(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 116650628 A
(43)申请公布日 2023.08.29

(21)申请号 202310285468.9

(22)申请日 2021.01.29

(30)优先权数据
62/968,818 2020.01.31 US
63/041,707 2020.06.19 US

(62)分案原申请数据
202180011999.8 2021.01.29

(71)申请人 基因泰克公司
地址 美国加利福尼亚州
申请人 生物泰克股份有限公司
豪夫迈·罗氏有限公司

(72)发明人 L·米勒 R·L·萨巴多
M·亚达夫 J·张 U·沙欣

(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494
专利代理师 封新琴

(51)Int.Cl.
A61K 39/00(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)

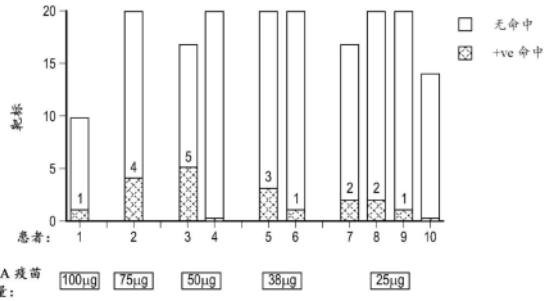
权利要求书1页 说明书111页
序列表（电子公布） 附图44页

(54)发明名称

用PD-1轴结合拮抗剂和RNA疫苗诱导新表位特异性T细胞的方法

(57)摘要

本公开提供了使用RNA疫苗或将RNA疫苗与PD-1轴结合拮抗剂联合使用在个体中诱导新表位特异性CD8+T细胞或在个体中诱导新表位特异性CD8+T细胞向肿瘤的运输的方法。本文还提供了用于在个体中诱导新表位特异性CD8+T细胞或在个体中诱导新表位特异性CD8+T细胞向肿瘤的运输的方法中使用的PD-1轴结合拮抗剂和RNA疫苗，所述RNA疫苗包括一种或多种多核苷酸，所述一种或多种多核苷酸编码由在获得自所述个体的肿瘤样本中存在的癌症特异性体细胞突变产生的一个或多个新表位。



CN 116650628 A

1.一种在患有肿瘤的个体中诱导新表位特异性CD8+T细胞的方法,其包括向所述个体施用有效量的RNA疫苗,其中所述RNA疫苗包含一种或多种多核苷酸,所述一种或多种多核苷酸编码由在获得自所述个体的肿瘤样本中存在的癌症特异性体细胞突变产生的一个或多个新表位,并且其中在施用所述RNA疫苗后获得自所述个体的外周血样品中约1%至约6%的CD8+T细胞为对由所述RNA疫苗的所述一种或多种多核苷酸编码的所述新表位中的至少一者具有特异性的新表位特异性CD8+T细胞。

2.根据权利要求1所述的方法,其中所述外周血样品包含约5%或约6%的对由所述RNA疫苗的所述一种或多种多核苷酸编码的所述新表位中的至少一者具有特异性的CD8+T细胞。

3.根据权利要求1或权利要求2所述的方法,其中通过离体ELISPOT或MHC多聚体分析在所述外周血样品中检测所述新表位特异性CD8+T细胞。

4.根据权利要求1至3中任一项所述的方法,其中与施用所述RNA疫苗之前相比,向所述个体施用所述RNA疫苗导致在所述个体的所述外周血中对新表位特异性CD4+T细胞的诱导,其中所述新表位特异性CD4+T细胞对由所述RNA疫苗的所述一种或多种多核苷酸编码的所述新表位中的至少一者具有特异性。

5.根据权利要求4所述的方法,其中通过离体ELISPOT分析在获得自所述个体的外周血样品中检测所述新表位特异性CD4+T细胞。

6.根据权利要求1至5中任一项所述的方法,其中与施用所述RNA疫苗之前相比,向多个个体施用所述RNA疫苗导致在所述多个个体中的至少约70%的个体的所述外周血中对新表位特异性CD4+或CD8+T细胞的诱导,其中所述新表位特异性CD4+或CD8+T细胞对由所述RNA疫苗的所述一种或多种多核苷酸编码的所述新表位中的至少一者具有特异性,并且其中通过离体ELISPOT或MHC多聚体分析来评定对新表位特异性CD4+或CD8+T细胞的所述诱导。

7.根据权利要求1至6中任一项所述的方法,其中与施用所述RNA疫苗之前的一种或多种炎症性细胞因子的水平相比,向所述个体施用所述RNA疫苗导致所述个体的所述外周血中的所述一种或多种炎症性细胞因子的所述水平升高。

8.根据权利要求7所述的方法,其中在施用所述RNA疫苗后约4小时至约6小时之间,所述个体的所述外周血中存在所述一种或多种炎症性细胞因子的所述水平的所述升高。

9.根据权利要求7或权利要求8所述的方法,其中所述一种或多种炎症性细胞因子选自由以下项组成的组:IFNγ、IFNα、IL-12和IL-6。

10.一种在个体中诱导新表位特异性CD8+T细胞向肿瘤的运输的方法,其包括向所述个体施用有效量的RNA疫苗,其中所述RNA疫苗包含一种或多种多核苷酸,所述一种或多种多核苷酸编码由在获得自所述个体的肿瘤样本中存在的癌症特异性体细胞突变产生的一个或多个新表位,并且其中在施用所述RNA疫苗后运输至所述肿瘤的所述新表位特异性CD8+T细胞对由所述RNA疫苗的所述一种或多种多核苷酸编码的所述新表位中的至少一者具有特异性。

用PD-1轴结合拮抗剂和RNA疫苗诱导新表位特异性T细胞的方法

[0001] 本申请是申请日为2021年1月29日、申请号为202180011999.8、发明名称为“用PD-1轴结合拮抗剂和RNA疫苗诱导新表位特异性T细胞的方法”的发明专利申请的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求2020年6月19日提交的美国临时申请63/041,707和2020年1月31日提交的美国临时申请62/968,818的权益,这些临时申请据此以其全文引用的方式并入。

技术领域

[0004] 本公开涉及在患有肿瘤的个体中诱导新表位特异性免疫应答的方法。

[0005] 以ASCII文本文件提交序列表

[0006] 以下提交的ASCII文本文件的内容全文以引用方式并入本文:序列表的计算机可读格式(CRF)(文件名:1463920501405EQLIST.TXT,记录日期:2021年1月22日,大小:41KB)。

背景技术

[0007] 调节免疫抑制性途径是近来癌症治疗的重大突破。靶向细胞毒性T淋巴细胞抗原4(CTLA-4,YERVOY/伊匹单抗(ipilimumab))、程序性细胞死亡蛋白1(PD-1,OPDIVO/纳武单抗(nivolumab)或KEYTRUDA/派姆单抗(pembrolizumab))和PD-L1(阿特珠单抗(atezolizumab))的检查点阻断抗体已经在多种肿瘤适应症患者中展现出可接受的毒性、有希望的临床应答、持久的疾病控制和改善的存活。但是,仅少数患者对免疫检查点阻断(ICB)疗法产生持续缓解,其余患者表现出原发性或继发性耐药性。

[0008] 典型地,肿瘤携带大量体细胞突变。继而,含有突变的肽的表达可能被适应性免疫系统识别为非自身新表位。识别到非自身抗原后,细胞毒性T细胞将触发免疫应答,导致显示非自身新表位的细胞凋亡。因此,正在开发和研究靶向免疫原性表位以活化免疫系统的治疗性疫苗以用于癌症治疗。但是,迄今为止,治疗性疫苗虽然很有前景,但过去一直未能达到预期。潜在原因之一是癌症特异性T细胞在长期暴露于癌症细胞期间变得功能耗竭。

[0009] 因此,可能需要采用两种或更多种靶向癌症免疫治疗(CIT)剂(例如一种检查点抑制剂和一种靶向免疫原性表位的治疗性疫苗)的联合治疗方案,以充分发挥宿主免疫系统的抗肿瘤潜力。

[0010] 因此,本领域需要诱导宿主免疫系统的抗肿瘤免疫应答的改进方法。

[0011] 本文所引用的所有参考文献,包括专利申请、专利公开和UniProtKB/Swiss-Prot登录号通过引用整体并入本文,如同个别参考文献各自特定地和个别地指示为通过引用并入一样。

发明内容

[0012] 本文提供了涉及用于治疗癌症的PD-1轴结合拮抗剂(例如,抗PD1或抗PD-L1抗体)和RNA疫苗的方法、试剂盒和用途。

[0013] 在一方面,本文提供了一种在患有肿瘤的个体中诱导新表位特异性CD8+T细胞的方法,其包括向该个体施用有效量的RNA疫苗,其中RNA疫苗包含一种或多种多核苷酸,所述一种或多种多核苷酸编码由存在于获得自该个体的肿瘤样本中的癌症特异性体细胞突变产生的一个或多个新表位,并且其中在施用RNA疫苗后获得自该个体的外周血样品中约1%至约6%的CD8+T细胞为对由RNA疫苗的一种或多种多核苷酸编码的新表位中的至少一者具有特异性的新表位特异性CD8+T细胞。在一些实施例中,外周血样品包含约5%或约6%的对由RNA疫苗的一种或多种多核苷酸编码的新表位中的至少一者具有特异性的CD8+T细胞。在一些实施例中,利用离体ELISPOT或MHC多聚体分析来检测外周血样品中的新表位特异性CD8+T细胞。在一些实施例中,与施用RNA疫苗之前相比,向个体施用RNA疫苗导致对该个体的外周血中的新表位特异性CD4+T细胞的诱导,其中新表位特异性CD4+T细胞对由RNA疫苗的一种或多种多核苷酸编码的新表位中的至少一者具有特异性。在一些实施例中,利用离体ELISPOT分析来检测获得自个体的外周血样品中的新表位特异性CD4+T细胞。在一些实施例中,与施用RNA疫苗之前相比,向多个个体施用RNA疫苗导致在所述多个个体中的至少约70%的个体的外周血中诱导新表位特异性CD4+或CD8+T细胞,其中新表位特异性CD4+或CD8+T细胞对由RNA疫苗的一种或多种多核苷酸编码的新表位中的至少一者具有特异性,并且其中利用离体ELISPOT或MHC多聚体分析来评定对新表位特异性CD4+或CD8+T细胞的诱导。在一些实施例中,与施用RNA疫苗之前的一种或多种炎症性细胞因子的水平相比,向个体施用RNA疫苗导致该个体的外周血中的所述一种或多种炎症性细胞因子的水平升高。在一些实施例中,在施用RNA疫苗后约4小时至约6小时之间,个体的外周血中存在所述一种或多种炎症性细胞因子的水平的升高。在一些实施例中,所述一种或多种炎症性细胞因子选自IFNγ、IFNα、IL-12或IL-6。

[0014] 在另一方面,本文提供了一种在患有肿瘤的个体中诱导新表位特异性CD8+T细胞的方法,其包括向该个体施用有效量的RNA疫苗,其中RNA疫苗包含一种或多种多核苷酸,所述一种或多种多核苷酸编码由存在于获得自该个体的肿瘤样本中的癌症特异性体细胞突变产生的一个或多个新表位,并且其中在施用RNA疫苗后获得自该个体的外周血样品中至少约1%的CD8+T细胞为对由RNA疫苗的一种或多种多核苷酸编码的新表位中的至少一者具有特异性的新表位特异性CD8+T细胞。

[0015] 在另一方面,本文提供了一种在个体中诱导新表位特异性CD8+T细胞向肿瘤的运输的方法,其包括向该个体施用有效量的RNA疫苗,其中RNA疫苗包含一种或多种多核苷酸,所述一种或多种多核苷酸编码由存在于获得自该个体的肿瘤样本中的癌症特异性体细胞突变产生的一个或多个新表位,并且其中在施用RNA疫苗后运输至肿瘤的新表位特异性CD8+T细胞对由RNA疫苗的一种或多种多核苷酸编码的新表位中的至少一者具有特异性。

[0016] 在一些实施例中,其可与前述实施例中的任一者组合,新表位特异性CD8+T细胞具有记忆表型。在一些实施例中,具有记忆表型的新表位特异性CD8+T细胞为效应记忆T细胞(T_{em})。在一些实施例中,效应记忆T细胞(T_{em})为CD45RO阳性和CCR7阴性。在一些实施例中,新表位特异性CD8+T细胞为PD-1+。

[0017] 在一些实施例中,个体患有具有低至中等突变负荷的肿瘤。在一些实施例中,个体具有低肿瘤负荷。

[0018] 在一些实施例中,其可与前述实施例中的任一者组合,肿瘤具有低或阴性PD-L1表

达。在一些实施例中,获得自肿瘤的样品中的少于5%的肿瘤细胞表达PD-L1。在一些实施例中,获得自肿瘤的样品中的少于5%的免疫细胞表达PD-L1。在一些实施例中,使用免疫组织化学确定获得自肿瘤的样品中表达PD-L1的肿瘤细胞或免疫细胞的百分比。

[0019] 在一些实施例中,其可与前述实施例中的任一者组合,RNA疫苗的施用导致个体中的完全缓解(CR)或部分缓解(PR)。

[0020] 在一些实施例中,其可与前述实施例中的任一者组合,个体患有局部晚期或转移性实体瘤或者具有一种或多种转移性复发。在一些实施例中,肿瘤为非小细胞肺癌(NSCLC)、膀胱、肾、头颈部、肉瘤、乳腺、黑素瘤、前列腺、卵巢、胃、肝、尿路上皮、结肠、肾脏、子宫颈、梅克尔细胞癌(MCC)、子宫内膜、软组织肉瘤、食管、食管胃交界部、骨肉瘤、甲状腺或结直肠肿瘤。在一些实施例中,乳腺肿瘤为三阴性乳腺癌(TNBC)肿瘤。

[0021] 在一些实施例中,肿瘤为尿路上皮肿瘤,并且向多个个体施用RNA疫苗导致所述多个个体中至少约10%的个体中的客观缓解。在一些实施例中,肿瘤为肾肿瘤,并且向多个个体施用RNA疫苗导致所述多个个体中至少约22%的个体中的客观缓解。在一些实施例中,肿瘤为黑素瘤肿瘤,并且向多个个体施用RNA疫苗导致所述多个个体中至少约30%的个体中的客观缓解。在一些实施例中,肿瘤为TNBC肿瘤,并且向多个个体施用RNA疫苗导致所述多个个体中至少约4%的个体中的客观缓解。在一些实施例中,肿瘤为NSCLC肿瘤,并且向多个个体施用RNA疫苗导致所述多个个体中至少约10%的个体中的客观缓解。

[0022] 在一些实施例中,肿瘤为之前未接受过检查点抑制剂治疗的尿路上皮肿瘤,并且向多个个体施用RNA疫苗导致所述多个个体中至少约10%的个体中的客观缓解。在一些实施例中,肿瘤为之前未接受过检查点抑制剂治疗的肾肿瘤,并且向多个个体施用RNA疫苗导致所述多个个体中至少约22%的个体中的客观缓解。在一些实施例中,肿瘤为之前未接受过检查点抑制剂治疗的黑素瘤肿瘤,并且向多个个体施用RNA疫苗导致所述多个个体中至少约30%的个体中的客观缓解。在一些实施例中,肿瘤为之前未接受过检查点抑制剂治疗的TNBC肿瘤,并且向多个个体施用RNA疫苗导致所述多个个体中至少约4%的个体中的客观缓解。在一些实施例中,肿瘤为之前未接受过检查点抑制剂治疗的NSCLC肿瘤,并且向多个个体施用RNA疫苗导致所述多个个体中至少约10%的个体中的客观缓解。

[0023] 在一些实施例中,其可与前述实施例中的任一者组合,在施用RNA疫苗之前,个体已经接受过一种或多种癌症疗法或3种与5种之间的癌症疗法的治疗。在一些实施例中,在施用RNA疫苗之前,个体已经接受过检查点抑制剂疗法的治疗。在一些实施例中,在施用RNA疫苗之前,个体尚未接受过检查点抑制剂疗法的治疗。在一些实施例中,在施用RNA疫苗之前,个体已经接受过约1种至约17种之间或约1种至约9种之间的在先全身性癌症疗法的治疗。

[0024] 在一些实施例中,其可与前述实施例中的任一者组合,RNA疫苗包含一种或多种多核苷酸,所述一种或多种多核苷酸编码10至20个由存在于肿瘤样本中的癌症特异性体细胞突变产生的新表位。

[0025] 在一些实施例中,其可与前述实施例中的任一者组合,RNA疫苗被配制在脂质体复合物纳米颗粒或脂质体中。在一些实施例中,脂质体复合物纳米颗粒或脂质体包含一种或多种脂质,所述一种或多种脂质形成包封RNA疫苗的RNA的多层结构。在一些实施例中,所述一种或多种脂质包含至少一种阳离子脂质和至少一种辅助脂质。在一些实施例中,所述一

种或多种脂质包含(R)-N,N,N-三甲基-2,3-二油酰氧基-1-丙铵氯化物(DOTMA)和1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DOPE)。在一些实施例中,在生理pH,脂质体的正电荷与负电荷的总电荷比为1.3:2(0.65)。

[0026] 在一些实施例中,其可与前述实施例中的任一者组合,RNA疫苗以约15μg、约25μg、约38μg、约50μg、约75μg或约100μg的剂量施用于个体。在一些实施例中,RNA疫苗静脉内施用于个体。

[0027] 在一些实施例中,其可与前述实施例中的任一者组合,RNA疫苗以7天或1周的间隔施用于个体。在一些实施例中,RNA疫苗以14天或2周的间隔施用于个体。在一些实施例中,RNA疫苗施用于个体达12周或84天。

[0028] 在一些实施例中,其可与前述实施例中的任一者组合,RNA疫苗以四个21天周期施用于个体,其中RNA疫苗在第1周期的第1天、第8天和第15天;第2周期的第1天、第8天和第15天;第3周期的第1天和第15天;以及第4周期的第1天施用于个体。

[0029] 在一些实施例中,其可与前述实施例中的任一者组合,RNA疫苗以21天周期施用于个体,其中RNA疫苗在第1周期的第1天、第8天和第15天;第2周期的第1天、第8天和第15天;第3周期的第1天和第15天;以及第7周期的第1天施用于个体。在一些实施例中,本文提供的方法进一步包括在第13周期的第1天并且在之后每24周或168天施用RNA疫苗。在一些实施例中,RNA疫苗的施用持续直至个体发生疾病进展为止。

[0030] 在一些实施例中,其可与前述实施例中的任一者组合,RNA疫苗以21天周期施用于个体,其中RNA疫苗在第2周期的第1天、第8天和第15天;第3周期的第1天和第15天;以及第7周期的第1天施用于个体。在一些实施例中,本文提供的方法进一步包括在第13周期的第1天并且在之后每24周或168天施用RNA疫苗。在一些实施例中,RNA疫苗的施用持续直至个体发生疾病进展为止。

[0031] 在一些实施例中,RNA疫苗在诱导期和该诱导期之后的维持期施用于个体,其中RNA疫苗在诱导期期间以1周或2周的间隔施用于个体,并且其中RNA疫苗在维持期期间以24周的间隔施用于个体。在一些实施例中,RNA疫苗在诱导期和该诱导期之后的维持期施用于个体,其中RNA疫苗在诱导期期间以7天或14天的间隔施用于个体,并且其中RNA疫苗在维持期期间以168天的间隔施用于个体。在一些实施例中,RNA疫苗在诱导期和该诱导期后的维持期施用于个体,其中RNA疫苗在诱导期期间以四个21天周期施用于个体,其中在诱导期期间,RNA疫苗在第1周期的第1天、第8天和第15天;第2周期的第1天、第8天和第15天;第3周期的第1天和第15天;以及第4周期的第1天施用于个体;并且其中在维持期期间,RNA疫苗在第5周期的第1天施用于个体并且在之后每24周或168天施用一次。在一些实施例中,诱导期包括施用至多9次RNA疫苗。

[0032] 在一些实施例中,其可与前述实施例中的任一者组合,RNA疫苗在诱导期和该诱导期后的维持期施用于个体,其中RNA疫苗以21天周期施用于个体;其中,在诱导期期间,RNA疫苗在第1周期的第1天、第8天和第15天;第2周期的第1天、第8天和第15天;第3周期的第1天和第15天;以及第7周期的第1天施用于个体;并且其中,在维持期期间,RNA疫苗在第13周期的第1天施用于个体并且在之后每24周或168天施用一次。在一些实施例中,诱导期包括施用至多9次RNA疫苗。在一些实施例中,维持期持续直至个体发生疾病进展为止。

[0033] 在一些实施例中,其可与前述实施例中的任一者组合,RNA疫苗在诱导期和该诱导

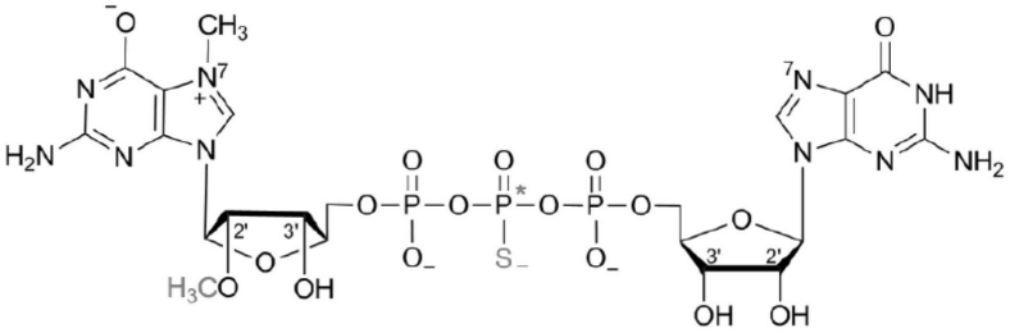
期后的维持期施用于个体，其中RNA疫苗以21天周期施用于个体；其中，在诱导期期间，RNA疫苗在第2周期的第1天、第8天和第15天；第3周期的第1天和第15天；以及第7周期的第1天施用于个体；并且其中，在维持期期间，RNA疫苗在第13周期的第1天施用于个体并且在之后每24周或168天施用一次。在一些实施例中，诱导期包括6剂RNA疫苗。在一些实施例中，维持期持续直至个体发生疾病进展为止。

[0034] 在一些实施例中，其可与前述实施例中的任一者组合，RNA疫苗包含RNA分子，该RNA分子在5'→3'方向上包含：(1)5'帽；(2)5'非翻译区(UTR)；(3)编码分泌性信号肽的多核苷酸序列；(4)编码由存在于肿瘤样本中的癌症特异性体细胞突变产生的一个或多个新表位的多核苷酸序列；(5)编码主要组织相容性复合物(MHC)分子的跨膜和胞质结构域的至少一部分的多核苷酸序列；(6)3'UTR，其包含：(a)分裂的氨基末端增强子(AES)mRNA的3′非翻译区或其片段；和(b)线粒体编码的12S RNA的非编码RNA或其片段；以及(7)poly(A)序列。在一些实施例中，RNA分子进一步包含编码氨基酸接头的多核苷酸序列；其中编码氨基酸接头的多核苷酸序列与一个或多个新表位中的第一个形成第一接头-新表位模块；并且其中在5'→3'方向上，形成第一接头-新表位模块的多核苷酸序列在编码分泌性信号肽的多核苷酸序列与编码MHC分子的跨膜和胞质结构域的至少一部分的多核苷酸序列之间。在一些实施例中，氨基酸接头包含序列GGSGGGGSGG(SEQ ID NO:39)。在一些实施例中，编码氨基酸接头的多核苷酸序列包含序列GGCGGCUCUGGAGGAGGCGGCUCCGGAGGC(SEQ ID NO:37)。

[0035] 在一些实施例中，其可与前述实施例中的任一者组合，RNA分子在5'→3'方向上进一步包含：至少第二接头-表位模块，其中所述至少第二接头-表位模块包含编码氨基酸接头的多核苷酸序列和编码新表位的多核苷酸序列；其中在5'→3'方向上，形成第二接头-新表位模块的多核苷酸序列在编码第一接头-新表位模块的新表位的多核苷酸序列与编码MHC分子的跨膜和胞质结构域的至少一部分的多核苷酸序列之间；并且其中第一接头-表位模块的新表位不同于第二接头-表位模块的新表位。在一些实施例中，RNA分子包含5个接头-表位模块，并且其中5个接头-表位模块各自编码不同的新表位。在一些实施例中，RNA分子包含10个接头-表位模块，并且其中10个接头-表位模块各自编码不同的新表位。在一些实施例中，RNA分子包含20个接头-表位模块，并且其中20个接头-表位模块各自编码不同的新表位。

[0036] 在一些实施例中，其可与前述实施例中的任一者组合，RNA分子进一步包含编码氨基酸接头的第二多核苷酸序列，其中编码氨基酸接头的第二多核苷酸序列在编码3'方向上最远的新表位的多核苷酸序列与编码MHC分子的跨膜和胞质结构域的至少一部分的多核苷酸序列之间。

[0037] 在一些实施例中，其可与前述实施例中的任一者组合，5'帽包含以下结构的D1非对映异构体：

[0038] 

[0039] 在一些实施例中,其可与前述实施例中的任一者组合,5'UTR包含序列UUCUUCUGG UCCCCACAGACUCAGAGAGAACCCGCCACC(SEQ ID NO:23)。在一些实施例中,5′UTR包含序列 GGCGAACUAGUAUUCUU CUGGUCCCCACAGACUCAGAGAGAACCCGCCACC(SEQ ID NO:21)。

[0040] 在一些实施例中,其可与前述实施例中的任一者组合,分泌性信号肽包含氨基酸序列MRVMAPRTLILLLSGALALTETWAGS(SEQ ID NO:27)。在一些实施例中,编码分泌性信号肽的多核苷酸序列包含序列AUGAGAGUGAUGGCCCCCAGAACCCUGAUCCUGCUGCUGUCUGGCG CCCUGGC CCUGACAGAGACAUGGGCCGGAAGC(SEQ ID NO:25)。

[0041] 在一些实施例中,其可与前述实施例中的任一者组合,MHC分子的跨膜和胞质结构域的至少一部分包含氨基酸序列IVGIVAGLAVLAVVVIGAV VATVMCRRKSSGGKGGSYSQAASSDSAQ GSDVSLTA(SEQ ID NO:30)。在一些实施例中,编码MHC分子的跨膜和胞质结构域的至少一部分的多核苷酸序列包含序列AUCGUGGGAAUUGUGGCAGGACUGGCAGUGCUGGCCGUGGUGGUGAUCGGAG CCGUGGUGGCUACCGUGAUGUGCAGACGGAAGUCCAGCGGAGGCAAGGGCGGCAGCUACAGCCAGGCCGCCAGCUC UGAUAGCGCCCAGGGCAGCGACGUGUCACUGACAGCC(SEQ ID NO:28)。

[0042] 在一些实施例中,其可与前述实施例中的任一者组合,AES mRNA的3′非翻译区包含序列CUGGUACUGCAUGCACGCAAUGCUAGCUGCCCC UUUCCCGUCCUGGGUACCCCGAGUCUCCCCCGACCU CGGGUCCCAGG UAUGCUCCCACCUCCACCUGCCCCACUCACCACCUCUGCUAGUUCCA GACACCUCC(SEQ ID NO:33)。在一些实施例中,线粒体编码的12S RNA的非编码RNA包含序列CAAGCACGCAGCAAUG CAGCUCAAAACGCUUAGCCUAGCCACACCCCCACGGGAAACAGCAGUGAUUAACCUUUAGCAAUAAACGAAAGUUU AACUAAGCUAUACUAACCCCAGGGUUGGUCAAUUUCGUGCCAGCCACACCG(SEQ ID NO:35)。在一些实施例中,3′UTR包含序列CUCGAGCUGGUACUGCAUGCACGCAAUGCUAGCUGCCCCUUUCCCGUCCUGGGUACCC CGAGUCUCCCCCGACCUCGGGUCCCAGGUAUGCUCCCACCUCCACCUGCCCCACUCACCACCUCUGCUAGUUCCAG ACACCUCCCAAGCACGCAGCAAUGCAGCUCAAAACGCUUAGCCUAGCCACACCCCCACGGGAAACAGCAGUGAUUA ACCUUUAGCAAUAAACGAAAGUUUAACUAAGCUAUACUAACCCCAGGGUUGGUCAAUUUCGUGCCAGCCACACCGA GACCUGGUCCAGAGUCGCUAGCCGCGUCGCU(SEQ ID NO:31)。在一些实施例中,poly(A)序列包含120个腺嘌呤核苷酸。

[0043] 在一些实施例中,其可与前述实施例中的任一者组合,RNA疫苗包含RNA分子,该RNA分子在5'→3'方向上包含:多核苷酸序列GGCGAA CUAGUAUUCUUCUGGUCCCCACAGACUCAGA GAGAACCCGCCACCA UGAGAGUGAUGGCCCCCAGAACCCUGAUCCUGCUGCUGUCUGGCGC CCUGGCCCUGACAGAGACAUGGGCCGGAAGC(SEQ ID NO:19);编码由存在于肿瘤样本中的癌症特异性体细胞突变产生的一个或多个新表位的多核苷酸序列;以及多核苷酸序列 AUCGUGGGAAUUGUGGCAGGACU GGCAGUGCUGGCCGUGGUGGUGAUCGGAGCCGUGGUGGCUACCGUGAUGUGC AGACGGAAGUCCAGCGGAGGCAAGGGCGGCAGCUACAGCCAGGCCGCCAGCUCUGAUAGCGCCCAGGGCAGCGACG

UGUCACUGACAGCCUAGUAACUCGAGCUGGUACUGCAUGCACGCAAUGCUAGCUGCCCCUUUCCCGUCCUGGGUAC CCCGAGUCUCCCCCGACCUCGGGUCCCAGGUAUGCUCCCACCUCCACCUGCCCCACUCACCACCUCUGCUAGUUCC AGACACCUCCCAAGCACGCAGCAAUGCAGCUCAAAACGCUUAGCCUAGCCACACCCCCACGGGAAACAGCAGUGAU UAACCUUUAGCAAUAAACGAAAGUUUAACUAAGCUAUACUAACCCCAGGGUUGGUCAAUUUCGUGCCAGCCACACC GAGACCUGGUCCAGAGUCGCUAGCCGCGUCGCU(SEQ ID NO:20)。

[0044] 在一些实施例中,其可与前述实施例中的任一者组合,本文提供的方法进一步包括向个体施用PD-1轴结合拮抗剂。

[0045] 在一些实施例中,其可与前述实施例中的任一者组合,PD-1轴结合拮抗剂为PD-1结合拮抗剂。在一些实施例中,PD-1结合拮抗剂是抗PD-1抗体。在一些实施例中,抗PD-1抗体为纳武单抗或派姆单抗。

[0046] 在一些实施例中,其可与前述实施例中的任一者组合,PD-1轴结合拮抗剂为PD-L1结合拮抗剂。在一些实施例中,PD-L1结合拮抗剂是抗PD-L1抗体。在一些实施例中,抗PD-L1抗体为阿维单抗或德瓦鲁单抗。在一些实施例中,抗PD-L1抗体包含:(a)重链可变区(VH),该重链可变区包含:HVR-H1,其包含GFTFSDSWIH(SEQ ID NO:1)的氨基酸序列;HVR-2,其包含AWISPYGGSTYYADSVKG(SEQ ID NO:2)的氨基酸序列;和HVR-3,其包含氨基酸RHWPGGFDY(SEQ ID NO:3);以及(b)轻链可变区(VL),该轻链可变区包含:HVR-L1,其包含RASQDVSTAVA(SEQ ID NO:4)的氨基酸序列;HVR-L2,其包含SASFLYS(SEQ ID NO:5)的氨基酸序列;和HVR-L3,其包含QQYLYHPAT(SEQ ID NO:6)的氨基酸序列。在一些实施例中,抗PD-L1抗体包含重链可变区(V_H)和轻链可变区(V_L),该重链可变区包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列,该轻链可变区包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列。在一些实施例中,抗PD-L1抗体为阿特珠单抗。

[0047] 在一些实施例中,其可与前述实施例中的任一者组合,PD-1轴结合拮抗剂静脉内施用于个体。在一些实施例中,抗PD-L1抗体以约1200mg的剂量施用于个体。在一些实施例中,PD-1轴结合拮抗剂以21天或3周的间隔施用于个体。

[0048] 在一些实施例中,其可与前述实施例中的任一者组合,PD-1轴结合拮抗剂为阿特珠单抗,并且其中阿特珠单抗以21天周期施用于个体,其中阿特珠单抗在第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11和12周期中的每个周期的第1天施用。在一些实施例中,本文提供的方法进一步包括在第13周期的第1天并且在之后每3周或21天施用阿特珠单抗。在一些实施例中,阿特珠单抗的施用持续直至个体发生疾病进展为止。

[0049] 在一些实施例中,其可与前述实施例中的任一者组合,PD-1轴结合拮抗剂为阿特珠单抗,并且阿特珠单抗在诱导期期间和该诱导期后的维持期期间以21天周期施用于个体;其中,在诱导期期间,阿特珠单抗在第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11和12周期中的每个周期的第1天施用;并且其中,在诱导期后的维持期期间,阿特珠单抗在第13周期的第1天并且在之后每3周或21天施用。在一些实施例中,维持期持续直至个体发生疾病进展为止。

[0050] 在一些实施例中,其可与前述实施例中的任一者组合,个体为人。

[0051] 在另一方面,本文提供了一种用于在患有肿瘤的个体中诱导新表位特异性CD8+T细胞的方法中使用的RNA疫苗,所述方法包括向个体施用有效量的RNA疫苗,其中RNA疫苗包含一种或多种多核苷酸,所述一种或多种多核苷酸编码由存在于获得自个体的肿瘤样本中的癌症特异性体细胞突变产生的一个或多个新表位,并且其中在施用RNA疫苗后获得自个体的外周血样品中约1%至约6%的CD8+T细胞为对由RNA疫苗的一种或多种多核苷酸编码

的新表位中的至少一者具有特异性的新表位特异性CD8+T细胞。在一些实施例中，该方法进一步包括向个体施用PD-1轴结合拮抗剂。

[0052] 在另一方面，本文提供了一种用于在患有肿瘤的个体中诱导新表位特异性CD8+T细胞的方法中使用的RNA疫苗，所述方法包括向个体施用有效量的RNA疫苗，其中RNA疫苗包含一种或多种多核苷酸，所述一种或多种多核苷酸编码由存在于获得自个体的肿瘤样本中的癌症特异性体细胞突变产生的一个或多个新表位，并且其中在施用RNA疫苗后获得自个体的外周血样品中至少约1％的CD8+T细胞为对由RNA疫苗的一种或多种多核苷酸编码的新表位中的至少一者具有特异性的新表位特异性CD8+T细胞。在一些实施例中，该方法进一步包括向个体施用PD-1轴结合拮抗剂。

[0053] 在另一方面，本文提供了一种用于在个体中诱导新表位特异性CD8+T细胞向肿瘤的运输的方法中使用的RNA疫苗，所述方法包括向个体施用有效量的RNA疫苗，其中RNA疫苗包含一种或多种多核苷酸，所述一种或多种多核苷酸编码由存在于获得自个体的肿瘤样本中的癌症特异性体细胞突变产生的一个或多个新表位，并且其中在施用RNA疫苗后运输至肿瘤的新表位特异性CD8+T细胞对由RNA疫苗的一种或多种多核苷酸编码的新表位中的至少一者具有特异性。在一些实施例中，该方法进一步包括向个体施用PD-1轴结合拮抗剂。

[0054] 在另一方面，本文提供了一种用于在患有肿瘤的个体中诱导新表位特异性CD8+T细胞的方法中使用的PD-1轴结合拮抗剂，所述方法包括向个体施用有效量的PD-1轴结合拮抗剂和RNA疫苗，其中RNA疫苗包含一种或多种多核苷酸，所述一种或多种多核苷酸编码由存在于获得自个体的肿瘤样本中的癌症特异性体细胞突变产生的一个或多个新表位，并且其中在施用PD-1轴结合拮抗剂和RNA疫苗后获得自个体的外周血样品中约1％至约6％的CD8+T细胞为对由RNA疫苗的一种或多种多核苷酸编码的新表位中的至少一者具有特异性的新表位特异性CD8+T细胞。

[0055] 在另一方面，本文提供了一种用于在患有肿瘤的个体中诱导新表位特异性CD8+T细胞的方法中使用的PD-1轴结合拮抗剂，所述方法包括向个体施用有效量的PD-1轴结合拮抗剂和RNA疫苗，其中RNA疫苗包含一种或多种多核苷酸，所述一种或多种多核苷酸编码由存在于获得自个体的肿瘤样本中的癌症特异性体细胞突变产生的一个或多个新表位，并且其中在施用PD-1轴结合拮抗剂和RNA疫苗后获得自个体的外周血样品中至少约1％的CD8+T细胞为对由RNA疫苗的一种或多种多核苷酸编码的新表位中的至少一者具有特异性的新表位特异性CD8+T细胞。

[0056] 在另一方面，本文提供了一种用于在个体中诱导新表位特异性CD8+T细胞向肿瘤的运输的方法中使用的PD-1轴结合拮抗剂，所述方法包括向个体施用有效量的PD-1轴结合拮抗剂和RNA疫苗，其中RNA疫苗包含一种或多种多核苷酸，所述一种或多种多核苷酸编码由存在于获得自个体的肿瘤样本中的癌症特异性体细胞突变产生的一个或多个新表位，并且其中在施用PD-1轴结合拮抗剂和RNA疫苗后运输至肿瘤的新表位特异性CD8+T细胞对由RNA疫苗的一种或多种多核苷酸编码的新表位中的至少一者具有特异性。

[0057] 在另一方面，本文提供了一种用于在患有肿瘤的个体中诱导新表位特异性CD8+T细胞的方法中使用的RNA疫苗，所述方法包括向个体施用有效量的RNA疫苗，其中RNA疫苗包含一种或多种多核苷酸，所述一种或多种多核苷酸编码由存在于获得自个体的肿瘤样本中的癌症特异性体细胞突变产生的一个或多个新表位，其中在施用RNA疫苗后获得自个体的

外周血样品中约1％至约6％的CD8+T细胞为对由RNA疫苗的一种或多种多核苷酸编码的新表位中的至少一者具有特异性的新表位特异性CD8+T细胞，并且其中利用离体ELISPOT或MHC多聚体分析来检测外周血样品中的新表位特异性CD8+T细胞。

[0058] 在另一方面，本文提供了一种用于在患有肿瘤的个体中诱导新表位特异性CD8+T细胞的方法中使用的RNA疫苗，所述方法包括向个体施用有效量的RNA疫苗，其中RNA疫苗包含一种或多种多核苷酸，所述一种或多种多核苷酸编码由存在于获得自个体的肿瘤样本中的癌症特异性体细胞突变产生的一个或多个新表位，其中在施用RNA疫苗后获得自个体的外周血样品中约1％至约6％的CD8+T细胞为对由RNA疫苗的一种或多种多核苷酸编码的新表位中的至少一者具有特异性的新表位特异性CD8+T细胞，并且其中外周血样品包含约5％或约6％的对由RNA疫苗的一种或多种多核苷酸编码的新表位中的至少一者具有特异性的CD8+T细胞。

[0059] 在另一方面，本文提供了一种用于在患有肿瘤的个体中诱导新表位特异性CD8+T细胞的方法中使用的RNA疫苗，所述方法包括向个体施用有效量的RNA疫苗，其中RNA疫苗包含一种或多种多核苷酸，所述一种或多种多核苷酸编码由存在于获得自个体的肿瘤样本中的癌症特异性体细胞突变产生的一个或多个新表位，其中在施用RNA疫苗后获得自个体的外周血样品中约1％至约6％的CD8+T细胞为对由RNA疫苗的一种或多种多核苷酸编码的新表位中的至少一者具有特异性的新表位特异性CD8+T细胞，并且其中与施用RNA疫苗之前相比，向个体施用RNA疫苗导致在该个体中的外周血中诱导新表位特异性CD4+细胞，其中新表位特异性CD4+T细胞对由RNA疫苗的一种或多种多核苷酸编码的新表位中的至少一者具有特异性。

[0060] 在另一方面，本文提供了一种用于在患有肿瘤的个体中诱导新表位特异性CD8+T细胞的方法中使用的RNA疫苗，所述方法包括向个体施用有效量的RNA疫苗，其中RNA疫苗包含一种或多种多核苷酸，所述一种或多种多核苷酸编码由存在于获得自个体的肿瘤样本中的癌症特异性体细胞突变产生的一个或多个新表位，其中在施用RNA疫苗后获得自个体的外周血样品中约1％至约6％的CD8+T细胞为对由RNA疫苗的一种或多种多核苷酸编码的新表位中的至少一者具有特异性的新表位特异性CD8+T细胞，并且其中向多个个体施用RNA疫苗导致在所述多个个体中的至少约70％的个体的外周血中诱导新表位特异性CD4+或CD8+T细胞，其中新表位特异性CD4+或CD8+T细胞对由RNA疫苗的一种或多种多核苷酸编码的新表位中的至少一者具有特异性，并且其中利用离体ELISPOT或MHC多聚体分析来评定对新表位特异性CD4+或CD8+T细胞的诱导。

[0061] 在另一方面，本文提供了一种用于在患有肿瘤的个体中诱导新表位特异性CD8+T细胞的方法中使用的RNA疫苗，所述方法包括向个体施用有效量的RNA疫苗，其中RNA疫苗包含一种或多种多核苷酸，所述一种或多种多核苷酸编码由存在于获得自个体的肿瘤样本中的癌症特异性体细胞突变产生的一个或多个新表位，其中在施用RNA疫苗后获得自个体的外周血样品中约1％至约6％的CD8+T细胞为对由RNA疫苗的一种或多种多核苷酸编码的新表位中的至少一者具有特异性的新表位特异性CD8+T细胞，并且其中与施用RNA疫苗之前的一种或多种炎症性细胞因子的水平相比，向个体施用RNA疫苗导致该个体的外周血中的所述一种或多种炎症性细胞因子的水平升高。在一些实施例中，所述一种或多种炎症性细胞因子选自IFNγ、IFNα、IL-12或IL-6。

[0062] 在另一方面，本文提供了一种用于在患有肿瘤的个体中诱导新表位特异性CD8+T细胞的方法中使用的RNA疫苗，所述方法包括向个体施用有效量的RNA疫苗，其中RNA疫苗包含一种或多种多核苷酸，所述一种或多种多核苷酸编码由存在于获得自个体的肿瘤样本中的癌症特异性体细胞突变产生的一个或多个新表位，其中在施用RNA疫苗后获得自个体的外周血样品中约1％至约6％的CD8+T细胞为对由RNA疫苗的一种或多种多核苷酸编码的新表位中的至少一者具有特异性的新表位特异性CD8+T细胞，并且其中新表位特异性CD8+T细胞为效应记忆T细胞(T_{em})。

[0063] 在另一方面，本文提供了一种用于在患有肿瘤的个体中诱导新表位特异性CD8+T细胞的方法中使用的RNA疫苗，所述方法包括向个体施用有效量的RNA疫苗，其中RNA疫苗包含一种或多种多核苷酸，所述一种或多种多核苷酸编码由存在于获得自个体的肿瘤样本中的癌症特异性体细胞突变产生的一个或多个新表位，其中在施用RNA疫苗后获得自个体的外周血样品中约1％至约6％的CD8+T细胞为对由RNA疫苗的一种或多种多核苷酸编码的新表位中的至少一者具有特异性的新表位特异性CD8+T细胞，并且其中新表位特异性CD8+T细胞为PD-1+。

[0064] 在另一方面，本文提供了一种用于在患有肿瘤的个体中诱导新表位特异性CD8+T细胞的方法中使用的RNA疫苗，所述方法包括向个体施用有效量的RNA疫苗，其中RNA疫苗包含一种或多种多核苷酸，所述一种或多种多核苷酸编码由存在于获得自个体的肿瘤样本中的癌症特异性体细胞突变产生的一个或多个新表位，其中在施用RNA疫苗后获得自个体的外周血样品中约1％至约6％的CD8+T细胞为对由RNA疫苗的一种或多种多核苷酸编码的新表位中的至少一者具有特异性的新表位特异性CD8+T细胞，并且其中RNA疫苗的施用导致个体中的完全缓解(CR)或部分缓解(PR)。

[0065] 在另一方面，本文提供了一种用于在患有肿瘤的个体中诱导新表位特异性CD8+T细胞的方法中使用的RNA疫苗，所述方法包括向个体施用有效量的RNA疫苗，其中RNA疫苗包含一种或多种多核苷酸，所述一种或多种多核苷酸编码由存在于获得自个体的肿瘤样本中的癌症特异性体细胞突变产生的一个或多个新表位，其中在施用RNA疫苗后获得自个体的外周血样品中约1％至约6％的CD8+T细胞为对由RNA疫苗的一种或多种多核苷酸编码的新表位中的至少一者具有特异性的新表位特异性CD8+T细胞，并且其中RNA疫苗以约15μg、约25μg、约38μg、约50μg、约75μg或约100μg的剂量施用于个体。

[0066] 在另一方面，本文提供了一种用于在患有肿瘤的个体中诱导新表位特异性CD8+T细胞的方法中使用的RNA疫苗，所述方法包括向个体施用有效量的RNA疫苗，其中RNA疫苗包含一种或多种多核苷酸，所述一种或多种多核苷酸编码由存在于获得自个体的肿瘤样本中的癌症特异性体细胞突变产生的一个或多个新表位，其中在施用RNA疫苗后获得自个体的外周血样品中约1％至约6％的CD8+T细胞为对由RNA疫苗的一种或多种多核苷酸编码的新表位中的至少一者具有特异性的新表位特异性CD8+T细胞，并且其中RNA疫苗以约15μg、约25μg、约38μg、约50μg、约75μg或约100μg的剂量施用于个体，其中RNA疫苗以21天周期施用于个体，其中RNA疫苗在第1周期的第1天、第8天和第15天；第2周期的第1天、第8天和第15天；第3周期的第1天和第15天；以及第7周期的第1天施用于个体；并且任选地在第13周期的第1天以及之后每24周或168天施用于个体。

[0067] 在另一方面，本文提供了一种用于在患有肿瘤的个体中诱导新表位特异性CD8+T

细胞的方法中使用的RNA疫苗，所述方法包括向个体施用有效量的RNA疫苗，其中RNA疫苗包含一种或多种多核苷酸，所述一种或多种多核苷酸编码由存在于获得自个体的肿瘤样本中的癌症特异性体细胞突变产生的一个或多个新表位，其中在施用RNA疫苗后获得自个体的外周血样品中约1％至约6％的CD8+T细胞为对由RNA疫苗的一种或多种多核苷酸编码的新表位中的至少一者具有特异性的新表位特异性CD8+T细胞，并且其中RNA疫苗以约15μg、约25μg、约38μg、约50μg、约75μg或约100μg的剂量施用于个体，其中RNA疫苗在诱导期和该诱导期后的维持期施用于个体，其中RNA疫苗以21天周期施用于个体；其中，在诱导期期间，RNA疫苗在第1周期的第1天、第8天和第15天；第2周期的第1天、第8天和第15天；第3周期的第1天和第15天；以及第7周期的第1天施用于个体；并且其中，在维持期期间，RNA疫苗在第13周期的第1天施用于个体并且在之后每24周或168天施用一次。

[0068] 在另一方面，本文提供了一种用于在个体中诱导新表位特异性CD8+T细胞向肿瘤的运输的方法中使用的RNA疫苗，所述方法包括向个体施用有效量的RNA疫苗，其中RNA疫苗包含一种或多种多核苷酸，所述一种或多种多核苷酸编码由存在于获得自个体的肿瘤样本中的癌症特异性体细胞突变产生的一个或多个新表位，其中在施用RNA疫苗后运输至肿瘤的新表位特异性CD8+T细胞对由RNA疫苗的一种或多种多核苷酸编码的新表位中的至少一者具有特异性，并且其中新表位特异性CD8+T细胞为效应记忆T细胞(T_{em})。

[0069] 在另一方面，本文提供了一种用于在个体中诱导新表位特异性CD8+T细胞向肿瘤的运输的方法中使用的RNA疫苗，所述方法包括向个体施用有效量的RNA疫苗，其中RNA疫苗包含一种或多种多核苷酸，所述一种或多种多核苷酸编码由存在于获得自个体的肿瘤样本中的癌症特异性体细胞突变产生的一个或多个新表位，其中在施用RNA疫苗后运输至肿瘤的新表位特异性CD8+T细胞对由RNA疫苗的一种或多种多核苷酸编码的新表位中的至少一者具有特异性，并且其中新表位特异性CD8+T细胞为PD-1+。

[0070] 在另一方面，本文提供了一种用于在个体中诱导新表位特异性CD8+T细胞向肿瘤的运输的方法中使用的RNA疫苗，所述方法包括向个体施用有效量的RNA疫苗，其中RNA疫苗包含一种或多种多核苷酸，所述一种或多种多核苷酸编码由存在于获得自个体的肿瘤样本中的癌症特异性体细胞突变产生的一个或多个新表位，其中在施用RNA疫苗后运输至肿瘤的新表位特异性CD8+T细胞对由RNA疫苗的一种或多种多核苷酸编码的新表位中的至少一者具有特异性，并且其中RNA疫苗的施用导致个体中的完全缓解(CR)或部分缓解(PR)。

[0071] 在另一方面，本文提供了一种用于在个体中诱导新表位特异性CD8+T细胞向肿瘤的运输的方法中使用的RNA疫苗，所述方法包括向个体施用有效量的RNA疫苗，其中RNA疫苗包含一种或多种多核苷酸，所述一种或多种多核苷酸编码由存在于获得自个体的肿瘤样本中的癌症特异性体细胞突变产生的一个或多个新表位，其中在施用RNA疫苗后运输至肿瘤的新表位特异性CD8+T细胞对由RNA疫苗的一种或多种多核苷酸编码的新表位中的至少一者具有特异性，并且其中RNA疫苗以约15μg、约25μg、约38μg、约50μg、约75μg或约100μg的剂量施用于个体。

[0072] 在另一方面，本文提供了一种用于在个体中诱导新表位特异性CD8+T细胞向肿瘤的运输的方法中使用的RNA疫苗，所述方法包括向个体施用有效量的RNA疫苗，其中RNA疫苗包含一种或多种多核苷酸，所述一种或多种多核苷酸编码由存在于获得自个体的肿瘤样本中的癌症特异性体细胞突变产生的一个或多个新表位，其中在施用RNA疫苗后运输至肿瘤

的新表位特异性CD8+T细胞对由RNA疫苗的一种或多种多核苷酸编码的新表位中的至少一者具有特异性，并且其中RNA疫苗以约15μg、约25μg、约38μg、约50μg、约75μg或约100μg的剂量施用于个体，其中RNA疫苗以21天周期施用于个体，其中RNA疫苗在第1周期的第1天、第8天和第15天；第2周期的第1天、第8天和第15天；第3周期的第1天和第15天；以及第7周期的第1天施用于个体；并且任选地在第13周期的第1天以及之后每24周或168天施用于个体。

[0073] 在另一方面，本文提供了一种用于在个体中诱导新表位特异性CD8+T细胞向肿瘤的运输的方法中使用的RNA疫苗，所述方法包括向个体施用有效量的RNA疫苗，其中RNA疫苗包含一种或多种多核苷酸，所述一种或多种多核苷酸编码由存在于获得自个体的肿瘤样本中的癌症特异性体细胞突变产生的一个或多个新表位，其中在施用RNA疫苗后运输至肿瘤的新表位特异性CD8+T细胞对由RNA疫苗的一种或多种多核苷酸编码的新表位中的至少一者具有特异性，并且其中RNA疫苗以约15μg、约25μg、约38μg、约50μg、约75μg或约100μg的剂量施用于个体，其中RNA疫苗在诱导期和该诱导期后的维持期施用于个体，其中RNA疫苗以21天周期施用于个体；其中，在诱导期期间，RNA疫苗在第1周期的第1天、第8天和第15天；第2周期的第1天、第8天和第15天；第3周期的第1天和第15天；以及第7周期的第1天施用于个体；并且其中，在维持期期间，RNA疫苗在第13周期的第1天施用于个体并且在之后每24周或168天施用一次。

[0074] 在前述方面中的任一者的一些实施例中，该方法进一步包括向个体施用PD-1轴结合拮抗剂。

[0075] 在另一方面，本文提供了一种用于在患有肿瘤的个体中诱导新表位特异性CD8+T细胞的方法中使用的PD-1轴结合拮抗剂，所述方法包括向个体施用有效量的PD-1轴结合拮抗剂和RNA疫苗，其中RNA疫苗包含一种或多种多核苷酸，所述一种或多种多核苷酸编码由存在于获得自个体的肿瘤样本中的癌症特异性体细胞突变产生的一个或多个新表位，其中在施用PD-1轴结合拮抗剂和RNA疫苗后获得自个体的外周血样品中约1％至约6％的CD8+T细胞为对由RNA疫苗的一种或多种多核苷酸编码的新表位中的至少一者具有特异性的新表位特异性CD8+T细胞，并且其中利用离体ELISPOT或MHC多聚体分析来检测外周血样品中的新表位特异性CD8+T细胞。

[0076] 在另一方面，本文提供了一种用于在患有肿瘤的个体中诱导新表位特异性CD8+T细胞的方法中使用的PD-1轴结合拮抗剂，所述方法包括向个体施用有效量的PD-1轴结合拮抗剂和RNA疫苗，其中RNA疫苗包含一种或多种多核苷酸，所述一种或多种多核苷酸编码由存在于获得自个体的肿瘤样本中的癌症特异性体细胞突变产生的一个或多个新表位，其中在施用PD-1轴结合拮抗剂和RNA疫苗后获得自个体的外周血样品中约1％至约6％的CD8+T细胞为对由RNA疫苗的一种或多种多核苷酸编码的新表位中的至少一者具有特异性的新表位特异性CD8+T细胞，并且其中外周血样品包含约5％或约6％的对由RNA疫苗的一种或多种多核苷酸编码的新表位中的至少一者具有特异性的CD8+T细胞。

[0077] 在另一方面，本文提供了一种用于在患有肿瘤的个体中诱导新表位特异性CD8+T细胞的方法中使用的PD-1轴结合拮抗剂，所述方法包括向个体施用有效量的PD-1轴结合拮抗剂和RNA疫苗，其中RNA疫苗包含一种或多种多核苷酸，所述一种或多种多核苷酸编码由存在于获得自个体的肿瘤样本中的癌症特异性体细胞突变产生的一个或多个新表位，其中在施用PD-1轴结合拮抗剂和RNA疫苗后获得自个体的外周血样品中约1％至约6％的CD8+T

细胞为对由RNA疫苗的一种或多种多核苷酸编码的新表位中的至少一者具有特异性的新表位特异性CD8+T细胞，并且其中与施用RNA疫苗之前相比，向个体施用PD-1轴结合拮抗剂和RNA疫苗导致在该个体中的外周血中诱导新表位特异性CD4+细胞，其中新表位特异性CD4+T细胞对由RNA疫苗的一种或多种多核苷酸编码的新表位中的至少一者具有特异性。

[0078] 在另一方面，本文提供了一种用于在患有肿瘤的个体中诱导新表位特异性CD8+T细胞的方法中使用的PD-1轴结合拮抗剂，所述方法包括向个体施用有效量的PD-1轴结合拮抗剂和RNA疫苗，其中RNA疫苗包含一种或多种多核苷酸，所述一种或多种多核苷酸编码由存在于获得自个体的肿瘤样本中的癌症特异性体细胞突变产生的一个或多个新表位，其中在施用PD-1轴结合拮抗剂和RNA疫苗后获得自个体的外周血样品中约1％至约6％的CD8+T细胞为对由RNA疫苗的一种或多种多核苷酸编码的新表位中的至少一者具有特异性的新表位特异性CD8+T细胞，并且其中与施用RNA疫苗之前相比，向多个个体施用PD-1轴结合拮抗剂和RNA疫苗导致在所述多个个体中的至少约70％的个体的外周血中诱导新表位特异性CD4+或CD8+T细胞，其中新表位特异性CD4+或CD8+T细胞对由RNA疫苗的一种或多种多核苷酸编码的新表位中的至少一者具有特异性，并且其中利用离体ELISPOT或MHC多聚体分析来评定对新表位特异性CD4+或CD8+T细胞的诱导。

[0079] 在另一方面，本文提供了一种用于在患有肿瘤的个体中诱导新表位特异性CD8+T细胞的方法中使用的PD-1轴结合拮抗剂，所述方法包括向个体施用有效量的PD-1轴结合拮抗剂和RNA疫苗，其中RNA疫苗包含一种或多种多核苷酸，所述一种或多种多核苷酸编码由存在于获得自个体的肿瘤样本中的癌症特异性体细胞突变产生的一个或多个新表位，其中在施用PD-1轴结合拮抗剂和RNA疫苗后获得自个体的外周血样品中约1％至约6％的CD8+T细胞为对由RNA疫苗的一种或多种多核苷酸编码的新表位中的至少一者具有特异性的新表位特异性CD8+T细胞，并且其中与施用RNA疫苗之前的一种或多种炎症性细胞因子的水平相比，向个体施用PD-1轴结合拮抗剂和RNA疫苗导致该个体的外周血中的所述一种或多种炎症性细胞因子的水平升高。在一些实施例中，所述一种或多种炎症性细胞因子选自IFNγ、IFNα、IL-12或IL-6。

[0080] 在另一方面，本文提供了一种用于在患有肿瘤的个体中诱导新表位特异性CD8+T细胞的方法中使用的PD-1轴结合拮抗剂，所述方法包括向个体施用有效量的PD-1轴结合拮抗剂和RNA疫苗，其中RNA疫苗包含一种或多种多核苷酸，所述一种或多种多核苷酸编码由存在于获得自个体的肿瘤样本中的癌症特异性体细胞突变产生的一个或多个新表位，其中在施用PD-1轴结合拮抗剂和RNA疫苗后获得自个体的外周血样品中约1％至约6％的CD8+T细胞为对由RNA疫苗的一种或多种多核苷酸编码的新表位中的至少一者具有特异性的新表位特异性CD8+T细胞，并且其中新表位特异性CD8+T细胞为效应记忆T细胞(T_{em})。

[0081] 在另一方面，本文提供了一种用于在患有肿瘤的个体中诱导新表位特异性CD8+T细胞的方法中使用的PD-1轴结合拮抗剂，所述方法包括向个体施用有效量的PD-1轴结合拮抗剂和RNA疫苗，其中RNA疫苗包含一种或多种多核苷酸，所述一种或多种多核苷酸编码由存在于获得自个体的肿瘤样本中的癌症特异性体细胞突变产生的一个或多个新表位，其中在施用PD-1轴结合拮抗剂和RNA疫苗后获得自个体的外周血样品中约1％至约6％的CD8+T细胞为对由RNA疫苗的一种或多种多核苷酸编码的新表位中的至少一者具有特异性的新表位特异性CD8+T细胞，并且其中新表位特异性CD8+T细胞为PD-1+。

[0082] 在另一方面，本文提供了一种用于在患有肿瘤的个体中诱导新表位特异性CD8+T细胞的方法中使用的PD-1轴结合拮抗剂，所述方法包括向个体施用有效量的PD-1轴结合拮抗剂和RNA疫苗，其中RNA疫苗包含一种或多种多核苷酸，所述一种或多种多核苷酸编码由存在于获得自个体的肿瘤样本中的癌症特异性体细胞突变产生的一个或多个新表位，其中在施用PD-1轴结合拮抗剂和RNA疫苗后获得自个体的外周血样品中约1％至约6％的CD8+T细胞为对由RNA疫苗的一种或多种多核苷酸编码的新表位中的至少一者具有特异性的新表位特异性CD8+T细胞，并且其中PD-1轴结合拮抗剂和RNA疫苗的施用导致个体中的完全缓解(CR)或部分缓解(PR)。

[0083] 在另一方面，本文提供了一种用于在患有肿瘤的个体中诱导新表位特异性CD8+T细胞的方法中使用的PD-1轴结合拮抗剂，所述方法包括向个体施用有效量的PD-1轴结合拮抗剂和RNA疫苗，其中RNA疫苗包含一种或多种多核苷酸，所述一种或多种多核苷酸编码由存在于获得自个体的肿瘤样本中的癌症特异性体细胞突变产生的一个或多个新表位，其中在施用PD-1轴结合拮抗剂和RNA疫苗后获得自个体的外周血样品中约1％至约6％的CD8+T细胞为对由RNA疫苗的一种或多种多核苷酸编码的新表位中的至少一者具有特异性的新表位特异性CD8+T细胞，其中PD-1轴结合拮抗剂为阿特珠单抗，其中阿特珠单抗以21天或3周的间隔以约1200mg的剂量施用于个体，并且其中RNA疫苗以21天周期以约15μg、约25μg、约38μg、约50μg、约75μg或约100μg的剂量施用于个体。

[0084] 在另一方面，本文提供了一种用于在患有肿瘤的个体中诱导新表位特异性CD8+T细胞的方法中使用的PD-1轴结合拮抗剂，所述方法包括向个体施用有效量的PD-1轴结合拮抗剂和RNA疫苗，其中RNA疫苗包含一种或多种多核苷酸，所述一种或多种多核苷酸编码由存在于获得自个体的肿瘤样本中的癌症特异性体细胞突变产生的一个或多个新表位，其中在施用PD-1轴结合拮抗剂和RNA疫苗后获得自个体的外周血样品中约1％至约6％的CD8+T细胞为对由RNA疫苗的一种或多种多核苷酸编码的新表位中的至少一者具有特异性的新表位特异性CD8+T细胞，其中PD-1轴结合拮抗剂为阿特珠单抗，其中阿特珠单抗以21天周期以约1200mg的剂量施用于个体，其中阿特珠单抗在第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11和12周期中的每个周期的第1天施用，并且任选地在第13周期的第1天并且在之后每3周或21天施用；并且其中RNA疫苗以约15μg、约25μg、约38μg、约50μg、约75μg或约100μg的剂量施用于个体，其中RNA疫苗以21天周期施用于个体；其中RNA疫苗在第1周期的第1天、第8天和第15天；第2周期的第1天、第8天和第15天；第3周期的第1天和第15天；以及第7周期的第1天施用于个体；并且任选地在第13周期的第1天并且在之后每24周或168天施用于个体。

[0085] 在另一方面，本文提供了一种用于在患有肿瘤的个体中诱导新表位特异性CD8+T细胞的方法中使用的PD-1轴结合拮抗剂，所述方法包括向个体施用有效量的PD-1轴结合拮抗剂和RNA疫苗，其中RNA疫苗包含一种或多种多核苷酸，所述一种或多种多核苷酸编码由存在于获得自个体的肿瘤样本中的癌症特异性体细胞突变产生的一个或多个新表位，其中在施用PD-1轴结合拮抗剂和RNA疫苗后获得自个体的外周血样品中约1％至约6％的CD8+T细胞为对由RNA疫苗的一种或多种多核苷酸编码的新表位中的至少一者具有特异性的新表位特异性CD8+T细胞，其中PD-1轴结合拮抗剂为阿特珠单抗，其中阿特珠单抗在诱导期期间和该诱导期后的维持期期间以21天周期以约1200mg的剂量施用于个体，其中，在诱导期期间，阿特珠单抗在第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11和12周期中的每个周期的第1天施用，并且

其中,在诱导期后的维持期期间,阿特珠单抗在第13周期的第1天并且在之后每3周或21天施用;并且其中RNA疫苗以约15μg、约25μg、约38μg、约50μg、约75μg或约100μg的剂量施用于个体,其中RNA疫苗在诱导期和该诱导期后的维持期施用于个体,其中RNA疫苗以21天周期施用于个体;其中,在诱导期期间,RNA疫苗在第1周期的第1天、第8天和第15天;第2周期的第1天、第8天和第15天;第3周期的第1天和第15天;以及第7周期的第1天施用于个体;并且其中,在维持期期间,RNA疫苗在第13周期的第1天施用于个体并且在之后每24周或168天施用一次。

[0086] 在另一方面,本文提供了一种用于在个体中诱导新表位特异性CD8+T细胞向肿瘤的运输的方法中使用的PD-1轴结合拮抗剂,所述方法包括向个体施用有效量的PD-1轴结合拮抗剂和RNA疫苗,其中RNA疫苗包含一种或多种多核苷酸,所述一种或多种多核苷酸编码由存在于获得自个体的肿瘤样本中的癌症特异性体细胞突变产生的一个或多个新表位,其中在施用PD-1轴结合拮抗剂和RNA疫苗后运输至肿瘤的新表位特异性CD8+T细胞对由RNA疫苗的一种或多种多核苷酸编码的新表位中的至少一者具有特异性,并且其中新表位特异性CD8+T细胞为效应记忆T细胞(T_{em})。

[0087] 在另一方面,本文提供了一种用于在个体中诱导新表位特异性CD8+T细胞向肿瘤的运输的方法中使用的PD-1轴结合拮抗剂,所述方法包括向个体施用有效量的PD-1轴结合拮抗剂和RNA疫苗,其中RNA疫苗包含一种或多种多核苷酸,所述一种或多种多核苷酸编码由存在于获得自个体的肿瘤样本中的癌症特异性体细胞突变产生的一个或多个新表位,其中在施用PD-1轴结合拮抗剂和RNA疫苗后运输至肿瘤的新表位特异性CD8+T细胞对由RNA疫苗的一种或多种多核苷酸编码的新表位中的至少一者具有特异性,并且其中新表位特异性CD8+T细胞为PD-1+。

[0088] 在另一方面,本文提供了一种用于在个体中诱导新表位特异性CD8+T细胞向肿瘤的运输的方法中使用的PD-1轴结合拮抗剂,所述方法包括向个体施用有效量的PD-1轴结合拮抗剂和RNA疫苗,其中RNA疫苗包含一种或多种多核苷酸,所述一种或多种多核苷酸编码由存在于获得自个体的肿瘤样本中的癌症特异性体细胞突变产生的一个或多个新表位,其中在施用PD-1轴结合拮抗剂和RNA疫苗后运输至肿瘤的新表位特异性CD8+T细胞对由RNA疫苗的一种或多种多核苷酸编码的新表位中的至少一者具有特异性,并且其中RNA疫苗的施用导致个体中的完全缓解(CR)或部分缓解(PR)。

[0089] 在另一方面,本文提供了一种用于在个体中诱导新表位特异性CD8+T细胞向肿瘤的运输的方法中使用的PD-1轴结合拮抗剂,所述方法包括向个体施用有效量的PD-1轴结合拮抗剂和RNA疫苗,其中RNA疫苗包含一种或多种多核苷酸,所述一种或多种多核苷酸编码由存在于获得自个体的肿瘤样本中的癌症特异性体细胞突变产生的一个或多个新表位,其中在施用PD-1轴结合拮抗剂和RNA疫苗后运输至肿瘤的新表位特异性CD8+T细胞对由RNA疫苗的一种或多种多核苷酸编码的新表位中的至少一者具有特异性,其中PD-1轴结合拮抗剂为阿特珠单抗,其中阿特珠单抗以21天或3周的间隔以约1200mg的剂量施用于个体,并且其中RNA疫苗以21天周期以约15μg、约25μg、约38μg、约50μg、约75μg或约100μg的剂量施用于个体。

[0090] 在另一方面,本文提供了一种用于在个体中诱导新表位特异性CD8+T细胞向肿瘤的运输的方法中使用的PD-1轴结合拮抗剂,所述方法包括向个体施用有效量的PD-1轴结合

拮抗剂和RNA疫苗，其中RNA疫苗包含一种或多种多核苷酸，所述一种或多种多核苷酸编码由存在于获得自个体的肿瘤样本中的癌症特异性体细胞突变产生的一个或多个新表位，其中在施用PD-1轴结合拮抗剂和RNA疫苗后运输至肿瘤的新表位特异性CD8+T细胞对由RNA疫苗的一种或多种多核苷酸编码的新表位中的至少一者具有特异性，其中PD-1轴结合拮抗剂为阿特珠单抗，其中阿特珠单抗以21天周期以约1200mg的剂量施用于个体，其中阿特珠单抗在第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11和12周期中的每个周期的第1天施用，并且任选地在第13周期的第1天并且在之后每3周或21天施用；并且其中RNA疫苗以约15μg、约25μg、约38μg、约50μg、约75μg或约100μg的剂量施用于个体，其中RNA疫苗以21天周期施用于个体，其中RNA疫苗在第1周期的第1天、第8天和第15天；第2周期的第1天、第8天和第15天；第3周期的第1天和第15天；以及第7周期的第1天施用于个体；并且任选地在第13周期的第1天并且在之后每24周或168天施用于个体。

[0091] 在另一方面，本文提供了一种用于在个体中诱导新表位特异性CD8+T细胞向肿瘤的运输的方法中使用的PD-1轴结合拮抗剂，所述方法包括向个体施用有效量的PD-1轴结合拮抗剂和RNA疫苗，其中RNA疫苗包含一种或多种多核苷酸，所述一种或多种多核苷酸编码由存在于获得自个体的肿瘤样本中的癌症特异性体细胞突变产生的一个或多个新表位，其中在施用PD-1轴结合拮抗剂和RNA疫苗后运输至肿瘤的新表位特异性CD8+T细胞对由RNA疫苗的一种或多种多核苷酸编码的新表位中的至少一者具有特异性，其中PD-1轴结合拮抗剂为阿特珠单抗，其中阿特珠单抗在诱导期期间和该诱导期后的维持期期间以21天周期以约1200mg的剂量施用于个体，其中，在诱导期期间，阿特珠单抗在第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11和12周期中的每个周期的第1天施用，并且其中，在诱导期后的维持期期间，阿特珠单抗在第13周期的第1天并且在之后每3周或21天施用；并且其中RNA疫苗以约15μg、约25μg、约38μg、约50μg、约75μg或约100μg的剂量施用于个体，其中RNA疫苗在诱导期和该诱导期后的维持期施用于个体，其中RNA疫苗以21天周期施用于个体；其中，在诱导期期间，RNA疫苗在第1周期的第1天、第8天和第15天；第2周期的第1天、第8天和第15天；第3周期的第1天和第15天；以及第7周期的第1天施用于个体；并且其中，在维持期期间，RNA疫苗在第13周期的第1天施用于个体并且在之后每24周或168天施用一次。

[0092] 在另一方面，本文提供了一种用于在患有肿瘤的个体中诱导新表位特异性CD8+T细胞的方法中使用的RNA疫苗，所述方法包括向个体施用有效量的RNA疫苗，其中RNA疫苗包含一种或多种多核苷酸，所述一种或多种多核苷酸编码由存在于获得自个体的肿瘤样本中的癌症特异性体细胞突变产生的一个或多个新表位，其中在施用RNA疫苗后获得自个体的外周血样品中至少约1％的CD8+T细胞为对由RNA疫苗的一种或多种多核苷酸编码的新表位中的至少一者具有特异性的新表位特异性CD8+T细胞，并且其中利用离体ELISPOT或MHC多聚体分析来检测外周血样品中的新表位特异性CD8+T细胞。

[0093] 在另一方面，本文提供了一种用于在患有肿瘤的个体中诱导新表位特异性CD8+T细胞的方法中使用的RNA疫苗，所述方法包括向个体施用有效量的RNA疫苗，其中RNA疫苗包含一种或多种多核苷酸，所述一种或多种多核苷酸编码由存在于获得自个体的肿瘤样本中的癌症特异性体细胞突变产生的一个或多个新表位，其中在施用RNA疫苗后获得自个体的外周血样品中至少约1％的CD8+T细胞为对由RNA疫苗的一种或多种多核苷酸编码的新表位中的至少一者具有特异性的新表位特异性CD8+T细胞，并且其中与施用RNA疫苗之前相比，

向个体施用RNA疫苗导致在该个体中的外周血中诱导新表位特异性CD4+细胞，其中新表位特异性CD4+T细胞对由RNA疫苗的一种或多种多核苷酸编码的新表位中的至少一者具有特异性。

[0094] 在另一方面，本文提供了一种用于在患有肿瘤的个体中诱导新表位特异性CD8+T细胞的方法中使用的RNA疫苗，所述方法包括向个体施用有效量的RNA疫苗，其中RNA疫苗包含一种或多种多核苷酸，所述一种或多种多核苷酸编码由存在于获得自个体的肿瘤样本中的癌症特异性体细胞突变产生的一个或多个新表位，其中在施用RNA疫苗后获得自个体的外周血样品中至少约1％的CD8+T细胞为对由RNA疫苗的一种或多种多核苷酸编码的新表位中的至少一者具有特异性的新表位特异性CD8+T细胞，并且其中向多个个体施用RNA疫苗导致在所述多个个体中的至少约70％的个体的外周血中诱导新表位特异性CD4+或CD8+T细胞，其中新表位特异性CD4+或CD8+T细胞对由RNA疫苗的一种或多种多核苷酸编码的新表位中的至少一者具有特异性，并且其中利用离体ELISPOT或MHC多聚体分析来评定对新表位特异性CD4+或CD8+T细胞的诱导。

[0095] 在另一方面，本文提供了一种用于在患有肿瘤的个体中诱导新表位特异性CD8+T细胞的方法中使用的RNA疫苗，所述方法包括向个体施用有效量的RNA疫苗，其中RNA疫苗包含一种或多种多核苷酸，所述一种或多种多核苷酸编码由存在于获得自个体的肿瘤样本中的癌症特异性体细胞突变产生的一个或多个新表位，其中在施用RNA疫苗后获得自个体的外周血样品中至少约1％的CD8+T细胞为对由RNA疫苗的一种或多种多核苷酸编码的新表位中的至少一者具有特异性的新表位特异性CD8+T细胞，并且其中与施用RNA疫苗之前的一种或多种炎症性细胞因子的水平相比，向个体施用RNA疫苗导致该个体的外周血中的所述一种或多种炎症性细胞因子的水平升高。在一些实施例中，所述一种或多种炎症性细胞因子选自IFNγ、IFNα、IL-12或IL-6。

[0096] 在另一方面，本文提供了一种用于在患有肿瘤的个体中诱导新表位特异性CD8+T细胞的方法中使用的RNA疫苗，所述方法包括向个体施用有效量的RNA疫苗，其中RNA疫苗包含一种或多种多核苷酸，所述一种或多种多核苷酸编码由存在于获得自个体的肿瘤样本中的癌症特异性体细胞突变产生的一个或多个新表位，其中在施用RNA疫苗后获得自个体的外周血样品中至少约1％的CD8+T细胞为对由RNA疫苗的一种或多种多核苷酸编码的新表位中的至少一者具有特异性的新表位特异性CD8+T细胞，并且其中新表位特异性CD8+T细胞为效应记忆T细胞(T_{em})。

[0097] 在另一方面，本文提供了一种用于在患有肿瘤的个体中诱导新表位特异性CD8+T细胞的方法中使用的RNA疫苗，所述方法包括向个体施用有效量的RNA疫苗，其中RNA疫苗包含一种或多种多核苷酸，所述一种或多种多核苷酸编码由存在于获得自个体的肿瘤样本中的癌症特异性体细胞突变产生的一个或多个新表位，其中在施用RNA疫苗后获得自个体的外周血样品中至少约1％的CD8+T细胞为对由RNA疫苗的一种或多种多核苷酸编码的新表位中的至少一者具有特异性的新表位特异性CD8+T细胞，并且其中新表位特异性CD8+T细胞为PD-1+。

[0098] 在另一方面，本文提供了一种用于在患有肿瘤的个体中诱导新表位特异性CD8+T细胞的方法中使用的RNA疫苗，所述方法包括向个体施用有效量的RNA疫苗，其中RNA疫苗包含一种或多种多核苷酸，所述一种或多种多核苷酸编码由存在于获得自个体的肿瘤样本中

的癌症特异性体细胞突变产生的一个或多个新表位，其中在施用RNA疫苗后获得自个体的外周血样品中至少约1％的CD8+T细胞为对由RNA疫苗的一种或多种多核苷酸编码的新表位中的至少一者具有特异性的新表位特异性CD8+T细胞，并且其中RNA疫苗的施用导致个体中的完全缓解(CR)或部分缓解(PR)。

[0099] 在另一方面，本文提供了一种用于在患有肿瘤的个体中诱导新表位特异性CD8+T细胞的方法中使用的RNA疫苗，所述方法包括向个体施用有效量的RNA疫苗，其中RNA疫苗包含一种或多种多核苷酸，所述一种或多种多核苷酸编码由存在于获得自个体的肿瘤样本中的癌症特异性体细胞突变产生的一个或多个新表位，其中在施用RNA疫苗后获得自个体的外周血样品中至少约1％的CD8+T细胞为对由RNA疫苗的一种或多种多核苷酸编码的新表位中的至少一者具有特异性的新表位特异性CD8+T细胞，并且其中RNA疫苗以约15μg、约25μg、约38μg、约50μg、约75μg或约100μg的剂量施用于个体。

[0100] 在另一方面，本文提供了一种用于在患有肿瘤的个体中诱导新表位特异性CD8+T细胞的方法中使用的RNA疫苗，所述方法包括向个体施用有效量的RNA疫苗，其中RNA疫苗包含一种或多种多核苷酸，所述一种或多种多核苷酸编码由存在于获得自个体的肿瘤样本中的癌症特异性体细胞突变产生的一个或多个新表位，其中在施用RNA疫苗后获得自个体的外周血样品中至少约1％的CD8+T细胞为对由RNA疫苗的一种或多种多核苷酸编码的新表位中的至少一者具有特异性的新表位特异性CD8+T细胞，并且其中RNA疫苗以约15μg、约25μg、约38μg、约50μg、约75μg或约100μg的剂量施用于个体，其中RNA疫苗以21天周期施用于个体，其中RNA疫苗在第1周期的第1天、第8天和第15天；第2周期的第1天、第8天和第15天；第3周期的第1天和第15天；以及第7周期的第1天施用于个体；并且任选地在第13周期的第1天以及之后每24周或168天施用于个体。

[0101] 在另一方面，本文提供了一种用于在患有肿瘤的个体中诱导新表位特异性CD8+T细胞的方法中使用的RNA疫苗，所述方法包括向个体施用有效量的RNA疫苗，其中RNA疫苗包含一种或多种多核苷酸，所述一种或多种多核苷酸编码由存在于获得自个体的肿瘤样本中的癌症特异性体细胞突变产生的一个或多个新表位，其中在施用RNA疫苗后获得自个体的外周血样品中至少约1％的CD8+T细胞为对由RNA疫苗的一种或多种多核苷酸编码的新表位中的至少一者具有特异性的新表位特异性CD8+T细胞，并且其中RNA疫苗以约15μg、约25μg、约38μg、约50μg、约75μg或约100μg的剂量施用于个体，其中RNA疫苗在诱导期和该诱导期后的维持期施用于个体，其中RNA疫苗以21天周期施用于个体；其中，在诱导期期间，RNA疫苗在第1周期的第1天、第8天和第15天；第2周期的第1天、第8天和第15天；第3周期的第1天和第15天；以及第7周期的第1天施用于个体；并且其中，在维持期期间，RNA疫苗在第13周期的第1天施用于个体并且在之后每24周或168天施用一次。

[0102] 在前述方面中的任一者的一些实施例中，该方法进一步包括向个体施用PD-1轴结合拮抗剂。

[0103] 在另一方面，本文提供了一种用于在患有肿瘤的个体中诱导新表位特异性CD8+T细胞的方法中使用的PD-1轴结合拮抗剂，所述方法包括向个体施用有效量的PD-1轴结合拮抗剂和RNA疫苗，其中RNA疫苗包含一种或多种多核苷酸，所述一种或多种多核苷酸编码由存在于获得自个体的肿瘤样本中的癌症特异性体细胞突变产生的一个或多个新表位，其中在施用PD-1轴结合拮抗剂和RNA疫苗后获得自个体的外周血样品中至少约1％的CD8+T细胞

为对由RNA疫苗的一种或多种多核苷酸编码的新表位中的至少一者具有特异性的新表位特异性CD8+T细胞，并且其中利用离体ELISPOT或MHC多聚体分析来检测外周血样品中的新表位特异性CD8+T细胞。

[0104] 在另一方面，本文提供了一种用于在患有肿瘤的个体中诱导新表位特异性CD8+T细胞的方法中使用的PD-1轴结合拮抗剂，所述方法包括向个体施用有效量的PD-1轴结合拮抗剂和RNA疫苗，其中RNA疫苗包含一种或多种多核苷酸，所述一种或多种多核苷酸编码由存在于获得自个体的肿瘤样本中的癌症特异性体细胞突变产生的一个或多个新表位，其中在施用PD-1轴结合拮抗剂和RNA疫苗后获得自个体的外周血样品中至少约1％的CD8+T细胞为对由RNA疫苗的一种或多种多核苷酸编码的新表位中的至少一者具有特异性的新表位特异性CD8+T细胞，并且其中与施用RNA疫苗之前相比，向个体施用PD-1轴结合拮抗剂和RNA疫苗导致在该个体中的外周血中诱导新表位特异性CD4+细胞，其中新表位特异性CD4+T细胞对由RNA疫苗的一种或多种多核苷酸编码的新表位中的至少一者具有特异性。

[0105] 在另一方面，本文提供了一种用于在患有肿瘤的个体中诱导新表位特异性CD8+T细胞的方法中使用的PD-1轴结合拮抗剂，所述方法包括向个体施用有效量的PD-1轴结合拮抗剂和RNA疫苗，其中RNA疫苗包含一种或多种多核苷酸，所述一种或多种多核苷酸编码由存在于获得自个体的肿瘤样本中的癌症特异性体细胞突变产生的一个或多个新表位，其中在施用PD-1轴结合拮抗剂和RNA疫苗后获得自个体的外周血样品中至少约1％的CD8+T细胞为对由RNA疫苗的一种或多种多核苷酸编码的新表位中的至少一者具有特异性的新表位特异性CD8+T细胞，并且其中与施用RNA疫苗之前相比，向多个个体施用PD-1轴结合拮抗剂和RNA疫苗导致在所述多个个体中的至少约70％的个体的外周血中诱导新表位特异性CD4+或CD8+T细胞，其中新表位特异性CD4+或CD8+T细胞对由RNA疫苗的一种或多种多核苷酸编码的新表位中的至少一者具有特异性，并且其中利用离体ELISPOT或MHC多聚体分析来评定对新表位特异性CD4+或CD8+T细胞的诱导。

[0106] 在另一方面，本文提供了一种用于在患有肿瘤的个体中诱导新表位特异性CD8+T细胞的方法中使用的PD-1轴结合拮抗剂，所述方法包括向个体施用有效量的PD-1轴结合拮抗剂和RNA疫苗，其中RNA疫苗包含一种或多种多核苷酸，所述一种或多种多核苷酸编码由存在于获得自个体的肿瘤样本中的癌症特异性体细胞突变产生的一个或多个新表位，其中在施用PD-1轴结合拮抗剂和RNA疫苗后获得自个体的外周血样品中至少约1％的CD8+T细胞为对由RNA疫苗的一种或多种多核苷酸编码的新表位中的至少一者具有特异性的新表位特异性CD8+T细胞，并且其中与施用RNA疫苗之前的一种或多种炎症性细胞因子的水平相比，向个体施用PD-1轴结合拮抗剂和RNA疫苗导致该个体的外周血中的所述一种或多种炎症性细胞因子的水平升高。在一些实施例中，所述一种或多种炎症性细胞因子选自IFNγ、IFNα、IL-12或IL-6。

[0107] 在另一方面，本文提供了一种用于在患有肿瘤的个体中诱导新表位特异性CD8+T细胞的方法中使用的PD-1轴结合拮抗剂，所述方法包括向个体施用有效量的PD-1轴结合拮抗剂和RNA疫苗，其中RNA疫苗包含一种或多种多核苷酸，所述一种或多种多核苷酸编码由存在于获得自个体的肿瘤样本中的癌症特异性体细胞突变产生的一个或多个新表位，其中在施用PD-1轴结合拮抗剂和RNA疫苗后获得自个体的外周血样品中至少约1％的CD8+T细胞为对由RNA疫苗的一种或多种多核苷酸编码的新表位中的至少一者具有特异性的新表位特

异性CD8+T细胞，并且其中新表位特异性CD8+T细胞为效应记忆T细胞(T_{em})。

[0108] 在另一方面，本文提供了一种用于在患有肿瘤的个体中诱导新表位特异性CD8+T细胞的方法中使用的PD-1轴结合拮抗剂，所述方法包括向个体施用有效量的PD-1轴结合拮抗剂和RNA疫苗，其中RNA疫苗包含一种或多种多核苷酸，所述一种或多种多核苷酸编码由存在于获得自个体的肿瘤样本中的癌症特异性体细胞突变产生的一个或多个新表位，其中在施用PD-1轴结合拮抗剂和RNA疫苗后获得自个体的外周血样品中至少约1％的CD8+T细胞为对由RNA疫苗的一种或多种多核苷酸编码的新表位中的至少一者具有特异性的新表位特异性CD8+T细胞，并且其中新表位特异性CD8+T细胞为PD-1+。

[0109] 在另一方面，本文提供了一种用于在患有肿瘤的个体中诱导新表位特异性CD8+T细胞的方法中使用的PD-1轴结合拮抗剂，所述方法包括向个体施用有效量的PD-1轴结合拮抗剂和RNA疫苗，其中RNA疫苗包含一种或多种多核苷酸，所述一种或多种多核苷酸编码由存在于获得自个体的肿瘤样本中的癌症特异性体细胞突变产生的一个或多个新表位，其中在施用PD-1轴结合拮抗剂和RNA疫苗后获得自个体的外周血样品中至少约1％的CD8+T细胞为对由RNA疫苗的一种或多种多核苷酸编码的新表位中的至少一者具有特异性的新表位特异性CD8+T细胞，并且其中PD-1轴结合拮抗剂和RNA疫苗的施用导致个体中的完全缓解(CR)或部分缓解(PR)。

[0110] 在另一方面，本文提供了一种用于在患有肿瘤的个体中诱导新表位特异性CD8+T细胞的方法中使用的PD-1轴结合拮抗剂，所述方法包括向个体施用有效量的PD-1轴结合拮抗剂和RNA疫苗，其中RNA疫苗包含一种或多种多核苷酸，所述一种或多种多核苷酸编码由存在于获得自个体的肿瘤样本中的癌症特异性体细胞突变产生的一个或多个新表位，其中在施用PD-1轴结合拮抗剂和RNA疫苗后获得自个体的外周血样品中至少约1％的CD8+T细胞为对由RNA疫苗的一种或多种多核苷酸编码的新表位中的至少一者具有特异性的新表位特异性CD8+T细胞，其中PD-1轴结合拮抗剂为阿特珠单抗，其中阿特珠单抗以21天或3周的间隔以约1200mg的剂量施用于个体，并且其中RNA疫苗以21天周期以约15μg、约25μg、约38μg、约50μg、约75μg或约100μg的剂量施用于个体。

[0111] 在另一方面，本文提供了一种用于在患有肿瘤的个体中诱导新表位特异性CD8+T细胞的方法中使用的PD-1轴结合拮抗剂，所述方法包括向个体施用有效量的PD-1轴结合拮抗剂和RNA疫苗，其中RNA疫苗包含一种或多种多核苷酸，所述一种或多种多核苷酸编码由存在于获得自个体的肿瘤样本中的癌症特异性体细胞突变产生的一个或多个新表位，其中在施用PD-1轴结合拮抗剂和RNA疫苗后获得自个体的外周血样品中至少约1％的CD8+T细胞为对由RNA疫苗的一种或多种多核苷酸编码的新表位中的至少一者具有特异性的新表位特异性CD8+T细胞，其中PD-1轴结合拮抗剂为阿特珠单抗，其中阿特珠单抗以21天周期以约1200mg的剂量施用于个体，其中阿特珠单抗在第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11和12周期中的每个周期的第1天施用，并且任选地在第13周期的第1天并且在之后每3周或21天施用；并且其中RNA疫苗以约15μg、约25μg、约38μg、约50μg、约75μg或约100μg的剂量施用于个体，其中RNA疫苗以21天周期施用于个体；其中RNA疫苗在第1周期的第1天、第8天和第15天；第2周期的第1天、第8天和第15天；第3周期的第1天和第15天；以及第7周期的第1天施用于个体；并且任选地在第13周期的第1天并且在之后每24周或168天施用于个体。

[0112] 在另一方面，本文提供了一种用于在患有肿瘤的个体中诱导新表位特异性CD8+T

细胞的方法中使用的PD-1轴结合拮抗剂,所述方法包括向个体施用有效量的PD-1轴结合拮抗剂和RNA疫苗,其中RNA疫苗包含一种或多种多核苷酸,所述一种或多种多核苷酸编码由存在于获得自个体的肿瘤样本中的癌症特异性体细胞突变产生的一个或多个新表位,其中在施用PD-1轴结合拮抗剂和RNA疫苗后获得自个体的外周血样品中至少约1%的CD8+T细胞为对由RNA疫苗的一种或多种多核苷酸编码的新表位中的至少一者具有特异性的新表位特异性CD8+T细胞,其中PD-1轴结合拮抗剂为阿特珠单抗,其中阿特珠单抗在诱导期期间和该诱导期后的维持期期间以21天周期以约1200mg的剂量施用于个体,其中,在诱导期期间,阿特珠单抗在第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11和12周期中的每个周期的第1天施用,并且其中,在诱导期后的维持期期间,阿特珠单抗在第13周期的第1天并且在之后每3周或21天施用;并且其中RNA疫苗以约15μg、约25μg、约38μg、约50μg、约75μg或约100μg的剂量施用于个体,其中RNA疫苗在诱导期和该诱导期后的维持期施用于个体,其中RNA疫苗以21天周期施用于个体;其中,在诱导期期间,RNA疫苗在第1周期的第1天、第8天和第15天;第2周期的第1天、第8天和第15天;第3周期的第1天和第15天;以及第7周期的第1天施用于个体;并且其中,在维持期期间,RNA疫苗在第13周期的第1天施用于个体并且在之后每24周或168天施用一次。

[0113] 应了解,本文所描述的各种实施例的一种、一些或所有特性可组合形成本发明的其它实施例。本发明的这些和其它方面对于本领域技术人员将变得显而易见。通过下面的详细描述进一步描述本发明的这些和其它实施例。

附图说明

[0114] 专利或申请文件包含至少一幅彩色附图。在提出请求并支付必要的费用后,专利局将提供带有一幅或多幅彩图的本专利或专利申请公布的拷贝。

[0115] 图1显示了示例性RNA疫苗(即多新表位RNA)的一般结构。该图为RNA原料药的一般结构的示意图,其具有恒定5′-帽(β-S-ARCA(D1))、5'-非翻译区和3'-非翻译区(分别为hAg-Kozak和FI)、N末端和C末端融合标签(分别为$sec_{2.0}$和MITD)和poly(A)尾巴(A120)以及编码通过富含GS的接头融合的新表位(neo1至neo10)的肿瘤特异性序列。

[0116] 图2为示例性RNA疫苗(SEQ ID NO:42)的恒定区的核糖核苷酸序列(5′->3′)。前两个G残基之间的键结为独特的键(5′→5′)-pp_sp-,如图3中的5'加帽结构所示。患者癌症特异性序列的在C131与A132残基(以粗体标记)。"N"是指编码一个或多个(例如,1-20个)新表位(由任选的接头隔开)的一个或多个多核苷酸序列的位置。

[0117] 图3为在RNA恒定区的5'末端所用的5'-加帽结构β-S-ARCA(D1)($m_2^{7\cdot2'\cdot0}Gpp_spG$)。立体P中心为"D1"异构体中的Rp构型。注:红色示出β-S-ARCA(D1)与碱性帽结构m^7GpppG之间的差异;结构单元m^7G的C2'位置处的-OCH3基团和β-磷酸酯处的非桥接氧被硫取代。由于存在立体P中心(带有*标记),硫代磷酸酯帽类似物β-S-ARCA以两种非对映异构体形式存在。根据它们在反相高效液相色谱中的洗脱顺序,将其称为01和02。

[0118] 图4为实例1至5中所述的Ia/Ib期研究的设计图。在Ia期剂量递增研究中,RNA疫苗作为单一疗法以25μg、38μg、50μg、75μg或100μg的剂量施用于受试者。在初始治疗(诱导期)期间,RNA疫苗在第1周期的第1天、第8天和第15天、在第2周期的第1天、第8天和第15天、在第3周期的第1天和第15天并且在第7周期的第1天(每个周期为21天)施用。在初始治疗后的维持期期间,RNA疫苗在第13周期的第1天施用,并且在之后每8个周期(即,之后每24周,或

之后每168天)施用,直至发生疾病进展(PD)为止(每个周期为21天)。在Ib期研究中,RNA疫苗以15μg(未显示)、25μg、38μg或50μg的剂量与1200mg阿特珠单抗联合施用于受试者。Ib期研究包括RNA疫苗的剂量递增阶段以及扩展阶段,在该扩展阶段中,RNA疫苗以15μg或25μg的剂量与阿特珠单抗联合施用于患有未接受过指定检查点抑制剂治疗或经过检查点抑制剂治疗的肿瘤类型的患者(Ib期扩展阶段的其他肿瘤类型提供于实例1中)。在初始治疗(诱导期)期间,阿特珠单抗在第1周期至第12周期中每个周期的第1天施用;RNA疫苗在第1周期的第1天、第8天和第15天、在第2周期的第1天、第8天和第15天、在第3周期的第1天和第15天并且在第7周期的第1天施用(每个周期为21天)。在初始治疗后的维持期期间,阿特珠单抗从第13周期的第1天开始每3周施用一次,直至发生疾病进展(PD)未知;并且RNA疫苗在第13周期的第1天施用,并且在之后每8个周期(即,之后每24周,或之后每168天)施用,直至发生疾病进展(PD)为止(每个周期为21天)。

[0119] 图5A至5C示出由作为单一疗法施用(Ia期)或与阿特珠单抗联合施用(Ib期)施用的RNA疫苗所诱导的先天免疫应答。图5A示出在研究的Ia期中施用25μg RNA疫苗的患者血浆中的IFNg水平(pg/ml)。每条线表示单个患者。“C”=周期(即,C1=第1周期;C2=第2周期,等)。“D”=天(即,D1=第1天,D8=第8天,等)。“hr”=施用一剂RNA疫苗后的小时数。施用RNA疫苗的日期如实线箭头所示。图5B示出在RNA疫苗作为单一疗法以指定剂量施用(Ia期;Ph1a)或与阿特珠单抗联合施用(Ib期;Ph1b)的患者中,每次施用RNA疫苗后4小时的血浆IFNg水平中位数。每个圆圈表示每个个体患者在所有RNA疫苗给药后4小时的IFNg水平中值。图5C示出在RNA疫苗作为单一疗法以指定剂量施用(Ia期;Ph1a)或与阿特珠单抗联合施用(Ib期;Ph1b)的患者中,每次施用RNA疫苗后4小时的IFNa血浆水平中值。每个圆圈表示每个个体患者在所有RNA疫苗给药后4小时的IFNa水平中值。

[0120] 图6提供了用于评估RNA疫苗作为单一疗法施用(Ia期)或与阿特珠单抗联合施用(Ib期)后的新抗原特异性CD4+和CD8+T细胞免疫应答的离体EliSpot测定图。

[0121] 图7A至7D示出在RNA疫苗作为单一疗法施用(Ia期)或与阿特珠单抗联合施用(Ib期)后评估新抗原特异性免疫应答的EliSpot测定的结果。图7A示出在第4周期第1天接受RNA疫苗作为单一疗法施用(Ia期)的患者中的新抗原特异性免疫应答。图7B示出在第4周期第1天接受RNA疫苗联合阿特珠单抗施用(Ib期)的患者中的新抗原特异性免疫应答。星号指示第1周期第1天和第1周期第8天的RNA疫苗剂量为30μg,之后的剂量为15μg。在图7A至7B中,y轴显示在EliSpot测定中检测的新抗原数量。深色条和相应的数字表示在EliSpot测定中鉴别的阳性新抗原命中数。浅色条表示阴性新抗原命中数。标明RNA疫苗剂量。EliSpot反应被定义为每300,000个细胞>15个斑点并且与背景孔具有统计学差异(通常小于10个点);所有新抗原均重复检测两次。阳性命中(“+ve命中”)是指在第4周期第1天具有EliSpot测定反应并且在基线时无EliSpot测定反应的新抗原。阴性命中(“无命中”)是指在第4周期第1天具有阴性EliSpot测定反应的新抗原。图7C示出对于Ib期研究中以指定剂量施用RNA疫苗的患者,通过EliSpot测定鉴别为阳性命中的每种新抗原的IFNg形成斑点的总和。每个彩色框表示单个新抗原的IFNg形成斑点的数量。EliSpot反应被定义为每300,000个细胞>15个斑点并且与背景孔具有统计学差异(通常小于10个点);所有新抗原均重复检测两次。图7D提供了在Ib期研究中以指定剂量施用RNA疫苗的患者中IFNg形成斑点的平均数量。箱线图中的中线表示IFNg形成斑点的中位数;数据框显示四分位数范围;误差条显示最小值和最

大值。

[0122] 图8提供了用于评估RNA疫苗作为单一疗法施用(Ia期)或与阿特珠单抗联合施用(Ib期)后的新抗原特异性CD8+T细胞免疫应答的MHC多聚体染色测定图。

[0123] 图9A至9G示出评估接受RNA疫苗以25μg的剂量与阿特珠单抗联合施用(Ib期;患者22)的CIT初治三阴性乳腺癌患者中的新抗原特异性免疫应答的EliSpot测定和MHC多聚体染色测定法的结果。图9A示出评估患者22在基线时和第4周期第1天的新抗原特异性免疫应答的批量PBMC EliSpot测定的结果。检测的新抗原和对照显示在x轴上;y轴显示每300,000个PBMC中IFNg形成斑点的数量。新抗原R3和R8显示在框中。水平虚线指示在EliSpot测定中确定阳性命中的阈值。阳性命中被定义为每300,000个细胞>15个斑点并且与背景孔具有统计学差异(通常少于10个斑点)。新抗原重复检测两次;CEFT＝来自巨细胞病毒、爱泼斯坦-巴尔病毒、流感病毒和破伤风毒素的表位;CEF＝来自巨细胞病毒、爱泼斯坦-巴尔病毒和流感病毒的表位。图9B示出在指定时间通过MHC多聚体染色测定评估的患者22中的R8新抗原特异性CD8+T细胞免疫应答。散点图示出用MHC多聚体染色的CD8+T细胞,其中在x轴和y轴上采用两种不同的配置。将双阳性细胞标记为具有新抗原特异性。新抗原特异性CD8+T细胞的百分比显示在散点图的右上象限中。图9C示出对图9B所示的第3周期第1天的新抗原特异性CD8+T细胞群中CD45RO和CCR7表达的分析。如右侧图例所示,CD8+初始细胞位于散点图的左上象限中;中央记忆T细胞(Tcm)位于散点图的右上象限中;CD45RA+效应记忆T细胞(TEMRA)位于散点图的左下象限中;并且效应记忆T细胞(Tem)位于散点图的右下象限中。图9D示出对图9B所示的第3周期第1天的新抗原特异性CD8+T细胞群中PD-1表达的分析。图9E示出在指定时间通过MHC多聚体染色测定评估的患者22中的R3新抗原特异性CD8+T细胞免疫应答。散点图示出用MHC多聚体染色的CD8+T细胞,其中在x轴和y轴上采用两种不同的配置。新抗原特异性CD8+T细胞的百分比显示在散点图的右上象限中。图9F示出对图9E所示的第3周期第1天的新抗原特异性CD8+T细胞群中CD45RO和CCR7表达的分析。如右侧图例所示,CD8+初始细胞位于散点图的左上象限中;中央记忆T细胞(Tcm)位于散点图的右上象限中;CD45RA+效应记忆T细胞(TEMRA)位于散点图的左下象限中;并且效应记忆T细胞(Tem)位于散点图的右下象限中。图9G示出对图9E所示的第3周期第1天的新抗原特异性CD8+T细胞群中PD-1表达的分析。

[0124] 图10A至10B提供了RNA疫苗的生产工作流程和提出的作用机制的概述。图10A示出RNA疫苗的生产工艺。在生产期间,采集患者的血液样品和肿瘤样品(例如,肿瘤活检),并且对肿瘤DNA和非肿瘤DNA(例如,外周血单核细胞DNA)进行测序(例如,新一代测序和/或全外显子组测序),以鉴别患者肿瘤中特异性存在的非同义体细胞突变。还对来自肿瘤样品的RNA进行测序,以评定包含已鉴别的非同义体细胞突变的蛋白质的表达。使用生物信息学工作流程预测新抗原,对它们可能的免疫原性进行排序。利用提供有关健康组织中各个野生型基因表达水平的综合信息的数据库,通过移除具有不利风险特征的候选目标来制定个性化的风险缓解策略。例如,滤除蛋白质发生的可能在关键器官中具有较高自身免疫风险的突变,并且不考虑将其用于疫苗生产。选择经预测对个体患者引起$CD8^+$T细胞和/或$CD4^+$T细胞应答的多达20个新抗原纳入疫苗中。RNA疫苗包含5'帽、5'非翻译区(UTR)、N末端融合标签(例如SEC)、多达20个新抗原(例如2个decatope)(每个新抗原之间具有接头序列)、C末端融合标签(例如MITD)、3'UTR和poly(A)尾巴。RNA疫苗配制成例如脂质体复合物。RNA疫苗在

静脉施用于患者之前可以储存。如图10A所示，据信RNA疫苗通过刺激先天免疫应答(例如，通过用作内在TLR7/8激动剂)和通过刺激新抗原的表达以及随后由抗原呈递细胞呈递的新抗原来发挥作用。图10B示出所提出的RNA疫苗作用机制的详细信息。另外参见Kranz等人(2016)Nature,16;534(7607):396-401。

[0125] 图11提供了在RNA疫苗单一疗法的Ia期研究中超过10％的患者发生的不良事件总结。提供了所有报告的AE以及与研究治疗相关的AE的相对频率。所报告的AE的严重程度显示在右侧的图例中(1至5级)。[a]16％的患者报告了恶性肿瘤进展的严重不良事件(SAE)(数据未显示)。显示了输注相关反应和细胞因子释放综合征的全身反应。[b]根据美国国家癌症研究所(NCI)不良事件通用术语标准(CTCAE)5.0版。

[0126] 图12A至12B示出RNA疫苗作为单一疗法以25μg的剂量施用的患者血浆中的IFNγ水平(pg/ml)。图12A示出RNA疫苗作为单一疗法在指定时间以25μg的剂量施用的患者血浆中的IFNγ水平(pg/ml)。每条线表示单个患者。图12B示出RNA疫苗作为单一疗法在指定时间以25μg的剂量施用的九例患者的血浆中的IFNγ水平(pg/ml)的代表性模式。RNA疫苗给药方案显示在图12B中的图下方。每个箭头表示RNA疫苗剂量的施用。“C”＝周期(即，C1＝第1周期；C2＝第2周期，等)；“D”＝天(即，D1＝第1天，D8＝第8天，等)；“HR”＝施用一剂RNA疫苗后的小时数。

[0127] 图13示出RNA疫苗作为单一疗法在指定时间以25μg的剂量施用的患者血浆中的IL-6和IFNα水平(pg/ml)。每条线表示单个患者。“C”＝周期(即，C1＝第1周期；C2＝第2周期，等)；“D”＝天(即，D1＝第1天，D8＝第8天，等)；“HR”＝施用一剂RNA疫苗后的小时数。

[0128] 图14A至14B提供了在十四例患者中由作为单一疗法(Ia期)施用的RNA疫苗所诱导的新抗原特异性免疫应答的概述。图14A示出在Ia期研究中通过EliSpot和/或MHC多聚体染色测定法确定具有至少一种新抗原特异性免疫应答的患者数量。图14B示出通过离体EliSpot测定在指定患者中表现出新抗原免疫应答的新抗原的数量。

[0129] 图15示出接受剂量为75μg的RNA疫苗作为单一疗法治疗的前列腺癌患者的肿瘤中的T细胞受体(TCR)测序实验的结果。y轴显示在施用RNA疫苗之前(基线)肿瘤中TCR(Log_{10})的频率。x轴显示以RNA疫苗治疗后肿瘤中TCR(Log_{10})的频率。RNA疫苗特异性TCR用阴影圆圈表示，并且其他TCR用空圆圈表示。

[0130] 图16A至16C示出评估接受剂量为38μg的RNA疫苗作为单一疗法治疗的前列腺癌患者中的新抗原特异性CD8+T细胞免疫应答的MHC多聚体染色测定的结果。图16A示出指定时间的新抗原特异性CD8+T细胞免疫应答。散点图示出用MHC多聚体染色的CD8+T细胞，其中在x轴和y轴上采用两种不同的配置。新抗原特异性CD8+T细胞的百分比显示在散点图的右上象限中。“C”＝周期(即，C1＝第1周期；C2＝第2周期，等)；“D”＝天(即，D1＝第1天，D8＝第8天，等)。图16B示出对图16A所示的第4周期第1天的新抗原特异性CD8+T细胞群中CD45RO和CCR7表达的分析。CD8+初始细胞位于散点图的左上象限中(Tn)；中央记忆T细胞(Tcm)位于散点图的右上象限中；并且效应记忆T细胞(Tem)位于散点图的右下象限中。显示了Tem细胞的百分比。图16C示出对图16A所示的第4周期第1天的新抗原特异性CD8+T细胞群中PD-1表达的分析。显示了PD-1+CD8+T细胞的百分比。

[0131] 图17提供了在接受RNA疫苗作为单一疗法治疗的患者中观察到的临床应答的总结。每个条表示个体患者，其中每例患者的肿瘤类型提供在x轴上。y轴指示观察到的每例患

者的靶病灶的最长直径之和(SLD)的最佳变化。向每例患者施用的RNA疫苗剂量显示在右侧图例和每个条上方。对于每例患者,通过SP142 Ventana测定法分析的肿瘤浸润免疫细胞(IC)或肿瘤细胞(TC)上的基线PD-L1表达显示在图下方(N=否;Y=是)。研究期间每例患者的最佳总体反应(BOR)显示在图下方(PD=疾病进展;SD=疾病稳定;CR=完全缓解)。此外,每位患者是否接受过在先检查点抑制剂治疗("经过CPI")显示在图下方(N=否;Y=是)。HNC=头颈癌;STS=软组织肉瘤;EGJ=食管胃交界部。水平虚线指示根据实体瘤临床疗效评价标准(RECIST)的疾病进展和部分缓解的阈值(即,SLD较基线增加≥20%表示疾病进展(PD);并且SLD较基线减少≥30%表示部分缓解(PR))。

[0132] 图18示出在基线和在第4周期第1天在一例胃癌患者中通过EliSpot测定法所测得的新抗原特异性免疫应答,该患者在接受剂量为50μg剂量的RNA疫苗作为单一疗法治疗后表现出完全缓解(CR)。单个新抗原和对照显示在x轴上。y轴示出每300,000个外周血单核细胞(PBMC)的IFNγ形成斑点。水平虚线指示在EliSpot测定中确定阳性命中的阈值。EliSpot阳性命中被定义为每300,000个细胞>15个斑点并且与背景孔具有统计学差异(通常少于10个斑点);所有新抗原均重复检测两次。[a] 14%的患者报告了恶性肿瘤进展的严重AE(SAE)(数据未显示)。

[0133] 图19提供了在RNA疫苗与阿特珠单抗联合施用的Ib期研究中超过10%的患者发生的不良事件总结。提供了所有报告的AE以及与研究治疗相关的AE的相对频率。所报告的AE的严重程度显示在右侧的图例中(1至5级)。显示了输注相关反应、细胞因子释放综合征和流感样疾病的全身反应。

[0134] 图20示出在Ib期研究中通过EliSpot和/或MHC多聚体染色测定法确定具有至少一种新抗原特-异性免疫应答的患者数量。

[0135] 图21示出接受阿特珠单抗和剂量为38μg RNA疫苗治疗的直肠癌患者的肿瘤中的T细胞受体(TCR)测序实验的结果。y轴显示在施用阿特珠单抗和RNA疫苗之前(基线)肿瘤中TCR(Log_{10})的频率。x轴显示以阿特珠单抗和RNA疫苗治疗后肿瘤中TCR(Log_{10})的频率。RNA疫苗特异性TCR用阴影圆圈表示,并且其他TCR用空圆圈表示。

[0136] 图22提供了在接受RNA疫苗与阿特珠单抗联合治疗的患者中观察到的临床应答的总结。每个条表示个体患者,其中每例患者的肿瘤类型提供在x轴上。y轴指示观察到的每例患者的最长直径之和(SLD)的最佳变化。向每例患者施用的RNA疫苗剂量显示在右侧图例和每个条上方。[a]通过SP142 Ventana测定法分析的每例患者的肿瘤浸润免疫细胞(IC)或肿瘤细胞(TC)上的基线PD-L1表达显示在图下方(N=否;Y=是)。研究期间每例患者的最佳总体反应(BOR)显示在图下方(PD=疾病进展;SD=疾病稳定;PR=部分缓解;CR=完全缓解)。此外,每位患者是否接受过在先检查点抑制剂治疗("经过CPI")显示在图下方(N=否;Y=是)。HNC=头颈癌;STS=软组织肉瘤;NSCLC=非小细胞肺癌;MCC=梅克尔细胞癌。框指示一例经过CPI的三阴性乳腺癌(TNBC)患者,该患者接受了剂量为38μg的RNA疫苗与阿特珠单抗联合施用。水平虚线指示根据实体瘤临床疗效评价标准(RECIST)的疾病进展和部分缓解的阈值(即,SLD较基线增加≥20%表示疾病进展(PD);并且SLD较基线减少≥30%表示部分缓解(PR))。

[0137] 图23A至23B示出在三阴性乳腺癌(TNBC)患者中观察到的肿瘤和新抗原特异性免疫应答,该患者接受了剂量为38μg的RNA疫苗与阿特珠单抗联合施用(由图22中的框指示)。

如图22所示，该TNBC患者对治疗表现出部分缓解，在≥5％的肿瘤浸润性免疫细胞或肿瘤细胞上具有基线PD-L1表达(通过SP142 Ventana测定法评定)，并且之前接受过检查点抑制剂治疗(经过CPI)。图23A中提供的计算机断层扫描(CT)图像显示，患者在筛选时具有与转移性疾病相关联的若干肿瘤块，并且肿瘤在治疗的第4周期时减小(肿瘤由箭头指示)。图23B显示患者在筛选时对新抗原特异性CD8+T细胞呈阴性(0.01％；背景水平)，并且在治疗的第4周期时，新抗原特异性CD8+T细胞的水平增加至2.2％(通过MHC多聚体染色评定)。散点图示出用MHC多聚体染色的CD8+T细胞，其中在x轴和y轴上采用两种不同的配置。

[0138] 图24A至24E提供了在本文所述的Ib期研究的适应症特定扩展阶段检查点抑制剂初治患者的最长直径之和(SLD)和客观缓解率(ORR)随时间的变化。图24A示出检查点抑制剂初治尿路上皮癌(UC)患者的SLD和ORR随时间的变化。图24B示出检查点抑制剂初治肾细胞癌(RCC)患者的SLD和ORR随时间的变化。图24C示出检查点抑制剂初治黑素瘤患者的SLD和ORR随时间的变化。图24D示出检查点抑制剂初治三阴性乳腺癌(TNBC)患者的SLD和ORR随时间的变化。图24E示出检查点抑制剂初治非小细胞肺癌(NSCLC)患者的SLD和ORR随时间的变化。箭头指示继续接受积极治疗的患者。在图24A至24E中，水平虚线指示根据实体瘤临床疗效评价标准(RECIST)的疾病进展和部分缓解的阈值(即，SLD较基线增加≥20％表示疾病进展(PD)；并且SLD较基线减少≥30％表示部分缓解(PR))。

具体实施方式

[0139] I.定义

[0140] 在详细描述本发明之前，应当理解，本发明不限于特定的组合物或生物学系统，这些组合物或生物学系统当然可以变化。另外应当了解，本文使用的术语只是为了描述特定实施例的目的，并非旨在进行限制。

[0141] 如在本说明书和所附权利要求中所用，单数形式“一个”、“一种”、“该”和“所述”包括复数指代物，除非上下文另外明确规定。因此，例如，对“分子”的提及任选地包括两个或更多此类分子的组合等。

[0142] 如本文所用的术语“约”是指为此技术领域中的技术人员容易知晓的相应值的常见误差范围。在本文中提及“约”值或参数包括(且描述)涉及该值或参数本身的实施例。

[0143] 应当理解，本文所述的发明的方面和实施例包括“包含”、“由以下组成”及“基本上由以下组成”所指的方面和实施例。

[0144] 术语“PD-1轴结合拮抗剂”是指抑制PD-1轴结合配偶体与其一个或多个结合配偶体的相互作用的分子，以消除由PD-1信号传导轴上的信号传导引起的T细胞功能障碍，其结果是恢复或增强T细胞功能(例如，增殖、细胞因子产生、靶细胞杀伤)。如本文所用，PD-1轴结合拮抗剂包括PD-1结合拮抗剂、PD-L1结合拮抗剂和PD-L2结合拮抗剂。

[0145] 术语“PD-1结合拮抗剂”是指减少、阻断、抑制、消除或干扰由PD-1与其一种或多种结合配偶体(诸如PD-L1、PD-L2)相互作用产生的信号传导的分子。在一些实施例中，PD-1结合拮抗剂为抑制PD-1与其一个或多个结合配偶体结合的分子。在具体方面，PD-1结合拮抗剂抑制PD-1与PD-L1和/或PD-L2的结合。例如，PD-1结合拮抗剂包括抗PD-1抗体及其抗原结合片段、免疫粘附素、融合蛋白、寡肽以及其它减少、阻断、抑制、消除或干扰由PD-1与PD-L1和/或PD-L2相互作用产生的信号传导的分子。在一个实施例中，PD-1结合拮抗剂可减少由T

淋巴细胞上表达的细胞表面蛋白介导的或通过其表达的负共刺激信号，该表面蛋白通过PD-1介导的信号传导使功能障碍的T细胞功能障碍较少(例如，提高效应子对抗原识别的应答)。在一些实施例中，PD-1结合拮抗剂是抗PD-1抗体。下文提供了PD-1结合拮抗剂的具体实例。

[0146] 术语“PD-L1结合拮抗剂”是指减少、阻断、抑制、消除或干扰由PD-L1与其一种或多种结合配偶体(诸如PD-1、B7-1)相互作用产生的信号传导的分子。在一些实施例中，PD-L1结合拮抗剂是抑制PD-L1与其结合配偶体结合的分子。在具体方面，PD-L1结合拮抗剂抑制PD-L1至PD-1和/或B7-1的结合。在一些实施例中，PD-L1结合拮抗剂包括抗PD-L1抗体，其抗原结合片段、免疫粘附素、融合蛋白、寡肽和其他减少、阻断、抑制、消除或干扰由PD-L1与其一个或多个结合配偶体(诸如PD-1、B7-1)相互作用产生的信号传导的分子。在一个实施例中，PD-L1结合拮抗剂可减少由T淋巴细胞上表达的细胞表面蛋白介导的通过PD-L1的信号传导所介导的或通过其的负共刺激信号，从而使功能障碍的T细胞功能障碍更少(例如，提高效应子对抗原识别的应答)。在一些实施例中，PD-L1结合拮抗剂是抗PD-L1抗体。下文提供了PD-L1结合拮抗剂的具体实例。

[0147] 术语“PD-L2结合拮抗剂”是指减少、阻断、抑制、消除或干扰由PD-L2与其一种或多种结合配偶体(诸如PD-1)的相互作用产生的信号传导的分子。在一些实施例中，PD-L2结合拮抗剂为抑制PD-L2与其一个或多个结合配偶体结合的分子。在具体方面，PD-L2结合拮抗剂抑制PD-L2与PD-1的结合。在一些实施例中，PD-L2拮抗剂包括抗PD-L2抗体，其抗原结合片段、免疫粘附素、融合蛋白、寡肽和其他减少、阻断、抑制、消除或干扰由PD-L2与其一个或多个结合配偶体(诸如PD-1)相互作用产生的信号传导的分子。在一个实施例中，PD-L2结合拮抗剂可减少由T淋巴细胞上表达的细胞表面蛋白介导的或通过其表达的负共刺激信号，该表面蛋白通过PD-L2介导的信号传导使功能障碍的T细胞功能障碍较少(例如，提高效应子对抗原识别的应答)。在一些实施例中，PD-L2结合拮抗剂为免疫粘附素。

[0148] “持续应答”是指在停止治疗后对减少肿瘤生长的持续效果。例如，与给药阶段开始时的大小相比，肿瘤大小可以保持相同或更小。在一些实施例中，持续应答的持续时间至少与治疗持续时间相同、至少为治疗持续时间的1.5倍、2.0倍、2.5倍或3.0倍长度。

[0149] 术语“药物制剂”是指处于允许活性成分的生物学活性有效的形式，并且不含对于将被施用制剂的受试者具有不可接受的毒性的另外组分的制备物。此类制剂为无菌制剂。“药用”赋形剂(载体、添加剂)是指可合理地施用于受试哺乳动物以提供有效剂量的所用活性成分的赋形剂。

[0150] 如本文所用，术语“治疗”是指旨在于临床病理学的进程期间改变所治疗的个体或细胞的自然进程的临床干预。理想的治疗效果包括降低疾病进展速度、减缓或减轻疾病状态以及缓解或改善预后。例如，如果减轻或消除了与癌症有关的一种或多种症状，包括但不限于减少癌细胞的增殖(或破坏)、减轻疾病所致的症状、提高患有该疾病的人的生活质量、减少治疗该疾病所需的其他药物的剂量和/或延长个体的存活，则成功地“治疗”了个体。

[0151] 如本文所用，“延缓疾病的进展”意指延缓、阻碍、减缓、迟滞、稳定和/或推迟疾病(诸如癌症)的发展。这种延迟可以具有不同的时间长度，这取决于病史和/或待治疗的个体。对于本领域技术人员显而易见的是，充分或显著延迟实际上可以涵盖预防，因为个体不会患该病。例如，晚期癌症，诸如转移的发展，可能被延迟。

[0152] “有效量”至少是实现可测量的改善或预防特定病症所需的最小量。本文的有效量可以根据诸如患者的疾病状态、年龄、性别和体重以及抗体在个体中引起预期应答的能力等因素而变化。有效量也是治疗有益作用超过治疗的任何毒性或有害作用的量。对于预防用途、有益或预期结果包括诸如消除或降低风险、减轻严重程度或延迟疾病发作，包括疾病的生化、组织学和/或行为症状、其并发症以及在疾病发展过程中出现的中间病理表型。对于治疗用途、有益或预期结果包括临床结果，诸如减少由疾病引起的一种或多种症状、提高患病者的生活质量、减少治疗该疾病所需的其他药物的剂量、增强其他药物的效果(诸如通过靶向、延迟疾病进展和/或延长存活)。在癌症或肿瘤的情况下，有效量的药物可能减少癌细胞的数量;减小肿瘤大小;抑制(即，在某种程度上减慢或预期停止)癌细胞浸润进入周围器官中;抑制(即在某种程度上减慢并预期停止)肿瘤转移;在某种程度上抑制肿瘤的生长;以及/或在某种程度上减轻与疾患有关的一种或多种症状。有效量可以一次或多次施用。出于本发明的目的，药物、化合物或药物组合物的有效量为足以直接或间接地进行预防或治疗的量。如在临床背景中所理解的，与另一药物、化合物或药物组合物结合可以达到或不能达到有效量的药物、化合物或药物组合物。因此，可以在施用一种或多种治疗剂的情况下考虑“有效量”，并且如果与一种或多种其他试剂结合可以获得或实现预期结果，则可以考虑给予有效量的单一药剂。

[0153] 如本文所用，“与……结合”或“与……联合”是指在一种治疗方式以外还施用另一种治疗方式。因此，“与……结合”或“与……联合”是指在向个体施用一种治疗方式之前、期间或之后施用另一种治疗方式。

[0154] “疾患”是将从治疗获益的任何病症，包括但不限于慢性和急性疾患或疾病，包括那些使哺乳动物易患所述疾患的病理性病症。

[0155] 术语“细胞增殖性疾病”和“增殖性疾病”是指与某种程度的异常细胞增殖相关的病症。在一个实施例中，所述细胞增殖性病症为癌症。在一个实施例中，所述细胞增殖性病症为肿瘤。

[0156] 如本文所用，术语“肿瘤”是指所有赘生性细胞生长和增殖，无论是恶性还是良性，以及所有前癌性和癌性细胞和组织。术语“癌症”、“癌性”、“细胞增生性疾病”、“增生性疾病”和“肿瘤”在本文中并不互相排斥。

[0157] 用于治疗目的的“受试者”或“个体”是指被分类为哺乳动物的任何动物，包括人、家畜和农场动物以及动物园动物、运动动物或宠物，诸如狗、马、猫、牛等。优选地，哺乳动物是人。

[0158] 本文的术语“抗体”以最广泛的含义使用，并且具体地覆盖单克隆抗体(包括全长单克隆抗体)、多克隆抗体、多特异性抗体(例如，双特异性抗体)和抗体片段，只要它们表现出所需的抗原结合活性即可。

[0159] “经分离的”抗体是已经鉴定并且自其自然环境的组分中分离和/或回收的抗体。其自然环境的污染物组分是会干扰抗体研究、诊断或治疗用途的材料，并且可以包括酶、激素和其它蛋白质或非蛋白质溶质。在一些实施例中，将抗体纯化至(1)大于抗体重量的95％(例如通过Lowry方法测定)，在一些实施例中，大于99％重量;(2)足以获得N末端或内部氨基酸序列的至少15个残基的程度(例如通过使用旋转杯测序仪)，或(3)均质(在还原或非还原条件下进行SDS-PAGE，使用例如考马斯蓝或银染)。经分离的抗体包括重组细胞内的原位

抗体，因为不会存在抗体天然环境的至少一种成分。然而，通常，分离的抗体将通过至少一个纯化步骤来制备。

[0160] “天然抗体”通常是约150,000道尔顿的异源四聚体糖蛋白，由两条相同的轻(L)链和两条相同的重(H)链组成。每条轻链通过一个共价二硫键与重链相连，而二硫键的数目在不同免疫球蛋白同种型的重链之间变化。每条重链和轻链还具有规则间隔的链内二硫键。每条重链在一末端具有可变结构域(VH)，其后是多个恒定结构域。每条轻链在一末端(VL)具有可变结构域，在另一末端具有恒定结构域；轻链的恒定结构域与重链的第一恒定结构域对齐，并且轻链可变结构域与重链的可变结构域对齐。据信特定的氨基酸残基在轻链和重链可变结构域之间形成界面。

[0161] 术语“恒定结构域”是指免疫球蛋白分子的一部分，该部分相对于免疫球蛋白的另一部分(即可变结构域，其包含抗原结合位点)具有更保守的氨基酸序列。恒定结构域包含重链的CH1、CH2和CH3结构域(统称为CH)和轻链的CHL(或CL)结构域。

[0162] 抗体的“可变区”或“可变结构域”是指抗体的重链或轻链的氨基末端结构域。重链的可变结构域可称为“VH”。轻链的可变结构域可称为“VL”。这些结构域通常是抗体中变化最大的部分，并且包含抗原结合位点。

[0163] 术语“可变的”是指以下事实：可变结构域的某些部分在抗体之间的序列差异很大，并用于每种特定抗体对其特定抗原的结合和特异性。然而，可变性并非在抗体的可变结构域中均匀分布。它集中在轻链和重链可变结构域中的三个称为高变区(HVR)的区段中。可变结构域中保守性更高的部分称为构架区(FR)。天然重链和轻链的可变结构域各自包含四个FR区，其主要采用β折叠结构，由三个HVR连接，这三个HVR形成连接β折叠结构的环并且在一些情况下形成β折叠结构的一部分。每条链中的HVR通过FR区紧密保持在一起，并且与另一条链中的HVR一起，有助于抗体的抗原结合位点的形成(参见Kabat等人，《具有免疫学意义的蛋白质序列》(Sequences of Proteins of Immunological Interest)，第五版，美国卫生与公众服务部，国立卫生研究院，马里兰州贝塞斯达(1991))。恒定结构域不直接参与抗体与抗原的结合，但具有各自效应物功能，诸如抗体参与抗体依赖性细胞毒性作用。

[0164] 来自任何哺乳动物物种抗体(免疫球蛋白)的“轻链”基于其恒定结构域的氨基酸序列，可以配属为两种明显不同的类型中的一种，这两种类型分别称为卡帕(“κ”)和兰姆达(“λ”)。

[0165] 如本文所用，术语IgG“同种型”或“亚类”是指由免疫球蛋白恒定区的化学和抗原特征定义的免疫球蛋白的任何亚类。

[0166] 根据其重链恒定结构域的氨基酸序列，可以将抗体(免疫球蛋白)分为不同的类别。免疫球蛋白主要分为五类：IgA、IgD、IgE、IgG和IgM，并且它们中的一些可以进一步分为亚类(同型)，例如，IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2。对应于不同类别的免疫球蛋白的重链恒定结构域分别称为α、γ、ε、γ和μ。不同种类的免疫球蛋白的亚基结构和三维构型是众所周知的，并在例如以下文献中有一般描述：Abbas等人，《细胞和分子免疫学》(Cellular and Mol.Immunology)，第4版(W.B.Saunders,Co.,2000)。抗体可以是较大融合分子的一部分，该融合分子是通过抗体与一个或多个其他蛋白质或肽的共价或非共价缔合形成的。

[0167] 术语“全长抗体”、“完整抗体”和“全抗体”在本文中可互换使用，是指其基本上完整形式的抗体而不是如下文定义的抗体片段。该术语特别是指具有包含Fc区的重链的抗

体。

[0168] 出于本文目的的“裸抗体”是未与药物部分或放射性标记缀合的抗体。

[0169] “抗体片段”包含完整抗体的一部分，优选包含其抗原结合区。在一些实施例中，本文所述的抗体片段是抗原结合片段。抗体片段的示例包括Fab、Fab′、F(ab′)2和Fv片段；双体抗体；线性抗体；单链抗体分子；和由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0170] 木瓜蛋白酶消化抗体产生两个相同抗原结合片段，称为“Fab”片段，每个片段都有单个抗原结合位点和残留的“Fc”片段，其名称反映其容易结晶的能力。胃蛋白酶处理产生的F(ab′)2片段具有两个抗原结合位点并且仍能与抗原交联。

[0171] “Fv”是包含完全的抗原结合位点的最小抗体片段。在一个实施例中，双链Fv物类由紧密和非共价缔合的一个重链和一个轻链可变结构域的二聚体组成。在单链Fv(scFv)物类中，一个重链可变结构域和一个轻链可变结构域可通过柔性肽接头共价连接，使得轻链和重链可缔合成类似于在双链Fv物类中的“二聚体”结构。以此构型，每个可变结构域的三个HVR相互作用以在VH-VL二聚体的表面上限定抗原结合位点。六个HVR共同对抗体赋予抗原结合特异性。但是，即使单个可变结构域(或仅包含三个对抗原具有特异性的HVR的Fv的一半)也具有识别和结合抗原的能力，尽管其亲和力低于完整结合位点。

[0172] Fab片段含有重链可变结构域和轻链可变结构域且亦含有轻链的恒定结构域和重链的第一恒定结构域(CH1)。Fab’片段与Fab片段的不同之处在于Fab’片段在重链CH1结构域的羧基末端添加了一些残基，这些残基包括来自抗体铰链区的一个或多个半胱氨酸。Fab’-SH是本文中关于其中恒定结构域的半胱氨酸残基带有游离硫醇基的Fab’的命名。F(ab’)2抗体片段最初是作为在其间具有铰链半胱氨酸的成对Fab’片段而产生的。抗体片段的其他化学偶联也是已知的。

[0173] “单链Fv”或“scFv”抗体片段包含抗体的VH和VL结构域，其中这些结构域存在于单个多肽链中。一般地，scFv多肽在VH和VL结构域之间进一步包含多肽接头，使scFv形成所需的抗原结合结构。有关scFv的综述，参见例如Pluckthun的《单克隆抗体的药理学》(The Pharmacology of Monoclonal Antibodies)，第113卷，Rosenburg和Moore主编，(Springer-Verlag,New York,1994)，第269-315页。

[0174] 术语“双体抗体”是指具有两个抗原结合位点的抗体片段，其片段包含连接至与同一多肽链(VH-VL)中的轻链可变结构域(VL)的重链可变结构域(VH)。通过使用太短以至于不允许同一条链上两个结构域之间配对的接头，这些结构域被迫与另一条链的互补结构域配对并产生两个抗原结合位点。双体抗体可为二价抗体或双特异性抗体。双体抗体更全面地描述于例如:EP 404,097;WO 1993/01161;Hudson等人,Nat.Med.9:129-134(2003)；以及Hollinger等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:6444-6448(1993)。Hudson等人在《自然医学》(Nat.Med.)9:129-134(2003)中还描述了三体抗体和四体抗体。

[0175] 如本文所用的术语“单克隆抗体”是指从基本上同质的抗体群中获得的抗体，例如，除了可能存在的少量突变例如天然存在的突变，该抗体群包含的单独抗体是相同的。因此，修饰语“单克隆的”表明抗体的特征不是离散抗体的混合物。在某些实施例中，这样的单克隆抗体通常包括含有结合靶标的多肽序列的抗体，其中靶标结合多肽序列通过包括从多个多肽序列中选择单个靶标结合多肽序列的过程获得。例如，选择过程可以是从多个克隆，例如杂交瘤克隆、噬菌体克隆或重组DNA克隆的集合中选择独特的克隆。应当理解，可以进

一步改变选择的靶标结合序列，例如，用以提高对靶标的亲和力、用以使靶标结合序列人源化、用以提高其在细胞培养物中的产生、用以降低其在体内的免疫原性、用以产生多特异性抗体等，并且包含改变的靶标结合序列的抗体也是本发明的单克隆抗体。与通常包括针对不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制剂相反，单克隆抗体制剂中的每种单克隆抗体针对抗原上的单一决定簇。除其特异性外，单克隆抗体制剂的优势还在于其通常不受其他免疫球蛋白的污染。

[0176] 修饰语“单克隆”表示抗体的特征是从基本上同质的抗体群体获得的，并且不应解释为需要通过任何特定方法产生抗体。例如，根据本发明使用的单克隆抗体可以通过多种技术制备，包括例如杂交瘤方法(例如，Kohler and Milstein,Nature,256:495-97(1975)；Hongo等人,Hybridoma,14(3):253-260(1995)，Harlow等人，《抗体：实验室手册》(Antibodies:ALaboratory Manual,(Cold Spring Harbor Laboratory Press,第2版1988)；Hammerling等人，在:Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681(Elsevier,N.Y.,1981))、重组DNA方法(参见例如，美国专利号4,816,567)、噬菌体展示技术(参见例如，Clackson等人，Nature,352:624-628(1991)；Marks等人，J.Mol.Biol.222:581-597(1992)；Sidhu等人，J.Mol.Biol.338(2):299-310(2004)；Lee等人，J.Mol.Biol.340(5):1073-1093(2004)；Fellouse,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 101(34):12467-12472(2004)；和Lee等人，J.Immunol.Methods 284(1-2):119-132(2004))和在动物中产生具有部分或全部的编码人类免疫球蛋白序列的人类免疫球蛋白基因座或基因的人抗体或类人抗体的技术(参见，例如，WO 1998/24893；WO 1996/34096；WO 1996/33735；WO 1991/10741；Jakobovits等人，Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:2551(1993)；Jakobovits等人，Nature 362:255-258(1993)；Bruggemann等人，Year in Immunol.7:33(1993)；美国专利号5,545,807、5,545,806、5,569,825、5,625,126、5,633,425和5,661,016；Marks等人，Bio/Technology 10:779-783(1992)；Lonberg等人，Nature 368:856-859(1994)；Morrison,Nature 368:812-813(1994)；Fishwild等人，Nature Biotechnol.14:845-851(1996)；Neuberger,Nature Biotechnol.14:826(1996)；以及Lonberg和Huszar，Intern.Rev.Immunol.13:65-93(1995))。

[0177] 本文中的单克隆抗体具体地包括“嵌合”抗体，其中重链和/或轻链的一部分与来自特定物种或属于特定抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源，而一条或多条链的其余部分与来自另一物种或属于另一抗体类别或亚类的抗体中的相应序列以及这些抗体的片段相同或同源，只要它们表现出所需的生物学活性即可(参见例如美国专利号4,816,567和Morrison等人，Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81:6851-6855(1984))。嵌合抗体包括PRIMATTZED®抗体，其中抗体的抗原结合区源自通过例如用目标抗原免疫猕猴产生的抗体。

[0178] “人源化”形式的非人(例如，鼠)抗体为包含来源于非人免疫球蛋白的最小序列的嵌合抗体。在一个实施例中，人源化抗体是人类免疫球蛋白(受体抗体)，其中来自受体HVR的残基被来自非人类物种(供体抗体)例如小鼠、大鼠、兔或具有所需特异性、亲和力和/或能力的非人类灵长类动物的HVR的残基取代。在一些情况下，人类免疫球蛋白的FR残基被相应的非人类残基取代。此外，人源化抗体可包含受体抗体或供体抗体中不存在的残基。可以进行这些修饰以进一步改善抗体性能。总体上，人源化抗体将基本上包含所有中的至少一

个可变结构域,通常是两个可变结构域,其中所有或基本上所有高变环对应于非人类免疫球蛋白的高变环,并且所有或基本上所有的FR为人类免疫球蛋白序列的FR。人源化抗体还将任选地包含免疫球蛋白恒定区(Fc)的至少一部分,该免疫球蛋白通常为人类免疫球蛋白。更多详情参见例如Jones等人,Nature 321:522-525(1986);Riechmann等人,Nature 332:323-329(1988);和Presta,Curr.Op.Struct.Biol.2:593-596(1992)。另见例如Vaswani和Hamilton,Ann.Allergy,Asthma&Immunol.1:105-115(1998);Harris,Biochem.Soc.Transactions 23:1035-1038(1995);Hurle and Gross,Curr.Op.Biotech.5:428-433(1994);和美国专利号6,982,321和7,087,409。

[0179] “人类抗体”是具有对应于由人类产生的抗体的氨基酸序列的抗体和/或使用本文所公开的用于制备人类抗体的任何技术制得的抗体。人抗体的该定义特别地排除了包含非人抗原结合残基的人源化抗体。可以使用本领域已知的各种技术产生人类抗体,包括噬菌体展示文库。Hoogenboom和Winter,《分子生物学杂志》(J.Mol.Biol.),227:381(1991);Marks等人,《分子生物学杂志》(J.Mol.Biol.),222:581(1991)。还可用于制备人单克隆抗体的方法如以下文献所述:Cole等人,《单克隆抗体与癌症治疗》(Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy),Alan R.Liss,第77页(1985);Boerner等人,《免疫学杂志》(J.Immunol.),147(1):86-95(1991)。另参见van Dijk和van de Winkel,《药理学新见》(Curr.Opin.Pharmacol.),5:368-74(2001)。可以通过向转基因动物施用抗原来制备人抗体,该转基因动物已经修饰以对抗原攻击产生应答而产生此类抗体,但其内源基因座已失效,例如,免疫异种小鼠(参见例如,有关XENOMOUSETM技术的美国专利No.6,075,181和6,150,584)。另参见例如Li等人,《美国国家科学院院刊》(Proc.Natl.Acad.Sci.USA),103:3557-3562(2006)关于通过人B细胞杂交瘤技术产生的人抗体。

[0180] “物种依赖性抗体”是对来自第一哺乳动物物种的抗原具有比对来自第二哺乳动物物种的该抗原同系物更强的结合亲和力的抗体。通常,物种依赖性抗体与人抗原“特异性结合”(例如,其结合亲和力(Kd)值不超过约1×10^{-7}M,优选不超过约1×10^{-8}M,优选不超过约1×10^{-9}M),但对来自第二非人哺乳动物物种的该抗原同系物的结合亲和力比其对该人抗原的结合亲和力弱至少约50倍或至少约500倍或至少约1000倍。物种依赖性抗体可以是如上定义的各种抗体中的任何一种,但是优选地是人源化或人抗体。

[0181] 如本文所用的术语“高变区”、“HVR”或“HV”是指在序列上高变和/或形成结构上限定的环的抗体可变结构域的区域。通常,抗体包含六个HVR;三个在VH中(H1、H2、H3),并且三个在VL中(L1、L2、L3)。在天然抗体中,H3和L3在六个HVR中表现出最多的多样性,尤其是H3被认为在赋予抗体精细特异性方面起着独特的作用。参见例如:Xu等人,Immunity 13:37-45(2000);Johnson和Wu,Methods in Molecular Biology 248:1-25(Lo主编,Human Press,Totowa,N.J.,2003)。实际上,仅由重链组成的天然存在的骆驼科动物抗体在不存在轻链的情况下是有功能并稳定的。参见例如:Hamers-Casterman等人,Nature 363:446-448(1993);Sheriff等人,Nature Struct.Biol.3:733-736(1996)。

[0182] 许多HVR描述得到应用,并且包含于本文中。Kabat互补决定区(CDR)基于序列变异性并且是最常用的(Kabat等人,《具有免疫学意义的蛋白质序列》(Sequences of Proteins of Immunological Interest),第5版,美国卫生与公众服务部,国立卫生研究院,马里兰州贝塞斯达(1991))。相反,Chothia指的是结构环的位置(Chothia和Lesk J.Mol.Biol.196:

901-917(1987))。AbM HVR表示Kabat HVR和Chothia结构环之间的折衷,并且被牛津分子公司(Oxford Molecular)的AbM抗体建模软件采用。“接触”HVR基于可用的复杂晶体结构的分析结果。这些HVR中的每个的残基如下文所述。

[0183]

环	Kabat	AbM	Chothia	接触
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B（Kabat 编号）
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35（Chothia 编号）
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

[0184] HVR可以包括以下“扩展HVR”:VL中的24-36或24-34(L1)、46-56或50-56(L2)和89-97或89-96(L3),以及VH中的26-35(H1)、50-65或49-65(H2)和93-102、94-102或95-102(H3)。对于这些定义中的每一个,可变结构域残基均根据上述Kabat等人的方法进行编号。

[0185] HVR可以包括以下“扩展HVR”:VL中的24-36或24-34(L1)、46-56或50-56(L2)和89-97或89-96(L3),以及VH中的26-35(H1)、50-65或49-65(H2)和93-102、94-102或95-102(H3)。对于这些定义中的每一个,可变结构域残基均根据上述Kabat等人的方法进行编号。

[0186] “框架”或“FR”残基是除本文定义的HVR残基以外的那些可变结构域残基。

[0187] 术语“Kabat所述的可变结构域残基编号”或“Kabat所述的氨基酸位置编号”及其变型是指在上述Kabat等人的文献中提出的用于重链可变结构域或轻链可变结构域的编号系统。使用该编号系统,实际线性氨基酸序列可能包含较少或附加的氨基酸,其对应于对可变结构域的FR或HVR的缩短或插入。例如,重链可变结构域可在H2的残基52之后包括单个氨基酸插入片段(根据Kabat编号的残基52a)以及重链FR残基82之后的插入残基(例如,根据Kabat编号的残基82a、82b和82c等)。可通过将抗体序列与“标准”Kabat编号序列的同源性区域进行比对来确定给定抗体的残基的Kabat编号。

[0188] 当提及可变结构域中的残基(大约是轻链的残基1-107和重链的残基1-113)时,通常使用Kabat编号系统(例如,Kabat等人,《具有免疫学意义的蛋白质序列》(Sequences of Proteins of Immunological Interest)。第5版,美国卫生与公众服务部,国立卫生研究院,马里兰州贝塞斯达(1991))。当提及免疫球蛋白重链恒定区中的残基时,通常使用“EU编号系统”或“EU索引”(例如,上述Kabat等人所报道的EU索引)。“Kabat所述的EU索引”是指人类IgG1 EU抗体的残基编号。

[0189] 表述“线性抗体”是指Zapata等人在(1995Protein Eng,8(10):1057-1062)中所述的抗体。简而言之,这些抗体包含一对串联的Fd区段(VH-CH1-VH-CH1),其与互补的轻链多肽一起形成一对抗原结合区。线性抗体可以为双特异性或单特异性的。

[0190] 如本文所用,术语“结合”、“特异性结合”或“具有特异性”是指可测量和可再现的相互作用,诸如靶与抗体之间的结合,在存在分子(包括生物分子)的异质群体的存在下,其确定靶的存在。例如,与靶标(其可以是表位)结合或特异性结合的抗体是与其结合其他靶

标相比具有更大亲和力、亲合力、更容易和/或持续时间更长的结合该靶标的抗体。在一个实施例中，抗体与无关靶标的结合程度为该抗体与抗原结合的小于约10％，例如，通过放射免疫分析(RIA)所测量。在某些实施例中，与靶标特异性结合的抗体的解离常数(Kd)为≤1μM、≤100nM、≤10nM、≤1nM或≤0.1nM。在某些实施例中，抗体与蛋白上的表位特异性地结合，该表位在不同物类的蛋白之间具有保守性。在另一个实施例中，特异性结合可以包括但不要求排他结合。

[0191] 如本文所用，术语“样品”是指获自或衍生自目的受试者和/或个体的组合物，其包含例如待基于物理、生化、化学和/或生理特征进行表征和/或鉴定的细胞和/或其他分子实体。例如，短语“疾病样品”及其变型是指从目标受试者获得的任何样品，其预期或已知含有待表征的细胞和/或分子实体。样品包括但不限于原代或培养的细胞或细胞系、细胞上清液、细胞裂解液、血小板、血清、血浆、玻璃体液、淋巴液、滑液、卵泡液、精液、羊水、乳汁、全血、血液来源的细胞、尿液、脑脊液、唾液、痰、眼泪、汗液、粘液、肿瘤溶解产物和组织培养基、组织提取物诸如均质化的组织、肿瘤组织、细胞提取物以及它们的组合。在一些实施例中，样品是从个体的癌症获得的样品(例如，肿瘤样品)，其包含肿瘤细胞并且任选地包含肿瘤浸润免疫细胞。例如，样品可为包埋在石蜡块中的肿瘤样本，或者包括新鲜切割的、连续未染色的切片。在一些实施例中，样品来自活检，并且包括50个或更多活肿瘤细胞(例如，来自芯针活检并且任选地包埋于石蜡块中；切除、切口、穿孔或活检钳活检；或肿瘤组织切除)。

[0192] “组织样品”、“组织样本”或“细胞样品”是指从受试者或个体的组织(例如肿瘤)获得的相似细胞的集合。组织或细胞样品的来源可以是来自新鲜的、冷冻的和/或保存的器官、组织样品、活组织检查和/或吸出物的实体组织(例如，肿瘤)；血液或任何血液成分，例如血浆；体液，例如脑脊髓液、羊水、腹膜液或间质液；受试者妊娠或发育中任何时候的细胞。组织样品也可以是原代或培养的细胞或细胞系。任选地，组织或细胞样品获自疾病组织/器官。组织样品可以包含在自然环境天然不与组织混合的化合物，例如防腐剂、抗凝剂、缓冲剂、固定剂、营养物、抗生素等。

[0193] 如本文所用，“参考样品”、“参考细胞”、“参考组织”、“对照样品”、“对照细胞”或“对照组织”是指用于比较目的的样品、细胞、组织、标准品或水平。在一个实施例中，参考样品、参考细胞、参考组织、对照样品、对照细胞或对照组织获自同一受试者或个体身体的健康和/或未患病的部位(例如，组织或细胞)。例如，健康和/或未患病的细胞或组织邻近患病的细胞或组织(例如，与肿瘤相邻的细胞或组织)。在另一个实施例中，参考样品获自相同受试者或个体的未经处理的身体组织和/或细胞。在又一个实施例中，参考样品、参考细胞、参考组织、对照样品、对照细胞或对照组织获自并非受试者或研究个体的个体的健康和/或未患病的身体部位(例如，组织或细胞)。在另一个实施例中，参考样品、参考细胞、参考组织、对照样品、对照细胞或对照组织获自并非受试者或研究个体的个体的未经处理的身体组织和/或细胞。

[0194] 患者对药物和治疗的“有效响应”或患者的“响应性”和类似措词是指赋予处于患疾病或病症诸如癌症的风险下或患有该疾病或病症的患者的临床或治疗有益效果。在一个实施例中，这种益处包括以下一个或多个：延长存活(包括总存活和无进展存活)；导致客观缓解(包括完全缓解或部分缓解)；或改善癌症的体征或症状。

[0195] 对治疗“没有有效响应”的患者是指没有以下任一项的患者:延长存活(包括总存活和无进展存活);导致客观缓解(包括完全缓解或部分缓解);或改善癌症的征兆或症状。

[0196] “功能性Fc区”具有天然序列Fc区的“效应子功能”。示例性的“效应子功能”包括C1q结合;CDC;Fc受体结合;ADCC;吞噬作用;细胞表面受体(例如,B细胞受体;BCR)的下调等。此类效应子功能通常需要Fc区与结合结构域(例如,抗体可变结构域)组合,并且可使用例如本文定义中所公开的各种测定方法进行评估。

[0197] “具有人效应细胞”的癌症或生物样品是,在诊断测试中,样品中存在人效应细胞(例如,浸润的人效应细胞)的癌症或生物样品。

[0198] “具有表达FcR的细胞”的癌症或生物学样品是,在诊断测试中,样品中存在表达FcR的细胞(例如,浸润的表达FcR的细胞)的癌症或生物样品。在一些实施例中,FcR是FcγR。在一些实施例中,FcR是活化FcγR。

[0199] II.诱导新表位特异性免疫应答的方法

[0200] 本文提供了一种在患有肿瘤的个体中诱导新表位特异性CD8+T细胞的方法。在某些实施例中,该方法包括向个体施用有效量的RNA疫苗的步骤,其中疫苗包含一种或多种多核苷酸,所述一种或多种多核苷酸编码由存在于获得自个体的肿瘤样本中的癌症特异性体细胞突变产生的一个或多个新表位。在某些实施例中,在施用RNA疫苗后获得自个体的外周血样品中至少约1%(例如,约1%、约2%、约3%、约4%、约5%、约6%、约7%、约8%、约9%、约10%、约11%、约12%、约13%、约14%、约15%、约16%、约17%、约18%、约19%、约20%或更多中的任一者)的CD8+T细胞为对由RNA疫苗的一种或多种多核苷酸编码的新表位中的至少一者具有特异性的新表位特异性CD8+T细胞。在某些实施例中,在施用RNA疫苗后获得自个体的外周血样品中约1%至约6%(例如,约1%、约2%、约3%、约4%、约5%或约6%中的任一者)的CD8+T细胞为对由RNA疫苗的一种或多种多核苷酸编码的新表位中的至少一者具有特异性的新表位特异性CD8+T细胞。在一些实施例中,在施用RNA疫苗后获得自个体的外周血样品包含约5%或约6%的对由RNA疫苗的一种或多种多核苷酸编码的新表位中的至少一者具有特异性的CD8+T细胞。

[0201] 在某些实施例中,在施用RNA疫苗后获得自个体的外周血样品中至少约0.1%(例如,至少约0.1%、至少约0.18%、至少约0.2%、至少约0.27%、至少约0.29%、至少约0.3%、至少约0.4%、至少约0.5%、至少约0.6%、至少约0.7%、至少约0.8%、至少约0.87%、至少约0.9%、至少约1%、至少约1.25%、至少约1.5%、至少约1.75%、至少约2%、至少约2.25%、至少约2.5%、至少约2.5%、至少约2.75%、至少约3%、至少约3.25%、至少约3.5%、至少约3.75%、至少约4%、至少约4.25%、至少约4.5%、至少约4.75%、至少约5%、至少约5.25%、至少约5.5%、至少约5.67%或更多中的任一者)的CD8+T细胞为对由RNA疫苗的一种或多种多核苷酸编码的新表位中的至少一者具有特异性的新表位特异性CD8+T细胞。

[0202] 在某些实施例中,在施用RNA疫苗后获得自个体的外周血样品中至少约0.27%(例如,至少约0.27%、至少约0.29%、至少约0.3%、至少约0.4%、至少约0.5%、至少约0.6%、至少约0.7%、至少约0.8%、至少约0.87%、至少约0.9%、至少约1%、至少约1.25%、至少约1.5%、至少约1.75%、至少约2%、至少约2.25%、至少约2.5%、至少约2.5%、至少约2.75%、至少约3%、至少约3.25%、至少约3.5%、至少约3.75%、至少约4%、至少约

4.25%、至少约4.5%、至少约4.75%、至少约5%、至少约5.25%、至少约5.5%、至少约5.67%或更多中的任一者)的CD8+T细胞为对由RNA疫苗的一种或多种多核苷酸编码的新表位中的至少一者具有特异性的新表位特异性CD8+T细胞。

[0203] 在某些实施例中,在施用RNA疫苗后获得自个体的外周血样品中约0.1%与约5.67%之间(例如,约0.1%、约0.18%、约0.2%、约0.27%、约0.29%、约0.3%、约0.4%、约0.5%、约0.6%、约0.7%、约0.8%、约0.87%、约0.9%、约1%、约1.25%、约1.5%、约1.75%、约2%、约2.25%、约2.5%、约2.75%、约3%、约3.25%、约3.5%、约3.75%、约4%、约4.25%、约4.5%、约4.75%、约5%、约5.25%、约5.5%或约5.67%中的任一者)的CD8+T细胞为对由RNA疫苗的一种或多种多核苷酸编码的新表位中的至少一者具有特异性的新表位特异性CD8+T细胞。

[0204] 在某些实施例中,在施用RNA疫苗后获得自个体的外周血样品中约0.27%至约5.67%(例如,约0.27%、约0.29%、约0.3%、约0.4%、约0.5%、约0.6%、约0.7%、约0.8%、约0.87%、约0.9%、约1%、约1.25%、约1.5%、约1.75%、约2%、约2.25%、约2.5%、约2.75%、约3%、约3.25%、约3.5%、约3.75%、约4%、约4.25%、约4.5%、约4.75%、约5%、约5.25%、约5.5%或约5.67%中的任一者)的CD8+T细胞为对由RNA疫苗的一种或多种多核苷酸编码的新表位中的至少一者具有特异性的新表位特异性CD8+T细胞。

[0205] 在某些实施例中,在施用RNA疫苗后获得自个体的外周血样品中约0.18%的CD8+T细胞为对由RNA疫苗的一种或多种多核苷酸编码的新表位中的至少一者具有特异性的新表位特异性CD8+T细胞。在某些实施例中,在施用RNA疫苗后获得自个体的外周血样品中约0.27%的CD8+T细胞为对由RNA疫苗的一种或多种多核苷酸编码的新表位中的至少一者具有特异性的新表位特异性CD8+T细胞。在某些实施例中,在施用RNA疫苗后获得自个体的外周血样品中约0.29%的CD8+T细胞为对由RNA疫苗的一种或多种多核苷酸编码的新表位中的至少一者具有特异性的新表位特异性CD8+T细胞。在某些实施例中,在施用RNA疫苗后获得自个体的外周血样品中约0.87%的CD8+T细胞为对由RNA疫苗的一种或多种多核苷酸编码的新表位中的至少一者具有特异性的新表位特异性CD8+T细胞。在某些实施例中,在施用RNA疫苗后获得自个体的外周血样品中约1.89%的CD8+T细胞为对由RNA疫苗的一种或多种多核苷酸编码的新表位中的至少一者具有特异性的新表位特异性CD8+T细胞。在某些实施例中,在施用RNA疫苗后获得自个体的外周血样品中约3.1%的CD8+T细胞为对由RNA疫苗的一种或多种多核苷酸编码的新表位中的至少一者具有特异性的新表位特异性CD8+T细胞。在某些实施例中,在施用RNA疫苗后获得自个体的外周血样品中约5.67%的CD8+T细胞为对由RNA疫苗的一种或多种多核苷酸编码的新表位中的至少一者具有特异性的新表位特异性CD8+T细胞。在某些实施例中,在施用RNA疫苗后获得自个体的外周血样品中约1.95%的CD8+T细胞为对由RNA疫苗的一种或多种多核苷酸编码的新表位中的至少一者具有特异性的新表位特异性CD8+T细胞。在某些实施例中,在施用RNA疫苗后获得自个体的外周血样品中约2.49%的CD8+T细胞为对由RNA疫苗的一种或多种多核苷酸编码的新表位中的至少一者具有特异性的新表位特异性CD8+T细胞。在某些实施例中,在施用RNA疫苗后获得自个体的外周血样品中约4.7%的CD8+T细胞为对由RNA疫苗的一种或多种多核苷酸编码的新表位中的至少一者具有特异性的新表位特异性CD8+T细胞。在某些实施例中,在施用RNA疫苗后获得自个体的外周血样品中约2.2%的CD8+T细胞为对由RNA疫苗的一种或多种多核苷酸编码的

新表位中的至少一者具有特异性的新表位特异性CD8+T细胞。

[0206] 可利用本领域已知的任何方法诸如离体ELISPOT或MHC多聚体分析来检测在施用RNA疫苗后获得自个体的外周血样品中的新表位特异性CD8+T细胞。在一些实施例中，在施用RNA疫苗后获得自个体的外周血样品中的新表位特异性CD8+T细胞对由RNA疫苗的一种或多种多核苷酸编码的新表位中的1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个或20个中的任一者具有特异性。在一些实施例中，在施用RNA疫苗后获得自个体的外周血样品中的新表位特异性CD8+T细胞对由RNA疫苗的一种或多种多核苷酸编码的新表位中的1个至9个、1个至8个、1个至7个、1个至6个、1个至5个、1个至4个、1个至3个或1个至2个中的任一者具有特异性。在一些实施例中，在施用RNA疫苗后获得自个体的外周血样品中的新表位特异性CD8+T细胞对由RNA疫苗的一种或多种多核苷酸编码的新表位中的约2.6个或约3个具有特异性。

[0207] 在一些实施例中，在施用RNA疫苗后获得自个体的外周血样品中的新表位特异性CD8+T细胞对由RNA疫苗的一种或多种多核苷酸编码的新表位中的至少约5％、至少约10％、至少约15％、至少约20％、至少约25％、至少约30％、至少约35％、至少约40％、至少约45％、至少约50％、至少约55％、至少约60％、至少约65％、至少约70％或更多中的任一者具有特异性。在一些实施例中，在施用RNA疫苗后获得自个体的外周血样品中的新表位特异性CD8+T细胞对由RNA疫苗的一种或多种多核苷酸编码的新表位中的约5％至约70％中的任一者(例如，约5％、约10％、约15％、约20％、约25％、约30％、约35％、约40％、约45％、约50％、约55％、约60％、约65％或约70％中的任一者)具有特异性。在一些实施例中，在施用RNA疫苗后获得自个体的外周血样品中的新表位特异性CD8+T细胞对由RNA疫苗的一种或多种多核苷酸编码的新表位中的约5％至约35％中的任一者(例如，约5％、约10％、约15％、约20％、约25％、约30％或约35％中的任一者)具有特异性。

[0208] 在一些实施例中，与施用RNA疫苗之前相比，根据本文提供的方法向个体施用RNA疫苗导致诱导(例如，增加)对由RNA疫苗的一种或多种多核苷酸编码的新表位中的至少一者具有特异性的新表位特异性CD4+T细胞。在一些实施例中，在个体的外周血中检测到新表位特异性CD4+T细胞。在一些实施例中，在获得自个体的外周血样品中检测到新表位特异性CD4+T细胞。在一些实施例中，在施用RNA疫苗后获得自个体的外周血样品中的新表位特异性CD4+T细胞对由RNA疫苗的一种或多种多核苷酸编码的新表位中的1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个或20个中的任一者具有特异性。在一些实施例中，利用离体ELISPOT分析检测到获得自个体的外周血样品中的新表位特异性CD4+T细胞。在一些实施例中，与施用RNA疫苗之前相比，根据本文提供的方法向个体施用RNA疫苗导致诱导(例如，增加)对由RNA疫苗的一种或多种多核苷酸编码的新表位中的至少一者具有特异性的新表位特异性CD4+T细胞至少约1.1倍、至少约1.2倍、至少约1.3倍、至少约1.4倍、至少约1.5倍、至少约2倍、至少约2.5倍、至少约3倍、至少约3.5倍、至少约4倍、至少约4.5倍、至少约5倍、至少约5.5倍、至少约6倍、至少约6.5倍、至少约7倍、至少约7.5倍、至少约8倍、至少约8.5倍、至少约9倍、至少约9.5倍、至少约10倍或更多倍中的任一者。在一些实施例中，与施用RNA疫苗之前相比，根据本文提供的方法向个体施用RNA疫苗导致诱导(例如，增加)对由RNA疫苗的一种或多种多核苷酸编码的新表位中的至少一者具有特异性的新表位特异性CD4+T细胞至少约10倍、至少约20倍、至少约30倍、至

少约40倍、至少约50倍、至少约60倍、至少约70倍、至少约80倍、至少约90倍、至少约100倍、至少约110倍、至少约120倍、至少约130倍、至少约140倍、至少约150倍、至少约160倍、至少约170倍、至少约180倍、至少约190倍、至少约200倍、至少约210倍、至少约220倍、至少约230倍、至少约240倍、至少约250倍、至少约260倍、至少约270倍、至少约280倍、至少约290倍、至少约300倍或更多倍中的任一者。在一些实施例中，与施用RNA疫苗之前相比，根据本文提供的方法向个体施用RNA疫苗导致诱导(例如，增加)对由RNA疫苗的一种或多种多核苷酸编码的新表位中的至少一者具有特异性的新表位特异性CD4+T细胞至少约1％、至少约2％、至少约5％、至少约10％、至少约15％、至少约20％、至少约25％、至少约30％、至少约35％、至少约40％、至少约45％、至少约50％、至少约55％、至少约60％、至少约65％、至少约70％、至少约75％、至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约95％、至少约100％、至少约110％、至少约120％、至少约130％、至少约140％、至少约150％、至少约160％、至少约170％、至少约180％、至少约190％、至少约200％、至少约210％、至少约220％、至少约230％、至少约240％、至少约250％、至少约260％、至少约270％、至少约280％、至少约290％、至少约300％或更多中的任一者。

[0209] 在一些实施例中，根据本文提供的方法向多个个体施用RNA疫苗导致诱导(例如，增加)所述多个个体中至少约70％的个体(例如，所述多个个体中的至少约70％、至少约75％、至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约95％、至少约99％或100％中的任一者的个体)的外周血中的新表位特异性CD4+和/或CD8+T细胞。在一些实施例中，根据本文提供的方法向多个个体施用RNA疫苗导致诱导(例如，增加)所述多个个体中至少约73％的个体的外周血中的新表位特异性CD4+和/或CD8+T细胞。在一些实施例中，根据本文提供的方法向多个个体施用RNA疫苗导致诱导(例如，增加)所述多个个体中至少约86％的个体的外周血中的新表位特异性CD4+和/或CD8+T细胞。在一些实施例中，利用离体ELISPOT或MHC多聚体分析来评定对外周血中的新表位特异性CD4+和/或CD8+T细胞的诱导。在一些实施例中，对外周血中新表位特异性CD4+和/或CD8+T细胞的诱导(例如，增加)包含与施用RNA疫苗之前相比，在施用RNA疫苗后个体的外周血中的新表位特异性CD4+和/或CD8+T细胞增加至少约1.1倍、至少约1.2倍、至少约1.3倍、至少约1.4倍、至少约1.5倍、至少约2倍、至少约2.5倍、至少约3倍、至少约3.5倍、至少约4倍、至少约4.5倍、至少约5倍、至少约5.5倍、至少约6倍、至少约6.5倍、至少约7倍、至少约7.5倍、至少约8倍、至少约8.5倍、至少约9倍、至少约9.5倍、至少约10倍、至少约20倍、至少约30倍、至少约40倍、至少约50倍、至少约60倍、至少约70倍、至少约80倍、至少约90倍、至少约100倍、至少约110倍、至少约120倍、至少约130倍、至少约140倍、至少约150倍、至少约160倍、至少约170倍、至少约180倍、至少约190倍、至少约200倍、至少约210倍、至少约220倍、至少约230倍、至少约240倍、至少约250倍、至少约260倍、至少约270倍、至少约280倍、至少约290倍、至少约300倍或更多倍中的任一者。在一些实施例中，对外周血中新表位特异性CD4+和/或CD8+T细胞的诱导(例如，增加)包含与施用RNA疫苗之前相比，在施用RNA疫苗后个体的外周血中的新表位特异性CD4+和/或CD8+T细胞增加至少约1％、至少约5％、至少约10％、至少约15％、至少约20％、至少约25％、至少约30％、至少约35％、至少约40％、至少约45％、至少约50％、至少约55％、至少约60％、至少约65％、至少约70％、至少约75％、至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约95％、至少约100％、至少约110％、至少约120％、至少约130％、至少约140％、至少约150％、至少约

160％、至少约170％、至少约180％、至少约190％、至少约200％、至少约210％、至少约220％、至少约230％、至少约240％、至少约250％、至少约260％、至少约270％、至少约280％、至少约290％、至少约300％或更多中的任一者。

[0210] 在一些实施例中，根据本文提供的方法施用RNA疫苗导致一种或多种炎症性细胞因子的水平升高。炎症性细胞因子的实例包括但不限于IFNγ(即，IFNg)、IFNα(即，IFNa)、IL-12或IL-6。在一些实施例中，与施用RNA疫苗之前的一种或多种炎症性细胞因子的水平相比，根据本文提供的方法向个体施用RNA疫苗导致外周血中(例如，在血浆中)的所述一种或多种炎症性细胞因子(例如，IFNγ、IFNα、IL-12和/或IL-6)的水平升高。在一些实施例中，与施用一剂RNA疫苗之前的一种或多种炎症性细胞因子(例如，IFNγ、IFNα、IL-12和/或IL-6)的水平相比，在施用一剂RNA疫苗后，所述一种或多种炎症性细胞因子(例如，IFNγ、IFNα、IL-12和/或IL-6)的水平的升高为升高至少约1.5倍、至少约2倍、至少约2.5倍、至少约3倍、至少约3.5倍、至少约4倍、至少约4.5倍、至少约5倍、至少约5.5倍、至少约6倍、至少约6.5倍、至少约7倍、至少约7.5倍、至少约8倍、至少约8.5倍、至少约9倍、至少约9.5倍、至少约10倍或更多倍中的任一者。在一些实施例中，与施用一剂RNA疫苗之前的一种或多种炎症性细胞因子(例如，IFNγ、IFNα、IL-12和/或IL-6)的水平相比，在施用一剂RNA疫苗后，所述一种或多种炎症性细胞因子(例如，IFNγ、IFNα、IL-12和/或IL-6)的水平的升高为升高至少约10倍、至少约20倍、至少约30倍、至少约40倍、至少约50倍、至少约60倍、至少约70倍、至少约80倍、至少约90倍、至少约100倍、至少约110倍、至少约120倍、至少约130倍、至少约140倍、至少约150倍、至少约160倍、至少约170倍、至少约180倍、至少约190倍、至少约200倍、至少约210倍、至少约220倍、至少约230倍、至少约240倍、至少约250倍、至少约260倍、至少约270倍、至少约280倍、至少约290倍、至少约300倍或更多倍中的任一者。在一些实施例中，在施用一剂RNA疫苗后约4小时、约5小时、约6小时或更长时间中的任一者时，个体的外周血中(例如，在血浆中)存在一种或多种炎症性细胞因子(例如，IFNγ、IFNα、IL-12和/或IL-6)的水平的升高。可使用本领域已知的任何合适的方法(包括免疫测定诸如ELISA、基于适配体的测定、蛋白质印迹和质谱法)来定量外周血中(例如，在血浆中)炎症性细胞因子(例如，IFNγ、IFNα、IL-12和/或IL-6)的水平。在一些实施例中，外周血中(例如，在血浆中)炎症性细胞因子(例如，IFNγ、IFNα、IL-12和/或IL-6)的水平使用ELISA测定来定量。

[0211] 本文还提供了一种在个体中诱导新表位特异性CD8+T细胞向肿瘤的运输的方法。在某些实施例中，该方法包括向个体施用有效量的RNA疫苗的步骤，其中RNA疫苗包含一种或多种多核苷酸，所述一种或多种多核苷酸编码由存在于获得自个体的肿瘤样本中的癌症特异性体细胞突变产生的一个或多个新表位。在某些实施例中，在施用RNA疫苗后运输至肿瘤的新表位特异性CD8+T细胞对由RNA疫苗的一种或多种多核苷酸编码的新表位中的至少一者具有特异性。在某些实施例中，在施用RNA疫苗后运输至肿瘤的新表位特异性CD8+T细胞对由RNA疫苗的一种或多种多核苷酸编码的新表位中的1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个或20个中的任一者具有特异性。可利用本领域已知的任何方法(例如，如Cowell LG(2019)Cancer Res,1457.2019所述)来测量新表位特异性CD8+T细胞向肿瘤的运输。例如，可对取自肿瘤的样品中的T细胞受体进行测序，以鉴别和测量对由RNA疫苗的一种或多种多核苷酸编码的新表位中的至少一者具有特异性的T细胞受体。

[0212] 在本文提供的方法的一些实施例中，新表位特异性CD8+T细胞具有记忆表型(例如，新表位特异性T细胞为CD8+记忆T细胞)。在某些实施例中，具有记忆表型的新表位特异性CD8+T细胞为CD45RO阳性和CCR7阴性。在某些实施例中，具有记忆表型的新表位特异性CD8+T细胞为效应记忆T细胞(即，T_{em})。在某些实施例中，可使用本领域已知的任何标志物来确定新表位特异性CD8+T细胞的记忆表型。可使用本领域已知的任何方法(诸如免疫组织化学、荧光活化细胞分选和流式细胞术)来确定记忆表型(例如，CD45RO阳性和CCR7阴性)。

[0213] 在本文提供的方法的一些实施例中，个体患有具有低至中等突变负荷的肿瘤。在某些实施例中，肿瘤的突变负荷通过定量肿瘤中的体细胞突变来确定。在某些实施例中，个体患有具有300个体细胞突变或更少体细胞突变(例如，300个或更少、250个或更少、200个或更少、150个或更少、100个或更少、50个或更少、25个或更少、10个或更少、5个或更少或1个体细胞突变中的任一者)的肿瘤。在某些实施例中，个体患有具有至少约100个(例如，至少约100个、至少约200个、至少约300个、至少约400个、至少约500个、至少约600个、至少约700个、至少约800个、至少约900个、至少约1000个或更多个中的任一者)体细胞突变的肿瘤。在某些实施例中，个体患有具有至多1000个体细胞突变(例如，1个或更多、10个或更多、20个或更多、40个或更多、50个或更多、100个或更多、150个或更多、200个或更多、300个或更多、400个或更多、500个或更多、600个或更多、700个或更多、800个或更多、900个或更多或1000个体细胞突变中的任一者)的肿瘤。在某些实施例中，个体患有具有约100个与约2000个之间的(例如，约100个、约200个、约300个、约400个、约500个、约600个、约700个、约800个、约900个、约1000个、约1100个、约1200个、约1300个、约1400个、约1500个、约1600个、约1700个、约1800个、约1900个或约2000中的任一者)体细胞突变的肿瘤。在某些实施例中，个体患有具有约300个与约1000个体细胞突变的肿瘤。可使用本领域已知的任何方法(诸如全外显子组测序(WES))来确定肿瘤的突变负荷。

[0214] 在本文提供的方法的一些实施例中，个体具有低肿瘤负荷。在某些实施例中，个体具有与该个体患有相同类型的肿瘤或癌症的个体中的肿瘤负荷中位数的25％或更小(例如，25％或更小、20％或更小、15％或更小、10％或更小、5％或更小、2.5％或更小或1％或更小中的任一者)的肿瘤负荷。在某些实施例中，个体具有与该个体患有相同类型的肿瘤或癌症的个体中的肿瘤负荷中位数的50％或更小(例如，50％或更小、45％或更小、40％或更小、35％或更小、30％或更小、25％或更小、20％或更小、15％或更小、10％或更小、5％或更小、2.5％或更小或1％或更小中的任一者)的肿瘤负荷。可使用本领域已知的任何方法来测量个体中的肿瘤负荷，例如，如以下文献所述：Cai等人，(2018)Chronic Diseases and Translational Medicine,4(1):18-28;Nishino M(2018)ASCO Educational Book,28:1019-29;和Akbar等人，(2019)Scientific Reports,9:14099。例如，可通过定量肿瘤直径(例如，最大肿瘤直径和/或组合肿瘤直径)、定量肿瘤体积和定量转移的数量来测量肿瘤负荷。在某些实施例中，手动(例如，由临床医生和/或放射科医师)或自动(例如，使用计算方法)测量个体中的肿瘤负荷。如本文所用，个体中的肿瘤负荷也称为个体中的肿瘤负担(tumor load)。

[0215] 在本文提供的方法的一些实施例中，肿瘤具有低或阴性PD-L1表达。在某些实施例中，在获得自肿瘤的样品中，少于约5％(例如，少于约5％、少于约4.5％、少于约4％、少于约3.5％、少于约3％、少于约2.5％、少于约2％、少于约1.5％、少于约1％、少于约0.5％或少于

约0.25％中的任一者)的肿瘤细胞表达PD-L1。在某些实施例中,在获得自肿瘤的样品中,少于约5％(例如,少于约5％、少于约4.5％、少于约4％、少于约3.5％、少于约3％、少于约2.5％、少于约2％、少于约1.5％、少于约1％、少于约0.5％或少于约0.25％中的任一者)的免疫细胞表达PD-L1。可根据本领域已知的任何方法(诸如免疫组织化学、荧光活化细胞分选和流式细胞术)来确定获得自所述肿瘤的样品中表达PD-L1的肿瘤细胞和/或免疫细胞的百分比。在某些实施例中,使用免疫组织化学确定获得自肿瘤的样品中表达PD-L1的肿瘤细胞或免疫细胞的百分比。在一些实施例中,可通过利用免疫组织化学或本领域已知的任何方法定量PD-L1的膜染色水平,来确定获得自肿瘤的样品中表达PD-L1的肿瘤细胞或免疫细胞的百分比。在一些实施例中,获得自肿瘤的样品中表达PD-L1的肿瘤细胞和/或免疫细胞的百分比使用Ventana SP142测定来确定。

[0216] 施用RNA疫苗与PD-1轴拮抗剂

[0217] 在本文提供的方法的一些实施例中,RNA疫苗以约15μg至约100μg之间(例如,约15μg、约20μg、约25μg、约30μg、约35μg、约40μg、约45μg、约50μg、约55μg、约60μg、约65μg、约70μg、约75μg、约80μg、约85μg、约90μg、约95μg或约100μg中的任一者)施用于个体。在一些实施例中,RNA疫苗以约15μg、约25μg、约38μg、约50μg、约75μg或约100μg的剂量施用于个体。在某些实施例中,RNA疫苗静脉内施用于个体。

[0218] 在本文提供的方法的一些实施例中,RNA疫苗以7天或1周的间隔施用于个体。在某些实施例中,RNA疫苗以14天或2周的间隔施用于个体。在某些实施例中,RNA疫苗施用于个体达12周或84天。

[0219] 在本文提供的方法的一些实施例中,RNA疫苗以四个21天周期施用于个体,其中RNA疫苗在第1周期的第1天、第8天和第15天;第2周期的第1天、第8天和第15天;第3周期的第1天和第15天;以及第4周期的第1天施用于个体。

[0220] 在本文提供的方法的一些实施例中,RNA疫苗以21天周期施用于个体,其中RNA疫苗在第1周期的第1天、第8天和第15天;第2周期的第1天、第8天和第15天;第3周期的第1天和第15天;以及第7周期的第1天施用于个体。在一些实施例中,本文提供的方法进一步包括在第13周期的第1天并且在之后每24周或168天施用RNA疫苗。在一些实施例中,RNA疫苗的施用持续直至个体发生疾病进展为止。

[0221] 在本文提供的方法的一些实施例中,RNA疫苗以21天周期施用于个体,其中RNA疫苗在第2周期的第1天、第8天和第15天;第3周期的第1天和第15天;以及第7周期的第1天施用于个体。在一些实施例中,本文提供的方法进一步包括在第13周期的第1天并且在之后每24周或168天施用RNA疫苗。在一些实施例中,RNA疫苗的施用持续直至个体发生疾病进展为止。

[0222] 在本文提供的方法的一些实施例中,RNA疫苗在诱导期和该诱导期之后的维持期施用于个体,其中RNA疫苗在诱导期期间以1周或2周的间隔施用于个体,并且其中RNA疫苗在维持期期间以24周的间隔施用于个体。在某些实施例中,RNA疫苗在诱导期和该诱导期之后的维持期施用于个体,其中RNA疫苗在诱导期期间以7天或14天的间隔施用于个体,并且其中RNA疫苗在维持期期间以168天的间隔施用于个体。

[0223] 在本文提供的方法的一些实施例中,RNA疫苗在诱导期和该诱导期后的维持期施用于个体,其中RNA疫苗在诱导期期间以四个21天周期施用于个体,其中在诱导期期间,RNA

疫苗在第1周期的第1天、第8天和第15天;第2周期的第1天、第8天和第15天;第3周期的第1天和第15天;以及第4周期的第1天施用于个体;并且其中在维持期期间,RNA疫苗在第5周期的第1天施用于个体并且在之后每24周或168天施用一次。

[0224] 在本文提供的方法的一些实施例中,RNA疫苗在诱导期和该诱导期后的维持期施用于个体,其中RNA疫苗以21天周期施用于个体;其中,在诱导期期间,RNA疫苗在第1周期的第1天、第8天和第15天;第2周期的第1天、第8天和第15天;第3周期的第1天和第15天;以及第7周期的第1天施用于个体;并且其中,在维持期期间,RNA疫苗在第13周期的第1天施用于个体并且在之后每24周或168天施用一次。在一些实施例中,诱导期包括至多9剂RNA疫苗。在一些实施例中,维持期持续直至个体发生疾病进展为止。

[0225] 在本文提供的方法的一些实施例中,RNA疫苗在诱导期和该诱导期后的维持期施用于个体,其中RNA疫苗以21天周期施用于个体;其中,在诱导期期间,RNA疫苗在第2周期的第1天、第8天和第15天;第3周期的第1天和第15天;以及第7周期的第1天施用于个体;并且其中,在维持期期间,RNA疫苗在第13周期的第1天施用于个体并且在之后每24周或168天施用一次。在一些实施例中,诱导期包括至多9剂RNA疫苗。在一些实施例中,维持期持续直至个体发生疾病进展为止。

[0226] 在某些实施例中,维持期持续直至发生疾病进展或个体退出治疗。

[0227] 在某些实施例中,向个体施用至少3剂RNA疫苗。在某些实施例中,向个体施用至少6剂RNA疫苗。在某些实施例中,向个体施用至少9剂RNA疫苗。在某些实施例中,向个体施用约3剂RNA疫苗。在某些实施例中,向个体施用约6剂RNA疫苗。在某些实施例中,向个体施用约9剂RNA疫苗。在某些实施例中,诱导期包括至多9剂RNA疫苗。在某些实施例中,向个体施用少于9剂RNA疫苗。

[0228] 在本文提供的方法的一些实施例中,方法进一步包括向个体施用PD-1轴结合拮抗剂的步骤。在某些实施例中,PD-1轴结合拮抗剂静脉内施用于个体。

[0229] 在某些实施例中,PD-1轴结合拮抗剂为PD-1结合拮抗剂。在某些实施例中,PD-1结合拮抗剂是抗PD-1抗体。在某些实施例中,抗PD-1抗体为纳武单抗或派姆单抗。

[0230] 在本文提供的方法的某些实施例中,PD-1轴结合拮抗剂为PD-L1结合拮抗剂。在某些实施例中,PD-L1结合拮抗剂是抗PD-L1抗体。在某些实施例中,抗PD-L1抗体为阿维单抗或德瓦鲁单抗。在某些实施例中,抗PD-L1抗体包含:(a)重链可变区(VH),该重链可变区包含:HVR-H1,其包含GFTFSDSWIH(SEQ ID NO:1)的氨基酸序列;HVR-2,其包含AWISPYGGSTYYADSVKG(SEQ ID NO:2)的氨基酸序列;和HVR-3,其包含氨基酸RHWPGGFDY(SEQ ID NO:3);以及(b)轻链可变区(VL),该轻链可变区包含:HVR-L1,其包含RASQDVSTAVA(SEQ ID NO:4)的氨基酸序列;HVR-L2,其包含SASFLYS(SEQ ID NO:5)的氨基酸序列;和HVR-L3,其包含QQYLYHPAT(SEQ ID NO:6)的氨基酸序列。在某些实施例中,抗PD-L1抗体包含重链可变区(V_H)和轻链可变区(V_L),该重链可变区包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列,该轻链可变区包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列。在某些实施例中,抗PD-L1抗体为阿特珠单抗。在某些实施例中,抗PD-L1抗体以约1200mg的剂量施用于个体。

[0231] 在某些实施例中,PD-1轴结合拮抗剂以21天或3周的间隔(例如,在每个21天周期的第1天)施用于个体。

[0232] 在本文提供的方法的一些实施例中,PD-1轴结合拮抗剂为阿特珠单抗,并且阿特

珠单抗以21天周期施用于个体，其中阿特珠单抗在第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11和12周期中的每个周期的第1天施用。在一些实施例中，进一步在第13周期的第1天并且在之后每3周或21天施用阿特珠单抗。在一些实施例中，阿特珠单抗的施用持续直至个体发生疾病进展为止。

[0233] 在本文提供的方法的一些实施例中，PD-1轴结合拮抗剂为阿特珠单抗，并且阿特珠单抗在诱导期期间和该诱导期后的维持期期间以21天周期施用于个体；其中，在诱导期期间，阿特珠单抗在第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11和12周期中的每个周期的第1天施用；并且其中，在诱导期后的维持期期间，阿特珠单抗在第13周期的第1天并且在之后每3周或21天施用。在一些实施例中，维持期持续直至个体发生疾病进展为止。

[0234] 在一些实施例中，根据实体瘤临床疗效评价标准1.1版(RECIST v1.1)来评定疾病进展。

[0235] 对施用的反应

[0236] 在本文提供的在患有肿瘤的个体中诱导新表位特异性CD8+T细胞的方法、在个体中诱导新表位特异性CD8+T细胞向肿瘤的运输的方法和/或治疗方法(参见例如以下章节VII)的一些实施例中，RNA疫苗的施用导致个体中的完全缓解(CR)或部分缓解(PR)。在某些实施例中，RNA疫苗的施用导致个体中的完全缓解(CR)。在一些实施例中，RNA疫苗的施用导致个体中的部分缓解(PR)。在某些实施例中，根据实体瘤临床疗效评价标准1.1版(RECIST v1.1)或免疫修订后RECIST来评定完全缓解或部分缓解。在某些实施例中，从基线到最后一剂RNA疫苗、开始另一种全身性抗癌疗法、发生疾病进展或死亡来评定完全缓解或部分缓解。

[0237] 在本文提供的方法的一些实施例中，向多个患有肿瘤的个体施用RNA疫苗导致所述多个个体中至少约4％(例如，至少约4％、至少约5％、至少约10％、至少约15％、至少约20％、至少约25％、至少约30％、至少约35％、至少约40％、至少约45％、至少约50％、至少约60％、至少约70％、至少约80％、至少约90％或更多中的任一者)的个体具有完全缓解或部分缓解。

[0238] 在某些实施例中，完全缓解或部分缓解持续约6个月或更长时间(例如，约6个月或更长时间、约7个月或更长时间、约8个月或更长时间、约9个月或更长时间、约10个月或更长时间、约11个月或更长时间、约12个月或更长时间、约14个月或更长时间、约15个月或更长时间、约20个月或更长时间、约24个月或更长时间、约30个月或更长时间、约36个月或更长时间、约42个月或更长时间、约48个月或更长时间、约54个月或更长时间或约60个月或更长时间中的任一者)。在某些实施例中，完全缓解持续约10个月或更长时间。

[0239] 在一些实施例中，向多个患有肿瘤的个体施用RNA疫苗导致所述多个个体中至少约20％(例如，至少约20％、至少约30％、至少约40％、至少约50％、至少约60％、至少约70％、至少约80％、至少约90％、至少约95％、至少约99％或100％中的任一者)的个体具有稳定的疾病。在某些实施例中，向多个患有肿瘤的个体施用RNA疫苗导致所述多个个体中至少约42％的个体具有稳定的疾病。在某些实施例中，向多个患有肿瘤的个体施用RNA疫苗导致所述多个个体中至少约49％的个体具有稳定的疾病。

[0240] 在一些实施例中，向多个患有肿瘤的个体施用RNA疫苗导致至少60％(例如，至少60％、至少61％、至少62％、至少63％、至少64％、至少65％、至少66％、至少67％、至少68％、

至少69%、至少70%、至少71%、至少72%、至少73%、至少74%、至少75%、至少76%、至少77%、至少78%、至少79%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%中的任一者)的个体具有由RNA疫苗诱导的新抗原特异性CD8+T细胞应答(例如,其中在施用RNA疫苗后获得自个体的外周血样品包含至少约1%(例如,约1%、约2%、约3%、约4%、约5%、约6%、约7%、约8%、约9%、约10%、约11%、约12%、约13%、约14%、约15%、约16%、约17%、约18%、约19%、约20%或更多中的任一者)的对由RNA疫苗的一种或多种多核苷酸编码的新表位中的至少一者具有特异性的CD8+T细胞;或者其中在施用RNA疫苗后运输至肿瘤的新表位特异性CD8+T细胞对由RNA疫苗的一种或多种多核苷酸编码的新表位中的至少一者具有特异性)。在一些实施例中,向多个患有肿瘤的个体施用RNA疫苗导致至少60%(例如,至少60%、至少61%、至少62%、至少63%、至少64%、至少65%、至少66%、至少67%、至少68%、至少69%、至少70%、至少71%、至少72%、至少73%、至少74%、至少75%、至少76%、至少77%、至少78%、至少79%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%中的任一者)的个体具有由RNA疫苗诱导的新抗原特异性CD8+T细胞应答(例如,其中在施用RNA疫苗后获得自个体的外周血样品包含约1%至约6%的对由RNA疫苗的一种或多种多核苷酸编码的新表位中的至少一者具有特异性的CD8+T细胞;或者其中在施用RNA疫苗后运输至肿瘤的新表位特异性CD8+T细胞对由RNA疫苗的一种或多种多核苷酸编码的新表位中的至少一者具有特异性)。在一些实施例中,向多个患有肿瘤的个体施用RNA疫苗导致约77%的个体具有由RNA疫苗诱导的新抗原特异性CD8+T细胞应答。在一些实施例中,向多个患有肿瘤的个体施用RNA疫苗导致约87%的个体具有由RNA疫苗诱导的新抗原特异性CD8+T细胞应答。RNA疫苗诱导的新抗原特异性CD8+T细胞应答可使用本领域已知的任何方法(例如使用ELISPOT测定、T细胞受体测序或MHC多聚体分析)来测定。

[0241] 在一些实施例中,根据本文提供的方法向多个个体施用RNA疫苗导致所述多个个体中至少约70%(例如,所述多个个体中的至少70%、至少71%、至少72%、至少73%、至少74%、至少75%、至少76%、至少77%、至少78%、至少79%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%中的任一者)的个体的外周血中诱导新表位特异性CD4+和/或CD8+T细胞。在一些实施例中,根据本文提供的方法向多个个体施用RNA疫苗导致诱导所述多个个体中至少约73%的个体的外周血中的新表位特异性CD4+和/或CD8+T细胞。在一些实施例中,根据本文提供的方法向多个个体施用RNA疫苗导致诱导所述多个个体中至少约86%的个体的外周血中的新表位特异性CD4+和/或CD8+T细胞。RNA疫苗诱导的新抗原特异性CD8+和/或CD4+T细胞应答可使用本领域已知的任何方法(例如使用ELISPOT测定、T细胞受体测序或MHC多聚体分析)来测定。在一些实施例中,利用离体ELISPOT或MHC多聚体分析来评定对外周血中的新表位特异性CD4+和/或CD8+T细胞的诱导。

[0242] 在某些实施例中,施用RNA疫苗导致促炎性细胞因子随施用每剂RNA疫苗而释放。

[0243] 在一些实施例中，与未经施用RNA疫苗的多个患有肿瘤的个体相比，向多个患有肿瘤的个体施用RNA疫苗导致无进展生存期(PFS)增加(例如，平均或中位PFS增加)。在某些实施例中，PFS以天、周、月或年来衡量。在某些实施例中，PFS根据RECIST v1.1来确定。在某些实施例中，与未经施用RNA疫苗的多个患有肿瘤的个体相比，向多个患有肿瘤的个体施用RNA疫苗导致总存活增加(例如，平均或中位OS增加)。在某些实施例中，总存活以天、周、月或年来衡量。在某些实施例中，总存活是指在施用RNA疫苗后存活指定时间(例如，天、周、月或年)的个体的百分比。

[0244] 在一些实施例中，与包含在不存在RNA疫苗的情况下施用PD-1轴结合拮抗剂的治疗相比，该治疗延长了个体的无进展存活(PFS)和/或总存活(OS)。在一些实施例中，与包含在不存在RNA疫苗的情况下施用PD-1轴结合拮抗剂的治疗相比，该治疗改善了总缓解率(ORR)。在一些实施例中，ORR是指发生完全缓解(CR)或部分缓解(PR)的患者比例。在一些实施例中，与包含在不存在RNA疫苗的情况下施用PD-1轴结合拮抗剂的治疗相比，该治疗延长了缓解持续时间(DOR)。在一些实施例中，与包含在不存在RNA疫苗的情况下施用PD-1轴结合拮抗剂的治疗相比，该治疗改善了个体的健康相关生活质量(HRQoL)得分。

[0245] 在一些实施例中，根据本文提供的方法向多个个体施用RNA疫苗导致所述多个个体中至少约2％(例如，在所述多个个体中的至少约2％、至少约3％、至少约4％、至少约5％、至少约6％、至少约7％、至少约8％、至少约9％、至少约10％、至少约15％、至少约20％、至少约25％、至少约30％、至少约35％、至少约40％、至少约45％、至少约50％、至少约55％、至少约60％、至少约65％、至少约70％、至少约75％、至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约95％、至少约99％或100％中的任一者)的个体中的客观缓解。在一些实施例中，肿瘤为尿路上皮肿瘤(例如，之前未接受过检查点抑制剂治疗)，并且向多个个体施用RNA疫苗导致所述多个个体中至少约10％(例如，在所述多个个体中的至少约10％、至少约15％、至少约20％、至少约25％、至少约30％、至少约35％、至少约40％、至少约45％、至少约50％、至少约55％、至少约60％、至少约65％、至少约70％、至少约75％、至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约95％、至少约99％或100％中的任一者)的个体中的客观缓解。在一些实施例中，肿瘤为肾肿瘤(例如，之前未接受过检查点抑制剂治疗)，并且向多个个体施用RNA疫苗导致所述多个个体中至少约22％(例如，在所述多个个体中的至少约22％、至少约25％、至少约30％、至少约35％、至少约40％、至少约45％、至少约50％、至少约55％、至少约60％、至少约65％、至少约70％、至少约75％、至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约95％、至少约99％或100％中的任一者)的个体中的客观缓解。在一些实施例中，肿瘤为黑素瘤肿瘤(例如，之前未接受过检查点抑制剂治疗)，并且向多个个体施用RNA疫苗导致所述多个个体中至少约30％(例如，在所述多个个体中的至少约30％、至少约35％、至少约40％、至少约45％、至少约50％、至少约55％、至少约60％、至少约65％、至少约70％、至少约75％、至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约95％、至少约99％或100％中的任一者)的个体中的客观缓解。在一些实施例中，肿瘤为TNBC肿瘤(例如，之前未接受过检查点抑制剂治疗)，并且向多个个体施用RNA疫苗导致所述多个个体中至少约4％(例如，在所述多个个体中的至少约4％、至少约5％、至少约6％、至少约7％、至少约8％、至少约9％、至少约10％、至少约15％、至少约20％、至少约25％、至少约30％、至少约35％、至少约40％、至少约45％、至少约50％、至少约55％、至少约60％、至少约65％、至少约70％、至少约75％、至少约80％、至少约

85％、至少约90％、至少约95％、至少约99％或100％中的任一者)的个体中的客观缓解。在一些实施例中,肿瘤为NSCLC肿瘤(例如,之前未接受过检查点抑制剂治疗),并且向多个个体施用RNA疫苗导致所述多个个体中至少约10％(例如,在所述多个个体中的至少约10％、至少约15％、至少约20％、至少约25％、至少约30％、至少约35％、至少约40％、至少约45％、至少约50％、至少约55％、至少约60％、至少约65％、至少约70％、至少约75％、至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约95％、至少约99％或100％中的任一者)的个体中的客观缓解。客观缓解是指根据实体瘤临床疗效评价标准(RECIST)v1.1(参见例如,Eisenhauer等人(2009)Eur J Cancer,45:228-47),个体发生完全缓解或部分缓解。

[0246] 患有肿瘤的个体

[0247] 在本文提供的方法的某些实施例中,个体为人。

[0248] 在本文提供的方法的一些实施例中,个体患有局部晚期、复发性或转移性无法治愈的恶性肿瘤。在一些实施例中,个体患有局部晚期或转移性实体瘤或具有一种或多种转移性复发。在某些实施例中,在施用RNA疫苗之前,在至少一种标准疗法后肿瘤或恶性肿瘤已经发生进展。在某些实施例中,在施用RNA疫苗之前,标准疗法已被证明对个体无效、不耐受或不适用。在某些实施例中,在施用RNA疫苗之前,个体的东部肿瘤协作小组(Eastern Cooperative Oncology Group(ECOG))体能状态为0或1。在某些实施例中,在施用RNA疫苗之前,根据RECIST v1.1,个体患有可测量的疾病。

[0249] 在本文提供的方法的一些实施例中,肿瘤为非小细胞肺癌(NSCLC)、膀胱、肾、头颈、肉瘤、乳腺、黑素瘤、前列腺、卵巢、胃、肝或结直肠肿瘤。在一些实施例中,肿瘤为乳腺肿瘤,并且该乳腺肿瘤为三阴性乳腺癌(TNBC)肿瘤。在本文提供的方法的一些实施例中,肿瘤为非小细胞肺癌(NSCLC)、膀胱、肾、头颈部、肉瘤、乳腺、黑素瘤、前列腺、卵巢、胃、肝、尿路上皮、结肠、肾脏、子宫颈、梅克尔细胞癌(MCC)、子宫内膜、软组织肉瘤、食管、食管胃交界部、骨肉瘤、甲状腺或结直肠肿瘤。

[0250] 在本文提供的方法的一些实施例中,在施用RNA疫苗之前,个体已经接受过一种或多种癌症疗法的治疗。在一些实施例中,在施用RNA疫苗之前,个体已经接受过一种或多种癌症疗法或3种与5种之间的癌症疗法的治疗。在某些实施例中,在施用RNA疫苗之前,个体已经接受过约1种至约20种之间的(例如,约1种、约2种、约3种、约4种、约5种、约6种、约7种、约8种、约9种、约10种、约11种、约12种、约13种、约14种、约15种、约16种、约17种、约18种、约19种、约20种或更多种)癌症疗法的治疗。在某些实施例中,在施用RNA疫苗之前,个体已经接受过至少1种癌症疗法的治疗。在某些实施例中,在施用RNA疫苗之前,个体已经接受过约3种癌症疗法的治疗。在某些实施例中,在施用RNA疫苗之前,个体已经接受过约5种癌症疗法的治疗。在一些实施例中,在施用RNA疫苗之前,个体已经接受过3种与5种之间的癌症疗法的治疗。在一些实施例中,在施用RNA疫苗之前,个体已经接受过约1种至约17种之间的(例如,约1种、约2种、约3种、约4种、约5种、约6种、约7种、约8种、约9种、约10种、约11种、约12种、约13种、约14种、约15种、约16种或约17种的任一者)或约1种至约9种之间的(例如,约1种、约2种、约3种、约4种、约5种、约6种、约7种、约8种或约9种的任一者)在先全身性癌症疗法。全身性癌症疗法的实例包括但不限于化疗、激素疗法、放射疗法、靶向疗法、免疫疗法或其他疗法,例如,如Palumbo等人(2013)Front Pharmacol,4:57中所述。

[0251] 在本文提供的方法的一些实施例中,在施用RNA疫苗之前,个体已经接受过免疫疗

法的治疗。在本文提供的方法的一些实施例中，在施用RNA疫苗之前，个体已经接受过检查点抑制剂疗法(例如，抗PD-L1疗法、抗PD-1疗法、抗CTLA4疗法或其任意组合)的治疗。在某些实施例中，在施用RNA疫苗之前，个体尚未接受过检查点抑制剂疗法(例如，抗PD-L1疗法、抗PD-1疗法、抗CTLA4疗法或其任意组合)的治疗。

[0252] 在本文提供的方法的一些实施例中，肿瘤为NSCLC肿瘤，并且在施用RNA疫苗之前，个体尚未接受过抗PD-L1/PD-1和/或抗CTLA-4疗法的治疗。在某些实施例中，肿瘤为NSCLC肿瘤，并且在施用RNA疫苗之前，个体已经接受过与抗CTLA-4疗法联合或不与其联合的抗PD-L1/PD-1疗法的治疗。

[0253] 在某些实施例中，肿瘤为TNBC肿瘤，并且在施用RNA疫苗之前，个体之前尚未接受过抗PD-L1/PD-1和/或抗CTLA-4疗法的先前的治疗。在某些实施例中，肿瘤为TNBC肿瘤，并且在施用RNA疫苗之前，个体之前已经接受过与抗CTLA-4疗法联合或不与其联合的抗PD-L1/PD-1疗法的治疗。如本文所用，TNBC肿瘤是指雌激素受体(ER)阴性、孕激素受体阴性和人表皮生长因子受体2(HER2)阴性的乳腺腺癌。

[0254] 在某些实施例中，肿瘤为结直肠癌肿瘤，并且在施用RNA疫苗之前，个体之前尚未接受过抗PD-L1/PD-1和/或抗CTLA-4疗法的先前的治疗。在某些实施例中，肿瘤为结直肠癌肿瘤，并且在施用RNA疫苗之前，个体之前已经接受过与抗CTLA-4疗法联合或不与其联合的抗PD-L1/PD-1疗法的治疗。

[0255] 在某些实施例中，肿瘤为头颈鳞状细胞癌，并且在施用RNA疫苗之前，个体之前尚未接受过抗PDL1/PD-1和/或抗CTLA-4疗法的先前的治疗。在某些实施例中，肿瘤为头颈鳞状细胞癌，并且在施用RNA疫苗之前，个体之前已经接受过与抗CTLA-4疗法联合或不与其联合的抗PD-L1/PD-1疗法的治疗。

[0256] 在某些实施例中，肿瘤为尿路上皮癌肿瘤，并且在施用RNA疫苗之前，个体之前尚未接受过与抗CTLA-4疗法联合或不与其联合的抗PD-L1/PD-1疗法的治疗。在某些实施例中，肿瘤为尿路上皮癌肿瘤，并且在施用RNA疫苗之前，个体之前已经接受过与抗CTLA-4疗法联合或不与其联合的抗PD-L1/PD-1疗法的治疗。

[0257] 在某些实施例中，肿瘤为肾细胞癌，并且在施用RNA疫苗之前，个体之前尚未接受过抗PD-L1/PD-1和/或抗CTLA-4疗法的先前的治疗。在某些实施例中，肿瘤为肾细胞癌，并且在施用RNA疫苗之前，个体之前已经接受过与抗CTLA-4疗法联合或不与其联合的抗PD-L1/PD-1疗法的治疗。

[0258] 在某些实施例中，肿瘤为黑素瘤肿瘤，并且在施用RNA疫苗之前，个体之前尚未接受过抗PD-L1/PD-1和/或抗CTLA-4疗法的先前的治疗。在某些实施例中，肿瘤为黑素瘤肿瘤，并且在施用RNA疫苗之前，个体之前已经接受过抗PD-L1/PD-1和/或抗CTLA-4疗法的先前的治疗。

[0259] 在某些实施例中，在施用RNA疫苗之前，已经向个体施用免疫调节剂，诸如Toll样受体(TLR)激动剂、吲哚胺2,3-双加氧酶(IDO)/色氨酸-2,3-双加氧酶(TDO)的抑制剂或OX40激动剂。

[0260] 在本文提供的方法的一些实施例中，个体未患有临床上显著的肝病。在某些实施例中，在施用RNA疫苗之前，个体未接受过脾切除术。在某些实施例中，个体未患有原发性免疫缺陷，无论是细胞免疫缺陷(例如，迪格奥尔格综合征、T阴性重症联合免疫缺陷[SCID])

还是T细胞和B细胞联合免疫缺陷(例如T和B阴性SCID、威斯科特-奥尔德里奇综合征、共济失调毛细血管扩张症、普通变异型免疫缺陷病)。在某些实施例中,个体未患有原发性中枢神经系统(CNS)恶性肿瘤、未经治疗的CNS转移瘤或活动性CNS转移瘤。在某些实施例中,个体未患有软脑膜病。在某些实施例中,个体未患有自身免疫病。在某些实施例中,个体未患有特发性肺纤维化、肺炎、机化性肺炎或在筛查胸部计算机断层扫描(CT)时存在活动性肺炎的证据;未患有人类免疫缺陷病毒感染;活动性乙型或丙型肝炎;活动性或潜伏结核感染;或重度感染。在某些实施例中,个体未接受过同种异体骨髓移植或实体器官移植。

[0261] III.RNA疫苗

[0262] 本公开的某些方面涉及个体化癌症疫苗(PCV)。在一些实施例中,PCV为RNA疫苗。示例性RNA疫苗的特征如下文所述。在一些实施例中,本公开提供了一种RNA多核苷酸,其包含下文描述的RNA疫苗的特征/序列中的一种或多种。在一些实施例中,RNA多核苷酸为单链mRNA多核苷酸。在其他实施例中,本公开提供了一种编码RNA的DNA多核苷酸,该RNA包含下文描述的RNA疫苗的特征/序列中的一种或多种。

[0263] 个体化癌症疫苗包含个体化新抗原(即在患者癌症中特异性表达的肿瘤相关抗原(TAA)),这些个体化新抗原经鉴定具有潜在的免疫刺激活性。在本文所述的实施例中,PCV为核酸,例如信使RNA。因此,不受理论的约束,据信在施用后,个体化癌症疫苗(例如,本公开的RNA疫苗)被吸收并且由抗原呈递细胞(APC)翻译,并且所表达的蛋白质经由主要组织相容性复合物(MHC)分子呈递在APC的表面上。由此诱导针对表达TAA的癌症细胞的细胞毒性T淋巴细胞(CTL)和记忆T细胞依赖性免疫反应两者。

[0264] PCV(例如,RNA疫苗)通常包括多个新抗原表位("新表位"),例如2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、28个、29个或30个新表位或者至少2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、28个、29个或30个新表位,任选地在各个新表位之间具有接头序列。在一些实施例中,如本文所用的新表位是指对患者的癌症具有特异性但不存在于患者的正常细胞中的新颖表位。在一些实施例中,新表位在结合至MHC时呈递给T细胞。在一些实施例中,PCV还包括5'mRNA帽类似物、5'UTR、信号序列、促进抗原表达的结构域、3'UTR和/或polyA尾巴。在一些实施例中,RNA疫苗包含一种或多种编码10-20个新表位的多核苷酸,这些新表位由存在于肿瘤样本中的癌症特异性体细胞突变产生。在一些实施例中,RNA疫苗包含一种或多种编码至少5个新表位的多核苷酸,这些新表位由存在于肿瘤样本中的癌症特异性体细胞突变产生。在一些实施例中,RNA疫苗包含一种或多种编码5-20个新表位的多核苷酸,这些新表位由存在于肿瘤样本中的癌症特异性体细胞突变产生。在一些实施例中,RNA疫苗包含一种或多种编码5-10个新表位的多核苷酸,这些新表位由存在于肿瘤样本中的癌症特异性体细胞突变产生。

[0265] 在一些实施例中,本公开的RNA疫苗的制造为多步过程,其中通过二代测序(NGS)鉴定患者肿瘤中的体细胞突变并且预测免疫原性新抗原表位(或"新表位")。靶向选定新表位的RNA癌症疫苗按患者进行生产。在一些实施例中,疫苗为基于RNA的癌症疫苗,其由多达两个信使RNA分子组成,每个分子编码多达10个新表位(总共编码多达20个新表位),这些新表位对患者的肿瘤具有特异性。

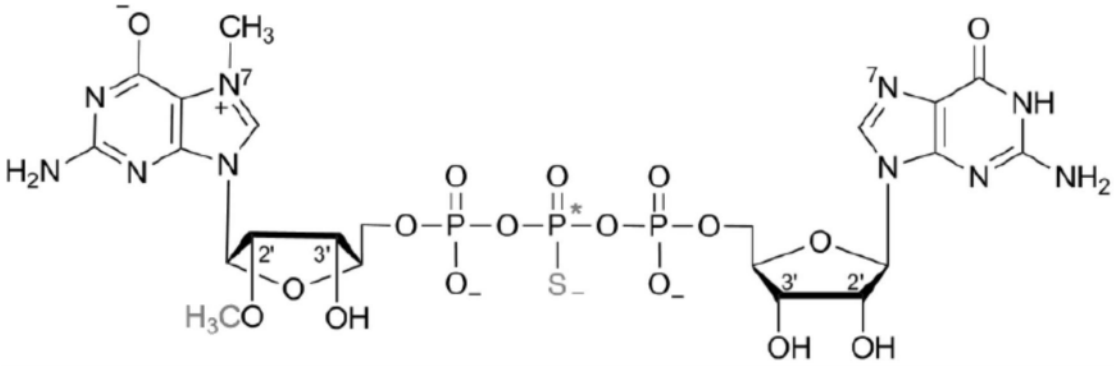
[0266] 在一些实施例中,所表达的非同义突变通过肿瘤DNA和外周血单核细胞(PBMC)DNA(作为患者的健康组织来源)的全外显子组测序(WES)以及肿瘤RNA测序(用于评估表达)进行鉴定。根据所得突变蛋白质的列表,使用生物信息学工作流程预测潜在的新抗原,该工作流程基于多种因素对这些抗原可能具有的免疫原性进行排序,这些因素包括所预测的表位与个体主要组织相容性复合物(MHC)分子的结合亲和力以及相关RNA的表达水平。突变发现、优先级排序和确认过程得到一个数据库的补充,该数据库提供了有关健康组织中相应野生型基因的表达水平的综合信息。这些信息使得能够通过去除具有不利风险特征的候选目标来制定个体化风险缓解策略。滤除蛋白质发生的可能在关键器官中具有较高自身免疫风险的突变,并且不考虑将其用于疫苗生产。在一些实施例中,选择经预测对个体患者分别引起$CD8^+$T细胞和/或$CD4^+$T细胞应答的多达20个MHCI和MHCII新表位纳入疫苗中。预期针对多个新表位进行疫苗接种将增加对PCV的总体免疫应答的广度和强度,并且可能有助于降低免疫逃逸的风险,该风险可能发生于肿瘤暴露于有效免疫应答的选择压力的情况下(Tran E,Robbins PF,Lu YC等人,N Engl J Med 2016;375:2255-62;Verdegaal EM,de Miranda NF,Visser M等人,Nature 2016;536:91-5)。

[0267] 在一些实施例中,RNA疫苗包含一个或多个编码氨基酸接头的多核苷酸序列。例如,可在2个肿瘤特异性新表位序列之间、肿瘤特异性新表位序列与融合蛋白标签(例如,包含来源于MHC复合物多肽的序列)之间或分泌性信号肽与肿瘤特异性新表位序列之间使用氨基酸接头。在一些实施例中,RNA疫苗编码多种接头。在一些实施例中,RNA疫苗包含一种或多种编码5-20个新表位的多核苷酸,这些新表位由存在于肿瘤样本中的癌症特异性体细胞突变产生,并且编码每个表位的多核苷酸由编码接头序列的多核苷酸隔开。在一些实施例中,RNA疫苗包含一种或多种编码5-10个新表位的多核苷酸,这些新表位由存在于肿瘤样本中的癌症特异性体细胞突变产生,并且编码每个表位的多核苷酸由编码接头序列的多核苷酸隔开。在一些实施例中,编码接头序列的多核苷酸还存在于编码N末端融合标签(例如,分泌性信号肽)的多核苷酸与编码新表位中的一个的多核苷酸之间,和/或存在于编码新表位中的一个或多个的多核苷酸与编码C末端融合标签(例如,包含MHC多肽的一部分)的多核苷酸之间。在一些实施例中,由RNA疫苗编码的两种或更多种接头包含不同的序列。在一些实施例中,RNA疫苗编码多种接头,其全部共享相同的氨基酸序列。

[0268] 各种接头序列是本领域中已知的。在一些实施例中,接头为柔性接头。在一些实施例中,接头包含G、S、A和/或T残基。在一些实施例中,接头由甘氨酸和丝氨酸残基组成。在一些实施例中,接头的长度在约5个氨基酸与20个氨基酸之间或在约5个氨基酸与12氨基酸之间,例如长度为约5个氨基酸、约6个氨基酸、约7个氨基酸、约8个氨基酸、约9个氨基酸、约10个氨基酸、约11个氨基酸、约12个氨基酸、约13个氨基酸、约14个氨基酸、约15个氨基酸、约16个氨基酸、约17个氨基酸、约18个氨基酸、约19个氨基酸或约20个氨基酸。在一些实施例中,接头包含序列GGSGGGGSGG(SEQ ID NO:39)。在一些实施例中,RNA疫苗的接头包含序列GGCGGCUCUGGAGGAGGCGGCUCCGGAGGC(SEQ ID NO:37)。在一些实施例中,RNA疫苗的接头由包含序列GGCGGCTCTGGAGGAGGCGGCTCCGGAGGC(SEQ ID NO:38)的DNA编码。

[0269] 在一些实施例中,RNA疫苗包含5'帽。已知mRNA帽结构包含2个核苷酸(例如,两个鸟嘌呤)与远处鸟嘌呤上的7-甲基基团之间的5′-5′三磷酸酯键,即m^7GpppG。示例性帽结构可参见例如美国专利号8,153,773和9,295,717以及Kuhn,A.N.等人(2010)Gene Ther.17:

961-971。在一些实施例中,5′帽具有结构$m_2^{7,2'-O}Gpp_spG$。在一些实施例中,5′帽为β-S-ARCA帽。S-ARCA帽结构包括2′-O甲基取代(例如,在m^7G的C2′位置)和一个或多个磷酸酯基团处的S-取代。在一些实施例中,5'帽包含以下结构:

[0270] 

[0271] 在一些实施例中,5′帽为β-S-ARCA的D1非对映异构体(参见例如美国专利号9,295,717)。上述结构中的*表示立体P中心,其可能存在于两种非对映异构体(称为D1和D2)中。β-S-ARCA的D1非对映异构体或β-S-ARCA(D1)为β-S-ARCA的非对映异构体,与β-S-ARCA的D2非对映异构体(β-S-ARCA(D2))相比,在HPLC色谱柱上首先洗脱,并由此表现出较短的保留时间。HPLC优选为分析型HPLC。在一个实施例中,利用Supelcosil LC-18-T RP色谱柱(优选以下规格:5μm,4.6×250mm)进行分离,其中可采用流速1.3ml/min。在一个实施例中,利用乙酸铵中的甲醇梯度,例如在15min内,0.05M乙酸铵溶液(pH=5.9)中的甲醇以线性梯度从0%增加至25%。可在260nm下进行UV检测(VWD),并且可采用280nm的激发波长和337nm的检测波长进行荧光检测(FLD)。

[0272] 在一些实施例中,RNA疫苗包含5′UTR。研究表明,存在于mRNA中的蛋白质编码序列的5′末端的某些非翻译序列可提高翻译效率。参见例如Kozak,M.(1987)J.Mol.Biol.196:947-950。在一些实施例中,5′UTR包含来自人α球蛋白mRNA的序列。在一些实施例中,RNA疫苗包含UUCUUCUGGUCCCCACAGACUCAGAGAGAACCCGCCACC(SEQ ID NO:23)的5′UTR序列。在一些实施例中,RNA疫苗的5′UTR序列由包含序列TTCTTCTGGTCCCCACAGACTCAGAGAGAACCCGCCACC(SEQ ID NO:24)的DNA编码。在一些实施例中,RNA疫苗的5′UTR序列包含序列GGCGAACUAGUAUUCUUCUGGUCCCCACAGACUCAGAGAGAACCCGCCACC(SEQ ID NO:21)。在一些实施例中,RNA疫苗的5′UTR序列由包含序列GGCGAACTAGTATTCTTCTGGTCCCCACAGACTCAGAGAGAACCCGCCACC(SEQ ID NO:22)的DNA编码。

[0273] 在本文提供的方法的一些实施例中,示例性RNA疫苗的恒定区包含SEQ ID NO:42的核糖核苷酸序列(5′->3′)。前两个G残基之间的键结为独特的键(5′→5′)-pp_sp-,例如,如表1和图3中的5′加帽结构所示。"N"是指编码一个或多个(例如,1-20个)新表位(由任选的接头隔开)的一个或多个多核苷酸序列的位置。肿瘤特异性序列的插入位点(C131-A132;以粗体标记)以粗体显示。有关示例性RNA序列中经修饰的碱基和不常见的键,参见表1。

[0274] 表1

[0275]

类型	位置	描述
经修饰的碱基	G1	$m_2^{7\cdot2'\cdot O}G$
不常见键	G1-G2	(5′→5′)-pp_sp-
不常见键	C131-A132	肿瘤特异性序列的插入位点

[0276] 在一些实施例中,RNA疫苗包含编码分泌性信号肽的多核苷酸序列。如本领域已知的,分泌性信号肽是一种氨基酸序列,在翻译后引导多肽从内质网中转运出并且进入分泌途径。在一些实施例中,信号肽源自一种人多肽,诸如MHC多肽。参见例如Kreiter,S.等人(2008)J.Immunol.180:309-318,其中描述了一种示例性分泌性信号肽,该分泌性信号肽改善了人类树突细胞中MHC I类和II类表位的加工和呈递。在一些实施例中,在翻译后,信号肽为RNA疫苗编码的一个或多个新表位序列的N末端。在一些实施例中,分泌性信号肽包含序列MRVMAPRTLILLLSGALALTETWAGS(SEQ ID NO:27)。在一些实施例中,RNA疫苗的分泌性信号肽包含序列AUGAGAGUGAUGGCCCCCAGAACCCUGAUCCUGCUGCUGUCUGGCGCCCUGGCCCUGACAGAGACAUGGGCCGGAAGC(SEQ ID NO:25)。在一些实施例中,RNA疫苗的分泌性信号肽由包含序列ATGAGAGTGATGGCCCCCAGAACCCTGATCCTGCTGCTGTCTGGCGCCCTGGCCCTGACAGAGACATGGGCCGGAAGC(SEQ ID NO:26)的DNA编码。

[0277] 在一些实施例中,RNA疫苗包含编码跨膜和/或胞质结构域的至少一部分的多核苷酸序列。在一些实施例中,跨膜和/或胞质结构域来自MHC分子的跨膜/胞质结构域。术语“主要组织相容性复合物”和缩写“MHC”是指一种存在于所有脊椎动物中的基因复合物。MHC蛋白质或分子在正常免疫应答中淋巴细胞和抗原呈递细胞之间的信号传导中的功能涉及它们结合肽并且将其呈递以便由T细胞受体(TCR)进行识别。MHC分子在细胞内加工区室中结合肽,并且将抗原呈递细胞表面上的这些肽呈递给T细胞。人类MHC区,也称为HLA,位于6号染色体上,并且包含I类区和II类区。I类α链为分子量约44kDa的糖蛋白。多肽链的长度略多于350个氨基酸残基。它可分为三个功能区:外部区、跨膜区和胞质区。外部区的长度为283个氨基酸残基,并且分为三个结构域,即α1、α2和α3。这些结构域和区通常由I类基因的单独的外显子编码。跨膜区横跨质膜的脂质双层。它由23个通常疏水的氨基酸残基组成,这些氨基酸残基排列成α螺旋形式。胞质区,即朝向细胞质并且与跨膜区连接的部分,其长度通常为32个氨基酸残基,并且能够与细胞骨架的元件相互作用。α链与β2-微球蛋白相互作用,由此在细胞表面上形成α-β2二聚体。术语“MHC II类”或“II类”是指主要组织相容性复合物II类蛋白质或基因。在人类MHC II类区内,存在II类α链基因和β链基因的DP、DQ和DR亚区(即DPα、DPβ、DQα、DQβ、DRα和DRβ)。II类分子为各自由α链和β链组成的异二聚体。两条链为具有31-34kDa(a)或26-29kDA(β)的分子量的糖蛋白。α链的总长度在229个残基与233个残基之间变化,并且β链的总长度为225个残基至238个残基。α链和β链均由外部区、连接肽、跨膜区和胞质尾区组成。外部区由两个结构域(即α1和α2或β1和β2)组成。连接肽在α链和β链中分别为β和9个残基长。它将两个结构域连接至跨膜区,该跨膜区在α链和β链中均由23个氨基酸残基组成。胞质区(即朝向细胞质并且与跨膜区连接的部分)的α链长度在3个残基至16个残基之间变化,β链长度在8个残基至20个残基之间变化。示例性跨膜/胞质结构域序列描述于美国专利号8,178,653和8,637,006中。在一些实施例中,在翻译后,跨膜和/或胞质结构域为RNA疫苗编码的一个或多个新表位序列的C末端。在一些实施例中,MHC分子的跨膜和/或胞质结构域由包含序列IVGIVAGLAVLAVVVIGAVVA TVMCRRKSSGGKGGSYSQAASSDSAQGSDVSLTA(SEQ ID NO:30)的RNA疫苗编码。在一些实施例中,MHC分子的跨膜和/或胞质结构域包含序列AUCGUGGGAAUUGUGGCAGGACUGGCAGUGCUGGCCGUGGUGGUGAUCGGAGCCGUGGUGGCUACCGUGAUGUGCAGACGGAAGUCCAGCGGAGGCAAGGGCGGCAGCUACAGCCAGGCCGCCAGCUCUGAUAGCGCCCAGGGCAGCGACGUGUCACUGACAGCC(SEQ ID NO:28)。在一些实施例中,MHC分子的跨膜和/或胞质结构域由

包含序列ATCGTGGGAATTGTGGCAGGACTGGCAGTGCTGGCCGTGGTGGTGATCGGAGCCGTGGTGGCTACCGTGATGTGCAGACGGAAGTCCAGCGGAGGCAAGGGCGGCAGCTACAGCCAGGCCGCCAGCTCTGATAGCGCCCAGGGCAGCGACGTGTCACTGACAGCC(SEQ ID NO:29)的DNA编码。

[0278] 在一些实施例中,RNA疫苗包含编码位于一个或多个新表位序列的N末端的分泌性信号肽的多核苷酸序列以及编码位于一个或多个新表位序列的C末端的跨膜和/或胞质结构域的多核苷酸序列。研究表明,将此类序列组合可改善人类树突细胞中MHC I类和II类表位的加工和呈递。参见例如Kreiter,S.等人(2008)J.Immunol.180:309-318。

[0279] 在骨髓DC中,RNA释放到细胞溶质中并且翻译为多新表位肽。多肽包含额外的序列以增强抗原呈递。在一些实施例中,利用来自多肽的N-末端的MHCI重链的信号序列(sec)将新生分子靶向内质网,已表明这种做法可提高MHCI呈递效率。不受理论的约束,据信MHCI重链的跨膜和胞质结构域将多肽引导至表现出改善的MHCII呈递的内体/溶酶体区室。

[0280] 在一些实施例中,RNA疫苗包含3′UTR。研究表明,存在于mRNA中的蛋白质编码序列的3'末端的某些非翻译序列可改善RNA稳定性、翻译和蛋白质表达。适合用作3'UTR的多核苷酸序列描述于例如PG公开号US20190071682中。在一些实施例中,3′UTR包含AES的3′非翻译区或其片段和/或线粒体编码的12S RNA的非编码RNA。术语“AES”是指分裂的氨基末端增强子并且包括AES基因(参见例如NCBI基因ID:166)。由该基因编码的蛋白质属于groucho/TLE蛋白质家族,其可作为同源寡聚体或与其他家族成员形成异源寡聚体以显性抑制其他家族成员基因的表达。一种示例性AES mRNA序列提供于NCBI参考序列登录号NM_198969中。术语“MT_RNR1”是指线粒体编码的12S RNA并且包括MT_RNR1基因(参见例如NCBI基因ID:4549)。该RNA基因属于Mt_rRNA类基因。与MT-RNR1相关联的疾病包括限制型心肌病和听神经病。其相关途径包括真核生物中的核糖体生物发生和CFTR翻译保真性(I类突变)。一种MT_RNR1 RNA序列存在于NCBI参考序列登录号NC_012920的序列中。在一些实施例中,RNA疫苗的3′UTR包含序列

[0281] CUGGUACU

[0282] GCAUGCACGCAAUGCUAGCUGCCCCUUUCCCGUCCUGGGUACCCCGA

[0283] GUCUCCCCCGACCUCGGGUCCCAGGUAUGCUCCCACCUCCACCUGCCCCACUCACCACCUCUGCUAGUUCCAGACACCUCC(SEQ ID NO:33)。在一些实施例中,RNA疫苗的3′UTR包含序列CAAGCACGCAGCAAUGCAGCUCAAAACGCUUAGCCUAGCCACACCCCCACGGGAAACAGCAGUGAUUAACCUUUAGCAAUAAACGAAAGUUUAACUAAGCUAUACUAACCCCAGGGUUGGUCAAUUUCGUGCCAGCCACACCG(SEQ ID NO:35)。在一些实施例中,RNA疫苗的3′UTR包含序列CUGGUACUGCAUGCACGCAAUGCUAGCUGCCCCUUUCCCGUCCUGGGUACCCCGAGUCUCCCCCGACCUCGGGUCCCAGGUAUGCUCCCACCUCCACCUGCCCCACUCACCACCUCUGCUAGUUCCAGACACCUCC(SEQ ID NO:33)和序列CAAGCACGCAGCAAUGCAGCUCAAAACGCUUAGCCUAGCCACACCCCCACGGGAAACAGCAGUGAUUAACCUUUAGCAAUAAACGAAAGUUUAACUAAGCUAUACUAACCCCAGGGUUGGUCAAUUUCGUGCCAGCCACACCG(SEQ ID NO:35)。在一些实施例中,RNA疫苗的3′UTR包含序列CUCGAGCUGGUACUGCAUGCACGCAAUGCUAGCUGCCCCUUUCCCGUCCUGGGUACCCCGAGUCUCCCCCGACCUCGGGUCCCAGGUAUGCUCCCACCUCCACCUGCCCCACUCACCACCUCUGCUAGUUCCAGACACCUCCCAAGCACGCAGCAAUGCAGCUCAAAACGCUUAGCCUAGCCACACCCCCACGGGAAACAGCAGUGAUUAACCUUUAGCAAUAAACGAAAGUUUAACUAAGCUAUACUAACCCCAGGGUUGGUCAAUUUCGUGCCAGCCACACCGAGACCUGGUCCAGAGUCGCUAGCCGCGUCGCU(SEQ ID NO:31)。在一些实施例中,RNA疫苗的3′UTR由包含序列CTGGTAC

TGCATGCACGCAATGCTAGCTGCCCCTTTCCCGTCCTGGGT ACCCCGAGTCTCCCCCGACCTCGGGTCCCAGGTA TGCTCCCACCTCCA CCTGCCCCACTCACCACCTCTGCTAGTTCCAGACACCTCC(SEQ ID NO:34)的DNA编码。在一些实施例中,RNA疫苗的3′UTR由包含序列CAAGCACGCAGCAATGCAGCTCAAAACGCTTAGC CTAGCCACACCCCCACGGGAAACAGCAGTGATTAACCTTTAGCAATAAACGAAAGTTTAACTAAGCTATACTAACC CCAGGGTTGGTCAATTTCGTGCCAGCCACACCG(SEQ ID NO:36)的DNA编码。在一些实施例中,RNA疫苗的3′UTR由包含序列CTGGTACTGCATGCACGCAATGCTAGCTGCCCCTTTCCCGTCCTGGGTACCCCGAGT CTCCCCCGACCTCGGGTCCCAGGTATGCTCCCACCTCCACCTGCCCCACTCACCACCTCTGCTAGTTCCAGACACC TCC(SEQ ID NO:34)和序列CAAGCACGCAGCAATGCAGCTCAAAACGCTTA GCCTAGCCACACCCCCACGG GAAACAGCAGTGATTAACCTTTAGCAAT AAACGAAAGTTTAACTAAGCTATACTAACCCCAGGGTTGGTCAATTTC GTGCCAGCCACACCG(SEQ ID NO:36)的DNA编码。在一些实施例中,RNA疫苗的3′UTR由包含序列CTGGTACTGCATGCACGCAATGC TAGCTGCCCCTTTCCCGTCCTGGGTACCCCGAGTCTCCCCCGACCTCGGG TCCCAGGTATGCTCCCACCTCCACCTGCCCCACTCACCACCTCTGCTAGTTCCAGACACCTCCCAAGCACGCAGCA ATGCAGCTCAAAACGCTTAGCCTAGCCACACCCCCACGGGAAACAGCAGTGATTAACCTTTAGCAATAAACGAAAG TTTAACTAAGCTATACTAACCCCAGGGTTGGTCAATTTCGTGCCAGCCACACCGAGACCTGGTCCAGAGTCGCTAG CCGCGTCGCT(SEQ ID NO:32)的DNA编码。

[0284] 在一些实施例中,RNA疫苗包含在其3’末端的poly(A)尾巴。在一些实施例中,poly(A)尾巴包含多于50个或多于100个腺嘌呤核苷酸。例如,在一些实施例中,poly(A)尾巴包含120个腺嘌呤核苷酸。已证明该poly(A)尾巴能够提高RNA稳定性和翻译效率(Holtkamp,S.等人(2006)Blood 108:4009-4017)。在一些实施例中,包含poly(A)尾巴的RNA通过转录DNA分子产生,该DNA分子在5’→3’转录方向上包含编码至少50个、100个或120个腺嘌呤连续核苷酸以及IIS型限制性内切酶的识别序列的多核苷酸序列。改善翻译的示例性poly(A)尾巴和3′UTR序列参见例如美国专利号9,476,055。

[0285] 在一些实施例中,本公开的RNA疫苗或分子包含以下一般结构(在5’3’方向上):(1)5’帽;(2)5’非翻译区(UTR);(3)编码分泌性信号肽的多核苷酸序列;(4)编码主要组织相容性复合物(MHC)分子的跨膜和胞质结构域的至少一部分的多核苷酸序列;(5)3’UTR,该3’UTR包含:(a)分裂的氨基末端增强子(AES)mRNA的3’非翻译区或其片段;和(b)线粒体编码的12S RNA的非编码RNA或其片段;以及(6)poly(A)序列。在一些实施例中,本公开的RNA疫苗或分子在5′→3’方向上包含:多核苷酸序列GGCGAACUAGUAUUCUUCUGGUCCCCACAGACUCA GAGAGAACCCG CCACCAUGAGAGUGAUGGCCCCCAGAACCCUGAUCCUGCUGCUGUC UGGCGCCCUGGCCCUGA CAGAGACAUGGGCCGGAAGC(SEQ ID NO:19);和多核苷酸序列AUCGUGGGAAUUGUGGCAGGACUGGCAGUG CUGGCCGUGGUGGUGAUCGGAGCCGUGGUGGCUACCGUGAUGUGC AGACGGAAGUCCAGCGGAGGCAAGGGCGGCAGCUACAGCCAGGCCGCCAGCUCUGAUAGCGCCCAGGGCAGCGACG UGUCACUGACAGCCUAGUAACUCGAGCUGGUACUGCAUGCACGCAAUGCUAGCUGCCCCUUUCCCGUCCUGGGUAC CCCGAGUCUCCCCCGACCUCGGGUCCCAGGUAUGCUCCCACCUCCACCUGCCCCACUCACCACCUCUGCUAGUUCC AGACACCUCCCAAGCACGCAGCAAUGCAGCUCAAAACGCUUAGCCUAGCCACACCCCCACGGGAAACAGCAGUGAU UAACCUUUAGCAAUAAACGAAAGUUUAACUAAGCUAUACUAACCCCAGGGUUGGUCAAUUUCGUGCCAGCCACACC GAGACCUGGUCCAGAGUCGCUAGCCGCGUCGCU(SEQ ID NO:20)。有利地,包含结构或序列的这一组合和取向的RNA疫苗的特征在于以下各项中的一者或多者:改善的RNA稳定性、增强的翻译效率、改善的抗原呈递和/或加工(例如,通过DC)和增加的蛋白质表达。

[0286] 在一些实施例中，本公开的RNA疫苗或分子包含SEQ ID NO:42的序列(在5′→3′方向上)。参见例如图2。在一些实施例中，N是指编码至少2个、至少3个、至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个、至少10个、至少11个、至少12个、至少13个、至少14个、至少15个、至少16个、至少17个、至少18个、至少19个、至少20个、至少21个、至少22个、至少23个、至少24个、至少25个、至少26个、至少27个、至少28个、至少29个或30个不同新表位的多核苷酸序列。在一些实施例中，N是指编码一个或多个接头-表位模块(例如至少2个、至少3个、至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个、至少10个、至少11个、至少12个、至少13个、至少14个、至少15个、至少16个、至少17个、至少18个、至少19个、至少20个、至少21个、至少22个、至少23个、至少24个、至少25个、至少26个、至少27个、至少28个、至少29个或30个不同接头-表位模块)的多核苷酸序列。在一些实施例中，N是指编码一个或多个接头-表位模块(例如至少2个、至少3个、至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个、至少10个、至少11个、至少12个、至少13个、至少14个、至少15个、至少16个、至少17个、至少18个、至少19个、至少20个、至少21个、至少22个、至少23个、至少24个、至少25个、至少26个、至少27个、至少28个、至少29个或30个不同接头-表位模块)和3′末端的额外氨基酸接头的多核苷酸序列。

[0287] 在一些实施例中，RNA疫苗或分子进一步包含编码至少一个新表位的多核苷酸序列；其中在5'→3'方向上，编码所述至少一个新表位的多核苷酸序列在编码分泌性信号肽的多核苷酸序列与编码MHC分子的跨膜和胞质结构域的至少一部分的多核苷酸序列之间。在一些实施例中，RNA分子包含编码至少2个、至少3个、至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个、至少10个、至少11个、至少12个、至少13个、至少14个、至少15个、至少16个、至少17个、至少18个、至少19个或20个不同新表位的多核苷酸序列。

[0288] 在一些实施例中，RNA疫苗或分子在5'→3'方向上进一步包含：编码氨基酸接头的多核苷酸序列；以及编码新表位的多核苷酸序列。在一些实施例中，编码氨基酸接头和新表位的多核苷酸序列形成接头-新表位模块(例如，在5'→3'方向上在同一开放阅读框中的连续序列)。在一些实施例中，在5′→3′方向上，形成接头-新表位模块的多核苷酸序列在编码分泌性信号肽的多核苷酸序列与编码MHC分子的跨膜和胞质结构域的至少一部分的多核苷酸序列之间，或在SEQ ID NO:19的序列与SEQ ID NO:20的序列之间。在一些实施例中，RNA疫苗或分子包含2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、28个、29个或30个接头-表位模块。在一些实施例中，接头-表位模块中的每一个编码不同的新表位。在一些实施例中，RNA疫苗或分子包含2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个或20个接头-表位模块，并且RNA疫苗或分子包含编码至少2个、至少3个、至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个、至少10个、至少11个、至少12个、至少13个、至少14个、至少15个、至少16个、至少17个、至少18个、至少19个或20个不同新表位的多核苷酸。在一些实施例中，RNA疫苗或分子包含5个、10个或20个接头-表位模块s。在一些实施例中，接头-表位模块中的每一个编码不同的新表位。在一些实施例中，接头-表位模块在5'→3'方向上在同一开放阅读框中形成连续序列。在一些实施例中，编码第一接头-表位模块的接头的多核苷酸序列为编码分泌性信号肽的多核苷酸序列的3′端。在一些实施例中，编码最后一个接头-表位模块的新表位的多核苷酸序列为编码

MHC分子的跨膜和胞质结构域的至少一部分的多核苷酸序列的5'端。

[0289] 在一些实施例中,RNA疫苗的长度为至少800个核苷酸、至少1000个核苷酸或至少1200个核苷酸。在一些实施例中,RNA疫苗的长度为少于2000个核苷酸。在一些实施例中,RNA疫苗的长度为至少800个核苷酸但少于2000个核苷酸,长度为至少1000个核苷酸但少于2000个核苷酸,长度为至少1200个核苷酸但少于2000个核苷酸,长度为至少1400个核苷酸但少于2000个核苷酸,长度为至少800个核苷酸但少于1400个核苷酸,或长度为至少800个核苷酸但少于2000个核苷酸。例如,包含如上所述的元件的RNA疫苗的恒定区的长度为约800个核苷酸。在一些实施例中,包含5个患者特异性新表位(例如,各自编码27个氨基酸)的RNA疫苗的长度大于1300个核苷酸。在一些实施例中,包含10个患者特异性新表位(例如,各自编码27个氨基酸)的RNA疫苗的长度大于1800个核苷酸。

[0290] 在一些实施例中,RNA疫苗被配制在脂质体复合物纳米颗粒或脂质体中。在一些实施例中,RNA的脂质体复合物纳米颗粒制剂(RNA-脂质体复合物)用于实现本公开的RNA疫苗的静脉内递送。在一些实施例中,利用包含合成阳离子脂质(R)-N,N,N-三甲基-2,3-二油酰氧基-1-丙铵氯化物(DOTMA)和磷脂1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DOPE)的RNA癌症疫苗的脂质体复合物纳米颗粒制剂,例如以实现IV递送。DOTMA/DOPE脂质体组分已针对脾脏和其他淋巴器官中抗原呈递细胞的IV递送和靶向进行了优化。

[0291] 在一个实施例中,纳米颗粒包含至少一种脂质。在一个实施例中,纳米颗粒包含至少一种阳离子脂质。阳离子脂质可为单阳离子脂质或多阳离子脂质。任何阳离子两亲分子(例如,包含至少一个亲水部分和亲脂性部分的分子)均为本发明的含义范围内的阳离子脂质。在一个实施例中,正电荷由所述至少一种阳离子脂质产生,负电荷由RNA产生。在一个实施例中,纳米颗粒包含至少一种辅助脂质。辅助脂质可为中性脂质或阴离子脂质。辅助脂质可为天然脂质(诸如磷脂)或天然脂质的类似物或全合成脂质或与天然脂质无相似性的类脂质分子。在一个实施例中,阳离子脂质和/或辅助脂质为双层形成脂质。

[0292] 在一个实施例中,所述至少一种阳离子脂质包含1,2-二-O-十八烯基-3-三甲基铵丙烷(DOTMA)或其类似物或衍生物和/或1,2-二油酰基-3-三甲基铵丙烷(DOTAP)或其类似物或衍生物。

[0293] 在一个实施例中,所述至少一种辅助脂质包含1,2-二-(9Z-十八烯酰基)-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DOPE)或其类似物或衍生物、胆固醇(Chol)或其类似物或衍生物和/或1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DOPC)或其类似物或衍生物。

[0294] 在一个实施例中,所述至少一种阳离子脂质与所述至少一种辅助脂质的摩尔比为10:0至3:7,优选为9:1至3:7、4:1至1:2、4:1至2:3、7:3至1:1或2:1至1:1,优选为约1:1。在一个实施例中,在该摩尔比下,阳离子脂质的摩尔量由阳离子脂质的摩尔量乘以阳离子脂质中的正电荷数得到。

[0295] 在一个实施例中,脂质包含在包封所述RNA的囊泡中。囊泡可为多层囊泡、单层囊泡或它们的混合物。囊泡可为脂质体。

[0296] 可根据阳离子脂质与RNA的(+/-)电荷比调整正电荷与负电荷并且将RNA与阳离子脂质混合,形成本文所述的纳米颗粒或脂质体。本文所述的纳米颗粒中阳离子脂质与RNA的+/-电荷比可通过以下公式进行计算。(+/-电荷比)=[(阳离子脂质量(mol))×(阳离子脂质中正电荷总数)]:[(RNA量(mol))×(RNA中负电荷总数)]。本领域的技术人员根据制备纳

米颗粒时的负载量，可轻松确定RNA量和阳离子脂质量。有关示例性纳米颗粒的进一步描述，参见例如PG公开号US20150086612。

[0297] 在一个实施例中，纳米颗粒或脂质体中正电荷与负电荷的总电荷比(例如，在生理pH)介于1.4:1和1:8之间，优选介于1.2:1和1:4之间，例如介于1:1和1:3之间，诸如介于1:1.2和1:2之间、介于1:1.2和1:1.8之间、介于1:1.3和1:1.7之间，特别是介于1:1.4和1:1.6之间，诸如约1:1.5。在一些实施例中，在生理pH，纳米颗粒的正电荷与负电荷的总电荷比介于1:1.2$(0.8\bar{3})$和1:2(0.5)之间。在一些实施例中，在生理pH，纳米颗粒或脂质体的正电荷与负电荷的总电荷比介于1.6:2(0.8)和1:2(0.5)之间或介于1.6:2(0.8)和1.1:2(0.55)之间。在一些实施例中，在生理pH，纳米颗粒或脂质体的正电荷与负电荷的总电荷比为1.3:2(0.65)。在一些实施例中，在生理pH下，脂质体的正电荷与负电荷的总电荷比不低于1.0:2.0。在一些实施例中，在生理pH下，脂质体的正电荷与负电荷的总电荷比不高于1.9:2.0。在一些实施例中，在生理pH下，脂质体的正电荷与负电荷的总电荷比不低于1.0:2.0并且不高于1.9:2.0。

[0298] 在一个实施例中，纳米颗粒为脂质体复合物，其包含摩尔比为10:0至1:9、优选8:2至3:7并且更优选7:3至5:5的DOTMA与DOPE，并且其中DOTMA的正电荷与RNA的负电荷的电荷比为1.8:2至0.8:2、更优选1.6:2至1:2、甚至更优选1.4:2至1.1:2并且甚至更优选约1.2:2。在一个实施例中，纳米颗粒为脂质体复合物，其包含摩尔比为10:0至1:9、优选8:2至3:7并且更优选7:3至5:5的DOTMA与胆固醇，并且其中DOTMA的正电荷与RNA的负电荷的电荷比为1.8:2至0.8:2、更优选1.6:2至1:2、甚至更优选1.4:2至1.1:2并且甚至更优选约1.2:2。在一个实施例中，纳米颗粒为脂质体复合物，其包含摩尔比为10:0至1:9、优选8:2至3:7并且更优选7:3至5:5的DOTAP与DOPE，并且其中DOTMA的正电荷与RNA的负电荷的电荷比为1.8:2至0.8:2、更优选1.6:2至1:2、甚至更优选1.4:2至1.1:2并且甚至更优选约1.2:2。在一个实施例中，纳米颗粒为脂质体复合物，其包含摩尔比为2:1至1:2、优选2:1至1:1的DOTMA与DOPE，并且其中DOTMA的正电荷与RNA的负电荷的电荷比为1.4:1或更小。在一个实施例中，纳米颗粒为脂质体复合物，其包含摩尔比为2:1至1:2、优选2:1至1:1的DOTMA与胆固醇，并且其中DOTMA的正电荷与RNA的负电荷的电荷比为1.4:1或更小。在一个实施例中，纳米颗粒为脂质体复合物，其包含摩尔比为2:1至1:2、优选2:1至1:1的DOTAP与DOPE，并且其中DOTAP的正电荷与RNA的负电荷的电荷比为1.4:1或更小。

[0299] 在一个实施例中，纳米颗粒或脂质体的ζ电位为-5或更小、-10或更小、-15或更小、-20或更小或-25或更小。在各种实施例中，纳米颗粒或脂质体的ζ电位为-35或更高、-30或更高或-25或更高。在一个实施例中，纳米颗粒或脂质体具有0mV至-50mV、优选0mV至-40mV或-10mV至-30mV的ζ电位。

[0300] 在一些实施例中，纳米颗粒或脂质体的多分散性指数为0.5或更小、0.4或更小或0.3或更小，如通过动态光散射所测得的。

[0301] 在一些实施例中，纳米颗粒脂质体具有在约50nm至约1000nm范围内、在约100nm至约800nm范围内、在约200nm至约600nm范围内、在约250nm至约700nm范围内或在约250nm至约550nm范围内的平均直径，如通过动态光散射所测得的。

[0302] 在一些实施例中，PCV以15μg、25μg、38μg、50μg或100μg的剂量经静脉内施用(例如，以脂质体制剂的形式)。在一些实施例中，每剂递送15μg、25μg、38μg、50μg或100μg RNA

(即,剂量重量反映施用的RNA的重量而非施用的制剂或脂质体复合物的总重量)。可向受试者施用多于一种PCV,例如,向受试者施用包含新表位的组合的一种PCV并且还施用包含不同的新表位组合的单独PCV。在一些实施例中,联合施用包含十个新表位的第一PCV与包含十个替代表位的第二PCV。

[0303] 在一些实施例中,施用PCV以使得将其递送至脾脏。例如,可施用PCV以使得将一种或多种抗原(例如,肿瘤特异性新抗原)递送至抗原呈递细胞(例如,在脾脏中)。

[0304] 本公开的PCV或RNA疫苗中的任一者均可用于本文所述的方法中。例如,在一些实施例中,施用本公开的PD-1轴结合拮抗剂与个体化癌症疫苗(PCV)(例如,本文所述的RNA疫苗)联合。

[0305] 本文进一步提供了编码本公开的RNA疫苗中任一者的DNA分子。例如,在一些实施例中,本公开的DNA分子包含一般结构(在5'→3'方向上):(1)编码5'非翻译区(UTR)的多核苷酸序列;(2)编码分泌性信号肽的多核苷酸序列;(3)编码主要组织相容性复合物(MHC)分子的跨膜和胞质结构域的至少一部分的多核苷酸序列;(4)编码3'UTR的多核苷酸序列,该3'UTR包含:(a)分裂的氨基末端增强子(AES)mRNA的3'非翻译区或其片段;和(b)线粒体编码的12S RNA的非编码RNA或其片段;以及(5)编码poly(A)序列的多核苷酸序列。在一些实施例中,本公开的DNA分子在5′→3′方向上包含:多核苷酸序列GGCGAACTAGTATTCTTCTGGTCCCCACAGACTCAGAGAGAACCCGCCACCATGAGAGTGATGGCCCCCAG AACCCTGATCCTGCTGCTGTCTGGCGCCCTGGCCCTGACAGAGACATG GGCCGGAAGC(SEQ ID NO:40);和多核苷酸序列ATCGTGGG AATTGTGGCAGGACTGGCAGTGCTGGCCGTGGTGGTGATCGGAGCCGTGGTGGCTACCGTGATGTGCAGACGGAAGTCCAGCGGAGGCAAGGGCGGCAGCTACAGCCAGGCCGCCAGCTCTGATAGCGCCCAGGGCAGCGACGTGTCACTGACAGCCTAGTAACTCGAGCTGGTACTGCATGCACGCAATGCTAGCTGCCCCTTTCCCGTCCTGGGTACCCCGAGTCTCCCCCGACCTCGGGTCCCAGGTATGCTCCCACCTCCACCTGCCCCACTCACCACCTCTGCTAGTTCCAGACACCTCCCAAGCACGCAGCAATGCAGCTCAAAACGCTTAGCCTAGCCACACCCCCACGGGAAACAGCAGTGATTAACCTTTAGCAATAAACGAAAGTTTAACTAAGCTATACTAACCCCAGGGTTGGTCAATTTCGTGCCAGCCACACCGAGACCTGGTCCAGAGTCGCTAGCCGCGTCGCT(SEQ ID NO:41)。

[0306] 在一些实施例中,DNA分子在5′→3'方向上进一步包含:编码氨基酸接头的多核苷酸序列;以及编码新表位的多核苷酸序列。在一些实施例中,编码氨基酸接头和新表位的多核苷酸序列形成接头-新表位模块(例如,在5′→3'方向上在同一开放阅读框中的连续序列)。在一些实施例中,在5′→3'方向上,形成接头-新表位模块的多核苷酸序列在编码分泌性信号肽的多核苷酸序列与编码MHC分子的跨膜和胞质结构域的至少一部分的多核苷酸序列之间,或在SEQ ID NO:40的序列与SEQ ID NO:41的序列之间。在一些实施例中,DNA分子包含2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、28个、29个或30个接头-表位模块,并且接头-表位模块中的每一个编码不同的新表位。在一些实施例中,DNA分子包含2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个或20个接头-表位模块,并且DNA分子包含编码至少2个、至少3个、至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个、至少10个、至少11个、至少12个、至少13个、至少14个、至少15个、至少16个、至少17个、至少18个、至少19个或20个不同新表位的多核苷酸。在一些实施例中,DNA分子包含5个、10个或20个接头-表位模块。在一些实施例中,接头-表位模块中

的每一个编码不同的新表位。在一些实施例中，接头-表位模块在5′→3′方向上在同一开放阅读框中形成连续序列。在一些实施例中，编码第一接头-表位模块的接头的多核苷酸序列为编码分泌性信号肽的多核苷酸序列的3′端。在一些实施例中，编码最后一个接头-表位模块的新表位的多核苷酸序列为编码MHC分子的跨膜和胞质结构域的至少一部分的多核苷酸序列的5′端。

[0307] 本文还提供了产生本公开的RNA疫苗中任一者的方法，这些方法包括转录(例如，通过线性、双链DNA或质粒DNA转录，诸如通过体外转录)本公开的DNA分子。在一些实施例中，这些方法进一步包括从DNA分子中分离和/或纯化转录的RNA分子。

[0308] 在一些实施例中，本公开的RNA或DNA分子包含IIS型限制性切割位点，该位点允许在5'RNA聚合酶启动子的控制下转录RNA，并且包含多聚腺苷酸盒(poly(A)序列)，其中识别序列位于poly(A)序列的3'末端，而切割位点位于上游并因此在poly(A)序列内。IIS型限制性切割位点的限制性切割使质粒能够在poly(A)序列内线性化，如美国专利号9,476,055和10,106,800中所述。然后可使用线性化质粒作为体外转录的模板，所得转录物以未掩蔽的poly(A)序列结尾。可使用美国专利号9,476,055和10,106,800中描述的任意类型的IIS限制性切割位点。

[0309] 在本文提供的方法的一些实施例中，RNA疫苗包含一种或多种多核苷酸，所述一种或多种多核苷酸编码由存在于肿瘤样本中的癌症特异性体细胞突变产生的10至20个(例如，10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个或20个中的任一者)新表位。在某些实施例中，RNA疫苗被配制在脂质体复合物纳米颗粒或脂质体中。在某些实施例中，脂质体复合物纳米颗粒或脂质体包含一种或多种脂质，所述一种或多种脂质形成包封RNA疫苗的RNA的多层结构。在某些实施例中，所述一种或多种脂质包含至少一种阳离子脂质和至少一种辅助脂质。在某些实施例中，所述一种或多种脂质包含(R)-N,N,N-三甲基-2,3-二油酰氧基-1-丙铵氯化物(DOTMA)和1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DOPE)。在某些实施例中，在生理pH，脂质体的正电荷与负电荷的总电荷比为1.3:2(0.65)。

[0310] 在某些实施例中，RNA疫苗包含RNA分子，该RNA分子在5'→3'方向上包含：(1)5'帽；(2)5'非翻译区(UTR)；(3)编码分泌性信号肽的多核苷酸序列；(4)编码由存在于肿瘤样本中的癌症特异性体细胞突变产生的一个或多个新表位的多核苷酸序列；(5)编码主要组织相容性复合物(MHC)分子的跨膜和胞质结构域的至少一部分的多核苷酸序列；(6)3'UTR，其包含：(a)分裂的氨基末端增强子(AES)mRNA的3'非翻译区或其片段；和(b)线粒体编码的12S RNA的非编码RNA或其片段；以及(7)poly(A)序列。

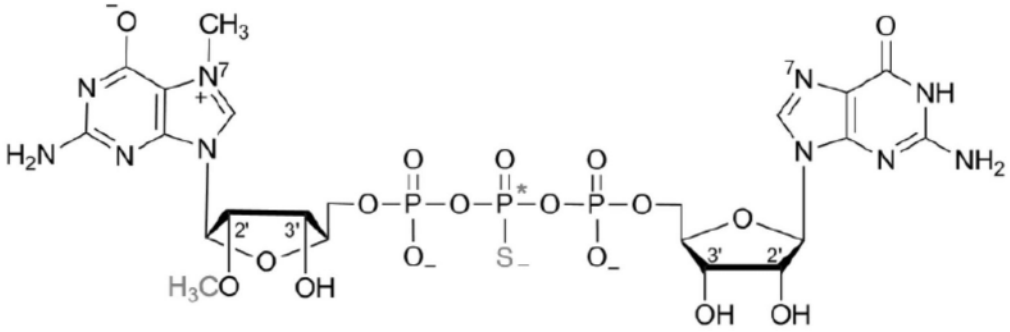
[0311] 在某些实施例中，RNA分子进一步包含编码氨基酸接头的多核苷酸序列；其中编码氨基酸接头的多核苷酸序列与一个或多个新表位中的第一个形成第一接头-新表位模块；并且其中在5'→3'方向上，形成第一接头-新表位模块的多核苷酸序列在编码分泌性信号肽的多核苷酸序列与编码MHC分子的跨膜和胞质结构域的至少一部分的多核苷酸序列之间。在某些实施例中，氨基酸接头包括序列GGSGGGGSGG(SEQ ID NO:39)。在某些实施例中，编码氨基酸接头的多核苷酸序列包括序列GGCGGCUCUGGAGGAGG CGGCUCCGGAGGC(SEQ ID NO:37)。

[0312] 在某些实施例中，RNA分子在5′→3'方向上进一步包含：至少第二接头-表位模块，其中所述至少第二接头-表位模块包含编码氨基酸接头的多核苷酸序列和编码新表位的多

核苷酸序列;其中在5′→3'方向上,形成第二接头-新表位模块的多核苷酸序列在编码第一接头-新表位模块的新表位的多核苷酸序列与编码MHC分子的跨膜和胞质结构域的至少一部分的多核苷酸序列之间;并且其中第一接头-表位模块的新表位不同于第二接头-表位模块的新表位。在某些实施例中,RNA分子包含5个接头-表位模块,其中5个接头-表位模块各自编码不同的新表位。在某些实施例中,RNA分子包含10个接头-表位模块,其中10个接头-表位模块各自编码不同的新表位。在某些实施例中,RNA分子包含20个接头-表位模块,其中20个接头-表位模块各自编码不同的新表位。

[0313] 在某些实施例中,RNA分子进一步包含编码氨基酸接头的第二多核苷酸序列,其中编码氨基酸接头的第二多核苷酸序列在编码3'方向上最远的新表位的多核苷酸序列与编码MHC分子的跨膜和胞质结构域的至少一部分的多核苷酸序列之间。

[0314] 在某些实施例中,5'帽包含以下结构的D1非对映异构体:

[0315] 

[0316] 在某些实施例中,5′UTR包含序列UUCUUCUGGUCCCCACAGACU CAGAGAGAACCCGCCACC(SEQ ID NO:23)。在某些实施例中,5′UTR包含序列GGCGAACUAGUAUUCUUCUGGUCCCCACAGACU CAGAGAG AACCCGCCACC(SEQ ID NO:21)。

[0317] 在某些实施例中,分泌性信号肽包含氨基酸序列MRVMAPRTLILL LSGALALTETWAGS(SEQ ID NO:27)。在某些实施例中,编码分泌性信号肽的多核苷酸序列包含序列AUGAGAGUGAUGGCCCCCAG AACCCUGAUCCUGCUGCUGUCUGGCGCCCUGGCCCUGACAGAGACA UGGGCCGGAAGC(SEQ ID NO:25)。

[0318] 在某些实施例中,MHC分子的跨膜和胞质结构域的至少一部分包含氨基酸序列IV GIVAGLAVLAVVVIGAVVATVMCRRKSSGGKGGSYSQAAS SDSAQGSDVSLTA(SEQ ID NO:30)。在某些实施例中,编码MHC分子的跨膜和胞质结构域的至少一部分的多核苷酸序列包含序列AUCGUG GGAAUUGUGGCAGGACUGGCAGUGCUGGCCGUGGUGGUGAUCGGAGCCGUGGUGGCUACCGUGAUGUGCAGACGGA AGUCCAGCGGAGGCAAGGGCGGCAGCUACAGCCAGGCCGCCAGCUCUGAUAGCGCCCAGGGCAGCGACGUGUCACU GACAGCC(SEQ ID NO:28)。

[0319] 在某些实施例中,AES mRNA的3′非翻译区包含序列CUGGUACUG CAUGCACGCAAUGCU AGCUGCCCCUUUCCCGUCCUGGGUACCCCGAG UCUCCCCCGACCUCGGGUCCCAGGUAUGCUCCCACCUCCACCU GCCC CACUCACCACCUCUGCUAGUUCCAGACACCUCC(SEQ ID NO:33)。在某些实施例中,线粒体编码的12S RNA的非编码RNA包含序列CAAGCACGCAGCAAUGCAGCUCAAAACGCUUAGCCUAGCCACACCC CCACGGGAAACAGCAGUGAUUAACCUUUAGCAAUAAACGAAAGUUUAACUAAGCUAUACUAACCCCAGGGUUGGUC AAUUUCGUGCCAGCCACACCG(SEQ ID NO:35)。在某些实施例中,3′UTR包含序列CUCGAGCUGGUA CUGCAUGCACGCAAUGCUAGCUGCCCCUUUCCCGUCCUGGGUACCCCGAGUCUCCCCCGACCUCGGGUCCCAGGUA UGCUCCCACCUCCACCUGCCCCACUCACCACCUCUGCUAGUUCCAGACACCUCCCAAGCACGCAGCAAUGCAGCUC

AAAACGCUUAGCCUAGCCACACCCCCACGGGAAACAGCAGUGAUUAACCUUUAGCAAUAAACGAAAGUUUAACUAAGCUAUACUAACCCCAGGGUUGGUCAAUUUCGUGCCAGCCACACCGAGACCUGGUCCAGAGUCGCUAGCCGCGUCGCU(SEQ ID NO:31)。

[0320] 在某些实施例中,poly(A)序列包含120个腺嘌呤核苷酸。

[0321] 在某些实施例中,RNA疫苗包含RNA分子,该RNA分子在5'→3'方向上包含:多核苷酸序列GGCGAACUAGUAUUCUUCUGGUCCCCAC AGACUCAGAGAGAACCCGCCACCAUGAGAGUGAUGGCCCCCAGAAC CCUGAUCCUGCUGCUGUCUGGCGCCCUGGCCCUGACAGAGACAUGG GCCGGAAGC(SEQ ID NO:19);编码由存在于肿瘤样本中的癌症特异性体细胞突变产生的一个或多个新表位的多核苷酸序列;以及多核苷酸序列AUCGUGGGAAUUGUGGCAGGACUGGCAGUGCUGGCCGUGGUGGUGAUCGGAGCCGUGGUGGCUACCGUGAUGUGCAGACGGAAGUCCAGCGGAGGCAAGGGCGGCAGCUACAGCCAGGCCGCCAGCUCUGAUAGCGCCCAGGGCAGCGACGUGUCACUGACAGCCUAGUAACUCGAGCUGGUACUGCAUGCACGCAAUGCUAGCUGCCCCUUUCCCGUCCUGGGUACCCCGAGUCUCCCCCGACCUCGGGUCCCAGGUAUGCUCCCACCUCCACCUGCCCCACUCACCACCUCUGCUAGUUCCAGACACCUCCCAAGCACGCAGCAAUGCAGCUCAAAACGCUUAGCCUAGCCACACCCCCACGGGAAACAGCAGUGAUUAACCUUUAGCAAUAAACGAAAGUUUAACUAAGCUAUACUAACCCCAGGGUUGGUCAAUUUCGUGCCAGCCACACCGAGACCUGGUCCAGAGUCGCUAGCCGCGUCGCU(SEQ ID NO:20)。

[0322] IV.PD-1轴结合拮抗剂

[0323] 在一些实施例中,施用本公开的PCV(例如,RNA疫苗)与PD-1轴结合拮抗剂联合。

[0324] 例如,PD-1轴结合拮抗剂包括PD-1结合拮抗剂、PDL1结合拮抗剂和PDL2结合拮抗剂。"PD-1"的别名包括CD279和SLEB2。"PDL1"的别名包括B7-H1、B7-4、CD274和B7-H。"PDL2"的别名包括B7-DC、Btdc和CD273。在一些实施例中,PD-1、PDL1和PDL2是人PD-1、PDL1和PDL2。

[0325] 在一些实施例中,PD-1结合拮抗剂是抑制PD-1与其配体结合配偶体结合的分子。在具体方面,PD-1配体结合配偶体是PDL1和/或PDL2。在另一实施例中,PDL1结合拮抗剂是抑制PDL1与其结合配偶体结合的分子。在具体方面,PDL1结合配偶体是PD-1和/或B7-1。在另一实施例中,PDL2结合拮抗剂是抑制PDL2与其结合配偶体结合的分子。在一个特定方面,PDL2结合配偶体是PD-1。拮抗剂可以是抗体、其抗原结合片段、免疫粘附素、融合蛋白或寡肽。

[0326] 在一些实施例中,PD-1结合拮抗剂是抗PD-1抗体(例如,人抗体、人源化抗体或嵌合抗体)。

[0327] 在一些实施例中,抗PD-1抗体是纳武单抗(nivolumab)(CAS登记号:946414-94-4)。纳武单抗(Bristol-Myers Squibb/Ono),也称为MDX-1106-04、MDX-1106、ONO-4538、BMS-936558和OPDIVO®,是WO2006/121168中所述的抗PD-1抗体。在一些实施例中,抗PD-1抗体包含重链和轻链序列,其中:

[0328] (a)重链包含以下氨基酸序列:QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDC KASGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSKRYYADSVKGRFTISRDNSKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCATNDDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVM

HEALHNHYTQKSLSLSLG(SEQ ID NO:11),和

[0329] (b)轻链包含以下氨基酸序列:EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRA SQSVSSYLAWYQQKPG QAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQSSNWPRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(SEQ ID NO:12)。

[0330] 在一些实施例中,抗PD-1抗体包含来自SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12的六个HVR序列(例如,来自SEQ ID NO:11的三个重链HVR和来自SEQ ID NO:12的三个轻链HVR)。在一些实施例中,抗PD-1抗体包含来自SEQ ID NO:11的重链可变结构域和来自SEQ ID NO:12的轻链可变结构域。

[0331] 在一些实施例中,抗PD-1抗体是派姆单抗(Pembrolizumab)(CAS登记号:1374853-91-4)。派姆单抗(Merck),也称为MK-3475、Merck3475、lambrolizumab、KEYTRUDA®和SCH-900475,是WO2009/114335中所述的抗PD-1抗体。在一些实施例中,抗PD-1抗体包含重链和轻链序列,其中:

[0332] (a)重链包含以下氨基酸序列:QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSC KASGYTFTNYYMYWVRQAP GQGLEWMGGINPSNGGTNFNEKFKNRVTLTTDSSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDYRFDMGFDYWGQGTTVT VSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPS SSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQE DPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG(SEQ ID NO:13),和

[0333] (b)轻链包含以下氨基酸序列:EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRA SKGVSTSGYSYLHWYQ QKPGQAPRLLIYLASYLESGVPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQHSRDLPLTFGGGTKVEIKRTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(SEQ ID NO:14)。

[0334] 在一些实施例中,抗PD-1抗体包含来自SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:14的六个HVR序列(例如,来自SEQ ID NO:13的三个重链HVR和来自SEQ ID NO:14的三个轻链HVR)。在一些实施例中,抗PD-1抗体包含来自SEQ ID NO:13的重链可变结构域和来自SEQ ID NO:14的轻链可变结构域。

[0335] 在一些实施例中,抗PD-1抗体是MEDI-0680(AMP-514;AstraZeneca)。MEDI-0680是人源化IgG4抗PD-1抗体。

[0336] 在一些实施例中,抗PD-1抗体是PDR001(CAS登记号1859072-53-9;Novartis)。PDR001是人源化IgG4抗PD1抗体,可阻断PDL1和PDL2与PD-1的结合。

[0337] 在一些实施例中,抗PD-1抗体是REGN2810(Regeneron)。REGN2810为人抗PD1抗体,也称为LIBTAYO®和西米普利单抗。

[0338] 在一些实施例中,抗PD-1抗体是BGB-108(BeiGene)。在一些实施例中,抗PD-1抗体是BGB-A317(BeiGene)。

[0339] 在一些实施例中,抗PD-1抗体是JS-001(Shanghai Junshi)。JS-001是人源化抗PD1抗体。

[0340] 在一些实施例中,抗PD-1抗体是STI-A1110(Sorrento)。STI-A1110是人抗PD1抗

体。

[0341] 在一些实施例中,抗PD-1抗体是INCSHR-1210(Incyte)。INCSHR-1210是人IgG4抗PD1抗体。

[0342] 在一些实施例中,抗PD-1抗体是PF-06801591(Pfizer)。

[0343] 在一些实施例中,抗PD-1抗体是TSR-042(也称为ANB011;Tesaro/AnaptysBio)。

[0344] 在一些实施例中,抗PD-1抗体是AM0001(ARMO Biosciences)。

[0345] 在一些实施例中,抗PD-1抗体是ENUM 244C8(Enumeral Biomedical Holdings)。ENUM 244C8是抗PD1抗体,可抑制PD-1的功能而不阻断PDL1与PD-1的结合。

[0346] 在一些实施例中,抗PD-1抗体是ENUM 388D4(Enumeral Biomedical Holdings)。ENUM 388D4是抗PD1抗体,可竞争性抑制PDL1与PD-1的结合。

[0347] 在一些实施例中,PD-1抗体包含来自下述文献中描述的PD-1抗体的六个HVR序列(例如三个重链HVR和三个轻链HVR)和/或重链可变结构域和轻链可变结构域:WO2015/112800(申请人:Regeneron)、WO2015/112805(申请人:Regeneron)、WO2015/112900(申请人:Novartis)、US20150210769(转让给Novartis)、WO2016/089873(申请人:Celgene)、WO2015/035606(申请人:Beigene)、WO2015/085847(申请人:Shanghai Hengrui Pharmaceutical/Jiangsu Hengrui Medicine)、WO2014/206107(申请人:Shanghai Junshi Biosciences/Junmeng Biosciences)、WO2012/145493(申请人:Amplimmune)、US9205148(转让给MedImmune)、WO2015/119930(申请人:Pfizer/Merck)、WO2015/119923(申请人:Pfizer/Merck)、WO2016/032927(申请人:Pfizer/Merck)、WO2014/179664(申请人:AnaptysBio)、WO2016/106160(申请人:Enumeral)和WO2014/194302(申请人:Sorrento)。

[0348] 在一些实施例中,PD-1结合拮抗剂是免疫粘附素(例如,包含与恒定区(例如,免疫球蛋白序列的Fc区)融合的PDL1或PDL2的细胞外或PD-1结合部分的免疫粘附素)。在一些实施例中,PD-1结合拮抗剂是AMP-224。AMP-224(CAS登记号:1422184-00-6;GlaxoSmithKline/MedImmune),也称为B7-DCIg,是WO2010/027827和WO2011/066342中所述的PDL2-Fc融合可溶性受体。

[0349] 在一些实施例中,PD-1结合拮抗剂是肽或小分子化合物。在一些实施例中,PD-1结合拮抗剂是AUNP-12(PierreFabre/Aurigene)。参见,例如WO2012/168944、WO2015/036927、WO2015/044900、WO2015/033303、WO2013/144704、WO2013/132317和WO2011/161699。

[0350] 在一些实施例中,PDL1结合拮抗剂是抑制PD-1的小分子。在一些实施例中,PDL1结合拮抗剂是抑制PDL1的小分子。在一些实施例中,PDL1结合拮抗剂是抑制PDL1和VISTA的小分子。在一些实施例中,PDL1结合拮抗剂是CA-170(也称为AUPM-170)。在一些实施例中,PDL1结合拮抗剂是抑制PDL1和TIM3的小分子。在一些实施例中,小分子是在WO2015/033301和WO2015/033299中描述的化合物。

[0351] 在一些实施例中,PD-1轴结合拮抗剂是抗PDL1抗体。本文考虑并描述了多种抗PDL1抗体。在本文的任何实施例中,分离的抗PDL1抗体可以结合人PDL1,例如UniProtKB/Swiss-Prot登录号Q9NZQ7.1中所示的人PDL1,或其变体。在一些实施例中,抗PDL1抗体能够抑制PDL1和PD-1之间和/或PDL1和B7-1之间的结合。在一些实施例中,抗PDL1抗体是单克隆抗体。在一些实施例中,抗PDL1抗体是选自由Fab、Fab′-SH、Fv、scFv和$(Fab')_2$片段组成的组的抗体片段。在一些实施例中,抗PDL1抗体为人源化抗体。在一些实施例中,抗PDL1抗体

是人抗体。可用于本发明方法的抗PDL1抗体的实例及其制备方法在PCT专利申请WO 2010/077634A1和美国专利号8,217,149中描述,其通过引用并入本文。

[0352] 在一些实施例中,抗PDL1抗体包含重链可变区和轻链可变区,其中:

[0353] (a)重链可变区包含HVR-H1、HVR-H2和HVR-H3,其序列分别为GFTFSDSWIH(SEQ ID NO:1)、AWISPYGGSTYYADSVKG(SEQ ID NO:2)和RHWPGGFDY(SEQ ID NO:3),并且

[0354] (b)轻链可变区包含HVR-L1、HVR-L2和HVR-L3,其序列分别为RASQDVSTAVA(SEQ ID NO:4)、SASFLYS(SEQ ID NO:5)和QQYLYHPAT(SEQ ID NO:6)。

[0355] 在一些实施例中,抗PDL1抗体是MPDL3280A,也称为阿特珠单抗和TECENTRIQ®(CAS登记号:1422185-06-5),《WHO药物信息(国际非专利药名)》中拟定的INN描述于2015年1月16日发表的列表112第28卷第4期中(参见第485页)。在一些实施例中,抗PDL1抗体包含重链和轻链序列,其中:

[0356] (a)重链可变区序列包含以下氨基酸序列:EVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFTFSD SWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSV KGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFD YWGQGT LVTVSS(SEQ ID NO:7)和

[0357] (b)轻链可变区序列包含以下氨基酸序列:DIQMTQSPSSLSASVG DRVTITCRASQDVST AVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSG SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEI KR(SEQ ID NO:8)。

[0358] 在一些实施例中,抗PDL1抗体包含重链和轻链序列,其中:

[0359] (a)重链包含以下氨基酸序列:EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFSDSWIHWVRQAP GKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTLVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG(SEQ ID NO:9),和

[0360] (b)轻链包含以下氨基酸序列:DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCR ASQDVSTAVAWYQQKPG KAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(SEQ ID NO:10)。

[0361] 在一些实施例中,抗PDL1抗体是阿维单抗(avelumab)(CAS登记号:1537032-82-8)。阿维单抗,也称为MSB0010718C,是人单克隆IgG1抗PDL1抗体(Merck KGaA,Pfizer)。在一些实施例中,抗PDL1抗体包含重链和轻链序列,其中:

[0362] (a)重链包含以下氨基酸序列:EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFSSYIMMWVRQAP GKGLEWVSSIYPSGGITFYADTVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARIKLGTVTTVDYWGQGTLVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPS SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG(SEQ ID NO:15),和

[0363] (b)轻链包含以下氨基酸序列:QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGT SSDVGGYNYVSWYQQH PGKAPKLMIYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTRVFGTGTKVTVLGQPKANP TVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHR SYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS(SEQ ID NO:16)。

[0364] 在一些实施例中,抗PDL1抗体包含来自SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:16的六个HVR序列(例如,来自SEQ ID NO:15的三个重链HVR和来自SEQ ID NO:16的三个轻链HVR)。在一些实施例中,抗PDL1抗体包含来自SEQ ID NO:15的重链可变结构域和来自SEQ ID NO:16的轻链可变结构域。

[0365] 在一些实施例中,抗PDL1抗体是德瓦鲁单抗(durvalumab)(CAS登记号:1428935-60-7)。德瓦鲁单抗,也称为MEDI4736,是WO2011/066389和US2013/034559中所述的Fc优化的人单克隆IgG1κ抗PDL1抗体(MedImmune,AstraZeneca)。在一些实施例中,抗PDL1抗体包含重链和轻链序列,其中:

[0366] (a)重链包含以下氨基酸序列:EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFSRYWMSWVRQAP GKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGGWFGELAFDYWGQGTLV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG(SEQ ID NO:17),和

[0367] (b)轻链包含以下氨基酸序列:EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRA SQRVSSSYLAWYQQKP GQAPRLLIYDASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSLPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVF IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(SEQ ID NO:18)。

[0368] 在一些实施例中,抗PDL1抗体包含来自SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:18的六个HVR序列(例如,来自SEQ ID NO:17的三个重链HVR和来自SEQ ID NO:18的三个轻链HVR)。在一些实施例中,抗PDL1抗体包含来自SEQ ID NO:17的重链可变结构域和来自SEQ ID NO:18的轻链可变结构域。

[0369] 在一些实施例中,抗PDL1抗体是MDX-1105(Bristol Myers Squibb)。MDX-1105,也称为BMS-936559,是WO2007/005874中所述的抗PDL1抗体。

[0370] 在一些实施例中,抗PDL1抗体是LY3300054(Eli Lilly)。

[0371] 在一些实施例中,抗PDL1抗体是STI-A1014(Sorrento)。STI-A1014是人抗PDL1抗体。

[0372] 在一些实施例中,抗PDL1抗体是KN035(Suzhou Alphamab)。KN035是从骆驼噬菌体展示文库生成的单结构域抗体(dAB)。

[0373] 在一些实施例中,抗PDL1抗体包含可裂解的部分或接头,当被裂解时(例如,通过肿瘤微环境中的蛋白酶),该部分或接头活化抗体抗原结合结构域(例如,通过去除非结合的空间部分)以使其结合其抗原。在一些实施例中,抗PDL1抗体是CX-072(CytomX Therapeutics)。

[0374] 在一些实施例中,PDL1抗体包含来自以下文献所述的PDL1抗体的六个HVR序列(例

如,三个重链HVR和三个轻链HVR)和/或重链可变结构域和轻链可变结构域:US20160108123(转让给Novartis)、WO2016/000619(申请人:Beigene)、WO2012/145493(申请人:Amplimmune)、US9205148(转让给MedImmune)、WO2013/181634(申请人:Sorrento)和WO2016/061142(申请人:Novartis)。

[0375] 在更进一步具体方面,抗体进一步包含人或鼠恒定区。在另一方面,人恒定区选自由IgG1、IgG2、IgG2、IgG3、IgG4组成的组。在更进一步具体方面,人恒定区是IgG1。在又一个方面,鼠恒定区选自由IgG1、IgG2A、IgG2B、IgG3组成的组。在另一方面,鼠恒定区为IgG2A。

[0376] 在更进一步具体方面,抗体具有降低的或最小的效应子功能。在又一个具体方面,最小的效应子功能来自"无效应子的Fc突变"或无糖基化突变。在另一实施例中,无效应子Fc突变是恒定区中的N297A或D265A/N297A取代。在一些实施例中,分离的抗PDL1抗体是去糖基化的。抗体的糖基化通常是N-连接或O-连接的。N-连接是指碳水化合物部分连接至天冬酰胺残基的侧链。三肽序列天冬酰胺-X-丝氨酸和天冬酰胺-X-苏氨酸,其中X是脯氨酸以外的任何氨基酸,是将碳水化合物部分酶促连接至天冬酰胺侧链的识别序列。因此,多肽中这些三肽序列中任一个的存在产生潜在的糖基化位点。O-连接的糖基化是指糖N-乙酰半乳糖胺、半乳糖或木糖中的一种连接至羟基氨基酸,该羟基氨基酸最通常为丝氨酸或苏氨酸,但也可以使用5-羟脯氨酸或5-羟基赖氨酸。通过改变氨基酸序列以除去上述三肽序列之一(对于N-连接的糖基化位点),可以方便地从抗体上除去糖基化位点。可以通过将糖基化位点内的天冬酰胺、丝氨酸或苏氨酸残基取代为另一个氨基酸残基(例如,甘氨酸、丙氨酸或保守取代)来进行变异。

[0377] 在又一实施例中,本公开提供了包含任何上述抗PDL1抗体与至少一种药用的载体联合的组合物。

[0378] 在又一实施例中,本公开提供了一种组合物,其包含如本文提供的抗PDL1、抗PD-1或抗PDL2抗体或其抗原结合片段以及至少一种药用的载体。在一些实施例中,施用于个体的抗PDL1、抗PD-1或抗PDL2抗体或其抗原结合片段是包含一种或多种药用的载体的组合物。可以使用本文所述或本领域已知的任何药用的载体。

[0379] V.抗体制备

[0380] 本文所述的抗体是使用本领域可用于产生抗体的技术制备的,其示例性方法在以下部分中更详细地描述。

[0381] 抗体针对目标抗原(例如,PD-1或PD-L1,诸如人PD-1或PD-L1)。优选地,抗原是生物学上重要的多肽,并且向患有病症的哺乳动物施用抗体可以在该哺乳动物中产生治疗益处。

[0382] 在某些实施例中,本文提供的的抗体具有≤1μM、≤150nM、≤100nM、≤50nM、≤10nM、≤1nM、≤0.1nM、≤0.01nM或≤0.001nM(例如10^{-8}M或更小,例如10^{-8}M至10^{-13}M,例如10^{-9}M至10^{-13}M)的解离常数(Kd)。

[0383] 在一个实施例中,通过用如以下测定所述的Fab形式的目标抗体及其抗原进行放射性标记的抗原结合测定(RIA)来测量Kd。通过在一系列未标记的抗原滴定存在下用最小浓度(^{125}I)标记的抗原平衡Fab,然后用抗Fab抗体包被的板捕获结合的抗原,来测量Fab对抗原的溶液结合亲和力(参见例如,Chen等人,J.Mol.Biol.293:865-881(1999))。为了确定用于测定的条件,用在50mM碳酸钠(pH 9.6)中5μg/ml捕获抗Fab抗体(Cappel Labs)包被

MICROTITER®多孔板(Thermo Scientific)过夜,随后在室温(大约23℃)用在PBS中2%(w/v)牛血清白蛋白阻断二至五小时。在非吸附板(Nunc#269620)中,将100pM或26pM[^{125}I]-抗原与目标Fab的系列稀释液混合。然后将目的Fab孵育过夜;然而,孵育可以持续更长时间(例如,约65小时)以确保达到平衡。此后,将混合物转移至捕获板以在室温孵育(例如,一小时)。随后移除溶液并且用在PBS中的0.1%聚山梨酯20(TWEEN-20®)洗涤该板八次。当板已干燥时,添加150μl/孔的闪烁体(MICROSCINT-20™;Packard),并且在TOPCOUNT™γ计数器(Packard)上对板计数十分钟。选择给出小于或等于20%最大结合的各Fab的浓度以用于竞争性结合测定中。

[0384] 根据另一实施例,在25℃,用经固定化的抗原CM5芯片,在大约10响应单位(RU)下,使用BIACORE®-2000或BIACORE®-3000(BIAcore,Inc.,Piscataway,NJ),通过表面等离子体共振测定来测量Kd。简而言之,根据供应商说明书,用N-乙基-N′-(3-二甲基氨基丙基)-碳化二亚胺盐酸盐(EDC)及N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)活化羧甲基化的葡聚糖生物感测器芯片(CM5,BIACORE,Inc.)。将抗原用10mM醋酸钠pH 4.8稀释至5μg/ml(约0.2μM),之后以5μl/分钟的流速进行注射以获得大约10响应单位(RU)的偶联蛋白。注射抗原之后,注射1M乙醇胺以阻断未反应的基团。关于动力学测量,在25℃,以约25μl/min的流速,注射在含有0.05%聚山梨酯20(TWEEN-20™)表面活性剂(PBST)的PBS中的Fab的两倍连续稀释液(0.78nM至500nM)。通过同时拟合缔合和解离传感图,使用简单的一对一朗缪尔结合模型(BIACORE®评估软件3.2版)计算缔合速率(kon)和解离速率(koff)。平衡解离常数(Kd)计算为比率koff/kon。参加例如Chen,Y.等人,J.Mol.Biol.293:865-881(1999)。若通过上述表面等离子体共振测定得出缔合速率超过106M-1s-1,则可通过使用荧光淬灭技术测定缔合速率,即如在分光计诸如配备止流装置的分光光度计(Aviv Instruments)或8000系列SLM-AMINCO™分光光度计(ThermoSpectronic)中用搅拌比色杯所测得的,在浓度渐增的抗原存在下,测量在25℃PBS pH 7.2中的20nM抗抗原抗体(Fab形式)的荧光发射强度(激发=295nm;发射=340nm,16nm带通)的增加或减少。

[0385] 嵌合抗体、人源化抗体和人抗体

[0386] 在某些实施例中,本文提供的抗体是嵌合抗体。某些嵌合抗体描述于例如美国专利号4,816,567和Morrison等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,81:6851-6855(1984)中。在一个实例中,嵌合抗体包含非人可变区(例如,源自小鼠、大鼠、仓鼠、兔或非人灵长类动物(诸如猴)的可变区)和人恒定区。在另一个实例中,嵌合抗体为其中类别或亚类已经与亲本抗体的类别或亚类改变的“类别转换”抗体。嵌合抗体包括其抗原结合片段。

[0387] 在某些实施例中,嵌合抗体是人源化抗体。通常,将非人抗体人源化以减少对人的免疫原性,同时保留亲本非人抗体的特异性和亲和力。通常,人源化抗体包含一个或多个可变结构域,其中HVR,例如CDR(或其部分)源自非人抗体,而FR(或其部分)源自人抗体序列。人源化抗体任选地还将包含人恒定区的至少一部分。在一些实施例中,人源化抗体中的一些FR残基被来自非人抗体(例如,HVR残基所来源于的抗体)的相应残基取代,例如以恢复或改善抗体特异性或亲和力。

[0388] 人源化抗体及其制备方法综述于例如Almagro和Fransson,Front.Biosci.13:1619-1633(2008)中,并且进一步描述于例如Riechmann等人,Nature 332:323-329(1988);

Queen等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86:10029-10033(1989);美国专利号5,821,337、7,527,791、6,982,321和7,087,409;Kashmiri等人,Methods 36:25-34(2005)(描述了SDR(a-CDR)移植);Padlan,Mol.Immunol.28:489-498(1991)(描述了"表面再塑");Dall'Acqua等人,Methods 36:43-60(2005)(描述了"FR改组");以及Osbourn等人,Methods 36:61-68(2005)和Klimka等人,Br.J.Cancer,83:252-260(2000)(描述了用于FR改组的"指导选择"方法)中。

[0389] 可用于人源化的人框架区包括但不限于:使用"最佳拟合"方法选择的框架区(参见例如Sims等人J.Immunol.151:2296(1993));来源于轻链或重链可变区的特定亚组的人抗体的共有序列的框架区(参见例如,Carter等人Proc.Natl.Acad.Sci.USA,89:4285(1992);以及Presta等人J.Immunol.,151:2623(1993));人成熟(体细胞突变)框架区或人种系框架区(参见例如,Almagro和Fransson,Front.Biosci.13:1619-1633(2008));以及来源于筛选FR文库的框架区(参见例如,Baca等人,J.Biol.Chem.272:10678-10684(1997)和Rosok等人,J.Biol.Chem.271:22611-22618(1996))。

[0390] 在某些实施例中,本文提供的抗体是人抗体。可以使用本领域已知的各种技术来产生人抗体。人抗体一般描述于van Dijk和van de Winkel,Curr.Opin.Pharmacol.5:368-74(2001)以及Lonberg,Curr.Opin.Immunol.20:450-459(2008)中。

[0391] 可以通过以下方式来制备人抗体:将免疫原施用于转基因动物,所述转基因动物已被修饰以响应于抗原激发而产生具有人可变区的完整人抗体或完整抗体。此类动物通常含有全部或部分人免疫球蛋白基因座,所述全部或部分人免疫球蛋白基因座替代内源性免疫球蛋白基因座,或者在动物的染色体外存在或随机整合至动物的染色体中。在此类转基因小鼠中,内源性免疫球蛋白基因座通常已被灭活。关于从转基因动物获得人抗体的方法的综述,参见Lonberg,Nat.Biotech.23:1117-1125(2005)。另见例如描述XENOMOUSE™技术的美国专利号6,075,181和6,150,584;描述HuMab®技术的美国专利号5,770,429;描述K-M MOUSE®技术的美国专利号7,041,870,以及描述VelociMouse®技术的美国专利申请公开号US 2007/0061900)。可以进一步修饰来自由此类动物产生的完整抗体的人可变区,例如通过与不同的人恒定区组合。

[0392] 人抗体也可以通过基于杂交瘤的方法制备。已经描述了用于产生人单克隆抗体的人骨髓瘤和小鼠-人杂交骨髓瘤细胞系。(参见例如:Kozbor J.Immunol.,133:3001(1984);Brodeur等人,《单克隆抗体生产技术及应用》(Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications),第51-63页(Marcel Dekker,Inc.,New York,1987);以及Boerner等人,J.Immunol.,147:86(1991)。)经由人B细胞杂交瘤技术产生的人抗体也如Li等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,103:3557-3562(2006)所述。另外的方法包括例如在美国专利号7,189,826(描述了从杂交瘤细胞系产生单克隆人IgM抗体)和Ni,Xiandai Mianyixue,26(4):265-268(2006)(描述了人-人杂交瘤)中描述的那些方法。人类杂交瘤技术(Trioma技术)也描述于Vollmers和Brandlein,Histology and Histopathology,20(3):927-937(2005)和Vollmers和Brandlein,Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology,27(3):185-91(2005)中。

[0393] 人抗体还可以通过分离选自人源噬菌体展示文库的Fv克隆可变结构域序列产生。然后可以将此类可变结构域序列与预期的人恒定结构域结合。从抗体文库中选择人抗体的

技术描述如下。

[0394] 抗体片段

[0395] 抗体片段可以通过传统方法(诸如酶消化)或通过重组技术产生。在某些情况下，使用抗体片段而不是全抗体具有优势。片段的较小尺寸允许快速清除，并可以改善对实体瘤的进入。关于某些抗体片段的综述，参见Hudson等人(2003)Nat.Med.9:129-134。

[0396] 已经开发了用于产生抗体片段的各种技术。传统上，这些片段通过完整抗体的蛋白水解消化而获得(参见例如，Morimoto等人，Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117(1992)；和Brennan等人，Science,229:81(1985))。然而，这些片段现在可以直接由重组宿主细胞产生。Fab、Fv和ScFv抗体片段均可在大肠杆菌中表达并从大肠杆菌中分泌出来，因此可轻松生产大量这些片段。可以从以上讨论的抗体噬菌体文库中分离抗体片段。可替代地，Fab′-SH片段可以直接从大肠杆菌中回收，并化学偶联形成$F(ab')_2$片段(Carter等人，Bio/Technology 10:163-167(1992))。根据另一种方法，可以直接从重组宿主细胞培养物中分离$F(ab')_2$片段。具有增加的体内半衰期的包含挽救受体结合表位残基的Fab和$F(ab')_2$片段描述于美国专利号5,869,046中。产生抗体片段的其它技术对熟练技术人员将是显而易见的。在某些实施例中，抗体为单链Fv片段(scFv)。参见WO 93/16185;美国专利号5,571,894和5,587,458。Fv和scFv是具有完整结合位点没有恒定区的仅有的种类;因此，它们可能适合于在体内使用期间减少非特异性结合。可以构建scFv融合蛋白以在scFv的氨基末端或羧基末端产生效应蛋白的融合。参见Antibody Engineering,ed.Borrebaeck，同上。例如，该抗体片段也可以是“线性抗体”，例如美国专利号5,641,870中所述。这样的线性抗体可以是单特异性或双特异性的。

[0397] 单结构域抗体

[0398] 在一些实施例中，本公开的抗体是单结构域抗体。单结构域抗体为包含抗体的全部或部分重链可变结构域或全部或部分轻链可变结构域的单个多肽链。在某些实施例中，单结构域抗体是人单结构域抗体(Domantis,Inc.,Waltham,Mass.;参见例如美国专利号6,248,516B1)。在一个实施例中，单结构域抗体由抗体的全部或部分重链可变结构域组成。

[0399] 抗体变体

[0400] 在一些实施例中，考虑了本文描述的抗体的氨基酸序列修饰。例如，可能期望改善抗体的结合亲和力和/或其他生物特性。抗体的氨基酸序列变体可以通过向编码抗体的核苷酸序列中引入适当的改变或通过肽合成来制备。此类修饰包括例如抗体氨基酸序列内残基的缺失和/或插入和/或取代。可以进行缺失、插入和取代的任何组合以获得最终构建体，前提条件是所述最终构建体具有所需特性。可以在形成序列时将氨基酸改变引入受试抗体的氨基酸序列中。

[0401] 取代、插入和缺失变体

[0402] 在某些实施例中，提供了具有一或多个氨基酸取代的抗体变体。用于取代突变的目的位点包括HVR和FR。保守取代如表2所示。下文参考氨基酸侧链类别进一步描述了更多实质性改变。可以将氨基酸取代引入目标抗体中，并对产物进行所需活性(例如保留/改善的抗原结合、降低的免疫原性或改善的ADCC或CDC)筛选。

[0403] 表2.保守取代。

[0404]

原始残基	示例性取代	优选的取代

Ala(A)	Val;Leu;Ile	Val
Arg(R)	Lys;Gln;Asn	Lys
Asn(N)	Gln;His;Asp、Lys;Arg	Gln
Asp(D)	Glu;Asn	Glu
Cys(C)	Ser;Ala	Ser
Gln(Q)	Asn;Glu	Asn
Glu(E)	Asp;Gln	Asp
Gly(G)	Ala	Ala
His(H)	Asn;Gln;Lys;Arg	Arg
Ile(I)	Leu;Val;Met;Ala;Phe;正亮氨酸	Leu
Leu(L)	正亮氨酸;Ile;Val;Met;Ala;Phe	Ile
Lys(K)	Arg;Gln;Asn	Arg
Met(M)	Leu;Phe;Ile	Leu
Phe(F)	Trp;Leu;Val;Ile;Ala;Tyr	Tyr
Pro(P)	Ala	Ala
Ser(S)	Thr	Thr
Thr(T)	Val;Ser	Ser
Trp(W)	Tyr;Phe	Tyr
Tyr(Y)	Trp;Phe;Thr;Ser	Phe
Val(V)	Ile;Leu;Met;Phe;Ala;正亮氨酸	Leu

[0405] 可根据共同的侧链特性将氨基酸分组：

[0406] a.疏水：正亮氨酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile；

[0407] b.中性亲水性：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln；

[0408] c.酸性：Asp、Glu；

[0409] d.碱性：His、Lys、Arg；

[0410] e.影响链取向的残基：Gly,Pro；

[0411] f.芳香族：Trp、Tyr、Phe。

[0412] 非保守性取代将需要用这些类别中的一个的成员交换另一类别。

[0413] 一种类型的置换变体涉及置换亲本抗体(例如,人源化抗体或人抗体)的一个或多个高变区残基。通常,相对于亲本抗体,选为用于进一步研究的一个或多个所得变体将在某些生物学特性方面(例如,亲和力增加、免疫原性降低)有改变(例如,改善)和/或将基本上保留亲本抗体的某些生物学特性。示例性置换变体为亲和力成熟抗体,其可例如使用诸如本文所述的那些基于噬菌体展示的亲和力成熟技术方便地生成。简而言之,将一个或多个HVR残基突变并且将变体抗体展示在噬菌体上并针对特定生物活性(例如结合亲和力)进行筛选。

[0414] 可以在HVR中进行改变(例如取代),例如以改善抗体亲和力。此类改变可发生于HVR“热点”中,即由体细胞成熟过程中发生高频突变的密码子编码的残基中(参见例如Chowdhury,Methods Mol.Biol.207:179-196(2008))和/或SDR(a-CDR)(检测所得变体VH或VL的结合亲和力)。通过构建以及从二级文库中重新选择以实现亲和力成熟的方法已描述

于例如Hoogenboom等人,Methods in Molecular Biology 178:1-37(O'Brien等人编,Human Press,Totowa,NJ,2001)中。在亲和力成熟的一些实施例中,通过多种方法(例如,易错PCR、链改组或寡核苷酸定向突变)中的任一个将多样性引入出于成熟目的而挑选的可变基因中。然后创建一个二级文库。然后筛选该文库以鉴定具有所需亲和力的任何抗体变体。引入多样性的另一种方法涉及HVR定向方法,其中将若干HVR残基(例如,每次4-6个残基)随机化。参与抗原结合的HVR残基可例如使用丙氨酸扫描突变或建模来特异性地鉴定。特别是CDR-H3和CDR-L3经常成为目标。

[0415] 在某些实施例中,取代、插入或缺失可发生在一个或多个HVR内,只要此类改变基本上不降低抗体的抗原结合能力即可。例如,可在HVR中进行基本上不降低结合亲和力的保守性改变(例如,如本文提供的保守性取代)。此类改变可在HVR"热点"或SDR之外。在上文提供的变体VH和VL序列的某些实施例中,每个HVR保持不变,或包含不超过一个、两个或三个氨基酸取代。

[0416] 可用于鉴别可被靶向诱变的抗体残基或区域的方法称作"丙氨酸扫描诱变",如Cunningham和Wells(1989)Science,244:1081-1085所描述。在此方法中,鉴别残基或一组靶残基(例如,带电残基,诸如Arg、Asp、His、Lys和Glu)并用中性或带负电的氨基酸(例如,丙氨酸或多丙氨酸)替换以确定抗体与抗原的相互作用是否受到影响。可在对初始取代展示功能敏感性的氨基酸位置引入其他取代。可替代地或另外地,利用抗原-抗体复合物的晶体结构鉴定抗体与抗原之间的接触点。可靶向或消除作为取代的候选的此类接触残基和相邻残基。可筛选变体以确定它们是否具备期望的特性。

[0417] 氨基酸序列插入包括长度范围为一个残基至含有一百个或更多个残基的多肽的氨基和/或羧基末端融合,以及一个或多个氨基酸残基的序列内插入。末端插入的实例包括具有N末端甲硫氨酰残基的抗体。抗体分子的其它插入变体包括抗体的N末端或C末端与增加抗体的血清半衰期的酶(例如,对于ADEPT)或多肽的融合。

[0418] 糖基化变体

[0419] 在某些实施例中,改变本文提供的抗体以增加或降低抗体糖基化的程度。糖基化位点向抗体的添加或缺失可通过改变氨基酸序列以产生或去除一个或多个糖基化位点而方便地实现。

[0420] 当抗体包含Fc区时,附接于其上的碳水化合物可以被改变。由哺乳动物细胞产生的天然抗体通常包含具有支链的双触角寡糖,所述双触角寡糖通常通过N-键结连接于Fc区的CH2结构域的Asn297。参见,例如,Wright等人TIBTECH 15:26-32(1997)。寡糖可包括各种碳水化合物,例如,甘露糖、N-乙酰基葡糖胺(GlcNAc)、半乳糖和唾液酸、以及附接于双触角寡糖结构的"主干"中的GlcNAc的岩藻糖。在一些实施例中,可对本公开的抗体中的寡糖进行修饰,以产生具有某些改善特性的抗体变体。

[0421] 在一个实施例中,提供了包含Fc区的抗体变体,其中连接至Fc区的碳水化合物结构具有减少的岩藻糖或缺乏岩藻糖,这可以改善ADCC功能。具体地,本文考虑相对于在野生型CHO细胞中产生的相同抗体上的岩藻糖的量,具有减少的岩藻糖的抗体。也就是说,它们的特征在于其岩藻糖的量比天然CHO细胞(例如,产生天然糖基化模式的CHO细胞,诸如含有天然FUT8基因的CHO细胞)产生的岩藻糖的量低。在某些实施例中,该抗体是一种抗体,其中其上少于约50%、40%、30%、20%、10%或5%的N-连接聚糖包含岩藻糖。例如,此类抗体中

的岩藻糖的量可以为1％至80％、1％至65％、5％至65％或20％至40％。在某些实施例中，该抗体是一种抗体，其中其上的N-连接聚糖均不包含岩藻糖，即，其中该抗体完全没有岩藻糖，或没有岩藻糖或被去岩藻糖基化。岩藻糖的量为通过计算相对于通过MALDI-TOF质谱测得的与Asn 297附接的所有糖结构(例如，复合、杂合和高甘露糖结构)的总和，糖链中在Asn297处的岩藻糖的平均量，确定，如WO 2008/077546中所述。Asn297是指位于Fc区中约位置297处的天冬酰胺残基(Fc区残基的Eu编号)；然而，由于抗体中的微小序列变化，Asn297也可以位于位置297上游或下游大约±3个氨基酸，即在位置294和300之间。此类岩藻糖基化变体可具有改善的ADCC功能。参见，例如，美国专利公布号US 2003/0157108(Presta,L.)和US 2004/0093621(日本协和发酵工业株式会社(Kyowa Hakko Kogyo Co.,Ltd))。有关“去岩藻糖化”或“岩藻糖缺陷型”抗体变体包括:US 2003/0157108;WO 2000/61739;WO 2001/29246;US 2003/0115614;US 2002/0164328;US 2004/0093621;US 2004/0132140;US 2004/0110704;US 2004/0110282;US 2004/0109865;WO 2003/085119;WO 2003/084570;WO 2005/035586;WO 2005/035778;WO2005/053742;WO2002/031140;Okazaki等人，J.Mol.Biol.336:1239-1249(2004)；Yamane-Ohnuki等人，Biotech.Bioeng.87:614(2004)。能够产生去岩藻糖基化抗体的细胞系的示例包括蛋白岩藻糖基化缺陷的Lec13 CHO细胞(Ripka等人Arch.Biochem.Biophys.249:533-545(1986)；美国专利申请号US 2003/0157108A1,Presta,L;和WO 2004/056312A1,Adams等人，特别是实例11)，和敲除细胞系，诸如α-1,6-岩藻糖基转移酶基因(FUT8)敲除的CHO细胞(参见，例如，Yamane-Ohnuki等人Biotech.Bioeng.87:614(2004)；Kanda,Y.等人，Biotechnol.Bioeng.,94(4):680-688(2006)；和WO2003/085107)。

[0422] 抗体变体还提供有二等分的寡糖，例如，其中附接于抗体的Fc区的双触角寡糖被GlcNAc二等分。此类抗体变体可具有减少的岩藻糖基化和/或改善的ADCC功能。此类抗体变体的示例描述于例如WO 2003/011878(Jean-Mairet等人)；美国专利号6,602,684(Umana等人)；US 2005/0123546(Umana等人)；以及Ferrara等人，Biotechnology and Bioengineering,93(5):851-861(2006)中。还提供了在连接于Fc区的寡糖中具有至少一个半乳糖残基的抗体变体。这样的抗体变体可以具有改善的CDC功能。此类抗体变体描述于例如WO 1997/30087(Patel等人)；WO 1998/58964(Raju,S.)；以及WO 1999/22764(Raju,S.)中。

[0423] 在某些实施例中，包含本文所述的Fc区的抗体变体能够结合FcγRIII。在某些实施例中，与包含人野生型IgG1 Fc区的其它相同抗体相比，包含本文所述的Fc区的抗体变体在人效应细胞存在下具有ADCC活性，或在人效应细胞存在下具有增加的ADCC活性。

[0424] Fc区变体

[0425] 在某些实施例中，一个或多个氨基酸修饰可引入本文提供的抗体的Fc区中，从而生成Fc区变体。Fc区变体可以包含人Fc区序列(例如人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4 Fc区)，其在一个或多个氨基酸位置上包含氨基酸修饰(例如，取代)。

[0426] 在某些实施例中，本公开考虑了具有一些但不是全部效应子功能的抗体变体，这使其成为应用的期望候选物，其中体内的抗体的半衰期为重要的而某些效应子功能(诸如补体和ADCC)为不必要的或有害的。可以进行体外和/或体内细胞毒性测定，以确认CDC和/或ADCC活性的降低/耗尽。例如，可以进行Fc受体(FcR)结合测定以确保抗体缺乏FcγR结合

(因此可能缺乏ADCC活性),但是保留FcRn结合能力。介导ADCC的原代细胞NK细胞仅表达Fc(RIII,而单核细胞表达Fc(RI、Fc(RII和Fc(RIII。造血细胞上的FcR表达总结在Ravetch和Kinet,Kinet,Annu.Rev.Immunol.9:457-492(1991)的第464页的表3中。用于评估目标分子的ADCC活性的体外测定的其他非限制性实例描述于美国专利号5,500,362(参见例如Hellstrom,I.等人Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 83:7059-7063(1986))和Hellstrom,等人,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 82:1499-1502(1985);5,821,337(参见Bruggemann,M.等人,J.Exp.Med.166:1351-1361(1987))。可替代地,可以使用非放射性测定方法(参见例如,用于流式细胞术的ACTITM非放射性细胞毒性测定(CellTechnology,Inc.Mountain View,CA;以及CytoTox 96®非放射性细胞毒性测定(威斯康星州,麦迪逊市,普洛麦格公司(Promega,Madison,WI)。可用于此类测定的效应细胞包括外周血单核细胞(PBMC)和自然杀伤(NK)细胞。可替代地或附加地,可例如在诸如在Clynes等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 95:652-656(1998)中公开的动物模型中体内评估感兴趣的分子的ADCC活性。也可以进行C1q结合测定以确认抗体不能结合C1q,因此缺乏CDC活性。参见例如WO 2006/029879和WO 2005/100402中的C1q和C3c结合ELISA。为了评估补体活化,可以执行CDC测定(参见例如Gazzano-Santoro等人,J.Immunol.Methods 202:163(1996);Cragg,M.S.等人,Blood 101:1045-1052(2003);以及Cragg,M.S.和M.J.Glennie,Blood 103:2738-2743(2004))。FcRn结合和体内清除/半衰期测定也可以使用本领域已知的方法执行(参见例如Petkova,S.B.等人,Int'l.Immunol.18(12):1759-1769(2006))。

[0427] 具有降低的效应子功能的抗体包括具有Fc区残基238、265、269、270、297、327和329中一个或多个的取代的那些(美国专利号6,737,056)。此类Fc突变体包括在第265、269、270、297和327位氨基酸中两个或更多个处具有取代的Fc突变体,包括所谓的"DANA"Fc突变体,其残基265和297被取代为丙氨酸(美国专利号7,332,581)。

[0428] 描述了具有改善的或降低的与FcR的结合的某些抗体变体。(参见例如美国专利号6,737,056;WO 2004/056312,以及Shields.等人,J.Biol.Chem 9(2):6591-6604(2001)。)

[0429] 在某些实施例中,抗体变体包含具有一个或多个氨基酸取代的Fc区,取代改善ADCC,例如,在Fc区的298、333和/或334位(残基的EU编号)处的取代。在一个示例性的实施例中,该抗体在其Fc区中包含以下氨基酸取代:S298A、E333A和K334A。

[0430] 在一些实施例中,在Fc区中进行导致改变的(即,改善的或减少的)C1q结合和/或补体依赖性细胞毒性(CDC)的改变,例如,如美国专利号6,194,551、WO 99/51642以及Idusogie等人J.Immunol.164:4178-4184(2000)中所描述。

[0431] 具有延长的半衰期和改善的新生儿Fc受体(FcRn)结合、负责将母体IgG转移至胎儿(Guyer等人,J.Immunol.117:587(1976);以及Kim等人,J.Immunol.24:249(1994))的抗体描述于US 2005/0014934A1(Hinton等人)中。那些抗体包含这样的Fc区,所述Fc区中具有改善Fc区与FcRn的结合的一个或多个取代。此类Fc变体包括在以下Fc区残基中的一处或多处具有取代的Fc变体:238、256、265、272、286、303、305、307、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424或434,例如对Fc区残基434的取代(美国专利号7,371,826)。关于Fc区变体的其他实例还参见Duncan&Winter,Nature 322:738-40(1988);美国专利号5,648,260;美国专利号5,624,821;和WO 94/29351。

[0432] VI.药物组合物和制剂

[0433] 本文还提供了药物组合物和制剂,其例如用于治疗癌症,或用于根据本文所述的方法诱导新表位特异性免疫应答。在一些实施例中,药物组合物和制剂进一步包含药用载体。

[0434] 在制备目的抗体后(例如,生产可以如本文所公开地配制的抗体的技术在本文中阐述并且是本领域已知的),制备了包含它的药物制剂。在某些实施例中,待配制的抗体未经预先冻干,并且本文目标制剂是水性制剂。在某些实施例中,抗体是全长抗体。在一个实施例中,制剂中的抗体为抗体片段,诸如$F(ab')_2$,在这种情况下,可能需要解决使用全长抗体时可能不会发生的问题(诸如将抗体剪接到Fab)。制剂中存在的抗体的治疗有效量例如通过考虑所需的剂量体积和施用方式来确定。约25mg/mL至约150mg/mL、或约30mg/mL至约140mg/mL、或约35mg/mL至约130mg/mL、或约40mg/mL至约120mg/mL、或约50mg/mL至约130mg/mL、或约50mg/mL至约125mg/mL、或约50mg/mL至约120mg/mL、或约50mg/mL至约110mg/mL、或约50mg/mL至约100mg/mL、或约50mg/mL至约90mg/mL、或约50mg/mL至约80mg/mL、或约54mg/mL至约66mg/mL是制剂中的示例性抗体浓度。在一些实施例中,本文所述的抗PDL1抗体(诸如阿特珠单抗)以约1200mg的剂量施用。在一些实施例中,本文所述的抗PD1抗体(诸如派姆单抗)以约200mg的剂量施用。在一些实施例中,本文所述的抗PD1抗体(诸如纳武单抗)以约240mg(例如,每2周一次)或480mg(例如,每4周一次)的剂量施用。

[0435] 在一些实施例中,本文所述的RNA疫苗以约15μg、约25μg、约38μg、约50μg或约100μg的剂量施用。

[0436] 本文所述的药物组合物和制剂可通过将具有所需纯度的活性成分(例如抗体或多肽)与一种或多种任选的药用载体(Remington's Pharmaceutical Sciences第16版,Osol,A.主编(1980))混合,以冻干制剂或水溶液的形式来制备。药用载体在所采用的剂量和浓度下通常对受体无毒,包括但不限于:缓冲剂,例如磷酸盐、柠檬酸盐和其它有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(例如十八烷基二甲基苄基氯化铵;六甲基氯化铵;苯扎氯铵;苄索氯铵;苯酚,丁醇或苄醇;对羟基苯甲酸烷基酯,例如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯;邻苯二酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;和间甲酚);低分子量(少于约10个残基)多肽;蛋白质,例如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,例如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,例如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖,二糖和其它碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,如EDTA;糖,如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇;成盐的抗衡离子,例如钠;金属络合物(例如锌蛋白络合物);和/或非离子表面活性剂,例如聚乙二醇(PEG)。本文的示例性药用的载体还包括间质药物分散剂例如可溶性中性活性透明质酸酶糖蛋白(sHASEGP),诸如人可溶性PH-20透明质酸酶糖蛋白,例如rHuPH20(HYLENEX®,Baxter International,Inc.)。某些示例性sHASEGP和使用方法,包括rHuPH20,描述于美国专利公开号2005/0260186和2006/0104968中。在一个方面中,将sHASEGP与一种或多种另外的糖胺聚糖酶(诸如软骨素酶)组合。

[0437] 示例性的冻干抗体制剂描述于美国专利号6,267,958中。水性抗体制剂包括在美国专利号6,171,586和WO2006/044908中描述的那些,后一者中的制剂包含组氨酸-乙酸盐缓冲剂。

[0438] 本文的制剂和组合物还可含有多于一种对于所治疗的特定适应症是必需的活性成分,优选是具有不会彼此不利地影响的互补活性的活性成分。此类活性成分适当地以对

预期目的有效的量组合存在。

[0439] 活性成分可以包埋在例如通过凝聚技术或通过界面聚合而制备的微胶囊(例如分别为羟甲基纤维素或明胶微胶囊和聚(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊)中;在胶体药物递送系统(例如,脂质体、白蛋白微球、微乳液、纳米粒子和纳米胶囊)中;或在粗乳液中。此类技术公开于Remington′sPharmaceutical Sciences第16版,Osol,A.编(1980)。

[0440] 可以制备缓释制备物。缓释制备物的合适实例包括含有抗体的固态疏水聚合物的半透性基质,所述基质是例如膜或微胶囊等成型制品的形式。待用于体内施用的制剂通常是无菌的。无菌可以容易地实现,例如通过无菌过滤膜的过滤。

[0441] 阿特珠单抗和派姆单抗的药物制剂可商购获得。例如,阿特珠单抗以商品名(如本文其他地方所述)TECENTRIQ®为人所知。派姆单抗以商品名(如本文其他地方所述)KEYTRUDA®为人所知。在一些实施例中,阿特珠单抗和RNA疫苗或派姆单抗和RNA疫苗提供于单独的容器中。在一些实施例中,如可从市售产品获得的处方信息中所述,阿特珠单抗和/或派姆单抗用于和/或制备用于施用于个体。

[0442] VII.治疗方法

[0443] 本文提供了用于治疗个体癌症或延缓其进展的方法(例如,通过根据本文提供的方法诱导新表位特异性免疫应答),其包括向个体施用有效量的RNA疫苗作为单一药剂或与PD-1轴结合拮抗剂联合施用。在一些实施例中,个体是人。

[0444] 本公开的PD-1轴结合拮抗剂和RNA疫苗中的任一者均可用于本文所述的治疗方法中。在一些实施例中,RNA疫苗包含一种或多种编码10-20个新表位的多核苷酸,这些新表位由存在于肿瘤样本中的癌症特异性体细胞突变产生。在一些实施例中,RNA疫苗包含一种或多种编码5-20个新表位的多核苷酸,这些新表位由存在于肿瘤样本中的癌症特异性体细胞突变产生。在一些实施例中,RNA疫苗被配制在脂质体复合物纳米颗粒或脂质体中。在一些实施例中,RNA的脂质体复合物纳米颗粒制剂(RNA-脂质体复合物)用于实现本公开的RNA疫苗的静脉内递送。在一些实施例中,PCV以15μg、25μg、38μg、50μg或100μg的剂量经静脉内施用(例如,以脂质体制剂的形式)。在一些实施例中,每剂递送15μg、25μg、38μg、50μg或100μg RNA(即,剂量重量反映施用的RNA的重量而非施用的制剂或脂质体复合物的总重量)。可向受试者施用多于一种PCV,例如,向受试者施用包含新表位的组合的一种PCV并且还施用包含不同的新表位组合的单独PCV。在一些实施例中,联合施用包含十个新表位的第一PCV与包含十个替代表位的第二PCV。在一些实施例中,PD-1轴结合拮抗剂为抗PD-1抗体,其包括但不限于派姆单抗。在一些实施例中,PD-1轴结合拮抗剂为抗PD-L1抗体,其包括但不限于阿特珠单抗。

[0445] 在一些实施例中,PD-1轴结合拮抗剂以21天或3周的间隔施用于个体。在一些实施例中,PD-1轴结合拮抗剂为抗PD-1抗体(例如,派姆单抗),以21天或3周的间隔例如以约200mg的剂量施用于个体。在一些实施例中,PD-1轴结合拮抗剂为抗PD-1抗体(例如,西米普利单抗)以21天或3周的间隔例如以约350mg的剂量施用于个体。在一些实施例中,PD-1轴结合拮抗剂为抗PD-L1抗体(例如,阿特珠单抗)施用于个体,以21天或3周的间隔例如以约1200mg的剂量施用于个体。

[0446] 在一些实施例中,PD-1轴结合拮抗剂以14天或28天的间隔施用于个体。在一些实施例中,PD-1轴结合拮抗剂以2周或4周的间隔施用于个体。在一些实施例中,PD-1轴结合拮

抗剂为抗PD-1抗体(例如,纳武单抗),以14天、2周、28天或4周的间隔施用于个体,例如以14天或2周的间隔以约240mg的剂量施用,或以28天或4周的间隔以约480mg的剂量施用。在一些实施例中,PD-1轴结合拮抗剂为抗PD-1抗体(例如,纳武单抗),以21天或3周的间隔施用于个体,例如以约1mg/kg的剂量以1剂、2剂、3剂或4剂施用于个体,任选地与抗CTLA-4抗体(例如,伊匹单抗)联合,并且任选地随后以14天、2周、28天或4周的间隔单独施用抗PD-1抗体(例如,纳武单抗),例如以14天或2周的间隔以约240mg的剂量施用或以28天或4周的间隔以约480mg的剂量施用。

[0447] 在一些实施例中,PD-1轴结合拮抗剂以14天或2周的间隔施用于个体。在一些实施例中,PD-1轴结合拮抗剂为抗PD-L1抗体(例如,德瓦鲁单抗),以14天或2周的间隔施用于个体,例如以约10mg/kg的剂量施用(任选地通过静脉输注60分钟进行施用)。在一些实施例中,PD-1轴结合拮抗剂为抗PD-L1抗体(例如,阿维单抗),以14天或2周的间隔施用于个体,例如以约10mg/kg的剂量施用(任选地通过静脉输注60分钟进行施用)。

[0448] 在一些实施例中,RNA疫苗以21天或3周的间隔施用于个体。

[0449] 在一些实施例中,PD-1轴结合拮抗剂和RNA疫苗在8个21天周期中施用于个体。在一些实施例中,RNA疫苗在第2周期的第1天、第8天和第15天以及第3周期至第7周期的第1天施用于个体。在一些实施例中,PD-1轴结合拮抗剂在第1周期至第8周期的第1天施用于个体。在一些实施例中,RNA疫苗在第2周期的第1天、第8天和第15天以及第3周期至第7周期的第1天施用于个体,并且PD-1轴结合拮抗剂在第1周期至第8周期的第1天施用于个体。

[0450] 在一些实施例中,PD-1轴结合拮抗剂和RNA疫苗在第8周期后进一步施用于个体。在一些实施例中,PD-1轴结合拮抗剂和RNA疫苗在17个另外的21天周期进一步施用于个体,其中PD-1轴结合拮抗剂在第13周期至第29周期的第1天施用于个体,并且/或者其中RNA疫苗在第13周期、第21周期和第29周期的第1天施用于个体。

[0451] 在某些实施例中,PD-1轴结合拮抗剂和RNA疫苗在8个21天周期中施用于个体,其中PD-1轴结合拮抗剂为派姆单抗并且在第1周期至第8周期的第1天以约200mg的剂量施用于个体,并且其中RNA疫苗在第2周期的第1天、第8天和第15天以及第3周期至第7周期的第1天以约25μg的剂量施用于个体。在某些实施例中,PD-L1轴结合拮抗剂和RNA疫苗在8个21天周期中施用于个体,其中PD-L1轴结合拮抗剂为阿特珠单抗并且在第1周期至第8周期的第1天以约1200mg的剂量施用于个体,并且其中RNA疫苗在第2周期的第1天、第8天和第15天以及第3周期至第7周期的第1天以约25μg的剂量施用于个体。在一些实施例中,RNA疫苗在第2周期的第1天以约25μg的剂量、在第2周期的第8天以约25μg的剂量、在第2周期的第15天以约25μg的剂量并且在第3周期至第7周期中每个周期的第1天以约25μg的剂量施用于个体(也就是说,在第2周期内以3剂总共向个体施用约75μg疫苗)。在一些实施例中,在施用RNA疫苗的第一周期内,以3剂总共向个体施用约75μg疫苗。

[0452] 在某些实施例中,PD-1轴结合拮抗剂和RNA疫苗在8个21天周期中施用于个体,其中PD-1轴结合拮抗剂为派姆单抗并且在第1周期至第8周期的第1天以200mg的剂量施用于个体,并且其中RNA疫苗在第2周期的第1天、第8天和第15天以及第3周期至第7周期的第1天以25μg的剂量施用于个体。在某些实施例中,PD-L1轴结合拮抗剂和RNA疫苗在8个21天周期中施用于个体,其中PD-L1轴结合拮抗剂为阿特珠单抗并且在第1周期至第8周期的第1天以1200mg的剂量施用于个体,并且其中RNA疫苗在第2周期的第1天、第8天和第15天以及第3周

期至第7周期的第1天以25μg的剂量施用于个体。在一些实施例中,RNA疫苗在第2周期的第1天以25μg的剂量、在第2周期的第8天以25μg的剂量、在第2周期的第15天以25μg的剂量并且在第3周期至第7周期中每个周期的第1天以25μg的剂量施用于个体(也就是说,在第2周期内以3剂总共向个体施用75μg疫苗)。在一些实施例中,在施用RNA疫苗的第一周期内,以3剂总共向个体施用75μg疫苗。

[0453] 在一些实施例中,RNA疫苗以约15μg至约100μg之间(例如,约15μg、约20μg、约25μg、约30μg、约35μg、约40μg、约45μg、约50μg、约55μg、约60μg、约65μg、约70μg、约75μg、约80μg、约85μg、约90μg、约95μg或约100μg中的任一者)施用于个体。在一些实施例中,RNA疫苗以约15μg、约25μg、约38μg、约50μg、约75μg或约100μg的剂量施用于个体。在某些实施例中,RNA疫苗静脉内施用于个体。

[0454] 在一些实施例中,RNA疫苗以7天或1周的间隔施用于个体。在某些实施例中,RNA疫苗以14天或2周的间隔施用于个体。在某些实施例中,RNA疫苗施用于个体达12周。

[0455] 在一些实施例中,RNA疫苗以四个21天周期施用于个体,其中RNA疫苗在第1周期的第1天、第8天和第15天;第2周期的第1天、第8天和第15天;第3周期的第1天和第15天;以及第4周期的第1天施用于个体。

[0456] 在一些实施例中,RNA疫苗在诱导期和该诱导期之后的维持期施用于个体,其中RNA疫苗在诱导期期间以1周或2周的间隔施用于个体,并且其中RNA疫苗在维持期期间以24周的间隔施用于个体。在某些实施例中,RNA疫苗在诱导期和该诱导期之后的维持期施用于个体,其中RNA疫苗在诱导期期间以7天或14天的间隔施用于个体,并且其中RNA疫苗在维持期期间以168天的间隔施用于个体。

[0457] 在一些实施例中,RNA疫苗在诱导期和该诱导期后的维持期施用于个体,其中RNA疫苗在诱导期期间以四个21天周期施用于个体,其中在诱导期期间,RNA疫苗在第1周期的第1天、第8天和第15天;第2周期的第1天、第8天和第15天;第3周期的第1天和第15天;以及第4周期的第1天施用于个体;并且其中在维持期期间,RNA疫苗在第5周期的第1天施用于个体并且在之后每24周或168天施用一次。

[0458] PD-1轴结合拮抗剂和RNA疫苗可以任意顺序施用。例如,PD-1轴结合拮抗剂和RNA疫苗可依次(在不同时间)或同时(在同一时间)施用。在一些实施例中,PD-1轴结合拮抗剂和RNA疫苗在单独的组合物中。在一些实施例中,PD-1轴结合拮抗剂和RNA疫苗在同一组合物中。

[0459] 在一些实施例中,癌症选自由以下项组成的组:黑素瘤、非小细胞肺癌、膀胱癌、结直肠癌、三阴性乳腺癌、肾癌和头颈部癌。在一些实施例中,癌症为局部晚期或转移性黑素瘤、非小细胞肺癌、膀胱癌、结直肠癌、三阴性乳腺癌、肾癌或头颈部癌。在一些实施例中,癌症选自由以下项组成的组:非小细胞肺癌、膀胱癌、结直肠癌、三阴性乳腺癌、肾癌和头颈部癌。在一些实施例中,癌症为局部晚期或转移性非小细胞肺癌、膀胱癌、结直肠癌、三阴性乳腺癌、肾癌或头颈部癌。

[0460] 在一些实施例中,癌症为黑素瘤。在一些实施例中,黑素瘤为皮肤黑素瘤或黏膜黑素瘤。在一些实施例中,黑素瘤为皮肤黑素瘤、粘膜黑素瘤或肢端黑素瘤。在一些实施例中,黑素瘤并非眼黑素瘤或肢端黑素瘤。在一些实施例中,黑素瘤为转移性或不可切除的局部晚期黑素瘤。在一些实施例中,黑素瘤为IV期黑素瘤。在一些实施例中,黑素瘤为IIIC期或

IIID期黑素瘤。在一些实施例中，黑素瘤为不可切除的或转移性黑素瘤。在一些实施例中，所述方法提供了黑素瘤的辅助治疗。

[0461] 在一些实施例中，既往未接受过癌症(例如，黑素瘤)治疗。在一些实施例中，癌症为既往未接受过治疗的晚期黑素瘤。

[0462] 在一些实施例中，肿瘤为非小细胞肺癌(NSCLC)、膀胱、肾、头颈、肉瘤、乳腺、黑素瘤、前列腺、卵巢、胃、肝或结直肠肿瘤。在一些实施例中，其中乳腺肿瘤为三阴性乳腺癌(TNBC)肿瘤。在一些实施例中，在施用RNA疫苗之前，个体已经接受过一种或多种癌症疗法的治疗。在一些实施例中，在施用RNA疫苗之前，个体已经接受过检查点抑制剂疗法的治疗。在一些实施例中，在施用RNA疫苗之前，个体尚未接受过检查点抑制剂疗法的治疗。

[0463] 在一些实施例中，在根据本文所述的方法中的任一者所述接受PD-1轴结合拮抗剂和RNA疫苗治疗之前，个体在接受基于PD-1轴结合拮抗剂的单一疗法(例如，接受不存在RNA疫苗的情况下的派姆单抗治疗)后发生进展或未能产生足够的应答。

[0464] PD-1轴结合拮抗剂和RNA疫苗可通过相同的施用途径或通过不同的施用途径施用。在一些实施例中，通过静脉内、肌肉内、皮下、局部、口服、经皮、腹膜内、眶内、植入、吸入、鞘内、心室内或鼻内施用PD-1轴结合拮抗剂。在一些实施例中，RNA疫苗经静脉内、肌内、皮下、局部、口服、经皮、腹膜内、眶内、通过植入、通过吸入、鞘内、心室内或鼻内施用(例如，以脂质体复合物颗粒或脂质体的形式)。在一些实施例中，PD-1轴结合拮抗剂和RNA疫苗通过静脉输注施用。可施用有效量的PD-1轴结合拮抗剂和RNA疫苗以预防或治疗疾病。

[0465] 在一些实施例中，方法可以进一步包括附加疗法。附加疗法可以是放射疗法、手术(例如，乳房肿瘤切除术和乳房切除术)、化学疗法、基因疗法、DNA疗法、病毒疗法、RNA疗法、免疫疗法、骨髓移植、纳米疗法、单克隆抗体疗法、或上述疗法的组合。附加疗法可以是辅助疗法或新辅助疗法的形式。在一些实施例中，附加疗法是施用小分子酶抑制剂或抗转移剂。在一些实施例中，附加疗法为施用副作用限制剂(例如，旨在减少治疗副作用的发生和/或严重性的药剂，如抗恶心剂等)。在一些实施例中，附加疗法为放射疗法。在一些实施例中，附加疗法为手术。在一些实施例中，附加疗法为放射疗法和手术的组合。在一些实施例中，附加疗法为γ射线辐照。

[0466] VIII.制品或试剂盒

[0467] 本文进一步提供了一种制品或试剂盒，其包含本公开的RNA疫苗。本文进一步提供了包含PD-1轴结合拮抗剂(诸如阿特珠单抗或派姆单抗)的制品或试剂盒。在一些实施例中，制品或试剂盒进一步包含药品说明书，该药品说明书包含使用RNA疫苗和/或PD-1轴结合拮抗剂(例如，与RNA疫苗联合)治疗个体的癌症或延缓其进展、增强患有癌症的个体的免疫功能、在患有肿瘤的个体中诱导新表位特异性T细胞和/或在个体中诱导新表位特异性T细胞运输至肿瘤的说明。本文还提供了包含PD-1轴结合拮抗剂(诸如阿特珠单抗或派姆单抗)和RNA疫苗的制品或试剂盒。

[0468] 在一些实施例中，PD-1轴结合拮抗剂和RNA疫苗在同一容器中或单独的容器中。合适的容器包括例如瓶、小瓶、袋子和注射器。容器可以由多种材料形成，例如玻璃、塑料(诸如聚氯乙烯或聚烯烃)或金属合金(诸如不锈钢或哈氏合金)。在一些实施例中，容器容纳制剂，容器上或与容器相关的标签可以指示使用说明。制品或试剂盒还可以包括从商业和用户角度出发期望的其它材料，包括其它缓冲剂、稀释剂、过滤器、针头、注射器和带有使用说

明的包装插页。在一些实施例中，制品还包括一种或多种其他药剂(例如化疗剂和抗肿瘤剂)。用于一种或多种药剂的合适容器包括例如瓶、小瓶、袋子和注射器。

[0469] 该说明书被认为足以使本领域技术人员能够实施本发明。除了本文中示出和描述的之外，本发明的各种修改对于根据说明书前文的本领域技术人员而言将变得显而易见，并且落入所附权利要求的范围内。本文引用的所有出版物、专利和专利申请出于所有目的通过引用整体并入本文。

[0470] 实例

[0471] 参考以下实例将更全面地理解本公开。但是，它们不应被解释为限制本发明的范围。应当理解，本文描述的实例和实施例仅用于说明目的，并且其各种修改或改变将被建议给本领域技术人员，并且将被包括在本申请的精神和界限内以及所附权利要求的范围内。

[0472] 实例1:在患有局部晚期或转移性肿瘤的患者中RNA疫苗作为单一药剂以及与阿特珠单抗联合的研究

[0473] 本实例描述了一项1a/1b期、开放、多中心、全球剂量递增研究，其旨在评估作为单一药剂以及与抗PD-L1抗体阿特珠单抗联合的新抗原特异性RNA疫苗的安全性、耐受性、免疫应答和药代动力学。

[0474] 研究目标

[0475] 本研究的目的是评估作为单一药剂以及与阿特珠单抗联合的RNA疫苗的安全性、耐受性、免疫应答和药代动力学。

[0476] 研究设计

[0477] 1a期

[0478] 在本研究的1a期剂量递增群组中，以21天周期通过静脉内(IV)输注向患者施用剂量递增的RNA疫苗。

[0479] 1b期

[0480] 本研究的1b期包括剂量递增群组、探索群组、扩展群组以及包含系列活检的扩展群组。

[0481] 在本研究的1b期剂量递增群组中，以21天周期向患者IV输注剂量递增的RNA疫苗。还在每21天周期的第1天向患者施用固定剂量1200mg的阿特珠单抗。

[0482] 在本研究的1b期探索群组中，以21天周期通过IV输注向之前接受过癌症免疫疗法(CIT)治疗的非小细胞肺癌(NSCLC)或黑素瘤患者施用剂量低于最大耐受剂量(MTD)的RNA疫苗。还在每21天周期的第1天向患者施用固定剂量1200mg的阿特珠单抗。

[0483] 在本研究的1b期扩展群组中，以21天周期通过IV输注向患有下文研究“纳入标准”中所述的适应症的患者施用低于MTD的多个剂量水平的RNA疫苗。还在每21天周期的第1天向患者施用固定剂量1200mg的阿特珠单抗。

[0484] 在本研究的包含系列活检的1b期扩展群组中，以21天周期通过IV输注向患有下文研究“纳入标准”中所述的肿瘤类型的CIT初治患者施用低于MTD的多个剂量水平的RNA疫苗。还在每21天周期的第1天向患者施用固定剂量1200mg的阿特珠单抗。

[0485] 研究参与者

[0486] 纳入标准

[0487] 将符合以下标准的患者纳入本研究中：

[0488] • 东部肿瘤协作组(ECOG)体能状态为0或1。

[0489] • 具有在至少一种可用的标准治疗后发生进展的局部晚期、复发性或转移性无法治愈的恶性肿瘤的组织学记录;或对其而言,标准疗法已被证明无效或不耐受或被认为不适用。

[0490] • 根据实体瘤临床疗效评价标准1.1版(RECIST v1.1)的可测量疾病。

[0491] 此外,将符合以下适应症特定标准的患者纳入本研究1b期的探索或扩展群组中:

[0492] • 非小细胞肺癌(NSCLC)群组(CIT初治):患有组织学上证实的无法治愈的晚期NSCLC并且之前未接受过抗PD-L1/PD-1和/或抗CTLA-4疗法治疗的患者。

[0493] • NSCLC群组(接受过CIT治疗):患有组织学上证实的无法治愈的晚期NSCLC并且之前接受过与抗CTLA-4疗法联合或不与其联合的抗PD-L1/PD-1疗法治疗的患者。

[0494] • 三阴性乳腺癌(TNBC)群组(CIT初治):患有组织学上证实的无法治愈的晚期雌激素受体(ER)阴性、孕激素受体阴性和人表皮生长因子受体2(HER2)阴性的乳腺腺癌(三阴性)并且之前未接受过抗PD-L1/PD-1和/或抗CTLA-4疗法治疗的患者。

[0495] • 结直肠癌(CRC)群组(CIT初治):患有组织学上证实的无法治愈的晚期结肠或直肠腺癌并且之前未接受过抗PD-L1/PD-1和/或抗CTLA-4疗法治疗的患者。

[0496] • 头颈鳞状细胞癌(HNSCC)群组(CIT初治):患有组织学上证实的不可手术的、局部晚期或转移性、复发性或持续性HNSCC(口腔、口咽、下咽部或喉)的不适合治愈性疗法并且之前未接受过抗PDL1/PD-1和/或抗CTLA-4疗法治疗的患者。

[0497] • 尿路上皮癌(UC)群组(CIT初治):患有组织学上证实的无法治愈的晚期尿路上皮(包括肾盂、输尿管、膀胱和尿道)移行细胞癌并且之前未接受过与抗CTLA-4疗法联合或不与其联合的抗PD-L1/PD-1疗法治疗的患者。

[0498] • UC群组(接受过CIT治疗):患有组织学上证实的无法治愈的晚期尿路上皮(包括肾盂、输尿管、膀胱和尿道)移行细胞癌并且之前接受过与抗CTLA-4疗法联合或不与其联合的抗PD-L1/PD-1疗法治疗的患者。

[0499] • 肾细胞癌(RCC)群组(CIT初治):患有组织学上证实的无法治愈的具有透明细胞组织学成分和/或肉瘤样组织学成分的晚期RCC并且之前未接受过抗PD-L1/PD-1和/或抗CTLA-4疗法治疗的患者。

[0500] • 黑素瘤群组(在转移情形下CIT初治):在转移情形下患有组织学上证实的无法治愈的晚期黑素瘤并且之前未接受过抗PD-L1/PD-1和/或抗CTLA-4疗法治疗的患者。

[0501] • 黑素瘤群组(接受过CIT治疗):患有组织学上证实的无法治愈的晚期黑素瘤并且之前接受过抗PD-L1/PD-1和/或抗CTLA-4疗法治疗的患者。

[0502] 此外,将符合以下适应症特定标准的患者纳入本研究1b期的系列活检扩展群组中:

[0503] • 患者患有上述研究“纳入标准”中指定的局部晚期或转移性实体瘤类型中的一者。

[0504] • 患者具有可触及的病灶,其允许总共进行二至三次活检(治疗前和治疗中)或一次活检(治疗中,如有存档组织代替治疗前活检)而不存在不可接受的明显手术并发症的风险。RECIST病灶未经活检。

[0505] 排除标准

[0506] 将符合以下标准的患者排除在本研究之外：

[0507] • 临床上显著的肝病。

[0508] • 之前接受过脾切除术。

[0509] • 原发性免疫缺陷，无论是细胞免疫缺陷(例如，迪格奥尔格综合

[0510] 征、T阴性重症联合免疫缺陷[SCID])还是T细胞和B细胞联合免疫缺陷(例如T和B阴性SCID、威斯科特-奥尔德里奇综合征、共济失调毛细血管扩张症、普通变异型免疫缺陷病)。

[0511] • 在研究治疗开始前3周内接受过任何抗癌疗法(包括化疗、激素

[0512] 疗法和/或放射疗法)的治疗，除非另有说明。

[0513] • 在先新抗原特异性或全肿瘤癌症疫苗，除非另有说明。

[0514] • 允许接受细胞因子的在先治疗，前提条件是在本研究的最后一次

[0515] 给药与第1周期的第1天之间已经过去至少6周或5个药物半衰期(以较短者为准)。

[0516] • 允许接受免疫检查点抑制剂、免疫调节单克隆抗体(mAb)和/或mAb衍生疗法的在先治疗，前提条件是在本研究的最后一次给药与第1周期的第1天之间已经过去至少6周(1a期)或3周(1b期)，除非另有说明。

[0517] • 在Ib期的CIT初治扩展群组中，不允许接受过抗PD-L1/PD-1疗

[0518] 法和/或抗CTLA-4疗法的在先治疗。

[0519] • 在Ib期的黑素瘤CIT初治扩展群组中，不允许在转移情形下接受

[0520] 抗PD-L1/PD-1疗法和/或抗CTLA-4疗法的在先治疗。

[0521] • 允许接受免疫调节剂(包括toll样受体(TLR)激动剂、吲哚胺2,3-双加氧酶(IDO)/色氨酸-2,3-双加氧酶(TDO)的抑制剂或OX40的激动剂)的在先治疗，前提条件是介于在先治疗的最后一次给药与本研究的第1周期的第1天之间已经过去5个药物半衰期或至少3周，除非另有说明。

[0522] • 任何归因于在先CIT的免疫相关4级不良事件发生史(通过替代

[0523] 疗法得到控制的内分泌疾病或无症状的血清淀粉酶或脂肪酶升高除外)。

[0524] • 任何归因于在先CIT的免疫相关3级不良事件发生史(通过替代

[0525] 疗法得到控制的甲状腺功能减退症除外)，导致在先免疫治疗剂永久停用和/或发生在本研究的第1周期的第1天之前少于或等于6个月。

[0526] • 尚未消退至低于或等于1级的由在先抗癌疗法引起的不良事件，

[0527] 但脱发、白癜风或通过替代疗法得到控制的内分泌疾病除外。

[0528] • 与在先CIT相关的免疫相关不良事件(通过替代疗法得到控制的内分泌疾病或稳定型白癜风除外)必须已经完全消退至基线水平。

[0529] • 原发性中枢神经系统(CNS)恶性肿瘤、未经治疗的CNS转移、或活动性CNS转移(发生进展或需要皮质类固醇控制症状)。

[0530] • 在本研究的第1周期的第1天前5年内患有除研究中的疾病之外的恶性肿瘤，但转移或死亡风险可忽略不计的那些恶性肿瘤除外。

[0531] • 软脑膜病。

[0532] • 未经手术和/或放疗进行明确治疗的脊髓压迫症，或之前经诊断和治疗的脊髓压迫症，但没有证据表明筛选前疾病在临床上稳定长于或等于2周。

[0533] • 不受控制的高钙血症、胸腔积液、心包积液或需要反复引流手术的腹水，或肿瘤相关疼痛。

[0534] • 自身免疫病史，除非另有说明。

[0535] • 在本研究的第1周期的第1天之前3周内接受过单胺氧化酶抑制剂(MAOI)治疗。

[0536] • 在本研究的第1周期的第1天之前2周内接受过全身性免疫抑制药物治疗。

[0537] • 特发性肺纤维化、肺炎、机化性肺炎病史，或在筛查胸部计算机断层扫描(CT)时存在活动性肺炎的证据；人类免疫缺陷病毒感染检测呈阳性；活动性乙型或丙型肝炎；活动性或潜伏结核感染；

[0538] 或本研究的第1周期的第1天之前4周内发生重度感染。

[0539] • 接受过在先同种异体骨髓移植或在先实体器官移植。

[0540] 研究结果量度

[0541] 本研究的主要结果量度包括以下项：

[0542] • 从本研究1a期的第1天至第14天和从本研究1b期的第1天至第

[0543] 21天评定的具有剂量限制性毒性(DLT)的患者百分比。

[0544] • 从本研究1a期的第1天至第14天和从本研究1b期的第1天至第21天评定的RNA疫苗的最大耐受剂量(MTD)和推荐2期剂量(RP2D)。

[0545] • 从基线直至研究结束评定的发生不良事件(AE)的患者百分比。AE的严重程序根据美国国家癌症研究所不良事件通用术语标准(NCI CTCAE)5.0版进行评定。

[0546] • 从基线直至研究结束评定的发生免疫介导的不良事件(imAE)

[0547] (NCI CTCAE 5.0版)的百分比。

[0548] • 从基线直至研究结束评定的患者所接受的治疗周期数。

[0549] • 从基线直至研究结束评定的RNA疫苗的剂量强度。

[0550] • 从基线直至研究结束评定的生命体征、临床实验室检查结果和心

[0551] 电图(ECG)较基线的变化。

[0552] 本研究的次要结果量度包括以下项：

[0553] • 从输注前直至治疗中断评定的(R)-N,N,N-三甲基-2,3-二油酰氧基-1-丙铵氯化物(DOTMA)的血浆浓度。

[0554] • 从输注前直至治疗中断评定的核糖核酸(RNA)的血浆浓度。

[0555] • 从输注前直至治疗中断后2个月评定的阿特珠单抗的血清浓度。• 从输注前直至治疗中断评定的外周血中发生对抗原特异性T细胞

[0556] 应答的诱导的患者百分比。

[0557] • 从输注前直至治疗中断评定的免疫相关细胞因子水平。

[0558] • 从基线直至最后一剂研究治疗或开始另一种全身性抗癌疗法后90

[0559] 天(以先发生者为准)评定的根据RECIST v1.1发生客观缓解(包括完全缓解(CR)或部分缓解(PR))的患者百分比。

[0560] • 从首次发生有记录的CR或PR直至疾病进展或因任何原因导致

[0561] 死亡(以先发生者为准)评定的根据RECIST v1.1的缓解持续时间(DoR)。

[0562] • 从基线直至最后一剂研究治疗或开始另一种全身性抗癌疗法后90

[0563] 天(以先发生者为准)评定的根据免疫修订后RECIST发生客观缓解(包括CR或PR)

的患者百分比。

[0564] • 从首次发生有记录的CR或PR直至疾病进展或因任何原因导致死亡(以先发生者为准)评定的根据免疫修订后RECIST的DoR。

[0565] • 从基线直至最后一剂研究治疗或开始另一种全身性抗癌疗法后90天(以先发生者为准)评定的根据RECIST v1.1的无进展生存期(PFS)。

[0566] • 从基线直至最后一剂研究治疗或开始另一种全身性抗癌疗法后90天评定的总存活(OS)。

[0567] • 从输注前直至治疗中断后2个月评定的对阿特珠单抗具有抗体-药物抗体(ADA)的患者百分比。

[0568] 实例2:在患有局部晚期或转移性实体瘤的患者中RNA疫苗作为单一药剂以及与阿特珠单抗联合的Ia/Ib期研究

[0569] 由体细胞突变产生的新抗原是癌症免疫疗法的引人关注的靶标,因为它们可能被免疫系统识别为外来的。RNA脂质体复合物疫苗旨在刺激针对新抗原的T细胞应答。如实例1中所述,在患有局部晚期或转移性实体瘤的患者中进行了RNA疫苗的首次人体Ia期研究。

[0570] RNA疫苗按患者进行生产,并且含有多达20个肿瘤特异性新表位。在包含12个周期的诱导期期间以每周或每两周一次的间隔并且在维持期期间以每24周的间隔全身性静脉内施用九剂RNA疫苗。具体地,RNA疫苗在诱导期期间以四个21天周期施用于个体:在第1周期的第1天、第8天和第15天;在第2周期的第1天、第8天和第15天;第3周期的第1天和第15天;以及第7周期的第1天。在诱导期后的维持期期间,RNA疫苗在第13周期的第1天施用并且在之后每24周或168天施用一次。更多详细信息参见实例1。

[0571] 在Ia期研究中,29例患者入组剂量范围为25至100μg的群组。最常见的肿瘤类型是HR+/HER2+乳腺癌、前列腺癌和卵巢癌。在先疗法数量的中位数为5(范围为1至17)。34%的患者接受过在线免疫疗法。大多数患者具有低PD-L1表达(97%的患者的肿瘤细胞上的PD-L1表达<5%,93%的患者的免疫细胞上的表达<5%)。接受的RNA疫苗剂数的中位数为6;28%的患者在完成6周治疗前因PD而退出。大多数不良事件(AE)为1至2级。≥20%的患者发生的AE包括输注相关反应(IRR)/细胞因子释放综合征(CRS)、疲乏、恶心和腹泻。IRR/CRS短暂并且可逆,主要呈现为1至2级寒战和发热。在100μg剂量水平下发生了单例3级CRS的DLT。无患者因AE而停用RNA疫苗。

[0572] RNA疫苗在每次给药时均诱导促炎性细胞因子的脉冲式释放,这与RNA的先天免疫激动剂活性一致。利用离体ELISPOT或MHC多聚体分析,在16例患者中的14例(87%)患者的外周血中观察到RNA疫苗诱导的新抗原特异性T细胞应答。MHC多聚体分析表明,在外周血中诱导高达5%的具有记忆表型的新表位特异性CD8 T细胞。

[0573] 在治疗后肿瘤活检中检测到RNA疫苗诱导的针对多种新抗原的T细胞。在经过至少一次肿瘤评定的26例患者中,1例(4%)胃癌患者具有持续≥10个月的CR,并且11例(42%)患者具有SD。

[0574] 可为具有临床相关周转时间的个体患者生产RNA疫苗。在本研究中,RNA疫苗具有与其作用机制一致的可控的安全性特征,并且在具有低和中等突变负荷肿瘤类型的患者中诱导强烈的新抗原特异性免疫应答。

[0575] 如实例1中进一步所述,还在患有局部晚期或转移性实体瘤的患者中进行了RNA疫

苗与抗PD-L1抗体阿特珠单抗联合的首次人体Ib期研究。

[0576] 如上所述施用RNA疫苗。阿特珠单抗在每个21天周期的第1天施用。更多详细信息参见实例1。

[0577] 132例患者入组剂量范围为15μg至50μg的RNA疫苗联合1200mg阿特珠单抗的群组。最常见的肿瘤类型是NSCLC、TNBC、黑素瘤和结直肠癌(CRC)。在先疗法数量的中位数为3(范围为1至11)。39％的患者接受过在线免疫疗法。大多数患者具有低PD-L1表达水平(93％的患者的肿瘤细胞上的PD-L1表达<5％,79％的患者的免疫细胞上的PD-L1表达<5％)。接受的RNA疫苗剂数的中位数为8;16％的患者在完成6周治疗前因PD而退出。大多数不良事件(AE)为1至2级。≥15％的患者发生的AE包括输注相关反应(IRR)/细胞因子释放综合征(CRS)、疲乏、恶心和腹泻。IRR/CRS短暂并且可逆,主要呈现为1至2级寒战和发热。无DLT。七例患者(5％)由于与研究药物相关的不良事件而停止治疗。

[0578] RNA疫苗在每次给药时均诱导促炎性细胞因子的脉冲式释放,这与RNA的先天免疫激动剂活性一致。利用离体ELISPOT或MHC多聚体分析,在49例患者中的37例(77％)患者的外周血中观察到RNA疫苗诱导的新抗原特异性T细胞应答。在外周血中观察到诱导高达6％的MHC多聚体染色的具有记忆表型的$CD8^+$T细胞。在治疗后肿瘤活检中检测到RNA疫苗诱导的针对多种新抗原的T细胞。在接受至少一次肿瘤评定的108例患者中,9例产生反应(ORR 8％,包括1起CR),并且53例具有SD(49％)。

[0579] RNA疫苗与阿特珠单抗联合具有与研究药物的作用机制一致的可控的安全性特征,并且诱导显著水平的新抗原特异性免疫应答。

[0580] 总之,本文所述的Ia期和Ib期试验是非注册信号搜寻研究,包括黑素瘤、非小细胞肺癌、膀胱癌、结直肠癌、TNBC、肾癌、头颈癌、肉瘤患者。如实例1所示,这些研究旨在招募接受过和未接受过在先检查点抑制剂方案治疗的患者。该研究的主要目的是评定安全性(包括剂量限制性毒性),其他目的包括评估免疫原性和初步评定抗肿瘤活性。试验包括1a期(单一疗法)剂量递增群组、1b期(联合)剂量递增群组和多个1b期扩展群组。患者在诱导期期间以每周或每两周一次的间隔并且在维持期期间以每八个周期接受静脉内施用九剂RNA疫苗。在试验的1b期部分,阿特珠单抗在每个21天周期的第一天施用。

[0581] RNA疫苗按患者进行生产,包括内部确定癌症突变特征、计算预测新抗原、设计和生产基于脂质体配制的RNA(RNA-LPX)的疫苗。每种疫苗含有多达20个肿瘤特异性新表位。重要的是,使用涵盖一系列肿瘤类型(包括那些具有低或中等肿瘤突变负荷的肿瘤)的临床活检或常规临床样本,证明在临床实践相容的周转时间内为个体患者生产疫苗是可行的。

[0582] 对1a期试验中的29例患者和1b期试验中的132例患者的初步临床结果进行了评定。1a期患者接受的在先疗法的中位数为5种(范围为1至17),并且1b期患者接受的在先疗法的中位数为3种(范围为1至11)。RNA疫苗与阿特珠单抗联合和不联合时都具有可控的安全性特征,主要具有短暂并且可逆的1级和2级不良事件,诸如输注相关反应/细胞因子释放综合征,表现为发热和寒战。对互补定量免疫测定的分析表明,RNA疫苗与阿特珠单抗联合和不联合时都能诱导强烈的新表位特异性免疫应答,包括在具有低和中等突变负荷的肿瘤患者中。在疫苗接种后活检中检测到疫苗诱导的新抗原特异性T细胞。在接受RNA疫苗治疗的患者中的几乎一半患者中观察到的最佳缓解是疾病稳定,包括在有限数量的患者(包括接受过和未接受过在先检查点抑制剂方案治疗的患者)中的客观缓解。这表明RNA疫苗与阿

特珠单抗联合的临床活性水平，但是需要随机数据来评定RNA疫苗在检查点抑制剂之上的单独贡献。

[0583] 此外，基于之前对RNA疫苗作为转移性黑素瘤患者手术的佐剂的研究，并且不希望受理论的束缚，认为RNA疫苗可能非常适合控制患有较低肿瘤负荷的患者的转移性复发。

[0584] 实例3：在患有局部晚期或转移性实体瘤的患者中RNA疫苗作为单一药剂以及与阿特珠单抗联合所诱导的免疫应答。

[0585] 如实例1和2中所述，在患有局部晚期或转移性实体瘤的患者中实施了RNA疫苗作为单一疗法(Ia期)以及与阿特珠单抗联合(Ib期)的首次人体Ia期和Ib期研究(图4)。RNA疫苗按患者进行生产，并且含有多达20个肿瘤特异性新表位(参见例如，图10A和Türeci等人(2016)Clin Canc Res,22(8):1885-96;Vormehr等人(2019)Ann Rev Med,70:395-407;和Sahin等人(2018)Science,359(6382):1355-1360)。本实例描述了评估由单独的RNA疫苗以及与阿特珠单抗联合诱导的先天和新抗原特异性免疫应答的实验结果。

[0586] 材料和方法

[0587] ELISPOT测定

[0588] 在体外用对应于RNA疫苗中多达20个单独的新抗原靶标的重叠肽刺激大量外周血单核细胞(PBMC)或分离的CD8+T细胞和CD4+T细胞。在过夜刺激后，使用ELISPOT方法评定IFNg的产生。该测定中的斑点数对应于PBMC或分离的CD8+T细胞和CD4+T细胞中新抗原特异性T细胞的频率。每个新抗原靶标在一式两份的孔中进行测试。利用无新抗原肽的内部对照定义测定中的阳性染色。具体地，如果测试孔中的平均斑点数超过15并且与对照孔具有统计学显着差异，则指定为阳性反应。为确定RNA疫苗特异性反应，将用RNA疫苗处理后获得的样品的斑点数与相同新抗原的基线样品(RNA疫苗处理前)进行比较；阳性命中被定义为处理后样品中的阳性反应和基线样品中的阴性反应，或者如果基线样品也呈阳性，处理后样品中的斑点数较基线斑点计数增加两倍。ELISPOT测定方法的示意图提供于图6中。

[0589] pMHC多聚体测定

[0590] 基于患者的HLA I类等位基因并且使用来源于RNA疫苗中使用的新抗原靶标中预测表位的肽，为每例患者设计了单独的pMHC多聚体。利用冷冻外周血单核细胞(PBMC)进行荧光活化细胞分选(FACS)染色。将每个样品用多种pMHC多聚体和另外的抗体染色，以确定新抗原特异性CD8+T细胞的表型。FACS组合设计为使得每种新抗原具有带两种不同的荧光团标记(以提高染色的特异性)的两种pMHC多聚体。CD8+T细胞在PBMC中进行门控，并且对于每种新抗原，使用带两种不同的荧光团标记的两种pMHC多聚体进行染色分析。为了使任何给定的CD8+T细胞被称为阳性染色(即，新抗原特异性)，它必须对带有两种不同荧光团标记的两种pMHC多聚体染色阳性并且落在FACS直方图中的右上象限中。pMHC多聚体染色测定方法的示意图提供于图8中。

[0591] 结果

[0592] 先天免疫应答

[0593] 通过在治疗开始前以及施用RNA疫苗和阿特珠单抗后的多个时间点使用酶联免疫吸附测定(ELISA)分析测量血浆中的细胞因子(例如IFNg或IFNa)的水平，来评估RNA疫苗作为单一疗法(Ia期)或与阿特珠单抗联合(Ib期)所诱导的先天免疫应答。

[0594] 如图5A所示的Ia期研究，在Ia期研究中以25μg的剂量RNA疫苗的患者表现出血浆

IFNg水平的脉冲式上升(显示了来自五例患者的结果)。此外,每次施用RNA疫苗后4小时的血浆IFNg水平以剂量依赖性方式增加(图5B)。每次施用RNA疫苗后4小时的IFNa水平也以剂量依赖性方式增加(图5C)。若干例以50μg的剂量施用RNA疫苗的患者接受了类固醇治疗,并且剂量减至25μg。

[0595] 在Ib期研究中,还在每次向患者施用RNA疫苗后4小时评估了细胞因子水平。如图5B至5C所示,每次施用RNA疫苗后4小时的血浆IFNg和IFNa水平以剂量依赖性方式增加。

[0596] 总体而言,这些结果表明,RNA疫苗作为单一疗法或与阿特珠单抗联合施用导致稳定且剂量依赖性先天免疫活化,与提出的RNA疫苗通过TLR7/8激动作为先天免疫刺激物的功能一致(参见例如,图10A至10B)。此外,与RNA疫苗单一疗法相比,RNA疫苗与阿特珠单抗联合增强了先天免疫应答(图5B至5C)。该效应在25μg RNA疫苗剂量下最为明显。对于其他细胞因子(包括IL-6和IL-12),观察到了类似的结果(数据未显示)。

[0597] 新抗原特异性免疫应答

[0598] 使用离体EliSpot测定(图6)和MHC多聚体染色测定(图8)来评定RNA疫苗作为单一疗法施用(Ia期)或与阿特珠单抗联合施用(Ib期)后的新抗原特异性免疫应答。

[0599] EliSpot测定

[0600] 首先在第4周期第1天使用离体IFNg EliSpot测定来评定RNA疫苗作为单一疗法施用(Ia期)或与阿特珠单抗联合施用(Ib期)后的新抗原特异性免疫应答(图6)。

[0601] 如图7A所示,接受RNA疫苗作为单一疗法(Ia期)施用的患者表现出广度(即,诱导免疫应答的抗原数量)有所不同的新抗原特异性免疫应答。例如,以100μg的剂量施用RNA疫苗的患者1显示出针对十种抗原中的一种(10%)的新抗原特异性免疫应答。在另一个实例中,以75μg的剂量施用RNA疫苗的患者2显示出针对二十种抗原中的四种(20%)的新抗原特异性免疫应答。

[0602] 接受RNA疫苗与阿特珠单抗联合施用(Ib期)的患者也表现出广度(即,诱导免疫应答的抗原数量)有所不同的新抗原特异性免疫应答。例如,如图7B所示,以50μg的剂量施用RNA疫苗的患者11显示出针对二十种抗原中的一种(5%)的新抗原特异性免疫应答。在另一个实例中,以25μg的剂量施用RNA疫苗的患者20显示出针对二十种抗原中的七种(35%)的新抗原特异性免疫应答。

[0603] 在Ib期研究中,还确定了患者观察到的新抗原特异性免疫应答的强度。如图7C所示,诱导免疫应答的每种新抗原的IFNg形成斑点数量是变化的。利用EliSpot测定发现患者27无任何阳性新抗原命中,但利用pMHC多聚体染色测定发现其表现出一种阳性新抗原命中(见下文)。图7C显示的患者20和14的数据包括针对每种新抗原命中的CD4和CD8斑点两者。患者12的数据显示出CD4+T细胞应答。此外,观察到的免疫应答的强度中值在患者中在RNA疫苗剂量内和跨RNA疫苗剂量变化,如图7D和表3所示。

[0604] 表3.在Ib期研究中在患者中观察到的新抗原特异性免疫应答的强度。

[0605]

RNA疫苗剂量:	50μg	38μg	25μg	15μg
患者数量	2	6	7	5
IFNg形成斑点的中位数	29	127.2	81.5	88.71
IFNg形成斑点的平均数	29	152.4	101.7	78.89

[0606] 在一个实例中,对获得自接受剂量为25μg的RNA疫苗与阿特珠单抗联合施用(Ib

期;患者22)的CIT初治三阴性乳腺癌患者的大量PBMC所进行的IFNg EliSpot测定显示,抗原R6和R8导致在第4周期第1天的新抗原特异性免疫应答(图9A)。相比之下,新抗原R3未作为阳性命中得到检出。

[0607] pMHC多聚体测定

[0608] 还使用完全定量的肽MHC(pMHC)多聚体染色测定(图8)评估了患者22(参见图9A)中的新抗原特异性CD8+T细胞应答。

[0609] 如图9B所示,与图9A中所示的大量PBMC EliSpot测定一致,使用pMHC多聚体染色测定检测到对新抗原R8具有特异性的CD8+T细胞应答。新抗原特异性CD8+T细胞免疫应答的动力学表明,峰值反应(即,约5.67%的新抗原特异性CD8+T细胞)发生在约3至约6剂疫苗之间,并且免疫应答由C7D1时的剂量增强(参见,图9B中的C8D1)。对第3周期第1天新抗原特异性CD8+T细胞群表达的标志物的分析表明,该细胞群表包括CD45+RA+效应记忆细胞(TEMRA;1.18%)、中央记忆细胞(Tcm;1.28%)和效应记忆细胞(Tem;93.10%)(图9C)。此外,99.1%的新抗原特异性CD8+T细胞群是PD-1+(图9D)。

[0610] 与使用新抗原R8观察到的结果相比,图9A所示的PBMC EliSpot测定未能将新抗原R3检测为阳性命中,使用pMHC多聚体测定法检测到对新抗原R3具有特异性的CD8+T细胞应答(图9E)。针对新抗原R3的新抗原特异性CD8+T细胞免疫应答的动力学表明,峰值反应(即,约0.27%的新抗原特异性CD8+T细胞)也发生在约3至约6剂疫苗之间。对第3周期第1天新抗原特异性CD8+T细胞群表达的标志物的分析表明,该细胞群表包括CD45+RA+效应记忆细胞(TEMRA;1.08%);和效应记忆细胞(Tem;95.7%)(图9F)。此外,100.00%的新抗原特异性CD8+T细胞群是PD-1+(图9G)。

[0611] 总体而言,这些结果表明,RNA疫苗与阿特珠单抗联合施用后,使用EliSpot测定以及pMHC多聚体测定检测到新抗原特异性T细胞应答,并且由RNA疫苗诱导的CD8+T细胞的数量可在外周血中达到>5%(例如,高达约6%)。此外,结果表明pMHC多聚体测定与EliSpot测定相比具有更高的灵敏度。此外,由RNA疫苗诱导的新抗原特异性免疫应答包括具有高表达水平的PD-1(即,PD-1+)并且主要具有效应记忆表型的CD8+T细胞。这些结果表明,RNA疫苗导致了持久的新抗原特异性免疫应答。

[0612] 讨论

[0613] 本实例中呈现的结果表明,RNA疫苗作为单一疗法或与阿特珠单抗联合施用导致稳定的先天免疫活化以及新抗原特异性免疫应答。这些结果与所提出的RNA疫苗的作用机制一致,如图10A至10B所示,据信RNA疫苗通过先天免疫刺激(例如,内在TLR7/8激动)以及在树突状细胞呈递新抗原后刺激新抗原特异性T细胞应答(例如,CD4+和CD8+T细胞应答)而起作用(参见例如,Kranz等人(2016)Nature,16;534(7607):396-401)。

[0614] 实例4:在患有局部晚期或转移性实体瘤的患者中RNA疫苗作为单一药剂的Ia期研究的其他结果。

[0615] 本实例提供了在实例1至3中所述的在患有局部晚期或转移性实体瘤的患者中RNA疫苗作为单一药剂的Ia期研究的其他安全性和有效性结果。

[0616] 如图4所示,Ia期剂量递增研究中的患者接受剂量范围25μg至100μg(25μg、38μg、50μg、75μg和100μg)的RNA疫苗的施用。在初始治疗期间(诱导期),RNA疫苗以21天周期施用。在初始治疗期间(诱导期),RNA疫苗在第1周期的第1天、第8天和第15天;第2周期的第1

天、第8天和第15天;第3周期的第1天和第15天;以及第7周期的第1天施用。在初始治疗后的维持期期间,RNA疫苗在第13周期的第1天施用,并且在之后每8个周期施用(即,之后每24周施用一次或之后每168天施用一次),直至发生疾病进展为止。

[0617] 患者基本信息和疾病特征

[0618] 如表4所示,本研究中患者的中值年龄为59岁,并且大多数患者为女性(65%)。55%的患者的ECOG体能状态为1,45%的患者的ECOG体能状态为0。最常见的肿瘤类型是乳腺癌(HER2+或HR+)、前列腺癌、卵巢癌、骨肉瘤、子宫内膜癌、胃癌和软组织肉瘤。患者之前接受过中位数为5种的在先全身性疗法以治疗转移性疾病,并且32%的患者接受过检查点抑制剂的在先治疗。此外,90%的患者在<5%的肿瘤浸润免疫细胞和肿瘤细胞中表达PD-L1,并且10%的患者在≥5%的肿瘤浸润免疫细胞或肿瘤细胞中表达PD-L1。

[0619] 表4.患者基本信息和疾病特征。

[0620]

	剂量递增 (N = 31)
中值年龄(范围),岁	59(21 至 77)
女性,n (%)	20 (65)
ECOG PS,n (%) 0 1	 14 (45) 17 (55)
最常见的肿瘤类型,n (%) 乳腺癌(HER2+ 或 HR+) 前列腺癌 卵巢癌 骨肉瘤 子宫内膜癌 胃癌 软组织肉瘤	 6 (19) 5 (16) 4 (13) 4 (13) 2 (7) 2 (7) 2 (7)
针对转移性疾病的在先全身性疗法的中位数(范围),n	5(1 至 17)
在先检查点抑制剂,n (%)	10 (32)
PD-L1 (Ventana SP142),n (%) < 5% IC 和 TC ≥ 5% IC 或 TC	 28 (90) 3 (10)
IC = 肿瘤浸润免疫细胞; TC = 肿瘤细胞; ECOG PS = 东部肿瘤协作组体能状态; HER = 人表皮生长因子受体; HR = 激素受体; PD-L1 = 程序性死亡配体 1。	

[0621] 暴露和处置

[0622] 如表5所示,Ia期所有患者的中位治疗持续时间为43天。在治疗期间,在100μg RNA

疫苗剂量下观察到一种剂量限制性毒性(DLT)(3级细胞因子释放综合征)。接受剂量为38μg的RNA疫苗施用的一例患者发生RNA疫苗剂量减少。总体而言,29例患者已停止治疗,其中12例因转入Ib期,11例因发生疾病进展,5例因退出研究。研究中的八例患者在完成6周治疗前因疾病进展而停止治疗。

[0623] 表5.治疗期间的患者暴露和处置。

[0624]

	RNA 疫苗 IV 剂量					
	25 μg (n = 13)	38 μg (n = 5)	50 μg (n = 4)	75 μg (n = 8)	100 μg (n = 1)	总计 (N = 31)
DLT，n (%)	0	0	0	0	1 (100)[a]	1 (3)
RNA 疫苗剂量减少，n (%)	0	1 (20)	0	0	0	1 (3)
中值（范围）治疗持续时间，天	43 (1-123)	42 (15-128)	40 (15-254)	40 (9-69)	56 (56-56)	43 (1-254)
继续治疗，n (%)	0	1 (20)	1 (25)	0	0	2 (7)
停止研究治疗，n (%)	13 (100)	4 (80)	3 (75)	8 (100)	1 (100)	29 (94)
停止治疗的原因，n (%)						
疾病进展	4 (31)	1 (20)	1 (25)	5 (62)	1 (100)	12 (39)
交叉[b]	5 (38)	2 (40)	2 (50)	2 (25)	0	11 (35)
死亡	0	0	0	0	0	0
AE	0	0	0	0	0	0

[0625]

受试者退出	4 (31)	1 (20)	0	0	0	5 (16)
其他	0	0	0	1 (12)	0	1 (3)
在完成 6 周治疗前因疾病进展而停止治疗，n (%)	4 (31)	0	2 (50)	2 (25)	0	8 (26)
[a]DLT 事件为 3 级细胞因子释放综合征 (CTCAE v5.0); [b]发生疾病进展或临床益处丧失的 Ia 期患者可转入 Ib 期的联合治疗； AE = 不良事件； DLT = 剂量限制性毒性。						

[0626] 安全性

[0627] 图11提供了>10％的患者发生的最常见的AE的总结。在>10％的患者中发生的最常见的研究治疗相关AE为全身性反应，包括输注相关反应和细胞因子释放综合征。>10％的患者发生的其他AE包括疲乏、腹泻、呕吐、恶心、肌痛、呼吸困难、脱水、四肢疼痛、食欲下降、便秘和腹痛。16％的患者报告了恶性肿瘤进展的严重不良事件(SAE)(数据未显示)。

[0628] 大多数全身反应发生在RNA疫苗输注后约2至4小时内，并且在约1至2小时内消退。表6提供了≥5％的患者发生的全身性反应的个体体征和症状的概述。大多数低血压和缺氧事件为2级，但具有3级低血压和3级缺氧症状的DLT事件除外。

[0629] 表6.≥5％的患者发生的全身性反应(CRS/IRR/ILI)的个体体征和症状。

[0630]

	RNA 疫苗剂量					
n (%)	25 μg (n = 13)	38 μg (n = 5)	50 μg (n = 4)	75 μg (n = 8)	100 μg (n = 1)	所有患者 (N = 31)
寒战	8 (62)	4 (80)	4 (100)	8 (100)	1 (100)	25 (81)
发热	6 (46)	2 (40)	3 (75)	5 (63)	1 (100)	17 (55)
恶心	3 (23)	2 (40)	4 (100)	3 (38)	0	12 (39)
头痛	3 (23)	1 (20)	1 (25)	1 (13)	0	6 (19)

[0631]

呕吐	3 (23)	1 (20)	1 (25)	0	0	5 (16)
低血压	0	1 (20)	0	2 (25)	1 (100)	4 (13)
缺氧	0	1 (20)	0	1 (13)	1 (100)	3 (10)
肌痛	2 (15)	0	0	1 (13)	0	3 (10)
心动过速	0	0	1 (25)	2 (25)	0	3 (10)
颈痛	1 (8)	1 (20)	0	0	0	2 (7)
窦性心动过速	1 (8)	1 (20)	0	0	0	2 (7)
震颤	0	1 (20)	1 (25)	0	0	2 (7)
CRS = 细胞因子释放综合征 (CTCAE v.5); IRR = 输注相关反应; ILI = 流感样疾病。						

[0632] 总体而言,安全性结果表明,RNA疫苗通常具有良好的耐受性,治疗相关AE主要是短暂的全身性反应,其表现为低度细胞因子释放综合征、输注相关反应或流感样症状。全身性反应是短暂的,并且在门诊环境中通常是可控的。未达到最大耐受剂量(MTD)。

[0633] 先天免疫应答

[0634] 用RNA疫苗作为单一疗法进行治疗诱导了促炎性细胞因子的脉冲式释放,这些促炎症性细胞因子在每次RNA疫苗给药时均在血浆中测得。例如,如图12A至12B所示,以25μg的剂量施用RNA疫苗的患者在每次RNA疫苗给药后表现出IFNγ的脉冲式释放。在以25μg的剂量施用RNA疫苗的患者中也观察到类似的IL-6和IFNα脉冲式释放模式(图13)。观察到的RNA疫苗诱导的促炎性细胞因子的脉冲式释放与所提出的RNA疫苗的先天免疫激动剂活性一致。

[0635] 新抗原特异性免疫应答

[0636] 利用EliSpot测定(参见例如,图6)和MHC多聚体染色测定(参见例如,图8)在86%的评估的患者(图14A)中检测到离体新抗原特异性T细胞应答。患者中新抗原特异性应答的中位数为2(范围为1至5)(图14B)。

[0637] 利用T细胞受体测序对接受剂量为75μg的RNA疫苗治疗的前列腺癌患者的肿瘤中的T细胞受体进行的分析表明,仅在接受RNA疫苗治疗后,肿瘤中才存在新抗原特异性T细胞(图15)。这些结果表明,RNA疫苗诱导由RNA疫苗刺激的T细胞浸润到肿瘤中。

[0638] 使用完全定量的肽MHC(pMHC)多聚体染色测定分析接受剂量为38μg的RNA疫苗治疗的前列腺癌患者外周血中的新抗原特异性CD8+T细胞应答随时间的变化(图8)。如图16A所示,外周血中的CD8+新抗原特异性T细胞随时间推移而增加,在第4周期第1天达到4.7%。对第4周期第1天新抗原特异性CD8+T细胞群表达的标志物的分析显示,这些细胞中的87.7%的细胞具有效应记忆T细胞表型(Tem;图16B),并且99.6%的细胞为PD-1+(图16C)。

[0639] 观察到的RNA疫苗诱导的新抗原特异性免疫应答与提出的RNA疫苗作为新抗原呈递刺激物的功能一致。

[0640] 临床活性

[0641] 图17提供了在用RNA疫苗作为单一疗法治疗的患者中观察到的临床应答的总结以及最长直径之和(SLD)较基线的最佳百分比变化。一例接受剂量为50μg的RNA疫苗治疗的胃癌患者表现出完全缓解(CR)。该患者在接受RNA疫苗施用之前已经接受过3线在先疗法(不包括检查点抑制剂),并且在继续接受RNA疫苗治疗的情况下经过1.5年的随访。如图18所示,该患者在研究的第4周期第1天表现出通过IFNγ ELiSpot测定测得的针对抗原R4、R8、R9、R12和R15的新抗原特异性免疫应答。

[0642] 讨论

[0643] 本实例中描述的结果表明,作为单一疗法施用的剂量范围为25μg至100μg的RNA疫苗通常具有良好的耐受性。治疗期间的免疫监测表明,RNA疫苗在每次施用时均诱导促炎性细胞因子的脉冲式释放、新抗原特异性T细胞免疫应答以及受刺激的T细胞浸润到一例患者的肿瘤中。此外,临床疗效结果表明,RNA疫苗导致一例患者发生完全缓解。总体而言,这些结果与所提出的RNA疫苗作为先天免疫应答和新抗原呈递刺激物的双重作用机制一致(参见例如,图10A至10B)。

[0644] 实例5:在患有局部晚期或转移性实体瘤的患者中RNA疫苗与阿特珠单抗联合的Ib期研究的其他结果。

[0645] 本实例提供了在实例1至3中所述的在患有局部晚期或转移性实体瘤的患者中RNA疫苗与阿特珠单抗联合施用的Ib期研究的其他安全性和有效性结果。

[0646] 如图4所示,在Ib期研究中,RNA疫苗以15μg、25μg、38μg或50μg的剂量与1200mg阿特珠单抗联合施用于受试者。Ib期研究包括RNA疫苗剂量的剂量递增阶段以及患有所指示的未接受过或接受过检查点抑制剂治疗的肿瘤类型的患者接受RNA疫苗与阿特珠单抗联合施用的扩展阶段。在初始治疗期间(诱导期),RNA疫苗在第1周期的第1天、第8天和第15天;第2周期的第1天、第8天和第15天;第3周期的第1天和第15天;以及第7周期的第1天施用。在初始治疗后的维持期期间,RNA疫苗在第13周期的第1天施用,并且在之后每8个周期施用(即,之后每24周施用一次或之后每168天施用一次),直至发生疾病进展为止。阿特珠单抗在第1周期至第12周期中的每个周期的第1天、第13个周期的第1天以及之后每3周(即,之后每21天)施用,直至发生疾病进展为止(参见图4)。每个周期为21天。

[0647] 患者基本信息和疾病特征

[0648] 如表7所示,在剂量递增阶段,患者的中位年龄为57.5岁,并且56.6%的患者为男性。50%的患者的ECOG体能状态为0,50%的患者的ECOG体能状态为1。在剂量递增阶段,最常见的肿瘤类型为结肠癌(30%)、直肠癌(16.7%)、肾细胞癌(10%)和三阴性乳腺癌(10%)。针对转移性疾病的在先全身性疗法的中位数为4(范围:1至9),其中43.3%的患者已经接受过检查点抑制剂的在先疗法。80%的患者在<5%的肿瘤浸润免疫细胞和肿瘤细胞中表达PD-L1,并且16.7%的患者在≥5%的肿瘤浸润免疫细胞或肿瘤细胞中表达PD-L1。

[0649] 表7.剂量递增阶段的患者基本信息和疾病特征。

[0650]

	剂量递增
	总计 (n = 30)
中值年龄（范围），岁	57.5（35 - 77）
男性，n (%)	17 (56.6)
ECOG PS，n (%) 0 1	 15 (50) 15 (50)
最常见的肿瘤类型，n (%) 结肠癌 NSCLC 黑素瘤 直肠癌 RCC TNBC UC	 9 (30.0) – 5 (16.7) 3 (10.0) 3 (10.0) –
针对转移性疾病的在线全身性疗法的中位数（范围），n	4（1 - 9）
在先检查点抑制剂，n (%)	13 (43.3)
PD-L1 (Ventana SP142)，n (%) < 5% IC 和 TC ⩾ 5% IC 或 TC 缺失	 24 (80.0) 5 (16.7) 1 (3.3)
NSCLC = 非小细胞肺癌；RCC = 肾细胞癌；TNBC = 三阴性乳腺癌；UC = 尿路上皮癌；CPI = 检查点抑制剂；IC = 肿瘤浸润免疫细胞；TC = 肿瘤细胞。	

[0651] 如表8所示，在扩展阶段，之前接受过检查点抑制剂治疗的患者(经历过CPI治疗)的中位年龄为61.5岁，并且CPI初治患者中位年龄为57.5岁。59.5%的经历过CPI治疗的患者和43.1%的CPI初治患者为男性。45.2%的经历过CPI治疗的患者和52.8%的CPI初治患者的ECOG体能状态为0，并且54.8%经历过CPI治疗的患者和47.2%的CPI初治患者的ECOG体能状态为1。经历过CPI治疗的患者中最常见的肿瘤类型是非小细胞肺癌(71.4%)和黑素瘤(19%)。CPI初治患者中最常见的肿瘤类型是非小细胞肺癌(13.9%)、黑素瘤(12.5%)、肾细胞癌(33.3%)和尿路上皮癌(13.9%)。经历过CPI治疗的患者接受过中位数为3种的针

对转移性疾病的在先全身性疗法，而CPI初治患者接受过中位数为2种的针对转移性疾病的在先全身性疗法。50％的经历过CPI治疗的患者在<5％的肿瘤浸润免疫细胞和肿瘤细胞中表达PD-L1，并且28.6％的患者在≥5％的肿瘤浸润免疫细胞或肿瘤细胞中表达PD-L1。75％的CPI初治患者在<5％的肿瘤浸润免疫细胞和肿瘤细胞中表达PD-L1，并且13.9％的患者在≥5％的肿瘤浸润免疫细胞或肿瘤细胞中表达PD-L1。

[0652] 表8.扩展阶段的患者基本信息和疾病特征。

[0653]

	扩增	
	经历过 CPI (n = 42)	CPI 初治 (n = 72)
中值年龄（范围），岁	61.5（36 - 82）	57.5（29 - 79）
男性，n (%)	25 (59.5)	31 (43.1)
ECOG PS，n (%)		
0	19 (45.2)	38 (52.8)
1	23 (54.8)	34 (47.2)
最常见的肿瘤类型，n (%)		
结肠癌	–	–
NSCLC	30 (71.4)	10 (13.9)
黑素瘤	8 (19.0)	9 (12.5)
直肠癌	–	–
RCC	–	9 (12.5)
TNBC	–	24 (33.3)
UC	–	10 (13.9)
针对转移性疾病的在线全身性疗法的中位数（范围），n	3（1 - 10）	2（1 - 11）
在先检查点抑制剂，n (%)	42 (100)	0
PD-L1 (Ventana SP142)，n (%)		
< 5% IC 和 TC	21 (50.0)	54 (75.0)
⩾ 5% IC 或 TC	12 (28.6)	10 (13.9)
缺失	9 (21.4)	8 (11.1)
NSCLC = 非小细胞肺癌；RCC = 肾细胞癌；TNBC = 三阴性乳腺癌；UC = 尿路上皮癌；CPI = 检查点抑制剂；IC = 肿瘤浸润免疫细胞；TC = 肿瘤细胞。		

[0654]

[0655] 暴露和处置

[0656] 表9提供了Ib期研究中患者的治疗暴露和患者处置总结。接受RNA疫苗治疗的中位

持续时间为57天，并且接受阿特珠单抗治疗的中位持续时间为66天。总共发生了6例RNA疫苗剂量减少和一例RNA疫苗停用。76.8%的患者已停止研究治疗，并且23.2%的患者继续治疗。63.4%的RNA疫苗停用是由于疾病进展，3.5%是由于死亡，5.6%是由于不良事件，1.4%是由于受试者退出。16.9%的患者在完成6周治疗前因疾病进展而停止研究治疗。

[0657] 表9.患者暴露和处置。

[0658]

	RNA 疫苗 IV 剂量 + 阿特珠单抗 1200 mg IV q3w				
	15 μg (n = 27)	25 μg (n = 95)	38 μg (n = 11)	50 μg (n = 9)	总计 (N = 142)
DLT，n (%)	0	0	0	0	0
RNA 疫苗剂量减少，n (%)	1 (3.7)	2 (2.1)	1 (9.1)	2 (22.2)	6 (4.2)
中值（范围）治疗持续时间（用 RNA 疫苗），天	65 (8-253)	57 (1-400)	64 (35-441)	36 (1-253)	57 (1-441)
中值（范围）治疗持续时间（用阿特	104 (1-316)	64 (1-462)	106 (21-	22 (1-296)	66 (1-504)

[0659]

珠单抗），天			504)		
继续治疗，n (%)	9 (33.3)	22 (23.2)	2 (18.3)	0	33 (23.2)
仅停用 RNA 疫苗，n (%)	0	1 (1.1)[a]	0	0	1 (0.7)
停止两种研究治疗，n (%)	18 (66.7)	72 (75.8)	9 (81.8)	9 (100)	109 (76.8)
停用 RNA 疫苗的原因，n (%) 疾病进展 死亡[b] AE 受试者退出 其他	 15 (55.6) 1 (3.7) 0 1 (3.7) 1 (3.7)	 61 (64.2) 4 (4.2) 5 (5.3) 1 (1.1) 2 (2.1)	 8 (72.7) 0 1 (9.1) 0 0	 6 (66.7) 0 2 (22.2) 0 1 (11.1)	 90 (63.4) 5 (3.5) 8 (5.6) 2 (1.4) 4 (2.8)
在完成 6 周疗法前因疾病进展而停止治疗，n (%)	2 (7.4)	19 (20.0)	1 (9.1)	2 (22.2)	24 (16.9)

[a]患者在停用 RNA 疫苗的同时停用阿特珠单抗。但是，停用阿特珠单抗的信息不可用。

[b]四例死亡是由于恶性肿瘤进展。一例死亡是由于恶性心包积液。无死亡与研究治疗相关。

[0660] 安全性

[0661] 图19提供了Ib期研究中>10％的患者发生的最常见的AE的总结。>10％的患者发生的治疗相关不良事件主要是全身性反应，诸如输注相关反应、细胞因子释放综合征和流感样疾病。>10％的患者发生的其他AE包括疲乏、恶心、发热、腹泻、食欲下降、呕吐、头痛、咳嗽、呼吸困难、关节痛、便秘和贫血。14％的患者报告了恶性肿瘤进展的严重不良事件(数据未显示)。在实例1至4所述的Ia期研究中，相对于RNA疫苗作为单一疗法施用的患者，未观察到免疫介导的不良事件增加(数据未显示)。

[0662] 如表10所示，全身性反应的中值发作时间对于以15μg的剂量施用RNA疫苗的患者为5.7小时，对于以25μg的剂量施用RNA疫苗的患者为4.0小时，对于以38μg的剂量施用RNA疫苗的患者为4.1小时，并且对于以50μg的剂量施用RNA疫苗的患者为3.2小时。全身性反应在中值时间1.8小时或更短时间内消退。

[0663] 表10.全身性反应的发作和消退的中值时间。

[0664]

RNA 疫苗 IV 剂量 + 阿特珠单抗 1200 mg IV	中值（范围）发作时间，小时 (n = 70)	中值（范围）消退时间，小时 (n = 57)
15μg	5.7（1.1 至 11.8）	1.8（0.3 至 5.1）
25μg	4.0（0.7 至 9.7）	1.8（0.1 至 20.1）
38μg	4.1（2.1 至 6.1）	1.5（0.4 至 3.3）
50μg	3.2（2.4 至 5.9）	1.4（0.4 至 1.7）

[0665] 表11提供了≥5%的患者发生的全身性反应的个体体征和症状的概述。

[0666] 表11.≥5例患者中发生的全身性反应(CRS/IRR/ILI)的个别体征和症状。

[0667]

RNA 疫苗 IV 剂量 + 阿特珠单抗 1200 mg IV					
n (%)	15 μg (n = 27)	25 μg (n = 95)	38 μg (n = 11)	50 μg (n = 9)	全部患者 (N = 142)
发热	10 (37.0)	60 (63.2)	10 (90.9)	6 (66.7)	86 (60.6)
寒战	11 (40.7)	58 (61.1)	8 (72.7)	7 (77.8)	84 (59.2)
恶心	2 (7.4)	14 (14.7)	2 (18.2)	2 (22.2)	20 (14.1)
心动过速	1 (3.7)	8 (8.4)	2 (18.2)	3 (33.3)	14 (9.9)
头痛	3 (11.1)	7 (7.4)	2 (18.2)	0	12 (8.5)
呕吐	1 (3.7)	9 (9.5)	2 (18.2)	0	12 (8.5)
高血压	1 (3.7)	5 (5.3)	0	2 (22.2)	8 (5.6)

[0668]

低血压	3 (11.1)	3 (3.2)	1 (9.1)	0	7 (4.9)
肌痛	2 (7.4)	4 (4.2)	1 (9.1)	0	7 (4.9)
背痛	0	4 (4.2)	1 (9.1)	1 (11.1)	6 (4.2)
疲乏	1 (3.7)	4 (4.2)	0	0	5 (3.5)
缺氧	0	3 (3.2)	1 (9.1)	1 (11.1)	5 (3.5)
CRS = 细胞因子释放综合征 (CTCAE v.5); IRR = 输注相关反应; ILI = 流感样疾病。					

[0669] 未观察到剂量限制性毒性,并且未达到最大耐受剂量。此外,治疗相关AE主要是全身性反应,其表现为低度细胞因子释放综合征(CRS)、输注相关反应(IRR)或流感样症状。总体而言,全身性反应是短暂、可逆的,并且在门诊环境中通常是可控的。

[0670] 先天免疫应答

[0671] 在研究期间对血浆中细胞因子的分析表明,RNA疫苗与阿特珠单抗联合施用以类似于在Ia期研究中的患者中观察到的方式诱导促炎性细胞因子的脉冲式释放,例如,如实例4中所述(数据未显示)。

[0672] 新抗原特异性免疫应答

[0673] 利用EliSpot测定(参见例如,图6)和MHC多聚体染色测定(参见例如,图8)在约73%的评估的患者(n=63)(图20)中检测到离体新抗原特异性T细胞应答。患者中新抗原特异性应答的中位数为2.6(范围为1至9)。此外,在测试的患者(n=14)中检测到CD4+和CD8+T细胞应答两者(数据未显示)。

[0674] 利用T细胞受体测序对接受1200mg阿特珠单抗和剂量为38μg的RNA疫苗治疗的直肠癌患者的肿瘤中的T细胞受体进行的分析表明,仅在接受RNA疫苗治疗后,肿瘤中才存在新抗原特异性T细胞(图21)。这些结果表明,RNA疫苗诱导由RNA疫苗刺激的T细胞浸润到肿瘤中。

[0675] 总体而言,这些结果表明,RNA疫苗与阿特珠单抗联合施用在大多数接受治疗的患者中诱导了新抗原特异性T细胞应答。

[0676] 临床活性

[0677] 在接受RNA疫苗与阿特珠单抗联合治疗的患者中观察到的临床应答的总结提供于图22中。

[0678] 一例接受剂量为38μg的RNA疫苗治疗的直肠癌患者表现出完全缓解(CR)。该患者之前尚未接受过检查点抑制剂治疗,并且通过SP142Ventana测定法评定,在≥5%的肿瘤浸润性免疫细胞或肿瘤细胞中不具有PD-L1表达。

[0679] 接受剂量为38μg的RNA疫苗治疗的另一例三阴性乳腺癌患者(由图22中的框指示)表现出部分缓解(PR)。该患者之前已经接受过检查点抑制剂治疗(经历过CPI治疗),并且通过SP142 Ventana测定法评估,在≥5%的肿瘤浸润性免疫细胞或肿瘤细胞中具有PD-L1表达。如图23A至23B所示,在基线时,该患者具有若干与转移性疾病相关的可见肿瘤块,并且CD8+新抗原特异性T细胞呈阴性(0.01%;背景水平)。在第4周期,肿瘤大小缩小,并且患者

具有2.2%的CD8+新抗原特异性T细胞。适应症特定扩展阶段的临床活性

[0680] 如实例1所述和图4所示，Ib期研究包括适应症特定扩展阶段，其中具有特定肿瘤类型(未接受过检查点抑制剂治疗，或经历过检查点抑制剂治疗)的患者接受剂量为15μg或25μg的RNA疫苗与阿特珠单抗(1200mg)治疗。Ib期研究的适应症特定、检查点抑制剂初治扩展阶段中包括的患者的基线患者和疾病特征总结提供于表12中。

[0681] 表12.适应症特定扩展阶段的基线患者特征。

[0682]

群组	中值（范围）在先疗法，n	PD-L1 表达，n (%)[a]		
		<5%	≥ 5%	缺失
UC (n = 10)	1 (1-3)	7 (70)	3 (30)	0
NSCLC (n = 10)	1.5 (1-5)	8 (100)	0	2
TNBC (n = 22)	3.5 (1-11)	16 (80)	4 (20)	2
RCC (n = 9)	1 (1-1)	7 (77.7)	2 (22.2)	0
黑素瘤 (n = 10)	1 (1-2)	9 (90.0)	0	1
所有患者均未接受过检查点抑制剂治疗；[a]通过 SP142 Ventana 测定来分析 IC/TC 上的 PD-L1 表达。UC = 尿路上皮癌；NSCLC = 非小细胞肺癌；TNBC = 三阴性乳腺癌；RCC = 肾细胞癌。				

[0683] 图24A至24E提供了检查点抑制剂初治尿路上皮癌(图24A)、肾细胞癌(图24B)、黑素瘤(图24C)、三阴性乳腺癌(图24D)和非小细胞肺癌(图24E)患者的最长直径之和(SLD)和客观缓解率(ORR)随时间的变化。尿路上皮癌患者具有10%的ORR，肾细胞癌患者具有22%的ORR，黑素瘤患者具有30%的ORR，三阴性乳腺癌患者具有4%的ORR，并且非小细胞肺癌患者具有10%的ORR。

[0684] 讨论

[0685] 本实例中描述的结果表明，RNA疫苗与阿特珠单抗联合施用通常具有良好的耐受性。未观察到剂量限制性毒性，并且未达到最大耐受剂量。治疗期间的免疫监测表明，RNA疫苗与阿特珠单抗联合施用在大多数患者中诱导了促炎性细胞因子的释放、外周T细胞应答，并且RNA疫苗诱导的T细胞浸润到一例患者的肿瘤中。此外，观察到一例患者中在接受RNA疫苗与阿特珠单抗联合治疗后发生完全缓解，并且在几例患有各种肿瘤类型的患者中观察到客观缓解。总体而言，这些结果与所提出的RNA疫苗作为先天免疫应答和新抗原呈递刺激物的双重作用机制一致(参见例如，图10A至10B)。

[0686] 更具体地，本申请提供下列各项：

[0687] 1.一种在患有肿瘤的个体中诱导新表位特异性CD8+T细胞的方法，其包括向所述个体施用有效量的RNA疫苗，其中所述RNA疫苗包含一种或多种多核苷酸，所述一种或多种多核苷酸编码由在获得自所述个体的肿瘤样本中存在的癌症特异性体细胞突变产生的一个或多个新表位，并且其中在施用所述RNA疫苗后获得自所述个体的外周血样品中约1%至约6%的CD8+T细胞为对由所述RNA疫苗的所述一种或多种多核苷酸编码的所述新表位中的至少一者具有特异性的新表位特异性CD8+T细胞。

[0688] 2.根据项1所述的方法，其中所述外周血样品包含约5%或约6%的对由所述RNA疫

苗的所述一种或多种多核苷酸编码的所述新表位中的至少一者具有特异性的CD8+T细胞。

[0689] 3.根据项1或项2所述的方法,其中通过离体ELISPOT或MHC多聚体分析在所述外周血样品中检测所述新表位特异性CD8+T细胞。

[0690] 4.根据项1至3中任一项所述的方法,其中与施用所述RNA疫苗之前相比,向所述个体施用所述RNA疫苗导致在所述个体的所述外周血中对新表位特异性CD4+T细胞的诱导,其中所述新表位特异性CD4+T细胞对由所述RNA疫苗的所述一种或多种多核苷酸编码的所述新表位中的至少一者具有特异性。

[0691] 5.根据项4所述的方法,其中通过离体ELISPOT分析在获得自所述个体的外周血样品中检测所述新表位特异性CD4+T细胞。

[0692] 6.根据项1至5中任一项所述的方法,其中与施用所述RNA疫苗之前相比,向多个个体施用所述RNA疫苗导致在所述多个个体中的至少约70%的个体的所述外周血中对新表位特异性CD4+或CD8+T细胞的诱导,其中所述新表位特异性CD4+或CD8+T细胞对由所述RNA疫苗的所述一种或多种多核苷酸编码的所述新表位中的至少一者具有特异性,并且其中通过离体ELISPOT或MHC多聚体分析来评定对新表位特异性CD4+或CD8+T细胞的所述诱导。

[0693] 7.根据项1至6中任一项所述的方法,其中与施用所述RNA疫苗之前的一种或多种炎症性细胞因子的水平相比,向所述个体施用所述RNA疫苗导致所述个体的所述外周血中的所述一种或多种炎症性细胞因子的所述水平升高。

[0694] 8.根据项7所述的方法,其中在施用所述RNA疫苗后约4小时至约6

[0695] 小时之间,所述个体的所述外周血中存在所述一种或多种炎症性细胞因子的所述水平的所述升高。

[0696] 9.根据项7或项8所述的方法,其中所述一种或多种炎症性细胞因子选自由以下项组成的组:IFNγ、IFNα、IL-12和IL-6。

[0697] 10.一种在个体中诱导新表位特异性CD8+T细胞向肿瘤的运输的方法,其包括向所述个体施用有效量的RNA疫苗,其中所述RNA疫苗包含一种或多种多核苷酸,所述一种或多种多核苷酸编码由在获得自所述个体的肿瘤样本中存在的癌症特异性体细胞突变产生的一个或多个新表位,并且其中在施用所述RNA疫苗后运输至所述肿瘤的所述新表位特异性CD8+T细胞对由所述RNA疫苗的所述一种或多种多核苷酸编码的所述新表位中的至少一者具有特异性。

[0698] 11.根据项1至10中任一项所述的方法,其中所述新表位特异性CD8+

[0699] T细胞具有记忆表型。

[0700] 12.根据项11所述的方法,其中具有记忆表型的所述新表位特异性CD8+T细胞为效应记忆T细胞(T_{em})。

[0701] 13.根据项12所述的方法,其中所述效应记忆T细胞(T_{em})为CD45RO

[0702] 阳性和CCR7阴性。

[0703] 14.根据项1至13中任一项所述的方法,其中所述新表位特异性CD8+

[0704] T细胞为PD-1+。

[0705] 15.根据项1至14中任一项所述的方法,其中所述个体患有具有低至中等突变负荷的肿瘤。

[0706] 16.根据项1至15中任一项所述的方法,其中所述个体具有低肿瘤负荷。

[0707] 17.根据项1至16中任一项所述的方法,其中所述肿瘤具有低或阴性PD-L1表达。

[0708] 18.根据项17所述的方法,其中获得自所述肿瘤的样品中的少于5%的肿瘤细胞表达PD-L1。

[0709] 19.根据项17所述的方法,其中获得自所述肿瘤的样品中的少于5%的免疫细胞表达PD-L1。

[0710] 20.根据项18或项19所述的方法,其中使用免疫组织化学确定获得自所述肿瘤的样品中表达PD-L1的肿瘤细胞或免疫细胞的百分比。

[0711] 21.根据项1至20中任一项所述的方法,其中所述RNA疫苗的施用导致所述个体中的完全缓解(CR)或部分缓解(PR)。

[0712] 22.根据项1至21中任一项所述的方法,其中所述个体患有局部晚期或转移性实体瘤或者具有一种或多种转移性复发。

[0713] 23.根据项1至22中任一项所述的方法,其中所述肿瘤为非小细胞肺癌(NSCLC)、膀胱、肾、头颈部、肉瘤、乳腺、黑素瘤、前列腺、卵巢、胃、肝、尿路上皮、结肠、肾脏、子宫颈、Merkel细胞癌(MCC)、子宫内膜、软组织肉瘤、食管、食管胃交界部、骨肉瘤、甲状腺或结直肠肿瘤。

[0714] 24.根据项23所述的方法,其中所述乳腺肿瘤为三阴性乳腺癌(TNBC)

[0715] 肿瘤。

[0716] 25.根据项23所述的方法,其中所述肿瘤为尿路上皮肿瘤,并且其中向多个个体施用所述RNA疫苗导致所述多个个体中至少约10%的个体中的客观缓解。

[0717] 26.根据项23所述的方法,其中所述肿瘤为肾肿瘤,并且其中向多个个体施用所述RNA疫苗导致所述多个个体中至少约22%的个体中的客观缓解。

[0718] 27.根据项23所述的方法,其中所述肿瘤为黑素瘤肿瘤,并且其中向多个个体施用所述RNA疫苗导致所述多个个体中至少约30%的个体中的客观缓解。

[0719] 28.根据项24所述的方法,其中所述肿瘤为TNBC肿瘤,并且其中向多个个体施用所述RNA疫苗导致所述多个个体中至少约4%的个体中的客观缓解。

[0720] 29.根据项23所述的方法,其中所述肿瘤为NSCLC肿瘤,并且其中向多个个体施用所述RNA疫苗导致所述多个个体中至少约10%的个体中的客观缓解。

[0721] 30.根据项1至29中任一项所述的方法,其中在施用所述RNA疫苗之前,所述个体已经接受过一种或多种癌症疗法或3种与5种之间的癌症疗法的治疗。

[0722] 31.根据项1至29中任一项所述的方法,其中在施用所述RNA疫苗之前,所述个体已经接受过约1种至约17种之间或约1种至约9种之间的在先全身性癌症疗法的治疗。

[0723] 32.根据项1至31中任一项所述的方法,其中在施用所述RNA疫苗之前,所述个体已经接受过检查点抑制剂疗法的治疗。

[0724] 33.根据项1至31中任一项所述的方法,其中在施用所述RNA疫苗之前,所述个体尚未接受过检查点抑制剂疗法的治疗。

[0725] 34.根据项1至33中任一项所述的方法,其中所述RNA疫苗包含一种或多种多核苷酸,所述一种或多种多核苷酸编码10至20个由在所述肿瘤样本中存在的癌症特异性体细胞突变产生新表位。

[0726] 35.根据项1至34中任一项所述的方法,其中所述RNA疫苗被配制在脂质体复合物

纳米颗粒或脂质体中。

[0727] 36.根据项35所述的方法,其中所述脂质体复合物纳米颗粒或脂质体包含一种或多种脂质,所述一种或多种脂质形成包封所述RNA疫苗的所述RNA的多层结构。

[0728] 37.根据项36所述的方法,其中所述一种或多种脂质包含至少一种阳离子脂质和至少一种辅助脂质。

[0729] 38.根据项36所述的方法,其中所述一种或多种脂质包含(R)-N,N,N-三甲基-2,3-二油酰氧基-1-丙铵氯化物(DOTMA)和1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DOPE)。

[0730] 39.根据项38所述的方法,其中在生理pH,所述脂质体的正电荷与负电荷的总电荷比为1.3:2(0.65)。

[0731] 40.根据项1至39中任一项所述的方法,其中所述RNA疫苗以约15μg、约25μg、约38μg、约50μg、约75μg或约100μg的剂量施用于所述个体。

[0732] 41.根据项1至40中任一项所述的方法,其中所述RNA疫苗静脉内施用于所述个体。

[0733] 42.根据项1至41中任一项所述的方法,其中所述RNA疫苗以7天或

[0734] 1周的间隔施用于所述个体。

[0735] 43.根据项1至41中任一项所述的方法,其中所述RNA疫苗以14天或

[0736] 2周的间隔施用于所述个体。

[0737] 44.根据项42或项43所述的方法,其中所述RNA疫苗施用于所述个体达12周或84天。

[0738] 45.根据项1至41中任一项所述的方法,其中所述RNA疫苗以21天周期施用于所述个体,其中所述RNA疫苗在第1周期的第1天、第8天和第15天;第2周期的第1天、第8天和第15天;第3周期的第1天和第15天;以及第7周期的第1天施用于所述个体。

[0739] 46.根据项45所述的方法,其进一步包括在第13周期的第1天并且在之后每24周或168天施用所述RNA疫苗。

[0740] 47.根据项46所述的方法,其中所述RNA疫苗的施用持续直至所述个体发生疾病进展为止。

[0741] 48.根据项1至41中任一项所述的方法,其中所述RNA疫苗在诱导期和所述诱导期之后的维持期施用于所述个体,其中所述RNA疫苗在所述诱导期期间以1周或2周的间隔施用于所述个体,并且其中所述RNA疫苗在所述维持期期间以24周的间隔施用于所述个体。

[0742] 49.根据项1至41中任一项所述的方法,其中所述RNA疫苗在诱导期和所述诱导期之后的维持期施用于所述个体,其中所述RNA疫苗在所述诱导期期间以7天或14天的间隔施用于所述个体,并且其中所述RNA疫苗在所述维持期期间以168天的间隔施用于所述个体。

[0743] 50.根据项1至41中任一项所述的方法,其中所述RNA疫苗在诱导期和所述诱导期后的维持期施用于所述个体,其中所述RNA疫苗以21天周期施用于所述个体;

[0744] 其中,在所述诱导期期间,所述RNA疫苗在第1周期的第1天、第8天和第15天;第2周期的第1天、第8天和第15天;第3周期的第1天和第15天;以及第7周期的第1天施用于所述个体;并且

[0745] 其中,在所述维持期期间,所述RNA疫苗在第13周期的第1天施用于所述个体并且在之后每24周或168天施用一次。

[0746] 51.根据项48或项49所述的方法,其中所述诱导期包括施用至多9次所述RNA疫苗。

[0747] 52.根据项48至51中任一项所述的方法,其中所述维持期持续直至所述个体发生疾病进展为止。

[0748] 53.根据项1至52中任一项所述的方法,其中所述RNA疫苗包含RNA分子,所述RNA分子在5'→3'方向上包含:

[0749] (1)5'帽;

[0750] (2)5'非翻译区(UTR);

[0751] (3)编码分泌性信号肽的多核苷酸序列;

[0752] (4)编码由在所述肿瘤样本中存在的癌症特异性体细胞突变产生的所述一个或多个新表位的多核苷酸序列;

[0753] (5)编码主要组织相容性复合物(MHC)分子的跨膜和胞质结构域的至少一部分的多核苷酸序列;

[0754] (6)3'UTR,其包含:

[0755] (a)分裂的氨基末端增强子(AES)mRNA的3'非翻译区或其片段;和

[0756] (b)线粒体编码的12S RNA的非编码RNA或其片段;以及

[0757] (7)poly(A)序列。

[0758] 54.根据项53所述的方法,其中所述RNA分子进一步包含编码氨基酸接头的多核苷酸序列;其中编码所述氨基酸接头的所述多核苷酸序列与所述一个或多个新表位中的第一个形成第一接头-新表位模块;并且其中在5'→3'方向上,形成所述第一接头-新表位模块的所述多核苷酸序列在编码所述分泌性信号肽的所述多核苷酸序列与编码所述MHC分子的所述跨膜和胞质结构域的所述至少一部分的所述多核苷酸序列之间。

[0759] 55.根据项54所述的方法,其中所述氨基酸接头包含序列GGSGGGGSGG(SEQ ID NO:39)。

[0760] 56.根据项54所述的方法,其中编码所述氨基酸接头的所述多核苷酸序列包含序列GGCGGCUCUGGAGGAGGCGGCUCCGGAGGC(SEQID NO:37)。

[0761] 57.根据项54至56中任一项所述的方法,其中所述RNA分子在5′→3′

[0762] 方向上进一步包含:至少第二接头-表位模块,其中所述至少第二接头-表位模块包含编码氨基酸接头的多核苷酸序列和编码新表位的多核苷酸序列;其中在5'→3'方向上,形成所述第二接头-新表位模块的所述多核苷酸序列在编码所述第一接头-新表位模块的所述新表位的所述多核苷酸序列与编码所述MHC分子的所述跨膜和胞质结构域的所述至少一部分的所述多核苷酸序列之间;并且其中所述第一接头-表位模块的所述新表位不同于所述第二接头-表位模块的所述新表位。

[0763] 58.根据项57所述的方法,其中所述RNA分子包含5个接头-表位模块,并且其中所述5个接头-表位模块各自编码不同的新表位。

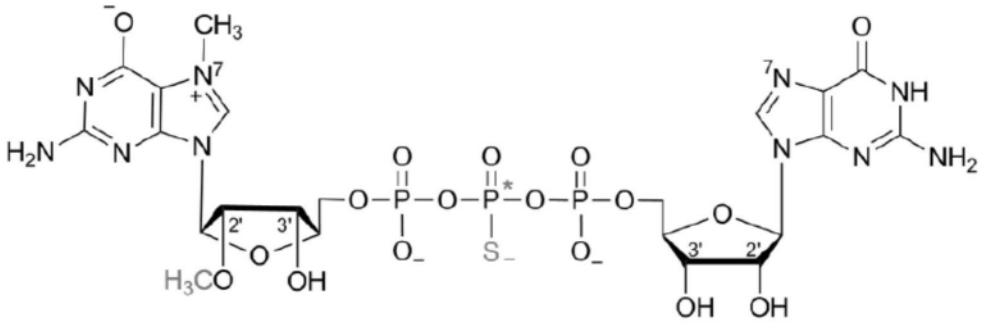
[0764] 59.根据项57所述的方法,其中所述RNA分子包含10个接头-表位模块,并且其中所述10个接头-表位模块各自编码不同的新表位。

[0765] 60.根据项57所述的方法,其中所述RNA分子包含20个接头-表位模块,并且其中所述20个接头-表位模块各自编码不同的新表位。

[0766] 61.根据项53至60中任一项所述的方法,其中所述RNA分子进一步包含编码氨基酸接头的第二多核苷酸序列,其中编码所述氨基酸接头的所述第二多核苷酸序列在编码3'方

向上最远的所述新表位的所述多核苷酸序列与编码所述MHC分子的所述跨膜和胞质结构域的所述至少一部分的所述多核苷酸序列之间。

[0767] 62.根据项53至61中任一项所述的方法，其中所述5′帽包含以下结构的D1非对映异构体：

[0768] 

[0769] 63.根据项53至62中任一项所述的方法，其中所述5'UTR包含序列UUCUUCUGGUCCCCACAGACUCAGAGAGAACCCGCCACC(SEQID NO:23)。

[0770] 64.根据项53至62中任一项所述的方法，其中所述5'UTR包含序列

[0771] GGCGAACUAGUAUUCUUCUGGUCCCCACAGACUCAGAG

[0772] AGAACCCGCCACC(SEQ ID NO:21)。

[0773] 65.根据项53至64中任一项所述的方法，其中所述分泌性信号肽包含氨基酸序列MRVMAPRTLILLLSGALALTETWAGS(SEQ ID NO:27)。

[0774] 66.根据项53至64中任一项所述的方法，其中编码所述分泌性信号肽的所述多核苷酸序列包含序列AUGAGAGUGAUGGCCCCC

[0775] AGAACCCUGAUCCUGCUGCUGUCUGGCGCCCUGGCCCUGACAGAGACAUGGGCCGGAAGC(SEQ ID NO:25)。

[0776] 67.根据项53至66中任一项所述的方法，其中所述MHC分子的所述跨膜和胞质结构域的所述至少一部分包含氨基酸序列IVGIVAGLAVLAVVVIGAVVATVMCRRKSSGGKGGSYSQAASSDSAQGSDVSLTA(SEQ ID NO:30)。

[0777] 68.根据项53至66中任一项所述的方法，其中编码所述MHC分子的所述跨膜和胞质结构域的所述至少一部分的所述多核苷酸序列包含序列AUCGUGGGAAUUGUGGCAGGACUGGCAGUGCUGG

[0778] CCGUGGUGGUGAUCGGAGCCGUGGUGGCUACCGUGAUGUGCA

[0779] GACGGAAGUCCAGCGGAGGCAAGGGCGGCAGCUACAGCCAGG

[0780] CCGCCAGCUCUGAUAGCGCCCAGGGCAGCGACGUGUCACUGACAGCC(SEQ ID NO:28)。

[0781] 69.根据项53至68中任一项所述的方法，其中所述AES mRNA的所述3′非翻译区包含序列CUGGUACUGCAUGCACGCAAUGC

[0782] UAGCUGCCCCUUUCCCGUCCUGGGUACCCCGAGUCUCCCCCG

[0783] ACCUCGGGUCCCAGGUAUGCUCCCACCUCCACCUGCCCCACUCACCACCUCUGCUAGUUCCAGACACCUCC(SEQ ID NO:33)。

[0784] 70.根据项53至69中任一项所述的方法，其中所述线粒体编码的12S

[0785] RNA的非编码RNA包含序列CAAGCACGCAGCAAUGCA

[0786] GCUCAAAACGCUUAGCCUAGCCACACCCCCACGGGAAACAGC

[0787] AGUGAUUAACCUUUAGCAAUAAACGAAAGUUUAACUAAGCU

[0788] AUACUAACCCCAGGGUUGGUCAAUUUCGUGCCAGCCACACCG

[0789] (SEQ ID NO:35)。

[0790] 71.根据项53至70中任一项所述的方法,其中所述3'UTR包含序列

[0791] CUCGAGCUGGUACUGCAUGCACGCAAUGCUAGCUGCCC

[0792] CUUUCCCGUCCUGGGUACCCCGAGUCUCCCCCGACCUCGGGU

[0793] CCCAGGUAUGCUCCCACCUCCACCUGCCCCACUCACCACCUCU

[0794] GCUAGUUCCAGACACCUCCCAAGCACGCAGCAAUGCAGCUCA

[0795] AAACGCUUAGCCUAGCCACACCCCCACGGGAAACAGCAGUGA

[0796] UUAACCUUUAGCAAUAAACGAAAGUUUAACUAAGCUAUACU

[0797] AACCCCAGGGUUGGUCAAUUUCGUGCCAGCCACACCGAGACCUGGUCCAGAGUCGCUAGCCGCGUCGCU (SEQ ID NO:31)。

[0798] 72.根据项53至71中任一项所述的方法,其中所述poly(A)序列包含120个腺嘌呤核苷酸。

[0799] 73.根据项1至52中任一项所述的方法,其中所述RNA疫苗包含RNA分子,所述RNA分子在5'→3'方向上包含:

[0800] 多核苷酸序列GGCGAACUAGUAUUCUUCUGGUCCCCACAGAC

[0801] UCAGAGAGAACCCGCCACCAUGAGAGUGAUGGCCCCCAG

[0802] AACCCUGAUCCUGCUGCUGUCUGGCGCCCUGGCCCUGACAGAGACAUGGGCCGGAAGC(SEQ ID NO:19);

[0803] 编码由在所述肿瘤样本中存在的癌症特异性体细胞突变产生的所述一个或多个新表位的多核苷酸序列;以及

[0804] 多核苷酸序列AUCGUGGGAAUUGUGGCAGGACUGGCAGUGC

[0805] UGGCCGUGGUGGUGAUCGGAGCCGUGGUGGCUACCGUG

[0806] AUGUGCAGACGGAAGUCCAGCGGAGGCAAGGGCGGCAGC

[0807] UACAGCCAGGCCGCCAGCUCUGAUAGCGCCCAGGGCAGC

[0808] GACGUGUCACUGACAGCCUAGUAACUCGAGCUGGUACUG

[0809] CAUGCACGCAAUGCUAGCUGCCCCUUUCCCGUCCUGGGU

[0810] ACCCCGAGUCUCCCCCGACCUCGGGUCCCAGGUAUGCUC

[0811] CCACCUCCACCUGCCCCACUCACCACCUCUGCUAGUUCCA

[0812] GACACCUCCCAAGCACGCAGCAAUGCAGCUCAAAACGCU

[0813] UAGCCUAGCCACACCCCCACGGGAAACAGCAGUGAUUAA

[0814] CCUUUAGCAAUAAACGAAAGUUUAACUAAGCUAUACUA

[0815] ACCCCAGGGUUGGUCAAUUUCGUGCCAGCCACACCGAGACCUGGUCCAGAGUCGCUAGCCGCGUCGCU (SEQ ID

[0816] NO:20)。

[0817] 74.根据项1至73中任一项所述的方法,其进一步包括向所述个体施用PD-1轴结合拮抗剂。

[0818] 75.根据项74所述的方法,其中所述PD-1轴结合拮抗剂为PD-1结合拮抗剂。

[0819] 76.根据项75所述的方法,其中所述PD-1结合拮抗剂为抗PD-1抗体。

[0820] 77.根据项76所述的方法,其中所述抗PD-1抗体为纳武单抗或派姆单抗。

[0821] 78.根据项74所述的方法,其中所述PD-1轴结合拮抗剂为PD-L1结合拮抗剂。

[0822] 79.根据项78所述的方法,其中所述PD-L1结合拮抗剂为抗PD-L1抗体。

[0823] 80.根据项79所述的方法,其中所述抗PD-L1抗体为阿维单抗或德瓦鲁单抗。

[0824] 81.根据项79所述的方法,其中所述抗PD-L1抗体包含:

[0825] (a)重链可变区(VH),所述重链可变区包含:HVR-H1,其包含GFTFSDSWIH(SEQ ID NO:1)的氨基酸序列;HVR-2,其包含AWISPYGGSTYYADSVKG(SEQ ID NO:2)的氨基酸序列;和HVR-3,其包含氨基酸RHWPGGFDY(SEQ ID NO:3);以及

[0826] (b)轻链可变区(VL),所述轻链可变区包含:HVR-L1,其包含RASQDVSTAVA(SEQ ID NO:4)的氨基酸序列;HVR-L2,其包含SASFLYS(SEQ ID NO:5)的氨基酸序列;和HVR-L3,其包含QQYLYHPAT(SEQ ID NO:6)的氨基酸序列。

[0827] 82.根据项79所述的方法,其中所述抗PD-L1抗体包含重链可变区(V_H)和轻链可变区(V_L),所述重链可变区包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列。

[0828] 83.根据项79所述的方法,其中所述抗PD-L1抗体为阿特珠单抗。

[0829] 84.根据项74至83中任一项所述的方法,其中所述PD-1轴结合拮抗剂静脉内施用于所述个体。

[0830] 85.根据项79至84中任一项所述的方法,其中所述抗PD-L1抗体以约1200mg的剂量施用于所述个体。

[0831] 86.根据项74至85中任一项所述的方法,其中所述PD-1轴结合拮抗剂以21天或3周的间隔施用于所述个体。

[0832] 87.根据项83至86中任一项所述的方法,其中所述阿特珠单抗以21天周期施用于所述个体,其中阿特珠单抗在第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11和12周期中的每个周期的第1天施用。

[0833] 88.根据项87所述的方法,其进一步包括在第13周期的第1天并且在之后每3周或21天施用阿特珠单抗。

[0834] 89.根据项88所述的方法,其中阿特珠单抗的施用持续直至所述个体发生疾病进展为止。

[0835] 90.根据项83至86中任一项所述的方法,其中所述阿特珠单抗在诱导期期间和所述诱导期后的维持期期间以21天周期施用于所述个体;其中,在所述诱导期期间,阿特珠单抗在第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11和12周期中的每个周期的第1天施用;并且其中,在所述诱导期后的所述维持期期间,阿特珠单抗在第13周期的第1天并且在之后每3周或21天施用。

[0836] 91.根据项90所述的方法,其中所述维持期持续直至所述个体发生疾病进展为止。

[0837] 92.根据项1至91中任一项所述的方法,其中所述个体为人。

[0838] 93.一种用于在患有肿瘤的个体中诱导新表位特异性CD8+T细胞的方法中使用的RNA疫苗,所述方法包括向所述个体施用有效量的所述RNA疫苗,其中所述RNA疫苗包含一种

或多种多核苷酸,所述一种或多种多核苷酸编码由在获得自所述个体的肿瘤样本中存在的癌症特异性体细胞突变产生的一个或多个新表位,并且其中在施用所述RNA疫苗后获得自所述个体的外周血样品中约1%至约6%的CD8+T细胞为对由所述RNA疫苗的所述一种或多种多核苷酸编码的所述新表位中的至少一者具有特异性的新表位特异性CD8+T细胞。

[0839] 94.一种用于在个体中诱导新表位特异性CD8+T细胞向肿瘤的运输的方法中使用的RNA疫苗,所述方法包括向所述个体施用有效量的所述RNA疫苗,其中所述RNA疫苗包含一种或多种多核苷酸,所述一种或多种多核苷酸编码由在获得自所述个体的肿瘤样本中存在的癌症特异性体细胞突变产生的一个或多个新表位,并且其中在施用所述RNA疫苗后运输至所述肿瘤的所述新表位特异性CD8+T细胞对由所述RNA疫苗的所述一种或多种多核苷酸编码的所述新表位中的至少一者具有特异性。

[0840] 95.根据项93或项94所述使用的RNA疫苗,其中所述方法进一步包括向所述个体施用PD-1轴结合拮抗剂。

[0841] 96.一种用于在患有肿瘤的个体中诱导新表位特异性CD8+T细胞的方法中使用的PD-1轴结合拮抗剂,所述方法包括向所述个体施用有效量的所述PD-1轴结合拮抗剂和RNA疫苗,其中所述RNA疫苗包含一种或多种多核苷酸,所述一种或多种多核苷酸编码由在获得自所述个体的肿瘤样本中存在的癌症特异性体细胞突变产生的一个或多个新表位,并且其中在施用所述PD-1轴结合拮抗剂和所述RNA疫苗后获得自所述个体的外周血样品中约1%至约6%的CD8+T细胞为对由所述RNA疫苗的所述一种或多种多核苷酸编码的所述新表位中的至少一者具有特异性的新表位特异性CD8+T细胞。

[0842] 97.一种用于在个体中诱导新表位特异性CD8+T细胞向肿瘤的运输的方法中使用的PD-1轴结合拮抗剂,所述方法包括向所述个体施用有效量的所述PD-1轴结合拮抗剂和RNA疫苗,其中所述RNA疫苗包含一种或多种多核苷酸,所述一种或多种多核苷酸编码由在获得自所述个体的肿瘤样本中存在的癌症特异性体细胞突变产生的一个或多个新表位,并且其中在施用所述PD-1轴结合拮抗剂和所述RNA疫苗后运输至所述肿瘤的所述新表位特异性CD8+T细胞对由所述RNA疫苗的所述一种或多种多核苷酸编码的所述新表位中的至少一者具有特异性。

[0843] 98.一种在患有肿瘤的个体中诱导新表位特异性CD8+T细胞的方法,其包括向所述个体施用有效量的RNA疫苗,其中所述RNA疫苗包含一种或多种多核苷酸,所述一种或多种多核苷酸编码由在获得自所述个体的肿瘤样本中存在的癌症特异性体细胞突变产生的一个或多个新表位,并且其中在施用所述RNA疫苗后获得自所述个体的外周血样品中至少约1%的CD8+T细胞为对由所述RNA疫苗的所述一种或多种多核苷酸编码的所述新表位中的至少一者具有特异性的新表位特异性CD8+T细胞。

[0844] 99.一种用于在患有肿瘤的个体中诱导新表位特异性CD8+T细胞的方法中使用的RNA疫苗,所述方法包括向所述个体施用有效量的所述RNA疫苗,其中所述RNA疫苗包含一种或多种多核苷酸,所述一种或多种多核苷酸编码由在获得自所述个体的肿瘤样本中存在的癌症特异性体细胞突变产生的一个或多个新表位,并且其中在施用所述RNA疫苗后获得自所述个体的外周血样品中至少约1%的CD8+T细胞为对由所述RNA疫苗的所述一种或多种多核苷酸编码的所述新表位中的至少一者具有特异性的新表位特异性CD8+T细胞。

[0845] 100.一种用于在患有肿瘤的个体中诱导新表位特异性CD8+T细胞的方法中使用的

PD-1轴结合拮抗剂,所述方法包括向所述个体施用有效量的所述PD-1轴结合拮抗剂和RNA疫苗,其中所述RNA疫苗包含一种或多种多核苷酸,所述一种或多种多核苷酸编码由在获得自所述个体的肿瘤样本中存在的癌症特异性体细胞突变产生的一个或多个新表位,并且其中在施用所述PD-1轴结合拮抗剂和所述RNA疫苗后获得自所述个体的外周血样品中至少约1%的CD8+T细胞为对由所述RNA疫苗的所述一种或多种多核苷酸编码的所述新表位中的至少一者具有特异性的新表位特异性CD8+T细胞。

[0846] 序列

[0847] 所有多核苷酸序列均按5'→3'方向显示。所有多肽序列均按N末端至C末端方向显示。

[0848] 抗PDL1抗体HVR-H1序列(SEQ ID NO:1)

[0849] GFTFSDSWIH

[0850] 抗PDL1抗体HVR-H2序列(SEQ ID NO:2)

[0851] AWISPYGGSTYYADSVKG

[0852] 抗PDL1抗体HVR-H3序列(SEQ ID NO:3)

[0853] RHWPGGFDY

[0854] 抗PDL1抗体HVR-L1序列(SEQ ID NO:4)

[0855] RASQDVSTAVA

[0856] 抗PDL1抗体HVR-L2序列(SEQ ID NO:5)

[0857] SASFLYS

[0858] 抗PDL1抗体HVR-L3序列(SEQ ID NO:6)

[0859] QQYLYHPAT

[0860] 抗PDL1抗体VH序列(SEQ ID NO:7)

[0861] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTLVTVSS

[0862] 抗PDL1抗体VL序列(SEQ ID NO:8)

[0863] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIY SASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIKR

[0864] 抗PDL1抗体重链序列(SEQ ID NO:9)

[0865] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

[0866] 抗PDL1抗体轻链序列(SEQ ID NO:10)

[0867] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0868] 纳武单抗重链序列(SEQ ID NO:11)

[0869] QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSKRYYADSVKGRFT ISRDNSKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCATNDDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCP APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG

[0870] 纳武单抗轻链序列(SEQ ID NO:12)

[0871] EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGT DFTLTISSLEPEDFAVYYCQQSSNWPRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0872] 派姆单抗重链序列(SEQ ID NO:13)

[0873] QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYMYWVRQAPGQGLEWMGGINPSNGGTNFNEKFKNRVT LTTDSSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDYRFDMGFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYG PPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG

[0874] 派姆单抗轻链序列(SEQ ID NO:14)

[0875] EIVLTQSPAT

[0876] LSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQKPGQAPRLLIYLASYLESGVPARFSGSGSGTDFTLTI SSLEPEDFAVYYCQHSRDLPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0877] 阿维单抗重链序列(SEQ ID NO:15)

[0878] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMMWVRQAPGKGLEWVSSIYPSGGITFYADTVKGRFT ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARIKLGTVTTVDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

[0879] 阿维单抗轻链序列(SEQ ID NO:16)

[0880] QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIYDVSNRPSGVSNRFSGSKS GNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTRVFGTGTKVTVLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPG AVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

[0881] 德瓦鲁单抗重链序列(SEQ ID NO:17)

[0882] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFT ISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGGWFGELAFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKS CDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY

PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

[0883] 德瓦鲁单抗轻链序列(SEQ ID NO:18)

[0884] EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQRVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASSRATGIPDRFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSLPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0885] 完整PCV RNA 5′恒定序列(SEQ ID NO:19)

[0886] GGCGAACUAGUAUUCUUCUGGUCCCCACAGACUCAGAGAGAACCCGCCACCAUGAGAGUGAUGGCCCCC AGAACCCUGAUCCUGCUGCUGUCUGGCGCCCUGGCCCUGACAGAGACAUGGGCCGGAAGC

[0887] 完整PCV RNA 3′恒定序列(SEQ ID NO:20)

[0888] AUCGUGGGAAUUGUGGCAGGACUGGCAGUGCUGGCCGUGGUGGUGAUCGGAGCCGUGGUGGCUACCGUG AUGUGCAGACGGAAGUCCAGCGGAGGCAAGGGCGGCAGCUACAGCCAGGCCGCCAGCUCUGAUAGCGCCCAGGGCAG CGACGUGUCACUGACAGCCUAGUAACUCGAGCUGGUACUGCAUGCACGCAAUGCUAGCUGCCCCUUUCCCGUCCUGG GUACCCCGAGUCUCCCCCGACCUCGGGUCCCAGGUAUGCUCCCACCUCCACCUGCCCCACUCACCACCUCUGCUAGU UCCAGACACCUCCCAAGCACGCAGCAAUGCAGCUCAAAACGCUUAGCCUAGCCACACCCCCACGGGAAACAGCAGUG AUUAACCUUUAGCAAUAAACGAAAGUUUAACUAAGCUAUACUAACCCCAGGGUUGGUCAAUUUCGUGCCAGCCACAC CGAGACCUGGUCCAGAGUCGCUAGCCGCGUCGCU

[0889] 完整PCV Kozak RNA(SEQ ID NO:21)

[0890] GGCGAACUAGUAUUCUUCUGGUCCCCACAGACUCAGAGAGAACCCGCCACC

[0891] 完整PCV Kozak DNA(SEQ ID NO:22)

[0892] GGCGAACTAGTATTCTTCTGGTCCCCACAGACTCAGAGAGAACCCGCCACC

[0893] 短Kozak RNA(SEQ ID NO:23)

[0894] UUCUUCUGGUCCCCACAGACUCAGAGAGAACCCGCCACC

[0895] 短Kozak DNA(SEQ ID NO:24)

[0896] TTCTTCTGGTCCCCACAGACTCAGAGAGAACCCGCCACC

[0897] sec RNA(SEQ ID NO:25)

[0898] AUGAGAGUGAUGGCCCCCAGAACCCUGAUCCUGCUGCUGUCUGGCGCCCUGGCCCUGACAGAGACAUGG GCCGGAAGC

[0899] sec DNA(SEQ ID NO:26)

[0900] ATGAGAGTGATGGCCCCCAGAACCCTGATCCTGCTGCTGTCTGGCGCCCTGGCCCTGACAGAGACATGG GCCGGAAGC

[0901] sec蛋白(SEQ ID NO:27)

[0902] MRVMAPRTLILLLSGALALTETWAGS

[0903] MITD RNA(SEQ ID NO:28)

[0904] AUCGUGGGAAUUGUGGCAGGACUGGCAGUGCUGGCCGUGGUGGUGAUCGGAGCCGUGGUGGCUACCGUG AUGUGCAGACGGAAGUCCAGCGGAGGCAAGGGCGGCAGCUACAGCCAGGCCGCCAGCUCUGAUAGCGCCCAGGGCAG CGACGUGUCACUGACAGCC

[0905] MITD DNA(SEQ ID NO:29)

[0906] ATCGTGGGAATTGTGGCAGGACTGGCAGTGCTGGCCGTGGTGGTGATCGGAGCCGTGGTGGCTACCGTG ATGTGCAGACGGAAGTCCAGCGGAGGCAAGGGCGGCAGCTACAGCCAGGCCGCCAGCTCTGATAGCGCCCAGGGCAG

CGACGTGTCACTGACAGCC

[0907] MITD蛋白(SEQ ID NO:30)

[0908] IVGIVAGLAVLAVVVIGAVVATVMCRRKSSGGKGGSYSQAASSDSAQGSDVSLTA

[0909] 完整PCV FI RNA(SEQ ID NO:31)

[0910] CUCGAGCUGGUACUGCAUGCACGCAAUGCUAGCUGCCCCUUUCCCGUCCUGGGUACCCCGAGUCUCCCCCGACCUCGGGUCCCAGGUAUGCUCCCACCUCCACCUGCCCCACUCACCACCUCUGCUAGUUCCAGACACCUCCCAAGCACGCAGCAAUGCAGCUCAAAACGCUUAGCCUAGCCACACCCCCACGGGAAACAGCAGUGAUUAACCUUUAGCAAUAAACGAAAGUUUAACUAAGCUAUACUAACCCCAGGGUUGGUCAAUUUCGUGCCAGCCACACCGAGACCUGGUCCAGAGUCGCUAGCCGCGUCGCU

[0911] 完整PCV FI DNA(SEQ ID NO:32)

[0912] CTGGTACTGCATGCACGCAATGCTAGCTGCCCCTTTCCCGTCCTGGGTACCCCGAGTCTCCCCCGACCTCGGGTCCCAGGTATGCTCCCACCTCCACCTGCCCCACTCACCACCTCTGCTAGTTCCAGACACCTCCCAAGCACGCAGCAATGCAGCTCAAAACGCTTAGCCTAGCCACACCCCCACGGGAAACAGCAGTGATTAACCTTTAGCAATAAACGAAAGTTTAACTAAGCTATACTAACCCCAGGGTTGGTCAATTTCGTGCCAGCCACACCGAGACCTGGTCCAGAGTCGCTAGCCGCGTCGCT

[0913] F元件RNA(SEQ ID NO:33)

[0914] CUGGUACUGCAUGCACGCAAUGCUAGCUGCCCCUUUCCCGUCCUGGGUACCCCGAGUCUCCCCCGACCUCGGGUCCCAGGUAUGCUCCCACCUCCACCUGCCCCACUCACCACCUCUGCUAGUUCCAGACACCUCC

[0915] F元件DNA(SEQ ID NO:34)

[0916] CTGGTACTGCATGCACGCAATGCTAGCTGCCCCTTTCCCGTCCTGGGTACCCCGAGTCTCCCCCGACCTCGGGTCCCAGGTATGCTCCCACCTCCACCTGCCCCACTCACCACCTCTGCTAGTTCCAGACACCTCC

[0917] I元件RNA(SEQ ID NO:35)

[0918] CAAGCACGCAGCAAUGCAGCUCAAAACGCUUAGCCUAGCCACACCCCCACGGGAAACAGCAGUGAUUAACCUUUAGCAAUAAACGAAAGUUUAACUAAGCUAUACUAACCCCAGGGUUGGUCAAUUUCGUGCCAGCCACACCG

[0919] I元件DNA(SEQ ID NO:36)

[0920] CAAGCACGCAGCAATGCAGCTCAAAACGCTTAGCCTAGCCACACCCCCACGGGAAACAGCAGTGATTAACCTTTAGCAATAAACGAAAGTTTAACTAAGCTATACTAACCCCAGGGTTGGTCAATTTCGTGCCAGCCACACCG

[0921] 接头RNA(SEQ ID NO:37)

[0922] GGCGGCUCUGGAGGAGGCGGCUCCGGAGGC

[0923] 接头DNA(SEQ ID NO:38)

[0924] GGCGGCTCTGGAGGAGGCGGCTCCGGAGGC

[0925] 接头蛋白(SEQ ID NO:39)

[0926] GGSGGGGSGG

[0927] 完整PCV DNA 5′恒定序列(SEQ ID NO:40)

[0928] GGCGAACTAGTATTCTTCTGGTCCCCACAGACTCAGAGAGAACCCGCCACCATGAGAGTGATGGCCCCCAGAACCCTGATCCTGCTGCTGTCTGGCGCCCTGGCCCTGACAGAGACATGGGCCGGAAGC

[0929] 完整PCV DNA 3′恒定序列(SEQ ID NO:41)

[0930] ATCGTGGGAATTGTGGCAGGACTGGCAGTGCTGGCCGTGGTGGTGATCGGAGCCGTGGTGGCTACCGTGATGTGCAGACGGAAGTCCAGCGGAGGCAAGGGCGGCAGCTACAGCCAGGCCGCCAGCTCTGATAGCGCCCAGGGCAG

CGACGTGTCACTGACAGCCTAGTAACTCGAGCTGGTACTGCATGCACGCAATGCTAGCTGCCCCTTTCCCGTCCTGG GTACCCCGAGTCTCCCCCGACCTCGGGTCCCAGGTATGCTCCCACCTCCACCTGCCCCACTCACCACCTCTGCTAGT TCCAGACACCTCCCAAGCACGCAGCAATGCAGCTCAAAACGCTTAGCCTAGCCACACCCCCACGGGAAACAGCAGTG ATTAACCTTTAGCAATAAACGAAAGTTTAACTAAGCTATACTAACCCCAGGGTTGGTCAATTTCGTGCCAGCCACAC CGAGACCTGGTCCAGAGTCGCTAGCCGCGTCGCT

[0931] 包含来自帽的5′GG的完整PCV RNA(SEQ ID NO:42)

[0932] GGGGCGAACU AGUAUUCUUC UGGUCCCCAC AGACUCAGAG AGAACCCGCC ACCAUGAGAG UGAUGGCCCC CAGAACCCUG AUCCUGCUGC UGUCUGGCGC CCUGGCCCUG ACAGAGACAU GGGCCGGAAG CNAUCGUGGGA AUUGUGGCAG GACUGGCAGU GCUGGCCGUG GUGGUGAUCG GAGCCGUGGU GGCUACCGUG AUGUGCAGAC GGAAGUCCAG CGGAGGCAAG GGCGGCAGCU ACAGCCAGGC CGCCAGCUCU GAUAGCGCCC AGGGCAGCGA CGUGUCACUG ACAGCCUAGU AACUCGAGCU GGUACUGCAU GCACGCAAUG CUAGCUGCCC CUUUCCCGUC CUGGGUACCC CGAGUCUCCC CCGACCUCGG GUCCCAGGUA UGCUCCCACC UCCACCUGCC CCACUCACCA CCUCUGCUAG UUCCAGACAC CUCCCAAGCA CGCAGCAAUG CAGCUCAAAA CGCUUAGCCU AGCCACACCC CCACGGGAAA CAGCAGUGAU UAACCUUUAG CAAUAAACGA AAGUUUAACU AAGCUAUACU AACCCCAGGG UUGGUCAAUU UCGUGCCAGC CACACCGAGA CCUGGUCCAG AGUCGCUAGC CGCGUCGCUA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAA。

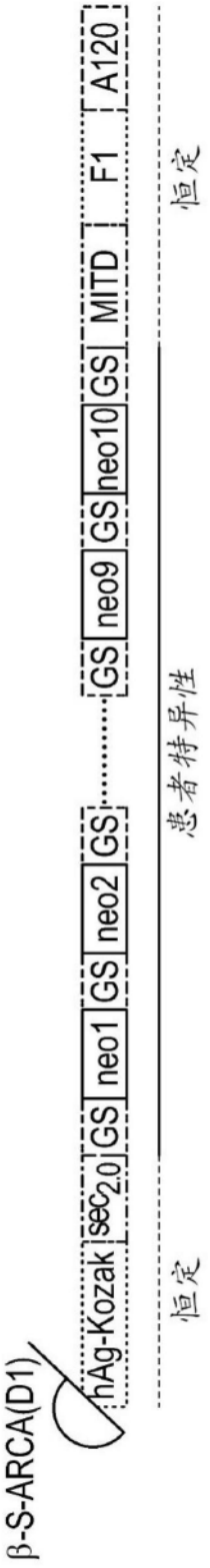

β-S-ARCA(D1)
hAg-Kozak
sec2.0
GS
neo1
GS
neo2
GS
GS
neo9
GS
neo10
GS
MITD
F1
A120
恒定
患者特异性
恒定

图1

```
GGGGCGAACU AGUAUUCUUC UGGUCCCCAC AGACUCAGAG AGAACCCGCC 50
ACCAUGAGAG UGAUGGCCCC CAGAACCCUG AUCCUGCUGC UGUCUGGCGC 100
CCUGGCCCUG ACAGAGACAU GGGCCGGAAG cNaUCGUGGGA AUUGUGGCAG 150
GACUGGCAGU GCUGGCCGUG GUGGUGAUCG GAGCCGUGGU GGCUACCGUG 200
AUGUGCAGAC GGAAGUCCAG CGGAGGCAAG GGCGGCAGCU ACAGCCAGGC 250
CGCCAGCUCU GAUAGCGCCC AGGGCAGCGA CGUGUCACUG ACAGCCUAGU 300
AACUCGAGCU GGUACUGCAU GCACGCAAUG CUAGCUGCCC CUUUCCCGUC 350
CUGGGUACCC CGAGUCUCCC CCGACCUCGG GUCCCAGGUA UGCUCCCACC 400
UCCACCUGCC CCACUCACCA CCUCUGCUAG UUCCAGACAC CUCCCAAGCA 450
CGCAGCAAUG CAGCUCAAAA CGCUUAGCCU AGCCACACCC CCACGGGAAA 500
CAGCAGUGAU UAACCUUUAG CAAUAAACGA AAGUUUAACU AAGCUAUACU 550
AACCCCAGGG UUGGUCAAUU UCGUGCCAGC CACACCGAGA CCUGGUCCAG 600
AGUCGCUAGC CGCGUCGCUA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA 650
AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA 700
AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA 739
```

图2

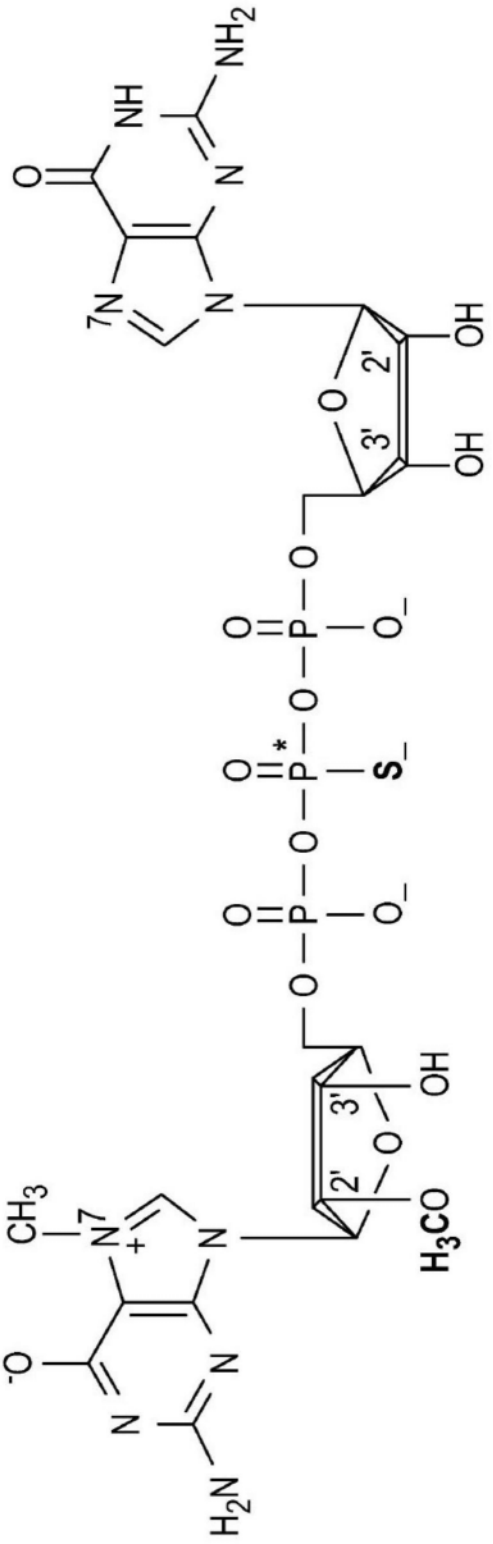


图3

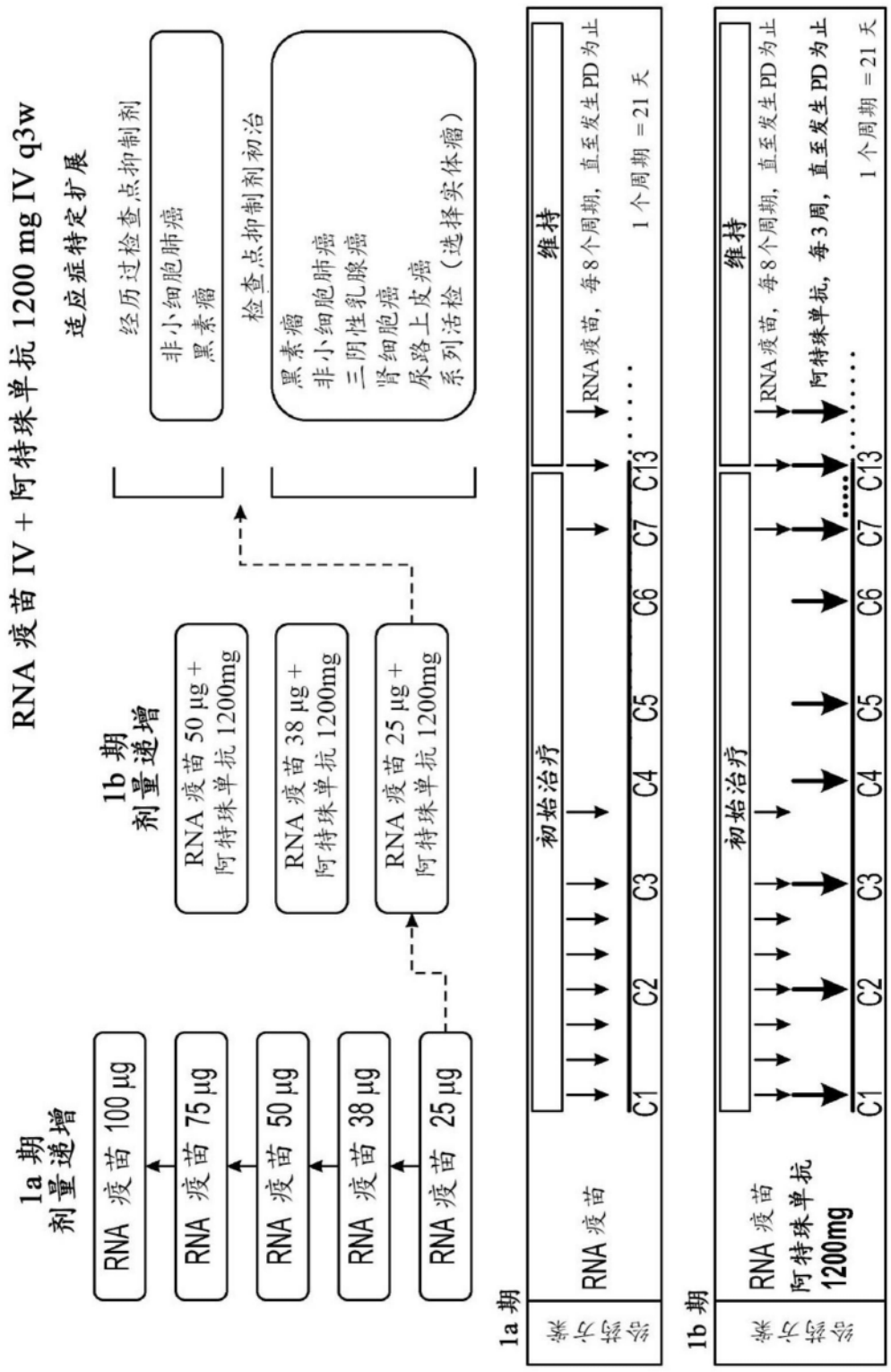

RNA 疫苗 IV + 阿特珠单抗 1200 mg IV q3w
适应症特定扩展
1a 期
剂量递增
RNA 疫苗 100 µg
RNA 疫苗 75 µg
RNA 疫苗 50 µg
RNA 疫苗 38 µg
RNA 疫苗 25 µg
1b 期
剂量递增
RNA 疫苗 50 µg + 阿特珠单抗 1200mg
RNA 疫苗 38 µg + 阿特珠单抗 1200mg
RNA 疫苗 25 µg + 阿特珠单抗 1200mg
经历过检查点抑制剂
非小细胞肺癌
黑素瘤
检查点抑制剂初治
黑素瘤
非小细胞肺癌
三阴性乳腺癌
肾细胞癌
尿路上皮癌
系列活检（选择实体瘤）
1a 期
给药方案
RNA 疫苗
初始治疗
C1 C2 C3 C4 C5 C6 C7 C13
维持
RNA 疫苗，每8个周期，直至发生PD为止
1个周期 = 21 天
1b 期
给药方案
RNA 疫苗
阿特珠单抗
1200mg
初始治疗
C1 C2 C3 C4 C5 C6 C7 C13
维持
RNA 疫苗，每8个周期，直至发生PD为止
阿特珠单抗，每3周，直至发生PD为止
1个周期 = 21 天

图4

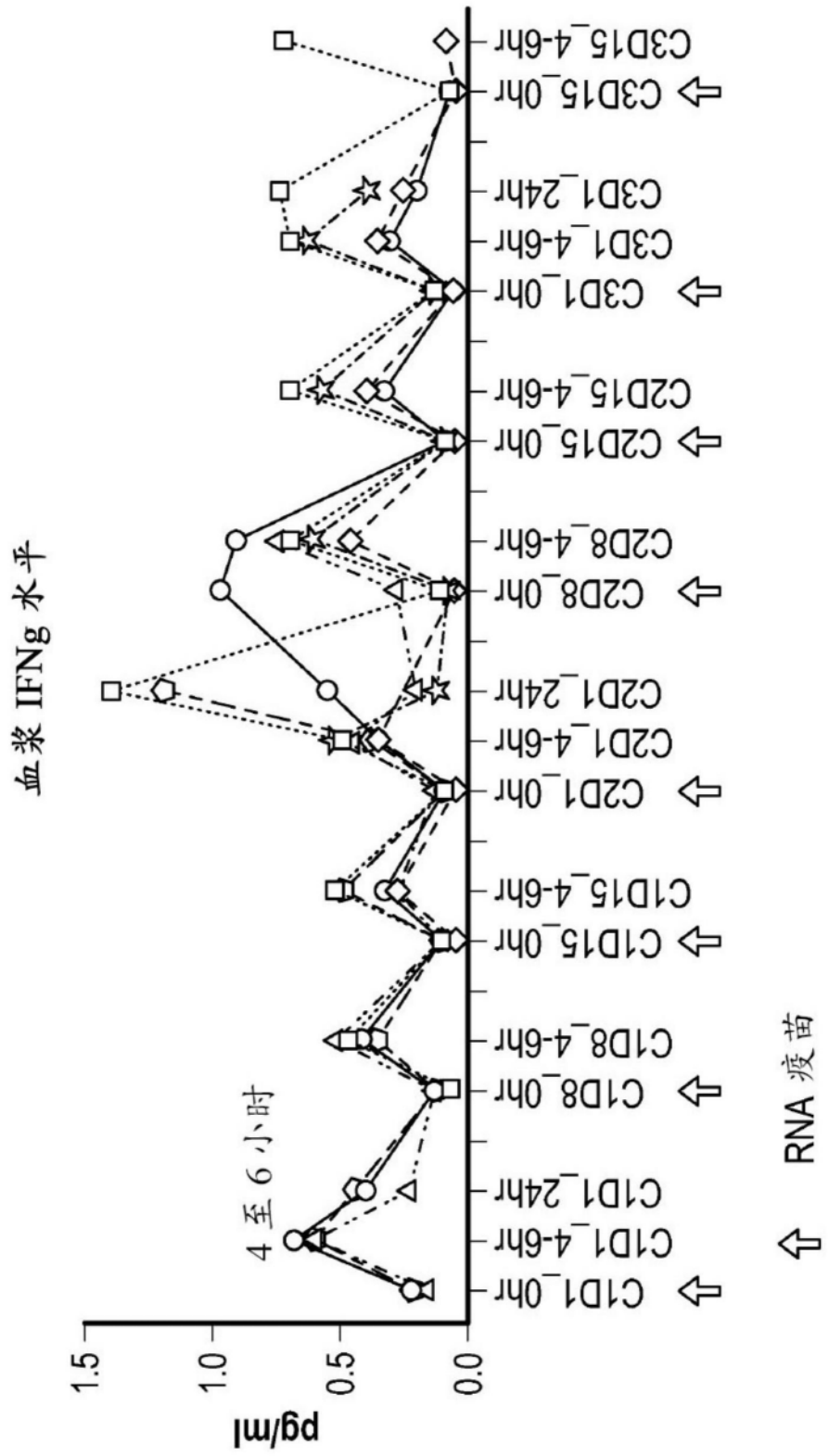

血浆 IFNg 水平
pg/ml
1.5
1.0
0.5
0.0
4 至 6 小时
C1D1_0hr
C1D1_4-6hr
C1D1_24hr
C1D8_0hr
C1D8_4-6hr
C1D15_0hr
C1D15_4-6hr
C2D1_0hr
C2D1_4-6hr
C2D1_24hr
C2D8_0hr
C2D8_4-6hr
C2D15_0hr
C2D15_4-6hr
C3D1_0hr
C3D1_4-6hr
C3D1_24hr
C3D15_0hr
C3D15_4-6hr
RNA 疫苗

图5A

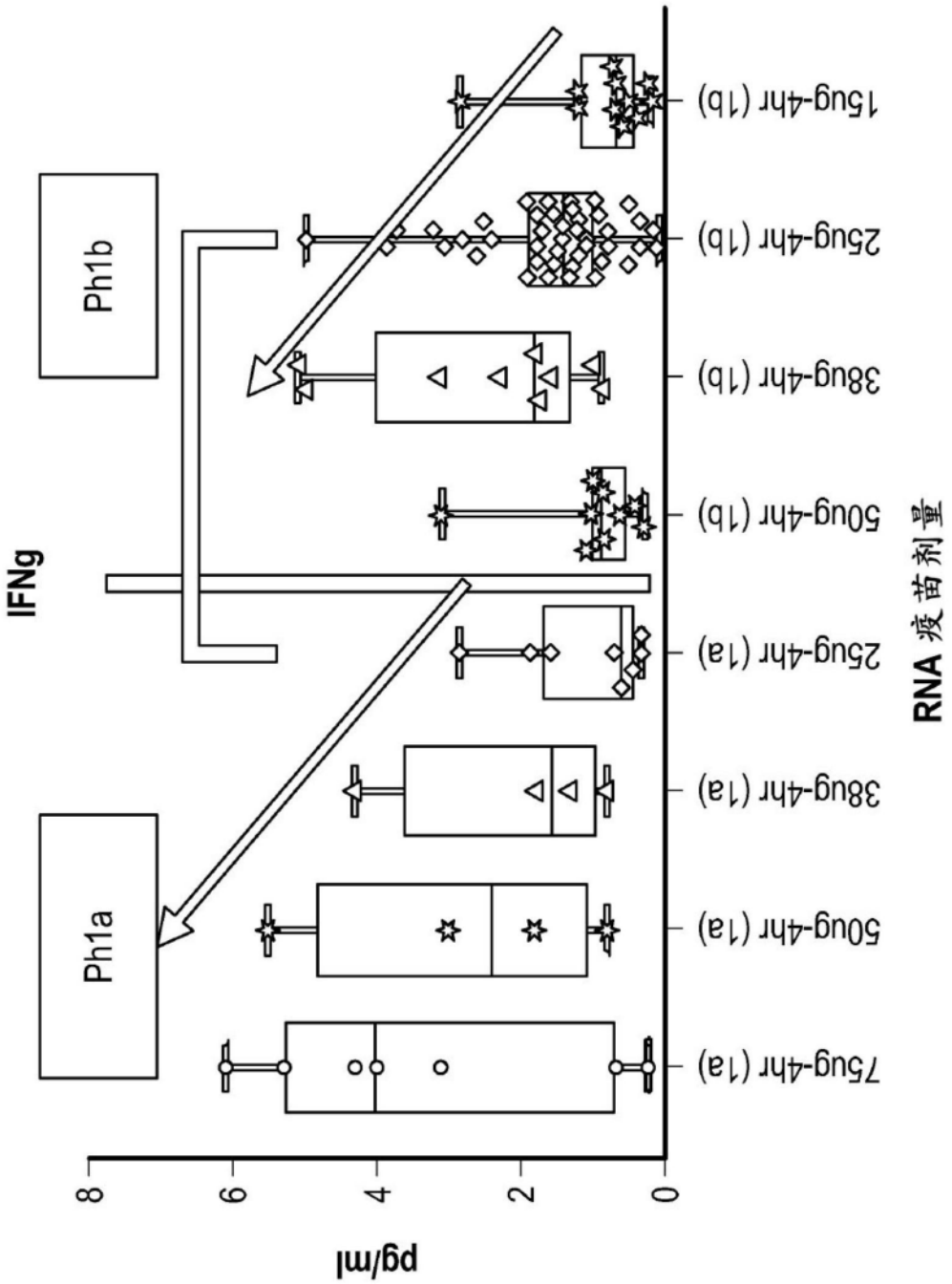

IFNg
pg/ml
0
2
4
6
8
Ph1a
Ph1b
75ug-4hr (1a)
50ug-4hr (1a)
38ug-4hr (1a)
25ug-4hr (1a)
50ug-4hr (1b)
38ug-4hr (1b)
25ug-4hr (1b)
15ug-4hr (1b)
RNA 疫苗剂量

图5B

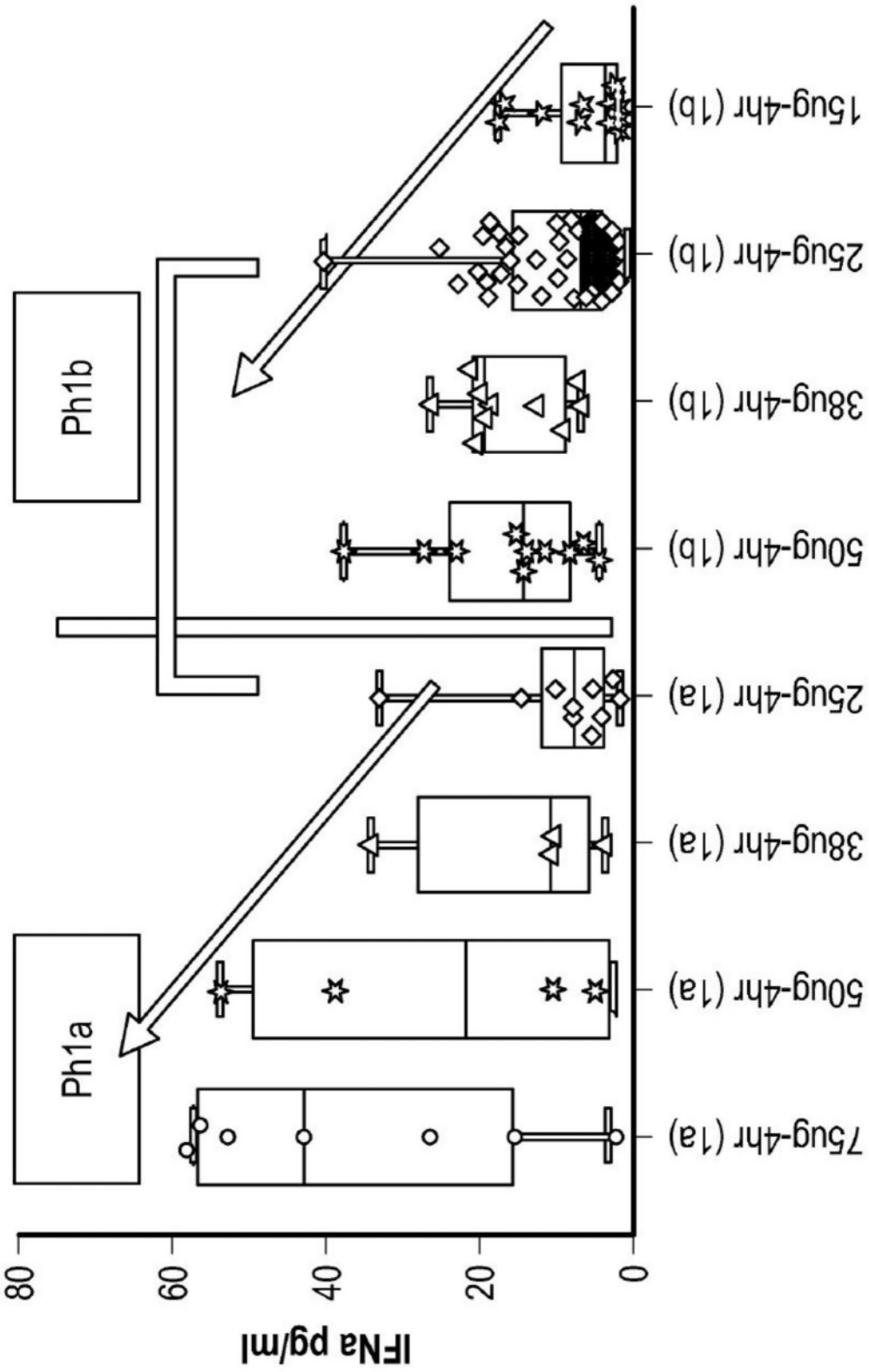

IFNa pg/ml
0
20
40
60
80
Ph1a
Ph1b
75ug-4hr (1a)
50ug-4hr (1a)
38ug-4hr (1a)
25ug-4hr (1a)
50ug-4hr (1b)
38ug-4hr (1b)
25ug-4hr (1b)
15ug-4hr (1b)

图5C

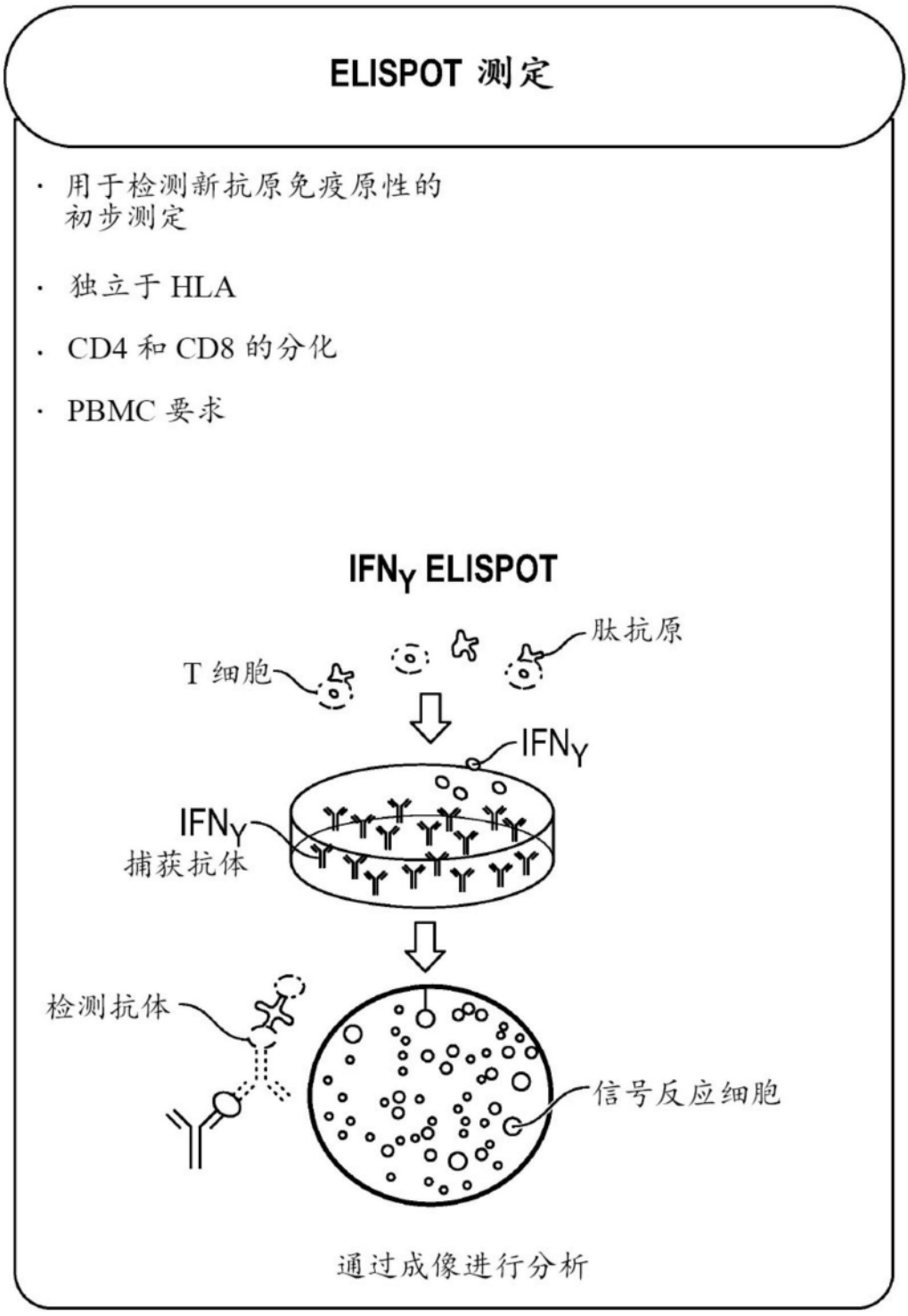

ELISPOT 测定
· 用于检测新抗原免疫原性的初步测定
· 独立于 HLA
· CD4 和 CD8 的分化
· PBMC 要求
IFNγ ELISPOT
肽抗原
T 细胞
IFNγ
IFNγ
捕获抗体
检测抗体
信号反应细胞
通过成像进行分析

图6

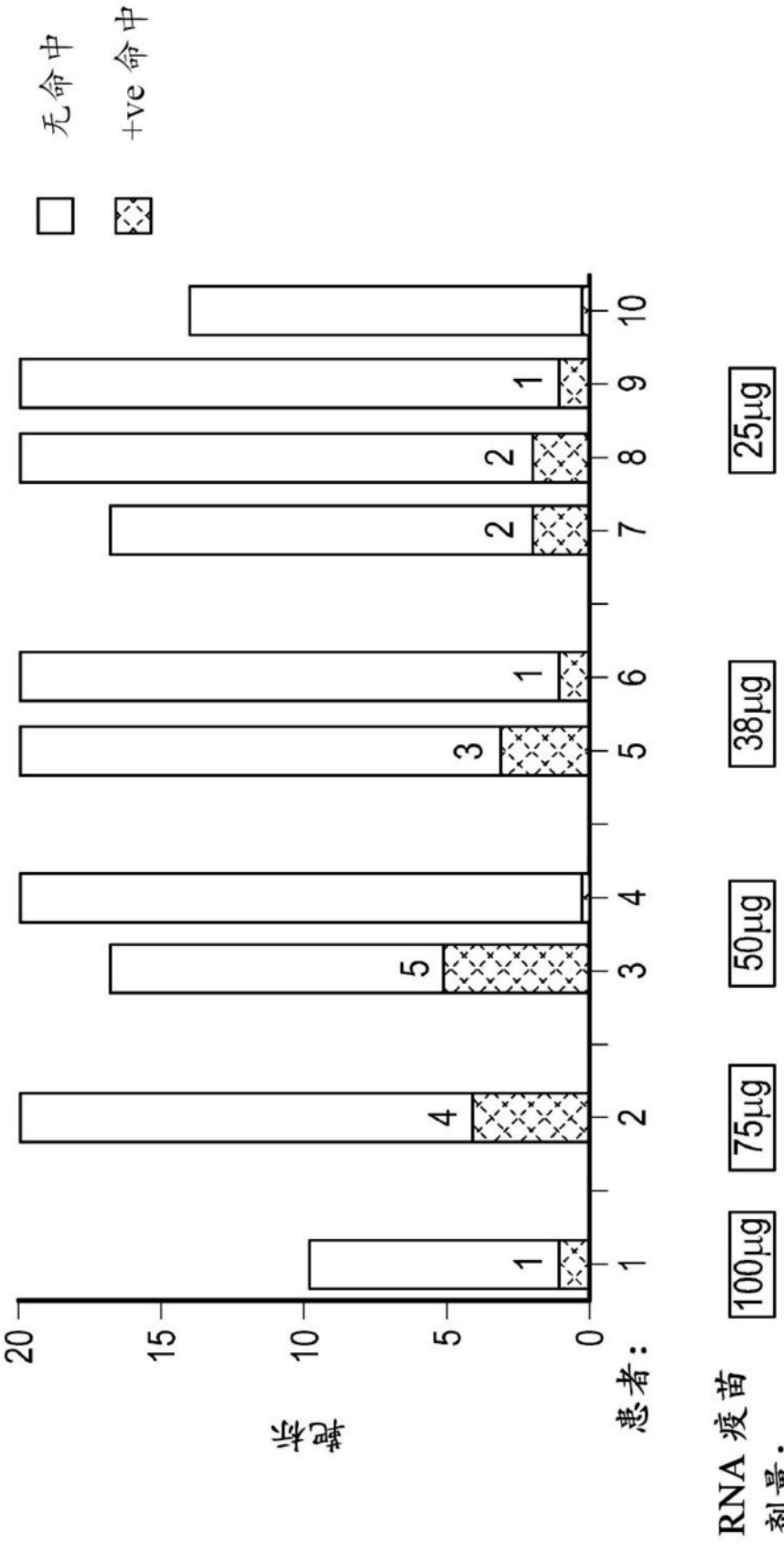

无命中
+ve 命中
计数
20
15
10
5
0
患者：
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
RNA 疫苗
剂量：
100μg
75μg
50μg
38μg
25μg

图7A

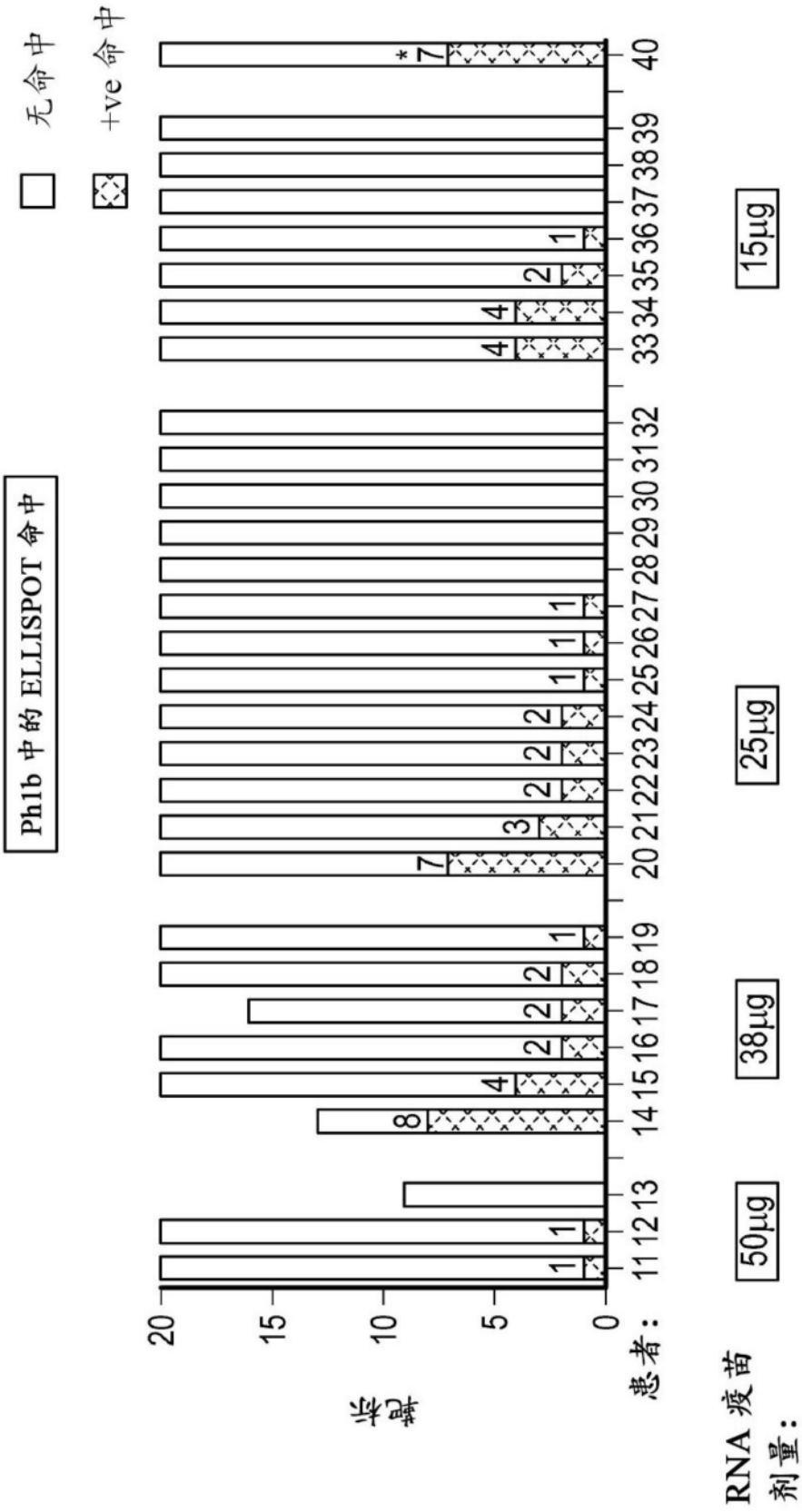

无命中
+ve 命中
Ph1b 中的 ELLISPOT 命中
20
15
10
5
0
频率
患者：
11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40
RNA 疫苗
剂量：
50μg
38μg
25μg
15μg

图7B

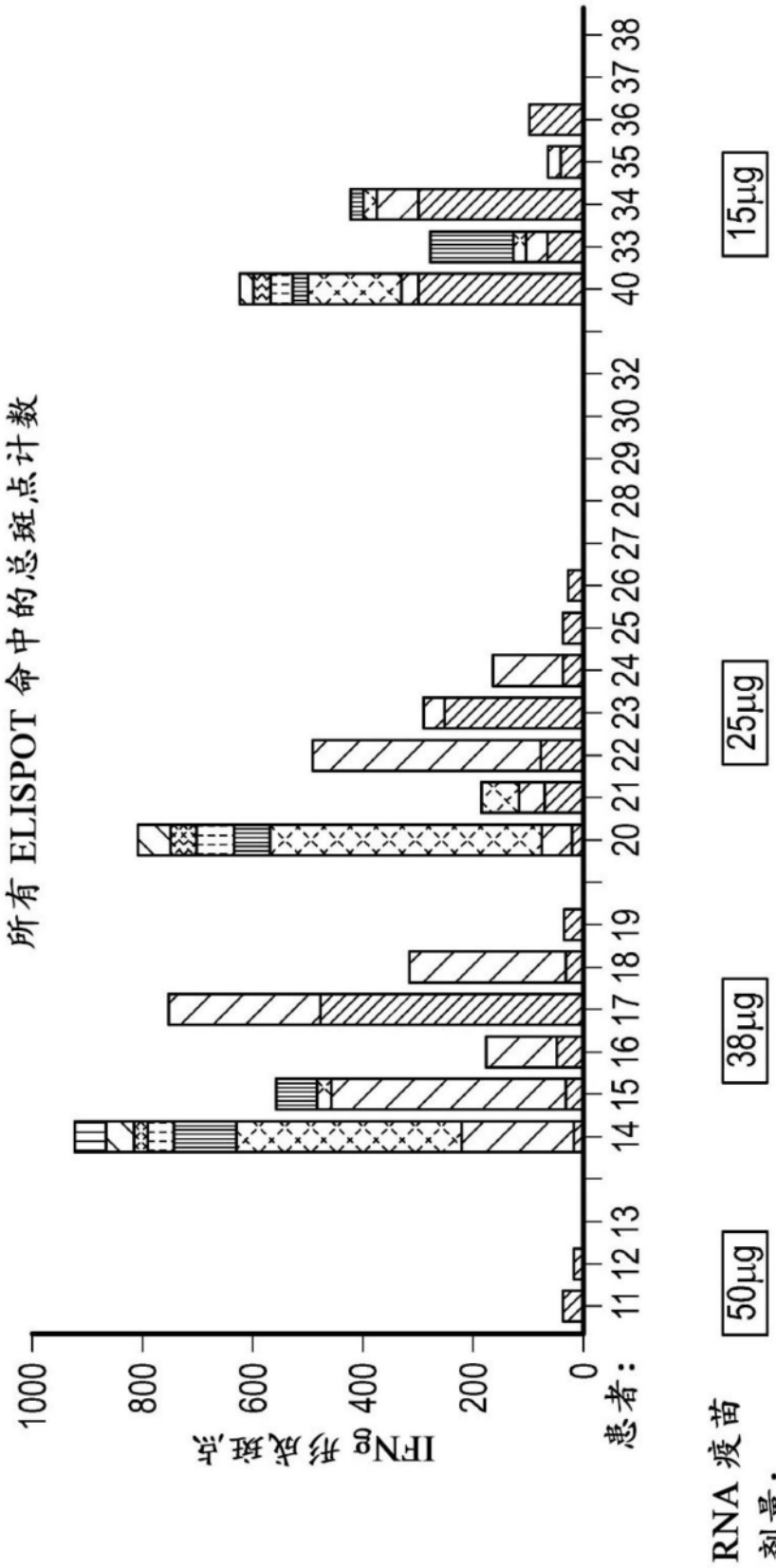

所有 ELISPOT 命中的总斑点计数
IFNg 形成斑点
1000
800
600
400
200
0
患者：
11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 32 40 33 34 35 36 37 38
RNA 疫苗
剂量：
50μg
38μg
25μg
15μg

图7C

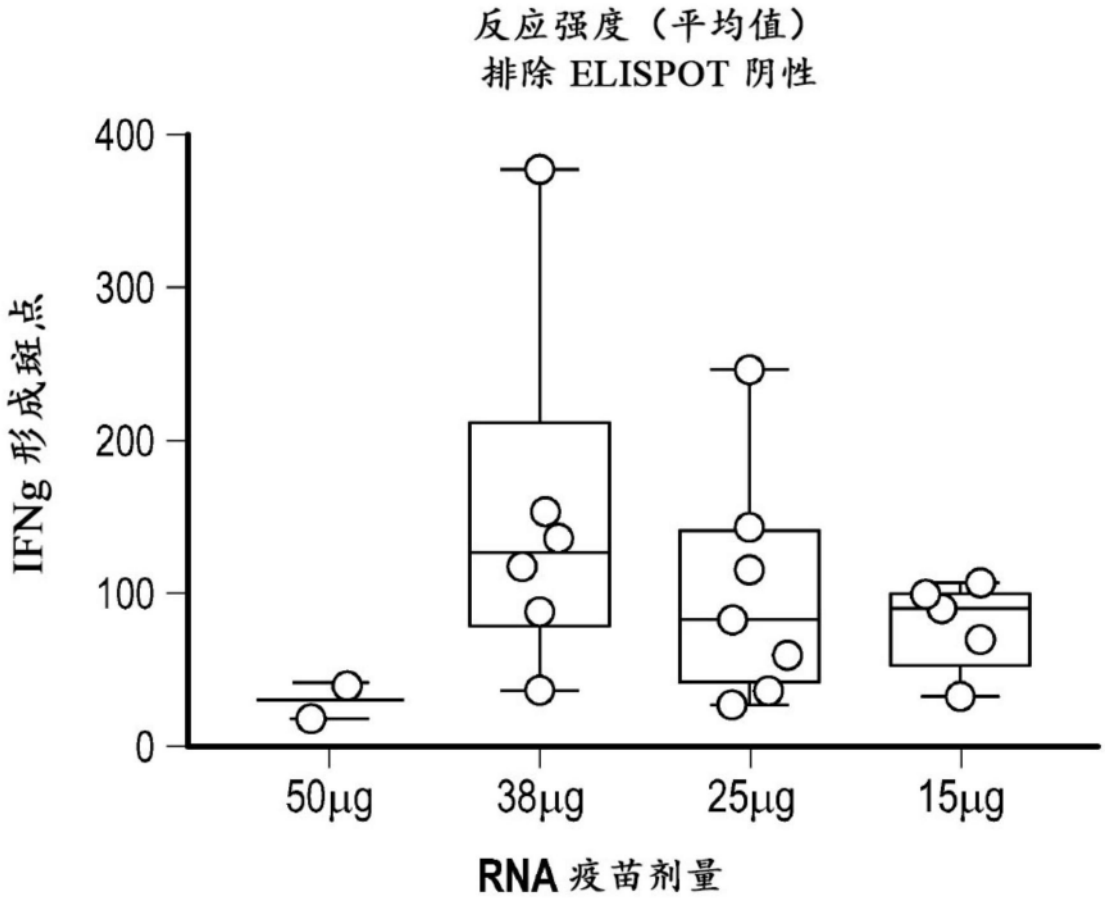

反应强度（平均值）
排除 ELISPOT 阴性
IFNg 形成斑点
400
300
200
100
0
50μg
38μg
25μg
15μg
RNA 疫苗剂量

图7D

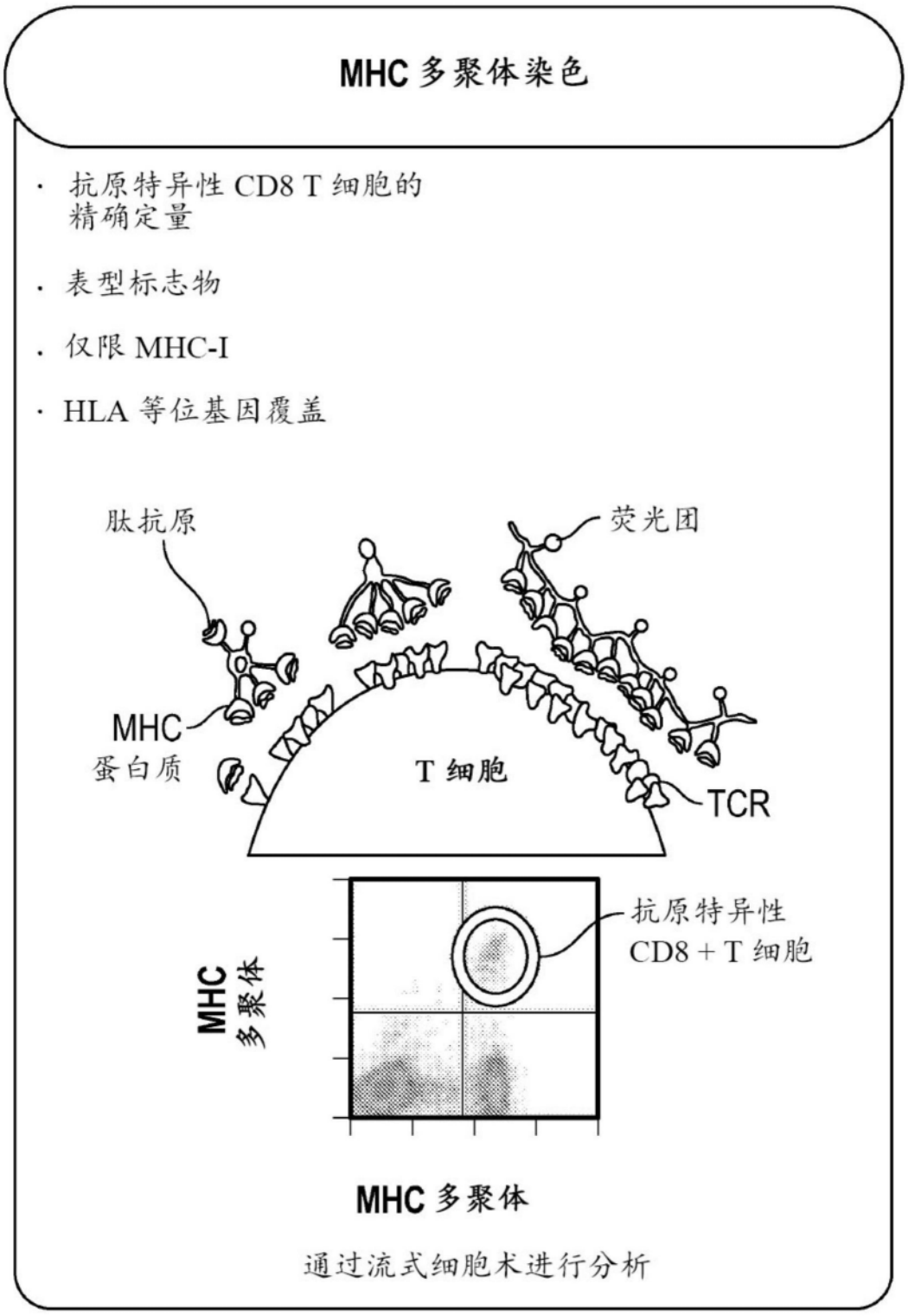

MHC 多聚体染色
· 抗原特异性 CD8 T 细胞的精确定量
· 表型标志物
· 仅限 MHC-I
· HLA 等位基因覆盖
肽抗原
荧光团
MHC
蛋白质
T 细胞
TCR
MHC 多聚体
抗原特异性
CD8 + T 细胞
MHC 多聚体
通过流式细胞术进行分析

图8

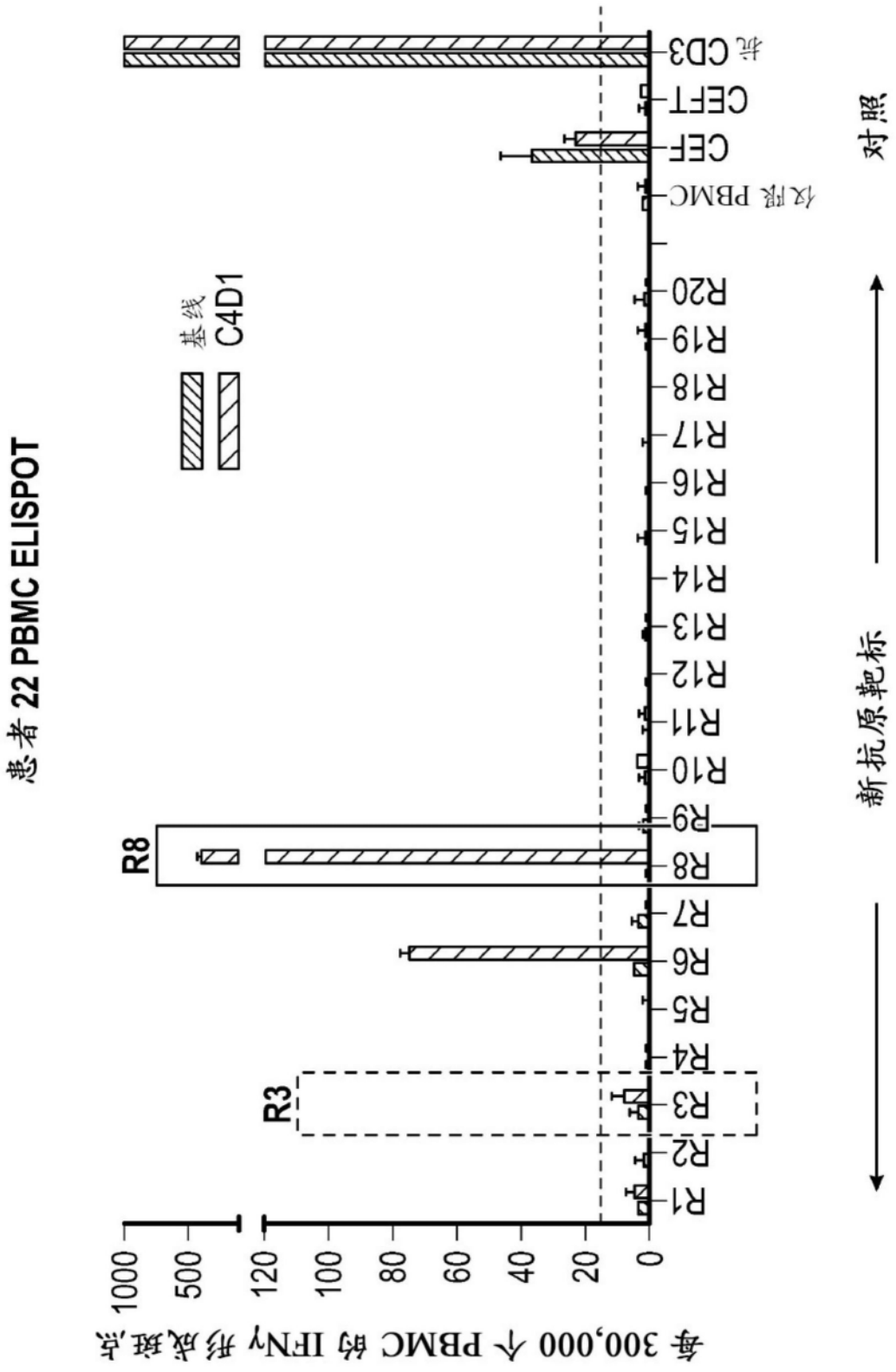

患者 22 PBMC ELISPOT
基线
C4D1
每 300,000 个 PBMC 的 IFNγ 形成斑点
1000
500
120
100
80
60
40
20
0
R1
R2
R3
R4
R5
R6
R7
R8
R9
R10
R11
R12
R13
R14
R15
R16
R17
R18
R19
R20
抗原 PBMC
CEF
CEFT
抗 CD3
对照
新抗原靶标

图9A

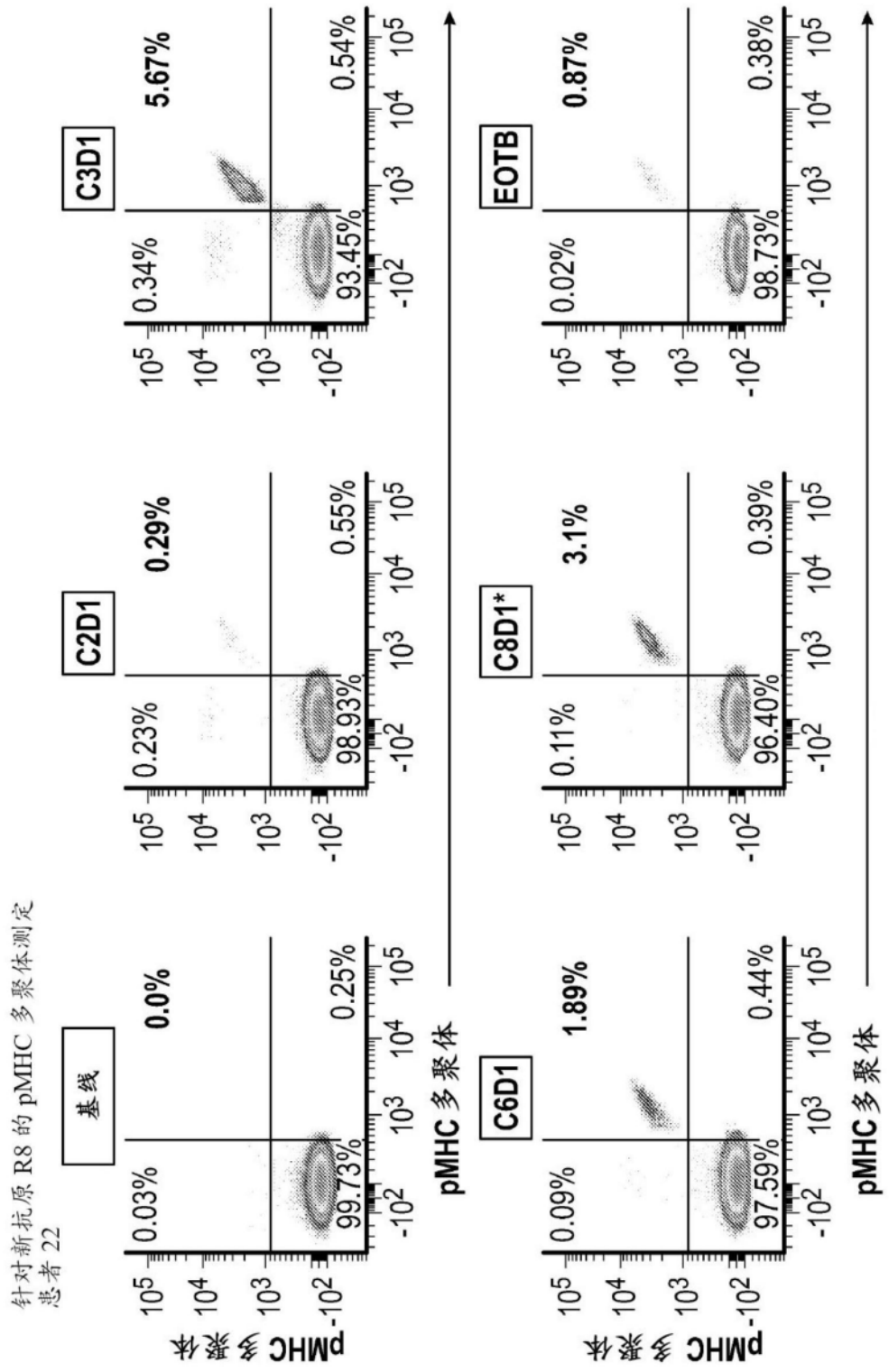

针对新抗原 R8 的 pMHC 多聚体测定
患者 22
基线
C2D1
C3D1
C6D1
C8D1*
EOTB
0.0%
0.29%
5.67%
1.89%
3.1%
0.87%
0.03%
99.73%
0.25%
0.23%
98.93%
0.55%
0.34%
93.45%
0.54%
0.09%
97.59%
0.44%
0.11%
96.40%
0.39%
0.02%
98.73%
0.38%
pMHC 多聚体

图9B

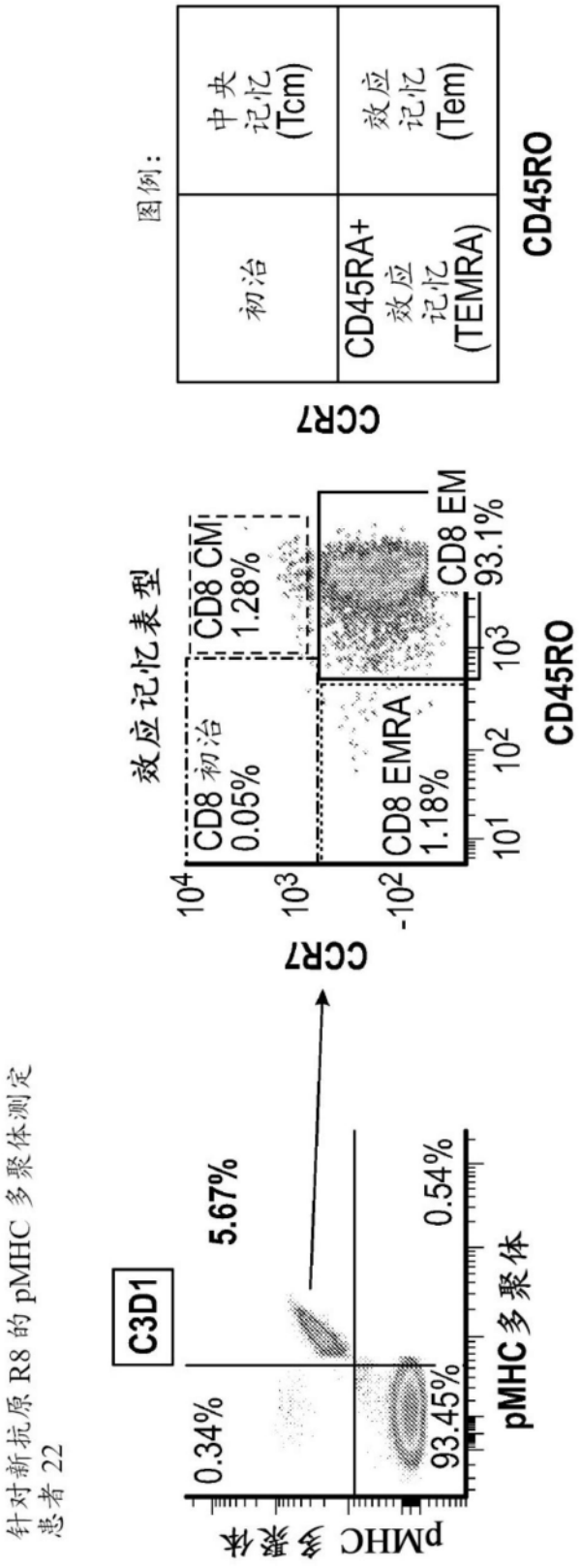

针对新抗原 R8 的 pMHC 多聚体测定
患者 22
C3D1
0.34%
93.45%
5.67%
0.54%
pMHC 多聚体
CCR7
效应记忆表型
CD8 初治
0.05%
CD8 CM
1.28%
CD8 EMRA
1.18%
CD8 EM
93.1%
CD45RO
图例：
初治
中央记忆 (Tcm)
CD45RA+ 效应记忆 (TEMRA)
效应记忆 (Tem)
CCR7
CD45RO

图9C

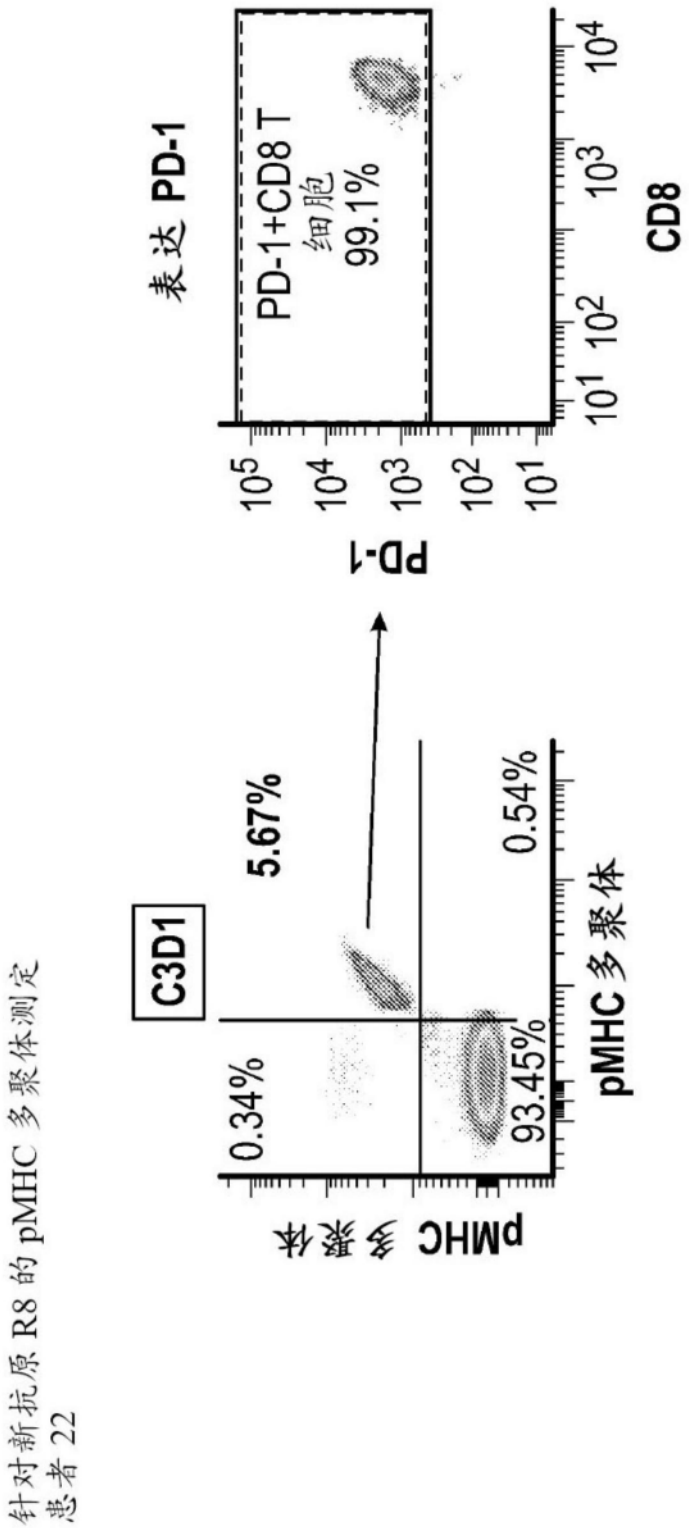

针对新抗原 R8 的 pMHC 多聚体测定
患者 22
C3D1
0.34%
93.45%
5.67%
0.54%
pMHC 多聚体
pMHC 多聚体
PD-1
表达 PD-1
PD-1+CD8 T
细胞
99.1%
CD8

图9D

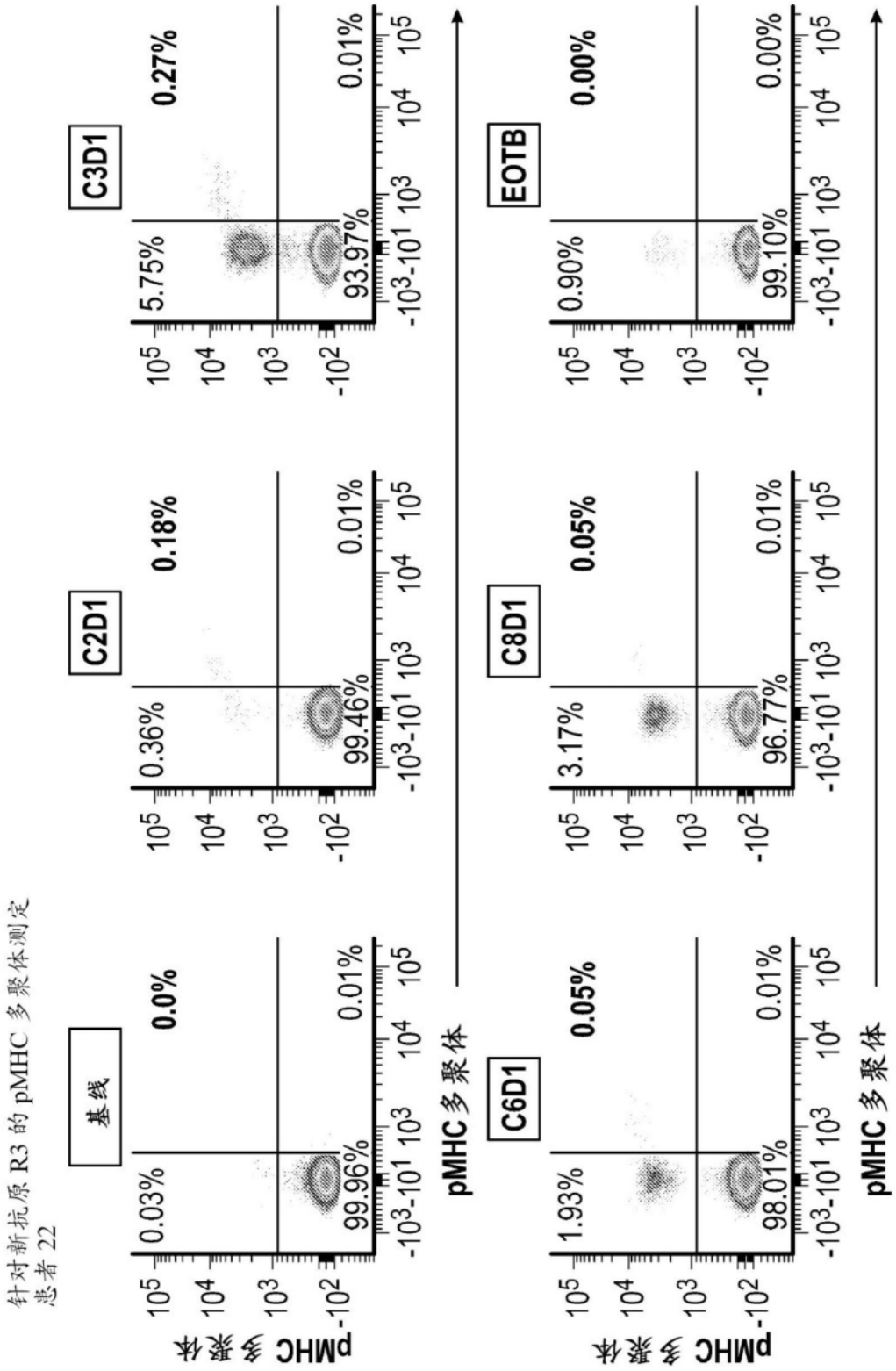

针对新抗原 R3 的 pMHC 多聚体测定
患者 22
基线
0.0%
0.03%
99.96%
C2D1
0.18%
0.36%
99.46%
C3D1
0.27%
5.75%
93.97%
C6D1
0.05%
1.93%
98.01%
C8D1
0.05%
3.17%
96.77%
EOTB
0.00%
0.90%
99.10%
0.01%
pMHC 多聚体

图9E

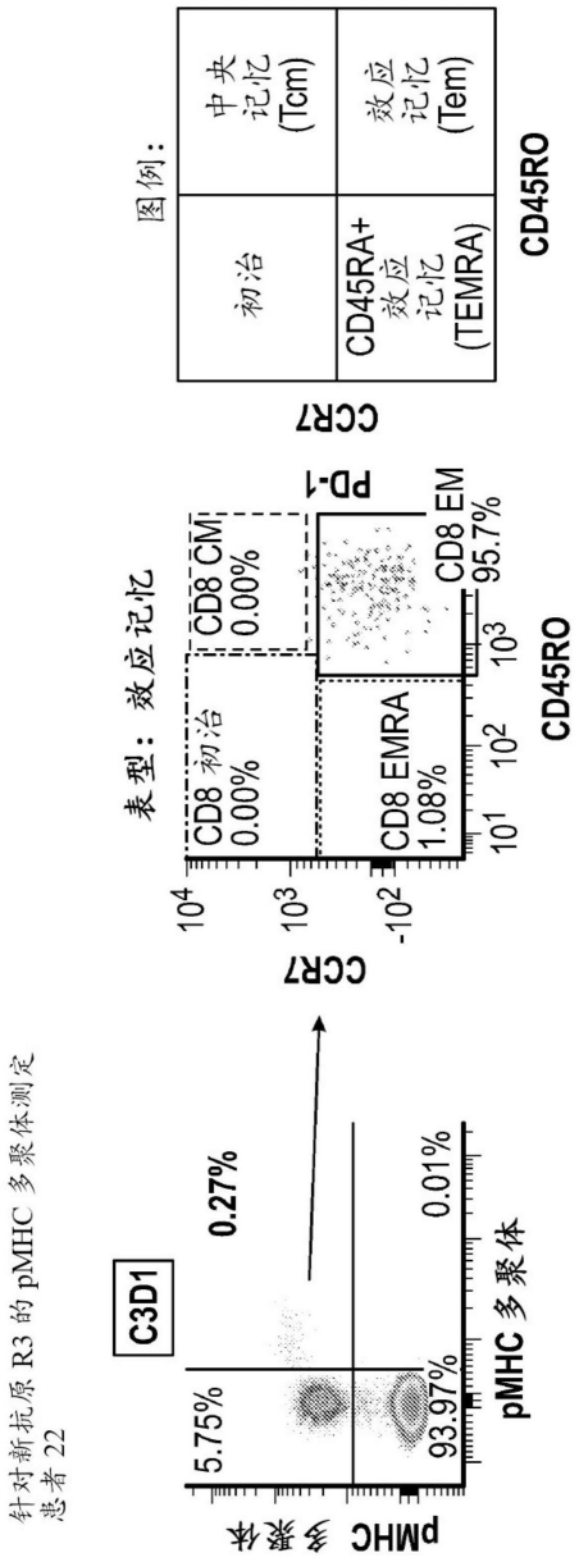

针对新抗原 R3 的 pMHC 多聚体测定
患者 22
C3D1
pMHC 多聚体
5.75%
93.97%
0.27%
0.01%
pMHC 多聚体
CCR7
CD45RO
表型：效应记忆
CD8 初治
0.00%
CD8 CM
0.00%
CD8 EMRA
1.08%
CD8 EM
95.7%
PD-1
CCR7
CD45RO
图例：
初治
中央记忆 (Tcm)
CD45RA+ 效应记忆 (TEMRA)
效应记忆 (Tem)
CCR7
CD45RO

图9F

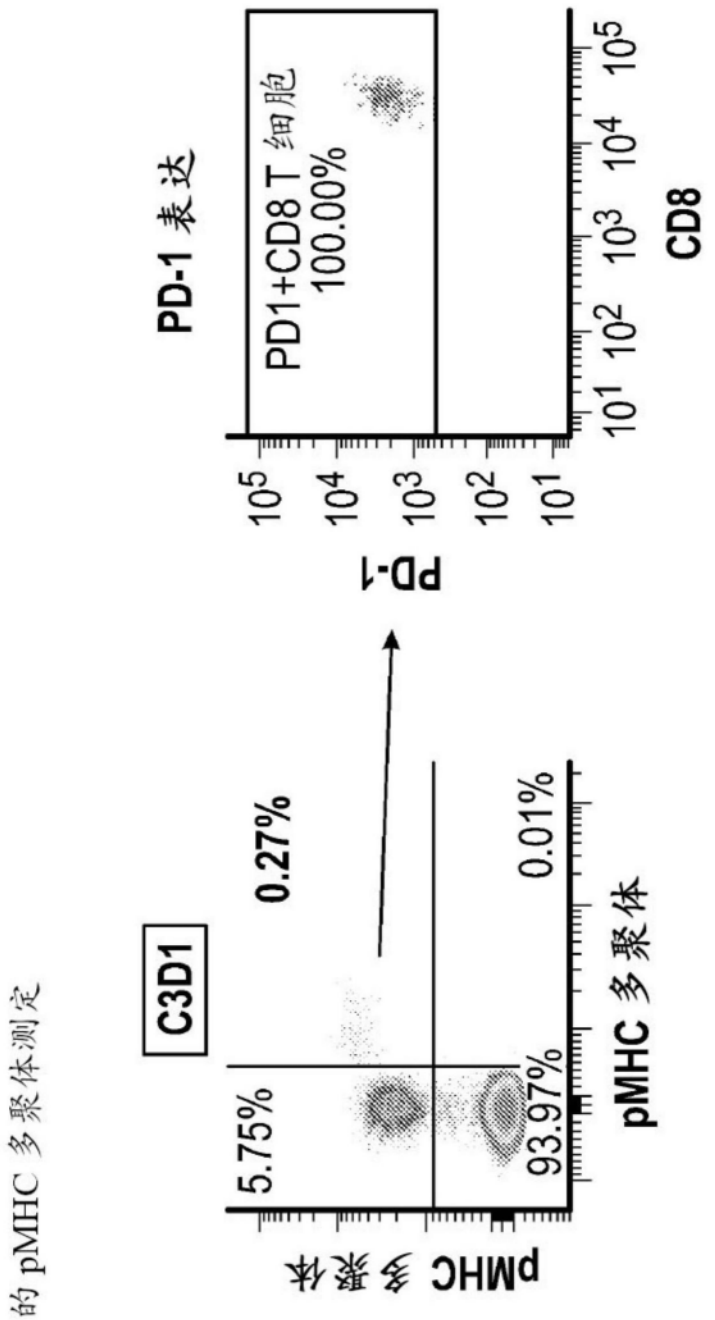

针对新抗原 R3 的 pMHC 多聚体测定
患者 22
C3D1
5.75%
0.27%
93.97%
0.01%
pMHC 多聚体
pMHC 多聚体
PD-1
PD-1 表达
PD1+CD8 T 细胞
100.00%
CD8

图9G

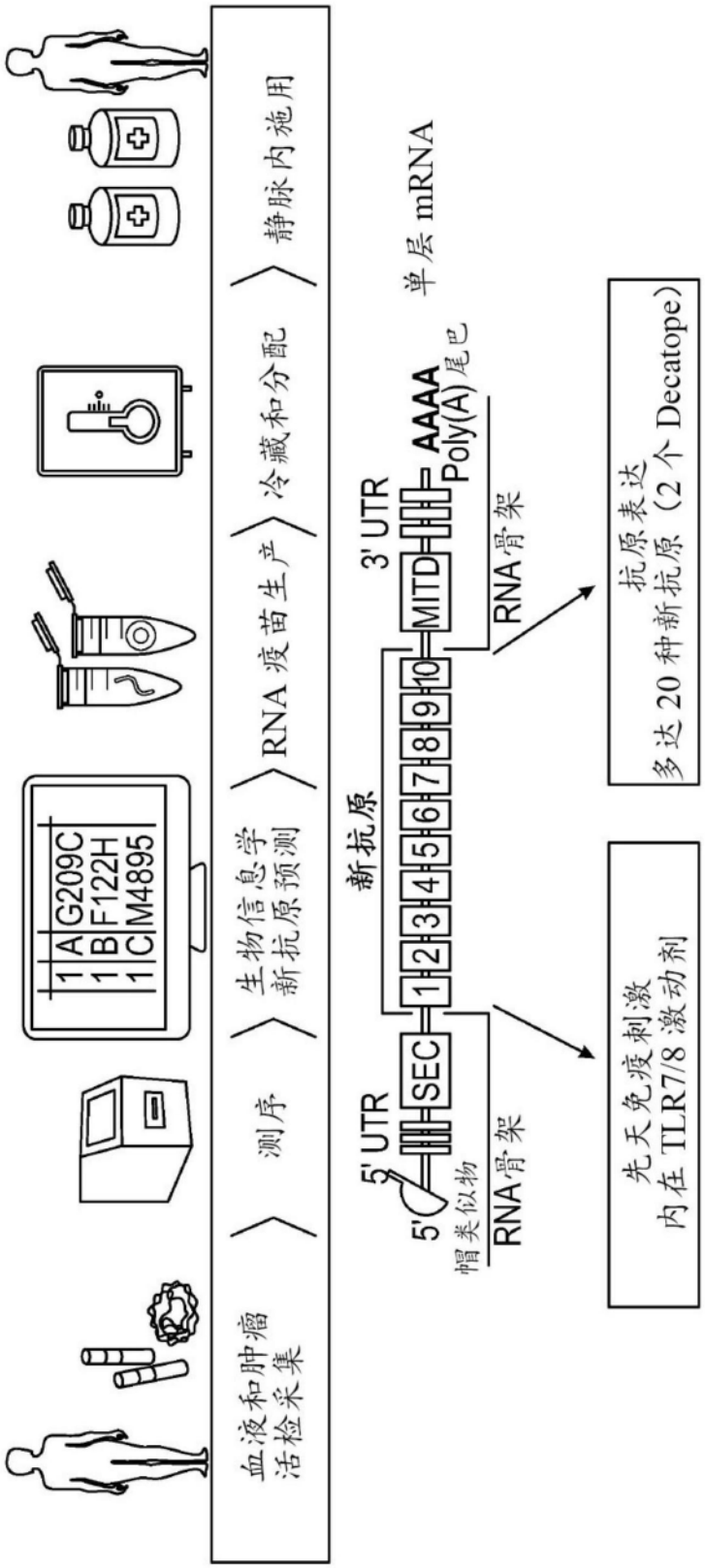

血液和肿瘤
活检采集
测序
1A G209C
1B F122H
1C M4895
生物信息学
新抗原预测
RNA 疫苗生产
冷藏和分配
静脉内施用
单层 mRNA
5' UTR
帽类似物
5'
SEC
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
新抗原
3' UTR
MITD
AAAA
Poly(A)尾巴
RNA骨架
RNA骨架
先天免疫刺激
内在 TLR7/8 激动剂
抗原表达
多达 20 种新抗原（2 个 Decatope）

图10A

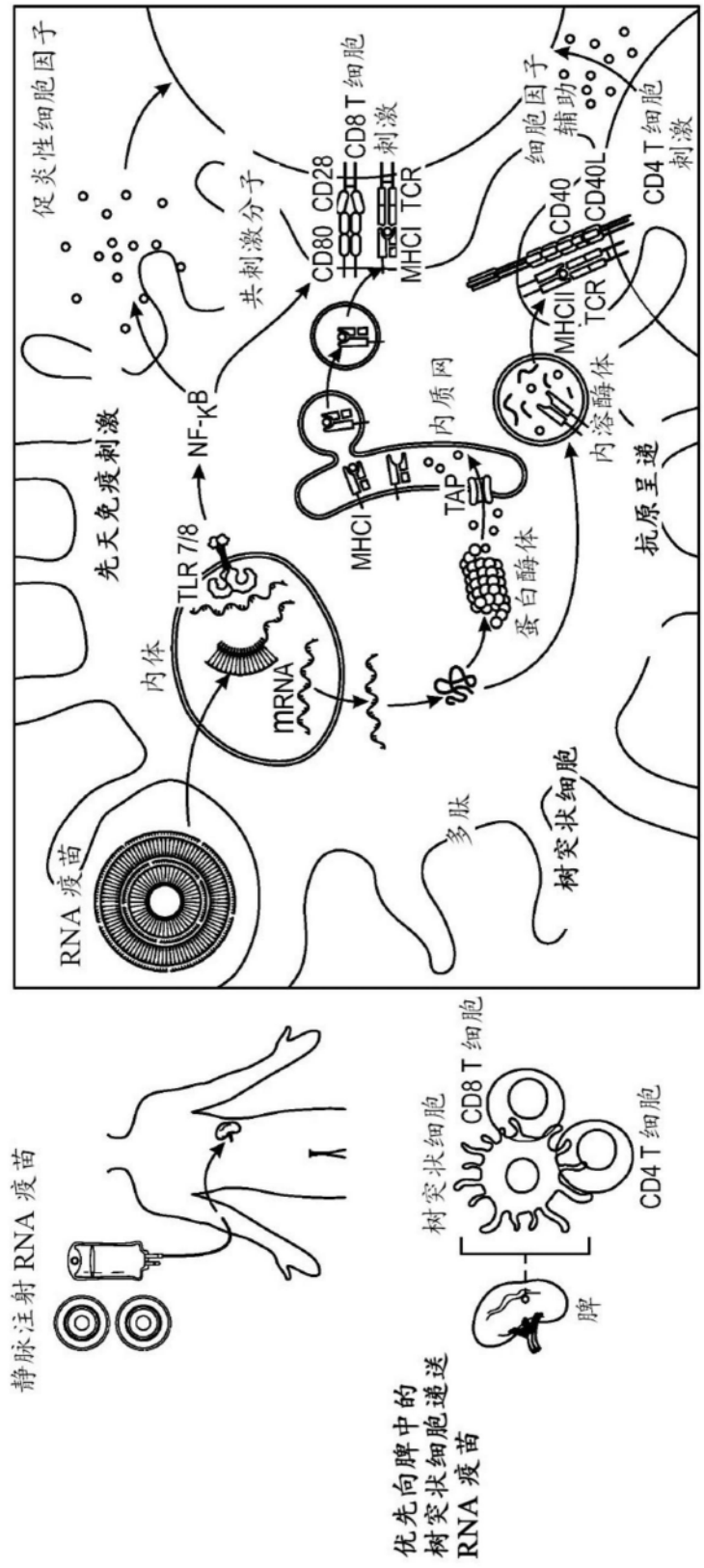

促炎性细胞因子
先天免疫刺激
NF-κB
共刺激分子
CD80 CD28
CD8 T 细胞
刺激
MHCI TCR
细胞因子
辅助
CD40
CD40L
CD4 T 细胞
刺激
RNA 疫苗
内体
TLR 7/8
mRNA
MHCI
内质网
TAP
蛋白酶体
内溶酶体
MHCII
TCR
抗原呈递
多肽
树突状细胞
静脉注射 RNA 疫苗
树突状细胞
CD8 T 细胞
脾
CD4 T 细胞
优先向脾中的
树突状细胞递送
RNA 疫苗

图10B

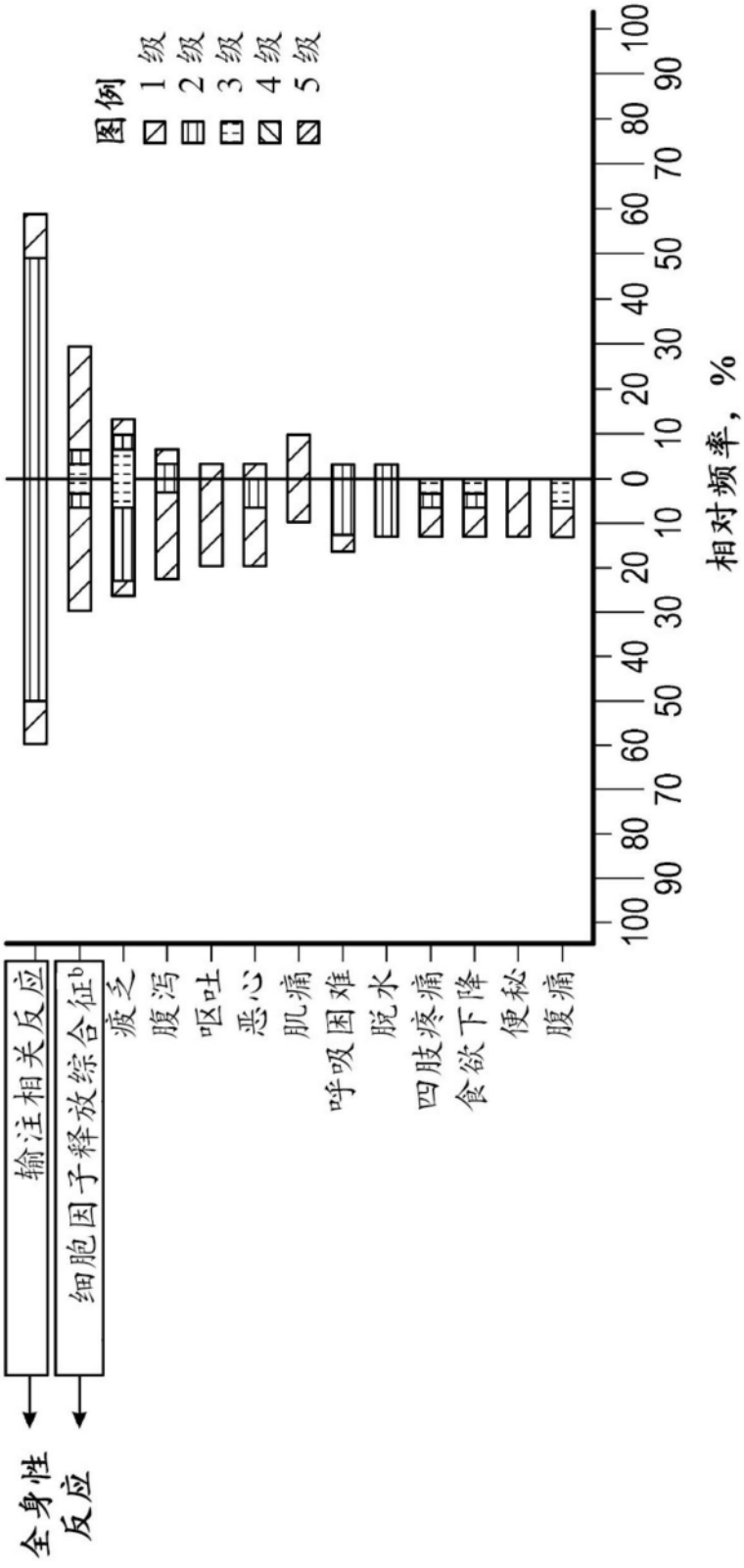

> 10% 的患者报告的 AE 术语[a]
所有 AE (n = 31)
所有 AE (n = 28)
图例
1 级
2 级
3 级
4 级
5 级
全身性反应
输注相关反应
细胞因子释放综合征[b]
疲乏
腹泻
呕吐
恶心
肌痛
呼吸困难
脱水
四肢疼痛
食欲下降
便秘
腹痛
100 80 60 40 20 0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
相对频率，%

图11

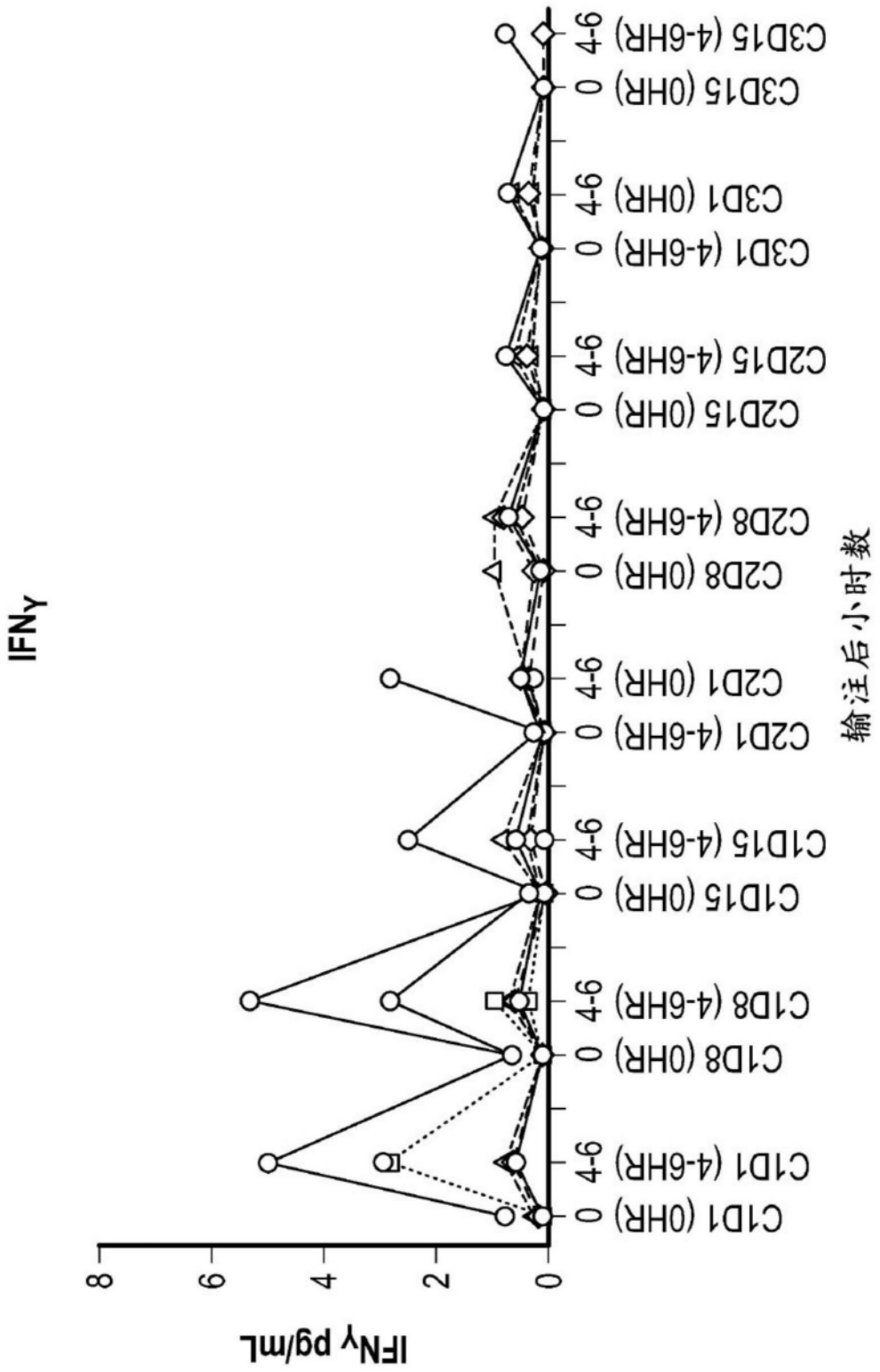

IFNγ
IFNγ pg/mL
0
2
4
6
8
C1D1 (0HR)
0
4-6
C1D1 (4-6HR)
C1D8 (0HR)
C1D8 (4-6HR)
C1D15 (0HR)
C1D15 (4-6HR)
C2D1 (0HR)
C2D1 (4-6HR)
C2D8 (0HR)
C2D8 (4-6HR)
C2D15 (0HR)
C2D15 (4-6HR)
C3D1 (0HR)
C3D1 (4-6HR)
C3D15 (0HR)
C3D15 (4-6HR)
输注后小时数

图12A

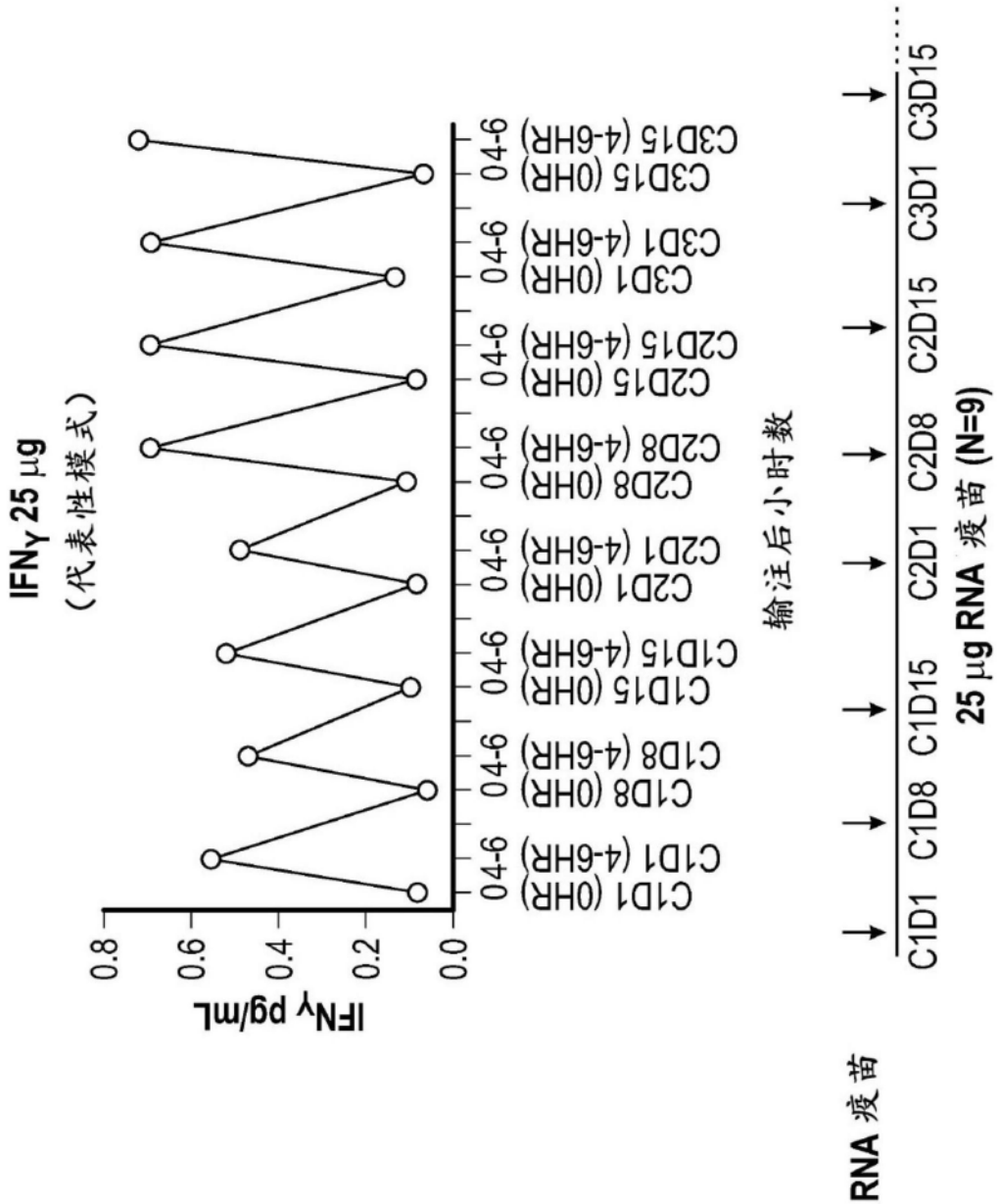

IFNγ 25 μg
（代表性模式）
IFNγ pg/mL
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
C1D1 (0HR)
C1D1 (4-6HR)
C1D8 (0HR)
C1D8 (4-6HR)
C1D15 (0HR)
C1D15 (4-6HR)
C2D1 (0HR)
C2D1 (4-6HR)
C2D8 (0HR)
C2D8 (4-6HR)
C2D15 (0HR)
C2D15 (4-6HR)
C3D1 (0HR)
C3D1 (4-6HR)
C3D15 (0HR)
C3D15 (4-6HR)
04-6
输注后小时数
RNA 疫苗
C1D1 C1D8 C1D15 C2D1 C2D8 C2D15 C3D1 C3D15
25 μg RNA 疫苗 (N=9)

图12B

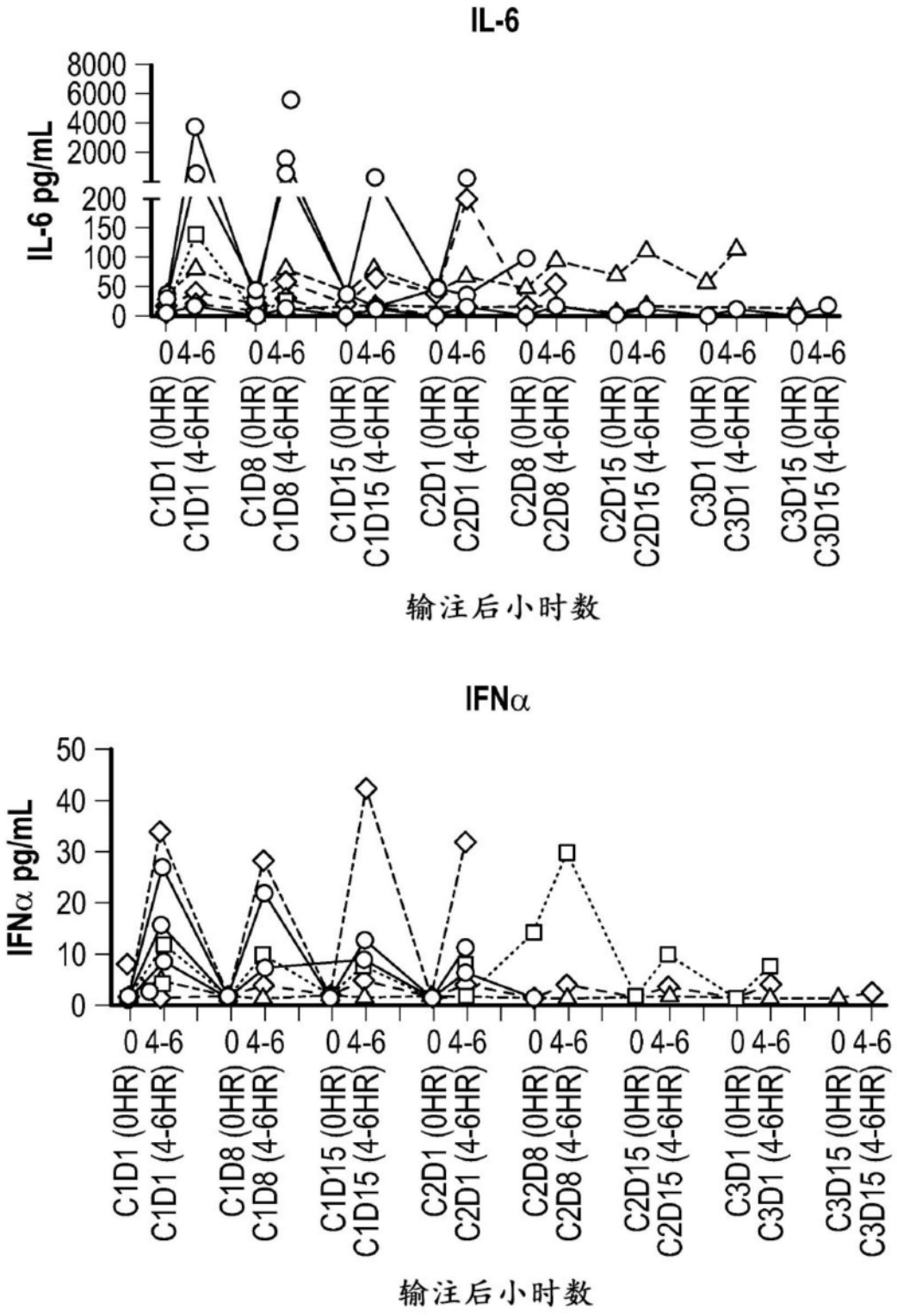

IL-6
IL-6 pg/mL
8000
6000
4000
2000
200
150
100
50
0
0 4-6
C1D1 (0HR)
C1D1 (4-6HR)
C1D8 (0HR)
C1D8 (4-6HR)
C1D15 (0HR)
C1D15 (4-6HR)
C2D1 (0HR)
C2D1 (4-6HR)
C2D8 (0HR)
C2D8 (4-6HR)
C2D15 (0HR)
C2D15 (4-6HR)
C3D1 (0HR)
C3D1 (4-6HR)
C3D15 (0HR)
C3D15 (4-6HR)
输注后小时数
IFNα
IFNα pg/mL
50
40
30
20
10
0
输注后小时数

图13

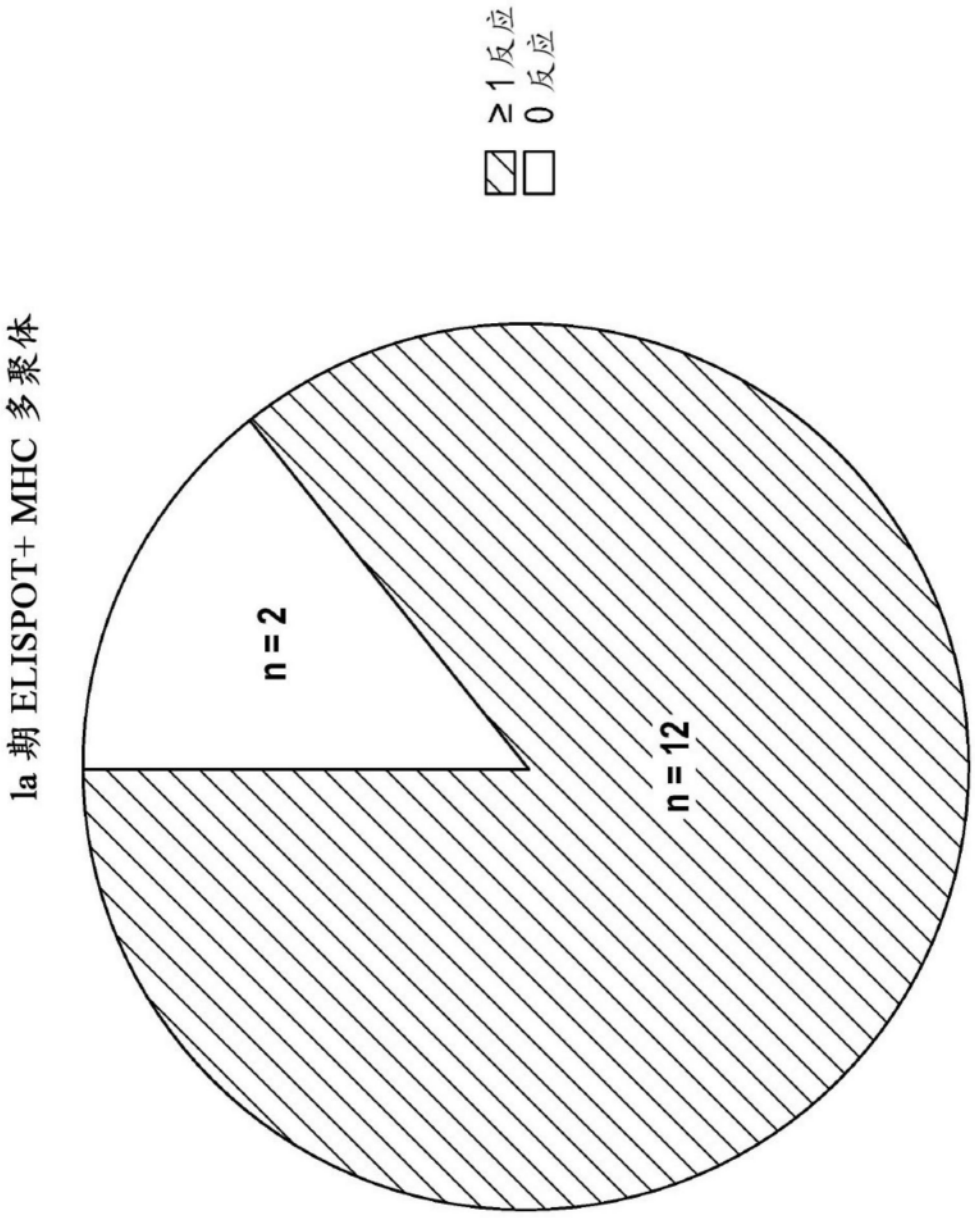


图14A

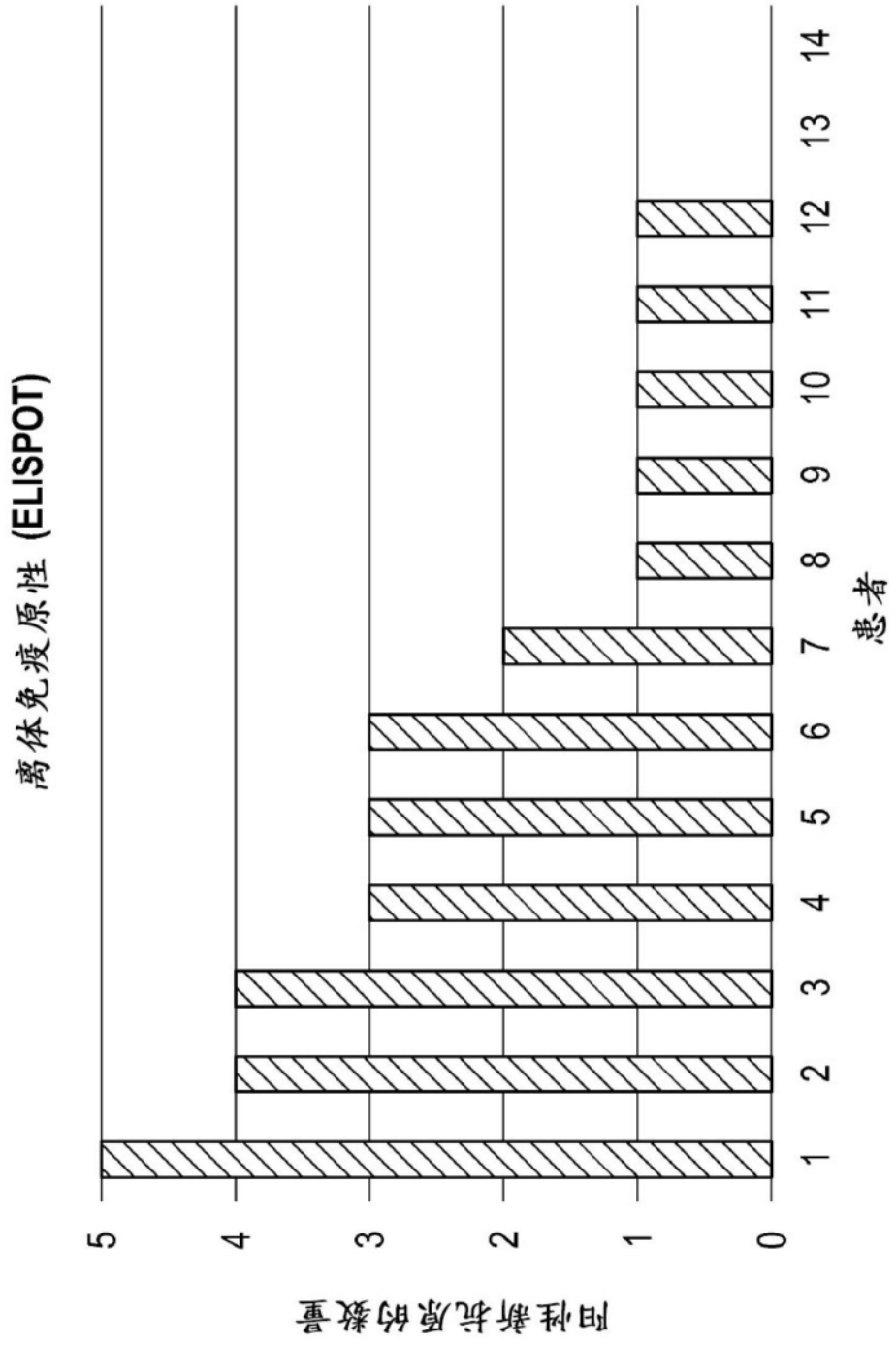


图14B

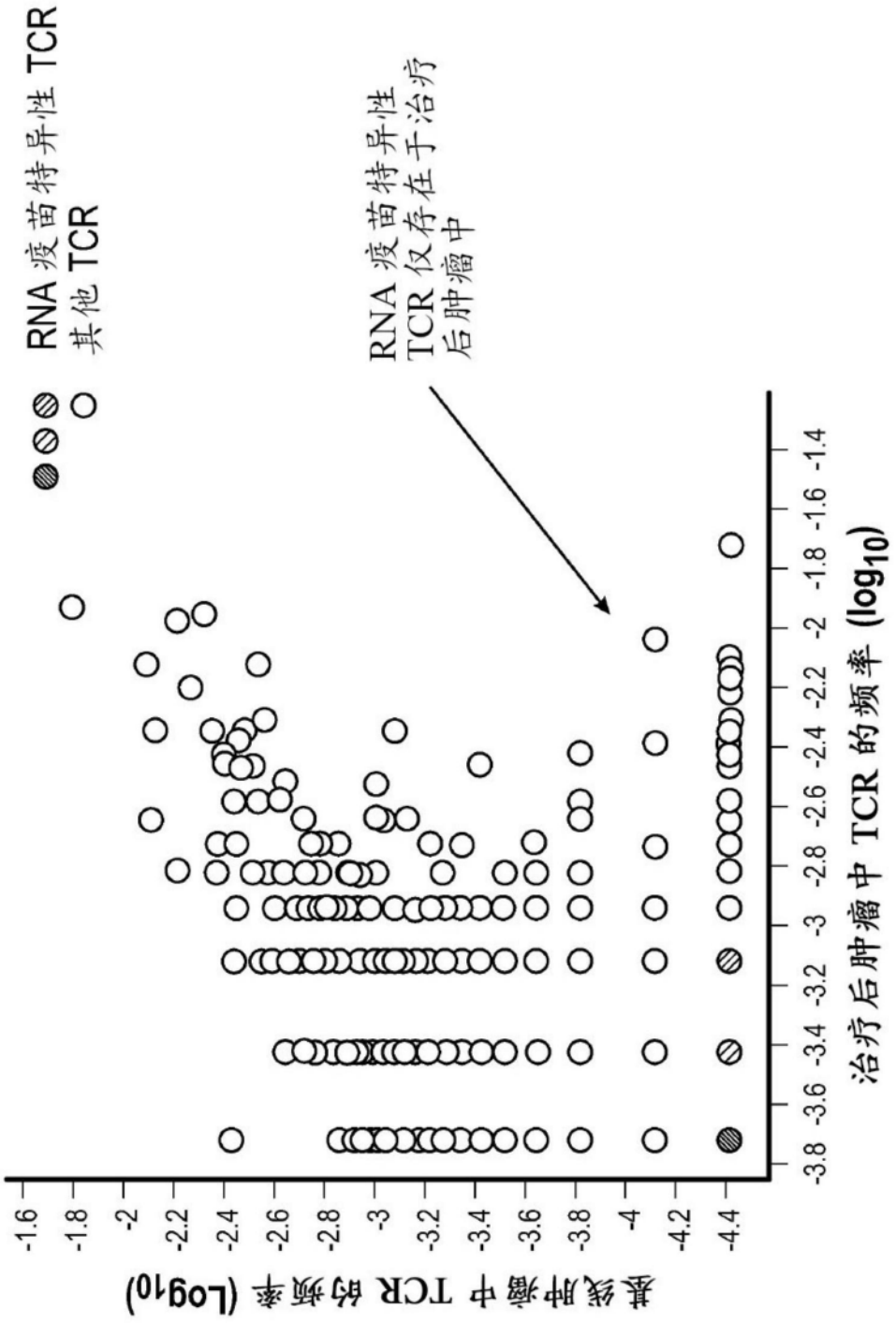

RNA 疫苗特异性 TCR
其他 TCR
RNA 疫苗特异性
TCR 仅存在于治疗
后肿瘤中
基线肿瘤中 TCR 的频率 (Log10)
治疗后肿瘤中 TCR 的频率 (log10)
-1.6
-1.8
-2
-2.2
-2.4
-2.6
-2.8
-3
-3.2
-3.4
-3.6
-3.8
-4
-4.2
-4.4
-3.8
-3.6
-3.4
-3.2
-3
-2.8
-2.6
-2.4
-2.2
-2
-1.8
-1.6
-1.4

图15

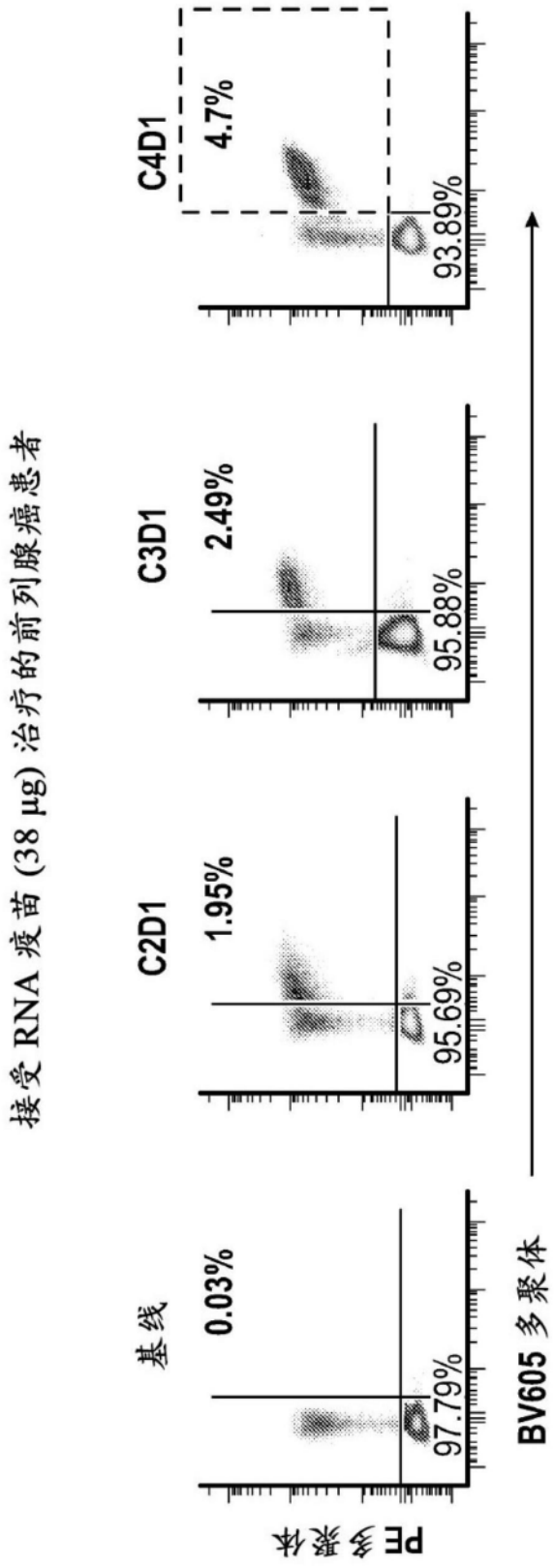

接受 RNA 疫苗 (38 μg) 治疗的前列腺癌患者
基线
0.03%
97.79%
C2D1
1.95%
95.69%
C3D1
2.49%
95.88%
C4D1
4.7%
93.89%
PE 多聚体
BV605 多聚体

图16A

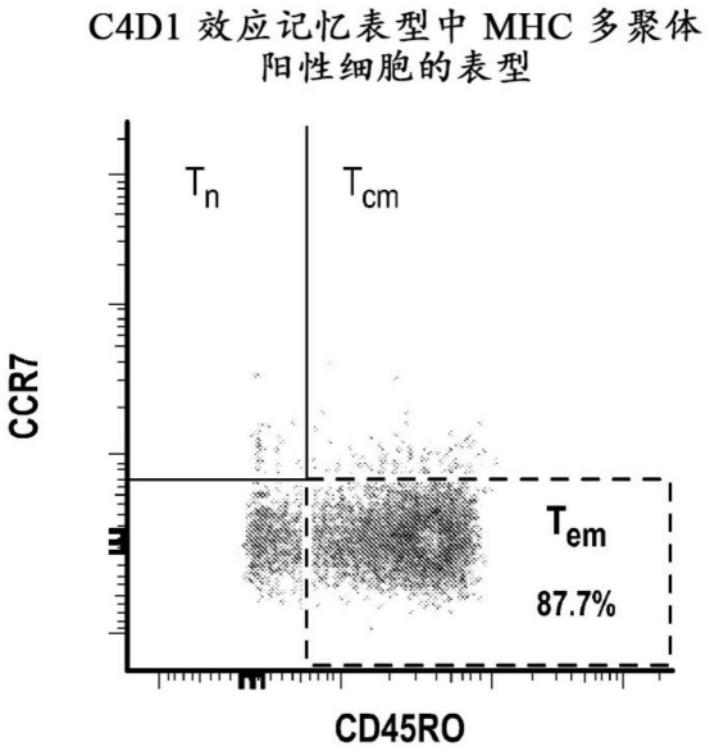

C4D1 效应记忆表型中 MHC 多聚体
阳性细胞的表型
Tn
Tcm
Tem
87.7%
CCR7
CD45RO

图16B

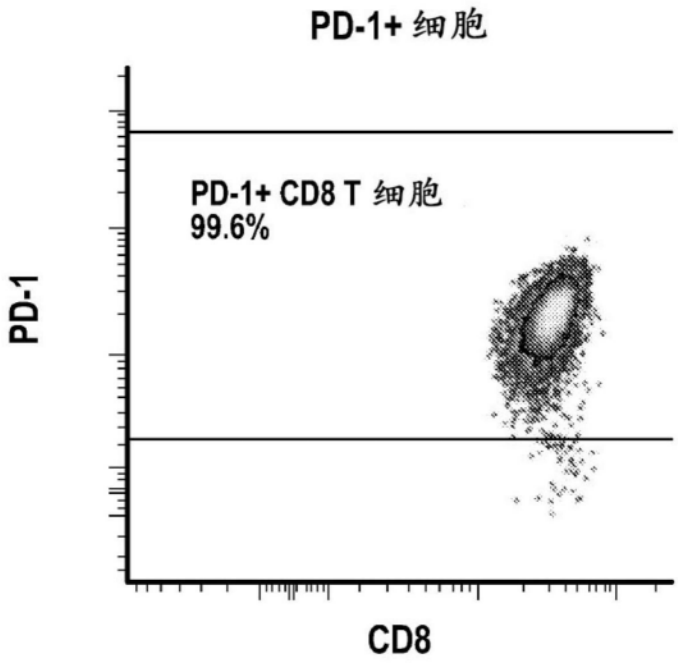

PD-1+ 细胞
PD-1+ CD8 T 细胞
99.6%
PD-1
CD8

图16C

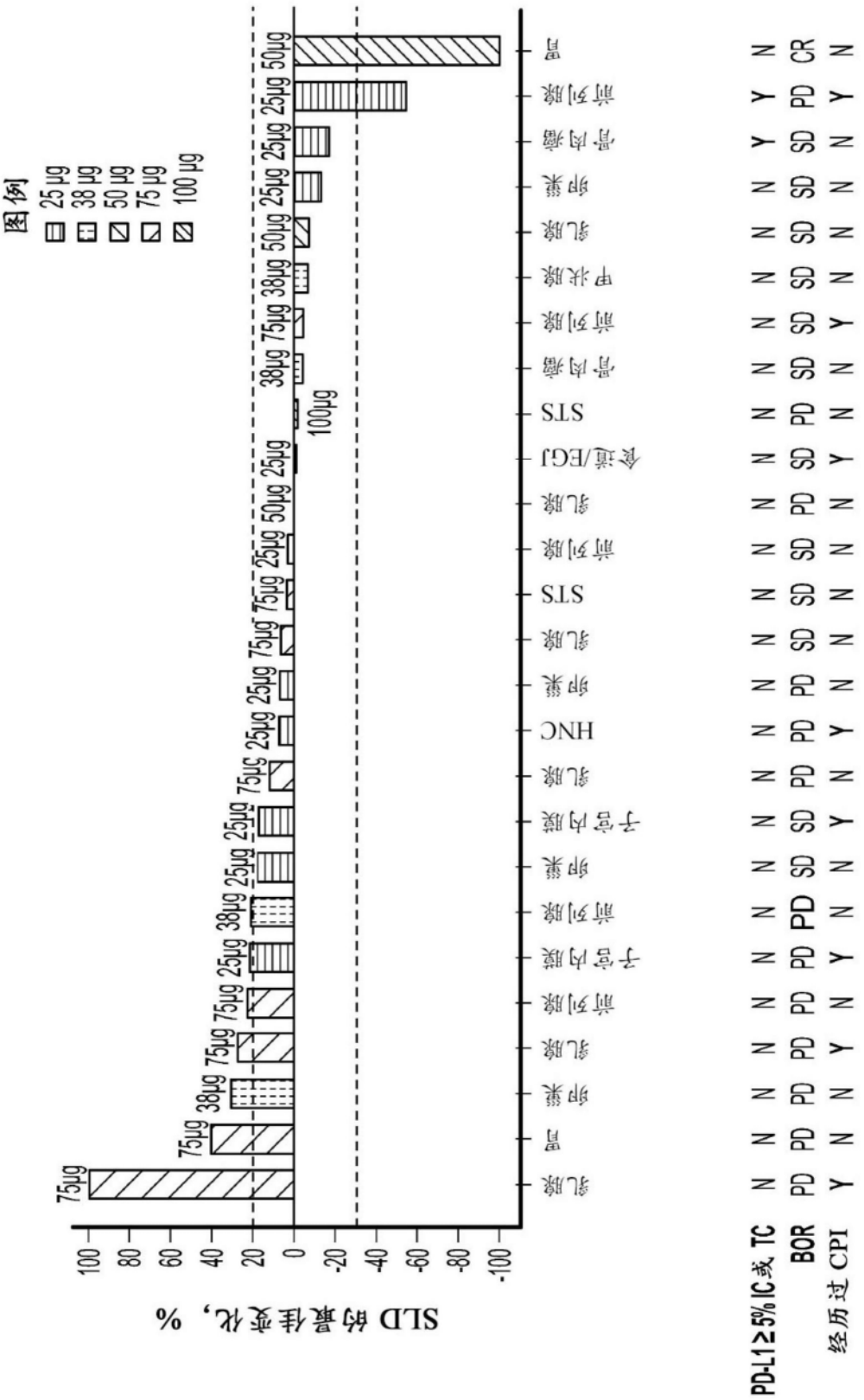

SLD 的最佳变化，%
100
80
60
40
20
0
-20
-40
-60
-80
-100
图例
25 μg
38 μg
50 μg
75 μg
100 μg
乳腺
胃
卵巢
乳腺
前列腺
子宫内膜
前列腺
卵巢
乳腺
HNC
卵巢
乳腺
子宫内膜
卵巢
前列腺
子宫内膜
乳腺
STS
乳腺
食道/EGJ
前列腺
乳腺
STS
前列腺
甲状腺
乳腺
卵巢
骨肉瘤
前列腺
胃
PD-L1≥5% IC或 TC
BOR
经历过 CPI

图17

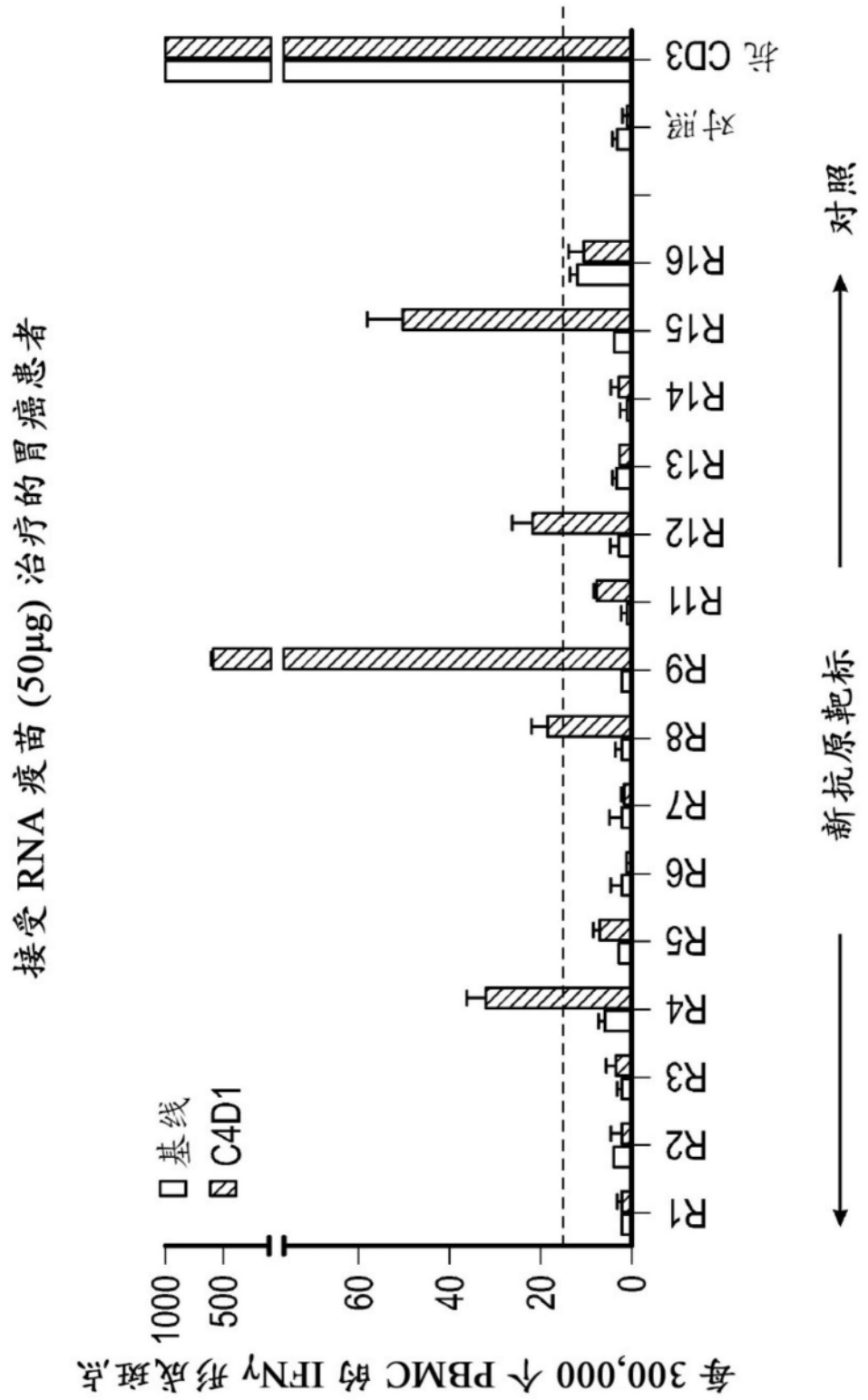

接受 RNA 疫苗 (50μg) 治疗的胃癌患者
每 300,000 个 PBMC 的 IFNγ 形成斑点
基线
C4D1
1000
500
60
40
20
0
R1
R2
R3
R4
R5
R6
R7
R8
R9
R11
R12
R13
R14
R15
R16
对照
CD3
新抗原靶标

图18

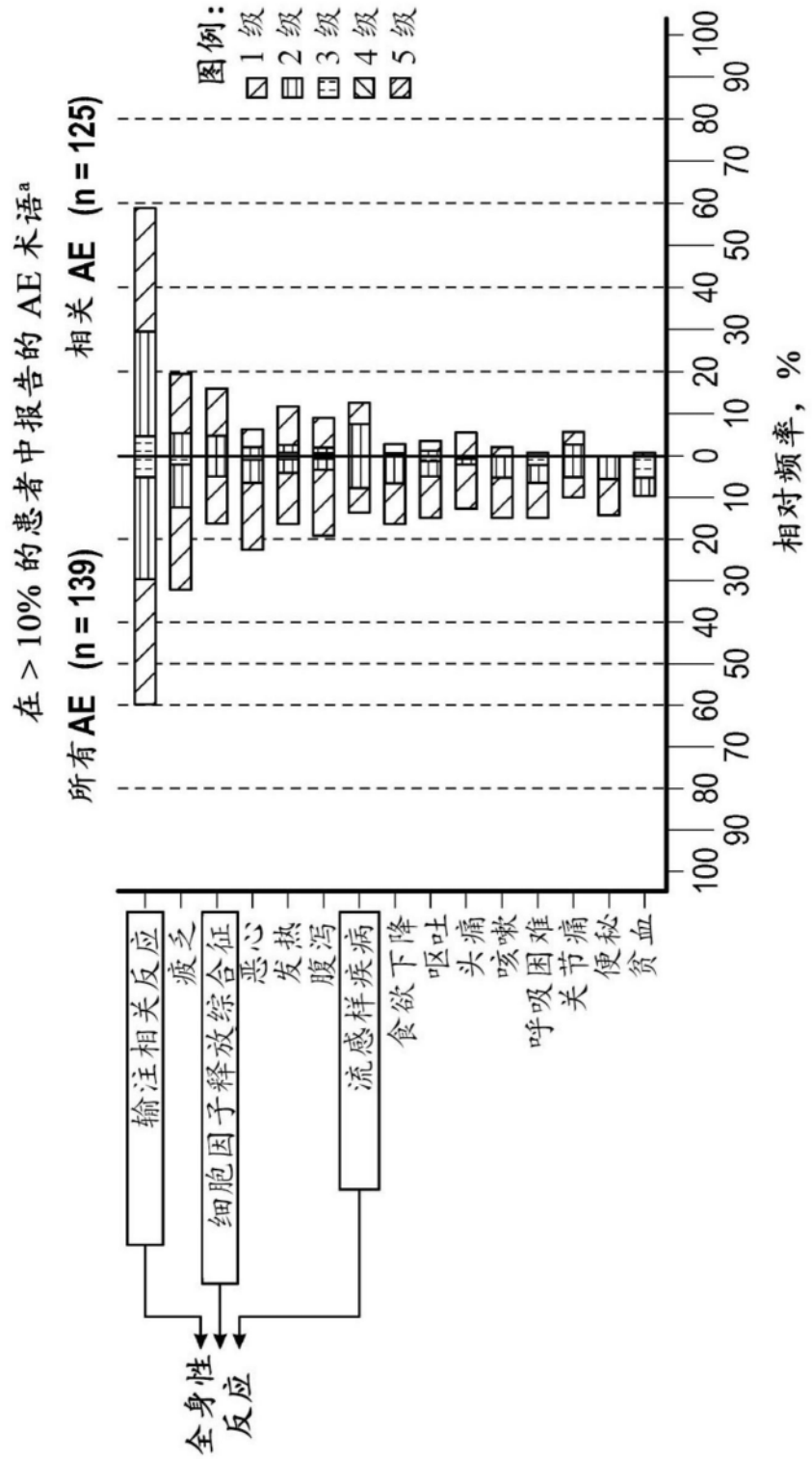

在 > 10% 的患者中报告的 AE 术语[a]
所有AE (n = 139)
相关 AE (n = 125)
图例：
1 级
2 级
3 级
4 级
5 级
100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
相对频率，%
全身性反应
输注相关反应
疲乏
细胞因子释放综合征
恶心
发热
腹泻
流感样疾病
食欲下降
呕吐
头痛
咳嗽
呼吸困难
关节痛
便秘
贫血

图19

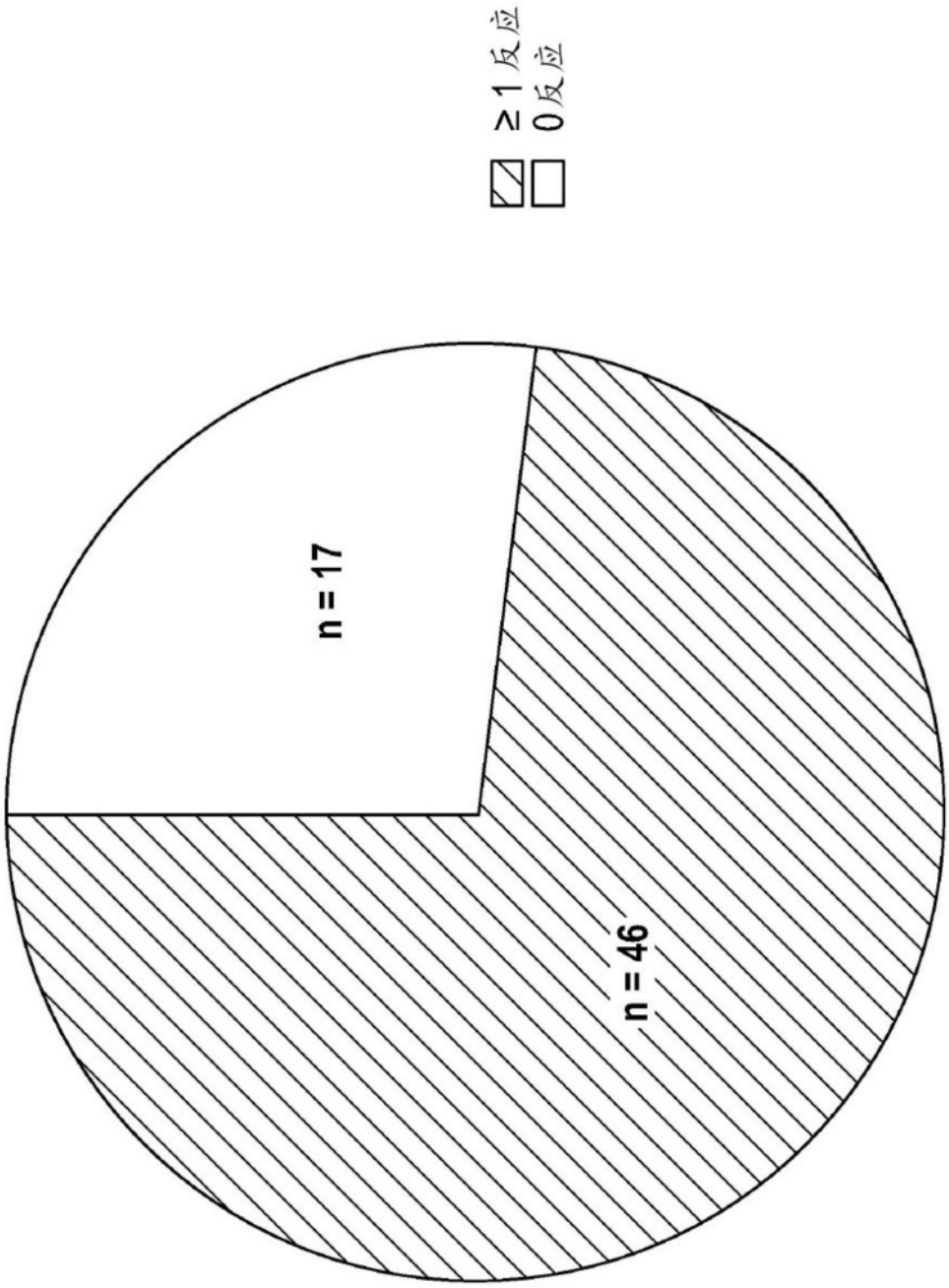


图20

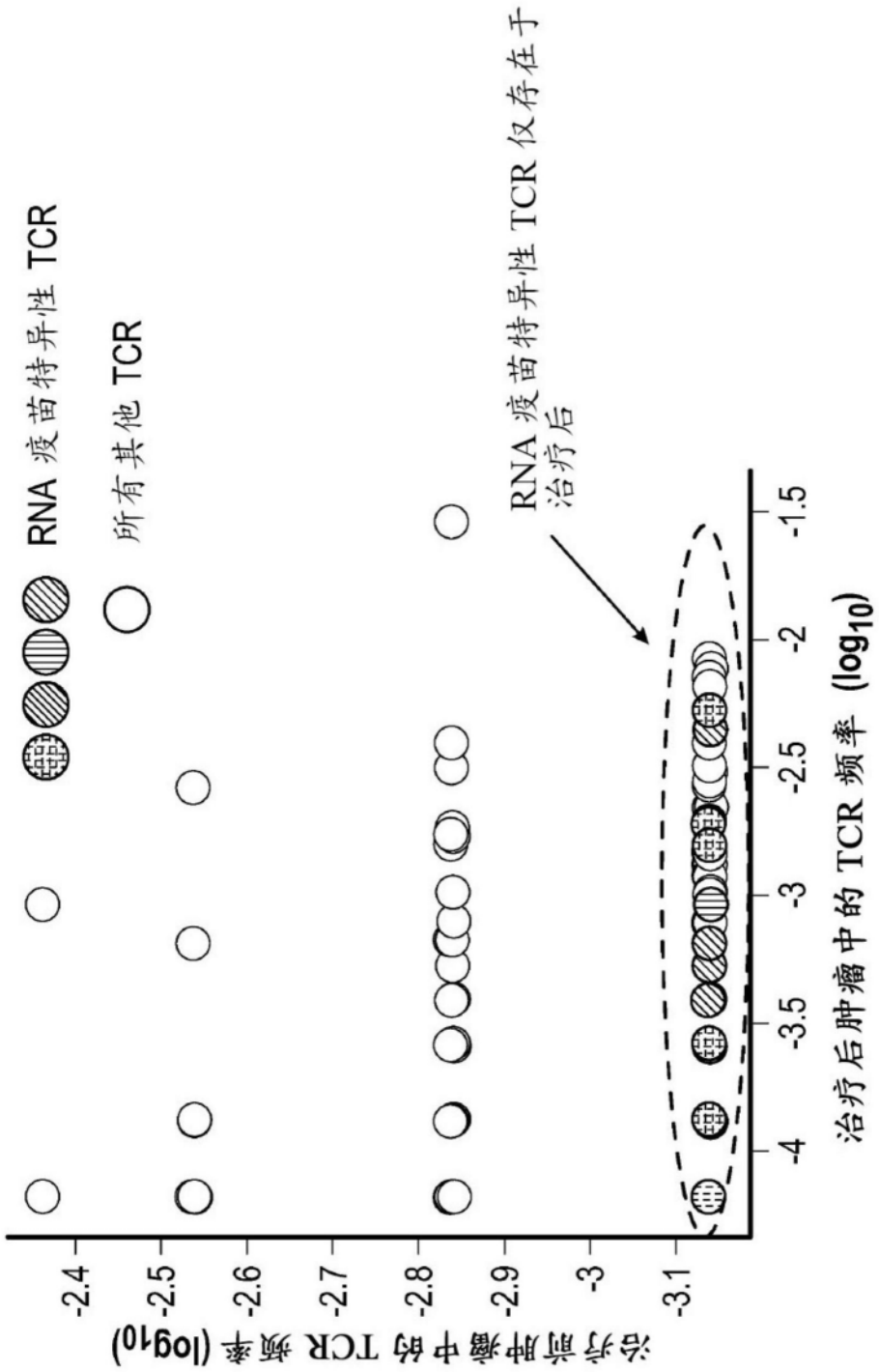

RNA 疫苗特异性 TCR
所有其他 TCR
RNA 疫苗特异性 TCR 仅存在于治疗后
治疗前肿瘤中的 TCR 频率 (log10)
-2.4
-2.5
-2.6
-2.7
-2.8
-2.9
-3
-3.1
治疗后肿瘤中的 TCR 频率 (log10)
-4
-3.5
-3
-2.5
-2
-1.5

图21

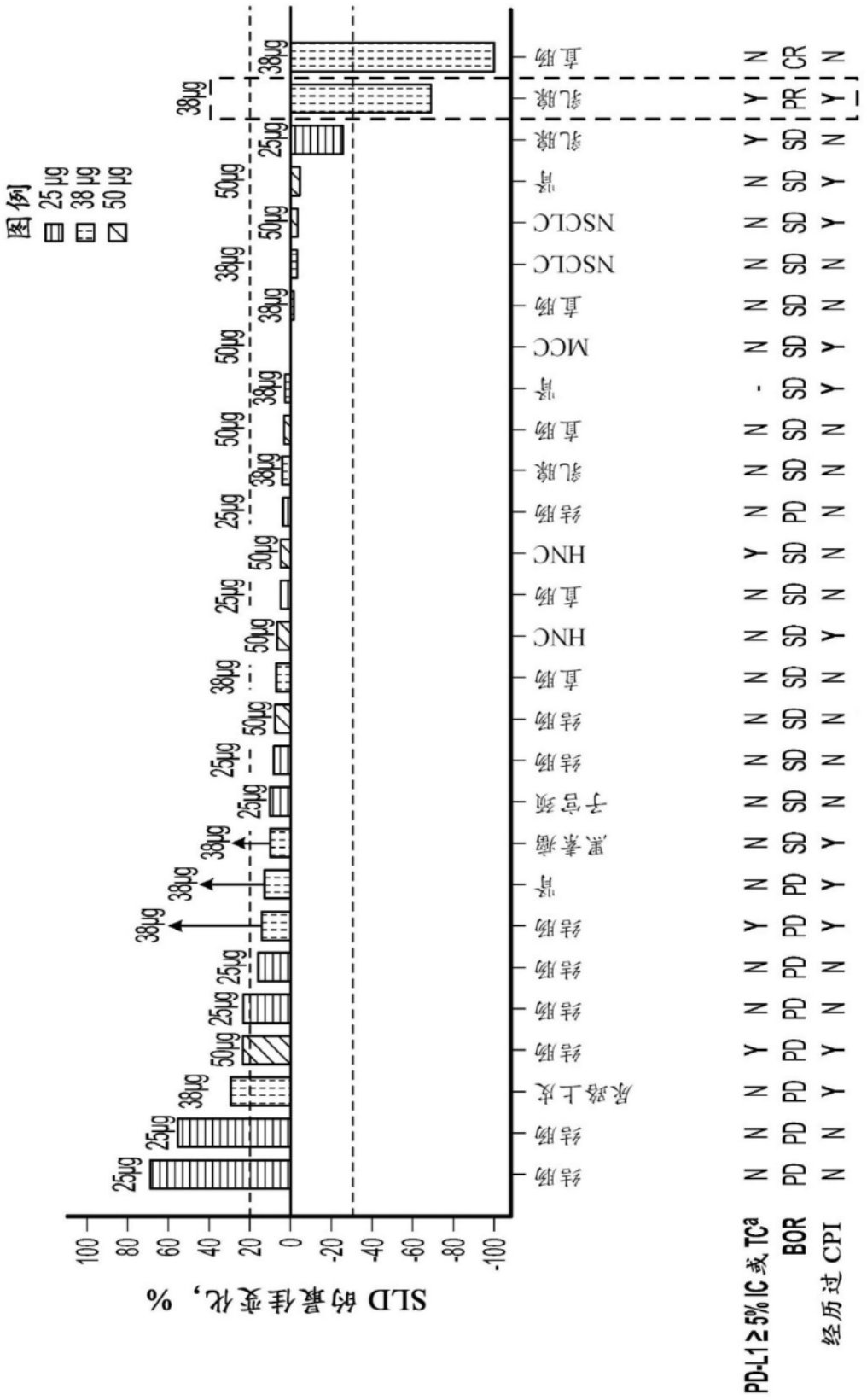

SLD 的最佳变化，%
100
80
60
40
20
0
-20
-40
-60
-80
-100
图例
25 μg
38 μg
50 μg
结肠
结肠
尿路上皮
结肠
结肠
结肠
结肠
肾
黑素瘤
子宫颈
结肠
结肠
直肠
HNC
直肠
HNC
直肠
结肠
乳腺
直肠
肾
MCC
直肠
NSCLC
NSCLC
肾
乳腺
乳腺
直肠
PD-L1≥5% IC或TC[a]
BOR
经历过CPI

图22

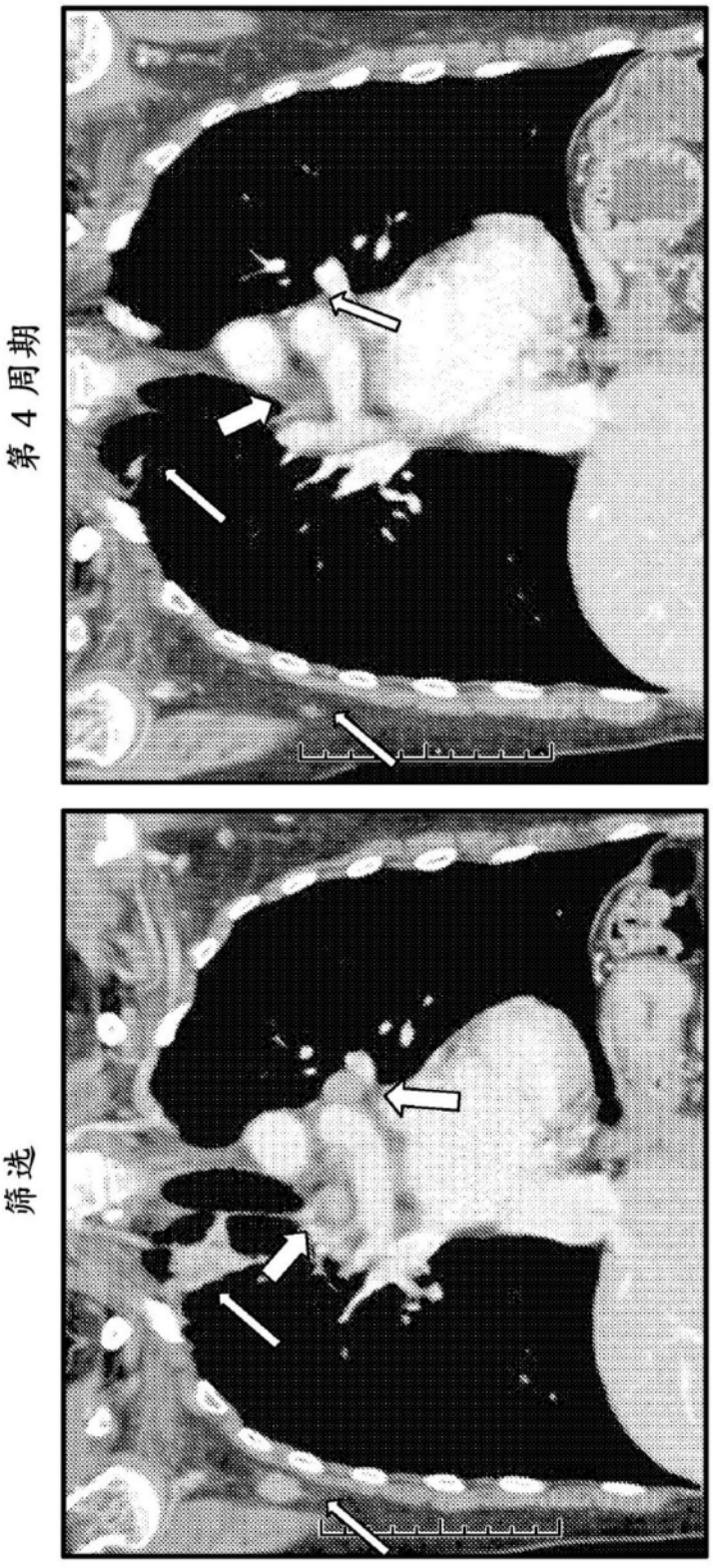


图23A

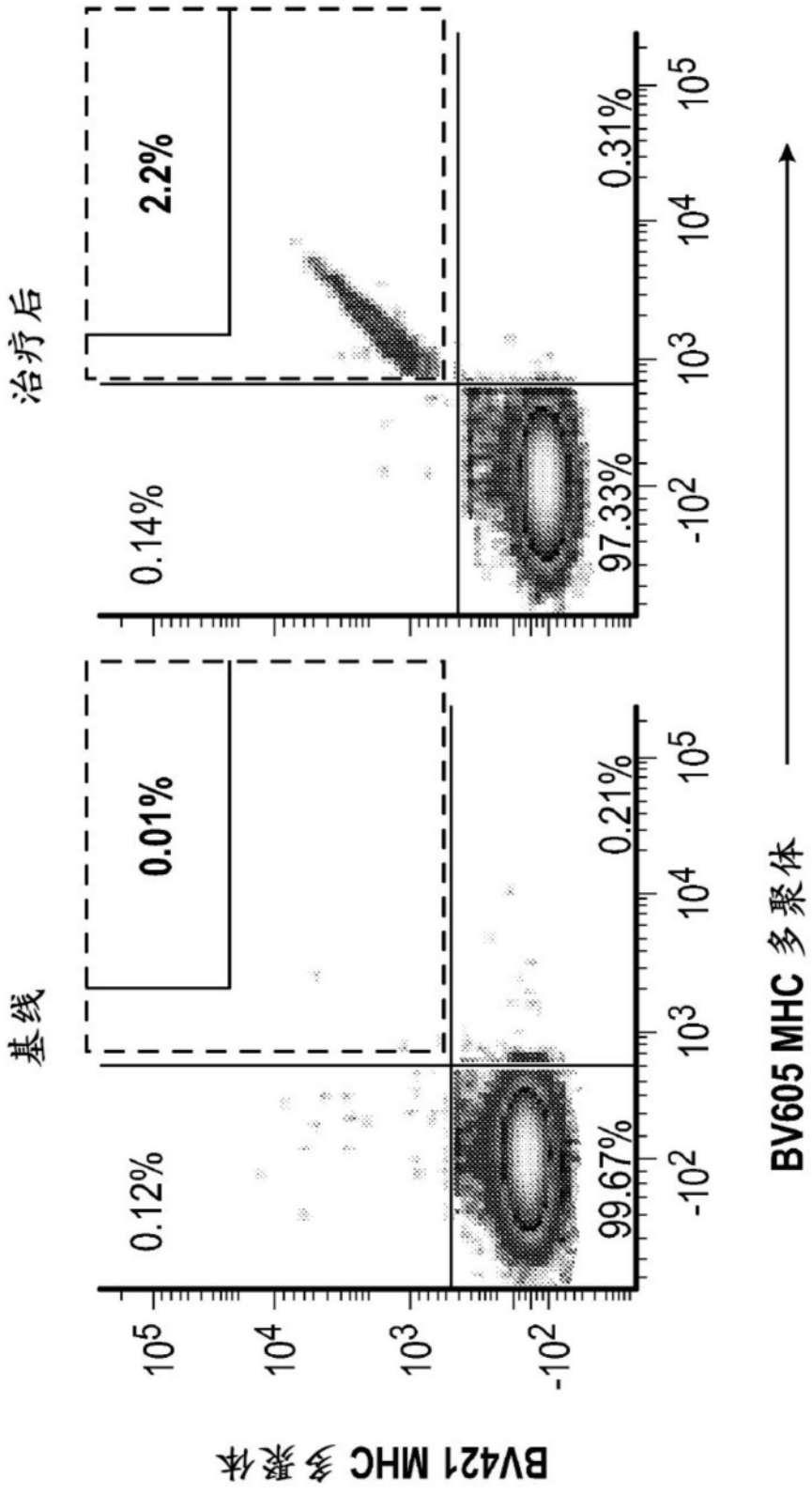

治疗后
基线
2.2%
0.01%
0.14%
0.12%
97.33%
99.67%
0.31%
0.21%
BV421 MHC 多聚体
BV605 MHC 多聚体

图23B

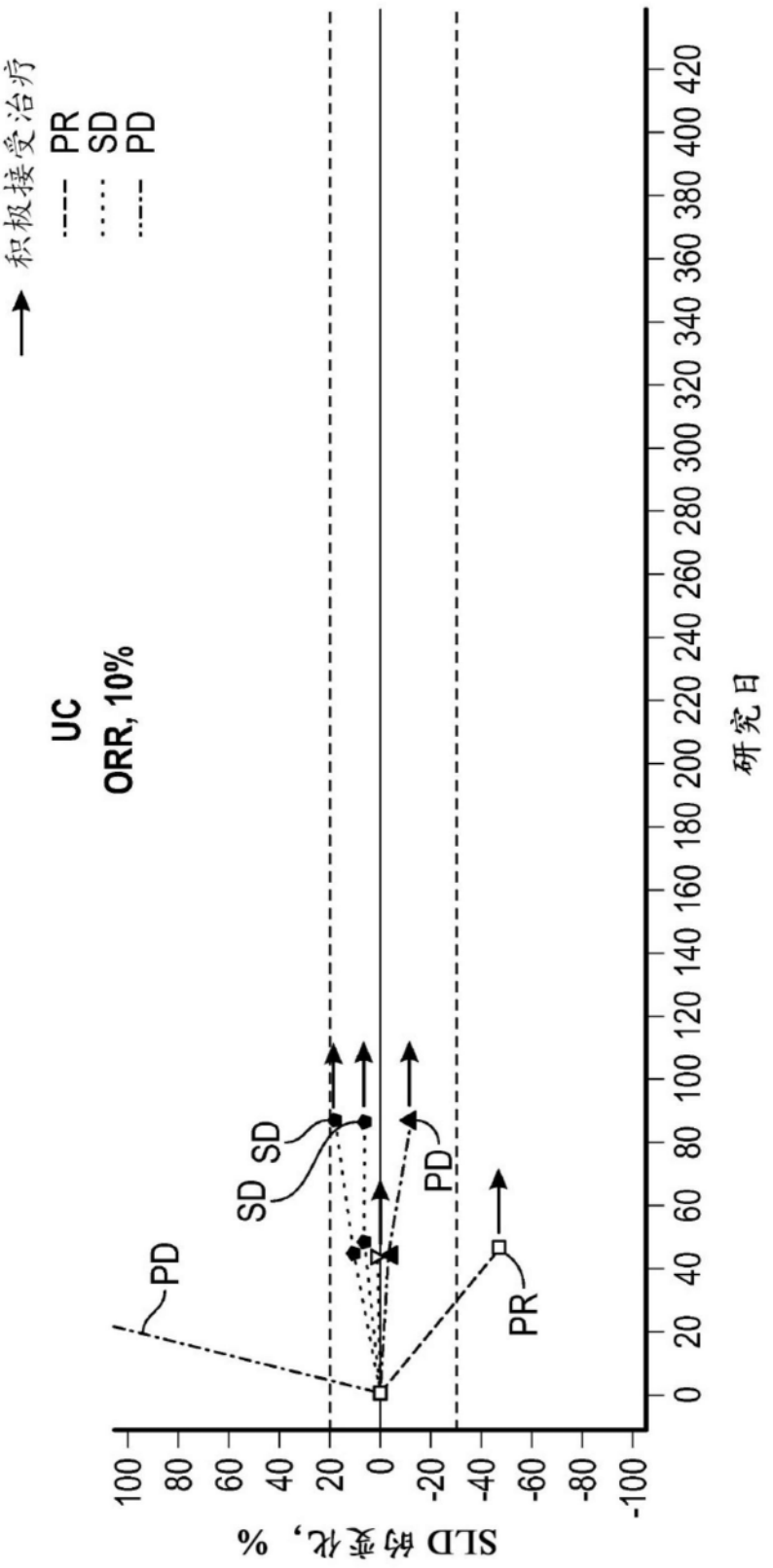

积极接受治疗
PR
SD
PD
UC
ORR, 10%
SLD 的变化, %
100
80
60
40
20
0
-20
-40
-60
-80
-100
0 20 40 60 80 100 120 140 160 180 200 220 240 260 280 300 320 340 360 380 400 420
研究日
PD
SD
SD
PD
PR

图24A

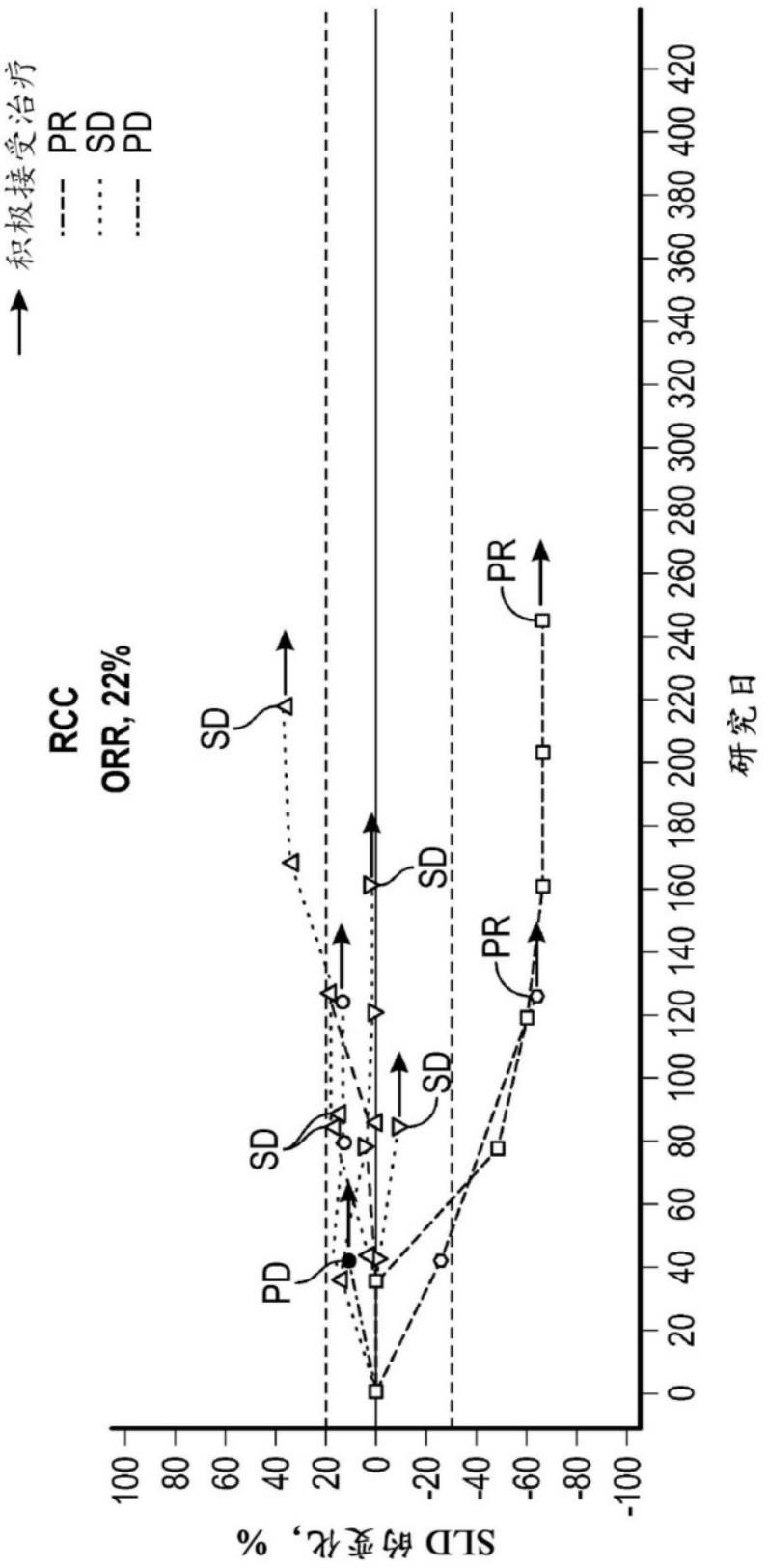

积极接受治疗
PR
SD
PD
RCC
ORR, 22%
SLD 的变化，%
研究日
100
80
60
40
20
0
-20
-40
-60
-80
-100
0 20 40 60 80 100 120 140 160 180 200 220 240 260 280 300 320 340 360 380 400 420
SD
SD
SD
SD
PD
PR
PR

图24B

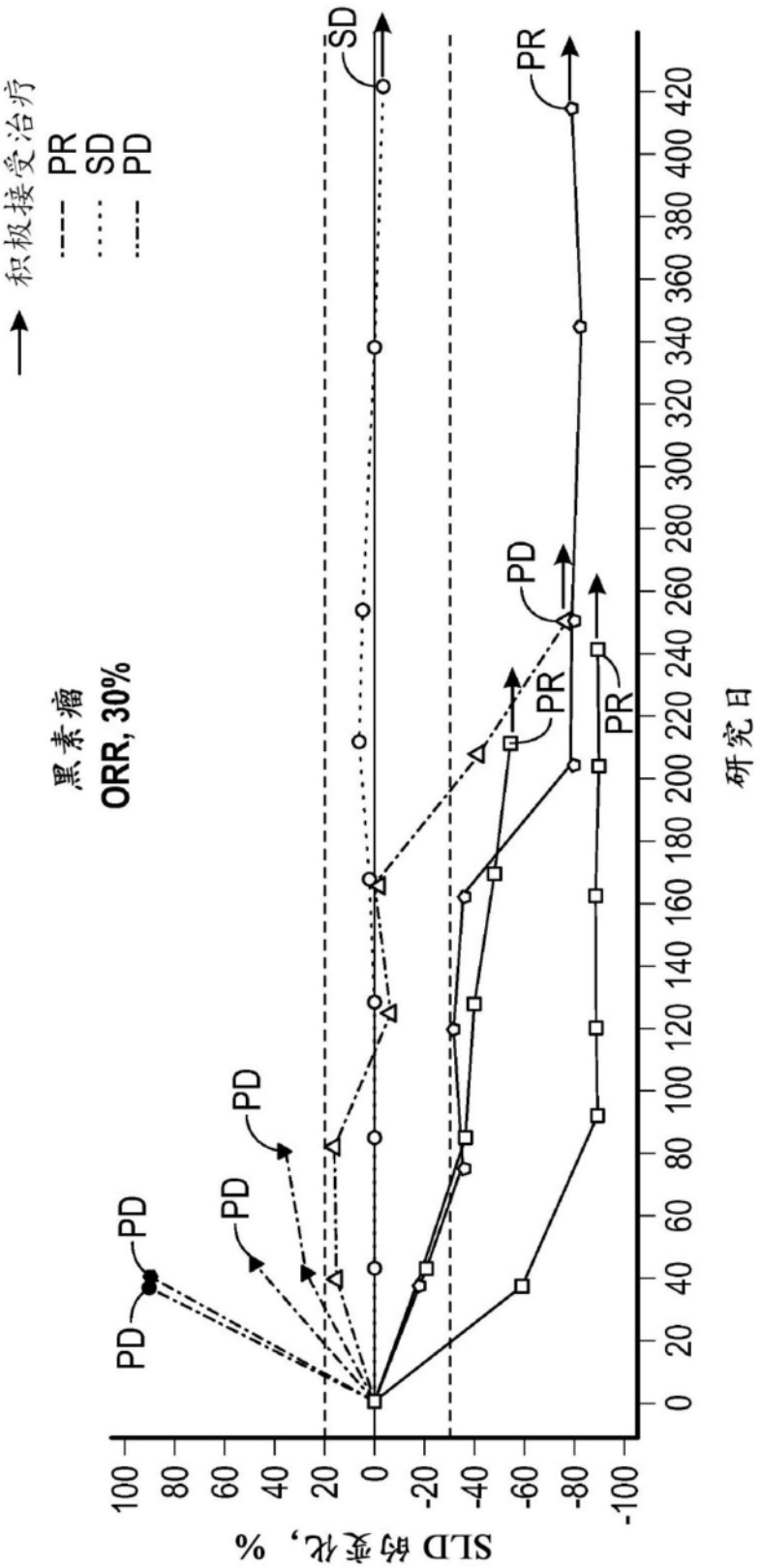

积极接受治疗
PR
SD
PD
黑素瘤
ORR, 30%
SLD 的变化, %
研究日
100
80
60
40
20
0
-20
-40
-60
-80
-100
0
20
40
60
80
100
120
140
160
180
200
220
240
260
280
300
320
340
360
380
400
420
SD
PR
PD
PR
PR
PD
PD
PD
PD

图24C

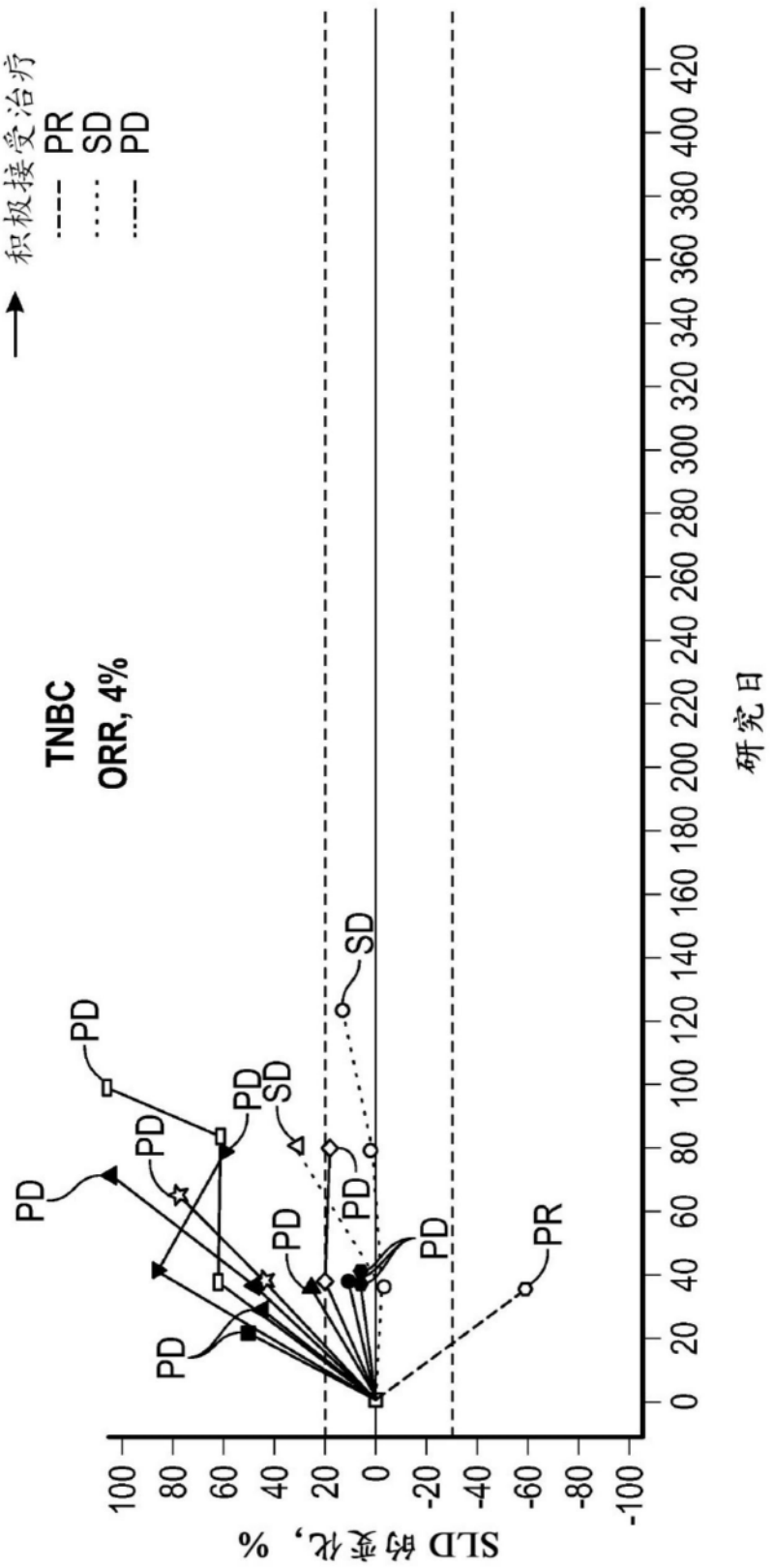


图24D

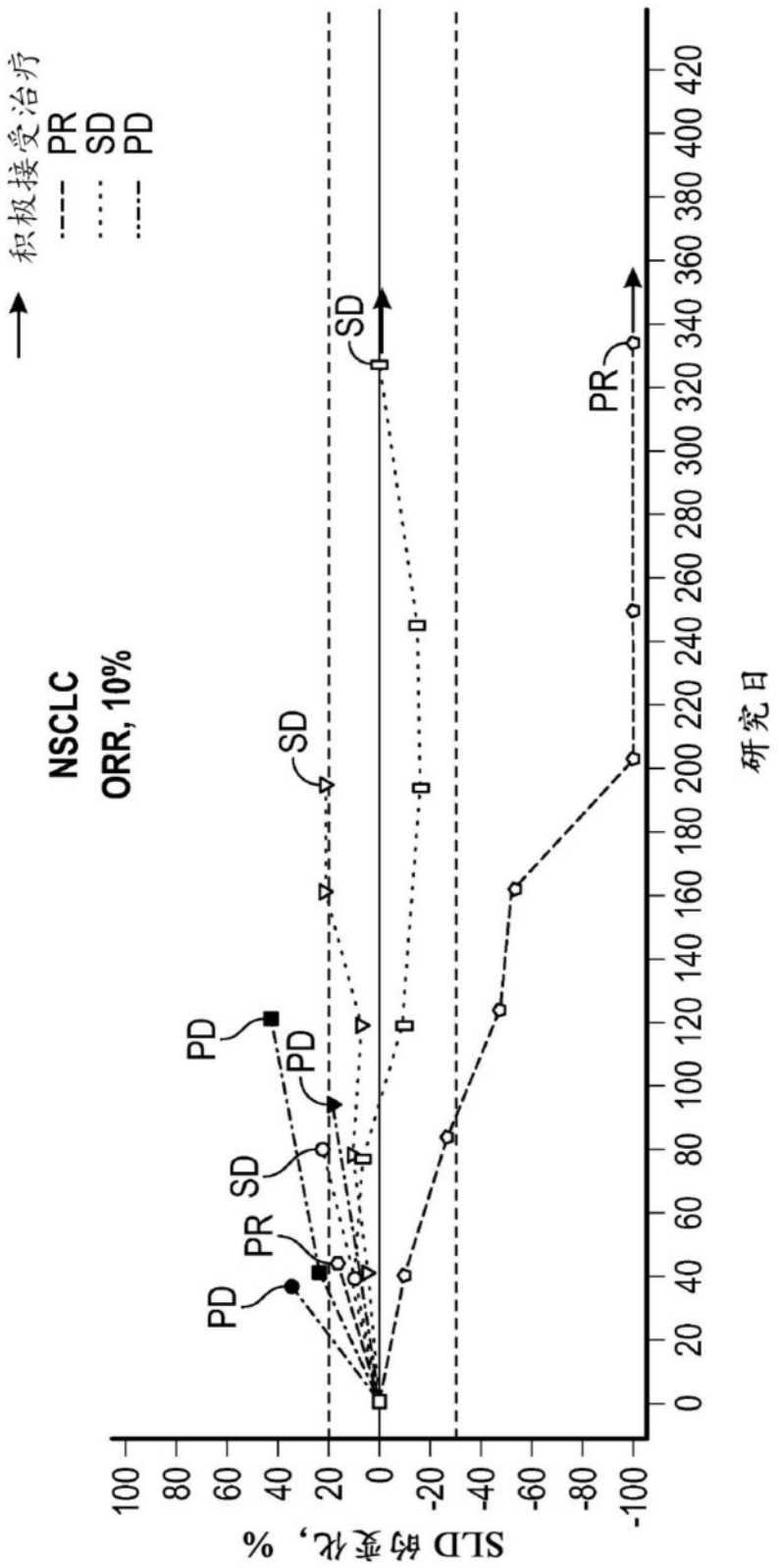

积极接受治疗
PR
SD
PD
NSCLC
ORR, 10%
SLD 的变化, %
研究日
100
80
60
40
20
0
-20
-40
-60
-80
-100
0 20 40 60 80 100 120 140 160 180 200 220 240 260 280 300 320 340 360 380 400 420
PD
PD
SD
PR
SD
PD
SD
PR

图24E