



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111670043 A

(43)申请公布日 2020.09.15

(21)申请号 201880087466.6

A·贝纳瑟-格里瑟利

(22)申请日 2018.11.23

C·德斯特克

(30)优先权数据

(74)专利代理机构 北京市金杜律师事务所

17306635.8 2017.11.24 EP

11256

代理人 孟凡宏 谢燕军

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2020.07.22

(51)Int.Cl.

(86)PCT国际申请的申请数据

A61K 39/00(2006.01)

PCT/EP2018/082429 2018.11.23

A61K 39/39(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

(87)PCT国际申请的公布数据

W02019/101956 EN 2019.05.31

(71)申请人 国家医疗保健研究所

地址 法国巴黎

申请人 巴黎公共救济院

巴黎-萨克雷大学 巴黎大学

(72)发明人 F·格里瑟利 A·蒂汉

权利要求书2页 说明书47页 附图15页

(54)发明名称

治疗癌症的方法和组合物

(57)摘要

发明人提供了治疗表达胚胎抗原的癌症的新治疗策略。因此,本发明涉及一种治疗患有癌症的受试者的方法,包括向所述受试者同时、分别或顺次施用治疗量的作为组合制剂的i)携带癌症相关胎儿新基因的衍生的工程化胎儿干细胞群和ii)选自激活免疫应答的化合物的步骤。

1. (i) 组蛋白脱乙酰基酶抑制剂 (HDACi) 和 (ii) 包含灭活的胎儿细胞群体的疫苗组合物的联合用于治疗受试者的癌症的用途。

2. 根据权利要求1所述的联合的用途, 其中所述群体的细胞表达一种或多种也被受试者的癌细胞表达的目标抗原。

3. 根据权利要求1或2所述的联合的用途, 其中所述灭活的胎儿细胞群体是类器官。

4. 根据权利要求1-2任一项所述的联合的用途, 其中所述胎儿干细胞通过包括以下步骤的方法获得:

a. 将多能细胞群体向与患者特定癌症有关的途径分化,

b. 扩增如此分化的细胞,

c. 任选在扩增期间暴露于诱变剂, 以诱导所述群体的细胞中的基因突变,

d. 验证至少70%的所述群体的细胞表达胎儿标志物,

e. 任选验证所述群体的细胞表达存在于所述受试者癌细胞中的至少一种肿瘤相关抗原 (TAA) 或新抗原,

f. 灭活所述细胞, 以使所述细胞丧失其分裂能力。

5. 根据权利要求4所述的联合的用途, 其中所述诱变剂选自下组: 化学诱变剂和辐射诱变剂 (X射线、UV辐射)。

6. 根据权利要求4或5任一项所述的联合的用途, 其中所述诱变剂选自下组: ENU、活性氧族、脱胺剂、多环芳族烃、芳族胺和叠氮化钠。

7. 根据权利要求1-6任一项所述的联合的用途, 其中所述组蛋白脱乙酰基酶抑制剂选自下组: 丙戊酸 (VPA)、伏林司他、帕比司他、吉诺司他、贝利司他、恩替司他、莫西诺司他、Practinostat、西达本胺、奎诺司他和阿贝司他。

8. 一种灭活的细胞的组合物, 其包含由iPS衍生的胎儿造血谱系获得的灭活的胎儿干细胞, 其中扩增后所述群体中的细胞在选自下组的至少一种基因中呈现至少0.1%的突变率: ARHGEF10L、TRIM66、NKAIN、ITGAGGT1、PDZD、MUC4、MUC2、NECAB3、MNT、GLTSCR1、COPZ2、ZFP36、MIB2、ABCC12、IGFN1、LRRK2、RIN3、GGT1、ANK2、HDAC7、MUC20、SDCCAG3、DNAI1、BTNL9、ABTB2、MC2R、DOCK4、FSD1L、CRP、PPP1R3A、SLC22A17、PITPNM1、A2M、CTDSP2、IFNA14、KIF5C、THNSL2、GTF3C3、NRXN1、MED26、FNBP1、TMC03、ING1、ZNF292、RBL1、CD109、FOXRED2、PLIN2、ZNF85、SESN1、CENPE、BTBD7、STOM、ZNF317、TET1、LRBA、MED4、CDC27、BCR、HPRT1、NASP和MSH2。

9. 一种灭活的胎儿细胞的组合物, 其包含iPS衍生的肾类器官中的灭活的胎儿干细胞, 其中所述群体中的细胞表达至少一种选自下组的胎儿抗原: TRAPPC4、MX1、ITSN1、DNAJC7、TAF15、TMEM88、CRYM、PRTG、TYRO3、C12ORF60、FJX1、ADM、FAM45A、ASS1、CA2、ZFH4、CLVS1、NRG1、EZH2、SLC22A23、MSH5、FBN2、GTF2H2、LIX1、HESX1、FZD5、LRP2、RHOQ、NUAK2、ILF2、ACP6、RPL5、NMNAT1、ID1、U2AF2、KLHL14、CDH2、GREB1L、ARRDC4、THBS1、BMP4、LRIG3、SOX5、SF1、LGR4、MGEA5、BCORL1、STOM、GLIS3、ANXA1、KDM4C、SDC2、TMEM130、MAGI2、GLI3、HEY2、TPBG、ID4、MYLIP、ENC1、EGR1、CDH6、NPY1R、SEL1L3、LRAT、CLDN1、CEP97、BHLHE40、ARL5A、ARL4C、ZNF385B、LYPD1、B3GNT7、INSIG2、ARHGAP29、NOTCH2和IFI16。

10. 一种灭活的胎儿细胞的组合物, 其包含iPS衍生的肺类器官中的灭活的胎儿干细胞, 其中所述群体中的细胞表达至少一种选自下组的胎儿抗原: AIM2、AQP4、AURKA、BMP5,

CDCA7, CEP55, CYP4B1, DACH1, EMP2, EPB41L4A, GJB2, MAOA, MELK, MKI67, NEBL, NFIA, PHF19, RNF144B和UHRF1。

11. 一种疫苗组合物, 其包含:

- a. 灭活的胎儿干细胞群体, 和
- b. 刺激免疫应答和/或MHC I表达的试剂。

12. 根据权利要求11所述的疫苗组合物, 其中所述灭活的胎儿干细胞包含诱变的胎儿干细胞。

13. 根据权利要求11或12所述的疫苗组合物用于治疗受试者的癌症的用途。

14. 根据权利要求13所述的疫苗组合物的用途, 其中所述癌症具有胎儿干细胞特征。

15. 一种试剂盒, 其包含根据权利要求11或12所述的疫苗组合物和提供疫苗接种的指南的说明书。

16. i) 灭活的胎儿干细胞群体和ii) 激活MHC表达和/或免疫应答的化合物的联合制剂通过同时、分别或顺次施用用于治疗受试者的癌症的用途。

17. 根据权利要求16所述的联合制剂的用途, 其中所述癌症选自下组: 膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、胆管癌、结直肠癌、骨肉瘤、神经胶质瘤、肺癌、淋巴瘤、急性和慢性淋巴样和髓样白血病、黑素瘤、多发性骨髓瘤、骨肉瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、胃癌、肾癌、头颈肿瘤以及实体瘤和造血系统恶性肿瘤的所有亚型。

## 治疗癌症的方法和组合物

### 技术领域

[0001] 本发明属于肿瘤学领域,更具体地,本发明涉及抗癌疫苗联合疗法。

[0002] 更特别地,本发明涉及制备包含呈现多种新抗原的胎儿干细胞的组合物的方法,以及所述方法用于制备癌细胞疫苗。

### 背景技术

[0003] 癌症干细胞(CSC)代表少数自我更新的响应肿瘤的持久性和复发的癌细胞群体,因为它们可能对常规治疗耐药。这些CSC最近在各种来源的实体瘤(包括乳腺癌、结肠癌和头颈癌)中得到证实,并且代表一种新的治疗靶标。已经表明那些CSC表达大量的与人胚胎干细胞(hESC)或人诱导的多能干细胞(hiPSC)共享表达的胚胎抗原。还已经在与肿瘤发生和/或肿瘤进展相关的分化癌细胞中发现了某些那些胚胎抗原的表达。此外,癌症还表达在多能细胞中不表达的胎儿抗原。

[0004] 在过去的十年中,癌症治疗方法已经从靶向疗法发展到免疫干预策略,其中在生存率以及与癌症相关的发病率和死亡率方面取得了空前的增长。但是,尽管已经证明免疫检查点抑制剂的功效和临床益处,但仍存在大量由影响肿瘤特异性免疫响应和癌细胞自主性诱导的免疫调节因子引起的部分响应者和原发性耐药性肿瘤(“先天性耐药性”)。对PD-1/PD-L1阻断的最初响应后,在大量进展和复发的癌症中发生了获得性耐药性。对PD1/PDL-1阻断的潜在获得的耐药性的机制由具有获得性体细胞突变(突变组)、具有耗尽的T细胞的表现遗传稳定性的进化的肿瘤免疫微环境(TIME)的新抗原格局的演变引起。

[0005] 癌症种系抗原代表在胚胎和胎儿发育过程中表达的蛋白质,这些表观遗传控制的抗原可以在多种癌症中以可变比例重新表达。迄今为止,已经建立了几种人类癌症疫苗试验,以靶向胚胎抗原,例如癌胚抗原(CEA)、甲胎蛋白或癌症/睾丸抗原(NY-ESO-1)。基因工程化以表达针对癌症种系抗原NY-ESO-1的HLA\*0201表位的T细胞抗原受体(TCR)的自体淋巴细胞的过继细胞转移,导致一些转移性黑色素瘤患者的持久性肿瘤消退。不幸的是,已经证明单独靶向一种抗原不足以产生强的抗肿瘤免疫应答以介导肿瘤排斥,因为逃逸突变体和新的体细胞新抗原的快速出现以及单价癌症疫苗普遍低效。

[0006] 最近对于干细胞在再生医学中的潜力的兴趣使得定义明确的未分化ESC系以及在表型上和功能上与ESC相似的未分化iPSC得以广泛应用。

[0007] 继发于来自强大的免疫抑制肿瘤微环境的内在途径和诱导因子,具有干性特征的癌症呈现出基因组可塑性以及染色质景观的深刻变化。它们去分化为未成熟祖细胞的能力赋予肿瘤克隆从胎儿发育中重新表达基因,同时下调I类CMH的表达并上调共同抑制分子的表达。

[0008] 因此,仍然需要预防和/或治疗具有干细胞特征的癌症的新方法。针对干细胞突变新表位的疫苗接种可用于增强过继转移的T细胞或通过免疫检查点阻断激活的细胞的免疫应答。

[0009] 本公开的主题完全或部分解决了这一需求和其他需求。

[0010] 发明简述

[0011] 本发明涉及一种用于治疗患有癌症的受试者的方法,包括以下步骤:向所述受试者同时、分别或顺次施用治疗量的(i)组蛋白脱乙酰酶抑制剂(HDACi)和(ii)包含免疫原性成分的疫苗组合物。优选地,所述免疫原性成分已经是灭活的胎儿细胞群体,所述胎儿细胞有利地处于与待治疗的癌症相同的细胞分化谱系中。本发明特别由权利要求书限定。

[0012] 在一个实施方案中,本发明涉及(i)组蛋白脱乙酰酶抑制剂(HDACi)和(ii)包含灭活的胎儿细胞群体的疫苗组合物的联合用于治疗受试者的癌症的用途。在另一个实施方案中,疫苗由灭活的胎儿细胞群体组成。特别地,群体细胞表达一种或多种也被受试者的癌细胞表达的目标抗原。在一个特定实施方案中,灭活的胎儿细胞群体是类器官或衍生自类器官(即已经通过破坏类器官的3D结构获得)。

[0013] 当通过包括以下步骤的方法获得胎儿干细胞时是优选的:

[0014] a. 将多能细胞群体向与患者特定癌症有关的途径分化,

[0015] b. 扩增如此分化的细胞,

[0016] c. 任选在扩增期间暴露于诱变剂,以诱导所述群体的细胞中的基因诱变,

[0017] d. 验证至少70%的所述群体的细胞表达胎儿标志物,

[0018] e. 任选验证所述群体的细胞表达存在于所述受试者癌细胞中的至少一种肿瘤相关抗原(TAA)或新抗原,

[0019] f. 灭活所述细胞,以使所述细胞丧失其分裂能力。

[0020] 当进行诱变时,优选诱变剂选自下组:化学诱变剂和辐射诱变剂(X射线、UV辐射)。

特别地,诱变剂选自下组:ENU、活性氧族、脱胺剂、多环芳族烃、芳族胺和叠氮化钠。

[0021] 在优选的实施方案中,组蛋白脱乙酰基酶抑制剂选自下组:丙戊酸(VPA)、伏林司他、帕比司他、吉诺司他、贝利司他、恩替司他、莫西诺司他、Practinostat、西达本胺、奎诺司他和阿贝司他。

[0022] 本发明还涉及灭活的细胞的组合物,其包含由iPS衍生的胎儿造血谱系获得的灭活的胎儿干细胞,其中扩增后所述群体中的细胞在选自下组的至少一种基因中呈现至少0.1%的突变率:ARHGEF10L、TRIM66、NKAIN、ITGAGGT1、PDZD、MUC4、MUC2、NECAB3、MNT、GLTSCR1、COPZ2、ZFP36、MIB2、ABCC12、IGFN1、LRRK2、RIN3、GGT1、ANK2、HDAC7、MUC20、SDCCAG3、DNAI1、BTNL9、ABTB2、MC2R、DOCK4、FSD1L、CRP、PPP1R3A、SLC22A17、PITPNM1、A2M、CTDSP2、IFNA14、KIF5C、THNSL2、GTF3C3、NRXN1、MED26、FBNP1、TMC03、ING1、ZNF292、RBL1、CD109、FOXRED2、PLIN2、ZNF85、SESN1、CENPE、BTBD7、STOM、ZNF317、TET1、LRBA、MED4、CDC27、BCR、HPRT1、NASP和MSH2。这些基因通常在急性白血病,特别是急性髓细胞性白血病中表达。

[0023] 本发明还涉及灭活的胎儿细胞的组合物,其包含iPS衍生的肾类器官中的灭活胎儿干细胞,其中所述群体中的细胞表达至少一种选自下组的胎儿抗原:TRAPPC4、MX1、ITSN1、DNAJC7、TAF15、TMEM88、CRYM、PRTG、TYRO3、C12ORF60、FJX1、ADM、FAM45A、ASS1、CA2、ZFH4、CLVS1、NRG1、EZH2、SLC22A23、MSH5、FBN2、GTF2H2、LIX1、HESX1、FZD5、LRP2、RHOQ、NUAK2、ILF2、ACP6、RPL5、NMNAT1、ID1、U2AF2、KLHL14、CDH2、GREB1L、ARRDC4、THBS1、BMP4、LRIG3、SOX5、SF1、LGR4、MGEA5、BCORL1、STOM、GLIS3、ANXA1、KDM4C、SDC2、TMEM130、MAGI2、GLI3、HEY2、TPBG、ID4、MYLIP、ENC1、EGR1、CDH6、NPY1R、SEL1L3、LRAT、CLDN1、CEP97、BHLHE40、ARL5A、ARL4C、ZNF385B、LYPD1、B3GNT7、INSIG2、ARHGAP29、NOTCH2和IFI16。这些基

因通常在与c-Met突变相关或不相关的原发性成人肾癌中表达。

[0024] 本发明还涉及灭活的胎儿细胞的组合物,其包含iPS衍生的肺类器官中的灭活的胎儿干细胞,其中所述群体中的细胞表达至少一种选自下组的胎儿抗原:AIM2、AQP4、AURKA、BMP5、CDCA7、CEP55、CYP4B1、DACH1、EMP2、EPB41L4A、GJB2、MAOA、MELK、MKI67、NEBL、NFIA、PHF19、RNF144B和UHRF1。这些基因通常在成人肺癌中表达。

[0025] 本发明还涉及疫苗组合物,其包含:

[0026] a. 灭活的胎儿干细胞群体,和

[0027] b. 刺激免疫应答和/或MHC I表达的试剂。

[0028] 特别地,灭活的胎儿干细胞包含诱变的胎儿干细胞。它可以用于治疗受试者的癌症,尤其是在癌症具有胎儿干细胞特征的情况下。

[0029] 本发明的另一部分是试剂盒,其包含如本文公开的疫苗组合物和提供疫苗接种的指南的说明书。

[0030] 本发明还涉及i) 灭活的胎儿干细胞群体和ii) 激活MHC表达和/或免疫应答的化合物的联合制剂,所述联合制剂通过同时、分别或顺次施用用于治疗受试者的癌症。当癌症选自膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、胆管癌、结直肠癌、胃肉瘤、神经胶质瘤、肺癌、淋巴瘤、急性和慢性淋巴样和髓样白血病、黑素瘤、多发性骨髓瘤、骨肉瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、胃癌、肾癌、头颈肿瘤以及实体瘤和造血系统恶性肿瘤的所有亚型时,可以使用该联合制剂。

[0031] 还公开了其中向需要治疗的患者施用治疗量的组合物(灭活的胎儿细胞群体和佐剂)的治疗方法,并且是本发明的一部分。

[0032] 在本申请中,所有基因均以本领域技术人员已知的名称表示。根据这些名称,可以使用任何搜索引擎(包括通才搜索引擎)或在专用于维护癌症基因库的数据库(例如COSMIC数据库,(Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer,由英国Sanger研究所开发)或癌症基因组图谱(TCGA,由美国NCBI维护)找到基因和蛋白序列。这些数据库重组了编码癌细胞中表达的抗原的各种序列。

[0033] 发明详述

[0034] 发明人已经表明,将HDACi与胎儿干细胞群体一起使用导致免疫系统针对肿瘤细胞的协同作用和有效响应。他们还表明,多种HDAC抑制剂(HDACi,包括伏林司他、恩替司他、leviteracetam和丙戊酸)能够与胎儿干细胞群体协同作用,从而提高针对肿瘤细胞的有效免疫应答。发明人还表明,用(i) 胎儿干细胞,例如经辐射的内胚层祖细胞(EndoPC)和(ii) HDACi,例如丙戊酸的联合对罹患癌症(例如胰腺癌)的个体进行疫苗接种,导致对肿瘤的强烈抑制并显著提高生存率。

[0035] 事实上,发明人假设,可以将作为胎儿新抗原来源的衍生自工程化iPSC的胎儿干细胞用作疫苗,以产生针对肿瘤细胞共有的多种胎儿抗原的免疫应答,并且这种应答可能比多能细胞获得的应答更具特异性。他们进一步假设,用与HDACi(例如丙戊酸)联合的胎儿干细胞免疫接种小鼠将增强免疫系统,并能够证明这种诱导的有效免疫和抗肿瘤响应,而没有副作用和自身免疫性疾病的证据。

[0036] 现有技术文献的描述

[0037] WO 2012/122629公开了HDACi与表达下组的抗原的病毒溶瘤疫苗的联合:肿瘤抗原(AFP)、癌胚抗原(CEA)、CA 125、Her2、多巴色素互变异构酶(DCT)、GP100、MART1、MAGE蛋

白、NY-ESO1、HPV E6和HPV E7。HDACi是免疫调节剂,可在病毒抗原(来自病毒或由病毒表达)诱导的初次免疫应答后增加二次免疫应答。

[0038] Bartlett等人(Molecular Cancer 2013,12:103)公开了溶瘤病毒(OV)作为治疗性癌症疫苗。具有OV臂的免疫刺激基因在动物模型和人患者中诱导有效的抗肿瘤免疫力,特别是与暂时抑制先天免疫力的HDAC抑制剂共同施用,从而促进OV的感染和扩散。因此,HDAC抑制剂(HDACi)的作用是通过使载体更有效地传播来增强免疫应答。

[0039] Bridle等人(Molecular Therapy vol.21no.4,887-894apr.2013)公开了HDAC抑制可抑制初次免疫应答,增强二次免疫应答,并在肿瘤免疫疗法期间消除自身免疫。但是,结果是在溶瘤病毒(OV)作为适用于多种恶性肿瘤的治疗剂的背景下获得的,并且仅表明HDACi能够削弱针对溶瘤疫苗载体的初次免疫应答并增强随后的二次应答。

[0040] Wu等人(J Ovarian Res.2015Oct 24;8:68)使用建立的富含干细胞的卵巢癌细胞系作为针对给定癌症的疫苗,无需使用任何佐剂。

[0041] WO 2016/065330公开了包含细胞毒性有效载荷;(ii)野生型或转基因病毒;(iii)野生型或转基因细菌;或(iv)其两种或更多种的联合用于治疗受试者的实体瘤或血液系统恶性肿瘤的用途。其说明书提供了可潜在使用的干细胞列表,但没有这些细胞的实际性质或特征的任何细节。该文件没有描述也没有启示添加HDACi以产生针对癌症的免疫应答。

[0042] WO 2017/027757公开了天花疫苗用于治疗受试者癌症的用途,其中可以向该疫苗添加干细胞。其说明书提供了可使用的干细胞列表,但没有这些细胞的实际性质或特征的任何细节。该文件没有描述也没有启示添加HDACi以产生针对癌症的免疫应答。

[0043] EP 2 599 860公开了一种诱导癌干细胞,其为诱导癌前干细胞或诱导恶性干细胞,其中所述诱导癌干细胞表达六个基因POU5F1、NANOG、SOX2、ZFP42、LIN28和TERT;并且其畸变是(a)内源性肿瘤抑制基因的突变或(b)内源性癌症相关基因的表达增加。鉴于表达的基因,该细胞不是胎儿细胞。特别地,POU5F1和NANOG是未分化和多能性的标志物。

[0044] Zheng等人(Oncol Rep.2017Mar;37(3):1716-1724)比较用肝干细胞(HSC)或胚胎干细胞(ESC)接种疫苗。HSC从成年小鼠的肝脏中分离,因此不是胎儿细胞。此外,该研究未使用其他佐剂,特别是HDACi。

[0045] WO 2017/202949公开了多能细胞与HDACi一起用于治疗癌症的用途。多能细胞不同于胎儿细胞,并且不表达一些在胎儿细胞和癌症中表达的抗原。

[0046] 总之,以上文献均未公开灭活的胎儿细胞群体(潜在突变的)与佐剂(特别是HDACi或刺激MHC-1表达)一起的特定联合作为针对癌症的治疗性或预防性疫苗。

[0047] 胎儿细胞组合物和使用方法

[0048] 本发明使用胎儿细胞群体作为免疫原,并且也与此相关。

[0049] 在本文中,胎儿细胞群体对应于维持为细胞培养物的细胞群体,但也涵盖类器官,其中细胞开始形成器官,并且其中可以观察到细胞的3D空间结构。

[0050] 要提醒的是,分化是由较不特化的细胞形成较特化的细胞的过程。这是一个连续的过程。从多能细胞(胚胎干细胞或iPS)开始,这些细胞将丧失多能性,并参与一种分化方式,其中它将在完全分化的特化细胞中成熟。对于某些器官,在分化过程中,多个细胞将产生类器官。

[0051] 诱导和指导多能细胞的分化是本领域技术人员已知的。可以引用Wu等人

(Cell.2016Jun 16;165(7):1572-1585)、Fatehullah等人(Nat Cell Biol.2016Mar;18(3):246-54)或Sasaki和Clevers(Curr Opin Genet Dev.2018Sep 24;52:117-122),其描述了来自多能细胞的发育或类器官。还有许多其他文章描述和教导了使多能细胞在各种目标组织中分化的方法和条件。

[0052] 胎儿细胞群体的定义

[0053] 胎儿细胞是指已经丧失其多能性的细胞,因为其开始参与分化途径(内胚层、中胚层、外胚层)。

[0054] 可以确定细胞群是否是胎儿细胞群体,因为这些细胞应表达胎儿标志物(见下文)而不表达多能性标志物。

[0055] 根据本发明,群体包含大量细胞(至少 $0.5 \times 10^6$ 个细胞,更优选至少 $1 \times 10^6$ 个细胞,更优选至少 $2 \times 10^6$ 个细胞或 $5 \times 10^6$ 个细胞或大于 $5 \times 10^6$ 个细胞。

[0056] 为了确定细胞群体是否为胎儿细胞群体,必须:

[0057] (a) 确定该群体的细胞基本上不表达多能性基因(或标志物),

[0058] (b) 确定由该群体的细胞表达的胎儿基因(或标志物)的存在。

[0059] 在特定实施方案中,胎儿细胞群体的细胞使得

[0060] (a) 没有细胞或小于10%的细胞表达典型地在未分化的多能自我更新细胞(胚胎干细胞或诱导多能干细胞)中表达的基因。这优选通过流式细胞术,更具体地通过FACS(荧光激活细胞分选)来确定

[0061] 和

[0062] (b) 群体中至少70%,更优选大于75%,更优选大于80%的细胞表达祖细胞/胎儿标志物,而不论群体是否为源自三个种系层或3D类器官组织的定型分化祖细胞的形式。

[0063] 当小于10%的细胞表达成年组织标志物时,这也是优选的。成年组织标志物是在成年细胞中表达的标志物(蛋白质或基因)。

[0064] 上述百分比与群体中表达给定标志物的细胞百分比有关。作为说明,典型地在未分化的多能自我更新细胞中表达的主基因的低表达(<10%)表明群体中小于10%的细胞表达所关注的基因,如下文进一步解释。

[0065] 要提醒的是,表达的标志物在分化过程中发生变化。因此,一些与细胞的胎儿性质有关的标志物在分化过程中早期表达(即在丧失多能性后迅速表达),而某些标志物在分化过程中晚期表达(即在成年细胞成熟之前)。缺乏这些胎儿标志物的表达表明细胞已经丧失其胎儿特性,并可能获得了表型,表明它们已经成熟为分化的成体细胞。

[0066] 为了确定(a)多能性基因不被群体的细胞表达,可以使用基因表达和/或免疫细胞化学评估。目的是表明典型地在未分化的多能自我更新细胞(胚胎干细胞和诱导多能干细胞)中表达的主基因的缺乏或较低表达。

[0067] 特别是,可以:

[0068] a) 使用iPS细胞的群体作为多能性标志物的阳性对照,并且

[0069] b) 比较一组多能性基因在靶标群体和iPS细胞群体中的表达水平。

[0070] 当多能性基因的表达水平低于iPS细胞群体中这些基因的表达水平的10%,更优选地低于5%时,或当少于10%,更优选少于5%的细胞表达基因时,认为靶标群体的细胞不表达多能性基因。可以使用任何定量方法,例如RT-PCR或流式细胞仪,或免疫组织标记。优



选使用细胞的FACS(荧光激活细胞分选)。用这种方法,群体的少于10%的细胞应表达这些多能性基因。

[0071] 多能细胞表达多种标志物。实际上,当细胞丧失其多能性特征时,由于这些多能性标志物的表达是相关的,因此它也将丧失这些标志物的表达。因此,尽管由多能细胞表达的多个基因(多能性基因)是本领域已知的,但是不必研究大量这种基因。

[0072] 更详细地,优选研究选自下组的至少一种多能性基因的表达:NANOG、POU5F1(Oct4)、SSEA4、Tra-1-81和Tra-1-60。

[0073] 在一个实施方案中,可以使用一种细胞内(例如OCT4或Nanog)和一种细胞外(例如SSEA-4或Tra-1-60或Tra-1-81)的联合以改进测量的准确性。

[0074] 但是,也有可能观察这些基因中的三个、四个或甚至五个基因。

[0075] 利用本领域可用的抗体,通过FACS方法可以容易地确定群体中表达这些标志物的细胞的百分比。甚至有可能在多重实验中进行此分析。

[0076] 当研究多个基因时,通过取具有每个标志物的细胞百分比的平均值来确定群体中被认为是多能细胞的百分比。

[0077] 作为示例,如果给定群体中表达基因(1)的细胞百分比为6%,而给定群体中表达基因(2)的细胞百分比为5%,则认为该群体包含5.5%的多能细胞(5%和6%的平均值)并且给定的群体将被视为已通过上述条件(a)。

[0078] 为了确定群体中的细胞表达胎儿基因并满足条件(b),当细胞进入分化途径之一时,有必要检测由细胞表达的基因(标志物、蛋白质或抗原)。

[0079] 神经胎儿细胞:

[0080] 早期神经外胚层祖细胞:TP63、MASH1、Notch1、Sox1、Sox2、Musashi 2、Musashi 1、Nestin、Pax6、MUC18、BMI1、Mash1、FABP7、Nucleostemin

[0081] 造血胎儿细胞:

[0082] 造血中胚层祖细胞:Brachyury(T)、MIXL1、cryptic、GATA1、LMO2、ACE、SCL(Tal1)、HoxA9、Flil

[0083] 肾胎儿细胞:

[0084] 肾中胚层祖细胞:WT1、HOXD11、SIX2、SALL1、WT1、PAX2、OSR1、PAX8、LHX1、GATA3、HOXB7

[0085] 肝胎儿细胞:

[0086] 肝内胚层祖细胞:SOX17、HNF3B、HNF6、Fox-A2、HNF1B、GATA4、AFP、LGR5

[0087] 胰腺胎细胞:

[0088] 胰腺内胚层祖细胞:SOX17、Fox-A2、CXCR4、GATA4、HNF1B、HNF4A、PDX1、HNF6、PROX1、Ngn3、NeuroD1、PAX6、、SYP、SOX9、NKX2-2、NKX6-1、P48、LGR5、HB9

[0089] 肠胎细胞:

[0090] 肠内胚层祖细胞:CDX2、TCF-2、SOX 9、NMYC、ID2、SOX2、PAX8、Nkx2.1、LGR5

[0091] 肺胎细胞:

[0092] 肺内胚层祖细胞:CXCR4、SOX17、FOXA2、NKX2.1、PAX9、TBX1、SOX2 SOX9、ID2、Foxj1、Scgblal、Foxj1

[0093] 甲状腺胎细胞:

[0094] 甲状腺内胚层祖细胞:CXCR4、SOX17、FOXA2、Pax8、HHEX、Nkx2-1

[0095] 其他胎细胞:

[0096] 成肌细胞祖细胞:Pax7、Pax3、Myf5

[0097] 软骨细胞祖细胞:Osteonectin、Sox9

[0098] 成骨细胞祖细胞:Runx2、ALP、Osx、Osteopontin、Osteocalcin。

[0099] 上述基因都是本领域已知的,并且对于每种分化途径和每种组织类器官具有特异性。这些早期或晚期祖细胞中的胎儿基因在成年完全分化的细胞中不表达。如所示,它们的序列可以在广泛使用的公共数据库中找到。

[0100] 因此,这些标志物是早期个体发育的标志物,并且反映了具有这些标志物的细胞不是完全成年的成熟细胞的事实。它们仍然是胎儿发育阶段的祖细胞,这意味着它们仍然可以产生各种类型的成熟细胞。

[0101] 在本发明的上下文中,为了获得胎儿细胞群体,本领域技术人员应根据已知方法在分化途径之一中诱导多能细胞(例如胚胎干细胞或iPS细胞)的分化。

[0102] 通过检查至少90%的细胞中如上所述的标志物的表达丧失将验证多能性的丧失。

[0103] 取决于本领域技术人员选择的分化途径,可以检查细胞群中上述的特定胎儿标志物的存在。

[0104] 为此,本领域技术人员将使用FACS分析来测量表达给定途径的胎儿标志物的细胞百分比,并将通过验证至少70%的细胞表达这些标志物中的至少一种来计算百分比。使用多重FACS分析还可以鉴定表达一种以上标志物的细胞数量。换言之,这表示不表达任何这些标志物的细胞百分比不超过30%。也可以通过FACS分析容易地测定。

[0105] 即使没有细胞分化途径的在先知识,也可以确定细胞群是否是胎儿细胞群体。

[0106] 为了检查细胞群是否为根据本发明的胎儿细胞群体,首先应观察细胞是否表达一种或多种上述多能性标志物(以及在该群体中表达所述标志物的细胞百分比)。如果少于10%的细胞表达上述标志物,则本领域技术人员可以观察细胞群对胎儿标志物的表达。

[0107] 细胞的形态/组织学可以向本领域技术人员提供关于细胞谱系提交的信息,从而可以选择一些标志物用于首次检查。但是,也可以在不预先了解细胞谱系提交的情况下验证细胞的胎儿自然阶段。

[0108] 为此,可以将来自群体细胞的RNA提取、反转录、任选扩增、并应用于包含上述用于胎儿标志物的探针的任何DNA芯片或阵列。尤其可以使用低密度阵列(LDA)。这不仅可以测定胎儿标志物的存在,而且还使这些标志物合格,即可以测定群体细胞的分化途径(取决于被来自细胞群的RNA“打开”的探针)。

[0109] 一旦知道了分化途径,就可以使用该特定细胞谱系分化途径的特定标志物进行FACS分析以量化在群体中表达这些标志物的细胞百分比。

[0110] 胎儿细胞群体的用途

[0111] 长期以来提示,胎抗原可能在肿瘤细胞中表达(Ting et al,Proc Natl Acad Sci USA.1972Jul;69(7):1664-1668)。

[0112] 本发明人现已证明,可以使用本文公开的胎儿细胞群体用于受试者的癌症的预防性或治疗性治疗。发明人假设癌症的发生和发展可能是由于受试者细胞中的突变引起或促进的,所述细胞诱导去分化并使其在分化途径中消退以达到新的“胎儿样”特征,并导致其

增殖。因此,此类细胞表达胎儿标志物,而在成熟且完全分化的成年细胞中不表达。此外,由于这些细胞以高速率分裂,这诱导突变,其产生突变的抗原,也称为新抗原。实际上要注意,肿瘤细胞的胎儿抗原或新抗原通常在癌症之间共享,至少在源自相同分化途径(外胚层、内胚层或中胚层)的器官的癌症之间共享。

[0113] 从外胚层途径,器官是表皮皮肤细胞、神经元、神经胶质细胞、神经嵴、色素细胞。

[0114] 从中胚层途径,器官是心肌、骨骼肌细胞、肾脏(肾小管)、红细胞、平滑肌(肠内)。

[0115] 从内胚层途径,可以引用肺细胞(特别是肺泡)、甲状腺细胞、胰腺细胞、肝细胞。

[0116] 最后,癌细胞的微环境通常对免疫系统有利,因为它将抑制T淋巴细胞的作用。

[0117] 将这些胎儿细胞群体的灭活的细胞,优选与HDACi或增加MHC-1分子表达的化合物一起施用,将可以诱导针对受试者(优选人,但是可以是另一种哺乳动物,例如狗、猫、牛或马)中群体细胞上存在的胎儿抗原的免疫应答,因此对抗肿瘤细胞,从而导致癌症消退。它对于实体瘤和血液肿瘤均有效。

[0118] 实际上,癌细胞可以表达抗原(标志物),例如本文公开和表征的胎群体细胞表达的抗原。

[0119] 因此,胎儿细胞群体(胎群体)可用于引发患者的免疫系统,以使其能够充分和有效地对抗癌症。

[0120] 发明人注意到,在同时使用HDACi(或增加MHC-1表达的试剂)和灭活的胎儿细胞群体时存在协同效应,据信这是由于以下一种或多种原因:

[0121] i) 增加MHC I类在胎细胞和肿瘤细胞上的表达以激活/增强免疫应答(更好地呈现胎抗原和新抗原),

[0122] ii) 通过脱甲基作用增加癌症干细胞(CSC)和肿瘤细胞中的胎儿抗原/新抗原,从而诱导针对这些抗原/新抗原的特异性免疫应答,

[0123] iii) 增加趋化因子表达以将CD4+和/或CD8+、和/或CD8+PD1-T淋巴细胞募集到肿瘤中,这使肿瘤具有免疫反应性,

[0124] iv) 减少在肿瘤微环境中的调节性T淋巴细胞和髓样抑制细胞(MDSC),从而使肿瘤具有免疫反应性。

[0125] 鉴于不同的途径,胎儿细胞群体可用于治疗肺癌、胰腺癌、肾癌、乳腺癌、血液癌、胃肠道癌、甲状腺癌、前列腺癌、脑癌(尤其是成胶质细胞瘤)、胃癌、肝癌、骨癌、卵巢癌。应当选择与待治疗癌症参与相同细胞分化谱系的胎儿细胞群体。

[0126] 使用这种胎儿细胞群体使得可以递送在给定癌症中表达或在不同癌症中共同的至少10,更通常至少50,或至少100、500或甚至1000个胎抗原或新抗原。

[0127] 胎细胞可含有易患家族性癌症的突变,这些突变表达由该突变去调节的胎基因(BRCA、cMET、RET、APC等),并在谱系癌症中共享,例如,由包含c-Met突变的血细胞获得的iPS细胞可衍生为包含肾癌中存在的c-Met突变的肾脏类器官。

[0128] 在制备胎细胞组合物时使用诱变剂(见下文)应在群体细胞基因中引入突变(例如错义或移码突变),从而表达新抗原。

[0129] 特别地,本发明人已经表明,获自慢性髓性白血病(CML)、经ENU突变并衍生于造血胎细胞的iPS细胞包含存在于急性髓性白血病(AML)中的抗原。

[0130] 为了治疗患者,可以

- [0131] i) 从此类癌症的活检中获得受试者癌症的抗原特异性特征,
- [0132] ii) 选择灭活的胎儿细胞群体,这些细胞群含有表达步骤i)中测定的至少一种抗原的细胞,
- [0133] iii) 将该群与HDACi或增加MHC-1表达的试剂一起向患者施用。
- [0134] 使用本领域中可用的工具,通过本领域已知的方法进行步骤i)。
- [0135] 所述特征尤其通过以下获得:
- [0136] -测定在癌细胞中表达的基因(外显子组测序),
- [0137] -将基因与癌症特异性基因的数据库比较(尤其可以引用COSMIC数据库(英国Sanger研究所开发的癌症体细胞突变目录)或癌基因组图谱(TCGA,由美国NCBI维护)。这些数据库重新组合了编码癌细胞中表达的抗原的各种序列,
- [0138] -选择存在于外显子组和数据库两者中的基因作为癌症的抗原特异性特征。
- [0139] 步骤ii)是通过进行胎儿细胞群体的外显子组并验证从胎儿细胞群体获得的外显子组中是否存在癌症的抗原特异性特征的至少一种基因来进行。
- [0140] 在另一实施例中,可以
- [0141] i) 从此类癌症的活检中获得受试者癌症的抗原特异性特征,
- [0142] ii) 选择灭活的胎儿细胞群体,这些细胞包含通常表达步骤i)中测定的至少一种抗原的细胞,
- [0143] iii) 将该群的提取物与HDACi或增加MHC-1表达的试剂一起向患者施用。
- [0144] 在该实施方案中,提取物选自总RNA、mRNA、DNA、蛋白质提取物、裂解物、冻干提取物、冻干或干燥细胞、外泌体、细胞外微泡和凋亡小体。
- [0145] 在另一实施例中,可以
- [0146] i) 从此类癌症的活检中获得受试者癌症的抗原特异性特征,
- [0147] ii) 选择灭活的胎儿细胞群体,这些细胞包含通常表达步骤i)中测定的至少一种抗原的细胞,
- [0148] iii) 在HDACi或增加MHC-1表达的试剂存在下,向患者施用已经用ii)的群体或这种群的提取物体外引发的T细胞或抗原呈递细胞群。
- [0149] 在一个具体的实施方案中,通过以下获得所述群:
- [0150] a. 多能细胞群向与患者特定癌症有关的途径分化,其中多能细胞任选已经在诱变剂存在下扩增,
- [0151] b. 扩增如此分化的细胞,
- [0152] c. 任选地在扩增期间暴露于诱变剂,以诱导所述群体的细胞中的基因诱变,
- [0153] d. 验证至少70%的群体细胞表达胎儿标志物,
- [0154] e. 任选验证群体细胞是否表达存在于受试者癌细胞中的至少一种癌症或新抗原,
- [0155] f. 灭活所述细胞,以使细胞丧失其分裂能力。
- [0156] 使用根据本发明的胎儿细胞群体是特别令人感兴趣的。实际上,这些细胞包含易被癌细胞表达的多种胎抗原。
- [0157] 本发明还涉及开发和产生旨在用于治疗患者癌症的细胞群的方法。
- [0158] 该方法包括以下步骤:
- [0159] a) 可选地对癌症进行活检,

[0160] b) 分析从患者的癌症活检回收的细胞以鉴定癌细胞表达的胎儿标志物和癌症标志物,

[0161] c) 通过与患者特定癌症有关的途径分化多能细胞群(例如,如果患者患有肾癌,则将诱导肾脏途径的分化),

[0162] d) 任选地在分化的细胞群中引入突变:该步骤是任选的,但优选进行。其旨在增加由群体细胞表达的抗原的多样性,以改进一旦暴露于细胞免疫系统控制癌细胞的能力,即使存在其细胞突变。突变率可以通过检查细胞群体的一个或多个基因的序列来控制。可以鉴定群体中给定基因的突变序列的存在并量化,例如与群体中的基因序列进行比较。例如,给定基因的0.1%的突变率表明在该群体中针对该基因鉴定的序列的0.1%表现出突变,

[0163] e) 任选验证所述群体的细胞表达存在于所述受试者的癌细胞中至少一种癌症或新抗原,

[0164] f) 灭活所述细胞,以使细胞丧失其分裂能力。这是为了避免在向患者施用全部或部分细胞群后体内细胞的增殖。

[0165] 一旦获得细胞群,可以优选在HDACi或刺激MHC-1表达的化合物存在下将其全部或部分施用于动物(优选哺乳动物,更优选人)。如上所述,在所有方法中,可以施用灭活的胎儿细胞群体或其提取物,或用该群或其提取物引发的T淋巴细胞或抗原呈递细胞。

[0166] 在一个具体的实施方案中,步骤c)的多能细胞是已经从患者细胞发育而来的iPS细胞(诱导的多能干细胞)。当向患者施用胎细胞时,这可以降低交叉免疫的风险。实际上,非胎抗原不应被免疫系统识别,而胎抗原(存在于群体细胞和癌细胞上)则应被识别。

[0167] 或者,本发明涉及一种治疗患者的方法,包括以下步骤:

[0168] a) 可选地对癌症进行活检,

[0169] b) 分析从患者的癌症活检回收的细胞以鉴定癌细胞表达的胎儿标志物和癌症标志物,

[0170] c) 选择参与与患者特定癌症有关的分化途径的灭活和任选诱变的胎儿细胞群体,

[0171] d) 向患者施用细胞、HDACi或刺激或增加MHC-1表达的化合物。

[0172] 在具体的实施方案中,胎细胞参与肺分化途径。因此,它们将表达上述用于肺的标志物。这些细胞特别适合于治疗肺癌。

[0173] 在具体的实施方案中,胎细胞参与甲状腺分化途径。因此,它们将表达上述用于甲状腺的标志物。这些细胞特别适合于治疗甲状腺癌。

[0174] 在具体的实施方案中,胎细胞参与肾脏分化途径。因此,它们将表达上述用于肾脏的标志物。这些细胞特别适合于治疗肾癌。

[0175] 在具体的实施方案中,胎细胞参与造血分化途径。因此,它们将表达上述用于造血细胞的标志物。这些细胞特别适合于治疗血癌(白血病)。

[0176] 在具体的实施方案中,胎细胞参与肠分化途径。因此,它们将表达上述用于肠的标志物。这些细胞特别适合于治疗胃肠癌。

[0177] 在具体的实施方案中,胎细胞参与胰腺分化途径。因此,它们将表达上述用于胰腺的标志物。这些细胞特别适合于治疗胰腺癌。

[0178] 在具体的实施方案中,胎细胞参与神经分化途径。因此,它们将表达上述用于神经元或脑的标志物。这些细胞特别适于治疗脑癌(特别是成胶质细胞瘤)。

[0179] 在具体的实施方案中,胎细胞参与骨分化途径。因此,它们将表达上述用于骨的标志物。这些细胞特别适合于治疗骨癌。

[0180] 用于改进免疫应答的HDACi

[0181] 第一方面,本发明涉及增强受试者中疫苗组合物的功效的方法,包括向受试者施用HDACi和所述疫苗组合物。特别地,在疫苗组合物中加入HDACi。

[0182] 本发明还涉及(i)组蛋白脱乙酰基酶抑制剂(HDACi)和(ii)包含用于治疗受试者癌症的免疫原性成分的疫苗组合物的组合。根据一些实施方案,本发明涉及(i)组蛋白脱乙酰基酶抑制剂(HDACi)和(ii)包含免疫原性成分的疫苗组合物的组合,其通过同时、分别或顺次施用而用于治疗受试者的癌症。

[0183] 本发明还涉及(i)组蛋白脱乙酰基酶抑制剂(HDACi)和(ii)包含免疫原性成分的疫苗的组合在制备用于治疗受试者癌症的药物组合物中的用途。根据一些实施方案,本发明涉及(i)组蛋白脱乙酰基酶抑制剂(HDACi)和(ii)包含免疫原性成分的疫苗的组合用于同时、分别或顺次施用而用于制备治疗受试者的癌症的药物组合物的用途。

[0184] 如本文所使用,术语“增加的功效”是指疫苗组合物的免疫原性增强,针对疫苗组合物的免疫应答增强或由免疫组合物产生的免疫应答增强。这可以与不存在HDACi时产生的免疫应答进行比较。

[0185] 疫苗组合物包括旨在使受试者产生针对一个或多个目标抗原的免疫应答的免疫原性元件。目标抗原是期望免疫应答的任何抗原,包括来自自身的(例如来自癌细胞的抗原)或外源的任何肽、蛋白质,例如细菌、病毒或寄生虫蛋白,其他种类的抗原,例如核酸、糖、脂多糖等。

[0186] 因此,本发明涉及HDACi作为佐剂,特别是用于增强针对疫苗组合物的免疫应答的用途,并且涉及其用作佐剂,或用于增强针对疫苗组合物的免疫应答的HDACi。本发明还涉及HDACi在制备含有一种或多种目标抗原的疫苗组合物中的用途,所述疫苗组合物旨在使受试者产生针对目标抗原的免疫应答。

[0187] 当疫苗组合物是癌症疫苗组合物,即含有由癌细胞表达的目标抗原时,本文公开的方法和用途特别令人感兴趣。特别地,该方法和用途非常适用于具有特别免疫抑制性肿瘤微环境的肿瘤(即,存在细胞因子和分子信号的表达,以及免疫耐受细胞的募集,免疫细胞对癌抗原的效力降低)。不受这一理论束缚,假定HDACi的存在将改变肿瘤微环境并允许免疫细胞增强以对抗癌细胞,可能是通过改变在肿瘤内、肿瘤附近或肿瘤周围的细胞中具有免疫抑制作用的基因的表达。

[0188] 本文所述的方法还包括在施用疫苗组合物后几天施用HDACi的步骤。HDACi的这种连续施用可用于将微环境变化维持足够长的时间以使免疫细胞能够“接管”肿瘤。通常,HDACi的这种进一步连续施用在于在施用疫苗后至少三天,并且长达一个月,每天施用足够剂量的HDACi。然而,优选进一步施用HDACi至少一周,更优选至少或约两周。

[0189] 疫苗组合物包含旨在使患者产生针对一个或多个目标抗原的免疫应答的免疫原性成分(在本文中也称为免疫原性化合物)。

[0190] 所述免疫原性元件可以是抗原(或多个抗原)。如上所述,取决于靶细胞(其意欲包括宿主细胞,以及细菌细胞、寄生病原体或病毒颗粒),该抗原可以是任何形式。它也可以与本领域已知的任何佐剂(免疫刺激剂),例如明矾或弗氏完全或不完全佐剂一起配制。

[0191] 在另一个实施方案中,免疫原性化合物是来自细胞组合物的提取物,其中所述组合物的细胞表达目标抗原。细胞提取物可以是已经离心以除去不溶物例如膜片段、囊泡和细胞核的裂解细胞,因此主要由细胞溶质组成。在另一个实施方案中,提取物可以使用特定技术制备以耗尽或富集特定组分(例如,超声处理可用于将大的膜片段破碎成保留在提取物中的小颗粒,或高速离心以除去最小的不溶性组分)。通过任何化学或机械作用,例如通过压力、蒸馏、蒸发等获得细胞提取物。

[0192] 在另一个实施方案中,免疫原性成分是细胞组合物,其中所述组合物的细胞表达目标抗原。在特定的实施方案中,保留细胞膜(以便通过MHC-I途径呈递抗原)。在特定的实施方案中,如下所述,优选细胞是灭活的。

[0193] 在在特定的实施方案中,细胞是胎儿干细胞,如下所述,癌症干细胞、病毒感染的细胞或细菌细胞。

[0194] 在另一个实施方案中,免疫原性元件是包含已经通过目标抗原在体外引发(prime)的抗原呈递细胞(APC)的细胞组合物。该组合物是抗原呈递细胞疫苗,由抗原和抗原呈递细胞(APC)制成。抗原呈递细胞是在其表面上显示与主要组织相容性复合物(MHC)复合的抗原的细胞。在本发明的上下文中,可以引用优选的树突细胞(DC),因为它们能够将抗原呈递给辅助细胞和细胞毒性T细胞、巨噬细胞或B细胞。这些APC可以是天然细胞或工程化细胞。特别地,可以引用Eggermont等(*Trends in Biotechnology*, 2014, 32, 9, 456-465),其综述了开发人工抗原呈递细胞的进展。使用APC开发抗癌疫苗的方法是本领域已经广泛提出的,并且是本领域技术人员已知的。

[0195] 在另一个实施方案中,免疫原性元件实际上不含抗原,而是由在体外针对目标抗原引发(例如通过暴露于呈递目标抗原的抗原呈递细胞)的T细胞淋巴细胞的组合物组成。因此,该组合物能够在体内针对目标抗原产生免疫应答。这种策略可以称为“T细胞的过继转移”,并且已知这种过继转移的T细胞在体内持续存在很长一段时间并且容易在淋巴和血管隔室之间迁移(Bear等,*J Biomed Biotechnol.* 2011; 2011:417403; Melief等,*J Clin Invest.* 2015; 125 (9) :3401-3412)。

[0196] 在一些实施方案中,HDACi与含有免疫原性元件的疫苗组合物联合施用。所述施用可以是同时、分别或顺次进行,如以下免疫原性元件是胎儿干细胞组合物的实施方案所公开。应注意,对于胎儿干细胞组合物公开的以下所有描述同样适用于如上所述的包含任何免疫原性元件的疫苗。

[0197] 本说明书强调HDAC抑制剂(特别是丙戊酸),以及胎儿干细胞组合物,因为这种胎儿干细胞表达在非常侵袭性的癌症中同样存在的新抗原,如上所述。因此,无论免疫原性成分如何,优选目标抗原是由癌细胞表达的新抗原,如上文以及下文所述。

[0198] 在特定的实施方案中,免疫原性成分是细胞组合物,其中胎细胞组合物获自多能干细胞和胎细胞灭活,如下面进一步详细公开。

[0199] 如本文所用,术语“免疫原性成分”是指刺激免疫系统的化合物。在本发明的上下文中,免疫原性成分选自:

[0200] a. 目标抗原

[0201] b. 胎儿干细胞组合物,

[0202] b. 细胞组合物的提取物,其中所述组合物的细胞表达目标抗原,

[0203] c. 细胞组合物, 其中所述组合物的细胞表达目标抗原,

[0204] d. 包含已通过目标抗原体外引发的抗原提呈细胞的细胞组合物, 或

[0205] e. 通过暴露于呈递目标抗原的抗原呈递细胞已针对目标抗原体外引发的T细胞淋巴细胞。

[0206] 在特定的实施方案中, 免疫原性成分是细胞组合物, 其中细胞组合物已经通过多能干细胞 (ESC和iPSC) 的体外分化获得。更特别地, 免疫原性成分是通过分化从ESC和iPSC获得的胎儿干细胞群。

[0207] 根据本发明的方法, 其中所述治疗是治疗性治疗。

[0208] 根据本发明的方法, 其中所述治疗是预防性治疗。

[0209] 用组合制剂治疗患有癌症的受试者的方法

[0210] 第二方面, 本发明涉及治疗患有癌症的受试者的方法, 包括向所述受试者同时、分别或顺次施用治疗量的作为组合制剂的 i) 胎儿干细胞群和 ii) 选自激活MHC表达和/或免疫应答的化合物的步骤。

[0211] 在特定的实施方案中, 培养细胞以便通过MHC I途径呈递新抗原, 特别是群体中的一些细胞被突变。与胎细胞联合使用的化合物不保持多能干细胞的多能性。在特定的实施方案中, 在施用胎细胞之后, 施用激活MHC表达和/或免疫应答的化合物 (优选与最初联合施用的化合物相同, 但可能是另一种) 以增强免疫应答。

[0212] 如本文所用, 术语“治疗”是指预防或预防性治疗以及治愈性或疾病改变性治疗, 包括治疗具有高度患癌症 (例如遗传性家族癌症综合征) 风险的受试者, 或怀疑患有癌症的受试者以及生病或已经被诊断患有癌症或医学病症的受试者, 且包括抑制临床复发。可以向患有癌症或最终可能患有癌症的受试者施用治疗, 以预防、治愈、延迟癌症或复发性癌症的一种或多种症状的发作、降低癌症或复发性癌症的一种或多种症状的严重性或改善癌症或复发性癌症的一种或多种症状, 或者为了使受试者的存活期延长超过在没有这种治疗的情况下预期的存活期。“治疗方案”是指疾病的治疗模式, 例如治疗期间使用的剂量模式。治疗方案可包括诱导方案和维持方案。短语“诱导方案”或“诱导期”是指用于疾病初始治疗的治疗方案 (或治疗方案的一部分)。诱导方案的一般目标是在治疗方案的初始阶段向受试者提供高水平的药物。诱导方案可以 (部分或全部) 采用“加载方案”, 其可以包括施用比医生在维持方案期间使用的更大剂量的药物, 比医生在维持治疗期间更频繁地施用药物, 或两者。短语“维持方案”或“维持期”是指用于在治疗疾病期间维持受试者, 例如使受试者长期 (数月或数年) 保持缓解的治疗方案 (或治疗方案的一部分)。维持方案可以采用持续治疗 (例如以规律的间隔 (例如每周、每月、每年等) 施用药物) 或间歇治疗 (例如中断治疗、间歇治疗、复发治疗或实现特定的预定标准 (例如疼痛、疾病表现等) 时的治疗)。

[0213] 如本文所用, 术语“同时施用”是指通过相同途径并同时或基本上同时施用2种活性成分。术语“分别施用”是指同时或基本上同时通过不同途径施用2种活性成分。术语“顺次施用”是指在不同时间施用2种活性成分, 施用途径相同或不同。

[0214] 如本文所用, 术语“受试者”是指任何哺乳动物, 例如啮齿动物、猫科动物、犬科动物以及非人类和人类灵长类动物。特别地, 在本发明中, 受试者是患有或易患有具有癌症的人, 所述癌症表达胎样干细胞抗原。

[0215] 如本文所用, 术语“群体”是指细胞群, 其中细胞总数的大多数 (例如至少约20%、



优选至少约50%、更优选至少约70%、甚至更优选至少约80%，甚至更优选至少约90%) 具有目标细胞的特定特征(例如,胎儿干细胞标志物)。

[0216] 如本文所用,术语“胎儿干细胞群”是指胎儿细胞群体,其是在发育早期出现的瞬时祖细胞。可以通过异源、异种或同基因多能干细胞(ESC和iPSC)的分化在体外繁殖这种群体。胎群体细胞的特征是与多能性有关的基因丧失,其中以下基因丧失至少20%: NACC1, BLM, WDR33, DAZAP1, CDK1, CDC45, ZNF165, XRCC5, SMARCAD1, AIMP2, CKS1B, NANOG, ZFP42, U2AF1, CCNB2, DCTPP1, TGIF1, SUPT3H, AURKB, GEMIN7, SRSF1, PNP, SIGLEC12, POU5F1, PSMA3, RMND5B, GDF9, STXBP2, BAG6, GMPS, PCNA, NME1, POP7, RCHY1, SMARCC1, HNRNPK, PTMA, NPM1, SNRPA, MYBBP1A, CDT1, HSPD1, TRIM28, PHF10, GRB7, HSPE1, DAXX, FAM136A, KPNA2, FUS, PNN, RFC3, HPRT1, PA2G4, SNRPE, RBPMS, PRMT5, PIAS2, BYSL, POLD2, LSM5, TDGF1, NOP56, EPPK1, TARBP2, MRE11A, CDC7, SRSF3, TNNT3, NUDT1, DIAPH1, PPID, CDA, GADD45A, MCM6, SNURF, CDC25C, TNFRSF8, STIP1, ACTA1, POLR1D, TUBA3C, RPA1, VAMP8, UNC119, COIL, BIK, PARP1, SP1, CHEK2, NLE1, RPA2, HDAC1, KPNB1, LSM7, TMSB4Y, HMGA1, POLR1C, LSM1, EXO1, MCM5, ITGB3BP, LSM6, UNG, PSMA6, CCNE1, SMNDC1, SET, FKBP3, TK1, CTBP2, POLQ, PLSCR1, GMNN, RND1, NUP153, PHGDH, SNRPB, HSPA14, HSPH1, TCOF1, ANP32A, PELP1, MBD2, HIST1H2BC, TMP0, SPAG5, DNMT3B, LCK, ARMC6, COPS6, MCM3, PPAP2C, LSM4, NME1-NME2, EWSR1, POLG2, BCL2, NFKBIB, SALL4, PXN, EXOSC8, HSPA2, HMGB1, RUVBL1, GOT2, PPM1B, ATIC, DHCR24, APEX1, RFC2, WDYHV1, NTHL1, EXOSC7, SNRPD1, DPPA2, MRPS12, FBL, POLD1, MCM10, EXOSC3, NOP58, TPX2, PAK3, HNRNPAB, ANXA2, BUB1B, SEPHS1, WDR77, LUC7L3, VASP, MCM4, PAK1, PMAIP1, PBX1, NOLC1, PCYT1B, NCL, ORC6, GPRIN2, ORC1, RAD51, HSPA8, ANXA3, NUP50, SNRPC, HAUS1, MATK, BIRC5, MYC, GEMIN6, PSIP1, DSCC1, STRBP, SMN1, EXOSC9, TOE1, GEMIN2, TRIP13, ORC2, MSH3, MNAT1, KIT, RFC5, FOXO4, AATF, RBM14, ZNF281, NPPB, RPA3, APOE, PFDN6, COPS3, CCND1, CXADR, MCM2, ANAPC1, SUMO1, SSB, HSP90AB1, TRAIP, PHC1, LRIF1, LSM3, SNRPN, RPP40, MSH2, FBP1, PFN1, OTX2, STX3, STXBP3, GTF2H2, ELAC2, TCERG1, ERCC5, PASK, ZNF593, PSME3, WRN, ARID3B, ERBB3, POP1, KAT7, PTPN6, SYNCRIP, SIRT1, SLC19A1, ARL4A, CEBPZ, MSH6, AURKA, BAK1, MTHFD1, HSPA9, MYBL2, POP5, RFC4, CHEK1, BCCIP, SOCS1, PHB, PMF1, MPP6, NOC2L, HDAC2, CENPE, RECQL4, CASP6, GNL3, SRSF2, BRX1, MYB, RNMTL1, DHFR, FEN1, SNRPF, MUTYH, PRNP, MT1G, PSMD11, GAR1, DDX11, FUBP1, CDK7, WRAP73, CASP9, RASL11B, CHAF1A, CCNB1, CKS2, CCNA2, PPA1, WEE1, TP53, HMMR, TDP2, RAD9A或RAD54L。特别地,胎儿干细胞的特征还在于不存在成年分化细胞的谱系特异性基因的表达。

[0217] 在特定的实施方案中,可以通过去分化程序或通过使用小分子的转分化技术和/或通过特异性转录因子的过表达来直接转化成年体细胞来获得胎儿干细胞群。这些称为“诱导的胎群体细胞”的特征在于胎基因的获取和成年细胞谱系特异性基因的丧失。所有胎群体细胞均来自三个胚层,分别是外胚层、内胚层和中胚层祖细胞。这些胎基因由以下表示:

[0218] 1) 在至少通过SOX17, CXCR4, FOXA1, FOXA2, FOXA3, HHEX, GATA4, GATA6, HNF1B, HNF4A, TF, ALB, TBX3, AFP, TTR, CER1, MIXL1, LHX1, GSC, PAX9, NEPN, SHH, PYY, MNX1, KITL, CLDN4, CLDN8, GFPT2, KRT19, SORCS2, EPPK1, NEDD9, PLAT, VTN, PDX1, TMPRSS4, CLIC6, RIPK4, CLDN8, ST1A表示内胚层祖细胞中;

[0219] 2) 在至少通过PCGF4, PAX6, PAX7, CXCR4, SOX1, SOX2, SOX10, ITGB1, FABP7, NES, FUT4, PROM1, MELK, MSI1, MAP2, DCX, NCAM1, TUBB3, SLC1A3, CD44, S100B, VIM, GFAP, CNP, OLIG2, CA2, CSPG4, TAZ, MSX1, SPARC, ID2, NES, NKX2.2, NKX6-1, FOXP2, FOXD3, ZIC1表示的外胚层祖细胞中;和

[0220] 3) 在至少通过Brackury (T), MIXL1, SNAI1, SNAI2, HLX, EOMES, MESP1, MESP2, TBX6, MEST, NKX2-5, KDR表示中胚层祖细胞中。

[0221] 通常,胎群体细胞表达在成年阶段不表达的胎发育基因。这些胎基因与特定的胎细胞谱系或分化的组织(例如3D类器官结构或拟胚体或球体或细胞聚集体)连锁。这些胎细胞可以是:神经干细胞、神经元、肝样细胞、成肝细胞、肾元肾祖细胞、胰腺内胚层祖细胞、胆管细胞、造血祖细胞、成血管细胞、间充质干细胞、内皮细胞、心肌细胞、神经嵴祖细胞、乳腺上皮细胞、肠或结肠类器官、肺类器官、肾类器官、脑类器官。

[0222] 如本文所用,术语“多能性”是指细胞具有产生后代的能力,所述后代在适当条件下可以从三个胚层(内胚层,中胚层和外胚层)衍生分化为具有特定细胞谱系特征的所有细胞类型。术语“多能性”包括正常胚胎干细胞(ESC)、或非常小的胚胎样干细胞(VSEL)或从所有来源和细胞来源的成体体细胞(ASC)重编程的工程诱导的多能干细胞(iPSC)。

[0223] 多能干细胞贡献了产前、出生后或成年生物的组织的功能发育。使用标准的本领域公认测试来建立细胞群的多能性,例如在8-12周龄SCID小鼠中形成畸胎瘤的能力,以及各种多能干细胞特征。更具体地,人多能干细胞表达来自以下非限制性列表的至少一些(至少三个、更通常至少四个或五个)和任选地所有标志物:SSEA-3、SSEA-4、TRA-1-60、TRA-1-81、TRA-2-49/6E、碱性磷酸酶(ALP)、Sox2、E-钙粘蛋白、UTF-1、Oct4、Lin28、Rex1、Nanog、TERC、TERT。

[0224] 多能干细胞一般起源于胚胎发育的胚泡阶段,并且可能除了胎盘外,还能够发育成所有类型的胎儿和成体细胞。胚胎多能干细胞(ESC)通常可以从50-150个细胞的4-5天龄的受精后胚泡中分离。虽然ESC能够无限期离体增殖,它们在胚胎发生期间仅在体内瞬时存在。各种动物(包括人)ESC系,例如NIH批准的细胞系WA09人ESC可以从WiCell Research Institute, Madison, Wis商购获得。人ESC系,例如Cecol-14,可以从例如Cecolfes, Bogota, Colombia商购获得。当然,如果需要,可以使用其他胚胎干细胞系。

[0225] 如本文所用,术语“胚胎干细胞”是指人的多能细胞(即hESC)。hESC从胚泡前期的胚胎中分离。在另一个实施方案中,通过将至少部分分化的细胞(例如多能细胞)去分化来制备hES细胞,它们在实践中具有全能性。制备hESC的方法是众所周知的,并且教导于例如美国专利号5,843,780、6,200,806、7,029,913、5,453,357、5,690,926、6,642,048、6,800,480、5,166,065、6,090,622、6,562,619、6,921,632和5,914,268、美国公开申请号2005/0176707、国际申请号W02001085917。在本发明的上下文中,根据Chung等2008中描述的技术,在不破坏胚胎的情况下产生人胚胎干细胞(hESC)。

[0226] 在特定的实施方案中,通过体外方法,例如通过分化多能干细胞例如ESC和iPSC来获得根据本发明的胎群体细胞。如本文所用,术语“诱导的多能干细胞”是指使用本领域已知的并且最初由Yamanaka公开的方法(特别是W02012/060473、PCT/JP2006/324881、PCT/JP02/05350、US 9,499,797、US 9,637,732、US 8,158,766、US 8,129,187、US 8,058,065、US 8,278,104),通过重编程程序从非多能细胞人工衍生的多能干细胞。简言之,通过确定

因子(例如Oct4、Sox2、Klf4和c-My,或Oct4、Sox2、Lin28和Nanog)的异位表达将体细胞重编程为诱导的多能干细胞(iPSC)。在一个具体的实施方案中,诱导的多能干细胞衍生自哺乳动物,特别是(但不限于)啮齿动物、猪、猫、狗和非人灵长类动物,和人。

[0227] 已经从各种来源的正常体细胞(成纤维细胞、血细胞、角质形成细胞.....)以及各种疾病(例如,体细胞或遗传性癌症(白血病、胶质母细胞瘤、黑素瘤、乳腺癌.....)和遗传性疾病成功地制备了iPSC。细胞重编程可以通过在含或不含小化合物的情况下使用各种技术(如整合的慢病毒/逆转录病毒和非整合的载体,如仙台病毒、游离载体、合成mRNA、腺病毒、rAAV、重组蛋白质.....)来进行。通过充当表观遗传修饰物(即,修饰一些基因的表达),小分子可用于增强小鼠和人iPSC的诱导和质量。

[0228] 举例来说,可以引用BIX01294(BIX,G9a组蛋白甲基转移酶抑制剂)、丁酸钠(NaB,组蛋白脱乙酰基酶HDAC抑制剂)或S-腺苷酸同型半胱氨酸(SAH,DNA去甲基化剂)、5-氮杂胞苷(5-AZA,DNA甲基转移酶抑制剂)、丙戊酸(VPA,另一种组蛋白脱乙酰基酶抑制剂)也改进了正常iPSC的重编程和质量。完全重编程的真正的iPSC表达与具有自我更新能力的胚胎干细胞相似的多能基因并且代表无限的干细胞(或干细胞样)资源。ESC和IPSC可以在多个和无限(illimited)的传代中反复扩增,从而允许可扩大的干细胞来源。通过保持多能性基因的高水平表达,在容许培养条件下积极维持多能性潜力。这些方法在本领域中是已知的。然而,已经描述了允许复制稳定的基因组(但具有一些外显子组突变和表观基因组修饰)的特定培养条件和方法(Gore A and al.Nature 2011)。

[0229] 如本文所用,术语“体细胞”是指除生殖细胞(精子和卵子)外的任何机体细胞。如本文所用,术语“同种异体细胞”是指来自相同物种但在遗传上不同的细胞。如本文所用,术语“同基因或自体细胞”是指来自相同物种且具有相同遗传背景的细胞。如本文所用,术语“异种细胞”是指来自不同物种并且遗传上不同的细胞。在一个具体实施方案中,干细胞可以源自哺乳动物,但不限于啮齿动物、猪、猫、狗和灵长类动物,包括人。

#### [0230] 制备胎儿干细胞组合物的方法

[0231] 第三方面,本发明涉及用于制备胎儿干细胞组合物的方法,包括以下步骤:

[0232] i) 在多能干细胞分化后,在诱导所述群体中的MHC-I抗原呈递的试剂存在下,胎儿干细胞,

[0233] ii) 将胎儿干细胞暴露于将使细胞灭活的灭活剂,

[0234] iii) 回收并调节分化的灭活的胎儿干细胞。

[0235] 在一个具体的实施方案中,在步骤ii)中保持胎儿干细胞被膜的完整性。在另一个实施方案中,将胎儿干细胞灭活并获得细胞衍生产物,例如细胞提取物。根据本发明所公开的方法,根据上述方法产生的细胞组合物可用于癌症治疗。

#### [0236] 制备胎儿干细胞

[0237] 通过经典方法(例如在2D或3D培养系统中使用小分子、形态发生和生长因子定义培养条件),从诱导分化后的多能干细胞获得胎儿干细胞或胎类器官。胎儿干细胞或类器官丧失多能性标志物。通常,胎儿干细胞或类器官耗尽至少20%的以下具有多能性的基因: NACC1、BLM、WDR33、DAZAP1、CDK1、CDC45、ZNF165、XRCC5、SMARCA1、AIMP2、CKS1B、NANOG、ZFP42、U2AF1、CCNB2、DCTPP1、TGIF1、SUPT3H、AURKB、GEMIN7、SRSF1、PNP、SIGLEC12、POU5F1、PSMA3、RMND5B、GDF9、STXBP2、BAG6、GMPS、PCNA、NME1、POP7、RCHY1、SMARCC1、HNRNPK、PTMA、

NPM1、SNRPA、MYBBP1A、CDT1、HSPD1、TRIM28、PHF10、GRB7、HSPE1、DAXX、FAM136A、KPNA2、FUS、PNN、RFC3、HPRT1、PA2G4、SNRPE、RBPMS、PRMT5、PIAS2、BYSL、POLD2、LSM5、TDGF1、NOP56、EPPK1、TARBP2、MRE11A、CDC7、SRSF3、TNNT3、NUDT1、DIAPH1、PPID、CDA、GADD45A、MCM6、SNURF、CDC25C、TNFRSF8、STIP1、ACTA1、POLR1D、TUBA3C、RPA1、VAMP8、UNC119、COIL、BIK、PARP1、SP1、CHEK2、NLE1、RPA2、HDAC1、KPNB1、LSM7、TMSB4Y、HMGA1、POLR1C、LSM1、EXO1、MCM5、ITGB3BP、LSM6、UNG、PSMA6、CCNE1、SMNDC1、SET、FKBP3、TK1、CTBP2、POLQ、PLSCR1、GMNN、RND1、NUP153、PHGDH、SNRPB、HSPA14、HSPH1、TCOF1、ANP32A、PELP1、MBD2、HIST1H2BC、TMP0、SPAG5、DNMT3B、LCK、ARMC6、COPS6、MCM3、PPAP2C、LSM4、NME1-NME2、EWSR1、POLG2、BCL2、NFKBIB、SALL4、PXN、EXOSC8、HSPA2、HMGB1、RUVBL1、GOT2、PPM1B、ATIC、DHCR24、APEX1、RFC2、WDYHV1、NTHL1、EXOSC7、SNRPD1、DPPA2、MRPS12、FBL、POLD1、MCM10、EXOSC3、NOP58、TPX2、PAK3、HNRNPAB、ANXA2、BUB1B、SEPHS1、WDR77、LUC7L3、VASP、MCM4、PAK1、PMAIP1、PBX1、NOLC1、PCYT1B、NCL、ORC6、GPRIN2、ORC1、RAD51、HSPA8、ANXA3、NUP50、SNRPC、HAUS1、MATK、BIRC5、MYC、GEMIN6、PSIP1、DSCC1、STRBP、SMN1、EXOSC9、TOE1、GEMIN2、TRIP13、ORC2、MSH3、MNAT1、KIT、RFC5、FOXO4、AATF、RBM14、ZNF281、NPPB、RPA3、APOE、PFDN6、COPS3、CCND1、CXADR、MCM2、ANAPC1、SUMO1、SSB、HSP90AB1、TRAIP、PHC1、LRIF1、LSM3、SNRPN、RPP40、MSH2、FBP1、PFN1、OTX2、STX3、STXBP3、GTF2H2、ELAC2、TCERG1、ERCC5、PASK、ZNF593、PSME3、WRN、ARID3B、ERBB3、POP1、KAT7、PTPN6、SYNCRIP、SIRT1、SLC19A1、ARL4A、CEBPZ、MSH6、AURKA、BAK1、MTHFD1、HSPA9、MYBL2、POP5、RFC4、CHEK1、BCCIP、SOCS1、PHB、PMF1、MPP6、NOC2L、HDAC2、CENPE、RECQL4、CASP6、GNL3、SRSF2、BRIX1、MYB、RNMTL1、DHFR、FEN1、SNRPF、MUTYH、PRNP、MT1G、PSMD11、GAR1、DDX11、FUBP1、CDK7、WRAP73、CASP9、RASL11B、CHAF1A、CCNB1、CKS2、CCNA2、PPAN、WEE1、TP53、HMMR、TDP2、RAD9A或RAD54L。

[0238] 用于MHC I抗原呈递的试剂

[0239] 在改进通过MHC I途径的抗原呈递的试剂存在下在分化后维持从工程化的iPSC或ESC细胞获得的胎儿干细胞或类器官。通过比较在存在或不存在试剂的情况下细胞表面的MHC I分子数,可以检查这种改进的表达。

[0240] 这些试剂是本领域已知的,尤其可以引用组蛋白脱乙酰基酶抑制剂(HDACi)。具有这种活性的许多产品是本领域已知的,在这些HDAC中,尤其可以引用丙戊酸盐(VPA或丙戊酸,CAS号99-66-1)。可以使用的其他HDACi(因为它们与VPA具有相同的作用模式),特别是伏林司他、罗米地辛、西达本胺、帕比司他、贝利司他、帕比司他、莫西诺司他、阿昔诺司他、恩替司他、SB939、瑞米司他、吉维司他或奎诺司他。

[0241] 这些试剂存在于胎儿干细胞允许并在多能干细胞分化后的细胞培养基中。

[0242] 灭活的胎儿细胞

[0243] 用于本发明的胎儿干细胞是灭活的。如本文所使用,术语“灭活的”及其语法变体是指存活但已经不能增殖(即,有丝分裂灭活)的细胞(例如胎细胞)。本领域技术人员可以使用本领域已知的技术,包括但不限于暴露于化学试剂、辐射和/或冻干。胎儿干细胞可以被灭活,使得在向受试者施用胎细胞不能分裂,因此不能在受试者中形成胎组织。应理解,在多个细胞的背景下,并非每个细胞都需要不能增殖。因此,如本文所用,短语“灭活到足以防止在受试者中形成胎组织的程度”是指整个群体中的灭活程度,使得在向受试者施用后不会形成畸胎瘤,因为如体外培养所证实的,经辐射的胎儿干细胞不再分裂。应注意,

即使多个细胞中的一个或多个细胞实际上能够在受试者中增殖,也假定宿主的免疫系统将在胎组织形成之前破坏那些细胞。通过在具有功能性和非功能性免疫系统的小鼠中进行测试,可以证实不能增殖和不能形成组织。

[0244] 在一些实施方案中,“灭活的”细胞是杀死的细胞,在另一个实施方案中,灭活的细胞是完整的细胞裂解物、胎儿干细胞或类器官衍生的外泌体、富集的癌症干细胞新抗原、完全纯化的癌症干细胞新抗原、DNA、mRNA和蛋白质提取物、冻干的全细胞悬浮液、细胞裂解物的级分(例如膜级分、细胞质级分)或其组合。当用胎儿干细胞与丙戊酸或另一种HDACi组合进行小鼠疫苗接种时,灭活的胎儿干细胞仍然能够刺激免疫应答。该疫苗接种能够诱导针对癌症的有效免疫和抗肿瘤应答,而没有副作用和自身免疫疾病的迹象。

[0245] 通常,为了将胎儿干细胞灭活,可以将它们暴露于致死剂量的辐射(例如,单个级分5至100Gy)。递送至胎细胞的精确辐射剂量和剂量长度并不重要,只要细胞不能存活即可。

[0246] 回收并调节细胞

[0247] 该方法的回收步骤包括洗涤细胞培养物的一个(或多个)步骤,并将细胞重悬于任何适当的培养基中,例如任何临床级细胞培养基。

[0248] 调节细胞可以包括冷冻或冻干细胞以能够在使用前储存细胞组合物。

[0249] 突变胎儿干细胞并表达新抗原

[0250] 应提醒,多能细胞是遗传上非常稳定的细胞。实际上,由于它们在胚胎发育过程中很早就存在并且它们必须繁殖以进行胚胎发育,这些细胞不易发生突变以便在胚胎中具有同质性是非常重要的。

[0251] 因此,当考虑它们的遗传内容时,存在于多能细胞群中的细胞通常是非常均质的(即,群体中超过95%的细胞呈现相同的遗传背景)。

[0252] 当制备iPSC时,在多次传代期间出现一些细胞的选择性优势,这导致在晚期传代中呈现特定突变但细胞基因组的序列接近100%的iPSC克隆群。

[0253] 然而,经过几次传代,iPSC与hESC一样稳定(Hussein SM和al,Nature 2011)。在长期培养后将获得具有极少遗传变化的培养诱导的(适应性)突变(Hussein SM和al,Bioessays,2013)。

[0254] 然而,有利的是能够在细胞中诱导突变以增加经处理的细胞材料上的胚胎新抗原的可变性。突变的多能干细胞衍生的胎儿干细胞用于揭示大多数在侵袭性癌症中发现的组织特异性的胎儿新抗原。以这种方式,它将增加免疫系统针对这些突变的胎细胞产生的胎儿新抗原产生T细胞的可能性,所述T细胞针对这些突变细胞并且能够对抗癌细胞以及在肿瘤生长期间将经历后期变化的癌细胞。

[0255] 这将有助于对抗由体细胞遗传变异的积累所导致的癌症,所述遗传变异来自癌症干细胞增殖和进展期间的DNA复制错误和/或环境损害。这些变异包括引发致癌的癌症驱动突变和基因组不稳定突变。这种增加的基因组不稳定性导致克隆进化,进而导致选择耐药性增加的更具攻击性的克隆。

[0256] 因此,可以将细胞暴露于诱变剂,即改变生物体的遗传物质(通常是DNA)的物理或化学试剂,从而增加突变频率超过自然背景水平。

[0257] 诱变剂可以选自物理诱变剂和化学诱变剂。

- [0258] 在物理诱变剂中,可以引用:
- [0259] -可以导致DNA断裂和其他损伤的电离辐射,如X射线、 $\gamma$ 射线和 $\alpha$ 粒子。尤其可以引用来自钴-60和铯-137的辐射。辐射射线的水平应远低于用于细胞灭活的射线,并且可由本领域技术人员设计;
- [0260] -波长在260nm以上的紫外线辐射,如果不加以纠正,可能会导致复制错误;
- [0261] -放射性衰变,如DNA中的<sup>14</sup>C。
- [0262] 在化学诱变剂中,可以引用:
- [0263] -活性氧族(ROS),如超氧化物、羟基自由基、过氧化氢;
- [0264] -脱氨基剂例如亚硝酸,其可通过将胞嘧啶转化为尿嘧啶而引起转换突变;
- [0265] -多环芳烃(PAH),当被活化为二醇-环氧化物时可与DNA结合;
- [0266] -烷化剂,例如乙基亚硝基脲(ENU,CAS号759-73-9)、芥子气或氯乙烯;
- [0267] -芳香胺和酰胺,如2-乙酰氨基苄;
- [0268] -来自植物的生物碱,例如来自长春花种的生物碱;
- [0269] -溴和一些含有溴的化合物;
- [0270] -叠氮化钠;
- [0271] -博莱霉素;
- [0272] -补骨脂素与紫外线辐射相结合;
- [0273] -苯;
- [0274] -碱基类似物,其可在复制过程中替代DNA碱基并引起转换突变;
- [0275] -嵌入剂,如溴化乙锭、普罗黄素、柔红霉素;
- [0276] -金属,如砷、镉、铬、镍及其可能具有致突变性的化合物。
- [0277] 在特定实施方案中,可以获得多能细胞群,其中细胞具有随机突变(通常细胞之间彼此不同,从而导致异质群体),特别是在癌症相关的新抗原中。
- [0278] 发明人已经表明,可以设计培养条件,从而在多能干细胞中诱导DNA复制错误,而不触发DNA损伤依赖性细胞凋亡。
- [0279] 这特别出乎意料,因为如上所述,多能细胞天然非常稳定,因此在胚胎发生早期应引入尽可能少量的突变。由此得出,DNA修复机制在这些细胞中非常有效,从而纠正大多数缺陷和/或在不可能纠正这些缺陷的情况下诱导细胞凋亡。
- [0280] 在特定的实施方案中,将起始群体的多能干细胞在2D或3D类器官类器官培养系统(如本领域已知)中用允许的培养基扩增并分化为胎儿谱系,以诱导胎儿特异性组织发育。在这些条件下,通常会观察到少量的外显子组突变(每个外显子组5-10个突变)。
- [0281] 然后用诱变化合物方法在体外培养多能细胞以诱导和增加多能干细胞内的基因组不稳定性,例如上面列出的那些。作为双链断裂(DSB)的标记物, $\gamma$ H2AX磷酸化证实了DNA损伤。ESC或iPSC中 $\gamma$ H2AX阳性细胞的比例和 $\gamma$ H2AX灶的频率均增加,以及作为基因组不稳定性标志物的微核数量较高。然后在2D或3D类器官类器官培养系统中将突变的多能干细胞扩增,并分化为胎儿谱系,以诱导胎儿特异性组织发育。在分化期间,一组体细胞突变在胎细胞中选择性表达。这些组织或谱系特异的体细胞突变促进生长和存活优势,并且对谱系具有特异性。
- [0282] 在一个实施方案中,分化后获得的胎儿细胞也可以在体外与突变化合物一起培养

以诱导体细胞突变。

[0283] 优选的试剂是博来霉素、ENU、烷化剂、放线菌素D、ROS调节剂、UV、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、电离辐射( $\gamma$ 射线、X射线),它们都能诱导和增强在培养过程中积累的多能干细胞中的突变率。

[0284] 在特定的实施方案中,已经显示剂量<50 $\mu$ g/ml的N-乙基-N-亚硝基脲(ENU)在长期培养(至少7至60天)期间产生新的突变并增强经处理的多能干细胞中的新抗原水平。在胎儿干细胞中选择性表达的这些体细胞突变与癌症中报道的相似。因此,可以用长时间培养时来自选择性优势的高突变率,在多能干细胞中积累多种响应于DNA损伤的突变,同时保持细胞的多能性,特别是在培养基中用HDACi培养细胞时。培养物中HDACi的存在可以保持增加的活性组蛋白(H3K4me3和H3K9ac)。分化后,将源自突变的多能干细胞的胎细胞保留在允许的培养基和HDACi中。将表达更高水平的新抗原的细胞与衍生自未突变的多能干细胞的胎细胞进行比较。

[0285] 在另一个实施方案中,通过用促进高水平基因组不稳定性的基因对细胞进行遗传修饰,在多能干细胞中诱导本文所述的组合物和方法、突变。特别地,可以使用适当的抑制剂如NER/BER/DSBR/MMR抑制剂来删除或降低参与DNA修复和复制的基因或信号传导途径的活性。诱导与DNA损伤增加相关的基因组不稳定性的这些方法可以通过使用灭活或敲低DNA修复相关基因或信号传导途径的“载体”或“遗传修饰”进行,例如DNA聚合酶 $\delta$ 复合物、错配修复(MMR)、碱基切除修复(BER)、核苷酸切除修复(NER)、同源重组(HR)、DSBR或NEJH。DNA修复基因的其他实例是DNAPkC、Ku70、Rad 51、Brca1或Brca2。

[0286] 在其他实施方案中,修饰多能干细胞以通过遗传修饰或化学p53(例如Pifithrin-mu、Nutlin-3),或通过使用增强细胞存活的化合物如Y-27632(一种p160-Rho相关卷曲激酶(ROCK)的选择性抑制剂)来抑制细胞凋亡相关基因如p53。

[0287] 在一个特定的实施方案中,多能干细胞群由从体细胞(例如从已经包含与以下相关的基因组改变的患者分离的细胞)产生:

[0288] i) DNA修复疾病,包括例如共济失调毛细血管扩张症、布卢姆综合征、Cockayne综合征、范可尼贫血症、Werner综合征、着色性干皮病、奈梅亨破损综合征;

[0289] ii) 具有基因组不稳定性的遗传性家族癌症综合征,如林奇综合征(具有MMR基因(包括MLH1、MSH2、MSH6、PMS1和PMS2)突变的遗传性非息肉性结直肠癌)、具有TP53基因或CHEK2突变的Li-Fraumeni、具有BRCA1/2基因缺失或突变的遗传性乳腺癌和卵巢癌(HBOC)综合征、具有APC基因突变的家族性腺瘤性息肉病(FAP);具有c-Met突变的肾细胞癌;具有RET突变的甲状腺髓样癌;

[0290] iii) 如在具有易位(T9;22)、Jak突变的CML中体细胞致癌诱导的基因组不稳定性。

[0291] 在特定的实施方案中,多能干细胞衍生自含有与疾病相关的基因组改变的体细胞。通常,基因组改变可以是易位(T9:22)、缺失(BRCA1/2)或突变(BRCA、RET、c-Met)。源自这些多能干细胞的胎儿干细胞可在胎儿水平上复制基因组改变。

[0292] 在一个具体的实施方案中,多能干细胞群(iPSC)由癌细胞系或患者特异性癌细胞产生。衍生的胎儿干细胞或类器官类器官可在胎儿水平上复制与原发癌中报道的相似的癌症表型和基因型。在另一个实施方案中,通过使用“载体”对多能干细胞进行遗传修饰以过表达多种非随机癌症干细胞相关的新抗原。在具体的实施方案中,通过“基因组编辑”技术对多能干细胞、胎儿干细胞或类器官类器官进行遗传修饰以在多能干细胞中表达多种突变

和癌症干细胞特异性新抗原(至少1种)。遗传修饰的胎儿干细胞或类器官类器官可复制与原发癌中报道的那些相似的癌症基因型。本发明提供了通过RNA引导的多重基因组编辑、修饰、表达抑制和其他基于RNA的技术引入多种新抗原来提供多能干细胞和胎细胞或类器官类器官的组合物和方法。

[0293] 本文使用的术语“基因组编辑”是指RNA介导的遗传操作,特别包括用于cas9介导的基因组编辑的向导RNA。该向导RNA(gRNA)与内切核酸酶cas9一起转染。向导RNA提供支架和与靶标互补的间隔子序列。在另一个实施方案中,遗传操作序列可以是设计用于根据本领域的标准方法通过使用Crispr-Cas 9系统进行基因沉默的siRNA或microRNA序列。制备和使用Crispr-Cas系统的组合物和方法是本领域已知的,并且特别描述于U.S.8,697,359中。

[0294] 在一个具体实施方案中,用烷化剂处理多能干细胞群或衍生的胎儿细胞群体。如本文所用,术语“烷化剂”是指将一个或多个烷基从一个分子添加到另一个分子的物质。这种处理在新抗原中产生新的突变,通过增加TIL的寡克隆扩增和Th1/Th2细胞免疫来提供优异的免疫应答。在本发明中,烷化剂选自以下:氮芥、亚硝基脲、烷基磺酸盐、三嗪、乙烯亚胺及其组合。氮芥的非限制性实例包括盐酸氮芥(Lundbeck)、苯丁酸氮芥(GlaxoSmithKline)、环磷酰胺(Mead Johnson Co.)、苯达莫司汀(Astellas)、异环磷酰胺(Baxter International)、美法仑(Ligand)、美法仑氟哌嗪(Oncopeptides)及其药学上可接受的盐。亚硝基脲的非限制性实例包括链佐星(Teva)、卡莫司汀(Eisai)、洛莫司汀(Sanofi)及其药学上可接受的盐。烷基磺酸盐的非限制性实例包括白消安(Jazz Pharmaceuticals)及其药学上可接受的盐。三嗪的非限制性实例包括达卡巴嗪(Bayer)、替莫唑胺(Cancer Research Technology)及其药学上可接受的盐。乙烯亚胺的非限制性实例包括噻替派(Bedford Laboratories)、六甲蜜胺(MGI Pharma)及其药学上可接受的盐。其他烷化剂包括ProLindac(Access)、Ac-225 BC-8(Actinium Pharmaceuticals)、ALF-2111(Alfact Innovation)、曲磷胺(Baxter International)、MDX-1203(Bristol-Myers Squibb)、硫尿基丁腈(CellCeutix)、二溴硝基苯(Chinoin)、二溴卫矛醇(Chinoin)、尼莫司汀(Daiichi Sankyo)、葡磷酰胺(Elison Pharmaceuticals)、HuMax-TAC和PBD ADC组合(Genmab)、BP-C1(Meabco)、苏消安(Medac)、硝呋替莫(Metronomx)、甲磺英丙舒凡(Mitsubishi tanabe Pharma)、雷莫司汀(Mitsubishi tanabe Pharma)、ND-01(NanoCarrier)、HH-1(Nordic Nanovector)、22P1G细胞和异环磷酰胺组合(Nuvilex)、雌莫司汀磷酸盐(Pfizer)、泼尼莫司汀(Pfizer)、lurbinectedin(PharmaMar)、曲贝替定(PharmaMar)、altreatamine(Sanofi)、SGN-CD33A(Seattle Genetics)、福莫司汀(Servier)、奈达铂(Shionogi)、庚铂(Sk Holdings)、阿哌唑酮(Spectrum Pharmaceuticals)、SG-2000(Spirogen)、TLK-58747(Telik)、拉莫司汀(Vion Pharmaceuticals)、甲基苄肼(Alkem Laboratories Ltd.)及其药学上可接受的盐。在另一个实施方案中,烷化剂选自盐酸氮芥(Lundbeck)、苯丁酸氮芥(GlaxoSmithKline)、环磷酰胺(Mead Johnson Co.)、链佐星(Teva)、达卡巴嗪(Bayer)、噻替派(Bedford Laboratories)、六甲蜜胺(MGI Pharma)、其药学上可接受的盐,以及它们的组合。在另一个实施方案中,烷化剂选自ProLindac(Access)、Ac-225 BC-8(Actinium Pharmaceuticals)、ALF-2111(Alfact Innovation)、苯达莫司汀(Astellas)、异环磷酰胺(Baxter



International)、曲磷胺(Baxter International)、MDX-1203(Bristol-Myers Squibb)、替莫唑胺(Cancer Research Technology)、硫尿基丁腈(CellCeutix)、二溴硝基苯(Chinoïn)、二溴卫矛醇(Chinoïn)、尼莫司汀(Daiichi Sankyo)、卡莫司汀(Eisai)、葡磷酰胺(Elieison Pharmaceuticals)、HuMax-TAC和PBD ADC组合(Genmab)、白消安(Jazz Pharmaceuticals)、美法仑(Ligand)、BP-C1(Meabco)、苏消安(Medac)、硝呋替莫(Metronomx)、甲磺英丙舒凡(Mitsubishi tanabe Pharma)、雷莫司汀(Mitsubishi tanabe Pharma)、ND-01(NanoCarrier)、HH-1(Nordic Nanovector)、22P1 G细胞和异环磷酰胺组合(Nuvilex)、美法仑氟哌嗪(Oncopeptides)、雌莫司汀磷酸盐(Pfizer)、泼尼莫司汀(Pfizer)、lurbinedin(PharmaMar)、曲贝替定(PharmaMar)、altreatamine(Sanofi)、洛莫司汀(Sanofi)、SGN-CD33A(Seattle Genetics)、福莫司汀(Servier)、奈达铂(Shionogi)、庚铂(Sk Holdings)、阿哌喹酮(Spectrum Pharmaceuticals)、SG-2000(Spirogen)、TLK-58747(Telik)、拉莫司汀(Vion Pharmaceuticals)、甲基苄肼(Alkem Laboratories Ltd.)、其药理学上可接受的盐,及其组合。

[0295] 在特定的实施方案中,用N-乙基N-亚硝基脲(ENU,CAS号759-73-9)处理多能干细胞群。ENU具有以下化学式 $C_3H_7N_3O_2$ ,它是一种通过将乙基转移到核酸中的核碱基的高效诱变剂。

[0296] 如上所述,诱变剂的目的是在扩增期间在多能干细胞的基因中引入随机突变(在细胞复制和分裂期间引入突变)。多能干细胞群获得可提供生长优势的突变,并被选择用于促进培养适应。源自多能干细胞的胎儿细胞群体获得突变,促进允许的培养基中胎细胞的生长和存活。

[0297] 在特定的实施方案中,当使用ENU时,其可以施用至少7天,更优选至少15天,更优选至少20天,更优选至少30天,更优选至少40天,更优选至少50天或甚至至少60天。

[0298] 施用诱变剂后,洗涤细胞(如果诱变剂是化学试剂)并且可以在有利于MHC-I表达的试剂(特别是HDACi)存在下进一步培养。优选该试剂也存在于施用诱变剂期间。

[0299] 因此可以观察和检查诱变剂将在胎细胞表达的一些胎儿基因中诱导突变(即非同义、无义、移码、StopGain、剪接变体、CNV、SNV),从而增加胎儿抗原(全基因组中的新抗原)的多样性。因此,这将增加疫苗组合物具有增强的免疫原性的可能性,能够刺激针对存在快速和频繁突变的侵袭性癌症的广泛免疫应答。

[0300] 对于随着肿瘤细胞表达的抗原的新体细胞突变而发生克隆演变的某些癌症,确实难以获得有效的免疫应答。因此,免疫应答将取决于癌症和免疫原性新抗原的突变载量。因此,通过使用诱变剂在胎儿细胞群体中产生特异性突变将导致增加疫苗接种后呈递给免疫系统的抗原的多样性。

[0301] 因此,已经存在针对突变胎儿抗原的引发的T细胞,所述突变抗原在癌细胞分裂期间将出现在这些细胞中,这将加速并改善针对这些细胞的免疫应答。

[0302] 在特定的实施方案中,多能干细胞可以首先通过经典方法分化(例如在2D或3D培养系统中使用小分子、形态发生因子和生长因子定义培养条件),然后用诱变剂(例如ENU)处理以表达胎儿新抗原。

[0303] 胎儿干细胞的修饰

[0304] 在一个具体的实施方案中,对多能干细胞群进行遗传修饰以过表达化合物,所述

化合物通过在多能细胞基因组内的基因整合来刺激免疫应答。通常,在第一步中,分离并扩增多能干细胞群。在第二步中,将目标基因包装到整合病毒载体(例如逆转录病毒或慢病毒)中。在第三步中,将含有目标基因的整合病毒载体转移到多能干细胞群中并分化为胎儿干细胞。

[0305] 在一个具体的实施方案中,用刺激MHC表达和/或免疫应答的蛋白质基因修饰胎儿干细胞群或类器官类器官。这些化合物选自干扰素 $\alpha$  (IFN- $\alpha$ )、干扰素 $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )、白细胞介素2 (IL-2)、白细胞介素4 (IL-4)、白细胞介素6 (IL-6)、白细胞介素12 (IL-12)、肿瘤坏死因子 (TNF) 和粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF)、其功能片段及其组合。

[0306] 本发明考虑的干扰素 (IFN) 包括常见的IFN类型,IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ 和IFN- $\gamma$ 。IFN可以直接作用于癌细胞,例如,通过减缓它们的生长、促进它们发育成具有更正常行为的细胞和/或增加它们的抗原产生,从而使癌细胞更容易被免疫系统识别和破坏。IFN还可以间接作用于癌细胞,例如,通过减慢血管生成、增强免疫系统和/或刺激自然杀伤 (NK) 细胞、T细胞和巨噬细胞。重组IFN- $\alpha$ 可作为Roferon (Roche Pharmaceuticals) 和Intron A (Schering Corporation) 商购获得。

[0307] 本发明考虑的白细胞介素包括IL-2、IL-4、IL-11和IL-12。可商购获得的重组白细胞介素的实例包括 **Proleukin**<sup>®</sup> (IL-2; Chiron Corporation) 和 **Neumega**<sup>®</sup> (IL-12; Wyeth Pharmaceuticals)。Zymogenetics, Inc (Seattle, Wash) 目前正在测试重组形式的IL-21, 其也预期用于本发明的组合。

[0308] 本发明考虑的集落刺激因子 (CSF) 包括粒细胞集落刺激因子 (G-CSF或非格司亭)、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF或沙格司亭) 和促红细胞生成素 (阿法依伯汀、达比波廷)。用一种或多种生长因子处理可以帮助在经历传统化疗的受试者中刺激新血细胞的产生。因此,用CSF处理可有助于减少与化疗相关的副作用,并且可允许使用更高剂量的化疗剂。各种重组菌落刺激因子可商购获得,例如Neupogen (G-CSF; Amgen)、Neulasta (pelfilgrastim; Amgen)、Leukine (GM-CSF; Berlex)、Procrit (促红细胞生成素; Ortho Biotech)、Epoen (促红细胞生成素; Amgen)、Arnesp (促红细胞生成素)。

[0309] 在其最广泛的意义上,“载体”是能够促进寡核苷酸转移至细胞的任何载体。优选地,相对于载体不存在导致的降解程度,载体将核酸转运至细胞的降解降低。通常,可用于本发明的载体包括但不限于裸质粒、非病毒递送系统(电穿孔、声孔、阳离子转染剂、脂质体等)、噬菌粒、病毒、已经通过插入或整合核酸序列进行操作的衍生自病毒或细菌来源的其他载体。病毒载体是优选的载体类型,包括但不限于来自以下病毒的核酸序列:RNA病毒,例如逆转录病毒(例如莫洛尼鼠白血病病毒和衍生自慢病毒的载体)、哈维小鼠肉瘤病毒、鼠乳腺肿瘤病毒和Rous肉瘤病毒;腺病毒、腺相关病毒;SV40型病毒;多瘤病毒;爱泼斯坦-巴尔病毒;乳头状瘤病毒;疱疹病毒;牛痘病毒;脊髓灰质炎病毒。可以容易地采用本领域已知但未命名的其他载体。

[0310] 通常,在本发明的上下文中,病毒载体包括腺病毒和腺相关 (AAV) 病毒,它们是已经被批准用于人类基因治疗用途的DNA病毒。实际上,已知12种不同的AAV血清型 (AAV1至12), 每种具有不同的组织趋向性 (Wu, Z Mol Ther 2006;14:316-27)。重组AAV衍生自依赖性细小病毒AAV (Choi, VW J Virol 2005;79:6801-07)。可以将1型至12型腺相关病毒工程化为复制缺陷型并且能够感染多种细胞类型和物种 (Wu, Z Mol Ther 2006;14:316-27)。它

还具有例如以下优点:热和脂溶剂稳定性;不同谱系细胞(包括造血细胞)中的高转导频率;并且缺乏重复感染抑制因此允许多系列转导。此外,在没有选择压力的情况下,在超过100次传代的组织培养中已经进行了野生型腺相关病毒的感染,这意味着腺相关病毒基因组整合是相对稳定的事件。腺相关病毒也可以以染色体外方式起作用。

[0311] 其他载体包括质粒载体。质粒载体已在本领域中广泛描述,并为本领域技术人员所熟知。参见例如Sambrook等,1989。在过去几年中,质粒载体已被用作DNA疫苗,用于在体内将抗原编码基因递送给细胞。对此它们特别有利,因为它们不像许多病毒载体那样具有相同的安全性问题。然而,这些质粒具有与宿主细胞相容的启动子,可以从质粒内可操作编码的基因表达肽。一些常用的质粒包括pBR322、pUC18、pUC19、pRC/CMV、SV40和pBlueScript。其他质粒是本领域普通技术人员熟知的。另外,可以使用限制性酶和连接反应定制设计质粒以去除和添加特定的DNA片段。质粒可以通过各种肠胃外、粘膜和局部途径递送。例如,DNA质粒可以通过肌肉内、皮内、皮下或其他途径注射。它也可以通过鼻内喷雾剂或滴剂、直肠栓剂和口服施用。优选地,通过眼内方式(玻璃体内、视网膜下,脉络膜上...)注射所述DNA质粒。也可以使用基因枪将其施用于表皮或粘膜表面。质粒可以在水溶液中提供,干燥到金颗粒上或与另一种DNA递送系统结合,包括但不限于脂质体、树枝状大分子、耳蜗和微囊化。

[0312] 在一个具体的实施方案中,通过同源重组将转基因如siRNA引入染色体19的AAVS1基因座来修饰胎儿干细胞群。

[0313] 如本文所用,术语“同源重组”是指用于人工修饰染色体或基因组上的特定基因的基因靶向手段。当将与染色体上的靶序列具有部分同源的基因组片段引入细胞时,该术语是指基于引入的基因组片段与染色体上相对应的基因座之间的核苷酸序列同源性发生的重组。

[0314] 此外,术语“遗传修饰”是指在染色体上所需基因的基因座插入外源DNA、用外源DNA取代部分或全部基因,或删除基因。更具体地,遗传修饰是指插入(即“敲入”)外源DNA片段的同时以使得该片段与特定基因座的基因的表达一起表达或组成型表达的方式保留内源DNA序列,或取代、缺失或破坏(即“敲除”)一部分或全部基因序列以修饰内源DNA序列。

[0315] 将人工染色体引入细胞的方法的实例包括磷酸钙沉淀法(Graham等,(1973) *Virology* 52:456-467,Wigler等,1979) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 76 1373-1376和 *Current Protocols in Molecular Biology Vol.1,Wiley Inter-Science,Supplement 14,Unit 9.1.1-9.1.9(1990)*),使用聚乙二醇的融合法(美国专利号4,684,611),使用脂质载体的方法例如脂质转染(Teifel等,(1995) *Biotechniques* 19:79-80、Albrecht等,(1996) *Ann.Hematol.* 72:73-79;Holmen等,(1995) *In Vitro Cell Dev.Biol.Anim.* 31:347-351,Remy等,(1994) *Bioconjug.Chem.* 5:647-654、Le Bolc'h等,(1995) *Tetrahedron Lett.* 36:6681-6684,Loeffler等,(1993) *Meth.Enzymol*, 217:599-618和Strauss (1996) *Meth.Mol.Biol.* 54:307-327),电穿孔和用微细胞融合的方法(美国专利号5,240,840,4,806,476,5,298,429和5,396,767,Fournier (1981) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 78:6349-6353和Lambert等,(1991) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 88:5907-59)。

[0316] 胎儿干细胞群

[0317] 因此,通过如上所述的方法,发明人获得了在部分或全部胎基因中表达新的胎表

位的胎儿干细胞群,其将引发更有效的抗肿瘤免疫。因此,第四方面,本发明涉及根据上述方法获得的干细胞群。与未突变多能干来源的胎儿细胞群体(即不经ENU预处理)相比,经N-乙基-N-亚硝基脲(ENU)预处理的多能干细胞来源的胎儿干细胞群呈现出新突变数量增加。这些胎儿新抗原与原发性癌症有关。因此,该群体也是本发明的主题。

[0318] 因此,所获得群体的特征尤其在于胎儿干细胞丧失了与多能性有关的基因,其中至少20%以下基因:NACC1、BLM、WDR33、DAZAP1、CDK1、CDC45、ZNF165、XRCC5、SMARCA1、AIMP2、CKS1B、NANOG、ZFP42、U2AF1、CCNB2、DCTPP1、TGIF1、SUPT3H、AURKB、GEMIN7、SRSF1、PNP、SIGLEC12、POU5F1、PSMA3、RMND5B、GDF9、STXBP2、BAG6、GMPS、PCNA、NME1、POP7、RCHY1、SMARCC1、HNRNPK、PTMA、NPM1、SNRPA、MYBBP1A、CDT1、HSPD1、TRIM28、PHF10、GRB7、HSPE1、DAXX、FAM136A、KPNA2、FUS、PNN、RFC3、HPRT1、PA2G4、SNRPE、RBPMS、PRMT5、PIAS2、BYSL、POLD2、LSM5、TDGF1、NOP56、EPPK1、TARBP2、MRE11A、CDC7、SRSF3、TNNT3、NUDT1、DIAPH1、PPID、CDA、GADD45A、MCM6、SNURF、CDC25C、TNFRSF8、STIP1、ACTA1、POLR1D、TUBA3C、RPA1、VAMP8、UNC119、COIL、BIK、PARP1、SP1、CHEK2、NLE1、RPA2、HDAC1、KPNB1、LSM7、TMSB4Y、HMGA1、POLR1C、LSM1、EXO1、MCM5、ITGB3BP、LSM6、UNG、PSMA6、CCNE1、SMNDC1、SET、FKBP3、TK1、CTBP2、POLQ、PLSCR1、GMNN、RND1、NUP153、PHGDH、SNRPB、HSPA14、HSPH1、TCOF1、ANP32A、PELP1、MBD2、HIST1H2BC、TMPO、SPAG5、DNMT3B、LCK、ARMC6、COPS6、MCM3、PPAP2C、LSM4、NME1-NME2、EWSR1、POLG2、BCL2、NFKB1B、SALL4、PXN、EXOSC8、HSPA2、HMGB1、RUVBL1、GOT2、PPM1B、ATIC、DHCR24、APEX1、RFC2、WDYHV1、NTHL1、EXOSC7、SNRPD1、DPPA2、MRPS12、FBL、POLD1、MCM10、EXOSC3、NOP58、TPX2、PAK3、HNRNPAB、ANXA2、BUB1B、SEPHS1、WDR77、LUC7L3、VASP、MCM4、PAK1、PMAIP1、PBX1、NOLC1、PCYT1B、NCL、ORC6、GPRIN2、ORC1、RAD51、HSPA8、ANXA3、NUP50、SNRPC、HAUS1、MATK、BIRC5、MYC、GEMIN6、PSIP1、DSCC1、STRBP、SMN1、EXOSC9、TOE1、GEMIN2、TRIP13、ORC2、MSH3、MNAT1、KIT、RFC5、FOXO4、AATF、RBM14、ZNF281、NPPB、RPA3、APOE、PFDN6、COPS3、CCND1、CXADR、MCM2、ANAPC1、SUMO1、SSB、HSP90AB1、TRAIIP、PHC1、LRIF1、LSM3、SNRPN、RPP40、MSH2、FBP1、PFN1、OTX2、STX3、STXBP3、GTF2H2、ELAC2、TCERG1、ERCC5、PASK、ZNF593、PSME3、WRN、ARID3B、ERBB3、POP1、KAT7、PTPN6、SYNCRIP、SIRT1、SLC19A1、ARL4A、CEBPZ、MSH6、AURKA、BAK1、MTHFD1、HSPA9、MYBL2、POP5、RFC4、CHEK1、BCCIP、SOCS1、PHB、PMF1、MPP6、NOC2L、HDAC2、CENPE、RECQL4、CASP6、GNL3、SRSF2、BRX1、MYB、RNMTL1、DHFR、FEN1、SNRPF、MUTYH、PRNP、MT1G、PSMD11、GAR1、DDX11、FUBP1、CDK7、WRAP73、CASP9、RASL11B、CHAF1A、CCNB1、CKS2、CCNA2、PPAN、WEE1、TP53、HMMR、TDP2、RAD9A或RAD54L。

[0319] 不存在成年分化细胞的谱系特异性基因表达。

[0320] 因此,本发明涉及包含胎儿干细胞的细胞组合物,其中所述群体中的细胞呈现胎儿新抗原。胎儿新抗原的体细胞突变率在暴露于诱变剂后衍生自多能干细胞母库的胎儿干细胞群中是合格的。如果进行这种进一步的扩增,则这些体细胞胎儿新抗原的稳定性在进一步扩增之前或之后是合格的。在至少一种选自衍生的胎细胞或类器官中表达的胎儿新抗原的基因中,胎儿干细胞或类器官中的突变率为至少0.1%,优选至少1%,更优选至少2%,更优选至少5%,更优选至少10%,更优选至少15%,更优选至少20%,更优选至少30%,更优选至少40%,或甚至至少50%。给定基因的突变率显然是通过对该基因的DNA测序,并计算包含突变的拷贝数相对于天然序列(该序列是基本且主要存在的序列(作为主要序列)来计算的)是原生的“野生型”序列)。

[0321] 人来源的胎儿造血干细胞(即源自通过诱变剂离体处理后的人造血胚胎体)表达胎儿新抗原。这些胎儿新抗原的特征在于至少下组: ARHGEF10L:221656\_s\_at、TRIM66:213748\_at、ARHGEF10L:1570511\_at、NKAIN3:1553241\_at、ITGA7:216331\_at、GGT1:211417\_x\_at、PDZD7:220555\_s\_at、MUC4:235055\_x\_at、GGT1:215603\_x\_at、MUC2:204673\_at、NECAB3:210720\_s\_at、GGT1:208284\_x\_at、MNT:204206\_at、GGT1:207131\_x\_at、ITGA7:209663\_s\_at、BTNL9:230992\_at、FNBP1:230086\_at、GLTSCR1:219445\_at、NECAB3:223954\_x\_at、COPZ2:219561\_at、ZFP36:201531\_at、MIB2:241541\_at、ABCC12:1553410\_a\_at、IGFN1:1563098\_at、LRRK2:229584\_at、MNT:236749\_at、RIN3:220439\_at、GGT1:233837\_at、KIF5C:1557089\_at、ANK2:202921\_s\_at、HDAC7:236326\_at、MUC20:1558220\_at、SDCCAG3:230058\_at、GGT1:209919\_x\_at、RIN3:1562005\_at、DNAI1:233195\_at、DNAI1:220125\_at、BTNL9:241496\_at、ABTB2:232624\_at、MC2R:208568\_at、DOCK4:244840\_x\_at、FSD1L:230904\_at、HDAC7:217937\_s\_at、CRP:205753\_at、PPP1R3A:206895\_at、SLC22A17:221106\_at、PITPNM1:203826\_s\_at、BTBD7:224943\_at、MIB2:241377\_s\_at、A2M:1558450\_at、CTDSP2:208735\_s\_at、IFNA14:208182\_x\_at、KIF5C:203130\_s\_at、MUC20:243774\_at、THNSL2:239949\_at、KIF5C:203129\_s\_at、GTF3C3:1555439\_at、NRXN1:1558708\_at、MED26:1559593\_a\_at、FNBP1:230389\_at、TMC03:230317\_x\_at、PPP1R3A:211169\_s\_at、ING1:208415\_x\_at、ZNF292:1562991\_at、RBL1:1555004\_a\_at、CD109:239719\_at、CD109:229900\_at、FOXRED2:233250\_x\_at、PLIN2:209122\_at、ZNF85:1554445\_at、SESN1:218346\_s\_at、TMC03:220240\_s\_at、MED26:231724\_at、CD109:226545\_at、CENPE:205046\_at、ING1:210350\_x\_at、TMC03:226050\_at、FOXRED2:220707\_s\_at、GTF3C3:222604\_at、BTBD7:224945\_at、CDC27:217881\_s\_at、STOM:201061\_s\_at、CDC27:217880\_at、ZNF317:1555337\_a\_at、TET1:228906\_at、LRBA:214109\_at、MED4:217843\_s\_at、CDC27:217879\_at、ZNF317:225296\_at、ZNF292:212366\_at、MED4:222438\_at、BCR:226602\_s\_at、STOM:201060\_x\_at、BCR:202315\_s\_at、ZNF85:206572\_x\_at、BCR:217223\_s\_at、HPRT1:202854\_at、LRBA:212692\_s\_at、GTF3C3:218343\_s\_at、NASP:201969\_at、NASP:201970\_s\_at、MSH2:209421\_at。

[0322] 在特定的实施方案中,衍生自多能干细胞的人胎儿肾类器官在肾祖细胞中表达胎儿抗原,其通常与原发性成人肾癌中报道的癌症基因相关。这些特征化的胎基因对应于至少下组: TRAPPC4、MX1、ITSN1、DNAJC7、TAF15、TMEM88、CRYM、PRTG、TYRO3、C12ORF60、FJX1、ADM、FAM45A、ASS1、CA2、ZFHX4、CLVS1、NRG1、EZH2、SLC22A23、MSH5、FBN2、GTF2H2、LIX1、HESX1、FZD5、LRP2、RHOQ、NUAK2、ILF2、ACP6、RPL5、NMNAT1、ID1、U2AF2、KLHL14、CDH2、GREB1L、ARRDC4、THBS1、BMP4、LRIG3、SOX5、SF1、LGR4、MGEA5、BCORL1、STOM、GLIS3、ANXA1、KDM4C、SDC2、TMEM130、MAGI2、GLI3、HEY2、TPBG、ID4、MYLIP、ENC1、EGR1、CDH6、NPY1R、SEL1L3、LRAT、CLDN1、CEP97、BHLHE40、ARL5A、ARL4C、ZNF385B、LYPD1、B3GNT7、INSIG2、ARHGAP29、NOTCH2、IFI16。

[0323] 将多能细胞暴露于诱变剂将触发这些细胞基因组中随机突变的出现。因此,由于长期扩增和培养期间的天然突变率较低,与基本上更加同质并且限于原发癌基因组中报道的癌症新抗原的胎儿干细胞群相比,由这种暴露产生的群体将是异质的。

[0324] 在另一个实施方案中,本发明涉及包含胎儿干细胞的细胞组合物,其中所述群体

中的细胞在包含一种或多种下列特征的胎儿干细胞群中呈现突变谱：

[0325] 1) 通过基因组修饰在胎儿干细胞中遗传地引入至少>1 (或更多, 如上所述) 癌症相关的新抗原突变；

[0326] 2) 突变类型的组合限于由诱变剂诱导的癌症基因组并且在培养的胎儿干细胞中通过选择性优势富集。

[0327] 诱变过程导致所得的胎儿干细胞系中新基因组突变和遗传镶嵌的水平增加。基因突变的分析优选通过NGS、外显子组、RNAseq或全基因组测序、CGH阵列、SNP阵列对每个胎儿干细胞群中诱导的癌症相关“突变组学 (mutanome)”特征进行大规模基因组分析。全外显子组测序与转录组分析相结合使得能够描述由表达的蛋白质编码的突变组学。

[0328] 通过使用本领域已知的至少2种用于生物信息学分析的算法来鉴定基因组体细胞畸变和新抗原。施用诱变剂后全基因组中总突变的普遍性将证实输出胎儿干细胞中更高的突变和/或CNV载量。

[0329] 定性和定量标准将允许在胎儿干细胞中的遗传镶嵌内定义每个细胞群, 如下所述：

[0330] 定性标准包括：

[0331] - 鉴定由以下定义的获得的新的分子体细胞变异 (突变、CNV或SNV) : 在诱变后它们在胎儿干细胞基因组中存在, 并在有或没有诱变下它们在亲本多能干细胞中不存在；

[0332] - 每个新突变的分类 (即非同义、无义、剪接变体、CNV、SNV), 并通过它们在原发性患者特异性癌症或癌症基因组 (来自数据库, 即TCGA、ICGC、COSMIC) 以及在正常成年细胞或组织中不存在的多能干细胞之间的重叠检测进行验证。

[0333] 定量标准包括：

[0334] - 定义每个胎儿干细胞群或类器官的全基因组中这些新的体细胞突变 (错误发现率置信度值FDR<0.05) 和新CNV/SNV (FDR<10%) 的普遍性；

[0335] - 在至少>3个的不同胎儿基因中存在经验证的突变；

[0336] - 在克隆选择和扩增后或在传代次数 (从50X深度到100X, 并且目标外显子组覆盖率为80-98%) 后, 具有等位基因频率的每个新的且稳定的体细胞突变的突变率至少从>0.1% (或如上所见的其他百分比) 至高达50%；

[0337] - 与诱变或遗传修饰之前的输入胎儿干细胞相比, 稳定的胎儿干细胞标志物和基于基因表达的测定 (PluriTest) 的表达具有至少>90%的表达率；

[0338] - 与不存在HDACi (特别是VPA) 的情况下维持的胎儿细胞群体相比, MHC I分子在细胞表面的表达 (例如通过FACS测定) 增加至少50%, 并且通常高达90%。

[0339] 疫苗组合物

[0340] 如上所述的胎儿干细胞群可以用于疫苗组合物。因此, 第五方面,

[0341] 本发明涉及一种疫苗组合物, 其包括如上公开的胎儿干细胞群和刺激免疫应答和/或MHC I表达的试剂。

[0342] 具体地, 这种多能细胞是ESC或IPSC, 优选灭活的, 且任选是突变的, 以抑制其增殖能力并可选地获得细胞提取物。

[0343] 刺激免疫应答的试剂可以是本领域已知的佐剂 (免疫刺激剂)。优选是HDACi (以0.2mM-4mM的剂量使用)。当使用HDACi时, 也可以使用另一种佐剂。

[0344] 本发明还涉及包含这种疫苗组合物的装置(例如注射器),其可用于同时施用HDACi化合物和细胞组合物。

[0345] 这种疫苗组合物可以用作针对癌细胞(表达免疫原性新抗原、驱动子或乘客突变的癌细胞;祖细胞作为表观遗传去分化的细胞,表达胎儿和胚胎基因的肿瘤引发细胞)的治疗性疫苗以治愈患者,或用作预防性疫苗以预防这种癌症发生,尤其是在易患这些癌症的患者中。

[0346] 易感基因例如是(也参见Lindor等、2008Journal of the National Cancer Institute Monographs、No.38、Concise Handbook of Familial Cancer Susceptibility Syndromes、Second Edition):

[0347] 乳腺/卵巢:BRCA1、BRCA2、PALB2、RAD51;

[0348] 林奇综合征:MLH1、MSH2、MSH6、PMS2、EPCAM;

[0349] 遗传性乳头状肾细胞癌:FH、MET;

[0350] 考登病:PTEN、PIK3CA;

[0351] 范可尼病:FANC;

[0352] Von Hippel-Lindau病:VHL;

[0353] 恶性黑素瘤:CDKN2A、MITF、BAP1、CDK4;

[0354] 内分泌肿瘤:MEN1、RET、CDKN1B;

[0355] 神经纤维瘤病:NF1、NF2、LZTR1、SMARCB1、SPRED1;

[0356] 遗传性嗜铬细胞瘤副神经节细胞瘤:SDH、TMEM127、MAX、EPAS1;

[0357] 家族性腺瘤性息肉病:APC、MUTYH;

[0358] 视网膜母细胞瘤:RB1;

[0359] Birt-hogg-dubé综合征:FLCN;

[0360] 布卢姆综合征:BLM;

[0361] Carney综合征:PRKAR1A;

[0362] Gorlin综合征:PTCH1;

[0363] Li-Fraumeni综合征:TP53、CHEK2;

[0364] 奈梅亨综合征:NBN;

[0365] Peutz-Jeghers综合征:STK11;

[0366] 家族性幼年性息肉病:BMPR1A、SMAD4;

[0367] 着色性干皮病:XP。

[0368] 该列表是非限制性的。

[0369] 在某些实施方案中,癌症干细胞疫苗产品包含冻干后的细胞裂解物的混合物、富集的多癌干细胞新抗原的混合物、纯化的癌干细胞新抗原、源自胎儿干细胞的外泌体、来自工程化胎儿干细胞的DNA、RNA蛋白或多肽。这些是如上公开的免疫原性试剂,其在HDACi存在下配制。

[0370] 在另一个实施方案中,将癌症干细胞疫苗产品与用作佐剂效应物的来自辐照的工程化胎儿干细胞的上清液GMP培养基混合。

[0371] 在特定的实施方案中,该组合物中的衍生的胎细胞是灭活的(即不能再增殖)。

[0372] 本发明的衍生的胎细胞和类器官组合物易于通过上述任何方法获得。

[0373] 应注意,当使用诱变剂时,该组合物中的衍生的胎细胞是遗传异质并携带特定的体细胞突变,因此不同于根据本领域已知的方法制备的并且是更加遗传均质的衍生的胎细胞组合物。

[0374] 当在没有诱变剂的情况下培养时,衍生的胎儿细胞群体不同于用本领域已知的方法制备的衍生的胎儿细胞群体,因为培养基中存在的维持胎儿基因表达并增加MHC I呈递的试剂将导致细胞在其表面上具有更多的这些MHC I分子。

[0375] 如本文所用,术语“选自激活MHC I表达和/或免疫应答的组的化合物”是指能够刺激免疫原性的化合物。这种化合物被称为MHC表达和/或免疫应答的激活剂。术语“MHC”是指主要组织相容性复合物,其存在于细胞表面以识别称为抗原的外源分子。MHC与抗原结合并将其呈递给免疫分子,例如T和B淋巴细胞。术语“免疫应答”是指免疫系统对抗原的免疫应答。通过激活免疫应答,FoxP3亚群和髓源性抑制性细胞(MDSC)的群体减少,相反,NK群体增加。在本发明的上下文中,针对肿瘤的免疫应答包括针对存在于肿瘤细胞中或细胞上的抗原的细胞毒性T细胞应答。在一些实施方案中,细胞毒性T细胞应答由CD8+T细胞介导。通常,在本发明的上下文中,激活MHC表达和/或免疫应答的抗原对应于如上所述的胎儿细胞群体上存在的分子。激活MHC表达和/或免疫系统的化合物是胎儿基因或免疫原性新抗原。术语“新抗原”或“新抗原性的”是指由至少一种突变产生的一类抗原,所述突变改变基因组编码的蛋白质的氨基酸序列。

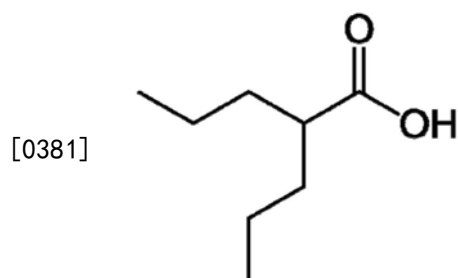
[0376] 在本发明的上下文中,化合物选自:细胞因子、组蛋白脱乙酰基酶抑制剂、DNA甲基转移酶抑制剂和组蛋白-赖氨酸N-甲基转移酶抑制剂。

[0377] 在一个具体实施方案中,MHC表达和/或免疫应答的激活剂是组蛋白脱乙酰基酶抑制剂。

[0378] 如本文所用,术语组蛋白“组蛋白脱乙酰基酶抑制剂”也称为HDACi,是指干扰组蛋白脱乙酰基酶功能的一类化合物。组蛋白脱乙酰基酶(HDAC)在转录调节和癌症的发病机制中发挥重要作用。通常,HDAC的抑制剂调控转录并诱导细胞生长停滞、分化和细胞凋亡。HDAC还增强用于癌症治疗的治疗剂(包括放射和化疗药物)的细胞毒性作用。

[0379] 在一个具体的实施方案中,组蛋白脱乙酰基酶抑制剂是丙戊酸(VPA)。

[0380] 术语“丙戊酸”是指酸-2-丙戊酸钠( $C_8H_{16}O_2$ ),在本领域中其具有以下CAS号和式99-66-1:



[0382] 丙戊酸具有多种生物活性(Chateauvieux等、J.Biomed.Biotechnol、2010、pii:479364.doi:10.1155/2010/479364)。丙戊酸影响增强抑制活性的神经递质GABA( $\gamma$ 氨基丁酸盐)。提出了几种作用机制。丙戊酸尤其是GABA代谢:抑制GABA、GABA转氨基黄嘌呤(LAMP)的降解,GABA合成的衰减,并改变其流动。此外,丙戊酸阻断某些离子通道,减少由N-甲基-D-天冬氨酸介导的唤醒,并阻断包括 $Na^+$ 和 $Ca^{2+}$ 的离子通道的活性(电压依赖性L型CACNA1



C、D、N和F型)。

[0383] 在本发明的上下文中,丙戊酸用作免疫刺激剂以增强针对癌症的免疫应答,所述癌症表达与胎儿干细胞共有的癌症胎儿干细胞新抗原。

[0384] 更具体地,VPA用于刺激并增强癌症干细胞隔室上MHC-1的表达,增加一些肿瘤细胞中的新抗原含量。胎儿干细胞上的更高表达允许增强与MHC-I相关的新抗原向APC/树突细胞的呈递以诱导TH1免疫应答。更高水平的趋化因子(CXCL9、CXCL10)允许增强T细胞募集到肿瘤中。

[0385] 本发明涉及通过核染质重塑以及趋化因子表达(CXCL9,CXCL10)来增加衍生的胎儿干细胞中(在HADCi如VPA和/或5氮杂胞苷存在下)以及表达胎儿抗原的肿瘤细胞中新抗原含量的方法。

[0386] 特别地,当用于体内治疗受试者时,本发明的组合物和疫苗使得可以改变肿瘤微环境并促进T细胞募集到肿瘤中,从而获得肿瘤体积的长期持久减少。

[0387] 这是由于胎儿干细胞疫苗和VPA共施用的协同效应,当在疫苗注射后的一段时间(例如至少15天)进一步向患者施用HDACi时,其进一步改善。

[0388] 实施例表明,胎儿干细胞疫苗和VPA的联合治疗通过增加具有Th1/Th2细胞免疫的TIL、减少FoxP3 TReg亚群提供了优异的抗肿瘤反应,同时逆转了肿瘤免疫抑制、降低(肿瘤和脾脏中的)TReg,并将T CD4+和CD8+淋巴细胞募集到肿瘤中,而表达脾脏中PD-1的T CD4和CD比例较低。

[0389] VPA可下调c-Myc表达水平并可能诱导癌细胞和肿瘤起始细胞的细胞凋亡和自噬。VPA可通过自噬体交叉呈递增强适应性免疫应答。

[0390] VPA的另一种公知作用是减少炎症细胞因子,例如淋巴结中的IL6、IL8、TNF $\alpha$ 、白细胞介素(IL)-1 $\beta$ 、IL-17。

[0391] 在一个具体的实施方案中,组蛋白脱乙酰基酶抑制剂是辛二酰苯胺异羟肟酸,也称为伏立诺他(N-羟基-N'-苯基辛二酰胺),它是美国食品和药物管理局(FDA)于2006年批准的第一个组蛋白脱乙酰基酶抑制剂(Marchion DC等2004;Valente等2014)。

[0392] 在一个具体的实施方案中,组蛋白脱乙酰基酶抑制剂是FDA于2015年批准的帕比司他(LBH-589),它的结构如Valente等2014所述。

[0393] 在一个具体的实施方案中,组蛋白脱乙酰基酶抑制剂是吉维斯特(ITF2357),它已被欧盟批准为孤儿药(Leoni等2005;Valente等2014)。

[0394] 在一个具体的实施方案中,组蛋白脱乙酰基酶抑制剂是FDA于2014年批准的贝利司他,也称为Beleodaq(PXD-101)(Ja等2003;Valente等2014)。

[0395] 在一个具体的实施方案中,组蛋白脱乙酰基酶抑制剂是恩替诺特(作为SNDX-275或MS-275)。该分子具有以下化学式(C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>),其结构如Valente等2014所述。

[0396] 在一个具体的实施方案中,组蛋白脱乙酰基酶抑制剂是莫西诺司他(MGCD01030),具有以下化学式(C<sub>23</sub>H<sub>20</sub>N<sub>6</sub>O)(Valente等2014)。

[0397] 在一个具体的实施方案中,组蛋白脱乙酰基酶抑制剂是Practinostat(SB939),具有以下化学式(C<sub>20</sub>H<sub>30</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>),结构如Diermayr等2012所述。

[0398] 在一个具体的实施方案中,组蛋白脱乙酰基酶抑制剂是具有以下化学式(C<sub>22</sub>H<sub>19</sub>FN<sub>4</sub>O<sub>2</sub>)的西达本胺(CS055/HBI-8000)。

- [0399] 在一个具体的实施方案中,组蛋白脱乙酰基酶抑制剂是具有以下化学式( $C_{21}H_{26}N_6O_2$ )的奎司他斯特(JNJ-26481585)。
- [0400] 在一个具体的实施方案中,组蛋白脱乙酰基酶抑制剂是具有以下化学式( $C_{21}H_{23}N_3O_5$ )的阿昔诺司他(PCI24781)(Valente等,2014)。
- [0401] 在一个具体的实施方案中,组蛋白脱乙酰基酶抑制剂是具有以下化学式( $C_{20}H_{19}FN_6O_2$ )的CHR-3996(Moffat D等2010;Banerji等2012)。
- [0402] 在一个具体的实施方案中,组蛋白脱乙酰基酶抑制剂是具有以下化学式( $C_{18}H_{20}N_2O_3$ )的AR-42(Lin等,2010)。
- [0403] 在一个具体实施方案中,MHC表达的激活剂是DNA甲基转移酶抑制剂。
- [0404] 如本文所用,术语“DNA甲基转移酶抑制剂”是指能够与DNA甲基转移酶(DNMT)相互作用并抑制其活性的化合物。DNMT是催化甲基转移至DNA的酶。DNA甲基化具有多种生物学功能。所有已知的DNA甲基转移酶都使用S-腺苷甲硫氨酸(SAM)作为甲基供体。
- [0405] 在一个具体的实施方案中,DNA甲基转移酶抑制剂是氮杂胞苷,也称为5-氮杂-2'-脱氧胞苷,具有以下化学式( $C_8H_{12}N_4O_5$ )和本领域的结构(Kaminskas等2004;Estey等2013)。
- [0406] 在一个具体的实施方案中,DNA甲基转移酶抑制剂是地西他滨,也称为5-氮杂-2'-脱氧胞苷,具有下式( $C_8H_{12}N_4O_4$ )(Kantarjian等,2006)。
- [0407] 在一个具体的实施方案中,MHC表达和/或免疫应答的激活剂是组蛋白-赖氨酸N-甲基转移酶抑制剂或DNA甲基转移酶抑制剂。如本文所用,术语“组蛋白-赖氨酸N-甲基转移酶抑制剂”是指能够与由参与DNA甲基化的zeste同源物1(EZH1)和2(EZH2)基因的增强子编码的组蛋白-赖氨酸N-甲基转移酶相互作用的化合物。EZH2通过使用辅因子S-腺苷-L-甲硫氨酸催化向赖氨酸27处的组蛋白H3添加甲基。
- [0408] 在一个具体的实施方案中,组蛋白-赖氨酸N-甲基转移酶抑制剂是3-脱氮亚麻素A(DZNep,C-c3Ado)。DZNep,C-c3Ado在本领域中具有以下化学式 $C_{12}H_{14}N_4O_3$ 和CAS号102052-95-9。
- [0409] 在一个具体的实施方案中,组蛋白-赖氨酸N-甲基转移酶抑制剂是UNC1999和无活性的类似化合物。UNC1999在本领域中具有以下化学式 $C_{33}H_{43}N_7O_2$ 和CAS号1431612-23-5。
- [0410] 在一个具体的实施方案中,组蛋白-赖氨酸N-甲基转移酶抑制剂是UNC2400和无活性的类似化合物。UNC2400在本领域中具有以下化学式 $C_{35}H_{47}N_7O_2$ 和CAS号1433200-49-7。
- [0411] 在一个具体的实施方案中,组蛋白-赖氨酸N-甲基转移酶抑制剂是tazemetostat(EPZ6438,E7438)。Tazemetostat在本领域中具有以下化学式 $C_{34}H_{44}N_4O_4$ 和CAS号1403254-99-8。
- [0412] 在一个具体的实施方案中,组蛋白-赖氨酸N-甲基转移酶抑制剂是三氟乙酸盐(EPZ011989)。三氟乙酸盐在本领域中具有以下化学式 $CF_3COONa$ 和CAS号2923-18-4。
- [0413] 在一个具体的实施方案中,组蛋白-赖氨酸N-甲基转移酶抑制剂是EPZ005687。EPZ005687在本领域中具有以下化学式 $C_{32}H_{37}N_5O_3$ 和CAS号1396772-26-1。
- [0414] 在一个具体的实施方案中,组蛋白-赖氨酸N-甲基转移酶抑制剂是GSK343。GSK343在本领域中具有以下化学式 $C_{31}H_{39}N_7O_2$ 和CAS号1346704-33-3。
- [0415] 在一个具体的实施方案中,组蛋白-赖氨酸N-甲基转移酶抑制剂是GSK126。GSK126在本领域中具有以下化学式 $C_{31}H_{38}N_6O_2$ 和CAS号1346574-57-9。

[0416] 在一个具体的实施方案中,组蛋白-赖氨酸N-甲基转移酶抑制剂是GSK2816126。GSK2816126在本领域中具有以下化学式 $C_{31}H_{38}N_6O_2$ 和CAS号1346574-57-9。

[0417] 在一个具体的实施方案中,组蛋白-赖氨酸N-甲基转移酶抑制剂是ZLD1039。ZLD1039在本领域中具有以下化学式 $C_{36}H_{48}N_6O_3$ 和CAS号1826865-46-6。

[0418] 在特定的实施方案中,同时使用HDACi和DNA甲基转移酶抑制剂两者。实际上,已经表明,VPA和5-氮杂胞苷(核苷胞嘧啶的类似物,其可以整合入DNA和RNA)的组合使用导致新的抗胚胎抗原的再表达的协同作用。

[0419] HDACi以治疗有效量施用。对于VPA,其可以是10-15mg/kg/天,至多60mg/kg/天。VPA的血浆水平应优选在通常可接受的治疗范围内(50-100 $\mu$ g/mL)。

[0420] 在进一步的方面,根据本发明的方法适于治疗表达大量胎儿抗原的癌症,所述胎儿抗原与人胎儿干细胞(例如NACC1、BLM、WDR33、DAZAP1、CDK1、CDC45、ZNF165、XRCC5、SMARCA1、AIMP2、CKS1B...)具有共同的表达。

[0421] 如本文所用,术语“表达胎儿干细胞的癌症”是优选通过本文公开的方法、疫苗和组合物靶向的癌症,是指表达大量与人胎儿干细胞具有共同表达的胎儿抗原的癌症干细胞。通常,癌症选自膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、胆管癌、结肠直肠癌、骨肉瘤、神经胶质瘤、肺癌、淋巴瘤、急性和慢性淋巴样和髓样白血病、黑素瘤、多发性骨髓瘤、骨肉瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、胃癌、肾癌、头颈肿瘤和所有实体瘤和造血系统恶性肿瘤。要注意的是,该组合物中的细胞本质上是异质的。更特别地,当已经使用诱变剂并因此不同于根据本领域已知方法培养的多能细胞组合物时,其是同质的。

[0422] 如本文所用,术语“施用”是指将机体外存在的物质(例如,组合制剂)注射或通过物理递送至受试者的行为,例如通过粘膜、皮内、静脉内、皮下、肌肉内递送和/或本文所述或本领域已知的任何其他物理递送方法。当正在治疗疾病或其症状时,通常在疾病或其症状发作之后施用物质。当预防疾病或其症状时,通常在疾病或其症状发作之前施用物质。

[0423] 在特定的实施方案中,皮下注射疫苗组合物(胎儿干细胞+刺激MHC呈递的试剂)。注射可以同时、一次、分别,在同一注射点或不同注射点,在同一注射器中,或在单独的注射器中进行.....

[0424] 在特定的实施方案中,通过口服途径施用随访治疗(施用刺激MHC I和/或免疫系统的化合物,例如HDACi,特别是VPA)。

[0425] “治疗有效量”是指用于赋予受试者治疗益处所必需的活性剂的最小量。例如,对受试者的“治疗有效量”是这样的量,其诱导、缓解或引起与病症相关的病理症状、疾病进展或生理状况的改善或对疾病的抵抗。应当理解,本发明化合物的每日总用量将由主治医师在合理的医学判断范围内决定。任何特定受试者的特定治疗有效剂量水平将取决于多种因素,包括所治疗的病症和病症的严重程度;所用特定化合物的活性;所用的具体组合物、受试者的年龄、体重、一般健康状况、性别和饮食;所用特定化合物的施用时间、施用途径和排泄率;治疗的持续时间;与所用特定化合物组合或巧合使用的药物;以及医学领域众所周知的因素。例如,本领域技术人员已知以低于实现所需治疗效果所需的水平开始化合物的剂量并逐渐增加剂量直至达到所需效果。然而,产品的每日剂量可在0.01-1,000mg/成人/天的宽范围内变化。通常,组合物含有0.01、0.05、0.1、0.5、1.0、2.5、5.0、10.0、15.0、25.0、50.0、100、250和500mg活性成分,用于对待治疗的受试者的剂量进行症状调整。药物通常含

有约0.01mg至约500mg活性成分,优选1mg至约100mg活性成分。通常以每天0.0002mg/kg至约20mg/kg体重,特别是每天约0.001mg/kg至7mg/kg体重的剂量水平提供有效量的药物。

[0426] 在一个具体的实施方案中,根据本发明的方法还包括放疗、靶向疗法、免疫疗法或化疗中的一种或多种。通常,医生可以选择向受试者施用作为组合制剂的i) 胎儿干细胞群和ii) 选自激活MHC表达和/或免疫应答的组的化合物,以及放疗、靶向疗法、免疫疗法或化疗。

[0427] 在一些实施方案中,向受试者施用作为组合制剂的i) 胎儿干细胞群和ii) 选自激活MHC表达和/或免疫应答的组的化合物和化疗剂。

[0428] 术语“化疗剂”是指有效抑制肿瘤生长的化学化合物。化疗剂的实例包括烷化剂如噻替派和环磷酰胺;烷基磺酸盐,例如白消安、英丙舒凡和哌泊舒凡;氮杂环丙烷,例如苯佐替派、卡波醌、美妥替派和乌瑞替派;乙烯亚胺和甲基蜜胺,包括六甲蜜胺、曲他胺、三亚乙基磷酰胺、三亚乙基硫代磷酰胺和三甲密胺;多聚乙酰(尤其是布拉他辛和布拉他辛酮);喜树碱(包括合成类似物拓朴替康);苔藓抑素;卡利他汀;CC-1065(包括其阿多来新、卡折来新和比折来新合成类似物);念珠藻环肽(具体是念珠藻环肽1和念珠藻环肽8);多拉司他汀;倍癌霉素(包括合成类似物KW-2189和CB1-TM1);软珊瑚醇;水鬼蕉碱;匍枝珊瑚醇;海绵抑制素;氮芥,例如苯丁酸氮芥、萘氮芥、氯磷酰胺、雌氮芥、异环磷酰胺、甲二氯二乙胺、甲二氯二乙胺氧化物盐酸盐、美法仑、新氮芥、胆甾醇对苯乙酸氮芥(phenesterine)、泼尼莫司汀、曲磷胺、尿嘧啶氮芥;亚硝基脲,例如卡莫司汀、氯脲菌素、福莫司汀、洛莫司汀、尼莫司汀和雷莫司汀;抗生素,例如烯二炔抗生素(例如卡奇霉素、尤其是卡奇霉素11和卡奇霉素211,参见例如Agnew Chem Intl.Ed.Engl.33:183-186(1994));达内霉素,包括达内霉素A;埃斯培拉霉素;以及新制癌菌素发色团和相关色素蛋白烯二炔抗生素发色团)、阿克拉霉素、放线菌素、氨基霉素、偶氮丝氨酸、争光霉素、放线菌素C、卡柔比星、洋红霉素、嗜癌素、色霉素、更生霉素、道诺霉素、地托比星、6-重氨基-5-氧基-L-正亮氨酸、多柔比星(包括吗啉代-多柔比星、氰基吗啉代-多柔比星、2-吡咯啉基-多柔比星和脱氧多柔比星)、表柔比星、依索比星、伊达比星、麻西罗霉素、丝裂霉素、霉酚酸、诺加霉素、橄榄霉素、培洛霉素、泼非霉素、嘌呤霉素、奎那霉素、罗多比星、链黑霉素、链佐星、杀结核菌素、乌苯美司、净司他丁、佐柔比星;抗代谢药,诸如氨甲蝶呤和5-氟尿嘧啶(5-FU);叶酸类似物,例如迪诺特宁、氨甲蝶呤、蝶罗呤、曲美沙特;嘌呤类似物,例如氟达拉滨、6-巯基嘌呤、噻咪嘌呤、硫鸟嘌呤;嘧啶类似物,例如环胞苷、阿扎胞苷、6-氮尿苷、卡莫氟、阿糖胞苷、双脱氧尿苷、脱氧氟尿苷、依诺他滨、氟尿苷、5-FU;雄激素,例如卡芦睾酮、丙酸屈他雄酮、环硫雄醇、美雄烷、睾内酯;抗肾上腺药,例如氨鲁米特、米托坦、曲洛司坦;叶酸补充剂,例如亚叶酸;醋葡醛内酯;醛磷酰胺糖苷;氨基乙酰丙酸;安吡啶;贝斯布西;比生群;依达曲沙;地磷酰胺;秋水仙胺;地吡醌;依洛尼塞;依利醋铵;埃博霉素;乙环氧啶;硝酸镓;羟基脲;蘑菇多糖;氯尼达明;类美登素,例如美登素和安丝菌素;米托胍脲;米托蒽醌;莫哌达醇;二胺硝吡啶;喷司他汀;蛋氨酸;吡柔比星;鬼臼酸;2-乙酰肼;甲基苄肼;PSK®;雷佐生;根霉素);西佐喃;锗螺胺;替奴佐酸;三亚胺醌;2,2',2'-三氯三乙胺;单端孢霉烯(尤其是T-2毒素、粘液霉素A、杆孢菌素A和蛇形菌素);乌拉坦;长春地辛;达卡巴嗪;甘露氮芥;二溴甘露醇;二溴卫矛醇;哌泊溴烷;加西托星;阿糖胞苷("Ara-C");环磷酰胺;噻替派;紫杉烷类,例如紫杉醇(TAXOL®、Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.)和多西他赛(

TAXOTERE®、Rhone-Poulenc Rorer、Antony、France)；苯丁酸氮芥；吉西他滨；6-硫鸟嘌呤；巯基嘌呤；氨甲蝶呤；铂类似物，例如顺铂和卡铂；长春碱；铂；依托泊苷(VP-16)；异环磷酰胺；丝裂霉素C；米托蒽醌；长春新碱；长春瑞滨；诺维本(navelbine)；诺消灵(novantrone)；替尼泊苷；柔红霉素；氨基喋呤；希罗达(xeloda)；伊班膦酸盐；CPT-11；拓扑异构酶抑制剂RFS2000；二氟甲基鸟氨酸(DMFO)；视黄酸；卡培他滨；和以上任一种的药学上可接受的盐、酸或衍生物。该定义还包括用于调节或抑制激素对肿瘤的作用的抗激素剂，例如抗雌激素剂，包括例如他莫昔芬、雷洛昔芬、抑制4(5)-咪唑的芳香酶、4-羟基他莫昔芬、曲沃昔芬、盐酸雷洛昔芬(keoxifene、LY117018、奥那司酮和托瑞米芬(Fareston)；和抗雄激素剂，如氟他胺、尼鲁米特、比卡鲁胺、亮丙瑞林和戈舍瑞林；和以上任一种的药学上可接受的盐、酸或衍生物。

[0429] 在一些实施方案中，向受试者施用作为组合制剂的i) 胎儿干细胞群和ii) 选自激活MHC表达和/或免疫应答的组的化合物和靶向癌症疗法。

[0430] 靶向癌症疗法是通过干扰参与癌症生长、进展和扩散的特定分子(“分子靶标”)来阻断癌症生长和扩散的药物或其他物质。靶向癌症疗法有时被称为“分子靶向药物”、“分子靶向疗法”、“精准药物”或类似名称。在一些实施方案中，靶向疗法在于向受试者施用酪氨酸激酶抑制剂。术语“酪氨酸激酶抑制剂”是指充当受体和/或非受体酪氨酸激酶的选择性或非选择性抑制剂的多种治疗剂或药物中的任何一种。酪氨酸激酶抑制剂及其相关化合物是本领域熟知的，并描述于通过引用整体并入本文的美国专利公开2007/0254295中。本领域技术人员将理解，与酪氨酸激酶抑制剂相关的化合物将再现酪氨酸激酶抑制剂的作用，例如，相关化合物将作用于酪氨酸激酶信号传导途径的不同成员以产生与那个酪氨酸激酶的酪氨酸激酶抑制剂相同的效果。适用于本发明实施方案的方法的酪氨酸激酶抑制剂和相关化合物的实例包括但不限于：达沙替尼(BMS-354825)、PP2、BEZ235、沙拉替尼、吉非替尼(Iressa)、舒尼替尼(Sutent;SU11248)、厄洛替尼(Tarceva;OSI-1774)、拉帕替尼(GW572016;GW2016)、坎尼替尼(CI 1033)、塞马西尼(SU5416)、瓦塔拉尼(PTK787/ZK222584)、索拉非尼(BAY 43-9006)、伊马替尼(Gleevec;STI571)、来氟米特(SU101)、凡德他尼(Zactima;ZD6474)、贝伐单抗(avastin)、MK-2206(8-[4-氨基环丁基]苯基)-9-苯基-1,2,4-三唑并[3,4-f][1,6]萘啶-3(2H)-酮盐酸盐)衍生物、其类似物，及其组合。适用于本发明的另外的酪氨酸激酶抑制剂和相关化合物描述于，例如，美国专利公开2007/0254295、美国专利号5,618,829、5,639,757、5,728,868、5,804,396、6,100,254、6,127,374、6,245,759、6,306,874、6,313,138、6,316,444、6,329,380、6,344,459、6,420,382、6,479,512、6,498,165、6,544,988、6,562,818、6,586,423、6,586,424、6,740,665、6,794,393、6,875,767、6,927,293和6,958,340，所有这些都通过引用整体并入本文。在某些实施方案中，酪氨酸激酶抑制剂是已经口服施用的小分子激酶抑制剂，并且已经是至少一个I期临床试验的对象，更优选至少一个II期临床试验，甚至更优选至少一个III期临床试验，最优选由FDA批准用于至少一种血液学或肿瘤学适应症。此类抑制剂的实例包括但不限于吉非替尼、厄洛替尼、拉帕替尼、卡奈替尼、BMS-599626(AC-480)、来那替尼、KRN-633、CEP-11981、伊马替尼、尼罗替尼、达沙替尼、AZM-475271、CP-724714、TAK-165、舒尼替尼、瓦他拉尼、CP-547632、凡德他尼、博舒替尼、来他替尼、坦度替尼、米喹妥林、恩扎妥林(Enzastaurin)、AEE-788、帕唑帕尼、阿西替尼、莫塔塞尼、OSI-930、西地尼布、KRN-951、多韦替尼、

Seliciclib、SNS-032、PD-0332991、MKC-1 (Ro-317453;R-440)、索拉非尼、ABT-869、布立尼布 (BMS-582664)、SU-14813、替拉替尼、SU-6668、(TSU-68)、L-21649、MLN-8054、AEW-541和PD-0325901。

[0431] 在一些实施方案中,向受试者施用作为组合制剂的i) 胎儿干细胞群和ii) 选自激活MHC表达和/或免疫应答的组的化合物和免疫检查点抑制剂。

[0432] 如本文所用,术语“免疫检查点抑制剂”是指完全或部分减少、抑制、干扰或调节一种或多种检查点蛋白的分子。检查点蛋白调节T细胞活化或功能。已知许多检查点蛋白质,例如CTLA-4及其配体CD80和CD86;和PD1及其配体PDL1和PDL2 (Pardoll, Nature Reviews Cancer 12:252-264, 2012)。这些蛋白负责T细胞反应的共刺激性或抑制性相互作用。免疫检查点蛋白调节并维持自身耐受性以及生理免疫反应的持续时间和幅度。免疫检查点抑制剂包括抗体或衍生自抗体。在一些实施方案中,免疫检查点抑制剂是选自以下的抗体:抗CTLA4抗体(例如伊匹单抗)、抗PD1抗体(例如尼沃单抗、派姆单抗)、抗PDL1抗体、抗TIM3抗体、抗LAG3抗体、抗B7H3抗体、抗B7H4抗体、抗BTLA抗体和抗B7H6抗体。抗CTLA-4抗体的实例描述于美国专利号5,811,097、5811097、5855887、6051227、6207157、6,682,736、6,984,720和7,605,238。一种抗CTLA-4抗体是曲美莫单抗(替昔单抗,CP-675,206)。在一些实施方案中,抗CTLA-4抗体是伊匹单抗(也称为10D1,MDX-D010),其是结合CTLA-4的完全人单克隆IgG抗体。另一种免疫检查点蛋白是程序性细胞死亡1 (PD-1)。PD-1和PD-L1阻断剂的实例描述于美国专利号7,488,802、7943743、8008449、8168757、8,217,149和PCT公开专利申请号:W003042402、W02008156712、W02010089411、W02010036959、W02011066342、W02011159877、W02011082400和W02011161699。在一些实施方案中,PD-1阻断剂包括抗PD-L1抗体。在某些其他实施方案中,PD-1阻断剂包括抗PD-1抗体和类似的结合蛋白,例如尼沃单抗(MDX 1106、BMS 936558、ONO 4538),其是结合并通过其配体PD-L1和PD-L2阻断PD-1活化的完全人IgG4抗体;兰布利单抗(MK-3475或SCH 900475),抗PD-1的人源化单克隆IgG4抗体;CT-011,结合PD-1的人源化抗体;AMP-224是B7-DC的融合蛋白;抗体Fc部分;用于PD-L1 (B7-H1)阻断的BMS-936559 (MDX-1105-01)。其他免疫检查点抑制剂包括淋巴细胞活化基因-3 (LAG-3) 抑制剂,例如IMP321,一种可溶性Ig融合蛋白 (Brignone等,2007, J. Immunol. 179:4202-4211)。其他免疫检查点抑制剂包括B7抑制剂,例如B7-H3和B7-H4抑制剂。特别地,抗B7-H3抗体MGA271 (Loo等,2012, Clin. Cancer Res. July 15 (18) 3834)。还包括TIM3 (T细胞免疫球蛋白结构域和粘蛋白结构域3) 抑制剂 (Fourcade等,2010, J. Exp. Med. 207:2175-86和Sakuishi等,2010, J. Exp. Med. 207:2187-94)。在一些实施方案中,免疫疗法性治疗由过继免疫疗法组成,如Nicholas P. Restifo, Mark E. Dudley和Steven A. Rosenberg所述 (“Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response, Nature Reviews Immunology, Volume 12, April 2012)。在过继免疫疗法中,在体外分离患者的循环淋巴细胞或肿瘤浸润的淋巴细胞,由淋巴因子如IL-2活化并重新施用 (Rosenberg等, 1988; 1989)。活化的淋巴细胞最优选是早期从血液样品中分离并在体外活化(或“扩增”)的患者自己的细胞。

[0433] 在一些实施方案中,向受试者施用作为组合制剂的i) 胎儿干细胞群和ii) 选自激活MHC表达和/或免疫应答的组的化合物和放疗剂。

[0434] 如本文所用,术语“放疗剂”意指不受限的本领域技术人员已知的有效治疗或缓解

癌症的任何放疗剂。例如,放疗剂可以是诸如在近距离放射治疗或放射性核素治疗中施用的那些试剂。此类方法可任选地进一步包括施用一种或多种另外的癌症疗法,例如但不限于化疗和/或另一种放疗。

#### [0435] 药物和疫苗组合物

[0436] 如上所述的激活MHC表达和/或免疫应答的化合物和胎儿干细胞群可以与药学上可接受的赋形剂和任选的缓释基质(例如可生物降解的聚合物)组合以形成药物组合物。

[0437] “药学上”或“药学上可接受的”是指当适当地施用于哺乳动物,尤其是人时,不产生有害的、过敏的或其他不良反应的分子实体和组合物。药学上可接受的载体或赋形剂是指无毒固体、半固体或液体填充剂、稀释剂、封装材料或任何类型的制剂助剂。本发明的药物组合物用于口服、舌下、皮下、肌肉内、静脉内、透皮、局部或直肠施用,活性成分(单独或与另一种活性成分组合)可以以单位施用形式,作为与传统的药学支持物的混合物向动物和人施用。合适的单位施用形式包括口服途径形式,例如片剂、凝胶胶囊、粉末、颗粒和口服悬浮液或溶液、舌下和口腔施用形式、气溶胶、植入物、皮下、透皮、局部、腹膜内、肌肉内、静脉内、真皮下、透皮、鞘内和鼻内施用形式和直肠施用形式。通常,药物组合物含有对于被注射的制剂而言药学上可接受的载体。这些可以特别是等渗的无菌盐水溶液(磷酸二氢钠或磷酸二钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙或氯化镁等或这些盐的混合物),或干燥的、尤其是冷冻干燥的组合物,其在添加在无菌水或生理盐水(取决于情况)时,允许构成可注射溶液。适于注射使用的药物形式包括无菌水溶液或分散体;制剂包括芝麻油、花生油或丙二醇水溶液和用于临时制备无菌可注射溶液或分散体的无菌粉末。在所有情况下,该形式必须是无菌的并且必须以易于注射的程度流动。它必须在制备和储存条件下稳定,并且必须预防微生物如细菌和真菌的污染作用。可以在适当地与表面活性剂如羟丙基纤维素混合的水中制备包含本发明化合物作为游离碱或药理学上可接受的盐的溶液。分散体也可以在甘油、液体聚乙二醇及其混合物和油中制备。在通常的储存和使用条件下,这些制剂含有防腐剂以预防微生物的生长。可以将多肽(或编码其的核酸)配制成中性或盐形式的组合物。药学上可接受的盐包括与无机酸(例如盐酸或磷酸)或有机酸(如乙酸、草酸、酒石酸、扁桃酸等)形成的酸加成盐(与蛋白质的游离氨基形成)。与游离羧基形成的盐也可以衍生自无机碱,例如氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化铵、氢氧化钙或氢氧化铁,和有机碱,如异丙胺、三甲胺、组氨酸、普鲁卡因等。载体也可以是溶剂或分散介质,其含有例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)、其合适的混合物和植物油。例如,通过使用涂层如卵磷脂,在分散体的情况下通过维持所需的粒径和通过使用表面活性剂来保持适当的流动性。可以通过各种抗细菌剂和抗真菌剂,例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞等来预防微生物的作用。在许多情况下,优选包括等渗剂,例如糖或氯化钠。通过在组合物中使用延迟吸收的试剂,例如单硬脂酸铝和明胶可以延长可注射组合物的吸收。通过以下制备无菌可注射溶液:将所需量的活性多肽加入含有如上列举的几种其它成分(根据需要)的适当溶剂中,然后过滤灭菌。通常,通过以下制备分散体:将各种灭菌的活性成分加入无菌载体,所述无菌载体含有基础分散体介质和所需的来自如上列举的其他成分。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末的情况下,优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥技术,其从先前无菌过滤的溶液产生活性成分和任何其他所需成分的粉末。配制后,溶液将以与剂量制剂相容的方式并以治疗有效的量施用。制剂易于以多种剂型给药,例如上述可注射溶液的类型,但也

可使用药物释放胶囊等。例如,对于水溶液中的肠胃外施用,如果需要,溶液应适当缓冲,并且首先用足够的盐水或葡萄糖使液体稀释液等渗。这些特定的水溶液特别适用于静脉内、肌肉内、皮下和腹膜内施用。就此而言,根据本公开内容,可以使用的无菌含水介质是本领域技术人员已知的。例如,可以将一个剂量溶解在1ml等渗NaCl溶液中,并将其加入到1000ml的皮下输注液中或在所提出的输注部位注射。取决于所治疗的受试者的状况,剂量必然发生一些变化。在任何情况下,负责施用的人员将确定个体受试者的适当剂量。

[0438] 更具体地,将胎儿干细胞群和激活MHC表达和/或免疫应答的化合物配制为疫苗组合物。因此,本发明涉及疫苗组合物,其包含i) 胎儿干细胞群和ii) 选自激活MHC表达和/或免疫应答的组的化合物。

[0439] 在一个具体的实施方案中,根据本发明的疫苗组合物包含i) 胎儿干细胞和ii) 丙戊酸。

[0440] 在一个具体的实施方案中,根据本发明的疫苗组合物包含i) 表达新抗原,尤其是通过诱变剂或遗传修饰增强的新抗原的胎儿干细胞(iPSC)和ii) 丙戊酸。

[0441] 组合物还可以包含5氮杂胞苷。

[0442] 此外,如上所述,本发明的疫苗组合物可用于患有癌症的受试者。

[0443] 可以以与免疫原性组合物相同的方式,与上文所示的生理学赋形剂一起配制根据本发明的疫苗组合物。例如,药学上可接受的载体包括但不限于磷酸盐缓冲的盐水溶液、蒸馏水、乳剂如油/水乳剂、各种类型的润湿剂无菌溶液等。诸如胞壁酰肽如MDP、IL-12、磷酸铝、氢氧化铝、明矾和/或Montanide (R) 的佐剂可用于疫苗中。

[0444] 根据本发明的疫苗组合物可以皮下(s.c.)、皮内(i.d.)、肌肉内(i.m.)或静脉内(i.v.)注射施用、口服施用和鼻内施用或吸入。施用的疫苗通常是单剂量。或者,本发明的疫苗的施用是第一次(初次接种),然后用相同的干细胞群、刺激免疫系统的化合物或其组合和/或进一步的放疗、靶向疗法、免疫疗法或化疗中的一种或多种进行1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或100次加强(recall)(后续施用)。

[0445] 疫苗组合物也以试剂盒提供。该试剂盒包含疫苗组合物和提供免疫说明书的信息传单。该试剂盒还包括用于施用产品的所有材料。

[0446] 通过以下附图和实施例进一步说明本发明。然而,这些实施例和附图不应以任何方式解释为限制本发明的范围。

## 附图说明

[0447] 图1:在c-MET突变的IPSC的肾类器官规范期间测定的转录组。PB56(c-MET突变的IPSC)和EB56(从亲本c-Met IPSC的胚胎体衍生的胎儿肾类器官)差异表达基因之间的表达热图(欧几里得距离);

[0448] 图2:cMET-IPSC转录组和原发性乳头状肾癌(PRCC)样品的转录组之间的荟萃分析的Venn图。通过Fisher的超几何检验计算PRCC表达谱中胚胎体胎儿肾类器官转录组特征的p值。



[0449] 图3:在IPSC分化后获得的培养的人造血胎儿干细胞(EB)中,存在和不存在HDACi(VPA)时,CMH I类和II类的表达。

[0450] 图4:在BCR-ABL阳性IPSC中由诱变剂诱导的人源造血胎儿干细胞的基因组变异。与亲本BCR-ABL阳性IPSC相比,通过外显子组测序发现基因的Venn图受基因组变异影响,测试了3种不同的实验条件:没有基因组不稳定性衍生的造血EB(蓝色)、由ENU诱导的具有基因组不稳定性的早期传代中的衍生的胎儿造血EB(绿色)、由ENU诱导的具有基因组不稳定性的晚期传代中的胎儿造血EB(红色)。

[0451] 图5:与AML转录组(GSE10358)相比,在由ENU处理的IPSCs BCR-ABL的转录组实验中,对123个基因进行了无监督主成分分析。

[0452] AML患者原始转录组分析中集成的“培养皿中的原始细胞危象”模型中受影响的123个基因预测了预后歧视(对数秩p值=1E-4)。

[0453] 小灰点:G2预后良好AML。大黑点:G1预后不良AML。

[0454] 横坐标:第一维,以因素分析(主成分分析)的任意单位表示;纵坐标:第二维,以因素分析(主成分分析)的任意单位表示。

[0455] 图6:具有良好和不良预后特征的AML患者的总生存期。

[0456] 上曲线:良好预后AML(G2)。下曲线:不良预后AML(G1)。

[0457] 横坐标:总生存期的可能性;纵坐标:时间,以月表示。

[0458] 图7:从iPSC获得的肺类器官与肺癌之间的签名显示了19种常见基因。

[0459] 图8:用于评估MHC1 HLA-ABC表达的HDACi浓度。

[0460] 图9:在存在和不存在HDACi的情况下,在CML衍生的IPSC(PB32)上MHC1 HLA ABC的表达。

[0461] 左图:使用MHC I HLA-ABC单克隆抗体和APC,将RFI MEAN标准化为用4种不同的HDACi处理的iPSC(PB32)的DMSO对照。纵坐标:RF/MHC1荧光倍数。

[0462] 右图:标准化为暴露于4种不同HDACi的CML衍生的IPSC(PB32)的DMSO对照的MHC1表达百分比。纵坐标:标准化为DMSO对照的阳性APC荧光的百分比。

[0463] 图10:在IPSC上存在和不存在HDACi的情况下,MHC1 HLA ABC的表达,无基因组改变(PB33)。

[0464] 左图:使用MHC I HLA-ABC单克隆抗体和APC,将RFI MEAN标准化为用4种不同的HDACi处理的IPSC(PB33)的DMSO对照。纵坐标:RF/MHC1荧光倍数。

[0465] 右图:标准化为暴露于4种不同HDACi的IPSC(PB33)的DMSO对照的MHC1表达百分比。纵坐标:标准化为DMSO对照的阳性APC荧光的百分比。

[0466] 图11:在鼠IPSCs、鼠ESC、移植的Pan02和鼠内胚层祖细胞(EndoPC)的转录组实验中,对392个基因进行了无监督主成分分析。

[0467] 横坐标:第一维,以因素分析(主成分分析)的任意单位表示;纵坐标:第二维,以因素分析(主成分分析)的任意单位表示。

[0468] 图12:在鼠IPSCs、鼠ESC、移植的Pan02和鼠内胚层祖细胞(EndoPC)之间用359个基因进行的基因表达热图和无监督分类。

[0469] 图13:通过RT-PCR在鼠成纤维细胞、iPSC和EndoPC上表达多能基因。

[0470] 与鼠iPSC和原代鼠C57BL/6成纤维细胞相比,通过定量RT-PCR在EndoPC中表达富

含iPSC的基因。将包括OCT4、SOX2、NANOG、LIN28、CMYC、KLF4和碱性磷酸酶(ALP)的七个不同因子定量,然后将其标准化为miPSC中发现的mRNA水平(值为100)。纵坐标:mRNA的相对表达,以任意单位表示。横坐标,从左到右的条形组:(i)m成纤维细胞;(ii)EndoPCs;(iii)miPSC。对于从左到右的条形组:(i)OCT4、(ii)SOX2、(iii)NANOG、(iv)LIN 28、(v)cMYC、(vi)KLF4、(vii)ALP。

[0471] 图14:与ESC相比,通过流式细胞术分析mESC标志物SSEA-1在EndoPC中的表达。

[0472] 左图:mESC(CK35);右图:EndoPC。纵坐标:荧光信号强度(对数),以任意单位表示。横坐标:信号幅度。

[0473] 图15:0.5和4小时后进行用或不用100ng/ml IL6在Pan 02上扩增STAT3、pSTAT3(Y705)和β肌动蛋白的蛋白质印迹分析。

[0474] 将Pan02细胞与(从左至右的原料)孵育:(i)无IL-6,无Jak抑制剂,(ii)无IL-6,无Jak抑制剂,(iii)IL-6,无Jak抑制剂(iv)IL-6,无Jak抑制剂,(v)IL-6,Jak抑制剂,(vi)IL-6,Jak抑制剂。从上到下的线:(i)p-Stat 3Y705、(ii)Stat 3、(iii)β-肌动蛋白。

[0475] 图16:与未处理的小鼠相比,接种2次增强的EndoPC的小鼠的总生存期(n=8)。

[0476] 纵坐标:生存百分比;横坐标:时间,以天表示。

[0477] 图17:通过生物发光定量目标区域(ROI),所述生物发光测量了与对照小鼠相比经治疗的小鼠的胰腺上的表面强度。

[0478] 纵坐标:目标区域(ROI)表面强度,以任意单位表示。

[0479] 图18:该图代表从多能干细胞获得胎儿干细胞的不同步骤。

## 具体实施方式

[0480] 实施例1:

[0481] 衍生自携带c-MET突变的肾类器官的胎儿抗原的表征

[0482] 我们通过使用仙台病毒介导的多能基因转移对来自患有1型乳头状肾癌(PRCC)的供体的血细胞进行重编程,从而产生了具有遗传性c-MET突变的iPSC系。我们设计了3D培养系统来诱导c-MET iPSC分化为由胎细胞组成的肾类器官。我们证明,iPSC衍生的肾类器官表达具有肾小球和肾小管结构的肾祖细胞的标志物。透射电子显微镜分析证实了管状结构中紧密连接的存在。在肾类器官(EB56)和亲本多能干细胞(PB56)中进行基因阵列分析。在具有c-met突变的iPSC(PB56)和包含确定的肾祖细胞的衍生的胎儿肾类器官之间进行排序产品算法的监督分析允许鉴定196个差异表达的基因探针:与IPSC PB56和它们中的少数相比,EB56中的148个被下调,与IPSC PB56相比,EB56中的48个被上调(图1)。这证实胎儿肾类器官丧失了来自iPSC的多能性基因并获得了与确定的肾脏组织有关的胎儿基因。

[0483] 通过在PRCC RNAseq样品上进行的c-MET状态监督的机器学习允许表征1333个预测基因,并具有最小的误分类错误。c-MET突变的IPSC特征和PRCC特征之间的荟萃分析显示IPSC谱的显著富集可预测c-MET突变的PRCC肿瘤状态(富集倍数:5.68;p值<2.2E-16,图2)。通常与原发成人肾癌中报告的癌基因相关的来自肾祖细胞的特征性胎儿基因至少在下组中:TRAPPC4、MX1、ITSN1、DNAJC7、TAF15、TMEM88、CRYM、PRTG、TYRO3、C12ORF60、FJX1、ADM、FAM45A、ASS1、CA2、ZFHX4、CLVS1、NRG1、EZH2、SLC22A23、MSH5、FBN2、GTF2H2、LIX1、HESX1、FZD5、LRP2、RHOQ、NUAK2、ILF2、ACP6、RPL5、NMNAT1、ID1、U2AF2、KLHL14、CDH2、GREB1L、

ARRDC4、THBS1、BMP4、LRIG3、SOX5、SF1、LGR4、MGEA5、BCORL1、STOM、GLIS3、ANXA1、KDM4C、SDC2、TMEM130、MAGI2、GLI3、HEY2、TPBG、ID4、MYLIP、ENC1、EGR1、CDH6、NPY1R、SEL1L3、LRAT、CLDN1、CEP97、BHLHE40、ARL5A、ARL4C、ZNF385B、LYPD1、B3GNT7、INSIG2、ARHGAP29、NOTCH2、IFI16。

[0484] 这些结果证实,源自c-MET突变的IPSC的胎儿肾类器官是与模型乳头状肾癌相关的胎儿细胞,所述乳头状肾癌表达至少77种与常见癌症相关的胎儿新抗原,允许制备用于与c-met突变相关的肾癌的癌细胞疫苗产品或细胞提取物。

[0485] 实施例2

[0486] 急性髓性白血病(AML)衍生的胎儿造血干细胞中常见的突变组。

[0487] 我们开发了慢性粒细胞白血病的诱导的多能细胞(IPSC)模型来模拟疾病的进展。BCR-ABL融合蛋白表达在慢性粒细胞白血病的进展期间增加,并且众所周知,这种现象诱导基因组不稳定并促进与原始细胞转化相容的继发性基因组事件的发生,从而导致急性粒细胞白血病。

[0488] 培养携带Bcr-Abl癌基因的人多能干细胞,并用诱变剂(ENU)扩增,以诱导基因组不稳定并增强连续分裂期间的体细胞突变。在存在生长和形态发生的情况下,利用胚胎小体(EB)技术制备确定的造血祖细胞。分析了第2-3天对应于成血管细胞阶段、原始细胞菌落的胚胎体(EB)和第4-20天的EB。通过FACS分析表征造血EB的造血标志物CD34、C43、CD45。通过计数CFC的数量并分析CFC的类型,通过菌落形成测定法确认了造血潜能。我们表明,ENU可以诱导基因组不稳定性,并允许在培养皿中复制原始细胞危机,其中培养物中具有更新的原始造血骨髓祖细胞。如通过FACS分析所述,培养的造血EB中VPA的存在允许增加CMH I类的量,并降低CMH II类的功效(图3)。

[0489] 在第16天,对衍生的胎儿造血EB祖细胞进行基因阵列、外显子组和CGH阵列,这些祖细胞从暴露于ENU之后的早期传代(>20代)的IPSC和晚期传代(>100代)的IPSC获得。与具有或不具有基因组不稳定的分化胚胎体以及在早期传代和晚期传代培养的IPSC的EB相比,对亲本IPSC的DNA进行了整个外显子组分析。下一代测序在Illumina Technologies上通过末端配对测序并使用在HG19基因组版本上比对的CASAVA流水线进行。对于EXAC数据库中的一般人群,选择频率低于0.01的基因组变体。

[0490] 我们比较了造血EB与亲本IPSC的基因组变异,其中等位基因频率的差异多0.10。如图4和表1所示,从BCR-ABL阳性IPSC产生的造血EB中鉴定了一些基因组变异:发现14个基因受9个错义单核苷酸变异和5个移码影响。

[0491] 另一方面,暴露于ENU后,IPSC(<20代和>100代)分化为造血胎儿干细胞(EB),并将突变组特征与衍生自不具有ENU的亲本IPSC的EB进行比较。ENU已表明可在造血EB中诱导大量的基因组变异和体细胞突变,从而导致基因组不稳定。重要的是,我们在早期传代和晚期传代中发现了衍生自IPSC的造血EB的相似突变,表明在iPSC的可扩展扩增期间稳定的突变组(图4和表1)。

[0492] 在来自经ENU处理的IPSC的EB中发现一共123个基因组变异,包括编码错义、停止获得和移码。这些基因组变异通常在原发性急性白血病中表达并报道,其中至少: ARHGEF10L:221656\_s\_at、TRIM66:213748\_at、ARHGEF10L:1570511\_at、NKAIN3:1553241\_at、ITGA7:216331\_at、GGT1:211417\_x\_at、PDZD7:220555\_s\_at、MUC4:235055\_x\_at、GGT1:

215603\_x\_at、MUC2:204673\_at、NECAB3:210720\_s\_at、GGT1:208284\_x\_at、MNT:204206\_at、GGT1:207131\_x\_at、ITGA7:209663\_s\_at、BTNL9:230992\_at、FNBP1:230086\_at、GLTSCR1:219445\_at、NECAB3:223954\_x\_at、COPZ2:219561\_at、ZFP36:201531\_at、MIB2:241541\_at、ABCC12:1553410\_a\_at、IGFN1:1563098\_at、LRRK2:229584\_at、MNT:236749\_at、RIN3:220439\_at、GGT1:233837\_at、KIF5C:1557089\_at、ANK2:202921\_s\_at、HDAC7:236326\_at、MUC20:1558220\_at、SDCCAG3:230058\_at、GGT1:209919\_x\_at、RIN3:1562005\_at、DNAI1:233195\_at、DNAI1:220125\_at、BTNL9:241496\_at、ABTB2:232624\_at、MC2R:208568\_at、DOCK4:244840\_x\_at、FSD1L:230904\_at、HDAC7:217937\_s\_at、CRP:205753\_at、PPP1R3A:206895\_at、SLC22A17:221106\_at、PITPNM1:203826\_s\_at、BTBD7:224943\_at、MIB2:241377\_s\_at、A2M:1558450\_at、CTDSP2:208735\_s\_at、IFNA14:208182\_x\_at、KIF5C:203130\_s\_at、MUC20:243774\_at、THNSL2:239949\_at、KIF5C:203129\_s\_at、GTF3C3:1555439\_at、NRXN1:1558708\_at、MED26:1559593\_a\_at、FNBP1:230389\_at、TMC03:230317\_x\_at、PPP1R3A:211169\_s\_at、ING1:208415\_x\_at、ZNF292:1562991\_at、RBL1:1555004\_a\_at、CD109:239719\_at、CD109:229900\_at、FOXRED2:233250\_x\_at、PLIN2:209122\_at、ZNF85:1554445\_at、SESN1:218346\_s\_at、TMC03:220240\_s\_at、MED26:231724\_at、CD109:226545\_at、CENPE:205046\_at、ING1:210350\_x\_at、TMC03:226050\_at、FOXRED2:220707\_s\_at、GTF3C3:222604\_at、BTBD7:224945\_at、CDC27:217881\_s\_at、STOM:201061\_s\_at、CDC27:217880\_at、ZNF317:1555337\_a\_at、TET1:228906\_at、LRBA:214109\_at、MED4:217843\_s\_at、CDC27:217879\_at、ZNF317:225296\_at、ZNF292:212366\_at、MED4:222438\_at、BCR:226602\_s\_at、STOM:201060\_x\_at、BCR:202315\_s\_at、ZNF85:206572\_x\_at、BCR:217223\_s\_at、HPRT1:202854\_at、LRBA:212692\_s\_at、GTF3C3:218343\_s\_at、NASP:201969\_at、NASP:201970\_s\_at、MSH2:209421\_at。

[0493] AML患者原始转录组分析中集成的“培养皿中的原始细胞危象”模型中的这些受影响的123个基因预测了总体生存率(对数秩 $p$ 值=1E-4,图6)的预后歧视( $p$ 值=0.00000187,图5)。

[0494] 这些结果证实,受IPSC衍生的造血EB中的基因组变异影响的新抗原复制AML中表达的类似胎儿新抗原。因此,可以从这种修饰的工程化胎儿造血细胞生产疫苗产品,例如辐射细胞或细胞提取物(AND、ARN、蛋白质)或新表位和肽制剂。因此,该相关的胎儿造血细胞可通过疫苗接种治疗策略用于刺激针对急性白血病的免疫应答。

IPSC BCR-ABL	造血分化中的 EB	具有遗传不稳定性的早期传代的造血分化中的 EB	具有遗传不稳定性的晚期传代的造血分化中的 EB
停止获得	0	4	3
错义	9	77	88
移码	5	5	5
变异总数	14	86	96
受影响的基因数	14	84	92
总受影响基因 n=123			

[0496] 表1:通过外显子组测序与亲本BCR-ABL阳性IPSC相比检测到的基因组修饰的总结:描述了每个过程样品(造血EB:胚状体)与衍生自它们的亲本IPSC的基因组相比的根据行数的不同类型的基因组变异。

[0497] 实施例3

[0498] 患有肺癌的胎儿肺类器官衍生的常见基因表达

[0499] 我们调查了从IPSC(并因此由胎细胞组成)衍生的肺类器官的转录组分析以预测肺癌的特征:通过错误发现率(FDR)进行多次测试校正后的LIMMA算法在分选的细胞和从第0代到第5代的细胞培养物之间鉴定了8372个可变基因。SAM算法联合发现肺肿瘤和正常肺组织之间有5619个差异表达基因(FDR<0.05, n=246个样品)。借助机器学习优化了对肺泡类器官与肺癌特征之间的交集的嵌套分析,并从斯坦福鉴定的算法中留下一一种算法。发现了19个预测基因的共同特征,其误分类错误的最小值小于9%(图7)。

[0500] 实施例4

[0501] HDAC抑制剂增加疫苗的免疫原性

[0502] 用作疫苗的MHC I在细胞中的更高表达将允许增强与MHC-1相关的新抗原向APC/树突细胞的呈递以诱导TH1免疫应答。为此目的,我们测试了四个不同的HDACi,以检查它们在两个独立的iPSC上增加MHC 1表达的能力。一种没有遗传变异的iPSC(PB33)和一种带有由CML疾病患者产生的BCR-ABL融合产物的iPSCS(PB32)。

[0503] 以1-1.5 $\mu$ M的剂量测试了四个HDACi,包括伏林司他、恩替司他、左旋乙酰胺和丙戊酸(图8)。培养24小时后,通过流式细胞术分析对MHC1 HLA ABC的表达进行定量,表明两种IPSC的MHC1均增加了23-52%(图9和10,右图)。对于每种细胞系,相对于DMSO对照的相对荧光强度(RFI)平均值的标准化显示MHC1增加了0.84-2.45倍(图9和10左图)。

[0504] 实施例5

[0505] 用自体内胚层祖细胞与丙戊酸(VPA)联合接种产生针对导管胰腺腺癌(PDAC)的抗肿瘤应答。

[0506] 通过使用表达Oct4/Sox2/cMyc/Kf14转录因子的病毒载体,我们从鼠尾成纤维细胞衍生的iPSC和鼠分化的肝细胞中产生了内胚层祖细胞(EndoPC)。这些祖细胞是胎细胞。为了突出EndoPC的胰腺肿瘤表达谱,其转录组与被移植到同基因C57BL/6小鼠中的Pan02细

胞相关联,相比之下,iPSC的干细胞表达谱衍生自鼠胚胎干细胞(D3)。在组合和跨批次标准化转录组矩阵上,在p值阈值小于 $10^{-4}$ 且组间实施500次排列的情况下,在4个样本组之间进行了监督ANOVA。发现3230个基因标识符的清单在4个实验条件之间存在显著差异(数据未显示)。第二次,在这些可变表达谱上,采用SAM监督的算法来发现以下各组之间的显著差异表达基因:(EndoPCs+Pan02体内) versus (D3-ES+鼠\_iPSC),其中FDR小于1%。通过这些分析,发现EndoPC的胰腺肿瘤基因表达谱包含359个基因标识符,其允许通过无监督的主成分分析(图11),也可通过在此图谱的基因表达热图上进行(Pearson距离,完整方法,图12)的无监督的聚类进行显著个体化的实验组(P值=1.138249e-10)。这些结果表明胰腺肿瘤表达谱在EndoPC中可能是突出的。

[0507] 我们还证明了加工独特分子特征的EndoPC与鼠iPSC不同,并且通过定量RT-PCR发现对于多能性维持相关的基因(如OCT4、SOX2、NANOG、LIN28、CMYC、KLF4和碱性磷酸酶(ALP))呈阴性(图13)。后者的结果通过流式细胞术分析证实,表明不存在阶段特异性胚胎抗原(SSEA)-1表达(图14)。此外,EndoPC与Pan02共享若干基因,包括PDX1、HNF4A、HNF1B、HNF1A、FOXA2、FOXA3(数据未显示),并且它们的增殖和自我更新能力依赖于IL-6/JAK/STAT3信号通路。为了评估Pan02和EndoPC的IL-6/JAK/STAT3轴,我们分别用100ng/ml IL-6和在存在JAK抑制剂的情况下用IL-6处理。

[0508] 在两种细胞系中该途径的激活与响应IL-6的酪氨酸705上的STAT3的磷酸化相关(图15仅显示了Pan02细胞的结果)。在暴露30分钟和4小时后,在添加JAK抑制剂后,Western blot分析检测到Tyr-705-phospho-STAT3形式被强烈抑制。另外,IL-6/JAK/STAT3轴的激活与β连环蛋白和TCF4 mRNA的上调有关(数据未显示)。

[0509] 然后,我们调查了在同系PDAC小鼠模型中用辐射的EndoPC与VPA组合进行疫苗接种是否对胰腺癌有效。疫苗接种在于通过皮下途径注射两种 $2 \times 10^6$  EndoPCS悬浮液,并用80灰剂量辐射。

[0510] 在正交注射前7天和14天将细胞注射表达荧光素酶基因的 $2 \times 10^6$ 个Pan02Luc细胞的胰腺尾部。接受2次加强疫苗接种的小鼠(n=8)在攻击日接受饮用水中剂量为0.40mM的VPA。同时,未接种疫苗的小鼠接受相同数量的没有VPA的Pan02Luc癌细胞。我们发现,与未接种疫苗的小鼠相反,用辐射的EndoPC预先注射的小鼠的生存率显著提高(图16)。我们还发现,Pan02肿瘤在PBS对照组中逐渐生长,而引人注目地,用EndoPC免疫导致肿瘤生长的阻滞,其中与对照组相比,处理组的平均肿瘤大小存在统计学上的显著差异。系统量化了通过生物发光测量表面强度的目标区域(ROI),表明从肿瘤攻击后第4天起疫苗处理组肿瘤的明显抑制(图17)。

[0511] 在整个申请中,各种参考文献描述了本发明所属领域的现有技术。这些参考文献的公开内容通过引用结合到本公开中。

[0512] 参考文献

[0513] 专利文献

[0514] EP 2 599 860

[0515] PCT/JP2006/324881、PCT/JP02/05350

[0516] US 2005/0176707

[0517] 美国专利号5,843,780;6,200,806;7,029,913;5,453,357;5,690,926;6,642,

048;6,800,480;5,166,065;6,090,622;6,562,619;6,921,632;5,914,268;9,499,797;9,637,732;8,158,766;8,129,187;8,058,065;8,278,104;8,697,359;4,684,611;5,240,840;4,806,476;5,298,429;5,396,767;5,811,097;5,811,097;5,855,887;6,051,227;6,207,157;6,682,736;6,984,720;7,605,238;7,488,802;7,943,743;8,008,449;8,168,757;8,217,149

[0518] WO 2012/122629、WO 2016/065330、WO 2017/027757、WO 2017/202949、WO 2001/085917、WO 2012/060473、WO 03/042402、WO 2008/156712、WO 2010/089411、WO 2010/036959、WO 2011/066342、WO 2011/159877、WO 2011/082400、and WO 2011/161699

[0519] 非专利文献

[0520] Albrecht T, Schwab R, Peschel C, Engels HJ, Fischer T, Huber C, Aulitzky WE. Cationic lipid mediated transfer of c-abl and bcr antisense oligonucleotides to immature normal myeloid cells: uptake, biological effects and modulation of gene expression. *Ann Hematol.* 1996 Feb; 72 (2) :73-9.

[0521] Banerji U, van Doorn L, Papadatos-Pastos D, Kristeleit R, Debnam P, Tall M, Stewart A, Raynaud F, Garrett MD, Toal M, Hooftman L, De Bono JS, Verweij J, Eskens FA. A phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of CHR-3996, an oral class I selective histone deacetylase inhibitor in refractory solid tumors. *Clin Cancer Res.* 2012 May 1; 18 (9) :2687-94.

[0522] Bartlett DL, Liu Z, Sathaiyah M, Ravindranathan R, Guo Z, He Y, Guo ZS. Oncolytic viruses as therapeutic cancer vaccines. *Mol Cancer.* 2013 Sep 11; 12 (1) :103.

[0523] Bear AS, Cruz CR, Foster AE. T cells as vehicles for cancer vaccination. *J Biomed Biotechnol.* 2011; 2011:417403.

[0524] Bridle BW, Chen L, Lemay CG, Diallo JS, Pol J, Nguyen A, Capretta A, He R, Bramson JL, Bell JC, Lichty BD, Wan Y. HDAC inhibition suppresses primary immune responses, enhances secondary immune responses, and abrogates autoimmunity during tumor immunotherapy. *Mol Ther.* 2013 Apr; 21 (4) :887-94.

[0525] Brignone C, Grygar C, Marcu M, **Schäkel**K, Triebel F. A soluble form of lymphocyte activation gene-3 (IMP321) induces activation of a large range of human effector cytotoxic cells. *J Immunol.* 2007 Sep 15; 179 (6) :4202-11.

[0526] Chateauvieux S, Morceau F, Dicato M, Diederich M. Molecular and therapeutic potential and toxicity of valproic acid. *J Biomed Biotechnol.* 2010; 2010.pii:479364.

[0527] Choi VW, Samulski RJ, McCarty DM. Effects of adeno-associated virus DNA hairpin structure on recombination. *J Virol.* 2005 Jun; 79 (11) :6801-7.

[0528] Chung Y, Klimanskaya I, Becker S, Li T, Maserati M, Lu SJ, Zdravkovic T, Ilic D, Genbacev O, Fisher S, Krtolica A, Lanza R. Human embryonic stem cell lines generated without embryo destruction. *Cell Stem Cell.* 2008 Feb 7; 2 (2) :113-7.

[0529] Eggermont LJ, Paulis LE, Tel J, Figdor CG. Towards efficient cancer

immunotherapy:advances in developing artificial antigen-presenting cells.Trends Biotechnol.2014 Sep;32(9):456-65.

[0530] Fatehullah A,Tan SH,Barker N.Organoids as an in vitro model of human development and disease.Nat Cell Biol.2016 Mar;18(3):246-54.

[0531] Fourcade J,Sun Z,Benallaoua M,Guillaume P,Luescher IF,Sander C,Kirkwood JM,Kuchroo V,Zarour HM.Upregulation of Tim-3 and PD-1 expression is associated with tumor antigen-specific CD8+T cell dysfunction in melanoma patients.J Exp Med.2010 Sep 27;207(10):2175-86.

[0532] Fournier RE.A general high-efficiency procedure for production of microcell hybrids.Proc Natl Acad Sci U S A.1981 Oct;78(10):6349-6353.

[0533] Gore A,Li Z,Fung HL,Young JE,Agarwal S,Antosiewicz-Bourget J,Canto I,Giorgetti A,Israel MA,Kiskinis E,Lee JH,Loh YH,Manos PD,Montserrat N,Panopoulos AD,Ruiz S,Wilbert ML,Yu J,Kirkness EF,Izpisua Belmonte JC,Rossi DJ,Thomson JA,Eggan K,Daley GQ,Goldstein LS,Zhang K.Somatic coding mutations in human induced pluripotent stem cells.Nature.2011 Mar 3;471(7336):63-7.

[0534] Graham FL,van der Eb AJ.A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA.Virology.1973 Apr;52(2):456-67.

[0535] Holmen SL,Vanbrocklin MW,Eversole RR,Stapleton SR,Ginsberg LC.Efficient lipid-mediated transfection of DNA into primary rat hepatocytes.In Vitro Cell Dev Biol Anim.1995 May;31(5):347-51.

[0536] Hussein S.M.,Batada N.N.,Vuoristo S.,Ching R.W.,Autio R.,Narva E.Copy number variation and selection during reprogramming to pluripotency.Nature.2011;471(7336):58-62.

[0537] Hussein SM,Elbaz J,Nagy AA.Genome damage in induced pluripotent stem cells:assessing the mechanisms and their consequences.BioEssays:news and reviews in molecular,cellular and developmental biology.2013;35:152-162.

[0538] Lambert C,Schultz RA,Smith M,Wagner-McPherson C,McDaniel LD,Donlon T,Stanbridge EJ,Friedberg EC.Functional complementation of ataxia-telangiectasia group D(AT-D) cells by microcell-mediated chromosome transfer and mapping of the AT-D locus to the region 11q22-23.Proc Natl Acad Sci USA July 1,1991 88(13)5907-5911

[0539] Le Bolc'h G,Le Bris N,Yaouanc JJ,Climent JC,des Abbayes H,Audrézet MP,Férec C.Cationic phosphonolipids as non viral vectors for DNA transfection.Tetrahedron Lett.1995,Sept 11;36:6681-6684.

[0540] Leoni F,Fossati G,Lewis EC,Lee JK,Porro G,Pagani P,Modena D,Moras ML,Pozzi P,Reznikov LL,Siegmund B,Fantuzzi G,Dinarello CA,Mascagni P.The histone deacetylase inhibitor ITF2357 reduces production of pro-inflammatory cytokines in vitro and systemic inflammation in vivo.Mol Med.2005 Jan-Dec;11(1-12):1-15.



- [0541] Lin TY, Fenger J, Murahari S, Bear MD, Kulp SK, Wang D, Chen CS, Kisseberth WC, London CA. AR-42, a novel HDAC inhibitor, exhibits biologic activity against malignant mast cell lines via down-regulation of constitutively activated Kit. *Blood*. 2010; 115: 4217-4225.
- [0542] Lindor NM, McMaster ML, Lindor CJ, Greene MH; National Cancer Institute, Division of Cancer Prevention, Community Oncology and Prevention Trials Research Group. Concise handbook of familial cancer susceptibility syndromes—second edition. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2008; (38): 1-93.
- [0543] Loeffler JP, Behr JP. Gene transfer into primary and established mammalian cell lines with lipopolyamine-coated DNA. *Meth. Enzymol*, 1993; 217: 599-618
- [0544] Loo D, Alderson RF, Chen FZ, Huang L, Zhang W, Gorlatov S, Burke S, Ciccarone V, Li H, Yang Y, Son T, Chen Y, Easton AN, Li JC, Rillema JR, Licea M, Fieger C, Liang TW, Mather JP, Koenig S, Stewart SJ, Johnson S, Bonvini E, Moore PA. Development of an Fc-enhanced anti-B7-H3 monoclonal antibody with potent antitumor activity. *Clin Cancer Res*. 2012 Jul 15; 18(14): 3834-45.
- [0545] Marchion DC, Bicaku E, Daud AI, Richon V, Sullivan DM, Munster PN. Sequence-specific potentiation of topoisomerase II inhibitors by the histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid. *J Cell Biochem*. 2004; 92: 223-237.
- [0546] Melief CJ, van Hall T, Arens R, Ossendorp F, van der Burg SH. Therapeutic cancer vaccines. *J Clin Invest*. 2015 Sep; 125(9): 3401-12.
- [0547] Moffat D, Patel S, Day F, Belfield A, Donald A, Rowlands M, Wibawa J, Brotherton D, Stimson L, Clark V, Owen J, Bawden L, Box G, Bone E, Mortenson P, Hardcastle A, van Meurs S, Eccles S, Raynaud F, Aherne W. Discovery of 2-(6-[(6-fluoroquinolin-2-yl)methyl]amino)bicyclo[3.1.0]hex-3-yl)-N-hydroxy pyrimidine-5-carboxamide (CHR-3996), a class I selective orally active histone deacetylase inhibitor. *J Med Chem*. 2010 Dec 23; 53(24): 8663-78.
- [0548] Nicolaou KC, Li T, Nakada M, Hummel CW, Hiatt A, Wrasidlo W. Calicheamicin $\theta$  1: A Rationally Designed Molecule with Extremely Potent and Selective DNA Cleaving Properties and Apoptosis Inducing Activity. *Agnew Chem Intl. Ed. Engl*. 1994 Feb, 1; 33(2): 183-186.
- [0549] V Novotny-Diermayr, S Hart, K C Goh, A Cheong, L-C Ong, H Hentze, M K Pasha, R Jayaraman, K Ethirajulu, J M Wood. The oral HDAC inhibitor pracinostat (SB939) is efficacious and synergistic with the JAK2 inhibitor pacritinib (SB1518) in preclinical models of AML. *Blood Cancer J*. 2012 May; 2(5): e69.
- [0550] Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2012 Mar 22; 12(4): 252-64.
- [0551] Remy JS, Sirlin C, Vierling P, Behr JP. Gene Transfer with a Series of

Lipophilic DNA-Binding Molecules. *Bioconjugate Chem.*, 1994, 5 (6), pp 647-654.

[0552] Restifo NP, Dudley ME, Rosenberg SA. Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response. *Nat Rev Immunol.* 2012 Mar 22; 12 (4): 269-81.

[0553] Rosenberg SA, Packard BS, Aebersold PM, Solomon D, Topalian SL, Toy ST, Simon P, Lotze MT, Yang JC, Seipp CA, et al. Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report. *N Engl J Med.* 1988 Dec 22; 319 (25): 1676-80.

[0554] Sakuishi K, Apetoh L, Sullivan JM, Blazar BR, Kuchroo VK, Anderson AC. Targeting Tim-3 and PD-1 pathways to reverse T cell exhaustion and restore anti-tumor immunity. *J Exp Med.* 2010 Sep 27; 207 (10): 2187-94.

[0555] Sasaki N, Clevers H. Studying cellular heterogeneity and drug sensitivity in colorectal cancer using organoid technology. *Curr Opin Genet Dev.* 2018 Sep 24; 52: 117-122.

[0556] Strauss WM. Transfection of Mammalian Cells via Lipofection. In: Markie D. (eds) *YAC Protocols. Methods in Molecular Biology™*, vol 54. Humana Press; 307-327.

[0557] Teifel M, Friedl P. New lipid mixture for efficient lipid-mediated transfection of BHK cells. *Biotechniques* 1995, Jul 1; 19 (1): 79-80.

[0558] Ting CC, Lavrin DH, Shiu G, Herberman RB. Expression of Fetal Antigens in Tumor Cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1972 Jul; 69 (7): 1664-1668.

[0559] Valente S, Mai A. Small-molecule inhibitors of histone deacetylase for the treatment of cancer and non-cancer diseases: a patent review (2011-2013). *Expert Opin Ther Pat.* 2014 Apr; 24 (4): 401-15.

[0560] Wigler M, Pellicer A, Silverstein S, Axel R, Urlaub G, Chasin L. DNA-mediated transfer of the adenine phosphoribosyltransferase locus into mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979 Mar; 76 (3): 1373-6.

[0561] Wu Z, Asokan A, Samulski RJ. Adeno-associated virus serotypes: vector toolkit for human gene therapy. *Mol Ther.* 2006 Sep; 14 (3): 316-27.

[0562] Wu D, Wang J, Cai Y, Ren M, Zhang Y, Shi F, Zhao F, He X, Pan M, Yan C, Dou J. Effect of targeted ovarian cancer immunotherapy using ovarian cancer stem cell vaccine. *J Ovarian Res.* 2015 Oct 24; 8: 68.

[0563] Wu J, Izpisua Belmonte JC. Stem Cells: A Renaissance in Human Biology Research. *Cell.* 2016 Jun 16; 165 (7): 1572-1585.

[0564] Zheng Q, Zheng Y, Chen J, You J, Zhu Y, Liu Y, Jiang JJ. A hepatic stem cell vaccine is superior to an embryonic stem cell vaccine in the prophylaxis and treatment of murine hepatocarcinoma. *Oncol Rep.* 2017 Mar; 37 (3): 1716-1724.

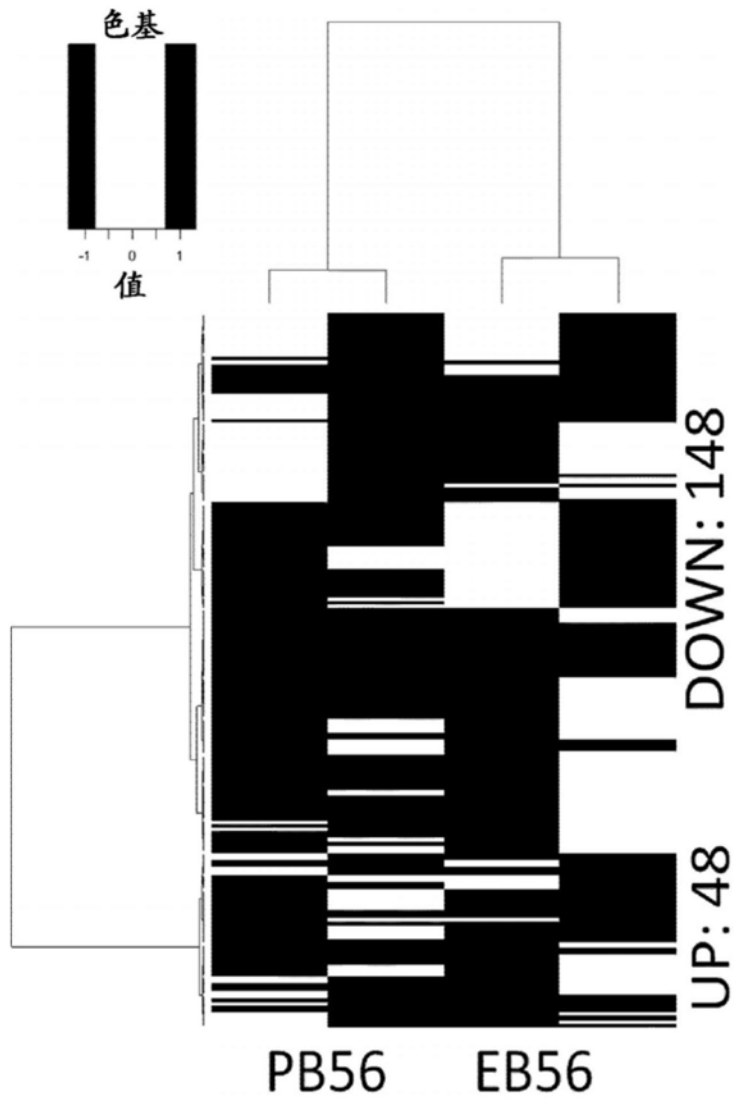


图1

p- 值 < 2.2e-16

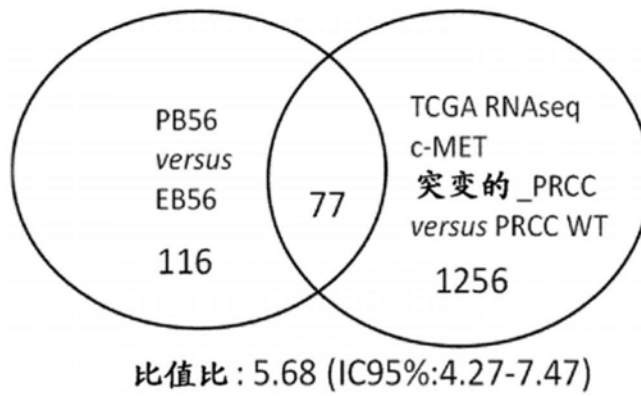


图2

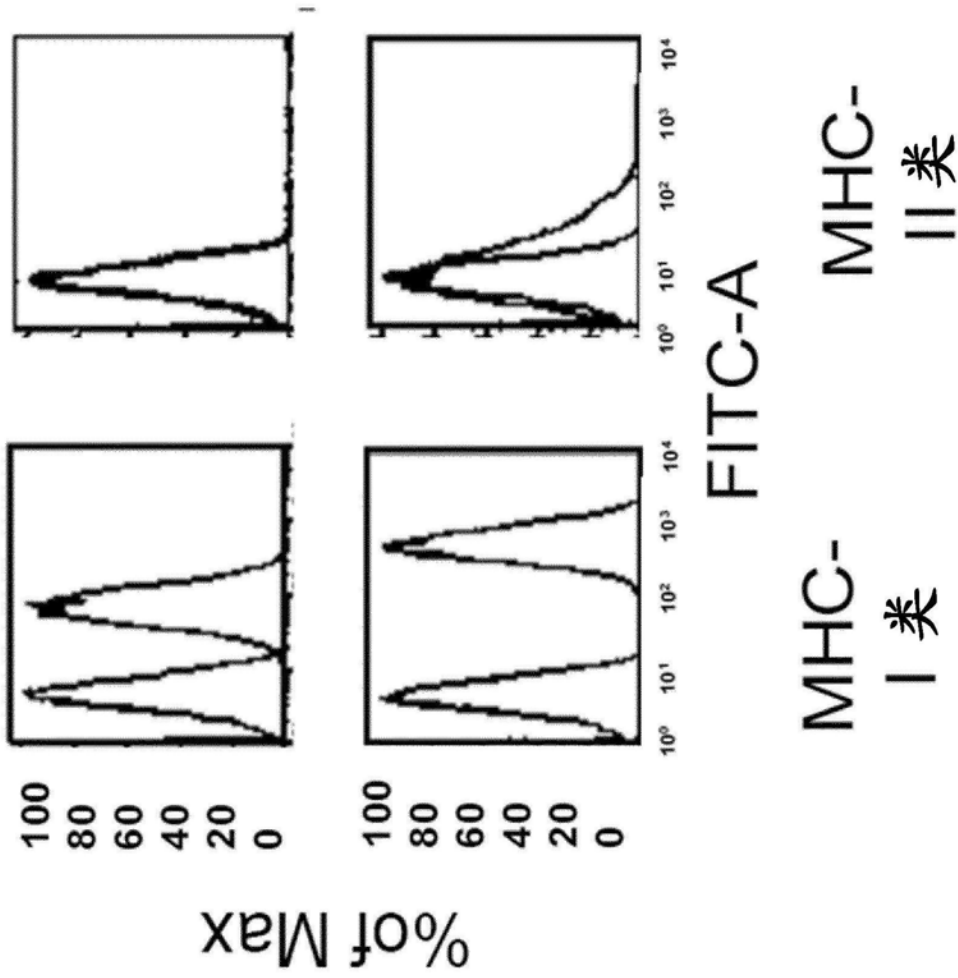


图3

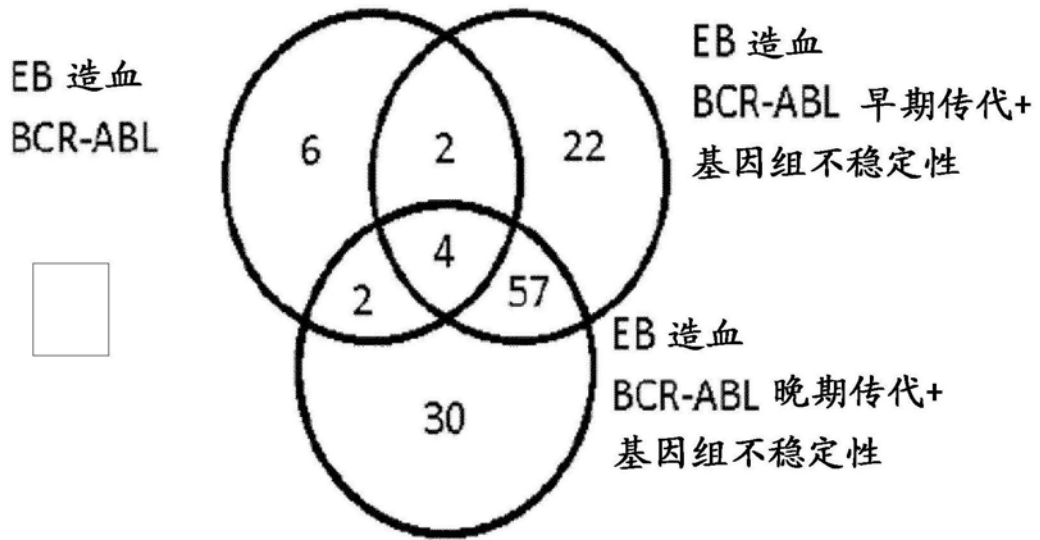


图4

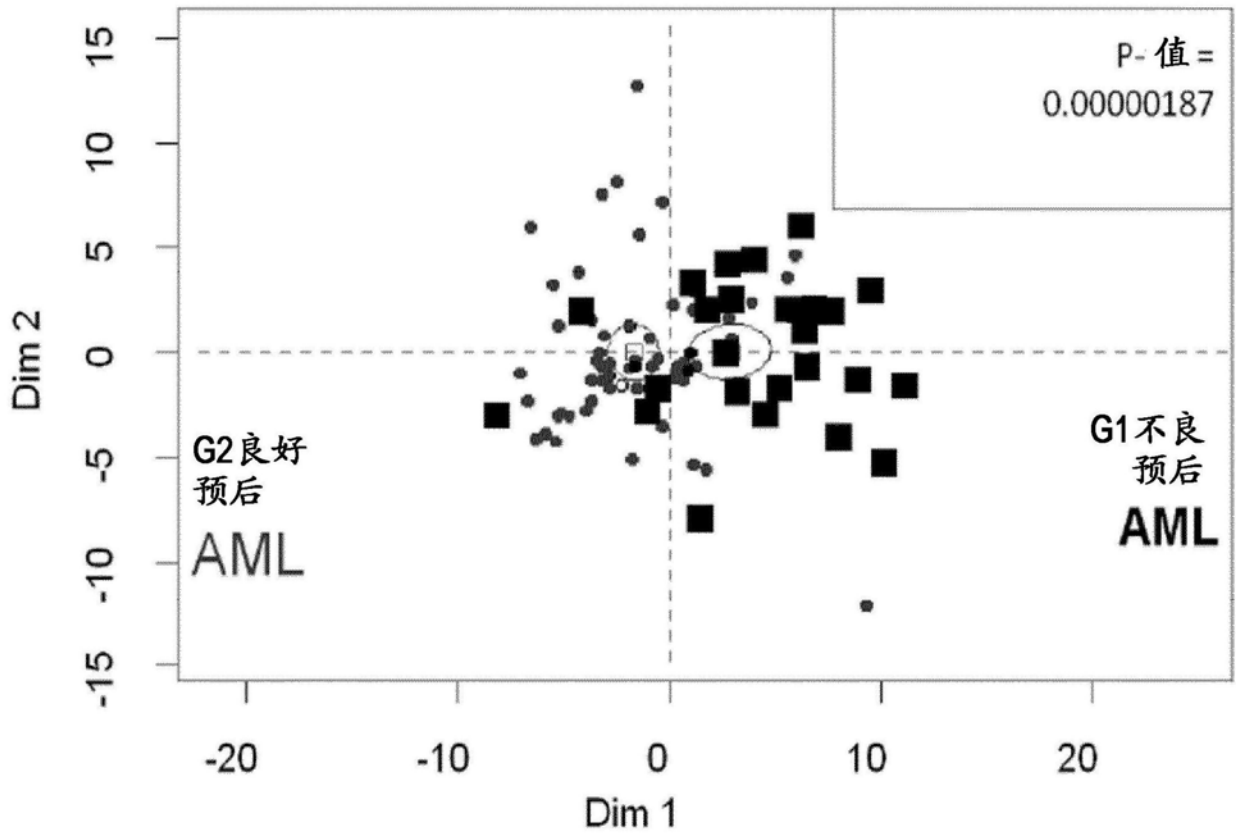


图5

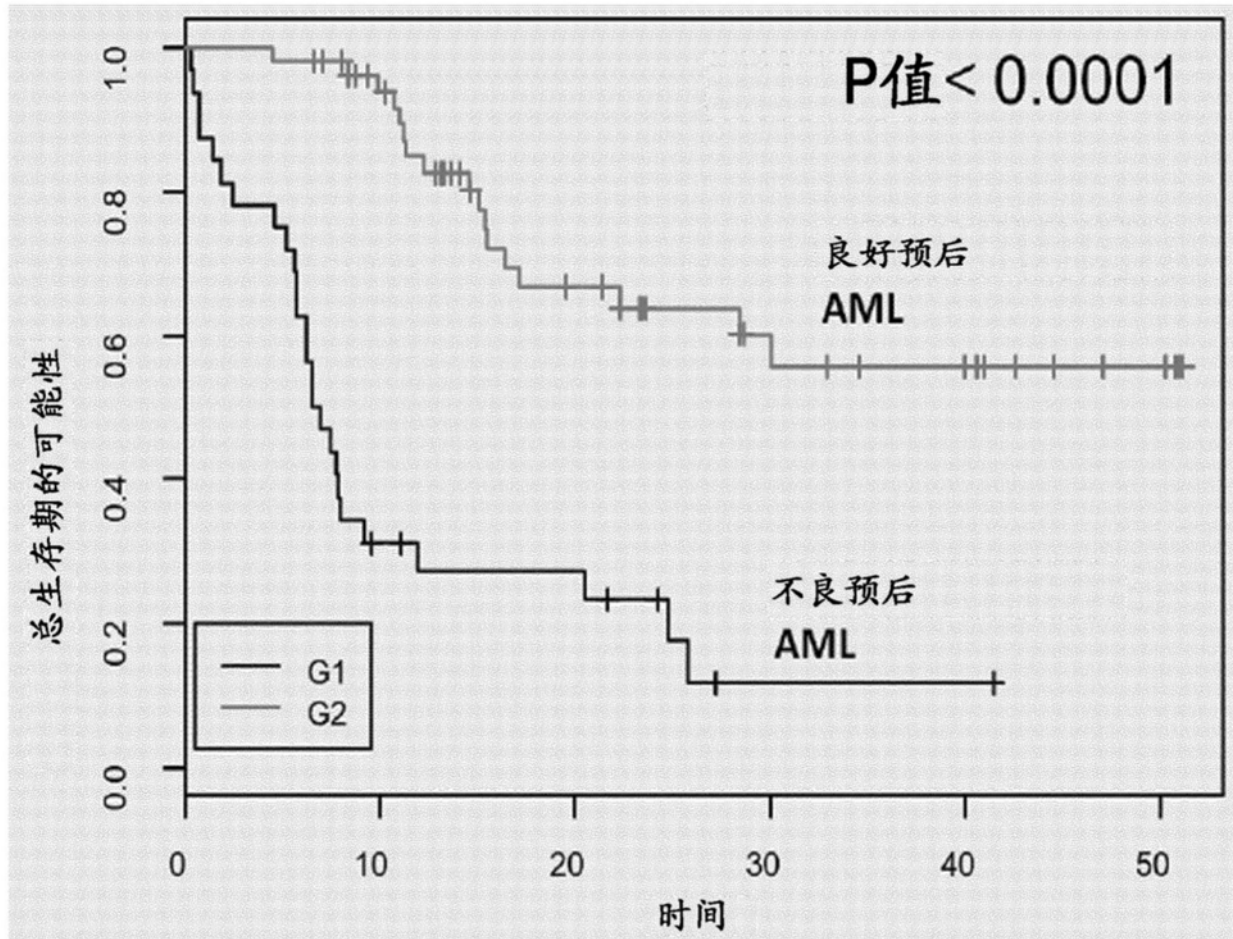


图6

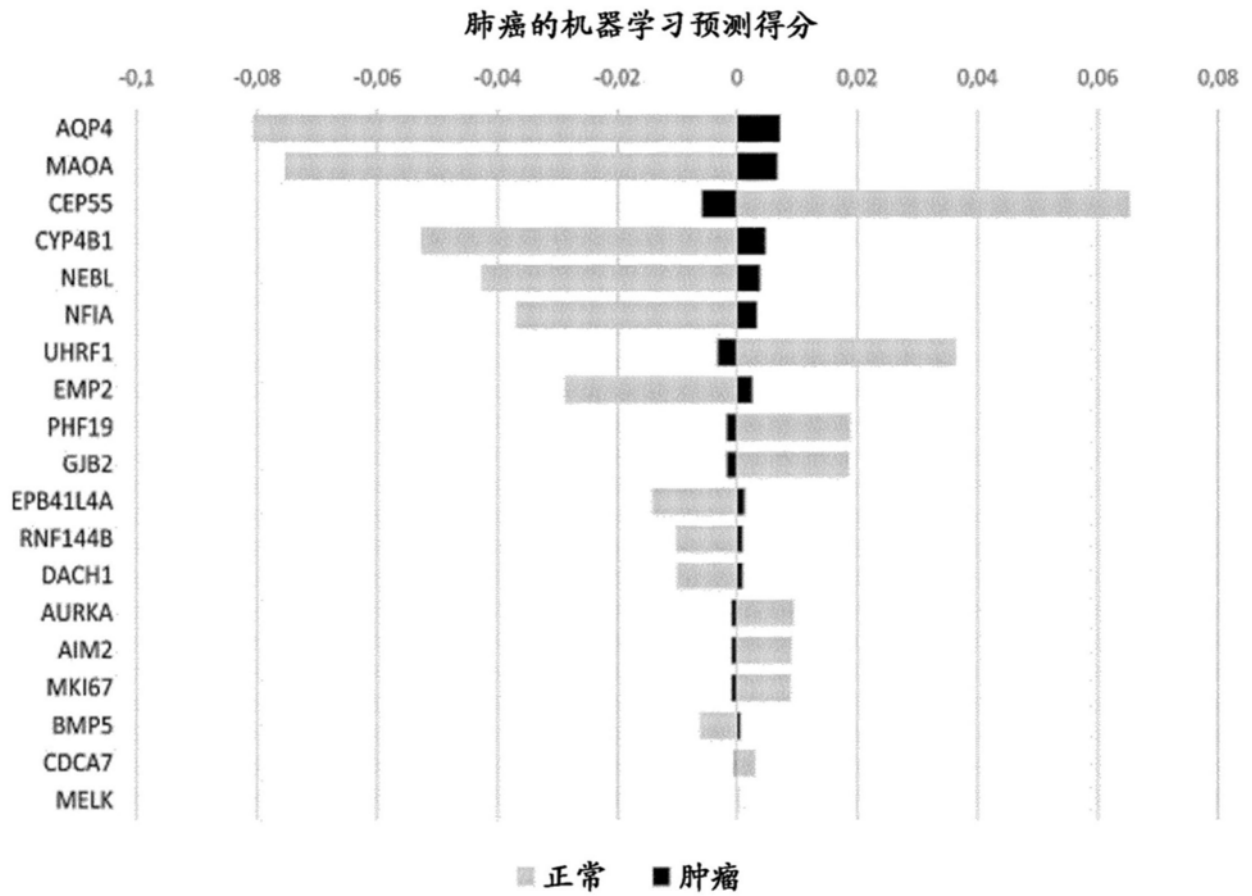


图7

伏林司他	1.5 $\mu$ M
恩替司他	1 $\mu$ M
左旋乙酰胺	1 $\mu$ M
丙戊酸	1mM

图8

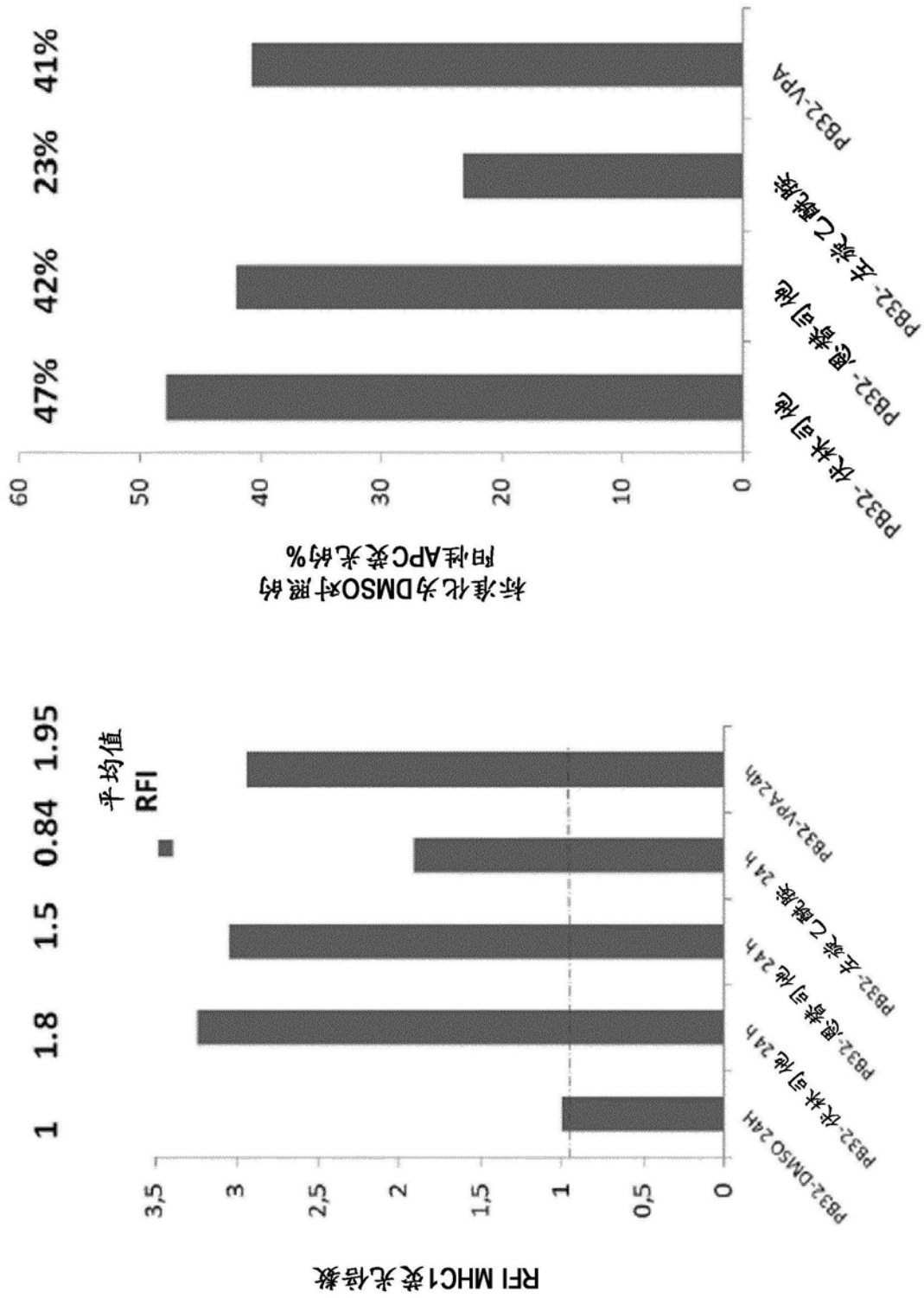


图9



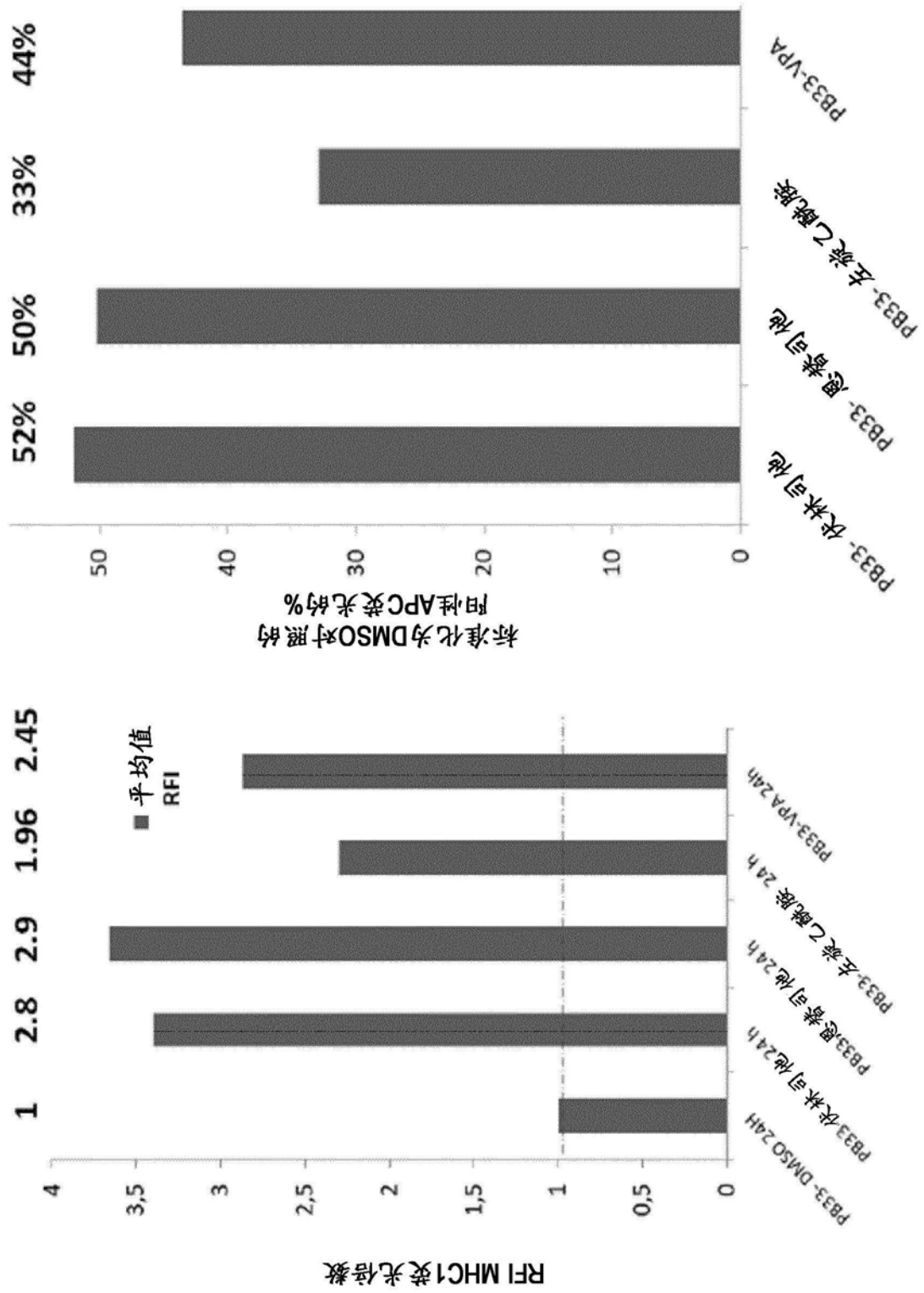


图10

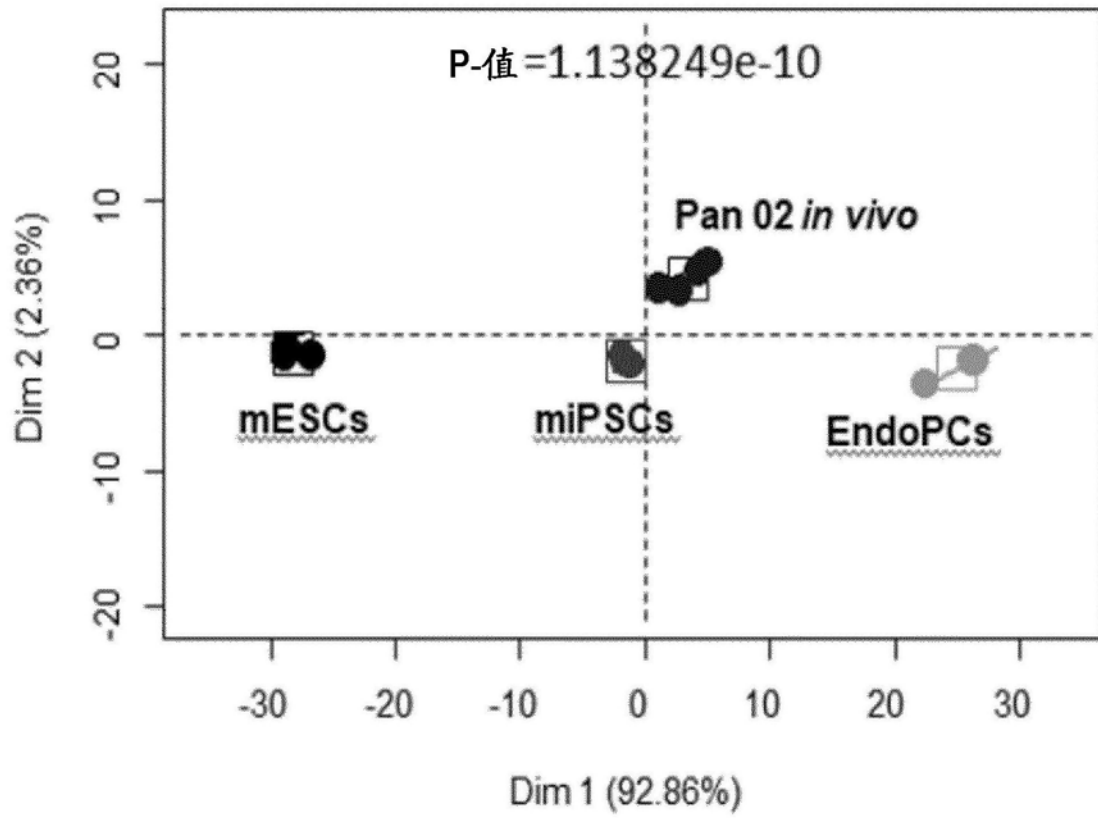


图11

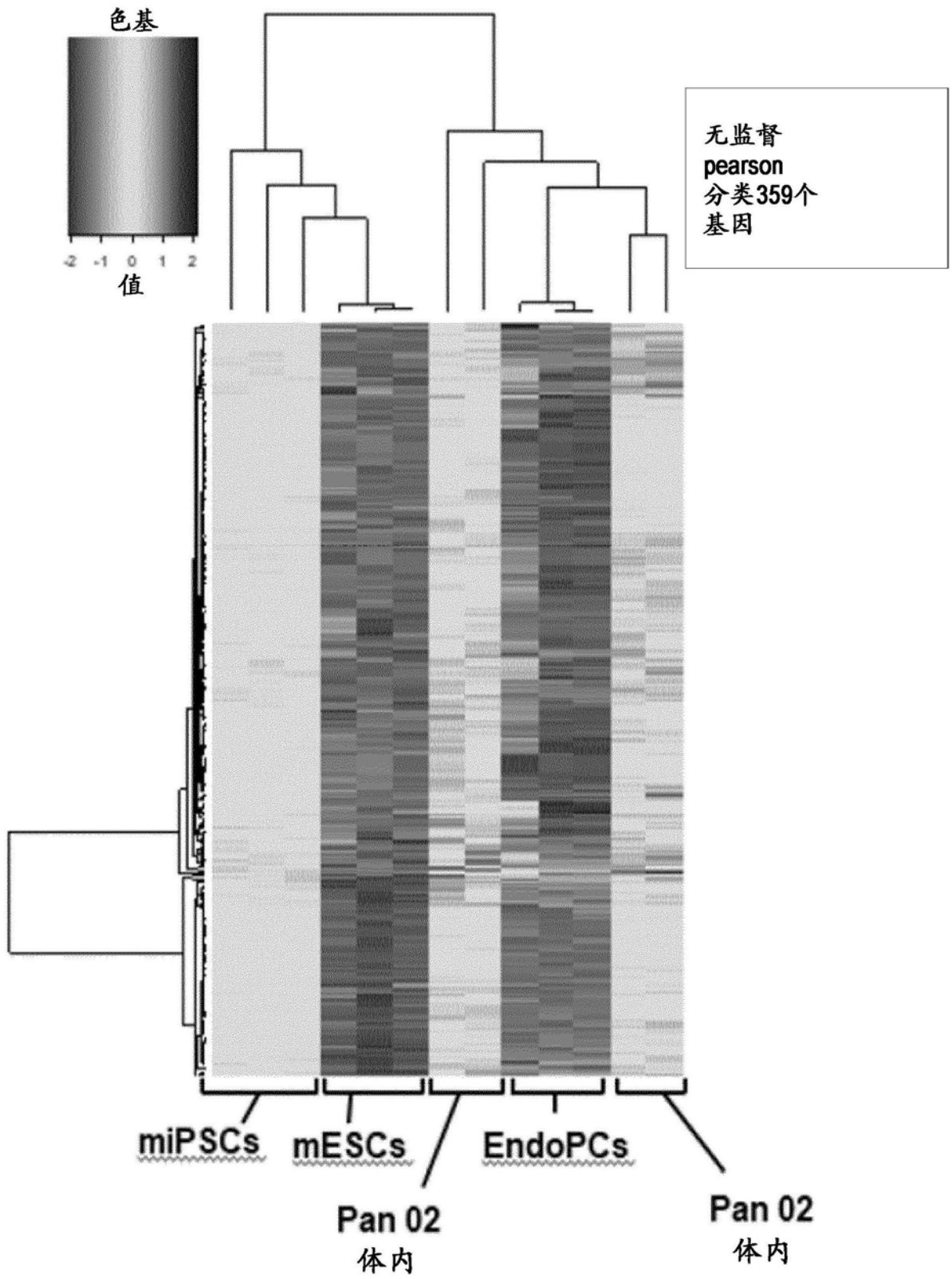


图12

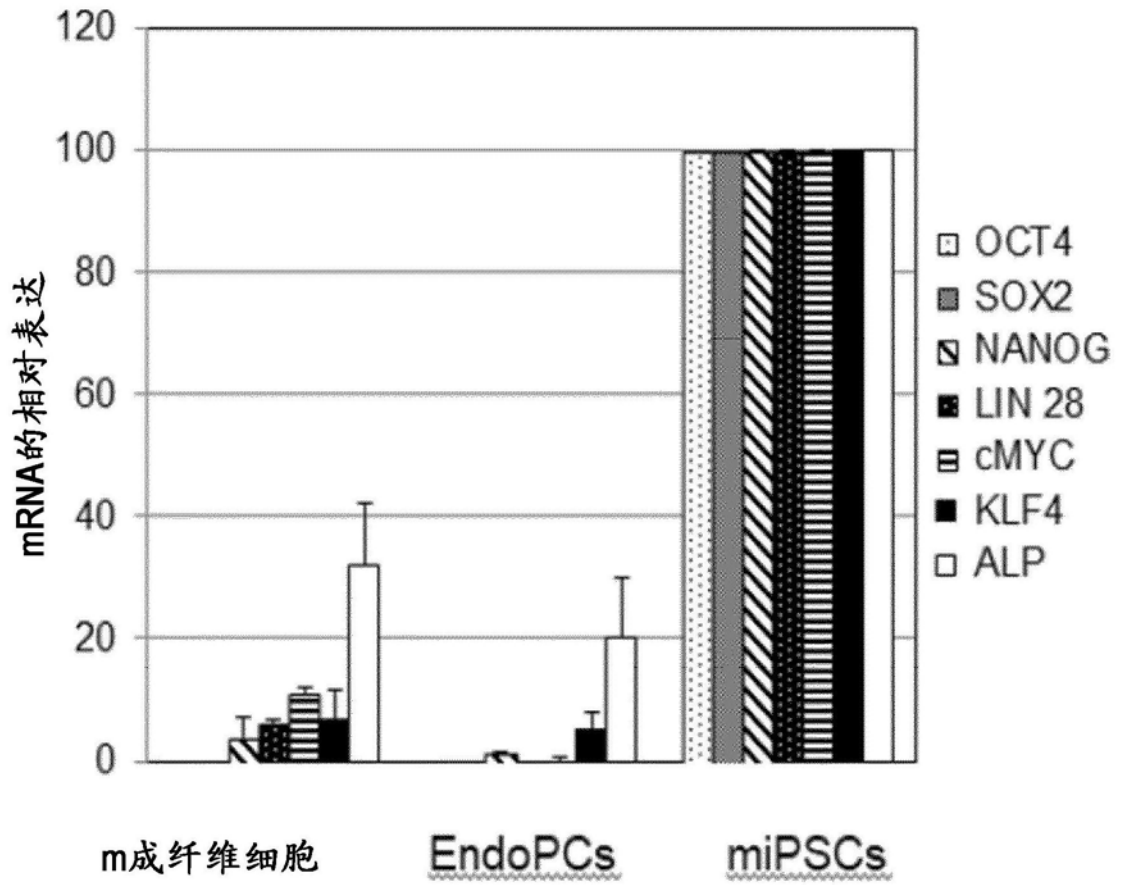


图13

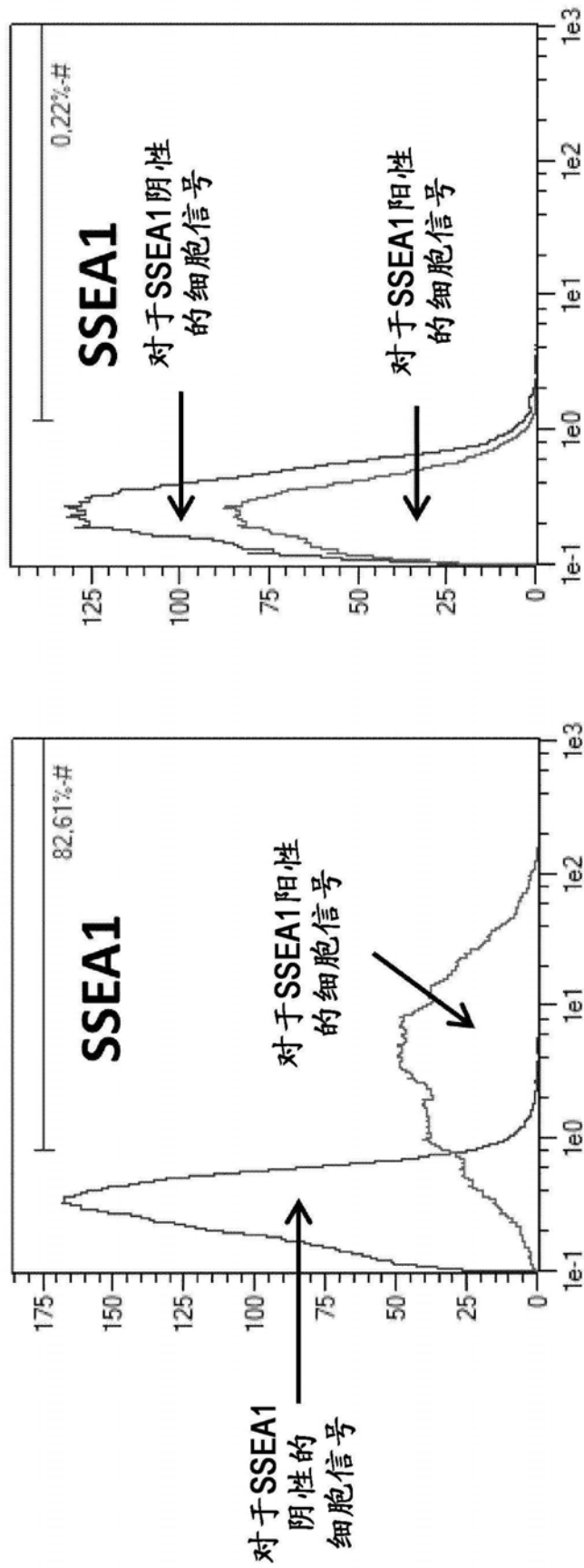


图14

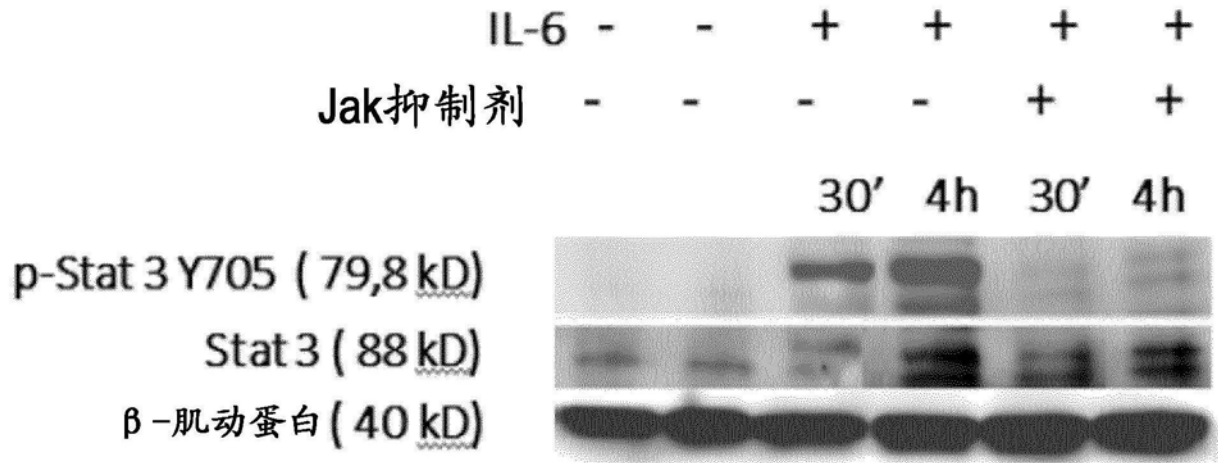
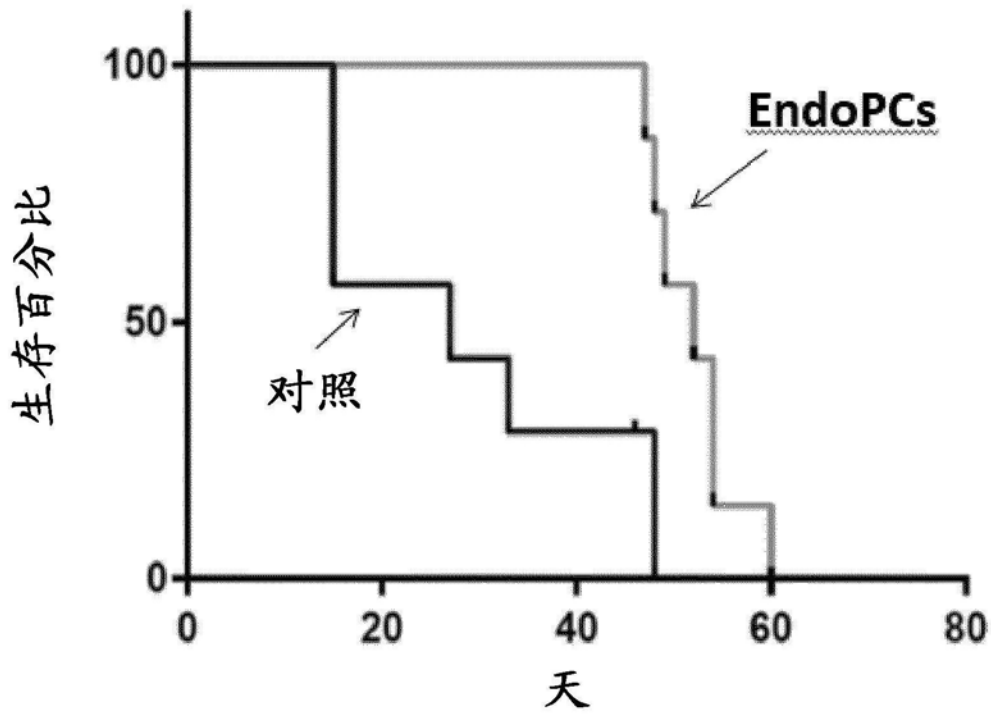


图15



对数秩 (mantel-Cox) 检验

卡方	8,446
df	1
p值	0,0037
p值概括	**
生存曲线信号是否不同?	是

Gehan-Breslow-Wilcoxon 检验

卡方	7,989
df	1
p值	0,0047
p值概括	**
生存曲线信号是否不同?	是

中位生存期	
对照	27
内胚层祖细胞	52
比例 (及其倒数)	0,5192
比例的95% CI	0,1745 to 1,545

图16

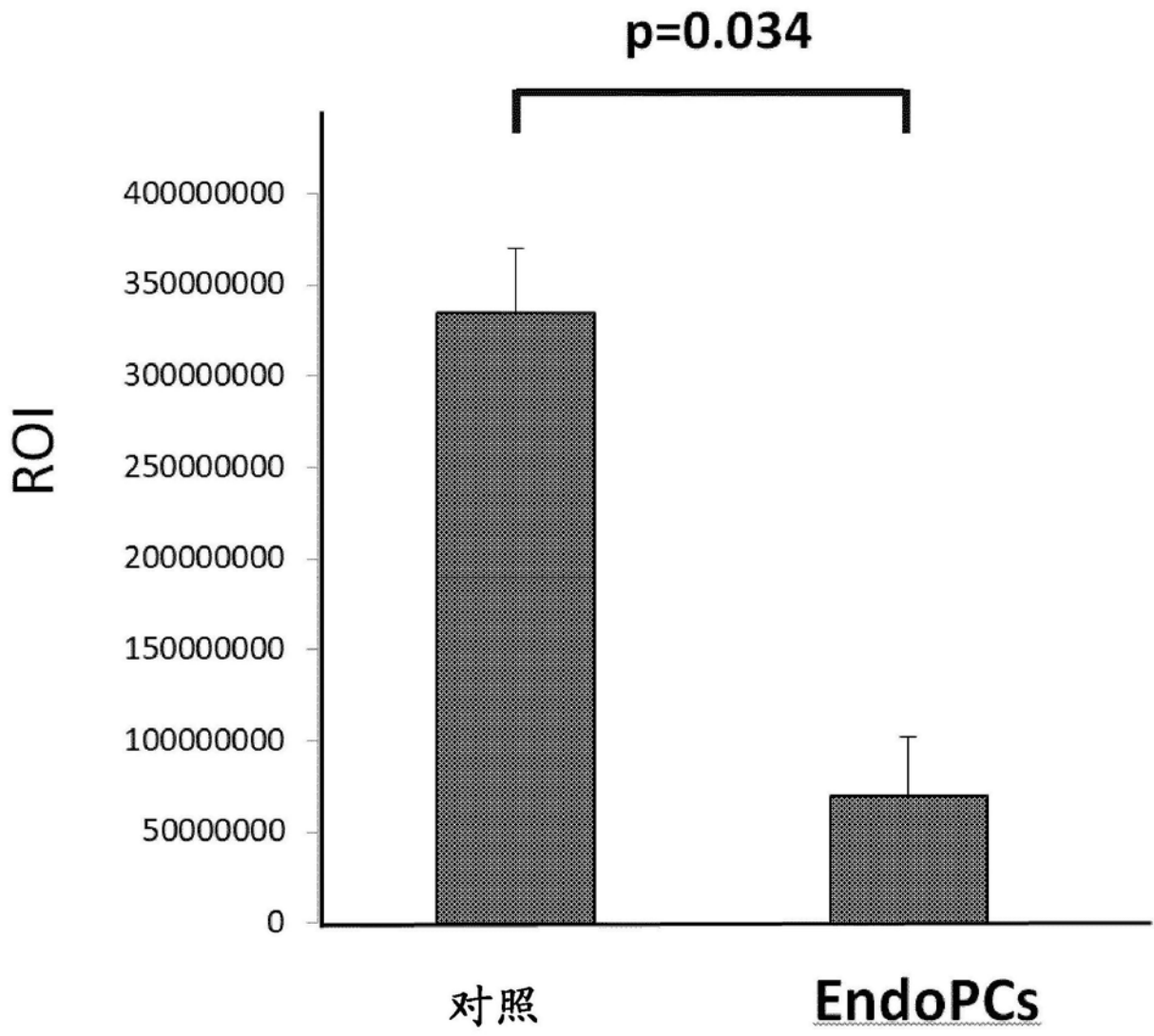


图17





图18