



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117203340 A

(43) 申请公布日 2023. 12. 08

(21) 申请号 202280028901.4

(22) 申请日 2022.04.15

(30) 优先权数据

63/176,128 2021.04.16 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.10.16

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2022/025128 2022.04.15

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2022/221736 EN 2022.10.20

(71) 申请人 基因泰克公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 E·C·弗罗因德 A·M·赫茨纳

R·莱伊莱克 A·J·唐

S·维西纳 L·Y·德拉马尔

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

专利代理师 封新琴

(51) Int.Cl.

C12N 15/117 (2006.01)

权利要求书13页 说明书79页

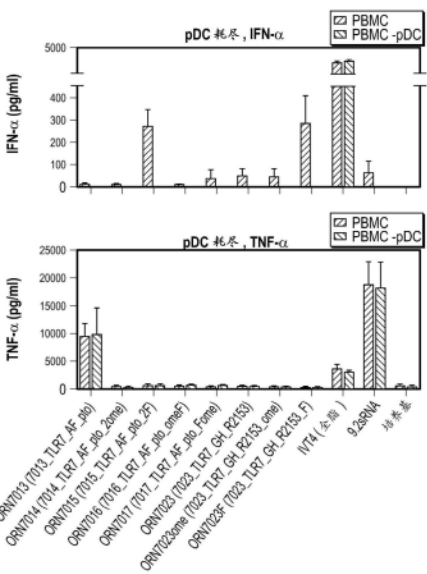
序列表24页 附图19页

(54) 发明名称

优化的TLR7配体及其用途

(57) 摘要

本公开涉及选择性地活化TLR7的免疫调节组合物,所述免疫调节组合物包含RNA配体和药用载体,以及涉及此类免疫调节组合物的体外和治疗用途。



1. 一种选择性地活化TLR7的免疫调节组合物,所述免疫调节组合物包含RNA配体和药用载体,其中所述RNA配体包含:

(a) TLR7选择性基序,其包含式II:

$C_1*U_2-U_3*U_4-U_5*C_6$ (式II),

其中 C_1 和 C_6 为胞苷核苷,并且 U_2 、 U_3 、 U_4 和 U_5 为尿苷核苷,

其中 U_2 具有2'-O-甲基修饰(mU)、2'-氟修饰(fU)、2'-氨基修饰、2'-脱氧修饰或2'-甲氧基乙氧基修饰,

其中 U_4 具有2'-O-甲基修饰(mU)、2'-氟修饰(fU)、2'-氨基修饰、2'-脱氧修饰或2'-甲氧基乙氧基修饰,并且

其中“*”表示硫代磷酸酯键,并且“-”表示磷酸二酯键;

(b) 第一核苷酸序列,其连接至所述TLR7选择性基序的5'端;以及

(c) 第二核苷酸序列,其连接至所述TLR7选择性基序的3'端。

2. 根据权利要求1所述的免疫调节组合物,其中所述TLR7选择性基序的 U_2 具有2'-O-甲基修饰(mU)。

3. 根据权利要求1所述的免疫调节组合物,其中所述TLR7选择性基序的 U_4 具有2'-O-甲基修饰(mU)。

4. 根据权利要求1所述的免疫调节组合物,其中所述TLR7选择性基序的 U_2 具有2'-氟修饰(fU)。

5. 根据权利要求1所述的免疫调节组合物,其中所述TLR7选择性基序的 U_4 具有2'-氟修饰(fU)。

6. 根据权利要求1至3中任一项所述的免疫调节组合物,其中所述TLR7选择性基序的 U_2 和 U_4 具有2'-O-甲基修饰(mU)。

7. 根据权利要求1和4至5中任一项所述的免疫调节组合物,其中所述TLR7选择性基序的 U_2 和 U_4 具有2'-氟修饰(fU)。

8. 根据权利要求1至2和5中任一项所述的免疫调节组合物,其中所述TLR7选择性基序的 U_2 具有2'-O-甲基修饰(mU),并且所述TLR7选择性基序的 U_4 具有2'-氟修饰(fU)。

9. 根据权利要求1和3至4中任一项所述的免疫调节组合物,其中所述TLR7选择性基序的 U_2 具有2'-氟修饰(fU),并且所述TLR7选择性基序的 U_4 具有2'-O-甲基修饰(mU)。

10. 根据权利要求1至3中任一项所述的免疫调节组合物,其中所述TLR7选择性基序包含SEQ ID NO:44的核苷酸序列。

11. 根据权利要求1和4至5中任一项所述的免疫调节组合物,其中所述TLR7选择性基序包含SEQ ID NO:45的核苷酸序列。

12. 根据权利要求1至2和5中任一项所述的免疫调节组合物,其中所述TLR7选择性基序包含SEQ ID NO:46的核苷酸序列。

13. 根据权利要求1和3至4中任一项所述的免疫调节组合物,其中所述TLR7选择性基序包含SEQ ID NO:47的核苷酸序列。

14. 一种选择性地活化TLR7的免疫调节组合物,所述免疫调节组合物包含RNA配体和药用载体,其中所述RNA配体包含:

(a) TLR7选择性基序,其包含选自SEQ ID NO:44、45、46和47组成的组的核苷酸序列,

(b) 第一核苷酸序列,其连接至所述TLR7选择性基序的5'端,以及

(c) 第二核苷酸序列,其连接至所述TLR7选择性基序的3'端。

15. 根据权利要求1至14中任一项所述的免疫调节组合物,其中所述第一核苷酸序列包含一个核苷、或通过硫代磷酸酯键连接的至少两个核苷,

其中所述第一核苷酸序列不包含尿苷核苷,并且

其中所述第一核苷酸序列通过硫代磷酸酯键连接至所述TLR7选择性基序。

16. 根据权利要求15所述的免疫调节组合物,其中所述第一核苷酸序列包含通过硫代磷酸酯键连接的八个核苷。

17. 根据权利要求1至16中任一项所述的免疫调节组合物,其中所述第一核苷酸序列包含核苷酸序列C*C*G*A*G*C*C*G (SEQ ID NO:58)、或与SEQ ID NO:58具有至少约85%同一性的核苷酸序列,其中“*”表示硫代磷酸酯键,并且

其中所述第一核苷酸序列通过硫代磷酸酯键连接至所述TLR7选择性基序。

18. 根据权利要求1至17中任一项所述的免疫调节组合物,其中所述第二核苷酸序列包含一个核苷、或通过硫代磷酸酯键连接的至少两个核苷,

其中所述第二核苷酸序列不包含尿苷核苷,并且

其中所述第二核苷酸序列通过硫代磷酸酯键连接至所述TLR7选择性基序。

19. 根据权利要求18所述的免疫调节组合物,其中所述第二核苷酸序列包含通过硫代磷酸酯键连接的两个核苷。

20. 根据权利要求1至19中任一项所述的免疫调节组合物,其中所述第二核苷酸序列包含核苷酸序列C*C (SEQ ID NO:59),

其中“*”表示硫代磷酸酯键,并且

其中所述第二核苷酸序列通过硫代磷酸酯键连接至所述TLR7选择性基序。

21. 根据权利要求1至3、6、10和14至20中任一项所述的免疫调节组合物,其中所述RNA配体包含SEQ ID NO:12的核苷酸序列、或与SEQ ID NO:12具有至少约85%同一性且包含SEQ ID NO:44的TLR7选择性基序的核苷酸序列。

22. 根据权利要求1、4至5、7、11和14至20中任一项所述的免疫调节组合物,其中所述RNA配体包含SEQ ID NO:13的核苷酸序列、或与SEQ ID NO:13具有至少约85%同一性且包含SEQ ID NO:45的TLR7选择性基序的核苷酸序列。

23. 根据权利要求1、2、5、8、12和14至20中任一项所述的免疫调节组合物,其中所述RNA配体包含SEQ ID NO:14的核苷酸序列、或与SEQ ID NO:14具有至少约85%同一性且包含SEQ ID NO:46的TLR7选择性基序的核苷酸序列。

24. 根据权利要求1、3至4、9和13至20中任一项所述的免疫调节组合物,其中所述RNA配体包含SEQ ID NO:15的核苷酸序列、或与SEQ ID NO:15具有至少约85%同一性且包含SEQ ID NO:47的TLR7选择性基序的核苷酸序列。

25. 一种选择性地活化TLR7的免疫调节组合物,所述免疫调节组合物包含RNA配体和药用载体,其中所述RNA配体包含:

(a) 选自SEQ ID NO:12、13、14和15组成的组的核苷酸序列;

(b) 与SEQ ID NO:12具有至少约85%同一性且包含SEQ ID NO:44的TLR7选择性基序的核苷酸序列;

(c) 与SEQ ID NO:13具有至少约85%同一性且包含SEQ ID NO:45的TLR7选择性基序的核苷酸序列;

(d) 与SEQ ID NO:14具有至少约85%同一性且包含SEQ ID NO:46的TLR7选择性基序的核苷酸序列;或

(e) 与SEQ ID NO:15具有至少约85%同一性且包含SEQ ID NO:47的TLR7选择性基序的核苷酸序列。

26. 一种选择性地活化TLR7的免疫调节组合物,所述免疫调节组合物包含RNA配体和药用载体,其中所述RNA配体包含:

(a) TLR7选择性基序,其包含式III:

$C_1-U_2-C_3$ (式III),

其中 C_1 和 C_3 为胞苷核苷,并且 U_2 为尿苷核苷,

其中 C_1 具有2'-O-甲基修饰(mU)、2'-氟修饰(fU)、2'-氨基修饰、2'-脱氧修饰或2'-甲氧基乙氧基修饰,并且

其中“-”表示磷酸二酯键;

(b) 第一核苷酸序列,其连接至所述TLR7选择性基序的5'端;以及

(c) 第二核苷酸序列,其连接至所述TLR7选择性基序的3'端。

27. 根据权利要求26所述的免疫调节组合物,其中所述TLR7选择性基序的 C_1 具有2'-氟修饰(fC)。

28. 根据权利要求26所述的免疫调节组合物,其中所述TLR7选择性基序的 C_1 具有2'-O-甲基修饰(mC)。

29. 根据权利要求26所述的免疫调节组合物,其中所述TLR7选择性基序包含SEQ ID NO:42的核苷酸序列。

30. 根据权利要求26所述的免疫调节组合物,其中所述TLR7选择性基序包含SEQ ID NO:43的核苷酸序列。

31. 一种选择性地活化TLR7的免疫调节组合物,所述免疫调节组合物包含RNA配体和药用载体,其中所述RNA配体包含:

(a) TLR7选择性基序,其包含SEQ ID NO:42或43的核苷酸序列,

(b) 第一核苷酸序列,其连接至所述TLR7选择性基序的5'端,以及

(c) 第二核苷酸序列,其连接至所述TLR7选择性基序的3'端。

32. 根据权利要求26至31中任一项所述的免疫调节组合物,其中所述RNA配体能够采用双链RNA发夹结构。

33. 根据权利要求26至32中任一项所述的免疫调节组合物,其中所述RNA配体包含G:U摆动碱基对。

34. 根据权利要求26至33中任一项所述的免疫调节组合物,其中所述第一核苷酸序列不包含尿苷核苷,并且

其中所述第一核苷酸序列通过磷酸二酯键连接至所述TLR7选择性基序。

35. 根据权利要求34所述的免疫调节组合物,其中所述第一核苷酸序列包含三个核苷。

36. 根据权利要求34或权利要求35所述的免疫调节组合物,其中所述第一核苷酸序列内的所述核苷通过磷酸二酯键连接。

37. 根据权利要求26至36中任一项所述的免疫调节组合物, 其中所述第一核苷酸序列包含核苷酸序列C-G-G (SEQ ID NO:60), 其中“-”表示磷酸二酯键。

38. 根据权利要求26至37中任一项所述的免疫调节组合物, 其中所述第二核苷酸序列不包含尿苷核苷,

其中所述第二核苷酸序列包含核苷酸序列G-G-G (SEQ ID NO:69), 其中所述核苷酸序列G-G-G (SEQ ID NO:69) 能够与所述TLR7选择性基序进行碱基配对, 并且

其中所述第二核苷酸序列通过磷酸二酯键连接至所述TLR7选择性基序。

39. 根据权利要求38所述的免疫调节组合物, 其中所述第二核苷酸序列包含约15个核苷。

40. 根据权利要求38或权利要求39所述的免疫调节组合物, 其中所述第二核苷酸序列内的所述核苷通过磷酸二酯键连接。

41. 根据权利要求26至40中任一项所述的免疫调节组合物, 其中所述第二核苷酸序列包含:

(a) 核苷酸序列G-G-C-A-G-A-A-G-C-C-G-G-G-C-C (SEQ ID NO:

61), 或

(b) 与SEQ ID NO:61具有至少约85%同一性且包含所述核苷酸序列G-G-G (SEQ ID NO:69) 的核苷酸序列, 其中所述核苷酸序列G-G-G (SEQ ID NO:69) 能够与所述TLR7选择性基序进行碱基配对, 并且

其中“-”表示磷酸二酯键。

42. 根据权利要求26至27、29和31至41中任一项所述的免疫调节组合物, 其中所述RNA配体包含:

(a) SEQ ID NO:23的核苷酸序列, 或

(b) 与SEQ ID NO:23具有至少约85%同一性且包含SEQ ID NO:42的TLR7选择性基序和所述核苷酸序列G-G-G (SEQ ID NO:69) 的核苷酸序列, 其中所述核苷酸序列G-G-G (SEQ ID NO:69) 能够与所述TLR7选择性基序进行碱基配对。

43. 根据权利要求26、28和30至41中任一项所述的免疫调节组合物, 其中所述RNA配体包含:

(a) SEQ ID NO:24的核苷酸序列, 或

(b) 与SEQ ID NO:24具有至少约85%同一性且包含SEQ ID NO:43的TLR7选择性基序和所述核苷酸序列G-G-G (SEQ ID NO:69) 的核苷酸序列, 其中所述核苷酸序列G-G-G (SEQ ID NO:69) 能够与所述TLR7选择性基序进行碱基配对。

44. 一种选择性地活化TLR7的免疫调节组合物, 所述免疫调节组合物包含RNA配体和药用载体, 其中所述RNA配体包含:

(a) SEQ ID NO:23或24的核苷酸序列;

(b) 与SEQ ID NO:23具有至少约85%同一性且包含SEQ ID NO:42的TLR7选择性基序和核苷酸序列G-G-G (SEQ ID NO:69) 的核苷酸序列, 其中所述核苷酸序列G-G-G (SEQ ID NO:69) 能够与所述TLR7选择性基序进行碱基配对; 或

(c) 与SEQ ID NO:24具有至少约85%同一性且包含SEQ ID NO:43的TLR7选择性基序和核苷酸序列G-G-G (SEQ ID NO:69) 的核苷酸序列, 其中所述核苷酸序列G-G-G (SEQ ID NO:

69) 能够与所述TLR7选择性基序进行碱基配对。

45. 一种选择性地活化TLR7的免疫调节组合物, 所述免疫调节组合物包含RNA配体和药用载体, 其中所述RNA配体包含:

(a) 第一TLR7选择性基序和第二TLR7选择性基序, 其包含式IV:

$C_1-U_2-U_3-C_4$ (式IV),

其中 C_1 和 C_4 为胞苷核苷, 并且 U_2 和 U_3 为尿苷核苷,

其中 U_2 具有2'-O-甲基修饰(mU)、2'-氟修饰(fU)、2'-氨基修饰、2'-脱氧修饰或2'-甲氧基乙氧基修饰, 并且

其中“-”表示磷酸二酯键;

(b) 第一核苷酸序列, 其连接至所述第一TLR7选择性基序的5'端; 以及

(c) 第二核苷酸序列, 其连接至所述第一TLR7选择性基序的3'端和连接至所述第二TLR7选择性基序的5'端。

46. 根据权利要求45所述的免疫调节组合物, 其中所述第一TLR7选择性基序的 U_2 具有2'-O-甲基修饰(mU)。

47. 根据权利要求45或权利要求46所述的免疫调节组合物, 其中所述第二TLR7选择性基序的 U_2 具有2'-O-甲基修饰(mU)。

48. 根据权利要求45所述的免疫调节组合物, 其中所述第一TLR7选择性基序的 U_2 具有2'-氟修饰(fU)。

49. 根据权利要求45或权利要求48所述的免疫调节组合物, 其中所述第二TLR7选择性基序的 U_2 具有2'-氟修饰(fU)。

50. 根据权利要求45所述的免疫调节组合物, 其中所述第一TLR7选择性基序包含SEQ ID NO:36的核苷酸序列。

51. 根据权利要求45或权利要求50所述的免疫调节组合物, 其中所述第二TLR7选择性基序包含SEQ ID NO:36的核苷酸序列。

52. 根据权利要求45所述的免疫调节组合物, 其中所述第一TLR7选择性基序包含SEQ ID NO:37的核苷酸序列。

53. 根据权利要求45或权利要求52所述的免疫调节组合物, 其中所述第二TLR7选择性基序包含SEQ ID NO:37的核苷酸序列。

54. 一种选择性地活化TLR7的免疫调节组合物, 所述免疫调节组合物包含RNA配体和药用载体, 其中所述RNA配体包含:

(a) 第一TLR7选择性基序, 其包含SEQ ID NO:36或37的核苷酸序列;

(b) 第二TLR7选择性基序, 其包含SEQ ID NO:36或37的核苷酸序列;

(c) 第一核苷酸序列, 其连接至所述第一TLR7选择性基序的5'端; 以及

(d) 第二核苷酸序列, 其连接至所述第一TLR7选择性基序的3'端和连接至所述第二TLR7选择性基序的5'端。

55. 根据权利要求45至54中任一项所述的免疫调节组合物, 其中所述第一核苷酸序列包含一个核苷、或通过磷酸二酯键连接的至少两个核苷,

其中所述第一核苷酸序列不包含尿苷核苷, 并且

其中所述第一核苷酸序列通过磷酸二酯键连接至所述第一TLR7选择性基序。

56. 根据权利要求45至55中任一项所述的免疫调节组合物,其中所述第二核苷酸序列包含一个核苷、或通过磷酸二酯键连接的至少两个核苷,

其中所述第二核苷酸序列不包含尿苷核苷,并且

其中所述第二核苷酸序列通过磷酸二酯键连接至所述第一TLR7选择性基序和/或连接至所述第二TLR7选择性基序。

57. 根据权利要求55或权利要求56所述的免疫调节组合物,其中所述第一核苷酸序列和/或所述第二核苷酸序列包含通过磷酸二酯键连接的五个核苷。

58. 根据权利要求45至57中任一项所述的免疫调节组合物,其中所述第一核苷酸序列和/或所述第二核苷酸序列包含核苷酸序列C-A-G-A-C (SEQ ID NO:67)、或与SEQ ID NO:67具有至少约85%同一性的核苷酸序列,其中“-”表示磷酸二酯键。

59. 根据权利要求45至47、50至51和54至58中任一项所述的免疫调节组合物,其中所述RNA配体包含SEQ ID NO:33的核苷酸序列、或与SEQ ID NO:33具有至少约85%同一性且包含SEQ ID NO:36的第一TLR7选择性基序和/或SEQ ID NO:36的第二TLR7选择性基序的核苷酸序列。

60. 根据权利要求45、48至49和52至58中任一项所述的免疫调节组合物,其中所述RNA配体包含SEQ ID NO:34的核苷酸序列、或与SEQ ID NO:34具有至少约85%同一性且包含SEQ ID NO:37的第一TLR7选择性基序和/或SEQ ID NO:37的第二TLR7选择性基序的核苷酸序列。

61. 一种选择性地活化TLR7的免疫调节组合物,所述免疫调节组合物包含RNA配体和药用载体,其中所述RNA配体包含:

(a) SEQ ID NO:33或34的核苷酸序列;

(b) 与SEQ ID NO:33具有至少约85%同一性且包含SEQ ID NO:36的第一TLR7选择性基序和第二TLR7选择性基序的核苷酸序列;或

(c) 与SEQ ID NO:34具有至少约85%同一性且包含SEQ ID NO:37的第一TLR7选择性基序和第二TLR7选择性基序的核苷酸序列。

62. 一种选择性地活化TLR7的免疫调节组合物,所述免疫调节组合物包含RNA配体和药用载体,其中所述RNA配体包含:

(a) 第一TLR7选择性基序和一个或多个另外的TLR7选择性基序,其包含式V:

$U_1-U_2-C_3$ (式V),

其中 U_1 和 U_2 为尿苷核苷,并且 C_3 为胞苷核苷,

其中 U_1 具有2'-O-甲基修饰(mU)、2'-氟修饰(fU)、2'-氨基修饰、2'-脱氧修饰或2'-甲氧基乙氧基修饰,并且

其中“-”表示磷酸二酯键;以及

(b) 第一核苷酸序列,其连接至所述第一TLR7选择性基序的5'端。

63. 根据权利要求62所述的免疫调节组合物,其中所述一个或多个另外的TLR7选择性基序包括一个、两个、三个、四个、五个或更多个包含式V的另外的TLR7选择性基序。

64. 根据权利要求62或权利要求63所述的免疫调节组合物,其中所述一个或多个另外的TLR7选择性基序包括五个包含式V的另外的TLR7选择性基序。

65. 根据权利要求62至64中任一项所述的免疫调节组合物,其中所述第一TLR7选择性

基序的U₁具有2'-O-甲基修饰(mU)。

66. 根据权利要求62至65中任一项所述的免疫调节组合物,其中所述一个或多个另外的TLR7选择性基序中的至少一者的U₁、或所述一个或多个另外的TLR7选择性基序中的所有的U₁具有2'-O-甲基修饰(mU)。

67. 根据权利要求62至64中任一项所述的免疫调节组合物,其中所述第一TLR7选择性基序的U₁具有2'-氟修饰。

68. 根据权利要求62至64和67中任一项所述的免疫调节组合物,其中所述一个或多个另外的TLR7选择性基序中的至少一者的U₁、或所述一个或多个另外的TLR7选择性基序中的所有的U₁具有2'-氟修饰。

69. 根据权利要求62至64中任一项所述的免疫调节组合物,其中所述第一TLR7选择性基序包含SEQ ID NO:40的核苷酸序列。

70. 根据权利要求62至64和69中任一项所述的免疫调节组合物,其中所述一个或多个另外的TLR7选择性基序中的至少一者、或所述一个或多个另外的TLR7选择性基序中的所有包含SEQ ID NO:40的核苷酸序列。

71. 根据权利要求62至64中任一项所述的免疫调节组合物,其中所述第一TLR7选择性基序包含SEQ ID NO:41的核苷酸序列。

72. 根据权利要求62至64和71中任一项所述的免疫调节组合物,其中所述一个或多个另外的TLR7选择性基序中的至少一者、或所述一个或多个另外的TLR7选择性基序中的所有包含SEQ ID NO:41的核苷酸序列。

73. 一种选择性地活化TLR7的免疫调节组合物,所述免疫调节组合物包含RNA配体和药用载体,其中所述RNA配体包含:

(a) 第一TLR7选择性基序,其包含SEQ ID NO:40或41的核苷酸序列;

(b) 一个或多个另外的TLR7选择性基序,其中所述一个或多个另外的TLR7选择性基序中的至少一者、或所述一个或多个另外的TLR7选择性基序中的所有包含SEQ ID NO:40或41的核苷酸序列;以及

(c) 第一核苷酸序列,其连接至所述第一TLR7选择性基序的5'端。

74. 根据权利要求73所述的免疫调节组合物,其中所述一个或多个另外的TLR7选择性基序包括一个、两个、三个、四个、五个或更多个包含SEQ ID NO:40或41的核苷酸序列的另外的TLR7选择性基序。

75. 根据权利要求73或权利要求74所述的免疫调节组合物,其中所述一个或多个另外的TLR7选择性基序包括五个包含SEQ ID NO:40或41的核苷酸序列的另外的TLR7选择性基序。

76. 根据权利要求62至75中任一项所述的免疫调节组合物,其中所述第一核苷酸序列包含一个核苷、或通过磷酸二酯键连接的至少两个核苷,

其中所述第一核苷酸序列不包含尿苷核苷,并且

其中所述第一核苷酸序列通过磷酸二酯键连接至所述第一TLR7选择性基序。

77. 根据权利要求76所述的免疫调节组合物,其中所述第一核苷酸序列包含通过磷酸二酯键连接的两个核苷。

78. 根据权利要求76或权利要求77所述的免疫调节组合物,其中所述第一核苷酸序列

包含通过磷酸二酯键连接的两个胞苷核苷。

79. 根据权利要求62至66、69至70和73至78中任一项所述的免疫调节组合物,其中所述RNA配体包含SEQ ID NO:29的核苷酸序列、或与SEQ ID NO:29具有至少约85%同一性且包含SEQ ID NO:40的第一TLR7选择性基序和SEQ ID NO:40的五个另外的TLR7选择性基序的核苷酸序列。

80. 根据权利要求62至64、67至68和71至78中任一项所述的免疫调节组合物,其中所述RNA配体包含SEQ ID NO:30的核苷酸序列、或与SEQ ID NO:30具有至少约85%同一性且包含SEQ ID NO:41的第一TLR7选择性基序和SEQ ID NO:41的五个另外的TLR7选择性基序的核苷酸序列。

81. 一种选择性地活化TLR7的免疫调节组合物,所述免疫调节组合物包含RNA配体和药用载体,其中所述RNA配体包含:

(a) SEQ ID NO:29或30的核苷酸序列;

(b) 与SEQ ID NO:29具有至少约85%同一性且包含SEQ ID NO:40的六个TLR7选择性基序的核苷酸序列;或

(c) 与SEQ ID NO:30具有至少约85%同一性且包含SEQ ID NO:41的六个TLR7选择性基序的核苷酸序列。

82. 一种选择性地活化TLR7的免疫调节组合物,所述免疫调节组合物包含RNA配体和药用载体,其中所述RNA配体包含:

(a) TLR7选择性基序,其包含式VI:

$C_1-U_2-U_3*U_4-U_5*C_6$ (式VI),

其中 C_1 和 C_6 为胞苷核苷,并且 U_2 、 U_3 、 U_4 和 U_5 为尿苷核苷,

其中 U_2 具有2'-O-甲基修饰(mU)、2'-氟修饰(fU)、2'-氨基修饰、2'-脱氧修饰或2'-甲氧基乙氧基修饰,

其中 U_4 具有2'-O-甲基修饰(mU)、2'-氟修饰(fU)、2'-氨基修饰、2'-脱氧修饰或2'-甲氧基乙氧基修饰,并且

其中“*”表示硫代磷酸酯键,并且“-”表示磷酸二酯键;

(b) 第一核苷酸序列,其连接至所述TLR7选择性基序的5'端;以及

(c) 第二核苷酸序列,其连接至所述TLR7选择性基序的3'端。

83. 根据权利要求82所述的免疫调节组合物,其中所述TLR7选择性基序的 U_2 具有2'-O-甲基修饰(mU)。

84. 根据权利要求82所述的免疫调节组合物,其中所述TLR7选择性基序的 U_4 具有2'-O-甲基修饰(mU)。

85. 根据权利要求82所述的免疫调节组合物,其中所述TLR7选择性基序的 U_2 具有2'-氟修饰(fU)。

86. 根据权利要求82所述的免疫调节组合物,其中所述TLR7选择性基序的 U_4 具有2'-氟修饰(fU)。

87. 根据权利要求82至84中任一项所述的免疫调节组合物,其中所述TLR7选择性基序的 U_2 和 U_4 具有2'-O-甲基修饰(mU)。

88. 根据权利要求82和85至86中任一项所述的免疫调节组合物,其中所述TLR7选择性

基序的U₂和U₄具有2'-氟修饰(fU)。

89. 根据权利要求82至83和86中任一项所述的免疫调节组合物,其中所述TLR7选择性基序的U₂具有2'-O-甲基修饰(mU),并且所述TLR7选择性基序的U₄具有2'-氟修饰(fU)。

90. 根据权利要求82和84至85中任一项所述的免疫调节组合物,其中所述TLR7选择性基序的U₂具有2'-氟修饰(fU),并且所述TLR7选择性基序的U₄具有2'-O-甲基修饰(mU)。

91. 根据权利要求82至84中任一项所述的免疫调节组合物,其中所述TLR7选择性基序包含SEQ ID NO:48的核苷酸序列。

92. 根据权利要求82和85至86中任一项所述的免疫调节组合物,其中所述TLR7选择性基序包含SEQ ID NO:49的核苷酸序列。

93. 根据权利要求82至83和86中任一项所述的免疫调节组合物,其中所述TLR7选择性基序包含SEQ ID NO:50的核苷酸序列。

94. 根据权利要求82和84至85中任一项所述的免疫调节组合物,其中所述TLR7选择性基序包含SEQ ID NO:51的核苷酸序列。

95. 一种选择性地活化TLR7的免疫调节组合物,所述免疫调节组合物包含RNA配体和药用载体,其中所述RNA配体包含:

- (a) TLR7选择性基序,其包含选自SEQ ID NO:48、49、50和51组成的组的核苷酸序列;
- (b) 第一核苷酸序列,其连接至所述TLR7选择性基序的5'端;以及
- (c) 第二核苷酸序列,其连接至所述TLR7选择性基序的3'端。

96. 根据权利要求82至95中任一项所述的免疫调节组合物,其中所述第一核苷酸序列包含一个核苷、或通过磷酸二酯键连接的至少两个核苷,

其中所述第一核苷酸序列不包含尿苷核苷,并且

其中所述第一核苷酸序列通过磷酸二酯键连接至所述TLR7选择性基序。

97. 根据权利要求96所述的免疫调节组合物,其中所述第一核苷酸序列包含通过磷酸二酯键连接的八个核苷。

98. 根据权利要求82至97中任一项所述的免疫调节组合物,其中所述第一核苷酸序列包含核苷酸序列C-C-G-A-G-C-C-G (SEQ ID NO:68)、或与SEQ ID NO:68具有至少约85%同一性的核苷酸序列,其中“-”表示磷酸二酯键,并且

其中所述第一核苷酸序列通过磷酸二酯键连接至所述TLR7选择性基序。

99. 根据权利要求82至98中任一项所述的免疫调节组合物,其中所述第二核苷酸序列包含一个核苷、或通过磷酸二酯键连接的至少两个核苷,

其中所述第二核苷酸序列不包含尿苷核苷,并且

其中所述第二核苷酸序列通过磷酸二酯键连接至所述TLR7选择性基序。

100. 根据权利要求99所述的免疫调节组合物,其中所述第二核苷酸序列包含通过磷酸二酯键连接的两个核苷。

101. 根据权利要求100所述的免疫调节组合物,其中所述第二核苷酸序列包含通过磷酸二酯键连接的两个胞苷核苷。

102. 根据权利要求82至84、87、91和95至101中任一项所述的免疫调节组合物,其中所述RNA配体包含SEQ ID NO:17的核苷酸序列、或与SEQ ID NO:17具有至少约85%同一性且包含SEQ ID NO:48的TLR7选择性基序的核苷酸序列。

103. 根据权利要求82、85至86、88、92和95至101中任一项所述的免疫调节组合物,其中所述RNA配体包含SEQ ID NO:18的核苷酸序列、或与SEQ ID NO:18具有至少约85%同一性且包含SEQ ID NO:49的TLR7选择性基序的核苷酸序列。

104. 根据权利要求82、83、86、89、93和95至101中任一项所述的免疫调节组合物,其中所述RNA配体包含SEQ ID NO:19的核苷酸序列、或与SEQ ID NO:19具有至少约85%同一性且包含SEQ ID NO:50的TLR7选择性基序的核苷酸序列。

105. 根据权利要求82、84至85、90和94至101中任一项所述的免疫调节组合物,其中所述RNA配体包含SEQ ID NO:20的核苷酸序列、或与SEQ ID NO:20具有至少约85%同一性且包含SEQ ID NO:51的TLR7选择性基序的核苷酸序列。

106. 一种选择性地活化TLR7的免疫调节组合物,所述免疫调节组合物包含RNA配体和药用载体,其中所述RNA配体包含:

(a) 选自由SEQ ID NO:17、18、19和20组成的组的核苷酸序列;

(b) 与SEQ ID NO:17具有至少约85%同一性且包含SEQ ID NO:48的TLR7选择性基序的核苷酸序列;

(c) 与SEQ ID NO:18具有至少约85%同一性且包含SEQ ID NO:49的TLR7选择性基序的核苷酸序列;

(d) 与SEQ ID NO:19具有至少约85%同一性且包含SEQ ID NO:50的TLR7选择性基序的核苷酸序列;或

(e) 与SEQ ID NO:20具有至少约85%同一性且包含SEQ ID NO:51的TLR7选择性基序的核苷酸序列。

107. 根据权利要求1至106中任一项所述的免疫调节组合物,其中所述药用载体为脂质纳米颗粒(LNP)。

108. 根据权利要求107所述的免疫调节组合物,其中所述LNP包含阳离子脂质。

109. 根据权利要求107或权利要求108所述的免疫调节组合物,其中所述LNP包含可电离脂质。

110. 根据权利要求1至109中任一项所述的免疫调节组合物,其中所述药用载体为或包含聚-L-精氨酸或1,2-二油酰基-3-三甲基铵丙烷(DOTAP)。

111. 根据权利要求1至110中任一项所述的免疫调节组合物,其中所述免疫调节组合物选择性地活化与所述免疫调节组合物接触的一种或多种细胞中的TLR7。

112. 根据权利要求111所述的免疫调节组合物,其中所述一种或多种细胞表达TLR7。

113. 根据权利要求111或权利要求112所述的免疫调节组合物,其中所述一种或多种细胞包括外周血单核细胞(PBMC)。

114. 根据权利要求111至113中任一项所述的免疫调节组合物,其中所述一种或多种细胞包括一种或多种浆细胞样树突状细胞。

115. 根据权利要求1至114中任一项所述的免疫调节组合物,其中相比于未与所述免疫调节组合物接触的对应的一种或多种细胞,所述免疫调节组合物使与所述免疫调节组合物接触的一种或多种细胞中的TLR7活性增加。

116. 根据权利要求1至115中任一项所述的免疫调节组合物,其中相比于未与所述免疫调节组合物接触的对应的一种或多种细胞,所述免疫调节组合物使与所述免疫调节组合物

接触的一种或多种细胞的IFN- α 的分泌增加。

117. 根据权利要求115所述的免疫调节组合物,其中相比于未与所述免疫调节组合物接触的对应的一种或多种细胞,与所述免疫调节组合物接触的所述一种或多种细胞中的TLR7活性的所述增加为至少约5%、至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约100%或更多的增加。

118. 根据权利要求116所述的免疫调节组合物,其中相比于未与所述免疫调节组合物接触的对应的一种或多种细胞,与所述免疫调节组合物接触的所述一种或多种细胞的IFN- α 的分泌的所述增加为至少约5%、至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约100%或更多的增加。

119. 根据权利要求1至118中任一项所述的免疫调节组合物,其中相比于未与所述免疫调节组合物接触的对应的一种或多种细胞,所述免疫调节组合物使与所述免疫调节组合物接触的一种或多种细胞中的TLR8活性增加小于约20%、小于约15%、小于约10%、小于约5%、或小于约1%。

120. 根据权利要求1至119中任一项所述的免疫调节组合物,其中相比于未与所述免疫调节组合物接触的对应的一种或多种细胞,所述免疫调节组合物使与所述免疫调节组合物接触的一种或多种细胞的TNF- α 的分泌增加小于约20%、小于约15%、小于约10%、小于约5%、或小于约1%。

121. 根据权利要求111至120中任一项所述的免疫调节组合物,其中将所述RNA配体引入与所述免疫调节组合物接触的所述一种或多种细胞中。

122. 根据权利要求111至121中任一项所述的免疫调节组合物,其中与所述免疫调节组合物接触的所述一种或多种细胞进一步与鸟苷或鸟苷衍生物接触,任选地其中所述鸟苷衍生物为2'3'环GMP。

123. 一种分离的核酸,其包含根据权利要求1至122中任一项所述的免疫调节组合物的所述RNA配体。

124. 根据权利要求123所述的核酸,其中所述核酸为DNA、RNA或DNA/RNA分子。

125. 一种载体,其包含根据权利要求1至122中任一项所述的免疫调节组合物的所述RNA配体或根据权利要求123或权利要求124所述的核酸。

126. 一种药物组合物,其包含根据权利要求1至122中任一项所述的免疫调节组合物。

127. 一种宿主细胞,其包含根据权利要求1至122中任一项所述的免疫调节组合物的所述RNA配体、根据权利要求123或权利要求124所述的核酸、或根据权利要求125所述的载体。

128. 一种疫苗组合物,其包含根据权利要求1至122中任一项所述的免疫调节组合物或根据权利要求126所述的药物组合物。

129. 一种用于选择性地活化一种或多种细胞中的TLR7的方法,所述方法包括使一种或多种细胞与根据权利要求1至122中任一项所述的免疫调节组合物或根据权利要求126所述的药物组合物接触。

130. 根据权利要求129所述的方法,其中所述一种或多种细胞表达TLR7。

131. 根据权利要求129或权利要求130所述的方法,其中所述一种或多种细胞包括外周血单核细胞(PBMC)。

132. 根据权利要求129至131中任一项所述的方法,其中所述一种或多种细胞包括一种

或多种浆细胞样树突状细胞。

133. 根据权利要求129至132中任一项所述的方法,其中相比于未与根据权利要求1至122中任一项所述的免疫调节组合物或根据权利要求126所述的药物组合物接触的对应的一种或多种细胞,使所述一种或多种细胞与所述免疫调节组合物或所述药物组合物接触引起所述一种或多种细胞中的TLR7活性的增加。

134. 根据权利要求129至133中任一项所述的方法,其中相比于未与根据权利要求1至122中任一项所述的免疫调节组合物或根据权利要求126所述的药物组合物接触的对应的一种或多种细胞,使所述一种或多种细胞与所述免疫调节组合物或所述药物组合物接触引起所述一种或多种细胞的IFN- α 的分泌的增加。

135. 根据权利要求133所述的方法,其中相比于未与所述免疫调节组合物或所述药物组合物接触的对应的一种或多种细胞,所述一种或多种细胞中的TLR7活性的所述增加为至少约5%、至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约100%或更多的增加。

136. 根据权利要求134所述的方法,其中相比于未与所述免疫调节组合物或所述药物组合物接触的对应的一种或多种细胞,所述一种或多种细胞的IFN- α 的分泌的所述增加为至少约5%、至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约100%或更多的增加。

137. 根据权利要求129至136中任一项所述的方法,其中相比于未与根据权利要求1至122中任一项所述的免疫调节组合物或根据权利要求126所述的药物组合物接触的对应的一种或多种细胞,使所述一种或多种细胞与所述免疫调节组合物或所述药物组合物接触引起所述一种或多种细胞中的TLR8活性的小于约20%、小于约15%、小于约10%、小于约5%、或小于约1%的增加。

138. 根据权利要求129至137中任一项所述的方法,其中相比于未与根据权利要求1至122中任一项所述的免疫调节组合物或根据权利要求126所述的药物组合物接触的对应的一种或多种细胞,使所述一种或多种细胞与所述免疫调节组合物或所述药物组合物接触引起所述一种或多种细胞的TNF- α 的分泌的小于约20%、小于约15%、小于约10%、小于约5%、或小于约1%的增加。

139. 根据权利要求129至138中任一项所述的方法,其进一步包括使所述一种或多种细胞与鸟苷或鸟苷衍生物接触,任选地其中所述鸟苷衍生物为2'3'环GMP。

140. 根据权利要求134至139中任一项所述的方法,其进一步包括:通过酶联免疫吸附测定(ELISA)、免疫印迹、免疫测定、流式细胞术、基于电化学发光的方法、质谱或qPCR来测量IFN- α 和/或TNF- α 的分泌;及/或测量干扰素刺激基因(ISG)的表达水平。

141. 根据权利要求129至140中任一项所述的方法,其中使所述一种或多种细胞与根据权利要求1至122中任一项所述的免疫调节组合物或根据权利要求126所述的药物组合物接触包括将所述RNA配体引入所述一种或多种细胞中。

142. 一种用于选择性地活化个体中的TLR7的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的根据权利要求1至122中任一项所述的免疫调节组合物、根据权利要求126所述的药物组合物、或根据权利要求128所述的疫苗组合物。

143. 一种用于刺激个体中的免疫应答的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的

根据权利要求1至122中任一项所述的免疫调节组合物、根据权利要求126所述的药物组合物、或根据权利要求128所述的疫苗组合物。

144. 根据权利要求142或权利要求143所述的方法,其中相比于未施用根据权利要求1至122中任一项所述的免疫调节组合物、根据权利要求126所述的药物组合物或根据权利要求128所述的疫苗组合物的对应个体,向所述个体施用有效量的所述免疫调节组合物、所述药物组合物或所述疫苗组合物引起所述个体中的TLR7活性的增加。

145. 根据权利要求142至144中任一项所述的方法,其中相比于未施用根据权利要求1至122中任一项所述的免疫调节组合物、根据权利要求126所述的药物组合物或根据权利要求128所述的疫苗组合物的对应个体,向所述个体施用有效量的所述免疫调节组合物、所述药物组合物或所述疫苗组合物引起所述个体中的IFN- α 的水平增加。

146. 根据权利要求144所述的方法,其中相比于未施用所述免疫调节组合物、所述药物组合物或所述疫苗组合物的对应个体,TLR7活性的所述增加为至少约5%、至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约100%或更多的增加。

147. 根据权利要求145所述的方法,其中相比于未施用所述免疫调节组合物、所述药物组合物或所述疫苗组合物的对应个体,IFN- α 水平的所述增加为至少约5%、至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约100%或更多的增加。

148. 根据权利要求142至147中任一项所述的方法,其中相比于未施用根据权利要求1至122中任一项所述的免疫调节组合物、根据权利要求126所述的药物组合物或根据权利要求128所述的疫苗组合物的对应个体,向所述个体施用有效量的所述免疫调节组合物、所述药物组合物或所述疫苗组合物引起所述个体中的TLR8活性的小于约20%、小于约15%、小于约10%、小于约5%、或小于约1%的增加。

149. 根据权利要求142至148中任一项所述的方法,其中相比于未施用根据权利要求1至122中任一项所述的免疫调节组合物、根据权利要求126所述的药物组合物或根据权利要求128所述的疫苗组合物的对应个体,向所述个体施用有效量的所述免疫调节组合物、所述药物组合物或所述疫苗组合物引起所述个体中的TNF- α 的水平的小于约20%、小于约15%、小于约10%、小于约5%、或小于约1%的增加。

150. 一种佐剂,其用于制造用于活化个体中的TLR7的药物,其中所述佐剂包括根据权利要求1至122中任一项所述的免疫调节组合物、根据权利要求126所述的药物组合物、或根据权利要求128所述的疫苗组合物。

151. 一种佐剂,其用于活化个体中的TLR7的方法中,所述方法包括向所述个体施用有效量的根据权利要求1至122中任一项所述的免疫调节组合物、根据权利要求126所述的药物组合物、或根据权利要求128所述的疫苗组合物。

152. 一种试剂盒,其包括根据权利要求1至122中任一项所述的免疫调节组合物、根据权利要求123或权利要求124所述的核酸、根据权利要求125所述的载体、根据权利要求126所述的药物组合物、或根据权利要求128所述的疫苗组合物。

优化的TLR7配体及其用途

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2021年4月16日提交的美国临时申请第63/176,128号的权益,该临时申请的内容全文以引用方式并入本文。

[0003] 以ASCII文本文件提交序列表

[0004] 以下提交的ASCII文本文件的内容全文以引用方式并入本文:序列表的计算机可读格式(CRF)(文件名:146392053240SEQLIST.TXT,记录日期:2022年4月15日,大小:28,786字节)。

技术领域

[0005] 本公开涉及免疫调节组合物及其用途。

背景技术

[0006] 先天免疫系统的核酸受体是保护人类宿主免受病毒感染的重要哨兵。胞质溶胶和内体是细胞的两个主要区室,在感知病毒RNA方面发挥着重要作用。在胞质溶胶中,RIG-I样受体,它几乎在每种细胞类型中表达,感知作为复制副产物产生的双链RNA。在内体中,Toll样受体(TLR),诸如TLR7和TLR8,检测单链RNA(ssRNA)的降解产物,该Toll样受体主要由称为抗原呈递细胞的特殊免疫细胞类型(即浆细胞样树突状细胞(pDC)、常规树突状细胞(cDC)、骨髓细胞和B细胞)表达。此类RNA降解产物可衍生自病毒、病毒感染的细胞、坏死细胞、癌组织、含有RNA的抗体复合物、或化学合成或体外转录的RNA的脂质体制剂的吞噬作用。

[0007] 先天免疫细胞上Toll样受体(诸如TLR7和TLR8)的活化对于诱导炎症和对于启动适应性免疫应答至关重要。虽然人们对参与TLR7活化的RNA降解的酶知之甚少,但TLR8活化需要内体RNA酶T2和RNA酶2。

[0008] TLR7和TLR8的表达模式不同。TLR7在小鼠和人类两者中均表达并具有功能,而TLR8虽然在人类和小鼠两者中均表达,但仅在人类细胞中具有功能。TLR7在小鼠中由所有抗原呈递细胞(包括骨髓细胞)表达,但在人类中其表达仅限于pDC和B细胞。相比之下,TLR8在人类的骨髓细胞中表达,包括cDC、单核细胞和巨噬细胞。

[0009] 除了其表达模式上的差异外,TLR7和TLR8在活化后还会诱导不同的细胞因子谱。TLR8对人单核细胞或cDC上的刺激会以NF- κ B依赖性方式活化多种炎症细胞因子,诸如TNF α 和IL-6。另一方面,通过TLR7刺激人pDC会诱导有限的NF- κ B依赖性炎症细胞因子和大量的I型IFN,诸如IFN α 。

[0010] I型IFN是细胞因子的一个关键家族,在抗病毒免疫、促进适应性免疫和在抗肿瘤免疫中发挥作用。特别地,I型IFN在抗肿瘤免疫中的作用是通过活化cDC来实现的,这会导致IL-12分泌、抗原呈递增加和抗原特异性CD8⁺ T细胞应答增强。此外,TLR7激动剂已被证明,通过在小鼠免疫抑制肿瘤环境中活化cDC来启动和增加T细胞引发,与癌症免疫疗法(诸如PD-L1靶向疗法)协同作用。

[0011] 与TLR8相比,TLR7活化诱导的独特细胞因子谱,以及TLR7在人类中(即在pDC和B细胞中)的有限表达表明,TLR7选择性配体可以避免与双重TLR7/8激动剂(包括基于RNA的疗法)相关的一些毒性。然而,虽然已经描述了多种TLR8选择性配体,但治疗性TLR7选择性RNA配体非常罕见。

[0012] 因此,本领域需要具有增强的选择性地活化TLR7的能力的RNA配体。

[0013] 本文引用的所有参考文献(包括专利申请及公布)在此全部以引用的方式并入。

发明内容

[0014] 在一些方面,本文提供一种选择性地活化TLR7的免疫调节组合物,该免疫调节组合物包含RNA配体和药用载体,其中该RNA配体包含:(a) TLR7选择性基序,其包含式II: $C_1*U_2-U_3*U_4-U_5*C_6$ (式II),其中 C_1 和 C_6 为胞苷核苷,并且 U_2 、 U_3 、 U_4 和 U_5 为尿苷核苷,其中 U_2 具有2'-O-甲基修饰(mU)、2'-氟修饰(fU)、2'-氨基修饰、2'-脱氧修饰或2'-甲氧基乙氧基修饰,其中 U_4 具有2'-O-甲基修饰(mU)、2'-氟修饰(fU)、2'-氨基修饰、2'-脱氧修饰或2'-甲氧基乙氧基修饰,并且其中“*”表示硫代磷酸酯键,且“-”表示磷酸二酯键;(b) 第一核苷酸序列,其连接至TLR7选择性基序的5'端;以及(c) 第二核苷酸序列,其连接至TLR7选择性基序的3'端。在一些实施方案中,TLR7选择性基序的 U_2 具有2'-O-甲基修饰(mU)。在一些实施方案中,TLR7选择性基序的 U_4 具有2'-O-甲基修饰(mU)。在一些实施方案中,TLR7选择性基序的 U_2 具有2'-氟修饰(fU)。在一些实施方案中,TLR7选择性基序的 U_4 具有2'-氟修饰(fU)。在一些实施方案中,TLR7选择性基序的 U_2 和 U_4 具有2'-O-甲基修饰(mU)。在一些实施方案中,TLR7选择性基序的 U_2 和 U_4 具有2'-氟修饰(fU)。在一些实施方案中,TLR7选择性基序的 U_2 具有2'-O-甲基修饰(mU),并且TLR7选择性基序的 U_4 具有2'-氟修饰(fU)。在一些实施方案中,TLR7选择性基序的 U_2 具有2'-氟修饰(fU),并且TLR7选择性基序的 U_4 具有2'-O-甲基修饰(mU)。在一些实施方案中,TLR7选择性基序包含SEQ ID NO:44的核苷酸序列。在一些实施方案中,TLR7选择性基序包含SEQ ID NO:45的核苷酸序列。在一些实施方案中,TLR7选择性基序包含SEQ ID NO:46的核苷酸序列。在一些实施方案中,TLR7选择性基序包含SEQ ID NO:47的核苷酸序列。

[0015] 另一方面,本文提供一种选择性地活化TLR7的免疫调节组合物,该免疫调节组合物包含RNA配体和药用载体,其中该RNA配体包含:(a) TLR7选择性基序,其包含选自SEQ ID NO:44、45、46或47的核苷酸序列,(b) 第一核苷酸序列,其连接至TLR7选择性基序的5'端,以及(c) 第二核苷酸序列,其连接至TLR7选择性基序的3'端。

[0016] 在可与任何前述方面或实施方案组合的一些实施方案中,第一核苷酸序列包含一个核苷,或通过硫代磷酸酯键连接的至少两个核苷,其中第一核苷酸序列不包含尿苷核苷,并且其中第一核苷酸序列通过硫代磷酸酯键连接至TLR7选择性基序。在一些实施方案中,第一核苷酸序列包含通过硫代磷酸酯键连接的八个核苷。在一些实施方案中,第一核苷酸序列包含核苷酸序列 $C*C*G*A*G*C*C*G$ (SEQ ID NO:58),或与SEQ ID NO:58具有至少约85%同一性的核苷酸序列,其中“*”表示硫代磷酸酯键,并且其中第一核苷酸序列通过硫代磷酸酯键连接至TLR7选择性基序。

[0017] 在可与任何前述方面或实施方案组合的一些实施方案中,第二核苷酸序列包含一个核苷,或通过硫代磷酸酯键连接的至少两个核苷,其中第二核苷酸序列不包含尿苷核苷,

并且其中第二核苷酸序列通过硫代磷酸酯键连接至TLR7选择性基序。在一些实施方案中,第二核苷酸序列包含通过硫代磷酸酯键连接的两个核苷。在一些实施方案中,第二核苷酸序列包含核苷酸序列C*C (SEQ ID NO:59),其中“*”表示硫代磷酸酯键,并且其中第二核苷酸序列通过硫代磷酸酯键连接至TLR7选择性基序。

[0018] 在可与任何前述方面或实施方案组合的一些实施方案中, RNA配体包含SEQ ID NO:12的核苷酸序列、或与SEQ ID NO:12具有至少约85%同一性且包含SEQ ID NO:44的所述TLR7选择性基序的核苷酸序列。在可与任何前述方面或实施方案组合的一些实施方案中, RNA配体包含SEQ ID NO:13的核苷酸序列、或与SEQ ID NO:13具有至少约85%同一性且包含SEQ ID NO:45的所述TLR7选择性基序的核苷酸序列。在可与任何前述方面或实施方案组合的一些实施方案中, RNA配体包含SEQ ID NO:14的核苷酸序列、或与SEQ ID NO:14具有至少约85%同一性且包含SEQ ID NO:46的所述TLR7选择性基序的核苷酸序列。在可与任何前述方面或实施方案组合的一些实施方案中, RNA配体包含SEQ ID NO:15的核苷酸序列、或与SEQ ID NO:15具有至少约85%同一性且包含SEQ ID NO:47的所述TLR7选择性基序的核苷酸序列。

[0019] 另一方面, 本文提供一种选择性地活化TLR7的免疫调节组合物, 该免疫调节组合物包含RNA配体和药用载体, 其中该RNA配体包含: (a) 选自SEQ ID NO:12、13、14或15的核苷酸序列; (b) 与SEQ ID NO:12具有至少约85%同一性且包含SEQ ID NO:44的TLR7选择性基序的核苷酸序列; (c) 与SEQ ID NO:13具有至少约85%同一性且包含SEQ ID NO:45的TLR7选择性基序的核苷酸序列; (d) 与SEQ ID NO:14具有至少约85%同一性且包含SEQ ID NO:46的TLR7选择性基序的核苷酸序列; 或(e) 与SEQ ID NO:15具有至少约85%同一性且包含SEQ ID NO:47的TLR7选择性基序的核苷酸序列。

[0020] 另一方面, 本文提供一种选择性地活化TLR7的免疫调节组合物, 该免疫调节组合物包含RNA配体和药用载体, 其中该RNA配体包含: (a) TLR7选择性基序, 其包含式III: $C_1-U_2-C_3$ (式III), 其中 C_1 和 C_3 为胞苷核苷并且 U_2 为尿苷核苷, 其中 C_1 具有2'-O-甲基修饰(mU)、2'-氟修饰(fU)、2'-氨基修饰、2'-脱氧修饰或2'-甲氧基乙氧基修饰, 并且其中“-”表示磷酸二酯键; (b) 第一核苷酸序列, 其连接至TLR7选择性基序的5'端; 以及(c) 第二核苷酸序列, 其连接至TLR7选择性基序的3'端。在一些实施方案中, TLR7选择性基序的 C_1 具有2'-氟修饰(fC)。在一些实施方案中, TLR7选择性基序的 C_1 具有2'-O-甲基修饰(mC)。在一些实施方案中, TLR7选择性基序包含SEQ ID NO:42的核苷酸序列。在一些实施方案中, TLR7选择性基序包含SEQ ID NO:43的核苷酸序列。

[0021] 另一方面, 本文提供一种选择性地活化TLR7的免疫调节组合物, 该免疫调节组合物包含RNA配体和药用载体, 其中该RNA配体包含: (a) TLR7选择性基序, 其包含SEQ ID NO:42或43的核苷酸序列, (b) 第一核苷酸序列, 其连接至TLR7选择性基序的5'端, 以及(c) 第二核苷酸序列, 其连接至TLR7选择性基序的3'端。

[0022] 在可与任何前述方面或实施方案组合的一些实施方案中, RNA配体能够采用双链RNA发夹结构。在可与任何前述方面或实施方案组合的一些实施方案中, RNA配体包含G:U摆动碱基对。

[0023] 在可与任何前述方面或实施方案组合的一些实施方案中, 第一核苷酸序列不包含尿苷核苷, 并且其中第一核苷酸序列通过磷酸二酯键连接至TLR7选择性基序。在一些实施

方案中,第一核苷酸序列包含三个核苷。在一些实施方案中,第一核苷酸序列内的核苷通过磷酸二酯键连接。在一些实施方案中,第一核苷酸序列包含核苷酸序列C-G-G (SEQ ID NO: 60),其中“-”表示磷酸二酯键。

[0024] 在可与任何前述方面或实施方案组合的一些实施方案中,第二核苷酸序列不包含尿苷核苷,其中第二核苷酸序列包含核苷酸序列G-G-G (SEQ ID NO:69),其中核苷酸序列G-G-G (SEQ ID NO:69) 能够与TLR7选择性基序进行碱基配对,并且其中第二核苷酸序列通过磷酸二酯键连接至TLR7选择性基序。在一些实施方案中,第二核苷酸序列包含约15个核苷。在一些实施方案中,第二核苷酸序列内的核苷通过磷酸二酯键连接。在一些实施方案中,第二核苷酸序列包含:(a) 核苷酸序列G-G-C-A-G-A-A-G-C-C-G-G-G-C-C (SEQ ID NO:61),或(b) 与SEQ ID NO:61具有至少约85%同一性且包含核苷酸序列G-G-G (SEQ ID NO:69)的核苷酸序列,其中核苷酸序列G-G-G (SEQ ID NO:69) 能够与TLR7选择性基序进行碱基配对,并且其中“-”表示磷酸二酯键。

[0025] 在可与任何前述方面或实施方案组合的一些实施方案中,RNA配体包含:(a) SEQ ID NO:23的核苷酸序列,或(b) 与SEQ ID NO:23具有至少约85%同一性且包含SEQ ID NO:42的TLR7选择性基序和核苷酸序列G-G-G (SEQ ID NO:69)的核苷酸序列,其中核苷酸序列G-G-G (SEQ ID NO:69) 能够与TLR7选择性基序进行碱基配对。在可与任何前述方面或实施方案组合的一些实施方案中,RNA配体包含:(a) SEQ ID NO:24的核苷酸序列,或(b) 与SEQ ID NO:24具有至少约85%同一性且包含SEQ ID NO:43的TLR7选择性基序和核苷酸序列G-G-G (SEQ ID NO:69)的核苷酸序列,其中核苷酸序列G-G-G (SEQ ID NO:69) 能够与TLR7选择性基序进行碱基配对。

[0026] 另一方面,本文提供一种选择性地活化TLR7的免疫调节组合物,该免疫调节组合物包含RNA配体和药用载体,其中该RNA配体包含:(a) SEQ ID NO:23或24的核苷酸序列;(b) 与SEQ ID NO:23具有至少约85%同一性且包含SEQ ID NO:42的TLR7选择性基序和核苷酸序列G-G-G (SEQ ID NO:69)的核苷酸序列,其中核苷酸序列G-G-G (SEQ ID NO:69) 能够与TLR7选择性基序进行碱基配对;或(c) 与SEQ ID NO:24具有至少约85%同一性且包含SEQ ID NO:43的TLR7选择性基序和核苷酸序列G-G-G (SEQ ID NO:69)的核苷酸序列,其中核苷酸序列G-G-G (SEQ ID NO:69) 能够与TLR7选择性基序进行碱基配对。

[0027] 另一方面,本文提供一种选择性地活化TLR7的免疫调节组合物,该免疫调节组合物包含RNA配体和药用载体,其中该RNA配体包含:(a) 第一TLR7选择性基序和第二TLR7选择性基序,其包含式IV: $C_1-U_2-U_3-C_4$ (式IV),其中 C_1 和 C_4 为胞苷核苷并且 U_2 和 U_3 为尿苷核苷,其中 U_2 具有2'-O-甲基修饰(mU)、2'-氟修饰(fU)、2'-氨基修饰、2'-脱氧修饰或2'-甲氧基乙氧基修饰,并且其中“-”表示磷酸二酯键;(b) 第一核苷酸序列,其连接至第一TLR7选择性基序的5'端;以及(c) 第二核苷酸序列,其连接至第一TLR7选择性基序的3'端和连接至第二TLR7选择性基序的5'端。在一些实施方案中,第一TLR7选择性基序的 U_2 具有2'-O-甲基修饰(mU)。在一些实施方案中,第二TLR7选择性基序的 U_2 具有2'-O-甲基修饰(mU)。在一些实施方案中,第一TLR7选择性基序的 U_2 具有2'-氟修饰(fU)。在一些实施方案中,第二TLR7选择性基序的 U_2 具有2'-氟修饰(fU)。在一些实施方案中,第一TLR7选择性基序包含SEQ ID NO:36的核苷酸序列。在一些实施方案中,第二TLR7选择性基序包含SEQ ID NO:36的核苷酸序列。在一些实施方案中,第一TLR7选择性基序包含SEQ ID NO:37的核苷酸序列。在一些实施方案中,第

二TLR7选择性基序包含SEQ ID NO:37的核苷酸序列。

[0028] 另一方面,本文提供一种选择性地活化TLR7的免疫调节组合物,该免疫调节组合物包含RNA配体和药用载体,其中该RNA配体包含:(a) 第一TLR7选择性基序,其包含SEQ ID NO:36或37的核苷酸序列;(b) 第二TLR7选择性基序,其包含SEQ ID NO:36或37的核苷酸序列;(c) 第一核苷酸序列,其连接至第一TLR7选择性基序的5'端;以及(d) 第二核苷酸序列,其连接至第一TLR7选择性基序的3'端和连接至第二TLR7选择性基序的5'端。

[0029] 在可与任何前述方面或实施方案组合的一些实施方案中,第一核苷酸序列包含一个核苷,或通过磷酸二酯键连接的至少两个核苷,其中第一核苷酸序列不包含尿苷核苷,并且其中第一核苷酸序列通过磷酸二酯键连接至第一TLR7选择性基序。在可与任何前述方面或实施方案组合的一些实施方案中,第二核苷酸序列包含一个核苷,或通过磷酸二酯键连接的至少两个核苷,其中第二核苷酸序列不包含尿苷核苷,并且其中第二核苷酸序列通过磷酸二酯键连接至第一TLR7选择性基序和/或连接至第二TLR7选择性基序。在一些实施方案中,第一核苷酸序列和/或第二核苷酸序列包含通过磷酸二酯键连接的五个核苷。在一些实施方案中,第一核苷酸序列和/或第二核苷酸序列包含核苷酸序列C-A-G-A-C (SEQ ID NO:67)、或与SEQ ID NO:67具有至少约85%同一性的核苷酸序列,其中“-”表示磷酸二酯键。

[0030] 在可与任何前述方面或实施方案组合的一些实施方案中,RNA配体包含SEQ ID NO:33的核苷酸序列、或与SEQ ID NO:33具有至少约85%同一性且包含SEQ ID NO:36的第一TLR7选择性基序和/或SEQ ID NO:36的第二TLR7选择性基序的核苷酸序列。在可与任何前述方面或实施方案组合的一些实施方案中,RNA配体包含SEQ ID NO:34的核苷酸序列、或与SEQ ID NO:34具有至少约85%同一性且包含SEQ ID NO:37的第一TLR7选择性基序和/或SEQ ID NO:37的第二TLR7选择性基序的核苷酸序列。

[0031] 另一方面,本文提供一种选择性地活化TLR7的免疫调节组合物,该免疫调节组合物包含RNA配体和药用载体,其中该RNA配体包含:(a) SEQ ID NO:33或34的核苷酸序列;(b) 与SEQ ID NO:33具有至少约85%同一性且包含SEQ ID NO:36的第一和第二TLR7选择性基序的核苷酸序列;或(c) 与SEQ ID NO:34具有至少约85%同一性且包含SEQ ID NO:37的第一和第二TLR7选择性基序的核苷酸序列。

[0032] 另一方面,本文提供一种选择性地活化TLR7的免疫调节组合物,该免疫调节组合物包含RNA配体和药用载体,其中该RNA配体包含:(a) 第一TLR7选择性基序和一个或多个另外的TLR7选择性基序,其包含式V: $U_1-U_2-C_3$ (式V),其中 U_1 和 U_2 为尿苷核苷并且 C_3 为胞苷核苷,其中 U_1 具有2'-O-甲基修饰(mU)、2'-氟修饰(fU)、2'-氨基修饰、2'-脱氧修饰或2'-甲氧基乙氧基修饰,并且其中“-”表示磷酸二酯键;以及(b) 第一核苷酸序列,其连接至第一TLR7选择性基序的5'端。在一些实施方案中,一个或多个另外的TLR7选择性基序包括一个、两个、三个、四个、五个或更多个包含式V的另外的TLR7选择性基序。在一些实施方案中,一个或多个另外的TLR7选择性基序包括五个包含式V的另外TLR7选择性基序。在一些实施方案中,第一TLR7选择性基序的 U_1 具有2'-O-甲基修饰(mU)。在一些实施方案中,一个或多个另外的TLR7选择性基序中的至少一者的 U_1 、或一个或多个另外的TLR7选择性基序中的所有的 U_1 具有2'-O-甲基修饰(mU)。在一些实施方案中,第一TLR7选择性基序的 U_1 具有2'-氟修饰。在一些实施方案中,一个或多个另外的TLR7选择性基序中的至少一者的 U_1 、或一个或多个另

外的TLR7选择性基序中的所有的 U_1 具有2'-氟修饰。在一些实施方案中,第一TLR7选择性基序包含SEQ ID NO:40的核苷酸序列。在一些实施方案中,一个或多个另外的TLR7选择性基序中的至少一者、或一个或多个另外的TLR7选择性基序中的所有包含SEQ ID NO:40的核苷酸序列。在一些实施方案中,第一TLR7选择性基序包含SEQ ID NO:41的核苷酸序列。在一些实施方案中,一个或多个另外的TLR7选择性基序中的至少一者、或一个或多个另外的TLR7选择性基序中的所有包含SEQ ID NO:41的核苷酸序列。

[0033] 另一方面,本文提供一种选择性地活化TLR7的免疫调节组合物,该免疫调节组合物包含RNA配体和药用载体,其中该RNA配体包含:(a)第一TLR7选择性基序,其包含SEQ ID NO:40或41的核苷酸序列;(b)一个或多个另外的TLR7选择性基序,其中一个或多个另外的TLR7选择性基序中的至少一者、或一个或多个另外的TLR7选择性基序中的所有包含SEQ ID NO:40或41的核苷酸序列;以及(c)第一核苷酸序列,其连接至第一TLR7选择性基序的5'端。在一些实施方案中,一个或多个另外的TLR7选择性基序包括一个、两个、三个、四个、五个或更多个包含SEQ ID NO:40或41的核苷酸序列的另外的TLR7选择性基序。在一些实施方案中,一个或多个另外的TLR7选择性基序包括五个包含SEQ ID NO:40或41的核苷酸序列的另外的TLR7选择性基序。

[0034] 在可与任何前述方面或实施方案组合的一些实施方案中,第一核苷酸序列包含一个核苷,或通过磷酸二酯键连接的至少两个核苷,其中第一核苷酸序列不包含尿苷核苷,并且其中第一核苷酸序列通过磷酸二酯键连接至第一TLR7选择性基序。在一些实施方案中,第一核苷酸序列包含通过磷酸二酯键连接的两个核苷。在一些实施方案中,第一核苷酸序列包含通过磷酸二酯键连接的两个胞苷核苷。

[0035] 在可与任何前述方面或实施方案组合的一些实施方案中,RNA配体包含SEQ ID NO:29的核苷酸序列、或与SEQ ID NO:29具有至少约85%同一性且包含SEQ ID NO:40的第一TLR7选择性基序和五个SEQ ID NO:40的另外的TLR7选择性基序的核苷酸序列。在可与任何前述方面或实施方案组合的一些实施方案中,RNA配体包含SEQ ID NO:30的核苷酸序列、或与SEQ ID NO:30具有至少约85%同一性且包含SEQ ID NO:41的第一TLR7选择性基序和五个SEQ ID NO:41的另外的TLR7选择性基序的核苷酸序列。

[0036] 另一方面,本文提供一种选择性地活化TLR7的免疫调节组合物,该免疫调节组合物包含RNA配体和药用载体,其中该RNA配体包含:(a)SEQ ID NO:29或30的核苷酸序列;(b)与SEQ ID NO:29具有至少约85%同一性且包含六个SEQ ID NO:40的TLR7选择性基序的核苷酸序列;或(c)与SEQ ID NO:30具有至少约85%同一性且包含六个SEQ ID NO:41的TLR7选择性基序的核苷酸序列。

[0037] 另一方面,本文提供一种选择性地活化TLR7的免疫调节组合物,该免疫调节组合物包含RNA配体和药用载体,其中该RNA配体包含:(a)TLR7选择性基序,其包含式VI: $C_1-U_2-U_3*U_4-U_5*C_6$ (式VI),其中 C_1 和 C_6 为胞苷核苷,并且 U_2 、 U_3 、 U_4 和 U_5 为尿苷核苷,其中 U_2 具有2'-O-甲基修饰(mU)、2'-氟修饰(fU)、2'-氨基修饰、2'-脱氧修饰或2'-甲氧基乙氧基修饰,其中 U_4 具有2'-O-甲基修饰(mU)、2'-氟修饰(fU)、2'-氨基修饰、2'-脱氧修饰或2'-甲氧基乙氧基修饰,并且其中“*”表示硫代磷酸酯键,且“-”表示磷酸二酯键;(b)第一核苷酸序列,其连接至TLR7选择性基序的5'端;以及(c)第二核苷酸序列,其连接至TLR7选择性基序的3'端。在一些实施方案中,TLR7选择性基序的 U_2 具有2'-O-甲基修饰(mU)。在一些实施方案中,TLR7选

择性基序的U₄具有2'-O-甲基修饰(mU)。在一些实施方案中,TLR7选择性基序的U₂具有2'-氟修饰(fU)。在一些实施方案中,TLR7选择性基序的U₄具有2'-氟修饰(fU)。在一些实施方案中,TLR7选择性基序的U₂和U₄具有2'-O-甲基修饰(mU)。在一些实施方案中,TLR7选择性基序的U₂和U₄具有2'-氟修饰(fU)。在一些实施方案中,TLR7选择性基序的U₂具有2'-O-甲基修饰(mU),并且TLR7选择性基序的U₄具有2'-氟修饰(fU)。在一些实施方案中,TLR7选择性基序的U₂具有2'-氟修饰(fU),并且TLR7选择性基序的U₄具有2'-O-甲基修饰(mU)。在一些实施方案中,TLR7选择性基序包含SEQ ID NO:48的核苷酸序列。在一些实施方案中,TLR7选择性基序包含SEQ ID NO:49的核苷酸序列。在一些实施方案中,TLR7选择性基序包含SEQ ID NO:50的核苷酸序列。在一些实施方案中,TLR7选择性基序包含SEQ ID NO:51的核苷酸序列。

[0038] 另一方面,本文提供一种选择性地活化TLR7的免疫调节组合物,该免疫调节组合物包含RNA配体和药用载体,其中该RNA配体包含:(a) TLR7选择性基序,其包含选自SEQ ID NO:48、49、50或51的核苷酸序列;(b) 第一核苷酸序列,其连接至TLR7选择性基序的5'端;以及(c) 第二核苷酸序列,其连接至TLR7选择性基序的3'端。

[0039] 在可与任何前述方面或实施方案组合的一些实施方案中,第一核苷酸序列包含一个核苷,或通过磷酸二酯键连接的至少两个核苷,其中第一核苷酸序列不包含尿苷核苷,并且其中第一核苷酸序列通过磷酸二酯键连接至TLR7选择性基序。在一些实施方案中,第一核苷酸序列包含通过磷酸二酯键连接的八个核苷。在一些实施方案中,第一核苷酸序列包含核苷酸序列C-C-G-A-G-C-C-G (SEQ ID NO:68),或与SEQ ID NO:68具有至少约85%同一性的核苷酸序列,其中“-”表示磷酸二酯键,并且其中第一核苷酸序列通过磷酸二酯键连接至TLR7选择性基序。

[0040] 在可与任何前述方面或实施方案组合的一些实施方案中,第二核苷酸序列包含一个核苷,或通过磷酸二酯键连接的至少两个核苷,其中第二核苷酸序列不包含尿苷核苷,并且其中第二核苷酸序列通过磷酸二酯键连接至TLR7选择性基序。在一些实施方案中,第二核苷酸序列包含通过磷酸二酯键连接的两个核苷。在一些实施方案中,第二核苷酸序列包含通过磷酸二酯键连接的两个胞苷核苷。

[0041] 在可与任何前述方面或实施方案组合的一些实施方案中,RNA配体包含SEQ ID NO:17的核苷酸序列、或与SEQ ID NO:17具有至少约85%同一性且包含SEQ ID NO:48的所述TLR7选择性基序的核苷酸序列。在可与任何前述方面或实施方案组合的一些实施方案中,RNA配体包含SEQ ID NO:18的核苷酸序列、或与SEQ ID NO:18具有至少约85%同一性且包含SEQ ID NO:49的所述TLR7选择性基序的核苷酸序列。在可与任何前述方面或实施方案组合的一些实施方案中,RNA配体包含SEQ ID NO:19的核苷酸序列、或与SEQ ID NO:19具有至少约85%同一性且包含SEQ ID NO:50的所述TLR7选择性基序的核苷酸序列。在可与任何前述方面或实施方案组合的一些实施方案中,RNA配体包含SEQ ID NO:20的核苷酸序列、或与SEQ ID NO:20具有至少约85%同一性且包含SEQ ID NO:51的所述TLR7选择性基序的核苷酸序列。

[0042] 另一方面,本文提供一种选择性地活化TLR7的免疫调节组合物,该免疫调节组合物包含RNA配体和药用载体,其中该RNA配体包含:(a) 选自SEQ ID NO:17、18、19或20的核苷酸序列;(b) 与SEQ ID NO:17具有至少约85%同一性且包含SEQ ID NO:48的TLR7选择性基序的核苷酸序列;(c) 与SEQ ID NO:18具有至少约85%同一性且包含SEQ ID NO:49的TLR7

选择性基序的核苷酸序列；(d) 与SEQ ID NO:19具有至少约85%同一性且包含SEQ ID NO:50的TLR7选择性基序的核苷酸序列；或(e) 与SEQ ID NO:20具有至少约85%同一性且包含SEQ ID NO:51的TLR7选择性基序的核苷酸序列。

[0043] 在可与任何前述方面或实施方案组合的一些实施方案中,药用载体为脂质纳米颗粒(LNP)。在一些实施方案中,LNP包含阳离子脂质。在一些实施方案中,LNP包含可电离脂质。

[0044] 在可与任何前述方面或实施方案组合的一些实施方案中,药用载体是或包含聚-L-精氨酸或1,2-二油酰基-3-三甲基铵丙烷(DOTAP)。

[0045] 在可与任何前述方面或实施方案组合的一些实施方案中,免疫调节组合物选择性地活化与免疫调节组合物接触的一种或多种细胞中的TLR7。在一些实施方案中,一种或多种细胞表达TLR7。在一些实施方案中,一种或多种细胞包含外周血单核细胞(PBMC)。在一些实施方案中,一种或多种细胞包含一种或多种浆细胞样树突状细胞。在一些实施方案中,相比于未与免疫调节组合物接触的对应的一种或多种细胞,免疫调节组合物使与免疫调节组合物接触的一种或多种细胞中的TLR7活性增加。在一些实施方案中,相比于未与免疫调节组合物接触的对应的一种或多种细胞,免疫调节组合物使与免疫调节组合物接触的一种或多种细胞的IFN- α 的分泌增加。在一些实施方案中,相比于未与免疫调节组合物接触的对应的一种或多种细胞,与免疫调节组合物接触的一种或多种细胞中的TLR7活性的增加为至少约5%、至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约100%或更多的增加。在一些实施方案中,相比于未与免疫调节组合物接触的对应的一种或多种细胞,与免疫调节组合物接触的一种或多种细胞的IFN- α 的分泌的增加为至少约5%、至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约100%或更多的增加。在一些实施方案中,相比于未与免疫调节组合物接触的对应的一种或多种细胞,免疫调节组合物使与免疫调节组合物接触的一种或多种细胞中的TLR8活性增加小于约20%、小于约15%、小于约10%、小于约5%、或小于约1%。在一些实施方案中,相比于未与免疫调节组合物接触的对应的一种或多种细胞,免疫调节组合物使与免疫调节组合物接触的一种或多种细胞的TNF- α 的分泌增加小于约20%、小于约15%、小于约10%、小于约5%、或小于约1%。在一些实施方案中,将RNA配体引入与免疫调节组合物接触的一种或多种细胞中。在一些实施方案中,与免疫调节组合物接触的一种或多种细胞进一步与鸟苷或鸟苷衍生物接触,任选地其中鸟苷衍生物为2'3'环GMP。

[0046] 另一方面,本文提供分离的核酸,其包含本文所述的任何免疫调节组合物的RNA配体。在一些实施方案中,核酸是DNA、RNA或DNA/RNA分子。

[0047] 另一方面,本文提供载体,其包含本文所述的任何免疫调节组合物的RNA配体或本文所述的任何核酸。

[0048] 另一方面,本文提供药物组合物,其包含本文所述的任何免疫调节组合物。

[0049] 另一方面,本文提供宿主细胞,其包含本文所述的任何免疫调节组合物的RNA配体、本文所述的任何核酸、或本文所述的任何载体。

[0050] 另一方面,本文提供疫苗组合物,其包含本文所述的任何免疫调节组合物或本文所述的任何药物组合物。

[0051] 另一方面,本文提供用于选择性地活化一种或多种细胞中的TLR7的方法,该方法包括使一种或多种细胞与本文所述的任何免疫调节组合物或本文所述的任何药物组合物接触。在一些实施方案中,一种或多种细胞表达TLR7。在一些实施方案中,一种或多种细胞包含外周血单核细胞(PBMC)。在一些实施方案中,一种或多种细胞包含一种或多种浆细胞样树突状细胞。在一些实施方案中,相比于未与免疫调节组合物或药物组合物接触的对应的一种或多种细胞,使一种或多种细胞与免疫调节组合物或药物组合物接触引起一种或多种细胞中的TLR7活性的增加。在一些实施方案中,相比于未与免疫调节组合物或药物组合物接触的对应的一种或多种细胞,使一种或多种细胞与免疫调节组合物或药物组合物接触引起一种或多种细胞的IFN- α 的分泌的增加。在一些实施方案中,相比于未与免疫调节组合物或药物组合物接触的对应的一种或多种细胞,一种或多种细胞中的TLR7活性的增加为至少约5%、至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约100%或更多的增加。在一些实施方案中,相比于未与免疫调节组合物或药物组合物接触的对应的一种或多种细胞,一种或多种细胞的IFN- α 的分泌的增加为至少约5%、至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约100%或更多的增加。在一些实施方案中,相比于未与免疫调节组合物或药物组合物接触的对应的一种或多种细胞,使一种或多种细胞与免疫调节组合物或药物组合物接触引起一种或多种细胞中的TLR8活性的小于约20%、小于约15%、小于约10%、小于约5%、或小于约1%的增加。在一些实施方案中,相比于未与免疫调节组合物或药物组合物接触的对应的一种或多种细胞,使一种或多种细胞与免疫调节组合物或药物组合物接触引起一种或多种细胞的TNF- α 的分泌的小于约20%、小于约15%、小于约10%、小于约5%、或小于约1%的增加。在一些实施方案中,该方法进一步包括使一种或多种细胞与鸟苷或鸟苷衍生物接触,任选地其中鸟苷衍生物为2'3'环GMP。在一些实施方案中,该方法进一步包括:通过酶联免疫吸附测定(ELISA)、免疫印迹、免疫测定、流式细胞术、基于电化学发光的方法、质谱或qPCR来测量IFN- α 和/或TNF- α 的分泌;及/或测量干扰素刺激基因(ISG)的表达水平。在一些实施方案中,使一种或多种细胞与免疫调节组合物或药物组合物接触包括将RNA配体引入一种或多种细胞中。

[0052] 另一方面,本文提供用于选择性地活化个体中的TLR7的方法,该方法包括向个体施用有效量的本文所述的任何免疫调节组合物、本文所述的任何药物组合物、或本文所述的任何疫苗组合物。在一些实施方案中,相比于未施用免疫调节组合物、药物组合物或疫苗组合物的对应个体,向个体施用有效量的免疫调节组合物、药物组合物、或疫苗组合物引起个体中的TLR7活性的增加。在一些实施方案中,相比于未施用免疫调节组合物、药物组合物或疫苗组合物的对应个体,向个体施用有效量的免疫调节组合物、药物组合物、或疫苗组合物引起个体中的IFN- α 的水平增加。在一些实施方案中,相比于未施用免疫调节组合物、药物组合物或疫苗组合物的对应个体,TLR7活性的增加为至少约5%、至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约100%或更多的增加。在一些实施方案中,相比于未施用免疫调节组合物、药物组合物或疫苗组合物的对应个体,IFN- α 水平的增加为至少约5%、至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约100%或更多的增加。在一些实施方案中,相比于未施用免疫调节组合物、药物

组合物或疫苗组合物的对应个体,向个体施用有效量的免疫调节组合物、药物组合物、或疫苗组合物引起个体中的TLR8活性的小于约20%、小于约15%、小于约10%、小于约5%、或小于约1%的增加。在一些实施方案中,相比于未施用免疫调节组合物、药物组合物或疫苗组合物的对应个体,向个体施用有效量的免疫调节组合物、药物组合物、或疫苗组合物引起个体中的TNF- α 的水平的小于约20%、小于约15%、小于约10%、小于约5%、或小于约1%的增加。

[0053] 另一方面,本文提供用于刺激个体中的免疫应答的方法,该方法包括向个体施用有效量的本文所述的任何免疫调节组合物、本文所述的任何药物组合物、或本文所述的任何疫苗组合物。在一些实施方案中,相比于未施用免疫调节组合物、药物组合物或疫苗组合物的对应个体,向个体施用有效量的免疫调节组合物、药物组合物、或疫苗组合物引起个体中的TLR7活性的增加。在一些实施方案中,相比于未施用免疫调节组合物、药物组合物或疫苗组合物的对应个体,向个体施用有效量的免疫调节组合物、药物组合物、或疫苗组合物引起个体中的IFN- α 的水平增加。在一些实施方案中,相比于未施用免疫调节组合物、药物组合物或疫苗组合物的对应个体,TLR7活性的增加为至少约5%、至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约100%或更多的增加。在一些实施方案中,相比于未施用免疫调节组合物、药物组合物或疫苗组合物的对应个体,IFN- α 水平的增加为至少约5%、至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约100%或更多的增加。在一些实施方案中,相比于未施用免疫调节组合物、药物组合物或疫苗组合物的对应个体,向个体施用有效量的免疫调节组合物、药物组合物、或疫苗组合物引起个体中的TLR8活性的小于约20%、小于约15%、小于约10%、小于约5%、或小于约1%的增加。在一些实施方案中,相比于未施用免疫调节组合物、药物组合物或疫苗组合物的对应个体,向个体施用有效量的免疫调节组合物、药物组合物、或疫苗组合物引起个体中的TNF- α 的水平的小于约20%、小于约15%、小于约10%、小于约5%、或小于约1%的增加。

[0054] 另一方面,本文提供用于制造用于活化个体中的TLR7的药物的佐剂,其中该佐剂包含本文所述的任何免疫调节组合物、本文所述的任何药物组合物、或本文所述的任何疫苗组合物。

[0055] 另一方面,本文提供用于在个体中活化TLR7的方法中使用的佐剂,该方法包括向个体施用有效量的本文所述的任何免疫调节组合物、本文所述的任何药物组合物、或本文所述的任何疫苗组合物。

[0056] 另一方面,本文提供试剂盒,其包含本文所述的任何免疫调节组合物、本文所述的任何核酸、本文所述的任何载体、本文所述的任何药物组合物或本文所述的任何疫苗组合物。

[0057] 应了解,本文所述的各种实施例的一种、一些或所有特性可组合形成本发明的其它实施例。本发明的这些和其它方面对于本领域技术人员将变得显而易见。通过下面的详细描述进一步描述本发明的这些和其它实施例。

附图说明

[0058] 本专利或申请文件含有至少一幅彩色附图。在提出请求并支付必要的费用后,专

利局将提供带有一幅或多幅彩图的本专利或专利申请公布的拷贝。

[0059] 图1A-1B提供作为活化二聚体的猕猴 (*Macaca mulatta*) TLR7和人TLR8内体富含亮氨酸重复结构域的晶体结构,在结合位点#1和#2处具有示例性配体。如图1A所示,TLR7的结合位点#1与鸟苷(G)结合,而结合位点#2与侧面是至少两个核苷酸(优选嘧啶)的尿苷(U)结合。如图1B所示,TLR8的结合位点#1与尿苷(U)结合,而结合位点#2与UG二聚体结合,并且也可以被UA或UU二聚体或潜在的CG二聚体占据。星号指示TLR7或TLR8同二聚体的第二个亚基。参见,Miyake等人,International Immunology (2018) 30(2):43-51.也可以参见:Zhang等人,Immunity (2016) 45:737;以及Tanji等人,Nature Structural and Molecular Biology (2015) 22:109-115。

[0060] 图2描述了RNA酶催化的反应。RNA酶催化3'磷(顶部)处的亲核攻击,导致释放带有5'OH的3'核苷酸。3'端的特征是2'3'环磷酸酯。

[0061] 图3示出2'-O-甲基、2'-氟、2'-脱氧、2'-氨基、2'-甲氧基乙氧基和硫代磷酸酯(pto)修饰的化学结构。1'位置处的“U”或“N”表示任何可能的核碱基。

[0062] 图4示出ORN7023(衍生自W02010/105819)采用的二级结构,其具有核苷酸序列C-G-G-C-U-C-G-G-C-A-G-A-A-G-C-C-G-G-G-C-C (SEQ ID NO:2;“-”表示磷酸二酯键)。ORN7023形成短的规范的RNA发夹,包括方框所示的G:U摆动碱基对。ORN7023的二级结构使用RNAfold获得(参见例如,Gruber等人,Nucleic Acids Research (2008) 36:2s:W70-W74;Lorenz等人,Algorithms for Molecular Biology (2011) 6:1:26;以及rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi)。

[0063] 图5描绘了TLR7二聚体内的TLR7的结合位点#2。U₃-三聚体结合在结合位点#2内。U₁、U₂和U₃表示5'至3'方向的核苷酸。实心三角形标记了三个核苷酸(U₁、U₂和U₃)的2'OH部分。每个TLR7亚基均由浅蓝色或粉色阴影指示。星号指示TLR7同二聚体的第二个亚基。参见,Zhang等人,Cell Reports (2018) 25:3371-3381。

[0064] 图6描绘了外周血单核细胞(PBMC)的核酸受体表达和细胞因子分泌。PBMC中的主要细胞类型示出在图6的顶部(cDC=常规树突状细胞;pDC=浆细胞样树突状细胞;NK=自然杀伤细胞)。由pDC和单核细胞表达的细胞因子诱导核酸受体示出在图6的底部。

[0065] 图7示出测量PBMC响应实例1中所述的RNA配体的TNF- α 或IFN- α 分泌的水平的实验的结果。用聚-L-精氨酸(p-L-精氨酸)复合RNA配体(在x轴上指示),单独或与鸟苷联合刺激人PBMC(如图例所示;“noG”指示单独用p-L-精氨酸复合RNA配体刺激PBMC,并且“G”指示PBMC与p-L-精氨酸复合RNA配体和鸟苷共同刺激)。在p-L-精氨酸递送RNA配体后16小时测量TNF- α 和IFN- α 分泌的水平,如y轴(pg/ml)所示。“培养基”是指阴性对照(没有用p-L-精氨酸复合RNA配体或鸟苷刺激PBMC)。“R848”是阳性对照,并且是指用R848(一种小分子TLR7/8配体,也称为雷西莫特(resiquimod),浓度为1 μ g/ml)刺激的PBMC。

[0066] 图8示出测量PBMC或pDC耗尽的PBMC响应实例1中所述的某种RNA配体的TNF- α 和IFN- α 分泌的水平的实验的结果。如x轴所示,用p-L-精氨酸复合RNA配体刺激人PBMC或pDC耗尽的PBMC。在p-L-精氨酸递送RNA配体后16小时测量TNF- α 和IFN- α 分泌的水平,如y轴(pg/ml)所示。“培养基”是指阴性对照(没有用p-L-精氨酸复合RNA配体刺激PBMC)。9.2S RNA样品是用与TLR7/8活化9.2S RNA复合的p-L-精氨酸刺激的人PBMC或pDC耗尽的PBMC。9.2S RNA是阳性对照,其核苷酸序列为A-G-C-U-U-A-A-C-C-U-G-U-C-C-U-U-C-A-A (SEQ

IDN0:56;“-”表示磷酸二酯键)。“IVT4”是指用具有核苷酸序列G-G-G-A-C-G-C-U-G-A-C-C-C-A-G-A-A-G-A-U-C-A-C-U-A-G-A-A-A-U-A-G-U-A-G-A-U-C-U-U-C(SEQ ID NO:62;“-”表示磷酸二酯键)的Lipofectamine复合对照刺激的人PBMC或pDC耗尽的PBMC。IVT4对照是通过体外转录生成的,且具有氯喹抗性并活化RIG-I,但不活化TLR7/8。

[0067] 图9示出表征由所示RNA配体与p-L-精氨酸(pLA)复合形成的纳米颗粒的尺寸的实验的结果。

[0068] 图10A-10B示出测量PBMC响应实例1中所述的用DOTAP递送的指示的RNA配体的TNF- α 或IFN- α 分泌的水平的实验的结果。用浓度为0.6 μ g/ml(图10A)或2 μ g/ml(图10B)的DOTAP复合RNA配体(在x轴上指示)刺激人PBMC。在DOTAP递送RNA配体后16小时测量TNF- α 和IFN- α 分泌的水平,如y轴(pg/ml)所示。pCA、pCA-2和pCA-3样品是不会诱导细胞因子应答的阴性对照RNA寡核苷酸。pCA、pCA-2和pCA-3包含核苷酸序列C-A-C-A-C-A-C-A-C-A-C-A-C-A-C-A-C-A(SEQ ID NO:70),其中“-”指示磷酸二酯键。pU2G样品是诱导TLR7和TLR8两者的阳性对照RNA寡核苷酸。pU2G包含核苷酸序列G-G-U-U-G-U-U-G-U-U-G-U-U-G-U-U-G-U-U-G(SEQ ID NO:71),其中“-”指示磷酸二酯键。

[0069] 图11示出测量PBMC响应实例1中所述的无载体递送的指示的RNA配体(即,游离RNA配体)的TNF- α 或IFN- α 分泌的水平的实验的结果。人PBMC单独用游离RNA配体(在x轴上指示)刺激。递送后16小时测量TNF- α 和IFN- α 分泌的水平,如y轴(pg/ml)所示。pCA和pCA-2样品是不诱导细胞因子应答的阴性对照RNA寡核苷酸(SEQ ID NO:70)。pU2G_pto样品是诱导TLR7和TLR8两者的阳性对照RNA寡核苷酸。pU2G_pto包含核苷酸序列G*G*U*U*G*U*U*G*U*U*G*U*U*G*U*U*G*U*U*G*U*U*G(SEQ ID NO:72),其中“*”指示硫代磷酸酯键。

[0070] 图12示出实验的结果,其中ORN 7005-7012与单独的p-L-精氨酸(“无2'3'cGMP”)或与p-L-精氨酸和2'3'环GMP(“+2'3'cGMP”)复合递送至人PBMC。2'3'环GMP的终浓度为5 μ g/ml,并且ORN均以0.6 μ g/ml的浓度使用。如图7测量细胞因子分泌。PBMC取自6个人类供体。示出的结果表示两个独立的实验。

[0071] 图13示出如图8中所进行的实验的结果,只是在所有条件下,RNA配体均与2'3'环GMP(“2'3'cGMP”)复合在一起。2'3'环GMP的终浓度为5 μ g/ml,并且RNA配体(ORN 7005-7012)以0.6 μ g/ml的浓度使用。人类PBMC取自3个供体。示出的结果表示一项实验。

[0072] 图14示出如图8中所进行的实验的结果,但使用取自三个新供体的人类PBMC。

[0073] 图15A-15B示出评估2'位置处RNA修饰对RNA酶切割活性的影响的实验的结果。图15A示出对应于ORN7009和ORN7013的未修饰的序列,其中用箭头指示了潜在的RNA酶T2切割位点。箭头的大小指示RNA酶T2切割的共有序列的强度,并因此指示切割事件的可能性。切割位点基于文献(Ostendorf等人,(2020)52(4):591-605)。图15B示出加载有以下项的TBE-尿素PAGE凝胶:6 μ l含有RNA酶T2和未修饰的RNA配体(ORN7009和ORN7013)的每个反应,或3 μ l含有RNA酶T2和修饰的RNA配体(ORN7014-7017和ORN7010-7012)的每个反应。对于“无RNA酶”对照,将3 μ l的每种RNA配体在相同的反应条件下(减去RNA酶T2)孵育12分钟。图15B中的顶部凝胶示出RNA配体ORN7009-7012与0.2 μ g/ml RNA酶T2孵育3、6、9或12分钟。图15B中的底部凝胶示出RNA配体ORN7013-7017与0.5 μ g/ml RNA酶T2孵育3、6、9或12分钟。

[0074] 图16A-16B示出图12中绘制的IFN- α 数据,其中各个数据点指示两个独立实验中独特的人类PBMC供体。图16A和图16B通过说明供体和实验之间的可重复性,为图12中所见的

任何变化提供背景。

具体实施方式

[0075] 定义

[0076] 如在本文和所附权利要求书中所用,单数形式“一”、“或”和“该/所述”包括复数指代物,除非上下文另外明确规定。如本文所用,“约”是指为此技术领域中的技术人员容易知晓的相应值或参数的常见误差范围。在本文中提及“约”值或参数包括(且描述)涉及该值或参数本身的实施例。应当理解,本文所述的本公开的方面和实施例包括“包含”、“由以下组成”及“基本上由以下组成”所指的方面和实施例。

[0077] 如本文所用,术语“免疫调节”是指药剂(诸如本公开的组合物或RNA配体)调节宿主(例如个体,例如如本文所述)的免疫系统的能力。此类调节可以包括增加一种或多种免疫应答,诸如但不限于:增加抗体产生(例如,抗原特异性抗体产生);免疫系统细胞的活化或增殖,诸如T细胞、B细胞、自然杀伤细胞、树突状细胞、巨噬细胞等;免疫刺激细胞因子的产生或释放(例如分泌)增加;或直接或间接增强适应性、先天、细胞或体液免疫应答。此类调节还可以包括减少一种或多种免疫应答,诸如但不限于:减少抗原特异性抗体的产生;活化淋巴细胞或其他具有免疫抑制活性的细胞群;增加对某些细胞功能具有抑制作用的细胞因子的合成;或直接或间接降低某些适应性、先天、细胞或体液免疫应答。

[0078] 如本文所用,关于TLR7活性的术语“选择性的”、“选择性”和“选择性地”是指药剂(诸如本公开的免疫调节组合物或RNA配体)将TLR7(例如,在一种或多种细胞中)的活性增加到比另一种分子(诸如另一种Toll样受体,例如TLR8)的活性更大程度的能力。因此,本公开的TLR7选择性RNA配体或免疫调节组合物可以增加TLR7的活性,并且还可以增加另一种分子(诸如另一种Toll样受体,例如TLR8)的活性,然而,TLR7活性的增加将比其他分子(例如TLR8)活性增加的程度更大。

[0079] 如本文所用,“RNA配体”是指任何长度的核苷酸聚合物。核苷酸可以是核糖核苷酸、修饰的核糖核苷酸或碱基,和/或其类似物,或可以通过RNA聚合酶或通过合成反应纳入聚合物中的任何底物。多核苷酸可以包含修饰的核苷酸。如果存在的话,可以在聚合物组装之前或之后对核苷酸结构进行修饰。核苷酸的序列可以被非核苷酸成分中断。

[0080] 如本文所用,“药用载体”是指组合物中除活性成分外的对个体无毒的成分。

[0081] 如本文所用,关于特定主题序列或其特定部分的“同一性百分比(%)”定义为:在比对序列并且如果需要引入间隙以实现最大序列同一性百分比后,所鉴定的序列中与主题序列(或其特定部分)中的核苷酸相同的核苷酸的百分比。

[0082] “分离的”核酸是指已从其自然环境的组分中分离的核酸分子。经分离的核酸包括这样的核酸分子,其包含在通常含有核酸分子的细胞中,但该核酸分子存在于染色体外或与其天然染色体位置不同的染色体位置处。

[0083] 如本文所用,术语“载体”是指能够转运已与其连接的另一核酸的核酸分子。载体的一种类型是“质粒”,其是指另外的DNA链段可以连接到其中的环状双链DNA。另一类型的载体是噬菌体载体。载体的另一种类型是病毒载体,其中另外的DNA链段可以连接到病毒基因组中。某些载体能够在引入它们的宿主细胞(例如,具有细菌复制起点的细菌载体和附加体哺乳动物载体)中自主复制。在导入宿主细胞中之后,其他载体(例如,非附加体哺乳动物

载体)可以整合到宿主细胞的基因组中,从而与宿主基因组一起复制。此外,某些载体能够引导与其可操作地连接的核酸的表达。

[0084] 术语“宿主细胞”是指已将外源核酸引入细胞内的细胞,包括此类细胞的后代。宿主细胞包括“转化体”和“转化细胞”,其包括原代转化细胞和来源于所述原代转化细胞的子代,不考虑传代次数。子代可能不与亲本细胞的核酸内容物完全一致,而是可能含有突变。本文包括如在原始转化细胞中筛选或选择的具有相同功能或生物活性的突变子代。

[0085] “个体”为哺乳动物。哺乳动物包括但不限于驯养的动物(例如牛、绵羊、猫、犬和马)、灵长类动物(例如人和非人灵长类动物,诸如猴)、兔以及啮齿类动物(例如小鼠和大鼠)。在某些实施方案中,个体为人。

[0086] “有效量”是指在必需的剂量和的时段内,有效实现期望的治疗或预防结果的至少量。有效量可以在一次或多次施用中提供。本文的有效量可以根据诸如个体的疾病状态、年龄、性别和体重以及治疗在个体中引起预期应答的能力等因素而变化。有效量也是治疗有益作用超过治疗的任何毒性或有害作用的量。对于预防用途、有益或预期结果包括诸如消除或降低风险、减轻严重程度或延迟疾病发作,包括疾病的生化、组织学和/或行为症状、其并发症以及在疾病发展过程中出现的中间病理表型。对于治疗用途、有益或预期结果包括临床结果,诸如减少由疾病引起的一种或多种症状、提高患病者的生活质量、减少治疗该疾病所需的其他药物的剂量、增强其他药物的效果、延缓疾病进展和/或延长存活。药物、化合物或组合物的有效量为足以直接或间接地进行预防或治疗的量。如在临床背景中所理解的,与另一药物、化合物或药物组合物结合可以达到或不能达到有效量的药物、化合物或组合物。因此,可以在施用一种或多种治疗剂的情况下考虑“有效量”,并且如果与一种或多种其他试剂结合可以获得或实现预期结果,则可以考虑给予有效量的单一药剂。

[0087] 概述

[0088] 本公开的某些方面涉及包含选择性地活化TLR7的RNA配体的免疫调节组合物。

[0089] TLR7选择性配体开发中的困难

[0090] 虽然已经描述了多种TLR8选择性配体,但TLR7选择性RNA配体非常罕见。已经尝试了一些方法来生成TLR7选择性配体。例如,二级结构,诸如短双链RNA(dsRNA)序列内的发夹或G:U摆动碱基对已被描述为选择性地活化TLR7。然而,导致TLR7选择性的机制仍不清楚,并且不能仅用TLR7/8识别基序来解释。参见例如W02010/105819。然而,此类二级结构可能有利于RNA酶降解模式,不利于TLR8活化。然而,申请人认识到,仅依赖于发夹结构和/或G:U摆动碱基对的配体将需要此类结构作为固定的二级结构,并且不同的递送方法也可能具有可变的活性。

[0091] 申请人认识到缺乏TLR7选择性配体的可能原因可能是TLR7和TLR8中的两个核苷酸结合位点(称为结合位点#1和结合位点#2)的特异性(图1A-1B)。不希望受理论束缚,申请人在设计本公开的TLR7选择性配体时考虑了该性质。

[0092] 结合位点#1具有更高的重要性,并且结合单体核苷或潜在的3'2'环磷核苷,这些核苷是RNA酶降解的典型产物。如图1A-1B所示,TLR7结合位点#1与鸟苷结合(图1A),而TLR8结合位点#1与尿苷结合(图1B)。结合位点#1也被一系列的合成小分子活化剂结合,诸如雷西莫特、加迪喹莫特(gardiquimod)或咪喹莫特(imiquimod)。由于其高亲和力,合成小分子仅与结合位点#1结合就足以活化。然而,RNA配体的完全活化还需要在结合位点#2处结合。

[0093] TLR7和TLR8中的结合位点#2在质量和空间两者上都不同(图1A-1B)。TLR7结合位点#2似乎严格要求侧面有两个核苷酸的尿苷,优选是可以嵌入更长的RNA寡核糖核苷酸中的嘧啶(图1A)。另一方面,TLR8在结合位点#2处结合UG二聚体,但也更加混杂并且可以被UA或UU二聚体或潜在的CG二聚体占据(图1B)。3'端由3'-2'环磷酸酯定义,而5'端的定义不太明确,并可能是三聚体或甚至更长寡聚体的一部分。

[0094] 因此,生成TLR7选择性配体的困难可能至少部分是由于以下事实:TLR7似乎严格需要鸟苷(对于结合位点#1)和尿苷(对于结合位点#2)两者来活化,而TLR8仅需要尿苷。因此,任何U或UA限制序列都可能活化TLR8,但不能活化TLR7,而TLR7结合位点#2需要尿苷意味着,如果仅依赖于序列的选择性,活化TLR7的序列将具有生成TLR8配体的潜力。

[0095] 使用RNA修饰开发TLR7选择性配体

[0096] RNA酶是切割RNA的酶,并且可以生成RNA降解产物,这些产物可以作为TLR7和/或TLR8活化的配体。如图2所示,RNA酶s通过3'磷处2'氧的亲核攻击,切割RNA分子的3'核苷酸,导致释放带有5'OH的3'核苷酸并生成2'-3'环磷酸酯,这是广泛使用的RNA酶活性标志物。

[0097] 某些RNA修饰会干扰RNA酶的活性。例如,硫代磷酸酯修饰将手性引入主链的磷酸酯,并已被证明减缓RNA降解并增强TLR活化。此外,核糖上2'位置的修饰可能会剥夺RNA主链上RNA酶活性所需的2'OH和/或阻断任何核酸酶的结合。

[0098] 申请人认识到,在寡核糖核苷酸序列内的特定位点处引入某些RNA修饰可以干扰RNA酶活性并防止形成活化TLR8的RNA降解产物,同时允许释放活化TLR7的配体。

[0099] 因此,本公开的某些方面至少部分基于在特定位点具有特定RNA修饰的RNA配体的发现(参见例如实例1),其增强TLR7选择性并导致高水平的TLR7活性(参见例如实例2),从而克服了生成TLR7选择性配体的困难。

[0100] 本公开的组合物

[0101] 在一些方面,本文提供选择性地活化TLR7的免疫调节组合物。在一些实施方案中,本公开的免疫调节组合物包含RNA配体,例如本文所述的RNA配体。在一些实施方案中,RNA配体包含一个或多个TLR7选择性基序,诸如本文所述的TLR7选择性基序,其包含一种或多种RNA修饰,例如本文所述的RNA修饰中的一种或多种。在一些实施方案中,本公开的免疫调节组合物进一步包含载体,诸如药用载体,例如如本文所述。

[0102] RNA配体

[0103] 在一些方面,本文提供包含一个或多个TLR7选择性基序的RNA配体,其中该TLR7选择性基序包含本文所述的RNA修饰中的一种或多种。

[0104] 包含式I的TLR7选择性基序的RNA配体

[0105] 一方面,本文提供包含TLR7选择性基序的RNA配体,该TLR7选择性基序包含式I:

[0106] $N-/*U$ (式I),

[0107] 其中N是在核糖的2'位置处包含修饰的任何核苷,U为尿苷核苷,并且“-/*”表示磷酸二酯键或硫代磷酸酯键。

[0108] 在一些实施方案中,N包含核糖的2'位置处的修饰。在一些实施方案中,修饰是本领域已知的或本文所述的核糖的2'位置处的任何修饰。在一些实施方案中,修饰是本领域已知的或本文所述的抑制或阻断RNA酶活性的核糖的2'位置处的任何修饰。在一些实施方

案中,修饰是2'-O-甲基修饰、2'-氟修饰、2'-氨基修饰、2'-脱氧修饰或2'-甲氧基乙氧基修饰。在一些实施方案中,修饰是2'-O-甲基修饰。在一些实施方案中,修饰是2'-氟修饰。在一些实施方案中,修饰是2'-氨基修饰。在一些实施方案中,修饰是2'-脱氧修饰。在一些实施方案中,修饰是2'-甲氧基乙氧基修饰。

[0109] 在一些实施方案中, RNA配体进一步包含侧接TLR7选择性基序的5'端、TLR7选择性基序的3'端或两者的另外的核苷酸序列。在一些实施方案中,另外的核苷酸序列不包含尿苷核苷。

[0110] 在一些实施方案中, RNA配体进一步包含连接至TLR7选择性基序的5'端的第一核苷酸序列。在一些实施方案中,第一核苷酸序列包含至少一个核苷。在一些实施方案中,第一核苷酸序列包含至少两个核苷。在一些实施方案中,第一核苷酸序列的核苷通过磷酸二酯键或硫代磷酸酯键连接。在一些实施方案中,第一核苷酸序列包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100或更多个核苷中的任一者,或介于100与125个核苷、介于125与150个核苷、介于150与175个核苷、介于175与200个核苷、介于200与225个核苷、介于225与250个核苷、介于250与275个核苷、或介于275与300个核苷之间的任一者。在一些实施方案中,第一核苷酸序列通过磷酸二酯键或硫代磷酸酯键连接至TLR7选择性基序的5'端。在一些实施方案中,第一核苷酸序列不包含尿苷核苷。

[0111] 在一些实施方案中, RNA配体进一步包含连接至TLR7选择性基序的3'端的第二核苷酸序列。在一些实施方案中,第二核苷酸序列包含至少一个核苷。在一些实施方案中,第二核苷酸序列包含至少两个核苷。在一些实施方案中,第二核苷酸序列的核苷通过磷酸二酯键或硫代磷酸酯键连接。在一些实施方案中,第二核苷酸序列包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100或更多个核苷中的任一者,或介于100与125个核苷、介于125与150个核苷、介于150与175个核苷、介于175与200个核苷、介于200与225个核苷、介于225与250个核苷、介于250与275个核苷、或介于275与300个核苷之间的任一者。在一些实施方案中,第二核苷酸序列通过磷酸二酯键或硫代磷酸酯键连接至TLR7选择性基序的3'端。在一些实施方案中,第二核苷酸序列不包含尿苷核苷。

[0112] 在一些实施方案中,第一核苷酸序列的序列与第二核苷酸序列的序列相同。在一些实施方案中,第一核苷酸序列的序列不同于第二核苷酸序列的序列。

[0113] 在一些实施方案中, RNA配体包含两个或更多个包含式I的TLR7选择性基序。在一些实施方案中, RNA配体包含两个或更多个包含式I的TLR7选择性基序和至少两个另外的核苷酸序列,其中另外的核苷酸序列包含至少一种核苷。TLR7选择性基序和至少两个另外的核苷酸序列可以以任何顺序排列在RNA配体上。在一个非限制性实例中, RNA配体可以在5'至3'方向上包含第一核苷酸序列、式I的TLR7选择性基序、一个或多个另外的式I的TLR7选择性基序(例如,串联)、第二核苷酸序列、一个或多个另外的式I的TLR7选择性基序(例如,

串联)、以及第三核苷酸序列。在一些实施方案中,第一、第二和/或第三核苷酸序列包含至少一个核苷。在一些实施方案中,第一、第二和/或第三核苷酸序列包含至少两个核苷。在一些实施方案中,第一、第二和/或第三核苷酸序列的核苷通过磷酸二酯键或硫代磷酸酯键连接。在一些实施方案中,第一、第二和/或第三核苷酸序列包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、94、96、97、98、99、100或更多个核苷中的任一者,或介于100与125个核苷、介于125与150个核苷、介于150与175个核苷、介于175与200个核苷、介于200与225个核苷、介于225与250个核苷、介于250与275个核苷、或介于275与300个核苷之间的任一者。在一些实施方案中,第一、第二和/或第三核苷酸序列通过磷酸二酯键或硫代磷酸酯键连接至相邻的TLR7选择性基序。在一些实施方案中,第一、第二和/或第三核苷酸序列不包含尿苷核苷。本领域技术人员可以获得包含两个或更多个TLR7选择性基序的其他RNA配体,该TLR7选择性基序包含式I和至少两个另外的核苷酸序列(例如,如上所述),其中该TLR7选择性基序和至少两个另外的核苷酸序列在RNA配体上以任意顺序排列。

[0114] 包含式II的TLR7选择性基序的RNA配体

[0115] 一方面,本文提供包含TLR7选择性基序的RNA配体,该TLR7选择性基序包含式II:

[0116] $C_1*U_2-U_3*U_4-U_5*C_6$ (式II),

[0117] 其中 C_1 和 C_6 为胞苷核苷,并且 U_2 、 U_3 、 U_4 和 U_5 为尿苷核苷,其中“*”表示硫代磷酸酯键,并且“-”表示磷酸二酯键。

[0118] 在一些实施方案中, U_2 包含核糖的2'位置处的修饰。在一些实施方案中,修饰是本领域已知的或本文所述的核糖的2'位置处的任何修饰。在一些实施方案中,修饰是本领域已知的或本文所述的抑制或阻断RNA酶活性的核糖的2'位置处的任何修饰。在一些实施方案中,修饰是2'-O-甲基修饰、2'-氟修饰、2'-氨基修饰、2'-脱氧修饰或2'-甲氧基乙氧基修饰。在一些实施方案中,修饰是2'-O-甲基修饰。在一些实施方案中,修饰是2'-氟修饰。在一些实施方案中,修饰是2'-氨基修饰。在一些实施方案中,修饰是2'-脱氧修饰。在一些实施方案中,修饰是2'-甲氧基乙氧基修饰。

[0119] 在一些实施方案中, U_4 包含核糖的2'位置处的修饰。在一些实施方案中,修饰是本领域已知的或本文所述的核糖的2'位置处的任何修饰。在一些实施方案中,修饰是本领域已知的或本文所述的抑制或阻断RNA酶活性的核糖的2'位置处的任何修饰。在一些实施方案中,修饰是2'-O-甲基修饰、2'-氟修饰、2'-氨基修饰、2'-脱氧修饰或2'-甲氧基乙氧基修饰。在一些实施方案中,修饰是2'-O-甲基修饰。在一些实施方案中,修饰是2'-氟修饰。在一些实施方案中,修饰是2'-氨基修饰。在一些实施方案中,修饰是2'-脱氧修饰。在一些实施方案中,修饰是2'-甲氧基乙氧基修饰。

[0120] 在一些实施方案中, U_2 的核糖修饰是2'-O-甲基修饰,并且 U_4 的核糖修饰是2'-O-甲基修饰。在一些实施方案中, U_2 的核糖修饰是2'-O-甲基修饰,并且 U_4 的核糖修饰是2'-氟修饰。在一些实施方案中, U_2 的核糖修饰是2'-O-甲基修饰,并且 U_4 的核糖修饰是2'-氨基修饰。在一些实施方案中, U_2 的核糖修饰是2'-O-甲基修饰,并且 U_4 的核糖修饰是2'-脱氧修饰。在一些实施方案中, U_2 的核糖修饰是2'-O-甲基修饰,并且 U_4 的核糖修饰是2'-甲氧基乙氧基修饰。在一

些实施方案中, U_2 的核糖修饰是2'-氟修饰, 并且 U_4 的核糖修饰是2'-O-甲基修饰。在一些实施方案中, U_2 的核糖修饰是2'-氟修饰, 并且 U_4 的核糖修饰是2'-氟修饰。在一些实施方案中, U_2 的核糖修饰是2'-氟修饰, 并且 U_4 的核糖修饰是2'-氨基修饰。在一些实施方案中, U_2 的核糖修饰是2'-氟修饰, 并且 U_4 的核糖修饰是2'-脱氧修饰。在一些实施方案中, U_2 的核糖修饰是2'-氟修饰, 并且 U_4 的核糖修饰是2'-甲氧基乙氧基修饰。在一些实施方案中, U_2 的核糖修饰是2'-氨基修饰, 并且 U_4 的核糖修饰是2'-O-甲基修饰。在一些实施方案中, U_2 的核糖修饰是2'-氨基修饰, 并且 U_4 的核糖修饰是2'-氟修饰。在一些实施方案中, U_2 的核糖修饰是2'-氨基修饰, 并且 U_4 的核糖修饰是2'-氨基修饰。在一些实施方案中, U_2 的核糖修饰是2'-氨基修饰, 并且 U_4 的核糖修饰是2'-脱氧修饰。在一些实施方案中, U_2 的核糖修饰是2'-氨基修饰, 并且 U_4 的核糖修饰是2'-甲氧基乙氧基修饰。在一些实施方案中, U_2 的核糖修饰是2'-脱氧修饰, 并且 U_4 的核糖修饰是2'-O-甲基修饰。在一些实施方案中, U_2 的核糖修饰是2'-脱氧修饰, 并且 U_4 的核糖修饰是2'-氟修饰。在一些实施方案中, U_2 的核糖修饰是2'-脱氧修饰, 并且 U_4 的核糖修饰是2'-氨基修饰。在一些实施方案中, U_2 的核糖修饰是2'-脱氧修饰, 并且 U_4 的核糖修饰是2'-脱氧修饰。在一些实施方案中, U_2 的核糖修饰是2'-脱氧修饰, 并且 U_4 的核糖修饰是2'-甲氧基乙氧基修饰。在一些实施方案中, U_2 的核糖修饰是2'-甲氧基乙氧基修饰, 并且 U_4 的核糖修饰是2'-O-甲基修饰。在一些实施方案中, U_2 的核糖修饰是2'-甲氧基乙氧基修饰, 并且 U_4 的核糖修饰是2'-氟修饰。在一些实施方案中, U_2 的核糖修饰是2'-甲氧基乙氧基修饰, 并且 U_4 的核糖修饰是2'-氨基修饰。在一些实施方案中, U_2 的核糖修饰是2'-甲氧基乙氧基修饰, 并且 U_4 的核糖修饰是2'-脱氧修饰。在一些实施方案中, U_2 的核糖修饰是2'-甲氧基乙氧基修饰, 并且 U_4 的核糖修饰是2'-甲氧基乙氧基修饰。

[0121] 在一些实施方案中, TLR7选择性基序包含SEQ ID NO:44的核苷酸序列。在一些实施方案中, TLR7选择性基序包含SEQ ID NO:45的核苷酸序列。在一些实施方案中, TLR7选择性基序包含SEQ ID NO:46的核苷酸序列。在一些实施方案中, TLR7选择性基序包含SEQ ID NO:47的核苷酸序列。

[0122] 在一些实施方案中, RNA配体进一步包含侧接TLR7选择性基序的5'端、TLR7选择性基序的3'端或两者的另外的核苷酸序列。在一些实施方案中, 另外的核苷酸序列不包含尿苷核苷。

[0123] 在一些实施方案中, RNA配体包含连接至TLR7选择性基序的5'端的第一核苷酸序列。在一些实施方案中, 第一核苷酸序列包含至少一个核苷。在一些实施方案中, 第一核苷酸序列包含至少两个核苷。在一些实施方案中, 第一核苷酸序列的核苷通过磷酸二酯键或硫代磷酸酯键连接。在一些实施方案中, 第一核苷酸序列的核苷通过硫代磷酸酯键连接。在一些实施方案中, 第一核苷酸序列包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、94、96、97、98、99、100或更多个核苷中的任一者, 或介于100与125个核苷、介于125与150个核苷、介于150与175个核苷、介于175与200个核苷、介于200与225个核苷、介于225与250个核苷、介于250与275个核苷、或介于275与300个核苷之间的任一者。在一些实施方案中, 第一核苷酸序列包含8个核苷。在一些实施方案中, 第一核苷酸序列包含SEQ ID NO:58

的核苷酸序列,或与SEQ ID NO:58具有至少约85%、至少约86%、至少约87%、至少约88%、至少约89%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或100%同一性的核苷酸序列。在一些实施方案中,第一核苷酸序列通过磷酸二酯键或硫代磷酸酯键连接至TLR7选择性基序的5'端。在一些实施方案中,第一核苷酸序列通过硫代磷酸酯键连接至TLR7选择性基序的5'端。

[0124] 在一些实施方案中,RNA配体包含连接至TLR7选择性基序的3'端的第二核苷酸序列。在一些实施方案中,第二核苷酸序列包含至少一个核苷。在一些实施方案中,第二核苷酸序列包含至少两个核苷。在一些实施方案中,第二核苷酸序列的核苷通过磷酸二酯键或硫代磷酸酯键连接。在一些实施方案中,第二核苷酸序列的核苷通过硫代磷酸酯键连接。在一些实施方案中,第二核苷酸序列包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100或更多个核苷中的任一者,或介于100与125个核苷、介于125与150个核苷、介于150与175个核苷、介于175与200个核苷、介于200与225个核苷、介于225与250个核苷、介于250与275个核苷、或介于275与300个核苷之间的任一者。在一些实施方案中,第二核苷酸序列包含2个核苷。在一些实施方案中,第二核苷酸序列包含SEQ ID NO:59的核苷酸序列,或与SEQ ID NO:59具有至少约85%、至少约86%、至少约87%、至少约88%、至少约89%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或100%同一性的核苷酸序列。在一些实施方案中,第二核苷酸序列通过磷酸二酯键或硫代磷酸酯键连接至TLR7选择性基序的3'端。在一些实施方案中,第二核苷酸序列通过硫代磷酸酯键连接至TLR7选择性基序的3'端。

[0125] 另一方面,本文提供包含TLR7选择性基序的RNA配体,该TLR7选择性基序包含SEQ ID NO:44、45、46和47的核苷酸序列。在一些实施方案中,RNA配体包含TLR7选择性基序,该TLR7选择性基序包含SEQ ID NO:44的核苷酸序列。在一些实施方案中,RNA配体包含TLR7选择性基序,该TLR7选择性基序包含SEQ ID NO:45的核苷酸序列。在一些实施方案中,RNA配体包含TLR7选择性基序,该TLR7选择性基序包含SEQ ID NO:46的核苷酸序列。在一些实施方案中,RNA配体包含TLR7选择性基序,该TLR7选择性基序包含SEQ ID NO:47的核苷酸序列。在一些实施方案中,RNA配体进一步包含侧接TLR7选择性基序的5'端、TLR7选择性基序的3'端或两者的另外的核苷酸序列。在一些实施方案中,另外的核苷酸序列不包含尿苷核苷。在一些实施方案中,RNA配体进一步包含连接至TLR7选择性基序的5'端的第一核苷酸序列。在一些实施方案中,RNA配体进一步包含连接至TLR7选择性基序的3'端的第二核苷酸序列。在一些实施方案中,第一核苷酸序列包含至少一个核苷。在一些实施方案中,第一核苷酸序列包含至少两个核苷。在一些实施方案中,第一核苷酸序列的核苷通过磷酸二酯键或硫代磷酸酯键连接。在一些实施方案中,第一核苷酸序列的核苷通过硫代磷酸酯键连接。在一些实施方案中,第一核苷酸序列包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、

93、94、94、96、97、98、99、100或更多个核苷中的任一者,或介于100与125个核苷、介于125与150个核苷、介于150与175个核苷、介于175与200个核苷、介于200与225个核苷、介于225与250个核苷、介于250与275个核苷、或介于275与300个核苷之间的任一者。在一些实施方案中,第一核苷酸序列包含8个核苷。在一些实施方案中,第一核苷酸序列包含SEQ ID NO:58的核苷酸序列,或与SEQ ID NO:58具有至少约85%、至少约86%、至少约87%、至少约88%、至少约89%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或100%同一性的核苷酸序列。在一些实施方案中,第一核苷酸序列通过磷酸二酯键或硫代磷酸酯键连接至TLR7选择性基序的5'端。在一些实施方案中,第一核苷酸序列通过硫代磷酸酯键连接至TLR7选择性基序的5'端。在一些实施方案中,第二核苷酸序列包含至少一个核苷。在一些实施方案中,第二核苷酸序列包含至少两个核苷。在一些实施方案中,第二核苷酸序列的核苷通过磷酸二酯键或硫代磷酸酯键连接。在一些实施方案中,第二核苷酸序列的核苷通过硫代磷酸酯键连接。在一些实施方案中,第二核苷酸序列包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、94、96、97、98、99、100或更多个核苷中的任一者,或介于100与125个核苷、介于125与150个核苷、介于150与175个核苷、介于175与200个核苷、介于200与225个核苷、介于225与250个核苷、介于250与275个核苷、或介于275与300个核苷之间的任一者。在一些实施方案中,第二核苷酸序列包含2个核苷。在一些实施方案中,第二核苷酸序列包含SEQ ID NO:59的核苷酸序列,或与SEQ ID NO:59具有至少约85%、至少约86%、至少约87%、至少约88%、至少约89%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或100%同一性的核苷酸序列。在一些实施方案中,第二核苷酸序列通过磷酸二酯键或硫代磷酸酯键连接至TLR7选择性基序的3'端。在一些实施方案中,第二核苷酸序列通过硫代磷酸酯键连接至TLR7选择性基序的3'端。

[0126] 另一方面,本文提供RNA配体,其包含与SEQ ID NO:12具有至少约85%、至少约86%、至少约87%、至少约88%、至少约89%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或100%同一性的核苷酸序列并且包含SEQ ID NO:44的TLR7选择性基序。在一些实施方案中,RNA配体包含SEQ ID NO:12的核苷酸序列。

[0127] 另一方面,本文提供RNA配体,其包含与SEQ ID NO:13具有至少约85%、至少约86%、至少约87%、至少约88%、至少约89%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或100%同一性的核苷酸序列并且包含SEQ ID NO:45的TLR7选择性基序。在一些实施方案中,RNA配体包含SEQ ID NO:13的核苷酸序列。

[0128] 另一方面,本文提供RNA配体,其包含与SEQ ID NO:14具有至少约85%、至少约86%、至少约87%、至少约88%、至少约89%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或100%同一性的核苷酸序列并且包含SEQ ID NO:46的TLR7选择性基序。在一些实施方案中,RNA配

体包含SEQ ID NO:14的核苷酸序列。

[0129] 另一方面,本文提供RNA配体,其包含与SEQ ID NO:15具有至少约85%、至少约86%、至少约87%、至少约88%、至少约89%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或100%同一性的核苷酸序列并且包含SEQ ID NO:47的TLR7选择性基序。在一些实施方案中,RNA配体包含SEQ ID NO:15的核苷酸序列。

[0130] 包含式III的TLR7选择性基序的RNA配体

[0131] 一方面,本文提供包含TLR7选择性基序的RNA配体,该TLR7选择性基序包含式III:

[0132] $C_1-U_2-C_3$ (式III),

[0133] 其中 C_1 和 C_3 为胞苷核苷并且 U_2 为尿苷核苷,并且其中“-”表示磷酸二酯键。

[0134] 在一些实施方案中, C_1 包含核糖的2'位置处的修饰。在一些实施方案中,修饰是本领域已知的或本文所述的核糖的2'位置处的任何修饰。在一些实施方案中,修饰是本领域已知的或本文所述的抑制或阻断RNA酶活性的核糖的2'位置处的任何修饰。在一些实施方案中,修饰是2'-O-甲基修饰、2'-氟修饰、2'-氨基修饰、2'-脱氧修饰或2'-甲氧基乙氧基修饰。在一些实施方案中,修饰是2'-O-甲基修饰。在一些实施方案中,修饰是2'-氟修饰。在一些实施方案中,修饰是2'-氨基修饰。在一些实施方案中,修饰是2'-脱氧修饰。在一些实施方案中,修饰是2'-甲氧基乙氧基修饰。

[0135] 在一些实施方案中,TLR7选择性基序包含SEQ ID NO:42的核苷酸序列。在一些实施方案中,TLR7选择性基序包含SEQ ID NO:43的核苷酸序列。

[0136] 在一些实施方案中,RNA配体进一步包含侧接TLR7选择性基序的5'端、TLR7选择性基序的3'端或两者的另外的核苷酸序列。在一些实施方案中,另外的核苷酸序列不包含尿苷核苷。

[0137] 在一些实施方案中,RNA配体进一步包含连接至TLR7选择性基序的5'端的第一核苷酸序列。在一些实施方案中,第一核苷酸序列不包含尿苷核苷。在一些实施方案中,第一核苷酸序列通过磷酸二酯键连接至TLR7选择性基序。在一些实施方案中,第一核苷酸序列包含至少一个核苷。在一些实施方案中,第一核苷酸序列包含至少两个核苷。在一些实施方案中,第一核苷酸序列包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100或更多个核苷中的任一者,或介于100与125个核苷、介于125与150个核苷、介于150与175个核苷、介于175与200个核苷、介于200与225个核苷、介于225与250个核苷、介于250与275个核苷、或介于275与300个核苷之间的任一者。在一些实施方案中,第一核苷酸序列包含三个核苷。在一些实施方案中,第一核苷酸序列内的核苷通过磷酸二酯键或硫代磷酸酯键连接。在一些实施方案中,第一核苷酸序列内的核苷通过磷酸二酯键连接。在一些实施方案中,第一核苷酸序列包含核苷酸序列C-G-G (SEQ ID NO:60),其中“-”表示磷酸二酯键。

[0138] 在一些实施方案中,RNA配体进一步包含连接至TLR7选择性基序的3'端的第二核苷酸序列。在一些实施方案中,第二核苷酸序列不包含尿苷核苷。在一些实施方案中,第二

核苷酸序列包含能够与第一核苷酸序列的全部或部分和/或TLR7选择性基序的全部或部分杂交的核苷酸序列。在一些实施方案中,第二核苷酸序列包含能够与第一核苷酸序列的全部或部分和/或TLR7选择性基序的全部或部分杂交的核苷酸序列,其中杂交的序列形成G:U摆动碱基对。在一些实施方案中,第二核苷酸序列包含核苷酸序列G-G-G (SEQ ID NO:69)。在一些实施方案中,核苷酸序列G-G-G (SEQ ID NO:69) 能够与TLR7选择性基序进行碱基配对。在一些实施方案中,核苷酸序列G-G-G (SEQ ID NO:69) 与TLR7选择性基序杂交并形成G:U摆动碱基对。在一些实施方案中,第二核苷酸序列通过磷酸二酯键连接至TLR7选择性基序。在一些实施方案中,第二核苷酸序列包含至少三个核苷。在一些实施方案中,第二核苷酸序列包含3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、94、96、97、98、99、100或更多个核苷中的任一者,或介于100与125个核苷、介于125与150个核苷、介于150与175个核苷、介于175与200个核苷、介于200与225个核苷、介于225与250个核苷、介于250与275个核苷、或介于275与300个核苷之间的任一者。在一些实施方案中,第二核苷酸序列包含15个核苷。在一些实施方案中,第二核苷酸序列内的核苷通过磷酸二酯键或硫代磷酸酯键连接。在一些实施方案中,第二核苷酸序列内的核苷通过磷酸二酯键连接。在一些实施方案中,第二核苷酸序列包含与SEQ ID NO:61具有至少约85%、至少约86%、至少约87%、至少约88%、至少约89%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或100%同一性的核苷酸序列并且包含SEQ ID NO:69的核苷酸序列,其中SEQ ID NO:69的核苷酸序列能够与TLR7选择性基序进行碱基配对。在一些实施方案中,第二核苷酸序列包含SEQ ID NO:61的核苷酸序列。

[0139] 在一些实施方案中, RNA配体能够采用双链RNA发夹结构。在一些实施方案中, RNA配体包含G:U摆动碱基对。

[0140] 在一些实施方案中, RNA配体包含SEQ ID NO:23的核苷酸序列。在一些实施方案中, RNA配体包含与SEQ ID NO:23具有至少约85%、至少约86%、至少约87%、至少约88%、至少约89%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或100%同一性的核苷酸序列并且包含SEQ ID NO:42的TLR7选择性基序和SEQ ID NO:69的核苷酸序列, 其中SEQ ID NO:69的核苷酸序列能够与TLR7选择性基序进行碱基配对。

[0141] 在一些实施方案中, RNA配体包含SEQ ID NO:24的核苷酸序列。在一些实施方案中, RNA配体包含与SEQ ID NO:24具有至少约85%、至少约86%、至少约87%、至少约88%、至少约89%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或100%同一性的核苷酸序列并且包含SEQ ID NO:43的TLR7选择性基序和SEQ ID NO:69的核苷酸序列, 其中SEQ ID NO:69的核苷酸序列能够与TLR7选择性基序进行碱基配对。

[0142] 另一方面, 本文提供包含TLR7选择性基序的RNA配体, 该TLR7选择性基序包含SEQ ID NO:42或43的核苷酸序列。在一些实施方案中, RNA配体进一步包含连接至TLR7选择性基序的5'端的第一核苷酸序列。在一些实施方案中, RNA配体进一步包含连接至TLR7选择性基

序的3'端的第二核苷酸序列。在一些实施方案中,第一核苷酸序列不包含尿苷核苷。在一些实施方案中,第一核苷酸序列通过磷酸二酯键连接至TLR7选择性基序。在一些实施方案中,第一核苷酸序列包含至少一个核苷。在一些实施方案中,第一核苷酸序列包含至少两个核苷。在一些实施方案中,第一核苷酸序列包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、94、96、97、98、99、100或更多个核苷中的任一者,或介于100与125个核苷、介于125与150个核苷、介于150与175个核苷、介于175与200个核苷、介于200与225个核苷、介于225与250个核苷、介于250与275个核苷、或介于275与300个核苷之间的任一者。在一些实施方案中,第一核苷酸序列包含三个核苷。在一些实施方案中,第一核苷酸序列内的核苷通过磷酸二酯键或硫代磷酸酯键连接。在一些实施方案中,第一核苷酸序列内的核苷通过磷酸二酯键连接。在一些实施方案中,第一核苷酸序列包含核苷酸序列C-G-G (SEQ ID NO:60), 其中“-”表示磷酸二酯键。在一些实施方案中,第二核苷酸序列不包含尿苷核苷。在一些实施方案中,第二核苷酸序列包含能够与第一核苷酸序列的全部或部分和/或TLR7选择性基序的全部或部分杂交的核苷酸序列。在一些实施方案中,第二核苷酸序列包含能够与第一核苷酸序列的全部或部分和/或TLR7选择性基序的全部或部分杂交的核苷酸序列,其中杂交的序列形成G:U摆动碱基对。在一些实施方案中,第二核苷酸序列包含核苷酸序列G-G-G (SEQ ID NO:69)。在一些实施方案中,核苷酸序列G-G-G (SEQ ID NO:69) 能够与TLR7选择性基序进行碱基配对。在一些实施方案中,核苷酸序列G-G-G (SEQ ID NO:69) 与TLR7选择性基序杂交并形成G:U摆动碱基对。在一些实施方案中,第二核苷酸序列通过磷酸二酯键连接至TLR7选择性基序。在一些实施方案中,第二核苷酸序列包含至少三个核苷。在一些实施方案中,第二核苷酸序列包含3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、94、96、97、98、99、100或更多个核苷中的任一者,或介于100与125个核苷、介于125与150个核苷、介于150与175个核苷、介于175与200个核苷、介于200与225个核苷、介于225与250个核苷、介于250与275个核苷、或介于275与300个核苷之间的任一者。在一些实施方案中,第二核苷酸序列包含15个核苷。在一些实施方案中,第二核苷酸序列内的核苷通过磷酸二酯键或硫代磷酸酯键连接。在一些实施方案中,第二核苷酸序列内的核苷通过磷酸二酯键连接。在一些实施方案中,第二核苷酸序列包含与SEQ ID NO:61具有至少约85%、至少约86%、至少约87%、至少约88%、至少约89%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或100%同一性的核苷酸序列并且包含SEQ ID NO:69的核苷酸序列,其中SEQ ID NO:69的核苷酸序列能够与TLR7选择性基序进行碱基配对。在一些实施方案中,第二核苷酸序列包含SEQ ID NO:61的核苷酸序列。在一些实施方案中,RNA配体能够采用双链RNA发夹结构。在一些实施方案中,RNA配体包含G:U摆动碱基对。

[0143] 另一方面,本文提供RNA配体,其包含与SEQ ID NO:23具有至少约85%、至少约

86%、至少约87%、至少约88%、至少约89%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或100%同一性的核苷酸序列并且包含SEQ ID NO:42的TLR7选择性基序和SEQ ID NO:69的核苷酸序列,其中SEQ ID NO:69的核苷酸序列能够与TLR7选择性基序进行碱基配对。在一些实施方案中,RNA配体能够采用双链RNA发夹结构。在一些实施方案中,RNA配体包含G:U摆动碱基对。

[0144] 另一方面,本文提供RNA配体,其包含与SEQ ID NO:24具有至少约85%、至少约86%、至少约87%、至少约88%、至少约89%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或100%同一性的核苷酸序列并且包含SEQ ID NO:43的TLR7选择性基序和SEQ ID NO:69的核苷酸序列,其中SEQ ID NO:69的核苷酸序列能够与TLR7选择性基序进行碱基配对。在一些实施方案中,RNA配体能够采用双链RNA发夹结构。在一些实施方案中,RNA配体包含G:U摆动碱基对。

[0145] 另一方面,本文提供包含SEQ ID NO:23或24的核苷酸序列的RNA配体。在一些实施方案中,RNA配体能够采用双链RNA发夹结构。在一些实施方案中,RNA配体包含G:U摆动碱基对。

[0146] 包含式IV的TLR7选择性基序的RNA配体

[0147] 一方面,本文提供包含一个或多个TLR7选择性基序的RNA配体,该TLR7选择性基序包含式IV:

[0148] $C_1-U_2-U_3-C_4$ (式IV),

[0149] 其中 C_1 和 C_4 为胞苷核苷并且 U_2 和 U_3 为尿苷核苷,并且“-”表示磷酸二酯键。

[0150] 在一些实施方案中,RNA配体包含:包含式IV的第一和第二TLR7选择性基序。

[0151] 在一些实施方案中,第一TLR7选择性基序的 U_2 包含核糖的2'位置处的修饰。在一些实施方案中,修饰是本领域已知的或本文所述的核糖的2'位置处的任何修饰。在一些实施方案中,修饰是本领域已知的或本文所述的抑制或阻断RNA酶活性的核糖的2'位置处的任何修饰。在一些实施方案中,修饰是2'-O-甲基修饰、2'-氟修饰、2'-氨基修饰、2'-脱氧修饰或2'-甲氧基乙氧基修饰。在一些实施方案中,修饰是2'-O-甲基修饰。在一些实施方案中,修饰是2'-氟修饰。在一些实施方案中,修饰是2'-氨基修饰。在一些实施方案中,修饰是2'-脱氧修饰。在一些实施方案中,修饰是2'-甲氧基乙氧基修饰。

[0152] 在一些实施方案中,第二TLR7选择性基序的 U_2 包含核糖的2'位置处的修饰。在一些实施方案中,修饰是本领域已知的或本文所述的核糖的2'位置处的任何修饰。在一些实施方案中,修饰是本领域已知的或本文所述的抑制或阻断RNA酶活性的核糖的2'位置处的任何修饰。在一些实施方案中,修饰是2'-O-甲基修饰、2'-氟修饰、2'-氨基修饰、2'-脱氧修饰或2'-甲氧基乙氧基修饰。在一些实施方案中,修饰是2'-O-甲基修饰。在一些实施方案中,修饰是2'-氟修饰。在一些实施方案中,修饰是2'-氨基修饰。在一些实施方案中,修饰是2'-脱氧修饰。在一些实施方案中,修饰是2'-甲氧基乙氧基修饰。

[0153] 在一些实施方案中,第一TLR7选择性基序的 U_2 包含2'-O-甲基修饰,并且第二TLR7选择性基序的 U_2 包含2'-O-甲基修饰。在一些实施方案中,第一TLR7选择性基序的 U_2 包含2'-O-甲基修饰,并且第二TLR7选择性基序的 U_2 包含2'-氟修饰。在一些实施方案中,第一TLR7选

择性基序的U₂包含2'-O-甲基修饰,并且第二TLR7选择性基序的U₂包含2'-氨基修饰。在一些实施方案中,第一TLR7选择性基序的U₂包含2'-O-甲基修饰,并且第二TLR7选择性基序的U₂包含2'-脱氧修饰。在一些实施方案中,第一TLR7选择性基序的U₂包含2'-O-甲基修饰,并且第二TLR7选择性基序的U₂包含2'-甲氧基乙氧基修饰。在一些实施方案中,第一TLR7选择性基序的U₂包含2'-氟修饰,并且第二TLR7选择性基序的U₂包含2'-O-甲基修饰。在一些实施方案中,第一TLR7选择性基序的U₂包含2'-氟修饰,并且第二TLR7选择性基序的U₂包含2'-氟修饰。在一些实施方案中,第一TLR7选择性基序的U₂包含2'-氨基修饰,并且第二TLR7选择性基序的U₂包含2'-氟修饰,并且第二TLR7选择性基序的U₂包含2'-脱氧修饰。在一些实施方案中,第一TLR7选择性基序的U₂包含2'-氟修饰,并且第二TLR7选择性基序的U₂包含2'-甲氧基乙氧基修饰。在一些实施方案中,第一TLR7选择性基序的U₂包含2'-氨基修饰,并且第二TLR7选择性基序的U₂包含2'-O-甲基修饰。在一些实施方案中,第一TLR7选择性基序的U₂包含2'-氨基修饰,并且第二TLR7选择性基序的U₂包含2'-氟修饰。在一些实施方案中,第一TLR7选择性基序的U₂包含2'-氨基修饰,并且第二TLR7选择性基序的U₂包含2'-氨基修饰。在一些实施方案中,第一TLR7选择性基序的U₂包含2'-氨基修饰,并且第二TLR7选择性基序的U₂包含2'-脱氧修饰。在一些实施方案中,第一TLR7选择性基序的U₂包含2'-氨基修饰,并且第二TLR7选择性基序的U₂包含2'-甲氧基乙氧基修饰。在一些实施方案中,第一TLR7选择性基序的U₂包含2'-脱氧修饰,并且第二TLR7选择性基序的U₂包含2'-O-甲基修饰。在一些实施方案中,第一TLR7选择性基序的U₂包含2'-脱氧修饰,并且第二TLR7选择性基序的U₂包含2'-氟修饰。在一些实施方案中,第一TLR7选择性基序的U₂包含2'-脱氧修饰,并且第二TLR7选择性基序的U₂包含2'-氨基修饰。在一些实施方案中,第一TLR7选择性基序的U₂包含2'-脱氧修饰,并且第二TLR7选择性基序的U₂包含2'-脱氧修饰。在一些实施方案中,第一TLR7选择性基序的U₂包含2'-脱氧修饰,并且第二TLR7选择性基序的U₂包含2'-甲氧基乙氧基修饰。在一些实施方案中,第一TLR7选择性基序的U₂包含2'-甲氧基乙氧基修饰,并且第二TLR7选择性基序的U₂包含2'-O-甲基修饰。在一些实施方案中,第一TLR7选择性基序的U₂包含2'-甲氧基乙氧基修饰,并且第二TLR7选择性基序的U₂包含2'-氟修饰。在一些实施方案中,第一TLR7选择性基序的U₂包含2'-甲氧基乙氧基修饰,并且第二TLR7选择性基序的U₂包含2'-氨基修饰。在一些实施方案中,第一TLR7选择性基序的U₂包含2'-甲氧基乙氧基修饰,并且第二TLR7选择性基序的U₂包含2'-脱氧修饰。在一些实施方案中,第一TLR7选择性基序的U₂包含2'-甲氧基乙氧基修饰,并且第二TLR7选择性基序的U₂包含2'-甲氧基乙氧基修饰。

[0154] 在一些实施方案中,第一TLR7选择性基序包含SEQ ID NO:36的核苷酸序列。在一些实施方案中,第二TLR7选择性基序包含SEQ ID NO:36的核苷酸序列。在一些实施方案中,第一TLR7选择性基序包含SEQ ID NO:37的核苷酸序列。在一些实施方案中,第二TLR7选择性基序包含SEQ ID NO:37的核苷酸序列。在一些实施方案中,第一TLR7选择性基序包含SEQ ID NO:36的核苷酸序列并且第二TLR7选择性基序包含SEQ ID NO:37的核苷酸序列。在一些实施方案中,第一TLR7选择性基序包含SEQ ID NO:37的核苷酸序列并且第二TLR7选择性基序包含SEQ ID NO:36的核苷酸序列。

[0155] 在一些实施方案中,RNA配体进一步包含侧接TLR7选择性基序的5'端、TLR7选择性基序的3'端或两者的一种或多种另外的核苷酸序列。在一些实施方案中,另外的核苷酸序

列不包含尿苷核苷。

[0156] 在一些实施方案中, RNA配体进一步包含连接至第一TLR7选择性基序的5'端的第一核苷酸序列。在一些实施方案中, 第一核苷酸序列包含至少一个核苷。在一些实施方案中, 第一核苷酸序列包含至少两个核苷。在一些实施方案中, 第一核苷酸序列包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100或更多个核苷中的任一者, 或介于100与125个核苷、介于125与150个核苷、介于150与175个核苷、介于175与200个核苷、介于200与225个核苷、介于225与250个核苷、介于250与275个核苷、或介于275与300个核苷之间的任一者。在一些实施方案中, 第一核苷酸序列包含五个核苷。在一些实施方案中, 第一核苷酸序列不包含尿苷核苷。在一些实施方案中, 第一核苷酸序列通过磷酸二酯键连接至第一TLR7选择性基序。在一些实施方案中, 第一核苷酸序列内的核苷通过磷酸二酯键或硫代磷酸酯键连接。在一些实施方案中, 第一核苷酸序列内的核苷通过磷酸二酯键连接。在一些实施方案中, 第一核苷酸序列包含核苷酸序列C-A-G-A-C (SEQ ID NO:67), 或与SEQ ID NO:67具有至少约85%、至少约86%、至少约87%、至少约88%、至少约89%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或100%同一性的核苷酸序列, 其中“-”表示磷酸二酯键。

[0157] 在一些实施方案中, RNA配体进一步包含连接至第一TLR7选择性基序的3'端和连接至第二TLR7选择性基序的5'端的第二核苷酸序列。在一些实施方案中, 第二核苷酸序列包含至少一个核苷。在一些实施方案中, 第二核苷酸序列包含至少两个核苷。在一些实施方案中, 第二核苷酸序列包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100或更多个核苷中的任一者, 或介于100与125个核苷、介于125与150个核苷、介于150与175个核苷、介于175与200个核苷、介于200与225个核苷、介于225与250个核苷、介于250与275个核苷、或介于275与300个核苷之间的任一者。在一些实施方案中, 第二核苷酸序列包含五个核苷。在一些实施方案中, 第二核苷酸序列不包含尿苷核苷。在一些实施方案中, 第二核苷酸序列通过磷酸二酯键连接至第一和/或连接至第二TLR7选择性基序。在一些实施方案中, 第二核苷酸序列内的核苷通过磷酸二酯键或硫代磷酸酯键连接。在一些实施方案中, 第二核苷酸序列内的核苷通过磷酸二酯键连接。在一些实施方案中, 第二核苷酸序列包含与SEQ ID NO:67具有至少约85%、至少约86%、至少约87%、至少约88%、至少约89%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或100%同一性的核苷酸序列。在一些实施方案中, 第二核苷酸序列包含SEQ ID NO:67的核苷酸序列。

[0158] 在一些实施方案中, RNA配体包含与SEQ ID NO:33具有至少约85%、至少约86%、至少约87%、至少约88%、至少约89%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或100%同一

性的核苷酸序列并且包含SEQ ID NO:36的第一TLR7选择性基序和/或SEQ ID NO:36的第二TLR7选择性基序。在一些实施方案中, RNA配体包含SEQ ID NO:33的核苷酸序列。在一些实施方案中, RNA配体包含与SEQ ID NO:34具有至少约85%、至少约86%、至少约87%、至少约88%、至少约89%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或100%同一性的核苷酸序列并且包含SEQ ID NO:37的第一TLR7选择性基序和/或SEQ ID NO:37的第二TLR7选择性基序。

[0159] 另一方面, 本文提供包含第一TLR7选择性基序的RNA配体, 该第一TLR7选择性基序包含SEQ ID NO:36或37的核苷酸序列。在一些实施方案中, RNA配体进一步包含第二TLR7选择性基序, 该第二TLR7选择性基序包含SEQ ID NO:36或37的核苷酸序列。在一些实施方案中, RNA配体进一步包含连接至第一TLR7选择性基序的5'端的第一核苷酸序列。在一些实施方案中, RNA配体进一步包含连接至第一TLR7选择性基序的3'端和连接至第二TLR7选择性基序的5'端的第二核苷酸序列。在一些实施方案中, RNA配体包含: 包含SEQ ID NO:36的核苷酸序列的第一TLR7选择性基序和包含SEQ ID NO:36的核苷酸序列的第二TLR7选择性基序。在一些实施方案中, RNA配体包含: 包含SEQ ID NO:36的核苷酸序列的第一TLR7选择性基序和包含SEQ ID NO:37的核苷酸序列的第二TLR7选择性基序。在一些实施方案中, RNA配体包含: 包含SEQ ID NO:37的核苷酸序列的第一TLR7选择性基序和包含SEQ ID NO:37的核苷酸序列的第二TLR7选择性基序。在一些实施方案中, RNA配体包含: 包含SEQ ID NO:37的核苷酸序列的第一TLR7选择性基序和包含SEQ ID NO:36的核苷酸序列的第二TLR7选择性基序。在一些实施方案中, 第一核苷酸序列包含至少一个核苷。在一些实施方案中, 第一核苷酸序列包含至少两个核苷。在一些实施方案中, 第一核苷酸序列包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100或更多个核苷中的任一者, 或介于100与125个核苷、介于125与150个核苷、介于150与175个核苷、介于175与200个核苷、介于200与225个核苷、介于225与250个核苷、介于250与275个核苷、或介于275与300个核苷之间的任一者。在一些实施方案中, 第一核苷酸序列包含五个核苷。在一些实施方案中, 第一核苷酸序列不包含尿苷核苷。在一些实施方案中, 第一核苷酸序列通过磷酸二酯键连接至第一TLR7选择性基序。在一些实施方案中, 第一核苷酸序列内的核苷通过磷酸二酯键或硫代磷酸酯键连接。在一些实施方案中, 第一核苷酸序列内的核苷通过磷酸二酯键连接。在一些实施方案中, 第一核苷酸序列包含核苷酸序列C-A-G-A-C (SEQ ID NO:67), 或与SEQ ID NO:67具有至少约85%、至少约86%、至少约87%、至少约88%、至少约89%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或100%同一性的核苷酸序列, 其中“-”表示磷酸二酯键。在一些实施方案中, 第二核苷酸序列包含至少一个核苷。在一些实施方案中, 第二核苷酸序列包含至少两个核苷。在一些实施方案中, 第二核苷酸序列包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、

90、91、92、93、94、94、96、97、98、99、100或更多个核苷中的任一者,或介于100与125个核苷、介于125与150个核苷、介于150与175个核苷、介于175与200个核苷、介于200与225个核苷、介于225与250个核苷、介于250与275个核苷、或介于275与300个核苷之间的任一者。在一些实施方案中,第二核苷酸序列包含五个核苷。在一些实施方案中,第二核苷酸序列不包含尿苷核苷。在一些实施方案中,第二核苷酸序列通过磷酸二酯键连接至第一和/或连接至第二TLR7选择性基序。在一些实施方案中,第二核苷酸序列内的核苷通过磷酸二酯键或硫代磷酸酯键连接。在一些实施方案中,第二核苷酸序列内的核苷通过磷酸二酯键连接。在一些实施方案中,第二核苷酸序列包含与SEQ ID NO:67具有至少约85%、至少约86%、至少约87%、至少约88%、至少约89%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或100%同一性的核苷酸序列。在一些实施方案中,第二核苷酸序列包含SEQ ID NO:67的核苷酸序列。

[0160] 另一方面,本文提供RNA配体,其包含与SEQ ID NO:33具有至少约85%、至少约86%、至少约87%、至少约88%、至少约89%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或100%同一性的核苷酸序列并且包含SEQ ID NO:36的第一和第二TLR7选择性基序。

[0161] 另一方面,本文提供RNA配体,其包含与SEQ ID NO:34具有至少约85%、至少约86%、至少约87%、至少约88%、至少约89%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或100%同一性的核苷酸序列并且包含SEQ ID NO:37的第一和第二TLR7选择性基序。

[0162] 另一方面,本文提供包含SEQ ID NO:33的核苷酸序列的RNA配体。另一方面,本文提供包含SEQ ID NO:34的核苷酸序列的RNA配体。

[0163] 包含式V的TLR7选择性基序的RNA配体

[0164] 一方面,本文提供包含一个或多个TLR7选择性基序的RNA配体,该TLR7选择性基序包含式V:

[0165] $U_1-U_2-C_3$ (式V),

[0166] 其中 U_1 和 U_2 为尿苷核苷并且 C_3 为胞苷核苷,并且“-”表示磷酸二酯键。

[0167] 在一些实施方案中,RNA配体包含:包含式V的第一TLR7选择性基序和一个或多个包含式V的另外的TLR7选择性基序。在一些实施方案中,RNA配体包含:包含式V的第一TLR7选择性基序和1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个包含式V的另外的TLR7选择性基序。在一些实施方案中,RNA配体包含:包含式V的第一TLR7选择性基序和五个包含式V的另外的TLR7选择性基序。

[0168] 在一些实施方案中,第一TLR7选择性基序的3'端连接至第二TLR7选择性基序的5'端;第二TLR7选择性基序的3'端连接至第三TLR7选择性基序的5'端;第三TLR7选择性基序的3'端连接至第四TLR7选择性基序的5'端;第四TLR7选择性基序的3'端连接至第五TLR7选择性基序的5'端;并且第五TLR7选择性基序的3'端连接至第六TLR7选择性基序的5'端。

[0169] 在一些实施方案中,包含式V的一个或多个TLR7选择性基序的 U_1 包含在核糖的2'位置处的修饰。在一些实施方案中,修饰是本领域已知的或本文所述的核糖的2'位置处的任何修饰。在一些实施方案中,修饰是本领域已知的或本文所述的抑制或阻断RNA酶活性的核糖的2'位置处的任何修饰。在一些实施方案中,修饰是2'-O-甲基修饰、2'-氟修饰、2'-氨

基修饰、2'-脱氧修饰或2'-甲氧基乙氧基修饰。在一些实施方案中,修饰是2'-O-甲基修饰。在一些实施方案中,修饰是2'-氟修饰。在一些实施方案中,修饰是2'-氨基修饰。在一些实施方案中,修饰是2'-脱氧修饰。在一些实施方案中,修饰是2'-甲氧基乙氧基修饰。在一些实施方案中,RNA配体内包含式V的每个TLR7选择性基序在核糖的2'位置处包含相同的修饰。在一些实施方案中,RNA配体内包含式V的每个TLR7选择性基序可以以任意组合包含本文所述或本领域已知的核糖的2'位置处的任何修饰。在一些实施方案中,第一TLR7选择性基序的 U_1 包含本领域已知或本文所述的核糖的2'位置处的任何修饰。在一些实施方案中,第一TLR7选择性基序的 U_1 包含2'-O-甲基修饰、2'-氟修饰、2'-氨基修饰、2'-脱氧修饰或2'-甲氧基乙氧基修饰。在一些实施方案中,RNA配体内的第二TLR7选择性基序和任何一个或多个另外的TLR7选择性基序的 U_1 包含本领域已知的或本文所述的核糖的2'位置处的任何修饰。在一些实施方案中,RNA配体内的第二TLR7选择性基序和任何一个或多个另外的TLR7选择性基序的 U_1 包含2'-O-甲基修饰、2'-氟修饰、2'-氨基修饰、2'-脱氧修饰或2'-甲氧基乙氧基修饰。

[0170] 在一些实施方案中,RNA配体包含六个包含式V的TLR7选择性基序。在一些实施方案中,第一TLR7选择性基序的 U_1 包含在本领域已知的或本文所述的核糖的2'位置处的任何修饰。在一些实施方案中,第一TLR7选择性基序的 U_1 包含2'-O-甲基修饰、2'-氟修饰、2'-氨基修饰、2'-脱氧修饰或2'-甲氧基乙氧基修饰。在一些实施方案中,第二TLR7选择性基序的 U_1 包含本领域已知或本文所述的核糖的2'位置处的任何修饰。在一些实施方案中,第二TLR7选择性基序的 U_1 包含2'-O-甲基修饰、2'-氟修饰、2'-氨基修饰、2'-脱氧修饰或2'-甲氧基乙氧基修饰。在一些实施方案中,第三TLR7选择性基序的 U_1 包含本领域已知或本文所述的核糖的2'位置处的任何修饰。在一些实施方案中,第三TLR7选择性基序的 U_1 包含2'-O-甲基修饰、2'-氟修饰、2'-氨基修饰、2'-脱氧修饰或2'-甲氧基乙氧基修饰。在一些实施方案中,第四TLR7选择性基序的 U_1 包含本领域已知或本文所述的核糖的2'位置处的任何修饰。在一些实施方案中,第四TLR7选择性基序的 U_1 包含2'-O-甲基修饰、2'-氟修饰、2'-氨基修饰、2'-脱氧修饰或2'-甲氧基乙氧基修饰。在一些实施方案中,第五TLR7选择性基序的 U_1 包含本领域已知或本文所述的核糖的2'位置处的任何修饰。在一些实施方案中,第五TLR7选择性基序的 U_1 包含2'-O-甲基修饰、2'-氟修饰、2'-氨基修饰、2'-脱氧修饰或2'-甲氧基乙氧基修饰。在一些实施方案中,第六TLR7选择性基序的 U_1 包含本领域已知或本文所述的核糖的2'位置处的任何修饰。在一些实施方案中,第六TLR7选择性基序的 U_1 包含2'-O-甲基修饰、2'-氟修饰、2'-氨基修饰、2'-脱氧修饰或2'-甲氧基乙氧基修饰。

[0171] 在一些实施方案中,RNA配体包含六个包含式V的TLR7选择性基序。在一些实施方案中,第一TLR7选择性基序的 U_1 包含2'-O-甲基修饰,第二TLR7选择性基序的 U_1 包含2'-O-甲基修饰,第三TLR7选择性基序的 U_1 包含2'-O-甲基修饰,第四TLR7选择性基序的 U_1 包含2'-O-甲基修饰,第五TLR7选择性基序的 U_1 包含2'-O-甲基修饰,并且第六TLR7选择性基序的 U_1 包含2'-O-甲基修饰。

[0172] 在一些实施方案中,RNA配体包含六个包含式V的TLR7选择性基序。在一些实施方案中,第一TLR7选择性基序的 U_1 包含2'-氟修饰,第二TLR7选择性基序的 U_1 包含2'-氟修饰,第三TLR7选择性基序的 U_1 包含2'-氟修饰,第四TLR7选择性基序的 U_1 包含2'-氟修饰,第五TLR7选择性基序的 U_1 包含2'-氟修饰,并且第六TLR7选择性基序的 U_1 包含2'-氟修饰。

[0173] 在一些实施方案中,第一TLR7选择性基序包含SEQ ID NO:40的核苷酸序列。在一些实施方案中,一个或多个另外的TLR7选择性基序中的至少一者(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个另外的TLR7选择性基序中的任一者),或一个或多个另外的TLR7选择性基序中的所有(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个另外的TLR7选择性基序中的任一者)包含SEQ ID NO:40的核苷酸序列。

[0174] 在一些实施方案中,第一TLR7选择性基序包含SEQ ID NO:41的核苷酸序列。在一些实施方案中,一个或多个另外的TLR7选择性基序中的至少一者(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个另外的TLR7选择性基序中的任一者),或一个或多个另外的TLR7选择性基序中的所有(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个另外的TLR7选择性基序中的任一者)包含SEQ ID NO:41的核苷酸序列。

[0175] 在一些实施方案中,第一TLR7选择性基序包含SEQ ID NO:40的核苷酸序列。在一些实施方案中,RNA配体包含一个或多个另外的TLR7选择性基序(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个另外的TLR7选择性基序中的任一者),该TLR7选择性基序包含SEQ ID NO:40和SEQ ID NO:41的核苷酸序列的任意组合。

[0176] 在一些实施方案中,第一TLR7选择性基序包含SEQ ID NO:41的核苷酸序列。在一些实施方案中,RNA配体包含一个或多个另外的TLR7选择性基序(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个另外的TLR7选择性基序中的任一者),该TLR7选择性基序包含SEQ ID NO:40和SEQ ID NO:41的核苷酸序列的任意组合。

[0177] 在一些实施方案中,RNA配体进一步包含侧接TLR7选择性基序中的一者或多者的5'端、TLR7选择性基序中的一者或多者的3'端、或两者的一种或多种另外的核苷酸序列。在一些实施方案中,另外的核苷酸序列不包含尿苷核苷。

[0178] 在一些实施方案中,RNA配体包含连接至第一TLR7选择性基序的5'端的第一核苷酸序列。在一些实施方案中,第一核苷酸序列包含至少一个核苷。在一些实施方案中,第一核苷酸序列包含至少两个核苷。在一些实施方案中,第一核苷酸序列包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、94、96、97、98、99、100或更多个核苷中的任一者,或介于100与125个核苷、介于125与150个核苷、介于150与175个核苷、介于175与200个核苷、介于200与225个核苷、介于225与250个核苷、介于250与275个核苷、或介于275与300个核苷之间的任一者。在一些实施方案中,第一核苷酸序列包含两个核苷。在一些实施方案中,第一核苷酸序列不包含尿苷核苷。在一些实施方案中,第一核苷酸序列通过磷酸二酯键连接至第一TLR7选择性基序。在一些实施方案中,第一核苷酸序列内的核苷通过磷酸二酯键或硫代磷酸酯键连接。在一些实施方案中,第一核苷酸序列内的核苷通过磷酸二酯键连接。在一些实施方案中,第一核苷酸序列包含两个胞苷核苷。

[0179] 在一些实施方案中,RNA配体包含与SEQ ID NO:29具有至少约85%、至少约86%、至少约87%、至少约88%、至少约89%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或100%同一性的核苷酸序列并且包含SEQ ID NO:40的第一TLR7选择性基序和五个SEQ ID NO:40的另

外的TLR7选择性基序。在一些实施方案中, RNA配体包含SEQ ID NO:29的核苷酸序列。

[0180] 在一些实施方案中, RNA配体包含与SEQ ID NO:30具有至少约85%、至少约86%、至少约87%、至少约88%、至少约89%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或100%同一性的核苷酸序列并且包含SEQ ID NO:41的第一TLR7选择性基序和五个SEQ ID NO:41的另外的TLR7选择性基序。在一些实施方案中, RNA配体包含SEQ ID NO:30的核苷酸序列。

[0181] 另一方面, 本文提供包含第一TLR7选择性基序的RNA配体, 该第一TLR7选择性基序包含SEQ ID NO:40或41的核苷酸序列。在一些实施方案中, RNA配体包含一个或多个另外的TLR7选择性基序, 其中一个或多个另外的TLR7选择性基序中的至少一者、或一个或多个另外的TLR7选择性基序中的所有包含SEQ ID NO:40或41的核苷酸序列。在一些实施方案中, RNA配体包含连接至第一TLR7选择性基序的5'端的第一核苷酸序列。在一些实施方案中, RNA配体包含第一TLR7选择性基序和1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个另外的TLR7选择性基序。在一些实施方案中, RNA配体包含第一TLR7选择性基序和五个另外的TLR7选择性基序。在一些实施方案中, RNA配体内的TLR7选择性基序包含SEQ ID NO:40和SEQ ID NO:41的核苷酸序列的任意组合。在一些实施方案中, RNA配体内的TLR7选择性基序包含SEQ ID NO:40的核苷酸序列。在一些实施方案中, RNA配体内的TLR7选择性基序包含SEQ ID NO:41的核苷酸序列。在一些实施方案中, 第一核苷酸序列包含至少一个核苷。在一些实施方案中, 第一核苷酸序列包含至少两个核苷。在一些实施方案中, 第一核苷酸序列包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、96、97、98、99、100或更多个核苷中的任一者, 或介于100与125个核苷、介于125与150个核苷、介于150与175个核苷、介于175与200个核苷、介于200与225个核苷、介于225与250个核苷、介于250与275个核苷、或介于275与300个核苷之间的任一者。在一些实施方案中, 第一核苷酸序列包含两个核苷。在一些实施方案中, 第一核苷酸序列不包含尿苷核苷。在一些实施方案中, 第一核苷酸序列通过磷酸二酯键连接至第一TLR7选择性基序。在一些实施方案中, 第一核苷酸序列内的核苷通过磷酸二酯键或硫代磷酸酯键连接。在一些实施方案中, 第一核苷酸序列内的核苷通过磷酸二酯键连接。在一些实施方案中, 第一核苷酸序列包含两个胞苷核苷。

[0182] 另一方面, 本文提供RNA配体, 其包含与SEQ ID NO:29具有至少约85%、至少约86%、至少约87%、至少约88%、至少约89%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或100%同一性的核苷酸序列并且包含六个SEQ ID NO:40的TLR7选择性基序。

[0183] 另一方面, 本文提供RNA配体, 其包含与SEQ ID NO:30具有至少约85%、至少约86%、至少约87%、至少约88%、至少约89%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或100%同一性的核苷酸序列并且包含六个SEQ ID NO:41的TLR7选择性基序。

[0184] 另一方面, 本文提供包含SEQ ID NO:29或30的核苷酸序列的RNA配体。在一些实施方案中, RNA配体包含SEQ ID NO:29的核苷酸序列。在一些实施方案中, RNA配体包含SEQ ID

NO:30的核苷酸序列。

[0185] 包含式VI的TLR7选择性基序的RNA配体

[0186] 一方面,本文提供包含TLR7选择性基序的RNA配体,该TLR7选择性基序包含式VI:

[0187] $C_1-U_2-U_3*U_4-U_5*C_6$ (式VI),

[0188] 其中 C_1 和 C_6 为胞苷核苷,并且 U_2 、 U_3 、 U_4 和 U_5 为尿苷核苷,其中“*”表示硫代磷酸酯键,并且“-”表示磷酸二酯键。

[0189] 在一些实施方案中, U_4 包含核糖的2'位置处的修饰。在一些实施方案中,修饰是本领域已知的或本文所述的核糖的2'位置处的任何修饰。在一些实施方案中,修饰是本领域已知的或本文所述的抑制或阻断RNA酶活性的核糖的2'位置处的任何修饰。在一些实施方案中,修饰是2'-O-甲基修饰、2'-氟修饰、2'-氨基修饰、2'-脱氧修饰或2'甲氧基乙氧基修饰。在一些实施方案中,修饰是2'-O-甲基修饰。在一些实施方案中,修饰是2'-氟修饰。在一些实施方案中,修饰是2'-氨基修饰。在一些实施方案中,修饰是2'-脱氧修饰。在一些实施方案中,修饰是2'甲氧基乙氧基修饰。

[0190] 在一些实施方案中, U_4 包含核糖的2'位置处的修饰。在一些实施方案中,修饰是本领域已知的或本文所述的核糖的2'位置处的任何修饰。在一些实施方案中,修饰是本领域已知的或本文所述的抑制或阻断RNA酶活性的核糖的2'位置处的任何修饰。在一些实施方案中,修饰是2'-O-甲基修饰、2'-氟修饰、2'-氨基修饰、2'-脱氧修饰或2'甲氧基乙氧基修饰。在一些实施方案中,修饰是2'-O-甲基修饰。在一些实施方案中,修饰是2'-氟修饰。在一些实施方案中,修饰是2'-氨基修饰。在一些实施方案中,修饰是2'-脱氧修饰。在一些实施方案中,修饰是2'甲氧基乙氧基修饰。

[0191] 在一些实施方案中, U_2 的核糖修饰是2'-O-甲基修饰,并且 U_4 的核糖修饰是2'-O-甲基修饰。在一些实施方案中, U_2 的核糖修饰是2'-O-甲基修饰,并且 U_4 的核糖修饰是2'-氟修饰。在一些实施方案中, U_2 的核糖修饰是2'-O-甲基修饰,并且 U_4 的核糖修饰是2'-氨基修饰。在一些实施方案中, U_2 的核糖修饰是2'-O-甲基修饰,并且 U_4 的核糖修饰是2'-脱氧修饰。在一些实施方案中, U_2 的核糖修饰是2'-O-甲基修饰,并且 U_4 的核糖修饰是2'甲氧基乙氧基修饰。在一些实施方案中, U_2 的核糖修饰是2'-氟修饰,并且 U_4 的核糖修饰是2'-O-甲基修饰。在一些实施方案中, U_2 的核糖修饰是2'-氟修饰,并且 U_4 的核糖修饰是2'-氟修饰。在一些实施方案中, U_2 的核糖修饰是2'-氟修饰,并且 U_4 的核糖修饰是2'-氨基修饰。在一些实施方案中, U_2 的核糖修饰是2'-氟修饰,并且 U_4 的核糖修饰是2'-脱氧修饰。在一些实施方案中, U_2 的核糖修饰是2'-氟修饰,并且 U_4 的核糖修饰是2'甲氧基乙氧基修饰。在一些实施方案中, U_2 的核糖修饰是2'-氨基修饰,并且 U_4 的核糖修饰是2'-O-甲基修饰。在一些实施方案中, U_2 的核糖修饰是2'-氨基修饰,并且 U_4 的核糖修饰是2'-氟修饰。在一些实施方案中, U_2 的核糖修饰是2'-氨基修饰,并且 U_4 的核糖修饰是2'-氨基修饰。在一些实施方案中, U_2 的核糖修饰是2'-氨基修饰,并且 U_4 的核糖修饰是2'-脱氧修饰。在一些实施方案中, U_2 的核糖修饰是2'-氨基修饰,并且 U_4 的核糖修饰是2'-甲氧基乙氧基修饰。在一些实施方案中, U_2 的核糖修饰是2'-脱氧修饰,并且 U_4 的核糖修饰是2'-O-甲基修饰。在一些实施方案中, U_2 的核糖修饰是2'-脱氧修饰,并且 U_4 的核糖修饰是2'-氟修饰。在一些实施方案中, U_2 的核糖修饰是2'-脱氧修饰,并且 U_4 的核糖修饰是2'-氨基修饰。在一些实施方案中, U_2 的核糖修饰是2'-脱氧修饰,并且 U_4 的核糖修饰是2'-脱氧修饰。在一些实施方案中, U_2 的核糖修饰是2'-脱氧修饰,并且 U_4 的核糖修饰是2'

甲氧基乙氧基修饰。在一些实施方案中, U_2 的核糖修饰是 2' 甲氧基乙氧基修饰, 并且 U_4 的核糖修饰是 2'-O-甲基修饰。在一些实施方案中, U_2 的核糖修饰是 2' 甲氧基乙氧基修饰, 并且 U_4 的核糖修饰是 2'-氟修饰。在一些实施方案中, U_2 的核糖修饰是 2' 甲氧基乙氧基修饰, 并且 U_4 的核糖修饰是 2'-氨基修饰。在一些实施方案中, U_2 的核糖修饰是 2' 甲氧基乙氧基修饰, 并且 U_4 的核糖修饰是 2'-脱氧修饰。在一些实施方案中, U_2 的核糖修饰是 2' 甲氧基乙氧基修饰, 并且 U_4 的核糖修饰是 2' 甲氧基乙氧基修饰。

[0192] 在一些实施方案中, TLR7 选择性基序包含 SEQ ID NO:48 的核苷酸序列。在一些实施方案中, TLR7 选择性基序包含 SEQ ID NO:49 的核苷酸序列。在一些实施方案中, TLR7 选择性基序包含 SEQ ID NO:50 的核苷酸序列。在一些实施方案中, TLR7 选择性基序包含 SEQ ID NO:51 的核苷酸序列。

[0193] 在一些实施方案中, RNA 配体进一步包含侧接 TLR7 选择性基序的 5' 端、TLR7 选择性基序的 3' 端或两者的另外的核苷酸序列。在一些实施方案中, 另外的核苷酸序列不包含尿苷核苷。

[0194] 在一些实施方案中, RNA 配体进一步包含连接至 TLR7 选择性基序的 5' 端的第一核苷酸序列。在一些实施方案中, 第一核苷酸序列包含至少一个核苷。在一些实施方案中, 第一核苷酸序列包含至少两个核苷。在一些实施方案中, 第一核苷酸序列的核苷通过磷酸二酯键或硫代磷酸酯键连接。在一些实施方案中, 第一核苷酸序列的核苷通过磷酸二酯键连接。在一些实施方案中, 第一核苷酸序列不包含尿苷核苷。在一些实施方案中, 第一核苷酸序列包含 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100 或更多个核苷中的任一者, 或介于 100 与 125 个核苷、介于 125 与 150 个核苷、介于 150 与 175 个核苷、介于 175 与 200 个核苷、介于 200 与 225 个核苷、介于 225 与 250 个核苷、介于 250 与 275 个核苷、或介于 275 与 300 个核苷之间的任一者。在一些实施方案中, 第一核苷酸序列包含 8 个核苷。在一些实施方案中, 第一核苷酸序列包含与 SEQ ID NO:68 具有至少约 85%、至少约 86%、至少约 87%、至少约 88%、至少约 89%、至少约 90%、至少约 91%、至少约 92%、至少约 93%、至少约 94%、至少约 95%、至少约 96%、至少约 97%、至少约 98%、至少约 99% 或 100% 同一性的核苷酸序列。在一些实施方案中, 第一核苷酸序列包含 SEQ ID NO:68 的核苷酸序列。在一些实施方案中, 第一核苷酸序列通过磷酸二酯键或硫代磷酸酯键连接至 TLR7 选择性基序的 5' 端。在一些实施方案中, 第一核苷酸序列通过磷酸二酯键连接至 TLR7 选择性基序的 5' 端。

[0195] 在一些实施方案中, RNA 配体进一步包含连接至 TLR7 选择性基序的 3' 端的第二核苷酸序列。在一些实施方案中, 第二核苷酸序列包含至少一个核苷。在一些实施方案中, 第二核苷酸序列包含至少两个核苷。在一些实施方案中, 第二核苷酸序列的核苷通过磷酸二酯键或硫代磷酸酯键连接。在一些实施方案中, 第二核苷酸序列的核苷通过磷酸二酯键连接。在一些实施方案中, 第二核苷酸序列包含 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、

67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、94、96、97、98、99、100或更多个核苷中的任一者,或介于100与125个核苷、介于125与150个核苷、介于150与175个核苷、介于175与200个核苷、介于200与225个核苷、介于225与250个核苷、介于250与275个核苷、或介于275与300个核苷之间的任一者。在一些实施方案中,第二核苷酸序列包含2个核苷。在一些实施方案中,第二核苷酸序列不包含尿苷核苷。在一些实施方案中,第二核苷酸序列包含两个胞苷核苷。在一些实施方案中,第二核苷酸序列通过磷酸二酯键或硫代磷酸酯键连接至TLR7选择性基序的3'端。在一些实施方案中,第二核苷酸序列通过磷酸二酯键连接至TLR7选择性基序的3'端。

[0196] 在一些实施方案中, RNA配体包含与SEQ ID NO:17具有至少约85%、至少约86%、至少约87%、至少约88%、至少约89%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或100%同一性的核苷酸序列并且包含SEQ ID NO:48的TLR7选择性基序。在一些实施方案中, RNA配体包含SEQ ID NO:17的核苷酸序列。

[0197] 在一些实施方案中, RNA配体包含与SEQ ID NO:18具有至少约85%、至少约86%、至少约87%、至少约88%、至少约89%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或100%同一性的核苷酸序列并且包含SEQ ID NO:49的TLR7选择性基序。在一些实施方案中, RNA配体包含SEQ ID NO:18的核苷酸序列。

[0198] 在一些实施方案中, RNA配体包含与SEQ ID NO:19具有至少约85%、至少约86%、至少约87%、至少约88%、至少约89%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或100%同一性的核苷酸序列并且包含SEQ ID NO:50的TLR7选择性基序。在一些实施方案中, RNA配体包含SEQ ID NO:19的核苷酸序列。

[0199] 在一些实施方案中, RNA配体包含与SEQ ID NO:20具有至少约85%、至少约86%、至少约87%、至少约88%、至少约89%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或100%同一性的核苷酸序列并且包含SEQ ID NO:51的TLR7选择性基序。在一些实施方案中, RNA配体包含SEQ ID NO:20的核苷酸序列。

[0200] 另一方面, 本文提供包含TLR7选择性基序的RNA配体, 该TLR7选择性基序包含SEQ ID NO:48、49、50和51的核苷酸序列。在一些实施方案中, RNA配体进一步包含连接至TLR7选择性基序的5'端的第一核苷酸序列。在一些实施方案中, RNA配体进一步包含连接至TLR7选择性基序的3'端的第二核苷酸序列。在一些实施方案中, 第一核苷酸序列包含至少一个核苷。在一些实施方案中, 第一核苷酸序列包含至少两个核苷。在一些实施方案中, 第一核苷酸序列的核苷通过磷酸二酯键或硫代磷酸酯键连接。在一些实施方案中, 第一核苷酸序列的核苷通过磷酸二酯键连接。在一些实施方案中, 第一核苷酸序列不包含尿苷核苷。在一些实施方案中, 第一核苷酸序列包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、

94、96、97、98、99、100或更多个核苷中的任一者,或介于100与125个核苷、介于125与150个核苷、介于150与175个核苷、介于175与200个核苷、介于200与225个核苷、介于225与250个核苷、介于250与275个核苷、或介于275与300个核苷之间的任一者。在一些实施方案中,第一核苷酸序列包含8个核苷。在一些实施方案中,第一核苷酸序列包含与SEQ ID NO:68具有至少约85%、至少约86%、至少约87%、至少约88%、至少约89%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或100%同一性的核苷酸序列。在一些实施方案中,第一核苷酸序列包含SEQ ID NO:68的核苷酸序列。在一些实施方案中,第一核苷酸序列通过磷酸二酯键或硫代磷酸酯键连接至TLR7选择性基序的5'端。在一些实施方案中,第一核苷酸序列通过磷酸二酯键连接至TLR7选择性基序的5'端。在一些实施方案中,第二核苷酸序列包含至少一个核苷。在一些实施方案中,第二核苷酸序列包含至少两个核苷。在一些实施方案中,第二核苷酸序列的核苷通过磷酸二酯键或硫代磷酸酯键连接。在一些实施方案中,第二核苷酸序列的核苷通过磷酸二酯键连接。在一些实施方案中,第二核苷酸序列包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、94、96、97、98、99、100或更多个核苷中的任一者,或介于100与125个核苷、介于125与150个核苷、介于150与175个核苷、介于175与200个核苷、介于200与225个核苷、介于225与250个核苷、介于250与275个核苷、或介于275与300个核苷之间的任一者。在一些实施方案中,第二核苷酸序列包含2个核苷。在一些实施方案中,第二核苷酸序列不包含尿苷核苷。在一些实施方案中,第二核苷酸序列包含两个胞苷核苷。在一些实施方案中,第二核苷酸序列通过磷酸二酯键或硫代磷酸酯键连接至TLR7选择性基序的3'端。在一些实施方案中,第二核苷酸序列通过磷酸二酯键连接至TLR7选择性基序的3'端。

[0201] 另一方面,本文提供RNA配体,其包含与SEQ ID NO:17具有至少约85%、至少约86%、至少约87%、至少约88%、至少约89%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或100%同一性的核苷酸序列并且包含SEQ ID NO:48的TLR7选择性基序。在一些实施方案中,RNA配体包含SEQ ID NO:17的核苷酸序列。

[0202] 另一方面,本文提供RNA配体,其包含与SEQ ID NO:18具有至少约85%、至少约86%、至少约87%、至少约88%、至少约89%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或100%同一性的核苷酸序列并且包含SEQ ID NO:49的TLR7选择性基序。在一些实施方案中,RNA配体包含SEQ ID NO:18的核苷酸序列。

[0203] 另一方面,本文提供RNA配体,其包含与SEQ ID NO:19具有至少约85%、至少约86%、至少约87%、至少约88%、至少约89%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或100%同一性的核苷酸序列并且包含SEQ ID NO:50的TLR7选择性基序。在一些实施方案中,RNA配体包含SEQ ID NO:19的核苷酸序列。

[0204] 另一方面,本文提供RNA配体,其包含与SEQ ID NO:20具有至少约85%、至少约

86%、至少约87%、至少约88%、至少约89%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或100%同一性的核苷酸序列并且包含SEQ ID NO:51的TLR7选择性基序。在一些实施方案中, RNA配体包含SEQ ID NO:20的核苷酸序列。

[0205] RNA修饰

[0206] 在一些方面, 本文提供包含TLR7选择性基序的RNA配体, 该TLR7选择性基序包含至少一种核苷酸的一种或多种修饰。一种或多种核苷酸修饰可以是修饰的碱基、修饰的糖和/或修饰的磷酸。在一些实施方案中, 一种或多种核苷酸修饰可以是磷酸酯修饰的键。在一些实施方案中, 一种或多种修饰干扰RNA酶活性, 例如核糖核酸内切酶或核糖核酸外切酶活性。在一些实施方案中, 一种或多种修饰抑制或阻断RNA酶活性或RNA酶与RNA配体的结合。

[0207] 核碱基修饰

[0208] 在一些实施方案中, 本公开的RNA配体包含TLR7选择性基序, 该TLR7选择性基序包含至少一个修饰的碱基。

[0209] 在一些实施方案中, 修饰的碱基是修饰的嘌呤或修饰的嘧啶。在一些实施方案中, 修饰的碱基选自2-氨基腺苷、2,6-二氨基嘌呤、肌苷、吡啶-4-酮、吡啶-2-酮、苯基、假尿嘧啶、2,4,6-三甲氧基苯、3-甲基尿嘧啶、二氢尿苷、萘基、氨基苯基、5-烷基胞苷(例如, 5-甲基胞苷)、5-烷基尿苷(例如, 核糖胸苷)、5-卤代尿苷(例如, 5-溴尿苷)、6-氮杂嘧啶、6-烷基嘧啶(例如, 6-甲基尿苷)、丙炔、quesosine、2-硫尿苷、4-硫尿苷、怀丁苷、威布托索辛(wybutoxosine)、4-乙酰胞苷、5-(羧基甲基)尿苷、5'-羧甲基氨基甲基-2-硫尿苷、5-羧甲基氨基甲基尿苷、 β -D-半乳糖基奎苷、1-甲基腺苷、1-甲基肌苷、2,2-二甲基鸟苷、3-甲基胞苷、2-甲基腺苷、2-甲基鸟苷、 N^6 -甲基腺苷、7-甲基鸟苷、5-甲氧基氨基甲基-2-硫尿苷、5-甲基氨基甲基尿苷、5-甲基羰基甲基尿苷、5-甲氧基尿苷、5-甲基-2-硫代尿苷、2-甲硫基-N6-异戊烯基腺苷、 β -D-甘露糖基奎苷、尿苷-5-羟乙酸和2-硫代胞苷。

[0210] 在一些实施方案中, 本公开的RNA配体包含TLR7选择性基序, 该TLR7选择性基序包含至少一个脱碱基核苷酸。在一些实施方案中, 脱碱基核苷酸包含除1'位置处的碱基之外的化学基团, 例如3', 3'连接或5', 5'连接的脱氧脱碱基核糖衍生物。

[0211] 糖部分修饰

[0212] 在一些实施方案中, 本公开的RNA配体包含TLR7选择性基序, 该TLR7选择性基序包含至少一个具有修饰的糖部分的核苷酸。在一些实施方案中, 修饰的糖部分是修饰的核糖部分。

[0213] 在一些实施方案中, 本公开的RNA配体可以包括本领域通常已知的核糖的类似形式, 诸如但不限于碳环糖类似物、 α -异头糖、差向异构糖诸如阿拉伯糖、木糖或来苏糖、吡喃糖、呋喃糖、景天庚酮糖、无环类似物和碱性核苷类似物诸如甲基核苷。

[0214] 在一些实施方案中, 修饰的核糖部分包含2'位置处的修饰。在一些实施方案中, 核糖的2'-OH被另一部分取代, 诸如烷基、取代的烷基、烷基芳基、芳基烷基、-F、-Cl、-Br、-CN、-CF₃、-OCF₃、-OCN、-O-烷基、-S-烷基、HS-烷基-O、-O-烯基、-S-烯基、-N-烯基、-SO-烷基、-烷基-OSH、-烷基-OH、-O-烷基-OH、-O-烷基-SH、-S-烷基-OH、-S-烷基-SH、-烷基-S-烷基、-烷基-O-烷基、-ONO₂、-NO₂、-N₃、-NH₂、烷基氨基、二烷基氨基、氨基烷基、氨基烷氧基、氨基酸、氨基酰基、-ONH₂、-O-氨基烷基、-O-氨基酸、-O-氨基酰基、杂环烷基、杂环烷芳

基-、氨基烷基氨基-、聚烷基氨基-、取代的甲硅烷基-、甲氧基乙基-(MOE)、烯基或炔基。其他示例性2'核糖修饰包括C₁至C₁₀低级烷基、取代的低级芳烷基、0-烷芳基或0-芳烷基、SH₁、SCH₃、SOCH₃、SO₂CH₃、聚烷基氨基、取代的甲硅烷基、报告基团或嵌入剂。在一些实施方案中,核糖的2'位置处的修饰是2'-O-甲基修饰、2'-O-烯丙基修饰、2'-叠氮基-核糖修饰、2'-氟修饰、2'-氨基修饰、2'-脱氧修饰或2'-甲氧基乙氧基修饰。在一些实施方案中,核糖的2'位置处的修饰是2'-O-甲基修饰、2'-氟修饰、2'-氨基修饰、2'-脱氧修饰或2'-甲氧基乙氧基修饰。在一些实施方案中,核糖的2'位置处的修饰是2'-O-甲基修饰或2'-氟修饰。

[0215] 磷酸酯和连接修饰

[0216] 在一些实施方案中,一种或多种核苷酸修饰包含磷酸酯修饰。

[0217] 在一些实施方案中,磷酸酯修饰是修饰的磷酸二酯键修饰。例如,一个或多个磷酸二酯键可以由可替代的连接基团,诸如但不限于P(O)S(“硫代酸酯”)、P(S)S(“二硫代酸酯”)、(O)NR₂(“酰胺酸酯”)、P(O)R、P(R)OR'、CO或CH₂(“甲缩醛”)替换,其中每个R或R'独立地为H或取代或未取代的烷基(1-20C),任选地包含醚(—O—)键、芳基、烯基、环烷基、环烯基或芳烷基。其他示例性磷酸酯修饰包括但不限于磷酸甲酯、硫代磷酸酯、氨基磷酸酯、氨基甲酸酯、氨基磷酸酯、磷酸三酯或二硫代磷酸酯。在一些实施方案中,核苷酸修饰是硫代磷酸酯键修饰。

[0218] 在一些实施方案中,磷酸酯修饰是3'末端核苷酸间磷酸二酯键修饰,诸如烷基或芳基磷酸三酯、烷基或芳基磷酸酯、磷酸氢酯、氨基磷酸酯和/或硒酸磷酸酯键修饰。在一些实施方案中,3'末端核苷酸间磷酸二酯键修饰是氨基磷酸酯修饰。

[0219] 并非本公开的RNA配体中的所有键都需要相同。例如,本公开的RNA配体可以包括磷酸二酯、磷酸甲酯、硫代磷酸酯、氨基磷酸酯、氨基甲酸酯、氨基磷酸酯、磷酸三酯或二硫代磷酸酯键的任意组合。在一些实施方案中,本公开的RNA配体包含磷酸二酯键和硫代磷酸酯键的任意组合。在一些实施方案中,本公开的RNA配体仅包含磷酸二酯键。在一些实施方案中,本公开的RNA配体仅包含硫代磷酸酯键。

[0220] 另外的RNA修饰

[0221] 在一些实施方案中,本公开的RNA配体可包含修饰,诸如RNA帽(例如,7-甲基鸟苷(m⁷G)帽、m⁷Gppp5'N、2'-O甲基化m⁷G帽、m⁷G(5')ppp(5')G、m⁷G(5')ppp(5')A、G(5')ppp(5')A、G(5')ppp(5')G、3'-O-Me-m⁷G(5')ppp(5')G、ARCA或本领域已知的任何其他合适的RNA帽)和/或尾(例如,聚(A)尾);悬垂部分,诸如例如蛋白质(例如核酸酶、毒素、抗体、信号肽、聚-L-赖氨酸等);嵌入剂(例如吡啶、补骨脂素等);螯合剂(例如金属、放射性金属、硼、氧化金属等);烷基化剂和修饰的键(例如,α异头核酸等)。在一些实施方案中,本公开的RNA配体可以缀合至固体或半固体支持物。在一些实施方案中,5'和3'末端的OH可被磷酸化或被例如1至20个碳原子的胺或有机封端基团部分取代。其他羟基也可以被衍生为标准保护基团。

[0222] RNA配体的制备

[0223] 本公开的RNA配体,例如,包含本文所述的一种或多种RNA修饰,可以使用本领域已知的任何合适的方法来制备。

[0224] 在一些实施方案中,可以使用RNA合成的从头方法,包括但不限于:使用合适的保护基团的化学合成(参见例如Masuda等人,(2007)Nucleic Acids Symposium Series 57:3-4);b-氰乙基亚磷酰胺法(Beaucage S L等人(1981)Tetrahedron Lett 22:1859);核苷

H-磷酸盐方法 (Garegg P等人 (1986) *Tetrahedron Lett* 27:4051-4; Froehler B C等人 (1986) *Nucl Acid Res* 14:5399-407; Garegg P等人 (1986) *Tetrahedron Lett* 27:4055-8; Gaffney B L等人 (1988) *Tetrahedron Lett* 29:2619-22); 或 Uhlmann等人 (1990) *Chem Rev* 90:544-84 以及 Goodchild J (1990) *Bioconjugate Chem* 1:165 中公开的合成方法。这些和其他方法可以与市售的自动化核酸合成仪一起执行或修改以使用。

[0225] 本公开的RNA配体还可以使用本领域熟知和常规的合适的重组方法来制备, 诸如在宿主细胞中克隆、加工和/或表达多核苷酸, 例如, 如本文所述。定点诱变可用于改变核酸, 例如插入新的限制性位点、引入突变等。用于转录核酸序列的合适方法是本领域已知的和常规的。(一般参见 *Current Protocols in Molecular Biology*, 第2卷, Ausubel等人编辑, Greene Publish. Assoc. 和 Wiley Interscience, Ch.13, 1988; Glover, *DNA Cloning*, 第II卷, IRL出版社, Wash., D.C., Ch.3, 1986; Bitter等人, in *Methods in Enzymology* 153: 516-544 (1987); *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces*, 编辑. Strathern等人, Cold Spring Harbor Press, 第I和II卷, 1982; 以及 Sambrook等人, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, 1989.)

[0226] 在一些实施方案中, 本公开的RNA配体还可以使用体外转录方法来制备。如本领域所认识到的, 典型的体外RNA转录反应包括RNA聚合酶, 例如T7 RNA聚合酶; DNA模板; 核苷酸 (NTP); 离子, 诸如镁, 例如乙酸镁; 缓冲剂, 诸如例如HEPES或Tris, 例如处于合适的pH, 例如7-8.5。在一些实施方案中, 可以包括另外的化合物, 诸如二硫苏糖醇 (DTT) 和/或亚精胺。在一些实施方案中, 体外RNA转录反应中包括RNA酶抑制剂以确保在转录反应期间没有RNA酶诱导的降解。在一些实施方案中, 反应中包括焦磷酸酶以将每个核苷酸掺入两个无机磷酸盐单元后生成的无机焦磷酸盐切割。这确保了镁保留在溶液中并且不会以焦磷酸镁的形式沉淀。体外RNA转录反应的产物可以根据本领域已知的任何合适的方法纯化, 例如如下所述。

[0227] 本公开的RNA配体的制备可以包括纯化或分离RNA配体 (例如, 从反应混合物、细胞组分等中) 的一个或多个步骤。此类纯化可以使用本领域已知的任何合适的方法来完成, 诸如通过高效液相色谱 (HPLC)、基于柱的方法 (例如, 迷你快速旋转DNA柱 (Roche))、聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 和/或无RNA酶HPLC纯化。

[0228] 本公开的RNA配体中一种或多种RNA修饰的存在和/或数量可以使用任何合适的方法来确定。例如, 本公开的RNA配体可被消化成单磷酸 (例如, 使用核酸酶P1) 并去磷酸化 (例如, 使用合适的磷酸酶诸如CIAP), 并且通过反相HPLC分析所得核苷。可以使用的其他方法包括质谱法 (MS), 例如基质辅助激光解吸/电离 (MALDI)、串联MS (MS/MS)、电喷雾电离质谱法 (ESI-MS) 或液相色谱-质谱法 (LC-MS); 色谱法, 诸如薄层色谱法 (TLC) 或液相色谱法 (LC); 基于逆转录的方法; 基于RNA酶H切割的方法; 基于连接的方法; Northern印迹; 去甲基化酶促进的RNA测序; MC1核糖核酸酶切割; 直接RNA测序; 基于扩增的测序; 和亚硫酸氢盐测序。

[0229] 载体

[0230] 在一些实施方案中, 本公开的免疫调节组合物进一步包含载体, 诸如药用载体。

[0231] 在一些实施方案中, 载体促进RNA配体在细胞内转运至一种或多种细胞中。在一些实施方案中, 载体是阳离子剂, 诸如阳离子或聚阳离子化合物。在一些实施方案中, 载体是

适合于将本公开的RNA配体递送至一种或多种细胞中的任何载体。可用于本公开的组合物的载体的实例包括但不限于：聚乙烯亚胺(PEI)；聚亚烷基胺；聚精氨酸，例如聚-L-精氨酸；多胺；鱼精蛋白；聚赖氨酸，例如聚-L-赖氨酸或POLL；nucleoline；融合肽；聚酰胺胺树状聚合物(PAMAM, Dendritech Inc.)；聚乙二醇化阳离子聚合物；阳离子聚合物缀合物(例如，PEI-胆固醇、聚赖氨酸胆固醇等)；精胺或亚精胺；壳聚糖；阳离子葡聚糖；碱性多肽；细胞穿透肽(CPP)，诸如HIV结合肽、HIV-1Tat(HIV)、Tat衍生肽、Penetratin、VP22衍生肽或类似肽、瘟病毒Erns、HSV、VP22(单纯疱疹)、MAP、KALA或蛋白质转导结构域(PTD)、PpT620、富含脯氨酸的肽、富含精氨酸的肽、富含赖氨酸的肽、MPG肽、Pep-1、L-寡聚物、降钙素肽、触角足(Antennapedia)衍生肽(特别是来自果蝇触角足(*Drosophila antennapedia*))、pAntp、pIsl、FGF、乳铁蛋白、Transportan、抗菌肽-2、Bac715-24、SynB、SynB(1)、pVEC、hCT衍生肽、SAP或组蛋白；阳离子多糖，例如壳聚糖；阳离子环糊精；聚凝胺；阳离子或聚阳离子聚合物，诸如聚氨基酸(例如，聚-L-精氨酸、聚-L-赖氨酸、聚-L-鸟氨酸)；改性聚氨基酸，诸如 β -氨基酸聚合物或反相聚酰胺；改性聚乙烯，诸如PVP(聚(N-乙基-4-乙烯基溴化吡啶))；改性丙烯酸酯，诸如pDMAEMA(聚(二甲氨基乙基甲基丙烯酸酯))；改性酰胺基胺，诸如pAMAM(聚(酰胺基胺))；改性聚 β 氨基酯(PBAE)，诸如二胺末端改性的1,4丁二醇二丙烯酸酯-共-5-氨基-1-戊醇聚合物；树枝状聚合物，诸如聚丙胺树枝状聚合物或基于pAMAM的树枝状聚合物；聚亚胺，例如PEI、聚(丙烯亚胺)；聚烯丙胺；基于糖主链的聚合物，诸如基于环糊精的聚合物、基于葡聚糖的聚合物、壳聚糖；基于硅烷主链的聚合物，诸如PMOXA-PDMS共聚物；嵌段聚合物，其包含一种或多种阳离子嵌段(例如，选自如上所述的阳离子聚合物)和一种或多种亲水性或疏水性嵌段(例如，聚乙二醇)的组合。

[0232] 在一些实施方案中，载体为脂质。

[0233] 在一些实施方案中，载体为阳离子脂质。可用作载体的阳离子脂质的实例包括但不限于：二油酰三甲基丙烷铵(DOTAP)、N-[1-(2,3-二油酰氧基)丙基]-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTMA)、N,N-二油基-N,N-二甲基氯化铵(DODAC)、LipofectamineTM、Gene PorterTM、DMRIE(1,2-二肉豆蔻氧基-丙基-3-二甲基-羟乙基溴化铵)、二-C14-脒、DOTIM(1-[2-(油酰氧基)乙基]-2-油基-3-(2-羟乙基)氯化咪唑啉)、二甲基双十八烷基溴化铵(DDAB)、DOGS、1,2-二油酰氧基丙基-3-二甲基-羟乙基溴化铵(DORI)、N-(3-氨基丙基)-N,N-二甲基-2,3-双(十二烷氧基)-1-溴化丙铵(GAP-DLRIE)、SAINT、DC-Chol、双胍-tren-胆固醇(BGTC)、CTAP、1,2-二油酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DOPC)、1,2-二油酰-3-二甲基铵-丙烷(DODAP)、二油酰磷脂酰乙醇胺(DOPE)、2,3-二油酰氧基-N-[2(精胺甲酰氨基)乙基]-N,N-二甲基-1-丙胺三氟乙酸盐(DOSPA)、双十八烷基二甲基溴化铵(DODAB)、DOIC、DMEPC、二肉豆蔻酰氧丙基二甲基羟乙基溴化铵(DIMRI)、0,0-二十四烷酰基-N- α -三甲基铵乙酰基)二乙醇胺氯化物(DC-6-14)、外消旋-[(2,3-二十八烷氧基丙基)(2-羟乙基)]-二甲基氯化铵(CLIP1)、外消旋-[2(2,3-二十六烷氧基丙氧基甲氧基)乙基]-三甲基铵(CLIP6)、外消旋-[2(2,3-二十六烷氧基丙氧基琥珀氧基)乙基]-三甲基铵(CLIP9)、SM-102或oligofectamine。可用作载体的其他脂质包括但不限于US2008/0085870和US2008/0057080中描述的那些，其通过引用并入本文。

[0234] 在一些实施方案中，载体为jetPEI(参见例如Ami Sidi等人, The Journal of Urology(2008)180(6):2379-2383)。

[0235] 在一些实施方案中,载体为可电离脂质。可用作载体的可电离脂质的实例包括但不限于:ALC-0315([(4-羟基丁基) 氮杂二基]二(己烷-6,1-二基)双(2-己基癸酸酯))(参见,例如,网站:assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/944544/COVID-19_mRNA_Vaccine_BNT162b2_UKPAR__PFIZER_BIONTECH__15Dec2020.pdf)、SM-102(十七-9-基8-((2-羟乙基))(6-氧代-6-(十一烷氧基)己基)氨基)辛酸酯(参见例如网站:www.modernatx.com/sites/default/files/mRNA-1273-P301-Protocol.pdf)、咪唑胆固醇酯(参见例如US20200155691A1)、基于半胱氨酸的可电离脂质(例如,如W02020214946A1中所公开的,其关于其基于半胱氨酸的可电离脂质的公开通过引用并入本文)、脂质2,2(8,8)4C-CH₃(参见例如US9670152B2)、Genevant CL1(参见例如W02020219941A1)、Acuitas(A9)(参见例如Conway等人,Molecular Therapy(2019)27(4):866-877)、DLin-MC3-DMA(参见,例如Jayaraman等人,Angew Chem IntEdEngl(2012)51(34):8529-8533)、Lipid 5(参见,例如,Sabnis等人,Molecular Therapy(2018)26(6):1509-1519;以及网站:investors.modernatx.com/news-releases/news-release-details/moderna-announces-positive-phase-1-results-first-systemic)、C12-200(参见,例如Love等人,PNAS(2010)107(5):1864-1869)、5A2-SC8(参见,例如Cheng等人,Advanced Materials(2018)30(52):1805308)、DLin-KC2-DMA(参见,例如,Semple等人,Nature Biotechnology(2010)28:172-176)、OF-02(参见例如Fenton等人,Advanced Materials(2016)28(15):2939-2943)、3060i10(参见例如,Hajj等人,Small(2019)15(6):1805097)、cKK-E12(参见,例如Dong等人,PNAS(2014)111(11):3955-3960)、SS-EC、NOF Corporation(参见,例如网站:www.nofamerica.com/store/index.php?dispatch=products.view&product_id=771)、TT3(参见,例如Li等人,Nano Lett(2015)15(12):8099-8107)、OF-Deg-Lin(参见,例如Fenton等人,Angew Chem Int EdEngl(2018)57(41):13582-13586)、ssPalmE(参见,例如Akita等人,Journal of Controlled Release(2015)200:97-105)、或L319(Maier等人,Molecular Therapy(2013)21(8):1570-1578)。

[0236] 在一些实施方案中,载体为脂质纳米颗粒(LNP)。在某些实施方案中,LNP包含阳离子脂质,例如本文所述的或本领域已知的一种或多种阳离子脂质。在某些实施方案中,LNP包含可电离脂质,例如本文所述的或本领域已知的一种或多种可电离脂质。在一些实施方案中,载体为聚-L-精氨酸。在一些实施方案中,载体为DOTAP。

[0237] 本公开的组合物活性

[0238] 在本文所述的任何免疫调节组合物的一些实施方案中,免疫调节组合物选择性地活化与免疫调节组合物接触和/或转染的一种或多种细胞中的TLR7。

[0239] 在一些实施方案中,本公开的免疫调节组合物诱导或增加与免疫调节组合物接触的一种或多种细胞的一种或多种I型干扰素(IFN)的表达或分泌。I型IFN是一大类调节免疫系统的干扰素蛋白。I型IFN包括但不限于IFN- α (α)、IFN- β (β)、IFN- κ (κ)、IFN- δ (δ)、IFN- ϵ (ϵ)、IFN- τ (τ)、IFN- ω (ω)和IFN- ζ (ζ ,也称为limitin)。

[0240] 在一些实施方案中,例如相比于未与免疫调节组合物接触和/或转染的对应的一种或多种细胞(例如,相比于仅用阴性对照或仅用细胞培养基处理的对应的一种或多种细胞),本公开的免疫调节组合物诱导或增加与本公开的免疫调节组合物接触和/或转染的一种或多种细胞的一种或多种I型IFN(例如,IFN- α 、IFN- β 、IFN- κ 、IFN- δ 、IFN- ϵ 、IFN- τ 、IFN-

ω或IFN-ζ中的一者或多者)的表达或分泌。在一些实施方案中,诱导或增加是至少约1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%、300%、350%、400%、450%、500%、550%、600%、650%、700%、750%、800%、850%、900%、950%、1000%或更多中的任一者。在一些实施方案中,一种或多种细胞为人类细胞。在一些实施方案中,一种或多种细胞为人外周血单核细胞。在一些实施方案中,一种或多种细胞为浆细胞样树突状细胞。

[0241] 在一些实施方案中,例如相比于未与免疫调节组合物接触和/或转染的对应的一种或多种细胞(例如,相比于仅用阴性对照或仅用细胞培养基处理的对应的一种或多种细胞),本公开的免疫调节组合物诱导或增加与本公开的免疫调节组合物接触和/或转染的一种或多种细胞的IFN-α的表达或分泌。在一些实施方案中,诱导或增加是至少约1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%、300%、350%、400%、450%、500%、550%、600%、650%、700%、750%、800%、850%、900%、950%、1000%或更多中的任一者。在一些实施方案中,一种或多种细胞为人类细胞。在一些实施方案中,一种或多种细胞为人外周血单核细胞。在一些实施方案中,一种或多种细胞为浆细胞样树突状细胞。

[0242] 在一些实施方案中,例如相比于未与免疫调节组合物接触和/或转染的对应的一种或多种细胞(例如,相比于仅用阴性对照或仅用细胞培养基处理的对应的一种或多种细胞),本公开的免疫调节组合物诱导或增加与本公开的免疫调节组合物接触和/或转染的一种或多种细胞的IFN-β的表达或分泌。在一些实施方案中,诱导或增加是至少约1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%、300%、350%、400%、450%、500%、550%、600%、650%、700%、750%、800%、850%、900%、950%、1000%或更多中的任一者。在一些实施方案中,一种或多种细胞为人类细胞。在一些实施方案中,一种或多种细胞为人外周血单核细胞。在一些实施方案中,一种或多种细胞为浆细胞样树突状细胞。

[0243] 在一些实施方案中,例如相比于未与免疫调节组合物接触和/或转染的对应的一种或多种细胞(例如,相比于仅用阴性对照或仅用细胞培养基处理的对应的一种或多种细胞),本公开的免疫调节组合物诱导或增加与本公开的免疫调节组合物接触和/或转染的一种或多种细胞的IFN-κ的表达或分泌。在一些实施方案中,诱导或增加是至少约1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%、300%、350%、400%、450%、500%、550%、600%、650%、700%、750%、800%、850%、900%、950%、1000%或更多中的任一者。在一些实施方案中,一种或多种细胞为人类细胞。在一些实施方案中,一种或多种细胞为人外周血单核细胞。在一些实施方案中,一种或多种细胞为浆细胞样树突状细胞。

[0244] 在一些实施方案中,例如相比于未与免疫调节组合物接触和/或转染的对应的一种或多种细胞(例如,相比于仅用阴性对照或仅用细胞培养基处理的对应的一种或多种细胞),本公开的免疫调节组合物诱导或增加与本公开的免疫调节组合物接触和/或转染的一种或多种细胞的IFN-δ的表达或分泌。在一些实施方案中,诱导或增加是至少约1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%、300%、350%、400%、450%、500%、550%、600%、650%、700%、750%、800%、850%、900%、950%、

1000%或更多中的任一者。在一些实施方案中,一种或多种细胞为人类细胞。在一些实施方案中,一种或多种细胞为人外周血单核细胞。在一些实施方案中,一种或多种细胞为浆细胞样树突状细胞。

[0245] 在一些实施方案中,例如相比于未与免疫调节组合物接触和/或转染的对应的一种或多种细胞(例如,相比于仅用阴性对照或仅用细胞培养基处理的对应的一种或多种细胞),本公开的免疫调节组合物诱导或增加与本公开的免疫调节组合物接触和/或转染的一种或多种细胞的IFN- ϵ 的表达或分泌。在一些实施方案中,诱导或增加是至少约1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%、300%、350%、400%、450%、500%、550%、600%、650%、700%、750%、800%、850%、900%、950%、1000%或更多中的任一者。在一些实施方案中,一种或多种细胞为人类细胞。在一些实施方案中,一种或多种细胞为人外周血单核细胞。在一些实施方案中,一种或多种细胞为浆细胞样树突状细胞。

[0246] 在一些实施方案中,例如相比于未与免疫调节组合物接触和/或转染的对应的一种或多种细胞(例如,相比于仅用阴性对照或仅用细胞培养基处理的对应的一种或多种细胞),本公开的免疫调节组合物诱导或增加与本公开的免疫调节组合物接触和/或转染的一种或多种细胞的IFN- τ 的表达或分泌。在一些实施方案中,诱导或增加是至少约1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%、300%、350%、400%、450%、500%、550%、600%、650%、700%、750%、800%、850%、900%、950%、1000%或更多中的任一者。在一些实施方案中,一种或多种细胞为人类细胞。在一些实施方案中,一种或多种细胞为人外周血单核细胞。在一些实施方案中,一种或多种细胞为浆细胞样树突状细胞。

[0247] 在一些实施方案中,例如相比于未与免疫调节组合物接触和/或转染的对应的一种或多种细胞(例如,相比于仅用阴性对照或仅用细胞培养基处理的对应的一种或多种细胞),本公开的免疫调节组合物诱导或增加与本公开的免疫调节组合物接触和/或转染的一种或多种细胞的IFN- ω 的表达或分泌。在一些实施方案中,诱导或增加是至少约1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%、300%、350%、400%、450%、500%、550%、600%、650%、700%、750%、800%、850%、900%、950%、1000%或更多中的任一者。在一些实施方案中,一种或多种细胞为人类细胞。在一些实施方案中,一种或多种细胞为人外周血单核细胞。在一些实施方案中,一种或多种细胞为浆细胞样树突状细胞。

[0248] 在一些实施方案中,例如相比于未与免疫调节组合物接触和/或转染的对应的一种或多种细胞(例如,相比于仅用阴性对照或仅用细胞培养基处理的对应的一种或多种细胞),本公开的免疫调节组合物诱导或增加与本公开的免疫调节组合物接触和/或转染的一种或多种细胞的IFN- ζ 的表达或分泌。在一些实施方案中,诱导或增加是至少约1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%、300%、350%、400%、450%、500%、550%、600%、650%、700%、750%、800%、850%、900%、950%、1000%或更多中的任一者。在一些实施方案中,一种或多种细胞为人类细胞。在一些实施方案中,一种或多种细胞为人外周血单核细胞。在一些实施方案中,一种或多种细胞为浆细胞样树突状细胞。

[0249] 在一些实施方案中,例如,相比于未与免疫调节组合物接触和/或转染的对应的一种或多种细胞(例如,相比于仅用阴性对照或仅用细胞培养基处理的对应的一种或多种细胞),本公开的免疫调节组合物使与本公开的免疫调节组合物接触和/或转染的一种或多种细胞中的TLR8的活性增加小于约50%、小于约40%、小于约30%、小于约20%、小于约15%、小于约10%、小于约5%、小于约2%、或小于约1%。在一些实施方案中,一种或多种细胞为人类细胞。在一些实施方案中,一种或多种细胞为人外周血单核细胞。在一些实施方案中,一种或多种细胞为单核细胞。

[0250] 在一些实施方案中,例如,相比于未与免疫调节组合物接触和/或转染的对应的一种或多种细胞(例如,相比于仅用阴性对照或仅用细胞培养基处理的对应的一种或多种细胞),本公开的免疫调节组合物使与本公开的免疫调节组合物接触和/或转染的一种或多种细胞的炎症性细胞因子诸如TNF α 的表达或分泌增加小于约50%、小于约40%、小于约30%、小于约20%、小于约15%、小于约10%、小于约5%、小于约2%、或小于约1%。在一些实施方案中,一种或多种细胞为人类细胞。在一些实施方案中,一种或多种细胞为人外周血单核细胞。在一些实施方案中,一种或多种细胞为单核细胞。

[0251] 在一些实施方案中,例如,相比于未与免疫调节组合物接触和/或转染的对应的一种或多种细胞(例如,相比于仅用阴性对照或仅用细胞培养基处理的对应的一种或多种细胞),本公开的免疫调节组合物诱导与本公开的免疫调节组合物接触和/或转染的一种或多种细胞的NF κ -B依赖性细胞因子的表达或分泌或使该表达或分泌增加小于约50%、小于约40%、小于约30%、小于约20%、小于约15%、小于约10%、小于约5%、小于约2%、或小于约1%。在一些实施方案中,一种或多种细胞为人类细胞。在一些实施方案中,一种或多种细胞为人外周血单核细胞。在一些实施方案中,一种或多种细胞为单核细胞。

[0252] 在一些实施方案中,一种或多种细胞的I型IFN、炎症性细胞因子和/或NF κ -B依赖性细胞因子的表达或分泌可以使用本领域已知的任何合适的方法来测量,诸如酶联免疫吸附测定(ELISA)、免疫印迹、免疫测定,诸如Luminex测定(参见例如www.rndsystems.com/what-luminex-assay)、基于珠粒的免疫测定、基于电化学发光的方法,诸如Meso Scale Discovery (MSD)、通过流式细胞术或质谱分析的细胞因子的细胞内染色。在一些实施方案中,一种或多种细胞的I型IFN、炎症性细胞因子和/或NF κ -B依赖性细胞因子的表达或分泌可以基于I型IFN、炎症性细胞因子和/或NF κ -B依赖性细胞因子的mRNA水平进行评估,例如使用qPCR、RNA测序、基于微阵列的方法或本领域已知的用于测量mRNA的任何其他合适的方法。

[0253] 在一些实施方案中,本公开的免疫调节组合物调节一种或多种B细胞,例如一种或多种天然B细胞、活化B细胞和/或记忆B细胞的活性。在一些实施方案中,本公开的免疫调节组合物增加或增强一种或多种B细胞的活化,例如基于B细胞活化标志物诸如CD69、CD80或CD86的表达进行评估。在一些实施方案中,本公开的免疫调节组合物增加或增强B细胞增殖。在一些实施方案中,本公开的免疫调节组合物增加或增强类别转换重组。在一些实施方案中,本公开的免疫调节组合物增加或增强抗体分泌。在一些实施方案中,本公开的免疫调节组合物增加或增强B细胞表达或细胞因子的分泌。在一些实施方案中,B细胞活化标志物和/或细胞因子可以使用本领域已知的任何合适的方法来测量,诸如酶联免疫吸附测定(ELISA)、免疫印迹、免疫测定,诸如Luminex测定(参见例如www.rndsystems.com/what-luminex-assay)。

luminex-assay)、基于珠粒的免疫测定、基于电化学发光的方法,诸如Meso Scale Discovery (MSD)、通过流式细胞术或质谱分析的细胞因子的细胞内染色。在一些实施方案中,一种或多种B细胞的B细胞活化标志物和/或细胞因子的表达或分泌可以基于标志物或细胞因子的mRNA水平来评估,例如使用qPCR、RNA测序、基于微阵列的方法,或本领域已知的用于测量mRNA的任何其他合适的方法。

[0254] 在一些实施方案中,本公开的免疫调节组合物调节一种或多种干扰素刺激基因 (ISG) 的水平。在一些实施方案中,一种或多种ISG包括本领域已知的任何ISG。在一些实施方案中,一种或多种ISG包括Shamith等人,Nucleic Acids Research (2009) 37, suppl_1; Schoggins和Rice,Curr Opin Virol (2011) 1 (6):519-525;Forster等人,Nucleic Acids Research (2013) (数据库期号):D1040-D1046;以及Liu等人,PNAS (2012) 109 (11):4239-4244中描述的ISG中的任一者。可以评估的ISG的实例包括但不限于IFIT1、CXCL10、CXCL11、ISG15、CCL8、2'5'OAS、APOBEC3G、APOBEC3A、PKR、ISG56、Mx2、MDA5、IFI44、IRF7、OASL1、ISG20IFIT2、IFIT3、IFITM3、OAS2、OAS3、IFI16、IRF1、MX1或ID0。

[0255] 在一些实施方案中,一种或多种ISG的水平可以使用本领域已知的任何合适的方法来评估,诸如酶联免疫吸附测定 (ELISA)、免疫印迹、免疫测定,诸如Luminex测定 (参见例如www.rndsystems.com/what-luminex-assay)、基于珠粒的免疫测定、基于电化学发光的方法,诸如Meso Scale Discovery (MSD)、通过流式细胞术或质谱分析的细胞因子的细胞内染色。在一些实施方案中,一种或多种ISG的水平可以基于一种或多种ISG的mRNA水平来评估,例如使用qPCR、RNA测序、基于微阵列的方法或本领域已知的用于测量mRNA的任何其他合适的方法。

[0256] 体外用途

[0257] 在一些方面,本文提供用于选择性地活化一种或多种细胞中的TLR7的方法。在一些实施方案中,一种或多种细胞为人类细胞。在一些实施方案中,一种或多种细胞为人外周血单核细胞。在一些实施方案中,一种或多种细胞为浆细胞样树突状细胞。

[0258] 在一些实施方案中,该方法包括用本公开的免疫调节组合物接触和/或转染一种或多种细胞。在一些实施方案中,该方法进一步包括使一种或多种细胞与鸟苷或鸟苷衍生物接触。在一些实施方案中,鸟苷衍生物为2'3'环GMP、7-硫杂-8-氧代鸟苷、7-脱氮鸟苷、7-烯丙基-8-氧代鸟苷、7-脱氮-dG、9-己基-鸟嘌呤或其任意组合。

[0259] 在一些实施方案中,本公开的免疫调节组合物,其包含本公开的RNA配体和载体,诸如本领域已知的或本文所述的任何合适的载体 (例如,在“载体”部分中),可以使用本领域已知的任何合适的方法,诸如直接注射、显微注射、电穿孔、脂转染、基因枪等,被引入到一种或多种细胞中。在一些实施方案中,载体为脂质纳米颗粒 (LNP)。在某些实施方案中,LNP包含阳离子脂质。在某些实施方案中,LNP包含可电离脂质。在一些实施方案中,载体为聚-L-精氨酸。在一些实施方案中,载体为DOTAP。

[0260] TLR7活化

[0261] 在一些实施方案中,本公开的免疫调节组合物选择性地活化一种或多种细胞中的TLR7。

[0262] 在一些实施方案中,本公开的免疫调节组合物诱导或增加一种或多种细胞的一种或多种I型干扰素 (IFN) 的表达或分泌。

[0263] 在一些实施方案中,例如相比于未与免疫调节组合物接触和/或转染的对应的一种或多种细胞(例如,相比于仅用阴性对照或仅用细胞培养基处理的对应的一种或多种细胞),本公开的免疫调节组合物诱导或增加与本公开的免疫调节组合物接触和/或转染的一种或多种细胞的一种或多种I型IFN(例如,IFN- α 、IFN- β 、IFN- κ 、IFN- δ 、IFN- ϵ 、IFN- τ 、IFN- ω 或IFN- ζ 中的一者或多者)的表达或分泌。在一些实施方案中,诱导或增加是至少约1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%、300%、350%、400%、450%、500%、550%、600%、650%、700%、750%、800%、850%、900%、950%、1000%或更多中的任一者。在一些实施方案中,一种或多种细胞为人类细胞。在一些实施方案中,一种或多种细胞为人外周血单核细胞。在一些实施方案中,一种或多种细胞为浆细胞样树突状细胞。

[0264] 在一些实施方案中,例如相比于未与免疫调节组合物接触和/或转染的对应的一种或多种细胞(例如,相比于仅用阴性对照或仅用细胞培养基处理的对应的一种或多种细胞),本公开的免疫调节组合物诱导或增加与本公开的免疫调节组合物接触和/或转染的一种或多种细胞的IFN- α 的表达或分泌。在一些实施方案中,诱导或增加是至少约1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%、300%、350%、400%、450%、500%、550%、600%、650%、700%、750%、800%、850%、900%、950%、1000%或更多中的任一者。在一些实施方案中,一种或多种细胞为人类细胞。在一些实施方案中,一种或多种细胞为人外周血单核细胞。在一些实施方案中,一种或多种细胞为浆细胞样树突状细胞。

[0265] 在一些实施方案中,例如相比于未与免疫调节组合物接触和/或转染的对应的一种或多种细胞(例如,相比于仅用阴性对照或仅用细胞培养基处理的对应的一种或多种细胞),本公开的免疫调节组合物诱导或增加与本公开的免疫调节组合物接触和/或转染的一种或多种细胞的IFN- β 的表达或分泌。在一些实施方案中,诱导或增加是至少约1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%、300%、350%、400%、450%、500%、550%、600%、650%、700%、750%、800%、850%、900%、950%、1000%或更多中的任一者。在一些实施方案中,一种或多种细胞为人类细胞。在一些实施方案中,一种或多种细胞为人外周血单核细胞。在一些实施方案中,一种或多种细胞为浆细胞样树突状细胞。

[0266] 在一些实施方案中,例如相比于未与免疫调节组合物接触和/或转染的对应的一种或多种细胞(例如,相比于仅用阴性对照或仅用细胞培养基处理的对应的一种或多种细胞),本公开的免疫调节组合物诱导或增加与本公开的免疫调节组合物接触和/或转染的一种或多种细胞的IFN- κ 的表达或分泌。在一些实施方案中,诱导或增加是至少约1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%、300%、350%、400%、450%、500%、550%、600%、650%、700%、750%、800%、850%、900%、950%、1000%或更多中的任一者。在一些实施方案中,一种或多种细胞为人类细胞。在一些实施方案中,一种或多种细胞为人外周血单核细胞。在一些实施方案中,一种或多种细胞为浆细胞样树突状细胞。

[0267] 在一些实施方案中,例如相比于未与免疫调节组合物接触和/或转染的对应的一种或多种细胞(例如,相比于仅用阴性对照或仅用细胞培养基处理的对应的一种或多种细胞),本公开的免疫调节组合物诱导或增加与本公开的免疫调节组合物接触和/或转染的一种或多种细胞的IFN- δ 的表达或分泌。在一些实施方案中,诱导或增加是至少约1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%、300%、350%、400%、450%、500%、550%、600%、650%、700%、750%、800%、850%、900%、950%、1000%或更多中的任一者。在一些实施方案中,一种或多种细胞为人类细胞。在一些实施方案中,一种或多种细胞为人外周血单核细胞。在一些实施方案中,一种或多种细胞为浆细胞样树突状细胞。

胞),本公开的免疫调节组合物诱导或增加与本公开的免疫调节组合物接触和/或转染的一种或多种细胞的IFN- δ 的表达或分泌。在一些实施方案中,诱导或增加是至少约1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%、300%、350%、400%、450%、500%、550%、600%、650%、700%、750%、800%、850%、900%、950%、1000%或更多中的任一者。在一些实施方案中,一种或多种细胞为人类细胞。在一些实施方案中,一种或多种细胞为人外周血单核细胞。在一些实施方案中,一种或多种细胞为浆细胞样树突状细胞。

[0268] 在一些实施方案中,例如相比于未与免疫调节组合物接触和/或转染的对应的一种或多种细胞(例如,相比于仅用阴性对照或仅用细胞培养基处理的对应的一种或多种细胞),本公开的免疫调节组合物诱导或增加与本公开的免疫调节组合物接触和/或转染的一种或多种细胞的IFN- ϵ 的表达或分泌。在一些实施方案中,诱导或增加是至少约1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%、300%、350%、400%、450%、500%、550%、600%、650%、700%、750%、800%、850%、900%、950%、1000%或更多中的任一者。在一些实施方案中,一种或多种细胞为人类细胞。在一些实施方案中,一种或多种细胞为人外周血单核细胞。在一些实施方案中,一种或多种细胞为浆细胞样树突状细胞。

[0269] 在一些实施方案中,例如相比于未与免疫调节组合物接触和/或转染的对应的一种或多种细胞(例如,相比于仅用阴性对照或仅用细胞培养基处理的对应的一种或多种细胞),本公开的免疫调节组合物诱导或增加与本公开的免疫调节组合物接触和/或转染的一种或多种细胞的IFN- τ 的表达或分泌。在一些实施方案中,诱导或增加是至少约1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%、300%、350%、400%、450%、500%、550%、600%、650%、700%、750%、800%、850%、900%、950%、1000%或更多中的任一者。在一些实施方案中,一种或多种细胞为人类细胞。在一些实施方案中,一种或多种细胞为人外周血单核细胞。在一些实施方案中,一种或多种细胞为浆细胞样树突状细胞。

[0270] 在一些实施方案中,例如相比于未与免疫调节组合物接触和/或转染的对应的一种或多种细胞(例如,相比于仅用阴性对照或仅用细胞培养基处理的对应的一种或多种细胞),本公开的免疫调节组合物诱导或增加与本公开的免疫调节组合物接触和/或转染的一种或多种细胞的IFN- ω 的表达或分泌。在一些实施方案中,诱导或增加是至少约1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%、300%、350%、400%、450%、500%、550%、600%、650%、700%、750%、800%、850%、900%、950%、1000%或更多中的任一者。在一些实施方案中,一种或多种细胞为人类细胞。在一些实施方案中,一种或多种细胞为人外周血单核细胞。在一些实施方案中,一种或多种细胞为浆细胞样树突状细胞。

[0271] 在一些实施方案中,例如相比于未与免疫调节组合物接触和/或转染的对应的一种或多种细胞(例如,相比于仅用阴性对照或仅用细胞培养基处理的对应的一种或多种细胞),本公开的免疫调节组合物诱导或增加与本公开的免疫调节组合物接触和/或转染的一种或多种细胞的IFN- ζ 的表达或分泌。在一些实施方案中,诱导或增加是至少约1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%、300%、350%、

400%、450%、500%、550%、600%、650%、700%、750%、800%、850%、900%、950%、1000%或更多中的任一者。在一些实施方案中,一种或多种细胞为人类细胞。在一些实施方案中,一种或多种细胞为人外周血单核细胞。在一些实施方案中,一种或多种细胞为浆细胞样树突状细胞。

[0272] 在一些实施方案中,例如,相比于未与免疫调节组合物接触和/或转染的对应的一种或多种细胞(例如,相比于仅用阴性对照或仅用细胞培养基处理的对应的一种或多种细胞),本公开的免疫调节组合物使与本公开的免疫调节组合物接触和/或转染的一种或多种细胞中的TLR8的活性增加小于约50%、小于约40%、小于约30%、小于约20%、小于约15%、小于约10%、小于约5%、小于约2%、或小于约1%。在一些实施方案中,一种或多种细胞为人类细胞。在一些实施方案中,一种或多种细胞为人外周血单核细胞。在一些实施方案中,一种或多种细胞为单核细胞。

[0273] 在一些实施方案中,例如,相比于未与免疫调节组合物接触和/或转染的对应的一种或多种细胞(例如,相比于仅用阴性对照或仅用细胞培养基处理的对应的一种或多种细胞),本公开的免疫调节组合物使与本公开的免疫调节组合物接触和/或转染的一种或多种细胞的炎症性细胞因子诸如TNF α 的表达或分泌增加小于约50%、小于约40%、小于约30%、小于约20%、小于约15%、小于约10%、小于约5%、小于约2%、或小于约1%。在一些实施方案中,一种或多种细胞为人类细胞。在一些实施方案中,一种或多种细胞为人外周血单核细胞。在一些实施方案中,一种或多种细胞为单核细胞。

[0274] 在一些实施方案中,例如,相比于未与免疫调节组合物接触和/或转染的对应的一种或多种细胞(例如,相比于仅用阴性对照或仅用细胞培养基处理的对应的一种或多种细胞),本公开的免疫调节组合物诱导与本公开的免疫调节组合物接触和/或转染的一种或多种细胞的NF κ -B依赖性细胞因子的表达或分泌或使该表达或分泌增加小于约50%、小于约40%、小于约30%、小于约20%、小于约15%、小于约10%、小于约5%、小于约2%、或小于约1%。在一些实施方案中,一种或多种细胞为人类细胞。在一些实施方案中,一种或多种细胞为人外周血单核细胞。在一些实施方案中,一种或多种细胞为单核细胞。

[0275] 在一些实施方案中,一种或多种细胞的I型IFN、炎症性细胞因子和/或NF κ -B依赖性细胞因子的表达或分泌可以使用本领域已知的任何合适的方法来测量,诸如酶联免疫吸附测定(ELISA)、免疫印迹、免疫测定,诸如Luminex测定(参见例如www.rndsystems.com/what-luminex-assay)、基于珠粒的免疫测定、基于电化学发光的方法,诸如Meso Scale Discovery (MSD)、通过流式细胞术或质谱分析的细胞因子的细胞内染色。在一些实施方案中,一种或多种细胞的I型IFN、炎症性细胞因子和/或NF κ -B依赖性细胞因子的表达或分泌可以基于I型IFN、炎症性细胞因子和/或NF κ -B依赖性细胞因子的mRNA水平进行评估,例如使用qPCR、RNA测序、基于微阵列的方法或本领域已知的用于测量mRNA的任何其他合适的方法。

[0276] 在一些实施方案中,本公开的免疫调节组合物调节一种或多种B细胞,例如一种或多种天然B细胞、活化B细胞和/或记忆B细胞的活性。在一些实施方案中,本公开的免疫调节组合物增加或增强一种或多种B细胞的活化,例如基于B细胞活化标志物诸如CD69、CD80或CD86的表达进行评估。在一些实施方案中,本公开的免疫调节组合物增加或增强B细胞增殖。在一些实施方案中,本公开的免疫调节组合物增加或增强类别转换重组。在一些实施方

案中,本公开的免疫调节组合物增加或增强抗体分泌。在一些实施方案中,本公开的免疫调节组合物增加或增强B细胞表达或细胞因子的分泌。在一些实施方案中,B细胞活化标志物和/或细胞因子可以使用本领域已知的任何合适的方法来测量,诸如酶联免疫吸附测定(ELISA)、免疫印迹、免疫测定,诸如Luminex测定(参见例如www.rndsystems.com/what-luminex-assay)、基于珠粒的免疫测定、基于电化学发光的方法,诸如Meso Scale Discovery (MSD)、通过流式细胞术或质谱分析的细胞因子的细胞内染色。在一些实施方案中,一种或多种B细胞的B细胞活化标志物和/或细胞因子的表达或分泌可以基于标志物或细胞因子的mRNA水平来评估,例如使用qPCR、RNA测序、基于微阵列的方法,或本领域已知的用于测量mRNA的任何其他合适的方法。

[0277] 在一些实施方案中,本公开的免疫调节组合物调节一种或多种干扰素刺激基因(ISG)的水平。在一些实施方案中,一种或多种ISG包括本领域已知的任何ISG。在一些实施方案中,一种或多种ISG包括Shamith等人,Nucleic Acids Research (2009) 37, suppl_1; Schoggins和Rice,Curr Opin Virol (2011) 1 (6): 519-525; Forster等人,Nucleic Acids Research (2013) (数据库期号): D1040-D1046; Liu等人,PNAS (2012) 109 (11): 4239-4244中描述的ISG中的任一者。可以评估的ISG的实例包括但不限于IFIT1、CXCL10、CXCL11、ISG15、CCL8、2'5' OAS、APOBEC3G、APOBEC3A、PKR、ISG56、Mx2、MDA5、IFI44、IRF7、OASL1、ISG20IFIT2、IFIT3、IFITM3、OAS2、OAS3、IFI16、IRF1、MX1或IDO。

[0278] 在一些实施方案中,一种或多种ISG的水平可以使用本领域已知的任何合适的方法来评估,诸如酶联免疫吸附测定(ELISA)、免疫印迹、免疫测定,诸如Luminex测定(参见例如www.rndsystems.com/what-luminex-assay)、基于珠粒的免疫测定、基于电化学发光的方法,诸如Meso Scale Discovery (MSD)、通过流式细胞术或质谱分析的细胞因子的细胞内染色。在一些实施方案中,一种或多种ISG的水平可以基于一种或多种ISG的mRNA水平来评估,例如使用qPCR、RNA测序、基于微阵列的方法或本领域已知的用于测量mRNA的任何其他合适的方法。

[0279] 药物组合物

[0280] 在一些方面,本文提供包含本公开的免疫调节组合物的药物组合物。此类药物组合物可以包含一种或多种任选的药用赋形剂(Remington's Pharmaceutical Sciences第16版,Osol,A.编辑(1980)),并且可以呈冻干制剂或水溶液的形式。

[0281] 药用赋形剂在所采用的剂量和浓度下通常对接受者是无毒的。可用于本公开的药物组合物的示例性药用赋形剂包括以下项中的一者或多者:缓冲剂,诸如磷酸盐、柠檬酸盐和其他有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和蛋氨酸;防腐剂(诸如十八烷基二甲基苄基氯化铵;氯化六甲双铵;苯扎氯铵;苄索氯铵;苯酚、丁醇或苄醇;对羟基苯甲酸烷基酯,诸如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯;儿茶酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;间甲酚);低分子量(小于约10个残基)多肽;蛋白质,诸如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,诸如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其他碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,诸如EDTA;糖,诸如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨糖醇;成盐抗衡离子,诸如钠;金属络合物(例如锌蛋白络合物);和/或表面活性剂。

[0282] 可用于本公开的药物组合物的示例性药用赋形剂进一步包括一种或多种间质药

物分散剂,诸如可溶性活性透明质酸酶糖蛋白(sHASEGP),例如人可溶性PH-20透明质酸酶糖蛋白,诸如rHuPH20 (HYLENEX®, Baxter International, Inc.)。某些示例性sHASEGP和使用方法(包括rHuPH20)描述于美国专利公开号2005/0260186和2006/0104968中。在一个方面中,将sHASEGP与一种或多种另外的糖胺聚糖酶(诸如软骨素酶)组合。

[0283] 本公开的药物组合物的活性成分可以包埋在例如通过凝聚技术或通过界面聚合而制备的微胶囊(例如分别为羟甲基纤维素或明胶微胶囊和聚(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊)中;包埋在胶体药物递送系统(例如,脂质体、白蛋白微球、微乳剂、纳米粒子和纳米胶囊)中;或包埋在粗乳剂中。此类技术公开于Remington's Pharmaceutical Sciences第16版, Osol, A. 编辑(1980)中。

[0284] 可以制备缓释制备物。缓释制备物的合适示例包括固态疏水聚合物的半透性基质,该基质是例如膜或微胶囊等成型制品的形式。

[0285] 在一些实施方案中,本公开的药物组合物包含鸟苷或鸟苷衍生物。在一些实施方案中,鸟苷衍生物为2'3'环GMP、7-硫杂-8-氧代鸟苷、7-脱氮鸟苷、7-烯丙基-8-氧代鸟苷、7-脱氮-dG、9-己基-鸟嘌呤或其任意组合。

[0286] 用于体内施用的制剂通常是无菌的。例如,无菌可以通过无菌过滤膜过滤而容易地实现。

[0287] 在一些实施方案中,本公开的药物组合物是疫苗组合物。疫苗组合物是指在施用后诱导免疫应答,例如细胞免疫应答的药物组合物,其识别并攻击病原体或患病细胞,诸如癌细胞。疫苗可用于预防或治疗疾病。本公开的疫苗组合物可以包括本公开的RNA配体、药用载体例如聚-L-精氨酸或DOTAP、以及一种或多种的药用赋形剂、本文所述的任何另外的药剂、化合物、分子或成分、和/或本领域已知的任何合适的附加剂。

[0288] 在一些实施方案中,本公开的药物组合物是佐剂组合物。佐剂组合物是指在施用后增强免疫应答,例如细胞免疫应答的任何物质或物质组合,其识别并攻击病原体或患病细胞,诸如癌细胞。佐剂可用于预防或治疗疾病。本公开的佐剂组合物可以包括本公开的RNA配体、药用载体例如聚-L-精氨酸或DOTAP、以及一种或多种的药用赋形剂、本文所述的任何另外的药剂、化合物、分子或成分、和/或本领域已知的任何合适的附加剂。在一些实施方案中,本公开的免疫调节组合物或本公开的药物组合物可以用作另一种治疗的佐剂,诸如疫苗,例如抗病毒疫苗、抗菌疫苗或抗癌疫苗。

[0289] 另外的治疗剂

[0290] 在一些实施方案中,本公开的药物组合物可含有多于一种对于所治疗的特定适应症是必需的活性组分,优选是具有不会彼此不利地影响的互补活性的活性成分。例如,除了本公开的免疫调节组合物(即,包含本公开的RNA配体)之外,可能期望在药物组合物中包含另外的药剂,诸如另一种免疫调节组合物、核酸、蛋白质或多肽(例如抗体或其片段)、疫苗或疫苗组合物、佐剂和/或一种或多种药物,例如化疗剂、细胞毒性剂、细胞因子、生长抑制剂、抗激素剂,和/或心脏保护剂。在一些实施方案中,本公开的药物组合物包含本公开的免疫调节组合物和以下项中的一者或多者:免疫刺激剂、抗病毒剂、抗生素、抗真菌剂、抗寄生虫剂、抗菌剂、抗肿瘤剂、趋化因子、生长因子、抗血管生成因子、化疗剂、抗体、基因沉默剂或细胞因子(例如,I型IFN,诸如IFN- α 和/或IFN- β)。此类分子或药剂适合地以对预期目的有效的量组合存在。

[0291] 核酸、载体和宿主细胞

[0292] 在一些实施方案中,提供具有包含本公开的任何RNA配体的核苷酸序列的分离的核酸。在一些实施方案中,提供包含此类核酸的一种或多种载体(例如表达载体)。在一些实施方案中,还提供包含此类核酸或载体的宿主细胞。在一些实施方案中,宿主细胞为真核的或原核的。本公开的宿主细胞还包括,但不限于分离的细胞、体外培养的细胞和离体培养的细胞。

[0293] 在一些实施方案中,提供制备本公开的RNA配体的方法。在一些实施方案中,该方法包括在适合RNA配体表达的条件下培养包含核酸或载体的本公开的宿主细胞,该核酸或载体包含RNA配体。在一些实施方案中,随后从宿主细胞(或宿主细胞培养基)回收RNA配体。关于本公开的RNA配体的重组产生,可以将包含RNA配体的核酸分离并插入一或多个载体中以便于在宿主细胞中进一步克隆和/或表达。此类核酸可使用常规方法容易地分离并且测序。

[0294] 包含核酸序列的合适载体包括但不限于克隆载体和表达载体,该核酸序列包含本公开的RNA配体。合适的克隆载体可以根据标准技术构建,或者可以选自本领域可获得的大量克隆载体。虽然所选择的克隆载体可以根据打算使用的宿主细胞而变化,但有用的克隆载体通常具有自我复制的能力,可以具有特定限制性内切核酸酶的单一靶标,和/或可以携带用于标志物的基因,该标志物可用于选择包含载体的克隆。合适的实例包括质粒和细菌病毒,例如pUC18、pUC19、Bluescript(例如pBS SK+)及其衍生物、mp18、mp19、pBR322、pMB9、ColE1、pCR1、RP4、噬菌体DNA和穿梭载体诸如pSA3和pAT28。这些和许多其他克隆载体可从商业供应商,诸如BioRad、Stratagene和Invitrogen获得。

[0295] 用于克隆或表达本公开的RNA配体、核酸或载体的合适宿主细胞包括原核或真核细胞。例如,可以使用真核微生物,诸如丝状真菌或酵母。来自植物和昆虫的细胞也可用作宿主细胞。已经鉴定出了可以与昆虫细胞结合使用的许多杆状病毒株。植物细胞培养物也可用作宿主。脊椎动物细胞也可用作宿主。例如,适于在悬浮液中生长的哺乳动物细胞系可能是有用的。有用的哺乳动物宿主细胞系的其他实例为由SV40转化的猴肾CV1系(COS-7);人胚肾系(293或293细胞,如例如在Graham等人,J.Gen Virol.36:59(1977)中所述);幼仓鼠肾细胞(BHK);小鼠塞尔托利氏细胞(TM4细胞,如例如在Mather,Biol.Reprod.23:243-251(1980)中所述);猴肾细胞(CV1);非洲绿猴肾细胞(VERO-76);人宫颈癌细胞(HELA);犬肾细胞(MDCK);布法罗大鼠肝细胞(BRL 3A);人肺细胞(W138);人肝细胞(Hep G2);小鼠乳腺肿瘤细胞(MMT 060562);TRI细胞(如例如在Mather等人,Annals N.Y.Acad.Sci.383:44-68(1982)中所述);MRC 5细胞;以及FS4细胞。其他有用的哺乳动物宿主细胞系包括中国仓鼠卵巢(CHO)细胞和骨髓瘤细胞系。

[0296] 治疗方法

[0297] 本文提供本公开的免疫调节组合物和/或药物组合物的体内治疗用途。

[0298] 在一些方面,本文提供用于使用本公开的免疫调节组合物和/或药物组合物选择性地活化个体中的TLR7的方法。在一些实施方案中,该方法包括向个体施用治疗有效量的本公开的免疫调节组合物和/或药物组合物。在一些实施方案中,本公开的免疫调节组合物和/或药物组合物作为单一药剂施用,或与一种或多种另外的治疗剂组合施用,例如,如本文所述。本文提供的用于选择性地活化个体中的TLR7的方法可用于预防或治疗某些疾病、

病症或病状,诸如感染、免疫病症、癌症;和/或用于调节个体中的免疫系统。

[0299] 如本文所用,“预防(preventing/prevention/prevent)”等包括提供针对个体中的特定疾病、病症或病状的发生或复发的预防。个体可能倾向于、易患特定疾病、病症或病状,或者处于发展此类疾病、病症或病状的风险中,但尚未被诊断患有该疾病、病症或病状。“有风险”发展疾病、病症或病状的个体可能具有或可能不具有可检测的疾病或疾病症状,并且在本文所述的治疗方法之前可能已表现出或可能未表现出可检测的疾病或疾病症状。“有风险”表示个体具有一种或多种风险因素,该风险因素是与本领域已知的特定疾病、病症或病状的发展相关的可测量参数。具有这些风险因素中的一者或多者的个体比没有这些风险因素中的一者或多者的个体具有更高的发展特定疾病、病症或病状的可能性。

[0300] 如本文所用,“治疗(treat/treating/treatment)”等是指被设计为在临床病理过程中改变被治疗的个体的自然进程的临床干预。理想的治疗效果包括降低进展速度、减缓或减轻病理状态以及特定疾病、病症或病状的缓解或改善预后。例如,如果与特定疾病、病症或病状相关的一种或多种症状得到减轻或消除,则个体被成功“治疗”。

[0301] 如本文所用,“治疗有效量”至少是实现特定疾病、病症或病状的可测量改善所需的药剂(诸如本公开的免疫调节组合物或药物组合物)的最小量。本文的治疗有效量可以根据诸如患者的疾病状态、年龄、性别和体重以及药剂在个体中引起预期应答的能力等因素而变化。治疗有效量也是治疗有益作用超过药剂的任何毒性或有害作用的量。

[0302] 感染

[0303] Toll样受体,诸如TLR7,以及I型IFN在调节先天性和适应性免疫系统对病原体(诸如病毒、细菌、寄生虫和真菌)感染的应答方面具有多种已知作用。参见,例如,Lester和Li, *J Mol Biol* (2014) 426 (6) :1246-1264;MacNab等人, *Nat Rev Nutrition* (2020) 15 (2) :87-103。因此,选择性地活化TLR7的本公开的免疫调节组合物和/或药物组合物可用于预防或治疗病毒感染、细菌感染、寄生虫感染和/或真菌感染。

[0304] 在一些方面,本文提供用于预防或治疗个体中的病毒感染的方法。在一些实施方案中,该方法包括向个体施用治疗有效量的本公开的免疫调节组合物或药物组合物;或治疗有效量的本公开的免疫调节组合物或药物组合物与一种或多种用于预防或治疗病毒感染的另外的药剂组合。可以使用本公开的免疫调节组合物和/或药物组合物来预防或治疗的病毒感染的实例包括但不限于:呼吸道病毒,诸如腺病毒、流感病毒、副流感病毒、呼吸道合胞病毒(RSV)、冠状病毒和鼻病毒;腮腺炎、麻疹和其他儿童病毒,诸如副粘病毒、风疹病毒、风疹、细小病毒和水痘;痘病毒,诸如天花(variola);肠道病毒,诸如脊髓灰质炎病毒、柯萨奇病毒甲型和乙型、埃可病毒、埃可病毒和甲型肝炎;肝炎病毒,诸如甲型、乙型、丙型、丁型和戊型肝炎;疱疹病毒,诸如人类单纯疱疹病毒1型(HHSV1、HSV-1)、人类单纯疱疹病毒2型(HHSV2、HSV-2)、人类巨细胞病毒(HCMV)、EB病毒(EBV)、水痘带状疱疹病毒(VZV)、人疱疹病毒6(HHV6)、人疱疹病毒7(HHSV7、HHV7)和人疱疹病毒8(HHSV8、HHV8);弹状病毒,诸如狂犬病病毒;乳多空病毒,诸如人乳头瘤病毒(HPV)以及JC和BK病毒;逆转录病毒,诸如HIV-1、HIV-2和人类T淋巴细胞病毒(HTLV);虫媒病毒,诸如登革热病毒、黄热病、日本脑炎病毒、西尼罗河病毒、蜱传脑炎、水泡病毒、罗斯河病毒、辛德维斯病毒和白蛉病毒;朊病毒;以及其他病毒感染,包括但不限于埃博拉病毒、马尔堡病毒、拉沙病毒、非洲猪瘟病毒、麻疹病毒、汉坦病毒、狂犬病病毒和严重急性呼吸综合征(SARS)。

[0305] 在一些方面,本文提供用于预防或治疗个体中的细菌感染的方法。在一些实施方案中,该方法包括向个体施用治疗有效量的本公开的免疫调节组合物或药物组合物;或治疗有效量的本公开的免疫调节组合物或药物组合物与一种或多种用于预防或治疗细菌感染的另外的药剂组合。可以使用本公开的免疫调节组合物和/或药物组合物来预防或治疗的细菌感染的实例包括但不限于:无乳链球菌、大肠杆菌、单核细胞增生李斯特氏菌、肺炎链球菌、流感嗜血杆菌、脑膜炎奈瑟菌、克雷伯菌属种、葡萄球菌金黄色葡萄球菌、肺炎链球菌、结核分枝杆菌、新型隐球菌或破伤风梭菌。可以使用本公开的免疫调节组合物和/或药物组合物来预防或治疗的细菌感染的其他实例包括但不限于:皮肤感染,诸如金黄色葡萄球菌、酿脓链球菌或痤疮丙酸杆菌;耳部感染,诸如肺炎链球菌、卡他莫拉菌、流感嗜血杆菌、铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌;眼部感染,诸如金黄色葡萄球菌、肺炎链球菌、酿脓链球菌、流感嗜血杆菌、肠球菌、肠杆菌、铜绿假单胞菌、卡他莫拉菌、消化链球菌、草绿色链球菌、白喉棒杆菌、奇异变形杆菌、肺炎克雷伯氏菌、粘质沙雷氏菌、大肠杆菌、嗜水气单胞菌、莫拉菌属、多杀性巴氏杆菌、不动杆菌属、芽孢杆菌属、沙眼衣原体、梭菌属、淋病奈瑟氏菌、脑膜炎奈瑟氏菌或表皮葡萄球菌;呼吸道感染,诸如肺炎链球菌、金黄色葡萄球菌、肺炎支原体、肺炎衣原体、酿脓链球菌、大肠杆菌、无乳链球菌、沙眼衣原体、肺炎支原体或流感嗜血杆菌;或胃肠道感染,诸如变形链球菌、远缘链球菌、链球菌属种、干酪乳杆菌、放线菌属种、梭杆菌属种、中间普雷沃氏菌、齿状密螺旋体或双歧杆菌属种。

[0306] 在一些方面,本文提供用于预防或治疗个体中的真菌感染的方法。在一些实施方案中,该方法包括向个体施用治疗有效量的本公开的免疫调节组合物或药物组合物;或治疗有效量的本公开的免疫调节组合物或药物组合物与一种或多种用于预防或治疗真菌感染的另外的药剂组合。可以使用本公开的免疫调节组合物和/或药物组合物来预防或治疗的真菌感染的实例包括但不限于:伞枝犁头霉(*Absidia corymbifera*)、*Acremonia falciforme*、*A. kiliense*、*A. Recifei*、皮炎芽生菌(*Ajellomyces dermatitidis*)、*A. Capsulata*、曲霉菌属种(例如,黄曲霉、烟曲霉、构巢曲霉、黑曲霉、土曲霉)、念珠菌属种(例如,白色念珠菌、光滑念珠菌、吉勒蒙念珠菌(*C. Guillermondii*)、克柔念珠菌(*C. krusei*)、*C. Parapsilosis*、克氏念珠菌(*C. ke yr*)、热带念珠菌)、新型隐球菌、雅致小克银汉霉(*Cunninghamella elegans*)、伊蒙微小菌(*Emmonsia parva*)、絮状表皮癣菌、皮外癣菌(*Exophiala dermatitidis*)、*E. Werneckii*、甄氏外瓶霉(*E. Jeanselmei*)、棘状外瓶霉(*E. spinifera*)、*E. richardsiae*、*Filobasidiella neoformans*、紧密着色真菌(*Fonsecaea Compacta*)、*F. pedrosoi*、荚膜组织胞浆菌、*Leptoshaeria senegalensis*、如马杜拉足肿菌(*Madurella mycetomatis*)、*M. Grisea*、马拉色菌、小孢子菌属种、*Neotestudina rosatii*、巴西副球孢子菌(*Paracoccidioides brasiliensis*)、马尔尼菲青霉菌、疣状瓶霉、何德毛结节菌(*Piedraia hortae*)、卡氏肺孢菌、波氏足肿菌(*Pseudallescheria boydii*)、罗默罗氏核毛菌(*Pyrenochaeta romeroi*)、微小根毛霉、申克孢子丝菌、毛癣菌属种、白色毛孢子菌或木丝菌(*Xylohypha bantiana*)。

[0307] 在一些方面,本文提供用于预防或治疗个体中的寄生虫感染的方法。在一些实施方案中,该方法包括向个体施用治疗有效量的本公开的免疫调节组合物或药物组合物;或治疗有效量的本公开的免疫调节组合物或药物组合物与一种或多种用于预防或治疗寄生虫感染的另外的药剂组合。可以使用本公开的免疫调节组合物和/或药物组合物来预防或

治疗的寄生虫感染的实例包括但不限于蠕虫感染,诸如肠道蠕虫感染。可以使用本公开的免疫调节组合物和/或药物组合来预防或治疗的寄生虫感染的其他实例包括但不限于:棘阿米巴原虫病、非洲昏睡病(非洲锥虫病)、泡状包虫病(棘球蚴病、包虫病)、阿米巴病(溶组织内阿米巴病)、美洲锥虫病(恰加斯病)、钩虫病(钩虫)、管圆线虫病(管圆线虫属)、异尖线虫病(异尖线虫、伪新地线虫)、蛔虫病(蛔虫属、肠道蛔虫)、巴贝斯虫病(巴贝虫属)、小袋虫病(小袋虫属)、balamuthia、贝氏蛔虫病(贝氏蛔虫属、浣熊蛔虫)、血吸虫病(血吸虫)、人芽囊虫感染、毛细虫病(毛细线虫属)、尾蚴性皮炎(游泳者痒)、恰加斯病(美洲锥虫病)、迈氏唇鞭毛虫、华支睾吸虫病(支睾吸虫属)、皮肤幼虫移行症、钩虫病、隐孢子虫病(隐孢子虫)、环孢子虫病(环孢子虫)、囊尾蚴病(脑囊虫病)、囊等孢子虫病(Cystoisosporiasis)、等孢子虫、脆双核阿米巴(*Dientamoeba fragilis*)、裂头绦虫病(裂头绦虫)、犬二孔绦虫感染、恶丝虫病(恶丝虫属)、DPDx、麦地那龙线虫病(麦地那龙线虫病)、犬复殖孔绦虫、包虫病(囊性、泡型包虫病)、象皮病(丝虫病、淋巴丝虫病)、微小内蜒阿米巴(*Endolimax nana*)、结肠内阿米巴、迪斯帕内阿米巴、哈门氏内阿米巴、溶组织内阿米巴(阿米巴病)、*entamoeba polecki*、蛲虫病(蛲虫)、片形吸虫病(片形吸虫)、姜片虫病(姜片虫)、丝虫病、贾第鞭毛虫病(贾第鞭毛虫)、颚口线虫病(颚口线虫属)、异形吸虫病(异形吸虫)、包虫病、膜壳绦虫病(膜壳绦虫)、肠蛔虫病(蛔虫病、蛔虫感染)、布氏嗜碘内阿米巴(*Iodamoeba buetschlii*)、等孢子球虫属、黑热病(利什曼病、利什曼原虫)、角膜炎(棘阿米巴属)、肝片吸虫(支睾吸虫病、后睾吸虫病、肝片吸虫病)、罗阿丝虫病(罗阿丝虫)、淋巴丝虫病、疟疾(疟原虫)、微孢子虫病(微孢子虫)、螨虫、虱子、蝇蛆病、纳氏虫属、神经囊尾蚴病(囊尾蚴病)、眼幼虫移行症(弓蛔虫病、弓蛔虫、内脏幼虫移行症)、盘尾丝虫病(河盲症)、后睾吸虫病(后睾吸虫属)、肺吸虫病(并殖吸虫属)、虱病、癣菌病、蛲虫病、耶氏肺孢子虫肺炎、伪地虫病(异尖线虫病、异尖线虫)、贝氏蛔虫病(贝氏蛔虫属)、Sappinia、肉孢子虫病(肉孢子虫病)、血吸虫病(血吸虫)、昏睡病(锥体虫病)、土源性线虫、粪类圆线虫病(粪类圆线虫)、带绦虫病(绦虫)、弓形虫病(弓形虫)、旋毛虫病(Trichinosis)、毛线虫病(Trichinellosis)、毛滴虫病(毛滴虫)或鞭虫病(鞭虫,鞭虫属)。

[0308] 免疫病症

[0309] Toll样受体(诸如TLR7)以及I型IFN在免疫病症(诸如免疫缺陷、自身免疫性病症或过敏)的免疫病理学中具有多种已知作用。参见例如,Uematsu and Akira,Expert Opin Biol Ther(2006)6(3):203-14;Crow等人,Annual Review of Pathology:Mechanisms of Disease-Type I Interferons in Autoimmune Disease(2019)14:369-393;以及Wang等人,Front Immunol(2017)8:1431。因此,选择性地活化TLR7的本公开的免疫调节组合物和/或药物组合可用于预防或治疗免疫病症,诸如免疫缺陷、自身免疫性病症或过敏。

[0310] 在一些方面,本文提供用于预防或治疗个体中的免疫病症的方法。在一些实施方案中,该方法包括向个体施用治疗有效量的本公开的免疫调节组合或药物组合;或治疗有效量的本公开的免疫调节组合或药物组合与一种或多种用于预防或治疗免疫病症的另外的药剂组合。可以使用本公开的免疫调节组合物和/或药物组合来预防或治疗的免疫病症的实例包括但不限于自身免疫性疾病、免疫缺陷和过敏。

[0311] 可以使用本公开的免疫调节组合物和/或药物组合来预防或治疗的过敏的非限制性实例包括季节性过敏、肥大细胞增多症、常年性过敏、过敏反应、食物过敏、过敏性鼻炎

或特应性皮炎。

[0312] 可以使用本公开的免疫调节组合物和/或药物组合物来预防或治疗的免疫缺陷的非限制性实例包括：原发性免疫缺陷，诸如严重联合免疫缺陷 (SCID)、迪乔治综合征、高免疫球蛋白E综合征（也称为乔布氏综合征）、常见变异型免疫缺陷 (CVID)、慢性肉芽肿病 (CGD)、Wiskott-Aldrich综合征 (WAS)、自身免疫性淋巴增殖综合征 (ALPS)、高IgM综合征、白细胞粘附缺陷症 (LAD)、NF- κ B必需修饰因子 (NEMO) 突变、选择性免疫球蛋白A缺乏症、X连锁无丙种球蛋白血症、X连锁淋巴增殖性疾病 (XLP) 和共济失调-毛细血管扩张症；继发性免疫缺陷症，诸如获得性免疫缺陷综合征 (AIDS)；药物诱发的免疫缺陷或免疫抑制；或由慢性血液透析、创伤或外科手术引起的免疫抑制。

[0313] 可以使用本公开的免疫调节组合物和/或药物组合物来预防或治疗的自身免疫性病症的非限制性实例包括：狼疮、硬皮病、溶血性贫血、血管炎、1型糖尿病、格雷夫斯病、关节炎（包括类风湿性关节炎、幼年型类风湿性关节炎、骨关节炎、银屑病关节炎）、多发性硬化症、糖尿病、古德帕斯彻综合征、恶性贫血、肌病、乳糜泻、炎症性肠病、再生障碍性贫血、莱姆病、脑脊髓炎、重症肌无力、系统性红斑狼疮、自身免疫性甲状腺炎、皮炎（包括特应性皮炎和湿疹性皮炎）、银屑病、西奥格伦综合征、克罗恩病、口腔溃疡、虹膜炎、结膜炎、角结膜炎、溃疡性结肠炎、哮喘、过敏性哮喘、皮肤红斑狼疮、阴道炎、直肠炎、药疹、麻风逆转反应、麻风结节性红斑、自身免疫性葡萄膜炎、过敏性脑脊髓炎、急性坏死性出血性脑病、特发性双侧进行性感音神经性听力损失、纯红细胞贫血、特发性血小板减少症、多软骨炎、韦格纳肉芽肿、慢性活动性肝炎、史蒂文斯-约翰逊综合征、特发性口炎性腹泻、扁平苔藓、结节病、原发性胆汁性肝硬化、后葡萄膜炎和间质性肺纤维化。

[0314] 癌症

[0315] Toll样受体（诸如TLR7）以及I型IFN在调节抗肿瘤免疫应答中具有多种已知作用。参见例如，Urban-Wojciuk等人，Front. Immunol (2019) 10:2388；Musella等人，(2017) 6(5) : e1314424；以及Zitvogel等人，Nature Reviews Immunology (2015) 15:405-414。因此，选择性地活化TLR7的本公开的免疫调节组合物和/或药物组合物可用于预防或治疗癌症。

[0316] 在一些方面，本文提供用于预防或治疗个体中的癌症的方法。在一些实施方案中，该方法包括向个体施用治疗有效量的本公开的免疫调节组合物或药物组合物；或治疗有效量的本公开的免疫调节组合物或药物组合物与一种或多种用于预防或治疗癌症的另外的药剂组合。可以使用本公开的免疫调节组合物和/或药物组合物来预防或治疗的癌症的实例包括但不限于癌、肉瘤、淋巴瘤、白血病、生殖细胞肿瘤和母细胞瘤。可以使用本公开的免疫调节组合物和/或药物组合物来预防或治疗的癌症的具体实例包括但不限于：骨和肌肉肉瘤，诸如软骨肉瘤、尤文氏肉瘤、骨恶性纤维组织细胞瘤/骨肉瘤、骨肉瘤、横纹肌肉瘤和心脏病；脑和神经系统癌症，诸如星形细胞瘤、脑干胶质瘤、毛细胞星形细胞瘤、室管膜瘤、原始神经外胚层肿瘤、小脑星形细胞瘤、脑星形细胞瘤、胶质母细胞瘤、神经胶质瘤、髓母细胞瘤、神经母细胞瘤、少突胶质细胞瘤、松果体星形细胞瘤、垂体腺瘤以及视觉通路和下丘脑胶质瘤；乳腺癌，诸如浸润性小叶癌、管状癌、浸润性筛状癌、髓样癌、男性乳腺癌、叶状肿瘤和炎性乳腺癌；内分泌系统癌症，诸如肾上腺皮质癌、胰岛细胞癌（内分泌胰腺）、多发性内分泌肿瘤综合征、甲状旁腺癌、嗜铬细胞瘤、甲状腺癌和默克尔细胞癌；眼癌，诸如葡萄膜黑色素瘤和视网膜母细胞瘤；胃肠道癌症，诸如肛门癌、阑尾癌、胆管癌、类癌、胃肠道癌、结

肠癌、肝外胆管癌、胆囊癌、胃癌、胃肠道类癌、胃肠道间质瘤(GIST)、肝细胞癌、胰腺癌、胰岛细胞癌和直肠癌;泌尿生殖系统和妇科癌症,诸如膀胱癌、宫颈癌、子宫内膜癌、性腺外生殖细胞肿瘤、卵巢癌、卵巢上皮癌(表面上皮间质肿瘤)、卵巢生殖细胞肿瘤、阴茎癌、肾细胞癌、肾盂和输尿管移行细胞癌、前列腺癌、睾丸癌、妊娠滋养细胞肿瘤、输尿管和肾盂移行细胞癌、尿道癌、子宫肉瘤、阴道癌、外阴癌和威尔姆斯肿瘤;头颈部癌,诸如食道癌、头颈癌、鼻咽癌、口腔癌、口咽癌、鼻窦和鼻腔癌、咽癌、唾液腺癌和下咽癌;造血系统癌症,诸如急性双表型白血病、急性嗜酸性粒细胞白血病、急性淋巴细胞白血病、急性粒细胞白血病、急性粒细胞树突状细胞白血病、艾滋病相关淋巴瘤、间变性大细胞淋巴瘤、血管免疫母细胞T细胞淋巴瘤、B细胞幼淋巴细胞白血病、伯基特淋巴瘤、慢性淋巴细胞白血病、慢性粒细胞白血病、皮肤T细胞淋巴瘤、弥漫性大B细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、毛细胞白血病、肝脾T细胞淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、毛细胞白血病、血管内大B细胞淋巴瘤、大颗粒淋巴细胞白血病、淋巴浆细胞淋巴瘤、淋巴瘤样肉芽肿、套细胞淋巴瘤、边缘区B细胞淋巴瘤、肥大细胞白血病、纵隔大B细胞淋巴瘤、多发性骨髓瘤/浆细胞肿瘤、骨髓增生异常综合征、粘膜相关淋巴组织淋巴瘤、蕈样肉芽肿、结节边缘B区细胞淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、前体B淋巴细胞白血病、原发性中枢神经系统淋巴瘤、原发性皮肤滤泡性淋巴瘤、原发性皮肤免疫细胞瘤、原发性渗出性淋巴瘤、浆母细胞淋巴瘤、塞扎里(Sézary)综合征、脾边缘区淋巴瘤和T细胞幼淋巴细胞白血病;皮肤癌,诸如基底细胞癌、鳞状细胞癌、皮肤附件肿瘤(例如皮脂腺癌)、黑色素瘤、默克尔细胞癌、原发性皮肤来源的肉瘤(例如隆起性皮肤纤维肉瘤)和原发性皮肤来源的淋巴瘤(例如蕈样真菌病);胸部和呼吸道癌症,诸如支气管腺瘤/类癌、小细胞肺癌、间皮瘤、非小细胞肺癌、胸膜肺母细胞瘤、喉癌、胸腺瘤和胸腺癌;与艾滋病相关的癌症;卡波西肉瘤;上皮样血管内皮瘤(EHE);促结缔组织增生性小圆细胞瘤和脂肪肉瘤。

[0317] 增强免疫应答

[0318] Toll样受体(诸如TLR7)以及I型IFN在调节免疫系统中具有多种已知作用,包括但不限于调节体液免疫、适应性免疫和抗原特异性T细胞应答。参见例如,Le Bon等人,Immunity(2001)14(4):461-470;Fitzgerald and Kagan,Cell(2020)180(6):1044-1066;以及Li等人,Front Immunol(2019)10:2191。因此,选择性地活化TLR7的本公开的免疫调节组合物和/或药物组合物可用于增加、诱导或增强个体中的体液免疫、适应性免疫、B细胞应答和/或抗原特异性T细胞应答。

[0319] 在一些方面,本文提供用于增加、诱导或增强个体中的体液免疫的方法。在一些实施方案中,该方法包括向个体施用治疗有效量的本公开的免疫调节组合物或药物组合物;或治疗有效量的本公开的免疫调节组合物或药物组合物与一种或多种另外的药剂组合。

[0320] 在一些方面,本文提供用于增加、诱导或增强个体中的适应性免疫的方法。在一些实施方案中,该方法包括向个体施用治疗有效量的本公开的免疫调节组合物或药物组合物;或治疗有效量的本公开的免疫调节组合物或药物组合物与一种或多种另外的药剂组合。

[0321] 在一些方面,本文提供用于增加、诱导或增强个体中的抗原特异性T细胞应答(例如,CD8⁺T细胞)的方法。在一些实施方案中,该方法包括向个体施用治疗有效量的本公开的免疫调节组合物或药物组合物;或治疗有效量的本公开的免疫调节组合物或药物组合物与一种或多种另外的药剂组合。

[0322] 在一些方面,本文提供用于增加、诱导或增强个体中的B细胞活化和/或增殖的方法。在一些实施方案中,该方法包括向个体施用治疗有效量的本公开的免疫调节组合物或药物组合物;或治疗有效量的本公开的免疫调节组合物或药物组合物与一种或多种另外的药剂组合。

[0323] 在一些方面,本文提供用于增加、诱导或增强个体中的树突状细胞(例如,cDC、浆细胞样树突状细胞)活化和/或增殖的方法。在一些实施方案中,该方法包括向个体施用治疗有效量的本公开的免疫调节组合物或药物组合物;或治疗有效量的本公开的免疫调节组合物或药物组合物与一种或多种另外的药剂组合。

[0324] 在一些方面,本文提供用于增加、诱导或增强个体中的IL-12产生的方法。在一些实施方案中,该方法包括向个体施用治疗有效量的本公开的免疫调节组合物或药物组合物;或治疗有效量的本公开的免疫调节组合物或药物组合物与一种或多种另外的药剂组合。

[0325] 在一些方面,本文提供用于增加、诱导或增强个体中T细胞引发的方法。在一些实施方案中,该方法包括向个体施用治疗有效量的本公开的免疫调节组合物或药物组合物;或治疗有效量的本公开的免疫调节组合物或药物组合物与一种或多种另外的药剂组合。

[0326] 在一些方面,本文提供用于增加、诱导或增强个体中B细胞类别转换重组的方法。在一些实施方案中,该方法包括向个体施用治疗有效量的本公开的免疫调节组合物或药物组合物;或治疗有效量的本公开的免疫调节组合物或药物组合物与一种或多种另外的药剂组合。

[0327] 在一些方面,本文提供用于增加、诱导或增强个体中的B细胞抗体分泌的方法。在一些实施方案中,该方法包括向个体施用治疗有效量的本公开的免疫调节组合物或药物组合物;或治疗有效量的本公开的免疫调节组合物或药物组合物与一种或多种另外的药剂组合。

[0328] 在一些方面,本文提供用于增加、诱导或增强个体中的B细胞细胞因子分泌的方法。在一些实施方案中,该方法包括向个体施用治疗有效量的本公开的免疫调节组合物或药物组合物;或治疗有效量的本公开的免疫调节组合物或药物组合物与一种或多种另外的药剂组合。

[0329] 在本文所述的任何治疗方法的一些实施方案中,该方法进一步包括:在个体接受一剂或多剂本公开的免疫调节组合物和/或药物组合物之前和/或之后,测量从个体获得的样品中的TLR7活性的水平。在一些实施方案中,该方法进一步包括:在个体接受一剂或多剂本公开的免疫调节组合物和/或药物组合物之前和/或之后,测量从个体获得的样品中的一种或多种I型IFN(例如,IFN- α 、IFN- β 、IFN- κ 、IFN- δ 、IFN- ϵ 、IFN- τ 、IFN- ω 或IFN- ζ 中的一者或多者)的水平。在一些实施方案中,该方法进一步包括:在个体接受一剂或多剂本公开的免疫调节组合物和/或药物组合物之前和/或之后,测量从个体获得的样品中IFN- α 的水平。在一些实施方案中,该方法进一步包括:在个体接受一剂或多剂本公开的免疫调节组合物和/或药物组合物之前和/或之后,测量从个体获得的样品中一种或多种干扰素刺激基因(ISG)的水平。在一些实施方案中,一种或多种ISG包括本领域已知的任何ISG,例如Shamith等人,Nucleic Acids Research(2009) 37, suppl_1;Schoggins和Rice,Curr Opin Virol(2011) 1(6):519-525;Forster等人,Nucleic Acids Research(2013)(数据库期号):

D1040-D1046;Liu等人,PNAS (2012) 109 (11):4239-4244中描述的ISG中的任一者。可以评估的ISG的实例包括但不限于IFIT1、CXCL10、CXCL11、ISG15、CCL8、2'5'OAS、APOBEC3G、APOBEC3A、PKR、ISG56、Mx2、MDA5、IFI44、IRF7、OASL1、ISG20 IFIT2、IFIT3、IFITM3、OAS2、OAS3、IFI16、IRF1、MX1或ID0。

[0330] 在一些实施方案中,样品为血液样品、血浆样品或血清样品。在一些实施方案中,样品为组织活检,例如来自脾、一个或多个淋巴结或来自肿瘤。在一些实施方案中,I型IFN的水平可以使用本领域已知的任何合适的方法来测量,诸如酶联免疫吸附测定、免疫印迹、免疫测定,诸如Luminex测定(参见例如www.rndsystems.com/what-luminex-assay)、基于珠粒的免疫测定、基于电化学发光的方法,诸如Meso Scale Discovery (MSD)、通过流式细胞术或质谱分析的细胞因子的细胞内染色。在一些实施方案中,I型IFN的水平可以基于I型IFN的mRNA水平来评估,例如使用qPCR、RNA测序、基于微阵列的方法或本领域已知的用于测量mRNA的任何其他合适的方法。在一些实施方案中,I型IFN的水平可以通过荧光原位杂交(FISH)、qPCR或本领域已知的用于测量组织样品中的RNA水平的任何其他合适的方法来评估。在一些实施方案中,一种或多种ISG的水平可以使用本领域已知的任何合适的方法来评估,诸如酶联免疫吸附测定(ELISA)、免疫印迹、免疫测定,诸如Luminex测定(参见例如www.rndsystems.com/what-luminex-assay)、基于珠粒的免疫测定、基于电化学发光的方法,诸如Meso Scale Discovery (MSD)、通过流式细胞术或质谱分析的细胞因子的细胞内染色。在一些实施方案中,一种或多种ISG的水平可以基于一种或多种ISG的mRNA水平来评估,例如使用qPCR、RNA测序、基于微阵列的方法或本领域已知的用于测量mRNA的任何其他合适的方法。

[0331] 剂量和施用

[0332] 剂量

[0333] 本公开的免疫调节组合物和/或药物组合物的剂量和所需浓度可以根据设想的特定用途(例如本文所述的任何治疗方法)而变化。适当剂量或施用途径的确定完全在普通技术人员的技术范围内。动物实验为确定人类治疗的有效剂量提供可靠的指导。有效剂量的种间缩放可以按照Mordenti,J.和Chappell,W.“The Use of Interspecies Scaling in Toxicokinetics,”In Toxicokinetics and New Drug Development,Yacobi等人,编辑,Pergamon Press,New York 1989,第42-46页中所述的原则进行。

[0334] 对于本公开的任何免疫调节组合物和/或药物组合物的体内施用,正常剂量可以基于个体的体重和施用途径而变化。对于数天或更长时间的重复施用,取决于待治疗的疾病、病症或病状的严重程度,治疗持续直至所需的症状得到抑制。

[0335] 本公开的特定免疫调节组合物和/或药物组合物的剂量可以在已经给予本公开的免疫调节组合物和/或药物组合物的一次或多次施用的个体中凭经验确定。在一些实施方案中,向个体给予增量剂量的本公开的免疫调节组合物或药物组合物。

[0336] 在一些实施方案中,为了评估本公开的免疫调节组合物或药物组合物的功效,可以监测本公开的任何疾病、病症或病状的临床症状。在一些实施方案中,为了评估本公开的免疫调节组合物或药物组合物的功效,可以在个体接受一剂或多剂本公开的免疫调节组合物和/或药物组合物之前和/或之后测量从个体获得的样品中的TLR7活性的水平。在一些实施方案中,为了评估本公开的免疫调节组合物或药物组合物的功效,在个体接受一剂或多

剂本公开的免疫调节组合物和/或药物组合之前和/或之后,可以测量从个体获得的样品中的一种或多种I型IFN(例如,IFN- α 、IFN- β 、IFN- κ 、IFN- δ 、IFN- ϵ 、IFN- τ 、IFN- ω 或IFN- ζ 中的一者或多者)的水平。在一些实施方案中,为了评估本公开的免疫调节组合物或药物组合物的功效,可以在个体接受一剂或多剂本公开的免疫调节组合物和/或药物组合之前和/或之后测量从个体获得的样品中的IFN- α 的水平。在一些实施方案中,为了评估本公开的免疫调节组合物或药物组合物的功效,可以在个体接受一剂或多剂本公开的免疫调节组合物和/或药物组合之前和/或之后测量从个体获得的样品中的一种或多种干扰素刺激基因(ISG)的水平。在一些实施方案中,一种或多种ISG包括本领域已知的任何ISG,例如Shamith等人,Nucleic Acids Research(2009) 37, suppl_1;Schoggins和Rice,Curr Opin Virol(2011) 1(6):519-525;Forster等人,Nucleic Acids Research(2013)(数据库期号):D1040-D1046;Liu等人,PNAS(2012) 109(11):4239-4244中描述的ISG中的任一者。可以评估的ISG的实例包括但不限于IFIT1、CXCL10、CXCL11、ISG15、CCL8、2'5'OAS、APOBEC3G、APOBEC3A、PKR、ISG56、Mx2、MDA5、IFI44、IRF7、OASL1、ISG20IFIT2、IFIT3、IFITM3、OAS2、OAS3、IFI16、IRF1、MX1或ID0。

[0337] 在一些实施方案中,样品为血液样品、血浆样品或血清样品。在一些实施方案中,样品为组织活检,例如来自脾、一个或多个淋巴结或来自肿瘤。在一些实施方案中,I型IFN的水平可以使用本领域已知的任何合适的方法来测量,诸如酶联免疫吸附测定、免疫印迹、免疫测定,诸如Luminex测定(参见例如www.rndsystems.com/what-luminex-assay)、基于珠粒的免疫测定、基于电化学发光的方法,诸如Meso Scale Discovery (MSD)、通过流式细胞术或质谱分析的细胞因子的细胞内染色。在一些实施方案中,I型IFN的水平可以基于I型IFN的mRNA水平来评估,例如使用qPCR、RNA测序、基于微阵列的方法或本领域已知的用于测量mRNA的任何其他合适的方法。在一些实施方案中,I型IFN的水平可以通过荧光原位杂交(FISH)、qPCR或本领域已知的用于测量组织样品中的RNA水平的任何其他合适的方法来评估。在一些实施方案中,一种或多种ISG的水平可以基于一种或多种ISG的mRNA水平来评估,例如使用qPCR、RNA测序、基于微阵列的方法或本领域已知的用于测量mRNA的任何其他合适的方法。

[0338] 本公开的免疫调节组合物或药物组合物的施用可以是连续的或间歇的,取决于例如接受者的生理状况、施用的目的是治疗性的还是预防性的、以及技术人员已知的其他因素。本公开的免疫调节组合物或药物组合物的施用可以在预选的时间段内基本上连续,或者可以是一系列的间隔剂量。

[0339] 不同的制剂对于不同的治疗和不同的疾病、病症或病状有效,并且旨在治疗特定器官或组织的施用可能需要以与另一器官或组织不同的方式递送,这在本公开的范围。此外,剂量可以通过一次或多次单独施用或通过连续输注来施用。对于数天或更长时间的重复施用,取决于病症,治疗持续直至发生所需的疾病症状抑制。然而,其他剂量方案可能有用。通过常规技术和测定可以容易地监测该疗法的进展。

[0340] 施用

[0341] 含有本公开的RNA配体的本公开的免疫调节组合物和/或药物组合可以根据已知的方法施用给有需要的个体,诸如作为推注或通过在规定时间内连续输注进行静脉内施用、通过肌内、腹膜内、脑脊髓内、颅内、脊柱内、皮下、关节内、滑膜内、静脉内、动脉内、鞘

内、口服、局部或吸入途径。在一些实施方案中,本公开的免疫调节组合物和/或药物组合物通过静脉内输注施用。在一些实施方案中,本公开的免疫调节组合物和/或药物组合物通过局部注射施用,例如注射到组织或注射到器官中。本公开的免疫调节组合物或药物组合物的施用可以使用本领域已知的任何合适的方法进行,诸如使用导管、注射器或类似装置将免疫调节组合物或药物组合物递送至靶器官或组织中。

[0342] 本公开的免疫调节组合物或药物组合物可以以本领域已知的任何合适的形式施用。例如,本公开的免疫调节组合物或药物组合物可以配制用于作为脂质体、聚合物微粒或乳剂施用。

[0343] 在一些实施方案中,本公开的免疫调节组合物或药物组合物被配制用于作为脂质体施用。各种两亲性脂质可以在水性环境中形成双层,以作为脂质体封装含有RNA配体的水性核。这些脂质可具有阴离子、阳离子或两性离子亲水头基。可以使用的脂质包括本文例如“载体”部分中描述的或本领域已知的任何脂质。在一些实施方案中,本公开的脂质体包括一种或多种磷脂,诸如但不限于磷脂酰乙醇胺、磷脂酰胆碱、磷脂酰丝氨酸和磷脂酰甘油。在一些实施方案中,本公开的脂质体包括一种或多种阳离子脂质,诸如但不限于DOTAP、1,2-二硬脂酰基氧基-N,N-二甲基-3-氨基丙烷(DSDMA)、1,2-二油烯基氧基-N,N-二甲基-3-氨基丙烷(DODMA)、1,2-二亚油基氧基-N,N-二甲基-3-氨基丙烷(DLinDMA)、DOTMA或1,2-二亚油基氧基-N,N-二甲基-3-氨基丙烷(DLenDMA)。在一些实施方案中,本公开的脂质体包括一种或多种两性离子脂质,诸如但不限于酰基两性离子脂质、醚两性离子脂质、DPPC、DOPC或十二烷基磷酸胆碱。在一些实施方案中,本公开的脂质体包括饱和和/或不饱和脂质。在一些实施方案中,本公开的脂质体包括单一脂质或脂质混合物。在一些实施方案中,混合物可包含(i)阴离子脂质的混合物,(ii)阳离子脂质的混合物,(iii)两性离子脂质的混合物,(iv)阴离子脂质和阳离子脂质的混合物,(v)阴离子脂质和两性离子脂质的混合物,(vi)两性离子脂质和阳离子脂质的混合物,或(vii)阴离子脂质、阳离子脂质和两性离子脂质的混合物。在一些实施方案中,本公开的脂质体包括非两亲性脂质,诸如胆固醇。在一些实施方案中,本公开的脂质体内的脂质可以通过聚乙二醇的共价连接(即聚乙二醇化)进行修饰。参见例如,Heyes等人(2005) *J Controlled Release* 107:276-87。在一些实施方案中,本公开的脂质体是多层囊泡(MLV)、小单层囊泡(SUV)、大单层囊泡(LUV)或其混合物。MLV在每个囊泡中有多个双层,形成几个独立的水室。SUV和LUV具有封装水性核的单个双层。SUV的直径通常<50nm,而LUV的直径>50nm。可以使用用于制备脂质体的任何合适的方法,例如,如Weissing V(编辑) *Liposomes: Methods and Protocols*,第1卷, Springer, 12, 29-50 (2010); 以及 *Functional Polymer Colloids and Microparticles* 第4卷 (Microspheres, microcapsules and liposomes) (Arshady和Guyot编辑) Citus Books, 2002中所述。

[0344] 在一些实施方案中,本公开的免疫调节组合物或药物组合物被配制用于作为聚合物微粒施用。各种聚合物可以形成微粒以封装或吸附RNA。可以使用的聚合物包括本文例如“载体”部分中描述的或本领域已知的任何聚合物或聚合分子或药剂。可用于本公开的微粒的聚合物的实例包括但不限于:聚(α -羟基酸)、聚羟基丁酸、聚内酯(包括聚己内酯)、聚二恶酮、聚戊内酯、聚原酸酯、聚酸酐、聚氰基丙烯酸酯、酪氨酸衍生的聚碳酸酯、聚乙烯吡咯烷酮、聚酯酰胺、聚氨基酸(例如聚-L-精氨酸、聚-L-赖氨酸、聚-L-鸟氨酸)及其组合。用于制备合适微粒的技术是本领域熟知的。为了促进RNA的吸附,微粒可以包含阳离子表面活性

剂和/或脂质。制备聚合物微粒的可替代的方法是通过模制和固化,例如,如W02009/132206中所公开的。

[0345] 在一些实施方案中,本公开的免疫调节组合物或药物组合物被配制用于作为乳剂施用。本公开的乳剂可包含一种或多种油,诸如但不限于来自动物、植物或合成来源的油。乳剂可包含油的组合。乳剂的水性组分可以是水,例如注射用水,并且可以包括另外的组分,例如溶质。例如,它可以包含盐以形成缓冲剂,例如柠檬酸盐或磷酸盐,诸如钠盐。典型的缓冲剂包括磷酸盐缓冲剂;Tris缓冲剂;硼酸盐缓冲剂;琥珀酸盐缓冲剂;组氨酸缓冲剂;或柠檬酸盐缓冲剂。在一些实施方案中,乳剂包含阳离子脂质,诸如本文所述的或本领域已知的任何阳离子脂质。在一些实施方案中,乳剂包含非离子表面活性剂和/或两性离子表面活性剂。此类表面活性剂包括但不限于:聚氧乙烯脱水山梨糖醇酯表面活性剂(通常称为吐温),例如聚山梨醇酯20和聚山梨醇酯80;环氧乙烷(E0)、环氧丙烷(P0)和/或环氧丁烷(B0)的共聚物,诸如线性E0/P0嵌段共聚物;辛苯酚,诸如辛苯酚-9(Triton X-100,或叔辛基苯氧基聚乙氧基乙醇);(辛基苯氧基)聚乙氧基乙醇(IGEPAL CA-630/NP-40);磷脂,诸如磷脂酰胆碱(卵磷脂);衍生自月桂醇、鲸蜡醇、硬脂醇和油醇的聚氧乙烯脂肪醚(称为Brij表面活性剂),诸如三甘醇单月桂基醚(Brij 30);聚氧乙烯-9-月桂基醚;以及脱水山梨糖醇酯(通常称为Spans),诸如脱水山梨糖醇三油酸酯(Span 85)和脱水山梨糖醇单月桂酸酯。在一些实施方案中,乳剂包含本文所述和/或本领域已知的任何合适的表面活性剂的混合物。油和表面活性剂的绝对量及其比例可以在很宽的范围内变化,同时仍形成乳剂。技术人员可以改变组分的相对比例以获得所需的乳剂。可以使用本领域已知的任何方法评估液滴尺寸,诸如动态光散射和/或单颗粒光学传感,例如可从Particle Sizing Systems (Santa Barbara, USA)获得的Accusizer™和Nicomp™系列仪器,或Malvern Instruments (UK)的Zetasizer™仪器或Horiba (Kyoto, Japan)的粒径分布分析仪器。本公开的乳剂可以使用本领域已知的任何合适的方法来制备,诸如微流化或热方法。

[0346] 本公开的免疫调节组合物和/或药物组合物的施用可以与另一种化合物、组合物或药剂组合或结合进行。此类施用包括同时施用和/或在不同时间施用。结合或组合施用还涵盖作为共制剂施用或作为单独组合物施用,包括以不同的给药频率或间隔,以及使用相同的施用途径或不同的施用途径。

[0347] 试剂盒

[0348] 本公开还提供包含本公开的免疫调节组合物、核酸、载体、药物组合物或疫苗组合物的试剂盒。本公开的试剂盒可包括一个或多个容器,该容器包含本公开的免疫调节组合物、核酸、载体、药物组合物或疫苗组合物。在一些实施方案中,试剂盒进一步包括根据本公开的方法使用的说明书。在一些实施方案中,这些说明书包括:根据本公开的任何方法,对施用或使用本公开的免疫调节组合物、核酸、载体、药物组合物或疫苗组合物以预防、降低风险或治疗患有本文所述的疾病、病症或病状的个体的描述。说明书通常包括关于预期治疗的剂量、给药方案和施用途径的信息。

[0349] 在一些实施方案中,试剂盒可进一步包括另外的药剂(例如,在相同的容器或在一个或多个另外的容器中),诸如另一种免疫调节组合物、核酸、蛋白质或多肽(例如,抗体或其片段)、疫苗或疫苗组合物、佐剂和/或一种或多种药物,例如化疗剂、细胞毒剂、细胞因子、生长抑制剂、抗激素剂和/或心脏保护剂。在一些实施方案中,试剂盒可进一步包括(例

如,在相同的容器或在一个或多个另外的容器中)以下项中的一者或多者:免疫刺激剂、抗病毒剂、抗生素、抗真菌剂、抗寄生虫剂、抗细菌剂、抗肿瘤剂、趋化因子、生长因子、抗血管生成因子、化疗剂、抗体、基因沉默剂或细胞因子(例如,I型IFN,诸如IFN- α 和/或IFN- β)。在一些实施方案中,试剂盒可进一步包括:根据本公开的任何方法,使用本公开的免疫调节组合物、核酸、载体、药物组合物或疫苗组合物与另外的药剂(诸如另一种免疫调节组合物、核酸、蛋白质或多肽(例如抗体或其片段)、疫苗或疫苗组合物、佐剂、一种或多种药物,例如化疗剂、细胞毒性剂、细胞因子、生长抑制剂、抗激素剂、心脏保护剂、免疫刺激剂、抗病毒剂、抗生素、抗真菌剂、抗寄生虫剂、抗细菌剂、抗肿瘤剂、趋化因子、生长因子、抗血管生成因子、化疗剂、抗体、基因沉默剂或细胞因子(例如,I型IFN,诸如IFN- α 和/或IFN- β))组合的说明书。说明书通常包括关于预期治疗的剂量、给药方案和施用途径的信息。

[0350] 试剂盒中的容器可以是单位剂量、散装包装(例如多剂量包装)或亚单位剂量。

[0351] 本公开的试剂盒中提供的说明通常是在标签或包装插页(例如,试剂盒中包括的纸张)上的书面说明,但是机器可读的说明(例如,在磁性或光学存储盘上携带的说明)也包含在本公开中。标签或包装插页表明免疫调节组合物、核酸、载体、药物组合物或疫苗组合物以及任何另外的药剂用于治疗或预防例如本公开的疾病、病症或病状。可以提供用于实践本文所述的任何方法的说明。

[0352] 本公开的试剂盒采用合适的包装。合适的包装包括但不限于小瓶、瓶子、罐子、软包装(例如密封聚酯薄膜或塑料袋)等。还考虑与特定装置(诸如吸入器、鼻给药装置(例如雾化器)或输注装置(诸如微型泵))组合使用的包装。试剂盒可具有无菌入口(例如,该容器可以是静脉内溶液袋或具有可由皮下注射针刺穿的塞子的小瓶)。容器还可具有无菌入口(例如,该容器可以是静脉内溶液袋或具有可由皮下注射针刺穿的塞子的小瓶)。

[0353] 试剂盒可以任选地提供另外的组分,诸如缓冲剂和解释信息。通常地,试剂盒包括容器以及在该容器上或与该容器相关的标签或包装插页。

[0354] 整个公开中的所有引用均明确地通过引用并入本文。

[0355] 实例

[0356] 通过参考以下实例将更全面地理解本公开。然而,它们不应被解释为限制本公开的范围。应当理解,本文所述的实例和实施方案仅用于说明目的,并且其各种修改或改变将被建议给本领域技术人员,并且将被包括在本申请的精神和界限内以及所附权利要求的范围内。

[0357] 在以下实例所示的核苷酸序列中,星号(*)指示硫代磷酸酯键,并且“-”指示磷酸二酯键。

[0358] 实例1:TLR7选择性RNA配体的设计。

[0359] 本实例描述了具有RNA修饰的TLR7选择性配体的设计,该RNA修饰阻断在某些核苷酸处的RNA酶切割,以避免生成具有活化TLR8潜力的尿苷单体。

[0360] A. 选择初始RNA序列以生成具有阻断RNA酶切割的RNA修饰的TLR7选择性配体

[0361] 为了实现最大的TLR7选择性,选择已知相对于TLR8对TLR7具有一定选择性的RNA序列来生成TLR7选择性配体。

[0362] ORN7013

[0363] 第一个所选择的RNA序列,称为寡核糖核苷酸7013(ORN7013),具有核苷酸序列C*

C*G*A*G*C*C*G*C*U*U*U*U*C*C*C (SEQ ID NO:1) 并且衍生自Forsbach等人, J Immunology (2008) 180:3729-3738。ORN7013包含四个尿苷, 侧面为非刺激序列, 并且经过完全硫代磷酸酯修饰。

[0364] ORN7023

[0365] 第二个所选择的RNA序列衍生自R2153, 如Hartmann等人W02010/105819中所述, 并且在本文中称为ORN7023。ORN7023具有核苷酸序列C-G-G-C-U-C-G-G-C-A-G-A-A-G-C-C-G-G-G-C-C (SEQ ID NO:2), 并通过下划线序列配对形成短规范RNA发夹, 包括G:U摆动碱基对(图4)。

[0366] ORN7005和ORN7009

[0367] 另外的所选择的RNA序列包括ORN7005, 其具有核苷酸序列U-C-U-C-U-C-U-C-U-C-U-C-U-C-U-C-U-C-U-C (SEQ ID NO:3), 和ORN7009, 其具有核苷酸序列C-C-U-U-C-U-U-C-U-U-C-U-U-C-U-U-C-U-U-C-U-U-C (SEQ ID NO:4)。ORN7005和ORN7009分别衍生自pU1C和pU2C(参见, 例如, Zhang等人, 2018, Cell Reports 25, 3371-3381)。ORN7005和ORN7009基于磷酸二酯(PDE)主链。ORN7005和ORN7009不包含在TLR8结合位点#2处最活跃的UG基序(参见例如TANJI等人Nat Struct Mol Biol. 2015eb; 22(2):109-15), 并且添加鸟苷作为单独的药剂可能是实现TLR7活化所必需的。

[0368] ORN7001

[0369] 最后, 从头设计了另外的配体, 其串联序列包含侧面为腺苷的鸟苷, 以作为TLR7结合位点#1的鸟苷来源, 并避免TLR8与结合位点#2的结合。这种从头设计的配体, 称为ORN7001, 具有核苷酸序列C-A-G-A-C-C-U-U-C-C-A-G-A-C-C-U-U-C (SEQ ID NO:5)。ORN7001的序列还含有富含C/U的C-U-U-C基序(SEQ ID NO:32), 其具有TLR7结合位点#2的两个潜在基序:C-U-U(SEQ ID NO:54)和U-U-C(SEQ ID NO:55)。

[0370] 表1中提供所选择的初始RNA序列的总结以生成TLR7选择性配体。

[0371] 表1. 用于生成TLR7选择性配体的所选择的RNA序列。

[0372]

序列说明	序列	SEQ ID NO
ORN7013 (7013_TLR7_AF_pto) (序列衍生自 Forsbach 等人, J Immunology (2008) 180:3729-3738) 下划线是可以降解为 TLR7 和 TLR8 配体的基序。下划线序列对应于 SEQ ID NO: 7。	C*C*G*A*G*C*C*G* <u>C*U*</u> <u>U*U*U*C</u> *C*C	1
ORN7023 (7023u_TLR7_GH_R2153) (序列衍生自 WO2010/105819) 下划线是 TLR7 结合位点 #2 基序。下划线序列对应于 SEQ ID NO: 21。	C-G-G-C- <u>U-C</u> -G-G-C-A-G-A- A-G-C-C-G-G-G-C-C	2
ORN7005 (7005_TLR7_ZZ_pU1C) (序列衍生自 Zhang 等人, 2018, Cell Reports 25, 3371-3381 的 pU1C)	U-C-U-C-U-C-U-C-U-C-U-C- U-C-U-C-U-C-U-C	3
ORN7009 (7009_TLR7_ZZ_pU2C) (序列衍生自 Zhang 等人, 2018, Cell Reports 25, 3371-3381 的 pU2C)	C-C-U-U-C-U-U-C-U-U-C-U- U-C-U-U-C-U-U-C	4
ORN7001 (7001_TLR7_AH)	C-A-G-A-C- <u>C-U-U-C</u> -C-A-G-	5

[0373]

序列说明	序列	SEQ ID NO
(从头设计的序列) 下划线是富含 C/U 的 C-U-U-C 基序 (SEQ ID NO: 32), 其具有 TLR7 结合位点 #2 的两个潜在基序: C-U-U (SEQ ID NO: 54) 和 U-U-C (SEQ ID NO: 55)。	A-C- <u>C-U-U-C</u>	
星号 (*) 指示指定核苷之间的硫代磷酸酯 (pto) 修饰; “-” 指示指定核苷之间的磷酸二酯键。		

[0374] B. 在所选择的RNA序列内选择适合主链修饰的位置以生成TLR7选择性配体

[0375] 如图5所示, TLR7在结合位点#2结合的RNA三聚体 (U_1 - U_2 - U_3) 的中心的尿苷深深嵌入结合口袋中, 包括2'OH (2'OH₂)。这表明该2'OH的修饰可能会影响TLR7活性, 并且因此可能无法进行修饰。相比之下, 侧面核苷酸的2'OH部分 (2'OH₁和2'OH₃) 似乎位于结合口袋) 似乎位于结合口袋的更开放的部分 (图5)。因此, 我们寻求直接对所有可能成为尿苷单体的尿苷的5'的核苷酸进行修饰。

[0376] 体积较小但核酸酶抗性较低的2'-氟修饰和核酸酶抗性但体积较大的2'-O-甲基修饰两者都被用来实现RNA酶抗性。2'-氟修饰剥夺了RNA酶活性所需的2'OH的RNA主链, 但

仍可被核酸外切酶靶向。相比之下,2'-O-甲基化引入了阻断任何核酸酶的结合的大量修饰。参见例如图3。

[0377] C. 引入RNA修饰来生成TLR7选择性配体

[0378] 将特异性阻断某些核苷酸处RNA酶介导的切割的RNA修饰引入到上述所选择的RNA序列中。修饰的目的是能够生成与TLR7结合位点#2(即,具有序列N-U-N(SEQ ID NO:6)、N*U*N(SEQ ID NO:63)、或N-U*N(SEQ ID NO:64),其中N表示任何核糖核苷酸)结合的RNA三聚体降解产物,并且不能降解为单体U,其是TLR8结合位点#1的配体。

[0379] ORN7013修饰

[0380] 如下所示,ORN7013的核苷酸序列(SEQ ID NO:1),衍生自Forsbach等人,J Immunology(2008)180:3729-3738,包含下划线基序C*U*U*U*C(SEQ ID NO:7),其可以活化TLR7和TLR8:

[0381] C*C*G*A*G*C*C*G*C*U*U*U*U*C*C*C(SEQ ID NO:1)

[0382] C*U*U*U*C基序(SEQ ID NO:7)可以降解为TLR7结合位点#2基序C*U*U(SEQ ID NO:8)、U*U*U(SEQ ID NO:9)、或U*U*C(SEQ ID NO:10),并且可以进一步降解为单体U,其是TLR8结合位点#1配体。

[0383] 为了生成TLR7选择性配体,修饰C*U*U*U*C基序(SEQ ID NO:7)的U₂和U₄。这允许将TLR7结合位点#2基序内的中央U保留为常规(即,未修饰的)核糖核苷酸(参见例如图5)。C*U*U*U*C基序(SEQ ID NO:7)的U₂和U₄的修饰导致U₂和U₃以及U₄和U₅之间的键受到保护免于RNA酶降解,从而防止单体U的生成。这种免于RNA酶降解的保护还允许U₂和U₃之间以及U₄和U₅之间的硫代磷酸酯键交换为磷酸二酯键。这种减少的修饰,特别是两个相应核苷酸之间已经修饰的空间。

[0384] 上述C*U*U*U*C基序(SEQ ID NO:7)的修饰产生新的基序C*X-U*X-U*C(SEQ ID NO:11),其中X表示2'-氟-U或2'-O-甲基-U。假设未修饰的U是TLR7结合位点#2基序的中央U,则剩余基序将为X₂-U₃*X₄(SEQ ID NO:53)和X₄-U₅*C₆(SEQ ID NO:52)。如表2所示,两个修饰位点与两个不同修饰的组合产生四个具有单独基序的ORN,称为ORN7014-7017(对应于SEQ ID NO:12-15)。

[0385] 表2. 修饰ORN7013以生成TLR7选择性配体。

[0386]

序列说明	序列	SEQ ID NO
ORN7014 (7014_TLR7_AF_pto_2ome) 下划线的 C*mU-U*mU-U*C 基序对应于 SEQ ID NO: 44, 并且是 ORN7013 中的 TLR7/TLR8 基序的 2'O-甲基修饰的版本 (对应于 SEQ ID NO:7)。	C*C*G*A*G*C*C*G* <u>C*mU-U*mU-U*C</u> *C*C	12
ORN7015 (7015_TLR7_AF_pto_2F) 下划线的 C*fU-U*fU-U*C 基序对应于 SEQ ID NO: 45, 并且是 ORN7013 中的 TLR7/TLR8 基序的 2'-氟修饰的版本 (对应于 SEQ ID NO:7)。	C*C*G*A*G*C*C*G* <u>C*fU-U*fU-U*C</u> *C*C	13

[0387]

序列说明	序列	SEQ ID NO
ORN7016 (7016_TLR7_AF_pto_omeF) 下划线的 C*mU-U*fU-U*C 基序对应于 SEQ ID NO: 46, 并且是 ORN7013 中的 TLR7/TLR8 基序的 2'-氟和 2'O-甲基修饰的版本 (对应于 SEQ ID NO:7)。	C*C*G*A*G*C*C*G* <u>C*mU-U*fU-U*C</u> *C*C	14
ORN7017 (7017_TLR7_AF_pto_Fome) 下划线的 C*fU-U*mU-U*C 基序对应于 SEQ ID NO: 47, 并且是 ORN7013 中的 TLR7/TLR8 基序的 2'-氟和 2'O-甲基修饰的版本 (对应于 SEQ ID NO:7)。	C*C*G*A*G*C*C*G* <u>C*fU-U*mU-U*C</u> *C*C	15
星号 (*) 指示指定核苷之间的硫代磷酸酯 (pto) 修饰; “m” 指示 2'O-甲基修饰; “f” 指示 2'-氟修饰; “-” 指示指定核苷之间的磷酸二酯键。		

[0388] ORN7013, 衍生自Forsbach等人, J Immunology (2008) 180:3729-3738, 也被修饰以减少硫代磷酸酯修饰。具体地, 除了C*U*U*U*C基序 (SEQ ID NO:7) 中的核苷酸之外, 所有核苷酸均通过磷酸二酯主链而不是硫代磷酸酯修饰的主链连接。这产生了ORN7022, 其具有核苷酸序列C-C-G-A-G-C-C-G-C*U*U*U*C-C-C (SEQ ID NO:16)。基于ORN7022设计了等效于ORN7014-7017的修饰的ORN, 产生ORN7018-ORN7021, 对应于SEQ ID NO:17-20 (表3)。

[0389] 表3.使用减少的硫代磷酸酯键对ORN7013进行另外的修饰,以生成TLR7选择性配体。

序列说明	序列	SEQ ID NO
ORN7022 (7022_TLR7_AF_pto_Uonly) ORN7022 等效于 ORN7013, 只是除下划线的 C*U*U*U*U*C 基序 (SEQ ID NO: 7) 中的核苷酸外, 所有核苷酸均通过磷酸二酯主链连接。	C-C-G-A-G-C-C-G- <u>C*U*U*U*U*C</u> -C-C	16
ORN7018 (7018_TLR7_AF_2ome) 下划线的 C-mU-U*mU-U*C 基序对应于 SEQ ID NO: 48, 并且是 ORN7013 中的 TLR7/TLR8 基序的 2'O-甲基修饰的版本 (对应于 SEQ ID NO:7) 。	C-C-G-A-G-C-C-G- <u>C-mU-U*mU-</u> <u>U*C</u> -C-C	17
ORN7019 (7019_TLR7_AF_2F) 下划线的 C-fU-U*fU-U*C 基序对应于 SEQ ID NO: 49, 并且是 ORN7013 中的 TLR7/TLR8 基序的 2'-氟修饰的版本 (对应于 SEQ ID NO:7) 。	C-C-G-A-G-C-C-G- <u>C-fU-U*fU-</u> <u>U*C</u> -C-C	18
ORN7020 (7020_TLR7_AF_omeF) 下划线的 C-mU-U*fU-U*C 基序对应于 SEQ ID NO: 50, 并且是 ORN7013 中的 TLR7/TLR8 基序的 2'-氟和 2'O-甲基修饰的版本 (对应于 SEQ ID NO:7) 。	C-C-G-A-G-C-C-G- <u>C-mU-U*fU-</u> <u>U*C</u> -C-C	19
ORN7021 (7021_TLR7_AF_Fome) 下划线的 C-fU-U*mU-U*C 基序对应于 SEQ ID NO: 51, 并且是 ORN7013 中的 TLR7/TLR8 基序的 2'-氟和 2'O-甲基修饰的版本 (对应于 SEQ ID NO:7) 。	C-C-G-A-G-C-C-G- <u>C-fU-U*mU-</u> <u>U*C</u> -C-C	20
星号 (*) 指示指定核苷之间的硫代磷酸酯 (pto) 修饰; “m” 指示 2'O-甲基修饰; “f” 指示 2'-氟修饰; “-” 指示指定核苷之间的磷酸二酯键。		

[0392] ORN7023修饰

[0393] 如下所示, ORN7023的核苷酸序列(SEQ ID NO:2), 衍生自W02010/105819 (Hartmann等人), 仅包含一个TLR7结合位点#2基序(下划线), 其由ORN7023的第4-6位核苷酸组成:C-U-C(SEQ ID NO:21):

[0394] C-G-G-C-U-C-G-G-C-A-G-A-A-G-C-C-G-G-G-C-C(SEQ ID NO:2)

[0395] 因为假定C₁-U₂-C₃基序(SEQ ID NO:21)中的中心U₂需要保持未修饰(参见例如如图5), 所以基序内的C₁用2'-氟-或2'-O-甲基修饰进行修饰, 得到修饰的基序:D-U-C(SEQ ID NO:22), 其中D表示2'-氟-C或2'-O-甲基-C。这产生了2'-氟-C修饰的ORN7023F(SEQ ID NO:23), 具有基序fC-U-C(SEQ ID NO:42); 以及2'-O-甲基-C修饰的ORN7023Ome(SEQ ID NO:24), 具有基序mC-U-C(SEQ ID NO:43)。

[0396] 生成了ORN7023的另一版本, 包含2'未修饰的序列和从磷酸二酯键转变为硫代磷酸酯键的主链(ORN7024; SEQ ID NO:25)。

[0397] 表4中总结了衍生自ORN7023的修饰的ORN。

[0398] 表4. 修饰ORN7023以生成TLR7选择性配体。

序列说明	序列	SEQ ID NO
ORN7023F (7023F_TLR7_GH_R2153_F) 下划线的 fC-U-C 基序对应于 SEQ ID NO: 42, 并且是来自 ORN7023 (SEQ ID NO: 21) 的 TLR7 结合位点 #2 基序的 2'-氟修饰的版本。	C-G-G- <u>fC-U-C</u> -G-G-C-A-G-A-A-G-C-C-G-G-G-C-C	23
ORN7023Ome (7023Ome_TLR7_GH_R2153_ome) 下划线的 mC-U-C 基序对应于 SEQ ID NO: 43, 并且是来自 ORN7023 (SEQ ID NO: 21) 的 TLR7 结合位点 #2 基序的 2'-O-甲基修饰的版本。	C-G-G- <u>mC-U-C</u> -G-G-C-A-G-A-A-G-C-C-G-G-G-C-C	24
ORN7024 (7024_TLR7_GH_R2153_pto)	C*G*G* <u>C*U</u> *C*G*G*C*A*G*A*A*G*C *C*G*G*G*C*C	25

序列说明	序列	SEQ ID NO
ORN7024 等效于 ORN7023, 只是磷酸二 酯键被所指示的硫代磷 酸酯键替换。 下划线是来自 ORN7023 (SEQ ID NO: 21) 的 TLR7 结合位点 #2 基序, 经过修饰以 包括所指示的硫代磷酸 酯修饰。		
星号 (*) 指示指定核苷之间的硫代磷酸酯 (pto) 修饰; “m” 指示 2'O-甲基修饰; “f” 指示 2'-氟修饰; “-” 指示指定核苷之间的磷酸二酯键。		

[0401] ORN7005修饰

[0402] ORN7005, 衍生自pU1C (参见, Zhang等人, 2018, Cell Reports 25, 3371-3381), 具有核苷酸序列:

[0403] U-C-U-C-U-C-U-C-U-C-U-C-U-C-U-C-U-C-U-C (SEQ ID NO:3)

[0404] 在ORN7005 (SEQ ID NO:3) 的核苷酸序列中, 所有C残基均用2'O-甲基修饰或2'-氟修饰进行修饰, 以避免切割并保留未修饰的U残基。这产生了2'O-甲基修饰的ORN7006 (SEQ ID NO:26) 和2'-氟修饰的ORN7007 (SEQ ID NO:27)。此外, 为了测试硫代磷酸酯修饰赋予的有限RNA酶抗性是否可以增加活性, 生成了ORN7005的完全硫代磷酸酯修饰的版本, 生成ORN7008 (SEQ ID NO:28)。

[0405] 表5中总结了衍生自ORN7005的修饰的ORN。

[0406] 表5. 修饰ORN7005以生成TLR7选择性配体。

序列说明	序列	SEQ ID NO
ORN7006 (7006_TLR7_ZZ_pU1C_ome)	U-mC-U-mC-U-mC-U-mC-U-mC-U-mC-U-mC-U-mC-U-mC-U-C	26
ORN7007 (7007_TLR7_ZZ_pU1C_F)	U-fC-U-fC-U-fC-U-fC-U-fC-U-fC-U-fC-U-fC-U-fC-U-C	27
ORN7008 (7008_TLR7_ZZ_pU1C_pto)	U*C*U*C*U*C*U*C*U*C*U*C*U *C*U*C*U*C*U*C	28
星号 (*) 指示指定核苷之间的硫代磷酸酯 (pto) 修饰; “m” 指示 2'O-甲基修饰; “f” 指示 2'-氟修饰; “-” 指示指定核苷之间的磷酸二酯键。		

[0408] ORN7009修饰

[0409] ORN7009, 衍生自pU2C (参见, Zhang等人, 2018, Cell Reports 25, 3371-3381), 具有核苷酸序列:

[0410] C-C-U-U-C-U-U-C-U-U-C-U-U-C-U-U-C-U-U-C (SEQ ID NO:4)

[0411] ORN7009的核苷酸序列 (SEQ ID NO:4) 包含多个U-U-C重复序列 (SEQ ID NO:39)。

ORN7009中每个U-U-C重复序列(SEQ ID NO:39)中的第一个U用2'-O-甲基或2'-氟修饰进行修饰。这产生了2'-O-甲基修饰的ORN7010(SEQ ID NO:29),具有修饰的mU-U-C重复序列(SEQ ID NO:40);以及2'-氟修饰的ORN7011(SEQ ID NO:30),具有修饰的fU-U-C重复序列(SEQ ID NO:41)。此外,为了测试硫代磷酸酯修饰赋予的有限RNA酶抗性是否可以增加活性,生成了ORN7009的完全硫代磷酸酯修饰的版本,生成ORN7012(SEQ ID NO:31)。

[0412] 表6中总结了衍生自ORN7009的修饰的ORN。

[0413] 表6. 修饰ORN7009以生成TLR7选择性配体。

序列说明	序列	SEQ ID NO
ORN7010 (7010_TLR7_ZZ_pU2C_ome) ORN7010 包含 mU-U-C 基序 (SEQ ID NO: 40) 的几个重复序列。	C-C-mU-U-C-mU-U-C-mU-U-C-mU-U-C-mU-U-C-mU-U-C	29
ORN7011 (7011_TLR7_ZZ_pU2C_F) ORN7011 包含 fU-U-C 基序 (SEQ ID NO: 41) 的几个重复序列。	C-C-fU-U-C-fU-U-C-fU-U-C-fU-U-C-fU-U-C-fU-U-C	30
ORN7012 (7012_TLR7_ZZ_pU2C_pto) ORN7012 包含 U-U-C 基序 (SEQ ID NO: 39) 的几个重复序列, 但基序中的磷酸二酯键已被硫代磷酸酯键替换。	C*C*U*U*C*U*U*C*U*U*C*U*U*C*U*U*C*U*U*C*U*U*C	31
星号(*)指示指定核苷之间的硫代磷酸酯(pto)修饰; “m”指示2'-O-甲基修饰; “f”指示2'-氟修饰; “-”指示指定核苷之间的磷酸二酯键。		

[0415] ORN7001修饰

[0416] 如上所述,从头设计的ORN7001的核苷酸序列(SEQ ID NO:5)包含两个C-U-U-C基序(SEQ ID NO:32):

[0417] C-A-G-A-C-C-U-U-C-C-A-G-A-C-C-U-U-C(SEQ ID NO:5)

[0418] ORN7001中的C-U-U-C基序(SEQ ID NO:32)中的第一个U用2'-氟或2'-O-甲基修饰进行修饰,产生ORN7002(SEQ ID NO:33),具有修饰的基序C-mU-U-C(SEQ ID NO:36);和ORN7003(SEQ ID NO:34),具有修饰的基序C-fU-U-C(SEQ ID NO:37)。另外,从ORN7001生成修饰的ORN,其中整个C-U-U-C基序(SEQ ID NO:32)用硫代磷酸酯修饰,生成ORN7004(SEQ ID NO:35),具有修饰的基序C*U*U*C(SEQ ID NO:38)。

[0419] 表7中总结了衍生自ORN7001的修饰的ORN。

[0420] 表7. 修饰ORN7001以生成TLR7选择性配体。

[0421]

序列说明	序列	SEQ ID NO
ORN7002 (7002_TLR7_AH_ome) 下划线的 C-mU-U-C 基序对应于 SEQ ID NO: 36, 并且是 ORN7001 (SEQ ID NO: 32) 中的 C-U-U-C 基序的 2'O-甲基修饰的版本。	C-A-G-A-C- <u>C-mU-U-C</u> -C-A-G-A-C- <u>C-mU-U-C</u>	33
ORN7003 (7003_TLR7_AH_F) 下划线的 C-fU-U-C 基序对应于 SEQ ID NO: 37, 并且是 ORN7001 (SEQ ID NO: 32) 中的 C-U-U-C 基序的 2'-氟修饰的版本。	C-A-G-A-C- <u>C-fU-U-C</u> -C-A-G-A-C- <u>C-fU-U-C</u>	34
ORN7004 (7004_TLR7_AH_pto) 下划线的 C*U*U*C 基序对应于 SEQ ID NO: 38, 并且是 ORN7001 (SEQ ID NO: 32) 中的 C-U-U-C 基序的硫代磷酸酯修饰的版本。	C-A-G-A-C- <u>C*U*U*C</u> -C-A-G-A-C- <u>C*U*U*C</u>	35
星号 (*) 指示指定核苷之间的硫代磷酸酯 (pto) 修饰; “m” 指示 2'O-甲基修饰; “f” 指示 2'-氟修饰; “-” 指示指定核苷之间的磷酸二酯键。		

[0422] 实例2:TLR7选择性RNA配体的生成和功能表征。

[0423] 本实例描述了评估实例1中所述的RNA配体的TLR7选择性和活性的实验。这些实验的结果显示衍生自ORN7013(衍生自Forsbach等人,J Immunology (2008) 180:3729-3738)和ORN7023(衍生自W02010/105819)的某些修饰的RNA配体具有增强的TLR7选择性和活性。

[0424] 材料和方法

[0425] RNA生产

[0426] RNA寡聚物由集成DNA技术 (IDT) 合成并进行HPLC纯化。

[0427] 用于生产IVT4,DNA寡核苷酸IVT4-fwd (5'T-T-G-T-A-A-T-A-C-G-A-C-T-C-A-C-T-A-T-A-G-G-G-A-C-G-C-T-G-A-C-C-C-A-G-A-A-G-A-T-C-T-A-C-T-A-G-A-A-A-T-A-G-T-A-G-A-T-C-T-T-C-T-G-G-G-T-C-A-G-C-G-T-C-C-C 3';SEQ ID NO:65)和IVT4-rev (5'G-G-G-A-C-G-C-T-G-A-C-C-C-A-G-A-A-G-A-T-C-T-A-C-T-A-T-T-T-C-T-A-G-T-A-G-A-T-C-T-T-C-T-G-G-G-T-C-A-G-C-G-T-C-C-C-T-A-T-A-G-T-G-A-G-T-C-G-T-A-T-T-A-C-A-A 3';SEQ ID NO:66)在退火缓冲剂(25mM Tris-HCl、25mM NaCl、pH 7.4)中通过加热3分钟至95℃并在15分钟的过程内冷却至室温来退火。然后按照手册使用TranscriptAid T7高产转录试剂盒将该模板用于体外转录。然后使用迷你快速旋转DNA柱(Roche)纯化RNA。

[0428] PBMC分离

[0429] 外周血单核细胞(PBMC)获自血沉棕黄层(从健康成人供体获得)。首先用等体积的

磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 稀释血沉棕黄层样品。接下来,使用Lymphoprep密度梯度介质 (STEMCELL Technologies) 和SepMate-50管 (STEMCELL Technologies) 经由密度梯度离心分离PBMC。将样品以1000g离心15分钟。离心后,通过倒入新管中收集上层,用PBS稀释,并以450x g离心5分钟。为了裂解红细胞,将细胞沉淀用10mL氯化铵钾 (ACK) 裂解缓冲剂重悬,并在室温孵育8分钟。裂解后,用PBS洗涤细胞并通过两个70 μ m细胞过滤器。使用Vi-CELL细胞计数器 (Beckman Coulter) 测定活细胞计数。将PBMC在含有10%热灭活胎牛血清、1%L-谷氨酰胺和1X Pen/Strep的RPMI培养基中以每孔 4×10^5 个细胞的浓度接种到96孔圆底板中。

[0430] pDC耗尽

[0431] 对于浆细胞样树突状细胞 (pDC) 耗尽实验,如上所述分离PBMC。使用人类CD303微珠试剂盒 (Miltenyi Biotec) 耗尽pDC。

[0432] PBMC刺激

[0433] 在添加聚-L-精氨酸 (p-L-精氨酸) 复合RNA之前添加鸟苷约20分钟至约30分钟之间。

[0434] 为了生成p-L-精氨酸-RNA复合物,将0.2 μ g RNA添加到15 μ l PBS中,并添加0.38 μ g p-L-精氨酸 (>70000kDa, Sigma#P3892) (每孔)。通过上下移液混合后,将反应孵育10分钟,再次上下移液,然后添加到细胞中。在一些实验中,RNA配体的终浓度为0.6 μ g/ml。如果标为“+2'3'cGMP”,则从eMolecules购买的2'3'环GMP与RNA配体复合在一起。2'3'环GMP的终浓度为5 μ g/ml。相应调整p-L-精氨酸以保持核酸:p-L-精氨酸的质量比恒定。

[0435] 对于IVT4的Lipofectamine 2000转染,每次反应将0.5 μ l Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific) 添加到25 μ l Opti-MEM中。将混合物混合充分并在室温孵育5分钟。孵育期间,将2ng IVT4添加到25 μ l Opti-MEM中。将Lipofectamine/Opti-MEM混合物添加到稀释的IVT4中,并通过上下移液进行混合。将混合物在室温孵育20分钟,且然后添加到细胞中。

[0436] 为了生成DOTAP-RNA复合物,制备了含有DOTAP和Opti-MEM或RNA和Opti-MEM的主混合物,并在室温孵育5分钟。然后将两种主混合物以最终RNA:DOTAP质量比1:5混合。然后将混合物在室温孵育20分钟,然后添加到细胞中。

[0437] 细胞因子检测

[0438] 刺激后15-18小时收集细胞培养物上清液并储存在-80 $^{\circ}$ C。使用BD OptEIA人TNF ELISA套件 (BD Biosciences) 和Invitrogen IFN α 人匹配抗体对试剂盒 (Thermo Fisher Scientific) 或人IFN α 多亚型ELISA试剂盒 (PBL Assay Science) 检测细胞培养物上清液中的细胞因子。

[0439] 颗粒分布

[0440] 粒径通过动态光散射 (Wyatt Technology) 测定。将样品置于384孔板的多个孔中,并且每个孔测量十次,每次5秒。报告了Z平均值。

[0441] RNA酶切割

[0442] 如Ostendorf等人, (2020) 52 (4) :591-605中所述进行切割测定,并进行以下修改。将0.5 μ g每种RNA配体与重组RNA酶T2 (Origene) 在15 μ l反应中孵育。进行四点时间过程,其中反应孵育3、6、9和12分钟。用100mM Tris-HCL (pH 7.5) 终止反应。添加2X TBE-尿素样品缓冲剂 (Thermo LC6876) 后,将反应在70 $^{\circ}$ C孵育3分钟。然后将反应加载到15%TBE-尿素

PAGE凝胶中并在150V运行1.5小时。凝胶用SYBR Gold (Invitrogen) 以1:10K染色。

[0443] 结果

[0444] 某些修饰的RNA配体已增强了PBMC中的TLR7选择性和活性

[0445] 为了测试实例1中描述的RNA配体对TLR7和TLR8活化的影响,使用p-L-精氨酸复合物递送、用DOTAP递送或无载体递送,用RNA配体刺激PBMC。TLR7和TLR8的活性通过酶联免疫吸附测定(ELISA)基于IFN- α 或TNF- α 的测量进行评估。

[0446] 在这种情况下,如图6所示,小RNA诱导的IFN- α 衍生自pDC表达的TLR7,或衍生自单核细胞表达的RIG-I。相比之下,TNF- α 分泌衍生自单核细胞,并且可作为TLR8活化的指示。如此图所示,p-L-精氨酸递送限制TLR的大部分活化。

[0447] p-L-精氨酸递送

[0448] 首先,使用p-L-精氨酸复合物递送测试RNA配体对TLR7和TLR8活化的影响。

[0449] 如图7所示,ORN7005(衍生自Zhang等人的pU1C,2018)、ORN7009(衍生自Zhang等人的pU2C,2018)和ORN7001(从头设计的配体)不诱导或仅诱导少量IFN- α 分泌,无论修饰如何,表明TLR7活性有限。此外,衍生自ORN7005、ORN7009和ORN7001的几种修饰的ORN显示出显著的TLR8活性,如TNF- α 分泌所证明。当提供外源鸟苷作为TLR7结合位点#1的配体时,ORN7005-7008和ORN7009-7012预计显示出TLR7活性。在这种情况下观察到的IFN- α 分泌缺乏是出乎意料的。为了排除技术错误,重复了ORN7005-7008和ORN7009-7012的实验,并进行了以下修改:(1)鸟苷被鸟苷衍生物2'3'环GMP(2'3'cGMP)替换,它模拟了RNA降解产物;(2)2'3'cGMP包含在p-L-精氨酸复合物中,而不是直接添加到细胞培养基中;以及(3)使用更灵敏的ELISA试剂盒用于检测IFN- α 。如图12所示,当与2'3'cGMP作为TLR7结合位点#1的配体共同递送时,ORN7005-7008和ORN7009-7012活化TLR7和诱导IFN- α 分泌的能力显著增强。值得注意的是,供体和实验之间存在差异;具体地,一位供体对单独的ORN7005表现出出人意料的高IFN- α 应答(图16A-16B)。然而,从整体数据来看,当RNA配体与鸟苷类似物配对时,IFN- α 产量增加的趋势仍然一致。2'-氟和2'-O-甲基修饰的版本(即ORN7006、ORN7007、ORN7010、ORN7011)当与2'3'环GMP共同递送时表现出强大的IFN- α 诱导,几乎没有可测量的TNF- α ,表明TLR7选择性。

[0450] 相比之下,如图7所示,ORN7013的有限的TLR7选择性和活性(衍生自Forsbach等人, J Immunology (2008) 180:3729-3738)被证实。此外,相比于ORN7013,ORN7014-7017(ORN7013的修饰的版本)中引入的修饰进一步提高了TLR7选择性,如与ORN7013相比,IFN- α 分泌水平维持(或更低)并且TNF- α 分泌水平大大降低所示。衍生自ORN7013的磷酸二酯连接的ORN(ORN7022和ORN7018-7021)在使用聚-L-精氨酸递送时缺乏TLR7活性。

[0451] 类似地,如图7所示,将修饰引入ORN7023(衍生自W02010/105819)保持了TLR7选择性,同时进一步提高了活性(参见图7中的ORN7023F和ORN70230me)。然而,ORN7024,衍生自ORN7023的硫代磷酸酯修饰的RNA配体,活性降低。

[0452] DOTAP递送

[0453] 接下来,在两个不同的RNA配体的浓度下,0.6 μ g/ml和2 μ g/ml,使用DOTAP递送测试了RNA配体对TLR7和TLR8活化的影响。

[0454] 如图10A-10B所示,ORN7001(从头设计的配体)诱导TLR7和TLR8活性,分别由IFN- α 和TNF- α 分泌所示。ORN7002,它是ORN7001的2'-O-甲基修饰的版本,活性降低。相比之下,

ORN7003,它是ORN7001的2'-氟修饰的版本,维持相对于ORN7001的TLR7活性,同时消除TLR8活性。ORN7004,它是ORN7001的硫代磷酸酯连接的版本,TLR7活性轻度提高并且TLR8活性显著提高。

[0455] ORN7005(衍生自Zhang等人的pU1C,2018)和ORN7009(衍生自Zhang等人的pU2C,2018)活化TLR8而不是TLR7。ORN7005和ORN7009的硫代磷酸酯修饰(即分别为ORN7008和ORN7012)进一步提高了TLR8活化。ORN7005和ORN7009的2'-O-甲基修饰的版本(即分别为ORN7006和ORN7010)减少了TLR8和TLR7活化。此外,ORN7005的2'-氟修饰的版本(即ORN7007)也降低了活性。ORN7011,它是ORN7009的2'-氟修饰的版本,在2 μ g/ml的较高浓度下具有TLR7活性(图10B),但没有TLR8活性。重要的是,由于缺乏鸟苷或鸟苷衍生物作为TLR7结合位点#1的配体,这些RNA配体(即ORN7005-ORN7012)的TLR7活性在这种情况下可能是次优的。因此,鸟苷或鸟苷衍生物与RNA配体-DOTAP复合物的共同递送可以增强TLR7活性,如在p-L-精氨酸复合物递送的情况下所观察(图12)。

[0456] ORN7013(衍生自Forsbach等人,J Immunology(2008)180:3729-3738)及其修饰的版本ORN7014-ORN7017或者活化TLR8而不活化TLR7,或者没有活性。ORN7019,它是ORN7013的2'-氟修饰和磷酸二酯连接的版本,在0.6 μ g/ml的浓度下表现出选择性TLR7活化(图10A)。然而,ORN7019在2 μ g/ml的浓度下也具有TLR8活性(图10B)。ORN7022,它是ORN7013的磷酸二酯连接的版本,在0.6 μ g/ml和2 μ g/ml浓度下活化TLR7和TLR8两者(图10A-10B)。当使用DOTAP递送时,基于ORN7013(衍生自Forsbach等人,J Immunology(2008)180:3729-3738)的所有其他RNA配体导致低TLR7活化或无TLR7活化。

[0457] 因此,这些结果表明,当用DOTAP递送时,相比于用聚-L-精氨酸递送,不同范围的RNA配体具有最高活性。

[0458] 无载体递送

[0459] 最后,在10 μ g/ml的RNA配体的浓度下,使用无载体递送测试了RNA配体对TLR7和TLR8活化的影响。如图11所示,当没有载体递送时,没有一个RNA配体表现出可重复的TLR7或TLR8活化。

[0460] 修饰的RNA配体的活性对pDC中表达的TLR7具有特异性

[0461] 在PBMC中,TLR7活化后的IFN- α 分泌完全衍生自pDC,而RIG-I(短双链5'三磷酸RNA的传感器)活化后的IFN- α 分泌则依赖于单核细胞。因此,为了确认上述RNA配体的TLR7-特异性与RIG-I-特异性,在转染RNA配体之前从PBMC中耗尽pDC。

[0462] 如图8和图13-14所示,IFN- α 的分泌被pDC耗尽所消除,表明RNA配体对TLR7的活化,而不是RIG-I的活化,负责IFN- α 的分泌。由于RIG-I主要由单核细胞表达,因此在pDC耗尽后,Lipofectamine介导的RIG-I配体3P-RNA(IVT4)转染后的IFN- α 分泌得以维持。

[0463] 修饰的RNA配体的活性不是由纳米颗粒的结构差异引起的

[0464] 先前已报道,用与聚-L-精氨酸复合的寡核苷酸刺激后,IFN- α 相对于IL-12p70的生成是时间依赖性的,可能是由于颗粒大小的变化,参见例如Wimmenauer V. Identifikation immunstimulatorischer Nukleinsäureliganden zur Stimulation von Rezeptoren der angeborenen Immunantwort. 2009. 学位论文, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn. 在线版本可在以下网站获得: nbn-resolving.org/urn:nbn:de:hbz:5N-17312(特别参见第62和66页)。

[0465] 为了确定特定序列诱导的IFN- α 或TNF- α 的生成是否是由于粒径差异所致,使用动态光散射分析了各种RNA-聚-L-精氨酸复合物的粒径。如图9所示,含有TLR7选择性和高活性的ORN70230me的颗粒,与含有TLR8活性的ORN7012、较低TLR7选择性和活性的ORN7013、中等选择性和活性的ORN7015、TLR7选择性但弱活性的ORN7016和阴性对照pCA的颗粒表现相似。因为所有寡核糖核苷酸的孵育时间相同(10分钟)并且因为它们的直径在10分钟时间点相似,所以图9中所示的结果表明在不同寡核糖核苷酸中观察到的TLR7选择性和活性的范围并不是由于粒径的差异。

[0466] 2'氟和2'-O-甲基修饰抑制修饰的RNA配体的RNA酶介导的降解

[0467] 为了评估2'位置处的RNA修饰是否干扰RNA酶切割活性,通过将重组RNA酶T2与各种RNA配体孵育来进行一系列体外切割测定。RNA酶T2广泛表达,并且重要的是,它在表达TLR7的细胞类型中具有活性。此外,RNA酶T2已被鉴定对于TLR8的活化非常重要(Ostendorf等人,(2020)52(4):591-605)。

[0468] 进行时间过程,其中每个RNA配体与优化量的RNA酶T2孵育,并且来自每个反应的降解产物在TBE-尿素PAGE凝胶上可视化。对ORN 7013-7017和7009-7012进行测试。

[0469] 在每种情况下,未修饰的RNA配体(即ORN7013和ORN7009)降解得更快,如凝胶上全RNA配体水平的降低所见(图15A-15B)。值得注意的是,ORN 7010-7012表现出更强的针对RNA酶活性的保护,可能是由于以下事实:相比于ORN 7014-7017,它们由于其序列而具有更大比例的2'-修饰的尿苷(图15B)。

[0470] 序列

[0471] 表8

[0472]

序列说明	序列	SEQ ID NO
ORN7013 (7013_TLR7_AF_pto)	C*C*G*A*G*C*C*G*C*U*U*U*U*C*C*C	1
ORN7023 (7023u_TLR7_GH_R2153)	C-G-G-C-U-C-G-G-C-A-G-A-A-G-C-C-G-G-G-C-C	2
ORN7005 (7005_TLR7_ZZ_pUC)	U-C-U-C-U-C-U-C-U-C-U-C-U-C-U-C-U-C-U-C-U-C	3
ORN7009 (7009_TLR7_ZZ_pU2C)	C-C-U-U-C-U-U-C-U-U-C-U-U-C-U-U-C-U-U-C-U-U-C	4
ORN7001 (7001_TLR7_AH)	C-A-G-A-C-C-U-U-C-C-A-G-A-C-C-U-U-C	5
RNA 三聚体降解产物; N 表示任意核糖核苷酸。	N-U-N	6
ORN7013 中未修饰的 TLR7/TLR8 基序	C*U*U*U*U*C	7
ORN7013 中 TLR7/TLR8 基序的降解产物	C*U*U	8
ORN7013 中 TLR7/TLR8 基序的降解产物	U*U*U	9
ORN7013 中 TLR7/TLR8 基序的降解产物	U*U*C	10
ORN7013 中修饰的 TLR7/TLR8 基序 (X 表示 2'-氟-U 或 2'O-甲基-U)	C*X-U*X-U*C	11
ORN7014 (7014_TLR7_AF_pto_2ome)	C*C*G*A*G*C*C*G*C*mU-U*mU-U*C*C*C	12
ORN7015 (7015_TLR7_AF_pto_2F)	C*C*G*A*G*C*C*G*C*fU-U*fU-U*C*C*C	13
ORN7016	C*C*G*A*G*C*C*G*C*mU-	14

[0473]

序列说明	序列	SEQ ID NO
(7016_TLR7_AF_pto_omeF)	U*fU-U*C*C*C	
ORN7017 (7017_TLR7_AF_pto_Fome)	C*C*G*A*G*C*C*G*C*fU- U*mU-U*C*C*C	15
ORN7022 (7022_TLR7_AF_pto_Uonly)	C-C-G-A-G-C-C-G- C*U*U*U*U*C-C-C	16
ORN7018 (7018_TLR7_AF_2ome)	C-C-G-A-G-C-C-G-C-mU-U*mU- U*C-C-C	17
ORN7019 (7019_TLR7_AF_2F)	C-C-G-A-G-C-C-G-C-fU-U*fU- U*C-C-C	18
ORN7020 (7020_TLR7_AF_omeF)	C-C-G-A-G-C-C-G-C-mU-U*fU- U*C-C-C	19
ORN7021 (7021_TLR7_AF_Fome)	C-C-G-A-G-C-C-G-C-fU-U*mU- U*C-C-C	20
ORN7023 TLR7 结合位点 #2 基 序。	C-U-C	21
ORN7023 TLR7 结合位点 #2 修 饰的基序。 “D”表示 2'-氟-C 或 2'-O-甲基- C。	D-U-C	22
ORN7023F (7023F_TLR7_GH_R2153_F)	C-G-G-fC-U-C-G-G-C-A-G-A-A-G- C-C-G-G-G-C-C	23
ORN7023Ome (7023Ome_TLR7_GH_R2153_o me)	C-G-G-mC-U-C-G-G-C-A-G-A-A- G-C-C-G-G-G-C-C	24
ORN7024 (7024_TLR7_GH_R2153_pto)	C*G*G*C*U*C*G*G*C*A*G*A* A*G*C*C*G*G*G*C*C	25
ORN7006 (7006_TLR7_ZZ_pUC_ome)	U-mC-U-mC-U-mC-U-mC-U-mC- U-mC-U-mC-U-mC-U-mC-U-C	26
ORN7007 (7007_TLR7_ZZ_pUC_F)	U-fC-U-fC-U-fC-U-fC-U-fC-U-fC- U-fC-U-fC-U-fC-U-C	27
ORN7008 (7008_TLR7_ZZ_pUC_pto)	U*C*U*C*U*C*U*C*U*C*U*C* U*C*U*C*U*C*U*C	28
ORN7010 (7010_TLR7_ZZ_pU2C_ome)	C-C-mU-U-C-mU-U-C-mU-U-C- mU-U-C-mU-U-C-mU-U-C	29
ORN7011 (7011_TLR7_ZZ_pU2C_F)	C-C-fU-U-C-fU-U-C-fU-U-C-fU-U- C-fU-U-C-fU-U-C	30
ORN7012 (7012_TLR7_ZZ_pU2C_pto)	C*C*U*U*C*U*U*C*U*U*C*U* U*C*U*U*C*U*U*C	31
ORN7001 内富含 C/U 的 CUUC 基序, 含有 TLR7 结合位点 #2 的两个潜在基序: CUU 和 UUC。	C-U-U-C	32
ORN7002 (7002_TLR7_AH_ome)	C-A-G-A-C-C-mU-U-C-C-A-G-A- C-C-mU-U-C	33
ORN7003 (7003_TLR7_AH_F)	C-A-G-A-C-C-fU-U-C-C-A-G-A-C- C-fU-U-C	34

[0474]

序列说明	序列	SEQ ID NO
ORN7004 (7004 TLR7 AH_pto)	C-A-G-A-C-C*U*U*C-C-A-G-A-C-C*U*U*C	35
来自 ORN7002 的 2'-O-甲基修饰的富含 C/U 的 CUUC 基序。	C-mU-U-C	36
来自 ORN7003 的 2'-氟修饰的富含 C/U 的 CUUC 基序。	C-fU-U-C	37
来自 ORN7004 的硫代磷酸酯修饰的富含 C/U 的 CUUC 基序。	C*U*U*C	38
ORN 7009 中的 UUC 重复序列	U-U-C	39
来自 ORN7010 的 2'-O-甲基修饰的重复序列	mU-U-C	40
来自 ORN7011 的 2'-氟修饰的重复序列	fU-U-C	41
来自 ORN7023F 的 2'-氟修饰的 CUC 基序	fC-U-C	42
来自 ORN7023Ome 的 2'-O-甲基修饰的 CUC 基序	mC-U-C	43
ORN7014 中的 2'-O-甲基修饰的基序（衍生自 ORN7013）。	C*mU-U*mU-U*C	44
ORN7015 中的 2'-氟修饰的基序（衍生自 ORN7013）	C*fU-U*fU-U*C	45
ORN7016 中的 2'-O-甲基和 2'-氟修饰的基序（衍生自 ORN7013）。	C*mU-U*fU-U*C	46
ORN7017 中的 2'-氟和 2'-O-甲基修饰的基序（衍生自 ORN7013）。	C*fU-U*mU-U*C	47
ORN7018 中的硫代磷酸酯和 2'-O-甲基修饰的基序（衍生自 ORN7013）	C-mU-U*mU-U*C	48
ORN7019 中的硫代磷酸酯和 2'-氟修饰的基序（衍生自 ORN7013）。	C-fU-U*fU-U*C	49
ORN7020 中的硫代磷酸酯、2'-O-甲基和 2'-氟修饰的基序（衍生自 ORN7013）。	C-mU-U*fU-U*C	50
ORN7021 中的硫代磷酸酯、2'-氟和 2'-O-甲基修饰的基序（衍生自 ORN7013）。	C-fU-U*mU-U*C	51
来自 ORN7013 的修饰的 C*XU*XU*C 基序 (SEQ ID NO: 11) 内的结合位点 #2 基序。X	X-U*C	52

[0475]

序列说明	序列	SEQ ID NO
表示 2'-氟-U 或 2'O-甲基-U。		
来自 ORN7013 的修饰的 C*XU*XU*C 基序 (SEQ ID NO: 11) 内的结合位点 #2 基序。X 表示 2'-氟-U 或 2'O-甲基-U。	X-U*X	53
ORN7001 的富含 C/U 的 CUUC 基序 (SEQ ID NO: 32) 内的 TLR7 结合位点 #2 基序。	C-U-U	54
ORN7001 的富含 C/U 的 CUUC 基序 (SEQ ID NO: 32) 内的 TLR7 结合位点 #2 基序。	U-U-C	55
9.2S RNA	A-G-C-U-U-A-A-C-C-U-G-U-C-C-U-U-C-A-A	56
ORN7014-7017 的基序。U ₂ 具有 2'O-甲基修饰 (mU) 或 2'-氟修饰 (fU)，并且 U ₄ 具有 2'O-甲基修饰 (mU) 或 2'-氟修饰 (fU)	C ₁ *U ₂ -U ₃ *U ₄ -U ₅ *C ₆	57
ORN7014-7017 的 5' 核苷酸序列。	C*C*G*A*G*C*C*G	58
ORN7014-7017 的 3' 核苷酸序列。	C*C	59
ORN7023F、ORN7023Ome 的 5' 核苷酸序列	C-G-G	60
ORN7023F、ORN7023Ome 的 3' 核苷酸序列	G-G-C-A-G-A-A-G-C-C-G-G-G-C-C	61
IVT4 寡核苷酸序列	G-G-G-A-C-G-C-U-G-A-C-C-C-A-G-A-A-G-A-U-C-A-C-U-A-G-A-A-A-U-A-G-U-A-G-A-U-C-U-U-C-U-G-G-G-U-C-A-G-C-G-U-C-C-C	62
RNA 三聚体降解产物；N 表示任意核糖核苷酸。	N*U*N	63
RNA 三聚体降解产物；N 表示任意核糖核苷酸。	N-U*N	64
IVT4-fwd 寡核苷酸	T-T-G-T-A-A-T-A-C-G-A-C-T-C-A-C-T-A-T-A-G-G-G-A-C-G-C-T-G-A-C-C-C-A-G-A-A-G-A-T-C-T-A-C-T-A-G-A-A-T-A-G-T-A-G-A-T-C-T-T-C-T-G-G-G-T-C-A-G-C-G-T-C-C-C	65
IVT4-rev 寡核苷酸	G-G-G-A-C-G-C-T-G-A-C-C-C-A-G-A-A-G-A-T-C-T-A-C-T-A-T-T-T-C-T-A-G-T-A-G-A-T-C-T-T-C-T-	66

[0476]

序列说明	序列	SEQ ID NO
	G-G-G-T-C-A-G-C-G-T-C-C-C-T-A-T-A-G-T-G-A-G-T-C-G-T-A-T-T-A-C-A-A	
ORN7001-7004 的第一核苷酸序列	C-A-G-A-C	67
ORN7018-7021 的 5' 核苷酸序列。	C-C-G-A-G-C-C-G	68
ORN7023F、ORN7023Ome 的 3' 核苷酸序列中的 GGG 基序	G-G-G	69
pCA、pCA-2 和 pCA-3 核苷酸序列	C-A-C-A-C-A-C-A-C-A-C-A-C-A-C-A-C-A-C-A	70
pU2G 核苷酸序列	G-G-U-U-G-U-U-G-U-U-G-U-U-G-U-U-G-U-U-G-U-U-G	71
pU2G_pto 核苷酸序列	G*G*U*U*G*U*U*G*U*U*G*U*U*G*U*U*G*U*U*G*U*U*G	72
“*”指示指定核苷之间的硫代磷酸酯键；“-”指示指定核苷之间的磷酸二酯键；“m”指示 2'O-甲基修饰；“f”指示 2'-氟修饰。		

序列表

<110> 基因泰克公司

<120> 优化的 TLR7 配体及其用途

<130> 14639-20532.40

<140> 尚未分配

<141> 同时附上

<150> US 63/176,128

<151> 2021-04-16

<160> 72

<170> 用于 Windows 的 FastSEQ,4.0 版

<210> 1

<211> 16

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

<222> (1) .. (16)

<223> 各核苷之间的键如说明书的表 8 所示。修饰的核苷如说明书的表 8 所示。

<400> 1

ccgagccgcu uuuccc 16

<210> 2

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

<222> (1) .. (21)

<223> 各核苷之间的键如说明书的表 8 所示。修饰的核苷如说明书的表 8 所示。

<400> 2

cggcucggca gaagccgggc c 21

<210> 3

<211> 20

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> 变体
<222> (1) .. (20)
<223> 各核苷之间的键如说明书的表 8 所示。修饰的核苷如说明书的表 8 所示。
<400> 3
ucucucucuc ucucucucuc 20
<210> 4
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> 变体
<222> (1) .. (20)
<223> 各核苷之间的键如说明书的表 8 所示。修饰的核苷如说明书的表 8 所示。
<400> 4
ccuucuuuu cuucuuuuuc 20
<210> 5
<211> 18
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> 变体
<222> (1) .. (18)
<223> 各核苷之间的键如说明书的表 8 所示。修饰的核苷如说明书的表 8 所示。
<400> 5
cagaccuuuc agaccuuc 18
<210> 6
<211> 3
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<220>

<221> 变体
<222> (1) .. (3)
<223> 各核苷之间的键如说明书的表 8 所示。修饰的核苷如说明书的表 8 所示。
<220>
<221> misc_feature
<222> 1, 3
<223> n = 任何核苷
<400> 6
nun 3
<210> 7
<211> 6
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> 变体
<222> (1) .. (6)
<223> 各核苷之间的键如说明书的表 8 所示。修饰的核苷如说明书的表 8 所示。
<400> 7
cuuuuc 6
<210> 8
<211> 3
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> 变体
<222> (1) .. (3)
<223> 各核苷之间的键如说明书的表 8 所示。修饰的核苷如说明书的表 8 所示。
<400> 8
cuu 3
<210> 9
<211> 3
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体

<220>
<221> 变体
<222> (1) .. (3)
<223> 各核苷之间的键如说明书的表 8 所示。修饰的核苷如说明书的表 8 所示。
<400> 9
uuu 3
<210> 10
<211> 3
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> 变体
<222> (1) .. (3)
<223> 各核苷之间的键如说明书的表 8 所示。修饰的核苷如说明书的表 8 所示。
<400> 10
uuc 3
<210> 11
<211> 6
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> 变体
<222> (1) .. (6)
<223> 各核苷之间的键如说明书的表 8 所示。修饰的核苷如说明书的表 8 所示。
<220>
<221> misc_feature
<222> 2, 4
<223> n = 2'-氟-U 或 2'-O-甲基-U
<400> 11
cnunuc 6
<210> 12
<211> 16
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>

<223> 合成构建体
<220>
<221> 变体
<222> (1) .. (16)
<223> 各核苷之间的键如说明书的表 8 所示。修饰的核苷如说明书的表 8 所示。
<400> 12
ccgagccgcu uuuccc 16
<210> 13
<211> 16
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> 变体
<222> (1) .. (16)
<223> 各核苷之间的键如说明书的表 8 所示。修饰的核苷如说明书的表 8 所示。
<400> 13
ccgagccgcu uuuccc 16
<210> 14
<211> 16
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> 变体
<222> (1) .. (16)
<223> 各核苷之间的键如说明书的表 8 所示。修饰的核苷如说明书的表 8 所示。
<400> 14
ccgagccgcu uuuccc 16
<210> 15
<211> 16
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> 变体

<222> (1) .. (16)
<223> 各核苷之间的键如说明书的表 8 所示。修饰的核苷如说明书的表 8 所示。
<400> 15
ccgagccgcu uuuccc 16
<210> 16
<211> 16
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> 变体
<222> (1) .. (16)
<223> 各核苷之间的键如说明书的表 8 所示。修饰的核苷如说明书的表 8 所示。
<400> 16
ccgagccgcu uuuccc 16
<210> 17
<211> 16
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> 变体
<222> (1) .. (16)
<223> 各核苷之间的键如说明书的表 8 所示。修饰的核苷如说明书的表 8 所示。
<400> 17
ccgagccgcu uuuccc 16
<210> 18
<211> 16
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> 变体
<222> (1) .. (16)
<223> 各核苷之间的键如说明书的表 8 所示。修饰的核苷如说明书的表 8 所示。
<400> 18

ccgagccgcu uuuccc 16

<210> 19

<211> 16

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

<222> (1) .. (16)

<223> 各核苷之间的键如说明书的表 8 所示。修饰的核苷如说明书的表 8 所示。

<400> 19

ccgagccgcu uuuccc 16

<210> 20

<211> 16

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

<222> (1) .. (16)

<223> 各核苷之间的键如说明书的表 8 所示。修饰的核苷如说明书的表 8 所示。

<400> 20

ccgagccgcu uuuccc 16

<210> 21

<211> 3

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

<222> (1) .. (3)

<223> 各核苷之间的键如说明书的表 8 所示。修饰的核苷如说明书的表 8 所示。

<400> 21

cuc 3

<210> 22

<211> 3

<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> 变体
<222> (1) .. (3)
<223> 各核苷之间的键如说明书的表 8 所示。修饰的核苷如说明书的表 8 所示。
<220>
<221> misc_feature
<222> 1
<223> n = 2'-氟-C 或 2'-O-甲基-C
<400> 22
nuc 3
<210> 23
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> 变体
<222> (1) .. (21)
<223> 各核苷之间的键如说明书的表 8 所示。修饰的核苷如说明书的表 8 所示。
<400> 23
cggcucggca gaagccgggc c 21
<210> 24
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> 变体
<222> (1) .. (21)
<223> 各核苷之间的键如说明书的表 8 所示。修饰的核苷如说明书的表 8 所示。
<400> 24
cggcucggca gaagccgggc c 21
<210> 25

<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> 变体
<222> (1) .. (21)
<223> 各核苷之间的键如说明书的表 8 所示。修饰的核苷如说明书的表 8 所示。
<400> 25
cggcucggca gaagccgggc c 21
<210> 26
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> 变体
<222> (1) .. (20)
<223> 各核苷之间的键如说明书的表 8 所示。修饰的核苷如说明书的表 8 所示。
<400> 26
ucucucucuc ucucucucuc 20
<210> 27
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> 变体
<222> (1) .. (20)
<223> 各核苷之间的键如说明书的表 8 所示。修饰的核苷如说明书的表 8 所示。
<400> 27
ucucucucuc ucucucucuc 20
<210> 28
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> 变体
<222> (1) .. (20)
<223> 各核苷之间的键如说明书的表 8 所示。修饰的核苷如说明书的表 8 所示。
<400> 28
ucucucucuc ucucucucuc 20
<210> 29
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> 变体
<222> (1) .. (20)
<223> 各核苷之间的键如说明书的表 8 所示。修饰的核苷如说明书的表 8 所示。
<400> 29
ccuucuuuuu cuucuuuuuc 20
<210> 30
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> 变体
<222> (1) .. (20)
<223> 各核苷之间的键如说明书的表 8 所示。修饰的核苷如说明书的表 8 所示。
<400> 30
ccuucuuuuu cuucuuuuuc 20
<210> 31
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<220>

<221> 变体
<222> (1) .. (20)
<223> 各核苷之间的键如说明书的表 8 所示。修饰的核苷如说明书的表 8 所示。
<400> 31
ccuucuucuu cuucuucuc 20
<210> 32
<211> 4
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> 变体
<222> (1) .. (4)
<223> 各核苷之间的键如说明书的表 8 所示。修饰的核苷如说明书的表 8 所示。
<400> 32
cuuc 4
<210> 33
<211> 18
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> 变体
<222> (1) .. (18)
<223> 各核苷之间的键如说明书的表 8 所示。修饰的核苷如说明书的表 8 所示。
<400> 33
cagaccuucc agaccuuc 18
<210> 34
<211> 18
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> 变体
<222> (1) .. (18)
<223> 各核苷之间的键如说明书的表 8 所示。修饰的核苷如说明书的表 8 所示。

<400> 34
cagaccuucc agaccuuc 18
<210> 35
<211> 18
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> 变体
<222> (1) .. (18)
<223> 各核苷之间的键如说明书的表 8 所示。修饰的核苷如说明书的表 8 所示。
<400> 35
cagaccuucc agaccuuc 18
<210> 36
<211> 4
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> 变体
<222> (1) .. (4)
<223> 各核苷之间的键如说明书的表 8 所示。修饰的核苷如说明书的表 8 所示。
<400> 36
cuuc 4
<210> 37
<211> 4
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> 变体
<222> (1) .. (4)
<223> 各核苷之间的键如说明书的表 8 所示。修饰的核苷如说明书的表 8 所示。
<400> 37
cuuc 4
<210> 38

<211> 4
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> 变体
<222> (1) .. (4)
<223> 各核苷之间的键如说明书的表 8 所示。修饰的核苷如说明书的表 8 所示。
<400> 38
cuuc 4
<210> 39
<211> 3
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> 变体
<222> (1) .. (3)
<223> 各核苷之间的键如说明书的表 8 所示。修饰的核苷如说明书的表 8 所示。
<400> 39
uuc 3
<210> 40
<211> 3
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> 变体
<222> (1) .. (3)
<223> 各核苷之间的键如说明书的表 8 所示。修饰的核苷如说明书的表 8 所示。
<400> 40
uuc 3
<210> 41
<211> 3
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> 变体
<222> (1) .. (3)
<223> 各核苷之间的键如说明书的表 8 所示。修饰的核苷如说明书的表 8 所示。
<400> 41
uuc 3
<210> 42
<211> 3
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> 变体
<222> (1) .. (3)
<223> 各核苷之间的键如说明书的表 8 所示。修饰的核苷如说明书的表 8 所示。
<400> 42
cuc 3
<210> 43
<211> 3
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> 变体
<222> (1) .. (3)
<223> 各核苷之间的键如说明书的表 8 所示。修饰的核苷如说明书的表 8 所示。
<400> 43
cuc 3
<210> 44
<211> 6
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<220>

<221> 变体
<222> (1) .. (6)
<223> 各核苷之间的键如说明书的表 8 所示。修饰的核苷如说明书的表 8 所示。
<400> 44
cuuuuc 6
<210> 45
<211> 6
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> 变体
<222> (1) .. (6)
<223> 各核苷之间的键如说明书的表 8 所示。修饰的核苷如说明书的表 8 所示。
<400> 45
cuuuuc 6
<210> 46
<211> 6
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> 变体
<222> (1) .. (6)
<223> 各核苷之间的键如说明书的表 8 所示。修饰的核苷如说明书的表 8 所示。
<400> 46
cuuuuc 6
<210> 47
<211> 6
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> 变体
<222> (1) .. (6)
<223> 各核苷之间的键如说明书的表 8 所示。修饰的核苷如说明书的表 8 所示。

<400> 47
cuuuuc 6
<210> 48
<211> 6
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> 变体
<222> (1) .. (6)
<223> 各核苷之间的键如说明书的表 8 所示。修饰的核苷如说明书的表 8 所示。
<400> 48
cuuuuc 6
<210> 49
<211> 6
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> 变体
<222> (1) .. (6)
<223> 各核苷之间的键如说明书的表 8 所示。修饰的核苷如说明书的表 8 所示。
<400> 49
cuuuuc 6
<210> 50
<211> 6
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> 变体
<222> (1) .. (6)
<223> 各核苷之间的键如说明书的表 8 所示。修饰的核苷如说明书的表 8 所示。
<400> 50
cuuuuc 6
<210> 51

<211> 6
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> 变体
<222> (1) .. (6)
<223> 各核苷之间的键如说明书的表 8 所示。修饰的核苷如说明书的表 8 所示。
<400> 51
cuuuuc 6
<210> 52
<211> 3
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> 变体
<222> (1) .. (3)
<223> 各核苷之间的键如说明书的表 8 所示。修饰的核苷如说明书的表 8 所示。
<220>
<221> misc_feature
<222> 1
<223> n = 2'-氟-U 或 2'-O-甲基-U
<400> 52
nuc 3
<210> 53
<211> 3
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> 变体
<222> (1) .. (3)
<223> 各核苷之间的键如说明书的表 8 所示。修饰的核苷如说明书的表 8 所示。
<220>
<221> misc_feature

<222> 1, 3
<223> n = 2'-氟-U 或 2'-O-甲基-U
<400> 53
nun 3
<210> 54
<211> 3
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> 变体
<222> (1) .. (3)
<223> 各核苷之间的键如说明书的表 8 所示。修饰的核苷如说明书的表 8 所示。
<400> 54
cuu 3
<210> 55
<211> 3
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> 变体
<222> (1) .. (3)
<223> 各核苷之间的键如说明书的表 8 所示。修饰的核苷如说明书的表 8 所示。
<400> 55
uuc 3
<210> 56
<211> 19
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> 变体
<222> (1) .. (19)
<223> 各核苷之间的键如说明书的表 8 所示。修饰的核苷如说明书的表 8 所示。
<400> 56

agcuuaaccu guccuucuaa 19

<210> 57

<211> 6

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

<222> (1) .. (6)

<223> 各核苷之间的键如说明书的表 8 所示。修饰的核苷如说明书的表 8 所示。

<400> 57

cuuuuc 6

<210> 58

<211> 8

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

<222> (1) .. (8)

<223> 各核苷之间的键如说明书的表 8 所示。修饰的核苷如说明书的表 8 所示。

<400> 58

ccgagccg 8

<210> 59

<211> 2

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

<222> (1) .. (2)

<223> 各核苷之间的键如说明书的表 8 所示。修饰的核苷如说明书的表 8 所示。

<400> 59

cc 2

<210> 60

<211> 3

<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> 变体
<222> (1) .. (3)
<223> 各核苷之间的键如说明书的表 8 所示。修饰的核苷如说明书的表 8 所示。
<400> 60
cgg 3
<210> 61
<211> 15
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> 变体
<222> (1) .. (15)
<223> 各核苷之间的键如说明书的表 8 所示。修饰的核苷如说明书的表 8 所示。
<400> 61
ggcagaagcc gggcc 15
<210> 62
<211> 55
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> 变体
<222> (1) .. (55)
<223> 各核苷之间的键如说明书的表 8 所示。修饰的核苷如说明书的表 8 所示。
<400> 62
gggacgcuga cccagaagau cacuagaaau aguagaucuu cugggucagc guccc 55
<210> 63
<211> 3
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>

<223> 合成构建体
<220>
<221> 变体
<222> (1) .. (3)
<223> 各核苷之间的键如说明书的表 8 所示。修饰的核苷如说明书的表 8 所示。
<220>
<221> misc_feature
<222> 1, 3
<223> n = 任何核苷
<400> 63
nun 3
<210> 64
<211> 3
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> 变体
<222> (1) .. (3)
<223> 各核苷之间的键如说明书的表 8 所示。修饰的核苷如说明书的表 8 所示。
<220>
<221> misc_feature
<222> 1, 3
<223> n = 任何核苷
<400> 64
nun 3
<210> 65
<211> 76
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> 变体
<222> (1) .. (76)
<223> 各核苷之间的键如说明书的表 8 所示。修饰的核苷如说明书的表 8 所示。
<400> 65
ttgtaatac g actcactata gggacgctga cccagaagat ctactagaaa tagtagatct 60

tctgggtcag cgtccc 76

<210> 66

<211> 76

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

<222> (1) .. (76)

<223> 各核苷之间的键如说明书的表 8 所示。修饰的核苷如说明书的表 8 所示。

<400> 66

gggacgctga cccagaagat ctactatttc tagtagatct tctgggtcag cgtccctata 60
gtgagtcgta ttacaa 76

<210> 67

<211> 5

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

<222> (1) .. (5)

<223> 各核苷之间的键如说明书的表 8 所示。修饰的核苷如说明书的表 8 所示。

<400> 67

cagac 5

<210> 68

<211> 8

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

<222> (1) .. (8)

<223> 各核苷之间的键如说明书的表 8 所示。修饰的核苷如说明书的表 8 所示。

<400> 68

ccgagccg 8

<210> 69

<211> 3
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> 变体
<222> (1) .. (3)
<223> 各核苷之间的键如说明书的表 8 所示。修饰的核苷如说明书的表 8 所示。
<400> 69
ggg 3
<210> 70
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> 变体
<222> (1) .. (20)
<223> 各核苷之间的键如说明书的表 8 所示。修饰的核苷如说明书的表 8 所示。
<400> 70
cacacacaca cacacacaca 20
<210> 71
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> 变体
<222> (1) .. (20)
<223> 各核苷之间的键如说明书的表 8 所示。修饰的核苷如说明书的表 8 所示。
<400> 71
gguuguuguu guuguuguug 20
<210> 72
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

<222> (1) .. (20)

<223> 各核苷之间的键如说明书的表 8 所示。修饰的核苷如说明书的表 8 所示。

<400> 72

gguguuguuu guuguuguug 20

改编自：Miyake 等人, International Immunology (2018) 30 (2) :43-51

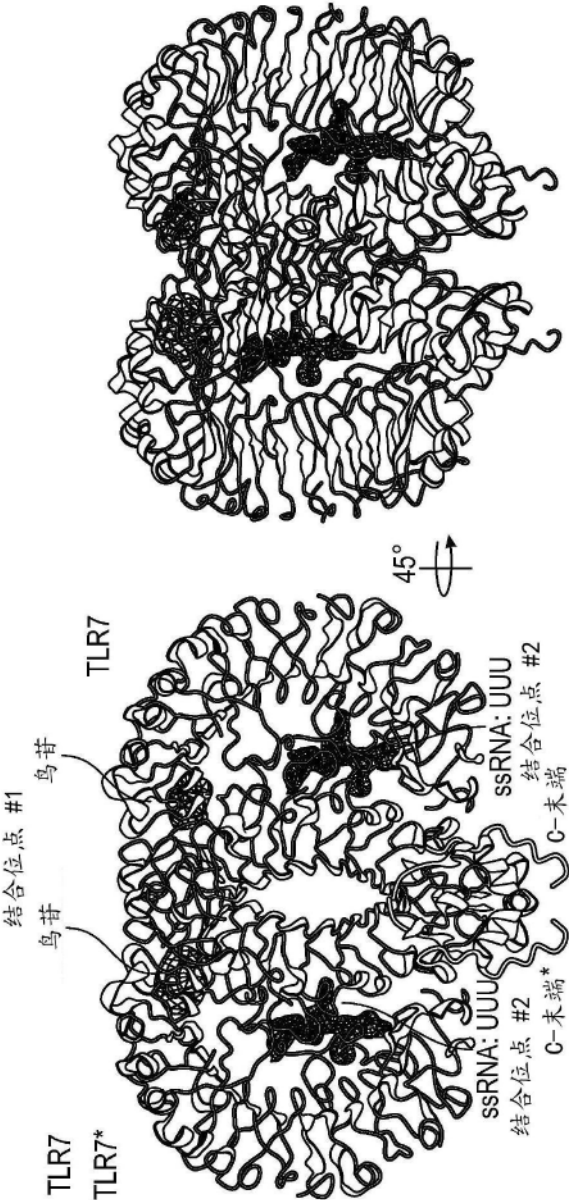


图1A

改编自: Miyake 等人, International Immunology (2018) 30 (2): 43-51

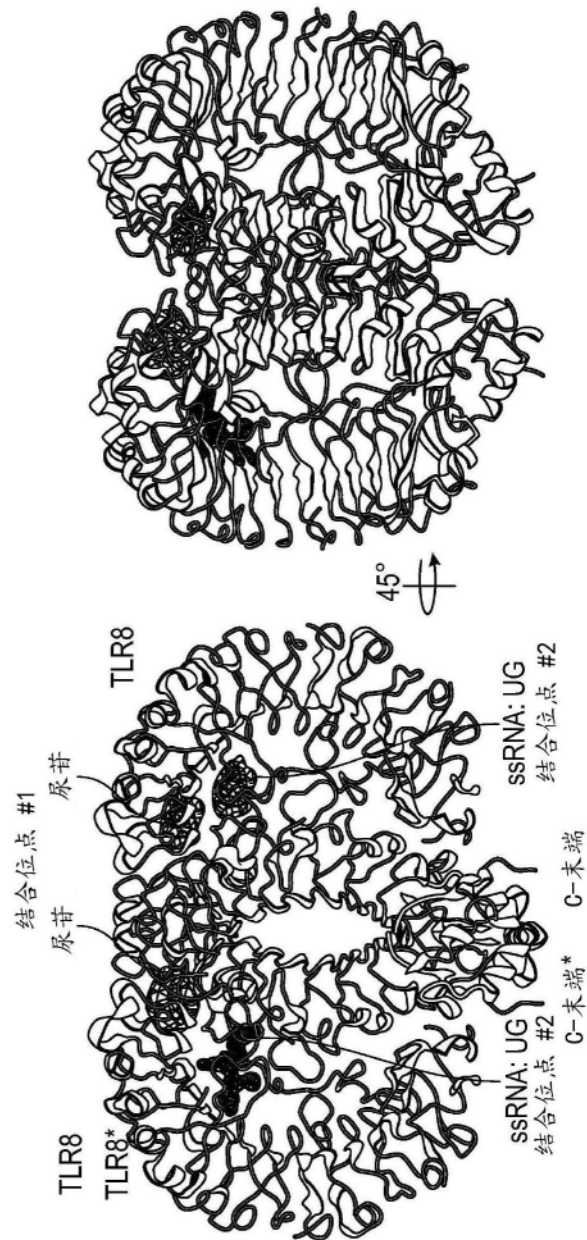


图1B

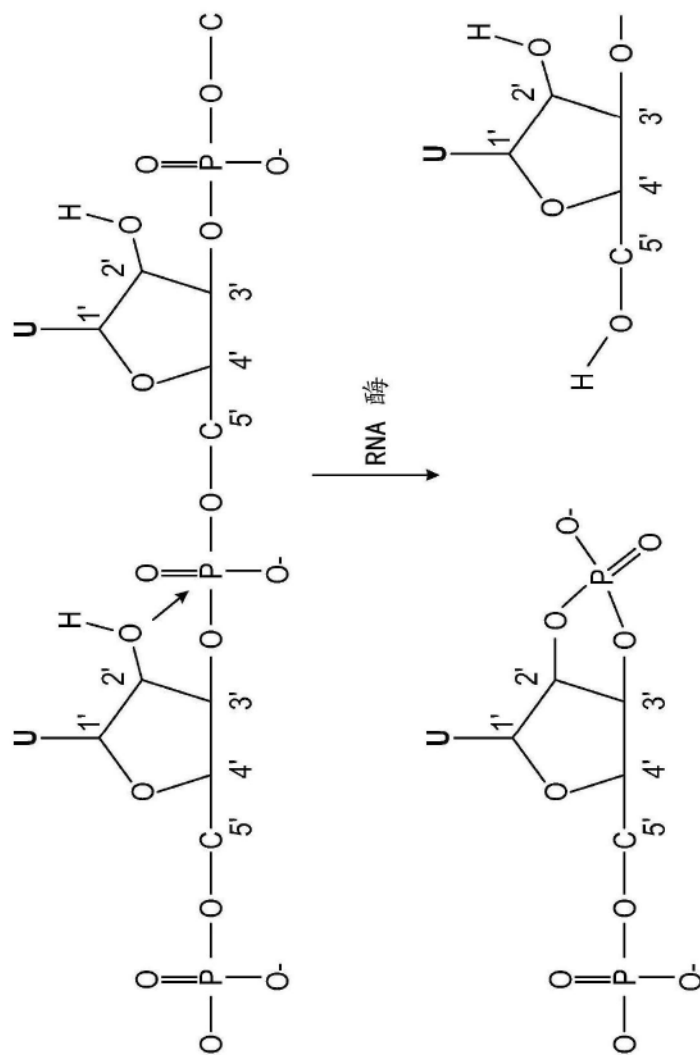


图2

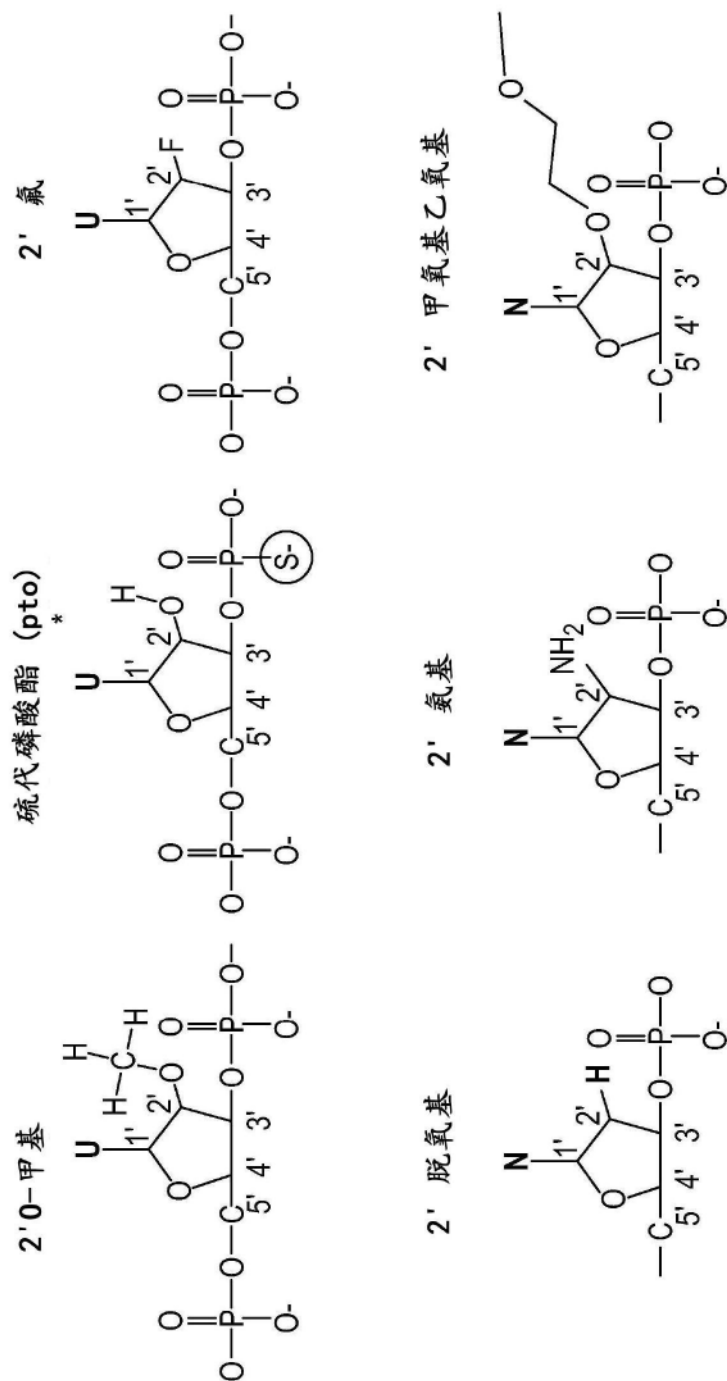


图3

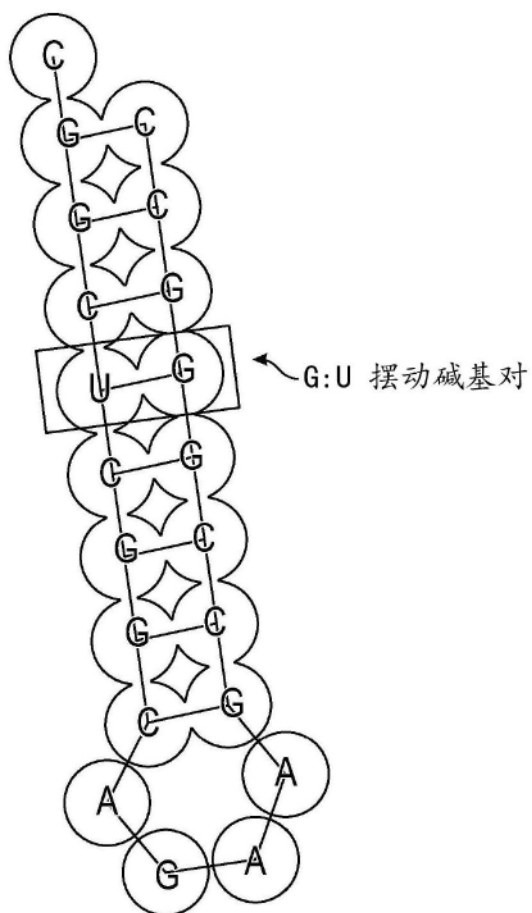
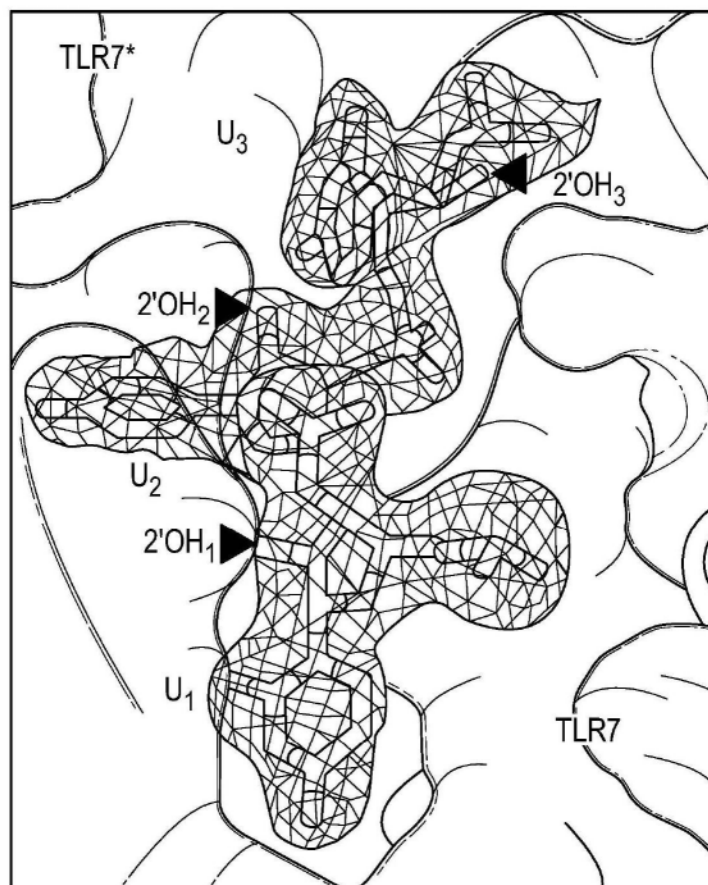


图4



改编自: Zhang 等人, Cell Reports (2018) 25:3371-3381

图5

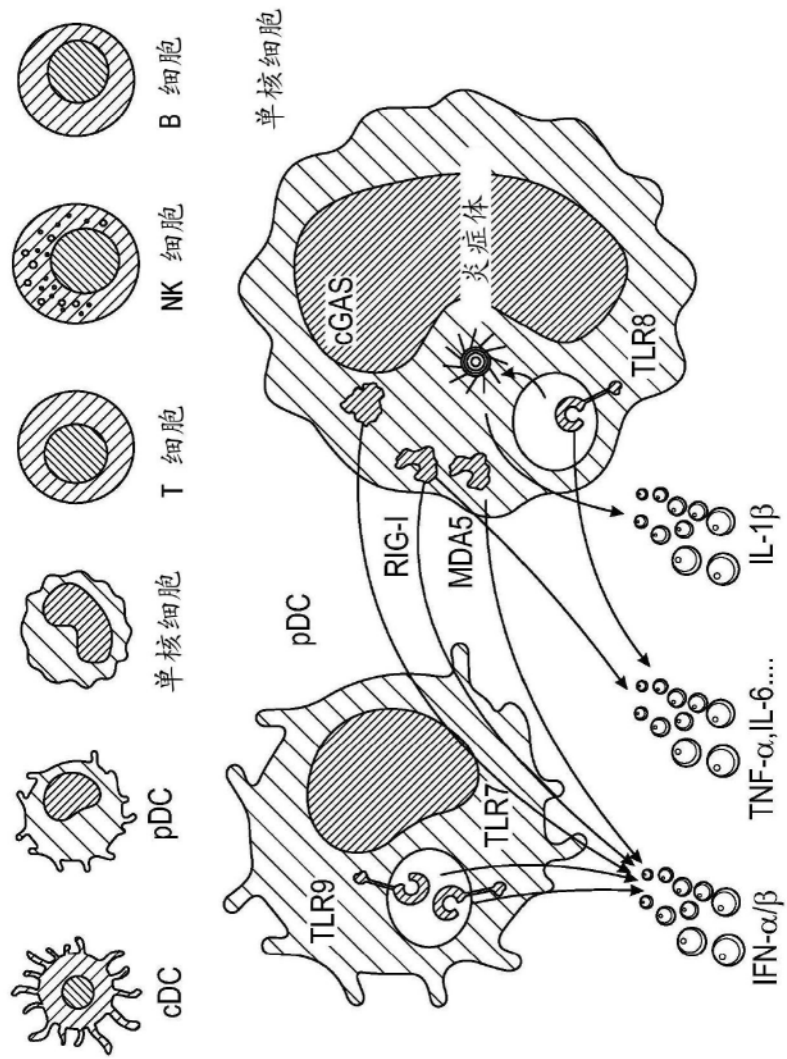


图6

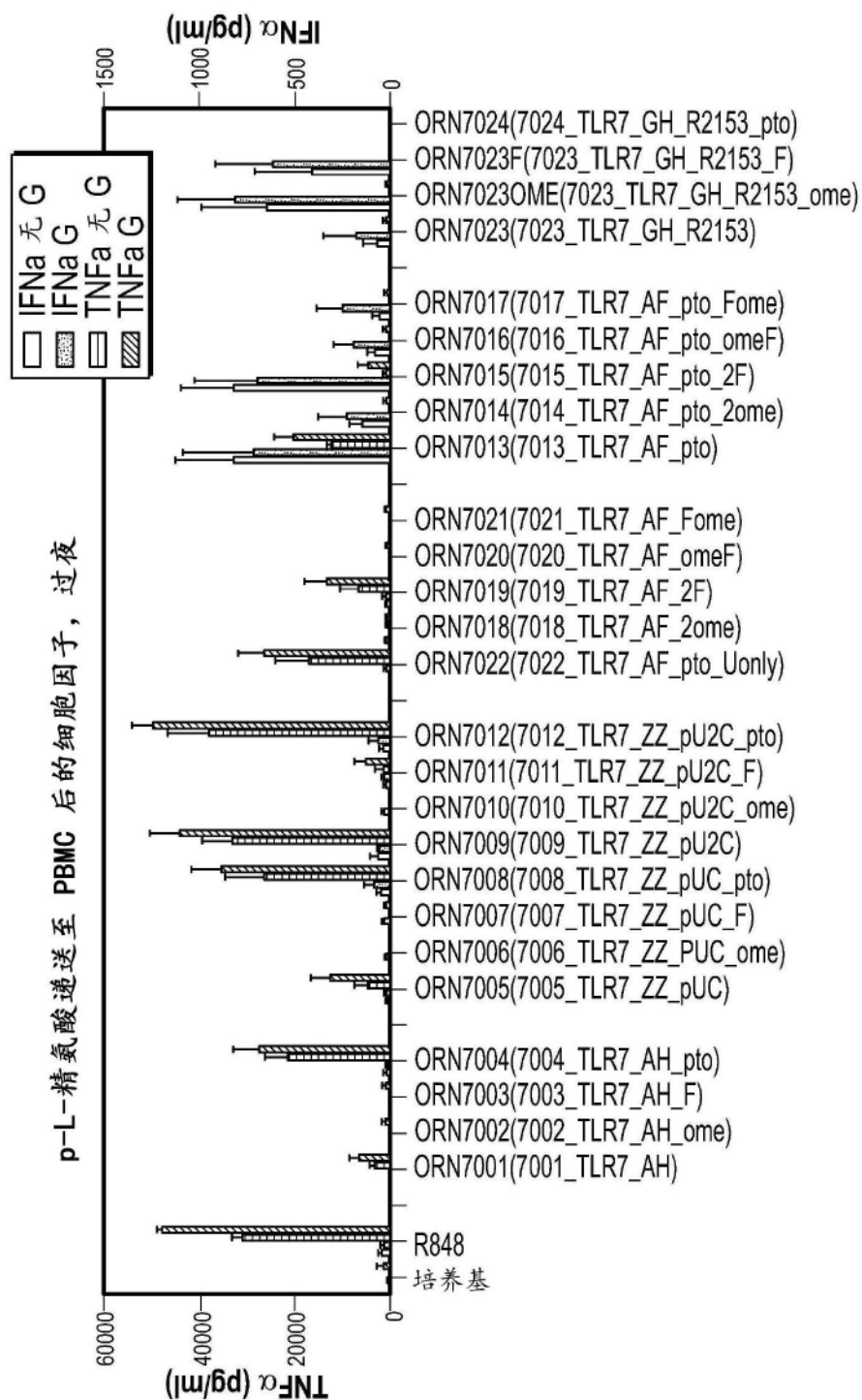


图7

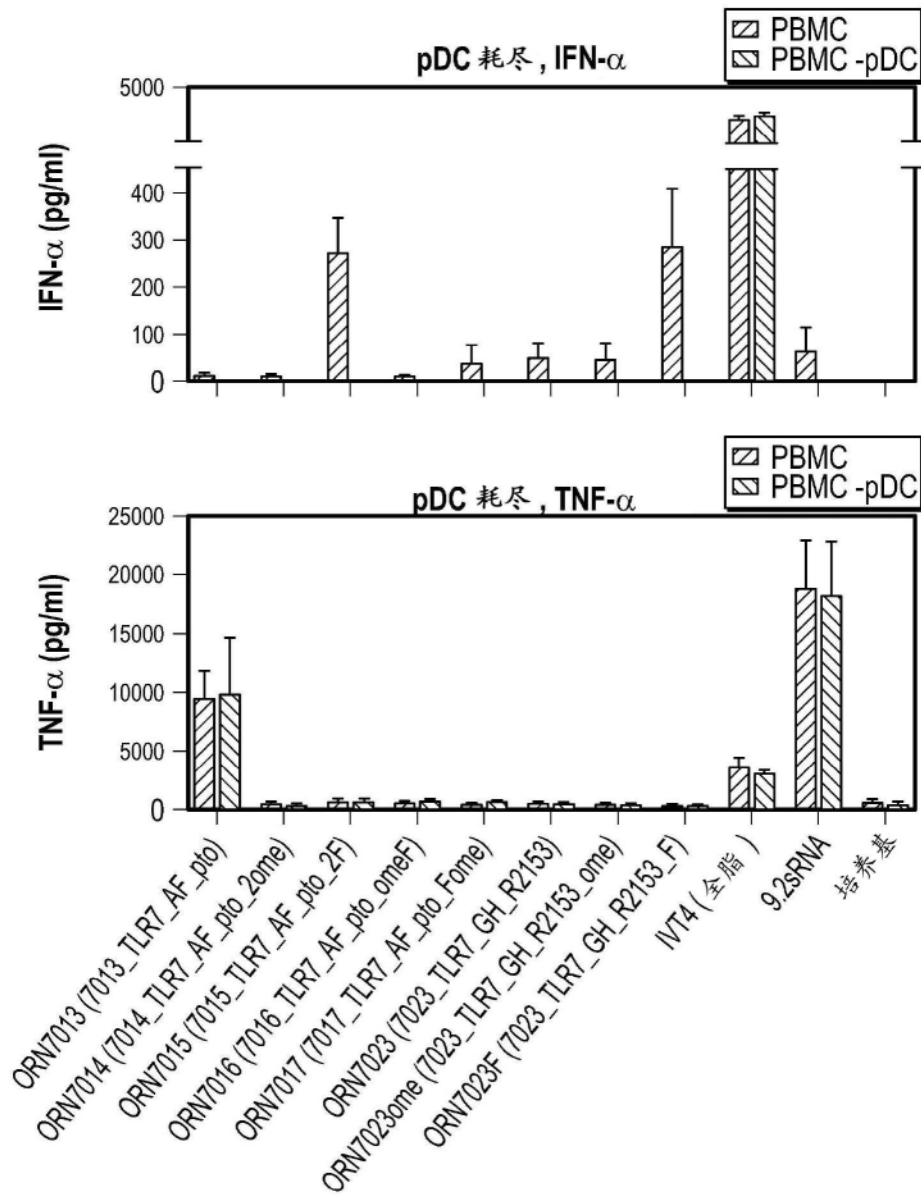


图8

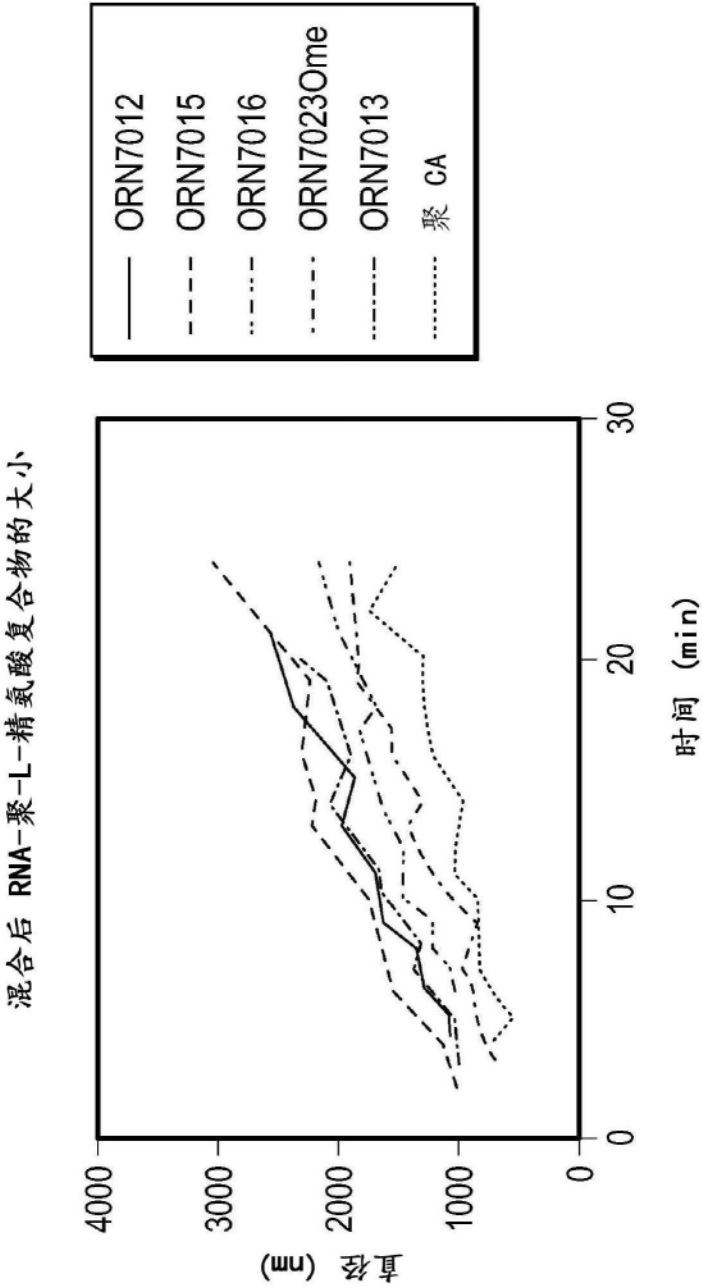


图9

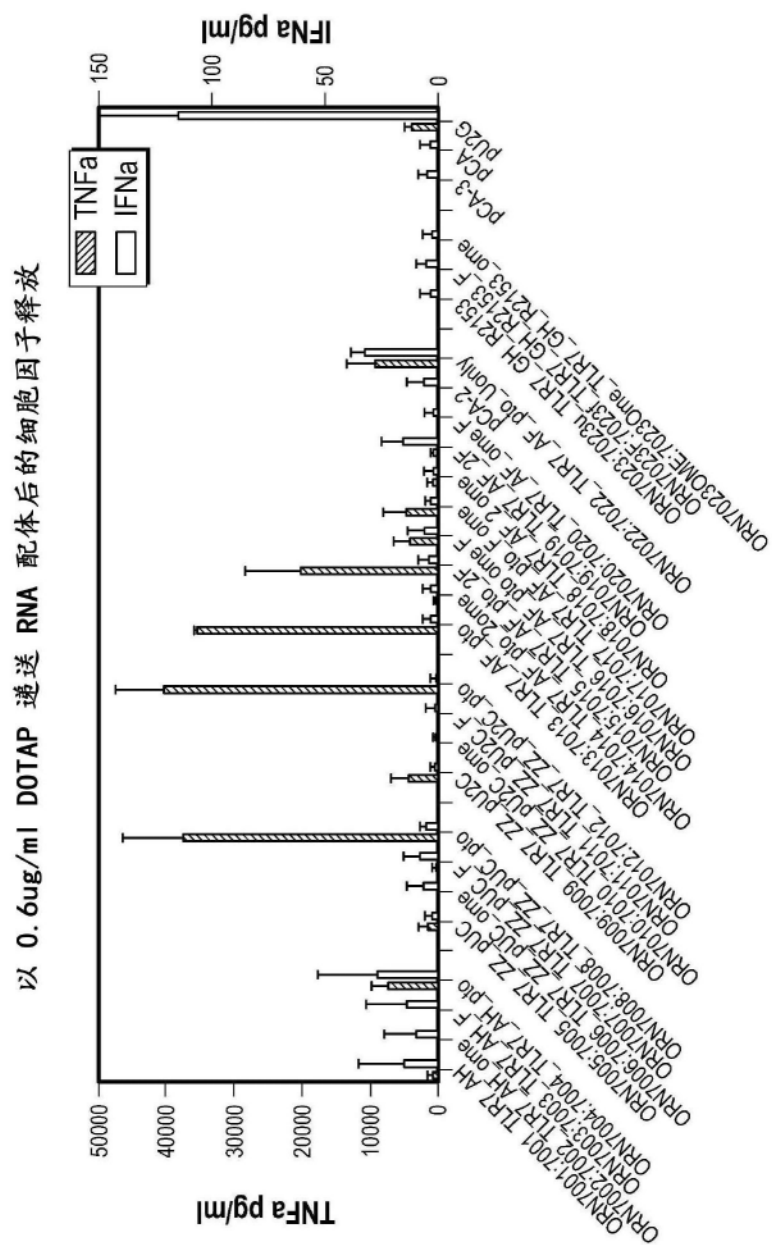


图10A

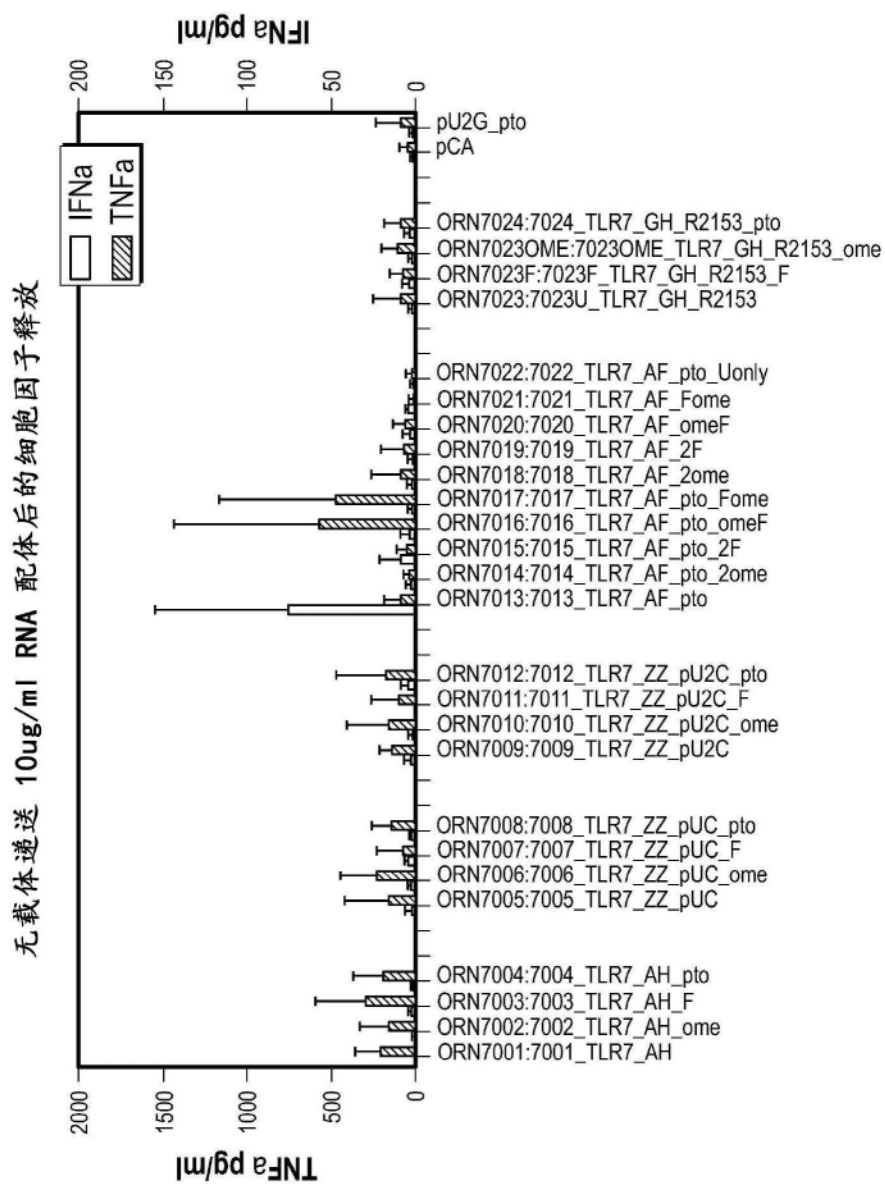


图11

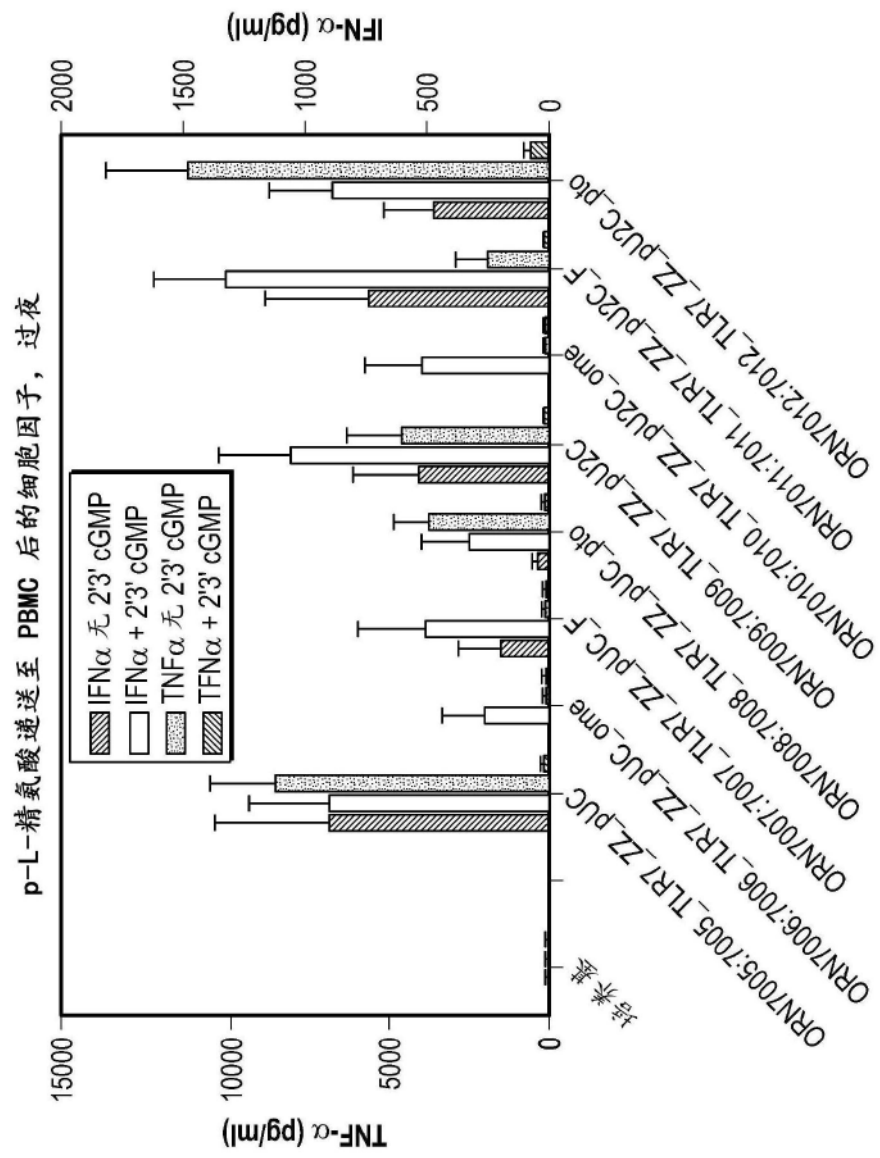


图12

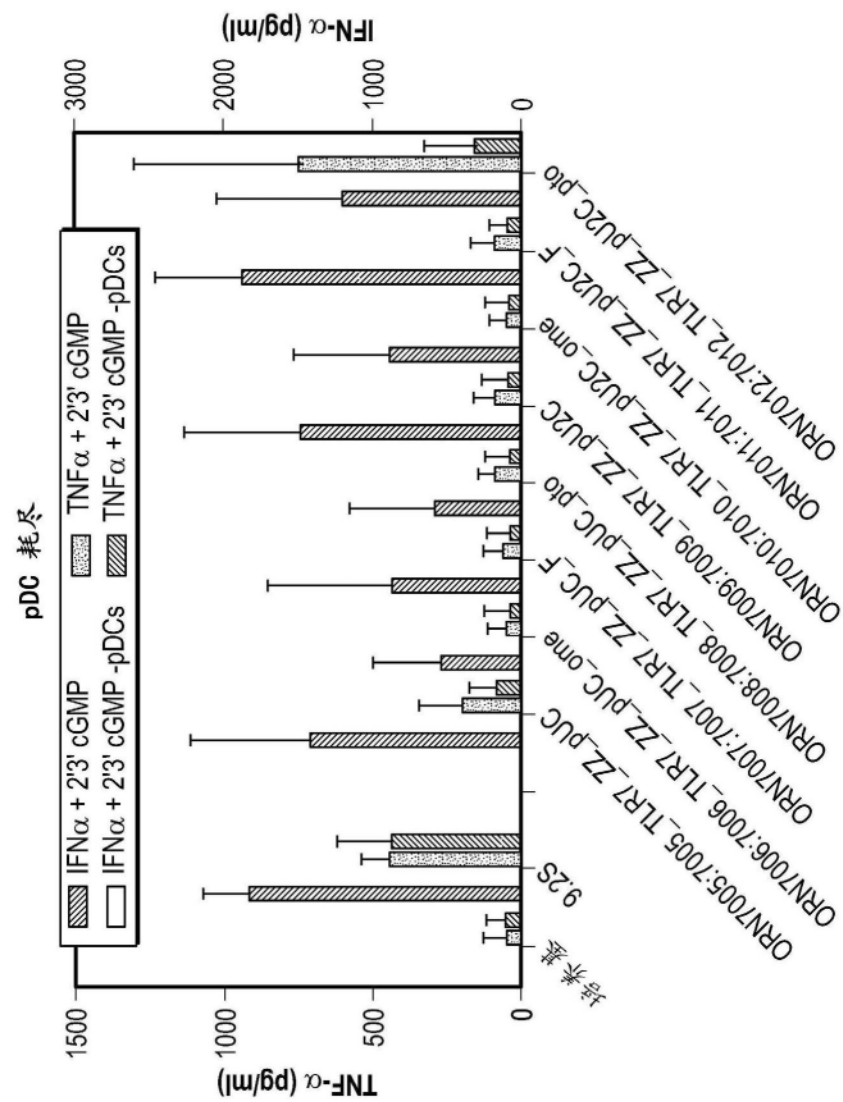


图13

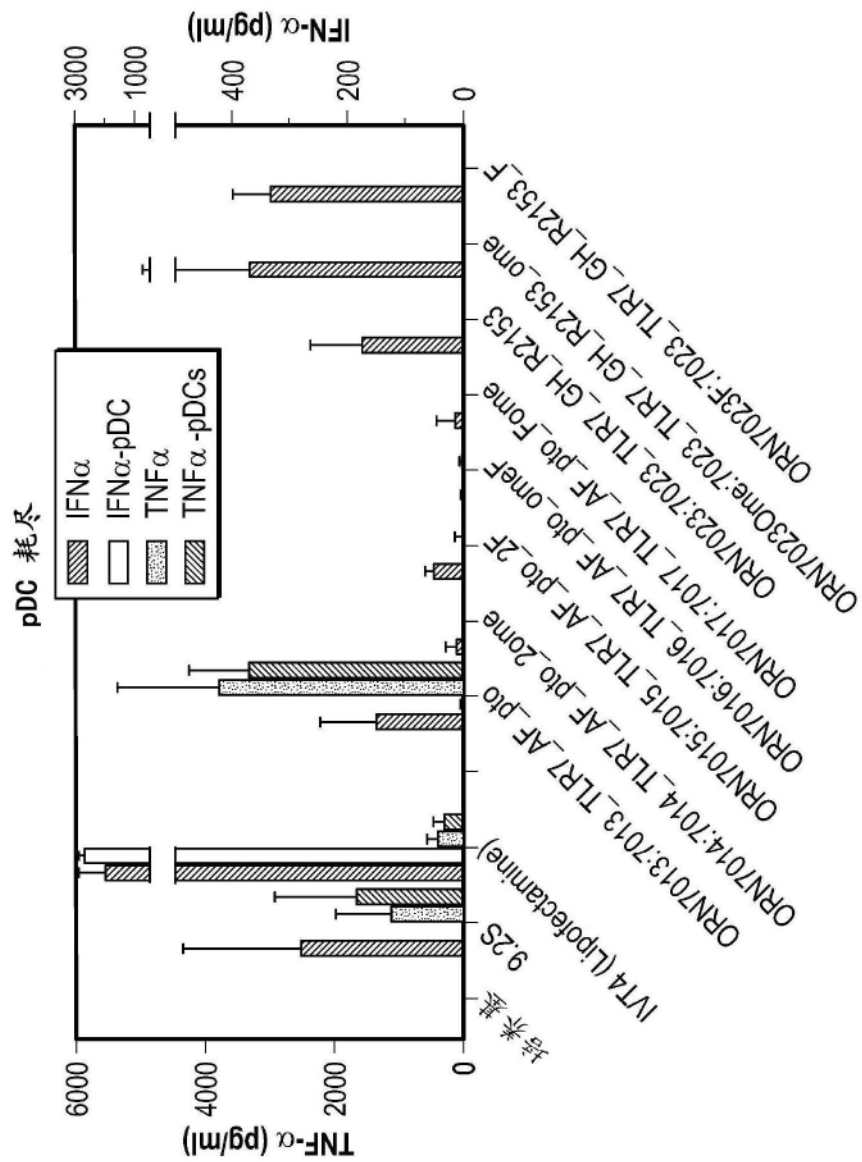


图14

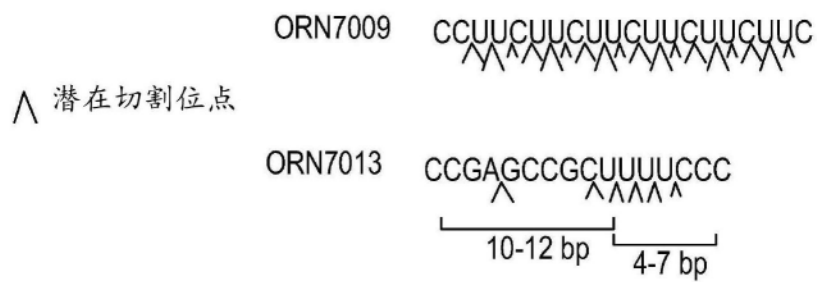


图15A

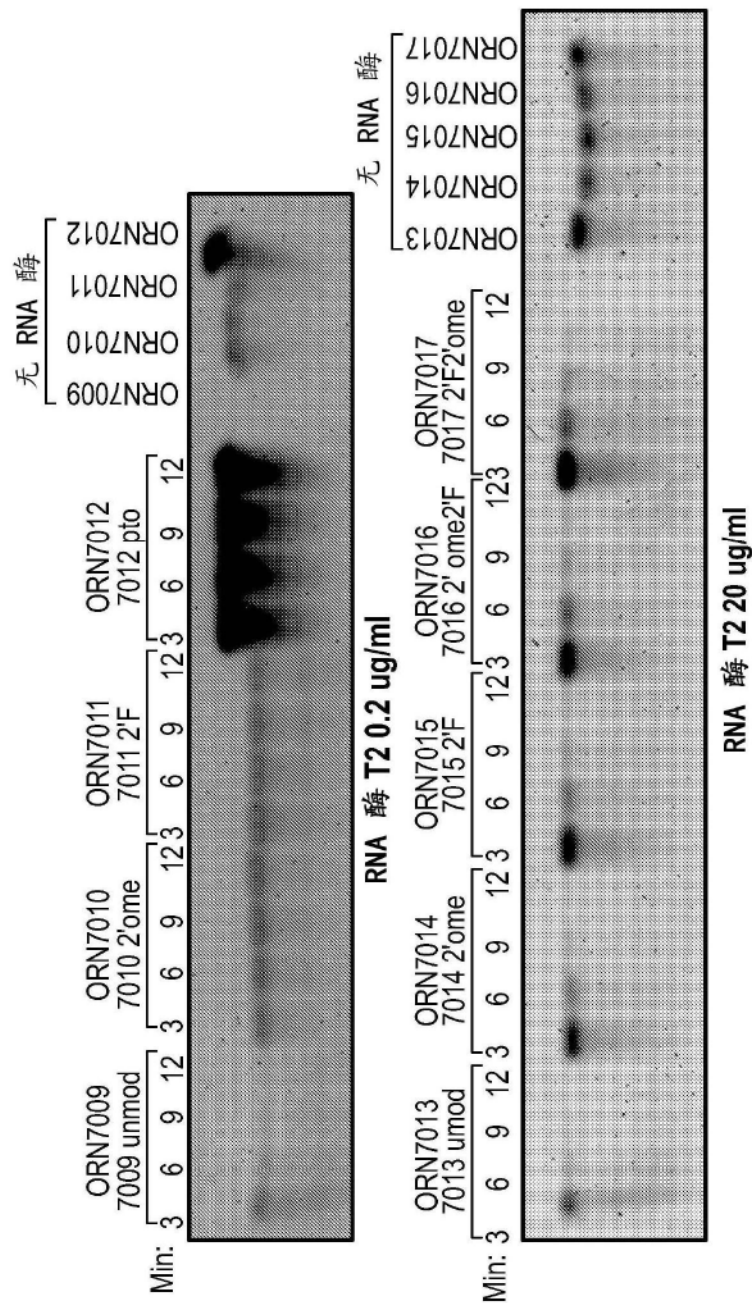


图15B

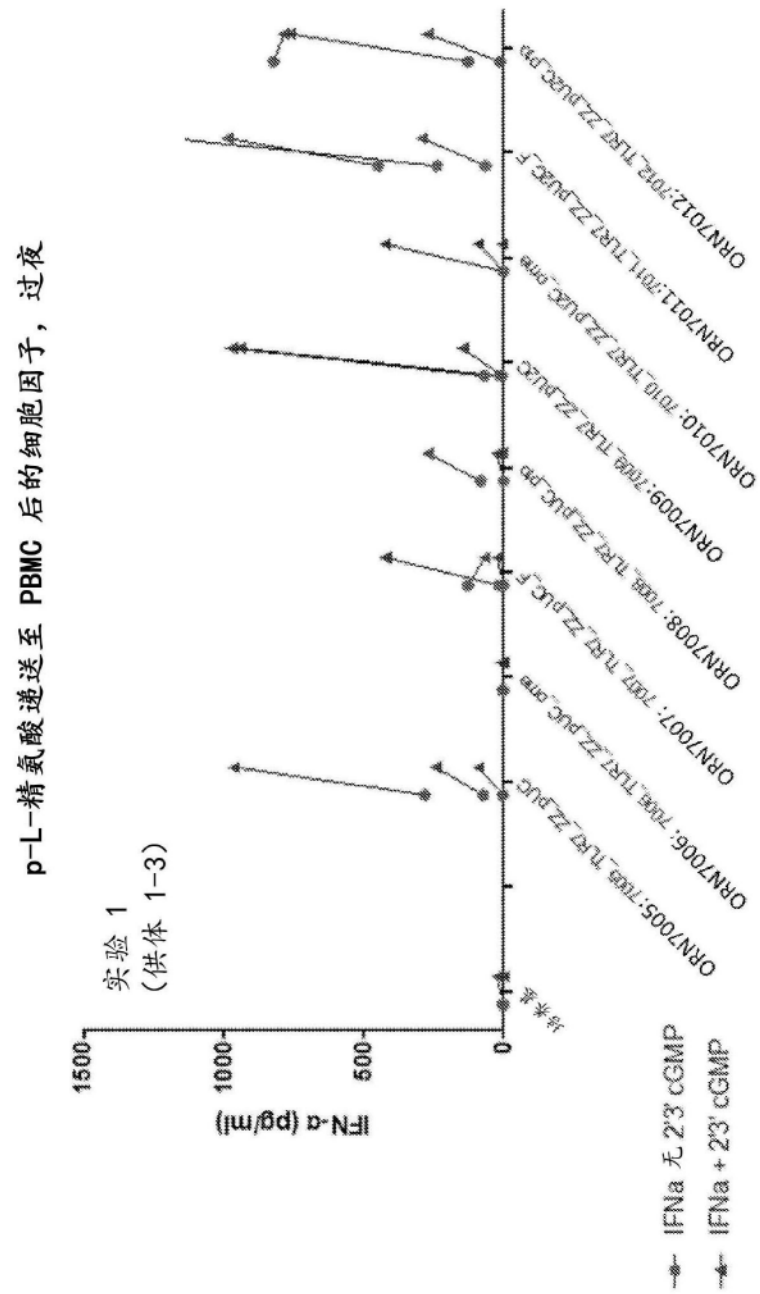


图16A

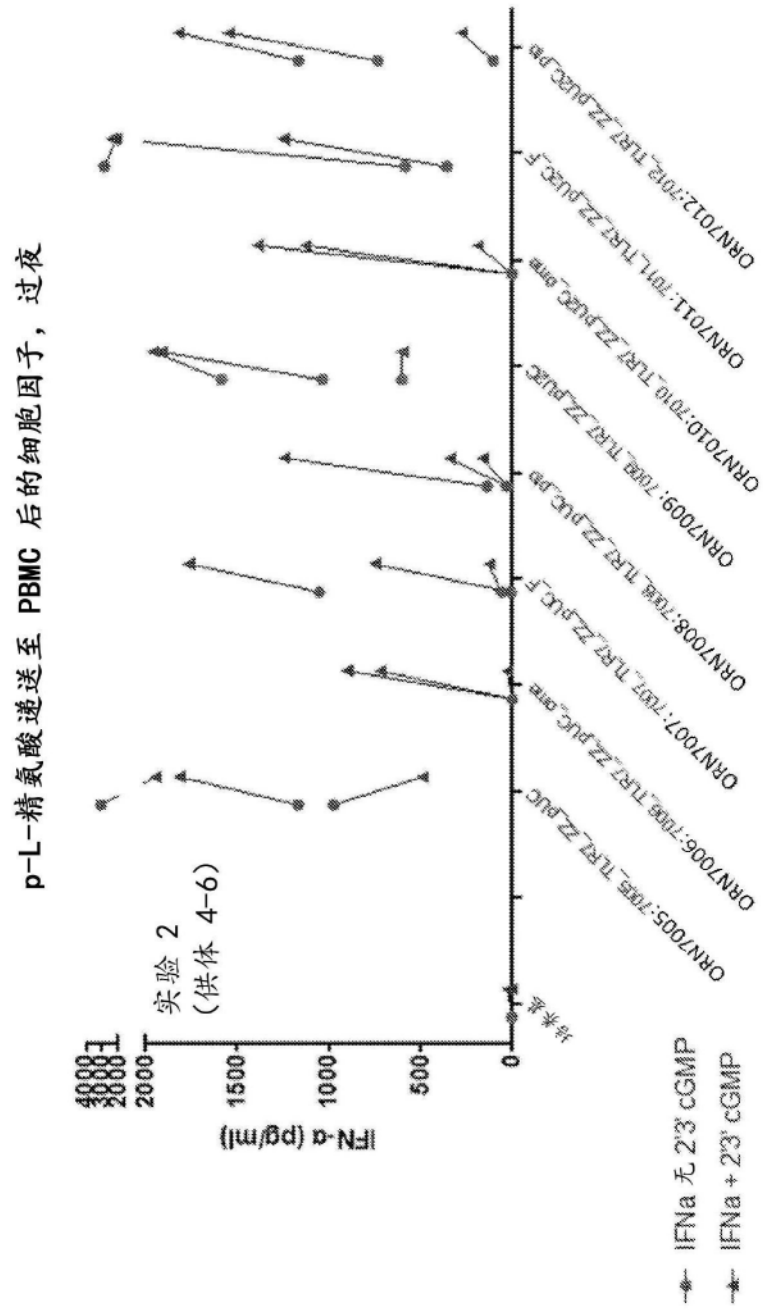


图16B