202400253

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本 (11)公開編號：TW 202400253 A

(43)公開日： 中華民國 113 (2024) 年 01 月 01 日

(21)申請案號：112117984 (22)申請日： 中華民國 112 (2023) 年 05 月 15 日

(51)Int. Cl.： *A61K48/00 (2006.01)* *A61K31/713 (2006.01)*
A61K31/7088 (2006.01) *A61K9/127 (2006.01)*
A61P35/00 (2006.01) *A61P31/04 (2006.01)*
A61P31/12 (2006.01)

(30)優先權：2022/05/13 美國 63/341,984
2023/05/12 世界智慧財產權組織 PCT/US23/66975

(71)申請人：美商科納療法股份有限公司 (美國) CORNER THERAPEUTICS, INC. (US)
美國

(72)發明人：戈瑟琳 艾蜜莉 GOSSELIN, EMILY (US)；茲凡奇 達妮亞 ZHIVAKI, DANIA (US)；周 強納森 CHOW, JONATHAN (US)；尼基福羅夫 安娜塔西亞 NIKIFOROV, ANASTASIA (US)；森古普塔 德布魯 SENGUPTA, DEBRUP (IN)

(74)代理人：陳長文；張哲倫；劉君怡

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：75 項 圖式數：9 共 101 頁

(54)名稱

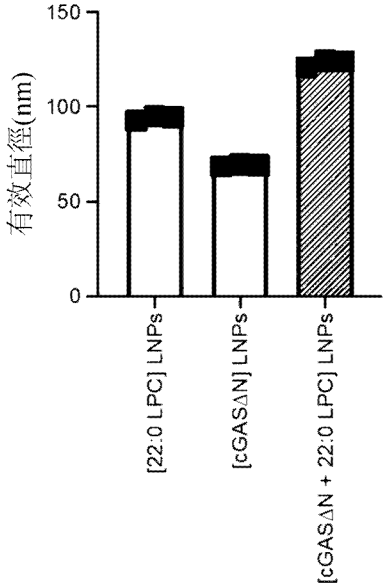
編碼具持續性活性之環 GMP-AMP 合成酶之核酸及用於彼等之免疫原性遞送載體

(57)摘要

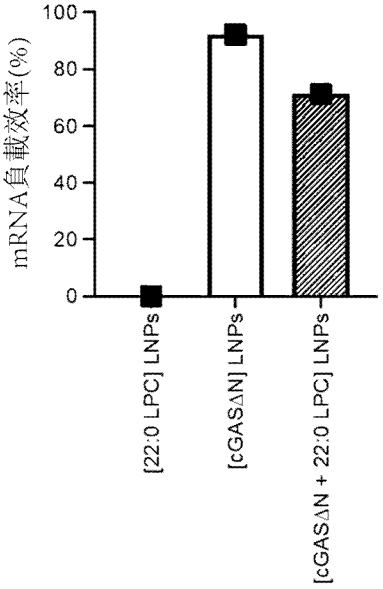
本發明係關於在哺乳動物個體之細胞中表現具持續性活性之環 GMP-AMP 合成酶之組合物，及其用於增強 mRNA 疫苗之免疫原性之用途。該 mRNA 可封裝於脂質奈米粒子(LNP)中或可與脂質複合(RNA-脂複合體(Lipoplex))。本發明亦關於進一步包含溶血磷脂醯膽鹼(LPC)化合物及病原體識別受體激動劑中之一者或二者之組合物。

The present disclosure relates to compositions for expression of a constitutively-active cyclic GMP-AMP synthase in cells of a mammalian subject and uses thereof for enhancing immunogenicity of mRNA vaccines. The mRNA may be encapsulated in a lipid nanoparticle (LNP) or may be complexed with a lipid (RNA-Lipoplex). The present disclosure also relates to compositions further comprising one or both of a lysophosphatidylcholine (LPC) compound and a pathogen recognition receptor agonist.

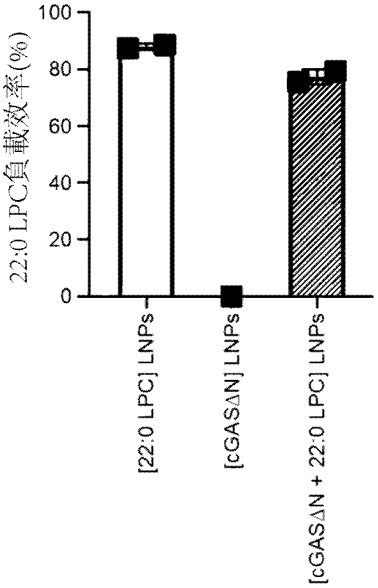
指定代表圖：


150
100
50
0
有效直徑(nm)
[22:0 LPC] LNPs
[cGASΔN] LNPs
[cGASΔN + 22:0 LPC] LNPs

【圖3A】


100
80
60
40
20
0
mRNA負載效率(%)
[22:0 LPC] LNPs
[cGASΔN] LNPs
[cGASΔN + 22:0 LPC] LNPs

【圖3B】


22:0 LPC負載效率(%)
100
80
60
40
20
0
[22:0 LPC] LNPs
[cGASΔN] LNPs
[cGASΔN + 22:0 LPC] LNPs

【圖3C】

【發明摘要】

【中文發明名稱】

編碼具持續性活性之環GMP-AMP合成酶之核酸及用於彼等之免疫原性遞送載體

【英文發明名稱】

NUCLEIC ACIDS ENCODING A CONSTITUTIVELY-ACTIVE CYCLIC GMP-AMP SYNTHASE AND IMMUNOGENIC DELIVERY VEHICLES FOR SAME

【中文】

本發明係關於在哺乳動物個體之細胞中表現具持續性活性之環GMP-AMP合成酶之組合物，及其用於增強mRNA疫苗之免疫原性之用途。該mRNA可封裝於脂質奈米粒子(LNP)中或可與脂質複合(RNA-脂複合體(Lipoplex))。本發明亦關於進一步包含溶血磷脂醯膽鹼(LPC)化合物及病原體識別受體激動劑中之一者或二者之組合物。

【英文】

The present disclosure relates to compositions for expression of a constitutively-active cyclic GMP-AMP synthase in cells of a mammalian subject and uses thereof for enhancing immunogenicity of mRNA vaccines. The mRNA may be encapsulated in a lipid nanoparticle (LNP) or may be complexed with a lipid (RNA-Lipoplex). The present disclosure also relates to compositions further comprising one or both of a lysophosphatidylcholine (LPC) compound and a pathogen recognition receptor agonist.

【指定代表圖】

圖3A至3C

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

編碼具持續性活性之環GMP-AMP合成酶之核酸及用於彼等之免疫原性遞送載體

【英文發明名稱】

NUCLEIC ACIDS ENCODING A CONSTITUTIVELY-ACTIVE CYCLIC GMP-AMP SYNTHASE AND IMMUNOGENIC DELIVERY VEHICLES FOR SAME

【技術領域】

【0001】 本發明係關於在哺乳動物受試者之細胞中表現具持續性活性之環GMP-AMP合成酶之組合物及其用於增強mRNA疫苗之免疫原性之用途。該mRNA可封裝於脂質奈米粒子(LNP)中或可與脂質複合(RNA-脂複合體(Lipoplex))。本發明亦關於進一步包含溶血磷脂醯膽鹼(LPC)化合物及病原體識別受體激動劑中之一者或二者之組合物。

【先前技術】

【0002】 mRNA化學及遞送系統之進步已實現數種有效mRNA COVID-19疫苗之快速產生(Hou等人，Nature Review Materials，6:1078-1094，2021)。然而，最近的報告發現，對SARS-CoV-2棘蛋白之T細胞反應性在經接種疫苗(vaccinated)、未感染的個體中比在具有先前SARS-CoV-2感染的個體中顯著更低(Naranbhai等人，Cell，185:1-11，2022)。此點令人擔憂，因為發現較高水平之SARS-CoV-2-反應性CD4+及CD8+ T細胞免疫反應與較輕度COVID-19疾病相關(Rydyznski Moderbacher等人，Cell，183(4):996-1012，2020)。

【0003】 因此，此項技術中需要用於增強由mRNA疫苗引發之細胞免疫反應之調配物。特定而言，需要適合於增加對核酸編碼之抗原之適應性免疫反應之佐劑。

【發明內容】

【0004】 本發明係關於在哺乳動物受試者之細胞中表現具持續性活性之環GMP-AMP合成酶之組合物及其用於增強mRNA疫苗之免疫原性之用途。該mRNA可封裝於脂質奈米粒子(LNP)中或可與脂質複合(RNA-脂複合體)。本發明亦關於進一步包含溶血磷脂醯膽鹼(LPC)化合物及病原體識別受體激動劑中之一者或二者之組合物。

【圖式簡單說明】

【0005】 **圖1**為靈長類動物cGASΔN蛋白質之胺基酸序列之比對，包括：人類(*現代人*，SEQ ID NO:1)；恆河猴(Rhesus monkey) (*恆河獼猴(Macaca mulatta)*，SEQ ID NO:2)；棕狒狒(olive baboon) (*東非狒狒(Papio anubis)*，SEQ ID NO:3)；北方白頰長臂猿(northern white-cheeked gibbon) (*白頰長臂猿(Nomascus leucogenys)*，SEQ ID NO:4)；普通長臂猿(common gibbon) (*白手長臂猿(Hylobates lar)*，SEQ ID NO:5)；蘇門答臘猩猩(Sumatran orangutan) (*蘇門答臘猩猩(Pongo abelii)*，SEQ ID NO:6)；黑猩猩(chimpanzee) (*黑猩猩(Pan troglodytes)*，SEQ ID NO:7)；西部大猩猩(western gorilla) (*大猩猩(Gorilla)*，SEQ ID NO:8)；及cGASΔN共通序列(SEQ ID NO:9)。

【0006】 **圖2**為描繪干擾素基因(STING)先天免疫信號傳導路徑之刺激因子藉由已改造成藉由移除其胺基端磷酸肌醇結合域而具有持續性活性之環GAMP-AMP合成酶(cGAS)之活化之草圖。cGASΔN定位至粒腺體，

其中其結合DNA而導致產生cGAMP。

【0007】 **圖3A至3C**描繪負載22:0 LPC及/或cGASΔN mRNA之脂質奈米粒子(LNP)之特性。**圖3A**顯示負載22:0 LPC及/或cGASΔN mRNA之LNP之直徑均小於150 nm。**圖3B**顯示在負載單獨cGASΔN mRNA之LNP與負載cGASΔN mRNA及22:0 LPC二者之LNP之間mRNA負載效率(實際負載相比理論負載)相似。**圖3C**顯示在負載單獨22:0 LPC之LNP與負載cGASΔN mRNA及22:0 LPC二者之LNP之間22:0 LPC負載效率(實際負載相比理論負載)相似。來自負載cGASΔN mRNA及22:0 LPC二者之LNP ([cGASΔN + 22:0 LPC] LNPs)之數據以對角紋形狀顯示。

【0008】 **圖4A至4B**顯示用R848與負載22:0 LPC之LNP之組合處理鼠類樹突細胞(DC)導致過度活化，此藉由DC在保持存活的同時分泌IL-1β之能力定義。利用對照(PBS或R848)或具有或不具有R848之LNP培養鼠類骨髓衍生之樹突細胞(BMDC)48小時。**圖4A**顯示具有R848之BMDC與負載22:0 LPC之LNP ([22:0 LPC] LNP)或負載cGASΔN mRNA及22:0 LPC二者之LNP ([cGASΔN + 22:0 LPC] LNP)之組合之刺激誘導IL-1β之分泌。相反地，用負載編碼單獨cGASΔN之mRNA ([cGASΔN] LNPs)之LNP或用[cGASΔN + 22:0 LPC] LNP處理BMDC對於IL-1β 分泌之誘導沒有足夠的刺激。**圖4B**顯示當收集細胞培養上清液時經由測定LDH釋放確定的BMDC之存活率。相對於PBS對照，大多數處理條件導致相對相似水平之細胞存活率，但用[cGASΔN + 22:0 LPC] LNP處理除外，此引起細胞存活率降低。將由於各種處理條件所致之細胞激素分泌之變化與利用單獨R848之處理比較。$p<0.0001$****。使用單向ANOVA與Tukey後測試完成統計學用於多重比較。來自經負載cGASΔN mRNA及22:0 LPC二者之

LNP ([cGASΔN + 22:0 LPC] LNPs)處理之DC之數據以對角紋形狀顯示。

【0009】 **圖5A至5C**顯示各種處理於鼠類DC之細胞激素分泌上之效應。將鼠類BMDC利用對照(PBS或R848)或具有或不具有R848之LNP培養48小時。**圖5A**及**圖5B**顯示在存在或不存在其他刺激物下用R848刺激BDMC誘導IL-6及TNFα之分泌。**圖5C**及**圖5D**顯示在存在或不存在其他刺激物下用R848刺激BMDC誘導RANTES及IP-10之分泌。有趣的是，[cGASΔN] LNP在不存在R848下刺激RANTES及IP-10之分泌，而[cGASΔN + 22:0 LPC] LNP在不存在R848下則沒有。將由於各種處理條件所致之細胞激素分泌之變化與利用單獨R848之處理比較。P<0.05*，p<0.0001****。使用單向ANOVA與Tukey後測試完成統計學用於多重比較。來自經負載cGASΔN mRNA及22:0 LPC二者之LNP ([cGASΔN + 22:0 LPC] LNPs)處理之DC之數據以對角紋形狀顯示。

【0010】 **圖6A至6C**顯示，人類單核細胞衍生之樹突細胞(moDC)可同時介導cGAS/STING信號傳導及過度活化。將人類moDC利用對照(PBS或R848)或具有或不具有R848之LNP培養48小時。**圖6A**顯示moDC在所有處理條件下均維持高水平之存活率，如藉由測定LDH釋放來確定。**圖6B**顯示，需要R848及22:0 LPC用於誘導moDC之IL-1β分泌，及將cGASΔN mRNA添加至LNP不是抑制性的。**圖6C**顯示甚至在與過度活化刺激物R848及22:0 LPC組合時，用負載cGASΔN mRNA之LNP處理moDC亦刺激IP-10分泌。將由於各種處理條件所致之細胞激素分泌之變化與利用單獨R848之處理比較。P<0.05*, p<0.0001****。使用單向ANOVA與Tukey後測試完成統計學用於多重比較。來自經負載cGASΔN mRNA及22:0 LPC二者之LNP ([cGASΔN + 22:0 LPC] LNPs)處理之DC之數據以對角紋

形狀顯示。

【0011】 **圖7A至7C**顯示，當將過度活化與cGAS/STING信號傳導組合時，藉由人類moDC之細胞表面標誌物表現經維持或升高。在染色之前將人類moDC利用對照(PBS或R848)或具有或不具有R848之LNP培養48小時用於表現參與DC功能之細胞表面蛋白。**圖7A**顯示moDC由於各種處理條件所致將細胞遷移至淋巴結所必需的CCR7 (一種趨化介素受體)之表現。**圖7B**顯示CD40(一種在T細胞活化期間接合T細胞表現之CD40L且導致moDC由於各種處理條件所致進一步增強T細胞活化之信號傳導之受體)之表現。**圖7C**顯示CD83 (一種涉及moDC由於各種處理條件所致活化T細胞之DC成熟之標誌物)之表現。將由於各種處理條件所致之細胞表面標誌物表現之變化與單獨R848刺激進行比較。$P < 0.05$* ，$p < 0.01$ ** ， < 0.0001**** 。使用單向ANOVA與Tukey後測試完成統計學用於多重比較。來自經負載cGASΔN mRNA及22:0 LPC二者之LNP ([cGASΔN + 22:0 LPC] LNP)處理之DC之數據以對角紋形狀顯示。

【0012】 **圖8A至8D**顯示，當將過度活化與cGAS/STING信號傳導組合時，抗原呈現及共刺激分子藉由人類moDC之表現經保持或升高。在染色之前將人類moDC利用對照(PBS或R848)或具有或不具有R848之LNP培養48小時用於表現參與DC功能之細胞表面蛋白。與PBS對照相比，利用刺激物之各種組合處理moDC導致CD80 (**圖8A**)及CD86 (**圖8B**)共刺激分子之上調。重要的是，當將cGAS/STING信號傳導與過度活化組合時，moDC維持高水平之CD80及CD86表現。與PBS對照相比，利用刺激物之各種組合處理moDC導致HLA-ABC (**圖8C**)及HLA-DR (**圖8D**)之上調。HLA-ABC及HLA-DR分別呈現抗原至CD8+ T細胞及CD4+ T細胞。當將

cGAS/STING信號傳導與過度活化(R848 + [cGASΔN + 22:0 LPC] LNP)組合時，觀察到HLA-ABC及HLA-DR表現之進一步的增加。將由於各種處理條件所致之細胞表面標誌物表現之變化與單獨R848刺激進行比較。P<0.05*，p<0.0001****。使用單向ANOVA與Tukey後測試完成統計學用於多重比較。來自經負載cGASΔN mRNA及22:0 LPC二者之LNP([cGASΔN + 22:0 LPC] LNP)處理之DC之數據以對角紋形狀顯示。

【0013】 **圖9A**顯示適合用於本發明之基於脂質之mRNA遞送載體中之陽離子及可電離之脂質之結構。**圖9B**顯示適合用於本發明之基於脂質之mRNA遞送載體中之其他類型之脂質之結構。亦參見，Hou等人，Nature Review Materials，6:1078-1094，2021，其係以引用之方式併入本文中。

【實施方式】

相關申請案之交叉參考

【0014】 本申請案主張2022年5月13日申請之美國臨時專利申請案第63/341,984號之優先權及權益，該案係以其全文引用之方式併入本文中。

以ASCII文字文檔提交序列表

【0015】 電子序列表之內容(165532000240SEQLIST.xml；大小：22,341位元組；及創建日期：2023年5月11日)以其全文引用方式併入本文中。

【0016】 本發明係關於在哺乳動物受試者之細胞中表現具持續性活性之環GMP-AMP合成酶之組合物及其用於增強mRNA疫苗之免疫原性之用途。該mRNA可封裝於脂質奈米粒子(LNP)中或可與脂質複合(RNA-脂

複合體)。本發明亦關於進一步包含溶血磷脂醯膽鹼(LPC)化合物及病原體識別受體激動劑中之一者或二者之組合物。

【0017】 可能需要誘導發炎反應，諸如對於免疫療法或疫苗接種。COVID-19 mRNA疫苗(包含負載編碼SARS-CoV-2抗原之mRNA之LNP)已經證實可有效降低感染之頻率及嚴重性。如本文所述，誘導包含負載編碼蛋白質抗原之mRNA之LNP的cGAS-STING先天免疫路徑佐劑組合物，其在示例性實施例中為卵白蛋白(OVA)。STING信號傳導在所有可能的先天免疫信號傳導路徑中特別受關注，因為不像一些其他信號傳導路徑，cGAS-STING活化不會誘導轉譯抑制。

【0018】 為了誘導cGAS-STING信號傳導，設計缺乏其N端之一部分之cGAS突變體，使得其具持續性活性(cGASΔN)。將編碼cGAS突變體之mRNA封裝於LNP中用於細胞吸收及蛋白質表現。該編碼cGASΔN之LNP封裝mRNA具有經由cGAS-STING路徑輔助免疫反應之能力。重要的是，包含編碼持續性活性cGAS之mRNA，諸如cGASΔN，藉由增加發炎信號來增加負載編碼抗原之mRNA之LNP之效力。

一般技術及定義

【0019】 除非另作指明，否則本發明之實務將採用分子生物學(包括重組技術)、微生物學、細胞生物學、生物化學及免疫學之習知技術，其係在此項技術之技藝範圍內。

【0020】 如本文中及隨附申請專利範圍中所用，除非另作指明，否則單數形式「一(a/an)」及「該」包括複數個指示物。例如，「一」賦形劑包括一或多種賦形劑。

【0021】 片語「包含」如本文所用係開放式，指示此類實施例可包

括另外要素。相反地，片語「由...組成」係封閉式，指示此類實施例不包括另外要素(微量雜質除外)。片語「基本上由...組成」係部分封閉式，指示此類實施例可進一步包含不實質上改變此類實施例之基本特徵之要素。

【0022】 術語「約」如本文所用提及值時包涵該值之90%至110%(例如，約900道耳頓之分子量係指810道耳頓至990道耳頓之分子量)。

【0023】 物質之「有效量」或「足夠量」為足以實現有益或期望結果(包括臨床結果)之量，且因此，「有效量」取決於其應用之上下文。例如，在投與包含編碼抗原之一或多個mRNA及具持續性活性之cGAS之免疫原性組合物之情況下，有效量含有足夠的mRNA，以刺激對抗抗原(例如抗原反應性抗體及/或細胞免疫反應)之免疫反應。

【0024】 術語「個體(individual)」及「受試者(subject)」係指哺乳動物。「哺乳動物」包括(但不限於)人類、非人類的靈長類動物(例如猴)、養殖動物、運動動物、嚙齒動物(例如小鼠及大鼠)及寵物(例如狗及貓)。在一些實施例中，該受試者為人類患者，諸如罹患癌症及/或傳染病之人類患者。

【0025】 術語「劑量」如本文所用提及免疫原性組合物時係指藉由在任何一個時間(投與至受試者或由受試者所接受)所採用的免疫原性組合物之所測定部分。

【0026】 術語「分離的」及「純化的」如本文所用係指自其天然相關的至少一種組分移除(例如自其原始環境移除)之材料。作為一個實例，當提及磷脂使用時，分離的磷脂為至少90%、95%、96%、97%、98%或99%純，藉由薄層層析或氣相層析所確定。作為另一個實例，當提及重組

蛋白質使用時，分離的蛋白質係指已自產生蛋白質之宿主細胞之培養基移除之蛋白質。

【0027】 術語「醫藥調配物」及「醫藥組合物」係指呈此種形式以允許活性成分之生物活性有效且不含對調配物或組合物將投與的個體具有不可接受之毒性之另外組分之製劑。此類調配物或組合物意欲為無菌。

【0028】 「賦形劑」如本文所用包括醫藥上可接受之賦形劑、載劑、載體或穩定劑，其對在所採用的劑量及濃度下暴露至其之細胞或哺乳動物無毒。通常，生理上可接受之賦形劑為水性pH緩衝溶液。

【0029】 術語「抗原」係指由抗體或T細胞抗原受體所特異性識別且結合之物質。抗原可包括肽、多肽、蛋白質、糖蛋白、多醣、複雜碳水化合物、糖、神經節苷脂、脂質及磷脂；其部分及其組合。在本發明之上下文中，術語「抗原」通常係指由mRNA或DNA之核酸序列編碼之多肽。多肽抗原較佳為至少八個胺基酸殘基長且可包含一或多個轉譯後修飾。

【0030】 術語「激動劑」在最廣義上使用且包括透過受體活化信號傳導之任何分子。在一些實施例中，該激動劑結合至受體。例如，TLR8激動劑結合至TLR8且活化TLR8信號傳導路徑。

【0031】 「烷基」係指單價飽和脂族烴基。Cx烷基係指具有x個碳原子之烷基。Cx-Cy烷基或Cx-y烷基係指具有x個至y個碳原子(含)之烷基。

【0032】 「伸烷基」係指二價飽和脂族烴基。

【0033】 「烯基」係指具有至少一個雙鍵(>C=C<)之單價烴基。Cx烯基係指具有x個碳原子之烯基。Cx-Cy烯基或Cx-y烯基係指具有x個至y

個碳原子(含)之烯基。

【0034】 反應或參數之「刺激」包括當與除所關注參數以外的其他相同條件相比時，或替代地，與另一條件相比，引發及/或增強該反應或參數(例如與在不存在TLR激動劑下相比在存在TLR激動劑下TLR信號傳導增加)。例如，免疫反應之「刺激」意指反應之增加。取決於所測量之參數，該增加可為2倍至2,000倍、或5倍至500倍或以上、或2、5、10、50或100倍至500、1,000、2,000、5,000或10,000倍。

【0035】 相反地，反應或參數之「抑制」包括當與除所關注參數以外的其他相同條件相比時，或替代地，與另一條件相比，減少及/或抑制該反應或參數(例如，與投與安慰劑組合物或不處理相比，在投與本發明之組合物之後，異常細胞增殖減少)。例如，免疫反應之「抑制」意指反應之減少。取決於所測量之參數，該減少可為2倍至2,000倍、或5倍至500倍或以上、或2、5、10、50或100倍至500、1,000、2,000、5,000或10,000倍。

【0036】 相對術語「較高」及「較低」分別指當與除所述參數以外的其他相同條件相比時，或替代地，與另一條件相比，可測量之反應或參數之增加或減少。例如，「較高水平之DC過度活化」係指由於處理條件造成之DC過度活化之水平，其至少2、3、4、5、6、7、8、9或10倍高於由於對照條件造成之DC過度活化之水平。同樣地，「較低水平之DC過度活化」係指由於處理條件造成之DC過度活化之水平，其至少2、3、4、5、6、7、8、9或10倍低於由於對照條件造成之DC過度活化之水平。

【0037】 如本文所用，術語「免疫接種」係指增加哺乳動物受試者的對抗原之免疫反應且因此改良其抵抗或克服感染及/或抵抗疾病之能力

之過程。

【0038】 術語「疫苗接種」如本文所用係指將疫苗引入至哺乳動物受試者體內。

【0039】 「佐劑」係指當添加至包含抗原或編碼抗原之核酸之組合物時增強(enhance/potentiate)暴露後哺乳動物接受者對抗原之免疫反應之物質。

【0040】 術語「治療(treating)」或「治療(treatment)」疾病係指執行方案，其可包括投與一或多種治療劑至個體(人類或其他)，以努力獲得個體中之有益或期望結果(包括臨床結果)。有益或期望臨床結果包括(但不限於)緩解或改善疾病之一或多種徵兆或症狀、減輕疾病程度、穩定疾病狀態(亦即不惡化)、防止疾病之擴散、延遲或減慢疾病進展、改善或減輕疾病狀態、及緩解(無論是部分或全部)。「治療」亦可意指與未接受治療的個體之期望存活期相比，延長存活期。此外，「治療(treating)」及「治療(treatment)」可藉由投與一種劑量之治療劑來進行，或可在投與一系列劑量之治療劑後進行。「治療(Treating)」或「治療(treatment)」不要求完全緩解徵兆或症狀，且不要求治癒，且具體而言包括僅對個體具有緩解性效應之方案。「減輕」疾病或病症意指與預期未治療結果相比，疾病或病症之程度及/或非所欲臨床表現減少及/或疾病或病症之進展之時程減慢。

【0041】 術語「持續性活性」如本文所用提及cGAS時係指結合至細胞質中之DNA且甚至在其中天然cGAS具有很少至沒有酶促活性之一些條件下催化cGAMP合成之cGAS變異體。在一些較佳實施例中，「持續性活性之cGAS」為「截短型cGAS」，諸如在不存在N端無序域(disordered

domain)下包含C端DNA結合酶促域之cGASAN，亦即，cGASAN為缺乏全長cGAS之N端無序域所賦予的酶促活性之調節的持續性活性之cGAS。

II. 持續性活性之環GMP-AMP合成酶

[0042] 環GMP-AMP合成酶，亦稱為cGAMP合成酶或cGAS，為細胞溶質DNA之酶促感測器。cGAS識別獨立於其序列之雙股DNA從而導致二聚化、液態樣液滴之形成及二級信使子2'3'環GMP-AMP (cGAMP)之產生，其結合並且活化STING從而導致干擾素及其他發炎介質之表現。人類cGAS為522個胺基酸長，包括N端磷酸肌醇結合域(殘基1至59)及C端DNA結合及酶促域(殘基160至522) (Barnett等人，Cell，176:1432-1446，2019)。重要的是，發現人類白血病單核細胞細胞系中cGASAN之表現會導致干擾素及干擾素刺激基因之更高水平之表現(Barnett，同前述，2019)。

[0043] 人類cGAS之胺基酸序列(GenBank No. NP_612450.2)為：MQPWDGKAMQRASPAGATAPKASARNARGAPHDPTESPAADPAALPKAGKPGPARKSGSRQKKSAPDTQKRPEVRATGARAKKAPQRAQDTQPSDATSAPGAPGLEPPAARPALSRAGSCRQRGARCSTKPRPPPGPWDVPSPGLPVSAPELVRRDAAPGASKLRAVLKKLKSRDDLSTDAGMVKGVVDKLLRLKCDSAFRGVGLQNTGSYCEHVKLSAPNPDVMPRKLPVPRQLPEGYSMTRAVPVKKRNPKPNELSQELPGCLSASKNLSKCRKLKPFINDDKDTDVDMKRRRGGSPAVTLLISPKLSVDPTLALKSSSMPASTQPGLRLQNMLSAKVRKQLRLKPFYLVPKHARPGIGPQPETMRLSFSEDEKKLRNHGKSKTCCENKEKRCCRKDCLKLMKYLLEQLKERPKDKKLDRFSSYHVKTAPFHVCTQNPQDSQWDRKDLGLCFDNCVTYFLQCLRTEKLENYFIPEFNLFSSNLLDRRSKEGTKQLEYYRNLPTVIEDF (SEQ ID NO:10)。

[0044] cGAS之N端域之胺基酸序列為：MQPWDGKAMQRASPAGATAPKASARNARGAPHDPTESPAADPAALPKAGKPGPARKSGSRQKKSAPDTQKRPEVRATGARAKKAPQRAQDTQPSDATSAPGAPGLEPPAARPALSRAGSCRQRGARCSTKPRPPPGPWDVPSPGLPVSAPELVRRDAA (SEQ ID NO:11)。

[0045] cGAS之C端域(cGASAN)之胺基酸序列為：

PGASKLRAVTPKLKLSRDDLSTAAGIVRGVVDILTGRLKCDSAPRGVGLINTGSYYGIVKLSAPNFGDVM
FKLEVPRIQLEEYSITRAYVFVKEKRNPKENPLSQFTGGELSASRNLSKFRKLIKEGINDLKDTDVVIK
RRRGGSPAVTLLISKKLSVDLTLALKSKSSWPASTQEGLRLQNMLSARVRKQLRLKPYYLVPKDAKEGIG
FQFPTHRLSFSIDPKFLLNHGKSKTCCPNHDFKCCRKDCFKLEKLLQFQLIGERFKDKKIIDKFSSVDVK
IAFFIVCIQNPQDSQIDRRDLGLCFDNCVTVFTQCLRTEKLNYCLPFNLFSSNLIDKRSKEFLEKQIK
YERNDFPVFDF (SEQ ID NO:1)。

[0046] 編碼人類cGASAN之核苷酸序列，其經密碼子最佳化用於小鼠細胞中之表現，係如SEQ ID NO:17所示。使用具有此種核苷酸序列之DNA模板以製備編碼人類cGASAN之mRNA，將其負載至LNP中且如實例中所述進行測試。

[0047] 本發明之組合物及方法包含編碼持續性活性之cGAS之核酸作為用於改良由mRNA疫苗引發之適應性免疫反應之催化佐劑。在一典較佳實施例中，該持續性活性之cGAS為缺乏N端磷酸肌醇結合域之截短型cGAS(cGASAN)。在一典較佳實施例中，該持續性活性之cGAS為包含C端DNA結合及酶促域之截短型cGAS(cGASAN)。

[0048] cGAS之同源物在整個動物王國的物種中進行表現，且在更高級靈長類動物中cGAS胺基酸序列為保守。人類cGAS之c端域之胺基酸序列與多種非人類靈長類動物cGAS蛋白質之c端域之胺基酸序列之比對顯示於圖1中。

表1. 由Clustal 12.1^建立之一致性百分比矩陣(Percent Identity Matrix)

#	物種	1	2	3	4	5	6	7	8
1	恆河獼猴	100.00	96.42	87.53	85.95	88.71	87.26	86.78	86.50
2	東非狒狒	96.42	100.00	87.53	86.23	88.98	88.09	87.88	87.33
3	白頰長臂猿	87.53	87.53	100.00	96.14	93.37	89.97	90.03	90.30
4	白手長臂猿	85.95	86.23	96.14	100.00	92.31	88.92	88.98	88.71
5	蘇門答臘狨猴	88.71	88.98	93.37	92.31	100.00	93.07	93.39	92.84

6	黑猩猩	87.26	88.09	89.97	88.92	93.07	100.00	97.51	96.95
7	現代人	86.78	87.88	90.03	88.98	93.39	97.51	100.00	98.35
8	大猩猩	86.50	87.33	90.30	88.71	92.84	96.95	98.35	100.00

^此表中之數字不是SEQ ID NO。

【0049】 在一些較佳實施例中，該持續性活性之cGAS為缺乏N端域(SEQ ID NO:11)之截短型人類cGAS。在一些較佳實施例中，該持續性活性之cGAS為包含C端域(SEQ ID NO:1)之截短型人類cGAS。在一些較佳實施例中，cGASΔN包含SEQ ID NO:1之胺基酸序列或與SEQ ID NO:1至少85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同之胺基酸序列。在一些較佳實施例中，cGASΔN包含SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:8之胺基酸序列、或與SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:8至少95%、96%、97%、98%或99%相同之胺基酸序列。在一些較佳實施例中，cGASΔN包含SEQ ID NO:9之共通胺基酸序列。對於在經轉染細胞中之表現，該編碼cGASΔN之核酸係與起始密碼子(ATG)可操作組合。

【0050】 針對於參考多肽序列之「序列一致性百分比(%)」定義為在比對該等序列及在必要時引入空位以達成最大序列一致性百分比，且不考慮任何保守性取代作為序列一致性之一部分後，候選序列中與參考多肽序列中之胺基酸殘基相同之胺基酸殘基之百分比。出於確定胺基酸序列一致性百分比之目的的比對可以在此項技術中的技能範圍內的各種方式來達成，例如，使用公開可得之電腦軟體，諸如BLAST、BLAST-2、ALIGN或Megalign (DNASTAR)軟體。熟習此項技術者可確定用於比對序列之適宜參數，包括於所比較的序列之全長上達成最大比對所需的任何演算法。例如，給定胺基酸序列A相對、與或針對給定胺基酸序列B之序列一致性

%(其可替代地表述為給定胺基酸序列A相對、與或針對給定胺基酸序列B具有或包含特定序列一致性%)係計算如下：將100乘以分數X/Y，其中X為於A及B之該程式比對中經序列評分為相同匹配之胺基酸殘基的數目，且其中Y為B中胺基酸殘基之總數。應明瞭，在胺基酸序列A之長度不等於胺基酸序列B之長度之情況下，A相對B之序列一致性%將不等於B相對A之序列一致性%。

II. 編碼抗原之mRNA

【0051】 本發明之組合物及方法可包含編碼抗原之mRNA或以其他方式適合與包含編碼抗原之mRNA之調配物一起使用。在一些實施例中，該抗原為蛋白質抗原。術語「多肽」及「蛋白質」在本文中提及包含至少8個胺基酸長的肽鏈之抗原時可互換使用。在一些實施例中，該抗原之長度為8至1800個胺基酸、9至1000個胺基酸、或10至100個胺基酸。該多肽可經轉譯後修飾，諸如藉由磷酸化、羥基化、磺化、棕櫚醯基化及/或糖基化。

【0052】 在一些實施例中，該抗原為包含至少一個全長蛋白質或其片段之胺基酸序列之腫瘤抗原。在一些實施例中，該腫瘤抗原包含來自致癌蛋白之胺基酸序列或其片段。在一些實施例中，該哺乳動物抗原為新抗原或由包含相對於存在於來自哺乳動物受試者之正常細胞中之基因之突變之基因編碼。據認為新抗原在使得T細胞能夠區分癌細胞與非癌細胞方面特別有用(參見，例如，Schumacher及Schreiber，Science，348:69-74，2015)。在其他實施例中，該腫瘤抗原包含病毒抗原，諸如引起癌症之病毒之抗原。

【0053】 在一些實施例中，該腫瘤抗原為包含兩種或更多種多肽之

融合蛋白質，其中每個多肽包含來自不同腫瘤抗原之胺基酸序列或來自相同腫瘤抗原之非連續胺基酸序列。在一些此等實施例中，該融合蛋白質包含第一多肽及第二多肽，其中每個多肽包含來自相同腫瘤抗原之非連續胺基酸序列。

【0054】 在一些實施例中，該抗原為微生物抗原。在一些實施例中，該微生物抗原包含病毒抗原、細菌抗原、原生動物抗原、真菌抗原或其組合。在一些實施例中，該微生物抗原包含表面蛋白或微生物之其他抗原次單元。

【0055】 在一些較佳實施例中，該mRNA包含在編碼區域的5'端處之5'非轉譯區域(5'UTR)及在編碼區域的3'端處之3'非轉譯區域(3'UTR)。在一些較佳實施例中，該mRNA包含5'帽結構及多腺苷酸尾中之一者或二者。

【0056】 在一些實施例中，該mRNA進一步編碼核糖體跳躍序列，諸如SEQ ID NO:12所示之2A樣(2A-like)(2AL)序列。另外的2AL序列示於SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14及SEQ ID NO:15。在其中mRNA包含兩個或更多個編碼區域之一些實施例中，該等編碼區域可間隔2AL序列。例如，該2AL序列可位於持續性活性之環GMP-AMP合成酶(cGAS)之編碼區域與抗原(例如cGASΔNs-2AL-抗原或抗原-2AL-cGASΔN)之編碼區域之間。類似地，在其中mRNA包含兩個或更多個抗原之編碼區域之一些實施例中，該等編碼區域可間隔2AL序列(例如抗原1-2AL-抗原2)。用於本發明之mRNA中之另外的2AL序列係此項技術中已知的(參見，例如，Luke等人，J. Gen. Virol，89:1036-1042，2008，圖2之2AL序列係以引用之方式併入本文中)。

III. 基於脂質之遞送載體

【0057】 本發明之組合物及方法可包含用於mRNA疫苗之基於脂質之遞送載體。在一些實施例中，該載體為脂質奈米粒子(LNP)。在其他實施例中，該載體為脂質，其與mRNA形成複合物(RNA-脂複合體)。

【0058】 在一些實施例中，該LNP包含至少一種選自由可電離之脂質、陽離子脂質、磷脂、聚乙二醇化脂質、結構脂質及其混合物組成之群之脂質。在一些實施例中，該至少一種脂質包含可電離之脂質。在一些實施例中，該至少一種脂質包含陽離子脂質。在一些實施例中，該至少一種脂質包含磷脂。在一些實施例中，該至少一種脂質包含聚乙二醇化脂質。在一些實施例中，該至少一種脂質包含結構脂質。在一些實施例中，該至少一種脂質包含可電離之脂質、磷脂、聚乙二醇化脂質及結構脂質。

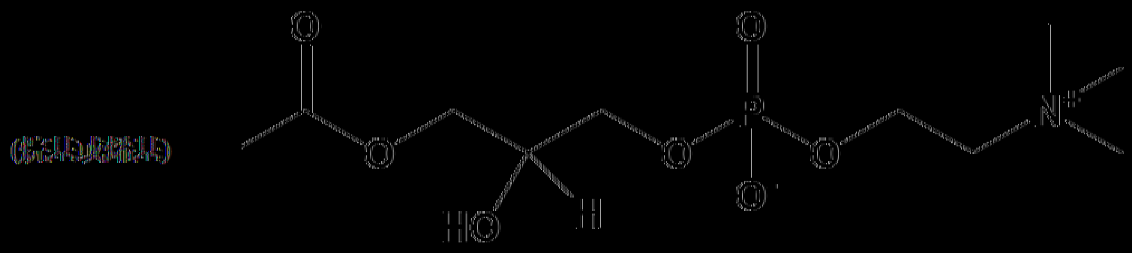
【0059】 在一些實施例中，RNA-脂複合體之脂質組分包含一或多種脂質。在一些較佳實施例中，該一或多種脂質包含第一脂質及第二脂質，其中該第一脂質不同於該第二脂質。在一些實施例中，該第一脂質為陽離子脂質，及該第二脂質為中性或陰離子脂質。

【0060】 適合用於本發明之基於脂質之mRNA遞送載體之脂質之結構描繪於**圖9A**及**圖9B**中，其改編自Hou等人，Nature Review Materials，6:1078-1094，2021之圖2。

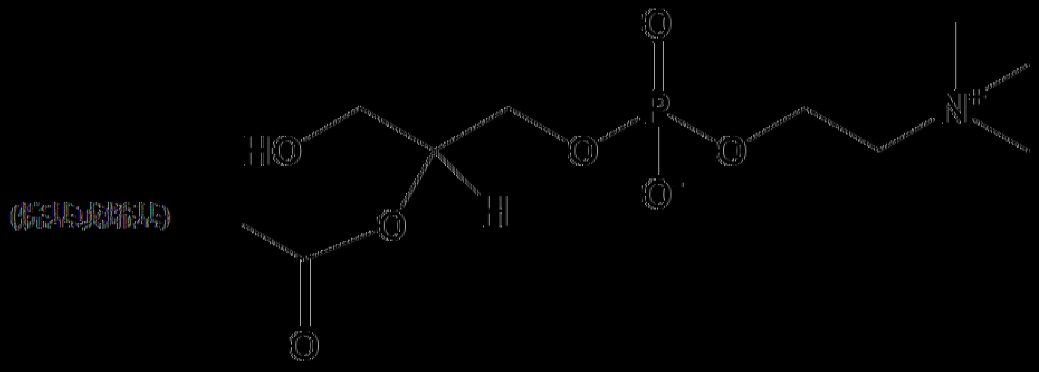
IV. 溶血磷脂醯膽鹼化合物

【0061】 本發明之組合物及方法可包含磷脂，較佳係溶血磷脂醯膽鹼。「溶血磷脂醯膽鹼」(LPC)或「溶血磷脂醯膽鹼分子」係指在甘油之羥基上載有一個磷酸膽鹼基及在甘油之其他兩個羥基中之一者上載有一個醯基之甘油分子。剩餘的羥基為未經取代。

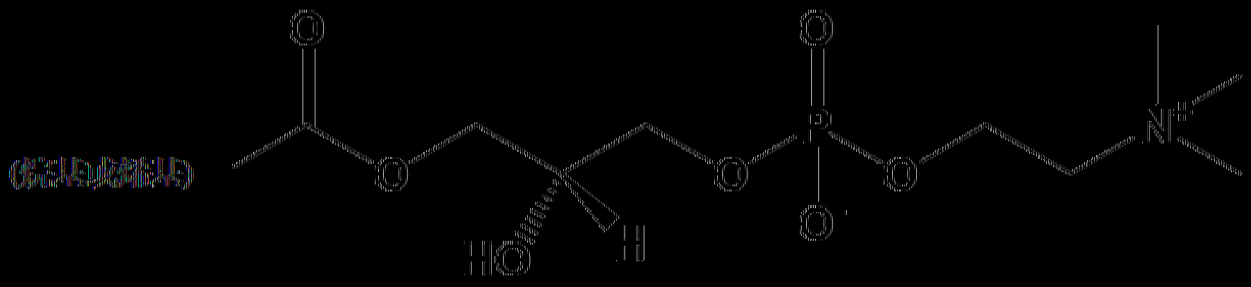
[0062] 在一些實施例中，具有單一醯基鏈之分離的溶血磷脂醯膽鹼 (LPC) 具有以下形式：



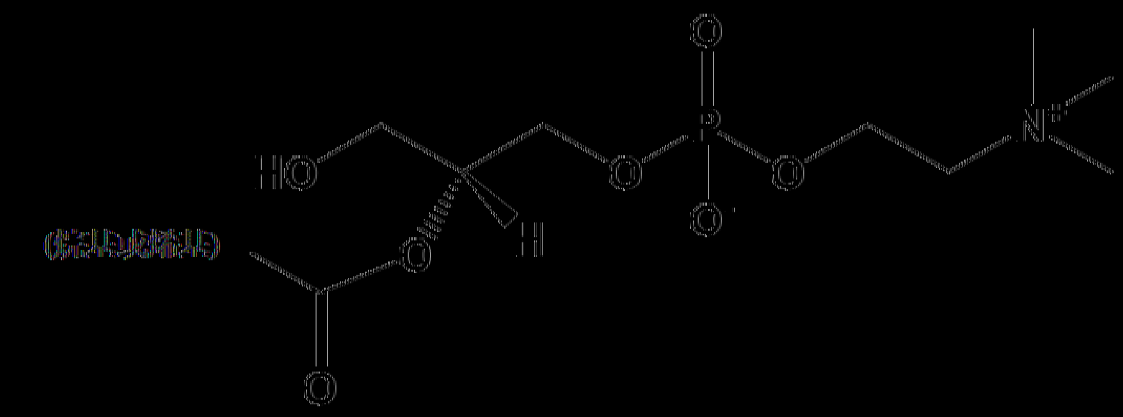
或



[0063] 在一些實施例中，具有單一醯基鏈之分離的溶血磷脂醯膽鹼 (LPC) 具有以下形式：



或



。

〔0064〕 該烷基或烯基鏈連同羰基碳一起形成比烷基或烯基鏈長一個碳原子之醯基鏈。例如，(C23烷基)-C(=O)-基形成C24醯基鏈。因此，當基團「(烷基或伸烷基)」為C12-C23烷基(諸如C12-C19烷基或C20-C23烷基)時，該(C12-C23烷基-C(=O)-基形成C13-C24醯基鏈(諸如C13-C20醯基鏈或C21-C24醯基鏈)。當基團「(烷基或伸烷基)」為C12-C23烯基(諸如C12-C19烯基或C20-C23烯基)時，該(C12-C23烯基-C(=O)-基形成C13-C24醯基鏈(諸如C13-C20醯基鏈或C21-C24醯基鏈)。醯基鏈可被稱為飽和醯基或不飽和醯基以區分含有烷基之醯基與含有烯基之醯基。標準δ符號或ω符號可用於指示不飽和醯基鏈中一或多個雙鍵的位置。

〔0065〕 本發明之溶血磷脂醯膽鹼(LPC)化合物具有其中醯基鏈為C13-C22醯基鏈或C13-C24醯基鏈之單一醯基鏈。在一些實施例中，該醯基鏈為C18-C22醯基鏈或C21-C24醯基鏈。在一些較佳實施例中，該醯基鏈為C22醯基鏈。

V. 病原體識別受體激動劑

〔0066〕 本發明之組合物及方法可包含另一病原體識別受體(PRR)激動劑。在一些實施例中，該PRR激動劑包含類鐸(toll-like)受體(TLR)、

類NOD受體(NLR)、類RIG-I受體(RLR)或C型凝集素受體(CLR)之激動劑。在一些實施例中，該PRR激動劑包含TLR7/8激動劑。

A. TLR7/8激動劑

【0067】 術語「TLR7/8激動劑」如本文所用係指TLR7及/或TLR8之激動劑。在一個態樣中，該TLR7/8激動劑為TLR7激動劑。在另一個態樣中，該TLR7/8激動劑為TLR8激動劑。在另一個態樣中，該TLR7/8激動劑為TLR7及TLR8二者之激動劑。本發明之TLR7/8激動劑適合於在LPC存在下過度活化人類樹突細胞。

【0068】 在一些態樣中，該TLR7/8激動劑為小分子。在一些實施例中，該TLR7/8激動劑為具有900道耳頓或更小之分子量之小分子或其鹽。亦即，該小分子TLR7/8激動劑不是如可由美國FDA的生物製劑評估及研究中心(the U.S. FDA's Center for Biologics Evaluation and Research)調節之重組蛋白質或合成寡核苷酸之大分子。相反地，該小分子TLR7/8激動劑可由FDA的藥物評估及研究中心(the FDA's Center for Drug Evaluation and Research)調節。在一些實施例中，該小分子具有約90至約900道耳頓之分子量。在一些實施例中，該TLR7/8激動劑包含咪唑并喹啉化合物。在一些較佳實施例中，該TLR7/8激動劑包含雷西莫特(resiquimod) (R848)。

B. 其他PRR激動劑

【0069】 在一些態樣中，該病原體識別受體(PRR)激動劑包含類鐸受體(TLR)激動劑，其限制條件為該TLR激動劑不包含TLR7/8激動劑。在一些實施例中，該TLR激動劑包含TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR9及TLR13中之一者或多者之激動劑。在一些實施例中，該PRR激動劑為

TLR2/6激動劑，諸如Pam2CSK4。在其他實施例中，該TLR激動劑為TLR4激動劑，諸如單磷醯基脂質A (MPLA)。然而，在較佳實施例中，該TLR激動劑不是TLR2、TLR4及/或TLR9之激動劑。例如，在較佳實施例中，該TLR9激動劑不是TLR4配體，諸如LPS (內毒素)。

【0070】 在其他態樣中，該PRR激動劑包含類NOD受體(NLR)激動劑。在其他態樣中，該PRR激動劑包含類RIG-I受體(RLR)激動劑。在另外態樣中，該PRR激動劑包含C型凝集素受體(CLR)激動劑。

VI. 醫藥調配物

【0071】 本發明之一些組合物為包含醫藥上可接受之賦形劑之醫藥調配物。本發明之醫藥調配物可呈溶液或懸浮液之形式。或者，該等醫藥調配物可為經脫水之固體(例如經冷凍乾燥之固體或經噴霧乾燥之固體)。本發明之醫藥調配物較佳為無菌，且較佳為基本上無內毒素。術語「醫藥調配物」在本文中與術語「藥物產品」及「藥劑」可互換使用。在一些實施例中，基於調配物之所欲目的，該醫藥調配物包含特定比率之各種組分。

【0072】 本發明之醫藥上可接受之賦形劑包括例如溶劑、緩衝劑、張力調節劑、增積劑及防腐劑(參見例如Pramanick等人，Pharma Times，45:65-77，2013)。在一些實施例中，該等醫藥調配物可包含用作溶劑、緩衝劑、張力調節劑及增積劑中之一者或多者之賦形劑(例如，含在鹽水中之氯化鈉可用作水性載體及張力調節劑二者)。

【0073】 在一些實施例中，該等醫藥調配物包含水性載體作為溶劑。適宜載體包括例如無菌水、鹽水溶液、磷酸鹽緩衝鹽水及林格氏溶液(Ringer's solution)。在一些實施例中，該組合物為等滲。

【0074】 該等醫藥調配物可包含緩衝劑。緩衝劑控制pH以抑制在加工、儲存及視情況復水期間活性劑之降解。適宜緩衝劑包括例如包含乙酸鹽、檸檬酸鹽、磷酸鹽或硫酸鹽之鹽。其他適宜緩衝劑包括例如胺基酸，諸如精胺酸、甘胺酸、組胺酸及離胺酸。該緩衝劑可進一步包含鹽酸或氫氧化鈉。在一些實施例中，該緩衝劑將該組合物之pH維持在6至9之範圍內。在一些實施例中，該pH大於(下限) 6、7或8。在一些實施例中，該pH小於(上限) 9、8或7。亦即，該pH在約6至9之範圍內，其中該下限小於該上限。

【0075】 該等醫藥組合物可包含張力調節劑。適宜張力調節劑包括(例如)右旋糖、甘油、氯化鈉、丙三醇及甘露醇。

【0076】 該等醫藥調配物可包含增積劑。當醫藥組合物欲在投與之前凍乾時，增積劑特別有用。在一些實施例中，該增積劑為有助於穩定及防止在冷凍或噴霧乾燥期間及/或儲存期間活性劑之降解之保護劑。適宜增積劑為糖(單醣、二醣及多醣)，諸如蔗糖、乳糖、海藻糖、甘露醇、山梨糖醇、葡萄糖及棉子糖。

【0077】 該等醫藥調配物可包含防腐劑。適宜防腐劑包括(例如)抗氧化劑及抗微生物劑。然而，在較佳實施例中，該醫藥調配物係在無菌條件下製備且係存於單次使用容器中，且因此不必包含防腐劑。

【0078】 本發明之醫藥調配物適合於非經腸投與。亦即，本發明之醫藥調配物無意用於腸內投與(例如，不是經口、經胃或經直腸)。

VII. 使用方法

【0079】 在一些態樣中，本發明係關於本文所述的組合物或調配物中之任何一者之使用方法。該等使用方法適合於涉及刺激免疫反應之複數

種用途。在一些實施例中，該等使用方法包含治療癌症之方法。在一些實施例中，該等使用方法包含抑制異常細胞增殖之方法。在一些實施例中，該等使用方法包含治療或預防傳染病之方法。該等方法包含投與有效量之本文所述的調配物或組合物至有需要的個體以達成特定結果。該個體為哺乳動物受試者，諸如人類患者。在其他實施例中，該個體為非人類患者。在一些實施例中，該個體為犬類患者。亦即，在一些實施例中，該等使用方法涉及臨床用途，而在其他實施例中，該等使用方法涉及臨床前及/或獸醫用途。對於臨床前用途，該哺乳動物受試者可為非人類的靈長類動物(例如猴或猿)或嚙齒動物(例如小鼠或大鼠)。對於獸醫用途，該哺乳動物受試者可為養殖動物(例如牛)、運動動物(例如馬)或寵物(例如伴侶動物，諸如狗或貓)。

A. 免疫反應之刺激

【0080】 簡言之，本發明提供刺激個體中之免疫反應之方法，其包括以足以刺激個體中之免疫反應之量對該個體投與本文所述的組合物或調配物。「刺激」免疫反應(與「引發」及免疫反應可互換使用)意指增加免疫反應，其可源自於引發重新免疫反應(例如，由於初始疫苗接種方案造成)或增強現有免疫反應(例如，由於加強疫苗接種方案造成)。在一些實施例中，刺激免疫反應包含由以下組成之群中之一者或多者：刺激細胞激素產生；刺激B淋巴細胞增殖；刺激干擾素路徑相關基因表現；刺激化學吸引劑相關基因表現；及刺激樹突細胞DC成熟。用於測定免疫反應之刺激之方法係此項技術中已知的。

【0081】 例如，本發明提供藉由以足以誘導個體中之抗原特異性免疫反應之量對個體投與本文所述的組合物或調配物來誘導個體中之抗原特

異性免疫反應之方法。在較佳實施例中，該組合物或調配物包含抗原。在一些實施例中，將該組合物或調配物投與至個體之包含抗原之組織。該免疫反應可包含抗原特異性抗體反應、抗原特異性細胞毒性T淋巴細胞(CTL)反應及抗原特異性輔助T (Th)細胞反應中之一者或多者。「誘導」抗原特異性抗體反應意指增加抗原特異性抗體之效價至高於臨限值水平，諸如投與前基線效價或血清保護水平。「誘導」抗原特異性CTL反應意指增加在周邊血液中發現的抗原特異性CTL之頻率至高於投與前基線頻率。「誘導」抗原特異性Th細胞反應意指增加在周邊血液中發現的抗原特異性Th細胞之頻率至高於投與前基線頻率。

【0082】 免疫反應之分析(包括定性及定量)可係藉由此項技術中已知的任何方法，包括(但不限於)測定抗原特異性抗體產生(包括測定特異性抗體亞類)、活化特定群體之淋巴細胞(諸如B細胞及輔助T細胞)、產生細胞激素(諸如IFN-α、IFN-γ、IL-6、IL-12)及/或釋放組織胺。用於測定抗原特異性抗體反應之方法包括酶聯免疫吸附分析(ELISA)。特定群體之淋巴細胞之活化可藉由增殖檢定且利用螢光活化細胞分類(FACS)來測定。細胞激素之產生亦可藉由ELISA測定。在一些實施例中，刺激免疫反應之方法包含藉由單核細胞衍生之樹突細胞或周邊血液單核細胞刺激介白素-1β (IL-1β)分泌、干擾素-γ (IFN-γ)分泌、及/或腫瘤壞死因子-α (TNF-α)分泌。在一些較佳實施例中，與本發明之組合物接觸的細胞之至少50%、55%、60%、65%、70%或75%在接觸後40至56小時(或約48小時)保持存活。

【0083】 在一些實施例中，該等方法適合於刺激抗腫瘤免疫反應。在其他實施例中，該等方法適合於刺激抗微生物免疫反應。在一些實施例

中，該抗微生物反應為抗細菌免疫反應。在一些實施例中，該抗微生物反應為抗真菌免疫反應。在一些實施例中，該抗微生物反應為抗病毒免疫反應。在一些實施例中，該抗微生物反應為抗原生動物免疫反應。

B. 治療或預防疾病

【0084】 本發明進一步提供治療或預防個體中之疾病之方法，其包括以足以治療或預防個體中之疾病之量對該個體投與本文所述的組合物或調配物。在一些實施例中，該疾病為癌症。在一些實施例中，該疾病為異常細胞增殖。在其他實施例中，該疾病為傳染病。

【0085】 在一些實施例中，該等方法涉及治療個體中之癌症或以其他方式治療患有癌症的哺乳動物受試者。在一些實施例中，該癌症為血液癌症，諸如淋巴瘤、白血病或骨髓瘤。在其他實施例中，該癌症為非血液癌，諸如肉瘤、癌或黑色素瘤。在一些實施例中，該癌症為惡性。

【0086】 在一些實施例中，該等方法涉及抑制個體中之異常細胞增殖。「異常細胞增殖」係指良性腫瘤或惡性腫瘤之增殖。該惡性腫瘤可為轉移性腫瘤。

【0087】 在一些實施例中，該等方法涉及治療或預防個體中之傳染病。在一些實施例中，該傳染病係由病毒感染引起。在其他實施例中，該傳染病係由細菌感染引起。在其他實施例中，該傳染病係由真菌感染引起。又在其他實施例中，該傳染病係由原生動物感染引起。特別重要的為由感染人類以及其他動物(諸如哺乳動物或鳥類)之人畜共通病原體引起之傳染病。在一些實施例中，該人畜共通病原體係經由中間物種(病媒動物)傳播給人類。

例舉實施例

1.一種包含封裝於脂質奈米粒子(LNP)中之mRNA之組合物，其中該mRNA包含持續性活性之環GMP-AMP合成酶(cGAS)之編碼區域，且該LNP包含第一磷脂、及至少一種選自由可電離之脂質、聚乙二醇化脂質、結構脂質、第二磷脂及其混合物組成之群之脂質，其中該第一磷脂包含具有單一C13-C24醯基鏈之溶血磷脂醯膽鹼(LPC)。

2.一種包含封裝於脂質奈米粒子(LNP)中之第一mRNA及第二mRNA之組合物，其中該第一mRNA包含持續性活性之環GMP-AMP合成酶(cGAS)之編碼區域，該第二mRNA包含抗原之編碼區域；且該LNP包含第一磷脂、及至少一種選自由可電離之脂質、聚乙二醇化脂質、結構脂質、第二磷脂及其混合物組成之群之脂質，其中該第一磷脂包含具有單一C13-C24醯基鏈之溶血磷脂醯膽鹼(LPC)。

3.一種包含封裝於脂質奈米粒子(LNP)中之mRNA之組合物，其中該mRNA包含經2A樣序列隔開之第一編碼區域及第二編碼區域，其中該第一編碼區域為持續性活性之環GMP-AMP合成酶(cGAS)之編碼區域及該第二編碼區域為抗原之編碼區域或該第一編碼區域為抗原之編碼區域及該第二編碼區域為持續性活性之環GMP-AMP合成酶(cGAS)之編碼區域，且該LNP包含第一磷脂及至少一種選自由可電離之脂質、聚乙二醇化脂質、結構脂質、第二磷脂及其混合物組成之群之脂質，其中該第一磷脂包含具有單一C13-C24醯基鏈之溶血磷脂醯膽鹼(LPC)。

4.如實施例1至3中任一項之組合物，其中該至少一種脂質包含可電離之脂質、第二磷脂、聚乙二醇化脂質及結構脂質。

5.如實施例1至4中任一項之組合物，其中該可電離之脂質包含：

i) 8-[(2-羥乙基)[6-側氧基-6-(十一基氧基)己基]胺基]-辛酸，1-辛基壬基酯(SM-102)或其類似物或衍生物；及/或

ii) 6-((2-己基癸醯基)氧基)-N-(6-((2-己基癸醯基)氧基)己基)-N-(4-羥基丁基)己烷-1-胺鎓(ALC-0315)或其類似物或衍生物；及/或

iii) (6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七碳-6,9,28,31-四烯-19-基 4-(二甲基胺基)丁酸酯(DLin-MC3-DMA)或其類似物或衍生物。

6.如實施例1至5中任一項之組合物，其中該聚乙二醇化脂質係選自由PEG修飾之磷脂醯乙醇胺、PEG修飾之磷脂酸、PEG修飾之神經醯胺、PEG修飾之二烷基胺、PEG修飾之二醯基甘油、PEG修飾之二烷基甘油及其組合組成之群。

7.如實施例1至5中任一項之組合物，其中該聚乙二醇化脂質包含聚乙二醇[PEG] 2000二肉豆蔻醯基甘油[DMG]。

8.如實施例1至7中任一項之組合物，其中該結構脂質係選自由膽固醇、糞固醇(fecosterol)、麥固醇、麥角固醇、菜油固醇(campesterol)、豆固醇、蕓苔甾醇(brassicasterol)、番茄鹼(tomatidine)、熊果酸(ursolic acid)、α-生育酚及其組合組成之群。

9.如實施例1至7中任一項之組合物，其中該結構脂質包含膽固醇。

10. 如實施例1至9中任一項之組合物，其中該第二磷脂包含：

i)選自由磷脂醯基膽鹼、磷脂醯基乙醇胺、磷脂醯基甘油、磷脂醯基絲胺酸、磷脂酸、2-溶血磷脂醯基膽鹼及神經鞘磷脂組成之群之親水性頭部部分；及

ii)一或多種選自由月桂酸、肉豆蔻酸、肉豆蔻油酸、棕櫚酸、棕櫚油酸、硬脂酸、油酸、亞麻油酸、α-次亞麻油酸、芥子酸、花生酸、花生

四烯酸、植烷酸(phytanoic acid)、二十碳五烯酸、山萮酸、二十二碳五烯酸及二十二碳六烯酸組成之群之脂肪酸尾部部分。

11. 如實施例1至9中任一項之組合物，其中該第二磷脂係選自由以下組成之群：

1,2-二亞油醯基-sn-甘油-3-磷酸膽鹼(DLPC)，

1,2-二肉豆蔻醯基-sn-甘油-磷酸膽鹼(DMPC)，

1,2-二油醯基-sn-甘油-3-磷酸膽鹼(DOPC)，

1,2-二棕櫚醯基-sn-甘油-3-磷酸膽鹼(DPPC)，

1,2-二硬脂醯基-sn-甘油-3-磷酸膽鹼(DSPC)，

1,2-二(十一醯基)-sn-甘油-磷酸膽鹼(DUPC)，

1-棕櫚醯基-2-油醯基-sn-甘油-3-磷酸膽鹼(POPC)，

1,2-二-O-十八烯基-sn-甘油-3-磷酸膽鹼，

1-油醯基-2-膽固醇基半琥珀醯基-sn-甘油-3-磷酸膽鹼，

1,2-二次亞麻油醯基-sn-甘油-3-磷酸膽鹼，

1,2-二花生四烯醯基-sn-甘油-3-磷酸膽鹼，

1,2-二(二十二碳六烯醯基)-sn-甘油-3-磷酸膽鹼，

1,2-二油醯基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DOPE)，

1,2-二植烷醯基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺，

1,2-二硬脂醯基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺，

1,2-二亞油醯基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺，

1,2-二次亞麻油醯基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺，

1,2-二花生四烯醯基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺，

1,2-二(二十二碳六烯醯基)-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺，

1,2-二油醯基-sn-甘油-3-磷酸-rac-(1-甘油)鈉鹽(DOPG)，

神經鞘磷脂，及

其組合。

12. 如實施例11之組合物，其中該第二磷脂包含1,2-二硬脂醯基-sn-甘油-3-磷酸膽鹼(DSPC)。

13. 如實施例1至12中任一項之組合物，其中該組合物進一步包含至少一種賦形劑。

14. 如實施例13之組合物，其中該賦形劑包含蔗糖。

15. 一種組合物，其包含：

i)與一或多種脂質複合之mRNA (RNA-脂複合體)；及

ii)具有單一C13-C24醯基鏈之溶血磷脂醯膽鹼(LPC)，

其中該mRNA包含持續性活性之環GMP-AMP合成酶(cGAS)之編碼區域，且該一或多種脂質包含第一脂質及第二脂質。

16. 一種組合物，其包含：

i)與一或多種脂質複合之第一mRNA及第二mRNA (RNA-脂複合體)；及

ii)具有單一C13-C24醯基鏈之溶血磷脂醯膽鹼(LPC)；

其中該第一mRNA包含持續性活性之環GMP-AMP合成酶(cGAS)之編碼區域，及該第二mRNA包含抗原之編碼區域，且該一或多種脂質包含第一脂質及第二脂質。

17. 一種組合物，其包含：

i)與一或多種脂質複合之mRNA (RNA-脂複合體)；及

ii)具有單一C13-C24醯基鏈之溶血磷脂醯膽鹼(LPC)，

其中該mRNA包含經2A樣序列隔開之第一編碼區域及第二編碼區域，該第一編碼區域為持續性活性之環GMP-AMP合成酶(cGAS)之編碼區域且該第二編碼區域為抗原之編碼區域或該第一編碼區域為抗原之編碼區域且該第二編碼區域為持續性活性之環GMP-AMP合成酶(cGAS)之編碼區域，且該一或多種脂質包含第一脂質及第二脂質。

18. 如實施例15至17中任一項之組合物，其中該第一脂質為陽離子脂質，且該第二脂質為中性或陰離子脂質。

19. 如實施例18之組合物，其中該陽離子脂質包含以下中之一者或二者：

i) 1,2-二-O-十八烯基-3-三甲基銨丙烷(DOTMA)或其類似物或衍生物；及

ii) 1,2-二油醯基-3-三甲基銨丙烷(DOTAP)或其類似物或衍生物。

20. 如實施例18或實施例19之組合物，其中該中性或陰離子脂質包含：

i) 1,2-二-(9Z-十八烯醯基)-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DOPE)或其類似物或衍生物；及/或

ii)膽固醇或其類似物或衍生物；及/或

iii) 1,2-二油醯基-sn-甘油-3-磷酸膽鹼(DOPC)或其類似物或衍生物。

21. 如實施例1至20中任一項之組合物，其中該LPC之該醯基鏈為C21-C24醯基鏈。

22. 如實施例1至20中任一項之組合物，其中該LPC之該醯基鏈為C22醯基鏈。

23. 如實施例1至22中任一項之組合物，其中該LPC之該醯基鏈為

完全飽和。

24. 如實施例23之組合物，其中該LPC包含1-山萮醯基-2-羥基-sn-甘油-3-磷酸膽鹼[LPC(22:0)]。

25. 如實施例1至24中任一項之組合物，其進一步包含TLR7/8激動劑。

26. 如實施例25之組合物，其中該TLR7/8激動劑為具有900道耳頓或更小之分子量之小分子。

27. 如實施例26之組合物，其中該TLR7/8激動劑包含咪唑并喹啉化合物。

28. 如實施例27之組合物，其中該TLR7/8激動劑包含雷西莫特(R848)。

29. 如實施例25至28中任一項之組合物，其中該LPC包含LPC(22:0)，且該TLR7/8激動劑包含雷西莫特(R848)。

30. 如實施例1至29中任一項之組合物，其中該mRNA或該第一mRNA及該第二mRNA包含5’非轉譯區域(5’UTR)及3’非轉譯區域(3’UTR)。

31. 如實施例1至30中任一項之組合物，其中該mRNA包含5'帽結構。

32. 如實施例1至31中任一項之組合物，其中該mRNA包含多腺苷酸尾部。

33. 如實施例1至32中任一項之組合物，其中該mRNA為經核苷修飾之mRNA。

34. 一種核酸，其包含：i)抗原之編碼區域、及ii)持續性活性之環

GMP-AMP合成酶(cGAS)之編碼區域，視情況，其中該核酸為mRNA，視情況，其中該核酸為DNA。

35. 一種表現載體，其包含如實施例34之核酸。

36. 如實施例1至35中任一項之組合物，其中該持續性活性之cGAS具有比其野生型對應物更大之自身DNA反應性傾向。

37. 如實施例1至36中任一項之組合物，其中該cGAS為缺乏胺基端磷酸肌醇結合域之截短型cGAS(cGASΔN)。

38. 如實施例37之組合物，其中該cGASΔN包含SEQ ID NO:1之胺基酸序列或與SEQ ID NO:1至少85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同之胺基酸序列。

39. 如實施例38之組合物，其中該cGASΔN包含：

(i) SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:8之胺基酸序列、或與SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:8至少95%、96%、97%、98%或99%相同之胺基酸序列；或

(ii) SEQ ID NO:9之共通胺基酸序列。

40. 如實施例38之組合物，其中該cGASΔN係由SEQ ID NO:17之核苷酸序列編碼。

41. 如實施例37至40中任一項之組合物，其中該cGASΔN之編碼區域係與起始密碼子(ATG)可操作組合。

42. 如實施例1至41中任一項之組合物，其中該抗原為腫瘤抗原。

43. 如實施例42之組合物，其中該腫瘤抗原為腫瘤相關抗原。

44. 如實施例42之組合物，其中該腫瘤抗原為新抗原。

45. 如實施例1至41中任一項之組合物，其中該抗原包含微生物抗原。

46. 如實施例44之組合物，其中該微生物抗原包含病毒抗原、細菌抗原、原生動物抗原或真菌抗原。

47. 如實施例1至41中任一項之組合物，其中該抗原包含病原體之表面蛋白或其片段。

48. 如實施例47之組合物，其中該病原體能夠在人類受試者中引起疾病。

49. 如實施例47或實施例48之組合物，其中該病原體為病毒。

50. 如實施例49之組合物，其中該病毒為SARS-CoV-2。

51. 如實施例50之組合物，其中該抗原為SARS-CoV-2之棘(S)糖蛋白，視情況，其中該棘糖蛋白為融合前穩定變異體。

52. 如實施例1至51中任一項之組合物，其中該組合物不包含脂多醣(LPS)或單磷醯基脂質A (MPLA)。

53. 如實施例1至52中任一項之組合物，其中該組合物不包含經氧化之1-棕櫚醯基-2-花生四烯醯基-sn-甘油-3-磷醯基膽鹼(oxPAPC)、或oxPAPC之物種。

54. 如實施例53之組合物，其中該組合物不包含2-[[(2R)-2-[(E)-7-羧基-5-羥基庚-6-烯醯基]氧基-3-十六烷醯基氧基丙氧基]-羥基磷醯基]氧基乙基-三甲基銨根(azanium)(HOdiA-PC)、[(2R)-2-[(E)-7-羧基-5-側氧基庚-6-烯醯基]氧基-3-十六烷醯基氧基丙基] 2-(三甲基銨根基(azaniumyl))乙基磷酸酯(KOdiA-PC)、1-棕櫚醯基-2-(5-羥基-8-側氧基-辛

烯醯基)-sn-甘油-3-磷醯基膽鹼(HOOA-PC)、2-[[(2R)-2-[(E)-5,8-二側氧基辛-6-烯醯基]氧基-3-十六烷醯基氧基丙氧基]-羥基磷醯基]氧基乙基-三甲基銨根(KOOA-PC)、[(2R)-3-十六烷醯基氧基-2-(5-側氧基戊醯基氧基)丙基] 2-(三甲基銨根基)乙基磷酸酯(POVPC)、[(2R)-2-(4-羧基丁醯基氧基)-3-十六烷醯基氧基丙基] 2-(三甲基銨根基)乙基磷酸酯(PGPC)、[(2R)-3-十六烷醯基氧基-2-[4-[3-[(E)-[2-[(Z)-辛-2-烯基]-5-側氧基亞環戊-3-烯-1-基]甲基]環氧乙烷-2-基]丁醯基氧基]丙基] 2-(三甲基銨根基)乙基磷酸酯(PECPC)、[(2R)-3-十六烷醯基氧基-2-[4-[3-[(E)-[3-羥基-2-[(Z)-辛-2-烯基]-5-側氧基亞環戊基]甲基]環氧乙烷-2-基]丁醯基氧基]丙基] 2-(三甲基銨根基)乙基磷酸酯(PEIPC)及/或1-棕櫚醯基-2-壬二醯基-sn-甘油-3-磷酸膽鹼(PAzePC)。

55. 一種醫藥調配物，其包含如實施例1至54中任一項之組合物及醫藥上可接受之賦形劑。

56. 一種用於產生經過度活化之樹突細胞之方法，該方法包括使樹突細胞與有效量之如實施例1至54中任一項、如實施例25至54中任一項之組合物、或如實施例55之調配物接觸以產生經過度活化之樹突細胞，其中該等經過度活化之樹突細胞分泌IL-1β而在暴露約48小時內不會經歷細胞死亡。

57. 如實施例56之方法，其中該等樹突細胞係：

(i)與該組合物體內接觸；或

(ii)與該組合物離體接觸。

58. 如實施例56或實施例57之方法，其中該等經過度活化之樹突細胞：

(i)與未經刺激之樹突細胞或與空LNP接觸之樹突細胞相比分泌更高水平之IL-6、TNFα、RANTES及IP-10中之一者或多者；及/或

(ii)表現更高水平之至少一種選自由CCR7、CD40、CD80、CD83、CD86、MHC II類、MHC I類及其組合組成之群之細胞表面標誌物。

59. 一種醫藥調配物，其包含至少10^3、10^4、10^5或10^6個藉由如實施例56至58中任一項之方法產生之經過度活化之樹突細胞、及醫藥上可接受之賦形劑。

60. 一種刺激針對抗原之免疫反應之方法，其包括向有需要的個體投與有效量之如實施例55或實施例59之醫藥調配物以刺激針對抗原之免疫反應。

61. 一種治療癌症之方法，其包括向有需要的個體投與有效量之如實施例55或實施例59之醫藥調配物以治療癌症。

62. 一種抑制異常細胞增殖之方法，其包括向有需要的個體投與有效量之如實施例55或實施例59之醫藥調配物以抑制異常細胞增殖。

63. 一種治療或預防傳染病之方法，其包括向有需要的個體投與有效量之如實施例55之醫藥調配物以治療或預防傳染病。

64. 如實施例63之方法，其中該傳染病為病毒性疾病。

65. 如實施例63之方法，其中該傳染病為細菌性疾病。

66. 如實施例56至62中任一項之方法或醫藥調配物，其中該等樹突細胞為哺乳動物細胞。

67. 如實施例66之方法或醫藥調配物，其中該等哺乳動物細胞為人類細胞。

68. 如實施例60至66中任一項之方法，其中該個體為哺乳動物。

69. 如實施例68之方法，其中該哺乳動物為人類。

70. 如實施例68之方法，其中該哺乳動物為狗或貓。

71. 如實施例1至70中任一項之組合物、調配物或方法，其中該第二磷脂包含1,2-二硬脂醯基-sn-甘油-3-磷酸膽鹼(DSPC)，及該至少一種脂質包含8-[(2-羥乙基)[6-側氧基-6-(十一基氧基)己基]胺基]-辛酸，1-辛基壬基酯(SM-102)或其類似物或衍生物、及膽固醇。

72. 如實施例71之組合物、調配物或方法，其中該至少一種脂質進一步包含聚乙二醇化脂質，視情況，其中該聚乙二醇化脂質包含聚乙二醇[PEG] 2000二肉豆蔻醯基甘油[DMG]。

73. 如實施例1至72中任一項之組合物、調配物或方法，其中該LNP具有小於約250奈米，視情況約25至約250奈米，視情況約50至約200奈米，或視情況約75至約175奈米之有效直徑。

74. 如實施例73之組合物、調配物或方法，其中該LNP具有小於約200奈米之有效直徑。

75. 如實施例73之組合物、調配物或方法，其中該LNP具有小於約150奈米之有效直徑。

實例

【0088】 縮寫：BMDC（骨髓衍生之樹突細胞）；CDS（細胞溶質DNA感測器）；環GMP-AMP合成酶(cGAS)；CLR（C型凝集素受體）；DAMP（損壞相關分子模式）；DC（樹突細胞）；dLN（引流淋巴結）；DLS(動態光散射)；DMG-PEG-2000（聚乙二醇[PEG] 2000二肉豆蔻醯基甘油[DMG]；DSPC（1,2-二硬脂醯基-sn-甘油-3-磷酸膽鹼)；ELSD（蒸發光散射偵測器)；FLT3L（與Fms相關的酪胺酸激酶3配體)；GFP（綠色螢光蛋

白質)；GV (GenVoy ILM™調配物)；(HOdiA-PC (1-棕櫚醯基-2-(5-羥基-8-側氧基-6-辛烯二醯基)-sn-甘油-3-磷脂醯膽鹼)；HOOA-PC (1-棕櫚醯基-2-(5-羥基-8-側氧基辛-6-烯醯基)-sn-甘油-3-磷酸膽鹼)；IFNγ (干擾素-γ)；IL-1b/IL1-β/IL-1β (介白素-1β)；KOdiA-PC (1-(棕櫚醯基)-2-(5-酮基-6-辛烯-二醯基)磷脂醯膽鹼)；KOOA-PC (1-棕櫚醯基-(5-酮基-8-側氧基-6-辛烯醯基)-sn-甘油-3-磷酸膽鹼)；LNP (脂質奈米粒子)；LPC/Lyso PC (溶血磷脂醯膽鹼)；Lyso PC(22:0) (1-山萮醯基-2-羥基-sn-甘油-3-磷酸膽鹼)；LPS (脂多醣)；MC3 ((6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七碳-6,9,28,31-四烯-19-基4-(二甲基胺基)丁酸酯，亦稱為DLin-MC3-DMA)；mcg或μg (微克)；moDC (單核細胞衍生之樹突細胞)；MPLA (單磷醯基脂質A)；NLR (類NOD受體)；OVA (卵白蛋白)；oxPAPC (經氧化之1-棕櫚醯基-2-二十碳四烯基-sn-甘油-3-磷醯基膽鹼)；PAMP (病原體相關分子模式)；PBMC (周邊血液單核細胞)；PGPC (1-棕櫚醯基-2-戊二醯基-sn-甘油-3-磷酸膽鹼)；POVPC (1-棕櫚醯基-2-(5'-側氧基-戊醯基)-sn-甘油-3-磷酸膽鹼)；PRR (病原體識別受體)；RLR (類RIG-I受體)；R848 (雷西莫特)；SC (皮下)；STING (干擾素基因之刺激因子)；TNFα (腫瘤壞死因子-α)；及TLR (類鐸受體)。

【0089】 儘管已出於清楚及理解之目的以說明及實例之方式略為詳細地描述本發明，但熟習此項技術者應明瞭可實施某些改變及修改。因此，以下實例不應解釋為限制本發明之範疇，該範疇係由隨附申請專利範圍所界定。

實例1：具有單一醯基鏈之溶血磷脂醯膽鹼(LPC)及TLR7/8激動劑之組合過度活化哺乳動物周邊血液單核細胞

【0090】 本實例描述利用脂質DAMP與小分子PAMP之組合過度活化犬類及人類周邊血液單核細胞(PBMC)。

材料及方法

【0091】 自全血分離PBMC。使用利用Ficoll-Paque PLUS (Cytivia)之密度梯度離心自全血分離PBMC。將全血用PBS1:1稀釋，於Ficoll-Paque PLUS的頂部分層且在室溫下以1000 xg離心30分鐘。收集PBMC，在PBS中洗滌兩次，且利用Ack裂解緩衝液(Lonza)培養以移除任何剩餘的紅血球。

【0092】 細胞培養及刺激。在分離之後，立即將PBMC接種於含有10% FBS、50單位/mL青黴素、50 mg/mL鏈黴素、2 mM L-麩醯胺酸、1 mM丙酮酸鈉及50 mM β-巰基乙醇之RPMI培養基(R10培養基)中。將細胞以1x10^5個(犬類細胞)或1x10^6個(人類細胞)/孔接種於96孔平底組織培養板中。根據製造商的建議將經凍乾之Vaccigrade R848 (Invivogen)復水且稀釋並以1 μg/mL之最終濃度添加至細胞。隨後立即將22:0 LYSO PC以最終濃度82.5 μM添加至細胞中。根據製造商的建議將另外的先天激動劑稀釋於R10培養基中且如下添加至該等細胞：人類GM-CSF (Peprotech)以10 ng/mL之最終濃度添加；2'3' cGAMP (Invivogen)以15 μg/mL之最終濃度添加；LPS (血清型O55:B5 (Enzo Life Sciences))以1 μg/mL之最終濃度添加；氫氧化鋁(Invivogen)以30 μg/mL之最終濃度添加。在37℃，5% CO_2下培養細胞兩天。然後，將細胞培養物用於終點分析。

【0093】 終點分析。在將PBMC用PAMP及DAMP培養兩天之後，收集上清液及細胞樣品用於分析。藉由以400xg離心5分鐘使培養物中之細胞沉澱。收集該等孔中一半的培養基體積用於藉由酶聯免疫吸附分析

(ELISA)或Lumit™生物發光分析之細胞激素定量，同時使用其餘培養基及細胞以藉由評估代謝活性來定量細胞存活率。

【0094】 細胞激素分泌之定量。使用以下套組中之一者來評估自人類PBMC之IL-1β分泌：ELISA MAX Deluxe Set人類IL-1β套組(Biolegend)、Invitrogen人類IL-1β套組或Lumit™人類IL-1β免疫檢定(Promega)。使用ELISA MAX Deluxe Set人類IFNγ(Biolegend)來評估自人類PBMC之IFNγ分泌及使用人類TNFα未塗覆ELISA套組(Invitrogen)來評估自人類PBMC之TNFα分泌。根據製造商說明書在以下修改下進行ELISA：i)將培養之總樣品 + 緩衝液體積自100 µL減少至50 µL；ii)以500 pg/mL製備最高標準，在兩倍稀釋下至7.8 pg/mL；及iii)在4℃在迴轉式振盪器上完成樣品培養過夜。根據製造商說明書進行Lumit™檢定。根據製造商說明書在以下修改下，使用犬類IL-1β/IL-1F2 DuoSet ELISA (R&D)評估自犬類PBMC之IL-1β分泌：i)將培養之總樣品 + 緩衝液體積自100 µL減少至50 µL；ii)在4℃在迴轉式振盪器上完成樣品培養過夜。對於所有ELISA，使用Spectramax M5e板式讀取器(Molecular Devices)在450 nm下測定吸光度，且進行570 nm校正。對於Lumit™檢定，使用Spectramax M5e板式讀取器(Molecular Devices) 利用500 ms之積分時間於所有波長測定發光。為了確定上清液中之細胞激素濃度，經由在GraphPad Prism 9 (GraphPad Software)上之4PL分析使用標準曲線內插樣品濃度。然後，針對對上清液做出的任何稀釋調整樣品之內插結果。

【0095】 細胞存活率之定量。藉由使用CellTiter-Glo發光細胞存活率分析(Promega)定量ATP之存在作為代謝活性細胞之指標來評估細胞存活率。遵循製造商說明書來評估代謝活性。將CellTiter-Glo試劑與細胞沉

澱及新鮮培養基混合，然後轉移至白色不透光96孔板。在Spectramax M5e板式讀取器(Molecular Devices)上使用500 ms之積分時間於所有波長測定發光。相對於經R848處理之PBMC之對照條件來計算存活率百分比。

【0096】 統計分析。對於每種條件，將來自每個供體之細胞一式三份地接種用於測試。對於細胞激素定量，使用三重複值進行內插且將數據繪製為總濃度(pg/mL)或每個供體相對於單獨R848之對照條件之倍數變化。對於存活率定量，求取每個供體一式三份的平均值，且使用該平均值作為一個供體測量。測試多個供體且柱形圖(column graph)上的每個數據點代表供體之值。為了測試測試條件的差異，將測試結果與單獨R848之對照條件進行比較。使用混合效應單向ANOVA計算P值，使用杜納檢驗(Dunnett's test)進行多種比較之校正。

結果 – 利用22:0 LYSO PC及R848之處理過度活化犬類PBMC

【0097】 經發現22:0 LYSO PC (DAMP)及TLR7/8激動劑R848 (PAMP)之組合在人類moDC中具有強效過度刺激活性。為了評估此種過度刺激活性是否轉移至其他臨床相關物種，評估22:0 LYSO PC + R848過度活化自犬類全血分離的PBMC之能力。對於每個數據集，由於缺乏可用於誘導骨真犬moDC之犬類特異性試劑，因此改用來自多個供體之PBMC替代moDC。簡言之，使用密度梯度離心自全血分離PBMC且然後利用所關注的過度活化刺激物培養兩天。

【0098】 在培養兩天後，藉由定量細胞培養上清液中之IL-1β及測定細胞存活率來評估過度活化。當用22:0 LYSO PC及R848一起處理時，與所測試的每一其他刺激物相比，犬類PBMC分泌相當或更高水平之IL-

1β，二者皆為每mL的濃度，以及每一供體相對於單獨R848之倍數變化。與顯示佔PBMC之5至10%之單核細胞可回應於利用R848之活化而釋放IL-1β之先前研究一致，與未經處理之細胞相比，犬PBMC利用單獨的R848具有升高水平之IL-1β分泌。如所預期，LPS + 明礬之焦亡組合引起高水平之IL-1β。值得注意的是，雖然與單獨R848相比，PGPC + R848引發類似水平之IL-1β，但與未經處理之細胞相比，GM-CSF及2'3'cGAMP均不會誘導自犬PBMC之顯著IL-1β分泌。

【0099】 雖然可在過度活化細胞培養上清液中之犬PBMC後一天偵測IL-1β，但在過度活化後兩天評估細胞存活率以確保IL-1β分泌後之持續存活率。22:0 LYSO + R848並未顯著降低相對細胞存活率。有趣的是，經證實PGPC與R848之組合對犬PBMC具有一些毒性，儘管未觀察到其對人類moDC或人類PBMC具有毒性。此等數據一起證實22:0 LYSO + R848引發犬PBMC之高水平之IL-1β分泌，此指示過度活化。

結果 – 利用22:0 LYSO PC及R848之處理過度活化人類PBMC

【0100】 亦利用獲自人類供體之全血分離之PBMC進行過度活化實驗。簡言之，藉由密度梯度離心自多個人類供體之全血分離PBMC且用所關注的過度活化刺激物培養兩天。

【0101】 人類PBMC(如人類moDC)及犬類PBMC以高於或相當於所測試的所有其他刺激物之水平分泌IL-1β。類似於犬PBMC，由於單核細胞活化，人類PBMC回應於單獨R848而分泌IL-1β，且此由添加22:0 LYSO PC而升高。如所預期，LPS + 明礬之焦亡(pyroptotic)組合引起高水平之IL-1β。與在犬類PBMC中的觀察一致，PGPC + R848並未誘導比單獨R848實質上更高水平之IL-1β。GM-CSF並未自人類PBMC誘導IL-1β

分泌水平顯著高於未處理細胞所產生之背景水平。

【0102】 在過度活化後兩天亦評估人類PBMC之存活率以確保IL-1β分泌後人類PBMC之持續存活率。在用任何刺激物處理後未觀察到人類PBMC存活率之顯著降低。此等數據一起證實人類及犬PBMC均由22:0 LYSO PC + R848過度活化。有趣的是，與由PGPC + R848相比，犬類PBMC由22:0 LYSO PC + R848過度活化至更大程度。

【0103】 由於經活化之人類PBMC可分泌除IL-1β之外的其他細胞激素，因此在過度活化後兩天測定細胞培養上清液中促發炎細胞激素IFNγ及TNFα之分泌。與所測試的所有其他刺激物相比，相對於單獨R848，22:0 LYSO PC + R848之組合誘導每個供體之IFNγ分泌及TNFα分泌之最高倍數變化。值得注意的是，雖然LPS + 明礬誘導自人類PBMC之高水平之IL-1β分泌，但此刺激物組合並未誘導IFNγ或TNFα分泌之倍數增加。此外，與單獨R848相比，GM-CSF及2'3'cGAMP均未引起IFNγ分泌之實質倍數變化。此等數據指示22:0 LYSO PC + R848之組合在誘導自人類PBMC分泌促發炎細胞激素IFNγ及TNFα方面優異。

實例2：cGASΔN mRNA及22:0 LPC均可負載至脂質奈米粒子(LNP)中

材料及方法

【0104】 *材料*。LNP之脂質係購自Cayman Chemicals (SM102)或Avanti (22:0 LPC、DSPC、DMG-PEG2000)。膽固醇係購自Sigma。cGASΔN mRNA係定製訂購且經由自線性化模板DNA (Trilink)體外轉錄合成。人類cGASΔN序列係經密碼子最佳化用於在鼠類細胞中表現，且合成核苷酸序列如SEQ ID NO:17所示。mRNA序列使用Trilink專利的Clean

Cap mRNA技術，利用N1-甲基假尿苷鹼基修飾、及120個殘基的多腺苷酸尾進行封端。該序列含有Bbsl限制酶位點。使用該序列資訊來構築質體，自其合成性合成mRNA。合成後，使mRNA經磷酸酶處理。

【0105】 *LNP合成*。使用定製LNP脂質混合物(**表2-1**)製備脂質奈米粒子(LNP)。製備以0.02 mg/mL含在檸檬酸鈉緩衝液(pH 4)中的cGASΔN mRNA。以12.5 mM製備定製LNP脂質混合物。基於確定每種組分之體外活性的先前實驗來選擇mRNA/22:0 LPC之比率。使用NanoAssemblr Ignite儀器(Precision Nanosystems)來合成LNP。使用12 mL/min之流速，將含在乙醇中之脂質與mRNA溶液個別地以1:3體積比組合。在10體積的磷酸鹽緩衝鹽水(PBS) (pH 7.4)中洗滌LNP以移除殘餘乙醇，且然後使用Amicon 10K MWCO離心過濾器濃縮。在使用前將LNP濾過0.2 μm過濾器。

表2-1. LNP調配物

	22:0 LPC LNP	**cGASΔN LNP**	**22:0 LPC + cGASΔN LNP**
脂質混合物			
SM102	40%	40%	40%
DSPC	0%	35%	0%
膽固醇	28.5%	28.5%	28.5%
DMG-PEG2000	1.5%	1.5%	1.5%
22:0 LPC	35%	0%	35%
mRNA	N/A	cGASΔN	cGASΔN

【0106】 *LNP表徵*。遵循製造商方案使用RiboGreen檢定(ThermoFisher)定量mRNA至LNP中之負載。將樣品稀釋至落在標準曲線之範圍內。使用Triton X-100溶解LNP以評估mRNA至LNP中之封裝。定量總mRNA及經封裝之mRNA。使用在NanoBrook Omni (Brookhaven)上之動態光散射(DLS)來評估LNP的大小。在於DLS上運行之前，將LNP 1:10稀釋於PBS中。記錄每個樣品之三次90秒測量。

結果

【0107】 *LNP可以類似於負載cGASΔN mRNA或22:0 LPC之LNP之水平負載cGASΔN mRNA及22:0 LPC*。所有LNP – 22:0 LPC LNP、cGASΔN LNP及cGASΔN + 22:0 LPC LNP – 均顯示類似大小，且所有LNP的大小< 150 nm(**圖3A**)並具有相對均勻的分佈(PDI <0.3)。cGASΔN LNP及cGASΔN + 22:0 LPC負載LNP顯示相似的mRNA負載水平，然而當亦將22:0 LPC添加至LNP時，總體負載效率(實際/理論負載)略有降低(圖**3B**)。對於22:0 LPC，22:0 LPC LNP及cGASΔN + 22:0 LPC LNP顯示相似的負載水平及效率(實際/理論) (**圖3C**)。

實例3：小鼠樹突細胞藉由用編碼cGASΔN之mRNA及過度活化刺激物處理達成獨特活化狀態

材料及方法

【0108】 *產生鼠類骨髓衍生之樹突細胞(BMDC)*。自小鼠移除腿股骨及脛骨，用剪刀切割，且沖洗至無菌管中。用ACK裂解緩衝液處理骨髓懸浮液1分鐘，然後使其通過40 μm細胞濾器。計數細胞且使其再懸浮於由含有10% FBS、青黴素及鏈黴素之完全IMDM所組成且補充L-麩醯胺酸及丙酮酸鈉之培養基(I10)中。然後將細胞以8E6個骨髓細胞/孔接種於P12板中。將重組小鼠FLT3L (Miltenyi)以200 ng/mL添加至培養物。將分化的細胞用於第9天的後續檢定。使用BD Symphony A3藉由流動式細胞測量術來監測分化之效率，且$CD11c^{+}MHC\text{-}II^{+}$細胞例行地高於活細胞的80%。對於每個實驗，使用5至15隻小鼠以自骨髓產生DC。

【0109】 *鼠類BMDC及cGASΔN遞送之過度活化*。在分化後第9天收穫BMDC，用PBS洗滌且以$2x10^{5}$個細胞/孔之濃度再接種於完全IMDM培

養基(I10)中。在存在或不存在以100 μM負載22:0 LPC LNP之LNP下，且在具有或不具有約1 μg/mL之cGASΔN mRNA下培養細胞(**表3-1**)。在某些條件下，以1 μg/mL最終濃度添加R848。刺激後四十八小時，收集上清液用於細胞激素分泌評估。遵循製造商說明書使用三明治(sandwich) ELISA (Invitrogen)來測定BMDC之IL-1β細胞激素分泌。根據製造商說明書使用LEGENDplex小鼠抗病毒反應板(Biolegend)來測定另外的細胞激素。根據製造商說明書，使用CyQUANT LDH細胞毒性分析(Invitrogen)，藉由測定LDH釋放至新鮮上清液中來評估細胞存活率。

表3-1. 鼠類BMDC之體外給藥

	22:0 LPC LNP	**cGASΔN LNP**	**22:0 LPC + cGASΔN LNP**
22:0 LPC劑量	100 μM	N/A	100 μM
mRNA劑量	N/A	0.91 μg/mL	0.91 μg/mL

結果

【0110】 在先前的研究中，吾人發現，使用R848及22:0 LPC之DC過度活化活化轉錄因子NF-kB，從而導致產生發炎細胞激素(諸如IL-6及TNFα)。另外，NLRP3發炎體經活化，從而導致IL-1β產生。不同於此等細胞反應，cGAS活化及所產生之STING信號傳導活化轉錄因子IRF3，其與NF-kB共調節一些基因但亦調節一組獨立於NF-kB之獨特基因。cGASΔN為持續性活性之經修飾之cGAS。使用具有及不具有22:0 LPC之經cGASΔN mRNA調配之LNP，吾人假設，cGAS信號傳導及過度活化可誘導一組互補的發炎信號。

【0111】 為了測試吾人的假設，使用FLT3L將小鼠骨髓細胞分化為DC。然後用R848、22:0 LPC及cGASΔN mRNA以各種組合刺激BMDC。如實例2中所述，cGASΔN mRNA及22:0 LPC係個別地或組合地調配於

LNP中。

【0112】 *可過度活化經R848及[cGASΔN + 22:0 LPC] LNP處理之Flt3L BMDC*。評估DC之回應於利用R848 + [cGASΔN + 22:0 LPC] LNP之處理而過度活化之潛力；過度活化以DC在保持存活的同時分泌IL-1β之能力為特徵。經PBS處理 (未經刺激)或僅經R848處理之DC產生最小或無IL-1β。如所預期，將R848及22:0 LPC處理組合導致48小時後產生IL-1β (**圖4A**)。使用含有cGASΔN mRNA之LNP處理細胞並未誘導IL-1β。與22:0 LPC組合之cGASΔN處理亦未導致IL-1β釋放(**圖4A**)。cGAS/STING信號傳導極有可能不足以產生為成熟IL-1β之22:0 LPC介導之釋放所需的前形式(pro-form)之IL-1β蛋白質。然而，將所有三種刺激物(R848、cGASΔN及22:0 LPC)組合導致IL-1β之釋放(**圖4A**)。此結果證實cGASΔN處理並未抑制過度活化。接下來，使用LDH釋放分析來評估細胞存活率以證實細胞過度活化而不是焦亡。在所測試的處理條件中，DC具有與未刺激之細胞相似之存活率概況，證實DC過度活化(**圖4B**)。總而言之，此等數據顯示，DC可同時用R848、22:0 LPC及cGASΔN mRNA處理且過度活化。

【0113】 *[cGASΔN及22:0 LPC] LNP + R848處理活化Flt3L BMDC中之NF-kB信號傳導及cGAS-STING路徑*。為了進一步確認個別刺激物之活性，定量IL-6及TNFα產生。此兩種基因主要藉由NF-kB且因此藉由R848刺激調節。當添加R848作為處理時，產生IL-6及TNFα (**圖5A至5B**)。添加含有22:0 LPC之LNP至R848處理增加IL-6及TNFα分泌。單獨cGASΔN並未刺激IL-6及TNFα分泌(**圖5A至5B**)。cGAS/STING信號傳導主要活化IRF3而不是NF-kB。此外，測定RANTES及IP-10之分泌，已知

其藉由cGAS/STING信號傳導調節。經PBS處理之細胞(未經刺激)並未表現RANTES或IP-10。相反地，cGASΔN刺激誘導RANTES及IP-10之表現，證實吾人的mRNA轉錄本編碼成功遞送至細胞且表現之活性cGAS (**圖5C至5D**)。出乎意料地，當將cGASΔN與22:0 LPC一起遞送時，與單次cGASΔN處理相比，RANTES及IP-10表現受到抑制。當在過度活化中用單獨的R848或與22:0 LPC組合來刺激細胞時，細胞產生RANTES及IP-10，而未觀察到22:0 LPC介導之抑制。儘管當將cGASΔN與22:0 LPC組合時觀察到驚人的抑制，但將所有三者組合導致RANTES及IP-10之表現(**圖5C至5D**)。

【0114】 總之，用R848、22:0 LPC及cGASΔN之各種組合處理鼠類DC證實幾件事情。首先，在LNP中成功調配cGASΔN mRNA用於遞送至DC中且轉譯成蛋白質。cGASΔN蛋白質為活性，如藉由治療的誘導RANTES及IP-10產生之能力所指示。其次，在與過度活化刺激物組合時，cGASΔN處理並未減少關鍵過度活化細胞激素IL-1β之分泌。最後，當用所有三種刺激物刺激細胞時，藉由一種刺激物調節之發炎基因不會受到其他兩種刺激物之效應的損害。此等數據證實，可將cGASΔN處理與過度活化刺激物組合以指導DC同時產生兩個過程之發炎環境。此種組合導致可在免疫反應中具有潛在優點之獨特DC活化狀態。

實例4：用cGASΔN及過度活化刺激物處理人類樹突細胞導致NLRP3發炎體及cGAS-STING路徑之活化

材料及方法

【0115】 *人類單核細胞衍生之樹突細胞(moDC)產生*。根據製造商說明書使用StraightFrom Leukopak CD14微珠套組自購自Miltenyi Inc.

(San Jose，CA)的Leukopaks分離人類單核細胞。然後，將單核細胞分成等分且在含有10%二甲基亞碸之胎牛血清中冷凍。對於利用單核細胞衍生之樹突細胞(moDC)培養物之研究，將單核細胞解凍且於含有10% FBS、50單位/mL青黴素、50 mg/mL鏈黴素、2 mM L-麩醯胺酸、1 mM丙酮酸鈉、50 mM β-巰基乙醇、10mM HEPES及Gibco MEM非必需胺基酸之RPMI培養基(R10培養基)中培養。為了將單核細胞分化為moDC，將重組人類GM-CSF (50 ng/mL)及IL-4 (25 ng/mL)添加至R10培養基。用GM-CSF及IL-4培養細胞6天，在第3天用含有GM-CSF及IL-4之R10培養基進行另外細胞餵養。在分化的第6天，收集moDC以供使用且對一部分進行染色以確認成功的分化。例行地，藉由使用BD Symphony A3之流動式細胞測量術，活細胞的>80%為CD11c+CD209+。

【0116】 *moDC及cGASΔN遞送之過度活化*。自單核細胞分化後六天，收集及計數moDC。將細胞以100,000個細胞/孔接種於96孔板中。用1ug/mL R848及含有22:0 LPC及/或cGASΔN mRNA之LNP處理moDC。在刺激後四十八小時，收集細胞培養上清液。根據製造商說明書使用LEGENDplex人類抗病毒反應板(Biolegend)來測定細胞激素表現。根據製造商說明書，使用CyQUANT LDH細胞毒性分析(Invitrogen)，藉由測定LDH釋放至新鮮上清液中來評估細胞存活率。收集且染色細胞以測量參與T細胞活化之DC分子之表現，諸如CD40、CD80、CD83、CD86、CCR7、HLA-ABC及HLA-DR表現，藉由使用BD Symphony A3之流動式細胞測量術來評估。

結果

【0117】 吾人假設，將cGASΔN介導之STING信號傳導與過度活化

組合可幫助建立可提供比目前可用的選項更佳的保護之免疫療法及疫苗。因此，吾人測試cGASΔN療法與人類DC上之過度活化之組合。作為DC的來源，人類單核細胞藉由在含有重組GM-CSF及IL-4之R10培養基中培養六天而分化為DC。在第6天藉由CD11c及CD209染色確認細胞為DC，且使用細胞以用吾人所關注的三種刺激物處理：R848、22:0 LPC及cGASΔN。

【0118】 *經R848及[cGASΔN + 22:0 LPC] LNP處理之moDC經過度活化且允許cGAS-STING路徑活化*。吾人首先始於確認使用鼠類DC獲得的主要結論。與經PBS處理之DC (未經刺激)相比，此三種處理(R848、22:0 LPC及cGASΔN)之組合於人類DC存活率上具有相似的影響(**圖6A**)。當測定IL-1β釋放時，吾人觀察到用 PBS (無刺激)或R848處理產生最少IL-1β(**圖6B**)。如所預期，經由LNP遞送之R848及22:0 LPC之組合誘導IL-1β分泌。類似於小鼠，單獨的cGASΔN處理或與22:0 LPC之組合並未誘導IL-1β之分泌(**圖6B**)。當將cGASΔN與R848及22:0 LPC之過度活化組合相組合時，IL-1β分泌經保持或增加(**圖6B**)。定量IP-10分泌以確保調配於LNP中之cGASΔN mRNA可誘導信號傳導。單獨的cGASΔN處理誘導IP-10表現。與鼠類數據相反，添加22:0 LPC至cGASΔN LNP並未抑制IP-10表現(**圖6C**)。此外，與鼠類數據相反，R848處理(單獨地或與22:0 LPC組合)不足以誘導IP-10表現(**圖6C**)。當將所有三種刺激物組合時，cGASΔN、R848及22:0 LPC能夠誘導IP-10表現(**圖6C**)。對於所顯示的供體，與單獨cGASΔN處理相比，當將所有三種刺激物組合時觀察到IP-10減少。然而，在所測試的4個供體中尚未持續觀察到此種減少。無論此種減少如何，cGASΔN、R848及22:0 LPC之組合導致顯著高於在未經刺激之條件

下所偵測到之IP-10表現(**圖6C**)。總之，此等結果表明，如同在鼠類DC中，人類DC能夠介導cGAS/STING活化同時亦被過度活化。

【0119】 *經R848及[cGASΔN + 22:0 LPC] LNP處理之moDC上調為T細胞活化所需的表面蛋白。*除了產生特定細胞激素環境外，DC需要表現在T細胞之活化中重要的細胞表面蛋白。一此種蛋白質為自周邊組織至淋巴結之DC運輸所需的趨化介素受體CCR7，其中其可初免T細胞。在用R848、22:0 LPC及cGASΔN之各種組合處理之後，DC經染色用於CCR7表現。如先前所觀察到，用單獨R848處理增加CCR7表現，及用R848與22:0 LPC之組合進行過度活化處理導致CCR7進一步增加(**圖7A**)。與未經刺激之細胞相比，cGASΔN處理亦增加CCR7表現，且添加22:0 LPC於CCR7表現上並沒有顯著效應(**圖7A**)。有趣的是，將cGASΔN處理與R848及22:0 LPC組合導致CCR7表現之最大偏移(**圖7A**)。重要的是，將cGASΔN與過度活化組合並未抑制CCR7表現，且增加之CCR7表現可實現DC至淋巴結之更有效的遷移。

【0120】 吾人繼續檢查樹突細胞上的對於其功能重要的其他關鍵細胞表面蛋白。CD40為接合CD4 T細胞上的CD40L且最終增強T細胞反應之受體。CD83亦參與T細胞活化且通常用作DC活化之指標。與未經刺激之細胞相比，當用具有或不具有22:0 LPC之R848處理DC時，CD40表現上調，且當用具有或不具有22:0 LPC之cGASΔN處理細胞時，觀察到進一步的增強(**圖7B**)。與未經刺激之細胞相比，將cGAS信號傳導與過度活化組合亦導致CD40表現增加(**圖7B**)。與CD40染色相比，CD83表現變化更大，但再次將cGASΔN處理與過度活化處理組合並沒有消除CD83之表現(**圖7C**)。

【0121】 CD80及CD86為在抗原呈現期間接合T細胞且用作呈現的非自體抗原確實是危險之確認信號之共刺激分子。當DC用R848或cGASΔN活化或當DC用R848及22:0 LPC過度活化時，CD80及CD86表現增加(**圖8A至8B**)。當將cGASΔN及過度活化處理組合時，與未經刺激之細胞相比，DC繼續上調CD80及CD86 (**圖8A至8B**)。因此，當兩個細胞過程均參與時，DC仍舊能夠為T細胞供應共刺激信號。

【0122】 最後，DC經染色用於HLA-ABC及HLA-DR，其為分別呈現抗原至CD8及CD4 T細胞之I類及II類MHC分子。與未經刺激之細胞相比，添加或未添加22:0 LPC之R848處理增加HLA-ABC之表現(**圖8C**)。用具有或不具有22:0 LPC之cGASΔN處理DC於HLA-ABC表現上亦具有相似效應(**圖8C**)。驚人的是，當將cGASΔN處理及過度活化組合時，與其他刺激物組合相比，觀察到HLA-ABC之顯著增加。當分析HLA-DR染色時，與未經刺激之細胞相比，觀察到R848處理增加HLA-DR表現(**圖8D**)。然後，當用R848及22:0 LPC之組合過度活化時觀察到進一步的增加(**圖8D**)。cGASΔN處理比單獨或作為過度活化之一部分之R848處理更有效(**圖8D**)。與單獨cGASΔN處理相比，將22:0 LPC添加至cGASΔN處理進一步增強HLA-DR表現(**圖8D**)。最後，將cGASΔN處理與過度活化組合導致所有實驗條件之最高HLA-DR表現(**圖8D**)。將所有三種刺激物組合導致MHC I類及II類分子之最高表現，其可實現至T細胞之更有效之抗原呈現。

【0123】 使用人類DC之研究表明，與小鼠DC相比，其一般類似於cGASΔN、R848及22:0 LPC地反應。一種出乎意料的差異係當細胞用具有或不具有22:0 LPC之cGASΔN處理時。雖然小鼠DC顯示當添加22:0

LPC時IP-10之抑制，但人類DC沒有相同結果。更重要的是，將cGASΔN、R848及22:0 LPC組合並未阻止人類DC過度活化且產生細胞激素(諸如IL-1β及IP-10)。關於參與T細胞活化之關鍵蛋白質之細胞表面表現之人類DC之進一步的分析證實該三種刺激物之組合並未抑制表現。此等蛋白質仍然為可誘導且在一些情況(諸如HLA-ABC及HLA-DR)下，與單獨cGASΔN處理或過度活化相比，表現進一步增加。總之，自人類DC之處理收集得的此等數據表明，可將cGASΔN處理與過度活化組合以誘導其中該兩個過程彼此補充且可潛在地於細胞功能上具有累加作用(additive effect)以誘導適應性免疫反應的細胞狀態。

實例5：將cGASΔN mRNA及過度活化組合作為疫苗接種策略來改良免疫反應

【0124】 藉由利用編碼cGASΔN之mRNA，DC可經活化以產生促進T細胞效應子反應之化學信號。DC之過度活化產生一組互補的化學信號。特定而言，過度活化誘導促發炎細胞激素且添加至其細胞激素譜系IL-1β(即記憶T細胞形成之關鍵細胞激素)。藉由組合刺激物以接合cGAS/STING信號傳導及過度活化，可產生更廣泛之發炎信號組以最大化由DC引起之免疫反應。

【0125】 為了測試此模型，在體內比較利用cGASΔN、R848及22:0 LPC之各種組合作為佐劑之疫苗接種策略。疫苗接種之目標係引導針對所關注抗原或所關注抗原之複雜來源(例如模型抗原、腫瘤相關抗原、新抗原(neoantigen)、微生物衍生之抗原等)之免疫反應。使用已確立的免疫方法及常見試劑(例如四聚物染色、ELISpot檢定、ELISA、流動式細胞測量術等)容易地偵測免疫反應。例如，藉由將編碼所關注抗原之mRNA轉錄

本負載至脂質奈米粒子(LNP)中，來製備免疫原性組合物。此等LNP適合投與至哺乳動物受試者以達成體內所關注抗原之表現用來啟動適應性免疫反應。

【0126】此實驗之目標係測試以含在LNP中之mRNA遞送之cGASΔN是否可用作疫苗佐劑以改良對模型抗原之免疫反應。cGASΔN、R848及22:0 LPC經考慮以藉由增強重新T細胞活化及記憶T細胞再活化來改良DC功能。此等改良可對效應子及記憶T細胞反應具有正面下游效應。當B細胞經歷需要T細胞接合之生殖中心反應時，經改良之T細胞活化亦可於B細胞上具有進一步的正面下游效應。

表5-1. 免疫接種策略

組	抗原	DC刺激物	先天路徑	效應子反應	記憶反應
1	無	[GFP]對照LNP	無	-	-
2	OVA	[GFP]對照LNP	無	+	-
3	OVA	R848 + [GFP]對照LNP	NFkB	+	-
4	OVA	R848 + [22:0 LPC] LNP	NFkB NLRP3	++	++
5	OVA	[cGASΔN] LNP	IRF3	+++	+
6	OVA	[cGASΔN + 22:0 LPC] LNP	IRF3	+++	+
7	OVA	R848 + [cGASΔN] LNP	NFkB NLRP3 IRF3	++++	+++
8	OVA	R848 + [cGASΔN + 22:0 LPC] LNP	NFkB NLRP3 IRF3	+++++	++++

方法

【0127】*利用含在LNP中之[cGASΔN + 22:0 LPC] LNPs加上mRNA抗原之體內免疫接種*。利用如**表5-1**中所詳述的LNP對C57BL/6J小鼠實施皮下免疫接種。使用負載OVA mRNA之LNP與含有佐劑cGASΔN mRNA

或非佐劑GFP mRNA之LNP組合，在體內遞送轉錄本以產生OVA抗原。OVA mRNA劑量固定為5 μg/小鼠，而佐劑cGASΔN mRNA以約1.5 μg/小鼠投與且22:0 LPC以約60 μg/小鼠投與(**表5-1**)。小鼠在第0天給與初級免疫接種，且在第7天給與相同劑量之加強免疫接種。為了評估短期效應子反應，在第14天，收集血液及次級淋巴器官。為了評估長期記憶反應，在第40天，收集血液及次級淋巴器官。收集血液以測定抗體及T細胞反應。使用血清分離管自血液收集血清，同時使用K2EDTA管收集用於細胞分析之血液。在血液收集之後，將小鼠安樂死，且收集引流淋巴結及脾臟並加工成單細胞懸浮液。預期反應顯示於**表5-1**中。

【0128】 *OVA特異性T細胞四聚物評估*。在初級免疫接種後第14及40天評估接受OVA LNP免疫接種的小鼠之血液及引流淋巴結中之OVA特異性T細胞。使用SIINFEKL-四聚物染色在血液及dLN中定量對於SIINFEKL (SEQ ID NO:17)具有特異性之CD8+ T細胞(即卵白蛋白(OVA)之MHC-I-限制T細胞抗原決定基)。簡言之，使用RBC裂解緩衝液裂解紅血球，其中裂解完成兩次以移除血液中之所有RBC。洗滌細胞，然後染色以用於存活率(活/死)、SIINFEKL-四聚物結合(MBL)、及CD3、CD4及CD8表現。用4%多聚甲醛固定細胞，且在運行之前添加計數珠粒以允許確定總細胞計數。使用BD FACS Symphony收集數據且使用Flowjo (BD)分析。

【0129】 *效應子及記憶T細胞測定*。在接受OVA LNP免疫接種的小鼠之血液及引流淋巴結中，藉由流動式細胞測量術來評估T效應子及T記憶細胞之頻率。簡言之，用CD3、CD4、CD8、CD62L及CD44抗體染色細胞懸浮液以使用BD FACS Symphony儀器測定T效應子細胞

($CD44^{Low}CD62L^{neg}$)及T記憶細胞($CD44^{high}CD62L^{+}$)之頻率且使用Flowjo (BD)分析數據。

【0130】 *OVA特異性抗體評估*。在初級免疫接種後第14天及第40天評估接受OVA LNP免疫接種的小鼠之血清中之OVA特異性抗體。藉由ELISA評估OVA特異性總IgG、IgG1及IgG2b。簡言之，將ELISA板塗布10 μg/mL Endofit卵白蛋白(Invivogen)過夜，然後用2%牛血清白蛋白洗滌及阻斷。再次洗滌板，且然後將血清以1:500稀釋，接著1:5稀釋添加至該等板以達成總共7種血清稀釋。洗滌樣本，然後用對於IgG、IgG1或IgG2b具有特異性之偵測抗體培養，該等偵測抗體經結合至HRP (Southern Biotech)，以分別偵測總、Th2-skewed及Th1-skewed OVA特異性抗體。洗滌板，然後用TMB培養，且在顏色顯現完成後添加停止溶液。

【0131】 *OVA特異性T細胞反應*。自次級淋巴器官活性確定OVA特異性T細胞反應。在免疫接種後，在早期(第14天)及晚期(第40天)時間點自小鼠收集引流淋巴結及脾臟。將所收穫的淋巴結及脾臟解離成單細胞懸浮液，將其用於ELISPOT檢定中。使用ELISPOT來偵測T細胞之IFNγ及IL-5分泌，其分別指示Th1及Th2反應。將來自引流淋巴結及脾臟之細胞接種於含有10% FBS、50單位/mL青黴素、50 mg/mL鏈黴素、2 mM L-麩醯胺酸、1 mM丙酮酸鈉、50 mM β-巰基乙醇、10 mM HEPES及Gibco MEM非必需胺基酸之RPMI培養基(R10培養基)中。將細胞以200,000個細胞/孔接種於96孔ELISPOT板中且用10 mcg/mL OVA peptivator或1 mcg/mL OVA肽抗原再刺激。作為對照，使另外的經接種細胞保持未經刺激或用不相關之抗原(不用於疫苗接種中)刺激。該檢定之完成產生可在T

細胞分泌細胞激素下可視覺定量之斑點，作為定量回應於再刺激之T細胞之數量之方法。

結果

【0132】 分析使用上述檢定以評估短期(疫苗接種後2週)及長期(疫苗接種後>4週)適應性T細胞免疫、效應子及記憶反應。**表5-1**列出包括在本研究中之實驗組。作為陰性對照，組1之小鼠接受不含抗原且不含佐劑之假注射以用作預期引發很少至不引發抗原特異性免疫反應之基線。組2小鼠接受調配於LNP中之編碼模型抗原(OVA)之mRNA，其代表標準LNP疫苗接種方案。剩餘的組均接受負載有編碼OVA之mRNA與佐劑之組合的LNP。取決於所投與的刺激物類型，預期以下一種或多種情況：i)活化細胞(誘導NFkB信號傳導)；ii)過度活化DC (誘導NLRP3路徑活化)；及iii)誘導DC中之IRF3信號傳導。例如，組4小鼠接受R848 + 22:0 LPC，預期其過度活化DC，其除了NFkB路徑之外亦活化NLRP3路徑，從而導致習知促發炎細胞激素分泌(IL-6及TNFα)及IL-1β產生。組5小鼠接受編碼cGASΔN之LNP，預期其經由IRF3誘導I型IFN反應。組6及組7的小鼠接受三種刺激物中的兩種，而組8的小鼠接受所有三種刺激物(R848、22:0 LPC及cGASΔN)。

【0133】 考慮cGASΔN體內表現以刺激特別有益於即時效應子免疫反應之DC信號。亦考慮過度活化條件有益於效應子反應，儘管不存在I型IFN信號傳導。另外，過度活化誘導之IL-1β信號傳導導致改良之記憶形成。因此，藉由組合cGAS信號傳導及過度活化，考慮引發極強效應子反應及持久記憶反應。藉由利用假處理(組1)免疫，極有可能觀察到很少至沒有效應子及記憶反應且考慮用單獨或與R848組合之抗原mRNA (組2及

3)免疫導致小效應子反應及最小記憶形成。組4處理過度活化DC且預期與組2處理相比有所改良。相比之下，組5及組6處理僅參與DC中之cGAS信號傳導且因此經考慮導致強效應子反應，但記憶反應不如組4處理持久。組7為過度活化處理條件。考慮組7及組8以產生最佳效應子及記憶反應，條件係其接合cGAS及過度活化路徑。由於過度活化脂質參與NLRP3活化除外之細胞過程，因此考慮組8處理(其包括22:0 LPC)導致優異效應子及記憶反應。

【0134】該三種輔助刺激物可以各種方式調配。例如，可將cGASΔN mRNA單獨或與22:0 LPC組合封裝於LNP中。R848可作為個別組分在LNP中或在含有一種或兩種其他刺激之LNP中投與。此外，投與刺激物之順序可改變。例如，在初免注射中投與負載抗原mRNA之LNP與負載cGASΔN mRNA之LNP及R848之組合以經由I型IFN提供強效應子信號，接著加強注射負載抗原mRNA之LNP與負載22:0 LPC之LNP及R848之組合以提供產生持久免疫所必需的記憶信號可能有益。

【0135】研究T及B細胞對疫苗接種之反應產生體內數據，其經考慮以證實將過度活化與cGAS信號傳導組合將導致抗原特異性免疫反應之改良。各種DC刺激物之投與如何影響B細胞反應之評估藉由測定免疫化小鼠的血清中之總抗原特異性IgG抗體以及抗體同型物(諸如IgG1 (與TH2反應相關聯)及IgG2b (與TH1反應相關聯))來達成。基於先前使用cGASΔN LNP之研究，吾人預期經負載編碼抗原之mRNA及編碼cGASΔN之mRNA之LNP免疫之小鼠預期會導致TH1-偏態(skewed)反應。

序列

SEQ ID NO: 1
>人類
PGASKLRAVLJKLKLSRDDLSTAAGHVKGVVDELLQRLKCDSAFRGVGLLN
TGSYYEHVKISAPNEFDVMFKLEVPRLQLEEYSNTRAYYFVKFKRNPKENPLSQFTLKGFCLSASKNLSKF
RGCLLEKLNDLFQTLDVLDKRRRGGSPAVTLLISFKLSYDLTLALFSKSSMPASTQEGLRLQNMLSAKVRK
QLRLSQPYLVPKHAKEGNGFQEGTMRLSFSDLEKCLLNNIGKSRTCCENKEEKCCRKDCLKLMKYLLEQL
KRFKDKKLLDKFSSYHVKTAFFHLCTFNLPQDSQMDPKDLGLCFDNCVTYFLQCLRTEKLENYFIPEFNL
FSSNLLDKRSKEFLTKQIEYERNNEFPVFDEF

SEQ ID NO: 2
>倉鼠
PGARKLRAVLJKLRLSEQDLSKAAKVVNGVVGELLRRLRCEQFEGGVKQLLL
TGSYYEHVKISAPNEFDVMFKLQVPRLQLEKYSDTGAYYFVKFKRNPKGNPLSLFTLKDFCLSASKNLSKF
RGCLLEKLNNLFQVQPDADVLDKRRRGGSPAVTLLINKCLSVDLTLALFGKTSMPASTQEGLAIKNMLSA
KVRQQLRLKQPYLVPKHAKEGNGFQEGTMRLSFSDLDKCLLSNIGKSRTCCENKENKCCRKDCLKLMKYL
LEQLKKFKDKKLLDKFSSYHVKTAFFHLCTFNLPQDSQMDPKDLGLCFDNCVTYFLKCLRTEQLENYFIP
EFNLFSSNLLDKRTSKEFLSKQLEYERNNEFPVFGEF

SEQ ID NO: 3
>沙鼠鼠
PGARKLRAVLJKLRLSEQDLSKAAKVVNGVVGELLRRLRCESFEGGVEQLLL
TGSYYEHVKISAPNEFDVMFKLQVPRLQLEKYSDTGAYYFVKFKRNPKGNPLSQFTLKDFCLSASKNLSQF
RGCLLEKLNNLFQTLDVLDKRRRGSPAVTLLINKCLSVDLTLALFGKTSMPASTQEGLAIKNMLSAKVRQ
QLRLSQPYLVPKHAKEGNGFQEGTMRLSFSDLDKCLLSNIGKSRTCCENKENKCCRKDCLKLMKYLLEQL
KKFKDKKLLDKFSSYHVKTAFFHLCTFNLPQDSQMDPKDLGLCFDNCVTYFLQCLRTEKLANYFIPEFNL
FSSNLLDKSSKEFLSKQLEYERNNEFPVFGEF

SEQ ID NO: 4
>广西眼镜蛇
PGARKLRAVLJKLKLSRQELSEAAKVVNGVVDELLRRLQKCDSFERGVGELRTGSYYEH
VKISAPNEFDVMFKLEVPRLQLEKYSNTGAYYFVKFKRNPKENPLSQFTLKGFCLSASKNLSKFTRKCLREK
INNLKDTDVTHKRRRGGSPAVTLLISFKLSVDLTLALFSNSNSNDASTQEGLPLKNMLSGKVRRQLRLKP
FYLVPKHAKEGNGFQEKTMRLSFSDLEKELLNNIGKLRTCCENKNVKCCRKDCLKLMKYLLEQLKEFKD
RKHLDKFSSYHVRTAFFHVCTFNLPQDSQMDPKNLGFCFDRCVLYFLKCLRTEQLGNYFIPGFNLFSSNLL
DKRSKEFLSKQLEYERNNEFYFVFEF

SEQ ID NO: 5

>IFTRIR

PGARKDJAVDJKDJKDSRQ
KDCPAAEVVNGVVDDDJRRQQKCDSDQRGVGDJRTGSYYQDVKDSAPNDPDVMPKDJVPRQQJKGYSNTG
AYYPVKPKRNPKQNPDCQPDJKGKDDJSASKMDSKPRKDDKPKNNDKDPDVDDKRKRGGSPAVTDJJDSKD
SVDDTDADJKSKSSSWPASTQKGSJPDRQMDSGKVRTQDRQKPFYDVPKDAKPGNGPQPCTWRDSFSDDPKP
DDNNDGPTKTCCPNKKVKCCRKDCJKQMKYDJJKQJKKPTDKKDDJDKFSSYDVKTADPTDVCTPNPKDSQW
DPKDLGDCPDKCVDYPQCDSTPQLGNYPTDPGPNDJFSSNDJDKRSKPFDJKQDDYPRNNPYDVPVPKC

SEQ ID NO:6
>顯性預測組
PGASKQRAVDJKDJKDSRQJCSKAAKVVNRVVDDDJRRQQKYNSKPRGVGDJRT
GSYYPDIVKDSAPNDPDVMPKDJKVPRQQJKGYSNTGAYYPVKPKRNPKKNPDLSQPDJKGPCDLSASKMDSKPR
KDDKKGNNDKDPDVDMKRKRGGSPAVTDJJSKKDSVDDTDADJKSKSSWPASTQKGQJPDKNWDSAKVRKQQ
RQKPFYDVPKDAKKGNGPQPCTMRDSPSDDPKKDDNNDGKSKTCCPKKPAKCCRKDCJKQMKYDJJKQQJKP
KPKDKKDDJDKPSSYDVKTADPDVCTPNPQDSQWDRKQQLGLCPDNCVTYPQCQRQPKQQGNYPTQPGPNDJPS
SNDJDKRSKPFDJKQDDYPRNNPFPVPDKP

SEQ ID NO:7
>顯隱組
PGASKQRAVDJKDJKDSRQDDSTAAGMVKGVVDDDJJRQKCDSAPRGVGDJN
TGSYYPDVKDSAPNPPDVMPKQJKVPRQQJKPYSNTRAYYPVKPKRNPKKNPDLSQPDJKGPCDLSASKMDSKP
RKDDKPKCNNDKDPDVDMKRKRGGSPAVTDJJSKKDSVDDTDADJKSKSSWPASTQKGQJPDKNWDSAKVRKQQ
RQKPFYDVPKDAKKGNGPQPCTMRDSPSDDPKKDDNNDGKSKTCCPKKPAKCCRKDCJKQMKYDJJKQQJKP
KPKDKKDDJDKPSSYDVKTADPDVCTPNPQDSQWDRKQDLGLCPDNCVTYPQCQRQPKQQGNYPTQPGPNDJPS
SNDJDKRSKPFDJKQDDYPRNNPFPVPDKP

SEQ ID NO:8
>大顯組
PGASKQRAVDJKDJKDSRQDDSTAAGMVKGVVDDDJJRQKCDSAPRGVGDJN
TGSYYPDVKDSAPNPPDVMPKQJKVPRQQJKPYSNTRAYYPVKPKRNPKKNPDLSQPDJKGPCDLSASKMDSKP
RKDDKPKCNNDKDPDVDMKRKRGGSPAVTDJJSKKDSVDDTDADJKSKSSWPASTQKGQJPDKNWDSAKVRKQ
QRQKPFYDVPKDAKKGNGPQPCTWRDSPSDDPKKDDNNDGKSKTCCPKKPAKCCRKDCJKQMKYDJJKQQJKP
KPKDKKDDJDKPSSYDVKTADPDVCTPNPQDSQWDRKQDLGLCPDNCVTYPQCQRQPKQQGNYPTQPGPNDJPS
PSRNDJDKRSKPFDJKQDDYPRNNPFPVPDKP

SEQ ID NO:9
>CGASAN 共通
PGAXKQXAVDJKDJKDSXKXDXXAAXXVXXVVXDDDJXRQXXXXXDPXGVXXDJX
TGSYYPDVKDSAPNPPDVMPKQXVPRQQJKPYSXTXAYYPVKPKRNPXXNPDLXXPDJKXPDLSASKMDSKP
RKDDKPKCNNDKXXXXXXDVDXKRKRXGSPAVTDJJXXXDSVDDTDADJKSKSSWPASTQPGQXDXQNWDSA
XKVRKQQRQKPFYDVPKDAKPGNGPQPCTWRDSPSDDPKPDDLXNNGXXKTCCPXKXXKCCRKDCJKQMKY
DJJKQJKXPXPKDAKXDDJDKPSSYDVKTADPDVCTPNPQDSQWDXKQLGLCPDNCVTYPQCQRQPKQQGNYPTQPGPND
PXPNDJPSXXDJDKXSKPFDJKQDDYPRNNPFPVPDKP

SEQ ID NO:10
>人類IGDAS 合成
MQPWDIGKAMQDASDAGATAPKASARNARGAPMDPTKSPAADPAALPKAGKPGPARKSGSRQKKSAPDTQP
RPPVRATGARAKKAPQRAQDTQPSDATSAPGAKGDPPAARKPALSRAGSCRQRGARCSTKPRPPPGPWD
VPSPGDLPVSAPDLVRDDAPGASKQRAVDJKDJKDSRDDSTAAGMVKGVVDDDJJRQKCDSAPRGVGDJN
TGSYYPDVKDSAPNPPDVMPKQJKVPRQQJKPYSNTRAYYPVKPKRNPKKNPDLSQPDJKGPCDLSASKMDSKP

RKCLQKFCNDDKDTDVCMKRRRGGSPAVTDLISFKCLSVDLTDAIFSKSSMPASTQPGGLRLQRMLSAKVRK
QLRLKPFYLVPKDAKEGNGFQRGTWRLSFSDLPKGTDANIIGRSRTCCENKFERCCRDGCDLKLMKYLLEQL
EGRFKDKKDLDGFSSYHVKCAFDVCTQMDQDSQMDRRDLGLCFDNCVTYELQCLRTEKLENYFIPFGNL
FSSNLLDKRSKFETLKQLEYLRNNFPVFDGF

SEQ ID NO:11
>人胚CGAS_N端
MQPHGKAMQRASFAGATAPKASARNARGADMDPTKSPAAPGAALPKAGKFGPARGSGSRQKKSAPDTQK
RPLVRATGARAKKAPQRAQDTQESDATSAPGAPGLKPDAARKPALSRAGSCRQRGARCSTKPRPPPGPRD
VPSPGLPVSAPTLVRRDAA

SEQ ID NO:12
>HIV基因组RNA结合蛋白(HIV-1 RNA GENOME-BINDING PROTEIN)[人类免疫缺陷病毒1型]
[GSG]EGRGSLLTCGDVEENPGP

SEQ ID NO:13
>猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)1型ORF4蛋白[猪繁殖与呼吸综合征病毒]
[GSG]ATNFSLLKQAGDVEENPGP

SEQ ID NO:14
>人类免疫缺陷病毒2型核心蛋白[人类免疫缺陷病毒2型]
[GSG]QCTNGALLKLAGDVESNPGP

SEQ ID NO:15
>口蹄疫病毒3B(FOOT-AND-MOUTH DISEASE VIRUS)1型ORF4蛋白[口蹄疫病毒]
[GSG]VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP

SEQ ID NO:16
>猪脑心肌炎病毒1型
SLLDPEKL

SEQ ID NO:17
>合成CGAS-AN
ATGCCCGGCGCCAGCAAGCTGAGGGCCGTGCTGGAGAAGCTGAAGCTGAGCAGGGACGACATCAGCACCG
CCGCCGGCATGGTGAAGGGCGTGGTGGACCACCTGCTGCTGAGGCTGAAGTGCGACAGCGGCCTTCAGGGC
CGTGGGCCTGCTGAACACCGGCAGCTACTACGAGCACGTGAAGATCAGCGCCCCCAACGAGTTCGACGTG
ATGTTCAAGCTGGAGGTGCCCAGGATCCAGCTGGAGGAGTACAGCAACACCAGGGCCTACTACTTCGTGA
AGTTCAAGAGGAACCCCAAGGAGAACCCCCTGAGCCAGTTCCTGGAGGGCGAGATCCTGAGCGCCAGCAA
GATGCTGAGCAAGTTCAGGAAGATCATCAAGGAGGAGATCAACGACATCAAGGACACCGACGTGATCATG
AAGAGGAAGAGGGCCGGCAGCCCCCGCCGTGACCCTGCTGATCAGCGAGAAGATCAGCGTGGACATCACCC
TGGCCCTGGAGAGCAAGAGCAGCCTGGCCCTGCAGCACCCAGGAGGGCCTGAGGATCCAGAACTGGCTGAG
CGCCAAGGTGAGGAAGCAGCTGAGCCTGAAGCCCTTCTACCTGGTGCCCAAGCACGCCAAGGAGGGCAAC
GGCTTCGAGGAGGAGACCTGGAGGCTGAGCTTCAGCCACATCGAGAAGGAGATCCTGAACAACCACGGCA
AGAGCAAGACCTGCTGCGAGAACAAGGAGGAGAAGTGCTGCAGGAAGGACTGCCTGAAGCTGATGAAGTA
CCTGCTGGAGCAGCTGAAGGAGAGGTTCAAGGACAAGAAGCACCTGGACAAGTTCAGCAGCTACCACGTG
AAGACCGCCTTCTTCCACGTGTGCACCCAGAACCCCCAGGACAGCCAGTGGGACAGGAAGGACCTGGCCC
TGTGCTTCGACAACTGCGTGACCTACTTCCTGCAGTGCCTGAGGACCGAGAAGCTGGAGAACTACTTCAT
CCCCGAGTTCAACCTGTTCAGCAGCAACCTGATCGACAAGAGGAGCAAGGAGTTCCTGACCAAGCAGATC
GAGTACGAGAGGAACAACGAGTTCCCCGTGTTCGACGAGTTCTAATGA

```
<?xml version="1.0" encoding="UTF-8"?>
<!DOCTYPE ST26SequenceListing PUBLIC "-//WIPO//DTD Sequence Listing 1.3//EN"
"ST26SequenceListing_V1_3.dtd">
<ST26SequenceListing originalFreeTextLanguageCode="en"  dtdVersion="V1_3"
fileName="C256000SEQA.xml" softwareName="WIPO Sequence" softwareVersion="2.3.0"
productionDate="2023-07-04">
 <ApplicationIdentification>
  <IPOfficeCode>TW</IPOfficeCode>
  <ApplicationNumberText></ApplicationNumberText>
  <FilingDate></FilingDate>
 </ApplicationIdentification>
 <ApplicantFileReference>16553-20002.41</ApplicantFileReference>
 <EarliestPriorityApplicationIdentification>
  <IPOfficeCode>US</IPOfficeCode>
  <ApplicationNumberText>63/341,984</ApplicationNumberText>
  <FilingDate>2022-05-13</FilingDate>
 </EarliestPriorityApplicationIdentification>
 <ApplicantName languageCode="zh">美商科納療法股份有限公司(CORNER THERAPEUTICS,
INC.)</ApplicantName>
 <ApplicantNameLatin>CORNER THERAPEUTICS, INC.</ApplicantNameLatin>
 <InventionTitle languageCode="zh">編碼具持續性活性之環GMP-AMP合成酶之核酸及用於
彼等之免疫原性遞送載體</InventionTitle>
 <SequenceTotalQuantity>17</SequenceTotalQuantity>
 <SequenceData sequenceIDNumber="1">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>363</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..363</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q2">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
```

<INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>PGASKLRAVLEKLKLSRDDISTAAGMVKGVVDHLLLRLKCDSAFRGVGLLNTGSYYEHVKIS
APNEFDVMFKLEVPRIQLEEYSNTRAYYFVKFKRNPKENPLSQFLEGEILSASKMLSKFRKIIKEEINDIKDTDVIMKRK
RGGSPAVTLLISEKISVDITLALESKSSWPASTQEGLRIQNWLSAKVRKQLRLKPFYLVPKHAKEGNGFQEETWRLSFSH
IEKEILNNHGKSKTCCENKEEKCCRKDCLKLMKYLLEQLKERFKDKKHLDKFSSYHVKTAFFHVCTQNPQDSQWDRKDLG
LCFDNCVTYFLQCLRTEKLENYFIPEFNLFSSNLIDKRSKEFLTKQIEYERNNEFPVFDEF</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="2">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>367</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..367</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q4">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>Macaca mulatta</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>PGARKLRAVLEKLRLSHQDISKAAKVVNGVVGHLLRRLKCEPEFGGVEQLHTGSYYEHVKIS
APNEFDVMFKLQVPRIQLEEYSDTGAYYFVKFKRNPEGNPLSLFLEDEILSASKMLSKFRKIIKEEINNIKDVQPDADVI
MKRKRPGSPAVTLLINKEISVDITLALELKTSWPASTQEGLAIKNWLSAKVRQQLRLKPFYLVPKHAKEGNGFQEETWRL
SFSHIEKEILSNHGKSKTCCENKEMKCCRKDCLKLMKYLLEQLKEKFKDKKHLDKFSSYHVKTAFFHLCTENPQDSQWDP
KDLGLCFDNCVTYFLECLRTEQLKNYFIPGFNLFSSNLIDKTSKEFLSKQIEYERNNEFPVFGEF</INSDSeq_seque
nce>

</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="3">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>363</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..363</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q6">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>Papio anubis</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>PGARKLRAVLEKLRLSHQDISKAAKVVNGVVGHLLHRLKCESEFEGVEQLHTGSYYEHVKIS
APNEFDVMFKLQVPRIQLEEYSDTGAYYFVKFKRNPKGNPLSQFLEDEILSASKMLSQFRKIIKEEINNIKDTDVIMKRK
RRGSPAVTLLINKEISVDITLALELKTSWPASTQEGLAIKNWLSAKVRQQLRLKPFYLVPKHAKEGNGFQEETWRLSFSH
IEKEILSNHGKSKTCCENKEMKCCRKDCLKLMKYLLEQLKEKFKDKKHLDKFSSYHVKTAFFHLCTENPQDSQWDPKDLG
LCFDNCVTHFLQCLRTEKLANYFIPGFNLFSSNLIDKSSKEFLSKQIEYERNNEFPVFGEF</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="4">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>363</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..363</INSDFeature_location>

```
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q8">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Nomascus leucogenys</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>PGARKLRAVLEKLKLSRQEISEAAEVVNGVVDHLLRRLQKCDSEFRGVGLLRTGSYYEHVKI
SAPNEFDVMFKLEVPRIQLEEYSNTGAYYFVKFKRNPKENPLSQFLEGEILSASKMLSKFRKIIKEEINNIKDTDVIMKR
KRGGSPAVTLLISEKISVDITLALESNSNSWPASTQEGLPIKDWLSGKVRRQLRLKPFYLVPKHAKEGNGFQEETWRLSF
SHIEKEILNNHGKTKTCCENKNVKCCRKDCLKLMKYLLEQLKERFKDKKHLDKFSSYHVKTAFFHVCTENPQDSQWDPKN
LGFCFDKCVIYFLKCLRTEQLGNYFIPGFNLFSSNLIDKRSKEFLSKQIEYERNNEYPVFG</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="5">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>365</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..365</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q10">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Hylobates lar</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
```

```
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>PGARKLPAVLEKLKLSRQEICEAAEVVNGVVDHLLRRLQKCDSEFRGVGLLRTGSYYEHVKI
SAPNEFDVMFKLEVPRIQLEEYSNTGAYYFVKFKRNPKENPLCQFLEGEILSASKMLSKFRKIIKEEINNIKDTDVILKR
KRGGSPAVTLLISEKISVDITLALESKSSSWPASTQEGLPIKDWLSGKVRTQLRLKPFYLVPKHAKEGNGFQEETWRLSF
SHIEKEILNNHGETKTCCENKKVKCCRKDCLKLMKYLLEQLKERFKDKKHLDKFSSYHVKTAFFHVCTENPKDSQWDPKD
LGLCFDKCVIYFLQCLSTEQLGNYFIPGFNLFSSNLIDKRSKEFLSKQIEYERNNEYPVFGKC</INSDSeq_sequenc
e>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="6">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>364</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..364</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q12">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Pongo abelii</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>PGASKLRAVLEKLKLSRLEISKAAEVVNRVVDHLLRRLQKYNSEFRGVGLLRTGSYYEHVKI
SAPNEFDVMFKLEVPRIQLEEYSNTGAYYFVKFKRNPKENPLSQFLEGEILSASKMLSKFRKIIKEEINNIKDTDVIMKR
KRGGSPAVTLLISEEISVDITLALESKSSWPASTQEGLPIKNWLSAKVRKQLRLKPFYLVPKHAKEGNGFQEETWRLSFS
HIEKEILNNHGKSKTCCEDKEVKCCRKDCLKLMKYLLEQLKERFKDKKHLDKFSSYHVKTAFFHVCTQNPQDSQWDPKDL
GLCFDNCVTYFLQCLRTEQLGNYFIPGFNLFSSNLIDKRSKEFLTKQIEYERNNEFPVFDEF</INSDSeq_sequence
>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="7">
```

```
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>361</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..361</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q14">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Pan troglodytes</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>PGASKLRAVLEKLKLSRDDISTAAGMVKGVVDHLLLRLKCDSAFRGVGLLNTGSYYEHVKIS
APNEFDVMFKLEVPRIQLEEYSNTRAYYFVKFKRNPKENPLSQFLEGEILSASKMLSKFRKIIKEEINNIKDVIMKRKRG
GSPAVTLLISEKISVDITLALESKSSWPASTQEGLPIKNWLSAKVRKQLRLKPFYLVPKHAKEGNGFQEETWRLSFSHIE
KEILNNHGKSKTCCEIKEAKCCRKDCLKLMKYLLEQLKEKFKDKKHLDKFSSYHVKTAFFHVCTENPQDSQWDRKDLGLC
FDNCVTYFLQCLRIEKLENYFIPEFNLFSSDLIDKRSKEFLTKQIEYERNNEFPVFDEF</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="8">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>363</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..363</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
```

<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q16">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>Gorilla gorilla</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>PGASKLRAVLEKLKLSRDDISTAAGMVKGVVDHLLLRLKCDSAFRGVGLLNTGSYYEHVKIS
APNEFDVMFKLEVPRIQLEEYSNTRAYYFVKFKRNPKENPLSQFLEGEILSASKMLSKFRKIIKEEINNIKDTDVIMKRK
RGGSPAVTLLISEKISVDITLALESKSSWPASTQEGLRIQNWLSAKVRRQLRLKPFYLVPKHAKEGNGFQEETWRLSFSH
IEKEILNNHGKSKTCCENKEAKCCRKDCLKLMKYLLEQLKERFKDKKHLDKFSSYHVKTAFFHVCTQNPQDSQWDRKQLG
LCFDNCVTYFLQCLRTERLENYFIPEFNLFSRNLIDKRSKEFLTKQIEYERNNEFPVFDEF</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="9">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>369</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..369</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q18">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>PGAXKLXAVLEKLXLSXXXIXXAAXXVXXVVXHLLXRLXXXXXXFXGVXXLXTGSYYEHVKI
SAPNEFDVMFKLXVPRIQLEEYSXTXAYYFVKFKRNPXXNPLXXFLEXEILSASKMLSXFRKIIKEEINXIKXXXXXXDV
IXKRKRXGSPAVTLLIXXXISVDITLALEXXXXSWPASTQEGLXIXXWLSXKVRXQLRLKPFYLVPKHAKEGNGFQEETW

RLSFSHIEKEILXNHGXXKTCCEXKXXKCCRKDCLKLMKYLLEQLKEXFKDKKHLDKFSSYHVKTAFFHXCTXNPXDSQW
DXKXLGXCFDXCVTXFLXCLXXEXLXNYFIPXFNLFSXXLIDKXSKEFLXKQIEYERNNEXPVFXXX</INSDSeq_seq
uence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="10">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>522</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..522</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q20">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MQPWHGKAMQRASEAGATAPKASARNARGAPMDPTESPAAPEAALPKAGKFGPARKSGSRQK
KSAPDTQERPPVRATGARAKKAPQRAQDTQPSDATSAPGAEGLEPPAAREPALSRAGSCRQRGARCSTKPRPPPGPWDVP
SPGLPVSAPILVRRDAAPGASKLRAVLEKLKLSRDDISTAAGMVKGVVDHLLLRLKCDSAFRGVGLLNTGSYYEHVKISA
PNEFDVMFKLEVPRIQLEEYSNTRAYYFVKFKRNPKENPLSQFLEGEILSASKMLSKFRKIIKEEINDIKDTDVIMKRKR
GGSPAVTLLISEKISVDITLALESKSSWPASTQEGLRIQNWLSAKVRKQLRLKPFYLVPKHAKEGNGFQEETWRLSFSHI
EKEILNNHGKSKTCCENKEEKCCRKDCLKLMKYLLEQLKERFKDKKHLDKFSSYHVKTAFFHVCTQNPQDSQWDRKDLGL
CFDNCVTYFLQCLRTEKLENYFIPEFNLFSSNLIDKRSKEFLTKQIEYERNNEFPVFDEF</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="11">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>159</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>

```
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..159</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q22">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MQPWHGKAMQRASEAGATAPKASARNARGAPMDPTESPAAPEAALPKAGKFGPARKSGSRQK
KSAPDTQERPPVRATGARAKKAPQRAQDTQPSDATSAPGAEGLEPPAAREPALSRAGSCRQRGARCSTKPRPPPGPWDVP
SPGLPVSAPILVRRDAA</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="12">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>21</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..21</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q24">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Thosea asigna virus</INSDQualifier_value>
```

```
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>VARIANT</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..3</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier id="q35">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>can be present or absent</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>GSGEGRGSLLTCGDVEENPGP</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="13">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>22</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..22</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q36">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>Porcine teschovirus-1</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>VARIANT</INSDFeature_key>
```

```
    <INSDFeature_location>1..3</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier id="q37">
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>can be present or absent</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="14">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>23</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..23</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q38">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>Equine rhinitis A virus</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>VARIANT</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..3</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier id="q39">
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>can be present or absent</INSDQualifier_value>
```

```
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>GSGQCTNYALLKLAGDVESNPGP</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="15">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>25</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..25</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q40">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>Foot-and-mouth disease virus</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>VARIANT</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..3</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier id="q41">
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>can be present or absent</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>GSGVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP</INSDSeq_sequence>
```

```
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="16">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>8</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..8</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q42">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>Gallus gallus</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>SIINFEKL</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="17">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>1098</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..1098</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
```

```
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q43">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>atgcccggcgccagcaagctgagggccgtgctggagaagctgaagctgagcagggacgacat
cagcaccgccgccggcatggtgaagggcgtggtggaccacctgctgctgaggctgaagtgcgacagcgccttcaggggcg
tgggcctgctgaacaccggcagctactacgagcacgtgaagatcagcgcccccaacgagttcgacgtgatgttcaagctg
gaggtgcccaggatccagctggaggagtacagcaacaccagggcctactacttcgtgaagttcaagaggaaccccaagga
gaaccccctgagccagttcctggagggcgagatcctgagcgccagcaagatgctgagcaagttcaggaagatcatcaagg
aggagatcaacgacatcaaggacaccgacgtgatcatgaagaggaagaggggcggcagccccgccgtgaccctgctgatc
agcgagaagatcagcgtggacatcaccctggccctggagagcaagagcagctggcccgccagcacccaggagggcctgag
gatccagaactggctgagcgccaaggtgaggaagcagctgaggctgaagcccttctacctggtgcccaagcacgccaagg
agggcaacggcttccaggaggagacctggaggctgagcttcagccacatcgagaaggagatcctgaacaaccacggcaag
agcaagacctgctgcgagaacaaggaggagaagtgctgcaggaaggactgcctgaagctgatgaagtacctgctggagca
gctgaaggagaggttcaaggacaagaagcacctggacaagttcagcagctaccacgtgaagaccgccttcttccacgtgt
gcacccagaacccccaggacagccagtgggacaggaaggacctgggcctgtgcttcgacaactgcgtgacctacttcctg
cagtgcctgaggaccgagaagctggagaactacttcatccccgagttcaacctgttcagcagcaacctgatcgacaagag
gagcaaggagttcctgaccaagcagatcgagtacgagaggaacaacgagttccccgtgttcgacgagttctaatga</IN
SDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
</ST26SequenceListing>
```

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種包含mRNA封裝於脂質奈米粒子(LNP)中之組合物，其中該mRNA包含持續性活性之環GMP-AMP合成酶(cGAS)之編碼區域，且該LNP包含第一磷脂、及至少一種選自由可電離之脂質、聚乙二醇化脂質、結構脂質、第二磷脂及其混合物組成之群之脂質，其中該第一磷脂包含具有單一C13-C24醯基鏈之溶血磷脂醯膽鹼(LPC)。

【請求項2】

一種包含第一mRNA及第二mRNA封裝於脂質奈米粒子(LNP)中之組合物，其中該第一mRNA包含持續性活性之環GMP-AMP合成酶(cGAS)之編碼區域，該第二mRNA包含抗原之編碼區域；且該LNP包含第一磷脂、及至少一種選自由可電離之脂質、聚乙二醇化脂質、結構脂質、第二磷脂及其混合物組成之群之脂質，其中該第一磷脂包含具有單一C13-C24醯基鏈之溶血磷脂醯膽鹼(LPC)。

【請求項3】

一種包含mRNA封裝於脂質奈米粒子(LNP)中之組合物，其中該mRNA包含第一編碼區域及第二編碼區域經2A樣(2A-like)序列隔開，其中該第一編碼區域係持續性活性之環GMP-AMP合成酶(cGAS)之編碼區域及該第二編碼區域係抗原之編碼區域，或該第一編碼區域係抗原之編碼區域及該第二編碼區域係持續性活性之環GMP-AMP合成酶(cGAS)之編碼區域，且該LNP包含第一磷脂、及至少一種選自由可電離之脂質、聚乙二醇化脂質、結構脂質、第二磷脂及其混合物組成之群之脂質，其中該第一磷脂包含具有單一C13-C24醯基鏈之溶血磷脂醯膽鹼(LPC)。

【請求項4】

如請求項1至3中任一項之組合物，其中該至少一種脂質包含可電離之脂質、第二磷脂、聚乙二醇化脂質及結構脂質。

【請求項5】

如實施例1至4中任一項之組合物，其中該可電離之脂質包含：

i) 8-[(2-羥乙基)[6-側氧基(oxo)-6-(十一基氧基)己基]胺基]-辛酸，1-辛基壬基酯(SM-102)或其類似物或衍生物；及/或

ii) 6-((2-己基癸醯基)氧基)-N-(6-((2-己基癸醯基)氧基)己基)-N-(4-羥基丁基)己烷-1-胺鎓(aminium)(ALC-0315)或其類似物或衍生物；及/或

iii) (6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七碳(heptatriaconta)-6,9,28,31-四烯-19-基4-(二甲基胺基)丁酸酯(DLin-MC3-DMA)或其類似物或衍生物。

【請求項6】

如請求項1至5中任一項之組合物，其中該聚乙二醇化脂質係選自由PEG修飾之磷脂醯乙醇胺、PEG修飾之磷脂酸、PEG修飾之神經醯胺、PEG修飾之二烷基胺、PEG修飾之二醯基甘油、PEG修飾之二烷基甘油及其組合組成之群。

【請求項7】

如請求項1至5中任一項之組合物，其中該聚乙二醇化脂質包含聚乙二醇[PEG] 2000二肉豆蔻醯基甘油[DMG]。

【請求項8】

如請求項1至7中任一項之組合物，其中該結構脂質係選自由膽固醇、糞固醇(fecosterol)、麥固醇、麥角固醇、菜油固醇(campesterol)、豆固醇、蕓苔甾醇(brassicasterol)、番茄鹼(tomatidine)、熊果酸(ursolic

acid)、α-生育酚及其組合組成之群。

【請求項9】

如請求項1至7中任一項之組合物，其中該結構脂質包含膽固醇。

【請求項10】

如請求項1至9中任一項之組合物，其中該第二磷脂包含：

i)選自由磷脂醯基膽鹼、磷脂醯基乙醇胺、磷脂醯基甘油、磷脂醯基絲胺酸、磷脂酸、2-溶血磷脂醯基膽鹼及神經鞘磷脂組成之群之親水性頭部部分；及

ii)一或多種選自由月桂酸、肉豆蔻酸、肉豆蔻油酸、棕櫚酸、棕櫚油酸、硬脂酸、油酸、亞麻油酸、α-次亞麻油酸、芥子酸、花生酸、花生四烯酸、植烷酸、二十碳五烯酸、山萮酸(behenic acid)、二十二碳五烯酸及二十二碳六烯酸組成之群之脂肪酸尾部部分。

【請求項11】

如請求項1至9中任一項之組合物，其中該第二磷脂係選自由以下組成之群：

1,2-二亞油醯基-sn-甘油-3-磷酸膽鹼(DLPC)，

1,2-二肉豆蔻醯基-sn-甘油-磷酸膽鹼(DMPC)，

1,2-二油醯基-sn-甘油-3-磷酸膽鹼(DOPC)，

1,2-二棕櫚醯基-sn-甘油-3-磷酸膽鹼(DPPC)，

1,2-二硬脂醯基-sn-甘油-3-磷酸膽鹼(DSPC)，

1,2-二(十一醯基)-sn-甘油-磷酸膽鹼(DUPC)，

1-棕櫚醯基-2-油醯基-sn-甘油-3-磷酸膽鹼(POPC)，

1,2-二-O-十八烯基-sn-甘油-3-磷酸膽鹼，

1-油醯基-2-膽固醇基半琥珀醯基-sn-甘油-3-磷酸膽鹼，

1,2-二次亞麻油醯基-sn-甘油-3-磷酸膽鹼，

1,2-二花生四烯醯基-sn-甘油-3-磷酸膽鹼，

1,2-二(二十二碳六烯醯基)-sn-甘油-3-磷酸膽鹼，

1,2-二油醯基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DOPE)，

1,2-二植烷醯基(diphytanoyl)-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺，

1,2-二硬脂醯基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺，

1,2-二亞油醯基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺，

1,2-二次亞麻油醯基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺，

1,2-二花生四烯醯基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺，

1,2-二(二十二碳六烯醯基)-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺，

1,2-二油醯基-sn-甘油-3-磷酸(phospho)-rac-(1-甘油)鈉鹽(DOPG)，

神經鞘磷脂，及

其組合。

【請求項12】

如請求項11之組合物，其中該第二磷脂包含1,2-二硬脂醯基-sn-甘油-3-磷酸膽鹼(DSPC)。

【請求項13】

如請求項1至12中任一項之組合物，其中該組合物進一步包含至少一種賦形劑。

【請求項14】

如請求項13之組合物，其中該賦形劑包含蔗糖。

【請求項15】

一種組合物，其包含：

i) mRNA與一或多種脂質複合(RNA-脂複合體)；及

ii)具有單一C13-C24醯基鏈之溶血磷脂醯膽鹼(LPC)，

其中該mRNA包含持續性活性之環GMP-AMP合成酶(cGAS)之編碼區域，且該一或多種脂質包含第一脂質及第二脂質。

【請求項16】

一種組合物，其包含：

i) 第一mRNA及第二mRNA與一或多種脂質複合(RNA-脂複合體)；及

ii)具有單一C13-C24醯基鏈之溶血磷脂醯膽鹼(LPC)；

其中該第一mRNA包含持續性活性之環GMP-AMP合成酶(cGAS)之編碼區域，及該第二mRNA包含抗原之編碼區域，且該一或多種脂質包含第一脂質及第二脂質。

【請求項17】

一種組合物，其包含：

i) mRNA與一或多種脂質複合 (RNA-脂複合體)；及

ii)具有單一C13-C24醯基鏈之溶血磷脂醯膽鹼(LPC)，

其中該mRNA包含第一編碼區域及第二編碼區域經2A樣序列隔開，該第一編碼區域係持續性活性之環GMP-AMP合成酶(cGAS)之編碼區域且該第二編碼區域係抗原之編碼區域，或該第一編碼區域係抗原之編碼區域且該第二編碼區域係持續性活性之環GMP-AMP合成酶(cGAS)之編碼區域，且該一或多種脂質包含第一脂質及第二脂質。

【請求項18】

如請求項15至17中任一項之組合物，其中該第一脂質係陽離子脂質，且該第二脂質係中性或陰離子脂質。

【請求項19】

如請求項18之組合物，其中該陽離子脂質包含以下中之一者或二者：

i) 1,2-二-O-十八烯基-3-三甲基銨丙烷(DOTMA)或其類似物或衍生物；及

ii) 1,2-二油醯基-3-三甲基銨丙烷(DOTAP)或其類似物或衍生物。

【請求項20】

如請求項18或19之組合物，其中該中性或陰離子脂質包含：

i) 1,2-二-(9Z-十八烯醯基)-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DOPE)或其類似物或衍生物；及/或

ii) 膽固醇或其類似物或衍生物；及/或

iii) 1,2-二油醯基-sn-甘油-3-磷酸膽鹼(DOPC)或其類似物或衍生物。

【請求項21】

如請求項1至20中任一項之組合物，其中該LPC之醯基鏈為C21-C24醯基鏈。

【請求項22】

如請求項1至20中任一項之組合物，其中該LPC之醯基鏈為C22醯基鏈。

【請求項23】

如請求項1至22中任一項之組合物，其中該LPC之醯基鏈為完全飽和。

【請求項24】

如請求項23之組合物，其中該LPC包含1-山萮醯基-2-羥基-sn-甘油-3-磷酸膽鹼[LPC(22:0)]。

【請求項25】

如請求項1至24中任一項之組合物，其進一步包含TLR7/8激動劑。

【請求項26】

如請求項25之組合物，其中該TLR7/8激動劑為具有900道耳頓或更小分子量之小分子。

【請求項27】

如請求項26之組合物，其中該TLR7/8激動劑包含咪唑并喹啉化合物。

【請求項28】

如請求項27之組合物，其中該TLR7/8激動劑包含雷西莫特(resiquimod) (R848)。

【請求項29】

如請求項25至28中任一項之組合物，其中該LPC包含LPC(22:0)，且該TLR7/8激動劑包含雷西莫特(R848)。

【請求項30】

如請求項1至29中任一項之組合物，其中該mRNA或該第一mRNA及該第二mRNA包含5’非轉譯區域(5’UTR)及3’非轉譯區域(3’UTR)。

【請求項31】

如請求項1至30中任一項之組合物，其中該mRNA包含5'帽結構。

【請求項32】

如請求項1至31中任一項之組合物，其中該mRNA包含多腺苷酸(polyA)尾部。

【請求項33】

如請求項1至32中任一項之組合物，其中該mRNA為核苷修飾之mRNA。

【請求項34】

一種核酸，其包含：i)抗原之編碼區域、及ii)持續性活性之環GMP-AMP合成酶(cGAS)之編碼區域，視情況其中該核酸為mRNA，視情況其中該核酸為DNA。

【請求項35】

一種包含如請求項34之核酸之表現載體。

【請求項36】

如請求項1至35中任一項之組合物，其中該持續性活性之cGAS具有比其野生型對應物更大之自身DNA反應性傾向。

【請求項37】

如請求項1至36中任一項之組合物，其中該cGAS為缺乏胺基端磷酸肌醇結合域之截短型cGAS(cGASΔN)。

【請求項38】

如請求項37之組合物，其中該cGASΔN包含SEQ ID NO:1之胺基酸序列或與SEQ ID NO:1至少85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同之胺基酸序列。

【請求項39】

如請求項38之組合物，其中該cGASΔN包含：

(i) SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:8之胺基酸序列、或與SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:8至少95%、96%、97%、98%或99%相同之胺基酸序列；或

(ii)SEQ ID NO:9之共通胺基酸序列。

【請求項40】

如請求項38之組合物，其中該cGASΔN係由SEQ ID NO:17之核苷酸序列編碼。

【請求項41】

如請求項37至40中任一項之組合物，其中該cGASΔN之編碼區域係與起始密碼子(ATG)可操作組合。

【請求項42】

如請求項1至41中任一項之組合物，其中該抗原為腫瘤抗原。

【請求項43】

如請求項42之組合物，其中該腫瘤抗原為腫瘤相關抗原。

【請求項44】

如請求項42之組合物，其中該腫瘤抗原為新抗原(neoantigen)。

【請求項45】

如請求項1至41中任一項之組合物，其中該抗原包含微生物抗原。

【請求項46】

如請求項44之組合物，其中該微生物抗原包含病毒抗原、細菌抗原、原生動物抗原或真菌抗原。

【請求項47】

如請求項1至41中任一項之組合物，其中該抗原包含病原體之表面蛋白或其片段。

【請求項48】

如請求項47之組合物，其中該病原體能夠在人類個體中引起疾病。

【請求項49】

如請求項47或48之組合物，其中該病原體為病毒。

【請求項50】

如請求項49之組合物，其中該病毒為SARS-CoV-2。

【請求項51】

如請求項50之組合物，其中該抗原為SARS-CoV-2之棘(S)糖蛋白，視情況其中該棘糖蛋白為融合前穩定變異體。

【請求項52】

如請求項1至51中任一項之組合物，其中該組合物不包含脂多醣(LPS)或單磷醯基脂質A (MPLA)。

【請求項53】

如請求項1至52中任一項之組合物，其中該組合物不包含經氧化之1-棕櫚醯基-2-花生四烯醯基-sn-甘油-3-磷醯基膽鹼(oxPAPC)或oxPAPC之物種。

【請求項54】

如請求項53之組合物，其中該組合物不包含2-[[(2R)-2-[(E)-7-羧基-5-羥基庚-6-烯醯基]氧基-3-十六烷醯基氧基丙氧基]-羥基磷醯基]氧基乙基-三甲基銨根(azanium)(HOdiA-PC)、[(2R)-2-[(E)-7-羧基-5-側氧基庚-6-

烯醯基]氧基-3-十六烷醯基氧基丙基] 2-(三甲基銨根基(azaniumyl))乙基磷酸酯(KOdiA-PC)、1-棕櫚醯基-2-(5-羥基-8-側氧基-辛烯醯基)-sn-甘油-3-磷醯基膽鹼(HOOA-PC)、2-[[(2R)-2-[(E)-5,8-二側氧基辛-6-烯醯基]氧基-3-十六烷醯基氧基丙氧基]-羥基磷醯基]氧基乙基-三甲基銨根(KOOA-PC)、[(2R)-3-十六烷醯基氧基-2-(5-側氧基戊醯基氧基)丙基] 2-(三甲基銨根基)乙基磷酸酯(POVPC)、[(2R)-2-(4-羧基丁醯基氧基)-3-十六烷醯基氧基丙基] 2-(三甲基銨根基)乙基磷酸酯(PGPC)、[(2R)-3-十六烷醯基氧基-2-[4-[3-[(E)-[2-[(Z)-辛-2-烯基]-5-側氧基亞環戊-3-烯-1-基]甲基]環氧乙烷-2-基]丁醯基氧基]丙基] 2-(三甲基銨根基)乙基磷酸酯(PECPC)、[(2R)-3-十六烷醯基氧基-2-[4-[3-[(E)-[3-羥基-2-[(Z)-辛-2-烯基]-5-側氧基亞環戊基]甲基]環氧乙烷-2-基]丁醯基氧基]丙基] 2-(三甲基銨根基)乙基磷酸酯(PEIPC)及/或1-棕櫚醯基-2-壬二醯基(azelaoyl)-sn-甘油-3-磷酸膽鹼(PAzePC)。

【請求項55】

一種醫藥調配物，其包含如請求項1至54中任一項之組合物及醫藥上可接受之賦形劑。

【請求項56】

一種用於產生過度活化(hyperactivated)之樹突細胞之方法，該方法包括使樹突細胞與有效量之如請求項1至54中任一項、如請求項25至54中任一項之組合物、或如請求項55之調配物接觸以產生過度活化之樹突細胞，其中該等過度活化之樹突細胞分泌IL-1β而在暴露約48小時內不會經歷細胞死亡。

【請求項57】

如請求項56之方法，其中該等樹突細胞係：

(i)與該組合物在活體內接觸；或

(ii)與該組合物離體接觸。

【請求項58】

如請求項56或57之方法，其中該等過度活化之樹突細胞：

(i)與未經刺激之樹突細胞或與空LNP接觸之樹突細胞相比分泌更高水平之IL-6、TNFα、RANTES及IP-10中之一者或多者；及/或

(ii)表現更高水平之至少一種選自由CCR7、CD40、CD80、CD83、CD86、MHC II類、MHC I類及其組合組成之群之細胞表面標誌物。

【請求項59】

一種醫藥調配物，其包含至少10^3、10^4、10^5或10^6個藉由如請求項56至58中任一項之方法產生之過度活化之樹突細胞、及醫藥上可接受之賦形劑。

【請求項60】

一種刺激針對抗原之免疫反應之方法，其包括向有需要的個體投與有效量之如請求項55或59之醫藥調配物以刺激針對抗原之免疫反應。

【請求項61】

一種治療癌症之方法，其包括向有需要的個體投與有效量之如請求項55或59之醫藥調配物以治療癌症。

【請求項62】

一種抑制異常細胞增殖之方法，其包括向有需要的個體投與有效量之如請求項55或59之醫藥調配物以抑制異常細胞增殖。

【請求項63】

一種治療或預防傳染病之方法，其包括向有需要的個體投與有效量之如請求項55之醫藥調配物以治療或預防傳染病。

【請求項64】

如請求項63之方法，其中該傳染病為病毒性疾病。

【請求項65】

如請求項63之方法，其中該傳染病為細菌性疾病。

【請求項66】

如請求項56至62中任一項之方法或醫藥調配物，其中該等樹突細胞為哺乳動物細胞。

【請求項67】

如請求項66之方法或醫藥調配物，其中該等哺乳動物細胞為人類細胞。

【請求項68】

如請求項60至66中任一項之方法，其中該個體為哺乳動物。

【請求項69】

如請求項68之方法，其中該哺乳動物為人類。

【請求項70】

如請求項68之方法，其中該哺乳動物為狗或貓。

【請求項71】

如請求項1至70中任一項之組合物、調配物或方法，其中該第二磷脂包含1,2-二硬脂醯基-sn-甘油-3-磷酸膽鹼(DSPC)，及該至少一種脂質包含8-[(2-羥乙基)[6-側氧基-6-(十一基氧基)己基]胺基]-辛酸，1-辛基壬基酯(SM-102)或其類似物或衍生物、及膽固醇。

【請求項72】

如請求項71之組合物、調配物或方法，其中該至少一種脂質進一步包含聚乙二醇化脂質，視情況其中該聚乙二醇化脂質包含聚乙二醇[PEG]2000二肉豆蔻醯基甘油[DMG]。

【請求項73】

如請求項1至72中任一項之組合物、調配物或方法，其中該LNP具有小於約250奈米，視情況約25至約250奈米，視情況約50至約200奈米，或視情況約75至約175奈米之有效直徑。

【請求項74】

如請求項73之組合物、調配物或方法，其中該LNP具有小於約200奈米之有效直徑。

【請求項75】

如請求項73之組合物、調配物或方法，其中該LNP具有小於約150奈米之有效直徑。

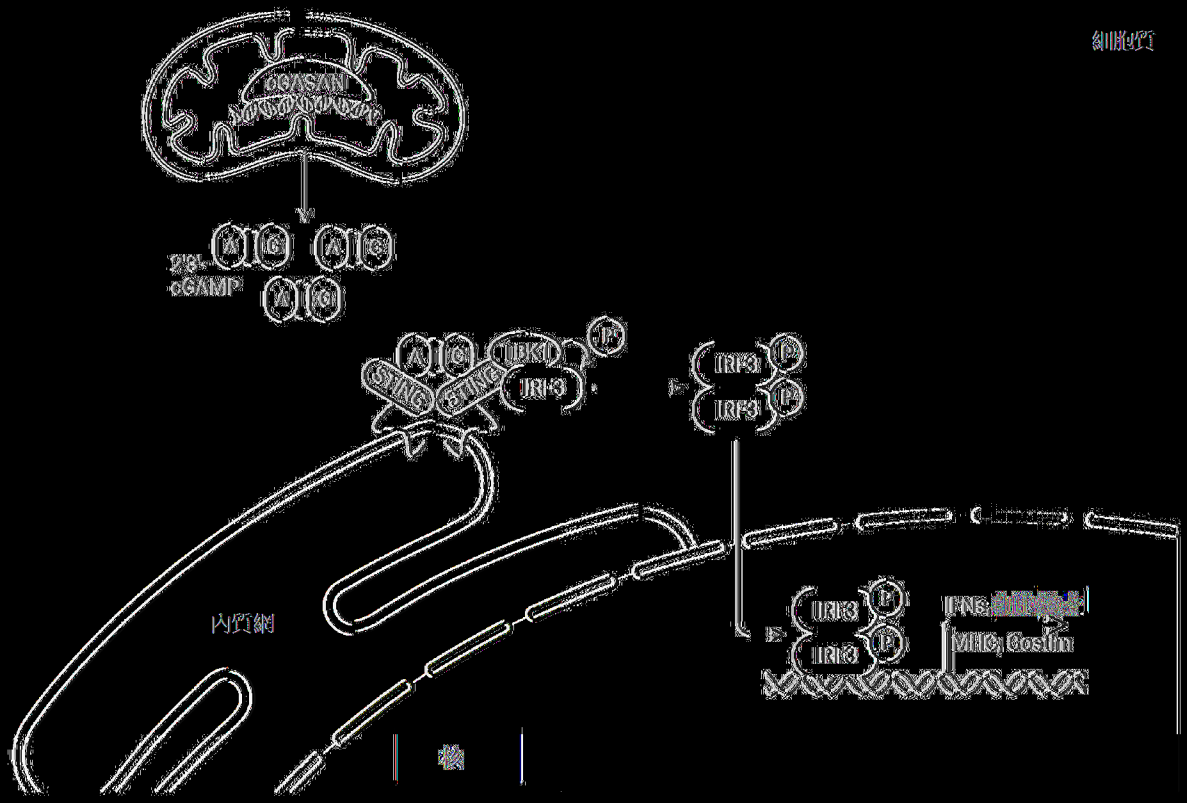
1(發明圖式)1

```
恆河獼猴        PCARKIRAVIJKIRISDQDISKAAKVVNGVVGIIJRRIK·CEPDFGGVEQIJFTGSYYDDV  59
東非狒狒        PCARKIRAVIJKIRISDQDISKAAKVVNGVVGIIJDRIK·CESDFEGVEQIJFTGSYYDDV  59
门頰長臀猿      PCARKIRAVIJKIKISRQEISEAAEKVVNGVVDIIJRRIQKCDSDFRGVCIJRTGSYYDDV  60
门子長臀猿      PCARKIPAVIJKIKISRQEICEAAEKVVNGVVDIIJRRIQKCDSDFRGVCIJRTGSYYDDV  60
蘇門答臘狒狒    PCASKIRAVIJKIKISRIJEISKAAEKVVNRVVDIIJRRIQKYNSDFRGVCIJRTGSYYDDV  60
黑狒狒          PCASKIRAVIJKIKISRDDISTAAGMVKGVVDIIJJRIK·CDSAFRGVCIJNTGSYYDDV  59
大狒狒          PCASKIRAVIJKIKISRDDISTAAGMVKGVVDIIJJRIK·CDSAFRGVCIJNTGSYYDDV  59
現代人          PCASKIRAVIJKIKISRDDISTAAGMVKGVVDIIJJRIK·CDSAFRGVCIJNTGSYYDDV  59
                *** ** ******:**: :*. ** :*: **.*** **:  :  * **  *.********

共通            PCA*KI*AVIJKI*ISxxxIxxAAxxVxxVV*IIJ*RI*xxxxxx*FxGVxxI*TGSYYDDV

恆河獼猴        KISAPNDFDVMIKIQVPRIQIJGGYSDTGAYYIVKDKRNPEGNPISIFIJDEIISASKMIS  119
東非狒狒        KISAPNDFDVMIKIQVPRIQIJGGYSDTGAYYIVKDKRNPKGNPISQFIJDEIISASKMIS  119
门頰長臀猿      KISAPNDFDVMIKIKVPRIQIJGGYSNTGAYYIVKDKRNPKDNPISQFIJGEIISASKMIS  120
门子長臀猿      KISAPNDFDVMIKIKVPRIQIJGGYSNTGAYYIVKDKRNPKDNPICQFIJGEIISASKMIS  120
蘇門答臘狒狒    KISAPNDFDVMIKIKVPRIQIJGGYSNTGAYYIVKDKRNPKDNPISQFIJGEIISASKMIS  120
黑狒狒          KISAPNDFDVMIKIKVPRIQIJGGYSNTRAYYIVKDKRNPKDNPISQFIJGEIISASKMIS  119
大狒狒          KISAPNDFDVMIKIKVPRIQIJGGYSNTRAYYIVKDKRNPKDNPISQFIJGEIISASKMIS  119
現代人          KISAPNDFDVMIKIKVPRIQIJGGYSNTRAYYIVKDKRNPKDNPISQFIJGEIISASKMIS  119
                ***************:**********:* ***********: ***. ***.**********

共通            KISAPNDFDVMIKI*VPRIQIJGGYS*T*AYYIVKDKRNP**NPI**FIJ*EIISASKMIS

恆河獼猴        KDRKIIKDGCINNIKDVQPDADVIMKRKRPGSPAVITJJNKDISVDITIAIJGJK·TSWPAS  178
東非狒狒        QDRKIIKDGCINNIKD·····IDVIMKRKRRGSPAVITJJNKDISVDITIAIJGJK·TSWPAS  174
门頰長臀猿      KDRKIIKDGCINNIKD·····IDVIMKRKRGGSPAVITJJSKDISVDITIAIJGSNSNSWPAS  176
门子長臀猿      KDRKIIKDGCINNIKD·····IDVIIKRKRGGSPAVITJJSKDISVDITIAIJGSKSSSWPAS  176
蘇門答臘狒狒    KDRKIIKDGCINNIKD·····IDVIMKRKRGGSPAVITJJSKDISVDITIAIJGSK·SSWPAS  175
黑狒狒          KDRKIIKDGCINNIK·····DVIMKRKRGGSPAVITJJSKDISVDITIAIJGSK·SSWPAS  172
大狒狒          KDRKIIKDGCINNIKD·····IDVIMKRKRGGSPAVITJJSKDISVDITIAIJGSK·SSWPAS  174
現代人          KDRKIIKDGCINDIKD·····IDVIMKRKRGGSPAVITJJSKDISVDITIAIJGSK·SSWPAS  174
                :**********:**       ***:**** *********.::********** :  .*****

共通            xDRKIIKDGCINxIKxxxxxxDVIxKRKRxGSPAVITJJxxxISVDITITAIJGxxxxSWPAS

恆河獼猴        TQECIAIKNWISAKVRQQIRIKPFYIVPKDAKEGNGFQECTWRISFSIIEKDGIISNDGKS  238
東非狒狒        TQECIAIKNWISAKVRQQIRIKPFYIVPKDAKEGNGFQECTWRISFSIIEKDGIISNDGKS  234
门頰長臀猿      TQECIPIKDWISGKVRRQIRIKPFYIVPKDAKEGNGFQECTWRISFSIIEKDGIINNDGKT  236
门子長臀猿      TQECIPIKDWISGKVRTQIRIKPFYIVPKDAKEGNGFQECTWRISFSIIEKDGIINNDGET  236
蘇門答臘狒狒    TQECIPIKNWISAKVRKQIRIKPFYIVPKDAKEGNGFQECTWRISFSIIEKDGIINNDGKS  235
黑狒狒          TQECIPIKNWISAKVRKQIRIKPFYIVPKDAKEGNGFQECTWRISFSIIEKDGIINNDGKS  232
大狒狒          TQECIRIQNWISAKVRRQIRIKPFYIVPKDAKEGNGFQECTWRISFSIIEKDGIINNDGKS  234
現代人          TQECIRIQNWISAKVRKQIRIKPFYIVPKDAKEGNGFQECTWRISFSIIEKDGIINNDGKS  234
                ***** *:.***.*** ***********************************.***::

共通            TQECI*I**WISxKVRxQIRIKPFYIVPKDAKEGNGFQECTWRISFSIIEKDGI*NDGxx
```

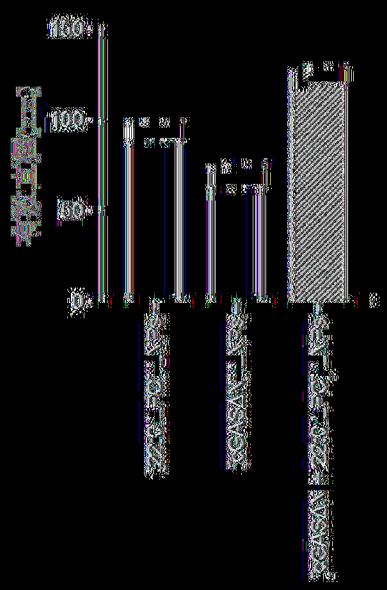
1(圖1)1

```
恆河獼猴      KTCCENKEMKCCRKDCLKLMKYLLEQLKEKFKDKKIIDKFSSYIIVKTAFFIILCTTENPQDS   298
東非狒狒      KTCCENKEMKCCRKDCLKLMKYLLEQLKEKFKDKKIIDKFSSYIIVKTAFFIILCTTENPQDS   294
白頰長臂猿    KTCCENKNVKCCRKDCLKLMKYLLEQLKERFKDKKIIDKFSSYIIVKTAFFIIVCTTENPQDS   296
白手長臂猿    KTCCENKKVKCCRKDCLKLMKYLLEQLKERFKDKKIIDKFSSYIIVKTAFFIIVCTTENPKDS   296
蘇門答臘猩猩  KTCCEDKEVKCCRKDCLKLMKYLLEQLKERFKDKKIIDKFSSYIIVKTAFFIIVCTQNPQDS   295
黑猩猩        KTCCELKEAKCCRKDCLKLMKYLLEQLKEKFKDKKIIDKFSSYIIVKTAFFIIVCTTENPQDS   292
大猩猩        KTCCENKEAKCCRKDCLKLMKYLLEQLKERFKDKKIIDKFSSYIIVKTAFFIIVCTQNPQDS   294
現代人        KTCCENKEEKCCRKDCLKLMKYLLEQLKERFKDKKIIDKFSSYIIVKTAFFIIVCTQNPQDS   294
              ***** *: ********************:*********************:**:**:**
共通          KTCCExKxxKCCRKDCLKLMKYLLEQLKExFKDKKIIDKFSSYIIVKTAFFIIxCTxNPxDS

恆河獼猴      QWDPKDLGLCFDNCVTYFLECLRTEQLKNYFTPGFNLFSSNLIDKTSKEFLSKQLEYERN   358
東非狒狒      QWDPKDLGLCFDNCVTIFLQCLRTEKLANYFTPGFNLFSSNLIDKSSKEFLSKQLEYERN   354
白頰長臂猿    QWDPKNLGFCFDKCVTYFLKCLRTEQLGNYFTPGFNLFSSNLIDKRSKEFLSKQLEYERN   356
白手長臂猿    QWDPKDLGLCFDKCVTYFLQCLSTEQLGNYFTPGFNLFSSNLIDKRSKEFLSKQLEYERN   356
蘇門答臘猩猩  QWDPKDLGLCFDNCVTYFLQCLRTEQLGNYFTPGFNLFSSNLIDKRSKEFLTKQLEYERN   355
黑猩猩        QWDRKDLGLCFDNCVTYFLQCLRTEKLENYFTPEFNLFSSDLIDKRSKEFLTKQLEYERN   352
大猩猩        QWDRKQLGLCFDNCVTYFLQCLRTERLENYFTPEFNLFSRNLIDKRSKEFLTKQLEYERN   354
現代人        QWDRKDLGLCFDNCVTYFLQCLRTEKLENYFTPEFNLFSSNLIDKRSKEFLTKQLEYERN   354
              *** *:**:***:** :**:**  *:* ***** ***** :**** *****:********
共通          QWDxKxLGxCFDxCVTxFLxCLxxLxLxNYFTPxFNLFSxxLIDKxSKEFLxKQLEYERN

恆河獼猴      NEFPVFGEF        367
東非狒狒      NEFPVFGEF        363
白頰長臂猿    NEYPVFG…         363
白手長臂猿    NEYPVFGKC        365
蘇門答臘猩猩  NEFPVFDEF        364
黑猩猩        NEFPVFDEF        361
大猩猩        NEFPVFDEF        363
現代人        NEFPVFDEF        363
              **:***.
共通              NExPVFxxx
```

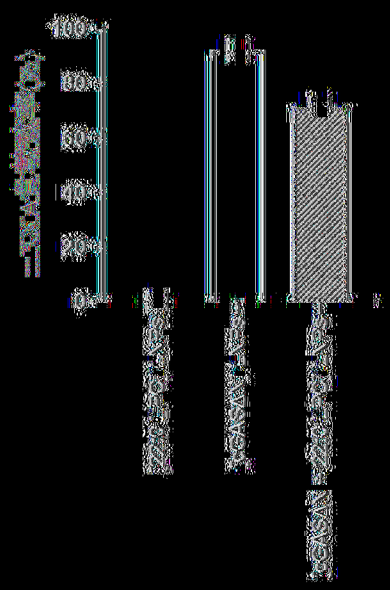
(圖1) (續)


細胞質
cGASAN
2'8'-
cGAMP
TBK1
IRF3
STING
IRF3
IRF3
IRF3
IRF3
IFNs
MHC, Costim
內質網

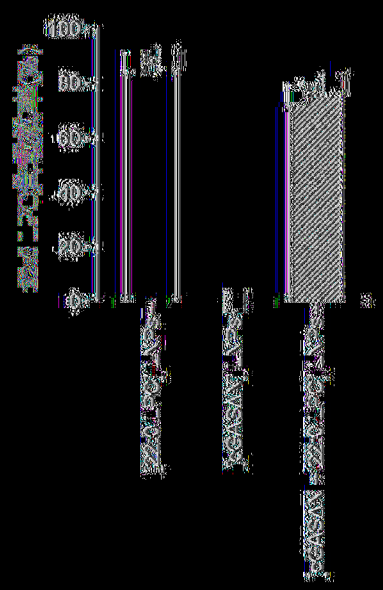
(圖2)



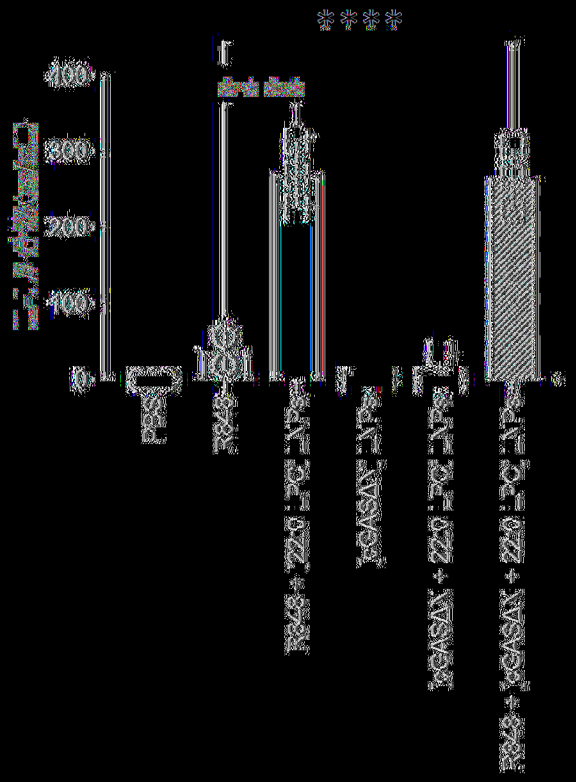
(圖3A)



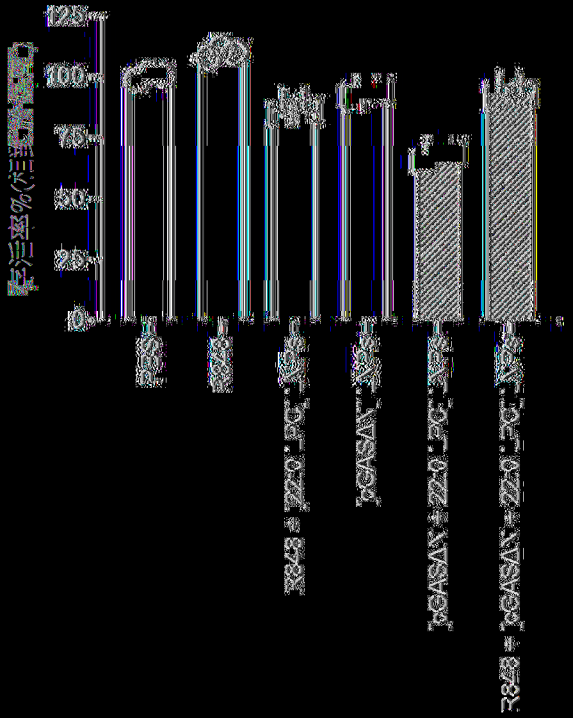
(圖3B)



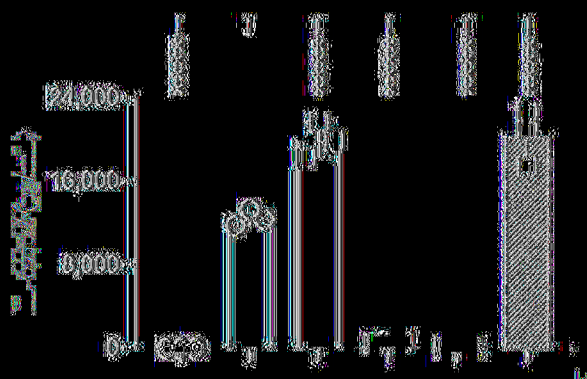
(圖3C)


400
300
200
100
0
PBS
R848
R848 + 22.0 μPC-NPs
pGASAX-NPs
pGASAX + 22.0 μPC-NPs
R848 + pGASAX + 22.0 μPC-NPs

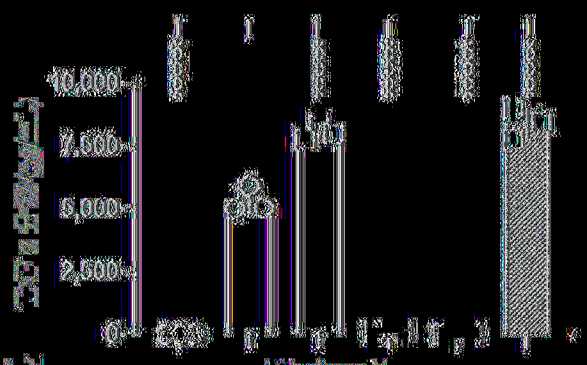
(圖4A)


125
100
75
50
25
0
PBS
R848
R848 + 22.0 μPC-NPs
pGASAX-NPs
pGASAX + 22.0 μPC-NPs
R848 + pGASAX + 22.0 μPC-NPs

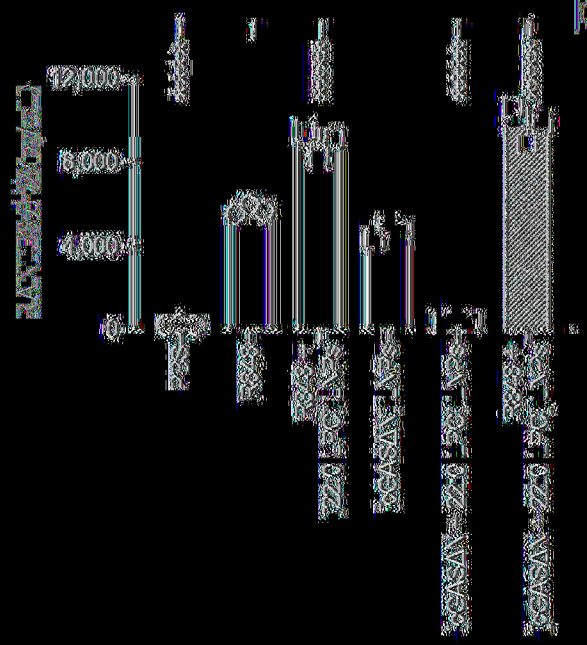
(圖4B)



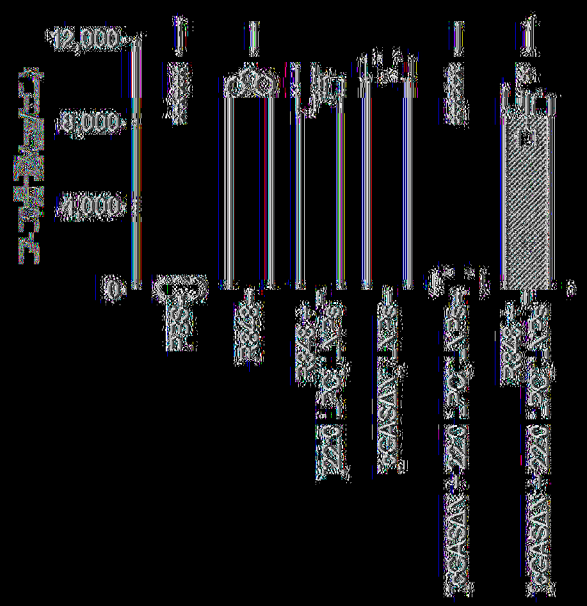
(圖5A)



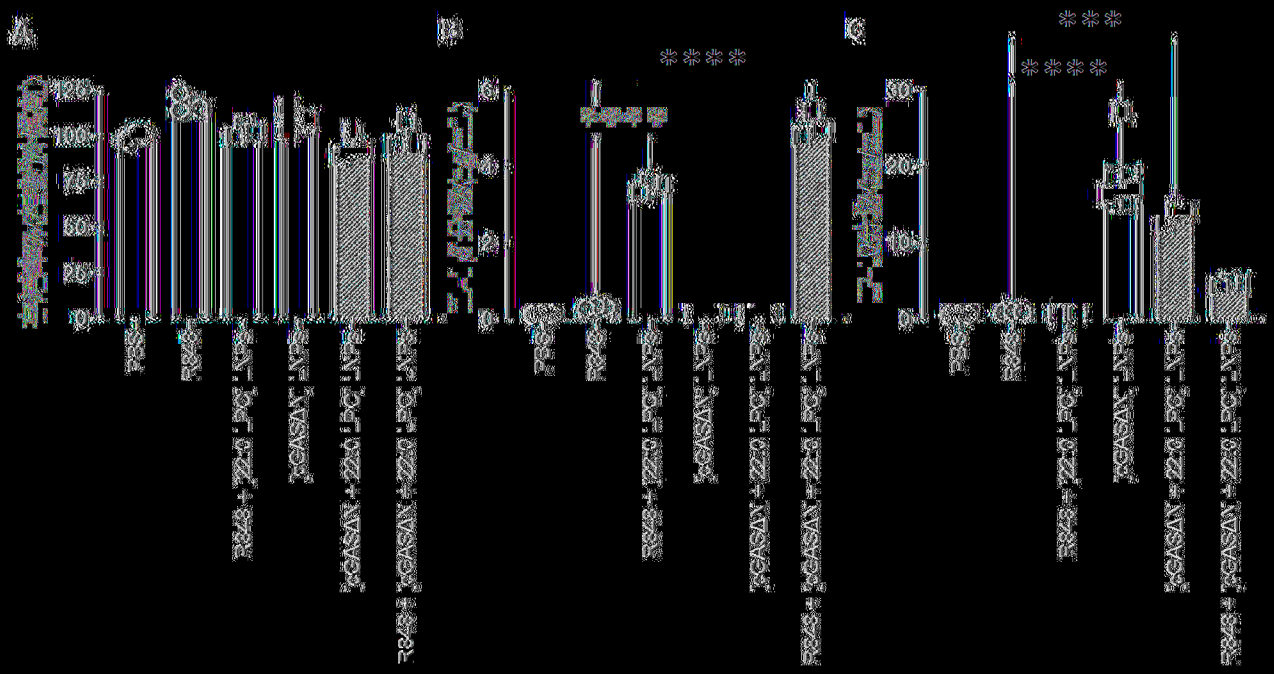
(圖5B)



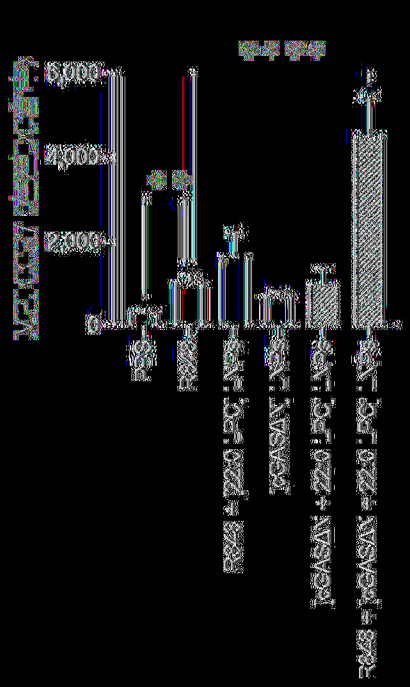
(圖5C)



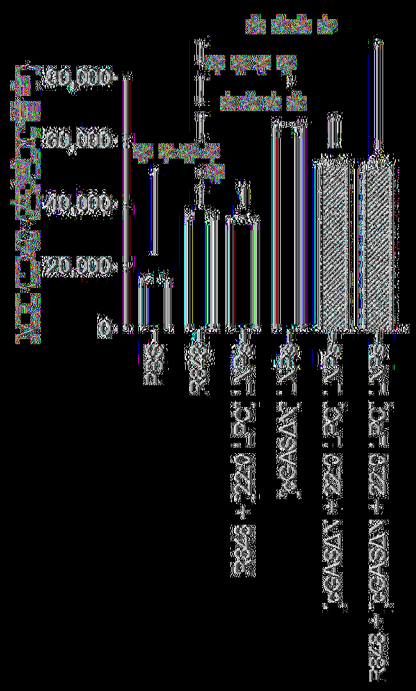
(圖5D)



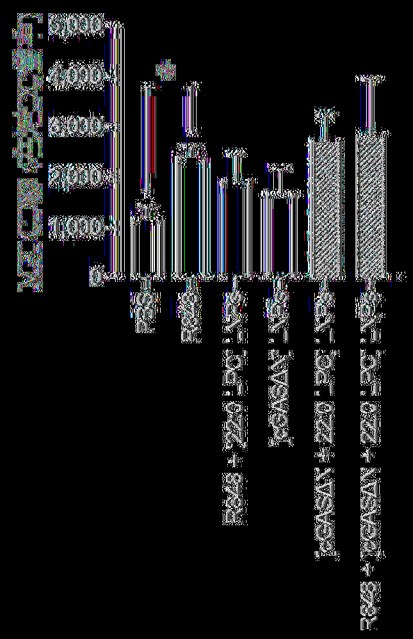
圖(6A)　　圖(6B)　　圖(6C)


6,000
4,000
2,000
0
R343 + 22.0 -PC -NPS
tcGASAN + 22.0 -PC -NPS
R343 + tcGASAN + 22.0 -PC -NPS

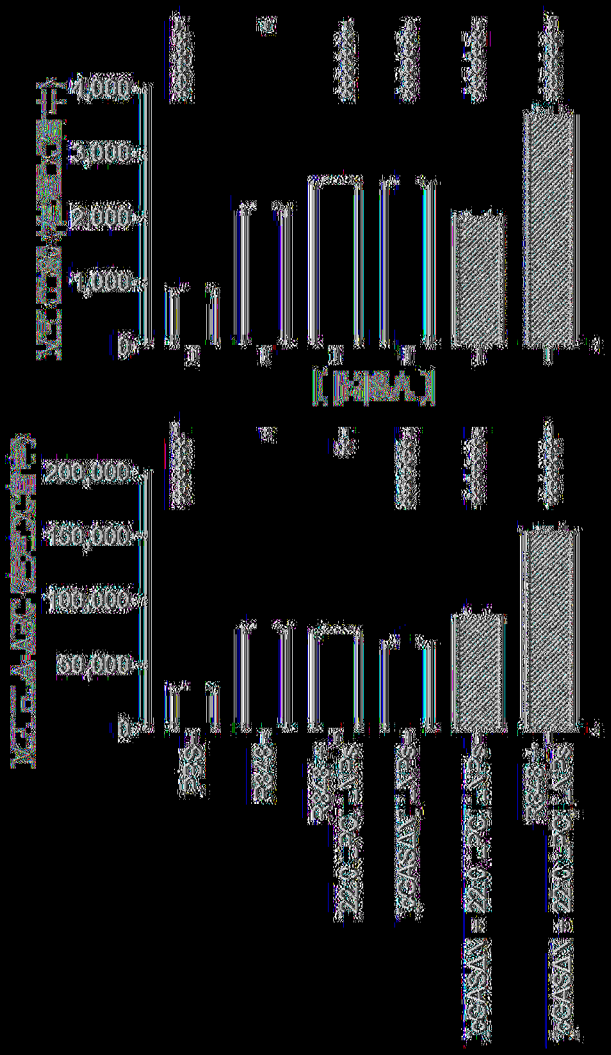
(圖7A)


80,000
60,000
40,000
20,000
0
R343 + 22.0 -PC -NPS
tcGASAN + 22.0 -PC -NPS
R343 + tcGASAN + 22.0 -PC -NPS

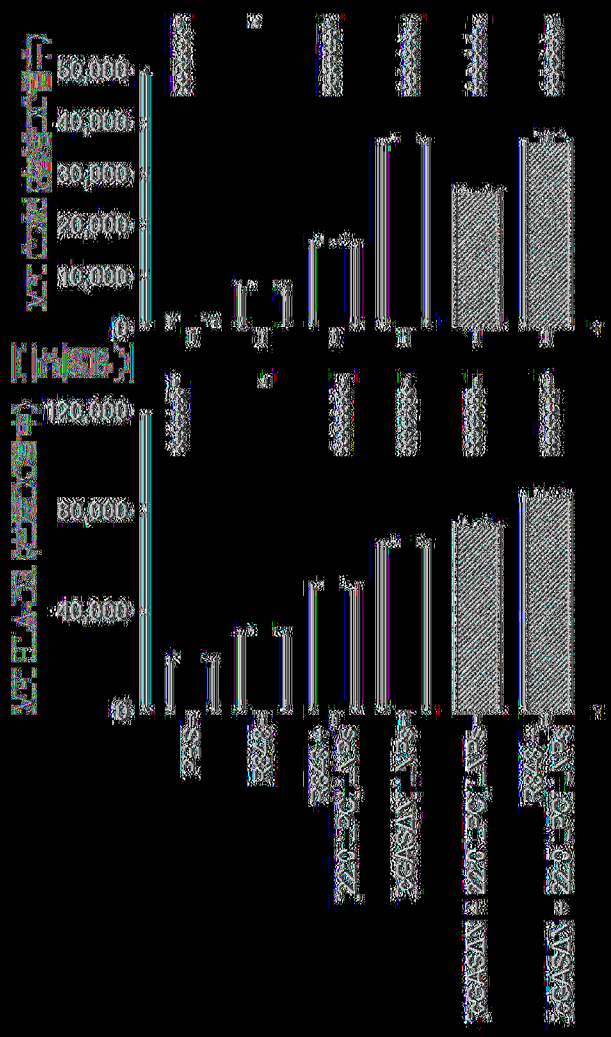
(圖7B)


5,000
4,000
3,000
2,000
1,000
0
R343 + 22.0 -PC -NPS
tcGASAN + 22.0 -PC -NPS
R343 + tcGASAN + 22.0 -PC -NPS

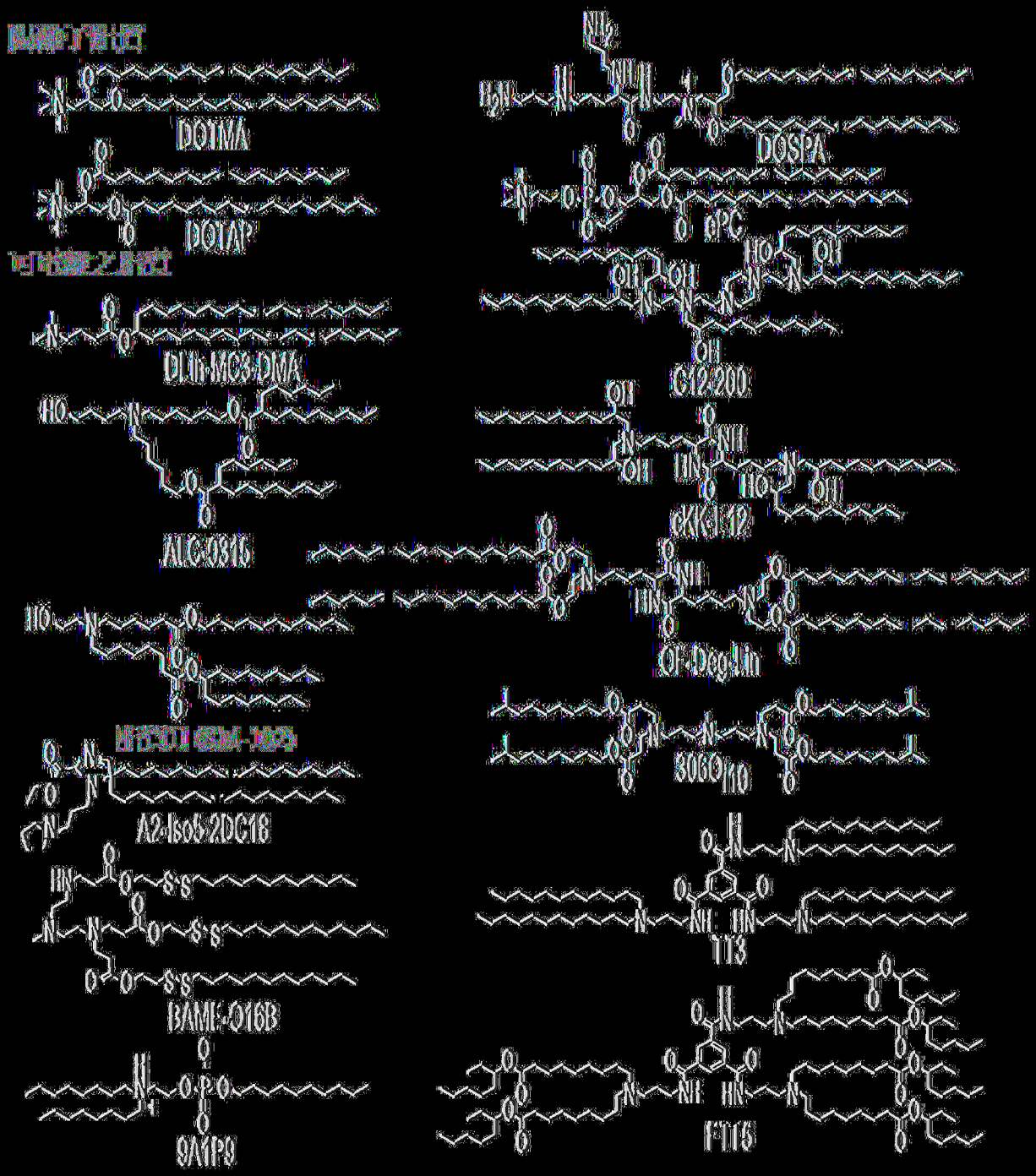
(圖7C)


4,000
3,000
2,000
1,000
0
200,000
150,000
100,000
50,000
0

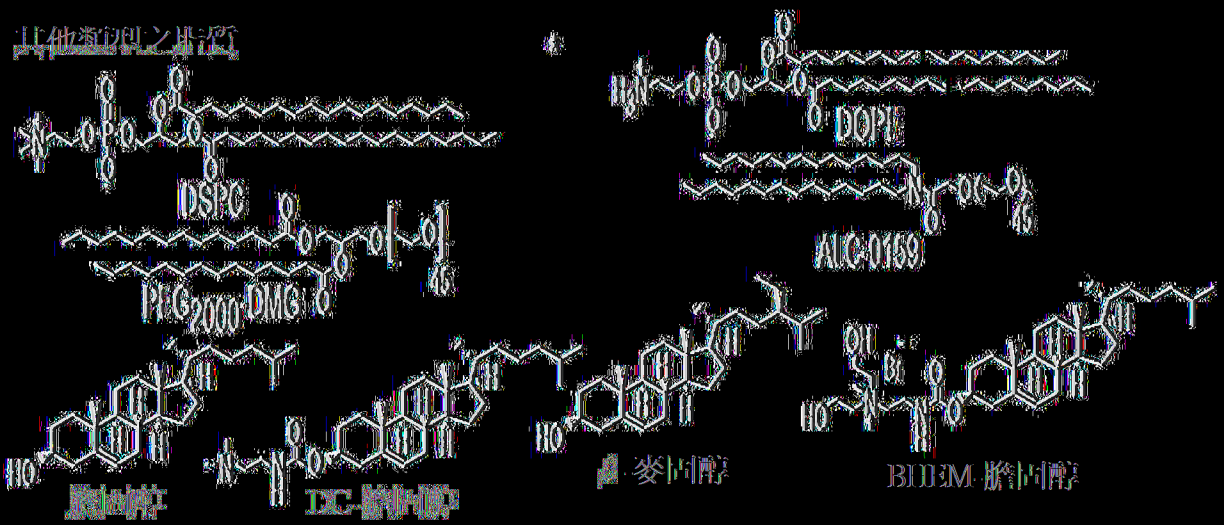
(圖8C)


50,000
40,000
30,000
20,000
10,000
0
120,000
80,000
40,000
0

(圖8D)


DOTMA
DOTAP
DLin-MC3-DMA
ALC-0315
A2-Iso5-2DC18
BAME-O16B
9A1P9
DOSPA
ePC
C12-200
cKK-E12
OF-Deg-Lin
306Oi10
TT3
FTT5

(附圖9A)



（圖9B）