



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114404581 A

(43) 申请公布日 2022. 04. 29

(21) 申请号 202111635839.9

朱塞佩·恰拉梅拉

(22) 申请日 2016.10.21

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

(30) 优先权数据

代理人 张福誉

62/245,031 2015.10.22 US

62/245,129 2015.10.22 US

62/247,472 2015.10.28 US

62/247,317 2015.10.28 US

62/368,810 2016.07.29 US

(51) Int.Cl.

A61K 39/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 9/51 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

(62) 分案原申请数据

201680075024.0 2016.10.21

(71) 申请人 摩登纳特斯有限公司
地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 尼古拉斯·瓦利安特
塔尔·扎克斯
埃里克·易-春·黄

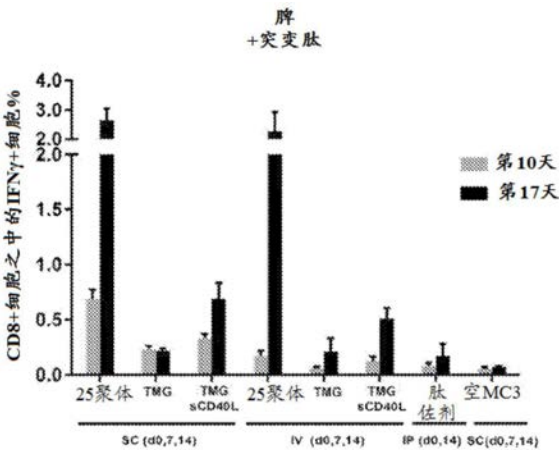
权利要求书1页 说明书151页
序列表7页 附图14页

(54) 发明名称

癌症疫苗

(57) 摘要

本发明涉及癌症疫苗。本公开涉及癌症核糖核酸 (RNA) 疫苗, 以及使用所述疫苗和包含所述疫苗的组合物。的方法。



1. 一种疫苗,其包含在脂质纳米粒子中配制的具有编码癌抗原的开放阅读框的mRNA和具有编码免疫检查点调节剂的开放阅读框的mRNA。
2. 如权利要求1所述的疫苗,其中所述免疫检查点调节剂是抑制性检查点多肽。
3. 如权利要求2所述的疫苗,其中所述抑制性检查点多肽是特异性结合至选自PD-1、TIM-3、VISTA、A2AR、B7-H3、B7-H4、BTLA、CTLA-4、IDO、KIR和LAG3组成的组的分子的抗体或其片段。
4. 如权利要求2所述的疫苗,其中所述抑制性检查点多肽是抗CTLA4抗体或抗PD1抗体。
5. 如权利要求1所述的疫苗,其中所述mRNA编码2-100种癌抗原。
6. 如权利要求1所述的疫苗,其中所述mRNA编码10-100种癌抗原。
7. 如权利要求1所述的疫苗,其中所述mRNA编码10-1,000种癌抗原。
8. 如权利要求1-7中任一项所述的疫苗,其中所述疫苗是个人化癌症疫苗并且其中所述癌抗原是受试者特异性癌抗原。
9. 如权利要求1所述的疫苗,其中所述受试者特异性癌抗原代表所述受试者的肿瘤样品的外显子组。
10. 如权利要求1所述的疫苗,其中所述受试者特异性癌抗原代表所述受试者的肿瘤样品的转录物组。

癌症疫苗

[0001] 本申请是申请号为201680075024.0的中国专利申请的分案申请,原申请是2016年10月21日提交的PCT国际申请PCT/US2016/058317于2018年6月20日进入中国国家阶段的申请。

[0002] 相关申请

[0003] 本申请根据35U.S.C.§119(e)要求2015年10月22日提交的美国临时申请号62/245,129、2015年10月22日提交的美国临时申请号62/245,031、2015年10月28日提交的美国临时申请号62/247,317、2015年10月28日提交的美国临时申请号62/247,472和2016年7月29日提交的美国临时申请号62/368,810的优先权,所述美国临时申请各自的内容以引用的方式整体并入本文。

技术领域

[0004] 本发明涉及癌症疫苗。

背景技术

[0005] 癌症疫苗包括预防性或防治性疫苗,其意图预防癌症在健康人中显现;以及治疗性疫苗,其意图通过加强身体的针对癌症的天然防御来治疗现有癌症。癌症预防性疫苗可例如靶向导致或促进癌症显现的致病因子以防止感染性疾病导致癌症。**Gardasil®**和**Cervarix®**是可商购获得的防治性疫苗的两个实例。各疫苗针对HPV感染进行保护。其他预防性癌症疫苗可靶向被预测会使个体在未来显现癌症的可能性增加的宿主蛋白质或片段。

[0006] 大多数商业疫苗或开发中疫苗基于整个微生物、蛋白质抗原、肽、多糖或脱氧核糖核酸(DNA)疫苗和它们的组合。DNA疫苗接种是一种用于刺激对抗原的体液和细胞免疫应答的技术。将经遗传工程化的DNA(例如裸质粒DNA)直接注射至活体宿主中导致它的少数细胞直接产生抗原,从而产生保护性免疫应答。然而,在这个技术的情况下,出现DNA整合至疫苗的基因组中的潜在问题,包括可能导致插入诱变,这可导致对致癌基因的活化或对肿瘤抑制基因的抑制。

发明内容

[0007] 本文提供可安全地引导身体的细胞机构来产生几乎任何目标癌蛋白或其片段的RNA(例如信使RNA(mRNA))的核糖核酸(RNA)癌症疫苗。在一些实施方案中,RNA是经修饰的RNA。本公开的RNA疫苗可用于诱导针对癌症的平衡免疫应答,其包括细胞免疫性与体液免疫性两者,而无例如可能导致插入诱变的风险。

[0008] 视癌症的盛行性或未满足医学需求的程度或水平而定,RNA疫苗可用于各种环境中。RNA疫苗可用于治疗和/或预防各种转移阶段或程度的癌症。RNA疫苗具有优越性质,因为相比于包括癌症疫苗的替代性抗癌疗法,它们产生大得多的抗体效价,并且更早产生应答。在不希望受理论束缚下,据信呈mRNA多核苷酸形式的RNA疫苗被更好设计以在翻译后产生适当蛋白质构象,因为RNA疫苗征用天然细胞机构。不同于离体制造并且可触发非所要细

胞应答的传统疫苗, RNA疫苗以更天然方式向细胞系统呈递。

[0009] 本公开的一些实施方案提供癌症疫苗, 其包括至少一种具有编码至少一种癌症抗原性多肽或其免疫原性片段(例如能够诱导对癌症的免疫应答的免疫原性片段)的开放阅读框的核糖核酸(RNA)多核苷酸。其他实施方案包括至少一种具有编码两种或更多种能够诱导对癌症的免疫应答的抗原或表位的开放阅读框的核糖核酸(RNA)多核苷酸。

[0010] 在一些方面, 本发明是具有编码癌抗原的开放阅读框的mRNA和具有编码免疫检查点调节剂的开放阅读框的mRNA的疫苗。在一些实施方案中, 免疫检查点调节剂是抑制性检查点多肽。在一些实施方案中, 抑制性检查点多肽是特异性结合至选自PD-1、TIM-3、VISTA、A2AR、B7-H3、B7-H4、BTLA、CTLA-4、IDO、KIR和LAG3组成的组的分子的抗体或其片段。在一些实施方案中, 抑制性检查点多肽是抗CTLA4抗体或抗PD1抗体。任选地, 疫苗包括脂质纳米粒子。在一些实施方案中, 向受试者施用具有编码癌抗原的开放阅读框的mRNA的疫苗。在其他实施方案中, 3-10周后施用检查点抑制剂。在一些实施方案中, 4周后施用检查点抑制剂。

[0011] 在其他方面, 本发明是一种个人化癌症疫苗, 其含有具有编码至少2种癌抗原的开放阅读框的mRNA, 其中所述至少2种癌抗原是患者特异性癌抗原, 以及脂质纳米粒子载体。在一些实施方案中, 脂质纳米粒子具有50-200nm的平均直径。

[0012] 在其他方面, 本发明是具有编码至少2种癌抗原的开放阅读框的mRNA的个人化癌症疫苗, 其中所述至少2种癌抗原代表患者的抗原。在一些实施方案中, 患者的抗原是所述患者的外来体鉴定抗原。在一些实施方案中, 单一mRNA编码癌抗原。在其他实施方案中, 多种mRNA编码癌抗原。

[0013] 在其他实施方案中, 各mRNA可编码5-10种癌抗原或单一癌抗原。在一些实施方案中, mRNA编码2-100种癌抗原。在其他实施方案中, mRNA编码10-100、20-100、50-100、100-200、300-400、500-600、600-700、700-800、900-1,000或1,000-10,000种癌抗原。

[0014] 在一些实施方案中,

[0015] a) 编码各癌抗原的mRNA散置有裂解敏感性位点;

[0016] b) 编码各癌抗原的mRNA在无连接体下直接彼此连接;

[0017] c) 编码各癌抗原的mRNA以单一核苷酸连接体彼此连接;

[0018] d) 各癌抗原包含25-35个氨基酸, 并且包括位于中心的SNP突变;

[0019] e) 至少30%的癌抗原对来自受试者的I类MHC分子具有最高亲和力;

[0020] f) 至少30%的癌抗原对来自受试者的II类MHC分子具有最高亲和力;

[0021] g) 至少50%的癌抗原对HLA-A、HLA-B和/或DRB1具有 $IC_{50} > 500nM$ 的预测结合亲和力;

[0022] h) mRNA编码20种癌抗原;

[0023] i) 50%的癌抗原对I类MHC具有结合亲和力, 并且50%的癌抗原对II类MHC具有结合亲和力; 和/或

[0024] j) 对编码癌抗原的mRNA进行排列以使癌抗原被排序来使假表位最少。

[0025] 在一些实施方案中, 各癌抗原包含31个氨基酸, 并且包括位于中心的SNP突变, 在所述SNP突变的各侧上具有15个侧接氨基酸。

[0026] 在一些实施方案中, 疫苗是个人化癌症疫苗, 并且其中癌抗原是受试者特异性癌

抗原。在一些实施方案中,受试者特异性癌抗原可代表受试者的肿瘤样品的外显子组,或代表受试者的肿瘤样品的转录物组。在一些实施方案中,受试者特异性癌抗原可代表受试者的外来体。

[0027] 在一些实施方案中,开放阅读框进一步编码一种或多种传统癌抗原。在一些实施方案中,传统癌抗原是非突变抗原。在一些实施方案中,传统癌抗原是突变抗原。

[0028] 在一些实施方案中,mRNA疫苗进一步包含具有编码一种或多种传统癌抗原的开放阅读框的mRNA。

[0029] 在一些实施方案中,单一mRNA编码癌抗原。在其他实施方案中,多种mRNA编码癌抗原。在一些实施方案中,各癌抗原的长度为10-50个氨基酸。在其他实施方案中,各癌抗原的长度为15-20个氨基酸。在其他实施方案中,癌抗原的长度为20-50、25-100、100-200、200-300、300-400、400-500、500-1,000或1,000-10,000个氨基酸。

[0030] 在一些实施方案中,疫苗进一步包含佐剂。

[0031] 本公开的一些实施方案提供一种癌症疫苗,其包括在脂质纳米粒子内配制的至少一种核糖核酸(RNA)多核苷酸,所述多核苷酸具有编码至少一种癌多肽的开放阅读框、至少一个5'末端帽和至少一种化学修饰。在一些实施方案中,5'末端帽是7mG(5')ppp(5')N1mpNp。

[0032] 在一些实施方案中,至少一种化学修饰选自假尿苷、N1-甲基假尿苷、N1-乙基假尿苷、2-硫代尿苷、4'-硫代尿苷、5-甲基胞嘧啶、2-硫代-1-甲基-1-脱氮-假尿苷、2-硫代-1-甲基-假尿苷、2-硫代-5-氮杂-尿苷、2-硫代-二氢假尿苷、2-硫代-二氢尿苷、2-硫代-假尿苷、4-甲氧基-2-硫代-假尿苷、4-甲氧基-假尿苷、4-硫代-1-甲基-假尿苷、4-硫代-假尿苷、5-氮杂-尿苷、二氢假尿苷、5-甲基尿苷、5-甲氧基尿苷和2'-O-甲基尿苷。在一些实施方案中,已使化学修饰的核苷酸的并入程度最优化以达成对疫苗制剂的改进免疫应答。

[0033] 在一些实施方案中,脂质纳米粒子包含阳离子脂质、经PEG修饰的脂质、固醇和非阳离子脂质。在一些实施方案中,阳离子脂质是可离子化阳离子脂质,并且非阳离子脂质是中性脂质,并且固醇是胆固醇。在一些实施方案中,阳离子脂质选自2,2-二亚油基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧杂环戊烷(DLin-KC2-DMA)、二亚油基-甲基-4-二甲基氨基丁酸酯(DLin-MC3-DMA)和9-((4-(二甲基氨基)丁酰基)氧基)十七烷二酸二((Z)-壬-2-烯-1-基)酯(L319)。

[0034] 在一些实施方案中,脂质纳米粒子制剂包括免疫增效剂(例如TLR激动剂)以使疫苗(制剂)的免疫原性增强。

[0035] 在一些实施方案中,开放阅读框中100%的尿嘧啶具有化学修饰。在一些实施方案中,化学修饰在尿嘧啶的5位。在一些实施方案中,化学修饰是N1-甲基假尿苷。

[0036] 在其他实施方案中,编码APC重新编程分子的mRNA被包括在疫苗中,或与疫苗共同施用。APC重新编程分子可为CIITA,伴侣蛋白诸如CLIP、HLA-DQ、HLA-DM,共刺激分子诸如CD40、CD80、CD86,CIITA片段诸如CIITA的氨基酸26-137或与CIITA具有80%序列同一性的蛋白质。

[0037] 在其他方面,提供一种通过以下方式在受试者中引发免疫应答的方法:从受试者的样品鉴定至少2种癌抗原,其中所述至少2种癌抗原包含选自由框移突变和重组组成的组的突变,以及向所述受试者施用具有编码所述至少2种癌抗原的开放阅读框的mRNA疫苗。

[0038] 在一些实施方案中,从受试者的外来体鉴定癌抗原。在一些实施方案中,从外来体鉴定2-100种抗原。在其他实施方案中,mRNA疫苗具有编码2-100种抗原的开放阅读框。单一mRNA或多种mRNA可编码抗原。

[0039] 在一些实施方案中,抗原是癌抗原。癌抗原可具有选自点突变、框移突变和重组的突变。方法可进一步涉及通过外显子组分析来确认癌抗原具有受试者特异性。在一些实施方案中,方法可进一步涉及通过转录物组分析来确认癌抗原具有受试者特异性。

[0040] 在一些实施方案中,方法也涉及在施用mRNA疫苗之后至少一个月,从受试者的样品鉴定至少2种癌抗原以产生第二组癌抗原,以及向所述受试者施用具有编码所述第二组癌抗原的开放阅读框的mRNA疫苗。在其他实施方案中,受试者的样品是肿瘤样品。

[0041] 在其他方面,本发明包括一种通过以下方式在受试者中引发免疫应答的方法:从受试者的样品鉴定至少2种癌抗原以产生第一组癌抗原,向所述受试者施用具有编码所述第一组癌抗原的开放阅读框的mRNA疫苗,在施用所述mRNA疫苗之后至少一个月,从受试者的样品鉴定至少2种癌抗原以产生第二组癌抗原,以及向所述受试者施用具有编码所述第二组癌抗原的开放阅读框的mRNA疫苗。

[0042] 在一些实施方案中,在具有编码第一组癌抗原的开放阅读框的mRNA疫苗之后6个月至1年,向受试者施用具有编码第二组抗原的开放阅读框的mRNA疫苗。在其他实施方案中,在具有编码第一组癌抗原的开放阅读框的mRNA疫苗之后1-2年,向受试者施用具有编码第二组抗原的开放阅读框的mRNA疫苗。

[0043] 在一些实施方案中,单一mRNA具有编码癌抗原的开放阅读框。在其他实施方案中,多种mRNA编码抗原。在一些实施方案中,第二组癌抗原包括2-100种抗原。在其他实施方案中,癌抗原具有选自点突变、框移突变和重组的突变。

[0044] 在其他方面,本发明包括一种通过以下方式在受试者中引发免疫应答的方法:从受试者的样品鉴定至少2种癌抗原,向所述受试者施用具有编码所述至少2种癌抗原的开放阅读框的mRNA,以及向所述受试者施用癌症治疗剂。在一些实施方案中,癌症治疗剂是靶向疗法。靶向疗法可为BRAF抑制剂诸如威罗菲尼(vemurafenib)(PLX4032)或达拉菲尼(dabrafenib)。

[0045] 在其他实施方案中,癌症治疗剂是T细胞治疗剂。T细胞治疗剂可为检查点抑制剂,诸如抗PD-1抗体或抗CTLA-4抗体。在一些实施方案中,抗PD-1抗体是BMS-936558(尼鲁单抗(nivolumab))。在其他实施方案中,抗CTLA-4抗体是易普利单抗(ipilimumab)。在其他实施方案中,T细胞治疗剂是OX40L。在其他实施方案中,癌症治疗剂是包含基于群体的肿瘤特异性抗原的疫苗。

[0046] 在其他实施方案中,癌症治疗剂是包含具有编码一种或多种传统癌抗原的开放阅读框的mRNA的疫苗。

[0047] 在一些实施方案中,与癌症治疗剂同时向受试者施用具有编码至少2种癌抗原的开放阅读框的mRNA。在一些实施方案中,在施用癌症治疗剂之前,向受试者施用具有编码至少2种癌抗原的开放阅读框的mRNA。在一些实施方案中,在施用癌症治疗剂之后,向受试者施用具有编码至少2种癌抗原的开放阅读框的mRNA。

[0048] 在本发明的其他方面,提供一种包括以下的方法:使具有编码癌抗原的开放阅读框的mRNA与脂质纳米粒子制剂混合以产生mRNA癌症疫苗,以及在混合的24小时内向受试者

施用所述mRNA癌症疫苗。在一些实施方案中,在混合的12小时内向受试者施用mRNA癌症疫苗。在其他实施方案中,在混合的1小时内向受试者施用mRNA癌症疫苗。在一些实施方案中,mRNA癌症疫苗编码2-100种癌抗原或10-100种癌抗原。

[0049] 在一些实施方案中,疫苗是个人化癌症疫苗,并且其中癌抗原是受试者特异性癌抗原。

[0050] 在一些实施方案中,单一mRNA编码癌抗原。在其他实施方案中,多种mRNA编码癌抗原。在其他实施方案中,各mRNA编码5-10种癌抗原或单一癌抗原。在其他实施方案中,各癌抗原的长度为10-50个氨基酸,或长度为15-20个氨基酸。

[0051] 在本发明的其他方面,提供一种试剂盒。试剂盒包括容纳脂质纳米粒子制剂的容器、容纳疫苗制剂的容器和关于以下的说明书:将个人化mRNA癌症疫苗添加至所述疫苗制剂中以产生个人化mRNA癌症疫苗制剂,在向受试者施用的24小时内使所述个人化mRNA癌症疫苗制剂与所述脂质纳米粒子制剂混合。在一些实施方案中,试剂盒包括具有编码2-100种癌抗原的开放阅读框的mRNA。

[0052] 本文进一步提供癌症疫苗制造用于在受试者中诱导抗原特异性免疫应答的方法中的药剂的用途,所述方法包括以有效产生抗原特异性免疫应答的量向所述受试者施用癌症疫苗。

[0053] 在其他方面,提供一种通过以下方式来治疗有此需要的受试者的癌症的方法:从分离自所述受试者的外来体鉴定至少2种癌抗原;基于所鉴定抗原产生具有编码所述抗原的开放阅读框的mRNA疫苗;以及向所述受试者施用所述mRNA疫苗,其中所述mRNA疫苗在所述受试者中诱导肿瘤特异性免疫应答,由此治疗所述受试者的癌症。

[0054] 在其他方面,本发明是一种可根据涉及以下的方法制备的RNA疫苗:从分离自受试者的外来体鉴定至少2种癌抗原;基于所鉴定抗原产生具有编码所述抗原的开放阅读框的mRNA疫苗。

[0055] 在本发明的各个方面,提供一种在受试者中引发针对癌抗原的免疫应答的方法。方法涉及向受试者施用RNA疫苗,其包含至少一种具有编码至少一种抗原性多肽或其免疫原性片段的开放阅读框的RNA多核苷酸,由此在受试者中诱导对抗原性多肽或其免疫原性片段具有特异性的免疫应答,其中相对于用防治有效剂量的针对癌症的传统疫苗接种疫苗的受试者中的抗抗原性多肽抗体效价,在疫苗接种之后,受试者中的抗抗原性多肽抗体效价增加。“抗抗原性多肽抗体”是特异性结合抗原性多肽的血清抗体。

[0056] 防治有效剂量是在临床可接受水平下预防癌症进展的治疗有效剂量。在一些实施方案中,治疗有效剂量是疫苗的包装插页中所列的剂量。如本文所用的传统疫苗是指除本发明的mRNA疫苗以外的疫苗。举例来说,传统疫苗包括但不限于活体微生物疫苗、杀灭微生物疫苗、亚单位疫苗、蛋白质抗原疫苗、DNA疫苗等。在示例性实施方案中,传统疫苗是已获得监管核准和/或由国立药物监管机构例如美国食品与药物管理局(FDA)或欧洲药品管理局(EMA)登记的疫苗。

[0057] 在一些实施方案中,相对于用防治有效剂量的针对癌症的传统疫苗接种疫苗的受试者中的抗抗原性多肽抗体效价,在疫苗接种之后,受试者中的抗抗原性多肽抗体效价增加1个log至10个log。

[0058] 在一些实施方案中,相对于用防治有效剂量的针对癌症的传统疫苗接种疫苗的受

试者中的抗抗原性多肽抗体效价,在疫苗接种之后,受试者中的抗抗原性多肽抗体效价增加1个log。

[0059] 在一些实施方案中,相对于用防治有效剂量的针对癌症的传统疫苗接种疫苗的受试者中的抗抗原性多肽抗体效价,在疫苗接种之后,受试者中的抗抗原性多肽抗体效价增加2个log。

[0060] 在一些实施方案中,相对于用防治有效剂量的针对癌症的传统疫苗接种疫苗的受试者中的抗抗原性多肽抗体效价,在疫苗接种之后,受试者中的抗抗原性多肽抗体效价增加3个log。

[0061] 在一些实施方案中,相对于用防治有效剂量的针对癌症的传统疫苗接种疫苗的受试者中的抗抗原性多肽抗体效价,在疫苗接种之后,受试者中的抗抗原性多肽抗体效价增加5个log。

[0062] 在一些实施方案中,相对于用防治有效剂量的针对癌症的传统疫苗接种疫苗的受试者中的抗抗原性多肽抗体效价,在疫苗接种之后,受试者中的抗抗原性多肽抗体效价增加10个log。

[0063] 在本发明的其他方面,提供一种在受试者中引发针对癌抗原的免疫应答的方法。方法涉及向受试者施用RNA疫苗,其包含至少一种具有编码至少一种抗原性多肽或其免疫原性片段的开放阅读框的RNA多核苷酸,由此在受试者中诱导对抗原性多肽或其免疫原性片段具有特异性的免疫应答,其中受试者中的所述免疫应答等效于用针对癌抗原的传统疫苗在相对于RNA疫苗是2倍至100倍的剂量水平下接种疫苗的受试者中的免疫应答。

[0064] 在一些实施方案中,受试者中的免疫应答等效于用传统疫苗在相对于RNA疫苗是两倍的剂量水平下接种疫苗的受试者中的免疫应答。

[0065] 在一些实施方案中,受试者中的免疫应答等效于用传统疫苗在相对于RNA疫苗是三倍的剂量水平下接种疫苗的受试者中的免疫应答。

[0066] 在一些实施方案中,受试者中的免疫应答等效于用传统疫苗在相对于RNA疫苗是4倍的剂量水平下接种疫苗的受试者中的免疫应答。

[0067] 在一些实施方案中,受试者中的免疫应答等效于用传统疫苗在相对于RNA疫苗是5倍的剂量水平下接种疫苗的受试者中的免疫应答。

[0068] 在一些实施方案中,受试者中的免疫应答等效于用传统疫苗在相对于RNA疫苗是10倍的剂量水平下接种疫苗的受试者中的免疫应答。

[0069] 在一些实施方案中,受试者中的免疫应答等效于用传统疫苗在相对于RNA疫苗是50倍的剂量水平下接种疫苗的受试者中的免疫应答。

[0070] 在一些实施方案中,受试者中的免疫应答等效于用传统疫苗在相对于RNA疫苗是100倍的剂量水平下接种疫苗的受试者中的免疫应答。

[0071] 在一些实施方案中,受试者中的免疫应答等效于用传统疫苗在相对于RNA疫苗是10倍至1000倍的剂量水平下接种疫苗的受试者中的免疫应答。

[0072] 在一些实施方案中,受试者中的免疫应答等效于用传统疫苗在相对于RNA疫苗是100倍至1000倍的剂量水平下接种疫苗的受试者中的免疫应答。

[0073] 在其他实施方案中,通过测定受试者中的抗体效价来评估免疫应答。

[0074] 在其他方面,本发明包括一种通过以下方式在受试者中引发免疫应答的方法:

向所述受试者施用包含至少一种具有编码至少一种癌症抗原性多肽或其免疫原性片段的开放阅读框的RNA多核苷酸的RNA疫苗,由此在所述受试者中诱导对抗原性多肽或其免疫原性片段具有特异性的免疫应答,其中相对于在用防治有效剂量的针对癌抗原的传统疫苗接种疫苗的受试者中诱导的免疫应答,所述受试者中的所述免疫应答早2天至10周被诱导。在一些实施方案中,受试者中的免疫应答在用防治有效剂量的传统疫苗在相对于RNA疫苗是2倍至100倍的剂量水平下接种疫苗的受试者中被诱导。

[0075] 在一些实施方案中,相对于在用防治有效剂量的传统疫苗接种疫苗的受试者中诱导的免疫应答,受试者中的免疫应答早2天被诱导。

[0076] 在一些实施方案中,相对于在用防治有效剂量的传统疫苗接种疫苗的受试者中诱导的免疫应答,受试者中的免疫应答早3天被诱导。

[0077] 在一些实施方案中,相对于在用防治有效剂量的传统疫苗接种疫苗的受试者中诱导的免疫应答,受试者中的免疫应答早1周被诱导。

[0078] 在一些实施方案中,相对于在用防治有效剂量的传统疫苗接种疫苗的受试者中诱导的免疫应答,受试者中的免疫应答早2周被诱导。

[0079] 在一些实施方案中,相对于在用防治有效剂量的传统疫苗接种疫苗的受试者中诱导的免疫应答,受试者中的免疫应答早3周被诱导。

[0080] 在一些实施方案中,相对于在用防治有效剂量的传统疫苗接种疫苗的受试者中诱导的免疫应答,受试者中的免疫应答早5周被诱导。

[0081] 在一些实施方案中,相对于在用防治有效剂量的传统疫苗接种疫苗的受试者中诱导的免疫应答,受试者中的免疫应答早10周被诱导。

[0082] 一种通过向受试者施用具有编码第一抗原性多肽的开放阅读框的癌症RNA疫苗来在所述受试者中引发针对癌症的免疫应答的方法,其中RNA多核苷酸不包括稳定化元件,并且其中佐剂不与所述疫苗共同配制或共同施用。

[0083] 在其他方面,本发明包括一种产生包含1000个与3000个之间的核苷酸的编码多联癌抗原的mRNA的方法,所述方法通过以下方式达成:

[0084] (a) 使包含编码多联癌抗原的开放阅读框的第一多核苷酸和包含5'-UTR的第二多核苷酸结合于与固体载体缀合的多核苷酸;

[0085] (b) 使所述第二多核苷酸的3'末端在适合条件下连接于所述第一多核苷酸的5'末端,其中所述适合条件包括DNA连接酶,由此产生第一连接产物;

[0086] (c) 使包含3'-UTR的第三多核苷酸的5'末端在适合条件下连接于所述第一连接产物的3'末端,其中所述适合条件包括RNA连接酶,由此产生第二连接产物;和

[0087] (d) 使所述第二连接产物从所述固体载体释放,

[0088] 由此产生包含1000个与3000个之间的核苷酸的编码多联癌抗原的mRNA。

[0089] 在任一提供的组合物或方法的一些实施方案中,mRNA编码一种或多种频发多态性。在一些实施方案中,一种或多种频发多态性包含p53中的频发体细胞癌突变。在一些所述实施方案中,p53中的一种或多种频发体细胞癌突变选自以下组成的组:

[0090] (1) 在典型5'剪接位点邻近密码子p.T125处的突变,从而诱导具有肽序列TAKSVTCTVSCPEGLASMRLQCLAVSPCISFVWNFGIPLHPLASCQCFFIVYPLNV (SEQ ID NO:1) 的保留内含子,所述序列含有表位AVSPCISFVW (SEQ ID NO:2) (HLA-B*57:01,HLA-B*58:01)、HPLASCQCFF

(SEQ ID NO:3) (HLA-B*35:01,HLA-B*53:01)、FVWNFGIPL (SEQ ID NO:4) (HLA-A*02:01,HLA-A*02:06,HLA-B*35:01) ;

[0091] (2) 在典型5' 剪接位点邻近密码子p.331处的突变,从而诱导具有肽序列EYFTLQV LSLGTSYQVESFQSNTQNAVFFLTVPALPAIGAFAIRGQ (SEQ ID NO:5) 的保留内含子,所述序列含有表位LQVLSLGTSY (SEQ ID NO:6) (HLA-B*15:01)、FQSNTQNAV (SEQ ID NO:7) (HLA-B*15:01) ;

[0092] (3) 在典型3' 剪接位点邻近密码子p.126处的突变,从而诱导隐蔽选择性外显子3' 剪接位点,其产生含有表位CTMFCQLAK (SEQ ID NO:9) (HLA-A*11:01)、KSVTCTMF (SEQ ID NO:10) (HLA-B*58:01) 的新型跨越肽序列AKSVTCTMFCQLAK (SEQ ID NO:8) ;和/或

[0093] (4) 在典型5' 剪接位点邻近密码子p.224处的突变,从而诱导隐蔽选择性内含子5' 剪接位点,其产生含有表位VPYEPPEVW (SEQ ID NO:12) (HLA-B*53:01,HLA-B*51:01)、LTVPPSTAW (SEQ ID NO:13) (HLA-B*58:01,HLA-B*57:01) 的新型跨越肽序列VPYEPPEVWLALTVPSTAWAA (SEQ ID NO:11),其中转录物密码子位置涉及来自Ensembl v83 人基因组注释的典型全长p53转录物ENST00000269305 (SEQ ID NO:14) 。

[0094] 在一个实施方案中,本发明提供一种包含编码开放阅读框 (ORF) 的mRNA的癌症治疗性疫苗,所述开放阅读框编码新抗原肽 (1) 至 (4) 中的一者或多者。在一个实施方案中,本发明提供基于患者的肿瘤含有任何以上突变来选择性施用含有或编码肽 (1) - (4) 中的一者或多者的疫苗。在一个实施方案中,本发明提供基于以下双重准则来选择性施用疫苗:受试者的肿瘤含有任何以上突变以及受试者的正常HLA类型含有被预测会结合所得新抗原的相应HLA等位基因。

[0095] 在本发明的其他方面,提供一种用于制备mRNA癌症疫苗的试剂盒。试剂盒具有一个或多个容纳一种或多种包含5'-ORF的多核苷酸、一种或多种包含3'-ORF的多核苷酸、一种或多种包含聚腺苷酸尾部的多核苷酸、连接酶的容器和关于以下的说明书:使一种或多种包含编码患者特异性表位的ORF的多核苷酸连接于一种或多种包含5'-ORF、3'-ORF和聚腺苷酸尾部的多核苷酸。

[0096] 在本发明的其他方面,提供一种用于通过以下方式用个人化mRNA癌症疫苗治疗受试者的方法:从受试者分离样品,通过分析患者转录物组和/或患者外显子组来从所述样品鉴定一组新表位以产生患者特异性突变组,基于MHC结合强度、MHC结合多样性、预测免疫原性程度、低自身反应性和/或T细胞反应性来从所述突变组选择一组用于疫苗的新表位,制备所述mRNA疫苗以编码所述一组新表位,以及在从所述受试者分离所述样品的2个月内向所述受试者施用所述mRNA疫苗。在一些实施方案中,在从受试者分离样品的1个月内向受试者施用mRNA疫苗。

[0097] 在其他方面,本发明包括一种通过以下方式来鉴定一组用于个人化mRNA癌症疫苗中的新表位的方法,所述癌症疫苗具有一种或多种编码所述一组新表位的多核苷酸:

[0098] a. 通过分析患者转录物组和患者外显子组来鉴定患者特异性突变组,

[0099] b. 使用新表位的基于以下中的至少三者的加权值来从所述突变组选择15-500种新表位的子组:在患者RNA测序中对基因或转录物水平表达的评估;变体识别置信度评分;RNA测序等位基因特异性表达;保守性氨基酸取代相对于非保守性氨基酸取代;点突变的位置 (关于增加的TCR啮合的中心化评分);点突变的位置 (关于差异性HLA结合的锚定评分);自身性:与患者WES数据具有<100%核心表位同源性;HLA-A和HLA-B对8聚体-11聚体的

IC50;HLA-DRB1对15聚体-20聚体的IC50;杂乱评分(即被预测会进行结合的患者HLA的数目);HLA-C对8聚体-11聚体的IC50;HLA-DRB3-5对15聚体-20聚体的IC50;HLA-DQB1/A1对15聚体-20聚体的IC50;HLA-DPB1/A1对15聚体-20聚体的IC50;I类相对于II类比例;涵盖的患者HLA-A、HLA-B和DRB1同种异型的多样性;点突变相对于复杂表位(例如框移)的比例;和/或假表位HLA结合评分,和

[0100] c. 基于最高加权值来从所述子组选择所述一组用于个人化mRNA癌症疫苗中的新表位,其中所述一组新表位包含15-40种新表位。

[0101] 在一些实施方案中,本文所述的核酸疫苗被化学修饰。在其他实施方案中,核酸疫苗未被修饰。

[0102] 其他方面提供用于对受试者接种疫苗的组合物和对受试者接种疫苗的方法,其包括向所述受试者施用包含一种或多种具有编码第一抗原性多肽或多联多肽的开放阅读框的RNA多核苷酸的核酸疫苗,其中所述RNA多核苷酸不包括稳定化元件,并且其中佐剂不与所述疫苗共同配制或共同施用。

[0103] 在其他方面,本发明是用于对受试者接种疫苗的组合物或对受试者接种疫苗的方法,其包括向所述受试者施用包含一种或多种具有编码第一抗原性多肽的开放阅读框的RNA多核苷酸的核酸疫苗,其中向所述受试者施用在10ug/kg与400ug/kg之间的剂量的所述核酸疫苗。在一些实施方案中,RNA多核苷酸的剂量是每剂1-5ug、5-10ug、10-15ug、15-20ug、10-25ug、20-25ug、20-50ug、30-50ug、40-50ug、40-60ug、60-80ug、60-100ug、50-100ug、80-120ug、40-120ug、40-150ug、50-150ug、50-200ug、80-200ug、100-200ug、120-250ug、150-250ug、180-280ug、200-300ug、50-300ug、80-300ug、100-300ug、40-300ug、50-350ug、100-350ug、200-350ug、300-350ug、320-400ug、40-380ug、40-100ug、100-400ug、200-400ug、或300-400ug。在一些实施方案中,通过真皮内或肌肉内注射来向受试者施用核酸疫苗。在一些实施方案中,在第0天向受试者施用核酸疫苗。在一些实施方案中,在第21天向受试者施用第二剂量的核酸疫苗。

[0104] 在一些实施方案中,25微克的剂量的RNA多核苷酸被包括在向受试者施用的核酸疫苗中。在一些实施方案中,100微克的剂量的RNA多核苷酸被包括在向受试者施用的核酸疫苗中。在一些实施方案中,50微克的剂量的RNA多核苷酸被包括在向受试者施用的核酸疫苗中。在一些实施方案中,75微克的剂量的RNA多核苷酸被包括在向受试者施用的核酸疫苗中。在一些实施方案中,150微克的剂量的RNA多核苷酸被包括在向受试者施用的核酸疫苗中。在一些实施方案中,400微克的剂量的RNA多核苷酸被包括在向受试者施用的核酸疫苗中。在一些实施方案中,200微克的剂量的RNA多核苷酸被包括在向受试者施用的核酸疫苗中。在一些实施方案中,相较于远端淋巴结,RNA多核苷酸在100倍高的水平下积累在局部淋巴结中。在其他实施方案中,核酸疫苗被化学修饰,而在其他实施方案中,核酸疫苗未被化学修饰。

[0105] 本发明的各个方面提供一种核酸疫苗,其包含一种或多种具有编码第一抗原性多肽或多联多肽的开放阅读框的RNA多核苷酸,其中所述RNA多核苷酸不包括稳定化元件,以及药学上可接受的载体或赋形剂,其中佐剂不包括在所述疫苗中。在一些实施方案中,稳定化元件是组蛋白茎-环。在一些实施方案中,稳定化元件是相对于野生型序列,具有增加的GC含量的核酸序列。

[0106] 本发明的各个方面提供包含一种或多种具有编码第一抗原性多肽的开放阅读框的RNA多核苷酸的核酸疫苗,其中所述RNA多核苷酸存在于用于在体内向宿主施用的制剂中,此对可接受百分比的人受试者赋予优于针对第一抗原的血清保护的准则的抗体效价。在一些实施方案中,由本发明的mRNA疫苗产生的抗体效价是中和抗体效价。在一些实施方案中,中和抗体效价大于蛋白疫苗。在其他实施方案中,由本发明的mRNA疫苗产生的中和抗体效价大于佐剂化蛋白疫苗。在其他实施方案中,由本发明的mRNA疫苗产生的中和抗体效价是1,000-10,000、1,200-10,000、1,400-10,000、1,500-10,000、1,000-5,000、1,000-4,000、1,800-10,000、2000-10,000、2,000-5,000、2,000-3,000、2,000-4,000、3,000-5,000、3,000-4,000、或2,000-2,500。通常将中和效价表示为实现空斑数目降低50%所需的最高血清稀释度。

[0107] 在优选方面,本发明的疫苗(例如LNP囊封的mRNA疫苗)产生抗原特异性抗体在接种疫苗的受试者的血液或血清中的防治有效和/或治疗有效水平、浓度和/或效价。如本文所定义,术语抗体效价是指在例如人受试者的受试者中产生的抗原特异性抗体的量。在示例性实施方案中,将抗体效价表示为仍然产生阳性结果的最大稀释度(在连续稀释中)的倒数。在示例性实施方案中,通过酶联免疫吸附测定(ELISA)来测定或测量抗体效价。在示例性实施方案中,通过中和测定,例如通过微量中和测定来测定或测量抗体效价。在某些方面,将抗体效价测量结果表示为比率,诸如1:40、1:100等。

[0108] 在本发明的示例性实施方案中,有效疫苗产生大于1:40、大于1:100、大于1:400、大于1:1000、大于1:2000、大于1:3000、大于1:4000、大于1:500、大于1:6000、大于1:7500、大于1:10000的抗体效价。在示例性实施方案中,截至疫苗接种之后10天,截至疫苗接种之后20天,截至疫苗接种之后30天,截至疫苗接种之后40天,或截至疫苗接种之后50天或更多天,产生或达到抗体效价。在示例性实施方案中,在向受试者施用的单次剂量的疫苗之后,产生或达到效价。在其他实施方案中,在多次剂量之后,例如在第一剂量和第二剂量(例如加强剂量)之后,产生或达到效价。

[0109] 在本发明的示例性方面,抗原特异性抗体以 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的单位计量,或以IU/L(每升对应的国际单位)或mIU/ml(每毫升对应的毫国际单位)的单位计量。在本发明的示例性实施方案中,有效疫苗产生 $>0.5\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $>0.1\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $>0.2\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $>0.35\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $>0.5\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $>1\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $>2\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $>5\mu\text{g}/\text{ml}$ 或 $>10\mu\text{g}/\text{ml}$ 。在本发明的示例性实施方案中,有效疫苗产生 $>10\text{mIU}/\text{ml}$ 、 $>20\text{mIU}/\text{ml}$ 、 $>50\text{mIU}/\text{ml}$ 、 $>100\text{mIU}/\text{ml}$ 、 $>200\text{mIU}/\text{ml}$ 、 $>500\text{mIU}/\text{ml}$ 或 $>1000\text{mIU}/\text{ml}$ 。在示例性实施方案中,截至疫苗接种之后10天,截至疫苗接种之后20天,截至疫苗接种之后30天,截至疫苗接种之后40天,或截至疫苗接种之后50天或更多天,产生或达到抗体水平或浓度。在示例性实施方案中,在向受试者施用的单次剂量的疫苗之后,产生或达到水平或浓度。在其他实施方案中,在多次剂量之后,例如在第一剂量和第二剂量(例如加强剂量)之后,产生或达到水平或浓度。在示例性实施方案中,通过酶联免疫吸附测定(ELISA)来测定或测量抗体水平或浓度。在示例性实施方案中,通过中和测定,例如通过微量中和测定来测定或测量抗体水平或浓度。也提供包含一种或多种具有编码第一抗原性多肽或多联多肽的开放阅读框的RNA多核苷酸的核酸疫苗,其中所述RNA多核苷酸存在于制剂中,所述制剂用于在体内向宿主施用以引发比由具有稳定元件或与佐剂一起配制以及编码所述第一抗原性多肽的mRNA疫苗引发的抗体效价更长久持续的高抗体效价。在一些实施方

案中,配制RNA多核苷酸以在单次施用的1周内产生中和抗体。在一些实施方案中,佐剂选自阳离子肽和免疫刺激性核酸。在一些实施方案中,阳离子肽是鱼精蛋白。

[0110] 各个方面提供包含一种或多种具有包含至少一种化学修饰或任选不包含核苷酸修饰的开放阅读框的RNA多核苷酸的核酸疫苗,所述开放阅读框编码第一抗原性多肽或多联多肽,其中所述RNA多核苷酸存在于制剂中,所述制剂用于在体内向宿主施用以使所述宿主中的抗原表达的水平显著超过由具有稳定元件或与佐剂一起配制以及编码所述第一抗原性多肽的mRNA疫苗产生的抗原表达的水平。

[0111] 其他方面提供包含一种或多种具有包含至少一种化学修饰或任选不包含核苷酸修饰的开放阅读框的RNA多核苷酸的核酸疫苗,所述开放阅读框编码第一抗原性多肽或多联多肽,其中相比于为未修饰mRNA疫苗产生相等抗体效价所需的RNA多核苷酸,所述疫苗具有的RNA多核苷酸是至少10倍少。在一些实施方案中,RNA多核苷酸以25-100微克的剂量存在。

[0112] 本发明的各个方面也提供一种处于使用单位下的疫苗,其包含10ug与400ug之间的一种或多种具有包含至少一种化学修饰或任选不包含核苷酸修饰的开放阅读框的RNA多核苷酸,所述开放阅读框编码第一抗原性多肽或多联多肽,以及药学上可接受的载体或赋形剂,被配制以向人受试者中递送。在一些实施方案中,疫苗进一步包含阳离子脂质纳米粒子。

[0113] 本发明的各个方面提供在个体或个体群体中创建、维持或恢复对肿瘤的抗原性记忆的方法,其包括向所述个体或群体施用抗原性记忆加强核酸疫苗,所述疫苗包含(a)至少一种RNA多核苷酸,所述多核苷酸包含至少一种化学修饰或任选不包含核苷酸修饰,以及两个或更多个密码子优化的开放阅读框,所述开放阅读框编码一组参照抗原性多肽,和(b)任选地,药学上可接受的载体或赋形剂。在一些实施方案中,通过选自由肌肉内施用、真皮内施用和皮下施用组成的组的途径来向个体施用疫苗。在一些实施方案中,施用步骤包括使受试者的肌肉组织与适于注射组合物的装置接触。在一些实施方案中,施用步骤包括使受试者的肌肉组织与适于与电穿孔组合注射组合物的装置接触。

[0114] 本发明的各个方面提供对受试者接种疫苗的方法,其包括以有效对所述受试者接种疫苗的量向所述受试者施用25ug/kg与400ug/kg之间的单次剂量的核酸疫苗,所述疫苗包含一种或多种具有编码第一抗原性多肽或多联多肽的开放阅读框的RNA多核苷酸。

[0115] 其他方面提供包含一种或多种具有包含至少一种化学修饰的开放阅读框的RNA多核苷酸的核酸疫苗,所述开放阅读框编码第一抗原性多肽或多联多肽,其中相比于为未修饰mRNA疫苗产生相等抗体效价所需的RNA多核苷酸,所述疫苗具有的RNA多核苷酸是至少10倍少。在一些实施方案中,RNA多核苷酸以25-100微克的剂量存在。

[0116] 其他方面提供包含LNP配制的RNA多核苷酸的核酸疫苗,所述RNA多核苷酸具有不包含核苷酸修饰(未修饰)的开放阅读框,所述开放阅读框编码第一抗原性多肽或多联多肽,其中相比于为不在LNP中配制的未修饰mRNA疫苗产生相等抗体效价所需的RNA多核苷酸,所述疫苗具有的RNA多核苷酸是至少10倍少。在一些实施方案中,RNA多核苷酸以25-100微克的剂量存在。

[0117] 实施例中呈现的数据证明使用本发明的制剂,免疫应答得以显著增强。惊人的是,与先前技术报道优选的是使用在载体中配制的未化学修饰的mRNA来生产疫苗不同,本文描

述相比于未修饰mRNA,化学修饰的mRNA-LNP疫苗需要低得多的有效mRNA剂量,即,当在除LNP以外的载体中配制时,有效mRNA剂量是未修饰mRNA的10倍少。相比于在不同脂质载体中配制的mRNA疫苗,本发明的化学修饰的RNA疫苗与未修饰RNA疫苗两者均产生更好免疫应答。

[0118] 在其他方面,本发明涵盖一种治疗年龄是60岁或更年长的年长受试者的方法,其包括以有效对所述受试者接种疫苗的量向所述受试者施用核酸疫苗,所述疫苗包含一种或多种具有编码抗原性多肽或多联多肽的开放阅读框的RNA多核苷酸。

[0119] 在其他方面,本发明涵盖一种治疗年龄是17岁或更年轻的年轻受试者的方法,其包括以有效对所述受试者接种疫苗的量向所述受试者施用核酸疫苗,所述疫苗包含一种或多种具有编码抗原性多肽或多联多肽的开放阅读框的RNA多核苷酸。

[0120] 在其他方面,本发明涵盖一种治疗成年受试者的方法,其包括以有效对所述受试者接种疫苗的量向所述受试者施用核酸疫苗,所述疫苗包含一种或多种具有编码抗原性多肽或多联多肽的开放阅读框的RNA多核苷酸。

[0121] 在一些方面,本发明包括一种用组合疫苗对受试者接种疫苗的方法,所述组合疫苗包括至少两种编码抗原的核酸序列,其中所述疫苗的剂量是组合治疗剂量,其中编码抗原的各个别核酸的剂量是亚治疗剂量。在一些实施方案中,组合剂量是向受试者施用的核酸疫苗中的25微克的RNA多核苷酸。在一些实施方案中,组合剂量是向受试者施用的核酸疫苗中的100微克的RNA多核苷酸。在一些实施方案中,组合剂量是向受试者施用的核酸疫苗中的50微克的RNA多核苷酸。在一些实施方案中,组合剂量是向受试者施用的核酸疫苗中的75微克的RNA多核苷酸。在一些实施方案中,组合剂量是向受试者施用的核酸疫苗中的150微克的RNA多核苷酸。在一些实施方案中,组合剂量是向受试者施用的核酸疫苗中的400微克的RNA多核苷酸。在一些实施方案中,编码抗原的各个别核酸的亚治疗剂量是1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20微克。在其他实施方案中,核酸疫苗被化学修饰,而在其他实施方案中,核酸疫苗未被化学修饰。

[0122] 本发明的各种实施方案的细节阐述于以下描述中。本发明的其他特征、目标和优势将根据描述和附图以及根据权利要求而显而易见。

附图说明

[0123] 先前以及其他目标、特征和优势将根据对本发明的特定实施方案的以下描述而显而易见,如附图中所说明,其中遍及不同视图,同样的参考记号是指相同部分。附图未必将依照比例,而是将重点放在说明本发明的各种实施方案的原理上。

[0124] 图1A-1D显示用以证明mRNA疫苗抗原特异性CD8应答的测定的结果。

[0125] 图2显示用以证明mRNA疫苗诱导的抗原特异性效应/记忆CD8T细胞应答的测定的结果。

[0126] 图3是描绘对基于mRNA的新表位的抗原设计的多因素考虑的示意图。

[0127] 图4是描绘对基于mRNA的新表位的抗原设计的多因素考虑的表。

[0128] 图5描绘在MCF7 (HLA*201) 的情况下验证基于FACS的对mRNA编码表位的测定的结果。通过抗mut.MART1TCR聚体在MCF7细胞上检测到特定MHC1/mut.MART1肽呈递。从顶部至底部的序列对应于SEQ ID NO:15-19。

[0129] 图6A和6B是示例性肽表位的示意图。图6A的多肽包括两个或更多个表位。表位可具有相同序列或不同序列,并且可为T细胞表位、完全B细胞表位或两者组合。图6B的示意图显示具有用于使MHC对肽的加工增强的各种末端单元的肽表位。

[0130] 图7描绘用编码20种表位的多联体的mRNA引发的示例性T细胞应答。mRNA多联体诱导I类T细胞应答与II类T细胞应答两者。

[0131] 图8A描绘用编码在不同位置具有表位的多联体的mRNA引发的示例性T细胞应答。CA80和CA81编码已知会引发T细胞应答的相同20种表位。它们包括5种II类表位,10种鼠I类表位,鼠阳性对照(SIINFELK (SEQ ID NO:22),源于卵白蛋白)和4种人(HLA-A2)表位(未显示)。CA80和CA81的不同之处仅在于不同表位的相对位置。图8B描绘干扰素- γ 斑点形成单位(SFU)与CD8+IFN- γ +应答之间的示例性关联。

[0132] 图9A和9B描绘用编码多联体CA-80的mRNA引发的示例性剂量响应。当施用的疫苗的量降低时,观察到命中物损失。

[0133] 图10描绘当用20聚体相对于5聚体进行免疫时,对已知表位的T细胞应答的示例性比较。当以20聚体或(3)3聚体形式接种疫苗时,对已知表位的T细胞应答是类似的。当用5聚体进行免疫时,观察到朝向略微更高T细胞应答的趋势。

[0134] 图11描绘对单独或在II类帮助存在下的I类表位的T细胞应答的示例性比较。当以5聚体形式单独(无II类帮助)或与5种已知II类表位一起(有II类帮助)施用表位时,比较对5种已知I类表位的T细胞应答。这组也包括已知I类表位的另一5聚体。在含有已知II类表位的5聚体存在下,对已知I类表位的T细胞应答更高。

[0135] 图12描绘在用与MC3或化合物25一起配制的多联疫苗接种疫苗下观察的示例性T细胞应答。CA-81(含有15种已知小鼠表位)在MC3和化合物25中配制。测量针对疫苗中的各表位的T细胞应答,并且在两种制剂之间比较应答。

[0136] 图13是mRNA-1的示例性mRNA组分的示意图。

[0137] 图14是mRNA-1的示例性一般性分子序列的示意图,其中患者特异性编码区以引用的方式描绘为(N)。序列对应于SEQ ID NO:20和21。

[0138] 图15是可在其上实施一些实施方案的示例性计算机系统的方块图。

[0139] 图16是描绘根据肿瘤类型的剪接位点突变频率(排除沉默突变)(顶部图版)和根据位置的p53突变(下部图版)的示意图。

[0140] 图17是描绘导致产生保留内含子和隐蔽剪接的热点剪接位点和沉默突变的示意图。若干突变位点通过RNA测序确认会产生保留内含子或隐蔽剪接。两种代表性突变源性肽具有在编码基因组中其他地方不具有匹配的多种HLA-A2结合表位。

具体实施方式

[0141] 本公开的实施方案提供包括编码癌抗原的多核苷酸的RNA(例如mRNA)疫苗。如本文提供的癌症RNA疫苗可用于诱导平衡免疫应答,其包括细胞免疫性和/或体液免疫性,而无与DNA疫苗接种相关的许多风险。在一些实施方案中,疫苗包含至少一种具有编码癌抗原的开放阅读框的RNA(例如mRNA)多核苷酸。

[0142] 尽管已试图产生功能性RNA疫苗,包括mRNA癌症疫苗,但这些RNA疫苗的治疗功效尚未被充分确定。十分惊人的是,本发明者已发现一类用于递送mRNA疫苗的制剂,其导致显

著增强以及在许多方面具有协同作用的免疫应答,包括增强的T细胞应答。本发明的疫苗包括传统癌症疫苗以及个人化癌症疫苗。在一些方面,本发明涉及脂质纳米粒子制剂使包括化学修饰的mRNA疫苗和未修饰mRNA疫苗的mRNA疫苗的有效性显著增强的惊人发现。

[0143] 本文所述的研究中使用的脂质纳米粒子先前已用于在各种动物模型中以及在人中递送siRNA。鉴于与用脂质纳米粒子制剂递送siRNA关联所进行的观察,脂质纳米粒子适用于疫苗中的事实是十分惊人的。已观察到治疗性递送在脂质纳米粒子中配制的siRNA导致与短暂IgM应答相关的不合需要的炎症性应答,从而通常导致抗原产生降低和免疫应答受损害。与用siRNA观察的研究结果不同,证明了脂质纳米粒子-mRNA疫苗制剂会产生对于防治方法和治疗方法足够的增强IgG水平,而非短暂IgM应答。

[0144] 产生引发针对在疫苗开发中所靶向的多肽序列的所需免疫应答(例如T细胞应答)的癌抗原仍然是一项具有挑战的任务。本发明涉及克服与疫苗开发相关的障碍的技术。通过使用本发明的技术,有可能通过选择适当T细胞或B细胞癌表位以及配制表位或抗原以达成有效体内递送来调适所需免疫应答。

[0145] 因此,本发明涉及mRNA疫苗。mRNA疫苗描述于2015年4月23日提交的国际专利申请号PCT/US2015/027400中,所述国际专利申请以引用的方式整体并入本文。

[0146] mRNA癌症疫苗提供基于肽的疫苗或DNA疫苗的独特治疗替代方案。当将mRNA癌症疫苗递送至细胞时,mRNA将由细胞内机构加工成多肽,所述机构可接着将所述多肽加工成能够刺激针对肿瘤的免疫应答的免疫敏感性片段。

[0147] 本文所述的癌症疫苗包括至少一种具有编码至少一种癌症抗原性多肽或其免疫原性片段(例如能够诱导对癌症的免疫应答的免疫原性片段)的开放阅读框的核糖核酸(RNA)多核苷酸。癌症疫苗可为传统或个人化癌症疫苗。传统癌症疫苗是包括已知普遍见于癌或肿瘤中或见于特定类型的癌或肿瘤中的癌抗原的疫苗。在肿瘤细胞中或由肿瘤细胞表达的抗原被称为“肿瘤相关抗原”。特定肿瘤相关抗原可或可不也在非癌性细胞中表达。许多肿瘤突变在本领域中是已知的。

[0148] 举例来说,个人化疫苗可包括编码一种或多种已知的为肿瘤所特有的癌抗原或为各受试者所特有的癌抗原的RNA,所述癌抗原被称为新表位或受试者特异性表位或抗原。“受试者特异性癌抗原”是已被鉴定为在特定患者的肿瘤中表达的抗原。受试者特异性癌抗原可或可不通常普遍存在于肿瘤样品中。不在或很少在非癌性细胞中表达,或其非癌性细胞中的表达相较于在癌性细胞中的表达足够降低,并且诱导在疫苗接种后被诱导的免疫应答的肿瘤相关抗原被称为新表位。如同肿瘤相关抗原一样,新表位对于身体来说完全是外来的,因此将不产生针对健康组织的免疫应答,或由免疫系统的保护性组分掩蔽。在一些实施方案中,基于新表位的个人化疫苗是合乎需要的,因为所述疫苗制剂将使针对患者的特定肿瘤的特异性最大化。突变源性新表位可由以下产生:点突变;导致蛋白质中的氨基酸不同的非同义突变;其中终止密码子被修改或缺失,从而导致翻译在C末端具有新型肿瘤特异性序列的较长蛋白质的通读突变;导致在成熟mRNA中包括内含子以及因此独特肿瘤特异性蛋白质序列的剪接位点突变;产生在2个蛋白质的接合(即基因融合)处具有肿瘤特异性序列的嵌合蛋白质的染色体重排;导致具有新型肿瘤特异性蛋白质序列的新开放阅读框的框移突变或缺失;以及易位。因此,在一些实施方案中,mRNA癌症疫苗包括至少2种癌抗原,其包含选自由框移突变和重组或任何本文所述的其他突变组成的组的突变。

[0149] 用于产生个人化癌症疫苗的方法通常涉及例如使用深度核酸或蛋白质测序技术来鉴定突变,例如使用经验肽-MHC结合预测算法的应用程序或其他分析技术来鉴定新表位以产生一组可结合患者HLA等位基因,并且基于肿瘤中存在的突变的候选T细胞表位,任选证明抗原特异性T细胞针对所选新表位,或证明候选新表位结合于肿瘤表面上的HLA蛋白,以及开发疫苗。本发明的mRNA癌症疫苗可包括单一新表位的多个拷贝、基于单一突变类型(即点突变)的多种不同新表位、基于多种突变类型的多种不同新表位、新表位和其他抗原,诸如肿瘤相关抗原或回忆抗原。

[0150] 用于鉴定突变的技术的实例包括但不限于动态等位基因特异性杂交(DASH)、微板阵列对角线凝胶电泳(MADGE)、焦磷酸测序、寡核苷酸特异性连接、TaqMan系统以及各种DNA“芯片”技术即Affymetrix SNP芯片、以及基于通过侵袭性裂解来产生小信号分子,继之以采用质谱测定法或固定化挂锁探针和滚环扩增的方法。

[0151] 深度核酸或蛋白质测序技术在本领域中是已知的。可使用任何类型的序列分析方法。可对整个肿瘤基因组、肿瘤外显子组(蛋白质编码DNA)、肿瘤转录物组或外来体进行核酸测序。实时单分子合成测序技术依赖于对荧光核苷酸的检测,因为它们被并入互补于所测序的模板的初生DNA链中。也存在其他快速高通量测序方法。可对肿瘤蛋白质组进行蛋白质测序。另外,蛋白质质谱测定法可用于鉴定或验证结合于肿瘤细胞上的MHC蛋白的突变肽的存在。肽可从肿瘤细胞或从由肿瘤加以免疫沉淀的HLA分子进行酸洗脱,接着使用质谱测定法加以鉴定。可将测序结果与已知对照组或与对患者的正常组织进行的测序分析进行比较。

[0152] 因此,本发明涉及用于鉴定和/或检测抗原的新表位诸如T细胞表位的方法。具体来说,本发明提供鉴定和/或检测适用于在受试者中诱导肿瘤特异性免疫应答的肿瘤特异性新表位的方法。任选地,相比于野生型肽,这些新表位以更大亲和力结合I类HLA蛋白,和/或能够使抗肿瘤CD8 T细胞活化。任何特定基因中的相同突变都很少在各种肿瘤间被发现。

[0153] I类MHC的蛋白质存在于身体的包括大多数肿瘤细胞的几乎所有细胞的表面上。I类MHC的蛋白质装载有通常源于内源性蛋白质或存在于细胞内部的病原体,并且接着向细胞毒性T淋巴细胞(CTL)呈递的抗原。T细胞受体能够识别和结合与I类MHC的分子复合的肽。各细胞毒性T淋巴细胞表达能够结合特定MHC/肽复合物的独特T细胞受体。

[0154] 使用计算机算法,有可能预测潜在新表位诸如T细胞表位,即由I类或II类MHC分子以肽呈递复合物形式结合,接着以这个形式由T淋巴细胞的T细胞受体识别的肽序列。适用于鉴定将结合MHC的肽的程序的实例包括例如:Lonza Epibase、SYFPEITHI(Rammensee等, Immunogenetics, 50 (1999), 213-219) 和HLA_BIND(Parker等, J. Immunol., 152 (1994), 163-175)。

[0155] 一旦选择推定新表位,即可使用体外和/或体内测定对它们进行进一步测试。常规体外实验室测定诸如Elispot测定可与来自各患者的分离物一起用于使基于算法的预测加以选择的新表位的清单细化。

[0156] 本发明的mRNA癌症疫苗是组合物,包括药物组合物。本发明也涵盖用于选择、设计、制备、制造、配制和/或使用mRNA癌症疫苗的方法。也提供用于选择、设计和/或利用本文所述的mRNA癌症疫苗的系统、方法、装置和试剂盒。

[0157] 本发明的mRNA疫苗可包括一种或多种癌抗原。在一些实施方案中,mRNA疫苗由3种

或更多种、4种或更多种、5种或更多种、6种或更多种、7种或更多种、8种或更多种、9种或更多种抗原组成。在其他实施方案中,mRNA疫苗由1000种或更少种、900种或更少种、500种或更少种、100种或更少种、75种或更少种、50种或更少种、40种或更少种、30种或更少种、20种或更少种或100种或更少种癌抗原组成。在其他实施方案中,mRNA疫苗具有3-100、5-100、10-100、15-100、20-100、25-100、30-100、35-100、40-100、45-100、50-100、55-100、60-100、65-100、70-100、75-100、80-100、90-100、5-50、10-50、15-50、20-50、25-50、30-50、35-50、40-50、45-50、100-150、100-200、100-300、100-400、100-500、50-500、50-800、50-1,000或100-1,000种癌抗原。

[0158] 在一些实施方案中,mRNA癌症疫苗和疫苗接种方法包括基于特定突变的表位或抗原(新表位)以及由癌种系基因表达的那些(为见于多个患者中的肿瘤所共有的抗原)。

[0159] 如本文所用的也称为抗原决定簇的表位是抗原的由免疫系统在适当情形下识别,具体来说由抗体、B细胞或T细胞识别的部分。表位包括B细胞表位和T细胞表位。B细胞表位是由特定抗体产生性B细胞识别所需的肽序列。B细胞表位是指抗原的由抗体识别的特定区域。抗体的结合表位的部分被称为互补位。表位可为基于结构和与互补位的相互作用的构象性表位或线性表位。线性或连续表位由蛋白质的特定区域的一级氨基酸序列界定。与抗体相互作用的序列依序彼此紧接位于蛋白质上,并且表位可通常用单一肽进行模拟。构象性表位是由天然蛋白质的构象性结构界定的表位。这些表位可为连续的或不连续的,即表位的组分可位于蛋白质的不同部分上,所述组分在折叠天然蛋白质结构中被致使彼此接近。

[0160] T细胞表位是与APC上的蛋白质缔合的为由特定T细胞识别所需的肽序列。T细胞表位在细胞内被加工,并且呈递在APC的表面上,在所述表面处,它们结合于包括II类MHC和I类MHC的MHC分子。肽表位可具有对于表位来说合理的任何长度。在一些实施方案中,肽表位是9-30个氨基酸。在其他实施方案中,长度为9-22、9-29、9-28、9-27、9-26、9-25、9-24、9-23、9-21、9-20、9-19、9-18、10-22、10-21、10-20、11-22、22-21、11-20、12-22、12-21、12-20、13-22、13-21、13-20、14-19、15-18或16-17个氨基酸。

[0161] 在一些实施方案中,肽表位包含至少一种MHC I类表位和至少一种MHC II类表位。在一些实施方案中,至少10%的表位是MHC I类表位。在一些实施方案中,至少20%的表位是MHC I类表位。在一些实施方案中,至少30%的表位是MHC I类表位。在一些实施方案中,至少40%的表位是MHC I类表位。在一些实施方案中,至少50%、60%、70%、80%、90%或100%的表位是MHC I类表位。在一些实施方案中,至少10%的表位是MHC II类表位。在一些实施方案中,至少20%的表位是MHC II类表位。在一些实施方案中,至少30%的表位是MHC II类表位。在一些实施方案中,至少40%的表位是MHC II类表位。在一些实施方案中,至少50%、60%、70%、80%、90%或100%的表位是MHC II类表位。在一些实施方案中,MHC I类表位与MHC II类表位的比率是选自约10%:约90%;约20%:约80%;约30%:约70%;约40%:约60%;约50%:约50%;约60%:约40%;约70%:约30%;约80%:约20%;约90%:约10% I类MHC表位:MHC II类表位的比率。在一些实施方案中,MHC II类表位与MHC I类表位的比率是选自约10%:约90%;约20%:约80%;约30%:约70%;约40%:约60%;约50%:约50%;约60%:约40%;约70%:约30%;约80%:约20%;约90%:约10% I类MHC表位:MHC I类表位的比率。在一些实施方案中,癌症疫苗的至少一种肽表位是B细胞表位。在一些实施

方案中,癌症疫苗的T细胞表位包含8个-11个之间的氨基酸。在一些实施方案中,癌症疫苗的B细胞表位包含13个-17个之间的氨基酸。

[0162] 在一些方面,本发明的癌症疫苗包括编码在表位之间以单一核苷酸间隔子加以排列或在表位之间在无间隔子下直接彼此排列的多种肽表位抗原的mRNA疫苗。多种表位抗原包括MHC I类表位和MHC II类表位的混合物。举例来说,多种肽表位抗原可为具有以下结构的多肽:

[0163] $(X-G-X)_{1-10} (G-Y-G-Y)_{1-10} (G-X-G-X)_{0-10} (G-Y-G-Y)_{0-10}$ 、 $(X-G)_{1-10} (G-Y)_{1-10} (G-X)_{0-10} (G-Y)_{0-10}$ 、 $(X-G-X-G-X)_{1-10} (G-Y-G-Y)_{1-10} (X-G-X)_{0-10} (G-Y-G-Y)_{0-10}$ 、 $(X-G-X)_{1-10} (G-Y-G-Y-G-Y)_{1-10} (X-G-X)_{0-10} (G-Y-G-Y)_{0-10}$ 、 $(X-G-X-G-X-G-X)_{1-10} (G-Y-G-Y)_{1-10} (X-G-X)_{0-10} (G-Y-G-Y)_{0-10}$ 、 $(X-G-X)_{1-10} (G-Y-G-Y-G-Y-G-Y)_{1-10} (X-G-X)_{0-10} (G-Y-G-Y)_{0-10}$ 、 $(X)_{1-10} (Y)_{1-10} (X)_{0-10} (Y)_{0-10}$ 、 $(Y)_{1-10} (X)_{1-10} (Y)_{0-10} (X)_{0-10}$ 、 $(XX)_{1-10} (Y)_{1-10} (X)_{0-10} (Y)_{0-10}$ 、 $(YY)_{1-10} (XX)_{1-10} (Y)_{0-10} (X)_{0-10}$ 、 $(X)_{1-10} (YY)_{1-10} (X)_{0-10} (Y)_{0-10}$ 、 $(XXX)_{1-10} (YYY)_{1-10} (XX)_{0-10} (YY)_{0-10}$ 、 $(YYY)_{1-10} (XXX)_{1-10} (YY)_{0-10} (XX)_{0-10}$ 、 $(XY)_{1-10} (Y)_{1-10} (X)_{1-10} (Y)_{1-10}$ 、 $(YX)_{1-10} (Y)_{1-10} (X)_{1-10} (Y)_{1-10}$ 、 $(YX)_{1-10} (X)_{1-10} (Y)_{1-10} (Y)_{1-10}$ 、 $(Y-G-Y)_{1-10} (G-X-G-X)_{1-10} (G-Y-G-Y)_{0-10} (G-X-G-X)_{0-10}$ 、 $(Y-G)_{1-10} (G-X)_{1-10} (G-Y)_{0-10} (G-X)_{0-10}$ 、 $(Y-G-Y-G-Y)_{1-10} (G-X-G-X)_{1-10} (Y-G-Y)_{0-10} (G-X-G-X)_{0-10}$ 、 $(Y-G-Y)_{1-10} (G-X-G-X-G-X)_{1-10} (Y-G-Y)_{0-10} (G-X-G-X)_{0-10}$ 、 $(Y-G-Y-G-Y-G-Y)_{1-10} (G-X-G-X)_{1-10} (Y-G-Y)_{0-10} (G-X-G-X)_{0-10}$ 、 $(Y-G-Y)_{1-10} (G-X-G-X-G-X-G-X)_{1-10} (Y-G-Y)_{0-10} (G-X-G-X)_{0-10}$ 、 $(XY)_{1-10} (YX)_{1-10} (XY)_{0-10} (YX)_{0-10}$ 、 $(YX)_{1-10} (XY)_{1-10} (Y)_{0-10} (X)_{0-10}$ 、 $(YY)_{1-10} (X)_{1-10} (Y)_{0-10} (X)_{0-10}$ 、 $(XY)_{1-10} (X)_{0-10} (X)_{0-10} (Y)_{1-10} (YX)_{1-10} (X)_{0-10} (Y)_{0-10}$ 、 $(XYX)_{1-10} (YXX)_{1-10} (YX)_{0-10} (YY)_{0-10}$ 或 $(YYX)_{1-10} (XXY)_{1-10} (YX)_{0-10} (XY)_{0-10}$,

[0164] X是长度为10-40个氨基酸的MHC I类表位,Y是长度为10-40个氨基酸的MHC II类表位,并且G是甘氨酸。

[0165] 在一些实施方案中,可使RNA疫苗与用于例如通过使非APC转化成假APC来促进抗原呈递细胞(APC)的产生的试剂组合。抗原呈递是免疫应答的引发、放大和持续中的关键步骤。在这个过程中,抗原的片段通过主要组织相容性复合物(MHC)或人白细胞抗原(HLA)向T细胞呈递,从而驱动抗原特异性免疫应答。对于免疫防治和治疗,使这个应答增强对于功效改进是重要的。本发明的RNA疫苗可被设计或增强以驱动高效抗原呈递。一种用于使APC加工和呈递增强的方法在于提供使RNA疫苗更好靶向抗原呈递细胞(APC)。另一方法涉及用免疫刺激性制剂和/或组分使APC细胞活化。

[0166] 或者,用于对非APC重新编程以变为APC的方法可与本发明的RNA疫苗一起使用。重要的是,摄取mRNA制剂,并且是它们的治疗作用的靶标的大多数细胞不是APC。因此,设计一种用以使这些细胞转化成APC的方式将对功效有益。本文提供用于将RNA疫苗例如mRNA疫苗递送至细胞,同时也促进非APC向APC转变的方法和途径。在一些实施方案中,编码APC重新编程分子的mRNA被包括在RNA疫苗中,或与RNA疫苗共同施用。

[0167] 如本文所用的APC重新编程分子是促进非APC细胞向APC样表型转变的分子。APC样表型是使得能够进行II类MHC加工的性质。因此,具有APC样表型的APC细胞是相较于不具有一种或多种外源性分子的相同细胞,具有所述一种或多种外源性分子(APC重新编程分子)的具有增强的II类MHC加工能力的细胞。在一些实施方案中,APC重新编程分子是CIITA(II类MHC表达的主要调控剂);伴侣蛋白诸如CLIP、HLA-DO、HLA-DM等(抗原片段向II类MHC中进

行装载的增强剂)和/或共刺激分子如CD40、CD80、CD86等(T细胞抗原识别和T细胞活化的增强剂)。

[0168] CIITA蛋白是通过与一组与II类启动子区域缔合的保守DNA结合蛋白相互作用来使II类MHC基因的转录的活化增强的反式活化子(Steimle等,1993,Cell 75:135-146)。已将CIITA的转录活化功能作图于氨基末端酸性结构域(氨基酸26-137)。核酸分子编码与CIITA相互作用的蛋白质,被称为CIITA相互作用蛋白104(在本文中也称为CIP104)。已显示CITTA与CIP104两者均使由II类MHC启动子进行的转录增强,因此适用作本发明的APC重新编程分子。在一些实施方案中,APC重新编程分子是全长CIITA、CIP104或其他相关分子或其活性片段,诸如CIITA的氨基酸26-137,或与其具有至少80%序列同一性以及维持使II类MHC基因的转录的活化增强的能力的氨基酸。

[0169] 在优选实施方案中,将APC重新编程分子以编码APC重新编程分子的mRNA形式递送至受试者中。因此,本发明的RNA疫苗可包括编码APC重新编程分子的mRNA。在一些实施方案中,mRNA呈单顺反子形式。在其他实施方案中,它呈多顺反子形式。在一些实施方案中,编码一种或多种抗原的mRNA在与编码APC重新编程分子的mRNA分开的制剂中。在其他实施方案中,编码一种或多种抗原的mRNA与编码APC重新编程分子的mRNA在同一制剂中。在一些实施方案中,编码一种或多种抗原的mRNA与编码APC重新编程分子的mRNA同时向受试者施用。在其他实施方案中,相比于编码APC重新编程分子的mRNA,编码一种或多种抗原的mRNA在不同时间向受试者施用。举例来说,编码APC重新编程分子的mRNA可在编码一种或多种抗原的mRNA之前施用。编码APC重新编程分子的mRNA可在编码抗原的mRNA之前立刻,在编码抗原的mRNA之前至少1小时,在编码抗原的mRNA之前至少1天,在编码抗原的mRNA之前至少一周,或在编码抗原的mRNA之前至少一个月施用。

[0170] 或者,编码APC重新编程分子的mRNA可在编码一种或多种抗原的mRNA之后施用。编码APC重新编程分子的mRNA可在编码抗原的mRNA之后立刻,在编码抗原的mRNA之后至少1小时,在编码抗原的mRNA之后至少1天,在编码抗原的mRNA之后至少一周,或在编码抗原的mRNA之后至少一个月施用。在一些实施方案中,抗原是癌抗原,诸如患者特异性抗原。在其他实施方案中,抗原是感染性疾病抗原。

[0171] 在一些实施方案中,mRNA疫苗可包括回忆抗原,有时也被称为记忆抗原。回忆抗原是由先前已由个体遭遇,并且有预先存在的针对其的记忆淋巴细胞的抗原。在一些实施方案中,回忆抗原可为个体可能已遭遇的感染性疾病抗原诸如流感抗原。回忆抗原帮助促进更强力免疫应答。

[0172] 选择用于包括在mRNA疫苗中的抗原或新表位通常将为高亲和力结合肽。在某一方面,相比于野生型肽,抗原或新表位以更大亲和力结合HLA蛋白。在一些实施方案中,抗原或新表位具有至少小于5000nM,至少小于500nM,至少小于250nM,至少小于200nM,至少小于150nM,至少小于100nM,至少小于50nM或更小的IC₅₀。通常,预测IC₅₀<50nM的肽一般被视为中亲和力至高亲和力结合肽,并且将被选择用于使用生物化学HLA结合测定来凭经验测试它们的亲和力。

[0173] 在个人化癌症疫苗中,可在患者的样品中鉴定受试者特异性癌抗原。举例来说,样品可为组织样品或肿瘤样品。举例来说,可考查具有一个或多个肿瘤细胞的样品中受试者特异性癌抗原的存在性。可使用整个基因组、外显子组或转录物组分析来考查肿瘤样品以

鉴定受试者特异性癌抗原。

[0174] 或者,可在受试者的外来体中鉴定受试者特异性癌抗原。当在受试者的外来体中鉴定用于疫苗的抗原时,所述抗原被称为代表受试者的外来体抗原。

[0175] 外来体是由细胞排出的小型微囊泡,通常具有约30-100nm的直径。外来体典型地由以下方式形成:晚期内体膜向内凹入和夹断,从而导致形成装满小型脂质双层囊泡的多囊体(MVB),所述囊泡各自含有亲本细胞的细胞质的样品。MVB与细胞膜的融合导致这些外来体从细胞释放,并且导致它们向血液、尿、脑脊髓液或其他体液中递送。可从这些生物液体中的任一者回收外来体以进行进一步分析。

[0176] 外来体内的核酸具有作为肿瘤抗原的生物标志物的作用。分析外来体以鉴定受试者特异性癌抗原的优势是方法规避对活检体的需要。这在患者需要进行包括癌抗原鉴定和疫苗接种的数轮治疗时可特别有利。

[0177] 本领域中已描述从生物样品分离外来体的许多方法。举例来说,可使用以下方法:差速离心、低速离心、阴离子交换和/或凝胶渗透色谱法、蔗糖密度梯度或细胞器电泳、磁激活的细胞分选(MACS)、纳米膜超滤浓缩、Percoll梯度分离以及使用微流体装置。示例性方法例如描述于美国专利公布号2014/0212871中。

[0178] 术语“生物样品”是指含有生物物质诸如DNA、RNA和蛋白质的样品。在一些实施方案中,生物样品可适合地包括来自受试者的体液。体液可为从受试者的身体中任何地方(优选是外周位置)分离的液体,包括但不限于例如血液、血浆、血清、尿、痰、脊髓液、脑脊髓液、胸膜液、乳头抽吸物、淋巴液、呼吸道液体、肠道液体和泌尿生殖道液体、泪液、唾液、母乳、来自淋巴系统的液体、精液、脑脊髓液、器官内系统液体、腹水、肿瘤囊肿液体、羊水及其组合。

[0179] 在一些实施方案中,可监测癌症的进展以鉴定所表达抗原的变化。因此,在一些实施方案中,方法也涉及在施用癌症mRNA疫苗之后至少一个月,从受试者的样品鉴定至少2种癌抗原以产生第二组癌抗原,以及向所述受试者施用具有编码所述第二组癌抗原的开放阅读框的mRNA疫苗。在一些实施方案中,在具有编码第一组癌抗原的开放阅读框的mRNA疫苗之后2个月、3个月、4个月、5个月、6个月、8个月、10个月或1年,向受试者施用具有编码第二组抗原的开放阅读框的mRNA疫苗。在其他实施方案中,在具有编码第一组癌抗原的开放阅读框的mRNA疫苗之后1 1/2、2、2 1/2、3、3 1/2、4、4 1/2或5年,向受试者施用具有编码第二组抗原的开放阅读框的mRNA疫苗。

[0180] 作为新抗原的热点突变

[0181] 在对癌症的群体分析中,相比于将被预期偶然发生的百分比,某些突变发生在更高百分比的患者中。已常常显示这些“频发”或“热点”突变在肿瘤中具有“驱动”作用,从而在癌细胞功能方面产生对肿瘤引发、维持或转移重要,并且因此在肿瘤的进化中被选择的某一变化。除它们在肿瘤生物学和疗法中具有重要性之外,频发突变为精准医学提供机会,其中将患者群体分层为更可能对特定疗法起响应的各组,所述疗法包括但不限于靶向突变蛋白自身。

[0182] 关于频发突变的许多尝试和研究已集中于非同义(或“错义”)单核苷酸变体(SNV),但群体分析已揭示多种更复杂(非SNV)变体分类,诸如同义(或“沉默”)、剪接位点、多核苷酸变体、插入和缺失,也可在高频率下发生。

[0183] 在人癌症的情况下,相比于任何其他基因,p53基因(官方符号TP53)更频繁突变。大量群组研究已显示对于大多数p53突变,基因组位置为一名患者或仅少许患者所特有,并且突变不能用作被设计用于特定患者群体的治疗性疫苗的频发新抗原。惊人的是,然而,p53基因座的小型子组确实展现“热点”样式,其中基因中的若干位置以相对较高频率被突变。引人注目的是,这些频发突变区域中的大部分发生在外显子-内含子边界附近,从而破坏由mRNA剪接机构识别的典型核苷酸序列基序。剪接基序的突变可改变最终mRNA序列,即使预测局部氨基酸序列无变化(即对于同义或内含子突变来说)。因此,这些突变常常由常见注释工具注释为“非编码”,并且被忽略用于进一步分析,即使它们可以不可预测方式改变mRNA剪接,并且对翻译蛋白质施加严重功能性影响。如果选择性剪接同种型产生同框序列变化(即不产生PTC),那么它可逃脱由NMD进行的耗竭,并且易于表达,加工,以及由HLA系统呈递在细胞表面上。此外,突变源性选择性剪接通常是“隐蔽的”,即不在正常组织中表达,因此可由T细胞识别为非自身新抗原。

[0184] 在一些方面,本发明提供用作治疗性疫苗接种的靶标的由p53中的某些频发体细胞癌突变产生,不限于错义SNV,以及常常导致选择性剪接的新抗原肽序列。在一些实施方案中,突变、mRNA剪接事件、所得新抗原肽和/或HLA限定的表位包括在典型5'剪接位点邻近密码子p.T125处的突变,从而诱导具有肽序列TAKSVTCTVSCPEGLASMRLQCLAVSPCISFVWNFGIPLHPLASCQCFFIVYPLNV(SEQ ID NO:1)的保留内含子,所述序列含有表位AVSPCISFVW(SEQ ID NO:2)(HLA-B*57:01,HLA-B*58:01)、HPLASCQCFF(SEQ ID NO:3)(HLA-B*35:01,HLA-B*53:01)、FVWNFGIPL(SEQ ID NO:4)(HLA-A*02:01,HLA-A*02:06,HLA-B*35:01)。

[0185] 在一些实施方案中,突变、mRNA剪接事件、所得新抗原肽和/或HLA限定的表位包括在典型5'剪接位点邻近密码子p.331处的突变,从而诱导具有肽序列EYFTLQVLSLGTSYQVESFQSNTQNAVFFLTVLPAIGAFAIRGQ(SEQ ID NO:5)的保留内含子,所述序列含有表位LQVLSLGTSY(SEQ ID NO:6)(HLA-B*15:01)、FQSNTQNAV(SEQ ID NO:7)(HLA-B*15:01)。

[0186] 在一些实施方案中,突变、mRNA剪接事件、所得新抗原肽和/或HLA限定的表位包括在典型3'剪接位点邻近密码子p.126处的突变,从而诱导隐蔽选择性外显子3'剪接位点,其产生含有表位CTMFCQLAK(SEQ ID NO:9)(HLA-A*11:01)、KSVTCTMF(SEQ ID NO:10)(HLA-B*58:01)的新型跨越肽序列AKSVTCTMFCQLAK(SEQ ID NO:8)。

[0187] 在一些实施方案中,突变、mRNA剪接事件、所得新抗原肽和/或HLA限定的表位包括在典型5'剪接位点邻近密码子p.224处的突变,从而诱导隐蔽选择性内含子5'剪接位点,其产生含有表位VPYEPPEVW(SEQ ID NO:12)(HLA-B*53:01,HLA-B*51:01)、LTVPPSTAW(SEQ ID NO:13)(HLA-B*58:01,HLA-B*57:01)的新型跨越肽序列VPYEPPEVWLALTVPSTAWAA(SEQ ID NO:11)。

[0188] 在先前序列中,转录物密码子位置涉及来自Ensembl v83人基因组注释的典型全长p53转录物ENST00000269305(SEQ ID NO:14)。

[0189] 在一个实施方案中,本发明提供一种mRNA疫苗,其包含含有编码新抗原肽1至4的开放阅读框(ORF)的多联多表位构建体或一组个别表位构建体。

[0190] 在一个实施方案中,本发明提供基于患者的肿瘤含有任何以上突变来选择性施用含有或编码肽1-4的疫苗。

[0191] 在一个实施方案中,本发明提供基于以下双重准则来选择性施用疫苗:1) 患者的

肿瘤含有任何以上突变以及2) 患者的正常HLA类型含有被预测会结合所得新抗原的相应HLA等位基因。

[0192] 已发现本文所述的mRNA疫苗在若干方面优于当前疫苗。首先,脂质纳米粒子(LNP)递送优于其他制剂,包括文献中所述的基于脂质体或鱼精蛋白的方法,并且额外佐剂将不是必要的。使用LNP使得能够有效递送化学修饰的mRNA疫苗或未修饰mRNA疫苗。经修饰LNP配制mRNA疫苗与未修饰LNP配制mRNA疫苗两者均以显著程度优于常规疫苗。在一些实施方案中,本发明的mRNA疫苗在优越性方面是常规疫苗的至少10倍、20倍、40倍、50倍、100倍、500倍或1,000倍。

[0193] 尽管已试图产生功能性RNA疫苗,包括mRNA疫苗和自我复制性RNA疫苗,但这些RNA疫苗的治疗功效尚未被充分确定。十分惊人的是,根据本发明的各个方面,本发明者已发现一类用于在体内递送mRNA疫苗的制剂,其导致显著增强以及在许多方面具有协同作用的免疫应答,包括增强的抗原产生和具有中和能力的功能性抗体产生。即使当相较于在其他类别的基于脂质的制剂的情况下使用的mRNA剂量,施用显著更低剂量的mRNA时,也可实现这些结果。本发明的制剂已显示足以确定功能性mRNA疫苗作为防治剂和治疗剂的功效的显著出乎意料的体内免疫应答。另外,自我复制性RNA疫苗依赖于病毒复制路径来将足够RNA递送至细胞以产生免疫原性应答。本发明的制剂不需要病毒复制来产生足够蛋白质以导致强烈免疫应答。因此,本发明的mRNA不是自我复制性RNA,并且不包括为病毒复制所必需的组分。

[0194] 在一些方面,本发明涉及脂质纳米粒子(LNP)制剂使包括化学修饰的mRNA疫苗和未修饰mRNA疫苗的mRNA疫苗的有效性显著增强的惊人发现。使用若干不同肿瘤抗原,在体内考查在LNP中配制的mRNA疫苗的功效。除提供增强的免疫应答之外,相比于其他测试疫苗,本发明的制剂也以更少剂量的抗原产生更快速免疫应答。相比于在不同载体中配制的疫苗,本发明的mRNA-LNP制剂也产生就定量和定性来说更好的免疫应答。另外,即使当mRNA的剂量低于其他疫苗时,本发明的mRNA-LNP制剂也优于其他疫苗。

[0195] 本文所述的研究中使用的LNP先前已用于在各种动物模型中以及在人中递送siRNA。鉴于与用LNP制剂递送siRNA关联所进行的观察,LNP适用于疫苗中的事实是十分惊人的。已观察到治疗性递送在LNP中配制的siRNA导致与短暂IgM应答相关的不合需要的炎症性应答,从而通常导致抗原产生降低和免疫应答受损害。与用siRNA观察的研究结果不同,本文证明本发明的LNP-mRNA制剂会产生对于防治方法和治疗方法足够的增强IgG水平,而非短暂IgM应答。

[0196] 核酸/多核苷酸

[0197] 如本文提供的癌症疫苗包含至少一种具有编码至少一种癌症抗原性多肽的开放阅读框的(一种或多种)核糖核酸(RNA)多核苷酸。术语“核酸”以它的最广泛意义包括包含核苷酸的聚合物的任何化合物和/或物质。这些聚合物被称为多核苷酸。

[0198] 核酸(也被称为多核苷酸)可为或可包括例如核糖核酸(RNA)、脱氧核糖核酸(DNA)、苏糖核酸(TNA)、二醇核酸(GNA)、肽核酸(PNA)、锁定核酸(LNA,包括具有 β -D-核糖构型的LNA、具有 α -L-核糖构型的 α -LNA(LNA的非对映异构体)、具有2'-氨基官能化的2'-氨基-LNA和具有2'-氨基官能化的2'-氨基- α -LNA)、亚乙基核酸(ENA)、环己基核酸(CeNA)或其嵌合体或组合。

[0199] 在一些实施方案中,本公开的多核苷酸充当信使RNA (mRNA)。“信使RNA”(mRNA)是指编码(至少一种)多肽(天然存在的、非天然存在的或经修饰氨基酸聚合物),并且可在体外、在体内、原位或离体被翻译以产生所编码多肽的任何多核苷酸。

[0200] mRNA分子的基本组分通常包括至少一个编码区、5'非翻译区(UTR)、3'UTR、5'帽和聚腺苷酸尾部。本公开的多核苷酸可充当mRNA,但可在它们的功能性和/或结构性设计特征方面区别于野生型mRNA,所述特征用于克服使用基于核酸的治疗剂进行有效多肽表达的现有问题。

[0201] 在一些实施方案中,癌症疫苗的RNA多核苷酸编码2-10、2-9、2-8、2-7、2-6、2-5、2-4、2-3、3-10、3-9、3-8、3-7、3-6、3-5、3-4、4-10、4-9、4-8、4-7、4-6、4-5、5-10、5-9、5-8、5-7、5-6、6-10、6-9、6-8、6-7、7-10、7-9、7-8、8-10、8-9或9-10种抗原性多肽。在一些实施方案中,癌症疫苗的RNA多核苷酸编码至少10、20、30、40、50、60、70、80、90或100种抗原性多肽。在一些实施方案中,癌症疫苗的RNA多核苷酸编码至少100或至少200种抗原性多肽。在一些实施方案中,癌症疫苗的RNA多核苷酸编码1-10、5-15、10-20、15-25、20-30、25-35、30-40、35-45、40-50、1-50、1-100、2-50或2-100种抗原性多肽。

[0202] 在一些实施方案中,对本公开的多核苷酸进行密码子优化。密码子优化方法在本领域中是已知的,并且可如本文所提供加以使用。在一些实施方案中,密码子优化可用于使靶标中的密码子频率和宿主生物体匹配以确保适当折叠;偏重GC含量以增加mRNA稳定性或减少二级结构;使可损害基因构建或表达的串联重复密码子或碱基延伸最少;定制转录和翻译控制区;插入或删除蛋白质移行序列;在所编码蛋白质中移除/添加翻译后修饰位点(例如糖基化位点);添加、移除或改组蛋白质结构域;插入或缺失限制位点;修饰核糖体结合位点和mRNA降解位点;调整翻译速率以使蛋白质的各种结构域适当折叠;或减少或消除多核苷酸内的问题二级结构。密码子优化工具、算法和服务在本领域中是已知的-非限制性实例包括来自GeneArt (Life Technologies)的服务、DNA2.0 (Menlo Park CA)和/或专有方法。在一些实施方案中,使用最优化算法使开放阅读框(ORF)序列最优化。

[0203] 在一些实施方案中,密码子优化的序列与天然存在的或野生型序列(例如编码目标多肽或蛋白质(例如抗原性蛋白质或多肽)的天然存在的或野生型mRNA序列)共有小于95%序列同一性。在一些实施方案中,密码子优化的序列与天然存在的或野生型序列(例如编码目标多肽或蛋白质(例如抗原性蛋白质或多肽)的天然存在的或野生型mRNA序列)共有小于90%序列同一性。在一些实施方案中,密码子优化的序列与天然存在的或野生型序列(例如编码目标多肽或蛋白质(例如抗原性蛋白质或多肽)的天然存在的或野生型mRNA序列)共有小于85%序列同一性。在一些实施方案中,密码子优化的序列与天然存在的或野生型序列(例如编码目标多肽或蛋白质(例如抗原性蛋白质或多肽)的天然存在的或野生型mRNA序列)共有小于80%序列同一性。在一些实施方案中,密码子优化的序列与天然存在的或野生型序列(例如编码目标多肽或蛋白质(例如抗原性蛋白质或多肽)的天然存在的或野生型mRNA序列)共有小于75%序列同一性。

[0204] 在一些实施方案中,密码子优化的序列与天然存在的或野生型序列(例如编码目标多肽或蛋白质(例如抗原性蛋白质或多肽)的天然存在的或野生型mRNA序列)共有65%与85%之间(例如约67%与约85%之间、或约67%与约80%之间)序列同一性。在一些实施方案中,密码子优化的序列与天然存在的或野生型序列(例如编码目标多肽或蛋白质(例如抗

原性蛋白质或多肽)的天然存在的或野生型mRNA序列)共有65%与75%之间或约80%序列同一性。

[0205] 在一些实施方案中,密码子优化的RNA可例如是其中G/C的水平得以增强的RNA。核酸分子的G/C含量可影响RNA的稳定性。相比于含有大量腺嘌呤(A)和胸腺嘧啶(T)或尿嘧啶(U)核苷酸的核酸,具有增加量的鸟嘌呤(G)和/或胞嘧啶(C)残基的RNA可在功能上更稳定。W002/098443公开一种含有通过翻译区中的序列修饰加以稳定的mRNA的药物组合物。归因于遗传密码的简并性,修饰通过将现有密码子替换成促进更大RNA稳定性而不改变所得氨基酸的那些来起作用。方法限于RNA的编码区。

[0206] 抗原/抗原性多肽

[0207] 在一些实施方案中,癌症抗原性多肽长于25个氨基酸,并且短于50个氨基酸。因此,多肽包括基因产物、天然存在的多肽、合成多肽、同源物、直系同源物、旁系同源物、片段以及前述各物的其他等效物、变体和类似物。多肽可为单分子或可为多分子复合物,诸如二聚体、三聚体或四聚体。多肽也可包括单链或多链多肽,诸如抗体或胰岛素,并且可加以缔合或连接。最通常地,二硫键见于多链多肽中。术语多肽也可适用于氨基酸聚合物,其中至少一个氨基酸残基是相应天然存在的氨基酸的人工化学类似物。

[0208] 术语“多肽变体”是指在它们的氨基酸序列方面不同于天然或参照序列的分子。相较于天然序列或参照序列,氨基酸序列变体可在氨基酸序列内的某些位置处具有取代、缺失和/或插入。通常,变体与天然序列或参照序列具有至少50%同一性。在一些实施方案中,变体与天然序列或参照序列共有至少80%或至少90%同一性。

[0209] 在一些实施方案中,提供“变异模拟物”。如本文所用,术语“变异模拟物”是含有至少一个将模拟活化序列的氨基酸的模拟物。举例来说,谷氨酸可充当磷酸苏氨酸和/或磷酸丝氨酸的模拟物。或者,变异模拟物可导致去活化,或导致含有所述模拟物的产物失活,举例来说,苯丙氨酸可充当酪氨酸的失活性替代物;或丙氨酸可充当丝氨酸的失活性替代物。

[0210] “直系同源物”是指不同物种中通过物种形成而从共同祖先基因进化的基因。通常,直系同源物在进化的过程中保留相同功能。鉴定直系同源物对于可靠预测新测序基因组中的基因功能至关重要。

[0211] “类似物”意图包括仍然维持亲本或起始多肽的一种或多种性质,差异在于具有一个或多个氨基酸改变例如氨基酸残基的取代、添加或缺失的多肽变体。

[0212] 本公开提供基于多核苷酸或多肽的若干类型的组合物,包括变体和衍生物。这些包括例如取代性、插入性、缺失和共价变体和衍生物。术语“衍生物”与术语“变体”同义使用,但通常是指相对于参照分子或起始分子,已以任何方式修饰和/或变化的分子。

[0213] 因此,在本公开的范围内包括编码相对于参照序列含有取代、插入和/或添加、缺失和共价修饰的肽或多肽特别是本文公开的多肽序列的多核苷酸。举例来说,可将序列标签或氨基酸诸如一个或多个赖氨酸添加至肽序列中(例如在N末端或C末端处)。序列标签可用于肽检测、纯化或定位。赖氨酸可用于使肽溶解性增加或允许达成生物素化。或者,可任选使位于肽或蛋白质的氨基酸序列的羧基和氨基末端区域处的氨基酸残基缺失,从而提供截短序列。或者,视序列的用途而定,可使某些氨基酸(例如C末端残基或N末端残基)缺失,所述用途如例如所述序列作为可溶性或连接于固体载体的较大序列的一部分进行表达。

[0214] “取代性变体”在涉及多肽时是天然或起始序列中至少一个氨基酸残基被移除,并

且不同氨基酸在相同位置被插入它的地点中的那些。取代可为单一的,其中分子中仅一个氨基酸已被取代,或它们可为多重的,其中同一分子中的两个或更多个氨基酸已被取代。

[0215] 如本文所用,术语“保守性氨基酸取代”是指用具有类似尺寸、电荷或极性的不同氨基酸取代通常存在于序列中的氨基酸。保守性取代的实例包括将非极性(疏水性)残基诸如异亮氨酸、缬氨酸和亮氨酸取代成另一非极性残基。同样,保守性取代的实例包括将一个极性(亲水性)残基取代成另一残基,诸如在精氨酸与赖氨酸之间,在谷氨酰胺与天冬酰胺之间,以及在甘氨酸与丝氨酸之间。另外,将碱性残基诸如赖氨酸、精氨酸或组氨酸取代成另一残基,或将一个酸性残基诸如天冬氨酸或谷氨酸取代成另一酸性残基是保守性取代的额外实例。非保守性取代的实例包括将非极性(疏水性)氨基酸残基诸如异亮氨酸、缬氨酸、亮氨酸、丙氨酸、甲硫氨酸取代成极性(亲水性)残基诸如半胱氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸或赖氨酸,和/或将极性残基取代成非极性残基。

[0216] “特征”在涉及多肽或多核苷酸时分别定义为分子的基于氨基酸序列或基于核苷酸的不同组分。由多核苷酸编码的多肽的特征包括表面表现形式、局部构象形状、折叠、环、半环、结构域、半结构域、位点、末端或其任何组合。

[0217] 如本文所用,当涉及多肽时,术语“结构域”是指多肽的具有一种或多种可鉴定结构或功能特征或性质(例如结合能力、充当蛋白质-蛋白质相互作用的位点)的基序。

[0218] 如本文所用,当涉及多肽时,术语“位点”在它涉及基于氨基酸的实施方案时与“氨基酸残基”和“氨基酸侧链”同义使用。如本文所用,当涉及多核苷酸时,术语“位点”在它涉及基于核苷酸的实施方案时与“核苷酸”同义使用。位点代表肽或多肽或多核苷酸内的可在基于多肽或基于多核苷酸的分子内被修饰、操作、改变、衍生或变化的位置。

[0219] 如本文所用,术语“末端(termini/terminus)”在涉及多肽或多核苷酸时分别是指多肽或多核苷酸的尽头。所述尽头不仅仅限于多肽或多核苷酸的第一位点或最终位点,而是可包括在末端区域中的额外氨基酸或核苷酸。基于多肽的分子可被表征为具有N末端(由具有游离氨基(NH₂)的氨基酸封端)与C末端(由具有游离羧基(COOH)的氨基酸封端)两者。在一些情况下,蛋白质由以二硫键或以非共价力集合的多个多肽链组成(多聚体、寡聚物)。这些蛋白质具有多个N末端和C末端。或者,可修饰多肽的末端以使它们视情况而定以基于非多肽的部分诸如有机缀合物开始或结束。

[0220] 如由本领域技术人员所认识到,蛋白质片段、功能性蛋白质结构域和同源性蛋白质也被视为在目标多肽的范围内。举例来说,本文提供长度为10、20、30、40、50、60、70、80、90、100或大于100个氨基酸的参照蛋白质的任何蛋白质片段(意指比参照多肽序列短至少一个氨基酸残基,但另外同一的多肽序列)。在另一实例中,可根据本公开来利用包括具有与任何本文所述的序列40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或100%同一的20、30、40、50或100个氨基酸的链段的任何蛋白质。在一些实施方案中,多肽包括如任何本文提供或参照的序列中所示的2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个突变。在另一实例中,可根据本公开来利用包括具有与任何本文所述的序列大于80%、90%、95%或100%同一的20、30、40、50或100个氨基酸的链段的任何蛋白质,其中所述蛋白质具有以下链段:所述链段具有与任何本文所述的序列小于80%、75%、70%、65%或60%同一的5、10、15、20、25或30个氨基酸。

[0221] 本公开的多肽或多核苷酸分子可与参照分子(例如参照多肽或参照多核苷酸),例如与本领域所述的分子(例如工程化或设计的分子或野生型分子)共有某一程度的序列类

似性或同一性。如本领域中已知的术语“同一性”是指两个或更多个多肽或多核苷酸的序列之间的关系,如通过将序列进行比较所确定。在本领域中,同一性也意指它们之间的序列相关性程度,如通过具有两个或更多个氨基酸残基或核酸残基的串段之间的匹配的数目所确定。同一性衡量两个或更多个序列之间相对于较小序列的同一匹配百分比,其中采用通过特定数学模型或计算机程序(例如“算法”)处理的空位比对(如果有的话)。相关肽的同一性可易于通过已知方法来计算。“同一性%”在它适用于多肽或多核苷酸序列时定义为在将序列对准以及必要时引入空位以实现最大同一性百分比之后,候选氨基酸或核酸序列中与第二序列的氨基酸序列或核酸序列中的残基同一的残基(氨基酸残基或核酸残基)的百分比。用于比对的方法和计算机程序在本领域中是熟知的。应了解同一性取决于对同一性百分比的计算,但可由于在计算中引入的空位和罚分而在数值方面不同。通常,特定多核苷酸或多肽的变体与那个特定参照多核苷酸或多肽具有至少40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%但小于100%序列同一性,如通过本文所述以及为本领域技术人员所知的序列比对程序和参数所确定。所述比对工具包括BLAST套件的那些(Stephen F. Altschul等(1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402)。另一普及局部比对技术基于Smith-Waterman算法(Smith, T.F. 和Waterman, M.S. (1981) "Identification of common molecular subsequences." *J. Mol. Biol.* 147:195-197)。一种基于动态规划的一般性整体比对技术是Needleman-Wunsch算法(Needleman, S.B. 和Wunsch, C.D. (1970) "A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequences of two proteins." *J. Mol. Biol.* 48:443-453.)。更新近地,已开发快速最优整体序列比对算法(Fast Optimal Global Sequence Alignment Algorithm, FOGSAA),其据称比包括Needleman-Wunsch算法的其他最优整体比对方法更快产生对核苷酸和蛋白质序列的整体比对。本文描述其他工具,具体来说,在以下对“同一性”定义时描述。

[0222] 如本文所用,术语“同源性”是指聚合分子之间,例如核酸分子(例如DNA分子和/或RNA分子)之间和/或多肽分子之间的总体相关性。共有通过比对匹配残基来确定的阈值水平的类似性或同一性的聚合分子(例如核酸分子(例如DNA分子和/或RNA分子)和/或多肽分子)被称为同源。同源性是描述分子之间的关系的定性术语,并且可基于定量类似性或同一性。类似性或同一性是确定两个所比较序列之间的序列匹配程度的定量术语。在一些实施方案中,如果聚合分子序列至少25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%同一或类似,那么它们被视为彼此“同源”。术语“同源”必须是指至少两个序列(多核苷酸或多肽序列)之间的比较。如果两个多核苷酸序列编码的多肽就至少一个具有至少20个氨基酸的链段来说至少50%、60%、70%、80%、90%、95%或甚至99%同一,那么它们被视为同源。在一些实施方案中,同源性多核苷酸序列的特征在于能够编码具有至少4-5个独特指定的氨基酸的链段。对于长度小于60个核苷酸的多核苷酸序列,同源性通过编码具有至少4-5个独特指定的氨基酸的链段的能力来确定。如果两个蛋白质就至少一个具有至少20个氨基酸的链段来说至少50%、60%、70%、80%或90%同一,那么所述两个蛋白质序列被视为同源。

[0223] 同源性暗示所比较序列在进化中从共同来源分散。术语“同源物”是指由于从共同

祖先序列遗传而与第二氨基酸序列或核酸序列相关的第一氨基酸序列或核酸序列(例如基因(DNA或RNA)或蛋白质序列)。术语“同源物”可适用于通过物种形成事件而分开的基因和/或蛋白质之间的关系,或适用于通过遗传重复事件而分开的基因和/或蛋白质之间的关系。“直系同源物”是不同物种中通过物种形成而从共同祖先基因(或蛋白质)进化的基因(或蛋白质)。通常,直系同源物在进化的过程中保留相同功能。“旁系同源物”是由于基因组内的重复而相关的基因(或蛋白质)。直系同源物在进化的过程中保留相同功能,而旁系同源物进化出新功能,即使这些功能与原始功能相关。

[0224] 术语“同一性”是指聚合分子之间,例如多核苷酸分子(例如DNA分子和/或RNA分子)之间和/或多肽分子之间的总体相关性。对两个多核酸序列的同一性百分比的计算例如可通过出于最优比较目的将两个序列对准来进行(例如可在第一核酸序列和第二核酸序列中的一者或两者中引入空位以达成最优比对,并且可出于比较目的而忽视非同一序列)。在某些实施方案中,出于比较目的而对准的序列的长度为参照序列的长度的至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%或100%。接着比较在相应核苷酸位置处的核苷酸。当第一序列中的位置由与第二序列中的相应位置相同的核苷酸占据时,那么分子在那个位置处是同一的。两个序列之间的同一性百分比是在考虑需要被引入以达成两个序列的最优比对的空位的数目和各空位的长度的情况下,由序列共有的同一位置的数目的函数。可使用数学算法来实现序列比较以及确定两个序列之间的同一性百分比。举例来说,两个核酸序列之间的同一性百分比可使用诸如以下中所述的那些方法的方法确定:Computational Molecular Biology,Lesk,A.M.编,Oxford University Press,New York,1988;Biocomputing:Informatics and Genome Projects,Smith,D.W.编,Academic Press,New York,1993;Sequence Analysis in Molecular Biology,von Heinje,G.,Academic Press,1987;Computer Analysis of Sequence Data,Part I,Griffin,A.M.和Griffin,H.G.编,Humana Press,New Jersey,1994;以及Sequence Analysis Primer,Gribskov,M.和Devereux,J.编,M Stockton Press,New York,1991;其各自以引用的方式并入本文。举例来说,可使用Meyers和Miller(CABIOS,1989,4:11-17)的算法来确定两个核酸序列之间的同一性百分比,所述算法已被并入ALIGN程序(2.0版)中,所述程序使用PAM120权重残基表、空位长度罚分12和空位罚分4。两个核酸序列之间的同一性百分比可或者使用GCG软件包中的GAP程序,在利用NWSgapdna.CMP矩阵下确定。通常用于确定序列之间的同一性百分比的方法包括但不限于Carillo,H.和Lipman,D.,SIAM JApplied Math.,48:1073(1988)中公开的那些;所述文献以引用的方式并入本文。用于确定同一性的技术被编纂在可公开获得的计算机程序中。用以确定两个序列之间的同源性的示例性计算机软件包括但不限于GCG程序包(Devereux,J.等,Nucleic Acids Research,12(1),387(1984))、BLASTP、BLASTN和FASTA(Altschul,S.F.等,J.Molec.Biol.,215,403(1990))。

[0225] 化学修饰

[0226] 在一些实施方案中,本公开的RNA(例如mRNA)疫苗包含至少一种具有编码至少一种呼吸道融合性病毒(RSV)抗原性多肽的开放阅读框的核糖核酸(RNA)多核苷酸,其中所述RNA包含至少一种化学修饰。

[0227] 术语“化学修饰”和“化学修饰的”是指关于腺苷(A)、鸟苷(G)、尿苷(U)、胸苷(T)或

胞苷(C)核糖核苷或脱氧核糖核苷在它们的位置、样式、百分比或群体中的至少一者方面进行修饰。通常,这些术语不指天然存在的5'末端mRNA帽部分中的核糖核苷酸修饰。

[0228] 多核苷酸的修饰包括但不限于本文所述的那些,并且包括但不限于包括化学修饰的那些修饰。多核苷酸(例如RNA多核苷酸,诸如mRNA多核苷酸)可包含天然存在的修饰、非天然存在的修饰,或多核苷酸可包含天然存在的修饰和非天然存在的修饰的组合。多核苷酸可包括例如对糖、核苷碱基或核苷间键联(例如对连接磷酸酯,对磷酸二酯键联或对磷酸二酯主链)的任何适用修饰。

[0229] 关于多肽,术语“修饰”是指关于一组典型20种氨基酸进行的修饰。如果如本文提供的多肽含有氨基酸取代、插入、或取代和插入的组合,那么它们也被视为“经修饰”。

[0230] 在一些实施方案中,多核苷酸(例如RNA多核苷酸,诸如mRNA多核苷酸)包含各种(超过一种)不同修饰。在一些实施方案中,多核苷酸的特定区域含有一个、两个或更多个(任选是不同的)核苷或核苷酸修饰。在一些实施方案中,相对于未修饰多核苷酸,引入细胞或生物体中的经修饰的RNA多核苷酸(例如经修饰mRNA多核苷酸)分别在所述细胞或生物体中展现降解降低。在一些实施方案中,引入细胞或生物体中的经修饰的RNA多核苷酸(例如经修饰mRNA多核苷酸)可分别在所述细胞或生物体中展现免疫原性降低(例如先天性应答降低)。

[0231] 在一些实施方案中,多核苷酸(例如RNA多核苷酸,诸如mRNA多核苷酸)包含在多核苷酸的合成或合成后期间引入以实现所需功能或性质的非天然经修饰核苷酸。修饰可存在于核苷酸间键联、嘌呤或嘧啶碱基或糖上。修饰可用化学合成或用聚合酶引入在链的末端或链中任何其他地方。可对多核苷酸的任何区域进行化学修饰。

[0232] 本公开提供多核苷酸(例如RNA多核苷酸,诸如mRNA多核苷酸)的经修饰核苷和核苷酸。“核苷”是指含有糖分子(例如戊糖或核糖)或其衍生物与有机碱基(例如嘌呤或嘧啶)或其衍生物(在本文中也称为“核苷碱基”)组合的化合物。“核苷酸”是指包括磷酸酯基团的核苷。经修饰核苷酸可通过用以包括一个或多个经修饰或非天然核苷的任何适用方法来合成,所述方法诸如像化学、酶促或重组方法。多核苷酸可包含一个或多个具有连接的核苷的区域。所述区域可具有可变主链键联。键联可为标准磷酸二酯键联,在所述情况下,多核苷酸将包含核苷酸的区域。

[0233] 经修饰核苷酸碱基配对不仅涵盖标准腺苷-胸腺嘧啶、腺苷-尿嘧啶或鸟苷-胞嘧啶碱基对,而且也涵盖在核苷酸和/或包含非标准或经修饰碱基的经修饰核苷酸之间形成的碱基对,其中氢键供体和氢键接受体的排列容许在非标准碱基与标准碱基之间或在两个互补性非标准碱基结构之间进行氢键合,诸如像在具有至少一种化学修饰的那些多核苷酸中。所述非标准碱基配对的一个实例是在经修饰核苷酸肌苷与腺嘌呤、胞嘧啶或尿嘧啶之间的碱基配对。碱基/糖或连接体的任何组合都可并入本公开的多核苷酸中。

[0234] 适用于本公开的组合物、疫苗、方法和合成方法中的多核苷酸(例如RNA多核苷酸,诸如mRNA多核苷酸)的修饰(包括但不限于化学修饰)包括但不限于以下:2-甲基硫基-N6-(顺-羟基异戊烯基)腺苷;2-甲基硫基-N6-甲基腺苷;2-甲基硫基-N6-苏氨酰基氨基甲酰基腺苷;N6-甘氨酸基氨基甲酰基腺苷;N6-异戊烯基腺苷;N6-甲基腺苷;N6-苏氨酰基氨基甲酰基腺苷;1,2'-O-二甲基腺苷;1-甲基腺苷;2'-O-甲基腺苷;2'-O-核糖基腺苷(磷酸酯);2-甲基腺苷;2-甲基硫基-N6异戊烯基腺苷;2-甲基硫基-N6-羟基正缬氨酰基氨基甲酰基腺

苷;2'-O-甲基腺苷;2'-O-核糖基腺苷(磷酸酯);异戊烯基腺苷;N6-(顺-羟基异戊烯基)腺苷;N6,2'-O-二甲基腺苷;N6,2'-O-二甲基腺苷;N6,N6,2'-O-三甲基腺苷;N6,N6-二甲基腺苷;N6-乙酰基腺苷;N6-羟基正缬氨酰基氨基甲酰基腺苷;N6-甲基-N6-苏氨酰基氨基甲酰基腺苷;2-甲基腺苷;2-甲基硫基-N6-异戊烯基腺苷;7-脱氮-腺苷;N1-甲基-腺苷;N6,N6(二甲基)腺嘌呤;N6-顺-羟基-异戊烯基-腺苷; α -硫代-腺苷;2(氨基)腺嘌呤;2(氨基丙基)腺嘌呤;2(甲基硫基)N6(异戊烯基)腺嘌呤;2-(烷基)腺嘌呤;2-(氨基烷基)腺嘌呤;2-(氨基丙基)腺嘌呤;2-(卤代)腺嘌呤;2-(卤代)腺嘌呤;2-(丙基)腺嘌呤;2'-氨基-2'-脱氧-ATP;2'-叠氮基-2'-脱氧-ATP;2'-脱氧-2'-a-氨基腺苷TP;2'-脱氧-2'-a-叠氮基腺苷TP;6(烷基)腺嘌呤;6(甲基)腺嘌呤;6-(烷基)腺嘌呤;6-(甲基)腺嘌呤;7(脱氮)腺嘌呤;8(烯基)腺嘌呤;8(炔基)腺嘌呤;8(氨基)腺嘌呤;8(烷基硫基)腺嘌呤;8-(烯基)腺嘌呤;8-(烷基)腺嘌呤;8-(炔基)腺嘌呤;8-(氨基)腺嘌呤;8-(卤代)腺嘌呤;8-(羟基)腺嘌呤;8-(烷基硫基)腺嘌呤;8-(硫醇)腺嘌呤;8-叠氮基-腺苷;氮杂腺嘌呤;脱氮腺嘌呤;N6(甲基)腺嘌呤;N6-(异戊基)腺嘌呤;7-脱氮-8-氮杂-腺苷;7-甲基腺嘌呤;1-脱氮腺苷TP;2'氟-N6-Bz-脱氧腺苷TP;2'-OMe-2-氨基-ATP;2'0-甲基-N6-Bz-脱氧腺苷TP;2'-a-乙炔基腺苷TP;2-氨基腺嘌呤;2-氨基腺苷TP;2-氨基-ATP;2'-a-三氟甲基腺苷TP;2-叠氮基腺苷TP;2'-b-乙炔基腺苷TP;2-溴腺苷TP;2'-b-三氟甲基腺苷TP;2-氯腺苷TP;2'-脱氧-2',2'-二氟腺苷TP;2'-脱氧-2'-a-硫基腺苷TP;2'-脱氧-2'-a-硫代甲氧基腺苷TP;2'-脱氧-2'-b-氨基腺苷TP;2'-脱氧-2'-b-叠氮基腺苷TP;2'-脱氧-2'-b-溴腺苷TP;2'-脱氧-2'-b-氯腺苷TP;2'-脱氧-2'-b-氟腺苷TP;2'-脱氧-2'-b-碘腺苷TP;2'-脱氧-2'-b-硫基腺苷TP;2'-脱氧-2'-b-硫代甲氧基腺苷TP;2-氟腺苷TP;2-碘腺苷TP;2-硫基腺苷TP;2-甲氧基-腺嘌呤;2-甲基硫基-腺嘌呤;2-三氟甲基腺苷TP;3-脱氮-3-溴腺苷TP;3-脱氮-3-氯腺苷TP;3-脱氮-3-氟腺苷TP;3-脱氮-3-碘腺苷TP;3-脱氮腺苷TP;4'-叠氮基腺苷TP;4'-碳环腺苷TP;4'-乙炔基腺苷TP;5'-高腺苷TP;8-氮杂-ATP;8-溴-腺苷TP;8-三氟甲基腺苷TP;9-脱氮腺苷TP;2-氨基嘌呤;7-脱氮-2,6-二氨基嘌呤;7-脱氮-8-氮杂-2,6-二氨基嘌呤;7-脱氮-8-氮杂-2-氨基嘌呤;2,6-二氨基嘌呤;7-脱氮-8-氮杂-腺嘌呤,7-脱氮-2-氨基嘌呤;2-硫代胞苷;3-甲基胞苷;5-甲酰基胞苷;5-羟基甲基胞苷;5-甲基胞苷;N4-乙酰基胞苷;2'-O-甲基胞苷;2'-O-甲基胞苷;5,2'-O-二甲基胞苷;5-甲酰基-2'-O-甲基胞苷;赖西丁(Lysidine);N4,2'-O-二甲基胞苷;N4-乙酰基-2'-O-甲基胞苷;N4-甲基胞苷;N4,N4-二甲基-2'-OMe-胞苷TP;4-甲基胞苷;5-氮杂-胞苷;假-异胞苷;吡咯并-胞苷; α -硫代-胞苷;2-(硫代)胞嘧啶;2'-氨基-2'-脱氧-CTP;2'-叠氮基-2'-脱氧-CTP;2'-脱氧-2'-a-氨基胞苷TP;2'-脱氧-2'-a-叠氮基胞苷TP;3(脱氮)5(氮杂)胞嘧啶;3(甲基)胞嘧啶;3-(烷基)胞嘧啶;3-(脱氮)5(氮杂)胞嘧啶;3-(甲基)胞苷;4,2'-O-二甲基胞苷;5(卤代)胞嘧啶;5(甲基)胞嘧啶;5(丙炔基)胞嘧啶;5(三氟甲基)胞嘧啶;5-(烷基)胞嘧啶;5-(炔基)胞嘧啶;5-(卤代)胞嘧啶;5-(丙炔基)胞嘧啶;5-(三氟甲基)胞嘧啶;5-溴-胞苷;5-碘-胞苷;5-丙炔基胞嘧啶;6-(偶氮基)胞嘧啶;6-氮杂-胞苷;氮杂胞嘧啶;脱氮胞嘧啶;N4(乙酰基)胞嘧啶;1-甲基-1-脱氮-假异胞苷;1-甲基-假异胞苷;2-甲氧基-5-甲基-胞苷;2-甲氧基-胞苷;2-硫代-5-甲基-胞苷;4-甲氧基-1-甲基-假异胞苷;4-甲氧基-假异胞苷;4-硫代-1-甲基-1-脱氮-假异胞苷;4-硫代-1-甲基-假异胞苷;4-硫代-假异胞苷;5-氮杂-泽布拉瑞(zebularine);5-甲基-泽布拉瑞;吡咯并-假异胞苷;泽布拉瑞;(E)-5-(2-溴-乙烯基)胞苷TP;2,2'-脱水-胞苷TP盐酸盐;2'

氟-N4-Bz-胞苷TP;2'氟-N4-乙酰基-胞苷TP;2'-O-甲基-N4-乙酰基-胞苷TP;2'-O-甲基-N4-Bz-胞苷TP;2'-a-乙炔基胞苷TP;2'-a-三氟甲基胞苷TP;2'-b-乙炔基胞苷TP;2'-b-三氟甲基胞苷TP;2'-脱氧-2',2'-二氟胞苷TP;2'-脱氧-2'-a-巯基胞苷TP;2'-脱氧-2'-a-硫代甲氧基胞苷TP;2'-脱氧-2'-b-氨基胞苷TP;2'-脱氧-2'-b-叠氮基胞苷TP;2'-脱氧-2'-b-溴胞苷TP;2'-脱氧-2'-b-氯胞苷TP;2'-脱氧-2'-b-氟胞苷TP;2'-脱氧-2'-b-碘胞苷TP;2'-脱氧-2'-b-巯基胞苷TP;2'-脱氧-2'-b-硫代甲氧基胞苷TP;2'-O-甲基-5-(1-丙炔基)胞苷TP;3'-乙炔基胞苷TP;4'-叠氮基胞苷TP;4'-碳环胞苷TP;4'-乙炔基胞苷TP;5-(1-丙炔基)阿糖胞苷TP;5-(2-氯-苯基)-2-硫代胞苷TP;5-(4-氨基-苯基)-2-硫代胞苷TP;5-氨基烯丙基-CTP;5-氰基胞苷TP;5-乙炔基阿糖胞苷TP;5-乙炔基胞苷TP;5'-高胞苷TP;5-甲氧基胞苷TP;5-三氟甲基-胞苷TP;N4-氨基-胞苷TP;N4-苯甲酰基-胞苷TP;假异胞苷;7-甲基鸟苷;N2,2'-O-二甲基鸟苷;N2-甲基鸟苷;γ 苷(Wyosine);1,2'-O-二甲基鸟苷;1-甲基鸟苷;2'-O-甲基鸟苷;2'-O-核糖基鸟苷(磷酸酯);2'-O-甲基鸟苷;2'-O-核糖基鸟苷(磷酸酯);7-氨基甲基-7-脱氮鸟苷;7-氰基-7-脱氮鸟苷;古嘌呤(Archaeosine);甲基γ 苷;N2,7-二甲基鸟苷;N2,N2,2'-O-三甲基鸟苷;N2,N2,7-三甲基鸟苷;N2,N2-二甲基鸟苷;N2,7,2'-O-三甲基鸟苷;6-硫代-鸟苷;7-脱氮-鸟苷;8-氧代-鸟苷;N1-甲基-鸟苷;α-硫代-鸟苷;2(丙基)鸟嘌呤;2-(烷基)鸟嘌呤;2'-氨基-2'-脱氧-GTP;2'-叠氮基-2'-脱氧-GTP;2'-脱氧-2'-a-氨基鸟苷TP;2'-脱氧-2'-a-叠氮基鸟苷TP;6(甲基)鸟嘌呤;6-(烷基)鸟嘌呤;6-(甲基)鸟嘌呤;6-甲基-鸟苷;7(烷基)鸟嘌呤;7(脱氮)鸟嘌呤;7(甲基)鸟嘌呤;7-(烷基)鸟嘌呤;7-(脱氮)鸟嘌呤;7-(甲基)鸟嘌呤;8(烷基)鸟嘌呤;8(炔基)鸟嘌呤;8(卤代)鸟嘌呤;8(烷基硫基)鸟嘌呤;8-(烯基)鸟嘌呤;8-(烷基)鸟嘌呤;8-(炔基)鸟嘌呤;8-(氨基)鸟嘌呤;8-(卤代)鸟嘌呤;8-(羟基)鸟嘌呤;8-(烷基硫基)鸟嘌呤;8-(硫醇)鸟嘌呤;氮杂鸟嘌呤;脱氮鸟嘌呤;N(甲基)鸟嘌呤;N-(甲基)鸟嘌呤;1-甲基-6-硫代-鸟苷;6-甲氧基-鸟苷;6-硫代-7-脱氮-8-氮杂-鸟苷;6-硫代-7-脱氮-鸟苷;6-硫代-7-甲基-鸟苷;7-脱氮-8-氮杂-鸟苷;7-甲基-8-氧代-鸟苷;N2,N2-二甲基-6-硫代-鸟苷;N2-甲基-6-硫代-鸟苷;1-Me-GTP;2'氟-N2-异丁基-鸟苷TP;2'-O-甲基-N2-异丁基-鸟苷TP;2'-a-乙炔基鸟苷TP;2'-a-三氟甲基鸟苷TP;2'-b-乙炔基鸟苷TP;2'-b-三氟甲基鸟苷TP;2'-脱氧-2',2'-二氟鸟苷TP;2'-脱氧-2'-a-巯基鸟苷TP;2'-脱氧-2'-a-硫代甲氧基鸟苷TP;2'-脱氧-2'-b-氨基鸟苷TP;2'-脱氧-2'-b-叠氮基鸟苷TP;2'-脱氧-2'-b-溴鸟苷TP;2'-脱氧-2'-b-氯鸟苷TP;2'-脱氧-2'-b-氟鸟苷TP;2'-脱氧-2'-b-碘鸟苷TP;2'-脱氧-2'-b-巯基鸟苷TP;2'-脱氧-2'-b-硫代甲氧基鸟苷TP;4'-叠氮基鸟苷TP;4'-碳环鸟苷TP;4'-乙炔基鸟苷TP;5'-高鸟苷TP;8-溴-鸟苷TP;9-脱氮鸟苷TP;N2-异丁基-鸟苷TP;1-甲基肌苷;肌苷;1,2'-O-二甲基肌苷;2'-O-甲基肌苷;7-甲基肌苷;2'-O-甲基肌苷;环氧基腺苷;半乳糖基-腺苷;甘露糖基腺苷;腺苷;烯丙基氨基-胸苷;氮杂胸苷;脱氮胸苷;脱氧-胸苷;2'-O-甲基尿苷;2-硫代尿苷;3-甲基尿苷;5-羧基甲基尿苷;5-羟基尿苷;5-甲基尿苷;5-牛磺酸基甲基-2-硫代尿苷;5-牛磺酸基甲基尿苷;二氢尿苷;假尿苷;(3-(3-氨基-3-羧基丙基)尿苷;1-甲基-3-(3-氨基-5-羧基丙基)假尿苷;1-甲基假尿苷;1-乙基-假尿苷;2'-O-甲基尿苷;2'-O-甲基假尿苷;2'-O-甲基尿苷;2-硫代-2'-O-甲基尿苷;3-(3-氨基-3-羧基丙基)尿苷;3,2'-O-二甲基尿苷;3-甲基-假-尿苷TP;4-硫代尿苷;5-(羧基羟基甲基)尿苷;5-(羧基羟基甲基)尿苷甲酯;5,2'-O-二甲基尿苷;5,6-二氢-尿苷;5-氨基甲基-2-硫代尿苷;5-氨基甲酰基甲基-2'-O-甲基尿苷;

5-氨基甲酰基甲基尿苷;5-羧基羟基甲基尿苷;5-羧基羟基甲基尿苷甲酯;5-羧基甲基氨基甲基-2'-0-甲基尿苷;5-羧基甲基氨基甲基-2-硫代尿苷;5-羧基甲基氨基甲基-2-硫代尿苷;5-羧基甲基氨基甲基尿苷;5-羧基甲基氨基甲基尿苷;5-氨基甲酰基甲基尿苷TP;5-甲氧基羰基甲基-2'-0-甲基尿苷;5-甲氧基羰基甲基-2-硫代尿苷;5-甲氧基羰基甲基尿苷;5-甲基尿苷),5-甲氧基尿苷;5-甲基-2-硫代尿苷;5-甲基氨基甲基-2-硫代尿苷;5-甲基氨基甲基-2-硫代尿苷;5-甲基二氢尿苷;5-氧基乙酸-尿苷TP;5-氧基乙酸-甲酯-尿苷TP;N1-甲基-假-尿嘧啶;N1-乙基-假-尿嘧啶;尿苷5-氧基乙酸;尿苷5-氧基乙酸甲酯;3-(3-氨基-3-羧基丙基)-尿苷TP;5-(异戊烯基氨基甲基)-2-硫代尿苷TP;5-(异戊烯基氨基甲基)-2'-0-甲基尿苷TP;5-(异戊烯基氨基甲基)尿苷TP;5-丙炔基尿嘧啶; α -硫代-尿苷;1(氨基烷基氨基-羰基乙烯基)-2(硫代)-假尿嘧啶;1(氨基烷基氨基羰基乙烯基)-2,4-(二硫代)假尿嘧啶;1(氨基烷基氨基羰基乙烯基)-4(硫代)假尿嘧啶;1(氨基烷基氨基羰基乙烯基)-假尿嘧啶;1(氨基羰基乙烯基)-2(硫代)-假尿嘧啶;1(氨基羰基乙烯基)-2,4-(二硫代)假尿嘧啶;1(氨基羰基乙烯基)-4(硫代)假尿嘧啶;1(氨基羰基乙烯基)-假尿嘧啶;1取代的2(硫代)-假尿嘧啶;1取代的2,4-(二硫代)假尿嘧啶;1取代的4(硫代)假尿嘧啶;1取代的假尿嘧啶;1-(氨基烷基氨基-羰基乙烯基)-2-(硫代)-假尿嘧啶;1-甲基-3-(3-氨基-3-羧基丙基)假尿苷TP;1-甲基-3-(3-氨基-3-羧基丙基)假-UTP;1-甲基-假-UTP;1-乙基-假-UTP;2(硫代)假尿嘧啶;2'脱氧尿苷;2'氟尿苷;2-(硫代)尿嘧啶;2,4-(二硫代)假尿嘧啶;2'甲基,2'氨基,2'叠氨基,2'氟-鸟苷;2'-氨基-2'-脱氧-UTP;2'-叠氨基-2'-脱氧-UTP;2'-叠氨基-脱氧尿苷TP;2'-0-甲基假尿苷;2'脱氧尿苷;2'氟尿苷;2'-脱氧-2'- α -氨基尿苷TP;2'-脱氧-2'- α -叠氨基尿苷TP;2-甲基假尿苷;3(3-氨基-3-羧基丙基)尿嘧啶;4(硫代)假尿嘧啶;4-(硫代)假尿嘧啶;4-(硫代)尿嘧啶;4-硫代尿嘧啶;5(1,3-二唑-1-烷基)尿嘧啶;5(2-氨基丙基)尿嘧啶;5(氨基烷基)尿嘧啶;5(二甲基氨基烷基)尿嘧啶;5(胍鎓烷基)尿嘧啶;5(甲氧基羰基甲基)-2-(硫代)尿嘧啶;5(甲氧基羰基-甲基)尿嘧啶;5(甲基)2(硫代)尿嘧啶;5(甲基)2,4(二硫代)尿嘧啶;5(甲基)4(硫代)尿嘧啶;5(甲基氨基甲基)-2(硫代)尿嘧啶;5(甲基氨基甲基)-2,4(二硫代)尿嘧啶;5(甲基氨基甲基)-4(硫代)尿嘧啶;5(丙炔基)尿嘧啶;5(三氟甲基)尿嘧啶;5-(2-氨基丙基)尿嘧啶;5-(烷基)-2-(硫代)假尿嘧啶;5-(烷基)-2,4(二硫代)假尿嘧啶;5-(烷基)-4(硫代)假尿嘧啶;5-(烷基)假尿嘧啶;5-(烷基)尿嘧啶;5-(炔基)尿嘧啶;5-(烯丙基氨基)尿嘧啶;5-(氰基烷基)尿嘧啶;5-(二烷基氨基烷基)尿嘧啶;5-(二甲基氨基烷基)尿嘧啶;5-(胍鎓烷基)尿嘧啶;5-(卤代)尿嘧啶;5-(1,3-二唑-1-烷基)尿嘧啶;5-(甲氧基)尿嘧啶;5-(甲氧基羰基甲基)-2-(硫代)尿嘧啶;5-(甲氧基羰基-甲基)尿嘧啶;5-(甲基)2(硫代)尿嘧啶;5-(甲基)2,4(二硫代)尿嘧啶;5-(甲基)4(硫代)尿嘧啶;5-(甲基)-2-(硫代)假尿嘧啶;5-(甲基)-2,4(二硫代)假尿嘧啶;5-(甲基)-4(硫代)假尿嘧啶;5-(甲基)假尿嘧啶;5-(甲基氨基甲基)-2(硫代)尿嘧啶;5-(甲基氨基甲基)-2,4(二硫代)尿嘧啶;5-(甲基氨基甲基)-4(硫代)尿嘧啶;5-(丙炔基)尿嘧啶;5-(三氟甲基)尿嘧啶;5-氨基烯丙基-尿苷;5-溴-尿苷;5-碘-尿苷;5-尿嘧啶;6(偶氮基)尿嘧啶;6-(偶氮基)尿嘧啶;6-氮杂-尿苷;烯丙基氨基-尿嘧啶;氮杂尿嘧啶;脱氮尿嘧啶;N3(甲基)尿嘧啶;假-UTP-1-2-乙酸;假尿嘧啶;4-硫代-假-UTP;1-羧基甲基-假尿苷;1-甲基-1-脱氮-假尿苷;1-丙炔基-尿苷;1-牛磺酸基甲基-1-甲基-尿苷;1-牛磺酸基甲基-4-硫代-尿苷;1-牛磺酸基甲基-假尿苷;2-甲氧基-4-硫代-假尿苷;2-硫代-

1-甲基-1-脱氮-假尿苷;2-硫代-1-甲基-假尿苷;2-硫代-5-氮杂-尿苷;2-硫代-二氢假尿苷;2-硫代-二氢尿苷;2-硫代-假尿苷;4-甲氧基-2-硫代-假尿苷;4-甲氧基-假尿苷;4-硫代-1-甲基-假尿苷;4-硫代-假尿苷;5-氮杂-尿苷;二氢假尿苷;(±)1-(2-羟基丙基)假尿苷TP;(2R)-1-(2-羟基丙基)假尿苷TP;(2S)-1-(2-羟基丙基)假尿苷TP;(E)-5-(2-溴-乙烯基)阿糖尿苷TP;(E)-5-(2-溴-乙烯基)尿苷TP;(Z)-5-(2-溴-乙烯基)阿糖尿苷TP;(Z)-5-(2-溴-乙烯基)尿苷TP;1-(2,2,2-三氟乙基)-假-UTP;1-(2,2,3,3,3-五氟丙基)假尿苷TP;1-(2,2-二乙氧基乙基)假尿苷TP;1-(2,4,6-三甲基苯甲基)假尿苷TP;1-(2,4,6-三甲基-苯甲基)假-UTP;1-(2,4,6-三甲基-苯基)假-UTP;1-(2-氨基-2-羧基乙基)假-UTP;1-(2-氨基-乙基)假-UTP;1-(2-羟基乙基)假尿苷TP;1-(2-甲氧基乙基)假尿苷TP;1-(3,4-双-三氟甲氧基苯甲基)假尿苷TP;1-(3,4-二甲氧基苯甲基)假尿苷TP;1-(3-氨基-3-羧基丙基)假-UTP;1-(3-氨基-丙基)假-UTP;1-(3-环丙基-丙-2-炔基)假尿苷TP;1-(4-氨基-4-羧基丁基)假-UTP;1-(4-氨基-苯甲基)假-UTP;1-(4-氨基-丁基)假-UTP;1-(4-氨基-苯基)假-UTP;1-(4-叠氮基苯甲基)假尿苷TP;1-(4-溴苯甲基)假尿苷TP;1-(4-氯苯甲基)假尿苷TP;1-(4-氟苯甲基)假尿苷TP;1-(4-碘苯甲基)假尿苷TP;1-(4-甲磺酰基苯甲基)假尿苷TP;1-(4-甲氧基苯甲基)假尿苷TP;1-(4-甲氧基-苯甲基)假-UTP;1-(4-甲氧基-苯基)假-UTP;1-(4-甲基苯甲基)假尿苷TP;1-(4-甲基-苯甲基)假-UTP;1-(4-硝基苯甲基)假尿苷TP;1-(4-硝基-苯甲基)假-UTP;1-(4-硝基-苯基)假-UTP;1-(4-硫代甲氧基苯甲基)假尿苷TP;1-(4-三氟甲氧基苯甲基)假尿苷TP;1-(4-三氟甲基苯甲基)假尿苷TP;1-(5-氨基-戊基)假-UTP;1-(6-氨基-己基)假-UTP;1,6-二甲基-假-UTP;1-[3-(2-{2-[2-(2-氨基乙氧基)-乙氧基]-乙氧基}-丙酰基)假尿苷TP;1-{3-[2-(2-氨基乙氧基)-乙氧基]-丙酰基}假尿苷TP;1-乙酰基假尿苷TP;1-烷基-6-(1-丙炔基)-假-UTP;1-烷基-6-(2-丙炔基)-假-UTP;1-烷基-6-烯丙基-假-UTP;1-烷基-6-乙炔基-假-UTP;1-烷基-6-高烯丙基-假-UTP;1-烷基-6-乙烯基-假-UTP;1-烯丙基假尿苷TP;1-氨基甲基-假-UTP;1-苯甲酰基假尿苷TP;1-苯甲基氧基甲基假尿苷TP;1-苯甲基-假-UTP;1-生物素基-PEG2-假尿苷TP;1-生物素基假尿苷TP;1-丁基-假-UTP;1-氰基甲基假尿苷TP;1-环丁基甲基-假-UTP;1-环丁基-假-UTP;1-环庚基甲基-假-UTP;1-环庚基-假-UTP;1-环己基甲基-假-UTP;1-环己基-假-UTP;1-环辛基甲基-假-UTP;1-环辛基-假-UTP;1-环戊基甲基-假-UTP;1-环戊基-假-UTP;1-环丙基甲基-假-UTP;1-环丙基-假-UTP;1-乙基-假-UTP;1-己基-假-UTP;1-高烯丙基假尿苷TP;1-羟基甲基假尿苷TP;1-异丙基-假-UTP;1-Me-2-硫代-假-UTP;1-Me-4-硫代-假-UTP;1-Me- α -硫代-假-UTP;1-甲磺酰基甲基假尿苷TP;1-甲氧基甲基假尿苷TP;1-甲基-6-(2,2,2-三氟乙基)假-UTP;1-甲基-6-(4-吗啉代)-假-UTP;1-甲基-6-(4-硫代吗啉代)-假-UTP;1-甲基-6-(取代的苯基)假-UTP;1-甲基-6-氨基-假-UTP;1-甲基-6-叠氮基-假-UTP;1-甲基-6-溴-假-UTP;1-甲基-6-丁基-假-UTP;1-甲基-6-氯-假-UTP;1-甲基-6-氰基-假-UTP;1-甲基-6-二甲基氨基-假-UTP;1-甲基-6-乙氧基-假-UTP;1-甲基-6-甲酸乙酯-假-UTP;1-甲基-6-乙基-假-UTP;1-甲基-6-氟-假-UTP;1-甲基-6-甲酰基-假-UTP;1-甲基-6-羟基氨基-假-UTP;1-甲基-6-羟基-假-UTP;1-甲基-6-碘-假-UTP;1-甲基-6-异丙基-假-UTP;1-甲基-6-甲氧基-假-UTP;1-甲基-6-甲基氨基-假-UTP;1-甲基-6-苯基-假-UTP;1-甲基-6-丙基-假-UTP;1-甲基-6-叔丁基-假-UTP;1-甲基-6-三氟甲氧基-假-UTP;1-甲基-6-三氟甲基-假-UTP;1-吗啉代甲基假尿苷TP;1-戊基-假-UTP;1-苯基-假-UTP;1-特戊酰基假尿苷TP;1-

炔丙基假尿苷TP;1-丙基-假-UTP;1-丙炔基-假尿苷;1-对甲苯基-假-UTP;1-叔丁基-假-UTP;1-硫代甲氧基甲基假尿苷TP;1-硫代吗啉代甲基假尿苷TP;1-三氟乙酰基假尿苷TP;1-三氟甲基-假-UTP;1-乙烯基假尿苷TP;2,2'-脱水-尿苷TP;2'-溴-脱氧尿苷TP;2'-F-5-甲基-2'-脱氧-UTP;2'-OMe-5-Me-UTP;2'-OMe-假-UTP;2'-a-乙炔基尿苷TP;2'-a-三氟甲基尿苷TP;2'-b-乙炔基尿苷TP;2'-b-三氟甲基尿苷TP;2'-脱氧-2',2'-二氟尿苷TP;2'-脱氧-2'-a-巯基尿苷TP;2'-脱氧-2'-a-硫代甲氧基尿苷TP;2'-脱氧-2'-b-氨基尿苷TP;2'-脱氧-2'-b-叠氮基尿苷TP;2'-脱氧-2'-b-溴尿苷TP;2'-脱氧-2'-b-氯尿苷TP;2'-脱氧-2'-b-氟尿苷TP;2'-脱氧-2'-b-碘尿苷TP;2'-脱氧-2'-b-巯基尿苷TP;2'-脱氧-2'-b-硫代甲氧基尿苷TP;2-甲氧基-4-硫代-尿苷;2-甲氧基尿苷;2'-O-甲基-5-(1-丙炔基)尿苷TP;3-烷基-假-UTP;4'-叠氮基尿苷TP;4'-碳环尿苷TP;4'-乙炔基尿苷TP;5-(1-丙炔基)阿糖尿苷TP;5-(2-呋喃基)尿苷TP;5-氰基尿苷TP;5-二甲基氨基尿苷TP;5'-高尿苷TP;5-碘-2'-氟-脱氧尿苷TP;5-苯基乙炔基尿苷TP;5-三氟化甲基-6-氘化尿苷TP;5-三氟甲基-尿苷TP;5-乙烯基阿糖尿苷TP;6-(2,2,2-三氟乙基)-假-UTP;6-(4-吗啉代)-假-UTP;6-(4-硫代吗啉代)-假-UTP;6-(取代的苯基)-假-UTP;6-氨基-假-UTP;6-叠氮基-假-UTP;6-溴-假-UTP;6-丁基-假-UTP;6-氯-假-UTP;6-氰基-假-UTP;6-二甲基氨基-假-UTP;6-乙氧基-假-UTP;6-甲酸乙酯-假-UTP;6-乙基-假-UTP;6-氟-假-UTP;6-甲酰基-假-UTP;6-羟基氨基-假-UTP;6-羟基-假-UTP;6-碘-假-UTP;6-异丙基-假-UTP;6-甲氧基-假-UTP;6-甲基氨基-假-UTP;6-甲基-假-UTP;6-苯基-假-UTP;6-苯基-假-UTP;6-丙基-假-UTP;6-叔丁基-假-UTP;6-三氟甲氧基-假-UTP;6-三氟甲基-假-UTP; α -硫代-假-UTP;假尿苷1-(4-甲基苯磺酸)TP;假尿苷1-(4-甲基苯甲酸)TP;假尿苷TP 1-[3-(2-乙氧基)]丙酸;假尿苷TP 1-[3-{2-(2-[2-(2-乙氧基)-乙氧基]-乙氧基)-乙氧基}]丙酸;假尿苷TP1-[3-{2-(2-[2-{2(2-乙氧基)-乙氧基}-乙氧基]-乙氧基)-乙氧基}]丙酸;假尿苷TP 1-[3-{2-(2-[2-乙氧基]-乙氧基)-乙氧基}]丙酸;假尿苷TP 1-[3-{2-(2-乙氧基)-乙氧基}]丙酸;假尿苷TP 1-甲基膦酸;假尿苷TP 1-甲基膦酸二乙酯;假-UTP-N1-3-丙酸;假-UTP-N1-4-丁酸;假-UTP-N1-5-戊酸;假-UTP-N1-6-己酸;假-UTP-N1-7-庚酸;假-UTP-N1-甲基-对苯甲酸;假-UTP-N1-对苯甲酸;怀丁苷(Wybutosine);羟基怀丁苷;异丫苷;过氧怀丁苷;修饰不完全的羟基怀丁苷;4-脱甲基丫苷;2,6-(二氨基)嘌呤;1-(氮杂)-2-(硫代)-3-(氮杂)-吩噻嗪-1-基;1,3-(二氮杂)-2-(氧代)-吩噻嗪-1-基;1,3-(二氮杂)-2-(氧代)-吩噻嗪-1-基;1,3,5-(三氮杂)-2,6-(二氧杂)-萘;2(氨基)嘌呤;2,4,5-(三甲基)苯基;2'甲基,2'氨基,2'叠氮基,2'氟-胞苷;2'甲基,2'氨基,2'叠氮基,2'氟-腺嘌呤;2'甲基,2'氨基,2'叠氮基,2'氟-尿苷;2'-氨基-2'-脱氧核糖;2-氨基-6-氯-嘌呤;2-氮杂-肌苷基;2'-叠氮基-2'-脱氧核糖;2'氟-2'-脱氧核糖;2'-氟修饰的碱基;2'-O-甲基-核糖;2-氧代-7-氨基吡啶并嘧啶-3-基;2-氧代-吡啶并嘧啶-3-基;2-吡啶酮;3硝基吡咯;3-(甲基)-7-(丙炔基)异喹诺酮基;3-(甲基)异喹诺酮基;4-(氟)-6-(甲基)苯并咪唑;4-(甲基)苯并咪唑;4-(甲基)吡啶基;4,6-(二甲基)吡啶基;5硝基吡啶;5取代的嘧啶;5-(甲基)异喹诺酮基;5-硝基吡啶;6-(氮杂)嘧啶;6-(偶氮基)胸腺嘧啶;6-(甲基)-7-(氮杂)吡啶基;6-氯-嘌呤;6-苯基-吡咯并-嘧啶-2-酮-3-基;7-(氨基烷基羟基)-1-(氮杂)-2-(硫代)-3-(氮杂)-吩噻嗪-1-基;7-(氨基烷基羟基)-1-(氮杂)-2-(硫代)-3-(氮杂)-吩噻嗪-1-基;7-(氨基烷基羟基)-1,3-(二氮杂)-2-(氧代)-吩噻嗪-1-基;7-(氨基烷基羟基)-1,3-(二氮杂)-2-(氧代)-吩噻嗪-1-基;7-(氨基烷基羟基)-

1,3-(二氮杂)-2-(氧代)-吩噻嗪-1-基;7-(氮杂)吡啶基;7-(胍鎓烷基羟基)-1-(氮杂)-2-(硫代)-3-(氮杂)-吩噻嗪-1-基;7-(胍鎓烷基羟基)-1-(氮杂)-2-(硫代)-3-(氮杂)-吩噻嗪-1-基;7-(胍鎓烷基羟基)-1-(氮杂)-2-(硫代)-3-(氮杂)-吩噻嗪-1-基;7-(胍鎓烷基羟基)-1,3-(二氮杂)-2-(氧代)-吩噻嗪-1-基;7-(胍鎓烷基羟基)-1,3-(二氮杂)-2-(氧代)-吩噻嗪-1-基;7-(丙炔基)异喹诺酮基;7-(丙炔基)异喹诺酮基,丙炔基-7-(氮杂)吡啶基;7-脱氮-肌苷基;7取代的1-(氮杂)-2-(硫代)-3-(氮杂)-吩噻嗪-1-基;7取代的1,3-(二氮杂)-2-(氧代)-吩噻嗪-1-基;9-(甲基)-咪唑并吡啶基;氨基吡啶基;蒽基;双-邻-(氨基烷基羟基)-6-苯基-吡咯并-嘧啶-2-酮-3-基;双-邻位取代的6-苯基-吡咯并-嘧啶-2-酮-3-基;二氟甲基基;次黄嘌呤;咪唑并吡啶基;肌苷基;异喹诺酮基;异鸟苷;N2取代的嘌呤;N6-甲基-2-氨基-嘌呤;N6取代的嘌呤;N-烷基化衍生物;萘基;硝基苯并咪唑基;硝基咪唑基;硝基吡啶基;硝基吡啶基;水粉蕈素(Nubularine);O6取代的嘌呤;O-烷基化衍生物;邻-(氨基烷基羟基)-6-苯基-吡咯并-嘧啶-2-酮-3-基;邻位取代的6-苯基-吡咯并-嘧啶-2-酮-3-基;氧代间型霉素(Oxoformycin)TP;对-(氨基烷基羟基)-6-苯基-吡咯并-嘧啶-2-酮-3-基;对位取代的6-苯基-吡咯并-嘧啶-2-酮-3-基;并五苯基;苯蒽基;苯基;丙炔基-7-(氮杂)吡啶基;茈基;吡啶并嘧啶-3-基;吡啶并嘧啶-3-基,2-氧代-7-氨基-吡啶并嘧啶-3-基;吡咯并-嘧啶-2-酮-3-基;吡咯并嘧啶基;吡咯并吡嗪基;茈基;取代的1,2,4-三唑;并四苯基;杀结核菌素(Tubercidine);黄嘌呤;黄嘌呤核苷-5'-TP;2-硫代-泽布拉瑞;5-氮杂-2-硫代-泽布拉瑞;7-脱氮-2-氨基-嘌呤;吡啶-4-酮核糖核苷;2-氨基-核糖核苷-TP;间型霉素A(Formycin A)TP;间型霉素B TP;Pyrrolosine TP;2'-OH-阿糖腺苷TP;2'-OH-阿糖胞苷TP;2'-OH-阿糖尿苷TP;2'-OH-阿糖鸟苷TP;5-(2-甲氧甲酰基乙烯基)尿苷TP;和N6-(19-氨基-五氧杂十九基)腺苷TP。

[0235] 在一些实施方案中,多核苷酸(例如RNA多核苷酸,诸如mRNA多核苷酸)包括至少两个(例如2、3、4个或更多个)以上提及的经修饰核苷碱基的组合。

[0236] 在一些实施方案中,多核苷酸(例如RNA多核苷酸,诸如mRNA多核苷酸)中的经修饰核苷碱基选自以下组成的组:假尿苷(ψ)、2-硫代尿苷(s2U)、4'-硫代尿苷、5-甲基胞嘧啶、2-硫代-1-甲基-1-脱氮-假尿苷、2-硫代-1-甲基-假尿苷、2-硫代-5-氮杂-尿苷、2-硫代-二氢假尿苷、2-硫代-二氢尿苷、2-硫代-假尿苷、4-甲氧基-2-硫代-假尿苷、4-甲氧基-假尿苷、4-硫代-1-甲基-假尿苷、4-硫代-假尿苷、5-氮杂-尿苷、二氢假尿苷、5-甲基尿苷、5-甲氧基尿苷、2'-O-甲基尿苷、1-甲基-假尿苷(m1 ψ)、1-乙基-假尿苷(e1 ψ)、5-甲氧基-尿苷(mo5U)、5-甲基-胞苷(m5C)、 α -硫代-鸟苷、 α -硫代-腺苷、5-氰基尿苷、4'-硫代尿苷7-脱氮-腺嘌呤、1-甲基-腺苷(m1A)、2-甲基-腺嘌呤(m2A)、N6-甲基-腺苷(m6A)和2,6-二氨基嘌呤、(I)、1-甲基-肌苷(m1I)、 γ 苷(imG)、甲基 γ 苷(mimG)、7-脱氮-鸟苷、7-氰基-7-脱氮-鸟苷(preQ0)、7-氨基甲基-7-脱氮-鸟苷(preQ1)、7-甲基-鸟苷(m7G)、1-甲基-鸟苷(m1G)、8-氧代-鸟苷、7-甲基-8-氧代-鸟苷、2,8-二甲基腺苷、2-香叶基硫代尿苷、2-赖西丁、2-硒代尿苷、3-(3-氨基-3-羧基丙基)-5,6-二氢尿苷、3-(3-氨基-3-羧基丙基)假尿苷、3-甲基假尿苷、5-(羧基羟基甲基)-2'-O-甲基尿苷甲酯、5-氨基甲基-2-香叶基硫代尿苷、5-氨基甲基-2-硒代尿苷、5-氨基甲基尿苷、5-氨基甲酰基羟基甲基尿苷、5-氨基甲酰基甲基-2-硫代尿苷、5-羧基甲基-2-硫代尿苷、5-羧基甲基氨基甲基-2-香叶基硫代尿苷、5-羧基甲基氨基

甲基-2-硫代尿苷、5-氰基甲基尿苷、5-羟基胞苷、5-甲基氨基甲基-2-香叶基硫代尿苷、7-氨基羧基丙基-脱甲基丫苷、7-氨基羧基丙基丫苷、7-氨基羧基丙基丫苷甲酯、8-甲基腺苷、N4,N4-二甲基胞苷、N6-甲酰基腺苷、N6-羟基甲基腺苷、2-胍丁胺基胞苷 (agmatidine)、环状N6-苏氨酰基氨基甲酰基腺苷、谷氨酰基-癸苷、甲基化修饰不完全的羟基怀丁苷、N4,N4,2'-O-三甲基胞苷、香叶基化5-甲基氨基甲基-2-硫代尿苷、香叶基化5-羧基甲基氨基甲基-2-硫代尿苷、Qbase、preQ0base、preQ1base及其两者或更多者组合。在一些实施方案中,至少一种化学修饰的核苷选自自由假尿苷、1-甲基-假尿苷、1-乙基-假尿苷、5-甲基胞嘧啶、5-甲氧基尿苷及其组合组成的组。在一些实施方案中,多核糖核苷酸(例如RNA多核糖核苷酸,诸如mRNA多核糖核苷酸)包括至少两个(例如2、3、4个或更多个)以上提及的经修饰核苷碱基的组合。在一些实施方案中,多核苷酸(例如RNA多核苷酸,诸如mRNA多核苷酸)包括至少两个(例如2、3、4个或更多个)以上提及的经修饰核苷碱基的组合。

[0237] 在一些实施方案中,多核苷酸(例如RNA多核苷酸,诸如mRNA多核苷酸)中的经修饰核苷碱基选自自由1-甲基-假尿苷(m1ψ)、1-乙基-假尿苷(e1ψ)、5-甲氧基-尿苷(mo5U)、5-甲基-胞苷(m5C)、假尿苷(ψ)、α-硫代-鸟苷和α-硫代-腺苷组成的组。在一些实施方案中,多核糖核苷酸包括至少两个(例如2、3、4个或更多个)以上提及的经修饰核苷碱基(包括但不限于化学修饰)的组合。

[0238] 在一些实施方案中,多核苷酸(例如RNA多核苷酸,诸如mRNA多核苷酸)包含假尿苷(ψ)和5-甲基-胞苷(m5C)。在一些实施方案中,多核糖核苷酸(例如RNA,诸如mRNA)包含1-甲基-假尿苷(m1ψ)。在一些实施方案中,多核苷酸(例如RNA,诸如mRNA)包含1-乙基-假尿苷(e1ψ)。在一些实施方案中,多核糖核苷酸(例如RNA,诸如mRNA)包含1-甲基-假尿苷(m1ψ)和5-甲基-胞苷(m5C)。在一些实施方案中,多核糖核苷酸(例如RNA,诸如mRNA)包含1-乙基-假尿苷(e1ψ)和5-甲基-胞苷(m5C)。在一些实施方案中,多核糖核苷酸(例如RNA,诸如mRNA)包含2-硫代尿苷(s2U)。在一些实施方案中,多核糖核苷酸(例如RNA,诸如mRNA)包含2-硫代尿苷和5-甲基-胞苷(m5C)。在一些实施方案中,多核糖核苷酸(例如RNA,诸如mRNA)包含甲氧基-尿苷(mo5U)。在一些实施方案中,多核糖核苷酸(例如RNA,诸如mRNA)包含5-甲氧基-尿苷(mo5U)和5-甲基-胞苷(m5C)。在一些实施方案中,多核糖核苷酸(例如RNA,诸如mRNA)包含2'-O-甲基尿苷。在一些实施方案中,多核糖核苷酸(例如RNA,诸如mRNA)包含2'-O-甲基尿苷和5-甲基-胞苷(m5C)。在一些实施方案中,多核糖核苷酸(例如RNA,诸如mRNA)包含N6-甲基-腺苷(m6A)。在一些实施方案中,多核糖核苷酸(例如RNA,诸如mRNA)包含N6-甲基-腺苷(m6A)和5-甲基-胞苷(m5C)。

[0239] 在一些实施方案中,多核苷酸(例如RNA多核苷酸,诸如mRNA多核苷酸)就特定修饰来说被均一修饰(例如完全修饰,遍及整个序列加以修饰)。举例来说,多核苷酸可用1-甲基-假尿苷均一修饰,这意味着mRNA序列中的所有尿苷残基都用1-甲基-假尿苷替换。类似地,多核苷酸可通过用经修饰残基诸如以上阐述的那些进行替换来就序列中存在的任何类型的核苷残基来说被均一修饰。

[0240] 具有经修饰胞嘧啶的示例性核苷碱基和核苷包括N4-乙酰基-胞苷(ac4C)、5-甲基-胞苷(m5C)、5-卤代-胞苷(例如5-碘-胞苷)、5-羟基甲基-胞苷(hm5C)、1-甲基-假异胞苷、2-硫代-胞苷(s2C)和2-硫代-5-甲基-胞苷。

[0241] 在一些实施方案中,经修饰核苷碱基是经修饰尿苷。具有经修饰尿苷的示例性核

核苷碱基和核苷包括1-甲基-假尿苷(m1ψ)、1-乙基-假尿苷(e1ψ)、5-甲氧基尿苷、2-硫代尿苷、5-氰基尿苷、2'-O-甲基尿苷和4'-硫代尿苷。

[0242] 在一些实施方案中,经修饰核苷碱基是经修饰腺嘌呤。具有经修饰腺嘌呤的示例性核苷碱基和核苷包括7-脱氮-腺嘌呤、1-甲基-腺苷(m1A)、2-甲基-腺嘌呤(m2A)和N6-甲基-腺苷(m6A)。

[0243] 在一些实施方案中,经修饰核苷碱基是经修饰鸟嘌呤。具有经修饰鸟嘌呤的示例性核苷碱基和核苷包括肌苷(I)、1-甲基-肌苷(m1I)、γ苷(imG)、甲基γ苷(mimG)、7-脱氮-鸟苷、7-氰基-7-脱氮-鸟苷(preQ0)、7-氨基甲基-7-脱氮-鸟苷(preQ1)、7-甲基-鸟苷(m7G)、1-甲基-鸟苷(m1G)、8-氧代-鸟苷、7-甲基-8-氧代-鸟苷。

[0244] 本公开的多核苷酸可沿分子的整个长度加以部分或完全修饰。举例来说,在本发明的多核苷酸中,或在其给定的预定序列区域中(例如在包括或排除聚腺苷酸尾部的mRNA中),一种或多种或所有或给定类型的核苷酸(例如嘌呤或嘧啶,或A、G、U、C中的任何一者或多者或全部)可被均一修饰。在一些实施方案中,本公开的多核苷酸中(或其给定序列区域中)的所有核苷酸X都是经修饰核苷酸,其中X可为核苷酸A、G、U、C中的任一者,或组合A+G、A+U、A+C、G+U、G+C、U+C、A+G+U、A+G+C、G+U+C或A+G+C中的任一者。

[0245] 多核苷酸可含有约1%至约100%经修饰核苷酸(相对于总体核苷酸内含物,或相对于一种或多种类型的核苷酸,即A、G、U或C中的任何一者或多者),或任何间插百分比(例如1%至20%、1%至25%、1%至50%、1%至60%、1%至70%、1%至80%、1%至90%、1%至95%、10%至20%、10%至25%、10%至50%、10%至60%、10%至70%、10%至80%、10%至90%、10%至95%、10%至100%、20%至25%、20%至50%、20%至60%、20%至70%、20%至80%、20%至90%、20%至95%、20%至100%、50%至60%、50%至70%、50%至80%、50%至90%、50%至95%、50%至100%、70%至80%、70%至90%、70%至95%、70%至100%、80%至90%、80%至95%、80%至100%、90%至95%、90%至100%、以及95%至100%)。应了解任何剩余百分比以存在未修饰A、G、U或C来说明。

[0246] 多核苷酸可含有最少1%以及最多100%经修饰核苷酸,或任何间插百分比,诸如至少5%经修饰核苷酸,至少10%经修饰核苷酸,至少25%经修饰核苷酸,至少50%经修饰核苷酸,至少80%经修饰核苷酸,或至少90%经修饰核苷酸。举例来说,多核苷酸可含有经修饰嘧啶,诸如经修饰尿嘧啶或胞嘧啶。在一些实施方案中,多核苷酸中至少5%、至少10%、至少25%、至少50%、至少80%、至少90%或100%的尿嘧啶用经修饰尿嘧啶(例如5取代的尿嘧啶)替换。经修饰尿嘧啶可由具有单一独特结构的化合物替换,或可由具有不同结构的多个化合物(例如2、3、4个或更多个独特结构)替换。在一些实施方案中,多核苷酸中至少5%、至少10%、至少25%、至少50%、至少80%、至少90%或100%的胞嘧啶用经修饰胞嘧啶(例如5取代的胞嘧啶)替换。经修饰胞嘧啶可由具有单一独特结构的化合物替换,或可由具有不同结构的多个化合物(例如2、3、4个或更多个独特结构)替换。

[0247] 因此,在一些实施方案中,RNA疫苗包含5'UTR元件、任选加以密码子优化的开放阅读框和3'UTR元件、聚腺苷酸序列和/或聚腺苷酸化信号,其中RNA未被化学修饰。

[0248] 在一些实施方案中,经修饰核苷碱基是经修饰尿嘧啶。具有经修饰尿嘧啶的示例性核苷碱基和核苷包括假尿苷(ψ)、吡啶-4-酮核糖核苷、5-氮杂-尿苷、6-氮杂-尿苷、2-硫代-5-氮杂-尿苷、2-硫代-尿苷(s²U)、4-硫代-尿苷(s⁴U)、4-硫代-假尿苷、2-硫代-假尿苷、

5-羟基-尿苷(ho^5U)、5-氨基烯丙基-尿苷、5-卤代-尿苷(例如5-碘-尿苷或5-溴-尿苷)、3-甲基-尿苷(m^3U)、5-甲氧基-尿苷(mo^5U)、尿苷5-氧基乙酸(cmo^5U)、尿苷5-氧基乙酸甲酯(mcmo^5U)、5-羧基甲基-尿苷(cm^5U)、1-羧基甲基-假尿苷、5-羧基羟基甲基-尿苷(chm^5U)、5-羧基羟基甲基-尿苷甲酯(mchm^5U)、5-甲氧基羰基甲基-尿苷(mcm^5U)、5-甲氧基羰基甲基-2-硫代-尿苷($\text{mcm}^5\text{s}^2\text{U}$)、5-氨基甲基-2-硫代-尿苷($\text{nm}^5\text{s}^2\text{U}$)、5-甲基氨基甲基-尿苷(mnm^5U)、5-甲基氨基甲基-2-硫代-尿苷($\text{mnm}^5\text{s}^2\text{U}$)、5-甲基氨基甲基-2-硒代-尿苷($\text{mnm}^5\text{se}^2\text{U}$)、5-氨基甲酰基甲基-尿苷(ncm^5U)、5-羧基甲基氨基甲基-尿苷(cmnm^5U)、5-羧基甲基氨基甲基-2-硫代-尿苷($\text{cmnm}^5\text{s}^2\text{U}$)、5-丙炔基-尿苷、1-丙炔基-假尿苷、5-牛磺酸基甲基-尿苷(tm^5U)、1-牛磺酸基甲基-假尿苷、5-牛磺酸基甲基-2-硫代-尿苷($\text{tm}^5\text{s}^2\text{U}$)、1-牛磺酸基甲基-4-硫代-假尿苷、5-甲基-尿苷(m^5U ,即具有核苷碱基脱氧胸腺嘧啶)、1-甲基-假尿苷($\text{m}^1\psi$)、1-乙基-假尿苷($\text{e}^1\psi$)、5-甲基-2-硫代-尿苷($\text{m}^5\text{s}^2\text{U}$)、1-甲基-4-硫代-假尿苷($\text{m}^1\text{s}^4\psi$)、4-硫代-1-甲基-假尿苷、3-甲基-假尿苷($\text{m}^3\psi$)、2-硫代-1-甲基-假尿苷、1-甲基-1-脱氮-假尿苷、2-硫代-1-甲基-1-脱氮-假尿苷、二氢尿苷(D)、二氢假尿苷、5,6-二氢尿苷、5-甲基-二氢尿苷(m^5D)、2-硫代-二氢尿苷、2-硫代-二氢假尿苷、2-甲氧基-尿苷、2-甲氧基-4-硫代-尿苷、4-甲氧基-假尿苷、4-甲氧基-2-硫代-假尿苷、N1-甲基-假尿苷、3-(3-氨基-3-羧基丙基)尿苷(acp^3U)、1-甲基-3-(3-氨基-3-羧基丙基)假尿苷($\text{acp}^3\psi$)、5-(异戊烯基氨基甲基)尿苷(inm^5U)、5-(异戊烯基氨基甲基)-2-硫代-尿苷($\text{inm}^5\text{s}^2\text{U}$)、 α -硫代-尿苷、2'-O-甲基-尿苷(Um)、5,2'-O-二甲基-尿苷(m^5Um)、2'-O-甲基-假尿苷(ψm)、2-硫代-2'-O-甲基-尿苷(s^2Um)、5-甲氧基羰基甲基-2'-O-甲基-尿苷(mcm^5Um)、5-氨基甲酰基甲基-2'-O-甲基-尿苷(ncm^5Um)、5-羧基甲基氨基甲基-2'-O-甲基-尿苷(cmnm^5Um)、3,2'-O-二甲基-尿苷(m^3Um)以及5-(异戊烯基氨基甲基)-2'-O-甲基-尿苷(inm^5Um)、1-硫代-尿苷、脱氧胸苷、2'-F-阿糖尿苷、2'-F-尿苷、2'-OH-阿糖尿苷、5-(2-甲氧甲酰基乙烯基)尿苷和5-[3-(1-E-丙烯基氨基)]尿苷。

[0249] 在一些实施方案中,经修饰核苷碱基是经修饰胞嘧啶。具有经修饰胞嘧啶的示例性核苷碱基和核苷包括5-氮杂-胞苷、6-氮杂-胞苷、假异胞苷、3-甲基-胞苷(m^3C)、N4-乙酰基-胞苷(ac^4C)、5-甲酰基-胞苷(f^5C)、N4-甲基-胞苷(m^4C)、5-甲基-胞苷(m^5C)、5-卤代-胞苷(例如5-碘-胞苷)、5-羟基甲基-胞苷(hm^5C)、1-甲基-假异胞苷、吡咯并-胞苷、吡咯并-假异胞苷、2-硫代-胞苷(s^2C)、2-硫代-5-甲基-胞苷、4-硫代-假异胞苷、4-硫代-1-甲基-假异胞苷、4-硫代-1-甲基-1-脱氮-假异胞苷、1-甲基-1-脱氮-假异胞苷、泽布拉瑞、5-氮杂-泽布拉瑞、5-甲基-泽布拉瑞、5-氮杂-2-硫代-泽布拉瑞、2-硫代-泽布拉瑞、2-甲氧基-胞苷、2-甲氧基-5-甲基-胞苷、4-甲氧基-假异胞苷、4-甲氧基-1-甲基-假异胞苷、赖西丁(k_2C)、 α -硫代-胞苷、2'-O-甲基-胞苷(Cm)、5,2'-O-二甲基-胞苷(m^5Cm)、N4-乙酰基-2'-O-甲基-胞苷(ac^4Cm)、N4,2'-O-二甲基-胞苷(m^4Cm)、5-甲酰基-2'-O-甲基-胞苷(f^5Cm)、N4,N4,2'-O-三甲基-胞苷(m^4_2Cm)、1-硫代-胞苷、2'-F-阿糖尿苷、2'-F-胞苷和2'-OH-阿糖尿苷。

[0250] 在一些实施方案中,经修饰核苷碱基是经修饰腺嘌呤。具有经修饰腺嘌呤的示例性核苷碱基和核苷包括2-氨基-嘌呤、2,6-二氨基嘌呤、2-氨基-6-卤代-嘌呤(例如2-氨基-6-氯-嘌呤)、6-卤代-嘌呤(例如6-氯-嘌呤)、2-氨基-6-甲基-嘌呤、8-叠氮基-腺苷、7-脱氮-腺嘌呤、7-脱氮-8-氮杂-腺嘌呤、7-脱氮-2-氨基-嘌呤、7-脱氮-8-氮杂-2-氨基-嘌呤、7-脱氮-2,6-二氨基嘌呤、7-脱氮-8-氮杂-2,6-二氨基嘌呤、1-甲基-腺苷(m^1A)、2-甲基-腺

嘌呤 (m^2A)、N6-甲基-腺苷 (m^6A)、2-甲基硫基-N6-甲基-腺苷 (ms^2m^6A)、N6-异戊烯基-腺苷 (i^6A)、2-甲基硫基-N6-异戊烯基-腺苷 (ms^2i^6A)、N6-(顺-羟基异戊烯基)腺苷 (io^6A)、2-甲基硫基-N6-(顺-羟基异戊烯基)腺苷 (ms^2io^6A)、N6-甘氨酸基氨基甲酰基-腺苷 (g^6A)、N6-苏氨酸基氨基甲酰基-腺苷 (t^6A)、N6-甲基-N6-苏氨酸基氨基甲酰基-腺苷 (m^6t^6A)、2-甲基硫基-N6-苏氨酸基氨基甲酰基-腺苷 (ms^2g^6A)、N6,N6-二甲基-腺苷 (m^6_2A)、N6-羟基正缬氨酸基氨基甲酰基-腺苷 (hn^6A)、2-甲基硫基-N6-羟基正缬氨酸基氨基甲酰基-腺苷 (ms^2hn^6A)、N6-乙酰基-腺苷 (ac^6A)、7-甲基-腺嘌呤、2-甲基硫基-腺嘌呤、2-甲氧基-腺嘌呤、 α -硫代-腺苷、2'-O-甲基-腺苷 (Am)、N6,2'-O-二甲基-腺苷 (m^6Am)、N6,N6,2'-O-三甲基-腺苷 (m^6_2Am)、1,2'-O-二甲基-腺苷 (m^1Am)、2'-O-核糖基腺苷(磷酸酯) ($Ar(p)$)、2-氨基-N6-甲基-嘌呤、1-硫代-腺苷、8-叠氮基-腺苷、2'-F-阿糖腺苷、2'-F-腺苷、2'-OH-阿糖腺苷和N6-(19-氨基-五氧杂十九基)-腺苷。

[0251] 在一些实施方案中,经修饰核苷碱基是经修饰鸟嘌呤。具有经修饰鸟嘌呤的示例性核苷碱基和核苷包括肌苷(I)、1-甲基-肌苷 (m^1I)、 γ 苷 (imG)、甲基 γ 苷 ($mimG$)、4-脱甲基- γ 苷 ($imG-14$)、异 γ 苷 ($imG2$)、怀丁苷 (yW)、过氧怀丁苷 (o_2yW)、羟基怀丁苷 ($OhyW$)、修饰不完全的羟基怀丁苷 ($OhyW^*$)、7-脱氮-鸟苷、癸苷(Q)、环氧基癸苷 (oQ)、半乳糖基-癸苷 ($galQ$)、甘露糖基-癸苷 ($manQ$)、7-氰基-7-脱氮-鸟苷 ($preQ_0$)、7-氨基甲基-7-脱氮-鸟苷 ($preQ_1$)、古嘌呤 (G^+)、7-脱氮-8-氮杂-鸟苷、6-硫代-鸟苷、6-硫代-7-脱氮-鸟苷、6-硫代-7-脱氮-8-氮杂-鸟苷、7-甲基-鸟苷 (m^7G)、6-硫代-7-甲基-鸟苷、7-甲基-肌苷、6-甲氧基-鸟苷、1-甲基-鸟苷 (m^1G)、N2-甲基-鸟苷 (m^2G)、N2,N2-二甲基-鸟苷 (m^2_2G)、N2,7-二甲基-鸟苷 ($m^{2,7}G$)、N2,N2,7-二甲基-鸟苷 ($m^{2,2,7}G$)、8-氧代-鸟苷、7-甲基-8-氧代-鸟苷、1-甲基-6-硫代-鸟苷、N2-甲基-6-硫代-鸟苷、N2,N2-二甲基-6-硫代-鸟苷、 α -硫代-鸟苷、2'-O-甲基-鸟苷 (Gm)、N2-甲基-2'-O-甲基-鸟苷 (m^2Gm)、N2,N2-二甲基-2'-O-甲基-鸟苷 (m^2_2Gm)、1-甲基-2'-O-甲基-鸟苷 (m^1Gm)、N2,7-二甲基-2'-O-甲基-鸟苷 ($m^{2,7}Gm$)、2'-O-甲基-肌苷 (Im)、1,2'-O-二甲基-肌苷 (m^1Im)、2'-O-核糖基鸟苷(磷酸酯) ($Gr(p)$)、1-硫代-鸟苷、O6-甲基-鸟苷、2'-F-阿糖鸟苷和2'-F-鸟苷。

[0252] RNA(例如mRNA)的体外转录

[0253] 本公开的癌症疫苗包含至少一种RNA多核苷酸,诸如mRNA(例如经修饰mRNA)。mRNA例如在体外从被称为“体外转录模板”的模板DNA转录。在一些实施方案中,体外转录模板编码5'非翻译(UTR)区,含有开放阅读框,并且编码3'UTR和聚腺苷酸尾部。体外转录模板的特定核酸序列组成和长度将取决于由模板编码的mRNA。

[0254] “5'非翻译区”(UTR)是指mRNA的直接在起始密码子(即mRNA转录物的由核糖体翻译的首个密码子)的上游(即5')的区域,其不编码多肽。

[0255] “3'非翻译区”(UTR)是指mRNA的直接在终止密码子(即mRNA转录物的发出翻译终止信号的密码子)的下游(即3')的区域,其不编码多肽。

[0256] “开放阅读框”是以起始密码子(例如甲硫氨酸(ATG))开始,并且以终止密码子(例如TAA、TAG或TGA)结束的一段连续DNA,并且编码多肽。

[0257] “聚腺苷酸尾部”是mRNA的在3'UTR的下游,例如直接在其下游(即3')的区域,其含有多个连续单磷酸腺苷。聚腺苷酸尾部可含有10至300个单磷酸腺苷。举例来说,聚腺苷酸尾部可含有10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、

200、210、220、230、240、250、260、270、280、290或300个单磷酸腺苷。在一些实施方案中,聚腺苷酸尾部含有50至250个单磷酸腺苷。在相关生物环境中(例如在细胞中,在体内),聚腺苷酸尾部起保护mRNA免遭例如在细胞质中的酶促降解的作用,并且有助于转录终止,mRNA从核输出以及翻译。

[0258] 在一些实施方案中,多核苷酸包括200至3,000个核苷酸。举例来说,多核苷酸可包括200至500、200至1000、200至1500、200至3000、500至1000、500至1500、500至2000、500至3000、1000至1500、1000至2000、1000至3000、1500至3000、或2000至3000个核苷酸。

[0259] 在其他方面,本发明涉及一种用于通过IVT方法来制备mRNA癌症疫苗的方法。体外转录(IVT)方法容许对具有几乎任何序列的RNA分子进行模板引导的合成。可使用IVT方法合成的RNA分子的大小在从短寡核苷酸至具有数千碱基的长核酸聚合物的范围内。IVT方法容许合成大量RNA转录物(例如从微克至毫克数量)(Beckert等,Synthesis of RNA by in vitro transcription,Methods Mol Biol.703:29-41(2011);Rio等RNA:A Laboratory Manual.Cold Spring Harbor:Cold Spring Harbor Laboratory Press,2011,205-220.;Cooper,Geoffery M.The Cell:A Molecular Approach.第4版Washington D.C.:ASM Press,2007.262-299)。通常,IVT利用特征在于在目标序列上游具有启动子序列的DNA模板。启动子序列最通常具有噬菌体来源(例如T7、T3或SP6启动子序列),但可允许许多其他启动子序列,包括重新设计的那些。对DNA模板的转录通常通过使用对应于特定噬菌体启动子序列的RNA聚合酶来最佳实现。示例性RNA聚合酶包括但不限于T7 RNA聚合酶、T3 RNA聚合酶或SP6 RNA聚合酶以及其他RNA聚合酶。IVT通常在dsDNA处引发,但可在单链上进行。

[0260] 应了解本公开的mRNA疫苗例如编码癌抗原的mRNA可使用任何适当合成方法制备。举例来说,在一些实施方案中,本公开的mRNA疫苗使用IVT由作为模板的单一底链DNA和充当启动子的互补性寡核苷酸制备。单一底链DNA可充当体外RNA转录的DNA模板,并且可从例如质粒、PCR产物或化学合成获得。在一些实施方案中,单一底链DNA从环状模板加以线性化。单一底链DNA模板通常包括启动子序列,例如噬菌体启动子序列,以有助于IVT。使用单一底链DNA和顶链启动子互补性寡核苷酸制备RNA的方法在本领域中是已知的。一示例性方法包括但不限于使DNA底链模板与顶链启动子互补性寡核苷酸(例如T7启动子互补性寡核苷酸、T3启动子互补性寡核苷酸或SP6启动子互补性寡核苷酸)退火,随后使用对应于启动子序列的RNA聚合酶例如T7 RNA聚合酶、T3 RNA聚合酶或SP6 RNA聚合酶进行IVT。

[0261] IVT方法也可使用双链DNA模板来进行。举例来说,在一些实施方案中,双链DNA模板通过使用本领域中可用的链延伸技术使互补性寡核苷酸延伸以产生互补性DNA链来制备。在一些实施方案中,使含有启动子序列和编码一种或多种目标表位的序列的单一底链DNA模板退火于顶链启动子互补性寡核苷酸,并且经受PCR样过程以使顶链延伸来产生双链DNA模板。或者或另外,使含有互补于底链启动子序列以及互补于编码一种或多种目标表位的序列的顶链DNA退火于底链启动子寡核苷酸,并且经受PCR样过程以使底链延伸来产生双链DNA模板。在一些实施方案中,PCR样循环的数目在1至20个循环例如3至10个循环的范围内。在一些实施方案中,双链DNA模板完全或部分地通过化学合成方法合成。可使双链DNA模板经受如本文所述的体外转录。

[0262] 在另一方面,本公开的mRNA疫苗例如编码癌抗原的mRNA可使用两个DNA链制备,所述两个DNA链跨越它们的序列的重叠部分是互补的,从而当使互补性部分退火时,留下单链

突出部分(即粘性末端)。可通过使用另一链作为模板进行延伸来使这些单链突出部分成为双链,由此产生双链DNA。在一些情况下,这个引物延伸方法可容许较大ORF并入模板DNA序列中,例如相较于通过顶链DNA合成方法获得的并入模板DNA序列中的大小。在引物延伸方法中,第一链(呈5'-3'方向)的3'末端的一部分互补于第二链(呈3'-5'方向)的3'末端的一部分。在一些所述实施方案中,单一第一链DNA可包括启动子(例如T7、T3或SP6)的序列,任选包括5'-UTR,以及ORF的一部分或全部(例如ORF的5'末端的一部分)。在一些实施方案中,单一第二链DNA可包括ORF的一部分或全部的互补性序列(例如互补于ORF的3'末端的部分),以及任选包括3'-UTR,终止序列和/或聚腺苷酸尾部。使用两个合成DNA链制备RNA的方法可包括使具有重叠互补性部分的两条链退火,随后使用一个或多个PCR样循环进行引物延伸以使链延伸来产生双链DNA模板。在一些实施方案中,PCR样循环的数目在1至20个循环例如3至10个循环的范围内。可使所述双链DNA经受如本文所述的体外转录。

[0263] 在另一方面,本公开的mRNA疫苗例如编码癌抗原的mRNA可使用作为双链DNA模板的合成双链线性DNA分子诸如gBlocks[®](Integrated DNA Technologies, Coralville, Iowa)制备。所述合成双链线性DNA分子的优势是它们提供产生mRNA所依据的较长模板。举例来说,gBlocks[®]的大小可在45-1000(例如125-750个核苷酸)的范围内。在一些实施方案中,合成双链线性DNA模板包括全长5'-UTR、全长3'-UTR或两者。全长5'-UTR的长度可多达100个核苷酸,例如约40-60个核苷酸。全长3'-UTR的长度可多达300个核苷酸,例如约100-150个核苷酸。

[0264] 为有助于产生较长构建体,被设计在3'链上具有重叠序列的两个或更多个双链线性DNA分子和/或基因片段可使用本领域中已知的方法装配在一起。举例来说,可按以下方式进行Gibson Assembly[™]方法(Synthetic Genomics, Inc., La Jolla, CA):使用从双链DNA片段的5'末端裂解碱基的中温核酸外切酶,随后使新形成的互补性单链3'末端退火,进行聚合酶依赖性延伸以填充任何单链空位,以及最终通过DNA连接酶来使DNA区段接合。

[0265] 在另一方面,本公开的mRNA疫苗例如编码癌抗原的mRNA可使用化学RNA合成来制备。方法例如涉及使包含编码多肽的开放阅读框的第一多核苷酸和包含5'-UTR的第二多核苷酸退火于与固体载体缀合的互补性多核苷酸。接着使第二多核苷酸的3'末端在适合条件下连接于第一多核苷酸的5'末端。适合条件包括使用DNA连接酶。连接反应产生第一连接产物。接着使包含3'-UTR的第三多核苷酸的5'末端在适合条件下连接于第一连接产物的3'末端。适于第二连接反应的条件包括RNA连接酶。在第二连接反应中产生第二连接产物。使第二连接产物从固体载体释放以产生编码目标多肽的mRNA。在一些实施方案中,mRNA的核苷酸在30个与1000个之间。

[0266] 编码目标多肽的mRNA也可通过使包含编码多肽的开放阅读框的第一多核苷酸和包含3'-UTR的第二多核苷酸结合于与固体载体缀合的互补性多核苷酸来制备。使第二多核苷酸的5'末端在适合条件下连接于第一多核苷酸的3'末端。适合条件包括DNA连接酶。方法产生第一连接产物。使包含5'-UTR的第三多核苷酸在适合条件下连接于第一连接产物以产生第二连接产物。适合条件包括RNA连接酶,诸如T4 RNA。使第二连接产物从固体载体释放以产生编码目标多肽的mRNA。

[0267] 在一些实施方案中,第一多核苷酸的特征在于具有5'-三磷酸和3'-OH。在其他实

施方案中,第二多核苷酸包含3'-OH。在其他实施方案中,第三多核苷酸包含5'-三磷酸和3'-OH。第二多核苷酸也可包括5'-帽结构。方法也可涉及使包含聚腺苷酸区域的第四多核苷酸连接在第三多核苷酸的3'末端的另一步骤。第四多核苷酸可包含5'-三磷酸。

[0268] 方法可或可不包括反相纯化。方法也可包括洗涤步骤,其中洗涤固体载体以移除未反应多核苷酸。固体载体可为例如捕集树脂。在一些实施方案中,方法涉及dT纯化。

[0269] 根据本公开,编码本公开的mRNA疫苗的模板DNA包括编码一种或多种癌表位的开放阅读框(ORF)。在一些实施方案中,模板DNA包括具有多达1000个核苷酸,例如约10-350、30-300个核苷酸或约50-250个核苷酸的ORF。在一些实施方案中,模板DNA包括具有约150个核苷酸的ORF。在一些实施方案中,模板DNA包括具有约200个核苷酸的ORF。

[0270] 在一些实施方案中,在反应发生之后,从IVT反应混合物的组分纯化IVT转录物。举例来说,粗制IVT混合物可用无RNA酶的DNA酶处理以消化原始模板。mRNA可使用本领域中已知的方法纯化,包括但不限于使用基于有机溶剂或管柱的纯化方法进行沉淀。商业试剂盒可用于纯化RNA,例如MEGACLEAR™试剂盒(Ambion,Austin,TX)。mRNA可使用本领域中已知的方法定量,包括但不限于可商购获得的仪器例如NanoDrop。纯化mRNA可例如通过琼脂糖凝胶电泳来分析以确认RNA具有适当大小,和/或确认尚未发生RNA降解。

[0271] 模板DNA可包括一种或多种稳定元件,除其他结构特征诸如5'帽结构或3'聚腺苷酸尾部之外,也包括但不限于在它们的5'末端的非翻译区(UTR)(5'UTR)和/或在它们的3'末端的非翻译区(3'UTR)。在一些实施方案中,模板DNA包括具有约1-30个核苷酸,例如约5-25个核苷酸或约10-20个核苷酸的5'-UTR。在一些实施方案中,模板DNA包括具有13个核苷酸的5'-UTR。在一些实施方案中,模板DNA不包括5'-UTR。在一些实施方案中,模板DNA包括具有约1-60个核苷酸,例如10-50个核苷酸的3'-UTR。在一些实施方案中,模板DNA包括具有40个核苷酸的3'-UTR。在一些实施方案中,模板DNA不包括3'-UTR。在一些实施方案中,模板DNA包括具有1-150个核苷酸,例如10-100个核苷酸,例如30个核苷酸的3'聚腺苷酸尾部。所述稳定元件可被包括在用于在IVT反应中进行转录的DNA中,或可被单独合成并添加至由IVT反应产生的所得RNA中。

[0272] 可将3'聚腺苷酸尾部添加至本公开的RNA中。用于聚腺苷酸尾部添加的方法在本领域中是熟知的。所述方法包括但不限于聚腺苷酸聚合酶催化或高碘酸盐处理。或者或另外,聚腺苷酸尾部可被单独合成,接着使用任何适当技术添加至RNA中,所述技术诸如点击化学、orthoclick化学、solulink或为本领域中的人士所知的其他生物缀合化学。

[0273] 可将7-甲基鸟苷(m7G)帽添加至本公开的RNA中。用于m7G帽添加的方法在本领域中是熟知的。实例包括但不限于使用RNA聚合酶诸如T7聚合酶进行抗反向帽类似物(ARCA)的共转录并入。商业试剂盒可用于产生T7 ARCA mRNA,诸如HiScribe™ T7 ARCA mRNA试剂盒(New England BioLab)。

[0274] 根据本公开,嵌合多核苷酸的两个区域或部分可例如使用三磷酸化学加以接合或连接。在一些实施方案中,具有100个核苷酸或更少的第一区域或部分被化学合成具有5'-单磷酸和末端3'-脱OH或经阻断OH。如果区域长于80个核苷酸,那么它可被合成为将随后通过连接加以化学连接的两条或更多条链。如果第一区域或部分被使用IVT而合成为非位置修饰区域或部分,那么可继之以向5'-单磷酸的转化以及后续对3'末端的封盖。单磷酸保护基可选自本领域中已知的那些中的任一者。嵌合多核苷酸的第二区域或部分可使用例如如

本文所述的化学合成或IVT方法来合成。IVT方法可包括使用可利用具有经修饰帽的引物的RNA聚合酶。或者,帽可被化学合成并偶联于IVT区域或部分。

[0275] 应注意对于连接方法,用DNAT4连接酶进行的连接,继之以用DNA酶处理(以消除为DNA T4连接酶活性所需的DNA夹板)应易于防止不合需要地形成串联产物。

[0276] 整个嵌合多核苷酸无需被制造具有磷酸根-糖主链。如果一个区域或部分编码多肽,那么优选的是所述区域或部分包含磷酸根-糖主链。

[0277] 连接可使用任何适当技术进行,所述技术诸如酶促连接、点击化学、orthoclick化学、solulink或为本领域中的人士所知的其他生物缀合化学。在一些实施方案中,连接由互补性寡核苷酸夹板引导。在一些实施方案中,连接在无互补性寡核苷酸夹板下进行。

[0278] 在其他方面,本发明涉及用于通过IVT方法来制备mRNA癌症疫苗的试剂盒。在个性化癌症疫苗中,重要的是鉴定患者特异性突变,并且用一种或多种新表位对患者接种疫苗。在所述疫苗中,由mRNA的ORF编码的抗原将为患者所特有。编码抗原的RNA的5'末端和3'末端可为更加广泛可适用的,因为它们包括为许多RNA所共有的非翻译区和稳定区。本公开尤其提供包括嵌合多核苷酸的一个或多个部分诸如RNA的一个或多个5'区域和/或3'区域的试剂盒,所述一个或多个部分可与编码患者特异性表位的ORF组合。举例来说,试剂盒可包括含有5'-ORF、3'-ORF和聚腺苷酸尾部中的一者或多者的多核苷酸。在一些实施方案中,各多核苷酸组分处于个别容器中。在其他实施方案中,超过一种多核苷酸组分共同存在于单一容器中。在一些实施方案中,试剂盒包括连接酶。在一些实施方案中,提供的试剂盒包括使用说明书。在一些实施方案中,说明书包括用以使表位编码ORF连接于来自试剂盒的一种或多种其他组分例如5'-ORF、3'-ORF和/或聚腺苷酸尾部的说明书。

[0279] 用于产生本发明的个性化癌症疫苗的方法涉及使用诸如如本文所述的深度核酸或蛋白质测序方法的技术鉴定组织样品的突变。在一些实施方案中,对患者的转录物组中的突变进行初始鉴定。将来自患者的转录物组的数据与来自患者外显子组的序列信息进行比较以鉴定表达的患者特异性和肿瘤特异性突变。比较产生推定新表位的数据集,被称为突变组。每名患者的突变组可包括约100-10,000个候选突变。使突变组经受使用一组查询或算法进行的数据探测分析以鉴定对于产生新抗原疫苗来说最优的一组突变。在一些实施方案中,设计并制造mRNA新抗原疫苗。接着用疫苗治疗患者。

[0280] 新抗原疫苗可为包括多种新表位的多顺反子疫苗或一种或多种单一RNA疫苗或其组合。

[0281] 在一些实施方案中,从启动突变鉴定过程至开始患者治疗的整个方法在少于2个月内实现。在其他实施方案中,整个过程在7周或更短时间、6周或更短时间、5周或更短时间、4周或更短时间、3周或更短时间、2周或更短时间或少于1周内实现。在一些实施方案中,整个方法在少于30天内进行。

[0282] 突变鉴定过程可涉及转录物组分析与外显子组分析两者,或仅转录物组分析或外显子组分析。在一些实施方案中,首先进行转录物组分析,并且其次进行外显子组分析。对生物样品或组织样品进行分析。在一些实施方案中,生物样品或组织样品是血液或血清样品。在其他实施方案中,样品是组织库样品,或EBV转化的B细胞。

[0283] 已认识和了解,通过分析癌症相关突变的某些性质,最优新表位可被评估和/或选择用于包括在mRNA疫苗中。举例来说,在给定时间,可对若干性质中的一者或多者进行评估

并加权以选择一组用于包括在疫苗中的新表位。新表位或一组新表位的性质可包括例如在患者RNA测序或其他核酸分析中对基因或转录物水平表达的评估,可用数据库中的组织特异性表达,已知致癌基因/肿瘤抑制剂,变体识别置信度评分,RNA测序等位基因特异性表达,保守性氨基酸取代相对于非保守性氨基酸取代,点突变的位置(关于增加的TCR啮合的中心化评分),点突变的位置(关于差异性HLA结合的锚定评分),自身性:与患者WES数据具有<100%核心表位同源性,HLA-A和HLA-B对8聚体-11聚体的IC50,HLA-DRB1对15聚体-20聚体的IC50;杂乱评分(即被预测会进行结合的患者HLA的数目),HLA-C对8聚体-11聚体的IC50,HLA-DRB3-5对15聚体-20聚体的IC50,HLA-DQB1/A1对15聚体-20聚体的IC50,HLA-DPB1/A1对15聚体-20聚体的IC50,I类相对于II类比例,涵盖的患者HLA-A、HLA-B和DRB1同种异型的多样性,点突变相对于复杂表位(例如框移)的比例,和/或假表位HLA结合评分。

[0284] 在一些实施方案中,癌症相关突变的用于鉴定最优新表位的性质是与突变类型、突变在患者样品中的丰度、免疫原性、缺乏自身反应性以及肽组成性质相关的性质。

[0285] 突变类型应被确定为和视为决定推定表位是否应被包括在疫苗中的因素。突变类型可变化。在一些情况下,可合乎需要的是在单一疫苗中包括多种不同类型的突变。在其他情况下,单一类型的突变可更加合乎需要。可对特定突变的价值加权并进行计算。在一些实施方案中,特定突变是单核苷酸多态性(SNP)。在一些实施方案中,特定突变是复杂变体,例如由内含子保留、复杂剪接事件、或改变序列的阅读框的插入/缺失突变产生的肽序列。

[0286] 也可对突变在患者样品中的丰度评分并作为决定推定表位是否应被包括在疫苗中的因素。高度充足的突变可促进更强力免疫应答。

[0287] 对免疫原性的考虑是在选择用于包括在疫苗中的最优新表位时的重要组成部分。免疫原性可例如通过分析新表位的MHC结合能力、HLA杂乱性、突变位置、预测T细胞反应性、实际T细胞反应性、导致特定构象和所引起的溶剂暴露的结构、以及表现的特定氨基酸来评估。诸如NetMHC预测算法的已知算法可用于预测肽结合常见HLA-A和HLA-B等位基因的能力。对MHC结合的肽的结构评估也可通过电子3维分析和/或蛋白质对接程序来进行。对诸如由Rosetta算法获得的在结合于MHC分子时加以预测的表位结构的使用可用于评估当表位结合于MHC分子时,所述表位的氨基酸残基的溶剂暴露程度。可在体外用表位和T细胞以实验方式评估T细胞反应性。或者,可使用T细胞应答/序列数据集评估T细胞反应性。

[0288] 包括在疫苗中的新表位的重要组成部分是缺乏自身反应性。可筛选推定新表位以确认表位限于肿瘤组织,例如由于恶性细胞内的遗传变化而产生。理想的是,表位不应存在于患者的正常组织中,因此自身类似表位被滤出数据集。个人化编码基因组可作为参照用于比较新抗原候选物以确定缺乏自身反应性。在一些实施方案中,从个别化转录物组和/或外显子组产生个人化编码基因组。

[0289] 肽组成性质也可在表位设计时加以考虑。举例来说,可关于见于表位中的保守氨基酸的价值相对于非保守氨基酸的价值对各推定表位提供评分。

[0290] 在一些实施方案中,通过本文所述的工具进行的分析可包括比较在不同时间从患者(即在治疗干预之前和之后),从不同组织样品,从具有类似肿瘤的不同患者等获得的不同组性质。在一些实施方案中,可将来自一组性质的峰值的平均值与来自另一组性质的峰值的平均值进行比较。举例来说,可在不同的两组分布之间比较HLA结合的平均值。可持续由例如数天、数月或数年分隔的持续时间确定两组分布。

[0291] 此外,本发明者已认识和了解,可收集并使用本文所述的算法分析关于癌症突变的性质的所述数据。数据适用于鉴定用于开发个人化癌症疫苗的新表位和新表位组。

[0292] 在一些实施方案中,肿瘤变异肽的所有注释转录物都被包括在本发明的疫苗中。在一些实施方案中,RNA测序中鉴定的RNA的翻译物被包括在本发明的疫苗中。

[0293] 应了解2个或更多个肽例如2个或更多个新抗原的多联体可在肽边界处创建非意图新表位(假表位)。为防止或消除所述假表位,可跨越多联体中的肽边界扫描I类等位基因的命中物。在一些实施方案中,使多联体内的肽顺序改组以降低或消除假表位形成。在一些实施方案中,在肽之间使用连接体,例如单一氨基酸连接体诸如甘氨酸,以降低或消除假表位形成。在一些实施方案中,锚定氨基酸可用将使假表位形成降低或消除的其他氨基酸替换。在一些实施方案中,在多联体内的肽边界处对肽进行调整以降低或消除假表位形成。

[0294] 在一些实施方案中,对多种肽表位抗原进行排列和排序以使假表位最少。在其他实施方案中,多种肽表位抗原是不含假表位的多肽。当癌抗原表位以头尾相接形态排列在多联结构中时,在各癌抗原表位之间形成接合部。那包括来自在肽的N末端的表位的数个(即1-10个)氨基酸和邻近的直接连接表位的在C末端的数个(即1-10个)氨基酸。重要的是接合部不是可产生免疫应答的免疫原性肽。在一些实施方案中,接合部形成结合受试者的HLA蛋白的肽序列,个人化癌症疫苗被设计对所述HLA蛋白具有大于约50nM的IC₅₀。在其他实施方案中,接合部肽序列以大于约10nM、150nM、200nM、250nM、300nM、350nM、400nM、450nm或500nM的IC₅₀结合受试者的HLA蛋白。

[0295] 根据本文所述的技术的新表位表征系统可采用任何适合形式,因为实施方案在这个方面不受限制。可与一些实施方案关联使用的计算机系统900的一说明性实施方式显示于图15中。一个或多个计算机系统诸如计算机系统900可用于实施任何上述功能性。计算机系统900可包括一个或多个处理器910和一个或多个计算机可读存储介质(即有形非暂时计算机可读介质),例如易失性存储器920和一个或多个非易失性存储介质930,其可由任何适合数据存储介质形成。处理器910可以任何适合方式控制向易失性存储器920和非易失性存储装置930写入数据以及从易失性存储器920和非易失性存储装置930读取数据,因为实施方案在这个方面不受限制。为执行任何本文所述的功能性,处理器910可执行一个或多个存储在一个或多个计算机可读存储介质(例如易失性存储器920和/或非易失性存储器930)中的指令,所述存储介质可充当存储用于由处理器910执行的指令的有形非暂时计算机可读介质。

[0296] 上述实施方案可以众多方式中的任一者来实施。举例来说,实施方案可使用硬件、软件或其组合来实施。当在软件中实施时,软件代码可在任何适合处理器或一批处理器上执行,无论这批处理器提供在单一计算机中还是分布在多个计算机之中。应了解执行上述功能的任何组件或一批组件都可在属类上被视为一个或多个控制以上讨论的功能的控制器。一个或多个控制器可以众多方式加以实施,诸如采用专用硬件,或采用使用微代码或软件加以编程以执行以上叙述的功能的通用硬件(例如一个或多个处理器)。

[0297] 在这个方面,应了解一个实施方式包括至少一个用计算机程序(即多个指令)编码的计算机可读存储介质(即至少一个有形非暂时计算机可读介质),诸如计算机存储器(例如硬盘驱动器、闪速存储器、处理器工作存储器等)、软盘、光盘、磁带或其他有形非暂时计算机可读介质,所述计算机程序当在一个或多个处理器上执行时会执行以上讨论的功能。

计算机可读存储介质可为可移动的,以使其上存储的程序可被装载于任何计算机资源上以实施本文讨论的技术。此外,应了解对当被执行时会执行以上讨论的功能的计算机程序的提及不限于在主计算机上运行的应用程序。更确切来说,术语“计算机程序”在本文中以通用意义用于指代可用于对一个或多个处理器编程以实施以上技术的任何类型的计算机代码(例如软件或微代码)。

[0298] 治疗方法

[0299] 本文提供用于预防和/或治疗人和其他哺乳动物的癌症的组合物(例如药物组合物)、方法、试剂盒和试剂。癌症RNA疫苗可用作治疗剂或防治剂。它们可在医学中用于预防和/或治疗癌症。在示例性方面,本公开的癌症RNA疫苗用于提供免遭癌症的防治性保护作用。免遭癌症的防治性保护作用可在施用本公开的癌症RNA疫苗之后实现。疫苗可施用一次、两次、三次、四次或更多次,但施用疫苗一次(任选继之以单次加强)可能就足够。更加可合乎需要的是向患有癌症的个体施用疫苗以实现治疗响应。可能需要相应调整给药。

[0300] 一旦合成mRNA疫苗,就将它向患者施用。在一些实施方案中,根据时程施用疫苗多达两个月,多达三个月,多达四个月,多达五个月,多达六个月,多达七个月,多达八个月,多达九个月,多达十个月,多达十一个月,多达1年,多达1年半,多达两年,多达三年,或多达四年。时程可相同或变化。在一些实施方案中,时程是每周一次,持续前3周,接着此后是每月一次。

[0301] 疫苗可通过任何途径来施用。在一些实施方案中,疫苗通过肌肉内(IM)或静脉内(IV)途径来施用。

[0302] 在治疗中的任何时点,都可检查患者以确定疫苗中的突变是否仍然适当。基于那个分析,可调整或重新配置疫苗以包括一种或多种不同突变或移除一种或多种突变。

[0303] 治疗性和防治性组合物

[0304] 本文提供用于预防、治疗或诊断例如人和其他哺乳动物的癌症的组合物(例如药物组合物)、方法、试剂盒和试剂。癌症RNA疫苗可用作治疗剂或防治剂。它们可在医学中用于预防和/或治疗癌症。在一些实施方案中,本发明的癌症疫苗可被设想用于对免疫效应细胞进行致敏,例如以离体使外周血液单核细胞(PBMC)活化,接着将其输注(再输注)至受试者中。

[0305] 在示例性实施方案中,可向受试者(例如哺乳动物受试者诸如人受试者)施用如本文所述的含有RNA多核苷酸的癌症疫苗,并且所述RNA多核苷酸在体内被翻译以产生抗原性多肽。

[0306] 可诱导癌症RNA疫苗以达成在细胞、组织或生物体中翻译多肽(例如抗原或免疫原)。在示例性实施方案中,所述翻译在体内发生,但可存在设想的实施方案,其中所述翻译离体、在培养中或在体外发生。在示例性实施方案中,使细胞、组织或生物体与有效量的含有癌症RNA疫苗的组合物接触,所述疫苗含有具有至少一个编码抗原性多肽的可翻译区域的多核苷酸。

[0307] 癌症RNA疫苗的“有效量”至少部分地基于靶标组织、靶标细胞类型、施用手段、多核苷酸的物理特征(例如大小和经修饰核苷的程度)和癌症RNA疫苗的其他组分以及其他决定因素而提供。一般来说,癌症RNA疫苗组合物的有效量提供随细胞中的抗原产生而变化的诱导或加强免疫应答,优选比含有编码相同抗原或肽抗原的相应未修饰多核苷酸的组合物

更高效。抗原产生增加可通过以下来证明：细胞转染增加(用RNA疫苗转染的细胞的百分比)、从多核苷酸进行的蛋白质翻译增加、核酸降解降低(如例如由从经修饰多核苷酸进行的蛋白质翻译的持续时间增加所证明)或宿主细胞的抗原特异性免疫应答改变。

[0308] 在一些实施方案中,本公开的RNA疫苗(包括多核苷酸它们的编码多肽)可用于治疗癌症。

[0309] 癌症RNA疫苗可作为主动免疫流程的一部分向健康个体或在癌症早期或在症状发作为之后的活动性癌症期间防治性或治疗性施用。在一些实施方案中,对细胞、组织或受试者提供的本公开的RNA疫苗的量可为有效用于免疫防治的量。

[0310] 癌症RNA疫苗可与其他防治性或治疗性化合物一起施用。作为一非限制性实例,防治性或治疗性化合物可为佐剂或加强剂。如本文所用,当涉及组合物诸如疫苗时,术语“加强”是指额外施用防治性(疫苗)组合物。加强剂(或加强疫苗)可在较早施用防治性组合物之后给与。在初始施用防治性组合物与加强剂之间的施用时间可为但不限于1分钟、2分钟、3分钟、4分钟、5分钟、6分钟、7分钟、8分钟、9分钟、10分钟、15分钟、20分钟、35分钟、40分钟、45分钟、50分钟、55分钟、1小时、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7小时、8小时、9小时、10小时、11小时、12小时、13小时、14小时、15小时、16小时、17小时、18小时、19小时、20小时、21小时、22小时、23小时、1天、36小时、2天、3天、4天、5天、6天、1周、10天、2周、3周、1个月、2个月、3个月、4个月、5个月、6个月、7个月、8个月、9个月、10个月、11个月、1年、18个月、2年、3年、4年、5年、6年、7年、8年、9年、10年、11年、12年、13年、14年、15年、16年、17年、18年、19年、20年、25年、30年、35年、40年、45年、50年、55年、60年、65年、70年、75年、80年、85年、90年、95年或超过99年。在示例性实施方案中,在初始施用防治性组合物与加强剂之间的施用时间可为但不限于1周、2周、3周、1个月、2个月、3个月、6个月或1年。

[0311] 在一个实施方案中,类似于本领域中已知的疫苗的施用,可肌肉内或真皮内施用多核苷酸。

[0312] 视癌症的严重性或未满足医学需求的程度或水平而定,mRNA癌症疫苗可用于各种环境中。作为一非限制性实例,mRNA癌症疫苗可用于治疗任何阶段的癌症。mRNA癌症疫苗具有优越性质,因为它们产生大得多的抗体效价、T细胞应答,并且相比于可商购获得的抗癌疫苗,更早产生应答。在不希望受理论束缚下,本发明者假设呈mRNA形式的mRNA癌症疫苗被更好设计以在翻译时产生适当蛋白质构象,因为mRNA癌症疫苗征用天然细胞机构。不同于离体制造并且可触发非所要细胞应答的传统疫苗,mRNA癌症疫苗以更天然方式向细胞系统呈递。

[0313] 以下呈现mRNA癌症疫苗可治疗的癌症的非限制性清单。肽表位或抗原可源于这些癌或肿瘤的任何抗原。所述表位被称为癌抗原或肿瘤抗原。癌细胞可在肿瘤进展的不同时期期间差异性表达细胞表面分子。举例来说,癌细胞可以良性状态表达细胞表面抗原,但在转移后使那个特定细胞表面抗原下调。因此,设想肿瘤抗原或癌抗原可涵盖在癌症进展的任何阶段期间产生的抗原。可调整本发明方法以适应这些变化。举例来说,可产生用于特定患者的若干不同mRNA疫苗。举例来说,第一疫苗可在治疗开始时使用。在稍后时间点,可产生新的mRNA疫苗,并且向患者施用以虑及所表达的不同抗原。

[0314] 在一些实施方案中,肿瘤抗原是以下抗原中的一者:CD2、CD19、CD20、CD22、CD27、CD33、CD37、CD38、CD40、CD44、CD47、CD52、CD56、CD70、CD79、CD137、4-1BB、5T4、AGS-5、AGS-

16、促血管生成素2 (Angiopoietin 2)、B7.1、B7.2、B7DC、B7H1、B7H2、B7H3、BT-062、BTLA、CAIX、癌胚抗原、CTLA4、Cripto、ED-B、ErbB1、ErbB2、ErbB3、ErbB4、EGFL7、EpCAM、EphA2、EphA3、EphB2、FAP、纤维连接蛋白 (Fibronectin)、叶酸受体、神经节苷脂GM3 (Ganglioside GM3)、GD2、糖皮质激素诱导的肿瘤坏死因子受体 (GITR)、gp100、gpA33、GPNMB、ICOS、IGF1R、整合素 α v (Integrin α v)、整合素 α v β 、LAG-3、Lewis Y、间皮素 (Mesothelin)、c-MET、MN碳酸酐酶IX、MUC1、MUC16、连接素-4 (Nectin-4)、NKGD2、NOTCH、OX40、OX40L、PD-1、PDL1、PSCA、PSMA、RANKL、ROR1、ROR2、SLC44A4、粘蛋白聚糖-1 (Syndecan-1)、TACI、TAG-72、腱生蛋白 (Tenascin)、TIM3、TRAILR1、TRAILR2、VEGFR-1、VEGFR-2、VEGFR-3及其变体。

[0315] 癌症或肿瘤包括但不限于赘瘤、恶性肿瘤、转移癌或特征在于细胞生长不受控制以致它将被视为具有癌性的任何疾病或病症。癌症可为原发性或转移性癌症。可根据本发明治疗的特定癌症包括但不限于下列出的那些 (对于所述病症的综述, 参见Fishman等, 1985, Medicine, 第2版, J.B. Lippincott Co., Philadelphia)。癌症包括但不限于胆道癌; 膀胱癌; 脑癌, 包括胶质母细胞瘤和神经管母细胞瘤; 乳腺癌; 子宫颈癌; 绒毛膜癌; 结肠癌; 子宫内膜癌; 食道癌; 胃癌; 血液学赘瘤, 包括急性淋巴细胞性和骨髓源性白血病; 多发性骨髓瘤; AIDS相关的白血病和成人T细胞白血病淋巴瘤; 上皮内赘瘤, 包括鲍恩氏病 (Bowen's disease) 和佩吉特氏病 (Paget's disease); 肝癌; 肺癌; 淋巴瘤, 包括霍奇金氏病 (Hodgkin's disease) 和淋巴细胞性淋巴瘤; 神经母细胞瘤; 口腔癌, 包括鳞状细胞癌; 卵巢癌, 包括由上皮细胞、基质细胞、生殖细胞和间质细胞引起的那些; 胰腺癌; 前列腺癌; 直肠癌; 肉瘤, 包括平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、脂肉瘤、纤维肉瘤和骨肉瘤; 皮肤癌, 包括黑素瘤、卡波西氏肉瘤 (Kaposi's sarcoma)、基底细胞癌和鳞状细胞癌; 睾丸癌, 包括生发肿瘤, 诸如精原细胞瘤、非精原细胞瘤、畸胎瘤、绒毛膜癌; 基质肿瘤和生殖细胞肿瘤; 甲状腺癌, 包括甲状腺腺癌和髓癌; 以及肾癌, 包括腺癌和威尔姆斯肿瘤 (Wilms' tumor)。通常遭遇的癌症包括乳腺癌、前列腺癌、肺癌、卵巢癌、结肠直肠癌和脑癌。

[0316] 本文提供药物组合物, 其包括癌症RNA疫苗和RNA疫苗组合物和/或复合物, 任选与一种或多种药学上可接受的赋形剂组合。

[0317] 癌症RNA疫苗可单独或与一种或多种其他组分联合配制或施用。举例来说, 癌症RNA疫苗 (疫苗组合物) 可包含包括但不限于佐剂的其他组分。在一些实施方案中, 癌症RNA疫苗不包括佐剂 (它们不含佐剂)。

[0318] 在其他实施方案中, 可使本文所述的mRNA癌症疫苗与适用于治疗患者的任何其他疗法组合。举例来说, 患者可用mRNA癌症疫苗和抗癌剂治疗。因此, 在一个实施方案中, 本发明方法可与一种或多种癌症治疗联合使用, 例如与抗癌剂、传统癌症疫苗、化学疗法、放射疗法等联合使用 (例如同时, 或作为总体治疗程序的一部分)。可变化的癌症治疗参数包括但不限于剂量、施用时机或持续时间或疗法; 并且癌症治疗可在剂量、时机或持续时间方面变化。另一癌症治疗是手术, 其可单独或与任何先前治疗方法组合加以利用。已知适用于或已用于或当前正用于预防或治疗癌症的任何药剂或疗法 (例如传统癌症疫苗、化学疗法、放射疗法、手术、激素疗法和/或生物疗法/免疫疗法) 都可与本文所述的根据本发明的本发明组合物组合使用。医学领域中的普通技术人员可确定适用于受试者的治疗。

[0319] 所述药剂 (即抗癌剂) 的实例包括但不限于DNA相互作用剂, 包括但不限于烷基化剂 (例如氮芥 (nitrogen mustard), 例如苯丁酸氮芥 (Chlorambucil)、环磷酰胺

(Cyclophosphamide)、异环磷酰胺(Isofamide)、二氯甲基二乙胺(Mechlorethamine)、美法仑(Melphalan)、尿嘧啶氮芥(Uracil mustard);氮丙啶(Aziridine),诸如噻替派(Thiotepa);甲烷磺酸酯,诸如白消安(Busulfan);亚硝基脲,诸如卡莫司汀(Carmustine)、洛莫司汀(Lomustine)、链脲霉素(Streptozocin);铂络合物,诸如顺铂(Cisplatin)、卡铂(Carboplatin);生物还原性烷基化剂,诸如丝裂霉素(Mitomycin)以及丙卡巴肼(Procarbazine)、达卡巴嗪(Dacarbazine)和六甲蜜胺(Altretamine));DNA链断裂剂,例如博莱霉素(Bleomycin);嵌入性拓扑异构酶II抑制剂,例如嵌入剂,诸如安吖啶(Amsacrine)、更生霉素(Dactinomycin)、柔红霉素(Daunorubicin)、多柔比星(Doxorubicin)、伊达比星(Idarubicin)、米托蒽醌(Mitoxantrone),以及非嵌入剂,诸如依托泊苷(Etoposide)和替尼泊苷(Teniposide);非嵌入性拓扑异构酶II抑制剂,例如依托泊苷和替尼泊苷;以及DNA小沟结合剂,例如普卡霉素(Plicamycin);抗代谢剂,包括但不限于叶酸拮抗剂,诸如甲氨蝶呤(Methotrexate)和三甲曲沙(trimetrexate);嘧啶拮抗剂,诸如氟尿嘧啶(Fluorouracil)、氟脱氧尿苷(Fluorodeoxyuridine)、CB3717、阿扎胞苷(Azacitidine)和氟尿苷(Floxuridine);嘌呤拮抗剂,诸如巯基嘌呤(Mercaptopurine)、6-硫鸟嘌呤(6-Thioguanine)、喷司他汀(Pentostatin);糖修饰的类似物,诸如阿糖胞苷(Cytarabine)和氟达拉滨(Fludarabine);以及核糖核苷酸还原酶抑制剂,诸如羟基脲(hydroxyurea);微管蛋白(tubulin)相互作用剂,包括但不限于秋水仙素(colchicine)、长春新碱(Vincristine)和长春花碱(Vinblastine)(两者均是生物碱)、以及太平洋紫杉醇(Paclitaxel)和癌得星(cytosan);激素剂,包括但不限于雌激素(estrogen)、缀合雌激素以及乙炔雌二醇(Ethinyl Estradiol)和己烯雌酚(Diethylstilbesterol)、氯烯雌醚(Chlortrianisene)和双烯雌酚(Idenestrol);孕激素(progestin),诸如己酸羟孕酮(Hydroxyprogesterone caproate)、甲孕酮(Medroxyprogesterone)和甲地孕酮(Megestrol);以及雄激素(androgen),诸如睾酮(testosterone)、丙酸睾酮(testosterone propionate);氟羟甲睾酮(flouxymesterone)、甲基睾酮(methyltestosterone);肾上腺皮质类固醇,例如泼尼松(Prednisone)、地塞米松(Dexamethasone)、甲基泼尼松龙(Methylprednisolone)和泼尼松龙(Prednisolone);促黄体生成激素释放激素剂或促性腺激素释放激素拮抗剂,例如乙酸亮丙瑞林(leuprolide acetate)和乙酸戈舍瑞林(goserelin acetate);抗激素抗原,包括但不限于抗雌激素剂诸如他莫昔芬(Tamoxifen)、抗雄激素剂诸如氟他胺(Flutamide);以及抗肾上腺剂,诸如米托坦(Mitotane)和胺鲁米特(Aminoglutethimide);细胞因子,包括但不限于IL-1 α 、IL-1 β 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-18、TGF- β 、GM-CSF、M-CSF、G-CSF、TNF- α 、TNF- β 、LAF、TCGF、BCGF、TRF、BAF、BDG、MP、LIF、OSM、TMF、PDGF、IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ 和子宫球蛋白(Uteroglobulin)(美国专利号5,696,092);抗血管生成剂,包括但不限于抑制VEGF的药剂(例如其他中和抗体)、可溶性受体构建体、酪氨酸激酶抑制剂、反义策略、针对VEGF或VEGF受体的RNA适体和核酶、免疫毒素和共凝集配体、肿瘤疫苗和抗体。

[0320] 可根据本发明的方法使用的抗癌剂的特定实例包括但不限于:阿西维辛(acivicin);阿柔比星(aclarubicin);盐酸阿考达唑(acodazole hydrochloride);阿克罗宁(acronine);阿多来新(adozelesin);阿地白介素(aldelesleukin);六甲蜜胺(altretamine);安波霉素(ambomycin);乙酸阿美蒽醌(ametrantrone acetate);胺鲁米特

(aminogluthethimide); 安吖啶 (amsacrine); 阿那曲唑 (anastrozole); 安曲霉素 (anthramycin); 天冬酰胺酶 (asparaginase); 曲林菌素 (asperlin); 阿扎胞苷 (azacitidine); 阿替派 (azetepa); 阿佐霉素 (azotomycin); 巴马司他 (batimastat); 苯佐替派 (benzodepa); 比卡鲁胺 (bicalutamide); 盐酸比生群 (bisantrene hydrochloride); 二甲磺酸双奈法德 (bisnafide dimesylate); 比折来新 (bizelesin); 硫酸博莱霉素 (bleomycin sulfate); 布喹那钠 (brequinar sodium); 溴匹立明 (bropirimine); 白消安 (busulfan); 放线菌素C (cactinomycin); 二甲睾酮 (calusterone); 卡醋酸 (caracemide); 卡贝替姆 (carbetimer); 卡铂 (carboplatin); 卡莫司汀 (carmustine); 盐酸卡柔比星 (carubicin hydrochloride); 卡折来新 (carzelesin); 西地芬戈 (cedefingol); 苯丁酸氮芥 (chlorambucil); 西罗霉素 (cirolemycin); 顺铂 (cisplatin); 克拉屈滨 (cladribine); 甲磺酸克立那托 (crisnatol mesylate); 环磷酰胺 (cyclophosphamide); 阿糖胞苷 (cytarabine); 达卡巴嗪 (dacarbazine); 更生霉素 (dactinomycin); 盐酸柔红霉素 (daunorubicin hydrochloride); 地西他滨 (decitabine); 右奥马铂 (dexormaplatin); 地扎胍宁 (dezaguanine); 甲磺酸地扎胍宁 (dezaguanine mesylate); 地吖醌 (diaziquone); 多西他赛 (docetaxel); 多柔比星 (doxorubicin); 盐酸多柔比星 (doxorubicin hydrochloride); 屈洛昔芬 (droloxifene); 柠檬酸屈洛昔芬 (droloxifene citrate); 丙酸屈他雄酮 (dromostanolone propionate); 达佐霉素 (duazomycin); 依达曲沙 (edatrexate); 盐酸依氟鸟氨酸 (eflomithine hydrochloride); 依沙芦星 (elsamitrucin); 恩洛铂 (enloplatin); 恩普氨酯 (enpromate); 依匹哌啶 (epipropidine); 盐酸表柔比星 (epirubicin hydrochloride); 厄布洛唑 (erbulozole); 盐酸依索比星 (esorubicin hydrochloride); 雌氮芥 (estramustine); 雌氮芥磷酸钠 (estramustine phosphate sodium); 依他硝唑 (etanidazole); 依托泊苷 (etoposide); 磷酸依托泊苷 (etoposide phosphate); 氯苯乙嘧啶 (etoprine); 盐酸法倔唑 (fadrozole hydrochloride); 法扎拉滨 (fazarabine); 芬维A胺 (fenretinide); 氟尿苷 (floxuridine); 磷酸氟达拉滨 (fludarabine phosphate); 氟尿嘧啶 (fluorouracil); 氟西他滨 (flurocitabine); 磷喹酮 (fosquidone); 福司曲星钠 (fostriccin sodium); 吉西他滨 (gemcitabine); 盐酸吉西他滨 (gemcitabine hydrochloride); 羟基脲 (hydroxyurea); 盐酸伊达比星 (idarubicin hydrochloride); 异环磷酰胺 (ifosfamide); 依莫佛新 (ilmofosine); 白介素II (包括重组白介素II或rIL2)、干扰素 α -2a (interferon alpha-2a); 干扰素 α -2b; 干扰素 α -n1; 干扰素 α -n3; 干扰素 β -I a; 干扰素 γ -I β ; 异丙铂 (iproplatin); 盐酸伊立替康 (irinotecan hydrochloride); 乙酸兰瑞肽 (lanreotide acetate); 来曲唑 (letrozole); 乙酸亮丙瑞林 (leuprolide acetate); 盐酸利阿唑 (liarozole hydrochloride); 洛美曲索钠 (lometrexol sodium); 洛莫司汀 (lomustine); 盐酸洛索萘醌 (losoxantrone hydrochloride); 马丙考 (masoprocol); 美登素 (maytansine); 盐酸二氯甲基二乙胺 (mechlorethamine hydrochloride); 乙酸甲地孕酮 (megestrol acetate); 乙酸美仑孕酮 (melengestrol acetate); 美法仑 (melphalan); 美诺立尔 (menogaril); 巯基嘌呤 (mercaptopurine); 甲氨蝶呤 (methotrexate); 甲氨蝶呤钠 (methotrexate sodium); 氯苯氨啶 (metoprime); 美乌替派 (meturedepa); 米丁度胺 (mitindomide); 米托克星 (mitocarcin); 丝裂红素 (mitocromin); 丝裂吉霉素

(mitogillin);丝裂马菌素(mitomalcin);丝裂霉素(mitomycin);米托司培(mitosper);米托坦(mitotane);盐酸米托蒽醌(mitoxantrone hydrochloride);霉酚酸(mycophenolic acid);诺考达唑(nocodazole);诺加霉素(nogalamycin);奥马铂(ormaplatin);亚磺酰吡啶(oxisuran);太平洋紫杉醇(paclitaxel);培加帕酶(pegaspargase);佩里霉素(peliomycin);戊氮芥(pentamustine);硫酸培洛霉素(peplomycin sulfate);培磷酰胺(perfosfamide);哌泊溴烷(pipobroman);保释芬(piposulfan);盐酸吡罗蒽醌(piroxantrone hydrochloride);光神霉素(plicamycin);普洛美坦(plomestane);卟吩姆钠(porfimer sodium);波福霉素(porfiromycin);松龙苯芥(prednimustine);盐酸丙卡巴肼(procarbazine hydrochloride);嘌呤霉素(puromycin);盐酸嘌呤霉素(puromycin hydrochloride);吡唑呋喃菌素(pyrazofurin);利波腺苷(riboprime);洛太米特(roglitimide);沙芬戈(safingol);盐酸沙芬戈(safingol hydrochloride);司莫司汀(semustine);辛曲秦(simtrazene);磷乙酰天冬氨酸钠(sparfosate sodium);稀疏霉素(sparsomycin);盐酸螺旋锗(spirogermanium hydrochloride);螺莫司汀(spiromustine);螺铂(spiroplatin);链黑菌素(streptonigrin);链脲霉素(streptozocin);磺氯苯脲(sulofenur);他利霉素(talisomycin);替可加兰钠(tecogalan sodium);替加氟(tegafur);盐酸替洛蒽醌(teloxantrone hydrochloride);替莫泊芬(temoporfin);替尼泊苷(teniposide);替罗昔隆(teroxirone);睾内酯(testolactone);硫咪嘌呤(thiamiprine);硫鸟嘌呤(thioguanine);噻替派(thiotepa);噻唑呋林(tiazofurin);替拉扎明(tirapazamine);柠檬酸托瑞米芬(toremifene citrate);乙酸曲托龙(trestolone acetate);磷酸曲西立滨(triciribine phosphate);三甲曲沙(trimetrexate);葡萄糖醛酸三甲曲沙(trimetrexate glucuronate);曲普瑞林(triptorelin);盐酸妥布氯唑(tubulazole hydrochloride);尿嘧啶氮芥(uracil mustard);乌瑞替派(uredepa);伐普肽(vapreotide);维替泊芬(verteporfin);硫酸长春花碱(vinblastine sulfate);硫酸长春新碱(vincristine sulfate);长春地辛(vindesine);硫酸长春地辛(vindesine sulfate);硫酸长春匹定(vinepidine sulfate);硫酸长春甘酯(vinglycinate sulfate);硫酸长春罗辛(vinleurosine sulfate);酒石酸长春瑞滨(vinorelbine tartrate);硫酸长春罗定(vinrosidine sulfate);硫酸长春利定(vinzolidine sulfate);伏氯唑(vorozole);折尼铂(zeniplatin);净司他汀(zinostatin);以及盐酸佐柔比星(zorubicin hydrochloride)。

[0321] 其他抗癌药物包括但不限于:20-表-1,25二羟基维生素D3;5-乙炔基尿嘧啶;血管生成抑制剂;抗背侧化形态发生蛋白-1;ara-CDP-DL-PTBA;BCR/ABL拮抗剂;CaRest M3;CARN 700;酪蛋白激酶抑制剂(ICOS);克霉唑(clotrimazole);碰撞霉素A(collismycin A);碰撞霉素B;考布他汀A4(combretastatin A4);甘蓝海绵素816(crambescidin 816);念珠藻素8(cryptophycin 8);库瑞辛A(curacin A);脱氢膜海鞘素B(dehydrodidemnin B);膜海鞘素B(didemnin B);二氢-5-氮杂胞苷(dihydro-5-azacytidine);二氢紫杉醇(dihydrotaxol);倍癌霉素SA(duocarmycin SA);卡哈拉肽F(kahalalide F);三乙酸片螺素-N(lamellarin-N triacetate);亮脯利特(leuprolide)+雌激素(estrogen)+孕酮(progesterone);利索纳得7(lissoclinamide 7);单磷酰基脂质A+分枝杆菌细胞壁sk;N-乙酰基地那林(N-acetyldinaline);N-取代的苯甲酰胺;06-苯甲基鸟嘌呤;普拉色汀A

(placetin A); 普拉色汀B; 铂络合物; 铂化合物; 铂-三胺络合物; 依替膦酸铼Re 186 (rhenium Re 186etidronate); RII维甲酰胺 (RII retinamide); 鲁比津酮B 1 (rubiginone B 1); SarCNU; 肌肉叶绿醇A (sarcophytol A); 沙莫司亭 (sargramostim); 衰老源性抑制剂1; 斯卡霉素D (spicamycin D); 他莫司汀 (tallimustine); 5-氟尿嘧啶; 血小板生成素 (thrombopoietin); 胸腺曲南 (thymotrinan); 甲状腺刺激激素; 瓦立奥林B (variolin B); 沙利度胺 (thalidomide); 维拉雷琐 (velaresol); 藜芦明 (veramine); 瓦尔丁 (verdins); 维替泊芬 (verteporfin); 长春瑞滨 (vinorelbine); 威科萨汀 (vinxaltine); 维塔辛 (vitaxin); 扎诺特隆 (zanoterone); 折尼铂 (zeniplatin); 以及亚苡维C (zilascorb)。

[0322] 本发明也涵盖与包括使用x射线、 γ 射线和其他放射源来破坏癌细胞的放射疗法组合施用包含mRNA癌症疫苗的组合物。在优选实施方案中,放射治疗以外部射束放射或远距疗法形式施用,其中放射从远距离源头加以引导。在其他优选实施方案中,放射治疗以内部疗法或近距疗法形式施用,其中将放射源接近于癌细胞或肿瘤团块来放置在身体内部。

[0323] 在特定实施方案中,视癌症类型而定来选择适当抗癌方案。举例来说,可与防治或治疗有效量的一种或多种适用于卵巢癌治疗的其他药剂组合向患有卵巢癌的患者施用防治或治疗有效量的包含mRNA癌症疫苗的组合物,所述药剂包括但不限于腹膜内放射疗法诸如P32疗法、总体腹部和骨盆放射疗法、顺铂、太平洋紫杉醇 (紫杉醇) 或多西他赛 (泰索帝 (Taxotere)) 和顺铂或卡铂的组合、环磷酰胺和顺铂的组合、环磷酰胺和卡铂的组合、5-FU和甲酰四氢叶酸 (leucovorin) 的组合、依托泊苷、脂质体多柔比星、吉西他滨或拓扑替康 (topotecan)。癌症疗法和它们的剂量、施用途径和推荐用法在本领域中是已知的,并且已描述于诸如Physician's Desk Reference (第56版,2002) 的文献中。

[0324] 在本发明的一些优选实施方案中,将mRNA癌症疫苗与诸如是免疫检查点调节剂的T细胞活化剂一起施用。免疫检查点调节剂包括刺激性检查点分子与抑制性检查点分子两者,即抗CTLA4抗体和抗PD1抗体。

[0325] 刺激性检查点抑制剂通过促进检查点过程来起作用。若干刺激性检查点分子是肿瘤坏死因子 (TNF) 受体超家族的成员-CD27、CD40、OX40、GITR和CD137,而其他属于B7-CD28超家族-CD28和ICOS。OX40 (CD134) 涉及于效应T细胞和记忆T细胞的扩增中。已显示抗OX40单克隆抗体有效治疗晚期癌症。MEDI0562是一种人源化OX40激动剂。糖皮质激素诱导的TNFR家族相关基因GITR涉及于T细胞扩增中。已显示针对GITR的若干抗体促进抗肿瘤应答。诱导性T细胞共刺激物ICOS在T细胞效应物功能方面是重要的。CD27支持原初T细胞的抗原特异性扩增,并且涉及于T细胞和B细胞记忆的产生中。若干激动性抗CD27抗体处于开发中。CD122是白介素-2受体 β 亚单位。NKTR-214是CD122偏倚的免疫刺激性细胞因子。

[0326] 抑制性检查点分子包括但不限于PD-1、TIM-3、VISTA、A2AR、B7-H3、B7-H4、BTLA、CTLA-4、IDO、KIR和LAG3。CTLA-4、PD-1和它的配体是遍及T细胞功能和其他细胞功能的所有阶段起重要作用的共同信号传导分子的CD28-B7家族的成员。细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4CTLA-4 (CD152) 涉及于控制T细胞增殖中。

[0327] PD-1受体在活化的T细胞 (和B细胞) 的表面上表达,并且在正常情况下结合它的在诸如树突细胞或巨噬细胞的抗原呈递细胞的表面上表达的配体 (PD-L1和PD-L2)。这个相互作用将信号传送到T细胞中,并且抑制T细胞。癌细胞通过驱动在它们的表面上高水平表达PD-L1来利用这个系统。这使它们获得对PD-1路径的控制,并且切断可进入肿瘤微环境中的

表达PD-1的T细胞,由此抑制抗癌免疫应答。帕母单抗(Pembrolizumab)(先前是MK-3475和兰罗利珠单抗(lambrolizumab),商品名称是齐求达(Keytruda))是一种用于癌症免疫疗法中的人抗体。它靶向PD-1受体。

[0328] 吡啶胺2,3-双加氧酶IDO是一种色氨酸分解代谢酶,其抑制T细胞和NK细胞,产生并活化Treg和骨髓源性抑制细胞,并且促进肿瘤血管生成。T细胞免疫球蛋白结构域和粘蛋白(Mucin)结构域3TIM-3通过在与它的配体半乳糖凝集素-9(galectin-9)相互作用后触发细胞死亡来充当Th1/Tc1功能的负性调控剂。VISTA是T细胞活化的V结构域Ig抑制剂。

[0329] 检查点抑制剂是诸如单克隆抗体、人源化抗体、完全人抗体、融合蛋白或其组合或小分子的分子。举例来说,检查点抑制剂抑制可为CTLA-4、PDL1、PDL2、PD1、B7-H3、B7-H4、BTLA、HVEM、TIM3、GAL9、LAG3、VISTA、KIR、2B4、CD160、CGEN-15049、CHK 1、CHK2、A2aR、B-7家族配体或其组合的检查点蛋白。检查点蛋白的配体包括但不限于CTLA-4、PDL1、PDL2、PD1、B7-H3、B7-H4、BTLA、HVEM、TIM3、GAL9、LAG3、VISTA、KIR、2V4、CD160、CGEN-15049、CHK 1、CHK2、A2aR和B-7家族配体。在一些实施方案中,抗PD-1抗体是BMS-936558(尼鲁单抗)。在其他实施方案中,抗CTLA-4抗体是易普利单抗(商品名称是叶沃(Yervoy),先前称为MDX-010和MDX-101)。

[0330] 在一些优选实施方案中,包括检查点调节剂的癌症治疗剂以编码癌症治疗剂例如PD1抗体、细胞因子、趋化因子或刺激性受体/配体(例如OX40)的mRNA形式递送。

[0331] 在一些实施方案中,癌症治疗剂是靶向疗法。靶向疗法可为BRAF抑制剂诸如威罗菲尼(PLX4032)或达拉菲尼。BRAF抑制剂可为PLX 4032、PLX 4720、PLX 4734、GDC-0879、PLX 4032、PLX-4720、PLX 4734和甲苯磺酸索拉非尼(Sorafenib Tosylate)。BRAF是产生称为B-Raf的蛋白质的人基因,也被称为原致癌基因B-Raf和v-Raf鼠肉瘤病毒致癌基因同源物B1。B-Raf蛋白涉及于在细胞内部传送信号中,所述信号涉及于指导细胞生长。BRAF抑制剂威罗菲尼由FDA核准用于治疗晚期黑素瘤。

[0332] 在其他实施方案中,T细胞治疗剂是OX40L。OX40是肿瘤坏死因子/神经生长因子受体(TNFR/NGFR)家族的成员。OX40可在T细胞活化以及对正常和恶性淋巴细胞的分化、增殖或凋亡的调控方面起作用。

[0333] 在其他实施方案中,癌症治疗剂是细胞因子。在其他实施方案中,癌症治疗剂是包含基于群体的肿瘤特异性抗原的疫苗。

[0334] 在其他实施方案中,癌症治疗剂是含有一种或多种由癌种系基因表达的传统抗原(为见于多个患者中的肿瘤所共有的抗原,也被称为“共有癌抗原”)的疫苗。在一些实施方案中,传统抗原是已知普遍见于癌或肿瘤中或见于特定类型的癌或肿瘤中的抗原。在一些实施方案中,传统癌抗原是非突变肿瘤抗原。在一些实施方案中,传统癌抗原是突变肿瘤抗原。

[0335] 在人癌症的情况下,相比于任何其他基因,p53基因(官方符号TP53)更频繁突变。大量群组研究已显示对于大多数p53突变,基因组位置为一名患者或仅少许患者所特有,并且突变不能用作被设计用于特定患者群体的治疗性疫苗的频发新抗原。然而,p53基因座的小型子组确实展现“热点”样式,其中基因中的若干位置以相对较高频率被突变。引人注目的是,这些频发突变区域中的大部分发生在外显子-内含子边界附近,从而破坏由mRNA剪接机构识别的典型核苷酸序列基序(图16)。剪接基序的突变可改变最终mRNA序列,即使预测

局部氨基酸序列无变化(即对于同义或内含子突变来说)。因此,这些突变常常由常见注释工具注释为“非编码”,并且被忽略用于进一步分析,即使它们可以不可预测方式改变mRNA剪接,并且对翻译蛋白质施加严重功能性影响。如果选择性剪接同种型产生同框序列变化(即不产生提前终止密码子(PTC)),那么它可逃脱由无义介导的mRNA降解(NMD)进行的耗竭,并且易于表达,加工,以及由HLA系统呈递在细胞表面上。此外,突变源性选择性剪接通常是“隐蔽的”,即不在正常组织中表达,因此可由T细胞识别为非自身新抗原。

[0336] 在一些情况下,癌症治疗剂是包括一种或多种作为频发多态性(“热点突变”)的新抗原的疫苗。举例来说,本发明尤其提供由p53中的某些频发体细胞癌突变产生的新抗原肽序列。产生新抗原肽和HLA限定的表位的示例性突变和mRNA剪接事件包括但不限于图17中描绘的那些以及以下突变:

[0337] (1)在典型5'剪接位点邻近密码子p.T125处的突变,从而诱导具有肽序列TAKSVTCTVSCPEGLASMRLQCLAVSPCISFVWNFGIPLHPLASCQCFFIVYPLNV(SEQ ID NO:1)的保留内含子,所述序列含有表位AVSPCISFVW(SEQ ID NO:2)(HLA-B*57:01,HLA-B*58:01)、HPLASCQCFF(SEQ ID NO:3)(HLA-B*35:01,HLA-B*53:01)、FVWNFGIPL(SEQ ID NO:4)(HLA-A*02:01,HLA-A*02:06,HLA-B*35:01);

[0338] (2)在典型5'剪接位点邻近密码子p.331处的突变,从而诱导具有肽序列EYFTLQVLSLGTSYQVESFQSNTQNAVFFLTVLPAIGAFAIRGQ(SEQ ID NO:5)的保留内含子,所述序列含有表位LQVLSLGTSY(SEQ ID NO:6)(HLA-B*15:01)、FQSNTQNAV(SEQ ID NO:7)(HLA-B*15:01);

[0339] (3)在典型3'剪接位点邻近密码子p.126处的突变,从而诱导隐蔽选择性外显子3'剪接位点,其产生含有表位CTMFCQLAK(SEQ ID NO:9)(HLA-A*11:01)、KSVTCTMF(SEQ ID NO:10)(HLA-B*58:01)的新型跨越肽序列AKSVTCTMFCQLAK(SEQ ID NO:8);和/或

[0340] (4)在典型5'剪接位点邻近密码子p.224处的突变,从而诱导隐蔽选择性内含子5'剪接位点,其产生含有表位VPYEPPEVW(SEQ ID NO:12)(HLA-B*53:01,HLA-B*51:01)、LTVPPSTAW(SEQ ID NO:13)(HLA-B*58:01,HLA-B*57:01)的新型跨越肽序列VPYEPPEVWLALTVPSTAWAA(SEQ ID NO:11),

[0341] 其中转录物密码子位置涉及来自Ensembl v83人基因组注释的典型全长p53转录物ENST00000269305(SEQ ID NO:14)。

[0342] 在一个实施方案中,本发明提供一种包含编码开放阅读框(ORF)的mRNA的癌症治疗性疫苗,所述开放阅读框编码新抗原肽(1)至(4)中的一者或多者。在一个实施方案中,本发明提供基于患者的肿瘤含有任何以上突变来选择性施用含有或编码肽(1)-(4)中的一者或多者的疫苗。在一个实施方案中,本发明提供基于以下双重准则来选择性施用疫苗:受试者的肿瘤含有任何以上突变以及受试者的正常HLA类型含有被预测会结合所得新抗原的相应HLA等位基因。

[0343] 在一些实施方案中,癌症治疗性疫苗包含一种或多种编码一种或多种频发多态性的mRNA。在一些实施方案中,癌症治疗性疫苗包含一种或多种编码一种或多种患者特异性新抗原的mRNA。在一些实施方案中,癌症治疗性疫苗包含一种或多种编码免疫检查点调节剂的mRNA。一种或多种频发多态性、一种或多种患者特异性新抗原和/或一种或多种免疫检查点调节剂可以任何方式加以组合。举例来说,对于一种或多种多联构建体,可合乎需要的是将一种或多种频发多态性、一种或多种患者特异性新抗原和/或一种或多种免疫检查点

调节剂编码成一体。在其他情况下,对于一种或多种频发多态性,一种或多种患者特异性新抗原和/或一种或多种免疫检查点调节剂,可合乎需要的是由单独mRNA构建体编码。应了解一种或多种频发多态性、一种或多种患者特异性新抗原和/或一种或多种免疫检查点调节剂可并行施用,或可依序施用。

[0344] 可使mRNA癌症疫苗和抗癌治疗组合以使免疫治疗响应甚至进一步增强。mRNA癌症疫苗和其他治疗剂可同时或依序施用。当同时施用其他治疗剂时,它们可于同一制剂中加以施用,或处于单独制剂中,但在同时加以施用。当其他治疗剂的施用和mRNA癌症疫苗的施用在时间上分隔时,其他治疗剂彼此以及与mRNA癌症疫苗依序施用。施用这些化合物之间的时间间隔可为大约数分钟,或它可更久,例如数小时、数天、数周、数月。举例来说,在一些实施方案中,施用这些化合物之间的时间间隔是1小时、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、8小时、12小时、24小时或更久。在一些实施方案中,施用这些化合物之间的时间间隔是2天、3天、4天、5天、6天或7天或更久。在一些实施方案中,mRNA癌症疫苗在抗癌治疗之前施用。在一些实施方案中,mRNA癌症疫苗在抗癌治疗之后施用。

[0345] 其他治疗剂包括但不限于抗癌治疗、佐剂、细胞因子、抗体、抗原等。

[0346] RNA疫苗可与一种或多种药学上可接受的赋形剂组合配制或施用。在一些实施方案中,疫苗组合物包含至少一种额外活性物质,诸如像治疗活性物质、防治活性物质或两者组合。疫苗组合物可为无菌的,无热原的,或无菌且无热原。在配制和/或制造药物制剂诸如疫苗组合物时的一般考虑事项可例如见于Remington:The Science and Practice of Pharmacy第21版,Lippincott Williams&Wilkins,2005(以引用的方式整体并入本文)中。

[0347] 在一些实施方案中,向人、人患者或受试者施用癌症RNA疫苗。出于本公开的目的,短语“活性成分”通常是指RNA疫苗或其中含有的多核苷酸,例如编码抗原性多肽的RNA多核苷酸(例如mRNA多核苷酸)。

[0348] 可通过药理学领域中已知或今后开发的任何方法制备本文所述的疫苗组合物的制剂。一般来说,所述制备方法包括以下步骤:使活性成分(例如mRNA多核苷酸)与赋形剂和/或一种或多种其他辅助成分缔合,接着如果必要和/或合乎需要,那么将产品划分、成形和/或包装成所需单次或多次剂量单位。

[0349] 可使用一种或多种赋形剂配制癌症RNA疫苗以:(1)使稳定性增加;(2)使细胞转染增加;(3)容许持续或延迟释放(例如从储槽制剂释放);(4)改变生物分布(例如靶向特定组织或细胞类型);(5)使所编码蛋白质在体内的翻译增加;和/或(6)改变所编码蛋白质(抗原)在体内的释放概况。除传统赋形剂诸如任何和所有溶剂、分散介质、稀释剂或其他液体媒介物、分散或混悬助剂、表面活性剂、等张剂、增稠剂或乳化剂、防腐剂之外,赋形剂也可包括但不限于类脂质、脂质体、脂质纳米粒子、聚合物、脂质复合物、核心-壳体纳米粒子、肽、蛋白质、用癌症RNA疫苗转染的细胞(例如用于向受试者中移植)、透明质酸酶、纳米粒子模拟物及其组合。

[0350] 稳定元件

[0351] 已发现天然存在的真核mRNA分子含有稳定元件,除其他结构特征诸如5'帽结构或3'聚腺苷酸尾部之外,也包括但不限于在它们的5'末端的非翻译区(UTR)(5'UTR)和/或在它们的3'末端的非翻译区(3'UTR)。5'UTR与3'UTR两者均通常从基因组DNA转录,并且是成熟前mRNA的元件。成熟mRNA的特征性结构特征诸如5'帽和3'聚腺苷酸尾部通常在mRNA加工

期间添加至转录的(成熟前)mRNA中。3'聚腺苷酸尾部通常是一段添加至转录的mRNA的3'末端的腺嘌呤核苷酸。它可包含多达约400个腺嘌呤核苷酸。在一些实施方案中,3'聚腺苷酸尾部的长度可为对于个体mRNA的稳定性来说所必需的要素。

[0352] 在一些实施方案中,RNA疫苗可包括一种或多种稳定元件。稳定元件可包括例如组蛋白茎-环。已鉴定作为32kDa蛋白质的茎-环结合蛋白(SLBP)。它在核与细胞质两者中在组蛋白信息的3'末端与组蛋白茎-环缔合。它的表达水平由细胞周期调控;它在S期期间达到峰值,此时组蛋白mRNA水平也升高。已显示所述蛋白质为由U7 snRNP对组蛋白前mRNA进行高效3'末端加工所必需。在加工之后,SLBP继续与茎-环缔合,接着在细胞质中刺激成熟组蛋白mRNA翻译成组蛋白。SLBP的RNA结合结构域遍及后生动物和原生动物是保守的;它与组蛋白茎-环的结合取决于环的结构。最小结合位点包括相对于茎-环在5'的至少三个核苷酸和在3'的两个核苷酸。

[0353] 在一些实施方案中,RNA疫苗包括编码区、至少一个组蛋白茎-环,以及任选地,聚腺苷酸序列或聚腺苷酸化信号。聚腺苷酸序列或聚腺苷酸化信号通常应使所编码蛋白质的表达水平增强。在一些实施方案中,所编码蛋白质不是组蛋白、报告体蛋白(例如荧光素酶、GFP、EGFP、 β -半乳糖苷酶、EGFP)或标志物或选择蛋白(例如 α -球蛋白、半乳糖激酶和黄嘌呤:鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶(GPT))。

[0354] 在一些实施方案中,尽管两者均代表自然界中的替代性机理,但聚腺苷酸序列或聚腺苷酸化信号和至少一个组蛋白茎-环的组合以协同方式作用以增加蛋白质表达,超过单独元件各自观察到的水平。已发现聚腺苷酸和至少一个组蛋白茎-环的组合的协同作用不取决于元件的顺序或聚腺苷酸序列的长度。

[0355] 在一些实施方案中,RNA疫苗不包含组蛋白下游元件(HDE)。“组蛋白下游元件”(HDE)包括在天然存在的茎-环的3'的一段具有约15至20个核苷酸的富含嘌呤的多核苷酸,其代表参与将组蛋白前mRNA加工成成熟组蛋白mRNA中的U7 snRNA的结合位点。理想地,本发明核酸不包括内含子。

[0356] 在一些实施方案中,RNA疫苗可或可不含有增强子和/或启动子序列,其可以是修饰的或未修饰的,或其可以是活化的或未活化的。在一些实施方案中,组蛋白茎-环通常源于组蛋白基因,并且包括以由短序列组成的间隔子分隔的两个相邻的、部分或完全反向互补序列的分子内碱基配对,所述间隔子形成结构的环。未配对的环区域通常不能与茎环元件中的任一者进行碱基配对。它更经常存在于RNA中,正如是许多RNA二级结构的关键组分那样,但也可存在于单链DNA中。茎-环结构的稳定性通常取决于配对区域的长度、错配或突起数目和碱基组成。在一些实施方案中,可产生摇摆碱基配对(非沃森-克里克(Watson-Crick)碱基配对)。在一些实施方案中,至少一个组蛋白茎-环序列包含15至45个核苷酸的长度。

[0357] 在其他实施方案中,RNA疫苗可已移除一个或多个富含AU的序列。有时被称为AURES的这些序列是见于3' UTR中的去稳定序列。可将AURES从RNA疫苗移除。或者,AURES可保持在RNA疫苗中。

[0358] 纳米粒子制剂

[0359] 在一些实施方案中,在纳米粒子中配制癌症RNA疫苗。在一些实施方案中,在脂质纳米粒子中配制癌症RNA疫苗。在一些实施方案中,在被称为阳离子脂质纳米粒子的脂质-

聚阳离子复合物中配制癌症RNA疫苗。脂质纳米粒子的形成可通过本领域中已知和/或如美国公布号20120178702中所述的方法来实现,所述公布以引用的方式整体并入本文。作为一非限制性实例,聚阳离子可包括阳离子肽或多肽,诸如但不限于聚赖氨酸、聚鸟氨酸和/或聚精氨酸以及国际公布号W02012013326或美国专利公布号US20130142818中所述的阳离子肽;所述公布各自以引用的方式整体并入本文。在一些实施方案中,在包括非阳离子脂质诸如但不限于胆固醇或二油酰基磷脂酰乙醇胺(DOPE)的脂质纳米粒子中配制癌症RNA疫苗。

[0360] 脂质纳米粒子制剂可受但不限于以下的影响:对阳离子脂质组分的选择、阳离子脂质饱和的程度、聚乙二醇化的性质、所有组分的比率和诸如尺寸的生物物理学参数。在Semple等(Nature Biotech.2010 28:172-176;其以引用的方式整体并入本文)的一个实例中,脂质纳米粒子制剂由57.1%阳离子脂质、7.1%二棕榈酰基磷脂酰胆碱、34.3%胆固醇和1.4%PEG-c-DMA组成。作为另一实例,改变阳离子脂质的组成可将siRNA更有效递送至各种抗原呈递细胞(Basha等Mol Ther.2011 19:2186-2200;其以引用的方式整体并入本文)。

[0361] 在一些实施方案中,脂质纳米粒子制剂可包含35至45%阳离子脂质、40%至50%阳离子脂质、50%至60%阳离子脂质和/或55%至65%阳离子脂质。在一些实施方案中,在脂质纳米粒子中,脂质与RNA(例如mRNA)的比率可为5:1至20:1、10:1至25:1、15:1至30:1和/或至少30:1。

[0362] 在一些实施方案中,可使脂质纳米粒子制剂中的PEG的比率增加或降低,和/或可将PEG脂质的碳链长度从C14改进至C18以改变脂质纳米粒子制剂的药物动力学和/或生物分布。作为一非限制性实例,脂质纳米粒子制剂可含有相较于阳离子脂质、DSPC和胆固醇,0.5%至3.0%、1.0%至3.5%、1.5%至4.0%、2.0%至4.5%、2.5%至5.0%和/或3.0%至6.0%的脂质摩尔比的PEG-c-DOMG(R-3-[(ω -甲氧基-聚(乙二醇)2000)氨基甲酰基])-1,2-二肉豆蔻基氧基丙基-3-胺)(在本文中也称为PEG-DOMG)。在一些实施方案中,PEG-c-DOMG可用PEG脂质诸如但不限于PEG-DSG(1,2-二硬脂酰基-sn-甘油,甲氧基聚乙二醇)、PEG-DMG(1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油)和/或PEG-DPG(1,2-二棕榈酰基-sn-甘油,甲氧基聚乙二醇)替换。阳离子脂质可选自本领域中已知的任何脂质,诸如但不限于DLin-MC3-DMA、DLin-DMA、C12-200和DLin-KC2-DMA。

[0363] 在一些实施方案中,癌症RNA疫苗制剂是包含至少一种脂质的纳米粒子。脂质可选自但不限于DLin-DMA、DLin-K-DMA、98N12-5、C12-200、DLin-MC3-DMA、DLin-KC2-DMA、DODMA、PLGA、PEG、PEG-DMG、聚乙二醇化脂质和氨基醇脂质。在一些实施方案中,脂质可为阳离子脂质,诸如但不限于DLin-DMA、DLin-D-DMA、DLin-MC3-DMA、DLin-KC2-DMA、DODMA和氨基醇脂质。氨基醇阳离子脂质可为美国专利公布号US20130150625中所述和/或通过美国专利公布号US20130150625中所述的方法制备的脂质,所述专利以引用的方式整体并入本文。作为一非限制性实例,阳离子脂质可为2-氨基-3-[(9Z,12Z)-十八-9,12-二烯-1-基氧基]-2-[[(9Z,2Z)-十八-9,12-二烯-1-基氧基]甲基]丙-1-醇(US20130150625中的化合物1);2-氨基-3-[(9Z)-十八-9-烯-1-基氧基]-2-[[(9Z)-十八-9-烯-1-基氧基]甲基]丙-1-醇(US20130150625中的化合物2);2-氨基-3-[(9Z,12Z)-十八-9,12-二烯-1-基氧基]-2-[(辛基氧基)甲基]丙-1-醇(US20130150625中的化合物3);和2-(二甲基氨基)-3-[(9Z,12Z)-十八-9,12-二烯-1-基氧基]-2-[[(9Z,12Z)-十八-9,12-二烯-1-基氧基]甲基]丙-1-醇(US20130150625中的化合物4);或其任何药学上可接受的盐或立体异构体。

[0364] 脂质纳米粒子制剂通常包含脂质,特别是可离子化阳离子脂质,例如2,2-二亚油基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧杂环戊烷(DLin-KC2-DMA)、二亚油基-甲基-4-二甲基氨基丁酸酯(DLin-MC3-DMA)或9-((4-(二甲基氨基)丁酰基)氧基)十七烷二酸二((Z)-壬-2-烯-1-基)酯(L319),并且进一步包含中性脂质、固醇和能够减少粒子聚集的分子例如PEG或经PEG修饰的脂质。

[0365] 在一些实施方案中,脂质纳米粒子制剂基本上由以下组成:(i)至少一种选自由以下组成的组的脂质:2,2-二亚油基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧杂环戊烷(DLin-KC2-DMA)、二亚油基-甲基-4-二甲基氨基丁酸酯(DLin-MC3-DMA)和9-((4-(二甲基氨基)丁酰基)氧基)十七烷二酸二((Z)-壬-2-烯-1-基)酯(L319);(ii)中性脂质,其选自DSPC、DPPC、POPC、DOPE和SM;(iii)固醇,例如胆固醇;和(iv)PEG-脂质,例如PEG-DMG或PEG-cDMA,呈20-60%阳离子脂质:5-25%中性脂质:25-55%固醇:0.5-15%PEG-脂质的摩尔比。

[0366] 在一些实施方案中,脂质纳米粒子制剂包括基于摩尔数,25%至75%的选自2,2-二亚油基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧杂环戊烷(DLin-KC2-DMA)、二亚油基-甲基-4-二甲基氨基丁酸酯(DLin-MC3-DMA)和9-((4-(二甲基氨基)丁酰基)氧基)十七烷二酸二((Z)-壬-2-烯-1-基)酯(L319)的阳离子脂质,例如基于摩尔数,35至65%、45至65%、60%、57.5%、50%或40%。

[0367] 在一些实施方案中,脂质纳米粒子制剂包括基于摩尔数,0.5%至15%的中性脂质,例如基于摩尔数,3至12%、5至10%或15%、10%或7.5%。中性脂质的实例包括但不限于DSPC、POPC、DPPC、DOPE和SM。在一些实施方案中,制剂包括基于摩尔数,5%至50%的固醇(例如基于摩尔数,15至45%、20至40%、40%、38.5%、35%或31%)。固醇的一非限制性实例是胆固醇。在一些实施方案中,脂质纳米粒子制剂包括基于摩尔数,0.5%至20%的PEG或经PEG修饰的脂质(例如基于摩尔数,0.5至10%、0.5至5%、1.5%、0.5%、1.5%、3.5%或5%)。在一些实施方案中,PEG或经PEG修饰的脂质包含平均分子量是2,000Da的PEG分子。在一些实施方案中,PEG或经PEG修饰的脂质包含平均分子量是小于2,000,例如约1,500Da、约1,000Da或约500Da的PEG分子。经PEG修饰的脂质的非限制性实例包括PEG-二硬脂酰基甘油(PEG-DMG)(在本文中也称为PEG-C14或C14-PEG)、PEG-cDMA(进一步讨论于Reyes等J.Controlled Release,107,276-287(2005)中,所述文献的内容以引用的方式整体并入本文)。

[0368] 在一些实施方案中,基于摩尔数,脂质纳米粒子制剂包括25-75%的选自2,2-二亚油基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧杂环戊烷(DLin-KC2-DMA)、二亚油基-甲基-4-二甲基氨基丁酸酯(DLin-MC3-DMA)和9-((4-(二甲基氨基)丁酰基)氧基)十七烷二酸二((Z)-壬-2-烯-1-基)酯(L319)的阳离子脂质,0.5-15%的中性脂质,5-50%的固醇,和0.5-20%的PEG或经PEG修饰的脂质。

[0369] 在一些实施方案中,基于摩尔数,脂质纳米粒子制剂包括35-65%的选自2,2-二亚油基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧杂环戊烷(DLin-KC2-DMA)、二亚油基-甲基-4-二甲基氨基丁酸酯(DLin-MC3-DMA)和9-((4-(二甲基氨基)丁酰基)氧基)十七烷二酸二((Z)-壬-2-烯-1-基)酯(L319)的阳离子脂质,3-12%的中性脂质,15-45%的固醇,和0.5-10%的PEG或经PEG修饰的脂质。

[0370] 在一些实施方案中,基于摩尔数,脂质纳米粒子制剂包括45-65%的选自2,2-二亚

油基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧杂环戊烷(DLin-KC2-DMA)、二亚油基-甲基-4-二甲基氨基丁酸酯(DLin-MC3-DMA)和9-((4-(二甲基氨基)丁酰基)氧基)十七烷二酸二((Z)-壬-2-烯-1-基)酯(L319)的阳离子脂质,5-10%的中性脂质,25-40%的固醇,和0.5-10%的PEG或经PEG修饰的脂质。

[0371] 在一些实施方案中,基于摩尔数,脂质纳米粒子制剂包括60%的选自2,2-二亚油基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧杂环戊烷(DLin-KC2-DMA)、二亚油基-甲基-4-二甲基氨基丁酸酯(DLin-MC3-DMA)和9-((4-(二甲基氨基)丁酰基)氧基)十七烷二酸二((Z)-壬-2-烯-1-基)酯(L319)的阳离子脂质,7.5%的中性脂质,31%的固醇,和1.5%的PEG或经PEG修饰的脂质。

[0372] 在一些实施方案中,基于摩尔数,脂质纳米粒子制剂包括50%的选自2,2-二亚油基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧杂环戊烷(DLin-KC2-DMA)、二亚油基-甲基-4-二甲基氨基丁酸酯(DLin-MC3-DMA)和9-((4-(二甲基氨基)丁酰基)氧基)十七烷二酸二((Z)-壬-2-烯-1-基)酯(L319)的阳离子脂质,10%的中性脂质,38.5%的固醇,和1.5%的PEG或经PEG修饰的脂质。

[0373] 在一些实施方案中,基于摩尔数,脂质纳米粒子制剂包括50%的选自2,2-二亚油基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧杂环戊烷(DLin-KC2-DMA)、二亚油基-甲基-4-二甲基氨基丁酸酯(DLin-MC3-DMA)和9-((4-(二甲基氨基)丁酰基)氧基)十七烷二酸二((Z)-壬-2-烯-1-基)酯(L319)的阳离子脂质,10%的中性脂质,35%的固醇,4.5%或5%的PEG或经PEG修饰的脂质,和0.5%的靶向性脂质。

[0374] 在一些实施方案中,基于摩尔数,脂质纳米粒子制剂包括40%的选自2,2-二亚油基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧杂环戊烷(DLin-KC2-DMA)、二亚油基-甲基-4-二甲基氨基丁酸酯(DLin-MC3-DMA)和9-((4-(二甲基氨基)丁酰基)氧基)十七烷二酸二((Z)-壬-2-烯-1-基)酯(L319)的阳离子脂质,15%的中性脂质,40%的固醇,和5%的PEG或经PEG修饰的脂质。

[0375] 在一些实施方案中,基于摩尔数,脂质纳米粒子制剂包括57.2%的选自2,2-二亚油基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧杂环戊烷(DLin-KC2-DMA)、二亚油基-甲基-4-二甲基氨基丁酸酯(DLin-MC3-DMA)和9-((4-(二甲基氨基)丁酰基)氧基)十七烷二酸二((Z)-壬-2-烯-1-基)酯(L319)的阳离子脂质,7.1%的中性脂质,34.3%的固醇,和1.4%的PEG或经PEG修饰的脂质。

[0376] 在一些实施方案中,基于摩尔数,脂质纳米粒子制剂包括57.5%的选自是PEG-cDMA(PEG-cDMA进一步讨论于Reyes等(J.Controlled Release,107,276-287(2005)中,所述文献的内容以引用的方式整体并入本文)的PEG脂质的阳离子脂质,7.5%的中性脂质,31.5%的固醇,和3.5%的PEG或经PEG修饰的脂质。

[0377] 在一些实施方案中,脂质纳米粒子制剂基本上由呈20-70%阳离子脂质:5-45%中性脂质:20-55%胆固醇:0.5-15%经PEG修饰的脂质的摩尔比的脂质混合物组成。在一些实施方案中,脂质纳米粒子制剂基本上由呈20-60%阳离子脂质:5-25%中性脂质:25-55%胆固醇:0.5-15%经PEG修饰的脂质的摩尔比的脂质混合物组成。

[0378] 在一些实施方案中,摩尔脂质比率是50/10/38.5/1.5(mol%阳离子脂质/中性脂质例如DSPC/胆固醇/经PEG修饰的脂质例如PEG-DMG、PEG-DSG或PEG-DPG)、57.2/7.1134.3/

1.4 (mol % 阳离子脂质/中性脂质例如DPPC/胆固醇/经PEG修饰的脂质例如PEG-cDMA)、40/15/40/5 (mol % 阳离子脂质/中性脂质例如DSPC/胆固醇/经PEG修饰的脂质例如PEG-DMG)、50/10/35/4.5/0.5 (mol % 阳离子脂质/中性脂质例如DSPC/胆固醇/经PEG修饰的脂质例如PEG-DSG)、50/10/35/5 (阳离子脂质/中性脂质例如DSPC/胆固醇/经PEG修饰的脂质例如PEG-DMG)、40/10/40/10 (mol % 阳离子脂质/中性脂质例如DSPC/胆固醇/经PEG修饰的脂质例如PEG-DMG或PEG-cDMA)、35/15/40/10 (mol % 阳离子脂质/中性脂质例如DSPC/胆固醇/经PEG修饰的脂质例如PEG-DMG或PEG-cDMA) 或52/13/30/5 (mol % 阳离子脂质/中性脂质例如DSPC/胆固醇/经PEG修饰的脂质例如PEG-DMG或PEG-cDMA)。

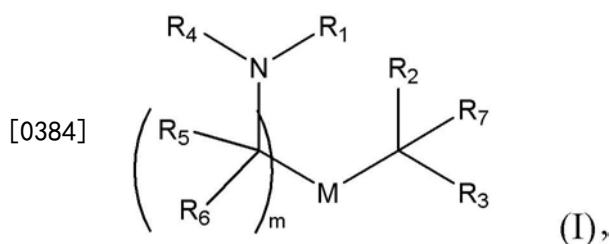
[0379] 脂质纳米粒子组合物和制备它们的方法的非限制性实例例如描述于Semple等(2010) *Nat. Biotechnol.* 28:172-176; Jayarama等(2012), *Angew. Chem. Int. Ed.*, 51:8529-8533; 以及Maier等(2013) *Molecular Therapy* 21,1570-1578 (其各自的内容以引用的方式整体并入本文) 中。

[0380] 在一些实施方案中, 脂质纳米粒子制剂可包含阳离子脂质、PEG脂质和结构性脂质, 并且任选包含非阳离子脂质。作为一非限制性实例, 脂质纳米粒子可包含40-60%的阳离子脂质, 5-15%的非阳离子脂质, 1-2%的PEG脂质和30-50%的结构性脂质。作为另一非限制性实例, 脂质纳米粒子可包含50%阳离子脂质, 10%非阳离子脂质, 1.5%PEG脂质和38.5%结构性脂质。作为另一非限制性实例, 脂质纳米粒子可包含55%阳离子脂质, 10%非阳离子脂质, 2.5%PEG脂质和32.5%结构性脂质。在一些实施方案中, 阳离子脂质可为本文所述的任何阳离子脂质, 诸如但不限于DLin-KC2-DMA、DLin-MC3-DMA和L319。

[0381] 在一些实施方案中, 本文所述的脂质纳米粒子制剂可为4组分脂质纳米粒子。脂质纳米粒子可包含阳离子脂质、非阳离子脂质、PEG脂质和结构性脂质。作为一非限制性实例, 脂质纳米粒子可包含40-60%的阳离子脂质, 5-15%的非阳离子脂质, 1-2%的PEG脂质和30-50%的结构性脂质。作为另一非限制性实例, 脂质纳米粒子可包含50%阳离子脂质, 10%非阳离子脂质, 1.5%PEG脂质和38.5%结构性脂质。作为另一非限制性实例, 脂质纳米粒子可包含55%阳离子脂质, 10%非阳离子脂质, 2.5%PEG脂质和32.5%结构性脂质。在一些实施方案中, 阳离子脂质可为本文所述的任何阳离子脂质, 诸如但不限于DLin-KC2-DMA、DLin-MC3-DMA和L319。

[0382] 在一些实施方案中, 本文所述的脂质纳米粒子制剂可包含阳离子脂质、非阳离子脂质、PEG脂质和结构性脂质。作为一非限制性实例, 脂质纳米粒子包含50%的阳离子脂质DLin-KC2-DMA, 10%的非阳离子脂质DSPC, 1.5%的PEG脂质PEG-DOMG和38.5%的结构性脂质胆固醇。作为一非限制性实例, 脂质纳米粒子包含50%的阳离子脂质DLin-MC3-DMA, 10%的非阳离子脂质DSPC, 1.5%的PEG脂质PEG-DOMG和38.5%的结构性脂质胆固醇。作为一非限制性实例, 脂质纳米粒子包含50%的阳离子脂质DLin-MC3-DMA, 10%的非阳离子脂质DSPC, 1.5%的PEG脂质PEG-DMG和38.5%的结构性脂质胆固醇。作为另一非限制性实例, 脂质纳米粒子包含55%的阳离子脂质L319, 10%的非阳离子脂质DSPC, 2.5%的PEG脂质PEG-DMG和32.5%的结构性脂质胆固醇。

[0383] 在一些实施方案中, 纳米粒子包含式(I)化合物:



[0385] 或其盐或异构体,其中:

[0386] R_1 选自自由以下组成的组: C_{5-30} 烷基、 C_{5-20} 烯基、 $-R^*YR''$ 、 $-YR''$ 和 $-R''M'R'$;

[0387] R_2 和 R_3 独立地选自自由以下组成的组: H、 C_{1-14} 烷基、 C_{2-14} 烯基、 $-R^*YR''$ 、 $-YR''$ 和 $-R^*OR''$, 或 R_2 和 R_3 连同它们所附接的原子一起形成杂环或碳环;

[0388] R_4 选自自由以下组成的组: C_{3-6} 碳环、 $-(CH_2)_nQ$ 、 $-(CH_2)_nCHQR$ 、 $-CHQR$ 、 $-CQ(R)_2$ 和未取代的 C_{1-6} 烷基, 其中 Q 选自碳环、杂环、 $-OR$ 、 $-O(CH_2)_nN(R)_2$ 、 $-C(O)OR$ 、 $-OC(O)R$ 、 $-CX_3$ 、 $-CX_2H$ 、 $-CXH_2$ 、 $-CN$ 、 $-N(R)_2$ 、 $-C(O)N(R)_2$ 、 $-N(R)C(O)R$ 、 $-N(R)S(O)_2R$ 、 $-N(R)C(O)N(R)_2$ 、 $-N(R)C(S)N(R)_2$ 、 $-N(R)R_8$ 、 $-O(CH_2)_nOR$ 、 $-N(R)C(=NR_9)N(R)_2$ 、 $-N(R)C(=CHR_9)N(R)_2$ 、 $-OC(O)N(R)_2$ 、 $-N(R)C(O)OR$ 、 $-N(OR)C(O)R$ 、 $-N(OR)S(O)_2R$ 、 $-N(OR)C(O)OR$ 、 $-N(OR)C(O)N(R)_2$ 、 $-N(OR)C(S)N(R)_2$ 、 $-N(OR)C(=NR_9)N(R)_2$ 、 $-N(OR)C(=CHR_9)N(R)_2$ 、 $-C(=NR_9)N(R)_2$ 、 $-C(=NR_9)R$ 、 $-C(O)N(R)OR$ 和 $-C(R)N(R)_2C(O)OR$, 并且各 n 独立地选自 1、2、3、4 和 5;

[0389] 各 R_5 独立地选自自由 C_{1-3} 烷基、 C_{2-3} 烯基和 H 组成的组;

[0390] 各 R_6 独立地选自自由 C_{1-3} 烷基、 C_{2-3} 烯基和 H 组成的组;

[0391] M 和 M' 独立地选自 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-C(O)N(R')$ 、 $-N(R')C(O)-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-C(S)S-$ 、 $-SC(S)-$ 、 $-CH(OH)-$ 、 $-P(O)(OR')O-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S-S-$ 、芳基和杂芳基;

[0392] R_7 选自自由 C_{1-3} 烷基、 C_{2-3} 烯基和 H 组成的组;

[0393] R_8 选自自由 C_{3-6} 碳环和杂环组成的组;

[0394] R_9 选自自由 H、CN、 NO_2 、 C_{1-6} 烷基、 $-OR$ 、 $-S(O)_2R$ 、 $-S(O)_2N(R)_2$ 、 C_{2-6} 烯基、 C_{3-6} 碳环和杂环组成的组;

[0395] 各 R 独立地选自自由 C_{1-3} 烷基、 C_{2-3} 烯基和 H 组成的组;

[0396] 各 R' 独立地选自自由 C_{1-18} 烷基、 C_{2-18} 烯基、 $-R^*YR''$ 、 $-YR''$ 和 H 组成的组;

[0397] 各 R'' 独立地选自自由 C_{3-14} 烷基和 C_{3-14} 烯基组成的组;

[0398] 各 R* 独立地选自自由 C_{1-12} 烷基和 C_{2-12} 烯基组成的组;

[0399] 各 Y 独立地是 C_{3-6} 碳环;

[0400] 各 X 独立地选自自由 F、Cl、Br 和 I 组成的组; 并且

[0401] m 选自 5、6、7、8、9、10、11、12 和 13。

[0402] 在一些实施方案中, 式 (I) 化合物的一子组包括以下那些式 (I) 化合物: 其中当 R_4 是 $-(CH_2)_nQ$ 、 $-(CH_2)_nCHQR$ 、 $-CHQR$ 或 $-CQ(R)_2$ 时, 那么 (i) 当 n 是 1、2、3、4 或 5 时, Q 不是 $-N(R)_2$, 或 (ii) 当 n 是 1 或 2 时, Q 不是 5、6 或 7 元杂环烷基。

[0403] 在一些实施方案中, 式 (I) 化合物的另一子组包括以下那些式 (I) 化合物: 其中

[0404] R_1 选自自由 C_{5-30} 烷基、 C_{5-20} 烯基、 $-R^*YR''$ 、 $-YR''$ 和 $-R''M'R'$ 组成的组;

[0405] R_2 和 R_3 独立地选自自由 H、 C_{1-14} 烷基、 C_{2-14} 烯基、 $-R^*YR''$ 、 $-YR''$ 和 $-R^*OR''$ 组成的组, 或 R_2 和 R_3 连同它们所连接的原子一起形成杂环或碳环;

[0406] R_4 选自自由 C_{3-6} 碳环、 $-(CH_2)_nQ$ 、 $-(CH_2)_nCHQR$ 、 $-CHQR$ 、 $-CQ(R)_2$ 和未取代的 C_{1-6} 烷基组成

的组,其中Q选自C₃₋₆碳环、具有一个或多个选自N、O和S的杂原子的5至14元杂芳基、-OR、-O(CH₂)_nN(R)₂、-C(O)OR、-OC(O)R、-CX₃、-CX₂H、-CXH₂、-CN、-C(O)N(R)₂、-N(R)C(O)R、-N(R)S(O)₂R、-N(R)C(O)N(R)₂、-N(R)C(S)N(R)₂、-CRN(R)₂C(O)OR、-N(R)R₈、-O(CH₂)_nOR、-N(R)C(=NR₉)N(R)₂、-N(R)C(=CHR₉)N(R)₂、-OC(O)N(R)₂、-N(R)C(O)OR、-N(OR)C(O)R、-N(OR)S(O)₂R、-N(OR)C(O)OR、-N(OR)C(O)N(R)₂、-N(OR)C(S)N(R)₂、-N(OR)C(=NR₉)N(R)₂、-N(OR)C(=CHR₉)N(R)₂、-C(=NR₉)N(R)₂、-C(=NR₉)R、-C(O)N(R)OR和具有一个或多个选自N、O和S的杂原子的5至14元杂环烷基,其被一个或多个选自氧代基(=O)、OH、氨基、单烷基氨基或二烷基氨基和C₁₋₃烷基的取代基取代,并且各n独立地选自1、2、3、4和5;

[0407] 各R₅独立地选自由C₁₋₃烷基、C₂₋₃烯基和H组成的组;

[0408] 各R₆独立地选自由C₁₋₃烷基、C₂₋₃烯基和H组成的组;

[0409] M和M'独立地选自-C(O)O-、-OC(O)-、-C(O)N(R')-、-N(R')C(O)-、-C(O)-、-C(S)-、-C(S)S-、-SC(S)-、-CH(OH)-、-P(O)(OR')O-、-S(O)₂-、-S-S-、芳基和杂芳基;

[0410] R₇选自由C₁₋₃烷基、C₂₋₃烯基和H组成的组;

[0411] R₈选自由C₃₋₆碳环和杂环组成的组;

[0412] R₉选自由H、CN、NO₂、C₁₋₆烷基、-OR、-S(O)₂R、-S(O)₂N(R)₂、C₂₋₆烯基、C₃₋₆碳环和杂环组成的组;

[0413] 各R独立地选自由C₁₋₃烷基、C₂₋₃烯基和H组成的组;

[0414] 各R'独立地选自由C₁₋₁₈烷基、C₂₋₁₈烯基、-R*YR''、-YR''和H组成的组;

[0415] 各R''独立地选自由C₃₋₁₄烷基和C₃₋₁₄烯基组成的组;

[0416] 各R*独立地选自由C₁₋₁₂烷基和C₂₋₁₂烯基组成的组;

[0417] 各Y独立地是C₃₋₆碳环;

[0418] 各X独立地选自由F、Cl、Br和I组成的组;并且

[0419] m选自5、6、7、8、9、10、11、12和13,

[0420] 或其盐或异构体。

[0421] 在一些实施方案中,式(I)化合物的另一子组包括以下那些式(I)化合物:其中

[0422] R₁选自由C₅₋₃₀烷基、C₅₋₂₀烯基、-R*YR''、-YR''和-R''M'R'组成的组;

[0423] R₂和R₃独立地选自由H、C₁₋₁₄烷基、C₂₋₁₄烯基、-R*YR''、-YR''和-R*OR''组成的组,或R₂和R₃连同它们所连接的原子一起形成杂环或碳环;

[0424] R₄选自由C₃₋₆碳环、-(CH₂)_nQ、-(CH₂)_nCHQR、-CHQR、-CQ(R)₂和未取代的C₁₋₆烷基组成的组,其中Q选自C₃₋₆碳环、具有一个或多个选自N、O和S的杂原子的5至14元杂环、-OR、-O(CH₂)_nN(R)₂、-C(O)OR、-OC(O)R、-CX₃、-CX₂H、-CXH₂、-CN、-C(O)N(R)₂、-N(R)C(O)R、-N(R)S(O)₂R、-N(R)C(O)N(R)₂、-N(R)C(S)N(R)₂、-CRN(R)₂C(O)OR、-N(R)R₈、-O(CH₂)_nOR、-N(R)C(=NR₉)N(R)₂、-N(R)C(=CHR₉)N(R)₂、-OC(O)N(R)₂、-N(R)C(O)OR、-N(OR)C(O)R、-N(OR)S(O)₂R、-N(OR)C(O)OR、-N(OR)C(O)N(R)₂、-N(OR)C(S)N(R)₂、-N(OR)C(=NR₉)N(R)₂、-N(OR)C(=CHR₉)N(R)₂、-C(=NR₉)R、-C(O)N(R)OR和-C(=NR₉)N(R)₂,并且各n独立地选自1、2、3、4和5;并且当Q是5至14元杂环,并且(i)R₄是-(CH₂)_nQ,其中n是1或2,或(ii)R₄是-(CH₂)_nCHQR,其中n是1,或(iii)R₄是-CHQR和-CQ(R)₂时,那么Q是5至14元杂芳基或8至14元杂环烷基;

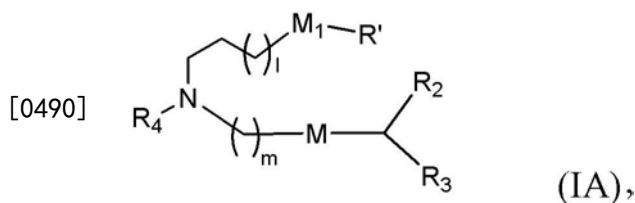
[0425] 各R₅独立地选自由C₁₋₃烷基、C₂₋₃烯基和H组成的组;

[0426] 各R₆独立地选自由C₁₋₃烷基、C₂₋₃烯基和H组成的组;

- [0427] M和M' 独立地选自 -C(O)O-、-OC(O)-、-C(O)N(R')-、-N(R')C(O)-、-C(O)-、-C(S)-、-C(S)S-、-SC(S)-、-CH(OH)-、-P(O)(OR')O-、-S(O)₂-、-S-S-、芳基和杂芳基；
- [0428] R₇选自由C₁₋₃烷基、C₂₋₃烯基和H组成的组；
- [0429] R₈选自由C₃₋₆碳环和杂环组成的组；
- [0430] R₉选自由H、CN、NO₂、C₁₋₆烷基、-OR、-S(O)₂R、-S(O)₂N(R)₂、C₂₋₆烯基、C₃₋₆碳环和杂环组成的组；
- [0431] 各R独立地选自由C₁₋₃烷基、C₂₋₃烯基和H组成的组；
- [0432] 各R' 独立地选自由C₁₋₁₈烷基、C₂₋₁₈烯基、-R*YR''、-YR''和H组成的组；
- [0433] 各R''独立地选自由C₃₋₁₄烷基和C₃₋₁₄烯基组成的组；
- [0434] 各R*独立地选自由C₁₋₁₂烷基和C₂₋₁₂烯基组成的组；
- [0435] 各Y独立地是C₃₋₆碳环；
- [0436] 各X独立地选自由F、Cl、Br和I组成的组；并且
- [0437] m选自5、6、7、8、9、10、11、12和13，
- [0438] 或其盐或异构体。
- [0439] 在一些实施方案中，式(I)化合物的另一子组包括以下那些式(I)化合物：其中
- [0440] R₁选自由C₅₋₃₀烷基、C₅₋₂₀烯基、-R*YR''、-YR''和-R''M' R'组成的组；
- [0441] R₂和R₃独立地选自由H、C₁₋₁₄烷基、C₂₋₁₄烯基、-R*YR''、-YR''和-R*OR''组成的组，或R₂和R₃连同它们所连接的原子一起形成杂环或碳环；
- [0442] R₄选自由C₃₋₆碳环、-(CH₂)_nQ、-(CH₂)_nCHQR、-CHQR、-CQ(R)₂和未取代的C₁₋₆烷基组成的组，其中Q选自C₃₋₆碳环、具有一个或多个选自N、O和S的杂原子的5至14元杂芳基、-OR、-O(CH₂)_nN(R)₂、-C(O)OR、-OC(O)R、-CX₃、-CX₂H、-CXH₂、-CN、-C(O)N(R)₂、-N(R)C(O)R、-N(R)S(O)₂R、-N(R)C(O)N(R)₂、-N(R)C(S)N(R)₂、-CRN(R)₂C(O)OR、-N(R)R₈、-O(CH₂)_nOR、-N(R)C(=NR₉)N(R)₂、-N(R)C(=CHR₉)N(R)₂、-OC(O)N(R)₂、-N(R)C(O)OR、-N(OR)C(O)R、-N(OR)S(O)₂R、-N(OR)C(O)OR、-N(OR)C(O)N(R)₂、-N(OR)C(S)N(R)₂、-N(OR)C(=NR₉)N(R)₂、-N(OR)C(=CHR₉)N(R)₂、-C(=NR₉)R、-C(O)N(R)OR和-C(=NR₉)N(R)₂，并且各n独立地选自1、2、3、4和5；
- [0443] 各R₅独立地选自由C₁₋₃烷基、C₂₋₃烯基和H组成的组；
- [0444] 各R₆独立地选自由C₁₋₃烷基、C₂₋₃烯基和H组成的组；
- [0445] M和M' 独立地选自 -C(O)O-、-OC(O)-、-C(O)N(R')-、-N(R')C(O)-、-C(O)-、-C(S)-、-C(S)S-、-SC(S)-、-CH(OH)-、-P(O)(OR')O-、-S(O)₂-、-S-S-、芳基和杂芳基；
- [0446] R₇选自由C₁₋₃烷基、C₂₋₃烯基和H组成的组；
- [0447] R₈选自由C₃₋₆碳环和杂环组成的组；
- [0448] R₉选自由H、CN、NO₂、C₁₋₆烷基、-OR、-S(O)₂R、-S(O)₂N(R)₂、C₂₋₆烯基、C₃₋₆碳环和杂环组成的组；
- [0449] 各R独立地选自由C₁₋₃烷基、C₂₋₃烯基和H组成的组；
- [0450] 各R' 独立地选自由C₁₋₁₈烷基、C₂₋₁₈烯基、-R*YR''、-YR''和H组成的组；
- [0451] 各R''独立地选自由C₃₋₁₄烷基和C₃₋₁₄烯基组成的组；
- [0452] 各R*独立地选自由C₁₋₁₂烷基和C₂₋₁₂烯基组成的组；
- [0453] 各Y独立地是C₃₋₆碳环；
- [0454] 各X独立地选自由F、Cl、Br和I组成的组；并且

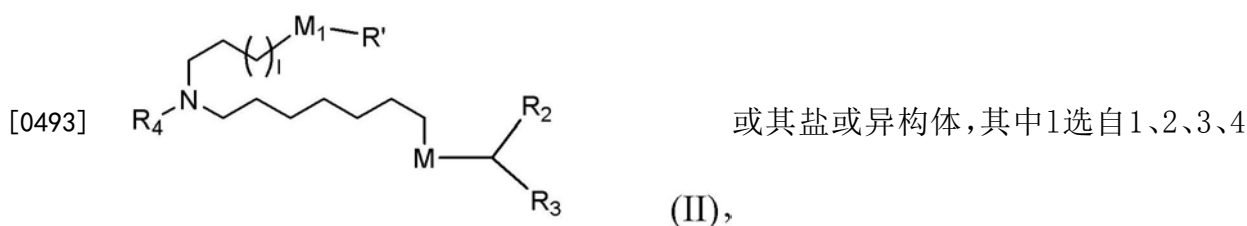
- [0455] m选自5、6、7、8、9、10、11、12和13，
- [0456] 或其盐或异构体。
- [0457] 在一些实施方案中，式(I)化合物的另一子组包括以下那些式(I)化合物：其中
- [0458] R_1 选自自由 C_{5-30} 烷基、 C_{5-20} 烯基、 $-R^*YR''$ 、 $-YR''$ 和 $-R''M'R'$ 组成的组；
- [0459] R_2 和 R_3 独立地选自自由H、 C_{2-14} 烷基、 C_{2-14} 烯基、 $-R^*YR''$ 、 $-YR''$ 和 $-R^*OR''$ 组成的组，或 R_2 和 R_3 连同它们所连接的原子一起形成杂环或碳环；
- [0460] R_4 是 $-(CH_2)_nQ$ 或 $-(CH_2)_nCHQR$ ，其中Q是 $-N(R)_2$ ，并且n选自3、4和5；
- [0461] 各 R_5 独立地选自自由 C_{1-3} 烷基、 C_{2-3} 烯基和H组成的组；
- [0462] 各 R_6 独立地选自自由 C_{1-3} 烷基、 C_{2-3} 烯基和H组成的组；
- [0463] M和M'独立地选自 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-C(O)N(R')$ 、 $-N(R')C(O)-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-C(S)S-$ 、 $-SC(S)-$ 、 $-CH(OH)-$ 、 $-P(O)(OR')O-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S-S-$ 、芳基和杂芳基；
- [0464] R_7 选自自由 C_{1-3} 烷基、 C_{2-3} 烯基和H组成的组；
- [0465] 各R独立地选自自由 C_{1-3} 烷基、 C_{2-3} 烯基和H组成的组；
- [0466] 各R'独立地选自自由 C_{1-18} 烷基、 C_{2-18} 烯基、 $-R^*YR''$ 、 $-YR''$ 和H组成的组；
- [0467] 各R''独立地选自自由 C_{3-14} 烷基和 C_{3-14} 烯基组成的组；
- [0468] 各R*独立地选自自由 C_{1-12} 烷基和 C_{1-12} 烯基组成的组；
- [0469] 各Y独立地是 C_{3-6} 碳环；
- [0470] 各X独立地选自自由F、Cl、Br和I组成的组；并且
- [0471] m选自5、6、7、8、9、10、11、12和13，
- [0472] 或其盐或异构体。
- [0473] 在一些实施方案中，式(I)化合物的另一子组包括以下那些式(I)化合物：其中
- [0474] R_1 选自自由 C_{5-30} 烷基、 C_{5-20} 烯基、 $-R^*YR''$ 、 $-YR''$ 和 $-R''M'R'$ 组成的组；
- [0475] R_2 和 R_3 独立地选自自由 C_{1-14} 烷基、 C_{2-14} 烯基、 $-R^*YR''$ 、 $-YR''$ 和 $-R^*OR''$ 组成的组，或 R_2 和 R_3 连同它们所连接的原子一起形成杂环或碳环；
- [0476] R_4 选自自由 $-(CH_2)_nQ$ 、 $-(CH_2)_nCHQR$ 、 $-CHQR$ 和 $-CQ(R)_2$ 组成的组，其中Q是 $-N(R)_2$ ，并且n选自1、2、3、4和5；
- [0477] 各 R_5 独立地选自自由 C_{1-3} 烷基、 C_{2-3} 烯基和H组成的组；
- [0478] 各 R_6 独立地选自自由 C_{1-3} 烷基、 C_{2-3} 烯基和H组成的组；
- [0479] M和M'独立地选自 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-C(O)N(R')$ 、 $-N(R')C(O)-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-C(S)S-$ 、 $-SC(S)-$ 、 $-CH(OH)-$ 、 $-P(O)(OR')O-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S-S-$ 、芳基和杂芳基；
- [0480] R_7 选自自由 C_{1-3} 烷基、 C_{2-3} 烯基和H组成的组；
- [0481] 各R独立地选自自由 C_{1-3} 烷基、 C_{2-3} 烯基和H组成的组；
- [0482] 各R'独立地选自自由 C_{1-18} 烷基、 C_{2-18} 烯基、 $-R^*YR''$ 、 $-YR''$ 和H组成的组；
- [0483] 各R''独立地选自自由 C_{3-14} 烷基和 C_{3-14} 烯基组成的组；
- [0484] 各R*独立地选自自由 C_{1-12} 烷基和 C_{1-12} 烯基组成的组；
- [0485] 各Y独立地是 C_{3-6} 碳环；
- [0486] 各X独立地选自自由F、Cl、Br和I组成的组；并且
- [0487] m选自5、6、7、8、9、10、11、12和13，
- [0488] 或其盐或异构体。

[0489] 在一些实施方案中,式(I)化合物的一子组包括具有式(IA)的那些式(I)化合物:



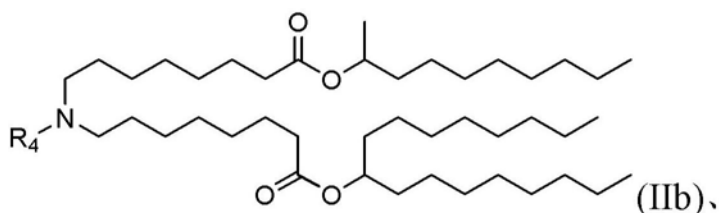
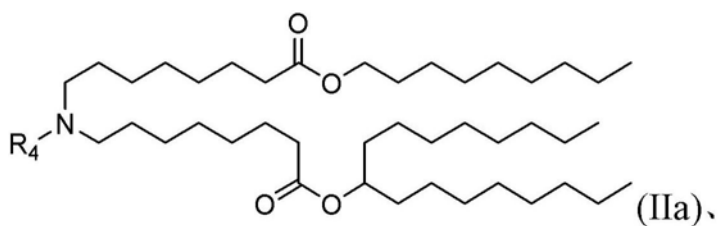
[0491] 或其盐或异构体,其中 l 选自1、2、3、4和5; m 选自5、6、7、8和9; M_1 是键或 M' ; R_4 是未取代的 C_{1-3} 烷基或 $-(CH_2)_n Q$,其中 Q 是OH、 $-NHC(S)N(R)_2$ 、 $-NHC(O)N(R)_2$ 、 $-N(R)C(O)R$ 、 $-N(R)S(O)_2R$ 、 $-N(R)R_8$ 、 $-NHC(=NR_9)N(R)_2$ 、 $-NHC(=CHR_9)N(R)_2$ 、 $-OC(O)N(R)_2$ 、 $-N(R)C(O)OR$ 、杂芳基或杂环烷基; M 和 M' 独立地选自 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-C(O)N(R')$ 、 $-P(O)(OR')O-$ 、 $-S-S-$ 、芳基和杂芳基;并且 R_2 和 R_3 独立地选自由H、 C_{1-14} 烷基和 C_{2-14} 烯基组成的组。

[0492] 在一些实施方案中,式(I)化合物的一子组包括具有式(II)的那些式(I)化合物:

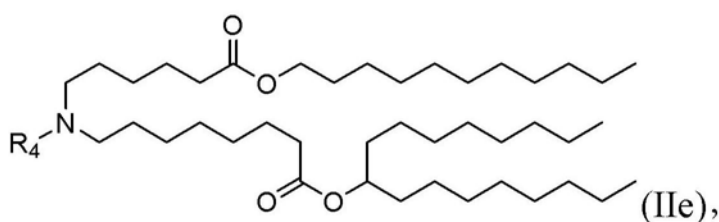
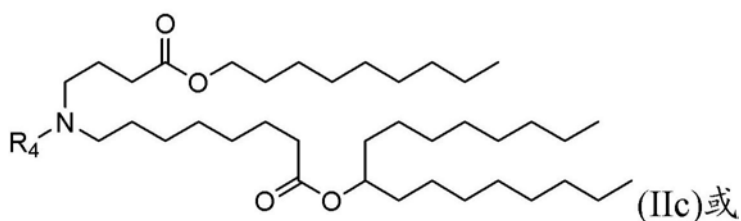


和5; M_1 是键或 M' ; R_4 是未取代的 C_{1-3} 烷基或 $-(CH_2)_n Q$,其中 n 是2、3或4,并且 Q 是OH、 $-NHC(S)N(R)_2$ 、 $-NHC(O)N(R)_2$ 、 $-N(R)C(O)R$ 、 $-N(R)S(O)_2R$ 、 $-N(R)R_8$ 、 $-NHC(=NR_9)N(R)_2$ 、 $-NHC(=CHR_9)N(R)_2$ 、 $-OC(O)N(R)_2$ 、 $-N(R)C(O)OR$ 、杂芳基或杂环烷基; M 和 M' 独立地选自 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-C(O)N(R')$ 、 $-P(O)(OR')O-$ 、 $-S-S-$ 、芳基和杂芳基;并且 R_2 和 R_3 独立地选自由H、 C_{1-14} 烷基和 C_{2-14} 烯基组成的组。

[0494] 在一些实施方案中,式(I)化合物的一子组包括具有式(IIa)、(IIb)、(IIc)或(IIe)的那些式(I)化合物:



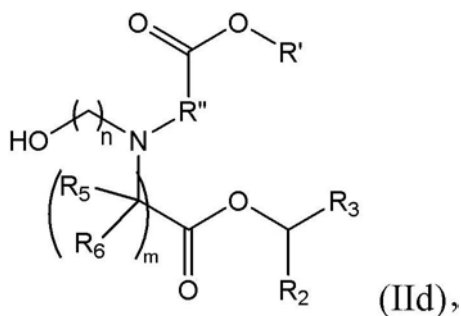
[0495]



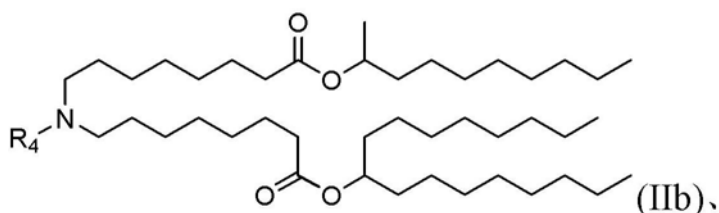
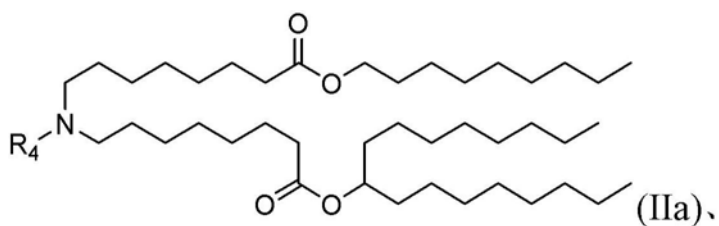
[0496] 或其盐或异构体,其中R4如本文所述。

[0497] 在一些实施方案中,式(I)化合物的一子组包括具有式(IId)的那些式(I)化合物:

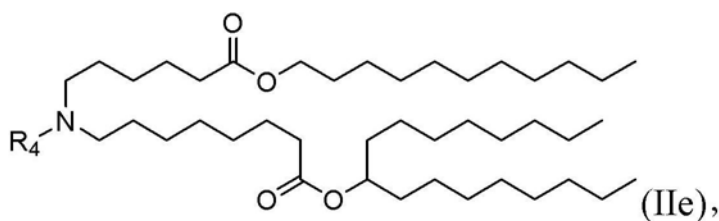
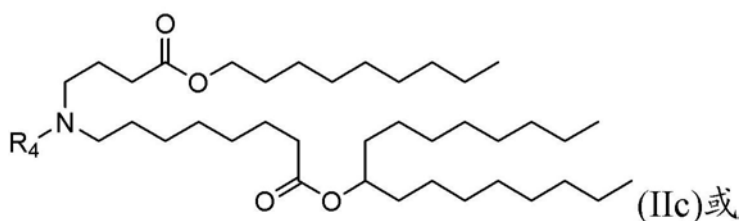
[0498]

[0499] 或其盐或异构体,其中n是2、3或4;并且m、R'、R''以及R₂至R₆如本文所述。举例来说, R₂和R₃各自可独立地选自由C₅₋₁₄烷基和C₅₋₁₄烯基组成的组。

[0500] 在一些实施方案中,式(I)化合物的一子组包括具有式(IIa)、(IIb)、(IIc)或(IIe)的那些式(I)化合物:

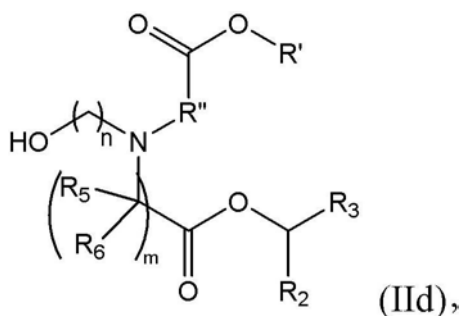


[0501]

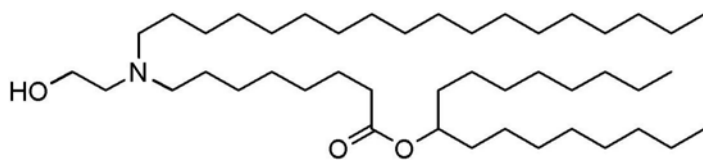
[0502] 或其盐或异构体,其中 R_4 如本文所述。

[0503] 在一些实施方案中,式(I)化合物的一子组包括具有式(IIId)的那些式(I)化合物:

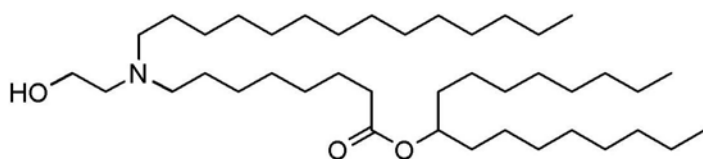
[0504]

[0505] 或其盐或异构体,其中 n 是2、3或4;并且 m 、 R' 、 R'' 以及 R_2 至 R_6 如本文所述。举例来说, R_2 和 R_3 各自可独立地选自由 C_{5-14} 烷基和 C_{5-14} 烯基组成的组。

[0506] 在一些实施方案中,式(I)化合物选自由以下组成的组:

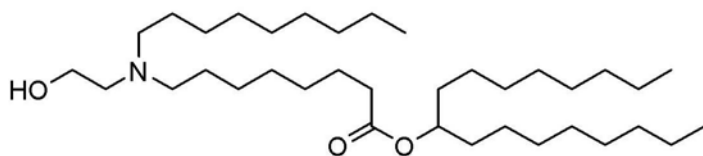


(化合物 1)、

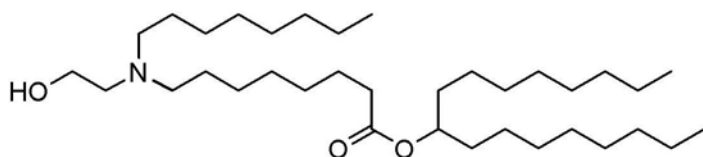


(化合物 2)、

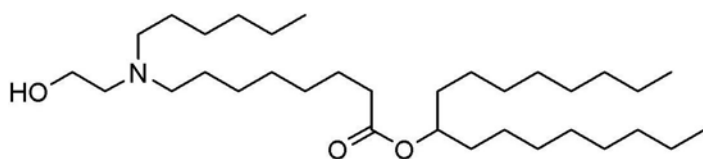
[0507]



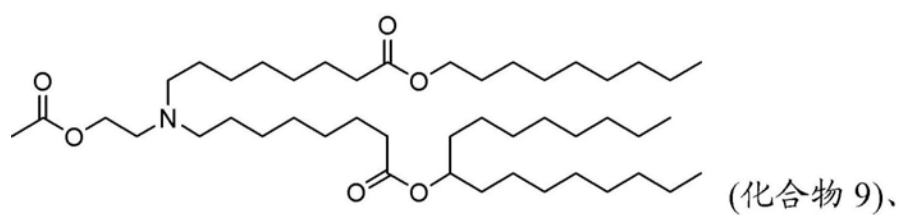
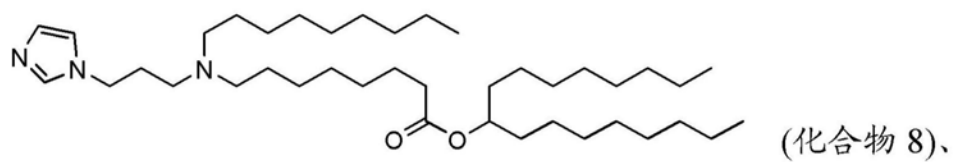
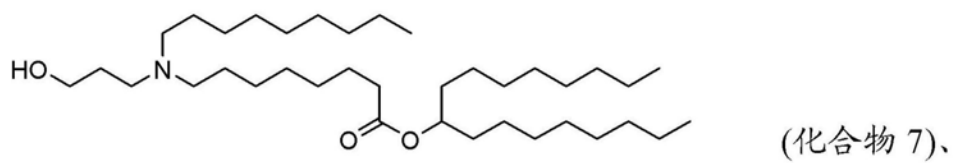
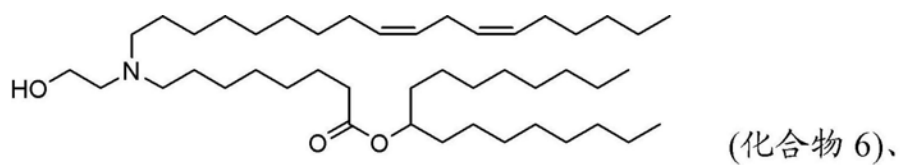
(化合物 3)、



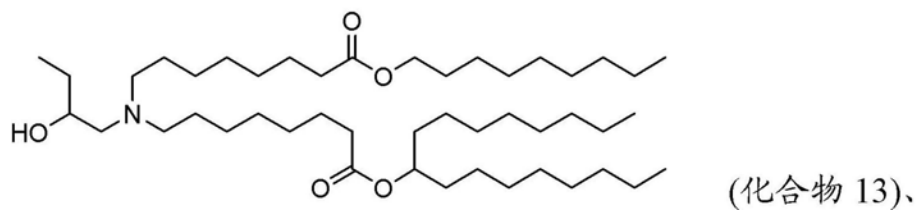
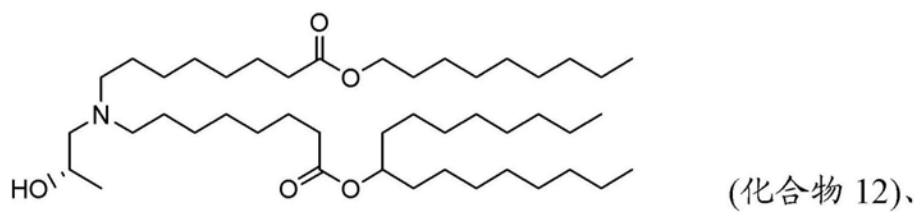
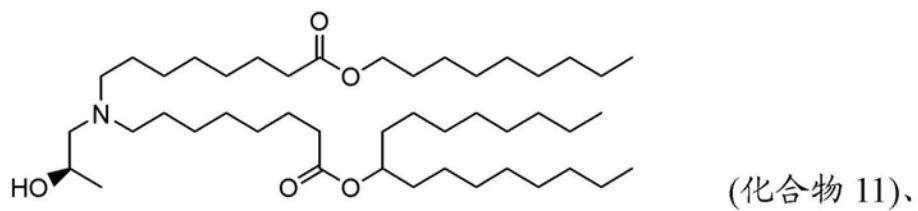
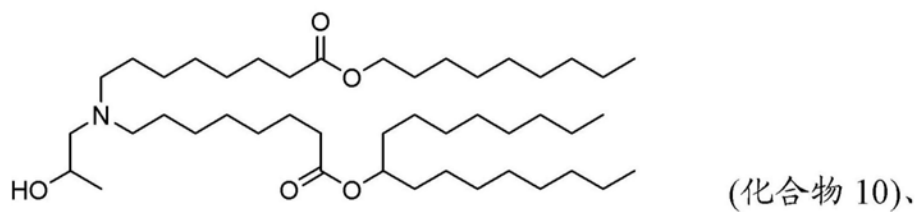
(化合物 4)、

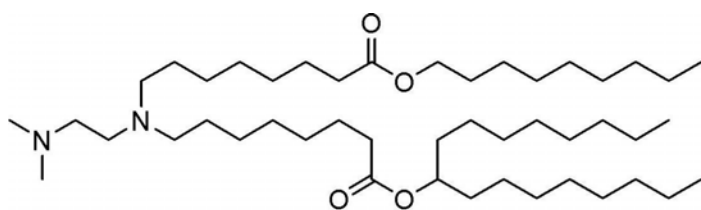


(化合物 5)、

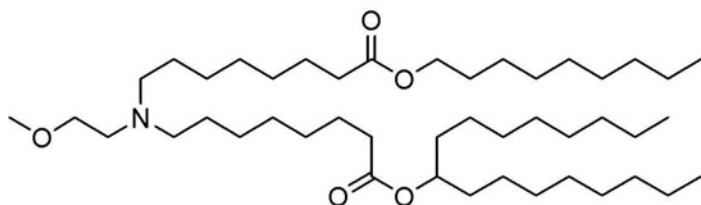


[0508]

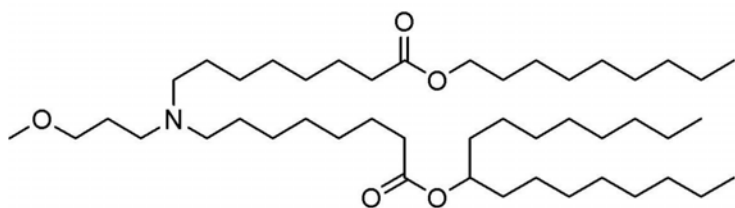




(化合物 14)。

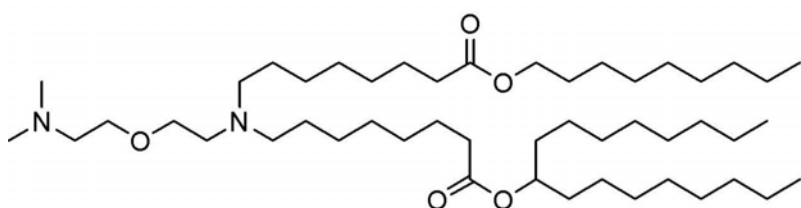


(化合物 15)。

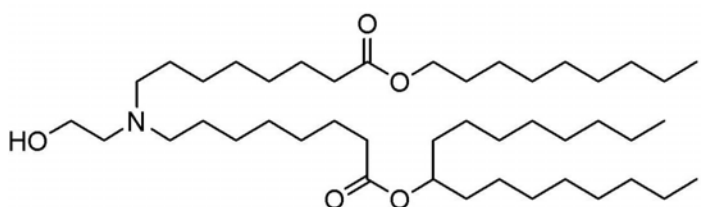


(化合物 16)。

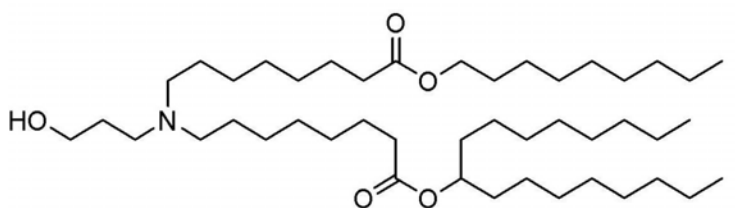
[0509]



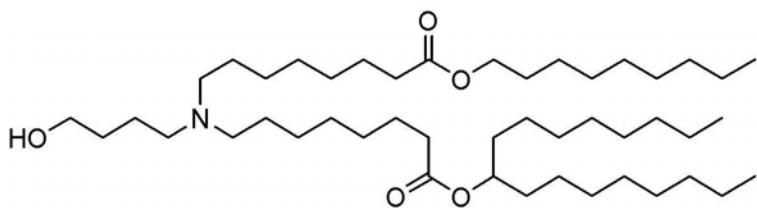
(化合物 17)。



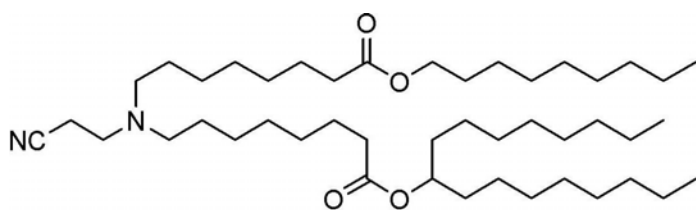
(化合物 18)。



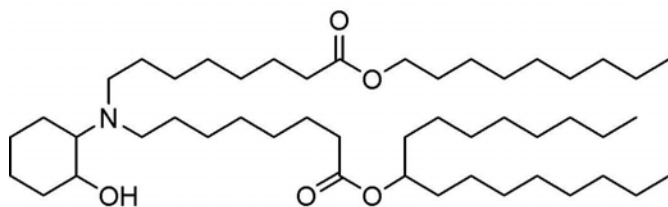
(化合物 19)。



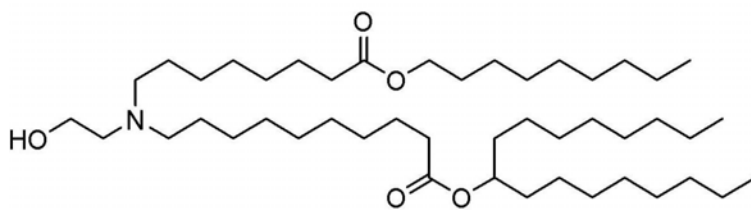
(化合物 20)。



(化合物 21)、

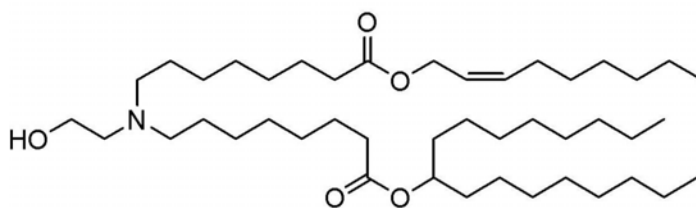


(化合物 22)、

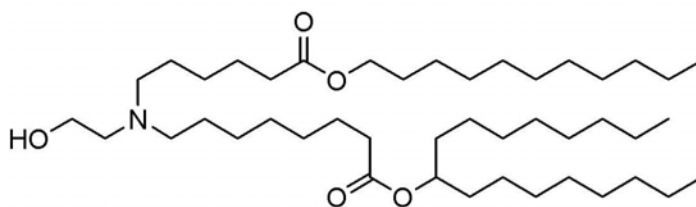


(化合物 23)、

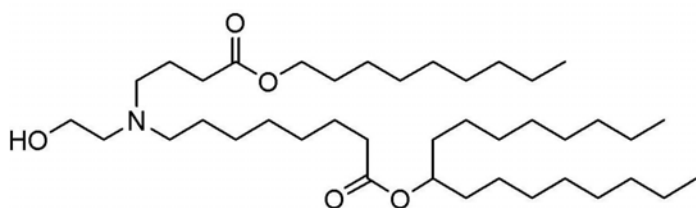
[0510]



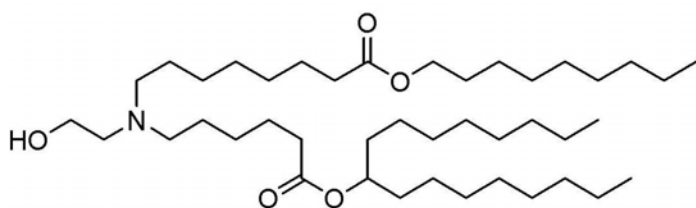
(化合物 24)、



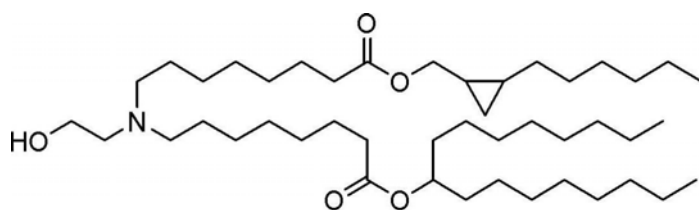
(化合物 25)、



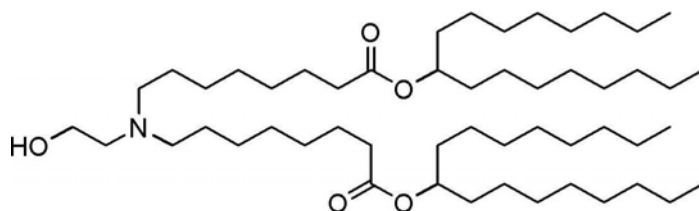
(化合物 26)、



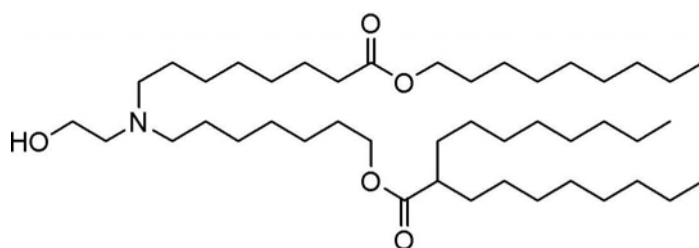
(化合物 27)、



(化合物 28)、

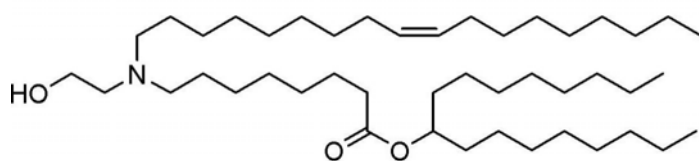


(化合物 29)、

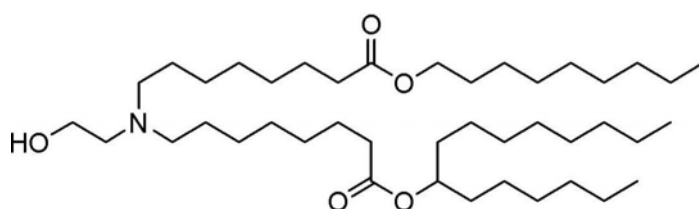


(化合物 30)、

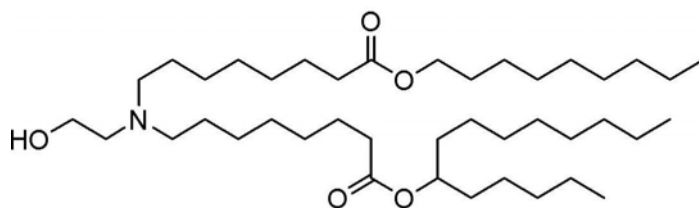
[0511]



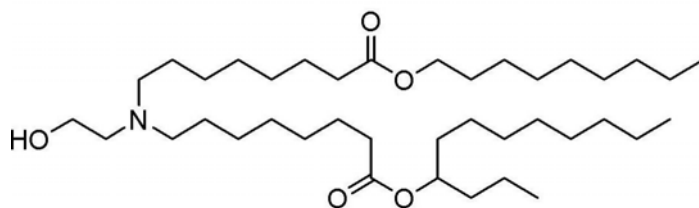
(化合物 31)、



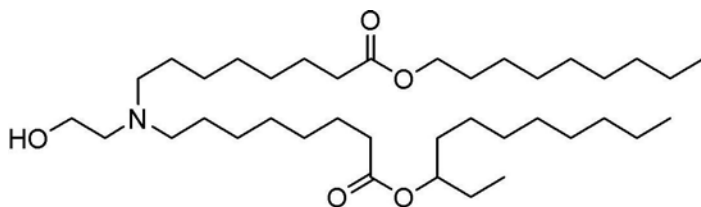
(化合物 32)、



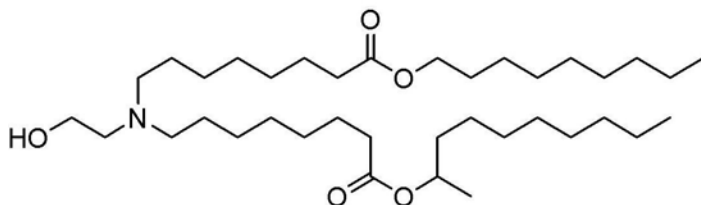
(化合物 33)、



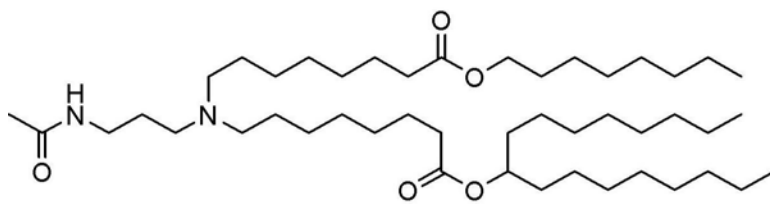
(化合物 34)、



(化合物 35)、

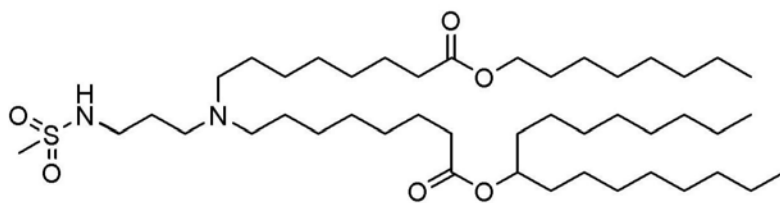


(化合物 36)、

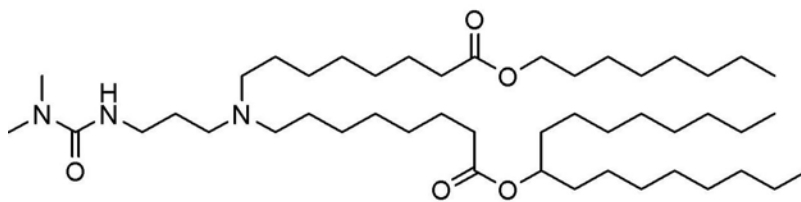


(化合物 37)、

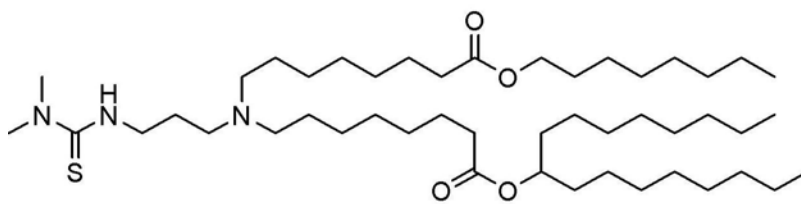
[0512]



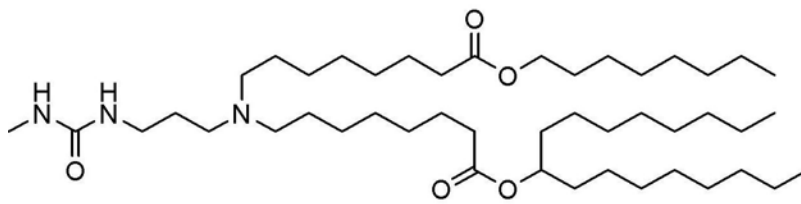
(化合物 38)、



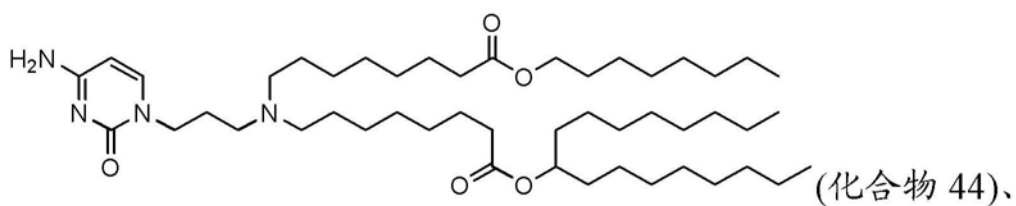
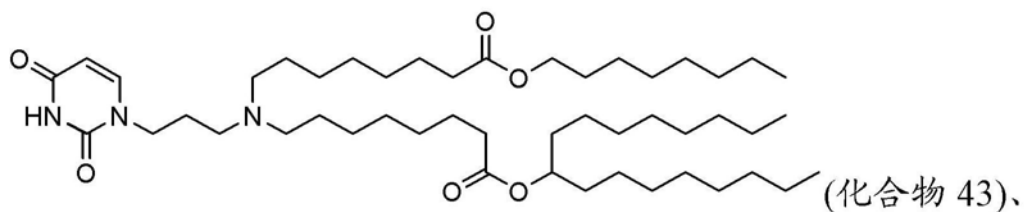
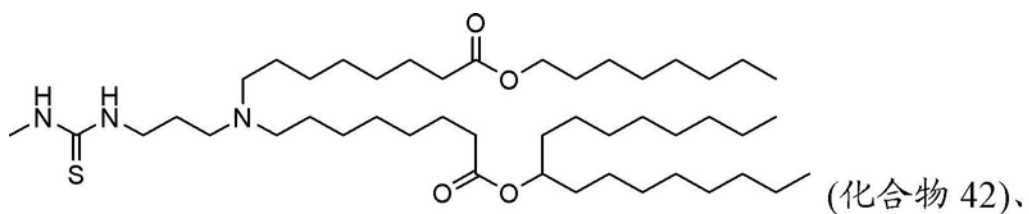
(化合物 39)、



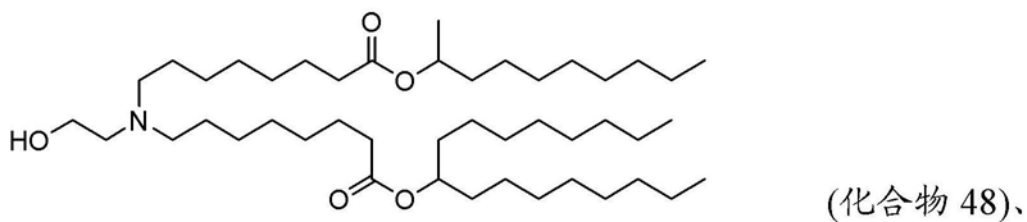
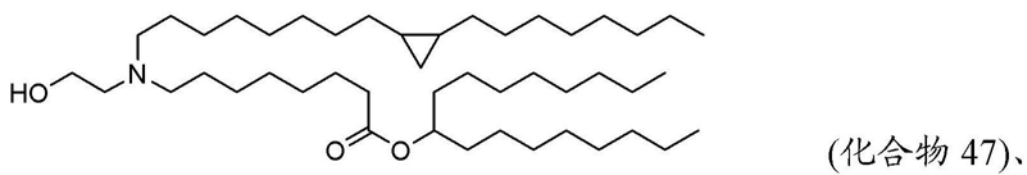
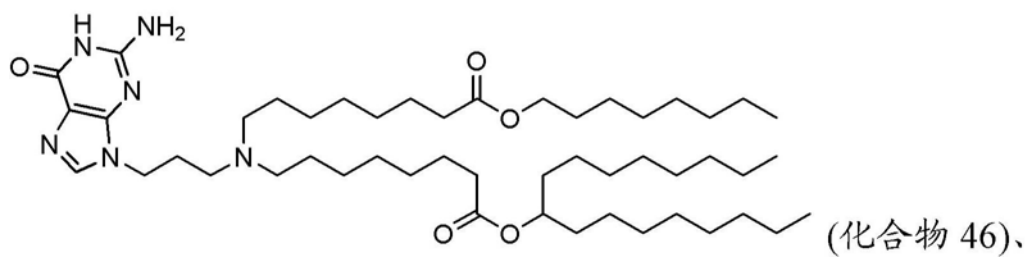
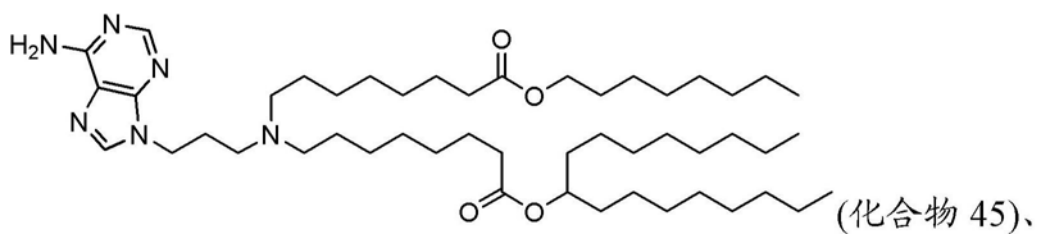
(化合物 40)、

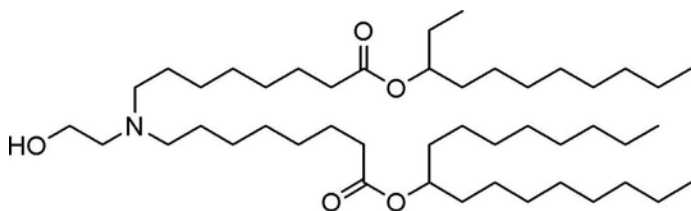


(化合物 41)、

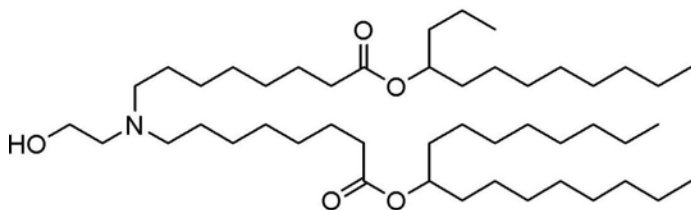


[0513]

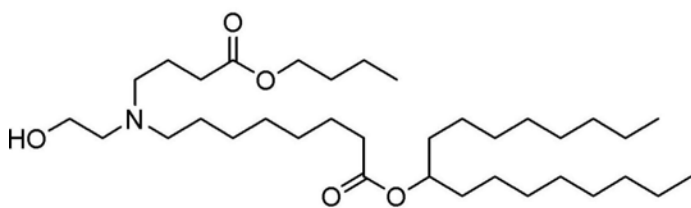




(化合物 49)、

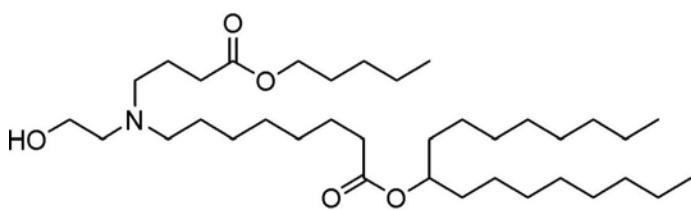


(化合物 50)、

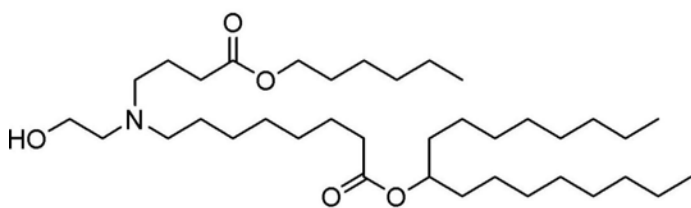


(化合物 51)、

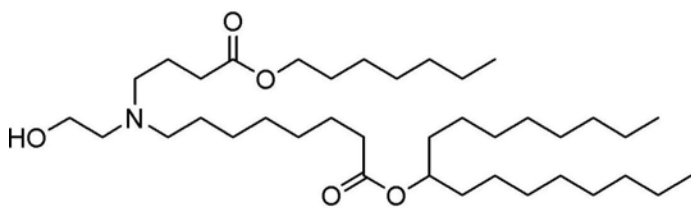
[0514]



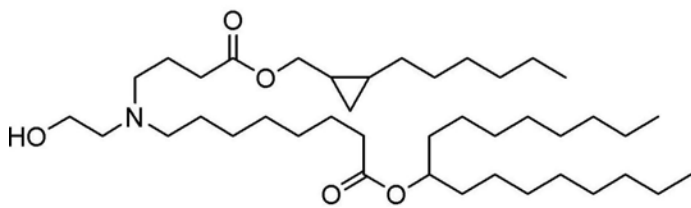
(化合物 52)、



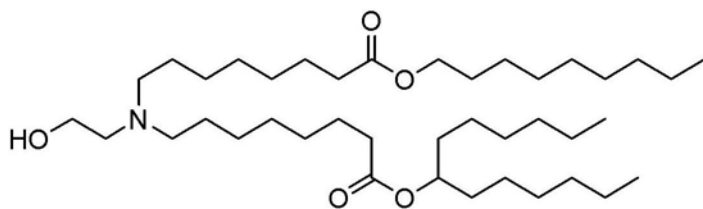
(化合物 53)、



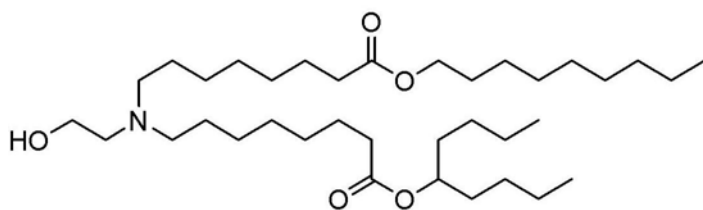
(化合物 54)、



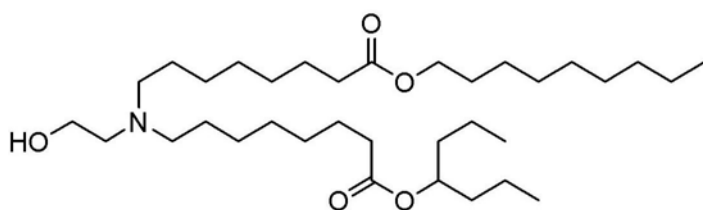
(化合物 55)、



(化合物 56)、

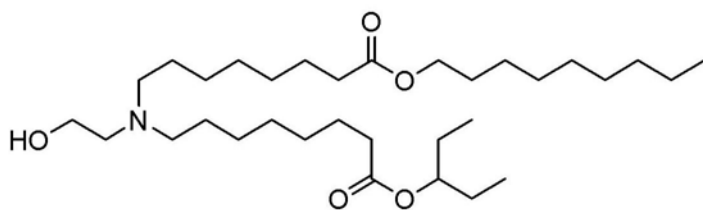


(化合物 57)、

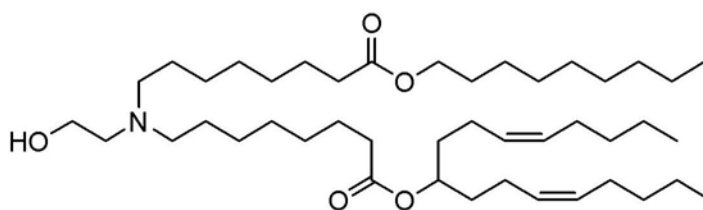


(化合物 58)、

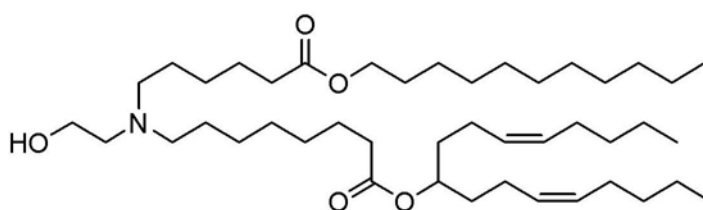
[0515]



(化合物 59)、

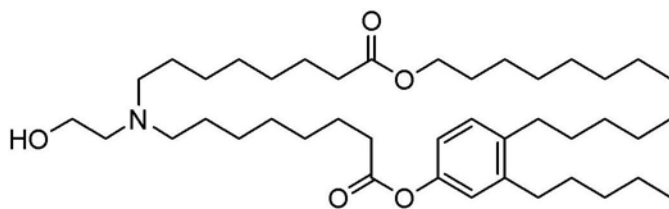


(化合物 60) 和



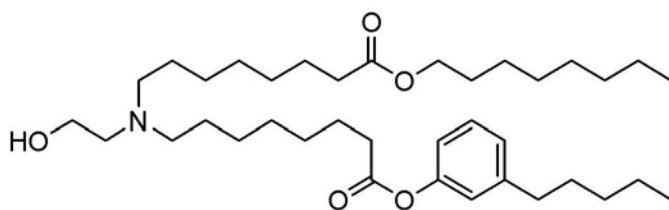
(化合物 61)。

[0516] 在其他实施方案中,式(I)化合物选自由以下组成的组:

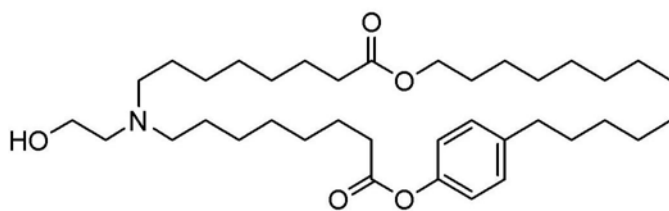


(化合物 62)、

[0517]

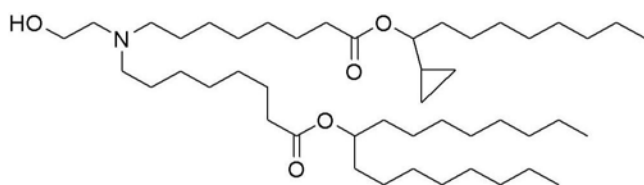


(化合物 63)和

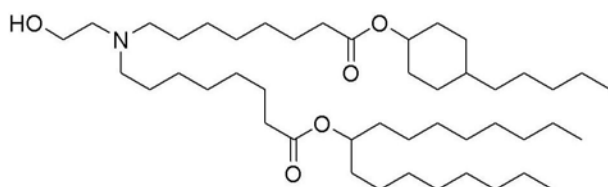


(化合物 64)。

[0518] 在一些实施方案中,式(I)化合物选自由以下组成的组:

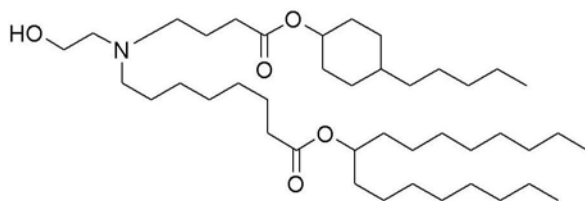


(化合物 65)、

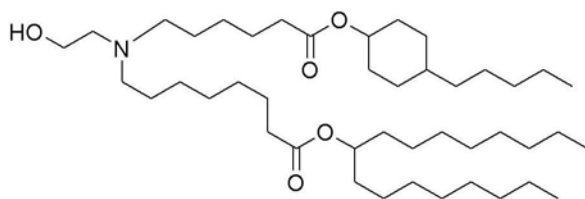


(化合物 66)、

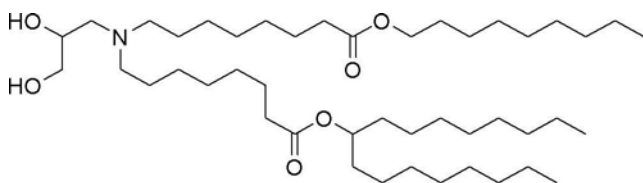
[0519]



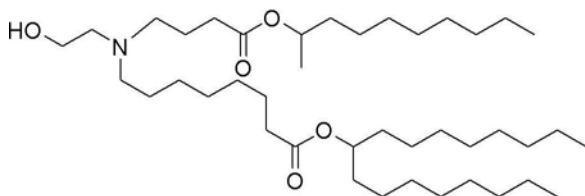
(化合物 67)、



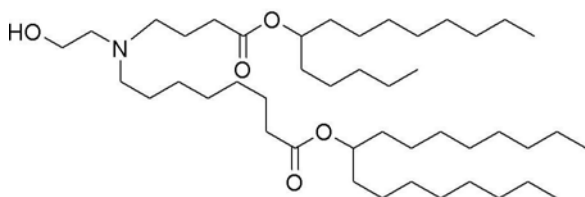
(化合物 68)、



(化合物 69)、

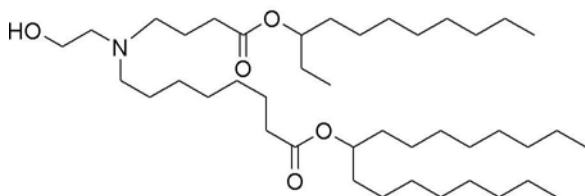


(化合物 70)、

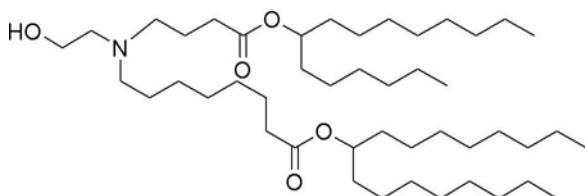


(化合物 71)、

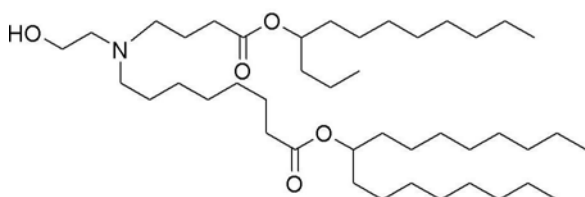
[0520]



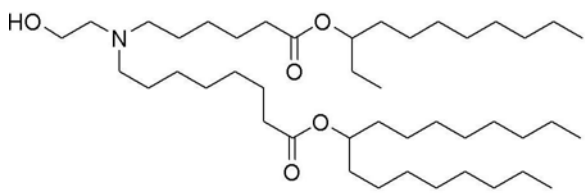
(化合物 72)、



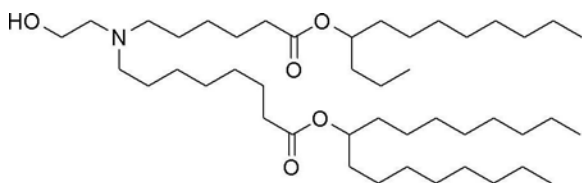
(化合物 73)、



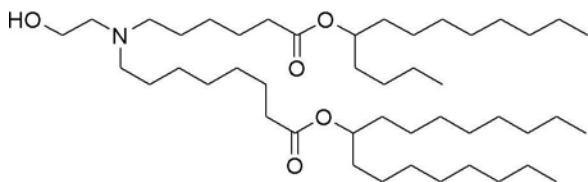
(化合物 74)、



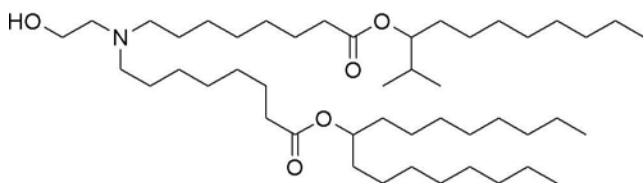
(化合物 75)、



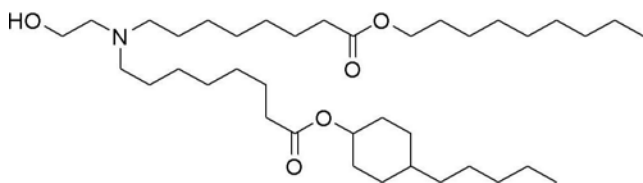
(化合物 76)、



(化合物 77)、

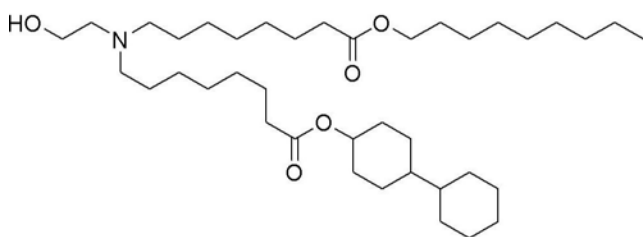


(化合物 78)、

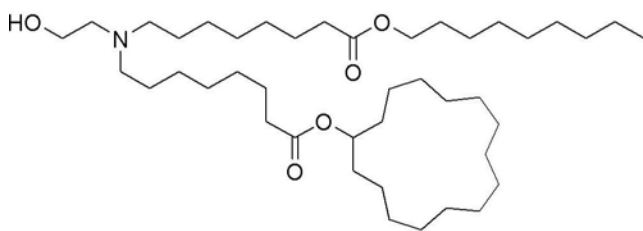


[0521]

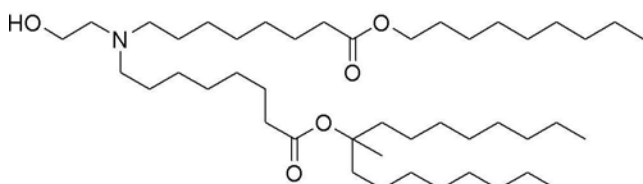
(化合物 79)、



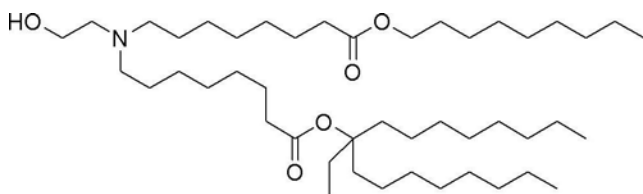
(化合物 80)、



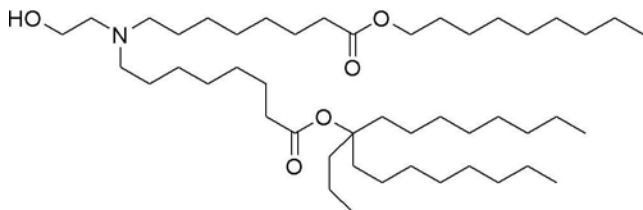
(化合物 81)、



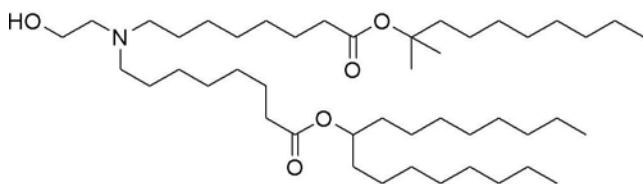
(化合物 82)、



(化合物 83)、

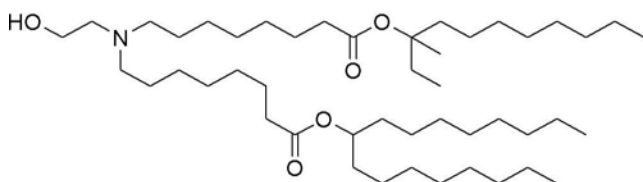


(化合物 84)、

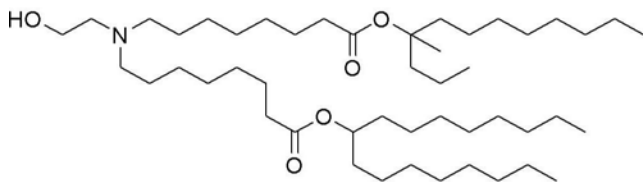


(化合物 85)、

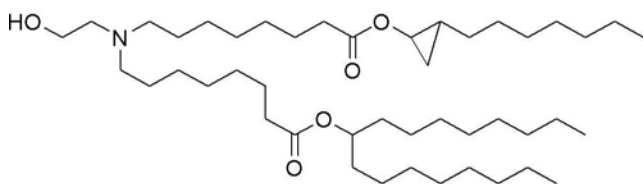
[0522]



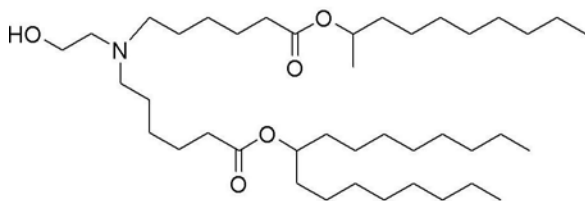
(化合物 86)、



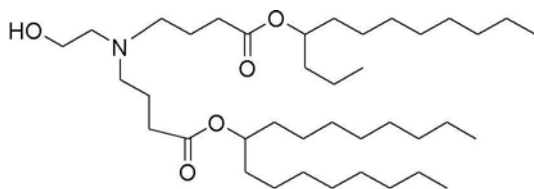
(化合物 87)、



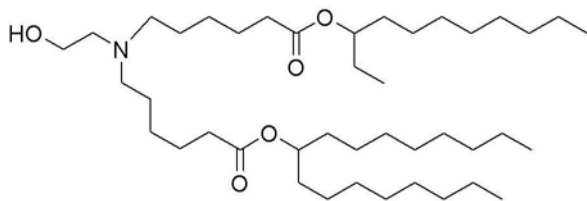
(化合物 88)、



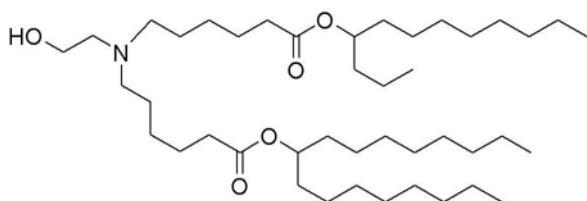
(化合物 89)、



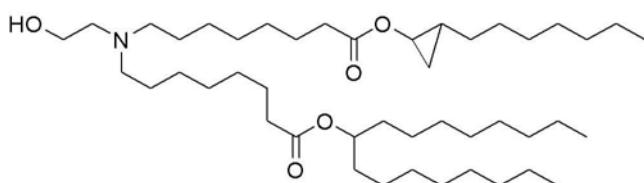
(化合物 90)、



(化合物 91)、

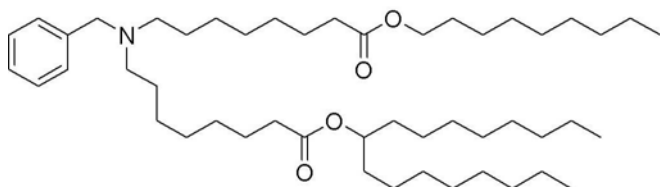


(化合物 92)、

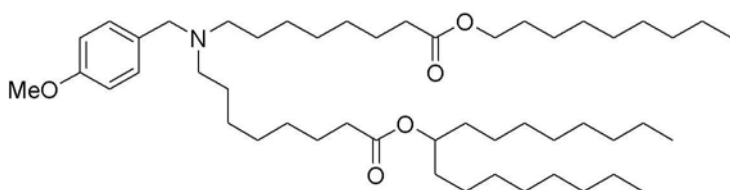


(化合物 93)、

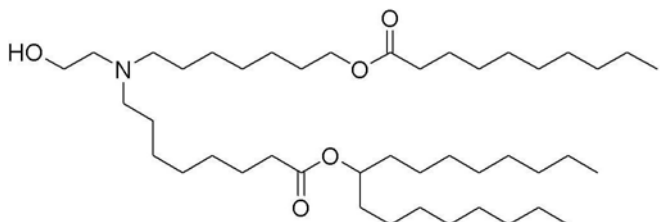
[0523]



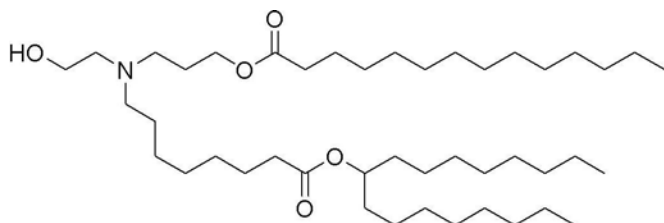
(化合物 94)、



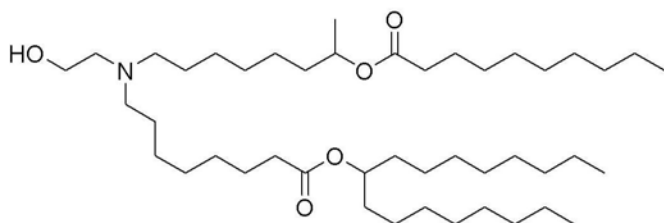
(化合物 95)、



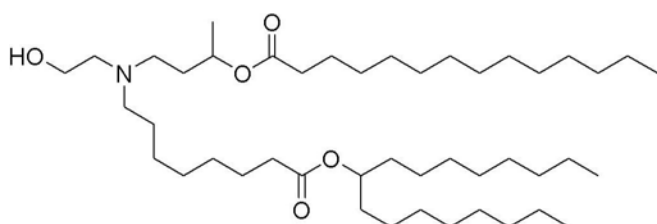
(化合物 96)、



(化合物 97)、

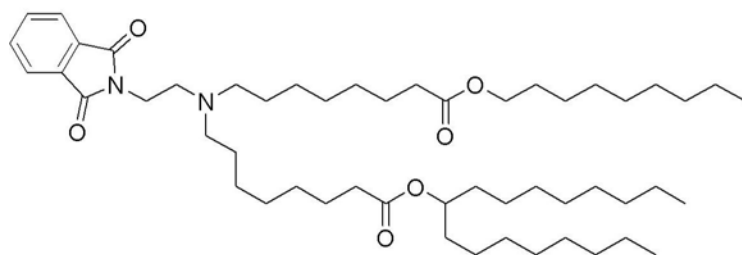


(化合物 98)、

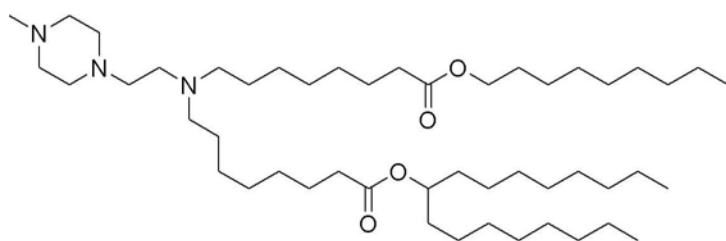


(化合物 99)、

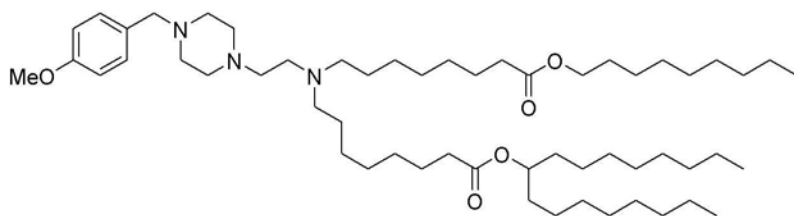
[0524]



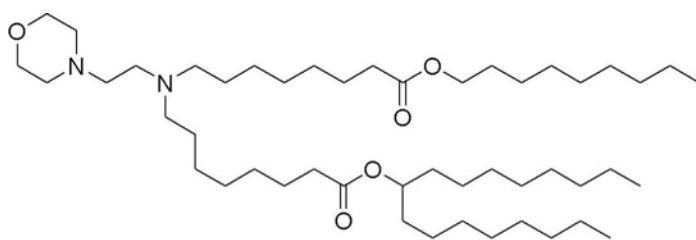
(化合物 100)、



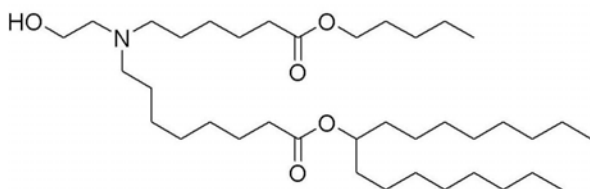
(化合物 101)、



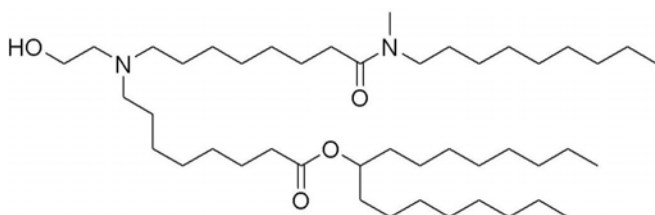
(化合物 102)、



(化合物 103)、

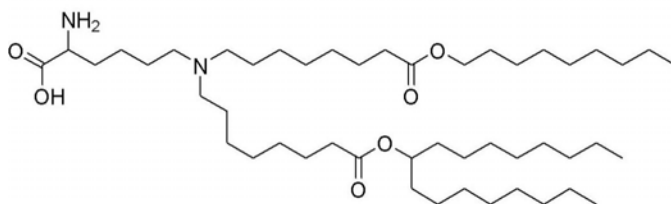


(化合物 104)、

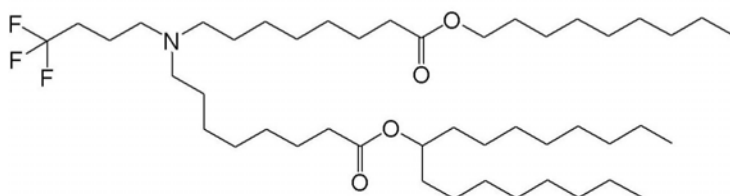


(化合物 105)、

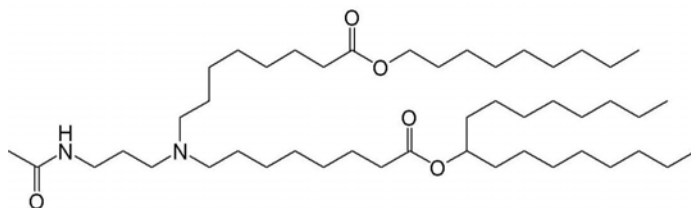
[0525]



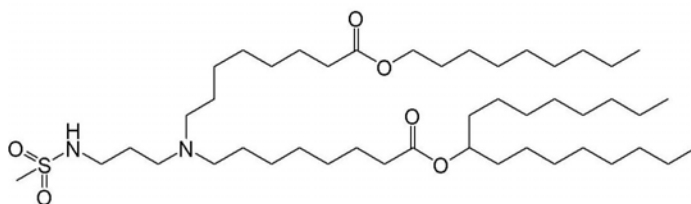
(化合物 106)、



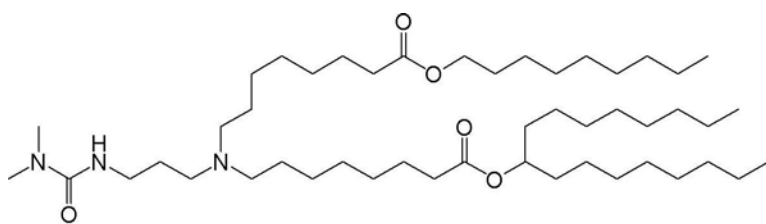
(化合物 107)、



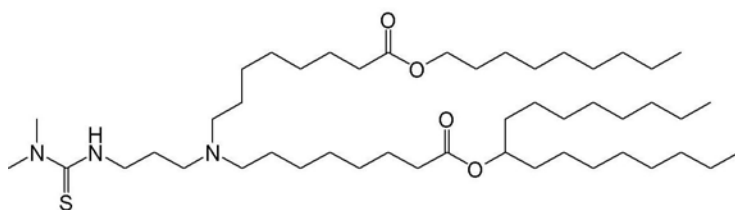
(化合物 108)、



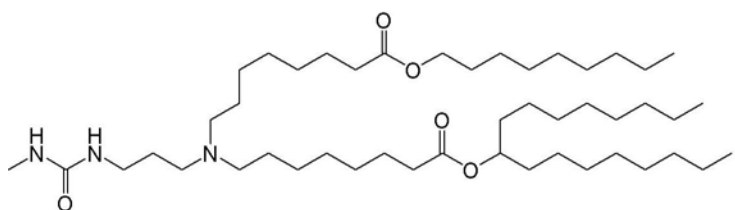
(化合物 109)、



(化合物 110)、

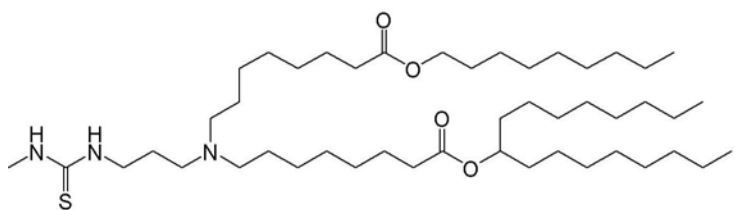


(化合物 111)、

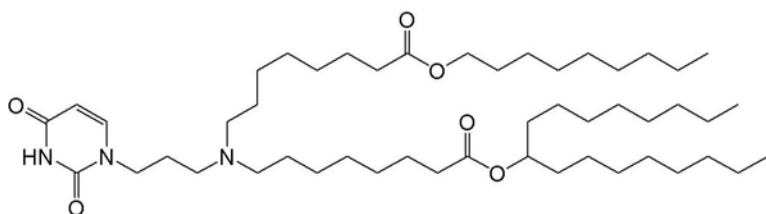


(化合物 112)、

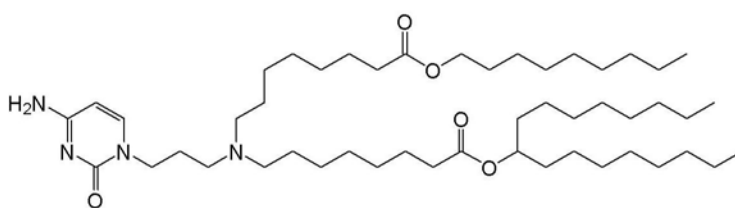
[0526]



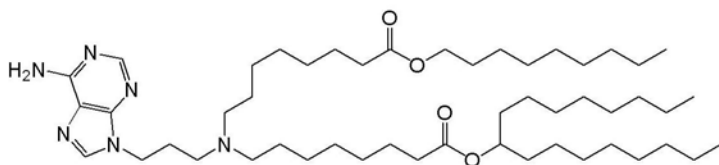
(化合物 113)、



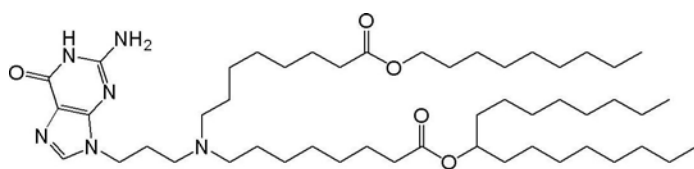
(化合物 114)、



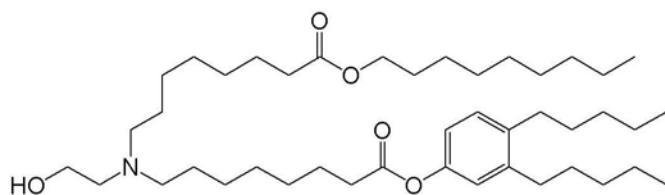
(化合物 115)、



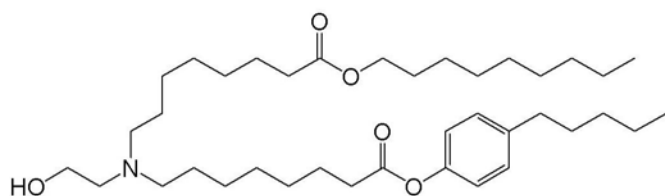
(化合物 116)、



(化合物 117)、

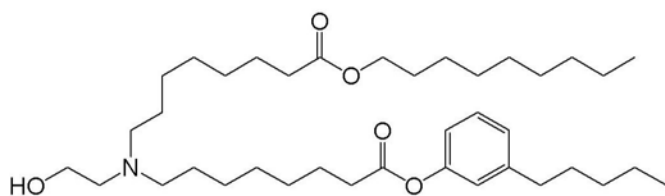


(化合物 118)、

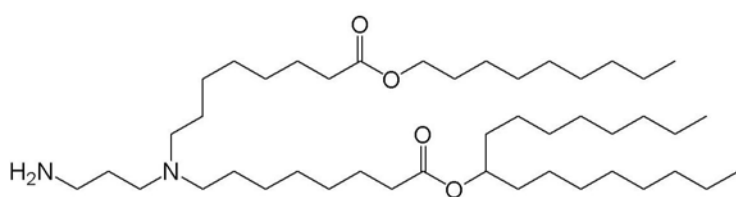


(化合物 119)、

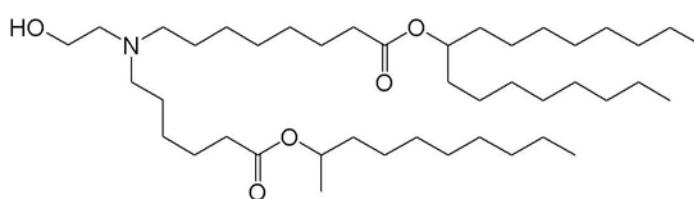
[0527]



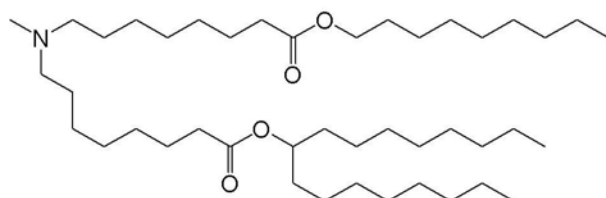
(化合物 120)、



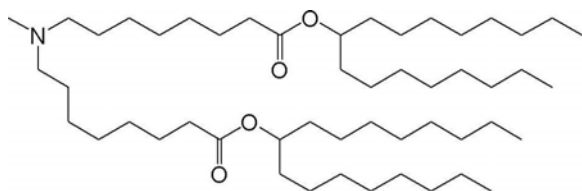
(化合物 121)、



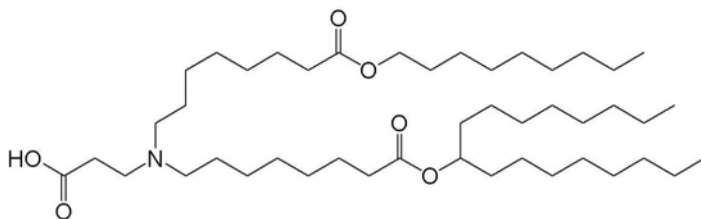
(化合物 122)、



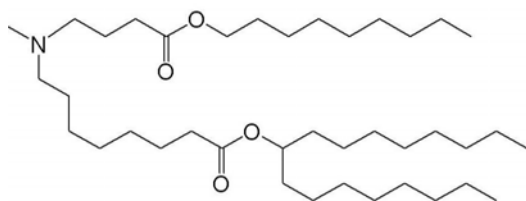
(化合物 123)、



(化合物 124)、

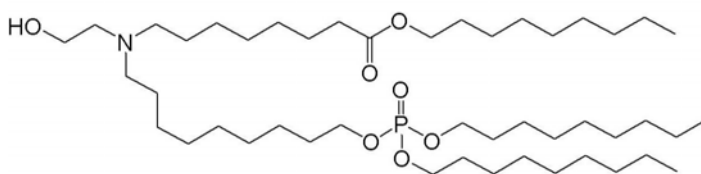


(化合物 125)、

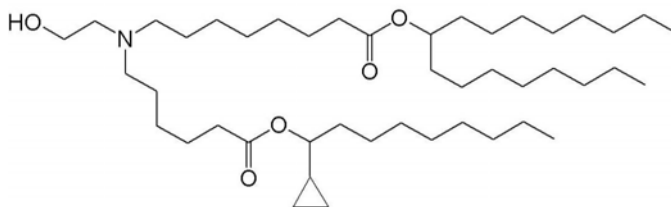


(化合物 126)、

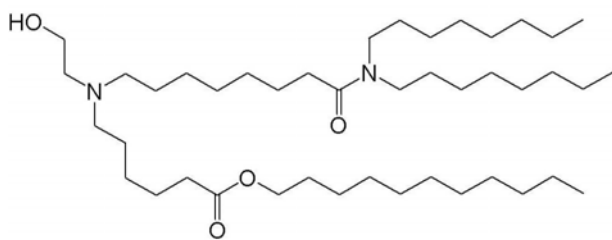
[0528]



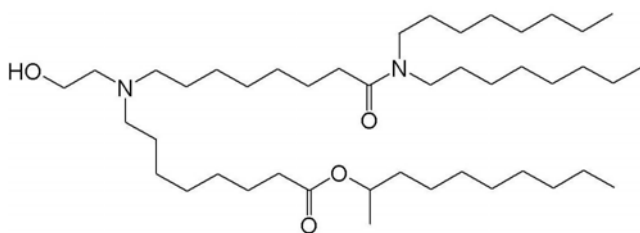
(化合物 127)、



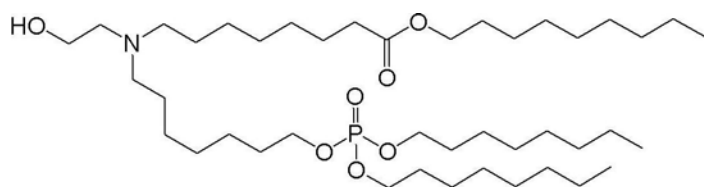
(化合物 128)、



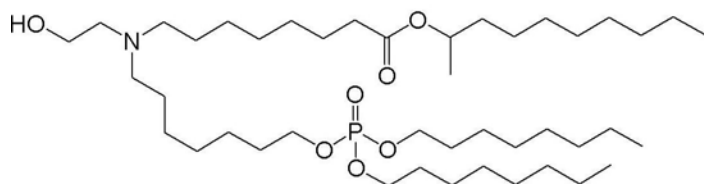
(化合物 129)、



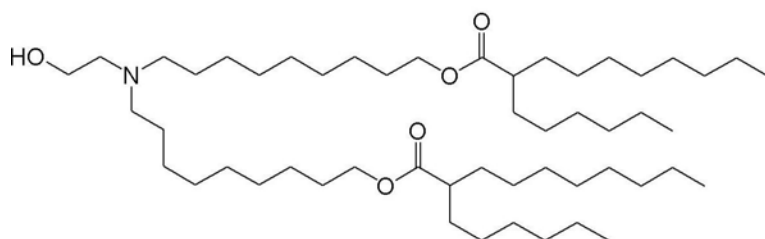
(化合物 130)、



(化合物 131)、

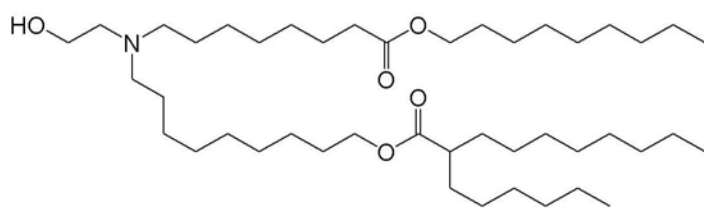


(化合物 132)、

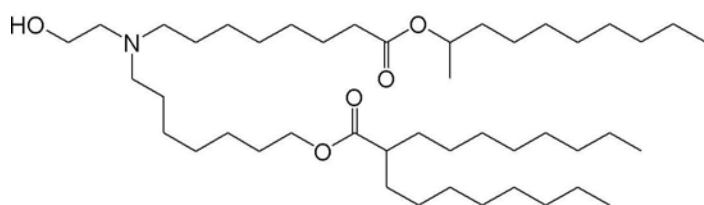


(化合物 133)、

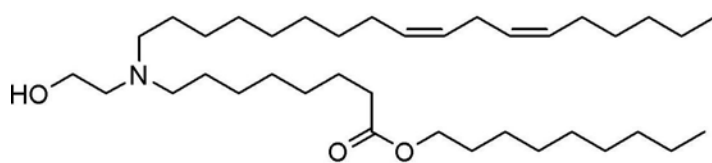
[0529]



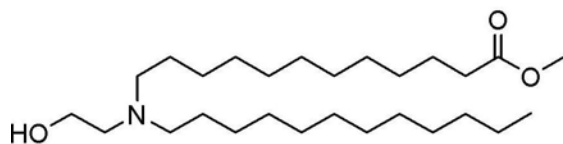
(化合物 134)、



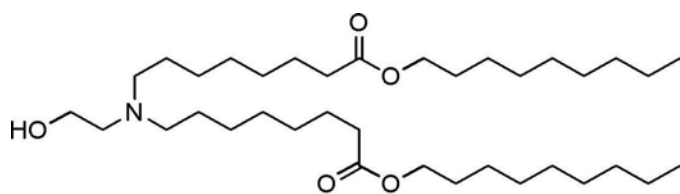
(化合物 135)、



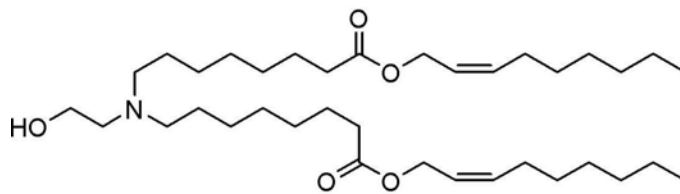
(化合物 136)、



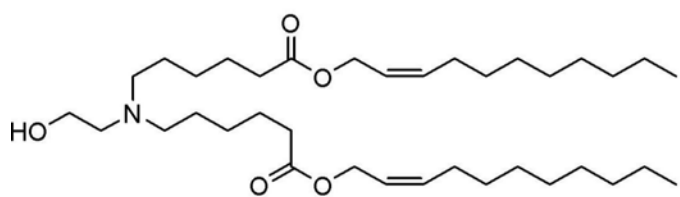
(化合物 137)、



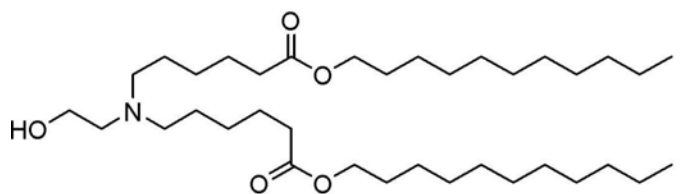
(化合物 138)、



(化合物 139)、

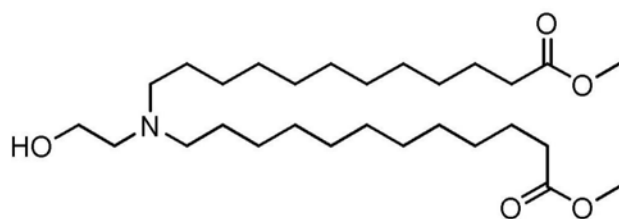


(化合物 140)、

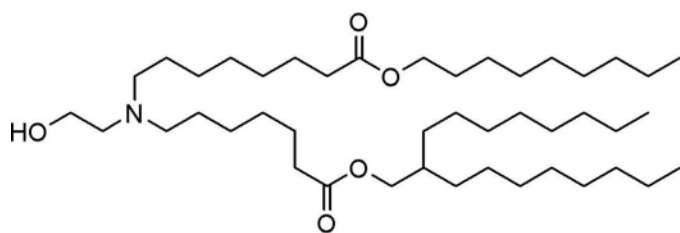


[0530]

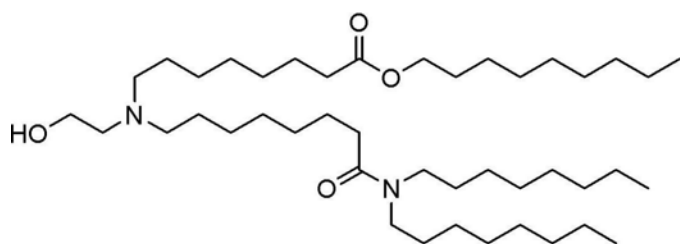
(化合物 141)



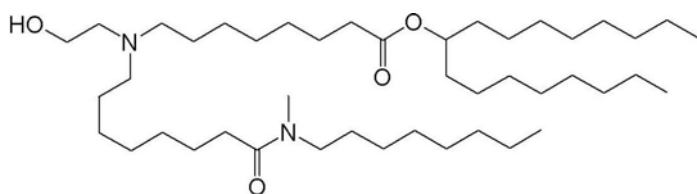
(化合物 142)、



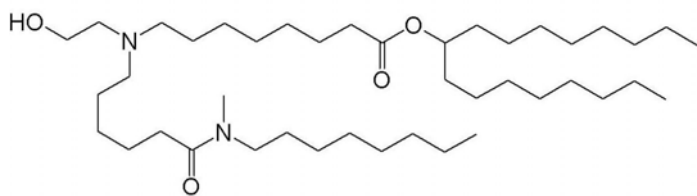
(化合物 143)、



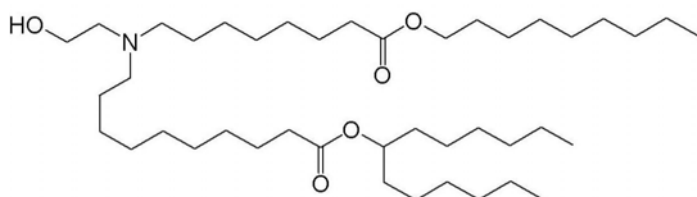
(化合物 144)、



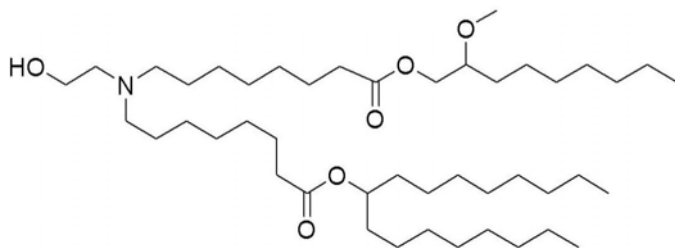
(化合物 145)、



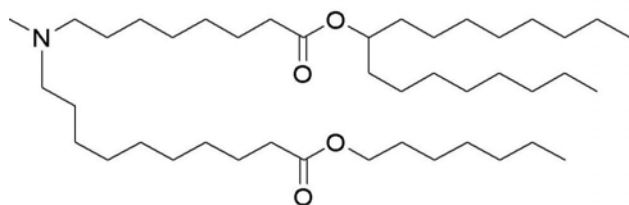
(化合物 146)、



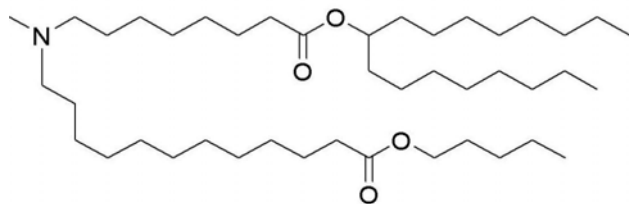
(化合物 147)、



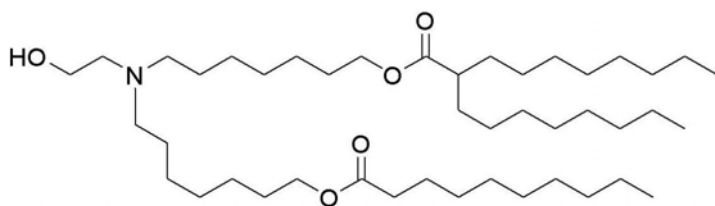
(化合物 148)、



(化合物 149)、

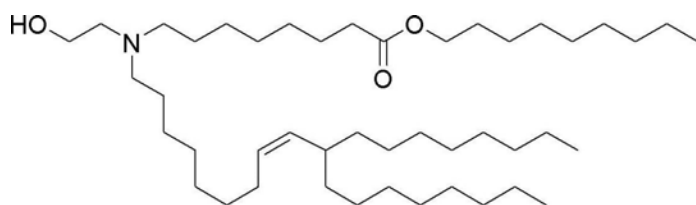


(化合物 150)、

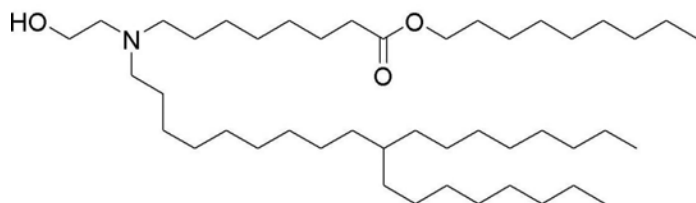


(化合物 151)、

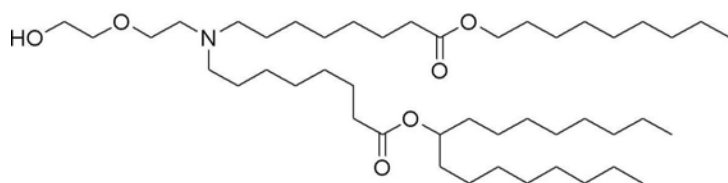
[0531]



(化合物 152)、

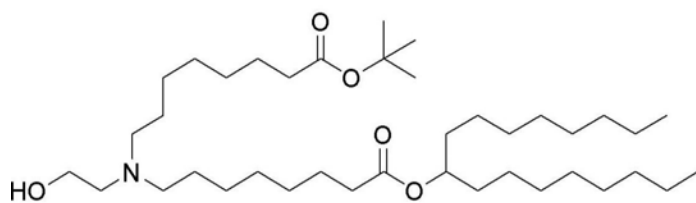


(化合物 153)、

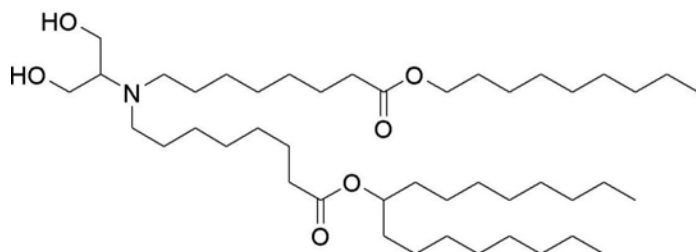


(化合物 154)、

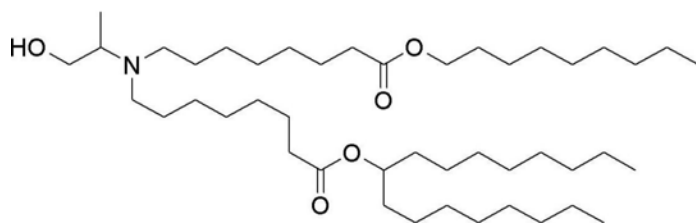
[0532]



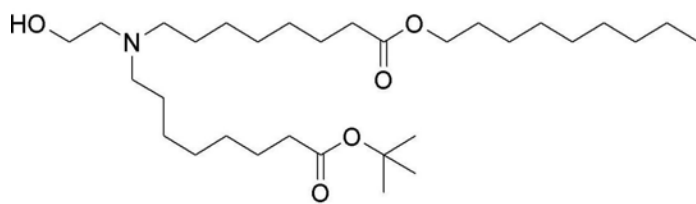
(化合物 155)、



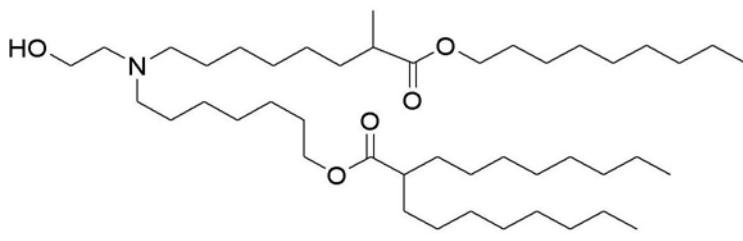
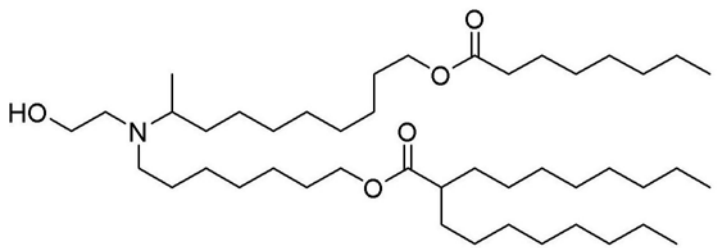
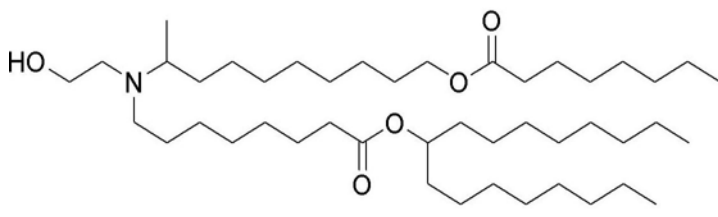
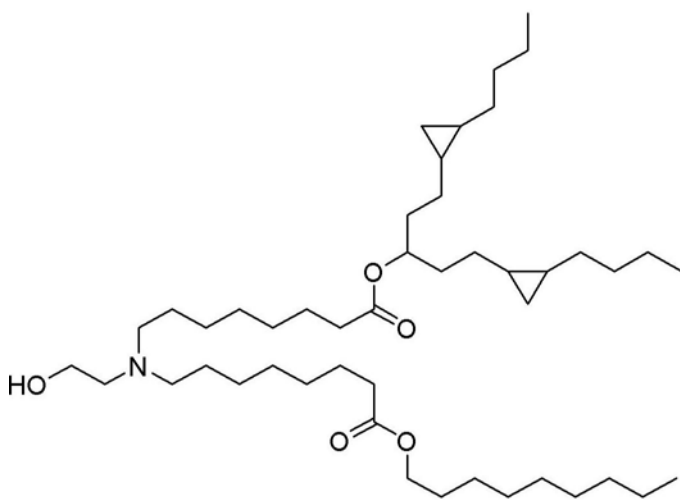
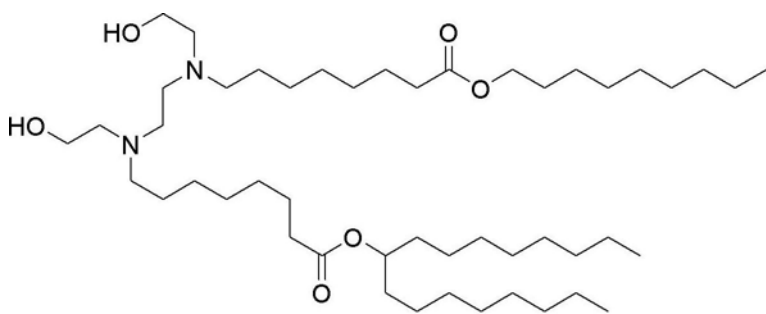
(化合物 156)、

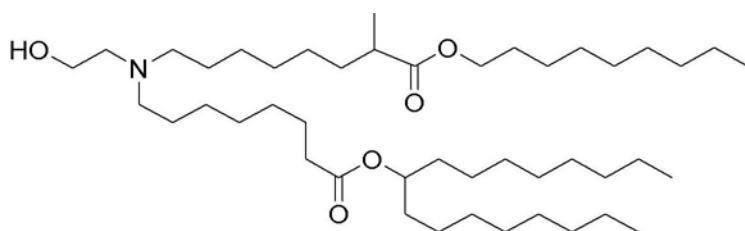


(化合物 157)、

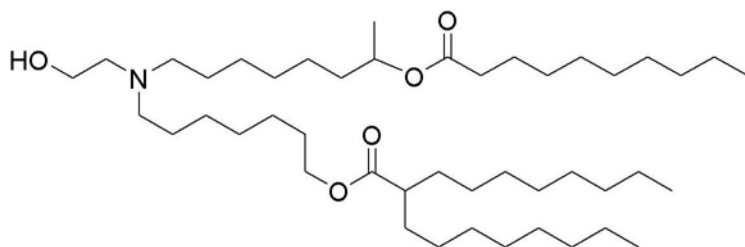


(化合物 158)、

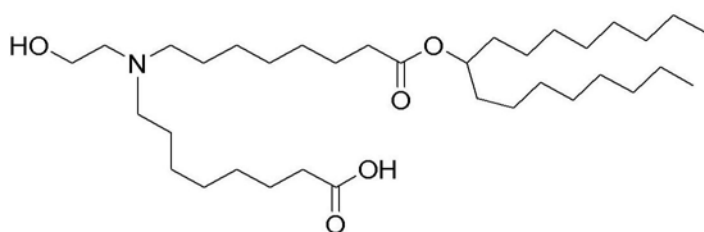




(化合物 164)、

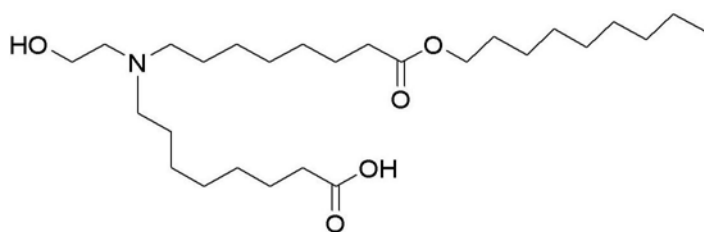


(化合物 165)、

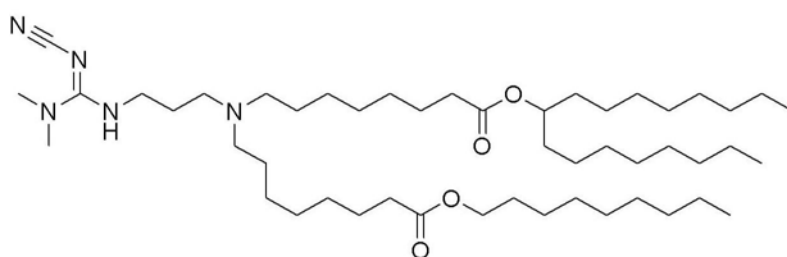


(化合物 166)、

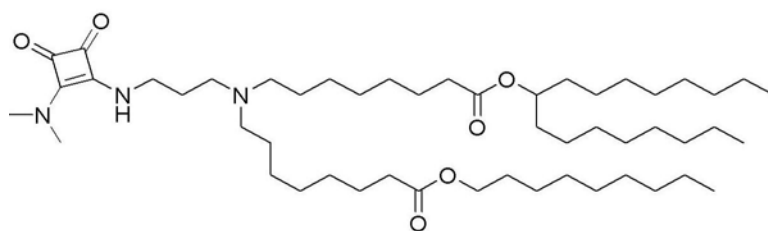
[0534]



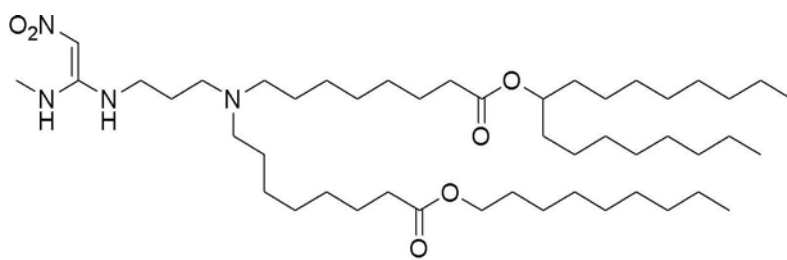
(化合物 167)、



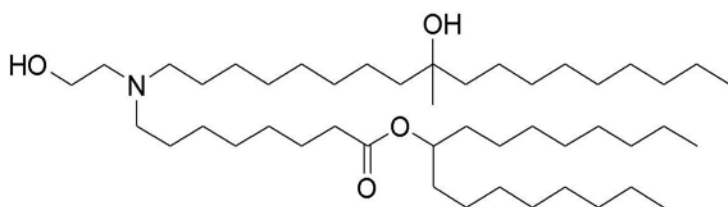
(化合物 168)、



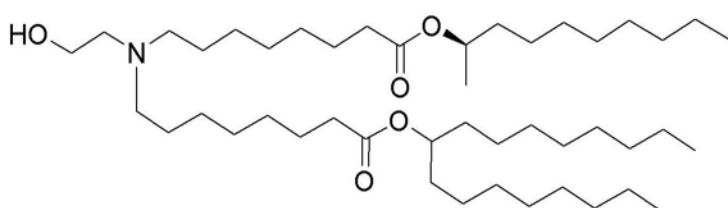
(化合物 169)、



(化合物 170)、

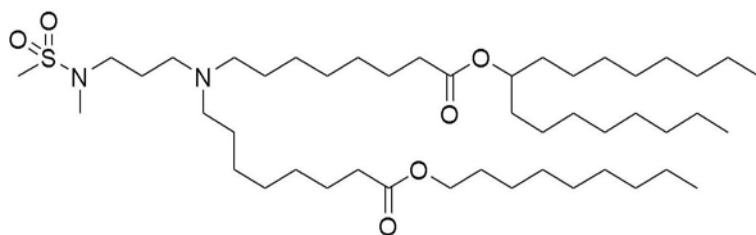


(化合物 171)、

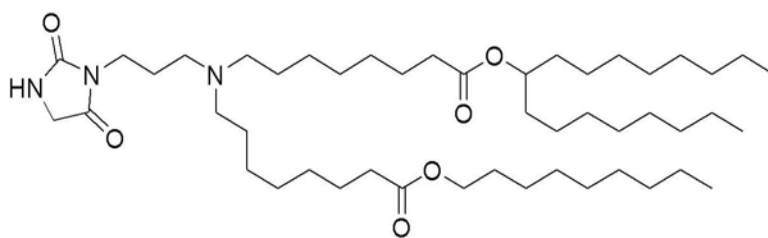


(化合物 172)、

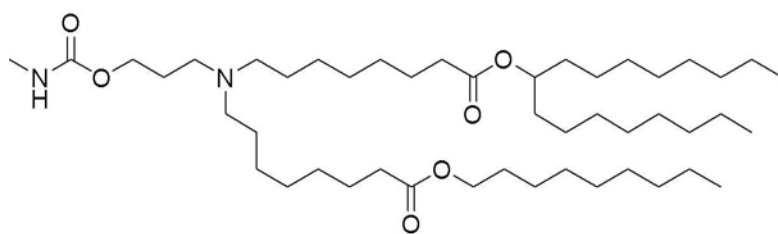
[0535]



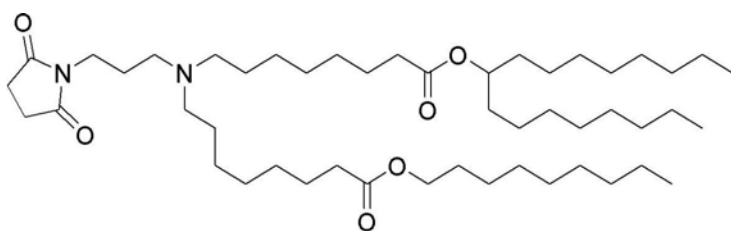
(化合物 173)、



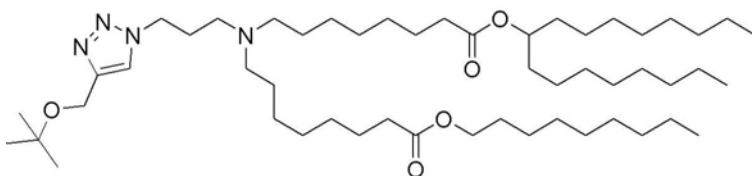
(化合物 174)、



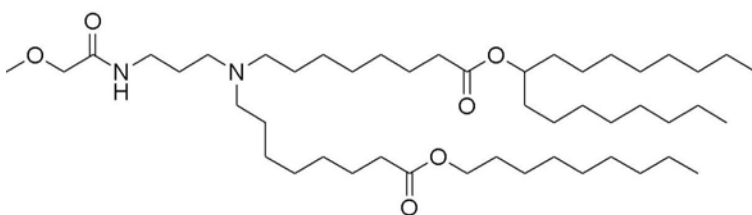
(化合物 175)、



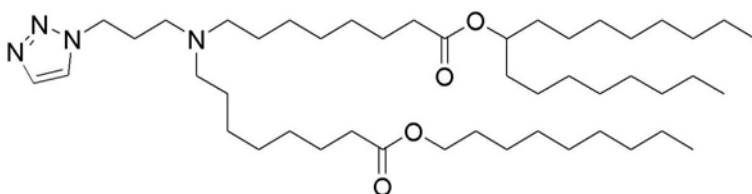
(化合物 176)、



(化合物 177)、

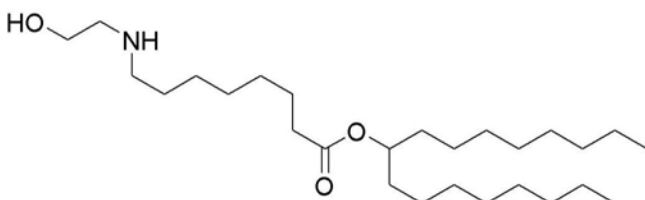


(化合物 178)、

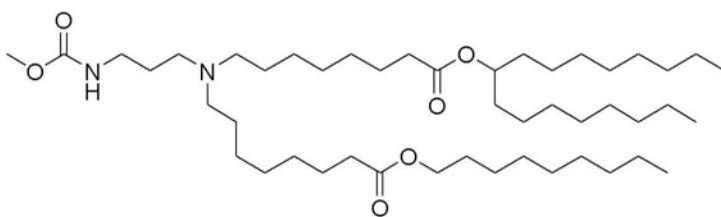


(化合物 179)、

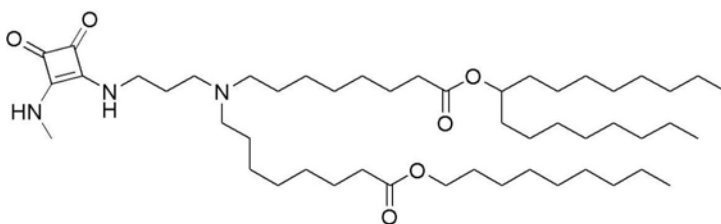
[0536]



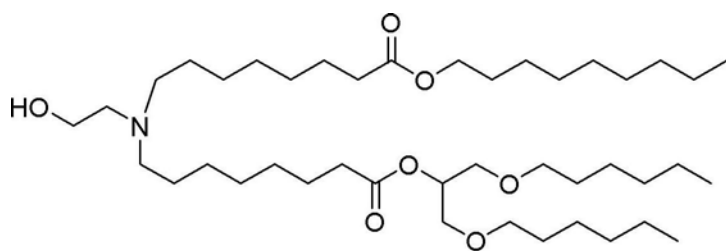
(化合物 180)、



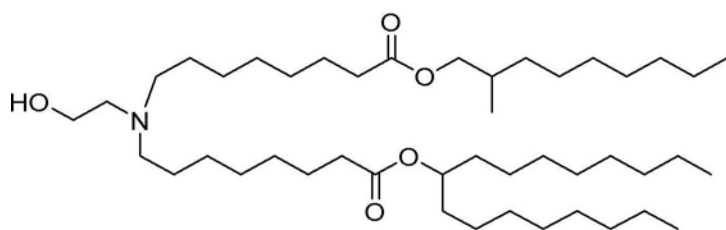
(化合物 181)、



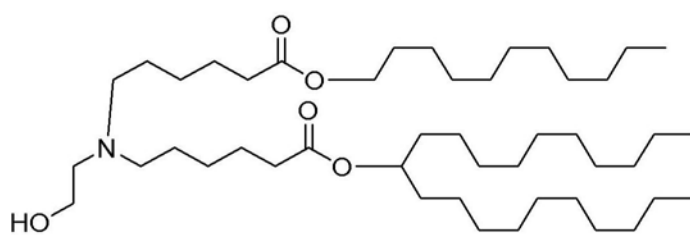
(化合物 182)、



(化合物 183)、

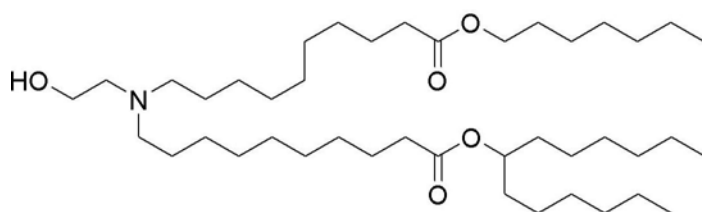


(化合物 184)、

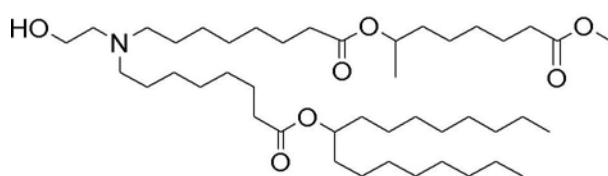


(化合物 185)、

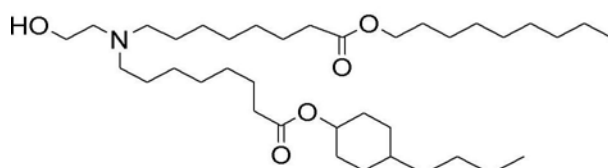
[0537]



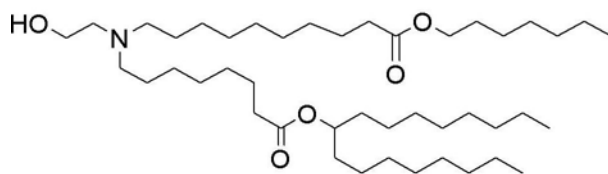
(化合物 186)、



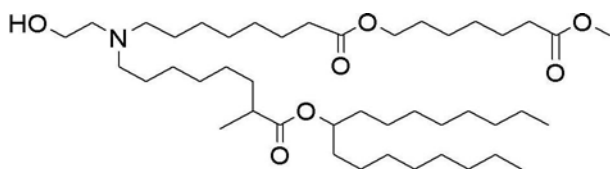
(化合物 187)、



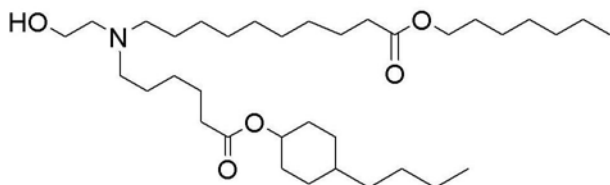
(化合物 188)、



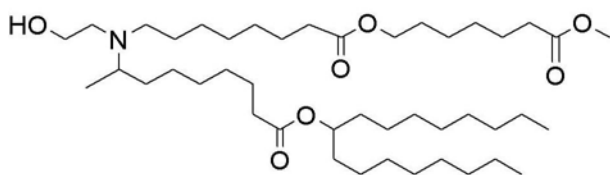
(化合物 189)、



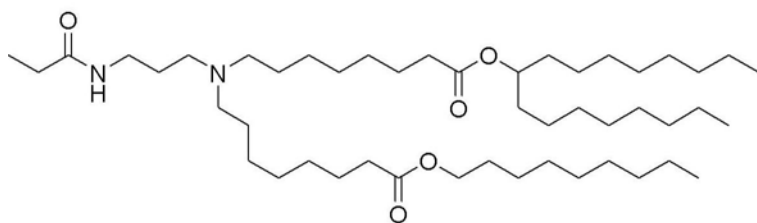
(化合物 190)、



(化合物 191)、

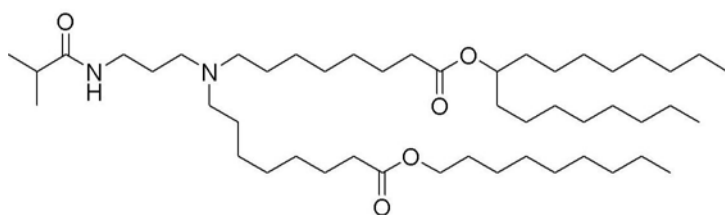


(化合物 192)、

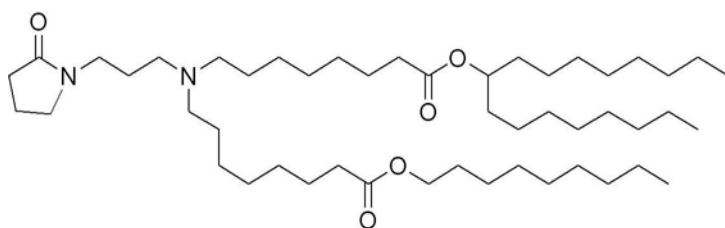


[0538]

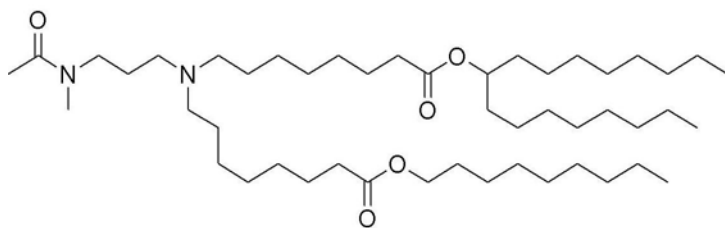
(化合物 193)、



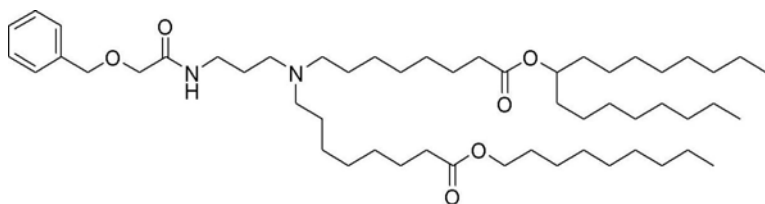
(化合物 194)、



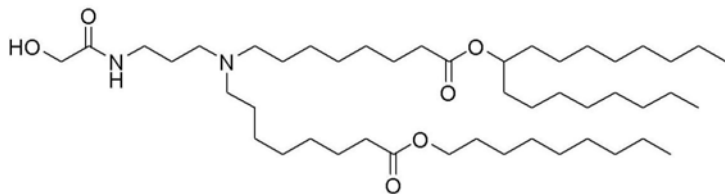
(化合物 195)、



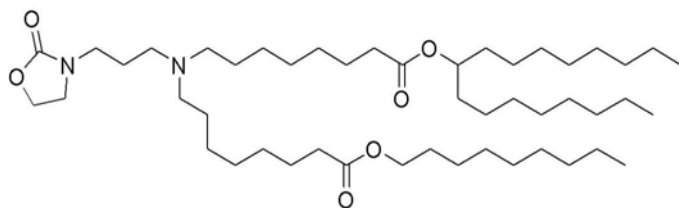
(化合物 196)、



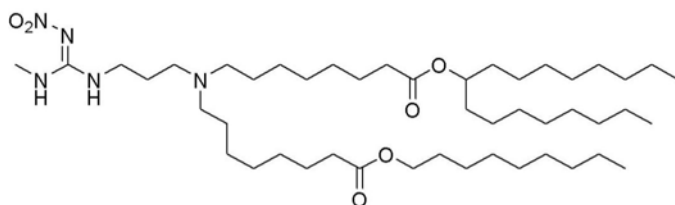
(化合物 197)、



(化合物 198)、

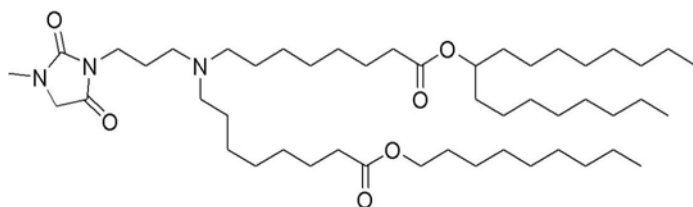


(化合物 199)、

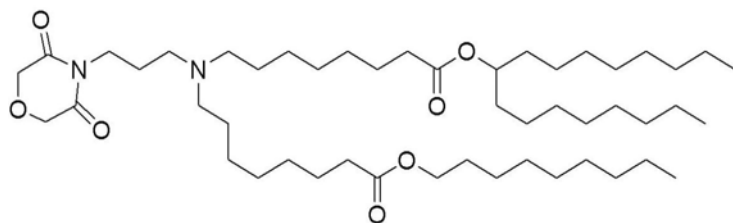


[0539]

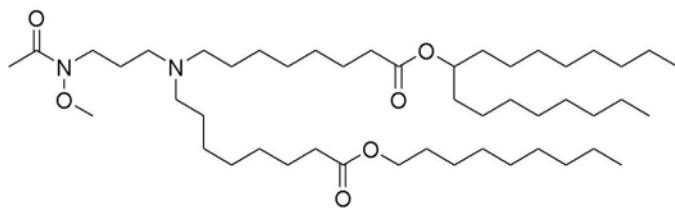
(化合物 200)、



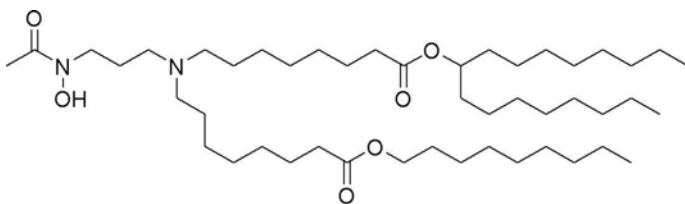
(化合物 201)、



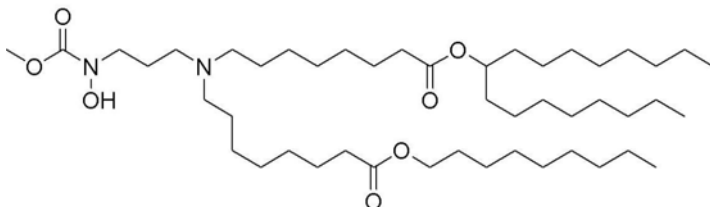
(化合物 202)、



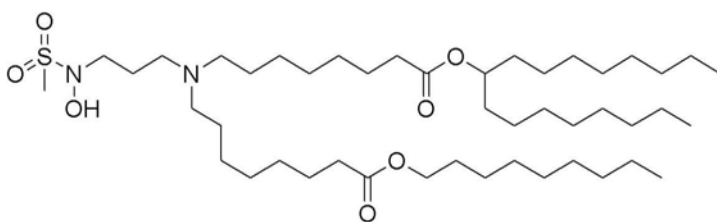
(化合物 203)、



(化合物 204)、

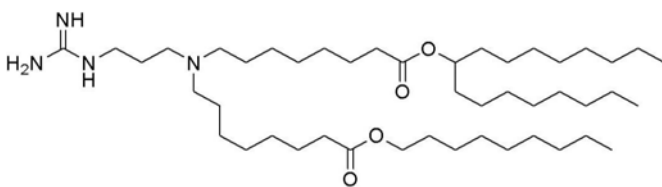


(化合物 205)、

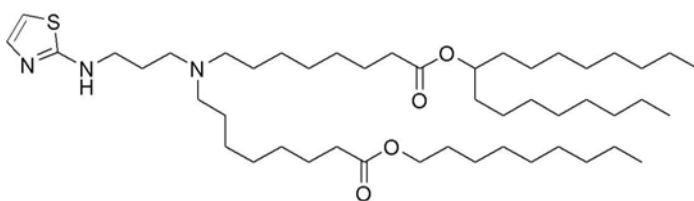


(化合物 206)、

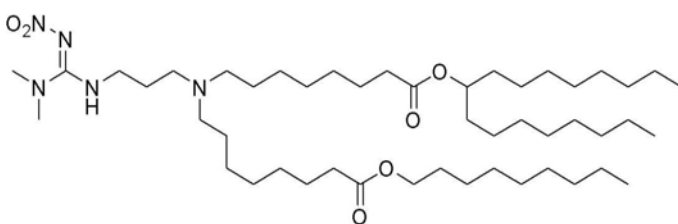
[0540]



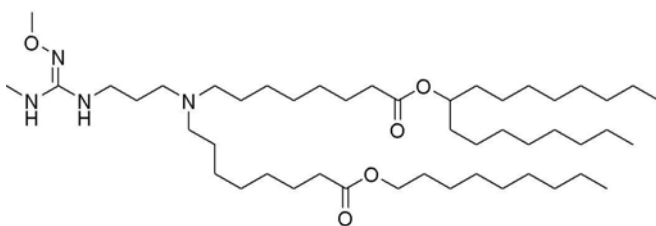
(化合物 207)、



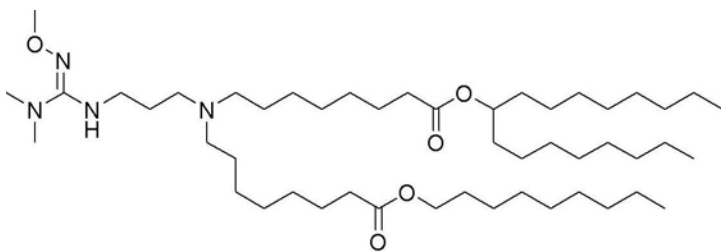
(化合物 208)、



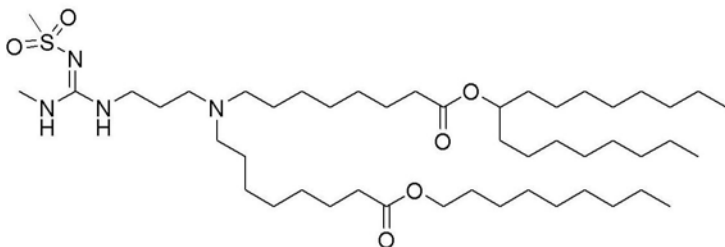
(化合物 209)、



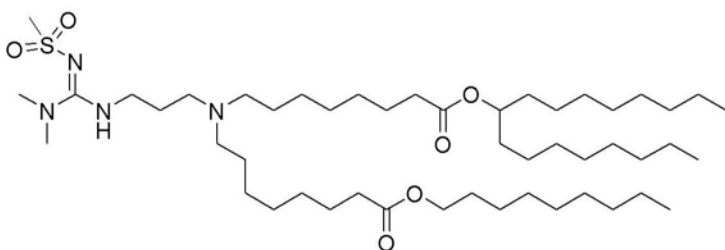
(化合物 210)、



(化合物 211)、

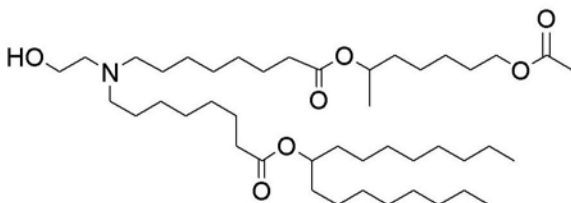


(化合物 212)、

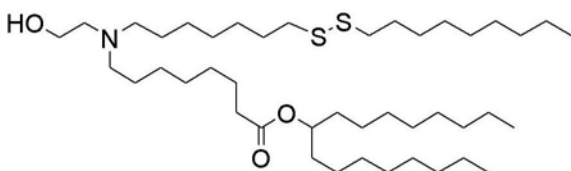


(化合物 213)、

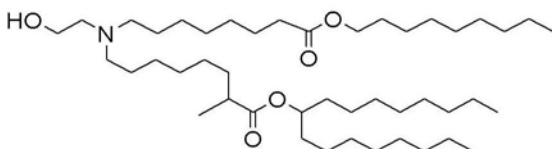
[0541]



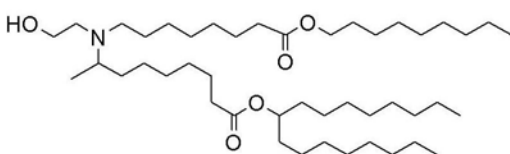
(化合物 214)、



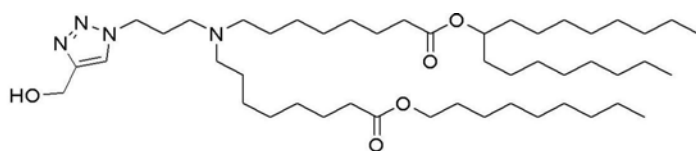
(化合物 215)、



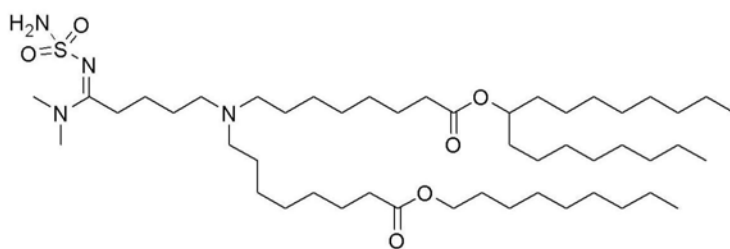
(化合物 216)、



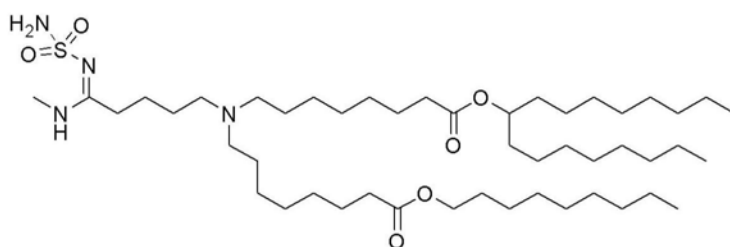
(化合物 217)、



(化合物 218)、

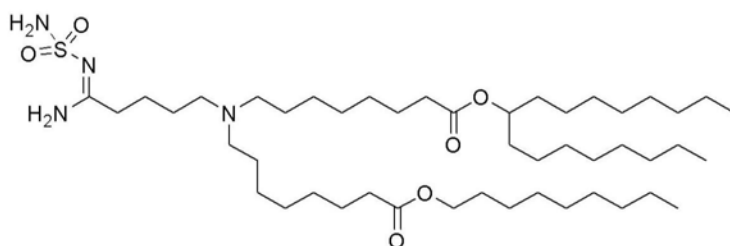


(化合物 219)、

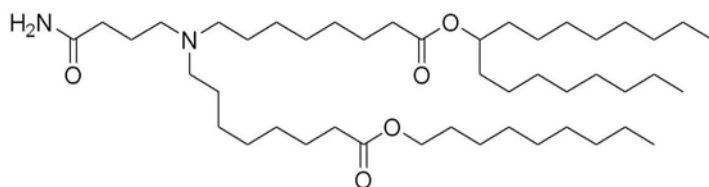


(化合物 220)、

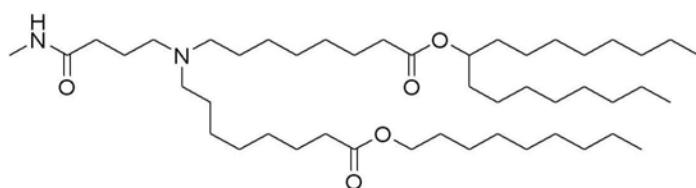
[0542]



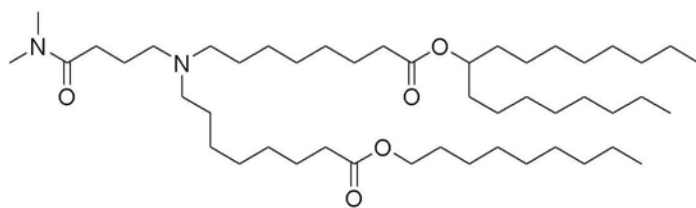
(化合物 221)、



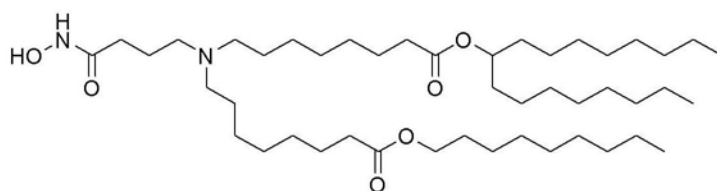
(化合物 222)、



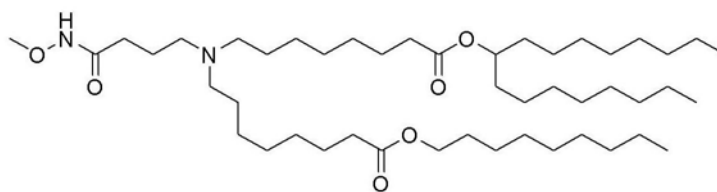
(化合物 223)、



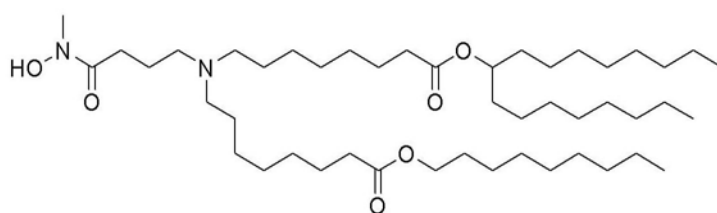
(化合物 224)、



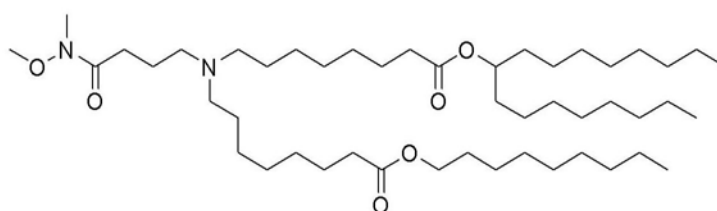
(化合物 225)、



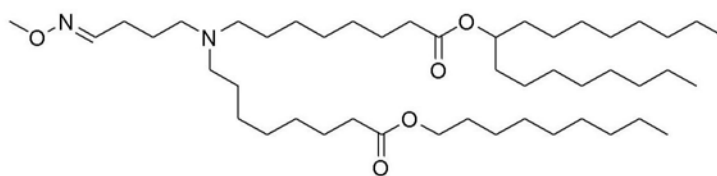
(化合物 226)、



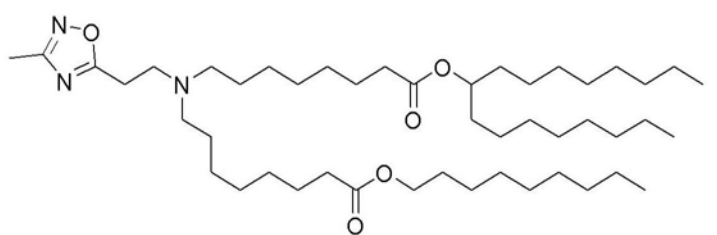
(化合物 227)、



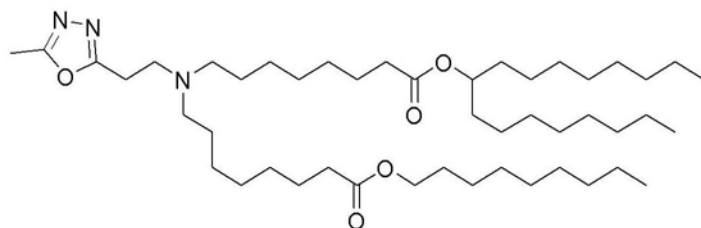
(化合物 228)、



(化合物 229)、

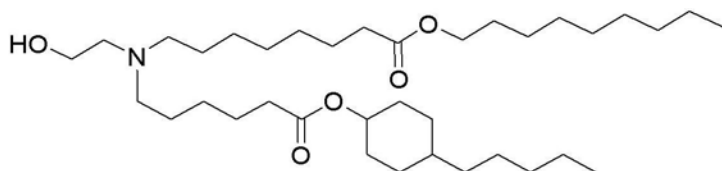


(化合物 230)、



(化合物 231)、

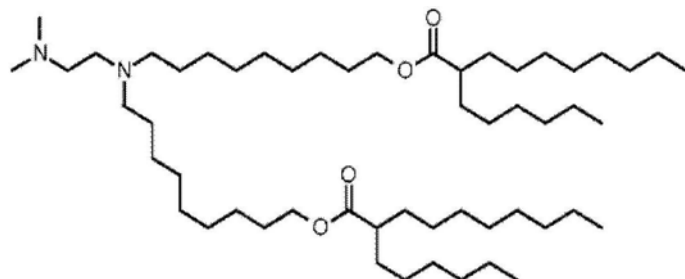
[0543]



(化合物 232)

[0545] 及其盐和异构体。

[0546] 在一些实施方案中, 纳米粒子包含以下化合物:



(化合物 233)

[0548] 或其盐和异构体。

[0549] 在一些实施方案中,本公开的特征在于一种纳米粒子组合物,其包括包含如本文所述的化合物(例如根据式(I)、(IA)、(II)、(IIa)、(IIb)、(IIc)、(IIId)或(IIe)的化合物)的脂质组分。

[0550] 在本发明的其他方面,也提供用于实现这些方法的试剂盒。试剂盒包括容纳脂质纳米粒子制剂的容器、容纳疫苗制剂的容器和关于以下的说明书:将个人化mRNA癌症疫苗添加至所述疫苗制剂中以产生个人化mRNA癌症疫苗制剂,在向受试者施用的24小时内使所述个人化mRNA癌症疫苗制剂与所述脂质纳米粒子制剂混合。在一些实施方案中,试剂盒包括具有编码2-100种癌抗原的开放阅读框的mRNA。

[0551] 制品包括在一个或多个容器中的医药级或诊断级本发明化合物。制品可包括宣传或描述本发明化合物的用途的说明书或标签。

[0552] 如本文所用,“宣传”包括所有营商方法,包括教育、医院和其他临床教导、医药工业活动(包括医药销售)、以及任何做广告或其他促销活动(包括与本发明组合物关联癌症治疗相关的任何形式的书面、口头和电子沟通)的方法。

[0553] “说明书”可详细说明宣传组分,并且通常涉及在本发明组合物的包装上或与本发明组合物的包装相伴的书面说明书。说明书也可包括以任何方式提供的任何口头或电子说明书。

[0554] 因此, 在一些实施方案中, 可将本文所述的试剂集合至药物或诊断或研究试剂盒中以有助于它们用于治疗、诊断或研究应用中。试剂盒可包括一个或多个容纳本发明的组分的容器和使用说明书。具体来说, 所述试剂盒可包括一种或多种本文所述的试剂, 以及描述这些试剂的预定治疗应用和适当施用的说明书。在某些实施方案中, 试剂盒中的试剂可呈适于特定应用和适于施用所述试剂的方法的药物制剂和剂量形式。

[0555] 试剂盒可被设计来有助于由医师使用本文所述的方法,并且可采用许多形式。试剂盒的各组合在可适用时可以液体形式(例如以溶液形式)或以固体形式(例如干燥粉末)提供。在某些情况下,一些组合可例如通过添加可或可不与试剂盒一起提供的适合溶剂或其他物质(例如水或细胞培养基)来构成或另外加工(例如以获得活性形式)。如本文所

用,“说明书”可详细说明教导和/或宣传组分,并且通常涉及在本发明的包装上或与本发明的包装相伴的书面说明书。说明书也可包括以使得使用者将明确认识到说明书将与试剂盒相伴的任何方式提供的任何口头或电子说明书,例如视听沟通(例如录像带、DVD等)、因特网沟通和/或基于网络的沟通等。书面说明书可呈由监管药物或生物产品的制造、使用或销售的政府机构指定的形式,所述说明书也可反映由所述机构核准进行制造、使用或销售以达成向人施用。

[0556] 试剂盒可含有在一个或多个容器中的任何一种或多种本文所述的组分。作为一实例,在一个实施方案中,试剂盒可包括混合试剂盒的一种或多种组分和/或分离和混合样品以及向受试者进行施加的说明书。试剂盒可包括容纳本文所述的试剂的容器。试剂可被无菌制备,包装在注射器中,并且冷藏运送。或者,可将它安放在小瓶或其他容器中以进行储存。第二容器可具有无菌制备的其他试剂。或者,试剂盒可包括预先混合以及在注射器、小瓶、管或其他容器中以运送的活性剂。

[0557] 试剂盒可具有多种形式,诸如泡罩小袋、收缩包装小袋、真空可密封小袋、可密封热成形托盘、或其中附属品松散包装在小袋内的类似小袋或托盘形式、一个或多个管、容器、盒子或袋子。试剂盒可在添加附属品之后加以灭菌,由此使得容器中的个别附属品将另外被打开包装。试剂盒可使用任何适当灭菌技术加以灭菌,所述技术诸如辐射灭菌、加热灭菌或本领域中已知的其他灭菌方法。视特定应用而定,试剂盒也可包括其他组成部分,例如容器、细胞培养基、盐、缓冲剂、试剂、注射器、针、用于施加或移除消毒剂的织物诸如纱布、一次性手套、在施用之前用于试剂的载体等。

[0558] 试剂盒的组合物可以任何适合形式,例如以液体溶液形式或以干燥粉末形式提供。当提供的组合物是干燥粉末时,所述粉末可通过添加也可加以提供的适合溶剂来复原。在其中使用组合物的液体形式的实施方案中,液体形式可为浓缩的或即用的。溶剂将取决于化合物和使用或施用模式。适于药物组合物的溶剂是熟知的,并且可在文献中获得。溶剂将取决于化合物和使用或施用模式。

[0559] 在一组实施方案中,试剂盒可包括被划分来以紧密限制方式容纳一个或多个容器部件诸如小瓶、管等的载体部件,各容器部件包含待用于方法中的单独要素中的一者。举例来说,一个容器可包含测定的阳性对照。另外,试剂盒可包括用于其他组分例如适用于测定中的缓冲剂的容器。

[0560] 本发明也涵盖一种成品包装和标签化药物产品。这个制品包括在适当器皿或容器诸如玻璃小瓶或其他气密容器中的适当单位剂型。在适于胃肠外施用的剂型的情况下,活性成分是无菌的,并且适于以无颗粒溶液形式施用。换句话说,本发明涵盖胃肠外溶液与冻干粉末两者,各自是无菌的,并且后者适于在注射之前进行复原。或者,单位剂型可为适于口服、经皮、经表面或经粘膜递送的固体。

[0561] 在一优选实施方案中,单位剂型适于静脉内、肌肉内或皮下递送。因此,本发明涵盖优选是无菌的,适于各个递送途径的溶液。

[0562] 在另一优选实施方案中,将本发明组合物与生物可相容清洁剂(包括但不限于卵磷脂、牛磺胆酸和胆固醇)一起;或与其他蛋白质(包括但不限于 γ 球蛋白和血清白蛋白)一起储存在容器中。更优选地,将本发明组合物与人血清白蛋白一起储存以达成在人中使用,以及与牛血清白蛋白一起储存以达成兽医学使用。

[0563] 如同任何药物产品一样,包装材料和容器被设计来在储存和运送期间保护产品的稳定性。此外,本发明的产品包括使用说明书或建议医师、技术人员或患者如何适当预防或治疗所论述的疾病或病症的其他信息材料。换句话说,制品包括指示或建议包括但不限于实际剂量、监测程序(诸如用于监测平均绝对淋巴细胞计数、肿瘤细胞计数和肿瘤尺寸的方法)和其他监测信息的给药方案的说明书部件。

[0564] 更具体来说,本发明提供一种制品,其包括包装材料诸如盒子、瓶、管、小瓶、容器、喷雾器、吹入器、静脉内(i.v.)袋、封袋等;以及在所述包装材料内含有的药物制剂的至少一种单位剂型。本发明也提供一种制品,其包括包装材料诸如盒子、瓶、管、小瓶、容器、喷雾器、吹入器、静脉内(i.v.)袋、封袋等;以及在所述包装材料内含有的各药物制剂的至少一种单位剂型。本发明进一步提供一种制品,其包括包装材料诸如盒子、瓶、管、小瓶、容器、喷雾器、吹入器、静脉内(i.v.)袋、封袋等;以及在所述包装材料内含有的各药物制剂的至少一种单位剂型。本发明进一步提供一种制品,其包括用于注射制剂的优选以无菌形式包装的针或注射器,和/或包装酒精片。

[0565] 疫苗组合物中的活性成分、药学上可接受的赋形剂和/或任何其他成分的相对量可根据所治疗受试者的身份、身材和/或状况而变化,并且进一步根据组合物的施用途径而变化。举例来说,组合物可包含在0.1%与99%(w/w)之间的活性成分。举例来说,组合物可包含在0.1%与100%之间,例如在.5与50%之间,在1-30%之间,在5-80%之间,至少80%(w/w)的活性成分。

[0566] 在一些实施方案中,RNA(例如mRNA)疫苗组合物可在足以递送每kg受试者体重0.0001mg至100mg,0.001mg至0.05mg,0.005mg至0.05mg,0.001mg至0.005mg,0.05mg至0.5mg,0.01mg至50mg,0.1mg至40mg,0.5mg至30mg,0.01mg至10mg,0.1mg至10mg,或1mg至25mg的剂量水平下每天,一天一次或多次,每周,每个月等施用以获得所需治疗、诊断、防治或成像作用(参见例如国际公布号W02013078199中所述的单位剂量的范围,所述公布以引用的方式整体并入本文)。所需剂量可一天三次、一天两次、一天一次、每隔一天、每三天、每周、每两周、每三周,每四周,每2个月,每3个月,每6个月等加以递送。在某些实施方案中,可使用多次施用(例如两次、三次、四次、五次、六次、七次、八次、九次、十次、十一次、十二次、十三次、十四次或更多次施用)来递送所需剂量。当采用多次施用时,可使用分次给药方案,诸如本文所述的那些。在一些实施方案中,RNA疫苗组合物可在足以递送0.0005mg/kg至0.01mg/kg,例如约0.0005mg/kg至约0.0075mg/kg,例如约0.0005mg/kg、约0.001mg/kg、约0.002mg/kg、约0.003mg/kg、约0.004mg/kg或约0.005mg/kg的剂量水平下施用。在一些实施方案中,RNA疫苗组合物可在足以递送0.025mg/kg至0.250mg/kg,0.025mg/kg至0.500mg/kg,0.025mg/kg至0.750mg/kg,或0.025mg/kg至1.0mg/kg的剂量水平下施用一次或两次(或更多次)。

[0567] 在一些实施方案中,RNA疫苗组合物可在以下总剂量下或在足以递送以下总剂量的剂量水平下施用两次(例如第0天和第7天、第0天和第14天、第0天和第21天、第0天和第28天、第0天和第60天、第0天和第90天、第0天和第120天、第0天和第150天、第0天和第180天、第0天和3个月后、第0天和6个月后、第0天和9个月后、第0天和12个月后、第0天和18个月后、第0天和2年后、第0天和5年后、或第0天和10年后):0.0100mg、0.025mg、0.050mg、0.075mg、0.100mg、0.125mg、0.150mg、0.175mg、0.200mg、0.225mg、0.250mg、0.275mg、0.300mg、

0.325mg、0.350mg、0.375mg、0.400mg、0.425mg、0.450mg、0.475mg、0.500mg、0.525mg、0.550mg、0.575mg、0.600mg、0.625mg、0.650mg、0.675mg、0.700mg、0.725mg、0.750mg、0.775mg、0.800mg、0.825mg、0.850mg、0.875mg、0.900mg、0.925mg、0.950mg、0.975mg或1.0mg。本公开涵盖更高和更低施用剂量和频率。举例来说,可施用RNA疫苗组合物3次或4次。

[0568] 在一些实施方案中,RNA疫苗组合物可在以下总剂量下或在足以递送以下总剂量的剂量水平下施用两次(例如第0天和第7天、第0天和第14天、第0天和第21天、第0天和第28天、第0天和第60天、第0天和第90天、第0天和第120天、第0天和第150天、第0天和第180天、第0天和3个月后、第0天和6个月后、第0天和9个月后、第0天和12个月后、第0天和18个月后、第0天和2年后、第0天和5年后、或第0天和10年后):0.010mg、0.025mg、0.100mg或0.400mg。

[0569] 在一些实施方案中,用于对受试者接种疫苗的方法中的RNA疫苗以用以对所述受试者接种疫苗的有效量,以在10 μ g/kg与400 μ g/kg之间的单次剂量的核酸疫苗向所述受试者施用。在一些实施方案中,用于对受试者接种疫苗的方法中的RNA疫苗以用以对所述受试者接种疫苗的有效量,以在10 μ g与400 μ g之间的单次剂量的核酸疫苗向所述受试者施用。

[0570] 在一些实施方案中,RNA疫苗组合物可包含在包含MC3、胆固醇、DSPC和PEG2000-DMG的脂质纳米粒子、缓冲剂柠檬酸钠、蔗糖和注射用水中配制的本文所述的多核苷酸。作为一非限制性实例,组合物包含:2.0mg/mL的药物物质(例如编码癌抗原的多核苷酸),21.8mg/mL的MC3,10.1mg/mL的胆固醇,5.4mg/mL的DSPC,2.7mg/mL的PEG2000-DMG,5.16mg/mL的柠檬酸钠,71mg/mL的蔗糖和1.0mL的注射用水。

[0571] 在一些实施方案中,纳米粒子(例如脂质纳米粒子)具有10-500nm、20-400nm、30-300nm、40-200nm的平均直径。在一些实施方案中,纳米粒子(例如脂质纳米粒子)具有50-150nm、50-200nm、80-100nm或80-200nm的平均直径。

[0572] 鞭毛素是一种具有约500个氨基酸的单体蛋白质,其聚合以形成与细菌运动相关的鞭毛。鞭毛素由多种鞭毛细菌(例如鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*))以及非鞭毛细菌(诸如大肠杆菌(*Escherichia coli*))表达。先天性免疫系统的细胞(树突细胞、巨噬细胞等)对鞭毛素的感知由Toll样受体5(TLR5)以及由Nod样受体(NLR)Ipaf和Naip5介导。TLR和NLR已被鉴定为在使先天性免疫应答和适应性免疫应答活化方面起作用。因此,鞭毛素在疫苗中提供佐剂作用。

[0573] 编码已知鞭毛素多肽的核苷酸和氨基酸序列可在NCBI GenBank数据库中公开获得。来自鼠伤寒沙门氏菌(*S. Typhimurium*)、幽门螺旋杆菌(*H. Pylori*)、霍乱弧菌(*V. Cholera*)、粘质沙雷氏菌(*S. marcesens*)、福氏志贺菌(*S. flexneri*)、梅毒密螺旋体(*T. Pallidum*)、嗜肺军团菌(*L. pneumophila*)、伯氏疏螺旋体(*B. burgdorferi*)、艰难梭菌(*C. difficile*)、苜蓿根瘤菌(*R. meliloti*)、根癌土壤杆菌(*A. tumefaciens*)、羽扇豆根瘤菌(*R. lupini*)、克拉里奇巴尔通氏体(*B. clarridgeiae*)、奇异变形杆菌(*P. Mirabilis*)、枯草芽孢杆菌(*B. subtilus*)、单核细胞增多性李斯特菌(*L. monocytogenes*)、绿脓假单胞菌(*P. aeruginosa*)和大肠杆菌(*E. coli*)的鞭毛素序列以及其他鞭毛素序列是已知的。

[0574] 如本文所用的鞭毛素多肽是指全长鞭毛素蛋白、其免疫原性片段以及与鞭毛素蛋白或其免疫原性片段具有至少50%序列同一性的肽。示例性鞭毛素蛋白包括来自伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhi*) (UniPro条目号:Q56086)、鼠伤寒沙门氏菌(A0A0C9DG09)、肠炎沙

门氏菌 (*Salmonella enteritidis*) (A0A0C9BAB7) 和肠道沙门氏菌 (*Salmonella choleraesuis*) (Q6V2X8) 的鞭毛素, 以及具有由SEQ ID NO:420-422中的任一者标识的氨基酸序列(表66)的蛋白质。在一些实施方案中, 鞭毛素多肽与鞭毛素蛋白或其免疫原性片段具有至少60%、70%、75%、80%、90%、95%、97%、98%或99%序列同一性。

[0575] 在一些实施方案中, 鞭毛素多肽是免疫原性片段。免疫原性片段是鞭毛素蛋白的激起免疫应答的部分。在一些实施方案中, 免疫应答是TLR5免疫应答。免疫原性片段的一实例是其中铰链区的全部或一部分已被缺失或用其他氨基酸替换的鞭毛素蛋白。举例来说, 可将抗原性多肽插入铰链区中。铰链区是鞭毛素的高变区。鞭毛素的铰链区也被称为“D3结构域或区域”、“螺旋桨结构域或区域”、“高变结构域或区域”和“可变结构域或区域”。如本文所用的“铰链区的至少一部分”是指鞭毛素的铰链区的任何部分, 或铰链区的全部。在其他实施方案中, 鞭毛素的免疫原性片段是鞭毛素的具有20、25、30、35或40个氨基酸的C末端片段。

[0576] 鞭毛素单体由结构域D0至D3形成。形成主干的D0和D1由串联长 α 螺旋组成, 并且在不同细菌之间高度保守。D1结构域包括适用于达成TLR5活化的若干段氨基酸。整个D1结构域或结构域内的一个或多个活性区域是鞭毛素的免疫原性片段。D1结构域内的免疫原性区域的实例包括鼠伤寒沙门氏菌FliC鞭毛素中的残基88-114和残基411-431。在88-100区域中的13个氨基酸内, 在沙门氏菌鞭毛素与仍然保持TLR5活化作用的其他鞭毛素之间容许具有至少6个取代。因此, 鞭毛素的免疫原性片段包括使TLR5活化的鞭毛素样序列, 并且含有与FliC的88-100中的沙门氏菌序列(LQRVRELAVQSAN; SEQ ID NO:428) 53%或更大同一的具有13个氨基酸的基序。

[0577] 在一些实施方案中, RNA(例如mRNA) 疫苗包括编码鞭毛素和一个或多个抗原性多肽的融合蛋白的RNA。如本文所用的“融合蛋白”是指构建体的两个组分的连接。在一些实施方案中, 使抗原性多肽的羧基末端融合或连接于鞭毛素多肽的氨基末端。在其他实施方案中, 使抗原性多肽的氨基末端融合或连接于鞭毛素多肽的羧基末端。融合蛋白可包括例如一个、两个、三个、四个、五个、六个或更多个鞭毛素多肽连接于一个、两个、三个、四个、五个、六个或更多个抗原性多肽。当使两个或更多个鞭毛素多肽和/或两个或更多个抗原性多肽连接时, 这种构建体可被称为“多聚体”。

[0578] 融合蛋白的各组分可彼此直接连接, 或它们可通过连接体来连接。举例来说, 连接体可为氨基酸连接体。由RNA(例如mRNA) 疫苗编码的用以连接融合蛋白的组分的氨基酸连接体可包括例如至少一个选自赖氨酸残基、谷氨酸残基、丝氨酸残基和精氨酸残基组成的组的成员。在一些实施方案中, 连接体的长度为1-30、1-25、1-25、5-10、5、15或5-20个氨基酸。

[0579] 在其他实施方案中, RNA(例如mRNA) 疫苗包括至少两种单独RNA多核苷酸, 一种编码一种或多种抗原性多肽, 并且另一种编码鞭毛素多肽。至少两种RNA多核苷酸可共同配制于诸如脂质纳米粒子的载体中。

[0580] 脂质体、脂质复合物和脂质纳米粒子

[0581] 本发明的RNA疫苗可使用一种或多种脂质体、脂质复合物或脂质纳米粒子来配制。在一个实施方案中, RNA疫苗的药物组合物包括脂质体。脂质体是人工制备的囊泡, 其可主要由脂质双层组成, 并且可作为递送载体用于施用营养物和药物制剂。脂质体可具有不同

尺寸,诸如但不限于直径可为数百纳米,并且可含有由狭窄水性区室分隔的一系列同心双层的多层囊泡(MLV),直径可为小于50nm的小单细胞囊泡(SUV),以及直径可在50与500nm之间的大单层囊泡(LUV)。脂质体设计可包括但不限于调理素(opsonin)或配体以改善脂质体对不健康组织的附着或激活诸如但不限于胞吞的事件。脂质体可含有低pH或高pH以改善药物制剂的递送。

[0582] 脂质体的形成可取决于物理化学特征,诸如但不限于圈闭的药物制剂和脂质体成分、脂质囊泡分散于其中的介质的性质、圈闭物质的有效浓度和它的潜在毒性、在施加和/或递送囊泡期间涉及的任何其他过程、囊泡用于预定应用的最优化尺寸、多分散性和储存期限、以及大规模生产安全和高效脂质体产品的批次与批次间重现性和可能性。

[0583] 作为一非限制性实例,诸如合成膜囊泡的脂质体可通过美国专利公布号US20130177638、US20130177637、US20130177636、US20130177635、US20130177634、US20130177633、US20130183375、US20130183373和US20130183372中所述的方法、器具和装置制备,所述专利各自的内容以引用的方式整体并入本文。

[0584] 在一个实施方案中,本文所述的药物组合物可包括但不限于诸如由以下形成的那些的脂质体:1,2-二油烯基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DODMA)脂质体、来自Marina Biotech(Bothell,WA)的DiLa2脂质体、1,2-二亚油基氧基-3-二甲基氨基丙烷(DLin-DMA)、2,2-二亚油基-4-(2-二甲基氨基乙基)-[1,3]-二氧杂环戊烷(DLin-KC2-DMA)和MC3(US20100324120;以引用的方式整体并入本文)以及可递送小分子药物的脂质体,诸如但不限于来自Janssen Biotech,Inc.(Horsham,PA)的DOXIL®。

[0585] 在一个实施方案中,本文所述的药物组合物可包括但不限于诸如由合成先前已被描述并且显示适于在体外和在体内进行寡核苷酸递送的稳定化质粒-脂质粒子(SPLP)或稳定化核酸脂质粒子(SNALP)形成的那些的脂质体(参见Wheeler等Gene Therapy.1999 6:271-281;Zhang等Gene Therapy.1999 6:1438-1447;Jeffs等Pharm Res.2005 22:362-372;Morrissey等,Nat Biotechnol.2005 2:1002-1007;Zimmermann等,Nature.2006 441:111-114;Heyes等J Contr Rel.2005 107:276-287;Semple等Nature Biotech.2010 28:172-176;Judge等J Clin Invest.2009 119:661-673;deFougerolles Hum Gene Ther.2008 19:125-132;美国专利公布号US20130122104;其全都整体并入本文)。Wheeler等的原始制造方法是清洁剂透析方法,其稍后由Jeffs等改进,并且被称为自发囊泡形成方法。除多核苷酸之外,脂质体制剂还由3至4个脂质组分组成。作为一实例,脂质体可含有但不限于55%胆固醇,20%二硬脂酰基磷脂酰胆碱(DSPC),10%PEG-S-DSG和15%1,2-二油烯基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DODMA),如由Jeffs等所述。作为另一实例,某些脂质体制剂可含有但不限于48%胆固醇,20%DSPC,2%PEG-c-DMA和30%阳离子脂质,其中阳离子脂质可为1,2-二硬脂基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DSDMA)、DODMA、DLin-DMA或1,2-二亚麻基氧基-3-二甲基氨基丙烷(DLenDMA),如由Heyes等所述。

[0586] 在一些实施方案中,脂质体制剂可包含约25.0%胆固醇至约40.0%胆固醇、约30.0%胆固醇至约45.0%胆固醇、约35.0%胆固醇至约50.0%胆固醇和/或约48.5%胆固醇至约60%胆固醇。在一优选实施方案中,制剂可包含选自由以下组成的组的百分比的胆固醇:28.5%、31.5%、33.5%、36.5%、37.0%、38.5%、39.0%和43.5%。在一些实施方案中,制剂可包含约5.0%至约10.0%DSPC和/或约7.0%至约15.0%DSPC。

[0587] 在一个实施方案中,药物组合物可包括可被形成来递送多核苷酸的脂质体,所述多核苷酸可编码至少一种免疫原(抗原)或任何其他目标多肽。RNA疫苗可由脂质体囊封,和/或它可含于水性核心中,所述核心可接着由脂质体囊封(参见国际公布号W02012031046、W02012031043、W02012030901和W02012006378以及美国专利公布号US20130189351、US20130195969和US20130202684;其各自的内容以引用的方式整体并入本文)。

[0588] 在另一实施方案中,可配制脂质体以达成靶向递送。作为一非限制性实例,可配制脂质体以达成向肝靶向递送。用于靶向递送的脂质体可包括但不限于美国专利公布号US20130195967中所述的脂质体以及美国专利公布号US20130195967中所述的制备脂质体的方法,所述专利的内容以引用的方式整体并入本文。

[0589] 在另一实施方案中,可编码免疫原(抗原)的多核苷酸可在阳离子水包油乳液中配制,其中乳液粒子包含油核心和可与多核苷酸相互作用,从而使分子锚定于乳液粒子的阳离子脂质(参见国际公布号W02012006380;其以引用的方式整体并入本文)。

[0590] 在一个实施方案中,RNA疫苗可在包含其中分散有亲水相的连续疏水相的油包水乳液中配制。作为一非限制性实例,乳液可通过国际公布号W0201087791中所述的方法制备,所述公布的内容以引用的方式整体并入本文。

[0591] 在另一实施方案中,脂质制剂可包括至少阳离子脂质、可使转染增强的脂质和至少一种含有连接于脂质部分的亲水性头部基团的脂质(国际公布号W02011076807和美国公布号20110200582;其各自的内容以引用的方式整体并入本文)。在另一实施方案中,编码免疫原的多核苷酸可在脂质囊泡中配制,所述囊泡可在官能化脂质双层之间具有交联(参见美国公布号20120177724,其内容以引用的方式整体并入本文)。

[0592] 在一个实施方案中,多核苷酸可在如国际专利公布号W02013086526中所述的脂质体中配制,所述专利的内容以引用的方式整体并入本文。可使用反向pH梯度和/或最优化内部缓冲组合物将RNA疫苗囊封在脂质体中,如国际专利公布号W02013086526中所述,所述专利的内容以引用的方式整体并入本文。

[0593] 在一个实施方案中,RNA疫苗药物组合物可在诸如但不限于以下的脂质体中配制:DiLa2脂质体(Marina Biotech,Bothell,WA)、SMARTICLES®(Marina Biotech,Bothell,WA)、基于中性DOPC(1,2-二油酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱)的脂质体(例如针对卵巢癌的siRNA递送(Landen等Cancer Biology&Therapy 20065(12)1708-1713);所述文献以引用的方式整体并入本文)和透明质酸涂布的脂质体(Quiet Therapeutics,Israel)。

[0594] 在一个实施方案中,阳离子脂质可为低分子量阳离子脂质,诸如美国专利申请号20130090372中所述的那些,所述专利的内容以引用的方式整体并入本文。

[0595] 在一个实施方案中,RNA疫苗可配制于可在官能化脂质双层之间具有交联的脂质囊泡中。

[0596] 在一个实施方案中,RNA疫苗可在包含阳离子脂质的脂质体中配制。脂质体可具有在1:1与20:1之间的阳离子脂质中的氮原子与RNA中的磷酸的摩尔比(N:P比率),如国际公布号W02013006825中所述,所述公布以引用的方式整体并入本文。在另一实施方案中,脂质体可具有大于20:1或小于1:1的N:P比率。

[0597] 在一个实施方案中,RNA疫苗可在脂质-聚阳离子复合物中配制。脂质-聚阳离子复

合物的形成可通过本领域中已知和/或如美国公布号20120178702中所述的方法来实现,所述专利以引用的方式整体并入本文。作为一非限制性实例,聚阳离子可包括阳离子肽或多肽,诸如但不限于聚赖氨酸、聚鸟氨酸和/或聚精氨酸以及国际公布号W02012013326或美国专利公布号US20130142818中所述的阳离子肽;所述公布各自以引用的方式整体并入本文。在另一实施方案中, RNA疫苗可在脂质-聚阳离子复合物中配制,所述复合物可进一步包括非阳离子脂质,诸如但不限于胆固醇或二油酰基磷脂酰乙醇胺(DOPE)。

[0598] 在一个实施方案中, RNA疫苗可在氨基醇类脂质中配制。可用于本发明中的氨基醇类脂质可通过美国专利号8,450,298中所述的方法制备,所述专利以引用的方式整体并入本文。

[0599] 脂质体制剂可受但不限于以下的影响:对阳离子脂质组分的选择、阳离子脂质饱和的程度、聚乙二醇化的性质、所有组分的比率和诸如尺寸的生物物理学参数。在由Semple等(Semple等Nature Biotech.2010 28:172-176;其以引用的方式整体并入本文)达成的一个实例中,脂质体制剂由57.1%阳离子脂质、7.1%二棕榈酰基磷脂酰胆碱、34.3%胆固醇和1.4%PEG-c-DMA组成。作为另一实例,改变阳离子脂质的组成可将siRNA更有效递送至各种抗原呈递细胞(Basha等Mol Ther.2011 19:2186-2200;其以引用的方式整体并入本文)。在一些实施方案中,脂质体制剂可包含约35至约45%阳离子脂质、约40%至约50%阳离子脂质、约50%至约60%阳离子脂质和/或约55%至约65%阳离子脂质。在一些实施方案中,在脂质体中,脂质与mRNA的比率可为约5:1至约20:1、约10:1至约25:1、约15:1至约30:1和/或至少30:1。

[0600] 在一些实施方案中,可使脂质纳米粒子(LNP)制剂中的PEG的比率增加或降低,和/或可将PEG脂质的碳链长度从C14改进至C18以改变LNP制剂的药物动力学和/或生物分布。作为一非限制性实例,LNP制剂可含有相较于阳离子脂质、DSPC和胆固醇,约0.5%至约3.0%、约1.0%至约3.5%、约1.5%至约4.0%、约2.0%至约4.5%、约2.5%至约5.0%和/或约3.0%至约6.0%的脂质摩尔比的PEG-c-DOMG(R-3-[(ω -甲氧基-聚(乙二醇)2000)氨基甲酰基])-1,2-二肉豆蔻基氧基丙基-3-胺)(在本文中也称为PEG-DOMG)。在另一实施方案中,PEG-c-DOMG可用PEG脂质诸如但不限于PEG-DSG(1,2-二硬脂酰基-sn-甘油,甲氧基聚乙二醇)、PEG-DMG(1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油)和/或PEG-DPG(1,2-二棕榈酰基-sn-甘油,甲氧基聚乙二醇)替换。阳离子脂质可选自本领域中已知的任何脂质,诸如但不限于DLin-MC3-DMA、DLin-DMA、C12-200和DLin-KC2-DMA。

[0601] 在一个实施方案中, RNA疫苗可在脂质纳米粒子诸如国际公布号W02012170930中所述的那些中配制,所述公布的内容以引用的方式整体并入本文。

[0602] 在一个实施方案中,包含多核苷酸的RNA疫苗制剂是可包含至少一种脂质的纳米粒子。脂质可选自但不限于DLin-DMA、DLin-K-DMA、98N12-5、C12-200、DLin-MC3-DMA、DLin-KC2-DMA、DODMA、PLGA、PEG、PEG-DMG、聚乙二醇化脂质和氨基醇脂质。在另一方面,脂质可为阳离子脂质,诸如但不限于DLin-DMA、DLin-D-DMA、DLin-MC3-DMA、DLin-KC2-DMA、DODMA和氨基醇脂质。氨基醇阳离子脂质可为美国专利公布号US20130150625中所述和/或通过美国专利公布号US20130150625中所述的方法制备的脂质,所述专利以引用的方式整体并入本文。作为一非限制性实例,阳离子脂质可为2-氨基-3-[(9Z,12Z)-十八-9,12-二烯-1-基氧基]-2-{[(9Z,2Z)-十八-9,12-二烯-1-基氧基]甲基}丙-1-醇(US20130150625中的化合物

1); 2-氨基-3-[(9Z)-十八-9-烯-1-基氧基]-2-[[(9Z)-十八-9-烯-1-基氧基]甲基]丙-1-醇 (US20130150625中的化合物2); 2-氨基-3-[(9Z,12Z)-十八-9,12-二烯-1-基氧基]-2-[(辛基氧基)甲基]丙-1-醇 (US20130150625中的化合物3); 和2-(二甲基氨基)-3-[(9Z,12Z)-十八-9,12-二烯-1-基氧基]-2-[[(9Z,12Z)-十八-9,12-二烯-1-基氧基]甲基]丙-1-醇 (US20130150625中的化合物4); 或其任何药学上可接受的盐或立体异构体。

[0603] 脂质纳米粒子制剂通常包含脂质,特别是可离子化阳离子脂质,例如2,2-二亚油基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧杂环戊烷 (DLin-KC2-DMA)、二亚油基-甲基-4-二甲基氨基丁酸酯 (DLin-MC3-DMA) 或9-((4-(二甲基氨基)丁酰基)氧基)十七烷二酸二((Z)-壬-2-烯-1-基)酯 (L319),并且进一步包含中性脂质、固醇和能够减少粒子聚集的分子例如PEG或经PEG修饰的脂质。

[0604] 在一个实施方案中,脂质纳米粒子制剂基本上由以下组成:(i)至少一种选自由以下组成的组的脂质:2,2-二亚油基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧杂环戊烷 (DLin-KC2-DMA)、二亚油基-甲基-4-二甲基氨基丁酸酯 (DLin-MC3-DMA) 和9-((4-(二甲基氨基)丁酰基)氧基)十七烷二酸二((Z)-壬-2-烯-1-基)酯 (L319); (ii)中性脂质,其选自DSPC、DPPC、POPC、DOPE和SM; (iii)固醇,例如胆固醇;和(iv)PEG-脂质,例如PEG-DMG或PEG-cDMA,呈约20-60%阳离子脂质:5-25%中性脂质:25-55%固醇:0.5-15%PEG-脂质的摩尔比。

[0605] 在一个实施方案中,制剂包括基于摩尔数,约25%至约75%的选自2,2-二亚油基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧杂环戊烷 (DLin-KC2-DMA)、二亚油基-甲基-4-二甲基氨基丁酸酯 (DLin-MC3-DMA) 和9-((4-(二甲基氨基)丁酰基)氧基)十七烷二酸二((Z)-壬-2-烯-1-基)酯 (L319)的阳离子脂质,例如基于摩尔数,约35至约65%、约45至约65%、约60%、约57.5%、约50%或约40%。

[0606] 在一个实施方案中,制剂包括基于摩尔数,约0.5%至约15%的中性脂质,例如基于摩尔数,约3至约12%、约5至约10%、或约15%、约10%或约7.5%。示例性中性脂质包括但不限于DSPC、POPC、DPPC、DOPE和SM。在一个实施方案中,制剂包括基于摩尔数,约5%至约50%的固醇(例如基于摩尔数,约15至约45%、约20至约40%、约40%、约38.5%、约35%或约31%)。一示例性固醇是胆固醇。在一个实施方案中,制剂包括基于摩尔数,约0.5%至约20%的PEG或经PEG修饰的脂质(例如基于摩尔数,约0.5至约10%、约0.5至约5%、约1.5%、约0.5%、约1.5%、约3.5%或约5%)。在一个实施方案中,PEG或经PEG修饰的脂质包含平均分子量是2,000Da的PEG分子。在其他实施方案中,PEG或经PEG修饰的脂质包含平均分子量是小于2,000,例如约1,500Da、约1,000Da或约500Da的PEG分子。示例性经PEG修饰的脂质包括但不限于PEG-二硬脂酰基甘油 (PEG-DMG) (在本文中也称为PEG-C14或C14-PEG)、PEG-cDMA(进一步讨论于Reyes等J.Controlled Release,107,276-287 (2005)中,所述文献的内容以引用的方式整体并入本文)。

[0607] 在一个实施方案中,基于摩尔数,本发明的制剂包括25-75%的选自2,2-二亚油基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧杂环戊烷 (DLin-KC2-DMA)、二亚油基-甲基-4-二甲基氨基丁酸酯 (DLin-MC3-DMA) 和9-((4-(二甲基氨基)丁酰基)氧基)十七烷二酸二((Z)-壬-2-烯-1-基)酯 (L319)的阳离子脂质,0.5-15%的中性脂质,5-50%的固醇,和0.5-20%的PEG或经PEG修饰的脂质。

[0608] 在一个实施方案中,基于摩尔数,本发明的制剂包括35-65%的选自2,2-二亚油

基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧杂环戊烷(DLin-KC2-DMA)、二亚油基-甲基-4-二甲基氨基丁酸酯(DLin-MC3-DMA)和9-((4-(二甲基氨基)丁酰基)氧基)十七烷二酸二((Z)-壬-2-烯-1-基)酯(L319)的阳离子脂质,3-12%的中性脂质,15-45%的固醇,和0.5-10%的PEG或经PEG修饰的脂质。

[0609] 在一个实施方案中,基于摩尔数,本发明的制剂包括45-65%的选自2,2-二亚油基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧杂环戊烷(DLin-KC2-DMA)、二亚油基-甲基-4-二甲基氨基丁酸酯(DLin-MC3-DMA)和9-((4-(二甲基氨基)丁酰基)氧基)十七烷二酸二((Z)-壬-2-烯-1-基)酯(L319)的阳离子脂质,5-10%的中性脂质,25-40%的固醇,和0.5-10%的PEG或经PEG修饰的脂质。

[0610] 在一个实施方案中,基于摩尔数,本发明的制剂包括约60%的选自2,2-二亚油基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧杂环戊烷(DLin-KC2-DMA)、二亚油基-甲基-4-二甲基氨基丁酸酯(DLin-MC3-DMA)和9-((4-(二甲基氨基)丁酰基)氧基)十七烷二酸二((Z)-壬-2-烯-1-基)酯(L319)的阳离子脂质,约7.5%的中性脂质,约31%的固醇,和约1.5%的PEG或经PEG修饰的脂质。

[0611] 在一个实施方案中,基于摩尔数,本发明的制剂包括约50%的选自2,2-二亚油基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧杂环戊烷(DLin-KC2-DMA)、二亚油基-甲基-4-二甲基氨基丁酸酯(DLin-MC3-DMA)和9-((4-(二甲基氨基)丁酰基)氧基)十七烷二酸二((Z)-壬-2-烯-1-基)酯(L319)的阳离子脂质,约10%的中性脂质,约38.5%的固醇,和约1.5%的PEG或经PEG修饰的脂质。

[0612] 在一个实施方案中,基于摩尔数,本发明的制剂包括约50%的选自2,2-二亚油基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧杂环戊烷(DLin-KC2-DMA)、二亚油基-甲基-4-二甲基氨基丁酸酯(DLin-MC3-DMA)和9-((4-(二甲基氨基)丁酰基)氧基)十七烷二酸二((Z)-壬-2-烯-1-基)酯(L319)的阳离子脂质,约10%的中性脂质,约35%的固醇,约4.5%或约5%的PEG或经PEG修饰的脂质,和约0.5%的靶向性脂质。

[0613] 在一个实施方案中,基于摩尔数,本发明的制剂包括约40%的选自2,2-二亚油基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧杂环戊烷(DLin-KC2-DMA)、二亚油基-甲基-4-二甲基氨基丁酸酯(DLin-MC3-DMA)和9-((4-(二甲基氨基)丁酰基)氧基)十七烷二酸二((Z)-壬-2-烯-1-基)酯(L319)的阳离子脂质,约15%的中性脂质,约40%的固醇,和约5%的PEG或经PEG修饰的脂质。

[0614] 在一个实施方案中,基于摩尔数,本发明的制剂包括约57.2%的选自2,2-二亚油基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧杂环戊烷(DLin-KC2-DMA)、二亚油基-甲基-4-二甲基氨基丁酸酯(DLin-MC3-DMA)和9-((4-(二甲基氨基)丁酰基)氧基)十七烷二酸二((Z)-壬-2-烯-1-基)酯(L319)的阳离子脂质,约7.1%的中性脂质,约34.3%的固醇,和约1.4%的PEG或经PEG修饰的脂质。

[0615] 在一个实施方案中,基于摩尔数,本发明的制剂包括约57.5%的选自是PEG-cDMA(PEG-cDMA进一步讨论于Reyes等(J.Controlled Release,107,276-287(2005)中,所述文献的内容以引用的方式整体并入本文)的PEG脂质的阳离子脂质,约7.5%的中性脂质,约31.5%的固醇,和约3.5%的PEG或经PEG修饰的脂质。

[0616] 在优选实施方案中,脂质纳米粒子制剂基本上由呈约20-70%阳离子脂质:5-45%

中性脂质:20-55%胆固醇:0.5-15%经PEG修饰的脂质的摩尔比;更优选呈约20-60%阳离子脂质:5-25%中性脂质:25-55%胆固醇:0.5-15%经PEG修饰的脂质的摩尔比的脂质混合物组成。

[0617] 在特定实施方案中,摩尔脂质比率是约50/10/38.5/1.5 (mol%阳离子脂质/中性脂质例如DSPC/胆固醇/经PEG修饰的脂质例如PEG-DMG、PEG-DSG或PEG-DPG)、57.2/7.1134.3/1.4 (mol%阳离子脂质/中性脂质例如DPPC/胆固醇/经PEG修饰的脂质例如PEG-cDMA)、40/15/40/5 (mol%阳离子脂质/中性脂质例如DSPC/胆固醇/经PEG修饰的脂质例如PEG-DMG)、50/10/35/4.5/0.5 (mol%阳离子脂质/中性脂质例如DSPC/胆固醇/经PEG修饰的脂质例如PEG-DSG)、50/10/35/5 (阳离子脂质/中性脂质例如DSPC/胆固醇/经PEG修饰的脂质例如PEG-DMG)、40/10/40/10 (mol%阳离子脂质/中性脂质例如DSPC/胆固醇/经PEG修饰的脂质例如PEG-DMG或PEG-cDMA)、35/15/40/10 (mol%阳离子脂质/中性脂质例如DSPC/胆固醇/经PEG修饰的脂质例如PEG-DMG或PEG-cDMA) 或52/13/30/5 (mol%阳离子脂质/中性脂质例如DSPC/胆固醇/经PEG修饰的脂质例如PEG-DMG或PEG-cDMA)。

[0618] 示例性脂质纳米粒子组合物及其制备方法例如描述于Semple等(2010) Nat.Biotechnol.28:172-176;Jayarama等(2012), Angew.Chem.Int.Ed.,51:8529-8533;以及Maier等(2013) Molecular Therapy 21,1570-1578 (其各自的内容以引用的方式整体并入本文)中。

[0619] 在一个实施方案中,本文所述的脂质纳米粒子制剂可包含阳离子脂质、PEG脂质和结构性脂质,并且任选包含非阳离子脂质。作为一非限制性实例,脂质纳米粒子可包含约40-60%的阳离子脂质,约5-15%的非阳离子脂质,约1-2%的PEG脂质和约30-50%的结构性脂质。作为另一非限制性实例,脂质纳米粒子可包含约50%阳离子脂质,约10%非阳离子脂质,约1.5%PEG脂质和约38.5%结构性脂质。作为另一非限制性实例,脂质纳米粒子可包含约55%阳离子脂质,约10%非阳离子脂质,约2.5%PEG脂质和约32.5%结构性脂质。在一个实施方案中,阳离子脂质可为本文所述的任何阳离子脂质,诸如但不限于Dlin-KC2-DMA、Dlin-MC3-DMIA和L319。

[0620] 在一个实施方案中,本文所述的脂质纳米粒子制剂可为4组分脂质纳米粒子。脂质纳米粒子可包含阳离子脂质、非阳离子脂质、PEG脂质和结构性脂质。作为一非限制性实例,脂质纳米粒子可包含约40-60%的阳离子脂质,约5-15%的非阳离子脂质,约1-2%的PEG脂质和约30-50%的结构性脂质。作为另一非限制性实例,脂质纳米粒子可包含约50%阳离子脂质,约10%非阳离子脂质,约1.5%PEG脂质和约38.5%结构性脂质。作为另一非限制性实例,脂质纳米粒子可包含约55%阳离子脂质,约10%非阳离子脂质,约2.5%PEG脂质和约32.5%结构性脂质。在一个实施方案中,阳离子脂质可为本文所述的任何阳离子脂质,诸如但不限于Dlin-KC2-DMA、Dlin-MC3-DMA和L319。

[0621] 在一个实施方案中,本文所述的脂质纳米粒子制剂可包含阳离子脂质、非阳离子脂质、PEG脂质和结构性脂质。作为一非限制性实例,脂质纳米粒子包含约50%的阳离子脂质Dlin-KC2-DMA,约10%的非阳离子脂质DSPC,约1.5%的PEG脂质PEG-DOMG和约38.5%的结构性脂质胆固醇。作为一非限制性实例,脂质纳米粒子包含约50%的阳离子脂质Dlin-MC3-DMA,约10%的非阳离子脂质DSPC,约1.5%的PEG脂质PEG-DOMG和约38.5%的结构性脂质胆固醇。作为一非限制性实例,脂质纳米粒子包含约50%的阳离子脂质Dlin-MC3-DMA,约

10%的非阳离子脂质DSPC,约1.5%的PEG脂质PEG-DMG和约38.5%的结构性脂质胆固醇。作为另一非限制性实例,脂质纳米粒子包含约55%的阳离子脂质L319,约10%的非阳离子脂质DSPC,约2.5%的PEG脂质PEG-DMG和约32.5%的结构性脂质胆固醇。

[0622] 在一个实施方案中,阳离子脂质可选自但不限于国际公布号W02012040184、W02011153120、W02011149733、W02011090965、W02011043913、W02011022460、W02012061259、W02012054365、W02012044638、W02010080724、W0201021865、W02008103276、W02013086373和W02013086354、美国专利号7,893,302、7,404,969、8,283,333和8,466,122以及美国专利公布号US20100036115、US20120202871、US20130064894、US20130129785、US20130150625、US20130178541和US20130225836中所述的阳离子脂质,所述专利各自的内容以引用的方式整体并入本文。在另一实施方案中,阳离子脂质可选自但不限于国际公布号W02012040184、W02011153120、W02011149733、W02011090965、W02011043913、W02011022460、W02012061259、W02012054365、W02012044638和W02013116126或美国专利公布号US20130178541和US20130225836中所述的式A;所述专利各自的内容以引用的方式整体并入本文。在另一实施方案中,阳离子脂质可选自但不限于国际公布号W02008103276的式CLI-CLXXIX、美国专利号7,893,302的式CLI-CLXXIX、美国专利号7,404,969的式CLI-CLXXXII和美国专利公布号US20100036115的式I-VI、美国专利公布号US20130123338的式I;所述专利各自以引用的方式整体并入本文。作为一非限制性实例,阳离子脂质可选自(20Z,23Z)-N,N-二甲基二十九-20,23-二烯-10-胺、(17Z,20Z)-N,N-二甲基二十六-17,20-二烯-9-胺、(1Z,19Z)-N,N-二甲基二十五-16,19-二烯-8-胺、(13Z,16Z)-N,N-二甲基二十二-13,16-二烯-5-胺、(12Z,15Z)-N,N-二甲基二十一-12,15-二烯-4-胺、(14Z,17Z)-N,N-二甲基二十三-14,17-二烯-6-胺、(15Z,18Z)-N,N-二甲基二十四-15,18-二烯-7-胺、(18Z,21Z)-N,N-二甲基二十七-18,21-二烯-10-胺、(15Z,18Z)-N,N-二甲基二十四-15,18-二烯-5-胺、(14Z,17Z)-N,N-二甲基二十三-14,17-二烯-4-胺、(19Z,22Z)-N,N-二甲基二十八-19,22-二烯-9-胺、(18Z,21Z)-N,N-二甲基二十七-18,21-二烯-8-胺、(17Z,20Z)-N,N-二甲基二十六-17,20-二烯-7-胺、(16Z,19Z)-N,N-二甲基二十五-16,19-二烯-6-胺、(22Z,25Z)-N,N-二甲基三十一-22,25-二烯-10-胺、(21Z,24Z)-N,N-二甲基三十-21,24-二烯-9-胺、(18Z)-N,N-二甲基二十七-18-烯-10-胺、(17Z)-N,N-二甲基二十六-17-烯-9-胺、(19Z,22Z)-N,N-二甲基二十八-19,22-二烯-7-胺、N,N-二甲基二十七烷-10-胺、(20Z,23Z)-N-乙基-N-甲基二十九-20,23-二烯-10-胺、1-[(11Z,14Z)-1-壬基二十-11,14-二烯-1-基]吡咯烷、(20Z)-N,N-二甲基二十七-20-烯-10-胺、(15Z)-N,N-二甲基二十七-15-烯-10-胺、(14Z)-N,N-二甲基二十九-14-烯-10-胺、(17Z)-N,N-二甲基二十九-17-烯-10-胺、(24Z)-N,N-二甲基三十三-24-烯-10-胺、(20Z)-N,N-二甲基二十九-20-烯-10-胺、(22Z)-N,N-二甲基三十一-22-烯-10-胺、(16Z)-N,N-二甲基二十五-16-烯-8-胺、(12Z,15Z)-N,N-二甲基-2-壬基二十一-12,15-二烯-1-胺、(13Z,16Z)-N,N-二甲基-3-壬基二十二-13,16-二烯-1-胺、N,N-二甲基-1-[(1S,2R)-2-辛基环丙基]十七烷-8-胺、1-[(1S,2R)-2-己基环丙基]-N,N-二甲基十九烷-10-胺、N,N-二甲基-1-[(1S,2R)-2-辛基环丙基]十九烷-10-胺、N,N-二甲基-21-[(1S,2R)-2-辛基环丙基]二十一烷-10-胺、N,N-二甲基-1-[(1S,2S)-2-{[(1R,2R)-2-戊基环丙基]甲基}环丙基]十九烷-10-胺、N,N-二甲基-1-[(1S,2R)-2-辛基环丙基]十六烷-8-胺、N,N-二甲基-[(1R,2S)-2-十一基环丙基]十四烷-5-胺、N,N-二甲基-3-{7-

[(1S,2R)-2-辛基环丙基]庚基]十二烷-1-胺、1-[(1R,2S)-2-庚基环丙基]-N,N-二甲基十八烷-9-胺、1-[(1S,2R)-2-癸基环丙基]-N,N-二甲基十五烷-6-胺、N,N-二甲基-1-[(1S,2R)-2-辛基环丙基]十五烷-8-胺、R-N,N-二甲基-1-[(9Z,12Z)-十八-9,12-二烯-1-基氧基]-3-(辛基氧基)丙-2-胺、S-N,N-二甲基-1-[(9Z,12Z)-十八-9,12-二烯-1-基氧基]-3-(辛基氧基)丙-2-胺、1-{2-[(9Z,12Z)-十八-9,12-二烯-1-基氧基]-1-[(辛基氧基)甲基]乙基}吡咯烷、(2S)-N,N-二甲基-1-[(9Z,12Z)-十八-9,12-二烯-1-基氧基]-3-[(5Z)-辛-5-烯-1-基氧基]丙-2-胺、1-{2-[(9Z,12Z)-十八-9,12-二烯-1-基氧基]-1-[(辛基氧基)甲基]乙基}氮杂环丁烷、(2S)-1-(己基氧基)-N,N-二甲基-3-[(9Z,12Z)-十八-9,12-二烯-1-基氧基]丙-2-胺、(2S)-1-(庚基氧基)-N,N-二甲基-3-[(9Z,12Z)-十八-9,12-二烯-1-基氧基]丙-2-胺、N,N-二甲基-1-(壬基氧基)-3-[(9Z,12Z)-十八-9,12-二烯-1-基氧基]丙-2-胺、N,N-二甲基-1-[(9Z)-十八-9-烯-1-基氧基]-3-(辛基氧基)丙-2-胺、(2S)-N,N-二甲基-1-[(6Z,9Z,12Z)-十八-6,9,12-三烯-1-基氧基]-3-(辛基氧基)丙-2-胺、(2S)-1-[(11Z,14Z)-二十-11,14-二烯-1-基氧基]-N,N-二甲基-3-(戊基氧基)丙-2-胺、(2S)-1-(己基氧基)-3-[(11Z,14Z)-二十-11,14-二烯-1-基氧基]-N,N-二甲基丙-2-胺、1-[(11Z,14Z)-二十-11,14-二烯-1-基氧基]-N,N-二甲基-3-(辛基氧基)丙-2-胺、1-[(13Z,16Z)-二十二-13,16-二烯-1-基氧基]-N,N-二甲基-3-(辛基氧基)丙-2-胺、(2S)-1-[(13Z,16Z)-二十二-13,16-二烯-1-基氧基]-3-(己基氧基)-N,N-二甲基丙-2-胺、(2S)-1-[(13Z)-二十二-13-烯-1-基氧基]-3-(己基氧基)-N,N-二甲基丙-2-胺、1-[(13Z)-二十二-13-烯-1-基氧基]-N,N-二甲基-3-(辛基氧基)丙-2-胺、1-[(9Z)-十六-9-烯-1-基氧基]-N,N-二甲基-3-(辛基氧基)丙-2-胺、(2R)-N,N-二甲基-H(1-甲基辛基)氧基]-3-[(9Z,12Z)-十八-9,12-二烯-1-基氧基]丙-2-胺、(2R)-1-[(3,7-二甲基辛基)氧基]-N,N-二甲基-3-[(9Z,12Z)-十八-9,12-二烯-1-基氧基]丙-2-胺、N,N-二甲基-1-(辛基氧基)-3-({8-[(1S,2S)-2-{[(1R,2R)-2-戊基环丙基]甲基}环丙基]辛基}氧基)丙-2-胺、N,N-二甲基-1-{{8-(2-辛基环丙基)辛基}氧基}-3-(辛基氧基)丙-2-胺和(11E,20Z,23Z)-N,N-二甲基二十九-11,20,2-三烯-10-胺或其药理学上可接受的盐或立体异构体。

[0623] 在一个实施方案中,脂质可为可裂解脂质,诸如国际公布号W02012170889中所述的那些,所述公布以引用的方式整体并入本文。

[0624] 在另一实施方案中,脂质可为阳离子脂质,诸如但不限于美国专利申请号US20130064894的式(I),所述专利的内容以引用的方式整体并入本文。

[0625] 在一个实施方案中,阳离子脂质可通过本领域中已知和/或如国际公布号W02012040184、W02011153120、W02011149733、W02011090965、W02011043913、W02011022460、W02012061259、W02012054365、W02012044638、W02010080724、W0201021865、W02013086373和W02013086354中所述的方法合成;所述公布各自的内容以引用的方式整体并入本文。

[0626] 在另一实施方案中,阳离子脂质可为三烷基阳离子脂质。三烷基阳离子脂质以及制备和使用三烷基阳离子脂质的方法的非限制性实例描述于国际专利公布号W02013126803中,所述专利的内容以引用的方式整体并入本文。

[0627] 在一个实施方案中,RNA疫苗的LNP制剂可含有3%脂质摩尔比的PEG-c-DOMG。在另一实施方案中,RRNA疫苗的LNP制剂可含有1.5%脂质摩尔比的PEG-c-DOMG。

[0628] 在一个实施方案中, RNA疫苗的 药物组合物可包括至少一种国际公布号 W02012099755 中所述的聚乙二醇化脂质, 所述公布的内容以引用的方式整体并入本文。

[0629] 在一个实施方案中, LNP 制剂可含有 PEG-DMG 2000 (1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-2000])。在一个实施方案中, LNP 制剂可含有 PEG-DMG 2000、本领域中已知的阳离子脂质和至少一种其他组分。在另一实施方案中, LNP 制剂可含有 PEG-DMG 2000、本领域中已知的阳离子脂质、DSPC 和胆固醇。作为一非限制性实例, LNP 制剂可含有 PEG-DMG 2000、DLin-DMA、DSPC 和胆固醇。作为另一非限制性实例, LNP 制剂可含有呈 2:40:10:48 的摩尔比的 PEG-DMG 2000、DLin-DMA、DSPC 和胆固醇 (参见例如 Geall 等, Nonviral delivery of self-amplifying RNA vaccines, PNAS2012; PMID:22908294, 其以引用的方式整体并入本文)。

[0630] 在一个实施方案中, LNP 制剂可通过国际公布号 W02011127255 或 W02008103276 中所述的方法配制, 所述公布各自的内容以引用的方式整体并入本文。作为一非限制性实例, 可将本文所述的 RNA 疫苗囊封在如 W02011127255 和/或 W02008103276 中所述的 LNP 制剂中; 所述专利各自以引用的方式整体并入本文。

[0631] 在一个实施方案中, 本文所述的 RNA 疫苗可在如美国公布号 US20120207845 中所述的待通过胃肠外途径递送的纳米粒子中配制; 所述公布的内容以引用的方式整体并入本文。

[0632] 在一个实施方案中, RNA 疫苗可在通过美国专利公布号 US20130156845 或国际公布号 W02013093648 或 W02012024526 中所述的方法制备的脂质纳米粒子中配制, 所述专利各自以引用的方式整体并入本文。

[0633] 本文所述的脂质纳米粒子可通过美国专利公布号 US20130164400 中所述的系统和/或方法来在无菌环境中制备, 所述专利以引用的方式整体并入本文。

[0634] 在一个实施方案中, LNP 制剂可以诸如美国专利号 8,492,359 中所述的核酸-脂质粒子的纳米粒子形式配制, 所述专利的内容以引用的方式整体并入本文。作为一非限制性实例, 脂质粒子可包含一种或多种活性剂或治疗剂; 一种或多种占粒子中存在的总脂质的约 50mol% 至约 85mol% 的阳离子脂质; 一种或多种占粒子中存在的总脂质的约 13mol% 至约 49.5mol% 的非阳离子脂质; 以及一种或多种占粒子中存在的总脂质的约 0.5mol% 至约 2mol% 的抑制粒子的聚集的缀合脂质。纳米粒子中的核酸可为本文所述和/或本领域中已知的多核苷酸。

[0635] 在一个实施方案中, LNP 制剂可通过国际公布号 W02011127255 或 W02008103276 中所述的方法配制, 所述公布各自的内容以引用的方式整体并入本文。作为一非限制性实例, 可将本文所述的经修饰的 RNA 囊封在如 W02011127255 和/或 W02008103276 中所述的 LNP 制剂中; 所述专利各自的内容以引用的方式整体并入本文。

[0636] 在一个实施方案中, 本文所述的 LNP 制剂可包含聚阳离子组合物。作为一非限制性实例, 聚阳离子组合物可选自美国专利公布号 US20050222064 的式 1-60; 所述专利的内容以引用的方式整体并入本文。在另一实施方案中, 包含聚阳离子组合物的 LNP 制剂可用于在体内和/或在体外递送本文所述的经修饰的 RNA。

[0637] 在一个实施方案中, 本文所述的 LNP 制剂可另外包含渗透增强分子。非限制性渗透增强分子描述于美国专利公布号 US20050222064 中; 所述专利的内容以引用的方式整体并

入本文。

[0638] 在一个实施方案中, RNA疫苗药物组合物可在诸如但不限于以下的脂质体中配制: DiLa2脂质体 (Marina Biotech, Bothell, WA)、SMARTICLES® (Marina Biotech, Bothell, WA)、基于中性DOPC (1,2-二油酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱) 的脂质体 (例如针对卵巢癌的siRNA递送 (Landen等Cancer Biology&Therapy 20065 (12) 1708-1713); 所述文献以引用的方式整体并入本文) 和透明质酸涂布的脂质体 (Quiet Therapeutics, Israel)。

[0639] 在一个实施方案中, RNA疫苗可在如美国公布号US2012060293中所述的冻干凝胶相脂质体组合物中配制, 所述公布以引用的方式整体并入本文。

[0640] 纳米粒子制剂可包含磷酸缀合物。磷酸缀合物可使纳米粒子的体内循环时间增加和/或使纳米粒子的靶向递送增加。供与本发明一起使用的磷酸缀合物可通过国际申请号W02013033438或美国专利公布号US20130196948中所述的方法制备, 所述专利各自的内容以引用的方式整体并入本文。作为一非限制性实例, 磷酸缀合物可包括具有国际申请号W02013033438中所述的任一结构式的化合物, 所述申请以引用的方式整体并入本文。

[0641] 纳米粒子制剂可包含聚合物缀合物。聚合物缀合物可为水溶性缀合物。聚合物缀合物可具有如美国专利申请号20130059360中所述的结构, 所述专利的内容以引用的方式整体并入本文。在一个方面, 可使用美国专利申请号20130072709中所述的方法和/或区段化聚合试剂制备具有本发明的多核苷酸的聚合物缀合物, 所述专利以引用的方式整体并入本文。在另一方面, 聚合物缀合物可具有包含环部分的侧挂侧基, 所述聚合物缀合物诸如但不限于美国专利公布号US20130196948中所述的聚合物缀合物, 所述专利的内容以引用的方式整体并入本文。

[0642] 纳米粒子制剂可包含用以使本发明的纳米粒子在受试者中的递送增强的缀合物。此外, 缀合物可抑制受试者中对纳米粒子的吞噬清除。在一个方面, 缀合物可为根据人膜蛋白CD47设计的“自身”肽 (例如由Rodriguez等 (Science 2013 339, 971-975) 所述的“自身”粒子, 所述文献以引用的方式整体并入本文)。如由Rodriguez等所示, 自身肽使巨噬细胞介导的对纳米粒子的清除延迟, 此使纳米粒子的递送增强。在另一方面, 缀合物可为膜蛋白CD47 (例如参见Rodriguez等Science 2013 339, 971-975, 其以引用的方式整体并入本文)。Rodriguez等显示, 类似于“自身”肽, 相较于搅乱肽和PEG涂布的纳米粒子, CD47可使受试者中的循环粒子比率增加。

[0643] 在一个实施方案中, 在纳米粒子中配制本发明的RNA疫苗, 所述纳米粒子包含用以使本发明的纳米粒子在受试者中的递送增强的缀合物。缀合物可为CD47膜, 或缀合物可源于CD47膜蛋白, 诸如先前所述的“自身”肽。在另一方面, 纳米粒子可包含PEG以及CD47或其衍生物的缀合物。在另一方面, 纳米粒子可包含上述“自身”肽与膜蛋白CD47两者。

[0644] 在另一方面, 可使“自身”肽和/或CD47蛋白缀合于如本文所述的病毒样粒子或假病毒粒子以递送本发明的RNA疫苗。

[0645] 在另一实施方案中, RNA疫苗药物组合物包含本发明的多核苷酸和可具有可降解键联的缀合物。缀合物的非限制性实例包括包含可离子化氢原子的芳族部分、间隔部分和水溶性聚合物。作为一非限制性实例, 包含具有可降解键联的缀合物的药物组合物和用于递送所述药物组合物方法描述于美国专利公布号US20130184443中, 所述专利的内容以引用的方式整体并入本文。

[0646] 纳米粒子制剂可为包含碳水化合物载体和RNA疫苗的碳水化合物纳米粒子。作为一非限制性实例,碳水化合物载体可包括但不限于经酸酐修饰的植物糖原或糖原型物质、植物糖原辛烯基丁二酸酯、植物糖原 β -糊精、经酸酐修饰的植物糖原 β -糊精。(参见例如国际公布号W02012109121;其内容以引用的方式整体并入本文)。

[0647] 本发明的纳米粒子制剂可用表面活性剂或聚合物涂布以使粒子的递送改进。在一个实施方案中,纳米粒子可用亲水性包衣涂布,所述包衣诸如但不限于PEG包衣和/或具有中性表面电荷的包衣。亲水性包衣可有助于在中枢神经系统内递送具有较大有效载荷诸如但不限于RNA疫苗的纳米粒子。作为一非限制性实例,包含亲水性包衣的纳米粒子和制备所述纳米粒子的方法描述于美国专利公布号US20130183244中,所述专利的内容以引用的方式整体并入本文。

[0648] 在一个实施方案中,本发明的脂质纳米粒子可为亲水性聚合物粒子。亲水性聚合物粒子和制备亲水性聚合物粒子的方法非限制性实例描述于美国专利公布号US20130210991中,所述专利的内容以引用的方式整体并入本文。

[0649] 在另一实施方案中,本发明的脂质纳米粒子可为疏水性聚合物粒子。

[0650] 脂质纳米粒子制剂可通过用称为快速消除脂质纳米粒子(reLNP)的生物可降解阳离子脂质替换阳离子脂质来改进。已显示诸如但不限于DLinDMA、DLin-KC2-DMA和DLin-MC3-DMA的可离子化阳离子脂质会随时间积累在血浆和组织中,并且可为潜在毒性来源。在大鼠中,对快速消除脂质的快速代谢可使脂质纳米粒子的可耐受性和治疗指数改进从1mg/kg剂量至10mg/kg剂量的数量级。包括酶降解酯键可使阳离子组分的降解和代谢概况改进,同时仍然维持reLNP制剂的活性。可使酯键在内部位于脂质链内,或可使它在末端位于脂质链的末端。内部酯键可替换脂质链中的任何碳。

[0651] 在一个实施方案中,可使内部酯键位于饱和碳的任一侧上。

[0652] 在一个实施方案中,免疫应答可通过递送可包括纳米物质、聚合物和免疫原的脂质纳米粒子来引发。(美国公布号20120189700和国际公布号W02012099805;其各自以引用的方式整体并入本文)。聚合物可囊封纳米物质,或部分囊封纳米物质。免疫原可为本文所述的重组蛋白、经修饰的RNA和/或多核苷酸。在一个实施方案中,可配制脂质纳米粒子以用于诸如但不限于针对病原体的疫苗中。

[0653] 脂质纳米粒子可被工程化来改变粒子的表面性质,因此脂质纳米粒子可穿透粘膜屏障。粘液位于粘膜组织上,所述粘膜组织诸如但不限于口腔(例如颊膜和食道膜以及扁桃腺组织)、眼、胃肠(例如胃、小肠、大肠、结肠、直肠)、鼻、呼吸道(例如鼻、咽、气管和支气管膜)、生殖器(例如阴道、子宫颈和尿道膜)。对于达成较高药物囊封效率以及能够提供对一系列广泛药物的持续递送来说是优选的大于10-200nm的纳米粒子已被认为太大以致不能穿过粘膜屏障快速扩散。粘液被连续分泌,排出,废弃或消化以及再循环,因此大多数经捕集粒子可在数秒内或在数小时内被从粘膜组织移除。已用低分子量聚乙二醇(PEG)密集涂布的大型聚合纳米粒子(直径是200nm-500nm)穿过粘液扩散低至相同粒子在水中扩散的仅1/4至1/6(Lai等PNAS 2007104(5):1482-487;Lai等Adv Drug Deliv Rev.200961(2):158-171;其各自以引用的方式整体并入本文)。可使用渗透率和/或荧光显微术技术来确定纳米粒子的输送,所述技术包括但不限于荧光漂白后恢复(FRAP)和高分辨率多粒子追踪(MPT)。作为一非限制性实例,可穿透粘膜屏障的组合物可如美国专利号8,241,670或国际

专利公布号W02013110028中所述加以制备,所述专利各自的内容以引用的方式整体并入本文。

[0654] 被工程化来穿透粘液的脂质纳米粒子可包含聚物质(即聚合核心)和/或聚合物-维生素缀合物和/或三嵌段共聚物。聚物质可包括但不限于聚胺、聚醚、聚酰胺、聚酯、聚氨基甲酸酯、聚脲、聚碳酸酯、聚(苯乙烯)、聚酰亚胺、聚砜、聚氨酯、聚乙炔、聚乙烯、聚乙烯亚胺、聚异氰酸酯、聚丙烯酸酯、聚甲基丙烯酸酯、聚丙烯腈和聚芳酯。聚物质可为生物可降解的和/或生物可相容的。生物可相容聚合物的非限制性实例描述于国际专利公布号W02013116804中,所述专利的内容以引用的方式整体并入本文。可另外对聚物质进行照射。作为一非限制性实例,可对聚物质进行 γ 照射(参见例如国际申请号W0201282165,其以引用的方式整体并入本文)。特定聚合物的非限制性实例包括聚(己内酯)(PCL) 乙烯乙酸乙烯酯聚合物(EVA)、聚(乳酸)(PLA)、聚(L-乳酸)(PLLA)、聚(乙醇酸)(PGA)、聚(乳酸-共-乙醇酸)(PLGA)、聚(L-乳酸-共-乙醇酸)(PLLGA)、聚(D,L-丙交酯)(PDLA)、聚(L-丙交酯)(PLLA)、聚(D,L-丙交酯-共-己内酯)、聚(D,L-丙交酯-共-己内酯-共-乙交酯)、聚(D,L-丙交酯-共-PEO-共-D,L-丙交酯)、聚(D,L-丙交酯-共-PPO-共-D,L-丙交酯)、聚氰基丙烯酸烷酯、聚氨酯、聚L-赖氨酸(PLL)、甲基丙烯酸羟基丙酯(HPMA)、聚乙二醇、聚L-谷氨酸、聚(羧基酸)、聚酞、聚原酸酯、聚(酯酰胺)、聚酰胺、聚(醚酯)、聚碳酸酯、聚烯烃诸如聚乙烯和聚丙烯、聚亚烷基二醇诸如聚(乙二醇)(PEG)、聚氧化烯(PEO)、聚对苯二甲酸亚烷酯诸如聚(对苯二甲酸乙二酯)、聚乙烯醇(PVA)、聚乙烯醚、聚乙烯酯诸如聚(乙酸乙烯酯)、聚卤乙烯诸如聚(氯乙烯)(PVC)、聚乙烯吡咯烷酮、聚硅氧烷、聚苯乙烯(PS)、聚氨酯、衍生化纤维素诸如烷基纤维素、羟基烷基纤维素、纤维素醚、纤维素酯、硝基纤维素、羟基丙基纤维素、羧基甲基纤维素,丙烯酸的聚合物诸如聚((甲基)丙烯酸甲酯)(PMMA)、聚((甲基)丙烯酸乙酯)、聚((甲基)丙烯酸丁酯)、聚((甲基)丙烯酸异丁酯)、聚((甲基)丙烯酸己酯)、聚((甲基)丙烯酸异癸酯)、聚((甲基)丙烯酸十二基酯)、聚((甲基)丙烯酸苯酯)、聚(丙烯酸甲酯)、聚(丙烯酸异丙酯)、聚(丙烯酸异丁酯)、聚(丙烯酸十八基酯)及其共聚物和混合物,聚二噁烷酮和它的共聚物、聚羟基链烷酸酯、聚反丁烯二酸丙二酯、聚甲醛、泊洛沙姆(poloxamer)、聚(原酸)酯、聚(丁酸)、聚(戊酸)、聚(丙交酯-共-己内酯)、PEG-PLGA-PEG和三亚甲基碳酸酯、聚乙烯吡咯烷酮。脂质纳米粒子可用共聚物涂布或与共聚物缔合,所述共聚物诸如但不限于嵌段共聚物(诸如国际公布号W02013012476中所述的分支聚醚-聚酰胺嵌段共聚物,所述公布以引用的方式整体并入本文)和(聚(乙二醇))-(聚(氧化丙烯))-(聚(乙二醇))三嵌段共聚物(参见例如美国公布20120121718和美国公布20100003337和美国专利号8,263,665,其各自以引用的方式整体并入本文)。共聚物可为通常被认为是安全的(GRAS)聚合物,并且可以不产生新的化学实体的方式形成脂质纳米粒子。举例来说,脂质纳米粒子可包含涂布PLGA纳米粒子的泊洛沙姆,而不形成新的化学实体,所述纳米粒子仍然能够快速穿透人粘液(Yang等Angew.Chem.Int.Ed.2011 50:2597-2600;其内容以引用的方式整体并入本文)。一种用以产生可穿透人粘液的纳米粒子的非限制性可缩放方法由Xu等(参见例如J Control Release 2013,170(2):279-86;其内容以引用的方式整体并入本文)描述。

[0655] 聚合物-维生素缀合物的维生素可为维生素E。缀合物的维生素部分可用其他适合组分诸如但不限于维生素A、维生素E、其他维生素、胆固醇、疏水性部分、或其他表面活性剂

的疏水性组分(例如固醇链、脂肪酸、烃链和氧化烯链)替代。

[0656] 被工程化来穿透粘液的脂质纳米粒子可包括表面改变剂,诸如但不限于多核苷酸、阴离子蛋白质(例如牛血清白蛋白)、表面活性剂(例如阳离子表面活性剂,诸如像二甲基二(十八基)-溴化铵)、糖或糖衍生物(例如环糊精)、核酸、聚合物(例如肝素、聚乙二醇和泊洛沙姆)、粘液溶解剂(例如N-乙酰基半胱氨酸、艾蒿(mugwort)、菠萝蛋白酶(bromelain)、木瓜蛋白酶(papain)、大青(clerodendrum)、乙酰基半胱氨酸、溴己新(bromhexine)、羧甲司坦(carbocisteine)、依普拉酮(eprazinone)、美斯纳(mesna)、氨溴索(ambroxol)、索布瑞醇(sobrerol)、多米奥醇(domiodol)、来托司坦(letosteine)、司替罗宁(stepronin)、硫普罗宁(tiopronin)、凝溶胶蛋白(gelsolin)、胸腺素B4(thymosin β 4)、链道酶 α (dornase alfa)、奈替克新(nelitenexine)、厄多司坦(erdosteine))和各种DNA酶,包括rhDNA酶(rhDNase)。可使表面改变剂包埋或缠缚在粒子的表面中,或排列(例如通过涂布、吸附、共价连接或其他过程)在脂质纳米粒子的表面上。(参见例如美国公布20100215580以及美国公布20080166414和US20130164343;其各自的内容以引用的方式整体并入本文)。

[0657] 在一个实施方案中,粘液穿透性脂质纳米粒子可包含至少一种本文所述的多核苷酸。可使多核苷酸囊封在脂质纳米粒子中和/或排列在粒子的表面上。可使多核苷酸共价偶联于脂质纳米粒子。粘液穿透性脂质纳米粒子的制剂可包含多种纳米粒子。此外,制剂可含有可与粘液相互作用以及改变周围粘液的结构性质和/或粘着性质以使粘膜粘附降低的粒子,此可使粘液穿透性脂质纳米粒子向粘膜组织的递送增加。

[0658] 在另一实施方案中,粘液穿透性脂质纳米粒子可为包含粘膜穿透增强性包衣的低张制剂。制剂对于它所向其递送的上皮来说可为低张的。低张制剂的非限制性实例可见于国际专利公布号W02013110028中,所述专利的内容以引用的方式整体并入本文。

[0659] 在一个实施方案中,为使穿过粘膜屏障的递送增强,RNA疫苗制剂可包括或可为低张溶液。发现低张溶液使诸如但不限于粘液穿透性粒子的粘膜惰性粒子能够到达阴道上皮表面所处的速率增加(参见例如Ensign等Biomaterials 2013 34(28):6922-9;其内容以引用的方式整体并入本文)。

[0660] 在一个实施方案中,将RNA疫苗配制成脂质复合物,诸如不限于来自Silence Therapeutics (London, United Kingdom)的ATUPLEXTM系统、DACC系统、DBTC系统和其他siRNA-脂质复合物技术,来自STEMGENT[®] (Cambridge, MA)的STEMFECTTM,以及基于聚乙烯亚胺(PEI)或鱼精蛋白的靶向和非靶向核酸递送(Aleku等Cancer Res. 2008 68:9788-9798; Strumberg等Int J Clin Pharmacol Ther 2012 50:76-78; Santel等, Gene Ther 2006 13:1222-1234; Santel等, Gene Ther 2006 13:1360-1370; Gutbier等, Pulm Pharmacol. Ther. 2010 23:334-344; Kaufmann等Microvasc Res 2010 80:286-293; Weide等J Immunother. 2009 32:498-507; Weide等J Immunother. 2008 31:180-188; Pascolo Expert Opin. Biol. Ther. 4:1285-1294; Fotin-Mleczek等, 2011 J. Immunother. 34:1-15; Song等, Nature Biotechnol. 2005, 23:709-717; Peer等, Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 6; 104:4095-4100; deFougerolles Hum Gene Ther. 2008 19:125-132,其全都以引用的方式整体并入本文)。

[0661] 在一个实施方案中,也可构建所述制剂,或改变组合物以使它们在体内被动地或

主动地被导向不同细胞类型,包括但不限于肝细胞、免疫细胞、肿瘤细胞、内皮细胞、抗原呈递细胞和白细胞(Akinc等Mol Ther.2010 18:1357-1364;Song等,Nat Biotechnol.2005 23:709-717;Judge等,J Clin Invest.2009 119:661-673;Kaufmann等,Microvasc Res 2010 80:286-293;Santel等,Gene Ther 2006 13:1222-1234;Santel等,Gene Ther 2006 13:1360-1370;Gutbier等,Pulm Pharmacol.Ther.2010 23:334-344;Basha等,Mol.Ther., 2011 19:2186-2200;Fenske和Cullis,Expert Opin Drug Deliv.2008 5:25-44;Peer等, Science.2008 319:627-630;Peer和Lieberman,Gene Ther.2011 18:1127-1133,其全都以引用的方式整体并入本文)。使制剂被动靶向肝细胞的一个实例包括基于Dlin-DMA、Dlin-KC2-DMA和Dlin-MC3-DMA的脂质纳米粒子制剂,已显示其在体内结合载脂蛋白E,并且促进这些制剂向肝细胞中结合和摄取(Akinc等Mol Ther.201018:1357-1364,其以引用的方式整体并入本文)。制剂也可通过在它们的表面上表达不同配体来被选择性靶向,如由但不受限于叶酸、转铁蛋白、N-乙酰基半乳糖胺(GalNAc)和抗体靶向方法所例示(Kolhatkar等, Curr Drug Discov Technol.2011 8:197-206;Musacchio和Torchilin,Front Biosci.2011 16:1388-1412;Yu等,Mol Membr Biol.2010 27:286-298;Patil等,Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.200825:1-61;Benoit等,Biomacromolecules.2011 12:2708-2714;Zhao等,Expert Opin Drug Deliv.20085:309-319;Akinc等,Mol Ther.2010 18: 1357-1364;Srinivasan等,Methods Mol Biol.2012 820:105-116;Ben-Arie等,Methods Mol Biol.2012 757:497-507;Peer 2010 J Control Release.20:63-68;Peer等,Proc Natl Acad Sci U SA.2007 104:4095-4100;Kim等,Methods Mol Biol.2011 721:339-353;Subramanya等,Mol Ther.2010 18:2028-2037;Song等,Nat Biotechnol.2005 23: 709-717;Peer等,Science.2008 319:627-630;Peer和Lieberman,Gene Ther.2011 18: 1127-1133,其全都以引用的方式整体并入本文)。

[0662] 在一个实施方案中,将RNA疫苗配制成固体脂质纳米粒子。固体脂质纳米粒子(SLN)可为球形,具有在10至1000nm之间的平均直径。SLN具有固体脂质核心基质,其可使亲脂性分子溶解,并且可用表面活性剂和/或乳化剂稳定化。在另一实施方案中,脂质纳米粒子可为自装配脂质-聚合物纳米粒子(参见Zhang等,ACS Nano,2008,2(8),第1696-1702页;其内容以引用的方式整体并入本文)。作为一非限制性实例,SLN可为国际专利公布号W02013105101中所述的SLN,所述专利的内容以引用的方式整体并入本文。作为另一非限制性实例,SLN可通过国际专利公布号W02013105101中所述的方法或过程制备,所述专利的内容以引用的方式整体并入本文。

[0663] 脂质体、脂质复合物或脂质纳米粒子可用于使多核苷酸引导的蛋白质产生的功效改进,因为这些制剂可能够使由RNA疫苗达成的细胞转染增加和/或使所编码蛋白质的翻译增加。一个所述实例涉及使用脂质囊封来使得能够有效全身性递送聚合复合物质粒DNA(Heyes等,Mol Ther.2007 15:713-720;其以引用的方式整体并入本文)。脂质体、脂质复合物或脂质纳米粒子也可用于使多核苷酸的稳定性增加。

[0664] 在一个实施方案中,可配制本发明的RNA疫苗以进行控制释放和/或靶向递送。如本文所用,“控制释放”是指符合特定释放样式以实现治疗效果的药物组合物或化合物释放概况。在一个实施方案中,可将RRNA疫苗囊封至本文所述和/或本领域中已知的递送剂中以达成控制释放和/或靶向递送。如本文所用,术语“囊封”意指包封、包围或包裹。当它涉及本

发明化合物的制剂时,囊封可为实质性囊封、完全囊封或部分囊封。术语“实质上囊封”意指至少大于50、60、70、80、85、90、95、96、97、98、99、99.9、99.9或大于99.999%的本发明的药物组合物或化合物可被包封、包围或包裹在递送剂内。“部分囊封”意指小于10、10、20、30、40、50或更少的本发明的药物组合物或化合物可被包封、包围或包裹在递送剂内。有利的是,可通过使用荧光和/或电子显微照片测量本发明的药物组合物或化合物的逃逸或活性来测定囊封。举例来说,至少1、5、10、20、30、40、50、60、70、80、85、90、95、96、97、98、99、99.9、99.99或大于99.99%的本发明的药物组合物或化合物被囊封在递送剂中。

[0665] 在一个实施方案中,控制释放制剂可包括但不限于三嵌段共聚物。作为一非限制性实例,制剂可包括两种不同类型的三嵌段共聚物(国际公布号W02012131104和W02012131106;其各自的内容以引用的方式整体并入本文)。

[0666] 在另一实施方案中,可将RNA疫苗囊封至脂质纳米粒子或快速消除脂质纳米粒子中,并且可接着将脂质纳米粒子或快速消除脂质纳米粒子囊封至本文所述和/或本领域中已知的聚合物、水凝胶和/或手术密封剂中。作为一非限制性实例,聚合物、水凝胶或手术密封剂可为PLGA、乙烯乙酸乙烯酯(EVAc)、泊洛沙姆、**GELSITE®**(Nanotherapeutics, Inc. Alachua, FL)、**HYLENEX®**(Halozyme Therapeutics, San Diego CA)、手术密封剂诸如纤维蛋白原(fibrinogen)聚合物(Ethicon Inc. Cornelia, GA)、**TISSELL®**(Baxter International, Inc. Deerfield, IL)、基于PEG的密封剂和**COSEAL®**(Baxter International, Inc. Deerfield, IL)。

[0667] 在另一实施方案中,可将脂质纳米粒子囊封至本领域中已知的在注射至受试者中时可形成凝胶的任何聚合物中。作为另一非限制性实例,可将脂质纳米粒子囊封至可为生物可降解的聚合物基质中。

[0668] 在一个实施方案中,用于控制释放和/或靶向递送的RNA疫苗制剂也可包括至少一种控制释放包衣。控制释放包衣包括但不限于**OPADRY®**、聚乙烯吡咯烷酮/乙酸乙烯酯共聚物、聚乙烯吡咯烷酮、羟基丙基甲基纤维素、羟基丙基纤维素、羟基乙基纤维素、**EUDRAGIT RL®**、**EUDRAGIT RS®**和纤维素衍生物诸如乙基纤维素水性分散液(**AQUACOAT®**和**SURELEASE®**)。

[0669] 在一个实施方案中, RNA疫苗控制释放和/或靶向递送制剂可包含至少一种可含有聚阳离子侧链的可降解聚酯。可降解聚酯包括但不限于聚(丝氨酸酯)、聚(L-丙交酯-共-L-赖氨酸)、聚(4-羟基-L-脯氨酸酯)及其组合。在另一实施方案中,可降解聚酯可包括PEG缀合以形成聚乙二醇化聚合物。

[0670] 在一个实施方案中,包含至少一种多核苷酸的RNA疫苗控制释放和/或靶向递送制剂可包含至少一种如美国专利号8,404,222中所述的PEG和/或PEG相关聚合物衍生物,所述专利以引用的方式整体并入本文。

[0671] 在另一实施方案中,包含至少一种多核苷酸的RNA疫苗控制释放递送制剂可为US20130130348中所述的控制释放聚合物系统,所述专利以引用的方式整体并入本文。

[0672] 在一个实施方案中,可将本发明的RNA疫苗囊封成治疗性纳米粒子,在本文中称为“治疗性纳米粒子RNA疫苗”。治疗性纳米粒子可通过本文所述和本领域中已知的方法来配制,诸如但不限于国际公布号W02010005740、W02010030763、W02010005721、W02010005723、W02012054923、美国公布号US20110262491、US20100104645、US20100087337、

US20100068285、US20110274759、US20100068286、US20120288541、US20130123351和US20130230567以及美国专利号8,206,747、8,293,276、8,318,208和8,318,211中的方法；所述专利各自的内容以引用的方式整体并入本文。在另一实施方案中，治疗性聚合物纳米粒子可通过美国公布号US20120140790中所述的方法来鉴定，所述专利的内容以引用的方式整体并入本文。

[0673] 在一个实施方案中，可配制治疗性纳米粒子RNA疫苗以达成持续释放。如本文所用，“持续释放”是指药物组合物或化合物符合历经特定时期的释放速率。时期可包括但不限于数小时、数天、数周、数月和数年。作为一非限制性实例，持续释放纳米粒子可包含聚合物和治疗剂诸如但不限于本发明的多核苷酸（参见国际公布号2010075072以及美国公布号US20100216804、US20110217377和US20120201859，其各自以引用的方式整体并入本文）。在另一非限制性实例中，持续释放制剂可包含容许达成持久生物可用性的试剂，诸如但不限于晶体、大分子凝胶和/或颗粒混悬液（参见美国专利公布号US20130150295，其内容以引用的方式整体并入本文）。

[0674] 在一个实施方案中，可配制治疗性纳米粒子RNA疫苗以达成靶标特异性。作为一非限制性实例，治疗性纳米粒子可包括皮质类固醇（参见国际公布号W02011084518，其以引用的方式整体并入本文）。作为一非限制性实例，治疗性纳米粒子可在国际公布号W02008121949、W02010005726、W02010005725、W02011084521以及美国公布号US20100069426、US20120004293和US20100104655中所述的纳米粒子中配制，所述公布各自以引用的方式整体并入本文。

[0675] 在一个实施方案中，本发明的纳米粒子可包含聚合基质。作为一非限制性实例，纳米粒子可包含两种或更多种聚合物，诸如但不限于聚乙烯、聚碳酸酯、聚酐、聚羧基酸、聚反丁烯二酸丙酯、聚己内酯、聚酰胺、聚缩醛、聚醚、聚酯、聚（原酸酯）、聚氰基丙烯酸酯、聚乙烯醇、聚氨酯、聚磷腈、聚丙烯酸酯、聚甲基丙烯酸酯、聚氰基丙烯酸酯、聚脲、聚苯乙烯、聚胺、聚赖氨酸、聚（乙烯亚胺）、聚（丝氨酸酯）、聚（L-丙交酯-共-L-赖氨酸）、聚（4-羟基-L-脯氨酸酯）或其组合。

[0676] 在一个实施方案中，治疗性纳米粒子包含二嵌段共聚物。在一个实施方案中，二嵌段共聚物可包括PEG与诸如但不限于以下的聚合物组合：聚乙烯、聚碳酸酯、聚酐、聚羧基酸、聚反丁烯二酸丙酯、聚己内酯、聚酰胺、聚缩醛、聚醚、聚酯、聚（原酸酯）、聚氰基丙烯酸酯、聚乙烯醇、聚氨酯、聚磷腈、聚丙烯酸酯、聚甲基丙烯酸酯、聚氰基丙烯酸酯、聚脲、聚苯乙烯、聚胺、聚赖氨酸、聚（乙烯亚胺）、聚（丝氨酸酯）、聚（L-丙交酯-共-L-赖氨酸）、聚（4-羟基-L-脯氨酸酯）或其组合。在另一实施方案中，二嵌段共聚物可包括欧洲专利公布号中所述的二嵌段共聚物，所述专利的内容以引用的方式整体并入本文。在另一实施方案中，二嵌段共聚物可为高X二嵌段共聚物，诸如国际专利公布号W02013120052中所述的那些，所述专利的内容以引用的方式整体并入本文。

[0677] 作为一非限制性实例，治疗性纳米粒子包含PLGA-PEG嵌段共聚物（参见美国公布号US20120004293和美国专利号8,236,330，其各自以引用的方式整体并入本文）。在另一非限制性实例中，治疗性纳米粒子是包含PEG和PLA或PEG和PLGA的二嵌段共聚物的隐形纳米粒子（参见美国专利号8,246,968和国际公布号W02012166923，其各自的内容以引用的方式整体并入本文）。在另一非限制性实例中，治疗性纳米粒子是如美国专利公布号

US20130172406中所述的隐形纳米粒子或靶标特异性隐形纳米粒子,所述专利的内容以引用的方式整体并入本文。

[0678] 在一个实施方案中,治疗性纳米粒子可包含多嵌段共聚物(参见例如美国专利号8,263,665和8,287,910以及美国专利公布号US20130195987;其各自的内容以引用的方式整体并入本文)。

[0679] 在另一非限制性实例中,脂质纳米粒子包含嵌段共聚物PEG-PLGA-PEG(参见例如,热敏性水凝胶(PEG-PLGA-PEG)在Lee等Thermosensitive Hydrogel as a Tgf- β 1 Gene Delivery Vehicle Enhances Diabetic Wound Healing. *Pharmaceutical Research*, 2003 20(12):1995-2000中用作TGF- β 1基因递送载体;在Li等Controlled Gene Delivery System Based on Thermosensitive Biodegradable Hydrogel. *Pharmaceutical Research* 2003 20(6):884-888;以及Chang等,Non-ionic amphiphilic biodegradable PEG-PLGA-PEG copolymer enhances gene delivery efficiency in rat skeletal muscle. *J Controlled Release*. 2007 118:245-253中用作控制基因递送系统,所述文献内容以引用的方式整体并入本文)。本发明的RNA疫苗可在包含PEG-PLGA-PEG嵌段共聚物的脂质纳米粒子中配制。

[0680] 在一个实施方案中,治疗性纳米粒子可包含多嵌段共聚物(参见例如美国专利号8,263,665和8,287,910以及美国专利公布号US20130195987;其各自的内容以引用的方式整体并入本文)。

[0681] 在一个实施方案中,可将本文所述的嵌段共聚物包括在包含非聚合胶束和嵌段共聚物的聚离子复合物中。(参见例如美国公布号20120076836,其以引用的方式整体并入本文)。

[0682] 在一个实施方案中,治疗性纳米粒子可包含至少一种丙烯酸聚合物。丙烯酸聚合物包括但不限于丙烯酸、甲基丙烯酸、丙烯酸和甲基丙烯酸共聚物、甲基丙烯酸甲酯共聚物、甲基丙烯酸乙氧基乙酯、甲基丙烯酸氰基乙酯、甲基丙烯酸氨基烷酯共聚物、聚(丙烯酸)、聚(甲基丙烯酸)、聚氰基丙烯酸酯及其组合。

[0683] 在一个实施方案中,治疗性纳米粒子可包含至少一种聚(乙烯基酯)聚合物。聚(乙烯基酯)聚合物可为共聚物诸如无规共聚物。作为一非限制性实例,无规共聚物可具有诸如国际申请号W02013032829或美国专利公布号US20130121954中所述的那些的结构,所述专利的内容以引用的方式整体并入本文。在一个方面,可使聚(乙烯基酯)聚合物缀合于本文所述的多核苷酸。在另一方面,可用于本发明中的聚(乙烯基酯)聚合物可为以引用的方式整体并入本文的中所述的那些。

[0684] 在一个实施方案中,治疗性纳米粒子可包含至少一种二嵌段共聚物。二嵌段共聚物可为但不限于聚(乳酸)-聚(亚乙基)二醇共聚物(参见例如国际专利公布号W02013044219;其以引用的方式整体并入本文)。作为一非限制性实例,治疗性纳米粒子可用于治疗癌症(参见国际公布号W02013044219;其以引用的方式整体并入本文)。

[0685] 在一个实施方案中,治疗性纳米粒子可包含至少一种本文所述和/或本领域中已知的阳离子聚合物。

[0686] 在一个实施方案中,治疗性纳米粒子可包含至少一种含胺聚合物,诸如但不限于聚赖氨酸、聚乙烯亚胺、聚(酰胺基胺)树枝状聚合物、聚(β -氨基酯)(参见例如美国专利号

8,287,849;其以引用的方式整体并入本文)及其组合。

[0687] 在另一实施方案中,本文所述的纳米粒子可包含胺阳离子脂质,诸如国际专利申请号W02013059496中所述的那些,所述专利的内容以引用的方式整体并入本文。在一个方面,阳离子脂质可具有氨基-胺或氨基-酰胺部分。

[0688] 在一个实施方案中,治疗性纳米粒子可包含至少一种可含有聚阳离子侧链的可降解聚酯。可降解聚酯包括但不限于聚(丝氨酸酯)、聚(L-丙交酯-共-L-赖氨酸)、聚(4-羟基-L-脯氨酸酯)及其组合。在另一实施方案中,可降解聚酯可包括PEG缀合以形成聚乙二醇化聚合物。

[0689] 在另一实施方案中,治疗性纳米粒子可包括至少一种靶向性配体的缀合。靶向性配体可为本领域中已知的任何配体诸如但不限于单克隆抗体。(Kirpotin等,Cancer Res.200666:6732-6740;其以引用的方式整体并入本文)。

[0690] 在一个实施方案中,治疗性纳米粒子可在可用于靶向癌症的水溶液中配制(参见国际公布号W02011084513和美国公布号US20110294717,其各自以引用的方式整体并入本文)。

[0691] 在一个实施方案中,可使用由Podobinski等在美国专利号8,404,799中描述的方法配制治疗性纳米粒子RNA疫苗,例如包含至少一种RNA疫苗的治疗性纳米粒子,所述专利的内容以引用的方式整体并入本文。

[0692] 在一个实施方案中,可将RNA疫苗囊封在合成纳米载体中,连接于合成纳米载体和/或与合成纳米载体缔合。合成纳米载体包括但不限于国际公布号W02010005740、W02010030763、W0201213501、W02012149252、W02012149255、W02012149259、W02012149265、W02012149268、W02012149282、W02012149301、W02012149393、W02012149405、W02012149411、W02012149454和W02013019669以及美国公布号US20110262491、US20100104645、US20100087337和US20120244222中所述的那些,所述公布各自以引用的方式整体并入本文。可使用本领域中已知和/或本文所述的方法配制合成纳米载体。作为一非限制性实例,合成纳米载体可通过国际公布号W02010005740、W02010030763和W0201213501以及美国公布号US20110262491、US20100104645、US20100087337和US20120244222中所述的方法配制,所述公布各自以引用的方式整体并入本文。在另一实施方案中,合成纳米载体制剂可通过国际公布号W02011072218和美国专利号8,211,473中所述的方法来冻干;所述专利各自的内容以引用的方式整体并入本文。在另一实施方案中,包括但不限于合成纳米载体的本发明制剂可通过美国专利公布号US20130230568中所述的方法来冻干或复原,所述专利的内容以引用的方式整体并入本文。

[0693] 在一个实施方案中,合成纳米载体可含有反应性基团以使本文所述的多核苷酸释放(参见国际公布号W020120952552和美国公布号US20120171229,其各自以引用的方式整体并入本文)。

[0694] 在一个实施方案中,合成纳米载体可含有免疫刺激剂以使由递送合成纳米载体所致的免疫应答增强。作为一非限制性实例,合成纳米载体可包含Th1免疫刺激剂,其可使免疫系统的基于Th1的应答增强(参见国际公布号W02010123569和美国公布号US20110223201,其各自以引用的方式整体并入本文)。

[0695] 在一个实施方案中,可配制合成纳米载体以达成靶向释放。在一个实施方案中,配

制合成纳米载体以使多核苷酸在指定pH下和/或在所需时间间隔之后释放。作为一非限制性实例,可配制合成纳米粒子以使RNA疫苗在24小时之后和/或在4.5的pH下释放(参见国际公布号W02010138193和W02010138194以及美国公布号US20110020388和US20110027217,其各自以引用的方式整体并入本文)。

[0696] 在一个实施方案中,可配制合成纳米载体以达成对本文所述的多核苷酸的控制和/或持续释放。作为一非限制性实例,用于持续释放的合成纳米载体可通过本领域中已知、本文所述和/或如国际公布号W02010138192和美国公布号20100303850中所述的方法来配制,所述公布各自以引用的方式整体并入本文。

[0697] 在一个实施方案中,可配制RNA疫苗以达成控制和/或持续释放,其中制剂包含至少一种是结晶侧链(CYSC)聚合物的聚合物。CYSC聚合物描述于美国专利号8,399,007中,所述专利以引用的方式整体并入本文。

[0698] 在一个实施方案中,可配制合成纳米载体以用作疫苗。在一个实施方案中,合成纳米载体可囊封至少一种编码至少一种抗原的多核苷酸。作为一非限制性实例,对于某一疫苗剂型,合成纳米载体可包括至少一种抗原以及赋形剂(参见国际公布号W02011150264和美国公布号US20110293723,其各自以引用的方式整体并入本文)。作为另一非限制性实例,疫苗剂型可包括至少两种具有相同或不同抗原以及赋形剂的合成纳米载体(参见国际公布号W02011150249和美国公布号US20110293701,其各自以引用的方式整体并入本文)。疫苗剂型可通过本文所述、本领域中已知和/或国际公布号W02011150258和美国公布号US20120027806中所述的方法来选择,所述公布各自以引用的方式整体并入本文。

[0699] 在一个实施方案中,合成纳米载体可包含至少一种编码至少一种佐剂的多核苷酸。作为非限制性实例,佐剂可包含二甲基二(十八基)溴化铵、二甲基二(十八基)氯化铵、二甲基二(十八基)磷酸铵或二甲基二(十八基)乙酸铵(DDA)和分支杆菌的总体脂质提取物的无极性部分或所述无极性部分的一部分(参见例如美国专利号8,241,610;其以引用的方式整体并入本文)。在另一实施方案中,合成纳米载体可包含至少一种多核苷酸以及佐剂。作为一非限制性实例,包含多核苷酸和佐剂的合成纳米载体可通过国际公布号W02011150240和美国公布号US20110293700中所述的方法来配制,所述公布各自以引用的方式整体并入本文。

[0700] 在一个实施方案中,合成纳米载体可囊封至少一种编码来自病毒的肽、片段或区域的多核苷酸。作为一非限制性实例,合成纳米载体可包括但不限于国际公布号W02012024621、W0201202629、W02012024632以及美国公布号US20120064110、US20120058153和US20120058154中所述的纳米载体,所述公布各自以引用的方式整体并入本文。

[0701] 在一个实施方案中,可使合成纳米载体偶联于可能够触发体液应答和/或细胞毒性T淋巴细胞(CTL)应答的多核苷酸(参见例如国际公布号W02013019669,其以引用的方式整体并入本文)。

[0702] 在一个实施方案中,可将RNA疫苗囊封在两性离子脂质中,连接于两性离子脂质和/或与两性离子脂质缔合。两性离子脂质和使用两性离子脂质的方法的非限制性实例描述于美国专利公布号US20130216607中,所述专利的内容以引用的方式整体并入本文。在一个方面,两性离子脂质可用于本文所述的脂质体和脂质纳米粒子中。

[0703] 在一个实施方案中, RNA疫苗可在如美国专利公布号US20130197100中所述的胶体纳米载体中配制, 所述专利的内容以引用的方式整体并入本文。

[0704] 在一个实施方案中, 纳米粒子可针对口服施用加以优化。纳米粒子可包含至少一种阳离子生物聚合物, 诸如但不限于壳聚糖或其衍生物。作为一非限制性实例, 纳米粒子可通过美国公布号20120282343中所述的方法来配制; 所述公布以引用的方式整体并入本文。

[0705] 在一些实施方案中, LNP包含脂质KL52 (美国申请公布号2012/0295832中公开的一种氨基-脂质, 所述申请公布以引用的方式整体明确并入本文)。施用LNP的活性和/或安全性 (如通过考查ALT/AST、白血细胞计数和细胞因子诱导中的一者或多者所度量) 可通过并有所述脂质来改进。可在静脉内和/或以一次或多次剂量施用包含KL52的LNP。在一些实施方案中, 相较于包含MC3的LNP, 施用包含KL52的LNP产生相等或改进的mRNA和/或蛋白质表达。

[0706] 在一些实施方案中, 可使用较小LNP递送RNA疫苗。所述粒子可包含从低于0.1 μ m直至100nm的直径, 诸如但不限于小于0.1 μ m、小于1.0 μ m、小于5 μ m、小于10 μ m、小于15 μ m、小于20 μ m、小于25 μ m、小于30 μ m、小于35 μ m、小于40 μ m、小于50 μ m、小于55 μ m、小于60 μ m、小于65 μ m、小于70 μ m、小于75 μ m、小于80 μ m、小于85 μ m、小于90 μ m、小于95 μ m、小于100 μ m、小于125 μ m、小于150 μ m、小于175 μ m、小于200 μ m、小于225 μ m、小于250 μ m、小于275 μ m、小于300 μ m、小于325 μ m、小于350 μ m、小于375 μ m、小于400 μ m、小于425 μ m、小于450 μ m、小于475 μ m、小于500 μ m、小于525 μ m、小于550 μ m、小于575 μ m、小于600 μ m、小于625 μ m、小于650 μ m、小于675 μ m、小于700 μ m、小于725 μ m、小于750 μ m、小于775 μ m、小于800 μ m、小于825 μ m、小于850 μ m、小于875 μ m、小于900 μ m、小于925 μ m、小于950 μ m、小于975 μ m。

[0707] 在另一实施方案中, 可使用较小LNP递送RNA疫苗, 所述LNP可包含以下直径: 约1nm至约100nm、约1nm至约10nm、约1nm至约20nm、约1nm至约30nm、约1nm至约40nm、约1nm至约50nm、约1nm至约60nm、约1nm至约70nm、约1nm至约80nm、约1nm至约90nm、约5nm至约100nm、约5nm至约10nm、约5nm至约20nm、约5nm至约30nm、约5nm至约40nm、约5nm至约50nm、约5nm至约60nm、约5nm至约70nm、约5nm至约80nm、约5nm至约90nm、约10至约50nm、约20至约50nm、约30至约50nm、约40至约50nm、约20至约60nm、约30至约60nm、约40至约60nm、约20至约70nm、约30至约70nm、约40至约70nm、约50至约70nm、约60至约70nm、约20至约80nm、约30至约80nm、约40至约80nm、约50至约80nm、约60至约80nm、约20至约90nm、约30至约90nm、约40至约90nm、约50至约90nm、约60至约90nm和/或约70至约90nm。

[0708] 在一些实施方案中, 使用包括微流体混合器的方法合成所述LNP。示例性微流体混合器可包括但不限于狭缝叉指式微混合器, 包括但不限于由Microinnova (Allerheiligen bei Wildon, Austria) 制造的那些, 和/或交错人字形微混合器 (SHM) (Zhigaltsev, I.V. 等, Bottom-up design and synthesis of limit size lipid nanoparticle systems with aqueous and triglyceride cores using millisecond microfluidic mixing 已发表 (Langmuir. 2012. 28: 3633-40); Belliveau, N.M. 等, Microfluidic synthesis of highly potent limit-size lipid nanoparticles for in vivo delivery of siRNA. Molecular Therapy-Nucleic Acids. 2012. 1: e37; Chen, D. 等, Rapid discovery of potent siRNA-containing lipid nanoparticles enabled by controlled microfluidic formulation. J Am Chem Soc. 2012. 134 (16): 6948-51; 其各自以引用的方式整体并入本

文)。在一些实施方案中,包括SHM的LNP产生方法进一步包括混合至少两个输入物流,其中混合通过微结构诱导的混沌平流(MICA)来发生。根据这个方法,流体物流流过存在于人字形图案中的通道,从而导致旋流以及使流体在彼此周围叠合。这个方法也可包括用于流体混合的表面,其中所述表面在流体循环期间改变定向。使用SHM产生LNP的方法包括美国申请公布号2004/0262223和2012/0276209中公开的那些,所述申请公布各自以引用的方式整体明确并入本文。

[0709] 在一个实施方案中,本发明的RNA疫苗可在使用微混合器产生的脂质纳米粒子中配制,所述微混合器诸如但不限于来自Institut für Mikrotechnik Mainz GmbH(Mainz Germany)的狭缝叉指式微结构化混合器(SIMM-V2)或标准狭缝叉指式微混合器(SSIMM)或履带式微混合器(CPMM)或冲击-射流微混合器(IJMM)。

[0710] 在一个实施方案中,本发明的RNA疫苗可在使用微流体技术产生的脂质纳米粒子中配制(参见Whitesides,George M.The Origins and the Future of Microfluidics.Nature,2006 442:368-373;以及Abraham等Chaotic Mixer for Microchannels.Science,2002 295:647-651;其各自以引用的方式整体并入本文)。作为一非限制性实例,控制微流体配制包括用于在低雷诺数(Reynolds number)下在微通道中混合稳定压力驱动的流动物流的被动方法(参见例如Abraham等Chaotic Mixer for Microchannels.Science,2002 295:647-651;其以引用的方式整体并入本文)。

[0711] 在一个实施方案中,本发明的RNA疫苗可在使用微混合器芯片产生的脂质纳米粒子中配制,所述芯片诸如但不限于来自Harvard Apparatus(Holliston,MA)或Dolomite Microfluidics(Royston,UK)的那些。微混合器芯片可用于以拆分和重组机理快速混合两个或更多个流体物流。

[0712] 在一个实施方案中,可使用国际专利公布号W02013063468或美国专利号8,440,614中所述的药物囊封微球体配制本发明的RNA疫苗以达成递送,所述专利各自以引用的方式整体并入本文。微球体可包含如国际专利公布号W02013063468中所述的式(I)、(II)、(III)、(IV)、(V)或(VI)化合物,所述专利的内容以引用的方式整体并入本文。在另一方面,氨基酸、肽、多肽、脂质(APPL)适用于将本发明的RNA疫苗递送至细胞(参见国际专利公布号W02013063468,其内容以引用的方式整体并入本文)。

[0713] 在一个实施方案中,本发明的RNA疫苗可在具有以下直径的脂质纳米粒子中配制:约10至约100nm,诸如但不限于约10至约20nm、约10至约30nm、约10至约40nm、约10至约50nm、约10至约60nm、约10至约70nm、约10至约80nm、约10至约90nm、约20至约30nm、约20至约40nm、约20至约50nm、约20至约60nm、约20至约70nm、约20至约80nm、约20至约90nm、约20至约100nm、约30至约40nm、约30至约50nm、约30至约60nm、约30至约70nm、约30至约80nm、约30至约90nm、约30至约100nm、约40至约50nm、约40至约60nm、约40至约70nm、约40至约80nm、约40至约90nm、约40至约100nm、约50至约60nm、约50至约70nm、约50至约80nm、约50至约90nm、约50至约100nm、约60至约70nm、约60至约80nm、约60至约90nm、约60至约100nm、约70至约80nm、约70至约90nm、约70至约100nm、约80至约90nm、约80至约100nm和/或约90至约100nm。

[0714] 在一个实施方案中,脂质纳米粒子可具有约10至500nm的直径。

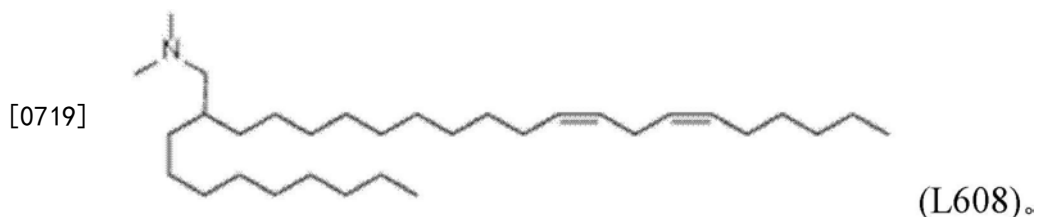
[0715] 在一个实施方案中,脂质纳米粒子可具有大于100nm、大于150nm、大于200nm、大于

250nm、大于300nm、大于350nm、大于400nm、大于450nm、大于500nm、大于550nm、大于600nm、大于650nm、大于700nm、大于750nm、大于800nm、大于850nm、大于900nm、大于950nm或大于1000nm的直径。

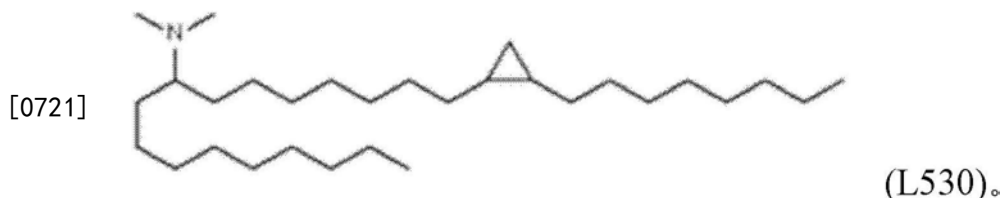
[0716] 在一个方面,脂质纳米粒子可为国际专利公布号W02013059922中所述的极限尺寸脂质纳米粒子,所述专利的内容以引用的方式整体并入本文。极限尺寸脂质纳米粒子可包含包围水性核心或疏水性核心的脂质双层;其中所述脂质双层可包含磷脂,诸如但不限于二酰基磷脂酰胆碱、二酰基磷脂酰乙醇胺、神经酰胺、鞘磷脂、二氢鞘磷脂、脑磷脂、脑苷脂、C8-C20脂肪酸二酰基磷脂酰胆碱和1-棕榈酰基-2-油酰基磷脂酰胆碱(POPC)。在另一方面,极限尺寸脂质纳米粒子可包含聚乙二醇-脂质,诸如但不限于DLPE-PEG、DMPE-PEG、DPPC-PEG和DSPE-PEG。

[0717] 在一些实施方案中,阳离子脂质是可离子化阳离子脂质,并且非阳离子脂质是中性脂质,并且固醇是胆固醇。在一些实施方案中,阳离子脂质选自由以下组成的组:2,2-二亚油基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧杂环戊烷(DLin-KC2-DMA)、二亚油基-甲基-4-二甲基氨基丁酸酯(DLin-MC3-DMA)、9-((4-(二甲基氨基)丁酰基)氧基)十七烷二酸二((Z)-壬-2-烯-1-基)酯(L319)、(12Z,15Z)-N,N-二甲基-2-壬基二十一-12,15-二烯-1-胺(L608)和N,N-二甲基-1-[(1S,2R)-2-辛基环丙基]十七烷-8-胺(L530)。

[0718] 在一些实施方案中,脂质是



[0720] 在一些实施方案中,脂质是



[0722] 在一个实施方案中,使用国际专利公布号W02013063530中所述的递送方法,可将RNA疫苗递送、定位和/或集中在特定位置中,所述专利的内容以引用的方式整体并入本文。作为一非限制性实例,可在向受试者递送RNA疫苗之前、同时或之后,向所述受试者施用空聚合粒子。空聚合粒子一旦与受试者接触即经受体积变化,并且变得排列、包埋、固定或圈闭在受试者中的特定位置处。

[0723] 在一个实施方案中,RNA疫苗可在活性物质释放系统中配制(参见例如美国专利公布号US20130102545,其内容以引用的方式整体并入本文)。活性物质释放系统可包含1)至少一种键合于寡核苷酸抑制链的纳米粒子,所述抑制链与催化活性核酸杂交,和2)键合于至少一种基底分子的化合物,所述基底分子键合于治疗活性物质(例如本文所述的多核苷酸),其中所述治疗活性物质通过由所述催化活性核酸裂解所述基底分子来释放。

[0724] 在一个实施方案中,RNA疫苗可在包含内部核心和外部表面的纳米粒子中配制,所述内部核心包含非细胞物质,所述外部表面包含细胞膜。细胞膜可源于细胞,或膜源于病

毒。作为一非限制性实例,纳米粒子可通过国际专利公布号W02013052167中所述的方法制备,所述专利以引用的方式整体并入本文。作为另一非限制性实例,国际专利公布号W02013052167中所述的纳米粒子可用于递送本文所述的RNA疫苗,所述专利以引用的方式整体并入本文。

[0725] 在一个实施方案中, RNA疫苗可在多孔纳米粒子支撑的脂质双层(原细胞)中配制。原细胞描述于国际专利公布号W02013056132中,所述专利的内容以引用的方式整体并入本文。

[0726] 在一个实施方案中, 本文所述的RNA疫苗可在如美国专利号8,420,123和8,518,963以及欧洲专利号EP2073848B1中所述或通过美国专利号8,420,123和8,518,963以及欧洲专利号EP2073848B1中所述的方法制备的聚合纳米粒子中配制,所述专利各自的内容以引用的方式整体并入本文。作为一非限制性实例,聚合纳米粒子可具有高玻璃转变温度,所述聚合纳米粒子诸如美国专利号8,518,963中所述的纳米粒子或通过美国专利号8,518,963中所述的方法制备的纳米粒子,所述专利的内容以引用的方式整体并入本文。作为另一非限制性实例,用于口服和胃肠外制剂的聚合物纳米粒子可通过欧洲专利号EP2073848B1中所述的方法制备,所述专利的内容以引用的方式整体并入本文。

[0727] 在另一实施方案中, 本文所述的RNA疫苗可在用于成像中的纳米粒子中配制。纳米粒子可为脂质体纳米粒子,诸如美国专利公布号US20130129636中所述的那些,所述专利以引用的方式整体并入本文。作为一非限制性实例,脂质体可包含2-{4,7-双-羧基甲基-10-[(N,N-二硬脂基酰胺基甲基-N'-酰胺基-甲基)-1,4,7,10-四氮杂环十二-1-基]-乙酸钪(III) 和中性完全饱和磷脂组分(参见例如美国专利公布号US20130129636,其内容以引用的方式整体并入本文)。

[0728] 在一个实施方案中, 可用于本发明中的纳米粒子通过美国专利申请号US20130130348中所述的方法来形成,所述专利的内容以引用的方式整体并入本文。

[0729] 本发明的纳米粒子可进一步包括营养物,诸如但不限于其缺乏可导致从贫血至神经管缺陷的健康危害的那些(参见例如国际专利公布号W02013072929中所述的纳米粒子,所述专利的内容以引用的方式整体并入本文)。作为一非限制性实例,营养物可为呈亚铁、铁盐或元素铁形式的铁、碘、叶酸、维生素或微量营养物。

[0730] 在一个实施方案中, 本发明的RNA疫苗可在可溶胀纳米粒子中配制。可溶胀纳米粒子可为但不限于美国专利号8,440,231中所述的那些,所述专利的内容以引用的方式整体并入本文。作为一非限制性实施方案,可溶胀纳米粒子可用于将本发明的RNA疫苗递送至肺系统(参见例如美国专利号8,440,231,其内容以引用的方式整体并入本文)。

[0731] 本发明的RNA疫苗可在聚酞纳米粒子中配制,所述纳米粒子诸如但不限于美国专利号8,449,916中所述的那些,所述专利的内容以引用的方式整体并入本文。

[0732] 本发明的纳米粒子和微粒可在几何上被工程化来调节巨噬细胞和/或免疫应答。在一个方面,在几何上工程化的粒子可具有不同形状、尺寸和/或表面电荷以并有本发明的多核苷酸来达成靶向递送,诸如但不限于肺递送(参见例如国际公布号W02013082111,其内容以引用的方式整体并入本文)。在几何上工程化的粒子可具有的其他物理特征包括但不限于穿孔、角度化臂部、不对称性和表面粗糙性、可改变与细胞和组织的相互作用的电荷。作为一非限制性实例,本发明的纳米粒子可通过国际公布号W02013082111中所述的方法制

备,所述公布的内容以引用的方式整体并入本文。

[0733] 在一个实施方案中,本发明的纳米粒子可为水溶性纳米粒子,诸如但不限于国际公布号W02013090601中所述的那些,所述公布的内容以引用的方式整体并入本文。纳米粒子可为无机纳米粒子,其具有致密性和两性离子性配体以展现良好水溶性。纳米粒子也可具有小流体动力学直径(HD),关于时间、pH和盐度的稳定性,以及低水平的非特异性蛋白质结合。

[0734] 在一个实施方案中,本发明的纳米粒子可通过美国专利公布号US20130172406中所述的方法来开发,所述专利的内容以引用的方式整体并入本文。

[0735] 在一个实施方案中,本发明的纳米粒子是隐形纳米粒子或靶标特异性隐形纳米粒子,诸如但不限于美国专利公布号US20130172406中所述的那些;所述专利的内容以引用的方式整体并入本文。本发明的纳米粒子可通过美国专利公布号US20130172406中所述的方法制备,所述专利的内容以引用的方式整体并入本文。

[0736] 在另一实施方案中,隐形或靶标特异性隐形纳米粒子可包含聚合基质。聚合基质可包含两种或更多种聚合物,诸如但不限于聚乙烯、聚碳酸酯、聚酐、聚羧基酸、聚反丁烯二酸丙酯、聚己内酯、聚酰胺、聚缩醛、聚醚、聚酯、聚(原酸酯)、聚氰基丙烯酸酯、聚乙烯醇、聚氨酯、聚磷腈、聚丙烯酸酯、聚甲基丙烯酸酯、聚氰基丙烯酸酯、聚脲、聚苯乙烯、聚胺、聚酯、聚酐、聚醚、聚氨酯、聚甲基丙烯酸酯、聚丙烯酸酯、聚氰基丙烯酸酯或其组合。

[0737] 在一个实施方案中,纳米粒子可为具有高密度核酸层的纳米粒子-核酸杂合结构。作为一非限制性实例,纳米粒子-核酸杂合结构可通过美国专利公布号US20130171646中所述的方法制备,所述专利的内容以引用的方式整体并入本文。纳米粒子可包含核酸,诸如但不限于本文所述和/或本领域中已知的多核苷酸。

[0738] 可将本发明的至少一种纳米粒子包埋在纳米结构中的核心中,或用能够在纳米结构内或在纳米结构的表面上携带或缔合至少一种有效载荷的低密度多孔3-D结构或包衣涂布。包含至少一种纳米粒子的纳米结构的非限制性实例描述于国际专利公布号W02013123523中,所述专利的内容以引用的方式整体并入本文。

[0739] 在一些实施方案中,RNA疫苗可与阳离子或聚阳离子化合物缔合,所述化合物包括鱼精蛋白、核仁蛋白(nucleoline)、精胺或亚精胺、或其他阳离子肽或蛋白质,诸如聚L-赖氨酸(PLL)、聚精氨酸、碱性多肽、细胞穿透肽(CPP),包括HIV结合肽、HIV-1Tat(HIV)、Tat源性肽、穿透蛋白(Penetratin)、VP²²源性肽或类似肽、瘟疫病毒Erns、HSV、VP²²(单纯性疱疹(Herpes simplex))、MAP、KALA或蛋白质转导结构域(PTD)、PpT620、富含脯氨酸的肽、富含精氨酸的肽、富含赖氨酸的肽、MPG-肽、Pep-1、L-寡聚物、降血钙素(Calcitonin)肽、触角足蛋白(Antennapedia)源性肽(特别是来自果蝇触角足蛋白)、pAntp、pIsl、FGF、乳铁传递蛋白(Lactoferrin)、转运素(Transportan)、Buforin-2、Bac715-24、SynB、SynB(1)、pVEC、hCT源性肽、SAP、组蛋白,阳离子多糖例如壳聚糖、聚凝胺、阳离子聚合物例如聚乙烯亚胺(PEI)、阳离子脂质例如DOTMA:[1-(2,3-二油烯基氧基)丙基]-N,N,N-三甲基氯化铵、DMRIE、二-C14-脘、DOTIM、SAINT、DC-Chol、BGTC、CTAP、DOPC、DODAP、DOPE:二油烯基磷脂酰基乙醇-胺、DOSPA、DODAB、DOIC、DMEPC、DOGS:二(十八基)酰胺基甘氨酸基精胺、DIMRI:二肉豆蔻基氧基丙基二甲基羟基乙基溴化铵、DOTAP:二油酰基氧基-3-(三甲基铵基)丙烷、DC-6-14:0,0-二(十四酰基)-N- α -三甲基铵基乙酰基)二乙醇胺氯化物、CLIP 1:外消旋-[(2,

3-二(十八基)氧基丙基)(2-羟基乙基)]-二甲基氯化铵、CLIP6:外消旋-[2(2,3-二(十六基)氧基丙基氧基甲基氧基)乙基]-三甲铵、CLIP9:外消旋-[2(2,3-二(十六基)氧基丙基氧基丁二酰基氧基)乙基]-三甲铵、寡聚转染胺(oligofectamine),或阳离子或聚阳离子聚合物,例如经修饰聚氨基酸,诸如 β -氨基酸聚合物或反向聚酰胺等,经修饰聚乙烯,诸如PVP(聚(N-乙基-4-乙烯基溴化吡啶鎓))等,经修饰丙烯酸酯,诸如pDMAEMA(聚(甲基丙烯酸二甲氨基乙酯))等,经修饰酰胺基胺,诸如pAMAM(聚(酰胺基胺))等,经修饰聚 β 氨基酯(PBAE),诸如二胺末端修饰的1,4丁二醇二丙烯酸酯-共-5-氨基-1-戊醇聚合物等,树枝状聚合物,诸如聚丙胺树枝状聚合物或基于pAMAM的树枝状聚合物等,聚亚胺,诸如PEI:聚(乙烯亚胺)、聚(丙烯亚胺)等,聚烯丙基胺、基于糖主链的聚合物,诸如基于环糊精的聚合物、基于右旋糖酐的聚合物、壳聚糖等,基于甲硅烷主链的聚合物,诸如PMOXA-PDMS共聚物等,由一个或多个阳离子嵌段(例如选自如上提及的阳离子聚合物)的组合以及一个或多个亲水性或疏水性嵌段(例如聚乙二醇)的组合组成的嵌段聚合物;等。

[0740] 在其他实施方案中, RNA疫苗不与阳离子或聚阳离子化合物缔合。

[0741] 疫苗施用模式

[0742] 可通过产生治疗有效效果的任何途径来施用癌症RNA疫苗。这些途径包括但不限于真皮内、肌肉内和/或皮下施用。本公开提供包括向有此需要的受试者施用RNA疫苗的方法。视受试者的物种、年龄和一般状况、疾病的严重性、特定组合物、它的施用模式、它的活性模式等而定,所需精确量将在受试者与受试者之间不同。癌症RNA疫苗组合物通常以剂量单位形式配制以易于达成剂量的施用和均一性。然而,应了解癌症RNA疫苗组合物的总每日用量将由主治医师在合理医学判断的范围内决定。用于任何特定患者的特定治疗有效、防治有效或适当成像剂量水平都将取决于多种因素,包括所治疗的病症和病症的严重性;所用特定化合物的活性;所用特定组合物;患者的年龄、体重、总体健康状况、性别和膳食;所用特定化合物的施用时间、施用途径和排泄速率;治疗的持续时间;与所用特定化合物组合或同时使用的药物;以及医学领域中熟知的类似因素。

[0743] 在一些实施方案中,癌症RNA疫苗组合物可在足以递送每kg受试者体重0.0001mg至100mg,0.001mg至0.05mg,0.005mg至0.05mg,0.001mg至0.005mg,0.05mg至0.5mg,0.01mg至50mg,0.1mg至40mg,0.5mg至30mg,0.01mg至10mg,0.1mg至10mg,或1mg至25mg的剂量水平下每天,一天一次或多次,每周,每个月等施用以获得所需治疗、诊断、防治或成像作用(参见例如国际公布号W02013078199中所述的单位剂量的范围,所述公布以引用的方式整体并入本文)。所需剂量可一天三次、一天两次、一天一次、每隔一天、每三天、每周、每两周、每三周,每四周,每2个月,每3个月,每6个月等加以递送。在某些实施方案中,可使用多次施用(例如两次、三次、四次、五次、六次、七次、八次、九次、十次、十一次、十二次、十三次、十四次或更多次施用)来递送所需剂量。当采用多次施用时,可使用分次给药方案,诸如本文所述的那些。在示例性实施方案中,癌症RNA疫苗组合物可在足以递送0.0005mg/kg至0.01mg/kg,例如约0.0005mg/kg至约0.0075mg/kg,例如约0.0005mg/kg、约0.001mg/kg、约0.002mg/kg、约0.003mg/kg、约0.004mg/kg或约0.005mg/kg的剂量水平下施用。

[0744] 可将本文所述的RNA疫苗药物组合物配制成本文所述的剂型,诸如鼻内、气管内或可注射(例如静脉内、眼内、玻璃体内、肌肉内、真皮内、心内、腹膜内和皮下)剂型。

[0745] 本发明在它的应用方面不限于以下描述中阐述或附图中说明的构建细节和组分

排列。本发明能够具有其他实施方案,并且能够以各种方式实施或进行。此外,本文所用的措辞和术语出于描述目的,并且不应被视为具有限制性。在本文中使用“包括”、“包含”或“具有”、“含有”、“涉及”及其变化形式意图涵盖此后所列的条目及其等效物以及额外条目。

[0746] 实施例

[0747] 实施例1.制造多核苷酸

[0748] 根据本公开,对多核苷酸和或其部分或区域的制造可利用题为“Manufacturing Methods for Production of RNA Transcripts”的国际申请W02014/152027中教导的方法来实现,所述申请的内容以引用的方式整体并入本文。

[0749] 纯化方法可包括国际申请W02014/152030和W02014/152031中教导的那些,所述申请各自以引用的方式整体并入本文。

[0750] 多核苷酸的检测和表征方法可如W02014/144039中所教导来进行,所述专利以引用的方式整体并入本文。

[0751] 对本公开的多核苷酸的表征可使用选自由多核苷酸作图、逆转录酶测序、电荷分布分析和RNA杂质检测组成的组的程序来实现。其中表征包括测定RNA转录物序列,测定RNA转录物的纯度,或测定RNA转录物的电荷异质性。此类方法教导于例如W02014/144711和W02014/144767中,所述专利各自的内容以引用的方式整体并入本文。

[0752] 实施例2嵌合多核苷酸合成

[0753] 引言

[0754] 根据本公开,嵌合多核苷酸的两个区域或部分可使用三磷酸盐化学加以连结或连接。

[0755] 根据这种方法,具有100个核苷酸或更少的第一区域或部分被化学合成具有5' 单磷酸根和末端3' 脱OH或经阻断OH。如果该区域长于80个核苷酸,那么它可被合成为用于连接的两条链。

[0756] 如果将第一区域或部分使用体外转录 (IVT) 合成为非位置修饰区域或部分,那么可继之以向5' 单磷酸根的转化以及后续对3' 末端的加帽。

[0757] 单磷酸根保护基可选自本领域中已知的那些中的任一者。

[0758] 嵌合多核苷酸的第二区域或部分可使用化学合成或IVT方法来合成。IVT方法可包括可利用具有经修饰帽的引物的RNA聚合酶。或者,可化学合成具有多达130个核苷酸的帽,并且使其偶联于IVT区域或部分。

[0759] 整个嵌合多核苷酸无需被制造具有磷酸根-糖主链。如果一个区域或部分编码多肽,那么优选的是所述区域或部分包含磷酸根-糖主链。

[0760] 接着使用任何已知点击化学、orthoclick化学、solulink或为本领域中的人士所知的其他生物缀合化学进行连接。

[0761] 合成途径

[0762] 使用一系列起始区段来制备嵌合多核苷酸。所述区段包括:

[0763] (a) 经加帽和经保护的5' 区段,其包含正常3' OH (SEG.1)

[0764] (b) 5' 三磷酸根区段,其可包括多肽的编码区以及包含正常3' OH (SEG.2)

[0765] (c) 嵌合多核苷酸的3' 末端(例如尾部)的5' 单磷酸根区段,其包含虫草素(cordycepin)或不包含3' OH (SEG.3)

[0766] 在(化学或IVT)合成之后,将区段3(SEG.3)用虫草素处理,接着用焦磷酸酶处理以产生5'单磷酸根。

[0767] 接着使用RNA连接酶使区段2(SEG.2)连接于SEG..3。接着使连接的多核苷酸纯化,并且用焦磷酸酶处理以裂解二磷酸根。接着使经处理的SEG.2-SEG..3构建体纯化,并且使SEG..1连接于5'末端。可对嵌合多核苷酸进行另一纯化步骤。

[0768] 当嵌合多核苷酸编码多肽时,连接或接合的区段可表示为:5' UTR(SEG..1)、开放阅读框或ORF(SEG.2)和3' UTR+聚腺苷酸(SEG.3)。

[0769] 各步骤的产率可多达90-95%。

[0770] 实施例3:用于cDNA产生的PCR

[0771] 使用由Kapa Biosystems(Woburn,MA)制造的2x KAPA HIFI™ HotStart ReadyMix进行用于制备cDNA的PCR程序。这个体系包括12.5μl 2x KAPA ReadyMix;0.75μl正向引物(10μM);0.75μl反向引物(10μM);100ng模板cDNA;和dH2O稀释至25.0μl。反应条件是在95℃下持续5分钟,以及25个循环的98℃持续20秒,接着58℃持续15秒,接着72℃持续45秒;接着72℃持续5分钟,接着4℃直至终止。

[0772] 根据制造商说明书(多达5μg),使用Invitrogen的PURELINK™ PCR微型试剂盒(Carlsbad,CA)来净化反应。更大量的反应将需要使用具有更大处理量的产品进行净化。在净化之后,使用NANODROPTM对cDNA定量,并且通过琼脂糖凝胶电泳来分析以确认cDNA具有预期大小。接着提交cDNA以进行测序分析,随后继续进行体外转录反应。

[0773] 实施例4体外转录(IVT)

[0774] 体外转录反应产生含有经均一修饰多核苷酸的多核苷酸。所述经均一修饰多核苷酸可包含本公开的多核苷酸的区域或部分。使用天然NTP和非天然NTP,内部制备输入三磷酸核苷酸(NTP)。

[0775] 典型体外转录反应包括以下:

1 模板 cDNA 1.0 μg

2 10x 转录缓冲液(400 mM Tris-HCl pH 8.0, 190 mM MgCl₂, 50 mM DTT, 10 mM 亚精胺) 2.0 μl

3 定制 NTP(各自 25 mM) 7.2 μl

[0776]

4 RNA 酶抑制剂 20 U

5 T7 RNA 聚合酶 3000 U

6 dH₂O 直至 20.0 μl, 和

7 在 37℃下孵育 3 小时-5 小时。

[0777] 可将粗制IVT混合物在4℃下储存过夜以在次日进行净化。1U的无RNA酶的DNA酶接

着用于消化原始模板。在37℃下孵育15分钟之后,遵循制造商说明书,使用Ambion的MEGACLEARTM试剂盒(Austin,TX)来纯化mRNA。这个试剂盒可纯化多达500μg的RNA。在净化之后,RNA使用NanoDrop加以定量,并且通过琼脂糖凝胶电泳来分析以确认RNA具有适当大小,并且尚未发生RNA降解。

[0778] 实施例5.用mRNA癌症疫苗进行的体内免疫原性测定

[0779] 使用mRNA疫苗,在小鼠中进行MC38免疫原性研究。产生mRNA抗原:具有以下形式的三种MC38新表位Adpgk、Dpagt1、Reps1:25聚体-TMG、分泌的CD40L-TMG融合蛋白。阳性对照是与25聚体肽免疫+抗-CD40+聚(I:C)的基准比较(Yadav等,Nature 2015)。在第0、7和14天使小鼠免疫。在第3、10和17天测量读出;随后在第21天进行MC38激发,并且在第35天处死。

[0780] 通过用右旋糖酐聚体染色获得的抗原特异性T细胞群体的频率来表征表位-特异性T细胞群体。产生细胞因子概况:细胞内细胞因子染色(IFN γ 、TNF α 、IL-2)和ELISPOT(在MC38突变肽刺激后)。使用以下记忆和T细胞分化标志物:CD44、CD62L、IL7R、KLRG1、CD122以及耗竭标志物:PD1、Lag3、Tim3、2B4。

[0781] 显示mRNA疫苗诱导抗原特异性CD8应答的结果显示于图1A-1D中。显示mRNA疫苗诱导抗原特异性效应/记忆CD8 T细胞的结果显示于图2中。

[0782] 关于抗原设计的一些考虑事项包括MHC类别、表达定位、多肽形式和构型以及效能增强基序。对基于mRNA的新表位的抗原设计的多因素考虑显示于图3(示意图)和4(表)中。

[0783] 实施例6.基于FACS的MHC呈递的方法开发

[0784] 目标:在MCF7(HLA*201)的情况下验证基于FACS的对mRNA编码表位的测定。所用mRNA是四种不同表位的多联体组合:mut.gp100(T209M)+mut.酪氨酸酶(N271D)+mut.CDK4(R24C)+mut.MART1(A27L)。TMG.G25(1/2)³.nPEST seq:mut.gp100(T209M)的三个重复的串联小基因的对照mRNA。使用抗-mut.MART1(A27L)TCR聚体-PE和抗HLA抗体检测蛋白质产生。

[0785] 该方法涉及:使用LF2000,用250ng mRNA转染MCF7;肽脉冲对照制备:使MCF7不受脉冲处理或在37℃下用含合成肽的无血清RPMI脉冲处理3小时;以及在约20小时时用抗-HLA和TCR聚体(对突变MART1-HLA*201复合物具有特异性)进行FACS分析。

[0786] 数据显示于图5中。在MCF7细胞上检测到通过抗mut.MART1TCR聚体进行的特定MHC1/mut.MART1肽呈递。

[0787] 实施例7.用编码20种表位的多联体的mRNA引发的T细胞应答

[0788] mRNA多联体诱导I类T细胞应答与II类T细胞应答两者。CA60编码源于患者的突变组的20种表位。它包括5种鼠II类表位,10种鼠I类表位,鼠阳性对照(SIINFEKL(SEQ ID NO:22),源于卵白蛋白)和4种人(HLA-A2)表位(未显示)。将小鼠用10μg mRNA免疫两次(致敏+加强,在第14天),并且通过流式细胞术在第21天分析脾细胞。

[0789] 数据显示于图7中。10种I类表位中的4种和5种II类表位中的5种具有免疫原性。表位显示应答是未刺激对照的两倍。一些I类经预测的表位显示某一水平的交叉呈递。

[0790] 实施例8.不管在mRNA多联体内的位置如何表位都具有免疫原性

[0791] 不管表位在mRNA内的位置如何,它们都具有免疫原性。CA80和CA81编码已知会引发T细胞应答的相同20种表位。它们包括5种II类表位,10种鼠I类表位,鼠阳性对照(SIINFEKL(SEQ ID NO:22),源于卵白蛋白)和4种人(HLA-A2)表位(未显示)。CA80和CA81的

不同之处仅在于不同表位的相对位置。将小鼠用10 μ g mRNA免疫两次(致敏+加强,在第14天),并且通过流式细胞术在第21天分析脾细胞。

[0792] 数据显示于图8A中。10种I类表位中的8种和5种II类表位中的3种具有免疫原性。表位显示应答是未刺激对照的八倍。不管在mRNA内的位置如何,都观察到相同免疫原性水平。图8B显示在CD8+IFN γ +细胞的频率百分比与ELISpot测定中的干扰素- γ 斑点形成单位(SFU)之间存在强烈关联(R平方=0.78)。

[0793] 对于用CA-80进行的疫苗接种,观察到剂量响应。如图9A和9B中所示,当施用的疫苗的量降低时,观察到“命中物”损失。

[0794] 当使用20聚体相对于5聚体进行免疫时,比较对已知表位的T细胞应答。如图10中所示,当以20聚体或(3)3聚体形式接种疫苗时,对已知表位的T细胞应答是类似的。当用5聚体进行免疫时,观察到朝向略微更高T细胞应答的趋势。

[0795] 当用单独I类表位或在II类帮助存在下进行免疫时,比较T细胞应答。如图11中所示,当以5聚体形式单独(无II类帮助)或与5种已知II类表位一起(有II类帮助)施用表位时,比较对5种已知I类表位的T细胞应答。这组也包括已知I类表位的另一5聚体。在含有已知II类表位的5聚体存在下,对已知I类表位的T细胞应答更高。因此,II类/Th表位使I类/Tc应答增强。

[0796] 在用与MC3或化合物25一起配制的多联疫苗接种疫苗下观察到T细胞应答。将CA-81(含有15种已知小鼠表位)在MC3和化合物25中配制。如图12中所示,测量针对疫苗中的各表位的T细胞应答,并且在两种制剂之间比较应答。化合物25配制的物质产生与MC3配制的物质类似的T细胞应答。

[0797] 实施例9.用以评估mRNA疫苗在具有实体肿瘤的患者中的安全性、可耐受性和免疫原性的I期开放标签研究

[0798] 进行用以评估单独mRNA-1在实体肿瘤被切除的患者中,以及与帕母单抗(一种人源化抗PD-1抗体)组合在具有不可切除实体肿瘤的患者中的安全性、可耐受性和免疫原性的I期开放标签研究。

[0799] 目标:主要:mRNA-1在实体肿瘤被切除的患者中(A部分)以及mRNA-1+帕母单抗在具有不可切除实体肿瘤的患者中(B部分)的安全性和可耐受性

[0800] 次要:A部分:所治疗的实体肿瘤被切除的患者的RFS。

[0801] B部分:具有不可切除实体肿瘤的患者ORR、DOR、PFS和OS(帕母单抗标签)

[0802] 探究性研究目标:免疫原性

[0803] 方法:两部分,开放标签,3+3剂量逐步升高:在21天循环期间通过肌肉内(IM)注射来施用0.1mg、0.2mg或0.4mg的固定剂量的mRNA-1一次,最多历经4个循环使用4次剂量。

[0804] mRNA-1的mRNA组分的示意图显示于图13中。mRNA-1含有在5'末端的典型二核苷酸哺乳动物帽1结构,其包含以5'-5'三磷酸根构型连接于在核糖糖的2'位被甲基化的倒数第二个核苷酸的7-甲基鸟苷(Kozak,1991;Fechter和Brownlee,2005)。帽结构为翻译起始所需。在帽结构之后是48-nt 5'非翻译区(5'UTR),其已被最优化来有助于翻译起始。5'UTR终止于编码mRNA-1的将对于各患者加以独特确定的蛋白质编码区或开放阅读框(ORF)的首个氨基酸的AUG甲硫氨酸起始密码子。mRNA-1的ORF以连续连接的三个哺乳动物终止密码子(5'-UGA-UAA-UAG-3')终止,所述终止密码子使已被最优化来促进mRNA稳定化的常见预指

定的3' UTR核苷酸序列起始。mRNA-1以为mRNA稳定化和蛋白质翻译所需的约100-nt腺苷同聚物即聚腺苷酸尾部终止。在5'末端的帽结构与在3'末端的聚腺苷酸尾部两者均为mRNA-1通过细胞翻译机构加以翻译所需。缺乏5'帽或3'聚腺苷酸尾部的RNA不能被翻译,因此将不产生蛋白质。缺乏在5'末端的帽1结构或在3'末端的聚腺苷酸尾部的mRNA-1的任何降解物都将不产生任何蛋白质。

[0805] mRNA-1的一般性分子序列的一个实例提供于图14中,其中患者特异性编码区以引用的方式描绘为(N)。mRNA-1中的核苷在化学上与天然存在的哺乳动物mRNA核苷相同,例外之处是通常存在于哺乳动物mRNA中的尿苷核苷用存在于哺乳动物tRNA中的天然存在的嘧啶碱基N1-甲基-假尿苷完全替换(Rozenski,Crain等1999;Kariko,Buckstein等2005)。这个核苷替代正常尿苷碱基被包括在mRNA-1中以使由病原体相关分子样式(PAMP)受体(例如Toll样受体(TLR),Desmet和Ishii,2012)对mRNA-1的无差别识别最少。

[0806] 实施例10.用以评估mRNA疫苗在具有实体肿瘤的患者中的安全性、可耐受性和免疫原性的I期开放标签研究

[0807] 进行用以评估单独mRNA2在实体肿瘤被切除的患者中,以及与帕母单抗(一种人源化抗PD-1抗体)组合在具有不可切除实体肿瘤的患者中的安全性、可耐受性和免疫原性的I期开放标签研究。

[0808] 目标:主要:mRNA-4157单一疗法在实体肿瘤被切除的患者中(A部分)以及mRNA-4157+帕母单抗在具有不可切除实体肿瘤的患者中(B部分)的安全性、可耐受性和推荐2期剂量

[0809] 方法:两部分,开放标签,3+3剂量逐步升高:在21天循环期间通过肌肉内(IM)注射来施用0.1mg、0.2mg或0.4mg的固定剂量的mRNA-4157一次,最多历经9个循环使用9次剂量(即6个月给药)。

[0810] 实施例11.p53中的频发剪接位点和沉默突变“热点”

[0811] 在人癌症的情况下,相比于任何其他基因,p53基因(官方符号TP53)更频繁突变。大量群组研究已显示对于大多数p53突变,基因组位置为一名患者或仅少许患者所特有,并且突变不能用作被设计用于特定患者群体的治疗性疫苗的频发新抗原。然而,p53基因座的小型子组确实展现“热点”样式,其中基因中的若干位置以相对较高频率被突变。引人注目的是,这些频发突变区域中的大部分发生在外显子-内含子边界附近,从而破坏由mRNA剪接机构识别的典型核苷酸序列基序,如图16中所示。剪接基序的突变可改变最终mRNA序列,即使预测局部氨基酸序列无变化(即对于同义突变或内含子突变来说)。因此,这些突变常常由常见注释工具注释为“非编码”,并且被忽略用于进一步分析,即使它们可以不可预测方式改变mRNA剪接,并且对翻译蛋白质施加严重功能性影响。如果选择性剪接同种型产生同框序列变化(即不产生PTC),那么它可逃脱由NMD进行的耗竭,并且易于表达,加工,以及由HLA系统呈递在细胞表面上。此外,突变源性选择性剪接通常是“隐蔽的”,即不在正常组织中表达,因此可由T细胞识别为非自身新抗原。如描绘导致产生保留内含子和隐蔽剪接的热点剪接位点和沉默突变的图17中所示,若干突变位点通过RNA-seq确认会产生保留内含子或隐蔽剪接。两种代表性突变源性肽具有在编码基因组中其他地方不具有匹配的多种HLA-A2结合表位。

[0812] p53中鉴定的频发突变包括:

[0813] (1) 在典型5' 剪接位点邻近密码子p.T125处的突变,从而诱导具有肽序列TAKSVTCTVSCPEGLASMRLQCLAVSPCISFVWNFGIPLHPLASCQCFFIVYPLNV (SEQ ID NO:1) 的保留内含子,所述序列含有表位AVSPCISFVW (SEQ ID NO:2) (HLA-B*57:01,HLA-B*58:01)、HPLASCQCFF (SEQ ID NO:3) (HLA-B*35:01,HLA-B*53:01)、FVWNFGIPL (SEQ ID NO:4) (HLA-A*02:01,HLA-A*02:06,HLA-B*35:01);

[0814] (2) 在典型5' 剪接位点邻近密码子p.331处的突变,从而诱导具有肽序列EYFTLQVLSLGTSYQVESFQSNTQNAVFFLTVPALPAIGAFAIRGQ (SEQ ID NO:5) 的保留内含子,所述序列含有表位LQVLSLGTSY (SEQ ID NO:6) (HLA-B*15:01)、FQSNTQNAV (SEQ ID NO:7) (HLA-B*15:01);

[0815] (3) 在典型3' 剪接位点邻近密码子p.126处的突变,从而诱导隐蔽选择性外显子3' 剪接位点,其产生含有表位CTMFCQLAK (SEQ ID NO:9) (HLA-A*11:01)、KSVTCTMF (SEQ ID NO:10) (HLA-B*58:01) 的新型跨越肽序列AKSVTCTMFCQLAK (SEQ ID NO:8);和

[0816] (4) 在典型5' 剪接位点邻近密码子p.224处的突变,从而诱导隐蔽选择性内含子5' 剪接位点,其产生含有表位VPYEPPEVW (SEQ ID NO:12) (HLA-B*53:01,HLA-B*51:01)、LTVPPSTAW (SEQ ID NO:13) (HLA-B*58:01,HLA-B*57:01) 的新型跨越肽序列VPYEPPEVWLALTVPSTAWAA (SEQ ID NO:11);

[0817] 其中转录物密码子位置涉及来自Ensembl v83人基因组注释的典型全长p53转录物ENST00000269305 (SEQ ID NO:14)。

[0818] 等效物

[0819] 本领域技术人员将仅使用常规实验就会认识到或能够确定本文所述的本公开的特定实施方案的许多等效物。所述等效物意图由以下权利要求涵盖。

[0820] 本文公开的包括专利文件的所有参考文献都以引用的方式整体并入本文。

[0821] 以下内容对应于母案申请中的原始权利要求书,现作为说明书的一部分并入此处:

[0822] 1. 一种疫苗,其包含在脂质纳米粒子中配制的具有编码癌抗原的开放阅读框的mRNA和具有编码免疫检查点调节剂的开放阅读框的mRNA。

[0823] 2. 如项1所述的疫苗,其中所述免疫检查点调节剂是抑制性检查点多肽。

[0824] 3. 如项2所述的疫苗,其中所述抑制性检查点多肽是特异性结合至选自PD-1、TIM-3、VISTA、A2AR、B7-H3、B7-H4、BTLA、CTLA-4、IDO、KIR和LAG3组成的组的分子的抗体或其片段。

[0825] 4. 如项2所述的疫苗,其中所述抑制性检查点多肽是抗CTLA4抗体或抗PD1抗体。

[0826] 5. 如项1所述的疫苗,其中所述mRNA编码2-100种癌抗原。

[0827] 6. 如项1所述的疫苗,其中所述mRNA编码10-100种癌抗原。

[0828] 7. 如项1所述的疫苗,其中所述mRNA编码10-1,000种癌抗原。

[0829] 8. 如项1-7中任一项所述的疫苗,其中所述疫苗是个人化癌症疫苗并且其中所述癌抗原是受试者特异性癌抗原。

[0830] 9. 如项1所述的疫苗,其中所述受试者特异性癌抗原代表所述受试者的肿瘤样品的外显子组。

[0831] 10. 如项1所述的疫苗,其中所述受试者特异性癌抗原代表所述受试者的肿瘤样品的转录物组。

- [0832] 11.如项6或7所述的疫苗,其中单一mRNA编码所述癌抗原。
- [0833] 12.如项6或7所述的疫苗,其中多种mRNA编码所述癌抗原。
- [0834] 13.如项12所述的疫苗,其中各mRNA编码5-10种癌抗原。
- [0835] 14.如项12所述的疫苗,其中各mRNA编码单一癌抗原。
- [0836] 15.如项12所述的疫苗,其中各mRNA编码50-200种癌抗原。
- [0837] 16.如项14或15所述的疫苗,其中各癌抗原的长度为10-50个氨基酸。
- [0838] 17.如项14或15所述的疫苗,其中各癌抗原的长度为20-100个氨基酸。
- [0839] 18.如项1-17中任一项所述的疫苗,其中所述mRNA包含至少一种化学修饰。
- [0840] 19.如项18所述的疫苗,其中所述化学修饰选自假尿苷、N1-甲基假尿苷、N1-乙基假尿苷、2-硫代尿苷、4'-硫代尿苷、5-甲基胞嘧啶、2-硫代-1-甲基-1-脱氮-假尿苷、2-硫代-1-甲基-假尿苷、2-硫代-5-氮杂-尿苷、2-硫代-二氢假尿苷、2-硫代-二氢尿苷、2-硫代-假尿苷、4-甲氧基-2-硫代-假尿苷、4-甲氧基-假尿苷、4-硫代-1-甲基-假尿苷、4-硫代-假尿苷、5-氮杂-尿苷、二氢假尿苷、5-甲基尿苷、5-甲氧基尿苷和2'-O-甲基尿苷。
- [0841] 20.如项1-19中任一项所述的疫苗,其中所述疫苗在脂质纳米粒子中配制。
- [0842] 21.如项20所述的疫苗,其中所述脂质纳米粒子包含阳离子脂质、经PEG修饰的脂质、固醇和非阳离子脂质。
- [0843] 22.如项21所述的疫苗,其中所述阳离子脂质是可离子化阳离子脂质,并且所述非阳离子脂质是中性脂质,并且所述固醇是胆固醇。
- [0844] 23.如项22所述的疫苗,其中所述阳离子脂质选自2,2-二亚油基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧杂环戊烷(DLin-KC2-DMA)、二亚油基-甲基-4-二甲基氨基丁酸酯(DLin-MC3-DMA)和9-((4-(二甲基氨基)丁酰基)氧基)十七烷二酸二((Z)-壬-2-烯-1-基)酯(L319)。
- [0845] 24.如项20所述的疫苗,其中所述脂质纳米粒子包含式(I)化合物。
- [0846] 25.如项24所述的疫苗,其中所述式(I)化合物是化合物25。
- [0847] 26.如项20所述的疫苗,其中所述脂质纳米粒子具有小于0.4的多分散性值。
- [0848] 27.如项20所述的疫苗,其中所述脂质纳米粒子在中性pH值下具有净中性电荷。
- [0849] 28.如项1-25中任一项所述的疫苗,其中所述mRNA编码一种或多种频发多态性。
- [0850] 29.如项28所述的疫苗,其中所述一种或多种频发多态性包含p53中的频发体细胞癌突变。
- [0851] 30.如项29所述的疫苗,其中p53中的所述一种或多种频发体细胞癌突变选自以下组成的组:
- [0852] (1)在典型5'剪接位点邻近密码子p.T125处的突变,从而诱导具有肽序列TAKSVTCTVSCPEGLASMRLQCLAVSPCISFVWNFGIPLHPLASCQCFFIVYPLNV(SEQ ID NO:1)的保留内含子,所述序列含有表位AVSPCISFVW(SEQ ID NO:2)(HLA-B*57:01,HLA-B*58:01)、HPLASCQCFF(SEQ ID NO:3)(HLA-B*35:01,HLA-B*53:01)、FVWNFGIPL(SEQ ID NO:4)(HLA-A*02:01,HLA-A*02:06,HLA-B*35:01);
- [0853] (2)在典型5'剪接位点邻近密码子p.331处的突变,从而诱导具有肽序列EYFTLQVLSLGTSYQVESFQSNTQNAVFFLTVLPAIGAFAIRGQ(SEQ ID NO:5)的保留内含子,所述序列含有表位LQVLSLGTSY(SEQ ID NO:6)(HLA-B*15:01)、FQSNTQNAV(SEQ ID NO:7)(HLA-B*15:01);

[0854] (3) 在典型3' 剪接位点邻近密码子p.126处的突变,从而诱导隐蔽选择性外显子3' 剪接位点,其产生含有表位CTMFCQLAK (SEQ ID NO:9) (HLA-A*11:01)、KSVTCTMF (SEQ ID NO:10) (HLA-B*58:01)的新型跨越肽序列AKSVTCTMFCQLAK (SEQ ID NO:8);和/或

[0855] (4) 在典型5' 剪接位点邻近密码子p.224处的突变,从而诱导隐蔽选择性内含子5' 剪接位点,其产生含有表位VPYEPPEVW (SEQ ID NO:12) (HLA-B*53:01,HLA-B*51:01)、LTVPPSTAW (SEQ ID NO:13) (HLA-B*58:01,HLA-B*57:01)的新型跨越肽序列VPYEPPEVWLALTVPSTAWAA (SEQ ID NO:11),

[0856] 其中转录物密码子位置涉及来自Ensembl v83人基因组注释的典型全长p53转录物ENST00000269305 (SEQ ID NO:14)。

[0857] 31.如项1-30中任一项所述的疫苗,其中所述开放阅读框进一步编码鞭毛素蛋白或肽。

[0858] 32.如项31所述的疫苗,其中所述鞭毛素蛋白或肽包含由SEQ ID NO:301-303中的任一者标识的氨基酸序列。

[0859] 33.一种个人化癌症疫苗,其包含具有编码至少2种癌抗原表位的开放阅读框的mRNA和脂质纳米粒子。

[0860] 34.如项33所述的个人化癌症疫苗,其中所述mRNA编码2-100种癌抗原。

[0861] 35.如项33所述的个人化癌症疫苗,其中所述mRNA编码10-1,000种癌抗原。

[0862] 36.如项34或35所述的个人化癌症疫苗,其中单一mRNA编码所述癌抗原表位。

[0863] 37.如项34或35所述的个人化癌症疫苗,其中多种mRNA编码所述癌抗原表位。

[0864] 38.如项37所述的个人化癌症疫苗,其中各mRNA编码5-10或20-100种癌抗原。

[0865] 39.如项37所述的个人化癌症疫苗,其中各mRNA编码单一癌抗原。

[0866] 40.如项38或39所述的个人化癌症疫苗,其中各癌抗原表位的长度为10-50个氨基酸。

[0867] 41.如项38或39所述的个人化癌症疫苗,其中各癌抗原表位的长度为15-20个氨基酸。

[0868] 42.如项38或39所述的个人化癌症疫苗,其中各癌抗原表位的长度为20-200个氨基酸。

[0869] 43.如项40-42中任一项所述的个人化癌症疫苗,其中所述mRNA包含至少一种化学修饰。

[0870] 44.如项43所述的个人化癌症疫苗,其中所述化学修饰选自假尿苷、N1-甲基假尿苷、N1-乙基假尿苷、2-硫代尿苷、4'-硫代尿苷、5-甲基胞嘧啶、2-硫代-1-甲基-1-脱氮-假尿苷、2-硫代-1-甲基-假尿苷、2-硫代-5-氮杂-尿苷、2-硫代-二氢假尿苷、2-硫代-二氢尿苷、2-硫代-假尿苷、4-甲氧基-2-硫代-假尿苷、4-甲氧基-假尿苷、4-硫代-1-甲基-假尿苷、4-硫代-假尿苷、5-氮杂-尿苷、二氢假尿苷、5-甲基尿苷、5-甲氧基尿苷和2'-O-甲基尿苷。

[0871] 45.如项40-43所述的个人化癌症疫苗,其中所述纳米粒子具有50-200nm的平均直径。

[0872] 46.如项45所述的个人化癌症疫苗,其中所述脂质纳米粒子包含阳离子脂质、经PEG修饰的脂质、固醇和非阳离子脂质。

[0873] 47.如项46所述的个人化癌症疫苗,其中所述阳离子脂质是可离子化阳离子脂质,

并且所述非阳离子脂质是中性脂质,并且所述固醇是胆固醇。

[0874] 48.如项46所述的个人化癌症疫苗,其中所述阳离子脂质选自2,2-二亚油基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧杂环戊烷(DLin-KC2-DMA)、二亚油基-甲基-4-二甲基氨基丁酸酯(DLin-MC3-DMA)和9-((4-(二甲基氨基)丁酰基)氧基)十七烷二酸二((Z)-壬-2-烯-1-基)酯(L319)。

[0875] 49.如项40-43所述的个人化癌症疫苗,其中所述脂质纳米粒子包含式(I)化合物。

[0876] 50.如项49所述的个人化癌症疫苗,其中所述式(I)化合物是化合物25。

[0877] 51.如项45-50所述的个人化癌症疫苗,其中所述纳米粒子具有小于0.4的多分散性值。

[0878] 52.如项45所述的个人化癌症疫苗,其中所述纳米粒子在中性pH值下具有净中性电荷。

[0879] 53.如项40-52中任一项所述的个人化癌症疫苗,其中所述mRNA编码一种或多种频发多态性。

[0880] 54.如项53所述的个人化癌症疫苗,其中所述一种或多种频发多态性包含p53中的频发体细胞癌突变。

[0881] 55.如项54所述的个人化癌症疫苗,其中p53中的所述一种或多种频发体细胞癌突变选自自由以下组成的组:

[0882] (1)在典型5'剪接位点邻近密码子p.T125处的突变,从而诱导具有肽序列TAKSVTCTVSCPEGLASMRLQCLAVSPCISFVWNFGIPLHPLASCQCFFIVYPLNV(SEQ ID NO:1)的保留内含子,所述序列含有表位AVSPCISFVW(SEQ ID NO:2)(HLA-B*57:01,HLA-B*58:01)、HPLASCQCFF(SEQ ID NO:3)(HLA-B*35:01,HLA-B*53:01)、FVWNFGIPL(SEQ ID NO:4)(HLA-A*02:01,HLA-A*02:06,HLA-B*35:01);

[0883] (2)在典型5'剪接位点邻近密码子p.331处的突变,从而诱导具有肽序列EYFTLQVLSLGTYSYQVESFQSNTQNAVFFLTVLPAIGAFAIRGQ(SEQ ID NO:5)的保留内含子,所述序列含有表位LQVLSLGTYSY(SEQ ID NO:6)(HLA-B*15:01)、FQSNTQNAVF(SEQ ID NO:7)(HLA-B*15:01);

[0884] (3)在典型3'剪接位点邻近密码子p.126处的突变,从而诱导隐蔽选择性外显子3'剪接位点,其产生含有表位CTMFCQLAK(SEQ ID NO:9)(HLA-A*11:01)、KSVTCTMF(SEQ ID NO:10)(HLA-B*58:01)的新型跨越肽序列AKSVTCTMFCQLAK(SEQ ID NO:8);和/或

[0885] (4)在典型5'剪接位点邻近密码子p.224处的突变,从而诱导隐蔽选择性内含子5'剪接位点,其产生含有表位VPYEPPEVW(SEQ ID NO:12)(HLA-B*53:01,HLA-B*51:01)、LTVPPSTAW(SEQ ID NO:13)(HLA-B*58:01,HLA-B*57:01)的新型跨越肽序列VPYEPPEVWLALTVPSTAWAA(SEQ ID NO:11),

[0886] 其中转录物密码子位置涉及来自Ensembl v83人基因组注释的典型全长p53转录物ENST00000269305(SEQ ID NO:14)。

[0887] 56.如项40-55中任一项所述的个人化癌症疫苗,其中所述开放阅读框编码在所述表位之间以单一核苷酸间隔子加以排列的多种肽表位抗原,并且其中所述多种表位抗原包含至少两种MHC I类表位和至少两种MHC II类表位。

[0888] 57.如项33-55中任一项所述的个人化癌症疫苗,其中所述开放阅读框编码在所述表位之间在无间隔子下直接彼此连接的多种肽表位抗原,并且其中所述多种表位抗原包含

至少两种MHC I类表位和至少两种MHC II类表位。

[0889] 58.如项56或57所述的个人化癌症疫苗,其中对所述多种肽表位抗原进行排列和排序以使假表位最少。

[0890] 59.如项56或57所述的个人化癌症疫苗,其中所述多种肽表位抗原是不含假表位的多肽。

[0891] 60.如项56所述的个人化癌症疫苗,其中所述多种肽表位抗原是具有以下结构的多肽:

[0892] $(X-G-X)_{1-10} (G-Y-G-Y)_{1-10} (G-X-G-X)_{0-10} (G-Y-G-Y)_{0-10}$ 、

[0893] $(X-G)_{1-10} (G-Y)_{1-10} (G-X)_{0-10} (G-Y)_{0-10}$ 、

[0894] $(X-G-X-G-X)_{1-10} (G-Y-G-Y)_{1-10} (X-G-X)_{0-10} (G-Y-G-Y)_{0-10}$ 、

[0895] $(X-G-X)_{1-10} (G-Y-G-Y-G-Y)_{1-10} (X-G-X)_{0-10} (G-Y-G-Y)_{0-10}$ 、

[0896] $(X-G-X-G-X-G-X)_{1-10} (G-Y-G-Y)_{1-10} (X-G-X)_{0-10} (G-Y-G-Y)_{0-10}$ 、

[0897] $(X-G-X)_{1-10} (G-Y-G-Y-G-Y-G-Y)_{1-10} (X-G-X)_{0-10} (G-Y-G-Y)_{0-10}$ 、

[0898] 其中X是长度为10-40个氨基酸的MHC I类表位,Y是长度为10-40个氨基酸的MHC II类表位,并且G是甘氨酸。

[0899] 61.如项57所述的个人化癌症疫苗,其中所述多种肽表位抗原是具有以下结构的多肽:

[0900] $(X)_{1-10} (Y)_{1-10} (X)_{0-10} (Y)_{0-10}$ 、

[0901] $(Y)_{1-10} (X)_{1-10} (Y)_{0-10} (X)_{0-10}$ 、

[0902] $(XX)_{1-10} (Y)_{1-10} (X)_{0-10} (Y)_{0-10}$ 、

[0903] $(YY)_{1-10} (XX)_{1-10} (Y)_{0-10} (X)_{0-10}$ 、

[0904] $(X)_{1-10} (YY)_{1-10} (X)_{0-10} (Y)_{0-10}$ 、

[0905] $(XXX)_{1-10} (YYY)_{1-10} (XX)_{0-10} (YY)_{0-10}$ 、

[0906] $(YYY)_{1-10} (XXX)_{1-10} (YY)_{0-10} (XX)_{0-10}$ 、

[0907] $(XY)_{1-10} (Y)_{1-10} (X)_{1-10} (Y)_{1-10}$ 、

[0908] $(YX)_{1-10} (Y)_{1-10} (X)_{1-10} (Y)_{1-10}$ 、

[0909] $(YX)_{1-10} (X)_{1-10} (Y)_{1-10} (Y)_{1-10}$ 、

[0910] 其中X是长度为10-40个氨基酸的MHC I类表位,并且Y是长度为10-40个氨基酸的MHC II类表位。

[0911] 62.如项40-61中任一项所述的个人化癌症疫苗,其中所述开放阅读框进一步编码鞭毛素蛋白或肽。

[0912] 63.如项62所述的个人化癌症疫苗,其中所述鞭毛素蛋白或肽包含由SEQ ID NO: 301-303中的任一者标识的氨基酸序列。

[0913] 64.一种在受试者中引发免疫应答的方法,其包括从受试者分离生物样品,从所述生物样品鉴定至少2种抗原,以及向所述受试者施用在脂质纳米粒子中配制的具有编码所述至少2种抗原的开放阅读框的mRNA疫苗。

[0914] 65.如项64所述的方法,其中从所述生物样品鉴定2-100种抗原。

[0915] 66.如项65所述的方法,其中所述mRNA疫苗具有编码所述2-100种抗原的开放阅读框。

- [0916] 67.如项66所述的方法,其中单一mRNA编码所述抗原。
- [0917] 68.如项66所述的方法,其中多种mRNA编码所述抗原。
- [0918] 69.如项64-68中任一项所述的方法,其中抗原是癌抗原。
- [0919] 70.如项69所述的方法,其中所述癌抗原具有选自点突变、框移突变和重组的突变。
- [0920] 71.如项70所述的方法,其进一步包括通过外显子组分析来确认所述癌抗原具有受试者特异性。
- [0921] 72.如项70所述的方法,其进一步包括通过转录物组分析来确认所述癌抗原具有受试者特异性。
- [0922] 73.如项70所述的方法,其进一步包括在施用所述mRNA疫苗之后至少一个月,从所述受试者的样品鉴定至少2种癌抗原以产生第二组癌抗原,以及向所述受试者施用具有编码所述第二组癌抗原的开放阅读框的mRNA疫苗。
- [0923] 74.如项73所述的方法,其中所述受试者的样品是外显子组。
- [0924] 75.如项73所述的方法,其中所述受试者的样品是肿瘤样品。
- [0925] 76.如项69-75中任一项所述的方法,其中所述开放阅读框进一步编码一种或多种传统癌抗原。
- [0926] 77.如项76所述的方法,其中所述传统癌抗原是非突变抗原。
- [0927] 78.如项76所述的方法,其中所述传统癌抗原是突变抗原。
- [0928] 79.如项69-75中任一项所述的方法,其中所述mRNA疫苗进一步包含具有编码一种或多种传统癌抗原的开放阅读框的mRNA。
- [0929] 80.如项64-79中任一项所述的方法,其中所述mRNA疫苗包含至少一种化学修饰。
- [0930] 81.如项80所述的方法,其中所述化学修饰选自假尿苷、N1-甲基假尿苷、N1-乙基假尿苷、2-硫代尿苷、4'-硫代尿苷、5-甲基胞嘧啶、2-硫代-1-甲基-1-脱氮-假尿苷、2-硫代-1-甲基-假尿苷、2-硫代-5-氮杂-尿苷、2-硫代-二氢假尿苷、2-硫代-二氢尿苷、2-硫代-假尿苷、4-甲氧基-2-硫代-假尿苷、4-甲氧基-假尿苷、4-硫代-1-甲基-假尿苷、4-硫代-假尿苷、5-氮杂-尿苷、二氢假尿苷、5-甲基尿苷、5-甲氧基尿苷和2'-O-甲基尿苷。
- [0931] 82.如项64-81中任一项所述的方法,其在纳米粒子中配制。
- [0932] 83.如项82所述的方法,其中所述纳米粒子具有50-200nm的平均直径。
- [0933] 84.如项82所述的方法,其中所述纳米粒子是脂质纳米粒子。
- [0934] 85.如项84所述的方法,其中所述脂质纳米粒子包含阳离子脂质、经PEG修饰的脂质、固醇和非阳离子脂质。
- [0935] 86.如项84所述的方法,其中所述阳离子脂质是可离子化阳离子脂质,并且所述非阳离子脂质是中性脂质,并且所述固醇是胆固醇。
- [0936] 87.如项84所述的方法,其中所述阳离子脂质选自2,2-二亚油基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧杂环戊烷(DLin-KC2-DMA)、二亚油基-甲基-4-二甲基氨基丁酸酯(DLin-MC3-DMA)和9-((4-(二甲基氨基)丁酰基)氧基)十七烷二酸二((Z)-壬-2-烯-1-基)酯(L319)。
- [0937] 88.如项82-84中任一项所述的方法,其中所述脂质纳米粒子包含式(I)化合物。
- [0938] 89.如项88所述的方法,其中所述式(I)化合物是化合物25。

- [0939] 90.如项82所述的方法,其中所述纳米粒子具有小于0.4的多分散性值。
- [0940] 91.如项82所述的方法,其中所述纳米粒子在中性pH值下具有净中性电荷。
- [0941] 92.如项64-91中任一项所述的方法,其中所述mRNA编码一种或多种频发多态性。
- [0942] 93.如项92所述的方法,其中所述一种或多种频发多态性包含p53中的频发体细胞癌突变。
- [0943] 94.如项93所述的方法,其中p53中的所述一种或多种频发体细胞癌突变选自由以下组成的组:
- [0944] (1)在典型5'剪接位点邻近密码子p.T125处的突变,从而诱导具有肽序列TAKSVTCTVSCPEGLASMRLQCLAVSPCISFVWNFGIPLHPLASCQCFFIVYPLNV (SEQ ID NO:1)的保留内含子,所述序列含有表位AVSPCISFVW (SEQ ID NO:2) (HLA-B*57:01,HLA-B*58:01)、HPLASCQCFF (SEQ ID NO:3) (HLA-B*35:01,HLA-B*53:01)、FVWNFGIPL (SEQ ID NO:4) (HLA-A*02:01,HLA-A*02:06,HLA-B*35:01);
- [0945] (2)在典型5'剪接位点邻近密码子p.331处的突变,从而诱导具有肽序列EYFTLQVLSLGTSYQVESFQSNTQNAVFFLTVLPAIGAFAIRGQ (SEQ ID NO:5)的保留内含子,所述序列含有表位LQVLSLGTSY (SEQ ID NO:6) (HLA-B*15:01)、FQSNTQNAV (SEQ ID NO:7) (HLA-B*15:01);
- [0946] (3)在典型3'剪接位点邻近密码子p.126处的突变,从而诱导隐蔽选择性外显子3'剪接位点,其产生含有表位CTMFCQLAK (SEQ ID NO:9) (HLA-A*11:01)、KSVTCTMF (SEQ ID NO:10) (HLA-B*58:01)的新型跨越肽序列AKSVTCTMFCQLAK (SEQ ID NO:8);和/或
- [0947] (4)在典型5'剪接位点邻近密码子p.224处的突变,从而诱导隐蔽选择性内含子5'剪接位点,其产生含有表位VPYEPPEVW (SEQ ID NO:12) (HLA-B*53:01,HLA-B*51:01)、LTVPPSTAW (SEQ ID NO:13) (HLA-B*58:01,HLA-B*57:01)的新型跨越肽序列VPYEPPEVWLALTVPSTAWAA (SEQ ID NO:11),
- [0948] 其中转录物密码子位置涉及来自Ensembl v83人基因组注释的典型全长p53转录物ENST00000269305 (SEQ ID NO:14)。
- [0949] 95.一种在受试者中引发免疫应答的方法,其包括从受试者的样品鉴定至少2种癌抗原以产生第一组癌抗原,向所述受试者施用具有编码所述第一组癌抗原的开放阅读框的mRNA疫苗,在施用所述mRNA疫苗之后至少一个月从受试者的样品鉴定至少2种癌抗原以产生第二组癌抗原,以及向所述受试者施用具有编码所述第二组癌抗原的开放阅读框的mRNA疫苗。
- [0950] 96.如项95所述的方法,其中所述第一组癌抗原包括2-100种抗原。
- [0951] 97.如项96所述的方法,其中在具有编码第一组癌抗原的开放阅读框的所述mRNA疫苗之后6个月至1年,向所述受试者施用具有编码第二组抗原的开放阅读框的所述mRNA疫苗。
- [0952] 98.如项96所述的方法,其中在具有编码第一组癌抗原的开放阅读框的所述mRNA疫苗之后1-2年,向所述受试者施用具有编码第二组抗原的开放阅读框的所述mRNA疫苗。
- [0953] 99.如项96所述的方法,其中单一mRNA具有编码所述癌抗原的开放阅读框。
- [0954] 100.如项96所述的方法,其中多种mRNA编码所述抗原。
- [0955] 101.如项95-100中任一项所述的方法,其中所述第二组癌抗原包括2-100种抗原。
- [0956] 102.如项96所述的方法,其中所述癌抗原具有选自点突变、框移突变和重组的突

变。

[0957] 103.如项95所述的方法,其中所述受试者的样品是外显子组。

[0958] 104.如项95所述的方法,其中所述受试者的样品是肿瘤样品。

[0959] 105.如项95-100中任一项所述的方法,其中所述开放阅读框进一步编码一种或多种传统癌抗原。

[0960] 106.如项105所述的方法,其中所述传统癌抗原是非突变抗原。

[0961] 107.如项105所述的方法,其中所述传统癌抗原是突变抗原。

[0962] 108.如项95-100中任一项所述的方法,其中所述mRNA疫苗进一步包含具有编码一种或多种传统癌抗原的开放阅读框的mRNA。

[0963] 109.如项95-108中任一项所述的方法,其中所述mRNA疫苗包含至少一种化学修饰。

[0964] 110.如项109所述的方法,其中所述化学修饰选自假尿苷、N1-甲基假尿苷、N1-乙基假尿苷、2-硫代尿苷、4'-硫代尿苷、5-甲基胞嘧啶、2-硫代-1-甲基-1-脱氮-假尿苷、2-硫代-1-甲基-假尿苷、2-硫代-5-氮杂-尿苷、2-硫代-二氢假尿苷、2-硫代-二氢尿苷、2-硫代-假尿苷、4-甲氧基-2-硫代-假尿苷、4-甲氧基-假尿苷、4-硫代-1-甲基-假尿苷、4-硫代-假尿苷、5-氮杂-尿苷、二氢假尿苷、5-甲基尿苷、5-甲氧基尿苷和2'-O-甲基尿苷。

[0965] 111.如项95-110中任一项所述的方法,其在纳米粒子中配制。

[0966] 112.如项111所述的方法,其中所述纳米粒子具有50-200nm的平均直径。

[0967] 113.如项111所述的方法,其中所述纳米粒子是脂质纳米粒子。

[0968] 114.如项113所述的方法,其中所述脂质纳米粒子包含阳离子脂质、经PEG修饰的脂质、固醇和非阳离子脂质。

[0969] 115.如项114所述的方法,其中所述阳离子脂质是可离子化阳离子脂质,并且所述非阳离子脂质是中性脂质,并且所述固醇是胆固醇。

[0970] 116.如项114所述的方法,其中所述阳离子脂质选自2,2-二亚油基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧杂环戊烷(DLin-KC2-DMA)、二亚油基-甲基-4-二甲基氨基丁酸酯(DLin-MC3-DMA)和9-((4-(二甲基氨基)丁酰基)氧基)十七烷二酸二((Z)-壬-2-烯-1-基)酯(L319)。

[0971] 117.如项87-89中任一项所述的方法,其中所述纳米粒子包含式(I)化合物。

[0972] 118.如项117所述的方法,其中所述式(I)化合物是化合物25。

[0973] 119.如项111所述的方法,其中所述纳米粒子具有小于0.4的多分散性值。

[0974] 120.如项111所述的方法,其中所述纳米粒子在中性pH值下具有净中性电荷。

[0975] 121.一种方法,其包括使具有编码癌抗原的开放阅读框的mRNA与脂质纳米粒子制剂混合以产生mRNA癌症疫苗,以及在混合的24小时内向受试者施用所述mRNA癌症疫苗。

[0976] 122.如项121所述的方法,其中在混合的12小时内向所述受试者施用所述mRNA癌症疫苗。

[0977] 123.如项121所述的方法,其中在混合的1小时内向所述受试者施用所述mRNA癌症疫苗。

[0978] 124.如项121所述的方法,其中所述mRNA癌症疫苗编码2-100种癌抗原。

[0979] 125.如项121所述的方法,其中所述mRNA癌症疫苗编码10-100种癌抗原。

[0980] 126.如项121-125中任一项所述的方法,其中所述疫苗是个人化癌症疫苗,并且其中所述癌抗原是受试者特异性癌抗原。

[0981] 127.如项126所述的方法,其中所述受试者特异性癌抗原代表所述受试者的肿瘤样品的外显子组。

[0982] 128.如项126所述的方法,其中所述受试者特异性癌抗原代表所述受试者的肿瘤样品的转录物组。

[0983] 129.如项126所述的方法,其中所述受试者特异性癌抗原代表所述受试者的外显子组。

[0984] 130.如项124或125所述的方法,其中单一mRNA编码所述癌抗原。

[0985] 131.如项127或125所述的方法,其中多种mRNA编码所述癌抗原。

[0986] 132.如项131所述的方法,其中各mRNA编码5-10种癌抗原。

[0987] 133.如项131所述的方法,其中各mRNA编码单一癌抗原。

[0988] 134.如项132或133所述的方法,其中各癌抗原的长度为10-50个氨基酸。

[0989] 135.如项132或133所述的方法,其中各癌抗原的长度为15-20个氨基酸。

[0990] 136.如项95-135中任一项所述的方法,其中所述mRNA编码一种或多种频发多态性。

[0991] 137.如项136所述的方法,其中所述一种或多种频发多态性包含p53中的频发体细胞癌突变。

[0992] 138.如项137所述的方法,其中p53中的所述一种或多种频发体细胞癌突变选自由以下组成的组:

[0993] (1)在典型5'剪接位点邻近密码子p.T125处的突变,从而诱导具有肽序列TAKSVTCTVSCPEGLASMRQLQCLAVSPCISFVWNFGIPLHPLASCQCFFIVYPLNV(SEQ ID NO:1)的保留内含子,所述序列含有表位AVSPCISFVW(SEQ ID NO:2)(HLA-B*57:01,HLA-B*58:01)、HPLASCQCFF(SEQ ID NO:3)(HLA-B*35:01,HLA-B*53:01)、FVWNFGIPL(SEQ ID NO:4)(HLA-A*02:01,HLA-A*02:06,HLA-B*35:01);

[0994] (2)在典型5'剪接位点邻近密码子p.331处的突变,从而诱导具有肽序列EYFTLQVLSLGTSYQVESFQSNTQNAVFFLTVPALGAFAIRGQ(SEQ ID NO:5)的保留内含子,所述序列含有表位LQVLSLGTSY(SEQ ID NO:6)(HLA-B*15:01)、FQSNTQNAV(SEQ ID NO:7)(HLA-B*15:01);

[0995] (3)在典型3'剪接位点邻近密码子p.126处的突变,从而诱导隐蔽选择性外显子3'剪接位点,其产生含有表位CTMFCQLAK(SEQ ID NO:9)(HLA-A*11:01)、KSVTCTMF(SEQ ID NO:10)(HLA-B*58:01)的新型跨越肽序列AKSVTCTMFCQLAK(SEQ ID NO:8);和/或

[0996] (4)在典型5'剪接位点邻近密码子p.224处的突变,从而诱导隐蔽选择性内含子5'剪接位点,其产生含有表位VPYEPPEVW(SEQ ID NO:12)(HLA-B*53:01,HLA-B*51:01)、LTVPPSTAW(SEQ ID NO:13)(HLA-B*58:01,HLA-B*57:01)的新型跨越肽序列VPYEPPEVWLALTVPSTAWAA(SEQ ID NO:11),

[0997] 其中转录物密码子位置涉及来自Ensembl v83人基因组注释的典型全长p53转录物ENST00000269305(SEQ ID NO:14)。

[0998] 139.一种试剂盒,其包括

[0999] 容纳脂质纳米粒子制剂的容器,

- [1000] 容纳疫苗制剂的容器,和
- [1001] 关于以下的说明书:将个人化mRNA癌症疫苗添加至所述疫苗制剂中以产生个人化mRNA癌症疫苗制剂,在向受试者施用的24小时内使所述个人化mRNA癌症疫苗制剂与所述脂质纳米粒子制剂混合。
- [1002] 140.如项139所述的试剂盒,其进一步包括具有编码2-100种癌抗原的开放阅读框的mRNA。
- [1003] 141.一种在受试者中引发免疫应答的方法,其包括从受试者的样品鉴定至少2种癌抗原,向所述受试者施用具有编码所述至少2种癌抗原的开放阅读框的mRNA,以及向所述受试者施用癌症治疗剂。
- [1004] 142.如项141所述的方法,其中所述癌症治疗剂是靶向疗法。
- [1005] 143.如项142所述的方法,其中所述靶向疗法是BRAF抑制剂。
- [1006] 144.如项142所述的方法,其中所述BRAF抑制剂是威罗菲尼(PLX4032)。
- [1007] 145.如项143所述的方法,其中所述BRAF抑制剂是达拉菲尼。
- [1008] 146.如项141所述的方法,其中所述癌症治疗剂是T细胞治疗剂。
- [1009] 147.如项146所述的方法,其中所述T细胞治疗剂是检查点抑制剂。
- [1010] 148.如项147所述的方法,其中所述检查点抑制剂是抗PD-1抗体。
- [1011] 149.如项148所述的方法,其中抗PD-1抗体是BMS-936558(尼鲁单抗)。
- [1012] 150.如项143所述的方法,其中所述检查点抑制剂是抗CTLA-4抗体。
- [1013] 151.如项150所述的方法,其中所述抗CTLA-4抗体是易普利单抗。
- [1014] 152.如项146所述的方法,其中所述T细胞治疗剂是OX40L。
- [1015] 153.如项141所述的方法,其中所述癌症治疗剂是包含基于群体的肿瘤特异性抗原的疫苗。
- [1016] 154.如项141所述的方法,其中所述癌症治疗剂是包含具有编码一种或多种传统癌抗原的开放阅读框的mRNA的疫苗。
- [1017] 155.如项141-154中任一项所述的方法,其中与所述癌症治疗剂同时向所述受试者施用具有编码所述至少2种癌抗原的开放阅读框的所述mRNA。
- [1018] 156.如项141-154中任一项所述的方法,其中在施用所述癌症治疗剂之前,向所述受试者施用具有编码所述至少2种癌抗原的开放阅读框的所述mRNA。
- [1019] 157.如项141-154中任一项所述的方法,其中在施用所述癌症治疗剂之后,向所述受试者施用具有编码所述至少2种癌抗原的开放阅读框的所述mRNA。
- [1020] 158.一种在受试者中引发免疫应答的方法,其包括从受试者的样品鉴定至少2种癌抗原,其中所述至少2种癌抗原包含选自由框移突变和重组组成的组的突变,以及向所述受试者施用具有编码所述至少2种癌抗原的开放阅读框的mRNA疫苗。
- [1021] 159.如项158所述的方法,其中所述mRNA疫苗编码2-100种癌抗原。
- [1022] 160.如项159所述的方法,其中单一mRNA编码所述抗原。
- [1023] 161.如项159所述的方法,其中多种mRNA编码所述抗原。
- [1024] 162.如项158-161中任一项所述的方法,其中所述mRNA疫苗包含至少一种化学修饰。
- [1025] 163.如项162所述的方法,其中所述化学修饰选自假尿苷、N1-甲基假尿苷、N1-乙

基假尿苷、2-硫代尿苷、4'-硫代尿苷、5-甲基胞嘧啶、2-硫代-1-甲基-1-脱氮-假尿苷、2-硫代-1-甲基-假尿苷、2-硫代-5-氮杂-尿苷、2-硫代-二氢假尿苷、2-硫代-二氢尿苷、2-硫代-假尿苷、4-甲氧基-2-硫代-假尿苷、4-甲氧基-假尿苷、4-硫代-1-甲基-假尿苷、4-硫代-假尿苷、5-氮杂-尿苷、二氢假尿苷、5-甲基尿苷、5-甲氧基尿苷和2'-0-甲基尿苷。

[1026] 164.如项158-163中任一项所述的方法,其在纳米粒子中配制。

[1027] 165.如项164所述的方法,其中所述纳米粒子具有50-200nm的平均直径。

[1028] 166.如项164所述的方法,其中所述纳米粒子是脂质纳米粒子。

[1029] 167.如项165所述的方法,其中所述脂质纳米粒子包含阳离子脂质、经PEG修饰的脂质、固醇和非阳离子脂质。

[1030] 168.如项167所述的方法,其中所述阳离子脂质是可离子化阳离子脂质,并且所述非阳离子脂质是中性脂质,并且所述固醇是胆固醇。

[1031] 169.如项167所述的方法,其中所述阳离子脂质选自2,2-二亚油基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧杂环戊烷(DLin-KC2-DMA)、二亚油基-甲基-4-二甲基氨基丁酸酯(DLin-MC3-DMA)和9-((4-(二甲基氨基)丁酰基)氧基)十七烷二酸二((Z)-壬-2-烯-1-基)酯(L319)。

[1032] 170.如项164-166中任一项所述的方法,其中所述纳米粒子包含式(I)化合物。

[1033] 171.如项170所述的方法,其中所述式(I)化合物是化合物25。

[1034] 172.如项164所述的方法,其中所述纳米粒子具有小于0.4的多分散性值。

[1035] 173.如项164所述的方法,其中所述纳米粒子在中性pH值下具有净中性电荷。

[1036] 174.如项141-173中任一项所述的方法,其中所述mRNA编码一种或多种频发多态性。

[1037] 175.如项174所述的方法,其中所述一种或多种频发多态性包含p53中的频发体细胞癌突变。

[1038] 176.如项175所述的方法,其中p53中的所述一种或多种频发体细胞癌突变选自由以下组成的组:

[1039] (1)在典型5'剪接位点邻近密码子p.T125处的突变,从而诱导具有肽序列TAKSVTCTVSCPEGLASMRLQCLAVSPCISFVWNFGIPLHPLASCQCFFIVYPLNV(SEQ ID NO:1)的保留内含子,所述序列含有表位AVSPCISFVW(SEQ ID NO:2)(HLA-B*57:01,HLA-B*58:01)、HPLASCQCFF(SEQ ID NO:3)(HLA-B*35:01,HLA-B*53:01)、FVWNFGIPL(SEQ ID NO:4)(HLA-A*02:01,HLA-A*02:06,HLA-B*35:01);

[1040] (2)在典型5'剪接位点邻近密码子p.331处的突变,从而诱导具有肽序列EYFTLQVLSLGTSYQVESFQSNTQNAVFFLTVLPAIGAFAIRGQ(SEQ ID NO:5)的保留内含子,所述序列含有表位LQVLSLGTSY(SEQ ID NO:6)(HLA-B*15:01)、FQSNTQNAV(SEQ ID NO:7)(HLA-B*15:01);

[1041] (3)在典型3'剪接位点邻近密码子p.126处的突变,从而诱导隐蔽选择性外显子3'剪接位点,其产生含有表位CTMFCQLAK(SEQ ID NO:9)(HLA-A*11:01)、KSVTCTMF(SEQ ID NO:10)(HLA-B*58:01)的新型跨越肽序列AKSVTCTMFCQLAK(SEQ ID NO:8);和/或

[1042] (4)在典型5'剪接位点邻近密码子p.224处的突变,从而诱导隐蔽选择性内含子5'剪接位点,其产生含有表位VPYEPPEVW(SEQ ID NO:12)(HLA-B*53:01,HLA-B*51:01)、LTVPPSTAW(SEQ ID NO:13)(HLA-B*58:01,HLA-B*57:01)的新型跨越肽序列

VPYEPPEVWLALTVPSTAWAA (SEQ ID NO:11),

[1043] 其中转录物密码子位置涉及来自Ensembl v83人基因组注释的典型全长p53转录物ENST00000269305 (SEQ ID NO:14)。

[1044] 177.如项33所述的个人化癌症疫苗,其中所述至少2种癌抗原是受试者的特异性癌抗原。

[1045] 178.如项1所述的mRNA癌症疫苗,其中肽表位包含至少一种MHC I类表位和至少一种MHC II类表位。

[1046] 179.如项1所述的mRNA癌症疫苗,其中至少30%的表位是MHC I类表位。

[1047] 180.如项1所述的mRNA癌症疫苗,其中至少30%的表位是MHC II类表位。

[1048] 181.如项1所述的mRNA癌症疫苗,其中所述抑制性检查点多肽是特异性结合至选自PD-1、TIM-3、VISTA、A2AR、B7-H3、B7-H4、BTLA、CTLA-4、IDO、KIR和LAG3组成的组的分子的抗体或其片段。

[1049] 182.如项1所述的mRNA癌症疫苗,其进一步包含编码细胞因子的mRNA。

[1050] 183.一种个人化癌症疫苗,其包含具有编码至少2种癌抗原的开放阅读框的mRNA,其中所述至少2种癌抗原代表受试者的外来体抗原。

[1051] 184.如项183所述的个人化癌症疫苗,其中所述mRNA编码2-100种癌抗原。

[1052] 185.如项183所述的个人化癌症疫苗,其中所述mRNA编码10-100种癌抗原。

[1053] 186.如项184或185所述的个人化癌症疫苗,其中单一mRNA编码所述癌抗原。

[1054] 187.如项184或185所述的个人化癌症疫苗,其中多种mRNA编码所述癌抗原。

[1055] 188.如项187所述的个人化癌症疫苗,其中各mRNA编码5-10种癌抗原。

[1056] 189.如项187所述的个人化癌症疫苗,其中各mRNA编码单一癌抗原。

[1057] 190.如项188或189所述的个人化癌症疫苗,其中各癌抗原的长度为10-50个氨基酸。

[1058] 191.如项188或189所述的个人化癌症疫苗,其中各癌抗原的长度为15-20个氨基酸。

[1059] 192.如项183-185中任一项所述的个人化癌症疫苗,其中所述mRNA包含至少一种化学修饰。

[1060] 193.如项192所述的个人化癌症疫苗,其中所述化学修饰选自假尿苷、N1-甲基假尿苷、N1-乙基假尿苷、2-硫代尿苷、4'-硫代尿苷、5-甲基胞嘧啶、2-硫代-1-甲基-1-脱氮-假尿苷、2-硫代-1-甲基-假尿苷、2-硫代-5-氮杂-尿苷、2-硫代-二氢假尿苷、2-硫代-二氢尿苷、2-硫代-假尿苷、4-甲氧基-2-硫代-假尿苷、4-甲氧基-假尿苷、4-硫代-1-甲基-假尿苷、4-硫代-假尿苷、5-氮杂-尿苷、二氢假尿苷、5-甲基尿苷、5-甲氧基尿苷和2'-O-甲基尿苷。

[1061] 194.如项183-193中任一项所述的个人化癌症疫苗,其在纳米粒子中配制。

[1062] 195.如项194所述的个人化癌症疫苗,其中所述纳米粒子具有50-200nm的平均直径。

[1063] 196.如项194所述的个人化癌症疫苗,其中所述纳米粒子是脂质纳米粒子。

[1064] 197.如项196所述的个人化癌症疫苗,其中所述脂质纳米粒子包含阳离子脂质、经PEG修饰的脂质、固醇和非阳离子脂质。

[1065] 198.如项197所述的个人化癌症疫苗,其中所述阳离子脂质是可离子化阳离子脂质,并且所述非阳离子脂质是中性脂质,并且所述固醇是胆固醇。

[1066] 199.如项197所述的个人化癌症疫苗,其中所述阳离子脂质选自2,2-二亚油基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧杂环戊烷(DLin-KC2-DMA)、二亚油基-甲基-4-二甲基氨基丁酸酯(DLin-MC3-DMA)和9-((4-(二甲基氨基)丁酰基)氧基)十七烷二酸二((Z)-壬-2-烯-1-基)酯(L319)。

[1067] 200.如项194-196中任一项所述的个人化癌症疫苗,其中所述纳米粒子包含式(I)化合物。

[1068] 201.如项200所述的个人化癌症疫苗,其中所述式(I)化合物是化合物25。

[1069] 202.如项194所述的个人化癌症疫苗,其中所述纳米粒子具有小于0.4的多分散性值。

[1070] 203.如项194所述的个人化癌症疫苗,其中所述纳米粒子在中性pH值下具有净中性电荷。

[1071] 204.如项183所述的个人化癌症疫苗,其中所述至少两种抗原是包含至少一种MHC I类表位和至少一种MHC II类表位的肽表位。

[1072] 205.如项204所述的个人化癌症疫苗,其中至少30%的所述表位是MHC I类表位。

[1073] 206.如项204所述的个人化癌症疫苗,其中至少30%的所述表位是MHC II类表位。

[1074] 207.如项204所述的个人化癌症疫苗,其进一步包含编码抑制性检查点多肽的mRNA,所述抑制性检查点多肽诸如特异性结合至选自由PD-1、TIM-3、VISTA、A2AR、B7-H3、B7-H4、BTLA、CTLA-4、IDO、KIR和LAG3组成的组的分子的抗体或其片段。

[1075] 208.如项183-207中任一项所述的个人化癌症疫苗,其中所述mRNA编码一种或多种频发多态性。

[1076] 209.如项208所述的个人化癌症疫苗,其中所述一种或多种频发多态性包含p53中的频发体细胞癌突变。

[1077] 210.如项209所述的个人化癌症疫苗,其中p53中的所述一种或多种频发体细胞癌突变选自由以下组成的组:

[1078] (1)在典型5'剪接位点邻近密码子p.T125处的突变,从而诱导具有肽序列TAKSVTCTVSCPEGLASMRLQCLAVSPCISFVWNFGIPLHPLASCQCFFIVYPLNV(SEQ ID NO:1)的保留内含子,所述序列含有表位AVSPCISFVW(SEQ ID NO:2)(HLA-B*57:01,HLA-B*58:01)、HPLASCQCFF(SEQ ID NO:3)(HLA-B*35:01,HLA-B*53:01)、FVWNFGIPL(SEQ ID NO:4)(HLA-A*02:01,HLA-A*02:06,HLA-B*35:01);

[1079] (2)在典型5'剪接位点邻近密码子p.331处的突变,从而诱导具有肽序列EYFTLQVLSLGTSYQVESFQSNTQNAVFFLTVLPAIGAFAIRGQ(SEQ ID NO:5)的保留内含子,所述序列含有表位LQVLSLGTSY(SEQ ID NO:6)(HLA-B*15:01)、FQSNTQNAVFF(SEQ ID NO:7)(HLA-B*15:01);

[1080] (3)在典型3'剪接位点邻近密码子p.126处的突变,从而诱导隐蔽选择性外显子3'剪接位点,其产生含有表位CTMFCQLAK(SEQ ID NO:9)(HLA-A*11:01)、KSVTCTMF(SEQ ID NO:10)(HLA-B*58:01)的新型跨越肽序列AKSVTCTMFCQLAK(SEQ ID NO:8);和/或

[1081] (4)在典型5'剪接位点邻近密码子p.224处的突变,从而诱导隐蔽选择性内含子5'剪接位点,其产生含有表位VPYEPPEVW(SEQ ID NO:12)(HLA-B*53:01,HLA-B*51:01)、

LTVPPSTAW (SEQ ID NO:13) (HLA-B*58:01, HLA-B*57:01) 的新型跨越肽序列 VPYEPPEVWLALTVPSTAWAA (SEQ ID NO:11),

[1082] 其中转录物密码子位置涉及来自Ensembl v83人基因组注释的典型全长p53转录物ENST00000269305 (SEQ ID NO:14)。

[1083] 211. 一种用于对受试者接种疫苗的方法, 其包括从受试者分离外来体、从所述外来体鉴定至少2种抗原以及向所述受试者施用具有编码所述至少2种抗原的开放阅读框的mRNA疫苗。

[1084] 212. 如项211所述的方法, 其中从所述外来体鉴定2-100种抗原。

[1085] 213. 如项212所述的方法, 其中所述mRNA疫苗具有编码所述2-100种抗原的开放阅读框。

[1086] 214. 如项213所述的方法, 其中单一mRNA编码所述抗原。

[1087] 215. 如项213所述的方法, 其中多种mRNA编码所述抗原。

[1088] 216. 如项211-215中任一项所述的方法, 其中抗原是癌抗原。

[1089] 217. 如项216所述的方法, 其中所述癌抗原具有选自点突变、框移突变和重组的突变。

[1090] 218. 如项217所述的方法, 其进一步包括通过外显子组分析来确认所述癌抗原具有受试者特异性。

[1091] 219. 如项217所述的方法, 其进一步包括通过转录物组分析来确认所述癌抗原具有受试者特异性。

[1092] 220. 如项217所述的方法, 其进一步包括在施用所述mRNA疫苗之后至少一个月从所述受试者的样品鉴定至少2种癌抗原以产生第二组癌抗原, 以及向所述受试者施用具有编码所述第二组癌抗原的开放阅读框的mRNA疫苗。

[1093] 221. 如项220所述的方法, 其中所述受试者的样品是外来体。

[1094] 222. 如项220所述的方法, 其中所述受试者的样品是肿瘤样品。

[1095] 223. 如项211-222中任一项所述的方法, 其中所述mRNA疫苗包含至少一种化学修饰。

[1096] 224. 如项223所述的方法, 其中所述化学修饰选自假尿苷、N1-甲基假尿苷、N1-乙基假尿苷、2-硫代尿苷、4'-硫代尿苷、5-甲基胞嘧啶、2-硫代-1-甲基-1-脱氮-假尿苷、2-硫代-1-甲基-假尿苷、2-硫代-5-氮杂-尿苷、2-硫代-二氢假尿苷、2-硫代-二氢尿苷、2-硫代-假尿苷、4-甲氧基-2-硫代-假尿苷、4-甲氧基-假尿苷、4-硫代-1-甲基-假尿苷、4-硫代-假尿苷、5-氮杂-尿苷、二氢假尿苷、5-甲基尿苷、5-甲氧基尿苷和2'-O-甲基尿苷。

[1097] 225. 如项211-224中任一项所述的方法, 其在纳米粒子中配制。

[1098] 226. 如项225所述的方法, 其中所述纳米粒子具有50-200nm的平均直径。

[1099] 227. 如项225所述的方法, 其中所述纳米粒子是脂质纳米粒子。

[1100] 228. 如项227所述的方法, 其中所述脂质纳米粒子包含阳离子脂质、经PEG修饰的脂质、固醇和非阳离子脂质。

[1101] 229. 如项227所述的方法, 其中所述阳离子脂质是可离子化阳离子脂质, 并且所述非阳离子脂质是中性脂质, 并且所述固醇是胆固醇。

[1102] 230. 如项227所述的方法, 其中所述阳离子脂质选自2,2-二亚油基-4-二甲基氨基

乙基-[1,3]-二氧杂环戊烷(DLin-KC2-DMA)、二亚油基-甲基-4-二甲基氨基丁酸酯(DLin-MC3-DMA)和9-((4-(二甲基氨基)丁酰基)氧基)十七烷二酸二((Z)-壬-2-烯-1-基)酯(L319)。

[1103] 231.如项225-227中任一项所述的方法,其中所述纳米粒子包含式(I)化合物。

[1104] 232.如项231所述的方法,其中所述式(I)化合物是化合物25。

[1105] 233.如项225所述的方法,其中所述纳米粒子具有小于0.4的多分散性值。

[1106] 234.如项225所述的方法,其中所述纳米粒子在中性pH值下具有净中性电荷。

[1107] 235.如项211所述的方法,其进一步包括向所述受试者施用癌症治疗剂。

[1108] 236.如项235所述的方法,其中所述癌症治疗剂是靶向疗法。

[1109] 237.如项236所述的方法,其中所述靶向疗法是BRAF抑制剂。

[1110] 238.如项236所述的方法,其中所述BRAF抑制剂是威罗菲尼(PLX4032)。

[1111] 239.如项237所述的方法,其中所述BRAF抑制剂是达拉菲尼。

[1112] 240.如项235所述的方法,其中所述癌症治疗剂是T细胞治疗剂。

[1113] 241.如项240所述的方法,其中所述T细胞治疗剂是编码检查点抑制剂的mRNA。

[1114] 242.如项241所述的方法,其中所述mRNA编码抗PD-1抗体。

[1115] 243.如项242所述的方法,其中抗PD-1抗体是BMS-936558(尼鲁单抗)。

[1116] 244.如项241所述的方法,其中所述mRNA编码抗CTLA-4抗体。

[1117] 245.如项244所述的方法,其中所述抗CTLA-4抗体是易普利单抗。

[1118] 246.如项236所述的方法,其中所述T细胞治疗剂是OX40L。

[1119] 247.如项211所述的方法,其进一步包括编码APC重新编程分子的mRNA。

[1120] 248.如项247所述的方法,其中所述APC重新编程分子是CIITA。

[1121] 249.如项211所述的方法,其中所述至少2种癌抗原包含选自框移突变和重组组成的组的突变。

[1122] 250.如项211-249中任一项所述的方法,其中所述mRNA编码一种或多种频发多态性。

[1123] 251.如项250所述的方法,其中所述一种或多种频发多态性包含p53中的频发体细胞癌突变。

[1124] 252.如项251所述的方法,其中p53中的所述一种或多种频发体细胞癌突变选自以下组成的组:

[1125] (1)在典型5'剪接位点邻近密码子p.T125处的突变,从而诱导具有肽序列TAKSVTCTVSCPEGLASMRLQCLAVSPCISFVWNFGIPLHPLASCQCFFIVYPLNV(SEQ ID NO:1)的保留内含子,所述序列含有表位AVSPCISFVW(SEQ ID NO:2)(HLA-B*57:01,HLA-B*58:01)、HPLASCQCFF(SEQ ID NO:3)(HLA-B*35:01,HLA-B*53:01)、FVWNFGIPL(SEQ ID NO:4)(HLA-A*02:01,HLA-A*02:06,HLA-B*35:01);

[1126] (2)在典型5'剪接位点邻近密码子p.331处的突变,从而诱导具有肽序列EYFTLQVLSLGTSYQVESFQSNTQNAVFFLTVLPAIGAFAIRGQ(SEQ ID NO:5)的保留内含子,所述序列含有表位LQVLSLGTSY(SEQ ID NO:6)(HLA-B*15:01)、FQSNTQNAV(SEQ ID NO:7)(HLA-B*15:01);

[1127] (3)在典型3'剪接位点邻近密码子p.126处的突变,从而诱导隐蔽选择性外显子3'剪接位点,其产生含有表位CTMFCQLAK(SEQ ID NO:9)(HLA-A*11:01)、KSVTCTMF(SEQ ID

NO:10) (HLA-B*58:01) 的新型跨越肽序列AKSVTCTMFCQLAK (SEQ ID NO:8); 和/或

[1128] (4) 在典型5' 剪接位点邻近密码子p.224处的突变, 从而诱导隐蔽选择性内含子5' 剪接位点, 其产生含有表位VPYEPPEVW (SEQ ID NO:12) (HLA-B*53:01, HLA-B*51:01)、LTVPPSTAW (SEQ ID NO:13) (HLA-B*58:01, HLA-B*57:01) 的新型跨越肽序列VPYEPPEVWLALTVPSTAWAA (SEQ ID NO:11),

[1129] 其中转录物密码子位置涉及来自Ensembl v83人基因组注释的典型全长p53转录物ENST00000269305 (SEQ ID NO:14)。

[1130] 253. 一种用于对受试者接种疫苗的药物组合物, 其包含

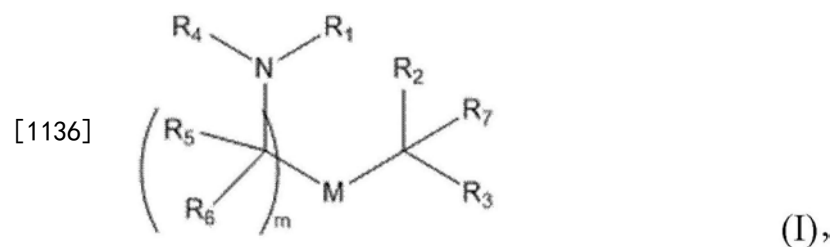
[1131] 有效剂量的编码癌抗原的mRNA, 其中所述有效剂量足以产生可检测水平的抗原, 如在施用后1-72小时在所述受试者的血清中所测量。

[1132] 254. 如项253所述的组合物, 其中所述抗原的截断指数是1-2。

[1133] 255. 一种用于对受试者接种疫苗的药物组合物, 其包含

[1134] 有效剂量的编码癌抗原的mRNA, 其中所述有效剂量足以产生由针对所述抗原的中和抗体产生的1,000-10,000中和效价, 如在施用后1-72小时在所述受试者的血清中所测量。

[1135] 256. 一种疫苗, 其包含在脂质纳米粒子中配制的编码癌抗原的mRNA, 所述脂质纳米粒子包含式(I)化合物:



[1137] 或其盐或异构体, 其中:

[1138] R_1 选自由 C_{5-30} 烷基、 C_{5-20} 烯基、 $-R^*YR''$ 、 $-YR''$ 和 $-R''M'R'$ 组成的组;

[1139] R_2 和 R_3 独立地选自由 H、 C_{1-14} 烷基、 C_{2-14} 烯基、 $-R^*YR''$ 、 $-YR''$ 和 $-R^*OR''$ 组成的组, 或 R_2 和 R_3 连同它们所附接的原子一起形成杂环或碳环;

[1140] R_4 选自由 C_{3-6} 碳环、 $-(CH_2)_nQ$ 、 $-(CH_2)_nCHQR$ 、 $-CHQR$ 、 $-CQ(R)_2$ 和未取代的 C_{1-6} 烷基组成的组, 其中 Q 选自碳环、杂环、 $-OR$ 、 $-O(CH_2)_nN(R)_2$ 、 $-C(O)OR$ 、 $-OC(O)R$ 、 $-CX_3$ 、 $-CX_2H$ 、 $-CXH_2$ 、 $-CN$ 、 $-N(R)_2$ 、 $-C(O)N(R)_2$ 、 $-N(R)C(O)R$ 、 $-N(R)S(O)_2R$ 、 $-N(R)C(O)N(R)_2$ 、 $-N(R)C(S)N(R)_2$ 、 $-N(R)R_8$ 、 $-O(CH_2)_nOR$ 、 $-N(R)C(=NR_9)N(R)_2$ 、 $-N(R)C(=CHR_9)N(R)_2$ 、 $-OC(O)N(R)_2$ 、 $-N(R)C(O)OR$ 、 $-N(OR)C(O)R$ 、 $-N(OR)S(O)_2R$ 、 $-N(OR)C(O)OR$ 、 $-N(OR)C(O)N(R)_2$ 、 $-N(OR)C(S)N(R)_2$ 、 $-N(OR)C(=NR_9)N(R)_2$ 、 $-N(OR)C(=CHR_9)N(R)_2$ 、 $-C(=NR_9)N(R)_2$ 、 $-C(=NR_9)R$ 、 $-C(O)N(R)OR$ 和 $-C(R)N(R)_2C(O)OR$, 并且各 n 独立地选自 1、2、3、4 和 5;

[1141] 各 R_5 独立地选自由 C_{1-3} 烷基、 C_{2-3} 烯基和 H 组成的组;

[1142] 各 R_6 独立地选自由 C_{1-3} 烷基、 C_{2-3} 烯基和 H 组成的组;

[1143] M 和 M' 独立地选自 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-C(O)N(R')$ 、 $-N(R')C(O)-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-C(S)S-$ 、 $-SC(S)-$ 、 $-CH(OH)-$ 、 $-P(O)(OR')O-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S-S-$ 、芳基基团和杂芳基基团;

[1144] R_7 选自由 C_{1-3} 烷基、 C_{2-3} 烯基和 H 组成的组;

- [1145] R_8 选自自由 C_{3-6} 碳环和杂环组成的组；
- [1146] R_9 选自自由H、CN、 NO_2 、 C_{1-6} 烷基、-OR、-S(O)₂R、-S(O)₂N(R)₂、 C_{2-6} 烯基、 C_{3-6} 碳环和杂环组成的组；
- [1147] 各R独立地选自自由 C_{1-3} 烷基、 C_{2-3} 烯基和H组成的组；
- [1148] 各R'独立地选自自由 C_{1-18} 烷基、 C_{2-18} 烯基、-R*YR''、-YR''和H组成的组；
- [1149] 各R''独立地选自自由 C_{3-14} 烷基和 C_{3-14} 烯基组成的组；
- [1150] 各R*独立地选自自由 C_{1-12} 烷基和 C_{2-12} 烯基组成的组；
- [1151] 各Y独立地是 C_{3-6} 碳环；
- [1152] 各X独立地选自自由F、Cl、Br和I组成的组；并且
- [1153] m选自5、6、7、8、9、10、11、12和13。
- [1154] 257. 一种个人化癌症疫苗，其包含具有编码至少5-100种癌抗原表位的开放阅读框的mRNA，其中至少50%的所述癌抗原表位特异性结合至HLA-A、HLA-B和HLA-DR中的一者或多者。
- [1155] 258. 如项257所述的个人化癌症疫苗，其中至少90%的所述癌抗原表位特异性结合至HLA-A、HLA-B和HLA-DR中的一者或多者。
- [1156] 259. 如项257所述的个人化癌症疫苗，其中100%的所述癌抗原表位特异性结合至HLA-A、HLA-B和HLA-DR中的一者或多者。
- [1157] 260. 如项257所述的个人化癌症疫苗，其中100%的所述癌抗原表位特异性结合至HLA-A、HLA-B、HLA-DR、HLA-DRB 1、HLA-C、HLA-A/A'、HLA-B/B'、HLA-C/C'、HLA-DRB1/B1'、HLA-DRB345/DRB3' 4' 5'、HLA-DPA/B、HLA-DPA' /B'、HLA-DPA' /B、HLA-DPA/B'、HLA-DQA/B、HLA-DQA' /B'、HLA-DQA' /B和HLA-DQA/B'中的一者或多者。
- [1158] 261. 如项257所述的个人化癌症疫苗，其中50%的所述癌抗原表位特异性结合至HLA-A/A'、HLA-B/B'、HLA-C/C'中的一者或多者，并且50%的所述癌抗原表位特异性结合至HLA-DRB1/B1'、HLA-DRB345/DRB3' 4' 5'、HLA-DPA/B、HLA-DPA' /B'、HLA-DPA' /B、HLA-DPA/B'、HLA-DQA/B、HLA-DQA' /B'、HLA-DQA' /B和HLA-DQA/B'中的一者或多者。
- [1159] 262. 如项257-261中任一项所述的个人化癌症疫苗，其中所述癌抗原表位在所述表位之间无间隔子下直接彼此连接。
- [1160] 263. 如项33-55或262中任一项所述的个人化癌症疫苗，其中所述癌抗原表位包含10-20种MHC I类表位和5-10种MHC II类表位。
- [1161] 264. 如项33-55或262中任一项所述的个人化癌症疫苗，其中所述癌抗原表位包含15种MHC I类表位和5种MHC II类表位。
- [1162] 265. 如项33-55或262-264中任一项所述的个人化癌症疫苗，其中所述癌抗原表位以头尾相接形态排列在多联结构中。
- [1163] 266. 如项265所述的个人化癌症疫苗，其中在所述癌抗原表位中的各者之间形成接合部，并且其中所述接合部包括来自在所述肽的N末端的表位的2-10个氨基酸和邻近的直接连接表位的在C末端的2-10个氨基酸，并且其中所述接合部形成结合至受试者的HLA蛋白的肽序列，所述个人化癌症疫苗被设计对所述HLA蛋白具有大于约50nM的IC50。
- [1164] 267. 如项266所述的个人化癌症疫苗，其中所述接合部形成以大于约500nM的IC50结合至所述受试者的HLA蛋白的肽序列。

序列表

<110> 摩登纳特斯有限公司

<120> 癌症疫苗

<130> M1378.70024W000

<140> 尚未指定

<141> 2016-10-21

<150> US 62/368,810

<151> 2016-07-29

<150> US 62/247,472

<151> 2015-10-28

<150> US 62/247,317

<151> 2015-10-28

<150> US 62/245,129

<151> 2015-10-22

<150> US 62/245,031

<151> 2015-10-22

<160> 22

<170> PatentIn 3.5版

<210> 1

<211> 56

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 1

Thr Ala Lys Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Cys Pro Glu Gly Leu Ala

1 5 10 15

Ser Met Arg Leu Gln Cys Leu Ala Val Ser Pro Cys Ile Ser Phe Val

20 25 30

Trp Asn Phe Gly Ile Pro Leu His Pro Leu Ala Ser Cys Gln Cys Phe

35 40 45

Phe Ile Val Tyr Pro Leu Asn Val

50 55

<210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 2

Ala Val Ser Pro Cys Ile Ser Phe Val Trp

1 5 10

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 3

His Pro Leu Ala Ser Cys Gln Cys Phe Phe

1 5 10

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 4

Phe Val Trp Asn Phe Gly Ile Pro Leu

1 5

<210> 5

<211> 44

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 5

Glu Tyr Phe Thr Leu Gln Val Leu Ser Leu Gly Thr Ser Tyr Gln Val

1 5 10 15

Glu Ser Phe Gln Ser Asn Thr Gln Asn Ala Val Phe Phe Leu Thr Val

20 25 30

Leu Pro Ala Ile Gly Ala Phe Ala Ile Arg Gly Gln

35 40

<210> 6

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 6

Leu Gln Val Leu Ser Leu Gly Thr Ser Tyr

1 5 10

<210> 7

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 7

Phe Gln Ser Asn Thr Gln Asn Ala Val Phe

1 5 10

<210> 8

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 8

Ala Lys Ser Val Thr Cys Thr Met Phe Cys Gln Leu Ala Lys

1 5 10

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 9

Cys Thr Met Phe Cys Gln Leu Ala Lys

1 5

<210> 10

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 10

Lys Ser Val Thr Cys Thr Met Phe

1 5

<210> 11

<211> 22

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 11

Val Pro Tyr Glu Pro Pro Glu Val Trp Leu Ala Leu Thr Val Pro Pro

1 5 10 15

Ser Thr Ala Trp Ala Ala

20

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 12

Val Pro Tyr Glu Pro Pro Glu Val Trp

1 5

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 13

Leu Thr Val Pro Pro Ser Thr Ala Trp

1 5

<210> 14

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (5) .. (8)

<223> Xaa可为任何天然存在的氨基酸

<400> 14

Glu Asn Ser Thr Xaa Xaa Xaa Xaa

1 5

<210> 15

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 15

Glu Ala Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val

1 5 10

<210> 16

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 16

Glu Leu Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val

1 5 10

<210> 17

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 17

Tyr Met Asp Gly Thr Met Ser Gln Val

1 5

<210> 18

<211> 140

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 18

```

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

```

<210> 19

<211> 115

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 19

```

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

```

Asp Ser Thr

115

<210> 20

<211> 51

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多核苷酸

<400> 20

ggggaaaauaa gagagaaaaag aagaguaaga agaaauauaa gagccaccu g

51

<210> 21

<211> 222

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多核苷酸

<400> 21

ugauaaauagg cuggagccuc gguggccaug cuucuugccc cuugggccuc cccccagccc

60

cuccuccccu uccugcacc guacccccgu ggucuuugaa uaaagucuga gugggcggca

120

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa

180

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaucu ag

222

<210> 22

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 22

Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu

1

5

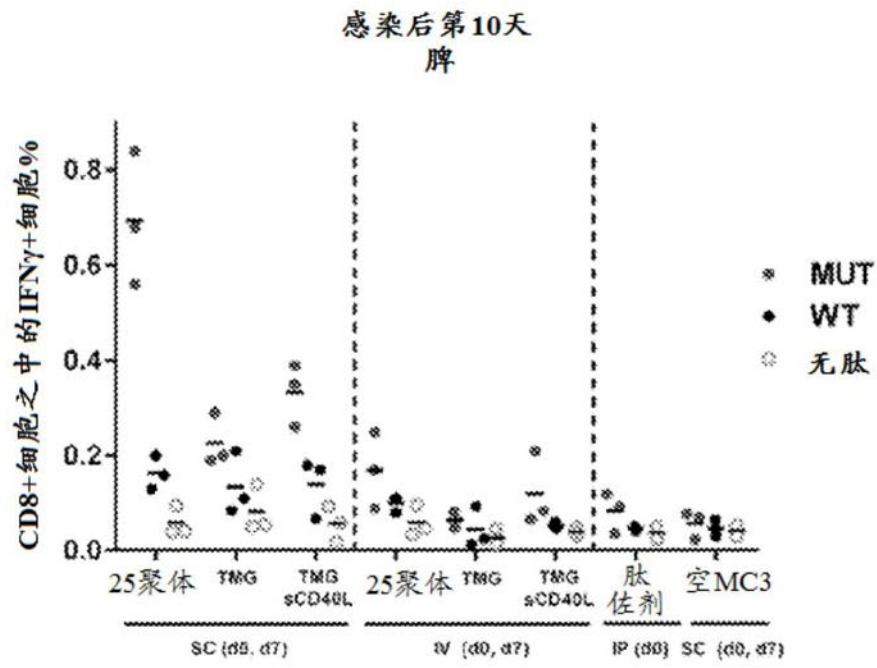


图1A

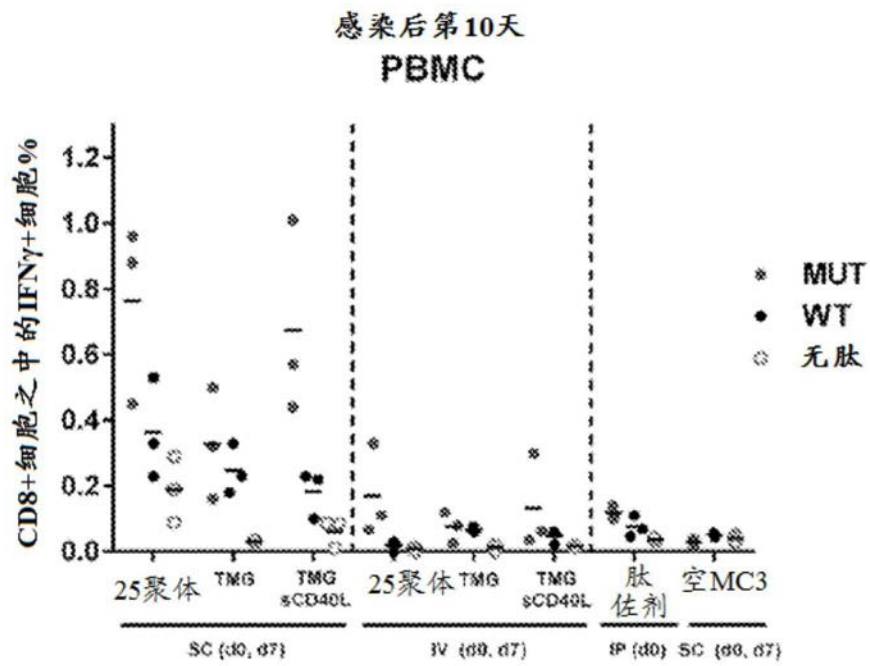


图1B

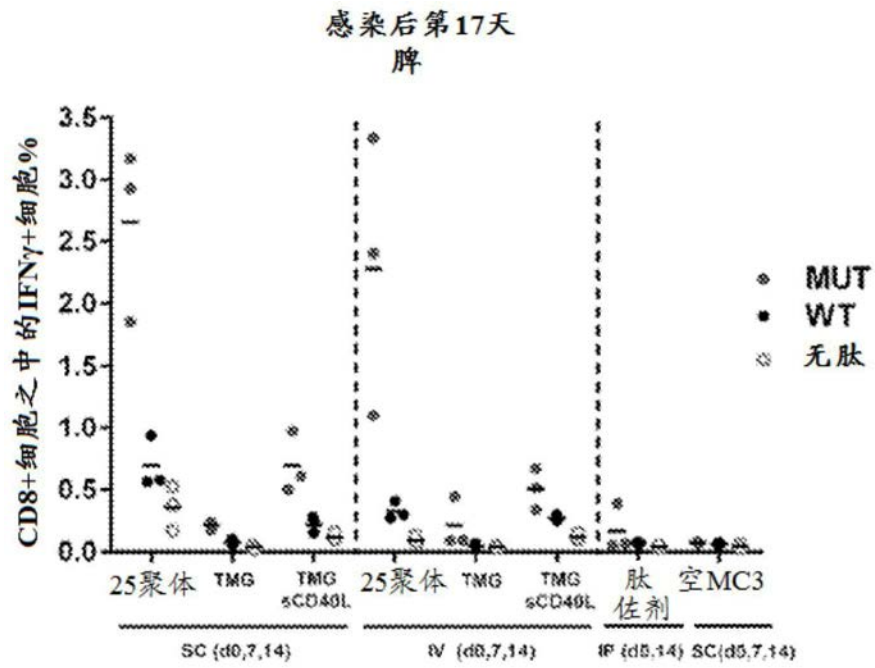


图1C

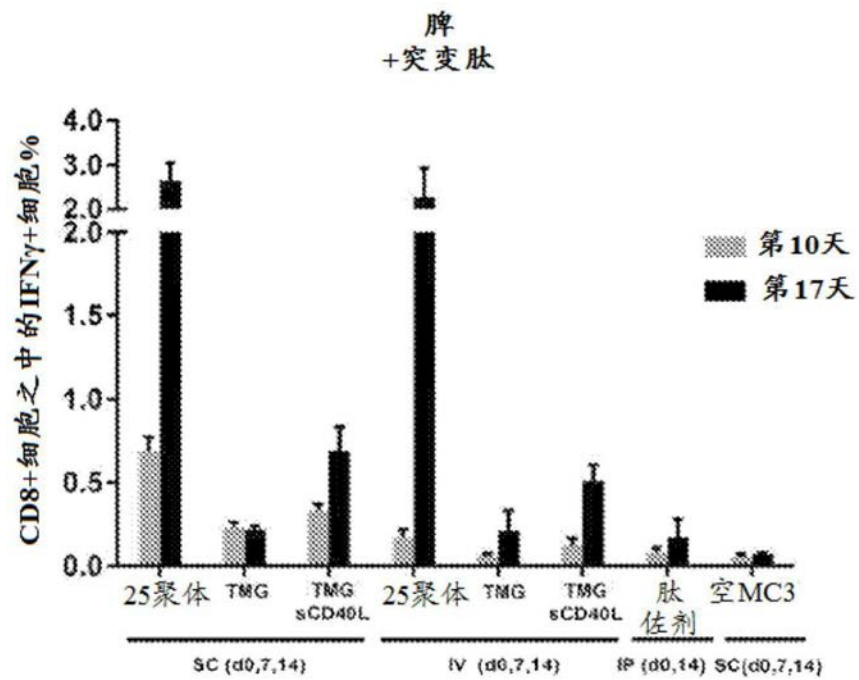


图1D

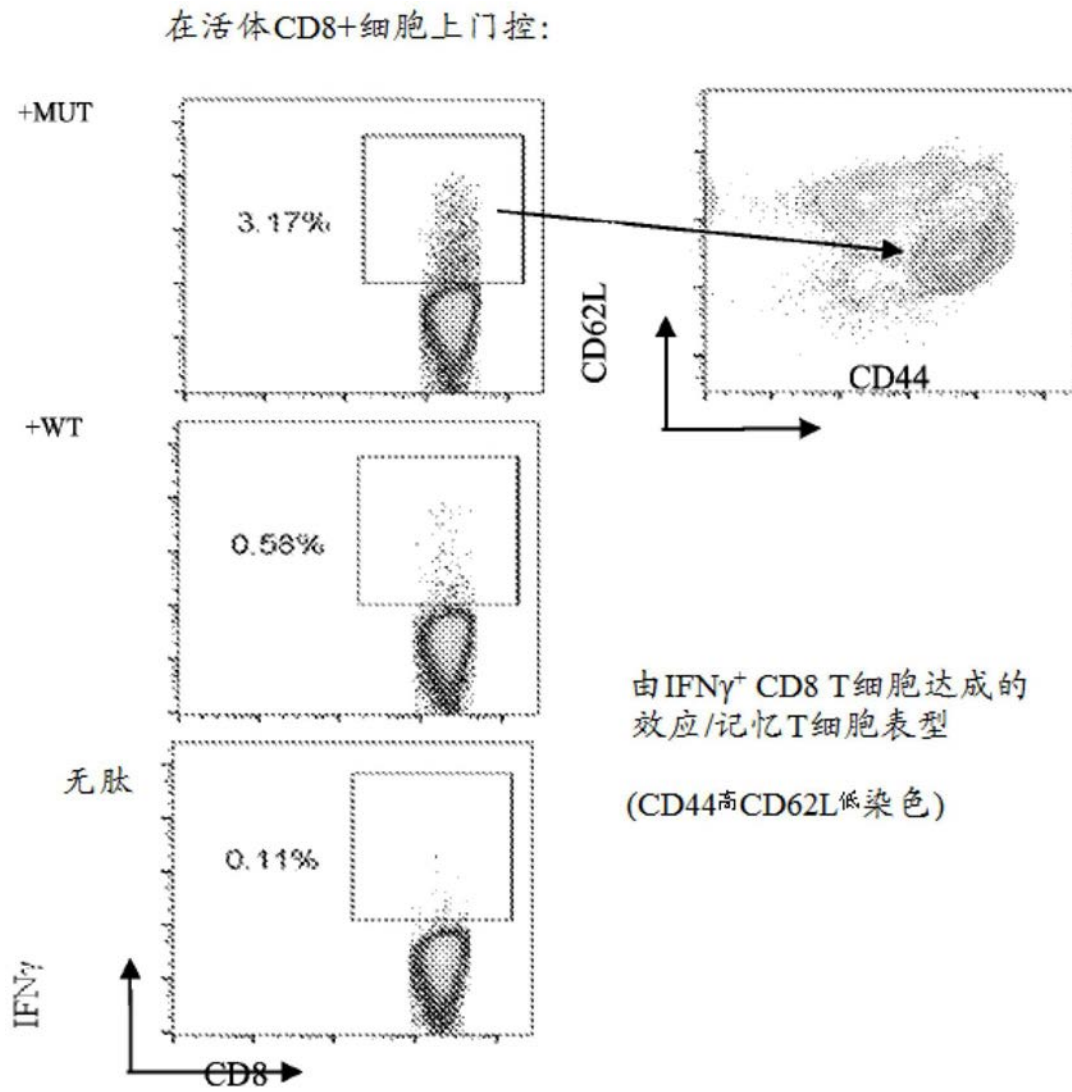


图2

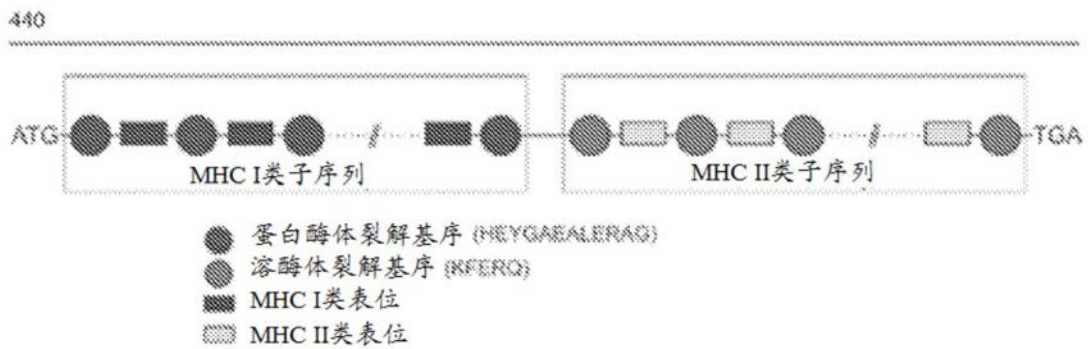


图3

	定位			形式			外源性基序			
	分泌	细胞内	组合	单一	TMG	多联体	交叉呈递	连接体	蛋白水解基序/降解决定子	自身裂解
MHC 1	1. 设计超过200种具有不同形式和构型的构建体 2. 其中50种处于生产中 3. 已优先考虑根据FACS和LCMS确定的用于MHC1呈递的最好的16种 4. 当新数据出现时进行持续改进									
MHC 2										
MHC 1										
MHC 2										

图4

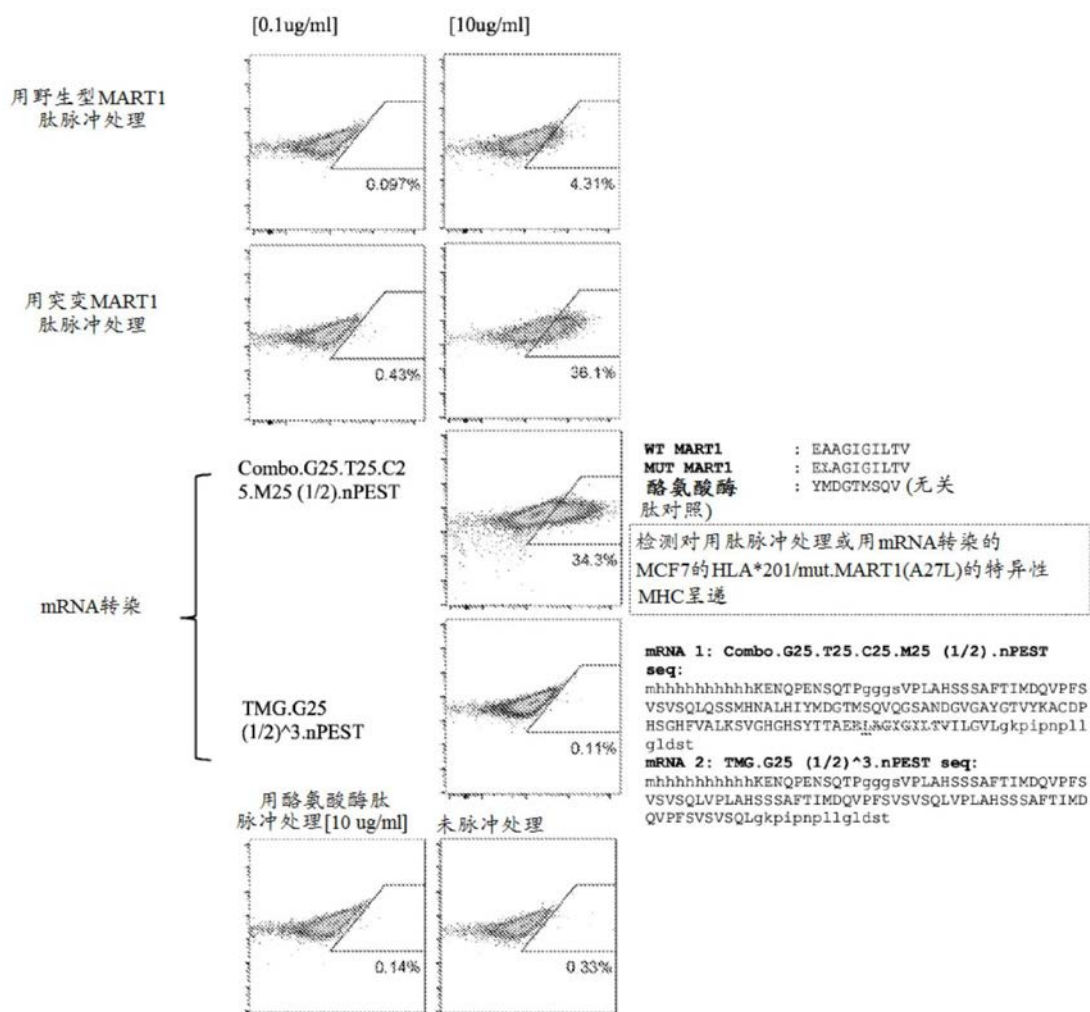


图5

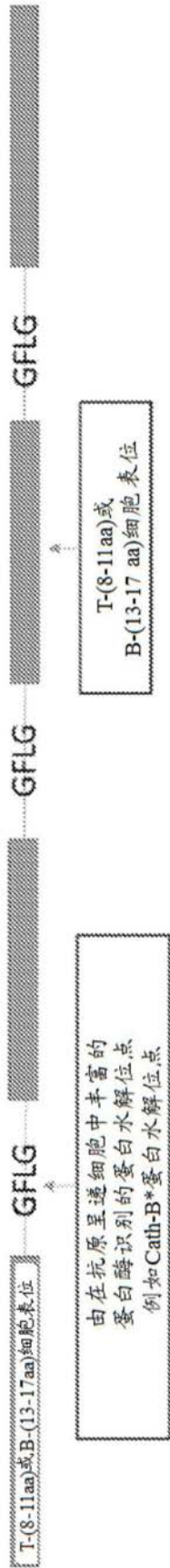


图6A

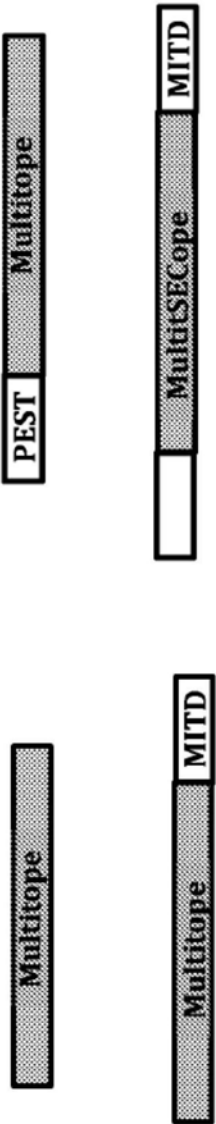


图6B

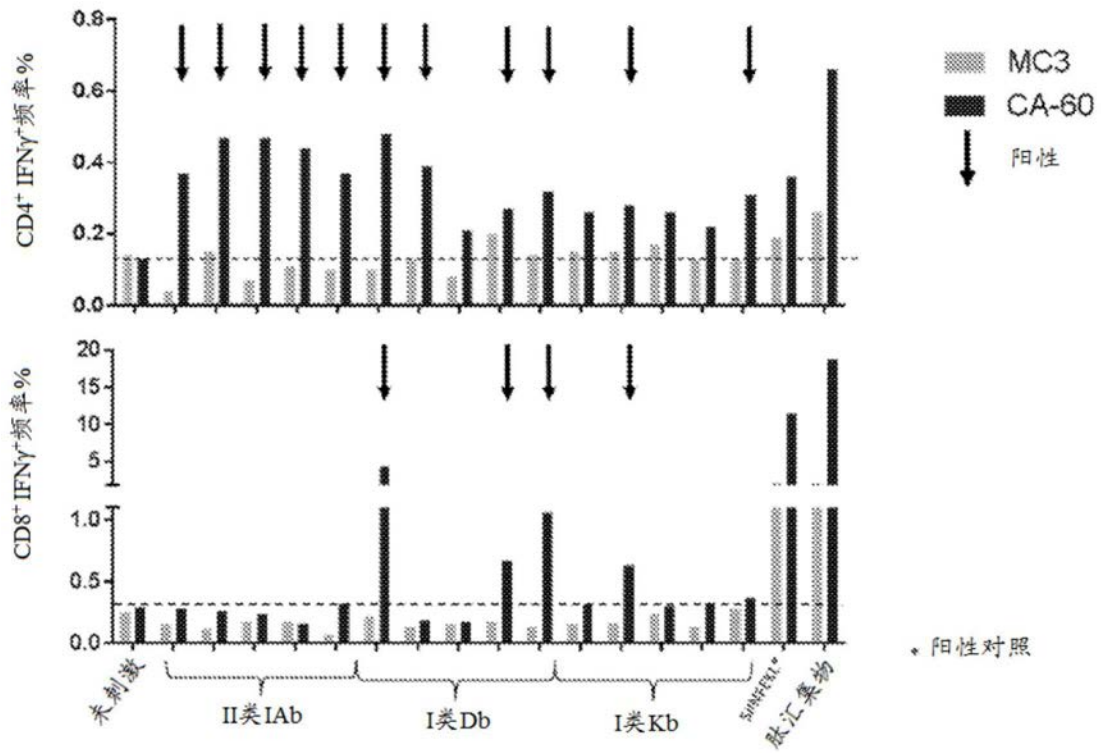


图7

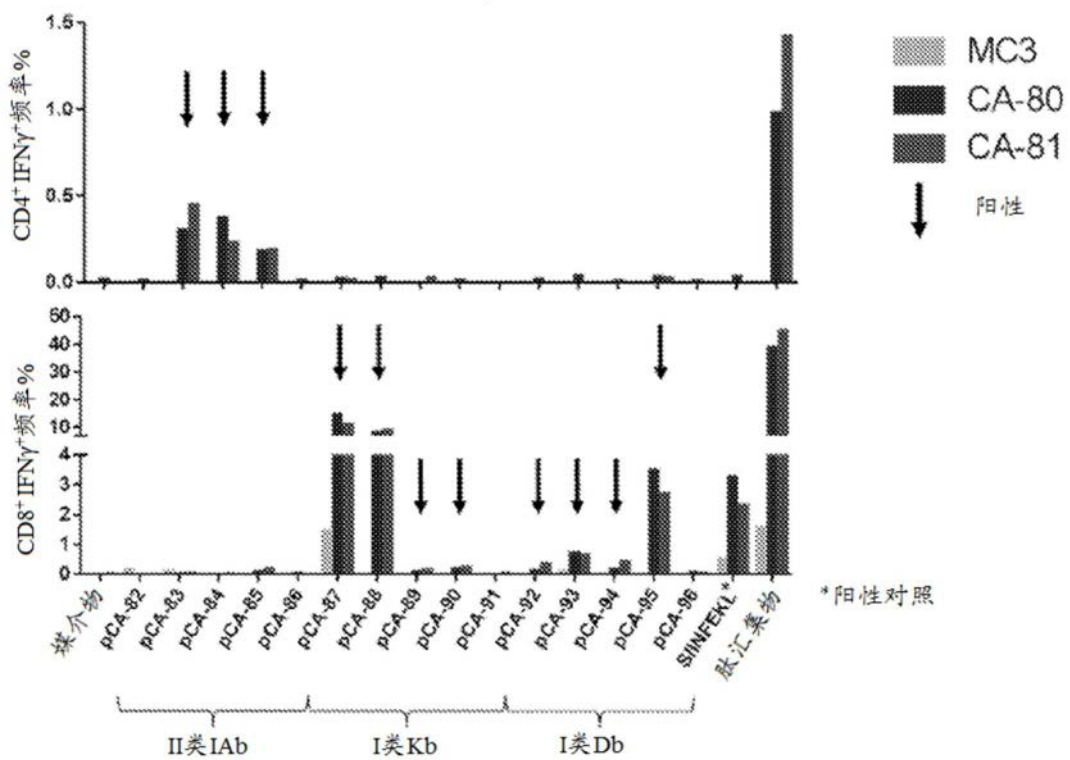


图8A

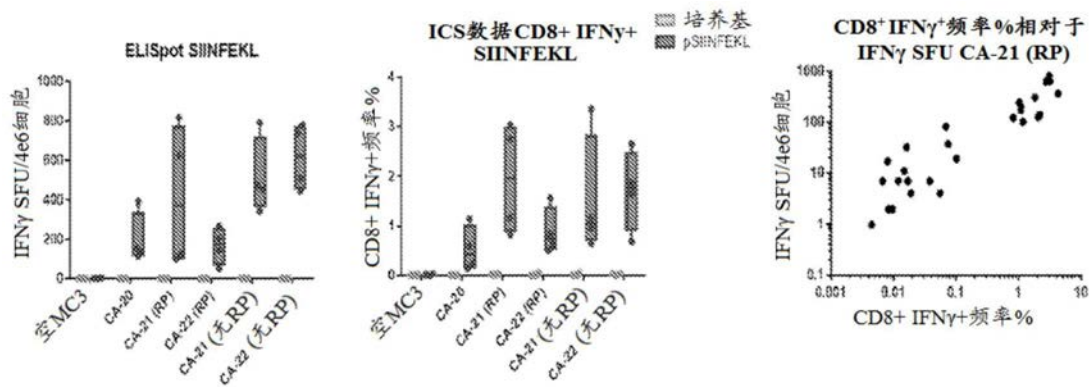


图8B

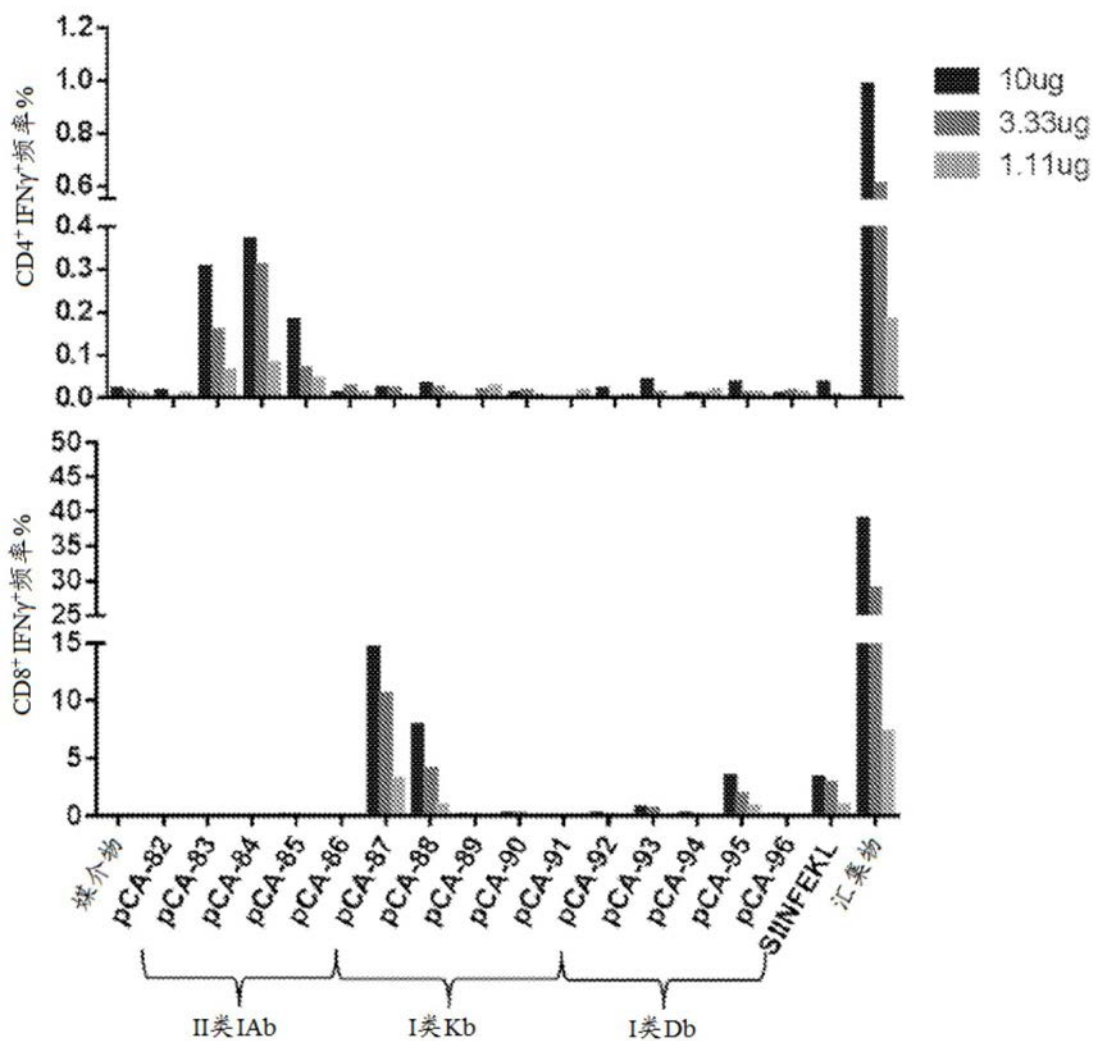


图9A

剂量组	阳性I类 表位数目*	阳性II类 表位数目*
10 μ g	8/10	3/5
3.33 μ g	7/10	2/5
1.11 μ g	3/10	1/5

* 8倍>媒介物

图9B

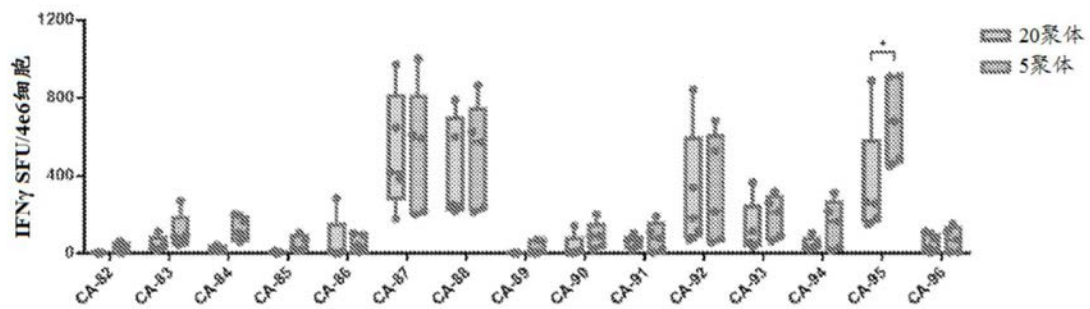


图10

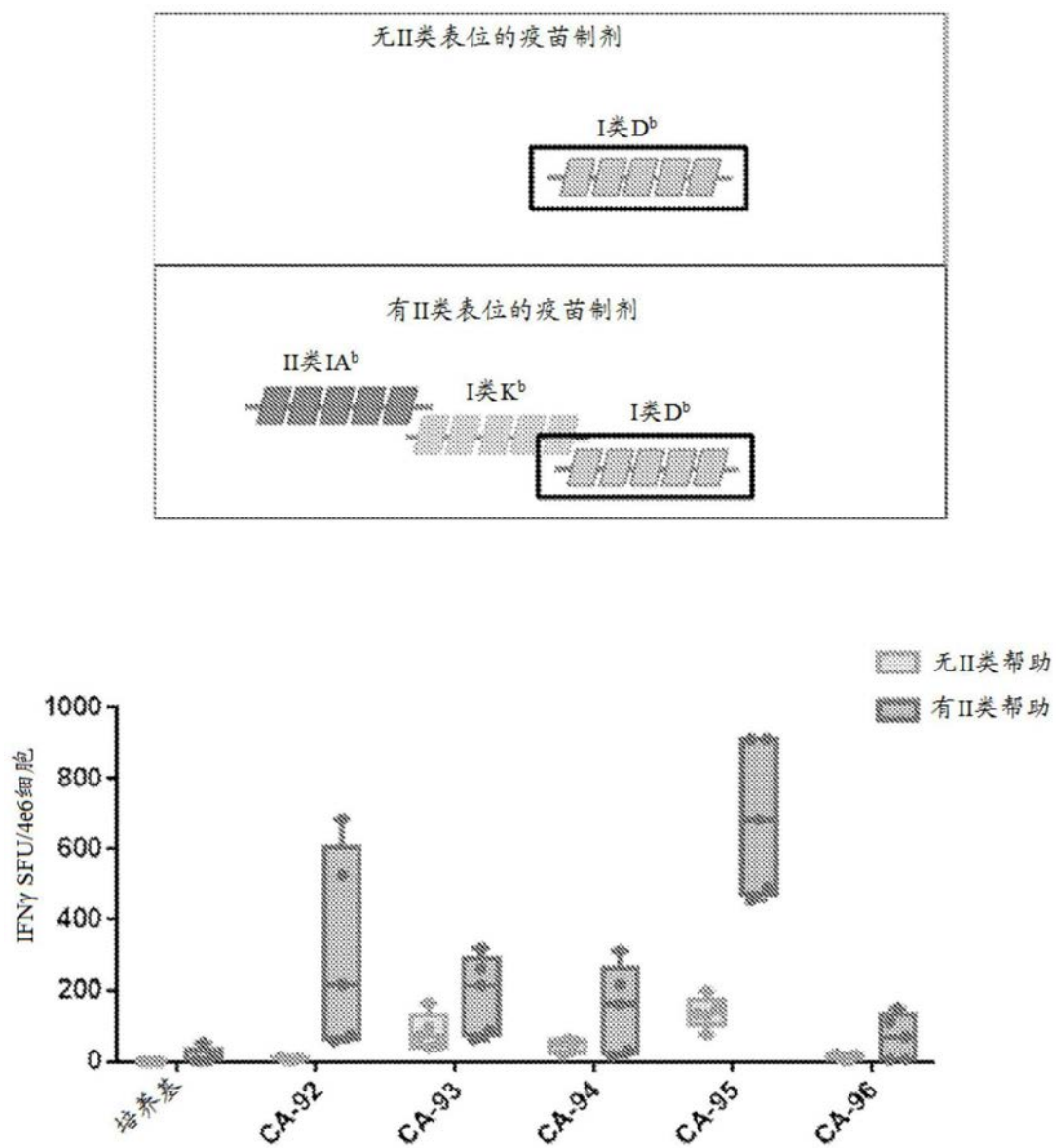


图11

对多联体的总T细胞应答

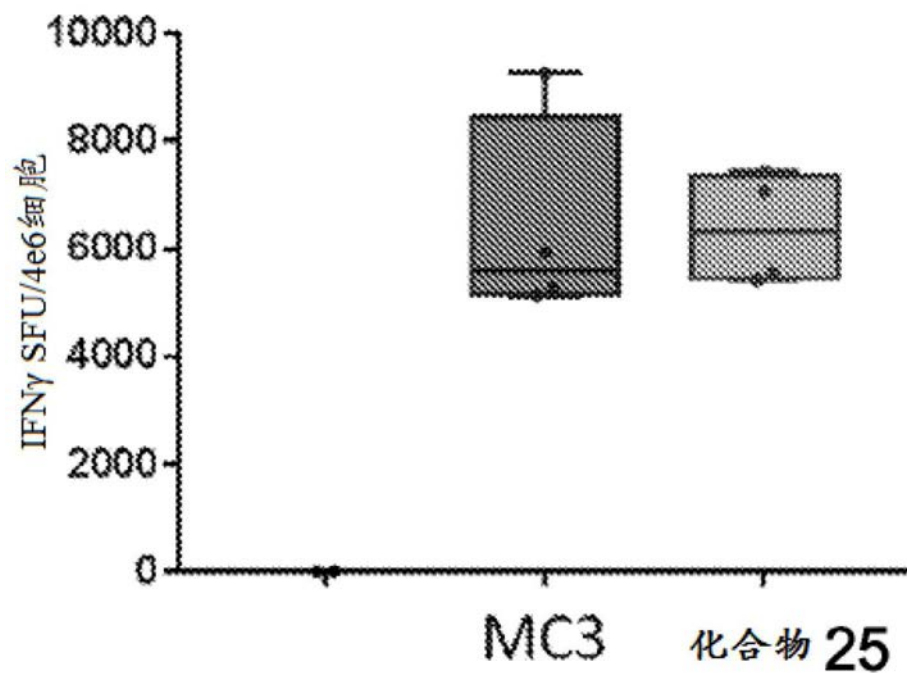


图12



UTR=非翻译区；ORF=开放阅读框

图13

5'-7mG_{cap}-G₂GGAAAUAAGAGAGAAAAGAAGAGUAAGAAGAAAUAUAAGAGCCACCAUG (N)₁₋₁₀₀
 UGAUAAUAGGCUGGAGCCUCCGUGGCCAUGCUUCUUGCCCCUUGGGCCUCCCCCAGCCCCUCCUCCCCUUC
 CUGCACCCGUACCCCGUGGUCUUGAAUAAAAGUCUGAGUGGGCGGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
 AAAAAAUCUAG_{3'}

A、C、G和U分别=AMP、CMP、GMP和N1-ΨUMP；Me=甲基；p=无机磷酸根；
 N=包含A、C、G或N1-ΨUMP的患者特异性编码序列

图14

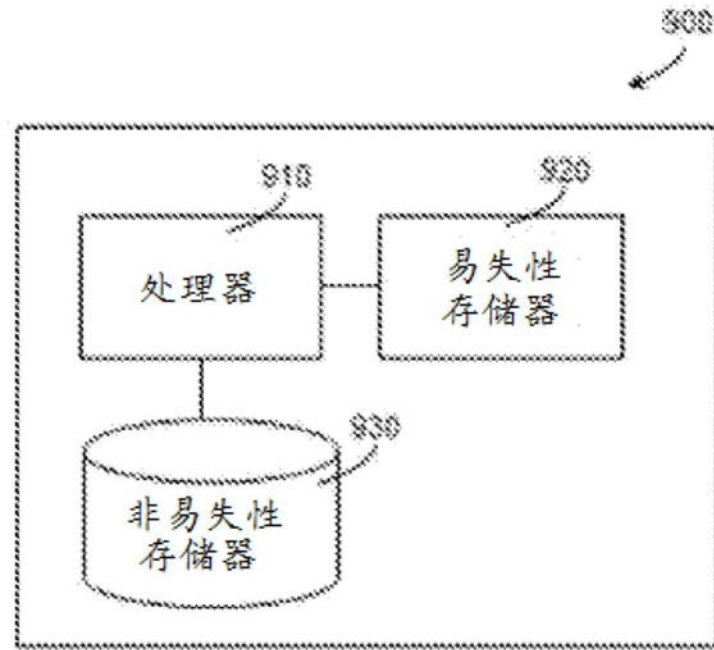


图15

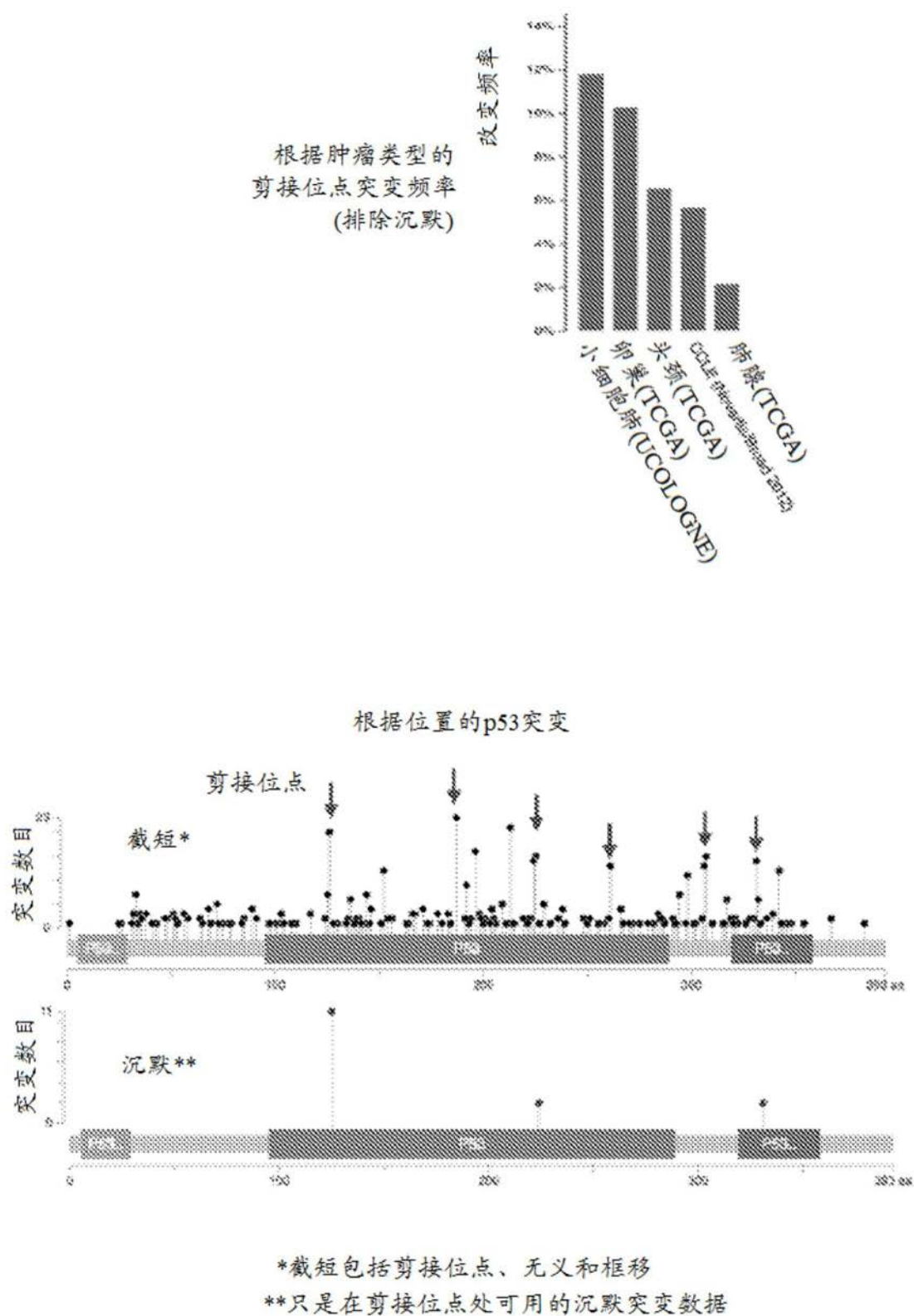


图16

