



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112638408 A

(43) 申请公布日 2021.04.09

(21) 申请号 201980057381.8

(74) 专利代理机构 北京品源专利代理有限公司
11332

(22) 申请日 2019.09.04

代理人 刘明海 宁涛

(30) 优先权数据

18192782.3 2018.09.05 EP

19150251.7 2019.01.03 EP

(51) Int.Cl.

A61K 39/00 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.03.02

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2019/073564 2019.09.04

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/049036 EN 2020.03.12

(71) 申请人 万科斯蒙股份有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72) 发明人 海因茨·卢本奥

权利要求书2页 说明书27页

序列表22页 附图2页

(54) 发明名称

用于联合疗法的靶向新抗原的DNA疫苗

(57) 摘要

本发明涉及伤寒沙门氏菌Ty21a菌株,和至少一种工程化T细胞、NKT细胞或NK细胞,联合用于治疗受试者的实体瘤,其中所述伤寒沙门氏菌Ty21a菌株包含DNA分子,所述DNA分子包含至少一个真核表达盒,所述至少一个真核表达盒编码至少一种多肽,所述至少一种多肽包含五种或更多种新抗原,所述至少一种工程化T细胞、NKT细胞或NK细胞包含至少一种肿瘤抗原结合细胞表面受体。

1. 一种用于治疗受试者的实体瘤的伤寒沙门氏菌Ty21a菌株,其包含DNA分子,所述DNA分子包含至少一个真核表达盒,所述至少一个真核表达盒编码至少一种多肽,所述至少一种多肽包含五种或更多种新抗原,其中所述受试者已经或正在用包含至少一种肿瘤抗原结合细胞表面受体的至少一种工程化T细胞、NKT细胞或NK细胞治疗。

2. 根据权利要求1或2所使用的伤寒沙门氏菌Ty21a菌株,其中所述五种或更多种新抗原是在所述受试者的实体瘤中鉴定的肿瘤特异性抗原。

3. 根据前述权利要求中任一项所使用的伤寒沙门氏菌Ty21a菌株,其中所述五种或更多种新抗原包括

(a) CD8 T细胞抗原;或

(b) CD8和CD4 T细胞抗原。

4. 根据前述权利要求中任一项所使用的伤寒沙门氏菌Ty21a菌株,其中所述治疗还包括施用至少一种检查点抑制剂。

5. 根据权利要求4所使用的伤寒沙门氏菌Ty21a菌株,其中,所述至少一种检查点抑制剂选自自由以下组成的组:抗PD-1、PD-L1、CTLA-4、IDO、GITR、OX40、TIM-3、LAG-3、KIR、CSF1R和CD137抗体。

6. 根据前述权利要求中任一项所使用的伤寒沙门氏菌Ty21a菌株,其中所述包含至少一种肿瘤抗原结合细胞表面受体的至少一种工程化T细胞、NKT细胞或NK细胞是嵌合抗原受体(CAR)-T细胞、CAR-NKT细胞或CAR-NK细胞。

7. 根据前述权利要求中任一项所使用的伤寒沙门氏菌Ty21a菌株,其中将在所述包含至少一种肿瘤抗原结合细胞表面受体的至少一种工程化T细胞、NKT细胞或NK细胞的过继细胞转移之后,施用所述伤寒沙门氏菌Ty21a菌株。

8. 根据权利要求7所使用的伤寒沙门氏菌Ty21a菌株,其中将在

(a) 所述包含至少一种肿瘤抗原结合细胞表面受体的至少一种工程化T细胞、NKT细胞或NK细胞的第一次过继细胞转移之后约两周至4个月时;或

(b) 所述包含至少一种肿瘤抗原结合细胞表面受体的至少一种工程化T细胞、NKT细胞或NK细胞的第一次过继细胞转移之后约2至3个月时,

施用所述伤寒沙门氏菌Ty21a菌株。

9. 根据前述权利要求中任一项所使用的伤寒沙门氏菌Ty21a菌株,其中在所述包含至少一种肿瘤抗原结合细胞表面受体的至少一种工程化T细胞、NKT细胞或NK细胞的过继细胞转移之前,所述受试者已经经过了淋巴细胞清除化疗。

10. 根据权利要求9所使用的伤寒沙门氏菌Ty21a菌株,其中在淋巴细胞和/或白细胞计数正常后施用所述伤寒沙门氏菌Ty21a菌株。

11. 根据前述权利要求中任一项所使用的伤寒沙门氏菌Ty21a菌株,其中所述伤寒沙门氏菌Ty21a菌株待口服施用。

12. 根据前述权利要求中任一项所使用的伤寒沙门氏菌Ty21a菌株,其中所述治疗还包括施用至少一种伤寒沙门氏菌Ty21a菌株,所述伤寒沙门氏菌Ty21a菌株包含DNA分子,所述DNA分子包含至少一个真核表达盒,所述至少一个真核表达盒编码至少一种抗原,所述至少一种抗原选自自由以下组成的组:人肾母细胞瘤蛋白(WT1)、人间皮素(MSLN)、人CEA、CMV pp65、人PD-L1、VEGFR-2和人成纤维细胞活化蛋白(FAP)。

13. 根据前述权利要求中任一项所使用的伤寒沙门氏菌Ty21a菌株,其中所述实体瘤选自结肠直肠癌、胰腺癌、肺癌、卵巢癌、间皮瘤、成胶质细胞瘤、胃癌、肝细胞癌、肾细胞癌、前列腺癌、宫颈癌、乳腺癌和黑素瘤。

14. 根据前述权利要求中任一项所使用的伤寒沙门氏菌Ty21a菌株,其中

(a) 单剂量的伤寒沙门氏菌Ty21a菌株包含约 10^6 至约 10^{10} ,更特别约 10^6 至约 10^9 ,更特别约 10^6 至约 10^8 ,最特别约 10^7 至约 10^8 个菌落形成单位(CFU);和/或

(b) 其中,在第1周施用所述伤寒沙门氏菌Ty21a菌株2至4次,然后每2至4周单剂量强化施用。

15. 根据前述权利要求中任一项所使用的伤寒沙门氏菌Ty21a菌株,其中所述伤寒沙门氏菌Ty21a菌株是药物组合物的形式,还包含至少一种药学上可接受的赋形剂。

用于联合疗法的靶向新抗原的DNA疫苗

技术领域

[0001] 本发明涉及伤寒沙门氏菌Ty21a菌株,和至少一种工程化T细胞、NKT细胞或NK细胞,联合用于治疗受试者的实体瘤,其中所述伤寒沙门氏菌Ty21a菌株包含DNA分子,所述DNA分子包含至少一个真核表达盒,所述至少一个真核表达盒编码至少一种多肽,所述至少一种多肽包含五种或更多种新抗原,所述至少一种工程化T细胞、NKT细胞或NK细胞包含至少一种肿瘤抗原结合细胞表面受体。

背景技术

[0002] 肿瘤可以是免疫原性的这一发现致使开发了许多癌症免疫疗法,这些癌症免疫疗法被设计成使用免疫系统来选择性地消除恶性细胞,同时保留正常组织。然而,仅接种抗肿瘤抗原的疫苗所带来的存活益处仍然不大。抗癌疫苗面临诸多挑战,其中之一是免疫抑制微环境。肿瘤脉管系统异常产生了低氧微环境,使炎性细胞趋向免疫抑制。此外,肿瘤通过分泌生长因子和细胞因子来系统地改变免疫细胞的增殖、分化和功能。

[0003] 为了治愈癌症,彻底根除癌症干细胞是至关重要的。人类肿瘤的多种免疫逃避机制仍然是癌症免疫治疗中的主要挑战。因此,非常需要改进的癌症疗法,包括联合癌症疗法,但迄今为止尚未得到满足。

[0004] 近来已经证明,用重编程的T细胞,例如CAR-T细胞和CAR-NKT细胞,以及重编程的NK细胞(CAR-NK细胞)对癌症进行过继细胞疗法是有前景的。尽管在最初的尝试中,治疗了受各种实体瘤和液体瘤影响的患者,但仅靶向B细胞血液学肿瘤的CAR-T细胞疗法取得了突破。FDA最近批准了两种抗CD19修饰的T细胞免疫疗法,即KYMRIAH(tisagenlecleucel)和YESCARTA(aticabtagene ciloleucel)。但是,尽管CAR-T细胞疗法可以有效地针对某些血液癌,但针对普通实体瘤的疗效却不高,特别是很少出现持久的完全应答。

[0005] 虽然迄今为止,主要的重点是改善CAR-T细胞,但将CAR转移到除常规 α T细胞之外的其他细胞类型,例如 γ δ T细胞、自然杀伤性T(NKT)细胞和自然杀伤性(NK)细胞中,已变得越来越重要。

[0006] 在癌症治疗中引起关注的另一种免疫治疗方法是针对癌症的疫苗接种。尽管有多种针对癌症进行免疫的方法,但是一种非常有前途的方法是使用诸如沙门氏菌的细菌作为抗肿瘤抗原或基质抗原的DNA疫苗的载体。例如,WO2014/005683公开了一种用于癌症免疫疗法特别是用于治疗胰腺癌的沙门氏菌减毒菌株,其包含编码VEGF受体蛋白的重组DNA分子。

[0007] 此外,WO 2014/173542和WO 2015/090584公开了一种用于癌症免疫治疗的沙门氏菌减毒株,所述沙门氏菌减毒株包含编码肾母细胞瘤蛋白(WT1)或间皮素的重组DNA分子。

[0008] WO 2013/09189公开了一种用于培养缺乏半乳糖差向异构酶活性并含有重组DNA分子的伤寒沙门氏菌减毒突变菌株的方法,并且WO 2018/011289公开了一种快速且有效的产生包含沙门氏菌减毒株的个性化癌症疫苗的方法。

[0009] 发明目的

[0010] 鉴于现有技术,本发明的目的在于提供新型癌症疗法。这种新型疗法将为改善具有实体瘤的癌症患者的治疗选择提供主要肿瘤优势。

发明内容

[0011] 在一个方面,本发明涉及一种用于治疗受试者的实体瘤的伤寒沙门氏菌Ty21a菌株,其包含DNA分子,所述DNA分子包含至少一个真核表达盒,所述至少一个真核表达盒编码至少一种多肽,所述至少一种多肽包含五种或更多种新抗原,其中所述受试者已经或正在用包含至少一种肿瘤抗原结合细胞表面受体的至少一种工程化T细胞、NKT细胞或NK细胞治疗。

[0012] 在另一方面,本发明涉及伤寒沙门氏菌Ty21a菌株与包含至少一种肿瘤抗原结合细胞表面受体的至少一种工程化T细胞、NKT细胞或NK细胞联合,用于治疗受试者的实体瘤,所述伤寒沙门氏菌Ty21a菌株包含DNA分子,所述DNA分子包含至少一个真核表达盒,所述至少一个真核表达盒编码至少一种多肽,所述至少一种多肽包含五种或更多种新抗原。

[0013] 根据本发明,所述至少五种或更多种新抗原是在所述受试者的实体瘤中鉴定的肿瘤特异性抗原。优选地,所述五种或更多种新抗原包括CD8 T细胞抗原或CD8和CD4 T细胞抗原。在一个实施方案中,所述至少一种多肽包含10种或更多种,优选20种或更多种新抗原,优选30种或更多种新抗原,优选50种或更多种新抗原。在另一个实施方案中,所述至少一种多肽包含5至300种新抗原,10至300种新抗原,20至300种新抗原,优选30至300种新抗原,优选50至300种新抗原。在又一个实施方案中,所述至少一种多肽包含10至200种新抗原,10至200种新抗原,20至200种新抗原,优选30至200种新抗原,优选50至200种新抗原。

[0014] 伤寒沙门氏菌Ty21a菌株可以进一步包含DNA分子,所述DNA分子编码至少一种多肽,所述至少一种多肽包含不是新抗原的肿瘤特异性抗原和/或肿瘤相关抗原,其中所述不是新抗原的肿瘤特异性抗原和/或肿瘤相关抗原在所述实体瘤中表达,其中所述包含不是新抗原的肿瘤特异性抗原和/或肿瘤相关抗原的至少一种多肽是(a)由同一DNA分子编码,所述同一DNA分子包含至少一个真核表达盒,所述至少一个真核表达盒编码至少一种多肽,所述至少一种多肽包含五种或更多种新抗原,或者由另外的单独的DNA分子编码,(b)是由编码所述包含五种或更多种新抗原的至少一种多肽的至少一个真核表达盒编码,或者由另一个单独的表达盒编码;或者(c)是所述包含五种或更多种新抗原的至少一种多肽,或者另外的单独的多肽。

[0015] 根据本发明,伤寒沙门氏菌Ty21a菌株可以与至少一种检查点抑制剂共同施用。优选地,所述至少一种检查点抑制剂选自由以下组成的组:抗PD-1、PD-L1、CTLA-4、IDO、GITR、OX40、TIM-3、LAG-3、KIR、CSF1R和CD137抗体。

[0016] 包含至少一种肿瘤抗原结合细胞表面受体的至少一种工程化T细胞、NKT细胞或NK细胞可以是包含嵌合抗原受体(CAR)的T细胞、NKT细胞或NK细胞,也分别称为嵌合抗原受体(CAR)-T细胞、CAR-NKT细胞或CAR-NK细胞。在一个实施方案中,将在包含至少一种肿瘤抗原结合细胞表面受体的至少一种工程化T细胞、NKT细胞或NK细胞的过继细胞转移之后,施用伤寒沙门氏菌Ty21a菌株。优选地,将在包含至少一种肿瘤抗原结合细胞表面受体的至少一种工程化T细胞、NKT细胞或NK细胞的第一次过继细胞转移之后约2周至4个月时,优选2至3个月时,施用伤寒沙门氏菌Ty21a菌株。

[0017] 在一个实施方案中,在包含至少一种肿瘤抗原结合细胞表面受体的至少一种工程化T细胞、NKT细胞或NK细胞的过继细胞转移之前,受试者已经经受了淋巴细胞清除化疗。在这种情况下,需要治疗的受试者免疫力低下,在施用伤寒沙门氏菌Ty21a菌株之前,需要使淋巴细胞和/或白细胞计数正常。

[0018] 根据本发明,所述伤寒沙门氏菌Ty21a菌株可以与至少一种伤寒沙门氏菌Ty21a菌株共同施用,前者伤寒沙门氏菌Ty21a菌株包含DNA分子,所述DNA分子包含至少一个真核表达盒,所述至少一个真核表达盒编码至少一种多肽,所述至少一种多肽包含五种或更多种新抗原;后者伤寒沙门氏菌Ty21a菌株包含DNA分子,所述DNA分子包含至少一个真核表达盒,所述至少一个真核表达盒编码肿瘤抗原、肿瘤基质抗原和/或检查点抑制剂抗原,优选选自:人肾母细胞瘤蛋白(WT1)、人间皮素(MSLN)、人CEA、CMV pp65、人PD-L1、VEGFR-2和人成纤维细胞活化蛋白(FAP)。更具体地,VEGFR-2可以包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列或与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列,WT1可以包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列或与SEQ ID NO:3的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列,MSLN可以包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列或与SEQ ID NO:4的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列;人CEA可以包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列或与SEQ ID NO:5的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列;CMV pp65可以包含SEQ ID NO:6、7或8的氨基酸序列或与SEQ ID NO:6、7或8的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列;和/或,人PD-L1可以包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列或与SEQ ID NO:9的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。

[0019] 在一个实施方案中,伤寒沙门氏菌Ty21a菌株是药物组合物的形式,并且可以进一步包含至少一种药学上可接受的赋形剂,其中所述伤寒沙门氏菌Ty21a菌株包含DNA分子,所述DNA分子包含至少一个真核表达盒,所述至少一个真核表达盒编码至少一种多肽,所述至少一种多肽包含五种或更多种新抗原。该药物组合物可以进一步包含至少一种伤寒沙门氏菌Ty21a菌株,所述伤寒沙门氏菌Ty21a菌株包含DNA分子,所述DNA分子包含至少一个真核表达盒,所述至少一个真核表达盒编码肿瘤抗原和/或肿瘤基质抗原,优选选自:WT1、MSLN、CEA、CMV pp65、PD-L1、VEGFR-2和FAP。

[0020] 待治疗的实体瘤可以是任何实体瘤,例如结直肠癌、胰腺癌、肺癌、卵巢癌、间皮瘤、成胶质细胞瘤、胃癌、肝细胞癌、肾细胞癌、前列腺癌、宫颈癌、乳腺癌或黑素瘤。

[0021] 本发明的单剂量的伤寒沙门氏菌Ty21a菌株包含约 10^6 至约 10^9 ,更特别约 10^6 至约 10^8 ,最特别约 10^7 至约 10^8 个菌落形成单位(CFU)。在一个实施方案中,本发明的伤寒沙门氏菌Ty21a菌株在第一周施用2至4次,优选在第一周施用4次,然后每2至4周,特别是在第1天和第7天,优选在第1、3、5和7天单次剂量强化施用,然后每2至4周单次剂量强化施用。

附图说明

[0022] 图1:在用(A)空载体、(B) VXMNeo1m和(C) VXM06m经口服途径免疫的C57BL/6小鼠脾细胞中指定表位特异性CD8⁺T细胞群的频率。显示的是对于指定表位而言,CD8⁺T细胞总数中表位特异性五聚体阳性CD8⁺T细胞的百分比。

[0023] 图2:药品的稳定性测试。成品药物在 $\leq 70^\circ\text{C}$ 下以 10^4 (P4)、 10^5 (P5)、 10^6 (P6) 或 10^7 (P7) 孵育指定的时间,其中成品药物基于伤寒沙门氏菌Ty21a递送平台,由编码三种不同靶

抗原的三种构建体(产品1、产品2和产品3)制成。显示的是活细胞计数(CFU/ml)。

具体实施方式

[0024] 通过参考本发明的以下详细描述,可以更容易地理解本发明。

[0025] 在一个方面,本发明涉及一种伤寒沙门氏菌Ty21a菌株,其包含DNA分子,所述DNA分子包含至少一个真核表达盒,所述至少一个真核表达盒编码至少一种多肽,所述至少一种多肽包含五种或更多种新抗原。编码包含五种或更多种新抗原的至少一种多肽的伤寒沙门氏菌Ty21a菌株可用于治疗受试者的实体瘤。特别地,这至少五种或更多种新抗原是在所述受试者的实体瘤中鉴定的肿瘤特异性抗原。

[0026] 本发明还涉及一种用于治疗受试者的实体瘤的伤寒沙门氏菌Ty21a菌株,其包含DNA分子,所述DNA分子包含至少一个真核表达盒,所述至少一个真核表达盒编码至少一种多肽,所述至少一种多肽包含五种或更多种新抗原,其中所述受试者已经或正在用包含至少一种肿瘤抗原结合细胞表面受体的至少一种工程化T细胞、NKT细胞或NK细胞治疗。特别地,这至少五种或更多种新抗原是在所述受试者的实体瘤中鉴定的肿瘤特异性抗原。此外,所述至少一种肿瘤抗原结合细胞表面受体与至少一种被鉴定在所述受试者的实体瘤中表达或过表达的肿瘤抗原结合。因此,优选鉴定至少一种肿瘤抗原在所述受试者的实体瘤中表达或过表达,并且所述受试者已经或正在用至少一种工程化T细胞、NKT细胞或NK细胞进行治疗,所述至少一种工程化T细胞、NKT细胞或NK细胞包含至少一种肿瘤抗原结合细胞表面受体,所述至少一种肿瘤抗原结合细胞表面受体靶向所述至少一种被鉴定在所述受试者的实体瘤中表达或过表达的肿瘤抗原。

[0027] 此外,本发明涉及一种伤寒沙门氏菌Ty21a菌株与包含至少一种肿瘤抗原结合细胞表面受体的至少一种工程化T细胞、NKT细胞或NK细胞联合,用于治疗受试者的实体瘤,其中所述伤寒沙门氏菌Ty21a菌株包含DNA分子,所述DNA分子包含至少一个真核表达盒,所述至少一个真核表达盒编码至少一种多肽,所述至少一种多肽包含五种或更多种新抗原。或者,伤寒沙门氏菌Ty21a菌株,与包含至少一种肿瘤抗原结合细胞表面受体的至少一种工程化T细胞、NKT细胞或NK细胞联合,用于治疗受试者的实体瘤,其中所述伤寒沙门氏菌Ty21a菌株包含DNA分子,所述DNA分子包含至少一个真核表达盒,所述至少一个真核表达盒编码至少一种多肽,所述至少一种多肽包含五种或更多种新抗原。特别地,这至少五种或更多种新抗原是在所述受试者的实体瘤中鉴定的肿瘤特异性抗原。此外,所述至少一种肿瘤抗原结合细胞表面受体与至少一种被鉴定在所述受试者的实体瘤中表达或过表达的肿瘤抗原结合。因此,优选鉴定至少一种肿瘤抗原在所述受试者的实体瘤中表达或过表达,并且所述受试者已经或正在用至少一种工程化T细胞、NKT细胞或NK细胞进行治疗,所述至少一种工程化T细胞、NKT细胞或NK细胞包含至少一种肿瘤抗原结合细胞表面受体,所述至少一种肿瘤抗原结合细胞表面受体靶向所述至少一种被鉴定在所述受试者的实体瘤中表达或过表达的肿瘤抗原。

[0028] 在另一方面,本发明涉及一种治疗受试者的实体瘤的方法,包括向受试者施用伤寒沙门氏菌Ty21a菌株,所述伤寒沙门氏菌Ty21a菌株包含DNA分子,所述DNA分子包含至少一个真核表达盒,所述至少一个真核表达盒编码至少一种多肽,所述至少一种多肽包含五种或更多种新抗原,其中所述受试者已经或正在用包含至少一种肿瘤抗原结合细胞表面受

体的至少一种工程化T细胞、NKT细胞或NK细胞治疗。更具体地,该方法包括向受试者施用包含至少一种肿瘤抗原结合细胞表面受体的至少一种工程化T细胞、NKT细胞或NK细胞,然后施用伤寒沙门氏菌Ty21a菌株,所述伤寒沙门氏菌Ty21a菌株包含DNA分子,所述DNA分子包含至少一个真核表达盒,所述至少一个真核表达盒编码至少一种多肽,所述至少一种多肽包含五种或更多种新抗原。通过过继细胞转移向受试者施用包含至少一种肿瘤抗原结合细胞表面受体的至少一种工程化T细胞、NKT细胞或NK细胞。该方法可以进一步包括鉴定至少五种或更多种新抗原是所述受试者实体瘤中的肿瘤特异性抗原,以及生成伤寒沙门氏菌Ty21a菌株,所述伤寒沙门氏菌Ty21a菌株包含DNA分子,所述DNA分子包含至少一个真核表达盒,所述至少一个真核表达盒编码至少一种多肽,所述至少一种多肽包含五种或更多种新抗原。该方法可以进一步包括鉴定至少一种肿瘤抗原在所述受试者的实体瘤中表达或过表达,以及施用至少一种工程化T细胞、NKT细胞或NK细胞,所述至少一种工程化T细胞、NKT细胞或NK细胞包含至少一种肿瘤抗原结合细胞表面受体,所述至少一种肿瘤抗原结合细胞表面受体靶向所述至少一种被鉴定在所述受试者的实体瘤中表达或过表达的肿瘤抗原。

[0029] 根据本发明,沙门氏菌减毒株充当DNA分子的细菌载体,用于将所述DNA分子递送至靶细胞,其中所述DNA分子包含至少一个真核表达盒,所述至少一个真核表达盒编码至少一条多肽,所述至少一条多肽包含五种或更多种新抗原。优选地,DNA分子是包含所述DNA分子的质粒的一部分,其中所述DNA分子包含至少一个真核表达盒,所述至少一个真核表达盒编码至少一种多肽,所述至少一种多肽包含五种或更多种新抗原。包含所述DNA分子的这种细菌载体或递送载体也可以称为DNA疫苗,其中所述DNA分子包含至少一个真核表达盒,所述至少一个真核表达盒编码至少一种多肽,所述至少一种多肽包含五种或更多种新抗原。

[0030] 在本发明的背景中,术语“疫苗”是指在施用后能够在受试者中诱导免疫应答的药剂。优选地,疫苗可以预防、改善或治疗疾病。在本发明的背景中,疫苗优选是口服疫苗。本发明的伤寒沙门氏菌Ty21a菌株,其包含DNA分子,所述DNA分子包含至少一个真核表达盒,所述至少一个真核表达盒编码至少一种多肽,所述至少一种多肽包含五种或更多种新抗原,所述伤寒沙门氏菌Ty21a菌株也可以缩写为“编码至包含五种或更多种新抗原的至少一条多肽的伤寒沙门氏菌Ty21a菌株”或“新抗原癌症疫苗”。

[0031] 新抗原癌症疫苗

[0032] 本发明的活的沙门氏菌减毒株,更特别是伤寒沙门氏菌Ty21a菌株,稳定地携带重组DNA分子,所述重组DNA分子包含至少一个真核表达盒,所述至少一个真核表达盒编码至少一种多肽,所述至少一种多肽包含五种或更多种新抗原。它用作口服递送所述重组DNA分子的载体。如本文所用,术语“伤寒沙门氏菌Ty21a的减毒株”是指沙门氏菌,尤其是伤寒沙门氏菌的减毒株,其中减毒株是Ty21a,在本文中与“伤寒沙门氏菌Ty21a”同义使用。

[0033] 基因免疫可能优于常规疫苗接种。靶DNA可以在相当长的一段时间内被检测到,从而充当抗原的储库。一些质粒中的序列基序,如CpG岛,具有免疫刺激性,并且可以用作佐剂,被LPS和其他细菌组分引起的免疫刺激促进。

[0034] 活减毒沙门氏菌载体在原位产生它们自己的免疫调节因子如脂多糖(LPS),这可能与其它形式的施用(例如微胶囊化)相比构成优势。此外,本发明的粘膜疫苗具有淋巴内作用模式,这被证明是有益的。注入本发明的减毒疫苗后,肠道派伊尔结中的巨噬细胞和其他细胞被修饰的细菌侵入。细菌被这些吞噬细胞摄取。由于它们的减毒突变,伤寒沙门氏菌

Ty21菌株细菌无法在这些吞噬细胞中持久存在,并死亡。重组DNA分子被释放,并随后通过特定的转运系统或通过内体泄露(endosomal leakage)转移到免疫吞噬细胞的胞质溶胶中。最后,重组DNA分子进入细胞核,它们在细胞核中被转录,导致在吞噬细胞的胞浆中大量表达包含5种或更多种新抗原的(一种或多种)多肽。被感染的细胞经历细胞凋亡,装载包含5种或更多种新抗原的(一种或多种)多肽,并被肠道免疫系统摄取和加工。细菌感染的危险信号在此过程中充当强力佐剂,导致在全身和粘膜隔室水平上产生强烈的靶抗原特异性CD8+T细胞和抗体应答。免疫应答在接种后十天左右达到峰值。抗载体应答的缺乏使得可使用多次相同疫苗来强化。

[0035] 在本发明的背景中,术语“减毒”是指与不具有减毒突变的亲本细菌菌株相比,由于减毒突变而导致毒力降低的细菌菌株。优选地,减毒细菌菌株丧失了其毒力,但保留了其诱导保护性免疫的能力。减毒可通过删除各种基因,包括毒力、调节和代谢基因来实现。减毒细菌可以天然存在,或者可以在实验室中人工生产,例如通过使其适应新的培养基或细胞培养物,或者可以通过重组DNA技术来生产它们。施用约 10^{11} CFU的本发明的沙门氏菌减毒株在优选地小于5%,更优选小于1%,最优选小于1‰受试者中引起沙门氏菌病。本发明的毒株Ty21a是伤寒沙门氏菌的减毒菌株。

[0036] 在本发明的背景中,术语“包含”(comprises)或“包含”(comprising)意指“包括但不限于”。该术语旨在是开放式的,旨在具体说明任何记载的特征、元件、整体、步骤或组分的存在,但并不排除一种或多种其他特征、元件、整体、步骤、组分或其组的存在或添加。因此,术语“包含”包括更限制性的术语“由……组成”和“基本上由……组成”。在一个实施方案中,在整个申请中,特别是在权利要求中使用的术语“包含”可以由术语“由……组成”代替。如本文所使用的术语“一个”可以包括复数并且包括但不限于“一个”。

[0037] 如本文所用,术语“新抗原”是指仅由癌细胞中表达的体细胞突变基因产生,而在同一患者的正常组织中不产生的肽。基因和染色体可以在体细胞组织或生殖组织中发生突变。与种系突变相反,体细胞突变不会遗传给后代。因此,基因的体细胞突变已在癌细胞中和癌症发展过程中获得。通常,突变是产生新表位的肿瘤特异性点突变,新表位也称为突变表位或点突变肽。它们具有高度免疫原性,因为它们不存在于正常组织中,并因此绕过了中央胸腺耐受。新抗原包括由MHC I或MHC II以肽形式呈递的新表位,优选由其组成。突变也可以是导致移码肽(FSP)抗原的移码突变。尽管FSP新抗原是由单个核苷酸的插入或缺失引起的,但它也包含长的抗原氨基酸序列,其可以包含多个免疫学相关的新表位。在特定的实施方案中,术语“新抗原”还包括与肽加工有关的T细胞表位(TEIPP)。TEIPP来源于普遍表达的非突变“自身”蛋白,它们在健康细胞中没有装载到MHC I中。在免疫逃逸的癌症中,抗原加工成分,例如与抗原加工相关的转运蛋白(TAP),通常被下调。因此,仅在抗原加工机制存在缺陷的细胞中,例如在由于突变或表观遗传沉默而没有TAP的情况下,癌细胞表面上可能会呈递TEIPP(Marjit et al., Journal of Experimental Medicine, 2018, 215 (9) : 2325)。

[0038] 在癌症进展过程中,癌症基因组中积累的突变会影响蛋白质编码基因,并导致蛋白质序列改变。突变的蛋白质被水解切割成短肽,并通过MHC(人类中的人白细胞抗原(HLA))呈递在肿瘤细胞表面。存在于恶性细胞但不存在于正常细胞中的这些体细胞突变的基因,即新抗原,可被肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)识别为是外来的。因此,术语新抗原是指一种肽,所述肽包含由MHC I或II呈递的含有体细胞突变的肽,优选由其组成。由MHC I呈递的新

抗原也可以称为CD8 T细胞抗原。由MHC II呈递的新抗原也可以称为CD4 T细胞抗原(或T辅助细胞抗原)。由于新抗原可以被TIL识别为是外来的,因此它们能够引发有效的肿瘤特异性免疫反应。肿瘤细胞死亡后释放的新抗原能够引发许多过程,这些过程最终导致T细胞通过不同T细胞受体(TCR)与特定新抗原-MHC复合物的相互作用来识别癌细胞。

[0039] 如本文所用,术语“包含五种或多种新抗原的至少一条多肽”是指一条多肽或多于一条多肽,其共同包含五种或更多种新抗原。这五种或更多种新抗原是同一多肽还是不同多肽的一部分并不重要。因此,这五种或更多种新抗原可以表达为一条多肽或多于一条多肽。优选地,至少一条或更多条多肽中包含的新抗原是10或更多,20或更多,30或更多,50或更多或多于50种新抗原。在本文所用的伤寒沙门氏菌Ty21a菌株的背景中,编码所述至少一条多肽的插入物可包含多达300种新抗原,优选多达200种新抗原。在I类或II类MHC(在人HLA中)上以肽形式呈递的抗原,对于MHC II而言通常为11至30个氨基酸长度(CD4抗原),对于MHC I而言则为8至10个氨基酸长度(CD8抗原)。因此,所述至少一条多肽中包含的新抗原的优选范围是5至300、10至300、20至300、30至300、50至300或多于50至300种新抗原。所述至少一条多肽中包含的新抗原的更优选的范围是5至200、10至200、20至200、30至200、50至200或多于50至200种新抗原。包含融合的新抗原的每个多肽都在抗原呈递细胞内被水解切割成新抗原,并通过HLA呈递以引发T细胞反应。

[0040] 根据本发明,这五种或更多种新抗原可以包括CD8 T细胞抗原和/或CD4 T细胞抗原。优选地,这五种或更多种新抗原包括CD8 T细胞抗原和CD4 T细胞抗原。

[0041] 假设,用新抗原进行疫苗接种既可以扩大已有的新抗原特异性T细胞群体,又可以在癌症患者中诱导出更广泛的新T细胞特异性。

[0042] 新抗原通常是具有8至30个氨基酸,优选8至20个氨基酸,更优选8至12个氨基酸的肽。

[0043] 对于新抗原癌症疫苗,如果疫苗靶向多种新抗原,则是有益的,因此降低了由于新抗原子集表达丧失而导致的免疫逃逸风险。本发明还包括用另一种伤寒沙门氏菌Ty21a菌株依次治疗患者,所述伤寒沙门氏菌Ty21a菌株包含DNA分子,所述DNA分子包含至少一个真核表达盒,所述至少一个真核表达盒编码至少一种多肽,所述至少一种多肽包含五种或更多种新抗原,包括靶向在肿瘤进展期间选择的新的新抗原或新的新抗原子集。

[0044] 伤寒沙门氏菌Ty21a减毒株(也被称为“伤寒沙门氏菌Ty21a”)作为包含五种或更多种新抗原的至少一种多肽的载体的优势是:已经建立了质量控制测定法,质粒的个体差异仅在于编码一种或更多种新抗原的插入片段不同,不需要扩增,并且由于口服给药也不需要无菌测试。此外,适于转化的表达质粒以及作为载体的伤寒沙门氏菌Ty21a菌株允许大量(最多300个)表位(新抗原)。新抗原可以以一串珠子的形式(表达为一种或多种多肽)插入质粒中,任选地被接头分隔。接头可以是但不限于GS接头、2A切割位点或IRES序列。由于生产快速并且仅需要有限的质量控制,生产伤寒沙门氏菌Ty21a菌株的时间很短,例如可以在鉴定新抗原后的15天内,优选14天内或更短的时间内实现,其中所述伤寒沙门氏菌Ty21a菌株包含DNA分子,所述DNA分子包含至少一个真核表达盒,所述至少一个真核表达盒编码至少一种多肽,所述至少一种多肽包含五种或更多种新抗原。过夜发酵足够,并且由于细菌的高产量而无须扩大规模,在1L培养物中的净产量在 10^{11} 个菌落形成单位(CFU)的范围内。这能够缩短制造时间并降低制造成本。此外,每批产品都足以满足多年的治疗需求,而且药

物产品被证明能够至少稳定三年。因此,不会发生批次变化,因为一个批次可以持续治疗患有实体瘤的受试者的整个治疗过程。

[0045] 为患有实体瘤的个体受试者生产伤寒沙门氏菌Ty21a菌株的方法,其中所述伤寒沙门氏菌Ty21a菌株包含DNA分子,所述DNA分子包含至少一个真核表达盒,所述至少一个真核表达盒编码至少一种多肽,所述至少一种多肽包含五种或更多种新抗原,该方法包括:(a) 提供来自所述受试者的肿瘤细胞样品和对照样品;(b) 鉴定肿瘤细胞样品中存在但对对照样品中不存在的五种或更多种新抗原;(c) 选择五种或更多种新抗原;(d) 合成cDNA,所述cDNA编码至少一条多肽,所述至少一条多肽包含五种或更多种新抗原;(e) 将所述cDNA克隆到至少一个真核表达盒中;(f) 用DNA分子转化伤寒沙门氏菌Ty21a受体菌株,其中所述DNA分子包含至少一个真核表达盒,所述至少一个真核表达盒编码至少一种多肽,所述至少一种多肽包含五种或更多种新抗原;(f) 发酵步骤(f)中获得的菌株,并基于CFU稀释至目标浓度;以及(g) 分析所述转化的伤寒沙门氏菌Ty21a菌株,包括对编码包含五种或更多种新抗原的至少一条多肽的cDNA进行测序。对照样品可以是来自待治疗受试者的正常组织或血液的任何样品。优选地,对照样品是血液样品。血液样品可以进一步用于患者的HLA分型。肿瘤细胞样品可以是肿瘤活检。

[0046] 检测肿瘤内的(所有)编码突变并可靠地预测或确定那些与自体人类白细胞抗原(HLA)分子高亲和力结合的突变肽的方法是本领域已知的。例如,可以对来自个体患者的匹配的肿瘤和正常细胞DNA进行全外显子组测序(WES)。然后通过对肿瘤的RNA测序,对已鉴定的体细胞突变进行正交验证并评估突变等位基因的表达。然后选择预测可能与患者的自体HLA-A或HLA-B蛋白结合的肽。这可以通过例如离体干扰素 γ 酶联免疫斑点(ELISPOT)来确认。或者,可以从细胞培养基中分离HLA-肽配体,并且可以通过LC-MS/MS分析进行鉴定。

[0047] 一条多肽可以包含几种相互融合的新抗原,优选5种或更多种,10种或更多种,20种或更多种,30种或更多种,或50种或更多新种抗原。在用于转染伤寒沙门氏菌Ty21a菌株的典型质粒中,例如pVAX1TM表达质粒(Invitrogen, San Diego, California)或其衍生的pVAX10,可表达多达约300种新抗原。因此,多肽可包含约5至300、10至300、20至300、30至300或50至300种新抗原,优选10至200、20至200、30至300或50至200种新抗原。根据新抗原的类型,多肽在细胞内被切割成肽,并在MHC I或MHC II分子上呈递。各个新抗原可以通过接头,例如GS接头、专门设计的接头或2A切割位点分隔。编码新抗原的DNA分子也可以被IRES序列分隔,从而产生独立的多肽。

[0048] 伤寒沙门氏菌Ty21a菌株,其包含DNA分子,所述DNA分子包含至少一个真核表达盒,所述至少一个真核表达盒编码至少一种多肽,所述至少一种多肽包含五种或更多种新抗原,所述伤寒沙门氏菌Ty21a菌株可以进一步包含DNA分子,所述DNA分子包含至少一个真核表达盒,所述至少一个真核表达盒编码至少一种多肽,所述至少一种多肽包含至少一种不是新抗原的肿瘤抗原和/或肿瘤基质抗原,其中所述至少一种不是新抗原的肿瘤抗原在待治疗患者的实体瘤中表达。所述包含至少一种不是新抗原的肿瘤抗原和/或肿瘤基质抗原的至少一种多肽(a)可以由同一DNA分子编码,所述DNA分子包含至少一个真核表达盒,所述至少一个真核表达盒编码至少一种多肽,所述至少一种多肽包含五种或更多种新抗原,或者由另一个单独的DNA分子编码,(b)可以由编码所述包含五种或更多种新抗原的至少一种多肽的至少一个真核表达盒编码,或者由另一个单独的表表达盒编码;或者(c)可以是所述

包含五种或更多种新抗原的至少一种多肽,或者另一种单独的多肽。因此,可以用两种DNA分子转化伤寒沙门氏菌Ty21a菌株,第一种编码五种或更多种新抗原,第二种编码至少一种不是新抗原的肿瘤抗原和/或肿瘤基质抗原。或者,可以用一种DNA分子转化伤寒沙门氏菌Ty21a菌株,所述DNA分子包含至少一个真核表达盒,所述至少一个真核表达盒编码至少一种多肽,所述至少一种多肽包含五种或更多种新抗原,所述DNA分子还包含至少一个另外的真核表达盒,所述至少一个另外的真核表达盒编码至少一种不是新抗原的肿瘤抗原和/或肿瘤基质抗原。或者,也可以用一种DNA分子转化伤寒沙门氏菌Ty21a菌株,所述DNA分子包含至少一个真核表达盒,所述至少一个真核表达盒编码至少一种多肽,所述至少一种多肽包含五种或更多种新抗原,并且还包含至少一种不是新抗原的肿瘤抗原和/或肿瘤基质抗原。在此背景下,肿瘤抗原的实例是但不限于WT1、MSLN、CEA、HER2、EGFR、FBP、GD2、GD3、MAGE-A1、PSCA、PSMA、MUC1、GPC3和CMV pp65。肿瘤抗原可以是肿瘤特异性抗原或肿瘤相关抗原。如本文所用,术语“肿瘤特异性抗原”是指在肿瘤中表达,但在正常组织中不表达的抗原。如本文所用,术语“肿瘤相关抗原”是指与正常组织相比,在肿瘤中过表达的抗原。如本文所用,术语“肿瘤基质抗原”是指在肿瘤基质中表达的抗原,包括但不限于VEGFR-2和FAP。伤寒沙门氏菌Ty21a菌株,其包含DNA分子,所述DNA分子包含至少一个真核表达盒,所述至少一个真核表达盒编码至少一种多肽,所述至少一种多肽包含五种或更多种新抗原,所述伤寒沙门氏菌Ty21a菌株还可以包含DNA分子,所述DNA分子包含至少一个真核表达盒,所述至少一个真核表达盒编码至少一种多肽,所述至少一种多肽包括检查点抑制剂,其中所述至少一种检查点抑制剂抗原或其配体在待治疗的实体瘤中过表达。关于伤寒沙门氏菌Ty21a菌株中检查点抑制剂抗原的表达,对于至少一种不是新抗原的肿瘤抗原和/或肿瘤基质抗原而言,也是如此,其中所述伤寒沙门氏菌Ty21a菌株包含DNA分子,所述DNA分子包含至少一个真核表达盒,所述至少一个真核表达盒编码至少一种多肽,所述至少一种多肽包含五种或更多种新抗原。检查点抑制剂抗原的一个实例是PD-1或PD-L1。在本文中使用的DNA分子优选是表达质粒。

[0049] DNA分子,其包含至少一个真核表达盒,所述至少一个真核表达盒编码至少一条多肽,所述至少一条多肽包含五种或更多种新抗原,所述DNA分子也可以称为重组DNA分子,即工程化DNA构建体,优选地由不同来源的DNA片段组成。所述DNA分子可以是线性核酸,或者优选地是环状DNA质粒,其通过将编码至少一条多肽的开放阅读框引入质粒的真核表达盒中而产生,其中所述至少一条多肽包含五种或更多种新抗原。包含真核表达盒的质粒也可以称为真核表达质粒。

[0050] 在本发明的背景下,术语“表达盒”是指包含至少一个开放阅读框(ORF)的核酸单位,所述开放阅读框在控制其表达的调节序列的控制下。表达盒可优选地介导所包含的开放阅读框在真核靶细胞中的转录,其中所述开放阅读框编码至少一条多肽,所述至少一条多肽包含五种或更多种新抗原。真核表达盒通常包含启动子、至少一个开放阅读框和转录终止信号,其允许在真核靶细胞中表达。

[0051] 在具体实施方案中,单剂量的伤寒沙门氏菌Ty21a菌株包含约 10^6 至约 10^{10} ,更特别约 10^6 至约 10^9 ,更特别约 10^7 至约 10^9 ,更特别约 10^6 至约 10^8 ,最特别约 10^6 至约 10^7 个菌落形成单位(CFU)。

[0052] 更特别地,单剂量的伤寒沙门氏菌Ty21a菌株包含约 1×10^6 至约 1×10^{10} ,更特别约

1×10^6 至约 1×10^9 ,更特别约 1×10^7 至约 1×10^9 ,更特别约 1×10^6 至约 1×10^8 ,最特别约 1×10^6 至约 1×10^7 个菌落形成单位(CFU)。

[0053] 此外,本发明的伤寒沙门氏菌Ty21a菌株优选在第一周施用2至4次,优选在第一周施用4次,然后每2至4周,特别是在第1天和第7天,优选在第1、3、5和7天单次剂量强化施用,然后每2至4周单次剂量强化施用。

[0054] 在这一背景下,术语“约”或“近”意指给定值或范围的3倍以内,或者2倍以内,包括1.5倍以内。

[0055] 在特定的实施方案中,治疗包括单次或多次施用本发明的伤寒沙门氏菌Ty21a菌株或药物组合物,其中所述伤寒沙门氏菌Ty21a菌株编码包含五种或更多种新抗原的至少一种多肽。单一剂量的施用可以相同或不同,优选相同,并且优选在本文公开的范围内。特别地,治疗包括治疗第一周的2至4次初次疫苗接种,然后每2至4周单次剂量强化施用本发明的伤寒沙门氏菌Ty21a菌株或药物组合物,其中所述伤寒沙门氏菌Ty21a菌株编码包含五种或更多种新抗原的至少一条多肽。

[0056] 将伤寒沙门氏菌Ty21a菌株用于治疗受试者的实体瘤,其中所述伤寒沙门氏菌Ty21a菌株编码至少一种多肽,所述至少一种多肽包含五种或更多种新抗原,其中所述受试者已经或正在用包含至少一种肿瘤抗原结合细胞表面受体的至少一种工程化T细胞、NKT细胞或NK细胞治疗。

[0057] 根据本发明待治疗的实体瘤可以是任何实体瘤,特别是选自以下的实体瘤:结直肠癌、胰腺癌、肺癌、卵巢癌、间皮瘤、成胶质细胞瘤、胃癌、肝细胞癌、肾细胞癌、前列腺癌、宫颈癌、乳腺癌和黑素瘤。

[0058] 工程化T细胞、NKT细胞或NK细胞

[0059] 将伤寒沙门氏菌Ty21a菌株施用于患有实体瘤的受试者,用于治疗实体瘤,其中所述伤寒沙门氏菌Ty21a菌株包含DNA分子,所述DNA分子包含至少一个真核表达盒,所述至少一个真核表达盒编码至少一种多肽,所述至少一种多肽包含五种或更多种新抗原。在一个实施方案中,受试者已经或进一步用包含至少一种肿瘤抗原结合细胞表面受体的至少一种工程化T细胞、NKT细胞或NK细胞治疗。优选地,通过过继细胞转移(ACT),即通过静脉注射包含至少一种肿瘤抗原结合细胞表面受体的至少一种工程化T细胞、NKT细胞或NK细胞,向患有实体瘤的受试者提供至少一种工程化T细胞、NKT细胞或NK细胞。如本文所用,术语“过继细胞转移”是指细胞转移至患者或受试者中。在至少一种工程化T细胞、NKT细胞或NK细胞的背景中,“施用”或“将向……施用”同义使用。如本文所用,术语“包含至少一种肿瘤抗原结合细胞表面受体的至少一种工程化T细胞、NKT细胞或NK细胞”是指“包含至少一种肿瘤抗原结合细胞表面受体的至少一种工程化T细胞、包含至少一种肿瘤抗原结合细胞表面受体的至少一种工程化NKT细胞或含至少一种肿瘤抗原结合细胞表面受体的至少一种工程化NK细胞”,可以缩写为“至少一种工程化T细胞、NKT细胞或NK细胞”或“至少一种工程化T细胞、至少一种工程化NKT细胞或至少一种工程化NK细胞”。更特别地,包含至少一种肿瘤抗原结合细胞表面受体的至少一种工程化T细胞可以是工程化的常规 $\alpha\beta$ T细胞或工程化 $\gamma\delta$ T细胞,优选地,包含至少一种肿瘤抗原结合细胞表面受体的至少一种工程化T细胞是工程化的常规 $\alpha\beta$ T细胞。

[0060] 包含至少一种肿瘤抗原结合细胞表面受体的至少一种工程化T细胞、NKT细胞或NK

细胞通常是定制的。这需要鉴定在待治疗受试者的实体瘤中表达的肿瘤抗原。鉴定在待治疗受试者的实体瘤中表达的肿瘤抗原包括：(a) 提供来自所述受试者的肿瘤细胞样品和对照样品；(b) 鉴定在肿瘤细胞样品中表达但在对照样品中不存在的肿瘤抗原。肿瘤细胞样品可以是肿瘤活检。此外，应当将肿瘤细胞样品理解为包含实体瘤组织以及肿瘤基质组织。鉴定在待治疗受试者的实体瘤中表达的肿瘤抗原，以生成至少一种工程化T细胞、NKT细胞或NK细胞，以及鉴定在待治疗受试者的实体瘤中表达的五种或更多种新抗原，以生成编码包含五种或更多种新抗原的至少一条多肽的伤寒沙门氏菌Ty21a菌株，可以在相同时间或在不同时间点进行，和/或可以在相同肿瘤细胞样品或不同肿瘤细胞样品中进行。优选地，鉴定在待治疗受试者的实体瘤或实体瘤的基质中表达的五种或更多种新抗原和肿瘤抗原和/或肿瘤基质抗原包括：(a) 提供来自所述受试者的肿瘤细胞样品和对照样品；以及(b) 鉴定肿瘤细胞样品中存在但对照样品中不存在的五种或更多种新抗原和肿瘤抗原和/或肿瘤基质抗原。所述至少一种肿瘤抗原结合细胞表面受体所靶向的肿瘤抗原可以与伤寒沙门氏菌Ty21a菌株所靶向的新抗原中的至少一种相同或不同，其中所述伤寒沙门氏菌Ty21a菌株包含DNA分子，所述DNA分子包含至少一个真核表达盒，所述至少一个真核表达盒编码至少一种多肽，所述至少一种多肽包含五种或更多种新抗原。

[0061] 包含至少一种肿瘤抗原结合细胞表面受体的至少一种工程化T细胞、NKT细胞或NK细胞可以是自体或同种异体T细胞、NKT细胞或NK细胞。术语“自体的”是指从患者获得的T细胞、NKT细胞或NK细胞，通过引入编码至少一种肿瘤抗原结合细胞表面受体的核酸分子进行遗传工程改造，在体外扩增并转移回待治疗的受试者。优选地，工程化T细胞是自体T细胞，即源自待治疗的受试者。T细胞，特别是工程化的常规 $\alpha\beta$ T细胞，也可以是异源于待治疗的受试者，即来自另一位健康供体。工程化NKT细胞以及工程化NK细胞可以分别是自体或同种异体NKT细胞或NK细胞。T细胞（特别是传统的 $\alpha\beta$ T细胞）的过继细胞转移具有一定的移植物抗宿主病(GvHD)的风险，而NKT细胞、NK细胞或 $\gamma\delta$ T细胞的过继细胞转移的这种情况可能较少。含有至少一种肿瘤抗原结合细胞表面受体的异源工程化T细胞、NKT细胞或NK细胞可以是预制的或现成的产品。此外，对于NK细胞而言，使用异源细胞的优点在于：NK细胞受自身MHC分子触发的KIR信号传导的抑制较少。

[0062] 如本文所用，术语“工程化”是指“被修饰”以在细胞表面表达至少一种肿瘤抗原结合细胞表面受体。将编码细胞表面上的至少一种肿瘤抗原结合细胞表面受体的基因或mRNA引入到T细胞、NKT细胞或NK细胞中，优选通过转染或转导。可以用编码至少一种肿瘤抗原结合细胞表面受体的RNA或DNA转染或转导T细胞、NKT细胞或NK细胞。然后，将工程化T细胞、NKT细胞或NK细胞离体繁殖或扩增，然后回输到受试者体内。用于基因递送的合适载体是本领域已知的，包括例如病毒载体，如逆转录病毒和慢病毒载体，或转座子，如Piggy-Bac (PB) 和Sleeping Beauty (SB)。本发明还设想了RNA瞬时工程化T细胞、NKT细胞或NK细胞，优选CAR-T细胞、CAR-NKT细胞或CAR-NK细胞。

[0063] 在某些实施方案中，所述至少一种工程化T细胞、NKT细胞或NK细胞在其细胞表面包含至少一种肿瘤抗原结合细胞表面受体，其中肿瘤抗原选自癌胚抗原(CEA)、上皮生长因子受体(EGFR)、叶酸结合蛋白(FBP)、GD2、GD3、人表皮生长因子受体2(HER2, erb-B2)、黑素瘤抗原A1(MAGE-A1)、间皮素(MSLN)、前列腺干细胞抗原(PSCA)、前列腺特异性膜抗原(PSMA)、粘蛋白-1(MUC1)、糖蛋白酶-3(GPC3)、肾母细胞瘤蛋白(WT1)、上皮细胞粘附分子

(EpCAM)、B细胞成熟抗原 (BCMA) 和酪氨酸蛋白激酶跨膜受体 (ROR1)。其中肿瘤抗原可以由例如但不限于表1中所列的实体瘤表达。

肿瘤抗原	实体瘤
CEA	结直肠癌、乳腺癌、肝细胞癌
EGFR	胶质瘤；肺癌，特别是非小细胞肺癌
FBP	卵巢癌
GD2	神经母细胞瘤、胶质母细胞瘤
GD3	胶质母细胞瘤、黑素瘤
HER2	胶质母细胞瘤、神经胶质瘤、肉瘤、头颈鳞状细胞癌、乳腺癌、卵巢癌、胃癌、肺癌、胰腺癌等癌
MAGE-A1	肺癌、黑素瘤、头颈癌
[0064] MSLN	转移癌、间皮瘤、胰腺癌、乳腺癌、肺癌
PSCA	前列腺癌
PSMA	前列腺癌
MUC1	胶质母细胞瘤、神经胶质瘤、乳腺癌、胃癌、肺癌、胰腺癌、结直肠癌、肝细胞癌等癌
GPC3	肺癌特别是非小细胞肺癌、肝细胞癌
WT1	胶质瘤、卵巢癌、肺癌
EpCAM	结直肠癌、肾癌、前列腺癌
BCMA	乳腺癌
ROR1	卵巢癌

[0065] 术语“包含至少一种肿瘤抗原结合细胞表面受体的工程化T细胞”是指携带与肿瘤抗原结合的重组T细胞受体的T细胞。具体地，这意味着携带重组表面受体的T细胞包含至少一个肿瘤抗原结合结构域、一个激活结构域和一个共刺激结构域。优选地，这意味着T细胞携带嵌合抗原受体 (CAR)，即所谓的“CAR-T细胞”。如本文所用，包含至少一种肿瘤抗原结合细胞表面受体的工程化T细胞或CAR-T细胞可以被理解为分别具体地指代工程化的常规 $\alpha\beta$ T细胞或CAR- $\alpha\beta$ T细胞。另外或者作为替代方案，包含至少一种肿瘤抗原结合细胞表面受体的工程化T细胞或CAR-T细胞可以是工程化的常规 $\alpha\beta$ T细胞或CAR- $\alpha\beta$ T细胞或工程化的 $\gamma\delta$ T细胞或CAR- $\gamma\delta$ T细胞。在本发明的背景中，工程化T细胞或CAR-T细胞可以包含少量的其他T细胞亚群，例如NKT细胞或CAR-NKT细胞。通常，本发明的工程化T细胞或CAR-T细胞分别含有小

于5%、小于2%、小于1%或小于0.5%的NKT细胞或CAR-NKT细胞。术语“包含至少一种肿瘤抗原结合细胞表面受体的至少一种工程化T细胞”包括工程化T细胞群,优选基本上纯的工程化T细胞群,更优选包含50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上或95%以上T细胞的细胞混合物。工程化T细胞优选由来自不同供体或待治疗受试者的外周血(PB)、骨髓(BM)、脐带血(CB)、胎盘或诱导性多能干细胞(iPSC)产生。

[0066] 术语“包含至少一种肿瘤抗原结合细胞表面受体的工程化NKT细胞”是指携带结合肿瘤抗原的重组表面受体的NKT细胞,特别是携带重组表面受体的NKT细胞,所述重组表面受体包含至少一个肿瘤抗原结合结构域、一个激活结构域和一个共刺激结构域。优选地,这意味着NKT细胞携带嵌合抗原受体(CAR),即所谓的“CAR-NKT细胞”。NKT细胞具有T细胞受体,该受体能够识别通过非经典MHC蛋白CD1d呈递的糖脂和脂质。如本文所用,术语“NKT细胞”是指CD1d限制性T细胞。NKT细胞是共表达 $\alpha\beta$ T细胞受体的T细胞的子集,而且表达通常与NK细胞相关的各种分子标记,例如NK1.1。NKT细胞细分为具有恒定T细胞受体的NKT细胞(恒定或1型NKT细胞)和多样化NKT细胞(2型NKT细胞)。CAR-NKT细胞的优势在于CAR活性可与NKT细胞固有的抗肿瘤活性协同作用。术语“包含至少一种肿瘤抗原结合细胞表面受体的至少一种工程化NKT细胞”包括工程化NKT细胞群,优选基本上纯的工程化NKT细胞群,更优选包含50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上或95%以上NKT细胞的细胞混合物。工程化NKT细胞优选由来自不同供体或待治疗受试者的外周血(PB)、骨髓(BM)、脐带血(CB)、胎盘或诱导性多能干细胞(iPSC)产生。

[0067] 术语“包含至少一种肿瘤抗原结合细胞表面受体的工程化NK细胞”是指携带结合肿瘤抗原的重组表面受体的NK细胞,特别是携带重组表面受体的NK细胞,所述重组表面受体包含至少一个肿瘤抗原结合结构域、一个激活结构域和一个共刺激结构域。优选地,这意味着NK细胞携带嵌合抗原受体(CAR),即所谓的“CAR-NK细胞”。NK细胞是包含许多活化和抑制种系编码受体的淋巴细胞。那些受体包括识别肿瘤细胞上的应激配体MIC-A和MIC-B的NKG2D受体,以及天然细胞毒性受体Nkp30、46和p44。另一方面,杀伤细胞免疫球蛋白样受体(KIR)家族与I类MHC分子结合,抑制NK细胞活化。唤起NK效应细胞功能的机制主要有两种:(i) 丢失自我:抑制性配体的缺失,例如由MHC呈递下调导致;(i) 诱导自我:促激活性刺激大于其抑制性对应物,例如由应激性配体或抗体包被细胞的上调导致。术语“包含至少一种肿瘤抗原结合细胞表面受体的至少一种工程化NK细胞”包括工程化NK细胞群,优选基本上纯的工程化NK细胞群,更优选包含50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上或95%以上NK细胞的细胞混合物。工程化NK细胞优选由来自不同供体或待治疗受试者的外周血(PB)、骨髓(BM)、脐带血(CB)、胎盘或诱导性多能干细胞(iPSC)产生或者来自NK细胞系(例如NK-92细胞)。CAR-NK细胞的优势在于CAR活性可与NK细胞固有的抗肿瘤活性协同作用。

[0068] 在优选的实施方案中,所述包含至少一种肿瘤抗原结合细胞表面受体的至少一种工程化T细胞、NKT细胞或NK细胞是CAR-T细胞、CAR-NKT细胞或CAR-NK细胞。

[0069] 术语“肿瘤抗原结合细胞表面受体”是指包含至少一个肿瘤抗原结合结构域的重组表面受体,优选指嵌合抗原受体(CAR)。CAR构建体通常由三部分组成,细胞外抗原识别结构域、跨膜结构域和细胞内信号传导结构域。细胞外结构域包含抗原识别位点,通常由单链可变片段(scFv)组成。在某些实施方式中,细胞外结构域还可包含两个或更多个具有相同或优选不同抗原特异性的scFv。它通常通过铰链区与跨膜结构域连接,铰链区赋予了柔性

以适当的定向并与抗原结合。细胞内信号传导结构域包括一个刺激结构域,例如活化受体的细胞内结构域(例如CD3 ζ 或FcR γ),和优选至少一个共刺激结构域,例如共刺激受体的细胞内结构域(例如CD28或4-1BB)。CAR是人工细胞表面受体,即跨膜蛋白,其包含细胞外配体识别结构域、激活各细胞的细胞内信号传导结构域(例如,CD3 ζ 或FcR γ)以及优选地共刺激受体的至少一个细胞内结构域(例如,CD28或4-1BB)。它们之所以称为嵌合体,是因为它们融合了来自不同来源的部分。细胞外配体识别结构域优选基于单克隆抗体的特异性,并且通常是单链可变片段(scFv)。

[0070] CAR编码具有双重功能的跨膜嵌合分子:(a)免疫识别肿瘤细胞表面表达的肿瘤抗原,(b)主动促进和传播控制激活和/或裂解机制的激活的信号传导事件。该系统具有几个优点:(1)提供了最开始激活机制的“重编程T细胞”、“重编程NKT细胞”或“重编程NK细胞”,(2)打破肿瘤细胞获得的耐受性,以及(3)绕开了HLA介导的抗原识别的限制,克服了细胞免疫疗法更广泛应用的障碍之一。

[0071] 对于T细胞,CAR可以是例如嵌合融合蛋白,所述嵌合融合蛋白包含scFv作为细胞外配体识别结构域,和细胞内信号传导结构域,所述细胞内信号传导域包含CD3 ζ 链信号传导结构域或FcR γ 链信号传导结构域。这为T淋巴细胞提供了抗体类型的特异性,并激活了效应细胞的所有功能,包括细胞因子(如IL-2)的产生以及靶细胞的裂解。CAR可以进一步包含细胞内CD28共刺激结构域和/或另外的转导结构域,例如来自CD27、4-1BB、CD40L、PD-1或OX40。通常,CAR是作为编码CAR的DNA或RNA分子预先设计和/或提供的。因此,尽管CAR-T细胞靶向的肿瘤抗原理论上也可以是新抗原,但通常是在某些实体瘤中表达或过表达并且被鉴定在待治疗受试者的实体瘤中表达的肿瘤抗原。

[0072] 根据本发明,包含至少一种肿瘤抗原结合细胞表面受体的工程化T细胞还包括“装甲CAR-T细胞(armored CAR-T cell)”。装甲CAR-T细胞已被进一步优化,以诱导性地或组成性地分泌活性细胞因子,例如白介素,或表达配体,进一步使CAR T细胞装甲以提高功效和持久性。“装甲”剂的选择基于对肿瘤微环境以及先天性和适应性免疫系统其他要素的作用的了解。实例是白细胞介素-2(IL-2)、白细胞介素-12(IL-12)、白细胞介素15(IL-15)、CD40L和4-1BBL。已显示这些试剂能够通过不同的机制进一步增强CAR T细胞的功效和在肿瘤微环境中的持久性。这些通常在同一CAR载体中作为独立基因表达。

[0073] 最近批准的两种CAR-T细胞KYMRIA[®](tisagenlecleucel)和YESCARTA[®](axicabtagene ciloleucel)都含有抗CD19鼠型scFv,但它们通过与CD3 ζ 链串联融合的不同共刺激结构域进行信号传递,KYMRIA[®]的共刺激结构域为4-1BB,YESCARTA[®]的共刺激结构域为CD28。

[0074] 对于NKT细胞,CAR可以是例如嵌合融合蛋白,所述嵌合融合蛋白包含scFv作为细胞外配体识别结构域,和细胞内信号传导结构域,所述细胞内信号传导域包含CD3 ζ 链信号传导结构域或FcR γ 链信号传导结构域。这为NKT细胞提供了抗体类型的特异性,并激活了效应细胞的所有功能。对于NKT细胞,这包括IFN γ 和粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)的产生,以及基于穿孔素的靶细胞裂解,和Fas配体介导的杀伤。CAR可以进一步包含细胞内CD28共刺激结构域和/或另外的转导结构域,例如来自CD27、CD40L、PD-1、4-1BB或OX40。通常,CAR是作为编码CAR的DNA或RNA分子预先设计和/或提供的。因此,尽管CAR-NKT细胞靶向的肿瘤抗原理论上也可以是新抗原,但通常是在某些实体瘤中表达或过表达并且

被鉴定在待治疗受试者的实体瘤中表达的肿瘤抗原。

[0075] 对于NK细胞,CAR可以是例如嵌合融合蛋白,所述嵌合融合蛋白包含scFv作为细胞外配体识别结构域,和细胞内信号传导结构域,所述细胞内信号传导域包含CD3 ζ 链信号传导结构域或FcR γ 链信号传导结构域。这为NK细胞提供了抗体类型的特异性,并激活了效应细胞的所有功能。对于NK细胞,这包括IFN γ 和粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)的产生,以及靶细胞裂解。CAR可以进一步包含细胞内CD28共刺激结构域和/或另外的转导结构域,例如来自CD27、CD40L、PD-1、4-1BB、4-1BB、OX40或2B4(CD244)或DNAX-活化蛋白12(DAP12)结构域。保护性肿瘤微环境中的一个关键细胞因子是转化生长因子 β (TGF- β),它能抑制NK细胞。因此,将TGF- β 受体的胞外结构域与NKG2D受体的胞内结构域融合,可进一步提高CAR-NK细胞的效果。通常,CAR是作为编码CAR的DNA或RNA分子预先设计和/或提供的。因此,尽管CAR-NK细胞靶向的肿瘤抗原理论上也可以是新抗原,但通常是在某些实体瘤中表达或过表达并且被鉴定在待治疗受试者的实体瘤中表达的肿瘤抗原。

[0076] 所述包含至少一种肿瘤抗原结合细胞表面受体的NK细胞或CAR-NK细胞可进一步包含含有NKG2D的CAR,并进一步表达DAP10,其中所述NKG2D与CD3 ζ 的信号传导结构域融合。NKG2D是一种C型凝集素样受体。人NKG2D受体单体通过跨膜结构域与DAP10二聚体的联合组装成六聚体结构。DAP10作为衔接蛋白,在配体与NKG2D结合后转导信号。NKG2D配体是诱导自我蛋白,在正常细胞表面完全不存在或仅以低水平存在,但例如转化细胞(肿瘤抗原)过表达。因此,CAR可以包含胞外结构域和来自天然受体的跨膜结构域,其与CD3 ζ 信号传导结构域融合,并进一步与DAP10结合。由于NKG2D受体能够识别几种不同的配体,而这些配体在细胞应激时经常上调,因此NKG2D-CAR-NK细胞,也是多特异性的,并且可能不容易出现肿瘤细胞的抗原丢失。尽管这种受体虽然是为CAR-NK细胞开发的,但也适用于CAR-T细胞和CAR-NKT细胞。

[0077] 根据本发明,在其细胞表面上包含至少一种肿瘤抗原结合蛋白的工程化NKT细胞或NK细胞也包括“装甲CAR-NK细胞”或“装甲CAR-NKT细胞”。装甲CAR-NK细胞已被进一步优化,以诱导性地或组成性地分泌活性细胞因子,或表达配体,进一步使CAR细胞装甲以提高功效和持久性。“装甲”剂的选择基于对肿瘤微环境以及先天性和适应性免疫系统其他要素的作用的了解。实例是白介素,例如对于NK细胞的IL-2和IL-15,和对于NKT细胞的IL-15。已显示这些试剂能够通过不同的机制进一步增强CAR-NKT细胞和CAR-NK细胞的功效和在肿瘤微环境中的持久性。这些通常在同一CAR载体中作为独立基因表达。

[0078] 在没有细胞因子支持的情况下,NK细胞在过继转移后不会持续存在。虽然NK细胞的寿命较短可能是有利的,允许发挥抗肿瘤活性,同时减少长期不良事件的发生概率,例如靶向/非肿瘤毒性引起的对正常组织的长期细胞减少,但是也可能限制其疗效。为了在体内存活和增殖,NK细胞需要持续的细胞因子支持,如果没有细胞因子支持,NK细胞在循环中只能检测到1-2周。支持过继转移的NK细胞持续存在的两种最常用的细胞因子是IL-2和IL-15。因此,可以将IL-2和/或IL-15的基因并入CAR-NK细胞的CAR构建体内。这允许不断地向CAR转导的细胞提供细胞因子支持。

[0079] 也可以外源性地提供白细胞介素,然而,输注IL-2或IL-15具有实质性的副作用。外源性施用细胞因子的另一种或额外的方法是在NK细胞的过继细胞转移之前进行淋巴细胞清除化疗,如环磷酰胺和氟达拉滨。这一方法通过清除成熟淋巴细胞(其消耗IL-15),为

NK细胞扩增提供了有利的环境,使内源性IL-15水平明显升高。除了靶标表位的选择、CAR设计以及所应用的剂量和给药方案外,对于实体瘤的CAR-T细胞、CAR-NKT细胞或CAR-NK细胞治疗的成功,高效的肿瘤归巢和在肿瘤环境中的长期存活也很重要。在大多数情况下,在施用CAR-T细胞、CAR-NKT细胞或CAR-NK细胞之前,都会对受试者进行淋巴细胞清除,可能的后续细胞因子支持也很重要。

[0080] CAR-T细胞在液体肿瘤中常见的副作用是细胞因子的大量产生,可能导致严重的细胞因子释放综合征(CRS)。对于实体瘤来说,这种风险不太明显。在不受理论约束的情况下,这可以由不同的效应细胞-靶细胞配比来解释,其在液体瘤中通常较在实体瘤中更高。此外,通常认为与T细胞,尤其是传统的 $\alpha\beta$ T细胞相比,NKT细胞或NK细胞的过继细胞转移的风险较小。

[0081] 此外,大多数肿瘤抗原不具有肿瘤选择性(不是肿瘤特异性抗原),特别是在实体瘤中,通常只是过表达(是肿瘤相关抗原)。因此,存在肿瘤脱靶毒性的风险。然而,减少肿瘤脱靶毒性的方法是本领域已知的。例如,可以通过以两个、三个或更多剂量施用所需数量的细胞来控制肿瘤脱靶毒性。另外,也可以使用RNA瞬时工程化CAR-T细胞、CAR-NKT细胞或CAR-NK细胞来减少肿瘤脱靶毒性。另外,在肿瘤发展的早期阶段,在癌细胞数量变得过高之前开始治疗,对治疗结果和降低肿瘤脱靶毒性是有利的。

[0082] 此外,可以通过识别同一细胞上表达的两种肿瘤抗原来保证靶标选择性。这可以通过使用串联CAR来实现,该串联CAR通过两种嵌合受体的参与来介导T细胞、NKT细胞或NK细胞的双特异性激活,其中这两种嵌合受体被设计为在不同的CAR中递送刺激和共刺激信号,例如CD3 ζ 链信号传导结构域和CD28协同刺激结构域,需要两种不同的肿瘤抗原的独立参与来实现有效的信号传导。另外,也可以使用抑制性嵌合抗原受体(iCAR)从正常组织转为CAR-T细胞、CAR-NKT细胞或CAR-NK细胞活性。iCAR结合原生抗原(即仅在正常组织上呈现),并包含抑制性信号传导结构域,如来自PD-1或CTLA-4,以关闭活性CAR的激活。因此,这两种方法,即串联CAR和iCAR,结合了两种嵌合抗原受体的活性。

[0083] 与CAR-T细胞免疫疗法特别有关,但也与CAR-NKT细胞或CAR-NK细胞免疫疗法有关的一个问题是抗原逃逸,可能会使CAR-T细胞、CAR-NKT细胞或CAR-NK细胞对癌细胞无效。此外,CAR-T细胞、CAR-NKT细胞或CAR-NK细胞通常不重复施用。因此,需要一种后续治疗。其允许靶向其他肿瘤抗原,最好是多种肿瘤抗原,例如新抗原。

[0084] 为了安全起见,CAR修饰的T细胞可以进一步包含自杀系统,例如诱导性caspase-9(iCasp9)或截短型表皮生长因子受体(缺乏信号传导结构域的EGFR,可以用抗EGFR抗体进行靶向,以快速消除转基因细胞),NKT和NK细胞也可如此。这可能与CAR-T和CAR-NKT细胞特别相关。虽然成熟的CAR-NK细胞的持久性有限,但是源自脐带血或造血干细胞的NK细胞具有更高的长期毒性风险,因此自杀系统也可用于这些细胞中。

[0085] 发明人发现,编码包含五种或更多种新抗原的至少一种多肽的伤寒沙门氏菌Ty21a菌株特别适合作为后续治疗,因为它可以靶向实体瘤中表达的多种新抗原。因此,在包含至少一种肿瘤抗原结合细胞表面受体的至少一种工程化T细胞、NKT细胞或NK细胞的过继细胞转移之后,施用伤寒沙门氏菌Ty21a菌株,其中所述伤寒沙门氏菌Ty21a菌株编码包含五种或更多种新抗原的至少一条多肽。如果受试者在包含至少一种肿瘤抗原结合细胞表面受体的至少一种工程化T细胞、NKT细胞或NK细胞的过继细胞转移之前没有经受淋巴细胞

清除化疗,也可以与包含至少一种肿瘤抗原结合细胞表面受体的至少一种工程化T细胞、NKT细胞或NK细胞的过继细胞转移一起或之后不久(例如,在几个小时或几天内),施用伤寒沙门氏菌Ty21a菌株,其中所述伤寒沙门氏菌Ty21a菌株编码包含五种或更多种新抗原的至少一条多肽。

[0086] 包含至少一种肿瘤抗原结合细胞表面受体的至少一种工程化T细胞、NKT细胞或NK细胞通常以一次过继性细胞转移的方式施用,并且不重复施用。然而,所需数量的工程化T细胞、NKT细胞或NK细胞可以在两次或三次后续过继性细胞转移中以分次剂量施用。因此,治疗可以包括第一次施用,以及任选的在两天或更长时间内的第二、第三甚至可能进一步的施用。过继转移的细胞的持续时间可能长达三个月、四个月或六个月。一些作者甚至声称它们是终身存在的活细胞。

[0087] 在包含至少一种肿瘤抗原结合细胞表面受体的至少一种工程化T细胞、NKT细胞或NK细胞的过继细胞转移之前,可以用伤寒沙门氏菌Ty21a治疗受试者,其中所述伤寒沙门氏菌Ty21a包含DNA分子,所述DNA分子包含编码VEGFR-2的至少一个真核表达盒(例如,如WO 2014/005683中所公开)。在一个实施方案中,VEGFR-2包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列。已知这种疫苗(VXM01)可增强肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)的数量。因此,该疫苗可以增强所述包含至少一种肿瘤抗原结合细胞表面受体的至少一种工程化T细胞、NKT细胞或NK细胞的功效。此外,因为所述包含至少一种肿瘤抗原结合细胞表面受体的至少一种工程化T细胞、NKT细胞或NK细胞通常是按需制造的,所以在制备包含至少一种肿瘤抗原结合细胞表面受体的至少一种工程化T细胞、NKT细胞或NK细胞的同时,该疫苗提供了癌症免疫疗法。因此,在一个具体的实施方案中,首先用伤寒沙门氏菌Ty21a治疗受试者,其中所述伤寒沙门氏菌Ty21a包含DNA分子,所述DNA分子包含编码VEGFR-2的至少一个真核表达盒,然后是包含至少一种肿瘤抗原结合细胞表面受体的至少一种工程化T细胞、NKT细胞或NK细胞的过继细胞转移(有或没有淋巴细胞清除化疗),以及编码包含五种或更多种新抗原的至少一条多肽的伤寒沙门氏菌Ty21a。

[0088] 在某些实施方式中,在包含至少一种肿瘤抗原结合细胞表面受体的至少一种工程化T细胞、NKT细胞或NK细胞的第一次过继细胞转移的同时或者之后的约2周至4个月时,优选2至3个月时,施用伤寒沙门氏菌Ty21a菌株,其中所述伤寒沙门氏菌Ty21a菌株编码包含五种或更多种新抗原的至少一条多肽。其中,同一时间是指几个小时或几天之内,优选同一天或一周之内。

[0089] 在某些实施方式中,在所述包含至少一种肿瘤抗原结合细胞表面受体的至少一种工程化T细胞、NKT细胞或NK细胞的过继细胞转移之前,所述受试者已经接受了淋巴细胞清除术(lymphodepletion),特别是淋巴细胞清除化疗(lymphodepleting chemotherapy)。如本文所用,术语“淋巴细胞清除化疗”是指在过继细胞转移之前,导致受试者淋巴细胞减少的化学疗法。它还包括非骨髓性淋巴细胞清除化疗,这也可能提高过继细胞转移疗法的疗效。淋巴细胞清除化疗也可以称为“调理”。淋巴细胞清除化疗是本领域已知的,并且可涉及例如使用环磷酰胺(CTX)或CXT和氟达拉滨7天。CTX不影响早期造血骨髓前体。

[0090] 为了在在过继性细胞转移之前已经经受过淋巴细胞清除化疗的受试者中引发针对新抗原的免疫反应,需要补充淋巴细胞,或者换言之,在施用伤寒沙门氏菌Ty21a菌株之前,受试者需要恢复免疫能力,其中所述伤寒沙门氏菌Ty21a菌株包含DNA分子,所述DNA分

子包含至少一个真核表达盒,所述至少一个真核表达盒编码至少一种多肽,所述至少一种多肽包含五种或更多种新抗原。取决于淋巴细胞清除化疗的类型,在淋巴细胞清除化疗后约1个月至2个月补充淋巴细胞。通常,在淋巴细胞清除化疗后约两周至16周,4周至16周,2周至16周或8周至12周补充淋巴细胞。优选地,在淋巴细胞清除化疗后淋巴细胞计数恢复正常后,更优选在淋巴细胞清除化疗后白细胞计数恢复正常后,更优选在受试者恢复免疫能力之后,向受试者施用伤寒沙门氏菌Ty21a菌株,其中所述伤寒沙门氏菌Ty21a菌株包含DNA分子,所述DNA分子包含至少一个真核表达盒,所述至少一个真核表达盒编码至少一种多肽,所述至少一种多肽包含五种或更多种新抗原。正常淋巴细胞计数在 $1000/\text{mm}^3$ 及以上的范围。正常白细胞计数在 $4000/\text{mm}^3$ 及以上的范围。免疫能力可以基于 $2000/\text{mm}^3$ 及以上的白细胞计数来确定。

[0091] 如果受试者在过继性细胞转移之前接受了淋巴细胞清除术,则在包含至少一种肿瘤抗原结合细胞表面受体的至少一种工程化T细胞、NKT细胞或NK细胞的第一次过继细胞转移之后约2周至4个月时,优选1至4个月时,优选2至4个月时,更优选2至3个月时,施用伤寒沙门氏菌Ty21a菌株,其中所述伤寒沙门氏菌Ty21a菌株编码包含五种或更多种新抗原的至少一条多肽。

[0092] 新抗原疫苗联合疗法

[0093] 根据本发明,伤寒沙门氏菌Ty21a菌株可以进一步与至少一种检查点抑制剂共同施用,其中所述伤寒沙门氏菌Ty21a菌株包含DNA分子,所述DNA分子包含至少一个真核表达盒,所述至少一个真核表达盒编码至少一种多肽,所述至少一种多肽包含五种或更多种新抗原。术语“检查点抑制剂”在本文中“免疫检查点抑制剂”同义使用。通常,检查点疗法会阻断抑制性检查点,从而恢复免疫系统功能。具体地,所述至少一种检查点抑制剂可以是抗体,特别是选自由以下组成的组:抗PD-1、PD-L1、CTLA-4、IDO、GITR、OX40、TIM-3、LAG-3、KIR、CSF1R和CD137抗体。检查点抑制剂可以与所述至少一种伤寒沙门氏菌Ty21a菌株同时或分开施用,其中所述伤寒沙门氏菌Ty21a菌株包含DNA分子,所述DNA分子包含至少一个真核表达盒,所述至少一个真核表达盒编码至少一种多肽,所述至少一种多肽包含五种或更多种新抗原。

[0094] 至少一种检查点抑制剂优选以批准的商业产品的盖仑制剂施用。

[0095] 在本发明的背景中,术语“同时”是指在同一天,更特别是在12小时内,更特别是在2小时内施用伤寒沙门氏菌Ty21a减毒菌株和检查点抑制剂,其中所述伤寒沙门氏菌Ty21a减毒菌株包含至少一个真核表达盒,所述至少一个真核表达盒编码至少一条多肽,所述至少一条多肽包含五种或更多种新抗原。在本文中使用的术语“分开地”是指在不同天,更特别是在不同施用方案下,以不同剂型施用。

[0096] 在已经用或正在用包含至少一种肿瘤抗原结合细胞表面受体的至少一种工程化T细胞、NKT细胞或NK细胞治疗的受试者中,在相对低剂量的编码包含五种或更多种新抗原的至少一条多肽的伤寒沙门氏菌Ty21a菌株下,所述编码包含五种或更多种新抗原的至少一条多肽的伤寒沙门氏菌Ty21a菌株与至少一种检查点抑制剂一起令人惊讶地显示出对T细胞、NKT细胞或NK细胞反应和/或总体存活的协同作用。施用低剂量的活细菌疫苗使排泄的风险降至最低,并由此使传播给第三方的风险降至最低。

[0097] 根据本发明,接受了伤寒沙门氏菌Ty21a菌株的受试者可以进一步用至少一种伤

寒沙门氏菌Ty21a进行治疗,前者伤寒沙门氏菌Ty21a菌株包含DNA分子,所述DNA分子包含至少一个真核表达盒,所述至少一个真核表达盒编码至少一种多肽,所述至少一种多肽包含五种或更多种新抗原;后者伤寒沙门氏菌Ty21a包含DNA分子,所述DNA分子包含至少一个真核表达盒,所述至少一个真核表达盒编码至少一种肿瘤抗原、肿瘤基质抗原和/或检查点抑制剂抗原。在一个实施方案中,所述至少一种肿瘤抗原、肿瘤基质抗原和/或检查点抑制剂抗原选自:人肾母细胞瘤蛋白(WT1)、人间皮素(MSLN)、人CEA、CMV pp65、人PD-L1、人VEGFR-2和人成纤维细胞活化蛋白(FAP),优选选自人PD-L1和人VEGFR-2。特别地,其中该治疗还包括向受试者施用的至少一种伤寒沙门氏菌Ty21a,其中所述伤寒沙门氏菌Ty21a包含DNA分子,所述DNA分子包含至少一个真核表达盒,所述真核表达盒编码选自以下的抗原:WT1、MSLN、CEA、CMV pp65、PD-L1、VEGFR-2和FAP。所述至少一种伤寒沙门氏菌Ty21a可以与所述至少一种伤寒沙门氏菌Ty21a同时或分开施用,前者伤寒沙门氏菌Ty21a包含DNA分子,所述DNA分子包含至少一个真核表达盒,所述真核表达盒编码选自以下的抗原:WT1、MSLN、CEA、CMV pp65、PD-L1、VEGFR-2和FAP;后者伤寒沙门氏菌Ty21a包含DNA分子,所述DNA分子包含至少一个真核表达盒,所述至少一个真核表达盒编码至少一种多肽,所述至少一种多肽包含五种或更多种新抗原。

[0098] 在本发明的背景中,术语“同时”是指在同一天,更特别地在12小时内,更特别地在2小时内施用不同的伤寒沙门氏菌Ty21a减毒株。不同的伤寒沙门氏菌Ty21a减毒株可以但不一定在同一剂型中。在本文中使用的术语“分开地”是指在不同天,更特别地在不同施用方案下,以及以不同剂型施用。

[0099] 在特定的实施方案中,人VEGFR-2包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列或与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。在特定的实施方案中,人肾母细胞瘤蛋白(WT1)包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列或与SEQ ID NO:3的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。在特定的实施方案中,人间皮素(MSLN)包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列或与SEQ ID NO:4的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。在特定的实施方案中,人CEA包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列或与SEQ ID NO:5的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。在特定的实施方案中,CMV pp65包含SEQ ID NO:6、7或8的氨基酸序列或与SEQ ID NO:6、7或8的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。在特定的实施方案中,人PD-L1包含SEQ ID NO:9或10的氨基酸序列或与SEQ ID NO:9、10或11的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。

[0100] 优选地,VEGFR-2具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列,WT1具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列,MSLN具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列,CEA具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列,CMV pp65具有SEQ ID NO:6、7或8的氨基酸序列和/或PD-L1具有SEQ ID NO:9、10或11的氨基酸序列。

[0101] VEGFR-2,也被称为含激酶插入结构域的受体(KDR),似乎介导几乎所有已知的对VEGF的细胞应答。例如,VEGF在血管生成中的作用似乎是通过该蛋白与VEGFR-2的相互作用来介导的。VEGFR-2为1356个氨基酸长,200-230kDa分子量,是VEGF以及VEGF-C和VEGF-D的高亲和力受体。通过人类内皮cDNA筛选酪氨酸激酶受体鉴定,VEGFR-2与先前发现的小鼠胎肝激酶1(F1k-1)具有85%的序列一致性。VEGFR-2通常在内皮前体细胞和造血前体细胞以及内皮细胞、新生造血干细胞和脐带基质中表达。然而,在静态成人脉管系统中,VEGFR-2mRNA似乎被下调。

[0102] VEGFR-2的细胞外结构域含有18个潜在的N-连接的糖基化位点。VEGFR-2最初被合成为150kDa的蛋白,并迅速糖基化成200kDa的中间体形式,然后以较慢的速度进一步糖基化成在细胞表面表达的成熟的230kDa蛋白。

[0103] 间皮素是40-kDa的细胞表面糖蛋白,存在于正常间皮细胞上,并在多种人类肿瘤,包括间皮瘤、卵巢和胰腺腺癌中过表达。间皮素基因编码71-kDa的前体蛋白,其经加工产生31-kDa的脱落蛋白,称为巨核细胞增强因子(MPF),和40-kDa的细胞结合片段间皮素。在存在白细胞介素-3的情况下,间皮素呈现出巨核细胞集落形成活性。间皮素是一种肿瘤分化抗原,其在有限的正常成人组织如间皮中以低水平存在,但在多种人类肿瘤,包括间皮瘤、卵巢和胰腺癌、宫颈、头和颈、外阴、肺和食道的鳞状细胞癌、肺腺癌、子宫内膜癌(endometrial carcinomas)、双相型滑膜肉瘤、促结缔组织增生性小圆细胞瘤和胃腺癌中异常过表达。间皮素的正常生物功能是未知的。间皮素敲除小鼠的研究显示没有可检测的表型,并且雄性和雌性小鼠都产生了健康的后代。胰腺癌的研究表明间皮素通过增加细胞增殖、迁移和S期细胞群而在肿瘤发生中起作用。此外,有证据表明,间皮素是一种免疫原性蛋白。由于其表达谱、致癌功能和免疫原性,肿瘤抗原间皮素是癌症疫苗开发的有前景的候选者。

[0104] 肾母细胞瘤基因1(WT1)编码参与细胞增殖和分化的锌指转录因子。WT1蛋白在C-末端含有四个锌指基序,在N-末端含有富含脯氨酸/谷氨酰胺的DNA-结合结构域。由在两个编码外显子处的选择性剪接而产生的多个转录变异体已被很好地表征。WT1在泌尿生殖系统的发育中起着重要作用,并参与细胞增殖和分化。WT1基因作为引起儿童肾肿瘤—肾母细胞瘤的基因被分离。它在很多种恶性肿瘤中高度表达,包括几种类型的血液恶性肿瘤和各种实体瘤。相反地,WT1在成人中的正常组织表达限于生殖腺、子宫、肾、间皮和各种类型的组织中的祖细胞。WT-1对祖细胞的分化有负向影响,并促进祖细胞的增殖。此外,过表达的WT1是免疫原性的;在癌症患者中已经观察到WT1特异性T细胞以及IgG抗WT1抗体。由于其表达谱、致癌功能和免疫原性,肿瘤抗原WT1是癌症疫苗开发的有前景的候选者。在具体的实施方案中,WT1被截短。在具体的实施方案中,WT1的锌指结构域被删除。在具体的实施方案中,被截短的WT1具有如SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列。

[0105] WT1的C端的锌指结构域包含四个锌指基元。氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示的截短的WT1代表蛋白质分析数据库(UniProt)编号P19544-7的1至371位氨基酸。锌指结构域的缺失使与含转录因子的其他锌指的免疫交叉反应风险降至最低。此外,缺少锌指结构域的截短的WT1具有比全长WT1更强的免疫原性。另外,对DNA结合所必需的锌指基元的缺失消除了WT1的致癌潜力,从而将致癌的风险降至最低。

[0106] 间层蛋白(tegument protein)CMV pp65是人巨细胞病毒(CMV)的主要免疫显性蛋白。CMV pp65的生物功能尚不清楚,但认为其参与细胞周期调控。CMV pp65是一种亲核蛋白,呈现出蛋白激酶活性,能够结合polo样激酶1(PLK-1)。HCMV pp65在超过90%的胶质母细胞瘤标本中表达,但在周围正常脑组织中不表达。因此,对于新型癌症免疫疗法的开发,这一病毒蛋白是肿瘤特异性靶标的有前景的候选者。

[0107] CMV pp65蛋白在羧基端附近的415至438位氨基酸处和537至561位氨基酸处含有两个双核定位信号(NLS),并且在赖氨酸-436处含有与其激酶活性相关的磷酸结合位点。436位的赖氨酸突变为天冬酰胺以及537-561位氨基酸的缺失导致无激酶活性的蛋白以及

核定位显著降低。该突变蛋白的免疫原性不变。

[0108] 在具体的实施方案中,CMV pp65具有如SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列。SEQ ID NO:6代表野生型CMV pp65的氨基酸序列。在其他具体实施方案中,CMV pp65具有如SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列。SEQ ID NO:7代表CMV pp65的氨基酸序列,其相对于SEQ ID NO:6的野生型人CMV pp65具有K436N突变。在其他具体实施方案中,CMV pp65具有如SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列。SEQ ID NO:8代表SEQ ID NO:7的CMV pp65的截短形式的氨基酸序列,其缺少第二个多出来的C-末端NLS(核定位序列)(即SEQ ID NO:7的CMV pp65的537至561位氨基酸)。

[0109] 癌胚抗原(CEA)(也称为CEACAM5和CD66e)是参与细胞粘附的高度相关的糖基磷脂酰肌醇(GPI)细胞表面锚定糖蛋白家族的成员。CEA通常在胎儿发育期间在胃肠组织中产生;蛋白表达在出生前结束。因此,CEA通常仅以非常低的水平存在于健康成年人的血液中。然而,在某些类型的癌症,特别是在结直肠癌中血清水平升高,因此其可作为肿瘤标志物。在胃癌、胰腺癌、肺癌、乳腺癌和甲状腺髓样癌以及一些非肿瘤性病况如溃疡性结肠炎、胰腺炎、肝硬化、COPD、克罗恩氏病和甲状腺功能减退症中,CEA水平也可能升高。

[0110] 程序性细胞死亡1(PD-1)在T细胞表面上表达,并传递维持针对同源抗原的T细胞功能性沉默的抑制信号。其配体PD-L1通常在炎性微环境中的抗原呈递细胞、胎盘细胞和非造血细胞上表达。据报道,PD-L1在免疫抑制性骨髓衍生的抑制细胞(MDSC)上表达。此外,PD-L1在各种类型的癌细胞表面广泛表达,这些癌细胞使用PD-1/PD-L1信号传导轴来逃避宿主免疫系统。据显示,癌细胞表达PD-L1与疾病阶段和不良患者预后相关。

[0111] 在具体的实施方案中,PD-L1选自由以下组成的组:全长PD-L1和包含PD-L1的细胞外结构域的截短的PD-L1。截短的PD-L1可包含SEQ ID NO:11的氨基酸19至238的氨基酸序列、SEQ ID NO:11的氨基酸序列、SEQ ID NO:10的氨基酸序列,或者可以包含与SEQ ID NO:11的氨基酸19至238、与SEQ ID NO:11或与SEQ ID NO:10具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。在具体的实施方案中,PD-L1选自由以下组成的组:具有如SEQ ID NO:9所示氨基酸序列的PD-L1以及与其具有至少80%序列一致性的蛋白。在具体的其他实施方案中,PD-L1选自由以下组成的组:具有如SEQ ID NO:10所示氨基酸序列的PD-L1以及与其具有至少80%序列一致性的蛋白。在具体的其他实施方案中,PD-L1选自由以下组成的组:具有如SEQ ID NO:11所示氨基酸序列的PD-L1以及与其具有至少80%序列一致性的蛋白。在具体的其他实施方案中,PD-L1选自由以下组成的组:具有如SEQ ID NO:11的氨基酸19至238的氨基酸序列的PD-L1以及与其具有至少80%序列一致性的蛋白。特别地,PD-L1具有如SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列,优选地,PD-L1包含SEQ ID NO:11的氨基酸19至238的氨基酸序列。在一个实施方案中,PD-L1至少包含细胞外结构域,所述细胞外结构域具有或不具有信号肽。

[0112] 如本文所用,术语“约”或“近”是在给定值或范围的80%至120%以内,或者90%至110%以内,包括95%至105%以内。

[0113] 在本发明的背景中,术语“与SEQ ID NO:X的氨基酸序列具有至少约80%的序列同一性的蛋白质”是指当与所提供的氨基酸序列比对时,具有80%以上氨基酸同一性的氨基酸序列的蛋白质。所述蛋白可以是天然来源的,例如野生型蛋白的突变形式,例如野生型VEGFR-2蛋白的突变形式,或不同物种的同源物,或工程化的蛋白,例如工程化的VEGFR-2蛋

白。用于设计和构建给定蛋白的衍生物的方法是本领域任一普通技术人员所熟知的。

[0114] 与参考氨基酸序列相比,与给定氨基酸序列具有至少约80%序列同一性的蛋白质可含有一个或多个氨基酸的一个或多个突变,包括添加、缺失和/或取代。根据本发明的教导,所述缺失、添加和/或取代的氨基酸可以是连续的氨基酸,或者可以散布在与给定参照蛋白具有至少约80%序列一致性的蛋白的氨基酸序列的长度上。根据本发明的教导,只要与参照氨基酸序列的氨基酸序列一致性至少约80%并且突变的蛋白是免疫原性的,则可以添加、缺失和/或取代任意数目的氨基酸。优选地,通过ELISA测量,与参考氨基酸序列相比,与参考氨基酸序列具有至少约80%序列一致性的蛋白的免疫原性减少了小于50%,小于40%,小于30%,小于20%,小于10%,小于5%或小于1%。用于设计和构建蛋白同源物和用于测试这些同源物的免疫原性潜力的方法是本领域普通任一技术人员所熟知的。在具体的实施方案中,与参考氨基酸的序列一致性为至少约85%,至少约90%,至少约95%,最特地,至少约99%。用于测定序列一致性包括比较亲本蛋白与其相对于亲本序列具有缺失、添加和/或取代的衍生物的方法和算法,是本领域普通技术人员公知的。在DNA水平上,由于遗传密码的简并性,编码与参考氨基酸序列具有至少约80%序列一致性的蛋白的核酸序列可能在很大程度上不同。

[0115] 在具体实施方案中,伤寒沙门氏菌Ty21a菌株的施用与沙门氏菌减毒菌株和一种检查点抑制剂的施用相联合,其中所述伤寒沙门氏菌Ty21a菌株编码包含五种或更多种新抗原的至少一条多肽,所述沙门氏菌减毒菌株编码选自WT1、MSLN、CEA、CMV pp65、PD-L1、VEGFR-2和FAP的肿瘤抗原或肿瘤基质抗原。

[0116] 在具体实施方案中,治疗还可以伴随化学疗法或放射疗法。为了治愈癌症,彻底根除癌症干细胞可能是必要的。因此,为获得最大效力,联合不同的治疗方法可能是有益的。

[0117] 可以与本发明的伤寒沙门氏菌Ty21a菌株联合使用的化学治疗剂可以是例如:吉西他滨、氨磷汀(乙醇)、卡巴他赛、顺铂、达卡巴嗪(DTIC)、放线菌素D、多烯紫杉醇、双氯乙基甲胺(mechlorethamine)、链脲霉素、环磷酰胺、carrustine(BCNU)、洛莫司汀(CCNU)、多柔比星(阿霉素)、多柔比星脂质体(doxil)、亚叶酸、吉西他滨(健择(gemzar))、道诺霉素、道诺霉素脂质体(daunoxome)、丙卡巴肼、酮康唑、丝裂霉素、阿糖胞苷、依托泊苷、甲氨蝶呤、5-氟尿嘧啶(5-FU)、长春碱、长春新碱、博来霉素、紫杉醇、多西他赛(泰索帝)、阿地白介素、天冬酰胺酶、白消安、卡铂、克拉屈滨、喜树碱、CPT-11、10-羟基-7-乙基-喜树碱(SN38)、达卡巴嗪、氟尿苷、氟达拉滨、羟基脲、异环磷酰胺、伊达比星、美司钠、干扰素 α 、干扰素 β 、伊立替康、米托蒽醌、拓扑替康、亮丙瑞林、甲地孕酮、美法仑、巯嘌呤、奥沙利铂、普卡霉素、米托坦、培门冬酶(pegaspargase)、喷司他汀、哌泊溴烷(pipobroman)、普卡霉素、链脲霉素、他莫西芬、替尼泊苷、鞣内酯、硫鸟嘌呤、噻替派、乌拉莫司汀(uracil mustard)、长春瑞滨、苯丁酸氮芥及其组合。

[0118] 本发明最优选的化疗剂是卡巴他赛,卡铂,奥沙利铂,顺铂,环磷酰胺,多西他赛,吉西他滨,多柔比星,紫杉醇,伊立替康,长春新碱,长春碱,长春瑞滨,亚叶酸,5-氟尿嘧啶和博来霉素,尤其是吉西他滨。

[0119] 特别地,在化疗或放疗治疗之前或期间施用伤寒沙门氏菌Ty21a菌株。在其他具体的实施方案中,在化疗或放疗治疗之前和期间施用伤寒沙门氏菌Ty21a菌株。

[0120] 伤寒沙门氏菌Ty21a

[0121] 沙门氏菌,特别是肠沙门氏菌的减毒株,是用于将异源抗原递送至哺乳动物免疫系统的有吸引力的载体,因为肠沙门氏菌菌株可以通过粘膜免疫途径,即口服或经鼻递送,与肠胃外给药相比,它具有简单性和安全性的优点。此外,沙门氏菌菌株在全身和粘膜隔室的水平均能够引发强烈的体液和细胞免疫应答。批量制备的成本低,并且活菌疫苗制剂非常稳定。减毒可通过删除各种基因,包括毒力、调节和代谢基因来实现。

[0122] 已证明,几种通过aro突变而减毒的鼠伤寒沙门氏菌菌株在动物模型中是安全有效的外源抗原递送载体。

[0123] 根据本发明,沙门氏菌的减毒株是肠沙门氏菌血清变种typhi菌株Ty21a,也称为伤寒沙门氏菌Ty21a。减毒活伤寒沙门氏菌Ty21a菌株是Typhoral L[®]的活性成分,Typhoral L[®]也称为Vivotif[®](由Cruce11在瑞士的公司Berna Biotech有限责任公司制造)。它是目前唯一获得许可的抗伤寒热口服活疫苗。这种疫苗已经被广泛测试,并已被证明在患者毒性以及向第三方传播方面是安全的(Wahdan等人,Wahdan等人,J.Infectious Diseases 1982,145:292-295)。该疫苗已在40多个国家获得许可,并已用于数百万人的抗伤寒热预防性疫苗接种中,包括数千名儿童。它拥有空前的安全记录。没有可获得的数据表明伤寒沙门氏菌Ty21a能够系统性地进入血液。因此,减毒活伤寒沙门氏菌Ty21a疫苗菌株能够在肠道中特异性靶向免疫系统,同时安全且耐受性良好。Typhoral L[®]的销售许可证编号为PL 15747/0001,日期为1996年12月16日。一个剂量的疫苗含有至少 2×10^9 个活伤寒沙门氏菌Ty21a菌落形成单位和至少 5×10^9 个失活的伤寒沙门氏菌Ty21a细胞。

[0124] 这种耐受性良好的、活体口服抗伤寒热疫苗是通过野生型毒性细菌分离株伤寒沙门氏菌Ty2的遗传诱变衍生的,并且含有galE基因功能缺失性突变,导致其不能代谢半乳糖。减毒细菌菌株也不能将硫酸盐还原成硫化物,从而将其与野生型伤寒沙门氏菌Ty2菌株区分开来。关于其血清学特征,伤寒沙门氏菌Ty21a菌株含有O9-抗原(其是细菌外膜的多糖)并且缺乏O5-抗原(其是鼠伤寒沙门氏菌的特征性成分)。该血清学特征支持将相应的测试包括在一组对批量释放的鉴定测试中的基本原理。

[0125] 如在本发明的伤寒沙门氏菌Ty21a菌株中使用的表达盒是真核表达盒,特别是包含CMV启动子。在本发明的背景中,术语“真核表达盒”是指允许真核细胞中开放阅读框表达的表盒。已证明,诱导足够的免疫应答所需的外源抗原的量对细菌可能是有毒性的,并可能导致细胞死亡、过度减毒或外源抗原表达缺失。使用在细菌载体中不表达而仅在靶细胞中表达的真核表达盒可以克服这一毒性问题,并且所表达的蛋白通常呈现出真核糖基化模式。

[0126] 真核表达盒包含能够控制开放阅读框在真核细胞中表达的调控序列,优选为启动子和聚腺苷酸化信号。本发明伤寒沙门氏菌Ty21a菌株所包含的真核表达盒中所包括的启动子和聚腺苷酸化信号被优选选择为在待免疫的受试者的细胞内起作用。合适的启动子,特别是用于生产人类DNA疫苗的实例包括但不限于来自巨细胞病毒(CMV)的启动子,如强CMV立即早期启动子;猿猴病毒40(SV40);小鼠乳腺肿瘤病毒(MMTV);人类免疫缺陷病毒(HIV),如HIV长末端重复(LTR)启动子;莫洛尼病毒;爱泼斯坦巴尔病毒(EBV);以及来自劳氏肉瘤病毒(RSV);由CMV早期增强子元件、鸡 β -肌动蛋白基因的启动子、第一外显子和第一内含子,以及兔 β 珠蛋白基因的剪接受体组成的合成CAG启动子;以及来自人类基因如人肌

动蛋白、人肌球蛋白、人血红蛋白、人肌肉肌酸和人类金属硫蛋白的启动子。在一个具体实施方案中,所述真核表达盒含有CMV启动子。在本发明的背景中,术语“CMV启动子”是指强立即早期巨细胞病毒启动子。

[0127] 合适的聚腺苷酸化信号,特别是用于生产人类DNA疫苗的聚腺苷酸化信号的实例包括但不限于牛生长激素(BGH)聚腺苷酸化位点、SV40聚腺苷酸化信号和LTR聚腺苷酸化信号。在一个特定的实施方案中,本发明的伤寒沙门氏菌Ty21a菌株所包含的真核表达盒包含BGH聚腺苷酸化位点。

[0128] 除了表达异源多肽所需的调节元件,如启动子和多腺苷酸化信号,真核表达盒中也可以包括其他元件。这种其他元件包括增强子。增强子可以是例如人肌动蛋白、人肌球蛋白、人血红蛋白、人肌肉肌酸的增强子和病毒增强子如来自CMV、RSV和EBV的增强子。

[0129] 调控序列和密码子通常是物种依赖的,因此为了使蛋白生产最大化,调控序列和密码子被优选选择为在待免疫的物种中有效。本领域技术人员可以生产在给定受试者物种(例如人类受试者)中有功能的重组DNA分子。

[0130] 在具体实施方案中,DNA分子或包含至少一个真核表达盒的DNA分子包含抗生素抗性基因(例如卡那霉素抗生素抗性基因)、ori(例如pMB1 ori或pUC)和强启动子(例如CMV启动子)。在具体实施方案中,重组DNA分子或包含至少一个真核表达盒的DNA分子是质粒,例如基于或衍生自市售pVAX1™表达质粒(Invitrogen, San Diego, California)的质粒。

[0131] 可以通过用pBR322的低拷贝pMB1复制起点取代高拷贝pUC复制起点来改造该表达载体。进行低拷贝修饰是为了降低代谢负担并使构建体更稳定。将产生的表达载体骨架命名为pVAX10。

[0132] 在具体实施方案中,表达质粒包含SEQ ID NO:2的DNA分子(载体主链pVAX10),其与表达载体pVAX10的序列相关,但不包含位于限制性酶切位点NheI和XhoI之间的多克隆位点部分。

[0133] 在具体实施方案中,口服施用伤寒沙门氏菌Ty21a菌株。经口施用比肠胃外施用更简单、更安全、更舒适。然而,必须指出的是,本发明的伤寒沙门氏菌Ty21菌株也可以通过任意其他合适的途径施用。优选地,向受试者施用治疗有效剂量,并且该剂量取决于具体应用、恶性肿瘤类型、受试者的体重、年龄、性别和健康状况、施用方式和制剂等。根据需要,施用可以是单次或多次。

[0134] 编码包含五种或更多种新抗原的至少一种多肽的伤寒沙门氏菌Ty21a菌株可以以溶液、悬浮液、冻干物、肠溶包衣胶囊或任意其他合适的形式提供。通常,将伤寒沙门氏菌Ty21a菌株配制成饮用溶液。该实施方案的患者依从性有所改善。优选地,所述饮用溶液包含将胃酸至少中和至某一程度,即,使胃液的pH接近pH 7的手段。优选地,所述饮用溶液是包含本发明伤寒沙门氏菌Ty21菌株的缓冲悬浮液。在一个具体实施方案中,所述缓冲悬浮液通过使伤寒沙门氏菌Ty21菌株悬浮在合适的缓冲液中而获得,所述合适的缓冲液优选含有2.6g碳酸氢钠、1.7g L-抗坏血酸、0.2g乳糖一水合物和100ml的饮用水。

[0135] 在具体实施方案中,单剂量的伤寒沙门氏菌Ty21a菌株包含约 10^6 至约 10^{10} ,更特别约 10^6 至约 10^9 ,更特别约 10^7 至约 10^9 ,更特别约 10^6 至约 10^8 ,最特别约 10^6 至约 10^7 个菌落形成单位(CFU)。

[0136] 更特别地,单剂量的伤寒沙门氏菌Ty21a菌株包含约 1×10^6 至约 1×10^{10} ,更特别约

1×10^6 至约 1×10^9 ,更特别约 1×10^7 至约 1×10^9 ,更特别约 1×10^6 至约 1×10^8 ,最特别约 1×10^6 至约 1×10^7 个菌落形成单位(CFU)。

[0137] 此外,本发明的伤寒沙门氏菌Ty21a菌株优选在第一周施用2至4次,优选在第一周施用4次,然后每2至4周,特别是在第1天和第7天,优选在第1、3、5和7天单次剂量强化施用,然后每2至4周单次剂量强化施用。

[0138] 在这一背景下,术语“约”或“近”意指给定值或范围的3倍以内,或者2倍以内,包括1.5倍以内。

[0139] 在特定的实施方案中,治疗包括单次或多次施用本发明的伤寒沙门氏菌Ty21a菌株或药物组合物,其中所述伤寒沙门氏菌Ty21a菌株编码包含五种或更多种新抗原的至少一种多肽。单一剂量的施用可以相同或不同,优选在本文公开的范围内。特别地,该治疗包括治疗第一周的2至4次初次疫苗接种,然后每2至4周单次剂量强化施用本发明的伤寒沙门氏菌Ty21a菌株或药物组合物,其中所述伤寒沙门氏菌Ty21a菌株编码包含五种或更多种新抗原的至少一条多肽,优选地其中多次施用在连续三到六个月内发生。

[0140] 取决于可能发生的副作用,包括使用抗生素或抗炎剂的治疗可能是有利的。

[0141] 如果发生类似由组胺、白三烯或细胞因子介导的过敏反应的不良事件,则可使用针对发热、过敏反应、血压不稳定、支气管痉挛和呼吸困难的治疗选项。在发生不期望的源自T细胞的自我攻击的情况下,治疗选项来源于干细胞移植后应用的急性和慢性移植抗宿主病的标准处理方案。提出环孢菌素和糖皮质激素作为治疗选项。

[0142] 在不太可能的全身性伤寒沙门氏菌Ty21a型感染的情况下,推荐适当的抗生素治疗,例如使用氟喹诺酮类(fluoroquinolones),包括环丙沙星(ciprofloxacin)或氧氟沙星(ofloxacin)。胃肠道的细菌感染使用相应的药剂例如利福昔明(rifaximin)来进行治疗。

[0143] 药物组合物

[0144] 在另一方面,本发明涉及一种药物组合物,其包含一种伤寒沙门氏菌Ty21a菌株,所述伤寒沙门氏菌Ty21a菌株包含DNA分子,所述DNA分子包含至少一个真核表达盒,所述至少一个真核表达盒编码至少一种多肽,所述至少一种多肽包含五种或更多种新抗原。

[0145] 本发明的药物组合物可以是溶液、悬浮液、肠溶包衣胶囊、冻干粉末或适用于预期用途的任意其它形式。本发明的药物组合物可以进一步包含一种或多种药学上可接受的赋形剂。

[0146] 在本发明的背景中,术语“赋形剂”是指与药物的活性成分一起制剂的天然或合成物质。合适的赋形剂包括抗粘剂、粘合剂、包衣、崩解剂、调味剂、着色剂、润滑剂、助流剂、吸收剂、防腐剂 and 甜味剂。

[0147] 在本发明的背景中,术语“药学上可接受的”是指,当施用于哺乳动物(例如人)时生理上可耐受的并且通常不产生不利反应的药物组合物的分子物质和其他成分。术语“药学上可接受的”还可以表示由联邦或州政府的管理机构批准或在美国药典或其他公认的药典中列出的用于哺乳动物,更特别是用于人的。

[0148] 特别地,合适的饮用溶液包含将胃酸至少中和至某一程度,即,使胃液的pH接近pH 7的手段。在一个具体实施方案中,饮用溶液是缓冲悬浮液,所述缓冲悬浮液通过使本发明的伤寒沙门氏菌Ty21菌株悬浮在合适的缓冲液中,优选地,悬浮在将胃酸至少中和至某一程度的缓冲液中而获得,优选地,悬浮在含有2.6g碳酸氢钠、1.7g L-抗坏血酸、0.2g乳糖

一水合物和100ml饮用水的缓冲液中而获得。

[0149] 在具体实施方案中,药物组合物用作药物,特别是用于治疗本发明受试者的实体瘤。在具体实施方案中,药物组合物用作药物,特别是用于治疗受试者的实体瘤,其中所述受试者已经或正在用包含至少一种肿瘤抗原结合细胞表面受体的至少一种工程化T细胞、NKT细胞或NK细胞治疗,或本文公开的任何其他用途或方法。

[0150] 实施例

[0151] 实施例1:使用编码包含多种抗原的多肽的伤寒沙门氏菌Ty21a菌株引发免疫应答的概念验证

[0152] 编码包含多种抗原的多肽的伤寒沙门氏菌Ty21a菌株的产生

[0153] 克隆构建体,该构建体包含9个显性CD8表位(2个VEGFR-2表位(称为KDR2、KDR3)、2个MSLN表位(称为MSLN_GSL、MSLN_IQL)、1个WT-1表位、3个CEA表位(称为CEA-CSA、CEA_CSV、CEA_LTL)和1个OVA表位。基于文献或基于预测的结合特性,选择这些表位作为模型抗原。重要的是要注意,选择用于概念验证的模型表位不是突变的或新抗原,而是来自已知肿瘤相关抗原例如间皮素(MSLN)、肾母细胞瘤1(WT-1)、癌胚抗原(CEA)、肿瘤基质抗原(VEGFR-2)或卵清蛋白(OVA)的显性CD8表位。

[0154] 接种疫苗后针对多种抗原的T细胞反应的评估

[0155] 在这项首次动物实验中,C57BL/6小鼠通过口服途径(p.o.)在一周内两次(q7dx2)以 10^{10} CFU/次的剂量接受VXMNeo1m或VXM空载体疫苗。作为阳性对照,一组小鼠接受了编码肾母细胞瘤(WT1)完整蛋白的VXM06m的初次疫苗接种(q7dx2)。阴性对照组口服接受空载体,接种时间表和剂量与VXMNeo1m载体疫苗相同(10^{10} CFU/次,q7dx2)。在研究第17天,即最后一次接种疫苗后10天,对小鼠实施安乐死,并取出脾脏,通过流式细胞仪(FC)进行五聚体分析。

[0156] 表2:

组#	动物数量	疫苗	剂量	途径	治疗时间表	
[0157]	1	5	空载体	10^{10} CFU/adm	p.o.	d1, d7
[0158]	2	5	VXM06m	10^{10} CFU/adm	p.o.	d1, d7
	3	5	VXMNeo1m	10^{10} CFU/adm	p.o.	d1, d7

[0159] 测试物质通过灌胃管口服灌胃施用。不论动物组如何,每只动物在给药前均通过口服管饲法接受给药前缓冲液以中和胃中的酸(100 μ L/动物/施用)。该缓冲液由将2.6g碳酸氢钠、1.7g L-抗坏血酸、0.2g乳糖一水合物溶解在100mL饮用水中组成,并在施用测试物质前30分钟内施用。这些施用是在施用当天新鲜制备的。

[0160] 用一组特定的五聚体,在最后一次接种疫苗后10天收集的脾细胞上,通过流式细胞仪分析表位特异性CD8 T细胞。使用一种不相关的五聚体,即HPV 16E7 49-57,来设置背景阈值。

[0161] 图1显示了使用9种相同的肽五聚体流式细胞仪试剂和另外的HPV试剂作为阴性对照确定的CD8 T细胞应答结果。

[0162] 实施例2:药品的稳定性测试

[0163] 在相同的制剂和容器/密闭系统中,基于相同的伤寒沙门氏菌Ty21a递送平台,由编码三种不同靶抗原的三种构建体生产成品药物。制备强度为 10^4 、 10^5 、 10^6 和 10^7 CFU/mL,每瓶填充量为1.3mL。将小瓶置于 $\leq 70^\circ\text{C}$ 下稳定。在不同的稳定性时间点,根据预定义的稳定性规程测试样品的特征、含量、效价、pH和微生物纯度。在所有时间点上,所有三种构建体的样品均符合预定义的规程,证实了Vaximm平台构建体在 $\leq 70^\circ\text{C}$ 的温度下在3年内的稳定性(不考虑克隆插入物)。图2显示了活细胞计数的测试结果。

[0164] 序列表

[0165] SEQ ID NO:1人VEGFR-2的氨基酸序列

[0166] SEQ ID NO:2表达载体pVAX10的核苷酸序列,其限制性位点NheI和XhoI

[0167] 之间没有多个克隆位点。

[0168] SEQ ID NO:3截短的(缺失锌指结构域)人WT1的氨基酸序列

[0169] SEQ ID NO:4人MSLN的氨基酸序列

[0170] SEQ ID NO:5人CEA的氨基酸序列

[0171] SEQ ID NO:6野生型CMV pp65的氨基酸序列

[0172] SEQ ID NO:7带有突变K436N的CMV pp65的氨基酸序列

[0173] SEQ ID NO:8截短的CMV pp65的氨基酸序列,其携带突变K436N并且缺失C端NLS (SEQ ID NO:7的aa 537-561)

[0174] SEQ ID NO:9人全长人PD-L1的氨基酸序列

[0175] SEQ ID NO:10缺失信号肽的人PD-L1的氨基酸序列

[0176] SEQ ID NO:11截短的人PD-L1的氨基酸序列,其包含细胞外结构域和信号肽

序列表

- <110> 万科斯蒙股份有限公司
 <120> 用于联合疗法的靶向新抗原的DNA疫苗
 <130> 114943P855PC
 <150> EP19150251.7
 <151> 2019-01-03
 <150> EP18192782.3
 <151> 2018-09-05
 <160> 11
 <170> BiSSAP 1.3.6
 <210> 1
 <211> 1356
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)
 <400> 1

```

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

```

	180		185		190
Ser Tyr Ala Gly Met Val Phe Cys Glu Ala Lys Ile Asn Asp Glu Ser					
	195		200		205
Tyr Gln Ser Ile Met Tyr Ile Val Val Val Val Gly Tyr Arg Ile Tyr					
	210		215		220
Asp Val Val Leu Ser Pro Ser His Gly Ile Glu Leu Ser Val Gly Glu					
225		230		235	240
Lys Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Arg Thr Glu Leu Asn Val Gly Ile					
	245		250		255
Asp Phe Asn Trp Glu Tyr Pro Ser Ser Lys His Gln His Lys Lys Leu					
	260		265		270
Val Asn Arg Asp Leu Lys Thr Gln Ser Gly Ser Glu Met Lys Lys Phe					
	275		280		285
Leu Ser Thr Leu Thr Ile Asp Gly Val Thr Arg Ser Asp Gln Gly Leu					
	290		295		300
Tyr Thr Cys Ala Ala Ser Ser Gly Leu Met Thr Lys Lys Asn Ser Thr					
305		310		315	320
Phe Val Arg Val His Glu Lys Pro Phe Val Ala Phe Gly Ser Gly Met					
	325		330		335
Glu Ser Leu Val Glu Ala Thr Val Gly Glu Arg Val Arg Ile Pro Ala					
	340		345		350
Lys Tyr Leu Gly Tyr Pro Pro Pro Glu Ile Lys Trp Tyr Lys Asn Gly					
	355		360		365
Ile Pro Leu Glu Ser Asn His Thr Ile Lys Ala Gly His Val Leu Thr					
	370		375		380
Ile Met Glu Val Ser Glu Arg Asp Thr Gly Asn Tyr Thr Val Ile Leu					
385		390		395	400
Thr Asn Pro Ile Ser Lys Glu Lys Gln Ser His Val Val Ser Leu Val					
	405		410		415
Val Tyr Val Pro Pro Gln Ile Gly Glu Lys Ser Leu Ile Ser Pro Val					
	420		425		430
Asp Ser Tyr Gln Tyr Gly Thr Thr Gln Thr Leu Thr Cys Thr Val Tyr					
	435		440		445
Ala Ile Pro Pro Pro His His Ile His Trp Tyr Trp Gln Leu Glu Glu					
	450		455		460
Glu Cys Ala Asn Glu Pro Ser Gln Ala Val Ser Val Thr Asn Pro Tyr					
465		470		475	480
Pro Cys Glu Glu Trp Arg Ser Val Glu Asp Phe Gln Gly Gly Asn Lys					
	485		490		495

Ile Glu Val Asn Lys Asn Gln Phe Ala Leu Ile Glu Gly Lys Asn Lys
 500 505 510
 Thr Val Ser Thr Leu Val Ile Gln Ala Ala Asn Val Ser Ala Leu Tyr
 515 520 525
 Lys Cys Glu Ala Val Asn Lys Val Gly Arg Gly Glu Arg Val Ile Ser
 530 535 540
 Phe His Val Thr Arg Gly Pro Glu Ile Thr Leu Gln Pro Asp Met Gln
 545 550 555 560
 Pro Thr Glu Gln Glu Ser Val Ser Leu Trp Cys Thr Ala Asp Arg Ser
 565 570 575
 Thr Phe Glu Asn Leu Thr Trp Tyr Lys Leu Gly Pro Gln Pro Leu Pro
 580 585 590
 Ile His Val Gly Glu Leu Pro Thr Pro Val Cys Lys Asn Leu Asp Thr
 595 600 605
 Leu Trp Lys Leu Asn Ala Thr Met Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asp Ile
 610 615 620
 Leu Ile Met Glu Leu Lys Asn Ala Ser Leu Gln Asp Gln Gly Asp Tyr
 625 630 635 640
 Val Cys Leu Ala Gln Asp Arg Lys Thr Lys Lys Arg His Cys Val Val
 645 650 655
 Arg Gln Leu Thr Val Leu Glu Arg Val Ala Pro Thr Ile Thr Gly Asn
 660 665 670
 Leu Glu Asn Gln Thr Thr Ser Ile Gly Glu Ser Ile Glu Val Ser Cys
 675 680 685
 Thr Ala Ser Gly Asn Pro Pro Pro Gln Ile Met Trp Phe Lys Asp Asn
 690 695 700
 Glu Thr Leu Val Glu Asp Ser Gly Ile Val Leu Lys Asp Gly Asn Arg
 705 710 715 720
 Asn Leu Thr Ile Arg Arg Val Arg Lys Glu Asp Glu Gly Leu Tyr Thr
 725 730 735
 Cys Gln Ala Cys Ser Val Leu Gly Cys Ala Lys Val Glu Ala Phe Phe
 740 745 750
 Ile Ile Glu Gly Ala Gln Glu Lys Thr Asn Leu Glu Ile Ile Ile Leu
 755 760 765
 Val Gly Thr Ala Val Ile Ala Met Phe Phe Trp Leu Leu Leu Val Ile
 770 775 780
 Ile Leu Arg Thr Val Lys Arg Ala Asn Gly Gly Glu Leu Lys Thr Gly
 785 790 795 800
 Tyr Leu Ser Ile Val Met Asp Pro Asp Glu Leu Pro Leu Asp Glu His

	805	810	815
Cys Glu Arg Leu Pro Tyr Asp Ala Ser Lys Trp Glu Phe Pro Arg Asp			
	820	825	830
Arg Leu Lys Leu Gly Lys Pro Leu Gly Arg Gly Ala Phe Gly Gln Val			
	835	840	845
Ile Glu Ala Asp Ala Phe Gly Ile Asp Lys Thr Ala Thr Cys Arg Thr			
	850	855	860
Val Ala Val Lys Met Leu Lys Glu Gly Ala Thr His Ser Glu His Arg			
865	870	875	880
Ala Leu Met Ser Glu Leu Lys Ile Leu Ile His Ile Gly His His Leu			
	885	890	895
Asn Val Val Asn Leu Leu Gly Ala Cys Thr Lys Pro Gly Gly Pro Leu			
	900	905	910
Met Val Ile Val Glu Phe Cys Lys Phe Gly Asn Leu Ser Thr Tyr Leu			
	915	920	925
Arg Ser Lys Arg Asn Glu Phe Val Pro Tyr Lys Thr Lys Gly Ala Arg			
	930	935	940
Phe Arg Gln Gly Lys Asp Tyr Val Gly Ala Ile Pro Val Asp Leu Lys			
945	950	955	960
Arg Arg Leu Asp Ser Ile Thr Ser Ser Gln Ser Ser Ala Ser Ser Gly			
	965	970	975
Phe Val Glu Glu Lys Ser Leu Ser Asp Val Glu Glu Glu Glu Ala Pro			
	980	985	990
Glu Asp Leu Tyr Lys Asp Phe Leu Thr Leu Glu His Leu Ile Cys Tyr			
	995	1000	1005
Ser Phe Gln Val Ala Lys Gly Met Glu Phe Leu Ala Ser Arg Lys Cys			
	1010	1015	1020
Ile His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Ile Leu Leu Ser Glu Lys Asn			
1025	1030	1035	1040
Val Val Lys Ile Cys Asp Phe Gly Leu Ala Arg Asp Ile Tyr Lys Asp			
	1045	1050	1055
Pro Asp Tyr Val Arg Lys Gly Asp Ala Arg Leu Pro Leu Lys Trp Met			
	1060	1065	1070
Ala Pro Glu Thr Ile Phe Asp Arg Val Tyr Thr Ile Gln Ser Asp Val			
	1075	1080	1085
Trp Ser Phe Gly Val Leu Leu Trp Glu Ile Phe Ser Leu Gly Ala Ser			
	1090	1095	1100
Pro Tyr Pro Gly Val Lys Ile Asp Glu Glu Phe Cys Arg Arg Leu Lys			
1105	1110	1115	1120

Glu Gly Thr Arg Met Arg Ala Pro Asp Tyr Thr Thr Pro Glu Met Tyr
 1125 1130 1135
 Gln Thr Met Leu Asp Cys Trp His Gly Glu Pro Ser Gln Arg Pro Thr
 1140 1145 1150
 Phe Ser Glu Leu Val Glu His Leu Gly Asn Leu Leu Gln Ala Asn Ala
 1155 1160 1165
 Gln Gln Asp Gly Lys Asp Tyr Ile Val Leu Pro Ile Ser Glu Thr Leu
 1170 1175 1180
 Ser Met Glu Glu Asp Ser Gly Leu Ser Leu Pro Thr Ser Pro Val Ser
 1185 1190 1195 1200
 Cys Met Glu Glu Glu Glu Val Cys Asp Pro Lys Phe His Tyr Asp Asn
 1205 1210 1215
 Thr Ala Gly Ile Ser Gln Tyr Leu Gln Asn Ser Lys Arg Lys Ser Arg
 1220 1225 1230
 Pro Val Ser Val Lys Thr Phe Glu Asp Ile Pro Leu Glu Glu Pro Glu
 1235 1240 1245
 Val Lys Val Ile Pro Asp Asp Asn Gln Thr Asp Ser Gly Met Val Leu
 1250 1255 1260
 Ala Ser Glu Glu Leu Lys Thr Leu Glu Asp Arg Thr Lys Leu Ser Pro
 1265 1270 1275 1280
 Ser Phe Gly Gly Met Val Pro Ser Lys Ser Arg Glu Ser Val Ala Ser
 1285 1290 1295
 Glu Gly Ser Asn Gln Thr Ser Gly Tyr Gln Ser Gly Tyr His Ser Asp
 1300 1305 1310
 Asp Thr Asp Thr Thr Val Tyr Ser Ser Glu Glu Ala Glu Leu Leu Lys
 1315 1320 1325
 Leu Ile Glu Ile Gly Val Gln Thr Gly Ser Thr Ala Gln Ile Leu Gln
 1330 1335 1340
 Pro Asp Ser Gly Thr Thr Leu Ser Ser Pro Pro Val
 1345 1350 1355

<210> 2

<211> 3500

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 表达质粒

<400> 2

tgggcttttg ctggcctttt gtcacatgt tcttgactct tcgcatgta cgggccagat 60
 atacgcgttg acattgatta ttgactagtt attaatagta atcaattacg gggtcattag 120

ttcatagccc atatatggag ttccgcgta cataacttac ggtaaattggc ccgcctggct 180
 gaccgccc aa cgacccccgc ccattgacgt caataatgac gtatgttccc atagtaacgc 240
 caatagggac tttccattga cgtcaatggg tggactattt acggtaaact gccacttgg 300
 cagtacatca agtgtatcat atgccaagta cgccccctat tgacgtcaat gacggtaaat 360
 ggccccgctg gcattatgcc cagtacatga cttatggga ctttctact tggcagtaca 420
 tctacgtatt agtcatcgct attaccatgg tgatgcggtt ttggcagtac atcaatgggc 480
 gtggatagcg gtttgactca cggggatttc caagtctcca cccattgac gtcaatggga 540
 gtttgttttg gcacaaaaat caacgggact ttccaaaatg tcgtaacaac tccgccccat 600
 tgacgcaaat gggcggtagg cgtgtacggg gggaggtcta tataagcaga gctctctggc 660
 taactagaga acccactgct tactggctta tcgaaattaa tacgactcac tatagggaga 720
 cccaagctgg ctagcctcga gtctagaggg cccgtttaa cccgctgac agcctcgact 780
 gtgccttcta gttgccagcc atctgttgtt tgccccctcc ccgtgccttc cttgaccctg 840
 gaaggtgcca ctccccactgt ctttctctaa taaaatgagg aaattgcatc gcattgtctg 900
 agtaggtgtc attctattct ggggggtggg gtggggcagg acagcaaggg ggaggattgg 960
 gaagacaata gcaggcatgc tggggatgag gtgggctcta tggcttctac tgggcggttt 1020
 tatggacagc aagcgaaccg gaattgccag ctggggcgcc ctctggtaag gttgggaagc 1080
 cctgcaaagt aaactggatg gcttctcgc cgccaaggat ctgatggcgc aggggatcaa 1140
 gctctgatca agagacagga tgaggatcgt ttcgatgat tgaacaagat ggattgcacg 1200
 caggttctcc ggccgcttgg gtggagaggc tattcggcta tgactgggca caacagacaa 1260
 tcggctgctc tgatgccgc gtgttccggc tgcagcgca gggcgcccc gttctttttg 1320
 tcaagaccga cctgtccggt gccctgaatg aactgcaaga cgaggcagcg cggctatcgt 1380
 ggctggccac gacgggcgtt ccttgcgag ctgtgctcga cgttgtcact gaagcgggaa 1440
 gggactggct gctattgggc gaagtgccgg ggcaggatct cctgtcatct caccttgctc 1500
 ctgccgagaa agtatccatc atggctgatg caatgcggcg gctgcatacg cttgatccgg 1560
 ctacctgcc attcgaccac caagcgaac atcgcatcga gcgagcacgt actcgatgg 1620
 aagccggtct tgtcgatcag gatgatctgg acgaagagca tcaggggctc gcgccagccg 1680
 aactgttgc caggctcaag gcgagcatgc ccgacggcga ggatctcgtc gtgacctatg 1740
 gcgatgcctg cttgccgaat atcatggtg aaaatggccg ctttctgga ttcacgact 1800
 gtggccggct ggggtgtggc gaccgctatc aggacatagc gttggctacc cgtgatattg 1860
 ctgaagagct tggcgcgcaa tgggctgacc gttctctgt gctttacggg atcggcctc 1920
 ccgattcgca gcgcatcgcc ttctatcgcc ttcttgacga gttcttctga attattaacg 1980
 cttacaattt cctgatgcgg tattttctec ttacgcatct gtgcggtatt tcacaccgca 2040
 tacaggtggc acttttcggg gaaatgtgcg cggaaccctc atttgtttat ttttctaaat 2100
 acattcaaat atgtatccgc tcatgagaca ataaccctga taaatgcttc aataatagca 2160
 cgtgctaaaa cttcattttt aatttaaaag gatctaggtg aagatcctt ttgataatct 2220
 catgacaaa atccctaac gtgagttttc gttccactga gcgtcagacc cccatcagtg 2280
 accaaacagg aaaaaaccgc ccttaacatg gcccgttta tcagaagcca gacattaacg 2340
 cttctggaga aactcaacga gctggacgcg gatgaacagg cagacatctg tgaatcgctt 2400
 cacgaccag ctgatgagct ttaccgcagc tgccctcgcg gtttcggtga tgacggtgaa 2460

aacctctgac acatgcagct cccggagacg gtcacagctt gtctgtaagc ggatgccggg 2520
 agcagacaag cccgtcaggg cgcgtcagcg ggtgttgccg ggtgtcgggg cgcagccatg 2580
 acccagtcac gtagcgatag cggagtgtat actggcttaa ctatgcggca tcagagcaga 2640
 ttgtactgag agtgcaccat atgcggtgtg aaataccgca cagatgcgta aggagaaaat 2700
 accgcatcag gcgctcttcc gcttcctcgc tcaactgactc gctgcgctcg gtcgttcggc 2760
 tgcggcgagc ggtatcagct cactcaaagg cggtaatagc gttatccaca gaatcagggg 2820
 ataacgcagg aaagaacatg tgagcaaaaag gccagcaaaa gccaggaac cgtaaaaagg 2880
 ccgctgtgct ggcgtttttc cataggtctc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac 2940
 gctcaagtca gaggtggcga aaccgcacag gactataaag ataccaggcg tttccccctg 3000
 gaagctccct cgtgcgctct cctgttccga cctgcccgt taccggatac ctgtccgcct 3060
 ttctcccctc gggaagcgtg gcgctttctc atagctcagc ctgtaggtat ctcaagtccg 3120
 tgtaggtcgt tcgctccaag ctgggctgtg tgcacgaacc ccccgttcag cccgaccgct 3180
 gcgccttata cggtaaactat cgtcttgagt ccaaccgggt aagacacgac ttatcgccac 3240
 tggcagcagc cactggtaac aggattagca gagcgagga tgtaggcggg gctacagagt 3300
 tcttgaagtg gtggcctaac tacggctaca ctagaaggac agtatttggt atctgcgctc 3360
 tgctgaagcc agttacctc ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca 3420
 ccgctggtag cgggtggtttt tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat 3480
 ctcaagaaga tcctttgatc 3500

<210> 3

<211> 371

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 3

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

Pro Asn Ala Pro Tyr Leu Pro Ser Cys Leu Glu Ser Gln Pro Ala Ile
 130 135 140
 Arg Asn Gln Gly Tyr Ser Thr Val Thr Phe Asp Gly Thr Pro Ser Tyr
 145 150 155 160
 Gly His Thr Pro Ser His His Ala Ala Gln Phe Pro Asn His Ser Phe
 165 170 175
 Lys His Glu Asp Pro Met Gly Gln Gln Gly Ser Leu Gly Glu Gln Gln
 180 185 190
 Tyr Ser Val Pro Pro Pro Val Tyr Gly Cys His Thr Pro Thr Asp Ser
 195 200 205
 Cys Thr Gly Ser Gln Ala Leu Leu Leu Arg Thr Pro Tyr Ser Ser Asp
 210 215 220
 Asn Leu Tyr Gln Met Thr Ser Gln Leu Glu Cys Met Thr Trp Asn Gln
 225 230 235 240
 Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu Lys Gly Val Ala Ala Gly Ser Ser Ser
 245 250 255
 Ser Val Lys Trp Thr Glu Gly Gln Ser Asn His Ser Thr Gly Tyr Glu
 260 265 270
 Ser Asp Asn His Thr Thr Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr Arg Ile
 275 280 285
 His Thr His Gly Val Phe Arg Gly Ile Gln Asp Val Arg Arg Val Pro
 290 295 300
 Gly Val Ala Pro Thr Leu Val Arg Ser Ala Ser Glu Thr Ser Glu Lys
 305 310 315 320
 Arg Pro Phe Met Cys Ala Tyr Pro Gly Cys Asn Lys Arg Tyr Phe Lys
 325 330 335
 Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His Thr Gly Glu Lys Pro
 340 345 350
 Tyr Gln Cys Asp Phe Lys Asp Cys Glu Arg Arg Phe Ser Arg Ser Asp
 355 360 365
 Gln Leu Lys
 370
 <210> 4
 <211> 630
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)
 <400> 4
 Met Ala Leu Pro Thr Ala Arg Pro Leu Leu Gly Ser Cys Gly Thr Pro
 1 5 10 15

Ala Leu Gly Ser Leu Leu Phe Leu Leu Phe Ser Leu Gly Trp Val Gln
 20 25 30
 Pro Ser Arg Thr Leu Ala Gly Glu Thr Gly Gln Glu Ala Ala Pro Leu
 35 40 45
 Asp Gly Val Leu Ala Asn Pro Pro Asn Ile Ser Ser Leu Ser Pro Arg
 50 55 60
 Gln Leu Leu Gly Phe Pro Cys Ala Glu Val Ser Gly Leu Ser Thr Glu
 65 70 75 80
 Arg Val Arg Glu Leu Ala Val Ala Leu Ala Gln Lys Asn Val Lys Leu
 85 90 95
 Ser Thr Glu Gln Leu Arg Cys Leu Ala His Arg Leu Ser Glu Pro Pro
 100 105 110
 Glu Asp Leu Asp Ala Leu Pro Leu Asp Leu Leu Leu Phe Leu Asn Pro
 115 120 125
 Asp Ala Phe Ser Gly Pro Gln Ala Cys Thr Arg Phe Phe Ser Arg Ile
 130 135 140
 Thr Lys Ala Asn Val Asp Leu Leu Pro Arg Gly Ala Pro Glu Arg Gln
 145 150 155 160
 Arg Leu Leu Pro Ala Ala Leu Ala Cys Trp Gly Val Arg Gly Ser Leu
 165 170 175
 Leu Ser Glu Ala Asp Val Arg Ala Leu Gly Gly Leu Ala Cys Asp Leu
 180 185 190
 Pro Gly Arg Phe Val Ala Glu Ser Ala Glu Val Leu Leu Pro Arg Leu
 195 200 205
 Val Ser Cys Pro Gly Pro Leu Asp Gln Asp Gln Gln Glu Ala Ala Arg
 210 215 220
 Ala Ala Leu Gln Gly Gly Gly Pro Pro Tyr Gly Pro Pro Ser Thr Trp
 225 230 235 240
 Ser Val Ser Thr Met Asp Ala Leu Arg Gly Leu Leu Pro Val Leu Gly
 245 250 255
 Gln Pro Ile Ile Arg Ser Ile Pro Gln Gly Ile Val Ala Ala Trp Arg
 260 265 270
 Gln Arg Ser Ser Arg Asp Pro Ser Trp Arg Gln Pro Glu Arg Thr Ile
 275 280 285
 Leu Arg Pro Arg Phe Arg Arg Glu Val Glu Lys Thr Ala Cys Pro Ser
 290 295 300
 Gly Lys Lys Ala Arg Glu Ile Asp Glu Ser Leu Ile Phe Tyr Lys Lys
 305 310 315 320
 Trp Glu Leu Glu Ala Cys Val Asp Ala Ala Leu Leu Ala Thr Gln Met

	325		330		335
Asp Arg Val	Asn Ala Ile Pro Phe Thr Tyr Glu Gln Leu Asp Val Leu				
	340		345		350
Lys His Lys	Leu Asp Glu Leu Tyr Pro Gln Gly Tyr Pro Glu Ser Val				
	355		360		365
Ile Gln His	Leu Gly Tyr Leu Phe Leu Lys Met Ser Pro Glu Asp Ile				
	370		375		380
Arg Lys Trp	Asn Val Thr Ser Leu Glu Thr Leu Lys Ala Leu Leu Glu				
385		390		395	400
Val Asn Lys	Gly His Glu Met Ser Pro Gln Ala Pro Arg Arg Pro Leu				
	405		410		415
Pro Gln Val	Ala Thr Leu Ile Asp Arg Phe Val Lys Gly Arg Gly Gln				
	420		425		430
Leu Asp Lys	Asp Thr Leu Asp Thr Leu Thr Ala Phe Tyr Pro Gly Tyr				
	435		440		445
Leu Cys Ser	Leu Ser Pro Glu Glu Leu Ser Ser Val Pro Pro Ser Ser				
	450		455		460
Ile Trp Ala	Val Arg Pro Gln Asp Leu Asp Thr Cys Asp Pro Arg Gln				
465		470		475	480
Leu Asp Val	Leu Tyr Pro Lys Ala Arg Leu Ala Phe Gln Asn Met Asn				
	485		490		495
Gly Ser Glu	Tyr Phe Val Lys Ile Gln Ser Phe Leu Gly Gly Ala Pro				
	500		505		510
Thr Glu Asp	Leu Lys Ala Leu Ser Gln Gln Asn Val Ser Met Asp Leu				
	515		520		525
Ala Thr Phe	Met Lys Leu Arg Thr Asp Ala Val Leu Pro Leu Thr Val				
	530		535		540
Ala Glu Val	Gln Lys Leu Leu Gly Pro His Val Glu Gly Leu Lys Ala				
545		550		555	560
Glu Glu Arg	His Arg Pro Val Arg Asp Trp Ile Leu Arg Gln Arg Gln				
	565		570		575
Asp Asp Leu	Asp Thr Leu Gly Leu Gly Leu Gln Gly Gly Ile Pro Asn				
	580		585		590
Gly Tyr Leu	Val Leu Asp Leu Ser Met Gln Glu Ala Leu Ser Gly Thr				
	595		600		605
Pro Cys Leu	Leu Gly Pro Gly Pro Val Leu Thr Val Leu Ala Leu Leu				
	610		615		620
Leu Ala Ser	Thr Leu Ala				
625		630			

<210> 5
 <211> 702
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)
 <400> 5
 Met Glu Ser Pro Ser Ala Pro Pro His Arg Trp Cys Ile Pro Trp Gln
 1 5 10 15
 Arg Leu Leu Leu Thr Ala Ser Leu Leu Thr Phe Trp Asn Pro Pro Thr
 20 25 30
 Thr Ala Lys Leu Thr Ile Glu Ser Thr Pro Phe Asn Val Ala Glu Gly
 35 40 45
 Lys Glu Val Leu Leu Leu Val His Asn Leu Pro Gln His Leu Phe Gly
 50 55 60
 Tyr Ser Trp Tyr Lys Gly Glu Arg Val Asp Gly Asn Arg Gln Ile Ile
 65 70 75 80
 Gly Tyr Val Ile Gly Thr Gln Gln Ala Thr Pro Gly Pro Ala Tyr Ser
 85 90 95
 Gly Arg Glu Ile Ile Tyr Pro Asn Ala Ser Leu Leu Ile Gln Asn Ile
 100 105 110
 Ile Gln Asn Asp Thr Gly Phe Tyr Thr Leu His Val Ile Lys Ser Asp
 115 120 125
 Leu Val Asn Glu Glu Ala Thr Gly Gln Phe Arg Val Tyr Pro Glu Leu
 130 135 140
 Pro Lys Pro Ser Ile Ser Ser Asn Asn Ser Lys Pro Val Glu Asp Lys
 145 150 155 160
 Asp Ala Val Ala Phe Thr Cys Glu Pro Glu Thr Gln Asp Ala Thr Tyr
 165 170 175
 Leu Trp Trp Val Asn Asn Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg Leu Gln
 180 185 190
 Leu Ser Asn Gly Asn Arg Thr Leu Thr Leu Phe Asn Val Thr Arg Asn
 195 200 205
 Asp Thr Ala Ser Tyr Lys Cys Glu Thr Gln Asn Pro Val Ser Ala Arg
 210 215 220
 Arg Ser Asp Ser Val Ile Leu Asn Val Leu Tyr Gly Pro Asp Ala Pro
 225 230 235 240
 Thr Ile Ser Pro Leu Asn Thr Ser Tyr Arg Ser Gly Glu Asn Leu Asn
 245 250 255
 Leu Ser Cys His Ala Ala Ser Asn Pro Pro Ala Gln Tyr Ser Trp Phe
 260 265 270

Val Asn Gly Thr Phe Gln Gln Ser Thr Gln Glu Leu Phe Ile Pro Asn
 275 280 285
 Ile Thr Val Asn Asn Ser Gly Ser Tyr Thr Cys Gln Ala His Asn Ser
 290 295 300
 Asp Thr Gly Leu Asn Arg Thr Thr Val Thr Thr Ile Thr Val Tyr Ala
 305 310 315 320
 Glu Pro Pro Lys Pro Phe Ile Thr Ser Asn Asn Ser Asn Pro Val Glu
 325 330 335
 Asp Glu Asp Ala Val Ala Leu Thr Cys Glu Pro Glu Ile Gln Asn Thr
 340 345 350
 Thr Tyr Leu Trp Trp Val Asn Asn Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg
 355 360 365
 Leu Gln Leu Ser Asn Asp Asn Arg Thr Leu Thr Leu Leu Ser Val Thr
 370 375 380
 Arg Asn Asp Val Gly Pro Tyr Glu Cys Gly Ile Gln Asn Lys Leu Ser
 385 390 395 400
 Val Asp His Ser Asp Pro Val Ile Leu Asn Val Leu Tyr Gly Pro Asp
 405 410 415
 Asp Pro Thr Ile Ser Pro Ser Tyr Thr Tyr Tyr Arg Pro Gly Val Asn
 420 425 430
 Leu Ser Leu Ser Cys His Ala Ala Ser Asn Pro Pro Ala Gln Tyr Ser
 435 440 445
 Trp Leu Ile Asp Gly Asn Ile Gln Gln His Thr Gln Glu Leu Phe Ile
 450 455 460
 Ser Asn Ile Thr Glu Lys Asn Ser Gly Leu Tyr Thr Cys Gln Ala Asn
 465 470 475 480
 Asn Ser Ala Ser Gly His Ser Arg Thr Thr Val Lys Thr Ile Thr Val
 485 490 495
 Ser Ala Glu Leu Pro Lys Pro Ser Ile Ser Ser Asn Asn Ser Lys Pro
 500 505 510
 Val Glu Asp Lys Asp Ala Val Ala Phe Thr Cys Glu Pro Glu Ala Gln
 515 520 525
 Asn Thr Thr Tyr Leu Trp Trp Val Asn Gly Gln Ser Leu Pro Val Ser
 530 535 540
 Pro Arg Leu Gln Leu Ser Asn Gly Asn Arg Thr Leu Thr Leu Phe Asn
 545 550 555 560
 Val Thr Arg Asn Asp Ala Arg Ala Tyr Val Cys Gly Ile Gln Asn Ser
 565 570 575
 Val Ser Ala Asn Arg Ser Asp Pro Val Thr Leu Asp Val Leu Tyr Gly

	580		585		590
Pro Asp Thr	Pro Ile Ile Ser	Pro Pro Asp Ser	Ser Tyr Leu Ser Gly		
	595		600		605
Ala Asn Leu Asn Leu Ser Cys His Ser Ala Ser Asn Pro Ser Pro Gln					
	610		615		620
Tyr Ser Trp Arg Ile Asn Gly Ile Pro Gln Gln His Thr Gln Val Leu					
625		630		635	640
Phe Ile Ala Lys Ile Thr Pro Asn Asn Asn Gly Thr Tyr Ala Cys Phe					
	645		650		655
Val Ser Asn Leu Ala Thr Gly Arg Asn Asn Ser Ile Val Lys Ser Ile					
	660		665		670
Thr Val Ser Ala Ser Gly Thr Ser Pro Gly Leu Ser Ala Gly Ala Thr					
	675		680		685
Val Gly Ile Met Ile Gly Val Leu Val Gly Val Ala Leu Ile					
	690		695		700
<210> 6					
<211> 561					
<212> PRT					
<213>巨细胞病毒(Cytomegalovirus)					
<400> 6					
Met Glu Ser Arg Gly Arg Arg Cys Pro Glu Met Ile Ser Val Leu Gly					
1	5		10		15
Pro Ile Ser Gly His Val Leu Lys Ala Val Phe Ser Arg Gly Asp Thr					
	20		25		30
Pro Val Leu Pro His Glu Thr Arg Leu Leu Gln Thr Gly Ile His Val					
	35		40		45
Arg Val Ser Gln Pro Ser Leu Ile Leu Val Ser Gln Tyr Thr Pro Asp					
	50		55		60
Ser Thr Pro Cys His Arg Gly Asp Asn Gln Leu Gln Val Gln His Thr					
65		70		75	80
Tyr Phe Thr Gly Ser Glu Val Glu Asn Val Ser Val Asn Val His Asn					
	85		90		95
Pro Thr Gly Arg Ser Ile Cys Pro Ser Gln Glu Pro Met Ser Ile Tyr					
	100		105		110
Val Tyr Ala Leu Pro Leu Lys Met Leu Asn Ile Pro Ser Ile Asn Val					
	115		120		125
His His Tyr Pro Ser Ala Ala Glu Arg Lys His Arg His Leu Pro Val					
	130		135		140
Ala Asp Ala Val Ile His Ala Ser Gly Lys Gln Met Trp Gln Ala Arg					

145	150	155	160
Leu Thr Val Ser Gly	Leu Ala Trp Thr	Arg Gln Gln Asn Gln	Trp Lys
	165	170	175
Glu Pro Asp Val Tyr Tyr Thr Ser Ala Phe Val Phe Pro Thr Lys Asp			
	180	185	190
Val Ala Leu Arg His Val Val Cys Ala His Glu Leu Val Cys Ser Met			
	195	200	205
Glu Asn Thr Arg Ala Thr Lys Met Gln Val Ile Gly Asp Gln Tyr Val			
	210	215	220
Lys Val Tyr Leu Glu Ser Phe Cys Glu Asp Val Pro Ser Gly Lys Leu			
225	230	235	240
Phe Met His Val Thr Leu Gly Ser Asp Val Glu Glu Asp Leu Thr Met			
	245	250	255
Thr Arg Asn Pro Gln Pro Phe Met Arg Pro His Glu Arg Asn Gly Phe			
	260	265	270
Thr Val Leu Cys Pro Lys Asn Met Ile Ile Lys Pro Gly Lys Ile Ser			
	275	280	285
His Ile Met Leu Asp Val Ala Phe Thr Ser His Glu His Phe Gly Leu			
	290	295	300
Leu Cys Pro Lys Ser Ile Pro Gly Leu Ser Ile Ser Gly Asn Leu Leu			
305	310	315	320
Met Asn Gly Gln Gln Ile Phe Leu Glu Val Gln Ala Ile Arg Glu Thr			
	325	330	335
Val Glu Leu Arg Gln Tyr Asp Pro Val Ala Ala Leu Phe Phe Phe Asp			
	340	345	350
Ile Asp Leu Leu Leu Gln Arg Gly Pro Gln Tyr Ser Glu His Pro Thr			
	355	360	365
Phe Thr Ser Gln Tyr Arg Ile Gln Gly Lys Leu Glu Tyr Arg His Thr			
	370	375	380
Trp Asp Arg His Asp Glu Gly Ala Ala Gln Gly Asp Asp Asp Val Trp			
385	390	395	400
Thr Ser Gly Ser Asp Ser Asp Glu Glu Leu Val Thr Thr Glu Arg Lys			
	405	410	415
Thr Pro Arg Val Thr Gly Gly Gly Ala Met Ala Gly Ala Ser Thr Ser			
	420	425	430
Ala Gly Arg Lys Arg Lys Ser Ala Ser Ser Ala Thr Ala Cys Thr Ala			
	435	440	445
Gly Val Met Thr Arg Gly Arg Leu Lys Ala Glu Ser Thr Val Ala Pro			
	450	455	460

Glu Glu Asp Thr Asp Glu Asp Ser Asp Asn Glu Ile His Asn Pro Ala
 465 470 475 480
 Val Phe Thr Trp Pro Pro Trp Gln Ala Gly Ile Leu Ala Arg Asn Leu
 485 490 495
 Val Pro Met Val Ala Thr Val Gln Gly Gln Asn Leu Lys Tyr Gln Glu
 500 505 510
 Phe Phe Trp Asp Ala Asn Asp Ile Tyr Arg Ile Phe Ala Glu Leu Glu
 515 520 525
 Gly Val Trp Gln Pro Ala Ala Gln Pro Lys Arg Arg Arg His Arg Gln
 530 535 540
 Asp Ala Leu Pro Gly Pro Cys Ile Ala Ser Thr Pro Lys Lys His Arg
 545 550 555 560
 Gly
 <210> 7
 <211> 561
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 突变型CMV pp65
 <400> 7
 Met Glu Ser Arg Gly Arg Arg Cys Pro Glu Met Ile Ser Val Leu Gly
 1 5 10 15
 Pro Ile Ser Gly His Val Leu Lys Ala Val Phe Ser Arg Gly Asp Thr
 20 25 30
 Pro Val Leu Pro His Glu Thr Arg Leu Leu Gln Thr Gly Ile His Val
 35 40 45
 Arg Val Ser Gln Pro Ser Leu Ile Leu Val Ser Gln Tyr Thr Pro Asp
 50 55 60
 Ser Thr Pro Cys His Arg Gly Asp Asn Gln Leu Gln Val Gln His Thr
 65 70 75 80
 Tyr Phe Thr Gly Ser Glu Val Glu Asn Val Ser Val Asn Val His Asn
 85 90 95
 Pro Thr Gly Arg Ser Ile Cys Pro Ser Gln Glu Pro Met Ser Ile Tyr
 100 105 110
 Val Tyr Ala Leu Pro Leu Lys Met Leu Asn Ile Pro Ser Ile Asn Val
 115 120 125
 His His Tyr Pro Ser Ala Ala Glu Arg Lys His Arg His Leu Pro Val
 130 135 140
 Ala Asp Ala Val Ile His Ala Ser Gly Lys Gln Met Trp Gln Ala Arg

145	150	155	160
Leu Thr Val Ser Gly	Leu Ala Trp Thr	Arg Gln Gln Asn Gln	Trp Lys
	165	170	175
Glu Pro Asp Val Tyr Tyr Thr Ser Ala Phe Val Phe Pro Thr Lys Asp			
	180	185	190
Val Ala Leu Arg His Val Val Cys Ala His Glu Leu Val Cys Ser Met			
	195	200	205
Glu Asn Thr Arg Ala Thr Lys Met Gln Val Ile Gly Asp Gln Tyr Val			
	210	215	220
Lys Val Tyr Leu Glu Ser Phe Cys Glu Asp Val Pro Ser Gly Lys Leu			
225	230	235	240
Phe Met His Val Thr Leu Gly Ser Asp Val Glu Glu Asp Leu Thr Met			
	245	250	255
Thr Arg Asn Pro Gln Pro Phe Met Arg Pro His Glu Arg Asn Gly Phe			
	260	265	270
Thr Val Leu Cys Pro Lys Asn Met Ile Ile Lys Pro Gly Lys Ile Ser			
	275	280	285
His Ile Met Leu Asp Val Ala Phe Thr Ser His Glu His Phe Gly Leu			
	290	295	300
Leu Cys Pro Lys Ser Ile Pro Gly Leu Ser Ile Ser Gly Asn Leu Leu			
305	310	315	320
Met Asn Gly Gln Gln Ile Phe Leu Glu Val Gln Ala Ile Arg Glu Thr			
	325	330	335
Val Glu Leu Arg Gln Tyr Asp Pro Val Ala Ala Leu Phe Phe Phe Asp			
	340	345	350
Ile Asp Leu Leu Leu Gln Arg Gly Pro Gln Tyr Ser Glu His Pro Thr			
	355	360	365
Phe Thr Ser Gln Tyr Arg Ile Gln Gly Lys Leu Glu Tyr Arg His Thr			
	370	375	380
Trp Asp Arg His Asp Glu Gly Ala Ala Gln Gly Asp Asp Asp Val Trp			
385	390	395	400
Thr Ser Gly Ser Asp Ser Asp Glu Glu Leu Val Thr Thr Glu Arg Lys			
	405	410	415
Thr Pro Arg Val Thr Gly Gly Gly Ala Met Ala Gly Ala Ser Thr Ser			
	420	425	430
Ala Gly Arg Asn Arg Lys Ser Ala Ser Ser Ala Thr Ala Cys Thr Ala			
	435	440	445
Gly Val Met Thr Arg Gly Arg Leu Lys Ala Glu Ser Thr Val Ala Pro			
	450	455	460

145	150	155	160
Leu Thr Val Ser Gly	Leu Ala Trp Thr	Arg Gln Gln Asn Gln	Trp Lys
	165	170	175
Glu Pro Asp Val Tyr Tyr Thr Ser Ala Phe Val Phe Pro Thr Lys Asp			
	180	185	190
Val Ala Leu Arg His Val Val Cys Ala His Glu Leu Val Cys Ser Met			
	195	200	205
Glu Asn Thr Arg Ala Thr Lys Met Gln Val Ile Gly Asp Gln Tyr Val			
	210	215	220
Lys Val Tyr Leu Glu Ser Phe Cys Glu Asp Val Pro Ser Gly Lys Leu			
225	230	235	240
Phe Met His Val Thr Leu Gly Ser Asp Val Glu Glu Asp Leu Thr Met			
	245	250	255
Thr Arg Asn Pro Gln Pro Phe Met Arg Pro His Glu Arg Asn Gly Phe			
	260	265	270
Thr Val Leu Cys Pro Lys Asn Met Ile Ile Lys Pro Gly Lys Ile Ser			
	275	280	285
His Ile Met Leu Asp Val Ala Phe Thr Ser His Glu His Phe Gly Leu			
	290	295	300
Leu Cys Pro Lys Ser Ile Pro Gly Leu Ser Ile Ser Gly Asn Leu Leu			
305	310	315	320
Met Asn Gly Gln Gln Ile Phe Leu Glu Val Gln Ala Ile Arg Glu Thr			
	325	330	335
Val Glu Leu Arg Gln Tyr Asp Pro Val Ala Ala Leu Phe Phe Phe Asp			
	340	345	350
Ile Asp Leu Leu Leu Gln Arg Gly Pro Gln Tyr Ser Glu His Pro Thr			
	355	360	365
Phe Thr Ser Gln Tyr Arg Ile Gln Gly Lys Leu Glu Tyr Arg His Thr			
	370	375	380
Trp Asp Arg His Asp Glu Gly Ala Ala Gln Gly Asp Asp Asp Val Trp			
385	390	395	400
Thr Ser Gly Ser Asp Ser Asp Glu Glu Leu Val Thr Thr Glu Arg Lys			
	405	410	415
Thr Pro Arg Val Thr Gly Gly Gly Ala Met Ala Gly Ala Ser Thr Ser			
	420	425	430
Ala Gly Arg Asn Arg Lys Ser Ala Ser Ser Ala Thr Ala Cys Thr Ala			
	435	440	445
Gly Val Met Thr Arg Gly Arg Leu Lys Ala Glu Ser Thr Val Ala Pro			
	450	455	460

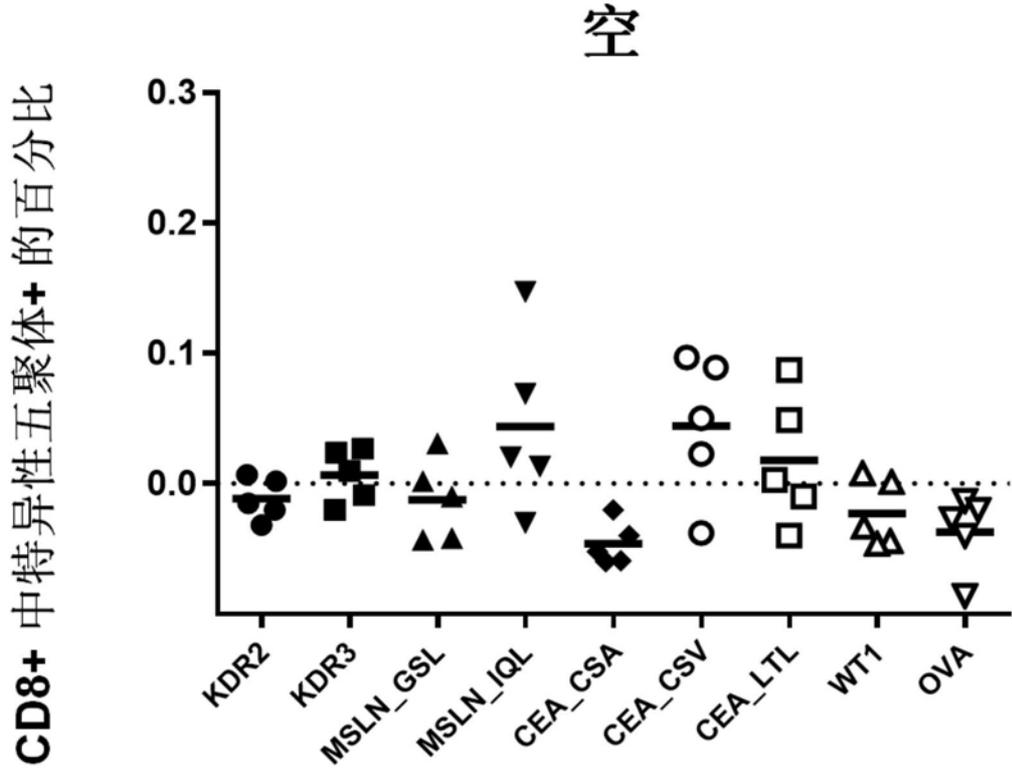
Glu Glu Asp Thr Asp Glu Asp Ser Asp Asn Glu Ile His Asn Pro Ala
 465 470 475 480
 Val Phe Thr Trp Pro Pro Trp Gln Ala Gly Ile Leu Ala Arg Asn Leu
 485 490 495
 Val Pro Met Val Ala Thr Val Gln Gly Gln Asn Leu Lys Tyr Gln Glu
 500 505 510
 Phe Phe Trp Asp Ala Asn Asp Ile Tyr Arg Ile Phe Ala Glu Leu Glu
 515 520 525
 Gly Val Trp Gln Pro Ala Ala Gln
 530 535
 <210> 9
 <211> 290
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)
 <400> 9
 Met Arg Ile Phe Ala Val Phe Ile Phe Met Thr Tyr Trp His Leu Leu
 1 5 10 15
 Asn Ala Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr
 20 25 30
 Gly Ser Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu
 35 40 45
 Asp Leu Ala Ala Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile
 50 55 60
 Ile Gln Phe Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln His Ser Ser
 65 70 75 80
 Tyr Arg Gln Arg Ala Arg Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu Gly Asn
 85 90 95
 Ala Ala Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr
 100 105 110
 Arg Cys Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val
 115 120 125
 Lys Val Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val
 130 135 140
 Asp Pro Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr
 145 150 155 160
 Pro Lys Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser
 165 170 175
 Gly Lys Thr Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys Leu Phe Asn
 180 185 190

Val Thr Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Thr Asn Glu Ile Phe Tyr
 195 200 205
 Cys Thr Phe Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu
 210 215 220
 Val Ile Pro Glu Leu Pro Leu Ala His Pro Pro Asn Glu Arg Thr His
 225 230 235 240
 Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala Leu Thr
 245 250 255
 Phe Ile Phe Arg Leu Arg Lys Gly Arg Met Met Asp Val Lys Lys Cys
 260 265 270
 Gly Ile Gln Asp Thr Asn Ser Lys Lys Gln Ser Asp Thr His Leu Glu
 275 280 285
 Glu Thr
 290
 <210> 10
 <211> 273
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)
 <400> 10
 Met Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr Gly
 1 5 10 15
 Ser Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu Asp
 20 25 30
 Leu Ala Ala Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile Ile
 35 40 45
 Gln Phe Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln His Ser Ser Tyr
 50 55 60
 Arg Gln Arg Ala Arg Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu Gly Asn Ala
 65 70 75 80
 Ala Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr Arg
 85 90 95
 Cys Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val Lys
 100 105 110
 Val Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val Asp
 115 120 125
 Pro Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr Pro
 130 135 140
 Lys Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser Gly
 145 150 155 160

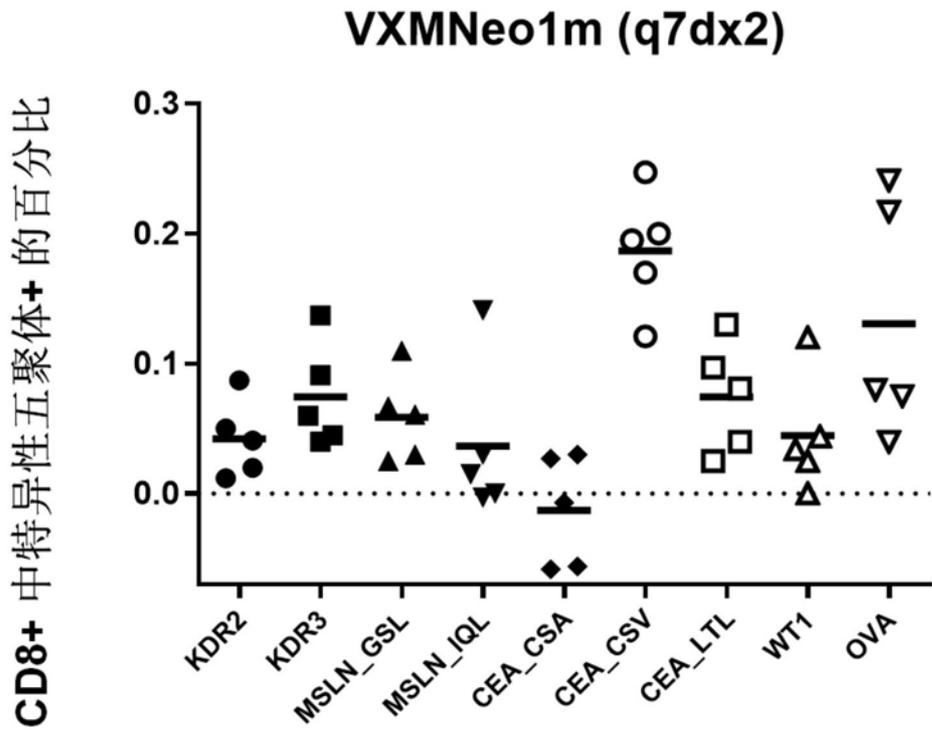
Lys Thr Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys Leu Phe Asn Val
 165 170 175
 Thr Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Thr Asn Glu Ile Phe Tyr Cys
 180 185 190
 Thr Phe Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu Val
 195 200 205
 Ile Pro Glu Leu Pro Leu Ala His Pro Pro Asn Glu Arg Thr His Leu
 210 215 220
 Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala Leu Thr Phe
 225 230 235 240
 Ile Phe Arg Leu Arg Lys Gly Arg Met Met Asp Val Lys Lys Cys Gly
 245 250 255
 Ile Gln Asp Thr Asn Ser Lys Lys Gln Ser Asp Thr His Leu Glu Glu
 260 265 270
 Thr
 <210> 11
 <211> 238
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)
 <400> 11
 Met Arg Ile Phe Ala Val Phe Ile Phe Met Thr Tyr Trp His Leu Leu
 1 5 10 15
 Asn Ala Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr
 20 25 30
 Gly Ser Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu
 35 40 45
 Asp Leu Ala Ala Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile
 50 55 60
 Ile Gln Phe Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln His Ser Ser
 65 70 75 80
 Tyr Arg Gln Arg Ala Arg Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu Gly Asn
 85 90 95
 Ala Ala Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr
 100 105 110
 Arg Cys Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val
 115 120 125
 Lys Val Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val
 130 135 140
 Asp Pro Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr

145		150		155		160									
Pro	Lys	Ala	Glu	Val	Ile	Trp	Thr	Ser	Ser	Asp	His	Gln	Val	Leu	Ser
				165						170					175
Gly	Lys	Thr	Thr	Thr	Thr	Asn	Ser	Lys	Arg	Glu	Glu	Lys	Leu	Phe	Asn
				180						185					190
Val	Thr	Ser	Thr	Leu	Arg	Ile	Asn	Thr	Thr	Thr	Asn	Glu	Ile	Phe	Tyr
				195						200					205
Cys	Thr	Phe	Arg	Arg	Leu	Asp	Pro	Glu	Glu	Asn	His	Thr	Ala	Glu	Leu
				210						215					220
Val	Ile	Pro	Glu	Leu	Pro	Leu	Ala	His	Pro	Pro	Asn	Glu	Arg		
225															
				230											
										235					

A



B



C

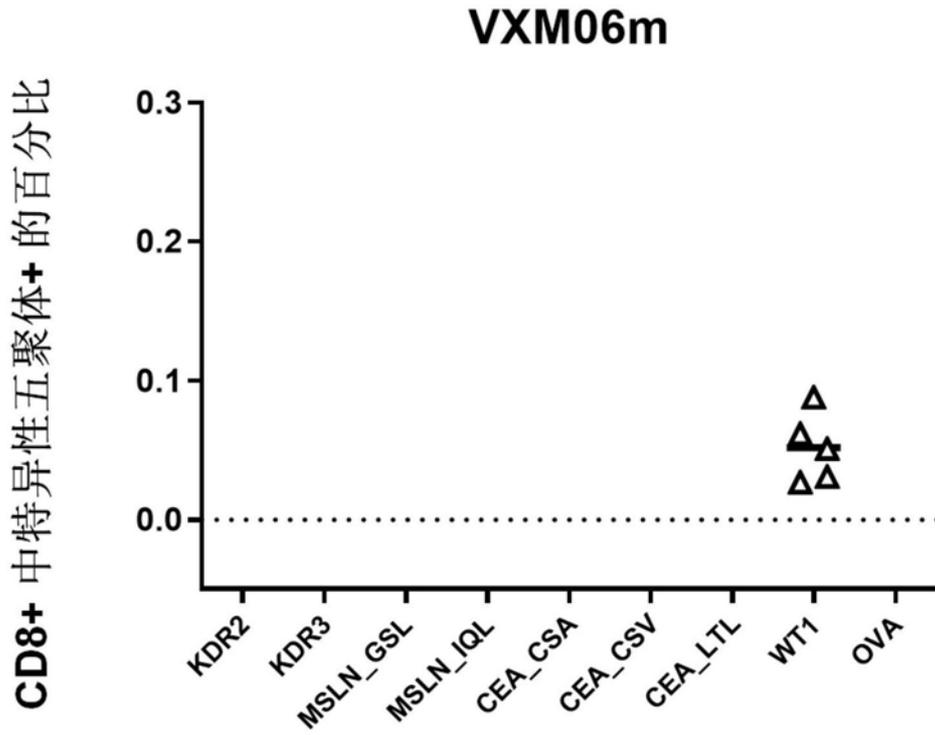


图1

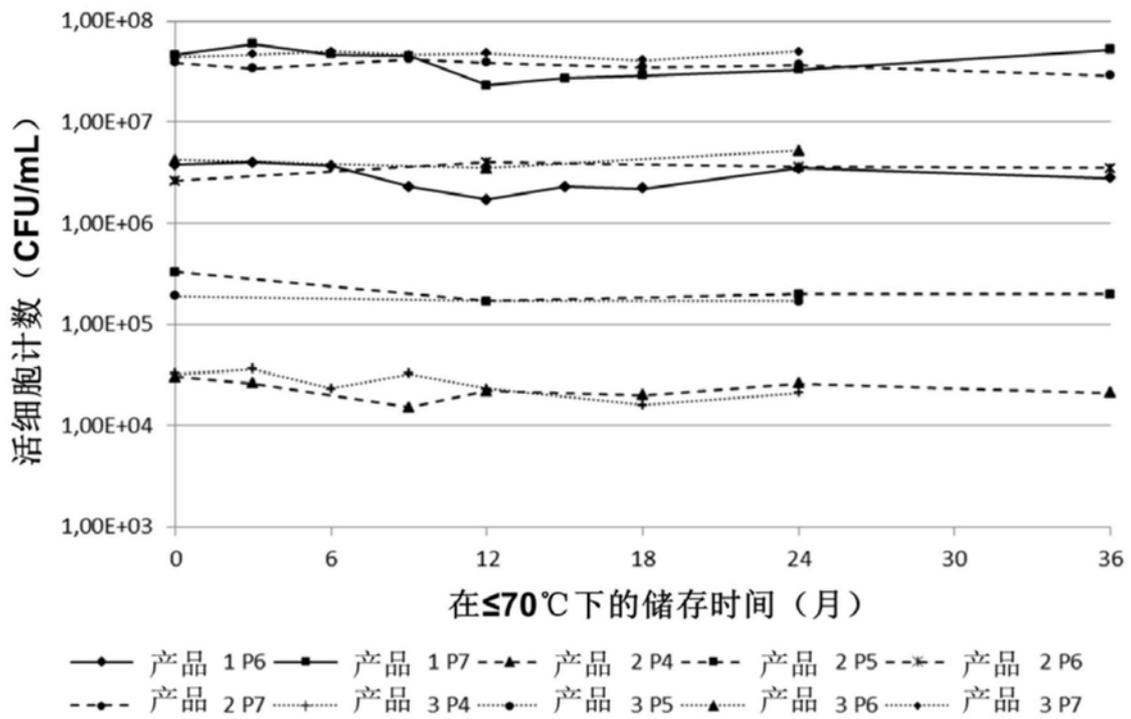


图2