



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109073637 A

(43)申请公布日 2018.12.21

(21)申请号 201780026579.0

芭芭拉·施勒尔斯 马丁·勒韦尔

(22)申请日 2017.05.10

塞巴斯蒂安·伯格

(30)优先权数据

PCT/EP2016/060897 2016.05.13 EP

(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

代理人 郑斌 尹玉峰

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.10.29

(51)Int.Cl.

G01N 33/50(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2017/061196 2017.05.10

(87)PCT国际申请的公布数据

WO2017/194610 EN 2017.11.16

(71)申请人 生物技术RNA制药有限公司

地址 德国美因兹

申请人 约翰·古腾堡大学美因兹医学大学
转化肿瘤学公司

权利要求书3页 说明书33页

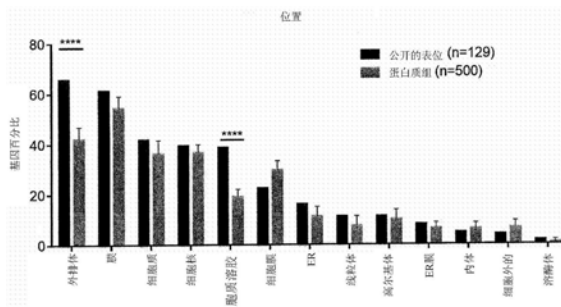
序列表2页 附图2页

(54)发明名称

用于预测蛋白质或蛋白质片段用于免疫治疗的有用性的方法

(57)摘要

本发明涉及用于预测可用于免疫治疗例如用于疫苗接种的肽或多肽例如T细胞表位的方法。特别地,本发明涉及用于预测肽或多肽例如肿瘤相关抗原或表位、特别是肿瘤相关新抗原或新表位是否具有免疫原性,并且特别地是否可用于免疫治疗例如用于疫苗接种的方法。本发明的方法特别地可用于提供对患者的肿瘤具有特异性的疫苗,并且因此可用于个体化癌症疫苗的情况。



1. 用于预测由病变细胞表达的蛋白质或其片段用于免疫治疗的有用性的方法,所述方法包括确定所述蛋白质或编码其的核酸或者所述蛋白质的片段的分布或定位。

2. 权利要求1所述的方法,其包括确定所述蛋白质或编码其的核酸或者所述蛋白质的片段在体内是否位于胞质溶胶中和/或外排体内或者在胞质溶胶中和/或外排体内丰富。

3. 权利要求1或2所述的方法,其中所述蛋白质或编码其的核酸或者所述蛋白质的片段位于胞质溶胶中和/或外排体内或者在胞质溶胶中和/或外排体内丰富指示所述蛋白质或其片段可用于免疫治疗。

4. 用于预测由病变细胞表达的蛋白质或其片段用于免疫治疗的有用性的方法,所述方法包括确定所述蛋白质或其片段是否由抗原呈递细胞,优选专职抗原呈递细胞交叉呈递。

5. 权利要求4所述的方法,其中所述蛋白质或其片段由抗原呈递细胞交叉呈递指示所述蛋白质或其片段可用于免疫治疗。

6. 权利要求4或5所述的方法,其中确定所述蛋白质或其片段是否由抗原呈递细胞交叉呈递包括确定所述蛋白质或编码其的核酸或者所述蛋白质的片段在体内是否位于胞质溶胶中和/或外排体内或者在胞质溶胶中和/或外排体内丰富。

7. 权利要求4至6中任一项所述的方法,其中所述蛋白质或编码其的核酸或者所述蛋白质的片段位于胞质溶胶中和/或外排体内或者在胞质溶胶中和/或外排体内丰富指示所述蛋白质或其片段由抗原呈递细胞交叉呈递。

8. 权利要求4至7中任一项所述的方法,其中确定所述蛋白质或其片段是否由抗原呈递细胞交叉呈递包括确定针对所述蛋白质或其片段的已有抗体应答。

9. 权利要求4至8中任一项所述的方法,其中针对所述蛋白质或其片段的已有抗体应答指示所述蛋白质或其片段由抗原呈递细胞交叉呈递。

10. 权利要求4至9中任一项所述的方法,其中确定所述蛋白质或其片段是否由抗原呈递细胞交叉呈递包括确定所述蛋白质或其片段是否与F肌动蛋白结合。

11. 权利要求4至10中任一项所述的方法,其中所述蛋白质或其片段与F肌动蛋白结合指示所述蛋白质或其片段由抗原呈递细胞交叉呈递。

12. 权利要求4至11中任一项所述的方法,其中确定所述蛋白质或其片段是否由抗原呈递细胞交叉呈递包括确定所述蛋白质或其片段是否与RNA结合。

13. 权利要求4至12中任一项所述的方法,其中所述蛋白质或其片段与RNA结合指示所述蛋白质或其片段由抗原呈递细胞交叉呈递。

14. 权利要求2、3、6至13中任一项所述的方法,其中所述蛋白质片段作为MHC肽复合物存在于外排体内,优选在外排体的表面上。

15. 权利要求2、3、6至13中任一项所述的方法,其中所述蛋白质或编码其的核酸或者所述蛋白质的片段位于胞质溶胶中或在胞质溶胶中丰富指示所述蛋白质在MHC I途径,优选病变细胞的MHC I途径中加工和呈递。

16. 权利要求15所述的方法,其中所述蛋白质在所述MHC I途径中加工和呈递导致CD8+ T细胞识别由MHC I和所述蛋白质的片段形成的复合物。

17. 权利要求2、3、6至13中任一项所述的方法,其中所述蛋白质或编码其的核酸或者所述蛋白质的片段位于外排体内或在外排体内丰富指示所述蛋白质或编码其的核酸或者所述蛋白质的片段在抗原呈递细胞,优选专职抗原呈递细胞中积累。

18. 权利要求17所述的方法,其中所述蛋白质或编码其的核酸或者所述蛋白质的片段在抗原呈递细胞中积累指示所述蛋白质在MHC I和/或MHC II途径,优选所述抗原呈递细胞的MHC I和/或MHC II途径中加工和呈递。

19. 权利要求18所述的方法,其中所述蛋白质在所述MHC I途径中加工和呈递导致CD8+ T细胞识别由MHC I和所述蛋白质的片段形成的复合物。

20. 用于预测由病变细胞表达的蛋白质或其片段用于免疫治疗的有用性的方法,所述方法包括确定以下一项或更多项:

- (a) 确定针对所述蛋白质或其片段的已有抗体应答,
- (b) 确定所述蛋白质或其片段是否与F肌动蛋白结合,和/或
- (c) 确定所述蛋白质或其片段是否与RNA结合。

21. 权利要求20所述的方法,其中针对所述蛋白质或其片段的已有抗体应答指示所述蛋白质或其片段可用于免疫治疗。

22. 权利要求20或21所述的方法,其中所述蛋白质或其片段与F肌动蛋白结合指示所述蛋白质或其片段可用于免疫治疗。

23. 权利要求20至22中任一项所述的方法,其中所述蛋白质或其片段与RNA结合指示所述蛋白质或其片段可用于免疫治疗。

24. 权利要求1至23中任一项所述的方法,其中所述蛋白质或其片段包含疾病特异性氨基酸修饰。

25. 权利要求24所述的方法,其中所述氨基酸修饰归因于疾病特异性体细胞突变。

26. 权利要求1至25中任一项所述的方法,其中所述疾病是癌症并且所述免疫治疗是抗癌免疫治疗。

27. 权利要求1至26中任一项所述的方法,其中所述蛋白质片段是MHC结合肽或潜在的MHC结合肽。

28. 针对疾病特异性氨基酸修饰在免疫治疗中的有用性对其进行选择和/或排序的方法,所述方法包括以下步骤:

(i) 鉴定由病变细胞表达的蛋白质,每种蛋白质包含至少一个疾病特异性氨基酸修饰,以及

(ii) 确定在(i)中鉴定的蛋白质或编码其的核酸或者所述蛋白质的片段的分布或定位,以及

(iii) 对在(i)中鉴定的至少一种另外的蛋白质重复步骤(ii)。

29. 权利要求28所述的方法,其中步骤(ii)包括确定所述蛋白质或编码其的核酸或者所述蛋白质的片段在体内是否位于胞质溶胶中和/或外排体内或者在胞质溶胶中和/或外排体内丰富。

30. 权利要求28或29所述的方法,其中所述蛋白质或编码其的核酸或者所述蛋白质的片段位于胞质溶胶中和/或外排体内或者在胞质溶胶中和/或外排体内丰富指示所述疾病特异性氨基酸修饰可用于免疫治疗。

31. 针对疾病特异性氨基酸修饰在免疫治疗中的有用性对其进行选择和/或排序的方法,所述方法包括以下步骤:

(i) 鉴定由病变细胞表达的蛋白质,每种蛋白质包含至少一个疾病特异性氨基酸修饰,

以及

(ii) 确定在 (i) 中鉴定的蛋白质或所述蛋白质的片段是否由抗原呈递细胞, 优选专职抗原呈递细胞交叉呈递, 以及

(iii) 对在 (i) 中鉴定的至少一种另外的蛋白质重复步骤 (ii)。

32. 权利要求31所述的方法, 其中所述蛋白质或其片段由抗原呈递细胞交叉呈递指示所述疾病特异性氨基酸修饰可用于免疫治疗。

33. 针对疾病特异性氨基酸修饰在免疫治疗中的有用性对其进行选择和/或排序的方法, 所述方法包括以下步骤:

(i) 鉴定由病变细胞表达的蛋白质, 每种蛋白质包含至少一个疾病特异性氨基酸修饰; 以及

(ii) 对在 (i) 中鉴定的蛋白质或所述蛋白质的片段确定以下一项或更多项:

(a) 确定针对所述蛋白质或其片段的已有抗体应答,

(b) 确定所述蛋白质或其片段是否与F肌动蛋白结合, 和/或

(c) 确定所述蛋白质或其片段是否与RNA结合; 以及

(iii) 对在 (i) 中鉴定的至少一种另外的蛋白质重复步骤 (ii)。

34. 权利要求33所述的方法, 其中针对所述蛋白质或其片段的已有抗体应答指示所述疾病特异性氨基酸修饰可用于免疫治疗。

35. 权利要求33或34所述的方法, 其中所述蛋白质或其片段与F肌动蛋白结合指示所述疾病特异性氨基酸修饰可用于免疫治疗。

36. 权利要求33至35中任一项所述的方法, 其中所述蛋白质或其片段与RNA结合指示所述疾病特异性氨基酸修饰可用于免疫治疗。

37. 权利要求28至36中任一项所述的方法, 其中所述疾病特异性氨基酸修饰被蛋白质片段包含, 所述蛋白质片段是MHC结合肽或潜在的MHC结合肽。

38. 权利要求1至37中任一项所述的方法, 其用于制造疫苗。

39. 权利要求38所述的方法, 其中所述疫苗来源于被预测为可用于免疫治疗的一种或更多种蛋白质或其片段或者一个或更多个疾病特异性氨基酸修饰。

40. 用于提供疫苗的方法, 其包括以下步骤:

鉴定通过权利要求1至39中任一项所述的方法被预测为可用于免疫治疗的一种或更多种蛋白质或其片段或者一个或更多个疾病特异性氨基酸修饰。

41. 权利要求40所述的方法, 其还包括以下步骤:

提供包含肽或多肽或者编码所述肽或多肽的核酸的疫苗, 所述肽或多肽包含被预测为可用于免疫治疗的一种或更多种蛋白质或其片段或者一个或更多个疾病特异性氨基酸修饰。

42. 疫苗, 其根据权利要求38至41中任一项所述的方法产生。

用于预测蛋白质或蛋白质片段用于免疫治疗的有用性的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及用于预测可用于免疫治疗例如用于疫苗接种的肽或多肽(例如T细胞表位)的方法。特别地,本发明涉及用于预测肽或多肽例如肿瘤相关抗原或表位、特别是肿瘤相关新抗原或新表位是否具有免疫原性并且特别地是否可用于免疫治疗例如用于疫苗接种的方法。本发明的方法特别地可用于提供对患者的肿瘤具有特异性的疫苗,并且因此可用于个性化癌症疫苗的情况。

背景技术

[0002] 免疫系统的进化在脊椎动物中产生基于两种防御类型:先天免疫和适应性免疫的高度有效网络。与依赖于识别与病原体相关的常见分子模式的不变受体的进化古老先天免疫系统相反,适应性免疫基于B细胞(B淋巴细胞)和T细胞(T淋巴细胞)上的高度特异性抗原受体和克隆选择。B细胞通过分泌抗体来引起体液免疫应答,而T细胞介导导致所识别细胞破坏的细胞免疫应答。

[0003] T细胞在人和动物中的细胞介导的免疫中起重要作用。特定抗原的识别和结合由T细胞表面上表达的T细胞受体介导。T细胞的T细胞受体(T cell receptor, TCR)能够与结合至主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)分子并且呈递在靶细胞表面上的免疫原性肽(表位)相互作用。TCR的特异性结合触发T细胞内的信号级联,导致增殖和分化成成熟的效应T细胞。为了能够靶向多种抗原,T细胞受体需要具有很大的多样性。

[0004] 抗原特异性免疫治疗旨在增强或诱导患者中的特异性免疫应答以控制感染性或恶性疾病。越来越多的病原体相关抗原和肿瘤相关抗原的鉴定导致用于免疫治疗的合适靶标的广泛集合。可以通过主动或被动免疫接种策略特异性地靶向呈递来源于这些抗原的免疫原性肽(表位)的细胞。主动免疫接种倾向于诱导和扩增患者中的抗原特异性T细胞,其能够特异性地识别并杀伤病变细胞。相比之下,被动免疫接种依赖于在体外扩增并任选地遗传改造的T细胞的过继转移(过继性T细胞治疗;adoptive T cell therapy, ACT)。

[0005] 肿瘤疫苗旨在通过主动免疫接种诱导内源性肿瘤特异性免疫应答。不同的抗原形式可用于肿瘤疫苗接种,包括完整的病变细胞、蛋白质、肽或免疫载体例如RNA、DNA或病毒载体,其可以直接体内应用或在转移到患者中之后通过DC的脉冲体外应用。

[0006] 基于ACT的免疫治疗可以广义地定义为用预先致敏的T细胞进行的被动免疫接种形式,所述T细胞在从低前体频率到临床上相关细胞数的离体扩增之后转移至非免疫接受者或自体宿主。克服ACT局限性的一种方法是自体T细胞的过继转移,所述自体T细胞被重编程以在短时间离体培养期间表达具有确定特异性的肿瘤反应性TCR,然后再输注到患者中。

[0007] 多种病原体相关抗原和肿瘤相关抗原的发现为抗原特异性免疫治疗概念提供了基础。肿瘤相关抗原(tumor-associated antigen, TAA)是由于肿瘤细胞的遗传不稳定性而在其上表达的不正常的蛋白质,其在正常细胞中不表达或表达受限。这些TAA可以导致免疫系统对恶性细胞的特异性识别。

[0008] 癌症可以由基因组突变和表观遗传变化的积累引起,其中一部分可具有病因的作用。除肿瘤相关抗原之外,人癌症还平均携带100-120个非同义突变,其中许多非同义突变可被疫苗靶向。肿瘤中超过95%的突变是独特且患者特异性的。可产生肿瘤特异性T细胞表位的蛋白质改变体细胞突变的数量为30至400。

[0009] 突变被认为是用于癌症免疫治疗的理想靶标。作为在任何健康组织中都严格缺乏表达的新表位,预期其是安全的并且可避开中心耐受机制(central tolerance mechanism)。我们最近已提出了靶向个体突变谱的个体化免疫治疗方案(Castle, J.C., 等, Cancer Res 72, 1081 (2012))。

[0010] 尽管用于免疫治疗方法的有吸引力的靶标结构的数量不断增加,但用于免疫治疗的合适表位的限定仍然是一个挑战。因此,需要预测表位、特别是新表位是否将诱导有效免疫并且因此将可用于免疫治疗的模型。

[0011] 在这里,我们显示免疫原性抗原和表位在某些亚细胞区室中具有强代表性。

[0012] 已知针对抗肿瘤抗原、特别是突变的肿瘤抗原的免疫应答不受肿瘤细胞本身影响,而是受接受从肿瘤细胞释放的肿瘤抗原的抗原呈递细胞(特别是树突细胞)影响。还已知,为了实现有效的免疫应答,由抗原呈递细胞摄取的释放的肿瘤抗原必须被加工并通过MHC II类呈递以诱导CD4免疫应答(外源性呈递)或通过MHC I类呈递以诱导CD8免疫应答(交叉呈递)。对于后一种免疫应答,需要存在针对递送至相同抗原呈递细胞的相同或不同肿瘤抗原的CD4免疫应答(Bennett等, J. Exp. Med. 186, 65-70 (1997))。

[0013] 不希望局限于特定理论,认为抗原在例如肿瘤细胞的病变细胞中的细胞定位决定该抗原是否将会被抗原呈递细胞摄取和呈递。从例如肿瘤细胞的病变细胞释放的外排体(exosome)包含mRNA、蛋白质以及MHC肽复合物并且因此可以将这些组分转移至抗原呈递细胞。外排体通过内陷产生并且因此除胞吞膜分子之外还主要含有胞质溶胶组分。因此,认为例如蛋白质的胞质溶胶组分在外排体中富集并且可以被转移至抗原呈递细胞。外排体还可以有效地转移mRNA,其可以在摄取RNA的细胞中被翻译。因此,不希望局限于特定理论,认为根据本发明的包含在外排体中的肽或多肽,特别是胞质溶胶肽或蛋白质,或者其编码RNA包含在外排体中的肽或多肽特别地可用于免疫治疗,因为外排体被抗原呈递细胞摄取,并且肽和蛋白质(任选地在编码RNA翻译之后)被抗原呈递细胞呈递。因此,外排体是肽、蛋白质或RNA到抗原呈递细胞的转载体,并且保护肽、蛋白质或RNA免受蛋白酶和核糖核酸酶的降解。或者,肽和蛋白质可能作为与其他分子(如抗体)的复合物通过受体依赖性机制被抗原呈递细胞摄取。

发明内容

[0014] 发明概述

[0015] 在一个方面,本发明涉及用于预测由病变细胞表达的蛋白质或其片段用于免疫治疗的有用性的方法,所述方法包括确定所述蛋白质或编码其的核酸或者所述蛋白质的片段的分布或定位。

[0016] 在一个实施方案中,所述方法包括确定所述蛋白质或编码其的核酸或者所述蛋白质的片段在体内是否位于胞质溶胶中和/或外排体内或者在胞质溶胶中和/或外排体内丰富。

[0017] 在一个实施方案中,所述蛋白质或编码其的核酸或者所述蛋白质的片段位于胞质溶胶中和/或外排体内或者在胞质溶胶中和/或外排体内丰富指示所述蛋白质或其片段可用于免疫治疗。

[0018] 在另一个方面,本发明涉及用于预测由病变细胞表达的蛋白质或其片段用于免疫治疗的有用性的方法,所述方法包括确定所述蛋白质或其片段是否由抗原呈递细胞,优选专职抗原呈递细胞交叉呈递。

[0019] 在一个实施方案中,所述蛋白质或其片段由抗原呈递细胞交叉呈递指示所述蛋白质或其片段可用于免疫治疗。

[0020] 在一个实施方案中,确定所述蛋白质或其片段是否由抗原呈递细胞交叉呈递包括确定所述蛋白质或编码其的核酸或者所述蛋白质的片段在体内是否位于胞质溶胶中和/或外排体内或者在胞质溶胶中和/或外排体内丰富。

[0021] 在一个实施方案中,所述蛋白质或编码其的核酸或者所述蛋白质的片段位于胞质溶胶中和/或外排体内或者在胞质溶胶中和/或外排体内丰富指示所述蛋白质或其片段由抗原呈递细胞交叉呈递。

[0022] 在一个实施方案中,确定所述蛋白质或其片段是否由抗原呈递细胞交叉呈递包括确定针对所述蛋白质或其片段的已有抗体应答。

[0023] 在一个实施方案中,针对所述蛋白质或其片段的已有抗体应答指示所述蛋白质或其片段由抗原呈递细胞交叉呈递。

[0024] 在一个实施方案中,确定所述蛋白质或其片段是否由抗原呈递细胞交叉呈递包括确定所述蛋白质或其片段是否与F肌动蛋白结合。

[0025] 在一个实施方案中,所述蛋白质或其片段与F肌动蛋白结合指示所述蛋白质或其片段由抗原呈递细胞交叉呈递。

[0026] 在一个实施方案中,确定所述蛋白质或其片段是否由抗原呈递细胞交叉呈递包括确定所述蛋白质或其片段是否与RNA结合。

[0027] 在一个实施方案中,所述蛋白质或其片段与RNA结合指示所述蛋白质或其片段由抗原呈递细胞交叉呈递。

[0028] 在本发明所有方面的一个实施方案中,蛋白质片段作为MHC肽复合物存在于外排体内,优选在外排体的表面上。

[0029] 在本发明所有方面的一个实施方案中,所述蛋白质或编码其的核酸或者所述蛋白质的片段位于胞质溶胶中或在胞质溶胶中丰富指示所述蛋白质在MHC I途径,优选病变细胞的MHC I途径中加工和呈递。在一个实施方案中,所述蛋白质在MHC I途径中加工和呈递导致CD8+T细胞识别由MHC I和所述蛋白质的片段形成的复合物。

[0030] 在本发明所有方面的一个实施方案中,所述蛋白质或编码其的核酸或者所述蛋白质的片段位于外排体内或在外排体内丰富指示所述蛋白质或编码其的核酸或者所述蛋白质的片段在抗原呈递细胞,优选专职抗原呈递细胞中积累。在一个实施方案中,所述蛋白质或编码其的核酸或者所述蛋白质的片段在抗原呈递细胞中积累指示所述蛋白质在MHC I和/或MHC II途径,优选抗原呈递细胞的MHC I和/或MHC II途径中加工和呈递。在一个实施方案中,所述蛋白质在MHC I途径中加工和呈递导致CD8+T细胞识别由MHC I和所述蛋白质的片段形成的复合物。

[0031] 在另一个方面,本发明涉及用于预测由病变细胞表达的蛋白质或其片段用于免疫治疗的有用性的方法,所述方法包括确定以下一项或更多项:

[0032] (a) 确定针对所述蛋白质或其片段的已有抗体应答,

[0033] (b) 确定所述蛋白质或其片段是否与F肌动蛋白结合,和/或

[0034] (c) 确定所述蛋白质或其片段是否与RNA结合。

[0035] 在一个实施方案中,针对所述蛋白质或其片段的已有抗体应答指示所述蛋白质或其片段可用于免疫治疗。

[0036] 在一个实施方案中,所述蛋白质或其片段与F肌动蛋白结合指示所述蛋白质或其片段可用于免疫治疗。

[0037] 在一个实施方案中,所述蛋白质或其片段与RNA结合指示所述蛋白质或其片段可用于免疫治疗。

[0038] 在本发明所有方面的一个实施方案中,所述蛋白质或其片段包含疾病特异性氨基酸修饰。在一个实施方案中,所述氨基酸修饰归因于疾病特异性体细胞突变。

[0039] 在本发明所有方面的一个实施方案中,所述疾病是癌症,并且所述免疫治疗是抗癌免疫治疗。

[0040] 在本发明所有方面的一个实施方案中,所述蛋白质片段是MHC结合肽或潜在的MHC结合肽。

[0041] 在另一个方面,本发明涉及针对疾病特异性氨基酸修饰在免疫治疗中的有用性对其进行选择和/或排序的方法,所述方法包括以下步骤:

[0042] (i) 鉴定由病变细胞表达的蛋白质,每种蛋白质包含至少一个疾病特异性氨基酸修饰,以及

[0043] (ii) 确定在(i)中鉴定的蛋白质或编码其的核酸或者所述蛋白质的片段的分布或定位,以及

[0044] (iii) 对在(i)中鉴定的至少一种另外的蛋白质重复步骤(ii)。

[0045] 在一个实施方案中,步骤(ii)包括确定所述蛋白质或编码其的核酸或者所述蛋白质的片段在体内是否位于胞质溶胶中和/或外排体内或者在胞质溶胶中和/或外排体内丰富。

[0046] 在一个实施方案中,所述蛋白质或编码其的核酸或者所述蛋白质的片段位于胞质溶胶中和/或外排体内或者在胞质溶胶中和/或外排体内丰富指示疾病特异性氨基酸修饰可用于免疫治疗。

[0047] 在另一个方面,本发明涉及针对疾病特异性氨基酸修饰在免疫治疗中的有用性对其进行选择和/或排序的方法,所述方法包括以下步骤:

[0048] (i) 鉴定由病变细胞表达的蛋白质,每种蛋白质包含至少一个疾病特异性氨基酸修饰,以及

[0049] (ii) 确定在(i)中鉴定的蛋白质或所述蛋白质的片段是否由抗原呈递细胞,优选专职抗原呈递细胞交叉呈递,以及

[0050] (iii) 对在(i)中鉴定的至少一种另外的蛋白质重复步骤(ii)。

[0051] 在一个实施方案中,所述蛋白质或其片段由抗原呈递细胞交叉呈递指示疾病特异性氨基酸修饰可用于免疫治疗。

[0052] 在另一个方面,本发明涉及针对疾病特异性氨基酸修饰在免疫治疗中的有用性对其进行选择和/或排序的方法,所述方法包括以下步骤:

[0053] (i) 鉴定由病变细胞表达的蛋白质,每种蛋白质包含至少一个疾病特异性氨基酸修饰;以及

[0054] (ii) 对在(i)中鉴定的蛋白质或所述蛋白质的片段确定以下一项或更多项:

[0055] (a) 确定针对所述蛋白质或其片段的已有抗体应答,

[0056] (b) 确定所述蛋白质或其片段是否与F肌动蛋白结合,和/或

[0057] (c) 确定所述蛋白质或其片段是否与RNA结合;以及

[0058] (iii) 对在(i)中鉴定的至少一种另外的蛋白质重复步骤(ii)。

[0059] 在一个实施方案中,针对所述蛋白质或其片段的已有抗体应答指示疾病特异性氨基酸修饰可用于免疫治疗。

[0060] 在一个实施方案中,所述蛋白质或其片段与F肌动蛋白结合指示疾病特异性氨基酸修饰可用于免疫治疗。

[0061] 在一个实施方案中,所述蛋白质或其片段与RNA结合指示疾病特异性氨基酸修饰可用于免疫治疗。

[0062] 在本发明所有方面的一个实施方案中,疾病特异性氨基酸修饰被蛋白质片段包含,所述蛋白质片段是MHC结合肽或潜在的MHC结合肽。

[0063] 在本发明所有方面的一个实施方案中,所述方法用于制造疫苗。在一个实施方案中,疫苗来源于被预测为可用于免疫治疗的一种或更多种蛋白质或其片段或者一个或更多个疾病特异性氨基酸修饰。

[0064] 在另一个方面,本发明涉及提供疫苗的方法,其包括以下步骤:鉴定通过本文描述的任何方面的方法被预测为可用于免疫治疗的一种或更多种蛋白质或其片段或者一个或更多个疾病特异性氨基酸修饰。在一个实施方案中,该方法还包括以下步骤:提供包含肽或多肽或者编码肽或多肽的核酸的疫苗,所述肽或多肽包含被预测为可用于免疫治疗的一种或更多种蛋白质或其片段或者一个或更多个疾病特异性氨基酸修饰。

[0065] 在另一个方面,本发明涉及根据本文所述任何方面的方法产生的疫苗。

[0066] 在本发明所有方面的一个实施方案中,指示由病变细胞表达的蛋白质或其片段用于免疫治疗的有用性指示所述蛋白质或其片段在施用(任选地以编码核酸的形式)之后将具有免疫原性。

[0067] 在本发明所有方面的一个实施方案中,本文描述的蛋白质片段是MHC结合肽或潜在的MHC结合肽(例如,MHC结合预测指示该蛋白质片段将与MHC结合)。在一个实施方案中,MHC结合肽是经修饰的肽,其是经修饰蛋白质的片段。

[0068] 在一个实施方案中,通过鉴定一个或更多个蛋白质编码区中的非同义突变来鉴定蛋白质或肽中的氨基酸修饰。

[0069] 在一个实施方案中,如下鉴定氨基酸修饰:对一个或更多个细胞(例如一个或更多个癌细胞和任选地一个或更多个非癌细胞)的基因组或转录物组进行部分或完全测序,并鉴定一个或更多个蛋白质编码区中的突变。在一个实施方案中,所述突变是体细胞突变。在一个实施方案中,所述突变是癌症突变。

[0070] 在一个实施方案中,特别是为了向患者例如癌症患者提供个体化疫苗,在所述患

者中存在所述修饰,并且对所述患者进行本发明的方法。在另一个方面,本发明提供了疫苗,其可以使用根据本发明的方法获得。本文描述了这样的疫苗的一些优选实施方案。

[0071] 根据本发明提供的疫苗可包含可药用载体并且可任选地包含一种或更多种佐剂、稳定剂等。疫苗可以是治疗性或预防性疫苗的形式。

[0072] 另一个方面涉及用于在患者中诱导免疫应答的方法,其包括向患者施用根据本发明提供的疫苗。

[0073] 另一个方面涉及治疗患者的方法,其包括以下步骤:

[0074] (a) 使用根据本发明的方法提供本文所述的免疫治疗剂,例如疫苗;以及

[0075] (b) 向患者施用所述免疫治疗剂。

[0076] 另一个方面涉及治疗患者的方法,其包括向患者施用本文所述的免疫治疗剂,例如疫苗。

[0077] 在一个实施方案中,所述患者是癌症患者,并且所述疫苗是抗癌疫苗,例如其施用提供癌症特异性新表位的疫苗。

[0078] 在另一些方面,本发明提供了本文所述的疫苗,其用于本文所述的治疗方法,特别地用于治疗或预防癌症。

[0079] 本文中所述的癌症治疗可与手术切除和/或放射和/或传统化学治疗组合。

[0080] 从以下发明详述和权利要求书中,本发明的其他特征和优点将变得明显。

[0081] 发明详述

[0082] 尽管下面详细描述了本发明,但是应当理解,本发明不限于本文所述的特定方法、方案和试剂,因为这些可以变化。还应当理解,本文中使用的术语仅用于描述特定实施方案的目的,并且不旨在限制本发明的范围,本发明的范围仅由所附权利要求书限制。除非另有定义,否则本文中使用的所有技术和科学术语具有与本领域普通技术人员通常理解的相同的含义。

[0083] 下文中,将描述本发明的要素。这些要素随具体实施方案列出,然而,应当理解,其可以以任何方式且以任意数量组合以产生另外的实施方案。各个描述的实例和优选实施方案不应被解释为将本发明仅限于明确描述的实施方案。本说明书应当理解为支持并涵盖将明确描述的实施方案与任何数量的所公开和/或优选要素组合的实施方案。此外,除非上下文另有指明,否则本申请中所有描述的要素的任意排列和组合应当被认为通过本申请的说明书公开。

[0084] 优选地,本文使用的术语如“A multilingual glossary of biotechnological terms: (IUPAC Recommendations)”,H.G.W.Leuenberger,B.Nagel,和H. *Kölbl*,编辑(1995)Helvetica Chimica Acta,CH-4010Basel,Switzerland中所述进行定义。

[0085] 除非另外指出,否则本发明的实施将采用生物化学、细胞生物学、免疫学和重组DNA技术中的常规方法,其在本领域的文献中进行了说明(参见,例如Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第2版,J.Sambrook等编辑,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor 1989)。

[0086] 在本说明书和所附权利要求书通篇,除非上下文另外要求,否则词语“包括/包含”及其变化形式将被理解为意指包括所述成员、整数或步骤或者成员、整数或步骤的组,但是不排除任何其他成员、整数或步骤或者成员、整数或步骤的组,尽管在一些实施方案中可以

排除这样的其他成员、整数或步骤或者成员、整数或步骤的组，即主题在于包括所述成员、整数或步骤或者成员、整数或步骤的组。除非本文中另外指出或与上下文明显矛盾，否则在描述本发明的上下文中（尤其是在权利要求书的上下文中）使用的没有数量词修饰的名词应被解释为涵盖一个/种或更多个/种。本文中数值范围的记载仅意在用作单独提及落入该范围内的每个单独值的简写方法。除非本文中另外指出，否则每个单独的值均被并入本说明书中，如同其在本文中被单独记载一样。

[0087] 除非本文中另外指出或另外与上下文明显矛盾，否则本文中描述的所有方法都可以以任何合适的顺序进行。本文中提供的任何和所有实例或示例性语言（例如，“例如”）的使用仅旨在更好地举例说明本发明，而不对以其他方式要求保护的本发明范围构成限制。说明书中的语言都不应被解释为指示实施本发明所必需的任何未要求保护的要素。

[0088] 在本说明书的正文通篇引用了数篇文件。本文中不管是在上文还是下文引用的每篇文件（包括所有专利、专利申请、科学出版物、制造商的说明书、指南等）均在此通过引用整体并入。本文中没有任何内容应被解释为承认本发明无权由于在先发明而早于这些公开内容。

[0089] 本发明设想通过利用存在于病变细胞中的蛋白质或蛋白质片段作为病变细胞的标记并靶向病变细胞来对疾病、特别是癌症疾病进行免疫治疗。特别地，可以通过靶向在MHC情况下呈递在病变细胞表面上的蛋白质片段来靶向病变细胞。根据本发明的免疫治疗通过主动和/或被动免疫治疗方法实现。

[0090] 特别地，本发明旨在确定用于免疫治疗的合适蛋白质或其片段。一旦鉴定出合适的蛋白质，该蛋白质或其片段（任选地作为较大多肽的一部分）或者编码该蛋白质或片段（任选地作为较大多肽的一部分）的核酸可用作疫苗以增强或诱导针对该蛋白质或其片段的免疫应答，特别是通过诱导和/或活化合适的效应细胞例如T细胞来进行，其通过合适的受体（例如T细胞受体或人工T细胞受体）识别该蛋白质或其片段（特别是当在MHC情况下呈递时）。作为替代或补充，可施用效应细胞例如T细胞，其通过合适的受体（例如T细胞受体或人工T细胞受体）识别蛋白质或其片段（特别是当在MHC情况下呈递时）。不希望局限于特定理论，认为通过本发明被预测为可用于免疫治疗的蛋白质或其片段很可能被抗原呈递细胞摄取并被抗原呈递细胞呈递（特别是通过交叉呈递），从而最终导致针对表达该蛋白质或其片段的病变细胞的有效免疫应答。

[0091] 根据本发明确定为可用于或适合于免疫治疗的蛋白质在本文中也称为“抗原”。根据本发明确定为可用于或适合于免疫治疗的蛋白质片段在本文中也称为“表位”。

[0092] 根据本发明的免疫治疗方法包括用以下进行免疫接种：

[0093] i) 蛋白质或肽（天然的或经修饰的），ii) 编码蛋白质或肽的核酸，iii) 编码蛋白质或肽的重组细胞，iv) 编码蛋白质或肽的重组病毒，和v) 用蛋白质或肽（天然的或经修饰的）脉冲或者用编码蛋白质或肽的核酸转染的抗原呈递细胞。

[0094] 根据本发明的免疫治疗方法还包括以下的转移：

[0095] vi) 识别蛋白质或肽的T细胞受体，和vii) 编码识别蛋白质或肽的受体的效应细胞（例如T细胞），特别是当在MHC情况下呈递时。

[0096] 根据本发明的优选蛋白质和片段以疾病特异性方式表达，例如其是疾病相关的抗原或表位（例如蛋白质或表达蛋白质的细胞的存在是疾病的特征）和/或包含一个或更多个

疾病特异性氨基酸修饰,例如其是疾病相关的新抗原或新表位。优选地,疾病特异性氨基酸修饰归因于一个或更多个疾病特异性体细胞突变。在一个特别优选的实施方案中,疾病特异性氨基酸修饰是癌症特异性氨基酸修饰,并且疾病特异性体细胞突变是癌症特异性体细胞突变。因此,根据本发明,疫苗优选地以患者的疾病特异性氨基酸修饰/疾病特异性体细胞突变为特征并且优选地在施用之后提供一个或更多个基于突变的新表位。因此,疫苗可包含肽或多肽或者编码所述肽或多肽的核酸,所述肽或多肽包含一个或更多个基于突变的新表位。在一个实施方案中,疾病特异性氨基酸修饰通过鉴定疾病特异性体细胞突变,例如通过对病变组织或者一个或更多个病变细胞的基因组DNA和/或RNA进行测序来鉴定。

[0097] 根据本发明,鉴定疾病特异性氨基酸修饰和/或鉴定疾病特异性体细胞突变的步骤可以在预测由病变细胞表达的蛋白质或其片段用于免疫治疗的有用性的本发明方法之前或之后进行。在本发明的一个优选实施方案中,首先在患者的病变试样中确定疾病特异性氨基酸修饰和/或疾病特异性体细胞突变,在此之后根据本发明方法预测包含一个或更多个疾病特异性氨基酸修饰的蛋白质或其包含一个或更多个疾病特异性氨基酸修饰的片段用于免疫治疗的有用性。一旦鉴定出,还可以根据本发明方法针对其在免疫治疗中的有用性选择疾病特异性氨基酸修饰(相应地包含一个或更多个疾病特异性氨基酸修饰的蛋白质或其包含一个或更多个疾病特异性氨基酸修饰的片段)和/或对其进行排序。

[0098] 术语“外排体”涉及存在于生物流体(包括血液、尿液和细胞培养物的培养基)中的细胞来源囊泡。外排体在多泡体与质膜融合时从细胞释放或者其直接从质膜释放。外排体包含其来源细胞的多种分子成分,包括蛋白质和RNA。尽管外排体蛋白质组成随着来源细胞和组织而变化,但大多数外排体包含在进化上保守的共同蛋白质分子组。外排体可以通过膜囊泡运输将分子从一个细胞转移到另一个细胞,从而影响免疫系统,例如树突细胞和B细胞,并且可以在介导针对病原体和肿瘤的适应性免疫应答中发挥功能性作用。

[0099] 如本文所用,术语“胞质溶胶(cytosol)”是指不在细胞的膜结合亚结构内的细胞质部分。

[0100] 根据本发明,术语“肽”指这样的物质,其包含两个或更多个、优选3个或更多个、优选4个或更多个、优选6个或更多个、优选8个或更多个、优选10个或更多个、优选13个或更多个、优选16个或更多个、优选21个或更多个并且多至优选8、10、20、30、40或50个、特别是100个通过肽键共价连接的氨基酸。术语“多肽”或“蛋白质”指大的肽,优选指具有多于100个氨基酸残基的肽,但一般而言,术语“肽”、“多肽”和“蛋白质”是同义词,并且在本文中可互换使用。

[0101] 根据本发明,与肽、多肽或蛋白质相关的术语“修饰”指与亲本序列(例如野生型肽、多肽或蛋白质的序列)相比的肽、多肽或蛋白质的序列变化。该术语包括氨基酸插入变体、氨基酸添加变体、氨基酸缺失变体和氨基酸替换变体,优选氨基酸替换变体。根据本发明的所有这些序列变化都可潜在地产生新表位。

[0102] 氨基酸插入变体包含在特定氨基酸序列中插入单个或者两个或更多个氨基酸。

[0103] 氨基酸添加变体包含一个或更多个氨基酸,例如1、2、3、4或5个或者更多个氨基酸的氨基和/或羧基末端融合。

[0104] 氨基酸缺失变体以从序列中去除一个或更多个氨基酸,例如以去除1、2、3、4或5个或者更多个氨基酸为特征。

[0105] 氨基酸替换变体的特征在于序列中的至少一个残基被去除并且在其位置插入另一个残基。

[0106] 根据本发明,修饰或经修饰肽可来源于包含修饰的蛋白质。

[0107] 根据本发明,术语“来源于”意指特定实体,特别是特定肽序列存在于其所来源于的物体中。在氨基酸序列,特别是特定序列区域的情况下,“来源于”特别地意指相关氨基酸序列来源于其所存在的氨基酸序列。

[0108] 根据本发明,本文描述的蛋白质优选包含一个或更多个疾病特异性氨基酸修饰。在一个实施方案中,这一个或更多个疾病特异性氨基酸修饰位于蛋白质的表位或潜在表位内。因此,本文描述的优选蛋白质是新抗原,其优选地包含一个或更多个新表位。类似地,本文描述的优选蛋白质片段是包含一个或更多个疾病特异性氨基酸修饰的蛋白质的片段,其中优选地一个或更多个疾病特异性氨基酸修饰位于该蛋白质片段内。因此,本文描述的一种优选蛋白质片段是新表位。

[0109] 根据本发明,术语“新抗原”指与亲本肽或蛋白质相比包含一个或更多个氨基酸修饰的肽或蛋白质。例如,新抗原可以是肿瘤相关新抗原,其中术语“肿瘤相关新抗原”包括由于肿瘤特异性突变而包含氨基酸修饰的肽或蛋白质。

[0110] 根据本发明,术语“疾病特异性突变”指存在于病变细胞的核酸中但不存在于对应的正常细胞,即非病变细胞的核酸中的体细胞突变。

[0111] 根据本发明,术语“肿瘤特异性突变”或“癌症特异性突变”指存在于肿瘤细胞或癌细胞的核酸中但不存在于对应的正常细胞,即非肿瘤细胞或非癌细胞的核酸中的体细胞突变。术语“肿瘤特异性突变”和“肿瘤突变”与术语“癌症/癌特异性突变”和“癌症/癌突变”在本文中可互换使用。

[0112] 术语“免疫应答”指免疫系统的反应,例如针对免疫原性生物体(例如细菌或病毒)、细胞或物质的反应。术语“免疫应答”包括先天免疫应答和适应性免疫应答。优选地,免疫应答涉及免疫细胞的活化、细胞因子生物合成的诱导和/或抗体产生。

[0113] 由本文所述组合物诱导的免疫应答优选地包括以下步骤:活化抗原呈递细胞(例如树突细胞和/或巨噬细胞),通过所述抗原呈递细胞呈递抗原或其片段,以及由于该呈递而活化细胞毒性T细胞。

[0114] “诱导免疫应答”可意指在诱导之前不存在免疫应答,但其还可意指在诱导之前存在一定水平的免疫应答并且在诱导之后所述免疫应答被增强。因此,“诱导免疫应答”还包括“增强免疫应答”。优选地,在对象中诱导免疫应答之后,所述对象被保护免于发生疾病,例如癌症疾病,或者通过诱导免疫应答,疾病状况得以改善。例如,可在患有癌症疾病的患者中或在处于发生癌症疾病风险之中的对象中诱导针对肿瘤表达抗原的免疫应答。在这种情况下诱导免疫应答可意味着改善对象的疾病状况、对象不发生转移或者处于发生癌症疾病风险之中的对象不发生癌症疾病。

[0115] 术语“细胞免疫应答”和“细胞应答”或类似术语指涉及充当“助手”或“杀手”的T细胞或T淋巴细胞针对以用MHC I类或II类呈递抗原为特征之细胞的免疫应答。辅助T细胞(也称为CD4⁺T细胞)通过调节免疫应答来发挥中心作用,并且杀伤细胞(也称为细胞毒性T细胞、细胞裂解性T细胞、CD8⁺T细胞或CTL)杀伤病变细胞,例如癌细胞,从而防止产生更多的病变细胞。在一些优选的实施方案中,本发明涉及刺激针对表达一种或更多种疾病相关抗

原并且优选地用I类MHC呈递此类疾病相关抗原的病变细胞的抗疾病CTL应答,特别是针对表达一种或更多种肿瘤表达抗原并且优选地用I类MHC呈递此类肿瘤表达抗原的肿瘤细胞的抗肿瘤CTL应答。

[0116] 根据本发明,术语“抗原”或“免疫原”涵盖以下任何物质,优选肽或蛋白质,其是免疫应答的靶标和/或其将引发免疫应答。特别地,“抗原”涉及与抗体或T淋巴细胞(T细胞)特异性反应的任何物质。根据本发明,术语“抗原”包括任何包含至少一个表位例如T细胞表位的分子。优选地,在本发明的上下文中,抗原是这样的分子,其任选地在加工之后诱导免疫反应,所述免疫反应优选地对该抗原或表达该抗原的细胞具有特异性。根据本发明,可以使用作为免疫反应的候选者的任何合适的抗原,其中所述免疫反应优选地是细胞免疫反应。在本发明实施方案的上下文中,抗原优选地在MHC分子的情况下由细胞,优选由抗原呈递细胞呈递,这导致针对该抗原的免疫反应。抗原优选地是对应于或来源于天然存在的抗原的产物。这样的天然存在的抗原可以包括或可以来源于变应原、病毒、细菌、真菌、寄生物以及其他感染原和病原体,或者抗原也可以是肿瘤抗原。根据本发明,抗原可以对应于天然存在的产物,例如病毒蛋白或其部分。在一些优选的实施方案中,抗原是表面多肽,即天然展示在细胞、病原体、细菌、病毒、真菌、寄生物、变应原或肿瘤的表面上的多肽。抗原可以引发针对细胞、病原体、细菌、病毒、真菌、寄生物、变应原或肿瘤的免疫应答。

[0117] 术语“疾病相关抗原”以其最广泛的含义使用,是指与疾病相关的任何抗原。疾病相关抗原是包含将刺激宿主的免疫系统以产生针对该疾病的抗原特异性细胞免疫应答和/或体液抗体应答的表位的分子。因此,疾病相关抗原可用于治疗目的。疾病相关抗原优选地与微生物感染(通常是微生物抗原)相关或与癌症(通常是肿瘤)相关。

[0118] 术语“病原体”是指能够在生物体,优选脊椎动物生物体中引起疾病的致病性生物材料。病原体包括微生物,例如细菌、单细胞真核生物(原生动物)、真菌、以及病毒。

[0119] 术语“表位”、“抗原肽”、“抗原表位”、“免疫原性肽”和“MHC结合肽”在本文中可互换使用,并且指分子(例如抗原)中的抗原决定簇,即指免疫活性化合物中被免疫系统识别(例如,被T细胞识别,特别是当在MHC分子的情况下呈递时)的部分或片段。蛋白质的表位优选地包含所述蛋白质的连续或不连续段,并且长度优选为5至100,优选5至50,更优选8至30,最优选10至25个氨基酸,例如,表位的长度可以优选为9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个氨基酸。根据本发明,表位可与MHC分子(例如细胞表面上的MHC分子)结合,并且因此可以是“MHC结合肽”或“抗原肽”。

[0120] 术语“主要组织相容性复合体”和缩写“MHC”包括MHC I类和MHC II类分子,并且指存在于所有脊椎动物中的基因复合体。MHC蛋白或分子在免疫反应中对淋巴细胞与抗原呈递细胞或病变细胞之间的信号传导具有重要意义,其中MHC蛋白或分子与肽结合并将其呈递以被T细胞受体识别。由MHC编码的蛋白质在细胞表面上表达,并且向T细胞展示自身抗原(来自细胞本身的肽片段)和非自身抗原(例如,入侵微生物的片段)两者。优选的此类免疫原性部分与MHC I类或II类分子结合。如本文所用,如果使用本领域已知的任何测定可检测到这种结合,则称免疫原性部分与MHC I类或II类分子“结合”。术语“MHC结合肽”是指结合MHC I类和/或MHC II类分子的肽。在I类MHC/肽复合物的情况下,结合肽的长度通常为8至10个氨基酸,但是更长或更短的肽也可以是有效的。在II类MHC/肽复合物的情况下,结合肽的长度通常为10至25个氨基酸,并且特别地长度为13至18个氨基酸,而更长和更短的肽也

可以是有效的。在本发明所有方面的一个优选实施方案中，MHC分子是HLA分子。

[0121] 如果肽是包含另外序列的较大实体(例如疫苗序列或多肽)的一部分，并且将在加工之后、特别是在切割之后被呈递，则通过加工产生的肽具有适于与MHC分子、特别是I类MHC分子结合的长度，并且优选地长度为7至30个氨基酸，例如长度为7至20个氨基酸，更优选地长度为7至12个氨基酸，更优选地长度为8至11个氨基酸，特别地长度为9或10个氨基酸。优选地，将在加工之后被呈递的肽的序列来源于用于疫苗接种的抗原或多肽的氨基酸序列，即其序列与该抗原或多肽的片段基本上对应并且优选地完全相同。

[0122] 因此，在一个实施方案中，MHC结合肽包含与抗原的片段基本上对应并且优选地完全相同的序列。

[0123] 本文中使用的术语“新表位”指在参照细胞(例如正常的非病变细胞(例如非癌细胞)或种系细胞)中不存在但见于病变细胞(例如癌细胞)中的表位。这特别地包括以下情况，其中在正常的非病变细胞或种系细胞中发现对应的表位，然而由于病变细胞中的一个或更多个突变，该表位的序列改变而产生新表位。

[0124] 如本文中使用的术语“T细胞表位”指以被T细胞受体识别的构型与MHC分子结合的肽。通常来说，T细胞表位呈递在抗原呈递细胞的表面上。

[0125] 根据本发明的T细胞表位优选地指抗原的一段或片段，其能够刺激针对该抗原或者针对以表达该抗原为特征并且优选地以呈递该抗原为特征的细胞(例如病变细胞，特别是癌细胞)的免疫应答，优选细胞应答。优选地，T细胞表位能够刺激针对以用I类MHC呈递抗原为特征的细胞的细胞应答，并且优选地能够刺激抗原响应性细胞毒性T淋巴细胞(CTL)。

[0126] 在一个实施方案中，根据本发明的疫苗包含适于对靶生物体进行疫苗接种的表位。本领域技术人员将知道免疫生物学和疫苗接种的原理之一基于以下事实：通过用疫苗对生物体进行免疫接种来产生针对疾病的免疫保护反应，所述疫苗与待治疗的疾病有免疫学相关性。根据本发明，抗原选自包括自身抗原和非自身抗原的组。非自身抗原优选地是细菌抗原、病毒抗原、真菌抗原、变应原或寄生物抗原。优选地，抗原包含能够在靶生物体中引发免疫应答的表位。例如，表位可以引发针对细菌、病毒、真菌、寄生物、变应原或肿瘤的免疫应答。

[0127] 在一些实施方案中，非自身抗原是细菌抗原。在一些实施方案中，抗原引发针对感染动物的细菌的免疫应答，所述动物包括鸟类、鱼类和哺乳动物，包括家养动物。优选地，针对其引发免疫应答的细菌是致病性细菌。

[0128] 在一些实施方案中，非自身抗原是病毒抗原。病毒抗原可以是例如来自病毒表面蛋白例如衣壳多肽或刺突多肽(spike polypeptide)的肽。在一些实施方案中，抗原引发针对感染动物的病毒的免疫应答，所述动物包括鸟类、鱼类和哺乳动物，包括家养动物。优选地，针对其引发免疫应答的病毒是致病性病毒。

[0129] 在一些实施方案中，非自身抗原是来自真菌的多肽或蛋白质。在一些实施方案中，抗原引发针对感染动物的真菌的免疫应答，所述动物包括鸟类、鱼类和哺乳动物，包括家养动物。优选地，针对其引发免疫应答的真菌是致病性真菌。

[0130] 在一些实施方案中，非自身抗原是来自单细胞真核寄生物的多肽或蛋白质。在一些实施方案中，抗原引发针对单细胞真核寄生物，优选致病性单细胞真核寄生物的免疫应答。致病性单细胞真核寄生物可以例如来自疟原虫属(Plasmodium)，例如恶性疟原虫(P.向

lci parum)、间日疟原虫 (*P. vivax*)、三日疟原虫 (*P. malariae*) 或卵形疟原虫 (*P. ovale*)；来自利什曼原虫属 (*Leishmania*)；或来自锥虫属 (*Trypanosoma*)，例如克氏锥虫 (*T. cruzi*) 或布氏锥虫 (*T. brucei*)。

[0131] 在一些实施方案中，非自身抗原是变应性多肽或变应性蛋白。变应性蛋白或变应性多肽适用于变应原免疫治疗，也称为减敏 (hypo-sensitization)。

[0132] 在一些实施方案中，抗原是自身抗原，特别是肿瘤抗原。肿瘤抗原及其确定是技术人员已知的。

[0133] 在本发明的上下文中，术语“肿瘤抗原”或“肿瘤相关抗原”指以下蛋白质，其在正常条件下在有限量的组织和/或器官中或在特定发育阶段特异性表达，例如肿瘤抗原可在正常条件下在胃组织中 (优选地在胃黏膜中)、在生殖器官中 (例如在睾丸中)、在滋养层组织中 (例如在胎盘中)、或在种系细胞中特异性表达；并且在一个或多个肿瘤或癌组织中表达或异常表达。在该情况下，“有限量”优选地意指不超过3，更优选不超过2。在本发明上下文中的肿瘤抗原包括例如分化抗原，优选细胞类型特异性分化抗原，即在正常条件下在特定分化阶段在特定细胞类型中特异性表达的蛋白质；癌症/睾丸抗原，即在正常条件下在睾丸中并且有时在胎盘中特异性表达的蛋白质；以及种系特异性抗原。在本发明的上下文中，肿瘤抗原优选与癌细胞的细胞表面缔合，并且优选地在正常组织中不表达或仅很少表达。优选地，肿瘤抗原或肿瘤抗原的异常表达鉴定癌细胞。在本发明的上下文中，对象例如患有癌症疾病的患者中由癌细胞表达的肿瘤抗原优选地是所述对象中的自身蛋白。在一些优选实施方案中，在本发明上下文中的肿瘤抗原在正常条件下在非必需组织或器官 (即当被免疫系统损害时不导致对象死亡的组织或器官) 中或者在免疫系统不可及或仅很难可及的身体器官或结构中特异性表达。优选地，肿瘤抗原的氨基酸序列在正常组织中表达的肿瘤抗原和在癌组织中表达的肿瘤抗原之间是相同的。

[0134] 可用于本发明的肿瘤抗原的一些实例是p53；ART-4；BAGE； β -联蛋白/m；Bcr-abL CAMEL；CAP-1；CASP-8；CDC27/m；CDK4/m；CEA；密蛋白家族的细胞表面蛋白，例如CLAUDIN-6、CLAUDIN-18.2和CLAUDIN-12；c-MYC；CT；Cyp-B；DAM；ELF2M；ETV6-AML1；G250；GAGE；GnT-V；Gap100；HAGE；HER-2/neu；HPV-E7；HPV-E6；HAST-2；hTERT (或hTRT)；LAGE；LDLR/FUT；MAGE-A，优选MAGE-A1、MAGE-A2、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-A3、MAGE-A6、MAGE-A7、MAGE-A8、MAGE-A9、MAGE-A10、MAGE-A11或MAGE-A12；MAGE-B；MAGE-C；MART-1/Melan-A；MC1R；肌球蛋白/m；MUC1；MUM-1；MUM-2；MUM-3；NA88-A；NF1；NY-ESO-1；NY-BR-1；p190小BCR-abL；Pml/RAR α ；PRAME；蛋白酶3；PSA；PSM；RAGE；RU1或RU2；SAGE；SART-1或SART-3；SCGB3A2；SCP1；SCP2；SCP3；SSX；SURVIVIN；TEL/AML1；TPI/m；TRP-1；TRP-2；TRP-2/INT2；TPTE和WT。特别优选的肿瘤抗原包括CLAUDIN-18.2 (CLDN18.2) 和CLAUDIN-6 (CLDN6)。

[0135] 术语“免疫原性”指诱导优选地与治疗性治疗，例如针对癌症的治疗相关的免疫应答的相对功效。本文中使用的术语“免疫原性的”指具有免疫原性的特性。例如，当在肽、多肽或蛋白质的情况下使用时，术语“免疫原性修饰”指所述肽、多肽或蛋白质诱导由所述修饰引起和/或针对所述修饰的免疫应答的功效。优选地，未经修饰的肽、多肽或蛋白质不诱导免疫应答、诱导不同的免疫应答或诱导不同水平，优选较低水平的免疫应答。

[0136] 根据本发明，术语“免疫原性”或“免疫原性的”优选地指诱导生物学相关免疫应答，特别是可用于疫苗接种的免疫应答的相对功效。因此，在一个优选实施方案中，如果氨

氨基酸修饰或经修饰肽在对象中诱导针对靶修饰的免疫应答,则其是免疫原性的,所述免疫应答可对治疗或预防目的具有益处。

[0137] 如本文所用,术语“预测蛋白质或其片段用于免疫治疗的有用性”是指预测蛋白质或者其一个或更多个片段例如表位、特别是T细胞表位是否可用于诱导免疫应答或靶向免疫应答。如果预测例如疾病相关抗原的蛋白质可用于免疫治疗,则例如,所述蛋白质的表位如本文所述可用于疫苗接种,或者可施用靶向所述蛋白质的表位的效应细胞。优选地,根据本发明预测用于免疫治疗的有用性的蛋白质在患者的病变细胞中表达。

[0138] 根据本发明,T细胞表位可作为包含多于一个T细胞表位的较大实体例如疫苗序列和/或多肽的一部分存在于疫苗中。呈递的肽或T细胞表位在适当地加工之后产生。而且,T细胞表位可在对TCR识别或与MHC结合非必需的一个或更多个残基处被修饰。这样的经修饰T细胞表位可以被认为是免疫学上等同的。优选地,T细胞表位当被MHC呈递并且被T细胞受体识别时能够在合适共刺激信号的存在下诱导携带特异性地识别肽/MHC复合物的T细胞受体的T细胞克隆扩增。优选地,T细胞表位包含基本上对应于抗原片段的氨基酸序列的氨基酸序列。优选地,所述抗原片段是MHC I类和/或II类呈递的肽。

[0139] “抗原加工”或“加工”指肽、多肽或蛋白质被降解成作为所述肽、多肽或蛋白质的片段的加工产物(例如,多肽被降解成肽),并且使这些片段中一个或更多个与MHC分子缔合(例如,通过结合)用于被细胞,优选抗原呈递细胞呈递于特定T细胞。

[0140] II类限制性抗原主要来源于外源蛋白,其通过胞吞途径进入抗原呈递细胞并在内体区室中加工。相反,I类限制性效应CTL识别的抗原通常来源于内源合成的蛋白质。因此,外源蛋白不能为I类限制性效应CTL提供抗原决定簇,除非将其直接引入靶细胞的细胞质中。

[0141] 术语“交叉呈递”是指抗原呈递细胞摄取、加工细胞外抗原并用MHCI类分子将细胞外抗原呈递至CD8 T细胞(细胞毒性T细胞)的能力。交叉致敏描述了通过该过程刺激天然细胞毒性CD8+T细胞。能够交叉呈递的抗原呈递细胞主要是树突细胞,但是已经显示巨噬细胞、B淋巴细胞和窦内皮细胞也能够这样做。

[0142] 已显示对于病毒蛋白和肿瘤抗原发生交叉致敏。这导致提出交叉致敏可以为免疫系统提供一种机制,通过该机制,免疫系统可以检测不感染专职APC的组织向性病毒并对其作出响应。在没有这种机制的情况下,病毒可以通过避免专职APC而逃脱免疫监视。该机制还为免疫系统提供了一种研究由新出现肿瘤细胞表达的新抗原的手段。与外源性外来抗原一样,外源性自身抗原也可以进入I类呈递途径。

[0143] “抗原呈递细胞”(antigen presenting cell,APC)是呈递与其细胞表面上的MHC分子缔合的蛋白质抗原的肽片段的细胞。一些APC可活化抗原特异性T细胞。

[0144] 专职抗原呈递细胞在通过吞噬或通过受体介导的胞吞内化抗原并随后在其膜上展示与II类MHC分子结合的抗原片段方面非常有效。T细胞识别抗原呈递细胞膜上的抗原-II类MHC分子复合物并与之相互作用。然后,抗原呈递细胞产生另外的共刺激信号,从而导致活化T细胞。共刺激分子的表达是专职抗原呈递细胞的限定特征。

[0145] 专职抗原呈递细胞的主要类型是树突细胞,其具有最宽范围的抗原呈递,并且可能是最重要的抗原呈递细胞;巨噬细胞;B细胞以及某些活化的上皮细胞。树突细胞(DC)是通过MHC II类和I类两种抗原呈递途径将外周组织中捕获的抗原呈递于T细胞的白细胞群

体。众所周知的是,树突细胞是免疫应答的有效诱导剂,并且这些细胞的活化是诱导抗肿瘤免疫的关键步骤。树突细胞常规被分类为“未成熟细胞”和“成熟细胞”,其可用作区分两种充分表征的表型的简单方式。然而,这种命名不应解释为排除所有可能的中间分化阶段。未成熟树突细胞表征为具有高抗原摄取和加工能力的抗原呈递细胞,这与Fc γ 受体和甘露糖受体的高表达相关。成熟表型通常以这些标志物的较低表达但是导致T细胞活化的细胞表面分子的高表达为特征,所述细胞表面分子例如I类和II类MHC、黏附分子(例如,CD54和CD11)和共刺激分子(例如,CD40、CD80、CD86和4-1BB)。树突细胞成熟指这样的抗原呈递树突细胞导致T细胞致敏的树突细胞活化状态,而通过未成熟树突细胞的呈递导致耐受。树突细胞成熟主要由以下引起:具有被先天受体检测的微生物特征的生物分子(细菌DNA、病毒RNA、内毒素等)、促炎细胞因子(TNF、IL-1、IFN)、树突细胞表面上的CD40被CD40L连接以及从正经受应激细胞死亡的细胞中释放的物质。树突细胞可以通过在体外用细胞因子培养骨髓细胞来获得,所述细胞因子例如粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)和肿瘤坏死因子 α 。

[0146] 非专职抗原呈递细胞不组成型地表达与天然T细胞相互作用所需的MHC II类蛋白;这些仅在非专职抗原呈递细胞被某些细胞因子(例如IFN γ)刺激之后表达。

[0147] “以呈递抗原为特征的细胞”或“呈递抗原的细胞”或者类似表述意指在MHC分子、特别是MHC I类分子情况下呈递抗原或者例如通过加工抗原而呈递来源于所述抗原的片段的细胞,例如病变细胞,如癌细胞,或者抗原呈递细胞。类似地,术语“以呈递抗原为特征的疾病”表示涉及以呈递抗原,特别地以I类MHC呈递抗原为特征之细胞的疾病。细胞的抗原呈递可通过用编码抗原的核酸(例如RNA)转染细胞来实现。

[0148] “所呈递的抗原片段”或类似表述意指所述片段例如当直接添加至抗原呈递细胞时可由MHC I类或II类,优选MHC I类呈递。在一个实施方案中,所述片段是由表达抗原的细胞天然呈递的片段。

[0149] “靶细胞”应意指为免疫应答(例如细胞免疫应答)靶标的细胞。靶细胞包括呈递抗原,即来源于抗原的肽片段的细胞,并且包括任何不期望的细胞,例如癌细胞。在一些优选实施方案中,靶细胞是表达本文中所述的抗原并且优选地用I类MHC呈递所述抗原的细胞。

[0150] 术语“段(portion)”指片段。对于例如氨基酸序列或蛋白质的特定结构,术语其“段”可指所述结构的连续或不连续片段。优选地,氨基酸序列的一段包含所述氨基酸序列的至少1%、至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、优选至少40%、优选至少50%、更优选至少60%、更优选至少70%、甚至更优选至少80%并且最优选至少90%的氨基酸。优选地,如果该段是不连续片段,则所述不连续片段由结构的2、3、4、5、6、7、8个或更多个部分构成,每个部分为该结构的连续元件。例如,氨基酸序列的不连续片段可由所述氨基酸序列的2、3、4、5、6、7、8个或更多个,优选不超过4个部分构成,其中每个部分优选地包含该氨基酸序列的至少5个连续氨基酸、至少10个连续氨基酸、优选至少20个连续氨基酸、优选至少30个连续氨基酸。

[0151] 术语“部分(part)”和“片段”在本文中可互换使用,并且指连续元件。例如,例如氨基酸序列或蛋白质的结构的一部分指所述结构的连续元件。结构的段、部分或片段优选地包含所述结构的一种或更多种功能特性。例如,表位、肽或蛋白质的段、部分或片段优选地与其所来源于的表位、肽或蛋白质免疫学等同。在本发明的上下文中,例如氨基酸序列的结

构的“部分”优选地包含整体结构或氨基酸序列的至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少85%、至少90%、至少92%、至少94%、至少96%、至少98%、至少99%，优选地由其组成。

[0152] 在本发明的上下文中，术语“效应细胞”、“免疫效应细胞”或“免疫反应性细胞”指在免疫反应期间发挥效应功能的细胞。“免疫反应性细胞”优选地能够与抗原或者以呈递抗原或其肽片段（例如，T细胞表位）为特征的细胞结合，并且介导免疫应答。例如，这样的细胞分泌细胞因子和/或趋化因子，分泌抗体，识别癌细胞并任选地消除这些细胞。例如，免疫反应性细胞包含T细胞（细胞毒性T细胞、辅助T细胞、肿瘤浸润性T细胞）、B细胞、自然杀伤细胞、中性粒细胞、巨噬细胞和树突细胞。优选地，在本发明的上下文中，免疫反应性细胞是T细胞，优选CD4⁺和/或CD8⁺T细胞。

[0153] 优选地，“免疫反应性细胞”以一定程度的特异性识别抗原或其肽片段，特别是如果在MHC分子情况下在例如抗原呈递细胞或病变细胞（例如癌细胞）的表面上呈递的话。优选地，所述识别使得识别抗原或其肽片段的细胞能够具有响应性或反应性。如果细胞是携带在MHC II类分子情况下识别抗原或其肽片段之受体的辅助T细胞（CD4⁺T细胞），则这样的响应性或反应性可涉及释放细胞因子和/或活化CD8⁺淋巴细胞（CTL）和/或B细胞。如果细胞是CTL，则这样的响应性或反应性可涉及例如通过凋亡或穿孔素介导的细胞裂解来消除在MHC I类分子情况下呈递的细胞，即以用I类MHC呈递抗原为特征的细胞。根据本发明，CTL响应性可包括持续的钙通量、细胞分裂、细胞因子（例如IFN- γ 和TNF- α ）产生、活化标志物（例如CD44和CD69）上调、以及抗原表达靶细胞的特异性细胞裂解性杀伤。CTL响应性还可使用精确地指示CTL响应性的人工报道子来确定。这样的识别抗原或抗原片段并且具有响应性或反应性的CTL在本文中还称为“抗原响应性CTL”。如果细胞是B细胞，则这样的响应性可涉及释放免疫球蛋白。

[0154] 术语“T细胞”和“T淋巴细胞”在本文中可互换使用并且包括T辅助细胞（CD4⁺T细胞）和包括细胞裂解性T细胞的细胞毒性T细胞（CTL，CD8⁺T细胞）。

[0155] T细胞属于已知为淋巴细胞的白细胞组，并且在细胞介导的免疫中起关键作用。其与其他淋巴细胞类型（例如B细胞和自然杀伤细胞）的区别之处可在于在其细胞表面上存在称为T细胞受体（TCR）的特殊受体。胸腺是负责T细胞成熟的主要器官。已发现T细胞的数个不同亚群，其各自均具有独特的功能。

[0156] T辅助细胞在免疫过程中辅助其他白细胞，除其他功能之外还包括使B细胞成熟为浆细胞以及活化细胞毒性T细胞和巨噬细胞。这些细胞由于其在其表面上表达CD4蛋白而还被称为CD4⁺T细胞。辅助T细胞当抗原呈递细胞（APC）表面上表达的MHC II类分子向其呈递肽抗原时变得活化。一旦活化，其迅速分裂并分泌在活性免疫应答中起调节或辅助作用的称为细胞因子的小蛋白。

[0157] 细胞毒性T细胞破坏病毒感染的细胞和肿瘤细胞，并且还参与移植物排斥。这些细胞由于其在其表面上表达CD8糖蛋白而还被称为CD8⁺T细胞。这些细胞通过结合与MHC I类缔合的抗原来识别其靶标，MHC I类存在于身体的几乎每个细胞的表面上。

[0158] 大多数T细胞具有作为数种蛋白质的复合体存在的T细胞受体（TCR）。实际的T细胞受体由两条独立的肽链构成，这些肽链由独立的T细胞受体 α 和 β （TCR α 和TCR β ）基因产生，并且称为 α -和 β -TCR链。 γ δ T细胞（gamma delta T细胞）代表在其表面上具有独特T细胞受体

(TCR)的一小部分T细胞。然而,在 $\gamma\delta$ T细胞中,TCR由一条 γ 链和一条 δ 链构成。与 $\alpha\beta$ T细胞相比,该T细胞组群较不常见(总T细胞的2%)。

[0159] 根据本发明,术语“抗原受体”包括天然存在的受体,例如T细胞受体以及经改造受体,其向效应细胞例如T细胞赋予任意特异性例如单克隆抗体的特异性。以这种方式,可以产生大量抗原特异性T细胞以用于过继细胞转移。因此,根据本发明的抗原受体可以存在于T细胞上,例如,作为T细胞自身的T细胞受体的替代或补充。这样的T细胞不一定需要对抗原进行加工和呈递以识别靶细胞,而是可以优选地特异性地识别靶细胞上存在的任何抗原。优选地,所述抗原受体在细胞表面上表达。出于本发明的目的,包含经改造抗原受体的T细胞包括在本文中使用的术语“T细胞”中。特别地,根据本发明,术语“抗原受体”包括包含以下单分子或分子复合物的人工受体,其识别(即结合)靶细胞(例如癌细胞)上的靶结构(例如抗原)(例如,通过使抗原结合位点或抗原结合结构域与靶细胞表面上表达的抗原结合),并且可以向在细胞表面上表达所述抗原受体的效应细胞例如T细胞赋予特异性。优选地,抗原受体对靶结构的识别导致表达所述抗原受体的效应细胞的活化。根据本发明,“抗原受体”可以是“嵌合抗原受体(CAR)”、“嵌合T细胞受体”或“人工T细胞受体”。

[0160] 根据本发明,抗原可以通过任何能够形成抗原结合位点的抗原识别结构域(本文中简称为“结构域”)例如通过可以存在于同一或不同肽链上的抗体和T细胞受体的抗原结合部分被抗原受体识别。在一个实施方案中,形成抗原结合位点的两个结构域来源于免疫球蛋白。在另一个实施方案中,形成抗原结合位点的两个结构域来源于T细胞受体。特别优选的是抗体可变结构域,例如来源于单克隆抗体的单链可变片段(scFv);和T细胞受体可变结构域,特别是TCR α 和 β 单链。事实上,几乎任何以高亲和力结合给定靶标的物质都可以用作抗原识别结构域。

[0161] T细胞活化中的第一信号通过T细胞受体与另一细胞上由MHC呈递的短肽结合来提供。这确保仅活化具有该肽特异性的TCR的T细胞。配偶体细胞通常是抗原呈递细胞,例如专职抗原呈递细胞,在稚应答(**naïve response**)的情况下通常为树突细胞,但是B细胞和巨噬细胞也可以是重要的APC。

[0162] 根据本发明,如果分子对预定靶标具有显著亲和力并且在标准测定中与所述预定靶标结合,则其能够与所述靶标结合。通常通过平衡解离常数(K_D)测量“亲和力”或“结合亲和力”。如果分子对靶标不具有显著亲和力并且在标准测定中不与所述靶标显著结合,则其(基本上)不能够与所述靶标结合。

[0163] 细胞毒性T淋巴细胞可通过在体内向抗原呈递细胞中并入抗原或其肽片段来体内产生。抗原或其肽片段可作为蛋白质、作为DNA(例如在载体内)或作为RNA表示。抗原可被加工以产生MHC分子的肽配偶体,而其片段则无需进行进一步加工即可呈递。如果这些可以与MHC分子结合,则后者尤其如此。一般来说,可通过皮内注射来向患者施用。然而,注射也可以在节内进行进入淋巴结中(Maloy等(2001),*Proc Natl Acad Sci USA* 98:3299-303)。产生的细胞呈递目的复合物并被自体细胞毒性T淋巴细胞识别,其随后增殖。

[0164] CD4+或CD8+T细胞的特异性活化可以以多种方式来检测。用于检测特异性T细胞活化的方法包括检测T细胞的增殖、细胞因子(例如,淋巴因子)的产生或细胞裂解活性的产生。对于CD4+T细胞,用于检测特异性T细胞活化的一种优选方法是检测T细胞增殖。对于CD8+T细胞,用于检测特异性T细胞活化的一种优选方法是检测细胞裂解活性的产生。

[0165] 术语“免疫学等同的”意指免疫学等同分子(例如免疫学等同氨基酸序列)表现出相同或基本上相同的免疫学特性和/或发挥相同或基本上相同的免疫学作用,例如对于免疫学作用的类型,例如诱导体液和/或细胞免疫应答、所诱导免疫反应的强度和/或持续时间、或者所诱导免疫反应的特异性。在本发明的上下文中,术语“免疫学等同的”优选地针对用于免疫接种的肽的免疫学作用或特性使用。例如,如果氨基酸序列在暴露于对象的免疫系统时诱导具有与参照氨基酸序列反应的特异性的免疫反应,则所述氨基酸序列与该参照氨基酸序列免疫学等同。

[0166] 在本发明的上下文中,术语“免疫效应功能”包括由免疫系统的组分介导的任何功能,其导致例如杀伤肿瘤细胞或者抑制肿瘤生长和/或抑制肿瘤发展,包括抑制肿瘤播散和转移。优选地,在本发明的上下文中,免疫效应功能是T细胞介导的效应功能。这样的功能在辅助T细胞(CD4⁺T细胞)的情况下包括抗原或抗原片段在MHC II类分子情况下被T细胞受体识别、释放细胞因子和/或活化CD8⁺淋巴细胞(CTL)和/或B细胞,并且在CTL的情况下包括抗原或抗原片段在MHC I类分子情况下被T细胞受体识别、通过例如凋亡或穿孔素介导的细胞裂解消除在MHC I类分子情况下呈递的细胞(即以用I类MHC呈递抗原为特征的细胞)、产生细胞因子(例如IFN- γ 和TNF- α)以及表达抗原的靶细胞的特异性细胞裂解性杀伤。

[0167] 总体上,根据本发明,对由病变细胞表达的蛋白质关于其在免疫治疗中的有用性进行评估。预测可用于免疫治疗的蛋白质可用于提供包含该蛋白质或者其一个或多个肽片段,特别是该蛋白质的一个或多个(潜在的)MHC结合肽的疫苗。

[0168] 根据本发明,术语“分布”是指定位状态。术语“确定分布或定位”特别地包括确定或预测定位状态,例如,确定或预测肽、蛋白质或核酸的亚细胞定位或丰度,例如确定或预测肽、蛋白质或核酸在体内是否位于胞质溶胶中和/或外排体内或者在胞质溶胶中和/或外排体内丰富。

[0169] 术语例如“预测”是指可能性的确定。

[0170] 根据本发明,预测由病变细胞表达的蛋白质或其片段用于免疫治疗的有用性可以包括以下一项或更多项:(i)确定该蛋白质或编码其的核酸或者该蛋白质的片段的分布或定位,例如确定该蛋白质或编码其的核酸或者该蛋白质的片段在体内是否位于胞质溶胶中和/或外排体内或者在胞质溶胶中和/或外排体内丰富;(ii)确定该蛋白质或其片段是否由抗原呈递细胞,优选专职抗原呈递细胞交叉呈递;(iii)确定针对该蛋白质或其片段的已有抗体应答;(iv)确定该蛋白质或其片段是否与F肌动蛋白结合;(v)确定该蛋白质或其片段是否与RNA结合。

[0171] 在一个实施方案中,如下确定蛋白质或编码其的核酸或者该蛋白质的片段在体内是否位于外排体内或在外排体内丰富:获得细胞外流体样品,例如通过差速离心分离外排体,例如通过凝胶电泳分离蛋白质或核酸,并例如通过质谱、ELISA、流式细胞术、抗体阵列或western印迹鉴定所述蛋白质或其片段或者例如通过微阵列、RNA测序或RT-PCR鉴定编码所述蛋白质的核酸。在另一个实施方案中,通过从数据库中提取信息来确定蛋白质或编码其的核酸或者该蛋白质的片段是否在体内位于外排体内或在外排体内丰富,所述数据库从上述这一部分中所述的实验收集数据,例如ExoCarta(Keerthikumar, S,等, J.Mol.Biol.428,688(2016))。

[0172] 在一个实施方案中,确定已有抗体应答可以使用SEREX来进行。SEREX意指通过重

组表达克隆对抗原进行血清学鉴定,并且是通过针对肿瘤来源cDNA转导的噬菌体文库的识别筛选来自患者血清的抗体来鉴定肿瘤抗原的方法。该技术使用噬菌体展示文库来表达患者的大量潜在抗原。将抗原转移到二维表面,从而允许其映射到特定的克隆。将表面与自体患者血清一起孵育。对免疫反应性克隆进行定位、培养和测序(Sahin,U,等,PNAS 92,11810 (1995))。

[0173] 本发明还可包括将蛋白质序列分解成适合MHC结合的片段,并确定所述片段与一个或多个MHC分子结合的评分。可对输出进行排序,并且输出可由肽及其预测的评分的列表组成,从而指示其结合的可能性。通常,如果根据本发明的蛋白质含有一个或多个(潜在的)MHC结合肽,则其特别地可用于免疫治疗。

[0174] 本发明的方法可以针对患者(例如癌症患者)进行,例如,对患者(例如癌症患者)的肿瘤试样进行。

[0175] 根据本发明,本文所述的蛋白质或蛋白质片段优选地包含至少一个氨基酸修饰。根据本发明确定用于免疫治疗的有用性的氨基酸修饰或根据本发明根据其预测的免疫原性进行选择 and/或排序的氨基酸修饰可以由细胞核酸的突变引起。这样的突变可通过已知的测序技术来鉴定。

[0176] 在一个实施方案中,所述突变是癌症患者的肿瘤试样中的癌症特异性体细胞突变,其可通过鉴定肿瘤试样的基因组、外显子组和/或转录物组与非肿瘤发生性试样的基因组、外显子组和/或转录物组之间的序列差异来确定。

[0177] 根据本发明,肿瘤试样指包含或怀疑包含肿瘤细胞或癌细胞的从患者获得的任何样品,例如身体样品。身体样品可以是任何组织样品,例如血液、从原发肿瘤或从肿瘤转移瘤获得的组织样品、或者包含肿瘤细胞或癌细胞的任何其他样品。优选地,身体样品是血液,并且在血液中包含的一个或多个循环肿瘤细胞(circulating tumor cell,CTC)中确定癌症特异性体细胞突变或序列差异。在另一个实施方案中,肿瘤试样涉及一个或多个分离的肿瘤细胞或癌细胞(例如循环肿瘤细胞(CTC))或者包含一个或多个分离的肿瘤细胞或癌细胞(例如循环肿瘤细胞(CTC))的样品。

[0178] 非肿瘤发生性试样指不包含或不怀疑包含肿瘤细胞或癌细胞的从患者或者优选地与该患者属于同一物种的另外个体,优选健康个体获得的任何样品,例如身体样品。身体样品可以是任何组织样品,例如血液或来自非肿瘤发生性组织的样品。

[0179] 本发明可涉及确定患者的癌症突变标志(signature)。术语“癌症突变标志”可指患者的一个或多个癌细胞中存在的所有癌症突变,或者其可指患者的一个或多个癌细胞中存在的仅部分癌症突变。因此,本发明可涉及鉴定患者的一个或多个癌细胞中存在的所有癌症特异性突变,或者其可涉及鉴定患者的一个或多个癌细胞中存在的仅部分癌症特异性突变。一般来说,本发明的方法允许鉴定大量突变,这使本发明方法中包括足够量的修饰或经修饰蛋白质。

[0180] 优选地,根据本发明鉴定的突变是非同义突变,优选肿瘤细胞或癌细胞中表达的蛋白质的非同义突变。

[0181] 在一个实施方案中,在肿瘤试样的基因组,优选整个基因组中确定癌症特异性体细胞突变或序列差异。因此,本发明可包括鉴定一个或多个癌细胞的基因组,优选整个基因组的癌症突变标志。在一个实施方案中,鉴定癌症患者的肿瘤试样中癌症特异性体细胞

突变的步骤包括鉴定全基因组癌症突变谱。

[0182] 在一个实施方案中,在肿瘤试样的外显子组,优选整个外显子组中确定癌症特异性体细胞突变或序列差异。因此,本发明可包括鉴定一个或更多个癌细胞的外显子组,优选整个外显子组的癌症突变标志。在一个实施方案中,鉴定癌症患者的肿瘤试样中癌症特异性体细胞突变的步骤包括鉴定全外显子组癌症突变谱。

[0183] 在一个实施方案中,在肿瘤试样的转录物组,优选整个转录物组中确定癌症特异性体细胞突变或序列差异。因此,本发明可包括鉴定一个或更多个癌细胞的转录物组,优选整个转录物组的癌症突变标志。在一个实施方案中,鉴定癌症患者的肿瘤试样中癌症特异性体细胞突变的步骤包括鉴定全转录物组癌症突变谱。

[0184] 在一个实施方案中,鉴定癌症特异性体细胞突变或鉴定序列差异的步骤包括对一个或更多个、优选2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20个或甚至更多个癌细胞进行单细胞测序。因此,本发明可包括鉴定所述一个或更多个癌细胞的癌症突变标志。在一个实施方案中,所述癌细胞是循环肿瘤细胞。例如循环肿瘤细胞的癌细胞可在单细胞测序之前分离。

[0185] 在一个实施方案中,鉴定癌症特异性体细胞突变或鉴定序列差异的步骤涉及使用下一代测序(next generation sequencing,NGS)。

[0186] 在一个实施方案中,鉴定癌症特异性体细胞突变或鉴定序列差异的步骤包括对肿瘤试样的基因组DNA和/或RNA进行测序。

[0187] 为了揭示癌症特异性体细胞突变或序列差异,优选地将由肿瘤试样获得的序列信息与参照(例如由测序正常非癌细胞(例如种系细胞)的核酸(例如DNA或RNA)获得的序列信息)进行比较,所述正常非癌细胞可从患者或不同个体获得。在一个实施方案中,正常的基因组种系DNA从外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell,PBMC)获得。

[0188] 术语“基因组”指生物体或细胞的染色体中遗传信息的总量。

[0189] 术语“外显子组”指生物体的基因组中由外显子形成的部分,其是所表达基因的编码部分。外显子组提供用于合成蛋白质及其他功能性基因产物的遗传蓝图。其是基因组中功能最相关的部分,因此,其最有可能促成生物体的表型。人基因组的外显子组估计占总基因组的1.5%(Ng,PC等,PLoS Gen.,4(8):1-15,2008)。

[0190] 术语“转录物组”指一个细胞或细胞群中产生的所有RNA分子,包括mRNA、rRNA、tRNA以及其他非编码RNA的集合。在本发明的上下文中,转录物组意指给定个体的一个细胞、细胞群(优选癌细胞群)或所有细胞在给定时间点产生的所有RNA分子的集合。

[0191] “核酸”根据本发明优选地是脱氧核糖核酸(DNA)或核糖核酸(RNA)、更优选RNA、最优选体外转录的RNA(*in vitro* transcribed RNA,IVT RNA)或合成的RNA。核酸根据本发明包括基因组DNA、cDNA、mRNA、重组产生的分子和化学合成的分子。根据本发明,核酸可以作为单链或双链且线性或共价环状闭合的分子存在。根据本发明,核酸可以被分离。根据本发明,术语“分离的核酸”意指核酸(i)在体外扩增,例如通过聚合酶链式反应(PCR)体外扩增;(ii)通过克隆重组产生;(iii)是纯化的,例如通过切割并通过凝胶电泳分离而纯化的;或(iv)是合成的,例如通过化学合成而合成的。核酸可用于引入细胞中,即转染细胞,特别是以RNA的形式,其可通过体外转录由DNA模板制备。此外,可在应用之前通过稳定化序列、加帽和聚腺苷酸化对RNA进行修饰。

[0192] 术语“遗传物质”指分离的核酸(DNA或RNA)、双螺旋的部分、染色体的部分、或者生物体或细胞的整个基因组,特别是其外显子组或转录物组。

[0193] 术语“突变”指与参照相比的核酸序列的变化或差异(核苷酸替换、添加或缺失)。除生殖细胞(精子和卵子)之外,身体的任何细胞都可能发生“体细胞突变”,因此不会传递给儿童。这些改变可(但不总是)引起癌症或其他疾病。优选地,突变是非同义突变。术语“非同义突变”指导致翻译产物中氨基酸改变(例如氨基酸替换)的突变,优选核苷酸替换。

[0194] 根据本发明,术语“突变”包括点突变、Indel、融合、染色体碎裂(chromothripsis)和RNA编辑。

[0195] 根据本发明,术语“Indel”描述一种特殊的突变种类,其定义为导致共定位的插入和缺失以及核苷酸净增加或损失的突变。在基因组的编码区中,除非indel的长度为3的倍数,否则其产生移码突变。Indel可与点突变形成对比,其中Indel从序列中插入和缺失核苷酸,点突变是取代一个核苷酸的替换形式。

[0196] 融合可产生由两个先前分离的基因形成的杂合基因。其可由于易位、中间缺失或染色体倒位而发生。通常,融合基因是癌基因。致癌性融合基因可导致具有新功能或不同于两个融合配偶体功能的基因产物。或者,原癌基因与强启动子融合,并且由此致癌功能被设定为通过由上游融合配偶体的强启动子引起的上调而起作用。致癌性融合转录物还可通过反式剪接或通读事件产生。

[0197] 根据本发明,术语“染色体碎裂”指通过单个灾难性事件(devastating event)基因组的特定区域被破碎并随后拼接在一起的遗传现象。

[0198] 根据本发明,术语“RNA编辑”指其中通过碱基组成的化学改变来改变RNA分子中的信息内容的分子过程。RNA编辑包括核苷修饰,例如胞苷(C)到尿苷(U)和腺苷(A)到肌苷(I)的脱氨基,以及非模板的核苷酸添加和插入。mRNA中的RNA编辑有效地改变所编码蛋白质的氨基酸序列,以使得其与由基因组DNA序列预测的不同。

[0199] 术语“癌症突变标志”指与非癌性参照细胞相比时存在于癌细胞中的突变组。

[0200] 根据本发明,“参照”可用于关联和比较来自肿瘤试样的结果。通常来说,“参照”可基于从患者或者一个或更多个不同个体,优选健康个体,特别是同一物种的个体获得的一个或更多个正常试样,特别是未受癌症疾病影响的试样来获得。“参照”可凭经验通过测试足够大量的正常试样来确定。

[0201] 根据本发明可使用任何合适的测序方法来确定突变,优选下一代测序(NGS)技术。第三代测序方法在未来可能替代NGS技术以加速方法的测序步骤。为了说明目的,术语“下一代测序”或“NGS”在本发明的上下文中意指全部的新高通量测序技术,其与称为Sanger化学的“常规”测序方法形成对比,通过将整个基因组断裂成小碎片来沿着整个基因组平行地随机阅读核酸模板。这样的NGS技术(也称为大规模平行测序技术)能够在非常短的时间段内,例如在1至2周内,优选地在1至7天内或者最优选地在不到24小时内递送整个基因组、外显子组、转录物组(基因组的所有转录序列)或甲基化组(基因组的所有甲基化序列)的核酸序列信息并且在原理上实现单细胞测序方法。在本发明的上下文中可使用可商购获得或文献中提及的多种NGS平台,例如Zhang等2011:The impact of next-generation sequencing on genomics.J.Genet Genomics 38(3),95-109中;或者Voelkerding等2009:Next generation sequencing:From basic research to diagnostics.Clinical

chemistry 55,641-658中详细描述的那些。这样的NGS技术/平台的非限制性实例为：

[0202] 1) 在例如Roche联合公司454Life Sciences (Branford,Connecticut) 的GS-FLX 454Genome Sequencer™中实施的称为焦磷酸测序的边合成边测序技术,其首先在Ronaghi等1998:A sequencing method based on real-time pyrophosphate".Science 281 (5375,) ,363-365中进行了描述。这项技术使用乳剂PCR,其中通过剧烈涡旋将单链DNA结合珠包封在由油包围的包含PCR反应物的水性胶束中,以用于进行乳剂PCR扩增。在焦磷酸测序过程期间,随着聚合酶合成DNA链,记录在核苷酸并入期间从磷酸分子发射的光;

[0203] 2) 由Solexa(现在为Illumina Inc.,San Diego,California的一部分)开发的边合成边测序方法,其基于可逆染料-终止剂并且例如在Illumina/Solexa Genome Analyzer™中和在Illumina HiSeq 2000Genome Analyzer™中实施。在这项技术中,将全部四种核苷酸与DNA聚合酶一起同时添加到流式细胞通道中的寡聚物引发的簇片段中。桥接扩增用所有四种荧光标记的核苷酸延伸簇链用于测序;

[0204] 3) 在例如Applied Biosystems(现在为Life Technologies Corporation, Carlsbad,California)的SOLid™平台中实施的边连接边测序方法。在这项技术中,根据测序位置标记固定长度的所有可能寡核苷酸的库。使寡核苷酸退火并连接;DNA连接酶对匹配序列的优先连接产生提供在该位置处核苷酸的信息的信号。在测序之前,通过乳剂PCR扩增DNA。将各自均仅包含相同DNA分子的拷贝的所得珠沉积在载玻片上。作为第二个实例,Dover Systems (Salem,New Hampshire)的Polonator™G.007平台还采用通过使用随机排列的基于珠的乳剂PCR来扩增DNA片段用于平行测序的边连接边测序方法;

[0205] 4) 例如如在Pacific Biosciences (Menlo Park,California)的PacBio RS系统或在Helicos Biosciences (Cambridge,Massachusetts)的HeliScope™平台中实施的单分子测序技术。这项技术的独特特征是其不经扩增对单DNA或RNA分子进行测序的能力,限定为单分子实时(Single-Molecule Real Time,SMRT)DNA测序。例如,HeliScope使用高灵敏荧光检测系统来直接随着每个核苷酸合成对其进行检测。Visigen Biotechnology (Houston, Texas)已经开发了基于荧光共振能量转移(fluorescence resonance energy transfer, FRET)的类似方法。其他基于荧光的单分子技术来自U.S.Genomics (GeneEngine™) 和 Genovoxx (AnyGene™);

[0206] 5) 用于单分子测序的纳米技术,其中使用例如布置在芯片上以监测在复制期间聚合酶分子在单链上的移动的多种纳米结构。基于纳米技术的方法的非限制性实例是Oxford Nanopore Technologies (Oxford,UK)的GridION™平台、由Nabsys (Providence,Rhode Island)开发的杂交辅助纳米孔测序(HANS™)平台、以及称为组合探针-锚连接(cPAL™)的具有DNA纳米球(DNA nanoball,DNB)技术的基于专有连接酶的DNA测序平台;

[0207] 6) 用于单分子测序的基于电子显微术的技术,例如由LightSpeed Genomics (Sunnyvale,California)和Halcyon Molecular (Redwood City,California)开发的那些;

[0208] 7) 基于检测在DNA聚合期间释放的氢离子的离子半导体测序。例如,离子激流系统(Ion Torrent System) (San Francisco,California)使用微加工孔的高密度阵列以大规模并行方式进行这一生物化学过程。每个孔容纳不同的DNA模板。在孔之下是离子灵敏层并且在其之下是专有离子传感器。

[0209] 优选地,DNA和RNA制备物充当NGS的起始物质。这样的核酸可容易地从例如生物材

料的样品,例如从新鲜的、迅速冷冻的或福尔马林固定的石蜡包埋肿瘤组织 (FFPE) 或者从新鲜分离的细胞或者从患者外周血中存在的CTC获得。可从正常的体细胞组织提取正常的未突变基因组DNA或RNA,然而在本发明的上下文中,种系细胞是优选的。种系DNA或RNA可从患有非血液学恶性肿瘤的患者中的外周血单个核细胞 (PBMC) 提取。虽然从FFPE组织或新鲜分离的单细胞提取的核酸是高度片段化的,但是其适合NGS应用。

[0210] 用于外显子组测序的数种靶向NGS方法在文献中进行了描述(有关综述,参见例如Teer和Mullikin 2010:Human Mol Genet 19(2),R145-51),其所有均可与本发明联合使用。这些方法(描述为例如基因组捕获、基因组分隔、基因组富集等)中有很多使用杂交技术并且包括基于阵列(例如,Hodges等2007:Nat.Genet. 39,1522-1527)和基于液体(例如,Choi等2009:Proc.Natl.Acad.Sci USA 106,19096-19101)的杂交方法。用于DNA样品制备和后续外显子组捕获的市售试剂盒也是可以获得的:例如,Illumina Inc.(San Diego, California)提供TruSeq™ DNA样品制备试剂盒和外显子组富集试剂盒TruSeq™外显子组富集试剂盒。

[0211] 为了在将例如肿瘤样品的序列与参照样品的序列(例如种系样品的序列)进行比较时降低检测癌症特异性体细胞突变或序列差异中假阳性发现的数量,优选地重复测定这些样品类型中一种或两种的序列。因此,优选地将参照样品的序列(例如种系样品的序列)确定两次、三次或更多次。作为替代或补充,将肿瘤样品的序列确定两次、三次或更多次。还可如下多于一次地确定参照样品的序列(例如,种系样品的序列)和/或肿瘤样品的序列:将基因组DNA中的序列确定至少一次,并且将所述参照样品和/或所述肿瘤样品的RNA中的序列确定至少一次。例如,通过确定参照样品(例如种系样品)在重复之间的变化,可估计假阳性体细胞突变的预期比率(FDR)作为统计量。样品的技术重复应产生相同的结果,并且在该“相同间比较(same vs.same comparison)”中的任何检测到的突变均为假阳性。特别地,为了确定肿瘤样品相对于参照样品中体细胞突变检测的假发现率,可使用参照样品的技术重复作为参考来估计假阳性的数量。此外,可使用机器学习方法来将多个质量相关计量(例如,覆盖率或SNP质量)组合成单质量评分。对于给定的体细胞变异,可计数具有超标质量评分的所有其他变异,这使得能够对数据集中的所有变异进行排序。

[0212] 在本发明的上下文中,术语“RNA”涉及包含至少一个核糖核苷酸残基并且优选地完全或基本上由核糖核苷酸残基构成的分子。“核糖核苷酸”是指在 β -D-呋喃核糖基的2'-位具有羟基的核苷酸。术语“RNA”包括双链RNA、单链RNA、分离的RNA例如部分或完全纯化的RNA、基本上纯的RNA、合成的RNA和重组产生的RNA例如通过一个或多个核苷酸的添加、缺失、替换和/或改变而不同于天然存在的RNA的经修饰的RNA。这样的改变可包括非核苷酸物质的添加,例如添加到RNA的末端或内部添加,例如添加在RNA的一个或多个核苷酸处。RNA分子中的核苷酸还可包含非标准核苷酸,例如非天然存在的核苷酸或化学合成的核苷酸或脱氧核苷酸。这些改变的RNA可以称为类似物或天然存在RNA的类似物。

[0213] 根据本发明,术语“RNA”包括并且优选地涉及“mRNA”。术语“mRNA”意指“信使RNA”,并且涉及通过使用DNA模板产生且编码肽或多肽的“转录物”。通常来说,mRNA包含5' -UTR、蛋白质编码区、3' -UTR和任选地poly(A)尾。mRNA在细胞中和在体外仅具有有限的半衰期。在本发明的上下文中,mRNA可由DNA模板通过体外转录产生。体外转录方法是技术人员已知的。例如,多种体外转录试剂盒可商购获得。

[0214] 根据本发明,可根据需要改变RNA的稳定性和翻译效率。例如,可通过具有稳定化效果和/或提高RNA翻译效率的一种或更多种修饰来稳定化RNA和提高其翻译。这样的修饰例如在PCT/EP2006/009448中进行了描述,其通过引用并入本文。为了提高根据本发明使用的RNA的表达,可在编码区(即编码所表达肽或蛋白质的序列)内,优选地在不改变所表达肽或蛋白质的序列的情况下对其进行修饰以提高GC含量从而提高mRNA稳定性和进行密码子优化,并且由此增强在细胞中的翻译。

[0215] 在本发明中使用的RNA的上下文中,术语“修饰”包括对RNA的非天然存在于所述RNA中的任何修饰。

[0216] 在本发明的一个实施方案中,根据本发明使用的RNA不具有未加帽的5'-三磷酸。去除这种未加帽的5'-三磷酸可以通过用磷酸酶处理RNA来实现。

[0217] 根据本发明的RNA可以具有经修饰的核糖核苷酸,以提高其稳定性和/或降低细胞毒性。例如,在一个实施方案中,在根据本发明使用的RNA中,5-甲基胞苷被部分或完全,优选完全替换为胞苷。作为替代或补充,在一个实施方案中,在根据本发明使用的RNA中,假尿苷被部分或完全,优选完全替换为尿苷。

[0218] 在一个实施方案中,术语“修饰”涉及向RNA提供5'-帽或5'-帽类似物。术语“5'-帽”是指见于mRNA分子的5'-端上的帽结构,并且通常由通过不寻常的5'至5'三磷酸酯键连接至mRNA的鸟苷核苷酸组成。在一个实施方案中,该鸟苷在7-位甲基化。术语“常规5'-帽”是指天然存在的RNA 5'-帽,优选7-甲基鸟苷帽(m7G)。在本发明的上下文中,术语“5'-帽”包括类似于RNA帽结构并且被修饰以具有稳定化RNA和/或增强RNA翻译(如果连接于RNA的话,优选在体内和/或在细胞中)的能力的5'-帽类似物。

[0219] 向RNA提供5'-帽或5'-帽类似物可以通过在所述5'-帽或5'-帽类似物存在下体外转录DNA模板来实现,其中所述5'-帽共转录并入产生的RNA链中,或者可以例如通过体外转录产生RNA并且可以在转录后使用加帽酶(例如痘苗病毒的加帽酶)使5'-帽与RNA连接。

[0220] RNA可包含另外的修饰。例如,本发明中使用的RNA的另外修饰可为延伸或截短天然存在的poly(A)尾或者改变5'-或3'-非翻译区(UTR),例如引入与所述RNA的编码区不相关的UTR,例如用来源于珠蛋白基因的3'-UTR交换已有的3'-UTR或者插入来源于球蛋白基因的3'-UTR的一个或更多个,优选两个拷贝,所述球蛋白基因例如 $\alpha 2$ -球蛋白、 $\alpha 1$ -球蛋白、 β -球蛋白,优选 β -球蛋白,更优选人 β -球蛋白。

[0221] 与具有经掩盖poly-A序列的RNA相比,具有未掩盖poly-A序列的RNA更有效地翻译。术语“poly(A)尾”或“poly-A序列”指通常位于RNA分子的3'端的腺嘌呤基(A)残基的序列,并且“未掩盖poly-A序列”意指在RNA分子3'端的poly-A序列以poly-A序列的A结束,并且除位于poly-A序列3'端(即下游)的A之外,在此之后没有核苷酸。此外,约120个碱基对的长poly-A序列产生最佳的转录物稳定性和RNA翻译效率。

[0222] 因此,为了提高根据本发明使用的RNA的稳定性和/或表达,可对其进行修饰以使其与poly-A序列联合存在,所述poly-A序列的长度优选为10至500,更优选30至300,甚至更优选65至200,尤其是100至150个腺苷残基。在一个尤其优选的实施方案中,poly-A序列的长度为约120个腺苷残基。为了进一步提高根据本发明使用的RNA的稳定性和/或表达,poly-A序列可以是未掩盖的。

[0223] 此外,向RNA分子的3'-非翻译区中并入3'-非翻译区(UTR)可使得增强翻译效率。

通过并入两个或更多个这样的3'-非翻译区可以实现协同效果。3'-非翻译区相对于并入其的RNA可以是自体或异源的。在一个具体实施方案中,3'-非翻译区来源于人-β球蛋白基因。

[0224] 上述修饰的组合对RNA稳定性和翻译效率提高具有协同影响,所述修饰即并入poly-A序列、未掩盖poly-A序列以及并入一个或更多个3'-非翻译区。

[0225] 术语RNA的“稳定性”涉及RNA的“半衰期”。“半衰期”涉及消除分子的一半活性、量或数目所需的时间段。在本发明的上下文中,RNA的半衰期指示所述RNA的稳定性。RNA的半衰期可能影响RNA的“表达持续时间”。可以预期具有长半衰期的RNA将在延长的时间段内表达。

[0226] 当然,如果根据本发明期望降低RNA的稳定性和/或翻译效率,则可以对RNA进行修饰以干扰如上所述提高RNA的稳定性和/或翻译效率的元件的功能。

[0227] 根据本发明,术语“表达”以其最一般含义使用并且包括产生RNA和/或肽、多肽或蛋白质,例如,通过转录和/或翻译。关于RNA,术语“表达”或“翻译”特别地涉及产生肽、多肽或蛋白质。其还包括核酸的部分表达。此外,表达可以是瞬时的或稳定的。

[0228] 根据本发明,术语表达还包括“异常表达”或“不正常表达”。根据本发明,“异常表达”或“不正常表达”意指与参照,例如未患有与某一蛋白质如肿瘤抗原的异常或不正常表达相关的疾病的对象的状态相比,表达改变,优选提高。表达提高是指提高至少10%,特别是至少20%、至少50%或至少100%或更多。在一个实施方案中,只在病变组织中发现表达,而在健康组织中的表达被抑制。

[0229] 术语“特异性表达”意指蛋白质基本上仅在特定组织或器官中表达。例如,在胃黏膜中特异性表达的肿瘤抗原意指所述蛋白质主要在胃黏膜中表达,而在其他组织中表达或者在其他组织或器官类型中不在显著程度上表达。因此,仅在胃黏膜细胞中表达和在任何其他组织如睾丸中在显著较小的程度上表达的蛋白质在胃黏膜细胞中特异性表达。在一些实施方案中,肿瘤抗原也可在正常条件下在多于一种组织类型或器官,例如2或3种组织类型或器官,但优选不超过3种不同的组织或器官类型中特异性表达。在这种情况下,肿瘤抗原然后在这些器官中特异性表达。例如,如果肿瘤抗原在正常条件下,优选在肺和胃中在大致相等的程度上表达,则所述肿瘤抗原在肺和胃中特异性表达。

[0230] 在本发明的上下文中,术语“转录”涉及其中将DNA序列中的遗传密码转录成RNA的过程。随后,可将RNA翻译成蛋白质。根据本发明,术语“转录”包括“体外转录”,其中术语“体外转录”涉及其中优选使用合适的细胞提取物在无细胞系统中体外合成RNA,特别是mRNA的过程。优选地,克隆载体被应用于产生转录物。这些克隆载体通常被指定为转录载体并且根据本发明被术语“载体”所涵盖。根据本发明,本发明中使用的RNA优选为体外转录的RNA (IVT-RNA) 并且可通过合适DNA模板的体外转录获得。用于控制转录的启动子可以是任何RNA聚合酶的任何启动子。RNA聚合酶的具体实例是T7、T3和SP6RNA聚合酶。优选地,根据本发明的体外转录由T7或SP6启动子控制。用于体外转录的DNA模板可通过克隆核酸,特别是cDNA,并将其引入用于体外转录的合适载体中而获得。cDNA可通过RNA的逆转录获得。

[0231] 根据本发明的术语“翻译”涉及细胞核糖体中的过程,通过该过程,信使RNA的链指导氨基酸序列组装以产生肽、多肽或蛋白质。

[0232] 根据本发明可与核酸功能性地连接的表达控制序列或调节序列相对于核酸可以是同源的或异源的。如果编码序列和调节序列共价结合在一起,使得编码序列的转录或翻

译受到调节序列的控制或影响,则它们“功能性地”连接在一起。如果编码序列待被翻译成功能性蛋白质,则在调节序列与编码序列的功能性连接下,调节序列的诱导导致编码序列的转录,而不引起编码序列中的阅读框移位或编码序列不能翻译成期望的蛋白质或肽。

[0233] 根据本发明,术语“表达控制序列”或“调节序列”包含控制核酸转录或所得RNA翻译的启动子、核糖体结合序列和其他控制元件。在本发明的某些实施方案中,可以控制调节序列。调节序列的精确结构可以根据物种或根据细胞类型而变化,但通常包括参与启动转录或翻译的5'-未转录序列以及5'和3'非翻译序列,例如TATA框、加帽序列、CAAT序列等。特别地,5'-未转录的调节序列包含启动子区,所述启动子区包含用于功能性结合基因的转录控制的启动子序列。调节序列还可以包含增强子序列或上游活化子序列。

[0234] 优选地,根据本发明,将待在细胞中表达的RNA引入到所述细胞中。在根据本发明方法的一个实施方案中,通过合适的DNA模板的体外转录获得待被引入到细胞中的RNA。

[0235] 根据本发明,例如“能够表达...的RNA”和“编码...的RNA”的术语在本文中可互换使用,并且对于特定的肽或多肽意味着所述RNA如果存在于合适的环境中,优选在细胞中可以被表达以产生所述肽或多肽。优选地,根据本发明的RNA能够与细胞翻译机器相互作用以提供其能够表达的肽或多肽。

[0236] 例如“转移”、“引入”或“转染”的术语在本文中可互换使用,并且涉及将核酸、特别是外源或异源核酸、特别是RNA引入到细胞中。根据本发明,细胞可以形成器官、组织和/或生物体的一部分。根据本发明,核酸的施用以裸核酸实现或与施用试剂组合来实现。优选地,核酸的施用以裸核酸的形式进行。优选地,RNA与稳定化物质如RNA酶抑制剂组合施用。本发明还设想将核酸重复引入到细胞中以允许持续表达的时间段延长。

[0237] 可以用可与RNA缔合的任何载体来转染细胞,例如,通过与RNA形成复合物或形成其中封装或包封RNA的囊泡,从而导致与裸RNA相比RNA的稳定性提高。根据本发明有用的载体包括例如含脂质载体如阳离子脂质、脂质体,特别是阳离子脂质体,以及胶束和纳米颗粒。阳离子脂质可与带负电荷的核酸形成复合物。根据本发明可使用任何阳离子脂质。

[0238] 优选地,将编码肽或多肽的RNA引入细胞,特别是在体内存在的细胞中,导致所述肽或多肽在细胞中表达。在一些具体实施方案中,优选将核酸靶向特定细胞。在这样的实施方案中,适用于将核酸施用于细胞的载体(例如,逆转录病毒或脂质体)展示靶向分子。例如,可以将分子例如对靶细胞上表面膜蛋白具有特异性的抗体或靶细胞上受体的配体并入到核酸载体中或可使其与核酸载体结合。在通过脂质体施用核酸的情况下,可将与和胞吞相关的表面膜蛋白结合的蛋白质并入到脂质体制剂中,以能够靶向和/或摄取。这样的蛋白质包括对特定细胞类型具有特异性的衣壳蛋白或其片段、针对内在化蛋白质的抗体、靶向细胞内位置的蛋白质等。

[0239] 术语“细胞”或“宿主细胞”优选是完整细胞,即未释放其正常细胞内组分如酶、细胞器或遗传物质的具有完整膜的细胞。完整细胞优选地是有生存力的细胞,即能够执行其正常代谢功能的活细胞。优选地,根据本发明,所述术语涉及可以用外源核酸转化或转染的任何细胞。根据本发明,术语“细胞”包括原核细胞(例如,大肠杆菌(*E. coli*))或真核细胞(例如,树突细胞、B细胞、CHO细胞、COS细胞、K562细胞、HEK293细胞、HELA细胞、酵母细胞和昆虫细胞)。外源核酸在细胞内可以如下存在:(i)本身自由分散、(ii)并入重组载体中或(iii)整合到宿主细胞基因组或线粒体DNA中。特别优选哺乳动物细胞,例如来自人、小鼠、

仓鼠、猪、山羊和灵长类动物的细胞。细胞可来源于大量组织类型并且包括原代细胞和细胞系。具体实例包括角质形成细胞、外周血白细胞、骨髓干细胞和胚胎干细胞。在另一些实施方案中,细胞是抗原呈递细胞,特别是树突细胞、单核细胞或巨噬细胞。

[0240] 包含核酸分子的细胞优选表达由所述核酸编码的肽或多肽。

[0241] 术语“克隆扩增”是指其中使特定实体倍增的过程。在本发明的上下文中,该术语优选在免疫应答的情况下使用,在所述免疫应答中淋巴细胞被抗原刺激,增殖,并且识别所述抗原的特异性淋巴细胞扩增。优选地,克隆扩增导致淋巴细胞分化。

[0242] 例如“降低”或“抑制”的术语涉及引起在水平上优选5%或更大、10%或更大、20%或更大,更优选50%或更大,并且最优选75%或更大的总体降低的能力。术语“抑制”或类似短语包括完全或基本上完全的抑制,即降低到零或基本上降低到零。

[0243] 例如“提高”、“增强”、“促进”或“延长”的术语优选地涉及提高、增强、促进或延长约至少10%,优选至少20%、优选至少30%、优选至少40%、优选至少50%、优选至少80%、优选至少100%、优选至少200%,并且特别是至少300%。这些术语还可涉及从零或者不可测量或不可检测的水平提高、增强、促进或延长至超过零的水平或者可测量或可检测的水平。

[0244] 本发明提供了基于通过本发明方法预测为可用于免疫治疗的优选经修饰蛋白质或蛋白质片段或氨基酸修饰而设计的疫苗,例如癌症疫苗。

[0245] 根据本发明,术语“疫苗”涉及在施用后诱导免疫应答,特别是细胞免疫应答的药物制剂(药物组合物)或产品,所述免疫应答识别和攻击病原体或病变细胞如癌细胞。疫苗可用于预防或治疗疾病。术语“个性化癌症疫苗”或“个体化癌症疫苗”涉及特定癌症患者并且意味着癌症疫苗适应于个体癌症患者的需要或特殊情况。

[0246] 在一个实施方案中,根据本发明提供的疫苗可包含肽或多肽或者编码所述肽或多肽的核酸,优选RNA,所述肽或多肽包含通过本发明方法预测为可用于免疫治疗的一个或更多个氨基酸修饰或者一种或更多种经修饰肽。

[0247] 根据本发明提供的癌症疫苗在施用于患者时优选提供适用于刺激、致敏和/或扩增对所述患者的病变细胞(例如患者的肿瘤)具有特异性的T细胞的一个或更多个T细胞表位。T细胞优选地针对表达T细胞表位所源自的抗原的细胞。本文中描述的疫苗优选能够诱导或促进针对以用I类MHC呈递一种或更多种肿瘤相关新抗原为特征的癌症疾病的细胞应答,优选细胞毒性T细胞活性。靶向癌症特异性突变的疫苗将对患者的肿瘤具有特异性。

[0248] 根据本发明提供的疫苗涉及以下疫苗,其在施用于患者时优选地提供一个或更多个T细胞表位,例如2个或更多个、5个或更多个、10个或更多个、15个或更多个、20个或更多个、25个或更多个、30个或更多个且优选多至60个、多至55个、多至50个、多至45个、多至40个、多至35个或多至30个T细胞表位,所述T细胞表位并入通过本发明方法预测为具有免疫原性的氨基酸修饰或经修饰肽。这样的T细胞表位在本文中也被称为“新表位”。通过患者的细胞,特别是抗原呈递细胞呈递这些表位优选地导致T细胞在与MHC结合时靶向所述表位并且因此靶向表达所述T细胞表位所源自的抗原和在肿瘤细胞表面上呈递相同表位的患者肿瘤,优选原发性肿瘤以及肿瘤转移瘤。

[0249] 本发明的方法可包括确定所鉴定的氨基酸修饰或经修饰肽用于癌症疫苗接种的可用性的进一步步骤。因此,进一步的步骤可以包括以下中的一个或更多个:(i) 评估修饰

是否位于已知或预测的MHC呈递表位中；(ii) 在体外和/或通过计算机(in silico) 测试修饰是否位于MHC呈递表位中，例如，测试修饰是否是被加工成MHC呈递表位和/或呈现为MHC呈递表位的肽序列的一部分；以及(iii) 在体外测试所设想的经修饰表位是否能够刺激具有期望特异性的T细胞，例如患者的T细胞，特别是当存在于其天然序列环境中时，例如当侧翼为在天然存在蛋白质中也侧接所述表位的氨基酸序列时，并且当在抗原呈递细胞中表达时。这样的侧翼序列各自可包含3个或更多个、5个或更多个、10个或更多个、15个或更多个、20个或更多个且优选多至50个、多至45个、多至40个、多至35个或多至30个氨基酸，并且可在N端和/或C端侧接表位序列。

[0250] 根据本发明确定的经修饰肽可以按其作为用于癌症疫苗接种的表位的可用性来排序。因此，在一个方面，本发明包括人工或基于计算机的分析方法，在所述分析方法中所鉴定的经修饰肽进行分析并针对其在待提供的各种疫苗中的可用性进行选择。在一个优选的实施方案中，所述分析方法是基于计算算法的方法。优选地，所述分析方法包括确定表位和/或根据其具有免疫原性的能力的预测来对其进行排序。

[0251] 根据本发明鉴定并由本发明的疫苗提供的新表位优选以包含所述新表位的多肽(例如多表位多肽)或编码所述多肽的核酸(特别是RNA)的形式存在。此外，新表位可以以疫苗序列的形式存在于多肽中，即存在于其天然序列环境中，例如侧翼为在天然存在的蛋白质中也侧接所述表位的氨基酸序列。这样的侧翼序列各自可包含5个或更多个、10个或更多个、15个或更多个、20个或更多个且优选多至50个、多至45个、多至40个、多至35个或多至30个氨基酸，并且可在N端和/或C端侧接表位序列。因此，疫苗序列可包含20个或更多个、25个或更多个、30个或更多个、35个或更多个、40个或更多个且优选多至50个、多至45个、多至40个、多至35个或多至30个氨基酸。在一个实施方案中，新表位和/或疫苗序列在多肽中头对尾排列。

[0252] 在一个实施方案中，新表位和/或疫苗序列通过接头，特别是中性接头隔开。根据本发明的术语“接头”涉及在两个肽结构域(例如表位或疫苗序列)之间添加的肽以连接所述肽结构域。关于接头序列没有特别限制。然而，优选地，接头序列减小了两个肽结构域之间的空间位阻，被很好地翻译并且支持或允许表位加工。此外，接头应当不具有或仅具有很少的免疫原性序列元件。接头优选地不应当产生非内源性新表位，如由相邻新表位之间的接合缝(junction suture)产生的那些，这可能产生不想要的免疫反应。因此，多表位疫苗应优选地包含能够降低不想要的MHC结合接合表位数目的接头序列。Hoyt等(EMBO J. 25(8), 1720-9, 2006)和Zhang等(J. Biol. Chem., 279(10), 8635-41, 2004)已经表明，富含甘氨酸的序列会损害蛋白酶体加工，并且因此使用富含甘氨酸的接头序列可以最大限度地减少可由蛋白酶体加工的包含接头的肽的数量。此外，观察到甘氨酸抑制MHC结合沟位置中的强结合(Abastado等, J. Immunol. 151(7), 3569-75, 1993)。Schlessinger等(Proteins, 61(1), 115-26, 2005)已发现氨基酸序列中包含的氨基酸甘氨酸和丝氨酸导致更有效地翻译和被蛋白酶体加工的更具柔性的蛋白质，从而使得能够更好地接近编码的新表位。接头各自可包含3个或更多个、6个或更多个、9个或更多个、10个或更多个、15个或更多个、20个或更多个且优选多至50个、多至45个、多至40个、多至35个或多至30个氨基酸。优选地，接头富含甘氨酸和/或丝氨酸氨基酸。优选地，接头的至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、或至少95%的氨基酸是甘氨酸和/或丝氨酸。在一个优选的实施方案中，接头基本上

由氨基酸甘氨酸和丝氨酸构成。在一个实施方案中,接头包含氨基酸序列(GGS)_a(GSS)_b(GGG)_c(SSG)_d(GSG)_e,其中a、b、c、d和e独立地为选自0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20的数,并且其中a+b+c+d+e与0不同且优选为2或更大、3或更大、4或更大或者5或更大。在一个实施方案中,接头包含如本文中描述的序列,包括实例中描述的接头序列,例如序列GGSGGGSG。

[0253] 在一个特别优选的实施方案中,将根据本发明的并入一个或多个新表位的多肽(例如多表位多肽)以核酸,优选RNA如体外转录或合成RNA的形式施用于患者,其可在患者的细胞如抗原呈递细胞中表达以产生多肽。本发明还设想施用一种或更多种多表位多肽,其出于本发明的目的被术语“多表位多肽”所包括,其优选以核酸,优选RNA如体外转录或合成RNA的形式,其可在患者的细胞如抗原呈递细胞中表达以产生一种或更多种多肽。在施用多于一种多表位多肽的情况下,由不同多表位多肽提供的新表位可不同或部分重叠。一旦存在于患者的细胞如抗原呈递细胞中,根据本发明的多肽被加工以产生根据本发明鉴定的新表位。施用根据本发明提供的疫苗优选提供MHC I类呈递表位,所述表位能够引起针对表达MHC呈递表位所源自的抗原之细胞的CD8+辅助T细胞应答。施用根据本发明提供的疫苗还可提供MHC II类呈递表位,所述表位能够引发针对表达MHC呈递表位所源自的抗原之细胞的CD4+T细胞应答。此外,施用根据本发明提供的疫苗可提供一个或多个新表位(包括已知的新表位和根据本发明鉴定的新表位)以及一个或多个不包含癌症特异性体细胞突变但是由癌细胞表达并且优选诱导针对癌细胞的免疫应答,优选癌症特异性免疫应答的表位。

[0254] 根据本发明提供的疫苗可以是重组疫苗。

[0255] 本发明上下文中的术语“重组的”意指“通过遗传工程制备的”。优选地,在本发明的上下文中的“重组实体”(例如重组多肽)不是天然存在的,并且优选是不天然组合的实体(例如氨基酸或核酸序列)组合的结果。例如,在本发明的上下文中的重组多肽可包含来源于不同蛋白质或者同一蛋白质的不同部分的数个氨基酸序列如新表位或疫苗序列,其例如通过肽键或合适接头融合在一起。

[0256] 本文使用的术语“天然存在的”是指物体可以在自然界中发现的事实。例如,存在于生物体(包括病毒)中并且可以从天然来源中分离且没有在实验室中被人故意修饰的肽或核酸是天然存在的。

[0257] 本文中描述的药剂和组合物可以被用于治疗患有疾病,例如特征在于存在表达抗原并呈递其片段的病变细胞的疾病的对象。一些特别优选的疾病是癌症疾病。本文中描述的药剂和组合物也可用于免疫接种或疫苗接种以预防本文中描述的疾病。

[0258] 术语“疾病”是指影响个体身体的异常状况。疾病通常被解释为与特定症状和体征相关的医学病症。疾病可由起初来自于外部来源的因素引起,例如感染性疾病,或者其可由内部功能障碍引起,例如自身免疫病。对于人,“疾病”通常更广泛地用于是指引起患病个体的疼痛、功能障碍、痛苦、社会问题或死亡或者与该个体接触的那些的类似问题的任何状况。在此更广泛的意义上,疾病有时包括损伤、失能、障碍、综合征、感染、孤立症状、不正常行为以及结构和功能的非典型变化,而在另一些情况下和出于另一些目的,这些可认为是可区分的类别。疾病通常不仅在身体上而且还在情感上影响个体,因为对许多疾病的感染和经历可以改变个体对生命的看法和个体性格。

[0259] 术语“正常”是指健康状态,或者健康对象或组织中的状况,即非病理状况,其中“健康”优选意指非癌性的。

[0260] 术语“与抗原相关的疾病”或“涉及抗原的疾病”是指牵涉抗原的任何疾病,例如以抗原或表达抗原的细胞的存在为特征的疾病。涉及抗原的疾病可以是感染性疾病、自身免疫病或癌症疾病或简单地癌症。如上所述,所述抗原可以是疾病相关抗原例如肿瘤相关抗原、病毒抗原或细菌抗原。

[0261] 根据本发明,“涉及表达抗原的细胞的疾病”意指在病变组织或器官的细胞中检测到抗原的表达。与健康组织或器官中的状态相比,在病变组织或器官的细胞中的表达可提高。提高是指提高至少10%,特别是至少20%、至少50%、至少100%、至少200%、至少500%、至少1000%、至少10000%或甚至更多。在一个实施方案中,只在病变组织中发现表达,而在健康组织中的表达被抑制。根据本发明,涉及表达抗原的细胞或与之相关的疾病包括癌症疾病。

[0262] 术语“感染性疾病”是指可以从个体传播到个体或从生物体传播到生物体并且由微生物原引起的任何疾病(例如普通感冒)。感染性疾病是本领域已知的,并且包括例如病毒性疾病、细菌性疾病或寄生物性疾病,这些疾病分别由病毒、细菌和寄生物引起。在这方面,感染性疾病可以是例如肝炎、性传播疾病(例如衣原体疾病或淋病)、结核、HIV/获得性免疫缺陷综合征(acquired immune deficiency syndrome,AIDS)、白喉、乙型肝炎、丙型肝炎、霍乱、严重急性呼吸道综合征(severe acute respiratory syndrome,SARS)、禽流感和流感。

[0263] 术语“自身免疫病”是指其中身体对其自身组织的某些成分产生免疫原性(即免疫系统)应答的任何疾病。换言之,免疫系统失去了其将身体内的某组织或系统识别为自身的能力并且如同其为外来的那样对其靶向和攻击。自身免疫病可分为主要影响一个器官的那些疾病(例如溶血性贫血和抗免疫性甲状腺炎)以及其中自身免疫病过程通过许多组织扩散的那些疾病(例如,系统性红斑狼疮)。例如,认为多发性硬化由T细胞攻击围绕脑和脊髓的神经纤维的鞘引起。这导致协调丧失、虚弱和视力模糊。自身免疫病是本领域中已知的,并且包括例如桥本甲状腺炎(Hashimoto's thyroiditis)、格雷夫斯病(Grave's disease)、狼疮、多发性硬化、风湿性关节炎、溶血性贫血、抗免疫性甲状腺炎、系统性红斑狼疮、乳糜泻、克罗恩病(Crohn's disease)、结肠炎、糖尿病、硬皮病、银屑病等。

[0264] 术语“癌症疾病”或“癌症”是指或描述个体中通常以不受调节的细胞生长为特征的生理状况。癌症的一些实例包括但不限于癌、淋巴瘤、母细胞瘤、肉瘤和白血病。更特别地,这样的癌症的一些实例包括骨癌、血癌、肺癌、肝癌、胰腺癌、皮肤癌、头或颈癌、皮肤或眼内黑素瘤、子宫癌、卵巢癌、直肠癌、肛区癌、胃癌、结肠癌、乳腺癌、前列腺癌、子宫癌、性器官和生殖器官癌、霍奇金病(Hodgkin's Disease)、食管癌、小肠癌、内分泌系统癌症、甲状腺癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、膀胱癌、肾癌、肾细胞癌、肾盂癌、中枢神经系统(CNS)赘生物、神经外胚层癌症、脊柱轴肿瘤、胶质瘤、脑膜瘤和垂体腺瘤。根据本发明的术语“癌症”还包括癌症转移。

[0265] 根据本发明,术语“肿瘤”或“肿瘤疾病”是指细胞(被称为赘生性细胞、肿瘤发生性细胞或肿瘤细胞)的异常生长,优选形成肿胀或病灶。“肿瘤细胞”意指通过快速的不受控制的细胞增殖生长并在引发新生长的刺激停止之后继续生长的异常细胞。肿瘤显示出结构组

织和与正常组织的功能协调的部分或完全缺失,并且通常形成独特的组织团块,其可能是良性的、恶化前的或恶性的。

[0266] 出于本发明的目的,术语“癌症”和“癌症疾病”与术语“肿瘤”和“肿瘤疾病”可互换使用。

[0267] “转移”意指癌细胞从其原始部位扩散到身体的另一部分。转移的形成是很复杂的过程,并且取决于恶性细胞从原发性肿瘤脱离,侵袭细胞外基质,渗透内皮基底膜以进入体腔和血管,以及然后在通过血液转运后浸润靶器官。最终,在靶位点的新肿瘤,即继发性肿瘤或转移性肿瘤的生长取决于血管生成。甚至在去除原发性肿瘤之后,也经常发生肿瘤转移,这是因为肿瘤细胞或组分可能保留并发展转移潜力。在一个实施方案中,根据本发明的术语“转移”涉及“远端转移”,其涉及远离原发性肿瘤和区域性淋巴结系统的转移。

[0268] 继发性或转移性肿瘤的细胞与原始肿瘤中的细胞类似。这意味着,例如,如果卵巢癌转移至肝脏,则继发性肿瘤由异常卵巢细胞而不是异常肝细胞构成。肝中的肿瘤然后被称为转移性卵巢癌,而不是肝癌。

[0269] 术语“循环肿瘤细胞”或“CTC”涉及从原发性肿瘤或肿瘤转移瘤脱离并且在血流中循环的细胞。CTC可构成随后在不同组织中生长另外的肿瘤(转移)的种子。循环肿瘤细胞以约1至10个CTC/mL全血的频率存在于患有转移性疾病的患者中。已开发了研究方法来分离CTC。本领域中已描述了若干种研究方法来分离CTC,例如使用上皮细胞通常表达细胞黏附蛋白EpCAM(其在正常血细胞中不存在)的这一事实的技术。基于免疫磁珠的捕获涉及用已与磁性颗粒缀合的针对EpCAM的抗体处理血液试样,随后在磁场中分离标记的细胞。然后,将分离的细胞用针对另一上皮标志物细胞角蛋白和常见的白细胞标志物CD45的抗体染色,以使罕见的CTC与污染白细胞区分开来。这种稳健且半自动化的方法以平均产量为约1个CTC/mL且纯度为0.1%鉴定CTC(Allard等,2004:Clin Cancer Res 10,6897-6904)。用于分离CTC的第二种方法使用基于微流体的CTC捕获装置,其涉及使全血流过嵌入有80,000个微柱的室,所述微柱通过用针对EpCAM的抗体包被而变得具有功能性。CTC然后用针对细胞角蛋白或组织特异性标志物(例如前列腺癌中的PSA或乳腺癌中的HER2)的二抗进行染色,并且通过沿着三维坐标在多个平面中自动化扫描微柱来可视化。CTC芯片能够以50个细胞/ml的中值产量和1%至80%的纯度来鉴定患者中的细胞角蛋白阳性循环肿瘤细胞(Nagrath等,2007:Nature 450,1235-1239)。用于分离CTC的另一种可能性是使用来自Veridex,LLC(Raritan,NJ)的CellSearch™循环肿瘤细胞(CTC)测试,其对血管中的CTC进行捕获、鉴定和计数。CellSearch™系统是美国食品和药物管理局(FDA)批准的用于全血中CTC计数的方法,其是基于免疫磁性标记和自动化数字显微术的组合。存在文献中描述的用于分离CTC的其他方法,所有这些方法均可以与本发明结合使用。

[0270] 当个体再次受到过去影响其的病症影响时,出现复发或再现。例如,如果患者曾患有肿瘤疾病,已经接受所述疾病的成功治疗,并且再次发生所述疾病,则所述新发生的疾病可认为是复发或再现。然而,根据本发明,肿瘤疾病的复发或再现可以但不一定发生在原始肿瘤疾病的部位。因此,例如,如果患者曾患有卵巢肿瘤并且已接受了成功治疗,则复发或再现可为在与卵巢不同的部位处出现卵巢肿瘤或出现肿瘤。肿瘤的复发或再现还包括其中肿瘤出现在与原始肿瘤部位不同的部位和出现在原始肿瘤部位的情况。优选地,患者已经接受治疗的原始肿瘤是原发性肿瘤,并且在与原始肿瘤部位不同的部位的肿瘤是继发性或

转移性肿瘤。

[0271] 术语“免疫治疗”涉及通过诱导、增强或抑制免疫应答来治疗疾病或病症。设计用于引发或扩大免疫应答的免疫治疗被分类为活化免疫治疗，而降低或抑制免疫应答的免疫治疗被分类为抑制免疫治疗。术语“免疫治疗”包括抗原免疫接种或抗原疫苗接种，或者肿瘤免疫接种或肿瘤疫苗接种。术语“免疫治疗”还涉及免疫应答的操纵，以使得在自身免疫病如风湿性关节炎、变态反应、糖尿病或多发性硬化的情况下，将不合适的免疫应答调节成更合适的免疫应答。

[0272] 术语“免疫接种”或“疫苗接种”描述了向个体施用抗原以诱导免疫应答的过程，例如，出于治疗或预防的原因。

[0273] 术语“治疗性治疗”或简称“治疗”涉及改善个体的健康状况和/或延长(增加)个体的生命的任何治疗。所述治疗可以消除个体的疾病，停止或减慢个体中疾病的发展，抑制或减慢个体中疾病的发生，降低个体中症状的频率或严重程度，和/或降低目前患有或以前患有疾病的个体中的再现。

[0274] 术语“预防性治疗”或“预防治疗”涉及旨在在个体中防止疾病发生的任何治疗。术语“预防性治疗”或“预防治疗”在本文中可互换使用。

[0275] 术语“保护”、“预防”、“预防性”、“预防的”或“保护性”涉及在个体中预防和/或治疗疾病(例如肿瘤)的发生和/或传播。例如，预防性施用免疫治疗，例如通过施用本文所述的组合物，可以保护接受个体免于肿瘤的发生。例如，治疗性施用免疫治疗，例如通过施用本文所述的组合物，可以阻止疾病的发展，例如导致抑制肿瘤的进展/生长。这包括减缓肿瘤的进展/生长，特别是破坏肿瘤的进展，其优选导致消除肿瘤。治疗性施用免疫治疗可以保护个体例如免于已有肿瘤的传播或转移。

[0276] 术语“个体”或“对象”涉及脊椎动物，特别是哺乳动物。例如，在本发明上下文中的哺乳动物是人；非人灵长类动物；家养动物，例如狗、猫、绵羊、牛、山羊、猪、马等；实验室动物，例如小鼠、大鼠、兔、豚鼠等；以及圈养动物，例如动物园的动物。术语“对象”还涉及非哺乳动物脊椎动物，例如鸟类(特别是家禽，例如鸡、鸭、鹅、火鸡)，并且涉及鱼类(特别是养殖鱼，例如鲑鱼或鳕鱼)。如本文所用的术语“动物”还包括人。优选地，术语“患者”涉及患病个体。

[0277] 本文中所述的药剂可以以任何合适的药物组合物的形式施用。术语“药物组合物”涉及包含治疗有效剂或其盐的制剂，优选与药用赋形剂例如缓冲剂、防腐剂和张力调节剂一起。所述药物组合物可用于通过将所述药物组合物施用于个体来治疗、预防疾病或病症、或者降低其严重程度。药物组合物在本领域中也称为药物制剂。药物组合物可以局部或全身施用。

[0278] 术语“全身施用”是指施用治疗有效剂以使得药剂以显著量广泛地分布于个体的体内并且产生生物学效果。根据本发明，优选地施用是通过肠胃外施用进行。

[0279] 术语“肠胃外施用”是指施用治疗有效剂以使得药剂不通过肠。术语“肠胃外施用”包括静脉内施用、皮下施用、皮内施用或动脉内施用，但不限于此。

[0280] 在一个特别优选的实施方案中，将根据本发明的组合物施用于肌肉组织，例如骨骼肌。因此，例如通过肌内注射的肌内施用是优选的施途径。

[0281] 施用可以以多种方式实现。在一个实施方案中，根据本发明的组合物通过注射施

用。在一个优选的实施方案中,注射通过针进行。可以使用无针注射作为替代方案。

[0282] 本发明的药物组合物可包含至少一种佐剂。术语“佐剂”涉及以下化合物,其当与抗原或抗原肽组合施用于个体时延长或增强或加速免疫应答。认为佐剂通过以下一种或更多种机制发挥其生物学活性:包括抗原表面的增加,抗原在体内的保留延长,抗原释放的延迟,抗原靶向巨噬细胞,抗原摄取的增加,抗原加工的增强,刺激细胞因子释放,刺激和活化免疫细胞如B细胞、巨噬细胞、树突细胞、T细胞,以及免疫细胞的非特异性活化。佐剂包含一组异质化合物,例如油乳剂(例如弗氏佐剂(Freund's adjuvant))、无机化合物(例如明矾)、细菌产物(例如百日咳博德特氏杆菌(*Bordetella pertussis*)毒素)或免疫刺激复合物。佐剂的一些实例包括皂苷、不完全弗氏佐剂、完全弗氏佐剂、生育酚或明矾,但不限于此。

[0283] 根据本发明的药物组合物通常以“药学有效量”和“可药用制剂”施用。

[0284] 术语“药学有效量”是指单独或与另外的剂量一起实现期望的反应或期望的效果的量。在治疗特定疾病的情况下,期望的反应优选地涉及抑制疾病进程。这包括减慢疾病的进展,并且特别是中断或逆转疾病的进展。治疗疾病的期望反应也可以是延迟所述疾病或所述病症的发生或者预防其发生。本文中描述的组合物的有效量将取决于待治疗的病症;疾病的严重程度;患者的个体参数,包括年龄、生理状况、身高和体重;治疗持续时间;伴随治疗(如果存在的话)的类型;具体施用途径;和类似因素。因此,本文中所述的组合物的施用剂量可以取决于多种这样的参数。在采用初始剂量患者的反应不足的情况下,可以使用更高的剂量(或通过不同的更局部化的施用途径实现有效更高的剂量)。

[0285] 术语“可药用的”是指不与药物组合物的活性组分的作用相互作用的材料的无毒性。

[0286] 本发明的药物组合物可包含盐、缓冲剂、防腐剂、载体和任选地其他治疗剂。优选地,本发明的药物组合物包含一种或更多种可药用载体、稀释剂和/或赋形剂。

[0287] 术语“赋形剂”旨在表示在药物组合物中但不是活性成分的所有物质,例如黏合剂、润滑剂、增稠剂、表面活性剂、防腐剂、乳化剂、缓冲剂、矫味剂或着色剂。

[0288] 术语“稀释剂”涉及稀释试剂和/或稀化剂。此外,术语“稀释剂”包括流体、液体或固体悬浮和/或混合介质中的任意一种或更多种。

[0289] 术语“载体”涉及适用于向人施用的一种或更多种相容性固体或液体填充剂或稀释剂。术语“载体”涉及天然或合成的有机或无机组分,其与活性组分组合以促进活性组分的应用。优选地,载体组分是无菌液体,例如水或油,包括来源于矿物油、动物或植物的那些,例如花生油、大豆油、芝麻油、向日葵油等。盐溶液和葡萄糖水溶液以及甘油溶液也可用作水性载体化合物。

[0290] 用于治疗用途的可药用载体或稀释剂在制药领域中是公知的,并且描述于例如 Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A.R Gennaro编辑,1985)中。合适的载体的一些实例包括例如碳酸镁、硬脂酸镁、滑石、糖、乳糖、果胶、糊精、淀粉、明胶、黄耆胶、甲基纤维素、羧甲基纤维素钠、低熔点蜡、可可脂等。合适的稀释剂的一些实例包括乙醇、甘油和水。

[0291] 可以根据预期的施用途径和标准药学实践选择药用载体、赋形剂或稀释剂。本发明的药物组合物可包含以下作为载体、赋形剂或稀释剂或者除载体、赋形剂或稀释剂之外

还可以包含以下:任何合适的黏合剂、润滑剂、助悬剂、包衣剂和/或增溶剂。合适的黏合剂的一些实例包括淀粉、明胶、天然糖例如葡萄糖、无水乳糖、自由流动乳糖 (free-flow lactose)、 β -乳糖、玉米甜味剂、天然和合成胶例如阿拉伯胶、黄蓍胶或藻酸钠、羧甲基纤维素和聚乙二醇。合适的润滑剂的一些实例包括油酸钠、硬脂酸钠、硬脂酸镁、苯甲酸钠、乙酸钠、氯化钠等。可以在药物组合物中提供防腐剂、稳定剂、染料以及甚至矫味剂。防腐剂的一些实例包括苯甲酸钠、山梨酸和对羟基苯甲酸酯。也可以使用抗氧化剂和助悬剂。

[0292] 在一个实施方案中,所述组合物是水性组合物。水性组合物可任选地包含溶质,例如盐。在一个实施方案中,所述组合物是冻干组合物的形式。冻干组合物可通过冷冻干燥相应的水性组合物获得。

[0293] 本文中提供的药剂和组合物可单独使用或与其他治疗方案例如手术、辐照、化学治疗和/或骨髓移植(自体的、同基因的、同种异体的或不相关的)组合使用。

[0294] 通过附图和实施例对本发明进行详细描述和说明,附图和实施例仅仅用于举例说明目的,并且不意味着是限制性的。由于描述和实施例,技术人员可理解同样包括在本发明中的另外的实施方案。

[0295] 附图

[0296] 图1. 如果与随机肽(蛋白质组)相比,公开的表位(published epitope)的蛋白质在外排体和胞质溶胶中显著富集。

[0297] 图2. 与随机肽相比,公开的表位的基因在SEREX数据库中显著更频繁地存在。

实施例

[0298] 本文中使用的技术和方法在本文中进行了描述或者以本身已知的方式并且如例如 Sambrook 等, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第2版(1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 中所述实施。除非特别地指出,否则包括试剂盒和试剂使用的所有方法都根据制造商的信息进行。

[0299] 实施例1: 包含公开的表位的蛋白质的位置

[0300] 筛选文献以鉴定MHC I类限制性突变新表位(“公开的表位”, $n=129$), 并将其位置与蛋白质编码基因的随机样本(“蛋白质组”, $n=500$) 进行比较(图1)。通过基因本体数据库(<http://www.ebi.ac.uk/QuickGO/>) 确定各基因的位置。此外,通过ExoCarta数据库(<http://www.exocarta.org/>) 测试在外排体中的存在。如图1所示,与对照基因相比,含有新表位的基因在外排体中以及在胞质溶胶中显著富集(fisher精确检验; $p<0.0001$)。

[0301] 在第二步中,在SEREX数据库(V. Jongeneel, *Cancer Immunity*, 第1卷, 第3页(2001年3月30日) 中将来自公开的表位的基因的存在与随机对照基因进行比较(图2)。SEREX数据库列出了显示被自身抗体识别的蛋白质。与随机肽相比,公开的表位的基因在SEREX数据库中显著更频繁地存在(fisher精确检验; $p<0.0001$)。

[0302] 图1和2中显示的结果表明,突变基因在外排体、胞质溶胶或自身抗体数据库中的存在是预测用于免疫治疗的相关突变抗原的有用参数。

序列表

- <110> 生物技术RNA制药有限公司等
- <120> 用于预测蛋白质或蛋白质片段用于免疫治疗的有用性的方法
- <130> 674-157 PCT2
- <150> PCT/EP2016/060897
- <151> 2016-05-13
- <160> 2
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 15
- <212> PRT
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> 接头序列
- <220>
- <221> REPEAT
- <222> (1) .. (3)
- <223> 序列部分重复a次, 其中a独立地为选自以下的数:0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20
- <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (1) .. (15)
- <223> a + b + c + d + e与0不同并且优选为2或更大、3或更大、4或更大或者5或更大
- <220>
- <221> REPEAT
- <222> (4) .. (6)
- <223> 序列部分重复b次, 其中b独立地为选自以下的数:0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20
- <220>
- <221> REPEAT
- <222> (7) .. (9)
- <223> 序列部分重复c次, 其中c独立地为选自以下的数:0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20
- <220>
- <221> REPEAT
- <222> (10) .. (12)
- <223> 序列部分重复d次, 其中d独立地为选自以下的数:0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、

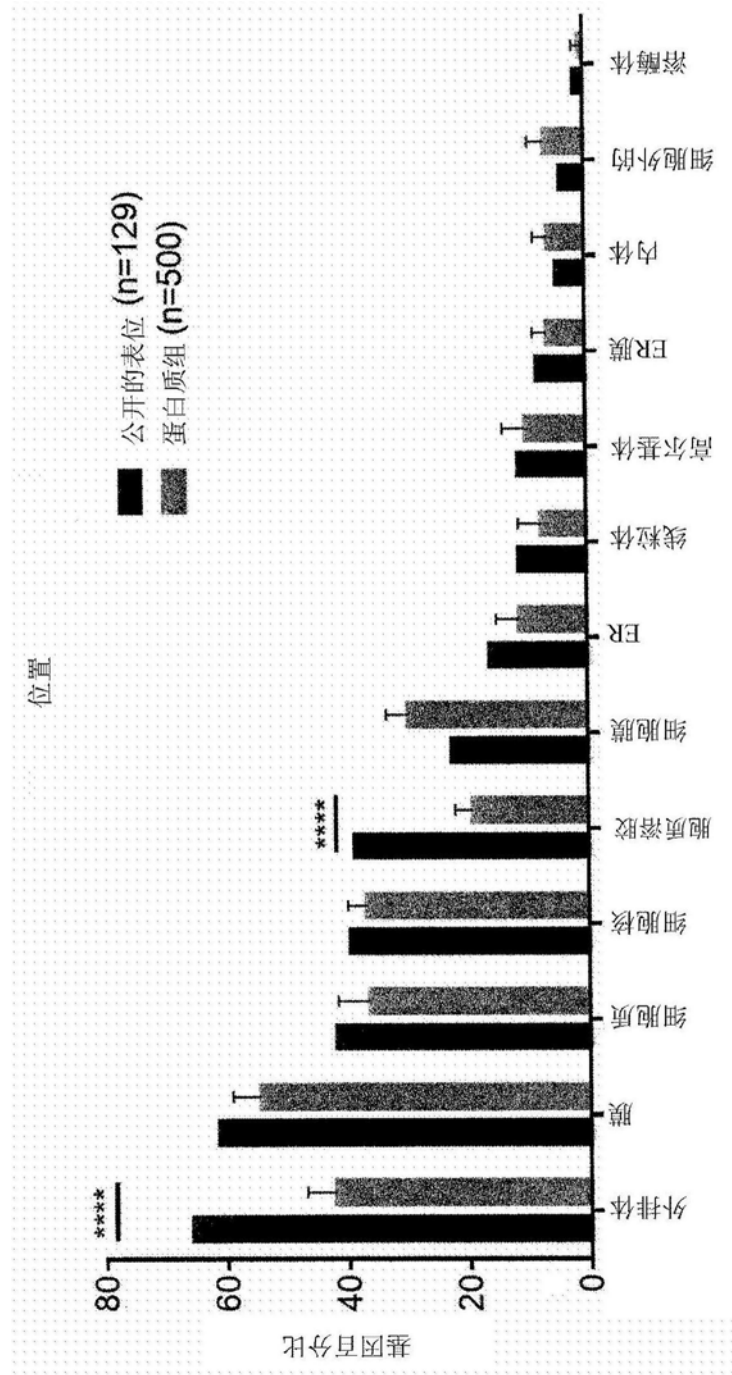


图1

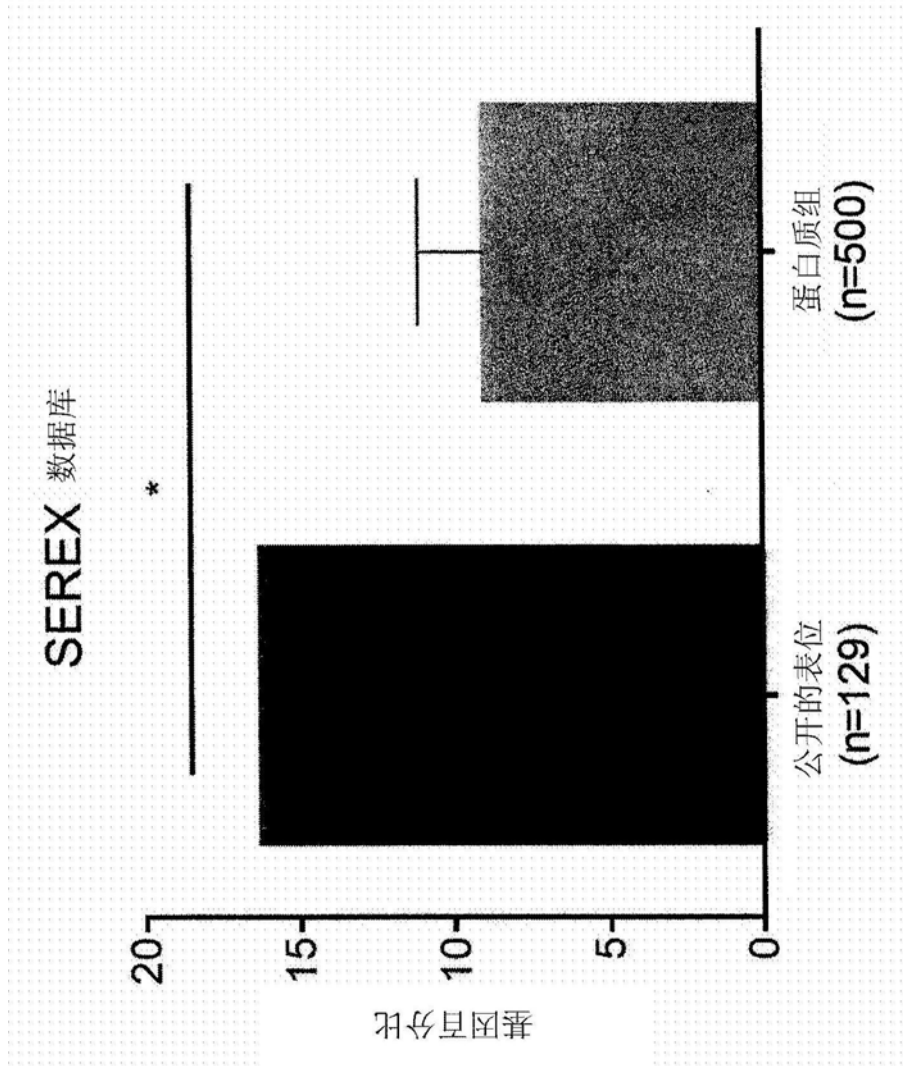


图2

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 用于预测蛋白质或蛋白质片段用于免疫治疗的有用性的方法 | | |
| 公开(公告)号 | CN109073637A | 公开(公告)日 | 2018-12-21 |
| 申请号 | CN201780026579.0 | 申请日 | 2017-05-10 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 约翰·古腾堡大学美因兹医学大学转化肿瘤学公司 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 约翰·古腾堡大学美因兹医学大学转化肿瘤学公司 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | 约翰·古腾堡大学美因兹医学大学转化肿瘤学公司 | | |
| [标]发明人 | 马蒂亚斯沃尔梅尔 乌尔沙欣 芭芭拉施勒尔斯 马丁勒韦尔 塞巴斯蒂安伯格 | | |
| 发明人 | 马蒂亚斯·沃尔梅尔 乌尔·沙欣 芭芭拉·施勒尔斯 马丁·勒韦尔 塞巴斯蒂安·伯格 | | |
| IPC分类号 | G01N33/50 G01N33/68 G01N33/53 | | |
| CPC分类号 | A61P35/04 G01N33/5035 G01N33/5308 G01N33/6878 G01N33/6887 G01N2333/4712 G01N2800/52 G01N33/56977 | | |
| 代理人(译) | 郑斌 尹玉峰 | | |
| 优先权 | PCT/EP2016/060897 2016-05-13 WO | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |

摘要(译)

本发明涉及用于预测可用于免疫治疗例如用于疫苗接种的肽或多肽例如T细胞表位的方法。特别地，本发明涉及用于预测肽或多肽例如肿瘤相关抗原或表位、特别是肿瘤相关新抗原或新表位是否具有免疫原性，并且特别地是否可用于免疫治疗例如用于疫苗接种的方法。本发明的方法特别地可用于提供对患者的肿瘤具有特异性的疫苗，并且因此可用于个体化癌症疫苗的情况。

