



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110505877 A

(43)申请公布日 2019.11.26

(21)申请号 201780089255.1

特德·阿什伯恩

(22)申请日 2017.10.26

克里斯滕·霍普森

(30)优先权数据

62/453,444 2017.02.01 US

62/453,465 2017.02.01 US

62/558,238 2017.09.13 US

(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

代理人 顾晋伟 刘振佳

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.09.29

(51)Int.Cl.

A61K 31/7088(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

A61K 39/00(2006.01)

A61K 39/39(2006.01)

A61K 31/7105(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2017/058595 2017.10.26

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/144082 EN 2018.08.09

(71)申请人 摩登纳特斯有限公司

地址 美国马萨诸塞州

(72)发明人 尼古拉斯·瓦利安特

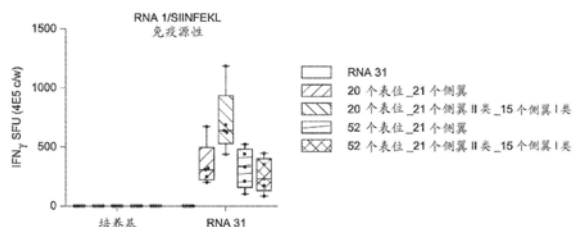
权利要求书13页 说明书252页 附图23页

(54)发明名称

RNA癌症疫苗

(57)摘要

本公开涉及癌症核糖核酸(RNA)疫苗,以及使用所述疫苗和包含所述疫苗的组合物的方法。特别地,本公开涉及在单一mRNA构建体,即多表位mRNA构建体或多新表位构建体上编码若干癌症表位的多联体mRNA癌症疫苗。本公开进一步涉及p53和KRAS突变,以及免疫增强剂,如STING,例如进一步编码免疫刺激剂或佐剂的mRNA构建体的掺入。本公开进一步涉及包含通用T细胞表位,如破伤风或白喉毒素以引发增强的免疫应答。



1. 一种mRNA癌症疫苗,其包含:
脂质纳米粒子,所述脂质纳米粒子包含以下中的一种或多种:
 - (a) 一种或多种mRNA,所述一种或多种mRNA各自具有一个或多个编码1-500个肽表位的开放阅读框和通用II型T细胞表位,所述肽表位是个人化癌抗原,
 - (b) 一种或多种mRNA,所述一种或多种mRNA各自具有编码活化致癌基因突变肽的开放阅读框,任选地其中所述mRNA还包含通用II型T细胞表位;
 - (c) 一种或多种mRNA,所述一种或多种mRNA各自具有编码癌抗原肽表位的开放阅读框,其中所述mRNA疫苗编码5-100个肽表位,并且所述肽表位中的至少两个是个人化癌抗原,任选地其中所述mRNA还包含通用II型T细胞表位;和/或
 - (d) 一种或多种mRNA,所述一种或多种mRNA各自具有编码癌抗原肽表位的开放阅读框,其中所述mRNA疫苗编码5-100个肽表位,并且所述肽表位中的至少三个是复杂变体,并且所述肽表位中的至少两个是点突变,任选地其中所述mRNA还包含通用II型T细胞表位。
2. 如权利要求1所述的mRNA癌症疫苗,其中所述mRNA癌症疫苗编码1-20个通用II型T细胞表位。
3. 如权利要求2所述的mRNA癌症疫苗,其中所述通用II型T细胞表位选自以下组成的组:ILMQYIKANSKFIGI(破伤风毒素;SEQ ID NO:226)、FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE(破伤风毒素;SEQ ID NO:227)、QYIKANSKFIGITE(破伤风毒素;SEQ ID NO:228)、QSIALSSLMVAQAIP(白喉毒素;SEQ ID NO:229)以及AKFVAAWTLKAAA(泛-DR表位;SEQ ID NO:230)。
4. 如权利要求1-3中任一项所述的mRNA癌症疫苗,其中所述通用II型T细胞表位在整个所述mRNA中是相同的通用II型T细胞表位。
5. 如权利要求1-3中任一项所述的mRNA癌症疫苗,其中所述通用II型T细胞表位在所述mRNA中重复1-20次。
6. 如权利要求1-3中任一项所述的mRNA癌症疫苗,其中所述通用II型T细胞表位在整个所述mRNA中彼此不同。
7. 如权利要求1-3中任一项所述的mRNA癌症疫苗,其中所述通用II型T细胞表位位于每个癌抗原肽表位之间。
8. 如权利要求1-3中任一项所述的mRNA癌症疫苗,其中所述通用II型T细胞表位位于每隔一个癌抗原肽表位之间。
9. 如权利要求1-3中任一项所述的mRNA癌症疫苗,其中所述通用II型T细胞表位位于每三个癌抗原肽表位之间。
10. 如任一前述权利要求所述的mRNA癌症疫苗,其中满足以下条件中的一个或多个:
 - (i) 所述活化致癌基因突变是KRAS突变;
 - (ii) 所述KRAS突变是G12突变,任选地其中所述G12 KRAS突变选自G12D、G12V、G12S、G12C、G12A和G12R KRAS突变;
 - (iii) 所述KRAS突变是G13突变,任选地其中所述G13 KRAS突变是G13D KRAS突变;和/或
 - (iv) 所述活化致癌基因突变是H-RAS或N-RAS突变。
11. 如任一前述权利要求所述的mRNA癌症疫苗,其中满足以下条件中的一个或多个:
 - (A) 所述mRNA具有编码两种或更多种活化致癌基因突变肽的多联体的开放阅读框;

(B) 所述肽表位中的至少两个通过单个甘氨酸彼此隔开,任选地其中所有所述肽表位都通过单个甘氨酸彼此隔开;

(C) 所述多联体包含3-10种活化致癌基因突变肽;和/或

(D) 所述肽表位中的至少两个在无接头的情况下彼此直接连接。

12. 如任一前述权利要求所述的mRNA癌症疫苗,其中满足以下条件中的一个或多个:

(i) 所述肽表位中的至少一个是传统癌抗原;

(ii) 所述肽表位中的至少一个是复发多态性;

(iii) 所述复发多态性包含p53中的复发体细胞癌突变;

(iv) p53中的所述复发体细胞癌突变选自以下组成的组:

(A) 在典型5'剪接位点邻近密码子p.T125处的突变,从而诱导具有肽序列TAKSVTCTVS CPEGLASMRLQCLAVSPCISFVWNFGIPLHPLASCQCFFIVYPLNV (SEQ ID NO:232) 的保留内含子,所述序列含有表位AVSPCISFVW (SEQ ID NO:233) (HLA-B*57:01,HLA-B*58:01)、HPLASCQCFF (SEQ ID NO:234) (HLA-B*35:01,HLA-B*53:01)、FVWNFGIPL (SEQ ID NO:235) (HLA-A*02:01,HLA-A*02:06,HLA-B*35:01);

(B) 在典型5'剪接位点邻近密码子p.331处的突变,从而诱导具有肽序列EYFTLQVLSLG TSYQVESFQSNTQNAVFFLTVPALPAIGAFAIRGQ (SEQ ID NO:236) 的保留内含子,所述序列含有表位LQVLSLGTSY (SEQ ID NO:237) (HLA-B*15:01)、FQSNTQNAVF (SEQ ID NO:238) (HLA-B*15:01);

(C) 在典型3'剪接位点邻近密码子p.126处的突变,从而诱导隐蔽选择性外显子3'剪接位点,产生含有表位CTMFCQLAK (SEQ ID NO:240) (HLA-A*11:01)、KSVTCTMF (SEQ ID NO:241) (HLA-B*58:01) 的新型跨越肽序列AKSVTCTMFCQLAK (SEQ ID NO:239);和/或

(D) 在典型5'剪接位点邻近密码子p.224处的突变,从而诱导隐蔽选择性内含子5'剪接位点,产生含有表位VPYEPPEVW (SEQ ID NO:243) (HLA-B*53:01,HLA-B*51:01)、LTVPPSTAW (SEQ ID NO:244) (HLA-B*58:01,HLA-B*57:01) 的新型跨越肽序列VPYEPPEVWLALTVPSTAWAA (SEQ ID NO:242);

其中转录物密码子位置涉及来自Ensemblv83人基因组注释的典型全长p53转录物ENST00000269305 (SEQ ID NO:245);和/或

(v) 所述mRNA癌症疫苗不包含稳定剂。

13. 如权利要求1-3中任一项所述的mRNA癌症疫苗,其中所述一种或多种mRNA还包含编码免疫增效剂的开放阅读框。

14. 如权利要求13所述的mRNA癌症疫苗,其中所述免疫增效剂被配制在所述脂质纳米粒子中。

15. 如权利要求13所述的mRNA癌症疫苗,其中所述免疫增效剂被配制在单独脂质纳米粒子中。

16. 如权利要求13所述的mRNA癌症疫苗,其中所述免疫增效剂是组成型活性人STING多肽。

17. 如权利要求13所述的mRNA癌症疫苗,其中所述组成型活性人STING多肽包含SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列。

18. 如权利要求13所述的mRNA癌症疫苗,其中编码所述组成型活性人STING多肽的所述

mRNA包含SEQ ID NO:170中所示的核苷酸序列。

19. 如权利要求13所述的mRNA癌症疫苗,其中编码所述组成型活性人STING多肽的所述mRNA包含具有miR-122微小RNA结合位点的3' UTR。

20. 如权利要求19所述的mRNA癌症疫苗,其中所述miR-122微小RNA结合位点包含SEQ ID NO:175中所示的核苷酸序列。

21. 如权利要求1-20中任一项所述的mRNA癌症疫苗,其中所述一种或多种mRNA各自包含5' UTR,所述5' UTR包含SEQ ID NO:176中列出的核苷酸序列。

22. 如权利要求1-21中任一项所述的mRNA癌症疫苗,其中所述一种或多种mRNA各自包含聚腺苷酸尾部。

23. 如权利要求22所述的mRNA癌症疫苗,其中所述聚腺苷酸尾部包含约100个核苷酸。

24. 如权利要求1-23中任一项所述的mRNA癌症疫苗,其中所述一种或多种mRNA各自包含5'帽1结构。

25. 如权利要求1-24中任一项所述的mRNA癌症疫苗,其中所述一种或多种mRNA包含至少一种化学修饰。

26. 如权利要求25所述的mRNA癌症疫苗,其中所述化学修饰是N1-甲基假尿苷。

27. 如权利要求26所述的mRNA癌症疫苗,其中所述一种或多种mRNA用N1-甲基假尿苷完全修饰。

28. 如权利要求1-27中任一项所述的mRNA癌症疫苗,其中所述一种或多种mRNA编码45-55种个人化癌抗原。

29. 如权利要求1-27中任一项所述的mRNA癌症疫苗,其中所述一种或多种mRNA编码52种个人化癌抗原。

30. 如权利要求1-27中任一项所述的mRNA癌症疫苗,其中所述个人化癌抗原中的每一种由单独的开放阅读框编码。

31. 如权利要求1-27中任一项所述的mRNA癌症疫苗,其中所述肽表位呈由2-100个肽表位组成的多联癌抗原形式,任选地其中所述多联癌抗原由5-100个肽表位组成。

32. 如权利要求31所述的mRNA癌症疫苗,其中所述多联癌抗原包含以下中的一种或多种:

- a) 所述2-100个肽表位或任选地5-100个肽表位间杂有裂解敏感性位点;
- b) 编码每个肽表位的所述mRNA在无接头的情况下彼此直接连接;
- c) 编码每个肽表位的所述mRNA以单一核苷酸接头彼此连接;
- d) 每个肽表位包含25-35个氨基酸并且包括位于中心的SNP突变;
- e) 至少30%的所述肽表位对来自受试者的I类MHC分子具有最高亲和力;
- f) 至少30%的所述肽表位对来自受试者的II类MHC分子具有最高亲和力;
- g) 至少50%的所述肽表位对HLA-A、HLA-B和/或DRB1具有IC₅₀>500nM的预测结合亲和力;
- h) 所述mRNA编码45-55个肽表位;
- i) 所述mRNA编码52个肽表位;
- j) 50%的所述肽表位对I类MHC具有结合亲和力并且50%的所述肽表位对II类MHC具有结合亲和力;

- k) 编码所述肽表位的所述mRNA被排列成使得所述肽表位被排序以使假表位最少,
- l) 至少30%的所述肽表位是长度为15个氨基酸的I类MHC结合肽;和/或
- m) 至少30%的所述肽表位是长度为21个氨基酸的II类MHC结合肽。

33. 一种mRNA癌症疫苗,其包含:

在脂质纳米粒子中配制的一种或多种mRNA,所述一种或多种mRNA各自具有一个或多个编码45-55个肽表位的开放阅读框,所述肽表位是个人化癌抗原;任选地其中所述肽表位中的至少一个是活化致癌基因突变肽或传统癌抗原,并且任选地其中所述肽表位中的至少三个是复杂变体,并且所述肽表位中的至少两个是点突变。

34. 如权利要求33所述的mRNA癌症疫苗,其中所述一种或多种mRNA编码48-54种个人化癌抗原。

35. 如权利要求33-34中任一项所述的mRNA癌症疫苗,其中所述一种或多种mRNA编码52种个人化癌抗原。

36. 如权利要求33-35中任一项所述的mRNA癌症疫苗,其中所述个人化癌抗原中的每一种由单独的开放阅读框编码。

37. 如权利要求33-35中任一项所述的mRNA癌症疫苗,其中所述肽表位呈由2-100个肽表位组成的多联癌抗原形式,任选地其中所述多联癌抗原由5-100个肽表位组成。

38. 如权利要求37所述的mRNA癌症疫苗,其中所述多联癌抗原包含以下中的一种或多种:

- a) 所述2-100个肽表位或任选地5-100个肽表位间杂有裂解敏感性位点;
- b) 编码每个肽表位的所述mRNA在无接头的情况下彼此直接连接;
- c) 编码每个肽表位的所述mRNA以单一核苷酸接头彼此连接;
- d) 每个肽表位包含25-35个氨基酸并且包括位于中心的SNP突变;
- e) 至少30%的所述肽表位对来自受试者的I类MHC分子具有最高亲和力;
- f) 至少30%的所述肽表位对来自受试者的II类MHC分子具有最高亲和力;
- g) 至少50%的所述肽表位对HLA-A、HLA-B和/或DRB1具有 $IC_{50} > 500nM$ 的预测结合亲和力;

h) 所述mRNA编码45-55个肽表位;

i) 所述mRNA编码52个肽表位;

j) 50%的所述肽表位对I类MHC具有结合亲和力并且50%的所述肽表位对II类MHC具有结合亲和力;

k) 编码所述肽表位的所述mRNA被排列成使得所述肽表位被排序以使假表位最少,

l) 至少30%的所述肽表位是长度为15个氨基酸的I类MHC结合肽;和/或

m) 至少30%的所述肽表位是长度为21个氨基酸的II类MHC结合肽。

39. 如权利要求33-38中任一项所述的mRNA癌症疫苗,其中所述肽表位中的至少两个通过通用II型T细胞表位彼此隔开。

40. 如权利要求33-38中任一项所述的mRNA癌症疫苗,其中所有所述肽表位都通过通用II型T细胞表位彼此隔开。

41. 如权利要求33-38中任一项所述的mRNA癌症疫苗,其中所述mRNA癌症疫苗编码1-20个通用II型T细胞表位。

42. 如权利要求41所述的mRNA癌症疫苗,其中所述通用II型T细胞表位选自以下组成的组:ILMQYIKANSKFIGI(破伤风毒素;SEQ ID NO:226)、FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE(破伤风毒素;SEQ ID NO:227)、QYIKANSKFIGITE(破伤风毒素;SEQ ID NO:228)、QSIALSSLMVAQAIP(白喉毒素;SEQ ID NO:229)以及AKFVAAWTLKAAA(泛-DR表位;SEQ ID NO:230)。

43. 如权利要求39-42中任一项所述的mRNA癌症疫苗,其中所述通用II型T细胞表位在整个所述mRNA中是相同的通用II型T细胞表位。

44. 如权利要求39-42中任一项所述的mRNA癌症疫苗,其中所述通用II型T细胞表位在所述mRNA中重复1-20次。

45. 如权利要求39-42中任一项所述的mRNA癌症疫苗,其中所述通用II型T细胞表位在整个所述mRNA中彼此不同。

46. 如权利要求39-42中任一项所述的mRNA癌症疫苗,其中所述通用II型T细胞表位位于每个肽表位之间。

47. 如权利要求39-42中任一项所述的mRNA癌症疫苗,其中所述通用II型T细胞表位位于每隔一个肽表位之间。

48. 如权利要求39-42中任一项所述的mRNA癌症疫苗,其中所述通用II型T细胞表位位于每三个肽表位之间。

49. 如权利要求33-48中任一项所述的mRNA癌症疫苗,其中所述一种或多种mRNA还包含编码免疫增效剂的开放阅读框。

50. 如权利要求38所述的mRNA癌症疫苗,其中所述免疫增效剂被配制在所述脂质纳米粒子中。

51. 如权利要求38所述的mRNA癌症疫苗,其中所述免疫增效剂被配制在单独脂质纳米粒子中。

52. 如权利要求38所述的mRNA癌症疫苗,其中所述免疫增效剂是组成型活性人STING多肽。

53. 如权利要求52所述的mRNA癌症疫苗,其中所述组成型活性人STING多肽包含SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列。

54. 如权利要求52所述的mRNA癌症疫苗,其中编码所述组成型活性人STING多肽的所述mRNA包含SEQ ID NO:170中所示的核苷酸序列。

55. 如权利要求33-54中任一项所述的mRNA癌症疫苗,其中满足以下条件中的一个或多个:

(i) 所述活化致癌基因突变是KRAS突变;

(ii) 所述KRAS突变是G12突变,任选地其中所述G12 KRAS突变选自G12D、G12V、G12S、G12C、G12A和G12R KRAS突变;

(iii) 所述KRAS突变是G13突变,任选地其中所述G13 KRAS突变是G13D KRAS突变;和/或

(iv) 所述活化致癌基因突变是H-RAS或N-RAS突变。

56. 如权利要求33-55中任一项所述的mRNA癌症疫苗,其中满足以下条件中的一个或多个:

(A) 所述mRNA具有编码两种或更多种活化致癌基因突变肽的多联体的开放阅读框;

(B) 所述肽表位中的至少两个通过单个甘氨酸彼此隔开, 任选地其中所有所述肽表位都通过单个甘氨酸彼此隔开;

(C) 所述多联体包含3-10种活化致癌基因突变肽; 和/或

(D) 所述肽表位中的至少两个在无接头的情况下彼此直接连接。

57. 如权利要求33-56中任一项所述的mRNA癌症疫苗, 其中满足以下条件中的一个或多个:

(i) 所述肽表位中的至少一个是传统癌抗原;

(ii) 所述肽表位中的至少一个是复发多态性;

(iii) 所述复发多态性包含p53中的复发体细胞癌突变;

(iv) p53中的所述复发体细胞癌突变选自以下组成的组:

(A) 在典型5' 剪接位点邻近密码子p.T125处的突变, 从而诱导具有肽序列TAKSVTCTVS CPEGLASMLRQCLAVSPCISFVWNFGIPLHPLASCQCFFIVYPLNV (SEQ ID NO:232) 的保留内含子, 所述序列含有表位AVSPCISFVW (SEQ ID NO:233) (HLA-B*57:01, HLA-B*58:01)、HPLASCQCFF (SEQ ID NO:234) (HLA-B*35:01, HLA-B*53:01)、FVWNFGIPL (SEQ ID NO:235) (HLA-A*02:01, HLA-A*02:06, HLA-B*35:01);

(B) 在典型5' 剪接位点邻近密码子p.331处的突变, 从而诱导具有肽序列EYFTLQVLSLG TSYQVESFQSNTQNAVFFLTVPALPAIGAFAIRGQ (SEQ ID NO:236) 的保留内含子, 所述序列含有表位LQVLSLGTSY (SEQ ID NO:237) (HLA-B*15:01)、FQSNTQNAV (SEQ ID NO:238) (HLA-B*15:01);

(C) 在典型3' 剪接位点邻近密码子p.126处的突变, 从而诱导隐蔽选择性外显子3' 剪接位点, 产生含有表位CTMFCQLAK (SEQ ID NO:240) (HLA-A*11:01)、KSVTCTMF (SEQ ID NO:241) (HLA-B*58:01) 的新型跨越肽序列AKSVTCTMFCQLAK (SEQ ID NO:239); 和/或

(D) 在典型5' 剪接位点邻近密码子p.224处的突变, 从而诱导隐蔽选择性内含子5' 剪接位点, 产生含有表位VPYEPPEVW (SEQ ID NO:243) (HLA-B*53:01, HLA-B*51:01)、LTVPPSTAW (SEQ ID NO:244) (HLA-B*58:01, HLA-B*57:01) 的新型跨越肽序列VPYEPPEVWLALTVPSTAWAA (SEQ ID NO:242),

其中转录物密码子位置涉及来自Ensembl v83人基因组注释的典型全长p53转录物ENST00000269305 (SEQ ID NO:245); 和/或

(v) 所述mRNA癌症疫苗不包含稳定剂。

58. 一种mRNA癌症疫苗, 其包含:

脂质纳米粒子, 所述脂质纳米粒子包含:

(i) 一种或多种mRNA, 所述一种或多种mRNA各自具有一个或多个编码1-500个肽表位的开放阅读框, 所述肽表位是个人化癌抗原, 以及

(ii) 具有编码多肽的开放阅读框的mRNA, 所述多肽增强对所述个人化癌抗原的免疫应答,

任选地其中(i)和(ii)以大约5:1的质量比存在; 任选地其中所述肽表位中的至少一个是活化致癌基因突变肽或传统癌抗原, 并且任选地其中所述肽表位中的至少三个是复杂变体, 并且所述肽表位中的至少两个是点突变。

59. 如权利要求58所述的mRNA癌症疫苗, 其中所述免疫应答包括细胞或体液免疫应答,

其特征在于：

- (i) 刺激I型干扰素途径信号传导；
- (ii) 刺激NFkB途径信号传导；
- (iii) 刺激炎症性应答；
- (iv) 刺激细胞因子产生；或者
- (v) 刺激树突细胞发育、活性或动员；以及
- (vi) (i) - (v) 中的任一项的组合。

60. 如权利要求58所述的mRNA癌症疫苗，其包含编码所述肽表位和所述多肽两者的单一mRNA构建体，所述多肽增强对个人化癌抗原的免疫应答。

61. 如权利要求58或59所述的mRNA癌症疫苗，其中所述肽表位呈由2-100个肽表位组成的多联癌抗原形式，任选地其中所述多联癌抗原由5-100个肽表位组成。

62. 如权利要求61所述的mRNA癌症疫苗，其中所述多联癌抗原包含以下中的一种或多种：

- a) 所述2-100个肽表位或任选地5-100个肽表位间杂有裂解敏感性位点；
- b) 编码每个肽表位的所述mRNA在无接头的情况下彼此直接连接；
- c) 编码每个肽表位的所述mRNA以单一核苷酸接头彼此连接；
- d) 每个肽表位包含25-35个氨基酸并且包括位于中心的SNP突变；
- e) 至少30%的所述肽表位对来自受试者的I类MHC分子具有最高亲和力；
- f) 至少30%的所述肽表位对来自受试者的II类MHC分子具有最高亲和力；
- g) 至少50%的所述肽表位对HLA-A、HLA-B和/或DRB1具有 $IC_{50} > 500nM$ 的预测结合亲和力；
- h) 所述mRNA编码45-55个肽表位；
- i) 所述mRNA编码52个肽表位；
- j) 50%的所述肽表位对I类MHC具有结合亲和力并且50%的所述肽表位对II类MHC具有结合亲和力；
- k) 编码所述肽表位的所述mRNA被排列成使得所述肽表位被排序以使假表位最少，
- l) 至少30%的所述肽表位是长度为15个氨基酸的I类MHC结合肽；和/或
- m) 至少30%的所述肽表位是长度为21个氨基酸的II类MHC结合肽。

63. 如权利要求62所述的mRNA癌症疫苗，其中每个肽表位包含位于中心的SNP突变，在所述SNP突变的每侧上具有7-15个侧接氨基酸。

64. 如权利要求58-63中任一项所述的mRNA癌症疫苗，其中所述增强对受试者中的至少一种个人化癌抗原的免疫应答的多肽是组成型活性人STING多肽。

65. 如权利要求64所述的mRNA癌症疫苗，其中所述组成型活性人STING多肽包含一种或多种选自以下组成的组的突变：V147L、N154S、V155M、R284M、R284K、R284T、E315Q、R375A以及其组合。

66. 如权利要求65所述的mRNA癌症疫苗，其中所述组成型活性人STING多肽包含V155M突变。

67. 如权利要求65所述的mRNA癌症疫苗，其中所述组成型活性人STING多肽包含突变R284M/V147L/N154S/V155M。

68. 如权利要求58-67中任一项所述的mRNA癌症疫苗,其中每种mRNA被配制在同一或不同脂质纳米粒子中。

69. 如权利要求68所述的mRNA癌症疫苗,其中编码癌症个人化癌抗原的每种mRNA被配制在同一或不同脂质纳米粒子中。

70. 如权利要求69所述的mRNA癌症疫苗,其中编码增强对所述个人化癌抗原的免疫应答的多肽的每种mRNA被配制在同一或不同脂质纳米粒子中。

71. 如权利要求68-70中任一项所述的mRNA癌症疫苗,其中编码个人化癌抗原的每种mRNA被配制在同一脂质纳米粒子中,并且编码增强对所述个人化癌抗原的免疫应答的多肽的每种mRNA被配制在不同脂质纳米粒子中。

72. 如权利要求68-70中任一项所述的mRNA癌症疫苗,其中编码个人化癌抗原的每种mRNA被配制在同一脂质纳米粒子中,并且编码增强对所述个人化癌抗原的免疫应答的多肽的每种mRNA被配制在与编码个人化癌抗原的每种mRNA相同的脂质纳米粒子中。

73. 如权利要求68-70中任一项所述的mRNA癌症疫苗,其中编码个人化癌抗原的每种mRNA被配制在不同脂质纳米粒子中,并且编码增强对所述个人化癌抗原的免疫应答的多肽的每种mRNA被配制在与编码每种个人化癌抗原的每种mRNA相同的脂质纳米粒子中。

74. 如权利要求1-73中任一项所述的mRNA癌症疫苗,其中所述肽表位是T细胞表位和/或B细胞表位。

75. 如权利要求1-73中任一项所述的mRNA癌症疫苗,其中所述肽表位包含T细胞表位和B细胞表位的组合。

76. 如权利要求1-73中任一项所述的mRNA癌症疫苗,其中所述肽表位中的至少1个是T细胞表位。

77. 如权利要求1-73中任一项所述的mRNA癌症疫苗,其中所述肽表位中的至少1个是B细胞表位。

78. 如权利要求1-73中任一项所述的mRNA癌症疫苗,其中所述肽表位已针对与所述受试者的MHC的结合强度进行了优化。

79. 如权利要求78所述的mRNA癌症疫苗,其中每个表位的TCR面与内源性蛋白具有低相似性。

80. 如权利要求1-73中任一项所述的mRNA癌症疫苗,其还包含回忆抗原。

81. 如权利要求80所述的mRNA癌症疫苗,其中所述回忆抗原是感染性疾病抗原。

82. 如权利要求1-73中任一项所述的mRNA癌症疫苗,其还包含具有编码一种或多种传统癌抗原的开放阅读框的mRNA。

83. 如权利要求58-82中任一项所述的mRNA癌症疫苗,其中满足以下条件中的一个或多个:

(i) 所述活化致癌基因突变是KRAS突变;

(ii) 所述KRAS突变是G12突变,任选地其中所述G12 KRAS突变选自G12D、G12V、G12S、G12C、G12A和G12R KRAS突变;

(iii) 所述KRAS突变是G13突变,任选地其中所述G13 KRAS突变是G13D KRAS突变;和/或

(iv) 所述活化致癌基因突变是H-RAS或N-RAS突变。

84. 如权利要求58-83中任一项所述的mRNA癌症疫苗,其中满足以下条件中的一个或多个:

(A) 所述mRNA具有编码两种或更多种活化致癌基因突变肽的多联体的开放阅读框;

(B) 所述肽表位中的至少两个通过单个甘氨酸彼此隔开,任选地其中所有所述肽表位都通过单个甘氨酸彼此隔开;

(C) 所述多联体包含3-10种活化致癌基因突变肽;和/或

(D) 所述肽表位中的至少两个在无接头的情况下彼此直接连接。

85. 如权利要求58-84中任一项所述的mRNA癌症疫苗,其中满足以下条件中的一个或多个:

(i) 所述肽表位中的至少一个是传统癌抗原;

(ii) 所述肽表位中的至少一个是复发多态性;

(iii) 所述复发多态性包含p53中的复发体细胞癌突变;

(iv) p53中的所述复发体细胞癌突变选自以下组成的组:

(A) 在典型5' 剪接位点邻近密码子p.T125处的突变,从而诱导具有肽序列TAKSVTCTVS CPEGLASMRLQCLAVSPCISFVWNFGIPLHPLASCQCFFIVYPLNV (SEQ ID NO:232) 的保留内含子,所述序列含有表位AVSPCISFVW (SEQ ID NO:233) (HLA-B*57:01,HLA-B*58:01)、HPLASCQCFF (SEQ ID NO:234) (HLA-B*35:01,HLA-B*53:01)、FVWNFGIPL (SEQ ID NO:235) (HLA-A*02:01,HLA-A*02:06,HLA-B*35:01);

(B) 在典型5' 剪接位点邻近密码子p.331处的突变,从而诱导具有肽序列EYFTLQVLSLG TSYQVESFQSNTQNAVFFLTVPALPAIGAFAIRGQ (SEQ ID NO:236) 的保留内含子,所述序列含有表位LQVLSLGTSY (SEQ ID NO:237) (HLA-B*15:01)、FQSNTQNAVF (SEQ ID NO:238) (HLA-B*15:01);

(C) 在典型3' 剪接位点邻近密码子p.126处的突变,从而诱导隐蔽选择性外显子3' 剪接位点,产生含有表位CTMFCQLAK (SEQ ID NO:240) (HLA-A*11:01)、KSVTCTMF (SEQ ID NO:241) (HLA-B*58:01) 的新型跨越肽序列AKSVTCTMFCQLAK (SEQ ID NO:239);和/或

(D) 在典型5' 剪接位点邻近密码子p.224处的突变,从而诱导隐蔽选择性内含子5' 剪接位点,产生含有表位VPYEPPEVW (SEQ ID NO:243) (HLA-B*53:01,HLA-B*51:01)、LTVPPSTAW (SEQ ID NO:244) (HLA-B*58:01,HLA-B*57:01) 的新型跨越肽序列VPYEPPEVWLALTVPSTAWAA (SEQ ID NO:242),

其中转录物密码子位置涉及来自Ensembl v83人基因组注释的典型全长p53转录物ENST00000269305 (SEQ ID NO:245);和/或

(v) 所述mRNA癌症疫苗不包含稳定剂。

86. 如权利要求1-85中任一项所述的mRNA癌症疫苗,其中所述脂质纳米粒子包含约20%-60%可电离氨基脂质;5%-25%中性脂质;25%-55%固醇;以及0.5%-15%PEG修饰的脂质的摩尔比,任选地其中所述可电离氨基脂质是阳离子脂质。

87. 如权利要求86所述的mRNA癌症疫苗,其中所述脂质纳米粒子包含约50%化合物25:约10%DSPC:约38.5%胆固醇;以及约1.5%PEG-DMG的摩尔比。

88. 如权利要求86所述的mRNA癌症疫苗,其中所述可电离氨基脂质选自以下组成的组:例如,2,2-二亚油基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧戊环(DLin-KC2-DMA)、二亚油基-

甲基-4-二甲基氨基丁酸酯(DLin-MC3-DMA)以及二((Z)-壬-2-烯-1-基)9-((4-(二甲基氨基)丁酰基)氧基)-十七烷二酸酯(L319)。

89. 如权利要求1-85中任一项所述的mRNA癌症疫苗,其中所述脂质纳米粒子包含式(I)化合物。

90. 如权利要求89所述的mRNA癌症疫苗,其中所述式(I)化合物是化合物25。

91. 如权利要求1-85中任一项所述的mRNA癌症疫苗,其中所述脂质纳米粒子具有小于0.4的多分散性值。

92. 如权利要求1-85中任一项所述的mRNA癌症疫苗,其中所述脂质纳米粒子在中性pH值下具有净中性电荷。

93. 如权利要求1-92中任一项所述的mRNA癌症疫苗,其中每个表位的TCR面与内源性蛋白具有低相似性。

94. 如权利要求1-93中任一项所述的mRNA癌症疫苗,其中所述mRNA还包含编码免疫检查点调节剂的开放阅读框。

95. 如权利要求1-93中任一项所述的mRNA癌症疫苗,其还包含另外的癌症治疗剂;任选地其中所述另外的癌症治疗剂是免疫检查点调节剂。

96. 如权利要求93或94所述的mRNA癌症疫苗,其中所述免疫检查点调节剂是抑制性检查点多肽。

97. 如权利要求96所述的mRNA癌症疫苗,其中所述抑制性检查点多肽抑制PD1、PD-L1、CTLA4、TIM-3、VISTA、A2AR、B7-H3、B7-H4、BTLA、IDO、KIR、LAG3或其组合。

98. 如权利要求97所述的mRNA癌症疫苗,其中所述检查点抑制剂多肽是抗体。

99. 如权利要求98所述的mRNA癌症疫苗,其中所述抑制性检查点多肽是选自特异性地结合CTLA4的抗CTLA4抗体或其抗原结合片段、特异性地结合PD1的抗PD1抗体或其抗原结合片段、特异性地结合PD-L1的抗PD-L1抗体或其抗原结合片段以及其组合的抗体。

100. 如权利要求99所述的mRNA癌症疫苗,其中所述检查点抑制剂多肽是选自阿特殊单抗、阿维鲁单抗或德瓦鲁单抗的抗PD-L1抗体。

101. 如权利要求99所述的mRNA癌症疫苗,其中所述检查点抑制剂多肽是选自曲美木单抗或伊匹单抗的抗CTLA-4抗体。

102. 如权利要求99所述的mRNA癌症疫苗,其中所述检查点抑制剂多肽是选自纳武单抗或派姆单抗的抗PD1抗体。

103. 如权利要求25-102中任一项所述的mRNA癌症疫苗,其中所述化学修饰选自自由以下组成的组:假尿苷、N1-甲基假尿苷、2-硫代尿苷、4'-硫代尿苷、5-甲基胞嘧啶、2-硫代-1-甲基-1-脱氮-假尿苷、2-硫代-1-甲基-假尿苷、2-硫代-5-氮杂-尿苷、2-硫代-二氢假尿苷、2-硫代-二氢尿苷、2-硫代-假尿苷、4-甲氧基-2-硫代-假尿苷、4-甲氧基-假尿苷、4-硫代-1-甲基-假尿苷、4-硫代-假尿苷、5-氮杂-尿苷、二氢假尿苷、5-甲基尿苷、5-甲基尿苷、5-甲氧基尿苷以及2'-O-甲基尿苷。

104. 一种用于对受试者接种疫苗的方法,所述方法包括:

向患有癌症的受试者施用如权利要求1-103中任一项所述的mRNA癌症疫苗。

105. 如权利要求104所述的方法,其中所述mRNA疫苗以足以向所述受试者递送10 μ g与400 μ g之间的所述mRNA疫苗的剂量水平施用。

106. 如权利要求105所述的方法, 其中所述mRNA疫苗以足以向所述受试者递送0.033mg、0.1mg、0.2mg或0.4mg的剂量水平施用。

107. 如权利要求104或105所述的方法, 其中所述mRNA疫苗向所述受试者施用两次、三次、四次或更多次。

108. 如权利要求107所述的方法, 其中所述mRNA疫苗每三周一天一次施用。

109. 如权利要求104-108中任一项所述的方法, 其中所述mRNA疫苗通过皮内、肌内和/或皮下施用来施用。

110. 如权利要求109所述的方法, 其中所述mRNA疫苗通过肌内施用来施用。

111. 如权利要求104-110中任一项所述的方法, 其还包括向所述受试者施用另外的癌症治疗剂; 任选地, 其中所述另外的癌症治疗剂是免疫检查点调节剂。

112. 如权利要求111所述的方法, 其中所述免疫检查点调节剂是抑制性检查点多肽。

113. 如权利要求112所述的方法, 其中所述抑制性检查点多肽抑制PD1、PD-L1、CTLA4、TIM-3、VISTA、A2AR、B7-H3、B7-H4、BTLA、IDO、KIR、LAG3或其组合。

114. 如权利要求112所述的方法, 其中所述检查点抑制剂多肽是抗体。

115. 如权利要求114所述的方法, 其中所述抑制性检查点多肽是选自特异性地结合CTLA4的抗CTLA4抗体或其抗原结合片段、特异性地结合PD1的抗PD1抗体或其抗原结合片段、特异性地结合PD-L1的抗PD-L1抗体或其抗原结合片段以及其组合的抗体。

116. 如权利要求115所述的方法, 其中所述检查点抑制剂多肽是选自阿特殊单抗、阿维鲁单抗或德瓦鲁单抗的抗PD-L1抗体。

117. 如权利要求115所述的方法, 其中所述检查点抑制剂多肽是选自曲美木单抗或伊匹单抗的抗CTLA-4抗体。

118. 如权利要求115所述的方法, 其中所述检查点抑制剂多肽是选自纳武单抗或派姆单抗的抗PD1抗体。

119. 如权利要求111-118中任一项所述的方法, 其中所述免疫检查点调节剂以足以向所述受试者递送100-300mg的剂量水平施用。

120. 如权利要求119所述的方法, 其中所述免疫检查点调节剂以足以向所述受试者递送200mg的剂量水平施用。

121. 如权利要求111-120中任一项所述的方法, 其中所述免疫检查点调节剂通过静脉内输注施用。

122. 如权利要求111-121中任一项所述的方法, 其中所述免疫检查点调节剂向所述受试者施用两次、三次、四次或更多次。

123. 如权利要求111-122中任一项所述的方法, 其中所述免疫检查点调节剂在与所述mRNA疫苗施用同一天施用至所述受试者。

124. 如权利要求104-123中任一项所述的方法, 其中所述癌症选自:

(i) 由以下组成的组: 非小细胞肺癌 (NSCLC)、小细胞肺癌、黑素瘤、膀胱尿路上皮癌、HPV阴性头颈鳞状细胞癌 (HNSCC) 以及为微卫星高 (MSIH) / 错配修复 (MMR) 缺陷型的实体恶性肿瘤; 和/或

(ii) 胰腺癌、腹膜癌、大肠癌、小肠癌、胆道癌、肺癌、子宫内膜癌、卵巢癌、生殖道癌、胃肠道癌、子宫颈癌、胃癌、泌尿道癌、结肠癌、直肠癌以及造血和淋巴组织癌症。

125. 如权利要求124所述的方法,其中所述NSCLC缺乏EGFR敏化突变和/或ALK易位。

126. 如权利要求125所述的方法,其中所述为微卫星高 (MSI-H) /错配修复 (MMR) 缺陷型的实体恶性肿瘤选自由以下组成的组:结肠直肠癌、胃腺癌、食道腺癌和子宫内膜癌。

127. 一种产生包含1000与3000个之间的核苷酸的编码多联癌抗原的mRNA的方法,所述方法包括:

(a) 使包含编码如权利要求1-103中任一项所述的癌抗原的开放阅读框的第一多核苷酸和包含5'-UTR的第二多核苷酸结合至与固体支撑物缀合的多核苷酸;

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

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

(d) 使所述第二连接产物从所述固体支撑物释放,

由此产生包含1000与3000个之间的核苷酸的编码所述多联癌抗原的mRNA。

128. 一种用个人化mRNA癌症疫苗治疗受试者的方法,所述方法包括:鉴定一组新表位以产生患者特异性突变组,基于MHC结合强度、MHC结合多样性、预测的免疫原性程度、低自身反应性和/或T细胞反应性来从所述突变组选择一组用于疫苗的新表位,制备所述mRNA疫苗以编码所述一组新表位,以及在从所述受试者分离所述样品的2个月内向所述受试者施用所述mRNA疫苗。

129. 一种鉴定用于个人化mRNA癌症疫苗中的一组新表位的方法,所述癌症疫苗具有一种或多种编码所述一组新表位的多核苷酸,所述方法包括:

(a) 通过分析患者转录物组和患者外显子组来鉴定患者特异性突变组,

(b) 使用所述新表位的基于以下中的至少三者的加权值来从所述突变组选择15-500种新表位的子集:在患者RNA测序中对基因或转录物水平表达的评估;变体识别置信度评分;RNA测序等位基因特异性表达;保守性氨基酸取代相对于非保守性氨基酸取代;点突变的位置(关于增加的TCR接合的中心化评分);点突变的位置(关于差异性HLA结合的锚定评分);自身性:与患者WES数据具有<100%核心表位同源性;HLA-A和HLA-B对8聚体-11聚体的IC50;HLA-DRB1对15聚体-20聚体的IC50;杂乱评分;HLA-C对8聚体-11聚体的IC50;HLA-DRB3-5对15聚体-20聚体的IC50;HLA-DQB1/A1对15聚体-20聚体的IC50;HLA-DPB1/A1对15聚体-20聚体的IC50;I类相对于II类比例;涵盖的患者HLA-A、HLA-B和DRB1同种异型的多样性;点突变相对于复杂表位的比例;假表位HLA结合评分;RNA测序读段的存在和/或丰度,以及

(c) 基于最高加权值来从所述子集选择所述一组用于个人化mRNA癌症疫苗中的新表位,其中所述一组新表位包括15-40种新表位。

130. 一种鉴定用于个人化mRNA癌症疫苗中的一组新表位的方法,所述癌症疫苗具有一种或多种编码所述一组新表位的多核苷酸,所述方法包括:

(a) 生成来自患者肿瘤的RNA测序样品以产生一组RNA测序读段,

(b) 编译来自所有RNA测序读段的核苷酸序列的总计数,

(c) 比较所述肿瘤样品与相同组织类型的正常组织的相应数据库之间的序列信息,以及

(d) 基于最高加权值来从所述子集选择所述一组用于个人化mRNA癌症疫苗中的新表位,其中所述一组新表位包含15-40种新表位。

RNA癌症疫苗

[0001] 相关申请

[0002] 本申请根据美国法典第35篇第119条(e)款要求2017年2月1日提交的题为“RNA CANCER VACCINES”的美国临时申请序列号62/453,444、2017年2月1日提交的题为“IMMUNOMODULATORY THERAPEUTIC MRNA COMPOSITIONS ENCODING ACTIVATING ONCOGENE MUTATION PEPTIDES”的美国临时申请序列号62/453,465以及2017年9月13日提交的题为“CONCATAMERIC RNA CANCER VACCINES”的美国临时申请序列号62/558,238的提交日期的权益,所述美国临时申请各自的全部内容以引用的方式并入本文。

[0003] 发明背景

[0004] 最近的癌症进化理论集中在三个步骤,包括应激诱导的基因组不稳定性、种群多样性或异质性以及基因组介导的宏观进化。所述理论解释了大多数已知的分子机制可促成癌症的原因,但大多数临床病例不存在单一主要机制。然而,共同的机制表明癌症疫苗可提供治疗癌症的通用解决方案。

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

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

发明内容

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

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

[0009] 所述RNA疫苗可包括具有编码至少一种癌抗原多肽或其免疫原性片段(例如能够

诱导对癌症的免疫应答的免疫原性片段)的开放阅读框的核糖核酸(RNA)多核苷酸。其他实施方案包括至少一种具有编码两种或更多种能够诱导对癌症的免疫应答的抗原或表位的开放阅读框的核糖核酸(RNA)多核苷酸。

[0010] 本发明在一些方面是一种mRNA癌症疫苗,所述mRNA癌症疫苗具有在脂质纳米粒子中配制的一种或多种mRNA,所述一种或多种mRNA各自具有编码癌抗原肽表位的开放阅读框,其中所述mRNA疫苗编码5-100个肽表位,并且所述肽表位中的至少两个是个人化癌抗原;和药学上可接受的载体或赋形剂。

[0011] 在一些方面,本公开提供了一种包含脂质纳米粒子的mRNA癌症疫苗,所述脂质纳米粒子包含一种或多种mRNA,所述一种或多种mRNA各自具有一个或多个编码1-500个肽表位的开放阅读框和通用II型T细胞表位,所述肽表位是个人化癌抗原。

[0012] 在一些方面,本公开提供了一种包含脂质纳米粒子的mRNA癌症疫苗,所述脂质纳米粒子包含以下中的一种或多种:(a)一种或多种mRNA,所述一种或多种mRNA各自具有一个或多个编码1-500个肽表位的开放阅读框和通用II型T细胞表位,所述肽表位是个人化癌抗原;(b)一种或多种mRNA,所述一种或多种mRNA各自具有编码活化致癌基因突变肽的开放阅读框,任选地其中所述mRNA还包含通用II型T细胞表位;(c)一种或多种mRNA,所述一种或多种mRNA各自具有编码癌抗原肽表位的开放阅读框,其中所述mRNA疫苗编码5-100个肽表位,并且所述肽表位中的至少两个是个人化癌抗原,任选地其中所述mRNA还包含通用II型T细胞表位;和/或(d)一种或多种mRNA,所述一种或多种mRNA各自具有编码癌抗原肽表位的开放阅读框,其中所述mRNA疫苗编码5-100个肽表位,并且所述肽表位中的至少三个是复杂变体,并且所述肽表位中的至少两个是点突变,任选地其中所述mRNA还包含通用II型T细胞表位。在一些实施方案中,所述mRNA癌症疫苗编码1-20个通用II型T细胞表位。在其他实施方案中,所述通用II型T细胞表位是选自以下组成的组:ILMQYIKANSKFIGI(破伤风毒素;SEQ ID NO:226)、FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE(破伤风毒素;SEQ ID NO:227)、QYIKANSKFIGITE(破伤风毒素;SEQ ID NO:228)、QSIALSSLMVAQAIP(白喉毒素;SEQ ID NO:229)以及AKFVAAWTLKAAA(泛-DR表位;SEQ ID NO:230)。

[0013] 在一些实施方案中,所述通用II型T细胞表位在整个所述mRNA中是相同的通用II型T细胞表位。在其他实施方案中,所述通用II型T细胞表位在所述mRNA中重复1-20次。在一个实施方案中,所述通用II型T细胞表位在整个所述mRNA中彼此不同。在一些实施方案中,所述通用II型T细胞表位位于每个癌抗原肽表位之间。在另一个实施方案中,所述通用II型T细胞表位位于每隔一个癌抗原肽表位之间。在一个实施方案中,所述通用II型T细胞表位位于每三个癌抗原肽表位之间。

[0014] 在一些实施方案中,满足以下条件中的一个或多个:(i)所述活化致癌基因突变是KRAS突变;(ii)所述KRAS突变是G12突变,任选地其中所述G12 KRAS突变是选自G12D、G12V、G12S、G12C、G12A和G12R KRAS突变;(iii)所述KRAS突变是G13突变,任选地其中所述G13 KRAS突变是G13D KRAS突变;和/或(iv)所述活化致癌基因突变是H-RAS或N-RAS突变。

[0015] 在一些实施方案中,满足以下条件中的一个或多个:(A)所述mRNA具有编码两种或更多种活化致癌基因突变肽的多联体的开放阅读框;(B)所述肽表位中的至少两个通过单个甘氨酸彼此隔开,任选地其中所有肽表位都通过单个甘氨酸彼此隔开;(C)所述多联体包含3-10种活化致癌基因突变肽;和/或(D)所述肽表位中的至少两个在无接头的情况下彼此

直接连接。

[0016] 在某些实施方案中,满足以下条件中的一个或多个:(i)所述肽表位中的至少一个是传统癌抗原;(ii)所述肽表位中的至少一个是复发多态性;(iii)所述复发多态性包含p53中的复发体细胞癌突变;(iv)p53中的复发体细胞癌突变是选自以下组成的组:(A)在典型5'剪接位点邻近密码子p.T125处的突变,从而诱导具有肽序列TAKSVTCTVSCPEGLASMR LQCLAVSPCISFVWNFGIPLHPLASCQCFFIVYPLNV (SEQ ID NO:232)的保留内含子,所述肽序列含有表位AVSPCISFVW (SEQ ID NO:233) (HLA-B*57:01,HLA-B*58:01)、HPLASCQCFF (SEQ ID NO:234) (HLA-B*35:01,HLA-B*53:01)、FVWNFGIPL (SEQ ID NO:235) (HLA-A*02:01,HLA-A*02:06,HLA-B*35:01);(B)在典型5'剪接位点邻近密码子p.331处的突变,从而诱导具有肽序列EYFTLQVLSLGTSYQVESFQSNTQNAVFFLTVPALPAIGAFAIRGQ (SEQ ID NO:236)的保留内含子,所述肽序列含有表位LQVLSLGTSY (SEQ ID NO:237) (HLA-B*15:01)、FQSNTQNAV (SEQ ID NO:238) (HLA-B*15:01);(C)在典型3'剪接位点邻近密码子p.126处的突变,从而诱导隐蔽选择性外显子3'剪接位点,其产生含有表位CTMFCQLAK (SEQ ID NO:240) (HLA-A*11:01),KSVTCTMF (SEQ ID NO:241) (HLA-B*58:01)的新型跨越肽序列AKSVTCTMFCQLAK (SEQ ID NO:239);和/或(D)在典型5'剪接位点邻近密码子p.224处的突变,从而诱导隐蔽选择性内含子5'剪接位点,其产生含有表位VPYEPPEVW (SEQ ID NO:243) (HLA-B*53:01,HLA-B*51:01)、LTVPPSTAW (SEQ ID NO:244) (HLA-B*58:01,HLA-B*57:01)的新型跨越肽序列VPYEPPEVWLALTVPSTAWAA (SEQ ID NO:242),其中转录物密码子位置涉及来自Ensembl v83人基因组注释的典型全长p53转录物ENST00000269305 (SEQ ID NO:245);和/或(v)所述mRNA癌症疫苗不包含稳定剂。

[0017] 在一些实施方案中,所述一种或多种mRNA还包含编码免疫增效剂的开放阅读框。在其他实施方案中,所述免疫增效剂被配制在所述脂质纳米粒子中。在一个实施方案中,所述免疫增效剂被配制在单独脂质纳米粒子中。在一些实施方案中,所述免疫增效剂是组成型活性人STING多肽。在一个实施方案中,所述组成型活性人STING多肽包含SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列。在另一个实施方案中,编码所述组成型活性人STING多肽的mRNA包含SEQ ID NO:170中所示的核苷酸序列。在一些实施方案中,编码所述组成型活性人STING多肽的mRNA包含具有miR-122微小RNA结合位点的3' UTR。在一个实施方案中,所述miR-122微小RNA结合位点包含SEQ ID NO:175中所示的核苷酸序列。

[0018] 在一些实施方案中,所述一种或多种mRNA各自包含5' UTR,所述5' UTR包含SEQ ID NO:176中列出的核苷酸序列。在一个实施方案中,所述一种或多种mRNA各自包含聚腺苷酸尾部(poly A tail)。在一个实施方案中,所述聚腺苷酸尾部包含约100个核苷酸。在一些实施方案中,所述一种或多种mRNA各自包含5'帽1结构。

[0019] 在一些实施方案中,所述一种或多种mRNA包含至少一种化学修饰。在一个实施方案中,所述化学修饰是N1-甲基假尿苷。在另一个实施方案中,所述一种或多种mRNA用N1-甲基假尿苷完全修饰。

[0020] 在一些实施方案中,所述一种或多种mRNA编码45-55种个人化癌抗原。在一个实施方案中,所述一种或多种mRNA编码52种个人化癌抗原。在一些实施方案中,所述个人化癌抗原中的每一种由单独的开放阅读框编码。在另一个实施方案中,所述肽表位呈由2-100个肽表位组成的多联癌抗原形式,任选地其中所述多联癌抗原由5-100个肽表位组成。

[0021] 在一些实施方案中,所述多联癌抗原包含以下中的一种或多种:a)所述2-100个肽表位或5-100个肽表位间杂有裂解敏感性位点;b)编码每个肽表位的mRNA在无接头的情况下彼此直接连接;c)编码每个肽表位的mRNA以单一核苷酸接头彼此连接;d)每个肽表位包含25-35个氨基酸并且包括位于中心的SNP突变;e)至少30%的肽表位对来自受试者的I类MHC分子具有最高亲和力;f)至少30%的肽表位对来自受试者的II类MHC分子具有最高亲和力;g)至少50%的肽表位对HLA-A、HLA-B和/或DRB1具有 $IC > 500nM$ 的预测结合亲和力;h)所述mRNA编码45-55个肽表位;i)所述mRNA编码52个肽表位;j)50%的肽表位对I类MHC具有结合亲和力并且50%的肽表位对II类MHC具有结合亲和力;k)编码肽表位的mRNA被排列成使得所述肽表位被排序以使假表位最少,l)至少30%的肽表位是长度为15个氨基酸的I类MHC结合肽;和/或m)至少30%的肽表位是长度为21个氨基酸的II类MHC结合肽。

[0022] 在一些方面,本公开提供了一种mRNA癌症疫苗,所述mRNA癌症疫苗包含在脂质纳米粒子中配制的一种或多种mRNA,所述一种或多种mRNA各自具有一个或多个编码45-55个肽表位的开放阅读框,所述肽表位是个人化癌抗原。

[0023] 在一些方面,本公开提供了一种mRNA癌症疫苗,所述mRNA癌症疫苗包含在脂质纳米粒子中配制的一种或多种mRNA,所述一种或多种mRNA各自具有一个或多个编码45-55个肽表位的开放阅读框,所述肽表位是个人化癌抗原;任选地其中所述肽表位中的至少一个是活化致癌基因突变肽或传统癌抗原,并且任选地其中所述肽表位中的至少三个是复杂变体,并且所述肽表位中的至少两个是点突变。

[0024] 在一些实施方案中,所述一种或多种mRNA编码48-54种个人化癌抗原。在一个实施方案中,所述一种或多种mRNA编码52种个人化癌抗原。在一些实施方案中,所述个人化癌抗原中的每一种由单独的开放阅读框编码。

[0025] 在另一个实施方案中,所述肽表位呈由2-100个肽表位组成的多联癌抗原形式,任选地其中所述多联癌抗原由5-100个肽表位组成。在一些实施方案中,所述多联癌抗原包含以下中的一种或多种:a)所述2-100个肽表位或5-100个肽表位间杂有裂解敏感性位点;b)编码每个肽表位的mRNA在无接头的情况下彼此直接连接;c)编码每个肽表位的mRNA以单一核苷酸接头彼此连接;d)每个肽表位包含25-35个氨基酸并且包括位于中心的SNP突变;e)至少30%的肽表位对来自受试者的I类MHC分子具有最高亲和力;f)至少30%的肽表位对来自受试者的II类MHC分子具有最高亲和力;g)至少50%的肽表位对HLA-A、HLA-B和/或DRB1具有 $IC > 500nM$ 的预测结合亲和力;h)所述mRNA编码45-55个肽表位;i)所述mRNA编码52个肽表位;j)50%的肽表位对I类MHC具有结合亲和力并且50%的肽表位对II类MHC具有结合亲和力;k)编码肽表位的mRNA被排列成使得所述肽表位被排序以使假表位最少,l)至少30%的肽表位是长度为15个氨基酸的I类MHC结合肽;和/或m)至少30%的肽表位是长度为21个氨基酸的II类MHC结合肽。

[0026] 在一些实施方案中,所述肽表位中的至少两个通过通用II型T细胞表位彼此隔开。在一个实施方案中,所有肽表位都通过通用II型T细胞表位彼此隔开。在另一个实施方案中,所述mRNA癌症疫苗编码1-20个通用II型T细胞表位。

[0027] 在一些实施方案中,所述通用II型T细胞表位是选自由以下组成的组:ILMQYIKANSKFIGI(破伤风毒素;SEQ ID NO:226)、FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE(破伤风毒素;SEQ ID NO:227)、QYIKANSKFIGITE(破伤风毒素;SEQ ID NO:228)、QSIALSSLMVAQAIP(白喉

毒素;SEQ ID NO:229)以及AKFVAAWTLKAAA(泛-DR表位;SEQ ID NO:230)。

[0028] 在一个实施方案中,所述通用II型T细胞表位在整个所述mRNA中是相同的通用II型T细胞表位。在一些实施方案中,所述通用II型T细胞表位在所述mRNA中重复1-20次。在另一个实施方案中,所述通用II型T细胞表位在整个所述mRNA中彼此不同。在一个实施方案中,所述通用II型T细胞表位位于每个肽表位之间。在一些实施方案中,所述通用II型T细胞表位位于每隔一个肽表位之间。在一个实施方案中,所述通用II型T细胞表位位于每三个癌抗原肽表位之间。

[0029] 在一些实施方案中,所述一种或多种mRNA还包含编码免疫增效剂的开放阅读框。在一个实施方案中,所述免疫增效剂被配制在所述脂质纳米粒子中。在另一个实施方案中,所述免疫增效剂被配制在单独脂质纳米粒子中。在一些实施方案中,所述免疫增效剂是组成型活性人STING多肽。在一个实施方案中,所述组成型活性人STING多肽包含SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列。在另一个实施方案中,编码所述组成型活性人STING多肽的mRNA包含SEQ ID NO:170中所示的核苷酸序列。

[0030] 在一些实施方案中,满足以下条件中的一个或多个:(i)所述活化致癌基因突变是KRAS突变;(ii)所述KRAS突变是G12突变,任选地其中所述G12 KRAS突变是选自G12D、G12V、G12S、G12C、G12A和G12R KRAS突变;(iii)所述KRAS突变是G13突变,任选地其中所述G13 KRAS突变是G13D KRAS突变;和/或(iv)所述活化致癌基因突变是H-RAS或N-RAS突变。

[0031] 在某些实施方案中,满足以下条件中的一个或多个:(A)所述mRNA具有编码两种或更多种活化致癌基因突变肽的多联体的开放阅读框;(B)所述肽表位中的至少两个通过单个甘氨酸彼此隔开,任选地其中所有肽表位都通过单个甘氨酸彼此隔开;(C)所述多联体包含3-10种活化致癌基因突变肽;和/或(D)所述肽表位中的至少两个在无接头的情况下彼此直接连接。

[0032] 在具体实施方案中,满足以下条件中的一个或多个:(i)所述肽表位中的至少一个是传统癌抗原;(ii)所述肽表位中的至少一个是复发多态性;(iii)所述复发多态性包含p53中的复发体细胞癌突变;(iv)p53中的复发体细胞癌突变是选自由以下组成的组:(A)在典型5'剪接位点邻近密码子p.T125处的突变,从而诱导具有肽序列TAKSVTCTVSCPEGLASMR LQCLAVSPCISFVWNFGIPLHPLASCQCFFIVYPLNV(SEQ ID NO:232)的保留内含子,所述肽序列含有表位AVSPCISFVW(SEQ ID NO:233)(HLA-B*57:01,HLA-B*58:01)、HPLASCQCFF(SEQ ID NO:234)(HLA-B*35:01,HLA-B*53:01)、FVWNFGIPL(SEQ ID NO:235)(HLA-A*02:01,HLA-A*02:06,HLA-B*35:01);(B)在典型5'剪接位点邻近密码子p.331处的突变,从而诱导具有肽序列EYFTLQVLSLGTSYQVESFQSNTQNAVFFLTVLPAIGAFAIRGQ(SEQ ID NO:236)的保留内含子,所述肽序列含有表位LQVLSLGTSY(SEQ ID NO:237)(HLA-B*15:01)、FQSNTQNAVF(SEQ ID NO:238)(HLA-B*15:01);(C)在典型3'剪接位点邻近密码子p.126处的突变,从而诱导隐蔽选择性外显子3'剪接位点,其产生含有表位CTMFCQLAK(SEQ ID NO:240)(HLA-A*11:01),KSVTCTMF(SEQ ID NO:241)(HLA-B*58:01)的新型跨越肽序列AKSVTCTMFCQLAK(SEQ ID NO:239);和/或(D)在典型5'剪接位点邻近密码子p.224处的突变,从而诱导隐蔽选择性内含子5'剪接位点,其产生含有表位VPYEPPEVW(SEQ ID NO:243)(HLA-B*53:01,HLA-B*51:01)、LTVPPSTAW(SEQ ID NO:244)(HLA-B*58:01,HLA-B*57:01)的新型跨越肽序列VPYEPPEVWLALTVPSTAWAA(SEQ ID NO:242),其中转录物密码子位置涉及来自Ensembl v83

人基因组注释的典型全长p53转录物ENST00000269305 (SEQ ID NO:245); 和/或(v) 所述 mRNA癌症疫苗不包含稳定剂。

[0033] 本公开的另一面是一种包含脂质纳米粒子的mRNA癌症疫苗,所述脂质纳米粒子包含(i) 一种或多种mRNA,所述一种或多种mRNA各自具有一个或多个编码1-500个肽表位的开放阅读框,所述肽表位是个人化癌抗原,和(ii) 具有编码多肽的开放阅读框的mRNA,所述多肽增强对所述个人化癌抗原的免疫应答,任选地其中(i) 和(ii) 以大约5:1的质量比存在。

[0034] 本公开的另一面是一种mRNA癌症疫苗,其包含:脂质纳米粒子,所述脂质纳米粒子包含:(i) 一种或多种mRNA,所述一种或多种mRNA各自具有一个或多个编码1-500个肽表位的开放阅读框,所述肽表位是个人化癌抗原,和(ii) 具有编码多肽的开放阅读框的mRNA,所述多肽增强对所述个人化癌抗原的免疫应答,任选地其中(i) 和(ii) 以大约5:1的质量比存在;任选地其中所述肽表位中的至少一个是活化致癌基因突变肽或传统癌抗原,并且任选地其中所述肽表位中的至少三个是复杂变体,并且所述肽表位中的至少两个是点突变。

[0035] 在一些实施方案中,所述免疫应答包括细胞或体液免疫应答,其特征在于:(i) 刺激I型干扰素途径信号传导;(ii) 刺激NFkB途径信号传导;(iii) 刺激炎症性应答;(iv) 刺激细胞因子产生;或(v) 刺激树突状细胞发育、活性或动员;以及(vi) (i)-(vi) 中的任一者的组合。

[0036] 在一个实施方案中,所述mRNA癌症疫苗包含编码肽表位和多肽两者的单一mRNA构建体,所述多肽增强对个人化癌抗原的免疫应答。在另一个实施方案中,所述肽表位呈由2-100个肽表位组成的多联癌抗原形式,任选地其中所述多联癌抗原由5-100个肽表位组成。

[0037] 在一些实施方案中,所述多联癌抗原包含以下中的一种或多种:a) 所述2-100个肽表位或5-100个肽表位间杂有裂解敏感性位点;b) 编码每个肽表位的mRNA在无接头的情况下彼此直接连接;c) 编码每个肽表位的mRNA以单一核苷酸接头彼此连接;d) 每个肽表位包含25-35个氨基酸并且包括位于中心的SNP突变;e) 至少30%的肽表位对来自受试者的I类MHC分子具有最高亲和力;f) 至少30%的肽表位对来自受试者的II类MHC分子具有最高亲和力;g) 至少50%的肽表位对HLA-A、HLA-B和/或DRB1具有IC₅₀>500nM的预测结合亲和力;h) 所述mRNA编码45-55个肽表位;i) 所述mRNA编码52个肽表位;j) 50%的肽表位对I类MHC具有结合亲和力并且50%的肽表位对II类MHC具有结合亲和力;k) 编码肽表位的mRNA被排列成使得所述肽表位被排序以使假表位最少,l) 至少30%的肽表位是长度为15个氨基酸的I类MHC结合肽;和/或m) 至少30%的肽表位是长度为21个氨基酸的II类MHC结合肽。

[0038] 在一些实施方案中,每个肽表位包含位于中心的SNP突变,在所述SNP突变的每侧上具有15个侧接氨基酸。

[0039] 在一个实施方案中,所述增强对受试者中的至少一种个人化癌抗原的免疫应答的多肽是组成型活性人STING多肽。在一个实施方案中,所述组成型活性人STING多肽包含一种或多种选自由以下组成的组的突变:V147L、N154S、V155M、R284M、R284K、R284T、E315Q、R375A以及其组合。在另一个实施方案中,所述组成型活性人STING多肽包含V155M突变。在另一个实施方案中,所述组成型活性人STING多肽包含突变R284M/V147L/N154S/V155M。

[0040] 在一些实施方案中,每种mRNA在同一或不同脂质纳米粒子中配制。在另一个实施方案中,编码癌症个人化癌抗原的每种mRNA在同一或不同脂质纳米粒子中配制。在一些实

施方案中,编码增强对所述个人化癌抗原的免疫应答的多肽的每种mRNA在同一或不同脂质纳米粒子中配制。

[0041] 在一些实施方案中,编码个人化癌抗原的每种mRNA配制在同一脂质纳米粒子中,并且编码增强对所述个人化癌抗原的免疫应答的多肽的每种mRNA配制在不同脂质纳米粒子中。在另一个实施方案中,编码个人化癌抗原的每种mRNA配制在同一脂质纳米粒子中,并且编码增强对所述个人化癌抗原的免疫应答的多肽的每种mRNA与编码个人化癌抗原的每种mRNA配制在同一脂质纳米粒子中。在一些实施方案中,编码个人化癌抗原的每种mRNA配制在不同脂质纳米粒子中,并且编码增强对所述个人化癌抗原的免疫应答的多肽的每种mRNA与编码每种个人化癌抗原的每种mRNA配制在同一脂质纳米粒子中。

[0042] 在一些实施方案中,所述肽表位是T细胞表位和/或B细胞表位。在其他实施方案中,所述肽表位包含T细胞表位和B细胞表位的组合。在一个实施方案中,所述肽表位中的至少1个是T细胞表位。在另一个实施方案中,所述肽表位中的至少1个是B细胞表位。

[0043] 在一些实施方案中,所述肽表位已针对与受试者的MHC的结合强度进行了优化。在其他实施方案中,每个表位的TCR面与内源性蛋白具有低相似性。

[0044] 在另一个实施方案中,所述mRNA癌症疫苗还包含回忆抗原。在一些实施方案中,所述回忆抗原是感染性疾病抗原。

[0045] 在一个实施方案中,所述mRNA疫苗还包含具有编码一种或多种传统癌抗原的开放阅读框的mRNA。

[0046] 在一个实施方案中,满足以下条件中的一个或多个:(i)所述活化致癌基因突变是KRAS突变;(ii)所述KRAS突变是G12突变,任选地其中所述G12 KRAS突变是选自G12D、G12V、G12S、G12C、G12A和G12R KRAS突变;(iii)所述KRAS突变是G13突变,任选地其中所述G13 KRAS突变是G13D KRAS突变;和/或(iv)所述活化致癌基因突变是H-RAS或N-RAS突变。

[0047] 在一个实施方案中,满足以下条件中的一个或多个:(A)所述mRNA具有编码两种或更多种活化致癌基因突变肽的多联体的开放阅读框;(B)所述肽表位中的至少两个通过单个甘氨酸彼此隔开,任选地其中所有肽表位都通过单个甘氨酸彼此隔开;(C)所述多联体包含3-10种活化致癌基因突变肽;和/或(D)所述肽表位中的至少两个在无接头的情况下彼此直接连接。

[0048] 在一个实施方案中,满足以下条件中的一个或多个:(i)所述肽表位中的至少一个是传统癌抗原;(ii)所述肽表位中的至少一个是复发多态性;(iii)所述复发多态性包含p53中的复发体细胞癌突变;(iv)p53中的复发体细胞癌突变是选自由以下组成的组:(A)在典型5'剪接位点邻近密码子p.T125处的突变,从而诱导具有肽序列TAKSVTCTVSCPEGLASMR LQCLAVSPCISFVWNFGIPLHPLASCQCFFIVYPLNV (SEQ ID NO:232)的保留内含子,所述肽序列含有表位AVSPCISFVW (SEQ ID NO:233) (HLA-B*57:01,HLA-B*58:01)、HPLASCQCFF (SEQ ID NO:234) (HLA-B*35:01,HLA-B*53:01)、FVWNFGIPL (SEQ ID NO:235) (HLA-A*02:01,HLA-A*02:06,HLA-B*35:01);(B)在典型5'剪接位点邻近密码子p.331处的突变,从而诱导具有肽序列YFTLQVLSLGTSTYQVESFQSNTQNAVFFLTVLPAIGAFAIRGQ (SEQ ID NO:236)的保留内含子,所述肽序列含有表位LQVLSLGTSTY (SEQ ID NO:237) (HLA-B*15:01)、FQSNTQNAV (SEQ ID NO:238) (HLA-B*15:01);(C)在典型3'剪接位点邻近密码子p.126处的突变,从而诱导隐蔽选择性外显子3'剪接位点,其产生含有表位CTMFCQLAK (SEQ ID NO:240) (HLA-A*11:01),

KSVTCTMF (SEQ ID NO:241) (HLA-B*58:01) 的新型跨越肽序列AKSVTCTMFCQLAK (SEQ ID NO:239);和/或(D)在典型5'剪接位点邻近密码子p.224处的突变,从而诱导隐蔽选择性内含子5'剪接位点,其产生含有表位VPYEPPEVW (SEQ ID NO:243) (HLA-B*53:01,HLA-B*51:01)、LTVPPSTAW (SEQ ID NO:244) (HLA-B*58:01,HLA-B*57:01) 的新型跨越肽序列VPYEPPEVWLALTVPSTAWAA (SEQ ID NO:242),其中转录物密码子位置涉及来自Ensembl v83人基因组注释的典型全长p53转录物ENST00000269305 (SEQ ID NO:245);和/或(v)所述mRNA癌症疫苗不包含稳定剂。

[0049] 在一些实施方案中,所述脂质纳米粒子包含约20%-60%可电离氨基脂质:5%-25%中性脂质:25%-55%固醇;以及0.5%-15%PEG修饰的脂质的摩尔比,任选地其中所述可电离氨基脂质是阳离子脂质。在一个实施方案中,所述脂质纳米粒子包含约50%化合物25:约10%DSPC:约38.5%胆固醇;以及约1.5%PEG-DMG的摩尔比。在另一个实施方案中,所述可电离氨基脂质是选自由以下组成的组:例如,2,2-二亚油基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧戊环(DLin-KC2-DMA)、二亚油基-甲基-4-二甲基氨基丁酸酯(DLin-MC3-DMA)以及二((Z)-壬-2-烯-1-基)9-((4-(二甲基氨基)丁酰基)氧基)-十七烷二酸酯(L319)。在一些实施方案中,所述脂质纳米粒子包含式(I)化合物。在一个实施方案中,所述式(I)化合物是化合物25。在另一个实施方案中,所述脂质纳米粒子具有小于0.4的多分散性值。在一些实施方案中,所述脂质纳米粒子在中性pH值下具有净中性电荷。

[0050] 在一个实施方案中,每个表位的TCR面与内源性蛋白具有低相似性。

[0051] 在另一个实施方案中,所述mRNA还包含编码免疫检查点调节剂的开放阅读框。在一个实施方案中,所述mRNA癌症疫苗还包含另外的癌症治疗剂;任选地,其中所述另外的癌症治疗剂是免疫检查点调节剂。在另一个实施方案中,所述免疫检查点调节剂是抑制性检查点多肽。在一些实施方案中,所述抑制性检查点多肽抑制PD1、PD-L1、CTLA4、TIM-3、VISTA、A2AR、B7-H3、B7-H4、BTLA、IDO、KIR、LAG3或其组合。

[0052] 在一些实施方案中,所述检查点抑制剂多肽是抗体。在一个实施方案中,所述抑制性检查点多肽是选自特异性地结合CTLA4的抗CTLA4抗体或其抗原结合片段、特异性地结合PD1的抗PD1抗体或其抗原结合片段、特异性地结合PD-L1的抗PD-L1抗体或其抗原结合片段以及其组合的抗体。在一个实施方案中,所述检查点抑制剂多肽是选自阿特珠单抗、阿维鲁单抗或德瓦鲁单抗的抗PD-L1抗体。在另一个实施方案中,所述检查点抑制剂多肽是选自曲美木单抗或伊匹单抗的抗CTLA-4抗体。在一些实施方案中,所述检查点抑制剂多肽是选自纳武单抗或派姆单抗的抗PD1抗体。

[0053] 在一些实施方案中,所述化学修饰是选自由以下组成的组:假尿苷、N1-甲基假尿苷、2-硫代尿苷、4'-硫代尿苷、5-甲基胞嘧啶、2-硫代-1-甲基-1-脱氮-假尿苷、2-硫代-1-甲基-假尿苷、2-硫代-5-氮杂-尿苷、2-硫代-二氢假尿苷、2-硫代-二氢尿苷、2-硫代-假尿苷、4-甲氧基-2-硫代-假尿苷、4-甲氧基-假尿苷、4-硫代-1-甲基-假尿苷、4-硫代-假尿苷、5-氮杂-尿苷、二氢假尿苷、5-甲基尿苷、5-甲基尿苷、5-甲氧基尿苷以及2'-O-甲基尿苷。

[0054] 在另一方面,本公开提供了一种用于对受试者接种疫苗的方法,所述方法包括向患有癌症的受试者施用上述mRNA癌症疫苗。

[0055] 在一些实施方案中,所述mRNA疫苗以足以向所述受试者递送10 μ g与400 μ g之间的所述mRNA疫苗的剂量水平施用。在一个实施方案中,所述mRNA疫苗以足以向所述受试者递

送0.033mg、0.1mg、0.2mg或0.4mg的剂量水平施用。在另一个实施方案中,所述mRNA疫苗向所述受试者施用两次、三次、四次或更多次。在一些实施方案中,所述mRNA疫苗每三周一天一次施用。在一个实施方案中,所述mRNA疫苗通过皮内、肌内和/或皮下施用来施用。在另一个实施方案中,所述mRNA疫苗通过肌内施用来施用。

[0056] 在一些实施方案中,所述方法还包括向所述受试者施用另外的癌症治疗剂;任选地,其中所述另外的癌症治疗剂是免疫检查点调节剂。在一个实施方案中,所述免疫检查点调节剂是抑制性检查点多肽。在另一个实施方案中,所述抑制性检查点多肽抑制PD1、PD-L1、CTLA4、TIM-3、VISTA、A2AR、B7-H3、B7-H4、BTLA、IDO、KIR、LAG3或其组合。在一些实施方案中,所述检查点抑制剂多肽是抗体。在其他实施方案中,所述抑制性检查点多肽是选自特异性地结合CTLA4的抗CTLA4抗体或其抗原结合片段、特异性地结合PD1的抗PD1抗体或其抗原结合片段、特异性地结合PD-L1的抗PD-L1抗体或其抗原结合片段以及其组合的抗体。在一些实施方案中,所述检查点抑制剂多肽是选自阿特殊单抗、阿维鲁单抗或德瓦鲁单抗的抗PD-L1抗体。在另一个实施方案中,所述检查点抑制剂多肽是选自曲美木单抗或伊匹单抗的抗CTLA-4抗体。在其他实施方案中,所述检查点抑制剂多肽是选自纳武单抗或派姆单抗的抗PD1抗体。

[0057] 在一个实施方案中,所述免疫检查点调节剂以足以向所述受试者递送100-300mg的剂量水平施用。在一些实施方案中,所述免疫检查点调节剂以足以向所述受试者递送200mg的剂量水平施用。在一些实施方案中,所述免疫检查点调节剂通过静脉内输注施用。在一个实施方案中,所述免疫检查点调节剂向所述受试者施用两次、三次、四次或更多次。在一些实施方案中,所述免疫检查点调节剂在与所述mRNA疫苗施用同一天施用至所述受试者。

[0058] 在一些实施方案中,所述癌症是选自由以下组成的组:非小细胞肺癌(NSCLC)、小细胞肺癌、黑素瘤、膀胱尿路上皮癌、HPV阴性头颈鳞状细胞癌(HNSCC)以及为微卫星高(MSI H)/错配修复(MMR)缺陷型的实体恶性肿瘤。在一个实施方案中,所述NSCLC缺乏EGFR敏化突变和/或ALK易位。在另一个实施方案中,为微卫星高(MSI H)/错配修复(MMR)缺陷型的实体恶性肿瘤是选自由以下组成的组:结肠直肠癌、胃腺癌、食道腺癌和子宫内膜癌。在一些实施方案中,癌症是选自胰腺癌、腹膜癌、大肠癌、小肠癌、胆道癌、肺癌、子宫内膜癌、卵巢癌、生殖道癌、胃肠道癌、子宫颈癌、胃癌、泌尿道癌、结肠癌、直肠癌以及造血和淋巴组织癌症。

[0059] 本发明在一些方面是一种mRNA癌症疫苗,所述mRNA癌症疫苗具有在脂质纳米粒子中配制的一种或多种mRNA,所述一种或多种mRNA各自具有编码癌抗原肽表位的开放阅读框,其中所述mRNA疫苗编码5-100个肽表位并且所述肽表位中的至少两个是个人化癌抗原;和药学上可接受的载体或赋形剂。

[0060] 在其他方面,本发明是一种mRNA癌症疫苗,所述mRNA癌症疫苗具有一种或多种mRNA,所述一种或多种mRNA各自具有编码癌抗原肽表位的开放阅读框,其中所述mRNA疫苗编码5-100个肽表位,并且所述肽表位中的至少三个是复杂变体,并且所述肽表位中的至少两个是点突变;和药学上可接受的载体或赋形剂。

[0061] 在一些实施方案中,所述脂质纳米粒子包含约20%-60%阳离子脂质;5%-25%非阳离子脂质;25%-55%固醇;以及0.5%-15%PEG修饰的脂质的摩尔比。在一些实施方案中,所述阳离子脂质选自由以下组成的组:例如2,2-二亚油基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-

二氧戊环 (DLin-KC2-DMA)、二亚油基-甲基-4-二甲基氨基丁酸酯 (DLin-MC3-DMA) 以及二((Z)-壬-2-烯-1-基) 9-((4-(二甲基氨基) 丁酰基) 氧基) 十七烷二酸酯 (L319)。在其他实施方案中,所述脂质纳米粒子包含式 (I) 化合物。在一些实施方案中,所述式 (I) 化合物是化合物 25。

[0062] 在一些实施方案中,所述脂质纳米粒子具有小于0.4的多分散性值。在一些实施方案中,所述脂质纳米粒子在中性pH值下具有净中性电荷。

[0063] 所述疫苗在一些实施方案中是具有开放阅读框的mRNA,所述开放阅读框编码由5-100个肽表位组成的多联癌抗原。在其他实施方案中,所述肽表位中的至少两个通过单个甘氨酸彼此隔开。在其他实施方案中,所述多联癌抗原包含20-40个肽表位。在一些实施方案中,所有肽表位都通过单个甘氨酸彼此隔开。在一些实施方案中,所述肽表位中的至少两个在没有接头的情况下彼此直接连接。

[0064] 实施方案中的每个肽表位包含25-35个氨基酸并且包括位于中心的SNP突变。

[0065] 在一些实施方案中,至少30%的肽表位对来自受试者的I类MHC分子具有最高亲和力。在其他实施方案中,至少30%的肽表位对来自受试者的II类MHC分子具有最高亲和力。在其他实施方案中,至少50%的肽表位对HLA-A、HLA-B和/或DRB1具有IC₅₀>500nM的预测结合亲和力。

[0066] 在一些实施方案中,本发明的一种或多种mRNA编码多达20个肽表位。在一些实施方案中,本发明的一种或多种mRNA编码多达50个表位。在一些实施方案中,本发明的一种或多种mRNA编码多达100个表位。

[0067] 根据其他实施方案,编码肽表位的mRNA被排列成使得所述肽表位被排序以使假表位最少。

[0068] 每个肽表位可包含31个氨基酸,并且包括位于中心的SNP突变,在所述SNP突变的每侧上具有15个侧接氨基酸。

[0069] 在一些实施方案中,每个表位的TCR面与内源性蛋白具有低相似性。

[0070] 在其他实施方案中,所述mRNA还包含回忆抗原。所述回忆抗原可以是感染性疾病抗原。

[0071] 在其他实施方案中,所述肽表位中的至少一个是传统癌抗原。所述疫苗在一些实施方案中包含具有编码一种或多种复发多态性的开放阅读框的mRNA。所述一种或多种复发多态性可包含p53中的复发体细胞癌突变。p53中的一种或多种复发体细胞癌突变在一些实施方案中是选自以下组成的组:(A)在典型5'剪接位点邻近密码子p.T125处的突变,从而诱导具有肽序列TAKSVTCTVSCPEGLASMRLQCLAVSPCISFVWNFGIPLHPLASCQCFFIVYPLNV (SEQ ID NO:232)的保留内含子,所述肽序列含有表位AVSPCISFVW (SEQ ID NO:233) (HLA-B*57:01, HLA-B*58:01)、HPLASCQCFF (SEQ ID NO:234) (HLA-B*35:01、HLA-B*53:01)、FVWNFGIPL (SEQ ID NO:235) (HLA-A*02:01,HLA-A*02:06,HLA-B*35:01);(B)在典型5'剪接位点邻近密码子p.331处的突变,从而诱导具有肽序列EYFTLQVLSLGTSYQVESFQSNTQNAVFFLTVPALGAFAIRGQ (SEQ ID NO:236)的保留内含子,所述肽序列含有表位LQVLSLGTSY (SEQ ID NO:237) (HLA-B*15:01)、FQSNTQNAV (SEQ ID NO:238) (HLA-B*15:01);(C)在典型3'剪接位点邻近密码子p.126处的突变,从而诱导隐蔽选择性外显子3'剪接位点,其产生含有表位CTMFCQLAK (SEQ ID NO:240) (HLA-A*11:01),KSVTCTMF (SEQ ID NO:241) (HLA-B*58:01)的新型跨越肽序列

AKSVTCTMFCQLAK (SEQ ID NO:239); 和/或 (D) 在典型5' 剪接位点邻近密码子p.224处的突变,从而诱导隐蔽选择性内含子5' 剪接位点,其产生含有表位VPYEPPEVW (SEQ ID NO:243) (HLA-B*53:01,HLA-B*51:01)、LTVPPSTAW (SEQ ID NO:244) (HLA-B*58:01,HLA-B*57:01) 的新型跨越肽序列VPYEPPEVWLALTVPSTAWAA (SEQ ID NO:242),其中转录物密码子位置涉及来自Ensembl v83人基因组注释的典型全长p53转录物ENST00000269305 (SEQ ID NO:245)。

[0072] 在一些实施方案中,所述mRNA还包含编码免疫检查点调节剂的开放阅读框。在一些实施方案中,所述mRNA癌症疫苗包含免疫检查点调节剂。在一些实施方案中,所述免疫检查点调节剂是抑制性检查点多肽。在一些实施方案中,所述抑制性检查点多肽是特异性地结合至选自PD-1、TIM-3、VISTA、A2AR、B7-H3、B7-H4、BTLA、CTLA-4、IDO、KIR和LAG3组成的组的分子的抗体或其片段。在一些实施方案中,所述抑制性检查点多肽是抗CTLA4或抗PD1抗体。在一些实施方案中,所述抗PD1抗体是派姆单抗。

[0073] 在一些实施方案中,所述mRNA癌症疫苗不包含稳定剂。

[0074] 在一些实施方案中,所述mRNA包含至少一种化学修饰。所述化学修饰可以是选自以下组成的组:假尿苷、N1-甲基假尿苷、2-硫代尿苷、4'-硫代尿苷、5-甲基胞嘧啶、2-硫代-1-甲基-1-脱氮-假尿苷、2-硫代-1-甲基-假尿苷、2-硫代-5-氮杂-尿苷、2-硫代-二氢假尿苷、2-硫代-二氢尿苷、2-硫代-假尿苷、4-甲氧基-2-硫代-假尿苷、4-甲氧基-假尿苷、4-硫代-1-甲基-假尿苷、4-硫代-假尿苷、5-氮杂-尿苷、二氢假尿苷、5-甲基尿苷、5-甲基尿苷、5-甲氧基尿苷以及2'-O-甲基尿苷。

[0075] 在其他方面,提供了一种用于对受试者接种疫苗的方法。所述方法涉及向患有癌症的受试者施用本文公开的mRNA疫苗。

[0076] 在一些实施方案中,所述mRNA疫苗以足以向所述受试者递送10 μ g与400 μ g之间的所述mRNA疫苗的剂量水平施用。在一些实施方案中,所述mRNA疫苗以足以向所述受试者递送0.033mg、0.1mg、0.2mg或0.4mg的剂量水平施用。在一些实施方案中,所述mRNA疫苗向所述受试者施用两次、三次、四次或更多次。在一些实施方案中,所述mRNA疫苗每三周一天一次施用。

[0077] 在一些实施方案中,所述mRNA疫苗通过皮内、肌内和/或皮下施用来施用。在一些实施方案中,所述mRNA疫苗通过肌内施用来施用。

[0078] 在一些实施方案中,所述方法还包括向所述受试者施用另外的癌症治疗剂;任选地,其中所述另外的癌症治疗剂是免疫检查点调节剂。在一些实施方案中,所述免疫检查点调节剂是抑制性检查点多肽。在一些实施方案中,所述抑制性检查点多肽是特异性地结合至选自PD-1、TIM-3、VISTA、A2AR、B7-H3、B7-H4、BTLA、CTLA-4、IDO、KIR和LAG3组成的组的分子的抗体或其片段。在一些实施方案中,所述抑制性检查点多肽是抗PD1抗体。在一些实施方案中,所述抗PD1抗体是派姆单抗。

[0079] 在一些实施方案中,所述免疫检查点调节剂以足以向所述受试者递送100-300mg的剂量水平施用。在一些实施方案中,所述免疫检查点调节剂以足以向所述受试者递送200mg的剂量水平施用。

[0080] 在一些实施方案中,所述免疫检查点调节剂通过静脉内输注施用。

[0081] 在一些实施方案中,所述免疫检查点调节剂向所述受试者施用两次、三次、四次或更多次。在一些实施方案中,所述免疫检查点调节剂在与所述mRNA疫苗施用同一天施用至

所述受试者。

[0082] 在一些实施方案中,所述癌症是选自由以下组成的组:非小细胞肺癌(NSCLC)、小细胞肺癌、黑素瘤、膀胱尿路上皮癌、HPV阴性头颈鳞状细胞癌(HNSCC)以及为微卫星高(MSI H)/错配修复(MMR)缺陷型的实体恶性肿瘤。在一些实施方案中,所述NSCLC缺乏EGFR敏化突变和/或ALK易位。在一些实施方案中,为微卫星高(MSI H)/错配修复(MMR)缺陷型的实体恶性肿瘤是选自由以下组成的组:结肠直肠癌、胃腺癌、食道腺癌和子宫内膜癌。在一些实施方案中,癌症是选自胰腺癌、腹膜癌、大肠癌、小肠癌、胆道癌、肺癌、子宫内膜癌、卵巢癌、生殖道癌、胃肠道癌、子宫颈癌、胃癌、泌尿道癌、结肠癌、直肠癌以及造血和淋巴组织癌症。

[0083] 在其他方面提供一种用于制备mRNA癌症疫苗的方法。所述方法涉及从受试者中分离样品,鉴定所述样品中的多种癌抗原,测定来自所述多种癌抗原的免疫原性表位,制备具有编码所述癌抗原的开放阅读框的mRNA癌症疫苗。在本发明的其他方面提供一种产生包含1000与3000个之间的核苷酸的编码多联癌抗原的mRNA的方法。所述方法涉及

[0084] (a) 使包含编码如前述权利要求中任一项所述的癌抗原的开放阅读框的第一多核苷酸和包含5'-UTR的第二多核苷酸结合至与固体支撑物缀合的多核苷酸;

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

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

[0087] (d) 使所述第二连接产物从所述固体支撑物释放,

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

[0089] 在其他方面,本发明是一种mRNA癌症疫苗,其包含根据本文所述的方法可制备的多联癌抗原。

[0090] 根据本发明的其他方面提供一种用个人化mRNA癌症疫苗治疗受试者的方法。所述方法涉及通过分析来自所述样品的患者转录物组和/或患者外显子组来鉴定一组新表位以产生患者特异性突变组,基于MHC结合强度、MHC结合多样性、预测的免疫原性程度、低自身反应性和/或T细胞反应性来从所述突变组选择一组用于疫苗的新表位,制备所述mRNA疫苗以编码所述一组新表位,以及在从所述受试者分离所述样品的2个月内向所述受试者施用所述mRNA疫苗。在一些实施方案中,所述鉴定包括从来自所述受试者的样品分析患者转录组和/或患者外显子组。在一些实施方案中,来自所述受试者的样品是生物样品,例如活组织检查。在一些实施方案中,所述方法还包括从所述受试者分离所述样品。在一些实施方案中,所述鉴定包括分析可用数据库中的组织特异性表达。

[0091] 在本发明的其他方面提供一种鉴定用于个人化mRNA癌症疫苗中的一组新表位的方法,所述癌症疫苗具有一种或多种编码所述一组新表位的多核苷酸。所述方法涉及:

[0092] a. 通过分析患者转录物组和患者外显子组来鉴定患者特异性突变组,

[0093] b. 使用所述新表位的基于以下中的至少三者的加权值来从所述突变组选择15-500种新表位的子集:在患者RNA测序中对基因或转录物水平表达的评估;变体识别置信度评分;RNA测序等位基因特异性表达;保守性氨基酸取代相对于非保守性氨基酸取代;点突变的位置(关于增加的TCR接合的中心化评分);点突变的位置(关于差异性HLA结合的锚定评分);自身性:与患者WES数据具有<100%核心表位同源性;HLA-A和HLA-B对8聚体-11聚

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

[0094] c. 基于最高加权值来从所述子集选择所述一组用于个人化mRNA癌症疫苗中的新表位,其中所述一组新表位包含15-40种新表位。

[0095] 本发明在一些方面是一种或多种mRNA的mRNA癌症疫苗,所述一种或多种mRNA各自具有编码癌抗原肽表位的开放阅读框,其中所述mRNA还包含miRNA结合位点。在一些实施方案中,所述疫苗编码5-100个肽表位。

[0096] 在一些实施方案中,本文所述的核酸疫苗被化学修饰。在其他实施方案中,所述核酸疫苗未被修饰。

[0097] 其他方面提供用于对受试者接种疫苗的组合物和对受试者接种疫苗的方法,所述方法包括向所述受试者施用包含一种或多种具有编码癌抗原表位的开放阅读框的RNA多核苷酸的核酸疫苗,其中所述RNA多核苷酸不包括稳定化元件,并且其中佐剂不与所述疫苗共同配制或共同施用。

[0098] 在其他方面,本发明是一种用于对受试者接种疫苗的组合物或对受试者接种疫苗的方法,所述方法包括向所述受试者施用包含一种或多种具有编码第一癌抗原表位的开放阅读框的RNA多核苷酸的核酸疫苗,其中向所述受试者施用10 μ g/kg与400 μ g/kg之间的剂量的所述核酸疫苗。在一些实施方案中,RNA多核苷酸的剂量是每剂1-5 μ g、5-10 μ g、10-15 μ g、15-20 μ g、10-25 μ g、20-25 μ g、20-50 μ g、30-50 μ g、40-50 μ g、40-60 μ g、60-80 μ g、60-100 μ g、50-100 μ g、80-120 μ g、40-120 μ g、40-150 μ g、50-150 μ g、50-200 μ g、80-200 μ g、100-200 μ g、120-250 μ g、150-250 μ g、180-280 μ g、200-300 μ g、50-300 μ g、80-300 μ g、100-300 μ g、40-300 μ g、50-350 μ g、100-350 μ g、200-350 μ g、300-350 μ g、320-400 μ g、40-380 μ g、40-100 μ g、100-400 μ g、200-400 μ g或300-400 μ g。在一些实施方案中,所述核酸疫苗通过皮内或肌内注射施用至受试者。在一些实施方案中,所述核酸疫苗在第零天施用至受试者。在一些实施方案中,所述核酸疫苗的第二剂量在第二十一天施用至受试者。

[0099] 在一些实施方案中,25微克剂量的RNA多核苷酸包含于施用至受试者的核酸疫苗中。在一些实施方案中,100微克剂量的RNA多核苷酸包含于施用至受试者的核酸疫苗中。在一些实施方案中,50微克剂量的RNA多核苷酸包含于施用至受试者的核酸疫苗中。在一些实施方案中,75微克剂量的RNA多核苷酸包含于施用至受试者的核酸疫苗中。在一些实施方案中,150微克剂量的RNA多核苷酸包含于施用至受试者的核酸疫苗中。在一些实施方案中,400微克剂量的RNA多核苷酸包含于施用至受试者的核酸疫苗中。在一些实施方案中,200微克剂量的RNA多核苷酸包含于施用至受试者的核酸疫苗中。在一些实施方案中,所述RNA多核苷酸在局部淋巴结中相较于远端淋巴结中以高100倍的水平累积。在其他实施方案中,核酸疫苗被化学修饰,并且在其他实施方案中,核酸疫苗未被化学修饰。

[0100] 在一些实施方案中,有效量是1-100 μ g的总剂量。在一些实施方案中,有效量是100 μ g的总剂量。在一些实施方案中,有效量是向受试者施用总计一次或两次的25 μ g的剂量。在一些实施方案中,有效量是向受试者施用总计两次的100 μ g的剂量。在一些实施方案中,有

效量是1 μ g-10 μ g、1 μ g-20 μ g、1 μ g-30 μ g、5 μ g-10 μ g、5 μ g-20 μ g、5 μ g-30 μ g、5 μ g-40 μ g、5 μ g-50 μ g、10 μ g-15 μ g、10 μ g-20 μ g、10 μ g-25 μ g、10 μ g-30 μ g、10 μ g-40 μ g、10 μ g-50 μ g、10 μ g-60 μ g、15 μ g-20 μ g、15 μ g-25 μ g、15 μ g-30 μ g、15 μ g-40 μ g、15 μ g-50 μ g、20 μ g-25 μ g、20 μ g-30 μ g、20 μ g-40 μ g、20 μ g-50 μ g、20 μ g-60 μ g、20 μ g-70 μ g、20 μ g-75 μ g、30 μ g-35 μ g、30 μ g-40 μ g、30 μ g-45 μ g、30 μ g-50 μ g、30 μ g-60 μ g、30 μ g-70 μ g、30 μ g-75 μ g的剂量,其可向受试者施用总计一次或两次或更多次。

[0101] 本发明的方面提供一种核酸疫苗,所述核酸疫苗包含一种或多种具有编码第一抗原多肽的开放阅读框的RNA多核苷酸,其中所述RNA多核苷酸不包含稳定化元件;以及药学上可接受的载体或赋形剂,其中佐剂不包含于所述疫苗中。在一些实施方案中,稳定化元件是组蛋白茎-环。在一些实施方案中,稳定化元件是相对于野生型序列具有增加的GC含量的核酸序列。

[0102] 方面提供核酸疫苗,所述核酸疫苗包含一种或多种具有包含至少一种化学修饰或任选地不包含化学修饰的开放阅读框的RNA多核苷酸,所述开放阅读框编码第一抗原多肽,其中所述RNA多核苷酸存在于用于体内施用至受试者以使得所述受试者中的抗原表达水平显著超过由具有稳定元件或与佐剂一起配制且编码所述第一抗原多肽的mRNA疫苗产生的抗原表达水平的制剂中。

[0103] 其他方面提供核酸疫苗,所述核酸疫苗包含一种或多种具有包含至少一种化学修饰或任选地不包含化学修饰的开放阅读框的RNA多核苷酸,所述开放阅读框编码第一抗原多肽,其中所述疫苗具有比未修饰的mRNA疫苗产生等效抗体效价所需的少至少10倍的RNA多核苷酸。

[0104] 本发明的方面还提供一种被配制用于递送至人受试者的单位使用疫苗,所述疫苗包含10 μ g与400 μ g之间的一种或多种具有包含至少一种化学修饰或任选地不包含化学修饰的开放阅读框的RNA多核苷酸,所述开放阅读框编码第一抗原多肽;以及药学上可接受的载体或赋形剂。在一些实施方案中,所述疫苗还包含阳离子脂质纳米粒子。

[0105] 本发明的方面提供了试剂盒,所述试剂盒包括含有本文公开的mRNA癌症疫苗的小瓶。在一些实施方案中,所述小瓶含有0.1mg至1mg的mRNA。在一些实施方案中,所述小瓶含有0.35mg的mRNA。在一些实施方案中,mRNA的浓度是1mg/mL。

[0106] 在一些实施方案中,所述小瓶含有5-15mg的总脂质。在一些实施方案中,所述小瓶含有7mg的总脂质。在一些实施方案中,总脂质的浓度是20mg/mL。

[0107] 在一些实施方案中,所述mRNA癌症疫苗是液体。

[0108] 在一些实施方案中,所述试剂盒还包括注射器。在一些实施方案中,所述注射器适合于肌肉施用。

[0109] 本发明的方面提供对受试者接种疫苗的方法,所述方法包括以有效量向所述受试者施用25 μ g/kg与400 μ g/kg之间的单次剂量的核酸疫苗以对所述受试者接种疫苗,所述核酸疫苗包含一种或多种具有编码第一抗原多肽的开放阅读框的RNA多核苷酸。

[0110] 本发明在一些方面是一种mRNA癌症疫苗,其可包含活化致癌基因突变作为抗原。在一些实施方案中,所述活化致癌基因突变是KRAS突变。在一些实施方案中,所述KRAS突变是G12突变。在一些实施方案中,G12 KRAS突变是选自G12D、G12V、G12S、G12C、G12A以及G12R KRAS突变,例如,所述G12 KRAS突变是选自G12D、G12V和G12S KRAS突变。在其他实施方案中,所述KRAS突变是G13突变,例如,G13 KRAS突变是G13D KRAS突变。在一些实施方案中,所

述活化致癌基因突变是H-RAS或N-RAS突变。

[0111] 在一些实施方案中,熟练的技术人员将基于本文提供的指导选择KRAS突变、HLA亚型和肿瘤类型,并且制备用于治疗KRAS疫苗。在一些实施方案中,所述KRAS突变是选自:G12C、G12V、G12D、G13D。在一些实施方案中,所述HLA亚型是选自:A*02:01、C*07:01、C*04:01、C*07:02。在一些实施方案中,肿瘤类型是选自结肠直肠癌、胰腺癌、肺癌和子宫内膜样癌。

[0112] 在一些实施方案中,HRAS突变是在密码子12、密码子13或密码子61处的突变。在一些实施方案中,HRAS突变是12V、61L或61R突变。

[0113] 在一些实施方案中,NRAS突变是在密码子12、密码子13或密码子61处的突变。在一些实施方案中,NRAS突变是12D、13D、61K或61R突变。

[0114] 本公开的一些实施方案提供了一种包含mRNA的mRNA癌症疫苗,所述mRNA具有编码两种或更多种活化致癌基因突变肽的多联体的开放阅读框。在一些实施方案中,所述肽表位中的至少两个通过单个甘氨酸彼此隔开。在一些实施方案中,所述多联体包含3-10个活化致癌基因突变肽。在一些此类实施方案中,所有肽表位都通过单个甘氨酸彼此隔开。在其他实施方案中,所述肽表位中的至少两个在没有接头的情況下彼此直接连接。

[0115] 在一些实施方案中,所述mRNA癌症疫苗还包含癌症治疗剂。在一些实施方案中,所述mRNA癌症疫苗还包含抑制性检查点多肽。例如,在一些实施方案中,所述抑制性检查点多肽是特异性地结合至选自由PD-1、TIM-3、VISTA、A2AR、B7-H3、B7-H4、BTLA、CTLA-4、1D0、KIR和LAG3组成的组的分子的抗体或其片段。在其他实施方案中,所述mRNA癌症疫苗还包含回忆抗原。例如,在一些实施方案中,所述回忆抗原是感染性疾病抗原。

[0116] 在一些实施方案中,所述mRNA癌症疫苗不包含稳定剂。

[0117] 在一些实施方案中,所述mRNA被配制在脂质纳米粒子载体,如包含约20%-60%阳离子脂质:5%-25%非阳离子脂质:25%-55%固醇;以及0.5%-15%PEG修饰的脂质的摩尔比的脂质纳米粒子载体中。所述阳离子脂质可选自由以下组成的组:例如2,2-二亚油基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧戊环(DLin-KC2-DMA)、二亚油基-甲基-4-二甲基氨基丁酸酯(DLin-MC3-DMA)以及二((Z)-壬-2-烯-1-基)9-((4-(二甲基氨基)丁酰基)氧基)十七烷二酸酯(L319)。

[0118] 在一些实施方案中,所述mRNA包含至少一种化学修饰。所述化学修饰可以是选自由以下组成的组:假尿苷、N1-甲基假尿苷、2-硫代尿苷、4'-硫代尿苷、5-甲基胞嘧啶、2-硫代-1-甲基-1-脱氮-假尿苷、2-硫代-1-甲基-假尿苷、2-硫代-5-氮杂-尿苷、2-硫代-二氢假尿苷、2-硫代-二氢尿苷、2-硫代-假尿苷、4-甲氧基-2-硫代-假尿苷、4-甲氧基-假尿苷、4-硫代-1-甲基-假尿苷、4-硫代-假尿苷、5-氮杂-尿苷、二氢假尿苷、5-甲基尿苷、5-甲基尿苷、5-甲氧基尿苷以及2'-O-甲基尿苷。

[0119] 在其他方面,提供了一种用于治疗受试者的方法。所述方法涉及向患有癌症的受试者施用如前述实施方案中任一项所述的mRNA癌症疫苗。在一些实施方案中,所述mRNA癌症疫苗与癌症治疗剂组合施用。在一些实施方案中,所述mRNA癌症疫苗与抑制性检查点多肽组合施用。例如,在一些实施方案中,所述mRNA癌症疫苗是特异性地结合至选自由PD-1、TIM-3、VISTA、A2AR、B7-H3、B7-H4、BTLA、CTLA-4、1D0、KIR和LAG3组成的组的分子的抗体或其片段。

[0120] 本文提供的方法可用于治疗患有癌症的受试者。在一些实施方案中,癌症是选自胰腺癌、腹膜癌、大肠癌、小肠癌、胆道癌、肺癌、子宫内膜癌、卵巢癌、生殖道癌、胃肠道癌、子宫颈癌、胃癌、泌尿道癌、结肠癌、直肠癌以及造血和淋巴组织癌症。在一些实施方案中,癌症是结肠直肠癌。

[0121] 在一些实施方案中,施用至受试者的mRNA癌症疫苗的剂量是每剂1-5 μ g、5-10 μ g、10-15 μ g、15-20 μ g、10-25 μ g、20-25 μ g、20-50 μ g、30-50 μ g、40-50 μ g、40-60 μ g、60-80 μ g、60-100 μ g、50-100 μ g、80-120 μ g、40-120 μ g、40-150 μ g、50-150 μ g、50-200 μ g、80-200 μ g、100-200 μ g、120-250 μ g、150-250 μ g、180-280 μ g、200-300 μ g、50-300 μ g、80-300 μ g、100-300 μ g、40-300 μ g、50-350 μ g、100-350 μ g、200-350 μ g、300-350 μ g、320-400 μ g、40-380 μ g、40-100 μ g、100-400 μ g、200-400 μ g或300-400 μ g。在一些实施方案中,所述mRNA癌症疫苗通过皮内或肌内注射施用至受试者。在一些实施方案中,所述mRNA癌症疫苗在第零天施用至受试者。在一些实施方案中,所述mRNA癌症疫苗的第二剂量在第二十天施用至受试者。

[0122] 在一些实施方案中,25微克剂量的mRNA癌症疫苗被施用至受试者。在一些实施方案中,100微克剂量的mRNA癌症疫苗被施用至受试者。在一些实施方案中,50微克剂量的mRNA癌症疫苗被施用至受试者。在一些实施方案中,75微克剂量的mRNA癌症疫苗被施用至受试者。在一些实施方案中,150微克剂量的mRNA癌症疫苗被施用至受试者。在一些实施方案中,400微克剂量的mRNA癌症疫苗被施用至受试者。在一些实施方案中,200微克剂量的mRNA癌症疫苗被施用至受试者。在一些实施方案中,所述mRNA癌症疫苗在局部淋巴结中相较于远端淋巴结中以高100倍的水平累积。在其他实施方案中,所述mRNA癌症疫苗被化学修饰,并且在其他实施方案中,所述mRNA癌症疫苗未被化学修饰。

[0123] 在一些实施方案中,有效量是1-100 μ g的总剂量。在一些实施方案中,有效量是100 μ g的总剂量。在一些实施方案中,有效量是向受试者施用总计一次或两次的25 μ g的剂量。在一些实施方案中,有效量是向受试者施用总计两次的100 μ g的剂量。在一些实施方案中,有效量是1 μ g-10 μ g、1 μ g-20 μ g、1 μ g-30 μ g、5 μ g-10 μ g、5 μ g-20 μ g、5 μ g-30 μ g、5 μ g-40 μ g、5 μ g-50 μ g、10 μ g-15 μ g、10 μ g-20 μ g、10 μ g-25 μ g、10 μ g-30 μ g、10 μ g-40 μ g、10 μ g-50 μ g、10 μ g-60 μ g、15 μ g-20 μ g、15 μ g-25 μ g、15 μ g-30 μ g、15 μ g-40 μ g、15 μ g-50 μ g、20 μ g-25 μ g、20 μ g-30 μ g、20 μ g-40 μ g、20 μ g-50 μ g、20 μ g-60 μ g、20 μ g-70 μ g、20 μ g-75 μ g、30 μ g-35 μ g、30 μ g-40 μ g、30 μ g-45 μ g、30 μ g-50 μ g、30 μ g-60 μ g、30 μ g-70 μ g、30 μ g-75 μ g的剂量,其可向受试者施用总计一次或两次或更多次。

[0124] 本发明的方面提供产生包含1000与3000个之间的核苷酸的编码多联癌抗原的mRNA的方法,所述方法包括:(a)使包含编码如权利要求1-103中任一项所述的癌抗原的开放阅读框的第一多核苷酸和包含5'-UTR的第二多核苷酸结合至与固体支撑物缀合的多核苷酸;(b)使所述第二多核苷酸的3'-末端在适合条件下连接至所述第一多核苷酸的5'-末端,其中所述适合条件包括DNA连接酶,由此产生第一连接产物;(c)使包含3'-UTR的第三多核苷酸的5'末端在适合条件下连接至所述第一连接产物的3'-末端,其中所述适合条件包括RNA连接酶,由此产生第二连接产物;以及(d)使所述第二连接产物从所述固体支撑物释放,由此产生包含1000与3000个之间的核苷酸的编码多联癌抗原的mRNA。

[0125] 本发明的方面提供用个人化mRNA癌症疫苗治疗受试者的方法,所述方法包括:鉴定一组新表位以产生患者特异性突变组,基于MHC结合强度、MHC结合多样性、预测的免疫原性程度、低自身反应性和/或T细胞反应性来从所述突变组选择一组用于疫苗的新表位,制

备所述mRNA疫苗以编码所述一组新表位,以及在从所述受试者分离所述样品的2个月内向所述受试者施用所述mRNA疫苗。

[0126] 本发明的方面提供鉴定用于个人化mRNA癌症疫苗中的一组新表位的方法,所述癌症疫苗具有一种或多种编码所述一组新表位的多核苷酸,所述方法包括:(a)通过分析患者转录物组和患者外显子组来鉴定患者特异性突变组,(b)使用所述新表位的基于以下中的至少三者的加权值来从所述突变组选择15-500种新表位的子集:在患者RNA测序中对基因或转录物水平表达的评估;变体识别置信度评分;RNA测序等位基因特异性表达;保守性氨基酸取代相对于非保守性氨基酸取代;点突变的位置(关于增加的TCR接合的中心化评分);点突变的位置(关于差异性HLA结合的锚定评分);自身性:与患者WES数据具有<100%核心表位同源性;HLA-A和HLA-B对8聚体-11聚体的IC50;HLA-DRB1对15聚体-20聚体的IC50;杂乱评分;HLA-C对8聚体-11聚体的IC50;HLA-DRB3-5对15聚体-20聚体的IC50;HLA-DQB1/A1对15聚体-20聚体的IC50;HLA-DPB1/A1对15聚体-20聚体的IC50;I类相对于II类比例;涵盖的患者HLA-A、HLA-B和DRB1同种异型的多样性;点突变相对于复杂表位的比例;假表位HLA结合评分;RNA测序读段的存在和/或丰度,以及(c)基于最高加权值来从所述子集选择所述一组用于个人化mRNA癌症疫苗中的新表位,其中所述一组新表位包含15-40种新表位。

[0127] 本发明的方面提供鉴定用于个人化mRNA癌症疫苗中的一组新表位的方法,所述癌症疫苗具有一种或多种编码所述一组新表位的多核苷酸,所述方法包括:(a)生成来自患者肿瘤的RNA测序样品以产生一组RNA测序读段,(b)编译来自所有RNA测序读段的核苷酸序列的总计数,(c)比较肿瘤样品与相同组织类型的正常组织的相应数据库之间的序列信息,以及(d)基于最高加权值来从所述子集选择所述一组用于个人化mRNA癌症疫苗中的新表位,其中所述一组新表位包含15-40种新表位。

[0128] 本发明的各种实施方案的细节在以下描述中阐述。本发明的其他特征、目的和优点将是本发明的描述和附图以及权利要求清楚的。

附图说明

[0129] 前述和其他目的、特征以及优点将是如从在附图中示出的本发明的具体实施方案的以下描述清楚的,在附图中相同参考符号贯穿不同视图指代相同部分。附图未必按比例绘制,而是将重点放在示出本发明的各种实施方案的原理上。

[0130] 图1示出多联体的完全通读的确认(SIINFELK是SEQ ID NO:231)。

[0131] 图2示出在两种构建体中发现的对I类表位的抗原特异性应答。

[0132] 图3示出仅在52聚体构建体中发现的对I类表位的抗原特异性应答。

[0133] 图4示出在两种构建体(左)中发现的和仅在52聚体构建体(右)中发现的对II类表位的抗原特异性应答。

[0134] 图5是可在其上实施一些实施方案的示例性计算机系统的方块图。

[0135] 图6示出来自用编码52个鼠表位的多联体的mRNA(添加表位_4a_DX_RX_perm)与在不同抗原和STING剂量以及抗原:STING比率下的STING免疫增效剂mRNA的组合免疫的小鼠的抗原特异性应答。所示的数据是针对用对应于在所述多联体内编码的II类表位RNA2的肽序列体外再刺激。

[0136] 图7示出来自用编码52个鼠表位的多联体的mRNA(添加表位_4a_DX_RX_perm)与在

不同抗原和STING剂量以及抗原:STING比率下的STING免疫增效剂mRNA的组合免疫的小鼠的抗原特异性应答。所示的数据是针对用对应于在所述多联体内编码的II类表位RNA3的肽序列体外再刺激。

[0137] 图8示出来自用编码52个鼠表位的多联体的mRNA(添加表位_4a_DX_RX_perm)与在不同抗原和STING剂量以及抗原:STING比率下的STING免疫增效剂mRNA的组合免疫的小鼠的抗原特异性应答。所示的数据是针对用对应于在所述多联体内编码的I类表位RNA7的肽序列体外再刺激。

[0138] 图9示出来自用编码52个鼠表位的多联体的mRNA(添加表位_4a_DX_RX_perm)与在不同抗原和STING剂量以及抗原:STING比率下的STING免疫增效剂mRNA的组合免疫的小鼠的抗原特异性应答。所示的数据是针对用对应于在所述多联体内编码的I类表位RNA13的肽序列体外再刺激。

[0139] 图10示出来自用编码52个鼠表位的多联体的mRNA(添加表位_4a_DX_RX_perm)与在不同抗原和STING剂量以及抗原:STING比率下的STING免疫增效剂mRNA的组合免疫的小鼠的抗原特异性应答。所示的数据是针对用对应于在所述多联体内编码的I类表位RNA22的肽序列体外再刺激。

[0140] 图11示出来自用编码52个鼠表位的多联体的mRNA(添加表位_4a_DX_RX_perm)与在不同抗原和STING剂量以及抗原:STING比率下的STING免疫增效剂mRNA的组合免疫的小鼠的抗原特异性应答。所示的数据是针对用对应于在所述多联体内编码的II类表位RNA10的肽序列体外再刺激。

[0141] 图12是示出与标准佐剂或未配制的(未包封于LNP中)相比,来自用编码20个鼠表位(RNA 31)的多联体的mRNA与STING免疫增效剂mRNA的组合免疫的小鼠的抗原特异性IFN- γ T应答的条形图。所示的数据是针对用在所述多联体内编码的II类表位(RNA 2和RNA 3)体外肽再刺激。

[0142] 图13是示出与标准佐剂或未配制的(未包封于LNP中)相比,来自用编码20个鼠表位(RNA 31)的多联体的mRNA与STING免疫增效剂mRNA的组合免疫的小鼠的抗原特异性IFN- γ T应答的条形图。所示的数据是针对用在所述多联体内编码的I类表位(RNA 7、RNA 10和RNA 13)体外肽再刺激。

[0143] 图14是示出来自用编码20个鼠表位(RNA 31)的多联体的mRNA与STING免疫增效剂mRNA的组合免疫的小鼠的抗原特异性IFN- γ T应答的条形图,其中STING构建体与疫苗同时施用、在24小时后或48小时后施用。所示的数据是针对用在所述多联体内编码的II类表位(RNA 2和RNA 3)或I类表位(RNA 7、RNA 10、RNA 13)体外肽再刺激。

[0144] 图15描绘如在COSMIC,2012数据集中鉴定的结肠直肠癌中的KRAS突变。

[0145] 图16描绘对HRAS的同种型特异性点突变特异性。从COSMIC v52释放中整理表示具有每种点突变的肿瘤总数的数据。指示产生每种氨基酸取代的单碱基突变。每种癌症类型的每种同种型的最常见突变用灰色阴影突出显示。H/L:造血组织/淋巴组织。(Prior等人 Cancer Res.2012年5月15日;72(10):2457-2467)。

[0146] 图17描绘对KRAS的同种型特异性点突变特异性。从COSMIC v52释放中整理表示具有每种点突变的肿瘤总数的数据。指示产生每种氨基酸取代的单碱基突变。每种癌症类型的每种同种型的最常见突变用灰色阴影突出显示。H/L:造血组织/淋巴组织。(Prior等人

Cancer Res.2012年5月15日;72(10):2457-2467)。

[0147] 图18描绘对NRAS的同种型特异性点突变特异性。从COSMIC v52释放中整理表示具有每种点突变的肿瘤总数的数据。指示产生每种氨基酸取代的单碱基突变。每种癌症类型的每种同种型的最常见突变用灰色阴影突出显示。H/L:造血组织/淋巴组织。(Prior等人Cancer Res.2012年5月15日;72(10):2457-2467)。

[0148] 图19描绘在获得EGFR阻断抗性后的继发性KRAS突变。(Diaz等人The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers,Nature 486:537(2012))。

[0149] 图20描绘在EGFR阻断后的继发性KRAS突变。(Misale等人Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer,Nature 486:532(2012))。

[0150] 图21描绘如使用cBioPortal鉴定的结肠直肠癌中的NRAS和KRAS突变频率。

具体实施方式

[0151] 本公开的实施方案提供包含编码癌抗原的多核苷酸的RNA(例如mRNA)疫苗。如本文提供的癌症RNA疫苗可用于诱导平衡免疫应答,其包括细胞免疫性和/或体液免疫性,而无与DNA疫苗接种相关的许多风险。在一些实施方案中,疫苗包含至少一种具有编码癌抗原的开放阅读框的RNA(例如,mRNA)多核苷酸。在一些实施方案中,疫苗包含至少一种具有至少一个编码癌抗原的开放阅读框和至少一个编码通用II型T细胞表位的开放阅读框的RNA(例如,mRNA)多核苷酸。在另一个实施方案中,疫苗包含至少一种具有至少一个编码癌抗原的开放阅读框和至少一个编码免疫增效剂(例如,佐剂)的开放阅读框的RNA(例如,mRNA)多核苷酸。在一些实施方案中,疫苗包含至少一种具有编码癌抗原(例如,活化致癌基因突变肽)的开放阅读框的RNA(例如,mRNA)多核苷酸。

[0152] 尽管已试图产生功能性RNA疫苗,包括mRNA癌症疫苗,但这些RNA疫苗的治疗功效尚未被充分确定。非常出人意料地,本发明者已发现一类用于递送mRNA疫苗的制剂,所述类别的制剂产生显著增强的并且在许多方面具有协同作用的免疫应答,包括增强的T细胞应答。本发明的疫苗包括传统癌症疫苗以及个人化癌症疫苗。在一些方面,本发明涉及脂质纳米粒子制剂使包括化学修饰的mRNA疫苗和未修饰mRNA疫苗的mRNA疫苗的有效性显著增强的出人意料地发现。

[0153] 本文所述的研究中使用的脂质纳米粒子先前已用于在各种动物模型中以及在人中递送siRNA。鉴于与脂质纳米粒子制剂的siRNA递送相关的观察结果,与脂质体相比,脂质纳米粒子在癌症疫苗中有用的事实是非常出人意料的。已观察到在脂质纳米粒子中配制的siRNA的治疗性递送导致与短暂IgM应答相关的不合需要的炎症性应答,从而通常导致抗原产生减少和免疫应答受损。与在siRNA情况下观察到的研究结果不同,证明了本文描述的脂质纳米粒子-mRNA癌症疫苗制剂会产生对于防治方法和治疗方法足够的增强的IgG水平,而非短暂IgM应答。本发明的脂质纳米粒子不是脂质体。如本文所用的脂质体是具有脂质双层或单层壳的基于脂质的结构,在核心中具有核酸有效负载。

[0154] 产生引发针对在疫苗开发中所靶向的多肽序列的所需免疫应答(例如T细胞应答)的癌抗原仍然是一项具有挑战的任务。本发明涉及克服与这种开发相关的障碍的技术。通

过使用本发明的技术,有可能通过选择适当的T细胞或B细胞癌表位以及配制表位或抗原以达成有效体内递送来调适所需免疫应答。另外或可替代地,通过选择除了适当的T细胞和/或B细胞癌表位或抗原之外待递送的一种或多种通用II型T细胞表位,可进一步增强免疫应答。

[0155] 另外或可替代地,mRNA疫苗可包含活化致癌基因突变肽(例如,KRAS突变肽)。先前的研究显示了提高对致癌突变具有特异性的T细胞的能力有限。此研究的大部分是在最常见的HLA等位基因(A2,其在约50%的高加索人中出现)的背景下进行的。最近的工作已经探索了在较不常见的HLA等位基因(A11,C8)背景下产生针对点突变的特异性T细胞。这些发现对癌症的治疗具有重要意义。致癌突变在许多癌症中常见。靶向这些突变并产生足以杀死肿瘤的T细胞的能力对癌症治疗具有广泛适用性。非常出人意外的,使用mRNA递送抗原将相对于肽疫苗的递送具有如此显著的优点。因此,在一些方面,本发明涉及出人意外的发现,即以mRNA形式体内递送的致癌突变抗原显著增强癌症治疗的有效性。

[0156] HLA I类分子是由两条多肽链(重链和轻链)组成的高度多态性跨膜糖蛋白。人白细胞抗原(人类中的主要组织相容性复合物)对每个个体都具有特异性并且具有遗传特征。I类重链由三种基因编码:HLA-A、HLA-B和HLA-C。HLA I类分子对于通过向T淋巴细胞呈递内源性抗原来建立免疫应答是重要的,其起始导致细胞毒性T细胞消除肿瘤细胞的一系列免疫反应。HLA I类抗原的产生的水平改变是恶性肿瘤中的普遍现象,并且伴随对抗肿瘤T细胞功能的显著抑制。它代表癌细胞用于逃避免疫监视的主要机制之一。在90%的NSCLC肿瘤(n=65)中检测到下调的HLA I类抗原水平。在76%的胰腺肿瘤样品(n=19)中检测到HLA的减少或丧失。在96%的肿瘤样品(n=25)中,HLA I类抗原在结肠癌中的表达显著降低或检测不到。

[0157] 越来越多的证据表明,肿瘤细胞利用两种一般策略来逃避免疫监视:免疫选择(免疫原性差的肿瘤细胞变体)和免疫颠覆(免疫系统的颠覆)。证实了HLA I类抗原的变化与KRAS密码子12突变的存在之间的相关性,这表明KRAS密码子12突变对癌症进展中的HLA I类抗原调控的可能诱导作用。预计许多常见的癌症突变以高亲和力($IC_{50} \leq 50nM$)结合HLA I类等位基因7并且可能适合于预防性癌症疫苗接种。

[0158] 治疗性mRNA可单独递送或与其他癌症治疗剂(如检查点抑制剂)组合递送,以提供针对肿瘤的显著增强的免疫应答。检查点抑制剂可通过消除促进免疫应答的一些障碍来增强编码活化致癌肽的mRNA的作用,从而允许活化的T细胞有效地促进针对肿瘤的免疫应答。

[0159] 已发现本文所述的mRNA疫苗在若干方面优于当前疫苗。首先,脂质纳米粒子(LNP)递送优于其他制剂,包括文献中所述的基于脂质体或鱼精蛋白的方法。使用LNP使得能够有效递送化学修饰的或未修饰的mRNA疫苗。经修饰的与未修饰的LNP配制mRNA疫苗两者均以显著程度优于常规疫苗。在一些实施方案中,本发明的mRNA疫苗在优越性方面是常规疫苗的至少10倍、20倍、40倍、50倍、100倍、500倍或1,000倍。

[0160] 尽管已试图产生功能性RNA疫苗,包括mRNA疫苗和自我复制性RNA疫苗,但这些RNA疫苗的治疗功效尚未被充分确定。非常出人意料地,根据本发明的方面,本发明人已发现一类用于在体内递送mRNA疫苗的制剂,所述类别的制剂产生显著增强的并且在许多方面具有协同作用的免疫应答,包括增强的抗原产生和具有中和能力的功能性抗体产生。即使当相较于在其他类别的基于脂质的制剂的情况下使用的mRNA剂量,施用显著更低剂量的mRNA

时,也可实现这些结果。本发明的制剂已显示足以确立功能性mRNA疫苗作为防治剂和治疗剂的功效的显著出人意外的体内免疫应答。另外,自我复制性RNA疫苗依赖于病毒复制路径来将足够RNA递送至细胞以产生免疫原性应答。本发明的制剂不需要病毒复制来产生足够蛋白质以导致强烈免疫应答。因此,本发明的mRNA不是自我复制性RNA,并且不包括为病毒复制所必需的组分。

[0161] 在一些方面,本发明涉及脂质纳米粒子(LNP)制剂使包括化学修饰的和未修饰的mRNA疫苗的mRNA疫苗的有效性显著增强的出人意外的发现。此外,发现对表位的免疫原性是相似的,与构建体内包含的表位的总数无关。与通过表位特异性IFN γ 应答测量的20聚体构建体相比,52聚体构建体中包含的表位具有相似的免疫原性。非常出人意料的是,增加的mRNA长度被证明对表位的免疫原性没有有害影响。在20聚体和52聚体中编码的最后一个表位(SIINFEKL, SEQ ID NO:231)具有可比性,这也表明多联体的完全通读。还出人意外的,发现当用组成型活性免疫增效剂配制疫苗时,对I类表位的抗原特异性应答增加。

[0162] 本文所述的研究中使用的LNP先前已用于在各种动物模型中以及在人中递送siRNA。鉴于与LNP制剂的siRNA递送相关的观察结果,LNP适用于疫苗中的事实是非常出人意外的。已经观察到,在LNP中配制的siRNA的治疗性递送引起与瞬时IgM应答相关的不希望的炎症应答,从而通常导致抗原产生减少和受损的免疫应答。与在siRNA情况下观察到的发现相比,本发明的LNP-mRNA制剂在本文中被证明产生增强的IgG水平,其足以用于预防性和治疗性方法而不是瞬时IgM应答。

[0163] mRNA癌症疫苗提供基于肽的疫苗或DNA疫苗的独特治疗替代方案。当将mRNA癌症疫苗递送至细胞时,mRNA将由细胞内机构加工成多肽,所述机构可接着将所述多肽加工成能够刺激针对肿瘤的免疫应答的免疫敏感性片段。

[0164] 在一些实施方案中,mRNA癌症疫苗可与抗癌治疗剂一起施用,所述抗癌治疗剂包括但不限于传统的癌症疫苗。可使mRNA癌症疫苗和抗癌治疗组合以使免疫治疗响应甚至进一步增强。mRNA癌症疫苗和其他治疗剂可同时或依序施用。当同时施用其他治疗剂时,它们可于同一制剂中加以施用,或处于单独制剂中,但在同时加以施用。当其他治疗剂的施用和mRNA癌症疫苗的施用在时间上分隔时,其他治疗剂彼此以及与mRNA癌症疫苗依序施用。施用这些化合物之间的时间分隔可以是大约数分钟,或它可更久,例如数小时、数天、数周、数月。其他治疗剂包括但不限于抗癌治疗、佐剂、细胞因子、抗体、抗原等。

[0165] 本文所述的癌症疫苗包括至少一种具有编码至少一种癌抗原多肽或其免疫原性片段(例如能够诱导对癌症的免疫应答的免疫原性片段)的开放阅读框的核糖核酸(RNA)多核苷酸。抗原肽可以是个人化癌抗原表位和/或复发抗原。在一些优选的实施方案中,疫苗是上述每种的混合物的多个表位。因此,癌症疫苗可以是传统或个人化癌症疫苗或其混合物。传统癌症疫苗是包括已知普遍见于癌或肿瘤中或见于特定类型的癌或肿瘤中的癌抗原的疫苗。在肿瘤细胞中或由肿瘤细胞表达的抗原被称为“肿瘤相关抗原”。特定肿瘤相关抗原可或可不也在非癌性细胞中表达。许多肿瘤突变在本领域中是已知的。

[0166] 已经出人意料地发现,基于RNA的多表位癌症疫苗(无论是配制为单独表位还是作为多联体)都可通过仔细平衡MHC I类表位和MHC II类表位来产生最佳免疫刺激。编码两种组分的RNA疫苗具有增强的免疫原性。

[0167] 举例来说,个人化疫苗可包含编码一种或多种已知的为肿瘤所特有的癌抗原或为

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

[0168] 用于产生个人化癌症疫苗的方法通常涉及例如使用深度核酸或蛋白质测序技术来鉴定突变,例如使用经验证肽-MHC结合预测算法的应用程序或其他分析技术来鉴定新表位以产生一组可结合患者HLA等位基因,并且基于肿瘤中存在的突变的候选T细胞表位,任选证明抗原特异性T细胞针对所选新表位,或证明候选新表位结合于肿瘤表面上的HLA蛋白,以及开发疫苗。本发明的mRNA癌症疫苗可包含单一新表位的多个拷贝、基于单一突变类型(即点突变)的多种不同新表位、基于多种突变类型的多种不同新表位、新表位和其他抗原,诸如肿瘤相关抗原或回忆抗原。

[0169] 用于鉴定突变的技术的实例包括但不限于动态等位基因特异性杂交(DASH)、微板阵列对角线凝胶电泳(MADGE)、焦磷酸测序、寡核苷酸特异性连接、TaqMan系统以及各种DNA“芯片”技术即Affymetrix SNP芯片、以及基于通过侵袭性裂解来产生小信号分子,继之以采用质谱测定法或固定化挂锁探针和滚环扩增的方法。

[0170] 深度核酸或蛋白质测序技术在本领域中是已知的。可使用任何类型的序列分析方法。可对整个肿瘤基因组、肿瘤外显子组(蛋白质编码DNA)、肿瘤转录物组或外来体进行核酸测序。实时单分子合成测序技术依赖于对荧光核苷酸的检测,因为它们被并入互补于所测序的模板的初生DNA链中。也存在其他快速高通量测序方法。可对肿瘤蛋白质组进行蛋白质测序。另外,蛋白质质谱测定法可用于鉴定或验证结合于肿瘤细胞上的MHC蛋白的突变肽的存在。肽可从肿瘤细胞或从由肿瘤加以免疫沉淀的HLA分子进行酸洗脱,接着使用质谱测定法加以鉴定。可将测序结果与已知对照组或与对患者的正常组织进行的测序分析进行比较。

[0171] 因此,本发明涉及用于鉴定和/或检测抗原的新表位的方法。具体来说,本发明提供鉴定和/或检测适用于在受试者中诱导肿瘤特异性免疫应答的肿瘤特异性新表位的方法。任选地,相比于野生型肽,这些新表位中的一些以更大亲和力结合至I类HLA蛋白,和/或能够活化抗肿瘤CD8T细胞。其他结合至II类并活化CD4+T辅助细胞。虽然已经认识到I类抗原在疫苗中发挥的重要作用,但是本文中已经发现,由I类和II类抗原的平衡组成的疫苗实

际上产生比基于单独I类或II类的疫苗更强的免疫应答。

[0172] I类MHC的蛋白质存在于身体的包括大多数肿瘤细胞的几乎所有细胞的表面上。I类MHC的蛋白质装载有通常源于内源性蛋白质或存在于细胞内部的病原体,并且接着向细胞毒性T淋巴细胞(CTL)呈递的抗原。T细胞受体能够识别和结合与I类MHC的分子复合的肽。各细胞毒性T淋巴细胞表达能够结合特定MHC/肽复合物的独特T细胞受体。

[0173] 使用计算机算法,有可能预测潜在新表位,即由I类或II类MHC分子以肽呈递复合物形式结合,接着以这个形式由T淋巴细胞的T细胞受体识别的肽序列。适用于鉴定将结合MHC的肽的程序的实例包括例如:Lonza Epibase、SYFPEITHI(Rammensee等人, Immunogenetics, 50 (1999), 213-219) 和HLA_BIND(Parker等人, J. Immunol., 152 (1994), 163-175)。

[0174] 一旦选择推定新表位,即可使用体外和/或体内测定对它们进行进一步测试。常规体外实验室测定诸如Elispot测定可与来自各患者的分离物一起用于使基于算法的预测加以选择的新表位的清单细化。

[0175] 本发明的mRNA癌症疫苗是组合物,包括药物组合物。本发明也涵盖用于选择、设计、制备、制造、配制和/或使用mRNA癌症疫苗的方法。也提供用于选择、设计和/或利用本文所述的mRNA癌症疫苗的系统、方法、装置和试剂盒。

[0176] 本发明的mRNA疫苗可包括一种或多种癌抗原。在一些实施方案中,mRNA疫苗由45种或更多种、46种或更多种、47种或更多种、48种或更多种、49种或更多种、50种或更多种、51种或更多种、52种或更多种、53种或更多种、54种或更多种或55种或更多种抗原组成。在其他实施方案中,mRNA疫苗由3种或更多种、4种或更多种、5种或更多种、6种或更多种、7种或更多种、8种或更多种或9种或更多种抗原组成。在其他实施方案中,mRNA疫苗由1000种或更少种、900种或更少种、500种或更少种、100种或更少种、75种或更少种、50种或更少种、40种或更少种、30种或更少种、20种或更少种或100种或更少种癌抗原组成。在其他实施方案中,mRNA疫苗具有3-100、5-100、10-100、15-100、20-100、25-100、30-100、35-100、40-100、45-100、50-100、55-100、60-100、65-100、70-100、75-100、80-100、90-100、5-50、10-50、15-50、20-50、25-50、30-50、35-50、40-50、45-50、100-150、100-200、100-300、100-400、100-500、50-500、50-800、50-1,000或100-1,000种癌抗原。

[0177] 在一些实施方案中,mRNA癌症疫苗和疫苗接种方法包括基于特定突变的表位或抗原(新表位)以及由癌种系基因表达的那些(为见于多个患者中的肿瘤所共有的抗原)。

[0178] 如本文所用的也称为抗原决定簇的表位是抗原的由免疫系统在适当情形下识别,具体来说由抗体、B细胞或T细胞识别的部分。表位包括B细胞表位和T细胞表位。B细胞表位是由特定抗体产生性B细胞识别所需的肽序列。B细胞表位是指抗原的由抗体识别的特定区域。抗体的结合表位的部分被称为互补位。表位可为基于结构和与互补位的相互作用的构象性表位或线性表位。线性或连续表位由蛋白质的特定区域的一级氨基酸序列界定。与抗体相互作用的序列依序彼此紧接位于蛋白质上,并且表位可通常用单一肽进行模拟。构象性表位是由天然蛋白质的构象性结构界定的表位。这些表位可为连续的或不连续的,即表位的组分可位于蛋白质的不同部分上,所述组分在折叠天然蛋白质结构中被致使彼此接近。

[0179] T细胞表位是与APC上的蛋白质缔合的为由特定T细胞识别所需的肽序列。T细胞表

位在细胞内被加工,并且呈递在APC的表面上,在所述表面处,它们结合于包括II类MHC和I类MHC的MHC分子。肽表位可具有对于表位来说合理的任何长度。在一些实施方案中,肽表位是9-30个氨基酸。在其他实施方案中,长度为9-22、9-29、9-28、9-27、9-26、9-25、9-24、9-23、9-21、9-20、9-19、9-18、10-22、10-21、10-20、11-22、-22-21、11-20、12-22、12-21、12-20、13-22、13-21、13-20、14-19、15-18或16-17个氨基酸。

[0180] 在一些实施方案中,肽表位包含至少一种MHC I类表位和至少一种MHC II类表位。在一些实施方案中,至少10%的表位是MHC I类表位。在一些实施方案中,至少20%的表位是MHC I类表位。在一些实施方案中,至少30%的表位是MHC I类表位。在一些实施方案中,至少40%的表位是MHC I类表位。在一些实施方案中,至少50%、60%、70%、80%、90%或100%的表位是MHC I类表位。在一些实施方案中,至少10%的表位是MHC II类表位。在一些实施方案中,至少20%的表位是MHC II类表位。在一些实施方案中,至少30%的表位是MHC II类表位。在一些实施方案中,至少40%的表位是MHC II类表位。在一些实施方案中,至少50%、60%、70%、80%、90%或100%的表位是MHC II类表位。在一些实施方案中,MHC I类表位与MHC II类表位的比率是选自约10%:约90%;约20%:约80%;约30%:约70%;约40%:约60%;约50%:约50%;约60%:约40%;约70%:约30%;约80%:约20%;约90%:约10%MHC I类表位:MHC II类表位的比率。在一个实施方案中,MHC I类表位:MHC II类表位的比率是3:1。在一些实施方案中,MHC II类表位与MHC I类表位的比率是选自约10%:约90%;约20%:约80%;约30%:约70%;约40%:约60%;约50%:约50%;约60%:约40%;约70%:约30%;约80%:约20%;约90%:约10%MHC II类表位:MHC I类表位的比率。在一个实施方案中,MHC II类表位:MHC I类表位的比率是1:3。在一些实施方案中,癌症疫苗的至少一种肽表位是B细胞表位。在一些实施方案中,癌症疫苗的T细胞表位包含8个-11个之间的氨基酸。在一些实施方案中,癌症疫苗的B细胞表位包含13个-17个之间的氨基酸。

[0181] 在其他方面,本发明的癌症疫苗包含编码排列有一个或多个间杂的通用II型T细胞表位的多种肽表位抗原的mRNA疫苗。所述通用II型T细胞表位包括但不限于ILMQYIKANSKFIGI(破伤风毒素;SEQ ID NO:226)、FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE(破伤风毒素;SEQ ID NO:227)、QYIKANSKFIGITE(破伤风毒素;SEQ ID NO:228)、QSIALSSLMVAQAIP(白喉毒素;SEQ ID NO:229)以及AKFVAAWTLKAAA(泛-DR表位(PADRE);SEQ ID NO:230)。在一些实施方案中,所述mRNA疫苗包含相同的通用II型T细胞表位。在其他实施方案中,所述mRNA疫苗包含2、3、4、5、6、7、8、9、10、15或20种不同的通用II型T细胞表位。在一些实施方案中,所述一种或多种通用II型T细胞表位间杂在每种癌抗原之间。在其他实施方案中,所述一种或多种通用II型T细胞表位间杂在每2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、22、24、26、28、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90或100种癌抗原之间。

[0182] 在一些方面,本发明的癌症疫苗包括编码在表位之间以单一核苷酸间隔子加以排列或在表位之间在无间隔子下直接彼此排列的多种肽表位抗原的mRNA疫苗。多种表位抗原包括MHC I类表位和MHC II类表位的混合物。举例来说,多种肽表位抗原可为具有以下结构的多肽:

[0183] $(X-G-X)_{1-10} (G-Y-G-Y)_{1-10} (G-X-G-X)_{0-10} (G-Y-G-Y)_{0-10}$ 、 $(X-G)_{1-10} (G-Y)_{1-10} (G-X)_{0-10} (G-Y)_{0-10}$ 、 $(X-G-X-G-X)_{1-10} (G-Y-G-Y)_{1-10} (X-G-X)_{0-10} (G-Y-G-Y)_{0-10}$ 、 $(X-G-X)_{1-10} (G-Y-G-Y-G-Y)_{1-10} (X-G-X)_{0-10} (G-Y-G-Y)_{0-10}$ 、 $(X-G-X-G-X-G-X)_{1-10} (G-Y-G-Y)_{1-10} (X-G-X)_{0-10} (G-Y-G-Y)_{0-10}$

Y)₀₋₁₀、(X-G-X)₁₋₁₀ (G-Y-G-Y-G-Y-G-Y)₁₋₁₀ (X-G-X)₀₋₁₀ (G-Y-G-Y)₀₋₁₀、(X)₁₋₁₀ (Y)₁₋₁₀ (X)₀₋₁₀ (Y)₀₋₁₀、(Y)₁₋₁₀ (X)₁₋₁₀ (Y)₀₋₁₀ (X)₀₋₁₀、(XX)₁₋₁₀ (Y)₁₋₁₀ (X)₀₋₁₀ (Y)₀₋₁₀、(YY)₁₋₁₀ (XX)₁₋₁₀ (Y)₀₋₁₀ (X)₀₋₁₀、(X)₁₋₁₀ (YY)₁₋₁₀ (X)₀₋₁₀ (Y)₀₋₁₀、(XXX)₁₋₁₀ (YYY)₁₋₁₀ (XX)₀₋₁₀ (YY)₀₋₁₀、(YYY)₁₋₁₀ (XXX)₁₋₁₀ (YY)₀₋₁₀ (XX)₀₋₁₀、(XY)₁₋₁₀ (Y)₁₋₁₀ (X)₁₋₁₀ (Y)₁₋₁₀、(YX)₁₋₁₀ (Y)₁₋₁₀ (X)₁₋₁₀ (Y)₁₋₁₀、(YX)₁₋₁₀ (X)₁₋₁₀ (Y)₁₋₁₀ (Y)₁₋₁₀、(Y-G-Y)₁₋₁₀ (G-X-G-X)₁₋₁₀ (G-Y-G-Y)₀₋₁₀ (G-X-G-X)₀₋₁₀、(Y-G)₁₋₁₀ (G-X)₁₋₁₀ (G-Y)₀₋₁₀ (G-X)₀₋₁₀、(Y-G-Y-G-Y)₁₋₁₀ (G-X-G-X)₁₋₁₀ (Y-G-Y)₀₋₁₀ (G-X-G-X)₀₋₁₀、(Y-G-Y)₁₋₁₀ (G-X-G-X-G-X-G-X)₁₋₁₀ (Y-G-Y)₀₋₁₀ (G-X-G-X)₀₋₁₀、(XY)₁₋₁₀ (YX)₁₋₁₀ (XY)₀₋₁₀ (YX)₀₋₁₀、(YX)₁₋₁₀ (XY)₁₋₁₀ (Y)₀₋₁₀ (X)₀₋₁₀、(YY)₁₋₁₀ (X)₁₋₁₀ (Y)₀₋₁₀ (X)₀₋₁₀、(XY)₁₋₁₀ (XY)₁₋₁₀ (X)₀₋₁₀ (X)₀₋₁₀、(Y)₁₋₁₀ (YX)₁₋₁₀ (X)₀₋₁₀ (Y)₀₋₁₀、(XYX)₁₋₁₀ (YXX)₁₋₁₀ (YX)₀₋₁₀ (YY)₀₋₁₀或 (YYX)₁₋₁₀ (XXY)₁₋₁₀ (YX)₀₋₁₀ (XY)₀₋₁₀，

[0184] X是长度为10-40个氨基酸的MHC I类表位，Y是长度为10-40个氨基酸的MHC II类表位，并且G是甘氨酸。

[0185] 在一些方面，本发明的癌症疫苗包含编码多种肽表位抗原的mRNA疫苗，所述多种肽表位抗原排列有位于中心的单核苷酸多态性 (SNP) 突变，在所述SNP突变的每侧上具有侧接氨基酸。在一些实施方案中，在位于中心的SNP突变的每侧上的侧接氨基酸的数目是5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、22、24、26、28或30。在一个实施方案中，癌症疫苗的表位包含由两个I类序列侧接的SNP，每个序列包含七个氨基酸。在另一个实施方案中，癌症疫苗的表位包含由两个II类序列侧接的SNP，每个序列包含10个氨基酸。在一些实施方案中，表位可包含位于中心的SNP和侧翼，所述侧翼两者均是I类序列、两者均是II类序列或一个I类序列和一个II类序列。

[0186] 免疫增效剂mRNA

[0187] 本公开的一方面涉及编码多肽的mRNA，所述多肽刺激或增强针对一种或多种目标癌抗原的免疫应答。增强对目标癌抗原的免疫应答的此类mRNA在本文中称为免疫增效剂mRNA构建体或免疫增效剂mRNA，包括化学修饰的mRNA (mmRNA)。本公开的免疫增效剂增强对受试者中的目标抗原的免疫应答。增强的免疫应答可以是细胞应答、体液应答或两者。如本文所用，“细胞”免疫应答意图涵盖涉及T细胞或由T细胞介导的免疫应答，而“体液”免疫应答意图涵盖涉及B细胞或由B细胞介导的免疫应答。免疫增效剂可通过例如以下各项来增强免疫应答：

[0188] (i) 刺激I型干扰素途径信号传导；

[0189] (ii) 刺激NFκB途径信号传导；

[0190] (iii) 刺激炎症性应答；

[0191] (iv) 刺激细胞因子产生；或者

[0192] (v) 刺激树突细胞发育、活性或动员；以及

[0193] (vi) (i) - (vi) 中的任一项的组合。

[0194] 如本文所用，“刺激I型干扰素途径信号传导”意图涵盖活化I型干扰素信号传导途径的一种或多种组分 (例如，修饰此类组分的磷酸化、二聚化等以由此活化所述途径)、刺激从干扰素敏感性应答元件 (ISRE) 的转录和/或刺激I型干扰素 (例如，IFN-α、IFN-β、IFN-ε、IFN-κ和/或IFN-ω) 的产生或分泌。如本文所用，“刺激NFκB途径信号传导”意图涵盖活化

NFkB信号传导途径的一种或多种组分(例如,修饰此类组分的磷酸化、二聚化等以由此活化所述途径)、刺激从NFkB位点的转录和/或刺激其表达受NFkB调控的基因产物的产生。如本文所用,“刺激炎症性应答”意图涵盖刺激炎症性细胞因子(包括但不限于I型干扰素、IL-6和/或TNF α)的产生。如本文所用,“刺激树突细胞发育、活性或动员”意图涵盖直接或间接刺激树突细胞成熟、增殖和/或功能活性。

[0195] 在一些方面,本公开提供一种编码多肽的mRNA,所述多肽通过例如在受试者中诱导适应性免疫(例如,通过刺激I型干扰素产生)、刺激炎症性应答、刺激NFkB信号传导和/或刺激树突细胞(DC)发育、活性或动员来刺激或增强有需要的受试者中的免疫应答(例如,增强受试者中的免疫应答)。在一些方面,向有需要的受试者施用免疫增效剂mRNA增强受试者的细胞免疫(例如,T细胞介导的免疫)、体液免疫(例如,B细胞介导的免疫)或细胞免疫和体液免疫两者。在一些方面,免疫增效剂mRNA的施用刺激细胞因子产生(例如,炎症性细胞因子产生)、刺激癌抗原特异性CD8⁺效应细胞应答、刺激抗原特异性CD4⁺辅助细胞应答、增加效应记忆CD62L^{lo} T细胞群体、刺激B细胞活性或刺激抗原特异性抗体产生,包括前述应答的组合。在一些方面,免疫增效剂mRNA的施用刺激细胞因子产生(例如,炎症性细胞因子产生)并刺激抗原特异性CD8⁺效应细胞应答。在一些方面,免疫增效剂mRNA的施用刺激细胞因子产生(例如,炎症性细胞因子产生)并刺激抗原特异性CD4⁺辅助细胞应答。在一些方面,免疫增效剂mRNA的施用刺激细胞因子产生(例如,炎症性细胞因子产生)并增加效应记忆CD62L^{lo} T细胞群体。在一些方面,免疫增效剂mRNA的施用刺激细胞因子产生(例如,炎症性细胞因子产生)并刺激B细胞活性或刺激抗原特异性抗体产生。

[0196] 在一个实施方案中,免疫增效剂增加癌抗原特异性CD8⁺效应细胞应答(细胞免疫)。例如,免疫增效剂可增加抗原特异性CD8⁺效应细胞活性的一个或多个指标,包括但不限于CD8⁺ T细胞增殖和CD8⁺ T细胞细胞因子产生。例如,在一个实施方案中,免疫增效剂增加抗原特异性CD8⁺ T细胞产生IFN- γ 、TNF α 和/或IL-2。在各种实施方案中,免疫增效剂可响应于抗原使CD8⁺ T细胞细胞因子产生(例如,IFN- γ 、TNF α 和/或IL-2产生)(与所述免疫增效剂不存在下CD8⁺ T细胞细胞因子产生相比)增加至少5%、或至少10%、或至少15%、或至少20%、或至少25%、或至少30%、或至少35%、或至少40%、或至少45%、或至少50%。例如,可用癌抗原体外刺激从受治疗的受试者获得的T细胞,并且可在体外评估CD8⁺ T细胞细胞因子产生。CD8⁺ T细胞细胞因子产生可通过本领域已知的标准方法测定,包括但不限于测量细胞因子产生的分泌水平(例如,通过ELISA或本领域已知用于测定上清液中的细胞因子的量的其他适合方法)和/或测定对细胞因子的细胞内染色(ICS)呈阳性的CD8⁺ T细胞的百分比。例如,用于表达IFN- γ 、TNF α 和/或IL-2的CD8⁺ T细胞的细胞内染色(ICS)可通过本领域已知的方法进行(参见例如实施例)。在一个实施方案中,免疫增效剂响应于抗原使通过ICS对一种或多种细胞因子(例如,IFN- γ 、TNF α 和/或IL-2)呈阳性的CD8⁺ T细胞的百分比(与在所述免疫增效剂不存在下通过ICS对所述细胞因子呈阳性的CD8⁺ T细胞的百分比相比)增加至少5%、或至少10%、或至少15%、或至少20%、或至少25%、或至少30%、或至少35%、或至少40%、或至少45%、或至少50%。

[0197] 在另一个实施方案中,免疫增效剂使总T细胞群体(例如,脾T细胞和/或PBMC)中CD8⁺ T细胞的百分比与所述免疫增效剂不存在下CD8⁺ T细胞的百分比相比增加。例如,免疫增效剂可使总T细胞群体中CD8⁺ T细胞的百分比与所述免疫增效剂不存在下CD8⁺ T细胞

的百分比相比增加至少5%、或至少10%、或至少15%、或至少20%、或至少25%、或至少30%、或至少35%、或至少40%、或至少45%、或至少50%。总T细胞群体中CD8⁺ T细胞的总百分比可通过本领域已知的标准方法测定,所述方法包括但不限于荧光活化细胞分选(FACS)或磁活化细胞分选(MACS)。

[0198] 在另一个实施方案中,免疫增效剂增加肿瘤特异性免疫细胞应答,如通过在所述免疫增效剂存在下的体内肿瘤体积与所述免疫增效剂不存在下的肿瘤体积相比减小所确定的。例如,免疫增效剂可使肿瘤体积与所述免疫增效剂不存在下的肿瘤体积相比减小至少5%、或至少10%、或至少15%、或至少20%、或至少25%、或至少30%、或至少35%、或至少40%、或至少45%、或至少50%。肿瘤体积的测量可通过本领域完善确立的方法来确定。

[0199] 在另一个实施方案中,与免疫增效剂不存在下的抗原特异性抗体产生相比,免疫增效剂例如通过增加抗原特异性抗体产生的量来增加B细胞活性(体液免疫应答)。例如,免疫增效剂可使抗原特异性抗体产生与所述免疫增效剂不存在下的抗原特异性抗体产生相比增加至少5%、或至少10%、或至少15%、或至少20%、或至少25%、或至少30%、或至少35%、或至少40%、或至少45%、或至少50%。在一个实施方案中,评价抗原特异性IgG产生。抗原特异性抗体产生可通过本领域完善确立的方法来进行评价,包括但不限于测量样品(例如血清样品)中的抗原特异性抗体(例如,IgG)的水平,如ELISA、RIA等。

[0200] 在另一个实施方案中,免疫增效剂增加效应记忆CD62L^{lo} T细胞群体。例如,免疫增效剂可增加CD8⁺ T细胞中CD62L^{lo} T细胞的总%。在其他功能中,效应记忆CD62L^{lo} T细胞群体已显示在淋巴细胞运输中具有重要功能(参见例如,Schenkel, J.M. 和Masopust, D. (2014) *Immunity* 41:886-897)。在各种实施方案中,免疫增效剂可响应于抗原使CD8⁺ T细胞中效应记忆CD62L^{lo} T细胞的总百分比(与所述免疫增效剂不存在下CD8⁺ T细胞群体中CD62L^{lo} T细胞的总百分比相比)增加至少5%、或至少10%、或至少15%、或至少20%、或至少25%、或至少30%、或至少35%、或至少40%、或至少45%、或至少50%。CD8⁺ T细胞中效应记忆CD62L^{lo} T细胞的总百分比可通过本领域已知的标准方法来测定,所述方法包括但不限于荧光活化细胞分选(FACS)或磁活化细胞分选(MACS)。

[0201] 可在本领域已知的小鼠模型系统中评价免疫增效剂mRNA构建体增强对癌抗原的免疫应答的能力。在一个实施方案中,使用免疫活性小鼠模型系统。在一个实施方案中,小鼠模型系统包括C57/B16小鼠(例如,以评价对癌抗原的抗原特异性CD8⁺ T细胞应答,如实施例中所描述)。在另一个实施方案中,小鼠模型系统包括BalbC小鼠或CD1小鼠(例如,以评价B细胞应答,如抗原特异性抗体应答)。

[0202] 在一个实施方案中,本公开的免疫增效剂多肽在至少一种Toll样受体(TLR)的下游起作用,以由此增强免疫应答。因此,在一个实施方案中,免疫增效剂不是TLR,而是受体自身下游的TLR信号传导途径内的分子。

[0203] 在一个实施方案中,本公开的编码免疫增效剂的mRNA可包含一个或多个修饰的核碱基。适合的修饰在下文进一步论述。

[0204] 在一个实施方案中,本公开的编码免疫增效剂的mRNA被配制到脂质纳米粒子中。在一个实施方案中,所述脂质纳米粒子还包含编码癌抗原的mRNA。在一个实施方案中,所述脂质纳米粒子被施用至受试者以增强所述受试者中针对癌抗原的免疫应答。适合的纳米粒子和使用方法将在下文进一步论述。

[0205] 刺激I型干扰素的免疫增效剂mRNA

[0206] 在一些方面,本公开提供了编码多肽的免疫增效剂mRNA,所述多肽通过模拟或增强I型干扰素途径信号传导来刺激或增强针对目标抗原的免疫应答,从而刺激或增强I型干扰素 (IFN) 产生。已经确立成功诱导抗肿瘤或抗微生物适应性免疫需要I型IFN信号传导 (参见例如,Fuertes,M.B.等人 (2013) Trends Immunol. 34:67-73)。I型IFN (包括IFN- α 、IFN- β 、IFN- ϵ 、IFN- κ 和IFN- ω) 的产生在清除微生物感染 (如病毒感染) 中起作用。还已经认识到,宿主细胞DNA (例如源自受损或垂死细胞) 能够诱导I型干扰素产生,并且I型IFN信号传导途径在适应性抗肿瘤免疫的发展中起作用。然而,许多病原体 and 癌细胞已经进化出减少或抑制I型干扰素应答的机制。因此,通过向有需要的受试者提供本公开的免疫增效剂mRNA来活化 (包括刺激和/或增强) 所述受试者中的I型IFN信号传导途径在各种临床情况下刺激或增强受试者中的免疫应答,包括治疗癌症和病原性感染,以及加强疫苗应答以提供保护性免疫。

[0207] I型干扰素 (IFN) 是通常在病毒感染后在多种不同细胞类型中快速产生并且已知具有多种作用的促炎性细胞因子。体内I型IFN产生的典型后果是抗微生物细胞程序的活化以及先天性和适应性免疫应答的发展。I型IFN在受感染细胞和邻近细胞中诱导细胞内在的抗微生物状态,这限制感染因子、特别是病毒病原体的传播。I型IFN还调节先天免疫细胞活化 (例如,树突细胞的成熟) 以促进抗原呈递和自然杀伤细胞功能。I型IFN还促进高亲和力和抗原特异性T细胞和B细胞应答和免疫记忆的发展 (Ivashkiv和Donlin (2014) Nat Rev Immunol 14 (1):36-49)。

[0208] I型IFN活化树突细胞 (DC) 并通过自分泌信号传导促进其T细胞刺激能力 (Montoya等人, (2002) Blood 99:3263-3271)。I型IFN暴露经由增加趋化因子受体和粘附分子的表达 (例如,以促进DC迁移到引流淋巴结中)、共刺激分子和MHC I类和II类抗原呈递来促进DC的成熟。在I型IFN暴露后成熟的DC可有效地引发保护性T细胞应答 (Wijesundara等人, (2014) Front Immunol 29 (412) 以及其中的参考文献)。

[0209] I型IFN可促进或抑制T细胞活化、增殖、分化和存活,这主要取决于I型IFN信号传导相对于T细胞受体信号传导的时机 (Crouse等人, (2015) Nat Rev Immunol 15:231-242)。早期研究表明MHC-I表达在多种细胞类型中响应于I型IFN上调 (Lindhahl等人, (1976) J Infect Dis 133 (Suppl):A66-A68;Lindhahl等人, (1976) Proc Natl Acad Sci USA 73:1284-1287), 其是最佳T细胞刺激、分化、扩增和溶细胞活性的要求。I型IFN可对CD8 T细胞发挥有效的共刺激作用,从而增强CD8 T细胞增殖和分化 (Curtsinger等人, (2005) J Immunol 174:4465-4469;Kolumam等人, (2005) J Exp Med 202:637-650)。

[0210] 类似于对T细胞的作用,I型IFN信号传导取决于暴露的时机和背景而对B细胞应答具有正面和负面影响 (Braun等人, (2002) Int Immunol 14 (4):411-419;Lin等人, (1998) 187 (1):79-87)。I型IFN信号传导可抑制未成熟B细胞的存活和成熟。与未成熟B细胞相比,已显示I型IFN暴露在病毒感染后或在实验性免疫后促进B细胞活化、抗体产生和同种型转换 (Le Bon等人, (2006) J Immunol 176:4:2074-2078;Swanson等人, (2010) J Exp Med 207:1485-1500)。

[0211] 已经确立了参与I型IFN途径信号传导的许多组分,包括STING,干扰素调控因子 (Interferon Regulatory Factors), 如IRF1、IRF3、IRF5、IRF7、IRF8和IRF9、TBK1、IKKi、

MyD88和TRAM。参与I型IFN途径信号传导的另外组分包括TRAF3、TRAF6、IRAK-1、IRAK-4、TRIF、IPS-1、TLR-3、TLR-4、TLR-7、TLR-8、TLR-9、RIG-1、DAI以及IFI16。

[0212] 因此,在一个实施方案中,免疫增效剂mRNA编码参与I型IFN途径信号传导的前述组分中的任一种。

[0213] 编码STING的免疫增效剂mRNA

[0214] 本公开涵盖编码STING (包括STING的组成型活性形式) 的mRNA (包括mmRNA) 作为免疫增效剂。STING (干扰素基因的刺激物; 也称为跨膜蛋白173 (TMEM173)、IRF3活化介质 (MITA)、甲硫氨酸-脯氨酸-酪氨酸-丝氨酸 (MPYS) 和ER IFN刺激物 (ERIS)) 是充当控制免疫应答基因 (包括I型IFN和促炎性细胞因子) 的转录的信号传导分子的379个氨基酸的内质网 (ER) 驻留跨膜蛋白 (Ishikawa&Barber, (2008) *Nature* 455:647-678; Ishikawa等人, (2009) *Nature* 461:788-792; Barber (2010) *Nat Rev Immunol* 15 (12):760-770)。

[0215] STING充当信号转导衔接子,从而将DNA的细胞溶质检测与TBK1/IRF3/I型IFN信号轴相联系。通过直接感测环状二核苷酸 (CDN) 活化STING的信号转导衔接子功能。CDN的实例包括环状二-GMP (鸟苷5'-单磷酸)、环状二-AMP (腺苷5'-单磷酸) 和环状GMP-AMP (cGAMP)。最初表征为普遍存在的细菌第二信使,现在已知CDN构成通过与STING的直接相互作用活化TBK1/IRF3/I型IFN信号传导轴的一类病原体相关分子模式分子 (PAMP)。STING能够感测细胞的细胞溶质中的异常DNA种类和/或CDN,包括源自细菌的CDN和/或源自宿主蛋白环状GMP-AMP合酶 (cGAS) 的CDN。cGAS蛋白是响应于细胞溶质中DNA的检测而产生cGAMP的DNA传感器 (Burdette等人, (2011) *Nature* 478:515-518; Sun等人, (2013) *Science* 339:786-791; Diner等人, (2013) *Cell Rep* 3:1355-1361; Ablasser等人, (2013) *Nature* 498:380-384)。

[0216] 在与CDN结合后,STING二聚化并经历构象变化,所述构象变化促进与TANK结合激酶1 (TBK1) 形成复合物 (Ouyang等人, (2012) *Immunity* 36 (6):1073-1086)。这种复合物易位至核周高尔基体,从而导致TBK1递送至内溶酶体区室,在内溶酶体区室中其磷酸化IRF3和NF- κ B转录因子 (Zhong等人, (2008) *Immunity* 29:538-550)。最近的研究表明,STING通过与TBK1和IRF3两者结合而充当支架,以特异性地促进TBK1对IRF3的磷酸化 (Tanaka&Chen, (2012) *Sci Signal* 5 (214):ra20)。IRF3-、IRF7-和NF- κ B-依赖性信号传导途径的活化诱导细胞因子和其他免疫应答相关蛋白 (如I型IFN) 的产生,其促进抗病原体 and/或抗肿瘤活性。

[0217] 许多研究已经调查了使用STING的CDN激动剂作为潜在疫苗佐剂或免疫调节剂来引发体液和细胞免疫应答 (Dubensky等人, (2013) *Ther Adv Vaccines* 1 (4):131-143以及其中的参考文献)。初步研究表明,CDN c-二-GMP的施用减弱了体内金黄色葡萄球菌感染,从而降低小鼠感染模型中回收的细菌细胞的数量,但c-二-GMP在体外对细菌细胞没有可观察到的抑制或杀菌作用,从而表明细菌细胞减少是由于对宿主免疫系统的影响 (Karaolis等人, (2005) *Antimicrob Agents Chemother* 49:1029-1038; Karaolis等人, (2007) *Infect Immun* 75:4942-4950)。最近的研究表明,与用单独GM-CSF疫苗免疫相比,用产生粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 的癌症疫苗 (称为STINGVAX) 配制的合成CDN衍生物分子在治疗性癌症动物模型中引发增强的体内抗肿瘤作用 (Fu等人, (2015) *Sci Transl Med* 7 (283):283ra52),从而表明CDN是有效的疫苗佐剂。

[0218] 已经描述了由定位至人TMEM173基因的多态性产生的突变型STING蛋白,其表现出

功能获得或组成型活性表型。当在体外表达时,显示突变型STING等位基因有效刺激I型IFN的诱导(Liu等人,(2014)N Engl J Med 371:507-518;Jeremiah等人,(2014)J Clin Invest 124:5516-5520;Dobbs等人,(2015)Cell Host Microbe 18(2):157-168;Tang& Wang,(2015)PLoS ONE 10(3):e0120090;Melki等人,(2017)J Allergy Clin Immunol In Press;Konig等人,(2017)Ann Rheum Dis 76(2):468-472;Burdette等人(2011)Nature 478:515-518)。

[0219] 本文提供了编码STING的组成型活性形式(包括用作如本文所述的免疫增效剂的突变型人STING同种型)的修饰的mRNA(mmRNA)。编码STING的组成型活性形式(包括突变型人STING同种型)的mmRNA在本文的序列表中列出。本文使用的突变型人STING多肽的氨基酸残基编号对应于本领域可作为Genbank登录号NP_938023获得的379个氨基酸残基野生型人STING(同种型1)的氨基酸残基编号。

[0220] 因此,在一方面,本公开提供了编码突变型人STING蛋白的mmRNA,所述突变型人STING蛋白在氨基酸残基155处具有突变,特别是氨基酸取代,如V155M突变。在一个实施方案中,所述mmRNA编码如SEQ ID NO:1中列出的氨基酸序列。在一个实施方案中,STING V155M突变体由SEQ ID NO:199中所示的核苷酸序列编码。在一个实施方案中,所述mmRNA包含如SEQ ID NO:209中所示的3' UTR序列,其包括miR122结合位点。

[0221] 在其他方面,本公开提供了编码突变型人STING蛋白的mmRNA,所述突变型人STING蛋白在氨基酸残基284处具有突变,如氨基酸取代。残基284取代的非限制性实例包括R284T、R284M和R284K。在某些实施方案中,突变型人STING蛋白具有R284T突变,例如具有SEQ ID NO:2中列出的氨基酸序列或由SEQ ID NO 200中所示的核苷酸序列编码。在某些实施方案中,突变型人STING蛋白具有R284M突变,例如具有如SEQ ID NO:3中列出的氨基酸序列或由SEQ ID NO:201中所示的核苷酸序列编码。在某些实施方案中,突变型人STING蛋白具有R284K突变,例如具有如SEQ ID NO:4或224中列出的氨基酸序列或由SEQ ID NO:202或225中所示的核苷酸序列编码。

[0222] 在其他方面,本公开提供了编码突变型人STING蛋白的mmRNA,所述突变型人STING蛋白在氨基酸残基154处具有突变,如氨基酸取代,如N154S突变。在某些实施方案中,突变型人STING蛋白具有N154S突变,例如具有如SEQ ID NO:5中列出的氨基酸序列或由SEQ ID NO:203中所示的核苷酸序列编码。

[0223] 在其他方面,本公开提供了编码突变型人STING蛋白的mmRNA,所述突变型人STING蛋白在氨基酸残基147处具有突变,如氨基酸取代,如V147L突变。在某些实施方案中,具有V147L突变的突变型人STING蛋白具有如SEQ ID NO:6中列出的氨基酸序列或由SEQ ID NO:204中所示的核苷酸序列编码。

[0224] 在其他方面,本公开提供了编码突变型人STING蛋白的mmRNA,所述突变型人STING蛋白在氨基酸残基315处具有突变,如氨基酸取代,如E315Q突变。在某些实施方案中,具有E315Q突变的突变型人STING蛋白具有如SEQ ID NO:7中列出的氨基酸序列或由SEQ ID NO:205中所示的核苷酸序列编码。

[0225] 在其他方面,本公开提供了编码突变型人STING蛋白的mmRNA,所述突变型人STING蛋白在氨基酸残基375处具有突变,如氨基酸取代,如R375A突变。在某些实施方案中,具有R375A突变的突变型人STING蛋白具有如SEQ ID NO:8中列出的氨基酸序列或由SEQ ID NO:

206中所示的核苷酸序列编码。

[0226] 在其他方面,本公开提供了编码突变型人STING蛋白的mmRNA,所述突变型人STING蛋白具有前述突变中的一种或多种或两种、三种、四种或更多种的组合。因此,在一方面,本公开提供了编码突变型人STING蛋白的mmRNA,所述突变型人STING蛋白具有选自以下组成的组的一种或多种突变:V147L、N154S、V155M、R284T、R284M、R284K、E315Q和R375A以及其组合。在其他方面,本公开提供了编码突变型人STING蛋白的mmRNA,所述突变型人STING蛋白具有选自以下组成的组的突变的组合:V155M和R284T;V155M和R284M;V155M和R284K;V155M和V147L;V155M和N154S;V155M和E315Q;以及V155M和R375A。

[0227] 在其他方面,本公开提供了编码具有V155M和以下突变中的一种、两种、三种或更多种的突变型人STING蛋白的mmRNA:R284T;R284M;R284K;V147L;N154S;E315Q;以及R375A。在其他方面,本公开提供了编码具有V155M、V147L和N154S突变的突变型人STING蛋白的mmRNA。在其他方面,本公开提供了编码突变型人STING蛋白的mmRNA,所述突变型人STING蛋白具有V155M、V147L、N154S突变以及任选地在氨基酸284处的突变。在其他方面,本公开提供了编码突变型人STING蛋白的mmRNA,所述突变型人STING蛋白具有V155M、V147L、N154S突变以及氨基酸284处选自R284T、R284M和R284K的突变。在其他方面,本公开提供了编码具有V155M、V147L、N154S和R284T突变的突变型人STING蛋白的mmRNA。在其他方面,本公开提供了编码具有V155M、V147L、N154S和R284M突变的突变型人STING蛋白的mmRNA。在其他方面,本公开提供了编码具有V155M、V147L、N154S和R284K突变的突变型人STING蛋白的mmRNA。

[0228] 在其他实施方案中,本公开提供了编码突变型人STING蛋白的mmRNA,所述突变型人STING蛋白具有氨基酸残基147、154、155和任选地284处的突变的组合,特别是氨基酸取代,如V147L、N154S、V155M和任选地R284M。在某些实施方案中,突变型人STING蛋白具有V147N、N154S和V155M突变,如SEQ ID NO:9中列出的氨基酸序列或由SEQ ID NO:207中所示的核苷酸序列编码。在某些实施方案中,突变型人STING蛋白具有R284M、V147N、N154S和V155M突变,如SEQ ID NO:10中列出的氨基酸序列或由SEQ ID NO:208中所示的核苷酸序列编码。

[0229] 在另一个实施方案中,本公开提供了编码突变型人STING蛋白的mmRNA,所述突变型人STING蛋白是全长379个氨基酸的野生型蛋白的组成型活性截短形式,如由氨基酸137-379组成的组成型活性人STING多肽。

[0230] 用于促进抗原呈递细胞的剂

[0231] 在一些实施方案中,可使RNA疫苗与用于例如通过使非APC转化成假APC来促进抗原呈递细胞(APC)的产生的剂组合。抗原呈递是免疫应答的引发、放大和持续中的关键步骤。在这个过程中,抗原的片段通过主要组织相容性复合物(MHC)或人白细胞抗原(HLA)向T细胞呈递,从而驱动抗原特异性免疫应答。对于免疫防治和治疗,使这个应答增强对于功效改进是重要的。本发明的RNA疫苗可被设计或增强以驱动高效抗原呈递。一种用于使APC加工和呈递增强的方法在于提供使RNA疫苗更好靶向抗原呈递细胞(APC)。另一方法涉及用免疫刺激性制剂和/或组分使APC细胞活化。

[0232] 或者,用于对非APC重新编程以变为APC的方法可与本发明的RNA疫苗一起使用。重要的是,摄取mRNA制剂,并且是它们的治疗作用的靶标的大多数细胞不是APC。因此,设计一种用以使这些细胞转化成APC的方式将对功效有益。本文提供用于将RNA疫苗例如mRNA疫苗

递送至细胞,同时也促进非APC向APC转变的方法和途径。在一些实施方案中,编码APC重新编程分子的mRNA被包括在RNA疫苗中,或与RNA疫苗共同施用。

[0233] 如本文所用的APC重新编程分子是促进非APC细胞向APC样表型转变的分子。APC样表型是使得能够进行II类MHC加工的性质。因此,具有APC样表型的APC细胞是相较于不具有一种或多种外源性分子的相同细胞,具有所述一种或多种外源性分子(APC重新编程分子)的具有增强的II类MHC加工能力的细胞。在一些实施方案中,APC重新编程分子是CIITA(II类MHC表达的主要调控剂);伴侣蛋白诸如CLIP、HLA-DO、HLA-DM等(抗原片段向II类MHC中进行装载的增强剂)和/或共刺激分子如CD40、CD80、CD86等(T细胞抗原识别和T细胞活化的增强剂)。

[0234] CIITA蛋白是通过与一组与II类启动子区域缔合的保守DNA结合蛋白相互作用来使II类MHC基因的转录的活化增强的反式活化子(Steimle等人,1993,Cell 75:135-146)。已将CIITA的转录活化功能作图于氨基末端酸性结构域(氨基酸26-137)。核酸分子编码与CIITA相互作用的蛋白质,被称为CIITA相互作用蛋白104(在本文中也称为CIP104)。已显示CITTA与CIP104两者均使由II类MHC启动子进行的转录增强,因此适用作本发明的APC重新编程分子。在一些实施方案中,APC重新编程分子是全长CIITA、CIP104或其他相关分子或其活性片段,诸如CIITA的氨基酸26-137,或与其具有至少80%序列同一性以及维持使II类MHC基因的转录的活化增强的能力的氨基酸。

[0235] 在优选实施方案中,将APC重新编程分子以编码APC重新编程分子的mRNA形式递送至受试者中。因此,本发明的RNA疫苗可包括编码APC重新编程分子的mRNA。在一些实施方案中,mRNA呈单顺反子形式。在其他实施方案中,它呈多顺反子形式。在一些实施方案中,编码一种或多种抗原的mRNA在与编码APC重新编程分子的mRNA分开的制剂中。在其他实施方案中,编码一种或多种抗原的mRNA与编码APC重新编程分子的mRNA在同一制剂中。在一些实施方案中,编码一种或多种抗原的mRNA与编码APC重新编程分子的mRNA同时向受试者施用。在其他实施方案中,相比于编码APC重新编程分子的mRNA,编码一种或多种抗原的mRNA在不同时间向受试者施用。举例来说,编码APC重新编程分子的mRNA可在编码一种或多种抗原的mRNA之前施用。编码APC重新编程分子的mRNA可在编码抗原的mRNA之前立刻,在编码抗原的mRNA之前至少1小时,在编码抗原的mRNA之前至少1天,在编码抗原的mRNA之前至少一周,或在编码抗原的mRNA之前至少一个月施用。

[0236] 或者,编码APC重新编程分子的mRNA可在编码一种或多种抗原的mRNA之后施用。编码APC重新编程分子的mRNA可在编码抗原的mRNA之后立刻,在编码抗原的mRNA之后至少1小时,在编码抗原的mRNA之后至少1天,在编码抗原的mRNA之后至少一周,或在编码抗原的mRNA之后至少一个月施用。在一些实施方案中,抗原是癌抗原,诸如患者特异性抗原。在其他实施方案中,抗原是感染性疾病抗原。

[0237] 在一些实施方案中,mRNA疫苗可包括回忆抗原,有时也被称为记忆抗原。回忆抗原先前已由个体遭遇,并且有预先存在的针对其的记忆淋巴细胞的抗原。在一些实施方案中,回忆抗原可为个体可能已遭遇的感染性疾病抗原诸如流感抗原。回忆抗原帮助促进更强力免疫应答。

[0238] 选择用于包括在mRNA疫苗中的抗原或新表位通常将为高亲和力结合肽。在一些方面,相比于野生型肽,抗原或新表位以更大亲和力结合HLA蛋白。在一些实施方案中,抗原或

新表位具有至少小于5000nM,至少小于500nM,至少小于250nM,至少小于200nM,至少小于150nM,至少小于100nM,至少小于50nM或更小的IC50。通常,预测IC50<50nM的肽一般被视为中亲和力至高亲和力结合肽,并且将被选择用于使用生物化学HLA结合测定来凭经验测试它们的亲和力。所述癌抗原可以是个人化癌抗原。举例来说,个人化RNA癌症疫苗可包括编码一种或多种已知的为肿瘤所特有的癌抗原或为各受试者所特有的癌抗原的RNA,所述癌抗原被称为新表位或受试者特异性表位或抗原。“受试者特异性癌抗原”是已被鉴定为在特定患者的肿瘤中表达的抗原。受试者特异性癌抗原可或不通常普遍存在于肿瘤样品中。不在或很少在非癌性细胞中表达,或其在非癌性细胞中的表达相较于在癌性细胞中的表达足够降低,并且诱导在疫苗接种后被诱导的免疫应答的肿瘤相关抗原被称为新表位。如同肿瘤相关抗原一样,新表位对于身体来说完全是外来的,因此将不产生针对健康组织的免疫应答,或由免疫系统的保护性组分掩蔽。在一些实施方案中,基于新表位的个人化RNA癌症疫苗是合乎需要的,因为所述疫苗制剂将使针对患者的特定肿瘤的特异性最大化。突变源性新表位可由以下产生:点突变;导致蛋白质中的氨基酸不同的非同义突变;其中终止密码子被修改或缺失,从而导致翻译在C末端具有新型肿瘤特异性序列的较长蛋白质的通读突变;导致在成熟mRNA中包括内含子以及因此独特肿瘤特异性蛋白质序列的剪接位点突变;产生在2个蛋白质的接合(即基因融合)处具有肿瘤特异性序列的嵌合蛋白质的染色体重排;导致具有新型肿瘤特异性蛋白质序列的新开放阅读框的框移突变或缺失;以及易位。因此,在一些实施方案中,RNA癌症疫苗包括至少1种癌抗原,其包含选自框移突变和重组或任何本文所述的其他突变组成的组的突变。

[0239] 用于产生个人化RNA癌症疫苗的方法通常涉及例如使用深度核酸或蛋白质测序技术来鉴定突变,例如使用经验肽-MHC结合预测算法的应用程序或其他分析技术来鉴定新表位以产生一组可结合患者HLA等位基因,并且基于肿瘤中存在的突变的候选T细胞表位,任选证明抗原特异性T细胞针对所选新表位,或证明候选新表位结合于肿瘤表面上的HLA蛋白,以及开发疫苗。本发明的RNA癌症疫苗可包括单一新表位的多个拷贝、基于单一突变类型(即点突变)的多种不同新表位、基于多种突变类型的多种不同新表位、新表位和其他抗原,诸如肿瘤相关抗原或回忆抗原。

[0240] 用于鉴定突变的技术的实例包括但不限于动态等位基因特异性杂交(DASH)、微板阵列对角线凝胶电泳(MADGE)、焦磷酸测序、寡核苷酸特异性连接、TaqMan系统以及各种DNA“芯片”技术即Affymetrix SNP芯片、以及基于通过侵袭性裂解来产生小信号分子,继之以采用质谱测定法或固定化挂锁探针和滚环扩增的方法。

[0241] 深度核酸或蛋白质测序技术在本领域中是已知的。可使用任何类型的序列分析方法。可对整个肿瘤基因组、肿瘤外显子组(蛋白质编码DNA)、肿瘤转录物组或外来体进行核酸测序。实时单分子合成测序技术依赖于对荧光核苷酸的检测,因为它们被并入互补于所测序的模板的初生DNA链中。也存在其他快速高通量测序方法。可对肿瘤蛋白质组进行蛋白质测序。另外,蛋白质质谱测定法可用于鉴定或验证结合于肿瘤细胞上的MHC蛋白的突变肽的存在。肽可从肿瘤细胞或从由肿瘤加以免疫沉淀的HLA分子进行酸洗脱,接着使用质谱测定法加以鉴定。可将测序结果与已知对照组或与对患者的正常组织进行的测序分析进行比较。

[0242] 因此,本发明涉及用于鉴定和/或检测抗原的新表位诸如T细胞表位的方法。具体

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

[0243] I类MHC的蛋白质存在于身体的包括大多数肿瘤细胞的几乎所有细胞的表面上。I类MHC的蛋白质装载有通常源于内源性蛋白质或存在于细胞内部的病原体,并且接着向细胞毒性T淋巴细胞(CTL)呈递的抗原。T细胞受体能够识别和结合与I类MHC的分子复合的肽。各细胞毒性T淋巴细胞表达能够结合特定MHC/肽复合物的独特T细胞受体。

[0244] 使用计算机算法,有可能预测潜在新表位诸如T细胞表位,即由I类或II类MHC分子以肽呈递复合物形式结合,接着以这个形式由T淋巴细胞的T细胞受体识别的肽序列。适用于鉴定将结合MHC的肽的程序的实例包括例如:Lonza Epibase、SYFPEITHI (Rammensee等人, Immunogenetics, 50 (1999), 213-219) 和HLA_BIND (Parker等人, J. Immunol., 152 (1994), 163-175)。

[0245] 一旦选择推定新表位,即可使用体外和/或体内测定对它们进行进一步测试。常规体外实验室测定诸如Elispot测定可与来自各患者的分离物一起用于使基于算法的预测加以选择的新表位的清单细化。新表位疫苗、其使用方法和制备方法都描述于PCT/US2016/044918中,所述专利特此以引用的方式整体并入。

[0246] 选择用于包含在RNA癌症疫苗中的活化致癌基因突变肽通常将是高亲和力结合肽。在一些方面,相比于野生型肽,活化致癌基因突变肽以更大的亲和力结合HLA蛋白。在一些实施方案中,活化致癌基因突变肽具有至少小于5000nM、至少小于500nM、至少小于250nM、至少小于200nM、至少小于150nM、至少小于100nM、至少小于50nM或更小的IC₅₀。通常,预测IC₅₀<50nM的肽一般被视为中亲和力至高亲和力结合肽,并且将被选择用于使用生物化学HLA结合测定来凭经验测试它们的亲和力。

[0247] 在个人化癌症疫苗中,可在患者的样品中鉴定受试者特异性癌抗原。举例来说,样品可为组织样品或肿瘤样品。举例来说,可考查具有一个或多个肿瘤细胞的样品中受试者特异性癌抗原的存在性。可使用整个基因组、外显子组或转录物组分析来考查肿瘤样品以鉴定受试者特异性癌抗原。

[0248] 或者,可在受试者的外来体中鉴定受试者特异性癌抗原。当在受试者的外来体中鉴定用于疫苗的抗原时,所述抗原被称为代表受试者的外来体抗原。

[0249] 外来体是由细胞排出的小型微囊泡,通常具有约30-100nm的直径。外来体典型地由以下方式形成:晚期内体膜向内凹入和夹断,从而导致形成装满小型脂质双层囊泡的多囊体(MVB),所述囊泡各自含有亲本细胞的细胞质的样品。MVB与细胞膜的融合导致这些外来体从细胞释放,并且导致它们向血液、尿、脑脊髓液或其他体液中递送。可从这些生物液体中的任一者回收外来体以进行进一步分析。

[0250] 外来体内的核酸具有作为肿瘤抗原的生物标志物的作用。分析外来体以鉴定受试者特异性癌抗原的优势是方法规避对活检体的需要。这在患者需要进行包括癌抗原鉴定和疫苗接种的数轮治疗时可特别有利。

[0251] 本领域中已描述从生物样品分离外来体的许多方法。举例来说,可使用以下方法:差速离心、低速离心、阴离子交换和/或凝胶渗透色谱法、蔗糖密度梯度或细胞器电泳、磁激活的细胞分选(MACS)、纳米膜超滤浓缩、Percoll梯度分离以及使用微流体装置。示例性方

法例如描述于美国专利公布号2014/0212871中。

[0252] 术语“生物样品”是指含有生物物质诸如DNA、RNA和蛋白质的样品。在一些实施方案中,生物样品可适合地包括来自受试者的体液。体液可为从受试者的身体中任何地方(优选是外周位置)分离的液体,包括但不限于例如血液、血浆、血清、尿、痰、脊髓液、脑脊髓液、胸膜液、乳头抽吸物、淋巴液、呼吸道液体、肠道液体和泌尿生殖道液体、泪液、唾液、母乳、来自淋巴系统的液体、精液、脑脊髓液、器官内系统液体、腹水、肿瘤囊肿液体、羊水及其组合。

[0253] 在一些实施方案中,可监测癌症的进展以鉴定所表达抗原的变化。因此,在一些实施方案中,方法也涉及在施用癌症mRNA疫苗之后至少一个月,从受试者的样品鉴定至少2种癌抗原以产生第二组癌抗原,以及向所述受试者施用具有编码所述第二组癌抗原的开放阅读框的mRNA疫苗。在一些实施方案中,在具有编码第一组癌抗原的开放阅读框的mRNA疫苗之后2个月、3个月、4个月、5个月、6个月、8个月、10个月或1年,向受试者施用具有编码第二组抗原的开放阅读框的mRNA疫苗。在其他实施方案中,在具有编码第一组癌抗原的开放阅读框的mRNA疫苗之后 $1\frac{1}{2}$ 、2、 $2\frac{1}{2}$ 、3、 $3\frac{1}{2}$ 、4、 $4\frac{1}{2}$ 或5年,向受试者施用具有编码第二组抗原的开放阅读框的mRNA疫苗。

[0254] 作为新抗原的热点突变

[0255] 在对癌症的群体分析中,相比于将被预期偶然发生的百分比,某些突变发生在更高百分比的患者中。已常常显示这些“复发”或“热点”突变在肿瘤中具有“驱动”作用,从而在癌细胞功能方面产生对肿瘤引发、维持或转移重要,并且因此在肿瘤的进化中被选择的某一变化。除它们在肿瘤生物学和疗法中具有重要性之外,复发突变为精准医学提供机会,其中将患者群体分层为更可能对特定疗法起响应的各组,所述疗法包括但不限于靶向突变蛋白自身。

[0256] 关于复发突变的许多尝试和研究已集中于非同义(或“错义”)单核苷酸变体(SNV),但群体分析已揭示多种更复杂(非SNV)变体分类,诸如同义(或“沉默”)、剪接位点、多核苷酸变体、插入和缺失,也可在高频率下发生。

[0257] 在人癌症的情况下,相比于任何其他基因,p53基因(官方符号TP53)更频繁突变。大量群组研究已显示对于大多数p53突变,基因组位置为一名患者或仅少许患者所特有,并且突变不能用作被设计用于特定患者群体的治疗性疫苗的复发新抗原。惊人的是,然而,p53基因座的小型子集确实展现“热点”样式,其中基因中的若干位置以相对较高频率被突变。引人注目的是,这些复发突变区域中的大部分发生在外显子-内含子边界附近,从而破坏由mRNA剪接机构识别的典型核苷酸序列基序。剪接基序的突变可改变最终mRNA序列,即使预测局部氨基酸序列无变化(即对于同义或内含子突变来说)。因此,这些突变常常由常见注释工具注释为“非编码”,并且被忽略用于进一步分析,即使它们可以不可预测方式改变mRNA剪接,并且对翻译蛋白质施加严重功能性影响。如果选择性剪接同种型产生同框序列变化(即不产生PTC),那么它可逃脱由NMD进行的耗竭,并且易于表达,加工,以及由HLA系统呈递在细胞表面上。此外,突变源性选择性剪接通常是“隐蔽的”,即不在正常组织中表达,因此可由T细胞识别为非自身新抗原。

[0258] 在一些方面,本发明提供用作治疗性疫苗接种的靶标的由p53中的某些复发体细胞癌突变产生,不限于错义SNV,以及常常导致选择性剪接的新抗原肽序列。在一些实施方

案中,突变、mRNA剪接事件、所得新抗原肽和/或HLA限定的表位包括在典型5'剪接位点邻近密码子p.T125处的突变,从而诱导具有肽序列TAKSVTCTVSCPEGLASMRLQCLAVSPCISFVWNFGIPLHPLASCQCFFIVYPLNV (SEQ ID NO:232)的保留内含子,所述序列含有表位AVSPCISFVW (SEQ ID NO:233) (HLA-B*57:01,HLA-B*58:01)、HPLASCQCFF (SEQ ID NO:234) (HLA-B*35:01,HLA-B*53:01)、FVWNFGIPL (SEQ ID NO:235) (HLA-A*02:01,HLA-A*02:06,HLA-B*35:01)。

[0259] 在一些实施方案中,突变、mRNA剪接事件、所得新抗原肽和/或HLA限定的表位包括在典型5'剪接位点邻近密码子p.331处的突变,从而诱导具有肽序列EYFTLQVLSLGTSYQVESFQSNTQNAVFFLTVPATGAFAIRGQ (SEQ ID NO:236)的保留内含子,所述序列含有表位LQVLSLGTSY (SEQ ID NO:237) (HLA-B*15:01)、FQSNTQNAVF (SEQ ID NO:238) (HLA-B*15:01)。

[0260] 在一些实施方案中,突变、mRNA剪接事件、所得新抗原肽和/或HLA限定的表位包括在典型3'剪接位点邻近密码子p.126处的突变,从而诱导隐蔽选择性外显子3'剪接位点,其产生含有表位CTMFCQLAK (SEQ ID NO:240) (HLA-A*11:01)、KSVTCTMF (SEQ ID NO:241) (HLA-B*58:01)的新型跨越肽序列AKSVTCTMFCQLAK (SEQ ID NO:239)。

[0261] 在一些实施方案中,突变、mRNA剪接事件、所得新抗原肽和/或HLA限定的表位包括在典型5'剪接位点邻近密码子p.224处的突变,从而诱导隐蔽选择性内含子5'剪接位点,其产生含有表位VPYEPPEVW (SEQ ID NO:243) (HLA-B*53:01,HLA-B*51:01)、LTVPPSTAW (SEQ ID NO:244) (HLA-B*58:01,HLA-B*57:01)的新型跨越肽序列VPYEPPEVWLALTVPSTAWAA (SEQ ID NO:242)。

[0262] 在先前序列中,转录物密码子位置涉及来自Ensembl v83人基因组注释的典型全长p53转录物ENST00000269305 (SEQ ID NO:245)。

[0263] 通常从患者的DNA测序数据获得突变以得到现有技术肽疫苗的新表位。然而,mRNA表达是对可能的表位的整体空间的更直接的测量。例如,一些肿瘤特异性新表位可能来自导致移码、替代启动子或表观遗传修饰的剪接变化、插入/缺失(InDel),其仅使用外显子组测序数据不容易鉴定。鉴定新抗原疫苗的这些类型的复杂突变中存在未开发的值,因为它们将增加能够结合患者独特的HLA同种异型的表位的数量。此外,复杂变体将具有更高的免疫原性并且可能导致针对肿瘤的更有效的免疫应答,因为与由单个氨基酸变化产生的变体相比,它们与自身蛋白质不同。

[0264] 在一些方面,本发明涉及用于鉴定患者特异性复杂突变并将这些突变配制成有效的个人化mRNA疫苗的方法。所述方法涉及使用短读取RNA测序。使用RNA测序的短读取所固有的主要挑战是由于选择性剪接和其他机制,可从同一基因组基因座获得多种mRNA转录物同种型的事实。由于测序读段比全长mRNA转录物短得多,因此难以将一组读段映射回至已知基因注释模型内的正确相应同种型。因此,通过标准方法可能难以发现与已知基因注释(如在癌症中常见)不同的复杂变体。然而,本发明涉及鉴定短肽而不是全长转录物的确切外显子组成。用于鉴定将代表这些复杂突变的短肽的方法涉及对复杂变体的新表位预测的短k聚体计数方法。

[0265] 典型的下一代测序读段是150个碱基对,如果捕获编码区,则其可解析50个密码子,或长度为9(27个核苷酸)的41个不同的肽表位。因此,使用简单的、计算可扩展的操作来计算来自RNA测序样品的所有27聚体,可将结果与来自相同样品的正常组织进行比较,或者

与来自正常组织的RNA测序的27聚体的预计算数据库(例如,GTE_x)进行比较。

[0266] 可创建含有从RNA测序数据预测的新表位的mRNA疫苗,其中1)从来自肿瘤样品的所有RNA测序读段计数所有可能的27聚体,2)每个读段的开放阅读框通过将整个读段的任何部分与转录组进行比对来预测,并且3)将27聚体计数与匹配的正常样品的相应27聚体计数和/或来自相同组织类型的正常组织的数据库进行比较,并且4)如果在同一基因中发现体细胞突变,则将来自相同肿瘤的DNA测序数据用于增加对新表位预测的置信度。关于点(4),通常突变可引起转录或剪接变化,所述变化导致mRNA序列的不能从突变本身直接预测的变化。例如,可预测剪接位点突变导致外显子跳跃,但是不可能确切地知道哪个下游外显子将由其位置中的剪接机器选择。

[0267] 在一个实施方案中,本发明提供一种mRNA疫苗,其包含含有编码新抗原肽1至4的开放阅读框(ORF)的多联多表位构建体或一组个别表位构建体。

[0268] 在一个实施方案中,本发明提供基于患者的肿瘤含有任何以上突变来选择性施用含有或编码肽1-4的疫苗。

[0269] 在一个实施方案中,本发明提供基于以下双重准则来选择性施用疫苗:1)患者的肿瘤含有任何以上突变以及2)患者的正常HLA类型含有被预测会结合所得新抗原的相应HLA等位基因。

[0270] 已发现本文所述的mRNA疫苗在若干方面优于当前疫苗。首先,脂质纳米粒子(LNP)递送优于其他制剂,包括文献中所述的基于脂质体或鱼精蛋白的方法,并且额外佐剂将不是必要的。使用LNP使得能够有效递送化学修饰的mRNA疫苗或未修饰mRNA疫苗。经修饰LNP配制mRNA疫苗与未修饰LNP配制mRNA疫苗两者均以显著程度优于常规疫苗。在一些实施方案中,本发明的mRNA疫苗在优越性方面是常规疫苗的至少10倍、20倍、40倍、50倍、100倍、500倍或1,000倍。

[0271] 尽管已经尝试产生功能性RNA疫苗,包括mRNA疫苗和自我复制RNA疫苗,但是这些RNA疫苗的治疗功效尚未充分确立。非常出人意料地,根据本发明的方面,本发明人已发现一类用于在体内递送mRNA疫苗的制剂,所述类别的制剂产生显著增强的并且在许多方面具有协同作用的免疫应答,包括增强的抗原产生和具有中和能力的功能性抗体产生。即使当相较于在其他类别的基于脂质的制剂的情况下使用的mRNA剂量,施用显著更低剂量的mRNA时,也可实现这些结果。本发明的制剂已显示足以确立功能性mRNA疫苗作为防治剂和治疗剂的功效的显著出人意料的体内免疫应答。另外,自我复制性RNA疫苗依赖于病毒复制路径来将足够RNA递送至细胞以产生免疫原性应答。本发明的制剂不需要病毒复制来产生足够蛋白质以导致强烈免疫应答。因此,本发明的mRNA不是自我复制性RNA,并且不包括为病毒复制所必需的组分。

[0272] 在一些方面,本发明涉及脂质纳米粒子(LNP)制剂使包括化学修饰的和未修饰的mRNA疫苗的mRNA疫苗的有效性显著增强的出人意料的发现。使用若干不同肿瘤抗原,在体内检查在LNP中配制的mRNA疫苗的功效。除提供增强的免疫应答之外,相比于其他测试疫苗,本发明的制剂也以更少剂量的抗原产生更快速免疫应答。相比于在不同载体中配制的疫苗,本发明的mRNA-LNP制剂也产生就定量和定性来说更好的免疫应答。另外,即使当mRNA的剂量低于其他疫苗时,本发明的mRNA-LNP制剂也优于其他疫苗。

[0273] 本文所述的研究中使用的LNP先前已用于在各种动物模型中以及在人中递送

siRNA。鉴于与LNP制剂的siRNA递送相关的观察结果，LNP适用于疫苗中的事实是非常出人意料。已经观察到，在LNP中配制的siRNA的治疗性递送引起与瞬时IgM应答相关的不希望的炎症应答，从而通常导致抗原产生减少和受损的免疫应答。与在siRNA情况下观察到的发现相比，本发明的LNP-mRNA制剂在本文中被证明产生增强的IgG水平，其足以用于预防性和治疗性方法而不是瞬时IgM应答。

[0274] 核酸/多核苷酸

[0275] 如本文提供的癌症疫苗包含至少一种(一种或多种)具有编码至少一种癌抗原多肽的开放阅读框的核糖核酸(RNA)多核苷酸。术语“核酸”以它的最广泛意义包括包含核苷酸的聚合物的任何化合物和/或物质。这些聚合物被称为多核苷酸。

[0276] 核酸(也被称为多核苷酸)可为或可包括例如核糖核酸(RNA)、脱氧核糖核酸(DNA)、苏糖核酸(TNA)、二醇核酸(GNA)、肽核酸(PNA)、锁定核酸(LNA,包括具有 β -D-核糖构型的LNA、具有 α -L-核糖构型的 α -LNA(LNA的非对映异构体)、具有2'-氨基官能化的2'-氨基-LNA和具有2'-氨基官能化的2'-氨基- α -LNA)、亚乙基核酸(ENA)、环己基核酸(CeNA)或其嵌合体或组合。

[0277] 在一些实施方案中，本公开的多核苷酸充当信使RNA(mRNA)。“信使RNA”(mRNA)是指编码(至少一种)多肽(天然存在的、非天然存在的或经修饰氨基酸聚合物)，并且可在体外、在体内、原位或离体被翻译以产生所编码多肽的任何多核苷酸。

[0278] mRNA分子的基本组分通常包括至少一个编码区、5'非翻译区(UTR)、3'UTR、5'帽和聚腺苷酸尾部。本公开的多核苷酸可充当mRNA，但可在它们的功能性和/或结构性设计特征方面区别于野生型mRNA，所述特征用于克服使用基于核酸的治疗剂进行有效多肽表达的现有问题。

[0279] 在一些实施方案中，癌症疫苗的RNA多核苷酸编码2-10、2-9、2-8、2-7、2-6、2-5、2-4、2-3、3-10、3-9、3-8、3-7、3-6、3-5、3-4、4-10、4-9、4-8、4-7、4-6、4-5、5-10、5-9、5-8、5-7、5-6、6-10、6-9、6-8、6-7、7-10、7-9、7-8、8-10、8-9或9-10种抗原多肽。在一些实施方案中，癌症疫苗的RNA多核苷酸编码至少10、20、30、40、50、60、70、80、90或100种抗原多肽。在一些实施方案中，癌症疫苗的RNA多核苷酸编码至少100或至少200种抗原多肽。在一些实施方案中，癌症疫苗的RNA多核苷酸编码1-10、5-15、10-20、15-25、20-30、25-35、30-40、35-45、40-50、55-65、60-70、65-75、70-80、75-85、80-90、85-95、90-100、1-50、1-100、2-50或2-100种抗原多肽。

[0280] 在一些实施方案中，癌症疫苗的RNA多核苷酸编码2-10、2-9、2-8、2-7、2-6、2-5、2-4、2-3、3-10、3-9、3-8、3-7、3-6、3-5、3-4、4-10、4-9、4-8、4-7、4-6、4-5、5-10、5-9、5-8、5-7、5-6、6-10、6-9、6-8、6-7、7-10、7-9、7-8、8-10、8-9或9-10种活化致癌基因突变肽。在一些实施方案中，癌症疫苗的RNA多核苷酸编码至少10、20、30、40、50、60、70、80、90或100种活化致癌基因突变肽。在一些实施方案中，癌症疫苗的RNA多核苷酸编码至少100或至少200种活化致癌基因突变肽。在一些实施方案中，癌症疫苗的RNA多核苷酸编码1-10、5-15、10-20、15-25、20-30、25-35、30-40、35-45、40-50、55-65、60-70、65-75、70-80、75-85、80-90、85-95、90-100、1-50、1-100、2-50或2-100种活化致癌基因突变肽。

[0281] 在一些实施方案中，对本公开的多核苷酸进行密码子优化。密码子优化方法在本领域中是已知的，并且可如本文所提供加以使用。在一些实施方案中，密码子优化可用于使

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

[0282] 在一些实施方案中,密码子优化的序列与天然存在的或野生型序列(例如编码目标多肽或蛋白质(例如抗原性蛋白质或多肽)的天然存在的或野生型mRNA序列)共有小于95%序列同一性。在一些实施方案中,密码子优化的序列与天然存在的或野生型序列(例如编码目标多肽或蛋白质(例如抗原性蛋白质或多肽)的天然存在的或野生型mRNA序列)共有小于90%序列同一性。在一些实施方案中,密码子优化的序列与天然存在的或野生型序列(例如编码目标多肽或蛋白质(例如抗原性蛋白质或多肽)的天然存在的或野生型mRNA序列)共有小于85%序列同一性。在一些实施方案中,密码子优化的序列与天然存在的或野生型序列(例如编码目标多肽或蛋白质(例如抗原性蛋白质或多肽)的天然存在的或野生型mRNA序列)共有小于80%序列同一性。在一些实施方案中,密码子优化的序列与天然存在的或野生型序列(例如编码目标多肽或蛋白质(例如抗原性蛋白质或多肽)的天然存在的或野生型mRNA序列)共有小于75%序列同一性。

[0283] 在一些实施方案中,密码子优化的序列与天然存在的或野生型序列(例如编码目标多肽或蛋白质(例如抗原性蛋白质或多肽)的天然存在的或野生型mRNA序列)共有65%与85%之间(例如约67%与约85%之间、或约67%与约80%之间)序列同一性。在一些实施方案中,密码子优化的序列与天然存在的或野生型序列(例如编码目标多肽或蛋白质(例如抗原性蛋白质或多肽)的天然存在的或野生型mRNA序列)共有65%与75%之间或约80%序列同一性。

[0284] 在一些实施方案中,密码子优化的RNA可例如是其中G/C的水平得以增强的RNA。核酸分子的G/C含量可影响RNA的稳定性。相比于含有大量腺嘌呤(A)和胸腺嘧啶(T)或尿嘧啶(U)核苷酸的核酸,具有增加量的鸟嘌呤(G)和/或胞嘧啶(C)残基的RNA可在功能上更稳定。W002/098443公开一种含有通过翻译区中的序列修饰加以稳定的mRNA的药物组合物。归因于遗传密码的简并性,修饰通过将现有密码子替换成促进更大RNA稳定性而不改变所得氨基酸的那些来起作用。方法限于RNA的编码区。

[0285] 抗原/抗原性多肽

[0286] 在一些实施方案中,癌多肽(例如,活化致癌基因突变肽)长于5个氨基酸并且短于50个氨基酸。在一些实施方案中,癌多肽长于25个氨基酸并且短于50个氨基酸。因此,多肽包括基因产物、天然存在的多肽、合成多肽、同源物、直系同源物、旁系同源物、片段以及前述各物的其他等效物、变体和类似物。多肽可以是单个分子或可以是多分子复合物如二聚物、三聚物或四聚物。多肽也可包括单链或多链多肽,诸如抗体或胰岛素,并且可加以缔合或连接。最通常地,二硫键见于多链多肽中。术语多肽也可适用于氨基酸聚合物,其中至少一个氨基酸残基是相应天然存在的氨基酸的人工化学类似物。

[0287] 术语“多肽变体”是指在其氨基酸序列方面与天然或参考序列不同的分子。与天然或参考序列相比,氨基酸序列变体可具有在氨基酸序列内的某些位置处的取代、缺失和/或插入。通常,变体与天然序列或参考序列具有至少50%同一性。在一些实施方案中,变体与天然序列或参考序列共有至少80%或至少90%同一性。

[0288] 在一些实施方案中,提供“变体模拟物”。如本文所用,术语“变异模拟物”是含有至少一个将模拟活化序列的氨基酸的模拟物。例如,谷氨酸可用作磷-苏氨酸和/或磷-丝氨酸的模拟物。或者,变异模拟物可导致去活化,或导致含有所述模拟物的产物失活,举例来说,苯丙氨酸可充当酪氨酸的失活性替代物;或丙氨酸可充当丝氨酸的失活性替代物。

[0289] “直系同源物”是指不同物种中通过物种形成而从共同祖先基因进化的基因。通常,直系同源物在进化的过程中保留相同功能。鉴定直系同源物对于可靠预测新测序基因组中的基因功能至关重要。

[0290] “类似物”意图包括仍然维持亲本或起始多肽的一种或多种性质,差异在于具有一个或多个氨基酸改变例如氨基酸残基的取代、添加或缺失的多肽变体。

[0291] 本公开提供基于多核苷酸或多肽的若干类型的组合物,包括变体和衍生物。这些包括例如取代性、插入性、缺失和共价变体和衍生物。术语“衍生物”与术语“变体”同义地使用,但通常是指已经相对于参考分子或起始分子以任何方式修饰和/或改变的分子。

[0292] 因此,在本公开的范围内包括编码相对于参考序列含有取代、插入和/或添加、缺失和共价修饰的肽或多肽特别是本文公开的多肽序列的多核苷酸。举例来说,可将序列标签或氨基酸诸如一个或多个赖氨酸添加至肽序列中(例如在N末端或C末端处)。序列标签可用于肽检测、纯化或定位。赖氨酸可用于增加肽溶解度或允许生物素化。或者,位于肽或蛋白质的氨基酸序列的羧基和氨基末端区处的氨基酸残基可任选地被缺失,从而提供截短序列。或者,视序列的用途而定,可使某些氨基酸(例如C末端残基或N末端残基)缺失,所述用途例如所述序列作为可溶性或连接于固体支撑物的较大序列的一部分进行表达。

[0293] 当提及多肽时“取代变体”是天然或起始序列中的至少一个氨基酸残基被去除并且在其同一位置处的位置中插入不同的氨基酸的多肽。取代可为单一的,其中分子中仅一个氨基酸已被取代,或它们可为多重的,其中同一分子中的两个或更多个氨基酸已被取代。

[0294] 如本文所用,术语“保守氨基酸取代”是指通常存在于序列中的氨基酸被具有类似大小、电荷或极性的不同氨基酸取代。保守取代的实例包括非极性(疏水性)残基如异亮氨酸、缬氨酸和亮氨酸取代另一种非极性残基。同样,保守取代的实例包括一种极性(亲水性)残基取代另一种,如精氨酸与赖氨酸之间、谷氨酰胺与天冬酰胺之间和甘氨酸与丝氨酸之间。另外,碱性残基如赖氨酸、精氨酸或组氨酸取代另一种碱性残基、或一种酸性残基如天冬氨酸或谷氨酸取代另一种酸性残基是保守取代的另外实例。非保守取代的实例包括非极性(疏水性)氨基酸残基如异亮氨酸、缬氨酸、亮氨酸、丙氨酸、蛋氨酸取代极性(亲水性)残基如半胱氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸或赖氨酸,和/或极性残基取代非极性残基。

[0295] “特征”在涉及多肽或多核苷酸时分别定义为分子的基于氨基酸序列或基于核苷酸的不同组分。由多核苷酸编码的多肽的特征包括表面表现形式、局部构象形状、折叠、环、半环、结构域、半结构域、位点、末端或其任何组合。

[0296] 如本文所用,当涉及多肽时,术语“结构域”是指多肽的具有一种或多种可鉴定结构或功能特征或性质(例如结合能力、充当蛋白质-蛋白质相互作用的位点)的基序。

[0297] 如本文所用,当提及多肽时术语“位点”在其涉及基于氨基酸的实施方案时与“氨基酸残基”和“氨基酸侧链”同义地使用。如本文所用,当涉及多核苷酸时,术语“位点”在它涉及基于核苷酸的实施方案时与“核苷酸”同义使用。位点代表肽或多肽或多核苷酸内的可在基于多肽或基于多核苷酸的分子内被修饰、操作、改变、衍生或变化的位置。

[0298] 如本文所用,术语“末端(termini/terminus)”在涉及多肽或多核苷酸时分别是指多肽或多核苷酸的尽头。所述尽头不仅仅限于多肽或多核苷酸的第一位点或最终位点,而是可包括在末端区域中的额外氨基酸或核苷酸。基于多肽的分子可被表征为具有N末端(由具有游离氨基(NH₂)的氨基酸封端)与C末端(由具有游离羧基(COOH)的氨基酸封端)两者。在一些情况下,蛋白质由以二硫键或以非共价力集合的多个多肽链组成(多聚体、寡聚物)。这些蛋白质具有多个N末端和C末端。或者,多肽的末端可进行修饰以使得它们根据情况以基于非多肽的部分(如有机缀合物)开始或结束。

[0299] 如由本领域技术人员所认识到,蛋白质片段、功能性蛋白质结构域和同源性蛋白质也被视为在目标多肽的范围内。举例来说,本文提供长度为5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100或大于100个氨基酸的参考蛋白质的任何蛋白质片段(意指比参考多肽序列短至少一个氨基酸残基,但在其他方面相同的多肽序列)。在另一实例中,可根据本公开来利用包含具有与任何本文所述的序列40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或100%相同的10、20、30、40、50或100个氨基酸的链段的任何蛋白质。在一些实施方案中,多肽包含如任何本文提供或参考的序列中所示的2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个突变。在另一实例中,可根据本公开来利用包含具有与任何本文所述的序列大于80%、90%、95%或100%相同的20、30、40、50或100个氨基酸的链段的任何蛋白质,其中所述蛋白质具有以下链段:所述链段具有与任何本文所述的序列小于80%、75%、70%、65%或60%相同的5、10、15、20、25或30个氨基酸。

[0300] 本公开的多肽或多核苷酸分子可与参考分子(例如参考多肽或参考多核苷酸),例如与本领域所述的分子(例如工程化或设计的分子或野生型分子)共有某一程度的序列类似性或同一性。如本领域中已知的术语“同一性”是指两个或更多个多肽或多核苷酸的序列之间的关系,如通过将序列进行比较所确定。在本领域中,同一性也意指它们之间的序列相关性程度,如通过具有两个或更多个氨基酸残基或核酸残基的串段之间的匹配的数目所确定。同一性衡量两个或更多个序列之间相对于较小序列的同一匹配百分比,其中采用通过特定数学模型或计算机程序(例如“算法”)处理的空位比对(如果有的话)。相关肽的同一性可通过已知方法容易地计算。“同一性%”在它适用于多肽或多核苷酸序列时定义为在将序列对准以及必要时引入空位以实现最大同一性百分比之后,候选氨基酸或核酸序列中与第二序列的氨基酸序列或核酸序列中的残基相同的残基(氨基酸残基或核酸残基)的百分比。用于比对的方法和计算机程序是本领域熟知的。应了解同一性取决于对同一性百分比的计算,但可由于在计算中引入的空位和罚分而在数值方面不同。通常,特定多核苷酸或多肽的变体与那个特定参考多核苷酸或多肽具有至少40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%但小于100%序列同一性,如通过本文所述以及为本领域技术人员所知的序列比对程序和参数所确定。所述比对工具包括BLAST套件的那些(Stephen F. Altschul等(1997), “Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs”, Nucleic Acids

Res.25:3389-3402)。另一普及局部比对技术基于Smith-Waterman算法(Smith,T.F.和Waterman,M.S.(1981)“Identification of common molecular subsequences.”J.Mol.Biol.147:195-197)。一种基于动态规划的一般性整体比对技术是Needleman-Wunsch算法(Needleman,S.B.和Wunsch,C.D.(1970)“A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequences of two proteins.”J.Mol.Biol.48:443-453.)。更新近地,已开发快速最优整体序列比对算法(Fast Optimal Global Sequence Alignment Algorithm,FOGSAA),其据称比包括Needleman-Wunsch算法的其他最优整体比对方法更快产生对核苷酸和蛋白质序列的整体比对。本文描述其他工具,具体来说,在以下对“同一性”定义时描述。

[0301] 如本文所用,术语“同源性”是指聚合分子之间,例如核酸分子(例如DNA分子和/或RNA分子)之间和/或多肽分子之间的总体相关性。共有通过比对匹配残基来确定的阈值水平的类似性或同一性的聚合分子(例如核酸分子(例如DNA分子和/或RNA分子)和/或多肽分子)被称为同源。同源性是描述分子之间的关系的定性术语,并且可基于定量类似性或同一性。类似性或同一性是确定两个所比较序列之间的序列匹配程度的定量术语。在一些实施方案中,如果聚合物分子的序列为至少25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%相同或相似,则认为它们是彼此“同源的”。术语“同源的”必定是指至少两个序列(多核苷酸序列或多肽序列)之间的比较。如果两个多核苷酸序列编码的多肽就至少一个具有至少20个氨基酸的链段来说至少50%、60%、70%、80%、90%、95%或甚至99%同一,那么它们被视为同源。在一些实施方案中,同源多核苷酸序列的特征在于编码一段至少4-5个独特指定的氨基酸的能力。对于长度小于60个核苷酸的多核苷酸序列,通过编码一段至少4-5个独特指定的氨基酸的能力来确定同源性。如果两个蛋白质就至少一个具有至少20个氨基酸的链段来说至少50%、60%、70%、80%或90%同一,那么所述两个蛋白质序列被视为同源。

[0302] 同源性暗示所比较序列在进化中从共同来源分散。术语“同源物”是指由于从共同祖先序列遗传而与第二氨基酸序列或核酸序列相关的第一氨基酸序列或核酸序列(例如基因(DNA或RNA)或蛋白质序列)。术语“同源物”可适用于通过物种形成事件而分开的基因和/或蛋白质之间的关系,或适用于通过遗传重复事件而分开的基因和/或蛋白质之间的关系。“直系同源物”是不同物种中通过物种形成而从共同祖先基因(或蛋白质)进化的基因(或蛋白质)。通常,直系同源物在进化的过程中保留相同功能。“旁系同源物”是由于基因组内的重复而相关的基因(或蛋白质)。直系同源物在进化的过程中保留相同功能,而旁系同源物进化出新功能,即使这些功能与原始功能相关。

[0303] 术语“同一性”是指聚合分子之间,例如多核苷酸分子(例如DNA分子和/或RNA分子)之间和/或多肽分子之间的总体相关性。对两个多核酸序列的同一性百分比的计算例如可通过出于最优比较目的将两个序列对准来进行(例如可在第一核酸序列和第二核酸序列中的一者或两者中引入空位以达成最优比对,并且可出于比较目的而忽视非同一序列)。在某些实施方案中,出于比较目的比对的序列的长度为参比序列长度的至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%或100%。然后比较相应核苷酸位置的核苷酸。当第一序列中的位置由与第二序列中的相应位置相同核苷酸占据时,那么在此位置的分子是相同的。两个序列之间的一致性百分比随着由序列共享的相同位置的

数目而变化,考虑到为了最优比对两个序列而需要引入的间隙的数目,和每个间隙的长度。两个序列之间的序列的比较和一致性百分比的确定可使用数学算法来完成。举例来说,两个核酸序列之间的同一性百分比可使用诸如以下中所述的那些方法的方法确定: Computational Molecular Biology, Lesk, A.M. 编, Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W. 编, Academic Press, New York, 1993; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A.M. 和 Griffin, H.G. 编, Humana Press, New Jersey, 1994; 以及 Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. 和 Devereux, J. 编, M StOckton Press, New York, 1991; 其各自以引用的方式并入本文。举例来说,可使用 Meyers 和 Miller (CABIOS, 1989, 4:11-17) 的算法来确定两个核酸序列之间的同一性百分比,所述算法已被并入 ALIGN 程序 (2.0 版) 中,所述程序使用 PAM120 权重残基表、空位长度罚分 12 和空位罚分 4。两个核酸序列之间的同一性百分比可或者使用 GCG 软件包中的 GAP 程序,在利用 NWSgapdna.CMP 矩阵下确定。确定序列之间的同一性百分比的经常采用的方法包括但不限于在 Carillo, H. 和 Lipman, D., SIAM J Applied Math., 48:1073 (1988) 中公开的那些; 所述参考文献以引用的方式并入本文。用于确定同一性的技术编写在公众可获得的计算机程序中。用以确定两个序列之间的同源性的示例性计算机软件包括但不限于 GCG 程序包 (Devereux, J. 等, Nucleic Acids Research, 12 (1), 387 (1984))、BLASTP、BLASTN 和 FASTA (Altschul, S.F. 等, J. Molec. Biol., 215, 403 (1990))。

[0304] 化学修饰

[0305] 编码表位抗原多肽的修饰的核苷酸序列

[0306] 在一些实施方案中,本公开的 RNA (例如 mRNA) 疫苗包含至少一种具有编码至少一种呼吸道合胞体病毒 (RSV) 抗原性多肽的开放阅读框的核糖核酸 (RNA) 多核苷酸,其中所述 RNA 包含至少一种化学修饰。

[0307] 术语“化学修饰”和“化学修饰的”是指关于腺苷 (A)、鸟苷 (G)、尿苷 (U)、胸苷 (T) 或胞苷 (C) 核糖核苷或脱氧核糖核苷在它们的位置、样式、百分比或群体中的至少一者方面进行修饰。通常,这些术语不指天然存在的 5' 末端 mRNA 帽部分中的核糖核苷酸修饰。

[0308] 多核苷酸的修饰包括但不限于本文所述的那些,并且包括但不明确限于包括化学修饰的那些修饰。多核苷酸 (例如 RNA 多核苷酸,诸如 mRNA 多核苷酸) 可包含天然存在的修饰、非天然存在的修饰,或多核苷酸可包含天然存在的修饰和非天然存在的修饰的组合。多核苷酸可包括例如对糖、核碱基或核苷间键联 (例如对连接磷酸酯,对磷酸二酯键联或对磷酸二酯主链) 的任何适用修饰。

[0309] 关于多肽,术语“修饰”是指关于一组典型 20 种氨基酸进行的修饰。如果如本文提供的多肽含有氨基酸取代、插入、或取代和插入的组合,那么它们也被视为“经修饰”。

[0310] 在一些实施方案中,多核苷酸 (例如 RNA 多核苷酸,诸如 mRNA 多核苷酸) 包含各种 (超过一种) 不同修饰。在一些实施方案中,多核苷酸的特定区域含有一个、两个或更多个 (任选是不同的) 核苷或核苷酸修饰。在一些实施方案中,相对于未修饰多核苷酸,引入细胞或生物体中的经修饰的 RNA 多核苷酸 (例如经修饰 mRNA 多核苷酸) 分别在所述细胞或生物体中展现降解降低。在一些实施方案中,引入细胞或生物体中的经修饰的 RNA 多核苷酸 (例如经修饰 mRNA 多核苷酸) 可分别在所述细胞或生物体中展现免疫原性降低 (例如先天性应答

降低)。

[0311] 在一些实施方案中,多核苷酸(例如RNA多核苷酸,诸如mRNA多核苷酸)包含在多核苷酸的合成或合成后期间引入以实现所需功能或性质的非天然经修饰核苷酸。修饰可存在于核苷酸间键联、嘌呤或嘧啶碱基或糖上。修饰可用化学合成或用聚合酶引入在链的末端或链中任何其他地方。可对多核苷酸的任何区域进行化学修饰。

[0312] 在一些实施方案中,本发明的多核苷酸(例如, RNA, 例如mRNA) 包含化学修饰的核碱基。本发明包括修饰的多核苷酸,其包含本文所述的多核苷酸(例如, 包含编码一种或多种癌表位多肽的核苷酸序列的多核苷酸)。可对修饰的多核苷酸进行化学修饰和/或结构修饰。当本发明的多核苷酸被化学和/或结构修饰时,所述多核苷酸可被称为“修饰的多核苷酸”。

[0313] 本公开提供编码一种或多种癌表位多肽的多核苷酸(例如RNA多核苷酸,诸如mRNA多核苷酸)的经修饰的核苷和核苷酸。“核苷”是指含有糖分子(例如戊糖或核糖)或其衍生物与有机碱基(例如嘌呤或嘧啶)或其衍生物(在本文中也称为“核碱基”)组合的化合物。“核苷酸”是指包含磷酸酯基团的核苷。经修饰的核苷酸可通过任何有用的方法(例如像化学、酶促或重组方法以包括一个或多个经修饰或非天然核苷)来合成。多核苷酸可包含连接的核苷的一个或多个区。此类区可具有可变主链键联。所述键联可以是标准磷酸二酯键联,在这种情况下多核苷酸将包含核苷酸的区。

[0314] 本文公开的修饰的多核苷酸可包含各种不同的修饰。在一些实施方案中,经修饰的多核苷酸含有一种、两种或更多种(任选不同的)核苷或核苷酸修饰。在一些实施方案中,引入至细胞的修饰的多核苷酸可表现出一种或多种合乎需要的性质,例如与未修饰的多核苷酸相比,细胞中改善的蛋白质表达、降低的免疫原性或降低的细胞降解。

[0315] 在一些实施方案中,对本发明的多核苷酸(例如, 包含编码一种或多种癌表位多肽的核苷酸序列的多核苷酸)进行结构修饰。如本文所用,“结构”修饰是其中两个或更多个连接核苷在多核苷酸中插入、缺失、复制、反转或随机化而无对所述核苷酸本身的显著化学修饰的修饰。因为要实现结构修饰就必须使化学键断裂并重新形成,所以结构修饰具有化学性质并因此是化学修饰。然而,结构修饰将产生不同的核苷酸序列。例如,多核苷酸“ATCG”可化学修饰成“AT-5meC-G”。同一多核苷酸可从“ATCG”结构修饰成“ATCCCG”。在此,已插入二核苷酸“CC”,从而产生对多核苷酸的结构修饰。

[0316] 在一些实施方案中,对本发明的多核苷酸进行化学修饰。如本文所用,关于多核苷酸,术语“化学修饰”或在适当时“化学修饰的”是指相对于腺苷(A)、鸟苷(G)、尿苷(U)或胞苷(C)核糖核苷或脱氧核糖核苷在它们的位置、模式、百分比或群体中的一个或多个方面的修饰。一般来说,在本文中,这些术语不意图指天然存在的5'末端mRNA帽部分中的核糖核苷酸修饰。

[0317] 在一些实施方案中,本发明的多核苷酸可具有全部或任何同一核苷类型的均一化学修饰,或通过在全部分或任何同一核苷类型中的相同起始修饰的仅仅向下滴定而产生的修饰群体,或全部或任何同一核苷类型的测量百分比的化学修饰但伴有随机并入,如其中所有尿苷被尿苷类似物(例如假尿苷或5-甲氧基尿苷)置换。在另一个实施方案中,所述多核苷酸可在整个多核苷酸中具有两种、三种或四种同一核苷类型的均一化学修饰(如所有尿苷和所有胞嘧啶等以相同方式修饰)。

[0318] 经修饰核苷酸碱基配对不仅涵盖标准腺苷-胸腺嘧啶、腺苷-尿嘧啶或鸟苷-胞嘧啶碱基对,而且也涵盖在核苷酸和/或包含非标准或经修饰碱基的经修饰核苷酸之间形成的碱基对,其中氢键供体和氢键接受体的排列容许在非标准碱基与标准碱基之间或在两个互补性非标准碱基结构之间进行氢键合,诸如像在具有至少一种化学修饰的那些多核苷酸中。这种非标准碱基配对的一个实例是修饰核苷酸肌苷与腺嘌呤、胞嘧啶或尿嘧啶之间的碱基配对。碱/糖或接头的任何组合可并入本公开的多核苷酸中。

[0319] 本领域技术人员将理解,除非另有说明,否则本申请中列出的多核苷酸序列将在代表性DNA序列中列举“T”,但是当序列代表RNA时,“T”将被取代为“U”。

[0320] 适用于本公开的组合物、方法和合成方法中的多核苷酸(例如, RNA多核苷酸, 诸如 mRNA多核苷酸)的修饰(包括但不限于化学修饰)包括但不限于以下: 均一核苷酸、核苷和核碱基: 2-甲基硫基-N6-(顺-羟基异戊烯基)腺苷; 2-甲基硫基-N6-甲基腺苷; 2-甲基硫基-N6-苏氨酰基氨基甲酰基腺苷; N6-甘氨酸基氨基甲酰基腺苷; N6-异戊烯基腺苷; N6-甲基腺苷; N6-苏氨酰基氨基甲酰基腺苷; 1,2'-O-二甲基腺苷; 1-甲基腺苷; 2'-O-甲基腺苷; 2'-O-核糖基腺苷(磷酸酯); 2-甲基腺苷; 2-甲基硫基-N6异戊烯基腺苷; 2-甲基硫基-N6-羟基正缬氨酰基氨基甲酰基腺苷; 2'-O-甲基腺苷; 2'-O-核糖基腺苷(磷酸酯); 异戊烯基腺苷; N6-(顺-羟基异戊烯基)腺苷; N6,2'-O-二甲基腺苷; N6,2'-O-二甲基腺苷; N6,N6,2'-O-三甲基腺苷; N6,N6-二甲基腺苷; N6-乙酰基腺苷; N6-羟基正缬氨酰基氨基甲酰基腺苷; N6-甲基-N6-苏氨酰基氨基甲酰基腺苷; 2-甲基腺苷; 2-甲基硫基-N6-异戊烯基腺苷; 7-脱氮-腺苷; N1-甲基-腺苷; N6,N6(二甲基)腺嘌呤; N6-顺-羟基-异戊烯基-腺苷; α -硫代-腺苷; 2(氨基)腺嘌呤; 2(氨基丙基)腺嘌呤; 2(甲基硫基)N6(异戊烯基)腺嘌呤; 2-(烷基)腺嘌呤; 2-(氨基烷基)腺嘌呤; 2-(氨基丙基)腺嘌呤; 2-(卤代)腺嘌呤; 2-(卤代)腺嘌呤; 2-(丙基)腺嘌呤; 2'-氨基-2'-脱氧-ATP; 2'-叠氮基-2'-脱氧-ATP; 2'-脱氧-2'-a-氨基腺苷TP; 2'-脱氧-2'-a-叠氮基腺苷TP; 6(烷基)腺嘌呤; 6(甲基)腺嘌呤; 6-(烷基)腺嘌呤; 6-(甲基)腺嘌呤; 7(脱氮)腺嘌呤; 8(烯基)腺嘌呤; 8(炔基)腺嘌呤; 8(氨基)腺嘌呤; 8(烷基硫基)腺嘌呤; 8-(烯基)腺嘌呤; 8-(烷基)腺嘌呤; 8-(炔基)腺嘌呤; 8-(氨基)腺嘌呤; 8-(卤代)腺嘌呤; 8-(羟基)腺嘌呤; 8-(烷基硫基)腺嘌呤; 8-(硫醇)腺嘌呤; 8-叠氮基-腺苷; 氮杂腺嘌呤; 脱氮腺嘌呤; N6(甲基)腺嘌呤; N6-(异戊基)腺嘌呤; 7-脱氮-8-氮杂-腺苷; 7-甲基腺嘌呤; 1-脱氮腺苷TP; 2'氟-N6-Bz-脱氧腺苷TP; 2'-OMe-2-氨基-ATP; 2'0-甲基-N6-Bz-脱氧腺苷TP; 2'-a-乙炔基腺苷TP; 2-氨基腺嘌呤; 2-氨基腺苷TP; 2-氨基-ATP; 2'-a-三氟甲基腺苷TP; 2-叠氮基腺苷TP; 2'-b-乙炔基腺苷TP; 2-溴腺苷TP; 2'-b-三氟甲基腺苷TP; 2-氯腺苷TP; 2'-脱氧-2',2'-二氟腺苷TP; 2'-脱氧-2'-a-巯基腺苷TP; 2'-脱氧-2'-a-硫代甲氧基腺苷TP; 2'-脱氧-2'-b-氨基腺苷TP; 2'-脱氧-2'-b-叠氮基腺苷TP; 2'-脱氧-2'-b-溴腺苷TP; 2'-脱氧-2'-b-氯腺苷TP; 2'-脱氧-2'-b-氟腺苷TP; 2'-脱氧-2'-b-碘腺苷TP; 2'-脱氧-2'-b-巯基腺苷TP; 2'-脱氧-2'-b-硫代甲氧基腺苷TP; 2-氟腺苷TP; 2-碘腺苷TP; 2-巯基腺苷TP; 2-甲氧基-腺嘌呤; 2-甲基硫基-腺嘌呤; 2-三氟甲基腺苷TP; 3-脱氮-3-溴腺苷TP; 3-脱氮-3-氯腺苷TP; 3-脱氮-3-氟腺苷TP; 3-脱氮-3-碘腺苷TP; 3-脱氮腺苷TP; 4'-叠氮基腺苷TP; 4'-碳环腺苷TP; 4'-乙炔基腺苷TP; 5'-高腺苷TP; 8-氮杂-ATP; 8-溴-腺苷TP; 8-三氟甲基腺苷TP; 9-脱氮腺苷TP; 2-氨基嘌呤; 7-脱氮-2,6-二氨基嘌呤; 7-脱氮-8-氮杂-2,6-二氨基嘌呤; 7-脱氮-8-氮杂-2-氨基嘌呤; 2,6-二氨基嘌呤; 7-脱氮-8-氮杂-腺嘌呤, 7-脱氮-2-氨基嘌呤; 2-

硫代胞苷;3-甲基胞苷;5-甲酰基胞苷;5-羟基甲基胞苷;5-甲基胞苷;N4-乙酰基胞苷;2'-0-甲基胞苷;2'-0-甲基胞苷;5,2'-0-二甲基胞苷;5-甲酰基-2'-0-甲基胞苷;赖西丁(Lysidine);N4,2'-0-二甲基胞苷;N4-乙酰基-2'-0-甲基胞苷;N4-甲基胞苷;N4,N4-二甲基-2'-OMe-胞苷TP;4-甲基胞苷;5-氮杂-胞苷;假-异胞苷;吡咯并-胞苷; α -硫代-胞苷;2-(硫代)胞嘧啶;2'-氨基-2'-脱氧-CTP;2'-叠氮基-2'-脱氧-CTP;2'-脱氧-2'-a-氨基胞苷TP;2'-脱氧-2'-a-叠氮基胞苷TP;3(脱氮)5(氮杂)胞嘧啶;3(甲基)胞嘧啶;3-(烷基)胞嘧啶;3-(脱氮)5(氮杂)胞嘧啶;3-(甲基)胞苷;4,2'-0-二甲基胞苷;5(卤代)胞嘧啶;5(甲基)胞嘧啶;5(丙炔基)胞嘧啶;5(三氟甲基)胞嘧啶;5-(烷基)胞嘧啶;5-(炔基)胞嘧啶;5-(卤代)胞嘧啶;5-(丙炔基)胞嘧啶;5-(三氟甲基)胞嘧啶;5-溴-胞苷;5-碘-胞苷;5-丙炔基胞嘧啶;6-(偶氮基)胞嘧啶;6-氮杂-胞苷;氮杂胞嘧啶;脱氮胞嘧啶;N4(乙酰基)胞嘧啶;1-甲基-1-脱氮-假异胞苷;1-甲基-假异胞苷;2-甲氧基-5-甲基-胞苷;2-甲氧基-胞苷;2-硫代-5-甲基-胞苷;4-甲氧基-1-甲基-假异胞苷;4-甲氧基-假异胞苷;4-硫代-1-甲基-1-脱氮-假异胞苷;4-硫代-1-甲基-假异胞苷;4-硫代-假异胞苷;5-氮杂-泽布拉林(zebrularine);5-甲基-泽布拉林;吡咯并-假异胞苷;泽布拉林;(E)-5-(2-溴-乙炔基)胞苷TP;2,2'-脱水-胞苷TP盐酸盐;2'氟-N4-Bz-胞苷TP;2'氟-N4-乙酰基-胞苷TP;2'-0-甲基-N4-乙酰基-胞苷TP;2'0-甲基-N4-Bz-胞苷TP;2'-a-乙炔基胞苷TP;2'-a-三氟甲基胞苷TP;2'-b-乙炔基胞苷TP;2'-b-三氟甲基胞苷TP;2'-脱氧-2',2'-二氟胞苷TP;2'-脱氧-2'-a-巯基胞苷TP;2'-脱氧-2'-a-硫代甲氧基胞苷TP;2'-脱氧-2'-b-氨基胞苷TP;2'-脱氧-2'-b-叠氮基胞苷TP;2'-脱氧-2'-b-溴胞苷TP;2'-脱氧-2'-b-氯胞苷TP;2'-脱氧-2'-b-氟胞苷TP;2'-脱氧-2'-b-碘胞苷TP;2'-脱氧-2'-b-巯基胞苷TP;2'-脱氧-2'-b-硫代甲氧基胞苷TP;2'-0-甲基-5-(1-丙炔基)胞苷TP;3'-乙炔基胞苷TP;4'-叠氮基胞苷TP;4'-碳环胞苷TP;4'-乙炔基胞苷TP;5-(1-丙炔基)阿糖胞苷TP;5-(2-氯-苯基)-2-硫代胞苷TP;5-(4-氨基-苯基)-2-硫代胞苷TP;5-氨基烯丙基-CTP;5-氰基胞苷TP;5-乙炔基阿糖胞苷TP;5-乙炔基胞苷TP;5'-高胞苷TP;5-甲氧基胞苷TP;5-三氟甲基-胞苷TP;N4-氨基-胞苷TP;N4-苯甲酰基-胞苷TP;假异胞苷;7-甲基鸟苷;N2,2'-0-二甲基鸟苷;N2-甲基鸟苷; γ 苷(Wyosine);1,2'-0-二甲基鸟苷;1-甲基鸟苷;2'-0-甲基鸟苷;2'-0-核糖基鸟苷(磷酸酯);2'-0-甲基鸟苷;2'-0-核糖基鸟苷(磷酸酯);7-氨基甲基-7-脱氮鸟苷;7-氰基-7-脱氮鸟苷;古嘌呤(Archaeosine);甲基 γ 苷;N2,7-二甲基鸟苷;N2,N2,2'-0-三甲基鸟苷;N2,N2,7-三甲基鸟苷;N2,N2-二甲基鸟苷;N2,7,2'-0-三甲基鸟苷;6-硫代-鸟苷;7-脱氮-鸟苷;8-氧代-鸟苷;N1-甲基-鸟苷; α -硫代-鸟苷;2(丙基)鸟嘌呤;2-(烷基)鸟嘌呤;2'-氨基-2'-脱氧-GTP;2'-叠氮基-2'-脱氧-GTP;2'-脱氧-2'-a-氨基鸟苷TP;2'-脱氧-2'-a-叠氮基鸟苷TP;6(甲基)鸟嘌呤;6-(烷基)鸟嘌呤;6-(甲基)鸟嘌呤;6-甲基-鸟苷;7(烷基)鸟嘌呤;7(脱氮)鸟嘌呤;7(甲基)鸟嘌呤;7-(烷基)鸟嘌呤;7-(脱氮)鸟嘌呤;7-(甲基)鸟嘌呤;8(烷基)鸟嘌呤;8(炔基)鸟嘌呤;8(卤代)鸟嘌呤;8(烷基巯基)鸟嘌呤;8-(烯基)鸟嘌呤;8-(烷基)鸟嘌呤;8-(炔基)鸟嘌呤;8-(氨基)鸟嘌呤;8-(卤代)鸟嘌呤;8-(羟基)鸟嘌呤;8-(烷基巯基)鸟嘌呤;8-(硫醇)鸟嘌呤;氮杂鸟嘌呤;脱氮鸟嘌呤;N(甲基)鸟嘌呤;N-(甲基)鸟嘌呤;1-甲基-6-硫代-鸟苷;6-甲氧基-鸟苷;6-硫代-7-脱氮-8-氮杂-鸟苷;6-硫代-7-脱氮-鸟苷;6-硫代-7-甲基-鸟苷;7-脱氮-8-氮杂-鸟苷;7-甲基-8-氧代-鸟苷;N2,N2-二甲基-6-硫代-鸟苷;N2-甲基-6-硫代-鸟苷;1-Me-GTP;2'氟-N2-异丁基-鸟苷TP;2'0-甲基-N2-异丁基-鸟苷TP;2'-a-乙炔基鸟苷

TP;2'-a-三氟甲基鸟苷TP;2'-b-乙炔基鸟苷TP;2'-b-三氟甲基鸟苷TP;2'-脱氧-2',2'-二氟鸟苷TP;2'-脱氧-2'-a-巯基鸟苷TP;2'-脱氧-2'-a-硫代甲氧基鸟苷TP;2'-脱氧-2'-b-氨基鸟苷TP;2'-脱氧-2'-b-叠氮基鸟苷TP;2'-脱氧-2'-b-溴鸟苷TP;2'-脱氧-2'-b-氯鸟苷TP;2'-脱氧-2'-b-氟鸟苷TP;2'-脱氧-2'-b-碘鸟苷TP;2'-脱氧-2'-b-巯基鸟苷TP;2'-脱氧-2'-b-硫代甲氧基鸟苷TP;4'-叠氮基鸟苷TP;4'-碳环鸟苷TP;4'-乙炔基鸟苷TP;5'-高鸟苷TP;8-溴-鸟苷TP;9-脱氮鸟苷TP;N2-异丁基-鸟苷TP;1-甲基肌苷;肌苷;1,2'-O-二甲基肌苷;2'-O-甲基肌苷;7-甲基肌苷;2'-O-甲基肌苷;环氧基腺苷;半乳糖基-腺苷;甘露糖基腺苷;腺苷;烯丙基氨基-胸苷;氮杂胸苷;脱氮胸苷;脱氧-胸苷;2'-O-甲基尿苷;2-硫代尿苷;3-甲基尿苷;5-羧基甲基尿苷;5-羟基尿苷;5-甲基尿苷;5-牛磺酸基甲基-2-硫代尿苷;5-牛磺酸基甲基尿苷;二氢尿苷;假尿苷;(3-(3-氨基-3-羧基丙基)尿苷;1-甲基-3-(3-氨基-5-羧基丙基)假尿苷;1-甲基假尿苷;1-乙基-假尿苷;2'-O-甲基尿苷;2'-O-甲基假尿苷;2'-O-甲基尿苷;2-硫代-2'-O-甲基尿苷;3-(3-氨基-3-羧基丙基)尿苷;3,2'-O-二甲基尿苷;3-甲基-假-尿苷TP;4-硫代尿苷;5-(羧基羟基甲基)尿苷;5-(羧基羟基甲基)尿苷甲酯;5,2'-O-二甲基尿苷;5,6-二氢-尿苷;5-氨基甲基-2-硫代尿苷;5-氨基甲酰基甲基-2'-O-甲基尿苷;5-氨基甲酰基甲基尿苷;5-羧基羟基甲基尿苷;5-羧基羟基甲基尿苷甲酯;5-羧基甲基氨基甲基-2'-O-甲基尿苷;5-羧基甲基氨基甲基-2-硫代尿苷;5-羧基甲基氨基甲基-2-硫代尿苷;5-羧基甲基氨基甲基尿苷;5-氨基甲酰基甲基尿苷TP;5-甲氧基羰基甲基-2'-O-甲基尿苷;5-甲氧基羰基甲基-2-硫代尿苷;5-甲氧基羰基甲基尿苷;5-甲基尿苷),5-甲氧基尿苷;5-甲基-2-硫代尿苷;5-甲基氨基甲基-2-硫代尿苷;5-甲基氨基甲基-2-硫代尿苷;5-甲基氨基甲基尿苷;5-甲基二氢尿苷;5-氧基乙酸-尿苷TP;5-氧基乙酸-甲酯-尿苷TP;N1-甲基-假-尿嘧啶;N1-乙基-假-尿嘧啶;尿苷5-氧基乙酸;尿苷5-氧基乙酸甲酯;3-(3-氨基-3-羧基丙基)-尿苷TP;5-(异戊烯基氨基甲基)-2-硫代尿苷TP;5-(异戊烯基氨基甲基)-2'-O-甲基尿苷TP;5-(异戊烯基氨基甲基)尿苷TP;5-丙炔基尿嘧啶; α -硫代-尿苷;1(氨基烷基氨基-羰基乙烯基)-2(硫代)-假尿嘧啶;1(氨基烷基氨基羰基乙烯基)-2,4-(二硫代)假尿嘧啶;1(氨基烷基氨基羰基乙烯基)-4(硫代)假尿嘧啶;1(氨基烷基氨基羰基乙烯基)-假尿嘧啶;1(氨基羰基乙烯基)-2(硫代)-假尿嘧啶;1(氨基羰基乙烯基)-2,4-(二硫代)假尿嘧啶;1(氨基羰基乙烯基)-4(硫代)假尿嘧啶;1(氨基羰基乙烯基)-假尿嘧啶;1取代的2(硫代)-假尿嘧啶;1取代的2,4-(二硫代)假尿嘧啶;1取代的4(硫代)假尿嘧啶;1取代的假尿嘧啶;1-(氨基烷基氨基-羰基乙烯基)-2-(硫代)-假尿嘧啶;1-甲基-3-(3-氨基-3-羧基丙基)假尿苷TP;1-甲基-3-(3-氨基-3-羧基丙基)假-UTP;1-甲基-假-UTP;1-乙基-假-UTP;2(硫代)假尿嘧啶;2'脱氧尿苷;2'氟尿苷;2-(硫代)尿嘧啶;2,4-(二硫代)假尿嘧啶;2'甲基,2'氨基,2'叠氮基,2'氟-鸟苷;2'-氨基-2'-脱氧-UTP;2'-叠氮基-2'-脱氧-UTP;2'-叠氮基-脱氧尿苷TP;2'-O-甲基假尿苷;2'脱氧尿苷;2'氟尿苷;2'-脱氧-2'-a-氨基尿苷TP;2'-脱氧-2'-a-叠氮基尿苷TP;2-甲基假尿苷;3(3-氨基-3-羧基丙基)尿嘧啶;4(硫代)假尿嘧啶;4-(硫代)假尿嘧啶;4-(硫代)尿嘧啶;4-硫代尿嘧啶;5(1,3-二唑-1-烷基)尿嘧啶;5(2-氨基丙基)尿嘧啶;5(氨基烷基)尿嘧啶;5(二甲基氨基烷基)尿嘧啶;5(胍鎗烷基)尿嘧啶;5(甲氧基羰基甲基)-2-(硫代)尿嘧啶;5(甲氧基羰基-甲基)尿嘧啶;5(甲基)2(硫代)尿嘧啶;5(甲基)2,4(二硫代)尿嘧啶;5(甲基)4(硫代)尿嘧啶;5(甲基氨基甲基)-2(硫代)尿嘧啶;5(甲基氨基甲基)-2,4(二硫代)尿嘧啶;5

(甲基氨基甲基)-4(硫代)尿嘧啶;5(丙炔基)尿嘧啶;5(三氟甲基)尿嘧啶;5-(2-氨基丙基)尿嘧啶;5-(烷基)-2-(硫代)假尿嘧啶;5-(烷基)-2,4(二硫代)假尿嘧啶;5-(烷基)-4(硫代)假尿嘧啶;5-(烷基)假尿嘧啶;5-(烷基)尿嘧啶;5-(炔基)尿嘧啶;5-(烯丙基氨基)尿嘧啶;5-(氰基烷基)尿嘧啶;5-(二烷基氨基烷基)尿嘧啶;5-(二甲基氨基烷基)尿嘧啶;5-(胍鎓烷基)尿嘧啶;5-(卤代)尿嘧啶;5-(1,3-二唑-1-烷基)尿嘧啶;5-(甲氧基)尿嘧啶;5-(甲氧基羰基甲基)-2-(硫代)尿嘧啶;5-(甲氧基羰基-甲基)尿嘧啶;5-(甲基)2(硫代)尿嘧啶;5-(甲基)2,4(二硫代)尿嘧啶;5-(甲基)4(硫代)尿嘧啶;5-(甲基)-2-(硫代)假尿嘧啶;5-(甲基)-2,4(二硫代)假尿嘧啶;5-(甲基)-4(硫代)假尿嘧啶;5-(甲基)假尿嘧啶;5-(甲基氨基甲基)-2(硫代)尿嘧啶;5-(甲基氨基甲基)-2,4(二硫代)尿嘧啶;5-(甲基氨基甲基)-4(硫代)尿嘧啶;5-(丙炔基)尿嘧啶;5-(三氟甲基)尿嘧啶;5-氨基烯丙基-尿苷;5-溴-尿苷;5-碘-尿苷;5-尿嘧啶;6(偶氮基)尿嘧啶;6-(偶氮基)尿嘧啶;6-氮杂-尿苷;烯丙基氨基-尿嘧啶;氮杂尿嘧啶;脱氮尿嘧啶;N3(甲基)尿嘧啶;假-UTP-1-2-乙酸;假尿嘧啶;4-硫代-假-UTP;1-羧基甲基-假尿苷;1-甲基-1-脱氮-假尿苷;1-丙炔基-尿苷;1-牛磺酸基甲基-1-甲基-尿苷;1-牛磺酸基甲基-4-硫代-尿苷;1-牛磺酸基甲基-假尿苷;2-甲氧基-4-硫代-假尿苷;2-硫代-1-甲基-1-脱氮-假尿苷;2-硫代-1-甲基-假尿苷;2-硫代-5-氮杂-尿苷;2-硫代-二氢假尿苷;2-硫代-二氢尿苷;2-硫代-假尿苷;4-甲氧基-2-硫代-假尿苷;4-甲氧基-假尿苷;4-硫代-1-甲基-假尿苷;4-硫代-假尿苷;5-氮杂-尿苷;二氢假尿苷;(±)1-(2-羟基丙基)假尿苷TP;(2R)-1-(2-羟基丙基)假尿苷TP;(2S)-1-(2-羟基丙基)假尿苷TP;(E)-5-(2-溴-乙烯基)阿糖尿苷TP;(E)-5-(2-溴-乙烯基)尿苷TP;(Z)-5-(2-溴-乙烯基)阿糖尿苷TP;(Z)-5-(2-溴-乙烯基)尿苷TP;1-(2,2,2-三氟乙基)-假-UTP;1-(2,2,3,3,3-五氟丙基)假尿苷TP;1-(2,2-二乙氧基乙基)假尿苷TP;1-(2,4,6-三甲基苯甲基)假尿苷TP;1-(2,4,6-三甲基-苯甲基)假-UTP;1-(2,4,6-三甲基-苯基)假-UTP;1-(2-氨基-2-羧基乙基)假-UTP;1-(2-氨基-乙基)假-UTP;1-(2-羟基乙基)假尿苷TP;1-(2-甲氧基乙基)假尿苷TP;1-(3,4-双-三氟甲氧基苯甲基)假尿苷TP;1-(3,4-二甲氧基苯甲基)假尿苷TP;1-(3-氨基-3-羧基丙基)假-UTP;1-(3-氨基-丙基)假-UTP;1-(3-环丙基-丙-2-炔基)假尿苷TP;1-(4-氨基-4-羧基丁基)假-UTP;1-(4-氨基-苯甲基)假-UTP;1-(4-氨基-丁基)假-UTP;1-(4-氨基-苯基)假-UTP;1-(4-叠氮基苯甲基)假尿苷TP;1-(4-溴苯甲基)假尿苷TP;1-(4-氯苯甲基)假尿苷TP;1-(4-氟苯甲基)假尿苷TP;1-(4-碘苯甲基)假尿苷TP;1-(4-甲烷磺酰基苯甲基)假尿苷TP;1-(4-甲氧基苯甲基)假尿苷TP;1-(4-甲氧基-苯甲基)假-UTP;1-(4-甲氧基-苯基)假-UTP;1-(4-甲基苯甲基)假尿苷TP;1-(4-甲基-苯甲基)假-UTP;1-(4-硝基苯甲基)假尿苷TP;1-(4-硝基-苯甲基)假-UTP;1-(4-硝基-苯基)假-UTP;1-(4-硫代甲氧基苯甲基)假尿苷TP;1-(4-三氟甲氧基苯甲基)假尿苷TP;1-(4-三氟甲基苯甲基)假尿苷TP;1-(5-氨基-戊基)假-UTP;1-(6-氨基-己基)假-UTP;1,6-二甲基-假-UTP;1-[3-(2-{2-[2-(2-氨基乙氧基)-乙氧基]-乙氧基}-丙酰基)假尿苷TP;1-{3-[2-(2-氨基乙氧基)-乙氧基]-丙酰基}假尿苷TP;1-乙酰基假尿苷TP;1-烷基-6-(1-丙炔基)-假-UTP;1-烷基-6-(2-丙炔基)-假-UTP;1-烷基-6-烯丙基-假-UTP;1-烷基-6-乙炔基-假-UTP;1-烷基-6-高烯丙基-假-UTP;1-烷基-6-乙烯基-假-UTP;1-烯丙基假尿苷TP;1-氨基甲基-假-UTP;1-苯甲酰基假尿苷TP;1-苯甲基氧基甲基假尿苷TP;1-苯甲基-假-UTP;1-生物素基-PEG2-假尿苷TP;1-生物素基假尿苷TP;1-丁基-假-UTP;1-氰基甲基假尿苷TP;1-环丁基甲基-假-UTP;1-

环丁基-假-UTP;1-环庚基甲基-假-UTP;1-环庚基-假-UTP;1-环己基甲基-假-UTP;1-环己基-假-UTP;1-环辛基甲基-假-UTP;1-环辛基-假-UTP;1-环戊基甲基-假-UTP;1-环戊基-假-UTP;1-环丙基甲基-假-UTP;1-环丙基-假-UTP;1-乙基-假-UTP;1-己基-假-UTP;1-高烯丙基假尿苷TP;1-羟基甲基假尿苷TP;1-异丙基-假-UTP;1-Me-2-硫代-假-UTP;1-Me-4-硫代-假-UTP;1-Me- α -硫代-假-UTP;1-甲烷磺酰基甲基假尿苷TP;1-甲氧基甲基假尿苷TP;1-甲基-6-(2,2,2-三氟乙基)-假-UTP;1-甲基-6-(4-吗啉代)-假-UTP;1-甲基-6-(4-硫代吗啉代)-假-UTP;1-甲基-6-(取代的苯基)-假-UTP;1-甲基-6-氨基-假-UTP;1-甲基-6-叠氮基-假-UTP;1-甲基-6-溴-假-UTP;1-甲基-6-丁基-假-UTP;1-甲基-6-氯-假-UTP;1-甲基-6-氰基-假-UTP;1-甲基-6-二甲基氨基-假-UTP;1-甲基-6-乙氧基-假-UTP;1-甲基-6-甲酸乙酯-假-UTP;1-甲基-6-乙基-假-UTP;1-甲基-6-氟-假-UTP;1-甲基-6-甲酰基-假-UTP;1-甲基-6-羟基氨基-假-UTP;1-甲基-6-羟基-假-UTP;1-甲基-6-碘-假-UTP;1-甲基-6-异丙基-假-UTP;1-甲基-6-甲氧基-假-UTP;1-甲基-6-甲基氨基-假-UTP;1-甲基-6-苯基-假-UTP;1-甲基-6-丙基-假-UTP;1-甲基-6-叔丁基-假-UTP;1-甲基-6-三氟甲氧基-假-UTP;1-甲基-6-三氟甲基-假-UTP;1-吗啉代甲基假尿苷TP;1-戊基-假-UTP;1-苯基-假-UTP;1-特戊酰基假尿苷TP;1-炔丙基假尿苷TP;1-丙基-假-UTP;1-丙炔基-假尿苷;1-对甲苯基-假-UTP;1-叔丁基-假-UTP;1-硫代甲氧基甲基假尿苷TP;1-硫代吗啉代甲基假尿苷TP;1-三氟乙酰基假尿苷TP;1-三氟甲基-假-UTP;1-乙烯基假尿苷TP;2,2'-脱水-尿苷TP;2'-溴-脱氧尿苷TP;2'-F-5-甲基-2'-脱氧-UTP;2'-OMe-5-Me-UTP;2'-OMe-假-UTP;2'-a-乙炔基尿苷TP;2'-a-三氟甲基尿苷TP;2'-b-乙炔基尿苷TP;2'-b-三氟甲基尿苷TP;2'-脱氧-2',2'-二氟尿苷TP;2'-脱氧-2'-a-巯基尿苷TP;2'-脱氧-2'-a-硫代甲氧基尿苷TP;2'-脱氧-2'-b-氨基尿苷TP;2'-脱氧-2'-b-叠氮基尿苷TP;2'-脱氧-2'-b-溴尿苷TP;2'-脱氧-2'-b-氯尿苷TP;2'-脱氧-2'-b-氟尿苷TP;2'-脱氧-2'-b-碘尿苷TP;2'-脱氧-2'-b-巯基尿苷TP;2'-脱氧-2'-b-硫代甲氧基尿苷TP;2-甲氧基-4-硫代-尿苷;2-甲氧基尿苷;2'-O-甲基-5-(1-丙炔基)尿苷TP;3-烷基-假-UTP;4'-叠氮基尿苷TP;4'-碳环尿苷TP;4'-乙炔基尿苷TP;5-(1-丙炔基)阿糖尿苷TP;5-(2-呋喃基)尿苷TP;5-氰基尿苷TP;5-二甲基氨基尿苷TP;5'-高尿苷TP;5-碘-2'-氟-脱氧尿苷TP;5-苯基乙炔基尿苷TP;5-三氟化甲基-6-氟化尿苷TP;5-三氟甲基-尿苷TP;5-乙烯基阿糖尿苷TP;6-(2,2,2-三氟乙基)-假-UTP;6-(4-吗啉代)-假-UTP;6-(4-硫代吗啉代)-假-UTP;6-(取代的苯基)-假-UTP;6-氨基-假-UTP;6-叠氮基-假-UTP;6-溴-假-UTP;6-丁基-假-UTP;6-氯-假-UTP;6-氰基-假-UTP;6-二甲基氨基-假-UTP;6-乙氧基-假-UTP;6-甲酸乙酯-假-UTP;6-乙基-假-UTP;6-氟-假-UTP;6-甲酰基-假-UTP;6-羟基氨基-假-UTP;6-羟基-假-UTP;6-碘-假-UTP;6-异丙基-假-UTP;6-甲氧基-假-UTP;6-甲基氨基-假-UTP;6-甲基-假-UTP;6-苯基-假-UTP;6-苯基-假-UTP;6-丙基-假-UTP;6-叔丁基-假-UTP;6-三氟甲氧基-假-UTP;6-三氟甲基-假-UTP; α -硫代-假-UTP;假尿苷1-(4-甲基苯磺酸)TP;假尿苷1-(4-甲基苯甲酸)TP;假尿苷TP 1-[3-(2-乙氧基)]丙酸;假尿苷TP 1-[3-{2-(2-[2-(2-乙氧基)-乙氧基]-乙氧基)-乙氧基}]丙酸;假尿苷TP 1-[3-{2-(2-[2-{2(2-乙氧基)-乙氧基}-乙氧基]-乙氧基)-乙氧基}-乙氧基}]丙酸;假尿苷TP 1-[3-{2-(2-[2-乙氧基]-乙氧基)-乙氧基}]丙酸;假尿苷TP 1-[3-{2-(2-乙氧基)-乙氧基}]丙酸;假尿苷TP 1-甲基膦酸;假尿苷TP 1-甲基膦酸二乙酯;假-UTP-N1-3-丙酸;假-UTP-N1-4-丁酸;假-UTP-N1-5-戊酸;假-UTP-N1-6-己酸;假-UTP-N1-7-庚酸;假-UTP-N1-甲基-对苯甲酸;假-UTP-

N1-对苯甲酸;怀丁昔(Wybutosine);羟基怀丁昔;异丫昔;过氧怀丁昔;修饰不完全的羟基怀丁昔;4-脱甲基丫昔;2,6-(二氨基)嘌呤;1-(氮杂)-2-(硫代)-3-(氮杂)-吩噻嗪-1-基;1,3-(二氮杂)-2-(氧代)-吩噻嗪-1-基;1,3-(二氮杂)-2-(氧代)-吩噻嗪-1-基;1,3,5-(三氮杂)-2,6-(二氧杂)-蔡;2(氨基)嘌呤;2,4,5-(三甲基)苯基;2'甲基、2'氨基、2'叠氮基、2'氟-胞苷;2'甲基、2'氨基、2'叠氮基、2'氟-腺嘌呤;2'甲基、2'氨基、2'叠氮基、2'氟-尿苷;2'-氨基-2'-脱氧核糖;2-氨基-6-氯-嘌呤;2-氮杂-肌苷基;2'-叠氮基-2'-脱氧核糖;2'氟g2'-脱氧核糖;2'-氟-修饰的碱基;2'-O-甲基-核糖;2-氧代-7-氨基吡啶并嘧啶-3-基;2-氧代-吡啶并嘧啶-3-基;2-吡啶酮;3硝基吡咯;3-(甲基)-7-(丙炔基)异喹诺酮基;3-(甲基)异喹诺酮基;4-(氟)-6-(甲基)苯并咪唑;4-(甲基)苯并咪唑;4-(甲基)吡啶基;4,6-(二甲基)吡啶基;5硝基吡啶;5取代的嘧啶;5-(甲基)异喹诺酮基;5-硝基吡啶;6-(氮杂)嘧啶;6-(偶氮)胸腺嘧啶;6-(甲基)-7-(氮杂)吡啶基;6-氯-嘌呤;6-苯基-吡咯并-嘧啶-2-酮-3-基;7-(氨基烷基羟基)-1-(氮杂)-2-(硫代)-3-(氮杂)-吩噻嗪-1-基;7-(氨基烷基羟基)-1-(氮杂)-2-(硫代)-3-(氮杂)-吩噻嗪-1-基;7-(氨基烷基羟基)-1,3-(二氮杂)-2-(氧代)-吩噻嗪-1-基;7-(氨基烷基羟基)-1,3-(二氮杂)-2-(氧代)-吩噻嗪-1-基;7-(氨基烷基羟基)-1,3-(二氮杂)-2-(氧代)-吩噻嗪-1-基;7-(氮杂)吡啶基;7-(胍烷基羟基)-1-(氮杂)-2-(硫代)-3-(氮杂)-吩噻嗪-基;7-(胍烷基羟基)-1-(氮杂)-2-(硫代)-3-(氮杂)-吩噻嗪-1-基;7-(胍烷基羟基)-1-(氮杂)-2-(硫代)-3-(氮杂)-吩噻嗪-1-基;7-(胍烷基羟基)-1,3-(二氮杂)-2-(氧代)-吩噻嗪-1-基;7-(胍烷基羟基)-1,3-(二氮杂)-2-(氧代)-吩噻嗪-1-基;7-(丙炔基)异喹诺酮基;7-(丙炔基)异喹诺酮基;丙炔基-7-(氮杂)吡啶基;7-脱氮-肌苷基;7-取代的1-(氮杂)-2-(硫代)-3-(氮杂)-吩噻嗪-1-基;7-取代的1,3-(二氮杂)-2-(氧代)-吩噻嗪-1-基;9-(甲基)-咪唑并吡啶基;氨基吡啶基;蒽基;双-邻-(氨基烷基羟基)-6-苯基-吡咯并-嘧啶-2-酮-3-基;双-邻-取代的-6-苯基-吡咯并-嘧啶-2-酮-3-基;二氟甲基苯基;次黄嘌呤;咪唑并吡啶基;肌苷基;异喹诺酮基;异鸟苷;N2-取代的嘌呤;N6-甲基-2-氨基-嘌呤;N6-取代的嘌呤;N-烷基化衍生物;蔡基;硝基苯并咪唑基;硝基咪唑基;硝基吡啶基;硝基吡啶基;水粉草素;06-取代的嘌呤;0-烷基化衍生物;邻-(氨基烷基羟基)-6-苯基-吡咯并-嘧啶-2-酮-3-基;邻-取代的-6-苯基-吡咯并-嘧啶-2-酮-3-基;氧代间型霉素TP;对-(氨基烷基羟基)-6-苯基-吡咯并-嘧啶-2-酮-3-基;对-取代的-6-苯基-吡咯并-嘧啶-2-酮-3-基;并五苯基;菲基;苯基;丙炔基-7-(氮杂)吡啶基;苊基;吡啶并嘧啶-3-基;吡啶并嘧啶-3-基,2-氧代-7-氨基-吡啶并嘧啶-3-基;吡咯并-嘧啶-2-酮-3-基;吡咯并嘧啶基;吡咯并吡啶基;苊基;取代的1,2,4-三唑;并四苯基;杀结核菌素;黄嘌呤;黄嘌呤核苷-5'-TP;2-硫代-泽布拉恩;5-氮杂-2-硫代-泽布拉恩;7-脱氮-2-氨基-嘌呤;吡啶-4-酮核糖核苷;2-氨基-核苷-TP;间型霉素A TP;间型霉素B TP;Pyrrolosine TP;2'-OH-ara-腺苷TP;2'-OH-ara-胞苷TP;2'-OH-ara-尿苷TP;2'-OH-ara-鸟苷TP;5-(2-甲氧羰基乙烯基)尿苷TP;以及N6-(19-氨基-五氧杂十九烷基)腺苷TP。

[0321] 在一些实施方案中,多核苷酸(例如, RNA多核苷酸,如mRNA多核苷酸)包括上述修饰的核碱基中的至少两种(例如,2、3、4或更多种)的组合。

[0322] 在一些实施方案中,所述mRNA包含至少一个化学修饰的核苷。在一些实施方案中,所述至少一个化学修饰的核苷是选自由以下组成的组:假尿苷(ψ)、2-硫代尿苷(s2U)、4'-

硫代尿苷、5-甲基胞嘧啶、2-硫代-1-甲基-1-脱氮-假尿苷、2-硫代-1-甲基-假尿苷、2-硫代-5-氮杂-尿苷、2-硫代-二氢假尿苷、2-硫代-二氢尿苷、2-硫代-假尿苷、4-甲氧基-2-硫代-假尿苷、4-甲氧基-假尿苷、4-硫代-1-甲基-假尿苷、4-硫代-假尿苷、5-氮杂-尿苷、二氢假尿苷、5-甲基尿苷、5-甲氧基尿苷、2'-0-甲基尿苷、1-甲基-假尿苷(m1ψ)、1-乙基-假尿苷(e1ψ)、5-甲氧基-尿苷(mo5U)、5-甲基-胞苷(m5C)、α-硫代-鸟苷、α-硫代-腺苷、5-氰基尿苷、4'-硫代尿苷7-脱氮-腺嘌呤、1-甲基-腺苷(m1A)、2-甲基-腺嘌呤(m2A)、N6-甲基-腺苷(m6A)和2,6-二氨基嘌呤、(I)、1-甲基-肌苷(m1I)、γ-苷(imG)、甲基γ-苷(mimG)、7-脱氮-鸟苷、7-氰基-7-脱氮-鸟苷(preQ0)、7-氨基甲基-7-脱氮-鸟苷(preQ1)、7-甲基-鸟苷(m7G)、1-甲基-鸟苷(m1G)、8-氧代-鸟苷、7-甲基-8-氧代-鸟苷、2,8-二甲基腺苷、2-香叶基硫代尿苷、2-赖西丁、2-硒代尿苷、3-(3-氨基-3-羧基丙基)-5,6-二氢尿苷、3-(3-氨基-3-羧基丙基)假尿苷、3-甲基假尿苷、5-(羧基羧基甲基)-2'-0-甲基尿苷甲酯、5-氨基甲基-2-香叶基硫代尿苷、5-氨基甲基-2-硒代尿苷、5-氨基甲基尿苷、5-氨基甲酰基羧基甲基尿苷、5-氨基甲酰基甲基-2-硫代尿苷、5-羧基甲基-2-硫代尿苷、5-羧基甲基氨基甲基-2-香叶基硫代尿苷、5-羧基甲基氨基甲基-2-硒代尿苷、5-氰基甲基尿苷、5-羧基胞苷、5-甲基氨基甲基-2-香叶基硫代尿苷、7-氨基羧基丙基-脱甲基γ-苷、7-氨基羧基丙基γ-苷、7-氨基羧基丙基γ-苷甲酯、8-甲基腺苷、N4,N4-二甲基胞苷、N6-甲酰基腺苷、N6-羧基甲基腺苷、2-胍丁胺基胞苷(agmatidine)、环状N6-苏氨酰基氨基甲酰基腺苷、谷氨酰基-腺苷、甲基化修饰不完全的羧基怀丁苷、N4,N4,2'-0-三甲基胞苷、香叶基化5-甲基氨基甲基-2-硫代尿苷、香叶基化5-羧基甲基氨基甲基-2-硫代尿苷、Qbase、preQ0base、preQ1base以及其两者或更多者组合。在一些实施方案中,至少一种化学修饰的核苷选自假尿苷、1-甲基-假尿苷、1-乙基-假尿苷、5-甲基胞嘧啶、5-甲氧基尿苷及其组合组成的组。在一些实施方案中,多核苷酸(例如, RNA多核苷酸,如mRNA多核苷酸)包括上述修饰的核碱基中的至少两种(例如,2、3、4或更多种)的组合。

[0323] 在一些实施方案中,mRNA是尿嘧啶修饰的序列,所述序列包含编码一种或多种癌表位多肽的ORF,其中所述mRNA包含化学修饰的核碱基,例如5-甲氧基尿嘧啶。在本发明的某些方面,当5-甲氧基尿嘧啶碱基与核糖连接时,如它在多核苷酸中那样,所得的修饰的核苷或核苷酸被称为5-甲氧基尿苷。在一些实施方案中,多核苷酸中的尿嘧啶是至少约25%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约95%、至少约99%或约100%的5-甲氧基尿嘧啶。在一个实施方案中,多核苷酸中的尿嘧啶是至少95%的5-甲氧基尿嘧啶。在另一个实施方案中,多核苷酸中的尿嘧啶是100%的5-甲氧基尿嘧啶。

[0324] 在多核苷酸中的尿嘧啶为至少95%的5-甲氧基尿嘧啶的实施方案中,可调节总体尿嘧啶含量,以使得mRNA提供适合的蛋白质表达水平,同时诱导很少或没有免疫应答。在一些实施方案中,ORF的尿嘧啶含量是相应野生型ORF中的理论最小尿嘧啶含量(%Utm)的约105%与约145%、约105%与约140%、约110%与约140%、约110%与约145%、约115%与约135%、约105%与约135%、约110%与约135%、约115%与约145%或约115%与约140%之间。在其他实施方案中,ORF的尿嘧啶含量是%UTM的约117%与约134%之间或118%与132%之间。在一些实施方案中,编码一种或多种癌表位多肽的ORF的尿嘧啶含量是%Utm的约115%、约120%、约125%、约130%、约135%、约140%、约145%或约150%。在这种背景

下,术语“尿嘧啶”可指5-甲氧基尿嘧啶和/或天然存在的尿嘧啶。

[0325] 在一些实施方案中,编码本发明的一种或多种癌表位多肽的mRNA的ORF中的尿嘧啶含量是所述ORF中的总核碱基含量的小于约50%、约40%、约30%、约20%、约15%或约12%。在一些实施方案中,所述ORF中的尿嘧啶含量是所述ORF中的总核碱基含量的约12%与约25%之间。在其他实施方案中,所述ORF中的尿嘧啶含量是所述ORF中的总核碱基含量的约15%与约17%之间。在一个实施方案中,编码一种或多种癌表位多肽的mRNA的ORF中的尿嘧啶含量是开放阅读框中的总核碱基含量的小于约20%。在这种背景下,术语“尿嘧啶”可指5-甲氧基尿嘧啶和/或天然存在的尿嘧啶。

[0326] 在其他实施方案中,编码本发明的一种或多种癌表位多肽的mRNA的ORF包含5-甲氧基尿嘧啶,并且具有调节的尿嘧啶含量,其含有比编码所述一种或多种癌表位多肽的相应野生型核苷酸序列更少的尿嘧啶对(UU)和/或尿嘧啶三联体(UUU)和/或尿嘧啶四联体(UUUU)。在一些实施方案中,编码本发明的一种或多种癌表位多肽的mRNA的ORF不含尿嘧啶对和/或尿嘧啶三联体和/或尿嘧啶四联体。在一些实施方案中,尿嘧啶对和/或尿嘧啶三联体和/或尿嘧啶四联体被降低至特定阈值以下,例如,在编码一种或多种癌表位多肽的mRNA的ORF中出现不超过1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20次。在一个具体实施方案中,编码本发明的一种或多种癌表位多肽的mRNA的ORF含有少于20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个非苯丙氨酸尿嘧啶对和/或三联体。在另一个实施方案中,编码一种或多种癌表位多肽的mRNA的ORF不含非苯丙氨酸尿嘧啶对和/或三联体。

[0327] 在其他实施方案中,编码本发明的一种或多种癌表位多肽的mRNA的ORF包含5-甲氧基尿嘧啶并且具有调节的尿嘧啶含量,其含有比编码一种或多种癌表位多肽的相应野生型核苷酸序列更少的富含尿嘧啶的簇。在一些实施方案中,编码本发明的一种或多种癌表位多肽的mRNA的ORF含有富含尿嘧啶的簇,其长度比编码所述一种或多种癌表位多肽的相应野生型核苷酸序列中的相应富含尿嘧啶的簇更短。

[0328] 在其他实施方案中,使用替代较低频率密码子。包含5-甲氧基尿嘧啶的mRNA的编码一种或多种癌表位多肽的ORF中至少约5%、至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约99%或100%的密码子被替代密码子取代,每个替代密码子的密码子频率低于同义密码子组中取代的密码子的密码子频率。如上所述,ORF还具有调节的尿嘧啶含量。在一些实施方案中,编码一种或多种癌表位多肽的mRNA的ORF中的至少一个密码子被替代密码子取代,所述替代密码子的密码子频率低于同义密码子组中被取代的密码子的密码子频率。

[0329] 在一些实施方案中,包含5-甲氧基尿嘧啶的mRNA的编码一种或多种癌表位多肽的ORF调节的尿嘧啶含量在施用至哺乳动物细胞时表现出高于来自相应野生型mRNA的一种或多种癌表位多肽的表达水平的所述一种或多种癌表位多肽的表达水平。在其他实施方案中,当施用至哺乳动物细胞时,一种或多种癌表位多肽的表达水平相对于含有至少95%5-甲氧基尿嘧啶并且尿嘧啶含量为理论最小值的约160%、约170%、约180%、约190%或约200%的相应mRNA增加。在其他实施方案中,当施用至哺乳动物细胞时,一种或多种癌表位

多肽的表达水平相对于相应mRNA增加,其中至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%或约100%的尿嘧啶是1-甲基假尿嘧啶或假尿嘧啶。在一些实施方案中,哺乳动物细胞是小鼠细胞、大鼠细胞或兔细胞。在其他实施方案中,哺乳动物细胞是猴细胞或人细胞。在一些实施方案中,人细胞是HeLa细胞、BJ成纤维细胞或外周血单核细胞(PBMC)。在一些实施方案中,当mRNA在体内施用于哺乳动物细胞时表达一种或多种癌表位多肽。在一些实施方案中,mRNA被施用至小鼠、兔、大鼠、猴或人。在一个实施方案中,小鼠是无效小鼠。在一些实施方案中,mRNA以约0.01mg/kg、约0.05mg/kg、约0.1mg/kg或约0.15mg/kg的量施用至小鼠。在一些实施方案中,mRNA通过静脉内或肌肉内施用。在其他实施方案中,当mRNA在体外施用至哺乳动物细胞时,表达所述一种或多种癌表位多肽。在一些实施方案中,表达被增加至少约2倍、至少约5倍、至少约10倍、至少约50倍、至少约500倍、至少约1500倍或至少约3000倍。在其他实施方案中,表达被增加至少约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、60%、约70%、约80%、约90%或约100%。

[0330] 在一些实施方案中,包含5-甲氧基尿嘧啶的mRNA的编码一种或多种癌表位多肽的ORF的调节的尿嘧啶含量表现出增加的稳定性。在一些实施方案中,相对于在相应条件下相应野生型mRNA的稳定性,所述mRNA在细胞中表现出增加的稳定性。在一些实施方案中,所述mRNA表现出增加的稳定性,包括对核酸酶的抗性、热稳定性和/或二级结构的稳定性增加。在一些实施方案中,通过测定mRNA的半衰期(例如,在血浆、细胞或组织样品中)和/或确定(例如,在体外或体内)随时间推移mRNA的蛋白质表达的曲线下面积(AUC)来测量所述mRNA表现出的增加的稳定性。如果在相同条件下半衰期和/或AUC大于相应野生型mRNA的半衰期和/或AUC,则mRNA被鉴定为具有增加的稳定性。

[0331] 在一些实施方案中,相对于在相同条件下由相应的野生型mRNA诱导的免疫应答,本发明的mRNA诱导可检测的较低免疫应答(例如,先天性或获得性)。在其他实施方案中,相对于在相同条件下由编码一种或多种癌表位多肽但不包含5-甲氧基尿嘧啶的mRNA诱导的免疫应答或相对于在相同条件下由编码一种或多种癌表位多肽并且包含5-甲氧基尿嘧啶但不具有调节的尿嘧啶含量的mRNA诱导的免疫应答,本公开的mRNA诱导可检测的较低免疫应答(例如,先天性或获得性)。先天性免疫应答可通过促炎性细胞因子的表达增加、细胞内PRR的活化(RIG-1、MDA5等)、细胞死亡和/或蛋白质翻译的终止或减少来表现。在一些实施方案中,先天性免疫应答的降低可通过1型干扰素(例如,IFN- α 、IFN- β 、IFN- κ 、IFN- δ 、IFN- ϵ 、IFN- τ 、IFN- ω 和IFN- ζ)的表达或活性水平或干扰素调控的基因如toll样受体(例如,TLR7和TLR8)的表达和/或通过在本发明的mRNA一次或多次施用至细胞中后细胞死亡减少来测量。

[0332] 在一些实施方案中,相对于相应的野生型mRNA、编码一种或多种癌表位多肽但不包含5-甲氧基尿嘧啶的mRNA、或编码一种或多种癌表位多肽并且包含5-甲氧基尿嘧啶但不具有调节的尿嘧啶含量的mRNA,响应于本公开的mRNA,哺乳动物细胞对1型干扰素的表达降低至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%、99.9%或大于99.9%。在一些实施方案中,干扰素是IFN- β 。在一些实施方案中,通过向哺乳动物细胞施用本公开的mRNA而引起的细胞死亡频率比在相应的野生型mRNA、编码一种或多种癌表位多肽但不包含5-甲氧基尿嘧啶的mRNA、或编码一种或多种癌表位多肽并且包含5-甲氧基尿嘧啶但不具有调节的尿嘧啶含量的mRNA情况下观察到的细胞死亡频率低10%、25%、50%、

75%、85%、90%、95%或超过95%。在一些实施方案中,哺乳动物细胞是BJ成纤维细胞。在其他实施方案中,哺乳动物细胞是脾细胞。在一些实施方案中,哺乳动物细胞是小鼠或大鼠的细胞。在其他实施方案中,哺乳动物细胞是人的细胞。在一个实施方案中,本公开的mRNA基本上不诱导引入mRNA的哺乳动物细胞的先天性免疫应答。

[0333] 在一些实施方案中,多核苷酸是包含编码一种或多种癌表位多肽的ORF的mRNA,其中所述mRNA中的尿嘧啶是至少约95%的5-甲氧基尿嘧啶,其中所述ORF的尿嘧啶含量在相应野生型ORF中的理论最小尿嘧啶含量的约115%与约135%之间,并且其中编码一种或多种癌表位多肽的ORF中的尿嘧啶含量是所述ORF中的总核碱基含量的小于约23%。在一些实施方案中,与相应的野生型ORF相比,进一步修饰编码一种或多种癌表位多肽的ORF以使ORF的G/C含量(绝对或相对)降低至少约40%。在其他实施方案中,编码一种或多种癌表位多肽的ORF含有少于20个非苯丙氨酸尿嘧啶对和/或三联体。在一些实施方案中,编码一种或多种癌表位多肽的mRNA的ORF中的至少一个密码子被替代密码子进一步取代,所述替代密码子的密码子频率低于同义密码子组中被取代的密码子的密码子频率。在一些实施方案中,当与来自相应野生型mRNA的一种或多种癌表位多肽的表达相比时,由包含ORF的mRNA编码的一种或多种癌表位多肽的表达增加至少约10倍,其中所述mRNA中的尿嘧啶是至少约95%的5-甲氧基尿嘧啶,并且其中所述ORF的尿嘧啶含量是相应野生型ORF中的理论最小尿嘧啶含量的约115%与约135%之间。在一些实施方案中,所述mRNA包含开放ORF,其中所述mRNA中的尿嘧啶是至少约95%的5-甲氧基尿嘧啶,并且其中所述ORF的尿嘧啶含量是相应野生型ORF中的理论最小尿嘧啶含量的约115%与约135%之间,并且其中所述mRNA基本上不诱导引入mRNA的哺乳动物细胞的先天性免疫应答。

[0334] 在某些实施方案中,化学修饰在多核苷酸(例如, RNA多核苷酸,如mRNA多核苷酸)中的核碱基处。在一些实施方案中,所述多核苷酸(例如, RNA多核苷酸,如mRNA多核苷酸)中的修饰的核碱基是选自由以下组成的组:1-甲基-假尿苷(m1ψ)、1-乙基-假尿苷(e1ψ)、5-甲氧基-尿苷(mo5U)、5-甲基-胞苷(m5C)、假尿苷(ψ)、α-硫代-鸟苷以及α-硫代-腺苷。在一些实施方案中,所述多核苷酸包含上述修饰的核碱基中的至少两种(例如,2、3、4或更多种)的组合。

[0335] 在一些实施方案中,所述多核苷酸(例如RNA多核苷酸,如mRNA多核苷酸)包含假尿苷(ψ)和5-甲基-胞苷(m5C)。在一些实施方案中,所述多核苷酸(例如RNA多核苷酸,如mRNA多核苷酸)包含1-甲基-假尿苷(m1ψ)。在一些实施方案中,所述多核苷酸(例如RNA多核苷酸,如mRNA多核苷酸)包含1-乙基-假尿苷(e1ψ)。在一些实施方案中,所述多核苷酸(例如RNA多核苷酸,如mRNA多核苷酸)包含1-甲基-假尿苷(m1ψ)和5-甲基-胞苷(m5C)。在一些实施方案中,所述多核苷酸(例如RNA多核苷酸,如mRNA多核苷酸)包含1-乙基-假尿苷(e1ψ)和5-甲基-胞苷(m5C)。在一些实施方案中,所述多核苷酸(例如RNA多核苷酸,如mRNA多核苷酸)包含2-硫代尿苷(s2U)。在一些实施方案中,所述多核苷酸(例如RNA多核苷酸,如mRNA多核苷酸)包含2-硫代尿苷和5-甲基-胞苷(m5C)。在一些实施方案中,所述多核苷酸(例如RNA多核苷酸,如mRNA多核苷酸)包含甲氧基-尿苷(mo5U)。在一些实施方案中,所述多核苷酸(例如RNA多核苷酸,如mRNA多核苷酸)包含5-甲氧基-尿苷(mo5U)和5-甲基-胞苷(m5C)。在一些实施方案中,所述多核苷酸(例如RNA多核苷酸,如mRNA多核苷酸)包含2'-O-甲基尿苷。在一些实施方案中,所述多核苷酸(例如RNA多核苷酸,如mRNA多核苷酸)包含2'-O-甲基尿

苷和5-甲基-胞苷(m5C)。在一些实施方案中,所述多核苷酸(例如RNA多核苷酸,如mRNA多核苷酸)包含N6-甲基-腺苷(m6A)。在一些实施方案中,所述多核苷酸(例如RNA多核苷酸,如mRNA多核苷酸)包含N6-甲基-腺苷(m6A)和5-甲基-胞苷(m5C)。

[0336] 在一些实施方案中,对于特定修饰,对多核苷酸(例如, RNA多核苷酸, 如mRNA多核苷酸)进行均一修饰(例如, 完全修饰, 在整个序列中修饰)。例如, 可用5-甲基-胞苷(m5C)均一修饰多核苷酸, 这意味着mRNA序列中的所有胞嘧啶残基都被5-甲基-胞苷(m5C)置换。作为另一个实例, 多核苷酸可用1-甲基-假尿苷均一修饰, 这意味着mRNA序列中的所有尿苷残基都用1-甲基-假尿苷置换。类似地, 可通过用修饰的残基(如以上列出的那些中的任一种)置换针对序列中存在的任何类型的核苷残基均一地修饰多核苷酸。

[0337] 在一些实施方案中, 开放阅读框中的化学修饰的核苷是选自由以下组成的组: 尿苷、腺嘌呤、胞嘧啶、鸟嘌呤以及其任何组合。

[0338] 在一些实施方案中, 修饰的核碱基是修饰的胞嘧啶。具有经修饰的胞嘧啶的示例性核碱基和核苷包括N4-乙酰基-胞苷(ac4C)、5-甲基-胞苷(m5C)、5-卤代-胞苷(例如5-碘-胞苷)、5-羟基甲基-胞苷(hm5C)、1-甲基-假尿苷、2-硫代-胞苷(s2C)和2-硫代-5-甲基-胞苷。

[0339] 在一些实施方案中, 修饰的核碱基是修饰的尿苷。具有经修饰的尿苷的示例性核碱基和核苷包括1-甲基-假尿苷(m1ψ)、1-乙基-假尿苷(e1ψ)、5-甲氧基尿苷、2-硫代尿苷、5-氰基尿苷、2'-O-甲基尿苷和4'-硫代尿苷。

[0340] 在一些实施方案中, 修饰的核碱基是修饰的腺嘌呤。具有经修饰的腺嘌呤的示例性核碱基和核苷包括7-脱氮-腺嘌呤、1-甲基-腺苷(m1A)、2-甲基-腺嘌呤(m2A)和N6-甲基-腺苷(m6A)以及2,6-二氨基嘌呤。

[0341] 在一些实施方案中, 修饰的核碱基是修饰的鸟嘌呤。具有修饰的鸟嘌呤的示例性核碱基和核苷包括肌苷(I)、1-甲基-肌苷(m1I)、怀俄苷(imG)、甲基怀俄苷(mimG)、7-脱氮-鸟苷、7-氰基-7-脱氮-鸟苷(preQ0)、7-氨基甲基-7-脱氮-鸟苷(preQ1)、7-甲基-鸟苷(m7G)、1-甲基-鸟苷(m1G)、8-氧代-鸟苷、7-甲基-8-氧代-鸟苷。

[0342] 在一些实施方案中, 所述多核苷酸(例如, RNA多核苷酸, 如mRNA多核苷酸)中的核碱基修饰的核苷酸是5-甲氧基尿苷。

[0343] 在一些实施方案中, 所述多核苷酸(例如, RNA多核苷酸, 如mRNA多核苷酸)包含至少两种(例如, 2、3、4或更多种)修饰的核碱基的组合。

[0344] 在一些实施方案中, 所述多核苷酸(例如RNA多核苷酸, 如mRNA多核苷酸)包含5-甲氧基尿苷(5mo5U)和5-甲基-胞苷(m5C)。

[0345] 在一些实施方案中, 对于特定修饰, 对多核苷酸(例如, RNA多核苷酸, 如mRNA多核苷酸)进行均一修饰(例如, 完全修饰, 在整个序列中修饰)。例如, 可用5-甲氧基尿苷均一修饰多核苷酸, 这意味着mRNA序列中基本上所有的尿苷残基都被5-甲氧基尿苷置换。类似地, 可通过用修饰的残基(如以上列出的那些中的任一种)置换针对序列中存在的任何类型的核苷残基均一地修饰多核苷酸。

[0346] 在一些实施方案中, 修饰的核碱基是修饰的胞嘧啶。

[0347] 在一些实施方案中, 修饰的核碱基是修饰的尿嘧啶。具有修饰的尿嘧啶的示例性核碱基和核苷包括5-甲氧基尿嘧啶。

[0348] 在一些实施方案中,修饰的核碱基是修饰的腺嘌呤。

[0349] 在一些实施方案中,修饰的核碱基是修饰的鸟嘌呤。

[0350] 在一些实施方案中,所述多核苷酸可包含在所述核苷之间的任何有用的接头。可用于本公开组合物中的此类接头(包括主链修饰)包括但不限于以下:3'-亚烷基磷酸酯、3'-氨基氨基磷酸酯、含烯烃的主链、氨基烷基氨基磷酸酯、氨基烷基磷酸三酯、硼烷磷酸酯、-CH₂-O-N(CH₃)-CH₂-、-CH₂-N(CH₃)-N(CH₃)-CH₂-、-CH₂-NH-CH₂-、手性磷酸酯、手性硫代磷酸酯、甲酰基和硫代甲酰基主链、亚甲基(甲基亚氨基)、亚甲基甲酰基和硫代甲酰基主链、亚甲基亚氨基和亚甲基胍基主链、吗啉代键联、-N(CH₃)-CH₂-CH₂-、具有杂原子核苷间键联的寡核苷、次磷酸酯、氨基磷酸酯、二硫代磷酸酯、硫代磷酸酯核苷间键联、硫代磷酸酯、磷酸三酯、PNA、硅氧烷主链、氨基磺酸酯主链、硫化亚砷和砷主链、磺酸酯和磺酰胺主链、硫羰基烷基磷酸酯、硫羰基烷基磷酸三酯以及硫羰基氨基磷酸酯。

[0351] 可并入多核苷酸(例如, RNA或mRNA, 如本文所描述)中的修饰的核苷和核苷酸(例如, 结构单元分子)可在核糖核酸的糖上被修饰。例如, 2'-羟基(OH)可以被多个不同的取代基修饰或置换。2'-位置处的示例性取代包括但不限于H、卤代、任选取代的C₁₋₆烷基;任选取代的C₁₋₆烷氧基;任选取代的C₆₋₁₀芳氧基;任选取代的C₃₋₈环烷基;任选取代的C₃₋₈环烷氧基;任选取代的C₆₋₁₀芳氧基;任选取代的C₆₋₁₀芳基-C₁₋₆烷氧基,任选取代的C₁₋₁₂(杂环基)氧基;糖(例如, 核糖、戊糖或本文所描述的任何糖);聚乙二醇(PEG), -O(CH₂CH₂O)_nCH₂CH₂OR, 其中R是H或任选取代的烷基, 并且n是0至20(例如, 0至4、0至8、0至10、0至16、1至4、1至8、1至10、1至16、1至20、2至4、2至8、2至10、2至16、2至20、4至8、4至10、4至16以及4至20)的整数;“锁”核酸(LNA), 其中2'-羟基通过C₁₋₆亚烷基或C₁₋₆杂亚烷基桥连接至同一核糖的4'-碳, 其中示例性桥包括亚甲基、亚丙基、醚或氨基桥;如本文所定义的氨基烷基;如本文所定义的氨基烷氧基;如本文所定义的氨基;以及如本文所定义的氨基酸。

[0352] 一般来说, RNA包括糖基核糖, 所述糖基核糖是具有氧的5元环。示例性、非限制性的修饰核苷酸包括核糖中的氧的置换(例如, 用S、Se或亚烷基如亚甲基或亚乙基置换);添加双键(例如, 以使用环戊烯基或环己烯基置换核糖);核糖的环缩反应(例如, 以便形成环丁烷或环氧丙烷的4元环);核糖的扩环反应(例如, 以便形成具有额外碳或杂原子的也具有氨基磷酸酯主链的6元或7元环, 如对于失水己糖醇、阿卓糖醇、甘露醇、环己烷基、环己烯基以及吗啉代来说);多环形式(例如, 三环;以及“非锁定”形式, 如乙二醇核酸(GNA)(例如, R-GNA或S-GNA, 其中核糖被连接至磷酸二酯键的乙二醇单元置换)、苏糖核酸(TNA, 其中核糖被 α -L-苏型呋喃糖基-(3'→2')置换), 和肽核酸(PNA, 其中2-氨基-乙基-甘氨酸键联置换核糖和磷酸二酯主链)。糖基还可包含具有与核糖中对应碳的立体化学构型相反的立体化学构型的一个或多个碳。因此, 多核苷酸分子可包括含有例如阿拉伯糖作为糖的核苷酸。此类糖修饰在国际专利公布号W02013052523和W02014093924中教导, 所述专利公布各自的内容以引用的方式整体并入本文。

[0353] 本发明的多核苷酸(例如, 包含编码一种或多种癌表位多肽的核苷酸序列或其功能片段或变体的多核苷酸)可包括对糖、核碱基和/或核苷间键联的修饰的组合。这些组合可包括本文所描述的任何一個或多个修饰。

[0354] 本公开的多核苷酸可沿分子的整个长度加以部分或完全修饰。举例来说, 在本发明的多核苷酸中, 或在其给定的预定序列区域中(例如在包括或排除聚腺苷酸尾部的mRNA

中),一种或多种或所有或给定类型的核苷酸(例如嘌呤或嘧啶,或A、G、U、C中的任何一者或多者或全部)可被均一修饰。在一些实施方案中,本公开的多核苷酸中(或其给定序列区域中)的所有核苷酸X都是经修饰核苷酸,其中X可为核苷酸A、G、U、C中的任一者,或组合A+G、A+U、A+C、G+U、G+C、U+C、A+G+U、A+G+C、G+U+C或A+G+C中的任一者。

[0355] 多核苷酸可含有约1%至约100%的修饰的核苷酸(相对于总体核苷酸含量或相对于一种或多种类型的核苷酸,即,A、G、U或C中的任何一者或多者)或任何中间百分比(例如,1%至20%、1%至25%、1%至50%、1%至60%、1%至70%、1%至80%、1%至90%、1%至95%、10%至20%、10%至25%、10%至50%、10%至60%、10%至70%、10%至80%、10%至90%、10%至95%、10%至100%、20%至25%、20%至50%、20%至60%、20%至70%、20%至80%、20%至90%、20%至95%、20%至100%、50%至60%、50%至70%、50%至80%、50%至90%、50%至95%、50%至100%、70%至80%、70%至90%、70%至95%、70%至100%、80%至90%、80%至95%、80%至100%、90%至95%、90%至100%以及95%至100%)。应了解任何剩余百分比以存在未修饰A、G、U或C来说明。

[0356] 多核苷酸可含有最少1%以及最多100%经修饰核苷酸,或任何间插百分比,诸如至少5%经修饰核苷酸,至少10%经修饰核苷酸,至少25%经修饰核苷酸,至少50%经修饰核苷酸,至少80%经修饰核苷酸,或至少90%经修饰核苷酸。举例来说,多核苷酸可含有经修饰嘧啶,诸如经修饰尿嘧啶或胞嘧啶。在一些实施方案中,多核苷酸中至少5%、至少10%、至少25%、至少50%、至少80%、至少90%或100%的尿嘧啶用经修饰尿嘧啶(例如5取代的尿嘧啶)替换。经修饰尿嘧啶可由具有单一独特结构的化合物替换,或可由具有不同结构的多个化合物(例如2、3、4个或更多个独特结构)替换。在一些实施方案中,多核苷酸中至少5%、至少10%、至少25%、至少50%、至少80%、至少90%或100%的胞嘧啶用经修饰胞嘧啶(例如5取代的胞嘧啶)替换。经修饰胞嘧啶可由具有单一独特结构的化合物替换,或可由具有不同结构的多个化合物(例如2、3、4个或更多个独特结构)替换。

[0357] 因此,在一些实施方案中,RNA疫苗包含5'UTR元件、任选加以密码子优化的开放阅读框和3'UTR元件、聚腺苷酸序列和/或聚腺苷酸化信号,其中RNA未被化学修饰。

[0358] 在一些实施方案中,修饰核碱基是修饰尿嘧啶。具有修饰的尿嘧啶的示例性核碱基和核苷包括假尿苷(Ψ)、吡啶-4-酮核糖核苷、5-氮杂-尿苷、6-氮杂-尿苷、2-硫代-5-氮杂-尿苷、2-硫代-尿苷(s^2U)、4-硫代-尿苷(s^4U)、4-硫代-假尿苷、2-硫代-假尿苷、5-羟基-尿苷(ho^5U)、5-氨基烯丙基-尿苷、5-卤代-尿苷(例如5-碘-尿苷或5-溴-尿苷)、3-甲基-尿苷(m^3U)、5-甲氧基-尿苷(mo^5U)、尿苷5-氧基乙酸(cmo^5U)、尿苷5-氧基乙酸甲酯($mcmo^5U$)、5-羧基甲基-尿苷(cm^5U)、1-羧基甲基-假尿苷、5-羧基羟基甲基-尿苷(chm^5U)、5-羧基羟基甲基-尿苷甲酯($mchm^5U$)、5-甲氧基羰基甲基-尿苷(mcm^5U)、5-甲氧基羰基甲基-2-硫代-尿苷(mcm^5s^2U)、5-氨基甲基-2-硫代-尿苷(nm^5s^2U)、5-甲基氨基甲基-尿苷(mnm^5U)、5-甲基氨基甲基-2-硫代-尿苷(mnm^5s^2U)、5-甲基氨基甲基-2-硒代-尿苷(mnm^5se^2U)、5-氨基甲酰基甲基-尿苷(ncm^5U)、5-羧基甲基氨基甲基-尿苷($cmnm^5U$)、5-羧基甲基氨基甲基-2-硫代-尿苷($cmnm^5s^2U$)、5-丙炔基-尿苷、1-丙炔基-假尿苷、5-牛磺酸基甲基-尿苷(τm^5U)、1-牛磺酸基甲基-假尿苷、5-牛磺酸基甲基-2-硫代-尿苷(τm^5s^2U)、1-牛磺酸基甲基-4-硫代-假尿苷、5-甲基-尿苷(m^5U ,即具有核碱基脱氧胸腺嘧啶)、1-甲基-假尿苷($m^1\Psi$)、1-乙基-假尿苷($e^1\Psi$)、5-甲基-2-硫代-尿苷(m^5s^2U)、1-甲基-4-硫代-假尿苷($m^1s^4\Psi$)、4-硫代-1-甲基-假尿苷、

3-甲基-假尿苷($m^3\psi$)、2-硫代-1-甲基-假尿苷、1-甲基-1-脱氮-假尿苷、2-硫代-1-甲基-1-脱氮-假尿苷、二氢尿苷(D)、二氢假尿苷、5,6-二氢尿苷、5-甲基-二氢尿苷(m^5D)、2-硫代-二氢尿苷、2-硫代-二氢假尿苷、2-甲氧基-尿苷、2-甲氧基-4-硫代-尿苷、4-甲氧基-假尿苷、4-甲氧基-2-硫代-假尿苷、N1-甲基-假尿苷、3-(3-氨基-3-羧基丙基)尿苷(acp^3U)、1-甲基-3-(3-氨基-3-羧基丙基)假尿苷($acp^3\psi$)、5-(异戊烯基氨基甲基)尿苷(inm^5U)、5-(异戊烯基氨基甲基)-2-硫代-尿苷(inm^5s^2U)、 α -硫代-尿苷、2'-O-甲基-尿苷(Um)、5,2'-O-二甲基-尿苷(m^5Um)、2'-O-甲基-假尿苷(ψm)、2-硫代-2'-O-甲基-尿苷(s^2Um)、5-甲氧基羧基甲基-2'-O-甲基-尿苷(mcm^5Um)、5-氨基甲酰基甲基-2'-O-甲基-尿苷(ncm^5Um)、5-羧基甲基氨基甲基-2'-O-甲基-尿苷($cmnm^5Um$)、3,2'-O-二甲基-尿苷(m^3Um)以及5-(异戊烯基氨基甲基)-2'-O-甲基-尿苷(inm^5Um)、1-硫代-尿苷、脱氧胸苷、2'-F-阿糖尿苷、2'-F-尿苷、2'-OH-阿糖尿苷、5-(2-甲氧甲酰基乙烯基)尿苷和5-[3-(1-E-丙烯基氨基)]尿苷。

[0359] 在一些实施方案中,经修饰的核碱基是经修饰的胞嘧啶。具有经修饰的胞嘧啶的示例性核碱基和核苷包括5-氮杂-胞苷、6-氮杂-胞苷、假异胞苷、3-甲基-胞苷(m^3C)、N4-乙酰基-胞苷(ac^4C)、5-甲酰基-胞苷(f^5C)、N4-甲基-胞苷(m^4C)、5-甲基-胞苷(m^5C)、5-卤代-胞苷(例如5-碘-胞苷)、5-羟基甲基-胞苷(hm^5C)、1-甲基-假异胞苷、吡咯并-胞苷、吡咯并-假异胞苷、2-硫代-胞苷(s^2C)、2-硫代-5-甲基-胞苷、4-硫代-假异胞苷、4-硫代-1-甲基-假异胞苷、4-硫代-1-甲基-1-脱氮-假异胞苷、1-甲基-1-脱氮-假异胞苷、泽布拉林、5-氮杂-泽布拉林、5-甲基-泽布拉林、5-氮杂-2-硫代-泽布拉林、2-硫代-泽布拉林、2-甲氧基-胞苷、2-甲氧基-5-甲基-胞苷、4-甲氧基-假异胞苷、4-甲氧基-1-甲基-假异胞苷、赖西丁($k2C$)、 α -硫代-胞苷、2'-O-甲基-胞苷(Cm)、5,2'-O-二甲基-胞苷(m^5Cm)、N4-乙酰基-2'-O-甲基-胞苷(ac^4Cm)、N4,2'-O-二甲基-胞苷(m^4Cm)、5-甲酰基-2'-O-甲基-胞苷(f^5Cm)、N4, N4,2'-O-三甲基-胞苷(m^4_2Cm)、1-硫代-胞苷、2'-F-阿糖胞苷、2'-F-胞苷和2'-OH-阿糖胞苷。

[0360] 在一些实施方案中,修饰核碱基是修饰腺嘌呤。具有经修饰的腺嘌呤的示例性核碱基和核苷包括2-氨基-嘌呤、2,6-二氨基嘌呤、2-氨基-6-卤代-嘌呤(例如2-氨基-6-氯-嘌呤)、6-卤代-嘌呤(例如6-氯-嘌呤)、2-氨基-6-甲基-嘌呤、8-叠氮基-腺苷、7-脱氮-腺嘌呤、7-脱氮-8-氮杂-腺嘌呤、7-脱氮-2-氨基-嘌呤、7-脱氮-8-氮杂-2-氨基-嘌呤、7-脱氮-2,6-二氨基嘌呤、7-脱氮-8-氮杂-2,6-二氨基嘌呤、1-甲基-腺苷(m^1A)、2-甲基-腺嘌呤(m^2A)、N6-甲基-腺苷(m^6A)、2-甲基硫基-N6-甲基-腺苷(ms^2m^6A)、N6-异戊烯基-腺苷(i^6A)、2-甲基硫基-N6-异戊烯基-腺苷(ms^2i^6A)、N6-(顺-羟基异戊烯基)腺苷(io^6A)、2-甲基硫基-N6-(顺-羟基异戊烯基)腺苷(ms^2io^6A)、N6-甘氨酸基氨基甲酰基-腺苷(g^6A)、N6-苏氨酰基氨基甲酰基-腺苷(t^6A)、N6-甲基-N6-苏氨酰基氨基甲酰基-腺苷(m^6t^6A)、2-甲基硫基-N6-苏氨酰基氨基甲酰基-腺苷(ms^2g^6A)、N6,N6-二甲基-腺苷(m^6_2A)、N6-羟基正缬氨酰基氨基甲酰基-腺苷(hn^6A)、2-甲基硫基-N6-羟基正缬氨酰基氨基甲酰基-腺苷(ms^2hn^6A)、N6-乙酰基-腺苷(ac^6A)、7-甲基-腺嘌呤、2-甲基硫基-腺嘌呤、2-甲氧基-腺嘌呤、 α -硫代-腺苷、2'-O-甲基-腺苷(Am)、N6,2'-O-二甲基-腺苷(m^6Am)、N6,N6,2'-O-三甲基-腺苷(m^6_2Am)、1,2'-O-二甲基-腺苷(m^1Am)、2'-O-核糖基腺苷(磷酸酯)(Ar(p))、2-氨基-N6-甲基-嘌呤、1-硫代-腺苷、8-叠氮基-腺苷、2'-F-阿糖腺苷、2'-F-腺苷、2'-OH-阿糖腺苷和N6-(19-氨基-五氧杂十九基)-腺苷。

[0361] 在一些实施方案中,修饰核碱基是修饰鸟嘌呤。具有经修饰的鸟嘌呤的示例性核碱基和核苷包括肌苷(I)、1-甲基-肌苷(m^1I)、 γ 苷(imG)、甲基 γ 苷(mimG)、4-脱甲基- γ 苷(imG-14)、异 γ 苷(imG2)、怀丁苷(yW)、过氧怀丁苷(o_2yW)、羟基怀丁苷(OhyW)、修饰不完全的羟基怀丁苷(OhyW*)、7-脱氮-鸟苷、癸苷(Q)、环氧基癸苷(oQ)、半乳糖基-癸苷(galQ)、甘露糖基-癸苷(manQ)、7-氰基-7-脱氮-鸟苷(preQ₀)、7-氨基甲基-7-脱氮-鸟苷(preQ₁)、古嘌呤(G⁺)、7-脱氮-8-氮杂-鸟苷、6-硫代-鸟苷、6-硫代-7-脱氮-鸟苷、6-硫代-7-脱氮-8-氮杂-鸟苷、7-甲基-鸟苷(m^7G)、6-硫代-7-甲基-鸟苷、7-甲基-肌苷、6-甲氧基-鸟苷、1-甲基-鸟苷(m^1G)、N2-甲基-鸟苷(m^2G)、N2,N2-二甲基-鸟苷(m^2_2G)、N2,7-二甲基-鸟苷($m^{2,7}G$)、N2,N2,7-二甲基-鸟苷($m^{2,2,7}G$)、8-氧代-鸟苷、7-甲基-8-氧代-鸟苷、1-甲基-6-硫代-鸟苷、N2-甲基-6-硫代-鸟苷、N2,N2-二甲基-6-硫代-鸟苷、 α -硫代-鸟苷、2'-O-甲基-鸟苷(Gm)、N2-甲基-2'-O-甲基-鸟苷(m^2Gm)、N2,N2-二甲基-2'-O-甲基-鸟苷(m^2_2Gm)、1-甲基-2'-O-甲基-鸟苷(m^1Gm)、N2,7-二甲基-2'-O-甲基-鸟苷($m^{2,7}Gm$)、2'-O-甲基-肌苷(Im)、1,2'-O-二甲基-肌苷(m^1Im)、2'-O-核糖基鸟苷(磷酸酯)(Gr(p))、1-硫代-鸟苷、O6-甲基-鸟苷、2'-F-阿糖鸟苷和2'-F-鸟苷。

[0362] RNA(例如mRNA)的体外转录

[0363] 本公开的癌症疫苗包含至少一种RNA多核苷酸,诸如mRNA(例如经修饰mRNA)。mRNA例如在体外从被称为“体外转录模板”的模板DNA转录。在一些实施方案中,体外转录模板编码5'非翻译(UTR)区,含有开放阅读框,并且编码3'UTR和聚腺苷酸尾部。体外转录模板的特定核酸序列组成和长度将取决于由模板编码的mRNA。

[0364] 在一些实施方案中,多核苷酸包括200至3,000个核苷酸。举例来说,多核苷酸可包括200至500、200至1000、200至1500、200至3000、500至1000、500至1500、500至2000、500至3000、1000至1500、1000至2000、1000至3000、1500至3000、或2000至3000个核苷酸。

[0365] 在其他方面,本发明涉及一种用于通过IVT方法来制备mRNA癌症疫苗的方法。体外转录(IVT)方法容许对具有几乎任何序列的RNA分子进行模板引导的合成。可使用IVT方法合成的RNA分子的大小在从短寡核苷酸至具有数千碱基的长核酸聚合物的范围内。IVT方法容许合成大量RNA转录物(例如从微克至毫克数量)(Beckert等人,Synthesis of RNA by in vitro transcription,Methods Mol Biol.703:29-41(2011);Rio等人RNA:A Laboratory Manual.Cold Spring Harbor:Cold Spring Harbor Laboratory Press,2011,205-220.;Cooper,Geoffery M.The Cell:A Molecular Approach.第4版Washington D.C.:ASM Press,2007.262-299)。通常,IVT利用特征在于在目标序列上游具有启动子序列的DNA模板。启动子序列最通常具有噬菌体来源(例如T7、T3或SP6启动子序列),但可允许许多其他启动子序列,包括重新设计的那些。对DNA模板的转录通常通过使用对应于特定噬菌体启动子序列的RNA聚合酶来最佳实现。示例性RNA聚合酶包括但不限于T7RNA聚合酶、T3RNA聚合酶或SP6RNA聚合酶以及其他RNA聚合酶。IVT通常在dsDNA处引发,但可在单链上进行。

[0366] 应了解本公开的mRNA疫苗,例如编码癌抗原的mRNA或例如活化致癌基因突变肽可使用任何适当的合成方法来制备。举例来说,在一些实施方案中,本公开的mRNA疫苗使用IVT由作为模板的单一底链DNA和充当启动子的互补性寡核苷酸制备。单一底链DNA可充当体外RNA转录的DNA模板,并且可从例如质粒、PCR产物或化学合成获得。在一些实施方案中,

单一底链DNA从环状模板加以线性化。单一底链DNA模板通常包括启动子序列,例如噬菌体启动子序列,以有助于IVT。使用单一底链DNA和顶链启动子互补性寡核苷酸制备RNA的方法在本领域中是已知的。一示例性方法包括但不限于使DNA底链模板与顶链启动子互补性寡核苷酸(例如T7启动子互补性寡核苷酸、T3启动子互补性寡核苷酸或SP6启动子互补性寡核苷酸)退火,随后使用对应于启动子序列的RNA聚合酶例如T7RNA聚合酶、T3RNA聚合酶或SP6RNA聚合酶进行IVT。

[0367] IVT方法也可使用双链DNA模板来进行。举例来说,在一些实施方案中,双链DNA模板通过使用本领域中可用的链延伸技术使互补性寡核苷酸延伸以产生互补性DNA链来制备。在一些实施方案中,使含有启动子序列和编码一种或多种目标表位的序列的单一底链DNA模板退火于顶链启动子互补性寡核苷酸,并且经受PCR样过程以使顶链延伸来产生双链DNA模板。或者或另外,使含有互补于底链启动子序列以及互补于编码一种或多种目标表位的序列的顶链DNA退火于底链启动子寡核苷酸,并且经受PCR样过程以使底链延伸来产生双链DNA模板。在一些实施方案中,PCR样循环的数目在1至20个循环例如3至10个循环的范围内。在一些实施方案中,双链DNA模板完全或部分地通过化学合成方法合成。可使双链DNA模板经受如本文所述的体外转录。

[0368] 在另一方面,本公开的mRNA疫苗,例如编码癌抗原或表位的mRNA可使用两个DNA链制备,所述两个DNA链跨越它们的序列的重叠部分是互补的,从而当使互补性部分退火时,留下单链突出部分(即粘性末端)。可通过使用另一链作为模板进行延伸来使这些单链突出部分成为双链,由此产生双链DNA。在一些情况下,这个引物延伸方法可容许较大ORF并入模板DNA序列中,例如相较于通过顶链DNA合成方法获得的并入模板DNA序列中的大小。在引物延伸方法中,第一链(呈5'-3'方向)的3'末端的一部分互补于第二链(呈3'-5'方向)的3'末端的一部分。在一些所述实施方案中,单一第一链DNA可包括启动子(例如T7、T3或SP6)的序列,任选包括5'-UTR,以及ORF的一部分或全部(例如ORF的5'末端的一部分)。在一些实施方案中,单一第二链DNA可包括ORF的一部分或全部的互补性序列(例如互补于ORF的3'末端的部分),以及任选包括3'-UTR,终止序列和/或聚腺苷酸尾部。使用两个合成DNA链制备RNA的方法可包括使具有重叠互补性部分的两条链退火,随后使用一个或多个PCR样循环进行引物延伸以使链延伸来产生双链DNA模板。在一些实施方案中,PCR样循环的数目在1至20个循环例如3至10个循环的范围内。可使所述双链DNA经受如本文所述的体外转录。

[0369] 在另一方面,本公开的mRNA疫苗,例如编码癌抗原或表位的mRNA可使用作为双链DNA模板的合成双链线性DNA分子诸如gBlocks® (Integrated DNA Technologies, Coralville, Iowa) 制备。所述合成双链线性DNA分子的优势是它们提供产生mRNA所依据的较长模板。举例来说,gBlocks® 的大小可在45-1000(例如125-750个核苷酸)的范围内。在一些实施方案中,合成双链线性DNA模板包括全长5'-UTR、全长3'-UTR或两者。全长5'-UTR的长度可多达100个核苷酸,例如约40-60个核苷酸。全长3'-UTR的长度可多达300个核苷酸,例如约100-150个核苷酸。

[0370] 为有助于产生较长构建体,被设计在3'链上具有重叠序列的两个或更多个双链线性DNA分子和/或基因片段可使用本领域中已知的方法装配在一起。举例来说,可按以下方式进行Gibson Assembly™方法(Synthetic Genomics, Inc., La Jolla, CA):使用从双链DNA

片段的5'末端裂解碱基的中温核酸外切酶,随后使新形成的互补性单链3'末端退火,进行聚合酶依赖性延伸以填充任何单链空位,以及最终通过DNA连接酶来使DNA区段接合。

[0371] 在另一方面,本公开的mRNA疫苗,例如编码癌抗原或表位的mRNA可使用化学RNA合成来制备。方法例如涉及使包含编码多肽的开放阅读框的第一多核苷酸和包含5'-UTR的第二多核苷酸退火于与固体支撑物缀合的互补性多核苷酸。接着使第二多核苷酸的3'末端在适合条件下连接于第一多核苷酸的5'末端。适合条件包括使用DNA连接酶。连接反应产生第一连接产物。接着使包含3'-UTR的第三多核苷酸的5'末端在适合条件下连接于第一连接产物的3'末端。适于第二连接反应的条件包括RNA连接酶。在第二连接反应中产生第二连接产物。使第二连接产物从固体支撑物释放以产生编码目标多肽的mRNA。在一些实施方案中,mRNA的核苷酸在30个与1000个之间。

[0372] 编码目标多肽的mRNA也可通过使包含编码多肽的开放阅读框的第一多核苷酸和包含3'-UTR的第二多核苷酸结合于与固体支撑物缀合的互补性多核苷酸来制备。使第二多核苷酸的5'末端在适合条件下连接于第一多核苷酸的3'末端。适合条件包括DNA连接酶。方法产生第一连接产物。使包含5'-UTR的第三多核苷酸在适合条件下连接于第一连接产物以产生第二连接产物。适合条件包括RNA连接酶,诸如T4RNA。使第二连接产物从固体支撑物释放以产生编码目标多肽的mRNA。

[0373] 在一些实施方案中,第一多核苷酸的特征在于具有5'-三磷酸和3'-OH。在其他实施方案中,第二多核苷酸包含3'-OH。在其他实施方案中,第三多核苷酸包含5'-三磷酸和3'-OH。第二多核苷酸也可包括5'-帽结构。方法也可涉及使包含聚腺苷酸区域的第四多核苷酸连接在第三多核苷酸的3'末端的另一步骤。第四多核苷酸可包含5'-三磷酸。

[0374] 方法可或不包括反相纯化。方法也可包括洗涤步骤,其中洗涤固体支撑物以移除未反应多核苷酸。固体支撑物可为例如捕集树脂。在一些实施方案中,方法涉及dT纯化。

[0375] 根据本公开,编码本公开的mRNA疫苗的模板DNA包括编码一种或多种癌表位的开放阅读框(ORF)。在一些实施方案中,模板DNA包括具有多达1000个核苷酸,例如约10-350、30-300个核苷酸或约50-250个核苷酸的ORF。在一些实施方案中,模板DNA包括具有约150个核苷酸的ORF。在一些实施方案中,模板DNA包括具有约200个核苷酸的ORF。

[0376] 在一些实施方案中,在反应发生之后,从IVT反应混合物的组分纯化IVT转录物。举例来说,粗制IVT混合物可用无RNA酶的DNA酶处理以消化原始模板。mRNA可使用本领域中已知的方法纯化,包括但不限于使用基于有机溶剂或管柱的纯化方法进行沉淀。商业试剂盒可用于纯化RNA,例如MEGACLEAR™试剂盒(Ambion,Austin,TX)。mRNA可使用本领域中已知的方法定量,包括但不限于可商购获得的仪器例如NanoDrop。纯化mRNA可例如通过琼脂糖凝胶电泳来分析以确认RNA具有适当大小,和/或确认尚未发生RNA降解。

[0377] 非翻译区(UTR)

[0378] 非翻译区(UTR)是在未翻译的起始密码子(5'UTR)之前和终止密码子(3'UTR)之后的多核苷酸的核酸区段。在一些实施方案中,包含编码一种或多种癌抗原或表位的开放阅读框(ORF)的本发明的多核苷酸(例如,核糖核酸(RNA),例如信使RNA(mRNA))还包含UTR(例如,5'UTR或其功能片段、3'UTR或其功能片段或其组合)。

[0379] UTR可与多核苷酸中的编码区同源或异源。在一些实施方案中,UTR与编码一种或多种癌表位多肽的ORF同源。在一些实施方案中,UTR与编码一种或多种癌表位多肽的ORF异

源。在一些实施方案中,多核苷酸包含两个或更多个5'UTR或其功能片段,其各自具有相同或不同的核苷酸序列。在一些实施方案中,多核苷酸包含两个或更多个3'UTR或其功能片段,其各自具有相同或不同的核苷酸序列。

[0380] 在一些实施方案中,所述5'UTR或其功能片段、3'UTR或其功能片段或其任何组合是序列优化的。

[0381] 在一些实施方案中,所述5'UTR或其功能片段、3'UTR或其功能片段或其任何组合包含至少一种化学修饰的核碱基,例如5-甲氧基尿嘧啶。

[0382] UTR可具有提供调控作用的特征,例如稳定性、定位和/或翻译效率的增加或降低。可将包含UTR的多核苷酸施用至细胞、组织或生物体,并且可使用常规方法测量一种或多种调控特征。在一些实施方案中,5'UTR或3'UTR的功能片段分别包含全长5'或3'UTR的一种或多种调控特征。

[0383] 天然5'UTR携带在翻译起始中起作用的特征。它们拥有像Kozak序列的签名序列,所述Kozak序列通常已知在核糖体起始许多基因的翻译的过程中有所涉及。Kozak序列具有共有CCR(A/G)CCAUGG(SEQ ID NO:246),其中R是在起始密子(AUG)的上游三个碱基处的嘌呤(腺嘌呤或鸟嘌呤),其之后是另一个'G'。还已知5'UTR形成在延伸因子结合中所涉及的二级结构。

[0384] 通过工程化通常在特定靶器官的丰富表达的基因中发现的特征,可增强多核苷酸的稳定性和蛋白质产生。例如,引入肝表达的mRNA(如白蛋白、血清淀粉样蛋白A、载脂蛋白A/B/E、转铁蛋白、甲胎蛋白、促红细胞生成素或因子VIII)的5'UTR可增强肝细胞系或肝脏中多核苷酸的表达。同样,使用来自其他组织特异性mRNA的5'UTR来改进所述组织中的表达对于以下各项来说是可能的:肌肉(例如,MyoD、肌球蛋白、肌红蛋白、肌细胞生成素(Myogenin)、力蛋白(Herculin))、内皮细胞(例如,Tie-1、CD36)、骨髓细胞(例如,C/EBP、AML1、G-CSF、GM-CSF、CD11b、MSR、Fr-1、i-NOS)、白细胞(例如,CD45、CD18)、脂肪组织(例如,CD36、GLUT4、ACRP30、脂联素)以及肺上皮细胞(例如,SP-A/B/C/D)。

[0385] 在一些实施方案中,UTR是选自其蛋白质共享共同功能、结构、特征或特性的转录物的家族。例如,编码的多肽可属于在特定细胞、组织中或在发育期间的特定时间表达的蛋白质家族(即,共享至少一种功能、结构、特征、定位、起源或表达模式)。来自任何所述基因或mRNA的UTR可交换相同或不同蛋白质家族的任何其他UTR以便形成新的多核苷酸。

[0386] 在一些实施方案中,5'UTR和3'UTR可以是异源的。在一些实施方案中,5'UTR可源自与3'UTR不同的物种。在一些实施方案中,3'UTR可源自与5'UTR不同的物种。

[0387] 共同拥有的国际专利申请号PCT/US2014/021522(公布号WO/2014/164253,其以引用的方式整体并入本文)提供可作为ORF的侧翼区用于本发明的多核苷酸中的示例性UTR的列表。

[0388] 本申请的示例性UTR包括但不限于源自以下的核酸序列的一个或多个5'UTR和/或3'UTR:球蛋白,如 α -或 β -球蛋白(例如非洲爪蟾、小鼠、兔或人球蛋白);强Kozak翻译起始信号;CYBA(例如,人细胞色素b-245 α 多肽);白蛋白(例如,人白蛋白7);HSD17B4(羟基类固醇(17- β)脱氢酶);病毒(例如,烟草蚀纹病毒(TEV)、委内瑞拉马脑炎病毒(VEEV)、登革热病毒、巨细胞病毒(CMV)(例如,CMV立即早期1(IE1))、肝炎病毒(例如,乙型肝炎病毒)、辛德毕斯病毒或PAV大麦黄矮病毒);热休克蛋白(例如,hsp70);翻译起始因子(例如,eIF4G);葡萄

糖转运蛋白(例如,hGLUT1(人葡萄糖转运蛋白1));肌动蛋白(例如人 α 或 β 肌动蛋白);GAPDH;微管蛋白;组蛋白;柠檬酸循环酶;拓扑异构酶(例如,缺少5' TOP基序的TOP基因的5' UTR(寡嘧啶束));核糖体蛋白大32(L32);核糖体蛋白(例如,人或小鼠核糖体蛋白,例如像rps9);ATP合酶(例如,ATP5A1或线粒体H⁺-ATP合酶的 β 亚基);生长激素e(例如,牛(bGH)或人(hGH));延伸因子(例如,延伸因子1 α 1(EEF1A1));锰超氧化物歧化酶(MnSOD);肌细胞增强因子2A(MEF2A); β -F1-ATP酶、肌酸激酶、肌红蛋白、粒细胞集落刺激因子(G-CSF);胶原(例如,I型胶原、 α 2(Col1A2)、I型胶原、 α 1(Col1A1)、VI型胶原、 α 2(Col6A2)、VI型胶原、 α 1(Col6A1));核糖体结合蛋白(例如核糖体结合蛋白I(RPNI));低密度脂蛋白受体相关蛋白(例如,LRP1);心肌营养素样细胞因子(例如,Nnt1);钙网蛋白(Calr);原胶原-赖氨酸、2-氧代戊二酸5-双加氧酶1(Plod1);和核连蛋白(例如Nucb1)。

[0389] 其他示例性5'和3'UTR包括但不限于在以下文献中描述的那些:Karik6等人,Mol.Ther.2008 16(11):1833-1840;Karik6等人,Mol.Ther.2012 20(5):948-953;Karik6等人,Nucleic Acids Res.2011 39(21):e142;Strong等人,Gene Therapy 1997 4:624-627;Hansson等人,J.Biol.Chem.2015 290(9):5661-5672;Yu等人,Vaccine 2007 25(10):1701-1711;Cafri等人,Mol.Ther.2015 23(8):1391-1400;Andries等人,Mol.Pharm.2012 9(8):2136-2145;Crowley等人,Gene Ther.2015年6月30日,doi:10.1038/gt.2015.68;Ramunas等人,FASEB J.2015 29(5):1930-1939;Wang等人,Curr.Gene Ther.2015 15(4):428-435;Holtkamp等人,Blood 2006 108(13):4009-4017;Kormann等人,Nat.Biotechnol.2011 29(2):154-157;Poleganov等人,Hum.Gen.Ther.2015 26(11):751-766;Warren等人,Cell Stem Cell 2010 7(5):618-630;Mandal和Rossi,Nat.Protoc.2013 8(3):568-582;Holcik和Liebhaber,PNAS 1997 94(6):2410-2414;Ferizi等人,Lab Chip.2015 15(17):3561-3571;Thess等人,Mol.Ther.2015 23(9):1456-1464;Boros等人,PLoS One 2015 10(6):e0131141;Boros等人,J.Photochem.Photobiol.B.2013 129:93-99;Andries等人,J.Control.Release 2015 217:337-344;Zinckgraf等人,Vaccine 2003 21(15):1640-9;Garneau等人,J.Virol.2008 82(2):880-892;Holden和Harris,Virology 2004 329(1):119-133;Chiu等人,J.Virol.2005 79(13):8303-8315;Wang等人,EMBO J.1997 16(13):4107-4116;Al-Zoghaibi等人,Gene 2007 391(1-2):130-9;Vivinus等人,Eur.J.Biochem.2001 268(7):1908-1917;Gan和Rhoads,J.Biol.Chem.1996 271(2):623-626;Boado等人,J.Neurochem.1996 67(4):1335-1343;Knirsch和Clerch,Biochem.Biophys.Res.Commun.2000 272(1):164-168;Chung等人,Biochemistry 1998 37(46):16298-16306;Izquierdo和Cuevza,Biochem.J.2000 346 Pt 3:849-855;Dwyer等人,J.Neurochem.1996 66(2):449-458;Black等人,Mol.Cell.Biol.1997 17(5):2756-2763;Izquierdo和Cuevza,Mol.Cell.Biol.1997 17(9):5255-5268;US8278036;US8748089;US8835108;US9012219;US2010/0129877;US2011/0065103;US2011/0086904;US2012/0195936;US2014/020675;US2013/0195967;US2014/029490;US2014/0206753;W02007/036366;W02011/015347;W02012/072096;W02013/143555;W02014/071963;W02013/185067;W02013/182623;W02014/089486;W02013/185069;W02014/144196;W02014/152659;2014/152673;W02014/152940;W02014/152774;W02014/153052;W02014/152966;W02014/152513;

W02015/101414;W02015/101415;W02015/062738;以及W02015/024667;其各自的内容以引用的方式整体并入本文。

[0390] 在一些实施方案中,5'UTR是选自由以下组成的组: β -球蛋白5'UTR;含有强Kozak翻译起始信号的5'UTR;细胞色素b-245 α 多肽(CYBA)5'UTR;羟基类固醇(17- β)脱氢酶(HSD17B4)5'UTR;烟草蚀纹病毒(TEV)5'UTR;委内瑞拉马脑炎病毒(VEEV)5'UTR;编码非结构蛋白的风疹病毒(RV)RNA的5'近端开放阅读框;登革热病毒(DEN)5'UTR;热休克蛋白70(Hsp70)5'UTR;eIF4G 5'UTR;GLUT1 5'UTR;其功能片段以及其任何组合。

[0391] 在一些实施方案中,3'UTR是选自由以下组成的组: β -球蛋白3'UTR;CYBA 3'UTR;白蛋白3'UTR;生长激素(GH)3'UTR;VEEV 3'UTR;乙型肝炎病毒(HBV)3'UTR; α -球蛋白3'UTR;DEN 3'UTR;PAV大麦黄矮病毒(BYDV-PAV)3'UTR;延伸因子1 α 1(EEF1A1)3'UTR;锰超氧化物歧化酶(MnSOD)3'UTR;线粒体H(+)-ATP合酶(β -mRNA)3'UTR的 β 亚基;GLUT1 3'UTR;MEF2A 3'UTR; β -F1-ATP酶3'UTR;其功能片段以及其组合。

[0392] 其他示例性UTR包括但不限于所述UTR中的一个或多个,包括W02014/164253中公开的UTR的任何组合,其内容以引用的方式整体并入本文。在美国临时申请号61/775,509的表21和美国临时申请号61/829,372的表22中(所述临时申请各自的内容以引用的方式整体并入本文)示出5'UTR和3'UTR的列表起始和终止位点。在表21中,每个5'UTR(5'-UTR-005至5'-UTR 68511)通过其起始和终止位点相对于其天然或野生型(同源)转录物(ENST;ENSEMBL数据库中使用的标识符)来鉴定。

[0393] 源自任何基因或mRNA的野生型UTR可并入本发明的多核苷酸中。在一些实施方案中,可相对于野生型或天然UTR改变UTR以产生变体UTR,例如通过改变所述UTR相对于ORF的取向或位置;或通过包含额外的核苷酸、核苷酸的缺失、核苷酸的交换或转位。在一些实施方案中,可使用5'或3'UTR的变体,例如野生型UTR的突变体,或其中将一个或多个核苷酸添加至UTR的末端或从UTR的末端除去的变体。

[0394] 另外,一种或多种合成UTR可与一种或多种非合成UTR组合使用。参见例如,Mandal和Rossi,Nat.Protoc.2013 8(3):568-82,以及可在www.addgene.org/Derrick_Rossi/获得的序列,其各自的内容以引用的方式整体并入本文。UTR或其部分可置于与它们所选自的转录物中相同的取向或可在取向或位置上有所改变。因此,5'和/或3'UTR可反转、缩短、延长、与一个或多个其他5'UTR或3'UTR组合。

[0395] 在一些实施方案中,多核苷酸包含多个UTR,例如双重、三重或四重5'UTR或3'UTR。例如,双重UTR包含同一UTR的串联或基本上串联的两个拷贝。例如,可使用双 β -球蛋白3'UTR(参见US2010/0129877,其内容以引用的方式整体并入本文)。

[0396] 在某些实施方案中,本发明的多核苷酸包含选自本文公开的任何UTR的5'UTR和/或3'UTR。在一些实施方案中,所述5'UTR和/或3'UTR包含:

[0397]

| 名称 | SEQ ID NO: |
|--|------------|
| 5'UTR-001 (上游 UTR) | 247 |
| 5'UTR-002 (上游 UTR) | 248 |
| 5'UTR-003 (上游 UTR) | 249 |
| 5'UTR-004 (上游 UTR) | 250 |
| 5'UTR-005 (上游 UTR) | 251 |
| 5'UTR-006 (上游 UTR) | 252 |
| 5'UTR-007 (上游 UTR) | 253 |
| 5'UTR-008 (上游 UTR) | 254 |
| 5'UTR-009 (上游 UTR) | 255 |
| 5'UTR-010 (上游 UTR) | 256 |
| 5'UTR-011 (上游 UTR) | 257 |
| 5'UTR-012 (上游 UTR) | 258 |
| 5'UTR-013 (上游 UTR) | 259 |
| 5'UTR-014 (上游 UTR) | 260 |
| 5'UTR-015 (上游 UTR) | 261 |
| 5'UTR-016 (上游 UTR) | 262 |
| 5'UTR-017 (上游 UTR) | 263 |
| 5'UTR-018 (上游 UTR) | 264 |
| 142-3p 5'UTR-001 (上游 UTR, 包括 miR142-3p 结合位点) | 265 |
| 142-3p 5'UTR-002 (上游 UTR, 包括 miR142-3p 结合位点) | 266 |
| 142-3p 5'UTR-003 (上游 UTR, 包括 miR142-3p 结合位点) | 267 |
| 142-3p 5'UTR-004 (上游 UTR, 包括 miR142-3p 结合位点) | 268 |
| 142-3p 5'UTR-005 (上游 UTR, 包括 miR142-3p 结合位点) | 269 |
| 142-3p 5'UTR-006 (上游 UTR, 包括 miR142-3p 结合位点) | 270 |
| 142-3p 5'UTR-007 (上游 UTR, 包括 miR142-3p 结合位点) | 271 |
| 3'UTR 包含: 3'UTR-001 (肌酸激酶 UTR) | 272 |
| 3'UTR-002 (肌红蛋白 UTR) | 273 |
| 3'UTR-003 (α -肌动蛋白 UTR) | 274 |
| 3'UTR-004 (白蛋白 UTR) | 275 |
| 3'UTR-005 (α -球蛋白 UTR) | 276 |
| 3'UTR-006 (G-CSF UTR) | 277 |
| 3'UTR-007 (Colla2; 胶原, I 型, $\alpha 2$ UTR) | 278 |
| 3'UTR-008 (Col6a2; 胶原, VI 型, $\alpha 2$ UTR) | 279 |
| 3'UTR-009 (RPN1; 核糖体结合糖蛋白 I UTR) | 280 |
| 3'UTR-010 (LRP1; 低密度脂蛋白受体相关蛋白 1 UTR) | 281 |
| 3'UTR-011 (Nnt1; 心肌营养素样细胞因子 1 UTR) | 282 |
| 3'UTR-012 (Col6a1; 胶原, VI 型, $\alpha 1$ UTR) | 283 |
| 3'UTR-013 (Calr; 钙网蛋白 UTR) | 284 |
| 3'UTR-014 (Colla1; 胶原, I 型, $\alpha 1$ UTR) | 285 |
| 3'UTR-015 (Plod1; 前胶原-赖氨酸, 2-酮戊二酸 5-双加氧酶 1 | 286 |

| | 名称 | SEQ ID NO: |
|--------|--|------------|
| | UTR) | |
| [0398] | 3'UTR-016 (Nucb1; 核连蛋白 1 UTR) | 287 |
| | 3'UTR-017 (α -球蛋白) | 288 |
| | 3'UTR-018 | 289 |
| | 具有 miR 142-3p 结合位点的 3' UTR | 290 |
| | 具有 miR 126-3p 结合位点的 3' UTR | 291 |
| | 具有 miR 142-3p 和 miR 126-3p 结合位点的 3' UTR | 292 |
| | 具有 3 个 miR 142-3p 结合位点的 3' UTR | 293 |
| | 具有 miR 142-5p 结合位点的 3'UTR | 294 |
| | 具有 3 个 miR 142-5p 结合位点的 3'UTR | 295 |
| | 具有 2 个 miR 142-5p 结合位点和 1 个 miR 142-3p 结合位点的 3'UTR | 296 |
| | 具有 miR 142-3p 结合位点、P1 插入的 3'UTR | 297 |
| | 具有 miR 142-3p 结合位点、P2 插入的 3'UTR | 298 |
| | 具有 miR 142-3p 结合位点、P3 插入的 3'UTR | 299 |
| | 具有 miR 155-5p 结合位点的 3'UTR | 300 |
| | 具有 3 个 miR 155-5p 结合位点的 3' UTR | 301 |
| | 具有 2 个 miR 155-5p 结合位点和 1 个 miR 142-3p 结合位点的 3'UTR | 302 |

[0399] 在某些实施方案中,本发明的5'UTR和/或3'UTR序列包含与选自由以下组成的组的序列至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%相同的核苷酸序列:包含SEQ ID NO:247-271中的任一者的5'UTR序列和/或包含SEQ ID NO:272-302中的任一者的3'UTR序列以及其任何组合。

[0400] 本发明的多核苷酸可包含特征的组合。例如,ORF可由包含强Kozak翻译起始信号的5'UTR和/或包含用于模板化添加聚腺苷酸尾部的oligo(dT)序列的3'UTR侧接。5'UTR可包含来自相同和/或不同UTR的第一多核苷酸片段和第二多核苷酸片段(参见例如,US2010/0293625,其以引用的方式整体并入本文)。

[0401] 具有图案化的UTR也在本发明的范围内。如本文所用,“图案化的UTR”包括重复或交替图案,如重复一次、两次或多于3次的ABABAB或AABBAABBAABB或ABCABCABC或其变体。在这些图案中,每个字母A、B或C表示不同的UTR核酸序列。

[0402] 其他非UTR序列可用作本发明的多核苷酸内的区或亚区。例如,内含子或内含子序列的部分可并入本发明的多核苷酸中。并入内含子序列可增加蛋白质产生以及多核苷酸表达水平。在一些实施方案中,本发明的多核苷酸代替UTR或除UTR之外还包含内部核糖体进入位点(IRES)(参见例如,Yakubov等人,Biochem.Biophys.Res.Commun.2010394(1):189-193,其内容以引用的方式整体并入本文)。在一些实施方案中,本发明的多核苷酸包含分别与风疹病毒(RV)基因组RNA的5'和/或3'端相关的5'和/或3'序列,或其缺失衍生物,包括编码非结构蛋白的RV RNA的5'近端开放阅读框(例如,参见Pogue等人,J.Virol.67(12):7106-7117,其内容以引用的方式整体并入本文)。病毒衣壳序列也可用作翻译增强子,例如衣壳序列的5'部分(例如,semliki森林病毒和辛德毕斯病毒衣壳RNA,如描述于Sjöberg等

人, *Biotechnology* (NY) 1994 12 (11):1127-1131以及Frolov和Schlesinger J. *Virology* 1996 70 (2):1182-1190中,其各自的内容以引用的方式整体并入本文)。在一些实施方案中,多核苷酸包含IRES而不是5'UTR序列。在一些实施方案中,多核苷酸包含ORF和病毒衣壳序列。在一些实施方案中,多核苷酸包含合成5'UTR与非合成3'UTR的组合。

[0403] 在一些实施方案中,UTR还可包括至少一种翻译增强子多核苷酸、翻译增强子元件或多个翻译增强子元件(统称为“TEE”,其是指增加由多核苷酸产生的多肽或蛋白质的量的核酸序列。作为非限制性实例,TEE可包括以引用的方式整体并入本文的US2009/0226470中描述的那些和本领域已知的那些。作为非限制性实例,TEE可位于转录启动子与起始密码子之间。在一些实施方案中,5'UTR包含TEE。

[0404] 在一方面,TEE是UTR中的保守元件,其可促进核酸的翻译活性,如但不限于帽依赖性或不依赖性翻译。已经在包括人在内的14种物种中显示出这些序列的保守性。参见例如,Panek等人,“An evolutionary conserved pattern of 18S rRNA sequence complementarity to mRNA 5'UTRs and its implications for eukaryotic gene translation regulation,”*Nucleic Acids Research* 2013,doi:10.1093/nar/gkt548,其以引用的方式整体并入本文。

[0405] 在一个非限制性实例中,TEE包含Gtx同源结构域蛋白的5'前导区中的TEE序列。参见Chappell等人,PNAS 2004 101:9590-9594,其以引用的方式整体并入本文。

[0406] 在另一个非限制性实例中,TEE包含具有US2009/0226470、US2013/0177581和W02009/075886中的SEQ ID NO:1-35;W02012/009644中的SEQ ID NO:1-5和7-645;以及W01999/024595、US6310197和US6849405中的SEQ ID NO:1的序列中的一个或多个的TEE;所述专利各自的内容以引用的方式整体并入本文。

[0407] 在一些实施方案中,TEE是内部核糖体进入位点(IRES)、HCV-IRES或IRES元件,如但不限于在US7468275、US2007/0048776、US2011/0124100、W02007/025008和W02001/055369中描述的那些;其各自的内容以引用的方式整体并入本文。IRES元件可包括但不限于如由Chappell等人,PNAS 2004 101:9590-9594,Zhou等人,PNAS 2005 102:6273-6278、US2007/0048776、US2011/0124100和W02007/025008描述的Gtx序列(例如,Gtx9-nt、Gtx8-nt、Gtx7-nt);其各自的内容以引用的方式并入本文。

[0408] “翻译增强子多核苷酸”或“翻译增强子多核苷酸序列”是指包含本文提供和/或本领域已知的一种或多种TEE的多核苷酸(参见例如US6310197、US6849405、US7456273、US7183395、US2009/0226470、US2007/0048776、US2011/0124100、US2009/0093049、US2013/0177581、W02009/075886、W02007/025008、W02012/009644、W02001/055371、W01999/024595、EP2610341A1以及EP2610340A1;其各自的内容以引用的方式整体并入本文)或其变体、同源物或功能衍生物。在一些实施方案中,本发明的多核苷酸包含TEE的一个或多个拷贝。翻译增强子多核苷酸中的TEE可组构在一个或多个序列区段中。序列区段可拥有本文提供的一种或多种TEE,每种TEE以一个或多个拷贝存在。当多个序列区段存在于翻译增强子多核苷酸中时,它们可以是同源的或异质的。因此,翻译增强子多核苷酸中的多个序列区段可拥有相同或不同类型的本文提供的TEE、每个TEE的相同或不同数量的拷贝和/或每个序列区段内TEE的相同或不同组构。在一个实施方案中,本发明的多核苷酸包含翻译增强子多核苷酸序列。

[0409] 在一些实施方案中,本发明的多核苷酸的5'UTR和/或3'UTR包含公开于以下中的至少一种TEE或其部分:W01999/024595、W02012/009644、W02009/075886、W02007/025008、W01999/024595、W02001/055371、EP2610341A1、EP2610340A1、US6310197、US6849405、US7456273、US7183395、US2009/0226470、US2011/0124100、US2007/0048776、US2009/0093049或US2013/0177581,其各自的内容以引用的方式整体并入本文。

[0410] 在一些实施方案中,本发明的多核苷酸的5'UTR和/或3'UTR包含与以下中公开的TEE至少5%、至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%相同的TEE:US2009/0226470、US2007/0048776、US2013/0177581、US2011/0124100、W01999/024595、W02012/009644、W02009/075886、W02007/025008、EP2610341A1、EP2610340A1、US6310197、US6849405、US7456273、US7183395;Chappell等人,PNAS 2004 101:9590-9594;Zhou等人,PNAS 2005 102:6273-6278以及Wellensiek等人,"Genome-wide profiling of human cap-independent translation-enhancing elements,"Nature Methods 2013,DOI:10.1038/NMETH.2522的补充表1和补充表2;其各自的内容以引用的方式整体并入本文。

[0411] 在一些实施方案中,本发明的多核苷酸的5'UTR和/或3'UTR包含选自以下中公开的TEE序列的5-30个核苷酸片段、5-25个核苷酸片段、5-20个核苷酸片段、5-15个核苷酸片段或5-10个核苷酸片段(包括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或30个核苷酸)的TEE:US2009/0226470、US2007/0048776、US2013/0177581、US2011/0124100、W01999/024595、W02012/009644、W02009/075886、W02007/025008、EP2610341A1、EP2610340A1、US6310197、US6849405、US7456273、US7183395;Chappell等人,PNAS 2004101:9590-9594;Zhou等人,PNAS 2005 102:6273-6278以及Wellensiek等人,"Genome-wide profiling of human cap-independent translation-enhancing elements,"Nature Methods 2013,DOI:10.1038/NMETH.2522的补充表1和补充表2。

[0412] 在一些实施方案中,本发明的多核苷酸的5'UTR和/或3'UTR包含TEE,其是US7456273、US7183395、US2009/0093049和W02001/055371中任一项所述的转录调控元件,所述专利各自的内容以引用的方式并入本文。转录调控元件可通过本领域已知的方法来鉴定,如但不限于US7456273、US7183395、US2009/0093049和W02001/055371中描述的方法。

[0413] 在一些实施方案中,包含至少一种本文所述的TEE的5'UTR和/或3'UTR可并入单顺反子序列,如但不限于载体系统或核酸载体中。作为非限制性实例,载体系统和核酸载体可包括US7456273、US7183395、US2007/0048776、US2009/0093049、US2011/0124100、W02007/025008和W02001/055371中描述的那些。

[0414] 在一些实施方案中,本发明的多核苷酸的5'UTR和/或3'UTR包含本文所述的TEE或其部分。在一些实施方案中,3'UTR中的TEE可与位于5'UTR中的TEE相同和/或不同。

[0415] 在一些实施方案中,本发明的多核苷酸的5'UTR和/或3'UTR可包含至少1、至少2、至少3、至少4、至少5、至少6、至少7、至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少16、至少17、至少18、至少19、至少20、至少21、至少22、至少23、至少24、至少25、至少30、至少35、至少40、至少45、至少50、至少55或超过60个TEE序列。在一个实施方案中,

本发明的多核苷酸的5'UTR可包含1-60、1-55、1-50、1-45、1-40、1-35、1-30、1-25、1-20、1-15、1-10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个TEE序列。本发明的多核苷酸的5'UTR中的TEE序列可以是相同或不同的TEE序列。本发明的多核苷酸的5'UTR中的不同TEE序列的组合可包括其中并入任何不同TEE序列的多于一个拷贝的组合。TEE序列可呈重复一次、两次、三次或多于三次的诸如ABABAB或AABBAABBAABB或ABCABCABC的图案或其变体形式。在这些图案中,每个字母A、B或C表示不同的TEE核苷酸序列。

[0416] 在一些实施方案中,5'UTR和/或3'UTR包含分隔两个TEE序列的间隔子。作为非限制性实例,间隔子可以是15个核苷酸的间隔子和/或本领域已知的其他间隔子。作为另一个非限制性实例,5'UTR和/或3'UTR分别包含5'UTR和/或3'UTR中重复至少一次、至少两次、至少3次、至少4次、至少5次、至少6次、至少7次、至少8次、至少9次、至少10次或多于10次的TEE序列-间隔子模块。在一些实施方案中,5'UTR和/或3'UTR包含重复1、2、3、4、5、6、7、8、9或10次的TEE序列-间隔子模块。

[0417] 在一些实施方案中,分隔两个TEE序列的间隔子可包括本领域已知的可调控本发明的多核苷酸翻译的其他序列,例如本文所述的miR序列(例如,miR结合位点和miR种子)。作为非限制性实例,用于分隔两个TEE序列的每个间隔子可包括不同的miR序列或miR序列的组分(例如,miR种子序列)。

[0418] 在一些实施方案中,本发明的多核苷酸包含miR和/或TEE序列。在一些实施方案中,将miR序列和/或TEE序列并入本发明的多核苷酸中可改变茎环区的形状,这可增加和/或减少翻译。参见例如,Kedde等人,Nature Cell Biology 2010 12(10):1014-20,其以引用的方式整体并入本文)。

[0419] 微小RNA(miRNA)结合位点:

[0420] 本发明的多核苷酸可包含调控元件,例如,微小RNA(miRNA)结合位点、转录因子结合位点、结构化mRNA序列和/或基序、工程化以充当内源核酸结合分子的假受体的人工结合位点以及其组合。在一些实施方案中,包含此类调控元件的多核苷酸被称为包含“传感器序列”。传感器序列的非限制性实例描述于美国公布2014/0200261中,其内容以引用的方式整体并入本文。

[0421] 在一些实施方案中,本发明的多核苷酸(例如,核糖核酸(RNA),例如信使RNA(mRNA))包含编码目标多肽的开放阅读框(ORF),并且还包含一个或多个miRNA结合位点。包含或并入miRNA结合位点提供了基于天然存在的miRNA的组织特异性和/或细胞类型特异性表达来调控本发明的多核苷酸并且进而调控由其编码的多肽。

[0422] miRNA(例如天然存在的miRNA)是19-25个核苷酸长的非编码RNA,其结合至多核苷酸并通过降低稳定性或通过抑制多核苷酸的翻译来下调基因表达。miRNA序列包含“种子”区域,即成熟miRNA的位置2-8的区域中的序列。miRNA种子可包含成熟miRNA的位置2-8或2-7。在一些实施方案中,miRNA种子可包含7个核苷酸(例如成熟miRNA的核苷酸2至8),其中相应miRNA结合位点中的种子互补位点由与miRNA位置1相反的腺苷(A)侧接。在一些实施方案中,miRNA种子可包含6个核苷酸(例如成熟miRNA的核苷酸2-7),其中相应miRNA结合位点中的种子互补位点由与miRNA位置1相反的腺苷(A)侧接。参见例如,Grimson A, Farh KK, Johnston WK, Garrett-Engle P, Lim LP, Bartel DP; Mol Cell. 2007年7月6日;27(1):91-105。可进行靶细胞或组织的miRNA分析以确定细胞或组织中miRNA的存在或不存在。在一些

实施方案中,本发明的多核苷酸(例如,核糖核酸(RNA),例如信使RNA(mRNA))包含一个或多个微小RNA结合位点、微小RNA靶序列、微小RNA互补序列或微小RNA种子互补序列。此类序列可对应于任何已知的微小RNA(例如与任何已知的微小RNA具有互补性),如美国公布US2005/0261218和美国公布US2005/0059005中所教导的那些,所述公布各自的内容以引用的方式整体并入本文。

[0423] 如本文所用,术语“微小RNA(miRNA或miR)结合位点”是指多核苷酸内(例如DNA内或RNA转录物内)的序列,包括5'UTR和/或3'UTR中的序列,所述序列对miRNA的全部或区域具有足够的互补性以与所述miRNA相互作用、缔合或结合至所述miRNA。在一些实施方案中,本发明的多核苷酸包含编码目标多肽的ORF,并且还包含一个或多个miRNA结合位点。在示例性实施方案中,多核苷酸的5'UTR和/或3'UTR(例如,核糖核酸(RNA),例如信使RNA(mRNA))包含一个或多个miRNA结合位点。

[0424] 与miRNA具有足够互补性的miRNA结合位点是指足以促进miRNA介导的多核苷酸调控(例如miRNA介导的翻译阻遏或多核苷酸降解)的互补程度。在本发明的示例性方面,与miRNA具有足够互补性的miRNA结合位点是指足以促进miRNA介导的多核苷酸降解(例如miRNA引导的RNA诱导的沉默复合物(RISC)介导的mRNA裂解)的互补程度。miRNA结合位点可与例如19-25个核苷酸的miRNA序列、19-23个核苷酸的miRNA序列或22个核苷酸的miRNA序列具有互补性。miRNA结合位点可与miRNA的仅一部分互补,例如与天然存在的miRNA序列的全长的少于1、2、3或4个核苷酸的部分互补。当所需的调控是mRNA降解时,优选完整或完全互补性(例如,天然存在的miRNA的长度的全部或显著部分上的完整互补性或完全互补性)。

[0425] 在一些实施方案中,miRNA结合位点包括与miRNA种子序列具有互补性(例如,部分或完全互补性)的序列。在一些实施方案中,miRNA结合位点包括与miRNA种子序列具有完全互补性的序列。在一些实施方案中,miRNA结合位点包括与miRNA序列具有互补性(例如,部分或完全互补性)的序列。在一些实施方案中,miRNA结合位点包括与miRNA序列具有完全互补性的序列。在一些实施方案中,miRNA结合位点与miRNA序列具有完全互补性,但具有1、2或3个核苷酸取代、末端添加和/或截短。

[0426] 在一些实施方案中,miRNA结合位点与相应的miRNA的长度相同。在其他实施方案中,miRNA结合位点比5'末端、3'末端或两者处的相应miRNA短一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、十一个或十二个核苷酸。在其他实施方案中,微小RNA结合位点比5'末端、3'末端或两者处的相应微小RNA短两个核苷酸。比相应miRNA短的miRNA结合位点仍然能够降解并入一个或多个miRNA结合位点的mRNA或阻止所述mRNA翻译。

[0427] 在一些实施方案中,miRNA结合位点结合相应的成熟miRNA,其是含有Dicer的活性RISC的一部分。在另一个实施方案中,miRNA结合位点与RISC中的相应miRNA的结合降解含有所述miRNA结合位点的mRNA或阻止所述mRNA被翻译。在一些实施方案中,miRNA结合位点与miRNA具有足够互补性,以使得包含所述miRNA的RISC复合物裂解包含所述miRNA结合位点的多核苷酸。在其他实施方案中,miRNA结合位点具有不完全互补性,以使得包含所述miRNA的RISC复合物诱导包含所述miRNA结合位点的多核苷酸中的不稳定性。在另一个实施方案中,miRNA结合位点具有不完全互补性,以使得包含所述miRNA的RISC复合物阻遏包含所述miRNA结合位点的多核苷酸的转录。

[0428] 在一些实施方案中,miRNA结合位点具有来自相应miRNA的一个、两个、三个、四个、

五个、六个、七个、八个、九个、十个、十一个或十二个错配。

[0429] 在一些实施方案中,miRNA结合位点具有分别与相应miRNA的至少约十个、至少约十一个、至少约十二个、至少约十三个、至少约十四个、至少约十五个、至少约十六个、至少约十七个、至少约十八个、至少约十九个、至少约二十个或至少约二十一个连续核苷酸互补的至少约十个、至少约十一个、至少约十二个、至少约十三个、至少约十四个、至少约十五个、至少约十六个、至少约十七个、至少约十八个、至少约十九个、至少约二十个或至少约二十一个连续核苷酸。

[0430] 通过将一个或多个miRNA结合位点工程化到本发明的多核苷酸中,所述多核苷酸可被靶向以获得降解或降低的翻译,条件是可获得所论述的miRNA。这可减少在递送多核苷酸时的脱靶效应。例如,如果本发明的多核苷酸不意图被递送至组织或细胞但在所述组织或细胞中结束,则在将miRNA的一个或多个结合位点工程化到多核苷酸的5'UTR和/或3'UTR中的情况下,在所述组织或细胞中丰富的miRNA可抑制目标基因的表达。

[0431] 相反,可从它们所天然存在的多核苷酸序列中除去miRNA结合位点,以增加特定组织中的蛋白质表达。例如,可从多核苷酸中除去特定miRNA的结合位点,以改进含有所述miRNA的组织或细胞中的蛋白质表达。

[0432] 在一个实施方案中,本发明的多核苷酸可在5'UTR和/或3'UTR中包含至少一个miRNA结合位点,以调控针对特定细胞如但不限于正常细胞和/或癌细胞的细胞毒性或细胞保护性mRNA治疗剂。在另一个实施方案中,本发明的多核苷酸可在5'-UTR和/或3'-UTR中包含两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个或更多个miRNA结合位点,以调控针对特定细胞如但不限于正常细胞和/或癌细胞的细胞毒性或细胞保护性mRNA治疗剂。

[0433] 可通过引入或除去一个或多个miRNA结合位点(例如,一个或多个不同的miRNA结合位点)来实现对多个组织中的表达的调控。是除去还是插入miRNA结合位点的决定可基于miRNA表达模式和/或它们在发育和/或疾病中的组织和/或细胞中的分布来进行。已经报告了miRNA、miRNA结合位点及其表达模式和在生物学中的作用的鉴定(例如,Bonauer等人,Curr Drug Targets 2010 11:943-949;Anand和Cheresh Curr Opin Hematol 2011 18:171-176;Contreras和Rao Leukemia 2012 26:404-413 (2011年12月20日.doi:10.1038/leu.2011.356);Bartel Cell 2009 136:215-233;Landgraf等人,Cell,2007 129:1401-1414;Gentner和Naldini,Tissue Antigens.2012 80:393-403以及其中的所有参考文献;其各自以引用的方式整体并入本文)。

[0434] miRNA和miRNA结合位点可对应于任何已知序列,包括美国公布号2014/0200261、2005/0261218和2005/0059005中描述的非限制性实例,所述公布各自以引用的方式整体并入本文。

[0435] 已知miRNA在其中调控mRNA并因此调控蛋白质表达的组织的实例包括但不限于,肝(miR-122)、肌肉(miR-133、miR-206、miR-208)、内皮细胞(miR-17-92、miR-126)、骨髓细胞(miR-142-3p、miR-142-5p、miR-16、miR-21、miR-223、miR-24、miR-27)、脂肪组织(let-7、miR-30c)、心脏(miR-1d、miR-149)、肾(miR-192、miR-194、miR-204)以及肺上皮细胞(let-7、miR-133、miR-126)。

[0436] 具体而言,已知miRNA在免疫细胞(也称为造血细胞)中差异表达,所述免疫细胞如抗原呈递细胞(APC)(例如树突细胞和巨噬细胞)、巨噬细胞、单核细胞、B淋巴细胞、T淋巴细

胞、粒细胞、自然杀伤细胞等。免疫细胞特异性miRNA参与免疫原性、自身免疫性、对感染的免疫应答、炎症以及基因疗法和组织/器官移植后的不想要的免疫应答。免疫细胞特异性miRNA还调控造血细胞(免疫细胞)的发育、增殖、分化和凋亡的许多方面。例如,miR-142和miR-146仅在免疫细胞中表达,特别是在骨髓树突细胞中丰富。已经证明,通过将miR-142结合位点添加至多核苷酸的3'-UTR,可关闭对多核苷酸的免疫应答,从而使组织和细胞中的基因转移能够更稳定。miR-142有效降解抗原呈递细胞中的外源性多核苷酸并抑制转导的细胞的细胞毒性消除(例如,Annoni A等人,blood,2009,114,5152-5161;Brown BD,等人,Nat med.2006,12(5),585-591;Brown BD,等人,blood,2007,110(13):4144-4152,其各自以引用的方式整体并入本文)。

[0437] 抗原介导的免疫应答可指由外来抗原触发的免疫应答,所述外来抗原在进入生物体时由抗原呈递细胞加工并展示在抗原呈递细胞的表面上。T细胞可识别呈递的抗原并诱导表达抗原的细胞的细胞毒性消除。

[0438] 将miR-142结合位点引入本发明的多核苷酸的5'UTR和/或3'UTR中可通过miR-142介导的降解选择性地阻遏抗原呈递细胞中的基因表达,从而限制抗原呈递细胞(例如,树突细胞)中的抗原呈递,并且由此在递送所述多核苷酸后防止抗原介导的免疫应答。所述多核苷酸然后在靶组织或细胞中稳定表达,而不触发细胞毒性消除。

[0439] 在一个实施方案中,已知在免疫细胞、特别是抗原呈递细胞中表达的miRNA的结合位点可被工程化到本发明的多核苷酸中,以通过miRNA介导的RNA降解遏制所述多核苷酸在抗原呈递细胞中的表达,从而抑制抗原介导的免疫应答。多核苷酸的表达在不表达免疫细胞特异性miRNA的非免疫细胞中维持。例如,在一些实施方案中,为了防止针对肝特异性蛋白的免疫原性反应,可除去任何miR-122结合位点并且可将miR-142(和/或miR-146)结合位点工程化到本发明的多核苷酸的5'UTR和/或3'UTR中。

[0440] 在一个实施方案中,可将已知在肝细胞中表达的miRNA的结合位点工程化到本发明的多核苷酸中以遏制所述多核苷酸在肝脏中的表达。例如,在一些实施方案中,为了防止抗原在肝脏中表达,可将任何肝脏特异性miR结合位点工程化到本发明的多核苷酸的5'UTR和/或3'UTR中。

[0441] 为了进一步推动APC和巨噬细胞中的选择性降解和遏制,本发明的多核苷酸可在5'UTR和/或3'UTR中包含单独或与miR-142和/或miR-146结合位点组合的另外负调控元件。作为非限制性实例,其他负调控元件是组成型衰变元件(CDE)。

[0442] 免疫细胞特异性miRNA包括但不限于hsa-let-7a-2-3p、hsa-let-7a-3p、hsa-7a-5p、hsa-let-7c、hsa-let-7e-3p、hsa-let-7e-5p、hsa-let-7g-3p、hsa-let-7g-5p、hsa-let-7i-3p、hsa-let-7i-5p、miR-10a-3p、miR-10a-5p、miR-1184、hsa-let-7f-1--3p、hsa-let-7f-2--5p、hsa-let-7f-5p、miR-125b-1-3p、miR-125b-2-3p、miR-125b-5p、miR-1279、miR-130a-3p、miR-130a-5p、miR-132-3p、miR-132-5p、miR-142-3p、miR-142-5p、miR-143-3p、miR-143-5p、miR-146a-3p、miR-146a-5p、miR-146b-3p、miR-146b-5p、miR-147a、miR-147b、miR-148a-5p、miR-148a-3p、miR-150-3p、miR-150-5p、miR-151b、miR-155-3p、miR-155-5p、miR-15a-3p、miR-15a-5p、miR-15b-5p、miR-15b-3p、miR-16-1-3p、miR-16-2-3p、miR-16-5p、miR-17-5p、miR-181a-3p、miR-181a-5p、miR-181a-2-3p、miR-182-3p、miR-182-5p、miR-197-3p、miR-197-5p、miR-21-5p、miR-21-3p、miR-214-3p、miR-214-5p、miR-223-

3p、miR-223-5p、miR-221-3p、miR-221-5p、miR-23b-3p、miR-23b-5p、miR-24-1-5p、miR-24-2-5p、miR-24-3p、miR-26a-1-3p、miR-26a-2-3p、miR-26a-5p、miR-26b-3p、miR-26b-5p、miR-27a-3p、miR-27a-5p、miR-27b-3p、miR-27b-5p、miR-28-3p、miR-28-5p、miR-2909、miR-29a-3p、miR-29a-5p、miR-29b-1-5p、miR-29b-2-5p、miR-29c-3p、miR-29c-5p、miR-30e-3p、miR-30e-5p、miR-331-5p、miR-339-3p、miR-339-5p、miR-345-3p、miR-345-5p、miR-346、miR-34a-3p、miR-34a-5p、miR-363-3p、miR-363-5p、miR-372、miR-377-3p、miR-377-5p、miR-493-3p、miR-493-5p、miR-542、miR-548b-5p、miR-548c-5p、miR-548i、miR-548j、miR-548n、miR-574-3p、miR-598、miR-718、miR-935、miR-99a-3p、miR-99a-5p、miR-99b-3p以及miR-99b-5p。此外，可通过微阵列杂交和切片分析在免疫细胞中鉴定新颖的miRNA（例如，Jima DD等人，Blood，2010，116:e118-e127；Vaz C等人，BMC Genomics，2010，11，288，其各自的内容以引用的方式整体并入本文。）

[0443] 已知在肝脏中表达的miRNA包括但不限于miR-107、miR-122-3p、miR-122-5p、miR-1228-3p、miR-1228-5p、miR-1249、miR-129-5p、miR-1303、miR-151a-3p、miR-151a-5p、miR-152、miR-194-3p、miR-194-5p、miR-199a-3p、miR-199a-5p、miR-199b-3p、miR-199b-5p、miR-296-5p、miR-557、miR-581、miR-939-3p以及miR-939-5p。可将来自任何肝特异性miRNA的miRNA结合位点引入本发明的多核苷酸或从本发明的多核苷酸中除去，以调控所述多核苷酸在肝脏中的表达。肝特异性miRNA结合位点可单独或进一步与本发明的多核苷酸中的免疫细胞（例如APC）miRNA结合位点组合工程化。

[0444] 已知在肺中表达的miRNA包括但不限于let-7a-2-3p、let-7a-3p、let-7a-5p、miR-126-3p、miR-126-5p、miR-127-3p、miR-127-5p、miR-130a-3p、miR-130a-5p、miR-130b-3p、miR-130b-5p、miR-133a、miR-133b、miR-134、miR-18a-3p、miR-18a-5p、miR-18b-3p、miR-18b-5p、miR-24-1-5p、miR-24-2-5p、miR-24-3p、miR-296-3p、miR-296-5p、miR-32-3p、miR-337-3p、miR-337-5p、miR-381-3p以及miR-381-5p。可将来自任何肺特异性miRNA的miRNA结合位点引入本发明的多核苷酸或从本发明的多核苷酸中除去，以调控所述多核苷酸在肺中的表达。肺特异性miRNA结合位点可单独或进一步与本发明的多核苷酸中的免疫细胞（例如APC）miRNA结合位点组合工程化。

[0445] 已知在心脏中表达的miRNA包括但不限于miR-1、miR-133a、miR-133b、miR-149-3p、miR-149-5p、miR-186-3p、miR-186-5p、miR-208a、miR-208b、miR-210、miR-296-3p、miR-320、miR-451a、miR-451b、miR-499a-3p、miR-499a-5p、miR-499b-3p、miR-499b-5p、miR-744-3p、miR-744-5p、miR-92b-3p以及miR-92b-5p。可将来自任何心脏特异性miRNA的miRNA结合位点引入本发明的多核苷酸或从本发明的多核苷酸中除去，以调控所述多核苷酸在心脏中的表达。心脏特异性miRNA结合位点可单独或进一步与本发明的多核苷酸中的免疫细胞（例如APC）miRNA结合位点组合工程化。

[0446] 已知在神经系统中表达的miRNA包括但不限于miR-124-5p、miR-125a-3p、miR-125a-5p、miR-125b-1-3p、miR-125b-2-3p、miR-125b-5p、miR-1271-3p、miR-1271-5p、miR-128、miR-132-5p、miR-135a-3p、miR-135a-5p、miR-135b-3p、miR-135b-5p、miR-137、miR-139-5p、miR-139-3p、miR-149-3p、miR-149-5p、miR-153、miR-181c-3p、miR-181c-5p、miR-183-3p、miR-183-5p、miR-190a、miR-190b、miR-212-3p、miR-212-5p、miR-219-1-3p、miR-219-2-3p、miR-23a-3p、miR-23a-5p、miR-30a-5p、miR-30b-3p、miR-30b-5p、miR-30c-1-3p、

miR-30c-2-3p、miR-30c-5p、miR-30d-3p、miR-30d-5p、miR-329、miR-342-3p、miR-3665、miR-3666、miR-380-3p、miR-380-5p、miR-383、miR-410、miR-425-3p、miR-425-5p、miR-454-3p、miR-454-5p、miR-483、miR-510、miR-516a-3p、miR-548b-5p、miR-548c-5p、miR-571、miR-7-1-3p、miR-7-2-3p、miR-7-5p、miR-802、miR-922、miR-9-3p以及miR-9-5p。在神经系统中富含的miRNA还包括在神经元中特异性表达的miRNA,包括但不限于miR-132-3p、miR-132-5p、miR-148b-3p、miR-148b-5p、miR-151a-3p、miR-151a-5p、miR-212-3p、miR-212-5p、miR-320b、miR-320e、miR-323a-3p、miR-323a-5p、miR-324-5p、miR-325、miR-326、miR-328、miR-922;以及在神经胶质细胞中特异性表达的那些,包括但不限于miR-1250、miR-219-1-3p、miR-219-2-3p、miR-219-5p、miR-23a-3p、miR-23a-5p、miR-3065-3p、miR-3065-5p、miR-30e-3p、miR-30e-5p、miR-32-5p、miR-338-5p以及miR-657。可将来自任何CNS特异性miRNA的miRNA结合位点引入本发明的多核苷酸或从本发明的多核苷酸中除去,以调控所述多核苷酸在神经系统中的表达。神经系统特异性miRNA结合位点可单独或进一步与本发明的多核苷酸中的免疫细胞(例如APC)miRNA结合位点组合工程化。

[0447] 已知在胰腺中表达的miRNA包括但不限于miR-105-3p、miR-105-5p、miR-184、miR-195-3p、miR-195-5p、miR-196a-3p、miR-196a-5p、miR-214-3p、miR-214-5p、miR-216a-3p、miR-216a-5p、miR-30a-3p、miR-33a-3p、miR-33a-5p、miR-375、miR-7-1-3p、miR-7-2-3p、miR-493-3p、miR-493-5p以及miR-944。可将来自任何胰腺特异性miRNA的miRNA结合位点引入本发明的多核苷酸或从本发明的多核苷酸中除去,以调控所述多核苷酸在胰腺中的表达。胰腺特异性miRNA结合位点可单独或进一步与本发明的多核苷酸中的免疫细胞(例如APC)miRNA结合位点组合工程化。

[0448] 已知在肾脏中表达的miRNA包括但不限于miR-122-3p、miR-145-5p、miR-17-5p、miR-192-3p、miR-192-5p、miR-194-3p、miR-194-5p、miR-20a-3p、miR-20a-5p、miR-204-3p、miR-204-5p、miR-210、miR-216a-3p、miR-216a-5p、miR-296-3p、miR-30a-3p、miR-30a-5p、miR-30b-3p、miR-30b-5p、miR-30c-1-3p、miR-30c-2-3p、miR-30c-5p、miR-324-3p、miR-335-3p、miR-335-5p、miR-363-3p、miR-363-5p以及miR-562。可将来自任何肾特异性miRNA的miRNA结合位点引入本发明的多核苷酸或从本发明的多核苷酸中除去,以调控所述多核苷酸在肾脏中的表达。肾特异性miRNA结合位点可单独或进一步与本发明的多核苷酸中的免疫细胞(例如APC)miRNA结合位点组合工程化。

[0449] 已知在肌肉中表达的miRNA包括但不限于let-7g-3p、let-7g-5p、miR-1、miR-1286、miR-133a、miR-133b、miR-140-3p、miR-143-3p、miR-143-5p、miR-145-3p、miR-145-5p、miR-188-3p、miR-188-5p、miR-206、miR-208a、miR-208b、miR-25-3p以及miR-25-5p。可将来自任何肌肉特异性miRNA的miRNA结合位点引入本发明的多核苷酸或从本发明的多核苷酸中除去,以调控所述多核苷酸在肌肉中的表达。肌肉特异性miRNA结合位点可单独或进一步与本发明的多核苷酸中的免疫细胞(例如APC)miRNA结合位点组合工程化。

[0450] miRNA也在不同类型的细胞,如但不限于内皮细胞、上皮细胞和脂肪细胞中差异表达。

[0451] 已知在内皮细胞中表达的miRNA包括但不限于let-7b-3p、let-7b-5p、miR-100-3p、miR-100-5p、miR-101-3p、miR-101-5p、miR-126-3p、miR-126-5p、miR-1236-3p、miR-1236-5p、miR-130a-3p、miR-130a-5p、miR-17-5p、miR-17-3p、miR-18a-3p、miR-18a-5p、

miR-19a-3p、miR-19a-5p、miR-19b-1-5p、miR-19b-2-5p、miR-19b-3p、miR-20a-3p、miR-20a-5p、miR-217、miR-210、miR-21-3p、miR-21-5p、miR-221-3p、miR-221-5p、miR-222-3p、miR-222-5p、miR-23a-3p、miR-23a-5p、miR-296-5p、miR-361-3p、miR-361-5p、miR-421、miR-424-3p、miR-424-5p、miR-513a-5p、miR-92a-1-5p、miR-92a-2-5p、miR-92a-3p、miR-92b-3p以及miR-92b-5p。在来自深度测序分析的内皮细胞中发现了许多新颖的miRNA(例如,Voellenkle C等人, RNA, 2012, 18, 472-484, 其以引用的方式整体并入本文)。可将来自任何内皮细胞特异性miRNA的miRNA结合位点引入本发明的多核苷酸或从本发明的多核苷酸中除去,以调控所述多核苷酸在内皮细胞中的表达。

[0452] 已知在上皮细胞中表达的miRNA包括但不限于let-7b-3p、let-7b-5p、miR-1246、miR-200a-3p、miR-200a-5p、miR-200b-3p、miR-200b-5p、miR-200c-3p、miR-200c-5p、miR-338-3p、miR-429、miR-451a、miR-451b、miR-494、miR-802和miR-34a、miR-34b-5p、miR-34c-5p、miR-449a、miR-449b-3p、在呼吸道纤毛上皮细胞中具有特异性的miR-449b-5p、let-7家族、miR-133a、miR-133b、在肺上皮细胞中具有特异性的miR-126、miR-382-3p、在肾上皮细胞中具有特异性的miR-382-5p以及在角膜上皮细胞中具有特异性的miR-762。可将来自任何上皮细胞特异性miRNA的miRNA结合位点引入本发明的多核苷酸或从本发明的多核苷酸中除去,以调控所述多核苷酸在上皮细胞中的表达。

[0453] 此外,大量的miRNA富含胚胎干细胞,从而控制干细胞自我更新以及各种细胞谱系(如神经细胞、心脏细胞、造血细胞、皮肤细胞、成骨细胞和肌肉细胞)的发育和/或分化(例如, Kuppusamy KT等人, Curr. Mol. Med, 2013, 13 (5), 757-764; Vidigal JA和Ventura A, Semin. Cancer Biol. 2012, 22 (5-6), 428-436; Goff LA等人, PLoS One, 2009, 4: e7192; Morin RD等人, Genome Res, 2008, 18, 610-621; Yoo JK等人, Stem Cells Dev. 2012, 21 (11), 2049-2057, 其各自以引用的方式整体并入本文)。在胚胎干细胞中丰富的miRNA包括但不限于let-7a-2-3p、let-a-3p、let-7a-5p、let7d-3p、let-7d-5p、miR-103a-2-3p、miR-103a-5p、miR-106b-3p、miR-106b-5p、miR-1246、miR-1275、miR-138-1-3p、miR-138-2-3p、miR-138-5p、miR-154-3p、miR-154-5p、miR-200c-3p、miR-200c-5p、miR-290、miR-301a-3p、miR-301a-5p、miR-302a-3p、miR-302a-5p、miR-302b-3p、miR-302b-5p、miR-302c-3p、miR-302c-5p、miR-302d-3p、miR-302d-5p、miR-302e、miR-367-3p、miR-367-5p、miR-369-3p、miR-369-5p、miR-370、miR-371、miR-373、miR-380-5p、miR-423-3p、miR-423-5p、miR-486-5p、miR-520c-3p、miR-548e、miR-548f、miR-548g-3p、miR-548g-5p、miR-548i、miR-548k、miR-548l、miR-548m、miR-548n、miR-548o-3p、miR-548o-5p、miR-548p、miR-664a-3p、miR-664a-5p、miR-664b-3p、miR-664b-5p、miR-766-3p、miR-766-5p、miR-885-3p、miR-885-5p、miR-93-3p、miR-93-5p、miR-941、miR-96-3p、miR-96-5p、miR-99b-3p以及miR-99b-5p。许多预测的新颖miRNA是通过人胚胎干细胞中的深度测序发现的(例如, Morin RD等人, Genome Res, 2008, 18, 610-621; Goff LA等人, PLoS One, 2009, 4: e7192; Bar M等人, Stem cells, 2008, 26, 2496-2505, 其各自的内容以引用的方式整体并入本文)。

[0454] 进行许多miRNA表达研究以分析miRNA在各种癌细胞/组织和其他疾病中的差异表达。一些miRNA在某些癌细胞中异常过表达,而其他则表达不足。例如,miRNA在以下中差异表达:癌细胞(WO2008/154098、US2013/0059015、US2013/0042333、WO2011/157294);癌症干细胞(US2012/0053224);胰腺癌和疾病(US2009/0131348、US2011/0171646、US2010/

0286232、US8389210) ;哮喘和炎症 (US8415096) ;前列腺癌 (US2013/0053264) ;肝细胞癌 (W02012/151212、US2012/0329672、W02008/054828、US8252538) ;肺癌细胞 (W02011/076143、W02013/033640、W02009/070653、US2010/0323357) ;皮肤T细胞淋巴瘤 (W02013/011378) ;结肠直肠癌细胞 (W02011/0281756、W02011/076142) ;癌症阳性淋巴结 (W02009/100430、US2009/0263803) ;鼻咽癌 (EP2112235) ;慢性阻塞性肺病 (US2012/0264626、US2013/0053263) ;甲状腺癌 (W02013/066678) ;卵巢癌细胞 (US2012/0309645、W02011/095623) ;乳腺癌细胞 (W02008/154098、W02007/081740、US2012/0214699) 、白血病和淋巴瘤 (W02008/073915、US2009/0092974、US2012/0316081、US2012/0283310、W02010/018563,其各自的内容以引用的方式整体并入本文)。

[0455] 作为非限制性实例,可从本发明的多核苷酸的3'UTR中除去在某些癌症和/或肿瘤细胞中过表达的miRNA的miRNA结合位点,从而恢复由癌细胞中过表达的miRNA抑制的表达,由此改善相应的生物学功能,例如转录刺激和/或阻遏、细胞周期停滞、细胞凋亡和细胞死亡。其中miRNA表达未上调的正常细胞和组织将保持不受影响。

[0456] miRNA还可调控复杂生物过程如血管生成(例如,miR-132) (Anand和Cheresh Curr Opin Hematol 2011 18:171-176)。在本发明的多核苷酸中,可除去或引入在此类过程中涉及的miRNA结合位点,以便针对生物上相关的细胞类型或针对相关生物过程定制多核苷酸的表达。在这种背景下,本发明的多核苷酸被定义为营养缺陷型多核苷酸。

[0457] 在一些实施方案中,本发明的多核苷酸包含miRNA结合位点,其中所述miRNA结合位点包含选自表1或本文其他地方描述的一个或多个核苷酸序列,包括miRNA结合位点序列中的任何一个或多个的一个或多个拷贝。在一些实施方案中,本发明的多核苷酸还包含选自表1或在本文其他地方描述的相同或不同miRNA结合位点中的至少一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个或更多个,包括其任何组合。在一些实施方案中,所述miRNA结合位点结合至miR-142或与miR-142互补。在一些实施方案中,所述miR-142包含SEQ ID NO:303。在一些实施方案中,所述miRNA结合位点结合至miR-142-3p或miR-142-5p。在一些实施方案中,miR-142-3p结合位点包含SEQ ID NO:305。在一些实施方案中,miR-142-5p结合位点包含SEQ ID NO:307。在一些实施方案中,miRNA结合位点包含与SEQ ID NO:305或307至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或100%相同的核苷酸序列。

[0458] 表1.miR-142和替代miR-142结合位点

| [0459] | SEQ ID NO. | 描述 | 序列 |
|--------|------------|-----------------|--|
| | 303 | miR-142 | GACAGUGCAGUCACCAUAAAGU AGAAAGCACUACUA ACAGCACUGGAGGGUGUAGUGUU UCCUACUUUAUGGA UGAGUGUACUGUG |
| | 304 | miR-142-3p | UGUAGUGUUUCCUACUUUAUGGA |
| | 305 | miR-142-3p 结合位点 | UCCAUAAGUAGGAAACACUACA |
| | 306 | miR-142-5p | CAUAAAGUAGAAAGCACUACU |
| | 307 | miR-142-5p 结合位点 | AGUAGUGCUUUCUACUUUAUG |

[0460] 在一些实施方案中,miRNA结合位点在本发明的多核苷酸的任何位置(例如,5'UTR和/或3'UTR)插入所述多核苷酸中。在一些实施方案中,5'UTR包含miRNA结合位点。在一些

实施方案中,3'UTR包含miRNA结合位点。在一些实施方案中,5'UTR和3'UTR包含miRNA结合位点。多核苷酸中的插入位点可以是多核苷酸中的任何地方,只要多核苷酸中的miRNA结合位点的插入在相应miRNA不存在下不干扰功能性多肽的翻译;并且在miRNA存在下,多核苷酸中miRNA结合位点的插入以及miRNA结合位点与相应miRNA的结合能够降解多核苷酸或阻止多核苷酸的翻译。

[0461] 在一些实施方案中,将miRNA结合位点插入包含ORF的本发明的多核苷酸中ORF的终止密码子下游至少约30个核苷酸处。在一些实施方案中,miRNA结合位点被插入本发明多核苷酸中ORF的终止密码子下游的至少约10个核苷酸、至少约15个核苷酸、至少约20个核苷酸、至少约25个核苷酸、至少约30个核苷酸、至少约35个核苷酸、至少约40个核苷酸、至少约45个核苷酸、至少约50个核苷酸、至少约55个核苷酸、至少约60个核苷酸、至少约65个核苷酸、至少约70个核苷酸、至少约75个核苷酸、至少约80个核苷酸、至少约85个核苷酸、至少约90个核苷酸、至少约95个核苷酸或至少约100个核苷酸中。在一些实施方案中,miRNA结合位点被插入本发明多核苷酸中ORF的终止密码子下游的约10个核苷酸至约100个核苷酸、约20个核苷酸至约90个核苷酸、约30个核苷酸至约80个核苷酸、约40个核苷酸至约70个核苷酸、约50个核苷酸至约60个核苷酸、约45个核苷酸至约65个核苷酸中。

[0462] miRNA基因调控可受miRNA周围的序列的影响,如但不限于周围序列的种类、序列的类型(例如,异源、同源、外源、内源或人工)、周围序列中的调控元件和/或周围序列中的结构元件。miRNA可受5'UTR和/或3'UTR的影响。作为非限制性实例,与相同序列类型的人3'UTR相比,非人3'UTR可增加miRNA序列对目标多肽的表达的调控作用。

[0463] 在一个实施方案中,5'UTR的其他调控元件和/或结构元件可影响miRNA介导的基因调控。调控元件和/或结构元件的一个实例是5'UTR中的结构化IRES(内部核糖体进入位点),其对于翻译延伸因子的结合以起始蛋白质翻译是必需的。EIF4A2与5'-UTR中的这种二级结构化元件的结合对于miRNA介导的基因表达是必需的(Meijer HA等人,Science,2013,340,82-85,其以引用的方式整体并入本文)。本发明的多核苷酸可进一步包括这种结构化的5'UTR,以增强微小RNA介导的基因调控。

[0464] 可将至少一个miRNA结合位点工程化到本发明多核苷酸的3'UTR中。在这种背景下,可将至少两个、至少三个、至少四个、至少五个、至少六个、至少七个、至少八个、至少九个、至少十个或更多个miRNA结合位点工程化到本发明多核苷酸的3'UTR中。例如,可将1至10、1至9、1至8、1至7、1至6、1至5、1至4、1至3、2或1个miRNA结合位点工程化到本发明多核苷酸的3'UTR中。在一个实施方案中,并入本发明多核苷酸中的miRNA结合位点可以是相同的或可以是不同的miRNA位点。并入本发明多核苷酸中的不同miRNA结合位点的组合可包括其中并入任何不同miRNA位点的多于一个拷贝的组合。在另一个实施方案中,并入本发明多核苷酸中的miRNA结合位点可靶向体内相同或不同的组织。作为非限制性实例,通过在本发明的多核苷酸的3'-UTR中引入组织、细胞类型或疾病特异性miRNA结合位点,可降低特定细胞类型(例如,肝细胞、骨髓细胞、内皮细胞、癌细胞等)中的表达程度。

[0465] 在一个实施方案中,miRNA结合位点可在本发明多核苷酸中的3'UTR的5'末端附近、3'UTR的5'末端与3'末端之间大约中间和/或3'UTR的3'末端附近工程化。作为非限制性实例,miRNA结合位点可在3'UTR的5'末端附近并且在3'UTR的5'末端与3'末端之间的大约中间工程化。作为另一个非限制性实例,miRNA结合位点可在3'UTR的3'末端附近并且在3'

UTR的5'末端与3'末端之间的大约中间工程化。作为另一个非限制性实例,miRNA结合位点可在3'UTR的5'末端附近和3'UTR的3'末端附近工程化。

[0466] 在另一个实施方案中,3'UTR可包含1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个miRNA结合位点。miRNA结合位点可与种子序列侧翼的miRNA、miRNA种子序列和/或miRNA序列互补。

[0467] 在一个实施方案中,可工程化本发明的多核苷酸以包含在受试者的不同组织或不同细胞类型中表达的多于一个miRNA位点。作为非限制性实例,可工程化本发明的多核苷酸以包含miR-192和miR-122来调控多核苷酸在受试者的肝脏和肾脏中的表达。在另一个实施方案中,可将本发明的多核苷酸工程化为包含相同组织的多于一个miRNA位点。

[0468] 在一些实施方案中,可用miRNA结合位点改变与由本发明的多核苷酸编码的多肽相关的治疗窗和或差异表达。例如,由于这些细胞的miRNA特征,可将编码提供死亡信号的多肽的多核苷酸设计为在癌细胞中更高表达。当癌细胞表达较低水平的特定miRNA时,编码所述miRNA(或多个miRNA)的结合位点的多核苷酸将更高表达。因此,提供死亡信号的多肽在癌细胞中触发或诱导细胞死亡。由于miRNA结合结合位点或在3'UTR中编码的“传感器”的影响,具有相同miRNA的更高表达的相邻非癌细胞因此将受编码的死亡信号的影响较小,因为多核苷酸将以较低水平表达。相反,细胞存活或细胞保护信号可递送至含有癌细胞和非癌细胞的组织,其中miRNA在癌细胞中具有更高表达-结果是对癌细胞的较低存活信号和对正常细胞的较大存活信号。基于如本文所述的miRNA结合位点的使用,可设计和施用具有不同信号的多种多核苷酸。

[0469] 在一些实施方案中,可通过在多核苷酸中并入至少一个miR结合位点或传感器序列并配制多核苷酸用于施用来控制本发明的多核苷酸的表达。作为非限制性实例,可通过并入miRNA结合位点并将本发明的多核苷酸配制在包含可电离脂质(例如阳离子脂质)(包括本文描述的任何脂质)的脂质纳米粒子中来使所述多核苷酸靶向组织或细胞。

[0470] 基于不同组织、细胞类型或生物学条件中miRNA的表达模式,可工程化本发明的多核苷酸以在特定组织、细胞类型或生物学条件中进行更多靶向表达。通过引入组织特异性miRNA结合位点,可设计本发明的多核苷酸以在组织或细胞中或在生物学条件的背景下最佳蛋白质表达。

[0471] 在一些实施方案中,可设计本发明的多核苷酸以并入miRNA结合位点,所述miRNA结合位点与已知的miRNA种子序列具有100%同一性或miRNA种子序列具有小于100%同一性。在一些实施方案中,可设计本发明的多核苷酸以并入与已知的miRNA种子序列具有至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的miRNA结合位点。可使miRNA种子序列部分突变以降低miRNA结合亲和力,并且因此导致多核苷酸的下调减少。实质上,miRNA结合位点与miRNA种子之间的匹配或错配程度可充当变阻器以更精细地调节miRNA调节蛋白质表达的能力。此外,miRNA结合位点的非种子区域中的突变也可影响miRNA调节蛋白质表达的能力。

[0472] 在一个实施方案中,miRNA序列可并入茎环的环中。

[0473] 在另一个实施方案中,miRNA种子序列可并入茎环的环中,并且miRNA结合位点可并入茎环的5'或3'茎中。

[0474] 在一个实施方案中,翻译增强子元件(TEE)可并入茎环的茎的5'端上,并且miRNA种子可并入茎环的茎中。在另一个实施方案中,TEE可并入茎环的茎的5'端,miRNA种子可并

入茎环的茎中,并且miRNA结合位点可并入茎的3'端或茎环后的序列中。miRNA种子和miRNA结合位点可用于相同和/或不同的miRNA序列。

[0475] 在一个实施方案中,并入miRNA序列和/或TEE序列可改变茎环区的形状,这可增加和/或减少翻译。(参见例如,Kedde等人,"A Pumilio-induced RNA structure switch in p27-3'UTR controls miR-221 and miR-22 accessibility." *Nature Cell Biology*.2010,其以引用的方式整体并入本文)。

[0476] 在一个实施方案中,本发明多核苷酸的5'-UTR可包含至少一个miRNA序列。miRNA序列可以是但不限于19或22个核苷酸序列和/或不含种子的miRNA序列。

[0477] 在一个实施方案中,5'UTR中的miRNA序列可用于稳定本文所述的本发明的多核苷酸。

[0478] 在另一个实施方案中,本发明多核苷酸的5'UTR中的miRNA序列可用于降低翻译起始位点(如但不限于起始密码子)的可及性。参见例如,Matsuda等人,PLoS One.2010 11 (5):e15057;其以引用的方式整体并入本文,其使用起始密码子(-4至+37,其中AUG密码子的A为+1)周围的反义锁核酸(LNA)寡核苷酸和外显子-连接复合物(EJC)以便降低第一个起始密码子(AUG)的可及性。Matsuda表明,用LNA或EJC改变起始密码子周围的序列会影响多核苷酸的效率、长度和结构稳定性。本发明的多核苷酸可在翻译起始位点附近包含miRNA序列,而不是Matsuda等人描述的LNA或EJC序列,以降低对翻译起始位点的可及性。翻译起始位点可在miRNA序列之前、之后或之内。作为非限制性实例,翻译起始位点可位于miRNA序列,如种子序列或结合位点内。作为另一个非限制性实例,翻译起始位点可位于miR-122序列,如种子序列或mir-122结合位点内。

[0479] 在一些实施方案中,本发明的多核苷酸可包含至少一种miRNA,以抑制抗原呈递细胞的抗原呈递。miRNA可以是完整的miRNA序列、miRNA种子序列、不含种子的miRNA序列或其组合。作为非限制性实例,并入本发明多核苷酸中的miRNA可对造血系统具有特异性。作为另一个非限制性实例,并入本发明多核苷酸中以阻遏抗原呈递的miRNA是miR-142-3p。

[0480] 在一些实施方案中,本发明的多核苷酸可包含至少一种miRNA,以阻遏目标组织或细胞中编码的多肽的表达。作为非限制性实例,本发明的多核苷酸可包含至少一个miR-122结合位点,以阻遏肝脏中编码的目标多肽的表达。作为另一个非限制性实例,本发明的多核苷酸可包含至少一个miR-142-3p结合位点、miR-142-3p种子序列、不含种子的miR-142-3p结合位点、miR-142-5p结合位点、miR-142-5p种子序列、不含种子的miR-142-5p结合位点、miR-146结合位点、miR-146种子序列和/或不含种子序列的miR-146结合位点。

[0481] 在一些实施方案中,本发明的多核苷酸可在3'UTR中包含至少一个miRNA结合位点,以选择性地降解免疫细胞中的mRNA治疗剂,以抑制由治疗性递送引起的不想要的免疫原性反应。作为非限制性实例,miRNA结合位点可使本发明的多核苷酸在抗原呈递细胞中更不稳定。这些miRNA的非限制性实例包括mir-142-5p、mir-142-3p、mir-146a-5p和mir-146-3p。

[0482] 在一个实施方案中,本发明的多核苷酸在多核苷酸的可与RNA结合蛋白相互作用的区域中包含至少一个miRNA序列。

[0483] 在一些实施方案中,本发明的多核苷酸(例如,RNA,例如mRNA)包含(i)编码一种或多种野生型表位抗原的序列优化的核苷酸序列(例如,ORF)和(ii)miRNA结合位点(例如,与

miR-142结合的miRNA结合位点)。

[0484] 在一些实施方案中,本发明的多核苷酸包含编码本文公开的一种或多种癌表位多肽的尿嘧啶修饰的序列和本文公开的miRNA结合位点,例如结合至miR-142的miRNA结合位点。在一些实施方案中,编码一种或多种癌表位多肽的尿嘧啶修饰的序列包含至少一个化学修饰的核碱基,例如5-甲氧基尿嘧啶。在一些实施方案中,编码本发明的一种或多种癌表位多肽的尿嘧啶修饰的序列中至少95%的核碱基(例如尿嘧啶)类型是修饰的核碱基。在一些实施方案中,编码一种或多种癌表位多肽的尿嘧啶修饰的序列中至少95%的尿嘧啶是5-甲氧基尿苷。在一些实施方案中,包含编码本文公开的一种或多种癌表位多肽的核苷酸序列和miRNA结合位点的多核苷酸与递送剂一起配制,所述递送剂例如包含例如具有式(I)、(IA)、(II)、(IIa)、(IIb)、(IIc)、(IId)或(IIe)的脂质的LNP,例如,化合物1-232中的任一种。

[0485] 3'UTR和富含AU的元件

[0486] 在某些实施方案中,本发明的多核苷酸(例如,包含编码本发明的癌抗原表位的核苷酸序列的多核苷酸)还包含3'UTR。在某些实施方案中,本发明的多核苷酸(例如,包含编码本发明的活化致癌基因突变肽的核苷酸序列的多核苷酸)还包含3'UTR。

[0487] 3'-UTR是紧接在翻译终止密码子之后的mRNA区段,并且通常含有转录后影响基因表达的调控区。3'-UTR内的调控区可影响mRNA的聚腺苷酸化、翻译效率、定位和稳定性。在一个实施方案中,可用于本发明的3'-UTR包含调控性蛋白质或微小RNA的结合位点。在一些实施方案中,3'-UTR具有沉默子区,所述沉默子区与阻遏蛋白结合并抑制mRNA的表达。在其他实施方案中,3'-UTR包含富含AU的元件。蛋白质结合ARE以便以局部方式影响转录物的稳定性或衰变速率或影响翻译起始。在其他实施方案中,3'-UTR包含序列AAUAAA,其指导被称为聚腺苷酸尾部(poly(A) tail)的数百个腺嘌呤残基添加至mRNA转录物的末端。

[0488] 已知天然或野生型3'UTR具有嵌入它们之中的腺苷和尿苷段。这些富含AU的签名序列在具有高更新率的基因中是特别普遍的。基于其序列特征和功能特性,富含AU的元件(ARE)可分成这些类别(Chen等人,1995):I类ARE在富含U的区内包含AUUUA基序的若干分散拷贝。C-Myc和MyoD包含I类ARE。II类ARE具有两个或更多个重叠的UUUUUA(U/A)(U/A)九聚物。含有这种类型的ARE的分子包括GM-CSF和TNF- α 。III类ARE的定义不太明确。这些富含U的区不包含AUUUA基序。c-Jun和肌细胞生成素是这种类别的两个被充分研究的实例。已知大多数结合ARE的蛋白质使信使不稳定,而ELAV家族的成员(最显著的是HuR)已被证明增加mRNA的稳定性。HuR结合所有三类的ARE。将HuR特异性结合位点工程化至核酸分子的3'UTR中将导致HuR结合,并因此导致体内信使的稳定化。

[0489] 3'UTR富含AU的元件的引入、除去或修饰可用于调节本发明的多核苷酸的稳定性。当工程化特定多核苷酸时,可引入ARE的一个或多个拷贝来使本发明的多核苷酸不那么稳定且由此缩减翻译和减少所得蛋白质的产生。同样,ARE可被鉴别和去除或突变以便增加细胞内稳定性并因此增加翻译和所得蛋白质的产生。可使用本发明的多核苷酸在相关细胞系中进行转染实验,并且可在转染后的不同时间点测定蛋白质产生。例如,可用不同的ARE工程化分子转染细胞,并且使用针对相关蛋白质的ELISA试剂盒测定转染后第6小时、第12小时、第24小时、第48小时以及7天产生的蛋白质。

[0490] 具有5'帽的区

[0491] 本发明还包括多核苷酸,其包含5'帽和本发明的多核苷酸(例如,包含编码癌抗原表位,例如活化致癌基因突变肽的核苷酸序列的多核苷酸)。

[0492] 天然mRNA的5'帽结构参与核输出,从而增加mRNA稳定性,并且结合mRNA帽结合蛋白(CBP),所述mRNA帽结合蛋白通过CBP与聚(A)结合蛋白缔合以形成成熟的环状mRNA物种来负责细胞中的mRNA稳定性和翻译能力。所述帽在mRNA剪接过程中进一步帮助除去5'近端内含子。

[0493] 内源性mRNA分子可以是5'端加帽的,从而在末端鸟苷帽残基与mRNA分子的5'末端转录的有义核苷酸之间产生5'-ppp-5'-三磷酸酯键联。这种5'-鸟苷酸帽然后可被甲基化以便产生N7-甲基-鸟苷酸残基。mRNA的5'端的末端和/或前末端(antiterminal)转录的核苷酸的核糖还可任选地是2'-O-甲基化的。通过鸟苷酸帽结构的水解和裂解的5'-脱帽可靶向用于降解的核酸分子,如mRNA分子。

[0494] 在一些实施方案中,本发明的多核苷酸(例如,包含编码癌抗原表位的核苷酸序列的多核苷酸)并入帽部分。

[0495] 在一些实施方案中,本发明的多核苷酸(例如,包含编码癌抗原表位,例如活化致癌基因突变肽的核苷酸序列的多核苷酸)包含不可水解的帽结构,从而防止脱帽并由此增加mRNA半衰期。因为帽结构水解要求5'-ppp-5'磷酸二酯键联的裂解,所以可在加帽反应过程中使用修饰核苷酸。例如,来自New England Biolabs(Ipswich,MA)的牛痘加帽酶可根据制造商的说明书与 α -硫代-鸟苷核苷酸一起使用以便在5'-ppp-5'帽中形成硫代磷酸酯键联。可使用另外修饰的鸟苷核苷酸,如 α -甲基-磷酸酯和硒代-磷酸酯核苷酸。

[0496] 另外的修饰包括但不限于多核苷酸(如上述)在糖环的2'-羟基上的5'-末端和/或5'-前末端核苷酸的核糖的2'-O-甲基化。多种不同的5'帽结构可用于产生核酸分子如充当mRNA分子的多核苷酸的5'帽。帽类似物,在本文还被称为合成帽类似物、化学帽、化学帽类似物或结构或功能帽类似物,在其化学结构上与天然(即内源性、野生型或生理的)5'帽不同,同时保留帽功能。帽类似物可以是化学(即非酶)或酶合成的和/或连接至本发明的多核苷酸。

[0497] 例如,抗-反向帽类似物(ARCA)帽包含通过5'-5'-三磷酸酯基团连接的两个鸟嘌呤,其中一个鸟嘌呤包含N7甲基以及3'-O-甲基(即N7,3'-O-二甲基-鸟苷-5'-三磷酸酯-5'-鸟苷(m7G-3'mppp-G;其可等效地指定为3'-O-Me-m7G(5')ppp(5')G)。另一未修饰鸟嘌呤的3'-O原子变成连接至加帽的多核苷酸的5'末端核苷酸。N7-和3'-O-甲基化的鸟嘌呤提供加帽的多核苷酸的末端部分。

[0498] 另一种示例性帽是mCAP,其与ARCA类似但在鸟苷上具有2'-O-甲基(即N7,2'-O-二甲基-鸟苷-5'-三磷酸酯-5'-鸟苷,m7Gm-ppp-G)。

[0499] 在一些实施方案中,所述帽是二核苷酸帽类似物。作为非限制性实例,二核苷酸帽类似物可在不同磷酸酯位置处用硼烷磷酸酯基团或硒代磷酸酯基团修饰,如在美国专利号US 8,519,110中描述的二核苷酸帽类似物,所述专利的内容以引用的方式整体并入本文。

[0500] 在另一个实施方案中,所述帽是帽类似物,所述帽类似物是本领域中已知和/或本文描述的帽类似物的N7-(4-氯苯氧基乙基)取代的二核苷酸形式。帽类似物的N7-(4-氯苯氧基乙基)取代的二核苷酸形式的非限制性实例包括N7-(4-氯苯氧基乙基)-G(5')ppp(5')G和N7-(4-氯苯氧基乙基)-m3'-OG(5')ppp(5')G帽类似物(参见例如,在Kore等人

Bioorganic&Medicinal Chemistry 2013 21:4570-4574中描述的各种帽类似物和合成帽类似物的方法;所述文献的内容以引用的方式整体并入本文)。在另一个实施方案中,本发明的帽类似物是4-氯/溴苯氧基乙基类似物。

[0501] 虽然帽类似物允许多核苷酸或其区在体外转录反应中的伴随加帽,但高达20%的转录物可仍保持未加帽。这种情况以及帽类似物与通过内源性细胞转录机器产生的核酸的内源性5'帽结构的结构差异可导致降低的翻译能力和降低的细胞稳定性。

[0502] 本发明的多核苷酸(例如,包含编码癌抗原表位的核苷酸序列的多核苷酸)还可在制造后使用酶加帽(无论IVT还是化学合成)以便产生更真实的5'-帽结构。如本文所用,短语“更真实的”是指在结构或功能上接近地反映或模拟内源性或野生型特征的特征。也就是说,“更真实的”特征是与现有技术的合成特征或类似物等相比,内源性、野生型、天然或生理细胞功能和/或结构的更好表示,或在一个或多个方面胜过对应的内源性、野生型、天然或生理特征的特征。本发明的更真实的5'帽结构的非限制性实例是与本领域已知的合成5'帽结构(或与野生型、天然或生理5'帽结构)相比,除其他事项之外具有帽结合蛋白的增强的结合、增加的半衰期、对5'内切核酸酶减少的敏感性和/或减少的5'脱帽的那些实例。例如,重组牛痘病毒加帽酶和重组2'-O-甲基转移酶可在多核苷酸的5'-末端核苷酸与鸟嘌呤帽核苷酸之间形成规范的5'-5'-三磷酸根键联,其中所述帽鸟嘌呤包含N7甲基化并且mRNA的5'-末端核苷酸包含2'-O-甲基。这种结构被称为帽1结构。这种帽导致与例如本领域已知的其他5'帽类似物结构相比更高的翻译能力和细胞稳定性以及减少的细胞促炎细胞因子的激活。帽结构包括但不限于,7mG(5')ppp(5')N,pN2p(帽0)、7mG(5')ppp(5')N1mpNp(帽1)以及7mG(5')-ppp(5')N1mpN2mp(帽2)。

[0503] 作为非限制性实例,在制造后对嵌合多核苷酸加帽可以更有效,因为几乎100%的嵌合多核苷酸可被加帽。这与在体外转录反应过程中帽类似物被连接至嵌合多核苷酸时的约80%形成对比。

[0504] 根据本发明,5'末端帽可包括内源性帽或帽类似物。根据本发明,5'末端帽可包含鸟嘌呤类似物。有用的鸟嘌呤类似物包括但不限于,肌苷、N1-甲基-鸟苷、2'-氟-鸟苷、7-脱氮-鸟苷、8-氧代-鸟苷、2-氨基-鸟苷、LNA-鸟苷以及2-叠氮基-鸟苷。

[0505] 聚腺苷酸尾部

[0506] 在一些实施方案中,本公开的多核苷酸(例如,包含编码癌抗原表位如活化致癌基因突变肽的核苷酸序列的多核苷酸)还包含聚腺苷酸尾部。在其他实施方案中,可并入聚腺苷酸尾部上的末端基团以获得稳定化。在其他实施方案中,聚腺苷酸尾部包含脱-3'羟基尾。

[0507] 在RNA加工过程中,可将长链腺嘌呤核苷酸(聚腺苷酸尾部)添加至多核苷酸如mRNA分子以便增加稳定性。紧随转录之后,转录物的3'端可被裂解以释放3'羟基。然后聚-A聚合酶将腺嘌呤核苷酸链添加至RNA。被称为聚腺苷酸化的过程添加可在例如大约80与大约250个之间残基长,包括大约80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240或250个残基长的聚腺苷酸尾部。

[0508] 聚腺苷酸尾部还可在从细胞核输出构建体之后添加。

[0509] 根据本发明,可并入聚腺苷酸尾部上的末端基团以获得稳定化。本发明的多核苷酸可包括脱-3'羟基尾。它们还可包括结构部分或2'-O-甲基修饰,如由Junjie Li,等人

(Current Biology,第15卷,1501-1507,2005年8月23日,其内容以引用的方式整体并入本文)所教导。

[0510] 本发明的多核苷酸可被设计成编码具有选择性聚腺苷酸尾部结构(包括组蛋白mRNA)的转录物。根据Norbury,还已在人复制依赖性组蛋白mRNA上检测到“末端尿苷化。这些mRNA的转换被认为对于在染色体DNA复制完成或抑制后预防潜在毒性组蛋白累积来说是重要的。这些mRNA的特征在于它们缺乏3'聚腺苷酸尾部,其功能相反由稳定的茎-环结构及其同源茎-环结合蛋白(SLBP)承担;后者执行与聚腺苷酸化mRNA上的PABP的那些相同的功能”(Norbury,“Cytoplasmic RNA:a case of the tail wagging the dog,”Nature Reviews Molecular Cell Biology;AOP,2013年8月29日在线公开;doi:10.1038/nrm3645),其内容以引用的方式整体并入本文。

[0511] 独特的聚腺苷酸尾部长度为本发明的多核苷酸提供某些优点。一般而言,当存在时,聚腺苷酸尾部的长度大于30个核苷酸。在另一个实施方案中,聚腺苷酸尾部的长度大于35个核苷酸(例如,至少或大于约35、40、45、50、55、60、70、80、90、100、120、140、160、180、200、250、300、350、400、450、500、600、700、800、900、1,000、1,100、1,200、1,300、1,400、1,500、1,600、1,700、1,800、1,900、2,000、2,500以及3,000个核苷酸)。

[0512] 在一些实施方案中,多核苷酸或其区包含约30至约3,000个核苷酸(例如,30至50、30至100、30至250、30至500、30至750、30至1,000、30至1,500、30至2,000、30至2,500、50至100、50至250、50至500、50至750、50至1,000、50至1,500、50至2,000、50至2,500、50至3,000、100至500、100至750、100至1,000、100至1,500、100至2,000、100至2,500、100至3,000、500至750、500至1,000、500至1,500、500至2,000、500至2,500、500至3,000、1,000至1,500、1,000至2,000、1,000至2,500、1,000至3,000、1,500至2,000、1,500至2,500、1,500至3,000、2,000至3,000、2,000至2,500以及2,500至3,000)。

[0513] 在一些实施方案中,相对于总体多核苷酸的长度或多核苷酸的特定区的长度来设计聚腺苷酸尾部。这种设计可以是基于编码区的长度、特定特征或区的长度或基于从多核苷酸表达的最终产物的长度。

[0514] 在这种背景下,聚腺苷酸尾部可在长度上大于多核苷酸或其特征10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%。聚腺苷酸尾部还可被设计为它所属的多核苷酸的一部分。在这种背景下,聚腺苷酸尾部可以是构建体、构建体区的总长度或构建体减去聚腺苷酸尾部的总长度的10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%或更多。此外,多核苷酸针对聚-A结合蛋白质的工程化的结合位点和缀合可增强表达。

[0515] 另外,多个不同的多核苷酸可使用聚腺苷酸尾部的3'末端处的修饰的核苷酸经由3'端一起连接至PABP(聚-A结合蛋白)。可在相关细胞系中进行转染实验并且可在转染后第12小时、第24小时、第48小时、第72小时和第7天通过ELISA测定蛋白质产生。

[0516] 在一些实施方案中,本发明的多核苷酸被设计成包括聚A-G四联体区。G四联体是可通过DNA和RNA两者中的富含G的序列形成的四个鸟嘌呤核苷酸的环状氢键合阵列。在这个实施方案中,G四联体并入在聚腺苷酸尾部的末端。在不同时间点针对稳定性、蛋白质产生和包括半衰期的其他参数来对所得多核苷酸进行测定。已发现聚A-G四联体使得来自mRNA的蛋白质产生等效于单独使用120个核苷酸的聚腺苷酸尾部所观察到的蛋白质产生的至少75%。

[0517] 起始密码子区

[0518] 本发明还包括多核苷酸,其包含起始密码子区和本文所述的多核苷酸(例如,包含编码癌抗原表位如活化致癌基因突变肽的核苷酸序列的多核苷酸)。在一些实施方案中,本发明的多核苷酸可具有与起始密码子区类似的或与起始密码子区类似起作用的区。

[0519] 在一些实施方案中,多核苷酸的翻译可起始于不为起始密码子AUG的密码子。多核苷酸的翻译可起始于选择性起始密码子如但不限于ACG、AGG、AAG、CTG/CUG、GTG/GUG、ATA/AUA、ATT/AUU、TTG/UUG(参见Touriol等人Biology of the Cell 95(2003)169-178以及Matsuda和Mauro PLoS ONE,2010 5:11;其各自的内容以引用的方式整体并入本文)。

[0520] 作为非限制性实例,多核苷酸的翻译开始于替代起始密码子ACG。作为另一个非限制性实例,多核苷酸翻译开始于替代起始密码子CTG或CUG。作为另一个非限制性实例,多核苷酸的翻译开始于替代起始密码子GTG或GUG。

[0521] 侧接起始翻译的密码子如但不限于起始密码子或替代起始密码子的核苷酸已知影响多核苷酸的翻译效率、长度和/或结构。(参见例如,Matsuda和Mauro PLoS ONE,2010 5:11;其内容以引用的方式整体并入本文)。掩蔽侧接起始翻译的密码子的任何核苷酸可用于改变多核苷酸的翻译起始位置、翻译效率、长度和/或者结构。

[0522] 在一些实施方案中,掩蔽剂可在起始密码子或替代起始密码子附近使用以便掩蔽或隐蔽所述密码子以降低在所掩蔽的起始密码子或替代起始密码子处翻译起始的可能性。掩蔽剂的非限制性实例包括反义锁核酸(LNA)多核苷酸和外显子连接复合物(EJC)(参见例如,Matsuda和Mauro描述掩蔽剂LNA多核苷酸和EJC(PLoS ONE,2010 5:11);其内容以引用的方式整体并入本文)。

[0523] 在另一个实施方案中,掩蔽剂可用于掩蔽多核苷酸的起始密码子以便增加翻译将起始于选择性起始密码子的可能性。在一些实施方案中,掩蔽剂可用于掩蔽第一起始密码子或替代起始密码子,以便增加翻译将起始于所掩蔽的起始密码子或替代起始密码子下游的起始密码子或替代起始密码子的机会。

[0524] 在一些实施方案中,起始密码子或替代起始密码子可位于miR结合位点的完全补体内。miR结合位点的完全补体可类似于掩蔽剂帮助控制多核苷酸的翻译、长度和/或结构。作为非限制性实例,起始密码子或选择性起始密码子可位于miRNA结合位点的完全补体的中间中。起始密码子或替代起始密码子可位于第一核苷酸、第二核苷酸、第三核苷酸、第四核苷酸、第五核苷酸、第六核苷酸、第七核苷酸、第八核苷酸、第九核苷酸、第十核苷酸、第十一核苷酸、第十二核苷酸、第十三核苷酸、第十四核苷酸、第十五核苷酸、第十六核苷酸、第十七核苷酸、第十八核苷酸、第十九核苷酸、第二十核苷酸或第二十一核苷酸之后。

[0525] 在另一个实施方案中,可从多核苷酸序列中去除多核苷酸的起始密码子,以便使多核苷酸的翻译开始于不为起始密码子的密码子。多核苷酸的翻译可开始于所去除的起始密码子之后的密码子或下游起始密码子或替代起始密码子。在非限制性实例中,将作为多核苷酸序列的前3个核苷酸的起始密码子ATG或AUG去除,以便使翻译起始于下游起始密码子或替代起始密码子。去除起始密码子的多核苷酸序列还可包含至少一种用于下游起始密码子和/或替代起始密码子的掩蔽剂,以便控制或试图控制翻译的起始、多核苷酸的长度和/或多核苷酸的结构。

[0526] 终止密码子区

[0527] 本发明还包括多核苷酸,其包含终止密码子区和本文所述的多核苷酸(例如,包含编码癌抗原表位如活化致癌基因突变肽的核苷酸序列的多核苷酸)。在一些实施方案中,本发明的多核苷酸可在3'非翻译区(UTR)之前包含至少两个终止密码子。终止密码子可选自TGA、TAA和TAG(在DNA的情况下)或选自UGA、UAA和UAG(在RNA的情况下)。在一些实施方案中,本发明的多核苷酸包含终止密码子TGA(在DNA的情况下)或终止密码子UGA(在RNA的情况下)和一个另外的终止密码子。在另一实施方案中,另外的终止密码子可以是TAA或UAA。在另一个实施方案中,本发明的多核苷酸包含三个连续终止密码子、四个终止密码子或更多。

[0528] 插入和取代

[0529] 本发明还包括本公开的多核苷酸,其还包含插入和/或取代。

[0530] 在一些实施方案中,所述多核苷酸的5'UTR可通过同一碱基的核苷的至少一个区和/或串的插入而被置换。核苷酸的区和/或串可包括但不限于至少3个、至少4个、至少5个、至少6个、至少7个或至少8个核苷酸并且所述核苷酸可以是天然的和/或非天然的。作为非限制性实例,核苷酸的群可包含5-8个腺嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶、本文所公开的任何其他核苷酸的串和/或其组合。

[0531] 在一些实施方案中,所述多核苷酸的5'UTR可通过两个不同碱基的核苷酸的至少两个区和/或串的插入而被置换,所述碱基如但不限于腺嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶、本文所公开的任何其他核苷酸和/或其组合。例如,5'UTR可通过插入5至8个腺嘌呤碱基、接着插入5至8个胞嘧啶碱基来置换。在另一个实例中,5'UTR可通过插入5至8个胞嘧啶碱基、接着插入5至8个腺嘌呤碱基来置换。

[0532] 在一些实施方案中,所述多核苷酸可包括在可由RNA聚合酶识别的转录起始位点下游的至少一个取代和/或插入。作为非限制性实例,至少一个取代和/或插入可通过取代紧靠转录起始位点下游(如但不限于+1至+6)的区中的至少一个核酸来在转录起始位点的下游发生。紧靠转录起始位点下游的核苷酸的区的变化可影响起始速率、增加表观核苷酸三磷酸(NTP)反应恒定值并且增加短转录物与转录复合物的解离从而消除(curing)初始转录(Briebe等人,Biochemistry(2002)41:5144-5149;以引用的方式整体并入本文)。至少一个核苷的修饰、取代和/或插入可引起序列的沉默突变或可引起氨基酸序列中的突变。

[0533] 在一些实施方案中,多核苷酸可包括在转录起始位点下游的至少1个、至少2个、至少3个、至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个、至少10个、至少11个、至少12个或至少13个鸟嘌呤碱基的取代。

[0534] 在一些实施方案中,多核苷酸可包括紧靠转录起始位点下游的区中的至少1个、至少2个、至少3个、至少4个、至少5个或至少6个鸟嘌呤碱基的取代。作为非限制性实例,如果所述区中的核苷酸是GGGAGA,那么鸟嘌呤碱基可被至少1个、至少2个、至少3个或至少4个腺嘌呤核苷酸取代。在另一个非限制性实例中,如果所述区中的核苷酸是GGGAGA,那么鸟嘌呤碱基可被至少1个、至少2个、至少3个或至少4个胞嘧啶碱基取代。在另一个非限制性实例中,如果所述区中的核苷酸是GGGAGA,那么鸟嘌呤碱基可被至少1个、至少2个、至少3个或至少4个胸腺嘧啶和/或本文所描述的任何核苷酸取代。

[0535] 在一些实施方案中,多核苷酸可包括起始密码子上游的至少一个取代和/或插入。为清楚起见,本领域技术人员将理解起始密码子是蛋白质编码区的第一个密码子,而转录

起始位点是转录开始的位点。多核苷酸可包括但不限于核苷酸碱基的至少1个、至少2个、至少3个、至少4个、至少5个、至少6个、至少7个或至少8个取代和/或插入。核苷酸碱基可在起始密码子上游的1个、至少1个、至少2个、至少3个、至少4个或至少5个位置处插入或取代。所插入和/或取代的核苷酸可以是相同碱基(例如,全部是A或全部是C或全部是T或全部是G)、两种不同的碱基(例如,A和C、A和T或C和T)、三种不同的碱基(例如,A、C和T或A、C和T)或至少四种不同的碱基。

[0536] 作为非限制性实例,多核苷酸中的编码区上游的鸟嘌呤碱基可被腺嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶或本文所描述的任何核苷酸取代。在另一个非限制性实例中,多核苷酸中的鸟嘌呤碱基的取代可进行设计以便保留在转录起始位点下游的区中并且在起始密码子之前的一个鸟嘌呤碱基(参见Esvelt等人Nature (2011) 472 (7344) :499-503;其内容以引用的方式整体并入本文)。作为非限制性实例,至少5个核苷酸可插入转录起始位点下游但起始密码子上游的1个位置处并且所述至少5个核苷酸可以是同一碱基类型。

[0537] 根据本公开,嵌合多核苷酸的两个区域或部分可例如使用三磷酸化学加以接合或连接。在一些实施方案中,具有100个核苷酸或更少的第一区域或部分被化学合成具有5'-单磷酸和末端3'-脱OH或经阻断OH。如果区域长于80个核苷酸,那么它可被合成为将随后通过连接加以化学连接的两条或更多条链。如果第一区域或部分被使用IVT而合成为非位置修饰区域或部分,那么可继之以向5'-单磷酸的转化以及后续对3'末端的封盖。单磷酸根保护基团可选自本领域种已知的任何一种。嵌合多核苷酸的第二区域或部分可使用例如如本文所述的化学合成或IVT方法来合成。IVT方法可包括使用可利用具有经修饰帽的引物的RNA聚合酶。或者,帽可被化学合成并偶联于IVT区域或部分。

[0538] 应注意对于连接方法,用DNA T4连接酶进行的连接,继之以用DNA酶处理(以消除为DNA T4连接酶活性所需的DNA夹板)应易于防止不合需要地形成串联产物。

[0539] 整个嵌合多核苷酸不需要用磷酸根-糖主链制造。如果所述区或部分之一编码多肽,则优选这种区或部分包含磷酸根-糖主链。

[0540] 连接可使用任何适当技术进行,所述技术诸如酶促连接、点击化学、orthoclick化学、solulink或为本领域中的人士所知的其他生物缀合化学。在一些实施方案中,连接由互补性寡核苷酸夹板引导。在一些实施方案中,连接在无互补性寡核苷酸夹板下进行。

[0541] 在其他方面,本发明涉及用于通过IVT方法来制备mRNA癌症疫苗的试剂盒。在个人化癌症疫苗中,重要的是鉴定患者特异性突变,并且用一种或多种新表位对患者接种疫苗。在所述疫苗中,由mRNA的ORF编码的抗原将为患者所特有。编码抗原的RNA的5'末端和3'末端可为更加广泛可适用的,因为它们包括为许多RNA所共有的非翻译区和稳定区。本公开尤其提供包括嵌合多核苷酸的一个或多个部分诸如RNA的一个或多个5'区域和/或3'区域的试剂盒,所述一个或多个部分可与编码患者特异性表位的ORF组合。举例来说,试剂盒可包括含有5'-ORF、3'-ORF和聚腺苷酸尾部中的一者或多者的多核苷酸。在一些实施方案中,各多核苷酸组分处于个别容器中。在其他实施方案中,超过一种多核苷酸组分共同存在于单一容器中。在一些实施方案中,试剂盒包括连接酶。在一些实施方案中,提供的试剂盒包括使用说明书。在一些实施方案中,说明书包括用以使表位编码ORF连接于来自试剂盒的一种或多种其他组分例如5'-ORF、3'-ORF和/或聚腺苷酸尾部的说明书。

[0542] 用于产生本发明的个人化癌症疫苗的方法涉及使用诸如如本文所述的深度核酸

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

[0543] 新抗原疫苗可为包括多种新表位的多顺反子疫苗或一种或多种单一RNA疫苗或其组合。

[0544] 在一些实施方案中,从启动突变鉴定过程至开始患者治疗的整个方法在少于2个月内实现。在其他实施方案中,整个过程在7周或更短时间、6周或更短时间、5周或更短时间、4周或更短时间、3周或更短时间、2周或更短时间或少于1周内实现。在一些实施方案中,整个方法在少于30天内进行。

[0545] 突变鉴定过程可涉及转录物组分析与外显子组分析两者,或仅转录物组分析或外显子组分析。在一些实施方案中,首先进行转录物组分析,并且其次进行外显子组分析。对生物样品或组织样品进行分析。在一些实施方案中,生物样品或组织样品是血液或血清样品。在其他实施方案中,样品是组织库样品,或EBV转化的B细胞。

[0546] 已认识和了解,通过分析癌症相关突变的某些性质,最优新表位可被评估和/或选择用于包括在mRNA疫苗中。举例来说,在给定时间,可对若干性质中的一者或多者进行评估并加权以选择一组用于包括在疫苗中的新表位。新表位或一组新表位的性质可包括例如在患者RNA测序或其他核酸分析中对基因或转录物水平表达的评估,可用数据库中的组织特异性表达,已知致癌基因/肿瘤抑制剂,变体识别置信度评分, RNA测序等位基因特异性表达,保守性氨基酸取代相对于非保守性氨基酸取代,点突变的位置(关于增加的TCR啮合的中心化评分),点突变的位置(关于差异性HLA结合的锚定评分),自身性:与患者WES数据具有<100%核心表位同源性,HLA-A和HLA-B对8聚体-11聚体的IC50,HLA-DRB1对15聚体-20聚体的IC50;杂乱评分(即被预测会进行结合的患者HLA的数目),HLA-C对8聚体-11聚体的IC50,HLA-DRB3-5对15聚体-20聚体的IC50,HLA-DQB1/A1对15聚体-20聚体的IC50,HLA-DPB1/A1对15聚体-20聚体的IC50,I类相对于II类比例,涵盖的患者HLA-A、HLA-B和DRB1同种异型的多样性,点突变相对于复杂表位(例如框移)的比例,和/或假表位HLA结合评分。

[0547] 在一些实施方案中,癌症相关突变的用于鉴定最优新表位的性质是与突变类型、突变在患者样品中的丰度、免疫原性、缺乏自身反应性以及肽组成性质相关的性质。

[0548] 突变类型应被确定为和视为决定推定表位是否应被包括在疫苗中的因素。突变类型可变化。在一些情况下,可合乎需要的是在单一疫苗中包括多种不同类型的突变。在其他情况下,单一类型的突变可更加合乎需要。可对特定突变的价值加权并进行计算。在一些实施方案中,特定突变是单核苷酸多态性(SNP)。在一些实施方案中,特定突变是复杂变体,例如由内含子保留、复杂剪接事件、或改变序列的阅读框的插入/缺失突变产生的肽序列。

[0549] 也可对突变在患者样品中的丰度评分并作为决定推定表位是否应被包括在疫苗中的因素。高度充足的突变可促进更强力免疫应答。

[0550] 对免疫原性的考虑是在选择用于包括在疫苗中的最优新表位时的重要组成部分。免疫原性可例如通过分析新表位的MHC结合能力、HLA杂乱性、突变位置、预测T细胞反应性、

实际T细胞反应性、导致特定构象和所引起的溶剂暴露的结构、以及表现的特定氨基酸来评估。诸如NetMHC预测算法的已知算法可用于预测肽结合常见HLA-A和HLA-B等位基因的能力。对MHC结合的肽的结构评估也可通过电子3维分析和/或蛋白质对接程序来进行。对诸如由Rosetta算法获得的在结合于MHC分子时加以预测的表位结构的使用可用于评估当表位结合于MHC分子时,所述表位的氨基酸残基的溶剂暴露程度。可在体外用表位和T细胞以实验方式评估T细胞反应性。或者,可使用T细胞应答/序列数据集评估T细胞反应性。

[0551] 包括在疫苗中的新表位的重要组成部分是缺乏自身反应性。可筛选推定新表位以确认表位限于肿瘤组织,例如由于恶性细胞内的遗传变化而产生。理想的是,表位不应存在于患者的正常组织中,因此自身类似表位被滤出数据集。个人化编码基因组可作为参照用于比较新抗原候选物以确定缺乏自身反应性。在一些实施方案中,从个别化转录物组和/或外显子组产生个人化编码基因组。

[0552] 肽组成性质也可在表位设计时加以考虑。举例来说,可关于见于表位中的保守氨基酸的价值相对于非保守氨基酸的价值对各推定表位提供评分。

[0553] 在一些实施方案中,通过本文所述的工具进行的分析可包括比较在不同时间从患者(即在治疗干预之前和之后),从不同组织样品,从具有类似肿瘤的不同患者等获得的不同组性质。在一些实施方案中,可将来自一组性质的峰值的平均值与来自另一组性质的峰值的平均值进行比较。举例来说,可在不同的两组分布之间比较HLA结合的平均值。可持续由例如数天、数月或数年分隔的持续时间确定两组分布。

[0554] 此外,本发明者已认识和了解,可收集并使用本文所述的算法分析关于癌症突变的性质的所述数据。数据适用于鉴定用于开发个人化癌症疫苗的新表位和新表位组。

[0555] 在一些实施方案中,肿瘤变异肽的所有注释转录物都被包括在本发明的疫苗中。在一些实施方案中,RNA测序中鉴定的RNA的翻译物被包括在本发明的疫苗中。

[0556] 应了解2个或更多个肽,例如2个或更多个新抗原的多联体可在肽边界处创建非意图新表位(假表位)。为防止或消除所述假表位,可跨越多联体中的肽边界扫描I类等位基因的命中物。在一些实施方案中,使多联体内的肽顺序改组以降低或消除假表位形成。在一些实施方案中,在肽之间使用连接体,例如单一氨基酸连接体诸如甘氨酸,以降低或消除假表位形成。在一些实施方案中,锚定氨基酸可用将使假表位形成降低或消除的其他氨基酸替换。在一些实施方案中,在多联体内的肽边界处对肽进行调整以降低或消除假表位形成。

[0557] 在一些实施方案中,对多种肽表位抗原进行排列和排序以使假表位最少。在其他实施方案中,多种肽表位抗原是不含假表位的多肽。当癌抗原表位以头尾相接形态排列在多联结构中时,在各癌抗原表位之间形成接合部。那包括来自在肽的N末端的表位的数个(即1-10个)氨基酸和邻近的直接连接表位的在C末端的数个(即1-10个)氨基酸。重要的是接合部不是可产生免疫应答的免疫原性肽。在一些实施方案中,接合部形成结合受试者的HLA蛋白的肽序列,个人化癌症疫苗被设计对所述HLA蛋白具有大于约50nM的IC₅₀。在其他实施方案中,接合部肽序列以大于约10nM、150nM、200nM、250nM、300nM、350nM、400nM、450nM或500nM的IC₅₀结合受试者的HLA蛋白。

[0558] 根据本文所述的技术的新表位表征系统可采用任何适合形式,因为实施方案在这个方面不受限制。可与一些实施方案关联使用的计算机系统900的一说明性实施方式显示于图5中。一个或多个计算机系统诸如计算机系统900可用于实施任何上述功能性。计算机

系统900可包括一个或多个处理器910和一个或多个计算机可读存储介质(即有形非暂时计算机可读介质),例如易失性存储器920和一个或多个非易失性存储介质930,其可由任何适合数据存储介质形成。处理器910可以任何适合方式控制向易失性存储器920和非易失性存储装置930写入数据以及从易失性存储器920和非易失性存储装置930读取数据,因为实施方案在这个方面不受限制。为执行任何本文所述的功能性,处理器910可执行一个或多个存储在一个或多个计算机可读存储介质(例如易失性存储器920和/或非易失性存储器930)中的指令,所述存储介质可充当存储用于由处理器910执行的指令的有形非暂时计算机可读介质。

[0559] 上述实施方案可以众多方式中的任一者来实施。例如,可以使用硬件、软件或其组合来实施这些实施例。当在软件中实施时,软件代码可在任何适合处理器或一批处理器上执行,无论这批处理器提供在单一计算机中还是分布在多个计算机之中。应了解执行上述功能的任何组件或一批组件都可在属类上被视为一个或多个控制以上讨论的功能的控制器。一个或多个控制器可以众多方式加以实施,诸如采用专用硬件,或采用使用微代码或软件加以编程以执行以上叙述的功能的通用硬件(例如一个或多个处理器)。

[0560] 在这个方面,应了解一个实施方式包括至少一个用计算机程序(即多个指令)编码的计算机可读存储介质(即至少一个有形非暂时计算机可读介质),诸如计算机存储器(例如硬盘驱动器、闪速存储器、处理器工作存储器等)、软盘、光盘、磁带或其他有形非暂时计算机可读介质,所述计算机程序当在一个或多个处理器上执行时会执行以上讨论的功能。计算机可读存储介质可为可移动的,以使其上存储的程序可被装载于任何计算机资源上以实施本文讨论的技术。此外,应了解对当被执行时会执行以上讨论的功能的计算机程序的提及不限于在主计算机上运行的应用程序。更确切来说,术语“计算机程序”在本文中以通用意义用于指代可用于对一个或多个处理器编程以实施以上技术的任何类型的计算机代码(例如软件或微代码)。

[0561] 富含GC的结构域

[0562] 定义

[0563] 富含GC:如本文所用,术语“富含GC”是指包含鸟嘌呤(G)和/或胞嘧啶(C)核碱基或其衍生物或类似物的多核苷酸(例如,mRNA)或其任何部分(例如,RNA元件)的核碱基组成,其中GC含量大于约50%。术语“富含GC”是指包含约50%的GC含量的多核苷酸的全部或一部分,包括但不限于基因、非编码区、5' UTR、3' UTR、开放阅读框、RNA元件、序列基序或其任何离散序列、片段或区段。在本公开的一些实施方案中,富含GC的多核苷酸或其任何部分仅由鸟嘌呤(G)和/或胞嘧啶(C)核碱基组成。

[0564] GC含量:如本文所用,术语“GC含量”是指多核苷酸(例如,mRNA)或其部分(例如,RNA元件)中的核碱基(为鸟嘌呤(G)和胞嘧啶(C)核碱基或其衍生物或类似物)的百分比(来自DNA和RNA中可能的核碱基的总数,包括腺嘌呤(A)和胸腺嘧啶(T)或尿嘧啶(U)及其衍生物或类似物)。术语“GC含量”是指多核苷酸的全部或一部分,包括但不限于基因、非编码区、5' 或3' UTR、开放阅读框、RNA元件、序列基序或其任何离散序列、片段或区段。

[0565] 起始密码子:如本文所用,术语“起始密码子(initiation codon)”与术语“起始密码子(start codon)”可互换使用,是指由核糖体翻译的开放阅读框的第一个密码子并且由连接的腺嘌呤-尿嘧啶-鸟嘌呤核碱基的三联体组成。起始密码子由腺嘌呤(A)、尿嘧啶(U)

和鸟嘌呤 (G) 的第一个字母代码描述,并且通常简称为“AUG”。尽管天然mRNA可使用除AUG以外的密码子(其在本文中称为“替代起始密码子”)作为起始密码子,但本文所述的多核苷酸的起始密码子使用AUG密码子。在翻译起始过程中,经由与核糖体结合的起始子tRNA (Met-tRNA_i^{Met}) 的反密码子的互补碱基配对识别包含起始密码子的序列。开放阅读框可含有多于一个AUG起始密码子,其在本文中称为“替代起始密码子”。

[0566] 起始密码子在翻译起始中起关键作用。起始密码子是由核糖体翻译的开放阅读框的第一个密码子。通常,起始密码子包含核苷酸三联体AUG,然而,在一些情况下,翻译起始可在由不同核苷酸组成的其他密码子处发生。真核生物中翻译的起始是多步骤生物化学过程,所述过程涉及信使RNA分子(mRNA)、40S核糖体亚基、翻译机制的其他组分(如真核起始因子;eIF)之间的大量蛋白质-蛋白质、蛋白质-RNA和RNA-RNA相互作用。mRNA翻译起始的当前模型假定起始前复合物(或者“43S起始前复合物”;缩写为“PIC”)通过以5′至3′方向扫描核苷酸直到遇到位于特定翻译促进核苷酸环境(Kozak序列)内的第一个AUG密码子来从mRNA上的募集位点(通常是5′帽)易位至起始密码子(Kozak (1989) J Cell Biol 108:229-241)。PIC的扫描在包含起始子Met-tRNA_i^{Met}转移RNA的反密码子的核苷酸与包含mRNA的起始密码子的核苷酸之间的互补碱基配对时结束。AUG密码子与Met-tRNA_i^{Met}反密码子之间的生产性碱基配对引发一系列结构和生物化学事件,所述事件最终导致大的60S核糖体亚基与PIC连接以形成能够进行翻译延伸的活性核糖体。

[0567] Kozak序列:术语“Kozak序列”(也称为“Kozak共有序列”)是指用于增强基因或开放阅读框表达的翻译起始增强子元件,并且其在真核生物中位于5′UTR中。Kozak共有序列最初被定义为序列GCCGCC,其中R=嘌呤,分析了起始密码子(AUG)周围的单一突变对前胰岛素原基因翻译的影响(Kozak (1986) Cell 44:283-292)。本文公开的多核苷酸包含Kozak共有序列,或其衍生物或修饰。(翻译增强子组合物及其使用方法的实例,参见Andrews等人的美国专利号5,807,707,其以引用的方式整体并入本文;Chernajovsky的美国专利号5,723,332,其以引用的方式整体并入本文;Wilson的美国专利号5,891,665,其以引用的方式整体并入本文。)

[0568] 遗漏扫描:可能发生称为“遗漏扫描”的现象,其中PIC绕过起始密码子而是继续向下游扫描直到识别出交替或替代起始密码子。取决于发生的频率,PIC对起始密码子的绕过可导致翻译效率的降低。此外,可发生来自此下游AUG密码子的翻译,这将导致产生不期望的异常翻译产物,其可能不能引发所需的治疗应答。在一些情况下,异常翻译产物实际上可能引起有害应答(Kracht等人,(2017) Nat Med 23(4):501-507)。

[0569] 修饰的:如本文所用,“修饰的”或“修饰”是指多核苷酸(例如mRNA)的改变的状态或组成或结构的改变。多核苷酸可以各种方式进行修饰,所述方式包括化学、结构和/或功能。例如,可通过并入一种或多种RNA元件对多核苷酸进行结构修饰,其中所述RNA元件包含提供一种或多种功能(例如,翻译调控活性)的序列和/或RNA二级结构。因此,本公开的多核苷酸可包含一种或多种修饰(例如,可包括一种或多种化学、结构或功能修饰,包括其任何组合)。

[0570] 核碱基:如本文所用,术语“核碱基”(或者“核苷酸碱基”或“含氮碱基”)是指在核酸中发现的嘌呤或嘧啶杂环化合物,包括赋予核酸或其部分或区段改善的性质(例如,结合亲和力、核酸酶抗性、化学稳定性)的天然存在的嘌呤和嘧啶的任何衍生物或类似物。腺嘌呤

呤、胞嘧啶、鸟嘌呤、胸腺嘧啶和尿嘧啶是主要存在于天然核酸中的核碱基。如本领域已知和/或本文所述的其他天然、非天然和/或合成核碱基可并入核酸中。

[0571] 核苷/核苷酸:如本文所用,术语“核苷”是指含有糖分子(例如,RNA中的核糖或DNA中的脱氧核糖)或其衍生物或类似物的化合物,所述化合物与核碱基(例如,嘌呤或嘧啶)或其衍生物或类似物(在本文中也称为“核碱基”)共价连接、但缺少核苷间连接基团(例如,磷酸根基团)。如本文所用,术语“核苷酸”是指与核苷间连接基团(例如,磷酸根基团)共价键合的核苷或其赋予核酸或其部分或区段改善的化学和/或功能特性(例如,结合亲和力、核酸酶抗性、化学稳定性)的任何衍生物、类似物或修饰。

[0572] 核酸:如本文所用,术语“核酸”以其最广泛的含义使用,并且涵盖包括核苷酸聚合物或其衍生物或类似物的任何化合物和/或物质。这些聚合物经常被称为多核苷酸。因此,如本文所用,术语“核酸”和“多核苷酸”是等效的并且可互换使用。本公开的示例性核酸或多核苷酸包括但不限于核糖核酸(RNA)、脱氧核糖核酸(DNA)、DNA-RNA杂合体、RNAi诱导剂、RNAi剂、siRNA、shRNA、mRNA、修饰的mRNA、miRNA、反义RNA、核酶、催化DNA、诱导三螺旋形成的RNA、苏糖核酸(TNA)、乙二醇核酸(GNA)、肽核酸(PNA)、锁核酸(LNA,包括具有 β -D-核糖构型的LNA)、具有 α -L-核糖构型的 α -LNA(LNA的非对映异构体)、具有2'-氨基官能化的2'-氨基-LNA以及具有2'-氨基官能化的2'-氨基- α -LNA)或其杂合体。

[0573] 核酸结构:如本文所用,术语“核酸结构”(与“多核苷酸结构”可互换使用)是指包含核酸(例如,mRNA)的原子、化学成分、元件、基序和/或连接的核苷酸或其衍生物或类似物的序列的排列或组构。所述术语还指核酸的二维或三维状态。因此,术语“RNA结构”是指包含RNA分子(例如,mRNA)的原子、化学成分、元件、基序和/或连接的核苷酸的序列或其衍生物或类似物的排列或组构或者是指RNA分子的二维和/或三维状态。核酸结构可进一步划分为四种组织类别,在本文中称为“分子结构”、“一级结构”、“二级结构”和基于组织复杂性增加的“三级结构”。

[0574] 开放阅读框:如本文所用,术语“开放阅读框”(缩写为“ORF”)是指编码多肽的mRNA分子的区段或区域。ORF包含以起始密码子开始并以终止密码子结束的一段连续的非重叠的框内密码子,并且由核糖体翻译。

[0575] 起始前复合物(PIC):如本文所用,术语“起始前复合物”(或者“43S起始前复合物”;缩写为“PIC”)是指包含40S核糖体亚基、真核起始因子(eIF1、eIF1A、eIF3、eIF5)和eIF2-GTP-Met-tRNA^{Met}三元复合物的核糖核蛋白复合物,其本质上能够附着于mRNA分子的5'帽并且在附着后能够进行5'UTR的核糖体扫描。

[0576] RNA元件:如本文所用,术语“RNA元件”是指RNA分子的提供生物学功能和/或具有生物学活性(例如,翻译调控活性)的一部分、片段或区段。通过并入一种或多种RNA元件(如本文所述的那些)修饰多核苷酸为修饰的多核苷酸提供一种或多种合乎需要的功能特性。如本文所述,RNA元件可以是天然存在的、非天然存在的、合成的、工程化的或其任何组合。例如,提供调控活性的天然存在的RNA元件包括在病毒、原核生物和真核生物(例如人)的整个转录组中发现的元件。已经显示RNA元件、特别是真核mRNA和翻译的病毒RNA参与介导细胞中的许多功能。示例性天然RNA元件包括但不限于翻译起始元件(例如,内部核糖体进入位点(IRES),参见Kieft等人,(2001)RNA 7(2):194-206)、翻译增强子元件(例如,APP mRNA翻译增强子元件,参见Rogers等人,(1999)J Biol Chem 274(10):6421-6431)、mRNA稳定性

元件(例如,富含AU的元件(ARE),参见Garneau等人,(2007) *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(2):113-126)、翻译阻遏元件(参见例如,Blumer等人,(2002) *Mech Dev* 110(1-2):97-112)、蛋白质-结合RNA元件(例如,铁响应性元件,参见Selezneva等人,(2013) *J Mol Biol* 425(18):3301-3310)、细胞质多腺苷酸化元件(Villalba等人,(2011) *Curr Opin Genet Dev* 21(4):452-457)和催化性RNA元件(例如,核酶,参见Scott等人,(2009) *Biochim Biophys Acta* 1789(9-10):634-641)。

[0577] 停留时间:如本文所用,术语“停留时间”是指沿着mRNA分子在离散位置或定位处占据起始前复合物(PIC)或核糖体的时间。

[0578] 翻译调控活性:如本文所用,术语“翻译调控活性”(与“翻译调控功能”可互换使用)是指调节(例如,调控、影响、控制、改变)翻译装置的活性(包括PIC和/或核糖体的活性)的生物学功能、机制或过程。在一些方面,所需的翻译调控活性促进和/或增强mRNA翻译的翻译保真度。在一些方面,所需的翻译调控活性减少和/或抑制遗漏扫描。

[0579] 包含编码多肽的开放阅读框的多核苷酸的翻译可通过由各种顺式作用核酸结构提供的多种机制来控制 and 调控。例如,形成发夹或其他高级(例如,假结)分子内mRNA二级结构的天然存在的顺式作用RNA元件可为多核苷酸提供翻译调控活性,其中RNA元件影响或调节多核苷酸翻译的起始,特别是当RNA元件位于靠近5'-帽结构的5'UTR中时(Pelletier和Sonenberg(1985) *Cell* 40(3):515-526;Kozak(1986) *Proc Natl Acad Sci* 83:2850-2854)。顺式作用RNA元件也可影响翻译延伸,参与许多移码事件(Namy等人,(2004) *Mol Cell* 13(2):157-168)。内部核糖体进入序列(IRES)代表另一种类型的顺式作用RNA元件,其通常位于5'UTR中,但也已报告在天然存在的mRNA的编码区内发现(Holcik等人(2000) *Trends Genet* 16(10):469-473)。在细胞mRNA中,IRES通常与5'-帽结构共存,并为mRNA提供在帽依赖性翻译受损的条件下翻译的功能能力(Gebauer等人,(2012) *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4(7):a012245)。另一种天然存在的顺式作用RNA元件包括上游开放阅读框(uORF)。天然存在的uORF在众多mRNA的5'UTR内单独或多重发生并影响下游主要ORF的翻译,通常是负面的(除了酵母中的GCN4mRNA和哺乳动物中的ATF4mRNA的值得注意的例外,其中uORF用于促进在eIF2磷酸化增加的条件下翻译下游主要ORF(Hinnebusch(2005) *Annu Rev Microbiol* 59:407-450))。由包含多核苷酸(例如mRNA)的组分、结构、元件、基序和/或特定序列提供的另外的示例性翻译调控活性包括但不限于mRNA稳定化或去稳定化(Baker和Parker(2004) *Curr Opin Cell Biol* 16(3):293-299)、翻译活化(Villalba等人,(2011) *Curr Opin Genet Dev* 21(4):452-457)和翻译阻遏(Blumer等人,(2002) *Mech Dev* 110(1-2):97-112)。研究表明,天然存在的顺式作用RNA元件在用于通过并入异源多核苷酸进行修饰时可赋予它们各自的功能(Goldberg-Cohen等人,(2002) *J Biol Chem* 277(16):13635-13640)。

[0580] 包含功能性RNA元件的修饰的多核苷酸

[0581] 本公开提供了包含修饰的合成多核苷酸(例如,RNA元件),其中所述修饰提供所需的翻译调控活性。在一些实施方案中,本公开提供了包含5'非翻译区(UTR)、起始密码子、编码多肽的完整开放阅读框、3'UTR和至少一种修饰的多核苷酸,其中所述至少一种修饰提供所需的翻译调控活性,例如,促进和/或增强mRNA翻译的翻译保真度的修饰。在一些实施方案中,所需的翻译调控活性是顺式作用调控活性。在一些实施方案中,所需的翻译调控活性

是在起始密码子处或其附近43S起始前复合物(PIC)或核糖体的停留时间的增加。在一些实施方案中,所需的翻译调控活性是在起始密码子处或从起始密码子多肽合成起始的增加。在一些实施方案中,所需的翻译调控活性是从完整开放阅读框翻译的多肽的量的增加。在一些实施方案中,所需的翻译调控活性是PIC或核糖体对起始密码子解码的保真度的增加。在一些实施方案中,所需的翻译调控活性是抑制或减少PIC或核糖体的遗漏扫描。在一些实施方案中,所需的翻译调控活性是PIC或核糖体解码起始密码子的速率的降低。在一些实施方案中,所需的翻译调控活性是在mRNA内除起始密码子以外的任何密码子处多肽合成起始的抑制或减少。在一些实施方案中,所需的翻译调控活性是抑制或减少从mRNA内除完整开放阅读框以外的任何开放阅读框翻译的多肽的量。在一些实施方案中,所需的翻译调控活性是抑制或减少异常翻译产物的产生。在一些实施方案中,所需的翻译调控活性是前述翻译调控活性中的一种或多种的组合。

[0582] 因此,本公开提供了包含RNA元件的多核苷酸(例如mRNA),所述RNA元件包含提供如本文所述的所需翻译调控活性的序列和/或RNA二级结构。在一些方面,mRNA包含RNA元件,所述RNA元件包含促进和/或增强mRNA翻译的翻译保真度的序列和/或RNA二级结构。在一些方面,mRNA包含RNA元件,所述RNA元件包含提供所需翻译调控活性(如抑制和/或减少遗漏扫描)的序列和/或RNA二级结构。在一些方面,本公开提供了包含RNA元件的mRNA,所述RNA元件包含抑制和/或减少遗漏扫描、从而促进mRNA的翻译保真度的序列和/或RNA二级结构。

[0583] 在一些实施方案中,RNA元件包含天然和/或修饰的核苷酸。在一些实施方案中,RNA元件包含连接的核苷酸的序列或其衍生物或类似物,所述序列提供如本文所述的所需翻译调控活性。在一些实施方案中,RNA元件包含连接的核苷酸的序列或其衍生物或类似物,所述序列形成或折叠成稳定的RNA二级结构,其中所述RNA二级结构提供如本文所述的所需翻译调控活性。可基于元件(例如,富含GC的元件)的一级序列、通过由元件形成的RNA二级结构(例如茎-环)、通过RNA分子(例如,位于mRNA的5'UTR内)内的元件的位置、通过元件(例如,“翻译增强子元件”)的生物学功能和/或活性以及其任何组合来鉴定和/或表征RNA元件。

[0584] 在一些方面,本公开提供了具有一种或多种结构修饰的mRNA,所述mRNA抑制遗漏扫描和/或促进mRNA翻译的翻译保真度,其中所述结构修饰中的至少一种是富含GC的RNA元件。在一些方面,本公开提供了包含至少一种修饰的修饰的mRNA,其中至少一种修饰是富含GC的RNA元件,所述富含GC的RNA元件包含在mRNA的5'UTR的Kozak共有序列之前的连接的核苷酸的序列或其衍生物或类似物。在一个实施方案中,富含GC的RNA元件位于mRNA的5'UTR中的Kozak共有序列上游的约30、约25、约20、约15、约10、约5、约4、约3、约2或约1个核苷酸处。在另一个实施方案中,富含GC的RNA元件位于Kozak共有序列上游的15-30、15-20、15-25、10-15或5-10个核苷酸处。在另一个实施方案中,富含GC的RNA元件位于紧邻mRNA的5'UTR中的Kozak共有序列处。

[0585] 在任何前述或相关方面,本公开提供富含GC的RNA元件,其包含以任何顺序连接的3-30、5-25、10-20、15-20、约20、约15、约12、约10、约7、约6或约3个核苷酸的序列、其衍生物或类似物,其中所述序列组成是70%-80%胞嘧啶、60%-70%胞嘧啶、50%-60%胞嘧啶、40%-50%胞嘧啶、30%-40%胞嘧啶碱基。在任何前述或相关方面,本公开提供富含GC的

RNA元件,其包含以任何顺序连接的3-30、5-25、10-20、15-20、约20、约15、约12、约10、约7、约6或约3个核苷酸的序列、其衍生物或类似物,其中所述序列组成是约80%胞嘧啶、约70%胞嘧啶、约60%胞嘧啶、约50%胞嘧啶、约40%胞嘧啶或约30%胞嘧啶。

[0586] 在任何前述或相关方面,本公开提供富含GC的RNA元件,其包含以任何顺序连接的20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4或3个核苷酸的序列、或其衍生物或类似物,其中所述序列组成是70%-80%胞嘧啶、60%-70%胞嘧啶、50%-60%胞嘧啶、40%-50%胞嘧啶或30%-40%胞嘧啶。在任何前述或相关方面,本公开提供富含GC的RNA元件,其包含以任何顺序连接的20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4或3个核苷酸的序列、或其衍生物或类似物,其中所述序列组成是约80%胞嘧啶、约70%胞嘧啶、约60%胞嘧啶、约50%胞嘧啶、约40%胞嘧啶或约30%胞嘧啶。

[0587] 在一些实施方案中,本公开提供包含至少一种修饰的修饰的mRNA,其中所述至少一种修饰是富含GC的RNA元件,所述富含GC的RNA元件包含在所述mRNA的5'UTR的Kozak共有序列之前的连接的核苷酸的序列或其衍生物或类似物,其中所述富含GC的RNA元件位于所述mRNA的5'UTR中的Kozak共有序列上游的约30、约25、约20、约15、约10、约5、约4、约3、约2或约1个核苷酸处,并且其中所述富含GC的RNA元件包含以任何顺序连接的3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个核苷酸、或其衍生物或类似物的序列,其中所述序列组成是>50%胞嘧啶。在一些实施方案中,所述序列组成是>55%胞嘧啶、>60%胞嘧啶、>65%胞嘧啶、>70%胞嘧啶、>75%胞嘧啶、>80%胞嘧啶、>85%胞嘧啶或>90%胞嘧啶。

[0588] 在其他方面,本公开提供包含至少一种修饰的修饰的mRNA,其中所述至少一种修饰是富含GC的RNA元件,所述富含GC的RNA元件包含在所述mRNA的5'UTR的Kozak共有序列之前的连接的核苷酸的序列或其衍生物或类似物,其中所述富含GC的RNA元件位于所述mRNA的5'UTR中的Kozak共有序列上游的约30、约25、约20、约15、约10、约5、约4、约3、约2或约1个核苷酸处,并且其中所述富含GC的RNA元件包含约3-30、5-25、10-20、15-20或约20、约15、约12、约10、约6或约3个核苷酸的序列或其衍生物或类似物,其中所述序列包含重复GC-基序,其中所述重复GC-基序是[CCG]_n,其中n=1至10、n=2至8、n=3至6或n=4至5。在一些实施方案中,所述序列包含重复GC-基序[CCG]_n,其中n=1、2、3、4或5。在一些实施方案中,所述序列包含重复GC-基序[CCG]_n,其中n=1、2或3。在一些实施方案中,所述序列包含重复GC-基序[CCG]_n,其中n=1。在一些实施方案中,所述序列包含重复GC-基序[CCG]_n,其中n=2。在一些实施方案中,所述序列包含重复GC-基序[CCG]_n,其中n=3。在一些实施方案中,所述序列包含重复GC-基序[CCG]_n,其中n=4 (SEQ ID NO:308)。在一些实施方案中,所述序列包含重复GC-基序[CCG]_n,其中n=5 (SEQ ID NO:309)。

[0589] 在另一方面,本公开提供了包含至少一种修饰的修饰的mRNA,其中至少一种修饰是富含GC的RNA元件,所述富含GC的RNA元件包含在mRNA的5'UTR的Kozak共有序列之前的连接的核苷酸的序列或其衍生物或类似物,其中所述富含GC的RNA元件包含表2中列出的序列中的任一者。在一个实施方案中,富含GC的RNA元件位于mRNA的5'UTR中的Kozak共有序列上游的约30、约25、约20、约15、约10、约5、约4、约3、约2或约1个核苷酸处。在另一个实施方案中,富含GC的RNA元件位于Kozak共有序列上游的约15-30、15-20、15-25、10-15或5-10个核苷酸处。在另一个实施方案中,富含GC的RNA元件位于紧邻mRNA的5'UTR中的Kozak共有序列

处。

[0590] 在其他方面,本公开提供了包含至少一种修饰的修饰的mRNA,其中至少一种修饰是富含GC的RNA元件,所述富含GC的RNA元件包含在mRNA的5'UTR中的Kozak共有序列之前的如表2中列出的序列V1[CCCCGGCGCC] (SEQ ID NO:310)或其衍生物或类似物。在一些实施方案中,富含GC的元件包含如表2中列出的序列V1,所述序列位于紧邻mRNA的5'UTR中的Kozak共有序列以及其上游。在一些实施方案中,富含GC的元件包含如表2中列出的序列V1,所述序列位于所述mRNA的5'UTR中的Kozak共有序列上游的1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个碱基处。在其他实施方案中,富含GC的元件包含如表2中列出的序列V1,所述序列位于所述mRNA的5'UTR中的Kozak共有序列上游的1-3、3-5、5-7、7-9、9-12或12-15个碱基处。

[0591] 在其他方面,本公开提供了包含至少一种修饰的修饰的mRNA,其中至少一种修饰是富含GC的RNA元件,所述富含GC的RNA元件包含在mRNA的5'UTR中的Kozak共有序列之前的如表2中列出的序列V2[CCCCGGC]或其衍生物或类似物。在一些实施方案中,富含GC的元件包含如表2中列出的序列V2,所述序列位于紧邻mRNA的5'UTR中的Kozak共有序列以及其上游。在一些实施方案中,富含GC的元件包含如表2中列出的序列V2,所述序列位于所述mRNA的5'UTR中的Kozak共有序列上游的1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个碱基处。在其他实施方案中,富含GC的元件包含如表2中列出的序列V2,所述序列位于所述mRNA的5'UTR中的Kozak共有序列上游的1-3、3-5、5-7、7-9、9-12或12-15个碱基处。

[0592] 在其他方面,本公开提供了包含至少一种修饰的修饰的mRNA,其中至少一种修饰是富含GC的RNA元件,所述富含GC的RNA元件包含在mRNA的5'UTR中的Kozak共有序列之前的如表2中列出的序列EK[GCCGCC]或其衍生物或类似物。在一些实施方案中,富含GC的元件包含如表2中列出的序列EK,所述序列位于紧邻mRNA的5'UTR中的Kozak共有序列以及其上游。在一些实施方案中,富含GC的元件包含如表2中列出的序列EK,所述序列位于所述mRNA的5'UTR中的Kozak共有序列上游的1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个碱基处。在其他实施方案中,富含GC的元件包含如表2中列出的序列EK,所述序列位于所述mRNA的5'UTR中的Kozak共有序列上游的1-3、3-5、5-7、7-9、9-12或12-15个碱基处。

[0593] 在其他方面,本公开提供了包含至少一种修饰的修饰的mRNA,其中至少一种修饰是富含GC的RNA元件,所述富含GC的RNA元件包含在mRNA的5'UTR中的Kozak共有序列之前的如表2中列出的序列V1[CCCCGGCGCC] (SEQ ID NO:310)或其衍生物或类似物,其中所述5'UTR包含表2中所示的以下序列:

[0594] GGGAAATAAGAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGA
(SEQ ID NO: 311)。

[0595] 在一些实施方案中,富含GC的元件包含如表2中列出的序列V1,所述序列位于紧邻表2中所示的5'UTR序列中的Kozak共有序列以及其上游。在一些实施方案中,富含GC的元件包含如表2中列出的序列V1,所述序列位于所述mRNA的5'UTR中的Kozak共有序列上游的1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个碱基处,其中所述5'UTR包含表2中所示的以下序列:

[0596] GGGAAATAAGAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATA
AGA (SEQ ID NO: 312)。

[0597] 在其他实施方案中,富含GC的元件包含如表1中列出的序列V1,所述序列位于所述

mRNA的5'UTR中的Kozak共有序列上游的1-3、3-5、5-7、7-9、9-12或12-15个碱基处,其中所述5'UTR包含表2中所示的以下序列:

[0598] GGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATA
AGA (SEQ ID NO: 312)。

[0599] 在一些实施方案中,所述5'UTR包含表2中列出的以下序列:

[0600] GGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATA
AGACCCCGGCGCCGCCACC (SEQ ID NO: 313)

[0601] 表2

[0602]

| SEQ ID NO: | 5' UTR | 5'UTR 序列 |
|------------|--------------------------------|---|
| 314 | 标准 | GGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGAGCCACC |
| 313 | V1-UTR | GGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGACCCCGGCGCCGCCACC |
| 315 | V2-UTR | GGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGACCCCGGCGCCACC |
| | 富含 GC 的 RNA 元件 | 序列 |
| | K0 (传统 Kozak 共有序列) | [GCCA/GCC] |
| | EK | [GCCGCC] |
| 310 | V1 | [CCCCGGCGCC] |
| | V2 | [CCCCGGC] |
| | (CCG) _n , 其中 n=1-10 | [CCG] _n |
| | (GCC) _n , 其中 n=1-10 | [GCC] _n |

[0603] 在另一方面,本公开提供了包含至少一种修饰的修饰的mRNA,其中至少一种修饰是富含GC的RNA元件,所述富含GC的RNA元件包含稳定的RNA二级结构,所述RNA二级结构包含形成发夹或茎环的按顺序连接的核苷酸序列或其衍生物或类似物。在一个实施方案中,稳定的RNA二级结构在Kozak共有序列的上游。在另一个实施方案中,稳定的RNA二级结构位于Kozak共有序列上游的约30、约25、约20、约15、约10或约5个核苷酸处。在另一个实施方案中,稳定的RNA二级结构位于Kozak共有序列上游的约20、约15、约10或约5个核苷酸处。在另一个实施方案中,稳定的RNA二级结构位于Kozak共有序列上游的约5、约4、约3、约2、约1个核苷酸处。在另一个实施方案中,稳定的RNA二级结构位于Kozak共有序列上游的约15-30、约15-20、约15-25、约10-15或约5-10个核苷酸处。在另一个实施方案中,稳定的RNA二级结构位于Kozak共有序列上游的12-15个核苷酸处。在另一个实施方案中,稳定的RNA二级结构具有约-30kcal/mol、约-20至-30kcal/mol、约-20kcal/mol、约-10至-20kcal/mol、约-10kcal/mol、约-5至-10kcal/mol的 ΔG 。

[0604] 在另一个实施方案中,所述修饰与编码多肽的开放阅读框可操作地连接,并且其中所述修饰和所述开放阅读框是异源的。

[0605] 在另一个实施方案中,富含GC的RNA元件的序列仅由鸟嘌呤(G)和胞嘧啶(C)核碱基组成。

[0606] 提供如本文所述的所需翻译调控活性的RNA元件可使用已知的技术如核糖体谱分析来鉴定和表征。核糖体谱分析是允许确定与mRNA结合的PIC和/或核糖体的位置的技术(参见例如Ingolia等人,(2009) *Science* 324 (5924):218-23,其以引用的方式并入本文)。所述技术是基于通过PIC和/或核糖体保护mRNA的区域或区段免于核酸酶消化。保护导致产生RNA的30-bp片段,称为‘足迹’。RNA足迹的序列和频率可通过本领域已知的方法(例如RNA测序)进行分析。所述足迹大致集中在核糖体的A位点。如果PIC或核糖体停留在沿着mRNA的特定位置或定位处,则在这些位置产生的足迹将相对常见。研究表明,在PIC和/或核糖体表现出降低的持续合成能力和较少的足迹的位置产生更多的足迹,其中PIC和/或核糖体表现出增加的持续合成能力(Gardin等人,(2014) *eLife* 3:e03735)。在一些实施方案中,通过核糖体谱分析确定沿着包含本文所述的任何一种或多种RNA元件的多核苷酸的离散位置或定位处的PIC或核糖体的停留时间或占据时间。

[0607] 治疗方法

[0608] 本文提供用于预防和/或治疗人和其他哺乳动物的癌症的组合物(例如药物组合物)、方法、试剂盒和试剂。癌症RNA疫苗可用作治疗剂或防治剂。它们可在医学中用于预防和/或治疗癌症。在示例性方面,本公开的癌症RNA疫苗用于提供免遭癌症的防治性保护作用。免遭癌症的防治性保护作用可在施用本公开的癌症RNA疫苗之后实现。疫苗可施用一次、两次、三次、四次或更多次,但施用疫苗一次(任选继之以单次加强)可能就足够。更加合乎需要的是向患有癌症的个体施用疫苗以实现治疗响应。可能需要相应调整给药。

[0609] 一旦合成mRNA疫苗,就将它向患者施用。在一些实施方案中,根据时程施用疫苗多达两个月,多达三个月,多达四个月,多达五个月,多达六个月,多达七个月,多达八个月,多达九个月,多达十个月,多达十一个月,多达1年,多达1年半,多达两年,多达三年,或多达四年。时程可相同或变化。在一些实施方案中,时程是每周一次,持续前3周,接着此后是每月一次。

[0610] 疫苗可通过任何途径来施用。在一些实施方案中,疫苗通过肌肉内(IM)或静脉内(IV)途径来施用。

[0611] 在治疗中的任何时点,都可检查患者以确定疫苗中的突变是否仍然适当。基于那个分析,可调整或重新配置疫苗以包括一种或多种不同突变或移除一种或多种突变。

[0612] 治疗性和防治性组合物

[0613] 本文提供用于预防、治疗或诊断人和其他哺乳动物的癌症的组合物(例如药物组合物)、方法、试剂盒和试剂,例如癌症RNA疫苗可用作治疗剂或防治剂。它们可在医学中用于预防和/或治疗癌症。在一些实施方案中,本发明的癌症疫苗可被设想用于对免疫效应细胞进行致敏,例如以离体使外周血液单核细胞(PBMC)活化,接着将其输注(再输注)至受试者中。

[0614] 在示例性实施方案中,可向受试者(例如哺乳动物受试者诸如人受试者)施用如本文所述的含有RNA多核苷酸的癌症疫苗,并且所述RNA多核苷酸在体内被翻译以产生抗原性多肽。

[0615] 可诱导癌症RNA疫苗以达成在细胞、组织或生物体中翻译多肽(例如抗原或免疫

原)。在示例性实施方案中,所述翻译在体内发生,但可存在设想的实施方案,其中所述翻译离体、在培养中或在体外发生。在示例性实施方案中,使细胞、组织或生物体与有效量的含有癌症RNA疫苗的组合物接触,所述疫苗含有具有至少一个编码抗原性多肽的可翻译区域的多核苷酸。

[0616] 癌症RNA疫苗的“有效量”至少部分地基于靶标组织、靶标细胞类型、施用手段、多核苷酸的物理特征(例如大小和经修饰核苷的程度)和癌症RNA疫苗的其他组分以及其他决定因素而提供。一般来说,癌症RNA疫苗组合物的有效量提供随细胞中的抗原产生而变化的诱导或加强免疫应答,优选比含有编码相同抗原或肽抗原的相应未修饰多核苷酸的组合物更高效。抗原产生增加可通过以下来证明:细胞转染增加(用RNA疫苗转染的细胞的百分比)、从多核苷酸进行的蛋白质翻译增加、核酸降解降低(如例如由从经修饰多核苷酸进行的蛋白质翻译的持续时间增加所证明)或宿主细胞的抗原特异性免疫应答改变。

[0617] 在一些实施方案中,本公开的RNA疫苗(包括多核苷酸它们的编码多肽)可用于治疗癌症。

[0618] 癌症RNA疫苗可作为主动免疫流程的一部分向健康个体或在癌症早期或在症状发作为之后的活动性癌症期间防治性或治疗性施用。在一些实施方案中,对细胞、组织或受试者提供的本公开的RNA疫苗的量可为有效用于免疫防治的量。

[0619] 癌症RNA疫苗可与其他防治性或治疗性化合物一起施用。作为非限制性实例,防治性或治疗性化合物可以是免疫增效剂、佐剂或加强剂。如本文所用,当涉及组合物诸如疫苗时,术语“加强”是指额外施用防治性(疫苗)组合物。可在早期施用预防性组合物后给予加强剂(或加强疫苗)。在初始施用防治性组合物与加强剂之间的施用时间可为但不限于1分钟、2分钟、3分钟、4分钟、5分钟、6分钟、7分钟、8分钟、9分钟、10分钟、15分钟、20分钟、35分钟、40分钟、45分钟、50分钟、55分钟、1小时、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7小时、8小时、9小时、10小时、11小时、12小时、13小时、14小时、15小时、16小时、17小时、18小时、19小时、20小时、21小时、22小时、23小时、1天、36小时、2天、3天、4天、5天、6天、1周、10天、2周、3周、1个月、2个月、3个月、4个月、5个月、6个月、7个月、8个月、9个月、10个月、11个月、1年、18个月、2年、3年、4年、5年、6年、7年、8年、9年、10年、11年、12年、13年、14年、15年、16年、17年、18年、19年、20年、25年、30年、35年、40年、45年、50年、55年、60年、65年、70年、75年、80年、85年、90年、95年或超过99年。在示例性实施方案中,在初始施用防治性组合物与加强剂之间的施用时间可为但不限于1周、2周、3周、1个月、2个月、3个月、6个月或1年。

[0620] 在一个实施方案中,类似于本领域中已知的疫苗的施用,可肌肉内或真皮内施用多核苷酸。

[0621] 视癌症的严重性或未满足医学需求的程度或水平而定,mRNA癌症疫苗可用于各种环境中。作为一非限制性实例,mRNA癌症疫苗可用于治疗任何阶段的癌症。mRNA癌症疫苗具有优越性质,因为它们产生大得多的抗体效价、T细胞应答,并且相比于可商购获得的抗癌疫苗,更早产生应答。在不希望受理论束缚下,本发明者假设呈mRNA形式的mRNA癌症疫苗被更好设计以在翻译时产生适当蛋白质构象,因为mRNA癌症疫苗征用天然细胞机构。不同于离体制造并且可触发非所要细胞应答的传统疫苗,mRNA癌症疫苗以更天然方式向细胞系统呈递。

[0622] 以下呈现mRNA癌症疫苗可治疗的癌症的非限制性清单。肽表位或抗原可源于这些

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

[0623] 在一些实施方案中,肿瘤抗原是以下抗原中的一者:CD2、CD19、CD20、CD22、CD27、CD33、CD37、CD38、CD40、CD44、CD47、CD52、CD56、CD70、CD79、CD137、4-1BB、5T4、AGS-5、AGS-16、促血管生成素2 (Angiopoietin 2)、B7.1、B7.2、B7DC、B7H1、B7H2、B7H3、BT-062、BTLA、CAIX、癌胚抗原、CTLA4、Cripto、ED-B、ErbB1、ErbB2、ErbB3、ErbB4、EGFL7、EpCAM、EphA2、EphA3、EphB2、FAP、纤维连接蛋白 (Fibronectin)、叶酸受体、神经节苷脂GM3 (Ganglioside GM3)、GD2、糖皮质激素诱导的肿瘤坏死因子受体 (GITR)、gp100、gpA33、GPNMB、ICOS、IGF1R、整合素 α v (Integrin α v)、整合素 α v β 、LAG-3、Lewis Y、间皮素 (Mesothelin)、c-MET、MN碳酸酐酶IX、MUC1、MUC16、连接素-4 (Nectin-4)、NKGD2、NOTCH、OX40、OX40L、PD-1、PDL1、PSCA、PSMA、RANKL、ROR1、ROR2、SLC44A4、粘结蛋白聚糖-1 (Syndecan-1)、TACI、TAG-72、腱生蛋白 (Tenascin)、TIM3、TRAILR1、TRAILR2、VEGFR-1、VEGFR-2、VEGFR-3及其变体。

[0624] 癌症或肿瘤包括但不限于赘瘤、恶性肿瘤、转移癌或特征在于细胞生长不受控制以致它将被视为具有癌性的任何疾病或病症。癌症可为原发性或转移性癌症。可根据本发明治疗的特定癌症包括但不限于下列出的那些(对于所述病症的综述,参见Fishman等人,1985,Medicine,第2版,J.B.Lippincott Co.,Philadelphia)。癌症包括但不限于胆道癌;膀胱癌;脑癌,包括胶质母细胞瘤和神经管母细胞瘤;乳腺癌;子宫颈癌;绒毛膜癌;结肠癌;子宫内膜癌;食道癌;胃癌;血液学赘瘤,包括急性淋巴细胞性和骨髓源性白血病;多发性骨髓瘤;AIDS相关的白血病和成人T细胞白血病淋巴瘤;上皮内赘瘤,包括鲍恩氏病 (Bowen's disease) 和佩吉特氏病 (Paget's disease);肝癌;肺癌;淋巴瘤,包括霍奇金氏病 (Hodgkin's disease) 和淋巴细胞性淋巴瘤;神经母细胞瘤;口腔癌,包括鳞状细胞癌;卵巢癌,包括由上皮细胞、基质细胞、生殖细胞和间质细胞引起的那些;胰腺癌;前列腺癌;直肠癌;肉瘤,包括平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、脂肉瘤、纤维肉瘤和骨肉瘤;皮肤癌,包括黑素瘤、卡波西氏肉瘤 (Kaposi's sarcoma)、基底细胞癌和鳞状细胞癌;睾丸癌,包括生发肿瘤,诸如精原细胞瘤、非精原细胞瘤、畸胎瘤、绒毛膜癌;基质肿瘤和生殖细胞肿瘤;甲状腺癌,包括甲状腺腺癌和髓癌;以及肾癌,包括腺癌和威尔姆斯肿瘤 (Wilms' tumor)。通常遭遇的癌症包括乳腺癌、前列腺癌、肺癌、卵巢癌、结肠直肠癌和脑癌。

[0625] 在一些实施方案中,所述癌症是选自由以下组成的组:非小细胞肺癌 (NSCLC)、小细胞肺癌、黑素瘤、膀胱尿路上皮癌、HPV阴性头颈鳞状细胞癌 (HNSCC) 以及为微卫星高 (MSI H)/错配修复 (MMR) 缺陷型的实体恶性肿瘤。在一些实施方案中,所述NSCLC缺乏EGFR敏化突变和/或ALK易位。在一些实施方案中,为微卫星高 (MSI H)/错配修复 (MMR) 缺陷型的实体恶性肿瘤是选自由以下组成的组:结肠直肠癌、胃腺癌、食道腺癌和子宫内膜癌。在一些实施方案中,癌症是选自胰腺癌、腹膜癌、大肠癌、小肠癌、胆道癌、肺癌、子宫内膜癌、卵巢癌、生殖道癌、胃肠道癌、子宫颈癌、胃癌、泌尿道癌、结肠癌、直肠癌以及造血和淋巴组织癌症。在一些实施方案中,癌症是结肠直肠癌。

[0626] 本文提供药物组合物,其包括癌症RNA疫苗和RNA疫苗组合物和/或复合物,任选与一种或多种药学上可接受的赋形剂组合。

[0627] 癌症RNA疫苗可单独或与一种或多种其他组分联合配制或施用。举例来说,癌症RNA疫苗(疫苗组合物)可包含包括但不限于免疫增效剂(例如,佐剂)的其他组分。在一些实施方案中,癌症RNA疫苗不包含免疫增效剂或佐剂(即,它们不含免疫增效剂或佐剂)。

[0628] 在其他实施方案中,可使本文所述的mRNA癌症疫苗与适用于治疗患者的任何其他疗法组合。举例来说,患者可用mRNA癌症疫苗和抗癌剂治疗。因此,在一个实施方案中,本发明方法可与一种或多种癌症治疗联合使用,例如与抗癌剂、传统癌症疫苗、化学疗法、放射疗法等联合使用(例如同时,或作为总体治疗程序的一部分)。可变化的癌症治疗参数包括但不限于剂量、施用时机或持续时间或疗法;并且癌症治疗可在剂量、时机或持续时间方面变化。另一癌症治疗是手术,其可单独或与任何先前治疗方法组合加以利用。已知适用于或已用于或当前正用于预防或治疗癌症的任何药剂或疗法(例如传统癌症疫苗、化学疗法、放射疗法、手术、激素疗法和/或生物疗法/免疫疗法)者可与本文所述的根据本发明的本发明组合物组合使用。医学领域中的普通技术人员可确定适用于受试者的治疗。

[0629] 所述药剂(即抗癌剂)的实例包括但不限于DNA相互作用剂,包括但不限于烷基化剂(例如氮芥(nitrogen mustard),例如苯丁酸氮芥(Chlorambucil)、环磷酰胺(Cyclophosphamide)、异环磷酰胺(Isofamide)、二氯甲基二乙胺(Mechlorethamine)、美法仑(Melphalan)、尿嘧啶氮芥(Uracil mustard);氮丙啶(Aziridine),诸如噻替派(Thiotepa);甲烷磺酸酯,诸如白消安(Busulfan);亚硝基脲,诸如卡莫司汀(Carmustine)、洛莫司汀(Lomustine)、链脲霉素(Streptozocin);铂络合物,诸如顺铂(Cisplatin)、卡铂(Carboplatin);生物还原性烷基化剂,诸如丝裂霉素(Mitomycin)以及丙卡巴肼(Procarbazine)、达卡巴嗪(Dacarbazine)和六甲蜜胺(Altretamine));DNA链断裂剂,例如博莱霉素(Bleomycin);嵌入性拓扑异构酶II抑制剂,例如嵌入剂,诸如安吖啶(Amsacrine)、更生霉素(Dactinomycin)、柔红霉素(Daunorubicin)、多柔比星(Doxorubicin)、伊达比星(Idarubicin)、米托蒽醌(Mitoxantrone),以及非嵌入剂,诸如依托泊苷(Etoposide)和替尼泊苷(Teniposide);非嵌入性拓扑异构酶II抑制剂,例如依托泊苷和替尼泊苷;以及DNA小沟结合剂,例如普卡霉素(Plicamycin);抗代谢剂,包括但不限于叶酸拮抗剂,诸如甲氨蝶呤(Methotrexate)和三甲曲沙(trimetrexate);嘧啶拮抗剂,诸如氟尿嘧啶(Fluorouracil)、氟脱氧尿苷(Fluorodeoxyuridine)、CB3717、阿扎胞苷(Azacitidine)和氟尿苷(Flouxuridine);嘌呤拮抗剂,诸如巯基嘌呤(Mercaptopurine)、6-硫鸟嘌呤(6-Thioguanine)、喷司他汀(Pentostatin);糖修饰的类似物,诸如阿糖胞苷(Cytarabine)和氟达拉滨(Fludarabine);以及核糖核苷酸还原酶抑制剂,诸如羟基脲(hydroxyurea);微管蛋白(tubulin)相互作用剂,包括但不限于秋水仙素(colchicine)、长春新碱(Vincristine)和长春花碱(Vinblastine)(两者均是生物碱)、以及太平洋紫杉醇(Paclitaxel)和癌得星(cytosan);激素剂,包括但不限于雌激素(estrogen)、缀合雌激素以及乙炔雌二醇(Ethinyl Estradiol)和己烯雌酚(Diethyl stilbesterol)、氯烯雌醚(Chlortrianisene)和双烯雌酚(Idenestrol);孕激素(progestin),诸如己酸羟孕酮(Hydroxyprogesterone caproate)、甲孕酮(Medroxyprogesterone)和甲地孕酮(Megestrol);以及雄激素(androgen),诸如睾酮(testosterone)、丙酸睾酮(testosterone

propionate); 氟羟甲睾酮(flouxymesterone)、甲基睾酮(methyltestosterone); 肾上腺皮质类固醇, 例如泼尼松(Prednisone)、地塞米松(Dexamethasone)、甲基泼尼松龙(Methylprednisolone)和泼尼松龙(Prednisolone); 促黄体生成激素释放激素剂或促性腺激素释放激素拮抗剂, 例如乙酸亮丙瑞林(leuprolide acetate)和乙酸戈舍瑞林(goserelin acetate); 抗激素抗原, 包括但不限于抗雌激素剂诸如他莫昔芬(Tamoxifen)、抗雄激素剂诸如氟他胺(Flutamide); 以及抗肾上腺剂, 诸如米托坦(Mitotane)和胺鲁米特(Aminoglutethimide); 细胞因子, 包括但不限于IL-1 α 、IL-1 β 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-18、TGF- β 、GM-CSF、M-CSF、G-CSF、TNF- α 、TNF- β 、LAF、TCGF、BCGF、TRF、BAF、BDG、MP、LIF、OSM、TMF、PDGF、IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ 和子宫球蛋白(Uteroglobulin) (美国专利号5,696,092); 抗血管生成剂, 包括但不限于抑制VEGF的药剂(例如其他中和抗体)、可溶性受体构建体、酪氨酸激酶抑制剂、反义策略、针对VEGF或VEGF受体的RNA适体和核酶、免疫毒素和共凝集配体、肿瘤疫苗和抗体。

[0630] 可根据本发明的方法使用的抗癌剂的特定实例包括但不限于: 阿西维辛(acivicin); 阿柔比星(aclarubicin); 盐酸阿考达唑(acodazole hydrochloride); 阿克罗宁(acronine); 阿多来新(adozelesin); 阿地白介素(aldesleukin); 六甲蜜胺(altretamine); 安波霉素(ambomycin); 乙酸阿美蒽醌(ametantrene acetate); 胺鲁米特(aminoglutethimide); 安吡啶(amsacrine); 阿那曲唑(anastrozole); 安曲霉素(anthracycline); 天冬酰胺酶(asparaginase); 曲林菌素(asperlin); 阿扎胞苷(azacitidine); 阿替派(azetepa); 阿佐霉素(azotomycin); 巴马司他(batimastat); 苯佐替派(benzodepa); 比卡鲁胺(bicalutamide); 盐酸比生群(bisantrene hydrochloride); 二甲磺酸双奈法德(bisnafide dimesylate); 比折来新(bizelesin); 硫酸博来霉素(bleomycin sulfate); 布喹那钠(brequinar sodium); 溴匹立明(bropiridine); 白消安(busulfan); 放线菌素C(cactinomycin); 二甲睾酮(calusterone); 卡醋胺(caracemide); 卡贝替姆(carbetimer); 卡铂(carboplatin); 卡莫司汀(carmustine); 盐酸卡柔比星(carubicin hydrochloride); 卡折来新(carzelesin); 西地芬戈(cedefingol); 苯丁酸氮芥(chlorambucil); 西罗霉素(cirolemycin); 顺铂(cisplatin); 克拉屈滨(cladribine); 甲磺酸克立那托(crisnatol mesylate); 环磷酰胺(cyclophosphamide); 阿糖胞苷(cytarabine); 达卡巴嗪(dacarbazine); 更生霉素(dactinomycin); 盐酸柔红霉素(daunorubicin hydrochloride); 地西他滨(decitabine); 右奥马铂(dexormaplatin); 地扎胍宁(dezaguanine); 甲磺酸地扎胍宁(dezaguanine mesylate); 地吡酮(diaziquone); 多西他赛(docetaxel); 多柔比星(doxorubicin); 盐酸多柔比星(doxorubicin hydrochloride); 屈洛昔芬(droloxifene); 柠檬酸屈洛昔芬(droloxifene citrate); 丙酸屈他雄酮(dromostanolone propionate); 达佐霉素(duazomycin); 依达曲沙(edatrexate); 盐酸依氟鸟氨酸(eflomithine hydrochloride); 依沙芦星(elsamitrucin); 恩洛铂(enloplatin); 恩普氨酯(enpromate); 依匹哌啶(epipropidine); 盐酸表柔比星(epirubicin hydrochloride); 厄布洛唑(erbulozole); 盐酸依索比星(esorubicin hydrochloride); 雌氮芥(estramustine); 雌氮芥磷酸钠(estramustine phosphate sodium); 依他硝唑(etanidazole); 依托泊苷(etoposide); 磷酸依托泊苷(etoposide phosphate); 氯苯乙嘧啶(etoprine); 盐酸法萘唑(fadrozole

hydrochloride);法扎拉滨(fazarabine);芬维A胺(fenretinide);氟尿苷(floxuridine);磷酸氟达拉滨(fludarabine phosphate);氟尿嘧啶(flourouracil);氟西他滨(flurocitabine);磷喹酮(fosquidone);福司曲星钠(fostriecin sodium);吉西他滨(gemcitabine);盐酸吉西他滨(gemcitabine hydrochloride);羟基脲(hydroxyurea);盐酸伊达比星(idarubicin hydrochloride);异环磷酰胺(ifosfamide);依莫佛新(ilmofosine);白介素II(包括重组白介素II或rIL2)、干扰素 α -2a(interferon alpha-2a);干扰素 α -2b;干扰素 α -n1;干扰素 α -n3;干扰素 β -I a;干扰素 γ -I b;异丙铂(iproplatin);盐酸伊立替康(irinotecan hydrochloride);乙酸兰瑞肽(lanreotide acetate);来曲唑(letrozole);乙酸亮丙瑞林(leuprolide acetate);盐酸利阿唑(liarozole hydrochloride);洛美曲索钠(lometrexol sodium);洛莫司汀(lomustine);盐酸洛索蒽醌(losoxantrone hydrochloride);马丙考(masoprocol);美登素(maytansine);盐酸二氯甲基二乙胺(mechlorethamine hydrochloride);乙酸甲地孕酮(megestrol acetate);乙酸美仑孕酮(melengestrol acetate);美法仑(melphalan);美诺立尔(menogaril);巯基嘌呤(mercaptopurine);甲氨蝶呤(methotrexate);甲氨蝶呤钠(methotrexate sodium);氯苯氨啉(metoprime);美乌替派(meturedopa);米丁度胺(mitindomide);米托克星(mitocarcin);丝裂红素(mitocromin);丝裂吉霉素(mitogillin);丝裂马菌素(mitomalcin);丝裂霉素(mitomycin);米托司培(mitosper);米托坦(mitotane);盐酸米托蒽醌(mitoxantrone hydrochloride);霉酚酸(mycophenolic acid);诺考达唑(nocodazole);诺加霉素(nogalamycin);奥马铂(ormaplatin);亚磺酰吡啶(oxisuran);太平洋紫杉醇(paclitaxel);培加帕酶(pegaspargase);佩里霉素(peliomycin);戊氮芥(pentamustine);硫酸培洛霉素(peplomycin sulfate);培磷酰胺(perfosfamide);哌泊溴烷(pipobroman);保释芬(piposulfan);盐酸吡罗蒽醌(piroxantrone hydrochloride);光神霉素(plicamycin);普洛美坦(plomestane);卟吩姆钠(porfimer sodium);波福霉素(porfiromycin);松龙苯芥(prednimustine);盐酸丙卡巴肼(procarbazine hydrochloride);嘌呤霉素(puromycin);盐酸嘌呤霉素(puromycin hydrochloride);吡唑呋喃菌素(pyrazofurin);利波腺苷(riboprime);洛太米特(rogletimide);沙芬戈(safingol);盐酸沙芬戈(safingol hydrochloride);司莫司汀(semustine);辛曲秦(simtrazene);磷乙酰天冬氨酸钠(sparfosate sodium);稀疏霉素(sparsomycin);盐酸螺旋锗(spirogermanium hydrochloride);螺莫司汀(spiromustine);螺铂(spiroplatin);链黑菌素(streptonigrin);链脲霉素(streptozocin);磺氯苯脲(sulofenur);他利霉素(talisomycin);替可加兰钠(tecogalan sodium);替加氟(tegafur);盐酸替洛蒽醌(teloxantrone hydrochloride);替莫泊芬(temoporfin);替尼泊苷(teniposide);替罗昔隆(teroxirone);睾内酯(testolactone);硫咪嘌呤(thiamiprime);硫鸟嘌呤(thioguanine);噻替派(thiotepa);噻唑呋林(tiazofurin);替拉扎明(tirapazamine);柠檬酸托瑞米芬(toremifene citrate);乙酸曲托龙(trestolone acetate);磷酸曲西立滨(triciribine phosphate);三甲曲沙(trimetrexate);葡萄糖醛酸三甲曲沙(trimetrexate glucuronate);曲普瑞林(triptorelin);盐酸妥布氯唑(tubulozole hydrochloride);尿嘧啶氮芥(uracil mustard);乌瑞替派(uredopa);伐普肽(vapreotide);维替泊芬(verteporfin);硫酸长春

花碱(vinblastine sulfate);硫酸长春新碱(vincristine sulfate);长春地辛(vindesine);硫酸长春地辛(vindesine sulfate);硫酸长春匹定(vinepidine sulfate);硫酸长春甘酯(vinglycinate sulfate);硫酸长春罗辛(vinleurosine sulfate);酒石酸长春瑞滨(vinorelbine tartrate);硫酸长春罗定(vinrosidine sulfate);硫酸长春利定(vinzolidine sulfate);伏氯唑(vorozole);折尼铂(zeniplatin);净司他汀(zinostatin);以及盐酸佐柔比星(zorubicin hydrochloride)。

[0631] 其他抗癌药物包括但不限于:20-表-1,25二羟基维生素D₃;5-乙炔基尿嘧啶;血管生成抑制剂;抗背侧化形态发生蛋白-1;ara-CDP-DL-PTBA;BCR/ABL拮抗剂;CaRest M3;CARN 700;酪蛋白激酶抑制剂(ICOS);克霉唑(clotrimazole);碰撞霉素A(collismycin A);碰撞霉素B;考布他汀A4(combretastatin A4);甘蓝海绵素816(crambescidin 816);念珠藻素8(cryptophycin 8);库瑞辛A(curacin A);脱氢膜海鞘素B(dehydrodidemnin B);膜海鞘素B(didemnin B);二氢-5-氮杂胞苷(dihydro-5-azacytidine);二氢紫杉醇(dihydrotaxol)、倍癌霉素SA(duocarmycin SA);卡哈拉肽F(kahalalide F);三乙酸片螺素-N(lamellarin-N triacetate);亮脯利特(leuprolide)+雌激素(estrogen)+孕酮(progesterone);利索纳得7(lissoclinamide 7);单磷酸基脂质A+分枝杆菌细胞壁sk;N-乙酰基地那林(N-acetyldinaline);N-取代的苯甲酰胺;06-苯甲基鸟嘌呤;普拉色汀A(placetin A);普拉色汀B;铂络合物;铂化合物;铂-三胺络合物;依替膦酸铼Re 186(rhenium Re 186 etidronate);RII维甲酰胺(RII retinamide);鲁比津酮B 1(rubiginone B 1);SarCNU;肌肉叶绿醇A(sarcophytol A);沙莫司亭(sargramostim);衰老源性抑制剂1;斯卡霉素D(spicamycin D);他莫司汀(tallimustine);5-氟尿嘧啶;血小板生成素(thrombopoietin);胸腺曲南(thymotrinan);甲状腺刺激激素;瓦立奥林B(variolin B);沙利度胺(thalidomide);维拉雷琐(velaresol);藜芦明(veramine);瓦尔丁(verdins);维替泊芬(verteporfin);长春瑞滨(vinorelbine);威科萨汀(vinxaltine);维塔辛(vitaxin);扎诺特隆(zanoterone);折尼铂(zeniplatin);以及亚苾维C(zilasorb)。

[0632] 本发明也涵盖与包括使用x射线、γ射线和其他放射源来破坏癌细胞的放射疗法组合施用包含mRNA癌症疫苗的组合物。在优选实施方案中,放射治疗以外部射束放射或远距疗法形式施用,其中放射从远距离源头加以引导。在其他优选实施方案中,放射治疗以内部疗法或近距疗法形式施用,其中将放射源接近于癌细胞或肿瘤团块来放置在身体内部。

[0633] 在特定实施方案中,视癌症类型而定来选择适当抗癌方案。举例来说,可与防治或治疗有效量的一种或多种适用于卵巢癌治疗的其他药剂组合向患有卵巢癌的患者施用防治或治疗有效量的包含mRNA癌症疫苗的组合物,所述药剂包括但不限于腹膜内放射疗法诸如P32疗法、总体腹部和骨盆放射疗法、顺铂、太平洋紫杉醇(紫杉醇)或多西他赛(泰索帝(Taxotere))和顺铂或卡铂的组合、环磷酰胺和顺铂的组合、环磷酰胺和卡铂的组合、5-FU和甲酰四氢叶酸(leucovorin)的组合、依托泊苷、脂质体多柔比星、吉西他滨或拓扑替康(topotecan)。癌症疗法和它们的剂量、施用途径和推荐用法在本领域中是已知的,并且已描述于诸如Physician's Desk Reference(第56版,2002)的文献中。

[0634] 在本发明的一些优选实施方案中,将mRNA癌症疫苗与诸如是免疫检查点调节剂的T细胞活化剂一起施用。免疫检查点调节剂包括刺激性检查点分子与抑制性检查点分子两

者,即抗CTLA4抗体和抗PD1抗体。

[0635] 刺激性检查点抑制剂通过促进检查点过程来起作用。若干刺激性检查点分子是肿瘤坏死因子(TNF)受体超家族的成员-CD27、CD40、OX40、GITR和CD137,而其他属于B7-CD28超家族-CD28和ICOS。OX40(CD134)涉及于效应T细胞和记忆T细胞的扩增中。已显示抗OX40单克隆抗体有效治疗晚期癌症。MEDI0562是一种人源化OX40激动剂。糖皮质激素诱导的TNFR家族相关基因GITR涉及于T细胞扩增中。已显示针对GITR的若干抗体促进抗肿瘤应答。诱导性T细胞共刺激物ICOS在T细胞效应物功能方面是重要的。CD27支持原初T细胞的抗原特异性扩增,并且涉及于T细胞和B细胞记忆的产生中。若干激动性抗CD27抗体处于开发中。CD122是白介素-2受体 β 亚单位。NKTR-214是CD122偏倚的免疫刺激性细胞因子。

[0636] 抑制性检查点分子包括但不限于PD-1、TIM-3、VISTA、A2AR、B7-H3、B7-H4、BTLA、CTLA-4、IDO、KIR和LAG3。CTLA-4、PD-1和它的配体是遍及T细胞功能和其他细胞功能的所有阶段起重要作用的共同信号传导分子的CD28-B7家族的成员。细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4CTLA-4(CD152)涉及于控制T细胞增殖中。

[0637] PD-1受体在活化的T细胞(和B细胞)的表面上表达,并且在正常情况下结合它的在诸如树突细胞或巨噬细胞的抗原呈递细胞的表面上表达的配体(PD-L1和PD-L2)。这个相互作用将信号传送至T细胞中,并且抑制T细胞。癌细胞通过驱动在它们的表面上高水平表达PD-L1来利用这个系统。这使它们获得对PD-1路径的控制,并且切断可进入肿瘤微环境中的表达PD-1的T细胞,由此抑制抗癌免疫应答。派姆单抗(Pembrolizumab)(先前是MK-3475和兰罗利珠单抗(lambrolizumab),商品名称是齐求达(Keytruda))是一种用于癌症免疫疗法中的人抗体。它靶向PD-1受体。

[0638] 吡啶胺2,3-双加氧酶IDO是一种色氨酸分解代谢酶,其抑制T细胞和NK细胞,产生并活化Treg和骨髓源性抑制细胞,并且促进肿瘤血管生成。T细胞免疫球蛋白结构域和粘蛋白(Mucin)结构域3TIM-3通过在与它的配体半乳糖凝集素-9(galectin-9)相互作用后触发细胞死亡来充当Th1/Tc1功能的负性调控剂。VISTA是T细胞活化的V结构域Ig抑制剂。

[0639] 检查点抑制剂是诸如单克隆抗体、人源化抗体、完全人抗体、融合蛋白或其组合或小分子的分子。举例来说,检查点抑制剂抑制可为CTLA-4、PDL1、PDL2、PD1、B7-H3、B7-H4、BTLA、HVEM、TIM3、GAL9、LAG3、VISTA、KIR、2B4、CD160、CGEN-15049、CHK 1、CHK2、A2aR、B-7家族配体或其组合的检查点蛋白。检查点蛋白的配体包括但不限于CTLA-4、PDL1、PDL2、PD1、B7-H3、B7-H4、BTLA、HVEM、TIM3、GAL9、LAG3、VISTA、KIR、2B4、CD160、CGEN-15049、CHK 1、CHK2、A2aR和B-7家族配体。在一些实施方案中,抗PD-1抗体是BMS-936558(纳武单抗)。在其他实施方案中,抗CTLA-4抗体是易普利单抗(商品名称是叶沃(Yervoy),先前称为MDX-010和MDX-101)。

[0640] 在一些优选实施方案中,包括检查点调节剂的癌症治疗剂以编码癌症治疗剂例如PD1抗体、细胞因子、趋化因子或刺激性受体/配体(例如OX40)的mRNA形式递送。

[0641] 在一些实施方案中,癌症治疗剂是靶向疗法。靶向疗法可为BRAF抑制剂诸如威罗菲尼(vemurafenib)(PLX4032)或达拉菲尼(dabrafenib)。BRAF抑制剂可为PLX 4032、PLX 4720、PLX 4734、GDC-0879、PLX 4032、PLX-4720、PLX 4734和甲苯磺酸索拉非尼(Sorafenib Tosylate)。BRAF是产生称为B-Raf的蛋白质的人基因,也被称为原致癌基因B-Raf和v-Raf鼠肉瘤病毒致癌基因同源物B1。B-Raf蛋白涉及于在细胞内部传送信号中,所述信号涉及于

指导细胞生长。BRAF抑制剂威罗菲尼由FDA核准用于治疗晚期黑素瘤。

[0642] 在其他实施方案中，T细胞治疗剂是OX40L。OX40是肿瘤坏死因子/神经生长因子受体 (TNFR/NGFR) 家族的成员。OX40可在T细胞活化以及对正常和恶性淋巴细胞的分化、增殖或凋亡的调控方面起作用。

[0643] 在一方面，本发明的方法还包括向所述受试者施用PD-1拮抗剂。在一些方面，所述PD-1拮抗剂是特异性地结合至PD-1的抗体或其抗原结合部分。在特定方面，所述PD-1拮抗剂是单克隆抗体。在一些方面，所述PD-1拮抗剂是选自由以下组成的组：纳武单抗、派姆单抗、匹地利珠单抗以及其任何组合。

[0644] 在另一方面，本发明的方法还包括向所述受试者施用PDL-1拮抗剂。在一些方面，所述PD-L1拮抗剂是特异性地结合至PD-L1的抗体或其抗原结合部分。在特定方面，所述PD-L1拮抗剂是单克隆抗体。在一些方面，所述PD-L1拮抗剂是选自由以下组成的组：德瓦鲁单抗、阿维鲁单抗、MEDI473、BMS-936559、阿特殊单抗以及其任何组合。

[0645] 在另一方面，本发明的方法还包括向所述受试者施用CTLA-4拮抗剂。在一些方面，所述CTLA-4拮抗剂是特异性地结合至CTLA-4的抗体或其抗原结合部分。在特定方面，所述CTLA-4拮抗剂是单克隆抗体。在一些方面，所述CTLA-4拮抗剂是选自由以下组成的组：伊匹单抗、曲美木单抗以及其任何组合。

[0646] 本发明的某些实施方案提供了治疗有需要的受试者的癌症的方法，所述方法包括向所述受试者施用多核苷酸（特别是编码KRAS疫苗肽的mRNA）与一种或多种抗癌剂。在一些实施方案中，所述一种或多种抗癌剂是一种或多种检查点抑制剂抗体。在一些实施方案中，所述一种或多种抗癌剂是编码一种或多种检查点抑制剂抗体的mRNA。

[0647] 在一个方面，在本公开的多核苷酸之前，先前已经用PD-1拮抗剂治疗了受试者。在另一方面，在本公开的多核苷酸之前，已经用结合至PD-1的单克隆抗体治疗了受试者。在另一方面，在本发明方法的多核苷酸之前，已经用抗PD-1单克隆抗体疗法治疗了受试者。在其他方面，抗PD-1单克隆抗体疗法包括纳武单抗、派姆单抗、匹地利珠单抗或其任何组合。

[0648] 在另一方面，在本公开的多核苷酸之前，已经用结合至PDL-1的单克隆抗体治疗了受试者。在另一方面，在本发明方法的多核苷酸之前，已经用抗PDL-1单克隆抗体疗法治疗了受试者。在其他方面，抗PDL-1单克隆抗体疗法包括德瓦鲁单抗、阿维鲁单抗、MEDI473、BMS-936559、阿特殊单抗或其任何组合。

[0649] 在一些方面，在本公开的多核苷酸之前，已经用CTLA-4拮抗剂治疗了受试者。在另一方面，在本公开的多核苷酸之前，先前已经用结合至CTLA-4的单克隆抗体治疗了受试者。在另一方面，在本发明的多核苷酸之前，已经用抗CTLA-4单克隆抗体治疗了受试者。在其他方面，抗CTLA-4抗体疗法包括伊匹单抗或曲美木单抗。

[0650] 在一个实施方案中，可用于本公开的抗PD-1抗体（或其抗原结合部分）是派姆单抗。派姆单抗（也称为"KEYTRUDA®"、兰布罗利珠单抗和MK-3475）是针对人细胞表面受体PD-1（程序性死亡-1或程序性细胞死亡-1）的人源化单克隆IgG4抗体。派姆单抗描述于，例如，美国专利号8,900,587中；还参见<http://www.cancer.gov/drugdictionary?cdrid=695789>（最后访问：2014年12月14日）。派姆单抗已获FDA批准用于治疗复发性或难治性黑素瘤和晚期NSCLC。

[0651] 在另一个实施方案中，可用于本公开的抗PD-1抗体是纳武单抗。纳武单抗（也称为

"OPDIVO®"; 以前称为5C4、BMS-936558、MDX-1106或ONO-4538) 是完全人IgG4 (S228P) PD-1免疫检查点抑制剂抗体,其可选择性地阻止与PD-1配体 (PD-L1和PD-L2) 的相互作用,从而阻断抗肿瘤T细胞功能的下调(美国专利号8,008,449;Wang等人,2014 Cancer Immunol Res.2 (9):846-56)。纳武单抗已经在多种晚期实体瘤中表现出活性,包括肾细胞癌(肾腺癌或肾上腺瘤)、黑素瘤和非小细胞肺癌(NSCLC) (Topalian等人,2012a;Topalian等人,2014;Drake等人,2013;WO 2013/173223)。

[0652] 在其他实施方案中,抗PD-1抗体是MEDI0680 (以前称为AMP-514),其是针对PD-1受体的单克隆抗体。MEDI0680描述于例如美国专利号8,609,089B2或<http://www.cancer.gov/drugdictionary?cdrid=756047> (最后访问于2014年12月14日) 中。

[0653] 在某些实施方案中,抗PD-1抗体是BGB-A317,其是人源化单克隆抗体。BGB-A317描述于美国公布号2015/0079109中。

[0654] 在某些实施方案中,PD-1拮抗剂是AMP-224,其是B7-DC Fc融合蛋白。AMP-224论述于美国公布号2013/0017199或<http://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-drug?cdrid=700595> (最后访问于2015年7月8日) 中。

[0655] 在某些实施方案中,可用于本公开的抗PD-L1抗体是MSB0010718C (也称为阿维鲁单抗;参见US 2014/0341917) 或BMS-936559 (以前称为12A4或MDX-1105) (参见例如,美国专利号7,943,743;WO 2013/173223)。在其他实施方案中,所述抗PD-L1抗体是MPDL3280A (也称为RG7446) (参见例如,Herbst等人(2013) J Clin Oncol 31(suppl):3000.摘要;美国专利号8,217,149)、MEDI4736 (也称为德瓦鲁单抗;Khleif(2013) 于:Proceedings from the European Cancer Congress 2013;9月27日-10月1日,2013;Amsterdam,The Netherlands 中)。

[0656] 示例性临床抗CTLA-4抗体是人mAb 10D1 (现在称为伊匹单抗并以YERVOY®销售),如美国专利号6,984,720中所公开。可用于本发明方法的另一种抗CTLA-4抗体是曲美木单抗(也称为CP-675,206)。曲美木单抗是人IgG2单克隆抗CTLA-4抗体。曲美木单抗描述于WO/2012/122444、美国公布号2012/263677或WO公布号2007/113648A2中。

[0657] 下表(表10)提供了特定肿瘤类型中的KRAS突变以及使用 and 测试中的治疗类型的实例。本发明的组合物适用于与任何这些疗法组合使用。

[0658] 表10

[0659]

| | 结肠直肠癌 | 胰腺癌 | 肺癌 | 子宫内膜样癌 |
|----------------------------|--------------------------------------|-----------------|---|--------|
| #US KRAS*患者 (mKRAS 发生率) | 57,712 | 49,257 | 26,695 | 10,281 |
| KRAS 突变% (对比总计) | 45.0% | 97.0% | 31.0% | 21.4% |
| 所测试的 PD-L1 抑制剂 | 阿特殊单抗 (P3-NR) 德瓦鲁单抗 (P2-NR) | 德瓦鲁单抗 (P2-R) | 阿维鲁单抗 (P3-R) 阿特殊单抗 (P3-R) 德瓦鲁单抗 (P2-R) | 无 |

[0660]

| | | | | |
|------------------------|--|--|--|----------------------------------|
| 所测试的 PD-1 抑制剂 | 纳武单抗 (P2-R) 派姆单抗 (P2-R) | 纳武单抗 (P2-R) 派姆单抗 (P2-R) | 纳武单抗 (P2-R) 派姆单抗 (P2-R) | 纳武单抗 (P2-R) 派姆单抗 (P2-R) |
| 所测试的癌症 疫苗 | 无 | 无 | GI-4000 (P2-C) DPV-001 (P2-R) | 无 |
| 所测试的 KRAS 疫苗 | 无 | 无 | GI-4000 (P2-C) DPV-001 (P2-R) | 无 |
| KRAS 疫苗的 公牛案例 | 45% w/突变型 KRAS 最大 pt 池 36% G12D 等 位基因 21% G12V 等 位基因 | 97% w/突变 型 KRAS 定义这种肿 瘤 39% G12D 等位基因 30% G12V 等位基因 | 31% w/突变 型 KRAS 39% G12C 等位基因 21% G12V 等位基因 | 21% w/突变 型 KRAS |
| KRAS 疫苗的 优先级(H/M/L) | H | H | H | M |

[0661] 在其他实施方案中，癌症治疗剂是细胞因子。在其他实施方案中，癌症治疗剂是包含基于群体的肿瘤特异性抗原的疫苗。

[0662] 在其他实施方案中，癌症治疗剂是含有一种或多种由癌种系基因表达的传统抗原（为见于多个患者中的肿瘤所共有的抗原，也被称为“共有癌抗原”）的疫苗。在一些实施方案中，传统抗原是已知普遍见于癌或肿瘤中或见于特定类型的癌或肿瘤中的抗原。在一些实施方案中，传统癌抗原是非突变肿瘤抗原。在一些实施方案中，传统癌抗原是突变肿瘤抗原。

[0663] 在人癌症的情况下,相比于任何其他基因,p53基因(官方符号TP53)更频繁突变。大量群组研究已显示对于大多数p53突变,基因组位置为一名患者或仅少许患者所特有,并且突变不能用作被设计用于特定患者群体的治疗性疫苗的复发新抗原。然而,p53基因座的小型子集确实展现“热点”样式,其中基因中的若干位置以相对较高频率被突变。引人注目的是,这些复发突变区域中的大部分发生在外显子-内含子边界附近,从而破坏由mRNA剪接机构识别的典型核苷酸序列基序。

[0664] 剪接基序的突变可改变最终mRNA序列,即使预测局部氨基酸序列无变化(即对于同义或内含子突变来说)。因此,这些突变常常由常见注释工具注释为“非编码”,并且被忽略用于进一步分析,即使它们可以不可预测方式改变mRNA剪接,并且对翻译蛋白质施加严重功能性影响。如果选择性剪接同种型产生同框序列变化(即不产生提前终止密码子(PTC)),那么它可逃脱由无义介导的mRNA降解(NMD)进行的耗竭,并且易于表达,加工,以及由HLA系统呈递在细胞表面上。此外,突变源性选择性剪接通常是“隐蔽的”,即不在正常组织中表达,因此可由T细胞识别为非自身新抗原。

[0665] 在一些情况下,癌症治疗剂是包括一种或多种作为复发多态性(“热点突变”)的新抗原的疫苗。举例来说,本发明尤其提供由p53中的某些复发体细胞癌突变产生的新抗原肽序列。产生新抗原肽和HLA限定的表位的示例性突变和mRNA剪接事件包括但不限于以下:

[0666] (1)在典型5'剪接位点邻近密码子p.T125处的突变,从而诱导具有肽序列TAKSVTCTVSCPEGLASMRLQCLAVSPCISFVWNFGIPLHPLASCQCFFIVYPLNV(SEQ ID NO:232)的保留内含子,所述序列含有表位AVSPCISFVW(SEQ ID NO:233)(HLA-B*57:01,HLA-B*58:01)、HPLASCQCFF(SEQ ID NO:234)(HLA-B*35:01,HLA-B*53:01)、FVWNFGIPL(SEQ ID NO:235)(HLA-A*02:01,HLA-A*02:06,HLA-B*35:01);

[0667] (2)在典型5'剪接位点邻近密码子p.331处的突变,从而诱导具有肽序列EYFTLQVLSLGTSYQVESFQSNTQNAVFFLTVPALPAIGAFAIRGQ(SEQ ID NO:236)的保留内含子,所述序列含有表位LQVLSLGTSY(SEQ ID NO:237)(HLA-B*15:01)、FQSNTQNAV(SEQ ID NO:238)(HLA-B*15:01);

[0668] (3)在典型3'剪接位点邻近密码子p.126处的突变,从而诱导隐蔽选择性外显子3'剪接位点,其产生含有表位CTMFCQLAK(SEQ ID NO:240)(HLA-A*11:01)、KSVTCTMF(SEQ ID NO:241)(HLA-B*58:01)的新型跨越肽序列AKSVTCTMFCQLAK(SEQ ID NO:239);和/或

[0669] (4)在典型5'剪接位点邻近密码子p.224处的突变,从而诱导隐蔽选择性内含子5'剪接位点,其产生含有表位VPYEPPEVW(SEQ ID NO:243)(HLA-B*53:01,HLA-B*51:01)、LTVPPSTAW(SEQ ID NO:244)(HLA-B*58:01,HLA-B*57:01)的新型跨越肽序列VPYEPPEVWLALTVPSTAWAA(SEQ ID NO:242);

[0670] 其中转录物密码子位置涉及来自Ensembl v83人基因组注释的典型全长p53转录物ENST00000269305(SEQ ID NO:245)。

[0671] 在一个实施方案中,本发明提供一种包含编码开放阅读框(ORF)的mRNA的癌症治疗性疫苗,所述开放阅读框编码新抗原肽(1)至(4)中的一者或多者。在一个实施方案中,本发明提供基于患者的肿瘤含有任何以上突变来选择性施用含有或编码肽(1)-(4)中的一者或多者的疫苗。在一个实施方案中,本发明提供基于以下双重准则来选择性施用疫苗:受试者的肿瘤含有任何以上突变以及受试者的正常HLA类型含有被预测会结合所得新抗原的相

应HLA等位基因。

[0672] 在一些实施方案中,癌症治疗性疫苗包含一种或多种编码一种或多种复发多态性的mRNA。在一些实施方案中,癌症治疗性疫苗包含一种或多种编码一种或多种患者特异性新抗原的mRNA。在一些实施方案中,癌症治疗性疫苗包含一种或多种编码免疫检查点调节剂的mRNA。一种或多种复发多态性、一种或多种患者特异性新抗原和/或一种或多种免疫检查点调节剂可以任何方式加以组合。举例来说,对于一种或多种多联构建体,可合乎需要的是将一种或多种复发多态性、一种或多种患者特异性新抗原和/或一种或多种免疫检查点调节剂编码成一体。在其他情况下,对于一种或多种复发多态性,一种或多种患者特异性新抗原和/或一种或多种免疫检查点调节剂,可合乎需要的是由单独mRNA构建体编码。应了解一种或多种复发多态性、一种或多种患者特异性新抗原和/或一种或多种免疫检查点调节剂可并行施用,或可依序施用。

[0673] 可使mRNA癌症疫苗和抗癌治疗组合以使免疫治疗响应甚至进一步增强。mRNA癌症疫苗和其他治疗剂可同时或依序施用。当同时施用其他治疗剂时,它们可于同一制剂中加以施用,或处于单独制剂中,但在同时加以施用。当其他治疗剂的施用和mRNA癌症疫苗的施用在时间上分隔时,其他治疗剂彼此以及与mRNA癌症疫苗依序施用。施用这些化合物之间的时间分隔可以是大约数分钟,或它可更久,例如数小时、数天、数周、数月。举例来说,在一些实施方案中,施用这些化合物之间的时间间隔是1小时、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、8小时、12小时、24小时或更久。在一些实施方案中,施用这些化合物之间的时间间隔是2天、3天、4天、5天、6天或7天或更久。在一些实施方案中,mRNA癌症疫苗在抗癌治疗之前施用。在一些实施方案中,mRNA癌症疫苗在抗癌治疗之后施用。

[0674] 其他治疗剂包括但不限于抗癌治疗、佐剂、细胞因子、抗体、抗原等。

[0675] 在一些方面,所提供的方法包括与免疫检查点调节剂组合施用mRNA癌症疫苗。在一些实施方案中,免疫检查点调节剂,例如检查点抑制剂如抗PD-1抗体以足以向所述受试者递送100-300mg的剂量水平施用。在一些实施方案中,免疫检查点调节剂,例如检查点抑制剂如抗PD-1抗体以足以向所述受试者递送200mg的剂量水平施用。在一些实施方案中,免疫检查点调节剂,例如检查点抑制剂如抗PD-1抗体通过静脉注射施用。在一些实施方案中,所述免疫检查点调节剂向所述受试者施用两次、三次、四次或更多次。在一些实施方案中,所述免疫检查点调节剂在与所述mRNA疫苗施用同一天施用至所述受试者。

[0676] RNA疫苗可与一种或多种药学上可接受的赋形剂组合配制或施用。在一些实施方案中,疫苗组合物包含至少一种额外活性物质,诸如像治疗活性物质、防治活性物质或两者组合。疫苗组合物可为无菌的,无热原的,或无菌且无热原。在配制和/或制造药物制剂诸如疫苗组合物时的一般考虑事项可例如见于Remington: The Science and Practice of Pharmacy第21版,Lippincott Williams&Wilkins,2005(以引用的方式整体并入本文)中。

[0677] 在一些实施方案中,向人、人患者或受试者施用癌症RNA疫苗。出于本公开的目的,短语“活性成分”通常是指RNA疫苗或其中含有的多核苷酸,例如编码抗原性多肽的RNA多核苷酸(例如mRNA多核苷酸)。

[0678] 可通过药理学领域中已知或今后开发的任何方法制备本文所述的疫苗组合物的制剂。一般来说,所述制备方法包括以下步骤:使活性成分(例如mRNA多核苷酸)与赋形剂和/或一种或多种其他辅助成分缔合,接着如果必要和/或合乎需要,那么将产品划分、成形

和/或包装成所需单次或多次剂量单位。

[0679] 可使用一种或多种赋形剂配制癌症RNA疫苗以：(1) 使稳定性增加；(2) 使细胞转染增加；(3) 容许持续或延迟释放（例如从储槽制剂释放）；(4) 改变生物分布（例如靶向特定组织或细胞类型）；(5) 使所编码蛋白质在体内的翻译增加；和/或(6) 改变所编码蛋白质（抗原）在体内的释放概况。除传统赋形剂诸如任何和所有溶剂、分散介质、稀释剂或其他液体媒介物、分散或混悬助剂、表面活性剂、等张剂、增稠剂或乳化剂、防腐剂之外，赋形剂也可包括但不限于类脂质、脂质体、脂质纳米粒子、聚合物、脂质复合物、核心-壳体纳米粒子、肽、蛋白质、用癌症RNA疫苗转染的细胞（例如用于向受试者中移植）、透明质酸酶、纳米粒子模拟物及其组合。

[0680] 加速的血液清除

[0681] 本发明提供用于降低ABC对重复施用的活性剂如生物活性剂的作用的化合物、组合物及其使用方法。显而易见的是，降低或完全消除ABC对施用的活性剂的作用有效地增加其半衰期并因此增加其功效。

[0682] 在一些实施方案中，术语降低ABC是指与诱导LNP如MC3LNP的阳性参考对照相比，ABC的任何降低。诱导LNP的ABC在给定时间范围内第二次或后续施用引起活性剂循环水平的降低。因此，ABC的降低是指相对于标准LNP，在第二次或后续剂量的剂时循环剂的清除较少。降低可以是例如至少10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或100%。在一些实施方案中，降低是10%-100%、10%-50%、20%-100%、20%-50%、30%-100%、30%-50%、40%-100%、40%-80%、50%-90%或50%-100%。或者，ABC的降低可被表征为在第二次或后续施用后至少可检测水平的循环剂或者相对于在施用标准LNP后的循环剂，循环剂增加至少2倍、3倍、4倍、5倍。在一些实施方案中，降低是2-100倍、2-50倍、3-100倍、3-50倍、3-20倍、4-100倍、4-50倍、4-40倍、4-30倍、4-25倍、4-20倍、4-15倍、4-10倍、4-5倍、5-100倍、5-50倍、5-40倍、5-30倍、5-25倍、5-20倍、5-15倍、5-10倍、6-100倍、6-50倍、6-40倍、6-30倍、6-25倍、6-20倍、6-15倍、6-10倍、8-100倍、8-50倍、8-40倍、8-30倍、8-25倍、8-20倍、8-15倍、8-10倍、10-100倍、10-50倍、10-40倍、10-30倍、10-25倍、10-20倍、10-15倍、20-100倍、20-50倍、20-40倍、20-30倍或20-25倍。

[0683] 本公开提供不易清除并因此具有更长的体内半衰期的包含脂质的化合物和组合物。在组合物意图用于重复（包括长期）施用的情况下尤其如此，并且在数天或数周内发生这种重复施用的情况下甚至更尤其如此。

[0684] 值得注意的是，这些组合物不太容易或完全避免观察到的加速血液清除现象（ABC）。ABC是一种现象，其中某些外源施用的剂在第二次和后续施用迅速从血液中清除。已经观察到这种现象部分地用于各种含脂质的组合物，包括但不限于脂化剂、脂质体或其他基于脂质的递送媒介物和脂质包封的剂。迄今为止，对ABC的基础知之甚少并且在一些情况下归因于体液免疫应答，并且因此用于限制其在体内、特别是在临床环境中的影响的策略仍然是难以捉摸的。

[0685] 本公开提供了不易受ABC影响（如果完全不易影响）的化合物和组合物。在一些重要方面，此类化合物和组合物是包含脂质的化合物或组合物。出人意料地，本发明的含脂质化合物或组合物在第二次和后续体内施用不经历ABC。这种对ABC的抗性使得这些化合物

和组合物特别适合于体内重复使用,包括在短时间段、包括数天或1-2周内重复使用。这种增强的稳定性和/或半衰期部分是由于这些组合物不能活化B1a和/或B1b细胞和/或常规B细胞、pDC和/或血小板。

[0686] 因此,本公开提供了加速血液清除(ABC)潜在的机制的阐明。已经发现,根据本公开和本文提供的发明,ABC现象至少在其涉及脂质和脂质纳米粒子时至少部分地介导涉及B1a和/或B1b细胞、pDC和/或血小板的先天性免疫应答。B1a细胞通常负责以循环IgM的形式分泌天然抗体。这种IgM是多反应性的,从而意味着它能够结合至多种抗原,尽管对每种抗原具有相对低的亲和力。

[0687] 根据本发明已经发现,一些脂质化剂或包含脂质的制剂如体内施用的脂质纳米粒子触发并经受ABC。根据本发明现在已经发现,在施用第一剂量的LNP后,一种或多种参与产生先天性免疫应答的细胞(在本文中称为传感器)结合这种剂,被活化,并且然后起始促进ABC和毒性的免疫因子的级联(在本文称为效应子)。例如,B1a和B1b细胞可结合至LNP,变得活化(单独或在其他传感器如pDC和/或效应物如IL6存在下)并分泌与LNP结合的天然IgM。受试者中预先存在的天然IgM也可识别并结合至LNP,从而触发补体固定。在施用第一剂量后,天然IgM的产生在LNP施用1-2小时内开始。通常约2-3周,由于IgM的天然半衰期,天然IgM从系统中清除。在施用LNP后约96小时开始产生天然IgG。当在天然环境中施用时,所述剂可相对不受B1a细胞或B1b细胞或天然IgG活化后产生的天然IgM的影响而发挥其生物学作用。天然IgM和天然IgG是非特异性的,并且因此不同于抗PEG IgM和抗PEG IgG。

[0688] 虽然申请人不受机制约束,但提出LNP通过以下机制触发ABC和/或毒性。据信当将LNP施用至受试者时,所述LNP快速通过血液输送至脾脏。所述LNP可能遇到血液和/或脾脏中的免疫细胞。响应于血液和/或脾脏中LNP的存在,触发快速先天性免疫应答。申请人在本文中已经表明,在施用LNP的数小时内,若干免疫传感器已经对LNP的存在作出反应。这些传感器包括但不限于参与产生免疫应答的免疫细胞,如B细胞、pDC和血小板。传感器可以存在于脾脏中,如脾脏的边缘区和/或血液中。所述LNP可与一个或多个传感器物理地相互作用,所述传感器可与其他传感器相互作用。在这种情况下,LNP直接或间接地与传感器相互作用。响应于LNP的识别,传感器可彼此直接相互作用。例如,许多传感器位于脾脏中并且可容易地彼此相互作用。或者,一个或多个传感器可与血液中的LNP相互作用并变得活化。活化的传感器然后可与其他传感器直接相互作用或间接地相互作用(例如,通过刺激或产生信使,如细胞因子,例如IL6)。

[0689] 在一些实施方案中,LNP可与以下传感器中的每种直接相互作用并使其活化:pDC、B1a细胞、B1b细胞和血小板。这些细胞然后可彼此直接或间接地相互作用以起始效应物的产生,这最终导致与重复剂量的LNP相关的ABC和/或毒性。例如,申请人已经显示LNP施用导致pDC活化、血小板聚集和活化以及B细胞活化。响应于LNP,血小板也聚集并被活化且与B细胞聚集。pDC细胞被活化。已经发现LNP相对快速地与血小板和B细胞的表面相互作用。阻断响应于LNP的这些传感器中的任一个或组合的活化对于阻抑通常将发生的免疫应答是有用的。这种免疫应答的阻抑导致避免ABC和/或毒性。

[0690] 传感器一旦活化就会产生效应物。如本文所用,效应物是由免疫细胞(例如B细胞)产生的免疫分子。效应物包括但不限于免疫球蛋白,如天然IgM和天然IgG;和细胞因子,如IL6。B1a和B1b细胞在施用LNP后2-6小时内刺激天然IgM的产生。可在96小时内检测到天然

IgG。IL6水平在若干小时内增加。天然IgM和IgG在体内循环数天至数周。在此期间，循环效应物可与新施用的LNP相互作用，从而触发那些LNP以被身体清除。例如，效应物可识别并结合至LNP。效应物的Fc区可通过巨噬细胞识别并触发对装饰的LNP的摄取。然后将巨噬细胞转运至脾脏。免疫传感器产生效应物是与针对ABC观察到的时机相关的瞬时应答。

[0691] 如果施用的剂量是第二次或后续施用的剂量，并且如果在先前诱导的天然IgM和/或IgG从系统中清除之前（例如，在2-3个窗口时间段之前）施用这种第二次或后续剂量，则这种第二次或后续剂量由触发替代补体途径活化并且本身快速清除的循环天然IgM和/或天然IgG或Fc靶向。当效应物从体内清除或数量减少后施用LNP时，未观察到ABC。

[0692] 因此，根据本发明的方面，有用的是抑制LNP与一个或多个传感器之间的相互作用，抑制LNP（直接或间接）活化一个或多个传感器，抑制一种或多种效应物的产生，和/或抑制一种或多种效应物的活性。在一些实施方案中，LNP被设计用于限制或阻断LNP与传感器的相互作用。例如，LNP可具有改变的PC和/或PEG以防止与传感器的相互作用。或者或另外，抑制由LNP诱导的免疫应答的剂可用于实现这些作用中的任何一种或多种。

[0693] 还已经确定常规B细胞也牵涉于ABC中。具体地，在第一次施用剂时，常规B细胞（本文称为CD19(+)）结合至所述剂并对所述剂起反应。然而，与B1a和B1b细胞不同，常规B细胞能够首先发动IgM应答（在施用LNP后约96小时开始），然后是IgG应答（在施用LNP后约14天开始）伴随记忆应答。因此，常规B细胞对施用的剂起反应并促成介导ABC的IgM（并最终促成IgG）。IgM和IgG通常是抗PEG IgM和抗PEG IgG。

[0694] 预期在一些情况下，大多数ABC应答是通过B1a细胞和B1a介导的免疫应答介导的。进一步预期在一些情况下，ABC应答由IgM和IgG两者介导，其中常规B细胞和B1a细胞均介导此类作用。在其他情况下，ABC应答由天然IgM分子介导，其中一些能够结合至天然IgM，其可由活化的B1a细胞产生。天然IgM可结合至LNP的一种或多种组分，例如，结合至LNP的磷脂组分（如结合至磷脂的PC部分）和/或结合至LNP的PEG-脂质组分（如结合至PEG-DMG，特别是结合至PEG-DMG的PEG部分）。由于B1a表达CD36，磷脂酰胆碱是CD36的配体，预期CD36受体可介导B1a细胞的活化并因此产生天然IgM。在其他情况下，ABC应答主要由常规B细胞介导。

[0695] 根据本发明已经发现，可通过使用不会活化B1a细胞的化合物和组合物（如剂、递送媒介物和制剂）至少部分地减少或消除ABC现象。不会活化B1a细胞的化合物和组合物在本文中可称为B1a惰性化合物和组合物。根据本发明进一步发现，可通过使用不会活化常规B细胞的化合物和组合物至少部分地减少或消除ABC现象。在一些实施方案中，不会活化常规B细胞的化合物和组合物在本文中可称为CD19-惰性化合物和组合物。因此，在本文提供的一些实施方案中，化合物和组合物不会活化B1a细胞，并且它们不会活化常规B细胞。在一些实施方案中，不会活化B1a细胞和常规B细胞的化合物和组合物在本文中可称为B1a/CD19-惰性化合物和组合物。

[0696] 迄今尚未理解这些潜在的机制，并且B1a和B1b细胞的作用及其与常规B细胞在这种现象中的相互影响也未被认识到。

[0697] 因此，本公开提供了不会促进ABC的化合物和组合物。这些可进一步表征为不能活化B1a和/或B1b细胞、血小板和/或pDC以及任选的常规B细胞。这些化合物（例如，剂，包括生物活性剂（如防治剂、治疗剂和诊断剂）、递送媒介物（包括脂质体、脂质纳米粒子和基于脂质的包封结构等）和组合物（例如，制剂等）对于需要重复施用、并且特别是在短时间段

内(例如1-2周内)内发生的重复施用的应用是也合乎需要的。例如,如果所述剂是以紧密间隔的时间间隔提供至受试者的基于核酸的治疗剂,则情况如此。本文提供的发现可应用于这些和其他类似地施用和/或受ABC影响的剂。

[0698] 特别感兴趣的是包含脂质的化合物、包含脂质的粒子和包含脂质的组合物,因为已知这些组合物易受ABC影响。此类包含脂质的化合物粒子和组合物已广泛用作生物活性剂或用作此类剂的递送媒介物。因此,无论是否通过降低ABC对剂本身或其递送媒介物的影响,改善此类剂的功效的能力对于多种活性剂都是有益的。

[0699] 本文还提供了不会刺激或增强与一种或多种生物活性剂的重复剂量施用相关的急性期应答(ARP)的组合物。

[0700] 在一些情况下,所述组合物可能不结合至IgM,包括但不限于天然IgM。

[0701] 在一些情况下,所述组合物可能不结合至急性期蛋白,如但不限于C-反应蛋白。

[0702] 在一些情况下,所述组合物可能不会触发CD5(+)介导的免疫应答。如本文所用,CD5(+)介导的免疫应答是由B1a和/或B1b细胞介导的免疫应答。这种应答可包括ABC应答、急性期应答、天然IgM和/或IgG的诱导等。

[0703] 在一些情况下,所述组合物可能不会触发CD19(+)介导的免疫应答。如本文所用,CD19(+)介导的免疫应答是由常规CD19(+)、CD5(-)B细胞介导的免疫应答。这种应答可包括IgM的诱导、IgG的诱导、记忆B细胞的诱导、ABC应答、包括抗蛋白应答的抗药物抗体(ADA)应答,其中所述蛋白质可包封在LNP内等。

[0704] B1a细胞是参与先天性免疫的B细胞的子集。这些细胞是循环IgM(称为天然抗体或天然血清抗体)的来源。天然IgM抗体的特征在于对许多抗原具有弱亲和力,并且因此它们被称为“多特异性”或“多反应性”,从而表明它们结合至多于一种抗原的能力。B1a细胞不能产生IgG。另外,它们不会发育成记忆细胞,并且因此不会促成适应性免疫应答。然而,它们能够在活化后分泌IgM。分泌的IgM通常在约2-3周内被清除,此时免疫系统对先前施用的抗原相对未致敏。如果在所述时间段后(例如,在初始暴露后约3周)呈递相同的抗原,则抗原不会快速清除。然而,显著地,如果抗原在所述时间段内(例如,在2周内,包括在1周内或在数天内)呈递,则抗原被快速清除。连续剂量之间的这种延迟使得某些含脂质的治疗剂或诊断剂不适合使用。

[0705] 在人中,B1a细胞是CD19(+)、CD20(+)、CD27(+)、CD43(+)、CD70(-)和CD5(+)。在小鼠中,B1a细胞是CD19(+)、CD5(+)和CD45B细胞同种型B220(+)。它是CD5的表达,其通常将B1a细胞与其他常规B细胞区分开。B1a细胞可表达高水平的CD5,并且在此基础上可区别于其他B-1细胞,如表达低水平或不可检测水平的CD5的B-1b细胞。CD5是pan-T细胞表面糖蛋白。B1a细胞也表达CD36,也称为脂肪酸转位酶。CD36是B类清道夫受体家族的成员。CD36可结合许多配体,包括氧化的低密度脂蛋白、天然脂蛋白、氧化磷脂和长链脂肪酸。

[0706] B1b细胞是参与先天性免疫的B细胞的另一子集。这些细胞是循环天然IgM的另一种来源。若干抗原(包括PS)能够通过B1b活化诱导T细胞非依赖性免疫。CD27通常在B1b细胞上响应抗原活化而上调。与B1a细胞类似,B1b细胞通常位于特定的身体位置,如脾脏和腹腔,并且在血液中的丰度非常低。B1b分泌的天然IgM通常在约2-3周内被清除,此时免疫系统对先前施用的抗原相对未致敏。如果在所述时间段后(例如,在初始暴露后约3周)呈递相同的抗原,则抗原不会快速清除。然而,显著地,如果抗原在所述时间段内(例如,在2周内,

包括在1周内或在数天内)呈递,则抗原被快速清除。连续剂量之间的这种延迟使得某些含脂质的治疗剂或诊断剂不适合使用。

[0707] 在一些实施方案中,期望阻断B1a和/或B1b细胞活化。阻断B1a和/或B1b细胞活化的一种策略涉及确定脂质纳米粒子的哪些组分促进B细胞活化并使那些组分中和。本文已发现至少PEG和磷脂酰胆碱(PC)有助于B1a和B1b细胞与其他细胞的相互作用和/或活化。PEG可能在促进B1细胞与血小板之间的聚集中起作用,这可能导致活化。PC(LNP中的辅助脂质)也参与活化B1细胞,可能通过与B细胞表面上的CD36受体相互作用。许多粒子具有PEG-脂质替代物,已经设计和测试了无PEG和/或PC替代脂质(例如油酸或其类似物)。申请人已经确定,替换LNP内的否则在重复施用时会促进ABC的一种或多种这些组分可用于通过减少天然IgM和/或B细胞活化的产生来防止ABC。因此,本发明涵盖由于消除包含B细胞触发剂的设计而具有减少的ABC的LNP。

[0708] 用于阻断B1a和/或B1b细胞活化的另一种策略涉及使用抑制由LNP诱导的免疫应答的剂。下文更详细地论述这些类型的剂。在一些实施方案中,这些剂阻断B1a/B1b细胞与LNP或血小板或pDC之间的相互作用。例如,所述剂可以是物理地阻断所述相互作用的抗体或其他结合剂。其实例是结合至CD36或CD6的抗体。所述剂也可以是一旦活化或在活化之前防止或禁止B1a/B1b细胞发信号的化合物。例如,有可能阻断由B细胞与LNP或其他免疫细胞的相互作用产生的B1a/B1b信号传导级联中的一种或多种组分。在其他实施方案中,所述剂可在活化后充当由B1a/B1b细胞产生的一种或多种效应物。这些效应物包括例如天然IgM和细胞因子。

[0709] 根据本发明的方面已经证明,当阻断pDC细胞的活化时,响应于LNP的B细胞活化减少。因此,为了避免ABC和/或毒性,可能需要防止pDC活化。与上文论述的策略类似,pDC细胞活化可被干扰pDC与LNP和/或B细胞/血小板之间的相互作用的剂阻断。或者,作用于pDC以阻断其被活化的能力或作用于其效应物的剂可与LNP一起使用以避免ABC。

[0710] 血小板也可能在ABC和毒性中起重要作用。在将第一剂量的LNP施用至受试者后,非常快速地,血小板与LNP缔合、聚集并被活化。在一些实施方案中,期望阻断血小板聚集和/或活化。用于阻断血小板聚集和/或活化的一种策略涉及确定脂质纳米粒子的哪些组分促进血小板聚集和/或活化并使那些组分中和。本文已经发现,至少PEG促成血小板聚集、活化和/或与其他细胞的相互作用。许多粒子具有PEG-脂质替代物,并且已经设计和测试了无PEG。申请人已经确定,替换LNP内的否则在重复施用时会促进ABC的一种或多种这些组分可用于通过减少天然IgM和/或血小板聚集来防止ABC。因此,本发明涵盖由于消除包含血小板触发剂的设计而具有减少的ABC的LNP。或者,作用于血小板以在其一旦被活化时阻断其活性或作用于其效应物的剂可与LNP一起使用以避免ABC。

[0711] 测量ABC活性和相关活性

[0712] 本文提供的各种化合物和组合物(包括LNP)在体内施用后不会促进ABC活性。可通过许多测定中的任一种来表征和/或鉴定这些LNP,所述测定如但不限于下文描述的那些。

[0713] 在一些实施方案中,所述方法涉及施用LNP而不产生促进ABC的免疫应答。促进ABC的免疫应答涉及活化一种或多种传感器(如B1细胞、pDC或血小板),以及一种或多种效应物,如天然IgM、天然IgG或细胞因子如IL6。因此,施用LNP而不产生促进ABC的免疫应答至少涉及施用LNP而没有显著一种或多种传感器和显著产生一种或多种效应物。在这种背景下

使用的显著是指相对于第二剂量的ABC触发LNP预期的血液清除水平,将导致全部或部分第二剂量的加速血液清除的生理后果的量。例如,应当阻抑免疫应答,以使得在第二剂量后观察到的ABC低于ABC触发LNP将所预期的ABC。

[0714] B1a或B1b活化测定

[0715] 本公开中提供的某些组合物不会活化B细胞,如B1a或B1b细胞(CD19+CD5+)和/或常规B细胞(CD19+CD5-)。B1a细胞、B1b细胞或常规B细胞的活化可以多种方式确定,其中一些方式在下文提供。B细胞群体可作为分级B细胞群体或未分级的脾细胞或外周血单核细胞(PBMC)群体提供。如果是后者,可将细胞群体与选择的LNP一起孵育一段时间,且然后收获用于进一步分析。或者,可收获上清液并进行分析。

[0716] 活化标志物细胞表面表达的上调

[0717] B1a细胞、B1b细胞或常规B细胞的活化可表现为B细胞活化标志物的表达增加,包括晚期活化标志物如CD86。在示例性的非限制性测定中,提供未分级的B细胞作为脾细胞群体或作为PBMC群体,与选择的LNP一起孵育特定时间段,且然后针对标准B细胞标志物如CD19和活化标志物如CD86染色,并使用例如流式细胞术进行分析。合适的阴性对照涉及将同一群体与培养基一起孵育,且然后进行相同的染色和可视化步骤。与阴性对照相比,测试群体中的CD86表达的增加表明B细胞活化。

[0718] 促炎性细胞因子释放

[0719] 还可通过细胞因子释放测定来评估B细胞活化。例如,可通过在用目标LNP暴露时产生和/或分泌细胞因子例如IL-6和/或TNF- α 来评估活化。

[0720] 可使用本领域熟知的常规细胞因子分泌测定进行此类测定。细胞因子分泌的增加表明B细胞活化。

[0721] LNP与B细胞结合/缔合和/或由B细胞摄取

[0722] LNP与B细胞的缔合或结合也可用于评估目标LNP并进一步表征这种LNP。可使用可检测标记的如荧光标记的LNP评估缔合/结合和/或摄取/内化,并在不同的孵育期后跟踪这种LNP在B细胞之中或之上的位置。

[0723] 本发明进一步预期本文提供的组合物可能能够逃避识别或检测并且任选地通过ABC的下游介质如循环IgM和/或急性期反应介质如急性期蛋白(例如,C-反应蛋白(CRP)结合。

[0724] 用于减少ABC的方法

[0725] 本文还提供了用于将可包封剂(如治疗剂)的LNP递送至受试者而不促进ABC的方法。

[0726] 在一些实施方案中,所述方法包括施用本文所述的不会促进ABC(例如,不会诱导天然IgM与LNP结合的产生、不会活化B1a和/或B1b细胞)的任一种LNP。如本文所用,“不会促进ABC”的LNP是指不诱导将导致实质性ABC的免疫应答或诱导基本上低水平的不足以导致实质性ABC的免疫应答的LNP。不诱导产生与LNP结合的天然IgM的LNP是指不诱导天然IgM与LNP结合或诱导基本上低水平的不足以导致实质性ABC的天然IgM分子的LNP。不会活化B1a和/或B1b细胞的LNP是指不诱导B1a和/或B1b细胞产生与LNP结合的天然IgM的应答或诱导基本上低水平的不足以导致实质性ABC的B1a和/或B1b应答的LNP。

[0727] 在一些实施方案中,术语不活化且不诱导产生是相对于参考值或条件的相对降

低。在一些实施方案中,参考值或条件是标准LNP(如MC3LNP)活化或诱导分子(例如IgM)的产生的量。在一些实施方案中,相对降低是至少30%、例如至少30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的降低。在其他实施方案中,术语不活化诸如B细胞的细胞并且不诱导蛋白质如IgM的产生可指不可检测量的活性细胞或特定蛋白质。

[0728] 血小板效应和毒性

[0729] 本发明进一步部分地基于阐明与LNP施用相关的剂量限制性毒性的机制。这种毒性可涉及凝血病、弥散性血管内凝血(DIC,也称为消耗性凝血病)(无论是急性还是慢性)和/或血管血栓形成。在一些情况下,与LNP相关的剂量限制性毒性是急性期应答(APR)或补体活化相关的假性过敏(CARPA)。

[0730] 如本文所用,凝血病是指体内增加的凝血(血液凝固)。本公开中报告的发现与这种增加的凝血一致并且显著提供对潜在机制的了解。凝血是涉及许多不同因子和细胞类型的过程,并且迄今为止,在这方面尚未理解LNP与血小板之间的关系和相互作用。本公开提供了这种相互作用的证据,并且还提供了经修饰以具有降低的血小板效应(包括降低的血小板缔合、降低的血小板聚集和/或降低的血小板聚集)的化合物和组合物。调节(包括优选地下调)这种血小板效应的能力可降低LNP施用后凝血病的发生率和/或严重程度。这进而将减少与这种LNP相关的毒性,从而允许更高剂量的LNP并且重要的是将其货物施用于有需要的患者。

[0731] CARPA是表现为超敏反应(HSR)的一类急性免疫毒性,其可能由纳米药物和生物制剂触发。与过敏反应不同,CARPA通常不涉及IgE,但是由于补体系统的活化而产生,补体系统是先天性免疫系统的一部分,其增强身体清除病原体的能力。以下途径(经典补体途径(CP)、旁路途径(AP)和凝集素途径(LP))中的一种或多种可参与CARPA。Szebeni, *Molecular Immunology*, 61:163-173 (2014)。

[0732] 经典途径由C1复合物的活化触发,所述复合物含有C1q、C1r、C1s或C1qr2s2。当C1q结合至与抗原复合的IgM或IgG时,或当C1q直接结合至病原体的表面时,发生C1复合物的活化。这种结合导致C1q分子的构象变化,这导致C1r的活化,这进而裂解C1s。C1r2s2组分现在分裂C4且然后分裂C2,从而产生C4a、C4b、C2a和C2b。C4b和C2b结合以形成经典途径C3转化酶(C4b2b复合物),其促进C3裂解成C3a和C3b。C3b然后结合C3转化酶以形成C5转化酶(C4b2b3b复合物)。由于自发C3水解,旁路途径被连续活化。因子P(备解素)是旁路途径的正调控因子。备解素的寡聚化使C3转化酶稳定,然后C3转化酶可裂解更多的C3。C3分子可结合至表面并募集更多的B、D和P活性,从而导致补体活化的扩增。

[0733] 急性期应答(APR)是用于预防感染和清除潜在的病原体的一种复杂的系统性先天性免疫应答。许多蛋白质参与APR,并且C反应蛋白是一种充分表征的蛋白质。

[0734] 根据本发明已经发现,某些LNP在体内施用后几乎立即能够与血小板物理缔合,而其他LNP根本不与血小板缔合或仅以背景水平缔合。值得注意的是,那些与血小板相关的LNP也明显地使此后形成的血小板聚集体稳定。血小板与某些LNP的物理接触与此类血小板在施用后长时间连续保持聚集或形成聚集体的能力相关。此类聚集体包含活化的血小板以及先天免疫细胞,如巨噬细胞和B细胞。

[0735] 脂质纳米粒子(LNP)

[0736] 在一组实施方案中,提供了脂质纳米粒子(LNP)。在一个实施方案中,脂质纳米粒子包含脂质,所述脂质包括可电离的脂质、结构脂质、磷脂和mRNA。本文描述的每种LNP可用作本文描述的mRNA的制剂。在一个实施方案中,脂质纳米粒子包含可电离的脂质、结构脂质、磷脂和mRNA。在一些实施方案中,LNP包含可电离脂质、PEG修饰的脂质、磷脂和结构脂质。在一些实施方案中,LNP具有约20%-60%可电离脂质:约5%-25%磷脂:约25%-55%结构脂质;以及约0.5%-15%PEG修饰的脂质的摩尔比。在一些实施方案中,所述LNP包含约50%可电离脂质、约1.5%PEG修饰的脂质、约38.5%结构脂质和约10%磷脂的摩尔比。在一些实施方案中,所述LNP包含约55%可电离脂质、约2.5%PEG脂质、约32.5%结构脂质和约10%磷脂的摩尔比。在一些实施方案中,可电离脂质是可电离的氨基或阳离子脂质,并且磷脂是中性脂质,并且结构脂质是胆固醇。在一些实施方案中,LNP具有50:38.5:10:1.5的可电离脂质:胆固醇:DSPC:PEG2000-DMG的摩尔比。

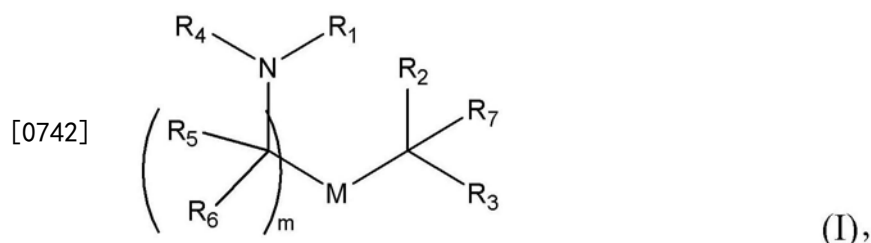
[0737] 可电离氨基脂质

[0738] 本公开提供了具有有利性质的药物组合物。例如,本文所述的脂质(例如具有式(I)、(IA)、(II)、(IIa)、(IIb)、(IIc)、(IId)、(IIE)、(III)、(IV)、(V)或(VI)中的任一者的那些)可有利地用于脂质纳米粒子组合物中,以用于将治疗剂和/或防治剂递送至哺乳动物细胞或器官。例如,本文所述的脂质具有很小的免疫原性或者没有免疫原性。例如,与参考脂质(例如,MC3、KC2或DLinDMA)相比,本文公开的脂质化合物具有较低的免疫原性。例如,与包含参考脂质(例如,MC3、KC2或DLinDMA)和相同治疗剂或防治剂的相应制剂相比,包含本文公开的脂质和治疗剂或防治剂的制剂具有增加的治疗指数。特别地,本申请提供了药物组合物,所述药物组合物包含:

[0739] (a) 包含编码一种或多种癌表位多肽的核苷酸序列的多核苷酸;以及

[0740] (b) 递送剂。

[0741] 在一些实施方案中,所述递送剂包含具有式(I)的脂质化合物



[0743] 其中,

[0744] R₁是选自由以下组成的组:C₅₋₃₀烷基、C₅₋₂₀烯基、-R*YR''、-YR''和-R''M'R' ;

[0745] R₂和R₃独立地选自由以下组成的组:H、C₁₋₁₄烷基、C₂₋₁₄烯基、-R*YR''、-YR''和-R*OR'',或者R₂和R₃与它们所连接的原子一起形成杂环或碳环;

[0746] R₄是选自由以下组成的组:C₃₋₆碳环、-(CH₂)_nQ、-(CH₂)_nCHQR、-CHQR、-CQ(R)₂以及未取代的C₁₋₆烷基,其中Q是选自碳环、杂环、-OR、-O(CH₂)_nN(R)₂、-C(O)OR、-OC(O)R、-CX₃、-CX₂H、-CXH₂、-CN、-N(R)₂、-C(O)N(R)₂、-N(R)C(O)R、-N(R)S(O)₂R、-N(R)C(O)N(R)₂、-N(R)C(S)N(R)₂、-N(R)R₈、-O(CH₂)_nOR、-N(R)C(=NR₉)N(R)₂、-N(R)C(=CHR₉)N(R)₂、-OC(O)N(R)₂、-N(R)C(O)OR、-N(OR)C(O)R、-N(OR)S(O)₂R、-N(OR)C(O)OR、-N(OR)C(O)N(R)₂、-N(OR)C(S)N(R)₂、-N(OR)C(=NR₉)N(R)₂、-N(OR)C(=CHR₉)N(R)₂、-C(=NR₉)N(R)₂、-C(=NR₉)R、-C(O)N

(R) OR以及 $-C(R)N(R)_2C(O)OR$,并且每个n独立地选自1、2、3、4和5;

[0747] 每个 R_5 独立地选自由以下组成的组: C_{1-3} 烷基、 C_{2-3} 烯基和H;

[0748] 每个 R_6 独立地选自由以下组成的组: C_{1-3} 烷基、 C_{2-3} 烯基和H;

[0749] M和 M' 独立地选自 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-C(O)N(R')$ 、 $-N(R')C(O)-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-C(S)S-$ 、 $-SC(S)-$ 、 $-CH(OH)-$ 、 $-P(O)(OR')O-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S-S-$ 、芳基以及杂芳基;

[0750] R_7 是选自由以下组成的组: C_{1-3} 烷基、 C_{2-3} 烯基和H;

[0751] R_8 是选自由以下组成的组: C_{3-6} 碳环和杂环;

[0752] R_9 是选自由以下组成的组:H、CN、 NO_2 、 C_{1-6} 烷基、 $-OR$ 、 $-S(O)_2R$ 、 $-S(O)_2N(R)_2$ 、 C_{2-6} 烯基、 C_{3-6} 碳环和杂环;

[0753] 每个R独立地选自由以下组成的组: C_{1-3} 烷基、 C_{2-3} 烯基和H;

[0754] 每个 R' 独立地选自由以下组成的组: C_{1-18} 烷基、 C_{2-18} 烯基、 $-R^*YR''$ 、 $-YR''$ 以及H;

[0755] 每个 R'' 独立地选自由以下组成的组: C_{3-14} 烷基和 C_{3-14} 烯基;

[0756] 每个 R^* 独立地选自由以下组成的组: C_{1-12} 烷基和 C_{2-12} 烯基;

[0757] 每个Y独立地是 C_{3-6} 碳环;

[0758] 每个X独立地选自由以下组成的组:F、Cl、Br和I;并且m是选自5、6、7、8、9、10、11、12和13,

[0759] 或其盐或立体异构体。

[0760] 在一些实施方案中,式(I)化合物的子集包括以下那些,其中

[0761] R_1 是选自由以下组成的组: C_{5-20} 烷基、 C_{5-20} 烯基、 $-R^*YR''$ 、 $-YR''$ 和 $-R''M'R'$;

[0762] R_2 和 R_3 独立地选自由以下组成的组:H、 C_{1-14} 烷基、 C_{2-14} 烯基、 $-R^*YR''$ 、 $-YR''$ 和 $-R^*OR''$,或者 R_2 和 R_3 与它们所连接的原子一起形成杂环或碳环;

[0763] R_4 是选自由以下组成的组: C_{3-6} 碳环、 $-(CH_2)_nQ$ 、 $-(CH_2)_nCHQR$ 、 $-CHQR$ 、 $-CQ(R)_2$ 以及未取代的 C_{1-6} 烷基,其中Q是选自碳环、杂环、 $-OR$ 、 $-O(CH_2)_nN(R)_2$ 、 $-C(O)OR$ 、 $-OC(O)R$ 、 $-CX_3$ 、 $-CX_2H$ 、 $-CXH_2$ 、 $-CN$ 、 $-N(R)_2$ 、 $-C(O)N(R)_2$ 、 $-N(R)C(O)R$ 、 $-N(R)S(O)_2R$ 、 $-N(R)C(O)N(R)_2$ 、 $-N(R)C(S)N(R)_2$ 以及 $-C(R)N(R)_2C(O)OR$,并且每个n独立地选自1、2、3、4和5;

[0764] 每个 R_5 独立地选自由以下组成的组: C_{1-3} 烷基、 C_{2-3} 烯基和H;

[0765] 每个 R_6 独立地选自由以下组成的组: C_{1-3} 烷基、 C_{2-3} 烯基和H;

[0766] M和 M' 独立地选自 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-C(O)N(R')$ 、 $-N(R')C(O)-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-C(S)S-$ 、 $-SC(S)-$ 、 $-CH(OH)-$ 、 $-P(O)(OR')O-$ 、 $-S(O)_2-$ 、芳基以及杂芳基;

[0767] R_7 是选自由以下组成的组: C_{1-3} 烷基、 C_{2-3} 烯基和H;

[0768] 每个R独立地选自由以下组成的组: C_{1-3} 烷基、 C_{2-3} 烯基和H;

[0769] 每个 R' 独立地选自由以下组成的组: C_{1-18} 烷基、 C_{2-18} 烯基、 $-R^*YR''$ 、 $-YR''$ 以及H;

[0770] 每个 R'' 独立地选自由以下组成的组: C_{3-14} 烷基和 C_{3-14} 烯基;

[0771] 每个 R^* 独立地选自由以下组成的组: C_{1-12} 烷基和 C_{2-12} 烯基;

[0772] 每个Y独立地是 C_{3-6} 碳环;

[0773] 每个X独立地选自由以下组成的组:F、Cl、Br和I;并且m是选自5、6、7、8、9、10、11、12和13,

[0774] 或其盐或立体异构体,其中烷基和烯基可以是直链的或支链的。

[0775] 在一些实施方案中,式(I)化合物的子集包括以下那些,其中当 R_4 是 $-(CH_2)_nQ$ 、

(CH₂)_nCHQR、-CHQR或-CQ(R)₂时,则(i)当n是1、2、3、4或5时,Q不是N(R)₂,或者(ii)当n是1或2时,Q不是5、6或7元杂环烷基。

[0776] 在一些实施方案中,式(I)化合物的另一子集包括以下那些,其中

[0777] R₁是选自由以下组成的组:C₅₋₃₀烷基、C₅₋₂₀烯基、-R*YR”、-YR”和-R”M’R’;

[0778] R₂和R₃独立地选自由以下组成的组:H、C₁₋₁₄烷基、C₂₋₁₄烯基、-R*YR”、-YR”和-R*OR”,或者R₂和R₃与它们所连接的原子一起形成杂环或碳环;

[0779] R₄是选自由以下组成的组:C₃₋₆碳环、-(CH₂)_nQ、-(CH₂)_nCHQR、-CHQR、-CQ(R)₂以及未取代的C₁₋₆烷基,其中Q是选自C₃₋₆碳环、具有一个或多个选自N、O和S的杂原子的5至14元杂芳基、-OR、-O(CH₂)_nN(R)₂、-C(O)OR、-OC(O)R、-CX₃、-CX₂H、-CXH₂、-CN、-C(O)N(R)₂、-N(R)C(O)R、-N(R)S(O)₂R、-N(R)C(O)N(R)₂、-N(R)C(S)N(R)₂、-CRN(R)₂C(O)OR、-N(R)R₈、-O(CH₂)_nOR、-N(R)C(=NR₉)N(R)₂、-N(R)C(=CHR₉)N(R)₂、-OC(O)N(R)₂、-N(R)C(O)OR、-N(OR)C(O)R、-N(OR)S(O)₂R、-N(OR)C(O)OR、-N(OR)C(O)N(R)₂、-N(OR)C(S)N(R)₂、-N(OR)C(=NR₉)N(R)₂、-N(OR)C(=CHR₉)N(R)₂、-C(=NR₉)N(R)₂、-C(=NR₉)R、-C(O)N(R)OR以及具有一个或多个选自N、O和S的杂原子的5至14元杂环烷基,其被一个或多个选自氧代(=O)、OH、氨基和C₁₋₃烷基的取代基取代,并且每个n独立地选自1、2、3、4和5;

[0780] 每个R₅独立地选自由以下组成的组:C₁₋₃烷基、C₂₋₃烯基和H;

[0781] 每个R₆独立地选自由以下组成的组:C₁₋₃烷基、C₂₋₃烯基和H;

[0782] M和M’独立地选自-C(O)O-、-OC(O)-、-C(O)N(R’)-、-N(R’)C(O)-、-C(O)-、-C(S)-、-C(S)S-、-SC(S)-、-CH(OH)-、-P(O)(OR’)O-、-S(O)₂-、-S-S-、芳基以及杂芳基;

[0783] R₇是选自由以下组成的组:C₁₋₃烷基、C₂₋₃烯基和H;

[0784] R₈是选自由以下组成的组:C₃₋₆碳环和杂环;

[0785] R₉是选自由以下组成的组:H、CN、NO₂、C₁₋₆烷基、-OR、-S(O)₂R、-S(O)₂N(R)₂、C₂₋₆烯基、C₃₋₆碳环和杂环;

[0786] 每个R独立地选自由以下组成的组:C₁₋₃烷基、C₂₋₃烯基和H;

[0787] 每个R’独立地选自由以下组成的组:C₁₋₁₈烷基、C₂₋₁₈烯基、-R*YR”、-YR”以及H;

[0788] 每个R”独立地选自由以下组成的组:C₃₋₁₄烷基和C₃₋₁₄烯基;

[0789] 每个R*独立地选自由以下组成的组:C₁₋₁₂烷基和C₂₋₁₂烯基;

[0790] 每个Y独立地是C₃₋₆碳环;

[0791] 每个X独立地选自由以下组成的组:F、Cl、Br和I;并且

[0792] m是选自5、6、7、8、9、10、11、12和13,

[0793] 或其盐或立体异构体。

[0794] 在一些实施方案中,式(I)化合物的另一子集包括以下那些,其中

[0795] R₁是选自由以下组成的组:C₅₋₃₀烷基、C₅₋₂₀烯基、-R*YR”、-YR”和-R”M’R’;

[0796] R₂和R₃独立地选自由以下组成的组:H、C₁₋₁₄烷基、C₂₋₁₄烯基、-R*YR”、-YR”和-R*OR”,或者R₂和R₃与它们所连接的原子一起形成杂环或碳环;

[0797] R₄是选自由以下组成的组:C₃₋₆碳环、-(CH₂)_nQ、-(CH₂)_nCHQR、-CHQR、-CQ(R)₂和未取代的C₁₋₆烷基,其中Q是选自C₃₋₆碳环、具有一个或多个选自N、O和S的杂原子的5至14元杂环、-OR、-O(CH₂)_nN(R)₂、-C(O)OR、-OC(O)R、-CX₃、-CX₂H、-CXH₂、-CN、-C(O)N(R)₂、-N(R)C(O)R、-N(R)S(O)₂R、-N(R)C(O)N(R)₂、-N(R)C(S)N(R)₂、-CRN(R)₂C(O)OR、-N(R)R₈、-O(CH₂)_nOR、-

N(R)C(=NR₉)N(R)₂、-N(R)C(=CHR₉)N(R)₂、-OC(O)N(R)₂、-N(R)C(O)OR、-N(OR)C(O)R、-N(OR)S(O)₂R、-N(OR)C(O)OR、-N(OR)C(O)N(R)₂、-N(OR)C(S)N(R)₂、-N(OR)C(=NR₉)N(R)₂、-N(OR)C(=CHR₉)N(R)₂、-C(=NR₉)R、-C(O)N(R)OR和-C(=NR₉)N(R)₂,并且每个n独立地选自1、2、3、4和5;并且当Q是5至14元杂环,且(i)R₄是-(CH₂)_nQ,其中n是1或2,或者(ii)R₄是-(CH₂)_nCHQR,其中n是1,或者(iii)R₄是-CHQR和-CQ(R)₂时,则Q是5至14元杂芳基或8至14元杂环烷基;

[0798] 每个R₅独立地选自由以下组成的组:C₁₋₃烷基、C₂₋₃烯基和H;

[0799] 每个R₆独立地选自由以下组成的组:C₁₋₃烷基、C₂₋₃烯基和H;

[0800] M和M'独立地选自-C(O)O-、-OC(O)-、-C(O)N(R')-、-N(R')C(O)-、-C(O)-、-C(S)-、-C(S)S-、-SC(S)-、-CH(OH)-、-P(O)(OR')O-、-S(O)₂-、-S-S-、芳基和杂芳基;

[0801] R₇是选自由以下组成的组:C₁₋₃烷基、C₂₋₃烯基和H;

[0802] R₈是选自由以下组成的组:C₃₋₆碳环和杂环;

[0803] R₉是选自由以下组成的组:H、CN、NO₂、C₁₋₆烷基、-OR、-S(O)₂R、-S(O)₂N(R)₂、C₂₋₆烯基、C₃₋₆碳环和杂环;

[0804] 每个R独立地选自由以下组成的组:C₁₋₃烷基、C₂₋₃烯基和H;

[0805] 每个R'独立地选自由以下组成的组:C₁₋₁₈烷基、C₂₋₁₈烯基、-R*YR''、-YR''和H;

[0806] 每个R''独立地选自由以下组成的组:C₃₋₁₄烷基和C₃₋₁₄烯基;

[0807] 每个R*独立地选自由以下组成的组:C₁₋₁₂烷基和C₂₋₁₂烯基;

[0808] 每个Y独立地是C₃₋₆碳环;

[0809] 每个X独立地选自由以下组成的组:F、Cl、Br和I;并且

[0810] m是选自5、6、7、8、9、10、11、12和13,

[0811] 或其盐或异构体。

[0812] 在一些实施方案中,式(I)化合物的另一子集包括以下那些,其中

[0813] R₁是选自由以下组成的组:C₅₋₃₀烷基、C₅₋₂₀烯基、-R*YR''、-YR''和-R''M'R';

[0814] R₂和R₃独立地选自由以下组成的组:H、C₁₋₁₄烷基、C₂₋₁₄烯基、-R*YR''、-YR''和-R*OR'',或者R₂和R₃与它们所连接的原子一起形成杂环或碳环;

[0815] R₄是选自由以下组成的组:C₃₋₆碳环、-(CH₂)_nQ、-(CH₂)_nCHQR、-CHQR、-CQ(R)₂以及未取代的C₁₋₆烷基,其中Q是选自C₃₋₆碳环、具有一个或多个选自N、O和S的杂原子的5至14元杂芳基、-OR、-O(CH₂)_nN(R)₂、-C(O)OR、-OC(O)R、-CX₃、-CX₂H、-CXH₂、-CN、-C(O)N(R)₂、-N(R)C(O)R、-N(R)S(O)₂R、-N(R)C(O)N(R)₂、-N(R)C(S)N(R)₂、-CRN(R)₂C(O)OR、-N(R)R₈、-O(CH₂)_nOR、-N(R)C(=NR₉)N(R)₂、-N(R)C(=CHR₉)N(R)₂、-OC(O)N(R)₂、-N(R)C(O)OR、-N(OR)C(O)R、-N(OR)S(O)₂R、-N(OR)C(O)OR、-N(OR)C(O)N(R)₂、-N(OR)C(S)N(R)₂、-N(OR)C(=NR₉)N(R)₂、-N(OR)C(=CHR₉)N(R)₂、-C(=NR₉)R、-C(O)N(R)OR和-C(=NR₉)N(R)₂以及具有一个或多个选自N、O和S的杂原子的5至14元杂环烷基,其被一个或多个选自氧代(=O)、OH、氨基和C₁₋₃烷基的取代基取代,并且每个n独立地选自1、2、3、4和5;

[0816] 每个R₅独立地选自由以下组成的组:C₁₋₃烷基、C₂₋₃烯基和H;

[0817] 每个R₆独立地选自由以下组成的组:C₁₋₃烷基、C₂₋₃烯基和H;

[0818] M和M'独立地选自-C(O)O-、-OC(O)-、-C(O)N(R')-、-N(R')C(O)-、-C(O)-、-C(S)-、-C(S)S-、-SC(S)-、-CH(OH)-、-P(O)(OR')O-、-S(O)₂-、芳基以及杂芳基;

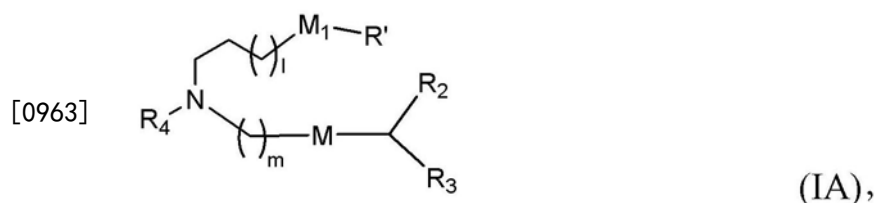
- [0819] R_7 是选自自由以下组成的组： C_{1-3} 烷基、 C_{2-3} 烯基和H；
- [0820] R_8 是选自自由以下组成的组： C_{3-6} 碳环和杂环；
- [0821] R_9 是选自自由以下组成的组：H、CN、 NO_2 、 C_{1-6} 烷基、 $-OR$ 、 $-S(O)_2R$ 、 $-S(O)_2N(R)_2$ 、 C_{2-6} 烯基、 C_{3-6} 碳环和杂环；
- [0822] 每个R独立地选自自由以下组成的组： C_{1-3} 烷基、 C_{2-3} 烯基和H；
- [0823] 每个 R' 独立地选自自由以下组成的组： C_{1-18} 烷基、 C_{2-18} 烯基、 $-R^*YR''$ 、 $-YR''$ 以及H；
- [0824] 每个 R'' 独立地选自自由以下组成的组： C_{3-14} 烷基和 C_{3-14} 烯基；
- [0825] 每个 R^* 独立地选自自由以下组成的组： C_{1-12} 烷基和 C_{2-12} 烯基；
- [0826] 每个Y独立地是 C_{3-6} 碳环；
- [0827] 每个X独立地选自自由以下组成的组：F、Cl、Br和I；并且
- [0828] m是选自5、6、7、8、9、10、11、12和13，
- [0829] 或其盐或异构体。
- [0830] 在一些实施方案中，式(I)化合物的另一子集包括以下那些，其中
- [0831] R_1 是选自自由以下组成的组： C_{5-20} 烷基、 C_{5-20} 烯基、 $-R^*YR''$ 、 $-YR''$ 和 $-R''M'R'$ ；
- [0832] R_2 和 R_3 独立地选自自由以下组成的组：H、 C_{1-14} 烷基、 C_{2-14} 烯基、 $-R^*YR''$ 、 $-YR''$ 和 $-R^*OR''$ ，或者 R_2 和 R_3 与它们所连接的原子一起形成杂环或碳环；
- [0833] R_4 是选自自由以下组成的组： C_{3-6} 碳环、 $-(CH_2)_nQ$ 、 $-(CH_2)_nCHQR$ 、 $-CHQR$ 、 $-CQ(R)_2$ 以及未取代的 C_{1-6} 烷基，其中Q是选自 C_{3-6} 碳环、具有一个或多个选自N、O和S的杂原子的5至14元杂环、 $-OR$ 、 $-O(CH_2)_nN(R)_2$ 、 $-C(O)OR$ 、 $-OC(O)R$ 、 $-CX_3$ 、 $-CX_2H$ 、 $-CXH_2$ 、 $-CN$ 、 $-C(O)N(R)_2$ 、 $-N(R)C(O)R$ 、 $-N(R)S(O)_2R$ 、 $-N(R)C(O)N(R)_2$ 、 $-N(R)C(S)N(R)_2$ 、 $-CRN(R)_2C(O)OR$ 、 $-N(R)R_8$ 、 $-O(CH_2)_nOR$ 、 $-N(R)C(=NR_9)N(R)_2$ 、 $-N(R)C(=CHR_9)N(R)_2$ 、 $-OC(O)N(R)_2$ 、 $-N(R)C(O)OR$ 、 $-N(OR)C(O)R$ 、 $-N(OR)S(O)_2R$ 、 $-N(OR)C(O)OR$ 、 $-N(OR)C(O)N(R)_2$ 、 $-N(OR)C(S)N(R)_2$ 、 $-N(OR)C(=NR_9)N(R)_2$ 、 $-N(OR)C(=CHR_9)N(R)_2$ 、 $-C(=NR_9)R$ 、 $-C(O)N(R)OR$ 、 $-N(R)_2$ 以及 $-C(=NR_9)N(R)_2$ ，并且每个n独立地选自1、2、3、4和5；并且当Q是5至14元杂环且(i) R_4 是 $-(CH_2)_nQ$ ，其中n是1或2，或者(ii) R_4 是 $-(CH_2)_nCHQR$ ，其中n是1，或者(iii) R_4 是 $-CHQR$ 和 $-CQ(R)_2$ 时，则Q是5至14元杂芳基或8至14元杂环烷基；
- [0834] 每个 R_5 独立地选自自由以下组成的组： C_{1-3} 烷基、 C_{2-3} 烯基和H；
- [0835] 每个 R_6 独立地选自自由以下组成的组： C_{1-3} 烷基、 C_{2-3} 烯基和H；
- [0836] M和 M' 独立地选自 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-C(O)N(R')$ 、 $-N(R')C(O)-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-C(S)S-$ 、 $-SC(S)-$ 、 $-CH(OH)-$ 、 $-P(O)(OR')O-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S-S-$ 、芳基以及杂芳基；
- [0837] R_7 是选自自由以下组成的组： C_{1-3} 烷基、 C_{2-3} 烯基和H；
- [0838] R_8 是选自自由以下组成的组： C_{3-6} 碳环和杂环；
- [0839] R_9 是选自自由以下组成的组：H、CN、 NO_2 、 C_{1-6} 烷基、 $-OR$ 、 $-S(O)_2R$ 、 $-S(O)_2N(R)_2$ 、 C_{2-6} 烯基、 C_{3-6} 碳环和杂环；
- [0840] 每个R独立地选自自由以下组成的组： C_{1-3} 烷基、 C_{2-3} 烯基和H；
- [0841] 每个 R' 独立地选自自由以下组成的组： C_{1-18} 烷基、 C_{2-18} 烯基、 $-R^*YR''$ 、 $-YR$ 、 $-YR''$ 以及H；
- [0842] 每个 R'' 独立地选自自由以下组成的组： C_{3-14} 烷基和 C_{3-14} 烯基；
- [0843] 每个 R^* 独立地选自自由以下组成的组： C_{1-12} 烷基、 C_{1-12} 烯基和 C_{2-12} 烯基；
- [0844] 每个Y独立地是 C_{3-6} 碳环；

- [0845] 每个X独立地选自由以下组成的组:F、Cl、Br和I;并且
- [0846] m是选自5、6、7、8、9、10、11、12和13,
- [0847] 或其盐或立体异构体。
- [0848] 在另一个实施方案中,式(I)化合物的另一子集包括以下那些,其中
- [0849] R_1 是选自由以下组成的组: C_{5-20} 烷基、 C_{5-20} 烯基、 $-R^*YR''$ 、 $-YR''$ 和 $-R''M'R'$;
- [0850] R_2 和 R_3 独立地选自由以下组成的组:H、 C_{1-14} 烷基、 C_{2-14} 烯基、 $-R^*YR''$ 、 $-YR''$ 和 $-R^*OR''$,或者 R_2 和 R_3 与它们所连接的原子一起形成杂环或碳环;
- [0851] R_4 是选自由以下组成的组: C_{3-6} 碳环、 $-(CH_2)_nQ$ 、 $-(CH_2)_nCHQR$ 、 $-CHQR$ 、 $-CQ(R)_2$ 以及未取代的 C_{1-6} 烷基,其中Q是选自 $-N(R)_2$ 、 C_{3-6} 碳环、具有一个或多个选自N、O和S的杂原子的5至14元杂环、 $-OR$ 、 $-O(CH_2)_nN(R)_2$ 、 $-C(O)OR$ 、 $-OC(O)R$ 、 $-CX_3$ 、 $-CX_2H$ 、 $-CXH_2$ 、 $-CN$ 、 $-C(O)N(R)_2$ 、 $-N(R)C(O)R$ 、 $-N(R)S(O)_2R$ 、 $-N(R)C(O)N(R)_2$ 、 $-N(R)C(S)N(R)_2$ 、 $-CRN(R)_2C(O)OR$,并且每个n独立地选自1、2、3、4和5;并且当Q是5至14元杂环且(i) R_4 是 $-(CH_2)_nQ$,其中n是1或2,或者(ii) R_4 是 $-(CH_2)_nCHQR$,其中n是1,或者(iii) R_4 是 $-CHQR$ 和 $-CQ(R)_2$ 时,则Q是5至14元杂芳基或8至14元杂环烷基;
- [0852] 每个 R_5 独立地选自由以下组成的组: C_{1-3} 烷基、 C_{2-3} 烯基和H;
- [0853] 每个 R_6 独立地选自由以下组成的组: C_{1-3} 烷基、 C_{2-3} 烯基和H;
- [0854] M和 M' 独立地选自 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-C(O)N(R')$ 、 $-N(R')C(O)-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-C(S)S-$ 、 $-SC(S)-$ 、 $-CH(OH)-$ 、 $-P(O)(OR')O-$ 、 $-S(O)_2-$ 、芳基以及杂芳基;
- [0855] R_7 是选自由以下组成的组: C_{1-3} 烷基、 C_{2-3} 烯基和H;
- [0856] 每个R独立地选自由以下组成的组: C_{1-3} 烷基、 C_{2-3} 烯基和H;
- [0857] 每个 R' 独立地选自由以下组成的组: C_{1-18} 烷基、 C_{2-18} 烯基、 $-R^*YR''$ 、 $-YR''$ 以及H;
- [0858] 每个 R'' 独立地选自由以下组成的组: C_{3-14} 烷基和 C_{3-14} 烯基;
- [0859] 每个 R^* 独立地选自由以下组成的组: C_{1-12} 烷基和 C_{2-12} 烯基;
- [0860] 每个Y独立地是 C_{3-6} 碳环;
- [0861] 每个X独立地选自由以下组成的组:F、Cl、Br和I;并且
- [0862] m是选自5、6、7、8、9、10、11、12和13,
- [0863] 或其盐或立体异构体。
- [0864] 在一些实施方案中,式(I)化合物的另一子集包括以下那些,其中
- [0865] R_1 是选自由以下组成的组: C_{5-30} 烷基、 C_{5-20} 烯基、 $-R^*YR''$ 、 $-YR''$ 和 $-R''M'R'$;
- [0866] R_2 和 R_3 独立地选自由以下组成的组:H、 C_{1-14} 烷基、 C_{2-14} 烯基、 $-R^*YR''$ 、 $-YR''$ 和 $-R^*OR''$,或者 R_2 和 R_3 与它们所连接的原子一起形成杂环或碳环;
- [0867] R_4 是选自由以下组成的组: C_{3-6} 碳环、 $-(CH_2)_nQ$ 、 $-(CH_2)_nCHQR$ 、 $CHQR$ 、 $-CQ(R)_2$ 以及未取代的 C_{1-6} 烷基,其中Q是选自 C_{3-6} 碳环、具有一个或多个选自N、O和S的杂原子的5-14元杂芳基、 $-OR$ 、 $-O(CH_2)_nN(R)_2$ 、 $-C(O)OR$ 、 $-OC(O)R$ 、 $-CX_3$ 、 $-CX_2H$ 、 $-CXH_2$ 、 $-CN$ 、 $-C(O)N(R)_2$ 、 $-N(R)C(O)R$ 、 $-N(R)S(O)_2R$ 、 $-N(R)C(O)N(R)_2$ 、 $-N(R)C(S)N(R)_2$ 、 $-CRN(R)_2C(O)OR$ 、 $-N(R)R_8$ 、 $-O(CH_2)_nOR$ 、 $-N(R)C(=NR_9)N(R)_2$ 、 $-N(R)C(=CHR_9)N(R)_2$ 、 $-OC(O)N(R)_2$ 、 $-N(R)C(O)OR$ 、 $-N(OR)C(O)R$ 、 $-N(OR)S(O)_2R$ 、 $-N(OR)C(O)OR$ 、 $-N(OR)C(O)N(R)_2$ 、 $-N(OR)C(S)N(R)_2$ 、 $-N(OR)C(=NR_9)N(R)_2$ 、 $-N(OR)C(=CHR_9)N(R)_2$ 、 $-C(=NR_9)R$ 、 $-C(O)N(R)OR$ 以及 $-C(=NR_9)N(R)_2$,并且每个n独立地选自1、2、3、4和5;

- [0868] 每个R₅独立地选自自由以下组成的组：C₁₋₃烷基、C₂₋₃烯基和H；
- [0869] 每个R₆独立地选自自由以下组成的组：C₁₋₃烷基、C₂₋₃烯基和H；
- [0870] M和M'独立地选自-C(O)O-、-OC(O)-、-C(O)N(R')-、-N(R')C(O)-、-C(O)-、-C(S)-、-C(S)S-、-SC(S)-、-CH(OH)-、-P(O)(OR')O-、-S(O)₂-、-S-S-、芳基以及杂芳基；
- [0871] R₇是选自自由以下组成的组：C₁₋₃烷基、C₂₋₃烯基和H；
- [0872] R₈是选自自由以下组成的组：C₃₋₆碳环和杂环；
- [0873] R₉是选自自由以下组成的组：H、CN、NO₂、C₁₋₆烷基、-OR、-S(O)₂R、-S(O)₂N(R)₂、C₂₋₆烯基、C₃₋₆碳环和杂环；
- [0874] 每个R独立地选自自由以下组成的组：C₁₋₃烷基、C₂₋₃烯基和H；
- [0875] 每个R'独立地选自自由以下组成的组：C₁₋₁₈烷基、C₂₋₁₈烯基、-R*YR''、-YR''以及H；
- [0876] 每个R''独立地选自自由以下组成的组：C₃₋₁₄烷基和C₃₋₁₄烯基；
- [0877] 每个R*独立地选自自由以下组成的组：C₁₋₁₂烷基和C₂₋₁₂烯基；
- [0878] 每个Y独立地是C₃₋₆碳环；
- [0879] 每个X独立地选自自由以下组成的组：F、Cl、Br和I；并且
- [0880] m是选自5、6、7、8、9、10、11、12和13，
- [0881] 或其盐或立体异构体。
- [0882] 在一些实施方案中，式(I)化合物的另一子集包括以下那些，其中
- [0883] R₁是选自自由以下组成的组：C₅₋₂₀烷基、C₅₋₂₀烯基、-R*YR''、-YR''和-R''M'R'；
- [0884] R₂和R₃独立地选自自由以下组成的组：H、C₁₋₁₄烷基、C₂₋₁₄烯基、-R*YR''、-YR''和-R*OR''，或者R₂和R₃与它们所连接的原子一起形成杂环或碳环；
- [0885] R₄是选自自由以下组成的组：C₃₋₆碳环、-(CH₂)_nQ、-(CH₂)_nCHQR、-CHQR、-CQ(R)₂以及未取代的C₁₋₆烷基，其中Q是选自C₃₋₆碳环、具有一个或多个选自N、O和S的杂原子的5至14元杂芳基、-OR、-O(CH₂)_nN(R)₂、-C(O)OR、-OC(O)R、-CX₃、-CX₂H、-CXH₂、-CN、-C(O)N(R)₂、-N(R)C(O)R、-N(R)S(O)₂R、-N(R)C(O)N(R)₂、-N(R)C(S)N(R)₂、-CRN(R)₂C(O)OR，并且每个n独立地选自1、2、3、4和5；
- [0886] 每个R₅独立地选自自由以下组成的组：C₁₋₃烷基、C₂₋₃烯基和H；
- [0887] 每个R₆独立地选自自由以下组成的组：C₁₋₃烷基、C₂₋₃烯基和H；
- [0888] M和M'独立地选自-C(O)O-、-OC(O)-、-C(O)N(R')-、-N(R')C(O)-、-C(O)-、-C(S)-、-C(S)S-、-SC(S)-、-CH(OH)-、-P(O)(OR')O-、-S(O)₂-、芳基以及杂芳基；
- [0889] R₇是选自自由以下组成的组：C₁₋₃烷基、C₂₋₃烯基和H；
- [0890] 每个R独立地选自自由以下组成的组：C₁₋₃烷基、C₂₋₃烯基和H；
- [0891] 每个R'独立地选自自由以下组成的组：C₁₋₁₈烷基、C₂₋₁₈烯基、-R*YR''、-YR''以及H；
- [0892] 每个R''独立地选自自由以下组成的组：C₃₋₁₄烷基和C₃₋₁₄烯基；
- [0893] 每个R*独立地选自自由以下组成的组：C₁₋₁₂烷基和C₂₋₁₂烯基；
- [0894] 每个Y独立地是C₃₋₆碳环；
- [0895] 每个X独立地选自自由以下组成的组：F、Cl、Br和I；并且
- [0896] m是选自5、6、7、8、9、10、11、12和13，
- [0897] 或其盐或立体异构体。
- [0898] 在另一个实施方案中，式(I)化合物的另一子集包括以下那些，其中

- [0899] R_1 是选自自由以下组成的组： C_{5-30} 烷基、 C_{5-20} 烯基、 $-R^*YR''$ 、 $-YR''$ 和 $-R''M'R'$ ；
- [0900] R_2 和 R_3 独立地选自自由以下组成的组： H 、 C_{2-14} 烷基、 C_{2-14} 烯基、 $-R^*YR''$ 、 $-YR''$ 和 $-R^*OR''$ ，或者 R_2 和 R_3 与它们所连接的原子一起形成杂环或碳环；
- [0901] R_4 是 $-(CH_2)_nQ$ 或 $-(CH_2)_nCHQR$ ，其中 Q 是 $-N(R)_2$ ，并且 n 是选自3、4和5；
- [0902] 每个 R_5 独立地选自自由以下组成的组： C_{1-3} 烷基、 C_{2-3} 烯基和 H ；
- [0903] 每个 R_6 独立地选自自由以下组成的组： C_{1-3} 烷基、 C_{2-3} 烯基和 H ；
- [0904] M 和 M' 独立地选自 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-C(O)N(R')$ 、 $-N(R')C(O)-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-C(S)S-$ 、 $-SC(S)-$ 、 $-CH(OH)-$ 、 $-P(O)(OR')O-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S-S-$ 、芳基以及杂芳基；
- [0905] R_7 是选自自由以下组成的组： C_{1-3} 烷基、 C_{2-3} 烯基和 H ；
- [0906] 每个 R 独立地选自自由以下组成的组： C_{1-3} 烷基、 C_{2-3} 烯基和 H ；
- [0907] 每个 R' 独立地选自自由以下组成的组： C_{1-18} 烷基、 C_{2-18} 烯基、 R^*YR'' 、 $-YR''$ 以及 H ；
- [0908] 每个 R'' 独立地选自自由以下组成的组： C_{3-14} 烷基和 C_{3-14} 烯基；
- [0909] 每个 R^* 独立地选自自由以下组成的组： C_{1-12} 烷基和 C_{1-12} 烯基；
- [0910] 每个 Y 独立地是 C_{3-6} 碳环；
- [0911] 每个 X 独立地选自自由以下组成的组： F 、 Cl 、 Br 和 I ；并且
- [0912] m 是选自5、6、7、8、9、10、11、12和13，
- [0913] 或其盐或立体异构体。
- [0914] 在另一个实施方案中，式(I)化合物的另一子集包括以下那些，其中
- [0915] R_1 是选自自由以下组成的组： C_{5-20} 烷基、 C_{5-20} 烯基、 $-R^*YR''$ 、 $-YR''$ 和 $-R''M'R'$ ；
- [0916] R_2 和 R_3 独立地选自自由以下组成的组： H 、 C_{2-14} 烷基、 C_{2-14} 烯基、 $-R^*YR''$ 、 $-YR''$ 和 $-R^*OR''$ ，或者 R_2 和 R_3 与它们所连接的原子一起形成杂环或碳环；
- [0917] R_4 是 $-(CH_2)_nQ$ 或 $-(CH_2)_nCHQR$ ，其中 Q 是 $-N(R)_2$ ，并且 n 是选自3、4和5；
- [0918] 每个 R_5 独立地选自自由以下组成的组： C_{1-3} 烷基、 C_{2-3} 烯基和 H ；
- [0919] 每个 R_6 独立地选自自由以下组成的组： C_{1-3} 烷基、 C_{2-3} 烯基和 H ；
- [0920] M 和 M' 独立地选自 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-C(O)N(R')$ 、 $-N(R')C(O)-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-C(S)S-$ 、 $-SC(S)-$ 、 $-CH(OH)-$ 、 $-P(O)(OR')O-$ 、 $-S(O)_2-$ 、芳基以及杂芳基；
- [0921] R_7 是选自自由以下组成的组： C_{1-3} 烷基、 C_{2-3} 烯基和 H ；
- [0922] 每个 R 独立地选自自由以下组成的组： C_{1-3} 烷基、 C_{2-3} 烯基和 H ；
- [0923] 每个 R' 独立地选自自由以下组成的组： C_{1-18} 烷基、 C_{2-18} 烯基、 $-R^*YR''$ 、 $-YR''$ 以及 H ；
- [0924] 每个 R'' 独立地选自自由以下组成的组： C_{3-14} 烷基和 C_{3-14} 烯基；
- [0925] 每个 R^* 独立地选自自由以下组成的组： C_{1-12} 烷基和 C_{1-12} 烯基；
- [0926] 每个 Y 独立地是 C_{3-6} 碳环；
- [0927] 每个 X 独立地选自自由以下组成的组： F 、 Cl 、 Br 和 I ；并且
- [0928] m 是选自5、6、7、8、9、10、11、12和13，
- [0929] 或其盐或立体异构体。
- [0930] 在其他实施方案中，式(I)化合物的另一子集包括以下那些，其中
- [0931] R_1 是选自自由以下组成的组： C_{5-30} 烷基、 C_{5-20} 烯基、 $-R^*YR''$ 、 $-YR''$ 和 $-R''M'R'$ ；
- [0932] R_2 和 R_3 独立地选自自由以下组成的组： C_{1-14} 烷基、 C_{2-14} 烯基、 R^*YR'' 、 $-YR''$ 和 $-R^*OR''$ ，或者 R_2 和 R_3 与它们所连接的原子一起形成杂环或碳环；

- [0933] R_4 是选自由以下组成的组： $-(CH_2)_nQ$ 、 $-(CH_2)_nCHQR$ 、 $-CHQR$ 和 $-CQ(R)_2$ ，其中 Q 是 $-N(R)_2$ ，并且 n 是选自1、2、3、4和5；
- [0934] 每个 R_5 独立地选自由以下组成的组： C_{1-3} 烷基、 C_{2-3} 烯基和H；
- [0935] 每个 R_6 独立地选自由以下组成的组： C_{1-3} 烷基、 C_{2-3} 烯基和H；
- [0936] M 和 M' 独立地选自 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-C(O)N(R')$ 、 $-N(R')C(O)-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-C(S)S-$ 、 $-SC(S)-$ 、 $-CH(OH)-$ 、 $-P(O)(OR')O-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S-S-$ 、芳基以及杂芳基；
- [0937] R_7 是选自由以下组成的组： C_{1-3} 烷基、 C_{2-3} 烯基和H；
- [0938] 每个 R 独立地选自由以下组成的组： C_{1-3} 烷基、 C_{2-3} 烯基和H；
- [0939] 每个 R' 独立地选自由以下组成的组： C_{1-18} 烷基、 C_{2-18} 烯基、 $-R^*YR''$ 、 $-YR''$ 以及H；
- [0940] 每个 R'' 独立地选自由以下组成的组： C_{3-14} 烷基和 C_{3-14} 烯基；
- [0941] 每个 R^* 独立地选自由以下组成的组： C_{1-12} 烷基和 C_{1-12} 烯基；
- [0942] 每个 Y 独立地是 C_{3-6} 碳环；
- [0943] 每个 X 独立地选自由以下组成的组：F、Cl、Br和I；并且
- [0944] m 是选自5、6、7、8、9、10、11、12和13，
- [0945] 或其盐或立体异构体。
- [0946] 在其他实施方案中，式(I)化合物的另一子集包括以下那些，其中
- [0947] R_1 是选自由以下组成的组： C_{5-20} 烷基、 C_{5-20} 烯基、 $-R^*YR''$ 、 $-YR''$ 和 $-R''M'R'$ ；
- [0948] R_2 和 R_3 独立地选自由以下组成的组： C_{1-14} 烷基、 C_{2-14} 烯基、 $-R^*YR''$ 、 $-YR''$ 和 $-R^*OR''$ ，或者 R_2 和 R_3 与它们所连接的原子一起形成杂环或碳环；
- [0949] R_4 是选自由以下组成的组： $-(CH_2)_nQ$ 、 $-(CH_2)_nCHQR$ 、 $-CHQR$ 和 $-CQ(R)_2$ ，其中 Q 是 $-N(R)_2$ ，并且 n 是选自1、2、3、4和5；
- [0950] 每个 R_5 独立地选自由以下组成的组： C_{1-3} 烷基、 C_{2-3} 烯基和H；
- [0951] 每个 R_6 独立地选自由以下组成的组： C_{1-3} 烷基、 C_{2-3} 烯基和H；
- [0952] M 和 M' 独立地选自 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-C(O)N(R')$ 、 $-N(R')C(O)-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-C(S)S-$ 、 $-SC(S)-$ 、 $-CH(OH)-$ 、 $-P(O)(OR')O-$ 、 $-S(O)_2-$ 、芳基以及杂芳基；
- [0953] R_7 是选自由以下组成的组： C_{1-3} 烷基、 C_{2-3} 烯基和H；
- [0954] 每个 R 独立地选自由以下组成的组： C_{1-3} 烷基、 C_{2-3} 烯基和H；
- [0955] 每个 R' 独立地选自由以下组成的组： C_{1-18} 烷基、 C_{2-18} 烯基、 $-R^*YR''$ 、 $-YR''$ 以及H；
- [0956] 每个 R'' 独立地选自由以下组成的组： C_{3-14} 烷基和 C_{3-14} 烯基；
- [0957] 每个 R^* 独立地选自由以下组成的组： C_{1-12} 烷基和 C_{1-12} 烯基；
- [0958] 每个 Y 独立地是 C_{3-6} 碳环；
- [0959] 每个 X 独立地选自由以下组成的组：F、Cl、Br和I；并且
- [0960] m 是选自5、6、7、8、9、10、11、12和13，
- [0961] 或其盐或立体异构体。
- [0962] 在某些实施方案中，式(I)化合物的子集包括式(IA)的那些：



[0964] 或其盐或立体异构体,其中 l 是选自1、2、3、4和5; m 是选自5、6、7、8和9; M_1 是键或 M' ; R_4 是未取代的 C_{1-3} 烷基或 $-(CH_2)_nQ$,其中 Q 是OH、 $-NHC(S)N(R)_2$ 、 $-NHC(O)N(R)_2$ 、 $-N(R)C(O)R$ 、 $-N(R)S(O)_2R$ 、 $-N(R)R_8$ 、 $-NHC(=NR_9)N(R)_2$ 、 $-NHC(=CHR_9)N(R)_2$ 、 $-OC(O)N(R)_2$ 、 $-N(R)C(O)OR$ 、杂芳基或杂环烷基; M 和 M' 独立地选自 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-C(O)N(R')$ 、 $-P(O)(OR')O-$ 、 $-S-S-$ 、芳基以及杂芳基;并且

[0965] R_2 和 R_3 独立地选自由以下组成的组:H、 C_{1-14} 烷基和 C_{2-14} 烯基。

[0966] 在一些实施方案中,式(I)化合物的子集包括式(IA)、式(II)的那些,或其盐或立体异构体,

[0967] 其中

[0968] l 是选自1、2、3、4和5; m 是选自5、6、7、8和9;

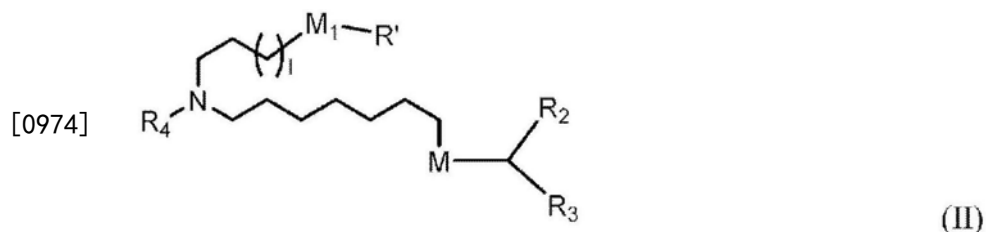
[0969] M_1 是键或 M' ;

[0970] R_4 是未取代的 C_{1-3} 烷基或 $-(CH_2)_nQ$,其中 Q 是OH、 $-NHC(S)N(R)_2$ 或 $-NHC(O)N(R)_2$;

[0971] M 和 M' 独立地选自 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-C(O)N(R')$ 、 $-P(O)(OR')O-$ 、芳基以及杂芳基;并且

[0972] R_2 和 R_3 独立地选自由以下组成的组:H、 C_{1-14} 烷基和 C_{2-14} 烯基。

[0973] 在某些实施方案中,式(I)化合物的子集包括式(II)的那些:



[0975] 或其盐或立体异构体,其中 l 是选自1、2、3、4和5; M_1 是键或 M' ; R_4 是未取代的 C_{1-3} 烷基或 $-(CH_2)_nQ$,其中 n 是2、3或4,并且 Q 是OH、 $-NHC(S)N(R)_2$ 、 $-NHC(O)N(R)_2$ 、 $-N(R)C(O)R$ 、 $-N(R)S(O)_2R$ 、 $-N(R)R_8$ 、 $-NHC(=NR_9)N(R)_2$ 、 $-NHC(=CHR_9)N(R)_2$ 、 $-OC(O)N(R)_2$ 、 $-N(R)C(O)OR$ 、杂芳基或杂环烷基; M 和 M' 独立地选自 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-C(O)N(R')$ 、 $-P(O)(OR')O-$ 、 $-S-S-$ 、芳基以及杂芳基;并且

[0976] R_2 和 R_3 独立地选自由以下组成的组:H、 C_{1-14} 烷基和 C_{2-14} 烯基。

[0977] 在一些实施方案中,式(I)化合物的子集包括式(II)的那些,或其盐或立体异构体,其中

[0978] l 是选自1、2、3、4和5;

[0979] M_1 是键或 M' ;

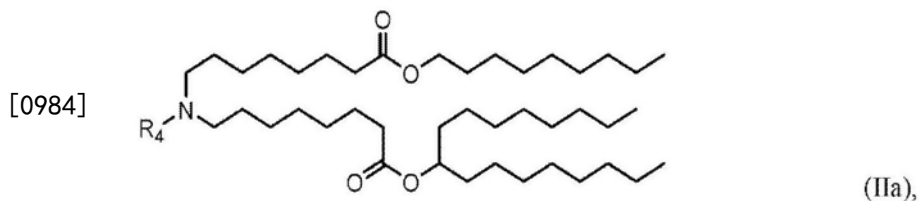
[0980] R_4 是未取代的 C_{1-3} 烷基或 $-(CH_2)_nQ$,其中 n 是2、3或4,并且 Q 是OH、 $-NHC(S)N(R)_2$ 或 $-NHC(O)N(R)_2$;

[0981] M 和 M' 独立地选自 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-C(O)N(R')$ 、 $-P(O)(OR')O-$ 、芳基以及杂芳基

基;并且

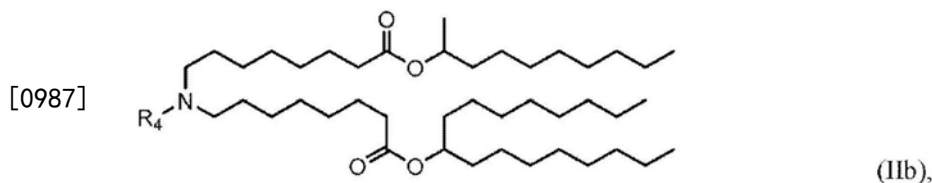
[0982] R_2 和 R_3 独立地选自由以下组成的组:H、 C_{1-14} 烷基和 C_{2-14} 烯基。

[0983] 在一些实施方案中,式(I)化合物具有式(IIa),



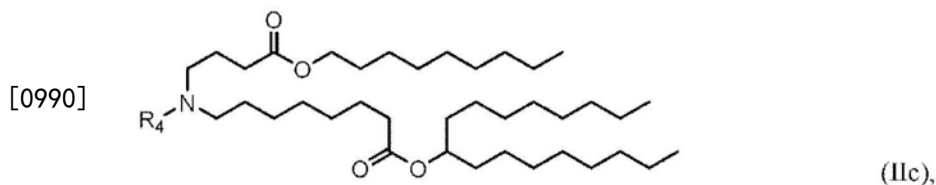
[0985] 或其盐,其中 R_4 如上文所描述。

[0986] 在一些实施方案中,式(I)化合物具有式(IIb),



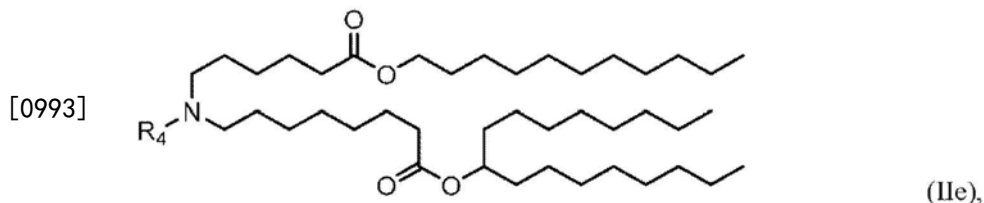
[0988] 或其盐,其中 R_4 如上文所描述。

[0989] 在一些实施方案中,式(I)化合物具有式(IIc),



[0991] 或其盐,其中 R_4 如上文所描述。

[0992] 在一些实施方案中,式(I)化合物具有式(IIe),

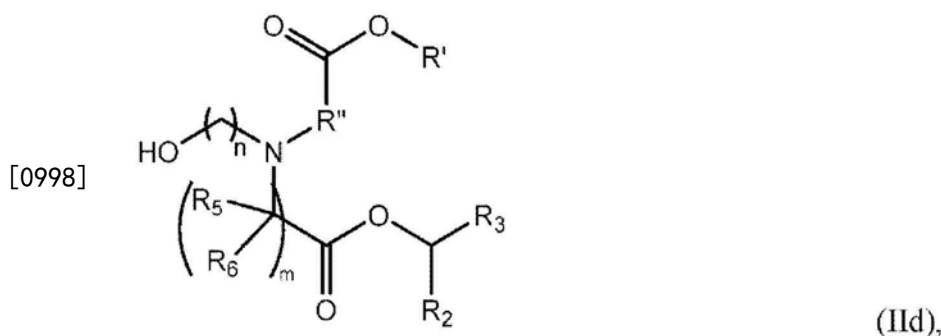


[0994] 或其盐,其中 R_4 如上文所描述。

[0995] 在一些实施方案中,式(IIa)、(IIb)、(IIc)或(IIe)的化合物包含 R_4 ,其是选自 $-(CH_2)_nQ$ 和 $-(CH_2)_nCHQR$,其中Q、R和n如上文所定义。

[0996] 在一些实施方案中,Q是选自由以下组成的组: $-OR$ 、 $-OH$ 、 $-O(CH_2)_nN(R)_2$ 、 $-OC(O)R$ 、 $-CX_3$ 、 $-CN$ 、 $-N(R)C(O)R$ 、 $-N(H)C(O)R$ 、 $-N(R)S(O)_2R$ 、 $-N(H)S(O)_2R$ 、 $-N(R)C(O)N(R)_2$ 、 $-N(H)C(O)N(R)_2$ 、 $-N(H)C(O)N(H)(R)$ 、 $-N(R)C(S)N(R)_2$ 、 $-N(H)C(S)N(R)_2$ 、 $-N(H)C(S)N(H)(R)$ 以及杂环,其中R如上文所定义。在一些方面,n是1或2。在一些实施方案中,Q是 OH 、 $-NHC(S)N(R)_2$ 或 $-NHC(O)N(R)_2$ 。

[0997] 在一些实施方案中,式(I)化合物具有式(IIId),



[0999] 或其盐或异构体,其中n是2、3或4;并且m、R'、R''以及R₂至R₆如本文所述。例如,R₂和R₃各自可独立地选自以下组成的组:C₅₋₁₄烷基和C₅₋₁₄烯基,n是选自2、3和4,并且R'、R''、R₅、R₆和m如上文所定义。

[1000] 在式(IIId)化合物的一些方面,R₂是C₈烷基。在式(IIId)化合物的一些方面,R₃是C₅₋₉烷基。在式(IIId)化合物的一些方面,m是5、7或9。在式(IIId)化合物的一些方面,每个R₅是H。在式(IIId)化合物的一些方面,每个R₆是H。

[1001] 在另一方面,本申请提供了一种脂质组合物(例如,脂质纳米粒子(LNP)),其包含:(1)具有式(I)的化合物;(2)任选的辅助脂质(例如磷脂);(3)任选的结构脂质(例如固醇);以及(4)任选的脂质缀合物(例如PEG-脂质)。在示例性实施方案中,所述脂质组合物(例如,LNP)还包含编码一种或多种癌表位多肽的多核苷酸,例如包封在其中的多核苷酸。

[1002] 如本文所用,术语“烷基(alkyl)”或“烷基基团(alkyl group)”是指包含一个或多个碳原子(例如,一、二、三、四、五、六、七、八、九、十、十一、十二、十三、十四、十五、十六、十七、十八、十九、二十个或更多个碳原子)的直链或支链饱和烃。

[1003] 符号“C₁₋₁₄烷基”是指包含1-14个碳原子的直链或支链饱和烃。烷基可任选地被取代。

[1004] 如本文所用,术语“烯基(alkenyl)”或“烯基基团(alkenyl group)”是指包含两个或更多个碳原子(例如,二、三、四、五、六、七、八、九、十、十一、十二、十三、十四、十五、十六、十七、十八、十九、二十个或更多个碳原子)和至少一个双键的直链或支链烃。

[1005] 符号“C₂₋₁₄烯基”是指包含2-14个碳原子和至少一个双键的直链或支链烃。烯基可包含一个、两个、三个、四个或更多个双键。例如,C₁₈烯基可包含一个或多个双键。包含两个双键的C₁₈烯基可以是亚油基。烯基可任选地被取代。

[1006] 如本文所用,术语“碳环”或“碳环基团”是指包含碳原子的一个或多个环的单环或多环系统。环可以是三、四、五、六、七、八、九、十、十一、十二、十三、十四或十五元环。

[1007] 符号“C₃₋₆碳环”是指包含具有3-6个碳原子的单环的碳环。碳环可包含一个或多个双键,并且可以是芳族的(例如芳基)。碳环的实例包括环丙基、环戊基、环己基、苯基、萘基和1,2-二氢萘基。碳环可被任选地取代。

[1008] 如本文所用,术语“杂环”或“杂环基团”是指包含一个或多个环的单环或多环系统,其中至少一个环包含至少一个杂原子。杂原子可以是例如氮、氧或硫原子。环可以是三、四、五、六、七、八、九、十、十一或十二元环。杂环可包含一个或多个双键,并且可以是芳族的(例如,杂芳基)。杂环的实例包括咪唑基、咪唑烷基、噁唑基、噁唑烷基、噻唑基、噻唑烷基、吡唑烷基、吡唑基、异噁唑烷基、异噁唑基、异噻唑烷基、异噻唑基、吗啉基、吡咯基、吡咯烷基、呋喃基、四氢呋喃基、苯硫基、吡啶基、哌啶基、喹啉基和异喹啉基。杂环可任选地被取

代。

[1009] 如本文所用,“可生物降解的基团”是可促进脂质在受试者中更快代谢的基团。可生物降解的基团可以是但不限于 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-C(O)N(R')-$ 、 $-N(R')C(O)-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-C(S)S-$ 、 $-SC(S)-$ 、 $-CH(OH)-$ 、 $-P(O)(OR')O-$ 、 $-S(O)_2-$ 、芳基和杂芳基。

[1010] 如本文所用,“芳基”是包含一个或多个芳环的碳环基团。芳基的实例包括苯基和萘基。

[1011] 如本文所用,“杂芳基”是包含一个或多个芳环的杂环基团。杂芳基的实例包括吡咯基、呋喃基、苯硫基、咪唑基、噁唑基和噻唑基。芳基和杂芳基均可任选地被取代。例如,M和M'可选自由任选取代的苯基、噁唑和噻唑组成的非限制性组。在本文的式中,M和M'可独立地选自上述可生物降解基团的列表。

[1012] 除非另有说明,否则烷基、烯基和环基(例如,碳环基和杂环基)可任选地被取代。任选的取代基可选自由以下组成的组:但不限于卤素原子(例如氯、溴、氟或碘基团)、羧酸(例如 $-C(O)OH$)、醇(例如,羟基、 $-OH$)、酯(例如, $-C(O)OR$ 或 $-OC(O)R$)、醛(例如, $-C(O)H$)、羰基(例如, $-C(O)R$,或者由 $C=O$ 表示)、酰基卤(例如, $-C(O)X$,其中X是选自溴化物、氟化物、氯化物和碘化物的卤化物)、碳酸根(例如, $-OC(O)OR$)、烷氧基(例如, $-OR$)、缩醛(例如, $-C(OR)_2R$)“其中每个OR是可相同或不同的烷氧基,并且R”“是烷基或烯基)、磷酸根(例如, $P(O)_4^{3-}$)、硫醇(例如, $-SH$)、亚砷(例如, $-S(O)R$)、亚磺酸(例如, $-S(O)OH$)、磺酸(例如, $-S(O)_2OH$)、硫醛(例如, $-C(S)H$)、硫酸根(例如, $S(O)_4^{2-}$)、磺酰基(例如, $-S(O)_2-$)、酰胺(例如, $-C(O)NR_2$ 或 $-N(R)C(O)R$)、叠氮基(例如, $-N_3$)、硝基(例如, $-NO_2$)、氰基(例如, $-CN$)、异氰基(例如, $-NC$)、酰氧基(例如, $-OC(O)R$)、氨基(例如, $-NR_2$ 、 $-NRH$ 或 $-NH_2$)、氨基甲酰基(例如, $-OC(O)NR_2$ 、 $-OC(O)NRH$ 或 $-OC(O)NH_2$)、磺酰胺(例如, $-S(O)_2NR_2$ 、 $-S(O)_2NRH$ 、 $-S(O)_2NH_2$ 、 $-N(R)S(O)_2R$ 、 $-N(H)S(O)_2R$ 、 $-N(R)S(O)_2H$ 或 $-N(H)S(O)_2H$)、烷基、烯基和环基(例如,碳环基或杂环基)。

[1013] 在前述任一项中,R是如本文所定义的烷基或烯基。在一些实施方案中,取代基本身可进一步被例如一个、两个、三个、四个、五个或六个如本文定义的取代基取代。例如, C_{1-6} 烷基可进一步被一个、两个、三个、四个、五个或六个如本文所述的取代基取代。

[1014] 当适用时,式(I)、(IA)、(II)、(IIa)、(IIb)、(IIc)、(IId)和(IIe)中任一个的化合物包含以下特征中的一种或多种。

[1015] 在一些实施方案中, R_4 是选自由以下组成的组: C_{3-6} 碳环、 $-(CH_2)_nQ$ 、 $-(CH_2)_nCHQR$ 、 $-CHQR$ 和 $-CQ(R)_2$,其中Q是选自 C_{3-6} 碳环、具有一个或多个选自N、O、S和P的杂原子的5至14元芳族或非芳族杂环、 $-OR$ 、 $-O(CH_2)_nN(R)_2$ 、 $-C(O)OR$ 、 $-OC(O)R$ 、 $-CX_3$ 、 $-CX_2H$ 、 $-CXH_2$ 、 $-CN$ 、 $-N(R)_2$ 、 $-C(O)N(R)_2$ 、 $-N(R)C(O)R$ 、 $-N(R)S(O)_2R$ 、 $-N(R)C(O)N(R)_2$ 、 $-N(R)C(S)N(R)_2$ 以及 $-C(R)N(R)_2C(O)OR$,并且每个n独立地选自1、2、3、4和5。

[1016] 在另一个实施方案中, R_4 是选自由以下组成的组: C_{3-6} 碳环、 $-(CH_2)_nQ$ 、 $-(CH_2)_nCHQR$ 、 $-CHQR$ 和 $-CQ(R)_2$,其中Q是选自 C_{3-6} 碳环、具有一个或多个选自N、O和S的杂原子的5至14元杂芳基、 $-OR$ 、 $-O(CH_2)_nN(R)_2$ 、 $-C(O)OR$ 、 $-OC(O)R$ 、 $-CX_3$ 、 $-CX_2H$ 、 $-CXH_2$ 、 $-CN$ 、 $-C(O)N(R)_2$ 、 $-N(R)C(O)R$ 、 $-N(R)S(O)_2R$ 、 $-N(R)C(O)N(R)_2$ 、 $-N(R)C(S)N(R)_2$ 、 $-C(R)N(R)_2C(O)OR$ 以及具有一个或多个选自N、O和S的杂原子的5至14元杂环烷基,其被一个或多个选自氧代($=O$)、OH、氨基以及 C_{1-3} 烷基的取代基取代,并且每个n独立地选自1、2、3、4和5。

[1017] 在另一个实施方案中, R_4 是选自由以下组成的组: C_{3-6} 碳环、 $-(CH_2)_nQ$ 、 $-(CH_2)_n$

$n\text{CHQR}$ 、 $-\text{CHQR}$ 和 $-\text{CQ}(\text{R})_2$,其中Q是选自 C_{3-6} 碳环、具有一个或多个选自N、O和S的杂原子的5至14元杂环、 $-\text{OR}$ 、 $-\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{N}(\text{R})_2$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{OR}$ 、 $-\text{OC}(\text{O})\text{R}$ 、 $-\text{CX}_3$ 、 $-\text{CX}_2\text{H}$ 、 $-\text{CXH}_2$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R})_2$ 、 $-\text{N}(\text{R})\text{C}(\text{O})\text{R}$ 、 $-\text{N}(\text{R})\text{S}(\text{O})_2\text{R}$ 、 $-\text{N}(\text{R})\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R})_2$ 、 $-\text{N}(\text{R})\text{C}(\text{S})\text{N}(\text{R})_2$ 、 $-\text{C}(\text{R})\text{N}(\text{R})_2\text{C}(\text{O})\text{OR}$,并且每个n独立地选自1、2、3、4和5;并且当Q是5至14元杂环且(i) R_4 是 $-(\text{CH}_2)_n\text{Q}$,其中n是1或2,或者(ii) R_4 是 $-(\text{CH}_2)_n\text{CHQR}$,其中n是1,或者(iii) R_4 是 $-\text{CHQR}$ 和 $-\text{CQ}(\text{R})_2$ 时,则Q是5至14元杂芳基或8至14元杂环烷基。

[1018] 在另一个实施方案中, R_4 是选自由以下组成的组: C_{3-6} 碳环、 $-(\text{CH}_2)_n\text{Q}$ 、 $-(\text{CH}_2)_n\text{CHQR}$ 、 $-\text{CHQR}$ 和 $-\text{CQ}(\text{R})_2$,其中Q是选自 C_{3-6} 碳环、具有一个或多个选自N、O和S的杂原子的5至14元杂芳基、 $-\text{OR}$ 、 $-\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{N}(\text{R})_2$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{OR}$ 、 $-\text{OC}(\text{O})\text{R}$ 、 $-\text{CX}_3$ 、 $-\text{CX}_2\text{H}$ 、 $-\text{CXH}_2$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R})_2$ 、 $-\text{N}(\text{R})\text{C}(\text{O})\text{R}$ 、 $-\text{N}(\text{R})\text{S}(\text{O})_2\text{R}$ 、 $-\text{N}(\text{R})\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R})_2$ 、 $-\text{N}(\text{R})\text{C}(\text{S})\text{N}(\text{R})_2$ 、 $-\text{C}(\text{R})\text{N}(\text{R})_2\text{C}(\text{O})\text{OR}$,并且每个n独立地选自1、2、3、4和5。

[1019] 在另一个实施方案中, R_4 是未取代的 C_{1-4} 烷基,例如未取代的甲基。

[1020] 在某些实施方案中,本公开提供了一种具有式(I)的化合物,其中 R_4 是 $-(\text{CH}_2)_n\text{Q}$ 或 $-(\text{CH}_2)_n\text{CHQR}$,其中Q是 $-\text{N}(\text{R})_2$,并且n是选自3、4和5。

[1021] 在某些实施方案中,本公开提供了一种具有式(I)的化合物,其中 R_4 是选自由以下组成的组: $-(\text{CH}_2)_n\text{Q}$ 、 $-(\text{CH}_2)_n\text{CHQR}$ 、 $-\text{CHQR}$ 和 $\text{CQ}(\text{R})_2$,其中Q是 $-\text{N}(\text{R})_2$,并且n是选自1、2、3、4和5。

[1022] 在某些实施方案中,本公开提供了一种具有式(I)的化合物,其中 R_2 和 R_3 独立地选自由以下组成的组: C_{2-14} 烷基、 C_{2-14} 烯基、 $-\text{R}^*\text{YR}^*$ 、 $-\text{YR}^*$ 和 $-\text{R}^*\text{OR}^*$,或者 R_2 和 R_3 与它们所连接的原子一起形成杂环或碳环,并且 R_4 是 $-(\text{CH}_2)_n\text{Q}$ 或 $-(\text{CH}_2)_n\text{CHQR}$,其中Q是 $-\text{N}(\text{R})_2$,并且n是选自3、4和5。

[1023] 在某些实施方案中, R_2 和 R_3 独立地选自由以下组成的组: C_{2-14} 烷基、 C_{2-14} 烯基、 $-\text{R}^*\text{YR}^*$ 、 $-\text{YR}^*$ 和 $-\text{R}^*\text{OR}^*$,或者 R_2 和 R_3 与它们所连接的原子一起形成杂环或碳环。

[1024] 在一些实施方案中, R_1 是选自由 C_{5-20} 烷基和 C_{5-20} 烯基组成的组。

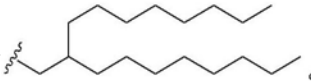
[1025] 在其他实施方案中, R_1 是选自由 $-\text{R}^*\text{YR}^*$ 、 $-\text{YR}^*$ 和 $-\text{R}^*\text{M}'\text{R}'$ 组成的组。

[1026] 在某些实施方案中, R_1 是选自 $-\text{R}^*\text{YR}^*$ 和 $-\text{YR}^*$ 。在一些实施方案中,Y是环丙基。在一些实施方案中, R^* 是 C_8 烷基或 C_8 烯基。在某些实施方案中, R^* 是 C_{3-12} 烷基。例如, R^* 可以是 C_3 烷基。例如, R^* 可以是 C_{4-8} 烷基(例如, C_4 、 C_5 、 C_6 、 C_7 或 C_8 烷基)。

[1027] 在一些实施方案中, R_1 是 C_{5-20} 烷基。在一些实施方案中, R_1 是 C_6 烷基。在一些实施方案中, R_1 是 C_8 烷基。在其他实施方案中, R_1 是 C_9 烷基。在某些实施方案中, R_1 是 C_{14} 烷基。在其他实施方案中, R_1 是 C_{18} 烷基。

[1028] 在一些实施方案中, R_1 是 C_{5-20} 烯基。在某些实施方案中, R_1 是 C_{18} 烯基。在一些实施方案中, R_1 是亚油基。

[1029] 在某些实施方案中, R_1 是支链的(例如,癸-2-基、十一烷-3-基、十二烷-4-基、十三烷-5-基、十四烷-6-基、2-甲基十一烷-3-基、2-甲基癸-2-基、3-甲基十三烷-3-基、4-甲基

十二烷-4-基或十七碳-9-基)。在某些实施方案中, R_1 是.

[1030] 在某些实施方案中, R_1 是未取代的 C_{5-20} 烷基或 C_{5-20} 烯基。在某些实施方案中, R' 是取代的 C_{5-20} 烷基或 C_{5-20} 烯基(例如,被 C_{3-6} 碳环如1-环丙基壬基取代)。

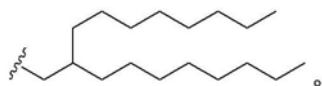
[1031] 在其他实施方案中, R_1 是 $-R''M'R'$ 。

[1032] 在一些实施方案中, R' 是选自 $-R*YR''$ 和 $-YR''$ 。在一些实施方案中, Y 是 C_{3-8} 环烷基。在一些实施方案中, Y 是 C_{6-10} 芳基。在一些实施方案中, Y 是环丙基。在一些实施方案中, Y 是环己基。在某些实施方案中, $R*$ 是 C_1 烷基。

[1033] 在一些实施方案中, R'' 是选自由 C_{3-12} 烷基和 C_{3-12} 烯基组成的组。在一些实施方案中, 邻近 Y 的是 R'' 是 C_1 烷基。在一些实施方案中, 邻近 Y 的是 R'' 是 C_{4-9} 烷基 (例如, C_4 、 C_5 、 C_6 、 C_7 或 C_8 或 C_9 烷基)。

[1034] 在一些实施方案中, R' 是选自 C_4 烷基和 C_4 烯基。在某些实施方案中, R' 是选自 C_5 烷基和 C_5 烯基。在一些实施方案中, R' 是选自 C_6 烷基和 C_6 烯基。在一些实施方案中, R' 是选自 C_7 烷基和 C_7 烯基。在一些实施方案中, R' 是选自 C_9 烷基和 C_9 烯基。

[1035] 在其他实施方案中, R' 是选自 C_{11} 烷基和 C_{11} 烯基。在其他实施方案中, R' 是选自 C_{12} 烷基、 C_{12} 烯基、 C_{13} 烷基、 C_{13} 烯基、 C_{14} 烷基、 C_{14} 烯基、 C_{15} 烷基、 C_{15} 烯基、 C_{16} 烷基、 C_{16} 烯基、 C_{17} 烷基、 C_{17} 烯基、 C_{18} 烷基和 C_{18} 烯基。在某些实施方案中, R' 是支链的 (例如, 癸-2-基、十一烷-3-基、十二烷-4-基、十三烷-5-基、十四烷-6-基、2-甲基十一烷-3-基、2-甲基癸-2-基、3-甲基十三烷-3-基、4-甲基十二烷-4-基或十七碳-9-基)。在某些实施方案中, R' 是



[1036] 在某些实施方案中, R' 是未取代的 C_{1-18} 烷基。在某些实施方案中, R' 是取代的 C_{1-18} 烷基 (例如, 被 C_{3-6} 碳环如 1-环丙基壬基取代的 C_{1-15} 烷基)。

[1037] 在一些实施方案中, R'' 是选自由 C_{3-14} 烷基和 C_{3-14} 烯基组成的组。在一些实施方案中, R'' 是 C_3 烷基、 C_4 烷基、 C_5 烷基、 C_6 烷基、 C_7 烷基或 C_8 烷基。在一些实施方案中, R'' 是 C_9 烷基、 C_{10} 烷基、 C_{11} 烷基、 C_{12} 烷基、 C_{13} 烷基或 C_{14} 烷基。

[1038] 在一些实施方案中, M' 是 $-C(O)O-$ 。在一些实施方案中, M' 是 $-OC(O)-$ 。

[1039] 在其他实施方案中, M' 是芳基或杂芳基。例如, M' 可选自由苯基、噁唑和噻唑组成的组。

[1040] 在一些实施方案中 M 是 $-C(O)O-$ 。在一些实施方案中, M 是 $-OC(O)-$ 。在一些实施方案中, M 是 $-C(O)N(R')$ 。在一些实施方案中, M 是 $-P(O)(OR')O-$ 。

[1041] 在其他实施方案中, M 是芳基或杂芳基。例如, M 可选自由苯基、噁唑和噻唑组成的组。

[1042] 在一些实施方案中, M 与 M' 相同。在其他实施方案中, M 与 M' 不同。

[1043] 在一些实施方案中, 每个 R_5 是 H 。在某些实施方案中, 每个 R_6 也是 H 。

[1044] 在一些实施方案中, R_7 是 H 。在其他实施方案中, R_7 是 C_{1-3} 烷基 (例如, 甲基、乙基、丙基或异丙基)。

[1045] 在一些实施方案中, R_2 和 R_3 独立地是 C_{5-14} 烷基或 C_{5-14} 烯基。

[1046] 在一些实施方案中, R_2 和 R_3 是相同的。在一些实施方案中, R_2 和 R_3 是 C_8 烷基。在某些实施方案中, R_2 和 R_3 是 C_2 烷基。在其他实施方案中, R_2 和 R_3 是 C_3 烷基。在一些实施方案中, R_2 和 R_3 是 C_4 烷基。在某些实施方案中, R_2 和 R_3 是 C_5 烷基。在其他实施方案中, R_2 和 R_3 是 C_6 烷基。在一些实施方案中, R_2 和 R_3 是 C_7 烷基。

[1047] 在其他实施方案中, R_2 和 R_3 是不同的。在某些实施方案中, R_2 是 C_8 烷基。在一些实施

方案中, R_3 是 C_{1-7} (例如, C_1 、 C_2 、 C_3 、 C_4 、 C_5 、 C_6 或 C_7 烷基)或 C_9 烷基。

[1048] 在一些实施方案中, R_7 和 R_3 是H。

[1049] 在某些实施方案中, R_2 是H。

[1050] 在一些实施方案中, m 是5、7或9。

[1051] 在一些实施方案中, R_4 是选自 $-(CH_2)_nQ$ 和 $-(CH_2)_nCHQR$ 。

[1052] 在一些实施方案中, Q 是选自由以下组成的组: $-OR$ 、 $-OH$ 、 $-O(CH_2)_nN(R)_2$ 、 $-OC(O)R$ 、 $-CX_3$ 、 $-CN$ 、 $-N(R)C(O)R$ 、 $-N(H)C(O)R$ 、 $-N(R)S(O)_2R$ 、 $-N(H)S(O)_2R$ 、 $-N(R)C(O)N(R)_2$ 、 $-N(H)C(O)N(R)_2$ 、 $-N(H)C(O)N(H)(R)$ 、 $-N(R)C(S)N(R)_2$ 、 $-N(H)C(S)N(R)_2$ 、 $-N(H)C(S)N(H)(R)$ 、 $-C(R)_2C(O)OR$ 、碳环以及杂环。

[1053] 在某些实施方案中, Q 是 $-OH$ 。

[1054] 在某些实施方案中, Q 是取代的或未取代的5至10元杂芳基, 例如, Q 是咪唑、嘧啶、嘌呤、2-氨基-1,9-二氢-6H-嘌呤-6-酮-9-基(或鸟嘌呤-9-基)、腺嘌呤-9-基、胞嘧啶-1-基或尿嘧啶-1-基。在某些实施方案中, Q 是取代的5至14元杂环烷基, 例如被一个或多个选自氧代($=O$)、 OH 、氨基和 C_{1-3} 烷基的取代基取代。例如, Q 是4-甲基哌嗪基、4-(4-甲氧基苄基)哌嗪基或异吲哚啉-2-基-1,3-二酮。

[1055] 在某些实施方案中, Q 是未取代的或取代的 C_{6-10} 芳基(如苯基)或 C_{3-6} 环烷基。

[1056] 在一些实施方案中, n 是1。在其他实施方案中, n 是2。在其他实施方案中, n 是3。在某些其他实施方案中, n 是4。例如, R_4 可以是 $-(CH_2)_2OH$ 。例如, R_4 可以是 $-(CH_2)_3OH$ 。例如, R_4 可以是 $-(CH_2)_4OH$ 。例如, R_4 可以是苄基。例如, R_4 可以是4-甲氧基苄基。

[1057] 在一些实施方案中, R_4 是 C_{3-6} 碳环。在一些实施方案中, R_4 是 C_{3-6} 环烷基。例如, R_4 可以是任选地被例如 OH 、卤代、 C_{1-6} 烷基等取代的环己基。例如, R_4 可以是2-羟基环己基。

[1058] 在一些实施方案中, R 是H。

[1059] 在一些实施方案中, R 是未取代的 C_{1-3} 烷基或未取代的 C_{2-3} 烯基。例如, R_4 可以是 $-CH_2CH(OH)CH_3$ 或 $-CH_2CH(OH)CH_2CH_3$ 。

[1060] 在一些实施方案中, R 是取代的 C_{1-3} 烷基, 例如, CH_2OH 。例如, R_4 可以是 $-CH_2CH(OH)CH_2OH$ 。

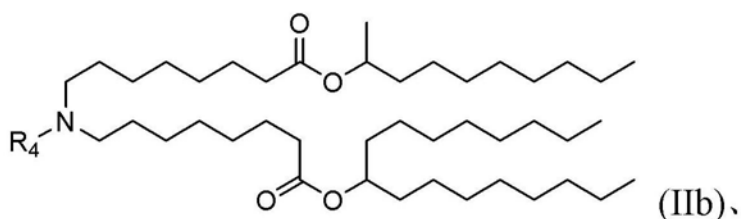
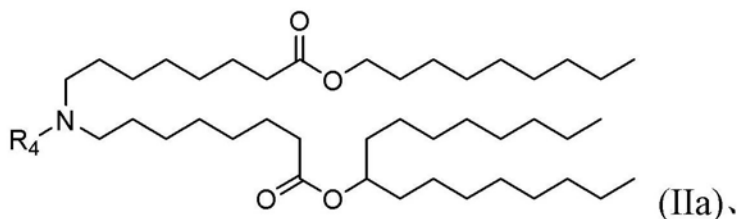
[1061] 在一些实施方案中, R_2 和 R_3 与它们所连接的原子一起形成杂环或碳环。在一些实施方案中, R_2 和 R_3 与它们所连接的原子一起形成具有一个或多个选自N、O、S和P的杂原子的5至14元芳族或非芳族杂环。在某些实施方案中, R_2 和 R_3 与它们所连接的原子一起形成任选取代的 C_{3-20} 碳环(例如, C_{3-18} 碳环、 C_{3-15} 碳环、 C_{3-12} 碳环或 C_{3-10} 碳环), 所述碳环是芳族或非芳族的。在某些实施方案中, R_2 和 R_3 与它们所连接的原子一起形成 C_{3-6} 碳环。在其他实施方案中, R_2 和 R_3 与它们所连接的原子一起形成 C_6 碳环, 如环己基或苯基。在某些实施方案中, 杂环或 C_{3-6} 碳环被一个或多个烷基取代(例如, 在相同环原子处或在相邻或不相邻的环原子处)。例如, R_2 和 R_3 与它们所连接的原子一起可形成带有一个或多个 C_5 烷基取代的环己基或苯基。在某些实施方案中, 由 R_2 和 R_3 形成的杂环或 C_{3-6} 碳环被碳环基团取代。例如, R_2 和 R_3 与它们所连接的原子一起可形成环己基或被环己基取代的苯基。在其他实施方案中, R_2 和 R_3 与它们所连接的原子一起形成 C_{7-15} 碳环, 如环庚基、环十五烷基或萘基。

[1062] 在一些实施方案中, R_4 是选自 $-(CH_2)_nQ$ 和 $-(CH_2)_nCHQR$ 。在某些实施方案中, Q 是选自由以下组成的组: $-OR$ 、 $-OH$ 、 $-O(CH_2)_nN(R)_2$ 、 $-OC(O)R$ 、 $-CX_3$ 、 $-CN$ 、 $-N(R)C(O)R$ 、 $-N(H)C(O)R$ 、 $-N$

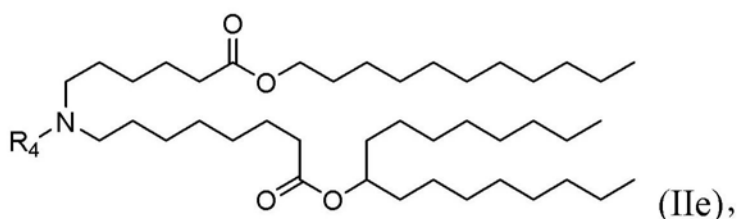
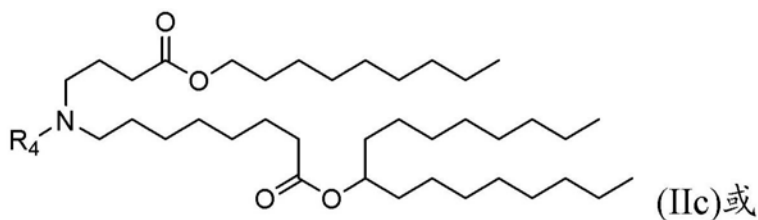
(R) S (O) ₂R、-N (H) S (O) ₂R、-N (R) C (O) N (R) ₂、-N (H) C (O) N (R) ₂、-N (H) C (O) N (H) (R)、-N (R) C (S) N (R) ₂、-N (H) C (S) N (R) ₂、-N (H) C (S) N (H) (R) 以及杂环。在其他实施方案中,Q是选自由咪唑、嘧啶和嘌呤组成的组。

[1063] 在一些实施方案中,R₂和R₃与它们所连接的原子一起形成杂环或碳环。在一些实施方案中,R₂和R₃与它们所连接的原子一起形成C₃₋₆碳环,如苯基。在某些实施方案中,杂环或C₃₋₆碳环被一个或多个烷基取代(例如,在相同环原子处或在相邻或不相邻的环原子处)。例如,R₂和R₃与它们所连接的原子一起可形成带有一个或多个C₅烷基取代的苯基。

[1064] 在一些实施方案中,式(I)化合物的子集包括式(IIa)、(IIb)、(IIc)或(IIe)的那些:

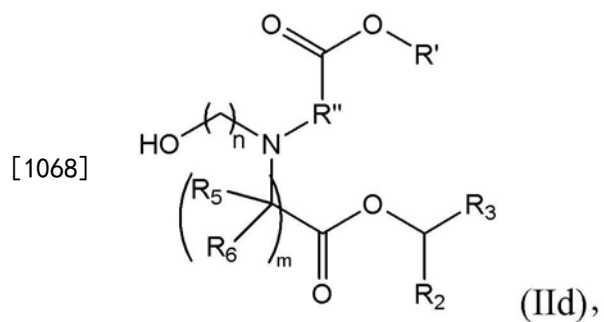


[1065]



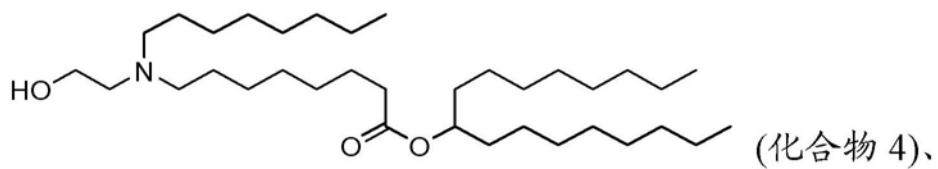
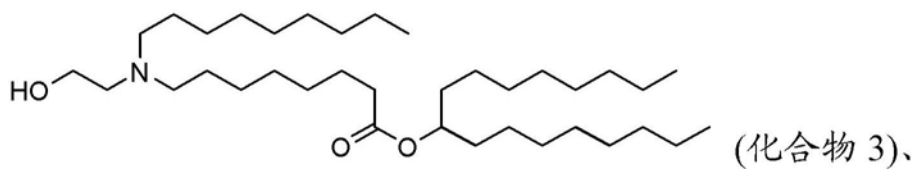
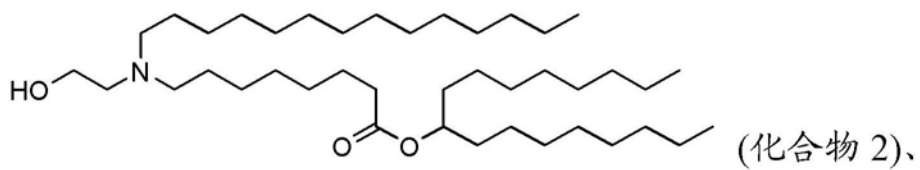
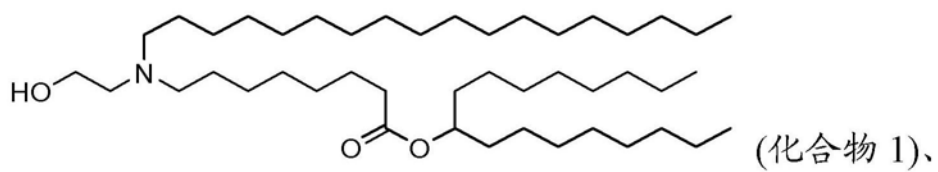
[1066] 或其盐或异构体,其中R₄如本文所述。

[1067] 在一些实施方案中,式(I)化合物的子集包括式(IIId)的那些:

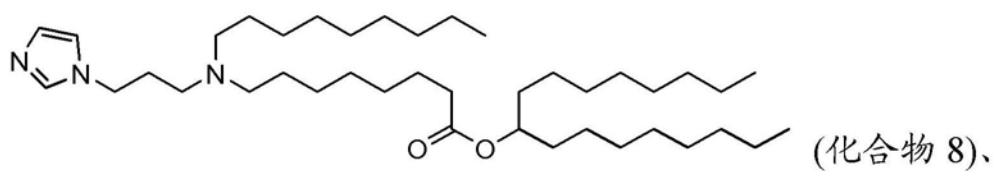
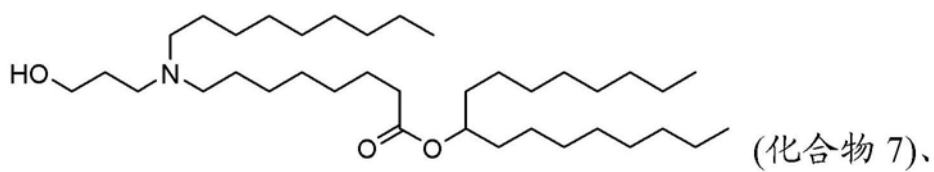
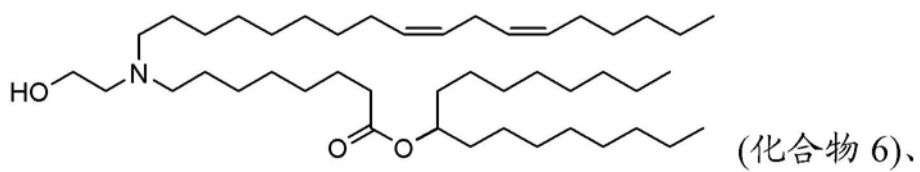
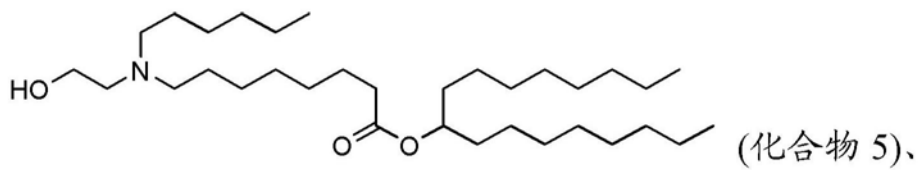


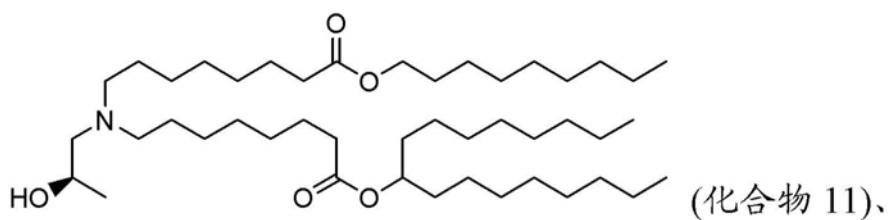
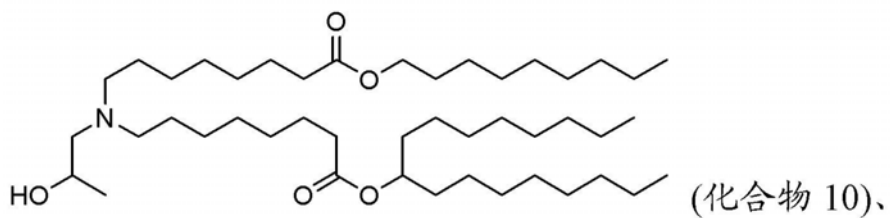
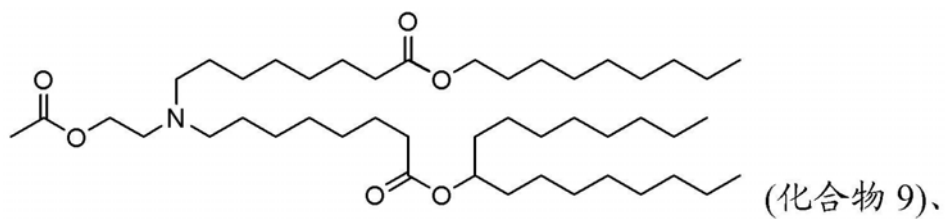
[1069] 或其盐或异构体,其中n是2、3或4;并且m、R'、R''以及R₂至R₆如本文所述。例如,R₂和R₃中的每个可独立地选自由以下组成的组:C₅₋₁₄烷基和C₅₋₁₄烯基。

[1070] 在一些实施方案中,本公开的药物组合物,式(I)化合物是选自由以下组成的组:

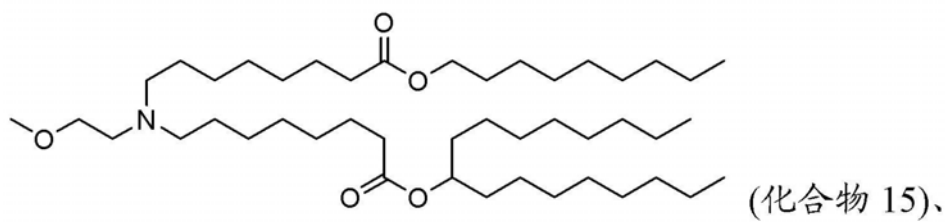
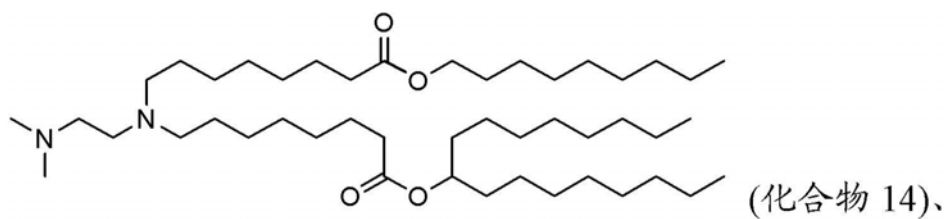
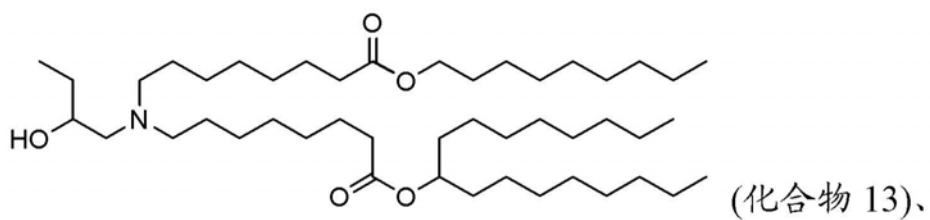
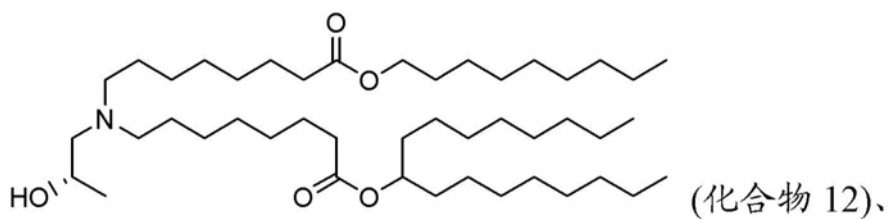


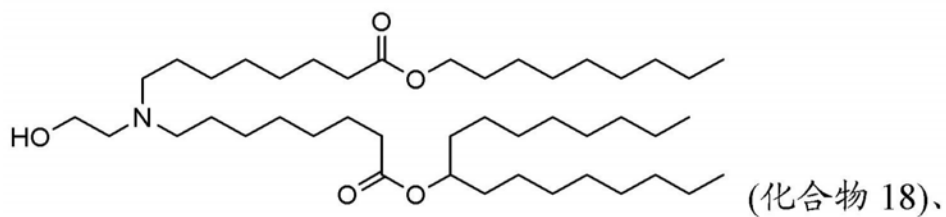
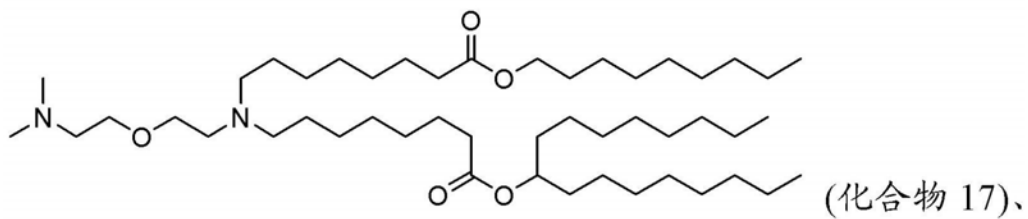
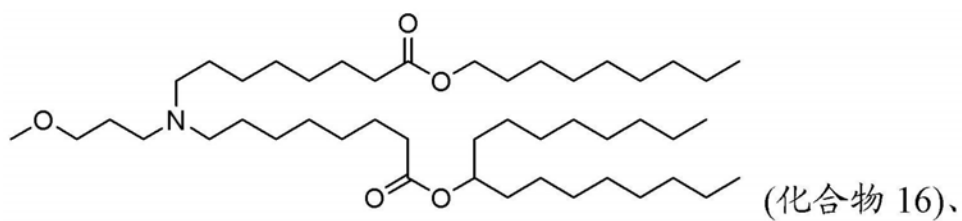
[1071]



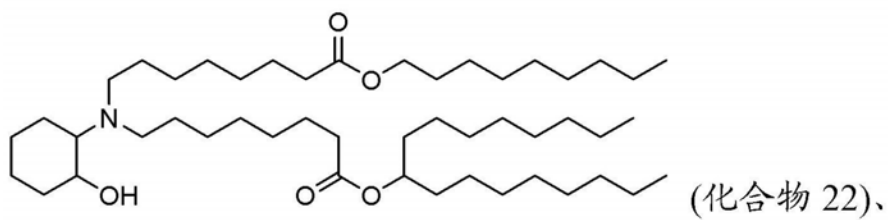
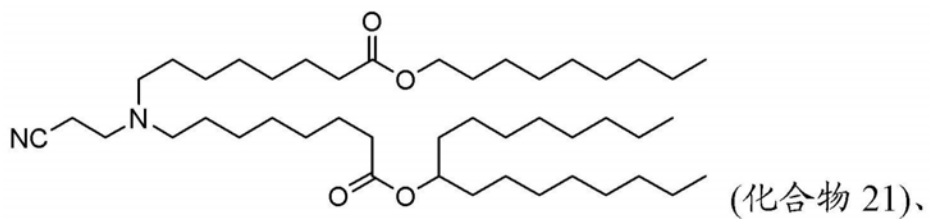
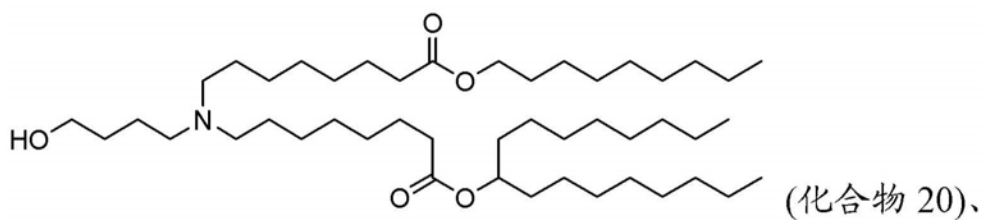
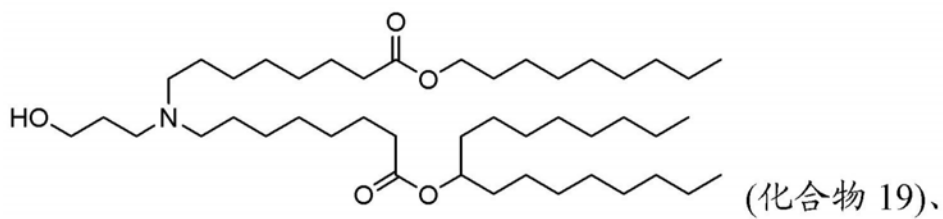


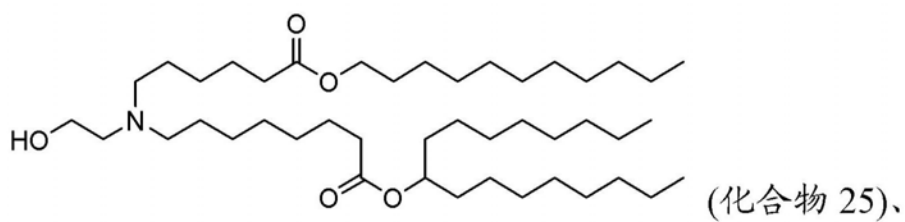
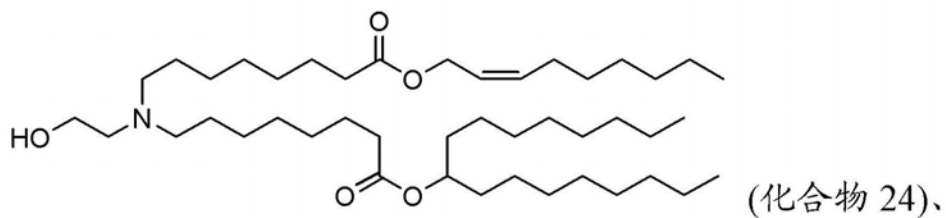
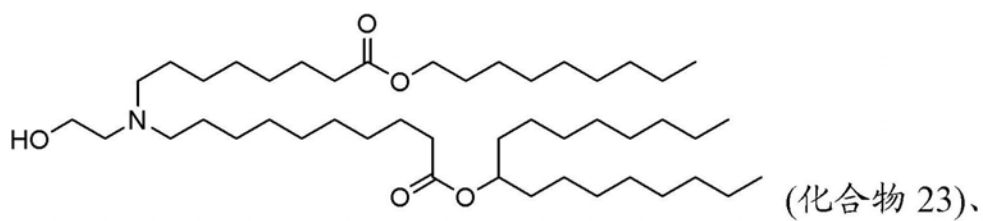
[1072]



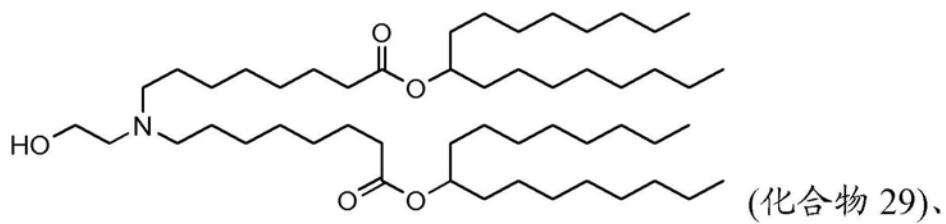
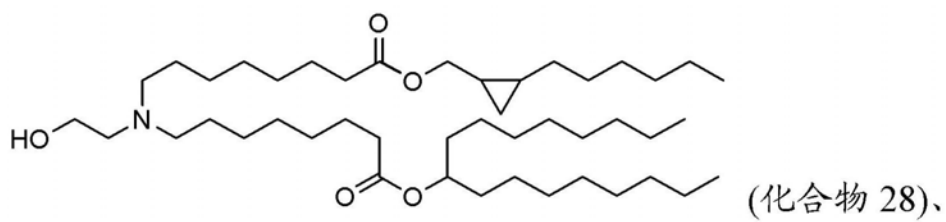
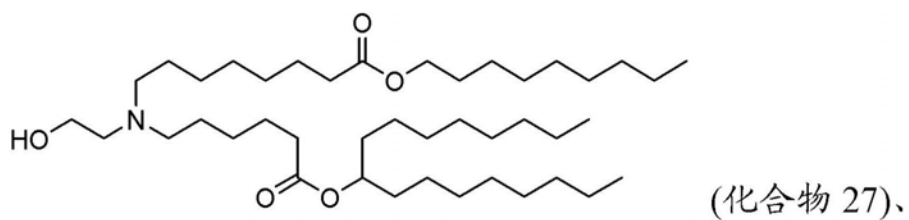
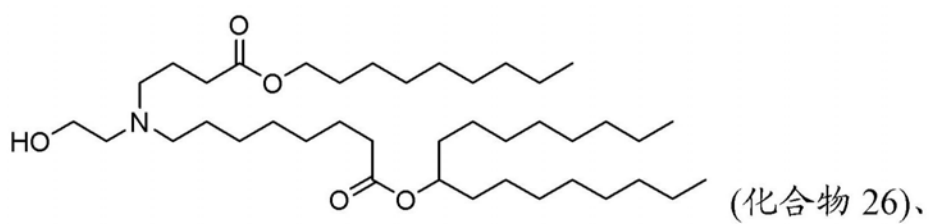


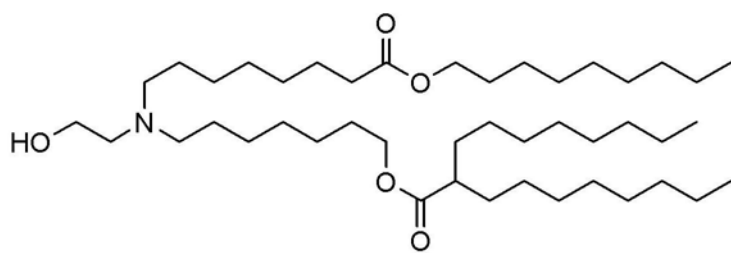
[1073]



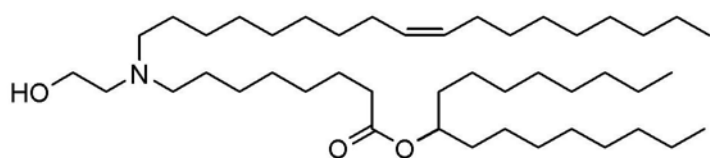


[1074]

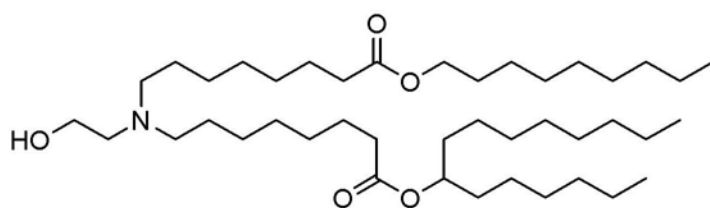




(化合物 30)、

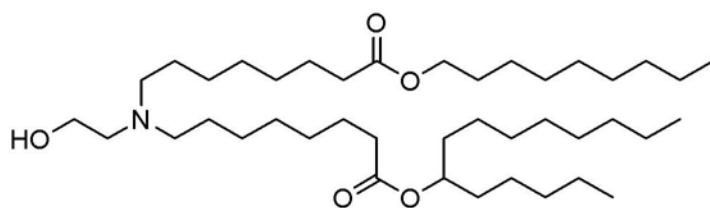


(化合物 31)、

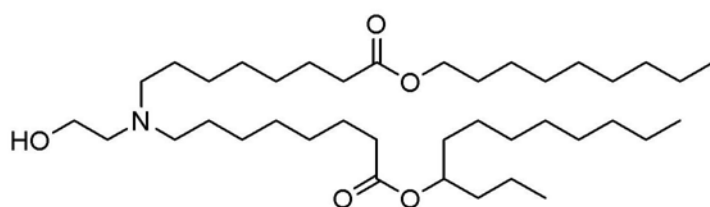


(化合物 32)、

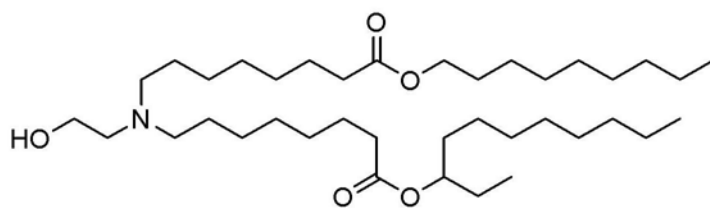
[1075]



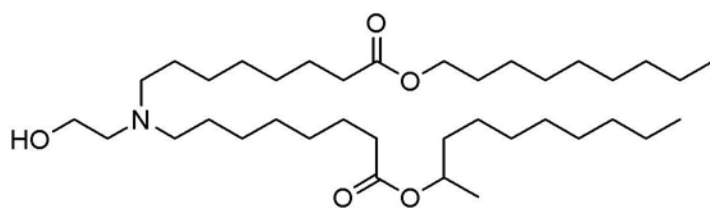
(化合物 33)、



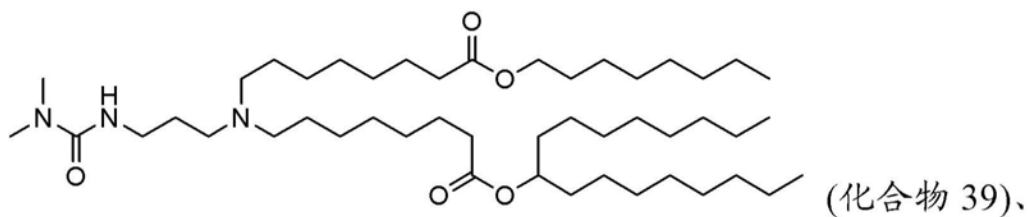
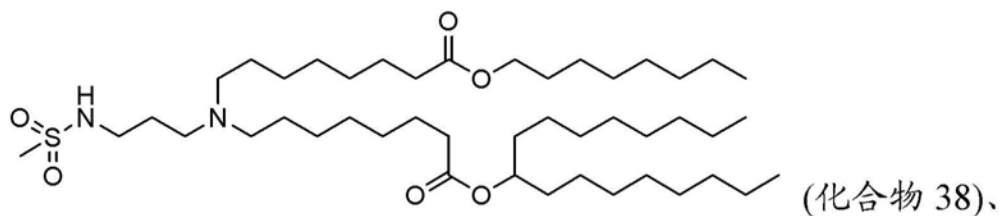
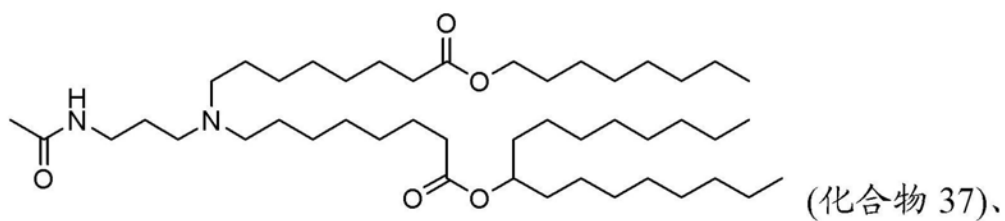
(化合物 34)、



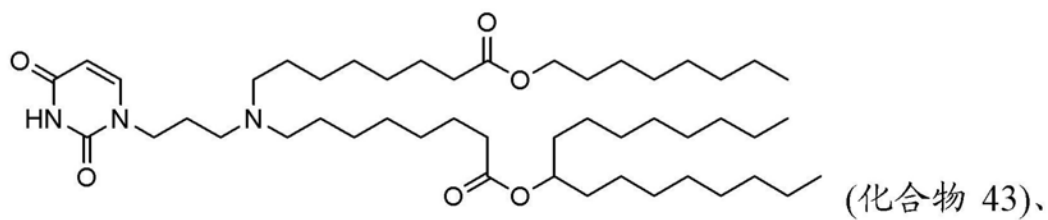
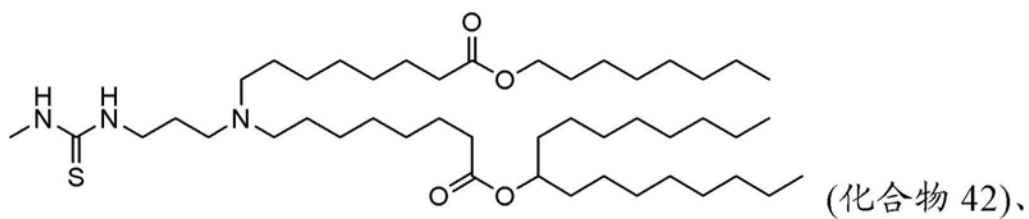
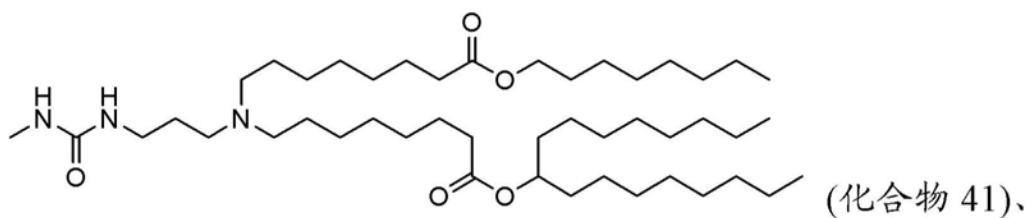
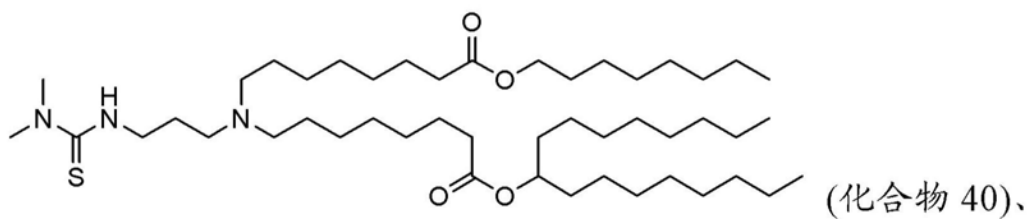
(化合物 35)、

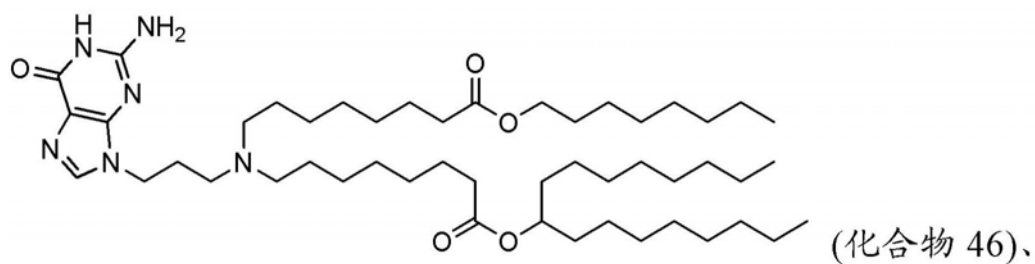
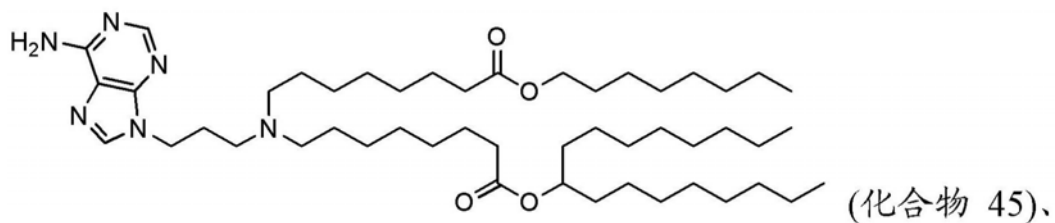
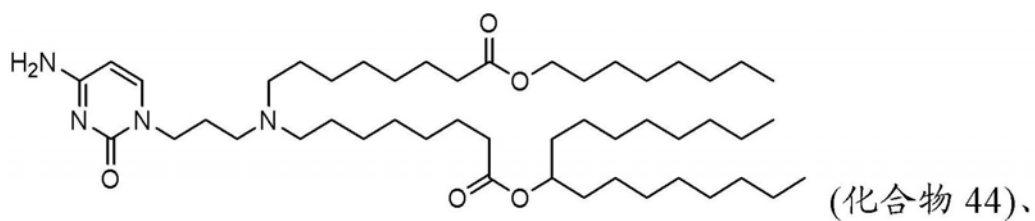


(化合物 36)、

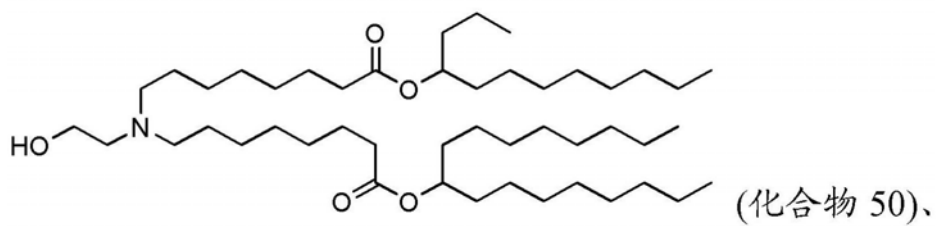
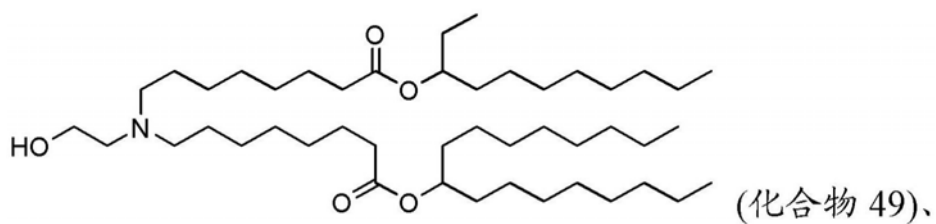
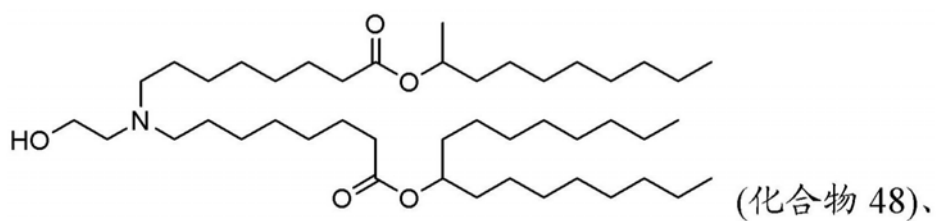
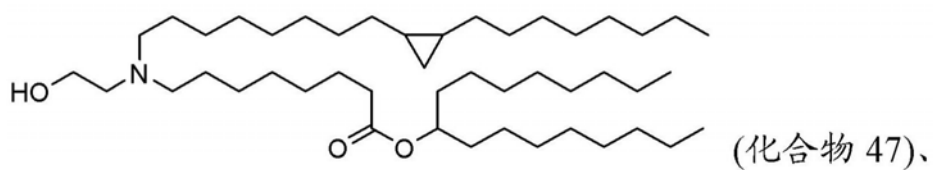


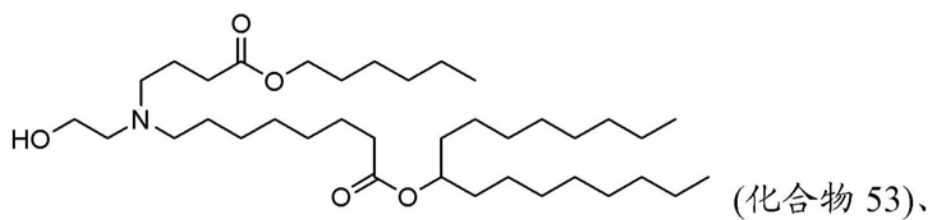
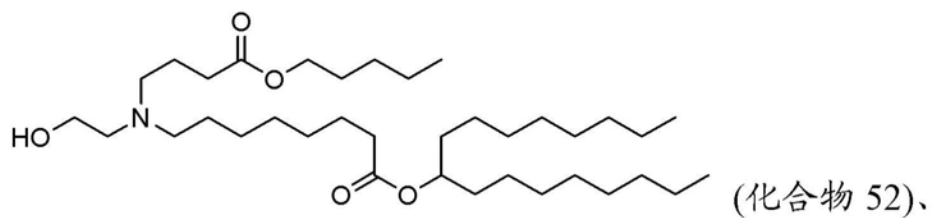
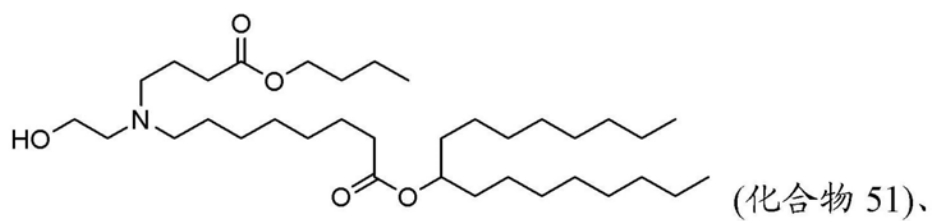
[1076]



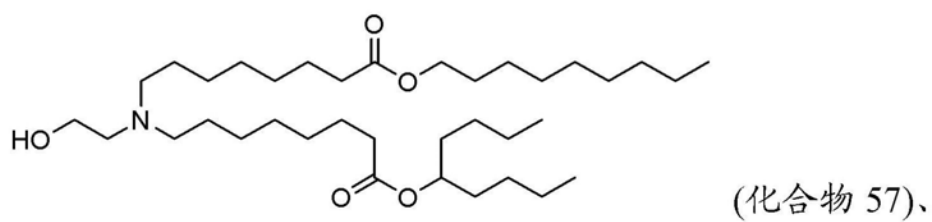
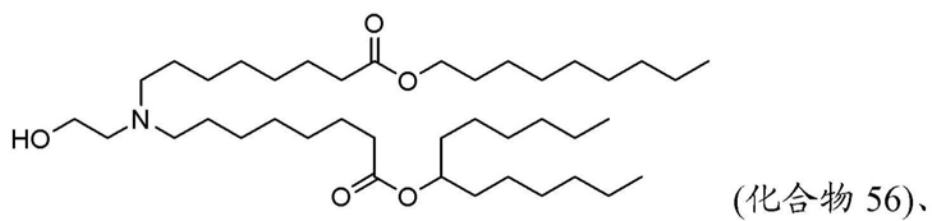
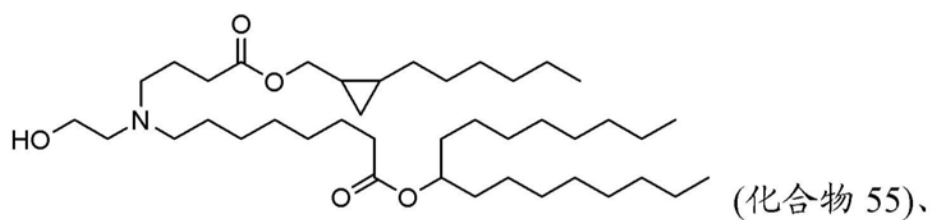
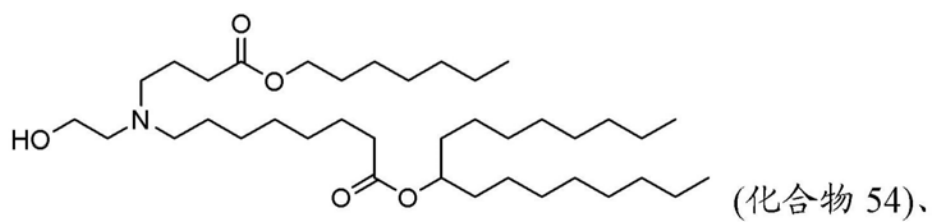


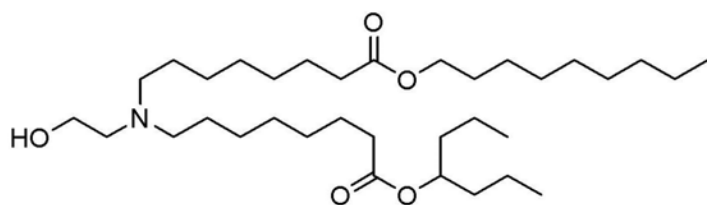
[1077]



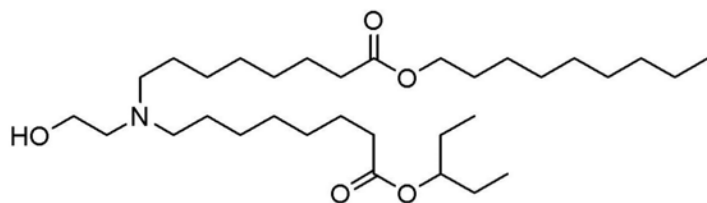


[1078]

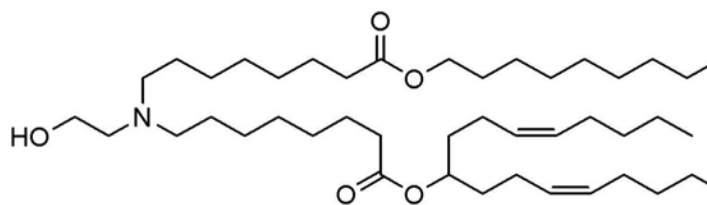




(化合物 58)、

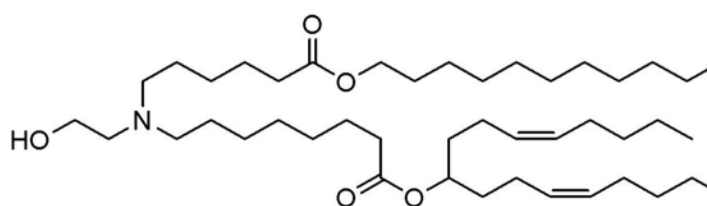


(化合物 59)、

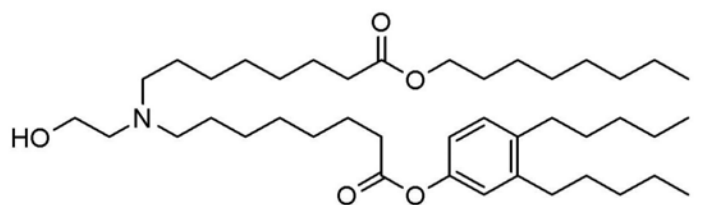


(化合物 60)、

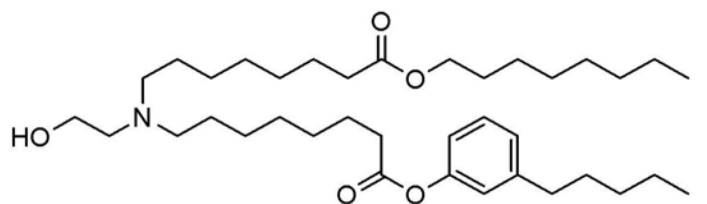
[1079]



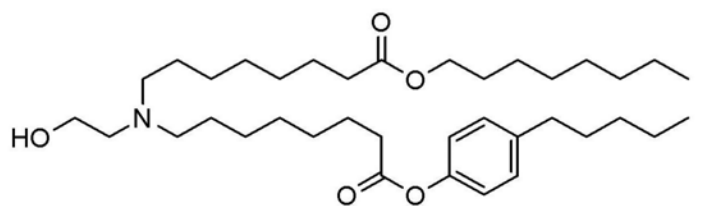
(化合物 61)、



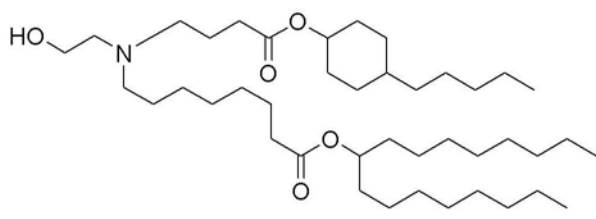
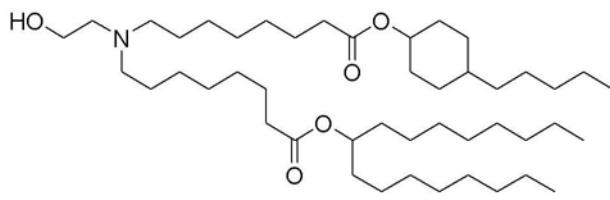
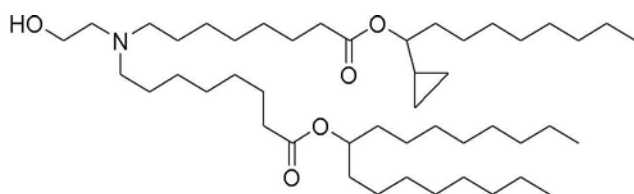
(化合物 62)、



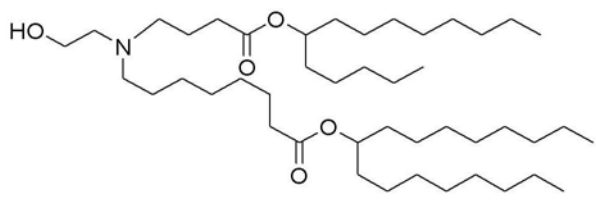
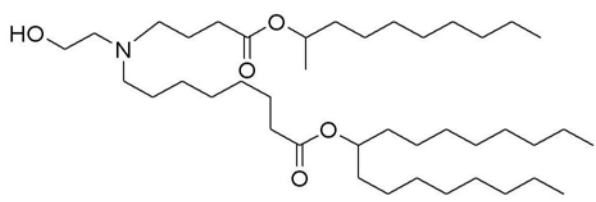
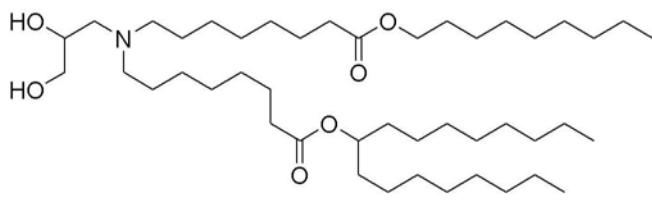
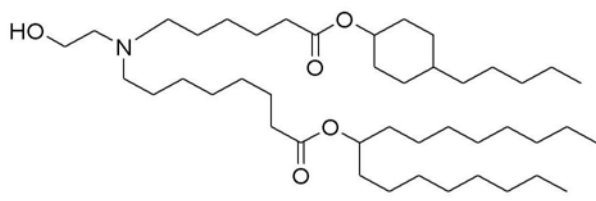
(化合物 63)、

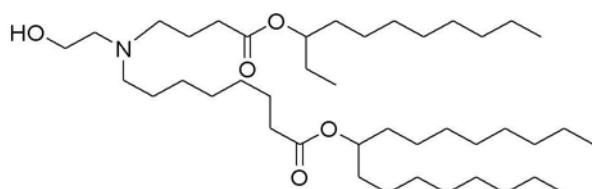


(化合物 64)、

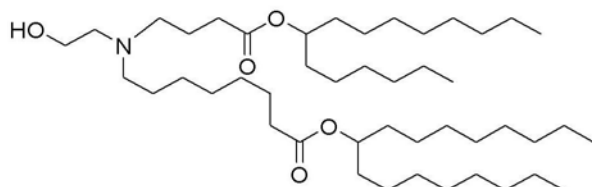


[1080]

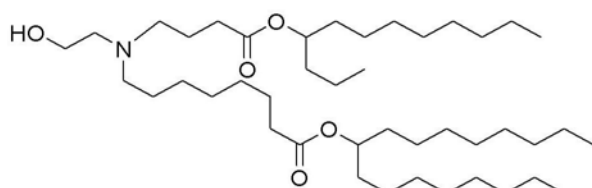




(化合物 72)、

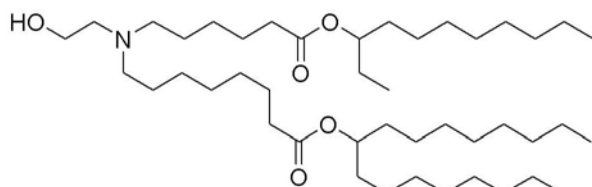


(化合物 73)、

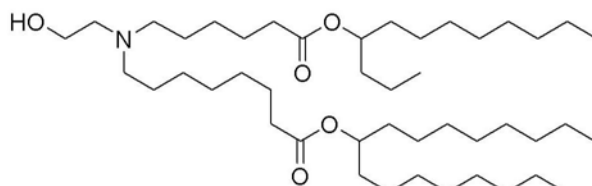


(化合物 74)、

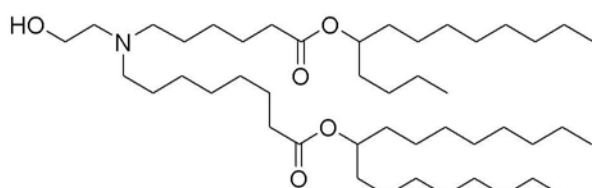
[1081]



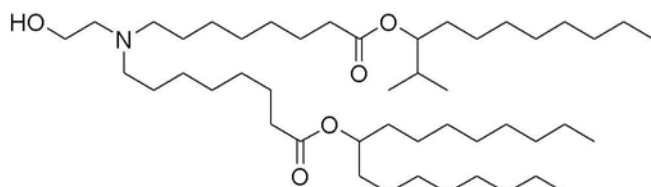
(化合物 75)、



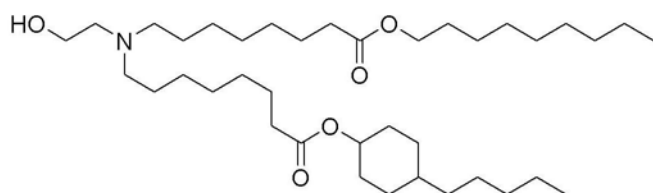
(化合物 76)、



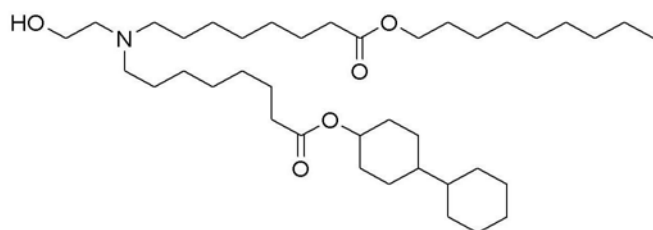
(化合物 77)、



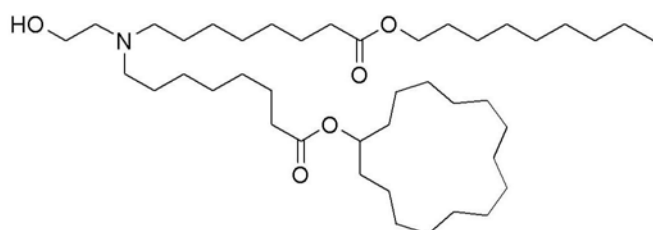
(化合物 78)、



(化合物 79)、

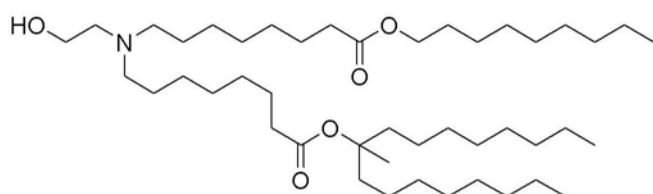


(化合物 80)、

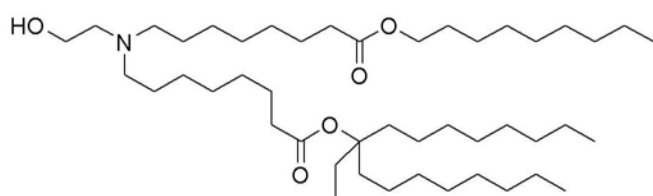


(化合物 81)、

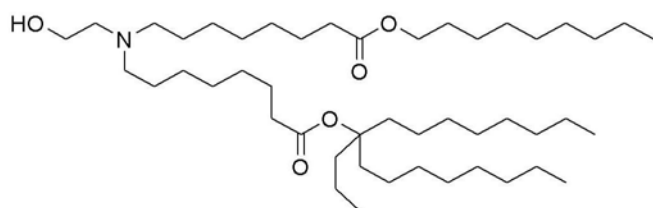
[1082]



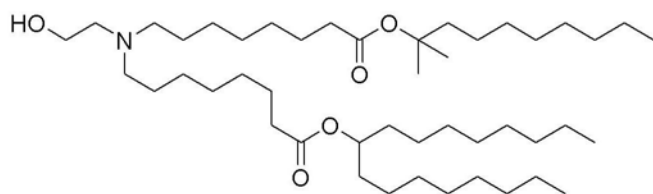
(化合物 82)、



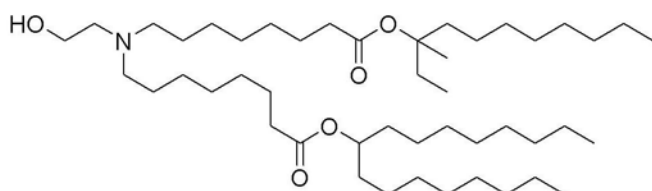
(化合物 83)、



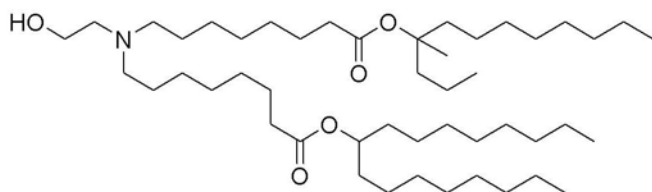
(化合物 84)、



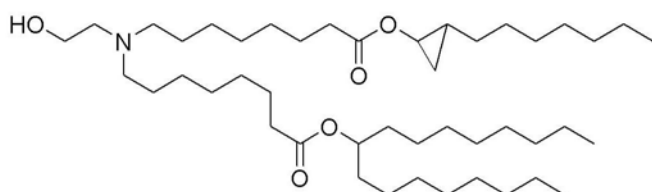
(化合物 85)、



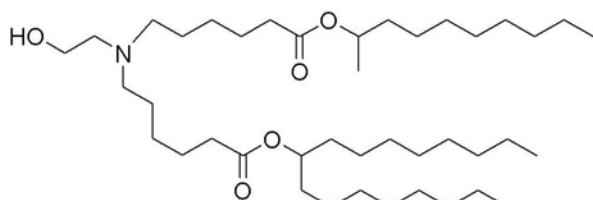
(化合物 86)、



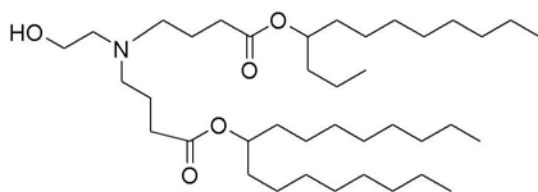
(化合物 87)、



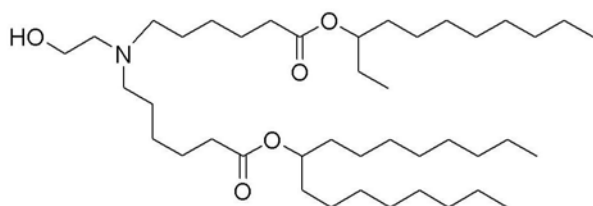
(化合物 88)、



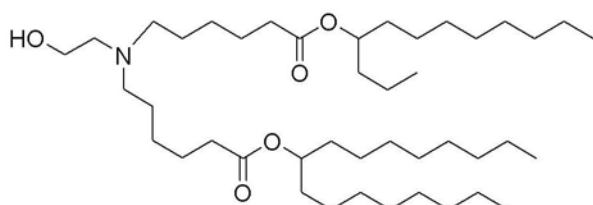
(化合物 89)、



(化合物 90)、

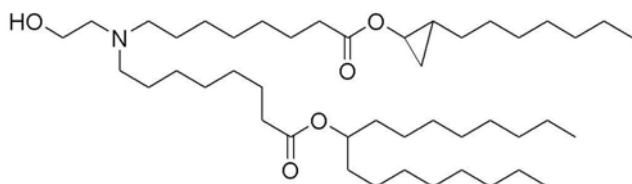


(化合物 91)、

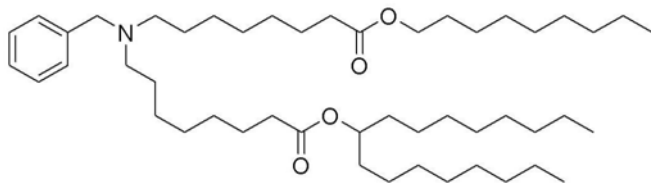


(化合物 92)、

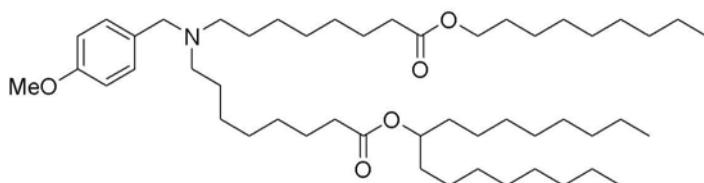
[1083]



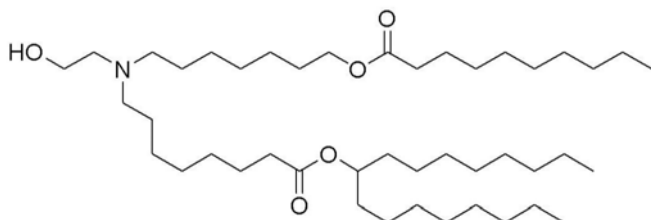
(化合物 93)、



(化合物 94)、

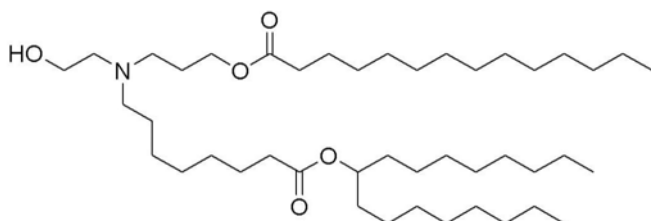


(化合物 95)、

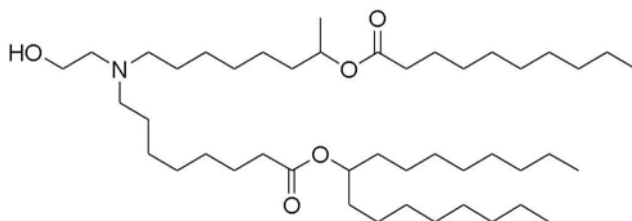


[1084]

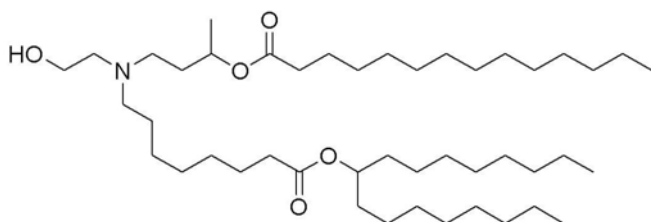
(化合物 96)、



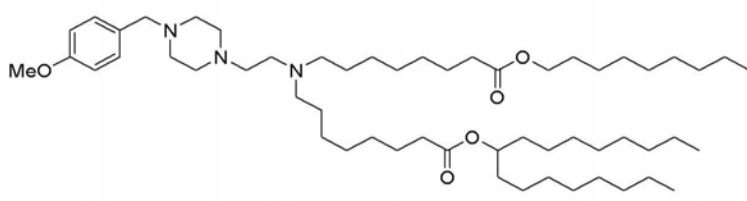
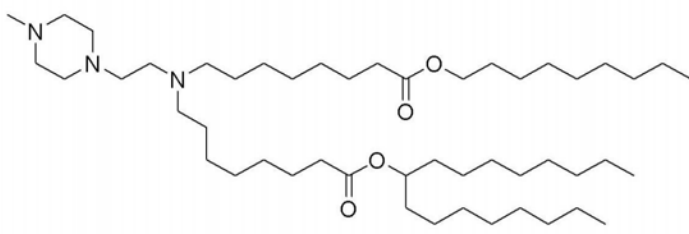
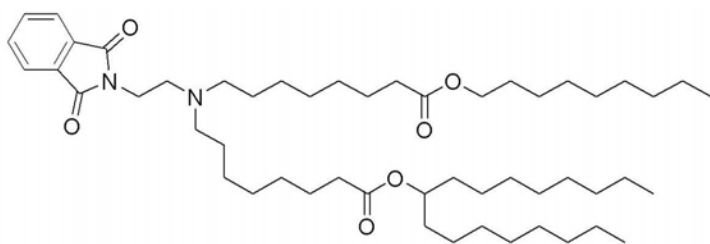
(化合物 97)、



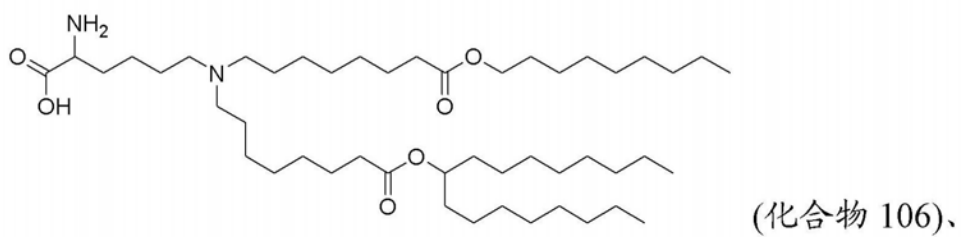
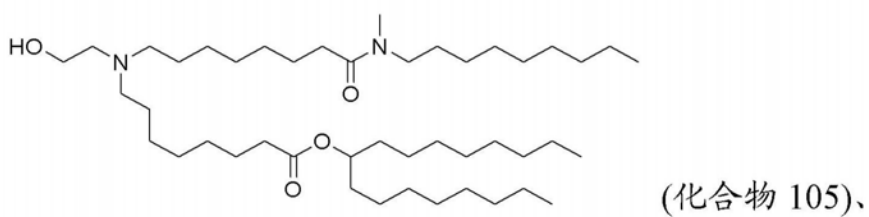
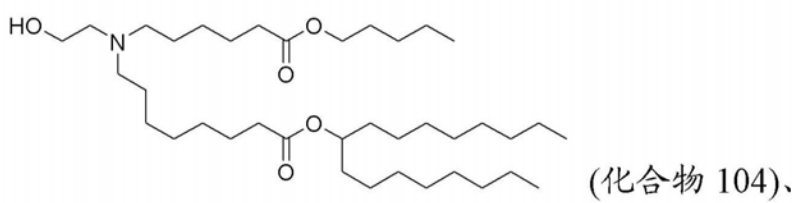
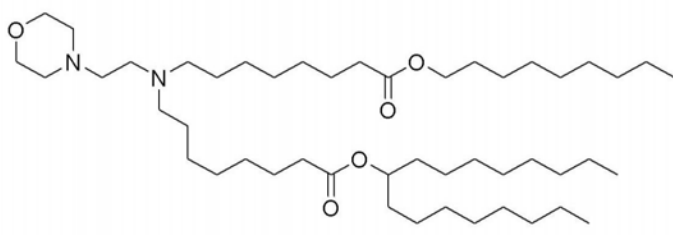
(化合物 98)、

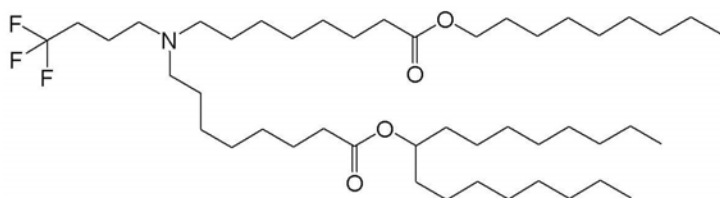


(化合物 99)、

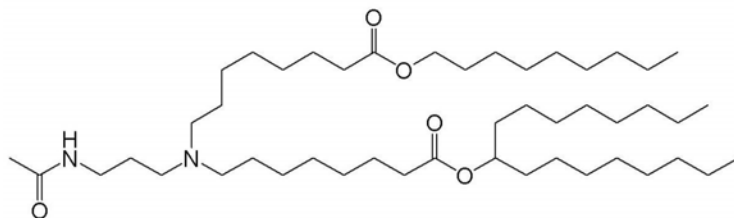


[1085]

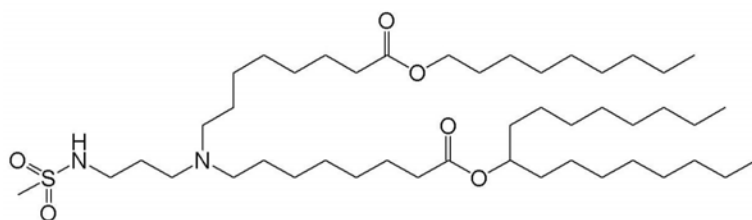




(化合物 107)、

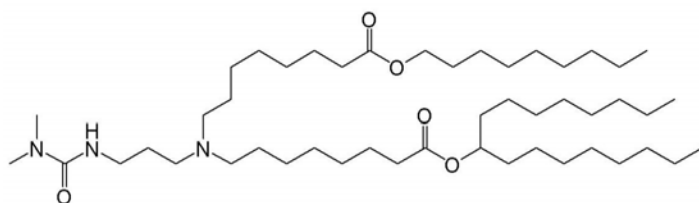


(化合物 108)、

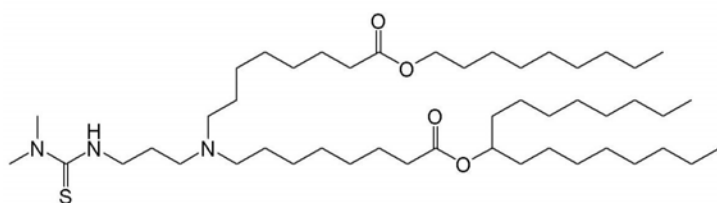


(化合物 109)、

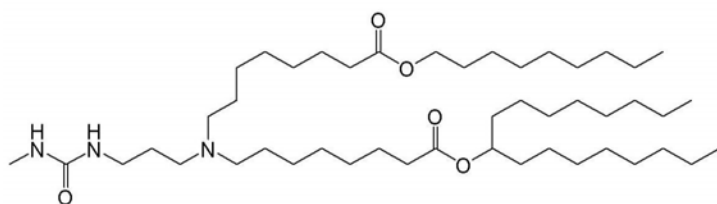
[1086]



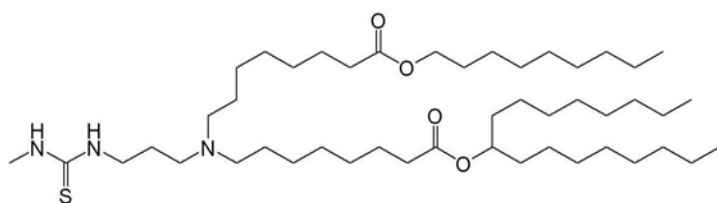
(化合物 110)、



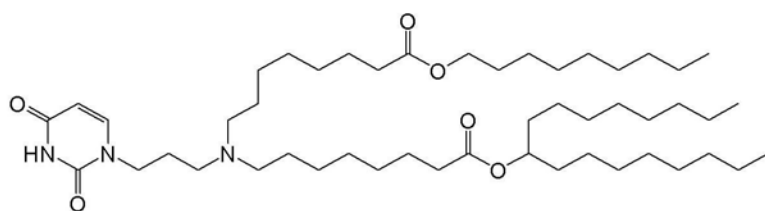
(化合物 111)、



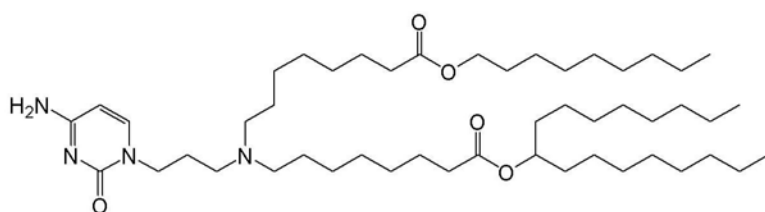
(化合物 112)、



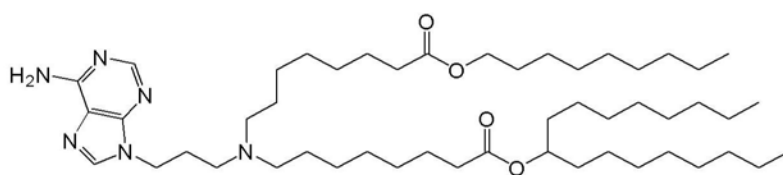
(化合物 113)、



(化合物 114)、

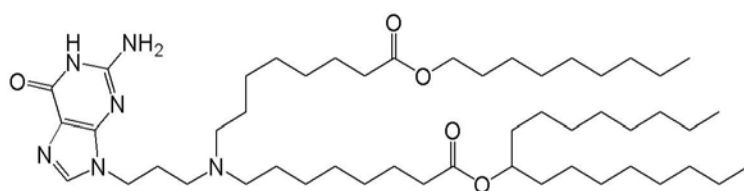


(化合物 115)、

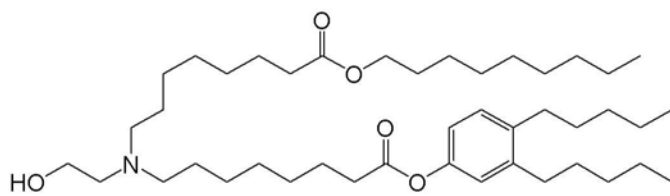


(化合物 116)、

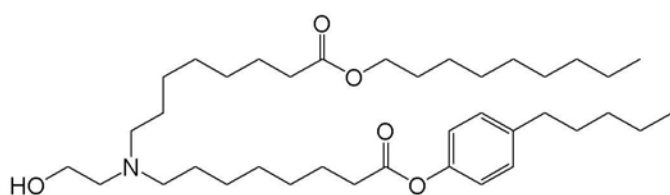
[1087]



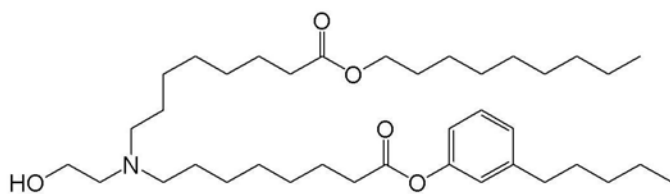
(化合物 117)、



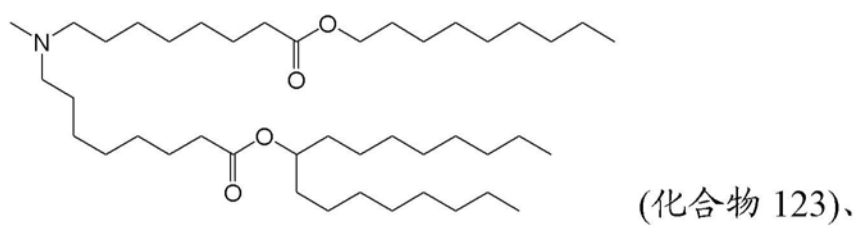
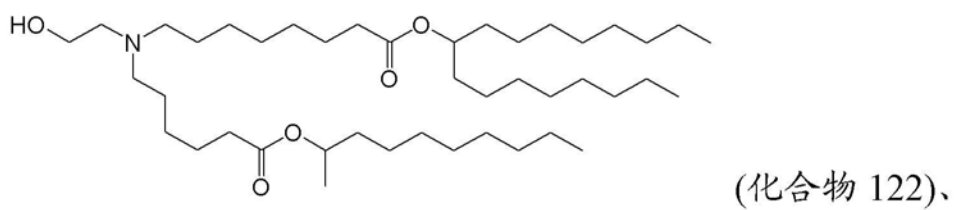
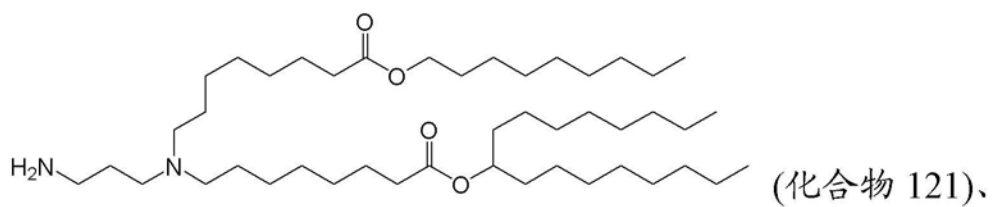
(化合物 118)、



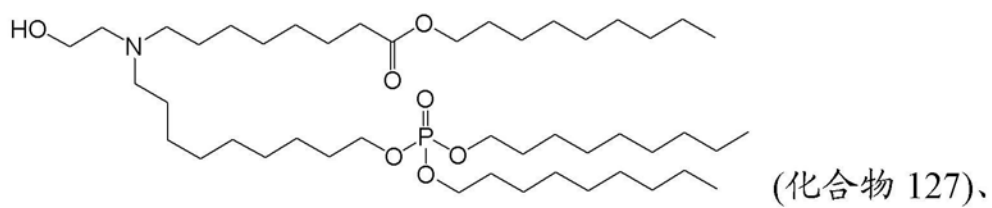
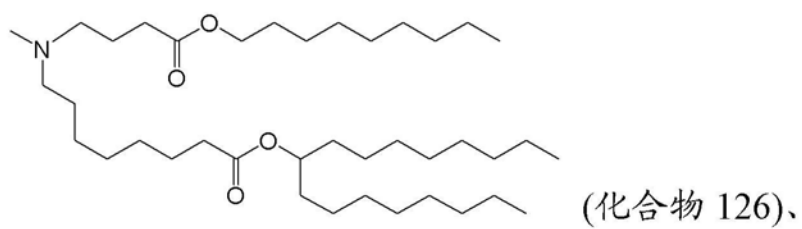
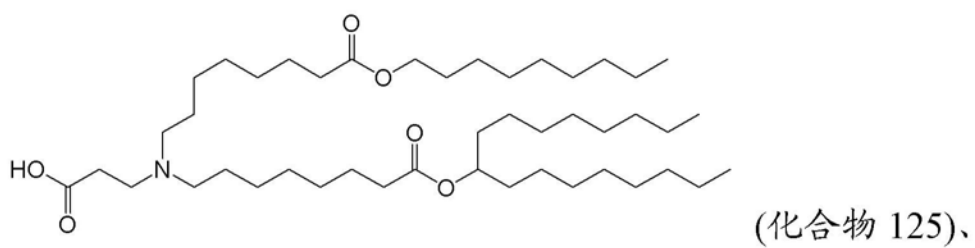
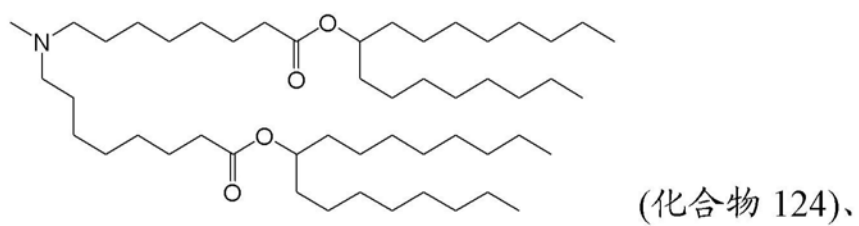
(化合物 119)、

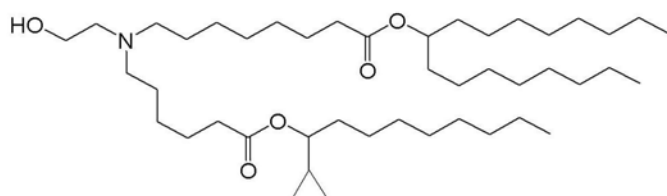


(化合物 120)、

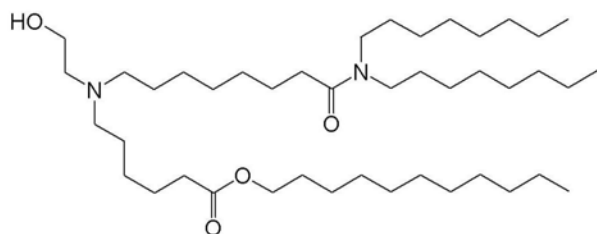


[1088]

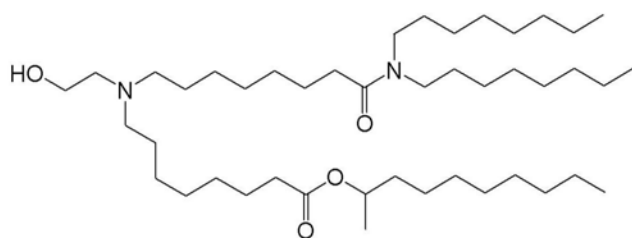




(化合物 128)、

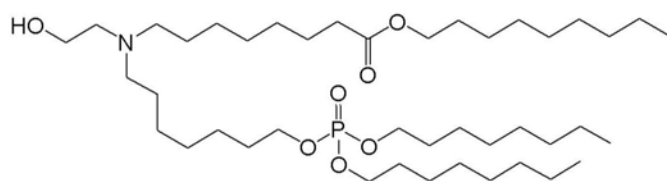


(化合物 129)、

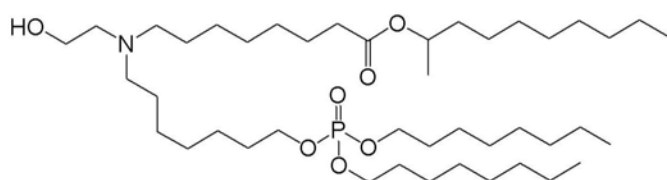


(化合物 130)、

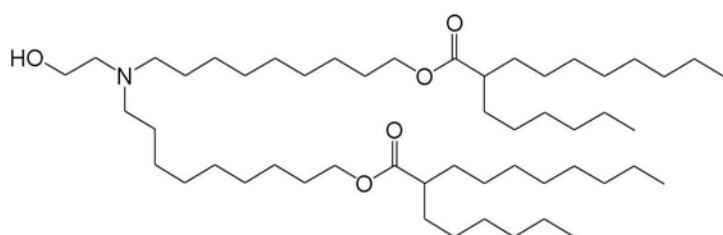
[1089]



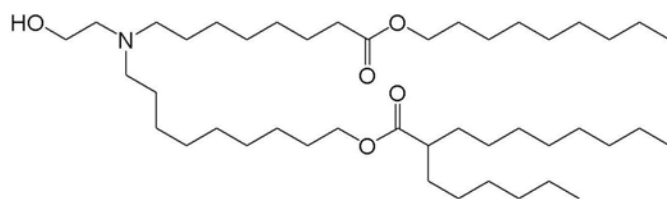
(化合物 131)、



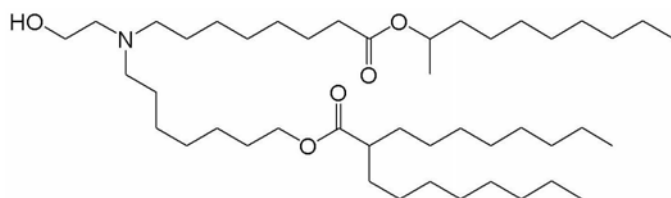
(化合物 132)、



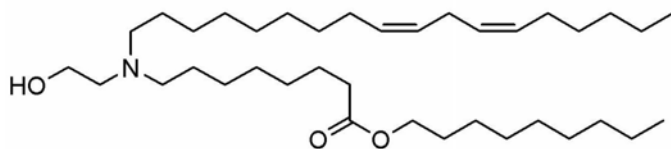
(化合物 133)、



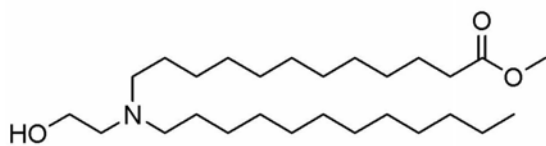
(化合物 134)、



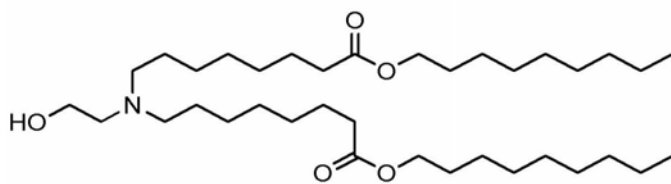
(化合物 135)、



(化合物 136)、

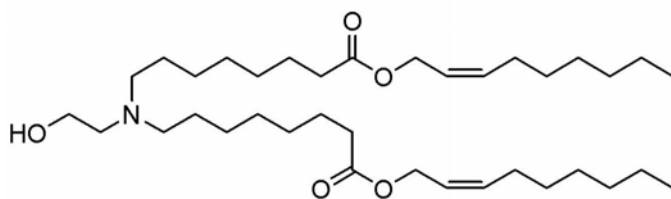


(化合物 137)、

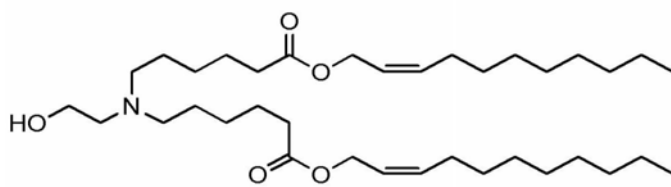


(化合物 138)、

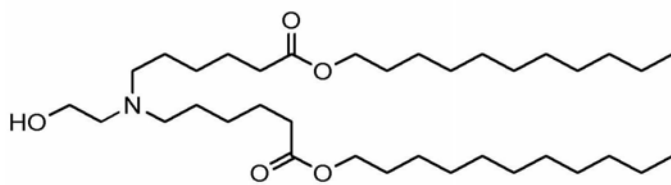
[1090]



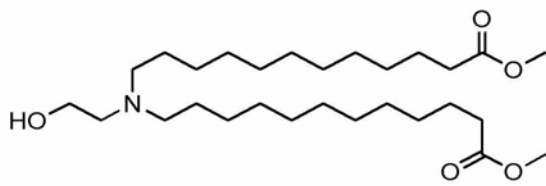
(化合物 139)、



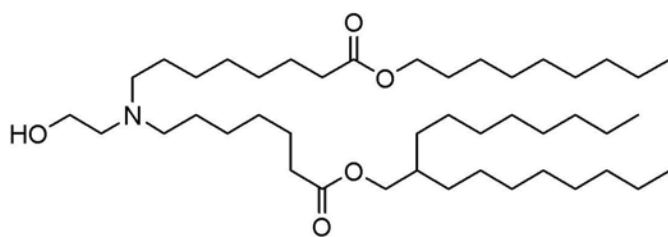
(化合物 140)、



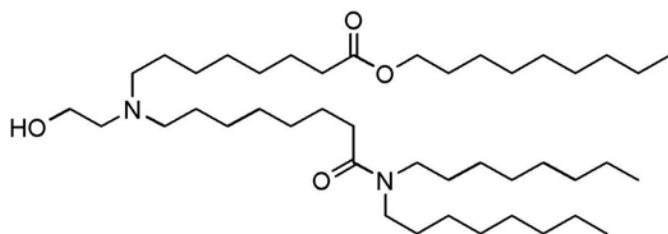
(化合物 141)、



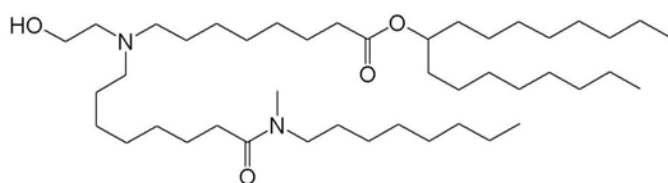
(化合物 142)、



(化合物 143)、

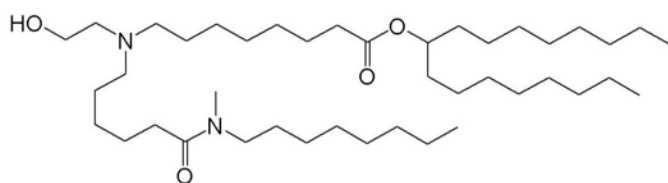


(化合物 144)、

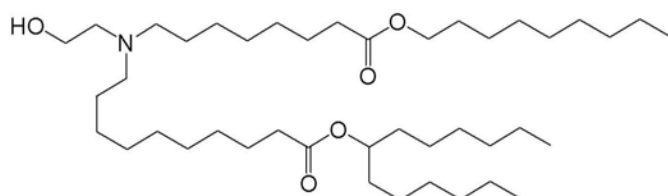


(化合物 145)、

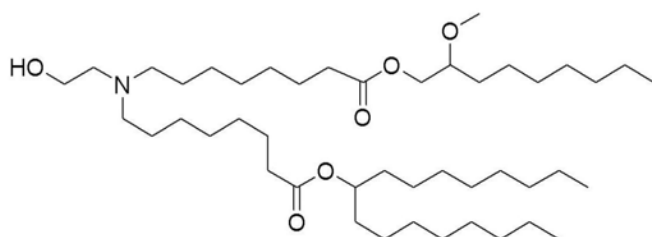
[1091]



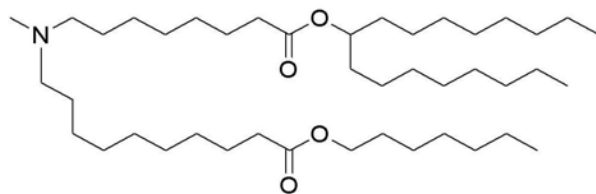
(化合物 146)、



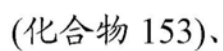
(化合物 147)、



(化合物 148)、

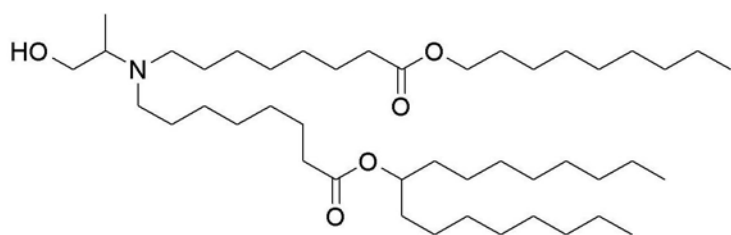


(化合物 149)、

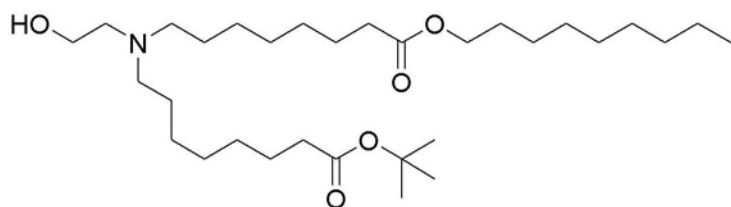


(化合物 154)、

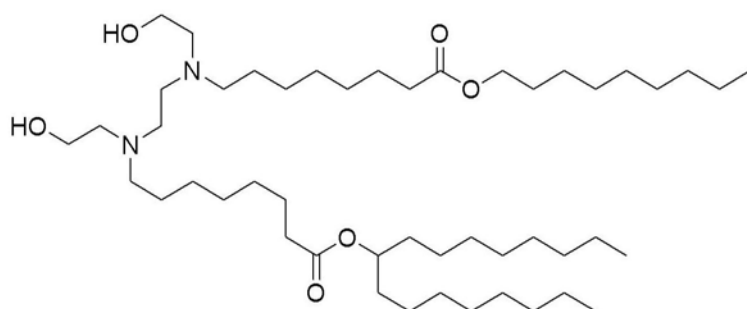




(化合物 157)、

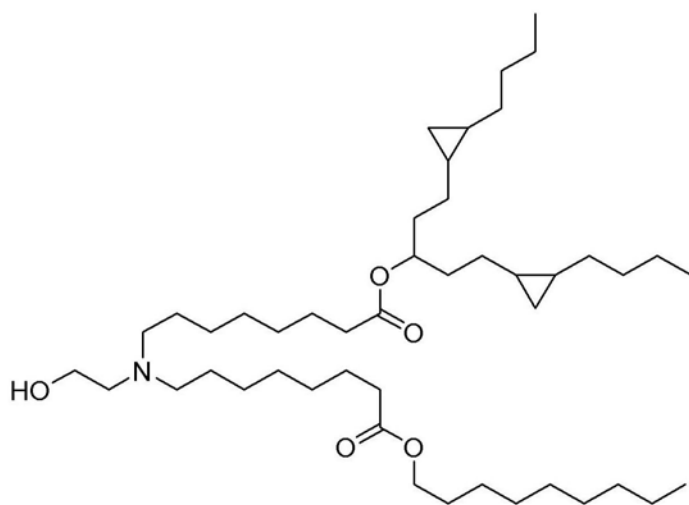


(化合物 158)、

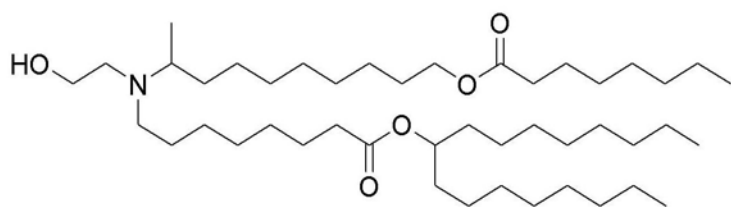


[1093]

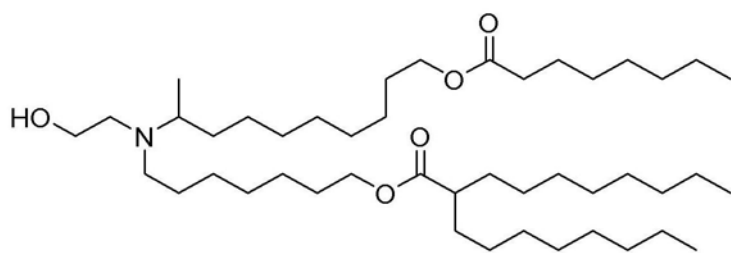
(化合物 159)、



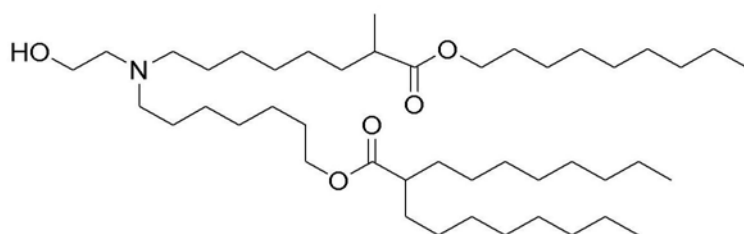
(化合物 160)、



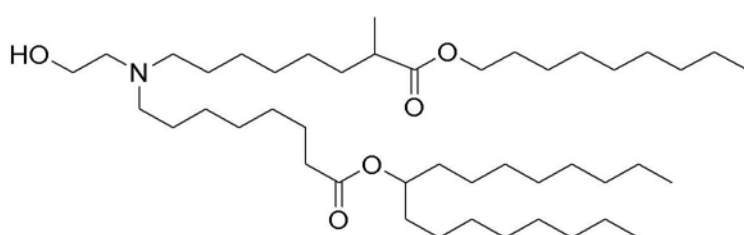
(化合物 161)、



(化合物 162)、

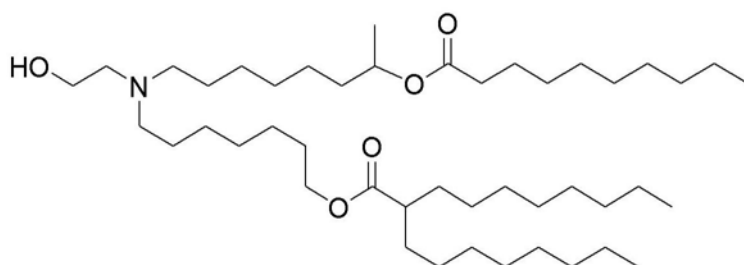


(化合物 163)、

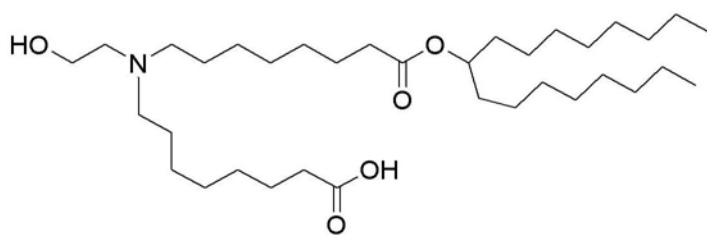


(化合物 164)、

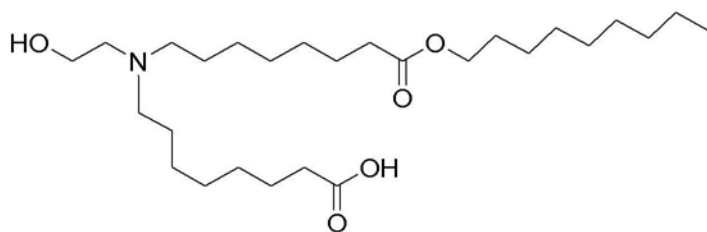
[1094]



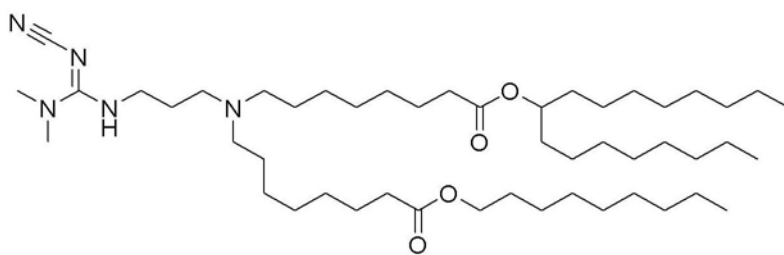
(化合物 165)、



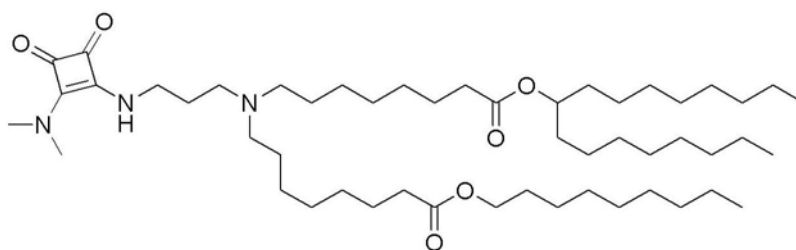
(化合物 166)、



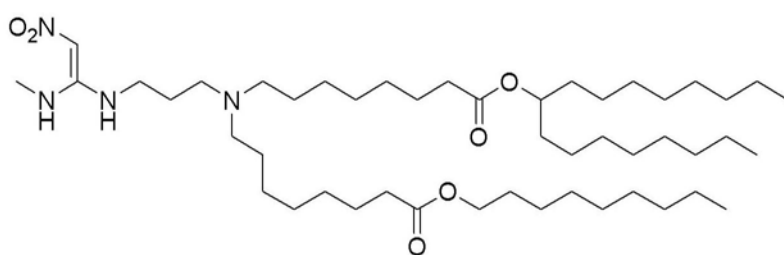
(化合物 167)、



(化合物 168)、

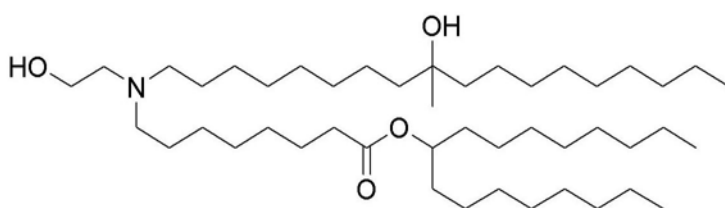


(化合物 169)、

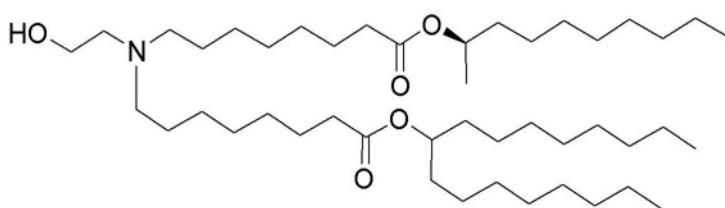


[1095]

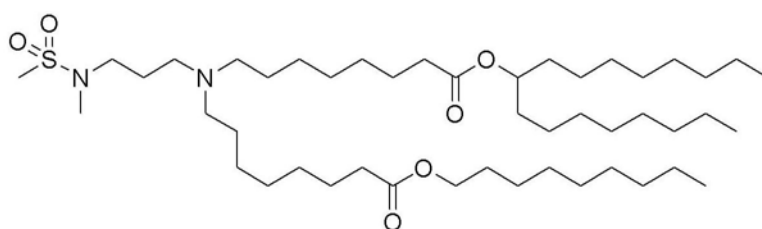
(化合物 170)、



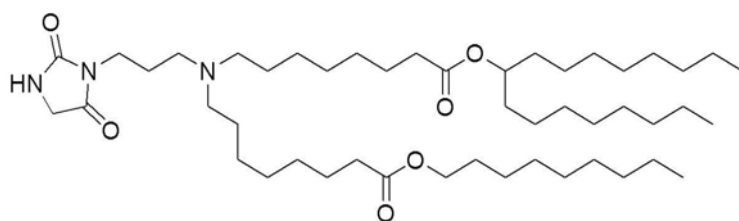
(化合物 171)、



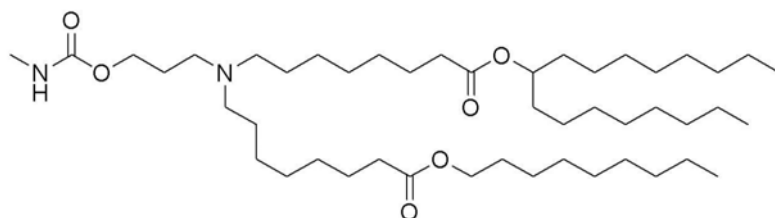
(化合物 172)、



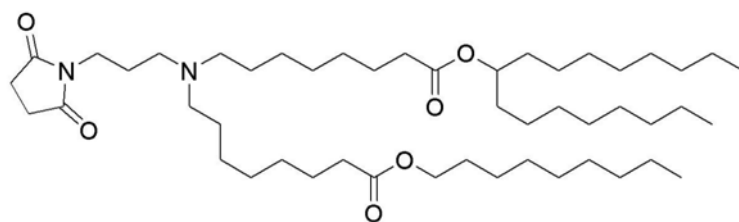
(化合物 173)、



(化合物 174)、

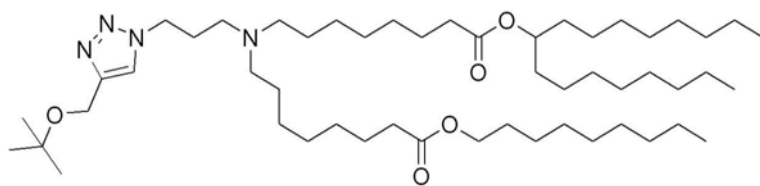


(化合物 175)、

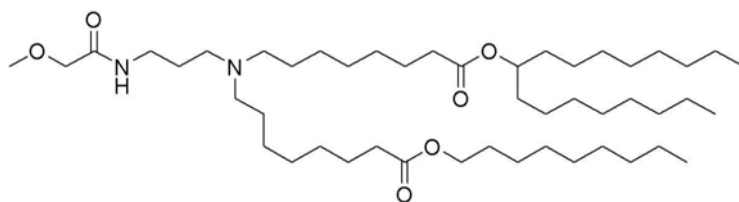


(化合物 176)、

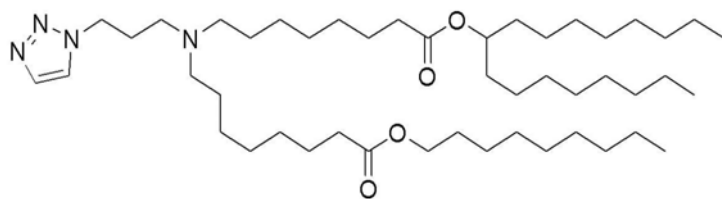
[1096]



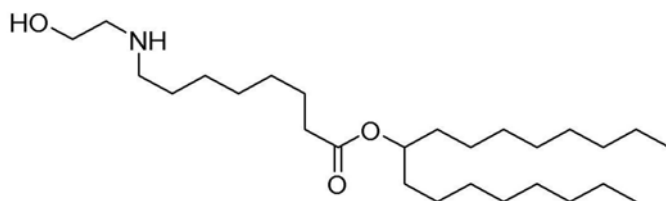
(化合物 177)、



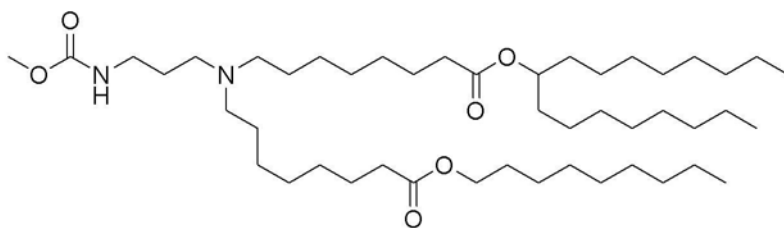
(化合物 178)、



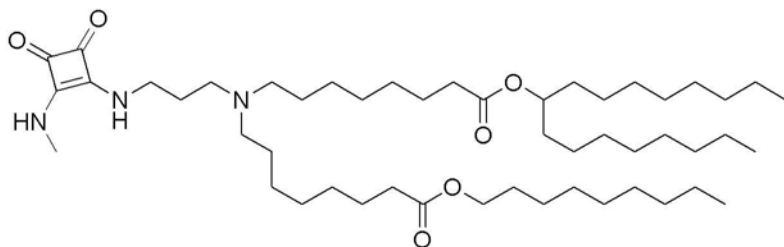
(化合物 179)、



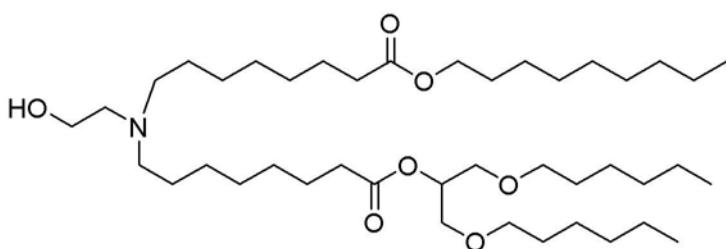
(化合物 180)、



(化合物 181)、

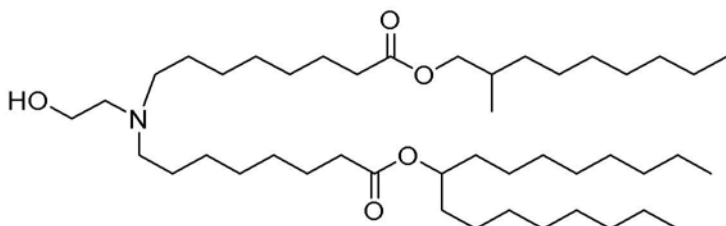


(化合物 182)、

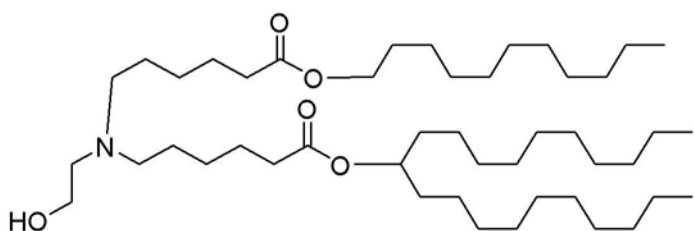


[1097]

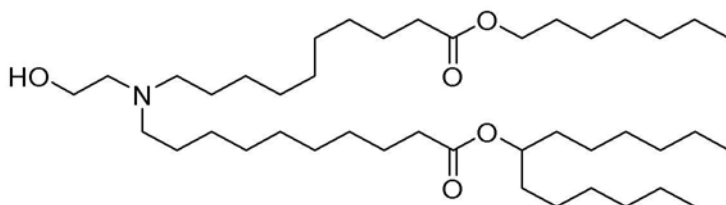
(化合物 183)、



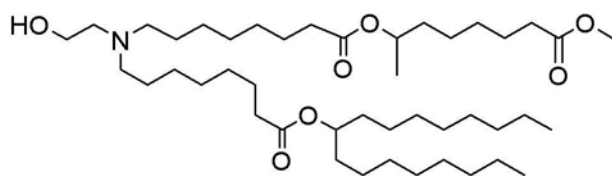
(化合物 184)、



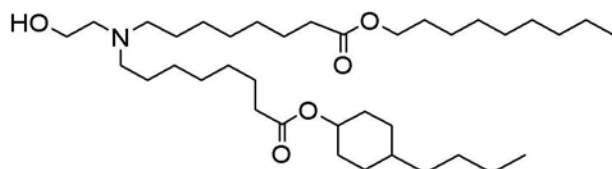
(化合物 185)、



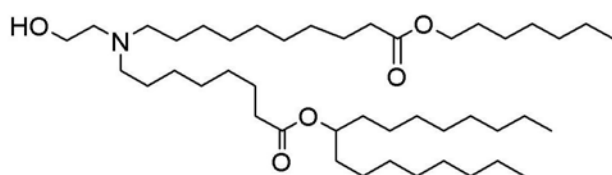
(化合物 186)、



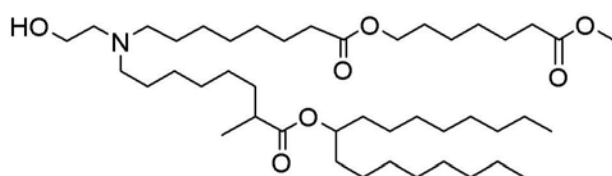
(化合物 187)、



(化合物 188)、

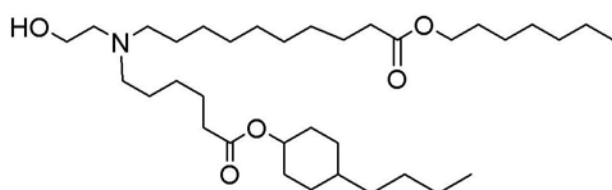


(化合物 189)、

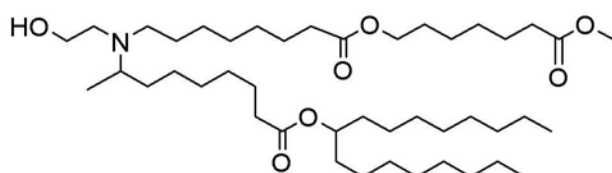


[1098]

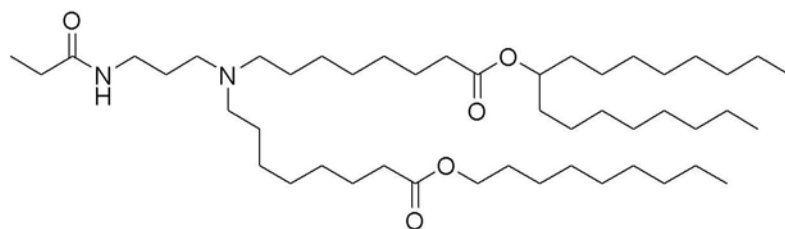
(化合物 190)、



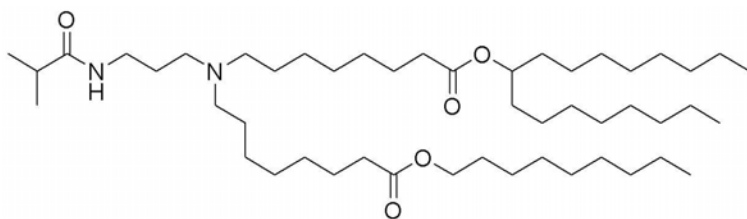
(化合物 191)、



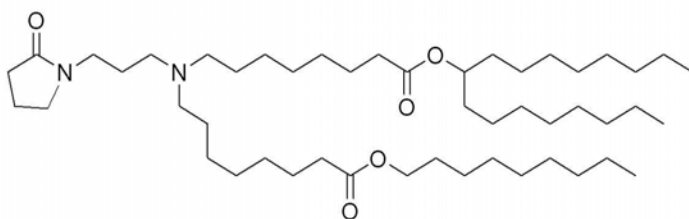
(化合物 192)、



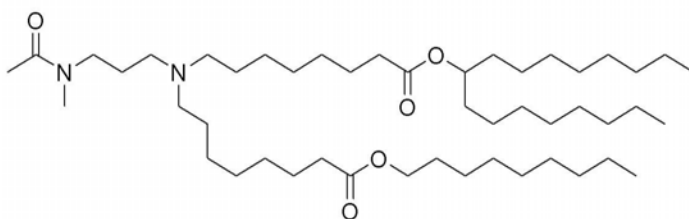
(化合物 193)、



(化合物 194)、

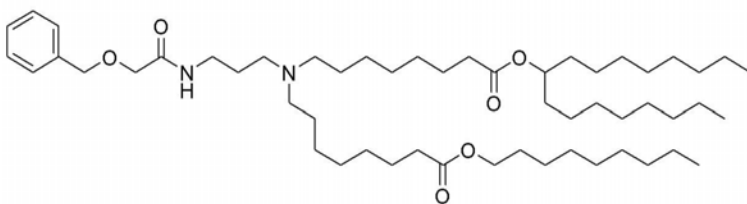


(化合物 195)、

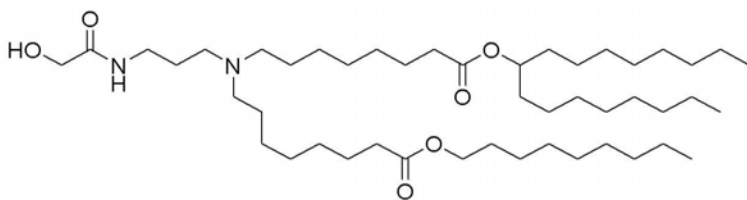


(化合物 196)、

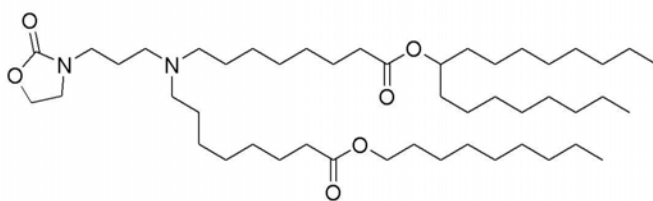
[1099]



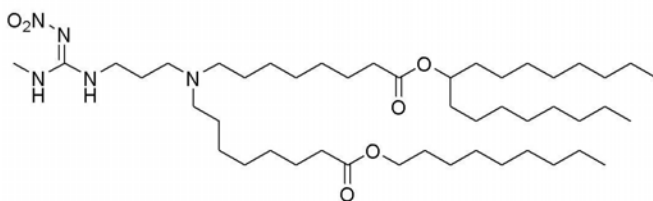
(化合物 197)、



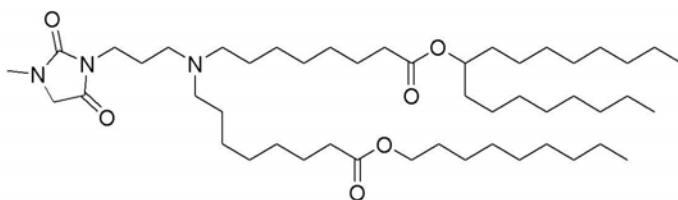
(化合物 198)、



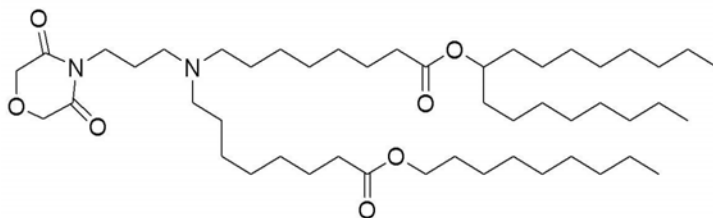
(化合物 199)、



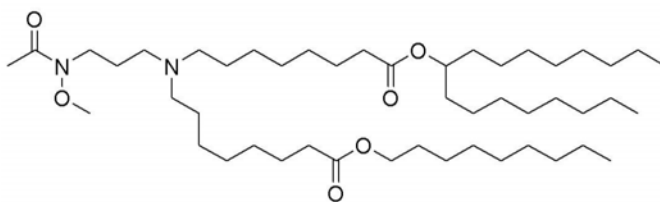
(化合物 200)、



(化合物 201)、

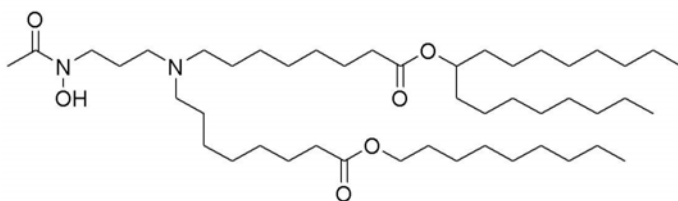


(化合物 202)、

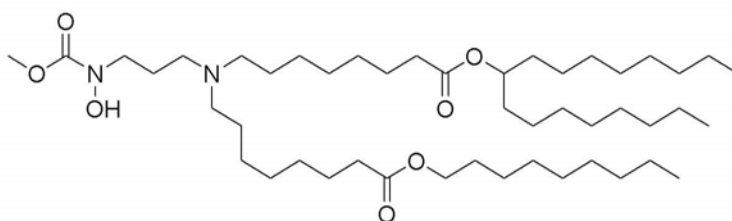


(化合物 203)、

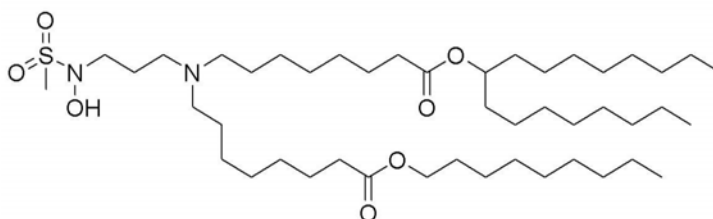
[1100]



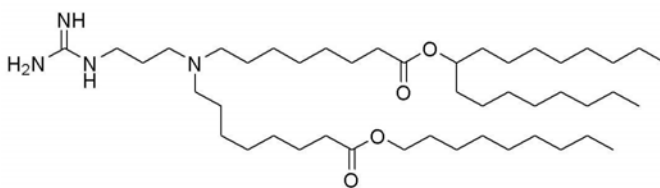
(化合物 204)、



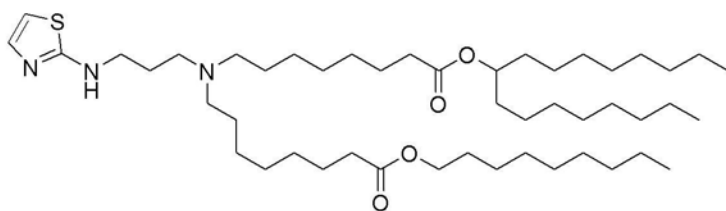
(化合物 205)、



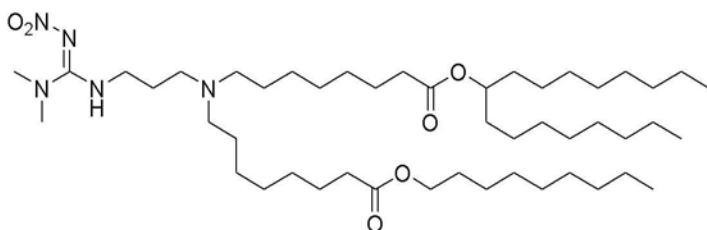
(化合物 206)、



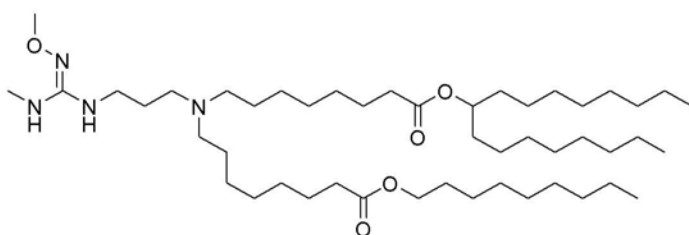
(化合物 207)、



(化合物 208)、

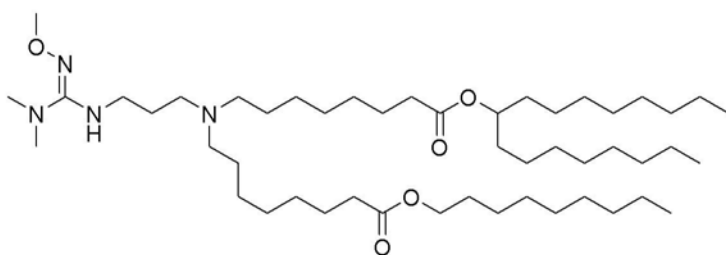


(化合物 209)、

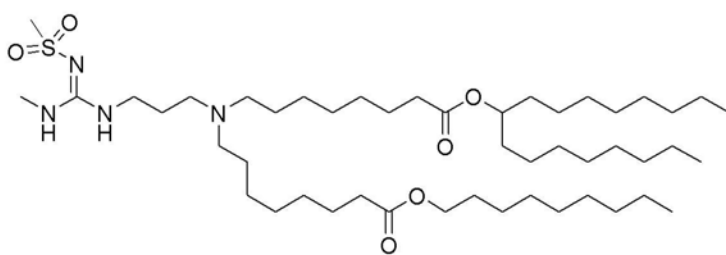


(化合物 210)、

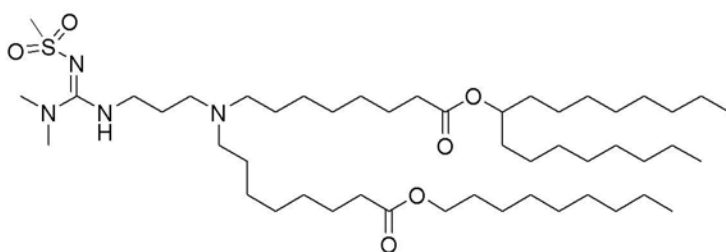
[1101]



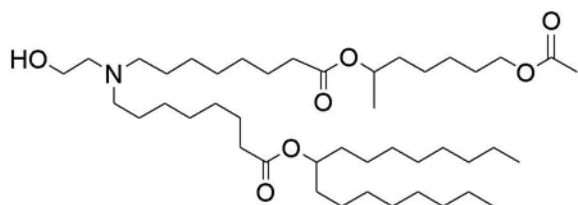
(化合物 211)、



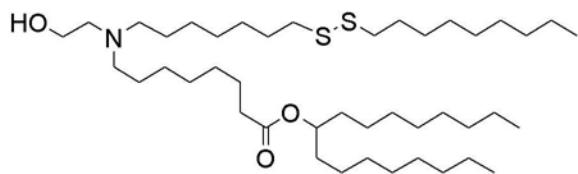
(化合物 212)、



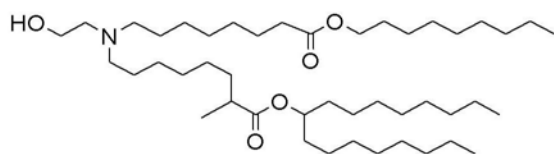
(化合物 213)、



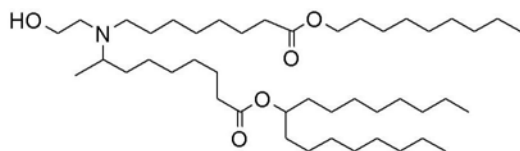
(化合物 214)、



(化合物 215)、

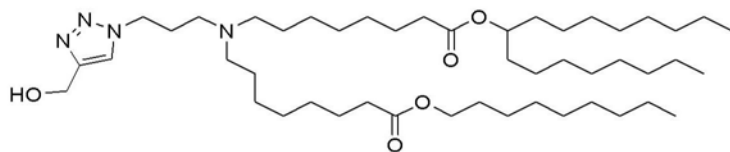


(化合物 216)、

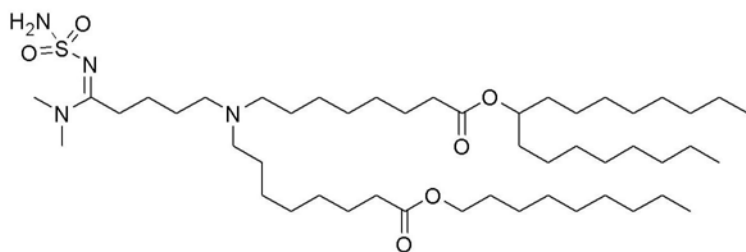


(化合物 217)、

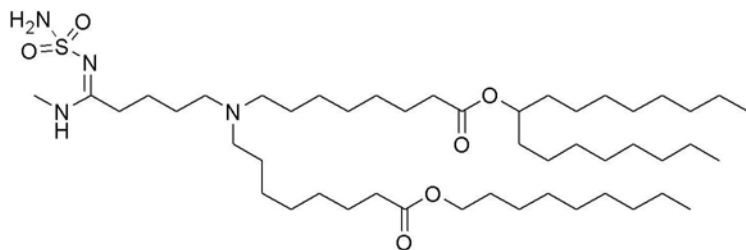
[1102]



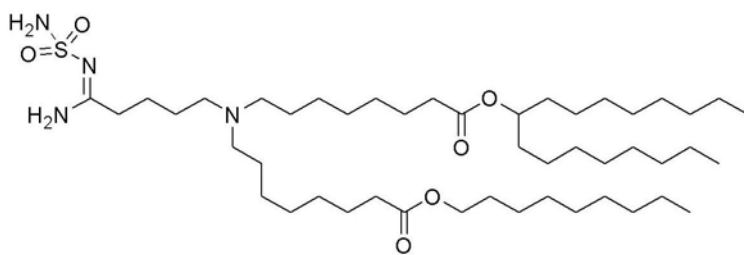
(化合物 218)、



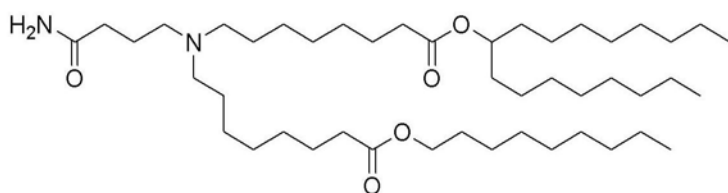
(化合物 219)、



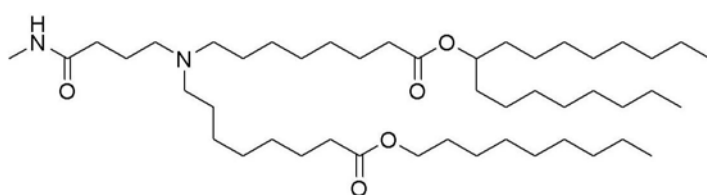
(化合物 220)、



(化合物 221)、

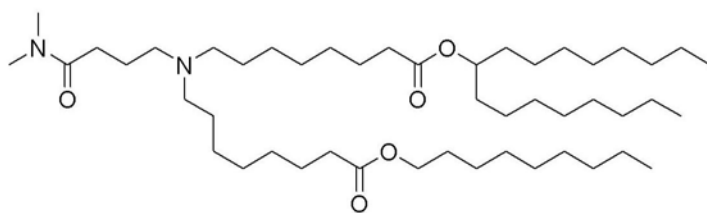


(化合物 222)、

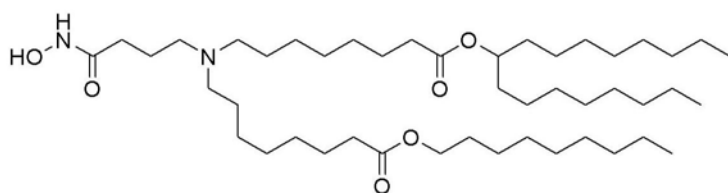


(化合物 223)、

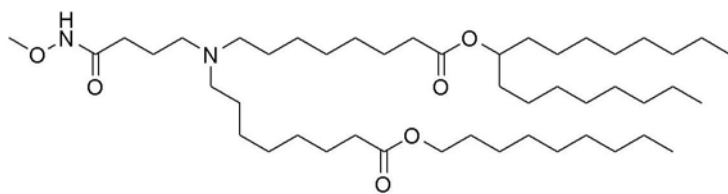
[1103]



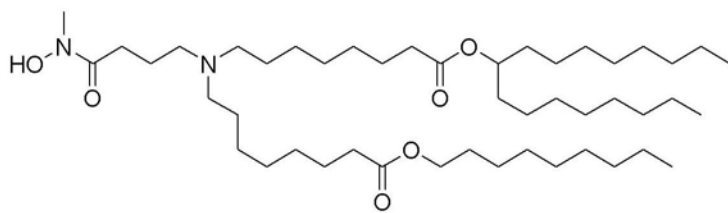
(化合物 224)、



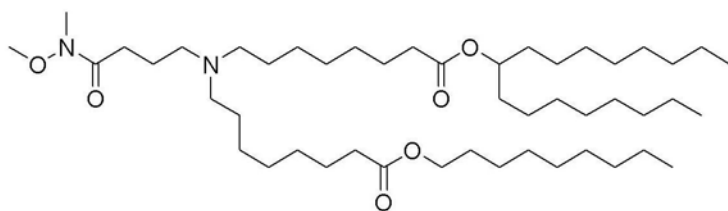
(化合物 225)、



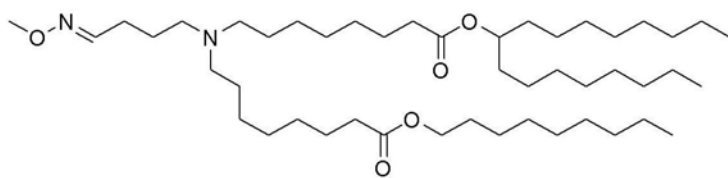
(化合物 226)、



(化合物 227)、

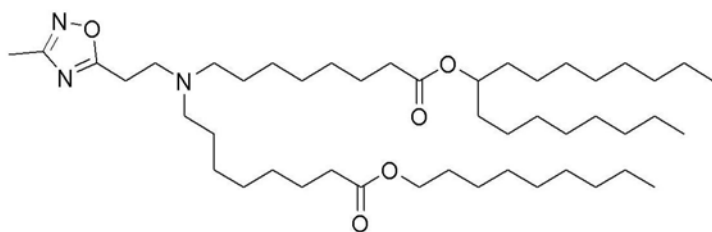


(化合物 228)、

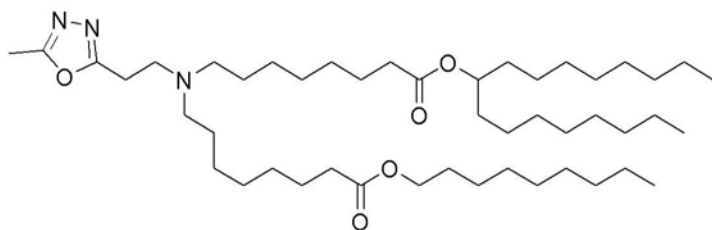


(化合物 229)、

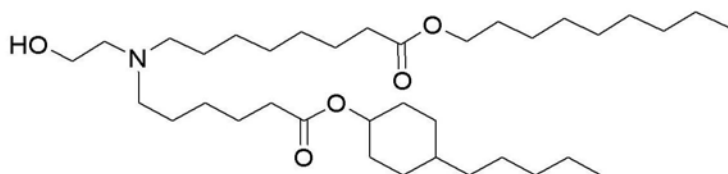
[1104]



(化合物 230)、



(化合物 231)、

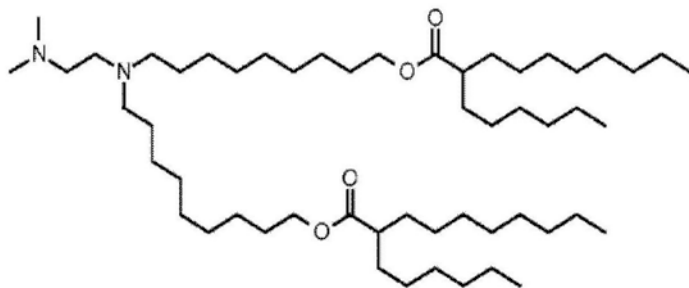


(化合物 232)、

[1105] 以及其盐或立体异构体。

[1106] 在一些实施方案中,纳米粒子包含以下化合物:

[1107]



或其盐或

(化合物 343)

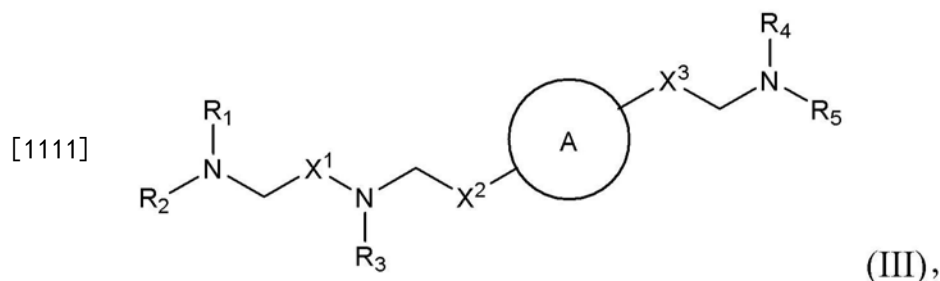
立体异构体。

[1108] 在其他实施方案中,式(I)化合物是选自由化合物1-化合物147、或其盐或立体异构体组成的组。

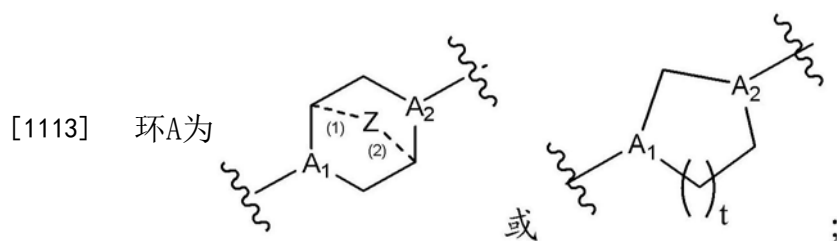
[1109] 在一些实施方案中,提供了包含中心哌嗪部分的可电离脂质。本文所述的脂质可

有利地用于脂质纳米粒子组合物中以用于将治疗剂和/或防治剂递送至哺乳动物细胞或器官。例如,本文所述的脂质具有很小的免疫原性或没有免疫原性。例如,与参考脂质(例如,MC3、KC2或DLinDMA)相比,本文公开的脂质化合物具有较低的免疫原性。例如,与包含参考脂质(例如,MC3、KC2或DLinDMA)和相同治疗剂或防治剂的相应制剂相比,包含本文公开的脂质和治疗剂或防治剂的制剂具有增加的治疗指数。

[1110] 在一些实施方案中,所述递送剂包含具有式(III)的脂质化合物



[1112] 或其盐或立体异构体,其中



[1114] t是1或2;

[1115] A₁和A₂各自独立地选自CH或N;

[1116] Z是CH₂或不存在,其中当Z是CH₂时,虚线(1)和(2)各自表示单键;并且当Z不存在时,虚线(1)和(2)均不存在;

[1117] R₁、R₂、R₃、R₄和R₅独立地选自由以下组成的组:C₅₋₂₀烷基、C₅₋₂₀烯基、-R^{''}MR'、-R*YR^{''}、-YR^{''}以及-R*OR^{''};

[1118] 每个M独立地选自由以下组成的组:-C(O)O-、-OC(O)-、-OC(O)O-、-C(O)N(R')-、-N(R')C(O)-、-C(O)-、-C(S)-、-C(S)S-、-SC(S)-、-CH(OH)-、-P(O)(OR')O-、-S(O)₂-、芳基以及杂芳基;

[1119] X¹、X²和X³独立地选自由以下组成的组:键、-CH₂-、-(CH₂)₂-、-CHR-、-CHY-、-C(O)-、-C(O)O-、-OC(O)-、-C(O)-CH₂-、-CH₂-C(O)-、-C(O)O-CH₂-、-OC(O)-CH₂-、-CH₂-C(O)O-、-CH₂-OC(O)-、-CH(OH)-、-C(S)-以及-CH(SH)-;

[1120] 每个Y独立地是C₃₋₆碳环;

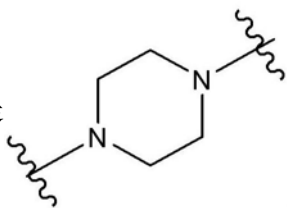
[1121] 每个R*独立地选自由以下组成的组:C₁₋₁₂烷基和C₂₋₁₂烯基;

[1122] 每个R独立地选自由以下组成的组:C₁₋₃烷基和C₃₋₆碳环;

[1123] 每个R'独立地选自由以下组成的组:C₁₋₁₂烷基、C₂₋₁₂烯基和H;并且

[1124] 每个R^{''}独立地选自由以下组成的组:C₃₋₁₂烷基和C₃₋₁₂烯基,

[1125] 其中当环A是

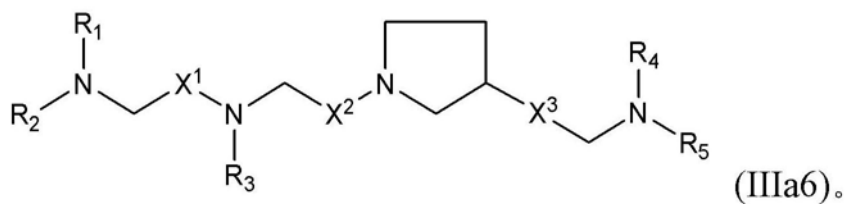
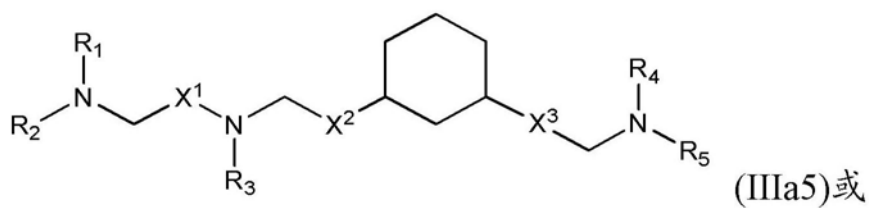
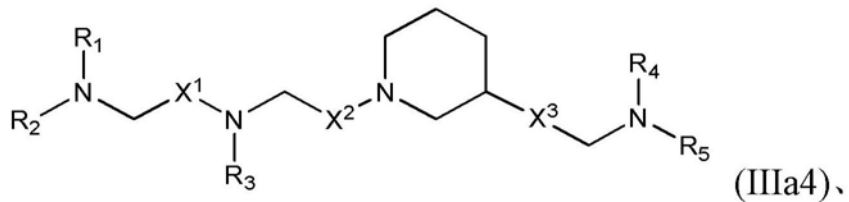
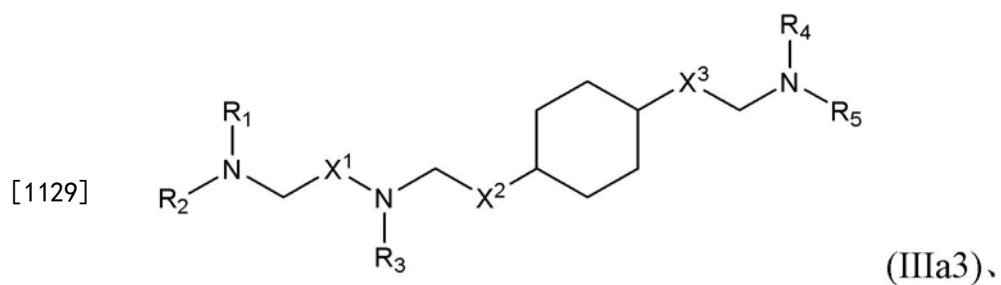
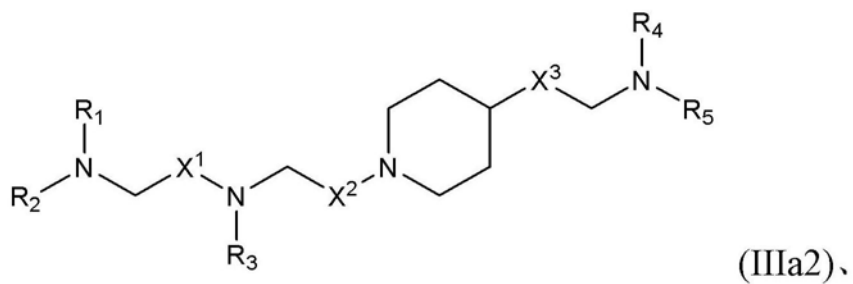
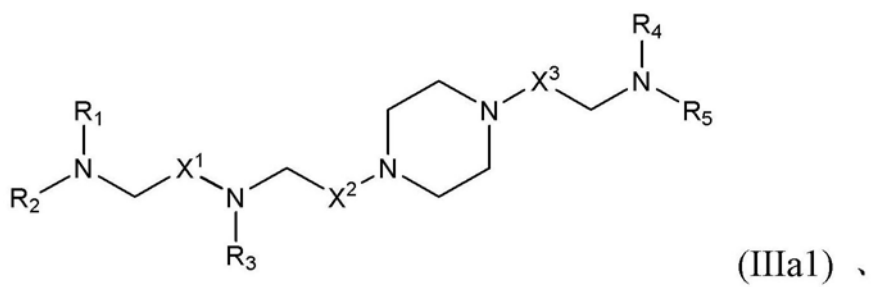


时,则

[1126] i) X^1 、 X^2 和 X^3 中的至少一个不是 $-\text{CH}_2-$;和/或

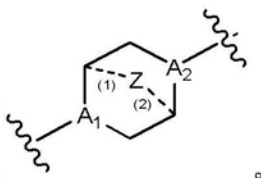
[1127] ii) R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 和 R_5 中的至少一个是 $-\text{R}''\text{MR}'$ 。

[1128] 在一些实施方案中,所述化合物是式 (IIIa1) – (IIIa6) 中的任一种:

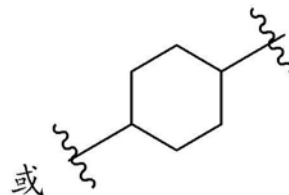
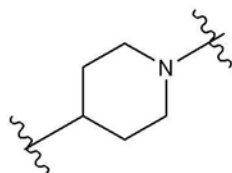


[1130] 式(III)或(IIIa1)-(IIIa6)中的任一种的化合物在适用时包括一种或多种以下特征。

[1131] 在一些实施方案中,环A是



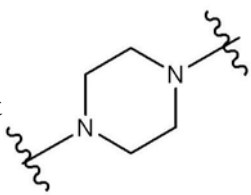
[1132] 在一些实施方案中,环A是



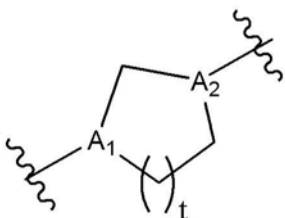
在一些实施

或

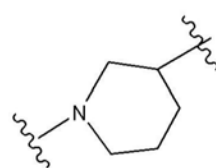
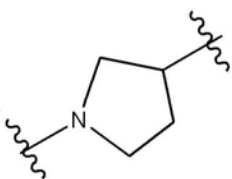
方案中,环A是



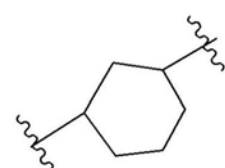
[1133] 在一些实施方案中,环A是



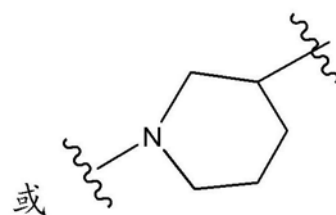
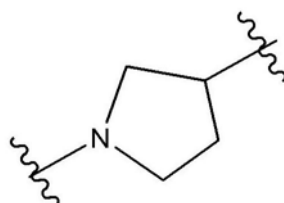
[1134] 在一些实施方案中,环A是



或



[1135] 在一些实施方案中,环A是



或

其中

环,其中N原子与 X^2 连接。

[1136] 在一些实施方案中,Z是 CH_2 。

[1137] 在一些实施方案中,Z不存在。

[1138] 在一些实施方案中, A_1 和 A_2 中的至少一个是N。

[1139] 在一些实施方案中, A_1 和 A_2 中的每一个是N。

[1140] 在一些实施方案中, A_1 和 A_2 中的每一个是CH。

[1141] 在一些实施方案中, A_1 是N,并且 A_2 是CH。

[1142] 在一些实施方案中, A_1 是CH,并且 A_2 是N。

[1143] 在一些实施方案中, X^1 、 X^2 和 X^3 中的至少一个不是 $-CH_2-$ 。例如,在某些实施方案中, X^1 不是 $-CH_2-$ 。在一些实施方案中, X^1 、 X^2 和 X^3 中的至少一个是 $-C(O)-$ 。

[1144] 在一些实施方案中, X^2 是 $-C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-C(O)-CH_2-$ 、 $-CH_2-C(O)-$ 、 $-C(O)O-CH_2-$ 、 $-OC(O)-CH_2-$ 、 $-CH_2-C(O)O-$ 或 $-CH_2-OC(O)-$ 。

[1145] 在一些实施方案中, X^3 是 $-C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-C(O)-CH_2-$ 、 $-CH_2-C(O)-$ 、 $-C(O)O-CH_2-$ 、 $-OC(O)-CH_2-$ 、 $-CH_2-C(O)O-$ 或 $-CH_2-OC(O)-$ 。在其他实施方案中, X^3 是 $-CH_2-$ 。

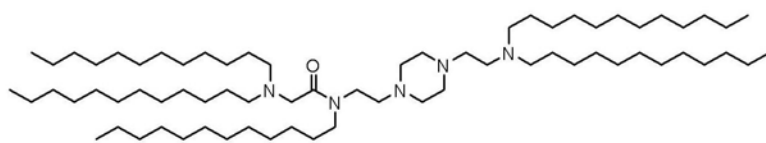
[1146] 在一些实施方案中, X^3 是键或 $-(CH_2)_2-$ 。

[1147] 在一些实施方案中, R_1 和 R_2 是相同的。在一些实施方案中, R_1 、 R_2 和 R_3 是相同的。在一些实施方案中, R_4 和 R_5 是相同的。在一些实施方案中, R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 和 R_5 是相同的。

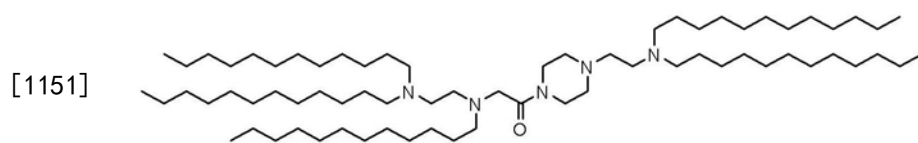
[1148] 在一些实施方案中, R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 和 R_5 中的至少一个是 $-R''MR'$ 。在一些实施方案中, R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 和 R_5 中的至多一个是 $-R''MR'$ 。例如, R_1 、 R_2 和 R_3 中的至少一个可以是 $-R''MR'$, 和/或 R_4 和 R_5 中的至少一个是 $-R''MR'$ 。在某些实施方案中, 至少一个 M 是 $-C(O)O-$ 。在一些实施方案中, 每个 M 是 $-C(O)O-$ 。在一些实施方案中, 至少一个 M 是 $-OC(O)-$ 。在一些实施方案中, 每个 M 是 $-OC(O)-$ 。在一些实施方案中, 至少一个 M 是 $-OC(O)O-$ 。在一些实施方案中, 每个 M 是 $-OC(O)O-$ 。在一些实施方案中, 至少一个 R'' 是 C_3 烷基。在某些实施方案中, 每个 R'' 是 C_3 烷基。在一些实施方案中, 至少一个 R'' 是 C_5 烷基。在某些实施方案中, 每个 R'' 是 C_5 烷基。在一些实施方案中, 至少一个 R'' 是 C_6 烷基。在某些实施方案中, 每个 R'' 是 C_6 烷基。在一些实施方案中, 至少一个 R'' 是 C_7 烷基。在某些实施方案中, 每个 R'' 是 C_7 烷基。在一些实施方案中, 至少一个 R' 是 C_5 烷基。在某些实施方案中, 每个 R' 是 C_5 烷基。在一些实施方案中, 至少一个 R' 是 C_1 烷基。在某些实施方案中, 每个 R' 是 C_1 烷基。在一些实施方案中, 至少一个 R' 是 C_2 烷基。在某些实施方案中, 每个 R' 是 C_2 烷基。

[1149] 在一些实施方案中, R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 和 R_5 中的至少一个是 C_{12} 烷基。在某些实施方案中, R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 和 R_5 中的每个是 C_{12} 烷基。

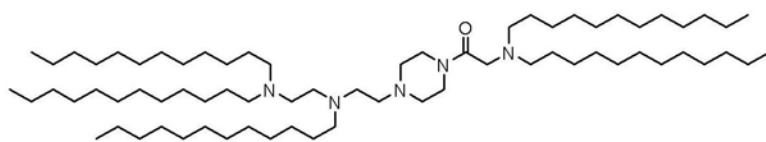
[1150] 在某些实施方案中, 化合物选自由以下各项组成的组:



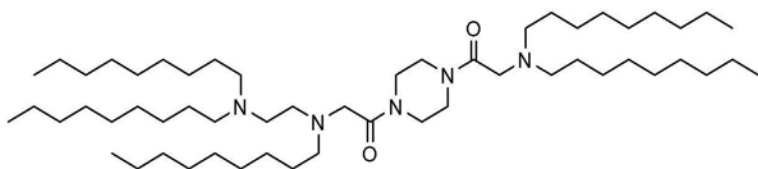
(化合物 233)、



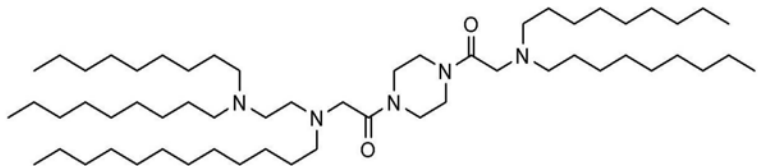
(化合物 234)、



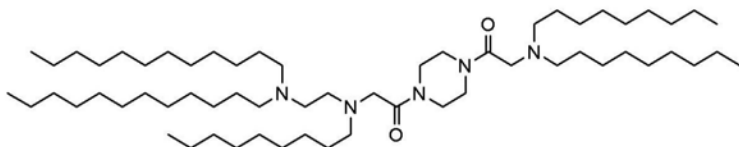
(化合物 235)、



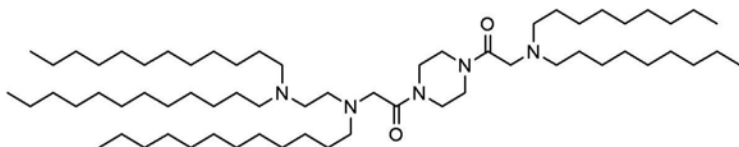
(化合物 236)、



(化合物 237)、

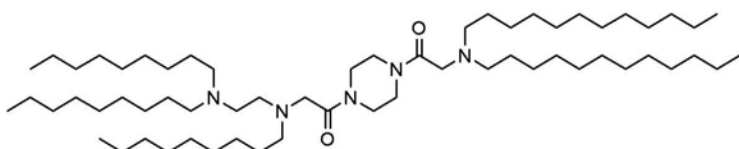


(化合物 238)、

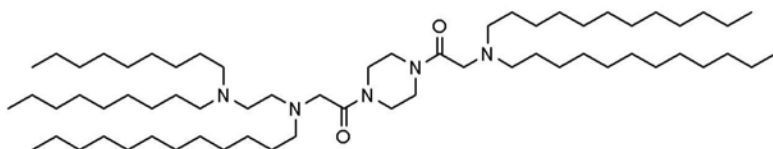


(化合物 239)、

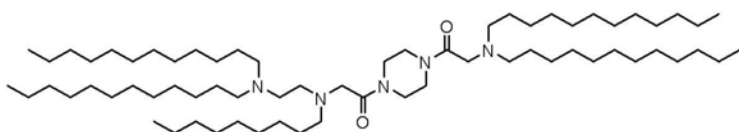
[1152]



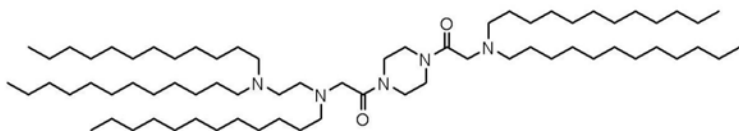
(化合物 240)、



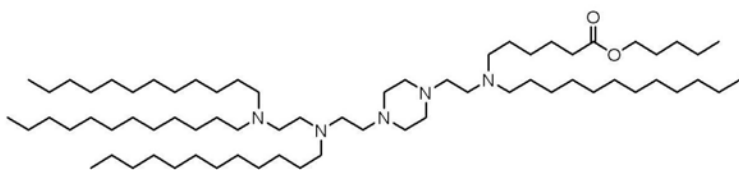
化合物 241)、



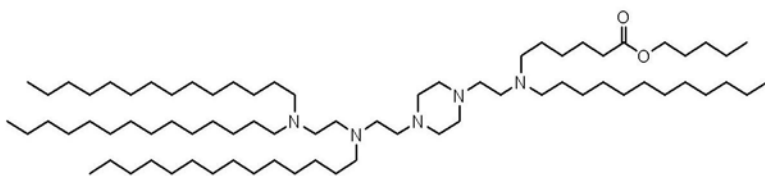
(化合物 242)、



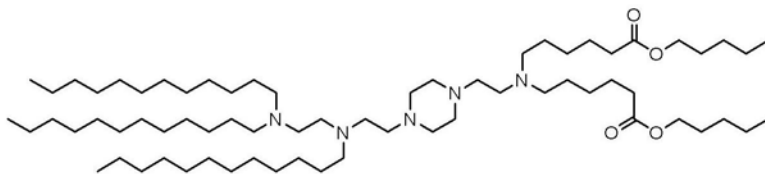
(化合物 243)、



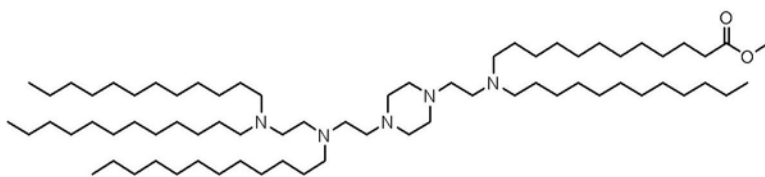
(化合物 244)、



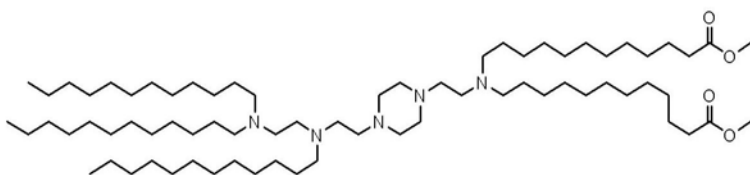
(化合物 245)、



(化合物 246)、

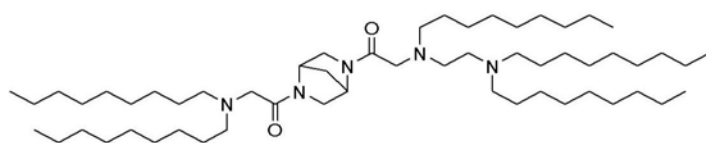


(化合物 247)、

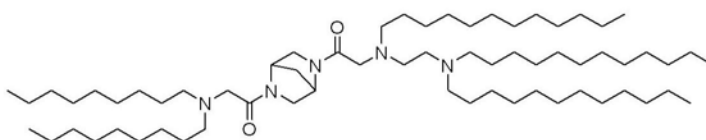


[1153]

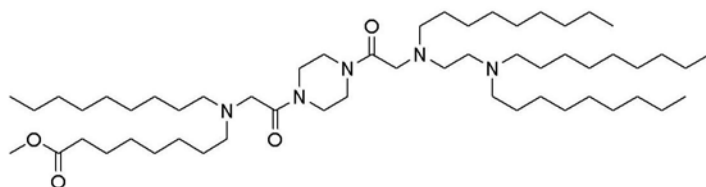
(化合物 248)、



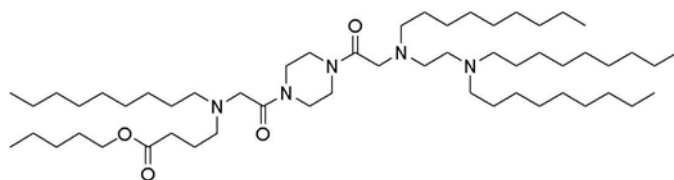
(化合物 274)、



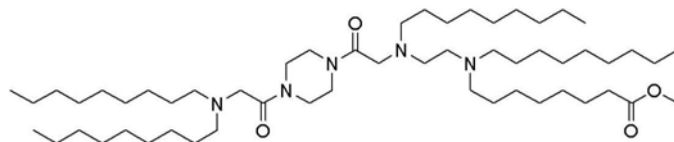
(化合物 275)、



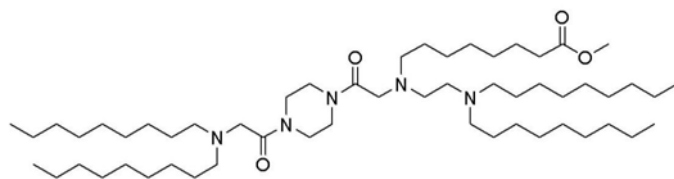
(化合物 276)、



(化合物 277)、

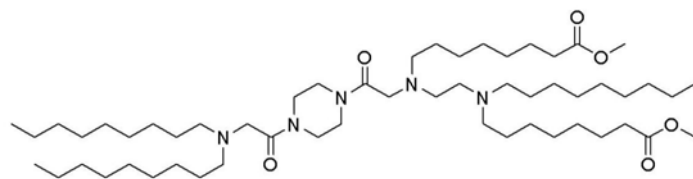


(化合物 278)、

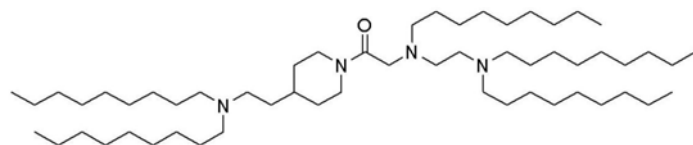


(化合物 279)、

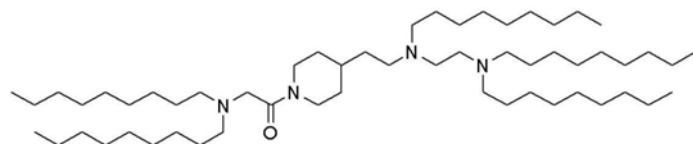
[1154]



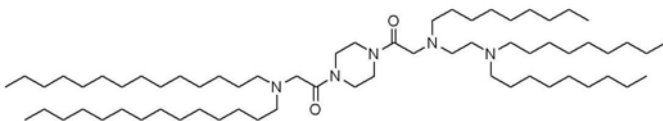
(化合物 280)、



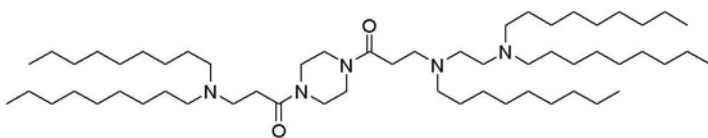
(化合物 281)、



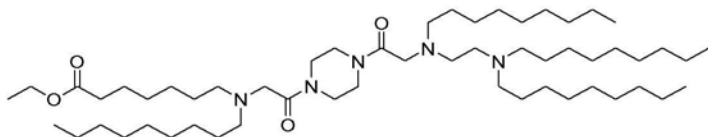
(化合物 282)、



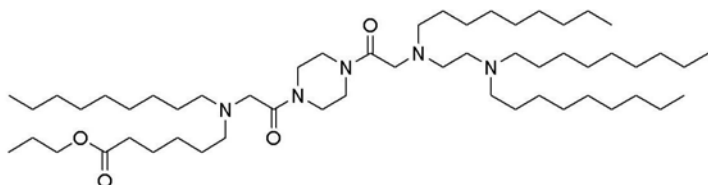
(化合物 283)、



(化合物 284)、

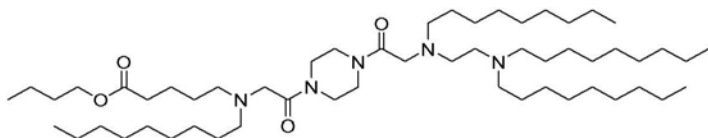


(化合物 285)、

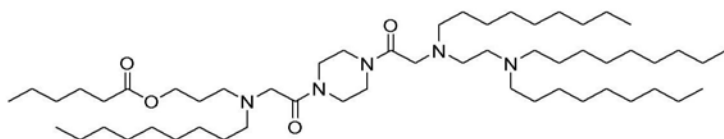


(化合物 286)、

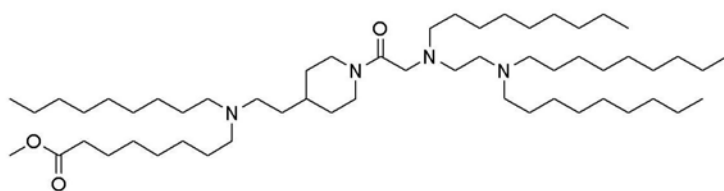
[1155]



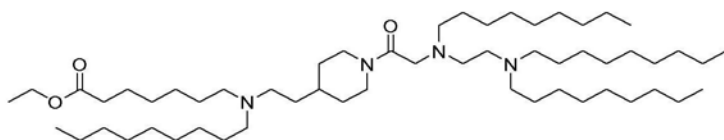
(化合物 287)、



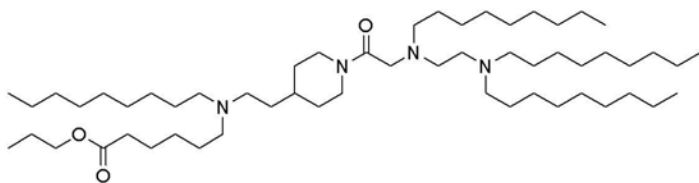
(化合物 288)、



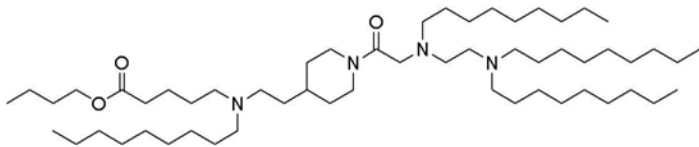
(化合物 289)、



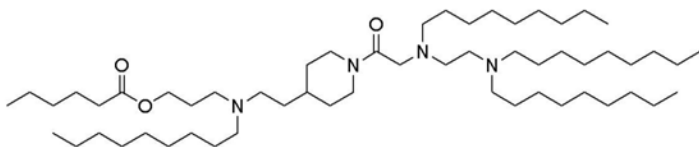
(化合物 290)、



(化合物 291)、

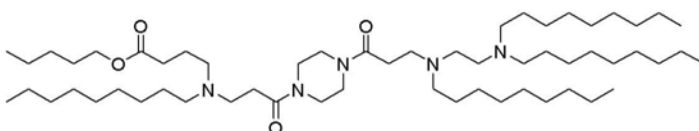


(化合物 292)、

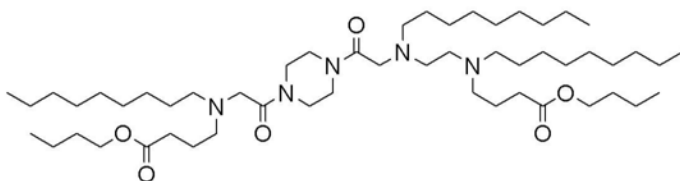


(化合物 293)、

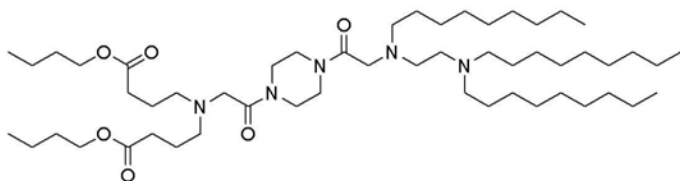
[1156]



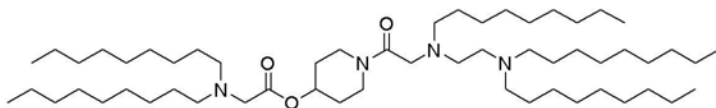
(化合物 294)、



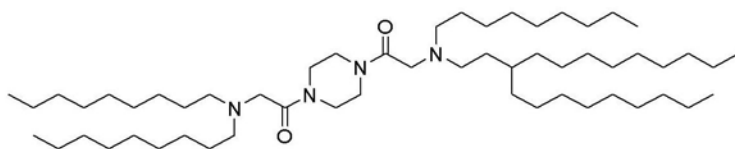
(化合物 295)、



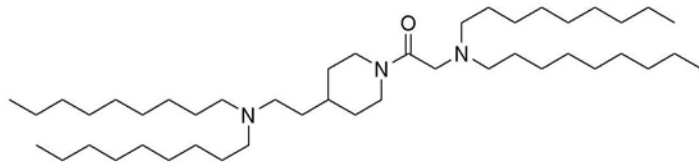
(化合物 296)、



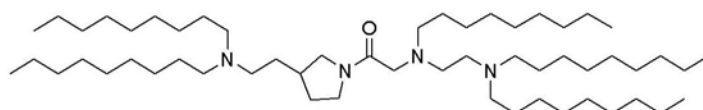
(化合物 297)、



(化合物 298)、

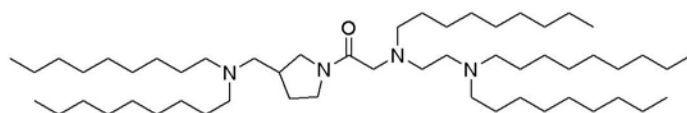


(化合物 300)、

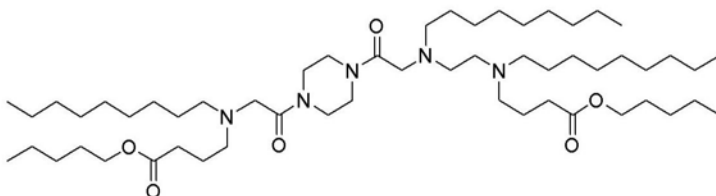


(化合物 301)、

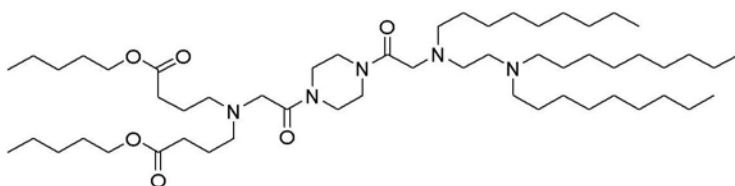
[1157]



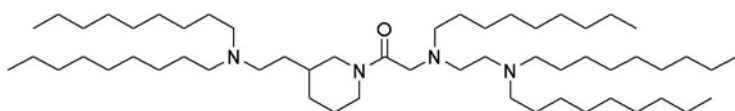
(化合物 302)、



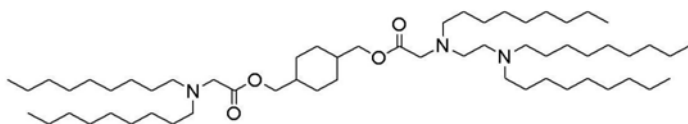
(化合物 303)、



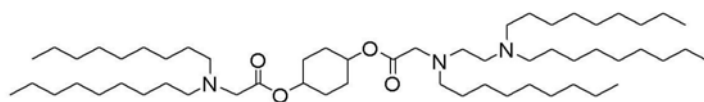
(化合物 304)、



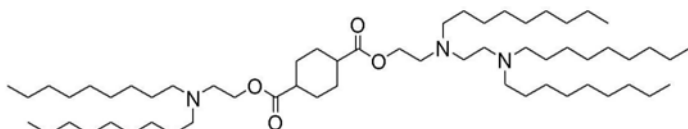
(化合物 305)、



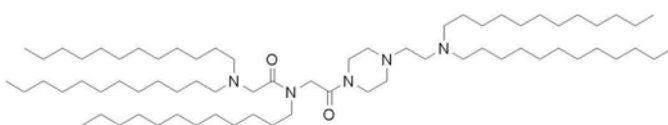
(化合物 306)、



(化合物 307)、

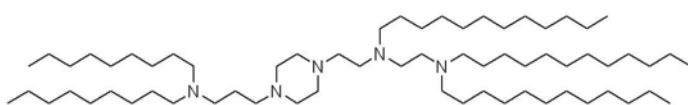


(化合物 308)、

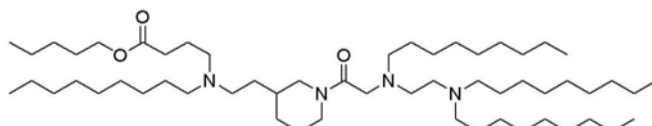


(化合物 310)、

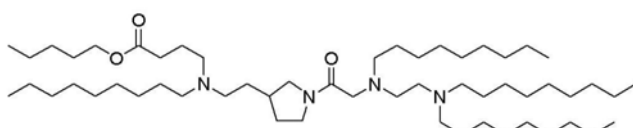
[1158]



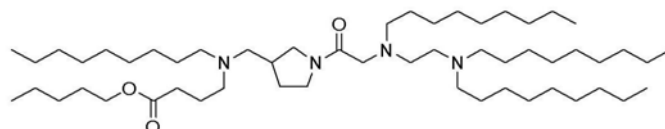
(化合物 311)、



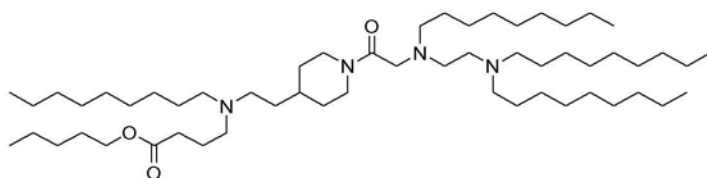
(化合物 312)、



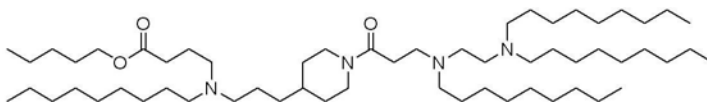
(化合物 313)、



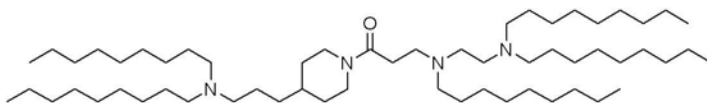
(化合物 314)、



(化合物 315)、

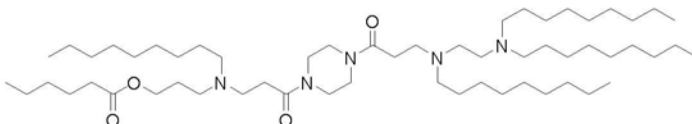


(化合物 316)、

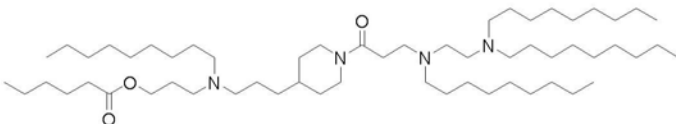


(化合物 317)、

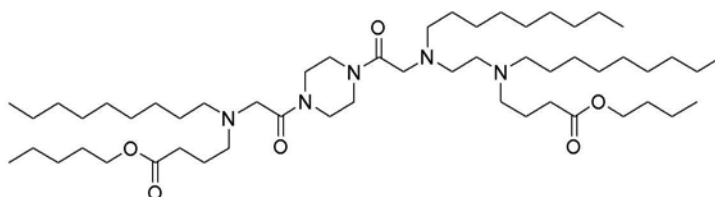
[1159]



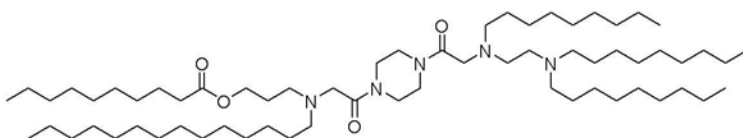
(化合物 318)、



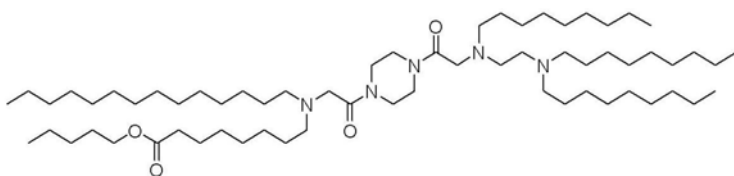
(化合物 319)、



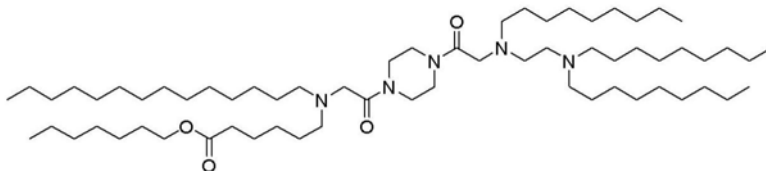
(化合物 320)、



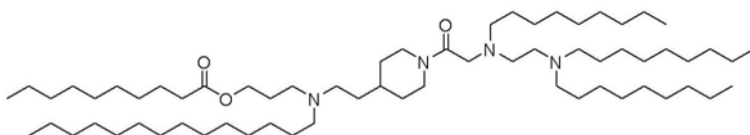
(化合物 321)、



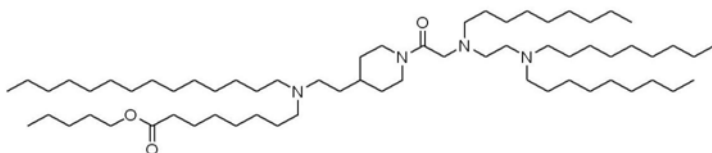
(化合物 322)、



(化合物 323)、

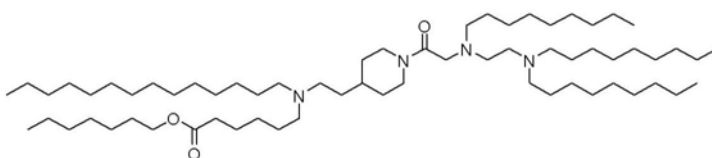


(化合物 324)、

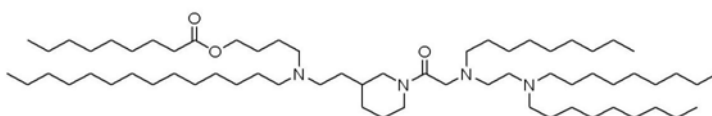


(化合物 325)、

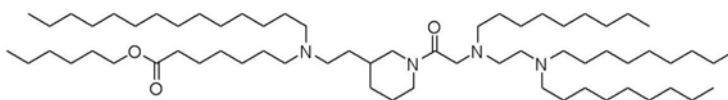
[1160]



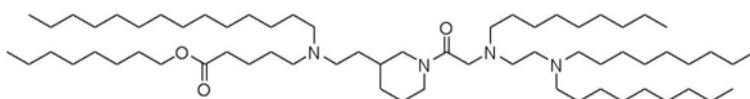
(化合物 326)、



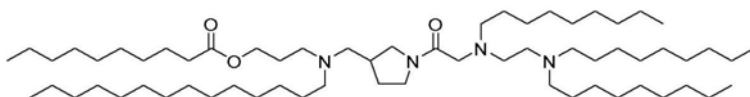
(化合物 327)、



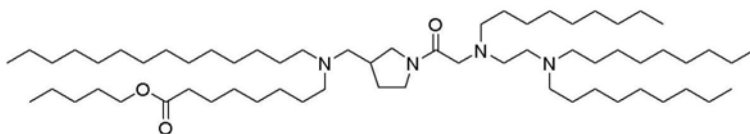
(化合物 328)、



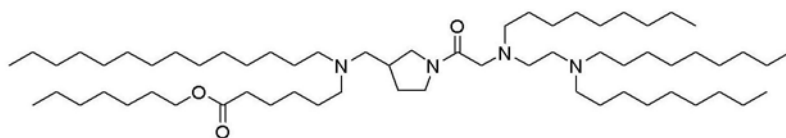
(化合物 329)、



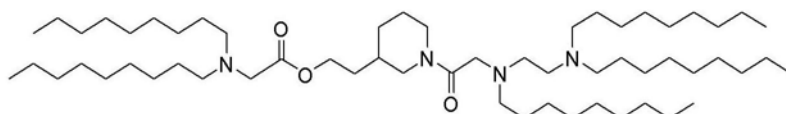
(化合物 330)、



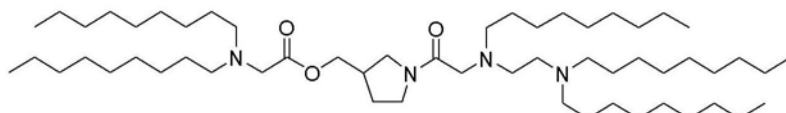
(化合物 331)、



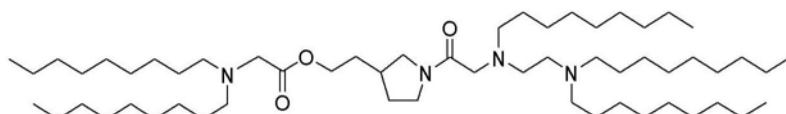
(化合物 332)、



(化合物 333)、

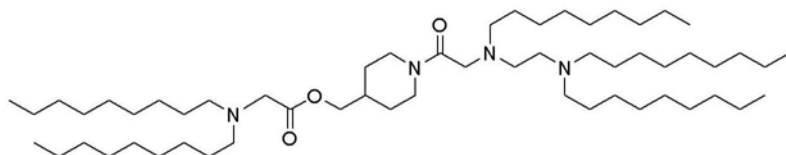


(化合物 334)、

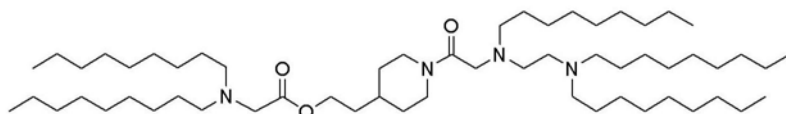


(化合物 335)、

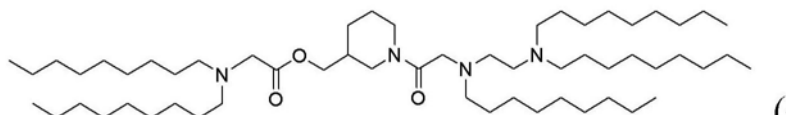
[1161]



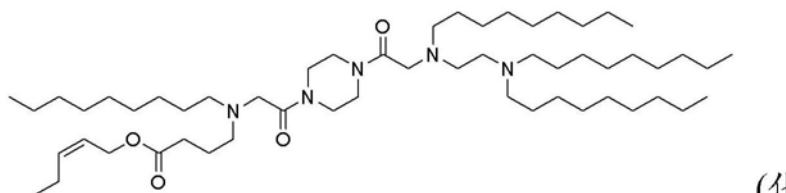
(化合物 336)、



(化合物 337)、

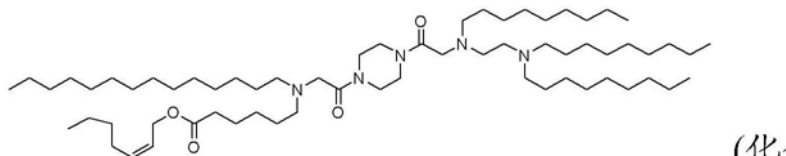


(化合物 338)、

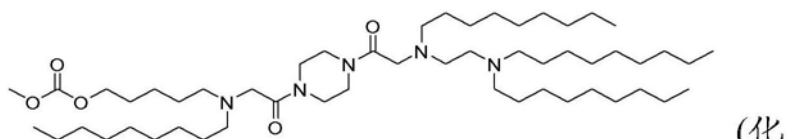


(化合物 339)、

[1162]

以及
(化合物 340)

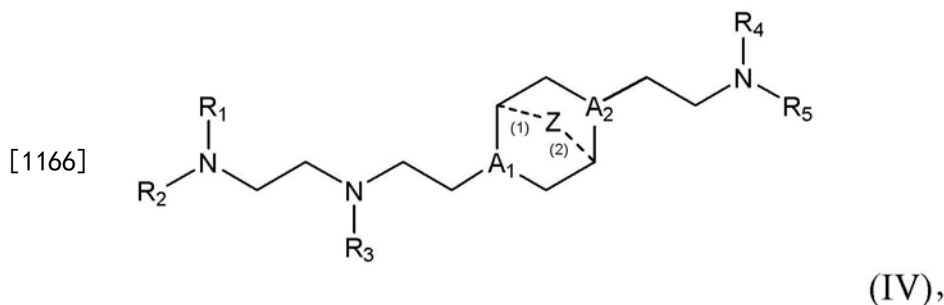
[1163]



(化合物 341)。

[1164] 在一些实施方案中,所述递送剂包含化合物236。

[1165] 在一些实施方案中,所述递送剂包含具有式 (IV) 的化合物

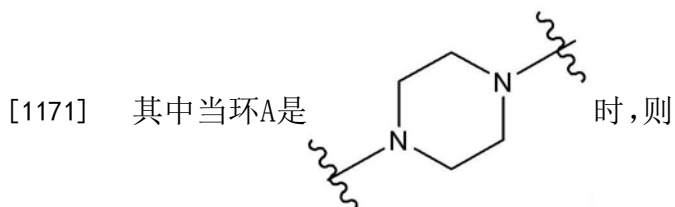


[1167] 或其盐或立体异构体,其中

[1168] A_1 和 A_2 各自独立地选自CH或N,并且 A_1 和 A_2 中的至少一个是N;

[1169] Z是 CH_2 或不存在,其中当Z是 CH_2 时,虚线(1)和(2)各自表示单键;并且当Z不存在时,虚线(1)和(2)均不存在;

[1170] R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 和 R_5 独立地选自由以下组成的组: C_{6-20} 烷基和 C_{6-20} 烯基;



[1172] i) R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 和 R_5 是相同的,其中 R_1 不是 C_{12} 烷基、 C_{18} 烷基或 C_{18} 烯基;

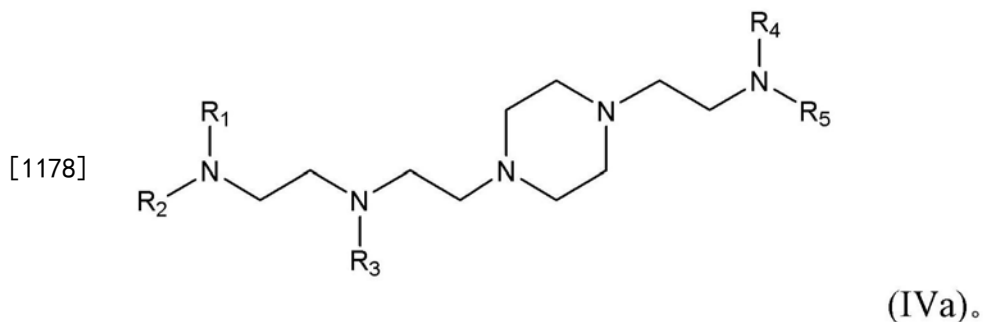
[1173] ii) R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 和 R_5 中的仅一个是选自 C_{6-20} 烯基;

[1174] iii) R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 和 R_5 中的至少一个具有与 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 和 R_5 中的至少另一个不同的碳原子数;

[1175] iv) R_1 、 R_2 和 R_3 是选自 C_{6-20} 烯基,并且 R_4 和 R_5 是选自 C_{6-20} 烷基;或者

[1176] v) R_1 、 R_2 和 R_3 是选自 C_{6-20} 烷基,并且 R_4 和 R_5 是选自 C_{6-20} 烯基。

[1177] 在一些实施方案中,所述化合物具有式 (IVa) :



[1179] 式 (IV) 或 (IVa) 的化合物在适用时包括一种或多种以下特征。

[1180] 在一些实施方案中,Z是 CH_2 。

[1181] 在一些实施方案中,Z不存在。

[1182] 在一些实施方案中, A_1 和 A_2 中的至少一个是N。

[1183] 在一些实施方案中, A_1 和 A_2 中的每一个是N。

[1184] 在一些实施方案中, A_1 和 A_2 中的每一个是CH。

[1185] 在一些实施方案中, A_1 是N,并且 A_2 是CH。

[1186] 在一些实施方案中, A₁是CH, 并且A₂是N。

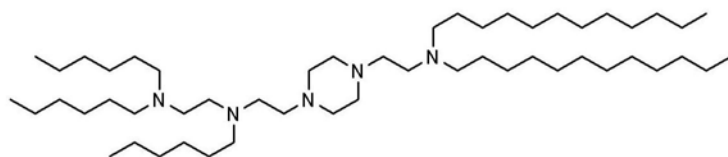
[1187] 在一些实施方案中, R₁、R₂、R₃、R₄和R₅是相同的, 并且不是C₁₂烷基、C₁₈烷基或C₁₈烯基。在一些实施方案中, R₁、R₂、R₃、R₄和R₅是相同的, 并且是C₉烷基或C₁₄烷基。

[1188] 在一些实施方案中, R₁、R₂、R₃、R₄和R₅中的仅一个是选自C₆₋₂₀烯基。在某些此类实施方案中, R₁、R₂、R₃、R₄和R₅具有相同的碳原子数。在一些实施方案中, R₄是选自C₅₋₂₀烯基。例如, R₄可以是C₁₂烯基或C₁₈烯基。

[1189] 在一些实施方案中, R₁、R₂、R₃、R₄和R₅中的至少一个具有与R₁、R₂、R₃、R₄和R₅中的至少另一个不同的碳原子数。

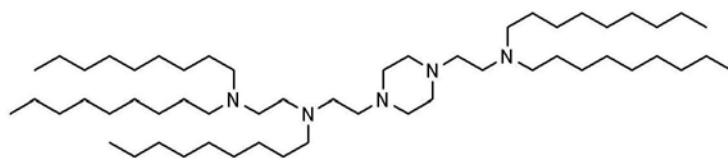
[1190] 在某些实施方案中, R₁、R₂和R₃是选自C₆₋₂₀烯基, 并且R₄和R₅是选自C₆₋₂₀烷基。在其他实施方案中, R₁、R₂和R₃是选自C₆₋₂₀烷基, 并且R₄和R₅是选自C₆₋₂₀烯基。在一些实施方案中, R₁、R₂和R₃具有相同的碳原子数, 和/或R₄和R₅具有相同的碳原子数。例如, R₁、R₂和R₃、或者R₄和R₅可具有6、8、9、12、14或18个碳原子。在一些实施方案中, R₁、R₂和R₃、或者R₄和R₅是C₁₈烯基(例如, 亚油基)。在一些实施方案中, R₁、R₂和R₃、或者R₄和R₅是包含6、8、9、12或14个碳原子的烷基。

[1191] 在一些实施方案中, R₁具有与R₂、R₃、R₄和R₅不同的碳原子数。在其他实施方案中, R₃具有与R₁、R₂、R₄和R₅不同的碳原子数。在其他实施方案中, R₄具有与R₁、R₂、R₃和R₅不同的碳原子数。在一些实施方案中, 所述化合物是选自由以下组成的组:

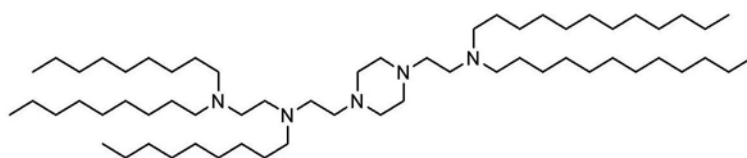


(化合物 249)、

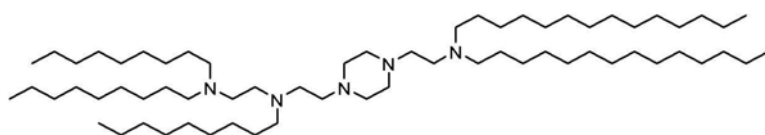
[1192]



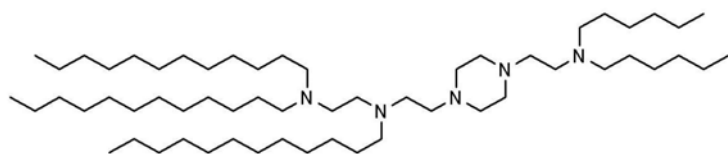
(化合物 250)、



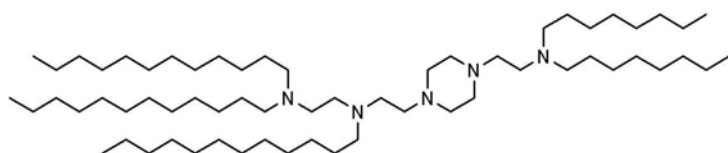
(化合物 251)、



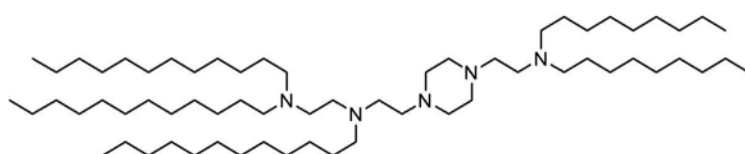
(化合物 252)、



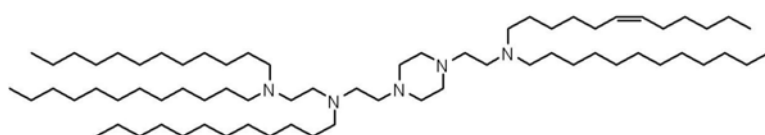
(化合物 253)、



(化合物 254)、

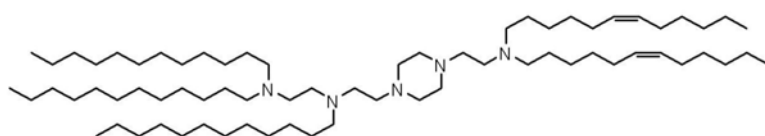


(化合物 255)、

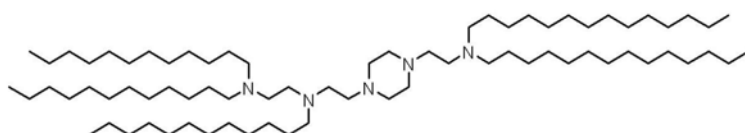


[1193]

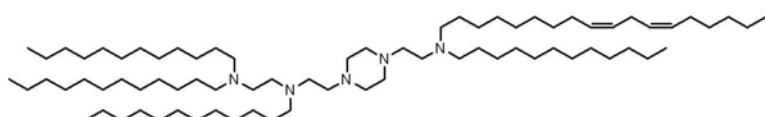
(化合物 256)、



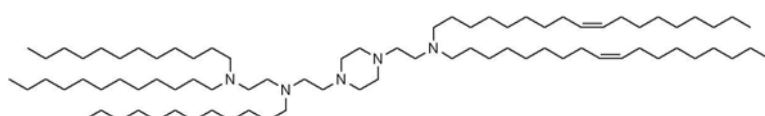
(化合物 257)、



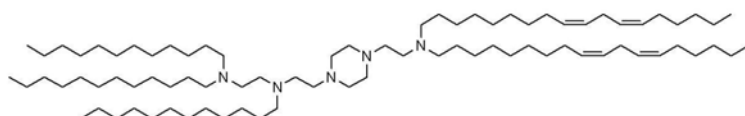
(化合物 258)、



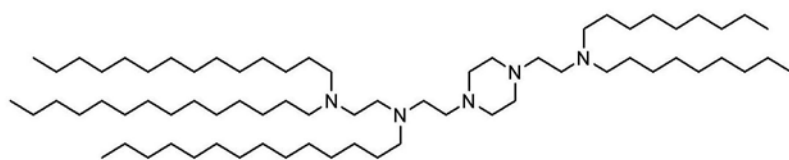
(化合物 259)、



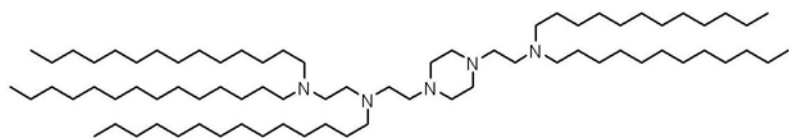
(化合物 260)、



(化合物 261)、

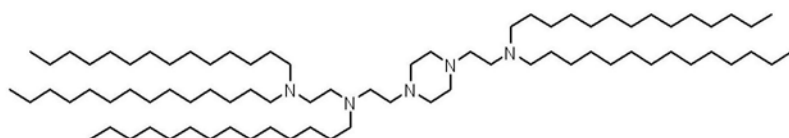


(化合物 262)、

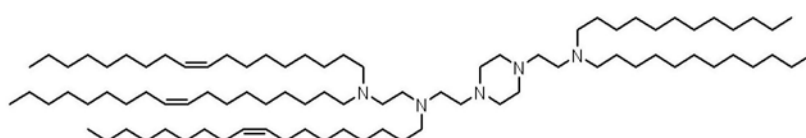


(化合物 263)、

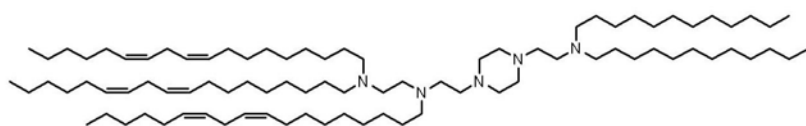
以及



(化合物 264)、

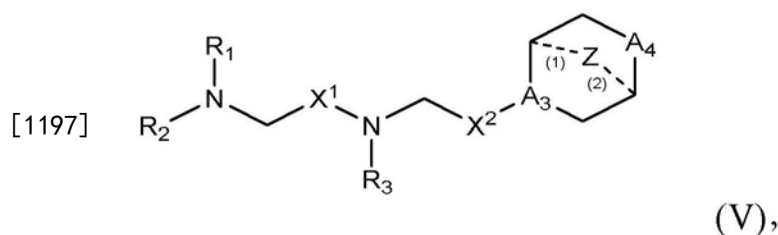


(化合物 265)



(化合物 266)。

[1196] 在其他实施方案中,所述递送剂包含具有式(V)的化合物



[1198] 或其盐或立体异构体,其中

[1199] A_3 是CH或N;

[1200] A_4 是 CH_2 或NH;并且 A_3 和 A_4 中的至少一个是N或NH;

[1201] Z是 CH_2 或不存在,其中当Z是 CH_2 时,虚线(1)和(2)各自表示单键;并且当Z不存在时,虚线(1)和(2)均不存在;

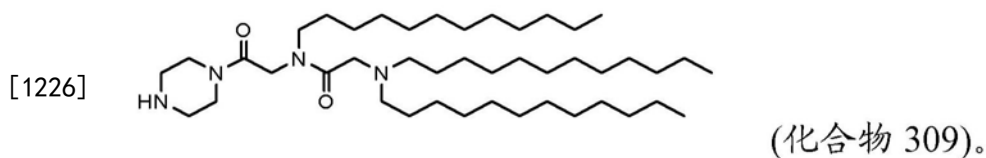
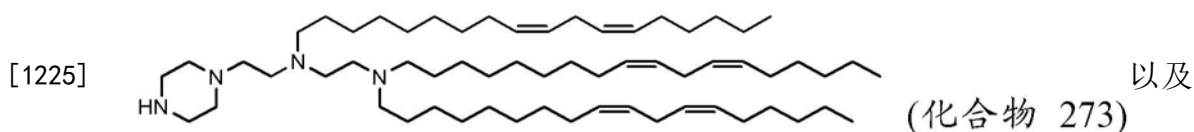
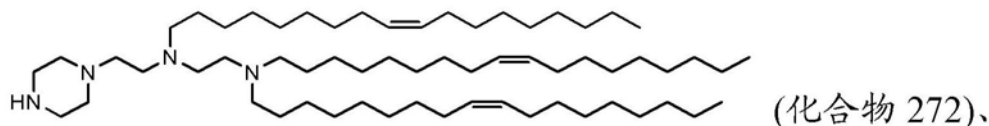
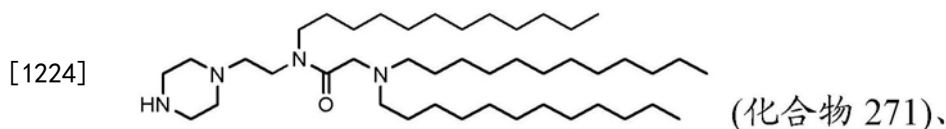
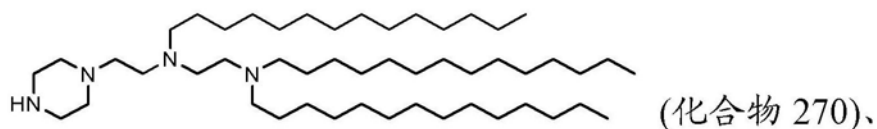
[1202] R_1 、 R_2 和 R_3 独立地选自由以下组成的组: C_{5-20} 烷基、 C_{5-20} 烯基、 $-R''MR'$ 、 $-R''YR''$ 、 $-YR''$ 以及 $-R''OR''$;

[1203] 每个M独立地选自 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-C(O)N(R')$ 、 $-N(R')C(O)-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-C(S)S-$ 、 $-SC(S)-$ 、 $-CH(OH)-$ 、 $-P(O)(OR')O-$ 、 $-S(O)_2-$ 、芳基以及杂芳基;

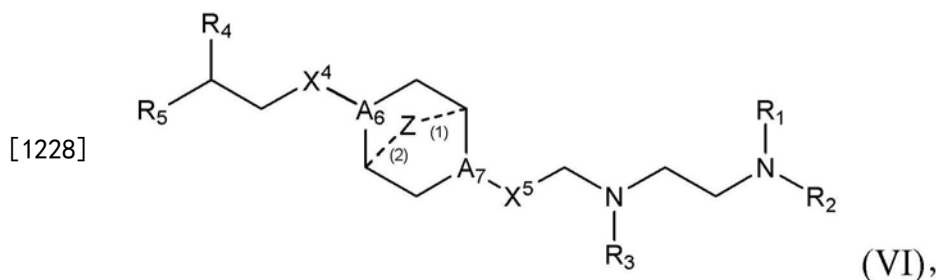
[1204] X^1 和 X^2 独立地选自由以下组成的组: $-CH_2-$ 、 $-(CH_2)_2-$ 、 $-CHR-$ 、 $-CHY-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-C(O)-CH_2-$ 、 $-CH_2-C(O)-$ 、 $-C(O)O-CH_2-$ 、 $-OC(O)-CH_2-$ 、 $-CH_2-C(O)O-$ 、 $-CH_2-OC(O)-$ 、 $-CH(OH)-$ 、 $-C(S)-$ 以及 $-CH(SH)-$;

[1205] 每个Y独立地是 C_{3-6} 碳环;

[1206] 每个 R'' 独立地选自由以下组成的组: C_{1-12} 烷基和 C_{2-12} 烯基;



[1227] 在其他实施方案中,所述递送剂包含具有式(VI)的化合物:



[1229] 或其盐或立体异构体,其中

[1230] A₆和A₇各自独立地选自CH或N,其中A₆和A₇中的至少一个是N;

[1231] Z是CH₂或不存在,其中当Z是CH₂时,虚线(1)和(2)各自表示单键;并且当Z不存在时,虚线(1)和(2)均不存在;

[1232] X⁴和X⁵独立地选自自由以下组成的组:-CH₂-、-CH₂)₂-、-CHR-、-CHY-、-C(O)-、-C(O)O-、-OC(O)-、-C(O)-CH₂-、-CH₂-C(O)-、-C(O)O-CH₂-、-OC(O)-CH₂-、-CH₂-C(O)O-、-CH₂-OC(O)-、-CH(OH)-、-C(S)-以及-CH(SH)-;

[1233] R₁、R₂、R₃、R₄和R₅各自独立地选自自由以下组成的组:C₅₋₂₀烷基、C₅₋₂₀烯基、-R''MR'、-R*YR''、-YR''以及-R*OR'';

[1234] 每个M独立地选自自由以下组成的组:-C(O)O-、-OC(O)-、-C(O)N(R')-、-N(R')C(O)-、-C(O)-、-C(S)-、-C(S)S-、-SC(S)-、-CH(OH)-、-P(O)(OR')O-、-S(O)₂-、芳基以及杂芳基;

[1235] 每个Y独立地是C₃₋₆碳环;

[1236] 每个R*独立地选自自由以下组成的组:C₁₋₁₂烷基和C₂₋₁₂烯基;

[1237] 每个R独立地选自自由以下组成的组:C₁₋₃烷基和C₃₋₆碳环;

[1238] 每个R'独立地选自由以下组成的组：C₁₋₁₂烷基、C₂₋₁₂烯基和H；并且

[1239] 每个R''独立地选自由以下组成的组：C₃₋₁₂烷基和C₃₋₁₂烯基。

[1240] 在一些实施方案中，R₁、R₂、R₃、R₄和R₅各自独立地选自由以下组成的组：C₆₋₂₀烷基和C₆₋₂₀烯基。

[1241] 在一些实施方案中，R₁和R₂是相同的。在一些实施方案中，R₁、R₂和R₃是相同的。在一些实施方案中，R₄和R₅是相同的。在一些实施方案中，R₁、R₂、R₃、R₄和R₅是相同的。

[1242] 在一些实施方案中，R₁、R₂、R₃、R₄和R₅中的至少一个是C₉₋₁₂烷基。在某些实施方案中，R₁、R₂、R₃、R₄和R₅各自独立地是C₉、C₁₂或C₁₄烷基。在某些实施方案中，R₁、R₂、R₃、R₄和R₅中的每个是C₉烷基。

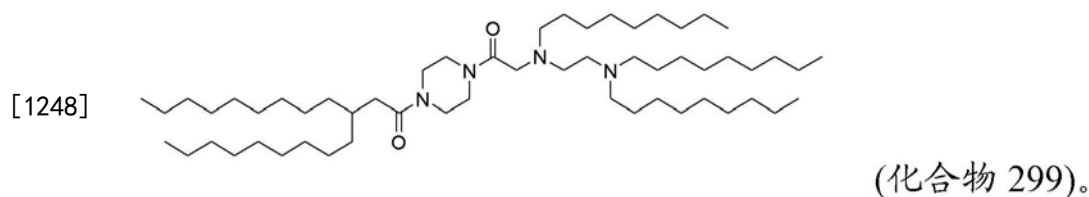
[1243] 在一些实施方案中，A₆是N，并且A₇是N。在一些实施方案中，A₆是CH，并且A₇是N。

[1244] 在一些实施方案中，X⁴是-CH₂-，并且X⁵是-C(O)-。在一些实施方案中，X⁴和X⁵是-C(O)-。

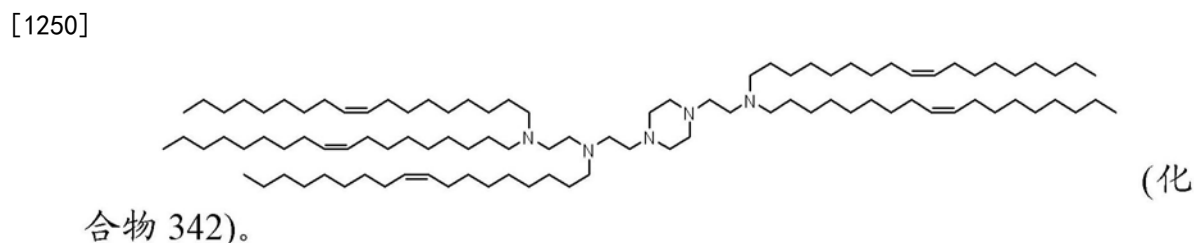
[1245] 在一些实施方案中，当A₆是N并且A₇是N时，X⁴和X⁵中的至少一个不是-CH₂-，例如，X⁴和X⁵中的至少一个是-C(O)-。在一些实施方案中，当A₆是N并且A₇是N时，R₁、R₂、R₃、R₄和R₅中的至少一个是-R''MR'。

[1246] 在一些实施方案中，R₁、R₂、R₃、R₄和R₅中的至少一个不是-R''MR'。

[1247] 在一些实施方案中，所述化合物是



[1249] 在其他实施方案中，所述递送剂包含具有下式的化合物：



[1251] 本文公开的脂质化合物的胺部分可在某些条件下质子化。例如，根据式(I)的脂质的中心胺部分通常在低于氨基部分的pKa的pH下质子化(即带正电)，并且在高于pKa的pH下基本上不带电。此类脂质可被称为可电离氨基脂质。

[1252] 在一个具体实施方案中，所述可电离氨基脂质是化合物18。在另一个实施方案中，所述可电离氨基脂质是化合物236。

[1253] 在一些实施方案中，在所述脂质组合物中可电离氨基脂质(例如式(I)化合物)的量在约1mol%至99mol%的范围内。

[1254] 在一个实施方案中，在所述脂质组合物中可电离氨基脂质，例如式(I)化合物的量是至少约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或99mol%。

[1255] 在一个实施方案中,在所述脂质组合物中可电离氨基脂质(例如式(I)化合物)的量在约30mol%至约70mol%、约35mol%至约65mol%、约40mol%至约60mol%以及约45mol%至约55mol%的范围内。

[1256] 在一个具体实施方案中,在所述脂质组合物中可电离氨基脂质(例如,式(I)化合物)的量是约50mol%。

[1257] 除本文公开的可电离氨基脂质(例如式(I)化合物)外,本文公开的药物组合物的脂质组合物还可包含额外组分,如磷脂、结构脂质、PEG-脂质以及其任何组合。

[1258] 磷脂

[1259] 本文公开的药物组合物的脂质组合物可包含一种或多种磷脂,例如,一种或多种饱和或(多)不饱和磷脂或其组合。一般来说,磷脂包含磷脂部分和一个或多个脂肪酸部分。

[1260] 磷脂部分可选自,例如,由以下组成的非限制性组:磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰甘油、磷脂酰丝氨酸、磷脂酸、2-溶血磷脂酰胆碱和鞘磷脂。

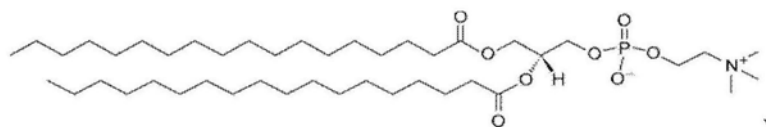
[1261] 脂肪酸部分可选自,例如,由以下组成的非限制性组:月桂酸、肉豆蔻酸、肉豆蔻脑酸、棕榈酸、棕榈油酸、硬脂酸、油酸、亚油酸、 α -亚麻酸、芥酸、植烷酸、花生酸、花生四烯酸、二十碳五烯酸、山嵛酸、二十二碳五烯酸和二十二碳六烯酸。

[1262] 特定磷脂可促进与膜的融合。例如,阳离子磷脂可与膜(例如,细胞或细胞内膜)的一种或多种带负电荷的磷脂相互作用。磷脂与膜的融合可允许含脂质组合物(例如,LNP)的一种或多种要素(例如,治疗剂)穿过所述膜,从而允许例如将一种或多种要素递送至靶组织(例如,肿瘤组织)。

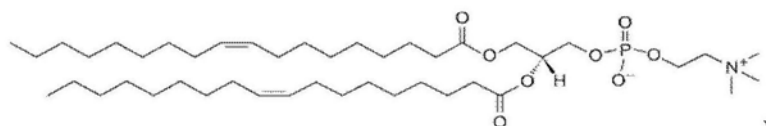
[1263] 还考虑了非天然磷脂物质,包括具有修饰和取代(包括支化、氧化、环化和炔烃)的天然物种。例如,磷脂可用一种或多种炔烃官能化或交联(例如,其中一个或多个双键被三键置换的烯基)。在适当反应条件下,炔烃基团可在暴露于叠氮化物时经历铜催化的环加成反应。此类反应可用于官能化纳米粒子组合物的脂质双层以促进膜渗透或细胞识别或将纳米粒子组合物与有用组分如靶向或成像部分(例如染料)缀合。

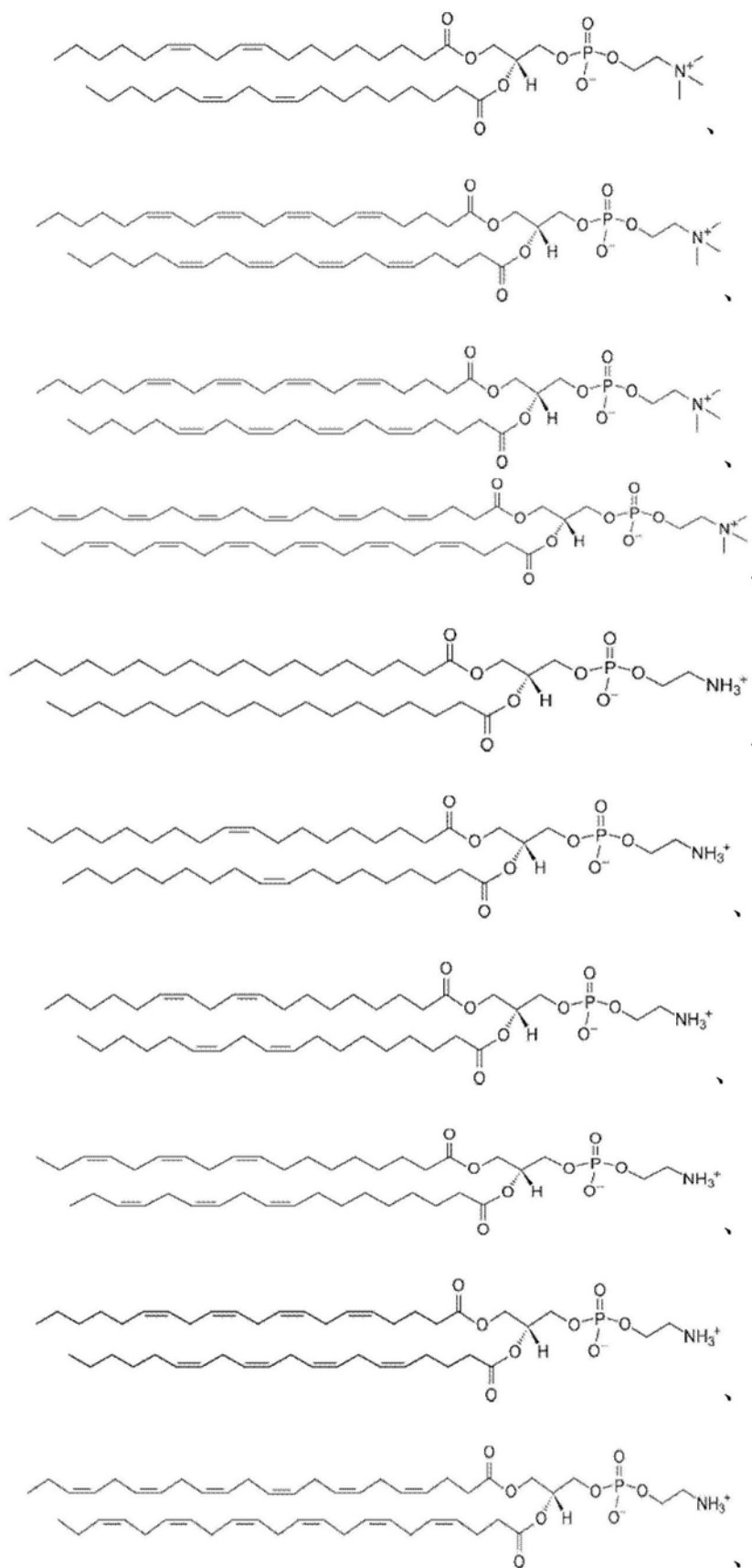
[1264] 磷脂包括但不限于甘油磷脂,如磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇、磷脂酰甘油和磷脂酸。磷脂还包括鞘磷脂(phosphosphingolipid),如鞘磷脂(sphingomyelin)。

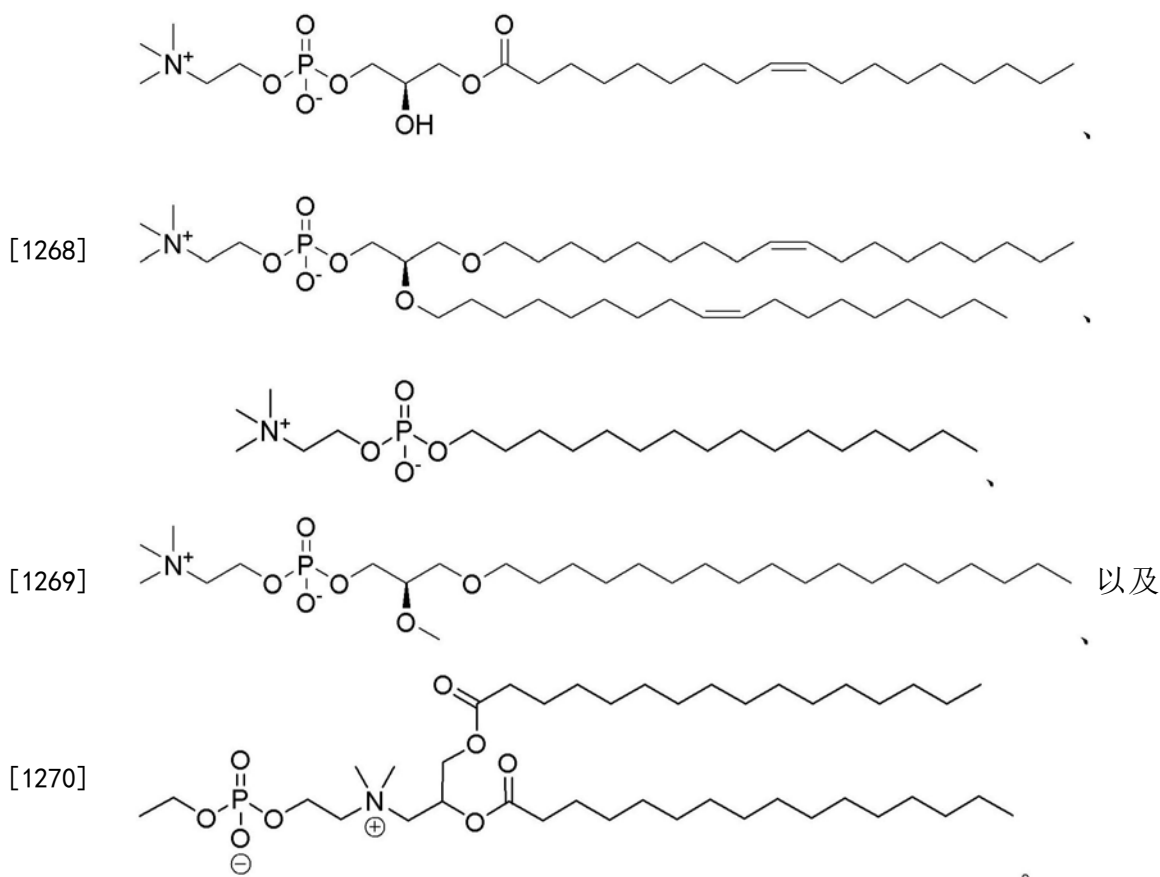
[1265] 磷脂的实例包括但不限于以下:



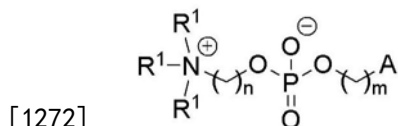
[1266]







[1271] 在某些实施方案中,在本发明中有用或可能有用的磷脂是DSPC的类似物或变体。
在某些实施方案中,在本发明中有用或可能有用的磷脂是式 (IX) 化合物:




(IX),

[1273] 或其盐,其中:

[1274] 每个R¹独立地是任选取代的烷基;或者任选地两个R¹与中间原子连接在一起以形成任选取代的单环碳环基或任选取代的单环杂环基;或者任选地三个R¹与中间原子连接在一起以形成任选取代的双环碳环基或任选取代的双环杂环基;

[1275] n是1、2、3、4、5、6、7、8、9或10;

[1276] m是0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10;

[1277] A具有式: ;

[1278] L²的每个实例独立地是键或任选取代的C₁₋₆亚烷基,其中所述任选取代的C₁₋₆亚烷基的一个亚甲基单元任选地被-O-、-N(R^N)-、-S-、-C(O)-、-C(O)N(R^N)-、-NR^NC(O)-、-C(O)O-、-OC(O)-、-OC(O)O-、-OC(O)N(R^N)-、-NR^NC(O)O-或-NR^NC(O)N(R^N)-置换;

[1279] R₂的每个实例独立地是任选取代的C₁₋₃₀烷基、任选取代的C₁₋₃₀烯基或任选取代的

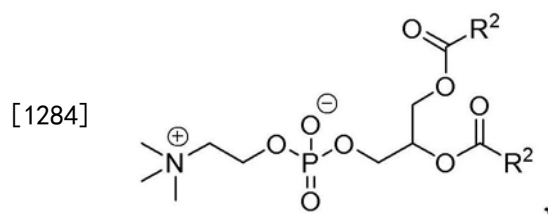
C₁₋₃₀炔基；任选地其中R₂的一个或多个亚甲基单元独立地被任选取代的亚碳环基、任选取代的亚杂环基、任选取代的亚芳基、任选取代的亚杂芳基、-N(R^N)-、-O-、-S-、-C(O)-、-C(O)N(R^N)-、-NR^NC(O)-、-NR^NC(O)N(R^N)-、-C(O)O-、-OC(O)-、-OC(O)O-、-OC(O)N(R^N)-、-NR^NC(O)O-、-C(O)S-、-SC(O)-、-C(=NR^N)-、-C(=NR^N)N(R^N)-、-NR^NC(=NR^N)-、-NR^NC(=NR^N)N(R^N)-、-C(S)-、-C(S)N(R^N)-、-NR^NC(S)-、-NR^NC(S)N(R^N)-、-S(O)-、-OS(O)-、-S(O)O-、-OS(O)O-、-OS(O)O₂-、-S(O)O₂-、-OS(O)O₂-、-N(R^N)S(O)-、-S(O)N(R^N)-、-N(R^N)S(O)N(R^N)-、-OS(O)N(R^N)-、-N(R^N)S(O)O-、-S(O)O₂-、-N(R^N)S(O)O₂-、-S(O)O₂N(R^N)-、-N(R^N)S(O)O₂N(R^N)-、-OS(O)O₂N(R^N)-或-N(R^N)S(O)O₂-置换；

[1280] R^N的每个实例独立地是氢、任选取代的烷基或氮保护基团；

[1281] 环B是任选取代的碳环基、任选取代的杂环基、任选取代的芳基或任选取代的杂芳基；并且

[1282] p是1或2；

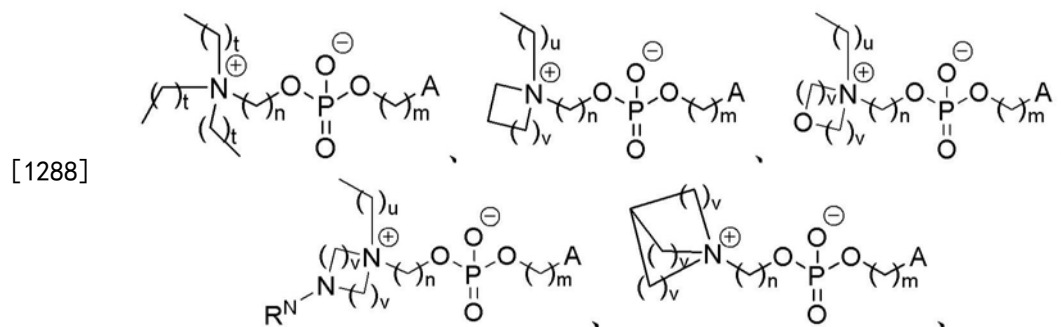
[1283] 前提是所述化合物不具有下式：



[1285] 其中R₂的每个实例独立地是未取代的烷基、未取代的烯基或未取代的炔基。

[1286] i) 磷脂头部修饰

[1287] 在某些实施方案中，在本发明中 useful 或可能有用的磷脂包含修饰的磷脂头部（例如，修饰的胆碱基团）。在某些实施方案中，具有修饰的头部的磷脂是具有修饰的季胺的DSPC或其类似物。例如，在式(IX)的实施方案中，至少一个R¹不是甲基。在某些实施方案中，至少一个R¹不是氢或甲基。在某些实施方案中，所述式(IX)化合物具有以下式之一：



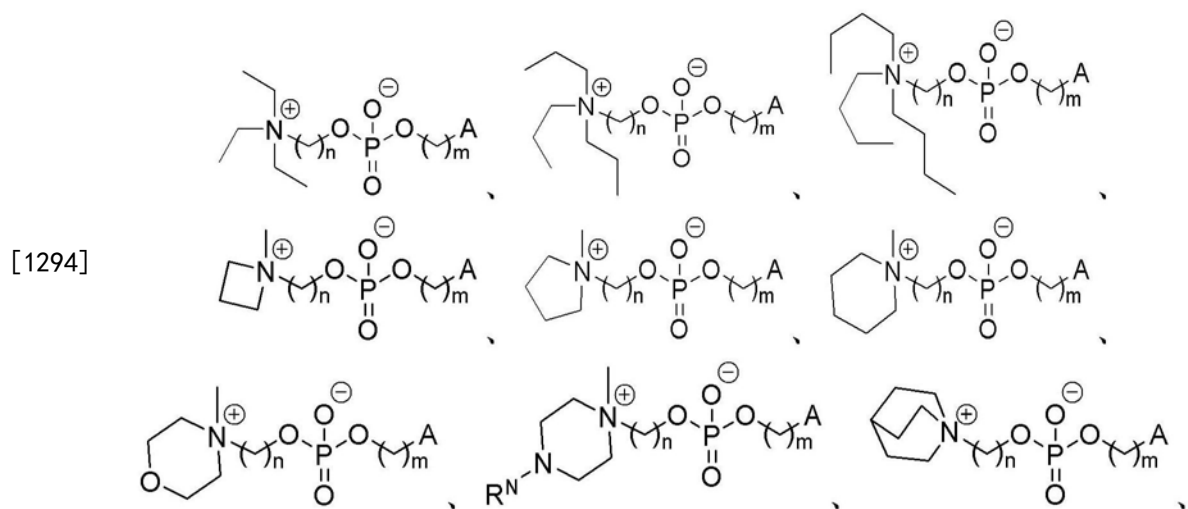
[1289] 或其盐，其中：

[1290] 每个t独立地是1、2、3、4、5、6、7、8、9或10；

[1291] 每个u独立地是0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10；并且

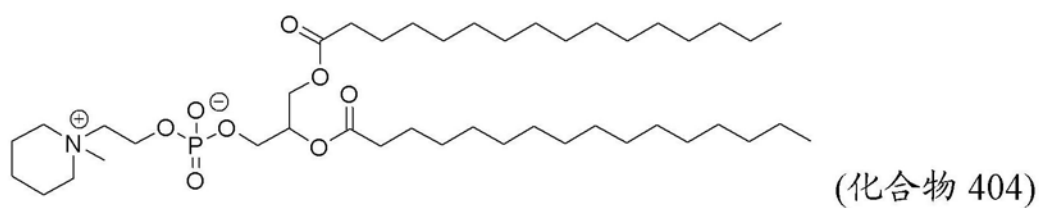
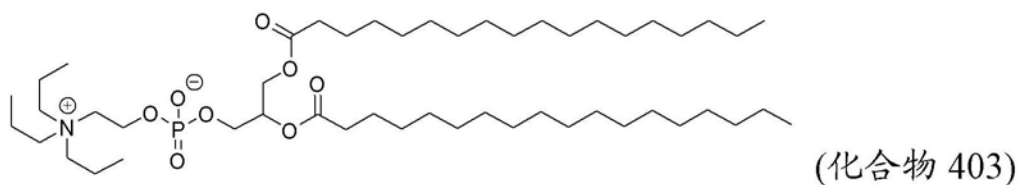
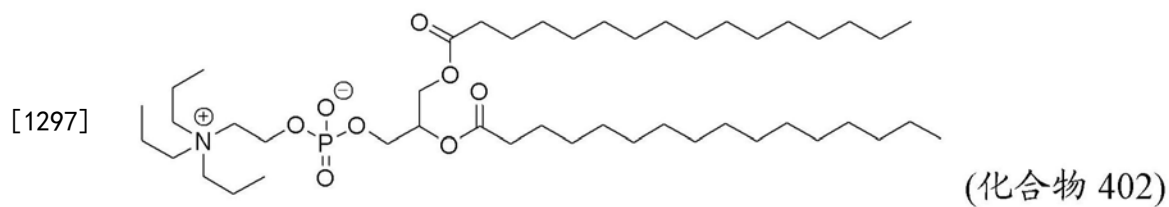
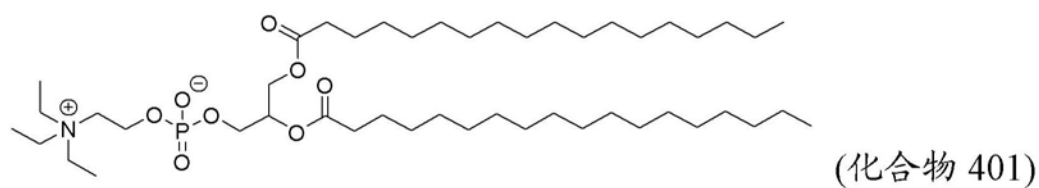
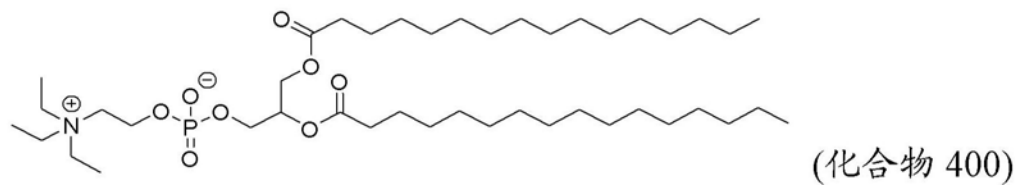
[1292] 每个v独立地是1、2或3。

[1293] 在某些实施方案中，所述式(IX)化合物具有以下式之一：

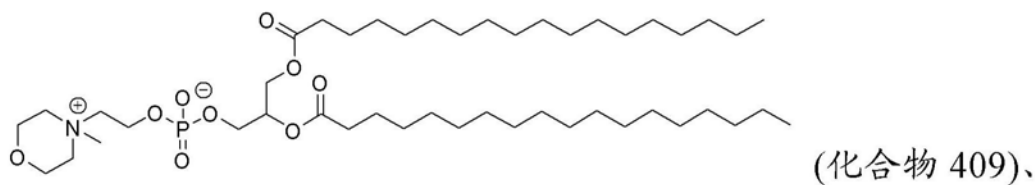
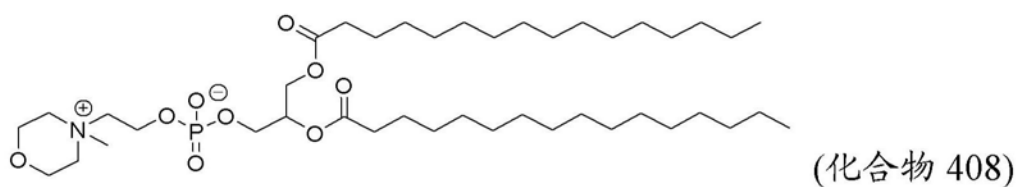
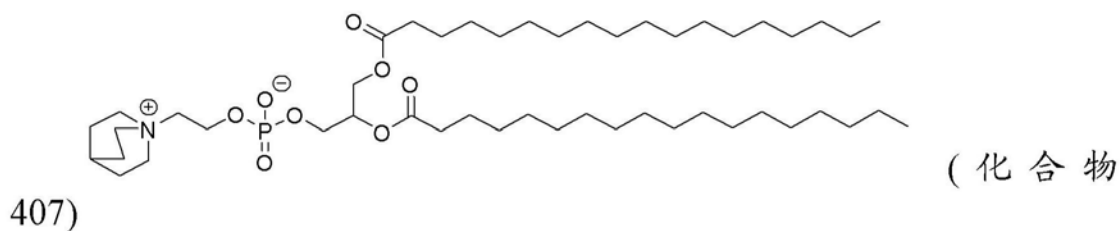
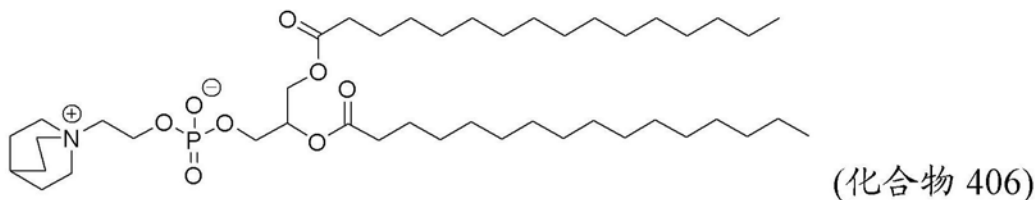
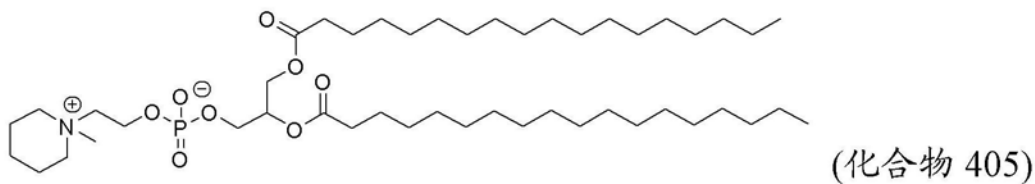


[1295] 或其盐。

[1296] 在某些实施方案中,式(IX)化合物是以下之一:

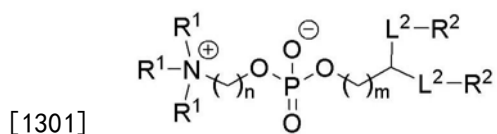


[1298]



[1299] 或其盐。

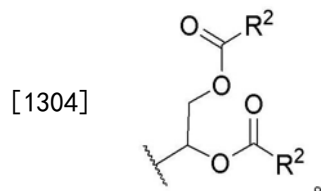
[1300] 在某些实施方案中,式(IX)化合物具有式(IX-a):



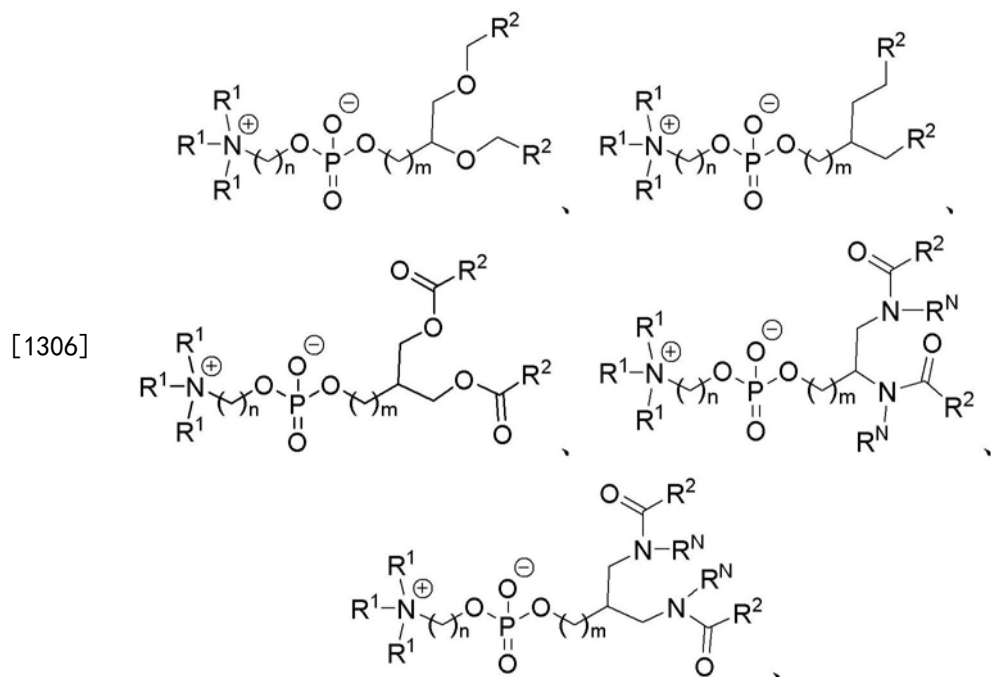
(IX-a),

[1302] 或其盐。

[1303] 在某些实施方案中,在本发明中 useful 或可能 useful 的磷脂包含修饰的核心。在某些实施方案中,本文描述的具有修饰的核心结构的磷脂是具有修饰的核心结构的DSPC或其类似物。例如,在式(IX-a)的某些实施方案中,基团A不具有下式:

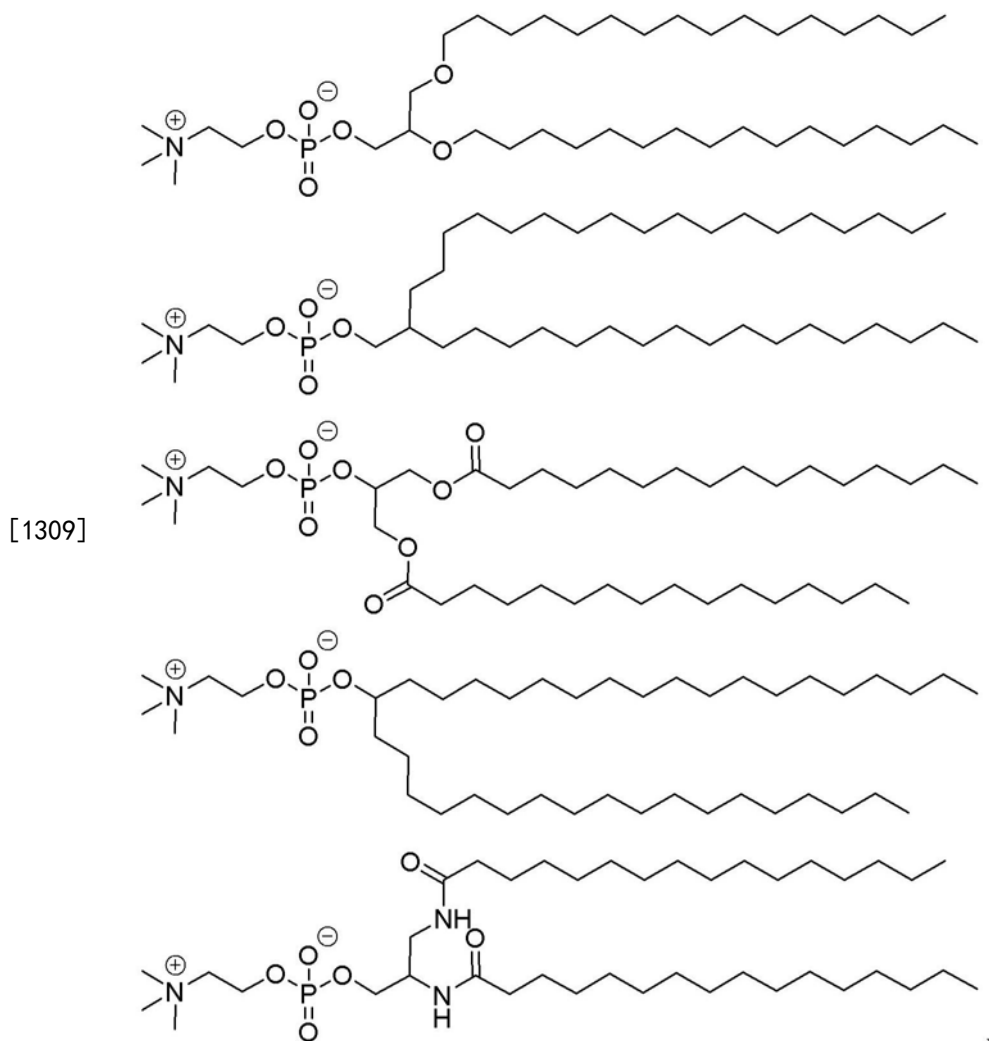


[1305] 在某些实施方案中,所述式 (IX-a) 化合物具有以下式之一:



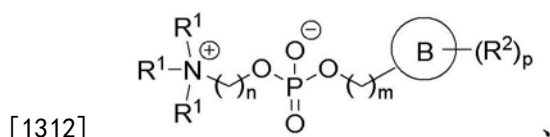
[1307] 或其盐。

[1308] 在某些实施方案中,式 (IX) 化合物是以下之一:



[1310] 或其盐。

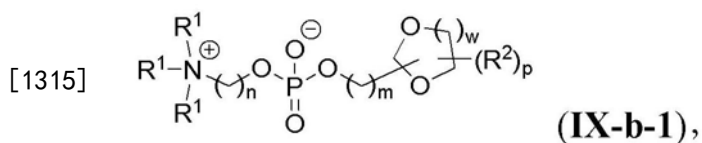
[1311] 在某些实施方案中,在本发明中可能有用或可能有用的磷脂包含代替甘油酯部分的环状部分。在某些实施方案中,可用于本发明的磷脂是具有代替甘油酯部分的环状部分的DSPC或其类似物。在某些实施方案中,所述式(IX)化合物具有式(IX-b):



(IX-b),

[1313] 或其盐。

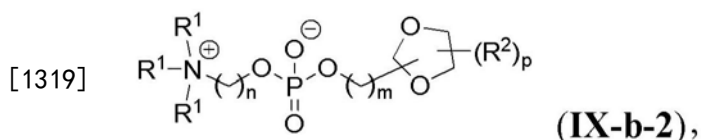
[1314] 在某些实施方案中,所述式(IX-b)化合物具有式(IX-b-1):



[1316] 或其盐,其中:

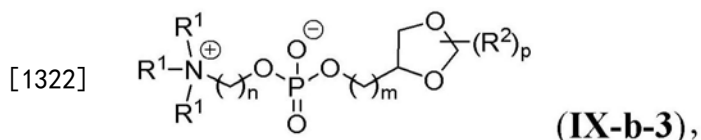
[1317] w是0、1、2或3。

[1318] 在某些实施方案中,所述式 (IX-b) 化合物具有式 (IX-b-2) :



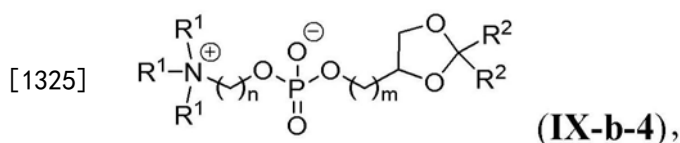
[1320] 或其盐。

[1321] 在某些实施方案中,所述式 (IX-b) 化合物具有式 (IX-b-3) :



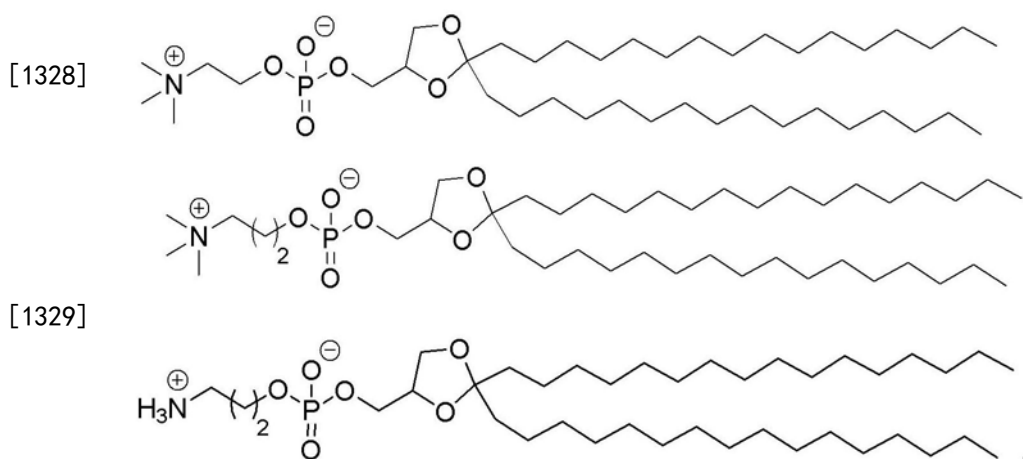
[1323] 或其盐。

[1324] 在某些实施方案中,所述式 (IX-b) 化合物具有式 (IX-b-4) :



[1326] 或其盐。

[1327] 在某些实施方案中,所述式 (IX-b) 化合物是以下之一:



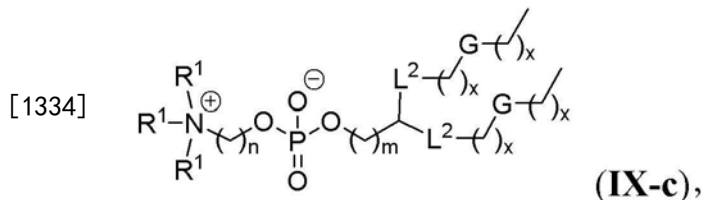
[1330] 或其盐。

[1331] (ii) 磷脂尾部修饰

[1332] 在某些实施方案中,在本发明中有用或可能有用的磷脂包含修饰的尾部。在某些实施方案中,在本发明中有用或可能有用的磷脂是具有修饰的尾部的DSPC或其类似物。如本文所述,“修饰的尾部”可以是具有更短或更长脂族链、具有引入支化的脂族链、具有引入的取代基的脂族链、其中一个或多个亚甲基被环状或杂原子基团置换的脂族链或其任何组合的尾部。例如,在某些实施方案中,(IX)的化合物是式 (IX-a) 或其盐,其中R²的至少一个实例是R²的每个实例是任选取代的C₁₋₃₀烷基,其中R²的一个或多个亚甲基单元独立地被任选取代的亚碳环基、任选取代的亚杂环基、任选取代的亚芳基、任选取代的亚杂芳基、-N(R^N)-、-O-、-S-、-C(O)-、-C(O)N(R^N)-、-NR^NC(O)-、-NR^NC(O)N(R^N)-、-C(O)O-、-OC(O)-、-OC(O)O-、-OC(O)N(R^N)-、-NR^NC(O)O-、-C(O)S-、-SC(O)-、-C(=NR^N)-、-C(=NR^N)N(R^N)-、-NR^NC

(=NR^N)-、-NR^NC(=NR^N)N(R^N)-、-C(S)-、-C(S)N(R^N)-、-NR^NC(S)-、-NR^NC(S)N(R^N)-、-S(O)-、-OS(O)-、-S(O)O-、-OS(O)O-、-OS(O)₂-、-S(O)₂O-、-OS(O)₂O-、-N(R^N)S(O)-、-S(O)N(R^N)-、-N(R^N)S(O)N(R^N)-、-OS(O)N(R^N)-、-N(R^N)S(O)O-、-S(O)₂-、-N(R^N)S(O)₂-、-S(O)₂N(R^N)-、-N(R^N)S(O)₂N(R^N)-、-OS(O)₂N(R^N)-或-N(R^N)S(O)₂O-置换。

[1333] 在某些实施方案中,所述式(IX)化合物具有式(IX-c):

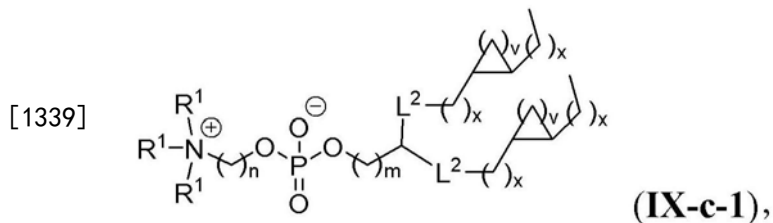


[1335] 或其盐,其中:

[1336] 每个x独立地是0-30之间的整数(包括0和30);并且

[1337] G的每个实例独立地选自由以下组成的组:任选取代的亚碳环基、任选取代的亚杂环基、任选取代的亚芳基、任选取代的亚杂芳基、-N(R^N)-、-O-、-S-、-C(O)-、-C(O)N(R^N)-、-NR^NC(O)-、-NR^NC(O)N(R^N)-、-C(O)O-、-OC(O)-、-OC(O)O-、-OC(O)N(R^N)-、-NR^NC(O)O-、-C(O)S-、-SC(O)-、-C(=NR^N)-、-C(=NR^N)N(R^N)-、-NR^NC(=NR^N)-、-NR^NC(=NR^N)N(R^N)-、-C(S)-、-C(S)N(R^N)-、-NR^NC(S)-、-NR^NC(S)N(R^N)-、-S(O)-、-OS(O)-、-S(O)O-、-OS(O)O-、-OS(O)₂-、-S(O)₂O-、-OS(O)₂O-、-N(R^N)S(O)-、-S(O)N(R^N)-、-N(R^N)S(O)N(R^N)-、-OS(O)N(R^N)-、-N(R^N)S(O)O-、-S(O)₂-、-N(R^N)S(O)₂-、-S(O)₂N(R^N)-、-N(R^N)S(O)₂N(R^N)-、-OS(O)₂N(R^N)-或-N(R^N)S(O)₂O-。每种可能性代表本发明的单独实施方案。

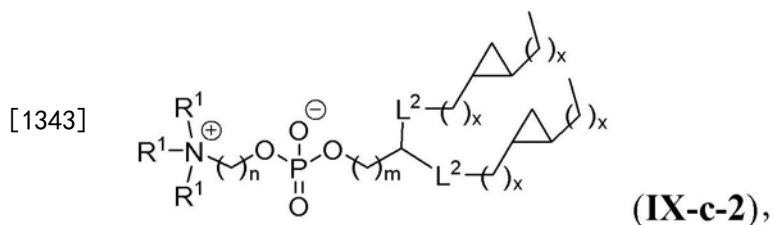
[1338] 在某些实施方案中,所述式(IX-c)化合物具有式(IX-c-1):



[1340] 或其盐,其中:

[1341] v的每个实例独立地是1、2或3。

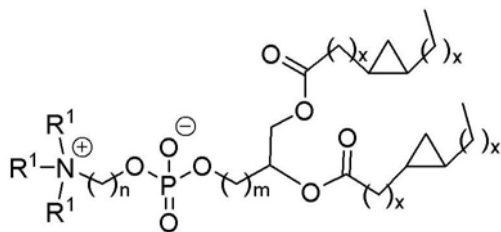
[1342] 在某些实施方案中,所述式(IX-c)化合物具有式(IX-c-2):



[1344] 或其盐。

[1345] 在某些实施方案中,所述式(IX-c)化合物具有以下式:

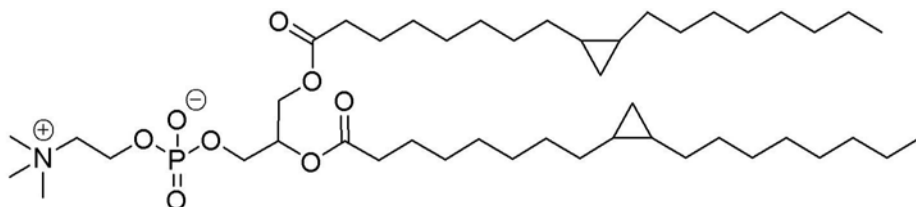
[1346]



[1347] 或其盐。

[1348] 在某些实施方案中,所述式 (IX-c) 化合物是以下:

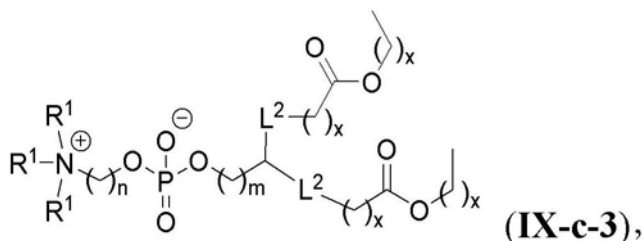
[1349]



[1350] 或其盐。

[1351] 在某些实施方案中,所述式 (IX-c) 化合物具有式 (IX-c-3):

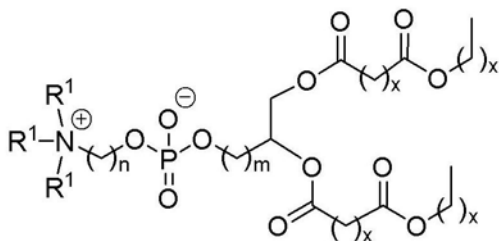
[1352]



[1353] 或其盐。

[1354] 在某些实施方案中,所述式 (IX-c) 化合物具有以下式:

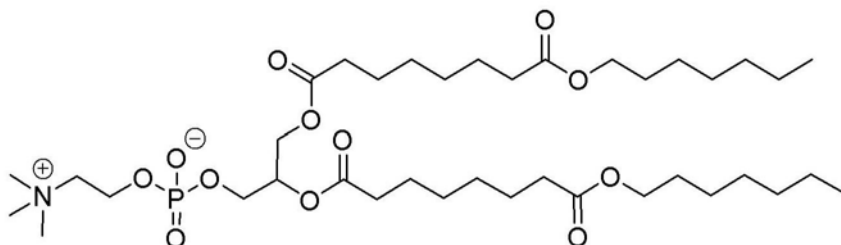
[1355]



[1356] 或其盐。

[1357] 在某些实施方案中,所述式 (IX-c) 化合物是以下:

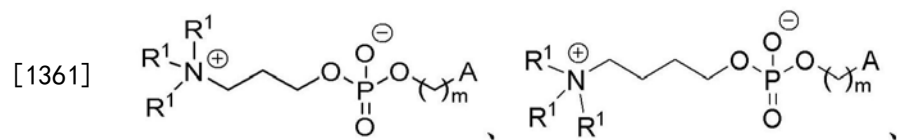
[1358]



[1359] 或其盐。

[1360] 在某些实施方案中,在本发明中有用或可能有用的磷脂包含修饰的磷酸胆碱部分,其中将季胺连接至磷酰基的烷基链不是亚乙基(例如,n不是2)。因此,在某些实施方案

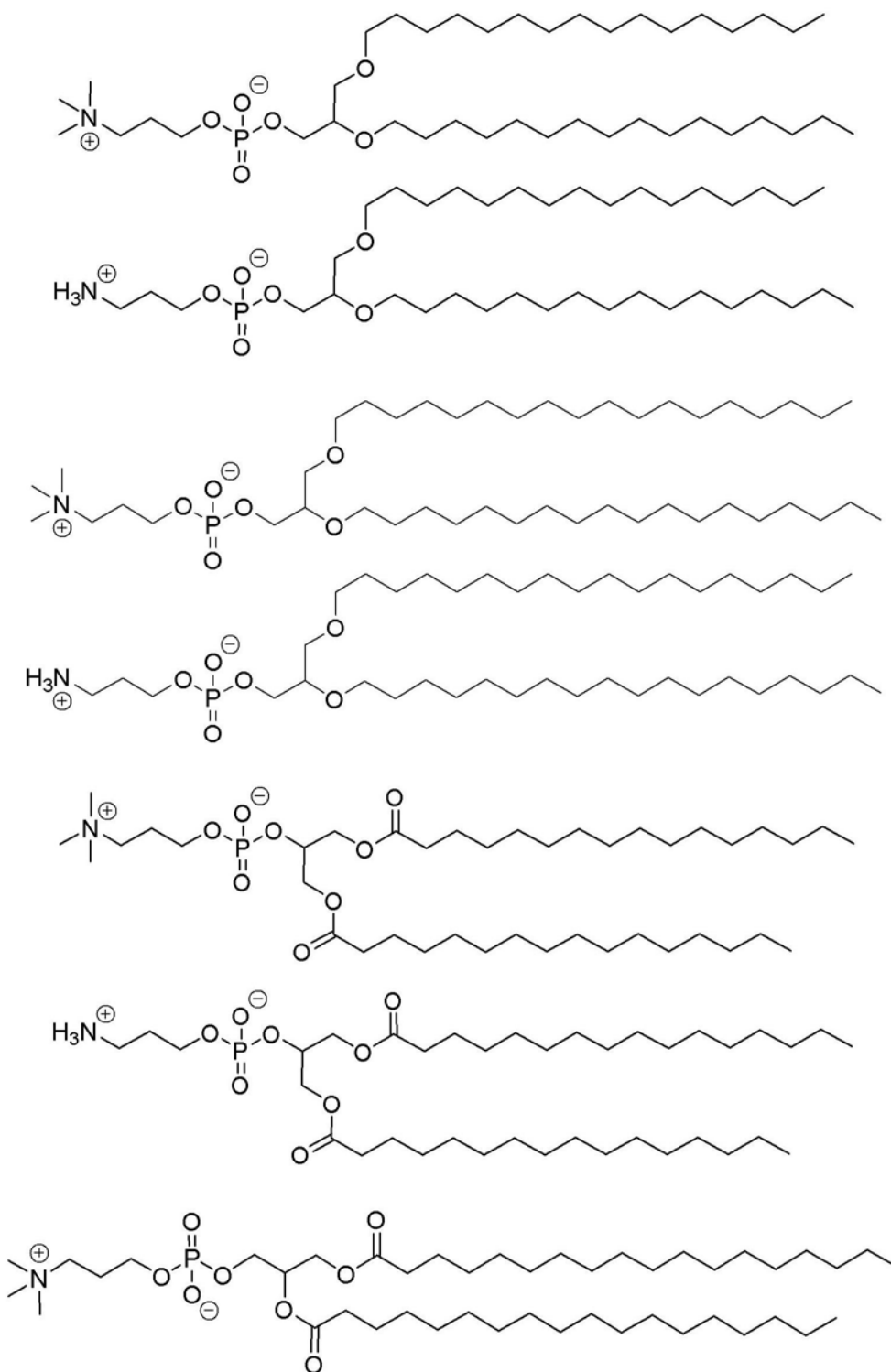
中,在本发明中 useful 或可能有用的磷脂是式 (IX) 的化合物,其中 n 是 1、3、4、5、6、7、8、9 或 10。
例如,在某些实施方案中,所述式 (IX) 化合物具有以下式之一:



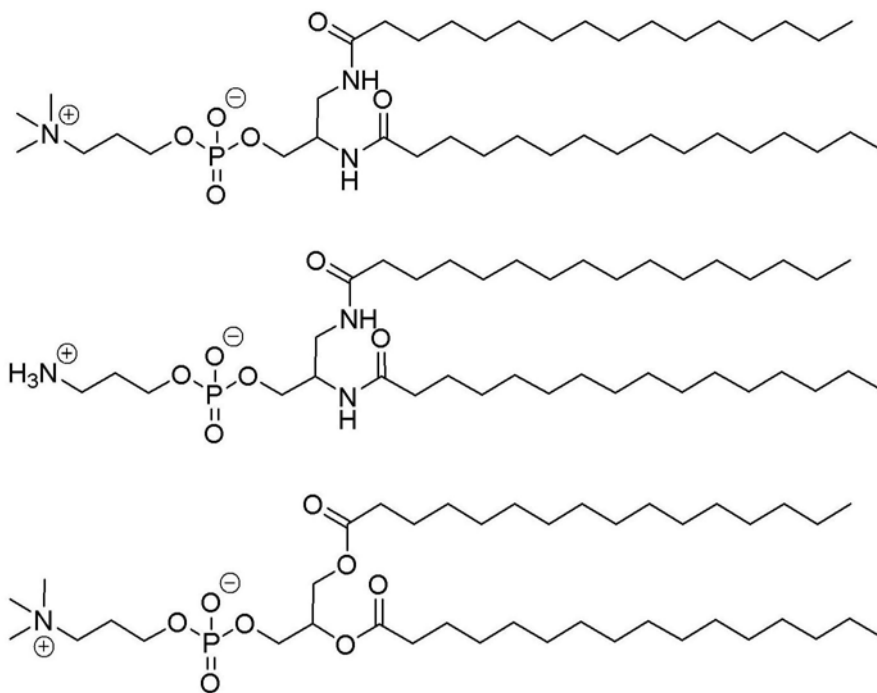
[1362] 或其盐。

[1363] 在某些实施方案中,式 (IX) 化合物是以下之一:

[1364]

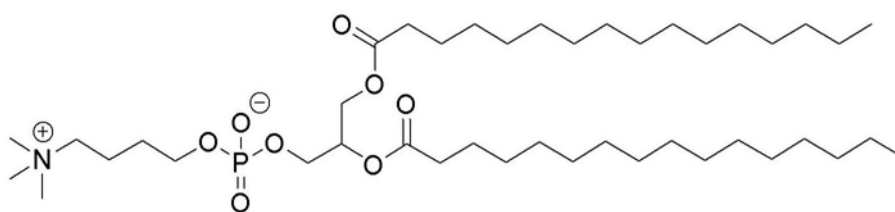


(化合物 411)

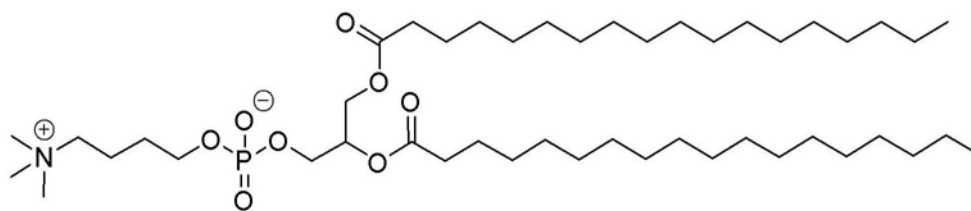


[1365]

(化合物 412)



(化合物 413)

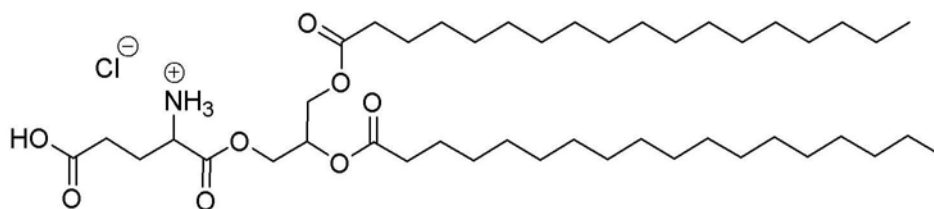
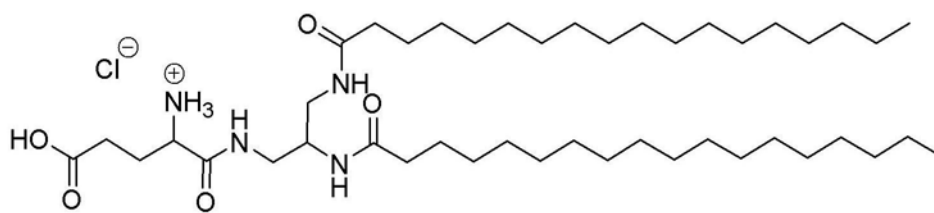


(化合物 414),

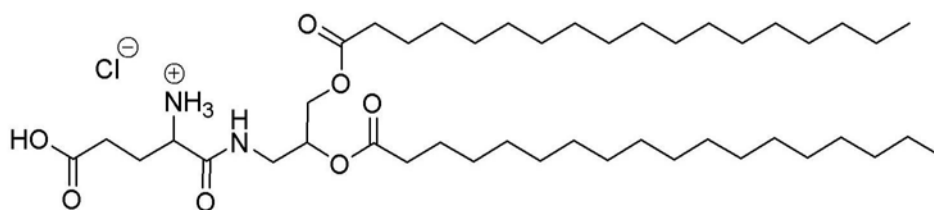
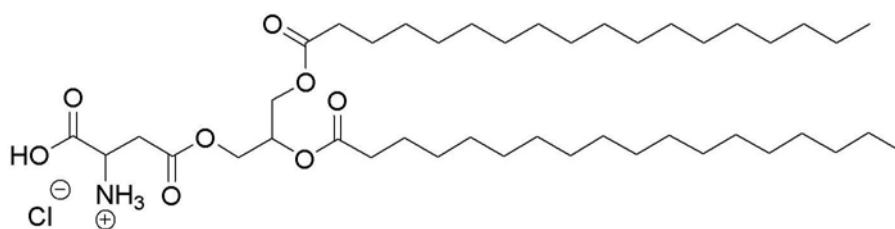
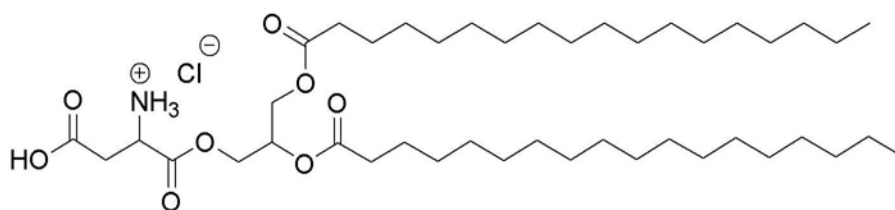
[1366] 或其盐。

[1367] 替代脂质

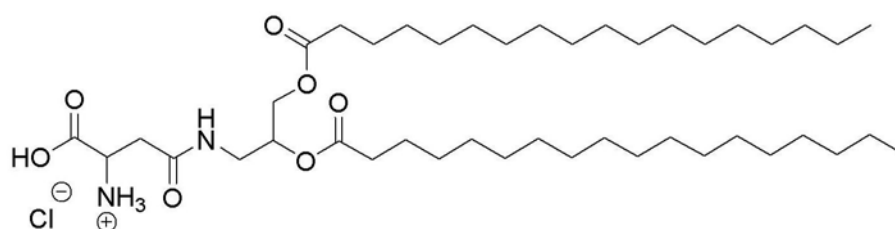
[1368] 在某些实施方案中,使用替代脂质代替本发明的磷脂。此类替代脂质的非限制性实例包括以下:



[1369]

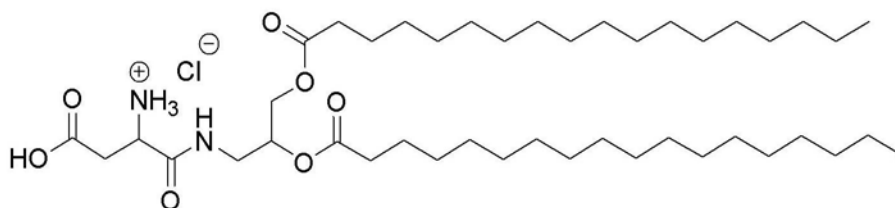


[1370]



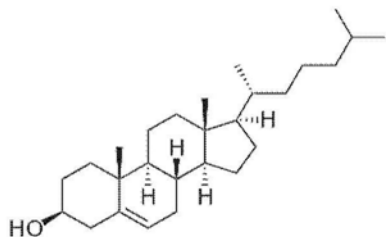
以及

[1371]

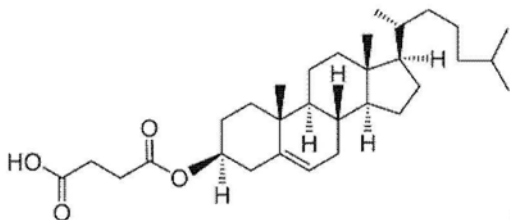
[1372] 结构脂质

[1373] 本文公开的药物组合物的脂质组合物可包含一种或多种结构脂质。如本文所用，术语“结构脂质”是指固醇以及含固醇部分的脂质。

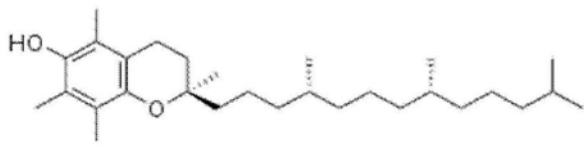
[1374] 在脂质纳米粒子中并入结构脂质可有助于减轻粒子中其他脂质的聚集。结构脂质可选自包括但不限于以下的组：胆固醇、粪固醇、谷固醇、麦角固醇、菜油固醇、豆固醇、菜籽固醇、番茄碱、番茄苷、熊果酸、 α -生育酚、藿烷类、植物固醇、类固醇以及其混合物。在一些实施方案中，结构脂质是固醇。如本文所定义，“固醇”是由类固醇组成的类固醇的亚组。在某些实施方案中，结构脂质是类固醇。在某些实施方案中，结构脂质是胆固醇。在某些实施方案中，结构脂质是胆固醇的类似物。在某些实施方案中，结构脂质是 α -生育酚。结构脂质的实例包括但不限于以下：



[1375] 、 以及



[1376]



[1377] 在一个实施方案中，本文公开的药物组合物的脂质组合物中的结构脂质（例如，固醇，如胆固醇）的量在约20mol%至约60mol%、约25mol%至约55mol%、约30mol%至约50mol%或约35mol%至约45mol%的范围内。

[1378] 在一个实施方案中，本文公开的脂质组合物中的结构脂质（例如，固醇，如胆固醇）的量在约25mol%至约30mol%、约30mol%至约35mol%或约35mol%至约40mol%的范围内。

[1379] 在一个实施方案中，本文公开的脂质组合物中的结构脂质（例如，固醇，如胆固醇）的量是约24mol%、约29mol%、约34mol%或约39mol%。

[1380] 在一些实施方案中，本文公开的脂质组合物中的结构脂质（例如，固醇，如胆固醇）的量是至少约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或60mol%。

[1381] 聚乙二醇 (PEG)-脂质

[1382] 本文公开的药物组合物的脂质组合物可包含一种或多种聚乙二醇 (PEG) 脂质。

[1383] 如本文所用，术语“PEG-脂质”是指聚乙二醇 (PEG) 修饰的脂质。PEG-脂质的非限制性实例包括PEG-修饰的磷脂酰乙醇胺和磷脂酸、PEG-神经酰胺缀合物（例如，PEG-CerC14或

PEG-CerC20)、PEG-修饰的二烷基胺和PEG-修饰的1,2-二酰氧基丙-3-胺。此类脂质也称为PEG化脂质。例如,PEG脂质可以是PEG-c-DOMG、PEG-DMG、PEG-DLPE、PEG-DMPE、PEG-DPPC或PEG-DSPE脂质。

[1384] 在一些实施方案中,PEG-脂质包括但不限于1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油甲氧基聚乙二醇(PEG-DMG)、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-[氨基(聚乙二醇)](PEG-DSPE)、PEG-二甾醇基甘油(PEG-DSG)、PEG-二棕榈油基、PEG-二油基、PEG-二硬脂基、PEG-二酰基甘油酰胺(PEG-DAG)、PEG-二棕榈酰基磷脂酰乙醇胺(PEG-DPPE)或PEG-1,2-二肉豆蔻酰基氧基丙基-3-胺(PEG-c-DMA)。

[1385] 在一个实施方案中,PEG-脂质是选自由以下组成的组:PEG修饰的磷脂酰乙醇胺、PEG修饰的磷脂酸、PEG修饰的神经酰胺、PEG修饰的二烷基胺、PEG修饰的二酰基甘油、PEG修饰的二烷基甘油以及其混合物。

[1386] 在一些实施方案中,PEG-脂质的脂质部分包括长度为约C₁₄至约C₂₂、优选约C₁₄至约C₁₆的那些。在一些实施方案中,PEG部分(例如mPEG-NH₂)具有约1000、2000、5000、10,000、15,000或20,000道尔顿的大小。在一个实施方案中,PEG-脂质是PEG_{2k}-DMG。

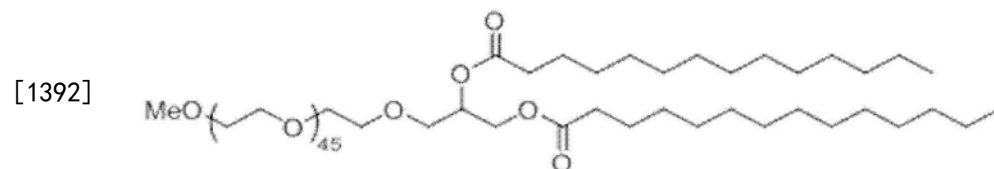
[1387] 在一个实施方案中,本文所述的脂质纳米粒子可包含PEG脂质,其是非扩散性PEG。非扩散性PEG的非限制性实例包括PEG-DSG和PEG-DSPE。

[1388] PEG-脂质是本领域中已知的,如美国专利号8158601和国际公布号W0 2015/130584 A2中描述的那些,所述专利以引用的方式整体并入本文。

[1389] 通常,本文所述的一些其他脂质组分(例如,PEG脂质)可如2016年12月10日提交的题为“Compositions and Methods for Delivery of Therapeutic Agents”的国际专利申请号PCT/US2016/000129所述来合成,所述专利申请以引用的方式整体并入本文。

[1390] 脂质纳米粒子组合物的脂质组分可包括一种或多种包含聚乙二醇的分子,如PEG或PEG修饰的脂质。此类物质可替代地称为PEG化脂质。PEG脂质是用聚乙二醇修饰的脂质。PEG脂质可选自包括以下的非限制性组:PEG-修饰的磷脂酰乙醇胺、PEG-修饰的磷脂酸、PEG-修饰的神经酰胺、PEG-修饰的二烷基胺、PEG-修饰的二酰基甘油、PEG-修饰的二烷基甘油以及其混合物。例如,PEG脂质可以是PEG-c-DOMG、PEG-DMG、PEG-DLPE、PEG-DMPE、PEG-DPPC或PEG-DSPE脂质。

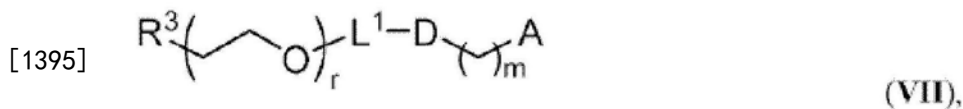
[1391] 在一些实施方案中,PEG修饰的脂质是PEG DMG的修饰的形式。PEG-DMG具有以下结构:



[1393] 在一个实施方案中,可用于本发明的PEG脂质可以是国际公布号W02012099755中描述的PEG化脂质,所述国际公布的内容以引用的方式整体并入本文。可修饰本文所述的任何这些示例性PEG脂质以在PEG链上包含羟基。在某些实施方案中,PEG脂质是PEG-OH脂质。如本文一般定义的,“PEG-OH脂质”(在本文中也称为“羟基-PEG化脂质”)是在脂质上具有一个或多个羟基(-OH)的PEG化脂质。在某些实施方案中,PEG-OH脂质在PEG链上包括一个或多个羟基。在某些实施方案中,PEG-OH或羟基-PEG化脂质在PEG链的末端包含-OH基团。每种可

能性代表本发明的单独实施方案。

[1394] 在某些实施方案中,可用于本发明的PEG脂质是式(VII)化合物。本文提供了式(VII)化合物:



[1396] 或其盐,其中:

[1397] R^3 是 $-\text{OR}^0$;

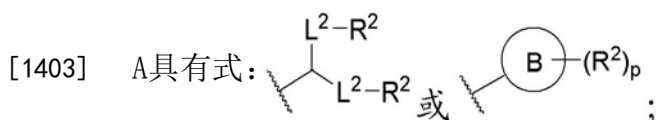
[1398] R^0 是氢、任选取代的烷基或氧保护基团;

[1399] r 是1与100之间的整数(包括0和4);

[1400] L^1 是任选取代的 C_{1-10} 亚烷基,其中所述任选取代的 C_{1-10} 亚烷基的至少一个亚甲基独立地被任选取代的亚环基、任选取代的亚杂环基、任选取代的亚芳基、任选取代的亚杂芳基、 O 、 $\text{N}(\text{R}^N)$ 、 S 、 $\text{C}(\text{O})$ 、 $\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}^N)$ 、 $\text{NR}^N\text{C}(\text{O})$ 、 $\text{C}(\text{O})\text{O}$ 、 $-\text{OC}(\text{O})$ 、 $\text{OC}(\text{O})\text{O}$ 、 $\text{OC}(\text{O})\text{N}(\text{R}^N)$ 、 $\text{NR}^N\text{C}(\text{O})\text{O}$ 或 $\text{NR}^N\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}^N)$ 置换;

[1401] D 是通过点击化学获得的部分或在生理条件下可裂解的部分;

[1402] m 是0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10;



[1404] L^2 的每个实例独立地是键或任选取代的 C_{1-6} 亚烷基,其中所述任选取代的 C_{1-6} 亚烷基的一个亚甲基单元任选地被 O 、 $\text{N}(\text{R}^N)$ 、 S 、 $\text{C}(\text{O})$ 、 $\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}^N)$ 、 $\text{NR}^N\text{C}(\text{O})$ 、 $\text{C}(\text{O})\text{O}$ 、 $\text{OC}(\text{O})$ 、 $\text{OC}(\text{O})\text{O}$ 、 $\text{OC}(\text{O})\text{N}(\text{R}^N)$ 、 $-\text{NR}^N\text{C}(\text{O})\text{O}$ 或 $\text{NR}^N\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}^N)$ 置换;

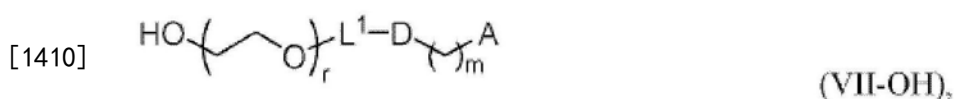
[1405] R^2 的每个实例独立地是任选取代的 C_{1-30} 烷基、任选取代的 C_{1-30} 烯基或任选取代的 C_{1-30} 炔基;任选地其中 R^2 的一个或多个亚甲基单元独立地被任选取代的亚碳环基、任选取代的亚杂环基、任选取代的亚芳基、任选取代的亚杂芳基、 $\text{N}(\text{R}^N)$ 、 O 、 S 、 $\text{C}(\text{O})$ 、 $\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}^N)$ 、 $\text{NR}^N\text{C}(\text{O})$ 、 $-\text{NR}^N\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}^N)$ 、 $\text{C}(\text{O})\text{O}$ 、 $\text{OC}(\text{O})$ 、 $\text{OC}(\text{O})\text{O}$ 、 $\text{OC}(\text{O})\text{N}(\text{R}^N)$ 、 $\text{NR}^N\text{C}(\text{O})\text{O}$ 、 $\text{C}(\text{O})\text{S}$ 、 $\text{SC}(\text{O})$ 、 $-\text{C}(=\text{NR}^N)$ 、 $\text{C}(=\text{NR}^N)\text{N}(\text{R}^N)$ 、 $\text{NR}^N\text{C}(=\text{NR}^N)$ 、 $\text{NR}^N\text{C}(=\text{NR}^N)\text{N}(\text{R}^N)$ 、 $\text{C}(\text{S})$ 、 $\text{C}(\text{S})\text{N}(\text{R}^N)$ 、 $\text{NR}^N\text{C}(\text{S})$ 、 $\text{NR}^N\text{C}(\text{S})\text{N}(\text{R}^N)$ 、 $\text{S}(\text{O})$ 、 $\text{OS}(\text{O})$ 、 $\text{S}(\text{O})\text{O}$ 、 $\text{OS}(\text{O})\text{O}$ 、 $\text{OS}(\text{O})_2$ 、 $\text{S}(\text{O})_2\text{O}$ 、 $\text{OS}(\text{O})_2\text{O}$ 、 $\text{N}(\text{R}^N)\text{S}(\text{O})$ 、 $-\text{S}(\text{O})\text{N}(\text{R}^N)$ 、 $\text{N}(\text{R}^N)\text{S}(\text{O})\text{N}(\text{R}^N)$ 、 $\text{OS}(\text{O})\text{N}(\text{R}^N)$ 、 $\text{N}(\text{R}^N)\text{S}(\text{O})\text{O}$ 、 $\text{S}(\text{O})_2$ 、 $\text{N}(\text{R}^N)\text{S}(\text{O})_2$ 、 $\text{S}(\text{O})_2\text{N}(\text{R}^N)$ 、 $\text{N}(\text{R}^N)\text{S}(\text{O})_2\text{N}(\text{R}^N)$ 、 $\text{OS}(\text{O})_2\text{N}(\text{R}^N)$ 或 $\text{N}(\text{R}^N)\text{S}(\text{O})_2\text{O}$ 置换;

[1406] R^N 的每个实例独立地是氢、任选取代的烷基或氮保护基团;

[1407] 环B是任选取代的碳环基、任选取代的杂环基、任选取代的芳基或任选取代的杂芳基;并且

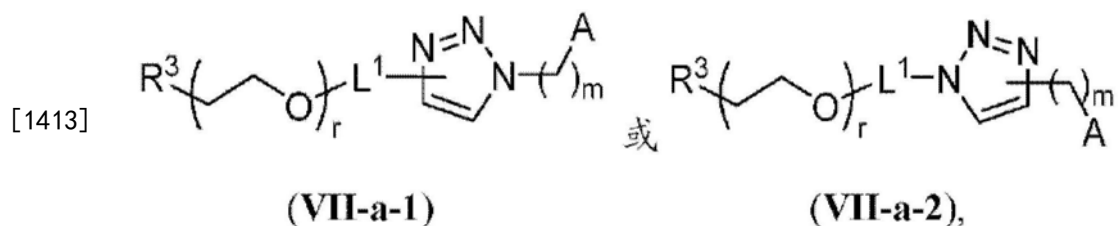
[1408] p 是1或2。

[1409] 在某些实施方案中,所述式(VII)化合物是PEG-OH脂质(即, R^3 是 $-\text{OR}^0$,并且 R^0 是氢)。在某些实施方案中,所述式(VII)化合物具有式(VII-OH):



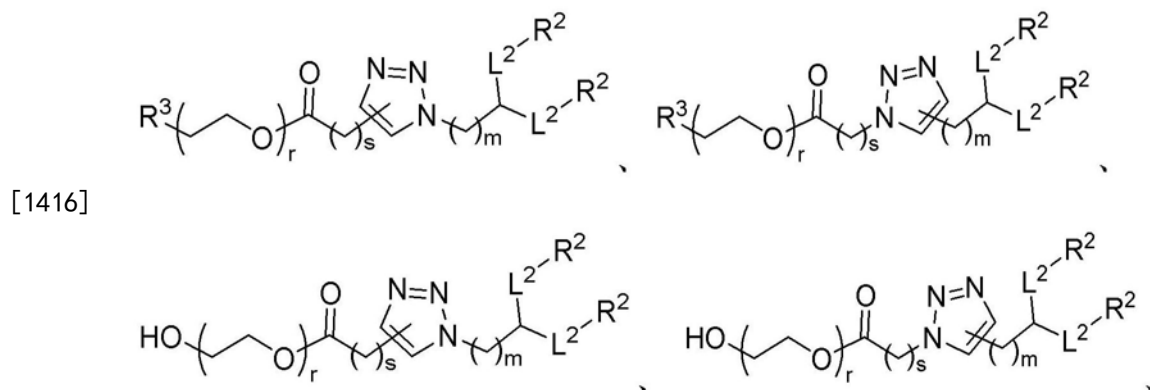
[1411] 或其盐。

[1412] 在某些实施方案中,D是通过点击化学(例如三唑)获得的部分。在某些实施方案中,所述式(VII)化合物具有式(VII-a-1)或(VII-a-2):



[1414] 或其盐。

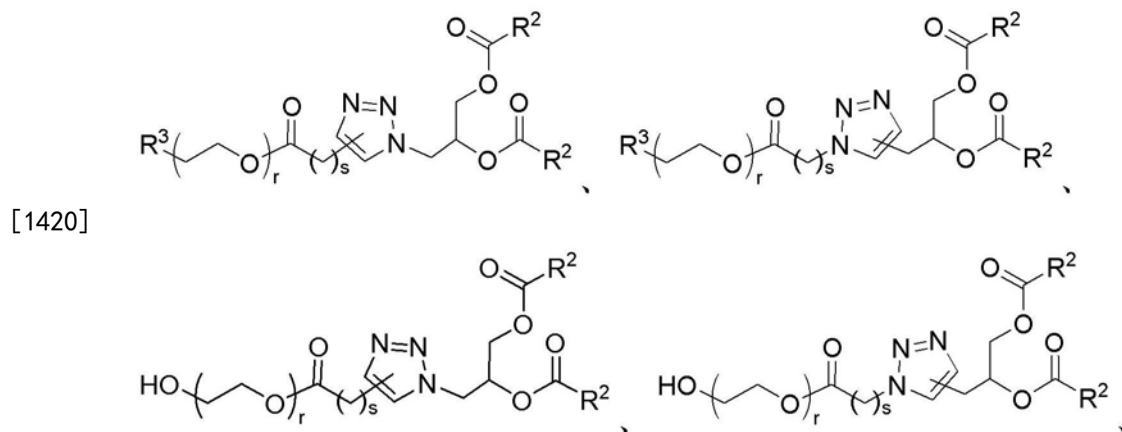
[1415] 在某些实施方案中,所述式(VII)化合物具有以下式之一:



[1417] 或其盐,其中

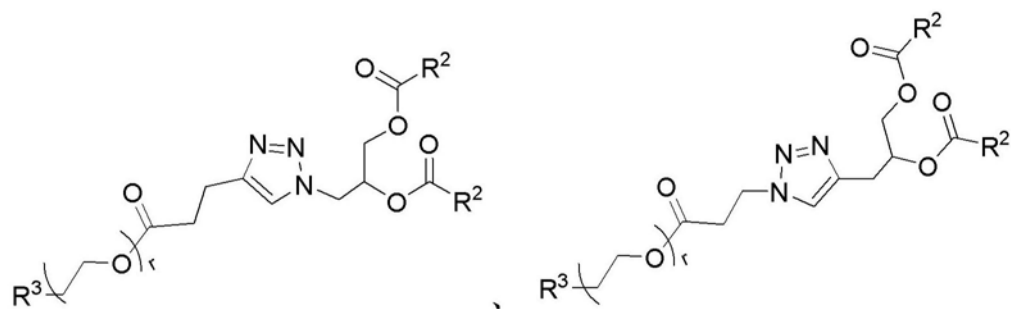
[1418] s是0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。

[1419] 在某些实施方案中,所述式(VII)化合物具有以下式之一:

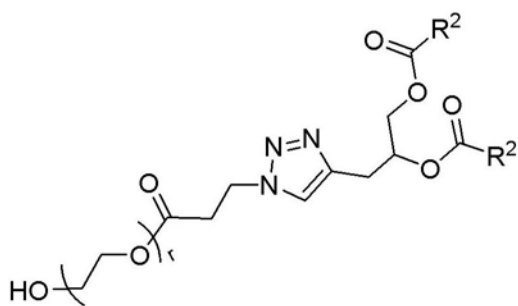
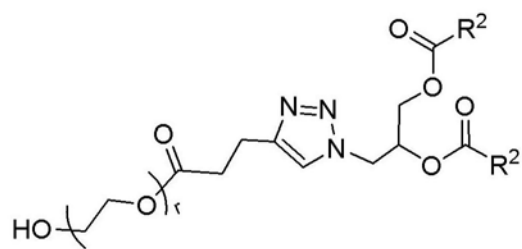


[1421] 或其盐。

[1422] 在某些实施方案中,式(VII)化合物具有以下式之一:

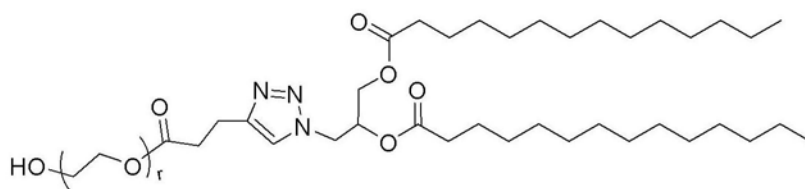


[1423]

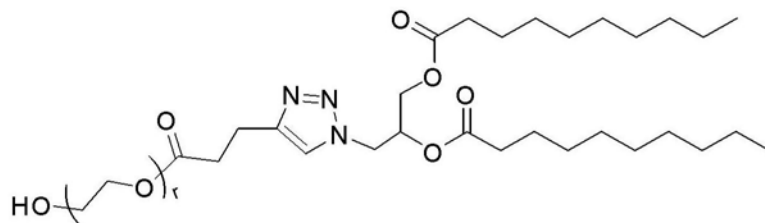


[1424] 或其盐。

[1425] 在某些实施方案中,式(VII)化合物具有以下式之一:

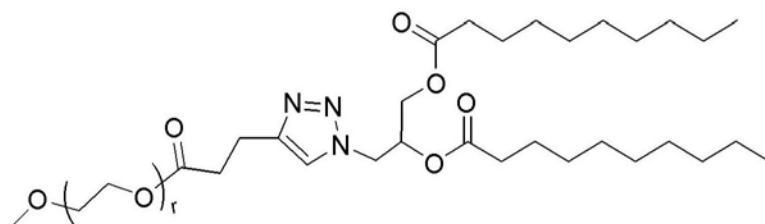


(化合物 415)、

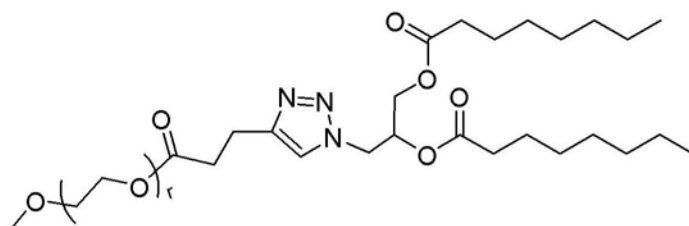


(化合物 416)、

[1426]



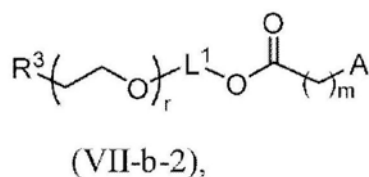
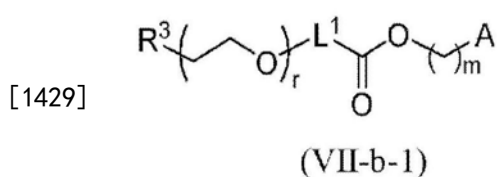
(化合物 417)、



(化合物 418)、

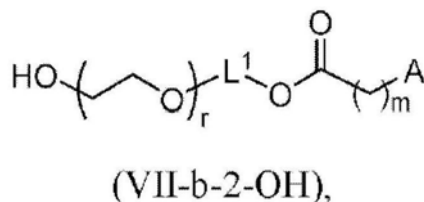
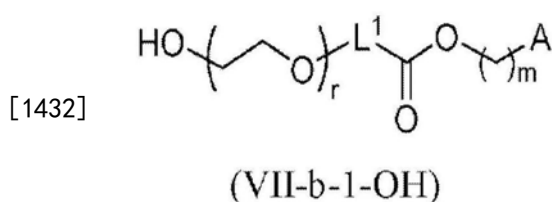
[1427] 或其盐。

[1428] 在某些实施方案中,D是在生理条件下可裂解的部分(例如,酯、酰胺、碳酸酯、氨基甲酸酯、脲)。在某些实施方案中,式(VII)化合物具有式(VII-b-1)或(VII-b-2):



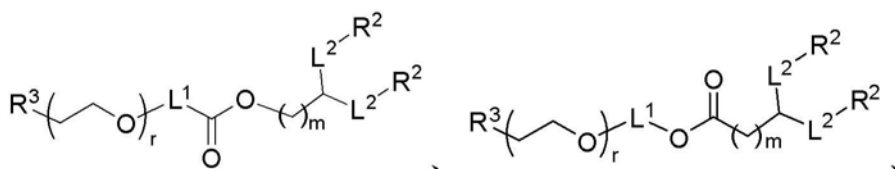
[1430] 或其盐。

[1431] 在某些实施方案中,式(VII)化合物具有式(VII-b-1-OH)或(VII-b-2-OH):

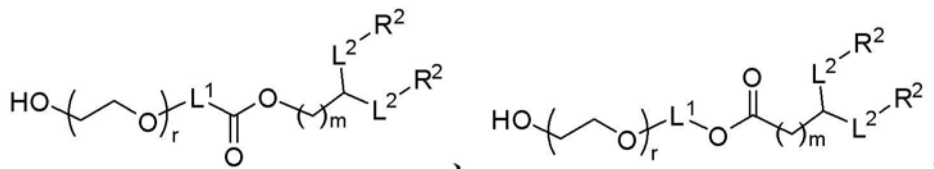


[1433] 或其盐。

[1434] 在某些实施方案中,所述式(VII)化合物具有以下式之一:

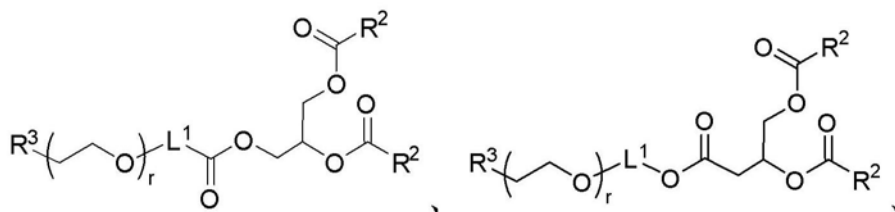


[1435]

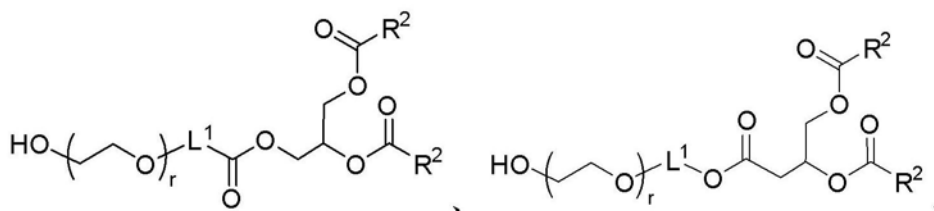


[1436] 或其盐。

[1437] 在某些实施方案中,式(VII)化合物具有以下式之一:

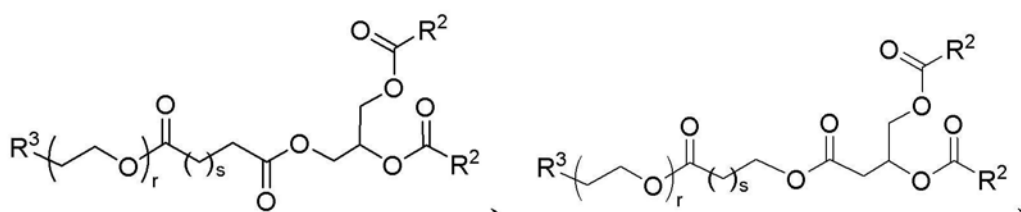


[1438]

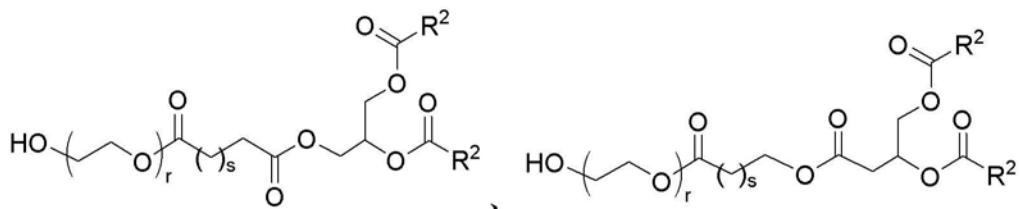


[1439] 或其盐。

[1440] 在某些实施方案中,式(VII)化合物具有以下式之一:



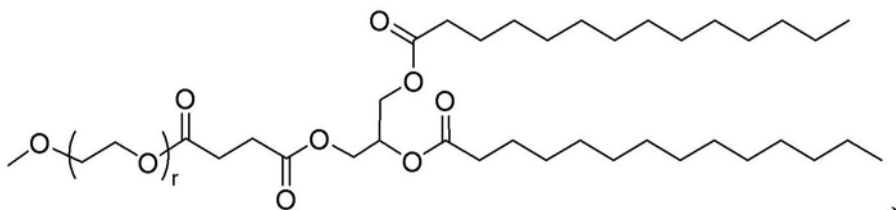
[1441]



[1442] 或其盐。

[1443] 在某些实施方案中,式(VII)化合物具有以下式之一:

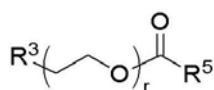
[1444]



[1445] 或其盐。

[1446] 在某些实施方案中,可用于本发明的PEG脂质是PEG化脂肪酸。在某些实施方案中,可用于本发明的PEG脂质是式(VIII)化合物。本文提供了式(VIII)化合物:

[1447]



(VIII),

[1448] 或其盐,其中:

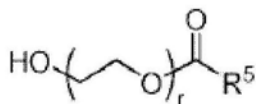
[1449] R^3 是 $-OR^0$;[1450] R^0 是氢、任选取代的烷基或氧保护基团;[1451] r 是1与100之间的整数(包括0和4);

[1452] R^5 是任选取代的 C_{10-40} 烷基、任选取代的 C_{10-40} 烯基或任选取代的 C_{10-40} 炔基;并且任选地 R^5 的一个或多个亚甲基基团被任选取代的亚碳环基、任选取代的亚杂环基、任选取代的亚芳基、任选取代的亚杂芳基、 $N(R^N)$ 、 O 、 S 、 $C(O)$ 、 $-C(O)N(R^N)$ 、 $NR^N C(O)$ 、 $NR^N C(O)N(R^N)$ 、 $C(O)O$ 、 $OC(O)$ 、 $OC(O)O$ 、 $OC(O)N(R^N)$ 、 $-NR^N C(O)O$ 、 $C(O)S$ 、 $SC(O)$ 、 $C(=NR^N)$ 、 $C(=NR^N)N(R^N)$ 、 $NR^N C(=NR^N)$ 、 $NR^N C(=NR^N)N(R^N)$ 、 $-C(S)$ 、 $C(S)N(R^N)$ 、 $NR^N C(S)$ 、 $NR^N C(S)N(R^N)$ 、 $S(O)$ 、 $OS(O)$ 、 $S(O)O$ 、 $OS(O)O$ 、 $OS(O)_2$ 、 $-S(O)_2O$ 、 $OS(O)_2O$ 、 $N(R^N)S(O)$ 、 $S(O)N(R^N)$ 、 $N(R^N)S(O)N(R^N)$ 、 $OS(O)N(R^N)$ 、 $N(R^N)S(O)O$ 、 $-S(O)_2$ 、 $N(R^N)S(O)_2$ 、 $S(O)_2N(R^N)$ 、 $N(R^N)S(O)_2N(R^N)$ 、 $OS(O)_2N(R^N)$ 或 $N(R^N)S(O)_2O$ 置换;并且

[1453] R^N 的每个实例独立地是氢、任选取代的烷基或氮保护基团。

[1454] 在某些实施方案中,所述式(VIII)化合物具有式(VIII-OH):

[1455]

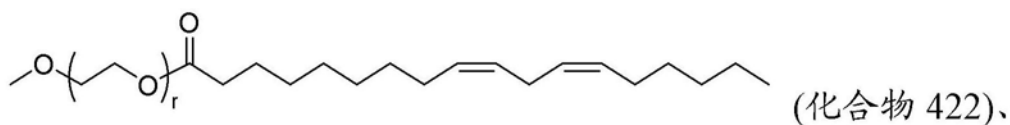
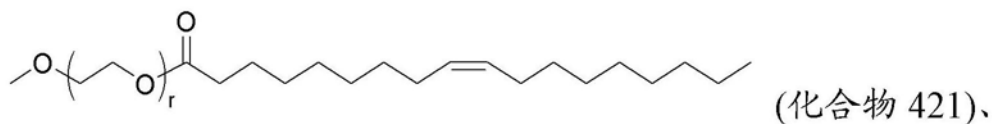
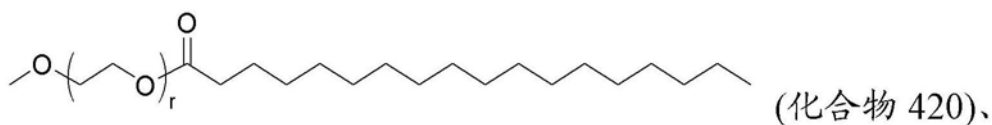
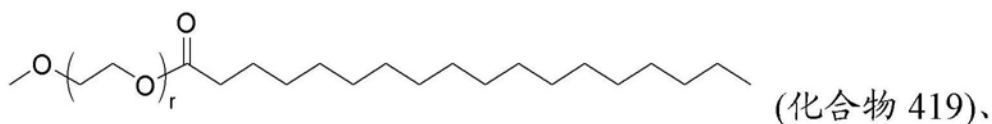


(VIII-OH),

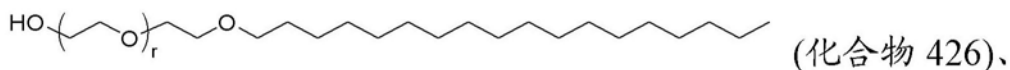
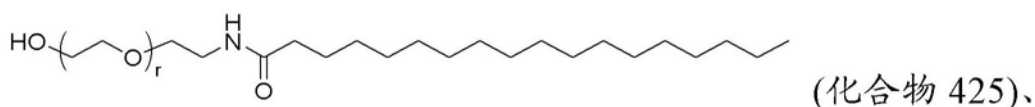
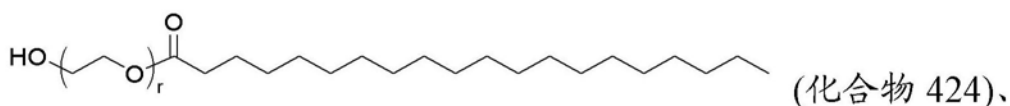
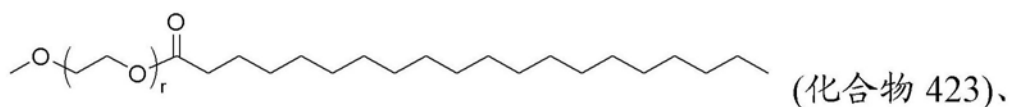
[1456] 或其盐。在一些实施方案中, r 是45。在其他实施方案中, r 是1。

[1457] 在某些实施方案中,式(VIII)化合物具有以下式之一:

[1458]

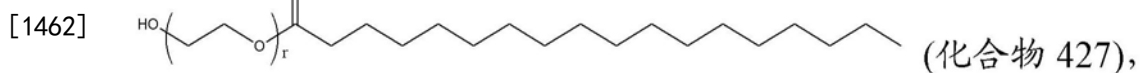


[1459]



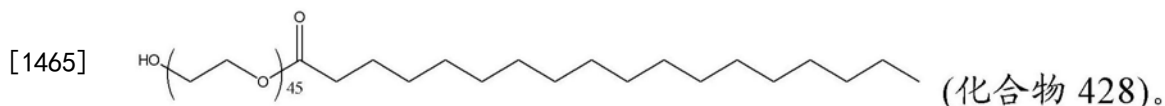
[1460] 或其盐。在一些实施方案中, r是45。

[1461] 在其他实施方案中, 所述式 (VIII) 化合物是:



[1463] 或其盐。

[1464] 在一个实施方案中, 所述式 (VIII) 化合物是



[1466] 在一个实施方案中, 本文公开的药物组合物的脂质组合物中的PEG-脂质的量在约0.1mol%至约5mol%、约0.5mol%至约5mol%、约1mol%至约5mol%、约1.5mol%至约5mol%、约2mol%至约5mol%mol%、约0.1mol%至约4mol%、约0.5mol%至约4mol%、约1mol%至约4mol%、约1.5mol%至约4mol%、约2mol%至约4mol%、约0.1mol%至约3mol%、约0.5mol%至约3mol%、约1mol%至约3mol%、约1.5mol%至约3mol%、约2mol%

至约3mol%、约0.1mol%至约2mol%、约0.5mol%至约2mol%、约1mol%至约2mol%、约1.5mol%至约2mol%、约0.1mol%至约1.5mol%、约0.5mol%至约1.5mol%或约1mol%至约1.5mol%的范围内。

[1467] 在一个实施方案中,本文公开的脂质组合物中的PEG-脂质的量是约2mol%。在一个实施方案中,本文公开的脂质组合物中的PEG-脂质的量是约1.5mol%。

[1468] 在一个实施方案中,本文公开的脂质组合物中的PEG-脂质的量是至少约0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9或5mol%。

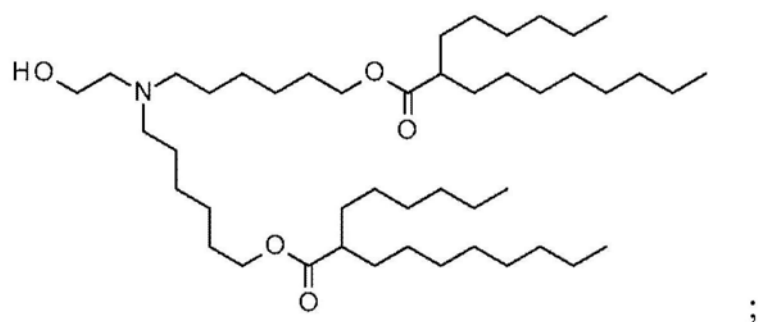
[1469] 在一些方面,本文公开的药物组合物的脂质组合物不包含PEG-脂质。

[1470] 其他可电离氨基脂质

[1471] 除了或代替根据式(I)、(II)、(III)、(IV)、(V)或(VI)的脂质,本文公开的药物组合物的脂质组合物还可包含一种或多种可电离氨基脂质。

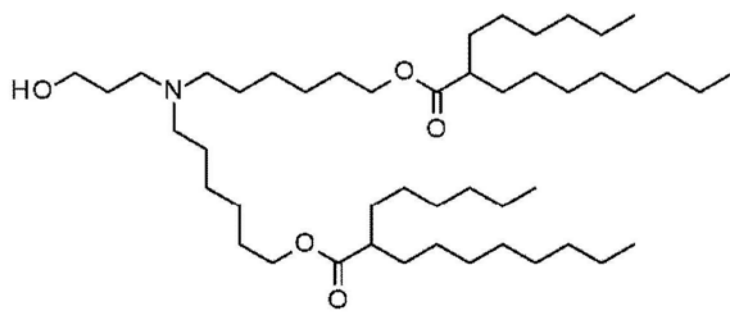
[1472] -可电离脂质可选自由以下组成的非限制性组:3-(双十二烷基氨基)-N1,N1,4-三十二烷基-1-哌嗪乙胺(KL10)、N1-[2-(双十二烷基氨基)乙基]-N1,N4,N4-三十二烷基-1,4-哌嗪二乙胺(KL22)、14,25-双十三烷基-15,18,21,24-四氮杂-三十八烷(KL25)、1,2-二亚油基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DLin-DMA)、2,2-二亚油基-4-二甲基氨基甲基-[1,3]-二氧戊环(DLin-K-DMA)、庚三十碳-6,9,28,31-四烯-19-基4-(二甲基氨基)丁酸酯(DLin-MC3-DMA)、2,2-二亚油基-4-(2-二甲基氨基乙基)-[1,3]-二氧戊环(DLin-KC2-DMA)、1,2-二油基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DODMA)、(13Z,165Z)-N,N-二甲基-3-壬二十二碳-13-16-烯-1-胺(L608)、2-({8-[(3β)-胆甾-5-烯-3-基氧基]辛基}氧基)-N,N-二甲基-3-[(9Z,12Z)-十八碳-9,12-烯-1-基氧基]丙-1-胺(辛基-CLinDMA)、(2R)-2-({8-[(3β)-胆甾-5-烯-3-基氧基]辛基}氧基)-N,N-二甲基-3-[(9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基氧基]丙-1-胺(辛基-CLinDMA(2R))以及(2S)-2-({8-[(3β)-胆甾-5-烯-3-基氧基]辛基}氧基)-N,N-二甲基-3-[(9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基氧基]丙-1-胺(辛基-CLinDMA(2S))。除这些之外,可电离氨基脂质还可以是包含环胺基团的脂质。

[1473] 可电离脂质还可以是国际公布号W0 2017/075531 A1中公开的化合物,所述公布特此以引用的方式整体并入。例如,可电离氨基脂质包括但不限于:

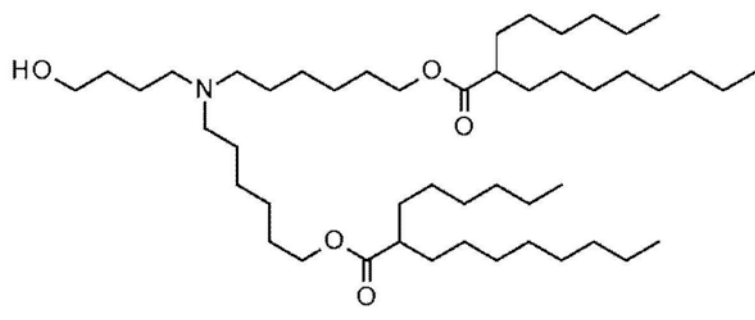


;

[1474]



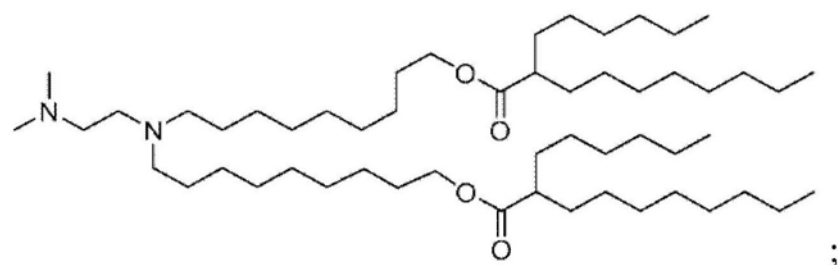
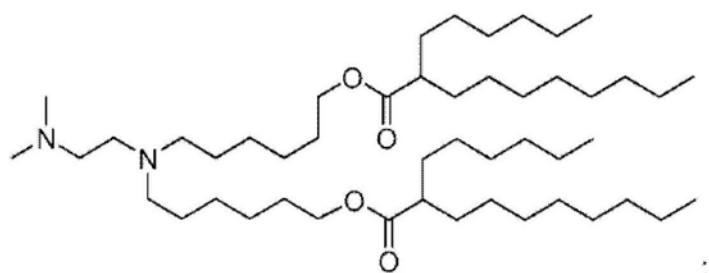
;



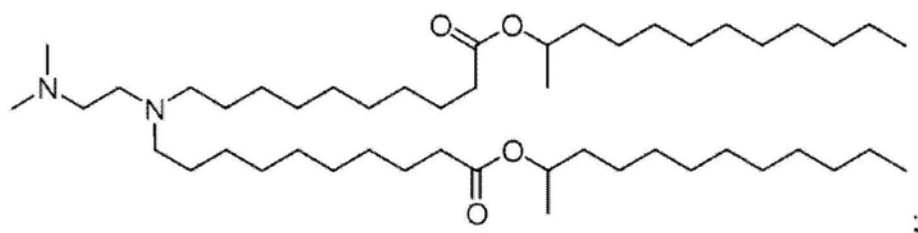
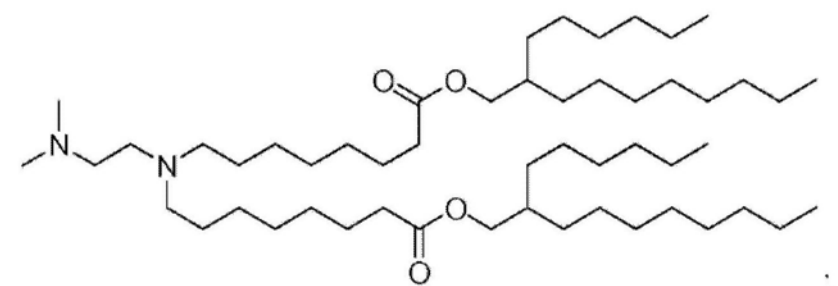
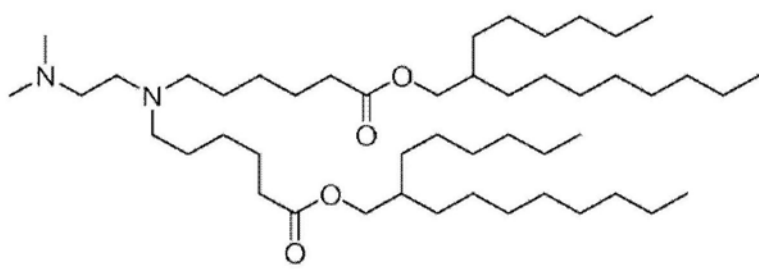
;

[1475] 以及它们的任何组合。

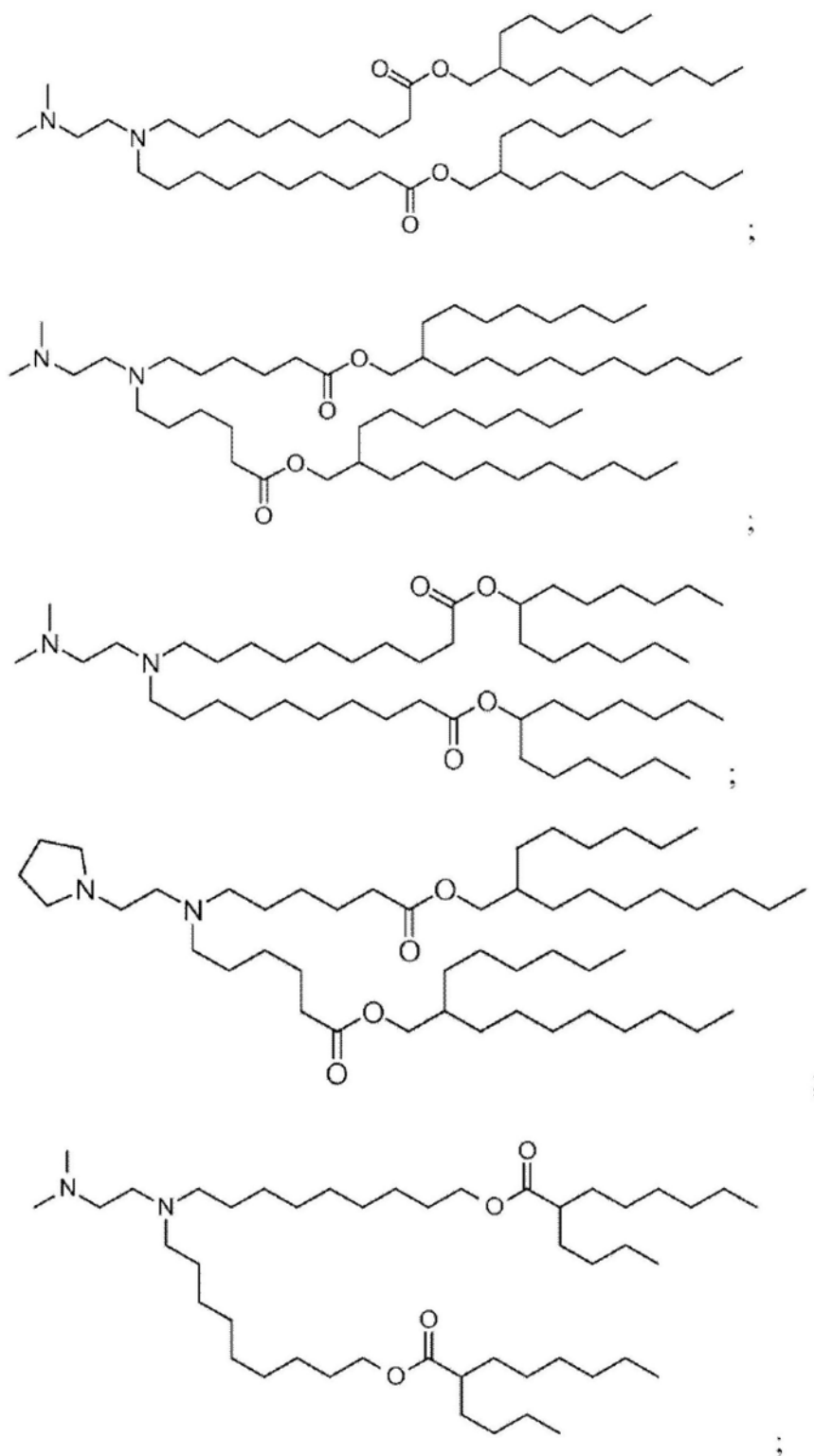
[1476] 可电离脂质还可以是国际公布号W0 2015/199952 A1中公开的化合物,所述公布特此以引用的方式整体并入。例如,可电离氨基脂质包括但不限于:



[1477]



[1478]



[1479] 以及它们的任何组合。

[1480] 纳米粒子组合物

[1481] 除了上述那些之外,本文公开的药物组合物的脂质组合物还可包含一种或多种组分。例如,所述脂质组合物可包含一种或多种渗透性增强剂分子、碳水化合物、聚合物、表面改变剂(例如表面活性剂)或其他组分。例如,渗透性增强剂分子可以是美国专利申请公布号2005/0222064中描述的分子。碳水化合物可包括单糖(例如,葡萄糖)和多糖(例如,糖原

及其衍生物和类似物)。

[1482] 聚合物可包含于本文公开的药物组合物(例如,脂质纳米粒子形式的药物组合物)和/或用于包封或部分包封所述药物组合物。聚合物可以是生物可降解的和/或生物相容的。聚合物可选自但不限于聚胺、聚醚、聚酰胺、聚酯、聚氨基甲酸酯、聚脲、聚碳酸酯、聚苯乙烯、聚酰亚胺、聚砜、聚氨酯、聚乙炔、聚乙烯、聚乙烯亚胺、聚异氰酸酯、聚丙烯酸、聚甲基丙烯酸酯、聚丙烯腈以及聚芳酯。

[1483] 脂质组合物与多核苷酸之间的比例范围可以是约10:1至约60:1(wt/wt)。

[1484] 在一些实施方案中,脂质组合物与多核苷酸之间的比例可以是约10:1、11:1、12:1、13:1、14:1、15:1、16:1、17:1、18:1、19:1、20:1、21:1、22:1、23:1、24:1、25:1、26:1、27:1、28:1、29:1、30:1、31:1、32:1、33:1、34:1、35:1、36:1、37:1、38:1、39:1、40:1、41:1、42:1、43:1、44:1、45:1、46:1、47:1、48:1、49:1、50:1、51:1、52:1、53:1、54:1、55:1、56:1、57:1、58:1、59:1或60:1(wt/wt)。在一些实施方案中,所述脂质组合物与编码治疗剂的多核苷酸的wt/wt比例是约20:1或约15:1。

[1485] 在一个实施方案中,本文描述的脂质纳米粒子可包含处于以下脂质:多核苷酸重量比的多核苷酸(例如,mRNA):5:1、10:1、15:1、20:1、25:1、30:1、35:1、40:1、45:1、50:1、55:1、60:1或70:1,或这些比例的范围或任一者,如但不限于5:1至约10:1、约5:1至约15:1、约5:1至约20:1、约5:1至约25:1、约5:1至约30:1、约5:1至约35:1、约5:1至约40:1、约5:1至约45:1、约5:1至约50:1、约5:1至约55:1、约5:1至约60:1、约5:1至约70:1、约10:1至约15:1、约10:1至约20:1、约10:1至约25:1、约10:1至约30:1、约10:1至约35:1、约10:1至约40:1、约10:1至约45:1、约10:1至约50:1、约10:1至约55:1、约10:1至约60:1、约10:1至约70:1、约15:1至约20:1、约15:1至约25:1、约15:1至约30:1、约15:1至约35:1、约15:1至约40:1、约15:1至约45:1、约15:1至约50:1、约15:1至约55:1、约15:1至约60:1或约15:1至约70:1。

[1486] 在一个实施方案中,本文所述的脂质纳米粒子可包含浓度为大约0.1mg/ml至2mg/ml,如但不限于0.1mg/ml、0.2mg/ml、0.3mg/ml、0.4mg/ml、0.5mg/ml、0.6mg/ml、0.7mg/ml、0.8mg/ml、0.9mg/ml、1.0mg/ml、1.1mg/ml、1.2mg/ml、1.3mg/ml、1.4mg/ml、1.5mg/ml、1.6mg/ml、1.7mg/ml、1.8mg/ml、1.9mg/ml、2.0mg/ml或大于2.0mg/ml的多核苷酸。

[1487] 在一些实施方案中,本文公开的药物组合物被配制为脂质纳米粒子(LNP)。因此,本公开还提供了纳米粒子组合物,其包含(i)包含递送剂(诸如,如本文所述的式(I)或(III)化合物)的脂质组合物,和(ii)编码一种或多种癌表位多肽的多核苷酸。在这种纳米粒子组合物中,本文公开的脂质组合物可包封编码一种或多种癌表位多肽的多核苷酸。

[1488] 纳米粒子组合物的尺寸通常为近似微米或更小,并且可包括脂质双层。纳米粒子组合物涵盖脂质纳米粒子(LNP)、脂质体(例如,脂质囊泡)和脂质复合物。例如,纳米粒子组合物可以是具有直径为500nm或更小的脂质双层的脂质体。

[1489] 纳米粒子组合物包括例如脂质纳米粒子(LNP)、脂质体和脂质复合物。在一些实施方案中,纳米粒子组合物是包含一个或多个脂质双层的囊泡。在某些实施方案中,纳米粒子组合物包含被水性区室分开的两个或更多个同心双层。脂质双层可彼此官能化和/或交联。脂质双层可包括一种或多种配体、蛋白质或通道。

[1490] 在一些实施方案中,本公开的纳米粒子组合物包含至少一种根据式(I)、(III)、(IV)、(V)或(VI)的化合物。例如,纳米粒子组合物可包含化合物1-147中的一种或多种,或

化合物1-342中的一种或多种。纳米粒子组合物还可包含各种其他组分。例如,除了根据式(I)、(II)、(III)、(IV)、(V)或(VI)的脂质外,纳米粒子组合物还可包含一种或多种其他脂质,如(i)至少一种磷脂、(ii)至少一种结构脂质、(iii)至少一种PEG-脂质或(iv)其任何组合。结构脂质的包含可以是任选的,例如当根据式III的脂质用于本发明的脂质纳米粒子组合物中时。

[1491] 在一些实施方案中,纳米粒子组合物包含式(I)化合物(例如,化合物18、25、26或48)。在一些实施方案中,纳米粒子组合物包含式(I)化合物(例如,化合物18、25、26或48)和磷脂(例如,DSPC)。

[1492] 在一些实施方案中,纳米粒子组合物包含式(III)化合物(例如,化合物236)。在一些实施方案中,纳米粒子组合物包含式(III)化合物(例如,化合物236)和磷脂(例如,DOPE或DSPC)。

[1493] 在一些实施方案中,纳米粒子组合物包含由或基本上由式(I)化合物(例如,化合物18、25、26或48)组成的脂质组合物。在一些实施方案中,纳米粒子组合物包含脂质组合物,所述脂质组合物由或基本上由式(I)化合物(例如,化合物18、25、26或48)和磷脂(例如, DSPC)组成。

[1494] 在一些实施方案中,纳米粒子组合物包含由或基本上由式(III)化合物(例如,化合物236)组成的脂质组合物。在一些实施方案中,纳米粒子组合物包含脂质组合物,所述脂质组合物由或基本上由式(III)化合物(例如,化合物236)和磷脂(例如,DOPE或DSPC)组成。

[1495] 在一个实施方案中,脂质纳米粒子包含可电离的脂质、结构脂质、磷脂和mRNA。在一些实施方案中,LNP包含可电离脂质、PEG修饰的脂质、磷脂和结构脂质。在一些实施方案中,LNP具有约20%-60%可电离脂质:约5%-25%磷脂:约25%-55%结构脂质;以及约0.5%-15%PEG修饰的脂质的摩尔比。在一些实施方案中,所述LNP包含约50%可电离脂质、约1.5%PEG修饰的脂质、约38.5%结构脂质和约10%磷脂的摩尔比。在一些实施方案中,所述LNP包含约55%可电离脂质、约2.5%PEG脂质、约32.5%结构脂质和约10%磷脂的摩尔比。在一些实施方案中,可电离脂质是可电离氨基脂质,并且磷脂是中性脂质,并且结构脂质是胆固醇。在一些实施方案中,所述LNP具有50:38.5:10:1.5的可电离脂质:胆固醇: DSPC:PEG脂质的摩尔比。在一些实施方案中,所述可电离脂质是化合物18或化合物236,并且所述PEG脂质是化合物428。

[1496] 在一些实施方案中,所述LNP具有50:38.5:10:1.5的化合物18:胆固醇:磷脂:化合物428的摩尔比。在一些实施方案中,所述LNP具有50:38.5:10:1.5的化合物18:胆固醇: DSPC:化合物428的摩尔比。

[1497] 在一些实施方案中,所述LNP具有50:38.5:10:1.5的化合物236:胆固醇:磷脂:化合物428的摩尔比。在一些实施方案中,所述LNP具有50:38.5:10:1.5的化合物236:胆固醇: DSPC:化合物428的摩尔比。

[1498] 在一些实施方案中,所述LNP具有小于0.4的多分散性值。在一些实施方案中,所述LNP在中性pH下具有净中性电荷。在一些实施方案中,所述LNP具有50-150nm的平均直径。在一些实施方案中,所述LNP具有80-100nm的平均直径。

[1499] 如本文一般定义,术语“脂质”是指具有疏水或两亲性质的小分子。脂质可以是天然存在的或合成的。脂质的实例包括但不限于脂肪、蜡、含固醇的代谢物、维生素、脂肪酸、

甘油脂质、甘油磷脂、鞘脂、糖脂和聚酮化合物以及异戊烯醇脂质。在一些情况下,一些脂质的两亲性质使得它们在水性介质中形成脂质体、囊泡或膜。

[1500] 在一些实施方案中,脂质纳米粒子(LNP)可包含可电离脂质。如本文所用,术语“可电离脂质”具有其在本领域中的普通含义,并且可指包含一个或多个带电荷的部分的脂质。在一些实施方案中,可电离脂质可带正电或带负电。可电离脂质可带正电,在这种情况下,它可被称为“阳离子脂质”。在某些实施方案中,可电离脂质分子可包含胺基团,并且可称为可电离氨基脂质。如本文所用,“带电荷的部分”是携带形式电子电荷的化学部分,例如,单价(+1或-1)、二价(+2或-2)、三价(+3或-3)等。带电荷部分可以是阴离子的(即带负电的)或阳离子的(即带正电的)。带正电的部分的实例包括胺基团(例如伯胺、仲胺和/或叔胺)、铵基团、吡啶鎓基团、胍基和咪唑鎓基团。在特定实施方案中,带电荷的部分包含胺基团。带负电的基团或其前体的实例包括羧酸根基团、磺酸根基团、硫酸根基团、膦酸根基团、磷酸根基团、羟基等。在一些情况下,带电荷的部分的电荷可随环境条件而变化,例如,pH的变化可改变所述部分的电荷,和/或使所述部分变得带电或不带电。通常,可根据需要选择分子的电荷密度。

[1501] 应理解,术语“带电荷”或“带电荷的部分”不是指分子上的“部分负电荷”或“部分正电荷”。术语“部分负电荷”和“部分正电荷”以其本领域中的普通含义给出。当官能团包含被极化的键以使得电子密度被拉向键的一个原子、从而在原子上产生部分负电荷时,可能产生“部分负电荷”。一般来说,本领域普通技术人员将认识到可以这种方式变得极化的键。

[1502] 在一些实施方案中,可电离脂质是可电离氨基脂质,在本领域中有时称为“可电离阳离子脂质”。在一个实施方案中,可电离氨基脂质可具有经由接头结构连接的带正电的亲水头和疏水尾。

[1503] 除这些之外,可电离脂质还可以是包含环胺基团的脂质。

[1504] 在一个实施方案中,可电离脂质可选自但不限于国际公布号W02013086354和W02013116126中描述的可电离脂质;所述公布各自的内容以引用的方式整体并入本文。

[1505] 在另一个实施方案中,可电离脂质可选自但不限于美国专利号7,404,969的式CLI-CLXXXII;所述专利各自以引用的方式整体并入。

[1506] 在一个实施方案中,脂质可以是可裂解脂质,诸如国际公布号W02012/170889中所述的那些,所述公布以引用的方式整体并入本文。在一个实施方案中,脂质可通过本领域中已知和/或如在国际公布号W02013/086354中所述的方法合成;所述专利各自的内容以引用的方式整体并入本文。

[1507] 纳米粒子组合物可通过多种方法进行表征。例如,显微镜(例如,透射电子显微镜或扫描电子显微镜)可用于检查纳米粒子组合物的形态和尺寸分布。动态光散射或电位测定法(例如电位滴定)可用于测量 ζ 电位。动态光散射也可用于确定粒度。诸如Zetasizer Nano ZS(Malvern Instruments Ltd,Malvern,Worcestershire,UK)的仪器也可用于测量纳米粒子组合物的多种特征,如粒度、多分散性指数和 ζ 电位。

[1508] 在一些实施方案中,纳米粒子组合物包含由或基本上由式(I)化合物(例如,化合物18、25、26或48)组成的脂质组合物。在一些实施方案中,纳米颗粒组合物包含脂质组合物,所述脂质组合物由或基本上由式(I)化合物(例如,化合物18、25、26或48)和磷脂(例如,DSPC或MSPC)组成。

[1509] 纳米粒子组合物可通过多种方法进行表征。例如,显微镜(例如,透射电子显微镜或扫描电子显微镜)可用于检查纳米粒子组合物的形态和尺寸分布。动态光散射或电位测定法(例如电位滴定)可用于测量 ζ 电位。动态光散射也可用于确定粒度。诸如Zetasizer Nano ZS(Malvern Instruments Ltd,Malvern,Worcestershire,UK)的仪器也可用于测量纳米粒子组合物的多种特征,如粒度、多分散性指数和 ζ 电位。

[1510] 纳米粒子的尺寸可帮助抵消生物反应,如但不限于炎症或可增加多核苷酸的生物作用。

[1511] 如本文所用,纳米粒子组合物背景下的“尺寸”或“平均尺寸”是指纳米粒子组合物的平均直径。

[1512] 在一个实施方案中,编码一种或多种癌表位多肽的多核苷酸被配制在脂质纳米粒子中,所述脂质纳米粒子具有约10至约100nm,诸如但不限于约10至约20nm、约10至约30nm、约10至约40nm、约10至约50nm、约10至约60nm、约10至约70nm、约10至约80nm、约10至约90nm、约20至约30nm、约20至约40nm、约20至约50nm、约20至约60nm、约20至约70nm、约20至约80nm、约20至约90nm、约20至约100nm、约30至约40nm、约30至约50nm、约30至约60nm、约30至约70nm、约30至约80nm、约30至约90nm、约30至约100nm、约40至约50nm、约40至约60nm、约40至约70nm、约40至约80nm、约40至约90nm、约40至约100nm、约50至约60nm、约50至约70nm、约50至约80nm、约50至约90nm、约50至约100nm、约60至约70nm、约60至约80nm、约60至约90nm、约60至约100nm、约70至约80nm、约70至约90nm、约70至约100nm、约80至约90nm、约80至约100nm和/或约90至约100nm的直径。

[1513] 在一个实施方案中,所述纳米粒子具有约10至500nm的直径。在一个实施方案中,所述纳米粒子具有大于100nm、大于150nm、大于200nm、大于250nm、大于300nm、大于350nm、大于400nm、大于450nm、大于500nm、大于550nm、大于600nm、大于650nm、大于700nm、大于750nm、大于800nm、大于850nm、大于900nm、大于950nm或大于1000nm的直径。

[1514] 在一些实施方案中,纳米粒子组合物的最大尺寸是1 μ m或更短(例如,1 μ m、900nm、800nm、700nm、600nm、500nm、400nm、300nm、200nm、175nm、150nm、125nm、100nm、75nm、50nm或更短)。

[1515] 纳米粒子组合物可以是相对均匀的。多分散性指数可用于指示纳米粒子组合物的均匀性,例如纳米粒子组合物的粒度分布。小的(例如,小于0.3的)多分散性指数通常指示窄的粒度分布。纳米粒子组合物可具有约0至约0.25,如0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.10、0.11、0.12、0.13、0.14、0.15、0.16、0.17、0.18、0.19、0.20、0.21、0.22、0.23、0.24或0.25的多分散性指数。在一些实施方案中,本文公开的纳米粒子组合物的多分散性指数可以是约0.10至约0.20。

[1516] 纳米粒子组合物的 ζ 电位可用于指示组合物的电动势。例如, ζ 电位可描述纳米粒子组合物的表面电荷。通常希望具有相对低的正或负电荷的纳米粒子组合物,因为带更高电荷的物质可能与体内的细胞、组织和其他元件不期望地相互作用。在一些实施方案中,本文公开的纳米粒子组合物的 ζ 电位可以是约-10mV至约+20mV、约-10mV至约+15mV、约-10mV至约+10mV、约-10mV至约+5mV、约-10mV至约0mV、约-10mV至约-5mV、约-5mV至约+20mV、约-5mV至约+15mV、约-5mV至约+10mV、约-5mV至约+5mV、约-5mV至约0mV、约0mV至约+20mV、约0mV至约+15mV、约0mV至约+10mV、约0mV至约+5mV、约+5mV至约+20mV、约+5mV至约+15mV或约

+5mV至约+10mV。

[1517] 在一些实施方案中,脂质纳米粒子的 ζ 电位可以是约0mV至约100mV、约0mV至约90mV、约0mV至约80mV、约0mV至约70mV、约0mV至约60mV、约0mV至约50mV、约0mV至约40mV、约0mV至约30mV、约0mV至约20mV、约0mV至约10mV、约10mV至约100mV、约10mV至约90mV、约10mV至约80mV、约10mV至约70mV、约10mV至约60mV、约10mV至约50mV、约10mV至约40mV、约10mV至约30mV、约10mV至约20mV、约20mV至约100mV、约20mV至约90mV、约20mV至约80mV、约20mV至约70mV、约20mV至约60mV、约20mV至约50mV、约20mV至约40mV、约20mV至约30mV、约30mV至约100mV、约30mV至约90mV、约30mV至约80mV、约30mV至约70mV、约30mV至约60mV、约30mV至约50mV、约30mV至约40mV、约40mV至约100mV、约40mV至约90mV、约40mV至约80mV、约40mV至约70mV、约40mV至约60mV以及约40mV至约50mV。在一些实施方案中,脂质纳米粒子的 ζ 电位可以是约10mV至约50mV、约15mV至约45mV、约20mV至约40mV以及约25mV至约35mV。在一些实施方案中,脂质纳米粒子的 ζ 电位可以是约10mV、约20mV、约30mV、约40mV、约50mV、约60mV、约70mV、约80mV、约90mV以及约100mV。

[1518] 术语多核苷酸的“包封效率”描述了相对于所提供的初始量,在制备后由纳米粒子组合物包封或以其他方式与纳米粒子组合物缔合的多核苷酸的量。如本文所用,“包封”可指完全、实质或部分封住、约束、包围或包住。

[1519] 期望封装效率高(例如,接近100%)。可例如通过比较在用一种或多种有机溶剂或洗涤剂破碎纳米粒子组合物之前和之后含有纳米粒子组合物的溶液中的多核苷酸的量来测量包封效率。

[1520] 荧光可用于测量溶液中的游离多核苷酸的量。对于本文所述的纳米粒子组合物,多核苷酸的包封效率可以是至少50%,例如50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%。在一些实施方案中,包封效率可以是至少80%。在一些实施方案中,包封效率可以是至少90%。

[1521] 本文公开的药物组合物中存在的多核苷酸的量可取决于多种因素,如多核苷酸的大小、所需的靶标和/或应用或纳米粒子组合物的其他性质以及多核苷酸。

[1522] 例如,可用于纳米粒子组合物的mRNA的量可取决于mRNA的大小(表示为长度或分子量)、序列和其他特征。纳米粒子组合物中的多核苷酸的相对量也可变化。

[1523] 可根据功效和耐受性的考虑来优化存在于本公开的脂质纳米粒子组合物中的脂质组合物和多核苷酸的相对量。对于包含mRNA作为多核苷酸的组合物,N:P比可充当有用的度量。

[1524] 由于纳米粒子组合物的N:P比控制表达和耐受性,因此需要具有低N:P比和强表达的纳米粒子组合物。N:P比根据纳米粒子组合物中脂质与RNA的比例而变化。

[1525] 一般来说,较低的N:P比是优选的。可选择一种或多种RNA、脂质及其量以提供约2:1至约30:1,如2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、12:1、14:1、16:1、18:1、20:1、22:1、24:1、26:1、28:1或30:1的N:P比。在某些实施方案中,N:P比可以是约2:1至约8:1。在其他实施方案中,N:P比是约5:1至约8:1。在某些实施方案中,N:P比是5:1至6:1。在一个具体方面,N:P比是约5.67:1。

[1526] 除了提供纳米粒子组合物外,本公开还提供了包括包封多核苷酸的产生脂质纳米粒子的方法。这种方法包括使用本文公开的药物组合物中的任一种并根据本领域中已知的

脂质纳米粒子的产生方法来产生脂质纳米粒子。参见例如,Wang等人(2015)“Delivery of oligonucleotides with lipid nanoparticles”*Adv.Drug Deliv.Rev.*87:68-80;Silva等人(2015)“Delivery Systems for Biopharmaceuticals.Part I:Nanoparticles and Microparticles”*Curr.Pharm.Technol.*16:940-954;Naseri等人(2015)“Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers:Structure,Preparation and Application”*Adv.Pharm.Bull.*5:305-13;Silva等人(2015)“Lipid nanoparticles for the delivery of biopharmaceuticals”*Curr.Pharm.Biotechnol.*16:291-302,以及其中引用的参考文献。

[1527] 试剂盒制剂

[1528] 在本发明的其他方面,也提供用于实现这些方法的试剂盒。试剂盒包括容纳脂质纳米粒子制剂的容器、容纳疫苗制剂的容器和关于以下的说明书:将个人化mRNA癌症疫苗添加至所述疫苗制剂中以产生个人化mRNA癌症疫苗制剂,在向受试者施用的24小时内使所述个人化mRNA癌症疫苗制剂与所述脂质纳米粒子制剂混合。在一些实施方案中,试剂盒包括具有编码2-100种癌抗原的开放阅读框的mRNA。

[1529] 制品包括在一个或多个容器中的医药级或诊断级本发明化合物。制品可包括宣传或描述本发明化合物的用途的说明书或标签。

[1530] 如本文所用,“宣传”包括所有营商方法,包括教育、医院和其他临床教导、医药工业活动(包括医药销售)、以及任何做广告或其他促销活动(包括与本发明组合物关联癌症治疗相关的任何形式的书面、口头和电子沟通)的方法。

[1531] “说明书”可详细说明宣传组分,并且通常涉及在本发明组合物的包装上或与本发明组合物的包装相伴的书面说明书。说明书也可包括以任何方式提供的任何口头或电子说明书。

[1532] 因此,在一些实施方案中,可将本文所述的试剂集合至药物或诊断或研究试剂盒中以有助于它们用于治疗、诊断或研究应用中。试剂盒可包括一个或多个容纳本发明的组分的容器和使用说明书。具体来说,所述试剂盒可包括一种或多种本文所述的试剂,以及描述这些试剂的预定治疗应用和适当施用的说明书。在某些实施方案中,试剂盒中的剂可呈适合于剂的特定应用和施用方法的药物制剂和剂量形式。

[1533] 试剂盒可被设计来有助于由医师使用本文所述的方法,并且可采用许多形式。试剂盒的各组合在可适用时可以液体形式(例如以溶液形式)或以固体形式(例如干燥粉末)提供。在某些情况下,一些组合物可例如通过添加可或可不与试剂盒一起提供的适合溶剂或其他物质(例如水或细胞培养基)来构成或另外加工(例如以获得活性形式)。如本文所用,“说明书”可详细说明教导和/或宣传组分,并且通常涉及在本发明的包装上或与本发明的包装相伴的书面说明书。说明书也可包括以使得使用者将明确认识到说明书将与试剂盒相伴的任何方式提供的任何口头或电子说明书,例如视听沟通(例如录像带、DVD等)、因特网沟通和/或基于网络的沟通等。书面说明书可呈由监管药物或生物产品的制造、使用或销售的政府机构指定的形式,所述说明书也可反映由所述机构核准进行制造、使用或销售以达成向人施用。

[1534] 试剂盒可含有在一个或多个容器中的任何一种或多种本文所述的组分。作为一实例,在一个实施方案中,试剂盒可包括混合试剂盒的一种或多种组分和/或分离和混合样品

以及向受试者进行施加的说明书。试剂盒可包括容纳本文所述的试剂的容器。试剂可被无菌制备,包装在注射器中,并且冷藏运送。或者,可将它安放在小瓶或其他容器中进行储存。第二容器可具有无菌制备的其他试剂。或者,试剂盒可包括预先混合以及在注射器、小瓶、管或其他容器加以运送的活性剂。

[1535] 试剂盒可具有多种形式,诸如泡罩小袋、收缩包装小袋、真空可密封小袋、可密封热成形托盘、或其中附属品松散包装在小袋内的类似小袋或托盘形式、一个或多个管、容器、盒子或袋子。试剂盒可在添加附属品之后加以灭菌,由此使得容器中的个别附属品将另外被打开包装。试剂盒可使用任何适当灭菌技术加以灭菌,所述技术诸如辐射灭菌、加热灭菌或本领域中已知的其他灭菌方法。视特定应用而定,试剂盒也可包括其他组成部分,例如容器、细胞培养基、盐、缓冲剂、试剂、注射器、针、用于施加或移除消毒剂的织物诸如纱布、一次性手套、在施用之前用于试剂的载体等。

[1536] 试剂盒的组合物可以任何适合形式,例如以液体溶液形式或以干燥粉末形式提供。当提供的组合物是干燥粉末时,所述粉末可通过添加也可加以提供的适合溶剂来复原。在其中使用组合物的液体形式的实施方案中,液体形式可为浓缩的或即用的。溶剂将取决于化合物和使用或施用模式。适于药物组合物的溶剂是熟知的,并且可在文献中获得。溶剂将取决于化合物和使用或施用模式。

[1537] 在一组实施方案中,试剂盒可包括被划分来以紧密限制方式容纳一个或多个容器部件诸如小瓶、管等的载体部件,各容器部件包含待用于方法中的单独要素中的一者。举例来说,一个容器可包含测定的阳性对照。另外,试剂盒可包括用于其他组分例如适用于测定中的缓冲剂的容器。

[1538] 本发明也涵盖一种成品包装和标签化药物产品。这种制造物品包括在适当器皿或容器(例如,玻璃小瓶或其他密封容器)中的适当的单位剂型。在适于胃肠外施用的剂型的情况下,活性成分是无菌的,并且适于以无粒子溶液形式施用。换句话说,本发明涵盖胃肠外溶液与冻干粉末两者,各自是无菌的,并且后者适于在注射之前进行复原。或者,单位剂型可为适于口服、经皮、经表面或经粘膜递送的固体。

[1539] 在一优选实施方案中,单位剂型适于静脉内、肌肉内或皮下递送。因此,本发明涵盖优选是无菌的,适于各个递送途径的溶液。

[1540] 在另一优选实施方案中,将本发明组合物与生物可相容清洁剂(包括但不限于卵磷脂、牛磺胆酸和胆固醇)一起;或与其他蛋白质(包括但不限于 γ 球蛋白和血清白蛋白)一起储存在容器中。更优选地,将本发明组合物与人血清白蛋白一起储存以达成在人中使用,以及与牛血清白蛋白一起储存以达成兽医学使用。

[1541] 如同任何药物产品,包装材料和容器被设计为在储存和装运期间保护产品的稳定性。此外,本发明的产品包括使用说明书或建议医师、技术人员或患者如何适当预防或治疗所论述的疾病或病症的其他信息材料。换句话说,制品包括指示或建议包括但不限于实际剂量、监测程序(诸如用于监测平均绝对淋巴细胞计数、肿瘤细胞计数和肿瘤尺寸的方法)和其他监测信息的给药方案的说明书部件。

[1542] 更具体来说,本发明提供一种制品,其包括包装材料诸如盒子、瓶、管、小瓶、容器、喷雾器、吹入器、静脉内(i.v.)袋、封袋等;以及在所述包装材料内含有的药物制剂的至少一种单位剂型。本发明也提供一种制品,其包括包装材料诸如盒子、瓶、管、小瓶、容器、喷雾

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

[1543] 疫苗组合物中的活性成分、药学上可接受的赋形剂和/或任何其他成分的相对量可根据所治疗受试者的身份、身材和/或状况而变化,并且进一步根据组合物的施用途径而变化。例如,组合物可包含0.1%与99% (w/w) 之间的活性成分。举例来说,组合物可包含在0.1%与100%之间,例如在.5与50%之间,在1-30%之间,在5-80%之间,至少80% (w/w) 的活性成分。

[1544] 在一些实施方案中,所述含有药物产品的包装含有0.1mg至1ng的mRNA。在一些实施方案中,所述含有药物产品的包装含有0.35mg的mRNA。在一些实施方案中,mRNA的浓度是1ng/mL。

[1545] 在一些实施方案中,所述含有药物产品的包装含有5-15mg的总脂质。在一些实施方案中,所述含有药物产品的包装含有7mg的总脂质。在一些实施方案中,总脂质的浓度是20mg/mL。

[1546] 在一些实施方案中, RNA (例如mRNA) 疫苗组合物可在足以递送0.0001mg/kg至100mg/kg、0.001mg/kg至0.05mg/kg、0.005mg/kg至0.05mg/kg、0.001mg/kg至0.005mg/kg、0.05mg/kg至0.5mg/kg、0.01mg/kg至50mg/kg、0.1mg/kg至40mg/kg、0.5mg/kg至30mg/kg、0.01mg/kg至10mg/kg、0.1mg/kg至10mg/kg或1mg/kg至25mg/kg的受试者体重的剂量水平下每天、一天一次或多次、每周、每个月等施用以获得所需治疗、诊断、防治或成像作用 (参见例如国际公布号W02013078199中所述的单位剂量的范围,所述公布以引用的方式整体并入本文)。在一些实施方案中, RNA (例如mRNA) 疫苗以足以递送0.0100mg、0.025mg、0.050mg、0.075mg、0.100mg、0.125mg、0.150mg、0.175mg、0.200mg、0.225mg、0.250mg、0.275mg、0.300mg、0.325mg、0.350mg、0.375mg、0.400mg、0.425mg、0.450mg、0.475mg、0.500mg、0.525mg、0.550mg、0.575mg、0.600mg、0.625mg、0.650mg、0.675mg、0.700mg、0.725mg、0.750mg、0.775mg、0.800mg、0.825mg、0.850mg、0.875mg、0.900mg、0.925mg、0.950mg、0.975mg或1.0mg的剂量水平施用。在一些实施方案中,所述RNA (例如mRNA) 疫苗以足以向所述受试者递送10 μ g与400 μ g之间的所述mRNA疫苗的剂量水平施用。在一些实施方案中,所述RNA (例如mRNA) 疫苗以足以向所述受试者递送0.033mg、0.1mg、0.2mg或0.4mg的剂量水平施用。

[1547] 所需剂量可一天三次、一天两次、一天一次、每隔一天、每三天、每周、每两周、每三周,每四周,每2个月,每3个月,每6个月等加以递送。在某些实施方案中,可使用多次施用 (例如两次、三次、四次、五次、六次、七次、八次、九次、十次、十一次、十二次、十三次、十四次或更多次施用) 来递送所需剂量。当采用多次施用时,可使用分次给药方案,如本文描述的那些。在一些实施方案中, RNA疫苗组合物可在足以递送0.0005mg/kg至0.01mg/kg,例如约0.0005mg/kg至约0.0075mg/kg,例如约0.0005mg/kg、约0.001mg/kg、约0.002mg/kg、约0.003mg/kg、约0.004mg/kg或约0.005mg/kg的剂量水平下施用。在一些实施方案中, RNA疫苗组合物可在足以递送0.025mg/kg至0.250mg/kg, 0.025mg/kg至0.500mg/kg, 0.025mg/kg

至0.750mg/kg,或0.025mg/kg至1.0mg/kg的剂量水平下施用一次或两次(或更多次)。

[1548] 在一些实施方案中, RNA疫苗组合物可在以下总剂量下或在足以递送以下总剂量的剂量水平下施用两次(例如第0天和第7天、第0天和第14天、第0天和第21天、第0天和第28天、第0天和第60天、第0天和第90天、第0天和第120天、第0天和第150天、第0天和第180天、第0天和3个月后、第0天和6个月后、第0天和9个月后、第0天和12个月后、第0天和18个月后、第0天和2年后、第0天和5年后、或第0天和10年后): 0.0100mg、0.025mg、0.050mg、0.075mg、0.100mg、0.125mg、0.150mg、0.175mg、0.200mg、0.225mg、0.250mg、0.275mg、0.300mg、0.325mg、0.350mg、0.375mg、0.400mg、0.425mg、0.450mg、0.475mg、0.500mg、0.525mg、0.550mg、0.575mg、0.600mg、0.625mg、0.650mg、0.675mg、0.700mg、0.725mg、0.750mg、0.775mg、0.800mg、0.825mg、0.850mg、0.875mg、0.900mg、0.925mg、0.950mg、0.975mg或1.0mg。本公开涵盖更高和更低施用剂量和频率。举例来说, 可施用RNA疫苗组合物3次或4次或更多次。在一些实施方案中, 所述mRNA疫苗组合物每三周一天一次施用。

[1549] 在一些实施方案中, RNA疫苗组合物可在以下总剂量下或在足以递送以下总剂量的剂量水平下施用两次(例如第0天和第7天、第0天和第14天、第0天和第21天、第0天和第28天、第0天和第60天、第0天和第90天、第0天和第120天、第0天和第150天、第0天和第180天、第0天和3个月后、第0天和6个月后、第0天和9个月后、第0天和12个月后、第0天和18个月后、第0天和2年后、第0天和5年后、或第0天和10年后): 0.010mg、0.025mg、0.100mg或0.400mg。

[1550] 在一些实施方案中, 用于对受试者接种疫苗的方法中的RNA疫苗以用以对所述受试者接种疫苗的有效量, 以在10 μ g/kg与400 μ g/kg之间的单次剂量的核酸疫苗向所述受试者施用。在一些实施方案中, 用于对受试者接种疫苗的方法中的RNA疫苗以用以对所述受试者接种疫苗的有效量, 以在10 μ g/kg与400 μ g/kg之间的单次剂量的核酸疫苗向所述受试者施用。

[1551] 在一些实施方案中, RNA疫苗组合物可包含在包含MC3、胆固醇、DSPC和PEG2000-DMG的脂质纳米粒子、缓冲剂柠檬酸钠、蔗糖和注射用水中配制的本文所述的多核苷酸。作为一非限制性实例, 组合物包含: 2.0mg/mL的药物物质(例如编码癌抗原的多核苷酸), 21.8mg/mL的MC3, 10.1mg/mL的胆固醇, 5.4mg/mL的DSPC, 2.7mg/mL的PEG2000-DMG, 5.16mg/mL的柠檬酸钠, 71mg/mL的蔗糖和1.0mL的注射用水。

[1552] 在一些实施方案中, 纳米粒子(例如脂质纳米粒子)具有10-500nm、20-400nm、30-300nm、40-200nm的平均直径。在一些实施方案中, 纳米粒子(例如脂质纳米粒子)具有50-150nm、50-200nm、80-100nm或80-200nm的平均直径。

[1553] 在一些实施方案中, 所述RNA疫苗包含5-15mg的总脂质, 例如5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15mg的总脂质。在一些实施方案中, 所述RNA疫苗包含7mg的总脂质。在一些实施方案中, 所述疫苗制剂中总脂质的浓度是10-30mg/mL, 例如10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30mg/mL。

[1554] 鞭毛素是一种具有约500个氨基酸的单体蛋白质, 其聚合以形成与细菌运动相关的鞭毛。鞭毛素由多种鞭毛细菌(例如鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*))以及非鞭毛细菌(诸如大肠杆菌(*Escherichia coli*))表达。先天性免疫系统的细胞(树突细胞、巨噬细胞等)对鞭毛素的感知由Toll样受体5 (TLR5) 以及由Nod样受体 (NLR) Ipaf和Naip5介导。TLR和NLR已被鉴定为在使先天性免疫应答和适应性免疫应答活化方面起作用。因此, 鞭

毛素在疫苗中提供佐剂作用。

[1555] 编码已知鞭毛素多肽的核苷酸和氨基酸序列可在NCBI GenBank数据库中公开获得。来自鼠伤寒沙门氏菌 (*S. Typhimurium*)、幽门螺旋杆菌 (*H. Pylori*)、霍乱弧菌 (*V. Cholera*)、粘质沙雷氏菌 (*S. marcesens*)、福氏志贺菌 (*S. flexneri*)、梅毒密螺旋体 (*T. Pallidum*)、嗜肺军团菌 (*L. pneumophila*)、伯氏疏螺旋体 (*B. burgdorferi*)、艰难梭菌 (*C. difficile*)、苜蓿根瘤菌 (*R. meliloti*)、根癌土壤杆菌 (*A. tumefaciens*)、羽扇豆根瘤菌 (*R. lupini*)、克拉里奇巴尔通氏体 (*B. clarridgeiae*)、奇异变形杆菌 (*P. Mirabilis*)、枯草芽孢杆菌 (*B. subtilus*)、单核细胞增多性李斯特菌 (*L. monocytogenes*)、绿脓假单胞菌 (*P. aeruginosa*) 和大肠杆菌 (*E. coli*) 的鞭毛素序列以及其他鞭毛素序列是已知的。

[1556] 如本文所用的鞭毛素多肽是指全长鞭毛素蛋白、其免疫原性片段以及与鞭毛素蛋白或其免疫原性片段具有至少50%序列同一性的肽。示例性鞭毛素蛋白包括来自伤寒沙门氏菌 (UniPro条目号:Q56086)、鼠伤寒沙门氏菌 (A0A0C9DG09)、肠炎沙门氏菌 (A0A0C9BAB7) 和肠道沙门氏菌 (Q6V2X8) 的鞭毛素。在一些实施方案中,鞭毛素多肽与鞭毛素蛋白或其免疫原性片段具有至少60%、70%、75%、80%、90%、95%、97%、98%或99%序列同一性。

[1557] 在一些实施方案中,鞭毛素多肽是免疫原性片段。免疫原性片段是鞭毛素蛋白的激起免疫应答的部分。在一些实施方案中,免疫应答是TLR5免疫应答。免疫原性片段的一实例是其中铰链区的全部或一部分已被缺失或用其他氨基酸替换的鞭毛素蛋白。举例来说,可将抗原性多肽插入铰链区中。铰链区是鞭毛素的高变区。鞭毛素的铰链区也被称为“D3结构域或区域”、“螺旋桨结构域或区域”、“高变结构域或区域”和“可变结构域或区域”。如本文所用的“铰链区的至少一部分”是指鞭毛素的铰链区的任何部分,或铰链区的全部。在其他实施方案中,鞭毛素的免疫原性片段是鞭毛素的具有20、25、30、35或40个氨基酸的C末端片段。

[1558] 鞭毛素单体由结构域D0至D3形成。形成主干的D0和D1由串联长 α 螺旋组成,并且在不同细菌之间高度保守。D1结构域包括适用于达成TLR5活化的若干段氨基酸。整个D1结构域或结构域内的一个或多个活性区域是鞭毛素的免疫原性片段。D1结构域内的免疫原性区域的实例包括鼠伤寒沙门氏菌FliC鞭毛素中的残基88-114和残基411-431。在88-100区域中的13个氨基酸内,在沙门氏菌鞭毛素与仍然保持TLR5活化作用的其他鞭毛素之间容许具有至少6个取代。因此,鞭毛素的免疫原性片段包括使TLR5活化的鞭毛素样序列,并且含有与FliC的88-100中的沙门氏菌序列 (LQRVRELAVQSAN; SEQ ID NO:356) 53%或更大同一的具有13个氨基酸的基序。

[1559] 在一些实施方案中,RNA (例如mRNA) 疫苗包括编码鞭毛素和一个或多个抗原性多肽的融合蛋白的RNA。如本文所用的“融合蛋白”是指构建体的两个组分的连接。在一些实施方案中,使抗原性多肽的羧基末端融合或连接于鞭毛素多肽的氨基末端。在其他实施方案中,使抗原性多肽的氨基末端融合或连接于鞭毛素多肽的羧基末端。融合蛋白可包括例如一个、两个、三个、四个、五个、六个或更多个鞭毛素多肽连接于一个、两个、三个、四个、五个、六个或更多个抗原性多肽。当使两个或更多个鞭毛素多肽和/或两个或更多个抗原性多肽连接时,这种构建体可被称为“多聚体”。

[1560] 融合蛋白的各组分可彼此直接连接,或它们可通过连接体来连接。举例来说,连接体可为氨基酸连接体。由RNA (例如mRNA) 疫苗编码的用以连接融合蛋白的组分的氨基酸连

接体可包括例如至少一个选自由赖氨酸残基、谷氨酸残基、丝氨酸残基和精氨酸残基组成的组的成员。在一些实施方案中,连接体的长度为1-30、1-25、1-25、5-10、5、15或5-20个氨基酸。

[1561] 疫苗施用模式

[1562] 可通过产生治疗有效效果的任何途径来施用癌症RNA疫苗。这些途径包括但不限于真皮内、肌肉内和/或皮下施用。本公开提供包括向有此需要的受试者施用RNA疫苗的方法。所需要的精确量可取决于受试者的种类、年龄和一般状况、疾病的严重性、具体组合物、其施用方式、其作用方式等在受试者与受试者之间不同。癌症RNA疫苗组合物通常以剂量单位形式配制以易于达成剂量的施用和均一性。然而,应了解癌症RNA疫苗组合物的总每日用量将由主治医师在合理医学判断的范围内决定。任何具体患者的具体治疗有效、预防有效或适当成像的剂量水平将取决于各种因素,所述因素包括所治疗的病症和病症的严重性;所采用的具体化合物的活性;所采用的具体组合物;患者年龄、体重、一般健康状况、性别和饮食;所采用的具体化合物的施用时间、施用途径和排泄速率;治疗持续时间;与所采用的具体化合物组合或同时使用的药物;以及医学领域中熟知的类似因素。

[1563] 在一些实施方案中,癌症RNA疫苗组合物可在足以递送每kg受试者体重0.0001mg至100mg,0.001mg至0.05mg,0.005mg至0.05mg,0.001mg至0.005mg,0.05mg至0.5mg,0.01mg至50mg,0.1mg至40mg,0.5mg至30mg,0.01mg至10mg,0.1mg至10mg,或1mg至25mg的剂量水平下每天,一天一次或多次,每周,每个月等施用以获得所需治疗、诊断、防治或成像作用(参见例如国际公布号W02013/078199中所述的单位剂量的范围,所述公布以引用的方式整体并入本文)。所需剂量可一天三次、一天两次、一天一次、每隔一天、每三天、每周、每两周、每三周,每四周,每2个月,每3个月,每6个月等加以递送。在某些实施方案中,可使用多次施用(例如两次、三次、四次、五次、六次、七次、八次、九次、十次、十一次、十二次、十三次、十四次或更多次施用)来递送所需剂量。当采用多次施用时,可使用分次给药方案,如本文描述的那些。在示例性实施方案中,癌症RNA疫苗组合物可在足以递送0.0005mg/kg至0.01mg/kg,例如约0.0005mg/kg至约0.0075mg/kg,例如约0.0005mg/kg、约0.001mg/kg、约0.002mg/kg、约0.003mg/kg、约0.004mg/kg或约0.005mg/kg的剂量水平下施用。

[1564] 可将本文所述的RNA疫苗药物组合物配制成本文所述的剂型,诸如鼻内、气管内或可注射(例如静脉内、眼内、玻璃体内、肌肉内、真皮内、心内、腹膜内和皮下)剂型。

[1565] 本发明在它的应用方面不限于以下描述中阐述或附图中说明的构建细节和组分排列。本发明能够具有其他实施方案,并且能够以各种方式实施或进行。同样,在此所使用的措辞和术语是用于描述的目的,而不应当被视为是限制性的。在本文中使用“包括”、“包含”或“具有”、“含有”、“涉及”及其变化形式意图涵盖此后所列的条目及其等效物以及额外条目。

[1566] 实施例

[1567] 实施例1. 多核苷酸的制造

[1568] 根据本公开,对多核苷酸和或其部分或区域的制造可利用题为“Manufacturing Methods for Production of RNA Transcripts”的国际申请W02014/152027中教导的方法来实现,所述申请的内容以引用的方式整体并入本文。

[1569] 纯化方法可包括国际申请W02014/152030和W02014/152031中教导的那些,所述申

请各自以引用的方式整体并入本文。

[1570] 多核苷酸的检测和表征方法可如W02014/144039中所教导来进行,所述专利以引用的方式整体并入本文。

[1571] 对本公开的多核苷酸的表征可使用选自由多核苷酸作图、逆转录酶测序、电荷分布分析和RNA杂质检测组成的组的程序来实现。其中表征包括测定RNA转录物序列、测定RNA转录物的纯度或测定RNA转录物的电荷异质性。此类方法教导于例如W02014/144711和W02014/144767中,所述专利各自的内容以引用的方式整体并入本文。

[1572] 实施例2嵌合多核苷酸合成

[1573] 引言

[1574] 根据本公开,嵌合多核苷酸的两个区域或部分可使用三磷酸根化学加以连结或连接。

[1575] 根据这种方法,具有100个核苷酸或更少的第一区或部分用5'单磷酸根和末端3' desOH或封闭的OH化学合成。如果所述区长于80个核苷酸,则其可合成为用于连接的两条链。

[1576] 如果将第一区域或部分使用体外转录 (IVT) 合成为非位置修饰区域或部分,那么可继之以向5'单磷酸根的转化以及后续对3'末端加帽。

[1577] 单磷酸根保护基团可选自本领域种已知的任何一种。

[1578] 嵌合多核苷酸的第二区或部分可使用化学合成或IVT方法合成。IVT方法可包括可利用具有修饰的帽的引物的RNA聚合酶。或者,可化学合成达130个核苷酸的帽并且将其偶联至IVT区或部分。

[1579] 整个嵌合多核苷酸不需要用磷酸根-糖主链制造。如果所述区或部分之一编码多肽,则优选这种区或部分包含磷酸根-糖主链。

[1580] 然后使用任何已知的点击化学、正点击化学、solulink或本领域的技术人员已知的其他生物缀合物化学进行连接。

[1581] 合成途径

[1582] 使用一系列起始区段制备嵌合多核苷酸。此类区段包括:

[1583] (a) 经加帽和经保护的5'区段,其包含正常3' OH (SEG.1)

[1584] (b) 5'三磷酸根区段,其可包括多肽的编码区以及包含正常3' OH (SEG.2)

[1585] (c) 嵌合多核苷酸的3'末端(例如尾部)的5'单磷酸根区段,其包含虫草素(cordycepin)或不包含3' OH (SEG.3)

[1586] 在(化学或IVT)合成之后,将区段3 (SEG.3) 用虫草素处理,接着用焦磷酸酶处理以产生5'单磷酸根。

[1587] 接着使用RNA连接酶使区段2 (SEG.2) 连接于SEG.3。然后纯化连接的多核苷酸并且用焦磷酸酶处理以裂解二磷酸根。然后纯化经处理的SEG.2-SEG.3构建体并且将SEG.1连接至5'末端。可进行嵌合多核苷酸的进一步纯化步骤。

[1588] 每个步骤的产率可高达90%-95%。

[1589] 实施例3:用于cDNA产生的PCR

[1590] 使用Kapa Biosystems (Woburn,MA) 的2x KAPA HIFI™ HotStart ReadyMix来执行用于制备cDNA的PCR程序。这个体系包括12.5μl 2x KAPA ReadyMix;0.75μl正向引物(10μ

M); 0.75 μ l 反向引物 (10 μ M); 100ng 模板 cDNA; 和 dH₂O 稀释至 25.0 μ l。反应条件是在 95 $^{\circ}$ C 下持续 5 分钟, 以及 25 个循环的 98 $^{\circ}$ C 持续 20 秒, 接着 58 $^{\circ}$ C 持续 15 秒, 接着 72 $^{\circ}$ C 持续 45 秒; 接着 72 $^{\circ}$ C 持续 5 分钟, 接着 4 $^{\circ}$ C 直至终止。

[1591] 使用 Invitrogen 的 PURELINK™ PCR Micro 试剂盒 (Carlsbad, CA) 根据制造商的说明清洗反应物 (至 5 μ g)。更大的反应物将需要使用具有更大容量的产品来清洗。清洗后, 使用 NANODROP™ 将 cDNA 定量, 并通过琼脂糖凝胶电泳进行分析, 以确认 cDNA 是期望大小。接着提交 cDNA 以进行测序分析, 随后继续进行体外转录反应。

[1592] 实施例 4. 体外转录 (IVT)

[1593] 体外转录反应产生含有经均一修饰多核苷酸的多核苷酸。所述经均一修饰多核苷酸可包含本公开的多核苷酸的区域或部分。使用天然或非天然 NTP 内部制备输入核苷酸三磷酸 (NTP) 混合物。

[1594] 典型体外转录反应包括以下:

[1595] 1 模板 cDNA 1.0 μ g

[1596] 2 10x 转录缓冲液 (400mM Tris-HCl pH 8.0, 190mM MgCl₂, 50mM DTT, 10mM 亚精胺) 2.0 μ l

[1597] 3 定制 NTP (各 25mM) 7.2 μ l

[1598] 4 RNA 酶抑制剂 20U

[1599] 5 T7 RNA 聚合酶 3000U

[1600] 6 dH₂O 至 20.0 μ l. 以及

[1601] 7 在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 3 小时至 5 小时。

[1602] 粗制 IVT 混合物可在 4 $^{\circ}$ C 下储存过夜, 用于第二天清洗。然后使用 1U 不含 RNA 酶的 DNA 酶来消化原始模板。在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 15 分钟后, 使用 Ambion 的 MEGACLEAR™ 试剂盒 (Austin, TX) 按照制造商的说明纯化 mRNA。此试剂盒可纯化达 500 μ g 的 RNA。清洗后, 使用 NanoDrop 将 RNA 定量, 并且通过琼脂糖凝胶电泳进行分析, 以确认 RNA 为适当大小并且 RNA 未发生降解。

[1603] 实施例 5. STING 研究

[1604] 在此实施例中, 研究了免疫增效剂 (如组成型活性 STING) 是否能够增强对多联体疫苗的 T 细胞应答。编码 I 类和 II 类表位的编码 RNA 31 多联体的 mRNA 构建体用作疫苗, 并且研究了 STING 对针对 I 类和 II 类表位的 T 细胞应答的影响。RNA 31 和 STING mRNA 或者共同配制并且同时递送, 或者不是共同配制的, 延迟递送 STING mRNA。在第 1 天向动物给予初免剂量, 并且在第 15 天给予加强。在第 22 天收获脾细胞。

[1605] 测试不同材料以确定当以各种比例将 STING 添加至多联体疫苗时的免疫原性, 以将 STING 与排名靠前的市售佐剂进行比较, 来确定免疫原性是否取决于 STING 给药的时机并且检查当用 STING 给药时未配制的 mRNA 的免疫原性。对以下材料/条件进行了测试: RNA 31 (3 μ g)、具有聚 I:C (10 μ g) 的 RNA 31 (3 μ g)、具有 MPLA (5 μ g) 的 RNA 31 (3 μ g)、STING (1 μ g)/RNA 31 (3 μ g)、STING (0.6 μ g)/RNA 31 (3 μ g)、STING (0.6 μ g)/RNA 54 (3 μ g)、STING (0.6 μ g)/RNA 31 (3 μ g) (24 小时后)、STING (0.6 μ g)/RNA 31 (3 μ g) (48 小时后)、STING (0.6 μ g)/RNA 31 (3 μ g) (未配制的) 以及 STING (6 μ g)/RNA 31 (30 μ g) (未配制的)。CA-54 是 5 个 II 类表位的多联体 (其全部都包含在 RNA 31 中)。

[1606] 结果在图12-13中示出。当用II类表位检查抗原特异性IFN γ 应答时,发现STING加强由mRNA编码的MHC II类表位的免疫应答。STING的表现与市售佐剂相当(剂量差异为5-10倍)。尽管测试的两种比例均有效,但1:5 STING:抗原比例优于1:3组合(图12)。使用如上所述的I类表位获得了类似的结果并在图3中示出。同样,发现1:5 STING:抗原比例比I类表位的1:3组合表现更好。

[1607] 此外,发现在稍后的时间点(24小时)给药STING具有与共同递送相似的免疫原性(图14)。

[1608] 在进一步的实验中,使用52个鼠表位(添加表位_4a_DX_RX_perm)检查不同STING与抗原比例的影响。小鼠在第1天接受初免剂量,在第8天接受加强剂量,并在第15天收获脾细胞。使用ELISpot和FACS评价针对再刺激的T细胞应答。用对应于编码多联体的表位的肽序列进行再刺激。检查了对两种II类表位(RNA 2、RNA 3)和四种I类表位(RNA 7、RNA 10、RNA 13、RNA 22)的T细胞应答。

[1609] 相当出人意料地,发现与单独的抗原相比,在所测试的大多数比例中添加STING改善了T细胞应答,并且从未表现出比单独抗原更差的表现。应答的广度是出人意料的。对于所测试的六种抗原(表位)中的四种,在10-30 μ g总剂量下向抗原添加STING始终产生比单独50 μ g剂量抗原更高的T细胞应答。因此,对于提高的免疫原性,STING:抗原的比例存在宽的钟形曲线。

[1610] 研究组如下表所示:

[1611]

| STING:Ag 比例 总 mRNA μ g | 0:1 | | 20:1 | | 5:1 | | 1:1 | | 1:5 | | 1:20 | |
|-------------------------------------|------------------|---------------|------------------|---------------|------------------|---------------|------------------|---------------|------------------|---------------|------------------|---------------|
| | STING (μ g) | AG (μ g) | STING (μ g) | AG (μ g) | STING (μ g) | AG (μ g) | STING (μ g) | AG (μ g) | STING (μ g) | AG (μ g) | STING (μ g) | AG (μ g) |
| 0.15 | 2.85 | 0.15 | | | | | | | | | | |
| 0.5 | 9.5 | 0.5 | | | | | | | | | | |
| 1.5 | 28.6 | 1.5 | | | | | | | | | | |
| 3 | 27 | 3 | 2.85 | 0.15 | 2.4 | 0.6 | 1.5 | 1.5 | 0.6 | 2.4 | 0.15 | 2.85 |
| 10 | 20 | 10 | 9.5 | 0.5 | 8.3 | 1.4 | 5.0 | 5.0 | 1.4 | 8.3 | 0.5 | 9.5 |
| 30 | 0 | 30 | 28.6 | 1.4 | 25.0 | 4.2 | 15.0 | 15.0 | 4.2 | 25.0 | 1.4 | 28.6 |
| 50 | 0 | 50 | | | | | | | | | | |

[1612] 在II类表位中,RNA 2(结果显示在图6中)和RNA 3(结果显示在图7中)显示相对于仅抗原组(包括在高达50 μ g单独抗原的剂量下),以小于1:1 (STING:抗原)的比例添加STING增加T细胞应答。图7的左图示出相对于仅抗原组,以所有比例添加STING增加T细胞应答。

[1613] 用I类表位观察到类似的结果。RNA 7(结果显示在图8中)、RNA13(结果显示在图9中)、RNA 22(结果显示在图10中)和RNA 10(结果显示在图11中)都显示出当与总mRNA剂量相比时,STING:抗原的比例相对于仅抗原组产生更高的T细胞应答。

[1614] 实施例6.多联体研究

[1615] 进行研究以检查是否可能完全通读较长构建体并比较与20和52个表位构建体中包含的表位的免疫原性。对于实验,在含有化合物257的LNP中测试了五组不同的制剂:

| | 组 | 测试/对照材料 | 最终浓度 | II类(构建体的数量-氨基酸的数量) | I类(构建体的数量-氨基酸的数量) |
|--------|---|------------------------------|------|--------------------|-------------------|
| [1616] | 1 | RNA 31 | 3 | 5-31 aa | 15-31 aa |
| | 2 | 20个表位_21个侧翼 | 3 | 5-21 aa | 15-21 aa |
| | 3 | 20个表位_21个侧翼 II类 _15个侧翼 I类 | 3 | 5-21 aa | 15-15 aa |
| [1617] | 4 | 52个表位_21个侧翼 | 7.5 | 13-21 aa | 39-21 aa |
| | 5 | 52个表位_21个侧翼 II类 _15个侧翼 I类 | 7.5 | 13-21 aa | 39-15 aa |

[1618] 给药是等皮摩尔,意味着尽管构建体长度,所有组都接受相同浓度的每个单独的表位。在第0天向动物给予一个剂量(引发剂量),在第6天给予第二剂量(加强),且然后在第12天收获脾细胞并对样品进行IFN γ ELISpot。

[1619] 检查了含有52个表位的疫苗的免疫原性。RNA 1/SIINFEBL (SEQ ID NO:231) 是所测试的四种构建体中的每一种的最终表位。52个表位构建体中的SIINFEBL (SEQ ID NO:231) T细胞应答证实了多联体的完全通读,因为当用RNA 1/SIINFEBL (SEQ ID NO:231) 进行再刺激时从所有测试组观察到INF γ 应答(图1)。注意,如所预期的,在RNA 31多联体中没有发现RNA 1,因为所述多联体不具有RNA 1/SIINFEBL (SEQ ID NO:231) 表位。

[1620] 52聚体与20聚体构建体之间的免疫原性是相似的。例如,当用I类表位再刺激时两者表现相似(图2) 修剪II类表位的长度可改善免疫原性,而修剪21至15个氨基酸的I类表位不影响免疫原性。此外,在52个表位构建体中检测到对另外表位的免疫原性(图3)。当用II类表位再刺激时,52聚体和20聚体构建体两者表现得相当(图4)。

[1621] 表3. 选择的序列

| | SEQ ID NO: | 序列 |
|--------|------------------|--|
| [1622] | 1 | MPHSSLHPSIPCPRGHGAQKAALVLLSACLVTWGLGEPPEH TLRYLVHLASLQLGLLLNGVCSLAEELRHIHSRYRGSYWRTR ACLGCP LRRGALLLSIYFYSLPNAVGPPFTWMLALLGLSQALN ILLGLKGLAPAEISAVCEKGNFNMAHGLAWSYYIGYLRILPELQ ARIRTYNQHYNNLLRGAVSQRLYILLPLDCGVDPNLSMADPNIRF LDKLPQQTGDHAGIKDRVYSNSIYELLENGQRAGTCVLEYATPL QTLFAMSQYSQAGFSREDRLAQAKLFCRTLEDILADAPESQNNCR LIAYQEPADDSSFSLSQEVLRLRQEEKEEVTVGSLKTSAPVSTST MSQEPELLISGMEKPLPLRTDFS (huSTING(V155M); 无表位标签) |

[1623]

| SEQ ID NO: | 序列 |
|------------------|---|
| 2 | <p>MPHSSLHPSIPCPRGHGAQKAALVLLSACLVTWGLGEPPEH TLRYLVLHLASLQLGLLLNGVCSLAEELRHIHSRYRGSYWRTVR ACLGCPPLRRGALLLLSIYFYYSLPNAVGPFTWMLALLGLSQALN ILLGLKGLAPAEISAVCEKGNFNVAHGLAWSYYIGYLRILPELQ ARIRTYNQHYNNLLRGAVSQRLYILLPLDCGVPDNLSMADPNIRF LDKLPQQTGDHAGIKDRVYSNSIYELLENGQRAGTCVLEYATPL QTLFAMSQYSQAGFSREDtLEQAKLFCRTLEDILADAPESQNNCR LIAYQEPADDSSFSLSQEVLRLRHLRQEEKEEVTVGSLKTSAVPSTST MSQEPPELLISGMEKPLPLRTDFS (Hu STING(R284T); 无表位标签)</p> |
| 3 | <p>MPHSSLHPSIPCPRGHGAQKAALVLLSACLVTWGLGEPPEH TLRYLVLHLASLQLGLLLNGVCSLAEELRHIHSRYRGSYWRTVR ACLGCPPLRRGALLLLSIYFYYSLPNAVGPFTWMLALLGLSQALN ILLGLKGLAPAEISAVCEKGNFNVAHGLAWSYYIGYLRILPELQ ARIRTYNQHYNNLLRGAVSQRLYILLPLDCGVPDNLSMADPNIRF LDKLPQQTGDHAGIKDRVYSNSIYELLENGQRAGTCVLEYATPL QTLFAMSQYSQAGFSREDmLEQAKLFCRTLEDILADAPESQNNCR LIAYQEPADDSSFSLSQEVLRLRHLRQEEKEEVTVGSLKTSAVPSTST MSQEPPELLISGMEKPLPLRTDFS (hu STING (R284M); 无表位标签)</p> |
| 4 | <p>MPHSSLHPSIPCPRGHGAQKAALVLLSACLVTWGLGEPPEH TLRYLVLHLASLQLGLLLNGVCSLAEELRHIHSRYRGSYWRTVR ACLGCPPLRRGALLLLSIYFYYSLPNAVGPFTWMLALLGLSQALN ILLGLKGLAPAEISAVCEKGNFNVAHGLAWSYYIGYLRILPELQ ARIRTYNQHYNNLLRGAVSQRLYILLPLDCGVPDNLSMADPNIRF LDKLPQQTGDHAGIKDRVYSNSIYELLENGQRAGTCVLEYATPL QTLFAMSQYSQAGFSREDkLEQAKLFCRTLEDILADAPESQNNCR LIAYQEPADDSSFSLSQEVLRLRHLRQEEKEEVTVGSLKTSAVPSTST MSQEPPELLISGMEKPLPLRTDFS (Hu STING (R284K); 无表位标签)</p> |
| 5 | <p>MPHSSLHPSIPCPRGHGAQKAALVLLSACLVTWGLGEPPEH TLRYLVLHLASLQLGLLLNGVCSLAEELRHIHSRYRGSYWRTVR ACLGCPPLRRGALLLLSIYFYYSLPNAVGPFTWMLALLGLSQALN ILLGLKGLAPAEISAVCEKGNFsVAHGLAWSYYIGYLRILPELQA RIRTYNQHYNNLLRGAVSQRLYILLPLDCGVPDNLSMADPNIRFL DKLPQQTGDHAGIKDRVYSNSIYELLENGQRAGTCVLEYATPLQ TLFAMSQYSQAGFSREDRLEQAKLFCRTLEDILADAPESQNNCRL IAYQEPADDSSFSLSQEVLRLRHLRQEEKEEVTVGSLKTSAVPSTSTM SQEPPELLISGMEKPLPLRTDFS (Hu STING(N154S); 无表位标签)</p> |

[1624]

| SEQ ID NO: | 序列 |
|------------------|---|
| 6 | <p>MPHSSLHPSIPCPRGHGAQKAALVLLSACLVTWGLGEPPEH TLRYLVLHLASLQLGLLLNGVCSLAEELRHIHSRYRGSYWRTVR ACLGCPPLRRGALLLLSIYFYYSLPNAVGPFTWMLALLGLSQALN ILLGLKGLAPAEISAIKEKGNFNVAHGLAWSYYIGYLRILPELQA RIRTYNQHYNNLLRGAVSQRLYILLPLDCGVPDNLSMADPNIRFL DKLPQQTGDHAGIKDRVYSNSIYELLENGQRAGTCVLEYATPLQ TLFAMSQYSQAGFSREDRLEQAKLFCRTLEDILADAPESQNNCRL IAYQEPADDSSFSLSQEVLRLRQEEKEEVTVGSLKTSAVPSTSTM SQEPELLISGMEKPLPLRTDFS</p> <p>(Hu STING(V147L); 无表位标签)</p> |
| 7 | <p>MPHSSLHPSIPCPRGHGAQKAALVLLSACLVTWGLGEPPEH TLRYLVLHLASLQLGLLLNGVCSLAEELRHIHSRYRGSYWRTVR ACLGCPPLRRGALLLLSIYFYYSLPNAVGPFTWMLALLGLSQALN ILLGLKGLAPAEISAVCEKGNFNVAHGLAWSYYIGYLRILPELQ ARIRTYNQHYNNLLRGAVSQRLYILLPLDCGVPDNLSMADPNIRF LDKLPQQTGDHAGIKDRVYSNSIYELLENGQRAGTCVLEYATPL QTLFAMSQYSQAGFSREDRLEQAKLFCRTLEDILADAPESQNNCR LIAYQqPADDSSFSLSQEVLRLRQEEKEEVTVGSLKTSAVPSTST MSQEPELLISGMEKPLPLRTDFS</p> <p>(Hu STING (E315Q); 无表位标签)</p> |
| 8 | <p>MPHSSLHPSIPCPRGHGAQKAALVLLSACLVTWGLGEPPEH TLRYLVLHLASLQLGLLLNGVCSLAEELRHIHSRYRGSYWRTVR ACLGCPPLRRGALLLLSIYFYYSLPNAVGPFTWMLALLGLSQALN ILLGLKGLAPAEISAVCEKGNFNVAHGLAWSYYIGYLRILPELQ ARIRTYNQHYNNLLRGAVSQRLYILLPLDCGVPDNLSMADPNIRF LDKLPQQTGDHAGIKDRVYSNSIYELLENGQRAGTCVLEYATPL QTLFAMSQYSQAGFSREDRLEQAKLFCRTLEDILADAPESQNNCR LIAYQEPADDSSFSLSQEVLRLRQEEKEEVTVGSLKTSAVPSTST MSQEPELLISGMEKPLPLaTDFS</p> <p>(Hu STING (R375A); 无表位标签)</p> |
| 9 | <p>MPHSSLHPSIPCPRGHGAQKAALVLLSACLVTWGLGEPPEH TLRYLVLHLASLQLGLLLNGVCSLAEELRHIHSRYRGSYWRTVR ACLGCPPLRRGALLLLSIYFYYSLPNAVGPFTWMLALLGLSQALN ILLGLKGLAPAEISALCEKGNFSMAHGLAWSYYIGYLRILPELQ ARIRTYNQHYNNLLRGAVSQRLYILLPLDCGVPDNLSMADPNIRF LDKLPQQTGDHAGIKDRVYSNSIYELLENGQRAGTCVLEYATPL QTLFAMSQYSQAGFSREDRLEQAKLFCRTLEDILADAPESQNNCR LIAYQEPADDSSFSLSQEVLRLRQEEKEEVTVGSLKTSAVPSTST MSQEPELLISGMEKPLPLRTDFS</p> <p>(Hu STING(V147L/N154S/V155M); 无表位标签)</p> |

[1625]

| SEQ ID NO: | 序列 |
|------------------|--|
| 10 | <p>MPHSSLHPSIPCPRGHGAQKAALVLLSACLVTWGLGEPPEH TLRYLVLHLASLQLGLLLNGVCSLAEELRHIHSRYRGSYWRTVR ACLGCPLRRGALLLSIYFYYSLPNAVGPFTWMLALLGLSQALN ILLGLKGLAPAEISALCEKGNFSMAHGLAWSYYIGYLRLLPELQ ARIRTYNQHYNNLLRGAVSQRLYILLPLDCGVDPNLSMADPNIRF LDKLPQQTGDHAGIKDRVYSNSIYELLENGQRAGTCVLEYATPL QTLFAMSQYSQAGFSREDMLEQAKLFCRTLEDILADAPESQNNC RLIAYQEPADDSSFSLSQEVLRLRLRQEEKEEVTVGSLKTSAPVSTS TMSQEPPELLISGMEKPLPLRTDFS (Hu STING(R284M/V147L/N154S/V155M); 无表位标签)</p> |
| 199 | <p>ATGCCCCACAGTAGCCTCCACCCCAGCATCCCCTGCCCCA GAGGCCACGGCGCACAGAAGGCCGCCCTGGTGCTGCTGAGCG CCTGTCTGGTGACCCTGTGGGGTCTGGGCGAGCCCCCGAGCA CACCCTGCGGTACCTCGTGCTGCATCTGGCCAGCCTGCAGCTG GGCCTGCTGCTGAACGGCGTGTGCAGCCTGGCCGAAGAGCTG AGACACATCCACAGCAGATACAGAGGCTCCTACTGGAGAACC GTCAGAGCCTGCCTCGGCTGTCCCCTGAGAAGAGGCGCCCTGC TGCTCCTGAGCATCTACTTCTACTACAGCCTGCCCAACGCCGT GGGCCCCCCTTCACCTGGATGCTGGCCCTGCTGGGCCTGAGC CAGGCCCTGAACATCCTGCTGGGCCTGAAGGGCTTGGCCCCCG CCGAGATCTCCGCCGTGTGCGAGAAGGGCAACTTCAACATGG CCCATGGCCTTGCCTGGTCCTACTACATCGGCTACCTGAGACT GATCCTGCCCCGAGCTGCAGGCCAGAATCAGAACCTACAACCA GCACTACAACAACCTGCTGAGAGGCGCCGTGAGCCAAAGACT GTACATCCTGCTGCCCCCTGGACTGCGGCGTGCCCGACAACCTT AGCATGGCCGACCCCAACATCAGATTCCTGGACAAGCTGCCCC AGCAGACCGGCGACACGCCGGCATCAAGGACAGAGTGTACA GCAACAGCATCTACGAGCTGCTGGAGAACGGCCAGAGAGCCG GCACCTGCGTGCTGGAGTACGCCACCCCCCTGCAGACCCTGTT CGCCATGAGCCAGTACAGCCAGGCCGGCTTCAGCAGAGAGGA CAGACTGGAGCAAGCCAAGCTGTTCTGCAGAACCTGGAGGA CATCCTGGCGGACGCCCCCGAGAGCCAAAACAACCTGCAGACT GATCGCCTACCAGGAGCCCGCCGACGACAGCAGCTTCAGCCT GAGCCAGGAAGTGCTGAGACACCTGAGACAGGAAGAGAAGG AGGAGGTGACCGTGGGAAGCCTGAAGACCAGCGCCGTGCCCA GCACCAGCACCATGAGCCAGGAGCCCGAGCTGCTGATCAGCG GCATGGAGAAGCCCCTGCCCTGAGAACCGACTTCAGC (huSTING(V155M); 无表位标签; 核苷酸序列)</p> |

[1626]

| <u>SEQ ID NO:</u> | <u>序列</u> |
|---------------------------|--|
| 200 | ATGCCTCACAGCAGCCTGCACCCTAGCATCCCTTGCCCTA GAGGCCACGGCGCCCAGAAGGCCGCCCTGGTGCTGCTGAGCG CCTGCCTGGTGACCCTGTGGGGCCTGGGCGAGCCTCCTGAGCA CACCCTGAGATACCTGGTGCTGCACCTGGCCAGCCTGCAGCTG GGCCTGCTGCTGAACGGCGTGTGCAGCCTGGCCGAGGAGCTG AGACACATCCACAGCAGATACAGAGGCAGCTACTGGAGAACC GTGAGAGCCTGCCTGGGCTGCCCTCTGAGAAGAGGCGCCCTGC TGCTGCTGAGCATCTACTTCTACTACAGCCTGCCTAACGCCGT GGGCCCTCCTTTCACCTGGATGCTGGCCCTGCTGGGCCTGAGC CAGGCCCTGAACATCCTGCTGGGCCTGAAGGGCCTGGCCCCTG CCGAGATCAGCGCCGTGTGCGAGAAGGGCAACTTCAACGTGG CCCACGGCCTGGCCTGGAGCTACTACATCGGCTACCTGAGACT GATCCTGCCTGAGCTGCAGGCCAGAATCAGAACCTACAACCA GCACTACAACAACCTGCTGAGAGGCGCCGTGAGCCAGAGACT GTACATCCTGCTGCCTCTGGACTGCGGCGTGCCTGACAACCTG AGCATGGCCGACCCTAACATCAGATTCCTGGACAAGCTGCCTC AGCAGACCGGCGACCACGCCGGCATCAAGGACAGAGTGTACA GCAACAGCATCTACGAGCTGCTGGAGAACGGCCAGAGAGCCG GCACCTGCGTGCTGGAGTACGCCACCCCTCTGCAGACCCTGTT CGCCATGAGCCAGTACAGCCAGGCCGGCTTCAGCAGAGAGGA CACCCTGGAGCAGGCCAAGCTGTTCTGCAGAACCTTGAGGA CATCCTGGCCGACGCCCCTGAGAGCCAGAACAACCTGCAGACT GATCGCCTACCAGGAGCCTGCCGACGACAGCAGCTTCAGCCTG AGCCAGGAGGTGCTGAGACACCTGAGACAGGAGGAGAAGGA GGAGGTGACCGTGGGCAGCCTGAAGACCAGCGCCGTGCCTAG CACCAGCACCATGAGCCAGGAGCCTGAGCTGCTGATCAGCGG CATGGAGAAGCCTCTGCCTCTGAGAACCGACTTCAGC (Hu STING(R284T); 无表位标签; 核苷酸序列) |

[1627]

| <u>SEQ ID NO:</u> | <u>序列</u> |
|---------------------------|---|
| 201 | <p> ATGCCCCACAGCAGCCTGCACCCCTCCATCCCCTGTCCCA GAGGCCACGGCGCCAGAAAGGCCGCCCTGGTGCTGCTGAGCG CCTGCCTGGTGACCTTATGGGGCCTGGGCGAGCCCCCGAGCA CACCCTGAGATACCTGGTCCTGCACCTGGCCAGCCTCCAGCTG GGCCTGCTGCTCAACGGCGTGTGTAGCCTGGCCGAGGAGCTGA GACACATCCACAGCAGATACAGAGGCAGCTACTGGAGAACCG TGAGAGCCTGCCTGGGTTGCCCACTGAGAAGAGGAGCTCTGCT GCTGCTGAGCATCTACTTCTACTACTCGCTGCCCAACGCTGTG GGCCCCCCTTCACCTGGATGCTGGCCCTGCTGGGTCTGAGCC AGGCCCTGAACATCCTCCTGGGCCTGAAGGGCCTGGCCCCCGC CGAGATAAGCGCCGTTTGCGAGAAGGGCAACTTCAACGTGGC CCATGGCCTGGCCTGGAGCTACTACATCGGCTACTTACGCCTG ATCCTGCCCCGAGCTGCAGGCCAGAAATCAGAACCTACAACCAG CATTACAACAACCTGCTGAGAGGCGCCGTGAGCCAGAGACTG TATATCCTGCTGCCCCTGGACTGCGGCGTGCCCGACAACCTGA GCATGGCCGACCCCAACATCAGATTCTGGACAAGCTCCCCCA GCAGACCGGCGACACGCCGGAATCAAAGACAGAGTGTATAG CAACAGCATCTACGAGCTGCTGGAGAACGGCCAGAGAGCCGG CACCTGCGTACTGGAGTACGCCACCCCTTGACAGACCCTGTTT GCCATGAGCCAGTACAGCCAGGCCGGCTTCAGCAGAGAGGAC ATGCTGGAGCAGGCCAAGCTGTTCTGCAGAACCTGGAGGAC ATCCTGGCCGACGCCCCGAGAGCCAGAACAACTGCAGACTG ATCGCCTACCAAGAGCCCGCCGACGACAGCAGCTTCAGCTTAA GCCAGGAGGTGCTGAGACATCTGAGACAGGAGGAGAAGGAG GAGGTGACCGTGGGCAGCCTCAAGACCAGCGCTGTGCCCTCTA CCAGCACCATGAGCCAGGAGCCCGAGCTGCTGATCAGCGGCA TGGAGAAGCCCCTGCCCTGAGAACAGACTTCAGC (hu STING (R284M); 无表位标签; 核苷酸序列) </p> |

[1628]

| <u>SEQ ID NO:</u> | <u>序列</u> |
|---------------------------|---|
| 202 | ATGCCCCATAGCAGCCTGCACCCCAGCATCCCCTGCCCCA GAGGCCACGGCGCCCAGAAGGCCGCCCTGGTCCTGCTGAGCG CATGCCTGGTCACCCTGTGGGGCCTGGGCGAGCCCCCGAGCA CACCCTGAGATACCTGGTGTGTCACCTCGCCAGCCTGCAGCTG GGCCTGCTGCTGAACGGCGTGTGCAGCCTGGCCGAGGAGCTG AGACACATCCACAGCAGATATAGAGGCAGCTACTGGAGAACC GTGAGAGCTTGCCTCGGCTGCCCCCTGAGAAGAGGCGCCCTGC TGCTGCTGAGCATCTACTTTTACTACAGCCTGCCCAACGCTGT GGGCCCCCCTTTCACGTGGATGCTCGCCCTGCTGGGACTGAGC CAGGCCCTGAACATCCTGCTGGGCCTTAAGGGCCTAGCCCCCG CCGAGATCAGCGCCGTGTGCGAGAAGGGCAACTTCAATGTGG CCCACGGCCTGGCCTGGAGCTACTACATCGGCTACCTGAGACT GATCCTGCCCCGAGCTGCAGGCCAGAATCAGAACCTACAATCA GCACTACAACAACCTGCTGAGAGGCGCCGTGAGCCAGAGACT GTACATCCTGCTGCCCCTGGACTGCGGCGTGCCCGACAACCTC AGCATGGCCGACCCCAACATCAGATTCCTGGACAAGCTGCCCC AGCAGACCGGCGACCACGCCGGCATCAAGGATCGCGTGTACA GCAACAGCATCTACGAGCTGCTGGAAAACGGCCAGAGAGCCG GAACCTGCGTGCTGGAGTACGCCACACCCCTGCAGACCCTGTT CGCCATGAGCCAGTACAGCCAGGCCGGCTTCAGCAGAGAGGA CAAGCTGGAGCAGGCCAAGCTGTTCTGCAGAACCTGGAGGA TATCCTCGCCGACGCCCCCGAGAGCCAGAACAACCTGCAGGCT GATCGCGTACCAGGAGCCCGCTGACGACAGCAGCTTTAGCCTG AGCCAGGAGGTGCTGAGACATCTGCGTCAAGAGGAAAAGGAG GAGGTGACCGTGGGCTCCCTGAAGACCAGCGCCGTGCCCAGC ACCAGCACCATGAGCCAGGAGCCCGAGCTGCTGATCAGCGGC ATGGAGAAGCCACTGCCCCTCAGAACCGACTTCAGC (Hu STING (R284K); 无表位标签; 核苷酸序列) |

[1629]

| <u>SEQ ID NO:</u> | <u>序列</u> |
|---------------------------|--|
| 203 | ATGCCTCACAGCAGCCTGCACCCTAGCATCCCTTGCCCTA GAGGCCACGGCGCCCAGAAGGCCGCCCTGGTGCTGCTGAGCG CCTGCCTGGTGACCCTGTGGGGCCTGGGCGAGCCTCCTGAGCA CACCCTGAGATACCTGGTGCTGCACCTGGCCAGCCTGCAGCTG GGCCTGCTGCTGAACGGCGTGTGCAGCCTGGCCGAGGAGCTG AGACACATCCACAGCAGATACAGAGGCAGCTACTGGAGAACC GTGAGAGCCTGCCTGGGCTGCCCTCTGAGAAGAGGCGCCCTGC TGCTGCTGAGCATCTACTTCTACTACAGCCTGCCTAACGCCGT GGGCCCTCCTTTCACCTGGATGCTGGCCCTGCTGGGCCTGAGC CAGGCCCTGAACATCCTGCTGGGCCTGAAGGGCCTGGCCCCTG CCGAGATCAGCGCCGTGTGCGAGAAGGGCAACTTCAGCGTGG CCCACGGCCTGGCCTGGAGCTACTACATCGGCTACCTGAGACT GATCCTGCCTGAGCTGCAGGCCAGAATCAGAACCTACAACCA GCACTACAACAACCTGCTGAGAGGCGCCGTGAGCCAGAGACT GTACATCCTGCTGCCTCTGGACTGCGGCGTGCCTGACAACCTG AGCATGGCCGACCCTAACATCAGATTCCTGGACAAGCTGCCTC AGCAGACCGGCGACCACGCCGGCATCAAGGACAGAGTGTACA GCAACAGCATCTACGAGCTGCTGGAGAACGGCCAGAGAGCCG GCACCTGCGTGCTGGAGTACGCCACCCCTCTGCAGACCCTGTT CGCCATGAGCCAGTACAGCCAGGCCGGCTTCAGCAGAGAGGA CAGACTGGAGCAGGCCAAGCTGTTCTGCAGAACCTGGAGGA CATCCTGGCCGACGCCCCTGAGAGCCAGAACAACCTGCAGACT GATCGCCTACCAGGAGCCTGCCGACGACAGCAGCTTCAGCCTG AGCCAGGAGGTGCTGAGACACCTGAGACAGGAGGAGAAGGA GGAGGTGACCGTGGGCAGCCTGAAGACCAGCGCCGTGCCTAG CACCAGCACCATGAGCCAGGAGCCTGAGCTGCTGATCAGCGG CATGGAGAAGCCTCTGCCTCTGAGAACCGACTTCAGC (Hu STING(N154S); 无表位标签; 核苷酸序列) |

[1630]

| <u>SEQ ID NO:</u> | <u>序列</u> |
|---------------------------|--|
| 204 | ATGCCTCACAGCAGCCTGCACCCTAGCATCCCTTGCCCTA GAGGCCACGGCGCCCAGAAGGCCGCCCTGGTGCTGCTGAGCG CCTGCCTGGTGACCCTGTGGGGCCTGGGCGAGCCTCCTGAGCA CACCCTGAGATACCTGGTGCTGCACCTGGCCAGCCTGCAGCTG GGCCTGCTGCTGAACGGCGTGTGCAGCCTGGCCGAGGAGCTG AGACACATCCACAGCAGATACAGAGGCAGCTACTGGAGAACC GTGAGAGCCTGCCTGGGCTGCCCTCTGAGAAGAGGCGCCCTGC TGCTGCTGAGCATCTACTTCTACTACAGCCTGCCTAACGCCGT GGGCCCTCCTTTCACCTGGATGCTGGCCCTGCTGGGCCTGAGC CAGGCCCTGAACATCCTGCTGGGCCTGAAGGGCCTGGCCCCTG CCGAGATCAGCGCCCTGTGCGAGAAGGGCAACTTCAACGTGG CCCACGGCCTGGCCTGGAGCTACTACATCGGCTACCTGAGACT GATCCTGCCTGAGCTGCAGGCCAGAATCAGAACCTACAACCA GCACTACAACAACCTGCTGAGAGGCGCCGTGAGCCAGAGACT GTACATCCTGCTGCCTCTGGACTGCGGCGTGCCTGACAACCTG AGCATGGCCGACCCTAACATCAGATTCCTGGACAAGCTGCCTC AGCAGACCGGCGACCACGCCGGCATCAAGGACAGAGTGTACA GCAACAGCATCTACGAGCTGCTGGAGAACGGCCAGAGAGCCG GCACCTGCGTGCTGGAGTACGCCACCCCTCTGCAGACCCTGTT CGCCATGAGCCAGTACAGCCAGGCCGGCTTCAGCAGAGAGGA CAGACTGGAGCAGGCCAAGCTGTTCTGCAGAACCTGGAGGA CATCCTGGCCGACGCCCCTGAGAGCCAGAACAACCTGCAGACT GATCGCCTACCAGGAGCCTGCCGACGACAGCAGCTTCAGCCTG AGCCAGGAGGTGCTGAGACACCTGAGACAGGAGGAGAAGGA GGAGGTGACCGTGGGCAGCCTGAAGACCAGCGCCGTGCCTAG CACCAGCACCATGAGCCAGGAGCCTGAGCTGCTGATCAGCGG CATGGAGAAGCCTCTGCCTCTGAGAACCGACTTCAGC (Hu STING(V147L); 无表位标签; 核苷酸序列) |

[1631]

| <u>SEQ ID NO:</u> | <u>序列</u> |
|---------------------------|---|
| 205 | ATGCCTCACAGCAGCCTGCACCCTAGCATCCCTTGCCCTA GAGGCCACGGCGCCCAGAAGGCCGCCCTGGTGCTGCTGAGCG CCTGCCTGGTGACCCTGTGGGGCCTGGGCGAGCCTCCTGAGCA CACCCTGAGATACCTGGTGCTGCACCTGGCCAGCCTGCAGCTG GGCCTGCTGCTGAACGGCGTGTGCAGCCTGGCCGAGGAGCTG AGACACATCCACAGCAGATACAGAGGCAGCTACTGGAGAACC GTGAGAGCCTGCCTGGGCTGCCCTCTGAGAAGAGGCGCCCTGC TGCTGCTGAGCATCTACTTCTACTACAGCCTGCCTAACGCCGT GGGCCCTCCTTTCACCTGGATGCTGGCCCTGCTGGGCCTGAGC CAGGCCCTGAACATCCTGCTGGGCCTGAAGGGCCTGGCCCCTG CCGAGATCAGCGCCGTGTGCGAGAAGGGCAACTTCAACGTGG CCCACGGCCTGGCCTGGAGCTACTACATCGGCTACCTGAGACT GATCCTGCCTGAGCTGCAGGCCAGAATCAGAACCTACAACCA GCACTACAACAACCTGCTGAGAGGCGCCGTGAGCCAGAGACT GTACATCCTGCTGCCTCTGGACTGCGGCGTGCCTGACAACCTG AGCATGGCCGACCCTAACATCAGATTCCTGGACAAGCTGCCTC AGCAGACCGGCGACCACGCCGGCATCAAGGACAGAGTGTACA GCAACAGCATCTACGAGCTGCTGGAGAACGGCCAGAGAGCCG GCACCTGCGTGCTGGAGTACGCCACCCCTCTGCAGACCCTGTT CGCCATGAGCCAGTACAGCCAGGCCGGCTTCAGCAGAGAGGA CAGACTGGAGCAGGCCAAGCTGTTCTGCAGAACCTGGAGGA CATCCTGGCCGACGCCCCTGAGAGCCAGAACAACCTGCAGACT GATCGCCTACCAGCAGCCTGCCGACGACAGCAGCTTCAGCCTG AGCCAGGAGGTGCTGAGACACCTGAGACAGGAGGAGAAGGA GGAGGTGACCGTGGGCAGCCTGAAGACCAGCGCCGTGCCTAG CACCAGCACCATGAGCCAGGAGCCTGAGCTGCTGATCAGCGG CATGGAGAAGCCTCTGCCTCTGAGAACCGACTTCAGC (Hu STING (E315Q); 无表位标签; 核苷酸序列) |

[1632]

| <u>SEQ ID NO:</u> | <u>序列</u> |
|---------------------------|---|
| 206 | <p> ATGCCTCACAGCAGCCTGCACCCTAGCATCCCTTGCCCTA GAGGCCACGGCGCCCAGAAGGCCGCCCTGGTGCTGCTGAGCG CCTGCCTGGTGACCCTGTGGGGCCTGGGCGAGCCTCCTGAGCA CACCCTGAGATACCTGGTGCTGCACCTGGCCAGCCTGCAGCTG GGCCTGCTGCTGAACGGCGTGTGCAGCCTGGCCGAGGAGCTG AGACACATCCACAGCAGATACAGAGGCAGCTACTGGAGAACC GTGAGAGCCTGCCTGGGCTGCCCTCTGAGAAGAGGCGCCCTGC TGCTGCTGAGCATCTACTTCTACTACAGCCTGCCTAACGCCGT GGGCCCTCCTTTCACCTGGATGCTGGCCCTGCTGGGCCTGAGC CAGGCCCTGAACATCCTGCTGGGCCTGAAGGGCCTGGCCCTG CCGAGATCAGCGCCGTGTGCGAGAAGGGCAACTTCAACGTGG CCCACGGCCTGGCCTGGAGCTACTACATCGGCTACCTGAGACT GATCCTGCCTGAGCTGCAGGCCAGAATCAGAACCTACAACCA GCACTACAACAACCTGCTGAGAGGCGCCGTGAGCCAGAGACT GTACATCCTGCTGCCTCTGGACTGCGGCGTGCCTGACAACCTG AGCATGGCCGACCCTAACATCAGATTCCTGGACAAGCTGCCTC AGCAGACCGGCGACCACGCCGGCATCAAGGACAGAGTGTACA GCAACAGCATCTACGAGCTGCTGGAGAACGGCCAGAGAGCCG GCACCTGCGTGCTGGAGTACGCCACCCCTCTGCAGACCCTGTT CGCCATGAGCCAGTACAGCCAGGCCGGCTTCAGCAGAGAGGA CAGACTGGAGCAGGCCAAGCTGTTCTGCAGAACCTGGAGGA CATCCTGGCCGACGCCCCTGAGAGCCAGAACAACCTGCAGACT GATCGCCTACCAGGAGCCTGCCGACGACAGCAGCTTCAGCCTG AGCCAGGAGGTGCTGAGACACCTGAGACAGGAGGAGAAGGA GGAGGTGACCGTGGGCAGCCTGAAGACCAGCGCCGTGCCTAG CACCAGCACCATGAGCCAGGAGCCTGAGCTGCTGATCAGCGG CATGGAGAAGCCTCTGCCTCTGGCCACCGACTTCAGC (Hu STING (R375A); 无表位标签; 核苷酸序列) </p> |

[1633]

| <u>SEQ ID NO:</u> | <u>序列</u> |
|---------------------------|--|
| 207 | ATGCCTCACAGCAGCCTGCACCCTAGCATCCCTTGCCCTA GAGGCCACGGCGCCCAGAAGGCCGCCCTGGTGCTGCTGAGCG CCTGCCTGGTGACCCTGTGGGGCCTGGGCGAGCCTCCTGAGCA CACCCTGAGATACCTGGTGCTGCACCTGGCCAGCCTGCAGCTG GGCCTGCTGCTGAACGGCGTGTGCAGCCTGGCCGAGGAGCTG AGACACATCCACAGCAGATACAGAGGCAGCTACTGGAGAACC GTGAGAGCCTGCCTGGGCTGCCCTCTGAGAAGAGGCGCCCTGC TGCTGCTGAGCATCTACTTCTACTACAGCCTGCCTAACGCCGT GGGCCCTCCTTTCACCTGGATGCTGGCCCTGCTGGGCCTGAGC CAGGCCCTGAACATCCTGCTGGGCCTGAAGGGCCTGGCCCCTG CCGAGATCAGCGCCCTGTGCGAGAAGGGCAACTTCAGCATGG CCCACGGCCTGGCCTGGAGCTACTACATCGGCTACCTGAGACT GATCCTGCCTGAGCTGCAGGCCAGAATCAGAACCTACAACCA GCACTACAACAACCTGCTGAGAGGCGCCGTGAGCCAGAGACT GTACATCCTGCTGCCTCTGGACTGCGGCGTGCCTGACAACCTG AGCATGGCCGACCCTAACATCAGATTCCTGGACAAGCTGCCTC AGCAGACCGGCGACCACGCCGGCATCAAGGACAGAGTGTACA GCAACAGCATCTACGAGCTGCTGGAGAACGGCCAGAGAGCCG GCACCTGCGTGCTGGAGTACGCCACCCCTCTGCAGACCCTGTT CGCCATGAGCCAGTACAGCCAGGCCGGCTTCAGCAGAGAGGA CAGACTGGAGCAGGCCAAGCTGTTCTGCAGAACCTTGAGGA CATCCTGGCCGACGCCCCTGAGAGCCAGAACAACCTGCAGACT GATCGCCTACCAGGAGCCTGCCGACGACAGCAGCTTCAGCCTG AGCCAGGAGGTGCTGAGACACCTGAGACAGGAGGAGAAGGA GGAGGTGACCGTGGGCAGCCTGAAGACCAGCGCCGTGCCTAG CACCAGCACCATGAGCCAGGAGCCTGAGCTGCTGATCAGCGG CATGGAGAAGCCTCTGCCTCTGAGAACCGACTTCAGC (Hu STING(V147L/N154S/V155M); 无表位标签; 核苷酸序列) |

[1634]

| SEQ ID NO: | 序列 |
|------------------|--|
| 208 | <p>ATGCCTCACAGCAGCCTGCACCCTAGCATCCCTTGCCCTA GAGGCCACGGCGCCCAGAAGGCCGCCCTGGTGCTGCTGAGCG CCTGCCTGGTGACCCTGTGGGGCCTGGGCGAGCCTCCTGAGCA CACCCTGAGATACCTGGTGCTGCACCTGGCCAGCCTGCAGCTG GGCCTGCTGCTGAACGGCGTGTGCAGCCTGGCCGAGGAGCTG AGACACATCCACAGCAGATACAGAGGCAGCTACTGGAGAACC GTGAGAGCCTGCCTGGGCTGCCCTCTGAGAAGAGGGCGCCCTGC TGCTGCTGAGCATCTACTTCTACTACAGCCTGCCTAACGCCGT GGGCCCTCCTTTACCTGGATGCTGGCCCTGCTGGGCCTGAGC CAGGCCCTGAACATCCTGCTGGGCCTGAAGGGCCTGGCCCTG CCGAGATCAGCGCCCTGTGCGAGAAGGGCAACTTCAGCATGG CCCACGGCCTGGCCTGGAGCTACTACATCGGCTACCTGAGACT GATCCTGCCTGAGCTGCAGGCCAGAATCAGAACCTACAACCA GCACTACAACAACCTGCTGAGAGGCGCCGTGAGCCAGAGACT GTACATCCTGCTGCCTCTGGACTGCGGCGTGCCTGACAACCTG AGCATGGCCGACCCTAACATCAGATTCTGGACAAGCTGCCTC AGCAGACCGGCGACCACGCCGGCATCAAGGACAGAGTGTACA GCAACAGCATCTACGAGCTGCTGGAGAACGGCCAGAGAGCCG GCACCTGCGTGCTGGAGTACGCCACCCCTCTGCAGACCCTGTT CGCCATGAGCCAGTACAGCCAGGCCGGCTTCAGCAGAGAGGA CATGCTGGAGCAGGCCAAGCTGTTCTGCAGAACCTGGAGGA CATCCTGGCCGACGCCCTGAGAGCCAGAACAACCTGCAGACT GATCGCCTACCAGGAGCCTGCCGACGACAGCAGCTTCAGCCTG AGCCAGGAGGTGCTGAGACACCTGAGACAGGAGGAGAAGGA GGAGGTGACCGTGGGCAGCCTGAAGACCAGCGCCGTGCCTAG CACCAGCACCATGAGCCAGGAGCCTGAGCTGCTGATCAGCGG CATGGAGAAGCCTCTGCCTCTGAGAACCGACTTCAGC (Hu STING(R284M/V147L/N154S/V155M); 无表位标签; 核苷酸 序列)</p> |
| 209 | <p>TGATAATAGGCTGGAGCCTCGGTGGCCTAGCTTCTTGCCC CTTGGGCCTCCCCCAGCCCCCTCCTCCCCTTCTGCACCCGTAC CCCCAAACACCATTGTCACACTCCAGTGGTCTTTGAATAAAG TCTGAGTGGGCGGC (在 STING V155M 构建体中使用的 3' UTR, 含有 miR122 结合 位点)</p> |
| 224 | <p>MPHSSLHPSIPCPRGHGAQKAALVLLSACLVT LWLGEPPEH TLRYLVHLASLQLGLLLNGVCSLAEELRHIHSRYRGSYWRTVR ACLGCP LRRGALLLSIYFYSLPNAVGPFTWMLALLGLSQALN ILLGLKGLAPAEISAVCEKGNFNV AHGLAWSYYIGYLRILPELQ ARIRTYNQHYNNLLRGAVSQRLYILLPLDCGVPDNL SMADPNIRF LDKLPQQTGDHAGIKDRVYSNSIYELLENGQRAGTCVLEYATPL QTLFAMSQYSQAGFSREDKLEQAKLFCRTLEDILADAPESQNNCR LIAYQEPADDSSFSLSQEVLRLRQEEKEEVTVGSLKTS AVPSTST MSQEP ELLISGMEKPLPLRTDFST (Hu STING (R284K) var; 无表位标签)</p> |

[1635]

| <u>SEQ ID NO:</u> | <u>序列</u> |
|---------------------------|---|
| 225 | ATGCCCCATAGCAGCCTGCACCCCAGCATCCCCTGCCCCA GAGGCCACGGCGCCCAGAAGGCCGCCCTGGTCCTGCTGAGCG CATGCCTGGTCACCCTGTGGGGCCTGGGCGAGCCCCCGAGCA CACCCTGAGATACCTGGTGCTGCACCTCGCCAGCCTGCAGCTG GGCCTGCTGCTGAACGGCGTGTGCAGCCTGGCCGAGGAGCTG AGACACATCCACAGCAGATATAGAGGCAGCTACTGGAGAACC GTGAGAGCTTGCCTCGGCTGCCCCCTGAGAAGAGGCGCCCTGC TGCTGCTGAGCATCTACTTTTACTACAGCCTGCCCAACGCTGT GGGCCCCCCTTTACGTGGATGCTCGCCCTGCTGGGACTGAGC CAGGCCCTGAACATCCTGCTGGGCCTTAAGGGCCTAGCCCCCG CCGAGATCAGCGCCGTGTGCGAGAAGGGCAACTTCAATGTGG CCCACGGCCTGGCCTGGAGCTACTACATCGGCTACCTGAGACT GATCCTGCCCCGAGCTGCAGGCCAGAATCAGAACCTACAATCA GCACTACAACAACCTGCTGAGAGGCGCCGTGAGCCAGAGACT GTACATCCTGCTGCCCCCTGGACTGCGGCGTGCCCCGACAACCTC AGCATGGCCGACCCCAACATCAGATTCCTGGACAAGCTGCCCC AGCAGACCGGCGACCACGCCGGCATCAAGGATCGCGTGTACA GCAACAGCATCTACGAGCTGCTGGAAAACGGCCAGAGAGCCG GAACCTGCGTGCTGGAGTACGCCACACCCCTGCAGACCCTGTT CGCCATGAGCCAGTACAGCCAGGCCGGCTTCAGCAGAGAGGA CAAGCTGGAGCAGGCCAAGCTGTTCTGCAGAACCTGGAGGA TATCCTCGCCGACGCCCCCGAGAGCCAGAACAACCTGCAGGCT GATCGCGTACCAGGAGCCCGCTGACGACAGCAGCTTTAGCCTG AGCCAGGAGGTGCTGAGACATCTGCGTCAAGAGGAAAAGGAG GAGGTGACCGTGGGCTCCCTGAAGACCAGCGCCGTGCCCAGC ACCAGCACCATGAGCCAGGAGCCCGAGCTGCTGATCAGCGGC ATGGAGAAGCCACTGCCCTCAGAACCGACTTCAGCACC (Hu STING (R284K) var; 无表位标签) |

[1636] 实施例7. 活化致癌基因KRAS突变

[1637] KRAS是人类癌症中最常见的突变致癌基因(约15%)。KRAS突变主要在单个“热点”中保守,并活化致癌基因。先前的研究显示了提高对致癌突变具有特异性的T细胞的能力有限。然而,此研究的大部分是在最常见的HLA等位基因(A2,其在约50%的高加索人中出现)的背景下进行的。最近,已经证明(a) 特异性T细胞可在较不常见的HLA等位基因(A11,C8)的背景下针对点突变产生,和(b) 离体生长这些细胞并将它们转移回至患者已经介导了肺癌患者中的显著肿瘤应答。(N Engl J Med 2016;375:2255-22622016年12月8日,DOI: 10.1056/NEJMoa1609279)。

[1638] 如下表4所示,在CRC(结肠直肠癌)中,仅有3种突变(G12V、G12D和G13D)占96%的病例。此外,所有CRC患者都接受KRAS突变的分型作为标准护理。

[1639] 表4.

| COSMIC* 病例计数 | | | | | |
|---|--------|-----|--|-------|-----|
| | 所有癌症 | % | | CRC | % |
| G12S | 1849 | 1% | | | |
| G12V | 9213 | 4% | | 5215 | 29% |
| G12C | 4535 | 2% | | | |
| G12D | 13634 | 7% | | 8083 | 44% |
| G12A | 2179 | 1% | | | |
| G12R | 1244 | 1% | | | |
| G13D | 5084 | 2% | | 4267 | 23% |
| | | 18% | | | 96% |
| 测试的 | 208629 | | | 18271 | |
| * http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/analysis?ln=KRAS | | | | | |

[1641] 在另一个COSMIC数据集中,结肠直肠癌中73.68%的KRAS突变由这3种突变(G12V、G12D和G13D)引起(图15和表5)。

[1642] 表5

| | 结肠 | % | 直肠 | % | 总计 | % |
|------------|-----|-------|-----|-------|-----|-------|
| [1643] 12D | 635 | 35.04 | 178 | 33.46 | 813 | 34.68 |
| 12V | 364 | 20.09 | 124 | 23.31 | 488 | 20.82 |
| 13D | 338 | 18.65 | 88 | 16.54 | 426 | 18.17 |
| | | | | | | 73.68 |

[1644] 图16、17和18分别描绘了对HRAS、KRAS和NRAS的同种型-特异性点突变特异性。从COSMIC v52释放中整理表示具有每种点突变的肿瘤总数的数据。指示产生每种氨基酸取代的单碱基突变。每种癌症类型的每种同种型的最常见突变用灰色阴影突出显示。H/L:造血组织/淋巴组织。(Prior等人Cancer Res.2012年5月15日;72(10):2457-2467)。

[1645] 此外,已在EGFR阻断抗性患者中鉴定出继发性KRAS突变。RAS是EGFR的下游,并且已经发现它构成了对EGFR阻断疗法的抗性机制。可使用本文公开的组合物和方法靶向EGFR阻断抗性KRAS突变型肿瘤。在少数情况下,在同一患者中鉴定出多于一种KRAS突变(共同发生多达四种不同的突变)。这种突变谱似乎与结肠直肠癌中的原发性肿瘤错义突变体至少有些不同。(Diaz等人The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers,Nature 486:537(2012);Misale等人Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer,Nature 486:532(2012))。图19描绘在获得EGFR阻断抗性后的继发性KRAS突变。(Diaz等人The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers,Nature 486:537(2012))。图20描绘在EGFR阻断后的继发性KRAS突变。(Misale等人Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to

anti-EGFR therapy in colorectal cancer, Nature 486:532 (2012))。

[1646] 如图21所示, NRAS也在结直肠癌中发生突变, 但频率低于KRAS。

[1647] 在此实施例中, 向动物施用RNA癌症疫苗, 所述RNA癌症疫苗包含编码至少一种活化致癌基因突变肽的mRNA例如至少一种活化KRAS突变。向HLA*A*11:01 Tg小鼠 (Taconic, 品系9660F, n=4) 或HLA-A*2:01 Tg小鼠 (Taconic, 品系9659F, n=4) 如下施用编码突变型KRAS的mRNA: 在第1天施用编码突变的KRAS的mRNA, 在第8天采血, 在第15天施用编码突变的KRAS的mRNA, 在第22天处死动物。测试组如下在表6中示出:

[1648] 表6

| 测试组 | 组 | 测试/对照材料 | 遗传佐剂 | 媒介物 | 途径 | 给药方案 |
|-----------------|---|-----------|----------|--------|----|---------------|
| [1649] KRAS-MUT | 1 | KRAS G12D | 无(NTFIX) | 化合物 25 | IM | 第 1 天, 第 15 天 |
| | 2 | KRAS G12V | 无(NTFIX) | 化合物 25 | IM | 第 1 天, 第 15 天 |
| | 3 | KRAS G13D | 无(NTFIX) | 化合物 25 | IM | 第 1 天, 第 15 天 |
| 无 Ag | 4 | NTFIX | NTFIX | 化合物 25 | IM | 第 1 天, 第 15 天 |

[1650] 将mRNA以0.5mg/kg的剂量施用至动物 (10ug/20-g动物)。在GolgiPlug (布雷菲德菌素A) 存在下, 在37摄氏度下测试离体再刺激 (每肽1ug/ml) 持续4小时。测试了KRAS G12D、KRAS G12V、KRAS G13D、KRAS G12WT、KRAS G13WT和无肽的细胞内细胞因子染色 (ICS)。

[1651] 测试了编码KRAS突变的mRNA产生T细胞的能力。例如, 将编码KRAS突变的mRNA的功效与例如肽疫苗接种进行比较。

[1652] 示例性KRAS突变体肽序列和mRNA构建体在表7-9中示出。

[1653] 表7. KRAS突变体肽序列

| | 9 AA 序列 | 15 聚体 | 25 聚体 |
|--------|--------------------------------------|------------------------------------|--|
| [1654] | G12D VVGADGVGK (SEQ ID NO:316) | KLVVVGADGVGKSAL (SEQ ID NO:317) | MTEYKLVVVGADG VGKSALTIQLIQ (SEQ ID NO:318) |
| | G12V VVGAVGVGK (SEQ ID NO:319) | KLVVVGAVGVGKSAL (SEQ ID NO:320) | MTEYKLVVVGAVG VGKSALTIQLIQ (SEQ ID NO:321) |
| | G13D VGAGDVGKS (SEQ ID NO:322) | LVVVGAGDVGKSALT (SEQ ID NO:323) | MTEYKLVVVGAGD VGKSALTIQLIQ (SEQ ID NO:324) |
| | G12C VVGACGVGK (SEQ ID NO:325) | KLVVVGACGVGKSA (SEQ ID NO:326) | MTEYKLVVVGACG VGKSALTIQLIQ (SEQ ID NO:327) |
| | WT | | MTEYKLVVVGAGG VGKSALTIQLIQ |
| [1655] | | | (SEQ ID NO:328) |

[1656] 表8.KRAS突变体氨基酸序列

| KRAS 突变体 | 氨基酸序列 |
|--------------------------------|---|
| KRAS(G12D) 15 聚体 | MKL VVVGADGVGKSAL (SEQ ID NO:329) |
| KRAS(G12V) 15 聚体 | MKL VVVGAVGVGKSAL (SEQ ID NO:330) |
| KRAS(G13D) 15 聚体 | ML VVVGAGDVGKSALT (SEQ ID NO:331) |
| KRAS(G12D) 25 聚体 | MTEYKLVVVGADGVGKSALTIQLIQ (SEQ ID NO:332) |
| KRAS(G12V) 25 聚体 | MTEYKLVVVGAVGVGKSALTIQLIQ (SEQ ID NO:333) |
| KRAS(G13D) 25 聚体 | MTEYKLVVVGAGDVGKSALTIQLIQ (SEQ ID NO:334) |
| KRAS(G12D) 15 聚体 ^{^3} | MKL VVVGADGVGKSALKLVVVGADGVGKSALKLV VVGADGVGKSAL (SEQ ID NO:335) |
| KRAS(G12V) 15 聚体 ^{^3} | MKL VVVGAVGVGKSALKLVVVGAVGVGKSALKLV VVGAVGVGKSAL (SEQ ID NO:336) |
| KRAS(G13D) 15 聚体 ^{^3} | ML VVVGAGDVGKSALT LVVVGAGDVGKSALT LVV VGAGDVGKSALT (SEQ ID NO:337) |
| KRAS(G12D) 25 聚体 ^{^3} | MTEYKLVVVGADGVGKSALTIQLIQMTEYKLVVVG ADGVGKSALTIQL IQMTEYKLVVVGADGVGKSALTIQLIQ (SEQ ID NO:338) |
| KRAS(G12V) 25 聚体 ^{^3} | MTEYKLVVVGAVGVGKSALTIQLIQMTEYKLVVVG AVGVGKSALTIQL IQMTEYKLVVVGAVGVGKSALTIQLIQ (SEQ ID NO:339) |
| KRAS(G13D) 25 聚体 ^{^3} | MTEYKLVVVGAGDVGKSALTIQLIQMTEYKLVVVG AGDVGKSALTIQL IQMTEYKLVVVGAGDVGKSALTIQLIQ (SEQ ID NO:340) |
| KRAS(G12C) 25 聚体 | MTEYKLVVVGACGVGKSALTIQLIQ (SEQ ID NO:341) |
| KRAS(G12C) 25 聚体 ^{^3} | MTEYKLVVVGACGVGKSALTIQLIQMTEYKLVVVG ACGVGKSALTIQL IQMTEYKLVVVGACGVGKSALTIQLIQ (SEQ ID NO:342) |
| KRAS(WT) 25 聚体 | MTEYKLVVVGAGGVGKSALTIQLIQ (SEQ ID NO:343) |

[1658] 表9.KRAS突变体抗原mRNA序列

[1659]

| mRNA 名称 | Orf 序列(氨基酸) | Orf 序列(核苷酸) |
|---------------------------------------|---|---|
| KRAS (G12D) 25 聚体 | MTEYKLVVVGADGVGKSALTIQLIQ (SEQ ID NO:357) | ATGACCGAGTACAAGCTGGTGGTGGTGGGCGCCGACGGCGTGGGCAAGAGCGCCCTGACCATCCAGCTGATCCAG (SEQ ID NO:344) |
| KRAS (G12V) 25 聚体 | MTEYKLVVVGADGVGKSALTIQLIQ (SEQ ID NO:358) | ATGACCGAGTACAAGCTGGTGGTGGTGGGCGCCGACGGCGTGGGCAAGAGCGCCCTGACCATCCAGCTGATCCAG (SEQ ID NO:345) |
| KRAS (G13D) 25 聚体 | MTEYKLVVVGADGVGKSALTIQLIQ (SEQ ID NO:359) | ATGACCGAGTACAAGCTGGTGGTGGTGGGCGCCGCGCGACGTGGGCAAGAGCGCCCTGACCATCCAGCTGATCCAG (SEQ ID NO:346) |
| KRAS (G12D) 25 聚体 ^{^3} | MTEYKLVVVGADGVGKSALTIQLIQMTEYKLVVGADGVGKSALTIQLIQ (SEQ ID NO:360) | ATGACCGAGTACAAGCTTAGTGGTTGTGGGCGCCGACGGCGTGGGCAAGAGCGCCCTCACCATCCAGCTTATCCAGATGACGGAATATAAGTTAGTAGTAGTGGGAGCCGACGGTGTTCGGCAAGTCCGCTTTGACCATTCAACTTATTCAGATGACAGAGTATAAGCTGGTCGTTGTAGGCGCAGACGGCGTTGGAAAGTCGGCACTGACGATCCAGTTGATCCAG (SEQ ID NO:347) |
| KRAS (G12V) 25 聚体 ^{^3} | MTEYKLVVVGADGVGKSALTIQLIQMTEYKLVVGAVGVGKSALTIQLIQMTEYKLVVGAVGVGKSALTIQLIQ (SEQ ID NO:361) | ATGACCGAGTACAAGCTCGTCGTGGTGGGCGCCGTCGGCGTGGGCAAGAGCGCCCTAACCATCCAGTTGATCCAGATGACCGAATATAAGCTCGTGGTAGTTCGGAGCGGTGGGCGTTGGCAAGTCAGCGCTAACAAATACAATAATCCAAATGACCGAATACAAGCTAGTTGTAGTCGGTGCCTCGGCGTTGGAAAGTCAGCCCTTACAATTCAGCTCATTGATCCAG (SEQ ID NO:348) |
| KRAS (G13D) 25 聚体 ^{^3} | MTEYKLVVVGADGVGKSALTIQLIQMTEYKLVVVGAGDVGKSALTIQLIQMTEYKLVVVGAGDVGKSALTIQLIQ (SEQ ID NO:362) | ATGACCGAGTACAAGCTCGTAGTGGTGGGCGCCGCGCGACGTGGGCAAGAGCGCCCTAACCATCCAGCTCATCCAGATGACAGAATATAAGCTTGTGGTTGTGGGAGCAGGAGACGTGGGAAAGAGTGCCTTGACGATTCAACTCATACAGATGACCGAATACAAGTTGGTGGTGGTTCGGCGCAGGTGACGTTGGTAAGTCTGCACTAACTATACAAGTATCCAG (SEQ ID NO:349) |
| KRAS (G12C) 25 聚体 | MTEYKLVVVGADGVGKSALTIQLIQ (SEQ ID NO:363) | ATGACCGAGTACAAGCTGGTGGTGGTGGGCGCCTGCGGCGTGGGCAAGAGCGCCCTGACCATCCAGCTGATCCAG (SEQ ID NO:350) |

[1660]

| mRNA 名称 | Orf 序列(氨基酸) | Orf 序列(核苷酸) |
|---------------------------------------|---|---|
| KRAS (G12C) 25 聚体 ^{^3} | MTEYKLVVVGACGVGKSALTIQLIQMTEYKLVVVGACGVGKSALTIQLIQMTEYKLVVVGACGVGKSALTIQLIQ (SEQ ID NO:364) | ATGACCGAGTACAAGCTCGTGGTTGTGGCGCCTGCGGCGTGGGCAAGAGCGCCCTCACCATCCAGCTCATCCAGATGACAGAGTATAAGTTAGTCGTTGTCGGA GCTTGC GGAGTTGGAAAGTCGGCGCTCACCATTCAACTCATACAAATGACAG AATATAAGTTAGTGGTGGTGGGTGCG TGTGGCGTTGGCAAGAGTGC GCTTAC TATCCAGCTCATT CAG (SEQ ID NO:351) |
| KRAS (WT) 25 聚体 | MTEYKLVVVGACGVGKSALTIQLIQ (SEQ ID NO:365) | ATGACCGAGTACAAGCTGGTGGTGGTGGGCGCCGGCGGCGTGGGCAAGAGCGCCCTGACCATCCAGCTGATCCAG (SEQ ID NO:352) |

[1661] 化学:尿嘧啶修饰的N1-甲基假尿苷(m1Ψ)

[1662] 帽:C1

[1663] 尾部:T100

[1664] 5' UTR 序列(标准 5' 侧翼(包括产生 FP+T7 位点+5' UTR)):

TCAAGCTTTTGGACCCTCGTACAGAAGCTAATACGACTCACTA

TAGGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAA

GAGCCACC (SEQ ID NO:353)

[1665] 5' UTR 序列(无启动子): GGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAG

TAAGAAGAAATATAAGAGCCACC (SEQ ID NO:354)

[1666] 3' UTR 序列(人 3' UTR 无 Xba I): TGATAATAGGCTGGAGCCT

CGGTGGCCATGCTTCTTGCCCCTTGGGCCTCCCCCAGCCCCCTC

CTCCCCCTTCCTGCACCCGTACCCCGTGGTCTTTGAATAAAGTC

TGAGTGGGCGGC (SEQ ID NO:355)

[1667] 实施例8.p53中的复发剪接位点和沉默突变“热点”

[1668] 在人癌症的情况下,相比于任何其他基因,p53基因(官方符号TP53)更频繁突变。大量群组研究已显示对于大多数p53突变,基因组位置为一名患者或仅少许患者所特有的,并且突变不能用作被设计用于特定患者群体的治疗性疫苗的复发新抗原。然而,p53基因座的小型子组确实展现“热点”样式,其中基因中的若干位置以相对较高频率被突变。引人注目的是,这些复发突变区域中的大部分发生在外显子-内含子边界附近,从而破坏由mRNA剪接机构识别的典型核苷酸序列基序。剪接基序的突变可改变最终mRNA序列,即使预测局部氨基酸序列无变化(即对于同义或内含子突变来说)。因此,这些突变常常由常见注释工具注释为“非编码”,并且被忽略用于进一步分析,即使它们可以不可预测方式改变mRNA剪接,并且对翻译蛋白质施加严重功能性影响。如果选择性剪接同种型产生同框序列变化(即不产生PTC),那么它可逃脱由NMD进行的耗竭,并且易于表达,加工,以及由HLA系统呈递在细胞表面上。此外,突变源性选择性剪接通常是“隐蔽的”,即不在正常组织中表达,因此可由T

细胞识别为非自身新抗原。

[1669] 若干突变位点通过RNA测序确认会产生保留内含子或隐蔽剪接。两种代表性突变源性肽具有在编码基因组中其他地方不具有匹配的多种HLA-A2结合表位。

[1670] p53中鉴定的复发突变包括：

[1671] (1) 在典型5' 剪接位点邻近密码子p.T125处的突变，从而诱导具有肽序列TAKSVTCTVSCPEGLASMRLQCLAVSPCISFVWNFGIPLHPLASCQCFFIVYPLNV (SEQ ID NO:232) 的保留内含子，所述序列含有表位AVSPCISFVW (SEQ ID NO:233) (HLA-B*57:01, HLA-B*58:01)、HPLASCQCFF (SEQ ID NO:234) (HLA-B*35:01, HLA-B*53:01)、FVWNFGIPL (SEQ ID NO:235) (HLA-A*02:01, HLA-A*02:06, HLA-B*35:01)；

[1672] (2) 在典型5' 剪接位点邻近密码子p.331处的突变，从而诱导具有肽序列EYFTLQVLSLGTSYQVESFQSNTQNAVFFLTVPALPAIGAFAIRGQ (SEQ ID NO:236) 的保留内含子，所述序列含有表位LQVLSLGTSY (SEQ ID NO:237) (HLA-B*15:01)、FQSNTQNAVF (SEQ ID NO:238) (HLA-B*15:01)；

[1673] (3) 在典型3' 剪接位点邻近密码子p.126处的突变，从而诱导隐蔽选择性外显子3' 剪接位点，产生含有表位CTMFCQLAK (SEQ ID NO:240) (HLA-A*11:01)、KSVTCTMF (SEQ ID NO:241) (HLA-B*58:01) 的新型跨越肽序列AKSVTCTMFCQLAK (SEQ ID NO:239)；和(4) 在典型5' 剪接位点邻近密码子p.224处的突变，从而诱导隐蔽选择性内含子5' 剪接位点，产生含有表位VPYEPPEVW (SEQ ID NO:243) (HLA-B*53:01, HLA-B*51:01)、LTVPPSTAW (SEQ ID NO:244) (HLA-B*58:01, HLA-B*57:01) 的新型跨越肽序列VPYEPPEVWLALTVPSTAWAA (SEQ ID NO:242)，其中转录物密码子位置涉及来自Ensembl v83人基因组注释的典型全长p53转录物ENST00000269305 (SEQ ID NO:245)。

[1674] 等效方案

[1675] 本领域技术人员将仅使用常规实验就会认识到或能够确定本文所述的本公开的特定实施方案的许多等效物。所述等效物意图由以下权利要求涵盖。

[1676] 在应用于一个或多个目标值时，术语“大约”或“约”是指类似于所阐述的参考值的值。在某些实施方案中，术语“大约”或“约”是指在所阐述的参考值的任一方向上的(大于或小于)25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或更小范围内的值范围，除非另外说明或以另外的方式从上下文显而易见(除了这样的数值将超过可能值的100%的情况)。

[1677] 本文公开的包括专利文件的所有参考文献都以引用的方式整体并入本文。

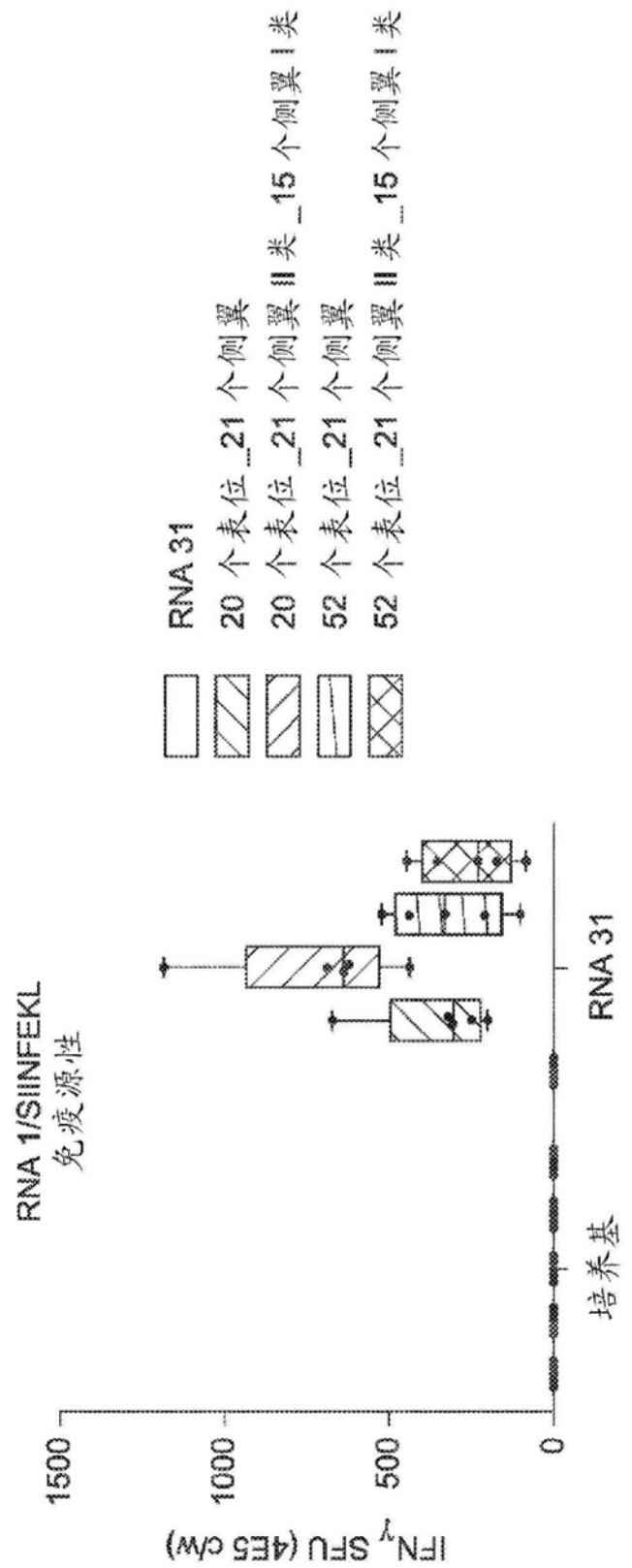


图1

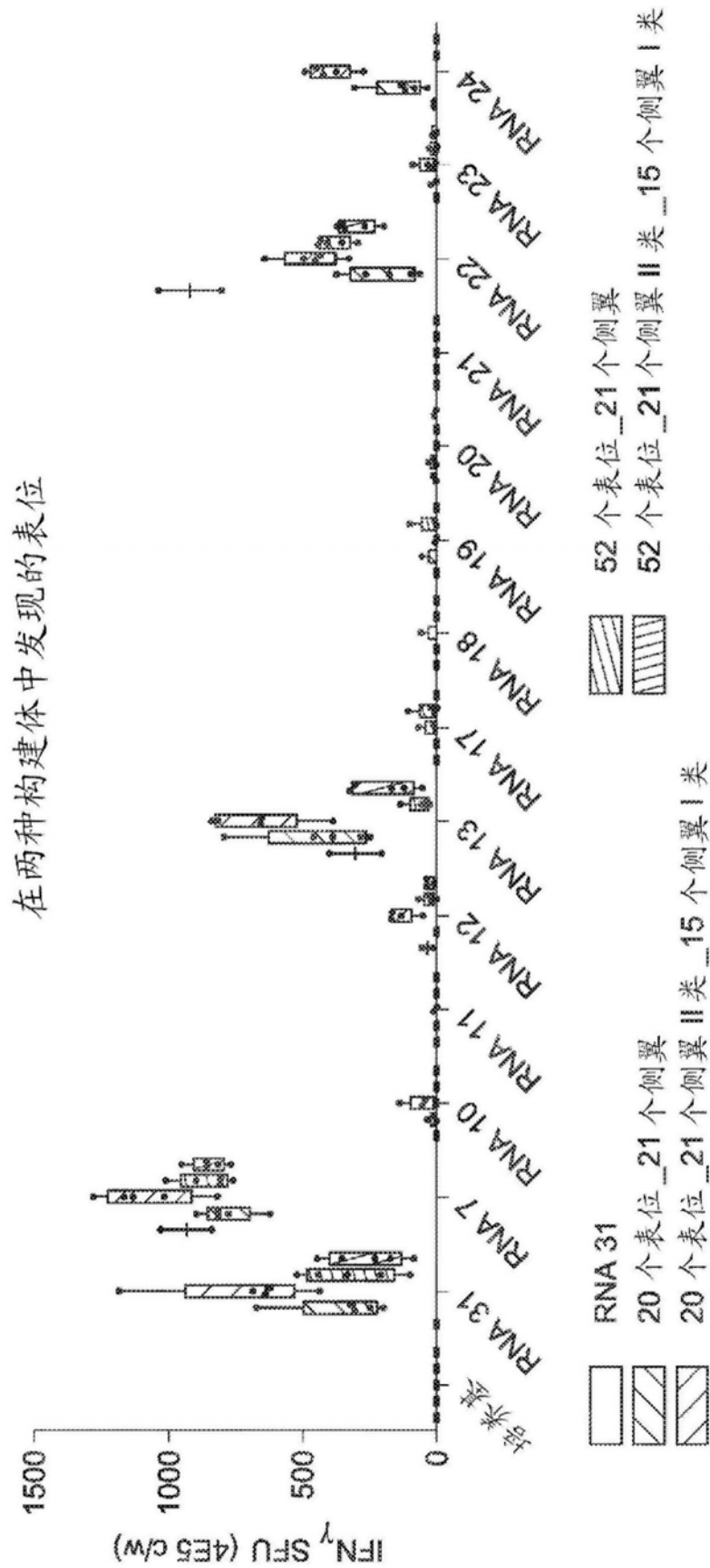


图2



图3

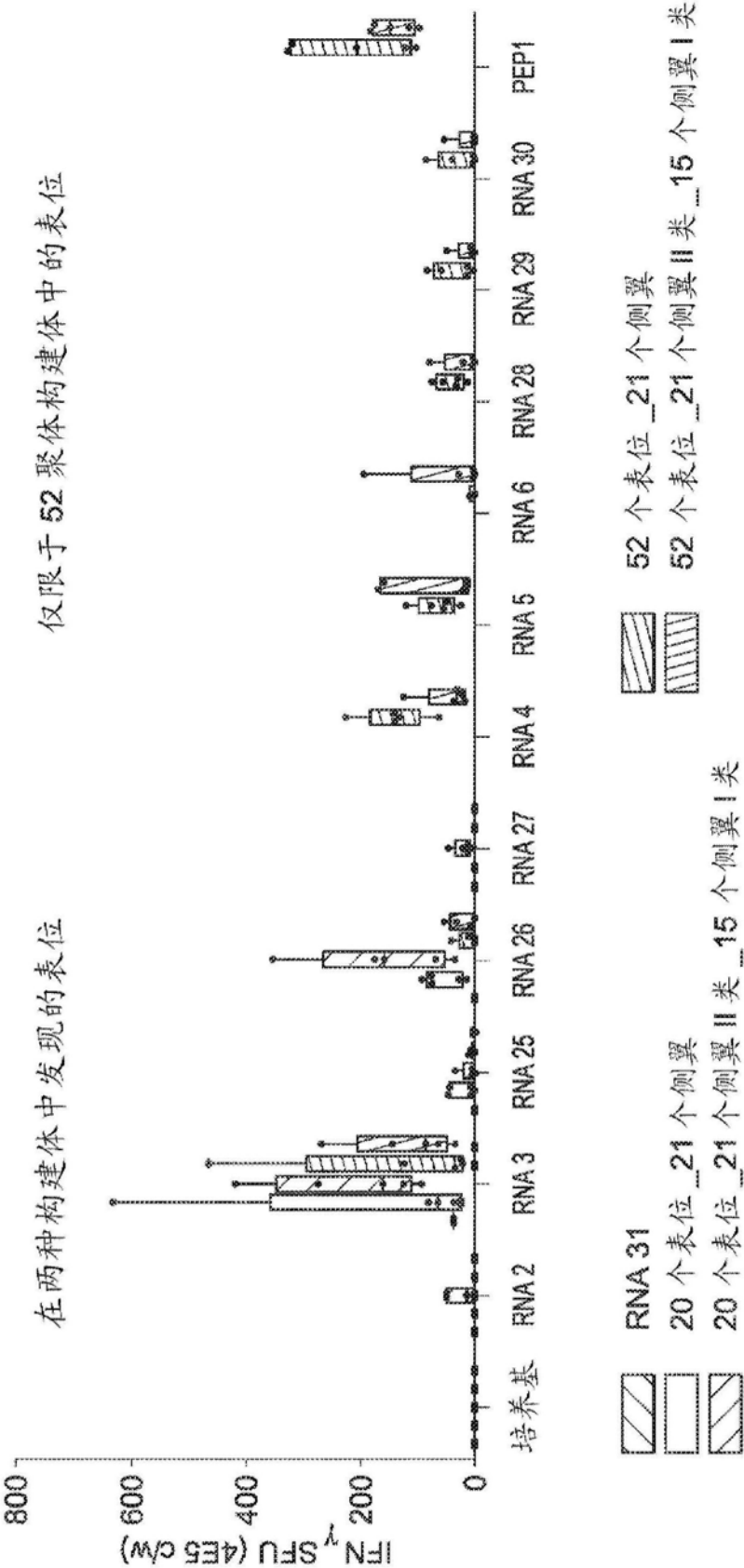


图4

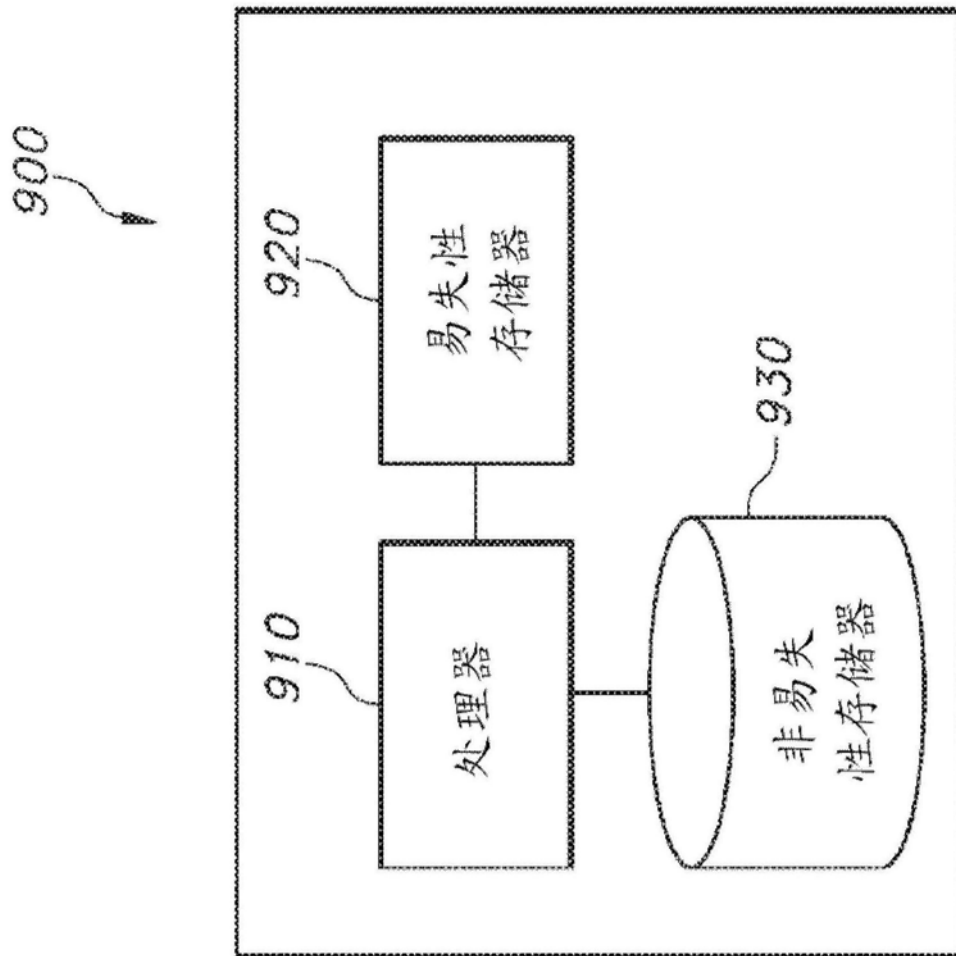


图5

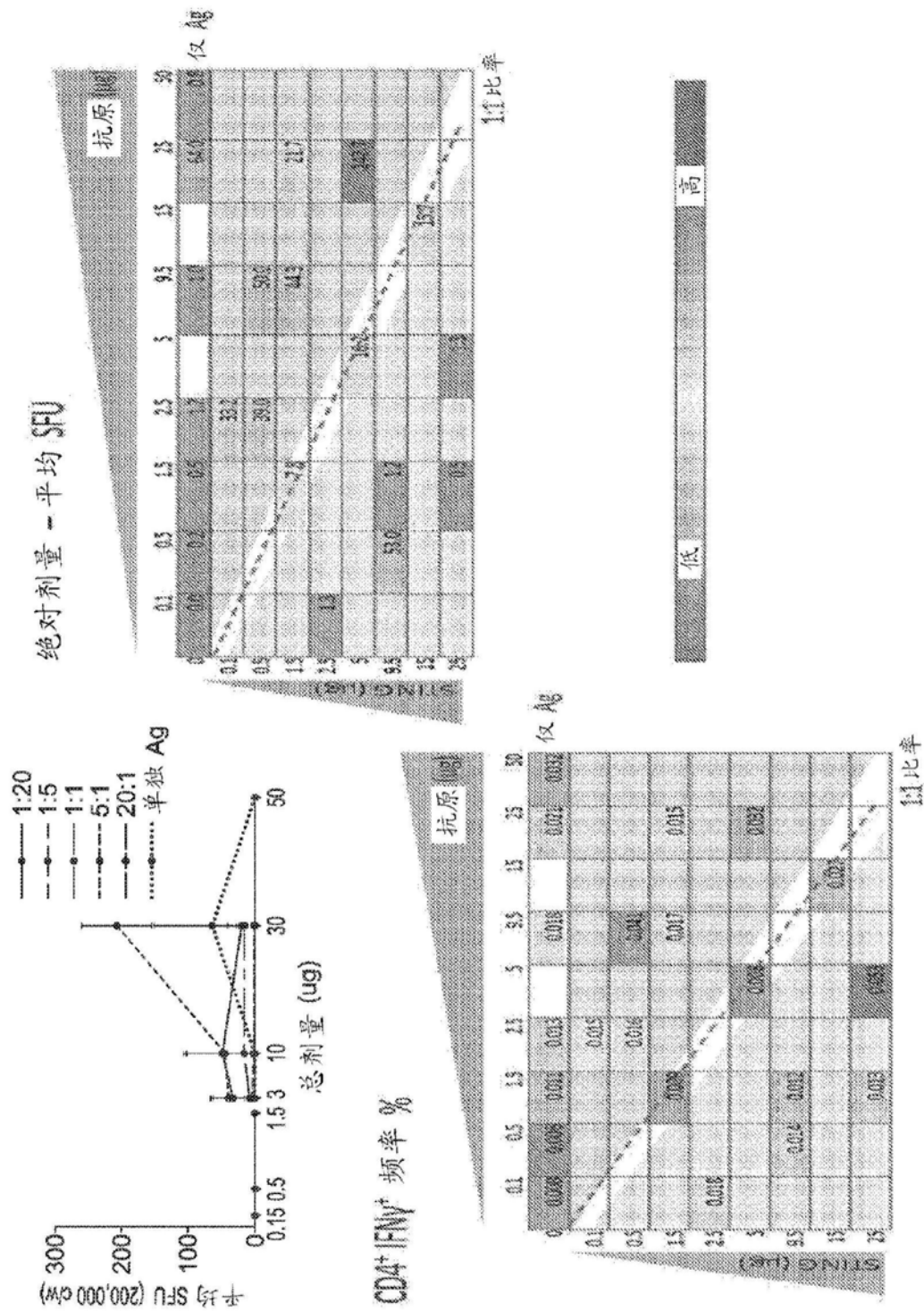


图6

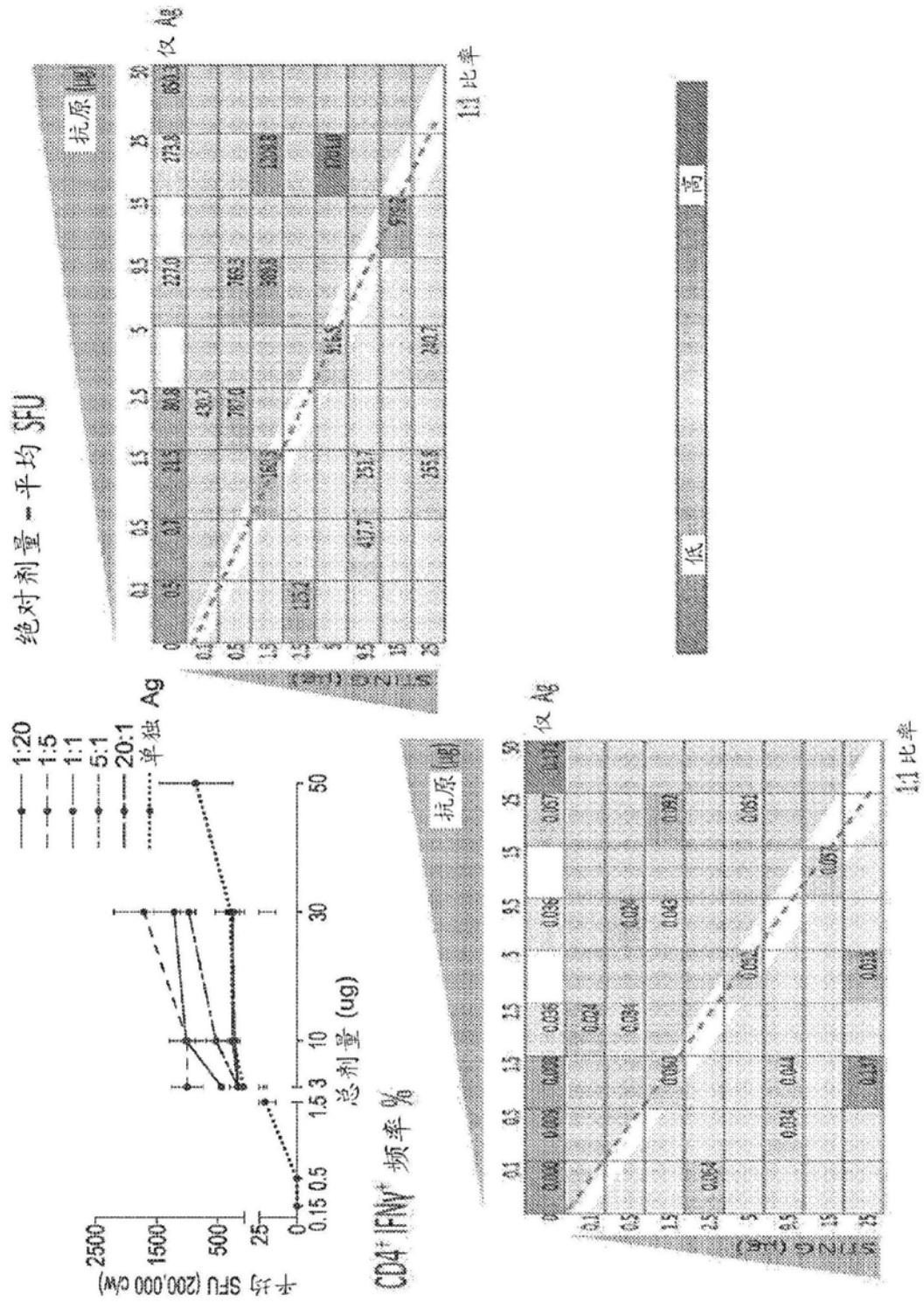


图7

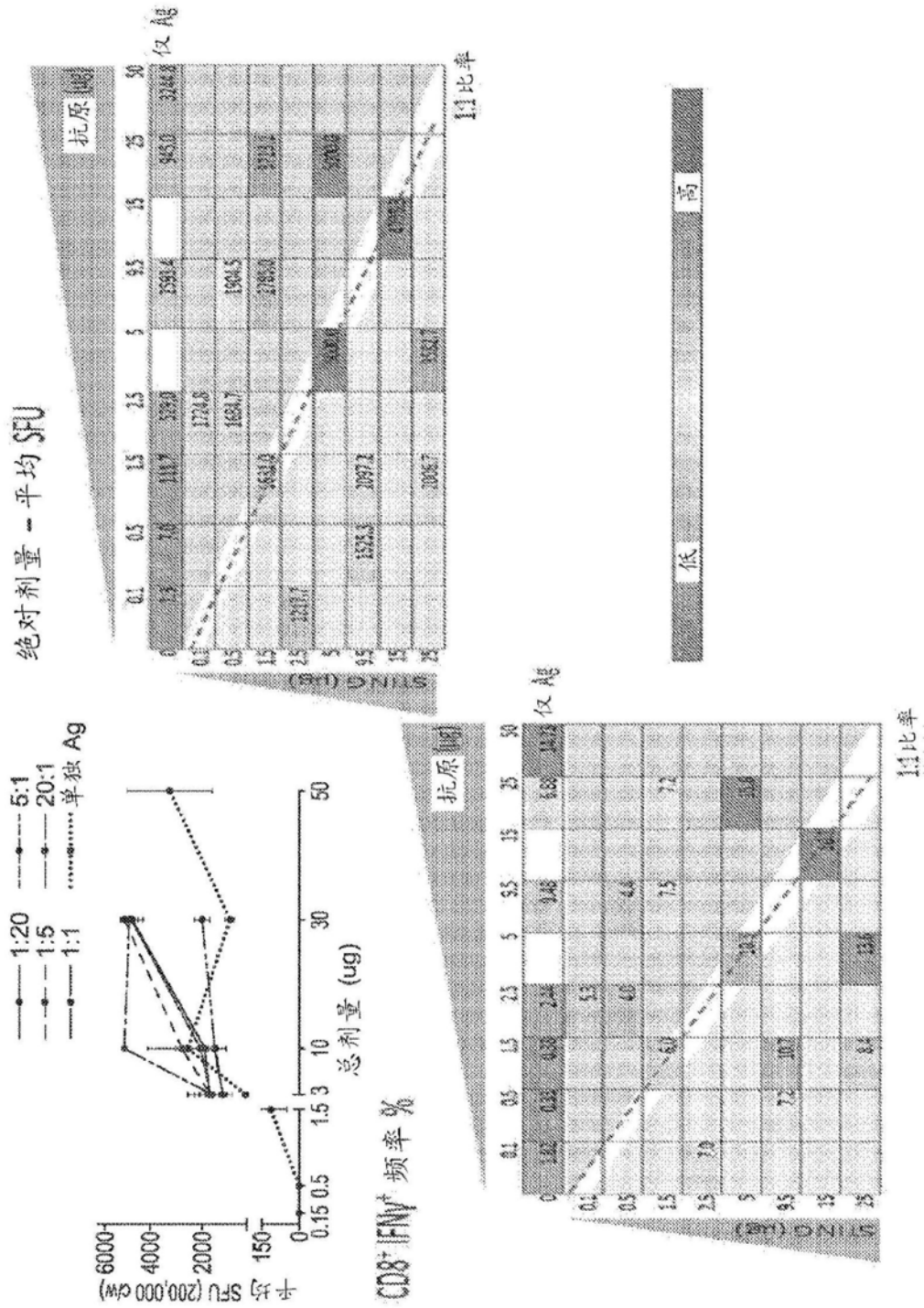


图8

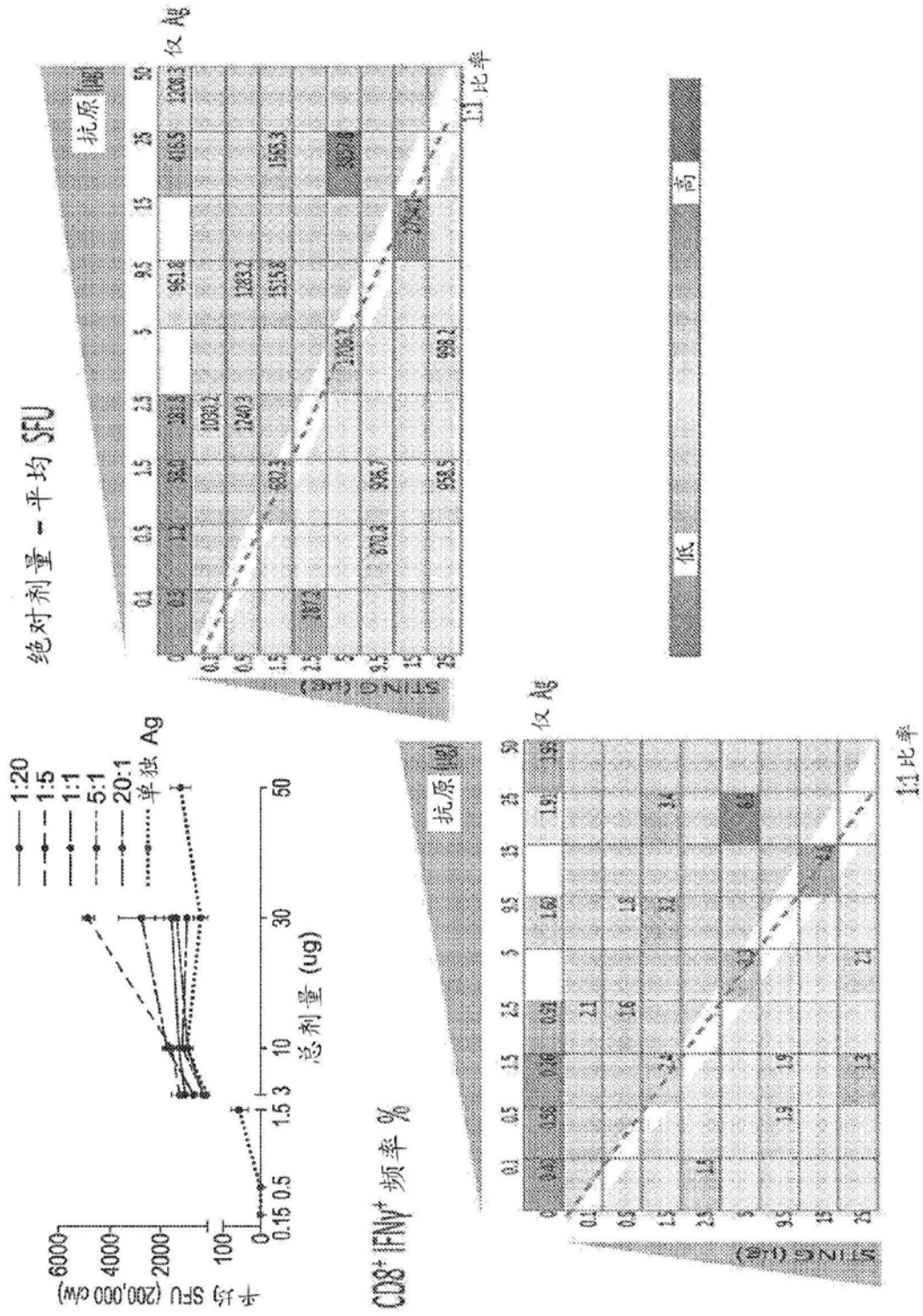


图9

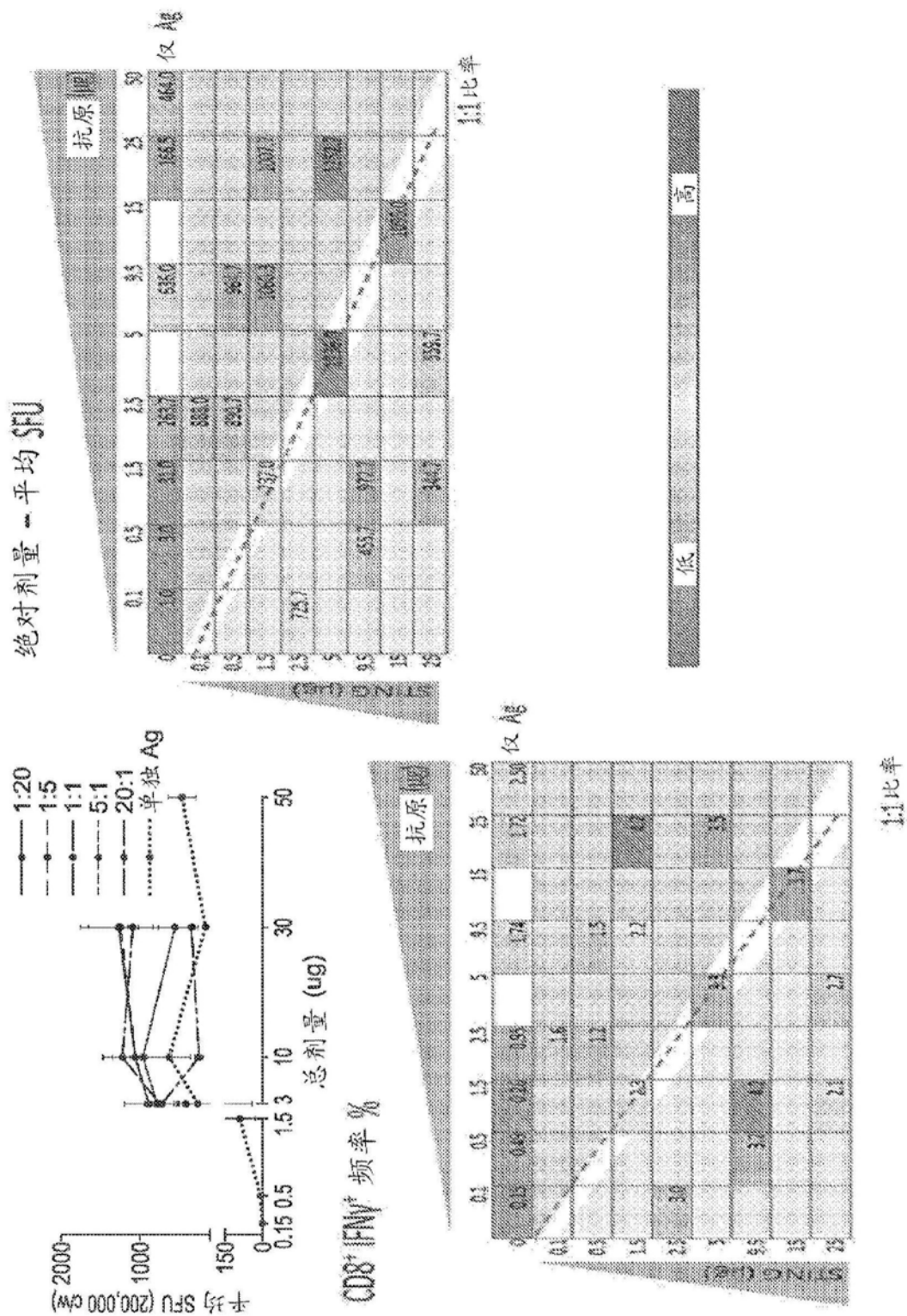


图10

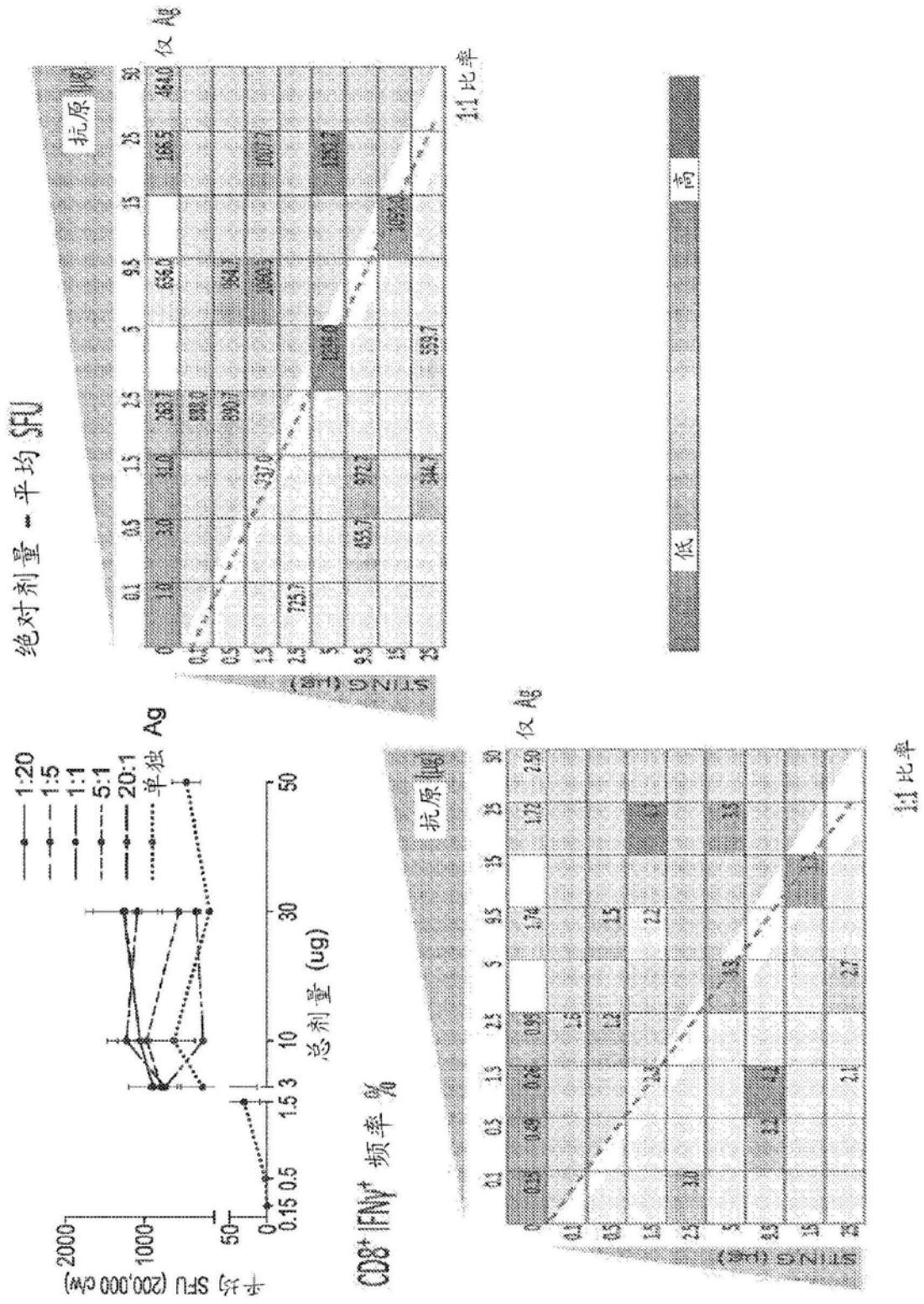


图11

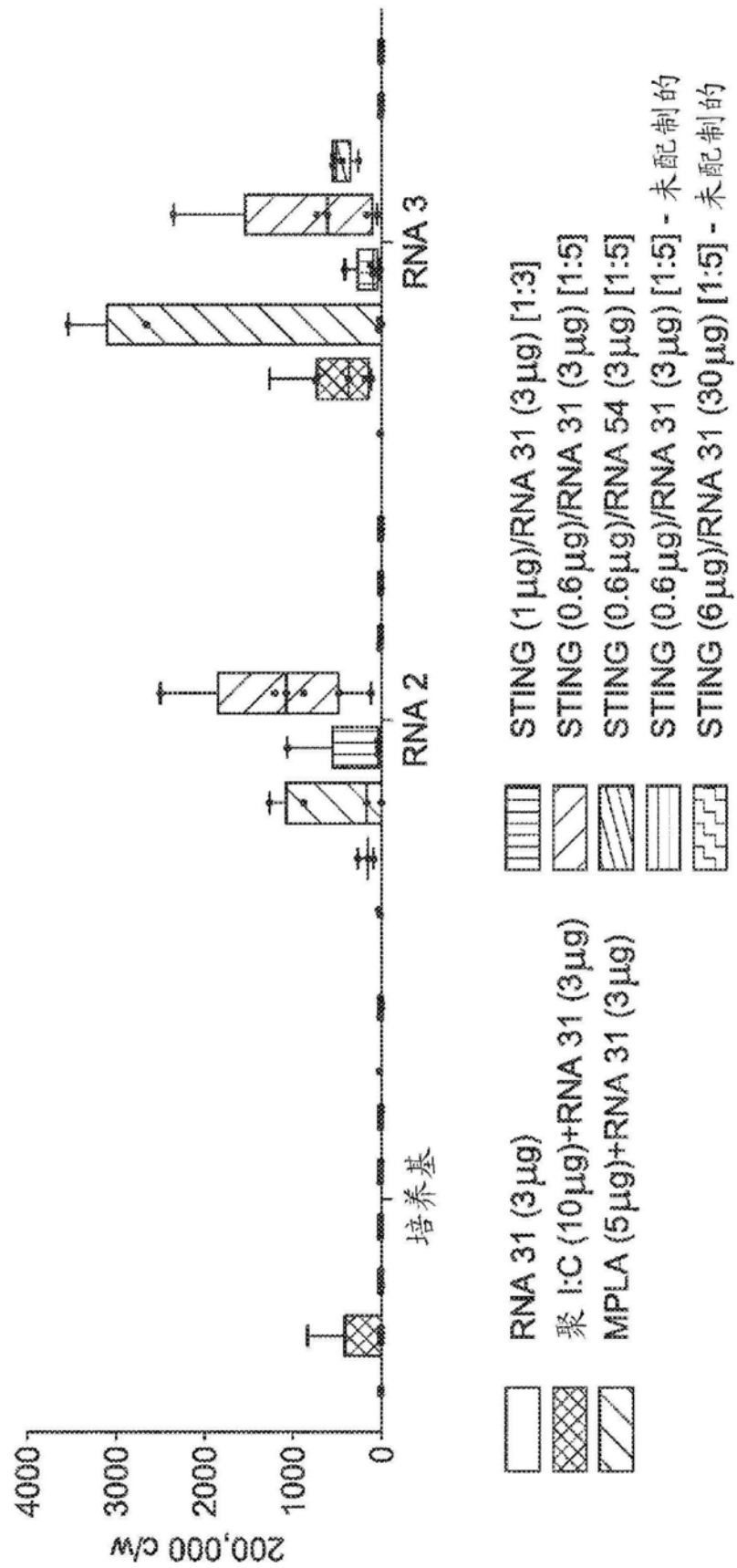


图12

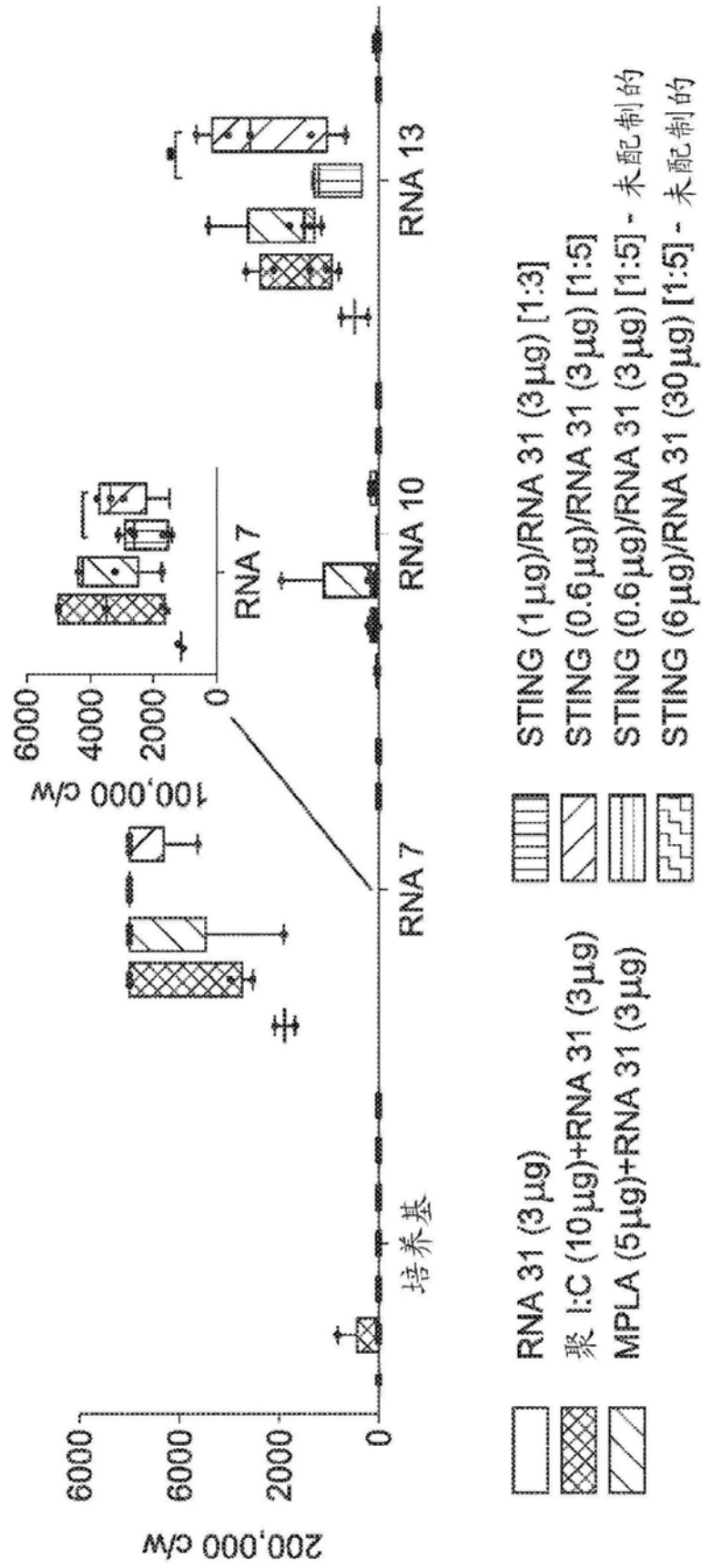


图13

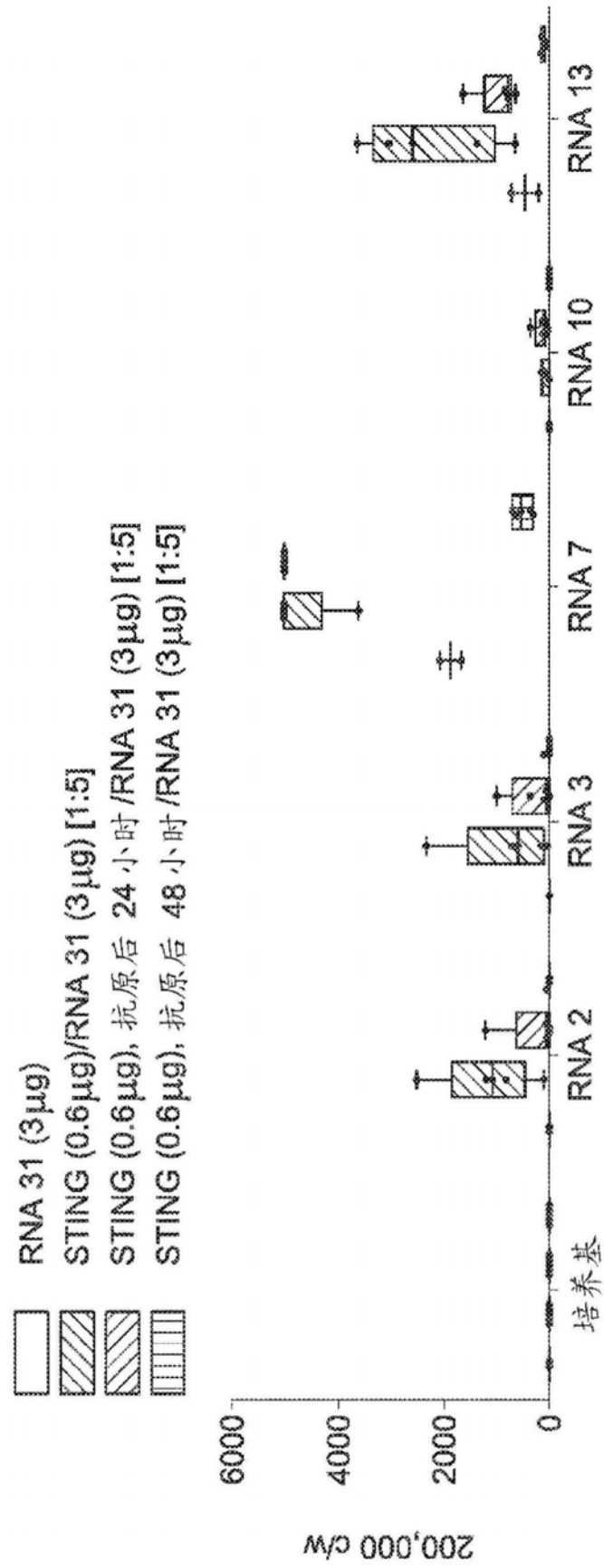


图14

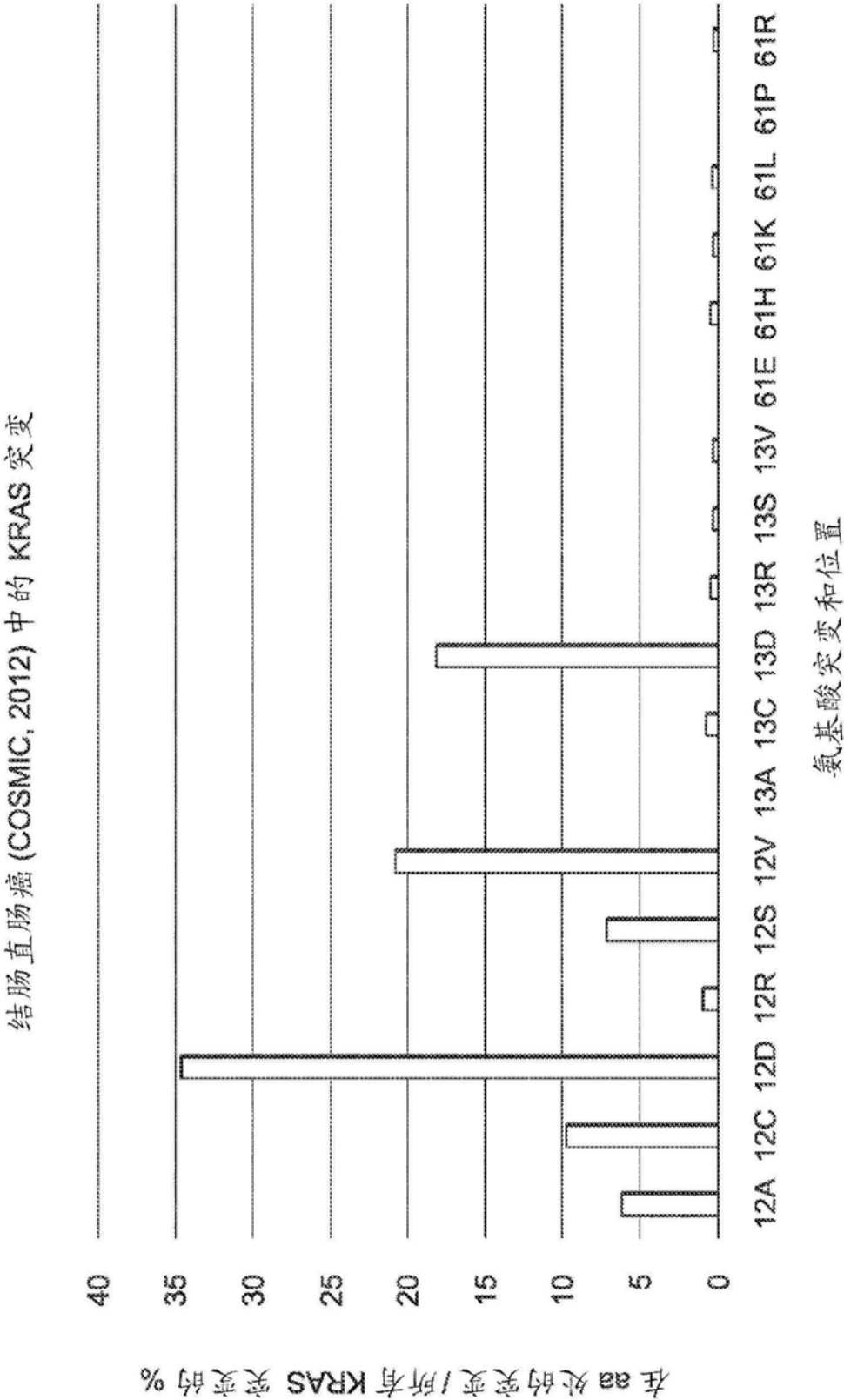


图15

| HRAS | | 结肠 12: GGC | | | | | | | | | | 结肠 13: GGT | | | | | | | | | | 结肠 61: CAG | | | | | | | | | |
|------|-------------|------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------------|-----|-----|------|-----|-----|----|-----|-----|--|------------|--|--|--|--|--|--|--|--|--|
| 原发组织 | 癌症 | -C- | T- | A- | C- | A- | T- | C- | T- | A- | C- | A- | T- | G- | -C/T | A- | T- | C- | -G- | 总计 | | | | | | | | | | | |
| | | 12A | 12C | 12D | 12R | 12S | 12V | 13A | 13C | 13D | 13R | 13S | 61H | 61K | 61L | 61P | 61R | | | | | | | | | | | | | | |
| 前列腺 | 腺癌 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 18 | 0 | 3 | 29 | | | | | | | | | | | |
| | 腺癌 | 0 | 0 | 1 | 4 | 1 | 8 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6 | 23 | | | | | | | | | | | |
| | 良性黑色素细胞癌 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 20 | 0 | 11 | 35 | | | | | | | | | | | |
| 皮肤 | 癌 | 0 | 2 | 2 | 0 | 0 | 24 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 3 | 0 | 0 | 35 | | | | | | | | | | | |
| | 恶性黑色素瘤 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 2 | 3 | 0 | 2 | 11 | | | | | | | | | | | |
| | 腺癌 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 14 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 14 | | | | | | | | | | | |
| 甲状腺 | 腺瘤-结节-甲状腺腺瘤 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 19 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 4 | 0 | 1 | 16 | 41 | | | | | | | | | | | |
| | 癌 | 2 | 2 | 2 | 1 | 2 | 19 | 0 | 2 | 3 | 6 | 0 | 0 | 0 | 2 | 10 | 1 | 1 | 23 | 76 | | | | | | | | | | | |
| | 膀胱癌 | 0 | 4 | 9 | 0 | 6 | 90 | 0 | 3 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6 | 6 | 0 | 9 | 138 | | | | | | | | | | | |
| 尿路 | 膀胱癌 | 0 | 4 | 9 | 0 | 6 | 90 | 0 | 3 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6 | 6 | 0 | 9 | 138 | | | | | | | | | | | |
| | 上消化呼吸道 | 0 | 5 | 3 | 2 | 24 | 14 | 0 | 1 | 3 | 4 | 1 | 4 | 0 | 3 | 0 | 3 | 0 | 9 | 76 | | | | | | | | | | | |
| 总计 | | 2 | 13 | 17 | 8 | 34 | 191 | 0 | 6 | 8 | 19 | 1 | 7 | 0 | 14 | 23 | 54 | 2 | 79 | 478 | | | | | | | | | | | |

图16

| KRAS | 原生组织 | 癌症 | 结肠 12: GGT | | | | | | | | | | 结肠 13: GGC | | | | | | | | | | 结肠 61: CAA | | | | | | | | | |
|-------|----------|----------|------------|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------------|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|--|--|------------|--|--|--|--|--|--|--|--|--|
| | | | -C- | T- | A- | C- | A- | T- | -C- | T- | A- | C- | A- | T- | G- | -C/T | A- | T- | C- | G- | | | | | | | | | | | | |
| | | | 12A | 12C | 12D | 12R | 12S | 12V | 13A | 13C | 13D | 13R | 13S | 13V | 61E | 61H | 61K | 61L | 61P | 61R | | | | | | | | | | | | |
| 胆道 | 胆管癌 | 胆管癌 | 14 | 29 | 107 | 6 | 30 | 49 | 0 | 5 | 12 | 0 | 1 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | | | | | | | | | |
| | | 癌 | 0 | 5 | 60 | 9 | 12 | 10 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | | | | | | | | | |
| | 结肠直肠 | 腺癌 | 107 | 184 | 635 | 18 | 133 | 364 | 0 | 10 | 338 | 6 | 3 | 3 | 0 | 5 | 1 | 4 | 0 | 1 | | | | | | | | | | | | |
| | | 直肠癌 | 37 | 45 | 178 | 4 | 33 | 124 | 0 | 6 | 88 | 4 | 0 | 3 | 0 | 5 | 0 | 3 | 0 | 2 | | | | | | | | | | | | |
| 子宫内膜 | 癌 | 癌 | 39 | 26 | 121 | 3 | 12 | 68 | 2 | 4 | 26 | 0 | 1 | 1 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | | | | | | | | | |
| | | 造血肿瘤 | 8 | 4 | 38 | 2 | 10 | 12 | 0 | 0 | 25 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 1 | 2 | 0 | 0 | | | | | | | | | | | | |
| | H/L | 淋巴瘤 | 19 | 7 | 43 | 4 | 10 | 10 | 0 | 0 | 48 | 0 | 1 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 3 | 0 | | | | | | | | | | | | |
| | | 腺癌 | 106 | 545 | 222 | 27 | 59 | 279 | 1 | 43 | 31 | 1 | 1 | 1 | 0 | 11 | 1 | 5 | 0 | 2 | | | | | | | | | | | | |
| 支气管肺泡 | 腺癌 | 腺癌 | 6 | 42 | 38 | 3 | 4 | 33 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | | | | | | | | | | |
| | | 非小细胞癌 | 34 | 283 | 113 | 14 | 30 | 112 | 0 | 23 | 20 | 1 | 1 | 1 | 1 | 6 | 4 | 1 | 1 | 5 | | | | | | | | | | | | |
| | 鳞状细胞癌 | 癌 | 3 | 25 | 26 | 5 | 6 | 10 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 3 | 0 | 1 | 0 | 1 | 2 | | | | | | | | | | | | |
| | | 癌 | 25 | 20 | 171 | 12 | 3 | 150 | 4 | 4 | 17 | 0 | 0 | 3 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | | | | | | | | | |
| 卵巢 | 胰腺 | 导管癌 | 57 | 79 | 1312 | 312 | 67 | 812 | 0 | 1 | 13 | 0 | 2 | 0 | 0 | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | | | | | | | | | |
| | | 上皮内瘤变 | 0 | 3 | 10 | 1 | 0 | 12 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | | | | | | | | | |
| | 腺泡导管化生 | 腺癌 | 6 | 3 | 44 | 13 | 1 | 16 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | | | | | | | | | |
| | | 自身免疫性胰腺炎 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | | | | | | | | | |
| | 交界性肿瘤 | 慢性胰腺炎 | 0 | 2 | 11 | 2 | 0 | 6 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | | | | | | | | | |
| | | 慢性胰腺炎 | 0 | 6 | 42 | 8 | 5 | 21 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | | | | | | | | | |
| | 发育不良原位肿瘤 | 发育不良原位肿瘤 | 1 | 0 | 24 | 16 | 4 | 17 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | | | | | | | | | |

图17

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------|--------|-----|------|------|-----|-----|------|---|-----|-----|----|----|----|---|----|----|----|---|----|------|
| 前列腺 | 增生 | 0 | 7 | 32 | 18 | 4 | 16 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 81 |
| | | 0 | 9 | 13 | 1 | 2 | 35 | 0 | 0 | 15 | 0 | 6 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 1 | 84 |
| 皮肤 | 腺癌 | 0 | 2 | 1 | 0 | 1 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 11 |
| | | 0 | 0 | 3 | 2 | 1 | 8 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 3 | 0 | 1 | 20 |
| | 恶性黑色素瘤 | 4 | 8 | 25 | 0 | 4 | 10 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 55 |
| | | 20 | 8 | 63 | 1 | 8 | 22 | 0 | 3 | 20 | 0 | 11 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 2 | 161 |
| 甲状腺 | 腺癌 | 5 | 18 | 35 | 4 | 15 | 8 | 1 | 1 | 22 | 2 | 10 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 3 | 4 | 129 |
| | | 4 | 4 | 4 | 2 | 4 | 3 | 0 | 0 | 3 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 27 |
| 尿路 | 膀胱癌 | 1 | 3 | 3 | 1 | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 16 |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 上消化呼吸道 | 口 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 总计 | | 496 | 1367 | 3390 | 488 | 464 | 2219 | 8 | 103 | 686 | 16 | 39 | 15 | 5 | 56 | 12 | 20 | 8 | 21 | 9413 |

图17续

| NRAS | | 结肠 12: GGT | | | | | | | | | | 结肠 13: GGT | | | | | | | | | | 结肠 61: CAA | | | | | | | | | |
|--------|------------|------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------------|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|------|--|------------|--|--|--|--|--|--|--|--|--|
| 原生组织 | 癌症 | -C- | T- | A- | C- | A- | -T- | C- | T- | A- | C- | A- | -T- | G- | -C/T | A- | -T- | C- | G- | 总计 | | | | | | | | | | | |
| | | 12A | 12C | 12D | 12R | 12S | 12V | 13A | 13C | 13D | 13R | 13S | 13V | 61E | 61H | 61K | 61L | 61P | 61R | | | | | | | | | | | | |
| H/L | 造血肿瘤 | 22 | 32 | 185 | 8 | 56 | 31 | 12 | 14 | 93 | 29 | 3 | 29 | 2 | 28 | 24 | 20 | 6 | 29 | 623 | | | | | | | | | | | |
| | 淋巴性肿瘤 | 7 | 11 | 60 | 0 | 17 | 11 | 1 | 4 | 54 | 7 | 1 | 6 | 1 | 21 | 37 | 20 | 11 | 27 | 296 | | | | | | | | | | | |
| 皮肤 | 良性黑素细胞癌 | 0 | 2 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 55 | 1 | 0 | 35 | 99 | | | | | | | | | | | |
| | 癌 | 0 | 0 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 10 | | | | | | | | | | | |
| 甲状腺 | 恶性黑素瘤 | 2 | 2 | 28 | 5 | 8 | 2 | 1 | 0 | 14 | 12 | 0 | 16 | 1 | 24 | 273 | 64 | 2 | 301 | 755 | | | | | | | | | | | |
| | 腺瘤-结节-甲状腺肿 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 12 | 1 | 0 | 44 | 63 | | | | | | | | | | | |
| 上消化呼吸道 | 癌 | 0 | 7 | 2 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 | 32 | 9 | 0 | 182 | 240 | | | | | | | | | | | |
| | 喉 | 0 | 0 | 0 | 0 | 20 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 20 | | | | | | | | | | | |
| 总计 | | 31 | 55 | 284 | 13 | 101 | 46 | 15 | 20 | 163 | 49 | 5 | 52 | 5 | 82 | 433 | 115 | 19 | 618 | 2106 | | | | | | | | | | | |

图18

补充表 2. KRAS 评估。

| 患者 # | 基线 KRAS 状态 | | 循环突变型 KRAS 状态* | | 循环突变型 KRAS (片段/mL)* | | | | | | | 检测到继续性 KRAS 突变的 时间(周) | 从检测到继续性 KRAS 突变的 疾病进展的 时间(周) |
|------|------------|------------------------|-------------------------|-----|---------------------|-----|------|------|------|---------------|----|-----------------------|------------------------------|
| | 肿瘤 基因型 | 在基线处检测 到的突变型 KRAS 等位基因 | 检测到的继续 性循环突变型 KRAS 等位基因 | 第1周 | 第5周 | 第9周 | 第13周 | 第17周 | 第25周 | 随访 (第26至 52周) | | | |
| 1 | WT | NMD | G12V | NMD | NMD | NMD | NMD | 6 | 43 | 498 | 17 | 16 | |
| | | | G12C | NMD | NMD | NMD | NMD | 6 | 54 | 431 | | | |
| | | | G12A | NMD | NMD | NMD | NMD | 2 | 17 | 317 | | | |
| | | | G12R | NMD | NMD | NMD | NMD | NMD | 6 | 38 | | | |
| 2 | WT | NMD | NMD | NMD | NMD | NMD | NMD | NMD | NMD | NMD | | | |
| 3 | G12D | NMD | NMD | NMD | NMD | NMD | NMD | NMD | NMD | NMD | | | |
| 4 | WT | NMD | G12R | NMD | NMD | NMD | NMD | NMD | NMD | 4 | 34 | 并发 | |
| 5 | WT | NMD | G12D | NMD | NMD | NMD | NMD | NMD | NMD | 13 | 25 | 并发 | |
| 6 | WT | NMD | NMD | NMD | NMD | NMD | NMD | NMD | NMD | NMD | | | |
| 7 | WT | NMD | NMD | NMD | NMD | NMD | NMD | NMD | NMD | NMD | | | |
| 8 | G13D | G13D | NMD | 23 | NMD | 100 | 119 | | | 386 | | | |
| 9 | WT | NMD | NMD | NMD | NMD | NMD | NMD | NMD | NMD | NMD | | | |
| 10 | WT | NMD | G12V | NMD | 23 | 48 | 3 | 48 | 12 | 37 | 5 | 19 | |
| 11 | WT | NMD | NMD | NMD | NMD | NMD | NMD | NMD | NMD | NMD | | | |
| 12 | WT | NMD | G12C | NMD | NMD | NMD | NMD | NMD | 25 | 80 | 25 | 并发 | |
| | | | G12A | NMD | NMD | NMD | NMD | NMD | 5 | 20 | | | |
| 13 | WT | NMD | NMD | NMD | NMD | NMD | NMD | NMD | 0 | NMD | | | |
| 14 | WT | NMD | NMD | NMD | NMD | NMD | | NMD | 0 | NMD | | | |
| 15 | WT | NMD | G12V | NMD | NMD | NMD | NMD | NMD | NMD | 127 | 22 | 并发 | |
| 16 | WT | NMD | NMD | NMD | NMD | NMD | | NMD | NMD | NMD | | | |
| 17 | WT | NMD | NMD | NMD | NMD | NMD | NMD | NMD | NMD | NMD | | | |
| 18 | WT | NMD | NMD | NMD | NMD | NMD | NMD | NMD | NMD | NMD | | | |
| 19 | WT | NMD | NMD | NMD | NMD | NMD | NMD | NMD | NMD | NMD | | | |
| 20 | G13D | G13D | NMD | 411 | 148 | | 1216 | | | 2484 | | | |

图19

| | | | | | | | | | | | | |
|----|------|------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|
| 21 | WT | NMD | NMD | NMD | NMD | NMD | NMD | NMD | NMD | 16 | 18 | 开发 |
| 22 | WT | NMD | G12B | NMD | NMD | NMD | 24 | | | | 17 | 开发 |
| | | | G12C | NMD | NMD | NMD | 3 | | | | | |
| | | | G12A | NMD | NMD | NMD | 8 | | | | | |
| | | | G12D | NMD | NMD | NMD | 4 | | | | | |
| 23 | WT | NMD | NMD | NMD | NMD | NMD | NMD | NMD | NMD | NMD | | |
| 24 | WT | NMD | G12A | NMD | NMD | NMD | NMD | NMD | NMD | 3 | 26 | 29 |
| 25 | WT | NMD | NMD | NMD | NMD | NMD | NMD | NMD | NMD | | | |
| 26 | WT | NMD | NMD | NMD | NMD | NMD | NMD | NMD | NMD | NMD | NMD | |
| 27 | WT | NMD | NMD | NMD | NMD | NMD | NMD | NMD | NMD | NMD | NMD | |
| 28 | G12D | G12D | NMD | 810 | 618 | 808 | | | | 984 | NMD | |

*NMD = 在评价的样品中未检测到突变; 空白值表示在指定时间点不可获得的样品

图19续

| 抗 EGFR 抗性肿瘤 KRAS 突变状态 | | | |
|--------------------------|------------------|-------|---------------|
| 患者 ID | 突变 | 百分比 | 读段*/事件† |
| 1 | WT* | 0% | 0/12,123 |
| 2 | G13D* | 10% | 859/8,556 |
| 4 | G13D* | 5.9% | 461/7,764 |
| 5 | G13D* | 14.3% | 1,037/7,247 |
| 6 | G13D* | 8.6% | 651/7,577 |
| 7 | WT* | 0% | 0/17,142 |
| 8 | Q61H† | 17.3% | 5,960/190,200 |
| 9 | G12D† | 0.04% | 17/40,200 |
| | G13D† | 0.44% | 117/26,400 |
| 10 | WT† | 0% | 0/50,300 |
| 11 | WT†(扩增的 KRAS) | 0% | 0/30,400 |

图20

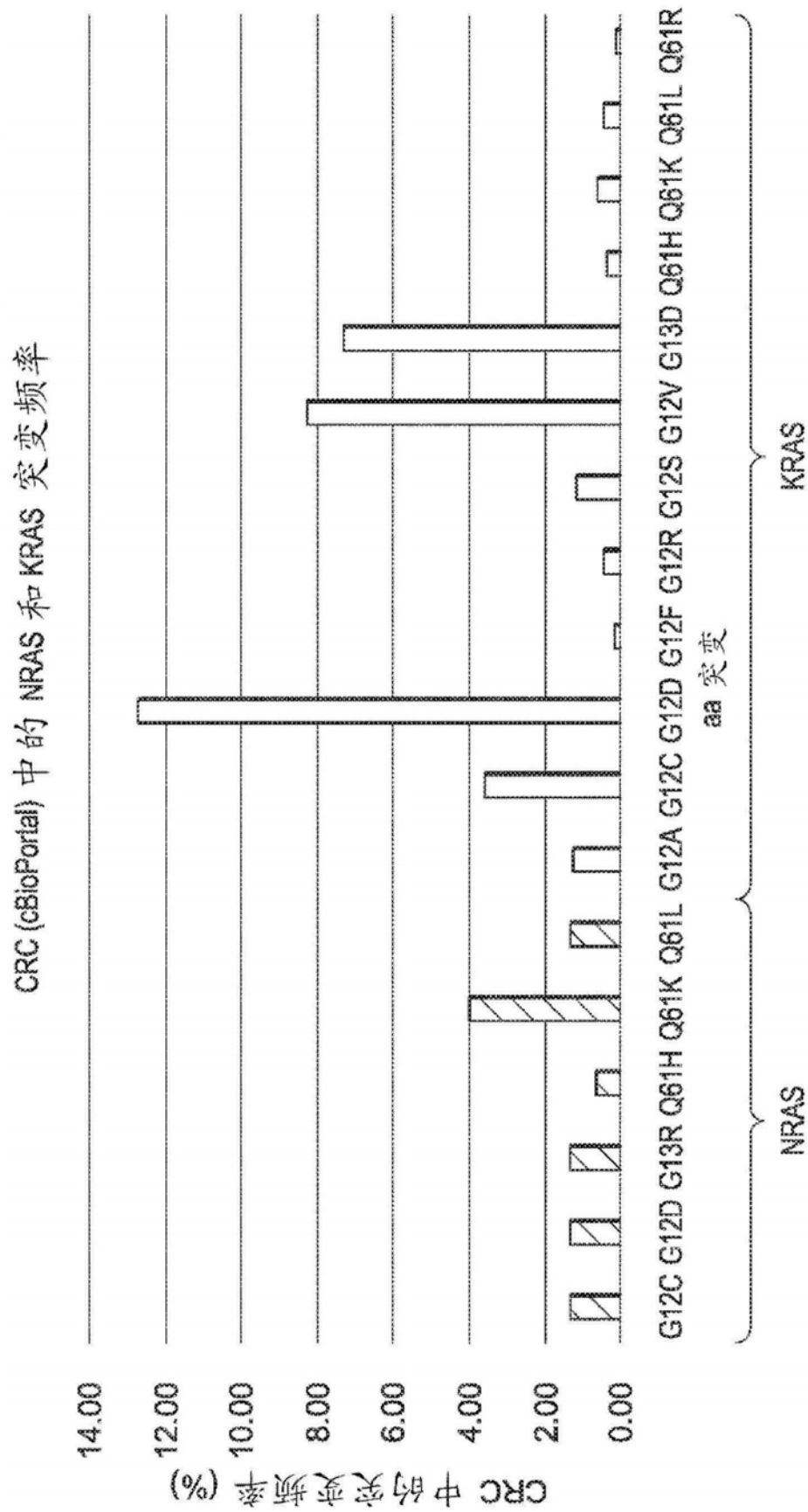


图21