



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I872040 B

(45)公告日：中華民國 114 (2025) 年 02 月 11 日

(21)申請案號：109101064

(22)申請日：中華民國 109 (2020) 年 01 月 13 日

(51)Int. Cl. : C07K16/28 (2006.01)

A61K39/395 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2019/01/14 美國 62/792,387

2019/01/22 美國 62/795,476

2019/08/15 美國 62/887,410

(71)申請人：美商建南德克公司 (美國) GENENTECH, INC. (US)

美國

德商拜恩技術股份公司 (德國) BIONTECH SE (DE)

德國

(72)發明人：穆勒 拉爾斯 MUELLER, LARS (DE)；范恩 桂格 丹尼爾 FINE, GREGG

DANIEL (US)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

TW 201842921A EP 2958588A1

WO 2018/144082A1

期刊 Ugur Sahin et al. Personalized RNA mutanome vaccines mobilize poly-specific therapeutic immunity against cancer. Nature. 547 (7662). Epub 2017 Jul 5. 222-226.

審查人員：張茜毓

申請專利範圍項數：35 項 圖式數：5 共 156 頁

(54)名稱

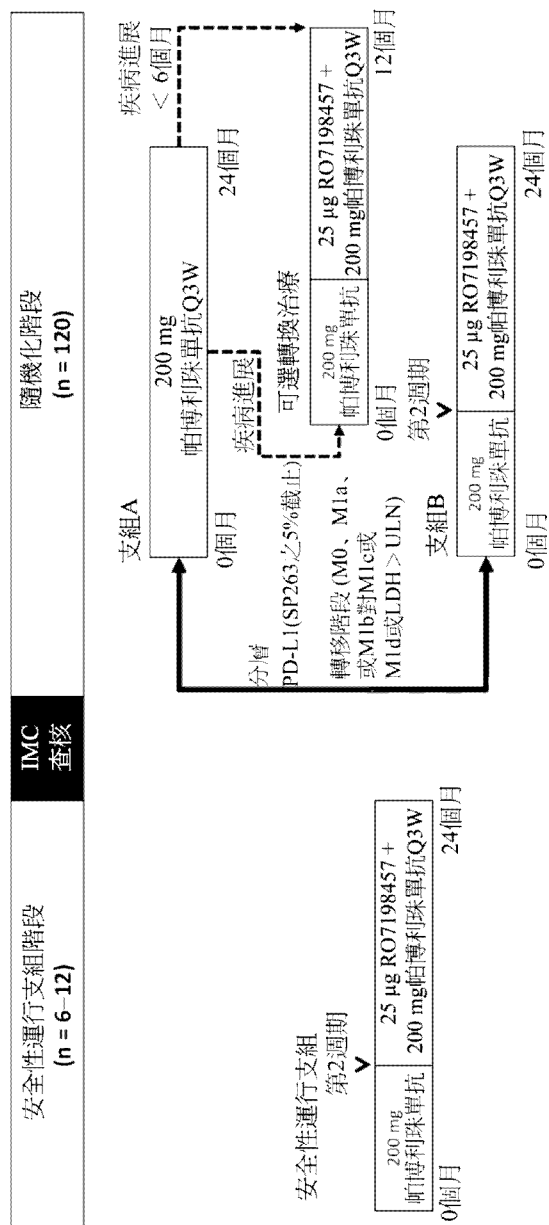
用於癌症療法之 RNA 分子

(57)摘要

本揭露提供用於治療個體之癌症的方法、用途、及套組。該等方法包含向個體投與 PD-1 軸結合拮抗劑(諸如抗 PD-1 或抗 PD-L1 抗體)及 RNA 疫苗(例如，包含一或多種多核苷酸之個人化癌症疫苗，該一或多種多核苷酸編碼由獲自個體之腫瘤標本中存在之癌症特異性體細胞突變所產生之一或多個新表位)。本文進一步提供 RNA 分子(例如，包含一或多種多核苷酸之個人化 RNA 癌症疫苗，該一或多種多核苷酸編碼由獲自個體之腫瘤標本中存在之癌症特異性體細胞突變所得之一或多個新表位)，以及適用於產生或使用 RNA 疫苗之 DNA 分子及方法。

The present disclosure provides methods, uses, and kits for treating cancer in an individual. The methods comprise administering to the individual a PD-1 axis binding antagonist (such as an anti-PD-1 or anti-PD-L1 antibody) and an RNA vaccine (e.g., a personalized cancer vaccine that comprises one or more polynucleotides encoding one or more neoepitopes resulting from cancer-specific somatic mutations present in a tumor specimen obtained from the individual). Further provided herein are RNA molecules (e.g., a personalized RNA cancer vaccine that comprises one or more polynucleotides encoding one or more

指定代表圖：



【圖 1】



I872040

【發明摘要】

【中文發明名稱】用於癌症療法之 RNA 分子

【英文發明名稱】RNA MOLECULES FOR USE IN CANCER THERAPIES

【中文】

本揭露提供用於治療個體之癌症的方法、用途、及套組。該等方法包含向個體投與 PD-1 軸結合拮抗劑(諸如抗 PD-1 或抗 PD-L1 抗體)及 RNA 疫苗(例如, 包含一或多種多核苷酸之個人化癌症疫苗, 該一或多種多核苷酸編碼由獲自個體之腫瘤標本中存在之癌症特異性體細胞突變所產生之一或多個新表位)。本文進一步提供 RNA 分子(例如, 包含一或多種多核苷酸之個人化 RNA 癌症疫苗, 該一或多種多核苷酸編碼由獲自個體之腫瘤標本中存在之癌症特異性體細胞突變所得之一或多個新表位), 以及適用於產生或使用 RNA 疫苗之 DNA 分子及方法。

【英文】

The present disclosure provides methods, uses, and kits for treating cancer in an individual. The methods comprise administering to the individual a PD-1 axis binding antagonist (such as an anti-PD-1 or anti-PD-L1 antibody) and an RNA vaccine (e.g., a personalized cancer vaccine that comprises one or more polynucleotides encoding one or more neoepitopes resulting from cancer-specific somatic mutations present in a tumor specimen obtained from the individual). Further provided herein are RNA molecules (e.g., a personalized RNA cancer vaccine that comprises one or more polynucleotides encoding one or more neoepitopes resulting from cancer-specific somatic mutations present in a tumor specimen obtained from the individual), as well as DNA molecules and methods useful for production or use of RNA vaccines.

【指定代表圖】圖 1

【代表圖之符號簡單說明】

無

【特徵化學式】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】用於癌症療法之 RNA 分子

【英文發明名稱】RNA MOLECULES FOR USE IN CANCER THERAPIES

【技術領域】

【0001】 本揭露係關於涉及藉由投與 PD-1 軸結合拮抗劑(例如，抗 PD-1 或抗 PD-L1 抗體)與 RNA 疫苗之組合治療癌症之方法、用途、及套組。本文進一步提供 RNA 分子(例如，包含一或多種多核苷酸之個人化 RNA 癌症疫苗，該一或多種多核苷酸編碼由獲自個體之腫瘤標本中存在之癌症特異性體細胞突變所產生之一或多個新表位)，以及適用於產生或使用 RNA 疫苗之 DNA 分子及方法。

【先前技術】

【0002】 黑素瘤為來源於黑素細胞之潛在致命性皮膚癌形式。2012 年，全世界有約 232,000 例黑素瘤新病例及 55,000 例死亡，其中歐洲有超過 100,000 例新病例及 22,000 例死亡 (Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J 等人 *Eur J Cancer* 2013;49:1374-403)。在美國，2018 年預計有 91,270 例新診斷黑素瘤，且預期約 9,320 名患者死於該疾病 (American Cancer Society 2018)。此外，估算值表明每 10-20 年黑素瘤之發病率會增加一倍 (Garbe C, Leiter U. *Clin Dermatol* 2009;27:3-9)。

【0003】 患有黑素瘤之患者的臨床結果高度依賴於顯現階段。直到最近，轉移性黑素瘤之治療選項仍然有限。達卡巴嗪被視為標準一線治療；然而，結果較差，反應率為 5%-12%，中位無進展生存期(PFS)小於 2 個月，中位總體生存期(OS)為 6.4 至 9.1 個月 (Middleton MR, Grob JJ, Aaronson N 等人 *J Clin Oncol* 2000;18:158-66；Bedikian AY, Millward M, Pehamberger H 等人 *J Clin Oncol*

2006;24:4738-45 ; Chapman PB, Hauschild A, Robert C 等人 *N Engl J Med* 2011;364:2507-16 ; Robert C, Thomas L, Bondarenko I 等人 *N Engl J Med* 2011;364:2517-26)。雖然組合化學療法及與干擾素- α (IFN)- α 或介白素-2(IL-2)組合之化學療法顯示經改良之反應率，但是其未產生經改良之 OS (Chapman PB , Einhorn LH , Meyers ML 等人 *J Clin Oncol* 1999;17:2745-51 ; Ives NJ, Stowe RL, Lorigan P 等人 *J Clin Oncol* 2007;25:5426-34)。

【0004】 靶向抑制 T 細胞活化之共抑制受體或「免疫檢查點」的免疫治療劑已改良了患有晚期黑素瘤之患者的預後。儘管取得了此等進展，但許多患者仍對當前療法無反應或後來死於其疾病，突顯了對更有效治療選項的持續未滿足之醫療需求。

【0005】 關於目前可用免疫治療劑的臨床及非臨床資料表明，單藥免疫療法在大多數患者中不可能誘導完全且持久之抗腫瘤反應。惡性細胞對宿主之免疫抑制藉由多種途徑介導；因此，可能需要採用兩種或更多種靶向癌症免疫治療 (CIT)劑的組合治療方案，以充分發揮宿主免疫系統之抗腫瘤潛能。

【0006】 治療性疫苗儘管很有前景，但是在歷史上未能達到預期。潛在原因之一為癌症特異性 T 細胞在長期暴露於癌細胞期間變得功能衰竭。

【0007】 本文所引用之所有參考文獻，包括專利申請案、專利公開案及 UniProtKB/Swiss-Prot 登錄號，均以全文引用之方式併入本文中，如同特別且個別指示各個別參考文獻以引用之方式併入一般。

【發明內容】

【0008】 本文提供涉及用於治療癌症之 PD-1 軸結合拮抗劑(例如，抗 PD1 或抗 PD-L1 抗體)及 RNA 疫苗之方法、套組、及用途。

【0009】 在一些態樣中，本文提供治療個體之癌症的方法，其包含向個體投

與有效量之 PD-1 軸結合拮抗劑及 RNA 疫苗，其中 RNA 疫苗包含一或多種多核苷酸，該一或多種多核苷酸編碼由獲自該個體之腫瘤標本中存在之癌症特異性體細胞突變所產生之一或多個新表位。

【0010】 在一些實施例中，PD-1 軸結合拮抗劑為 PD-1 結合拮抗劑。在一些實施例中，該 PD-1 結合拮抗劑為抗 PD-1 抗體。在一些實施例中，該抗 PD-1 抗體為納武單抗或帕博利珠單抗。在一些實施例中，抗 PD-1 抗體以約 200 mg 之劑量投與至個體。

【0011】 在一些實施例中，PD-1 軸結合拮抗劑為 PD-L1 結合拮抗劑。在一些實施例中，該 PD-L1 結合拮抗劑為抗 PD-L1 抗體。在一些實施例中，抗 PD-L1 抗體為阿維魯單抗或度伐魯單抗。在一些實施例中，該抗 PD-L1 抗體包含：(a) 重鏈可變區(VH)，其包含：包含胺基酸序列 GFTFSDSWIH(SEQ ID NO:1)之 HVR-H1、包含胺基酸序列 AWISPYGGSTYYADSVKG(SEQ ID NO:2)之 HVR-2、及包含胺基酸 RHWPGGFDY(SEQ ID NO:3)之 HVR-3，及(b)輕鏈可變區(VL)，其包含：包含胺基酸序列 RASQDVSTAVA(SEQ ID NO:4)之 HVR-L1、包含胺基酸序列 SASFLYS(SEQ ID NO:5)之 HVR-L2、及包含胺基酸序列 QQYLYHPAT(SEQ ID NO:6)之 HVR-L3。在一些實施例中，抗 PD-L1 抗體包含：包含胺基酸序列 SEQ ID NO:7 之重鏈可變區(V_H)及包含胺基酸序列 SEQ ID NO:8 之輕鏈可變區(V_L)。在一些實施例中，抗 PD-L1 抗體為阿特珠單抗。在一些實施例中，抗 PD-L1 抗體以約 1200 mg 之劑量投與至個體。

【0012】 在任一以上實施例之一些實施例中，PD-1 軸結合拮抗劑以 21 天或 3 週之時間間隔投與至個體。

【0013】 在一些實施例中，RNA 疫苗包含一或多種多核苷酸，該一或多種多核苷酸編碼由腫瘤標本中存在之癌症特異性體細胞突變所產生之 10-20 個新表

位。在一些實施例中，RNA 疫苗經調配成脂質複合體奈米粒子或脂質體。在一些實施例中，RNA 疫苗以約 15 μg 、約 25 μg 、約 38 μg 、約 50 μg 、或約 100 μg 之劑量投與至個體。在一些實施例中，RNA 疫苗以 21 天或 3 週之時間間隔投與至個體。

【0014】 在一些實施例中，PD-1 軸結合拮抗劑及 RNA 疫苗在 8 個 21 天週期中投與至個體，且 RNA 疫苗在第 2 週期之第 1、8、及 15 天及第 3-7 週期之第 1 天投與至個體。在一些實施例中，PD-1 軸結合拮抗劑在第 1-8 週期之第 1 天投與至個體。在一些實施例中，PD-1 軸結合拮抗劑及 RNA 疫苗在第 8 週期之後進一步投與至個體。在一些實施例中，PD-1 軸結合拮抗劑及 RNA 疫苗在 17 個額外 21 天週期中進一步投與至個體，PD-1 軸結合拮抗劑在第 13-29 週期之第 1 天投與至個體，且 RNA 疫苗在第 13、21、及 29 週期之第 1 天投與至個體。在一些實施例中，PD-1 軸結合拮抗劑及 RNA 疫苗在 8 個 21 天週期中投與至個體，PD-1 軸結合拮抗劑為帕博利珠單抗且在第 1-8 週期之第 1 天以約 200 mg 之劑量投與至個體，且 RNA 疫苗在第 2 週期之第 1、8、及 15 天及第 3-7 週期之第 1 天以約 25 μg 之劑量投與至個體。在一些實施例中，RNA 疫苗在第 2 週期之第 1 天以約 25 μg 、在第 2 週期之第 8 天以約 25 μg 、在第 2 週期之第 15 天以約 25 μg 、且在第 3-7 週期中各者之第 1 天以約 25 μg 之劑量投與至個體。在一些實施例中，PD-1 軸結合拮抗劑及 RNA 疫苗係靜脈內投與。在一些實施例中，個體為人類。

【0015】 在一些實施例中，癌症選自由以下組成之群：非小細胞肺癌、膀胱癌、結直腸癌、三陰性乳癌、腎癌、及頭頸癌。在一些實施例中，癌症為黑素瘤。在一些實施例中，黑素瘤為皮膚或黏膜黑素瘤。在一些實施例中，黑素瘤並非眼部或肢端黑素瘤。在一些實施例中，黑素瘤為轉移性的(例如，IV 期，諸如復發或從新 IV 期)或不可切除的局部晚期(例如，IIIC 期或 IIID 期)黑素瘤。在

一些實施例中，黑素瘤為先前未治療晚期黑素瘤。在一些實施例中，該方法導致無進展生存期(PFS)得以改良。在一些實施例中，該方法導致客觀反應率(ORR)增加。

【0016】 在一些態樣中，本文提供套組或製品，其包含用於與 RNA 疫苗組合來根據任一以上實施例之方法治療患有癌症之個體的 PD-1 軸結合拮抗劑。

【0017】 在一些態樣中，本文提供用於在治療患有癌症之人類個體之方法中使用的 PD-1 軸結合拮抗劑，該方法包含向個體投與有效量之 PD-1 軸結合拮抗劑與 RNA 疫苗之組合，其中 RNA 疫苗包含一或多種多核苷酸，該一或多種多核苷酸編碼由獲自該個體之腫瘤標本中存在之癌症特異性體細胞突變所產生之一或多個新表位。在一些態樣中，本文提供用於在治療患有癌症之人類個體之方法中使用的 RNA 疫苗，該方法包含向個體投與有效量之 RNA 疫苗與 PD-1 軸結合拮抗劑之組合，其中 RNA 疫苗包含一或多種多核苷酸，該一或多種多核苷酸編碼由獲自該個體之腫瘤標本中存在之癌症特異性體細胞突變所產生之一或多個新表位。

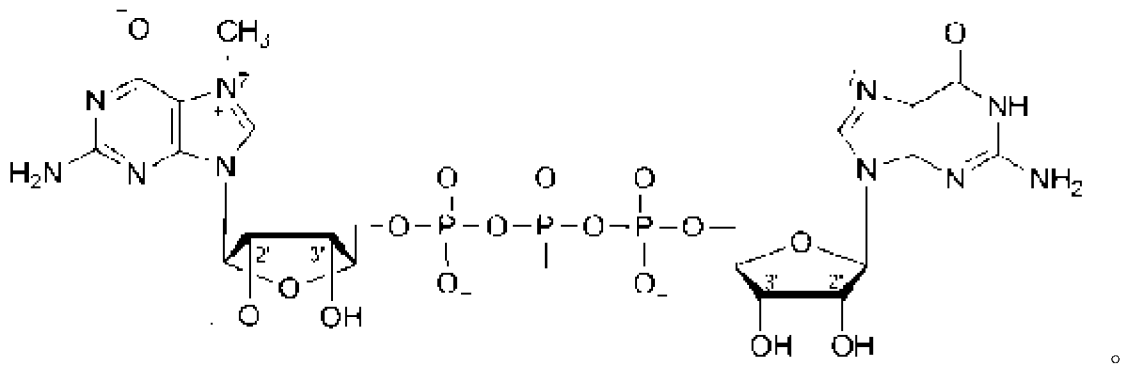
【0018】 在一些態樣中，本文提供 RNA 分子，其在 5'→3'方向上包含：(1)5'帽；(2)5'未轉譯區(UTR)；(3)編碼分泌信號肽之多核苷酸序列；(4)編碼主要組織相容性複合體(MHC)分子之跨膜及細胞質域之至少一部分的多核苷酸序列；(5)3'UTR，其包含：(a)酶切胺基端增強子(Amino-Terminal Enhancer of Split, AES) mRNA 之 3'未轉譯區或其片段；及(b)經粒線體編碼 12S RNA 之非編碼 RNA 或其片段；及(6)poly(A)序列。

【0019】 在一些實施例中，RNA 分子進一步包含編碼至少一個新表位之多核苷酸序列；其中在 5'→3'方向上，編碼至少一個新表位之多核苷酸序列係在編碼分泌信號肽之多核苷酸序列(例如，上述(3))與編碼 MHC 分子之跨膜及細胞質域

之至少一部分的多核苷酸序列(例如, 上述(4))之間。在一些實施例中, RNA 分子包含編碼至少 2、至少 3、至少 4、至少 5、至少 6、至少 7、至少 8、至少 9、至少 10、至少 11、至少 12、至少 13、至少 14、至少 15、至少 16、至少 17、至少 18、至少 19、或 20 個不同新表位之多核苷酸序列。在一些實施例中, RNA 分子在 5'→3'方向上進一步包含: 編碼胺基酸連接子之多核苷酸序列; 及編碼新表位之多核苷酸序列; 其中編碼胺基酸連接子及新表位之多核苷酸序列形成第一連接子-新表位模組; 且其中在 5'→3'方向上, 形成第一連接子-新表位模組之多核苷酸序列係在編碼分泌信號肽之多核苷酸序列(例如, 上述(3))與編碼 MHC 分子之跨膜及細胞質域之至少一部分的多核苷酸序列(例如, 上述(4))之間。在一些實施例中, 胺基酸連接子包含序列 GGS GGGGSGG (SEQ ID NO:39)。在一些實施例中, 編碼胺基酸連接子之多核苷酸序列包含序列 GGCGGCUCUGGAGGAGGCGGCUCCGGAGGC (SEQ ID NO:37)。在一些實施例中, RNA 分子在 5'→3'方向上進一步包含: 至少第二連接子-表位模組, 其中至少第二連接子-表位模組包含編碼胺基酸連接子之多核苷酸序列及編碼新表位之多核苷酸序列; 其中在 5'→3'方向上, 形成第二連接子-新表位模組之多核苷酸序列係在編碼第一連接子-新表位模組之新表位之多核苷酸序列與編碼 MHC 分子之跨膜及細胞質域之至少一部分的多核苷酸序列(例如, 上述(4))之間; 且其中第一連接子-表位模組之新表位不同於第二連接子-表位模組之新表位。在一些實施例中, RNA 分子包含 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、或 20 個連接子-表位模組, 且連接子-表位模組中之各者編碼不同新表位。在一些實施例中, RNA 分子包含 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、或 20 個連接子-表位模組, 且 RNA 分子包含編碼至少 2、至少 3、至少 4、至少 5、至少 6、至少 7、至少 8、至少 9、

至少 10、至少 11、至少 12、至少 13、至少 14、至少 15、至少 16、至少 17、至少 18、至少 19、或 20 個不同新表位之多核苷酸。在一些實施例中，RNA 分子進一步包含編碼胺基酸連接子之第二多核苷酸序列，其中編碼胺基酸連接子之第二多核苷酸序列係在編碼 3'方向最遠側之新表位之多核苷酸序列與編碼 MHC 分子之跨膜及細胞質域之至少一部分的多核苷酸序列(例如，上述(4))之間。在一些實施例中，RNA 分子包含圖 4 展示之序列。在一些實施例中，圖 4 中之 N 表示編碼一或多個新表位(例如，編碼至少 2、至少 3、至少 4、至少 5、至少 6、至少 7、至少 8、至少 9、至少 10、至少 11、至少 12、至少 13、至少 14、至少 15、至少 16、至少 17、至少 18、至少 19、或 20 個不同新表位)之多核苷酸序列。在一些實施例中，圖 4 中之 N 表示一或多個(例如，至少 2、至少 3、至少 4、至少 5、至少 6、至少 7、至少 8、至少 9、至少 10、至少 11、至少 12、至少 13、至少 14、至少 15、至少 16、至少 17、至少 18、至少 19、或 20 個不同)連接子-新表位模組，在 5'→3'方向上，各模組包含編碼一或多個胺基酸連接子之多核苷酸序列及編碼新表位之多核苷酸序列。

【0020】 在一些實施例中，RNA 分子之 5'帽(例如，上述(1))包含以下結構之 D1 非鏡像異構物：



【0021】 在一些實施例中，RNA 分子之 5'UTR(例如，上述(2))包含序列 UUC UUCUGGUCCCCACAGACUCAGAGAGAACCCGCCACC(SEQ ID NO:23)。在一些實施例中，RNA 分子之 5'UTR(例如，上述(2))包含序列 GGCGAACUAGU

AUUCUUCUGGUCCCCACAGACUCAGAGAGAACCCGCCACC(SEQ ID NO:21)。在一些實施例中，由 RNA 分子編碼之分泌信號肽(例如，上述(3))包含胺基酸序列 MRVMAPRTLILLLSGALALTETWAGS(SEQ ID NO:27)。在一些實施例中，RNA 分子之編碼分泌信號肽之多核苷酸序列(例如，上述(3))包含序列 AUGAGAGUGAUGGCCCCCAGAACCCUGAUCCUGCUGCUGUCUGGGCGCCCUGGCCUGACAGAGACAUGGGCCGGAAGC(SEQ ID NO:25)。在一些實施例中，由 RNA 分子編碼之 MHC 分子之跨膜及細胞質域的至少一部分(例如，上述(4))包含胺基酸序列 IVGIVAGLAVLAVVVIGAVVATVMCRRKSSGGKGGSYSQAASSDSAQGS D VSLTA(SEQ ID NO:30)。在一些實施例中，RNA 分子之編碼 MHC 分子之跨膜及細胞質域之至少一部分的多核苷酸序列(例如，上述(4))包含序列 AUCGUGGGAAUUGUGGCAGGACUGGCAGUGCUGGCCGUGGUGGUGAUCG GAGCCGUGGUGGCUACCGUGAUGUGCAGACGGAAGUCCAGCGGAGGCAAGGGCGGCAGCUACAGCCAGGCCGCCAGCUCUGAUAGCGCCCAGGGCAGCGACGUGUCACUGACAGCC(SEQ ID NO:28)。在一些實施例中，RNA 分子之 AES mRNA 之 3' 未轉譯區(例如，上述(5a))包含序列 CUGGUACUGCAUGCACGCAAUGCUAGCUGCCCCUUUCCCGUCCUGGGUACCCCGAGUCUCCCCGACCUCGGGUCCCAGGUAUGC UCCCACCUCACCUGCCCCACUCACCAC CUCUGCUAGUUC CAGACACCUC(CSEQ ID NO:33)。在一些實施例中，其中 RNA 分子之經粒線體編碼 12S RNA 之非編碼 RNA(例如，上述(5b))包含序列 CAGCACGCAGCAAUGCAGCUAAAACGCUUAGCCUAGCCACACCCCCACGGGAAACAGCAGUGAUUAACCUUUAGCAAUAAACGAAAGUUUAACUAAGCUAUACUAACCCCAGGGUUGGUCAAUUUCGUGCCAGCCACACCG(SEQ ID NO:35)。在一些實施例中，RNA 分子之 3'UTR(例如，上述(5))包含序列 CUC

GAGCUGGUACUGCAUGCACGCAAUGCUAGCUGCCCCUUUCCCGUCCUG
GGUACCCCGAGUCUCCCCCGACCUCGGGUCCCAGGUAUGCUCCCACCUC
CACCUGCCCCACUCACCACCUCUGCUAGUUCCAGACACCUCCCAAGCAC
GCAGCAAUGCAGCUCAAAACGCUUAGCCUAGCCACACCCCCACGGGAAA
CAGCAGUGAUUAACCUUUAGCAAUAAACGAAAGUUUAACUAAGCUAUA
CUAACCCCGAGGGUUGGUCAAUUUCGUGCCAGCCACACCGAGACCUGGU
CCAGAGUCGCUAGCCGCGUCGCU(SEQ ID NO:31)。在一些實施例中，RNA
分子之 poly(A)序列(例如，上述(6))包含 120 個腺嘌呤核苷酸。

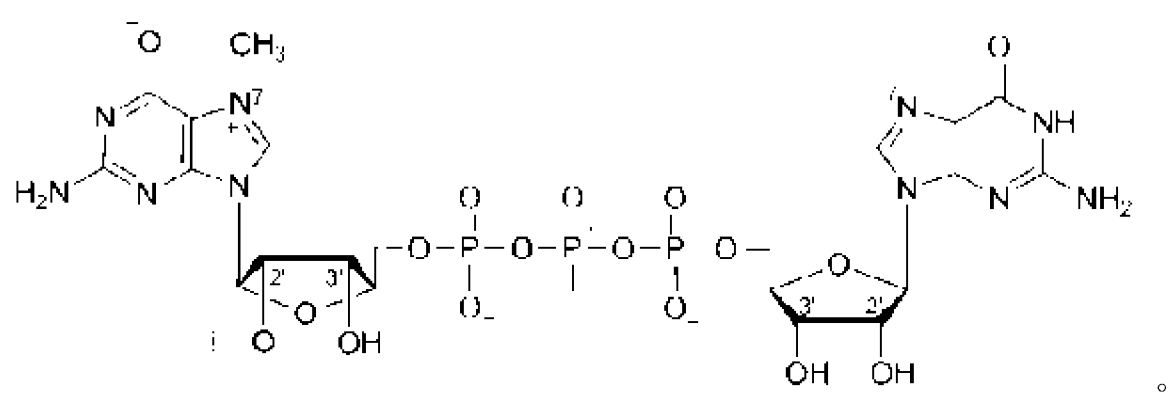
【0022】 在一些態樣中，本文提供一種 RNA 分子，其在 5'→3'方向上包含：
多核苷酸序列 GGCGAACUAGUAUUCUUCUGGUCCCCACAGACUCAGAGAG
AACCCGCCACCAUGAGAGUGAUGGGCCCCAGAACCCUGAUCCUGCUGCU
GUCUGGGCGCCUGGCCCUGACAGAGACAUGGGCCGGAAGC(SEQ ID NO:1
9)；及多核苷酸序列 AUCGUGGGAAUUGUGGCAGGACUGGCAGUGCUGGCC
GUGGUGGUGAUCGGAGCCGUGGUGGCUACCGUGAUGUGCAGACGGAAG
UCCAGCGGAGGCAAGGGCGGCAGCUACAGCCAGGCCGCCAGCUCUGAU
AGCGCCCAGGGCAGCGACGUGUCACUGACAGCCUAGUAACUCGAGCUG
GUACUGCAUGCACGCAAUGCUAGCUGCCCCUUUCCCGUCCUGGGUACCC
CGAGUCUCCCCCGACCUCGGGUCCCAGGUAUGCUCCCACCUCACCUGC
CCCACUCACCACCUCUGCUAGUUCCAGACACCUCCCAAGCACGCAGCAA
UGCAGCUCAAAACGCUUAGCCUAGCCACACCCCCACGGGAAACAGCAGU
GAUUAACCUUUAGCAAUAAACGAAAGUUUAACUAAGCUAUAACUAACCC
CAGGGUUGGUCAAUUUCGUGCCAGCCACACCGAGACCUGGUCCAGAGU
CGCUAGCCGCGUCGCU(SEQ ID NO:20)。

【0023】 在一些態樣中，本文提供一種 RNA 分子，其在 5'→3'方向上包含：
多核苷酸序列

GGGGCGAACU AGUAUUCUUC UGGUCCCCAC AGACUCAGAG AGAACCC
GCCACCAUGAGAG UGAUGGCCCC CAGAACCCUG AUCCUGCUGC UGUC
UGGCGCCCUGGCCCUG ACAGAGACAU GGGCCGGAAG CNAUCGUGGGA
AUUGUGGCAGGACUGGCAGU GCUGGCCGUG GUGGUGAUCG GAGCCGU
GGU GGCUACCGUGAUGUGCAGAC GGAAGUCCAG CGGAGGCAAG GGCG
GCAGCU ACAGCCAGGCCGCCAGCUCU GAUAGCGCCC AGGGCAGCGA CG
UGUCACUG ACAGCCUAGUAACUCGAGCU GGUACUGCAU GCACGCAAU
G CUAGCUGCCC CUUUCCCGUCCUGGGUACCC CGAGUCUCCC CCGACCU
CGG GUCCCAGGUA UGCUCCCACCUCACCUGCC CCACUCACCA CCUCU
GCUAG UUCCAGACAC CUCCCAAGCACGCAGCAAUG CAGCUCAAAA CGC
UUAGCCU AGCCACACCC CCACGGGAAACAGCAGUGAU UAACCUUUAG
CAAUAAACGA AAGUUUAACU AAGCUAUACUAACCCCAGGG UUGGUCA
AUU UCGUGCCAGC CACACCGAGA CCUGGUCCAGAGUCGCUAGC CGCG
UCGCUA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA A
AAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAA
AAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA (SEQ ID NO:42)

【0024】 在一些實施例中，RNA 分子進一步包含編碼至少一個新表位之多核
苷酸序列；其中編碼至少一個新表位之多核苷酸序列係在序列 SEQ ID NO:19 與
SEQ ID NO:20 之間，或在 SEQ ID NO:42 中標記為「N」之位置處。在一些實施
例中，RNA 分子包含編碼至少 2、至少 3、至少 4、至少 5、至少 6、至少 7、至
少 8、至少 9、至少 10、至少 11、至少 12、至少 13、至少 14、至少 15、至少

16、至少 17、至少 18、至少 19、或 20 個不同新表位之多核苷酸序列。在一些實施例中，RNA 分子在 5'→3'方向上(例如，在序列 SEQ ID NO:19 與 SEQ ID NO:20 之間，或在 SEQ ID NO:42 中標記為「N」之位置處)進一步包含：(a)至少第一連接子-新表位模組，其中至少第一連接子-新表位模組包含編碼胺基酸連接子之多核苷酸序列及編碼新表位之多核苷酸序列；及(b)編碼胺基酸連接子之第二多核苷酸序列。在一些實施例中，RNA 分子包含 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、或 20 個連接子-表位模組，且連接子-表位模組中之各者編碼不同新表位。在一些實施例中，RNA 分子包含 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、或 20 個連接子-表位模組，且 RNA 分子包含編碼至少 2、至少 3、至少 4、至少 5、至少 6、至少 7、至少 8、至少 9、至少 10、至少 11、至少 12、至少 13、至少 14、至少 15、至少 16、至少 17、至少 18、至少 19、或 20 個不同新表位之多核苷酸。在一些實施例中，RNA 分子進一步包含 5'帽，其中 5'帽位於序列 GGCGAACUAGUAUUCUUCUGGUCCCCACAGACUCAGAGAGAACCCGCCACCAUGAGAGUGAUGGCCCCCAGAACCCUGAUCCUGGCUGCUGUCUGGC GCCCUGGCCCUGACAGAGACAUGGGCCGGAAGC(SEQ ID NO:19)之 5'處。在一些實施例中，5'帽位於兩個鳥嘌呤核苷酸之間。在一些實施例中，RNA 分子進一步包含 5'帽，其中 5'帽位於 SEQ ID NO:42 中之前 2 個 G 鹼基之間(例如，在圖 4 中展示)。在一些實施例中，5'帽包含以下結構之 D1 非鏡像異構物：



【0025】 在一些態樣中，本文提供一種脂質體，其包含任一以上實施例之 RNA 分子(包括，例如，本文描述、或在序列表或圖式中描述之任何 RNA 分子)及一或多種脂質，其中一或多種脂質形成囊封 RNA 分子之多層結構。在一些實施例中，一或多種脂質包含至少一種陽離子脂質及至少一種輔助脂質。在一些實施例中，一或多種脂質包含(R)-N,N,N-三甲基-2,3-二油醯氧基-1-丙銨氯化物(DOTMA)及 1,2-二油醯基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DOPE)。在一些實施例中，在生理 pH 下，脂質體之正電荷與負電荷之總電荷比為 1.3:2(0.65)。在一些實施例中，在生理 pH 下，脂質體之正電荷與負電荷之總電荷比不低於 1.0:2.0。在一些實施例中，在生理 pH 下，脂質體之正電荷與負電荷之總電荷比不高於 1.9:2.0。在一些實施例中，在生理 pH 下，脂質體之正電荷與負電荷之總電荷比不低於 1.0:2.0 且不高於 1.9:2.0。

【0026】 在一些態樣中，本文提供一種治療個體之癌症或延遲其進展之方法，其包含向個體投與有效量之任一以上實施例之 RNA 分子(包括，例如，本文描述、或在序列表或圖式中描述之任何 RNA 分子)或任一以上實施例之脂質體。本文亦提供任一以上實施例之 RNA 分子或任一以上實施例之脂質體以供在治療個體之癌症或延遲其進展之方法中使用，其中該方法包含向個體投與有效量之 RNA 分子或脂質體。本文亦提供任一以上實施例之 RNA 分子(包括，例如，本文描述、或在序列表或圖式中描述之任何 RNA 分子)或任一以上實施例之脂質體

以供在製造用於治療個體之癌症或延遲其進展之藥物中使用。在一些實施例中，RNA 分子包含一或多種多核苷酸，該一或多種多核苷酸編碼由獲自該個體之腫瘤標本中存在之癌症特異性體細胞突變所產生之一或多個新表位。在一些實施例中，該等方法進一步包含向個體投與 PD-1 軸結合拮抗劑(例如，抗 PDL1 抗體)。在一些實施例中，癌症選自由以下組成之群：黑素瘤、非小細胞肺癌、膀胱癌、結直腸癌、三陰性乳癌、腎癌、及頭頸癌。在一些實施例中，RNA 分子或脂質體以約 15 μg 、約 25 μg 、約 38 μg 、約 50 μg 、或約 100 μg 之劑量投與。在一些實施例中，RNA 分子或脂質體以約 15 μg 、約 25 μg 、約 38 μg 、約 50 μg 、或約 100 μg 之劑量投與且 PD-1 軸結合拮抗劑(例如，抗 PDL1 抗體)以約 200 或約 1200 mg 之劑量投與。在一些實施例中，PD-1 軸結合拮抗劑及 RNA 疫苗或脂質體在 8 個 21 天週期中投與至個體，其中 PD-1 軸結合拮抗劑為帕博利珠單抗且在第 1-8 週期之第 1 天以約 200 mg 之劑量投與至個體，且其中 RNA 疫苗在第 2 週期之第 1、8、及 15 天及第 3-7 週期之第 1 天以約 25 μg 之劑量投與至個體。

【0027】 在一些態樣中，本文提供一種編碼本文描述之任何 RNA 分子的 DNA 分子。在一些態樣中，本文提供一種 DNA 分子，其在 5'→3' 方向上包含：(1)編碼 5' 未轉譯區(UTR)之多核苷酸序列；(2)編碼分泌信號肽之多核苷酸序列；(3)編碼主要組織相容性複合體(MHC)分子之跨膜及細胞質域之至少一部分的多核苷酸序列；(4)編碼 3'UTR 之多核苷酸序列，該 3'UTR 包含：(a)酶切胺基端增強子(AES) mRNA 之 3' 未轉譯區或其片段；及(b)經粒線體編碼 12S RNA 之非編碼 RNA 或其片段；及(5)編碼 poly(A)序列之多核苷酸序列。

【0028】 在一些實施例中，DNA 分子進一步包含編碼至少一個新表位之多核苷酸序列；其中在 5'→3' 方向上，編碼至少一個新表位之多核苷酸序列係在編碼分泌信號肽之多核苷酸序列(例如，上述(2))與編碼 MHC 分子之跨膜及細胞質域

之至少一部分的多核苷酸序列(例如,上述(3))之間。在一些實施例中,DNA 分子包含編碼至少 2、至少 3、至少 4、至少 5、至少 6、至少 7、至少 8、至少 9、至少 10、至少 11、至少 12、至少 13、至少 14、至少 15、至少 16、至少 17、至少 18、至少 19、或 20 個不同新表位之多核苷酸序列。在一些實施例中,DNA 分子在 5'→3'方向上進一步包含:編碼胺基酸連接子之多核苷酸序列;及編碼新表位之多核苷酸序列;其中編碼胺基酸連接子及新表位之多核苷酸序列形成第一連接子-新表位模組;且其中在 5'→3'方向上,形成第一連接子-新表位模組之多核苷酸序列係在編碼分泌信號肽之多核苷酸序列(例如,上述(2))與編碼 MHC 分子之跨膜及細胞質域之至少一部分的多核苷酸序列(例如,上述(3))之間。在一些實施例中,胺基酸連接子包含序列 GGS GGGGSGG(SEQ ID NO:39)。在一些實施例中,編碼胺基酸連接子之多核苷酸序列包含序列 GGCGGCTCTGGAG GAGGCGGCTCCGGAGGC(SEQ ID NO:38)。在一些實施例中,DNA 分子在 5'→3'方向上進一步包含:至少第二連接子-表位模組,其中至少第二連接子-表位模組包含編碼胺基酸連接子之多核苷酸序列及編碼新表位之多核苷酸序列;其中在 5'→3'方向上,形成第二連接子-新表位模組之多核苷酸序列係在編碼第一連接子-新表位模組之新表位之多核苷酸序列與編碼 MHC 分子之跨膜及細胞質域之至少一部分的多核苷酸序列(例如,上述(3))之間;且其中第一連接子-表位模組之新表位不同於第二連接子-表位模組之新表位。在一些實施例中,DNA 分子包含 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、或 20 個連接子-表位模組,且連接子-表位模組中之各者編碼不同新表位。在一些實施例中,DNA 分子包含 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、或 20 個連接子-表位模組,且 DNA 分子包含編碼至少 2、至少 3、至少 4、至少 5、至少 6、至少 7、至少 8、至少 9、至少 10、至少 11、

至少 12、至少 13、至少 14、至少 15、至少 16、至少 17、至少 18、至少 19、或 20 個不同新表位之多核苷酸。在一些實施例中，DNA 分子進一步包含編碼胺基酸連接子之第二多核苷酸序列，其中編碼胺基酸連接子之第二多核苷酸序列係在編碼 3' 方向最遠側之新表位之多核苷酸序列與編碼 MHC 分子之跨膜及細胞質域之至少一部分的多核苷酸序列(例如，上述(3))之間。在一些實施例中，編碼 5'UTR 之多核苷酸(例如，上述(1))包含序列 TTCTTCTGGTCCCCACAGACT CAGAGAGAACCCGCCACC(SEQ ID NO:24)。在一些實施例中，編碼 5'UTR 之多核苷酸(例如，上述(1))包含序列 GGCGAACTAGTATTCTTCTGGTCCCCACAGACTCAGAGAGAACCCGCCACC(SEQ ID NO:22)。在一些實施例中，分泌信號肽(例如，由以上(2)編碼)包含胺基酸序列 MRVMAPRTLILLLSGALALTETWAGS(SEQ ID NO:27)。在一些實施例中，編碼分泌信號肽之多核苷酸序列(例如，上述(2))包含序列 ATGAGAGTGATGGCCCCCAGAACCTGATCCTGCTGCTGTCTGGCGCCCTGGCCCTGACAGAGACATGGGCGCGGAAGC(SEQ ID NO:26)。在一些實施例中，MHC 分子之跨膜及細胞質域之至少一部分(例如，由以上(3)編碼)包含胺基酸序列 IVGIVAGLAVLAVVVIGAVVATVMCRRKSSGGKGGSYSQAASSDSAQGS DVSLTA(SEQ ID NO:30)。在一些實施例中，編碼 MHC 分子之跨膜及細胞質域之至少一部分的多核苷酸序列(例如，上述(3))包含序列 ATCGTGGGAATTGTGGCAGGACTGGCAGTGCTGGCCGTGGTGGTGATCGGAGCCGTGGTGGCTACCGTGATGTGCAGACGGAAGTCCAGCGGAGGCAAGGGCGGCAGCTACAGCCAGGCCGCCAGCTCTGATAGCGCCCAGGGCAGCGACGTG TCACTGACAGCC(SEQ ID NO:29)。在一些實施例中，編碼 AES mRNA 之 3' 未轉譯區之多核苷酸序列(例如，上述(4a))包含序列 CTGGTACTGCATGCACGCAATGCTAGCTGCCCCCTTTCCCGTCCTGGGTACCCCGAGTCTCCCCCGACCTC

GGGTCCCAGGTATGCTCCCACCTCCACCTGCCCCACTCACCACCTCTGCTA
GTTCCAGACACCTCC(SEQ ID NO:34)。在一些實施例中，編碼經粒線體編碼 1
2S RNA 之非編碼 RNA 之多核苷酸(例如，上述(4b))包含序列 CAAGCACGCAG
CAATGCAGCTCAAAACGCTTAGCCTAGCCACACCCCCACGGGAAACAGCA
GTGATTAACCTTTAGCAATAAACGAAAGTTTAACTAAGCTATACTAACCCCA
GGGTTGGTCAATTTTCGTGCCAGCCACACCG(SEQ ID NO:36)。在一些實施例
中，編碼 3'UTR 之多核苷酸(例如，上述(4))包含序列 CTGGTACTGCATGCACG
CAATGCTAGCTGCCCCCTTTCCCGTCCTGGGTACCCCGAGTCTCCCCCGACC
TCGGGTCCCAGGTATGCTCCCACCTCCACCTGCCCCACTCACCACCTCTGC
TAGTTCCAGACACCTCCCAAGCACGCAGCAATGCAGCTCAAAACGCTTAG
CCTAGCCACACCCCCACGGGAAACAGCAGTGATTAACCTTTAGCAATAAA
CGAAAGTTTAACTAAGCTATACTAACCCAGGGTTGGTCAATTTTCGTGCCA
GCCACACCGAGACCTGGTCCAGAGTCGCTAGCCGCGTCGCT(SEQ ID NO:3
2)。在一些實施例中，poly(A)序列(例如，上述(5))包含 120 個腺嘌呤核苷酸。

【0029】 在一些態樣中，本文提供一種 DNA 分子，其在 5'→3'方向上包含：
多核苷酸序列 GGCGAACTAGTATTCTTCTGGTCCCCACAGACTCAGAGAGA
ACCCGCCACCATGAGAGTGATGGCCCCCAGAACCCTGATCCTGCTGCTGTC
TGGCGCCCTGGCCCTGACAGAGACATGGGCCGGAAGC(SEQ ID NO:40)；及
多核苷酸序列 ATCGTGGGAATTGTGGCAGGACTGGCAGTGCTGGCCGTGGT
GGTGATCGGAGCCGTGGTGGCTACCGTGATGTGCAGACGGAAGTCCAGCG
GAGGCAAGGGCGGCAGCTACAGCCAGGCCGCCAGCTCTGATAGCGCCCA
GGGCAGCGACGTGTCACTGACAGCCTAGTAACTCGAGCTGGTACTGCATG
CACGCAATGCTAGCTGCCCCCTTTCCCGTCCTGGGTACCCCGAGTCTCCCC

GACCTCGGGTCCCAGGTATGCTCCCACCTCCACCTGCCCCACTCACCACCT
 CTGCTAGTTCCAGACACCTCCCAAGCACGCAGCAATGCAGCTCAAAACGC
 TTAGCCTAGCCACACCCCCACGGGAAACAGCAGTGATTAACCTTTAGCAAT
 AAACGAAAGTTTAACTAAGCTATACTAACCCCAGGGTTGGTCAATTTTCGTG
 CCAGCCACACCGAGACCTGGTCCAGAGTCGCTAGCCGCGTCGCT(SEQ ID
 NO:41)。

【0030】 在一些實施例中，DNA 分子進一步包含編碼至少一個新表位之多核苷酸序列；其中編碼至少一個新表位之多核苷酸序列係在序列 SEQ ID NO:40 與 SEQ ID NO:41 之間。在一些實施例中，DNA 分子包含編碼至少 2、至少 3、至少 4、至少 5、至少 6、至少 7、至少 8、至少 9、至少 10、至少 11、至少 12、至少 13、至少 14、至少 15、至少 16、至少 17、至少 18、至少 19、或 20 個不同新表位之多核苷酸序列。在一些實施例中，在 5'→3'方向上，DNA 分子在序列 SEQ ID NO:40 與 SEQ ID NO:41 之間包含：(a)至少第一連接子-新表位模組，其中至少第一連接子-新表位模組包含編碼胺基酸連接子之多核苷酸序列及編碼新表位之多核苷酸序列；及(b)編碼胺基酸連接子之第二多核苷酸序列。在一些實施例中，DNA 分子包含 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、或 20 個連接子-表位模組，且連接子-表位模組中之各者編碼不同新表位。在一些實施例中，DNA 分子包含 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、或 20 個連接子-表位模組，且 DNA 分子包含編碼至少 2、至少 3、至少 4、至少 5、至少 6、至少 7、至少 8、至少 9、至少 10、至少 11、至少 12、至少 13、至少 14、至少 15、至少 16、至少 17、至少 18、至少 19、或 20 個不同新表位之多核苷酸。

【0031】 在一些態樣中，本文提供一種產生 RNA 分子之方法，其包含轉錄任

一以上實施例之 DNA 分子。

【0032】 應瞭解，本文所述之各個實施例的一種、一些或所有特性可經組合以形成本發明之其他實施例。對於熟習此項技術者而言，本發明之此等及其他態樣變得顯而易知。以下實施方式進一步描述本發明之此等及其他實施例。

【圖式簡單說明】

【0033】 本專利或申請文件含有至少一幅彩圖。具有彩色附圖之本專利或專利申請公開案之副本將在請求並支付必要費用之後由專利局提供。

【0034】 **圖 1** 展示 II 期、隨機化、開放標籤研究之研究模式，該研究經設計以評估基於 RNA 之個人化癌症疫苗(R07198457)加上抗 PD1 抗體(帕博利珠單抗)之功效及安全性。在隨機化階段，將患者隨機分組(2:1)至實驗治療(支組 B)或對照治療(支組 A)。IMC=內部監測委員會；LDH=乳酸去氫酶；Q3W=每 3 週；TBD=待判定；ULN=正常值上限。

【0035】 **圖 2** 展示 II 期研究之支組 A(帕博利珠單抗)及安全性運行階段及支組 B(R07198457 加上帕博利珠單抗)之給藥模式。C = 週期；D = 天。

【0036】 **圖 3** 展示示範性 RNA 疫苗(亦即，多新表位 RNA)之一般結構。此圖為 RNA 藥物物質之一般結構之示意圖，該藥物物質具有恆定 5'-帽(β -S-ARCA(D1))、5'-及 3'-未轉譯區(分別為 hAg-Kozak 及 FI)、N-端及 C-端融合標籤(分別為 sec_{2.0} 及 MITD)、及 poly(A)-尾(A120)以及編碼藉由富含 GS 之連接子融合之新表位(neo1 至 10)的患者特異性序列。

【0037】 **圖 4** 為示範性 RNA 疫苗(SEQ ID NO:42)之恆定區之核糖核苷酸序列(5'→3')。前兩個 G 殘基之間之鍵聯為獨特鍵(5'→5')-pp_sp-，如在表 5 中及在圖 5 中對於 5'加帽結構所展示。患者癌症特異性序列之插入位點係在 C131 與 A132 殘基之間(以**粗體文字**標記)。「N」係指編碼一或多個(例如，1-20 個)新表位(藉

由可選連接子隔離)的多核苷酸序列之位置。

【0038】 圖 5 為用於 RNA 恆定區之 5'端處之 5'-加帽結構 β -S-ARCA(D1)($m_2^{7\cdot 2'\cdot O}$ Gpp_spG)。立體 P 中心在「D1」異構體中為 *Rp*-組配的。注意：以紅色展示 β -S-ARCA(D1)與鹼性帽結構 m^7 GpppG 之間之差異；結構單元 m^7 G 之 C2'位置處之-OCH₃ 基團及硫對 β -磷酸鹽處之非橋接氧之取代。由於存在立體 P 中心(加*標記)，硫代磷酸酯帽類似物 β -S-ARCA 以兩種非鏡像異構物形式存在。基於其在逆相高效能液相層析中之溶離順序，此等非鏡像異構物被稱為 01 及 02。

【實施方式】

相關申請案之交叉引用

【0039】 本申請案主張 2019 年 1 月 14 日提交之美國臨時申請案第 62/792,387 號；2019 年 1 月 22 日提交之美國臨時申請案第 62/795,476 號；及 2019 年 8 月 15 日提交之美國臨時申請案第 62/887,410 號之優先權益；其各自全文以引用方式併入本文。

以 ASCII 文本文件提交序列表

【0040】 以下提交之 ASCII 文本文件之內容全文以引用方式併入本文：電腦可讀形式(CRF)之序列表(文件名：146392046940SEQLIST.txt，記錄日期：2020 年 1 月 8 日，大小：41 KB)。

I. 定義

【0041】 在詳細描述本發明之前，應理解本發明不限於特定組成物或生物系統，其當然可以變化。亦應理解，本文使用之術語僅出於描述特定實施例之目的，而不欲為限制性的。

【0042】 除非內容另外明確規定，否則本說明書及隨附申請專利範圍中使用

之單數形式「一(a/an)」及「該/該等(the)」包括複數提及物。因此，例如，提及「一種分子」視情況包括兩種或更多種此類分子之組合，及其類似者。

【0043】 如本文所用之術語「約」係指為此項技術中之熟練技術人員容易知曉的相應值之常見誤差範圍。對「約」本文中之值或參數的提及包括(且描述)本身針對彼值或參數之實施例。

【0044】 應瞭解本文所述之本發明之態樣及實施例包括「包含態樣及實施例」、「由態樣及實施例組成」及/或「基本上由態樣及實施例組成」。

【0045】 術語「PD-1 軸結合拮抗劑」係指如下分子，其抑制 PD-1 軸結合搭配物與其結合搭配物中之一或多者之相互作用，從而去除由 PD-1 信號傳導軸上之信號傳導引起的 T 細胞功能異常，因此修復或提高 T 細胞功能(例如增殖、細胞介素產生、標靶細胞殺滅)。如本文使用，PD-1 軸結合拮抗劑包括 PD-1 結合拮抗劑、PD-L1 結合拮抗劑及 PD-L2 結合拮抗劑。

【0046】 術語「PD-1 結合拮抗劑」係指減少、阻斷、抑制、消除或干擾由 PD-1 與其結合搭配物諸如 PD-L1、PD-L2 中之一或多者之相互作用所產生之信號轉導的分子。在一些實施例中，PD-1 結合拮抗劑為抑制 PD-1 與其結合搭配物中之一或多者之結合的分子。在一特定態樣中，該 PD-1 結合拮抗劑抑制 PD-1 與 PD-L1 及/或 PD-L2 之結合。舉例而言，PD-1 結合拮抗劑包括抗 PD-1 抗體、其抗原結合片段、免疫黏附素、融合蛋白、寡肽及減少、阻斷、抑制、消除或干擾由 PD-1 與 PD-L1 及/或 PD-L2 之相互作用所導致之信號轉導的其他分子。在一個實施例中，PD-1 結合拮抗劑降低藉由或經由 T 淋巴細胞(其經由 PD-1 介導信號傳導)上表現之細胞表面蛋白介導的負共刺激信號，以便使功能異常性 T 細胞具有較低功能異常性(例如增強效應子對抗原識別之反應)。在一些實施例中，該 PD-1 結合拮抗劑為抗 PD-1 抗體。下文提供 PD-1 結合拮抗劑之特定實例。

【0047】 術語「PD-L1 結合拮抗劑」係指減少、阻斷、抑制、消除或干擾由 PD-L1 與其結合搭配物諸如 PD-1、B7-1 中之一或多者之相互作用所產生之信號轉導的分子。在一些實施例中，PD-L1 結合拮抗劑為抑制 PD-L1 與其結合搭配物之結合的分子。在一特定態樣中，該 PD-L1 結合拮抗劑抑制 PD-L1 與 PD-1 及/或 B7-1 之結合。在一些實施例中，PD-L1 結合拮抗劑包括抗 PD-L1 抗體、其抗原結合片段、免疫黏附素、融合蛋白、寡肽及減少、阻斷、抑制、消除或干擾由 PD-L1 與其結合搭配物諸如 PD-1、B7-1 中之一或多者之相互作用所產生之信號轉導的其他分子。在一個實施例中，PD-L1 結合拮抗劑降低藉由或經由在 T 淋巴細胞(其經由 PD-L1 介導信號傳導)上表現之細胞表面蛋白介導的陰性共刺激信號，以便使功能異常性 T 細胞具有較低功能異常性(例如增強效應子對抗原識別之反應)。在一些實施例中，PD-L1 結合拮抗劑為抗 PD-L1 抗體。下文提供 PD-L1 結合拮抗劑之特定實例。

【0048】 術語「PD-L2 結合拮抗劑」係指減少、阻斷、抑制、消除或干擾由 PD-L2 與其結合搭配物諸如 PD-1 中之一或多者之相互作用所產生之信號轉導的分子。在一些實施例中，PD-L2 結合拮抗劑為抑制 PD-L2 與其結合搭配物中之一或多者之結合的分子。在一特定態樣中，PD-L2 結合拮抗劑抑制 PD-L2 與 PD-1 之結合。在一些實施例中，PD-L2 拮抗劑包括抗 PD-L2 抗體、其抗原結合片段、免疫黏附素、融合蛋白、寡肽及減少、阻斷、抑制、消除或干擾由 PD-L2 與其結合搭配物諸如 PD-1 中之一或多者之相互作用所產生之信號轉導的其他分子。在一個實施例中，PD-L2 結合拮抗劑降低藉由或經由 T 淋巴細胞(其經由 PD-L2 介導信號傳導)上表現之細胞表面蛋白介導的負共刺激信號，以便使功能異常性 T 細胞具有較低功能異常性(例如增強效應子對抗原識別之反應)。在一些實施例中，PD-L2 結合拮抗劑為免疫黏附素。

【0049】 「持續反應」係指停止治療後對減少腫瘤生長之持續作用。例如，與投與階段開始時的大小相比，腫瘤大小可保持相同或更小。在一些實施例中，持續反應之持續時間至少與治療持續時間相同，為治療持續時間長度之 1.5X、2.0X、2.5X、或 3.0X。

【0050】 術語「醫藥調配物」係指以下製劑，其為使活性成分之生物活性有效之形式，且不含對調配物所將投與之受試者有不可接受毒性之其他組分。此類調配物為無菌的。「醫藥學上可接受之」賦形劑(媒劑、添加劑)為可合理地向受試哺乳動物投與以提供有效劑量之所用活性成分的物質。

【0051】 如本文所用，術語「治療」係指經設計以改變在臨床病理過程期間所治療之個體或細胞之自然過程的臨床幹預。所要治療作用包括降低疾病進展率、改善或減輕疾病狀態、及緩解或改良預後。例如，若減輕或消除了與癌症相關之一或多種症狀，包括但不限於減少癌細胞之增殖(或破壞癌細胞)、減少由疾病引起之症狀、提高罹患該疾病之患者的生活質量、減少治療該疾病所需之其他藥物的劑量、及/或延長個體之生存期，則成功「治療」了個體。

【0052】 如本文所用，「延遲疾病之進展」意指推遲、阻礙、減緩、延緩、穩定及/或推遲疾病(諸如癌症)之發展。此延遲可為不同時間長度，其取決於病史及/或所治療之個體。如熟習此項技術者顯而易知，足夠或顯著延遲可事實上涵蓋預防，只要個體未發展該疾病。例如，可延遲晚期階段癌症，諸如轉移之發展。

【0053】 「有效量」是實現特定病症之可量測改良或預防所需之至少最小量。有效量在本文中可根據如下因素改變，諸如患者之疾病狀態、年齡、性別及重量，及抗體在個體中引發所需反應之能力。有效量亦為治療之有益作用超過治療之任何毒性或有害作用的量。對於預防用途，有益或所要結果包括諸如

以下項之結果：消除或降低風險、減輕嚴重程度、或延遲疾病發作，包括疾病之生物化學、組織學、及/或行為症狀、其併發症、及在疾病發展期間呈現之中間病理學表型。對於治療用途，有益或所要結果包括諸如以下項之臨床結果：減少由疾病產生之一或多種症狀、提高罹患疾病者之生活品質、減少治療疾病所需之其他藥物的劑量、諸如經由靶向提高另一種藥物之作用、延遲疾病之進展、及/或延長生存期。在癌症或腫瘤之情形下，有效量之藥物可具有之作用為減少癌細胞之數目；降低腫瘤大小；抑制(亦即在某種程度上減慢且較佳地停止)癌細胞浸潤至外周器官中；抑制(亦即在某種程度上減慢且較佳地停止)腫瘤轉移；在某種程度上抑制腫瘤生長；及/或在某種程度上減輕與癌症相關之一或多種症狀。有效量可在一或多次投與中投與。出於本發明之目的，藥物、化合物、或醫藥組成物之有效量為足以直接或間接地實現預防性或治療性治療之量。如臨床背景中應瞭解，藥物、化合物、或醫藥組成物之有效量可與或不與另一藥物、化合物、或醫藥組成物聯合來實現。因此，「有效量」可在投與一或多種治療劑的情況下考慮，且單一劑若與一或多種其他藥劑聯合可實現或實現所要結果，則可被視為以有效量給予。

【0054】 如本文使用，「與...聯合」或「與...組合」係指將一種治療模式連同另一種治療模式一起投與。因此，「與...聯合」或「與...組合」係指在向個體投與一種治療模式之前、期間、或之後投與另一種治療模式。

【0055】 「病症」為將受益於治療之任何病狀，其包括但不限於慢性及急性病症或疾病，包括使哺乳動物易患所討論病症之彼等病理學病狀。

【0056】 術語「細胞增殖性病症」及「增殖性病症」係指與某一程度之異常細胞增殖相關的病症。在一個實施例中，細胞增殖性病症為癌症。在一個實施例中，細胞增殖性病症為腫瘤。

【0057】 如本文所用，「腫瘤」係指無論惡性抑或良性，所有贅瘤細胞生長及增殖，及所有癌前及癌性細胞及組織。如本文所提及，術語「癌症」、「癌」、「細胞增殖性病征」、「增殖性病征」及「腫瘤」不相互排斥。

【0058】 出於治療目的，「受試者」或「個體」係指歸類為哺乳動物之任何動物，包括人類、家畜及農畜、及動物園動物、體育動物、或寵物動物，諸如犬、馬、貓、牛等。較佳地，哺乳動物為人類。

【0059】 術語「抗體」在本文中以最廣泛含義使用且具體地包括單株抗體(包括全長單株抗體)、多株抗體、多特異性抗體(例如，雙特異性抗體)、及抗體片段，只要其展現所要生物活性即可。

【0060】 「經分離」抗體為已經鑑別且與其天然環境之組分分離及/或回收的抗體。其天然環境之污染物組分為會干擾抗體之研究、診斷或治療用途的物質，且可包括酶、激素及其他蛋白或非蛋白溶質。在一些實施例中，抗體經純化至(1)如藉由例如勞瑞法(Lowry method)所判定，抗體之大於 95 重量%，且在一些實施例中，純化至大於 99 重量%；(2)足以藉由使用例如轉杯式測序儀獲得 N 端或內部胺基酸序列之至少 15 個殘基的程度，或(3)藉由 SDS-PAGE 在還原或非還原條件下使用考馬斯藍(Coomassie blue)或銀染色之均一性。經分離抗體包括原位處於重組細胞內之抗體，因為抗體天然環境之至少一種組分將不存在。然而通常，經分離抗體藉由至少一個純化步驟來製備。

【0061】 「天然抗體」通常為具有約 150,000 道爾頓之雜四聚體醣蛋白，其由兩條相同的輕(L)鏈及兩條相同的重(H)鏈構成。各輕鏈由一個共價二硫鍵連接至重鏈，而不同免疫球蛋白同型之重鏈之間二硫鍵之數目變化。各重鏈及輕鏈亦具有規則隔開之鏈內二硫橋。各重鏈在一端具有可變域(VH)，接著為多個恆定域。各輕鏈在一端具有可變域(VL)且在其另一端具有恆定域；該輕鏈之恆定域

與該重鏈之第一恆定域對準，且該輕鏈可變域與該重鏈之可變域對準。據信特定胺基酸殘基在輕鏈與重鏈可變域之間形成界面。

【0062】 術語「恆定域」係指免疫球蛋白分子中之如下部分，其相對於免疫球蛋白中含有抗原結合位點之另一部分(即可變域)具有更保守之胺基酸序列。恆定域含有重鏈之 CH1、CH2、及 CH3 域(統稱為 CH)及輕鏈之 CHL (或 CL)域。

【0063】 抗體之「可變區」或「可變域」係指抗體重鏈或輕鏈之胺基端結構域。重鏈之可變結構域可稱為「VH」。輕鏈之可變結構域可稱為「VL」。此等域通常係抗體中變異最大之部分且含有抗原結合位點。

【0064】 術語「可變」係指如下實情，即抗體之間可變域之某些部分的序列廣泛不同，且用於各特定抗體對其特定抗原之結合及特異性中。然而，可變性並非在抗體可變域中均勻分佈。其集中於輕鏈及重鏈可變域兩者中三個稱為高變區(HVR)之區段中。可變域之更高度保守部分被稱為構架區(FR)。天然重鏈及輕鏈之可變域各自包含四個 FR 區，其大部分採用 β -折疊組態，由三個 HVR 連接，形成環連接，且在一些情況下形成 β -折疊結構之一部分。各鏈中之 HVR 由 FR 區緊密保持在一起且與另一鏈之 HVR 一起促使形成抗體之抗原結合位點(參見 Kabat 等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版, National Institute of Health, Bethesda, Md.(1991))。恆定域未直接參與抗體與抗原之結合，但展現多種效應子功能，諸如使抗體參與抗體依賴性細胞毒性。

【0065】 任何哺乳動物物種之抗體(免疫球蛋白)之「輕鏈」均可基於其恆定域之胺基酸序列來歸為稱為卡帕(「 κ 」)及拉姆達(「 λ 」)之兩種明顯不同類型之一。

【0066】 如本文所用，術語 IgG「同型」或「亞類」意謂藉由恆定區之化學及抗原特徵來定義之免疫球蛋白之任何亞類。

【0067】 視抗體(免疫球蛋白)重鏈恆定域之胺基酸序列而定，可將其歸為不同

類別。存在五種主要免疫球蛋白類別：IgA、IgD、IgE、IgG 及 IgM，且此等免疫球蛋白中之若干種可進一步分成亞類(同型)，例如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 及 IgA2。對應於不同類別之免疫球蛋白的重鏈恆定域分別稱為 α 、 γ 、 ϵ 、 γ 、及 μ 。不同類別之免疫球蛋白之亞基結構及三維構型為熟知的且總體上描述於例如 Abbas 等人 Cellular and Mol.Immunology, 第 4 版 (W.B.Saunders, Co., 2000)。抗體可為較大融合分子之一部分，該分子藉由抗體與一或多種其他蛋白或肽之共價或非共價締合形成。

【0068】 術語「全長抗體」、「完整抗體(intact antibody)」及「完整抗體(whole antibody)」在本文中可互換用於指基本上完整形式之抗體，而非如下定義之抗體片段。該等術語尤其係指具有含有 Fc 區之重鏈的抗體。

【0069】 出於本文目的，「裸抗體」為不與細胞毒性部分或放射性標記偶聯之抗體。

【0070】 「抗體片段」包含完整抗體之一部分，較佳地包含其抗原結合區。在一些實施例中，本文所述之抗體片段為抗原結合片段。抗體片段之實例包括 Fab、Fab'、F(ab')₂ 及 Fv 片段；雙功能抗體；線性抗體；單鏈抗體分子；及由抗體片段形成之多特異性抗體。

【0071】 抗體之木瓜酶消化產生兩個相同的抗原結合片段，稱為「Fab」片段，其各自具有單個抗原結合位點；及殘餘「Fc」片段，其名稱反映其容易結晶之能力。胃蛋白酶處理產生具有兩個抗原組合位點且仍能夠交聯抗原之 F(ab')₂ 片段。

【0072】 「Fv」為含有完整抗原結合位點之最小抗體片段。在一個實施例中，雙鏈 Fv 物質由一個重鏈可變域及一個輕鏈可變域緊密、非共價締合之二聚體組成。在單鏈 Fv (scFv)物質中，一個重鏈可變域及一個輕鏈可變域可藉由可撓性

肽連接子共價連接，使得輕鏈及重鏈可以類似於雙鏈 Fv 物質中之「二聚體」結構締合。在此組態中，各可變域之三個 HVR 相互作用以在 VH-VL 二聚體之表面上界定抗原結合位點。總之，六個 HVR 對抗體賦予抗原結合特異性。然而，即使單一可變域(或僅包含三個對抗原有特異性之 HVR 的 Fv 之一半)具有識別並結合抗原之能力，但是親和力低於整個結合位點。

【0073】 Fab 片段含有重鏈可變域及輕鏈可變域，且亦含有輕鏈恆定域及第一重鏈恆定域(CH1)。Fab'片段與 Fab 片段之不同之處在於在重鏈 CH1 域之羧基端處添加數個殘基，包括來自抗體鉸鏈區之一或多個半胱胺酸。Fab'-SH 在本文中為恆定域之半胱胺酸殘基具有遊離硫醇基之 Fab'的名稱。F(ab')₂ 抗體片段最初以 Fab'片段對之形式產生，該等片段之間具有鉸鏈半胱胺酸。亦已知抗體片段之其他化學偶合。

【0074】 「單鏈 Fv」或「scFv」抗體片段包含抗體之 VH 及 VL 域，其中此等域存在於單一多肽鏈中。一般而言，scFv 多肽進一步在 VH 與 VL 域之間包含多肽連接子，這使得 scFv 能夠形成抗原結合所需之結構。關於 scFv 之評述，參見 Pluckthün, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, 第 113 卷, Rosenberg 及 Moore 編, (Springer-Verlag, New York, 1994), 第 269-315 頁。

【0075】 術語「雙功能抗體」係指具有兩個抗原結合位點之抗體片段，該等片段包含在同一多肽鏈中連接於輕鏈可變域(VL)之重鏈可變域(VH)(VH-VL)。藉由使用過短而使得同一鏈上之兩個域之間不能配對的连接子，迫使該等域與另一鏈之互補域配對且產生兩個抗原結合位點。雙功能抗體可為二價或具有雙特異性。雙功能抗體更充分地描述於以下文獻中，例如 EP 404,097；WO 1993/01161；Hudson 等人, Nat. Med.9:129-134 (2003)；及 Hollinger 等人, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:6444-6448 (1993)。三功能抗體及四功能抗體亦描述於

Hudson 等人, Nat. Med.9:129-134 (2003)。

【0076】 如本文所用，術語「單株抗體」係指獲自實質上均質抗體之群體的抗體，例如構成該群體之個別抗體除可以微量存在之可能性突變例如天然存在之突變以外均為一致的。因此，修飾語「單株」指示該抗體並非分立抗體之混合物的之特徵。在某些實施例中，此種單株抗體通常包括包含結合標靶之多肽序列之抗體，其中標靶結合多肽序列藉由如下方法獲得，該方法包括自複數個多肽序列中選擇單一標靶結合多肽序列。例如，選擇方法可為自複數個純系中選擇獨特純系，該複數個純系諸如融合瘤純系、噬菌體純系、或重組 DNA 純系之庫。應瞭解，可進一步改變所選標靶結合序列，例如以改良對標靶之親和力、使標靶結合序列人類化、改良其在細胞培養物中之產生、降低其在活體內之免疫原性、產生多特異性抗體等，且包含經改變之標靶結合序列的抗體亦為本發明之單株抗體。與通常包括針對不同決定基(抗原決定基)之不同抗體的多株抗體製劑相比，單株抗體製劑之各單株抗體係針對抗原上之單一決定基。除其特異性外，單株抗體製劑之優點在於其通常不會經其他免疫球蛋白污染。

【0077】 修飾語「單株」表明抗體為自基本上均一之抗體群體獲得之特徵，且不應視為要求藉由任何特定方法產生抗體。例如，欲根據本發明使用之單株抗體可藉由各種技術來製造，包括例如融合瘤方法(例如 Kohler 及 Milstein, Nature, 256:495-97 (1975)；Hongo 等人, Hybridoma, 14 (3):253-260 (1995), Harlow 等人, Antibodies:A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 第 2 版 1988)；Hammerling 等人, in:Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981))、重組 DNA 方法(參見例如美國專利第 4,816,567 號)、噬菌體展示技術(參見例如 Clackson 等人, Nature, 352:624-628 (1991)；Marks 等人, J. Mol.Biol.222:581-597 (1992)；Sidhu 等人, J. Mol.Biol.338(2):299-310

(2004)；Lee 等人, J. Mol.Biol.340(5):1073-1093 (2004)；Fellouse, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 101(34):12467-12472 (2004)；及 Lee 等人, J. Immunol.Methods 284(1-2):119-132 (2004)，以及在具有人類免疫球蛋白基因座或編碼人類免疫球蛋白序列之基因中之部分或全部的動物中產生人類或人類樣抗體的技術(參見例如 WO 1998/24893；WO 1996/34096；WO 1996/33735；WO 1991/10741；Jakobovits 等人, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:2551 (1993)；Jakobovits 等人, Nature 362:255-258 (1993)；Bruggemann 等人, Year in Immunol.7:33 (1993)；美國專利第 5,545,807 號；第 5,545,806 號；第 5,569,825 號；第 5,625,126 號；第 5,633,425 號；及第 5,661,016 號；Marks 等人, Bio/Technology 10:779-783 (1992)；Lonberg 等人, Nature 368:856-859 (1994)；Morrison, Nature 368:812-813 (1994)；Fishwild 等人, Nature Biotechnol.14:845-851 (1996)；Neuberger, Nature Biotechnol.14:826 (1996)；及 Lonberg 及 Huszar, Intern.Rev. Immunol.13:65-93 (1995)。

【0078】 單株抗體在本文中尤其包括「嵌合」抗體，其中重鏈及/或輕鏈之一部分與來源於特定物種或屬於特定抗體類別或亞類之抗體中的相應序列一致或同源，而該(等)鏈之剩餘部分與來源於另一物種或屬於另一抗體類別或亞類之抗體中的相應序列一致或同源，以及該等抗體之片段，只要其展現所要生物活性即可(參見例如美國專利第 4,816,567 號；及 Morrison 等人, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81:6851-6855 (1984))。嵌合抗體包括 PRIMATIZED®抗體，其中抗體之抗原結合區來源於藉由例如用所關注之抗原對獼猴進行免疫接種所產生的抗體。

【0079】 「人類化」形式之非人類(例如，鼠類)抗體係含有來源於非人類免疫球蛋白之最小序列的嵌合抗體。在一個實施例中，人類化抗體為人類免疫球蛋白(受者抗體)，其中來自接受者之 HVR 的殘基經來自非人類物種(供者抗體)諸如

小鼠、大鼠、兔、或具有所要特異性、親和力、及/或能力之非人類靈長類之 HVR 的殘基置換。在一些情況下，人類免疫球蛋白之 FR 殘基經相應非人類殘基置換。此外，人類化抗體可包含受者抗體或供者抗體中未發現之殘基。可進行此等修飾以進一步改進抗體效能。一般而言，人類化抗體將包含至少一個且通常兩個可變域之實質上全部，其中高變環之全部或實質上全部對應於非人類免疫球蛋白之高變環，且 FR 之全部或實質上全部為人類免疫球蛋白序列之 FR。人類化抗體視情況亦將包含免疫球蛋白恆定區(Fc)之至少一部分，通常為人免疫球蛋白之至少一部分。關於進一步細節，參見例如 Jones 等人, *Nature* 321:522-525 (1986)；Riechmann 等人, *Nature* 332:323-329 (1988)；及 Presta, *Curr. Op.Struct.Biol.*2:593-596 (1992)。亦參見例如 Vaswani 及 Hamilton, *Ann.Allergy, Asthma & Immunol.*1:105-115 (1998)；Harris, *Biochem.Soc.Transactions* 23:1035-1038 (1995)；Hurle and Gross, *Curr.Op.Biotech.*5:428-433 (1994)；及美國專利第 6,982,321 號及第 7,087,409 號。

【0080】 「人類抗體」為如下抗體，其胺基酸序列對應於人類所產生抗體之胺基酸序列，及/或使用如本文所揭示之用於製備人類抗體之任何技術製備。人類抗體之此定義尤其排除包含非人類抗原結合殘基之人類化抗體。人類抗體可使用此項技術中已知之多種技術，包括噬菌體呈現文庫產生。Hoogenboom 及 Winter, *J. Mol.Biol.*, 227:381 (1991)；Marks 等人, *J. Mol.Biol.*, 222:581 (1991)。Cole 等人, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, 第 77 頁(1985)；Boerner 等人, *J. Immunol.*, 147(1):86-95 (1991)中所述之方法亦可用於製備人類單株抗體。亦參見 van Dijk 及 van de Winkel, *Curr.Opin.Pharmacol.*, 5:368-74 (2001)。人類抗體可藉由向轉殖基因動物投與抗原來製備，該轉殖基因動物已經修飾以回應於抗原攻擊而產生該等抗體，但其內源基因座已失能，例如經免疫之異種

小鼠(關於 XENOMOUSE™ 技術，參見例如美國專利第 6,075,181 號及第 6,150,584 號)。關於經由人類 B 細胞融合瘤技術產生之人類抗體，亦參見例如 Li 等人 Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 103:3557-3562 (2006)。

【0081】 「物種依賴性抗體」為如下抗體，其對來自第一哺乳動物物種之抗原的結合親和力強於其對該抗原之來自第二哺乳動物物種之同源物的結合親和力。通常，物種依賴性抗體與人類抗原「特異性結合」(例如結合親和力(Kd)值不大於約 1×10^{-7} M，較佳不大於約 1×10^{-8} M，且較佳不大於約 1×10^{-9} M)，但對該抗原之來自第二非人類哺乳動物物種之同源物的結合親和力比其對該人類抗原之結合親和力弱至少約 50 倍、或至少約 500 倍、或至少約 1000 倍。物種依賴性抗體可為如上定義之抗體之各種類型中的任一種，但較佳為人類化或人類抗體。

【0082】 當在本文中使用时，術語「高變區」、「HVR」或「HV」係指抗體可變域中序列高變且/或形成結構限定之環的區域。一般而言，抗體包含六個 HVR：三個在 VH 中(H1、H2、H3)，且三個在 VL 中(L1、L2、L3)。在天然抗體中，H3 及 L3 在六個 HVR 中展示最大多樣性，且據信 H3 尤其在賦予抗體優良特異性方面起獨特作用。參見，例如 Xu 等人, Immunity 13:37-45 (2000); Johnson 及 Wu, in Methods in Molecular Biology 248:1-25 (Lo 編, Human Press, Totowa, N.J., 2003)。實際上，僅由重鏈組成的天然存在之駱駝抗體在不存在輕鏈之情況下係具有功能性且穩定的。參見例如 Hamers-Casterman 等人, Nature 363:446-448 (1993); Sheriff 等人, Nature Struct.Biol.3:733-736 (1996)。

【0083】 多種 HVR 描繪可供使用且涵蓋於本文中。Kabat 互補決定區(CDR)係基於序列變異性且最常使用(Kabat 等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版 Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda,

Md.(1991))。替代地，Chothia 提及結構環之位置(Chothia 及 Lesk *J. Mol.Biol.*196:901-917 (1987))。AbM HVR 代表 Kabat HVR 與 Chothia 結構環之間的平衡(compromise)，且由 Oxford Molecular 之 AbM 抗體建模軟體使用。「接觸型(contact)」HVR 係基於可用複雜晶體結構之分析。來自此等 HVR 中各者之殘基如下所述。

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

【0084】 HVR 可包含如下「經延長 HVR」：VL 中之 24-36 或 24-34(L1)、46-56 或 50-56(L2)及 89-97 或 89-96(L3)及 VH 中之 26-35(H1)、50-65 或 49-65(H2)及 93-102、94-102、或 95-102(H3)。該等定義中之各者之可變域殘基係根據 Kabat 等人(出處同上)進行編號。

【0085】 HVR 可包含如下「經延長 HVR」：VL 中之 24-36 或 24-34(L1)、46-56 或 50-56(L2)及 89-97 或 89-96(L3)及 VH 中之 26-35(H1)、50-65 或 49-65(H2)及 93-102、94-102、或 95-102(H3)。該等定義中之各者之可變域殘基係根據 Kabat 等人(出處同上)進行編號。

【0086】 「構架」或「FR」殘基為除如本文所定義之 HVR 殘基以外的彼等可變域殘基。

【0087】 術語「如 Kabat 中之可變域殘基編號」或「如 Kabat 中之胺基酸位置編號」及其變化形式係指 Kabat 等人(出處同上)中用於抗體編譯之重鏈可變域或輕鏈可變域的編號系統。使用此編號系統，實際線性胺基酸序列可含有較少胺基酸或其他胺基酸，這對應於可變域之 FR 或 HVR 的縮短或插入。舉例而言，重鏈可變域可在 H2 之殘基 52 之後包括單一胺基酸插入(根據 Kabat 之殘基 52a)，且在重鏈 FR 殘基 82 之後包括經插入殘基(例如根據 Kabat 之殘基 82a、82b 及 82c 等)。可藉由在抗體序列中與「標準」Kabat 編號序列具有同源性之區域處進行比對來判定給定抗體中殘基之 Kabat 編號。

【0088】 在提及可變域中之殘基(大致為輕鏈之殘基 1-107 及重鏈之殘基 1-113)時，通常使用 Kabat 編號系統(例如，Kabat 等人，Sequences of Immunological Interest. 第 5 版 Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md.(1991))。在提及免疫球蛋白重鏈恆定區中之殘基時，通常使用「EU 編號系統」或「EU 索引」(例如，在 Kabat 等人(出處同上)中報告之 EU 索引)。「如 Kabat 中之 EU 索引」係指人類 IgG1 EU 抗體之殘基編號。

【0089】 表述「線性抗體」係指在 Zapata 等人(1995 Protein Eng, 8(10):1057-1062)中描述之抗體。簡言之，此等抗體包含一對串聯 Fd 區段(VH-CH1-VH-CH1)，其與互補輕鏈多肽一起形成一對抗原結合區。線性抗體可為雙特異性或單特異性的。

【0090】 如本文所用，術語「結合」、「特異性結合」或「對...具有特異性」係指可量測且可再現之相互作用，諸如標靶與抗體之間的結合，其在包括生物分子之異質分子群存在下判定標靶之存在。例如，與標靶(其可為抗原決定基)結合或特異性結合之抗體為與其與其他標靶結合相比，與該標靶結合的親和力更大、親合力更大、更容易、及/或持續時間更長的抗體。在一個實施例中，抗

體與不相關標靶之結合程度小於抗體與標靶結合之約 10%，例如藉由放射免疫檢定(RIA)所量測。在某些實施例中，特異性結合至標靶之抗體之解離常數(Kd) $\leq$ 1 μ M、 $\leq$ 100 nM、 $\leq$ 10 nM、 $\leq$ 1 nM、或 $\leq$ 0.1 nM。在某些實施例中，抗體特異性結合至蛋白上的在來自不同物種之蛋白之間保守的抗原決定基。在另一實施例中，特異性結合可包括但不需要排他性結合。

【0091】 如本文所用，術語「樣品」係指獲自或來源於所關注受試者及/或個體之組成物，其含有欲例如基於物理、生物化學、化學及/或生理學特徵進行表徵及/或鑑別之細胞及/或其他分子實體。例如，片語「疾病樣品」及其變化形式係指獲自所關注受試者之任何樣品，該樣品應為預期或已知含有欲表徵之細胞及/或分子實體。樣品包括但不限於原代或經培養細胞或細胞株、細胞上清液、細胞溶解產物、血小板、血清、血漿、玻璃狀液、淋巴液、滑液、濾泡液、精液、羊水、乳液、全血、血源性細胞、尿液、腦脊髓液、唾液、痰、眼淚、汗水、黏液、腫瘤溶解產物及組織培養基、組織提取物諸如均質化組織、腫瘤組織、細胞提取物及其組合。在一些實施例中，樣品為獲自個體之癌症之樣品(例如，腫瘤樣品)，其包含腫瘤細胞及視情況腫瘤浸潤免疫細胞。例如，樣品可為包埋於石蠟塊中或包括新鮮切割的未連續染色之切片的腫瘤標本。在一些實施例中，樣品來自生檢體且包括 50 或更多個活腫瘤細胞(例如，來自空芯針生檢體且視情況包埋於石蠟塊中；切除、切開、鑽取、或鉗夾生檢體；或腫瘤組織切除)。

【0092】 「組織樣品」或「細胞樣品」意謂獲自受試者或個體之組織的相似細胞之集合。組織或細胞樣品之來源可為如來自新鮮、冷凍、及/或防腐器官、組織樣品、生檢體、及/或吸出物之固體組織；血液或任何血液成分，諸如血漿；體液，諸如腦脊髓液、羊水、腹膜液、或間隙液；來自受試者妊娠或發育之任

何時間之細胞。組織樣品亦可為原代或經培養細胞或細胞株。視情況，組織或細胞樣品獲自疾病組織/器官。組織樣品可含有在自然界中未與該組織天然地混合之化合物，諸如防腐劑、抗凝血劑、緩衝液、固定劑、營養物、抗生素、或其類似物。

【0093】 如本文所用，「參考樣品」、「參考細胞」、「參考組織」、「對照樣品」、「對照細胞」或「對照組織」係指出於比較目的所使用之樣品、細胞、組織、標準或水準。在一個實施例中，參考樣品、參考細胞、參考組織、對照樣品、對照細胞、或對照組織獲自同一受試者或個體之身體之健康及/或非患病部分(例如，組織或細胞)。例如，與患病細胞或組織相鄰之健康及/或非患病細胞或組織(例如與腫瘤相鄰之細胞或組織)。在另一實施例中，參考樣品獲自同一受試者或個體之身體的未經治療組織及/或細胞。在另一實施例中，參考樣品、參考細胞、參考組織、對照樣品、對照細胞、或對照組織獲自不為該受試者或個體之個體的身體之健康及/或非患病部分(例如，組織或細胞)。在甚至另一實施例中，參考樣品、參考細胞、參考組織、對照樣品、對照細胞、或對照組織獲自不為該受試者或個體之個體的身體之未經治療組織及/或細胞。

【0094】 患者對以藥物治療之「有效反應」或患者對以藥物治療之「反應性」及類似措辭係指向具有疾病或病症諸如癌症之風險或罹患該疾病或病症諸如癌症之患者賦予的臨床或治療益處。在一個實施例中，此類益處包括以下項中之任一或多者：延長生存期(包括總生存期及無進展生存期)；產生客觀反應(包括完全反應或部分反應)；或改良癌症之病徵或症狀。

【0095】 對治療「無有效反應」之患者係指無以下項中任一者之患者：延長生存期(包括總生存期及無進展生存期)；產生客觀反應(包括完全反應或部分反應)；或改良癌症之病徵或症狀。

【0096】 「功能性 Fc 區」具有天然序列 Fc 區之「效應子功能」。示範性「效應子功能」包括 C1q 結合；CDC；Fc 受體結合；ADCC；吞噬作用；細胞表面受體(諸如 B 細胞受體；BCR)之下調等。此等效應子功能通常需要 Fc 區與結合域(例如，抗體可變域)組合且可使用如例如本文中之定義所揭示之各種檢定來評估。

【0097】 「具有人類效應細胞」之癌症或生物樣品為在診斷測試中具有存在於樣品中之人類效應細胞(例如浸潤性人類效應細胞)之癌症或生物樣品。

【0098】 「具有 FcR 表現細胞」之癌症或生物樣品為在診斷測試中具有存在於樣品中之 FcR 表現(例如浸潤性 FcR 表現細胞)之癌症或生物樣品。在一些實施例中，FcR 為 FcγR。在一些實施例中，FcR 為活化性 FcγR。

II. 概述

【0099】 本文提供一種用於治療個體之癌症或延遲其進展之方法，其包含向個體投與有效量之 PD-1 軸結合拮抗劑(例如，抗 PD-1 或抗 PD-L1 抗體)及 RNA 疫苗。在一些實施例中，RNA 疫苗包含一或多種多核苷酸，該一或多種多核苷酸編碼由癌症中，*例如*，獲自個體之腫瘤標本中存在之癌症特異性體細胞突變所產生之一或多個新表位。在一些實施例中，個體為人類。

【0100】 在一些實施例中，本文提供一種治療個體之癌症或延遲其進展之方法，其包含向個體投與有效量之 PD-1 軸結合拮抗劑(例如，抗 PD-1 或抗 PD-L1 抗體)及 RNA 疫苗，其中 RNA 疫苗包含一或多種多核苷酸，該一或多種多核苷酸編碼基於獲自個體之腫瘤樣品中存在之體細胞突變來鑑別之一或多個新表位。在一些實施例中，本文提供一種治療個體之癌症或延遲其進展之方法，其包含向個體投與有效量之 PD-1 軸結合拮抗劑(例如，抗 PD-1 或抗 PD-L1 抗體)及 RNA 疫苗，其中 RNA 疫苗包含編碼對應於獲自個體腫瘤樣品中存在之體細

胞突變之一或多個新表位的一或多種多核苷酸。

【0101】 在一些實施例中，與包含在不存在 RNA 疫苗的情況下投與 PD-1 軸結合拮抗劑之治療相比，該治療延長個體之無進展生存期(PFS)及/或總體生存期(OS)。在一些實施例中，與包含在不存在 RNA 疫苗的情況下投與 PD-1 軸結合拮抗劑之治療相比，該治療改良總體反應率(ORR)。在一些實施例中，ORR 係指具有完全反應(CR)或部分反應(PR)之患者之比例。在一些實施例中，如與包含在不存在 RNA 疫苗的情況下投與 PD-1 軸結合拮抗劑之治療相比，該治療延長個體之反應持續時間(DOR)。在一些實施例中，與包含在不存在 RNA 疫苗的情況下投與 PD-1 軸結合拮抗劑之治療相比，該治療改良個體之健康相關生活品質(HRQoL)評分。

【0102】 在一些實施例中，PD-1 軸結合拮抗劑以 21 天或 3 週之時間間隔投與至個體。在一些實施例中，PD-1 軸結合拮抗劑為抗 PD-1 抗體(例如，帕博利珠單抗)，其以 21 天或 3 週之時間間隔，例如以約 200 mg 之劑量投與至個體。在一些實施例中，PD-1 軸結合拮抗劑為抗 PD-L1 抗體(例如，阿特珠單抗)，其以 21 天或 3 週之時間間隔，例如以約 1200 mg 之劑量投與至個體。

【0103】 在一些實施例中，RNA 疫苗以 21 天或 3 週之時間間隔投與至個體。

【0104】 在一些實施例中，PD-1 軸結合拮抗劑及 RNA 疫苗在 8 個 21 天週期中投與至個體。在一些實施例中，RNA 疫苗在第 2 週期之第 1、8、及 15 天及第 3-7 週期之第 1 天投與至個體。在一些實施例中，PD-1 軸結合拮抗劑在第 1-8 週期之第 1 天投與至個體。在一些實施例中，RNA 疫苗在第 2 週期之第 1、8、及 15 天及第 3-7 週期之第 1 天投與至個體，且 PD-1 軸結合拮抗劑在第 1-8 週期之第 1 天投與至個體。

【0105】 在一些實施例中，PD-1 軸結合拮抗劑及 RNA 疫苗在第 8 週期之後

進一步投與至個體。在一些實施例中，PD-1 軸結合拮抗劑及 RNA 疫苗在 17 個額外 21 天週期中進一步投與至個體，其中 PD-1 軸結合拮抗劑在第 13-29 週期之第 1 天投與至個體，且/或其中 RNA 疫苗在第 13、21、及 29 週期之第 1 天投與至個體。

【0106】 在某些實施例中，PD-1 軸結合拮抗劑及 RNA 疫苗在 8 個 21 天週期中投與至個體，其中 PD-1 軸結合拮抗劑為帕博利珠單抗且在第 1-8 週期之第 1 天以約 200 mg 之劑量投與至個體，且其中 RNA 疫苗在第 2 週期之第 1、8、及 15 天及第 3-7 週期之第 1 天以約 25 µg 之劑量投與至個體。在某些實施例中，PD-L1 軸結合拮抗劑及 RNA 疫苗在 8 個 21 天週期中投與至個體，其中 PD-L1 軸結合拮抗劑為阿特珠單抗(atezolizumab)且在第 1-8 週期之第 1 天以約 1200 mg 之劑量投與至個體，且其中 RNA 疫苗在第 2 週期之第 1、8、及 15 天及第 3-7 週期之第 1 天以約 25 µg 之劑量投與至個體。在一些實施例中，RNA 疫苗在第 2 週期之第 1 天以約 25 µg、在第 2 週期之第 8 天以約 25 µg、在第 2 週期之第 15 天以約 25 µg、且在第 3-7 週期中之各者之第 1 天以約 25 µg 之劑量投與至個體(亦即，在第 2 週期期間之 3 個劑量內，將總共約 75 µg 之疫苗投與至個體)。在一些實施例中，在投與 RNA 疫苗之第一週期期間之 3 個劑量內，將總共約 75 µg 之疫苗投與至個體。在一些實施例中，PCV 例如以脂質體調配物形式，以 15 µg、25 µg、38 µg、50 µg、或 100 µg 之劑量來靜脈內投與。在一些實施例中，每劑量遞送 15 µg、25 µg、38 µg、50 µg、或 100 µg 之 RNA(亦即，劑量重量反映所投與 RNA 之重量，而非所投與調配物或脂質複合體之總重量)。

III. RNA 疫苗

【0107】 本揭露之某些態樣係關於個人化癌症疫苗(PCV)。在一些實施例中，PCV 為 RNA 疫苗。示範性 RNA 疫苗之特徵如下文描述。在一些實施例中，本

揭露提供一種 RNA 多核苷酸，其包含如下文描述之 RNA 疫苗之一個或多個特徵/序列。在一些實施例中，RNA 多核苷酸為單鏈 mRNA 多核苷酸。在其他實施例中，本揭露提供一種 DNA 多核苷酸，其編碼包含如下文描述之 RNA 疫苗之一個或多個特徵/序列之 RNA。

【0108】 個人化癌症疫苗包含個體化新抗原(亦即，在患者之癌症中特異性表現之腫瘤相關抗原(TAA))，其經鑑別為具有潛在免疫刺激活性。在本文所述之實施例中，PCV 為核酸，例如，信使 RNA。因此，不希望受理論束縛，咸信在投與後，個人化癌症疫苗被吸收且由抗原呈遞細胞(APC)轉譯且所表現之蛋白經由主要組織相容性複合體(MHC)分子來呈遞於 APC 之表面上。此舉導致誘導針對表現 TAA 之癌細胞之細胞毒性 T-淋巴球(CTL)及記憶 T-細胞依賴性免疫反應兩者。

【0109】 PCV 通常包括多個新抗原表位(「新表位」)，例如，2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、28、29、或 30 個新表位或至少 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、28、29、或 30 個新表位，視情況在個別新表位之間具有連接子序列。在一些實施例中，如本文使用之新表位係指對於患者之癌症具有特異性但患者正常細胞中並不存在之新穎表位。在一些實施例中，新表位在結合至 MHC 時呈遞給 T 細胞。在一些實施例中，PCV 亦包括 5'mRNA 帽類似物、5'UTR、信號序列、促進抗原表現之域、3'UTR、及/或 poly(A)尾。在一些實施例中，RNA 疫苗包含編碼由腫瘤標本中存在之癌症特異性體細胞突變所產生之 10-20 個新表位的一或多種多核苷酸。在一些實施例中，RNA 疫苗包含編碼由腫瘤標本中存在之癌症特異性體細胞突變所產生之至少 5 個新表位的一或多種多核苷酸。在一些實

施例中，RNA 疫苗包含編碼由腫瘤標本中存在之癌症特異性體細胞突變所產生之 5-20 個新表位的一或多種多核苷酸。在一些實施例中，RNA 疫苗包含編碼由腫瘤標本中存在之癌症特異性體細胞突變所產生之 5-10 個新表位的一或多種多核苷酸。

【0110】 在一些實施例中，製造本揭露之 RNA 疫苗為多步過程，其中患者腫瘤中之體細胞突變藉由下一代測序(NGS)來鑑別且對免疫原性新抗原表位(或「新表位」)進行預測。靶向所選定新表位之 RNA 癌症疫苗基於每位患者來製造。在一些實施例中，疫苗為由多達兩個信使 RNA 分子組成的基於 RNA 之癌症疫苗，各分子編碼多達 10 個對患者腫瘤具有特異性之新表位(總共多達 20 個新表位)。

【0111】 在一些實施例中，所表現之非同義突變藉由腫瘤 DNA 及外周血單核細胞(PBMC) DNA(作為來自患者之健康組織來源)之完整外顯子組測序(WES)以及腫瘤 RNA 測序(用以評估表現)來鑑別。根據所得突變蛋白清單，使用生物資訊學工作流程來預測潛在新抗原，該工作流程基於多種因素來對該等新抗原之可能免疫原性進行排序，該等因素包括所預測表位對於個別主要組織相容性複合體(MHC)分子之結合親和力及相關 RNA 之表現水準。資料庫對突變發現、優先級判定、及確認過程進行補充，該資料庫提供關於相應野生型基因在健康組織中之表現水準的綜合資訊。此資訊使得能夠藉由去除具有不利風險特徵之目標候選者來制定個人化風險緩解策略。濾除在蛋白質中發生的可能在關鍵器官中具有較高自體免疫風險之突變，且不考慮用於疫苗生產。在一些實施例中，選擇經預測對於個別患者分別引起 CD8⁺T-細胞及/或 CD4⁺T-細胞反應的多達 20 種 MHCI 及 MHCII 新表位來包含在疫苗中。預期針對多個新表位進行疫苗接種將增加對 PCV 之整體免疫反應之廣度及強度，並可能有助於減輕免疫逃逸之風

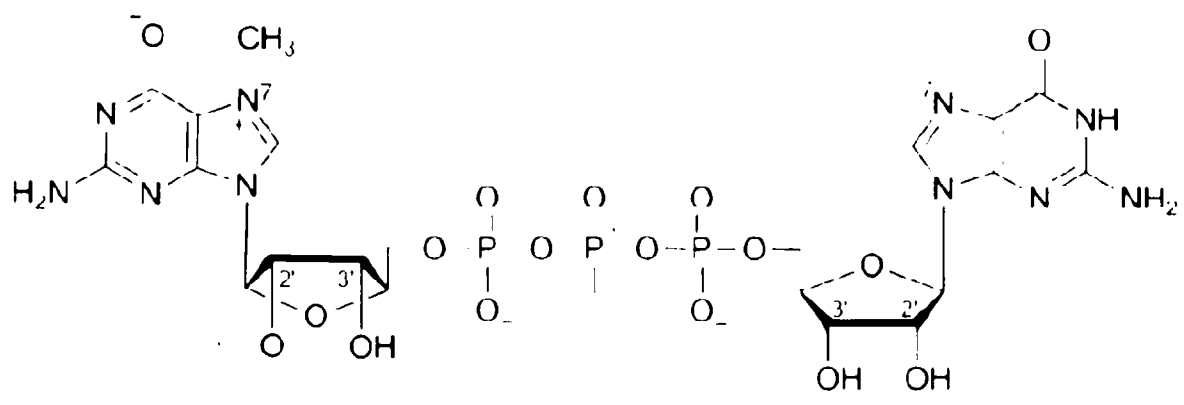
險，此風險可能會在腫瘤暴露於有效免疫反應之選擇壓力下時發生 (Tran E, Robbins PF, Lu YC 等人 *N Engl J Med* 2016;375:2255-62 ; Verdegaal EM, de Miranda NF, Visser M 等人 *Nature* 2016;536:91-5)。

【0112】 在一些實施例中，RNA 疫苗包含編碼胺基酸連接子之一或多種多核苷酸序列。例如，胺基酸連接子可在 2 個患者特異性新表位序列之間、在患者特異性新表位序列與融合蛋白標籤(例如，包含來源於 MHC 複合體多肽之序列)之間、或在分泌信號肽與患者特異性新表位序列之間使用。在一些實施例中，RNA 疫苗編碼多個連接子。在一些實施例中，RNA 疫苗包含編碼由腫瘤標本中存在之癌症特異性體細胞突變所產生之 5-20 個新表位之一或多種多核苷酸，且編碼各表位之多核苷酸藉由編碼連接子序列之多核苷酸來隔開。在一些實施例中，RNA 疫苗包含編碼由腫瘤標本中存在之癌症特異性體細胞突變所產生之 5-10 個新表位之一或多種多核苷酸，且編碼各表位之多核苷酸藉由編碼連接子序列之多核苷酸來隔開。在一些實施例中，編碼連接子序列之多核苷酸亦存在於編碼 N 端融合標籤(例如，分泌信號肽)之多核苷酸與編碼該等新表位之一的多核苷酸之間及/或編碼該等新表位之一的多核苷酸與編碼 C 端融合標籤(例如，包含 MHC 多肽之一部分)之多核苷酸之間。在一些實施例中，由 RNA 疫苗編碼之兩個或兩個以上連接子包含不同序列。在一些實施例中，RNA 疫苗編碼多個連接子，其全部共有相同胺基酸序列。

【0113】 多種連接子序列為此項技術中已知的。在一些實施例中，連接子為可撓性連接子。在一些實施例中，連接子包含 G、S、A、及/或 T 殘基。在一些實施例中，連接子由甘胺酸及絲胺酸殘基組成。在一些實施例中，連接子之長度為約 5 與約 20 個胺基酸之間或約 5 與約 12 個胺基酸之間，例如，長度為約 5、約 6、約 7、約 8、約 9、約 10、約 11、約 12、約 13、約 14、約 15、約 16、約

17、約 18、約 19、或約 20 個胺基酸。在一些實施例中，連接子包含序列 GGSGGGGSGG(SEQ ID NO:39)。在一些實施例中，RNA 疫苗之連接子包含序列 GGCGGCUCUGGAGGAGGCGGCUCCGGAGGC(SEQ ID NO:37)。在一些實施例中，RNA 疫苗之連接子由包含序列 GGCGGCTCTGGAGGAGGCGGCTCCGGAGGC(SEQ ID NO:38)之 DNA 來編碼。

【0114】 在一些實施例中，RNA 疫苗包含 5'帽。已知鹼性 mRNA 帽結構在 2 個核苷(例如，兩個鳥嘌呤)與遠端鳥嘌呤上之 7-甲基之間含有 5'-5'三磷酸鍵聯，亦即，m⁷GpppG。示範性帽結構可發現於例如 美國專利第 8,153,773 號及第 9,295,717 號及 Kuhn, A.N. 等人(2010) *Gene Ther.*17:961-971。在一些實施例中，5'帽具有結構 m₂^{7,2'-O}Gpp_spG。在一些實施例中，5'帽為 β-S-ARCA 帽。S-ARCA 帽結構包括 2'-O 甲基取代(例如，在 m⁷G 之 C2'位置處)及在一個或多個磷酸鹽基團處之 S-取代。在一些實施例中，5'帽包含以下結構：



【0115】 在一些實施例中，5'帽為 β-S-ARCA 之 D1 非鏡像異構物(參見，例如，美國專利第 9,295,717 號)。以上結構中之*指示立體 P 中心，其可以兩種非鏡像異構物(稱為 D1 及 D2)形式存在。β-S-ARCA 之 D1 非鏡像異構物或 β-S-ARCA(D1)為 β-S-ARCA 之非鏡像異構物，其與 β-S-ARCA 之 D2 非鏡像異構物(β-S-ARCA(D2))相比，首先在 HPLC 管柱上溶離，因此展現較短保留時間。

HPLC 較佳為分析 HPLC。在一個實施例中，Supelcosil LC-18-T RP 管柱，較佳為 5 μm ，4.6×250 mm 形式之管柱用於分離，其中可採用 1.3 ml/min 之流速。在一個實施例中，使用甲醇於乙酸銨中之梯度，例如，在 15 min 內，甲醇於 0.05 M 乙酸銨 pH=5.9 中之 0-25%線性梯度。UV-偵測(VWD)可在 260 nm 處執行且螢光偵測(FLD)可以 280 nm 處之激發及 337 nm 處之偵測來執行。

【0116】 在一些實施例中，RNA 疫苗包含 5'UTR。存在於 mRNA 中之蛋白編碼序列之 5'處的某些未轉譯序列已顯示增加轉譯效率。參見例如 Kozak, M. (1987) *J. Mol. Biol.* 196:947-950。在一些實施例中，5'UTR 包含來自人類 α 球蛋白 mRNA 之序列。在一些實施例中，RNA 疫苗包含 5'UTR 序列 UUCUUCUGGUCCCCACAGACUCAGAGAGAACCCGCCACC(SEQ ID NO:23)。在一些實施例中，RNA 疫苗之 5'UTR 序列由包含序列 TTCTTCTGGTCCCCACAGACTCAGAGAGAACCCGCCACC(SEQ ID NO:24)之 DNA 編碼。在一些實施例中，RNA 疫苗之 5'UTR 序列包含序列 GGCGAACUAGUAUUCUUCUGGUCCCCACAGACUCAGAGAGAACCCGCCACC(SEQ ID NO:21)。在一些實施例中，RNA 疫苗之 5'UTR 序列由包含序列 GGCGAACTAGTATTCTTCTGGTCCCCACAGACTCAGAGAGAACCCGCCACC(SEQ ID NO:22)之 DNA 編碼。

【0117】 在一些實施例中，RNA 疫苗包含編碼分泌信號肽之多核苷酸序列。如在此項技術中已知，分泌信號肽在轉譯後引導多肽自內質網中轉運出且轉運進入分泌途徑之為胺基酸序列。在一些實施例中，信號肽來源於人類多肽，諸如 MHC 多肽。參見例如 Kreiter, S. 等人(2008) *J. Immunol.* 180:309-318，其描述改良 MHC I 類及 II 類表位在人類樹突狀細胞中之加工及呈遞的示範性分泌信號肽。在一些實施例中，在轉譯後，信號肽在由 RNA 疫苗編碼之一或多個新表位序列之 N 端。在一些實施例中，分泌信號肽包含序列 MRVMAPRTLILLLSGAL

ALTETWAGS(SEQ ID NO:27)。在一些實施例中，RNA 疫苗之分泌信號肽包含序列 AUGAGAGUGAUGGCCCCCAGAACCCUGAUCCUGCUGCUGUCUGGC GCCCUGGCCCUGACAGAGACAUGGGCCGGAAGC(SEQ ID NO:25)。在一些實施例中，RNA 疫苗之分泌信號肽由包含序列 ATGAGAGTGATGGCCCCCAG AACCTGATCCTGCTGCTGTCTGGCGCCCTGGCCCTGACAGAGACATGGG CCGGAAGC(SEQ ID NO:26)之 DNA 編碼。

【0118】 在一些實施例中，RNA 疫苗包含編碼跨膜及/或細胞質域之至少一部分的多核苷酸序列。在一些實施例中，跨膜及/或細胞質域來自 MHC 分子之跨膜/細胞質域。術語「主要組織相容性複合體」及縮寫「MHC」係指在所有脊椎動物中出現之基因複合體。MHC 蛋白或分子在正常免疫反應中之淋巴球與抗原呈遞細胞之間之信號轉導中的功能涉及其結合肽且將其呈遞以便由 T-細胞受體 (TCR)識別。MHC 分子在細胞內處理區室中結合肽且將抗原呈遞細胞表面上之此等肽呈遞給 T 細胞。人類 MHC 區，亦被稱為 HLA，位於染色體 6 上且包含 I 類區及 II 類區。I 類 α 鏈為具有約 44 kDa 之分子量之醣蛋白。多肽鏈具有稍微超過 350 個胺基酸殘基之長度。其可劃分成三個功能區：外部、跨膜及細胞質區。外部區具有 283 個胺基酸殘基之長度且劃分成三個域， $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 及 $\alpha 3$ 。該等域及區通常由 I 類基因之單獨外顯子編碼。跨膜區橫跨質膜之脂質雙層。其由以 α 螺旋形式排列之 23 個通常疏水胺基酸殘基組成。細胞質區，亦即朝向細胞質且連接至跨膜區之部分，通常具有 32 個胺基酸殘基之長度且能夠與細胞骨架之要素相互作用。 α 鏈與 $\beta 2$ -微球蛋白相互作用，由此在細胞表面上形成 α - $\beta 2$ 二聚體。術語「MHC II 類」或「II 類」係指主要組織相容性複合體 II 類蛋白或基因。在人類 MHC II 類區內，存在 II 類 α 鏈基因及 β 鏈基因之 DP、DQ 及 DR 子區域 (亦即 $DP\alpha$ 、 $DP\beta$ 、 $DQ\alpha$ 、 $DQ\beta$ 、 $DR\alpha$ 及 $DR\beta$)。II 類分子為各自由 α 鏈及 β 鏈組

成之二聚體。兩種鏈為具有 31-34 kDa(α)或 26-29 kDa(β)之分子量的醣蛋白。 α 鏈之總長度在 229 至 233 個胺基酸殘基之間變化，且 β 鏈之長度在 225 至 238 個殘基之間變化。 α 及 β 鏈由外部區、連接肽、跨膜區及細胞質尾組成。外部區由兩個域， $\alpha 1$ 及 $\alpha 2$ 或 $\beta 1$ 及 $\beta 2$ 組成。連接肽在 α 及 β 鏈中分別為 β 及 9 個殘基之長度。其將兩個域連接至跨膜區，該跨膜區在 α 鏈及 β 鏈中均由 23 個胺基酸殘基組成。細胞質區，亦即朝向細胞質且連接至跨膜區之部分之長度在 α 鏈中在 3 至 16 個殘基之間變化，且在 β 鏈中在 8 至 20 個殘基之間變化。示範性跨膜/細胞質域序列描述於美國專利第 8,178,653 號及第 8,637,006 號。在一些實施例中，在轉譯後，跨膜及/或細胞質域位於由 RNA 疫苗編碼之一或多個新表位序列之 C 端。在一些實施例中，由 RNA 疫苗編碼之 MHC 分子之跨膜及/或細胞質域包含序列 IVGIVAGLAVLAVVVIGAVVATVMCRRKSSGGKGGSYSQAASSDSAQGS DVSLTA(SEQ ID NO:30)。在一些實施例中，MHC 分子之跨膜及/或細胞質域包含序列 AUCGUGGGAAUUGUGGCAGGACUGGCAGUGCUGGCCGUGGUGG UGAUCGGAGCCGUGGUGGCUACCGUGAUGUGCAGACGGAAGUCCAGCG GAGGCAAGGGCGGCAGCUACAGCCAGGCCGCCAGCUCUGAUAGCGCCC AGGGCAGCGACGUGUCACUGACAGCC(SEQ ID NO:28)。在一些實施例中，MHC 分子之跨膜及/或細胞質域由包含序列 ATCGTGGGAATTGTGGCAGGACT GGCAGTGCTGGCCGTGGTGGTGATCGGAGCCGTGGTGGCTACCGTGATGT GCAGACGGAAGTCCAGCGGAGGCAAGGGCGGCAGCTACAGCCAGGCCGC CAGCTCTGATAGCGCCCAGGGCAGCGACGTGTCACTGACAGCC(SEQ ID N O:29)之 DNA 編碼。

【0119】 在一些實施例中，RNA 疫苗包含編碼位於一或多個新表位序列之 N 端的分泌信號肽之多核苷酸序列及編碼位於一或多個新表位序列之 C 端的跨膜

及/或細胞質域之多核苷酸序列兩者。對此等序列進行組合已顯示可改良 MHC I 類及 II 表位在人類樹突狀細胞中之加工及呈遞。參見例如 Kreiter, S. 等人(2008) *J. Immunol.* 180:309-318。

【0120】 在骨髓 DC 中，該 RNA 釋放至細胞溶質中且轉譯成多新表位肽。多肽含有增強抗原呈遞之額外序列。在一些實施例中，來自多肽之 N 端處之 MHCI 重鏈之信號序列(sec)用於將新生分子靶向輸送至內質網，此舉已顯示增強 MHCI 呈遞效率。不希望受理論束縛，咸信 MHCI 重鏈之跨膜及細胞質域將多肽引導至內涵體/溶酶體區室，該等區室顯示改良 MHCII 呈遞。

【0121】 在一些實施例中，RNA 疫苗包含 3'UTR。存在於 mRNA 中之蛋白編碼序列之 3' 處的某些未轉譯序列已顯示改良 RNA 穩定性、轉譯、及蛋白表現。適合於用作 3'UTR 之多核苷酸序列描述於例如 PG 公開案第 US20190071682 號。在一些實施例中，3'UTR 包含 3' 未轉譯區 AES 或其片段及/或經粒線體編碼 12S RNA 之非編碼 RNA。術語「AES」係指酶切胺基端增強子且包括 AES 基因(參見，例如，NCBI Gene ID:166)。由此基因編碼之蛋白屬於 groucho/TLE 蛋白家族，其可充當同源寡聚物或充當與其他家族成員之異源寡聚物，以便佔優勢地抑制其他家族成員基因之表現。示範性 AES mRNA 序列提供於 NCBI Ref. Seq. 登錄號 NM_198969 中。術語「MT_RNR1」係指經粒線體編碼之 12S RNA 且包括 MT_RNR1 基因(參見，例如，NCBI Gene ID:4549)。此 RNA 基因屬於 Mt_rRNA 類別。與 MT-RNR1 相關之疾病包括限制性心肌病及聽覺神經病變。其相關途徑為真核生物中之核糖體生物發生及 CFTR 轉譯保真度(I 類突變)。示範性 MT_RNR1 RNA 序列存在於 NCBI Ref. Seq. 登錄號 NC_012920 之序列中。在一些實施例中，RNA 疫苗之 3'UTR 包含序列 CUGGUACUGCAUGCACGCAAUG CUAGCUGCCCCUUUCCCGUCCUGGGUACCCCGAGUCUCCCCCGACCUCG

GGUCCCAGGUAUGCUCUCCACCUCCACCUGCCCCACUCACCACCUCUGCU
AGUUCCAGACACCUCC(SEQ ID NO:33)。在一些實施例中，RNA 疫苗之 3'UT
R 包含序列 CAAGCACGCAGCAAUGCAGCUCAAAACGCUUAGCCUAGCCAC
ACCCCCACGGGAAACAGCAGUGAUUAACCUUUAGCAAUAAACGAAAGU
UUAACUAAGCUAUACUAACCCCAGGGUUGGUCAAUUUCGUGCCAGCCA
CACCG(SEQ ID NO:35)。在一些實施例中，RNA 疫苗之 3'UTR 包含序列 CUG
GUACUGCAUGCACGCAAUGCUGAGCUGCCCCUUUCCCGUCCUGGGUACCC
CGAGUCUCCCCCGACCUCGGGUCCCAGGUAUGCUCUCCACCUCCACCUGC
CCCACUCACCACCUCUGCUAGUUCCAGACACCUCC(SEQ ID NO:33)及序列
CAAGCACGCAGCAAUGCAGCUCAAAACGCUUAGCCUAGCCACACCCCCA
CGGGAAACAGCAGUGAUUAACCUUUAGCAAUAAACGAAAGUUUAACUA
AGCUAUACUAACCCCAGGGUUGGUCAAUUUCGUGCCAGCCACACCG(SE
Q ID NO:35)。在一些實施例中，RNA 疫苗之 3'UTR 包含序列 CUCGAGCUGG
UACUGCAUGCACGCAAUGCUGAGCUGCCCCUUUCCCGUCCUGGGUACCCC
GAGUCUCCCCCGACCUCGGGUCCCAGGUAUGCUCUCCACCUCCACCUGCC
CCACUCACCACCUCUGCUAGUUCCAGACACCUCCCAAGCACGCAGCAAU
GCAGCUCAAAACGCUUAGCCUAGCCACACCCCCACGGGAAACAGCAGUG
AUUAACCUUUAGCAAUAAACGAAAGUUUAACUAAGCUAUACUAACCCC
AGGGUUGGUCAAUUUCGUGCCAGCCACACCGAGACCUGGUCCAGAGUC
GCUAGCCGCGUCGCU(SEQ ID NO:31)。在一些實施例中，RNA 疫苗之 3'UT
R 編碼 DNA 包含序列 CTGGTACTGCATGCACGCAATGCTAGCTGCCCCTTTC
CCGTCCTGGGTACCCCGAGTCTCCCCCGACCTCGGGTCCCAGGTATGCTCC
CACCTCCACCTGCCCCACTCACCTCTGCTAGTTCCAGACACCTCC(SEQ

ID NO:34)。在一些實施例中，RNA 疫苗之 3'UTR 由包含序列 CAAGCACGCA GCAATGCAGCTCAAAACGCTTAGCCTAGCCACACCCCCACGGGAAACAGC AGTGATTAACCTTTAGCAATAAACGAAAGTTTAACTAAGCTATACTAACCCC AGGGTTGGTCAATTTTCGTGCCAGCCACACCG(SEQ ID NO:36)之 DNA 編碼。在一些實施例中，RNA 疫苗之 3'UTR 由包含序列 CTGGTACTGCATGCACGCA ATGCTAGCTGCCCCCTTTCCCGTCCTGGGTACCCCGAGTCTCCCCCGACCTC GGGTCCCAGGTATGCTCCCACCTCCACCTGCCCCACTCACACCTCTGCTA GTTCCAGACACCTCC(SEQ ID NO:34)及序列 CAAGCACGCAGCAATGCAGCT CAAAACGCTTAGCCTAGCCACACCCCCACGGGAAACAGCAGTGATTAACC TTTAGCAATAAACGAAAGTTTAACTAAGCTATACTAACCCCAGGGTTGGTC AATTTTCGTGCCAGCCACACCG(SEQ ID NO:36)之 DNA 編碼。在一些實施例 中，3'RNA 疫苗之 3'UTR 由包含序列 CTGGTACTGCATGCACGCAATGCTAGC TGCCCCCTTTCCCGTCCTGGGTACCCCGAGTCTCCCCCGACCTCGGGTCCCA GGTATGCTCCCACCTCCACCTGCCCCACTCACACCTCTGCTAGTTCCAGA CACCTCCCAAGCACGCAGCAATGCAGCTCAAAACGCTTAGCCTAGCCACA CCCCCACGGGAAACAGCAGTGATTAACCTTTAGCAATAAACGAAAGTTTA ACTAAGCTATACTAACCCCAGGGTTGGTCAATTTTCGTGCCAGCCACACCGA GACCTGGTCCAGAGTCGCTAGCCGCGTCGCT(SEQ ID NO:32)之 DNA 編碼。

【0122】 在一些實施例中，RNA 疫苗包含在其 3'端處之 poly(A)尾。在一些 實施例中，poly(A)尾包含超過 50 個或超過 100 個腺嘌呤核苷酸。例如，在一些 實施例中，poly(A)尾包含 120 個腺嘌呤核苷酸。此 poly(A)尾已經證明可增強 RNA 穩定性及轉譯效率(Holtkamp, S.等人(2006) *Blood* 108:4009-4017)。在一些 實施例中，包含 poly(A)尾之 RNA 藉由轉錄 DNA 分子來產生，該 DNA 分子在

5'→3'轉錄方向上包含編碼至少 50、100、或 120 個腺嘌呤連續核苷酸及 IIS 型限制性核酸內切酶之識別序列的多核苷酸序列。改良轉譯之示範性 poly(A)尾及 3'UTR 序列存在於例如美國專利第 9,476,055 號。

【0123】 在一些實施例中，本揭露之 RNA 疫苗或分子包含以下一般結構(在 5'→3'方向上)：(1)5'帽；(2)5'未轉譯區(UTR)；(3)編碼分泌信號肽之多核苷酸序列；(4)編碼主要組織相容性複合體(MHC)分子之跨膜及細胞質域之至少一部分的多核苷酸序列；(5)3'UTR，其包含：(a)酶切胺基端增強子(AES) mRNA 之 3'未轉譯區或其片段；及(b)經粒線體編碼 12S RNA 之非編碼 RNA 或其片段；及(6)poly(A)序列。在一些實施例中，本揭露之 RNA 疫苗或分子在 5'→3'方向上包含：多核苷酸序列 GGCGAACUAGUAUUCUUCUGGUCCCCACAGACUCAGAGAGAACCCGCCACCAUGAGAGUGAUGGGCCCCCAGAACCCUGAUCCUGCUGCUGUCUGGGCGCCCUGGCCCUGACAGAGACAUGGGCCGGAAGC(SEQ ID NO:19)；及多核苷酸序列 AUCGUGGGAAUUGUGGCAGGACUGGCAGUGCUGGGCCGUGGUGGUGAUCGGAGCCGUGGUGGCUACCGUGAUGUGCAGACGGAAGUCCAGCGGAGGCAAGGGCGGCAGCUACAGCCAGGCCGCCAGCUCUGAUAAGCGCCCAGGGCAGCGACGUGUCACUGACAGCCUAGUAACUCGAGCUGGUACUGCAUGCACGCAAUGCUAGCUGCCCCUUUCCCGUCCUGGGUACCCCGAGUCUCCCCCGACCUCGGGUCCCAGGUAUGCUCUCCACCUCUCCACCUGCCCCACUCACCACCUCUGCUAGUUCAGACACCUCUCCAAGCACGCAGCAAUGCAGCUCAAAACGCUUAGCCUAGCCACACCCCCACGGGAAACAGCAGUGAUUAACCUUUAGCAAUAAACGAAAGUUUAACUAAGCUAUACUAACCC CAGGGUUGGUCAAUUUCGUGCCAGCCACACCGAGACCUGGUCCAGAGUCGCUAGCCGCGUCGCU(SEQ ID NO:20)。有利地是，包含結構或序列之此組

合及取向的 RNA 疫苗藉由以下項中之一或多者來表徵：改良 RNA 穩定性、增強轉譯效率、改良抗原呈遞及/或加工(例如，藉由 DC)、及增加蛋白表現。

【0124】 在一些實施例中，本揭露之 RNA 疫苗或分子包含(在 5'→3'方向上)序列 SEQ ID NO:42。參見例如圖 4。在一些實施例中，N 係指編碼至少 2、至少 3、至少 4、至少 5、至少 6、至少 7、至少 8、至少 9、至少 10、至少 11、至少 12、至少 13、至少 14、至少 15、至少 16、至少 17、至少 18、至少 19、至少 20、至少 21、至少 22、至少 23、至少 24、至少 25、至少 26、至少 27、至少 28、至少 29、或 30 個不同新表位之多核苷酸序列。在一些實施例中，N 係指編碼一或多個連接子-表位模組(例如，至少 2、至少 3、至少 4、至少 5、至少 6、至少 7、至少 8、至少 9、至少 10、至少 11、至少 12、至少 13、至少 14、至少 15、至少 16、至少 17、至少 18、至少 19、至少 20、至少 21、至少 22、至少 23、至少 24、至少 25、至少 26、至少 27、至少 28、至少 29、或 30 個不同連接子-表位模組)之多核苷酸序列。在一些實施例中，N 係指編碼一或多個連接子-表位模組(例如，至少 2、至少 3、至少 4、至少 5、至少 6、至少 7、至少 8、至少 9、至少 10、至少 11、至少 12、至少 13、至少 14、至少 15、至少 16、至少 17、至少 18、至少 19、至少 20、至少 21、至少 22、至少 23、至少 24、至少 25、至少 26、至少 27、至少 28、至少 29、或 30 個不同連接子-表位模組)及 3' 端處之額外胺基酸連接子的多核苷酸序列。

【0125】 在一些實施例中，RNA 疫苗或分子進一步包含編碼至少一個新表位之多核苷酸序列；其中在 5'→3'方向上，編碼至少一個新表位之多核苷酸序列係在編碼分泌信號肽之多核苷酸序列與編碼 MHC 分子之跨膜及細胞質域之至少一部分之多核苷酸序列之間。在一些實施例中，RNA 分子包含編碼至少 2、至少 3、至少 4、至少 5、至少 6、至少 7、至少 8、至少 9、至少 10、至少 11、至

少 12、至少 13、至少 14、至少 15、至少 16、至少 17、至少 18、至少 19、或 20 個不同新表位之多核苷酸序列。

【0126】 在一些實施例中，RNA 疫苗或分子在 5'→3'方向上進一步包含：編碼胺基酸連接子之多核苷酸序列；及編碼新表位之多核苷酸序列。在一些實施例中，編碼胺基酸連接子及新表位之多核苷酸序列形成連接子-新表位模組(例如，在 5'→3'方向上在同一開讀框中之連續序列)。在一些實施例中，在 5'→3'方向上，形成連接子-新表位模組之多核苷酸序列係在編碼分泌信號肽之多核苷酸序列與編碼 MHC 分子之跨膜及細胞質域之至少一部分的多核苷酸序列之間，或係在序列 SEQ ID NO:19 與 SEQ ID NO:20 之間。在一些實施例中，RNA 疫苗或分子包含 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、28、29、或 30 個連接子-表位模組。在一些實施例中，連接子-表位模組中之各者編碼不同新表位。在一些實施例中，RNA 疫苗或分子包含 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、或 20 個連接子-表位模組，且 RNA 疫苗或分子包含編碼至少 2、至少 3、至少 4、至少 5、至少 6、至少 7、至少 8、至少 9、至少 10、至少 11、至少 12、至少 13、至少 14、至少 15、至少 16、至少 17、至少 18、至少 19、或 20 個不同新表位之多核苷酸。在一些實施例中，RNA 疫苗或分子包含 5、10、或 20 個連接子-表位模組。在一些實施例中，連接子-表位模組中之各者編碼不同新表位。在一些實施例中，連接子-表位模組在 5'→3'方向上在同一開讀框中形成連續序列。在一些實施例中，編碼第一連接子-表位模組之連接子之多核苷酸序列係在編碼分泌信號肽之多核苷酸序列之 3'處。在一些實施例中，編碼最後一個連接子-表位模組之新表位之多核苷酸序列係在編碼 MHC 分子之跨膜及細胞質域之至少一部分之多核苷酸序列的 5'處。

【0127】 在一些實施例中，RNA 疫苗之長度為至少 800 個核苷酸、至少 1000 個核苷酸、或至少 1200 個核苷酸。在一些實施例中，RNA 疫苗之長度為少於 2000 個核苷酸。在一些實施例中，RNA 疫苗之長度為至少 800 個核苷酸但是少於 2000 個核苷酸，長度為至少 1000 個核苷酸但是少於 2000 個核苷酸，長度為至少 1200 個核苷酸但是少於 2000 個核苷酸，長度為至少 1400 個核苷酸但是少於 2000 個核苷酸，長度為至少 800 個核苷酸但是少於 1400 個核苷酸，或長度為至少 800 個核苷酸但是少於 2000 個核苷酸。例如，包含如上所述要素之 RNA 疫苗之恆定區之長度為大約 800 個核苷酸。在一些實施例中，包含 5 種患者特異性新表位(例如，每一個新表位編碼 27 個胺基酸)之 RNA 疫苗之長度大於 1300 個核苷酸。在一些實施例中，包含 10 種患者特異性新表位(例如，每一個新表位編碼 27 個胺基酸)之 RNA 疫苗之長度大於 1800 個核苷酸。

【0128】 在一些實施例中，RNA 疫苗經調配成脂質複合體奈米粒子或脂質體。在一些實施例中，RNA 之脂質複合體奈米粒子調配物(RNA-脂質複合體)用於實現本揭露之 RNA 疫苗之 IV 遞送。在一些實施例中，例如為了實現 IV 遞送，使用包含合成陽離子脂質(R)-N,N,N-三甲基-2,3-二油醯氧基-1-丙銨氯化物(DOTMA)及磷脂 1,2-二油醯基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DOPE)的 RNA 癌症疫苗之脂質複合體奈米粒子調配物。為了在脾臟及其他淋巴器官中 IV 遞送及靶向抗原呈遞細胞，使 DOTMA/DOPE 脂質體組分已得以最佳化。

【0129】 在一個實施例中，奈米粒子包含至少一種脂質。在一個實施例中，奈米粒子包含至少一種陽離子脂質。陽離子脂質可為單陽離子或聚陽離子的。任何陽離子兩親分子，例如，包含至少一種親水性及親脂性部分之分子為本發明含義內之陽離子脂質。在一個實施例中，正電荷由至少一種陽離子脂質產生且負電荷由 RNA 產生。在一個實施例中，奈米粒子包含至少一種輔助脂質。輔

助脂質可為中性或陰離子脂質。輔助脂質可為天然脂質，諸如磷脂或天然脂質之類似物，或與天然脂質無相似性之完全合成脂質、或脂質樣分子。在一個實施例中，陽離子脂質及/或輔助脂質為雙層形成脂質。

【0130】 在一個實施例中，至少一種陽離子脂質包含 1,2-二-O-十八烯基-3-三甲基銨丙烷(DOTMA)或其類似物或衍生物及/或 1,2-二油醯基-3-三甲基銨-丙烷(DOTAP)或其類似物或衍生物。

【0131】 在一個實施例中，至少一種輔助脂質包含 1,2-二-(9Z-十八烯醯基)-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DOPE)或其類似物或衍生物，膽固醇(Chol)或其類似物或衍生物及/或 1,2-二油醯基-sn-甘油-3-磷酸膽鹼(DOPC)或其類似物或衍生物。

【0132】 在一個實施例中，至少一種陽離子脂質與至少一種輔助脂質之莫耳比為 10:0 至 3:7，較佳 9:1 至 3:7、4:1 至 1:2、4:1 至 2:3、7:3 至 1:1、或 2:1 至 1:1，較佳約 1:1。在一個實施例中，在此比率下，陽離子脂質之莫耳量由陽離子脂質之莫耳量乘以陽離子脂質中正電荷之數目產生。

【0133】 在一個實施例中，脂質包含在囊封該 RNA 之囊泡中。囊泡可為多層囊泡、單層囊泡、或其混合物。囊泡可為脂質體。

【0134】 藉由根據陽離子脂質與 RNA 之(+/-)電荷比調整正電荷與負電荷且將 RNA 與陽離子脂質混合，可形成本文所述奈米粒子或脂質體。本文所述奈米粒子中陽離子脂質與 RNA 之 +/- 電荷比可藉由以下方程來計算。 $(+/-\text{電荷比}) = [(\text{陽離子脂質量}(\text{mol})) * (\text{陽離子脂質中正電荷之總數})] : [(\text{RNA 量}(\text{mol})) * (\text{RNA 中負電荷之總數})]$ 。RNA 量及陽離子脂質量可由熟習此項技術者考慮到在製備奈米粒子時之負載量來容易地判定。關於示範性奈米粒子之進一步描述，參見，例如，PG 公開案第 US20150086612 號。

【0135】 在一個實施例中，奈米粒子或脂質體中正電荷與負電荷之總電荷比

(例如，在生理 pH 下)係在 1.4:1 與 1:8 之間，較佳 1.2:1 與 1:4 之間，例如 1:1 與 1:3 之間，諸如 1:1.2 與 1:2 之間、1:1.2 與 1:1.8 之間、1:1.3 與 1:1.7 之間，尤其 1:1.4 與 1:1.6 之間，諸如約 1:1.5。在一些實施例中，在生理 pH 下，奈米粒子之正電荷與負電荷之總電荷比係在 1:1.2(0.83)與 1:2(0.5)之間。在一些實施例中，在生理 pH 下，奈米粒子或脂質體之正電荷與負電荷之總電荷比係在 1.6:2(0.8)與 1:2(0.5)之間或 1.6:2(0.8)與 1.1:2(0.55)之間。在一些實施例中，在生理 pH 下，奈米粒子或脂質體之正電荷與負電荷之總電荷比為 1.3:2(0.65)。在一些實施例中，在生理 pH 下，脂質體之正電荷與負電荷之總電荷比不低於 1.0:2.0。在一些實施例中，在生理 pH 下，脂質體之正電荷與負電荷之總電荷比不高於 1.9:2.0。在一些實施例中，在生理 pH 下，脂質體之正電荷與負電荷之總電荷比不低於 1.0:2.0 且不高於 1.9:2.0。

【0136】 在一個實施例中，奈米粒子為包含莫耳比為 10:0 至 1:9、較佳 8:2 至 3:7、及更佳 7:3 至 5:5 之 DOTMA 及 DOPE 的脂質複合體，且其中 DOTMA 中之正電荷與 RNA 中之負電荷的電荷比為 1.8:2 至 0.8:2、更佳 1.6:2 至 1:2、甚至更佳 1.4:2 至 1.1:2 及甚至更佳約 1.2:2。在一個實施例中，奈米粒子為包含莫耳比為 10:0 至 1:9、較佳 8:2 至 3:7、及更佳 7:3 至 5:5 之 DOTMA 及膽固醇的脂質複合體，且其中 DOTMA 中之正電荷與 RNA 中之負電荷的電荷比為 1.8:2 至 0.8:2、更佳 1.6:2 至 1:2、甚至更佳 1.4:2 至 1.1:2 及甚至更佳約 1.2:2。在一個實施例中，奈米粒子為包含莫耳比為 10:0 至 1:9、較佳 8:2 至 3:7、及更佳 7:3 至 5:5 之 DOTAP 及 DOPE 的脂質複合體，且其中 DOTMA 中之正電荷與 RNA 中之負電荷的電荷比為 1.8:2 至 0.8:2、更佳 1.6:2 至 1:2、甚至更佳 1.4:2 至 1.1:2 及甚至更佳約 1.2:2。在一個實施例中，奈米粒子為包含莫耳比為 2:1 至 1:2、較佳 2:1 至 1:1 之 DOTMA 及 DOPE 的脂質複合體，且其中 DOTMA 中之正電荷與 RNA

中之負電荷的電荷比為 1.4:1 或更小。在一個實施例中，奈米粒子為包含莫耳比為 2:1 至 1:2、較佳 2:1 至 1:1 之 DOTMA 及膽固醇的脂質複合體，且其中 DOTMA 中之正電荷與 RNA 中之負電荷的電荷比為 1.4:1 或更小。在一個實施例中，奈米粒子為包含莫耳比為 2:1 至 1:2、較佳 2:1 至 1:1 之 DOTAP 及 DOPE 的脂質複合體，且其中 DOTAP 中之正電荷與 RNA 中之負電荷的電荷比為 1.4:1 或更小。

【0137】 在一個實施例中，奈米粒子或脂質體之灰他電位為-5 或更小、-10 或更小、-15 或更小、-20 或更小或-25 或更小。在各種實施例中，奈米粒子或脂質體之灰他電位為-35 或更高、-30 或更高或-25 或更高。在一個實施例中，奈米粒子或脂質體具有 0 mV 至-50 mV、較佳 0 mV 至-40 mV 或-10 mV 至-30 mV 之灰他電位。

【0138】 在一些實施例中，奈米粒子或脂質體之多分散性指數為 0.5 或更小、0.4 或更小、或 0.3 或更小，如藉由動態光散射量測。

【0139】 在一些實施例中，奈米粒子或脂質體具有約 50 nm 至約 1000 nm、約 100 nm 至約 800 nm、約 200 nm 至約 600 nm、約 250 nm 至約 700 nm、或約 250 nm 至約 550 nm 範圍內之平均直徑，如藉由動態光散射量測。

【0140】 在一些實施例中，PCV 例如以脂質體調配物形式，以 15 μ g、25 μ g、38 μ g、50 μ g、或 100 μ g 之劑量來靜脈內投與。在一些實施例中，每劑量遞送 15 μ g、25 μ g、38 μ g、50 μ g、或 100 μ g 之 RNA(亦即，劑量重量反映所投與 RNA 之重量，而非所投與調配物或脂質複合體之總重量)。可將超過一種 PCV 投與至受試者，例如，向受試者投與具有新表位之組合的一種 PCV 且亦投與具有不同新表位組合之單獨 PCV。在一些實施例中，投與具有十個新表位之第一 PCV 與具有十個替代表位之第二 PCV 之組合。

【0141】 在一些實施例中，投與 PCV 以使得將其遞送至脾臟。例如，可投與

PCT 以使得將一或多種抗原(例如，患者特異性新抗原)遞送至抗原呈遞細胞(例如，脾臟)。

【0142】 本揭露之任何 PCV 或 RNA 疫苗可適用於本文描述之方法。例如，在一些實施例中，投與本揭露之 PD-1 軸結合拮抗劑與個人化癌症疫苗(PCV)，例如，以上描述之 RNA 疫苗之組合。

【0143】 本文進一步提供編碼本揭露之任何 RNA 疫苗的 DNA 分子。例如，在一些實施例中，本揭露之 DNA 分子包含以下一般結構(在 5'→3'方向上)：(1)編碼 5'未轉譯區(UTR)之多核苷酸序列；(2)編碼分泌信號肽之多核苷酸序列；(3)編碼主要組織相容性複合體(MHC)分子之跨膜及細胞質域之至少一部分的多核苷酸序列；(4)編碼 3'UTR 之多核苷酸序列，該 3'UTR 包含：(a)酶切胺基端增強子(AES) mRNA 之 3'未轉譯區或其片段；及(b)經粒線體編碼 12S RNA 之非編碼 RNA 或其片段；及(5)編碼 poly(A)序列之多核苷酸序列。在一些實施例中，本揭露之 DNA 分子在 5' → 3'方向上包含：多核苷酸序列

GGCGAACTAGTATTCTTCTGGTCCCCACAGACTCAGAGAGAACCCGCCAC
CATGAGAGTGATGGCCCCCAGAACCCTGATCCTGCTGCTGTCTGGCGCCCT
GGCCCTGACAGAGACATGGGCCGGAAGC(SEQ ID NO:40)；及多核苷酸序列
ATCGTGGGAATTGTGGCAGGACTGGCAGTGCTGGCCGTGGTGGTGATCGG
AGCCGTGGTGGCTACCGTGATGTGCAGACGGAAGTCCAGCGGAGGCAAG
GGCGGCAGCTACAGCCAGGCCGCCAGCTCTGATAGCGCCCAGGGCAGCGA
CGTGTCAGTACAGCCTAGTAACTCGAGCTGGTACTGCATGCACGCAATGC
TAGCTGCCCCCTTTCCCGTCCTGGGTACCCCGAGTCTCCCCCGACCTCGGGT
CCCAGGTATGCTCCACCTCCACCTGCCCCACTCACACCTCTGCTAGTTC
CAGACACCTCCCAAGCACGCAGCAATGCAGCTCAAAACGCTTAGCCTAGC

CACACCCCCACGGGAAACAGCAGTGATTAACCTTTAGCAATAAACGAAAG
TTTAACTAAGCTATACTAACCCCAGGGTTGGTCAATTTCGTGCCAGCCACA
CCGAGACCTGGTCCAGAGTCGCTAGCCGCGTCGCT(SEQ ID NO:41)。

【0144】 在一些實施例中，DNA 分子在 5'→3'方向上進一步包含：編碼胺基酸連接子之多核苷酸序列；及編碼新表位之多核苷酸序列。在一些實施例中，編碼胺基酸連接子及新表位之多核苷酸序列形成連接子-新表位模組(例如，在 5'→3'方向上在同一開讀框中之連續序列)。在一些實施例中，在 5'→3'方向上，形成連接子-新表位模組之多核苷酸序列係在編碼分泌信號肽之多核苷酸序列與編碼 MHC 分子之跨膜及細胞質域之至少一部分之多核苷酸序列之間，或序列 SEQ ID NO:40 與 SEQ ID NO:41 之間。在一些實施例中，DNA 分子包含 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、28、29、或 30 個連接子-表位模組，且連接子-表位模組中之各者編碼不同新表位。在一些實施例中，DNA 分子包含 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、或 20 個連接子-表位模組，且 DNA 分子包含編碼至少 2、至少 3、至少 4、至少 5、至少 6、至少 7、至少 8、至少 9、至少 10、至少 11、至少 12、至少 13、至少 14、至少 15、至少 16、至少 17、至少 18、至少 19、或 20 個不同新表位之多核苷酸。在一些實施例中，DNA 分子包含 5、10、或 20 個連接子-表位模組。在一些實施例中，連接子-表位模組中之各者編碼不同新表位。在一些實施例中，連接子-表位模組在 5'→3'方向上在同一開讀框中形成連續序列。在一些實施例中，編碼第一連接子-表位模組之連接子之多核苷酸序列係在編碼分泌信號肽之多核苷酸序列之 3'處。在一些實施例中，編碼最後一個連接子-表位模組之新表位之多核苷酸序列係在編碼 MHC 分子之跨膜及細胞質域之至少一部分之多核苷酸序列之 5'處。

【0145】 本文亦提供產生本揭露之任何 RNA 疫苗的方法，其包含轉錄(例如，藉由轉錄線性雙鏈 DNA 或質體 DNA，諸如藉由活體外轉錄)本揭露之 DNA 分子。在一些實施例中，該等方法進一步包含將經轉錄 RNA 分子自 DNA 分子中分離及/或純化。

【0146】 在一些實施例中，本揭露之 RNA 或 DNA 分子包含 IIS 型限制性裂解位點，其允許 RNA 在 5'RNA 聚合酶啟動子之控制下進行轉錄且含有聚腺苷酸盒(poly(A)序列)，其中識別序列位於 poly(A)序列之 3'處，而裂解位點位於上游，因此在 poly(A)序列內。IIS 型限制性裂解位點處之限制行裂解使得質體能夠在 poly(A)序列內得以線性化，如美國專利第 9,476,055 號及第 10,106,800 號所描述。然後，線性化質體可用作活體外轉錄之模板，所得轉錄物終止於無掩蔽之 poly(A)序列。可使用描述於美國專利第 9,476,055 號及第 10,106,800 號中之任何 IIS 型限制性裂解位點。

IV. PD-1 軸結合拮抗劑

【0147】 在一些實施例中，本揭露之 PCV(例如，RNA 疫苗)與 PD-1 軸結合拮抗劑組合投與。

【0148】 舉例而言，PD-1 軸結合拮抗劑包括 PD-1 結合拮抗劑、PDL1 結合拮抗劑及 PDL2 結合拮抗劑。「PD-1」之替代名稱包括 CD279 及 SLEB2。「PDL1」之替代名稱包括 B7-H1、B7-4、CD274、及 B7-H。「PDL2」之替代名稱包括 B7-DC、Btdc、及 CD273。在一些實施例中，PD-1、PDL1 及 PDL2 為人類 PD-1、PDL1 及 PDL2。

【0149】 在一些實施例中，PD-1 結合拮抗劑為抑制 PD-1 與其配體結合搭配物之結合的分子。在一特定態樣中，PD-1 配體結合搭配物為 PDL1 及/或 PDL2。在另一實施例中，PDL1 結合拮抗劑為抑制 PDL1 與其結合搭配物之結合的分

子。在一特定態樣中，PDL1 結合搭配物為 PD-1 及/或 B7-1。在另一實施例中，PDL2 結合拮抗劑為抑制 PDL2 與其結合搭配物之結合的分子。在一特定態樣中，PDL2 結合搭配物為 PD-1。該拮抗劑可為抗體、其抗原結合片段、免疫黏附素、融合蛋白、或寡肽。

【0150】 在一些實施例中，PD-1 結合拮抗劑為抗 PD-1 抗體(例如，人類抗體、人類化抗體、或嵌合抗體)。

【0151】 在一些實施例中，該抗 PD-1 抗體為納武單抗(CAS 登錄號：946414-94-4)。納武單抗(Bristol-Myers Squibb/Ono)，亦稱為 MDX-1106-04、MDX-1106、ONO-4538、BMS-936558 及 OPDIVO®，為 WO2006/121168 中所述之抗 PD-1 抗體。在一些實施例中，抗 PD-1 抗體包含重鏈及輕鏈序列，其中：

(a) 重鏈包含以下胺基酸序列：QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWVAWIY DGSKRYYADSVKGRFTISRDN SKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCATNDDYWGQGT LVT VSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTPSSSLGTKYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT VTLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG (SEQ ID NO:1)，且

(b) 輕鏈包含以下胺基酸序列：EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLA WYQQKPGQAPRL LIYDASN RATGIPARFSGSGSGTDFTLT ISSLEPEDFAVYYCQQSSNWPRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR

EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYA
CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:12)。

【0152】 在一些實施例中，抗 PD-1 抗體包含來自 SEQ ID NO:11 及 SEQ ID NO:12 之六個HVR序列(例如來自 SEQ ID NO:11 之三個重鏈HVR及來自 SEQ ID NO:12 之三個輕鏈 HVR)。在一些實施例中，抗 PD-1 抗體包含來自 SEQ ID NO:11 之重鏈可變域及來自 SEQ ID NO:12 之輕鏈可變域。

【0153】 在一些實施例中，該抗 PD-1 抗體為帕博利珠單抗(CAS 登錄號：1374853-91-4)。帕博利珠單抗(Merck)，亦稱為 MK-3475、Merck 3475、拉姆珠單抗(lambrolizumab)、KEYTRUDA®及 SCH-900475，為 WO2009/114335 中所述之抗 PD-1 抗體。在一些實施例中，抗 PD-1 抗體包含重鏈及輕鏈序列，其中：

(a) 重鏈包含以下胺基酸序列：

QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYMYWVRQAPGQGLEWMG
G INPSNGGTNFKNEKFKNRVTLTDSSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDY
RFDMGFDYW GQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF
PEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVD
HKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCP APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
CVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQFNSTYRVVSVLTVLH
QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQ
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKS
RWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG (SEQ ID NO:13)，且

(b) 輕鏈包含以下胺基酸序列：

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQKPGQAPRLLIYL
ASYLESQVPAARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQHSRDLPLTFGGGTV

EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG
NSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN
RGEC (SEQ ID NO:14) .

【0154】 在一些實施例中，抗 PD-1 抗體包含來自 SEQ ID NO:13 及 SEQ ID NO:14 之六個HVR序列(例如來自 SEQ ID NO:13 之三 個重鏈HVR 及來自 SEQ ID NO:14 之三 個輕鏈 HVR)。在一些實施例中，抗 PD-1 抗體包含來自 SEQ ID NO:13 之重鏈可變域及來自 SEQ ID NO:14 之輕鏈可變域。

【0155】 在一些實施例中，抗 PD-1 抗體為 MEDI-0680 (AMP-514；AstraZeneca)。MEDI-0680 為人類化 IgG4 抗 PD-1 抗體。

【0156】 在一些實施例中，抗 PD-1 抗體為 PDR001 (CAS 登錄號 1859072-53-9；Novartis)。PDR001 為人類化 IgG4 抗 PD1 抗體，其阻斷 PDL1 及 PDL2 與 PD-1 之結合。

【0157】 在一些實施例中，抗 PD-1 抗體為 REGN2810 (Regeneron)。REGN2810 為人類抗 PD1 抗體，其亦稱為 LIBTAYO®及西米單抗 rwlc。

【0158】 在一些實施例中，抗 PD-1 抗體為 BGB-108 (BeiGene)。在一些實施例中，抗 PD-1 抗體為 BGB-A317 (BeiGene)。

【0159】 在一些實施例中，抗 PD-1 抗體為 JS-001 (Shanghai Junshi)。JS-001 為人類化抗 PD1 抗體。

【0160】 在一些實施例中，抗 PD-1 抗體為 STI-A1110 (Sorrento)。STI-A1110 為人類抗 PD1 抗體。

【0161】 在一些實施例中，抗 PD-1 抗體為 INCSHR-1210 (Incyte)。INCSHR-1210 為人類 IgG4 抗 PD1 抗體。

【0162】 在一些實施例中，抗 PD-1 抗體為 PF-06801591 (Pfizer)。

【0163】 在一些實施例中，抗 PD-1 抗體為 TSR-042 (亦稱為 ANB011；Tesaro/AnaptysBio)。

【0164】 在一些實施例中，抗 PD-1 抗體為 AM0001 (ARMO Biosciences)。

【0165】 在一些實施例中，抗 PD-1 抗體為 ENUM 244C8 (Enumeral Biomedical Holdings)。ENUM 244C8 為抗 PD1 抗體，其抑制 PD-1 功能而不阻斷 PDL1 與 PD-1 之結合。

【0166】 在一些實施例中，抗 PD-1 抗體為 ENUM 388D4 (Enumeral Biomedical Holdings)。ENUM 388D4 為抗 PD1 抗體，其競爭性抑制 PDL1 與 PD-1 之結合。

【0167】 在一些實施例中，PD-1 抗體包含來自在以下各者中描述之 PD-1 抗體之六個 HVR 序列(例如，三個重鏈 HVR 及三個輕鏈 HVR)及/或重鏈可變域及輕鏈可變域：WO2015/112800(申請人：Regeneron)、WO2015/112805 (申請人：Regeneron)、WO2015/112900 (申請人：Novartis)、US20150210769 (指定給 Novartis)、WO2016/089873 (申請人：Celgene)、WO2015/035606 (申請人：Beigene)、WO2015/085847 (申請人：Shanghai Hengrui Pharmaceutical/Jiangsu Hengrui Medicine)、WO2014/206107 (申請人：Shanghai Junshi Biosciences/Junmeng Biosciences)、WO2012/145493 (申請人：Amplimmune)、US9205148 (指定給 MedImmune)、WO2015/119930 (申請人：Pfizer/Merck)、WO2015/119923 (申請人：Pfizer/Merck)、WO2016/032927 (申請人：Pfizer/Merck)、WO2014/179664 (申請人：AnaptysBio)、WO2016/106160 (申請人：Enumeral)、及 WO2014/194302 (申請人：Sorrento)。

【0168】 在一些實施例中，PD-1 結合拮抗劑為免疫黏附素(例如包含融合至恆定區(例如免疫黏附素序列之 Fc 區)之 PDL1 或 PDL2 之細胞外或 PD-1 結合部分的免疫黏附素)。在一些實施例中，該 PD-1 結合拮抗劑為 AMP-224。AMP-224

(CAS 登錄號 1422184-00-6 ; GlaxoSmithKline/MedImmune)，亦稱為 B7-DCIg，為 WO2010/027827 及 WO2011/066342 中所述之 PDL2-Fc 融合可溶性受體。

【0169】 在一些實施例中，PD-1 結合拮抗劑為肽或小分子化合物。在一些實施例中，PD-1 結合拮抗劑為 AUNP-12 (PierreFabre/Aurigene)。參見例如 WO2012/168944、WO2015/036927、WO2015/044900、WO2015/033303、WO2013/144704、WO2013/132317 及 WO2011/161699。

【0170】 在一些實施例中，PDL1 結合拮抗劑為抑制 PD-1 之小分子。在一些實施例中，PDL1 結合拮抗劑為抑制 PDL1 之小分子。在一些實施例中，PDL1 結合拮抗劑為抑制 PDL1 及 VISTA 之小分子。在一些實施例中，PDL1 結合拮抗劑為 CA-170 (亦稱為 AUPM-170)。在一些實施例中，PDL1 結合拮抗劑為抑制 PDL1 及 TIM3 之小分子。在一些實施例中，小分子為 WO2015/033301 及 WO2015/033299 中所述之化合物。

【0171】 在一些實施例中，PD-1 軸結合拮抗劑為抗 PDL1 抗體。本文涵蓋且描述各種抗 PDL1 抗體。在本文實施例中之任一者中，經分離抗 PDL1 抗體可與人類 PDL1，例如 UniProtKB/Swiss-Prot 登錄號 Q9NZQ7.1 中所示之人類 PDL1 或其變異體結合。在一些實施例中，抗 PDL1 抗體能夠抑制 PDL1 與 PD-1 之間及/或 PDL1 與 B7-1 之間的結合。在一些實施例中，抗 PDL1 抗體為單株抗體。在一些實施例中，抗 PDL1 抗體為選自由以下項所組成之群的抗體片段：Fab、Fab'-SH、Fv、scFv 及(Fab')₂ 片段。在一些實施例中，抗 PDL1 抗體為人類化抗體。在一些實施例中，抗 PDL1 抗體為人類抗體。可用於本發明方法之抗 PDL1 抗體及其製備方法之實例描述於 PCT 專利申請案 WO 2010/077634 A1 及美國專利第 8,217,149 號中，該等案以引用之方式併入本文中。

【0172】 在一些實施例中，抗 PDL1 抗體包含重鏈可變區及輕鏈可變區，其

中：

(a) 重鏈可變區包含分別為 GFTFSDSWIH(SEQ ID NO:1)、AWISPYGGSTYYADSVKG(SEQ ID NO:2)及 RHWPGGFDY(SEQ ID NO:3)之 HVR-H1、HVR-H2、及 HVR-H3 序列，且

(b) 輕鏈可變區包含分別為 RASQDVSTAVA(SEQ ID NO:4)、SASFLYS(SEQ ID NO:5)及 QQYLYHPAT(SEQ ID NO:6)之 HVR-L1、HVR-L2、及 HVR-L3 序列。

【0173】 在一些實施例中，抗 PDL1 抗體為 MPDL3280A，亦稱為阿特珠單抗及 TECENTRIQ® (CAS 登錄號：1422185-06-5)，在 2015 年 1 月 16 日公佈之 WHO 藥物資訊(藥用物質之國際非專有名稱)中所建議之 INN 描述於第 4 期第 28 卷之清單 112 中(參見第 485 頁)。在一些實施例中，抗 PDL1 抗體包含重鏈及輕鏈序列，其中：

(a) 重鏈可變區序列包含以下胺基酸序列：EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKN TAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 7)，且

(b) 輕鏈可變區序列包含以下胺基酸序列：DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIY SASF LYSQVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIK R (SEQ ID NO:8)。

【0174】 在一些實施例中，抗 PDL1 抗體包含重鏈及輕鏈序列，其中：

(a) 重鏈包含以下胺基酸序列：EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDS WIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQM NSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS

TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT
VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV
FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
EEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR
EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SE
Q ID NO:9)，且

(b) 輕鏈包含以下胺基酸序列：DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAV
AWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYY
CQQYLYHPATFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYP
REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVY
ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:10)。

【0175】 在一些實施例中，抗 PDL1 抗體為阿維魯單抗(CAS 登錄號：
1537032-82-8)。阿維魯單抗，亦稱為 MSB0010718C，為人類單株 IgG1 抗 PDL1
抗體(Merck KGaA, Pfizer)。在一些實施例中，抗 PDL1 抗體包含重鏈及輕鏈序
列，其中：

(a) 重鏈包含以下胺基酸序列：EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYI
MMWVRQAPGKGLEWVSSIYPSGGITFYADTVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNS
LRAEDTAVYYCARIKLGT VTTVDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST
SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT
PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR

EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
LDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:15)，且

(b) 輕鏈包含以下胺基酸序列：QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNY
VSWYQQHPGKAPKLMIYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEA
DYCYSSYTSSSTRVFGTGTKVTVLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSH
RSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS (SEQ ID NO:16)。

【0176】 在一些實施例中，抗 PDL1 抗體包含來自 SEQ ID NO:15 及 SEQ ID NO:16 之六個 HVR 序列(例如來自 SEQ ID NO:15 之三條重鏈 HVR 及來自 SEQ ID NO:16 之三條輕鏈 HVR)。在一些實施例中，抗 PDL1 抗體包含來自 SEQ ID NO:15 之重鏈可變域及來自 SEQ ID NO:16 之輕鏈可變域。

【0177】 在一些實施例中，抗 PDL1 抗體為度伐魯單抗(CAS 登錄號:1428935-60-7)。度伐魯單抗，亦稱為 MEDI4736，為 WO2011/066389 及 US2013/034559 中所述之 Fc 最佳化之人類單株 IgG1 κ 抗 PDL1 抗體(MedImmune, AstraZeneca)。在一些實施例中，抗 PDL1 抗體包含重鏈及輕鏈序列，其中：

(a) 重鏈包含以下胺基酸序列：EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRY
WMSWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNKNSLYLQ
MNSLR AEDTAVYYCAREGGWFGELAFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLA
PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIIEKTISKAK

GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNHYTQKSLSLS
PG (SEQ ID NO:17)，且

(b) 輕鏈包含以下胺基酸序列：EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQRVSSSYL
AWYQQKPGQAPRLLIYDASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYY
CQQYGSLPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY
PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEEKHKV
YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:18)。

【0178】 在一些實施例中，抗 PDL1 抗體包含來自 SEQ ID NO:17 及 SEQ ID NO:18 之六個 HVR 序列(例如來自 SEQ ID NO:17 之三條重鏈 HVR 及來自 SEQ ID NO:18 之三條輕鏈 HVR)。在一些實施例中，抗 PDL1 抗體包含來自 SEQ ID NO:17 之重鏈可變域及來自 SEQ ID NO:18 之輕鏈可變域。

【0179】 在一些實施例中，抗 PDL1 抗體為 MDX-1105 (Bristol Myers Squibb)。MDX-1105，亦稱為 BMS-936559，為 WO2007/005874 中所述之抗 PDL1 抗體。

【0180】 在一些實施例中，抗 PDL1 抗體為 LY3300054 (Eli Lilly)。

【0181】 在一些實施例中，抗 PDL1 抗體為 STI-A1014 (Sorrento)。STI-A1014 為人類抗 PDL1 抗體。

【0182】 在一些實施例中，抗 PDL1 抗體為 KN035 (Suzhou Alphamab)。KN035 為由駱駝噬菌體呈現文庫產生之單域抗體(dAB)。

【0183】 在一些實施例中，抗 PDL1 抗體包含可裂解部分或連接子，其在裂解(例如由腫瘤微環境中之蛋白酶裂解)時例如藉由移除非結合空間部分來活化抗體抗原結合域以允許其結合其抗原。在一些實施例中，抗 PDL1 抗體為 CX-072 (CytomX Therapeutics)。

【0184】 在一些實施例中，PDL1 抗體包含來自在以下各者中描述之 PDL1 抗體之六個 HVR 序列(例如，三個重鏈 HVR 及三個輕鏈 HVR)及/或重鏈可變域及輕鏈可變域：US20160108123(指定給 Novartis)、WO2016/000619(申請人:Beigene)、WO2012/145493 (申請人:Amplimmune)、US9205148 (指定給 MedImmune)、WO2013/181634 (申請人:Sorrento)、及 WO2016/061142 (申請人:Novartis)。

【0185】 在另一特定態樣中，抗體進一步包含人類或鼠類恆定區。在另一態樣中，人類恆定區選自由以下項所組成之群：IgG1、IgG2、IgG2、IgG3、IgG4。在另一特定態樣中，人類恆定區為 IgG1。在另一態樣中，鼠類恆定區選自由以下項所組成之群：IgG1、IgG2A、IgG2B、IgG3。在另一態樣中，鼠類恆定區為 IgG2A。

【0186】 在另一特定態樣中，抗體具有降低或最小效應子功能。在另一特定態樣中，最小效應子功能由「無效應子 Fc 突變」或去糖基化突變引起。在另一實施例中，無效應子 Fc 突變為恆定區中之 N297A 或 D265A/N297A 取代。在一些實施例中，經分離抗 PDL1 抗體經去糖基化。抗體之糖基化通常為經 N-連接或經 O-連接的。經 N-連接係指該碳水化合物部分連接至天冬醯胺殘基之側鏈。三肽序列天冬醯胺-X-絲胺酸及天冬醯胺-X-蘇胺酸(其中 X 為除了脯胺酸外之任何胺基酸)為用於將該碳水化合物部分酶促連接至天冬醯胺側鏈之識別序列。因此，此等三肽序列中任一者於多肽中之存在均會產生潛在糖基化位點。經 O-連接之糖基化係指糖 N-乙醯半乳糖胺、半乳糖、或木糖中之一者連接至羥基胺基酸，最通常為絲胺酸或蘇胺酸，但亦可使用 5-羥基脯胺酸或 5-羥基離胺酸。藉由改變胺基酸序列使得移除上述三肽序列(對於經 N 連接之糖基化位點)之一，可便利地自抗體移除糖基化位點。可藉由用另一胺基酸殘基(例如甘胺酸、丙胺酸、

或保守取代)取代醣基化位點內之天冬醯胺、絲胺酸、或蘇胺酸殘基取代來進行改變。

【0187】 在另一實施例中，本揭露提供包含任何上述抗 PDL1 抗體與至少一種醫藥學上可接受之載劑之組合的組成物。

【0188】 在另一實施例中，本揭露提供一種組成物，其包含如本文所提供之抗 PDL1、抗 PD-1 或抗 PDL2 抗體或其抗原結合片段及至少一種醫藥學上可接受之載劑。在一些實施例中，向個體投與之抗 PDL1、抗 PD-1 或抗 PDL2 抗體或其抗原結合片段為包含一或多種醫藥學上可接受之載劑的組成物。可使用本文所述或此項技術中已知之任何醫藥學上可接受之載劑。

V. 抗體製備

【0189】 本文所述之抗體使用此項技術中可用於產生抗體之技術製備，其示範性方法在以下部分中更詳細地描述。

【0190】 抗體針對所關注抗原(例如 PD-1 或 PD-L1，諸如人類 PD-1 或 PD-L1)。較佳地，抗原為生物學上重要之多肽，且向患有病症之哺乳動物投與抗體可在該哺乳動物中產生治療益處。

【0191】 在某些實施例中，本文提供之抗體具有 $\leq 1\mu\text{M}$ 、 $\leq 150\text{ nM}$ 、 $\leq 100\text{ nM}$ 、 $\leq 50\text{ nM}$ 、 $\leq 10\text{ nM}$ 、 $\leq 1\text{ nM}$ 、 $\leq 0.1\text{ nM}$ 、 $\leq 0.01\text{ nM}$ 、或 $\leq 0.001\text{ nM}$ (例如， 10^{-8} M 或更少，例如， 10^{-8} M 至 10^{-13} M ，例如， 10^{-9} M 至 10^{-13} M)之解離常數(K_d)。

【0192】 在一個實施例中， K_d 係藉由用所關注抗體之 Fab 型式及其抗原進行放射性標記抗原結合檢定(RIA)來量測，如以下檢定所述。Fab 對抗原之溶液結合親和力藉由在一滴定系列之未經標記抗原存在下使 Fab 與最小濃度之(^{125}I)標記的抗原平衡，然後用抗 Fab 抗體塗佈之盤捕獲所結合抗原來量測(參見，例如

Chen 等人 *J. Mol. Biol.* 293:865-881(1999))。為了建立檢定條件，將 MICROTITER® 多孔盤(Thermo Scientific)用 5 µg/ml 的在 50 mM 碳酸鈉(pH 9.6)中的捕獲抗 Fab 抗體(Cappel Lab)塗佈過夜，隨後用 PBS 中的 2%(w/v)牛血清白蛋白在室溫(約 23°C)封閉二至五小時。在非吸附性盤(Nunc 編號 269620)中，將 100 pM 或 26 pM [¹²⁵I]-抗原與所關注 Fab 之系列稀釋液混合。接著將所關注 Fab 培育隔夜；然而，培育可持續更長時間(例如約 65 小時)以確保達到平衡。之後，將混合物轉移至捕獲盤中，在室溫下培育(例如達一小時)。然後移除溶液，並用在 PBS 中之 0.1% 聚山梨酯 20 (TWEEN-20®)洗滌盤 8 次。當盤乾燥時，添加 150 微升/孔閃爍體 (MICROSCINT-20™；Packard)，且在 TOPCOUNT™ γ 計數器(Packard)上對盤計數 10 分鐘。選擇提供小於或等於 20%最大結合之各 Fab 的濃度用於競爭性結合檢定。

【0193】 根據另一實施例，使用 BIACORE®-2000 或 BIACORE®-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)，在 25°C下使用在約 10 個反應單位(RU)下之經固定抗原 CM5 晶片，使用表面電漿子共振檢定來量測 K_d。簡言之，根據供應商說明書用 *N*-乙基-*N'*-(3-二甲基胺基丙基)-碳化二亞胺鹽酸鹽(EDC)及 *N*-羥基丁二醯亞胺(NHS)活化羧甲基化葡聚糖生物感測器晶片(CM5, BIACORE, Inc.)。以 10 mM 乙酸鈉(pH 4.8)稀釋抗原至 5 µg/ml (約 0.2 µM)，隨後以 5 µl/min 之流速注射，以實現約 10 個反應單位(RU)之偶合蛋白。在注射抗原後，注射 1 M 乙醇胺以阻斷未反應基團。對於動力學量測，在 25°C下將 Fab 之兩倍系列稀釋液(0.78 nM 至 500 nM)以約 25 µl/min 之流速注入到含有 0.05%聚山梨酯 20(TWEEN-20™)界面活性劑(PBST)之 PBS 中。藉由同時擬合結合及解離傳感圖，使用簡單一對一 Langmuir 結合模型(BIACORE®評估軟件版本 3.2)計算締合速率(k_{on})及解離速率(k_{off})。平衡解離常數(K_d)經計算為比率 k_{off}/k_{on}。參見例如 Chen 等人, *J.*

*Mol.Biol.*293:865-881 (1999)。若藉由以上表面電漿子共振檢定獲得之締合速率超過 $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ，則可藉由使用螢光淬滅技術來測定締合速率，該技術量測在 25°C 下，如分光計(諸如停流配備分光光度計(Aviv Instruments)或具有攪拌比色皿之 8000 系列 SLM-AMINCO™ 分光光度計(ThermoSpectronic))中所量測在增加濃度之抗原存在下，含 20 nM 抗抗原抗體(Fab 形式)之 PBS (pH 7.2)之螢光發射強度(激發= 295 nm；發射= 340 nm，16 nm 帶通)的增加或降低。

嵌合、人類化及人類抗體

【0194】 在某些實施例中，本文所提供之抗體為嵌合抗體。某些嵌合抗體描述於例如美國專利第 4,816,567 號；及 Morrison 等人, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 81:6851-6855 (1984))。在一個實例中，嵌合抗體包含非人類可變區(例如來源於小鼠、大鼠、倉鼠、兔、或非人類靈長類諸如猴的可變區)及人類恆定區。在另一實例中，嵌合抗體為「類別轉換」抗體，其中類別或子類別已自親本抗體之類別或子類別改變。嵌合抗體包括其抗原結合片段。

【0195】 在某些實施例中，嵌合抗體為人類化抗體。通常，將非人類抗體人類化以降低對人類之免疫原性，同時保留親本非人類抗體之特異性及親和力。一般而言，人類化抗體包含一或多個可變域，其中例如 CDR 的 HVR (或其部分)來源於非人類抗體，且 FR (或其部分)來源於人類抗體序列。人類化抗體視情況亦包含人類恆定區之至少一部分。在一些實施例中，人類化抗體中之一些 FR 殘基經來自非人類抗體(例如 HVR 殘基所來源之抗體)之相應殘基取代以例如恢復或改良抗體特異性或親和力。

【0196】 人類化抗體及其製備方法例如在 Almagro 及 Fransson, *Front.Biosci.*13:1619-1633 (2008)中綜述，且在例如以下各者中進一步描述：Riechmann 等人, *Nature* 332:323-329 (1988)；Queen 等人, *Proc.Nat'l Acad.Sci.USA*

86:10029-10033 (1989)；美國專利第 5,821,337 號、第 7,527,791 號、第 6,982,321 號及第 7,087,409 號；Kashmiri 等人, *Methods* 36:25-34 (2005) (描述 SDR (a-CDR) 移植)；Padlan, *Mol.Immunol.*28:489-498 (1991) (描述「表面再塑」)；Dall'Acqua 等人, *Methods* 36:43-60 (2005) (描述「FR 改組」)；及 Osbourn 等人, *Methods* 36:61-68 (2005) 及 Klimka 等人, *Br. J. Cancer*, 83:252-260 (2000) (描述 FR 改組之「引導選擇」方法)。

【0197】 可用於人類化之人類構架區包括但不限於：使用「最佳擬合」方法選擇之構架區(參見例如 Sims 等人 *J. Immunol.*151:2296 (1993))；來源於輕鏈或重鏈可變區之特定子組之人類抗體的共通序列之構架區 (參見例如 Carter 等人 *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 89:4285 (1992)；及 Presta 等人 *J. Immunol.*, 151:2623 (1993))；人類成熟(體細胞突變)構架區或人類生殖系構架區 (參見例如 Almagro 及 Fransson, *Front.Biosci.*13:1619-1633 (2008))；及由篩檢 FR 文庫獲得之構架區 (參見例如 Baca 等人, *J. Biol.Chem.*272:10678-10684 (1997)及 Rosok 等人, *J. Biol.Chem.*271:22611-22618 (1996))。

【0198】 在某些實施例中，本文所提供之抗體為人類抗體。人類抗體可以使用在此項技術中已知的各種技術來產生。人類抗體一般描述於 van Dijk 及 van d e Winkel, *Curr.Opin.Pharmacol.*5:368-74 (2001)及 Lonberg, *Curr.Opin.Immunol.*20:450-459 (2008)。

【0199】 人類抗體可藉由向已經改造以響應於抗原攻擊而產生完整人類抗體或具有人類可變區之完整抗體的基因轉殖動物投與免疫原來製備。此類動物通常含有人類免疫球蛋白基因座之全部或一部分，其置換內源性免疫球蛋白基因座，或存在於染色體外或隨機整合於動物之染色體中。在此類基因轉殖小鼠中，內源性免疫球蛋白基因座一般已失活。關於自轉殖基因動物獲得人類抗體之方

法之評述，參見 Lonberg, *Nat. Biotech.* 23:1117-1125 (2005)。亦參見例如描述 XENOMOUSE™ 技術的美國專利第 6,075,181 號及第 6,150,584 號；描述 HUMAB®技術的美國專利第 5,770,429 號；描述 K-M MOUSE®技術的美國專利第 7,041,870 號；及描述 VELOCIMOUSE®技術的美國專利申請公開案第 US 2007/0061900 號)。由此類動物生成之完整抗體之人類可變區可例如藉由與不同人類恆定區組合來進一步修飾。

【0200】 人類抗體亦可藉由基於融合瘤之方法製備。已描述了用於產生人類單株抗體之人類骨髓瘤及小鼠-人類雜骨髓瘤細胞株。(參見例如 Kozbor *J. Immunol.*, 133:3001 (1984)；Brodeur 等人, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, 第 51-63 頁 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)；及 Boerner 等人, *J. Immunol.*, 147:86 (1991)。)經由人類 B 細胞融合瘤技術產生之人類抗體亦描述於 Li 等人, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 103:3557-3562 (2006)。額外方法包括例如在美國專利第 7,189,826 號(描述了自融合瘤細胞株產生單株人類 IgM 抗體)及 Ni, *Xiandai Mianyixue*, 26(4):265-268 (2006)(描述了人類-人類融合瘤)中描述之彼等方法。人類融合瘤技術(三源融合瘤技術)亦描述於 Vollmers 及 Brandlein, *Histology and Histopathology*, 20(3):927-937 (2005)及 Vollmers 及 Brandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 27(3):185-91 (2005)中。

【0201】 亦可以藉由分離選自人源噬菌體顯示文庫之 Fv 純系可變域序列來生成人類抗體。隨後可以將此類可變域序列與所要人類恆定域組合。用於自抗體文庫選擇人類抗體之技術如下所述。

抗體片段

【0202】 抗體片段可藉由傳統方式諸如酶促消化或藉由重組技術生成。在某

些情況下，宜使用抗體片段而非完整抗體。片段之較小尺寸使得可快速清除，且可改良實體腫瘤之獲取。關於某些抗體片段之綜述，參見 Hudson 章(2003) *Nat. Med.* 9:129-134。

【0203】 已開發用於產生抗體片段之各種技術。傳統上，此等片段經由完整抗體之蛋白水解消化來產生(參見，例如，Morimoto 等人，*Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992)；及 Brennan 等人，*Science*, 229:81 (1985))。然而，此等片段現可直接由重組宿主細胞產生。Fab、Fv 及 ScFv 抗體片段均可在大腸桿菌(*E. coli*)中表現且自大腸桿菌分泌，因此可容易地產生大量此等片段。抗體片段可自以上論述之抗體噬菌體文庫中分離。或者，可直接自大腸桿菌回收 Fab'-SH 片段且化學偶合以形成 F(ab')₂ 片段(Carter 等人，*Bio/Technology* 10:163-167 (1992))。根據另一方法，可直接自重組宿主細胞培養物分離 F(ab')₂ 片段。包含拯救受體結合表位殘基且活體內半衰期增加之 Fab 及 F(ab')₂ 片段描述於美國專利第 5,869,046 號。用於產生抗體片段之其他技術對於熟練從業者將為顯而易知的。在某些實施例中，抗體為單鏈 Fv 片段(scFv)。參見 WO 93/16185；美國專利第 5,571,894 號；及第 5,587,458 號。Fv 及 scFv 為無恆定區之具有完整組合位點之唯一物質；因此，其可適合於在活體內使用期間減少之非特異性結合。可構築 scFv 融合蛋白以在 scFv 之胺基端或羧基端產生效應蛋白之融合物。參見 *Antibody Engineering*, Borrebaeck 編(出處同上)。抗體片段亦可為「線性抗體」，例如在美國專利第 5,641,870 號中所描述。此類線性抗體可為單特異性或雙特異性的。

單域抗體

【0204】 在一些實施例中，本揭露之抗體為單域抗體。單域抗體為包含抗體重鏈可變域之全部或一部分或輕鏈可變域之全部或一部分的單一多肽鏈。在某

些實施例中，單域抗體為人類單域抗體(Domantis, Inc., Waltham, Mass.；參見例如美國專利第 6,248,516 B1 號)。在一個實施例中，單域抗體由抗體重鏈可變域之全部或部分組成。

抗體變異體

【0205】 在一些實施例中，涵蓋本文所述抗體之胺基酸序列修飾。例如，可能需要改良抗體之結合親和力及/或其他生物特性。抗體之胺基酸序列變異體可藉由將適當改變引入編碼抗體之核苷酸序列中或藉由肽合成來製備。此類修飾包括例如抗體之胺基酸序列內的殘基之缺失、及/或插入、及/或取代。可製得缺失、插入、及取代之任何組合以獲得最終構築體，其限制條件在於該最終構築體具有所要特徵。可在製備序列時在標的抗體胺基酸序列中引入胺基酸改變。

取代、插入及缺失變異體

【0206】 在某些實施例中，提供具有一或多個胺基酸取代之抗體變異體。用於取代突變誘發之所關注位點包括 HVR 及 FR。保守取代展示於表 3 中。更實質性變化提供於表 1 中之標題「示範性取代」下，且如下文參考胺基酸側鏈類別進一步描述。可將胺基酸取代引入所關注抗體中，且針對如下所要活性篩選產物，例如經保留/改良之抗原結合、經降低之免疫原性或經改良之 ADCC 或 CDC。

表3.保守取代

原始殘基	示範性取代	較佳取代
Ala (A)	Val；Leu；Ile	Val
Arg (R)	Lys；Gln；Asn	Lys
Asn (N)	Gln；His；Asp, Lys；Arg	Gln
Asp (D)	Glu；Asn	Glu
Cys (C)	Ser；Ala	Ser
Gln (Q)	Asn；Glu	Asn
Glu (E)	Asp；Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala

原始殘基	示範性取代	較佳取代
His (H)	Asn ; Gln ; Lys ; Arg	Arg
Ile (I)	Leu ; Val ; Met ; Ala ; Phe ; 正白胺酸	Leu
Leu (L)	正白胺酸 ; Ile ; Val ; Met ; Ala ; Phe	Ile
Lys (K)	Arg ; Gln ; Asn	Arg
Met (M)	Leu ; Phe ; Ile	Leu
Phe (F)	Trp ; Leu ; Val ; Ile ; Ala ; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val ; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr ; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp ; Phe ; Thr ; Ser	Phe
Val (V)	Ile ; Leu ; Met ; Phe ; Ala ; 正白胺酸	Leu

【0207】 胺基酸可根據共有側鏈特性分組：

- a. 疏水性：正白胺酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile；
- b. 中性親水性：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln；
- c. 酸性：Asp、Glu；
- d. 鹼性：His、Lys、Arg；
- e. 影響
鏈取向之殘基：Gly、Pro；
- f. 芳族：Trp、Tyr、Phe。

【0208】 非保守取代需要將此等類別之一的成員交換為另一類別。

【0209】 一種類型之取代型變異體涉及取代親本抗體(例如人類化抗體或人類抗體)之一或多個高變區殘基。一般而言，選擇用於進一步研究之所得變異體將相對於親本抗體具有某些生物特性之改變(例如改良) (例如經提高之親和力、經減少之免疫原性)，及/或將具有實質上保留之親本抗體之某些生物特性。示範性取代變異體為親和力成熟抗體，其可例如使用基於噬菌體呈現之親和力成熟

技術諸如本文所述之技術便利地產生。簡言之，使一或多個 HVR 殘基突變，且在噬菌體上呈現變異抗體且針對特定生物活性(例如結合親和力)進行篩選。

【0210】 可在HVR中進行改變(例如取代)，例如以改良抗體親和力。可在HVR「熱點」(亦即由在體細胞成熟過程期間經受高頻率突變之密碼子編碼之殘基)(參見例如Chowdhury, *Methods Mol.Biol.* 207:179-196, 2008)及/或SDR (a-CDR)中進行此等改變，且測試所得變異型 VH 或 VL 之結合親和力。藉由構築及自二級文庫再選擇進行之親和力成熟已描述於例如 Hoogenboom 等人, *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien 等人編, Human Press, Totowa, NJ, (2001).)。在親和力成熟之一些實施例中，多樣性經引入至經選擇用於藉由多種方法(例如，易錯 PCR、鏈改組、或寡核苷酸定點突變誘發)中任一者實現之成熟之可變基因中。隨後產生二級文庫。接著篩選該文庫以鑑別具有所要親和力之任何抗體變異體。另一種引入多樣性之方法涉及 HVR 定點方法，其中將數個 HVR 殘基(例如每次 4-6 個殘基)隨機化。參與抗原結合之 HVR 殘基可例如使用丙胺酸掃描突變誘發或模型化特別地鑑別。特定而言，時常靶向 CDR-H3 及 CDR-L3。

【0211】 在某些實施例中，取代、插入、或缺失可出現於一或多個 HVR 內，只要此類改變不會實質上降低該抗體結合抗原之能力。例如，可在 HVR 中產生不會實質上降低結合親和力之保守改變(例如，如本文所提供之保守取代)。此類改變可在 HVR「熱點」或 SDR 以外。在上文所提供之變異體 VH 及 VL 序列的某些實施例中，各 HVR 未改變，或含有不多於一個、兩個、或三個胺基酸取代。

【0212】 用於鑑別抗體中可經靶向用於突變誘發之殘基或區的適用方法係稱為「丙胺酸掃描突變誘發」，如由 Cunningham 及 Wells (1989) *Science*, 244:1081-1085 所述。在此方法中，鑑別一殘基或一組標靶殘基(例如帶電荷殘基，諸如 arg、asp、his、lys 及 glu)且置換為中性或帶負電荷之胺基酸(例如丙胺

酸或聚丙胺酸)以判定抗體與抗原之相互作用是否受影響。可在對初始取代展示功能敏感性之胺基酸位置處引入進一步取代。另選或另外，抗原-抗體複合物之晶體結構鑑別該抗體與抗原之間的接觸點。此類接觸殘基及相鄰殘基可經靶向或消除以作為取代之候選者。可篩選變異體以判定其是否含有所要特性。

【0213】 胺基酸序列插入包括在一個殘基至含有一百個或更多個殘基之多肽之長度範圍內的胺基端及/或羧基端融合物，以及單個或多個胺基酸殘基之序列內插入。末端插入之實例包括具有 N 端甲硫胺醯基殘基之抗體。該抗體分子之其他插入變異體包括該抗體之 N 端或 C 端與酶(例如，針對 ADEPT)之融合物或增加該抗體之血清半衰期的多肽。

糖基化變異體

【0214】 在某些實施例中，對本文所提供之抗體進行改變以增加或降低抗體醣基化之程度。向抗體添加醣基化位點或使抗體缺失醣基化位點可藉由改變胺基酸序列以便產生或移除一或多個醣基化位點來便利地實現。

【0215】 在抗體包含 Fc 區之情況下，可改變連接於其上之碳水化合物。由哺乳動物細胞產生之天然抗體通常包含分支雙觸角寡醣，該寡醣一般藉由 N-鍵聯連接至該 Fc 區之 CH2 域的 Asn297。參見例如 Wright 等人 *TIBTECH* 15:26-32 (1997)。該寡醣可包括各種碳水化合物，例如甘露糖、N-乙醯基葡萄糖胺(GlcNAc)、半乳糖及唾液酸，以及連接於在雙觸角寡醣結構之「幹」中之 GlcNAc 的海藻糖。在一些實施例中，可對本揭露之抗體中之寡醣進行修飾以便產生具有某些經改良特性之抗體變異體。

【0216】 在一個實施例中，提供了包含 Fc 區之抗體變異體，其中與 Fc 區連接之碳水化合物結構具有減少之海藻糖或缺乏海藻糖，從而可改良 ADCC 功能。特定言之，本文涵蓋如下抗體，相對於野生型 CHO 細胞中產生之相同抗體

上之海藻糖量，其具有減少之海藻糖。亦即，其特徵在於相較於由天然 CHO 細胞(例如產生天然糖基化模式之 CHO 細胞，諸如含有天然 FUT8 基因之 CHO 細胞)產生時所具有之海藻糖量，具有更少量之海藻糖。在某些實施例中，抗體為其上之 N-連接聚醣中少於約 50%、40%、30%、20%、10%、或 5% 包含海藻糖之抗體。例如，此種抗體中海藻糖之量可為 1% 至 80%、1% 至 65%、5% 至 65%、或 20% 至 40%。在某些實施例中，抗體為其上之 N-連接聚醣均不包含海藻糖之抗體，亦即其中抗體完全不含海藻糖，或無海藻糖或經去海藻糖基化。海藻糖之量藉由計算糖鏈內 Asn297 處之海藻糖相對於連接於 Asn 297 上之所有醣結構(例如複合、雜交及高甘露糖結構)之總和的平均量(如藉由 MALDI-TOF 質譜分析所量測)來判定，如例如 WO 2008/077546 中所描述。Asn297 係指位於 Fc 區中約位置 297 處之天冬醯胺殘基(Fc 區殘基之 Eu 編號)；然而，由於抗體中之微小序列變化，Asn297 亦可位於位置 297 上游或下游之約 ± 3 個胺基酸處，亦即位於位置 294 與 300 之間。此類海藻糖化變異體可具有經改良之 ADCC 功能。參見例如美國專利公開案第 US 2003/0157108 號(Presta, L.)；US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd)。與「去海藻糖基化」或「海藻糖缺乏」抗體變異體相關之公開案之實例包括：US 2003/0157108；WO 2000/61739；WO 2001/29246；US 2003/0115614；US 2002/0164328；US 2004/0093621；US 2004/0132140；US 2004/0110704；US 2004/0110282；US 2004/0109865；WO 2003/085119；WO 2003/084570；WO 2005/035586；WO 2005/035778；WO2005/053742；WO2002/031140；Okazaki 等人 *J. Mol. Biol.* 336:1239-1249 (2004)；Yamane-Ohnuki 等人 *Biotech. Bioeng.* 87:614 (2004)。能夠產生去海藻糖基化抗體之細胞株之實例包括缺乏蛋白海藻糖基化作用之 Lec13 CHO 細胞 (Ripka 等人 *Arch. Biochem. Biophys.* 249:533-545 (1986)；美國專利申請案第 US 2003/0157108

A1 號, Presta, L ; 及 WO 2004/056312 A1 , Adams 等人, 尤其在實例 11 中)及基因剔除細胞株, 諸如 α -1,6-海藻糖基轉移酶基因 *FUT8* 基因剔除 CHO 細胞(參見例如 Yamane-Ohnuki 等人 *Biotech.Bioeng.*87:614 (2004); Kanda, Y.等 人, *Biotechnol.Bioeng.*, 94(4):680-688 (2006); 及 WO2003/085107)。

【0217】 進一步提供具有平分寡醣之抗體變異體, 例如其中連接於抗體 Fc 區之雙觸角寡醣由 GlcNAc 平分。此類抗體變異體可具有經降低之海藻糖化及/或經改良之 ADCC 功能。此類抗體變異體之實例描述於例如 WO 2003/011878 (Jean-Mairet 等人); 美國專利第 6,602,684 號 (Umana 等人); US 2005/0123546 (Umana 等人)、及 Ferrara 等人, *Biotechnology and Bioengineering*, 93(5):851-861 (2006)。亦提供在連接至 Fc 區之寡醣中具有至少一個半乳糖殘基之抗體變異體。此類抗體變異體可具有經改良之 CDC 功能。此類抗體變異體描述於例如 WO 1997/30087 (Patel 等人); WO 1998/58964 (Raju, S.); 及 WO 1999/22764 (Raju, S.) 中。

【0218】 在某些實施例中, 包含本文所述 Fc 區的抗體變異體能夠結合至 Fc γ RIII。在某些實施例中, 與包含人類野生型 IgG1Fc 區之其他方面相同之抗體相比, 包含本文所述 Fc 區之抗體變異體在人類效應細胞存在下具有 ADCC 活性或在人類效應細胞存在下具有經增加之 ADCC 活性。

Fc 區變異體

【0219】 在某些實施例中, 可將一或多個胺基酸修飾引入至本文所提供之抗體的 Fc 區中, 從而生成 Fc 區變異體。該 Fc 區變異體可包含在一或多個胺基酸位置處包含胺基酸修飾(例如, 取代)之人類 Fc 區序列(例如, 人類 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 Fc 區)。

【0220】 在某些實施例中, 本揭露涵蓋一種具有一些而非所有效應子功能之

抗體變異體，此使該抗體變異體成為如下應用之適宜候選者，在該等應用中抗體之活體內半衰期為重要的，但某些效應子功能(諸如補體及 ADCC)不必要或有害。可進行活體外及/或活體內細胞毒性檢定以確認 CDC 及/或 ADCC 活性的降低/減少。例如，可以進行 Fc 受體(FcR)結合檢定以確保抗體缺乏 FcγR 結合(因此有可能缺乏 ADCC 活性)，但保留 FcRn 結合能力。介導 ADCC 之原代細胞 NK 細胞僅表現 Fc(RIII)，而單核細胞表現 Fc(RI、Fc(RII 及 Fc(RIII。造血細胞上之 FcR 表現概述於 Ravetch 及 Kinet, *Annu.Rev. Immunol.* 9:457-492 (1991)第 464 頁之表 3 中。用於評估所關注分子之 ADCC 活性的活體外檢定之非限制性實例描述於美國專利第 5,500,362 號中(參見例如 Hellstrom, I.等人 *Proc.Nat'l Acad.Sci.USA* 83:7059-7063 (1986))及 Hellstrom, I 等人, *Proc.Nat'l Acad.Sci.USA* 82:1499-1502 (1985)；5,821,337 (參見 Bruggemann, M.等人, *J. Exp.Med.* 166:1351-1361 (1987))。或者，可採用非放射性檢定方法(參見例如流動式細胞量測術之 ACTI™非放射性細胞毒性檢定(CellTechnology, Inc. Mountain View, CA)；及 CytoTox 96®非放射性細胞毒性檢定(Promega, Madison, WI))。適用於此類檢定之效應細胞包括外周血單核細胞(PBMC)及自然殺手(NK)細胞。另選或另外，可在活體內，例如在動物模型中，諸如 Clynes 等人 *Proc.Nat'l Acad.Sci.USA* 95:652-656 (1998)中所揭示之動物模型中評估所關注分子之 ADCC 活性。亦可進行 C1q 結合檢定以確認該抗體不能結合 C1q 且因此缺乏 CDC 活性。參見例如 WO 2006/029879 及 WO 2005/100402 中之 C1q 及 C3c 結合 ELISA。為評估補體活化，可進行 CDC 檢定(參見例如 Gazzano-Santoro 等人, *J. Immunol.Methods* 202:163 (1996)；Cragg, M.S. 等人, *Blood* 101:1045-1052 (2003)；及 Cragg, M.S.及 M.J.Glennie, *Blood* 103:2738-2743 (2004))。亦可使用此項技術中已知之方法對 FcRn 結合及活體內清除率/半衰期進行測定(參見例如 Petkova, S.B.等人,

Int'l. Immunol. 18(12):1759-1769 (2006))。

【0221】 效應子功能減小之抗體包括具有 Fc 區殘基 238、265、269、270、297、327、及 329 中之一或多者之取代的彼等抗體(美國專利第 6,737,056 號)。此類 Fc 突變體包括具有胺基酸 265、269、270、297、及 327 位中之二或更多者之取代的 Fc 突變體，包括殘基 265 及 297 取代為丙胺酸的所謂「DANA」Fc 突變體(美國專利第 7,332,581 號)。

【0222】 描述了具有經改良或減弱之與 FcR 之結合的某些抗體變異體。(參見例如美國專利第 6,737,056 號；WO 2004/056312 及 Shields 等人, *J. Biol. Chem.* 9(2):6591-6604 (2001)。)

【0223】 在某些實施例中，抗體變異體包含具有改良 ADCC 之一或多個胺基酸取代的 Fc 區，該等取代例如 Fc 區之位置 298、333 及/或 334 (殘基之 EU 編號)處之取代。在示範性實施例中，抗體在其 Fc 區中包含以下胺基酸取代：S298A、E333A、及 K334A。

【0224】 在一些實施例中，在 Fc 區中進行導致 C1q 結合及/或補體依賴性細胞毒性(CDC)改變(亦即改良或削弱)之改變，例如如美國專利第 6,194,551 號、WO 99/51642 及 Idusogie 等人 *J. Immunol.* 164:4178-4184 (2000)中所述。

【0225】 半衰期增加且與負責將母體 IgG 轉移至胎兒之新生兒 Fc 受體 (FcRn)(Guyer 等人 *J. Immunol.* 117:587 (1976)及 Kim 等人, *J. Immunol.* 24:249, 1994)之結合得以改良的抗體描述於 US2005/0014934A1(Hinton 等人)中。彼等抗體包含其中具有一或多種取代之 Fc 區，該等取代改良 Fc 區與 FcRn 之結合。此類 Fc 變異體包括在 Fc 區殘基中之一或多者處具有取代之彼等變異體：238、256、265、272、286、303、305、307、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424 或 434，例如 Fc 區殘基 434 處的取代(美國專利第 7,371,826

號)。亦參見 Duncan 及 Winter, *Nature* 322:738-40 (1988)；美國專利第 5,648,260 號；美國專利第 5,624,821 號；及 WO 94/29351，其涉及 Fc 區變異體之其他實例。

VI. 醫藥組成物及調配物

【0226】 本文亦提供例如用於治療癌症之醫藥組成物及調配物。在一些實施例中，醫藥組成物及調配物亦包含醫藥學上可接受之載劑。

【0227】 在製備所關注抗體(例如本文詳述且此項技術中已知用於產生可如本文所揭示調配之抗體的技術)後，製備包含該抗體之醫藥調配物。在某些實施例中，欲調配抗體未進行預先凍乾，且本文之所關注調配物為水性調配物。在某些實施例中，抗體為全長抗體。在一個實施例中，調配物中之抗體為抗體片段，諸如 $F(ab')_2$ ，在該情況下，可能需要解決全長抗體可能不會出現之問題(諸如將抗體剪切為 Fab)。舉例而言，藉由考慮所要劑量體積及投與方式來判定調配物中存在之抗體的治療有效量。調配物中之示範性抗體濃度為約 25 mg/mL 至約 150 mg/mL、或約 30 mg/mL 至約 140 mg/mL、或約 35 mg/mL 至約 130 mg/mL、或約 40 mg/mL 至約 120 mg/mL、或約 50 mg/mL 至約 130 mg/mL、或約 50 mg/mL 至約 125 mg/mL、或約 50 mg/mL 至約 120 mg/mL、或約 50 mg/mL 至約 110 mg/mL、或約 50 mg/mL 至約 100 mg/mL、或約 50 mg/mL 至約 90 mg/mL、或約 50 mg/mL 至約 80 mg/mL、或約 54 mg/mL 至約 66 mg/mL。在一些實施例中，本文所述抗 PDL1 抗體(諸如阿特珠單抗)以約 1200 mg 之劑量投與。在一些實施例中，本文所述抗 PD1 抗體(諸如帕博利珠單抗)以約 200 mg 之劑量投與。在一些實施例中，本文所述抗 PD1 抗體(諸如納武單抗)以約 240 mg(例如，每 2 週)或 480 mg(例如，每 4 週)之劑量投與。

【0228】 在一些實施例中，本文所述 RNA 疫苗以約 15 μ g、約 25 μ g、約 38 μ g、約 50 μ g、或約 100 μ g 之劑量投與。

【0229】 如本文描述之醫藥組成物及調配物可藉由將具有所要純度之活性成分(例如抗體或多肽)與一或多種可選醫藥學上可接受之載劑(*Remington's Pharmaceutical Sciences* 第 16 版, Osol, A. Ed. (1980))混合成經凍乾調配物或水溶液形式來製備。醫藥學上可接受之載劑通常在所用劑量及濃度下對接受者無毒，且包括但不限於：緩衝劑，諸如磷酸鹽、檸檬酸鹽及其他有機酸；抗氧化劑，包括抗壞血酸及甲硫胺酸；防腐劑(諸如氯化十八烷基二甲基苯甲基銨；氯化六羥季銨；氯化苯甲銨；苄索氯銨；苯酚、丁醇或苯甲醇；對羥基苯甲酸銨酯，諸如對羥基苯甲酸甲酯或對羥基苯甲酸丙酯；兒茶酚(catechol)；間苯二酚；環己醇；3-戊醇；及間甲酚)；低分子量(少於約 10 個殘基)多肽；蛋白質，諸如血清白蛋白、明膠或免疫球蛋白；親水性聚合物，諸如聚乙烯吡咯啉酮；胺基酸，諸如甘胺酸、麩醯胺酸、天冬醯胺、組胺酸、精胺酸或離胺酸；單醣、二醣及其他碳水化合物，包括葡萄糖、甘露糖或糊精；螯合劑，諸如 EDTA；糖，諸如蔗糖、甘露糖醇、海藻糖或山梨糖醇；成鹽相對離子，諸如鈉；金屬錯合物(例如 Zn-蛋白錯合物)；及/或非離子介面活性劑，諸如聚乙二醇(PEG)。本文的示範性醫藥學上可接受之載劑進一步包括間質藥物分散劑，諸如可溶性中性活性玻尿酸酶醣蛋白(sHASEGP)，例如人類可溶性 PH-20 玻尿酸酶醣蛋白，諸如 rHuPH20 (HYLENEX[®]，Baxter International, Inc.)。某些示範性 sHASEGP (包括 rHuPH20)及使用方法描述於美國專利公開案第 2005/0260186 號及第 2006/0104968 號中。在一個態樣中，sHASEGP 與一或多種額外醣胺聚醣酶(諸如軟骨素酶)組合。

【0230】 示範性經凍乾抗體調配物描述於美國專利第 6,267,958 號中。水性抗體調配物包括美國專利第 6,171,586 號及 WO2006/044908 中所描述之彼等水性抗體調配物，WO2006/044908 中所描述之調配物包括組胺酸-乙酸鹽緩衝液。

【0231】 本文之組成物及調配物亦可含有超過一種為所治療特定適應症所必需之活性成分，較佳為具有互補活性且不會不利地彼此影響之活性成分。此類活性成分合適地以有效用於預期目的之量組合存在。

【0232】 活性成分可經包埋於例如藉由凝聚技術或藉由界面聚合製備之微膠囊中，例如分別在膠狀藥物遞送系統中(例如，脂質體、白蛋白微球、微乳液、奈米粒子、及奈米膠囊)或在巨乳液中之羥基甲基纖維素或明膠-微膠囊及聚-(甲基丙烯酸甲酯)微膠囊。此類技術揭示於 *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 第 16 版, Osol, A. 編 (1980) 中。

【0233】 可製備持續釋放製劑。持續釋放製劑之適合實例包括含有抗體之固體疏水性聚合物的半透性基質，該等基質呈成形製品，例如薄膜或微膠囊形式。欲用於活體內投與之調配物一般為無菌的。無菌性可易於例如藉由經無菌過濾膜過濾來達成。

【0234】 阿特珠單抗及帕博利珠單抗之醫藥調配物為可購得的。例如，阿特珠單抗在商品名稱(如本文中別處描述)TECENTRIQ®下為已知的。帕博利珠單抗在商品名稱(如本文中別處描述)KEYTRUDA®為已知的。在一些實施例中，將阿特珠單抗及 RNA 疫苗、或帕博利珠單抗及 RNA 疫苗提供於單獨容器中。在一些實施例中，如與市售產品一起可獲得之處方資訊中所描述，使用且/或製備阿特珠單抗及帕博利珠單抗用於投與至個體。

VII. 治療方法

【0235】 本文提供用於治療個體之癌症或延遲其進展之方法，其包含向個體投與有效量之 PD-1 軸結合拮抗劑及 RNA 疫苗。在一些實施例中，個體為人類。

【0236】 本揭露之任何 PD-1 軸結合拮抗劑及 RNA 疫苗可適用於本文描述之方法。在一些實施例中，RNA 疫苗包含編碼由腫瘤標本中存在之癌症特異性體

細胞突變所產生之 10-20 個新表位的一或多種多核苷酸。在一些實施例中，RNA 疫苗包含編碼由腫瘤標本中存在之癌症特異性體細胞突變所產生之 5-20 個新表位的一或多種多核苷酸。在一些實施例中，RNA 疫苗經調配成脂質複合體奈米粒子或脂質體。在一些實施例中，RNA 之脂質複合體奈米粒子調配物(RNA-脂質複合體)用於實現本揭露之 RNA 疫苗之 IV 遞送。在一些實施例中，PCV 例如以脂質體調配物形式，以 15 μ g、25 μ g、38 μ g、50 μ g、或 100 μ g 之劑量來靜脈內投與。在一些實施例中，每劑量遞送 15 μ g、25 μ g、38 μ g、50 μ g、或 100 μ g 之 RNA(亦即，劑量重量反映所投與 RNA 之重量，而非所投與調配物或脂質複合體之總重量)。可將超過一種 PCV 投與至受試者，例如，向受試者投與具有新表位之組合的一種 PCV 且亦投與具有不同新表位組合之單獨 PCV。在一些實施例中，具有十個新表位之第一 PCV 與具有十個替代表位之第二 PCV 一起組合投與。在一些實施例中，PD-1 軸結合拮抗劑為抗 PD-1 抗體，包括但不限於帕博利珠單抗。在一些實施例中，PD-1 軸結合拮抗劑為抗 PD-L1 抗體，包括但不限於阿特珠單抗。

【0237】 在一些實施例中，PD-1 軸結合拮抗劑以 21 天或 3 週之時間間隔投與至個體。在一些實施例中，PD-1 軸結合拮抗劑為抗 PD-1 抗體(例如，帕博利珠單抗)，其以 21 天或 3 週之時間間隔，例如以約 200 mg 之劑量投與至個體。在一些實施例中，PD-1 軸結合拮抗劑為抗 PD-1 抗體(例如，西米單抗-rwlc)，其以 21 天或 3 週之時間間隔，例如以約 350 mg 之劑量投與至個體。在一些實施例中，PD-1 軸結合拮抗劑為抗 PD-L1 抗體(例如，阿特珠單抗)，其以 21 天或 3 週之時間間隔，例如以約 1200 mg 之劑量投與至個體。

【0238】 在一些實施例中，PD-1 軸結合拮抗劑以 14 天或 28 天之時間間隔投與至個體。在一些實施例中，PD-1 軸結合拮抗劑以 2 週或 4 週之時間間隔投與

至個體。在一些實施例中，PD-1 軸結合拮抗劑為抗 PD-1 抗體(例如，納武單抗)，其以 14 天、2 週、28 天、或 4 週之時間間隔，例如以約 240 mg 之劑量以 14 天或 2 週之時間間隔或以約 480 mg 之劑量以 28 天或 4 週之時間間隔投與至個體。在一些實施例中，PD-1 軸結合拮抗劑為抗 PD-1 抗體(例如，納武單抗)，其以 21 天或 3 週之時間間隔，例如以約 1mg/kg 之劑量達 1 個、2 個、3 個、或 4 個劑量投與至個體，視情況與抗 CTLA-4 抗體(例如，依匹單抗)組合，且視情況隨後以 14 天、2 週、28 天、或 4 週之時間間隔，例如以約 240 mg 之劑量以 14 天或 2 週之時間間隔或以約 480 mg 之劑量以 28 天或 4 週之時間間隔來單獨投與抗 PD-1 抗體(例如，納武單抗)。

【0239】 在一些實施例中，PD-1 軸結合拮抗劑以 14 天或 2 週之時間間隔投與至個體。在一些實施例中，PD-1 軸結合拮抗劑為抗 PD-L1 抗體(例如，度伐魯單抗)，其以 14 天或 2 週之時間間隔，例如以約 10 mg/kg 之劑量投與至個體(視情況藉由在 60 分鐘內靜脈內輸注)。在一些實施例中，PD-1 軸結合拮抗劑為抗 PD-L1 抗體(例如，阿維魯單抗)，其以 14 天或 2 週之時間間隔，例如以約 10 mg/kg 之劑量投與至個體(視情況藉由在 60 分鐘內靜脈內輸注)。

【0240】 在一些實施例中，RNA 疫苗以 21 天或 3 週之時間間隔投與至個體。

【0241】 在一些實施例中，PD-1 軸結合拮抗劑及 RNA 疫苗在 8 個 21 天週期中投與至個體。在一些實施例中，RNA 疫苗在第 2 週期之第 1、8、及 15 天及第 3-7 週期之第 1 天投與至個體。在一些實施例中，PD-1 軸結合拮抗劑在第 1-8 週期之第 1 天投與至個體。在一些實施例中，RNA 疫苗在第 2 週期之第 1、8、及 15 天及第 3-7 週期之第 1 天投與至個體，且 PD-1 軸結合拮抗劑在第 1-8 週期之第 1 天投與至個體。

【0242】 在一些實施例中，PD-1 軸結合拮抗劑及 RNA 疫苗在第 8 週期之後

進一步投與至個體。在一些實施例中，PD-1 軸結合拮抗劑及 RNA 疫苗在 17 個額外 21 天週期中進一步投與至個體，其中 PD-1 軸結合拮抗劑在第 13-29 週期之第 1 天投與至個體，且/或其中 RNA 疫苗在第 13、21、及 29 週期之第 1 天投與至個體。

【0243】 在某些實施例中，PD-1 軸結合拮抗劑及 RNA 疫苗在 8 個 21 天週期中投與至個體，其中 PD-1 軸結合拮抗劑為帕博利珠單抗且在第 1-8 週期之第 1 天以約 200 mg 之劑量投與至個體，且其中 RNA 疫苗在第 2 週期之第 1、8、及 15 天及第 3-7 週期之第 1 天以約 25 µg 之劑量投與至個體。在某些實施例中，PD-L1 軸結合拮抗劑及 RNA 疫苗在 8 個 21 天週期中投與至個體，其中 PD-L1 軸結合拮抗劑為阿特珠單抗且在第 1-8 週期之第 1 天以約 1200 mg 之劑量投與至個體，且其中 RNA 疫苗在第 2 週期之第 1、8、及 15 天及第 3-7 週期之第 1 天以約 25 µg 之劑量投與至個體。在一些實施例中，RNA 疫苗在第 2 週期之第 1 天以約 25 µg、在第 2 週期之第 8 天以約 25 µg、在第 2 週期之第 15 天以約 25 µg、且在第 3-7 週期中之各者之第 1 天以約 25 µg 之劑量投與至個體(亦即，在第 2 週期期間之 3 個劑量內，將總共約 75 µg 之疫苗投與至個體)。在一些實施例中，在投與 RNA 疫苗之第一週期期間之 3 個劑量內，將總共約 75 µg 之疫苗投與至個體。

【0244】 在某些實施例中，PD-1 軸結合拮抗劑及 RNA 疫苗在 8 個 21 天週期中投與至個體，其中 PD-1 軸結合拮抗劑為帕博利珠單抗且在第 1-8 週期之第 1 天以約 200 mg 之劑量投與至個體，且其中 RNA 疫苗在第 2 週期之第 1、8、及 15 天及第 3-7 週期之第 1 天以約 25 µg 之劑量投與至個體。在某些實施例中，PD-L1 軸結合拮抗劑及 RNA 疫苗在 8 個 21 天週期中投與至個體，其中 PD-L1 軸結合拮抗劑為阿特珠單抗且在第 1-8 週期之第 1 天以約 1200 mg 之劑量投與至

個體，且其中 RNA 疫苗在第 2 週期之第 1、8、及 15 天及第 3-7 週期之第 1 天以約 25 μg 之劑量投與至個體。在一些實施例中，RNA 疫苗在第 2 週期之第 1 天以 25 μg 、在第 2 週期之第 8 天以 25 μg 、在第 2 週期之第 15 天以 25 μg 、且在第 3-7 週期中之各者之第 1 天以 25 μg 之劑量投與至個體(亦即，在第 2 週期期間之 3 個劑量內，將總共 75 μg 之疫苗投與至個體)。在一些實施例中，在投與 RNA 疫苗之第一週期期間之 3 個劑量內，將總共 75 μg 之疫苗投與至個體。

【0245】 PD-1 軸結合拮抗劑及 RNA 疫苗可以任何順序投與。例如，PD-1 軸結合拮抗劑及 RNA 疫苗可依序(在不同時間)或同時(在同一時間)投與。在一些實施例中，PD-1 軸結合拮抗劑及 RNA 疫苗係在單獨組成物中。在一些實施例中，PD-1 軸結合拮抗劑及 RNA 疫苗在同一組成物中。

【0246】 在一些實施例中，癌症選自由以下組成之群：黑素瘤、非小細胞肺癌、膀胱癌、結直腸癌、三陰性乳癌、腎癌、及頭頸癌。在一些實施例中，癌症為局部晚期或轉移性黑素瘤、非小細胞肺癌、膀胱癌、結直腸癌、三陰性乳癌、腎癌、及頭頸癌。在一些實施例中，癌症選自由以下組成之群：非小細胞肺癌、膀胱癌、結直腸癌、三陰性乳癌、腎癌、及頭頸癌。在一些實施例中，癌症為局部晚期或轉移性非小細胞肺癌、膀胱癌、結直腸癌、三陰性乳癌、腎癌、及頭頸癌。

【0247】 在一些實施例中，癌症為黑素瘤。在一些實施例中，黑素瘤為皮膚或黏膜黑素瘤。在一些實施例中，黑素瘤為皮膚、黏膜或肢端黑素瘤。在一些實施例中，黑素瘤並非眼部或肢端黑素瘤。在一些實施例中，黑素瘤為轉移性或不可切除的局部晚期黑素瘤。在一些實施例中，黑素瘤為 IV 期黑素瘤。在一些實施例中，黑素瘤為 IIIC 期或 IIID 期黑素瘤。在一些實施例中，黑素瘤為不可切除或轉移性的局部晚期黑素瘤。在一些實施例中，該方法提供黑素瘤之輔

助治療。

【0248】 在一些實施例中，癌症(例如，黑素瘤)為先前未治療的。在一些實施例中，癌症為先前未治療晚期黑素瘤。

【0249】 在一些實施例中，在根據本文描述之任何方法用 PD-1 軸結合拮抗劑及 RNA 疫苗治療之前，在用基於 PD-1 軸結合拮抗劑之單一療法來治療，例如，在不存在 RNA 疫苗的情況下用帕博利珠單抗來治療之後，個體發生進展或未能對該治療作出充分反應。

【0250】 PD-1 軸結合拮抗劑及 RNA 疫苗可藉由相同投與途徑或藉由不同投與途徑投與。在一些實施例中，PD-1 軸結合拮抗劑係靜脈內、肌肉內、皮下、局部、經口、經皮、腹膜內、眶內、藉由植入、藉由吸入、鞘內、心室內、或鼻內投與。在一些實施例中，RNA 疫苗(例如，在脂質複合體顆粒或脂質體中)係靜脈內、肌肉內、皮下、局部、經口、經皮、腹膜內、眶內、藉由植入、藉由吸入、鞘內、心室內、或鼻內投與。在一些實施例中，PD-1 軸結合拮抗劑及 RNA 疫苗經由靜脈內輸注投與。可投與有效量之 PD-1 軸結合拮抗劑及 RNA 疫苗來預防或治療疾病。

【0251】 在一些實施例中，該等方法可進一步包含額外療法。該額外療法可為輻射療法、手術(例如，乳房腫瘤切除術及乳房切除術)、化學療法、基因療法、DNA 療法、病毒療法、RNA 療法、免疫療法、骨髓移植術、奈米療法(nanotherapy)、單株抗體療法、或前述之組合。該額外療法可呈輔助或新輔助療法之形式。在一些實施例中，額外療法為投與小分子酶抑制劑或抗轉移劑。在一些實施例中，額外療法為投與副作用限制劑(例如，意欲減輕治療之副作用之發生及/或嚴重程度之藥劑，諸如抗噁心劑等)。在一些實施例中，額外療法為放射療法。在一些實施例中，額外療法為手術。在一些實施例中，額外療法為輻

射療法與手術之組合。在一些實施例中，額外療法為 γ 照射。

VIII. 製品或套組

【0252】 本文進一步提供一種包含 PD-1 軸結合拮抗劑(諸如阿特珠單抗或帕博利珠單抗)之製品或套組。在一些實施例中，製品或套組進一步包含包裝插頁，其包含使用 PD-1 軸結合拮抗劑以及 RNA 疫苗來治療個體之癌症或延遲其進展或增強患有癌症之個體之免疫功能的使用說明。本文亦提供一種包含 PD-1 軸結合拮抗劑(諸如阿特珠單抗或帕博利珠單抗)及 RNA 疫苗之製品或套組。

【0253】 在一些實施例中，PD-1 軸結合拮抗劑及 RNA 疫苗係在同一容器或單獨容器中。合適容器包括例如瓶子、小瓶、袋子、及注射器。容器可以由各種材料形成，諸如玻璃、塑膠(諸如聚氯乙烯或聚烯烴)、或金屬合金(諸如不銹鋼或哈氏合金(hastelloy))。在一些實施例中，容器容納調配物，且容器上或與容器相結合之標籤可指示使用說明。製品或套組亦可包括自商業及使用者觀點適宜之其他物質，包括其他緩衝劑、稀釋劑、過濾器、針頭、注射器及具有使用說明之包裝插頁。在一些實施例中，製品進一步包括一或多種其他藥劑(例如化學治療劑及抗腫瘤劑)。用於一或多種藥劑之合適容器包括例如瓶子、小瓶、袋子、及注射器。

【0254】 認為前述書面說明係足以能夠使熟習此項技術者來實踐本發明。除本文顯示及描述之內容外，熟習此項技藝者將根據前文之描述明顯瞭解本發明之各種修改，且該等修改屬於隨附申請專利範圍之範疇內。本文引用之所有公開案、專利、專利申請案均出於所有目的在此以全文引用之方式併入。

實例

【0255】 本揭露將藉由參考以下實例更充分理解。然而，該等實例不應視為限制本發明之範疇。應瞭解，本文所述之實例和實施例僅用於說明性目的，且

建議熟悉此項技藝者根據其進行各種修改或變化，且該等修改或變化將包括在本申請的精神和權限以及所附申請專利範圍的範圍內。

實例 1：RNA 疫苗與帕博利珠單抗之組合在患有先前未治療晚期黑素瘤之患者中的功效及安全性之 II 期、開放標籤、多中心、隨機化研究

基本原理

【0256】 如以上提及，檢查點抑制劑為轉移性黑素瘤之當前護理標準。然而，在包括黑色素瘤在內的多種惡性腫瘤中，使用靶向 PD-L1/PD-1 之藥劑所觀察到的持久臨床益處似乎僅限於一部分患者。儘管伴隨著現在廣泛使用之免疫療法，例如 PD-1 療法(納武單抗、帕博利珠單抗)或抗 PD1 與抗-CTLA-4 療法之組合(納武單抗及依匹單抗)的發展，OS 獲得進展，但是大部分患者對檢查點抑制劑之治療無反應或僅經歷短暫的疾病穩定 (Robert C, Long GV, Brady B 等人 *N Engl J Med* 2015a;372:320-30；Rosenberg JE, Hoffman-Censits J, Powles T 等人 *Lancet* 2016;387:1909-20)，此證明了患有轉移性實體瘤之患者之持續未滿足的需求。儘管對 PD-1 抑制劑治療產生反應之患者中約有 10%-30%的客觀反應趨於持久，但是此等患者仍有疾病進展之風險。在藉由 PD-1 阻斷來治療之黑素瘤患者的一項最新研究中，對帕博利珠單抗產生客觀反應之 205 名患者中有 53 名(26%) 在 21 個月之中期隨訪中發生疾病進展 (Ribas A, Hamid O, Daud A 等人 *JAMA* 2016;315:1600-9)。

【0257】 雖然抗 PD1 及抗 PD1 加上抗 CTLA-4 組合可顯著改良患有黑素瘤之患者中的長期預後，但後者以與治療相關之毒性增加為代價。儘管有此等改良，但仍有相當一部分患者仍處於疾病進展之風險中且死於疾病。需要解決伴隨毒性增加的抗性檢查點阻斷之機制的組合療法。

【0258】 抗性可在效應 T 細胞之水準下發生，該 T 細胞之活性可能由於不良

T 細胞刺激而受到限制。在臨床前模型中，誘導抗原特異性免疫與 PD-L1/PD-1 途徑同時阻斷之組合表明功效優於此等途徑之對應單藥抑制劑，甚至在單藥疫苗具有有限活性之模型中亦如此。在此等研究中，僅當 PD-L1 受到阻斷時，浸潤腫瘤 T 細胞才展現增加之 IFN- γ 表現(T 細胞之活化及抗腫瘤活性之標誌)，而對於單藥疫苗，則不存在此效果(Duraiswamy J, Kaluza KM, Freeman GJ 等人 *Cancer Res* 2013;73:3591-603；Fu J, Malm IJ, Kadayakkara DK 等人 *Cancer Res* 2014;74:4042-52)。基於此等研究，假設 RO7198457 與抗-PD-L1/PD-1 之組合可能導致抗腫瘤免疫反應之活化，從而導致癌症患者中腫瘤細胞之殺傷增加且臨床反應得到改良。

目標

【0259】 此項研究評估了在患有先前未經治療晚期黑素瘤之患者中，與單獨帕博利珠單抗相比，個人化 RNA 新表位疫苗(PCV)RO7198457 加上帕博利珠單抗之功效、安全性、藥代動力學及患者報告結果(PRO)。以下概述了該研究之具體目標及相應終點。

【0260】 此項研究之主要功效目標為基於以下終點，評估 RO7198457 加上帕博利珠單抗與單獨帕博利珠單抗相比之功效：

- 隨機分組後之無進展生存期(PFS)，其經定義為自隨機分組到首次出現疾病進展或因任何原因而導致死亡(以先發生者為準)的時間，如由研究者根據實體腫瘤反應評估標準 1.1 版(Response Evaluation Criteria in Solid Tumors, Version 1.1，RECIST v1.1)判定
- 客觀反應率(ORR)，其經定義為在間隔開 ≥ 4 週的連續兩個時機，具有完全反應(CR)或部分反應(PR)之患者的比例，如由研究者根據 RECIST v1.1 判定

【0261】 此項研究之次要功效目標為基於以下終點，評估 RNA 新表位疫苗加

上帕博利珠單抗與單獨帕博利珠單抗相比之功效：

- 隨機分組後之總生存期(OS)，其經定義為自隨機分組到因任何原因而導致死亡的時間
- 反應持續時間(DOR)，其經定義為首次出現所記錄之客觀反應到疾病進展或因任何原因而導致死亡的時間，如由研究者根據 RECIST v1.1 判定
- 健康相關生活品質(HRQoL)評分相對於基線之平均變化，如在指定時間點藉由使用歐洲癌症研究及治療組織生活品質-核心 30 (European Organisation for Research and Treatment of Cancer Quality of Life-Core 30，EORTC QLQ-C30)之兩項目總體健康狀況(GHS)/HRQoL 子量表(問題 29 及 30)來評估

【0262】 此項研究之另一個次要功效目標為評估在自帕博利珠單抗單一療法轉向組合療法(例如 RNA 新表位疫苗加上帕博利珠單抗)後出現 CR 或 PR 客觀反應的參與者之百分比。

【0263】 另一個次要目標為基於以下終點，評估在接受帕博利珠單抗單一療法後發生進展的患者中 RNA 新表位疫苗加上帕博利珠單抗之功效：

- ORR，其經定義為在轉換時，在間隔開 ≥ 4 週的連續兩個時機，具有 CR 或 PR 的患者之比例，如由研究者根據 RECIST v1.1 判定

【0264】 此項研究之另一個目標為評估不良事件(AE)之發生率及嚴重性。

研究設計

【0265】 此研究為 II 期、隨機化、開放標籤、多中心研究，其經設計以在患有先前未經治療晚期黑素瘤之患者中，評估 RO7198457 (PCV)加上帕博利珠單抗與單獨帕博利珠單抗相比之功效及安全性。患者群體包括患有不可切除的局部晚期(IIIC 期及 IIID)及轉移性(復發或從新 IV 期)黑素瘤之患者。此項研究將全域進行。

【0266】 該研究由兩個階段組成：最初安全性運行階段及隨機化階段(圖 1)。各階段都有一個分為兩部分的篩檢期、一個治療期及一個治療後隨訪期。

【0267】 安全性運行階段由登記大約 6-12 名患者之單一支組來組成，該等患者接受 1 個週期(21 天)之藉由 IV 輸注投與之 200 mg 帕博利珠單抗，繼之以在後續週期內，每 3 週(Q3W) IV 投與 25 µg RO7198457 加上 200 mg 帕博利珠單抗。在內部監督委員會(Internal Monitoring Committee, IMC)審核了在安全性運行階段中經治療之前 6 名患者之安全性資料之前，不會開始隨機化階段之應計數。

【0268】 隨機化階段登記約 120 名患者，以 2:1 比率隨機分配至實驗支組或對照支組：

- 支組 A (對照)：藉由 IV 輸注 Q3W 投與之 200 mg 帕博利珠單抗
- 支組 B (實驗)：1 個週期之藉由 IV 輸注投與之 200 mg 帕博利珠單抗，繼之以在後續週期內，Q3W IV 投與 25 µg RO7198457 加上 200 mg 帕博利珠單抗

【0269】 在確認疾病進展後(由研究者根據 RECIST v1.1 進行評估)，隨機分配到支組 A 之患者可以選擇轉換且接受 RO7198457 及帕博利珠單抗之組合治療，限制條件為他們符合資格標準。

【0270】 在篩檢階段之第一部分(A 部分)中，對同意的患者進行初步資格評估(例如，東部腫瘤協作組(Eastern Cooperative Oncology Group)[ECOG]體力狀態、血液化學，HIV、B 型肝炎病毒[HBV]及 C 型肝炎病毒[HCV]之血清學)，且收集腫瘤組織及血液樣品以定義腫瘤特異性體細胞突變並進行人類白血球抗原(HLA)分型，以實現 RO7198457 製作。當前計劃的製作周轉時間為在收到足夠數量及品質之血液樣品及腫瘤樣品後的大約 4-6 週。篩檢期之第二部分(B 部分)為第 1 天之前的 28 天，用以確認患者是否合格。

【0271】 合格患者包括年齡 ≥ 18 歲且 ECOG 體力狀態為 0 或 1 之男性及女性

患者，該等患者患有可量測之經組織學確診之 IIIC 期或 IIID 期(不可切除)或轉移性(復發或從新 IV 期)侵入性皮膚或黏膜黑素瘤，且先前未接受晚期疾病之治療。患有眼部或肢端黑素瘤或未經治療 CNS 轉移之患者不合格。允許先前使用依匹單抗、BRAF 抑制劑及/或 MEK 抑制劑進行輔助治療。允許先前使用抗 PD-1/PD-L1 藥劑進行輔助治療，限制條件為在第 1 週期第 1 天之前至少 6 個月投與最後一個劑量。患者必須能夠提供腫瘤標本用於疫苗製作及 PD-L1 測試。

【0272】 如圖 2 中展示，支組 A(帕博利珠單抗)中之患者接受 200 mg 之在第 1 週期中開始藉由 IV 輸注 Q3W 投與之帕博利珠單抗。安全性運行階段及隨機化階段支組 B(25 µg RO7198457 加上 200 mg 帕博利珠單抗)中之患者接受在第 1 週期中開始藉由 IV 輸注 Q3W 投與之帕博利珠單抗。第 1 週期為帕博利珠單抗單一療法運行期，以便有時間進行疫苗製作。RO7198457 加上帕博利珠單抗在第 2 週期中開始，其中 RO7198457 在完成帕博利珠單抗輸注之後 30 分鐘藉由 IV 輸注投與。對於安全性運行階段及支組 B，RO7198457 給藥在第 2 週期之第 1 天開始，然後在第 2 週期之第 8 天及第 15 天；第 3-7 週期(包括端點)之第 1 天投與，然後在第 13 週期開始每 8 個週期(第 13 週期、第 21 週期、及第 29 週期)作為維持治療投與。在獲得醫學監查員批准的情況下，可以允許在開始使用 RO7198457 進行組合治療時出現延誤的患者(例如，在第 2 週期之第 1 天之前無法獲得 RO7198457)或在 RO7198457 誘導期間中斷治療的患者晚於第 2 週期之第 1 天開始組合治療且/或在最初治療期後期，接受 RO7198457 之補充劑量，以達成總共 8 個誘導劑量(例如，錯過第 2 週期第 1 天的患者將在第 2 週期之第 8 天開始 RO7198457 且在第 3 週期之第 8 天以非預定就診形式接受補充劑量，在第 2 週期之第 15 天開始 RO7198457 之患者將在第 3 週期之第 8 天及第 15 天以非預定就診形式接受補充劑量等)。

【0273】 此項研究之治療時間對所有患者而言最長為 24 個月，只要在綜合評估放射學資料及臨床狀態後，在不存在不可接受之毒性或因疾病進展而導致的症狀惡化之情況下，經研究人員評估，他們正在經歷臨床益處。在符合 RECIST v1.1 進行性疾病標準後，可以允許患者繼續治療。若符合轉換資格標準，則在確認疾病進展後，支組 A 中之患者可以選擇轉換至使用 RO7198457 加上帕博利珠單抗之組合治療。此外，若支組 A 中之患者完成帕博利珠單抗之 24 個月治療且在停止帕博利珠單抗後≤6 個月內經歷經確認之疾病進展，則他們可以選擇接受使用 RO7198457 加上帕博利珠單抗之轉換治療。

【0274】 在基線(第 1 週期第 1 天)、第 12 週、且其後在第 1 週期第 1 天之後前 48 週內每 6 週(每 2 個週期)，使患者經歷腫瘤評估。若需要，在篩檢及每次腫瘤評估後之首次門診就診時進行皮膚病變之數位照相。在自第 1 週期第 1 天起的 48 週之後，患者每 12(=1)週經歷腫瘤評估(大約每 4 個週期)。腫瘤評估一直持續到研究治療終止、同意撤回、主辦者終止研究或死亡，以先發生者為準。在經歷導致治療中斷之疾病進展後，若可行，則亦要求患者以後約每 6(=2)週返回診所進行確診性腫瘤評估。因疾病進展以外之其他原因(例如毒性)中斷治療的患者應繼續進行預定腫瘤評估，直到疾病進展、同意撤回、主辦者終止研究或死亡，以先發生者為準。若需要，主辦者收集用於腫瘤評估之原始影像資料，以便對反應終點進行集中、獨立的檢查。

【0275】 此外，亦要求患者在各週期開始時完成 PRO 評估，直到疾病進展或治療終止(以較晚發生者為準)。

納入及排除標準

【0276】 患者必須滿足以下研究登記之標準：

- 簽署知情同意書時年齡≥18 歲

- 經組織學確診之轉移性(復發或從新 IV 期)或不可切除的局部晚期(IIIC 期或 IIID 期)皮膚或黏膜黑素瘤，如藉由 AJCC v8.0 定義 (Amin MB, Edge SB, Greene FL, 等人編 AJCC cancer staging manual.8th rev ed. New York:Springer ; 2017)
 - 黏膜黑素瘤患者之登記局限於約 10 名患者
- ECOG 體力狀態為 0 或 1
- 預期壽命 ≥ 12 週
- 足夠的血液學及終末器官功能，其由在首次研究治療(第 1 週期，第 1 天)前 28 天內獲得的以下實驗室結果來定義：
 - $\text{ANC} \geq 1,500$ 個細胞/ μL (第 1 週期第 1 天前 2 週內無顆粒球集落刺激因子 [G-CSF]支持)
 - WBC 計數 $\geq 2,500/\mu\text{L}$
 - 血小板計數 $\geq 100,000/\mu\text{L}$ (第 1 週期第 1 天前 14 天內未輸血)
 - 血色素 ≥ 9 g/dL (根據當地護理標準，患者可能需要輸血或接受促紅血球生成性治療)
 - 總膽紅素 $\leq 1.5 \times \text{ULN}$ ，以下除外：患有已知吉爾伯特病之患者：血清膽紅素水準 $\leq 3 \times \text{ULN}$ 。
 - AST 及 $\text{ALT} \leq 3 \times \text{ULN}$
 - $\text{ALP} \leq 2.5 \times \text{ULN}$ ，以下除外：患有經記錄之肝臟或骨骼轉移之患者可具有 $\text{ALP} \leq 5 \times \text{ULN}$ 。
 - 血清白蛋白 ≥ 2.5 g/dL
- 基於 Cockcroft-Gault 腎絲球濾過率估算，量測或計算得出之肌酐 $\text{CL} \geq 50$ mL/min：

$$\frac{(140 - \text{年齡}) \times (\text{以公斤為單位之體重}) \times (\text{若為女性，則為 } 0.85)}{72}$$

72 × (血清肌胺酸酐以 mg/dL 為單位)

- 根據 RECIST v1.1 之可量測疾病。除非存在經證明之病灶進展且無其他目標病灶，否則先前經照射之病灶不應算作目標病灶。意欲進行生檢之病灶不應算作目標病灶。僅藉由身體檢查可偵測到的皮膚病灶及其他淺表病灶不應算作目標病灶，而可作為非目標病灶包括在內。
- 未對晚期黑素瘤進行過全身抗癌治療(例如化學療法、激素療法、靶向療法、免疫療法或其他生物學療法)，以下輔助療法除外：
 - 使用抗 PD1/PD-L1 或抗 CTLA-4 進行輔助治療，但是在第 1 週期第 1 天前至少 6 個月中止且不符合任何以下標準：
 - 任何由先前 CIT 引起之免疫相關 4 級不良事件的病史(藉由替代療法管理之內分泌病或血清澱粉酶或脂肪酶無症狀升高除外)
 - 任何由先前 CIT 引起之免疫相關 3 級不良事件的病史，需要根據當地處方資訊、歐洲醫學腫瘤學會(European Society for Medical Oncology, ESMO)準則(Haanen JBAG, Carbone F, Robert C 等人 *Ann Oncol* 2017;28:iv119-iv142)、或美國臨床腫瘤學會(American Society of Clinical Oncology, ASCO)準則(Brahmer JR, Lacchetti C, Schneider BJ 等人 *J Clin Oncol* 2018;36:1714-68)，永久終止先前免疫治療劑
 - 尚未減退至 ≤1 級的由先前抗癌療法所產生之不良事件，禿頭症、白斑病或藉由替代療法來控制之內分泌病除外。脂肪酶/澱粉酶無症狀升高之患者在與醫學監查員討論後可為合格的。
 - 尚未減退至基線的與先前 CIT 相關之免疫相關不良事件(藉由替代療法來控制之內分泌病或穩定白斑病除外)。用皮質類固醇治療免疫相關不良事件的患者必須在停用皮質類固醇後 ≥ 4 週不表現出相關症狀或病徵。

- 靶向療法(例如 BRAFi/MEKi)之輔助治療，但在開始研究治療前至少 2 個月中止
- 草藥療法之輔助治療，但在開始研究治療前至少 7 天中止
- 經福爾馬林固定、石蠟包埋塊中之代表性腫瘤標本(較佳)或具有相關病理報告之切片組織(如實驗室手冊中所述)的經證實可用性。可接受樣品亦可包括深部腫瘤組織之空芯針生檢體(最少五個空芯針)，皮膚、皮下或黏膜病灶之切除、切開、鑽取、或鉗夾生檢體。在醫學監查員批准的情況下，具有少於五個空芯針生檢體之患者可被視為合格的。不可接受細針抽吸樣品、刷拭物、積液或腹水之細胞沉澱物、及灌洗樣品。來自骨轉移之腫瘤組織很難評估 PD-L1 之表現，且應避免。然而，在醫學監查員批准的情況下，若骨轉移部位為唯一可行組織來源，則其可為可接受腫瘤標本。已經脫鈣之骨組織在脫鈣前為可接受的，因為許多試劑具有會破壞用於 PD-L1 IHC 之抗原及用於測序之核酸的強酸。若可獲得來自不同時間點(例如，初始診斷時間及疾病復發時間)之足夠組織及/或多個轉移性腫瘤，則應優先考慮最近收集之組織(最好是在最近全身性輔助治療之後)。基於可用性，可收集給定患者之多個樣本。然而，對於包埋塊或切片組織之要求應通過單一生檢體或切除標本來滿足。由於需要可評估腫瘤組織來產生 PCV，因此檔案組織不足或不可用之患者為不合格的，除非該患者同意並接受腫瘤之治療前生檢樣品收集(有關可接受樣品，請參見上文)。
- 根據主辦者之定義，登記僅限於具有至少五個已經鑑定腫瘤新抗原且具有足夠腫瘤材料(品質及數量)以允許製作疫苗的患者。對於未經歷 CIT 之患者而言，檔案腫瘤組織為可接受的；其必須在登記前提交且經評定以便評估突變。對於有 CIT 經驗之患者(亦即在輔助環境中接受使用免疫檢查點抑制劑之治療的患者)而言，需要基線腫瘤生檢體，且其必須在登記前提交且經評定以便評估突變。在

接受 CIT 後但在登記前已進行了腫瘤生檢的有 CIT 經驗之患者可以使用該組織進行篩檢，只要存在足夠材料。若可獲得，患者亦應提交檔案腫瘤組織進行評估。對於有 CIT 經驗之患者而言，若基線新鮮腫瘤生檢體不足以用於製作，則亦可使用檔案組織。腫瘤組織無法評估或對於製作疫苗而言突變數量不足的患者為不合格的。

- 對於有生育能力之女性：同意禁欲(避免異性性交)或使用避孕措施，並同意不捐卵
- 對於男性：同意禁欲(避免異性性交)或使用避孕套，並同意不捐精

【0277】 符合以下任何標準之患者將自研究登記排除：

- 眼部或肢端黑素瘤
- 懷孕或哺乳，或意欲在研究期間或在 RO7198457 最終劑量後 1 個月內或在帕博利珠單抗最終劑量後 4 個月內懷孕，以較晚發生者為準。有生育能力之婦女(包括輸卵管結紮之婦女)必須在開始研究藥物(亦即第 1 週期第 1 天)前 14 天內具有陰性血清妊娠測試結果。
- 重大心血管疾病，例如紐約心臟協會(New York Heart Association)心臟病(II 級或更高級)、前 3 個月內之心肌梗塞、不穩定心律不齊及/或不穩定心絞痛。
- 已知臨床重大肝臟疾病，包括活動性病毒、酒精或其他肝炎、肝硬化、遺傳性肝病或當前酒精濫用
- 在第 1 週期第 1 天前 28 天內進行重大外科手術，或者預期在研究過程期間需要進行重大外科手術
- 任何其他疾病、代謝功能異常、身體檢查發現結果和/或臨床實驗室發現結果，該發現結果合理懷疑需禁止使用研究藥物或可能影響結果之解釋或使患者處於治療併發症之高風險下之某種疾病或病症

- 劑量高於 7.5 mg 普賴蘇濃之皮質類固醇(若非用於生理替代)
- 先前脾切除術
- 已知原發性免疫缺失，無論為細胞性(例如 DiGeorge 症候群、T 陰性嚴重合併性免疫缺失[SCID])或 T 細胞及 B 細胞合併性免疫缺失(例如 T 及 B 陰性 SCID、Wiskott-Aldrich 症候群、共濟失調毛細血管擴張症、常見變異免疫缺失)
- 有症狀、未經治療或活躍進展之 CNS 轉移。具有 CNS 病變史之患者合格，只要滿足以下所有條件：
 - 根據 RECIST v1.1 可量測之疾病必須存在於 CNS 外部
 - 僅允許幕上及小腦轉移(亦即，無中腦、腦橋、延髓或脊髓轉移)
 - 視神經器官(視神經及交叉) 10 mm 以內之轉移史
 - 不持續性需要使用皮質類固醇治療 CNS 疾病
 - 7 天內無立體定向放射
 - 先前無全腦放射
 - 在完成 CNS 定向治療與放射影像學檢查之間尚無臨時進展之臨床證據
 - 在篩檢掃描時發現有新的無症狀 CNS 轉移之患者必須接受放射治療及/或 CNS 轉移手術。治療後，若符合所有其他條件，則在第 1 週期第 1 天前無需進行額外腦部掃描，此等患者可為合格的。
 - 允許使用穩定劑量之抗驚厥藥進行治療
 - 無 CNS 病變顱內出血史
- 軟腦膜轉移病史
- 不受控制的腫瘤相關疼痛。需要麻醉性止痛藥之患者在研究開始時必須採用穩定治療方案。適合於姑息放射療法之症狀性病灶(例如，骨轉移或引起神經卡壓之轉移)在登記前應予以治療。患者應自放射影響中康復。不要求最短康復期限。

在進一步增長的情況下可能會導致功能缺陷或頑固疼痛之無症狀轉移性病灶(例如，目前與脊髓壓迫無關的硬膜外轉移)在登記前應考慮進行局部區域治療。

- 需要多於每 28 天一次重複引流的不受控制之胸腔積液、心包積液或腹水。允許留置引流導管(例如 PleurX[®])。

- 在開始研究治療之前，在轉移情形下之任何抗癌療法，無論經研究或已獲批准之療法，包括化學療法、激素療法及/或放射療法，但以下情況除外：

- 第 1 週期第 1 天前，草藥治療 ≥ 1 週

- 第 1 週期第 1 天前，用於疼痛性轉移或潛在敏感部位(例如硬膜外腔)之轉移的姑息性放射療法 ≥ 2 週

- 先前癌症疫苗(例如，T-vec)為不允許的

- 第 1 週期第 1 天前 5 年內除了正在研究之疾病以外的其他惡性腫瘤，但轉移或死亡之風險可忽略不計的惡性腫瘤(例如已得到充分治療之子宮頸原位癌、基底或鱗狀細胞皮膚癌、局部前列腺癌或原位導管癌)除外

- 不受控制的高鈣血(> 1.5 mmol/L 離子鈣或 Ca^{+2} > 12 mg/dL 或校正血清鈣 $\geq$ ULN) 或需要持續使用雙膦酸鹽療法之症狀性高鈣血。接受雙膦酸鹽治療或地諾單抗專門用於預防骨骼事件且無臨床顯著高鈣血症病史之患者為合格的。

- 未藉由手術及/或放射來決定性地治療之脊髓壓迫症，或先前經診斷及治療之脊髓壓迫症，但尚無證據表明在篩檢前疾病在臨床上穩定 $\geq$ 2 週。

- 自體免疫性疾病之病史，包括但不限於全身性紅斑狼瘡、類風濕性關節炎、炎症性腸病、與抗磷脂症候群相關之血管血栓形成、Wegener 肉芽腫、Sjögren 氏症候群、Bell 麻痺、Guillain-Barré 症候群、多發性硬化症、血管炎或腎絲球腎炎，但以下情況除外：

- 具有自體免疫性甲狀腺功能減退病史且服用穩定劑量之甲狀腺替代激素之患

者可為合格的。

○在穩定胰島素治療方案中 1 型糖尿病得到控制之患者可為合格的。

○患有僅具有皮膚病學表現(例如無牛皮癬性關節炎)的濕疹、牛皮癬、單純性扁平苔蘚或白斑病之患者可為合格的，限制條件為他們滿足以下條件：

■ 皮疹必須覆蓋人體表面積之 10%以下

■ 疾病在基線時得到良好控制，僅需要低效局部類固醇

■ 在過去 12 個月內，無潛在病情之急性加重(例如，不需要補骨脂素加上紫外線 A 輻射、胺甲蝶呤、類視色素、生物製劑、口服鈣調神經磷酸酶抑制劑、高效藥或口服類固醇激素)

● 第 1 週期第 1 天前 3 週內，使用單胺氧化酶抑制劑(MAOI)治療

● 在第 1 週期第 1 天前 2 週內，使用全身性免疫抑制藥物(包括但不限於潑尼松 $\geq$ 7.5 mg/天、環磷醯胺、硫唑嘌呤、胺甲蝶呤、沙利度胺及 TNF- α 拮抗劑)進行治療

○經醫學監查員討論並批准後，已接受急性、低劑量、全身性免疫抑制藥物(例如，用於噁心之地塞米松的一次性劑量)的患者可登記研究。

○允許使用吸入性皮質類固醇(例如，用於慢性阻塞性肺疾病之氟替卡松)

○允許使用口服鹽皮質激素(例如，用於患有直立性低血壓之患者之氟可體松)

○允許用於腎上腺皮質功能不全的生理劑量之皮質類固醇

● 特發性肺纖維化、肺炎(包括藥物誘導)、組織性肺炎(亦即閉塞性細支氣管炎、隱源性組織性肺炎等)的病史，或在篩檢胸部電腦斷層(CT)掃描中發現活動性肺炎之證據。允許有放射場中的放射性肺炎(纖維化)病史。

● HIV 感染測試呈陽性

● 活動性 B 型肝炎(經定義為篩檢時具有陽性 B 型肝炎表面抗原[HBsAg]測試)。

過去或已消退 B 型肝炎感染(經定義為具有陰性 HBsAg 測試，且抗 B 型肝炎核心抗原 IgG 抗體[抗 HBc]呈陽性)之患者為合格的。必須在第 1 週期第 1 天前獲得此等患者之 HBV DNA，且必須證明沒有活動性感染。

- 活動性 C 型肝炎。僅當 HCV RNA 之聚合酶鏈反應(PCR)呈陰性時，HCV 抗體呈陽性之患者才為合格的。
- 已知活動性或潛伏性結核感染。若研究者認為潛在患者之結核分枝桿菌感染風險增加，則在篩檢期間必須根據當地實踐標準遵循潛伏性結核病診斷程序
- 在第 1 週期第 1 天前 4 週內出現嚴重感染，包括但不限於因感染、菌血症或嚴重肺炎之併發症而住院
- 最近不符合嚴重感染標準之感染，包括以下各者：
 - 第 1 週期第 1 天前 2 週內感染之病徵或症狀
 - 第 1 週期第 1 天前 2 週內接受口服或 IV 抗生素
 - 接受預防性抗生素(例如，預防尿路感染或慢性阻塞性肺疾病)之患者為合格的
- 先前同種異體骨髓移植或先前實體器官移植
- 在第 1 週期第 1 天前 4 週內投與減毒活疫苗，或預期研究期間需要此減毒活疫苗。流感疫苗接種應僅在流感季節給予。在第 1 週期第 1 天前 4 週內、或在研究期間之任何時間以及最後一次研究治療後 5 個月內，患者不得接受減毒流感活疫苗(例如 FluMist[®])。
- 已知對疫苗中之活性物質或任何賦形劑過敏
- 對嵌合或人類化抗體或融合蛋白之嚴重變應性、過敏性或其他超敏反應之病史
- 對中國倉鼠卵巢細胞產品之已知超敏反應
- 對帕博利珠單抗調配物之成分的變應性或超敏反應

實例 2：

【0278】 此實例描述用於本文描述之方法中之示範性 RNA 疫苗。

總體說明

【0279】 RNA 疫苗為編碼恆定序列及患者特異性腫瘤新抗原序列之單鏈信使核糖核酸(mRNA)分子。具體而言，其為 5'-加帽、單鏈信使 RNA(mRNA)。各 mRNA 編碼由患者之經鑑別並選擇之腫瘤特異性突變來定義的多達 20 個新表位。含有患者腫瘤特異性突變之序列通常由 81 個核苷酸組成。在圖 3 中展示 mRNA(在此實例中，編碼 10 個患者特異性新表位之 mRNA)的示意圖。

【0280】 恆定序列要素包括以下項：5'帽(β-S-ARCA)、5'-，3'-未轉譯區 UTR]、分泌信號肽[sec_{2.0}]、MHC[主要組織相容性複合體]I 類跨膜及細胞質域[MITD]、及 poly(A)-尾。此等恆定序列已針對 mRNA 之轉譯效率及穩定性來最佳化，且對於各批次而言為相同的，因此對於所有患者而言為相同的。所有恆定序列要素之作用概述於表 4 中；其側接患者特異性新表位區域及富含甘胺酸/絲胺酸(GS)之連接子。

表 4

要素	描述
5'-帽	β-S-ARCA(D1)(參見圖 5)用作 RNA 癌症疫苗之 5'端處之特異性加帽結構，以便改良 RNA 穩定性及轉譯效率(Kuhn 等人 2010)。
5'-UTR (hAg-Kozak)	5'-UTR 序列來源於人類 α-球蛋白 RNA。添加最佳化「Kozak 序列」以便增加轉譯效率(Kozak 1987)。
分泌信號肽 (sec _{2.0})	來源於編碼人類 MHC I 類複合 α 鏈「HLA-I，Cw*」之序列之分泌信號肽「sec _{2.0} 」用作融合蛋白標籤，以便改良抗原加工及呈遞(Kreiter 等人 2008)。選擇「HLA-I，Cw*」，因為其對應於最常用單倍體型中之一者且與其他常用 MHC I 類等位基因具有較高同源性。
MITD	MITD 對應於 MHC I 類分子之跨膜及細胞質域且用作融合-蛋白標籤以便改良抗原加工及呈遞(Kreiter 等人 2008)。
3'-UTR (FI)	3'-UTR 為來源於 AES mRNA(稱為 F)及經粒線體編碼 12S 核糖體 RNA(稱為 I)之兩種序列要素之組合。此等序列要素藉

	由對序列執行賦予 RNA 穩定性之離體選擇過程來鑑別。
poly(A)-尾	添加經量測為 120 個核苷酸之 poly(A)-尾(A 120)以便確保較高 RNA 穩定性及蛋白表現(Holtkamp 等人 2006)。

縮寫：AES = 酶切胺基端增強子；MHC = 主要組織相容性複合體；

MITD=MHC I 類跨膜及細胞質域；UTR= 未轉譯區。

恆定序列說明

【0281】 RNA[1,2-[m₂^{7·2'·O} G-(5'→5')-pp_sp-G (*Rp*-異構體)]] (恆定 5' UTR 加上連接至恆定 MITD 之 sec_{2.0} 加上 3' UTR 及 poly(A)-尾)

序列長度：739 個核苷酸(A：255，C：204，G：168，U：112)

【0282】 在圖 4 中展示示範性 RNA 疫苗之恆定區之 RNA 序列。患者特異性序列(C131-A132)之插入位點以粗體文字來描繪。關於 RNA 序列之經修飾鹼基及少見鍵聯，參見表 5。

表 5

類型	位置	描述
經修飾鹼基	G1	m ₂ ^{7·2'·O} G
少見鍵聯	G1-G2	(5'→5')-pp _s p-
少見鍵聯	C131-A132	患者特異性序列之插入位點

【0283】 總之，各 RNA 之長度具有大約 1000-2000 個核苷酸之範圍，此取決於各新表位之大小及在各 RNA 上編碼之新表位之數目。與患者特異性序列無關，RNA 之恆定區構成 739 個核糖核苷酸。

參考文獻

Holtkamp S, Kreiter S, Selmi A, et al.Modification of antigen-encoding RNA increases stability,translational efficacy, and T-cell stimulatory capacity of dendritic cells.Blood 2006；108:4009-17

Kozak M. At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells.J Mol Biol 1987;196:947-50.

Kreiter S, Selmi A, Diken M, et al.Increased antigen presentation efficiency by coupling antigens to MHC class I trafficking signals.J Immunol 2008;180:309- 18.

Kuhn AN, Diken M, Kreiter S, et al.Phosphorothioate cap analogs increase stability and translational efficiency of RNA vaccines in immature dendritic cells and induce superior immune responses in vivo.Gene Ther 2010;17:961-71.

Trinh R, Gurbaxani B, Morrison SL, et al.Optimization of codon pair use within the (GGGGS)₃ linker sequence results in enhanced protein expression.Mol Immunol 2004;40:717- 22.

序列

所有多核苷酸序列在 5'→3 方向上描繪。所有多肽序列在 N 端至 C 端方向上描繪。

抗 PDL1 抗體 HVR-H1 序列(SEQ ID NO:1)

GFTFSDSWIH

抗 PDL1 抗體 HVR-H2 序列(SEQ ID NO:2)

AWISPYGGSTYYADSVKG

抗 PDL1 抗體 HVR-H3 序列(SEQ ID NO:3)

RHWPGGFDY

抗 PDL1 抗體 HVR-L1 序列(SEQ ID NO:4)

RASQDVSTAVA

抗 PDL1 抗體 HVR-L2 序列(SEQ ID NO:5)

SASFLYS

抗 PDL1 抗體 HVR-L3 序列(SEQ ID NO:6)

QQYLYHPAT

抗 PDL1 抗體 VH 序列(SEQ ID NO:7)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWIS
PYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPG
GFDYWGQGTLVTVSS

抗 PDL1 抗體 VL 序列(SEQ ID NO:8)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIY SASF
LYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIK
R

抗 PDL1 抗體重鏈序列(SEQ ID NO:9)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWIS
PYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPG
GFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN
TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQD
WLNKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

抗 PDL1 抗體輕鏈序列(SEQ ID NO:10)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFL
YSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIKR
TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
ESVTEQDSKDSSTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE

C

納武單抗重鏈序列(SEQ ID NO:11)

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWVAVI
WY
DGSKRYYADSVKGRFTISRDN SKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCATNDDYWG
QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG
ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKR
VESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDP
EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSNGKLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYP
SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSLG

納武單抗輕鏈序列(SEQ ID NO:12)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNR
AT
GIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQSSNWPRTFGQGTKVEIKRTVA
APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV
TEQDSKDSTYSLSSLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

帕博利珠單抗重鏈序列(SEQ ID NO:13)

QVQLVQSGVEVKKPGASVKV SCKASGYTFTNYYMYWVRQAPGQGLEWMG
G
INPSNGGTNFNEKFKNRVTLTTDSSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDYRF
DMGFDYW

GQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS
GALTSGV
HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYG
PPCPPCP
APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGV
EVHNAKTK
PREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
YKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS
LSLG

帕博利珠單抗輕鏈序列(SEQ ID NO:14)

EIVLTQSPAT
LSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQKPGQAPRLLIYLA
SYLES
GVPARFSGSGGTDFLTITSSLEPEDFAVYYCQHSRDLPLTFGGG
TKVEIKRTV
AAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES
VTEQ
DSKDSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR
GEC

阿維魯單抗重鏈序列(SEQ ID NO:15)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMMWVRQAPGK
GLEWVSSIY
PSGGITFYADTVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC
ARIKLGTVT
TVDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK
DYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC
NVNHKPSN
TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS
RTPEVTCV

VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

阿維魯單抗輕鏈序列(SEQ ID NO:16)

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIYD
VSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTRVFGTGTK
VTVLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPV
KAGVETTKPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTV
PTECS

度伐魯單抗重鏈序列(SEQ ID NO:17)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSWVRQAPGKGLEWVANI
KQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGGW
FGELAFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP
EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH
KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE
VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV
LHQDWLNQKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK
NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD
KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

度伐魯單抗輕鏈序列(SEQ ID NO:18)

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQRVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASS
RATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSLPWTFGQGGTKVEIK

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG
EC

完整 PCV RNA 5’恆定序列(SEQ ID NO:19)

GGCGAACUAGUAUUCUUCUGGUCCCCACAGACUCAGAGAGAACCCGCC
ACCAUGAGAGUGAUGGCCCCCAGAACCCUGAUCCUGCUGCUGUCUGGC
GCCUGGGCCUGACAGAGACAUGGGCCGGAAGC

完整 PCV RNA 3’恆定序列(SEQ ID NO:20)

AUCGUGGGAAUUGUGGCAGGACUGGCAGUGCUGGCCGUGGUGGUGAUC
GGAGCCGUGGUGGCUACCGUGAUGUGCAGACGGAAGUCCAGCGGAGGC
AAGGGCGGCAGCUACAGCCAGGCCGCCAGCUCUGAUAGCGCCCAGGGC
AGCGACGUGUCACUGACAGCCUAGUAACUCGAGCUGGUACUGCAUGCA
CGCAAUGCUAGCUGCCCCUUUCCCGUCCUGGGUACCCCGAGUCUCCCC
GACCUCGGGUCCCAGGUAUGCUCCCACCUCACCUGCCCCACUCACCAC
CUCUGCUAGUUCCAGACACCUCCCAAGCACGCAGCAAUGCAGCUCAAAA
CGCUUAGCCUAGCCACACCCCCACGGGAAACAGCAGUGAUUAACCUUU
AGCAAUAAACGAAAGUUUAACUAAGCUAUACUAACCCCGAGGGUUGGUC
AAUUUCGUGCCAGCCACACCGAGACCUGGUCCAGAGUCGCUAGCCGCG
UCGCU

完整 PCV Kozak RNA (SEQ ID NO:21)

GGCGAACUAGUAUUCUUCUGGUCCCCACAGACUCAGAGAGAACCCGCC
ACC

完整 PCV Kozak DNA (SEQ ID NO:22)

GGCGAACTAGTATTCTTCTGGTCCCCACAGACTCAGAGAGAACCCGCCAC
C

短 Kozak RNA (SEQ ID NO:23)

UUCUUCUGGUCCCCACAGACUCAGAGAGAACCCGCCACC

短 Kozak DNA (SEQ ID NO:24)

TTCTTCTGGTCCCCACAGACTCAGAGAGAACCCGCCACC

sec RNA (SEQ ID NO:25)

AUGAGAGUGAUGGCCCCCAGAACCCUGAUCCUGCUGCUGUCUGGCGCC
CUGGCCCUGACAGAGACAUGGGCCGGAAGC

sec DNA (SEQ ID NO:26)

ATGAGAGTGATGGCCCCCAGAACCCTGATCCTGCTGCTGTCTGGCGCCCTG
GCCCTGACAGAGACATGGGGCCGGAAGC

sec 蛋白(SEQ ID NO:27)

MRVMAPRTLILLLSGALALTETWAGS

MITD RNA (SEQ ID NO:28)

AUCGUGGGAAUUGUGGCAGGACUGGCAGUGCUGGCCGUGGUGGUGAUC
GGAGCCGUGGUGGCUACCGUGAUGUGCAGACGGAAGUCCAGCGGAGGC
AAGGGCGGCAGCUACAGCCAGGCCGCCAGCUCUGAUAGCGCCCAGGGC
AGCGACGUGUCACUGACAGCC

MITD DNA (SEQ ID NO:29)

ATCGTGGGAATTGTGGCAGGACTGGCAGTGCTGGCCGTGGTGGTGATCGG
AGCCGTGGTGGCTACCGTGATGTGCAGACGGAAGTCCAGCGGAGGCAAG
GGCGGCAGCTACAGCCAGGCCGCCAGCTCTGATAGCGCCCAGGGCAGCGA

CGTGTCACTGACAGCC

MITD 蛋白(SEQ ID NO:30)

IVGIVAGLAVLAVVVIGAVVATVMCRRKSSGGKGGSYSQAASSDSAQGSDVSL
TA

完整 PCV FI RNA (SEQ ID NO:31)

CUCGAGCUGGUACUGCAUGCACGCAAUGCUAGCUGCCCCUUUCCCGUCC
UGGGUACCCCGAGUCUCCCCCGACCUCGGGUCCCAGGUAUGCUCACCACC
UCCACCUGCCCCACUCACCACCUCUGCUAGUUCCAGACACCUCCCAAGC
ACGCAGCAAUGCAGCUCAAAACGCUUAGCCUAGCCACACCCCCACGGGA
AACAGCAGUGAUUAACCUUUAGCAAUAAACGAAAGUUUAACUAAGCUA
UACUAACCCCAGGGUUGGUCAAUUUCGUGCCAGCCACACCGAGACCUG
GUCCAGAGUCGCUAGCCGCGUCGCU

完整 PCV FI DNA (SEQ ID NO:32)

CTGGTACTGCATGCACGCAATGCTAGCTGCCCCTTTCCCGTCCTGGGTACC
CCGAGTCTCCCCCGACCTCGGGTCCCAGGTATGCTCCCACCTCCACCTGCC
CCACTCACCACCTCTGCTAGTTCCAGACACCTCCCAAGCACGCAGCAATG
CAGCTCAAAACGCTTAGCCTAGCCACACCCCCACGGGAAACAGCAGTGAT
TAACCTTTAGCAATAAACGAAAGTTTAACTAAGCTATACTAACCCCAGGGT
TGGTCAATTTTCGTGCCAGCCACACCGAGACCTGGTCCAGAGTCGCTAGCC
GCGTCGCT

F 要素 RNA (SEQ ID NO:33)

CUGGUACUGCAUGCACGCAAUGCUAGCUGCCCCUUUCCCGUCCUGGGU
ACCCCGAGUCUCCCCCGACCUCGGGUCCCAGGUAUGCUCACCACCUCAC

CUGCCCCACUCACCACCUCUGCUAGUUCCAGACACCUCC

F 要素 DNA (SEQ ID NO:34)

CTGGTACTGCATGCACGCAATGCTAGCTGCCCCTTTCCCGTCCTGGGTACC
CCGAGTCTCCCCCGACCTCGGGTCCCAGGTATGCTCCCACCTCCACCTGCC
CCACTCACCACCTCTGCTAGTTCCAGACACCTCC

I 要素 RNA (SEQ ID NO:35)

CAAGCACGCAGCAAUGCAGCUCAAAACGCUUAGCCUAGCCACACCCCCA
CGGGAAACAGCAGUGAUUAACCUUUAGCAAUAAACGAAAGUUUAACUA
AGCUAUACUAACCCCCAGGGUUGGUCAAUUUCGUGCCAGCCACACCG

I 要素 DNA (SEQ ID NO:36)

CAAGCACGCAGCAATGCAGCTCAAAACGCTTAGCCTAGCCACACCCCCAC
GGGAAACAGCAGTGATTAACCTTTAGCAATAAACGAAAGTTTAACTAAGCT
ATACTAACCCCAGGGTTGGTCAATTTTCGTGCCAGCCACACCG

連接子 RNA (SEQ ID NO:37)

GGCGGCUCUGGAGGAGGCGGCUCCGGAGGC

連接子 DNA (SEQ ID NO:38)

GGCGGCTCTGGAGGAGGCGGCTCCGGAGGC

連接蛋白(SEQ ID NO:39)

GGSGGGGSGG

完整 PCV DNA 5'恆定序列(SEQ ID NO:40)

GGCGAACTAGTATTCTTCTGGTCCCCACAGACTCAGAGAGAACCCGCCAC
CATGAGAGTGATGGCCCCCAGAACCCTGATCCTGCTGCTGTCTGGCGCCCT
GGCCCTGACAGAGACATGGGCCGGAAGC

完整 PCV DNA 3'恆定序列(SEQ ID NO:41)

ATCGTGGGAATTGTGGCAGGACTGGCAGTGCTGGCCGTGGTGGTGATCGG
AGCCGTGGTGGCTACCGTGATGTGCAGACGGAAGTCCAGCGGAGGCAAG
GGCGGCAGCTACAGCCAGGCCGCCAGCTCTGATAGCGCCCAGGGCAGCGA
CGTGTCACTGACAGCCTAGTAACTCGAGCTGGTACTGCATGCACGCAATGC
TAGCTGCCCCCTTTCCCGTCCTGGGTACCCCGAGTCTCCCCCGACCTCGGGT
CCCAGGTATGCTCCACCTCCACCTGCCCCACTCACACCTCTGCTAGTTC
CAGACACCTCCCAAGCACGCAGCAATGCAGCTCAAAACGCTTAGCCTAGC
CACACCCCCACGGGAAACAGCAGTGATTAACCTTTAGCAATAAACGAAAG
TTTAACTAAGCTATACTAACCCAGGGTTGGTCAATTTTCGTGCCAGCCACA
CCGAGACCTGGTCCAGAGTCGCTAGCCGCGTCGCT

具有來自帽之 5'GG 的完整 PCV RNA (SEQ ID NO:42)

GGGGCGAACU AGUAUUCUUC UGGUCCCCAC AGACUCAGAG AGAACCCGCC
ACCAUGAGAG UGAUGGCCCC CAGAACCUCUG AUCCUGCUGC UGUCUGGCGC
CCUGGCCCCUG ACAGAGACAU GGGCCGGAAG CNAUCGUGGGA AUUGUGGCAG
GACUGGCAGU GCUGGCCGUG GUGGUGAUCG GAGCCGUGGU GGCUACCGUG
AUGUGCAGAC GGAAGUCCAG CGGAGGCAAG GGCGGCAGCU ACAGCCAGGC
CGCCAGCUCU GAUAGCGCCC AGGGCAGCGA CGUGUCACUG ACAGCCUAGU
AACUCGAGCU GGUACUGCAU GCACGCAAUG CUAGCUGCCC CUUCCCCGUC
CUGGGUACCC CGAGUCUCCC CCGACCU'CGG GUCCCAGGUA UGCUCCCACC
UCCACCUGCC CCACUCACCA CCUCUGCUAG UCCAGACAC CUCCCAAGCA
CGCAGCAAUG CAGCUCAAAA CGCUUAGCCU AGCCACACCC CCACGGGAAA
CAGCAGUGAU UAACCUU'AG CAAUAAACGA AAGUU'AAU AAGCUAUACU
AACCCAGGG UUGGUCAAU UCGUGCCAGC CACACCGAGA CCUGGUCCAG
AGUCGCUAGC CGCGUCGCUA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA
AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA
AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA

【序列表】

<110> 美商建南德克公司(Genentech, Inc.)

<120> 用於癌症療法之RNA分子

<130> 14639-20469.40

<140> TW 109101064

<141> 2020-01-13

<150> US 62/792,387

<151> 2019-01-14

<150> US 62/795,476

<151> 2019-01-22

<150> US 62/887,410

<151> 2019-08-15

<160> 42

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成構築體

<400> 1

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser Trp Ile His
1 5 10

<210> 2

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成構築體

<400> 2

Ala Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 3
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 3
Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr
1 5

<210> 4
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 4
Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala
1 5 10

<210> 5
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 5
Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
1 5

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 6
Gln Gln Tyr Leu Tyr His Pro Ala Thr
1 5

<210> 7
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 7
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser
20 25 30
Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 8
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 8
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Leu Tyr His Pro Ala
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 9
<211> 447
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 9
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser
20 25 30
Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125
Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140
Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160
Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190
Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205
Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
210 215 220
His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro

260						265						270						
Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala			
275						280						285						
Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Ala	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val			
290						295						300						
Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr			
305						310						315						320
Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr			
325						330						335						
Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu			
340						345						350						
Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys			
355						360						365						
Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser			
370						375						380						
Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp			
385						390						395						400
Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser			
405						410						415						
Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala			
420						425						430						
Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly				
435						440						445						

<210> 10
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 10															
Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
1				5				10				15			
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Asp	Val	Ser	Thr	Ala
20				25				30							
Val	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
35				40				45							
Tyr	Ser	Ala	Ser	Phe	Leu	Tyr	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
50				55				60							
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
65				70				75				80			
Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Leu	Tyr	His	Pro	Ala
85				90				95							
Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala
100				105				110							
Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly
115				120				125							

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 11
<211> 439
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 11
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Asp Cys Lys Ala Ser Gly Ile Thr Phe Ser Asn Ser
20 25 30
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Thr Asn Asp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110
Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser
115 120 125
Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
130 135 140
Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
145 150 155 160
Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
165 170 175
Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys
180 185 190
Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
195 200 205
Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala

210 215 220
Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
225 230 235 240
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
245 250 255
Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val
260 265 270
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
275 280 285
Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
290 295 300
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly
305 310 315 320
Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
325 330 335
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr
340 345 350
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
355 360 365
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
370 375 380
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
385 390 395 400
Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe
405 410 415
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
420 425 430
Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
435

<210> 12
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 12
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Asn Trp Pro Arg
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 13
<211> 446
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 13
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Val Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30
Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Gly Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe
50 55 60
Lys Asn Arg Val Thr Leu Thr Thr Asp Ser Ser Thr Thr Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Lys Ser Leu Gln Phe Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Arg Asp Tyr Arg Phe Asp Met Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125
Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala
130 135 140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val

165					170					175						
Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	
180					185					190						
Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	
195					200					205						
Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	
210					215					220						
Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	
225					230					235					240	
Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	
245					250					255						
Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	
260					265					270						
Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	
275					280					285						
Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	
290					295					300						
Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	
305					310					315					320	
Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	
325					330					335						
Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	
340					345					350						
Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	
355					360					365						
Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	
370					375					380						
Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	
385					390					395					400	
Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	
405					410					415						
Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	
420					425					430						
His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly			
435					440					445						

<210> 14
<211> 218
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 14
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Lys Gly Val Ser Thr Ser
20 25 30

Gly Tyr Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
35 40 45
Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80
Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
85 90 95
Asp Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105 110
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
115 120 125
Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
130 135 140
Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145 150 155 160
Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
165 170 175
Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
180 185 190
His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
195 200 205
Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 15
<211> 449
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 15
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ile Met Met Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ser Ile Tyr Pro Ser Gly Gly Ile Thr Phe Tyr Ala Asp Thr Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Ile Lys Leu Gly Thr Val Thr Thr Val Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val

115	120	125
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala		
130	135	140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser		
145	150	155
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val		
165	170	175
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro		
180	185	190
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys		
195	200	205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp		
210	215	220
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly		
225	230	235
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile		
245	250	255
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu		
260	265	270
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His		
275	280	285
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg		
290	295	300
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys		
305	310	315
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu		
325	330	335
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr		
340	345	350
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu		
355	360	365
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp		
370	375	380
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val		
385	390	395
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp		
405	410	415
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His		
420	425	430
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro		
435	440	445
Gly		

<210> 16
<211> 216
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成構築體

<400> 16

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15
Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr
20 25 30
Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45
Met Ile Tyr Asp Val Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60
Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80
Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Thr Ser Ser
85 90 95
Ser Thr Arg Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Gln
100 105 110
Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
115 120 125
Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr
130 135 140
Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro Val Lys
145 150 155 160
Ala Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
165 170 175
Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
180 185 190
Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys
195 200 205
Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210 215

<210> 17

<211> 450

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成構築體

<400> 17

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr
20 25 30
Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val

50	55	60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr		
65	70	75
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
85	90	95
Ala Arg Glu Gly Gly Trp Phe Gly Glu Leu Ala Phe Asp Tyr Trp Gly		
100	105	110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser		
115	120	125
Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala		
130	135	140
Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val		
145	150	155
Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala		
165	170	175
Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val		
180	185	190
Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His		
195	200	205
Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys		
210	215	220
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly		
225	230	235
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met		
245	250	255
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His		
260	265	270
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val		
275	280	285
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr		
290	295	300
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly		
305	310	315
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser Ile		
325	330	335
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val		
340	345	350
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser		
355	360	365
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu		
370	375	380
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro		
385	390	395
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val		
405	410	415
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met		
420	425	430
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser		
435	440	445
Pro Gly		

450

<210> 18
<211> 215
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 18
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Arg Val Ser Ser Ser
20 25 30
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45
Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Leu Pro
85 90 95
Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
100 105 110
Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
115 120 125
Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
130 135 140
Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145 150 155 160
Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
165 170 175
Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
180 185 190
Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
195 200 205
Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 19
<211> 129
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 19
ggcgaacuag uauucuucug guccccacag acucagagag aaccgccac caugagagug 60
augggcccca gaaccugau ccugcugcug ucuggcgccc uggcccugac agagacaugg 120
gccggaagc 129

<210> 20
<211> 488
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 20
aucgugggaa uuuggcagg acuggcagug cuggccgugg uggugaucgg agccguggug 60
gcuaccguga ugugcagacg gaaguccagc ggaggcaagg gcggcagcua cagccaggcc 120
gccagcucug auagcgccca gggcagcgac gugucacuga cagccuagua acucgagcug 180
guacugcaug cacgcaaugc uagcugcccc uuucccgucc uggguacccc gagucucucc 240
cgaccucggg ucccagguau gcuccaccu ccaccugccc cacucaccac cucugcuagu 300
uccagacacc ucccagcac gcagcaaugc agcuaaaaac gcuuagccua gccacacccc 360
cacgggaaac agcagugauu aaccuuuagc aauaaacgaa aguuuaacua agcuauacua 420
accccagggu uggucaauuu cgugccagcc acaccgagac cugguccaga gucgcuagcc 480
gcgucgcu 488

<210> 21
<211> 51
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 21
ggcgaacuag uauucuucug guccccacag acucagagag aaccgccac c 51

<210> 22
<211> 51
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 22
ggcgaactag tattcttctg gtccccacag actcagagag aaccgccac c 51

<210> 23
<211> 39
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 23
uucuucuggu ccccacagac ucagagagaa cccgccacc 39

<210> 24
<211> 39
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 24
ttcttctggt ccccacagac tcagagagaa cccgccacc 39

<210> 25
<211> 78
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 25
augagaguga uggccccag aaccugauc cugcugcugu cuggcgcccu ggcccugaca 60
gagacauggg ccggaagc 78

<210> 26
<211> 78
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 26
atgagagtga tggccccag aacctgac ctgctgctgt ctggcgccct ggccctgaca 60
gagacatggg ccggaagc 78

<210> 27
<211> 26
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 27
Met Arg Val Met Ala Pro Arg Thr Leu Ile Leu Leu Leu Ser Gly Ala
1 5 10 15
Leu Ala Leu Thr Glu Thr Trp Ala Gly Ser
20 25

<210> 28
<211> 165
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 28
aucgugggaa uuguggcagg acuggcagug cuggccgugg uggugaucgg agccguggug 60
gcuaccguga ugugcagacg gaaguccagc ggaggcaagg gcggcagcua cagccaggcc 120
gccagcucug auagcgccca gggcagcgac gugucacuga cagcc 165

<210> 29
<211> 165
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 29
atcgtgggaa ttgtggcagg actggcagtg ctggccgtgg tggtgatcgg agccgtggtg 60
gctaccgtga tgtgcagacg gaagtccagc ggaggcaagg gcggcagcta cagccaggcc 120
gccagctctg atagcgccca gggcagcgac gtgtcactga cagcc 165

<210> 30
<211> 55
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 30
Ile Val Gly Ile Val Ala Gly Leu Ala Val Leu Ala Val Val Val Ile
1 5 10 15
Gly Ala Val Val Ala Thr Val Met Cys Arg Arg Lys Ser Ser Gly Gly
20 25 30
Lys Gly Gly Ser Tyr Ser Gln Ala Ala Ser Ser Asp Ser Ala Gln Gly
35 40 45
Ser Asp Val Ser Leu Thr Ala
50 55

<210> 31
<211> 317
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 31
cucgagcugg uacugcaugc acgcaaugcu agcugccccc uucccguccu ggguaccccc 60
agucuccccc gaccucgggu cccagguaug cucccaccuc caccugcccc acucaccacc 120
ucugcuaguu ccagacaccu cccaagcacg cagcaaugca gcucaaaacg cuuagccuag 180
ccacaccccc acgggaaaca gcagugauua accuuuagca auaaacgaaa guuuuacuaa 240
gcuauacuaa ccccaggggu ggucuuuuc gugccagcca caccgagacc ugguccagag 300
ucgcuagccg cgucgcu 317

<210> 32
<211> 311
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 32
ctggtactgc atgcacgcaa tgctagctgc ccttttcccg tcctgggtac cccgagtctc 60
ccccgacctc ggggtcccagg tatgtccca cctccacctg cccactcac cactctgct 120
agtccagac acctcccaag cacgcagcaa tgcagctcaa aacgcttagc ctagccacac 180
ccccacggga aacagcagtg attaaccttt agcaataaac gaaagttaa ctaagctata 240
ctaaccacag ggttggtcaa tttcgtgcc gccacaccga gacctggtcc agagtcgcta 300
gccgcgtcgc t 311

<210> 33
<211> 136
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<400> 33
cugguacugc augcacgcaa ugcuagcugc cccuuucccg uccuggguac cccgagucuc 60
ccccgaccuc gggucccagg uaugcucca ccuccaccug ccccacucac caccucugcu 120
aguuccagac accucc 136

<210> 34
<211> 136
<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成構築體

<400> 34

ctggtactgc atgcacgcaa tgctagctgc ccctttcccg tcctgggtac cccgagtctc 60
ccccgacctc ggggtcccagg tatgctccca cctccacctg ccccactcac cacctctgct 120
agttccagac acctcc 136

<210> 35

<211> 143

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成構築體

<400> 35

caagcacgca gcaaugcagc ucaaaacgcu uagccuagcc acacccccac gggaaacagc 60
agugauuaac cuuuagcaau aaacgaaagu uuaacuaagc uauacuaacc ccaggguugg 120
ucaauuuucgu gccagccaca ccg 143

<210> 36

<211> 143

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成構築體

<400> 36

caagcacgca gcaatgcagc tcaaaacgct tagcctagcc acacccccac gggaaacagc 60
agtgattaac ctttagcaat aaacgaaagt ttaactaagc tatactaacc ccagggttgg 120
tcaatttcgt gccagccaca ccg 143

<210> 37

<211> 30

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成構築體

<400> 37

ggcgggcucug gaggaggcgg cuccggaggc 30

<210> 38

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成構築體

<400> 38

ggcggctctg gaggaggcgg ctccggaggc 30

<210> 39

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成構築體

<400> 39

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
1 5 10

<210> 40

<211> 129

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成構築體

<400> 40

ggcgaactag tattcttctg gtccccacag actcagagag aaccgcccac catgagagtg 60
atggcccccga gaacctgat cctgctgctg tctggcgccc tggccctgac agagacatgg 120
gccggaagc 129

<210> 41

<211> 488

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成構築體

<400> 41

atcgtgggaa ttgtggcagg actggcagtg ctggccgtgg tggtgatcgg agccgtggtg 60
gctaccgtga tgtgcagacg gaagtccagc ggaggcaagg gcggcagcta cagccaggcc 120
gccagctctg atagcgccca gggcagcgac gtgtcactga cagcctagta actcgagctg 180
gtactgcatg cacgcaatgc tagctgcccc ttccccgtcc tgggtacccc gagtctcccc 240
cgacctcggg tcccaggtat gctcccacct ccacctgccc cactcaccac ctctgctagt 300
tccagacacc tcccaagcac gcagcaatgc agctcaaaac gcttagccta gccacacccc 360
cacgggaaac agcagtgatt aacctttagc aataaacgaa agtttaacta agctatacta 420

accccagggt tggatcaattt cgtgccagcc acaccgagac ctgggtccaga gtcgctagcc 480
gcgtcgct 488

<210> 42
<211> 740
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成構築體

<220>
<221> misc_feature
<222> 1,2
<223> 藉由(5' ->5')-pp(s)p-連接，如在本說明書之表5及圖5中所示

<220>
<221> misc_feature
<222> 132
<223> n = A,T,C,G or U

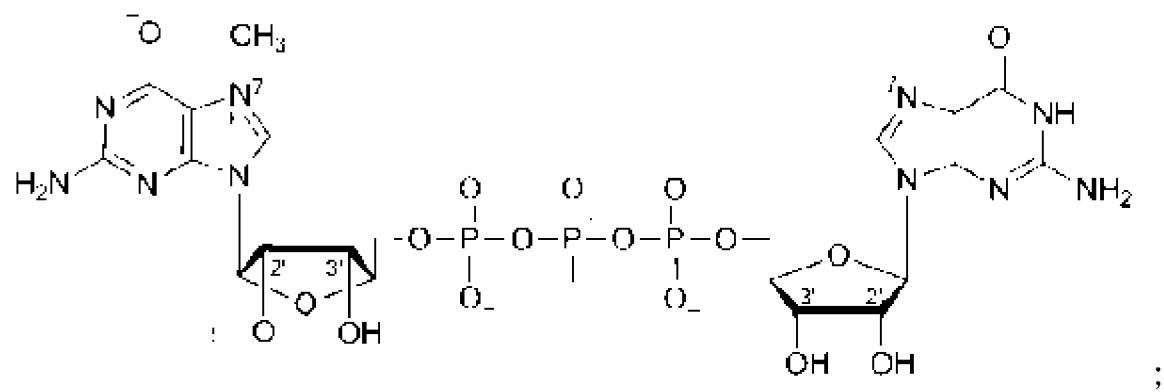
<220>
<221> misc_feature
<222> 132
<223> 作為本說明書中定義之多核苷酸序列存在且可編碼本說明書(例如圖3)中定義之患者癌症特異性表位
<400> 42

ggggcgaaacu aguaauucu ugguccccac agacucagag agaaccgcc accaugagag 60
ugauggcccc cagaaccugc auccugcugc ugucuggcgc ccuggcccug acagagacau 120
gggcccgaag cnaucguggg aaauugugca ggacuggcag ucuggccgu gguggugauc 180
ggagccgugg uggcuaccgu gaugugcaga cggaagucca gcggaggcaa gggcggcagc 240
uacagccagg ccgccagcuc ugaugcggc cagggcagcg acgugucacu gacagccuag 300
uaacucgagc ugguacugca ugcacgcaau gcuagcugcc ccuuuccgu ccuggguacc 360
ccgagucucc cccgaccucg ggucccaggu augcuccac cuccaccugc cccacucacc 420
accucugcua guuccagaca ccuccaagc acgcagcaau gcagcucaa acgcuuagcc 480
uagccacacc cccacgggaa acagcaguga uuaaccuuua gcaauaacg aaaguuaac 540
uaagcuauac uaaccccagg guuggucaau uucgugccag ccacaccgag accuggucca 600
gagucgcuag ccgcgucgu aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa 660
aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa 720
aaaaaaaaa aaaaaaaaa 740

【發明申請專利範圍】

【請求項 1】 一種 RNA 分子，其在 5'→3'方向上包含：

(1) 5'帽，該 5'帽包含以下結構之 D1 非鏡像異構物：



(2) 5'未轉譯區(UTR)，該 5' UTR 包含序列 UUCUUCUGGUCCCCACAGACUCAGAGAGAACCCGCCACC(SEQ ID NO:23)；

(3) 編碼分泌信號肽之多核苷酸序列，其中該分泌信號肽包含胺基酸序列 MRVMAPRTLILLLSGALALTETWAGS(SEQ ID NO:27)；

(4) 編碼主要組織相容性複合體(MHC)分子之跨膜及細胞質域之至少一部分之多核苷酸序列，其中該 MHC 分子之該跨膜及細胞質域之該至少一部分包含胺基酸序列 IVGIVAGLAVLAVVVIGAVVATVMCRRKSSGGKGGSYSQAASSDSAQGSD VSLTA(SEQ ID NO:30)；

(5) 3'UTR，其包含：

(a) 酶切胺基端增強子(AES) mRNA 之 3'未轉譯區或其片段，該 AES mRNA 之該 3'未轉譯區或其片段包含序列 CUGGUACUGCAUGCACGCAAUGCUAGCUGCCCCUUUCCCGUCCUGG GUACCCCGAGUCUCCCCCGACCUCGGGUCCCAGGUAUGCUCCCACC

UCCACCUGCCCCACUCACCACCUCUGCUAGUUCCAGACACCUCC(SEQ ID NO:33)；及

(b) 經粒線體編碼 12S RNA 之非編碼 RNA 或其片段，該經粒線體編碼 12S RNA 之該非編碼 RNA 或其片段包含序列
CAAGCACGCAGCAAUGCAGCUCAAAACGCUUAGCCUAGCCACACCC
CCACGGGAAACAGCAGUGAUUAACCUUUAGCAAUAAACGAAAGUU
UAACUAAGCUAUACUAACCCCAGGGUUGGUCAAUUUCGUGCCAGCC
ACACCG(SEQ ID NO:35)；及

(6) poly(A)序列。

【請求項 2】 如請求項 1 之 RNA 分子，其進一步包含：

(a) 編碼至少 1 個新表位之多核苷酸序列；其中在 5'→3'方向上，編碼該至少 1 個新表位之該多核苷酸序列係在編碼該分泌信號肽之該多核苷酸序列與編碼該 MHC 分子之該跨膜及細胞質域之該至少一部分之該多核苷酸序列之間；或

(b) 在 5'→3'方向上，編碼胺基酸連接子之多核苷酸序列；及編碼新表位之多核苷酸序列；

其中編碼該胺基酸連接子及該新表位之該等多核苷酸序列形成第一連接子-新表位模組；且

其中在 5'→3'方向上，形成該第一連接子-新表位模組之該等多核苷酸序列係在編碼該分泌信號肽之該多核苷酸序列與編碼該 MHC 分子之該跨膜及細胞質域之該至少一部分之該多核苷酸序列之間。

【請求項 3】 如請求項 2 之 RNA 分子，其中該胺基酸連接子包含序列
GGSGGGGSGG(SEQ ID NO:39)；及/或其中編碼該胺基酸連接子之該多核苷

酸序列包含序列 GGCGGCUCUGGAGGAGGCGGCUCCGGAGGC(SEQ ID NO:37)。

【請求項 4】 如請求項 2 之 RNA 分子，其在 5'→3'方向上進一步包含：至少第二連接子-新表位模組，其中該至少第二連接子-新表位模組包含編碼胺基酸連接子之多核苷酸序列及編碼新表位之多核苷酸序列；

其中在 5'→3'方向上，形成該第二連接子-新表位模組之該等多核苷酸序列係在編碼該第一連接子-新表位模組之該新表位之該多核苷酸序列與編碼該 MHC 分子之該跨膜及細胞質域之該至少一部分之該多核苷酸序列之間；且

其中該第一連接子-新表位模組之該新表位不同於該第二連接子-新表位模組之該新表位。

【請求項 5】 如請求項 4 之 RNA 分子，其中該 RNA 分子包含：

(a) 5 個連接子-新表位模組，且其中該 5 個連接子-新表位模組各自編碼不同的新表位；

(b) 10 個連接子-新表位模組，且其中該 10 個連接子-新表位模組各自編碼不同的新表位；或

(c) 20 個連接子-新表位模組，且其中該 20 個連接子-新表位模組各自編碼不同的新表位。

【請求項 6】 如請求項 2 至 5 中任一項之 RNA 分子，其進一步包含編碼胺基酸連接子之第二多核苷酸序列，其中編碼該胺基酸連接子之該第二多核苷酸序列係在編碼 3'方向最遠側之該新表位之該多核苷酸序列與編碼該 MHC 分子之該跨膜及細胞質域之該至少一部分之該多核苷酸序列之間。

【請求項 7】 如請求項 1 至 5 中任一項之 RNA 分子，其中包含序列 CUGGUACUGCAUGCACGCAAUGCUAGCUGCCCCUUUCCCGUCCUGG

GUACCCCGAGUCUCCCCCGACCUCGGGUCCCAGGUAUGCUCCCACC
UCCACCUGCCCCACUCACCACCUCUGCUAGUUCCAGACACCUCC(SE
Q ID NO:33)之該 AES mRNA 之該 3'未轉譯區或其片段位於包含序列
CAAGCACGCAGCAAUGCAGCUCAAAACGCUUAGCCUAGCCACACCC
CCACGGGAAACAGCAGUGAUUAACCUUUAGCAAUAAACGAAAGUU
UAACUAAGCUAUACUAACCCCAGGGUUGGUCAAUUUCGUGCCAGCC
ACACCG(SEQ ID NO:35)之該經粒線體編碼 12S RNA 之該非編碼 RNA 或其
片段之 5'處。

【請求項 8】 如請求項 1 至 4 中任一項之 RNA 分子，其中該 5'UTR 包含序列
GGCGAACUAGUAUUCUUCUGGUCCCCACAGACUCAGAGAGAACCCG
CCACC(SEQ ID NO:21)。

【請求項 9】 如請求項 1 之 RNA 分子，其中該 RNA 分子在 5'→3'方向上包含：

多	核	苷	酸	序	列
---	---	---	---	---	---

GGCGAACUAGUAUUCUUCUGGUCCCCACAGACUCAGAGAGAACCCG
CCACCAUGAGAGUGAUGGCCCCCAGAACCCUGAUCCUGCUGCUGUC
UGGCGCCCUGGCCCUGACAGAGACAUGGGCCGGAAGC(SEQ ID
NO:19)； 及 多 核 苷 酸 序 列

AUCGUGGGAAUUGUGGCAGGACUGGCAGUGCUGGCCGUGGUGGUG
AUCGGAGCCGUGGUGGCUACCGUGAUGUGCAGACGGAAGUCCAGCG
GAGGCAAGGGCGGCAGCUACAGCCAGGCCGCCAGCUCUGAUAGCGC
CCAGGGCAGCGACGUGUCACUGACAGCCUAGUAACUCGAGCUGGUA
CUGCAUGCACGCAAUGCUGAGCUGCCCCUUUCCCGUCCUGGGUACCC
CGAGUCUCCCCCGACCUCGGGUCCCAGGUAUGCUCCCACCUCCACCU

GCCCCACUCACCACCUCUGCUAGUUCCAGACACCUCCCAAGCACGCA
GCAAUGCAGCUCAAAACGCUUAGCCUAGCCACACCCCCACGGGAAA
CAGCAGUGAUUAACCUUUAGCAAUAAACGAAAGUUUAACUAAGCU
AUACUAACCCCAGGGUUGGUCAAUUUCGUGCCAGCCACACCGAGAC
CUGGUCCAGAGUCGCUAGCCGCGUCGCU(SEQ ID NO:20)。

【請求項 10】 如請求項 1 至 5 中任一項之 RNA 分子，其中該 3'UTR 包含序列
CUCGAGCUGGUACUGCAUGCACGCAAUGCUGCUGCCCCUUUCCCG
UCCUGGGUACCCCGAGUCUCCCCCGACCUCGGGUCCCAGGUAUGCU
CCCACCUCCACCUGCCCCACUCACCACCUCUGCUAGUUCCAGACACC
UCCCAAGCACGCAGCAAUGCAGCUCAAAACGCUUAGCCUAGCCACA
CCCCACGGGAAACAGCAGUGAUUAACCUUUAGCAAUAAACGAAAG
UUUAACUAAGCUAUACUAACCCCAGGGUUGGUCAAUUUCGUGCCAG
CCACACCGAGACCUGGUCCAGAGUCGCUAGCCGCGUCGCU(SEQ ID
NO:31)。

【請求項 11】 如請求項 1 至 4 中任一項之 RNA 分子，其中編碼該分泌信號肽
之該多核苷酸序列包含序列
AUGAGAGUGAUGGCCCCCAGAACCCUGAUCCUGCUGCUGUCUGGCG
CCCUGGCCCUGACAGAGACAUGGGCCGGAAGC(SEQ ID NO:25)。

【請求項 12】 如請求項 1 至 5 中任一項之 RNA 分子，其中編碼該 MHC 分子
之該跨膜及細胞質域之該至少一部分之該多核苷酸序列包含序列
AUCGUGGGAAUUGUGGCAGGACUGGCAGUGCUGGCCGUGGUGGUG
AUCGGAGCCGUGGUGGCUACCGUGAUGUGCAGACGGAAGUCCAGCG
GAGGCAAGGGCGGCAGCUACAGCCAGGCCGCCAGCUCUGAUAGCGC

CCAGGGCAGCGACGUGUCACUGACAGCC(SEQ ID NO:28)。

【請求項 13】 如請求項 1 至 5 中任一項之 RNA 分子，其中該 poly(A)序列包含 120 個腺嘌呤核苷酸。

【請求項 14】 如請求項 9 之 RNA 分子，其在序列 SEQ ID NO:19 與 SEQ ID NO:20 之間進一步包含編碼至少一個新表位之多核苷酸序列。

【請求項 15】 如請求項 14 之 RNA 分子，其在 5'→3'方向上在序列 SEQ ID NO:19 與 SEQ ID NO:20 之間進一步包含：

(a) 至少第一連接子-新表位模組，其中該至少第一連接子-新表位模組包含編碼胺基酸連接子之多核苷酸序列及編碼新表位之多核苷酸序列；及

(b) 編碼胺基酸連接子之第二多核苷酸序列。

【請求項 16】 如請求項 15 之 RNA 分子，其包含：

(a) 5 個連接子-表位模組，且其中該 5 個連接子-表位模組各自編碼不同的新表位；

(b) 10 個連接子-表位模組，且其中該 10 個連接子-表位模組各自編碼不同的新表位；或

(c) 20 個連接子-表位模組，且其中該 20 個連接子-表位模組各自編碼不同的新表位。

【請求項 17】 如請求項 1 之 RNA 分子，其中該 RNA 分子包含 SEQ ID NO: 42 之多核苷酸序列及編碼至少一個新表位之多核苷酸序列，其中編碼該至少一個新表位之該多核苷酸序列係在 SEQ ID NO:42 中標記為「N」之位置處。

【請求項 18】 如請求項 17 之 RNA 分子，其在 5'→3'方向上在 SEQ ID NO:42 中標記為「N」之位置處進一步包含：

(a) 至少第一連接子-新表位模組，其中該至少第一連接子-新表位模組包含

編碼胺基酸連接子之多核苷酸序列及編碼新表位之多核苷酸序列；及

(b) 編碼胺基酸連接子之第二多核苷酸序列。

【請求項 19】 如請求項 18 之 RNA 分子，其包含：

(a) 5 個連接子-表位模組，且其中該 5 個連接子-表位模組各自編碼不同的新表位；

(b) 10 個連接子-表位模組，且其中該 10 個連接子-表位模組各自編碼不同的新表位；或

(c) 20 個連接子-表位模組，且其中該 20 個連接子-表位模組各自編碼不同的新表位。

【請求項 20】 如請求項 17 之 RNA 分子，其中該 5'帽位於位於 SEQ ID NO:42 中之前 2 個 G 鹼基之間。

【請求項 21】 一種脂質體，其包含如請求項 1 至 20 中任一項之 RNA 分子及一或多種脂質，其中該一或多種脂質形成囊封該 RNA 分子之多層結構。

【請求項 22】 一種如請求項 1 至 20 中任一項之 RNA 分子或如請求項 21 之脂質體之用途，其係用於製備治療個體之癌症或延遲其進展之醫藥品。

【請求項 23】 一種編碼如請求項 1 及 3 至 20 中任一項之 RNA 分子的 DNA 分子，其中該 DNA 分子包含：

(a) 編碼該 5'UTR 之多核苷酸序列，其中該多核苷酸序列包含序列 TTCTTCTGGTCCCCACAGACTCAGAGAGAACCCGCCACC (SEQ ID NO:24)；

(b) 編碼該分泌信號肽之多核苷酸序列，其中該多核苷酸序列包含序列 ATGAGAGTGATGGCCCCAGAACCCTGATCCTGCTGCTGTCTGGCGCC CTGGCCCTGACAGAGACATGGGCCGGAAGC (SEQ ID NO:26)；

(c) 編碼該主要組織相容性複合體(MHC)分子之跨膜及細胞質域之該至少一部分的多核苷酸序列，其中該多核苷酸序列包含序列 ATCGTGGGAATTGTGGCAGGACTGGCAGTGCTGGCCGTGGTGGTGATC GGAGCCGTGGTGGCTACCGTGATGTGCAGACGGAAGTCCAGCGGAGG CAAGGGCGGCAGCTACAGCCAGGCCGCCAGCTCTGATAGCGCCCAGG GCAGCGACGTGTCACTGACAGCC (SEQ ID NO:29)；

(d) 編碼該酶切胺基端增強子(AES) mRNA 之該 3'末轉譯區之多核苷酸序列，其中該多核苷酸序列包含序列 CTGGTACTGCATGCACGCAATGCTAGCTGCCCCCTTTCCCGTCCTGGGTA CCCCAGTCTCCCCCGACCTCGGGTCCCAGGTATGCTCCCACCTCCAC CTGCCCCACTCACACCTCTGCTAGTTCCAGACACCTCC (SEQ ID NO:34)；及

(e) 編碼該經粒線體編碼 12S RNA 之該非編碼 RNA 之多核苷酸序列，其中該多核苷酸序列包含序列 CAAGCACGCAGCAATGCAGCTCAAAACGCTTAGCCTAGCCACACCCC CACGGGAAACAGCAGTGATTAACCTTTAGCAATAAACGAAAGTTTAAC TAAGCTATACTAACCCCAGGGTTGGTCAATTTTCGTGCCAGCCACACCG (SEQ ID NO:36)。

【請求項 24】 如請求項 23 之 DNA 分子，其中該 DNA 分子包含編碼該胺基酸連接子之多核苷酸序列，其中該多核苷酸序列包含序列 GGCGGCTCTGGAGGAGGCGGCTCCGGAGGC (SEQ ID NO:38)。

【請求項 25】 如請求項 23 之 DNA 分子，其中包含序列 CTGGTACTGCATGCACGCAATGCTAGCTGCCCCCTTTCCCGTCCTGGGTA

CCCCGAGTCTCCCCCGACCTCGGGTCCCAGGTATGCTCCCACCTCCAC
CTGCCCCACTCACCACCTCTGCTAGTTCCAGACACCTCC (SEQ ID
NO:34)之該 AES mRNA 之該 3'未轉譯區或其片段位於包含序列
CAAGCACGCAGCAATGCAGCTCAAAACGCTTAGCCTAGCCACACCCC
CACGGGAAACAGCAGTGATTAACCTTTAGCAATAAACGAAAGTTTAAC
TAAGCTATACTAACCCACAGGGTTGGTCAATTTTCGTGCCAGCCACACCG
(SEQ ID NO:36)之該多核苷酸序列之 5'處。

【請求項 26】 如請求項 23 至 25 中任一項之 DNA 分子，其中編碼該 5'UTR 之
該 多 核 苷 酸 序 列 包 含 序 列
GGCGAACTAGTATTCTTCTGGTCCCCACAGACTCAGAGAGAACCCGCC
ACC (SEQ ID NO:22)。

【請求項 27】 如請求項 23 至 25 中任一項之 DNA 分子，其中編碼該 3'UTR 之
該 多 核 苷 酸 序 列 包 含 序 列
CTGGTACTGCATGCACGCAATGCTAGCTGCCCCTTTCCCGTCCTGGGTA
CCCCGAGTCTCCCCCGACCTCGGGTCCCAGGTATGCTCCCACCTCCAC
CTGCCCCACTCACCACCTCTGCTAGTTCCAGACACCTCCCAAGCACGC
AGCAATGCAGCTCAAAACGCTTAGCCTAGCCACACCCCCACGGGAAA
CAGCAGTGATTAACCTTTAGCAATAAACGAAAGTTTAACTAAGCTATAC
TAACCCACAGGGTTGGTCAATTTTCGTGCCAGCCACACCGAGACCTGGTC
CAGAGTCGCTAGCCGCGTCGCT (SEQ ID NO:32)。

【請求項 28】 如請求項 23 至 25 中任一項之 DNA 分子，其中該 DNA 分子在 5'
→ 3'方 向 上 包 含 ： 多 核 苷 酸 序 列
GGCGAACTAGTATTCTTCTGGTCCCCACAGACTCAGAGAGAACCCGCC

ACCATGAGAGTGATGGCCCCCAGAACCCTGATCCTGCTGCTGTCTGGC
GCCCTGGCCCTGACAGAGACATGGGCCGGAAGC(SEQ ID NO:40)；及多
核 苷 酸 序 列
ATCGTGGGAATTGTGGCAGGACTGGCAGTGCTGGCCGTGGTGGTGATC
GGAGCCGTGGTGGCTACCGTGATGTGCAGACGGAAGTCCAGCGGAGG
CAAGGGCGGCAGCTACAGCCAGGCCGCCAGCTCTGATAGCGCCCAGG
GCAGCGACGTGTCACTGACAGCCTAGTAACTCGAGCTGGTACTGCATG
CACGCAATGCTAGCTGCCCCCTTTCCCGTCCTGGGTACCCCGAGTCTCCC
CCGACCTCGGGTCCCAGGTATGCTCCACCTCCACCTGCCCCACTCAC
CACCTCTGCTAGTTCCAGACACCTCCCAAGCACGCAGCAATGCAGCTC
AAAACGCTTAGCCTAGCCACACCCCCACGGGAAACAGCAGTGATTAA
CCTTTAGCAATAAACGAAAGTTTAACTAAGCTATACTAACCCCAGGGTT
GGTCAATTTTCGTGCCAGCCACACCGAGACCTGGTCCAGAGTCGCTAGC
CGCGTCGCT(SEQ ID NO:41)。

【請求項 29】 如請求項 28 之 DNA 分子，其在 5'→3'方向上在序列 SEQ ID NO:40 與 SEQ ID NO:41 之間包含：編碼至少一個新表位之多核苷酸序列。

【請求項 30】 如請求項 29 之 DNA 分子，其在 5'→3'方向上在序列 SEQ ID NO:40 與 SEQ ID NO:41 之間進一步包含：

- (a) 至少第一連接子-新表位模組，其中該至少第一連接子-新表位模組包含編碼胺基酸連接子之多核苷酸序列及編碼新表位之多核苷酸序列；及
- (b) 編碼胺基酸連接子之第二多核苷酸序列。

【請求項 31】 如請求項 30 之 DNA 分子，其包含：

- (a) 5 個連接子-表位模組，且其中該 5 個連接子-表位模組各自編碼不同的

新表位；

(b) 10 個連接子-表位模組，且其中該 10 個連接子-表位模組各自編碼不同的新表位；或

(c) 20 個連接子-表位模組，且其中該 20 個連接子-表位模組各自編碼不同的新表位。

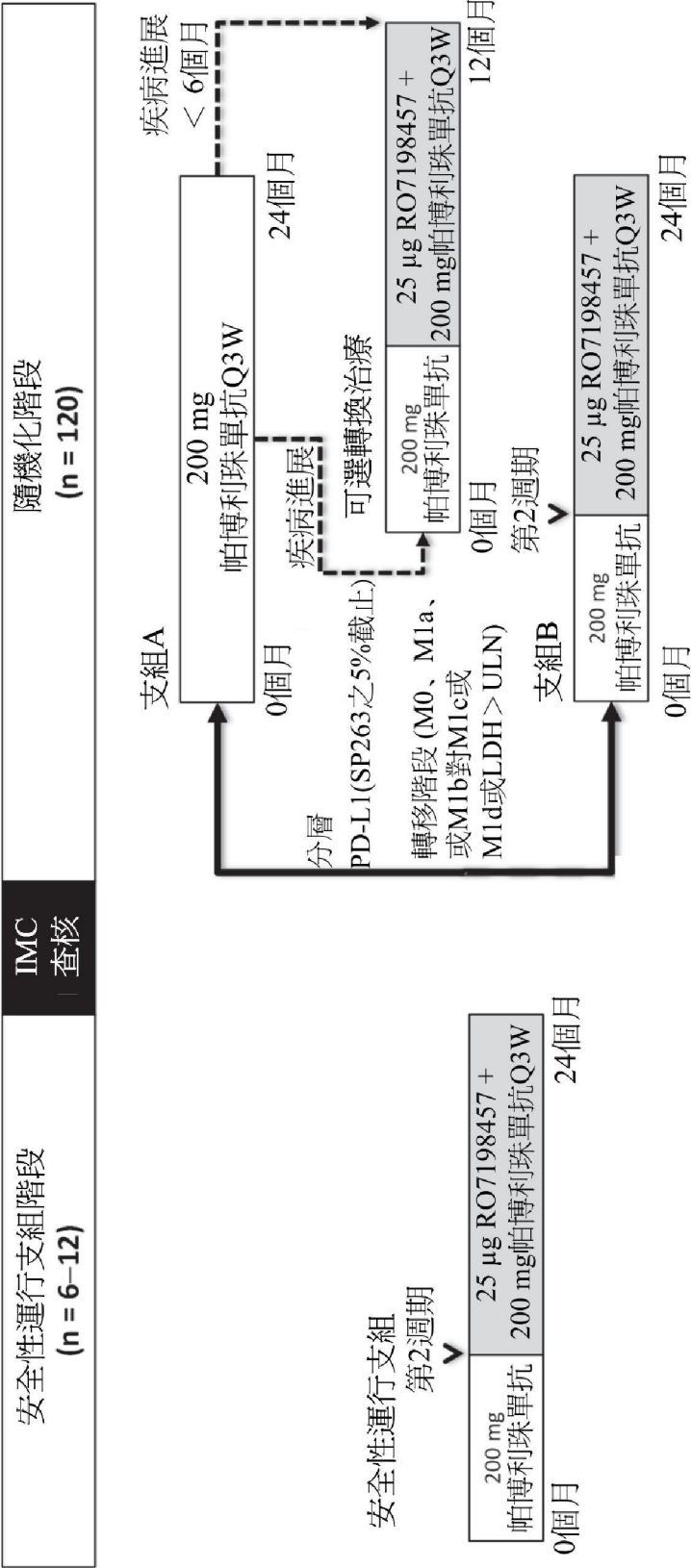
【請求項 32】 如請求項 21 之脂質體，其中該一或多種脂質包含至少一種陽離子脂質及至少一種輔助脂質。

【請求項 33】 如請求項 32 之脂質體，其中該至少一種輔助脂質包含(R)-N,N,N-三甲基-2,3-二油醯氧基-1-丙銨氯化物(DOTMA)及/或 1,2-二油醯基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DOPE)。

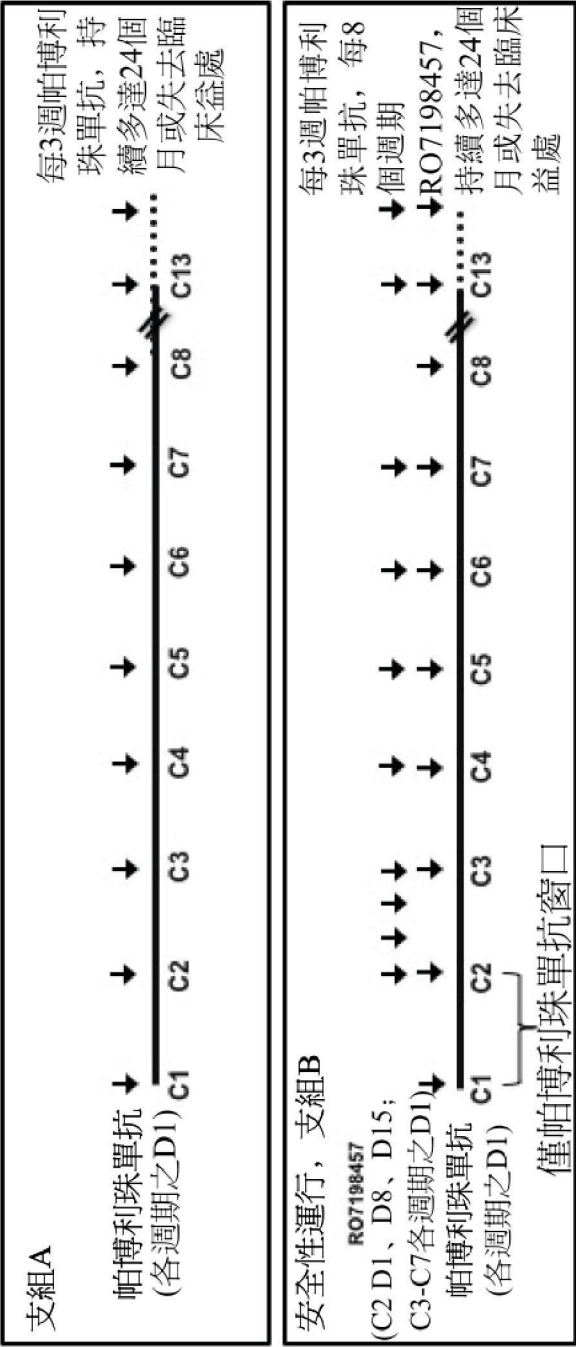
【請求項 34】 如請求項 32 之脂質體，其中在生理 pH 下，該脂質體之正電荷與負電荷的總電荷比為 1.3:2。

【請求項 35】 如請求項 22 之用途，其中該癌症選自由以下組成之群：黑素瘤、非小細胞肺癌、膀胱癌、結直腸癌、三陰性乳癌、腎癌、及頭頸癌。

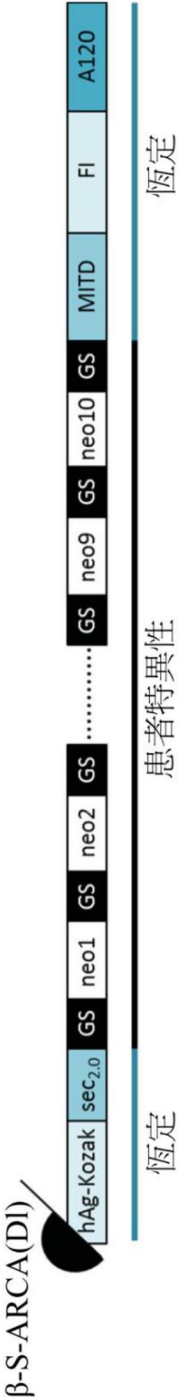
【發明圖式】



【圖 1】



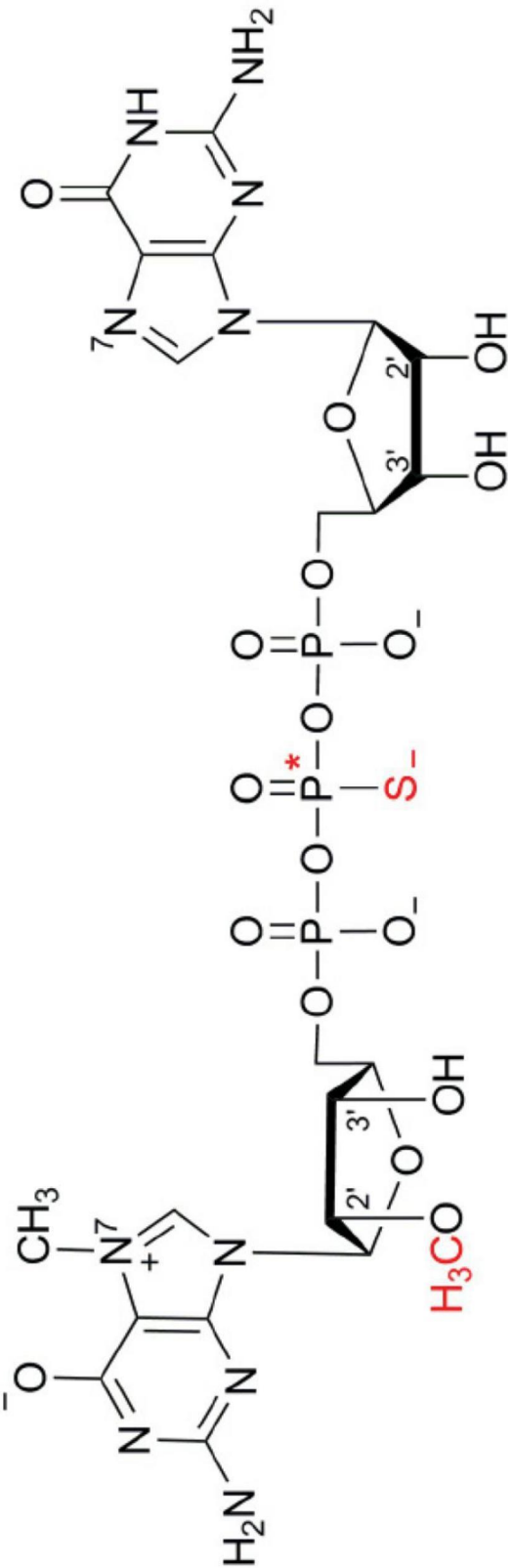
【圖 2】



【圖 3】

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

【圖 4】



【圖 5】