(iii) 将包含能够特异性结合至HLA蛋白或其片段的肽部分的至少一种肽构建体与包含不能特异性结合至HLA蛋白或其片段的肽部分的肽构建体分离;以及

(iv) 对能够特异性结合至HLA蛋白或其片段的至少一种肽构建体的鉴定核酸部分的全部或部分进行测序。

31. 根据权利要求30所述的方法,其中所述肽构建体文库包含通过分析多个患者特异

性肿瘤突变而设计的变体肽,所述分析预测每个突变对相应蛋白质的影响,并排除沉默突变和非编码区域中的突变。

32. 根据权利要求31所述的方法,其中所述变体肽包含预测影响相应蛋白质的结构的突变。

33. 一种治疗患者的癌症的方法,所述方法包括:

从切除自患者的肿瘤获得肿瘤细胞;

对来自患者的肿瘤DNA和/或RNA以及正常DNA和/或RNA进行基因组分析,来检测肿瘤细胞中的多个患者特异性肿瘤突变;

鉴定由体细胞突变产生的新抗原,所述新抗原显示出与对应于患者基因型的人白细胞抗原 (HLA) 蛋白或其片段的特异性结合;

生成信使核糖核酸 (mRNA) 多核苷酸,其包含编码一种或多种基于新抗原的肽的开放阅读框;以及

向患者施用治疗有效量的mRNA多核苷酸。

34. 根据权利要求33所述的方法,其中所述mRNA多核苷酸包含至少一个化学修饰。

35. 根据权利要求34所述的方法,其中所述化学修饰选自假尿苷、N1-甲基假尿苷、N1-乙基假尿苷、2-硫尿苷、4'-硫尿苷、5-甲基胞嘧啶、5-甲基尿苷、2-硫代-1-甲基-1-脱氮-假尿苷、2-硫代-1-甲基-假尿苷、2-硫代-5-氮杂-尿苷、2-硫代-二氢假尿苷、2-硫代-二氢尿苷、2-硫代-假尿苷、4-甲氧基-2-硫代-假尿苷、4-甲氧基-假尿苷、4-硫代-1-甲基-假尿苷、4-硫代-假尿苷、5-氮杂-尿苷、二氢假尿苷、5-甲氧基尿苷和2'-O-甲基尿苷。

36. 根据权利要求35所述的方法,其中所述化学修饰在尿嘧啶的碳5位。

37. 根据权利要求35所述的方法,其中所述化学修饰是N1-甲基假尿苷或N1-乙基假尿苷。

38. 根据权利要求33至37中任一项所述的方法,其中所述开放阅读框中至少80%的尿嘧啶具有化学修饰。

39. 根据权利要求33至38中任一项所述的方法,其中所述mRNA多核苷酸进一步编码5'末端帽。

40. 根据权利要求39所述的方法,其中所述5'末端帽是7mG(5')ppp(5')N1mpNp。

41. 根据权利要求33至40中任一项所述的方法,其中检测多个患者特异性肿瘤突变包括基因组谱分析与靶标基因盘的下一代测序。

42. 根据权利要求41所述的方法,其中所述基因组谱分析包括全基因组谱分析、全外显子组谱分析和/或转录组谱分析。

43. 根据权利要求33至42中任一项所述的方法,其中所述基因组分析包括通过对来自患者的肿瘤和正常样品进行核酸测序来鉴定表达基因中的多个患者特异性肿瘤突变,并且所述突变存在于患者的癌细胞基因组中,但不存在于来自受试者的正常细胞中。

44. 根据权利要求33至43中任一项所述的方法,其中

所述多个患者特异性肿瘤突变包括点突变、剪接位点突变、移码突变、通读突变、基因融合突变、插入、缺失或其组合;并且

所述多个患者特异性肿瘤突变编码至少一种具有肿瘤特异性新表位的突变多肽,相较于野生型多肽,其以更高的亲和力结合至HLA蛋白或其片段。

45. 根据权利要求33至44中任一项所述的方法,其进一步包括鉴定患者的主要组织相容性复合体(MHC)1类和2类基因型。

46. 根据权利要求45所述的方法,其中鉴定患者的MHC 1类和2类基因型包括分析来自肿瘤和/或正常组织的全外显子组测序(WES)和/或RNA测序。

47. 根据权利要求33至46中任一项所述的方法,其中鉴定新抗原包括:

(i) 提供肽构建体文库,其中

所述文库的每种肽构建体包含肽部分和鉴定肽部分的鉴定核酸部分,并且

至少一种肽构建体的肽部分能够特异性结合HLA蛋白或其片段;

(ii) 使HLA蛋白或其片段与所述肽构建体文库接触;

(iii) 将包含能够特异性结合至HLA蛋白或其片段的肽部分的至少一种肽构建体与包含不能特异性结合至HLA蛋白或其片段的肽部分的肽构建体分离;以及

(iv) 对能够特异性结合至HLA蛋白或其片段的至少一种肽构建体的鉴定核酸部分的全部或部分进行测序。

48. 根据权利要求47所述的方法,其中所述肽构建体文库包含通过分析多个患者特异性肿瘤突变而设计的变体肽,所述分析预测每个突变对相应蛋白质的影响,并排除沉默突变和非编码区域中的突变。

49. 根据权利要求48所述的方法,其中所述变体肽包含预测影响相应蛋白质的结构的突变。

50. 根据权利要求33至46中任一项所述的方法,其中鉴定新抗原包括:

(i) 使用噬菌体展示、核糖体展示、mRNA展示、双顺反子DNA展示、P2ADNA展示、CIS展示、酵母展示、或细菌展示来生成遗传编码的多肽组合文库,其中所述组合文库包含连接至编码多肽的相应核酸分子的多肽;

(ii) 使所述组合文库与HLA蛋白或其片段接触;

(iii) 分离显示出与所述组合文库特异性结合的HLA蛋白或其片段;以及

(iv) 对结合至HLA蛋白或其片段的组合文库的核酸分子的全部或部分进行测序,以鉴定新抗原。

51. 根据权利要求50所述的方法,其中所述多肽组合文库包含通过分析多个患者特异性肿瘤突变而设计的变体肽,所述分析预测每个突变对相应蛋白质的影响,并排除沉默突变和非编码区域中的突变。

52. 根据权利要求51所述的方法,其中所述变体肽包含预测影响相应蛋白质的结构的突变。

53. 根据权利要求33至52中任一项所述的方法,其中将所述mRNA多核苷酸施用于患者是静脉内、腹膜内、皮下、肌肉内或肿瘤内的。

54. 根据权利要求1至53中任一项所述的方法,其进一步包括施用有效量的肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)的治疗群体。

55. 根据权利要求54所述的方法,其中所述TIL的治疗群体与肽或mRNA多核苷酸同时或顺序施用。

56. 根据权利要求54或55所述的方法,其中所述TIL的治疗群体已被通过肽呈递或由mRNA多核苷酸编码的至少一种新抗原激活和/或训练。

57. 根据权利要求54至56中任一项所述的方法, 其中将肽或mRNA多核苷酸与TIL的治疗群体一起施用会增强患者中的免疫原性应答和/或抗肿瘤活性。

用于新抗原疫苗的方法和化合物

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2021年3月26日提交的美国临时专利申请第63/166,697号的权益,该申请的内容通过引用整体并入本文。

[0003] 以电子方式提交的序列表的引用

[0004] 序列表的正式副本经由EFS-Web作为ASCII格式的序列表以电子方式提交,文件名为“91482-255W0-PCT_Sequence_Listing.txt”,创建于2022年3月25日,大小为7379字节,与说明书同时提交。该ASCII格式文档中含有的序列表是说明书的一部分,并通过引用整体并入本文。

技术领域

[0005] 本发明涉及新型蛋白质及其制备方法,以及作为治疗剂或预防剂的用途,例如用于治疗癌症。

背景技术

[0006] 癌症是涉及异常细胞生长的一组疾病,有可能扩散至身体的各个部位。数百种癌症影响着人,并且数百万人已被诊断,而每年还有数百万人被诊断。最常见的癌症类型中包括肺癌、乳腺癌、前列腺癌、结直肠癌等。癌症的治疗包括手术、放射疗法、化学疗法、免疫疗法、激素疗法和干细胞替代。治疗选项可以是侵入性的,并具有各种不良副作用。

[0007] 因此,虽然科学界在该领域取得了进展,但本领域仍然需要改进的化合物和方法来预防和治疗癌症。

发明内容

[0008] 需要一种治疗疾病(包括癌症)的治疗策略。为了积极推动抗肿瘤免疫应答,已经开发了治疗性癌症疫苗。与预防性用于治疗传染病的预防性疫苗不同,治疗性疫苗被设计为通过刺激针对特定肿瘤相关抗原的免疫应答来治疗已确定的癌症。主动免疫疗法的优点在于,它们具有通过参与先天免疫应答和适应性免疫应答两者来提供持久的抗癌活性的潜力。新抗原是由主要组织相容性复合体(MHC)呈递的肽,其具有由体细胞突变形成的新序列,代表了一类尤其有前景的免疫治疗靶点,因为它们只出现在肿瘤上,因此引起最小的脱靶效应。

[0009] 本发明提供一种用于治疗患者的癌症的方法。治疗方法可以包括向患者施用治疗有效量的一种或多种对应于肿瘤新抗原的肽,或向患者施用治疗有效量的一种或多种寡核苷酸,每种寡核苷酸具有编码对应于肿瘤新抗原的肽的核酸序列。可以从患者肿瘤细胞中的患者特异性肿瘤突变中鉴定新抗原。

[0010] 根据各种实施方案,所述方法可以包括:(a)从切除自患者的肿瘤获得肿瘤细胞;(b)对来自患者的肿瘤DNA和/或RNA以及正常DNA和/或RNA进行基因组分析,来检测肿瘤细胞中的多个患者特异性肿瘤突变;(c)鉴定由体细胞突变产生的新抗原,所述新抗原显示出

与对应于患者基因型的人白细胞抗原 (HLA) 蛋白或其片段的特异性结合; 以及 (d) 向患者施用治疗有效量的对应于肿瘤新抗原的肽 (“新抗原肽”)。可以向患者同时施用佐剂与新抗原肽。

[0011] 根据其他实施方案, 所述方法可以包括: (a) 从切除自患者的肿瘤获得肿瘤细胞; (b) 对来自患者的肿瘤DNA和/或RNA以及正常DNA和/或RNA进行基因组分析, 来检测肿瘤细胞中的多个患者特异性肿瘤突变; (c) 鉴定由体细胞突变产生的新抗原, 所述新抗原显示出与对应于患者基因型的人白细胞抗原 (HLA) 蛋白或其片段的特异性结合; (d) 基于新抗原设计肽; (e) 生成编码所述肽的核酸序列; 以及 (f) 向患者施用治疗有效量的具有编码所述肽的核酸序列的寡核苷酸。

[0012] 在某些方面, 检测多个患者特异性肿瘤突变可以包括基因组谱分析 (profiling) 与靶标基因盘 (panel) 的下一代测序。在一方面, 基因组谱分析包括全基因组谱分析、全外显子组谱分析和/或转录组谱分析。

[0013] 在其他方面, 基因组分析可以包括通过对来自患者的肿瘤和正常样品进行核酸测序来鉴定表达基因中的多个患者特异性肿瘤突变, 并且所述突变存在于患者的癌细胞基因组中, 但不存在于来自受试者的正常细胞中。

[0014] 在另外的其他方面, 多个患者特异性肿瘤突变可以包括点突变、剪接位点突变、移码突变、通读突变、基因融合突变、插入、缺失或其组合; 并且多个患者特异性肿瘤突变编码至少一种具有肿瘤特异性新表位的突变多肽, 相较于野生型多肽, 其以更高的亲和力结合至HLA蛋白或其片段。

[0015] 在一些方面, 所述方法可以进一步包括鉴定患者的MHC 1类和2类基因型。在一方面, 鉴定患者的MHC 1类和2类基因型包括分析来自肿瘤和/或正常组织的全外显子组测序 (WES) 和/或RNA测序。

[0016] 在某些方面, 鉴定新抗原可以包括: (i) 提供肽构建体文库, 其中文库的每种肽构建体包含肽部分和鉴定肽部分的鉴定核酸部分, 并且至少一种肽构建体的肽部分能够特异性结合HLA蛋白或其片段; (ii) 使HLA蛋白或其片段与肽构建体文库接触; (iii) 将包含能够特异性结合至HLA蛋白或其片段的肽部分的至少一种肽构建体与包含不能特异性结合至HLA蛋白或其片段的肽部分的肽构建体分离; (iv) 对能够特异性结合至HLA蛋白或其片段的至少一种肽构建体的鉴定核酸部分的全部或部分进行测序。

[0017] 在一些方面, 肽构建体文库可以包含通过分析多个患者特异性肿瘤突变而设计的变体肽, 所述分析预测每个突变对相应蛋白质的影响, 并排除沉默突变和非编码区域中的突变。在一方面, 变体肽包含预测影响相应蛋白质的结构的突变。

[0018] 在其他方面, 鉴定新抗原可以包括 (i) 使用噬菌体展示、核糖体展示、mRNA展示、双顺反子DNA展示、P2A DNA展示、CIS展示、酵母展示、或细菌展示来生成遗传编码的多肽组合文库, 其中所述组合文库包含连接至编码多肽的相应核酸分子的多肽; (ii) 使组合文库与HLA蛋白或其片段接触; (iii) 分离显示出与组合文库特异性结合的HLA蛋白或其片段; 以及 (iv) 对结合至HLA蛋白或其片段的组合文库的核酸分子的全部或部分进行测序, 以鉴定新抗原。

[0019] 在一方面, 多肽组合文库可以包含通过分析多个患者特异性肿瘤突变而设计的变体肽, 所述分析预测每个突变对相应蛋白质的影响, 并排除沉默突变和非编码区域中的突

变。

[0020] 在某些方面,新抗原与HLA蛋白或其片段之间的特异性结合可以由以下步骤确定:(i)培养用至少一种核酸分子转化的细胞,所述核酸分子包含编码以下的核苷酸序列:MHC II类组分,其包含至少一部分MHC II类 α 链和至少一部分MHC II类 β 链,使得MHC II类 α 链和MHC II类 β 链形成肽结合槽;以及空间占位物(spaceholder)分子和第一可加工接头,其中所述空间占位物分子通过所述可加工接头连接至MHC II类组分,并且所述空间占位物分子在肽结合槽内结合,从而阻碍任何其他肽在肽结合槽内结合;进行培养步骤以产生MHC II类组分;(ii)回收MHC II类组分;(iii)处理可加工接头,从而从肽结合槽中释放空间占位物分子;(iv)在新抗原存在下孵育MHC II类组分,其中所述孵育促进新抗原结合至肽结合槽;(v)回收已结合新抗原的MHC II类组分。

[0021] 在一方面,空间占位物分子可以具有共有序列AAXAAAAAAXAA (SEQ ID NO:30)。在另一方面,空间占位物分子选自PVSKMRMATPLMQA (SEQ ID NO:25);AAMAAAAAAMAA (SEQ ID NO:26);AAMAAAAAAMAA (SEQ ID NO:27);AAFAAAAAAAMAA (SEQ ID NO:28);和ASMSAASAASMAA (SEQ ID NO:29)。

[0022] 在一些方面,可加工接头连接至MHC II类组分的MHC II类 α 链。在其他方面,用结合的新抗原回收MHC II类组分包括用识别MHC II类组分的抗体进行亲和层析。

[0023] 在某些方面,通过噬菌体展示来确定新抗原与HLA蛋白或其片段之间的特异性结合,在噬菌体表面表达HLA蛋白或其片段,并将新抗原与噬菌体孵育,以测定特异性结合。

[0024] 在一方面,所述方法进一步包括计算机分析以确定新抗原与MHC I类蛋白或其片段之间的特异性结合,其中所述计算机分析包括应用计算算法基于新抗原的肽序列来预测与MHC I蛋白的相对结合。

[0025] 在其他方面,本发明涉及一种治疗患者的癌症的方法,所述方法包括:从切除自患者的肿瘤获得肿瘤细胞;对来自患者的肿瘤DNA和/或RNA以及正常DNA和/或RNA进行基因组分析,来检测肿瘤细胞中的多个患者特异性肿瘤突变;鉴定由体细胞突变产生的新抗原,所述新抗原显示出与对应于患者基因型的人白细胞抗原(HLA)蛋白或其片段的特异性结合;生成信使核糖核酸(mRNA)多核苷酸,其包含编码一种或多种基于新抗原的肽的开放阅读框;以及向患者施用治疗有效量的mRNA多核苷酸。

[0026] 在一些方面,mRNA多核苷酸包含至少一个化学修饰。在一方面,化学修饰选自假尿苷、N1-甲基假尿苷、N1-乙基假尿苷、2-硫尿苷、4'-硫尿苷、5-甲基胞嘧啶、5-甲基尿苷、2-硫代-1-甲基-1-脱氮-假尿苷、2-硫代-1-甲基-假尿苷、2-硫代-5-氮杂-尿苷、2-硫代-二氢假尿苷、2-硫代-二氢尿苷、2-硫代-假尿苷、4-甲氧基-2-硫代-假尿苷、4-甲氧基-假尿苷、4-硫代-1-甲基-假尿苷、4-硫代-假尿苷、5-氮杂-尿苷、二氢假尿苷、5-甲氧基尿苷和2'-O-甲基尿苷。在另一方面,化学修饰在尿嘧啶的碳5位。在另一方面,化学修饰是N1-甲基假尿苷或N1-乙基假尿苷。

[0027] 在某些方面,开放阅读框中至少80%的尿嘧啶具有化学修饰。在其他方面,mRNA多核苷酸进一步编码5'末端帽。在一方面,5'末端帽是7mG(5')ppp(5')N1mpNp。

[0028] 在其他方面,所公开的方法进一步包括施用有效量的肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)的治疗群体。在某些方面,TIL的治疗群体与肽或mRNA多核苷酸同时或顺序施用。TIL的治疗群体已被通过肽呈递或由mRNA多核苷酸编码的至少一种新抗原激活和/或训练。

[0029] 在一些方面,将肽或mRNA多核苷酸与TIL的治疗群体一起施用会增强患者中的免疫原性应答和/或抗肿瘤活性。在一方面,患者中的免疫原性应答和/或抗肿瘤活性的增加是协同性的。

[0030] 除非另有明确说明,否则以上特征和元件可以无排他性地以各种组合方式组合。根据以下描述,这些特征和元件及其操作将变得更加明白易懂。然而,应理解的是,以下描述旨在具有示例性和非限制性。

附图说明

[0031] 本公开的主题在说明书的结论部分特别指出并明确要求。然而,当结合附图考虑时,最佳地通过参考具体实施方式和权利要求来获得对本公开的更完整的理解,附图中相似的数字可以表示相似的元件。

[0032] 图1说明了一种使用基因组工具产生个性化新抗原疫苗的方法;

[0033] 图2说明了一种用于开发基于新抗原肽的疫苗的方法以及一种使用所述基于新抗原肽的疫苗来治疗患者的方法的概述;

[0034] 图3说明了有效合成并分析DNA条形码肽的大型文库的分步工作流程;所描绘的肽-DNA文库显示了嘌呤霉素(“Puro”)连接物(adaptor),其促进DNA连接至编码的肽;

[0035] 图4说明了分析肿瘤外显子组以鉴定候选新抗原,使用MHC-肽-DNA缀合物测定来表征候选新抗原,以及评估T细胞对MHC-肽-DNA缀合物测定中结合至HLA蛋白的新抗原的应答;

[0036] 图5说明了DNA缀合物测定文库设计,其用于分析由肿瘤外显子组分析而鉴定的突变。

[0037] 图6说明了用于鉴定与MHC II类分子结合的新抗原的MHC-肽-DNA缀合物测定的实施方案;在对照组(“未切割”)中,CLIP肽未从HLA构建体中去除,候选新抗原非特异性结合,而在测试组(“切割”)中,去除CLIP肽打开了HLA构建体的识别位点,以允许候选新抗原特异性结合;

[0038] 图7说明了来自2个人患者(即TG0006和TG00013)的富集肽(即新抗原)的鉴定;用外显子组分析在每个患者中鉴定的突变数量在每个患者ID下显示;结合测定中使用的HLA复合物的人白细胞抗原血清型在每个图的左上角标识。富集肽显示为较大的数据点;

[0039] 图8A和图8B说明了从人患者TG00013鉴定富集肽(即新抗原)的额外数据集;富集肽在每个图的上半部分显示为数据点,对应于切割的HLA复合物的对数平均百分比读数更接近0(即更接近于与切割的HLA复合物100%结合)的那些肽;

[0040] 图9说明了富集肽的氨基酸序列,每种肽的相应突变,以及对于人患者TG00013,所述肽特异性结合的HLA复合物的人白细胞抗原血清型;并且

[0041] 图10说明了MHC-肽-DNA缀合物测定与计算机预测以鉴定新抗原的比较;用于计算机分析的IEDB共有序列获自免疫表位数据库和分析资源(IEDB),IEDB是由国家过敏和传染病研究所(NIAID)维护的公共资源。

[0042] 图11说明了数个人患者的信息,通过收集肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)并生成肽以激活并训练这些TIL以增强对新抗原的识别和抗肿瘤活性来评估所述人患者。

[0043] 图12说明了用所公开的方法制造肽疫苗的非限制性示例。

[0044] 图13说明了来自肿瘤患者的外周血单个核细胞(PBMC)对肿瘤细胞类器官的浸润。PBMC单独施用或与DMSO(阴性对照)施用,与IL-2组合施用,或与IL-2和鉴定为新抗原的肽组合施用。在对类器官进行各种处理后24小时拍摄图像。如条形图所示,仅24小时后,PBMC与IL-2和肽组合就显示出对类器官的显著浸润。

[0045] 图14说明了一项测试所公开的肽疫苗的安全性和疗效的研究。ORR:客观应答率;DOR:任何观察到的应答的持续时间;PFS:无进展生存期;OS:总生存期。

具体实施方式

[0046] 将理解的是,除非另有特别说明,否则提及“一个”、“一种”和/或“所述”可以包括一个/一种或多于一个/一种,并且提及单数的项目也可以包括复数的项目。通过不定冠词“一个”、“一种”和/或“所述”提及元件并不排除存在多于一个/一种元件的可能性,除非上下文明确要求存在且仅存在一个/一种元件。如本文所用,术语“包含”及其词形变化或任何其他变体在其非限制性意义上使用,以表示包括该词后面的项目,但不排除未特别提及的项目。

[0047] “新表位”在本领域中被理解为指在暴露于或发生特定事件(例如特定疾病、疾患或病症的发生或进展,例如感染、癌症、癌症分期等)后,在受试者中出现或发生的表位。如本文所用,新表位是其存在和/或水平与暴露于或发生事件相关的表位。在一些实施方案中,新表位是触发针对表达该表位(例如在相关水平上)的细胞的免疫应答的表位。在一些实施方案中,新表位是触发杀死或以其他方式破坏表达该表位(例如在相关水平上)的细胞的免疫应答的抗原。在一些实施方案中,触发新表位的相关事件是或包括细胞中的体细胞突变。在一些实施方案中,新表位是非癌细胞中不以触发和/或支持支持免疫应答(例如足以靶向表达所述新表位的癌细胞的免疫应答)的水平和/或方式表达。在一些实施方案中,新表位是新抗原。

[0048] 术语“肽”、“多肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用,以指任何长度的氨基酸聚合形式,化学或生化修饰或衍生化的氨基酸,以及具有修饰肽骨架的多肽。

[0049] 如本文所用的术语“肽构建体”是指附接至鉴定寡核苷酸上的任意长度的肽。附接可以通过中间接头,并且附接可以是共价的或非共价的。鉴定寡核苷酸可以是被翻译以形成构建体的肽部分的信息,或者它可以是任何其他已知且可以用于通过测序来鉴定附接的肽的序列。“肽构建体集”是指由定制设计的寡核苷酸集生成的肽构建体池。所述集可以含有每个肽构建体物种的少至一个拷贝,但通常含有每种肽构建体的许多拷贝。

[0050] 术语“氨基酸”是指天然存在的和合成的氨基酸,以及以类似于天然存在的氨基酸的方式发挥作用的氨基酸类似物和氨基酸模拟物。天然存在的氨基酸是由遗传密码编码的氨基酸,以及后来被修饰的那些氨基酸。非天然氨基酸不是由遗传密码编码的,并且可以但不必须具有与天然存在的氨基酸相同的基本结构。“氨基酸类似物”是指与天然存在的氨基酸具有相同的基本化学结构(即与氢、羧基、氨基和R基团结合的碳)的化合物,例如高丝氨酸、正亮氨酸、甲硫氨酸亚砷、甲硫氨酸甲基砷。此类类似物可以具有修饰的R基团(例如正亮氨酸)或修饰的肽骨架,但保留与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构。“氨基酸模拟物”是指具有与氨基酸的一般化学结构不同的结构,但以类似于天然存在的氨基酸的方式发挥功能的化合物。

[0051] 氨基酸可以通过三字母符号或IUPAC推荐的一字母符号来提及, IUAPC字母代码如下: G=甘氨酸; A=丙氨酸; L=亮氨酸; M=甲硫氨酸; F=苯丙氨酸; W=色氨酸; K=赖氨酸; Q=谷氨酰胺; E=谷氨酸; S=丝氨酸; P=脯氨酸; V=缬氨酸; I=异亮氨酸; C=半胱氨酸; Y=酪氨酸; H=组氨酸; R=精氨酸; N=天冬酰胺; D=天冬氨酸; T=苏氨酸。

[0052] 术语“同源”和“相似”是指具有“共同进化起源”的蛋白质之间的关系, 所述蛋白质包括来自超家族(例如免疫球蛋白超家族)的蛋白质和来自不同物种的同源蛋白质。此类蛋白质(及其编码基因)具有序列同源性, 如其序列相似性所反映的, 无论是在相似性百分比方面还是在特定残基或基序作为保守位置的存在方面。在具体的实施方案中, 当至少约80%、或至少约90%、或至少约95%的氨基酸在氨基酸序列的定义长度上匹配时, 两个肽序列是“基本上同源的或相似的”。

[0053] 术语“变体”适用于氨基酸序列和核酸序列两者。由于遗传密码的简并性, 大量功能相同的核酸编码任何给定的蛋白质。例如, 密码子GCA、GCC、GCG和GCU均编码氨基酸丙氨酸。变体可以包括对核酸、肽、多肽或蛋白质序列的单独替换、缺失或添加, 其改变、添加或缺失所编码序列中的单个氨基酸或很小百分比的氨基酸。

[0054] “功能保守变体”是其中蛋白质或酶中的给定氨基酸残基已被改变但不改变多肽的整体构象和功能的变体, 包括但不限于将氨基酸替换为具有相似特性(例如极性、氢键电位、酸性、碱性、疏水性、芳香族等)的氨基酸。具有相似特性的氨基酸是本领域公知的。例如, 精氨酸、组氨酸和赖氨酸是亲水性碱性氨基酸, 并且可以互换。类似地, 疏水性氨基酸异亮氨酸可以被替换为亮氨酸、甲硫氨酸或缬氨酸。预期此类变化对蛋白质或多肽的表观分子量或等电点影响很小或没有影响。

[0055] 除了那些被表明为保守的氨基酸之外的氨基酸在蛋白质中可以不同, 因此任何两种功能相似的蛋白质之间的蛋白质或氨基酸序列相似性百分比可以变化, 并且例如可以是70%至99%, 如根据比对方案所确定的那样。“变体”还包括这样的多肽, 其具有至少60%氨基酸同一性, 如通过BLAST或FASTA算法所确定的那样, 优选至少75%, 最优选至少85%, 并且甚至更优选至少90%, 更优选至少95%, 并且具有与其比较的天然或亲本蛋白质相同或基本上相似的特性或功能。特定变体是“功能获得性”变体, 是指其中蛋白质或酶中至少一个给定氨基酸残基的变化改善了多肽的特定功能(包括但不限于蛋白质活性)的多肽变体。氨基酸残基的变化可以是将氨基酸替换为具有相似特性的氨基酸。

[0056] 如本文所用, 术语“结合”是指两个分子之间的吸引力相互作用, 其导致稳定的缔合, 其中分子彼此非常接近。分子结合可以分为以下种类: 非共价、可逆共价和不可逆共价。可以参与分子结合的分子包括蛋白质、核酸、碳水化合物、脂质、和有机小分子如药物化合物。例如, 与其他分子形成稳定复合物的蛋白质通常称为受体, 而它们的结合配偶体称为配体。核酸也可以与其自身或其他物质形成稳定复合物, 例如DNA-蛋白质复合物、DNA-DNA复合物、DNA-RNA复合物、蛋白质-蛋白质复合物。

[0057] 如本文所用, 术语“特异性结合”是指结合物(例如蛋白质或抗体)的特异性, 使得它优选结合至靶标(如多肽抗原、受体或抗体)。当提及结合配偶体(例如蛋白质、核酸、抗体或其他亲和捕获剂等)时, “特异性结合”可以包括两种或更多种具有高亲和力和/或互补性的结合配偶体的结合反应, 以确保在指定的测定条件下选择性杂交。通常, 特异性结合将至少是背景信号标准偏差的三倍。因此, 在指定的条件下, 结合配偶体结合至其特定的靶标分

子,并且不大量结合至样品中存在的其他分子。在其他潜在干扰物质的存在下通过结合物或抗体识别特定靶标是这种结合的特征之一。优选地,对靶标具有特异性或特异性结合靶标的结合物、抗体或抗体片段、肽或融合肽结合至靶标的亲和力高于结合至其他非靶标物质的亲和力。还优选地,对靶标具有特异性或特异性结合至靶标的结合物、抗体或抗体片段、肽或融合肽避免结合至显著百分比的非靶标物质(例如存在于测试样品中的非靶标物质)。可以容易地使用本领域中可用的许多方法中的任何一种来确定抗体与包含同源表位的靶抗原、抗原片段、肽或融合肽的结合亲和力,所述方法包括但不限于酶联免疫吸附测定(ELISA)。在一些实施方案中,本公开的结合物、抗体或抗体片段、肽或融合肽避免结合大于约90%的非靶标物质,尽管明确考虑和优选更高的百分比。例如,本公开的结合物、抗体或抗体片段或肽避免结合约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%和约99%或更多的非靶标物质。在其他实施方案中,本公开的结合物、抗体或抗体片段或肽避免结合大于约10%、20%、30%、40%、50%、60%、或70%、或大于约75%、或大于约80%、或大于约85%的非靶标物质。

[0058] 术语“靶标”、“靶标分子”和“靶标试剂”在本文中可互换使用,是指与文库孵育以鉴定显示出与靶标特异性结合的肽的蛋白质、毒素、酶、病原体、细胞或生物标记物。靶标或标记物可以是细胞产生的、在细胞内表达的、在细胞表面可接近的或由细胞分泌的任何分子结构。标记物可以是任何蛋白质、碳水化合物、脂肪、核酸、催化位点,或这些的任何靶标,如酶、糖蛋白、细胞膜、病毒、细胞、器官、细胞器,或任何单分子或多分子结构,或现在已知或尚待公开的任何其他此类结构,无论是单独还是组合。靶标也可以称为标记物,并且这些术语可互换使用。靶标可以由氨基酸的序列表示,或由其可以源自的核酸的一条或多条链的序列来表示。例如,靶标可以由蛋白质序列表示。可选地,靶标可以由核酸序列表示,蛋白质或肽或其片段由所述核酸序列编码。

[0059] 此类核酸的示例包括单链和双链核酸序列,包括miRNA、tRNA、siRNA、mRNA、cDNA或基因组DNA序列,包括互补序列。标记物的概念并不局限于可以表示标记物的确切核酸序列或蛋白质序列的产物。相反,标记物涵盖可以通过评估标记物表达的方法检测到的所有分子。标记物涵盖的分子的示例包括点突变、沉默突变、缺失、移码突变、易位、选择性剪接衍生物、差异甲基化序列、差异修饰蛋白质序列、截断、细胞膜相关标记物的可溶性形式,以及导致产物可以被鉴定为标记物的任何其他变异。术语“靶标”进一步涵盖基因或其基因等位基因的产物(即蛋白质),所述基因或其基因等位基因的表达或活性直接地或间接地与特定的表型或细胞状况或生理特征相关。

[0060] 本文所用的术语“捕获剂”和“捕获基因”是指允许通过与靶标分子上的亲和基团或结构域、或者肽构建体的亲和标签结合或键合来捕获靶标分子或肽构建体的任何部分。捕获剂与其亲和标签之间的结合可以是共价键和/或非共价键。捕获剂包括,例如,选择性结合至融合肽上的亲和标签的结合对的成员、通过重组技术或其他机制添加的化学键、酶的辅助因子等。可以使用常规技术使捕获剂与肽构建体结合,所述技术包括杂交、交联(例如使用呋喃香豆素如补骨脂素的共价固定化)、连接、通过化学反应性基团附接、通过翻译后修饰引入等。

[0061] “序列测定”、“测序”等包括确定与核酸的核苷酸碱基序列相关的信息。此类信息可能包括核酸的部分序列信息以及全序列信息的鉴定或确定。可以以不同程度的统计可靠

性或置信度来确定序列信息。在一方面,该术语包括确定核酸中多个连续核苷酸的身份和排序。“高通量测序”或“下一代测序”包括使用以固有并行方式确定许多(通常为数千至数十亿个)核酸序列的方法来确定序列,即其中不是一次制备一个用于测序的DNA模板,而是在批量过程中制备,并且其中优选并行地读取许多序列,或者可选地使用本身可以并行化的超高通量串行过程。此类方法包括但不限于焦磷酸测序(例如由454Life Sciences, Inc., Branford, CT商品化的);连接法测序(例如在SOLiD™技术中商品化的,Life Technologies, Inc., Carlsbad, CA);使用修饰核苷酸的合成法测序(如在TruSeq™和HiSeq™技术中商品化的,Illumina, Inc., San Diego, CA;HeliScope™技术,Helicos Biosciences Corporation, Cambridge, MA;和PacBio RS, Pacific Biosciences of California, Inc., Menlo Park, CA)、离子检测技术测序(如Ion Torrent™技术,Life Technologies, Carlsbad, CA);DNA纳米球测序(Complete Genomics, Inc., Mountain View, CA);基于纳米孔的测序技术(例如由Oxford Nanopore Technologies, LTD, Oxford, UK开发的),以及类似的高度并行化测序方法。

[0062] 术语“外显子组”根据其在领域中理解的含义使用,是指特定基因组中具有的外显子序列的集。

[0063] 如本文所用,术语“突变”是指构成基因的DNA序列的永久性变化。在一些实施方案中,突变的大小范围从单个DNA构建单元(DNA碱基)到大型染色体片段不等。在一些实施方案中,突变可以包括错义突变、移码突变、重复、插入、无义突变、缺失和重复扩增。在一些实施方案中,错义突变是一个DNA碱基对的变化,其导致在基因产生的蛋白质中用一个氨基酸替换另一个氨基酸。在一些实施方案中,无义突变也是一个DNA碱基对的变化。然而,改变的DNA序列不是用一个氨基酸替换另一个氨基酸,而是过早地向细胞发出信号以停止构建蛋白质。在一些实施方案中,插入通过添加一段DNA来改变基因中DNA碱基的数量。在一些实施方案中,缺失通过去除一段DNA来改变DNA碱基的数量。在一些实施方案中,小的缺失可以去除基因中的一个或几个碱基对,而较大的缺失可以去除整个基因或数个相邻的基因。在一些实施方案中,重复由被异常复制一次或多次的一段DNA组成。在一些实施方案中,当DNA碱基的添加或缺失改变基因的阅读框时,发生移码突变。阅读框由3个碱基的组组成,每个组编码一个氨基酸。在一些实施方案中,移码突变使这些碱基的分组移位,并改变了氨基酸的编码。在一些实施方案中,插入、缺失和重复都可以是移码突变。在一些实施方案中,重复扩增是另一种类型的突变。在一些实施方案中,核苷酸重复序列是连续重复多次的短DNA序列。例如,三核苷酸重复序列由3个碱基对的序列组成,四核苷酸重复序列由4个碱基对的序列组成。在一些实施方案中,重复扩增是增加短DNA序列重复次数的突变。

[0064] 如本文所用的“小分子”是指小于5千道尔顿的分子,更通常为小于1千道尔顿。如本文所用的“小分子”包括肽。

[0065] “亲和标签”被给予其在本领域中的普通含义。亲和标签是可以容易地附接至靶标生物材料或化学材料的任何生物材料或化学材料。可以通过任何合适的方法将亲和标签附接至靶标生物分子或化学分子。例如,在一些实施方案中,可以使用遗传方法将亲和标签附接至靶标分子。例如,可以将编码亲和标签的核酸序列插入编码生物分子的序列附近;所述序列可以位于核酸内使得亲和标签能够与生物分子一起表达的任何位置,例如在生物分子内、与其相邻或在其附近。在其他实施方案中,还可以在产生(例如表达或合成)靶标生物分

子或化学分子之后将亲和标签附接至所述分子。作为一个示例,亲和标签(如生物素)可以化学偶联(例如共价直接地)至靶标蛋白或肽,以促进靶标结合至链霉亲和素。

[0066] 亲和标签包括,例如,金属结合标签(如组氨酸标签)、GST(在谷胱甘肽/GST结合中)、链霉亲和素(在生物素/链霉亲和素结合中)。其他亲和标签包括Myc/Max对中的Myc或Max,或聚氨基酸(如聚组氨酸)。在本文的不同位置,描述的特定亲和标签与结合相互作用相关。与亲和标签相互作用(即亲和标签结合的)的分子可以是已知的生物结合配偶体或化学结合配偶体,是“识别实体”。将理解的是,在采用亲和标签的任何实施方案中,本发明涉及一系列单独的实施方案,每个均涉及选择本文描述的任何亲和标签。

[0067] “识别实体”可以是能够结合至亲和标签的任何化学材料或生物材料。识别实体可以是,例如,小分子如麦芽糖(其结合至MBP或麦芽糖结合蛋白)、谷胱甘肽、NTA/Ni²⁺、生物素(其可以结合至链霉亲和素)或抗体。亲和标签/识别实体的相互作用可以促进靶标分子的附接,例如附接至另一种生物材料或化学材料,或附接至底物(例如硝酸纤维素膜或其他固定化底物)。亲和标签/识别实体的相互作用的示例包括聚组氨酸/NTA/Ni²⁺、谷胱甘肽S-转移酶/谷胱甘肽、麦芽糖结合蛋白/麦芽糖、链霉亲和素/生物素、生物素/链霉亲和素、抗原(或抗原片段)/抗体(或抗体片段)等。

[0068] 术语“核糖体展示”是指能够产生mRNA、核糖体和相应目的蛋白质的三元复合物的反应系统。核糖体展示可以用于筛选用于结合靶标抗原或配体的细胞表面受体、抗体及其片段。产生反应系统的步骤可以包括:1)生成DNA文库并将所述文库转录为RNA文库,2)纯化RNA并在无细胞蛋白质合成系统中体外翻译,3)允许翻译反应的核糖体复合物结合至靶标抗原或配体,4)选择结合的核糖体复合物,以及5)从复合物中分离RNA,并将转录本反转录为cDNA,其中所述cDNA可以被扩增、测序和/或进一步修饰。

[0069] 在一些实施方案中,药物组合物包含如本文所述的一种或多种肽或寡核苷酸,以及药学上可接受的载剂(carrier)、稀释剂或赋形剂。在制备包含本文教导中描述的肽或寡核苷酸的药物组合物时,可以使用多种载体(vehicle)、载体(vector)、赋形剂和施用途径。药物组合物将一般包含药学上可接受的载剂和药理学上(或治疗上)有效量的肽或寡核苷酸。在各种实施方案中,包含一种或多种肽的药物组合物可以包含用于诱导或增强患者的免疫应答的佐剂或其他试剂。在其他实施方案中,可以在没有佐剂的情况下递送包含一种或多种寡核苷酸的药物组合物。

[0070] 可以通过使得活性剂能够到达试剂的受试者体内作用部位的任何手段来施用本文中描述的药物组合物。施用剂量的变化取决于以下因素,如:药效学特征;施用模式和途径;受体受试者的年龄、健康和体重;症状的性质和程度;同时进行治疗;和治疗频率。

[0071] 如本文所用,术语将试剂“施用”至受试者包括将试剂引入或递送至受试者以执行其预期功能的任何途径。可以通过任何合适的途径进行施用,所述途径包括静脉内、肌肉内、腹膜内、吸入、鼻内或皮下。施用包括自行施用和由他人施用。

[0072] 术语“有效量”或“治疗有效量”是指足以影响预期应用(包括但不限于疾病治疗)的如本文所述的试剂或试剂组合的量。治疗有效量可以根据以下而变化:预期应用(体外或体内)、或被治疗的受试者和疾病病症(例如受试者的体重、年龄和性别)、疾病病症的严重程度或施用方式。该术语也适用于将在靶标细胞中诱导特定应答的剂量。具体剂量将根据以下而变化:选择的特定试剂、将遵循的给药方案、试剂是否与其他试剂组合施用、施用时

间、施用试剂的组织、以及携带化合物的物理递送系统。

[0073] 术语“治疗”等是指获得期望的药理作用和/或生理作用。所述作用可以是预防性的(在完全或部分预防疾病或其症状方面)和/或治疗性的(在部分或完全治愈疾病和/或可归因于所述疾病的不良反应方面)。如本文所用的“治疗”涵盖对哺乳动物(特别是人)的任何治疗,并且包括:(a)防止疾病发生在可能易患所述疾病但尚未被诊断为患有所述疾病的受试者中;(b)抑制疾病,即阻止其发生或进展;(c)缓解疾病,即导致疾病消退和/或缓解一种或多种疾病症状。“治疗”也意味着涵盖即使在没有疾病或病症的情况下递送试剂以提供药理作用。例如,“治疗”涵盖递送可以在没有疾病病症的情况下(例如在疫苗的情况下)引起免疫应答或赋予免疫力的组合物。

[0074] 如本文所用,术语“患者”或“受试者”是指向其提供或可以向其施用组合物的任何生物体,例如用于实验、诊断、预防、美容和/或治疗目的。例如,受试者可以指人或非人动物。在一些方面,受试者是指任何脊椎动物,包括但不限于人和其他灵长类动物(例如黑猩猩和其他猿和猴物种)、农场动物(例如牛、绵羊、猪、山羊和马)、家养哺乳动物(例如狗和猫)、实验动物(例如啮齿动物,如小鼠、大鼠和豚鼠)和鸟类(例如家禽、野生鸟类和猎禽,如鸡、火鸡和其他鹑鸡类鸟类、鸭、鹅等)。在一些实施方案中,受试者是哺乳动物。在进一步的实施方案中,受试者是人。

[0075] 在一些实施方案中,患者患有或易患一种或多种疾患或病症。在一些实施方案中,患者表现出疾病、疾患或病症的一种或多种症状。在一些实施方案中,患者已被诊断为患有一种或多种疾病、疾患或病症。在一些实施方案中,疾患或病症是或包括癌症,或是或包括一个或多个肿瘤的存在。

[0076] 肿瘤突变和/或新表位的检测

[0077] 如本文所述,可以使用各种已知技术中的任一种来筛选癌症以检测突变和/或新表位(例如检测新抗原特性,和/或新表位性质、水平和/或频率)。在一些实施方案中,在核酸水平(例如在DNA或RNA中)检测特定突变或新表位、或其表达。本领域技术人员将认识到,可以在包含来自癌细胞的DNA或RNA的样品中检测突变或新表位、或其表达。此外,本领域技术人员将理解的是,包含来自癌细胞的DNA或RNA的样品可以包括但不限于循环肿瘤DNA(ctDNA)、细胞游离DNA(cfDNA)、细胞、组织或器官。在一些实施方案中,在蛋白质水平检测突变或新表位、或其表达(例如在包含来自癌细胞的多肽的样品中,所述样品可以是或包含多肽复合物或其他高阶结构,包括但不限于细胞、组织或器官)。

[0078] 在一些具体的实施方案中,检测涉及核酸测序。在一些实施方案中,检测涉及全外显子组测序。在一些实施方案中,检测涉及免疫测定。在一些实施方案中,检测涉及使用微阵列。在一些实施方案中,检测涉及大规模平行外显子组测序。在一些实施方案中,检测涉及基因组测序。在一些实施方案中,检测涉及RNA测序。在一些实施方案中,检测涉及标准DNA或RNA测序。在一些实施方案中,检测涉及质谱法。

[0079] 在一些实施方案中,检测涉及下一代测序(DNA和/或RNA)。在一些实施方案中,检测涉及基因组测序、基因组重测序、靶向测序盘、转录组谱分析(RNA-Seq)、DNA-蛋白质相互作用(ChIP-测序)和/或表观基因组表征。在一些实施方案中,可以利用患者基因组的重测序,例如用于检测基因组变异。

[0080] 在一些实施方案中,检测涉及使用诸如ELISA、蛋白质印迹、免疫测定、质谱、微阵

列分析等技术。

[0081] 在一些实施方案中,检测涉及下一代测序(DNA和/或RNA)。在一些实施方案中,检测涉及靶标基因盘的下一代测序(例如**ASHION®**肿瘤/正常外显子组RNA检测(**GEMEXTRA®**)、**MSK-IMPACT**或**FOUNDATIONONE®**)。在一些实施方案中,检测涉及基因组谱分析。

[0082] 在一些实施方案中,检测涉及使用**GEMEXTRA®**测试的基因组谱分析。**GEMEXTRA®**测试是一种全面的外显子组和转录组谱分析测定,其既为癌症患者的护理提供信息,又能够实现未来对该疾病的研究。通过杂交捕获和临床深度测序分析了多于19000个基因,以鉴定体细胞点突变、小的和大的插入和缺失、以及结构重排。还进行了微卫星不稳定性(MSI)和肿瘤突变负荷(TMB)的测量,以为免疫疗法的应用提供信息。为了确保鉴定的变异为体细胞起源,对种系和肿瘤外显子组均进行了测序并比较。还对整个转录组进行测序,使得能够由患者RNA检测基因融合和选择性剪接事件。**GEMEXTRA®**适用于实体癌和血液癌。

[0083] 在一些实施方案中,检测涉及使用可操作癌症靶标的集成突变谱分析(**MSK-IMPACT**)进行基因组谱分析(参见Cheng D T,Mitchell T N,Zehir A等人,Memorial Sloan Kettering-Integrated Mutation Profiling of Actionable Cancer Targets(**MSK-IMPACT**):A Hybridization Capture-Based Next-Generation Sequencing Clinical Assay for Solid Tumor Molecular Oncology.J Mol Diagn.2015;17(3):251-264;和Ross D S,Zehir A,Cheng D T等人,Next-Generation Assessment of Human Epidermal Growth Factor Receptor 2(ERBB2) Amplification Status:Clinical Validation in the Context of a Hybrid Capture-Based,Comprehensive Solid Tumor Genomic Profiling Assay.J Mol Diagn.2017;19(2):244-254)。**MSK-IMPACT**是一种全面的分子谱分析测定,其涉及多个癌基因和肿瘤抑制基因的所有外显子和选定内含子的杂交捕获和深度测序,以允许检测点突变、小的和大的插入或缺失、以及重排。**MSK-IMPACT**还捕获散布在基因组中的基因间和内含子单核苷酸多态性(例如平铺(tiling)探针),其有助于准确评估全基因组拷贝数。在一些实施方案中,探针可以靶向兆碱基。

[0084] 在一些实施方案中,检测涉及使用**FOUNDATIONONE®CDX™**(“**F1CDx**”)测定进行基因组谱分析。**F1CDx**测定是基于体外诊断设备的下一代测序,其用于检测324个基因中的替换、插入和缺失改变(插入缺失(indel))、和拷贝数改变(CNA)、和选定的基因重排、以及基因组签名(包括微卫星不稳定性(MSI)和肿瘤突变负荷(TMB)),使用从福尔马林固定石蜡包埋(FFPE)肿瘤组织标本中分离的DNA进行检测。美国食品药品监督管理局(FDA)批准**F1CDx**用于数种肿瘤适应症,包括NSCLC、黑色素瘤、乳腺癌、结直肠癌和卵巢癌。

[0085] **F1CDx**测定采用从常规FFPE活检或手术切除标本中单次提取DNA的方法,50-1000ng DNA将进行全基因组鸟枪文库构建和基于杂交捕获来自309个癌症相关基因的所有编码外显子、一个启动子区域、一个非编码(ncRNA)区域、和来自34个常见重排基因的选定内含子区域(其中21个还包括编码外显子)。该测定总计检测总计324个基因中的改变。使用**ILLUMINA®**HiSeq 4000平台,对混合捕获选定的文库进行高均匀深度测序(靶标>500×中位覆盖率,>99%的外显子覆盖率>100×)。然后使用定制的分析管道处理序列数据,所述分析管道设计为检测所有类别的基因组改变,包括碱基替换、插入缺失、拷贝数改变(扩增

和纯合基因缺失)和选定的基因组重排(例如基因融合)。此外,还报告基因组签名,包括微卫星不稳定性(MSI)和肿瘤突变负荷(TMB)。

[0086] 在一些实施方案中,检测可以涉及对来自至少100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000或更多个基因(例如癌基因和/或肿瘤抑制基因)的外显子和/或内含子序列进行测序。例如,文献报告表明,MSK-IMPACT已用于实现468个癌基因和肿瘤抑制基因的所有外显子和选定内含子的深度测序。

[0087] 可选地或额外地,在一些实施方案中,检测可以涉及对基因间和/或内含子单核苷酸多态性进行测序。例如,文献报告表明,MSK-IMPACT已用于实现>1000个基因间和内含子单核苷酸多态性的深度测序。

[0088] 在一些实施方案中,检测涉及对剪接变体进行测序。癌细胞能够通过发展机制来适应和进化,以逃逸它们的微环境的控制。因此,选择性剪接提供的多样性和可塑性为癌细胞提供了产生适合于肿瘤生长和/或扩散的蛋白质亚型的机会(David C J和Manley J L. *Genes Dev.* 2010;24(21):2343-2364)。全基因组方法已揭示了在肿瘤发生过程中会发生大规模的选择性剪接(Venable J P等人, *Nat Struct Mol Biol.* 2009;16(6):670-676.),并且已证明选择性剪接模式的基因组画像可用于肿瘤分类中(Venable J P. *Bioessays.* 2006;28(4):378-386;Skotheim R I等人, *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(7-8):1432-1449;Omenn G S等人, *Dis Markers.* 2010;28(4):241-251)。

[0089] 已注意到报告了不同癌症中的异常剪接事件和选择性剪接转录本比例的改变(Rajan P等人, *Nat Rev Urol.* 2009;6(8):454-460)。这些事件导致在正常细胞对应物中未观察到的新转录本。已报道了肿瘤生物学的几乎所有领域都受到选择性剪接的影响,包括代谢、细胞凋亡、细胞周期控制、侵袭、转移和血管生成(Venables J P., *Bioessays.* 2006;28(4):378-386;Ghigna C等人, *Curr Genomics.* 2008;9(8):556-570)。

[0090] 具有相反凋亡效应的选择性剪接变体的最早示例之一是Bcl-x。可以选择性剪接Bcl-x前mRNA以产生两种剪接变体:抗凋亡Bcl-xL(长形式)和促凋亡Bcl-xS(短形式)(Boise L H等人, *Cell.* 1993;74(4):597-608)。可以在许多癌症类型(包括人淋巴瘤、乳腺癌和人肝细胞癌)中发现高Bcl-xL/Bcl-xS比率,其促进肿瘤细胞存活(Minn A J等人, *J Biol Chem.* 1996;271(11):6306-6312.44-46;Olopade O I等人, *Cancer J Sci Am.* 1997;3(4):230-237;Takehara T等人, *Hepatology.* 2001;34(1):55-61)。在癌细胞中经历选择性剪接的细胞凋亡相关基因的另一个示例是Fas受体基因。

[0091] Fas受体在许多细胞类型的细胞表面表达,细胞毒性T细胞产生的Fas配体激活Fas受体,从而启动死亡信号级联反应,导致表达Fas受体的细胞凋亡(Bouillet P等人, *Nat Rev Immunol.* 2009;9(7):514-519)。至少有3个Fas的短mRNA变体缺少编码的跨膜结构域,所得翻译的蛋白变体可能由癌细胞分泌并作为Fas配体的诱饵受体,从而允许癌细胞逃逸细胞凋亡(Cheng J等人, *Science.* 1994;263(5154):1759-1762;Cascino I等人, *Journal of immunology.* 1995;154(6):2706-2713)。

[0092] H-Ras癌基因的选择性剪接发生在先前未知的剪接外显子(称为IDX)上,由H-Ras基因的内含子突变引起(Cohen J B等人, *Cell.* 1989;58(3):461-472)。IDX剪接位点的这种突变导致H-Ras mRNA变体,其更加耐受无义介导的mRNA降解(NMD)过程,因此在癌症中过表达(Barbier J等人, *Mol Cell Biol.* 2007;27(20):7315-7333)。选择性剪接还在促进癌症

侵袭和转移行为方面发挥作用。CD44是最早具有与转移特异性相关的剪接变体的基因之一,其中含有外显子4-7(v4-7)和6-7(v6-7)的变体被显示在转移性胰腺癌细胞系中表达,但不在相应的亲本肿瘤中表达(Gunthert U等人,Cell.1991;65(1):13-24)。

[0093] 突变调用(Mutational Calling)软件工具

[0094] 在某些方面,使用了位于TGen.<https://github.com/tgen/pegasusPipe>的Pegasus人研究管道。将序列与HG19人基因组或HG38人基因组比对。在一方面,使用三个独立的突变调用者Seurat、Mutect和Strelka来调用体细胞突变。选择在多个调用者中看到的所有突变,用于生成肽。这背后的理由是每个调用者具有自己的优势和劣势。通过拉取由多个调用者调用的突变,会降低鉴定出假阳性的风险。调用者可获自:Mutect:<https://software.broadinstitute.org/cancer/cga/mutect>(Broad Institute Software); Seurat:<https://github.com/tgen/seurat>(TGen Caller);和Strelka:<https://github.com/Illumina/strelka>(GNU general public license)。遵循DNA和RNA工作流程的最佳实践。可选地,使用未改变的CLIA认证的体细胞调用以生成肽,所述肽作为候选新抗原用于进一步分析。

[0095] 在一些实施方案中,可以利用单个或多个突变调用者以调用基因组变异。对于由测序肿瘤和正常组织组成的样品,可以使用的调用者是:Strelka、Strelka2、VarDict、VarScan2、qSNP、Shimmer、RADIA、SOAPsnv、SomaticSniper、FaSD-somatic、Samtools、JointSNVMix、Virmid、SNVSniffer、Seurat、CaVEMan、MuTect、MuTect2、LoFreq、EBCall、deepSNV、LoLoPicker、MuSE、MutationSeq、SomaticSeq、SnooPer、FreeBayes、HapMuC、SPLINTER、Pisces、DeepSNVMiner、smCounter、DeepVariant、Cake、Tnscope、DNAscope、NeoMutate、Maftools、scABA、Sanivar、Sarek、BATCAVE、SomaticNet、CoVaCS、RegTools、xAtlas、R2D2、SiNple、Bambino和exactSNP。对于由仅测序肿瘤组成的样品,可以利用的调用者是:Platypus、LumosVar、LumosVar2、SNVMix2、SNver、OutLyzer、ISOWN、SomVarIUS、SiNVICT、FreeBayes、SNPiR、eSNV-detect、RNAIndel、VaDir和Clairvoyante。

[0096] 在某些实施方案中,可以利用识别剪接变体的单个或多个突变调用者以调用基因组变异。对于由测序肿瘤和正常组织组成的样品,可以使用的调用者是:RegTools、ASGAL、MATS(rMATS)、SUPPA(SUPPA2)、Leafcutter、MAJIQ、JunctionSeq、findAS、Cufflinks/Cuffdiff、IsoformSwitchAnalyzeR、ALEXA-seq、MISO、SplicingCompass、Flux Capacitor、JuncBASE、SpliceR、FineSplice、ARH-seq、Spladder、DEXSeq、edgeR、Limma、DiffSplice、dSpliceType、SpliceDetector、HISAT2、STAR、Subread、Subjunct、PennDiff、DSGseq、AltAnalyze、Splicing Express、SpliceTrap、PSGInfer、FDM、IsoEM2、MADS+、Spanki、SpliceMap、CASPER、AVISPA、PASA、SpliceSeq、MATT、Aspli、IPSA、SANJUAN、VAST-Tools、SpliceV、Asprofile、DESeq2、Yanagi、ABLas、IRIS和AS-Quant。

[0097] HLA分型

[0098] 在一些实施方案中,可以使用来自肿瘤和/或正常组织的全外显子组测序(WES)和/或RNA测序以鉴定个体患者的MHC 1类和2类基因型。

[0099] 可以利用单个或多个HLA调用者来鉴定HLA类型。对于DNA测序,可以利用的HLA调用者是:BWakit、PHLAT、OptiType、HLAMiner、HISAT、HISAT2、xHLA、HLA-Vbseq、GATK HLA Caller、PolySolver、HLAReporter、Athlates、HLAseq、HLAssign、SOAP-HLA、STC-Seq、

HapLogic、Gyper、HLATyphon、HLA-LA、HLA-PRG、MHC-PRG、Prohlatype、GraphTyper、ALPHLARD、Omixon、SNP2HLA、HLAscan、NeoEpitopePred和Assign。对于RNA测序,可以利用的HLA调用者是:BWakit、seq2HLA、PHLAT、HLAProfiler、OptiType、HLAMiner、HLAForest、arcasHLA、HISAT、HISAT2、HLAseq、HLAssign、STC-Seq、HLATyphon、ALPHLARD、Omixon和HLAscan。

[0100] 在一些实施方案中,可以使用Polysolver(多态性基因座解析器)分析全外显子组测序数据以进行HLA分型(Shukla等人,2015)。Polysolver是一种用于推断三个主要MHC I类(HLA-A、HLA-B、HLA-C)基因的等位基因的算法。例如,可以使用Polysolver从全外显子组测序数据推断患者的HLA I类等位基因。在其他变化形式中,在没有全外显子组测序数据的情况下,可以通过另一种HLA分型算法从转录组测序数据推断患者的HLA I类等位基因。

[0101] 在一个实施方案中,在计算机中使用在计算设备上运行的一种或多种技术(如OptiType)进行HLA分型。参见Szolek等人,OptiType:precision HLA typing from next-generation sequencing data,Bioinformatics.2014年12月1日;30(23),出于所有目的以其整体并入本文。也可以使用各种其他计算机技术。参见Major等人,HLA typing from 1000genomes whole genome and whole exome Illumina data,PLoS One.2013年11月6日;8(11):e78410;Wittig等人,Development of a high-resolution NGS-based HLA-typing and analysis pipeline,Nucl.Acids Res.(2015)。

[0102] 由肿瘤突变生成肽

[0103] 在一些实施方案中,如上面标题为“肿瘤突变和/或新表位的检测”一节所述获得突变数据。可以使用单个或多个工具(包括但不限于Varcode、customProDB和pyGeno)将突变调用转换为突变蛋白序列。这些工具将生成用于下游体外和计算机HLA结合测定的肽序列。此外,在一些实施方案中,肽将经过测试以验证每种肽对人蛋白质组是独特的。可以将肽与来自NCBI的数个不同蛋白质数据库进行比对,包括:非冗余蛋白质序列(Non-redundant protein sequences)、参考蛋白质(Reference proteins)、模式生物(model organisms)、UniProtKB/Swiss-Prot、专利蛋白质序列(Patented protein sequences)、蛋白质数据库蛋白质(Protein Data Bank proteins)、宏基因组蛋白质(Metagenomic proteins)和转录组鸟枪法组装蛋白质(Transcriptome Shotgun Assembly proteins)。使用上面列出的数据库,可以利用rBlast运行蛋白质BLAST,以鉴定对人蛋白质组具有100%同一性的蛋白质。

[0104] 在某些方面,在python中利用Varcode软件以预测基因组变异数据的影响。Varcode从突变和/或新表位生成期望的肽大小的野生型和突变蛋白序列。在某些方面,期望的肽大小为3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20个或更多个氨基酸。在一方面,期望的肽大小为15个氨基酸。

[0105] Varcode的依赖是Pyensembl,它是Ensembl参考基因组数据的python接入点,以生成肽。在一些实施方案中,Varcode预测每个突变对蛋白质的影响。排除了沉默突变和基因组非编码区域中的突变。然后使用Varcode在整个肽序列中生成突变。用计算机模拟方法和/或生化测定(例如肽-DNA缀合物测定)进一步分析这些含有用Varcode生成的突变的变体肽(即候选新抗原),以鉴定哪些肽结合患者特异性MHC I类和II类蛋白,以及哪些最终被患者的肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)识别。

[0106] 使用肽-DNA缀合物方法分析新抗原

[0107] 肽-DNA缀合物平台非常适合于快速筛选不同分子的大群体以获得候选新抗原。在一些实施方案中,本发明提供以下策略用于鉴定新抗原。根据各种实施方案,肽-DNA缀合物方法包括用于合并的高度平行表达蛋白质的方法,每种蛋白质与核酸条形码相关联。在一些实施方案中,肽-DNA缀合物方法包括用于合并的高度平行体外表达蛋白质的方法,每种蛋白质通过含有嘌呤霉素的键共价连接至DNA条形码。在其他实施方案中,肽-DNA缀合物方法包括噬菌体展示、mRNA展示或其他方法。

[0108] 肽-DNA缀合物方法是一种专有技术,其可以快速生成大量潜在的新抗原,作为患者特异性HLA蛋白的候选结合剂。肽-DNA缀合物方法是一种生成肽文库(长度为10-50个氨基酸)的方法,每种肽缀合至独特的DNA标签,在结合实验之后可以使用所述DNA标签监测肽丰度。重要地,肽序列可以用于具有多达100000种独特的可编程肽的大型多重结合测定。

[0109] 可以使用任何分子靶标的结合测定以筛选大型的不同肽-DNA缀合物文库。可以将生物结构(例如患者特异性HLA蛋白或其片段,其对应于患者的基因型)与不同的肽混合,从未结合的肽中分离,然后查询那些“粘附(stick)”的肽。具体的文库可以是基于靶标的先验知识(例如来自外显子组测序和分析)智能设计的文库。

[0110] 肽-DNA缀合物平台更详细地描述于美国专利号9,958,454;美国专利号10,288,608;以及美国专利申请公布号2016/0025726中,其内容通过引用并入本文。

[0111] 在一些实施方案中,肽-DNA缀合物方法用于鉴定新抗原。在某些方面,鉴定新抗原包括(i)提供肽构建体文库,其中文库的每种肽构建体包含肽部分和鉴定肽部分的鉴定核酸部分,并且至少一种肽构建体的肽部分能够特异性结合HLA蛋白或其片段;(ii)使HLA蛋白或其片段与肽构建体文库接触;(iii)将包含能够特异性结合至HLA蛋白或其片段的肽部分的至少一种肽构建体与包含不能特异性结合至HLA蛋白或其片段的肽部分的肽构建体分离;(iv)对能够特异性结合至HLA蛋白或其片段的至少一种肽构建体的鉴定核酸部分的全部或部分进行测序。在一些方面,每种肽构建体的鉴定核酸部分包含编码肽构建体的肽部分的多核苷酸序列或其互补物。

[0112] 用噬菌体展示、核糖体展示、mRNA展示、酵母展示、细菌展示和相关技术来鉴定新抗原

[0113] 在一些实施方案中,遗传编码目的多肽以促进鉴定新抗原。遗传编码的多肽文库的一个示例是mRNA展示文库。另一个示例是可复制遗传展示包(rgdp)文库,如噬菌体展示文库。在一个实施方案中,将目的多肽遗传编码为噬菌体展示文库。在这些实施方案中,核酸可以由噬菌体基因组组成。在这些实施方案中,多肽可以由噬菌体外壳组成。

[0114] 在一些实施方案中,可以使用本发明以产生遗传编码的多肽组合文库,通过将许多核酸翻译为相应多肽并将所述分子支架的分子连接至所述多肽而生成所述文库。可以通过噬菌体展示、酵母展示、核糖体展示、细菌展示或mRNA展示来生成遗传编码的多肽组合文库。

[0115] 噬菌体展示

[0116] 进行噬菌体展示的技术和方法可以见于WO 2009/098450中。

[0117] 多年来开发了不同的噬菌体展示系统,利用不同的噬菌体载体(M13丝状噬菌体、λ、T4和T7噬菌体)和各种噬菌体外壳蛋白进行共价融合。M13丝状噬菌体最常使用。丝状噬

菌体展示系统的优势在于该噬菌体的溶原生命周期和M13噬菌粒载体的可用性(Webster, 1006;Hufton等人,1999)。溶原噬菌体将其DNA整合至宿主细胞基因组中,与细菌细胞一起复制,并且不需要裂解细菌细胞以形成噬菌体颗粒。相反,噬菌体颗粒从细菌表面脱落而不会诱导细胞死亡(Webster,1996)。此外,开发M13噬菌粒载体允许了优异的可使用性。噬菌粒是含有丝状噬菌体的复制起点和包装信号、以及复制的质粒起点和编码噬菌体外壳蛋白的基因外加DNA插入片段的质粒(Webster,1996;Armstrong等人,1996)。对于噬菌体繁殖,感染噬菌粒的细菌细胞需要用所谓的辅助噬菌体“双重感染(superinfect)”,所述辅助噬菌体为形成活噬菌体病毒粒子提供所有其他必需的噬菌体成分。除了优异的可使用性以外,使用噬菌粒载体系统还允许单价展示重组蛋白(每个噬菌体病毒粒子最多一个重组蛋白),因为辅助噬菌体贡献非重组噬菌体外壳蛋白(Armstrong等人,1996)。通过各种外壳蛋白进行噬菌体展示的不同M13载体系统是可用的(Smith和Petrenko,1997;Barbas,1993)。主要外壳蛋白pVIII和次要外壳蛋白pIII最频繁用于展示目的(Armstrong等人,1996;Rodi和Makowski,1999)。由于两种蛋白质的N-末端暴露于噬菌体表面,将外源DNA序列插入编码外壳蛋白的基因的上游。开发用于C-末端融合至M13次要外壳蛋白pVI的噬菌体载体,其中C-末端暴露于噬菌体表面,是朝着开发cDNA噬菌体展示文库迈出的重要一步(Hufton等人,1999;Jespersen等人,1995)。

[0118] 最近以来,还在裂解噬菌体系统(即 λ 噬菌体、T4和T7噬菌体)中开发了展示方法。对于含有重组外壳蛋白的重组裂解噬菌体病毒粒子的形成和脱落,需要在噬菌体繁殖时裂解细菌细胞(Russel,1991)。此外,由于没有可用于裂解噬菌体的质粒载体,与使用质粒相比,DNA分离和实验方法更加劳动密集(Sambrook等人,1989)。由于裂解噬菌体生命周期和溶原噬菌体生命周期采用不同的噬菌体组装策略,两种方法都允许展示不同的蛋白质(Hufton等人,1999)。由于M13丝状噬菌体的病毒粒子蛋白(从而还有重组噬菌体外壳蛋白)在噬菌体病毒粒子组装之前嵌入细菌细胞膜中,因此该过程限制了可以在噬菌体表面展示的蛋白质;为了有效展示,cDNA产物必须能够穿过细菌细胞膜,并且需要允许形成活的且具有传染性的病毒粒子(Webster,1996;Russel,1991;Rodi等人,2002)。另一方面,对于裂解噬菌体病毒粒子的产生,重组蛋白在病毒粒子组装之前和期间形成并保留在细菌细胞的胞质溶胶中,使得裂解噬菌体可以展示的重组蛋白谱受到的限制较少(Hufton等人,1999;Russel,1991;Krumpe等人,2006)。

[0119] 噬菌体展示描述于例如以下中:Ladner等人,美国专利第5,223,409号;Smith (1985) Science 228:1315-1317;WO 92/18619;WO 91/17271;WO 92/20791;WO 92/15679;WO 93/01288;WO 92/01047;WO 92/09690;WO 90/02809;de Haard等人(1999) J. Biol. Chem 274:18218-30;Hoogenboom等人(1998) Immunotechnology 4:1-20;Hoogenboom等人(2000) Immunol Today 2:371-8;Fuchs等人(1991) Bio/Technology 9:1370-1372;Hay等人(1992) Hum Antibod Hybridomas 3:81-85;Huse等人(1989) Science 246:1275-1281;Griffiths等人(1993) EMBO J 12:725-734;Hawkins等人(1992) J Mol Biol 226:889-896;Clackson等人(1991) Nature 352:624-628;Gram等人(1992) Proc Natl Acad Sci USA 89:3576-3580;Garrard等人(1991) Bio/Technology 9:1373-1377;Rebar等人(1996) Methods Enzymol. 267:129-49;Hoogenboom等人(1991) Nuc Acid Res 19:4133-4137;和Barbas等人(1991) PNAS 88:7978-7982。

[0120] 核糖体展示

[0121] 在某些方面,本文描述的方法包括使用核糖体展示来鉴定新抗原。核糖体展示可以用于对目的蛋白质(例如候选新抗原)进行体外蛋白质合成。核糖体展示也可以用于进行体外蛋白质进化以产生具有期望的特性的蛋白质,例如结合至特定靶标分子的Fab片段。核糖体展示是一种可用于生成文库的众所周知的技术。这种完全体外的方法允许多样性为 10^{16} 个成员的文库。该过程产生与其RNA起源相关的翻译蛋白质,这些蛋白质可以作为复合物用于选择具有期望的特性(例如结合至固定化的靶标分子)的蛋白质。然后,可以将显示期望的特性(例如高结合亲和力)的RNA-蛋白质复合物逆转录为cDNA,并通过PCR扩增序列。该过程还提供了迭代或蛋白质表达的重复周期。此外,可以在随后的循环中将核酸突变有效地引入所选择的核酸文库,导致持续的DNA多样化,从而导致蛋白质进化。最终结果是可以用于产生目的蛋白质的核酸序列(例如特异性结合至患者特异性HLA蛋白并最终结合至患者的TIL的新抗原)。

[0122] 在本文提供的方法中,在核糖体的表面上展示从中翻译的目的蛋白质。简要地,在体外翻译系统中将RNA分子文库翻译至RNA分子的3'末端,使得核糖体不会脱落。这是通过在RNA模板中不掺入功能性终止密码子来实现的。通常,释放因子识别终止密码子,所述释放因子触发新生多肽从核糖体中分离。在核糖体展示中,肽从核糖体中出现,但不会脱离复合物。这例如允许新生多肽与另一种多肽结合以形成功能性二聚体。在一些情况下,在氧化环境中另有折叠步骤(对于形成二硫键很重要)。

[0123] 折叠的目的蛋白质、核糖体和RNA的整个复合物在数天内稳定,然后可以筛选期望的特性,如通过翻译的目的蛋白质特异性结合至结合对配体。可以将编码所选择的目的蛋白质的RNA逆转录为单链cDNA,其可以转化为双链DNA并通过PCR扩增,以提供所选择的蛋白质(例如新抗原)的编码序列。可以在核糖体展示复合物中结合的mRNA上进行逆转录反应,或者可以从核糖体展示复合物中分离mRNA,然后用于逆转录步骤中。用于破坏/解离核糖体复合物的合适方法是本领域已知的,包括EDTA处理和/或苯酚提取。

[0124] 一般地,用于核糖体展示的核酸(DNA)构建体含有启动子(T7、SP6或T3)、翻译起始信号(如Shine-Dalgarno(原核)或Kozak(真核)序列)、起始密码子、和目的蛋白质的编码序列(例如 V_H 或 V_L 链结构域)。可以包括编码一个或多个检测标签的一个或多个核酸序列,以提供产生进一步包含一个或多个检测标签(例如组氨酸标签)的蛋白质。为了能够展示完整的新生蛋白质并使其折叠成其活性构象,可以在C末端添加长度为至少23-30个氨基酸的间隔子结构域,以允许蛋白质完全退出核糖体。间隔子可以为设计用于RT-PCR回收DNA序列的引物提供已知序列。

[0125] 为了从DNA中去除终止密码子,可以在PCR构建过程中使用缺乏终止密码子的3'引物。可以在为了基于细菌的展示系统设计的构建体的DNA的5'和3'末端掺入含有茎环结构的序列,以稳定mRNA,防止细菌无细胞系统中RNA酶活性降解mRNA。

[0126] 本文描述的方法中使用的mRNA翻译系统可以是任何合适的可用系统。可以使用原核或真核翻译系统,例如大肠杆菌裂解物粗品(商业上可获自例如Promega Corp., Madison, Wis.; Agilent Technologies, Santa Clara, Calif.; GE Healthcare Biosciences, Pittsburgh, Pa.; Life Technologies, Carlsbad, Calif.)、重组核糖体系统(如PURE,参见例如Shimizu等人,Nat. Biotechnol., 19:751-755(2001)),或如下所述的无

细胞蛋白质合成系统。

[0127] PURE系统可以包含约32种单独纯化的组分,用于体外蛋白质生物合成(例如起始、延伸和终止)。在一些实施方案中,组分包括起始因子(例如IF1、IF2、IF3)、延伸因子(例如EF-G、EF-Tu、EF-Ts)、释放因子(例如RF1、RF3)、终止因子(例如RRF)、20种氨酰基-tRNA合成酶、甲硫酰基-tRNA转化酶、T7RNA聚合酶、核糖体、46种tRNA、NTP、磷酸肌酸、10-甲酰基-5,6,7,8-四氢叶酸、20种氨基酸、肌酸激酶、肌激酶、核苷二磷酸激酶和焦磷酸酶。

[0128] 已使用核糖体展示以成功生成对其靶标具有高亲和力的抗体片段。核糖体展示的详细描述见于例如Hanes, J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95:14130-14135 (1998); Schaffitzel等人, J. Immunological Methods, 231:119-135 (1999); He等人, J. Immunological Methods, 231, 105-117 (1999); Roberts R W, Current Opinion in Chemical Biology, 3:268-273 (1999)。

[0129] 用于体外选择的其他展示方法

[0130] 其他体外文库展示方法可以用于本文描述的方法中,例如但不限于mRNA展示、双顺反子展示、P2A展示和CIS展示(顺式活性展示)。

[0131] mRNA展示

[0132] 在mRNA展示中, RNA文库的每个成员通过与嘌呤霉素的稳定共价键直接附接至其编码的目的蛋白质,嘌呤霉素是一种可以模拟tRNA氨酰末端的抗生素(参见例如Robert R W和Szostak J W, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94:12297-12302 (1997))。嘌呤霉素是一种氨基核苷类抗生素,在原核生物或真核生物中均有活性,源自白黑链霉菌(*Streptomyces alboniger*)。在核糖体中发生翻译的过程中,过早的链终止会抑制蛋白质合成。分子的一部分作为酪氨酰基-tRNA的3'末端的类似物,其中其结构的一部分模拟腺苷分子,另一部分模拟酪氨酸分子。它进入A位点并转移至生长链,导致形成嘌呤酰化的新生链的和过早的链释放。3'位置含有酰胺键而不是tRNA的正常酯键,使得分子更耐水解并停止沿核糖体推进。

[0133] 蛋白质合成的其他嘌呤霉素类似物抑制剂包括O-去甲基嘌呤霉素、O-炔丙基嘌呤霉素、9-{3'-脱氧-3'-[(4-甲基-L-苯基丙氨酰基)氨基]- β -D-呋喃核糖基}-6-(N,N'-二甲氨基)嘌呤[L-(4-甲基)-苯基-PANS]和6-二甲氨基-9-[3-(对叠氮基-L- β -苯基丙氨酰氨基)-3-脱氧- β -呋喃核糖基]嘌呤。

[0134] RNA文库的成员可以通过接头(例如但不限于多核苷酸或化学接头(例如聚乙二醇))连接至嘌呤霉素(Fukuda等人, Nucleic Acid Research, 34(19):e127 (2006))。在一些实施方案中,包含RNA的多核苷酸接头在3'末端连接至嘌呤霉素。在其他实施方案中,PEG接头连接至嘌呤霉素。

[0135] 当连接至RNA分子的3'末端的嘌呤霉素进入核糖体时,由于核糖体中的肽基转移酶活性,它与新生蛋白质(由RNA分子编码)建立共价键。转而在蛋白质和嘌呤霉素的O-甲基酪氨酸部分之间形成稳定的酰胺键。

[0136] 如本文所述, RNA-嘌呤霉素融合物的RNA文库可以进行体外翻译以生成RNA-嘌呤霉素-蛋白质复合物(例如RNA-嘌呤霉素-新抗原复合物)。在一些实施方案中, RNA-嘌呤霉素融合物包含编码候选新抗原的RNA分子,所述候选新抗原通过来自患者的肿瘤细胞和野生型细胞的外显子组分析进行鉴定。

[0137] 可以在mRNA展示的蛋白质文库上进行亲和力选择,以筛选具有期望的特性(如特

异性结合至结合对配体)的蛋白质。可以在溶液中或在固体载体上进行mRNA展示。可以通过本领域已知的标准方法(如亲和层析法)来纯化所选择的mRNA展示的目的蛋白质。可以对mRNA进行克隆、PCR扩增和/或测序,以确定所选择的蛋白质的编码序列。在一个实施方案中,所选择的mRNA展示文库含有新抗原群体,其与患者特异性HLA蛋白或其片段结合,并最终与患者的TIL结合。

[0138] 在一些方面,核酸成员文库的成员连接至嘌呤霉素,其中每个成员编码预期目的蛋白质,其具有不同于其他核酸成员编码的其他蛋白质的一级氨基酸序列。mRNA展示系统可以含有不同复合物的群体或混合物,使得每个复合物具有不同的连接至嘌呤霉素的mRNA、核糖体和预期目的蛋白质。

[0139] 双顺反子DNA展示

[0140] 双顺反子DNA展示可以用于体外选择目的蛋白质(参见例如Sumida等人,Nucleic Acid Research,37(22):e147(2009))。该方法基于使翻译的目的蛋白质体外与其编码DNA形成复合物,使用所述编码DNA以确定目的蛋白质的序列。通常地,生成含有多个ORF的DNA模板,所述ORF可以连接至其编码的蛋白质。此外,偶联的转录/翻译反应被区隔在油包水乳液(例如胶束)中。

[0141] 在一些情况下,当使用多个ORF时,它们可以通过核糖体结合侧分隔。在一些实施方案中,将目的蛋白质的编码序列融合至链霉素亲和素的编码序列。在一些实施方案中,DNA模板通过接头进行生物素化。接头可以是可切割的。

[0142] 在体外转录/翻译过程中,蛋白质可以在胶束中表达。在一个非限制性说明性实施方案中,DNA模板含有候选新抗原的编码序列,并且候选新抗原在胶束中表达。在实施方案中,形成候选新抗原,并通过键(如链霉素亲和素-生物素键)使其与编码候选新抗原的DNA结合。DNA展示的目的蛋白质(如候选新抗原)可以从乳液中回收并通过亲和力选择进行筛选。可以通过诸如UV照射的方法从复合物中切割出所选择的DNA展示的目的蛋白质的DNA模板,然后进行PCR扩增、克隆和/或测序。

[0143] 在一些实施方案中,本文提供的方法包括生成核酸成员文库,每个成员编码预期目的蛋白质(即候选新抗原),其具有不同于其他核酸成员编码的其他蛋白质的一级氨基酸。在一些实施方案中,文库包含DNA成员,并且所述方法包括将文库转录为RNA,并在无细胞蛋白质合成系统中翻译所述RNA,以在油包水乳液中生成双顺反子DNA展示系统。在一些实施方案中,双顺反子DNA展示系统含有被选择用于特异性结合至结合对配体的目的蛋白质群体。在一个实施方案中,双顺反子DNA展示系统含有候选新抗原群体,其中每个候选新抗原与编码候选新抗原的DNA分子结合。

[0144] P2A DNA展示

[0145] 在利用核酸内切酶P2A的顺式活性的P2A DNA展示中,P2A和目的蛋白质的融合蛋白结合至表达了所述融合蛋白的同一DNA分子(参见例如Reiersen等人,Nucleic Acids Research,33(1):e10)。DNA模板可以含有编码目的蛋白质的编码序列,其遗传融合至P2A的编码序列、启动子和复制起点。可以通过本领域已知的标准方法获得P2A的编码序列并构建与目的蛋白质的遗传融合物。

[0146] 在一些实施方案中,使用P2A DNA展示以选择目的蛋白质。可以通过生成融合蛋白文库(其中文库的每个成员包含P2A和目的蛋白质之间的融合蛋白)并且基于期望的特性

(例如特异性结合至结合对配体)选择目的蛋白质,来选择目的蛋白质。可以由核酸成员文库构建该文库,所述核酸成员文库中每个成员包含编码不同目的蛋白质的DNA模板(即每种目的蛋白质具有不同于核酸文库其他成员编码的其他蛋白质的一级氨基酸序列),所述模板遗传融合至P2A的编码序列。

[0147] 在一些实施方案中,可以通过亲和力选择策略来筛选P2A DNA展示文库,例如在溶液中或在固体载体上筛选。可以通过例如亲和层析法来纯化所选择的目的蛋白质,并且可以对复合DNA进行PCR扩增、克隆和/或测序。

[0148] CIS展示

[0149] 与P2A DNA展示类似,CIS展示涉及一种基于DNA的方法,将体外转录/翻译的蛋白质直接连接至编码它们的DNA分子(参见例如Odegrip等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,101(9):2806-2810)。该方法使用RepA(一种DNA复制引发蛋白),如果DNA分子具有CIS元件,则RepA非共价结合至表达了它的DNA分子。除了RepA之外,还可以产生DNA分子以编码目的蛋白质(例如候选新抗原)。

[0150] 在一些实施方案中,使用CIS展示以选择目的蛋白质。可以通过生成融合蛋白的DNA文库(其中每个成员包含RepA和目的蛋白质之间的融合蛋白)并且基于期望的特性(例如特异性结合至结合对配体)选择目的蛋白质,来选择目的蛋白质。可以由DNA文库构建该文库,其中所述DNA文库的每个成员包含编码不同目的蛋白质的DNA模板(即每种目的蛋白质具有不同于核酸文库其他成员编码的其他蛋白质的一级氨基酸序列),所述模板遗传融合至RepA的编码序列。

[0151] 在一些实施方案中,DNA文库的成员含有目的蛋白质的编码序列、RepA的编码序列、CIS元件、复制起点和启动子,其中目的蛋白质的编码序列遗传融合至RepA的编码序列。CIS元件可以遗传连接至RepA编码序列。

[0152] 在一些实施方案中,文库含有RepA和目的蛋白质之间的融合蛋白,以及编码所述融合蛋白的DNA分子。

[0153] 可以通过亲和力选择策略来筛选RepA DNA展示的文库,例如在溶液中或在固体载体上筛选。可以通过例如亲和层析法来纯化所选择的目的蛋白质,并且可以对复合DNA进行PCR扩增、克隆和/或测序。

[0154] 无细胞蛋白质合成(CFPS)

[0155] 为了表达本文所述的目的生物活性蛋白质(即新抗原),可以使用无细胞蛋白质合成系统。已开发了在体外合成反应期间支持从纯化的mRNA转录本或从由DNA转录的mRNA体外合成蛋白质的细胞提取物。

[0156] 在包含细菌提取物和/或限定的试剂的反应混合物中进行多肽的CFPS。反应混合物包含至少:ATP或能量来源;用于生产大分子的模板,例如DNA、mRNA等;氨基酸,和多肽合成所需的辅助因子、酶和其他试剂,例如核糖体、tRNA、聚合酶、转录因子、氨酰基合成酶、延伸因子、起始因子等。在本发明的一个实施方案中,能量来源是稳态能量来源。还可以包含由高能磷酸键催化ATP再生的酶,例如乙酸激酶、肌酸激酶等。此类酶可以存在于用于翻译的提取物中,或者可以添加至反应混合物。此类合成反应体系是本领域众所周知的,并且已描述于文献中。

[0157] 用于无细胞蛋白质合成的模板可以是mRNA或DNA。模板可以包含任何特定目的基

因的序列,并且可以编码全长多肽或其任意长度的片段。用作蛋白质合成模板的核酸任选地源自天然来源,或者它们可以是合成的或重组的。例如,DNA可以是重组DNA,例如质粒、病毒等。

[0158] 如本文所用的术语“反应混合物”是指能够催化由核酸模板合成多肽的反应混合物。反应混合物包含来自细菌细胞的提取物,例如大肠杆菌 (*E. coli*) S30提取物。S30提取物是本领域公知的,并且描述于例如Lesley, S.A.等人, (1991), *J. Biol. Chem.* 266, 2632-8中。可以在有氧或厌氧条件下进行合成。

[0159] 在一些实施方案中,将细菌提取物干燥。可以将干燥的细菌提取物以原始固体的110%复溶于milli-Q水(例如反渗透水)中,通过测量起始材料的固体百分比来确定。在一个实施方案中,将精确称量的干燥提取物等分试样(代表10mL提取物的原始固体的110%)添加至玻璃烧杯中的10mL Milli-Q水中,所述玻璃烧杯在磁力搅拌器上并带有搅拌棒。搅拌所得混合物直至粉末溶解。除非立即使用,否则溶解后,将材料转移至15mL Falcon管中并储存于-80℃。

[0160] 提取物在反应混合物中的体积百分比将变化,其中提取物通常至少为总体积的约10%;更通常至少约20%;在一些情况下,当提供至少约50%时,可以提供额外的益处;或至少约60%;通常不超过总体积的约75%。

[0161] 一般系统包含编码目的蛋白质的核酸模板。核酸模板是编码mRNA的RNA分子(例如mRNA)或核酸(例如RNA、DNA),并且是任何形式(例如线状、环状、超螺旋、单链、双链等)。核酸模板指导产生期望的蛋白质。

[0162] 为了保持模板,可以选择用于产生提取物的细胞以减少、大量减少或消除有害酶的活性,或选择具有修饰活性的酶的所述细胞。具有修饰的核酸酶或磷酸酶活性(例如具有至少一种突变磷酸酶或核酸酶基因或其组合)的细菌细胞可以用于合成细胞提取物以提高合成效率。例如,用于制造用于CFPS的S30提取物的大肠杆菌菌株可以是RNA酶E或RNA酶A缺陷的(例如通过突变)。

[0163] 在通用CFPS反应中,编码目的蛋白质的基因在转录缓冲液中表达,从而产生mRNA,所述mRNA在CFPS提取物和翻译缓冲液中被翻译成目的蛋白质。可以单独添加转录缓冲液、无细胞提取物和翻译缓冲液,或者可以在添加前将这些溶液中的两种或更多种组合,或同时添加。

[0164] 为了在体外合成目的蛋白质,CFPS提取物在一些时候包含编码目的蛋白质的mRNA分子。在一些CFPS系统中,mRNA从天然来源纯化后外源添加,或使用RNA聚合酶(如RNA聚合酶II、SP6 RNA聚合酶、T3 RNA聚合酶、T7 RNA聚合酶、RNA聚合酶III和/或源自噬菌体的RNA聚合酶)由克隆的DNA体外合成制备。在其他系统中,mRNA由模板DNA在体外产生;转录和翻译都发生在这种类型的CFPS反应中。在一些实施方案中,转录和翻译系统是偶联的,或者包含互补的转录和翻译系统,其在同一反应中进行RNA和蛋白质两者的合成。在此类体外转录和翻译系统中,CFPS提取物含有在单个系统中转录(产生mRNA)和翻译(合成蛋白质)两者所需的所有组分(外源性或内源性)。

[0165] 无细胞蛋白质合成反应混合物包含以下组分:模板核酸,如DNA,其包含目的基因,所述基因可操作地连接至至少一个启动子和任选一个或多个其他调控序列(例如含有目的基因的克隆载体或表达载体)或PCR片段;RNA聚合酶,其识别目的基因可操作连接的启动子

和任选一种或多种转录因子,所述转录因子指向模板核酸可操作连接的任选调控序列;核糖核苷酸三磷酸(rNTP);任选地,其他转录因子及其辅助因子;核糖体;转运RNA(tRNA);其他或任选的翻译因子(例如翻译起始、延伸和终止因子)及其辅助因子;一种或多种能量来源(例如ATP、GTP);任选地,一种或多种能量再生组分(例如PEP/丙酮酸激酶、AP/乙酸激酶或磷酸肌酸/肌酸激酶);任选地,提高产率和/或效率的因子(例如核酸酶、核酸酶抑制剂、蛋白质稳定剂、伴侣)及其辅助因子;以及任选地,增溶剂。反应混合物进一步包含蛋白质合成具体所需的氨基酸和其他材料,包括盐(例如乙酸、谷氨酸或硫酸的钾盐、镁盐、铵盐和锰盐)、聚合化合物(例如聚乙二醇、葡聚糖、二乙基氨基乙基葡聚糖、季氨基乙基葡聚糖和氨乙基葡聚糖等)、环AMP、蛋白质或核酸降解酶的抑制剂、蛋白质合成的抑制剂或调节剂、氧化/还原调节剂(例如DTT、抗坏血酸、谷胱甘肽和/或其氧化物)、非变性表面活性剂(例如Triton X-100)、缓冲组分、精胺、亚精胺、腐胺等。CFPS反应的组分在美国专利第7,338,789和7,351,563号以及美国申请公开第2010/0184135号中更详细地讨论,其公开内容出于所有目的通过引用整体并入本文。

[0166] 根据提取物中存在的特定酶,例如可以选择许多已知的核酸酶、聚合酶或磷酸酶抑制剂中的一种或多种,并且有利地用于提高合成效率。

[0167] 蛋白质和核酸合成通常需要能量来源。启动转录以产生mRNA需要能量(例如,当使用DNA模板并用于启动翻译时,使用例如GTP形式的高能磷酸盐)。核糖体的一个密码子(三个核苷酸;一个氨基酸)的每个后续步骤都需要将另一个GTP水解为GDP。通常还需要ATP。对于将在蛋白质合成过程中聚合的氨基酸,必须首先将其激活。因此,蛋白质和/或核酸合成的进行需要来自高能磷酸键的大量能量。

[0168] 能量来源是可以被酶加工以提供能量以实现期望的化学反应的化学底物。通常使用允许通过切割高能磷酸键(例如见于核苷三磷酸(例如ATP)中的那些高能磷酸键)释放能量用于合成的能量来源。可转换为高能磷酸键的任何来源都尤其合适。通常可以认为ATP、GTP和其他三磷酸盐是支持蛋白质合成的等效能量来源。

[0169] 为了提供能量用于合成反应,系统可以包含添加的能量来源,如葡萄糖、丙酮酸、磷酸烯醇丙酮酸(PEP)、氨甲酰磷酸、乙酰磷酸、磷酸肌酸、磷酸丙酮酸、甘油醛-3-磷酸、3-磷酸甘油酸和葡萄糖-6-磷酸,其可以生成或再生高能三磷酸化合物,如ATP、GTP、其他NTP等。

[0170] 当合成系统中最初不存在足够的能量时,优选补充另外的能量来源。在体外合成反应过程中也可以添加或补充能量来源。

[0171] 在一些实施方案中,使用PANox-SP系统进行无细胞蛋白质合成反应,所述系统包含NTP、大肠杆菌tRNA、氨基酸、乙酸 Mg^{2+} 、谷氨酸 Mg^{2+} 、乙酸 K^{+} 、谷氨酸 K^{+} 、亚叶酸、Tris pH 8.2、DTT、丙酮酸激酶、T7 RNA聚合酶、二硫异构酶、磷酸烯醇丙酮酸(PEP)、NAD、CoA、草酸 Na^{+} 、腐胺、亚精胺和S30提取物。

[0172] 在一些情况下,无细胞合成反应不需要添加通常的二次能源,而是使用氧化磷酸化和蛋白质合成的共激活。在一些情况下,在诸如Cytomim(细胞质模拟物)系统的反应中进行CFPS。Cytomim系统定义为在没有聚乙二醇的情况下进行并具有优化的镁浓度的反应条件。该系统不会积累磷酸盐,已知磷酸盐会抑制蛋白质合成。

[0173] 可以使用特异性抑制活性氧化磷酸化途径中的步骤的抑制剂(如电子传递链抑制

剂)来测试所述途径的存在。氧化磷酸化途径抑制剂的示例包括:毒素类,如氰化物、一氧化碳、叠氮化物、羰基氰化间氯苯腈(CCCP)和2,4-二硝基苯酚;抗生素类,如寡霉素;杀虫剂类,如鱼藤酮;和琥珀酸脱氢酶的竞争性抑制剂,如丙二酸和草酰乙酸。

[0174] 在一些实施方案中,使用Cytomim系统进行无细胞蛋白质合成反应,所述系统包含NTP、大肠杆菌tRNA、氨基酸、乙酸 Mg^{2+} 、谷氨酸 Mg^{2+} 、乙酸 K^{+} 、谷氨酸 K^{+} 、亚叶酸、Tris pH 8.2、DTT、丙酮酸激酶、T7 RNA聚合酶、二硫异构酶、丙酮酸钠、NAD、CoA、草酸 Na^{+} 、腐胺、亚精胺和S30提取物。在一些实施方案中,Cytomim系统的能量底物是丙酮酸、谷氨酸和/或葡萄糖。在系统的一些实施方案中,将核苷三磷酸(NTP)替换为核苷单磷酸(NMP)。

[0175] 可以用碘乙酰胺处理细胞提取物,以灭活可以还原二硫键并损害适当的蛋白质折叠的酶。在一些实施方案中,细胞提取物包含外源性蛋白质伴侣。可以通过用于制造无细胞提取物的细菌菌株表达蛋白质伴侣,或者可以将蛋白质伴侣添加至细胞提取物。外源性蛋白质伴侣的非限制性示例包括二硫键异构酶(PDI)(例如但不限于大肠杆菌DsbC)和肽基脯氨酰基顺反异构酶(PPIase)(例如但不限于FkpA)。在一些实施方案中,提取物包含PDI和PPIase两者,例如DsbC和FkpA两者。也可以将谷胱甘肽二硫化物(GSSG)和/或谷胱甘肽(GSH)添加至提取物,其比例促进适当的蛋白质折叠并防止形成异常的蛋白质二硫化物。

[0176] 在一些实施方案中,CFPS反应包括反转的膜囊泡以进行氧化磷酸化。可以在制备细胞提取物过程的高压均质步骤中形成这些囊泡,如本文所述,并保留在用于反应混合物中的提取物中。

[0177] 制备细胞提取物的方法描述于例如以下中:Zawada, J. "Preparation and Testing of E.coli S30 In Vitro Transcription Translation Extracts", Douthwaite, J. A. 和 Jackson, R. H. (编辑), Ribosomal display and Related Technologies: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, vol. 805, pp. 31-41 (Humana Press, 2012); Jewett 等人, Molecular Systems Biology: 4, 1-10 (2008); Shin J. 和 Norieaux V., J. Biol. Eng., 4:8 (2010)。简要地,培养并收获细菌培养物;将其悬浮于合适的缓冲液(例如S30缓冲液)中,并匀浆以裂解细胞。

[0178] 可以在用于CFPS反应之前将无细胞提取物解冻至室温。当合成具有二硫键的蛋白质时,可以将提取物与50 μ M碘乙酰胺一起孵育30分钟。在一些实施方案中,CFPS反应包含约30% (v/v) 碘乙酰胺处理的提取物,其具有约8mM谷氨酸镁、约10mM谷氨酸铵、约130mM谷氨酸钾、约35mM丙酮酸钠、约1.2mM AMP、各自约0.86mM的GMP、UMP和CMP、约2mM氨基酸(酪氨酸约1mM)、约4mM草酸钠、约0.5mM腐胺、约1.5mM亚精胺、约16.7mM磷酸钾、约100mM T7 RNA聚合酶、约2-10 μ g/mL质粒DNA模板、约1-10 μ M大肠杆菌DsbC、和总浓度约2mM的氧化(GSSG)谷胱甘肽。任选地,无细胞提取物可以包含1mM还原GSH。

[0179] 生成裂解物

[0180] 本文描述的方法和系统可以使用细胞裂解物对目的靶标蛋白质进行体外翻译。为方便起见,用作裂解物来源的生物体可以称为来源生物体或宿主细胞。宿主细胞可以是细菌、酵母、哺乳动物或植物细胞,或能够合成蛋白质的任何其他类型的细胞。裂解物包含能够翻译编码期望的蛋白质的信使核糖核酸(mRNA)的组分,并且任选地包含能够转录编码期望的蛋白质的DNA的组分。此类组分包括,例如,DNA指导的RNA聚合酶(RNA聚合酶)、启动编码期望的蛋白质的DNA转录所需的任何转录激活因子、转运核糖核酸(tRNA)、氨酰基-tRNA

合成酶、70S核糖体、 N^{10} -甲酰基四氢叶酸、甲酰甲硫氨酸-tRNA^{Met}合成酶、肽基转移酶、起始因子(如IF-1、IF-2和IF-3)、延伸因子(如EF-Tu、EF-Ts和EF-G)、释放因子(如RF-1、RF-2和RF-3)等。

[0181] 实施方案使用裂解物所源自的细菌细胞。本发明的方法可以使用源自任何细菌菌株的细菌裂解物。可以如下获得细菌裂解物。在许多生长培养基中的任一种中,在本领域众所周知并且由实践者容易地优化以用于具体细菌的生长的生长条件下,使选择的细菌生长至对数期。例如,用于合成的天然环境利用源自细菌细胞的细胞裂解物,所述细菌细胞在含有葡萄糖和磷酸盐的培养基中生长,其中所述葡萄糖存在的浓度为至少约0.25% (重量/体积),更通常至少约1%;并且通常不超过约4%,更通常不超过约2%。这种培养基的一个示例是2YTPG培养基,然而本领域技术人员将理解的是,许多培养基可以适应此目的,因为有许多公布的培养基适合细菌(如大肠杆菌)的生长,使用定义和未定义的营养来源。可以通过将细胞沉淀悬浮于合适的细胞悬浮缓冲液中来裂解已过夜收获的细胞,并通过超声处理、在弗氏压碎器(French press)中、连续流动高压均质化、或本领域已知的任何其他可用于有效细胞裂解的方法来破碎悬浮细胞。然后将细胞裂解物离心或过滤以去除大的DNA片段和细胞碎片。

[0182] 用于制造细胞裂解物的细菌菌株一般具有降低的核酸酶和/或磷酸酶活性,以提高无细胞合成效率。例如,用于制造无细胞提取物的细菌菌株可以具有编码核酸酶RNA酶E和RNA酶A的基因中的突变。菌株还可以具有稳定细胞合成反应的组分的突变,如诸如tnaA、speA、sdaA或gshA的基因中的缺失,这些基因在无细胞合成反应中分别防止氨基酸色氨酸、精氨酸、丝氨酸和半胱氨酸的降解。此外,菌株可以具有稳定无细胞合成的蛋白质产物的突变,如蛋白酶ompT或lonP中的敲除。

[0183] 没有终止密码子的DNA表达盒

[0184] 在一些实施方案中,核糖体展示反应系统中使用的核酸模板包含DNA表达盒,其能够表达编码目的蛋白质的RNA,其中所述RNA缺乏可操作的终止密码子。为了从表达盒中的蛋白质编码区去除终止密码子,可以使用缺少终止密码子的PCR引物来扩增目的蛋白质的编码区,使得从翻译起点至编码C-末端氨基酸的序列的整个编码区被扩增。

[0185] 用新抗原文库进行MHC结合测定

[0186] 主要组织相容性复合体(MHC)是编码称为MHC蛋白的糖蛋白的基因集合。MHC蛋白在体内的主要功能是以能够被TCR识别的形式呈递抗原。MHC蛋白以抗原肽的形式结合至抗原,以形成MHC-肽复合物。

[0187] MHC蛋白在人中也称为人白细胞抗原(HLA),在小鼠中也称为H-2区,其分为两类:I类和II类MHC蛋白。这些蛋白质由一簇高度多态性基因组成。具体地,人HLA-A、HLA-B和HLA-C称为I类MHC分子,而人HLA-DP、HLA-DQ和HLA-DR称为II类MHC分子。HLA基因座包括HLA-DP、HLA-DN、HLA-DM、HLA-DO、HLA-DQ、HLA-DR、HLA-A、HLA-B和HLA-C。这些基因座各自含有人群中的不同等位基因。由这些等位基因变异编码的不同亚型旨在在本发明的保护范围内。

[0188] MHC II类蛋白是异二聚体整合膜蛋白,其包含非共价连接的一条 α 链和一条 β 链。 α 链具有两个细胞外结构域(α_1 和 α_2)、跨膜(TM)结构域和细胞质(CYT)结构域。 β 链含有两个细胞外结构域(β_1 和 β_2)、TM和CYT结构域。MHC I类蛋白是整合膜蛋白,其包含糖蛋白重链,所述重链具有三个细胞外结构域(即 α_1 、 α_2 和 α_3)、TM和CYT结构域。重链与称为 β_2 -微球蛋白(β_{2m})

的可溶性亚基非共价结合。

[0189] 在一些实施方案中,本发明的结合测定(例如MHC-肽-DNA缀合物测定)采用使用通过可加工接头连接至MHC II类组分(例如 β 链)的空间占位物分子。本发明的空间占位物分子可以是能够结合至MHC蛋白的肽结合槽的任何肽,其结合方式阻碍任何其他肽在肽结合槽中结合。优选地,空间占位物分子以中等亲和力在肽结合槽内结合,更优选以低亲和力结合,在大约中性的pH下结合。在一个实施方案中,空间占位物分子的长度为约5个至约40个氨基酸残基,更优选约6个至约30个氨基酸残基,8个至约20个氨基酸残基,甚至更优选约12个至15个氨基酸残基。在进一步的实施方案中,空间占位物分子为约13个氨基酸残基。合适的空间占位物分子的示例包括但不限于(以单字母氨基酸代码表示):PVSKMRMATPLLMQA (SEQ ID NO:25),也称为CLIP;AAMAAAAAAMAA (SEQ ID NO:26);AAMAAAAAAMAA (SEQ ID NO:27);AAFAAAAAAAMAA (SEQ ID NO:28);ASMSAASAASMAA (SEQ ID NO:29),及其功能等同物。在一个实施方案中,空间占位物分子将具有共有序列AAXAAAAAAXAA (SEQ ID NO:30),其中X是任何氨基酸。将空间占位物分子保持在MHC II类分子的结合槽内的能力防止形成“空的(empty)”分子。由于这些“空的”分子聚集的趋势,形成“空的”MHC II类分子一直是主要的限制因素,使得难以分离功能性MHC II类组分。

[0190] 本发明的空间占位物分子可以通过接头共价连接至MHC分子,所述接头具有含有能够切割蛋白质的酶的靶位点的氨基酸序列。此类接头在本文中称为“可加工接头”。本发明的可加工接头的示例包括含有酶(如胶原酶、金属蛋白酶、丝氨酸蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶、激肽释放酶、凝血酶和纤溶酶原激活物)的靶位点的接头。本发明优选的可加工接头包括具有凝血酶切割位点的接头。

[0191] 也可以使用各种方法设计可用于本发明的合适接头。例如,可以使用MHC蛋白的X射线晶体学数据来设计适当长度和电荷的接头,使得接头不会干扰空间占位物分子结合至MHC II类组分的肽结合槽。此类方法包括在本发明中。

[0192] 本发明的接头的长度优选足够短(即尺寸足够小),使得接头不会实质上抑制空间占位物分子与MHC II类组分之间的结合。本发明的接头的长度范围可以为约1个氨基酸残基至约40个氨基酸残基,更优选约5个氨基酸残基至约30个氨基酸残基,甚至更优选约8个氨基酸残基至约20个氨基酸残基。

[0193] 接头的切割促进空间占位物分子的释放,从而释放肽结合槽。然后将MHC II类组分与候选新抗原文库(例如由肿瘤和野生型细胞的外显子组分析设计的肽-DNA缀合物文库)孵育,以促进抗原肽分子结合至MHC II类组分。在允许结合的足够时间(其可以由本领域技术人员容易地确定)之后,回收已结合至抗原肽分子的MHC II类组分。

[0194] 在某些实施方案中,使用不同的抗原肽分子,重复切割接头并与抗原肽分子孵育的步骤。重复这些步骤的优点是允许形成识别数种抗原表位的许多MHC II类组分。此外,可以使用由MHC II类基因的不同等位基因形式构建的MHC II类分子来进行这些步骤。因此,该测定的这种特征允许生成对许多不同的MHC等位基因型具有特异性的数种MHC II类组分。

[0195] 可选地,本发明的结合测定(例如MHC-肽-DNA缀合物测定)采用噬菌体展示系统(参见例如Hammer J等人,Promiscuous and allele-specific anchors in HLA-DR-binding peptides,Cell(1993)74(1):197-203)。用噬菌体展示表达MHC II组分。然后将表

达MHC II组分的噬菌体与候选新抗原文库(例如由肿瘤和野生型细胞的外显子组分析设计的肽-DNA缀合物文库)孵育,以促进抗原肽分子结合至MHC II类组分。在允许结合的足够时间(其可以由本领域技术人员容易地确定)之后,回收已结合至抗原肽分子的MHC II类组分。

[0196] 在某些方面,使用计算机分析确定新抗原与MHC I类蛋白或其片段之间的特异性结合。计算机分析包括根据新抗原的肽序列,应用计算算法来预测与MHC I蛋白的相对结合。诸如netMHCpan的工具用于预测肽/新抗原与MHC蛋白的结合(参见Jurtz等人, NetMHCpan-4.0: Improved Peptide-MHC Class I Interaction Predictions Integrating Eluted Ligand and Peptide Binding Affinity Data, J Immunol (2017) 199(9):3360-3368)。该分析的输入是肽序列和目的MHC等位基因,输出是预测的结合亲和力。

[0197] 在某些方面,将在MHC结合测定或计算机中显示出与MHC I类分子或MHC II类分子结合的新抗原合并以形成肽混合物。然后将这种肽混合物或编码肽混合物中的肽的寡核苷酸直接施用于患者。

[0198] 疫苗施用

[0199] 可以以用于施用肽或寡核苷酸的任何合适的方式进行根据本文提供的方法的肽或寡核苷酸的施用,所述方式包括但不限于注射、输注、皮下、皮内、肿瘤内、淋巴结内、髓内、肌肉内、鞘内、通过静脉内或淋巴内注射、或腹膜内。在一些实施方案中,将新抗原或寡核苷酸施用至由切除肿瘤组织形成的腔中(即腔内递送),或在切除之前直接施用至肿瘤中(即肿瘤内递送)。在一个实施方案中,肽或寡核苷酸通过静脉内注射施用。

[0200] 在实施方案中,本发明包括用一种或多种新抗原肽或一种或多种寡核苷酸治疗癌症的方法,每种寡核苷酸具有编码新抗原肽的核酸序列,其中,在根据本发明的新抗原治疗或寡核苷酸治疗之前,用非清髓性化学疗法对患者进行预处理。

[0201] 治疗癌症的方法

[0202] 通过所公开的组合物和方法治疗的癌症可以是任何实体瘤。癌症也可以是转移性和/或复发性的。癌症的非限制性示例包括:急性淋巴细胞癌、急性髓系白血病、腺泡横纹肌肉瘤、骨癌、脑癌、乳腺癌、肛门癌、肛管癌或肛门直肠癌、眼癌、肝内胆管癌、关节癌、颈癌、胆囊癌或胸膜癌、鼻癌、鼻腔癌或中耳癌、外阴癌、慢性淋巴细胞白血病、慢性髓系癌、宫颈癌、神经胶质瘤、霍奇金淋巴瘤、下咽癌、肾癌、喉癌、肝癌、肺癌、恶性间皮瘤、黑色素瘤、多发性骨髓瘤、鼻咽癌、非霍奇金淋巴瘤、卵巢癌、腹膜癌、网膜癌和系膜癌、咽癌、前列腺癌、直肠癌、肾癌、皮肤癌、软组织癌、睾丸癌、甲状腺癌、输尿管癌、尿道膀胱癌和消化道癌(例如食道癌、胃癌、胰腺癌、胃癌、小肠癌、胃肠类癌肿瘤、口腔癌、结直肠癌和肝胆癌)。

[0203] 三阴性乳腺癌(TNBC)占有乳腺癌的约15%,是高度侵袭性肿瘤类型,其缺乏雌激素受体(ER)、孕激素受体(PR)和ERBB2(HER2)基因扩增。TNBC对激素治疗(如他莫昔芬)或芳香酶抑制剂或靶向HER2受体的疗法(如赫赛汀(曲妥珠单抗))无应答。因为可用于TNBC的靶点有限,所以目前对寻找新靶点从而有可以治疗该类型乳腺癌的个性化药物有强烈的兴趣。因此,在一些实施方案中,癌症是三阴性乳腺癌(TNBC)。

[0204] 组合癌症疗法

[0205] 公开的组合物和方法可以与其他癌症免疫疗法组合使用。有两种不同类型的免疫

疗法:被动免疫疗法使用免疫系统的组分来使靶向细胞毒性活性针对癌细胞,而不必在患者中启动免疫应答,而主动免疫疗法则积极触发内源性免疫应答。被动策略包括使用B细胞应答特定抗原而产生的单克隆抗体(mAb)。20世纪70年代杂交瘤技术的发展和肿瘤特异性抗原的鉴定允许药物开发mAb,所述mAb可以特异性靶向肿瘤细胞以使其被免疫系统破坏。到目前为止,mAb一直是免疫疗法的最成功案例;2012年最畅销的前三抗癌药物是mAb。其中有利妥昔单抗(美罗华,Genentech),其结合至B细胞恶性肿瘤(如非霍奇金淋巴瘤(NHL))表面高度表达的CD20蛋白。利妥昔单抗被FDA批准与化疗组合用于治疗NHL和慢性淋巴细胞白血病(CLL)。另一个重要的单克隆抗体是曲妥珠单抗(赫赛汀,Genentech),其通过靶向HER2的表达,彻底变革了HER2(人表皮生长因子受体2)阳性乳腺癌的治疗。

[0206] 生成最佳的“杀伤”CD8 T细胞应答还需要T细胞受体激活和共刺激,这可以通过连接肿瘤坏死因子受体家族成员(包括OX40(CD134)和4-1BB(CD137))来提供。OX40特别有意义,因为用激活(激动剂)抗OX40 mAb治疗会增强T细胞分化和细胞溶解功能,导致增强针对多种肿瘤的抗肿瘤免疫力。

[0207] 许多抗癌药物可用于与本发明的方法和组合物组合。以下是可以与辐照联合或不联合使用的抗癌(抗肿瘤)药物的非详尽列表:阿西维辛(Acivicin)、阿柔比星(Aclarubicin)、盐酸阿考达唑(Acodazole Hydrochloride)、阿克罗宁(AcrQnine)、阿多来新(Adozelesin)、阿地白介素(Aldesleukin)、六甲蜜胺(Altretamine)、安波霉素(Ambomycin)、醋酸阿美坦醌(Ametantrone Acetate)、氨鲁米特(Aminoglutethimide)、安吡啶(Amsacrine)、阿那曲唑(Anastrozole)、安曲霉素(Anthramycin)、天冬酰胺酶(Asparaginase)、曲林菌素(Asperlin)、阿扎胞苷(Azacitidine)、阿扎替派(Azetepa)、含氮霉素(Azotomycin)、巴马司他(Batimastat)、苯佐替派(Benzodepa)、比卡鲁胺(Bicalutamide)、盐酸比生群(Bisantrene Hydrochloride)、二甲磺酸双奈法德(Bisnafide Dimesylate)、比折来新(Bizelesin)、硫酸博来霉素(Bleomycin Sulfate)、布喹那钠(Brequinar Sodium)、溴匹立明(Bropiramine)、白消安(Busulfan)、放线菌素C(Cactinomycin)、卡鲁睾酮(Calusterone)、卡醋胺(Caracemide)、卡贝替姆(Carbetimer)、卡铂(Carboplatin)、卡莫司汀(Carmustine)、盐酸卡柔比星(Carubicin Hydrochloride)、卡折来新(Carzelesin)、西地芬戈(Cedefingol)、苯丁酸氮芥(Chlorambucil)、西罗霉素(Cirolemycin)、顺铂(Cisplatin)、克拉屈滨(Cladribine)、甲磺酸克立那托(Crisnatol Mesylate)、环磷酰胺(Cyclophosphamide)、阿糖胞苷(Cytarabine)、达卡巴嗪(Dacarbazine)、放线菌素D(Dactinomycin)、盐酸柔红霉素(Daunorubicin Hydrochloride)、地西他滨(Decitabine)、右奥马铂(Dexormaplatin)、地扎胍宁(Dezaguanine)、甲磺酸地扎胍宁、亚胺醌(Diaziquone)、多西他赛(Docetaxel)、阿霉素(Doxorubicin)、盐酸阿霉素、屈洛昔芬(Droloxifene)、柠檬酸屈洛昔芬、丙酸屈他雄酮(Dromostanolone Propionate)、偶氮霉素(Duazomycin)、依达曲沙(Edatrexate)、盐酸依氟鸟氨酸(Eflomithine Hydrochloride)、依沙芦星(Elsamitrucin)、恩洛铂(Enloplatin)、恩普氨酯(Enpromate)、依匹哌啶(Epipropidine)、盐酸表柔比星(Epirubicin Hydrochloride)、厄布洛唑(Erbulazole)、盐酸依索比星(Esorubicin Hydrochloride)、雌莫司汀(Estramustine)、雌莫司汀磷酸钠、依他硝唑(Etanidazole)、乙碘油I 131(Ethiodized Oil I 131)、依托泊苷(Etoposide)、磷酸依托泊苷、氯苯乙嘧胺

(Etoprine)、盐酸法徕唑(Fadrozole Hydrochloride)、法扎拉滨(Fazarabine)、维甲酰胺(Fenretinide)、氟尿苷(Floxuridine)、磷酸氟达拉滨(Fludarabine Phosphate)、氟尿嘧啶(Fluorouracil)、氟西他滨(Fluorocitabine)、磷喹酮(Fosquidone)、福司曲星钠(Fostriecin Sodium)、吉西他滨(Gemcitabine)、盐酸吉西他滨、金Au 198、羟基脲(Hydroxyurea)、盐酸伊达比星(Idarubicin Hydrochloride)、异环磷酰胺(Ifosfamide)、伊莫福新(Ilmofofosine)、异丙铂(Iproplatin)、盐酸伊立替康(Irinotecan Hydrochloride)、醋酸兰瑞肽(Lanreotide Acetate)、来曲唑(Letrozole)、醋酸亮丙瑞林(Leuprolide Acetate)、盐酸利阿唑(Liarozole Hydrochloride)、洛美曲索钠(Lometrexol Sodium)、洛莫司汀(Lomustine)、盐酸洛索蒽醌(Losoxantrone Hydrochloride)、马索罗酚(Masoprocol)、美登素(Maytansine)、盐酸氮芥(Mechlorethamine Hydrochloride)、醋酸甲地孕酮(Megestrol Acetate)、醋酸美仑孕酮(Melengestrol Acetate)、美法仑(Melphalan)、美诺立尔(Menogaril)、巯嘌呤(Mercaptopurine)、甲氨蝶呤(Methotrexate)、甲氨蝶呤钠、氯苯氨啉(Metoprine)、美妥替哌(Meturedopa)、米丁度胺(Mitindomide)、米托卡星(Mitocarcin)、丝裂红素(Mitocromin)、丝裂吉菌素(Mitogillin)、丝裂马菌素(Mitomalcin)、丝裂霉素(Mitomycin)、丝裂帕菌素(Mitosper)、米托坦(Mitotane)、盐酸米托蒽醌(Mitoxantrone Hydrochloride)、霉酚酸(Mycophenolic Acid)、诺考达唑(Nocodazole)、诺拉霉素(Nogalamycin)、奥马铂(Ormaplatin)、奥昔舒仑(Oxisuran)、紫杉醇(Paclitaxel)、培门冬酶(Pegaspargase)、培利霉素(Peliomycin)、奈莫司汀(Pentamustine)、硫酸培洛霉素(Peplomycin Sulfate)、培磷酰胺(Perfosfamide)、哌泊溴烷(Pipobroman)、哌泊舒凡(Piposulfan)、盐酸吡罗蒽醌(Piroxantrone Hydrochloride)、光辉霉素(Plicamycin)、普洛美坦(Plomestane)、卟吩姆钠(Porfimer Sodium)、泊非霉素(Porfiromycin)、泼尼莫司汀(Prednimustine)、盐酸丙卡巴肼(Procarbazine Hydrochloride)、嘌呤霉素(Puromycin)、盐酸嘌呤霉素、吡唑霉素(Pyrazofurin)、利波腺苷(Riboprine)、吡鲁米特(Rogletimide)、沙芬戈(Safmgol)、盐酸沙芬戈、司莫司汀(Semustine)、辛曲秦(Simtrazene)、磷乙酰天冬氨酸钠(Sparfosate Sodium)、稀疏霉素(Sparsomycin)、盐酸锗螺胺(Spirogermanium Hydrochloride)、螺莫司汀(Spiromustine)、螺铂(Spiroplatin)、链黑霉素(Streptonigrin)、链脲佐菌素(Streptozocin)、氯化锶Sr 89、磺氯苯脲(Sulofenur)、他利霉素(Talisomycin)、紫杉烷(Taxane)、紫杉化合物(Taxoid)、替可加兰钠(Tecogalan Sodium)、替加氟(Tegafur)、盐酸替洛蒽醌(Teloxantrone Hydrochloride)、替莫泊芬(Temoporfin)、替尼泊苷(Teniposide)、替罗昔隆(Teroxirone)、睾内酯(Testolactone)、硫咪嘌呤(Thiamiprine)、硫鸟嘌呤(Thioguanine)、噻替派(Thiotepa)、噻唑呋林(Tiazofurin)、替拉扎明(Tirapazamine)、盐酸拓扑替康(Topotecan Hydrochloride)、柠檬酸托瑞米芬(Toremifene Citrate)、醋酸曲托龙(Trestolone Acetate)、磷酸曲西立滨(Triciribine Phosphate)、三甲曲沙(Trimetrexate)、葡萄糖醛酸三甲曲沙、曲普瑞林(Triptorelin)、盐酸妥布氯唑(Tubulazole Hydrochloride)、尿嘧啶氮芥(Uracil Mustard)、乌瑞替哌(Uredopa)、伐普肽(Vapreotide)、维替泊芬(Verteporfin)、硫酸长春花碱(Vinblastine Sulfate)、硫酸长春新碱(Vincristine Sulfate)、长春地辛(Vindesine)、硫酸长春地辛、硫酸长春匹定

(Vinepidine Sulfate)、硫酸长春甘酯(Vinglycinate Sulfate)、硫酸长春素(Vinleurosine Sulfate)、酒石酸长春瑞滨(Vinorelbine Tartrate)、硫酸长春罗定(Vinrosidine Sulfate)、硫酸长春利定(Vinzolidine Sulfate)、伏氯唑(Vorozole)、折尼铂(Zeniplatin)、净司他丁(Zinostatin)、盐酸佐柔比星(Zorubicin Hydrochloride)。

[0208] 公开的组合物和方法可以与一种或多种免疫检查点抑制剂组合使用。免疫检查点抑制剂是指在检查点信号途径中抑制蛋白质的化合物。检查点信号途径中的蛋白质包括例如:CD27、CD28、CD40、CD 122、CD137、OX40、GITR、ICOS、A2AR、B7-H3、B7-H4、BTLA、CTLA-4、IDO、KIR、LAG3、PD-1、PD-L1、PD-L2、TIM-3、TIGIT、Lair1、CD244、HAVCR2、CD200、CD200R1、CD200R2、CD200R4、LILRB4、PILRA、ICOSL、4-1BB或VISTA。免疫检查点抑制剂是本领域已知的。

[0209] 例如,免疫检查点抑制剂可以是小分子。小分子可以是例如:核酸、肽、多肽、拟肽、碳水化合物、脂质或其他有机或无机分子。

[0210] 可选地,免疫检查点抑制剂是抗体或其片段。例如,抗体或其片段对检查点信号途径中的蛋白质具有特异性,所述蛋白质如CD27、CD28、CD40、CD 122、CD137、OX40、GITR、ICOS、A2AR、B7-H3、B7-H4、BTLA、CTLA-4、IDO、KIR、LAG3、PD-1、PD-L1、PD-L2、TIM-3、TIGIT、Lair1、CD244、HAVCR2、CD200、CD200R1、CD200R2、CD200R4、LILRB4、PILRA、ICOSL、4-1BB或VISTA。

[0211] 示例性抗免疫检查点抗体包括例如伊匹单抗(抗CTLA-4)、派姆单抗(抗PD-L1)、纳武单抗(抗PD-L1)、阿替利珠单抗(抗PD-L1)和德瓦鲁单抗(抗PD-L1)。

[0212] 通过以下实施例进一步说明本发明,所述实施例不应被解释为限制性的。本申请全文中引用的所有参考文献、专利和公开的专利申请的内容以及附图,通过引用整体并入本文并用于所有目的。

[0213] 实施例

[0214] 实施例1.新抗原疫苗概述

[0215] 发明人已经开发了一种差异化的肽疫苗方法(图1和图2),其中应用新型肽:MHC筛选技术(即“肽-DNA缀合物测定”或“PepSeq”)或相关方法(例如核糖体展示)从基因组分析中预测个性化免疫原性新抗原。设计对应于患者的新抗原的肽,然后将这些肽施用于患者。可以制造一种或多种寡核苷酸,其具有编码与新抗原相对应的肽的核酸序列。可以将寡核苷酸施用于患者。

[0216] 肽-DNA缀合物测定提供了一种用于有效合成并分析DNA条形码肽的大型文库的方法(参见图3)。

[0217] 实施例2.用于从人肿瘤中鉴定新抗原的方法

[0218] 以下方法使得能够从人肿瘤中鉴定新抗原。

[0219] 将来自患有各种恶性肿瘤的人患者的新鲜切除的肿瘤标本各自分成2个样品。第一样品将用于提取DNA和RNA,使得能够进行全外显子组测序和RNAseq。与种系样品(例如血液或颊拭子)一起,这将使得能够鉴定体细胞变异并对相关蛋白质的表达进行量化。

[0220] 在分析测序数据之后,将使用肿瘤基因组信息来设计覆盖候选突变及其野生型对应物的重合(overlapping)肽文库。例如,将使用肽-DNA缀合物平台或噬菌体展示平台以高度平行的方式合成这些肽的DNA编码文库,并与一组通常表达的人MHC II类蛋白质平行测

定。平行地,将应用MHC I类结合的计算机模型来鉴定候选新抗原的第二子集。所得数据将使得能够确定推定的I类或II类限制性新抗原的优先子集,以供下游关注。

[0221] 使用通过肽-DNA缀合物测定或噬菌体展示平台和/或计算机预测方法鉴定的候选新抗原,将寻求用于富集新抗原的两种平行方法。在第一方法中,将通过在细胞因子的存在下将从肿瘤中分离的TIL (没有肿瘤细胞) 与代表入围 (即优先) 新抗原序列的肽一起培养,来完成新抗原反应性T细胞的选择性扩增。

[0222] 此外,将使用对应于入围序列的荧光标记肽:MHC探针 (并且可能与细胞耗竭标记物组合),通过荧光激活细胞分选来分离新抗原反应性T细胞。在每种情况下,将使用体外激活测定来测量细胞产物针对自体肿瘤细胞的活性,可能包括使用源自体外的肿瘤类器官。

[0223] 实施例3. 用于从人肿瘤中鉴定新抗原的可选方法

[0224] 来自人患者的新鲜切除肿瘤标本用于提取DNA和RNA,使得能够进行全外显子组测序和RNAseq。与种系样品 (血液或颊拭子) 一起,这使得能够鉴定体细胞变异并对相关蛋白质的表达进行量化。

[0225] 在分析测序数据之后,使用肿瘤基因组信息来设计覆盖候选突变及其野生型对应物的重合肽文库。使用肽-DNA缀合物平台以高度平行的方式合成这些肽的DNA编码文库,并与患者特异性的MHC II类 (DR、DP和DQ) 平行测定。该过程使得能够通过选择性和亲和力快速、高置信度地鉴定候选新抗原肽:MHC。平行地,可以对肽文库进行计算机分析,基于新抗原的肽序列,应用计算算法来预测与MHC I类蛋白的相对结合。作为结果,从改变肽的体细胞肿瘤变异的通常很大的目录中选择靶标新抗原的小集合。

[0226] 实施例4. 从人患者和小鼠收集样品

[0227] 数个人患者入组一项临床试验,以测试NeoTIL疗法的疗效。患者已被诊断为患有肺癌、结直肠癌、黑色素瘤、乳腺癌和结肠癌。此外,结肠癌的BALB/c小鼠模型用于收集肿瘤浸润性淋巴细胞 (TIL)。

[0228] 从每个人患者和小鼠收集肿瘤活检。确定每个人患者的分离肿瘤细胞 (TC)、外周血单核细胞和TIL的数量。此外,鉴定了每个人患者和结肠癌的BALB/c小鼠模型的MHC等位基因和突变数量 (见表1)。

[0229] 表1. 每个人患者和结肠癌的BALB/c小鼠模型的MHC等位基因和突变的鉴定。

[0230]	物种	患者 ID	癌症类型	活检部位	MHC 等位基因		突变数量
	人	TG00006	原发性肺癌	肺	DRB1*07:01	DRB1*11:03	83
	人	TG00013	转移性黑色素瘤	背部	DRB1*03:01	DRB1*01:02	374
	小鼠	BALB/c 小鼠	结肠癌模型	N/A	1(A)d		1506

[0231] 实施例5. 外显子组测序、肽文库设计以及与人样品的结合测定

[0232] 肿瘤外显子组和来自正常细胞的外显子组的全外显子组测序用于设计肽-DNA缀合物文库,如图4和图5所概述。肽-DNA缀合物文库中的肽在序列上重叠,并含有野生型残基 (“W”) 和突变残基 (“M”) (参见图5)。

[0233] 对于人患者TG00006和TG00013,如图6所示,使用Day等人,J Clin Invest.2003; 112(6):831-842中概述的方法进行结合测定。结合测定鉴定了对存在于每个患者中的特定人白细胞抗原血清型具有高亲和力的肽(参见图7所示每个图左上角的较大数据点)。使用肽文库对人患者TG00013进行结合测定的额外分析示于图8A和图8B中。

[0234] 用使用肽-DNA缀合物测定鉴定的肽构建体来分离编码对HLA复合物具有高亲和力的肽的核酸。对这些核酸进行测序,并且对于人患者TG00013,相应的氨基酸序列示于图9中。MHC-肽-DNA缀合物测定结果与计算机预测的比较可以用于鉴定并确认新抗原和/或新表位,如图10所示。

[0235] 通过收集肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)并生成肽来激活并训练这些TIL以增强对新抗原的识别和抗肿瘤活性,评估了另外数个患有各种形式癌症的人患者,所述癌症包括肺癌、黑色素瘤、胰腺癌、结直肠癌、胃腺癌、葡萄膜黑色素瘤、基底细胞癌、梅克尔细胞癌和胆管癌(参见图11)。用于制造肽疫苗的方法的非限制性示例在图12中概述。

[0236] 实施例6.用肽激活外周血单个核细胞

[0237] 外周血单个核细胞(PBMC)是具有圆形细胞核的任何外周血细胞。这些细胞由淋巴细胞(T细胞、B细胞、NK细胞)和单核细胞组成,而红细胞和血小板没有细胞核,并且粒细胞(中性粒细胞、嗜碱性粒细胞和嗜酸性粒细胞)具有多叶细胞核。在人中,淋巴细胞占PBMC群体的大多数,其次是单核细胞,仅有很小百分比的树突状细胞。

[0238] 可以使用FICOLL®和梯度离心从全血中提取PBMC,FICOLL®是一种分离血液层的亲水性多糖,梯度离心会将血液分离为顶层血浆、然后是一层PBMC、以及多形核细胞(如中性粒细胞和嗜酸性粒细胞)和红细胞的底层部分。

[0239] 为了测试如本文所公开而生成的肽疫苗的效率,对源自患者的肿瘤类器官进行免疫浸润测定。简要地,在超低亲和力(ULA)板中培养从原始标本中分离的肿瘤细胞以形成3D结构(类器官)。已知类器官概括了来源组织的表型特征,包括抗原潜力。在将PBMC与源自同一患者的肿瘤类器官共培养后,通过z-堆叠成像对PBMC浸润至类器官中的水平进行量化。

[0240] PBMC用Invitrogen CELLTRACKER™ CM-DiI染色,这是一种红色荧光染料,非常适合于监测多代细胞的运动或位置以促进对类器官中的PBMC浸润进行定量。对类器官施用以下处理:1)PBMC;2)PBMC+IL-2;3)PBMC+IL-2+肽疫苗(“PEP”);4)PBMC+DMSO(载体)。在施用后24小时和48小时,对类器官中的PBMC浸润进行定量。如图13中的条形图所示,仅24小时后,PBMC与IL-2和肽组合就显示出对类器官的显著浸润。

[0241] 实施例7.肽疫苗研究

[0242] 评估如本文所公开而产生的肽疫苗的安全性和疗效的研究在图14中概述。研究在晚期或转移性癌症患者中进行,关键纳入标准和关键排除标准在图14中列出。研究具有以下目标:

- [0243] • 评估施用多肽疫苗的安全性;
- [0244] • 观察抗肿瘤活性,如通过客观应答率(ORR)和临床获益率(CBR)所评价的;
- [0245] • 评估任何观察到的应答的持续时间(DOR);
- [0246] • 评估所有入组患者的无进展生存期(PFS)和总生存期(OS);
- [0247] • 通过评估数项标准来表征疫苗诱导的免疫应答,所述标准包括疫苗处理之前、期间和之后外周血中的抗原特异性CD8+和CD4+T细胞应答;

[0248] • 评估外周血和肿瘤活检中的探索性生物标记物,如程序性死亡配体1 (PD-L1) 的表达、肿瘤浸润性淋巴细胞 (TIL) 和髓样细胞的丰度和表型、体细胞突变负荷和新抗原负荷。

[0249] 用肽疫苗处理的持续时间将为约12周。在疫苗处理期间,将进行安全性、功能性和免疫学评价。安全性和功能性评价将在最后一次给药后30天 (± 7 天) 进行。

[0250] 虽然已经结合其具体实施例描述了本发明,但将理解的是,本发明能够进一步修改,并且本申请旨在涵盖一般地遵循本公开的原理的本发明的任何变化、使用或改编,并且包括在本发明所属领域内的已知或惯常实践范围内、并且可以应用上文列出的基本特征的对本发明的偏离。

序列表

<110> 转化基因组学研究所

<120> 用于新抗原疫苗的方法和化合物

<130> 91482.255W0-PCT

<150> US 63/166,697

<151> 2021-03-26

<160> 54

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 新抗原

<400> 1

Lys	Ala	Glu	Ile	Leu	Ser	Ser	Leu	Gly	Ala	Leu	Tyr	Tyr	Asn	Thr
1				5				10					15	

<210> 2

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 新抗原

<400> 2

Pro	His	Gly	Tyr	Glu	Ile	Lys	Phe	Ile	Phe	Gly	Ile	Pro	Leu	Asp
1				5				10					15	

<210> 3

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 新抗原

<400> 3

Ile	Arg	Glu	Asn	Phe	Leu	Phe	Leu	Asp	Val	Phe	Phe	Glu	Ala	Leu
1				5				10					15	

<210> 4

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 新抗原

<400> 4

Gln His Asp Lys Glu Gln Lys Met Ile Gly Ser Val Ser Gln Ser

1 5 10 15

<210> 5

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 新抗原

<400> 5

Gln Glu Asn Thr Cys Asn Ile Thr Ile Glu Gly Leu Asp Ala Glu

1 5 10 15

<210> 6

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 新抗原

<400> 6

Val Glu Asp Pro Val Tyr Gln Val Ile Ser Glu Thr Ser Arg Asp

1 5 10 15

<210> 7

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 新抗原

<400> 7

Leu Gly Phe Phe Lys Gln Asn Glu His Gln Asn Leu Leu Phe Val

1 5 10 15

<210> 8

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 新抗原

<400> 8

Thr Lys Phe Ile Leu Val Glu Phe Pro Gly Ser Leu Ser Met Arg
1 5 10 15

<210> 9

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 新抗原

<400> 9

Ile Leu Leu Glu Asn Thr Asp Leu Ser Ala Leu Trp Tyr Leu Tyr
1 5 10 15

<210> 10

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 新抗原

<400> 10

Ser Glu Lys Leu Ser His Leu Lys Ile Thr Gly Asp Ser Phe Leu
1 5 10 15

<210> 11

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 新抗原

<400> 11

Lys Gln Glu Phe Val Lys Pro Lys Ile Val Ser Arg Glu Gly Gly
1 5 10 15

<210> 12

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 新抗原

<400> 12

Asp Cys Phe Ser Thr Asn Lys Leu Leu Thr Tyr Glu Ala Leu Gly
1 5 10 15

<210> 13

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 新抗原

<400> 13

Lys Ala Ile Glu Lys Glu Met Lys Val Thr Ala Leu Pro Pro Lys

1 5 10 15

<210> 14

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 新抗原

<400> 14

Asp Lys Glu Phe Val Lys Phe Asn Arg Met His Ala Val Asn Gly

1 5 10 15

<210> 15

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 新抗原

<400> 15

Ala Arg Ala Leu Ile Leu Leu Pro Thr Arg Glu Leu Ala Leu Gln

1 5 10 15

<210> 16

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 新抗原

<400> 16

Trp Gln Pro Gln Ser His Ser Arg Gln Gly His Gly Thr Ser Pro

1 5 10 15

<210> 17

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 新抗原

<400> 17

Ser Ile His Leu Leu Thr Ser Arg Ala Thr Asn Ser Gln Leu Phe

1 5 10 15

<210> 18

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 新抗原

<400> 18

Gln Val Ile Ala Leu His Cys Ser Gln Ala Gln Ser Ser Val Ser

1 5 10 15

<210> 19

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 新抗原

<400> 19

Leu Arg Cys Met Gly Asn Asn Gly Ile Cys Arg Ala Ser Cys Lys

1 5 10 15

<210> 20

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 新抗原

<400> 20

Trp Ile Thr Pro Leu Asp His Leu Val Ala Phe Pro Thr Arg Val

1 5 10 15

<210> 21

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 新抗原

<400> 21

Ala Ile Lys Thr Leu Lys Ser Gly His Met Asp Arg Gln Arg Arg

1 5 10 15

<210> 22

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 新抗原

<400> 22

Ala Leu Phe Asp Gly Asp Ser His Leu Ser Thr Glu Asn Pro Ala

1 5 10 15

<210> 23

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 新抗原

<400> 23

Pro Ser Pro Thr Val Leu Arg Ala His Ala Glu Met Ala Leu Asp

1 5 10 15

<210> 24

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 新抗原

<400> 24

Asp Met Leu Ser Gln Thr Asn Cys Phe Val Ser Leu Trp Leu Pro

1 5 10 15

<210> 25

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 空间占位物

<400> 25

Pro Val Ser Lys Met Arg Met Ala Thr Pro Leu Leu Met Gln Ala

1 5 10 15

<210> 26

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 空间占位物

<400> 26

Ala Ala Met Ala Ala Ala Ala Ala Ala Met Ala Ala

1 5 10

<210> 27

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 空间占位物

<400> 27

Ala Ala Met Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala

1 5 10

<210> 28

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 空间占位物

<400> 28

Ala Ala Phe Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala

1 5 10

<210> 29

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 空间占位物

<400> 29

Ala Ser Met Ser Ala Ala Ser Ala Ala Ser Met Ala Ala

1 5 10

<210> 30

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 空间占位物

<220>

<221> misc_feature

<222> (3) .. (3)

<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

<220>

<221> misc_feature

<222> (11) .. (11)

<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

<400> 30

Ala Ala Xaa Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Xaa Ala Ala

1

5

10

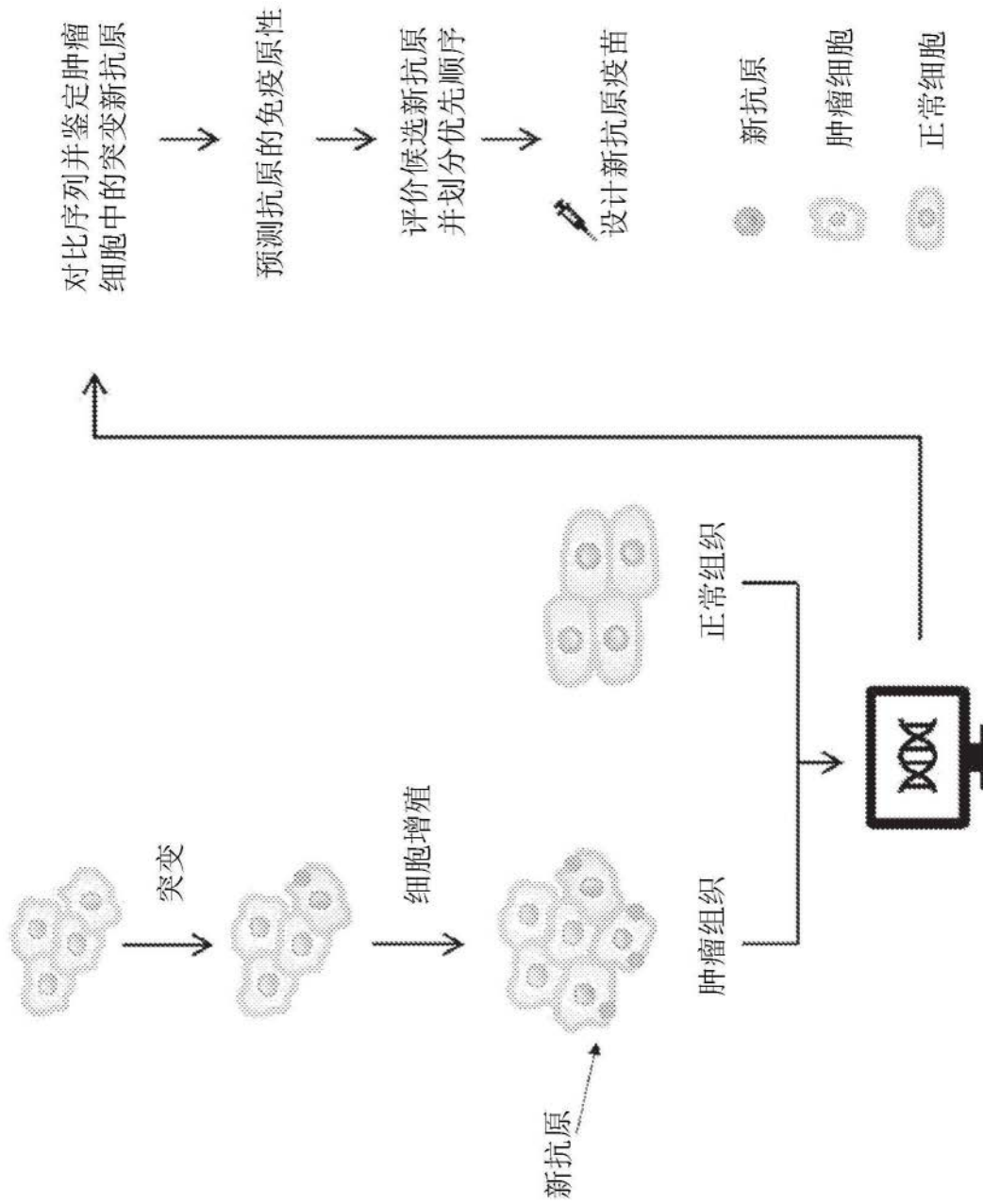


图1

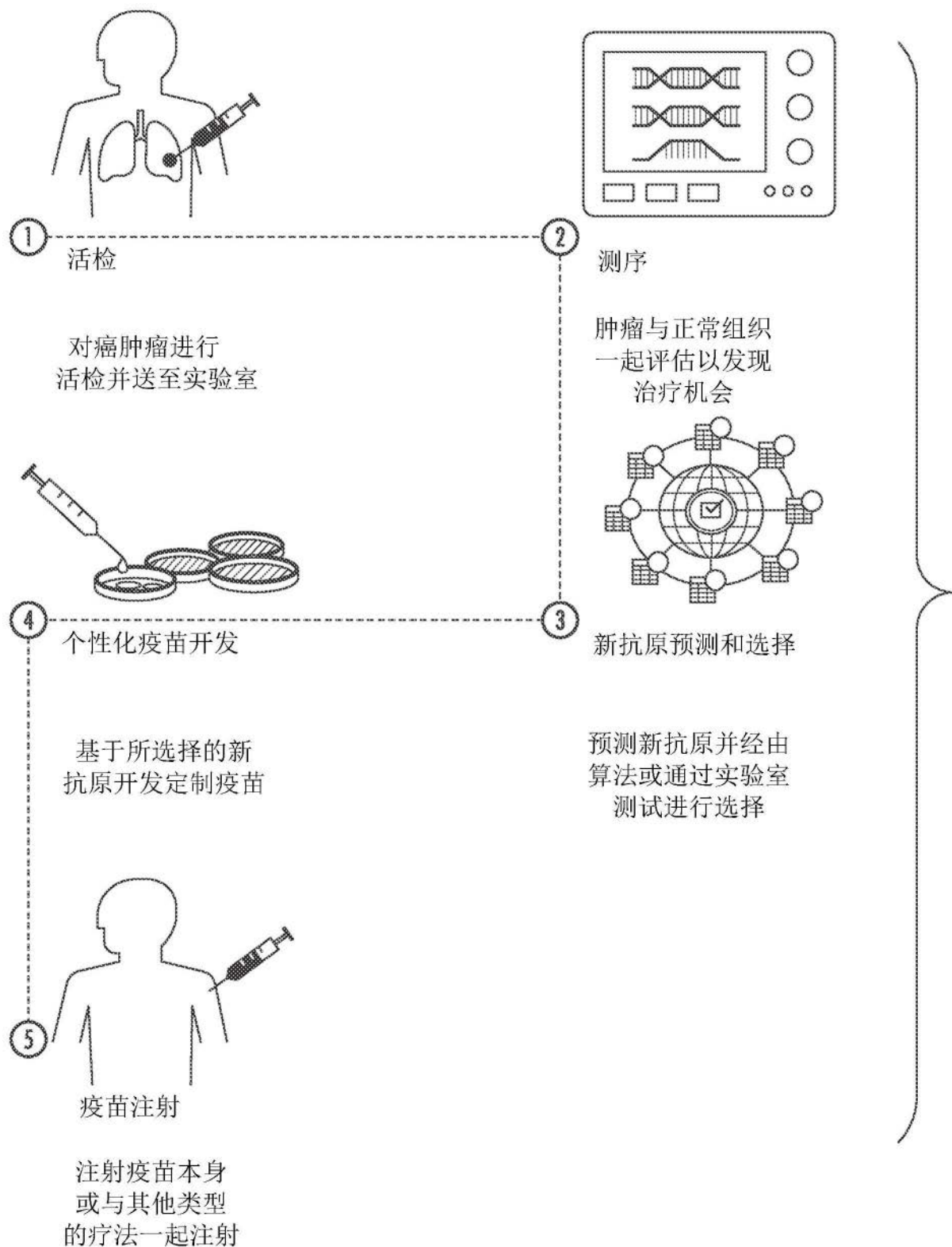


图2

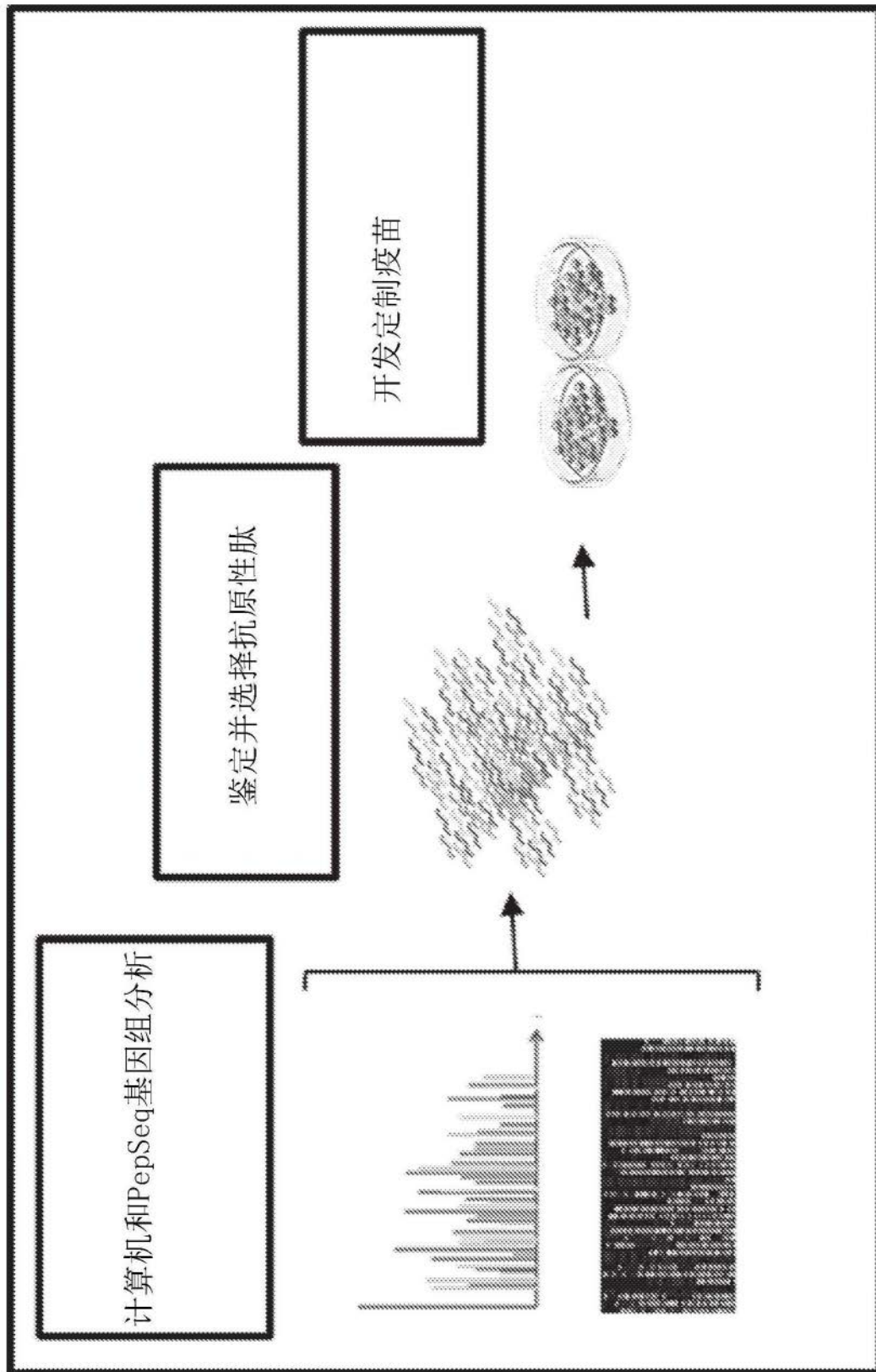


图2(续)

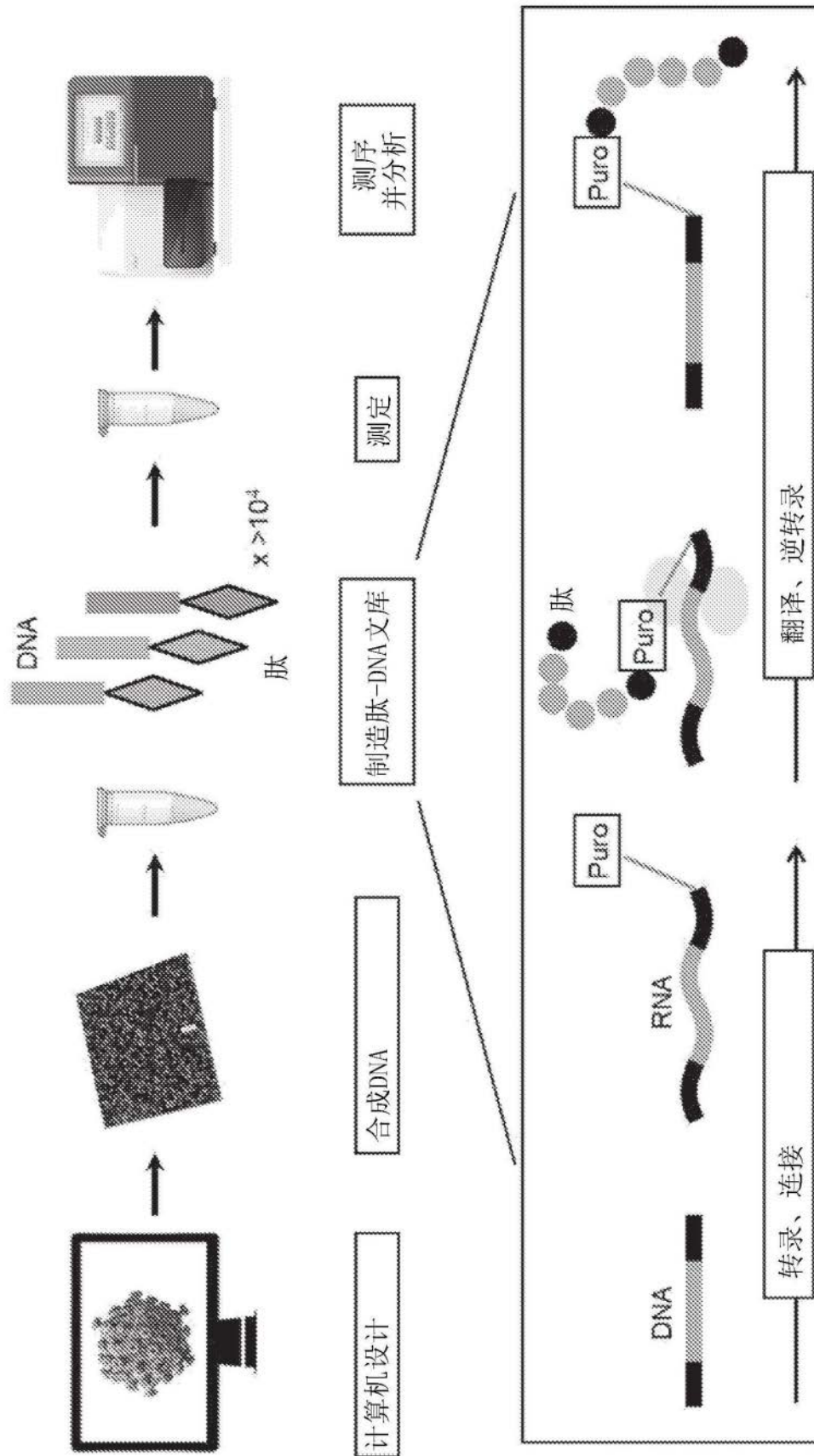


图3

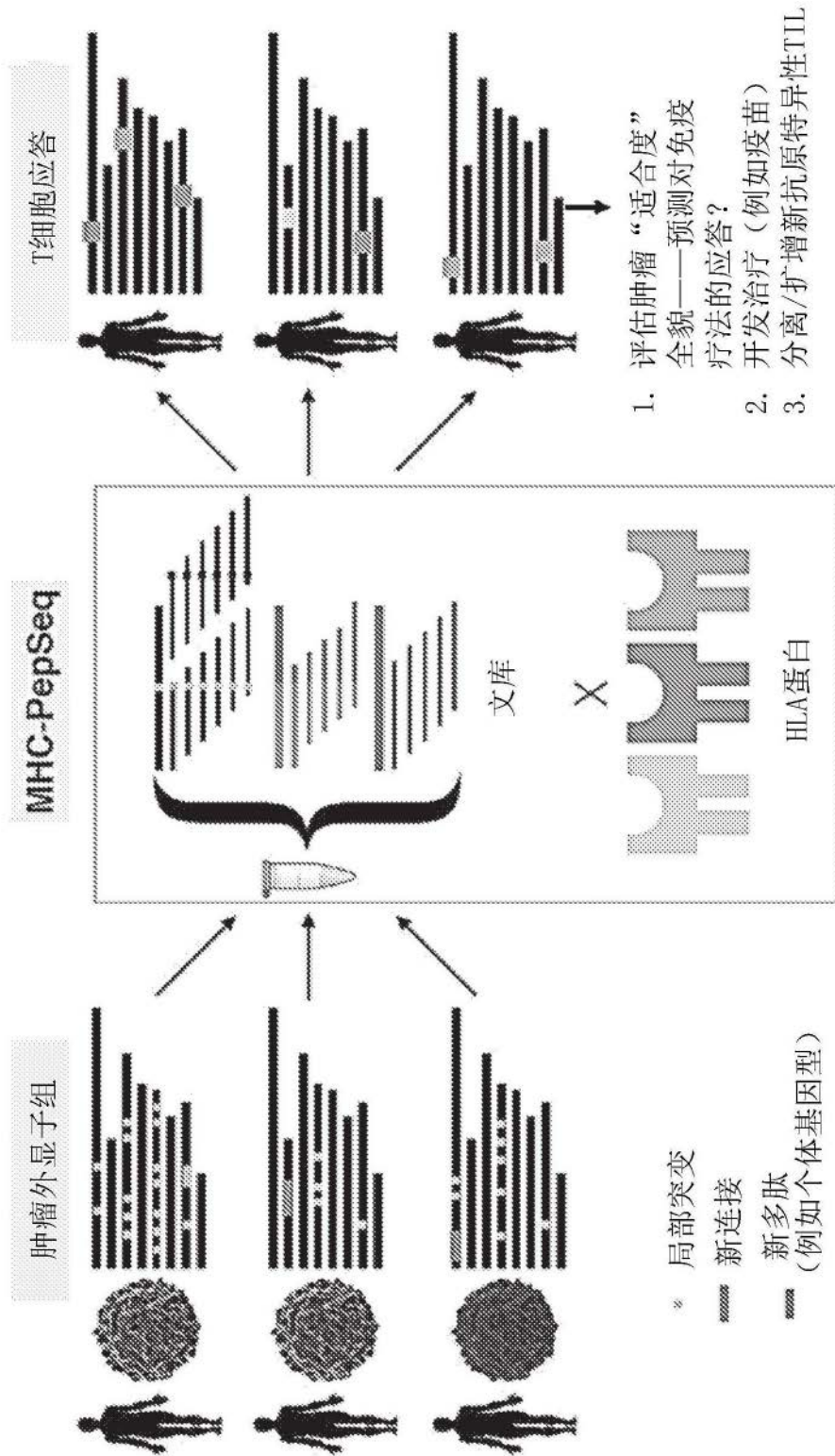


图4

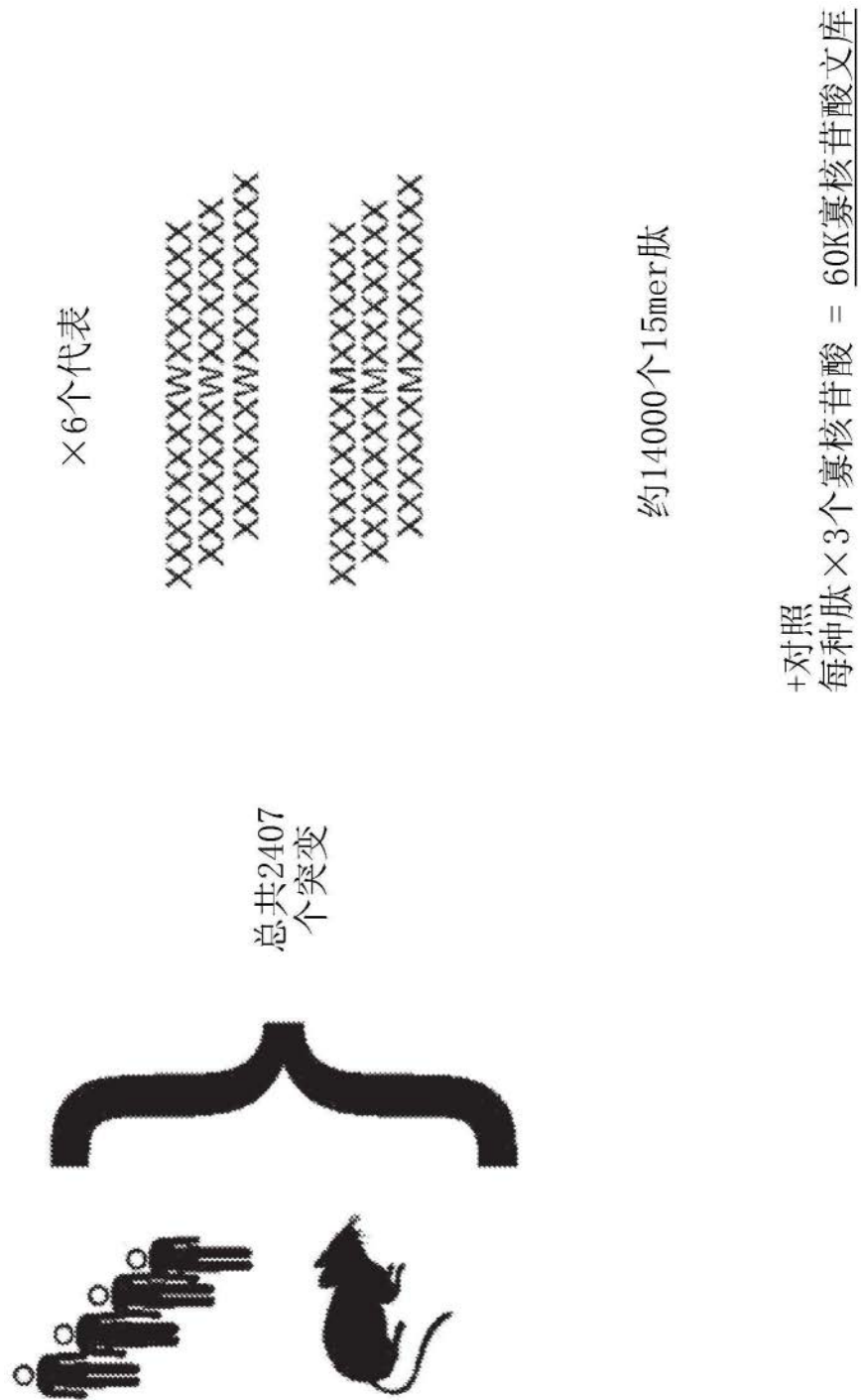


图5

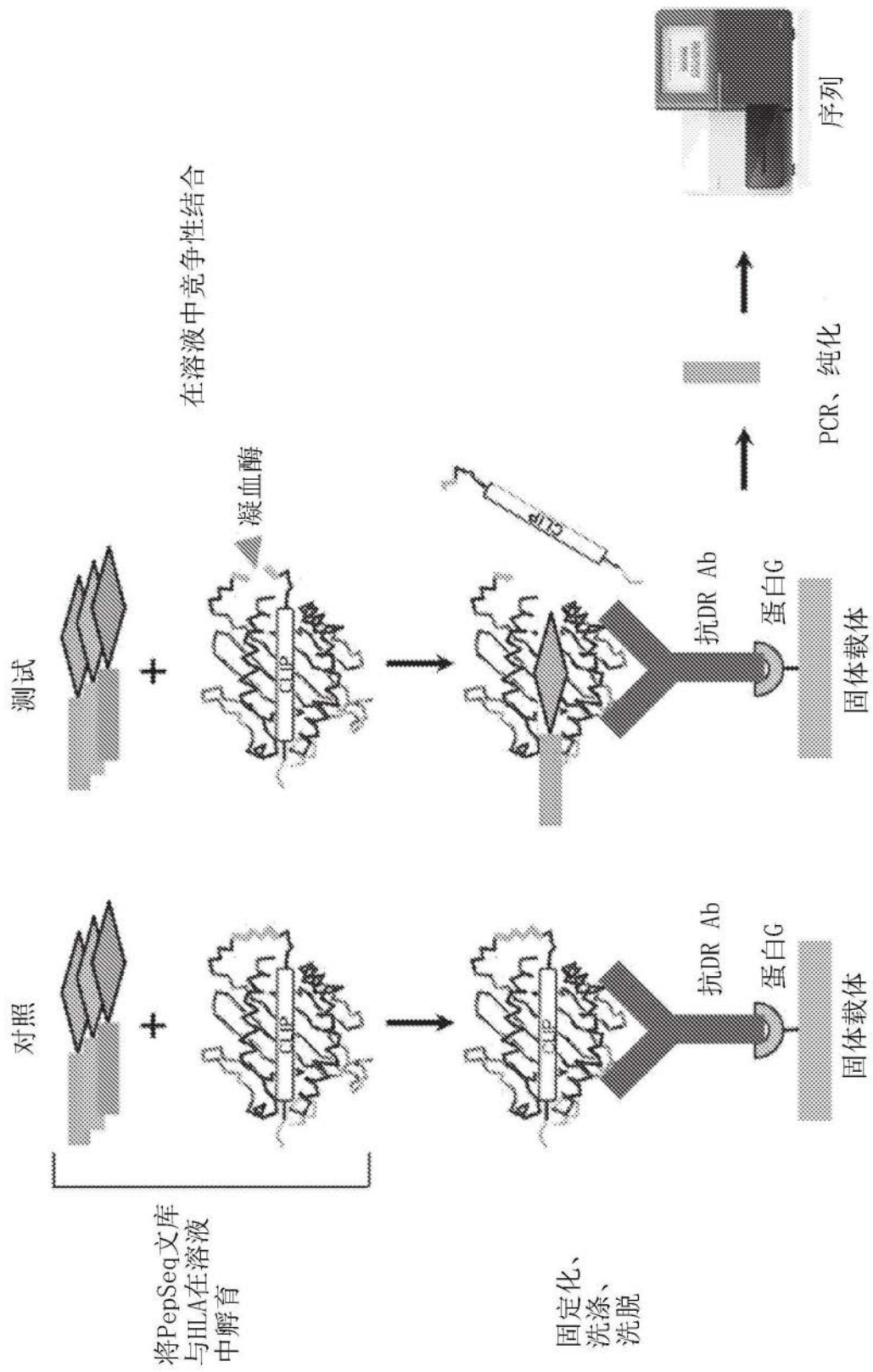


图6

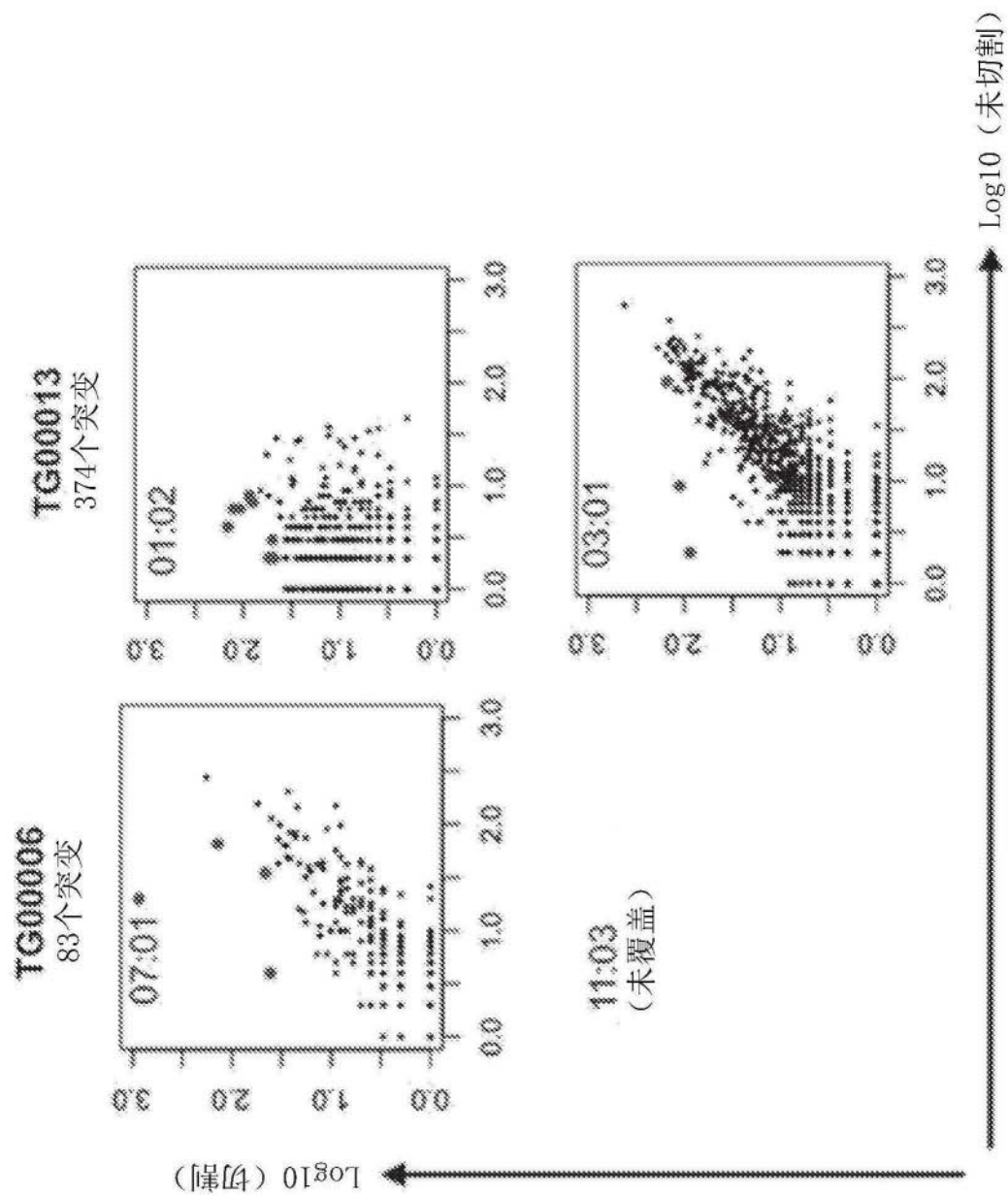


图7

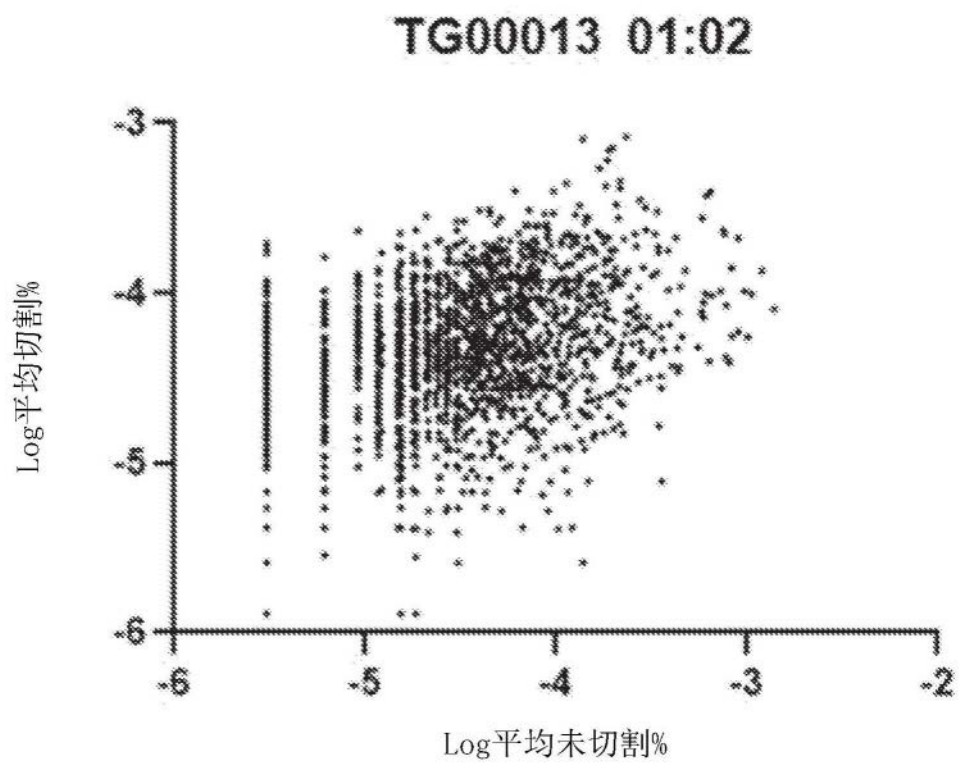


图8A

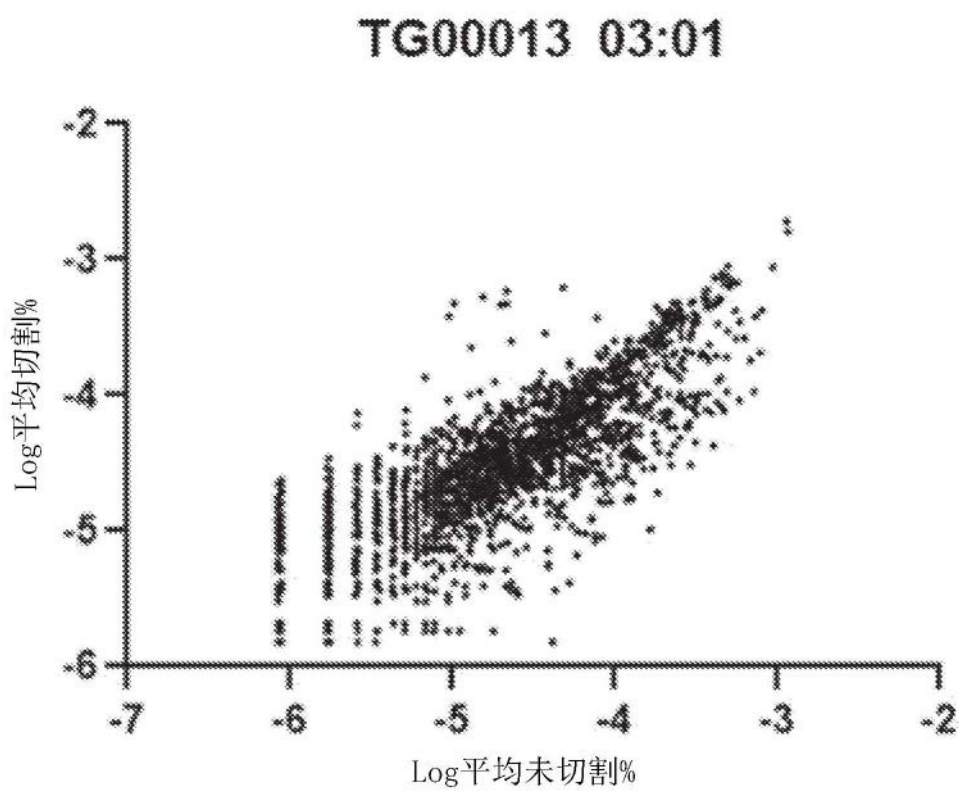


图8B

SEQ ID NO:	肽	变体ID	等位基因_1
1	KAEILSSLGAIYYNT	chr12 g.29670467G>A	HLA-A*01:01
2	PHGYEIKFIFGIPLD	chr7 g.100490061C>T	HLA-B*49:01
3	IRENFLFLDVFFEAL	chr2 g.220401801G>T	HLA-B*49:01
4	QHDKEQKMIGSVSQS	chr10 g.107022141G>A	HLA-B*49:01
5	QENTCNITIEGLDAE	chrX g.1317557C>T	HLA-B*49:01
6	VEDPVYQVISETSRD	chr1 g.57536673C>T	HLA-B*49:01
7	LGFFKQNEHQNLFFV	chr11 g.57982316G>A	HLA-B*49:01
8	TKFILVEFPGSLSMR	chr7 g.143701136G>A	HLA-B*49:01
9	ILLENTDLSALWYLY	chr8 g.56436242C>A	HLA-A*01:01
10	SEKLSHLKITGDSFL	chr10 g.127503689_127503689G>A	HLA-B*49:01
11	KQEFVKPKIVSREGG	chr14 g.23902797C>G	HLA-B*49:01
12	DCFSTNKLITYEALG	chr1 g.53446176G>A	HLA-A*01:01
13	KAIEKEMKVTALPPK	chr16 g.84432145A>T	HLA-B*49:01
14	DKEFVKFNRMHAVNG	chr11 g.93815720C>T	DRB1*01:02
15	ARALILPTRELALQ	chr12 g.113616994G>A	DRB1*01:02
16	WQPQSHSRQGHGTSP	chr20 g.62038446G>A	DRB1*01:02
17	SIHLTSRATNSQLF	chr8 g.134042224G>T	DRB1*01:02
18	QVIALHCSQAQSSVS	chrX g.91873700C>T	DRB1*01:02
19	LRCMGNGGICRASCK	chr20 g.29965209C>T	DRB1*01:02
20	WITPLDHLVAFPTRV	chr21 g.40765177G>A	DRB1*01:02
21	AIKTLKSGHMDRQRR	chr3 g.97251282G>A	DRB1*01:02
22	ALFDGDShLSTENPA	chr9 g.79320379G>A	DRB1*01:02
23	PSPTVLRAHAEMALD	chr9 g.95738854G>A	DRB1*01:02
24	DMLSQTNCFVSLWLP	chr15 g.42300052C>T	DRB1*03:01

图9

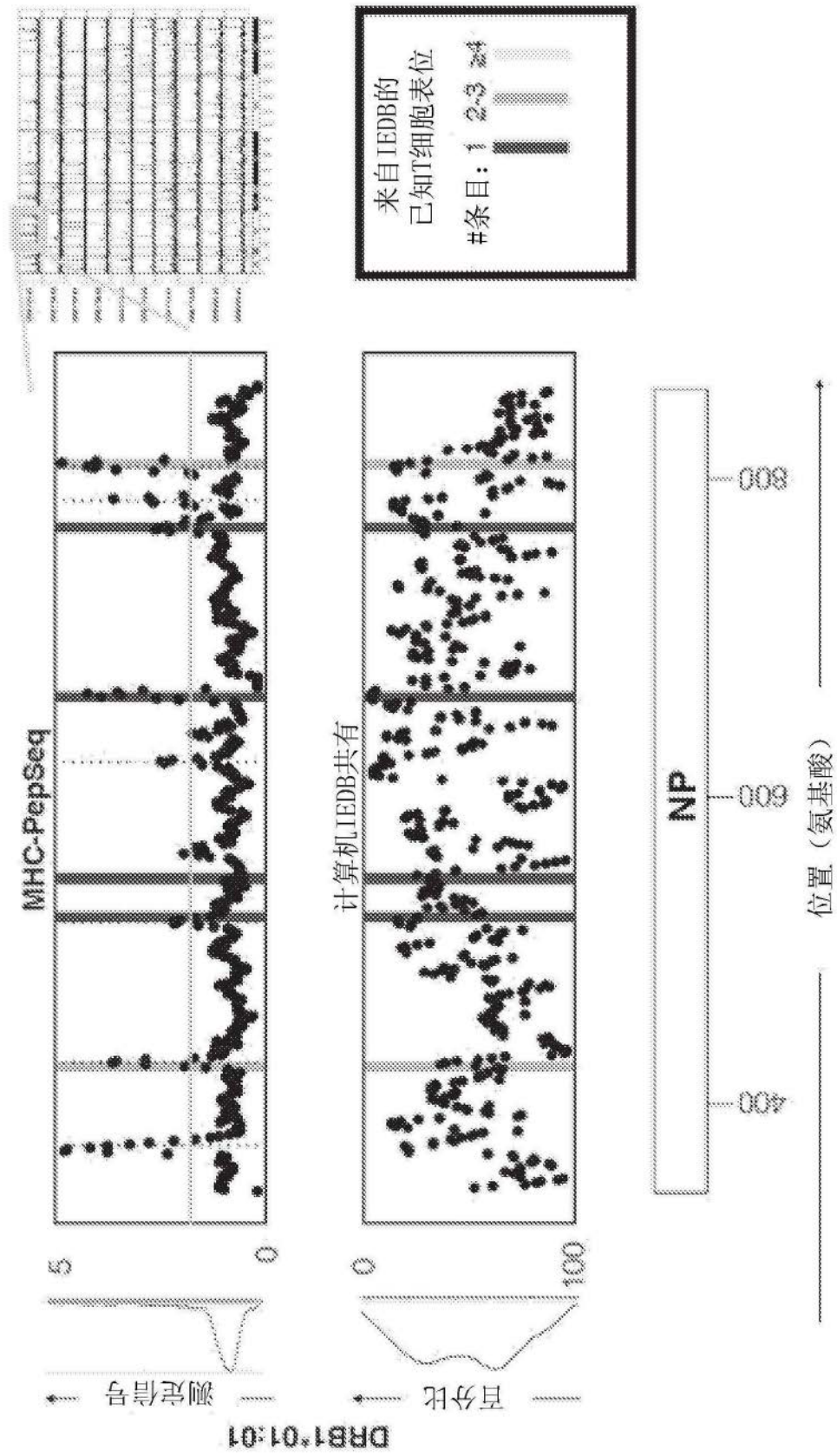


图10

TIL患者计数	肿瘤类型	TILs	类器官
1	肺癌	3.04×10^6	是
2	黑色素瘤	7.5×10^5	是
3	黑色素瘤	6.70×10^6	是
4	胰腺癌	4×10^5	是
5	胰腺癌	1.5×10^6	是
6	结直肠癌	9.65×10^5	是
7	胰腺癌	1×10^6	是
8	胰腺癌	9.53×10^5	是
9	胃癌	1.10×10^6	是
10	结直肠癌	5.88×10^6	是
11	结直肠癌	2.115×10^6	是
12	结直肠癌	8.54×10^5	是
13	葡萄膜黑色素瘤	1.1×10^6	是
14	胰腺癌	3×10^5	是
15	黑色素瘤	3.5×10^6	是
16	基底细胞癌	6.33×10^6	是
17	梅克尔细胞癌	6.33×10^7	是
18	胆管癌	6.33×10^8	是

图11

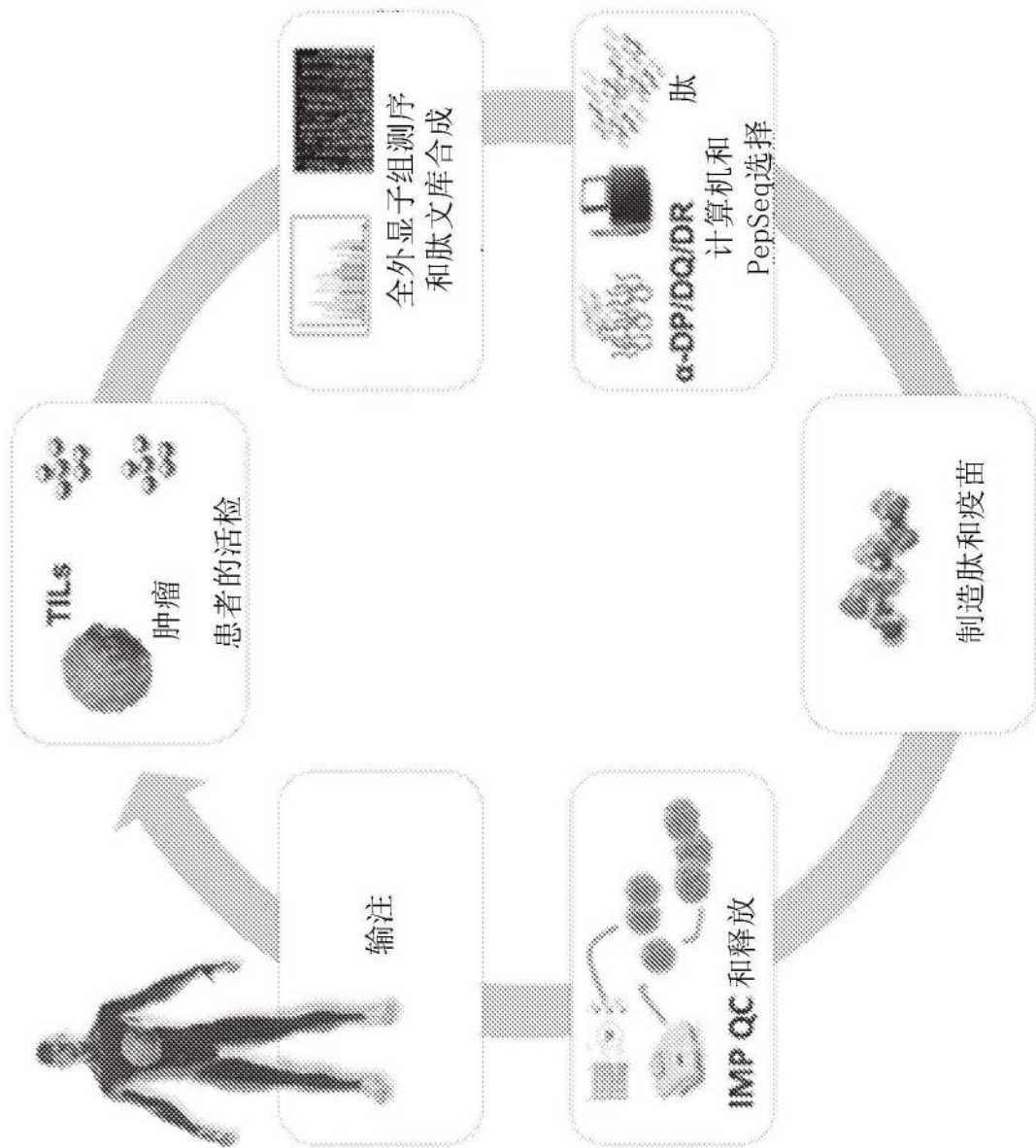
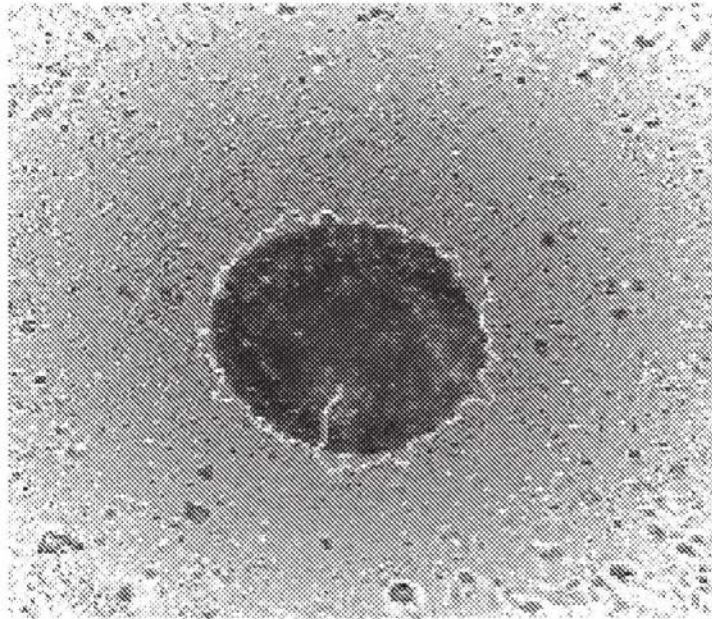


图12

PBMCs



PBMCs+IL-2

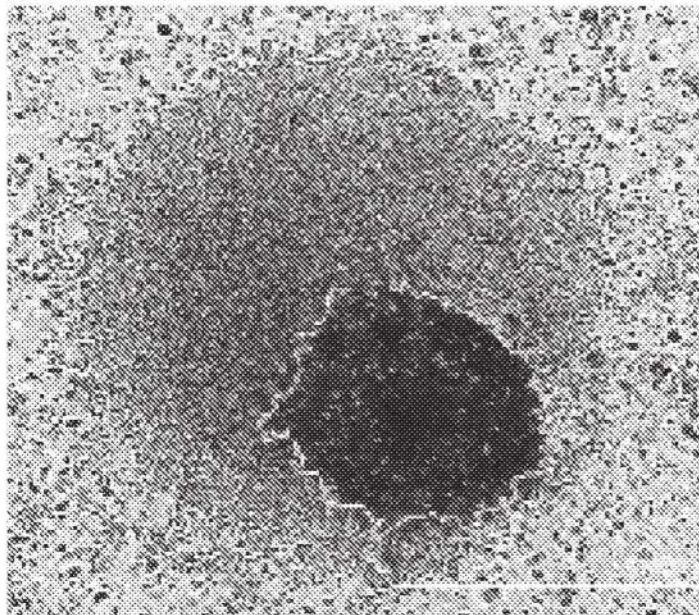
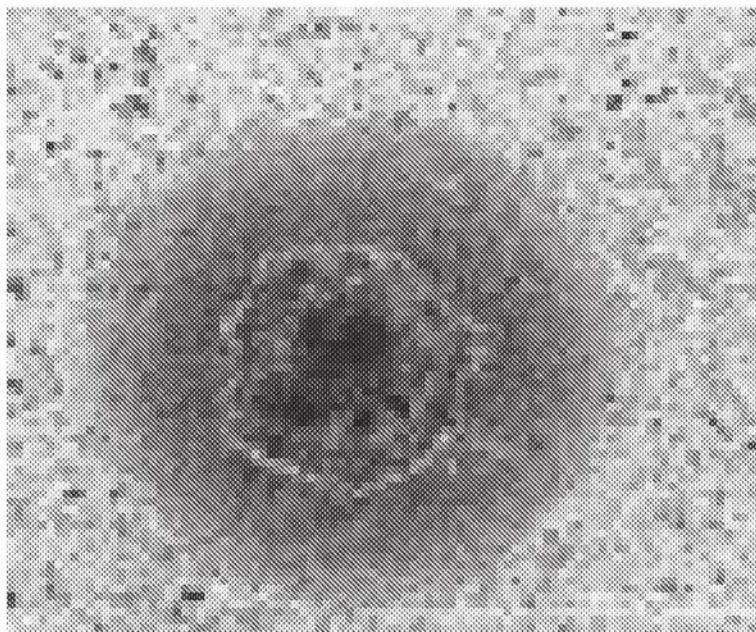


图13

PBMCs+Pep+IL2



PBMCs+DMSO

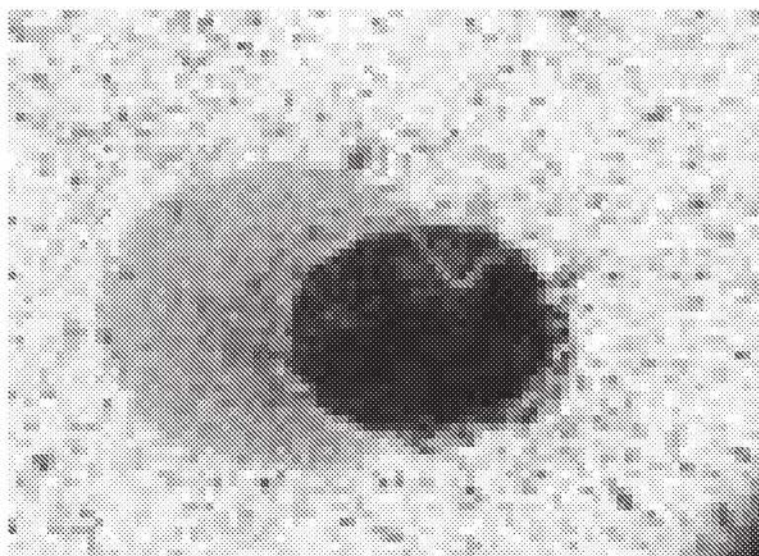


图13(续)

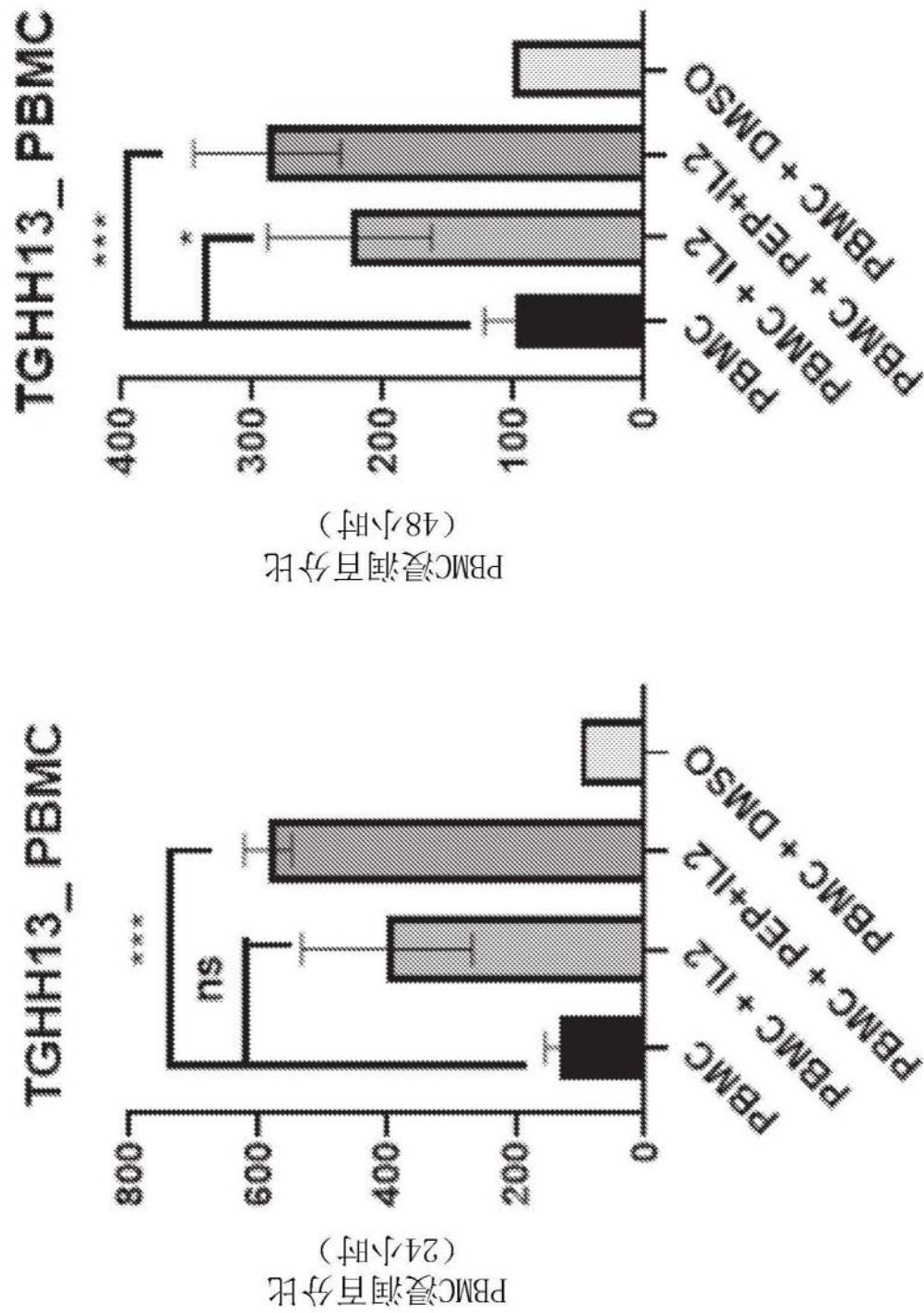


图13(续)

一项 Ph2 多中心篮子研究，旨在评价新型肽疫苗在先前 PD-1 免疫疗法后具有稳定疾病的转移性黑色素瘤、头颈癌、非小细胞肺癌（NSCLC）和肾癌患者中的疗效和安全性

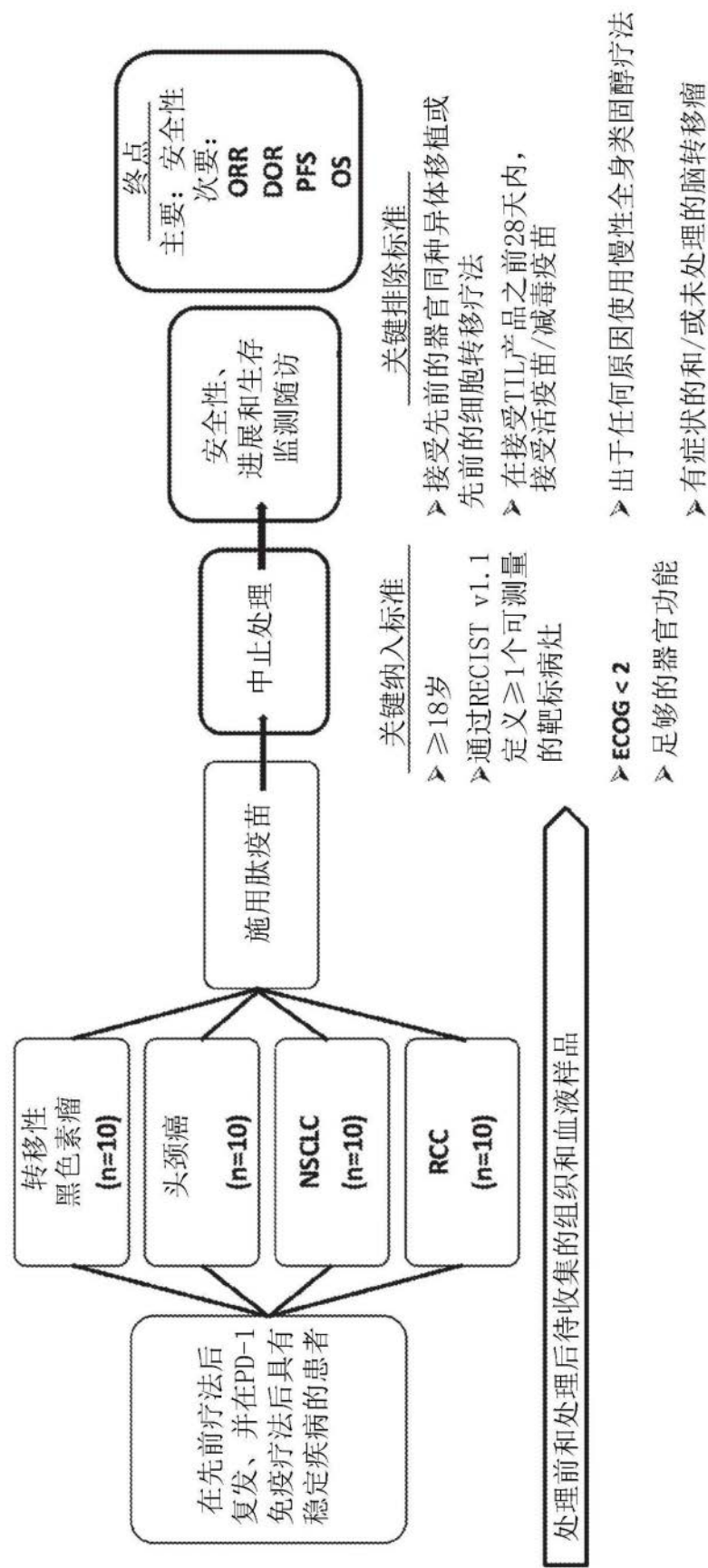


图14