(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 116249774 A
(43)申请公布日 2023.06.09

(21)申请号 202180048206.X
(22)申请日 2021.05.26
(30)优先权数据
63/030,056 2020.05.26 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2023.01.04
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2021/034131 2021.05.26
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2021/242793 EN 2021.12.02
(71)申请人 迪奥尼斯治疗公司
地址 美国马萨诸塞州
(72)发明人 E·F·弗里奇
(74)专利代理机构 北京市君合律师事务所 11517
专利代理师 吴瑜 吕学辰
(51)Int.Cl.
C12N 15/10(2006.01)

权利要求书15页 说明书40页 附图10页

(54)发明名称

核酸人工微型蛋白质组文库

(57)摘要

本文提供了核酸人工微型蛋白质组文库以及制备和使用此类文库的方法。

CN 116249774 A

1.一种从RNA转录物群体中富集框内编码区片段文库的方法,所述方法包括:

(a)将RNA转录物群体与嘌呤霉素标记的连接子多核苷酸连接,其中:

所述RNA转录物群体中的RNA转录物按5′至3′顺序各自包括:

(i)翻译起始位点,随后是不编码终止密码子的3个核苷酸的任何倍数;

(ii)RNA序列,所述RNA序列是从来自肿瘤的cDNA序列文库中的cDNA片段序列转录的;

(iii)编码多肽的核苷酸序列,所述编码多肽的核苷酸序列的长度为3个核苷酸的倍数,并且由起始于所述核苷酸序列的第一个5'核苷酸的阅读框编码,并且在所述阅读框中缺少框内终止密码子,但在另外两个阅读框中的每个阅读框中含有终止密码子;并且

所述嘌呤霉素标记的连接子多核苷酸各自包括3′嘌呤霉素分子,

其中RNA转录物的3′端与所述嘌呤霉素标记的连接子多核苷酸的5′端连接以产生嘌呤霉素标记的RNA转录物;

(b)对所述嘌呤霉素标记的RNA转录物进行体外翻译反应,其中对于每个嘌呤霉素标记的RNA片段,如果从嘌呤霉素标记的RNA转录物中的cDNA片段序列转录的RNA序列与所述翻译起始位点使用相同读框,在所述阅读框内没有终止密码子并且与所述编码多肽的核苷酸序列使用相同读框,那么所述嘌呤霉素将经翻译的多肽与所述嘌呤霉素标记的RNA转录物共价连接以形成多肽连接的RNA复合物;以及

(c)将所述多肽连接的RNA复合物与不处于此类复合物中的所述RNA转录物分离,由此从RNA转录物群体中富集框内编码区片段文库。

2.一种从RNA转录物群体中富集框内编码区片段文库的方法,所述方法包括:

(a)将RNA转录物群体与嘌呤霉素标记的连接子多核苷酸连接,其中:

所述RNA转录物群体中的RNA转录物按5′至3′顺序各自包括:

(i)翻译起始位点,随后是不编码终止密码子的3个核苷酸的任何倍数;

(ii)编码多肽的核苷酸序列,所述编码多肽的核苷酸序列的长度为3个核苷酸的倍数,并且由起始于所述核苷酸序列的第一个5'核苷酸的阅读框编码,并且在所述阅读框中缺少框内终止密码子;

(iii)RNA序列,所述RNA序列是从来自肿瘤的cDNA序列文库中的cDNA片段序列转录的;以及

(iv)衔接子序列,所述衔接子序列的长度为3个核苷酸的倍数,并且在起始于所述衔接子序列的第一个5'核苷酸的阅读框中缺少终止密码子,但在另外两个阅读框中含有终止密码子,

所述嘌呤霉素标记的连接子多核苷酸各自包括3′嘌呤霉素分子,

其中RNA转录物的3′端与所述嘌呤霉素标记的连接子多核苷酸的5′端连接以产生嘌呤霉素标记的RNA转录物;

(b)对所述嘌呤霉素标记的RNA转录物进行体外翻译反应,其中对于每个嘌呤霉素标记的RNA片段,如果从嘌呤霉素标记的RNA转录物中的cDNA片段序列转录的RNA序列与所述翻译起始位点使用相同读框,在所述阅读框内没有终止密码子并且与所述编码多肽的核苷酸序列使用相同读框,那么所述嘌呤霉素将经翻译的多肽与所述嘌呤霉素标记的RNA转录物共价连接以形成多肽连接的RNA复合物;以及

(c)将所述多肽连接的RNA复合物与不处于此类复合物中的所述RNA转录物分离,由此

从RNA转录物群体中富集框内编码区片段文库。

3.根据权利要求1或权利要求2所述的方法,其中所述RNA转录物群体通过以下与所述嘌呤霉素标记的连接子多核苷酸连接:

(a)使所述RNA转录物与夹板多核苷酸和所述嘌呤霉素标记的连接子多核苷酸接触,其中:

所述夹板多核苷酸按3′至5′顺序各自包括:

(I)与所述编码多肽的核苷酸序列的3'端互补的序列;以及

(II)连接子-靶序列,

所述嘌呤霉素标记的连接子多核苷酸按5′至3′顺序各自包括:

(1)与所述连接子-靶序列互补的序列;以及

(2)嘌呤霉素分子,并且

其中所述RNA转录物的所述编码多肽的核苷酸序列与所述与所述夹板多核苷酸的所述编码多肽的核苷酸序列的3'端互补的序列杂交,并且所述与所述连接子多核苷酸的所述连接子-靶序列互补的序列与所述夹板多核苷酸的连接子-靶序列杂交;

(b)进行连接反应以将所述RNA转录物的3′端与嘌呤霉素标记的DNA连接子的5′端连接,以便产生嘌呤霉素标记的RNA转录物。

4.根据权利要求3所述的方法,其中:

(i)夹板-靶序列是poly-dT序列,并且与所述夹板-靶序列互补的序列是poly-dA序列;或者

(ii)夹板-靶序列是poly-dA序列,并且与所述夹板-靶序列互补的序列是poly-dT序列。

5.根据权利要求1至4中任一项所述的方法,通过使用与由所述编码多肽的核苷酸序列编码的多肽结合的试剂亲和纯化所述多肽连接的RNA复合物,将所述多肽连接的RNA复合物与不处于此类复合物中的所述RNA转录物分离。

6.根据权利要求5所述的方法,其进一步包括对经纯化的多肽连接的RNA复合物进行RT-PCR扩增反应以产生包括所述cDNA片段序列的经扩增的DNA拷贝的扩增产物。

7.根据权利要求6所述的方法,其进一步包括将所述扩增产物插入到克隆载体中。

8.根据权利要求1至7中任一项所述的方法,其进一步包括在步骤(a)之前通过对RNA表达构建体文库进行转录反应来产生RNA转录物文库的步骤,其中每个RNA表达构建体包括:

(i)转录启动子;

(ii)翻译起始位点,随后是不编码终止密码子的3个核苷酸的任何倍数;

(iii)来自cDNA片段序列文库的cDNA片段序列;以及

(iv)编码多肽的核苷酸序列,所述编码多肽的核苷酸序列的长度为3个核苷酸的倍数,并且由起始于所述核苷酸序列的第一个5'核苷酸的阅读框编码,并且在所述阅读框中缺少框内终止密码子,但在另外两个阅读框中的每个阅读框中含有终止密码子。

9.根据权利要求8所述的方法,其中每个RNA表达构建体进一步包括衔接子序列,所述衔接子序列的长度为3个核苷酸的倍数,并且在起始于所述衔接子序列的第一个5'核苷酸的阅读框中缺少终止密码子,但在另外两个阅读框中含有终止密码子。

10.根据权利要求8或权利要求9所述的方法,其中所述cDNA片段序列文库富含含外显

子组的cDNA片段。

11.根据权利要求8至10中任一项所述的方法,其中所述cDNA片段序列文库富含含错配的cDNA片段序列。

12.根据权利要求8至11中任一项所述的方法,其中所述翻译起始位点包括夏因-达尔加诺序列(Shine-Dalgarno sequence)。

13.一种从来自肿瘤的细胞RNA片段群体中富集框内编码区片段文库的方法,所述方法包括:

(a)对细胞RNA片段群体进行链特异性随机引发的核酸扩增反应以产生cDNA片段群体;

(b)使所述cDNA片段群体与外显子组捕获探针接触,由此从所述cDNA片段群体中富集编码外显子组的cDNA片段,以产生外显子组富集的cDNA片段文库;

(c)产生包括以下的RNA表达构建体:(i)转录启动子;(ii)翻译起始位点,随后是不编码终止密码子的3个核苷酸的任何倍数;(iii)来自所述外显子组富集的cDNA片段文库的外显子组富集的cDNA片段之一;(v)编码多肽的核苷酸序列,所述编码多肽的核苷酸序列的长度为3个核苷酸的倍数,并且由起始于所述核苷酸序列的第一个5'核苷酸的阅读框编码,并且在所述阅读框中缺少框内终止密码子,但在另外两个阅读框中含有终止密码子;

(d)使用所述RNA表达构建体进行转录反应以产生RNA转录物文库,每个RNA转录物按5′至3′顺序包括:

(i)翻译起始位点,随后是不编码终止密码子的3个核苷酸的任何倍数;

(ii)RNA序列,所述RNA序列是从所述外显子组富集的cDNA片段文库中的cDNA片段序列转录的;

(iii)编码多肽的核苷酸序列,所述编码多肽的核苷酸序列的长度为3个核苷酸的倍数,并且由起始于所述核苷酸序列的第一个5'核苷酸的阅读框编码,并且在所述阅读框中缺少框内终止密码子,但在另外两个阅读框中的每个阅读框中含有终止密码子,

(e)将RNA转录物群体与嘌呤霉素标记的连接子多核苷酸连接,其中嘌呤霉素标记的连接子多核苷酸各自包括3′嘌呤霉素分子,并且RNA转录物的3′端与所述嘌呤霉素标记的连接子多核苷酸的5′端连接以产生嘌呤霉素标记的RNA转录物;

(f)对所述嘌呤霉素标记的RNA转录物进行体外翻译反应,其中对于每个嘌呤霉素标记的RNA片段,如果从嘌呤霉素标记的RNA转录物中的cDNA片段序列转录的RNA序列与所述翻译起始位点使用相同读框,在所述阅读框内没有终止密码子并且与所述编码多肽的核苷酸序列使用相同读框,那么所述嘌呤霉素将经翻译的多肽与所述嘌呤霉素标记的RNA转录物共价连接以形成多肽连接的RNA复合物;以及

(g)将所述多肽连接的RNA复合物与不处于此类复合物中的所述RNA转录物分离,由此从细胞RNA片段群体中富集框内编码区片段文库。

14.一种从来自肿瘤的细胞RNA片段群体中富集框内编码区片段文库的方法,所述方法包括:

(a)对细胞RNA片段群体进行链特异性随机引发的核酸扩增反应以产生cDNA片段群体;

(b)使所述cDNA片段群体与外显子组捕获探针接触,由此从所述cDNA片段群体中富集编码外显子组的cDNA片段,以产生外显子组富集的cDNA片段文库;

(c)产生包括以下的RNA表达构建体:(i)转录启动子;(ii)翻译起始位点,随后是不编

码终止密码子的3个核苷酸的任何倍数;(iii)编码多肽的核苷酸序列,所述编码多肽的核苷酸序列的长度为3个核苷酸的倍数,并且由起始于所述核苷酸序列的第一个5'核苷酸的阅读框编码,并且在所述阅读框中缺少框内终止密码子;(iv)来自所述外显子组富集的cDNA片段文库的外显子组富集的cDNA片段之一;以及(v)衔接子序列,所述衔接子序列的长度为3个核苷酸的倍数,并且在起始于所述衔接子序列的第一个5'核苷酸的所述阅读框中不含终止密码子,并且在其它阅读框中的每个阅读框中不含终止密码子;

(d)使用所述RNA表达构建体进行转录反应以产生RNA转录物文库,每个RNA转录物按5′至3′顺序包括:

(i)翻译起始位点,随后是不编码终止密码子的3个核苷酸的任何倍数;

(ii)编码多肽的核苷酸序列,所述编码多肽的核苷酸序列的长度为3个核苷酸的倍数,并且由起始于所述核苷酸序列的第一个5'核苷酸的阅读框编码,并且在所述阅读框中缺少框内终止密码子;

(iii)RNA序列,所述RNA序列是从所述外显子组富集的cDNA片段文库中的cDNA片段序列转录的;以及

(iv)衔接子序列,所述衔接子序列的长度为3个核苷酸的倍数,并且在起始于所述衔接子序列的第一个5'核苷酸的阅读框中不含终止密码子,并且在其它阅读框中的每个阅读框中不含终止密码子,

(e)将RNA转录物群体与嘌呤霉素标记的连接子多核苷酸连接,其中嘌呤霉素标记的连接子多核苷酸各自包括3′嘌呤霉素分子,并且RNA转录物的3′端与所述嘌呤霉素标记的连接子多核苷酸的5′端连接以产生嘌呤霉素标记的RNA转录物;

(f)对所述嘌呤霉素标记的RNA转录物进行体外翻译反应,其中对于每个嘌呤霉素标记的RNA片段,如果从嘌呤霉素标记的RNA转录物中的cDNA片段序列转录的RNA序列与所述翻译起始位点使用相同读框,在所述阅读框内没有终止密码子并且与所述编码多肽的核苷酸序列使用相同读框,那么所述嘌呤霉素将经翻译的多肽与所述嘌呤霉素标记的RNA转录物共价连接以形成多肽连接的RNA复合物;以及

(g)将所述多肽连接的RNA复合物与不处于此类复合物中的所述RNA转录物分离,由此从细胞RNA片段群体中富集框内编码区片段文库。

15.根据权利要求13或14所述的方法,其中所述RNA转录物群体通过以下与所述嘌呤霉素标记的连接子多核苷酸连接:

(a)使所述RNA转录物与夹板多核苷酸和所述嘌呤霉素标记的连接子多核苷酸接触,其中:

所述夹板多核苷酸按3′至5′顺序各自包括:

(I)与所述编码多肽的核苷酸序列的3'端互补的序列;以及

(II)连接子-靶序列,

所述嘌呤霉素标记的连接子多核苷酸按5′至3′顺序各自包括:

(1)与所述连接子-靶序列互补的序列;以及

(2)嘌呤霉素分子,并且

其中所述RNA转录物的所述编码多肽的核苷酸序列与所述与所述夹板多核苷酸的所述编码多肽的核苷酸序列的3'端互补的序列杂交,并且所述与所述连接子多核苷酸的所述连

接子-靶序列互补的序列与所述夹板多核苷酸的连接子-靶序列杂交；

(b)进行连接反应以将所述RNA转录物的3′端与嘌呤霉素标记的DNA连接子的5′端连接，以便产生嘌呤霉素标记的RNA转录物。

16.根据权利要求15所述的方法，其中：

(i)夹板-靶序列是poly-dT序列，并且与所述夹板-靶序列互补的序列是poly-dA序列；或者

(ii)夹板-靶序列是poly-dA序列，并且与所述夹板-靶序列互补的序列是poly-dT序列。

17.根据权利要求13至16中任一项所述的方法，其中步骤(b)进一步包括使所述cDNA片段群体与MutS蛋白接触，由此富集所述cDNA片段群体中的由于突变或单核苷酸多态性而含错配的cDNA片段。

18.根据权利要求13至16中任一项所述的方法，其中步骤(b)进一步包括使所述外显子组富集的cDNA片段文库与MutS蛋白接触，由此富集所述外显子组富集的cDNA片段文库中的由于突变或单核苷酸多态性而含错配的cDNA片段。

19.根据权利要求13至18中任一项所述的方法，其进一步包括由样品制备所述细胞RNA片段群体的步骤。

20.根据权利要求19所述的方法，其中所述样品是肿瘤样品、正常组织样品、患病组织样品、新鲜样品、冷冻样品和/或石蜡包埋(FFPE)样品。

21.根据权利要求20所述的方法，其中所述样品是石蜡包埋(FFPE)组织或肿瘤样品。

22.根据权利要求17至20中任一项所述的方法，其进一步包括从受试者获得所述样品。

23.根据权利要求13至22中任一项所述的方法，其中所述细胞RNA片段群体中的细胞RNA片段的长度介于150nt与250nt之间。

24.根据权利要求23所述的方法，其中所述细胞RNA片段群体中的细胞RNA片段的长度为约200nt。

25.根据权利要求13至24中任一项所述的方法，其中所述翻译起始位点包括夏因-达尔加诺序列。

26.根据权利要求1至25中任一项所述的方法，其中通过使用与由所述编码多肽的核苷酸序列编码的多肽结合的试剂亲和纯化所述多肽连接的RNA复合物，将所述多肽连接的RNA复合物与不处于此类复合物中的所述RNA转录物分离。

27.根据权利要求26所述的方法，其进一步包括对经纯化的多肽连接的RNA复合物文库进行RT-PCR扩增反应以产生包括所述cDNA片段序列的扩增产物。

28.根据权利要求27所述的方法，其进一步包括使所述扩增产物与MutS蛋白接触，由此富集所述扩增产物中的由于突变或单核苷酸多态性而含错配的cDNA片段。

29.根据权利要求27或28所述的方法，其进一步包括将所述扩增产物插入到载体中以产生包括所述cDNA片段序列的载体。

30.根据权利要求29所述的方法，其中所述载体是克隆载体。

31.根据权利要求29所述的方法，其中所述载体是表达载体。

32.根据权利要求29所述的方法，其中所述载体是疫苗编码载体。

33.根据权利要求32所述的方法，其进一步包括将所述疫苗编码载体插入到细菌中，并

且在使得所述细菌表达由所述疫苗编码载体编码的疫苗的条件下温育所述细菌。

34.根据权利要求32所述的方法,其进一步包括将所述疫苗编码载体插入到酵母中,并且在使得所述酵母表达由所述疫苗编码载体编码的疫苗的条件下温育所述酵母。

35.根据权利要求32所述的方法,其进一步包括使所述疫苗编码载体经受体外翻译反应,以产生由所述疫苗编码载体编码的疫苗。

36.根据权利要求29所述的方法,其进一步包括将所述载体转染或转导到哺乳动物细胞中,并且在使得所述哺乳动物细胞表达由所述载体编码的疫苗的条件下温育所述哺乳动物细胞。

37.根据权利要求36所述的方法,其中所述哺乳动物细胞是人细胞。

38.根据权利要求29所述的方法,其进一步包括将所述载体离体转染或转导到人细胞中,并且将所述人细胞递送到受试者。

39.根据权利要求38所述的方法,其中所述人细胞是从同一受试者或不同受试者中分离的原代T细胞或抗原呈递细胞。

40.根据权利要求29所述的方法,其进一步包括将所述载体递送到受试者,使得所述受试者表达由所述载体编码的疫苗。

41.根据权利要求38至40中任一项所述的方法,其中所述受试者是人。

42.一种经纯化的多肽连接的RNA复合物文库,其根据权利要求26所述的方法产生。

43.扩增产物,其根据权利要求27或28所述的方法产生。

44.载体,其根据权利要求29所述的方法产生。

45.根据权利要求44所述的载体,其中所述载体是克隆载体。

46.根据权利要求44所述的载体,其中所述载体是表达载体。

47.根据权利要求44所述的载体,其中所述载体是疫苗编码载体。

48.一种药物组合物,其包括根据权利要求43所述的扩增产物以及药学上可接受的载体。

49.一种药物组合物,其包括根据权利要求44至47中任一项所述的载体以及药学上可接受的载体。

50.一种产生肿瘤疫苗的方法,所述方法包括:

(a)由受试者的肿瘤样品产生细胞RNA片段;

(b)对所述RNA片段进行链特异性随机引发的核酸扩增反应以产生cDNA片段;

(c)使所述cDNA片段与外显子组捕获探针接触,由此从所述cDNA片段中富集编码外显子组的cDNA片段,以产生外显子组富集的cDNA片段文库;

(d)产生包括以下的RNA表达构建体:(i)转录启动子;(ii)翻译起始位点,随后是不编码终止密码子的3个核苷酸的任何倍数;(iii)来自所述外显子组富集的cDNA片段文库的外显子组富集的cDNA片段之一;(iv)编码多肽的核苷酸序列,所述编码多肽的核苷酸序列的长度为3个核苷酸的倍数,并且由起始于所述核苷酸序列的第一个5'核苷酸的阅读框编码,并且在所述阅读框中缺少框内终止密码子,但在另外两个阅读框中的每个阅读框中含有终止密码子;

(e)使用所述RNA表达构建体进行转录反应以产生RNA转录物文库,每个RNA转录物按5′至3′顺序包括:

(i)翻译起始位点,随后是不编码终止密码子的3个核苷酸的任何倍数;

(ii)RNA序列,所述RNA序列是从所述外显子组富集的cDNA片段文库中的cDNA片段序列转录的;

(iii)编码多肽的核苷酸序列,所述编码多肽的核苷酸序列的长度为3个核苷酸的倍数,并且由起始于所述核苷酸序列的第一个5'核苷酸的阅读框编码,并且在所述阅读框中缺少框内终止密码子,但在另外两个阅读框中的每个阅读框中含有终止密码子,

(f)将所述RNA转录物与嘌呤霉素标记的连接子多核苷酸连接,其中嘌呤霉素标记的连接子多核苷酸各自包括3′嘌呤霉素分子,并且RNA转录物的3′端与所述嘌呤霉素标记的连接子多核苷酸的5′端连接以产生嘌呤霉素标记的RNA转录物;

(g)对所述嘌呤霉素标记的RNA转录物进行体外翻译反应,其中对于每个嘌呤霉素标记的RNA片段,如果从嘌呤霉素标记的RNA转录物中的cDNA片段序列转录的RNA序列与所述翻译起始位点使用相同读框,在所述阅读框内没有终止密码子并且与所述编码多肽的核苷酸序列使用相同读框,那么所述嘌呤霉素将经翻译的多肽与所述嘌呤霉素标记的RNA转录物共价连接以形成多肽连接的RNA复合物;

(h)使用与由所述编码多肽的核苷酸序列编码的多肽结合的试剂亲和纯化所述多肽连接的RNA复合物,以产生经纯化的多肽连接的RNA复合物文库;

(i)对所述经纯化的多肽连接的RNA复合物文库进行扩增反应以产生包括所述cDNA片段序列的扩增产物;以及

(j)由步骤(i)的所述扩增产物中的一种或多种扩增产物产生肿瘤疫苗。

51.一种产生肿瘤疫苗的方法,所述方法包括:

(a)由受试者的肿瘤样品产生细胞RNA片段;

(b)对所述细胞RNA片段进行链特异性随机引发的核酸扩增反应以产生cDNA片段;

(c)使所述cDNA片段与外显子组捕获探针接触,由此从所述cDNA片段中富集编码外显子组的cDNA片段,以产生外显子组富集的cDNA片段文库;

(d)产生包括以下的RNA表达构建体:(i)转录启动子;(ii)翻译起始位点,随后是不编码终止密码子的3个核苷酸的任何倍数;(iii)编码多肽的核苷酸序列,所述编码多肽的核苷酸序列的长度为3个核苷酸的倍数,并且由起始于所述核苷酸序列的第一个5'核苷酸的阅读框编码,并且在所述阅读框中缺少框内终止密码子;(iv)来自所述外显子组富集的cDNA片段文库的外显子组富集的cDNA片段之一;以及(v)衔接子序列,所述衔接子序列的长度为3个核苷酸的倍数,并且在起始于所述衔接子序列的第一个5'核苷酸的阅读框中不含终止密码子,并且在其它阅读框中的每个阅读框中不含终止密码子;

(e)使用所述RNA表达构建体进行转录反应以产生RNA转录物文库,每个RNA转录物按5′至3′顺序包括:

(i)翻译起始位点,随后是不编码终止密码子的3个核苷酸的任何倍数;

(ii)编码多肽的核苷酸序列,所述编码多肽的核苷酸序列的长度为3个核苷酸的倍数,并且由起始于所述核苷酸序列的第一个5'核苷酸的阅读框编码,并且在所述阅读框中缺少框内终止密码子;

(iii)RNA序列,所述RNA序列是从所述外显子组富集的cDNA片段文库中的cDNA片段序列转录的;以及

(iv)衔接子序列,所述衔接子序列的长度为3个核苷酸的倍数,并且在起始于所述衔接子序列的第一个5'核苷酸的阅读框中不含终止密码子,并且在其它阅读框中的每个阅读框中不含终止密码子,

(f)将所述RNA转录物与嘌呤霉素标记的连接子多核苷酸连接,其中嘌呤霉素标记的连接子多核苷酸各自包括3′嘌呤霉素分子,并且RNA转录物的3′端与所述嘌呤霉素标记的连接子多核苷酸的5′端连接以产生嘌呤霉素标记的RNA转录物;

(g)对所述嘌呤霉素标记的RNA转录物进行体外翻译反应,其中对于每个嘌呤霉素标记的RNA片段,如果从嘌呤霉素标记的RNA转录物中的cDNA片段序列转录的RNA序列与所述翻译起始位点使用相同读框,在所述阅读框内没有终止密码子并且与所述编码多肽的核苷酸序列使用相同读框,那么所述嘌呤霉素将经翻译的多肽与所述嘌呤霉素标记的RNA转录物共价连接以形成多肽连接的RNA复合物;

(h)使用与由所述编码多肽的核苷酸序列编码的多肽结合的试剂亲和纯化所述多肽连接的RNA复合物,以产生经纯化的多肽连接的RNA复合物文库;

(i)对所述经纯化的多肽连接的RNA复合物文库进行扩增反应以产生包括所述cDNA片段序列的扩增产物;以及

(j)由步骤(i)的所述扩增产物中的一种或多种扩增产物产生肿瘤疫苗。

52.根据权利要求50或51所述的方法,其中所述RNA转录物群体通过以下与所述嘌呤霉素标记的连接子多核苷酸连接:

(a)使所述RNA转录物与夹板多核苷酸和所述嘌呤霉素标记的连接子多核苷酸接触,其中:

所述夹板多核苷酸按3′至5′顺序各自包括:

(I)与所述编码多肽的核苷酸序列的3'端互补的序列;以及

(II)连接子-靶序列,

所述嘌呤霉素标记的连接子多核苷酸按5′至3′顺序各自包括:

(1)与所述连接子-靶序列互补的序列;以及

(2)嘌呤霉素分子,并且

其中所述RNA转录物的所述编码多肽的核苷酸序列与所述与所述夹板多核苷酸的所述编码多肽的核苷酸序列的3'端互补的序列杂交,并且所述与所述连接子多核苷酸的所述连接子-靶序列互补的序列与所述夹板多核苷酸的连接子-靶序列杂交;

(b)进行连接反应以将所述RNA转录物的3′端与嘌呤霉素标记的DNA连接子的5′端连接,以便产生嘌呤霉素标记的RNA转录物。

53.根据权利要求52所述的方法,其中:

(i)夹板-靶序列是poly-dT序列,并且与所述夹板-靶序列互补的序列是poly-dA序列;或者

(ii)夹板-靶序列是poly-dA序列,并且与所述夹板-靶序列互补的序列是poly-dT序列。

54.根据权利要求50至53中任一项所述的方法,其中所述肿瘤样品是新鲜样品、冷冻样品和/或石蜡包埋(FFPE)样品。

55.根据权利要求54所述的方法,其中所述样品是石蜡包埋(FFPE)肿瘤样品。

56.根据权利要求50至55中任一项所述的方法，其进一步包括从受试者获得所述肿瘤样品。

57.根据权利要求50至56中任一项所述的方法，其中所述细胞RNA片段的长度介于150nt与250nt之间。

58.根据权利要求57所述的方法，其中所述细胞RNA片段的长度为约200nt。

59.根据权利要求50至58中任一项所述的方法，其中所述翻译起始位点包括夏因-达尔加诺序列。

60.根据权利要求50至59中任一项所述的方法，其进一步包括在步骤(j)之前，将所述扩增产物插入到疫苗编码载体中以产生包括所述cDNA片段序列的疫苗编码载体。

61.根据权利要求60所述的方法，其中步骤(j)包括将所述疫苗编码载体插入到细菌中，并且在使得所述细菌表达由所述疫苗编码载体编码的疫苗的条件下温育所述细菌。

62.根据权利要求60所述的方法，其中步骤(j)包括将所述疫苗编码载体插入到酵母中，并且在使得所述酵母表达由所述疫苗编码载体编码的疫苗的条件下温育所述酵母。

63.根据权利要求60所述的方法，其中步骤(j)包括使所述疫苗编码载体经受体外翻译反应，以产生由所述疫苗编码载体编码的疫苗。

64.根据权利要求60所述的方法，其中步骤(j)包括将所述疫苗编码载体转染或转导到哺乳动物细胞中，并且在使得所述哺乳动物细胞表达由所述疫苗编码载体编码的疫苗的条件下温育所述哺乳动物细胞。

65.根据权利要求64所述的方法，其中所述哺乳动物细胞是人细胞。

66.根据权利要求50至65中任一项所述的方法，其进一步包括将所述肿瘤疫苗施用于受试者。

67.根据权利要求60所述的方法，其中步骤(j)包括将所述疫苗编码载体转染或转导到人细胞中，并且将所述人细胞递送到受试者。

68.根据权利要求67所述的方法，其中所述人细胞是从同一受试者或不同受试者中分离的抗原呈递细胞。

69.根据权利要求60所述的方法，其中步骤(j)包括将所述疫苗编码载体递送到受试者，使得所述受试者表达由所述疫苗编码载体编码的疫苗。

70.根据权利要求66至69中任一项所述的方法，其中所述受试者是人。

71.一种治疗肿瘤的方法，所述方法包括将根据权利要求50至65中任一项所述的方法产生的所述肿瘤疫苗施用于有需要的受试者。

72.一种鉴定药物靶标的方法，所述方法包括将根据权利要求29产生的载体转染或转导到细胞，并且鉴定产生可选择表型的框内编码区片段。

73.根据权利要求72所述的方法，其中所述载体在体外或体内被转染或转导到细胞。

74.根据权利要求72或73所述的方法，其中所述框内编码区片段在具有所述可选择表型的细胞中富集或耗竭。

75.根据权利要求72至74中任一项所述的方法，其中所述框内编码区片段正向或负向改变细胞内通路。

76.根据权利要求72至75中任一项所述的方法，其中所述细胞是正常细胞，并且所述可选择表型是疾病表型。

77.一种从细胞RNA片段群体中富集框内编码区片段文库的方法,所述方法包括:

(a)对细胞RNA片段群体进行链特异性随机引发的核酸扩增反应以产生cDNA片段群体;

(b)使所述cDNA片段群体与外显子组捕获探针接触,由此从所述cDNA片段群体中富集编码外显子组的cDNA片段,以产生外显子组富集的cDNA片段文库;

(c)使所述外显子组富集的cDNA片段文库与MutS蛋白接触,由此富集所述外显子组富集的cDNA片段文库中的由于突变或单核苷酸多态性而含错配的cDNA片段;

(d)产生包括以下的RNA表达构建体:(i)转录启动子;(ii)翻译起始位点,随后是不编码终止密码子的3个核苷酸的任何倍数;(iii)来自所述外显子组富集的cDNA片段文库的外显子组富集的cDNA片段之一;(v)编码多肽的核苷酸序列,所述编码多肽的核苷酸序列的长度为3个核苷酸的倍数,并且由起始于所述核苷酸序列的第一个5'核苷酸的阅读框编码,并且在所述阅读框中缺少框内终止密码子,但在另外两个阅读框中含有终止密码子;

(e)使用所述RNA表达构建体进行转录反应以产生RNA转录物文库,每个RNA转录物按5′至3′顺序包括:

(i)翻译起始位点,随后是不编码终止密码子的3个核苷酸的任何倍数;

(ii)RNA序列,所述RNA序列是从所述外显子组富集的cDNA片段文库中的cDNA片段序列转录的;

(iii)编码多肽的核苷酸序列,所述编码多肽的核苷酸序列的长度为3个核苷酸的倍数,并且由起始于所述核苷酸序列的第一个5'核苷酸的阅读框编码,并且在所述阅读框中缺少框内终止密码子,但在另外两个阅读框中的每个阅读框中含有终止密码子,

(f)将所述RNA转录物与嘌呤霉素标记的连接子多核苷酸连接,其中嘌呤霉素标记的连接子多核苷酸各自包括3′嘌呤霉素分子,并且RNA转录物的3′端与所述嘌呤霉素标记的连接子多核苷酸的5′端连接以产生嘌呤霉素标记的RNA转录物;

(g)对所述嘌呤霉素标记的RNA转录物进行体外翻译反应,其中对于每个嘌呤霉素标记的RNA片段,如果从嘌呤霉素标记的RNA转录物中的cDNA片段序列转录的RNA序列与所述翻译起始位点使用相同读框,在所述阅读框内没有终止密码子与所述编码多肽的核苷酸序列使用相同读框,那么所述嘌呤霉素将经翻译的多肽与所述嘌呤霉素标记的RNA转录物共价连接以形成多肽连接的RNA复合物;以及

(h)将所述多肽连接的RNA复合物与不处于此类复合物中的所述RNA转录物分离,由此从RNA转录物群体中富集框内编码区片段文库。

78.一种从细胞RNA片段群体中富集框内编码区片段文库的方法,所述方法包括:

(a)对细胞RNA片段群体进行链特异性随机引发的核酸扩增反应以产生cDNA片段群体;

(b)使所述cDNA片段群体与外显子组捕获探针接触,由此从所述cDNA片段群体中富集编码外显子组的cDNA片段,以产生外显子组富集的cDNA片段文库;

(c)使所述外显子组富集的cDNA片段文库与MutS蛋白接触,由此富集所述外显子组富集的cDNA片段文库中的由于突变或单核苷酸多态性而含错配的cDNA片段;

(d)产生包括以下的RNA表达构建体:(i)转录启动子;(ii)翻译起始位点,随后是不编码终止密码子的3个核苷酸的任何倍数;(iii)编码多肽的核苷酸序列,所述编码多肽的核苷酸序列的长度为3个核苷酸的倍数,并且由起始于所述核苷酸序列的第一个5'核苷酸的阅读框编码,并且在所述阅读框中缺少框内终止密码子;(iv)来自所述外显子组富集的

cDNA片段文库的外显子组富集的cDNA片段之一;以及(v)衔接子序列,所述衔接子序列的长度为3个核苷酸的倍数,并且在起始于所述衔接子序列的第一个5'核苷酸的阅读框中不含终止密码子,并且在其它阅读框中的每个阅读框中不含终止密码子;

(e)使用所述RNA表达构建体进行转录反应以产生RNA转录物文库,每个RNA转录物按5′至3′顺序包括:

(i)翻译起始位点,随后是不编码终止密码子的3个核苷酸的任何倍数;

(ii)编码多肽的核苷酸序列,所述编码多肽的核苷酸序列的长度为3个核苷酸的倍数,并且由起始于所述核苷酸序列的第一个5'核苷酸的阅读框编码,并且在所述阅读框中缺少框内终止密码子;

(iii)RNA序列,所述RNA序列是从所述外显子组富集的cDNA片段文库中的cDNA片段序列转录的;以及

(iv)衔接子序列,所述衔接子序列的长度为3个核苷酸的倍数,并且在起始于所述衔接子序列的第一个5'核苷酸的阅读框中不含终止密码子,并且在其它阅读框中的每个阅读框中不含终止密码子,

(f)将所述RNA转录物与嘌呤霉素标记的连接子多核苷酸连接,其中嘌呤霉素标记的连接子多核苷酸各自包括3′嘌呤霉素分子,并且RNA转录物的3′端与所述嘌呤霉素标记的连接子多核苷酸的5′端连接以产生嘌呤霉素标记的RNA转录物;

(g)对所述嘌呤霉素标记的RNA转录物进行体外翻译反应,其中对于每个嘌呤霉素标记的RNA片段,如果从嘌呤霉素标记的RNA转录物中的cDNA片段序列转录的RNA序列与所述翻译起始位点使用相同读框,在所述阅读框内没有终止密码子与所述编码多肽的核苷酸序列使用相同读框,那么所述嘌呤霉素将经翻译的多肽与所述嘌呤霉素标记的RNA转录物共价连接以形成多肽连接的RNA复合物;以及

(h)将所述多肽连接的RNA复合物与不处于此类复合物中的所述RNA转录物分离,由此从RNA转录物群体中富集框内编码区片段文库。

79.根据权利要求77或78所述的方法,其中所述RNA转录物群体通过以下与所述嘌呤霉素标记的连接子多核苷酸连接:

(a)使所述RNA转录物与夹板多核苷酸和所述嘌呤霉素标记的连接子多核苷酸接触,其中:

所述夹板多核苷酸按3′至5′顺序各自包括:

(I)与所述编码多肽的核苷酸序列的3'端互补的序列;以及

(II)连接子-靶序列,

所述嘌呤霉素标记的连接子多核苷酸按5′至3′顺序各自包括:

(1)与所述连接子-靶序列互补的序列;以及

(2)嘌呤霉素分子,并且

其中所述RNA转录物的所述编码多肽的核苷酸序列与所述与所述夹板多核苷酸的所述编码多肽的核苷酸序列的3'端互补的序列杂交,并且所述与所述连接子多核苷酸的所述连接子-靶序列互补的序列与所述夹板多核苷酸的连接子-靶序列杂交;

(b)进行连接反应以将所述RNA转录物的3′端与嘌呤霉素标记的DNA连接子的5′端连接,以便产生嘌呤霉素标记的RNA转录物。

80.根据权利要求79所述的方法,其中:

(i)夹板-靶序列是poly-dT序列,并且与所述夹板-靶序列互补的序列是poly-dA序列;或者

(ii)夹板-靶序列是poly-dA序列,并且与所述夹板-靶序列互补的序列是poly-dT序列。

81.一种从细胞RNA片段群体中富集框内编码区片段文库的方法,所述方法包括:

(a)对细胞RNA片段群体进行链特异性随机引发的核酸扩增反应以产生cDNA片段群体;

(b)将所述cDNA片段群体插入到克隆载体中以产生DNA构建体文库,其中每个DNA构建体按5'至3'顺序包括:

(i)启动子;

(ii)翻译起始位点,随后是不编码终止密码子的3个核苷酸的任何倍数;

(iii)编码多肽的核苷酸序列,所述编码多肽的核苷酸序列的长度为3个核苷酸的倍数,并且由起始于所述核苷酸序列的第一个5'核苷酸的阅读框编码,并且在所述阅读框中缺少框内终止密码子;

(iv)所述cDNA片段群体中的一个cDNA片段;以及

(v)编码膜呈递蛋白的序列;

(c)将所述DNA构建体文库转化到细胞中;

(d)在使得所述细胞表达所述DNA构建体的条件下温育所述细胞;

(e)使用与由所述编码多肽的核苷酸序列编码的多肽结合的试剂亲和纯化表达完全融合蛋白的细胞,所述融合蛋白包括由所述编码多肽的核苷酸序列编码的多肽、由所述cDNA片段编码的多肽和所述膜呈递蛋白;

(f)通过PCR扩增从经纯化的细胞中回收框内cDNA片段序列,由此从细胞RNA片段群体中富集框内编码区片段文库。

82.根据权利要求81所述的方法,其中所述细胞是细菌。

83.根据权利要求81或82所述的方法,其中所述细胞中的所述DNA构建体的表达是能诱导的。

84.根据权利要求81至83中任一项所述的方法,其中所述编码膜呈递蛋白的序列编码AIDA。

85.根据权利要求81至84中任一项所述的方法,其中所述步骤(a)进一步包括使所述cDNA片段群体与外显子组捕获探针接触,由此从所述cDNA片段群体中富集编码外显子组的cDNA片段,以产生外显子组富集的cDNA片段文库。

86.根据权利要求81至84中任一项所述的方法,其中所述步骤(a)进一步包括使所述cDNA片段群体与MutS蛋白接触,由此富集所述cDNA片段群体中的由于突变或单核苷酸多态性而含错配的cDNA片段。

87.根据权利要求85所述的方法,其中所述步骤(a)进一步包括使所述编码外显子组的cDNA片段文库与MutS蛋白接触,由此富集所述编码外显子组的cDNA片段文库中的由于突变或单核苷酸多态性而含错配的cDNA片段。

88.根据权利要求81至85中任一项所述的方法,其进一步包括使所述扩增产物与MutS蛋白接触,由此富集所述扩增产物中的由于突变或单核苷酸多态性而含错配的cDNA片段。

89.根据权利要求81至88中任一项所述的方法,其进一步包括由样品制备所述细胞RNA片段群体的步骤。

90.根据权利要求89所述的方法,其中所述样品是肿瘤样品、正常组织样品、患病组织样品、新鲜样品、冷冻样品和/或石蜡包埋(FFPE)样品。

91.根据权利要求90所述的方法,其中所述样品是石蜡包埋(FFPE)组织或肿瘤样品。

92.根据权利要求89至91中任一项所述的方法,其进一步包括从受试者获得所述样品。

93.根据权利要求81至92中任一项所述的方法,其中所述细胞RNA片段群体中的细胞RNA片段的长度介于150nt与250nt之间。

94.根据权利要求93所述的方法,其中所述细胞RNA片段群体中的细胞RNA片段的长度为约200nt。

95.根据权利要求81至94中任一项所述的方法,其中所述翻译起始位点包括夏因-达尔加诺序列。

96.根据权利要求81至95中任一项所述的方法,其进一步包括将所述扩增产物插入到载体中以产生包括所述cDNA片段序列的载体。

97.根据权利要求96所述的方法,其中所述载体是克隆载体。

98.根据权利要求96所述的方法,其中所述载体是表达载体。

99.根据权利要求96所述的方法,其中所述载体是疫苗编码载体。

100.根据权利要求99所述的方法,其进一步包括将所述疫苗编码载体插入到细菌中,并且在使得所述细菌表达由所述疫苗编码载体编码的疫苗的条件下温育所述细菌。

101.根据权利要求99所述的方法,其进一步包括将所述疫苗编码载体插入到酵母中,并且在使得所述酵母表达由所述疫苗编码载体编码的疫苗的条件下温育所述酵母。

102.根据权利要求99所述的方法,其进一步包括使所述疫苗编码载体经受体外翻译反应,以产生由所述疫苗编码载体编码的疫苗。

103.根据权利要求96所述的方法,其进一步包括将所述载体转染或转导到哺乳动物细胞中,并且在使得所述哺乳动物细胞表达由所述载体编码的疫苗的条件下温育所述哺乳动物细胞。

104.根据权利要求103所述的方法,其中所述哺乳动物细胞是人细胞。

105.根据权利要求96所述的方法,其进一步包括将所述载体离体转染或转导到人细胞中,并且将所述人细胞递送到受试者。

106.根据权利要求105所述的方法,其中所述人细胞是从同一受试者或不同受试者中分离的原代T细胞或抗原呈递细胞。

107.根据权利要求96所述的方法,其进一步包括将所述载体递送到受试者,使得所述受试者表达由所述载体编码的疫苗。

108.根据权利要求105至107中任一项所述的方法,其中所述受试者是人。

109.一种扩增产物,其根据权利要求81至95中任一项所述的方法产生。

110.载体,其根据权利要求96所述的方法产生。

111.根据权利要求110所述的载体,其中所述载体是克隆载体。

112.根据权利要求110所述的载体,其中所述载体是表达载体。

113.根据权利要求110所述的载体,其中所述载体是疫苗编码载体。

114.一种药物组合物,其包括根据权利要求109所述的扩增产物以及药学上可接受的载体。

115.一种药物组合物,其包括根据权利要求110至113中任一项所述的载体以及药学上可接受的载体。

116.一种产生肿瘤疫苗的方法,所述方法包括:

(a)由受试者的肿瘤样品产生细胞RNA片段;

(b)对所述RNA片段进行链特异性随机引发的核酸扩增反应以产生cDNA片段;

(c)将所述cDNA片段群体插入到克隆载体中以产生DNA构建体文库,其中每个DNA构建体按5'至3'顺序包括:

(i)启动子;

(ii)翻译起始位点,随后是不编码终止密码子的3个核苷酸的任何倍数;

(iii)编码多肽的核苷酸序列,所述编码多肽的核苷酸序列的长度为3个核苷酸的倍数,并且由起始于所述核苷酸序列的第一个5'核苷酸的阅读框编码,并且在所述阅读框中缺少框内终止密码子;

(iv)所述cDNA片段群体中的一个cDNA片段;以及

(v)编码膜呈递蛋白的序列;

(d)将所述DNA构建体文库转化到细胞中,

(e)在使得所述细胞表达所述DNA构建体的条件下温育所述细胞;

(f)使用与由所述编码多肽的核苷酸序列编码的多肽结合的试剂亲和纯化表达完全融合蛋白的细胞,所述融合蛋白包括由所述编码多肽的核苷酸序列编码的多肽、由所述cDNA片段编码的多肽和所述膜呈递蛋白;

(g)通过PCR扩增从经纯化的细胞中回收框内cDNA片段序列;

(h)由步骤(g)的扩增产物中的一种或多种扩增产物产生肿瘤疫苗。

117.根据权利要求116所述的方法,其中所述肿瘤样品是新鲜样品、冷冻样品和/或石蜡包埋(FFPE)样品。

118.根据权利要求117所述的方法,其中所述样品是石蜡包埋(FFPE)肿瘤样品。

119.根据权利要求116至118中任一项所述的方法,其进一步包括从受试者获得所述肿瘤样品。

120.根据权利要求116至119中任一项所述的方法,其中所述细胞RNA片段的长度介于150nt与250nt之间。

121.根据权利要求120所述的方法,其中所述细胞RNA片段的长度为约200nt。

122.根据权利要求116至121中任一项所述的方法,其中所述翻译起始位点包括夏因-达尔加诺序列。

123.根据权利要求116至122中任一项所述的方法,其进一步包括在步骤(h)之前,将所述扩增产物插入到疫苗编码载体中以产生包括所述cDNA片段序列的疫苗编码载体。

124.根据权利要求123所述的方法,其中步骤(h)包括将所述疫苗编码载体插入到细菌中,并且在使得所述细菌表达由所述疫苗编码载体编码的疫苗的条件下温育所述细菌。

125.根据权利要求123所述的方法,其中步骤(h)包括将所述疫苗编码载体插入到酵母中,并且在使得所述酵母表达由所述疫苗编码载体编码的疫苗的条件下温育所述酵母。

126.根据权利要求123所述的方法，其中步骤(h)包括使所述疫苗编码载体经受体外翻译反应，以产生由所述疫苗编码载体编码的疫苗。

127.根据权利要求123所述的方法，其中步骤(h)包括将所述疫苗编码载体转染或转导到哺乳动物细胞中，并且在使得所述哺乳动物细胞表达由所述疫苗编码载体编码的疫苗的条件下温育所述哺乳动物细胞。

128.根据权利要求127所述的方法，其中所述哺乳动物细胞是人细胞。

129.根据权利要求116至128中任一项所述的方法，其进一步包括将所述肿瘤疫苗施用于受试者。

130.根据权利要求123所述的方法，其中步骤(h)包括将所述疫苗编码载体转染或转导到人细胞中，并且将所述人细胞递送到受试者。

131.根据权利要求130所述的方法，其中所述人细胞是从同一受试者或不同受试者中分离的抗原呈递细胞。

132.根据权利要求123所述的方法，其中步骤(h)包括将所述疫苗编码载体递送到受试者，使得所述受试者表达由所述疫苗编码载体编码的疫苗。

133.根据权利要求129至132中任一项所述的方法，其中所述受试者是人。

134.一种治疗肿瘤的方法，所述方法包括将根据权利要求116至128中任一项所述的方法产生的所述肿瘤疫苗施用于有需要的受试者。

135.一种鉴定药物靶标的方法，所述方法包括将根据权利要求96产生的载体转染或转导到细胞，并且鉴定产生可选择表型的框内编码区片段。

136.根据权利要求135所述的方法，其中所述载体在体外或体内被转染或转导到细胞。

137.根据权利要求135或136所述的方法，其中所述框内编码区片段在具有所述可选择表型的细胞中富集或耗竭。

138.根据权利要求135至137中任一项所述的方法，其中所述框内编码区片段正向或负向改变细胞内通路。

139.根据权利要求135至138中任一项所述的方法，其中所述细胞是正常细胞，并且所述可选择表型是疾病表型。

140.根据权利要求1至139中任一项所述的方法、文库、扩增产物、载体或药物组合物，其中所述编码多肽的核苷酸序列的长度为至少18个核苷酸。

核酸人工微型蛋白质组文库

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2020年5月26日提交的美国临时专利申请序列号63/030,056的优先权权益,所述美国临时专利申请特此通过引用整体并入。

背景技术

[0003] 富含编码开放阅读框的序列的核酸人工微型蛋白质组文库的可用性将具有许多不同的潜在应用。例如,此类文库对于生产疫苗,并且具体地是癌症疫苗是有价值的。

[0004] 疫苗在治疗癌症方面有着悠久的历史。癌症疫苗通常由肿瘤抗原和免疫刺激分子(例如,细胞因子或TLR配体)组成,它们共同作用以激活识别和裂解肿瘤细胞的抗原特异性细胞毒性T细胞(CTL)。此类疫苗通常含有共有或患者特异性肿瘤抗原或全肿瘤细胞制剂。共有肿瘤抗原是免疫原性蛋白,在许多个体的肿瘤中选择性表达,并且通常作为合成肽、重组蛋白、RNA或DNA载体递送到患者。已经用于疫苗的患者特异性肿瘤抗原由具有肿瘤特异性突变的蛋白质组成,所述肿瘤特异性突变导致氨基酸序列改变。此类突变的蛋白质有可能:(a)独特地标记肿瘤(相对于非肿瘤细胞),以便被免疫系统识别和破坏;以及(b)避免中枢和有时外周T细胞耐受,并且从而被更有效、高亲合力的T细胞受体识别。全肿瘤细胞制剂含有肿瘤细胞中的所有潜在抗原,并且可以作为自体辐射细胞、细胞裂解物、细胞融合物、热休克蛋白制剂或总mRNA(或对应于总mRNA的cDNA/DNA载体)递送到患者。当从自体患者中分离出完整的肿瘤细胞时,所述细胞表达患者特异性肿瘤抗原以及共有肿瘤抗原。

[0005] 来自细胞的总mRNA已被用于制备基于总细胞蛋白质组的癌症疫苗。然而,此类mRNA样品经常会断裂,具体地是当它是从石蜡包埋(FFPE)样品中获得时。使用来自肿瘤细胞的断裂mRNA作为癌症疫苗的一个问题是,大多数RNA片段不在有效翻译的正确阅读框架内。因此,仍然需要富含可用于生产癌症疫苗的开放阅读框片段的改进的核酸微型蛋白质组文库。具体地,仍然需要制备改进的核酸微型蛋白质组文库,用于基于每个个体中的蛋白质组的组成制备个体疫苗。

发明内容

[0006] 本文提供了与制备核酸文库相关的组合物和方法,所述核酸文库从细胞的断裂RNA中富集含有框内编码区的序列。此类文库代表细胞的微型蛋白质组,使得所述文库中的核酸可以转移到合适的宿主细胞中以表达微型蛋白质组。在某些实施例中,此类微型蛋白质组核酸文库可用作肿瘤疫苗和/或用于制备肿瘤疫苗,具体地是由个体的肿瘤RNA制备的个体肿瘤疫苗。

[0007] 在某些方面,本文提供了从RNA转录物群体或从细胞RNA片段群体(例如,来自肿瘤)中富集框内编码区片段文库的方法。在一些方面,本文提供了产生肿瘤疫苗的方法或使用产生的肿瘤疫苗治疗患有肿瘤的患者的方法。在某些方面,本公开涉及经纯化的多肽连接的RNA复合物文库、扩增产物和载体,其包括富集的框内编码片段序列、肿瘤疫苗和其药物组合物。

[0008] 在某些方面，本文提供了一种从RNA转录物群体中富集框内编码区片段文库的方法，所述方法包括：(a)产生嘌呤霉素标记的RNA转录物群体，其中：所述嘌呤霉素标记的RNA转录物群体中的每个RNA转录物按5′至3′顺序包括：(i)翻译起始位点，随后是不编码终止密码子的3个核苷酸的任何倍数；(ii)RNA序列，所述RNA序列是从(例如，来自肿瘤)cDNA序列文库中的cDNA片段序列转录的；(iii)编码多肽的核苷酸序列，所述编码多肽的核苷酸序列的长度为3个核苷酸的倍数，并且由起始于所述核苷酸序列的第一个5’核苷酸的阅读框编码，并且在所述阅读框中缺少框内终止密码子，但在另外两个阅读框中的每个阅读框中含有终止密码子；并且其中每个RNA转录物的3′端与嘌呤霉素标记的DNA连接子的5′端连接；(b)对所述嘌呤霉素标记的RNA转录物进行体外翻译反应，其中对于每个嘌呤霉素标记的RNA片段，如果从嘌呤霉素标记的RNA转录物中的cDNA片段序列转录的RNA序列与所述翻译起始位点使用相同读框，在所述阅读框内没有终止密码子并且与所述编码多肽的核苷酸序列使用相同读框，那么所述嘌呤霉素将经翻译的多肽与所述嘌呤霉素标记的RNA转录物共价连接以形成多肽连接的RNA复合物；以及(c)将所述多肽连接的RNA复合物与不处于此类复合物中的所述RNA转录物分离，由此从RNA转录物群体中富集框内编码区片段文库。

[0009] 在某些实施例中，所述嘌呤霉素标记的RNA转录物群体通过以下产生：(a)使所述RNA转录物与夹板多核苷酸和嘌呤霉素标记的DNA连接子接触，其中：所述夹板多核苷酸按3′至5′顺序各自包括：(I)与所述编码多肽的核苷酸序列的3’端互补的序列；以及(II)poly-T序列，所述嘌呤霉素标记的DNA连接子按5′至3′顺序各自包括：(1)poly-dA序列；以及(2)嘌呤霉素分子，并且其中所述RNA转录物的所述编码多肽的核苷酸序列与所述与所述夹板多核苷酸的所述编码多肽的核苷酸序列的3’端互补的序列杂交，并且所述连接子多核苷酸的poly-dA序列与所述夹板多核苷酸的poly-T序列杂交；(b)进行连接反应以将所述RNA转录物的3′端与嘌呤霉素标记的DNA连接子的5′端连接，以便产生嘌呤霉素标记的RNA转录物。

[0010] 在某些方面，本文提供了一种从RNA转录物群体中富集框内编码区片段文库的方法，所述方法包括：(a)产生嘌呤霉素标记的RNA转录物群体，其中：所述嘌呤霉素标记的RNA转录物文库中的每个RNA转录物按5′至3′顺序包括：(i)翻译起始位点，随后是不编码终止密码子的3个核苷酸的任何倍数；(ii)编码多肽的核苷酸序列，所述编码多肽的核苷酸序列的长度为3个核苷酸的倍数，并且由起始于所述核苷酸序列的第一个5’核苷酸的阅读框编码，并且在所述阅读框中缺少框内终止密码子；(iii)RNA序列，所述RNA序列是从(例如，来自肿瘤的)cDNA序列文库中的cDNA片段序列转录的；以及(iv)衔接子序列，所述衔接子序列的长度为3个核苷酸的倍数，并且在起始于所述衔接子序列的第一个5’核苷酸的阅读框中缺少终止密码子，但在另外两个阅读框中含有终止密码子，并且其中每个RNA转录物的3′端与嘌呤霉素标记的DNA连接子的5′端连接；(b)对所述嘌呤霉素标记的RNA转录物进行体外翻译反应，其中对于每个嘌呤霉素标记的RNA片段，如果从嘌呤霉素标记的RNA转录物中的cDNA片段序列转录的RNA序列与所述翻译起始位点使用相同读框，在所述阅读框内没有终止密码子并且如果所述RNA序列与所述编码多肽的核苷酸序列使用相同读框，那么所述嘌呤霉素将经翻译的多肽与所述嘌呤霉素标记的RNA转录物共价连接以形成多肽连接的RNA复合物；以及(c)将所述多肽连接的RNA复合物与不处于此类复合物中的所述RNA转录物分离，由此从RNA转录物群体中富集框内编码区片段文库。

[0011] 在某些实施例中,所述嘌呤霉素标记的RNA转录物群体通过以下产生:(a)使所述RNA转录物与夹板多核苷酸和嘌呤霉素标记的DNA连接子接触,其中:所述夹板多核苷酸按3′至5′顺序各自包括:(I)与所述衔接子序列互补的序列;以及(II)poly-T序列,所述嘌呤霉素标记的DNA连接子按5′至3′顺序各自包括:(1)poly-dA序列;以及(2)嘌呤霉素分子,并且其中所述RNA转录物的所述编码多肽的核苷酸序列与所述与所述夹板多核苷酸的所述衔接子序列互补的序列杂交,并且所述连接子多核苷酸的poly-dA序列与所述夹板多核苷酸的poly-T序列杂交;(b)进行连接反应以将所述RNA转录物的3′端与嘌呤霉素标记的DNA连接子的5′端连接,以便产生嘌呤霉素标记的RNA转录物。

[0012] 在一些实施例中,本文所描述的方法进一步包括在步骤(a)之前通过对RNA表达构建体文库进行转录反应来产生RNA转录物文库的步骤,其中每个RNA表达构建体包括:(i)转录启动子;(ii)翻译起始位点,随后是不编码终止密码子的3个核苷酸的任何倍数;(iii)来自cDNA片段序列文库的cDNA片段序列;以及(iv)编码多肽的核苷酸序列,所述编码多肽的核苷酸序列的长度为3个核苷酸的倍数,并且由起始于所述核苷酸序列的第一个5'核苷酸的阅读框编码,并且在所述阅读框中缺少框内终止密码子,但在另外两个阅读框中的每个阅读框中含有终止密码子。在某些实施例中,所述翻译起始位点包括夏因-达尔加诺序列(Shine-Dalgarno sequence)。

[0013] 在某些实施例中,每个RNA表达构建体进一步包括衔接子序列,所述衔接子序列的长度为3个核苷酸的倍数,并且在起始于所述衔接子序列的第一个5'核苷酸的阅读框中缺少终止密码子,但在另外两个阅读框中含有终止密码子。在一些实施例中,所述cDNA片段序列文库富含含外显子组的cDNA片段。在一些实施例中,所述cDNA片段序列文库富含含错配的cDNA片段序列。

[0014] 在某些方面,本文提供了一种从(例如,来自肿瘤的)细胞RNA片段群体中富集框内编码区片段文库的方法,所述方法包括:(a)对细胞RNA片段群体进行链特异性随机引发的核酸扩增反应以产生cDNA片段群体;(b)使所述cDNA片段群体与外显子组捕获探针接触,由此从所述cDNA片段群体中富集编码外显子组的cDNA片段,以产生外显子组富集的cDNA片段文库;(c)产生包括以下的RNA表达构建体:(i)转录启动子;(ii)翻译起始位点,随后是不编码终止密码子的3个核苷酸的任何倍数;(iii)来自所述外显子组富集的cDNA片段文库的外显子组富集的cDNA片段之一;(iv)编码多肽的核苷酸序列,所述编码多肽的核苷酸序列的长度为3个核苷酸的倍数,并且由起始于所述核苷酸序列的第一个5'核苷酸的阅读框编码,并且在所述阅读框中缺少框内终止密码子,但在另外两个阅读框中含有终止密码子;(d)使用所述RNA表达构建体进行转录反应以产生RNA转录物文库,每个RNA转录物按5′至3′顺序包括:(i)翻译起始位点,随后是不编码终止密码子的3个核苷酸的任何倍数;(ii)RNA序列,所述RNA序列是从所述外显子组富集的cDNA片段文库中的cDNA片段序列转录的;(iii)编码多肽的核苷酸序列,所述编码多肽的核苷酸序列的长度为3个核苷酸的倍数,并且由起始于所述核苷酸序列的第一个5'核苷酸的阅读框编码,并且在所述阅读框中缺少框内终止密码子,但在另外两个阅读框中的每个阅读框中含有终止密码子;(e)产生嘌呤霉素标记的RNA转录物群体,其中每个RNA转录物的3′端与嘌呤霉素标记的DNA连接子的5′端连接;(f)对所述嘌呤霉素标记的RNA转录物进行体外翻译反应,其中对于每个嘌呤霉素标记的RNA片段,如果从嘌呤霉素标记的RNA转录物中的cDNA片段序列转录的RNA序列与所述翻译起始位点

使用相同读框，在所述阅读框内没有终止密码子并且如果所述RNA序列与所述编码多肽的核苷酸序列使用相同读框，那么所述嘌呤霉素将经翻译的多肽与所述嘌呤霉素标记的RNA转录物共价连接以形成多肽连接的RNA复合物；以及(g)将所述多肽连接的RNA复合物与不处于此类复合物中的所述RNA转录物分离，由此从细胞RNA片段群体中富集框内编码区片段文库。在某些实施例中，所述翻译起始位点包括夏因-达尔加诺序列。

[0015] 在某些实施例中，所述嘌呤霉素标记的RNA转录物群体通过以下产生：(a)使所述RNA转录物与夹板多核苷酸和嘌呤霉素标记的DNA连接子接触，其中：所述夹板多核苷酸按3′至5′顺序各自包括：(I)与所述编码多肽的核苷酸序列的3’端互补的序列；以及(II)poly-T序列，所述嘌呤霉素标记的DNA连接子按5′至3′顺序各自包括：(1)poly-dA序列；以及(2)嘌呤霉素分子，并且其中所述RNA转录物的所述编码多肽的核苷酸序列与所述与所述夹板多核苷酸的所述编码多肽的核苷酸序列的3’端互补的序列杂交，并且所述连接子多核苷酸的poly-dA序列与所述夹板多核苷酸的poly-T序列杂交；(b)进行连接反应以将所述RNA转录物的3′端与嘌呤霉素标记的DNA连接子的5′端连接，以便产生嘌呤霉素标记的RNA转录物。

[0016] 在某些方面，本文提供了一种从(例如，来自肿瘤的)细胞RNA片段群体中富集框内编码区片段文库的方法，所述方法包括：(a)对细胞RNA片段群体进行链特异性随机引发的核酸扩增反应以产生cDNA片段群体；(b)使所述cDNA片段群体与外显子组捕获探针接触，由此从所述cDNA片段群体中富集编码外显子组的cDNA片段，以产生外显子组富集的cDNA片段文库；(c)产生包括以下的RNA表达构建体：(i)转录启动子；(ii)翻译起始位点，随后是不编码终止密码子的3个核苷酸的任何倍数；(iii)编码多肽的核苷酸序列，所述编码多肽的核苷酸序列的长度为3个核苷酸的倍数，并且由起始于所述核苷酸序列的第一个5’核苷酸的阅读框编码，并且在所述阅读框中缺少框内终止密码子；(iv)来自所述外显子组富集的cDNA片段文库的外显子组富集的cDNA片段之一；以及(v)衔接子序列，所述衔接子序列的长度为3个核苷酸的倍数，并且在起始于所述衔接子序列的第一个5’核苷酸的阅读框中不含终止密码子，并且在其它阅读框中的每个阅读框中不含终止密码子；(d)使用所述RNA表达构建体进行转录反应以产生RNA转录物文库，每个RNA转录物按5′至3′顺序包括：(i)翻译起始位点，随后是不编码终止密码子的3个核苷酸的任何倍数；(ii)编码多肽的核苷酸序列，所述编码多肽的核苷酸序列的长度为3个核苷酸的倍数，并且由起始于所述核苷酸序列的第一个5’核苷酸的阅读框编码，并且在所述阅读框中缺少框内终止密码子；(iii)RNA序列，所述RNA序列是从所述外显子组富集的cDNA片段文库中的cDNA片段序列转录的；以及(iv)衔接子序列，所述衔接子序列的长度为3个核苷酸的倍数，并且在起始于所述衔接子序列的第一个5’核苷酸的阅读框中不含终止密码子，并且在其它阅读框中的每个阅读框中不含终止密码子；(e)产生嘌呤霉素标记的RNA转录物群体，其中每个RNA转录物的3′端与嘌呤霉素标记的DNA连接子的5′端连接；(f)对所述嘌呤霉素标记的RNA转录物进行体外翻译反应，其中对于每个嘌呤霉素标记的RNA片段，如果从嘌呤霉素标记的RNA转录物中的cDNA片段序列转录的RNA序列与所述翻译起始位点使用相同读框，在所述阅读框内没有终止密码子并且如果所述RNA序列与所述编码多肽的核苷酸序列使用相同读框，那么所述嘌呤霉素将经翻译的多肽与所述嘌呤霉素标记的RNA转录物共价连接以形成多肽连接的RNA复合物；以及(g)将所述多肽连接的RNA复合物与不处于此类复合物中的所述RNA转录物分离，由此从细

胞RNA片段群体中富集框内编码区片段文库。在某些实施例中，所述翻译起始位点包括夏因-达尔加诺序列。

[0017] 在某些实施例中，所述嘌呤霉素标记的RNA转录物群体通过以下产生：(a)使所述RNA转录物与夹板多核苷酸和嘌呤霉素标记的DNA连接子接触，其中：所述夹板多核苷酸按3′至5′顺序各自包括：(I)与所述衔接子序列互补的序列；以及(II)poly-T序列，所述嘌呤霉素标记的DNA连接子按5′至3′顺序各自包括：(1)poly-dA序列；以及(2)嘌呤霉素分子，并且其中所述RNA转录物的所述编码多肽的核苷酸序列与所述与所述夹板多核苷酸的所述衔接子序列互补的序列杂交，并且所述连接子多核苷酸的poly-dA序列与所述夹板多核苷酸的poly-T序列杂交；(b)进行连接反应以将所述RNA转录物的3′端与嘌呤霉素标记的DNA连接子的5′端连接，以便产生嘌呤霉素标记的RNA转录物。

[0018] 在一些实施例中，本文所描述的从细胞RNA片段群体中富集框内编码区片段文库的方法的步骤(b)进一步包括使所述cDNA片段群体与MutS蛋白接触，由此富集所述cDNA片段群体中的由于突变或单核苷酸多态性而含错配的cDNA片段。在一些实施例中，本文所描述的从细胞RNA片段群体中富集框内编码区片段文库的方法的步骤(b)进一步包括使所述外显子组富集的cDNA片段文库与MutS蛋白接触，由此富集所述外显子组富集的cDNA片段文库中的由于突变或单核苷酸多态性而含错配的cDNA片段。

[0019] 在一些实施例中，本文所描述的从细胞RNA片段群体中富集框内编码区片段文库的方法进一步包括由样品制备细胞RNA片段群体的步骤。在一些实施例中，所述样品是肿瘤样品、正常组织样品、患病组织样品、新鲜样品、冷冻样品和/或石蜡包埋(FFPE)样品。在某些实施例中，所述样品是石蜡包埋(FFPE)组织或肿瘤样品。在一些实施例中，本文所描述的从细胞RNA片段群体中富集框内编码区片段文库的方法进一步包括从受试者(例如，癌症患者)获得所述样品。在一些实施例中，所述细胞RNA片段群体中的细胞RNA片段的长度介于150nt与250nt之间(例如，长度为约200nt)。

[0020] 在一些实施例中，通过使用与由所述编码多肽的核苷酸序列编码的多肽结合的试剂亲和纯化所述多肽连接的RNA复合物，将所述多肽连接的RNA复合物与不处于此类复合物中的所述RNA转录物分离。在一些实施例中，本文所描述的方法进一步包括对经纯化的蛋白质连接的RNA复合物进行RT-PCR扩增反应以产生包括所述cDNA片段序列的经扩增的DNA拷贝的扩增产物。在一些实施例中，本文所描述的方法进一步包括将所述扩增产物插入到载体(例如，克隆载体、表达载体或疫苗编码载体)中，以产生包括所述cDNA片段序列的载体。在某些实施例中，本文所描述的方法进一步包括使所述扩增产物与MutS蛋白接触，由此富集所述扩增产物中的由于突变或单核苷酸多态性而含错配的cDNA片段。

[0021] 在一些实施例中，本文所描述的方法进一步包括将所述疫苗编码载体插入到细菌中，并且在使得所述细菌表达由所述疫苗编码载体编码的疫苗的条件下温育所述细菌。在一些实施例中，本文所描述的方法进一步包括将所述疫苗编码载体插入到酵母中，并且在使得所述酵母表达由所述疫苗编码载体编码的疫苗的条件下温育所述酵母。在一些实施例中，本文所描述的方法进一步包括使所述疫苗编码载体经受体外翻译反应，以产生由所述疫苗编码载体编码的疫苗。在一些实施例中，本文所描述的方法进一步包括将所述载体转染或转导到哺乳动物细胞(例如，人细胞)中，并且在使得所述哺乳动物细胞表达由所述载体编码的疫苗的条件下温育所述哺乳动物细胞。在一些实施例中，本文所描述的方法进一

步包括将所述载体离体转染或转导到哺乳动物细胞(例如,人细胞)中,并且将所述哺乳动物细胞递送到受试者(例如,人,并且优选地是癌症患者)。在某些实施例中,所述哺乳动物细胞(例如,人细胞)是从同一受试者或不同受试者中分离的原代T细胞或抗原呈递细胞。在一些实施例中,本文所描述的方法进一步包括将所述载体递送到受试者(例如,人,优选地是癌症患者),使得所述受试者表达由所述载体编码的疫苗。

[0022] 在某些方面,本文提供了根据本文所描述的方法产生的经纯化的多肽连接的RNA复合物文库。

[0023] 在某些方面,本文提供了根据本文所描述的方法产生的扩增产物。

[0024] 在某些方面,本文提供了根据本文所描述的方法产生的载体(例如,克隆载体、表达载体或疫苗编码载体)。

[0025] 在某些方面,本文提供了一种药物组合物,其包括根据本文所描述的方法产生的扩增产物以及药学上可接受的载体。

[0026] 在某些方面,本文提供了一种药物组合物,其包括根据本文所描述的方法产生的载体以及药学上可接受的载体。

[0027] 在某些方面,本文提供了一种产生肿瘤疫苗的方法,所述方法包括:

[0028] (a)由受试者的肿瘤样品产生细胞RNA片段;(b)对所述RNA片段进行链特异性随机引发的核酸扩增反应以产生cDNA片段;(c)使所述cDNA片段与外显子组捕获探针接触,由此从所述cDNA片段中富集编码外显子组的cDNA片段,以产生外显子组富集的cDNA片段文库;(d)产生包括以下的RNA表达构建体:(i)转录启动子;(ii)翻译起始位点,随后是不编码终止密码子的3个核苷酸的任何倍数;(iii)来自所述外显子组富集的cDNA片段文库的外显子组富集的cDNA片段之一;(iv)编码多肽的核苷酸序列,所述编码多肽的核苷酸序列的长度为3个核苷酸的倍数,并且由起始于所述核苷酸序列的第一个5'核苷酸的阅读框编码,并且在所述阅读框中缺少框内终止密码子,但在另外两个阅读框中的每个阅读框中含有终止密码子;(e)使用所述RNA表达构建体进行转录反应以产生RNA转录物文库,每个RNA转录物按5′至3′顺序包括:(i)翻译起始位点,随后是不编码终止密码子的3个核苷酸的任何倍数;(ii)RNA序列,所述RNA序列是从所述外显子组富集的cDNA片段文库中的cDNA片段序列转录的;(iii)编码多肽的核苷酸序列,所述编码多肽的核苷酸序列的长度为3个核苷酸的倍数,并且由起始于所述核苷酸序列的第一个5'核苷酸的阅读框编码,并且在所述阅读框中缺少框内终止密码子,但在另外两个阅读框中的每个阅读框中含有终止密码子;(f)产生嘌呤霉素标记的RNA转录物群体,其中每个RNA转录物的3′端与嘌呤霉素标记的DNA连接子的5′端连接;(g)对所述嘌呤霉素标记的RNA转录物进行体外翻译反应,其中对于每个嘌呤霉素标记的RNA片段,如果从嘌呤霉素标记的RNA转录物中的cDNA片段序列转录的RNA序列与所述翻译起始位点使用相同读框,在所述阅读框内没有终止密码子并且如果所述RNA序列与所述编码多肽的核苷酸序列使用相同读框,那么所述嘌呤霉素将经翻译的多肽与所述嘌呤霉素标记的RNA转录物共价连接以形成多肽连接的RNA复合物;(h)使用与由所述编码多肽的核苷酸序列编码的多肽结合的试剂亲和纯化所述多肽连接的RNA复合物,以产生经纯化的多肽连接的RNA复合物文库;(i)对所述经纯化的多肽连接的RNA复合物文库进行扩增反应以产生包括所述cDNA片段序列的扩增产物;以及(j)由步骤(i)的所述扩增产物中的一种或多种扩增产物产生肿瘤疫苗。在某些实施例中,所述翻译起始位点包括夏因-达尔加诺序

列。

[0029] 在某些实施例中,所述嘌呤霉素标记的RNA转录物群体通过以下产生:(a)使所述RNA转录物与夹板多核苷酸和嘌呤霉素标记的DNA连接子接触,其中:所述夹板多核苷酸按3′至5′顺序各自包括:(I)与所述编码多肽的核苷酸序列的3'端互补的序列;以及(II)poly-T序列,所述嘌呤霉素标记的DNA连接子按5′至3′顺序各自包括:(1)poly-dA序列;以及(2)嘌呤霉素分子,并且其中所述RNA转录物的所述编码多肽的核苷酸序列与所述与所述夹板多核苷酸的所述编码多肽的核苷酸序列的3'端互补的序列杂交,并且所述连接子多核苷酸的poly-dA序列与所述夹板多核苷酸的poly-T序列杂交;(b)进行连接反应以将所述RNA转录物的3′端与嘌呤霉素标记的DNA连接子的5′端连接,以便产生嘌呤霉素标记的RNA转录物。

[0030] 在某些方面,本文提供了一种产生肿瘤疫苗的方法,所述方法包括:(a)由受试者的肿瘤样品产生细胞RNA片段;(b)对所述细胞RNA片段进行链特异性随机引发的核酸扩增反应以产生cDNA片段群体;(c)使所述cDNA片段与外显子组捕获探针接触,由此从所述cDNA片段中富集编码外显子组的cDNA片段,以产生外显子组富集的cDNA片段文库;(d)产生包括以下的RNA表达构建体:(i)转录启动子;(ii)翻译起始位点,随后是不编码终止密码子的3个核苷酸的任何倍数;(iii)编码多肽的核苷酸序列,所述编码多肽的核苷酸序列的长度为3个核苷酸的倍数,并且由起始于所述核苷酸序列的第一个5'核苷酸的阅读框编码,并且在所述阅读框中缺少框内终止密码子;(iv)来自所述外显子组富集的cDNA片段文库的外显子组富集的cDNA片段之一;以及(v)衔接子序列,所述衔接子序列的长度为3个核苷酸的倍数,并且在起始于所述衔接子序列的第一个5'核苷酸的阅读框中不含终止密码子,并且在其它阅读框中的每个阅读框中不含终止密码子;(e)使用所述RNA表达构建体进行转录反应以产生RNA转录物文库,每个RNA转录物按5′至3′顺序包括:(i)翻译起始位点,随后是不编码终止密码子的3个核苷酸的任何倍数;(ii)编码多肽的核苷酸序列,所述编码多肽的核苷酸序列的长度为3个核苷酸的倍数,并且由起始于所述核苷酸序列的第一个5'核苷酸的阅读框编码,并且在所述阅读框中缺少框内终止密码子;(iii)RNA序列,所述RNA序列是从所述外显子组富集的cDNA片段文库中的cDNA片段序列转录的;以及(iv)衔接子序列,所述衔接子序列的长度为3个核苷酸的倍数,并且在起始于所述衔接子序列的第一个5'核苷酸的阅读框中不含终止密码子,并且在其它阅读框中的每个阅读框中不含终止密码子;(f)产生嘌呤霉素标记的RNA转录物群体,其中每个RNA转录物的3′端与嘌呤霉素标记的DNA连接子的5′端连接;(g)对所述嘌呤霉素标记的RNA转录物进行体外翻译反应,其中对于每个嘌呤霉素标记的RNA片段,如果从嘌呤霉素标记的RNA转录物中的cDNA片段序列转录的RNA序列与所述翻译起始位点使用相同读框,在所述阅读框内没有终止密码子并且如果所述RNA序列与所述编码多肽的核苷酸序列使用相同读框,那么所述嘌呤霉素将经翻译的多肽与所述嘌呤霉素标记的RNA转录物共价连接以形成多肽连接的RNA复合物;(h)使用与由所述编码多肽的核苷酸序列编码的多肽结合的试剂亲和纯化所述多肽连接的RNA复合物,以产生经纯化的多肽连接的RNA复合物文库;(i)对所述经纯化的多肽连接的RNA复合物文库进行扩增反应以产生包括所述cDNA片段序列的扩增产物;以及(j)由步骤(i)的所述扩增产物中的一种或多种扩增产物产生肿瘤疫苗。在某些实施例中,所述翻译起始位点包括夏因-达尔加诺序列。

[0031] 在某些实施例中,所述嘌呤霉素标记的RNA转录物群体通过以下产生:(a)使所述RNA转录物与夹板多核苷酸和嘌呤霉素标记的DNA连接子接触,其中:所述夹板多核苷酸按3′至5′顺序各自包括:(I)与所述衔接子序列互补的序列;以及(II)poly-T序列,所述嘌呤霉素标记的DNA连接子按5′至3′顺序各自包括:(1)poly-dA序列;以及(2)嘌呤霉素分子,并且其中所述RNA转录物的所述编码多肽的核苷酸序列与所述与所述夹板多核苷酸的所述衔接子序列互补的序列杂交,并且所述连接子多核苷酸的poly-dA序列与所述夹板多核苷酸的poly-T序列杂交;(b)进行连接反应以将所述RNA转录物的3′端与嘌呤霉素标记的DNA连接子的5′端连接,以便产生嘌呤霉素标记的RNA转录物。

[0032] 在一些实施例中,所述样品是肿瘤样品、正常组织样品、患病组织样品、新鲜样品、冷冻样品和/或石蜡包埋(FFPE)样品。在某些实施例中,所述样品是石蜡包埋(FFPE)组织或肿瘤样品。在一些实施例中,本文所描述的产生肿瘤疫苗的方法进一步包括从受试者(例如,癌症患者)获得所述样品。在一些实施例中,所述细胞RNA片段群体中的细胞RNA片段的长度介于150nt与250nt之间(例如,长度为约200nt)。

[0033] 在一些实施例中,本文所描述的产生肿瘤疫苗的方法进一步包括在步骤(j)之前,将所述扩增产物插入到疫苗编码载体中以产生包括所述cDNA片段序列的疫苗编码载体。

[0034] 在一些实施例中,所述产生肿瘤疫苗的方法的步骤(j)包括将所述疫苗编码载体插入到细菌中,并且在使得所述细菌表达由所述疫苗编码载体编码的疫苗的条件下温育所述细菌。

[0035] 在一些实施例中,所述产生肿瘤疫苗的方法的步骤(j)包括将所述疫苗编码载体插入到酵母中,并且在使得所述酵母表达由所述疫苗编码载体编码的疫苗的条件下温育所述酵母。

[0036] 在一些实施例中,所述产生肿瘤疫苗的方法的步骤(j)包括使所述疫苗编码载体经受体外翻译反应,以产生由所述疫苗编码载体编码的疫苗。

[0037] 在一些实施例中,所述产生肿瘤疫苗的方法的步骤(j)包括将所述疫苗编码载体插入到哺乳动物细胞(例如,人细胞)中,并且在使得所述哺乳动物细胞表达由所述疫苗编码载体编码的疫苗的条件下温育所述哺乳动物细胞。

[0038] 在一些实施例中,所述产生肿瘤疫苗的方法的步骤(j)包括将所述疫苗编码载体递送到受试者(例如,人,优选地是癌症患者),使得所述受试者表达由所述疫苗编码载体编码的疫苗。

[0039] 在一些实施例中,所述产生肿瘤疫苗的方法的步骤(j)包括将所述疫苗编码载体离体转染或转导到人细胞中,并且将所述人细胞递送到受试者。在某些实施例中,所述人细胞是从同一受试者或不同受试者中分离的原代T细胞或抗原呈递细胞。

[0040] 在一些实施例中,本文所描述的产生肿瘤疫苗的方法进一步包括将所述肿瘤疫苗或含有所述肿瘤疫苗的细胞施用于受试者(例如,人,优选地是癌症患者)。

[0041] 在某个方面,本文提供了一种治疗肿瘤的方法,所述方法包括向有需要的受试者(例如,人,优选地是癌症患者)施用根据本文所描述的方法产生的肿瘤疫苗。

[0042] 在某个方面,本文提供了一种鉴定药物靶标的方法,所述方法包括将根据本文所描述的方法产生的载体转染或转导到细胞,并且鉴定产生可选择表型的框内编码区片段。在一些实施例中,所述载体在体外或体内被转染或转导到细胞。在某些实施例中,所述框内

编码区片段在具有所述可选择表型的细胞中富集或耗竭。在某些实施例中，所述框内编码区片段正向或负向改变细胞内通路。在某些实施例中，所述细胞是正常细胞，并且所述可选择表型是疾病表型。

[0043] 在某些方面，本文提供了一种从细胞RNA片段群体中富集框内编码区片段文库的方法，所述方法包括：(a)对细胞RNA片段群体进行链特异性随机引发的核酸扩增反应以产生cDNA片段群体；(b)将所述cDNA片段群体插入到克隆载体中以产生DNA构建体文库，其中每个DNA构建体按5'至3'顺序包括：(i)启动子；(ii)翻译起始位点，随后是不编码终止密码子的3个核苷酸的任何倍数；(iii)编码多肽的核苷酸序列，所述编码多肽的核苷酸序列的长度为3个核苷酸的倍数，并且由起始于所述核苷酸序列的第一个5'核苷酸的阅读框编码，并且在所述阅读框中缺少框内终止密码子；(iv)来自所述cDNA片段群体的cDNA片段；以及(v)编码膜呈递蛋白的序列；(c)将所述DNA构建体文库转化到细胞中；(d)在使得细胞表达所述DNA构建体的条件下温育所述细胞；(e)使用与由所述编码多肽的核苷酸序列编码的所述多肽结合的试剂纯化表达完全融合蛋白的所述细胞(例如，亲和纯化所述细胞)，所述融合蛋白包括由所述编码多肽的核苷酸序列编码的所述多肽、由所述cDNA片段编码的所述多肽和所述膜呈递蛋白；(f)(例如，通过PCR扩增)从经纯化的细胞中回收框内cDNA片段序列，由此从细胞RNA片段群体中富集框内编码区片段文库。

[0044] 在某些方面，本文提供了一种产生肿瘤疫苗的方法，所述方法包括：(a)由受试者的肿瘤样品产生细胞RNA片段；(b)对所述RNA片段进行链特异性随机引发的核酸扩增反应以产生cDNA片段群体；(c)将所述cDNA片段群体插入到克隆载体中以产生DNA构建体文库，其中每个DNA构建体按5'至3'顺序包括：(i)启动子；(ii)翻译起始位点，随后是不编码终止密码子的3个核苷酸的任何倍数；(iii)编码多肽的核苷酸序列，所述编码多肽的核苷酸序列的长度为3个核苷酸的倍数，并且由起始于所述核苷酸序列的第一个5'核苷酸的阅读框编码，并且在所述阅读框中缺少框内终止密码子；(iv)来自所述cDNA片段群体的一个cDNA片段；以及(v)编码膜呈递蛋白的序列；(d)将所述DNA构建体文库转化到细胞中；(e)在使得细胞表达所述DNA构建体的条件下温育所述细胞；(f)使用与由所述编码多肽的核苷酸序列编码的所述多肽结合的试剂纯化(例如，亲和纯化)表达完全融合蛋白的所述细胞，所述融合蛋白包括由所述编码多肽的核苷酸序列编码的所述多肽、由所述cDNA片段编码的所述多肽和所述膜呈递蛋白；(g)(例如，通过PCR扩增)从经纯化的细胞中回收框内cDNA片段序列；(h)由步骤(g)的所述扩增产物中的一种或多种扩增产物产生肿瘤疫苗。

附图说明

[0045] 图1是示出了链式双链(ds)cDNA的合成的示意图。如果期望的话，为了从反义RNA中捕获开放阅读框(ORF)，可以使用相同的文库，但是需要相反意义外外显子组捕获混合物，并且用于后续步骤的引物的链特异性被逆转。

[0046] 图2是示出了MutS富集(任选的)和外显子组捕获的示意图。

[0047] 图3是示出了用于展示的RNA的制备的示意图。小蛋白编码序列可以添加到来自cDNA文库的cDNA片段序列的5'上游或3'下游区域。

[0048] 图4是示出了用于RNA展示的示意图。

[0049] 图5是示出了多肽连接的RNA(AMPL-NA文库片段)的捕获和回收的示意图。

[0050] 图6是示出了用于膜表面展示的示例性克隆过程的示意图。

[0051] 图7是示出了根据本文所公开的某些示例性实施例的框内文库成员的转化、生长和表面呈递的示意图。

[0052] 图8是示出了根据本文所公开的某些示例性实施例的框内文库的亲和富集和DNA回收的示意图。

[0053] 图9是示出了示例性外显子组捕获转录文库的结构的示意图。RBS是大肠杆菌核糖体结合位点,ATG是用于蛋白质翻译的起始密码子,Read1和Read2是Illumina TruSeq序列,Twin-Strep-tag是用于结合纯化的28个氨基酸的肽的编码序列,并且肽是肽间隔子区段的编码序列。

[0054] 图10示出了在外显子组捕获之后("在RNA展示之前")和RNA展示后("在RNA展示之后")构建体的全长插入物与目标阅读框中的完整ORF的比较结果。

具体实施方式

[0055] 概述

[0056] 在某些方面,本文提供了从RNA转录物群体或从细胞RNA片段群体中富集框内编码区片段文库的方法。在一些方面,本文提供了产生肿瘤疫苗的方法或使用产生的肿瘤疫苗治疗患有肿瘤的患者的方法。在某些方面,本公开涉及经纯化的多肽连接的RNA复合物文库、扩增产物和载体,其包括富集的框内编码片段序列、肿瘤疫苗和其药物组合物。

[0057] 在某些方面,本公开涉及由含有合适的框内编码区的细胞的断裂RNA制备核酸文库以表示细胞的微型蛋白质组(微型蛋白质组在此被定义为约70个氨基酸区段的集合,表示细胞的表达RNA编码潜力),使得核酸可以被转移到合适的宿主细胞中以表达微型蛋白质组的方法。

[0058] 存在许多与制备此类文库相关的挑战。制备此类文库的困难在于:(a)因为需要外源翻译起始位点,所以没有办法控制随机断裂RNA在编码天然蛋白质的天然阅读框架中被翻译,以及(b)控制它将在阅读框架中退出断裂RNA,所述阅读框架不会快速终止,并且因此一旦插入到合适的宿主细胞中,就会被无义介导的衰变快速降解。因此,在没有本文所提供的解决方案的情况下,将近90%的文库成员将没有代表性或不具有功能性。

[0059] 由本公开提供的方法允许从细胞中富集出约200nt RNA片段的复杂混合物,这些片段将成功地在框内翻译并进入期望的阅读框的下游区域,因此消除了89%的不适于构建微型蛋白质组文库的RNA。

[0060] 如果RNA源自肿瘤细胞,此类文库可用于制备核酸抗肿瘤疫苗,或用于鉴定正向或负向改变细胞内(体外,即细胞培养中或体内)通路的微型蛋白质组的各部分,从而产生可以鉴定用于药物产品发现的新的或更高度精制的靶标的可选择表型。

[0061] 定义

[0062] 为了方便起见,此处集中了在说明书、实例和所附权利要求书中所采用的某些术语。

[0063] 冠词"一个(a)"和"一种(an)"在本文中用于指代冠词的语法宾语中的一个或多于一个(例如,至少一个)。举例来说,"要素"意指一个/种要素或超过一个/种要素。

[0064] 术语"带条形码的引物"是指包括唯一核苷酸序列的引物。此核苷酸序列的最小长

度取决于需要唯一标记的引物总数。例如,4个核苷酸长的核苷酸序列可以具有256个可以唯一地标记至多256个引物的不同序列。术语“条形码标记的扩增产物”是用这些“带条形码的引物”通过PCR扩增反应产生的。

[0065] 术语“结合”或“相互作用”是指两个分子之间例如抗体与靶之间的缔合,其可以是稳定的缔合,例如由于例如生理条件下的静电、疏水、离子和/或氢键相互作用。

[0066] 如本文所用,如果两个核酸序列在每个位置或所有位置的一部分处彼此碱基配对,则它们彼此“互补”或是彼此“互补的”。

[0067] 如本文所用,如果两个核酸序列均与同一核酸序列互补,则它们彼此“对应”。

[0068] 当用于功能性质或生物活性或过程(例如,酶活性或受体结合)时,术语“调节(modulation)”或“调节(modulate)”是指上调(例如,激活或刺激)、下调(例如,抑制或遏制)或以其它方式改变此类性质、活性或过程的质量的能力。在某些情况下,此类调节可能取决于特定事件的发生,如信号转导通路的激活,和/或可能仅在特定细胞类型中表现出来。

[0069] 术语“多核苷酸”和“核酸”在本文中可互换使用。所述术语指任何长度的核苷酸(脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸)或其类似物的聚合形式。多核苷酸可以具有任何三维结构并且可以执行任何已知或未知的功能。以下是多核苷酸的非限制性实例:基因或基因片段的编码或非编码区、由连锁分析定义的多个(一个)基因座、外显子、内含子、信使RNA(mRNA)、转移RNA、核糖体RNA、核酶、cDNA、合成多核苷酸、重组多核苷酸、分支多核苷酸、质粒、载体、任何序列的分离的DNA、任何序列的分离的RNA、核酸探针和引物。多核苷酸可以包括经修饰的核苷酸(如甲基化核苷酸)和核苷酸类似物。如果存在,则可以在组装聚合物之前或之后赋予对核苷酸结构的修饰。核苷酸序列可以间杂有非核苷酸组分。多核苷酸可以如通过与标记组分缀合来进一步修饰。

[0070] 术语“新抗原”或“新抗原性”意指由改变经基因组编码的蛋白质的氨基酸序列的肿瘤特异性突变产生的一类肿瘤抗原。

[0071] “疫苗”应理解为意指用于产生用于预防和/或治疗疾病(例如,肿瘤)的免疫力的组合物。因此,疫苗是包括抗原的药物,并且旨在用于人类或动物,通过疫苗接种产生特异性防御和保护物质。

[0072] 如本文所用,术语“施用”是指向受试者提供药剂或组合物,并且包含但不限于由医务专业人员施用和自我施用。

[0073] 如本文所用,术语“受试者”是指被选择用于治疗或疗法的人或非人动物。

[0074] 除非上下文明确指出,否则当提及基因表达产物,例如由编码序列编码的氨基酸序列时,“蛋白质”、“多肽”和“肽”在本文中可互换使用。“蛋白质”也可以指一种或多种蛋白质的缔合,如抗体。“蛋白质”也可以指蛋白质片段。蛋白质可以是经翻译后修饰的蛋白质,如糖基化蛋白质。“基因表达产物”意指作为整个或部分基因转录的结果而产生的分子。基因产物包含从基因转录的RNA分子,以及从此类转录物翻译的蛋白质。蛋白质可以是天然存在的分离蛋白质或者可以是重组或化学合成的产物。术语“蛋白质片段”是指与参考蛋白质本身相比,缺失氨基酸残基但是剩余的氨基酸序列通常与参考蛋白质的氨基酸序列的至少一部分相同的蛋白质。此类缺失可以发生在参考蛋白的氨基末端或羧基末端,或参考蛋白的某个内部位置,或超过一个此类位置。片段通常为至少约5个、6个、8个或10个氨基酸长、

至少约14个氨基酸长、至少约20个、30个、40个或50个氨基酸长、至少约75个氨基酸长或至少约100个、150个、200个、300个、500个或更多个氨基酸长。可以使用蛋白酶使较大的蛋白质断裂，或通过重组方法，如仅表达编码蛋白质的核苷酸序列的一部分(单独或与另一个编码蛋白质的核酸序列融合)来获得所述蛋白质的片段。在各个实施例中，片段可以包括参考蛋白质的酶活性和/或与例如细胞受体的相互作用位点。在另一个实施例中，片段可以具有免疫原性特性。蛋白质可以包含通过各种已知技术在特定基因组处引入的突变，所述突变不会对它们在本文所提供的方法中的用途产生不利影响，但可以增强其用途。片段可以保留参考蛋白质的一种或多种生物活性。

[0075] “载体”是指能够转运已经与其连接的另一个核酸的核酸分子。一种类型的优选载体是附加体，即能够进行染色体外复制的核酸。优选的载体是能够自主复制和/或表达与其连接的核酸的那些。能够指导与其可操作地连接的基因的表达的载体在本文中被称为“表达载体”。通常，可用于重组DNA技术的表达载体通常呈“质粒”的形式，通常是指环状双链DNA环，其载体形式不与染色体结合。在本说明书中，“质粒”和“载体”可互换使用，因为质粒是最常用的载体形式。然而，正如本领域技术人员所理解的那样，本发明旨在包含具有相同功能并且随后在本领域中已知的此类其它形式的表达载体。

[0076] 除非本文另外定义，否则本申请使用的科学和技术术语应该具有本领域的普通技术人员通常理解的含义。通常，本文所描述的与化学、分子生物学、细胞与癌症生物学、免疫学、微生物学、药理学以及蛋白质与核酸化学相关的术语表和技术是本领域熟知和常用的术语表和技术。

[0077] 富集框内编码区片段文库的方法

[0078] 在某些方面，本文提供了从RNA转录物群体中富集框内编码区片段文库的方法。在某些实施例中，此类方法包括(a)产生嘌呤霉素标记的RNA转录物群体；(b)对所述嘌呤霉素标记的RNA转录物进行体外翻译反应，其中对于每个嘌呤霉素标记的RNA片段，如果从嘌呤霉素标记的RNA转录物中的cDNA片段序列转录的RNA序列与所述翻译起始位点使用相同读框，在所述阅读框内没有终止密码子并且与所述编码多肽的核苷酸序列使用相同读框，那么所述嘌呤霉素将经翻译的多肽与所述嘌呤霉素标记的RNA转录物共价连接以形成多肽连接的RNA复合物；以及(c)将所述多肽连接的RNA复合物与不处于此类复合物中的所述RNA转录物分离，由此从RNA转录物群体中富集框内编码区片段文库。

[0079] 在一些实施例中，所述RNA转录物群体中的每个RNA转录物按5′至3′顺序包括：(i)翻译起始位点；(ii)从cDNA序列文库中的cDNA片段序列转录的RNA序列；(iii)编码多肽的核苷酸序列，其在起始于核苷酸序列的第一个5’核苷酸的阅读框中缺少框内终止密码子，但在另外两个阅读框的每个阅读框中含有终止密码子。

[0080] 在某些实施例中，所述嘌呤霉素标记的RNA转录物群体通过以下产生：(a)使所述RNA转录物与夹板多核苷酸和嘌呤霉素标记的DNA连接子接触，其中：所述夹板多核苷酸按3′至5′顺序各自包括：(I)与所述编码多肽的核苷酸序列的3’端互补的序列；以及(II)poly-T序列，所述嘌呤霉素标记的DNA连接子按5′至3′顺序各自包括：(1)poly-dA序列；以及(2)嘌呤霉素分子，并且其中所述RNA转录物的所述编码多肽的核苷酸序列与所述与所述夹板多核苷酸的所述编码多肽的核苷酸序列的3’端互补的序列杂交，并且所述连接子多核苷酸的poly-dA序列与所述夹板多核苷酸的poly-T序列杂交；(b)进行连接反应以将所述

RNA转录物的3′端与嘌呤霉素标记的DNA连接子的5′端连接，以便产生嘌呤霉素标记的RNA转录物。

[0081] 在一些实施例中，所述RNA转录物文库中的每个RNA转录物按5′至3′顺序包括：(i)翻译起始位点；(ii)编码多肽的核苷酸序列，其在起始于核苷酸序列的第一个5’核苷酸的阅读框中缺少框内终止密码子；(iii)从cDNA序列文库中的cDNA片段序列转录的RNA序列；以及(iv)衔接子序列，其在起始于所述衔接子序列的第一个5’核苷酸的阅读框中缺少终止密码子，但在另外两个阅读框中含有终止密码子。

[0082] 在某些实施例中，所述嘌呤霉素标记的RNA转录物群体通过以下产生：(a)使所述RNA转录物与夹板多核苷酸和嘌呤霉素标记的DNA连接子接触，其中：所述夹板多核苷酸按3′至5′顺序各自包括：(I)与所述衔接子序列互补的序列；以及(II)poly-T序列，所述嘌呤霉素标记的DNA连接子按5′至3′顺序各自包括：(1)poly-dA序列；以及(2)嘌呤霉素分子，并且其中所述RNA转录物的所述编码多肽的核苷酸序列与所述与所述夹板多核苷酸的所述衔接子序列互补的序列杂交，并且所述连接子多核苷酸的poly-dA序列与所述夹板多核苷酸的poly-T序列杂交；(b)进行连接反应以将所述RNA转录物的3′端与嘌呤霉素标记的DNA连接子的5′端连接，以便产生嘌呤霉素标记的RNA转录物。

[0083] RNA转录物的翻译起始位点可以包括起始密码子(例如，AUG)、夏因-达尔加诺(SD)序列和/或翻译增强子。夏因-达尔加诺序列是通常存在于细菌和古细菌信使RNA中并且通常定位于起始密码子AUG上游约8个碱基附近的核糖体结合位点。夏因-达尔加诺序列可以包括AGGAGG、AGGAGGU、GAGG、ACAGGAGGCA或UAAGGAGGUG。翻译增强子可以包括富含A/U的增强子，例如，5’-GCUCUUUAACAAUUUAUCA-3’、5’-ACAUGGAUUC-3’、5’-UUAACUUUAA-3’、5’-UUAACGGGAA-3’、5’-AAAAAAAAAA-3’、5’-UUAACUUUAA-$(A)_5$-3’、5’-UUAACUUUAA-$(A)_{10}$-3’、5’-UUAACUUUAA-$(A)_{20}$-3’或5’-UUAACUUUAA-$(ACAUGGAUUC)_2$-3’。翻译起始位点可以包括翻译增强子序列与夏因-达尔加诺序列之间的用于进一步提高翻译效率的一小段(10-20个核苷酸)A残基。

[0084] 在一些实施例中，RNA转录物的翻译起始位点随后是不编码终止密码子的3个核苷酸的任何倍数。例如，翻译起始位点后面可能有0、3、6、9、12、15、18、21、24、27、30、33、36、39、42、45、48、51、54、57、60、63、66、69、72、75、90、120、150、180、210、240、270、300、450、600、750、900、1200、1500、1800、2100、2400、2700、3000个不编码终止密码子的核苷酸。

[0085] 在一些实施例中，编码多肽的核苷酸序列的长度为至少9个、至少12个、至少15个、至少18个、至少21个、至少24个、至少27个、至少30个、至少33个、至少36个、至少39个、至少42个、至少45个、至少48个、至少51个、至少54个、至少57个、至少60个、至少63个、至少66个、至少69个或至少72个核苷酸，并且长度为3个核苷酸的倍数。例如，编码多肽的核苷酸序列的长度可以为15、18、21、24、27、30、33、36、39、42、45、48、51、54、57、60、63、66、69、72、75、90、120、150、180、210、240、270、300、450、600、750、900、1200、1500、1800、2100、2400、2700、3000个核苷酸。在一些实施例中，编码多肽的核苷酸序列的长度为18个核苷酸。编码多肽的核苷酸序列可以位于从cDNA片段序列文库中的cDNA片段序列转录的RNA序列的5’上游或3’下游处。

[0086] 在某些实施例中，RNA转录物的编码多肽的核苷酸序列可以编码小的可溶性蛋白质或蛋白质的可溶性结构域，所述小的可溶性蛋白质或蛋白质的可溶性结构域包含但不限

于肌联蛋白I27、泛素、Stefin A、10FN-III、Ig-L细丝蛋白A、腱生蛋白、Darpin、纤连蛋白、硫氧还蛋白或任何其它小蛋白质结构域(源自人类或任何其它物种),当通过体外翻译或在大肠杆菌中表达时,所述小蛋白质结构域是高度可溶的。在某些实施例中,编码多肽的核苷酸序列可以编码具有亲和标签的多肽。此类亲和标签包含但不限于六聚组氨酸标签、血球凝集素(HA)标签、钙调蛋白标签、FLAG标签、Myc标签、S标签、链霉亲和素标签、SBP标签、Softag 1、Softag 3、V5标签、Xpress标签、Isopeptag、SpyTag、生物素羧基载体蛋白(BCCP)标签、GST标签、荧光蛋白标签(例如,绿色荧光蛋白标签)、麦芽糖结合蛋白标签、Nus标签、Strep-tag、硫氧还蛋白标签、TC标签、Ty标签等。在某些实施例中,编码多肽的核苷酸从起始于核苷酸序列的第一个5'核苷酸的阅读框编码多肽。

[0087] 在一些实施例中,衔接子序列的长度为至少9个、至少12个、至少15个、至少18个、至少21个、至少24个、至少27个、至少30个、至少33个、至少36个、至少39个、至少42个、至少45个、至少48个、至少51个、至少54个、至少57个、至少60个、至少63个、至少66个、至少69个或至少72个核苷酸,并且长度为3个核苷酸的倍数。例如,衔接子序列的长度可以为15、18、21、24、27、30、33、36、39、42、45、48、51、54、57、60、63、66、69、72、75、90、120、150、180、210、240、270、300、450、600、750、900、1200、1500、1800、2100、2400、2700、3000个核苷酸。在某些实施例中,衔接子序列位于从cDNA片段序列文库中的cDNA片段序列转录的RNA序列的3'下游处。

[0088] 本文所描述的夹板多核苷酸可以按3′至5′顺序包括与编码多肽的核苷酸序列的3'端或与衔接子序列互补的序列,以及poly-T序列。在某些实施例中,夹板多核苷酸可以包括具有多于4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20个核苷酸的poly-T序列。

[0089] 本文所描述的连接子多核苷酸可以按5′至3′顺序包括poly-dA序列和嘌呤霉素分子。在某些实施例中,连接子多核苷酸可以包括具有多于4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20个核苷酸的poly-dA序列。

[0090] 在某些实施例中,在存在T4 DNA连接酶的情况下在使得RNA转录物的3′端与连接子多核苷酸的5′端连接以产生嘌呤霉素标记的RNA转录物的条件下进行连接反应。也可以使用可以将连接子多核苷酸的5'端与RNA转录物的3'端连接的其它方法。

[0091] 在某些方面,本文所描述的从RNA转录物群体中富集框内编码区片段文库的方法进一步包括在步骤(a)之前通过对RNA表达构建体文库进行转录反应来产生RNA转录物文库的步骤。

[0092] 在一些实施例中,所述RNA表达构建体文库中的每个RNA表达构建体包括:(i)转录启动子;(ii)翻译起始位点;(iii)来自cDNA片段序列文库的cDNA片段序列;以及(iv)编码多肽的核苷酸序列,其在起始于核苷酸序列的第一个5'核苷酸的阅读框中缺少框内终止密码子,但在另外两个阅读框的每个阅读框中含有终止密码子。在某些实施例中,所述翻译起始位点包括夏因-达尔加诺序列。

[0093] RNA表达构建体的转录启动子可以是任何能够启动RNA从其下游DNA转录的启动子。此类启动子包含但不限于T7启动子。

[0094] RNA表达构建体的翻译起始位点可以包括起始密码子(例如,ATG)、夏因-达尔加诺(SD)序列和/或翻译增强子。夏因-达尔加诺序列是通常存在于细菌和古细菌信使RNA中并且通常定位于起始密码子AUG上游约8个碱基附近的核糖体结合位点。夏因-达尔加诺序列

可以包括AGGAGG、AGGAGGU、GAGG、ACAGGAGGCA、UAAGGAGGUG。翻译增强子序列是夏因-达尔加诺序列上游的可以进一步增加蛋白质合成的量的序列。翻译增强子可以包括富含A/U的增强子，例如，5'-GCUCUUUAACAAUUUAUCA-3'、5'-ACAUGGAUUC-3'、5'-UUAACUUUAA-3'、5'-UUAACGGGAA-3'、5'-AAAAAAAAAA-3'、5'-UUAACUUUAA-$(A)_5$-3'、5'-UUAACUUUAA-$(A)_{10}$-3'、5'-UUAACUUUAA-$(A)_{20}$-3'或5'-UUAACUUUAA-$(ACAUGGAUUC)_2$-3'。翻译起始位点可以包括翻译增强子序列与夏因-达尔加诺序列之间的用于进一步提高翻译效率的一小段(10-20个核苷酸)A残基。

[0095] 在一些实施例中，RNA表达构建体的翻译起始位点随后是不编码终止密码子的3个核苷酸的任何倍数。例如，翻译起始位点后面可能有0、3、6、9、12、15、18、21、24、27、30、33、36、39、42、45、48、51、54、57、60、63、66、69、72、75、90、120、150、180、210、240、270、300、450、600、750、900、1200、1500、1800、2100、2400、2700、3000个不编码终止密码子的核苷酸。

[0096] 在一些实施例中，编码多肽的核苷酸序列的长度为至少9个、至少12个、至少15个、至少18个、至少21个、至少24个、至少27个、至少30个、至少33个、至少36个、至少39个、至少42个、至少45个、至少48个、至少51个、至少54个、至少57个、至少60个、至少63个、至少66个、至少69个或至少72个核苷酸，并且长度为3个核苷酸的倍数。例如，编码多肽的核苷酸序列的长度可以为15、18、21、24、27、30、33、36、39、42、45、48、51、54、57、60、63、66、69、72、75、90、120、150、180、210、240、270、300、450、600、750、900、1200、1500、1800、2100、2400、2700、3000个核苷酸。编码多肽的核苷酸序列可以位于cDNA片段序列文库中的cDNA片段序列的5'上游或3'下游处。

[0097] 在某些实施例中，RNA表达构建体的编码多肽的核苷酸序列可以编码小的可溶性蛋白质或蛋白质的可溶性结构域，所述小的可溶性蛋白质或蛋白质的可溶性结构域包含但不限于肌联蛋白I27、泛素、Stefin A、10FN-III、Ig-L细丝蛋白A、Darpin、腱生蛋白、纤连蛋白、硫氧还蛋白或任何其它小蛋白质结构域(源自人类或任何其它物种)，当通过体外翻译或在大肠杆菌中表达时，所述小蛋白质结构域是高度可溶的。在某些实施例中，编码多肽的核苷酸序列可以编码具有亲和标签的多肽。此类亲和标签包含但不限于六聚组氨酸标签、血球凝集素(HA)标签、钙调蛋白标签、FLAG标签、Myc标签、S标签、Strep标签、SBP标签、Softag 1、Softag 3、V5标签、Xpress标签、Isopeptag、SpyTag、生物素羧基载体蛋白(BCCP)标签、GST标签、荧光蛋白标签(例如，绿色荧光蛋白标签)、麦芽糖结合蛋白标签、Nus标签、Strep-tag、硫氧还蛋白标签、TC标签、Ty标签等。在某些实施例中，编码多肽的核苷酸从起始于核苷酸序列的第一个5'核苷酸的阅读框编码多肽。

[0098] 在一些实施例中，每个RNA表达构建体进一步包括衔接子序列，所述衔接子序列在起始于所述衔接子序列的第一个5'核苷酸的阅读框中缺少终止密码子，但在另外两个阅读框中含有终止密码子。

[0099] 在一些实施例中，衔接子序列的长度为至少9个、至少12个、至少15个、至少18个、至少21个、至少24个、至少27个、至少30个、至少33个、至少36个、至少39个、至少42个、至少45个、至少48个、至少51个、至少54个、至少57个、至少60个、至少63个、至少66个、至少69个或至少72个核苷酸，并且长度为3个核苷酸的倍数。例如，衔接子序列的长度可以为15、18、21、24、27、30、33、36、39、42、45、48、51、54、57、60、63、66、69、72、75、90、120、150、180、210、240、270、300、450、600、750、900、1200、1500、1800、2100、2400、2700、3000个核苷酸。在某些

实施例中,衔接子序列位于cDNA片段序列文库中的cDNA片段序列的3'下游处。

[0100] 在某些实施例中,RNA表达构建体是通过向cDNA片段序列文库中基于PCR添加转录启动子、翻译起始位点、编码多肽的核苷酸序列和任选地衔接子序列而产生的。cDNA片段序列文库可以富含含外显子组的cDNA片段和/或含错配的cDNA片段序列。在某些实施例中,RNA表达构建体的转录在存在T7聚合酶的情况下在体外进行。在某些实施例中,所述翻译起始位点包括夏因-达尔加诺序列。

[0101] 在某些方面,本文提供了从细胞RNA片段群体中富集框内编码区片段文库的方法。与上文描述的用于从RNA转录物群体中富集框内编码区片段文库的方法相比,从细胞RNA片段群体中富集框内编码区片段文库的方法进一步包括由细胞RNA片段群体中产生本文所描述的RNA转录物群体的步骤。

[0102] 由细胞RNA片段群体产生RNA转录物群体的此类另外步骤可以包括:(a)对细胞RNA片段群体进行链特异性随机引发的核酸扩增反应以产生cDNA片段群体;(b)使所述cDNA片段群体与外显子组捕获探针接触,由此从所述cDNA片段群体中富集编码外显子组的cDNA片段,以产生外显子组富集的cDNA片段文库;(c)由所述外显子组富集的cDNA片段文库产生RNA表达构建体;以及(d)使用所述RNA表达构建体进行转录反应以产生RNA转录物文库。

[0103] 步骤(c)中产生的RNA表达构建体和步骤(d)中产生的RNA转录物文库可以具有与从RNA转录物群体中富集框内编码区片段文库的方法中描述的那些相同的结构。在某些实施例中,RNA表达构建体是通过向由细胞RNA片段群体制备的外显子组富集的cDNA片段文库中基于PCR添加转录启动子、翻译起始位点、编码多肽的核苷酸序列和任选地衔接子序列而产生的。在某些实施例中,所述翻译起始位点包括夏因-达尔加诺序列。

[0104] 在一些实施例中,本文所描述的从RNA转录物群体或从细胞RNA片段群体中富集框内编码区片段文库的方法进一步包括使用与由编码多肽的核苷酸序列编码的多肽结合的试剂亲和纯化蛋白质连接的RNA复合物。与多肽结合的试剂可以是与和多肽连接的亲和标签特异性结合的抗体,或者是与多肽本身特异性结合的抗体。与亲和标签特异性结合的抗体在本领域是众所周知的,并且是可商购获得的。在一些方面,本文提供了根据本文所描述的方法产生的经纯化的多肽连接的RNA复合物文库。

[0105] 在一些实施例中,本文所描述的从RNA转录物群体或从细胞RNA片段群体中富集框内编码区片段文库的方法进一步包括对经纯化的蛋白质连接的RNA复合物进行RT-PCR扩增反应以产生包括所述cDNA片段序列的经扩增的DNA拷贝的扩增产物。在某些实施例中,用链特异性克隆引物进行PCR反应,使得扩增产物可以容易地克隆到载体中。在一些方面,本文提供了通过本文所描述的方法产生的扩增产物。

[0106] 在某些方面,本文提供了从细胞RNA片段群体中富集框内编码区片段文库的方法,所述方法包括:所述方法包括:(a)对细胞RNA片段群体进行链特异性随机引发的核酸扩增反应以产生cDNA片段群体;(b)将所述cDNA片段群体插入到克隆载体中以产生DNA构建体文库,其中每个DNA构建体按5'至3'顺序包括:(i)启动子;(ii)翻译起始位点;(iii)编码多肽的核苷酸序列,所述编码多肽的核苷酸序列的长度为3个核苷酸的倍数并且在起始于核苷酸序列的第一个5'核苷酸的阅读框中缺少框内终止密码子;(iv)cDNA片段群体中的一个cDNA片段;以及(v)编码膜呈递蛋白的序列;(c)将所述DNA构建体文库转化到细胞中;(d)在使得所述细胞表达所述DNA构建体的条件下温育所述细胞;(e)使用与由所述编码多肽的核

苷酸序列编码的所述多肽结合的试剂纯化(例如,亲和纯化)表达完全融合蛋白的所述细胞,所述融合蛋白包括由所述编码多肽的核苷酸序列编码的所述多肽、由所述cDNA片段编码的所述多肽和所述膜呈递蛋白;以及(f)(例如,通过PCR扩增)从经纯化的细胞中回收框内cDNA片段序列,由此从RNA转录物群体中富集框内编码区片段文库。

[0107] 在一些实施例中,步骤(a)进一步包括使所述cDNA片段群体与外显子组捕获探针接触,由此从所述cDNA片段群体中富集编码外显子组的cDNA片段,以产生外显子组富集的cDNA片段文库。然后,外显子组富集的cDNA片段文库可以用于以下步骤。

[0108] 在一些实施例中,DNA构建体的启动子是能够驱动细菌(例如,大肠杆菌)中的基因的表达的启动子。此类启动子包含但不限于噬菌体T7启动子。

[0109] DNA构建体的翻译起始位点可以包括起始密码子(例如,ATG)、夏因-达尔加诺(SD)序列和/或翻译增强子。夏因-达尔加诺序列是通常存在于细菌和古细菌信使RNA中并且通常定位于起始密码子AUG上游约8个碱基附近的核糖体结合位点。夏因-达尔加诺序列可以包括AGGAGG、AGGAGGU、GAGG、ACAGGAGGCA、UAAGGAGGUG。翻译增强子序列是夏因-达尔加诺序列上游的可以进一步增加蛋白质合成的量的序列。翻译增强子可以包括富含A/U的增强子,例如,5'-GCUCUUUAACAAUUUAUCA-3'、5'-ACAUGGAUUC-3'、5'-UUAACUUUAA-3'、5'-UUAACGGGAA-3'、5'-AAAAAAAAAA-3'、5'-UUAACUUUAA-$(A)_5$-3'、5'-UUAACUUUAA-$(A)_{10}$-3'、5'-UUAACUUUAA-$(A)_{20}$-3'或5'-UUAACUUUAA-$(ACAUGGAUUC)_2$-3'。翻译起始位点可以包括翻译增强子序列与夏因-达尔加诺序列之间的用于进一步提高翻译效率的一小段(10-20个核苷酸)A残基。

[0110] 在一些实施例中,DNA构建体的翻译起始位点随后是不编码终止密码子的3个核苷酸的任何倍数。例如,翻译起始位点后面可能有0、3、6、9、12、15、18、21、24、27、30、33、36、39、42、45、48、51、54、57、60、63、66、69、72、75、90、120、150、180、210、240、270、300、450、600、750、900、1200、1500、1800、2100、2400、2700、3000个不编码终止密码子的核苷酸。

[0111] 在一些实施例中,编码多肽的核苷酸序列的长度为至少9个、至少12个、至少15个、至少18个、至少21个、至少24个、至少27个、至少30个、至少33个、至少36个、至少39个、至少42个、至少45个、至少48个、至少51个、至少54个、至少57个、至少60个、至少63个、至少66个、至少69个或至少72个核苷酸,并且长度为3个核苷酸的倍数。例如,编码多肽的核苷酸序列的长度可以为15、18、21、24、27、30、33、36、39、42、45、48、51、54、57、60、63、66、69、72、75、90、120、150、180、210、240、270、300、450、600、750、900、1200、1500、1800、2100、2400、2700、3000个核苷酸。

[0112] 在某些实施例中,DNA构建体的编码多肽的核苷酸序列可以编码小的可溶性蛋白质或蛋白质的可溶性结构域,所述小的可溶性蛋白质或蛋白质的可溶性结构域包含但不限于肌联蛋白I27、泛素、Stefin A、10FN-III、Ig-L细丝蛋白A、Darpin、腱生蛋白、纤连蛋白、硫氧还蛋白或任何其它小蛋白质结构域(源自人类或任何其它物种),当通过体外翻译或在大肠杆菌中表达时,所述小蛋白质结构域是高度可溶的。在某些实施例中,编码多肽的核苷酸序列可以编码具有亲和标签的多肽。此类亲和标签包含但不限于六聚组氨酸标签、血球凝集素(HA)标签、钙调蛋白标签、FLAG标签、Myc标签、S标签、Strep标签、SBP标签、Softag 1、Softag 3、V5标签、Xpress标签、Isopeptag、SpyTag、生物素羧基载体蛋白(BCCP)标签、GST标签、荧光蛋白标签(例如,绿色荧光蛋白标签)、麦芽糖结合蛋白标签、Nus标签、Strep-

tag、硫氧还蛋白标签、TC标签、Ty标签等。在某些实施例中，编码多肽的核苷酸从起始于核苷酸序列的第一个5'核苷酸的阅读框编码多肽。

[0113] 在某些实施例中，编码膜呈递蛋白的序列可以编码任何允许将经翻译的蛋白质插入到外细胞膜中并且允许由编码多肽的核苷酸序列编码的多肽暴露在细胞的外表面上的膜呈递蛋白。在具体实施例中，编码膜呈递蛋白的序列编码细菌膜呈递蛋白，如粘附参与扩散粘附(AIDA-I)自动转运蛋白，其允许将经翻译的蛋白质插入到细菌外膜中，并且将由编码多肽的核苷酸序列编码的肽序列暴露在细菌细胞的外表面上。

[0114] 在某个实施例中，细胞是真核细胞(例如，哺乳动物细胞)。在一些实施例中，细胞是原核细胞(例如，细菌)。在某些实施例中，细菌细胞(例如，大肠杆菌)来自能够特异性控制T7 RNA聚合酶的表达的菌株。此类细菌菌株包含但不限于携带在araBAD启动子控制下的T7 RNA聚合酶的基因的菌株，使得可以将小分子(例如，阿拉伯糖)添加到细菌(例如大肠杆菌)培养物中以诱导T7 RNA聚合酶的表达。T7 RNA聚合酶然后可以诱导包括cDNA片段群体的DNA构建体的表达，并且将经翻译的蛋白质插入到细菌(例如，大肠杆菌)的外膜中。

[0115] 在某些实施例中，用DNA构建体以使得每个细胞具有不超过一个(例如，0或1个)DNA构建体的比率转染或转化细胞。

[0116] 在某些实施例中，用于亲和纯化的试剂与由编码多肽的序列编码的多肽结合。与多肽结合的试剂可以是与和多肽连接的亲和标签特异性结合的抗体，或者是与多肽本身特异性结合的抗体。

[0117] 在某些实施例中，编码膜呈递蛋白的序列编码不由细胞内源性表达的膜呈递蛋白。在此类情况下，DNA构建体不需要包括编码多肽的核苷酸序列，并且亲和纯化可以使用与膜呈递蛋白结合的试剂。

[0118] 在一些实施例中，除亲和纯化之外的方法可以用于富集表达完整融合蛋白的细胞，所述融合蛋白包括由框内cDNA片段编码的多肽。例如，在一些实施例中，编码多肽的核苷酸序列编码c末端选择标志物。在一些实施例中，c末端选择标志物是药物抗性基因(例如，抗生素抗性基因)，并且表达包括由框内cDNA片段编码的多肽的完全融合蛋白以及药物抗性基因的细胞可以通过向细胞培养物中添加药物来富集。在某些实施例中，c末端选择标志物是允许细胞在缺乏细胞培养基组分的情况下存活的蛋白质，并且表达包括由框内cDNA片段编码的多肽的完全融合蛋白以及c末端选择标志物的细胞可以通过从细胞培养基中抽取所述组分来富集。在一些实施例中，c末端选择标志物是荧光蛋白，并且表达包括由框内cDNA片段编码的多肽的完全融合蛋白以及药物抗性基因的细胞可以通过FACS来富集。

[0119] 在某些实施例中，用链特异性克隆引物进行步骤(f)中的PCR扩增反应，使得扩增产物可以容易地克隆到载体中。在一些方面，本文提供了通过本文所描述的方法产生的扩增产物。

[0120] 细胞RNA片段群体可以由如肿瘤样品、正常组织样品、患病组织样品、新鲜样品、冷冻样品和/或石蜡包埋(FFPE)样品等样品制备。在某些实施例中，所述样品是石蜡包埋(FFPE)组织或肿瘤样品。样品可以从受试者(例如，人，优选地是癌症患者)获得，并且将针对每个受试者具体地制备。样品也可以针对受试者制备，并且用于不同的受试者。可以从这些样品中分离出总RNA或mRNA，并使其断裂至适当的大小。所述细胞RNA片段群体中的细胞RNA片段的长度可以介于150nt与250nt之间。例如，细胞RNA片段群体中的细胞RNA片段的长

度可以为约150nt、约160nt、约170nt、约180nt、约190nt、约200nt、约210nt、约220nt、约230nt、约240nt、约250nt。在某些实施例中，所述细胞RNA片段群体中的细胞RNA片段的长度为约200nt。

[0121] 用于产生cDNA片段群体的链特异性随机引发的核酸扩增反应可以使用任何标准方案进行，如Illiumina TruSeq链总RNA方案。

[0122] 在一些实施例中，本文所描述的富集框内编码区片段文库的方法进一步包括使cDNA片段群体与MutS蛋白接触，并且回收那些与所述MutS蛋白结合的cDNA片段，由此富集所述cDNA片段群体中的由于突变或单核苷酸多态性而含错配的cDNA片段。

[0123] 在一些实施例中，本文所描述的富集框内编码区片段文库的方法进一步包括使所述外显子组富集的cDNA片段文库与MutS蛋白接触，并且回收那些与所述MutS蛋白结合的cDNA片段，由此富集富所述外显子组富集的cDNA片段文库中的由于突变或单核苷酸多态性而含错配的cDNA片段。

[0124] 在一些实施例中，本文所描述的富集框内编码区片段文库的方法进一步包括使所述框内富集的扩增产物与MutS蛋白接触，并且回收那些与所述MutS蛋白结合的框内cDNA片段，由此富集所述框内富集的扩增产物中的由于突变或单核苷酸多态性而含错配的cDNA片段。

[0125] 用于产生外显子组富集的cDNA片段文库的外显子组捕获探针可以是基于参考基因组序列设计的标准外显子组捕获探针，并且因此主要捕获所有已知CDS的编码区外显子。可替代地，外显子组捕获探针可以基于SNP的已知位置和频率来设计，使得这些外显子组捕获探针围绕这些SNP的位置来设计，以减少SNP的MutS富集。用于设计外显子组捕获探针的其它考虑在本文中的实例1中描述。

[0126] 术语“外显子组”是指完整的外显子组或完整外显子组的基于细胞类型、组织和所研究的疾病以及期望的RNA转录水平等的任何期望部分。

[0127] 制备肿瘤疫苗的方法

[0128] 在某个方面，本文提供了使用通过本文所描述的方法产生的扩增产物中的一种或多种扩增产物制备肿瘤疫苗的方法。本领域技术人员从本公开和本领域的知识中将会理解，存在多种方法可以生产此类肿瘤疫苗。通常，此类肿瘤疫苗可以在体外或体内产生。包括框内cDNA片段序列的扩增产物中的一种或多种扩增产物可以在体外表达，以产生一种或多种肿瘤特异性肽或多肽，其然后可以被调配成个性化肿瘤疫苗或免疫原性组合物并且施用于受试者。如本文进一步详细描述的，此类体外生产可以通过本领域技术人员已知的各种方法进行，例如，在各种细菌、真核或病毒重组表达系统中表达扩增产物中的一种或多种扩增产物，然后纯化所表达的肽/多肽。可替代地，通过将扩增产物中的一种或多种扩增产物插入到表达载体中，并且然后将此类表达载体引入到受试者中，由此表达经编码的肿瘤疫苗，可以在体内产生肿瘤疫苗。本文还进一步描述了体外和体内产生肿瘤疫苗的方法，因为其涉及药物组合物和递送方法。

[0129] 在某些实施例中，为了制备肿瘤疫苗，用本文所描述的方法产生的扩增产物被插入到载体中，以产生包括框内cDNA片段的序列的载体。这些载体可以是克隆载体、表达载体或疫苗编码载体。

[0130] 用于不同细胞类型的表达载体在本领域中是众所周知的并且可以在没有过度实

验的情况下进行选择。通常,将扩增产物以适当朝向和正确的阅读框插入如质粒等表达载体中以进行表达。如有必要,可以将扩增产物与期望宿主(例如,细菌)识别的适当转录和翻译调节控制核苷酸序列连接,但是此类控制通常在表达载体中可用。然后将载体引入到宿主细菌中以使用标准技术进行克隆(参见例如,Sambrook等人(1989)《分子克隆:实验室手册》,纽约冷泉港的冷泉港实验室(Cold Spring Harbor Laboratory,Cold Spring Harbor,N.Y.))。

[0131] 还考虑了包括经扩增的产物的表达载体,以及含有表达载体的宿主细胞。本发明的一种或多种经扩增的产物可以由单一表达载体编码。

[0132] 在一些实施例中,将扩增产物插入到表达载体中,并且任选地与适于蛋白质在期望的宿主中表达的表达控制序列可操作地连接。可以通过核苷酸测序、限制性作图和生物活性多肽在合适宿主中的表达来确认适当的组装。如本领域众所周知的,为了在宿主中获得转染基因的高表达水平,可以将基因可操作地与在所选表达宿主中起作用的转录和翻译表达控制序列连接。

[0133] 重组表达载体可以用于扩增和表达编码肿瘤特异性新抗原肽的cDNA片段序列。重组表达载体是可复制的DNA构建体,所述可复制的DNA构建体具有编码肿瘤特异性新抗原肽或生物等效类似物的合成的或cDNA衍生的DNA片段,其与源自哺乳动物、微生物、病毒或昆虫基因的合适的转录或翻译调节元件可操作地连接。转录单元通常包括以下的组装:(1)在基因表达中具有调节作用的一个或多个遗传元件,例如转录启动子或增强子;(2)被转录成mRNA并被翻译成蛋白质的结构或编码序列;(3)适当的转录和翻译起始和终止序列,如本文详细描述的。此类调节元件可以包含控制转录的操纵子序列。

[0134] 可以另外并入通常由复制起点和选择基因赋予的在宿主中进行复制以促进识别转化体的能力。当DNA区在功能上相互关联时,所述DNA区被操作性地连接。例如,如果信号肽(分泌性前导)的DNA表达为参与多肽分泌的前体,则其与多肽的DNA可操作地连接;如果启动子控制序列的转录,则其与编码序列可操作地连接;或者如果核糖体结合位点被定位成允许翻译,则其与编码序列可操作地连接。通常,可操作地连接意指连续,并且在分泌前导序列的情况下,意指连续且在阅读框中。旨在用于酵母表达系统的结构元件包含实现宿主细胞翻译的蛋白质的细胞外分泌的前导序列。可替代地,在表达重组蛋白而没有前导序列或转运序列的情况下,其可以包含N末端甲硫氨酸残基。此残基可以任选地随后从所表达的重组蛋白上切割下来以提供最终产物。

[0135] 用于真核宿主,尤其是哺乳动物或人的有用的表达载体包含例如包括来自SV40、牛乳头瘤病毒、腺病毒和巨细胞病毒的表达控制序列的载体。用于细菌宿主的有用的表达载体包含已知的细菌质粒,如来自大肠杆菌的质粒,包含pCR 1、pBR322、pMB9和其衍生物、更广泛的宿主范围质粒,如M13和丝状单链DNA噬菌体。

[0136] 用于表达多肽的合适的宿主细胞包含在适当启动子控制下的原核生物、酵母、昆虫或高等真核细胞。原核生物包含革兰氏阴性或革兰氏阳性生物,例如大肠杆菌或芽孢杆菌纲。高等真核细胞包含哺乳动物来源的已建立细胞系。还可以采用无细胞翻译系统。与细菌、真菌、酵母和哺乳动物细胞宿主一起使用的适当的克隆和表达载体是本领域众所周知的(参见Pouwels等人,《克隆载体:实验室手册(Cloning Vectors:A Laboratory Manual)》,纽约爱思唯尔出版(Elsevier,N.Y.),1985)。

[0137] 不同哺乳动物或昆虫细胞培养系统也有利地用于表达重组蛋白。可以在哺乳动物细胞中表达重组蛋白，因为此类蛋白质通常被正确折叠、适当修饰并且完全功能化。合适的哺乳动物宿主细胞系的实例包含Gluzman(《细胞》23:175,1981)描述的猴肾细胞的COS-7系和能够表达适当载体的其它细胞系，包含例如L细胞、C127、3T3、中国仓鼠卵巢(CHO)、293、HeLa和BHK细胞系。哺乳动物表达载体可以包括非转录元件如复制起点、与待表达的基因连接的合适启动子和增强子，以及其它5'或3'侧翼非转录序列，以及5'或3'非翻译序列，如必要的核糖体结合位点、聚腺苷酸化位点、剪接供体和受体位点以及转录终止序列。用于在昆虫细胞中产生外源蛋白的杆状病毒系统由Luckow和Summers，《生物/技术(Bio/Technology)》6:47(1988)综述。

[0138] 可以根据任何合适的方法纯化由转化宿主产生的蛋白质。此类标准方法包含色谱法(例如，离子交换、亲和以及大小柱色谱法等)、离心、差异溶解度或通过用于蛋白质纯化的任何其它标准技术。如六组氨酸、麦芽糖结合结构域、流感外壳序列、谷胱甘肽-S-转移酶等亲和标签可以与蛋白质连接，以便通过合适的亲和柱简单纯化。分离的蛋白质也可以使用如蛋白水解、核磁共振和x射线晶体学等技术进行物理表征。

[0139] 例如，来自将重组蛋白分泌到培养基中的系统的上清液可以首先使用可商购获得的蛋白质浓缩过滤器例如Amicon或Millipore Pellicon超滤单元进行浓缩。在浓缩步骤后，可以将浓缩物施加到合适的纯化基质上。可替代地，可以采用阴离子交换树脂，例如具有二乙基氨基乙基(DEAE)侧基的基质或底物。基质可以是丙烯酰胺、琼脂糖、葡聚糖、纤维素或在蛋白质纯化中常用的其它类型。可替代地，可以采用阳离子交换步骤。合适的阳离子交换剂包含各种包括磺丙基或羧甲基的不溶性基质。最后，一个或多个采用疏水性反相高效液相色谱(RP-HPLC)介质例如具有甲基或其它脂肪族侧基的硅胶的RP-HPLC步骤可以用于进一步纯化癌症干细胞蛋白-Fc组合物。也可以采用各种组合中的一些或所有前述纯化步骤来提供均质的重组蛋白。

[0140] 在细菌培养物中产生的重组蛋白可以被分离，例如，通过首先从细胞沉淀物中提取，随后进行一个或多个浓缩、盐析、水性离子交换或尺寸排阻色谱法步骤。高效液相色谱法(HPLC)可以用于最终的纯化步骤。重组蛋白的表达中采用的微生物细胞可以通过任何方便的方法破碎，所述方法包含冻融循环、超声处理、机械破碎或使用细胞裂解剂。

[0141] 在一些实施例中，载体可以经受体外翻译反应以产生肿瘤疫苗。存在本领域技术人员可以利用的许多示例性系统(例如，网织红细胞裂解物IVT试剂盒，马萨诸塞州沃尔瑟姆的生命技术公司(Life Technologies,Waltham,MA))。

[0142] 本发明还考虑使用核酸分子作为媒剂，以例如DNA/RNA疫苗的形式，体内或离体向有需要的受试者递送新抗原性肽/多肽(参见例如，WO2012/159643和WO2012/159754，所述文献通过引用整体并入本文)。

[0143] 在一个实施例中，包括框内cDNA片段序列的载体(例如，表达载体)可以施用于有需要的患者，以在体内产生肿瘤疫苗。这些载体通常由用于驱动所关注基因(或互补DNA)的体内转录和翻译的强病毒启动子组成(Mor等人，(1995).《免疫学杂志(The Journal of Immunology)》155(4):2039-2046)。内含子A有时可以被包含在内以提高mRNA稳定性，并且因此增加蛋白质表达(Leitner等人(1997).《免疫学杂志》159(12):6112-6119)。质粒还包含强聚腺苷酸化/转录终止信号，如牛生长激素或兔β-球蛋白聚腺苷酸化序列(Alarcon等

人,(1999).《寄生虫学进展(Adv.Parasitol.)》《寄生虫学进展》42:343-410;Robinson等人,(2000).《病毒研究进展(Adv.Virus Res.)》《病毒研究进展》55:1-74;Böhm等人,(1996).《免疫学方法杂志(Journal of Immunological Methods)》193(1):29-40.)。有时构建多顺反子载体以表达超过一种免疫原,或表达免疫原和免疫刺激蛋白(Lewis等人,(1999).《病毒研究进展》(学术出版社)54:129-88)。

[0144] 因为载体是表达肿瘤疫苗的"媒剂",优化载体设计以获得最大蛋白表达是至关重要的(Lewis等人,(1999).《病毒研究进展》(学术出版社)54:129-88)。另一个考虑是启动子的选择。此类启动子可以是SV40启动子或劳斯肉瘤病毒(RSV)。

[0145] 可以通过多种不同的方法将载体引入动物组织。两种最流行的方法是使用标准皮下注射针注射含DNA的盐水以及基因枪递送。《科学美国人(Scientific American)》(Weiner等人,(1999)《科学美国人》281(1):34-41)展示了DNA疫苗载体的构建和其随后通过这两种方法递送到宿主中的示意图。盐水注射通常在骨骼肌中肌内(IM)或皮内(ID)进行,其中DNA被递送到细胞外空间。这可以通过用肌毒素如布比卡因(bupivacaine)暂时破坏肌肉纤维;或者通过使用盐水或蔗糖的高渗溶液通过电穿孔辅助(Alarcon等人,(1999).《寄生虫学进展》《寄生虫学进展》42:343-410)。对这种递送方法的免疫应答可能受到许多因素的影响,包含针类型、针排列、注射速度、注射体积、肌肉类型以及被注射动物的年龄、性别和生理状况(Alarcon等人,(1999).《寄生虫学进展》《寄生虫学进展》42:343-410)。

[0146] 基因枪递送,即其它常用的递送方法,使用压缩氦作为促进剂,将吸附在金或钨微粒上的质粒DNA(pDNA)弹道加速进入靶细胞(Alarcon等人,(1999).《寄生虫学进展》《寄生虫学进展》42:343-410;以及Lewis等人,(1999).《病毒研究进展》(学术出版社)54:129-88)。

[0147] 替代性递送方法可以包含将裸DNA气溶胶滴注到如鼻和肺黏膜等黏膜表面(Lewis等人,(1999).《病毒研究进展》(学术出版社)54:129-88)和将pDNA局部施用于眼睛和阴道粘膜(Lewis等人,(1999)《病毒研究进展》(学术出版社)54:129-88)。使用阳离子脂质体-DNA制剂、可生物降解的微球、用于肠粘膜口服施用的减毒志贺氏菌属(Shigella)或李斯特菌属(Listeria)载体以及重组腺病毒载体也已实现粘膜表面递送。

[0148] 递送方法确定了产生有效免疫应答所需的DNA剂量。盐水注射需要不同量的DNA,10μg-1mg,而基因枪递送需要的是肌内盐水注射的1/100至1/1000DNA来提高有效的免疫应答。通常,需要0.2μg-20μg,尽管据报告的含量低至16ng。这些数量因物种而异,例如,小鼠所需的DNA是灵长类动物的大约1/10。盐水注射需要更多的DNA,因为DNA被递送到靶组织(通常是肌肉)的胞外空间,在所述胞外空间中,它必须在被细胞吸收之前克服物理屏障(如基底膜和大量结缔组织,仅举几例),而基因枪递送将DNA直接轰击到细胞中,产生较少的"浪费"(参见例如,Sedegah等人,(1994).《美国国家科学院院刊(Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America)》91(21):9866-9870;Daheshia等人,(1997).《免疫学杂志》159(4):1945-1952;Chen等人,(1998).《免疫学杂志》160(5):2425-2432;Sizemore(1995)《科学(Science)》270(5234):299-302;Fynan等人,(1993)《美国国家科学院院刊》90(24):11478-82)。

[0149] 在某些实施例中,本文所公开的编码疫苗的载体可以用于体外免疫疗法。例如,在一些实施例中,可以将编码疫苗的载体转染或转导到抗原呈递细胞(例如,树突状细胞)中。

在某些实施例中，然后将这些抗原呈递细胞施用于受试者。在一些实施例中，这些抗原呈递细胞用于体外激活T细胞(例如，自体T细胞、同基因T细胞)，其然后被施用于受试者。

[0150] 在一个实施例中，肿瘤疫苗或免疫原性组合物可以包含编码例如一种或多种如根据本发明鉴定的新抗原肽/多肽的单独DNA质粒。如本文所讨论的，表达载体的准确选择可以取决于要表达的肽/多肽，并且完全在普通技术人员的技能范围内。DNA构建体(例如，呈肌肉细胞中以游离的、非复制的、非整合的形式)的预期持久性预期会提供增加的保护持续时间。

[0151] 可替代地，框内富集RNA文库可以在体外转染或电穿孔到细胞中，或直接体内递送到受试者。自我复制的RNA可以用于产生RNA疫苗。可以使用多种方法例如皮下、肌内或静脉内注射、局部施加到皮肤或通过鼻腔喷雾将RNA疫苗递送到受试者。RNA疫苗也可以使用脂质纳米颗粒或RNA病毒来递送。用作载体的典型RNA病毒包含但不限于逆转录病毒、慢病毒、甲病毒和弹状病毒。

[0152] 本发明的肿瘤疫苗可以使用基于病毒的系统(例如，腺病毒系统、腺相关病毒(AAV)载体、痘病毒或慢病毒)在体内编码和表达。在一个实施例中，肿瘤疫苗或免疫原性组合物可以包含用于有需要的人患者的基于病毒的载体，如例如腺病毒(参见例如，Baden等人对重组腺病毒血清型26HIV-1Env疫苗(IPCAVD 001)的安全性和免疫原性的首次人体评估(First-in-human evaluation of the safety and immunogenicity of a recombinant adenovirus serotype 26HIV-1Env vaccine(IPCAVD 001).)《传染病杂志(J Infect Dis.)》2013年1月15日;207(2):240-7，所述文献特此通过引用整体并入。先前已经描述了可以用于腺相关病毒、腺病毒和慢病毒递送的质粒(参见例如，美国专利第6,955,808号和第6,943,019号，以及美国专利申请第20080254008号，所述文献特此通过引用并入)。

[0153] 在可以用于实施本发明的载体中，通过逆转录病毒基因转移方法可以整合到细胞的宿主基因组中，通常导致插入的转基因的长期表达。在优选的实施例中，所述逆转录病毒是慢病毒。另外地，已在许多不同的细胞类型和靶组织中观察到高转导效率。逆转录病毒的嗜性可以通过掺入外源包膜蛋白来改变，从而扩大靶细胞的潜在靶标群体。还可以对逆转录病毒进行工程化，以允许插入的转基因有条件地表达，使得只有某些细胞类型会被慢病毒感染。细胞类型特异性启动子可以用于靶向特定细胞类型中的表达。慢病毒载体是逆转录病毒载体(并且因此慢病毒和逆转录病毒载体可以用于实施本发明)。此外，慢病毒载体是优选的，因为他们能够转导或感染非分裂细胞，并且通常会产生高病毒滴度。因此，逆转录病毒基因转移系统的选择可能取决于靶组织。逆转录病毒载体包含具有至多6-10kb外源序列包装能力的顺式作用长末端重复序列。最小的顺式作用LTR足以复制和包装载体，然后所述载体用于将期望的核酸整合到靶细胞中以提供永久表达。可以用于实施本发明的广泛使用的逆转录病毒载体包含基于鼠白血病病毒(MuLV)、长臂猿白血病病毒(GaLV)、猿免疫缺陷病毒(SIV)、人免疫缺陷病毒(HIV)和其组合的那些逆转录病毒载体(参见例如Buchscher等人，(1992)《病毒学杂志(J.Virol.)》66:2731-2739;Johann等人，(1992)《病毒学杂志》66:1635-1640;Sommnerfelt等人，(1990)《病毒学(Virol.)》176:58-59;Wilson等人，(1998)《病毒学杂志》63:2374-2378;Miller等人，(1991)《病毒学杂志》65:2220-2224;PCT/US94/05700)。Zou等人通过鞘内导管施用了约10μl的滴度为1×10^{9}个转导单位(TU)/

ml的重组慢病毒。这些种类的剂量可以适用于或推断用于本发明的逆转录病毒或慢病毒载体。

[0154] 还可用于实施本发明的是如基于马传染性贫血病毒(EIAV)的慢病毒载体等最小的非灵长类慢病毒载体(参见例如,Balagaan,(2006)《基因医学杂志(J Gene Med)》;8:275-285,2005年11月21日在线发表于Wiley InterScience(interscience.wiley.com).DOI:10.1002/jgm.845)。载体可以具有驱动靶基因表达的巨细胞病毒(CMV)启动子。因此,本发明考虑了可用于实施本发明的载体:病毒载体,包含逆转录病毒载体和慢病毒载体。

[0155] 还可用于实施本发明的是腺病毒载体。一个优点是重组腺病毒能够在体外和体内在多种哺乳动物细胞和组织中有效转移和表达重组基因,从而导致转移的核酸的高表达。进一步地,有效感染静止细胞的能力扩大了重组腺病毒载体的用途。另外,高表达水平确保核酸产物将表达成生成免疫应答的足够水平(参见例如,美国专利第7,029,848号,特此通过引用并入)。

[0156] 在本文中的一实施例中,通过腺病毒进行递送,其可以是含有至少1×10^5个腺病毒载体颗粒(也被称为颗粒单位,pu)的单次加强剂量。在本文中的一实施例中,剂量优选地为腺病毒载体的至少约1×10^6个颗粒(例如,约1×10^6-1×10^{12}个颗粒),更优选地至少约1×10^7个颗粒,更优选地至少约1×10^8个颗粒(例如,约1×10^8-1×10^{11}个颗粒或约1×10^8-1×10^{12}个颗粒),并且最优选地至少约1×10^9个颗粒(例如,约1×10^9-1×10^{10}个颗粒或约1×10^9-1×10^{12}个颗粒)或甚至至少约1×10^{10}个颗粒(例如,约1×10^{10}-1×10^{12}个颗粒)。可替代地,剂量包括不超过约1×10^{14}个颗粒,优选地不超过约1×10^{13}个颗粒,甚至更优选地不超过约1×10^{12}个颗粒,甚至更优选不超过约1×10^{11}个颗粒,并且最优选地不超过约1×10^{10}个颗粒(例如,不超过约1×10^9个制品)。因此,所述剂量可以含有单个剂量的腺病毒载体,例如,约1×10^6颗粒单位(pu)、约2×10^6pu、约4×10^6pu、约1×10^7pu、约2×10^7pu、约4×10^7pu、约1×10^8pu、约2×10^8pu、约4×10^8pu、约1×10^9pu、约2×10^9pu、约4×10^9pu、约1×10^{10}pu、约2×10^{10}pu、约4×10^{10}pu、约1×10^{11}pu、约2×10^{11}pu、约4×10^{11}pu、约1×10^{12}pu、约2×10^{12}pu或约4×10^{12}pu的腺病毒载体。参见例如,于2013年6月4日授予Nabel等人的美国专利第8,454,972B2号中的腺病毒载体;通过引用并入本文,以及其第29栏第36-58行的剂量。在在本文中的一实施例中,腺病毒通过多剂量递送。

[0157] 在体内递送方面,由于毒性低和引起插入诱变的可能性低,AAV优于其它病毒载体,因为AAV没有整合到宿主基因组中。AAV的包装限制为4.5或4.75Kb。大于4.5或4.75Kb的构建体会导致病毒产量显著降低。有许多可以用于驱动核酸分子表达的启动子。AAV ITR可以作为启动子,并且有利于消除对另外启动子元件的需要。对于普遍存在的表达,可以使用以下启动子:CMV、CAG、CBh、PGK、SV40、铁蛋白重链或轻链等。对于脑表达,可以使用以下启动子:用于所有神经元的SynapsinI、用于兴奋性神经元的CaMKIIα、用于GABA能神经元的GAD67或GAD65或VGAT等。用于驱动RNA合成的启动子可以包含:如U6或H1等Pol III启动子。Pol II启动子和内含子盒的使用可以用于表达向导RNA(gRNA)。

[0158] 对于AAV,AAV可以是AAV1、AAV2、AAV5或其任何组合。可以针对要靶向的细胞选择AAV;例如,可以选择AAV血清型1、2、5或混合衣壳AAV1、AAV2、AAV5或其任何组合用于靶向脑或神经元细胞;并且可以选择AAV4用于靶向心脏组织。AAV8可用于递送到肝脏。上述启动子和载体单独地是优选的。

[0159] 在本文中的实施例中，递送是通过AAV。将AAV体内递送至人类的治疗有效剂量被认为在约20至约50ml的含有约1×10^{10}至约1×10^{14}功能性AAV/ml溶液的盐溶液的范围内。可以调整剂量以平衡治疗益处与任何副作用。在本文中的一实施例中，AAV剂量通常在约1×10^{5}至1×10^{14}个基因组AAV、约1×10^{8}至1×10^{14}个基因组AAV、约1×10^{10}至约5×10^{13}个基因组或约1×10^{11}至约1×10^{13}个基因组AAV的浓度范围内。人类剂量可以为约1×10^{13}个基因组AAV。此类浓度可以在约0.001ml至约100ml、约0.05ml至约50ml或约10ml至约25ml的载体溶液中递送。在优选的实施例中，AAV以约2×10^{13}个病毒基因组/毫升的滴度使用，并且小鼠的每个纹状体半球接受一次500纳升注射。通过建立剂量应答曲线的常规试验，本领域普通技术人员可以容易地确立其它有效剂量。参见例如，于2013年3月26日授予Hajjar等人的美国专利第8,404,658B2号，第27栏第45-60行。

[0160] 在另一个实施例中，有效激活肿瘤疫苗或免疫原性组合物的细胞免疫应答可以通过在非病原微生物中表达疫苗或免疫原性组合物中的相关抗原来实现。此类微生物的众所周知的实例是牛结核分枝杆菌BCG、沙门氏菌和假单胞菌(参见，美国专利第6,991,797号，其通过引用整体并入本文)。

[0161] 在另一个实施例中，痘病毒用于肿瘤疫苗或免疫原性组合物。这些包含正痘病毒、禽痘、牛痘、MVA、NYVAC、金丝雀痘、ALVAC、鸡痘、TROVAC等(参见例如Verardiet等人，《人疫苗免疫治疗学(Hum Vaccin Immunother.)》2012年7月;8(7):961-70;以及Moss，《疫苗》2013;31(39):4220-4222)。痘病毒表达载体描述于1982年，并且迅速广泛用于疫苗开发以及众多领域的研究。载体的优点包含结构简单、能够容纳大量外源DNA和高表达水平。

[0162] 在另一个实施例中，牛痘病毒用于肿瘤疫苗或免疫原性组合物中以表达新抗原。(Rolph等人，重组病毒作为疫苗和免疫工具(Recombinant viruses as vaccines and immunological tools.)《当前免疫学观点(Curr Opin Immunol)》9:517-524,1997)。重组牛痘病毒能够在受感染宿主细胞的细胞质内复制，并且因此所关注的多肽可以诱导免疫应答。此外，痘病毒已被广泛用作疫苗或免疫原性组合物载体，因为痘病毒能够通过直接感染免疫细胞，特别是抗原呈递细胞，靶向经编码的抗原以通过主要组织相容性复合物I类途径进行处理，而且还由于痘病毒能够自我辅助。

[0163] 在另一个实施例中，ALVAC用作肿瘤疫苗或免疫原性组合物中的载体。ALVAC是金丝雀痘病毒，所述金丝雀痘病毒可以被修饰成表达外源转基因，并且已被用作针对原核和真核抗原的疫苗接种方法(Horig H、Lee DS、Conkright W等人表达人癌胚抗原和B7.1共刺激分子的重组金丝雀痘病毒(ALVAC)疫苗的I期临床试验(Phase I clinical trial of a recombinant canarypoxvirus(ALVAC)vaccine expressing human carcinoembryonic antigen and the B7.1 co-stimulatory molecule.)《癌症免疫学免疫疗法(Cancer Immunol Immunother)》2000;49:504-14;von Mehren M、Arlen P、Tsang KY等人在患有复发性表达CEA的腺癌的患者中对含有癌胚抗原(CEA)和B7.1转基因的双基因重组禽痘疫苗进行初步研究(Pilot study of a dual gene recombinant avipox vaccine containing both carcinoembryonic antigen(CEA)and B7.1 transgenes in patients with recurrent CEA-expressing adenocarcinomas.)《临床癌症研究(Clin Cancer Res)》2000;6:2219-28;Musey L、Ding Y、Elizaga M等人肌内施用HIV-1疫苗接种可以在未感染HIV-1的个体中诱导全身性和粘膜T细胞免疫(HIV-1vaccination administered

intramuscularly can induce both systemic and mucosal T cell immunity in HIV-1-uninfected individuals.)《免疫学杂志》2003;171:1094-101;Paoletti E.痘病毒载体应用于疫苗接种:更新(Applications of pox virus vectors to vaccination:an update.)《美国国家科学院院刊》1996;93:11349-53;美国专利第7,255,862号)。在I期临床试验中,表达肿瘤抗原CEA的ALVAC病毒表现出极好的安全性特征,并且导致所选择患者的CEA特异性T-细胞应答增加;然而,未观察到客观的临床应答(Marshall JL、Hawkins MJ、Tsang KY等人表达人癌胚抗原的复制缺陷型禽痘重组疫苗在癌症患者中的I期研究(Phase I study in cancer patients of a replication-defective avipox recombinant vaccine that expresses human carcinoembryonic antigen.)《临床肿瘤学杂志(J Clin Oncol)》1999;17:332-7)。

[0164] 在另一个实施例中,经修饰的安卡拉牛痘(MVA)病毒可以用作肿瘤疫苗或免疫原性组合物的病毒载体。MVA是正痘病毒家族的成员,并且由安卡拉牛痘病毒菌株(CVA)的鸡胚成纤维细胞的约570次连续传代产生(关于综述,参见Mayr,A.等人,《感染(Infection)》3,6-14,1975)。由于这些传代,与CVA相比,所得MVA病毒含有的基因组信息少31千碱基,并且受到宿主细胞的高度限制(Meyer,H.等人,《普通病毒学杂志(J.Gen.Virol.)》72,1031-1038,1991)。MVA的特征在于其极度减毒,即毒力或感染能力降低,但仍具有极好的免疫原性。在各种动物模型中进行测试时,MVA被证明是无毒的,即使在免疫抑制个体中也是如此。此外,MVA-BN®-HER2是设计用于治疗HER-2阳性乳腺癌的候选免疫疗法,并且目前正处于临床试验阶段。(Mandl等人,《癌症免疫学免疫疗法》2012年1月;61(1):19-29)。已经描述了制造和使用重组MVA的方法(例如参见美国专利第8,309,098号和第5,185,146号,所述美国专利特此整体并入)。

[0165] 在另一个实施例中,经修饰的哥本哈根牛痘病毒毒株、NYVAC和NYVAC变体用作载体(参见美国专利第7,255,862号;PCT WO 95/30018;美国专利第5,364,773号和第5,494,807号,所述文献特此通过引用整体并入)。

[0166] 在一个实施例中,将疫苗或免疫原性组合物的重组病毒颗粒施用于有需要的患者。可以以任何合适的量施用疫苗或免疫原性组合物以实现在这些剂量水平下的表达。病毒颗粒可以以约至少$10^{3.5}$pfu的量施用于有需要的患者或转染到细胞中;因此,病毒颗粒优选地以至少约10^{4}pfu至约10^{6}pfu施用于有需要的患者或感染或转染到细胞中;然而,有需要的患者可以被施用至少约10^{8}pfu,使得用于施用的更优选的量可以是至少约10^{7}pfu至约10^{9}pfu。NYVAC的剂量适用于ALVAC、MVA、MVA-BN和禽痘,如金丝雀痘和鸟痘。

[0167] 药物组合物/递送方法

[0168] 在某些方面,本文提供了包括扩增产物的药物组合物,所述扩增产物包括用本文所描述的方法产生的框内cDNA片段序列。在某些方面,本文提供了包括载体的药物组合物,所述载体包括用本文所描述的方法载体框内cDNA片段序列。在一些实施例中,本文所提供的药物组合物进一步包括药学上可接受的载体。

[0169] 在某些实施例中,所述药物组合物用于产生肿瘤疫苗。在某些实施例中,所述药物组合物用于治疗癌症。

[0170] 本发明还涉及药物组合物,所述药物组合物包括用本文所描述的方法产生的有效量的肿瘤疫苗,任选地与药学上可接受的载体、赋形剂或添加剂组合。

[0171] “药学上可接受的载体”是指有助于向受试者施用活性剂和有助于受试者吸收的物质，并且所述物质可以包含在本文所描述的组合物中而不会对患者引起显著不良的毒理学作用。药学上可接受的赋形剂的非限制性实例包含水、NaCl、生理盐水溶液、乳酸化林格氏(Ringer's)液、普通蔗糖、普通葡萄糖、粘合剂、填充剂、崩解剂、润滑剂、包衣、甜味剂、调味剂、盐溶液(如林格氏溶液)、醇、油、明胶、碳水化合物(如乳糖、粉酶或淀粉)、脂肪酸酯、羟甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮和颜料等。此类制剂可以进行灭菌，并且如果需要的话，可以与助剂(如润滑剂、防腐剂、稳定剂、润湿剂、乳化剂、用于影响渗透压的盐、缓冲液、着色物质和/或芳香物质等)混合，所述助剂不与本文所描述的组合物发生有害反应。本领域的技术人员将认识到，其它药用赋形剂是有用的。

[0172] 虽然肿瘤疫苗可以作为唯一的活性药剂施用，但是它们也可以与一种或多种其它药剂和/或佐剂组合使用。当作为组合施用时，治疗剂可以被配制成同时或在不同时间给予的单独的组合物，或者治疗剂可以作为单一组合物给予。

[0173] 所述组合物可以每日一次、每日两次、每两天一次、每三天一次、每四天一次、每五天一次、每六天一次、每七天一次、每两周一次、每三周一次、每四周一次、每两个月一次、每六个月一次或每年一次施用。给药间隔可以根据个体患者的需要进行调整。对于更长的施用间隔，可以使用延长释放或贮库调配物。

[0174] 本发明的组合物可以用于治疗急性疾病和疾病病状，并且可以用于治疗慢性病状。具体地，本发明的组合物用于治疗或预防肿瘤的方法中。在某些实施例中，本发明的化合物的施用时间段超过两周、三周、一个月、两个月、三个月、四个月、五个月、六个月、一年、两年、三年、四年或五年、十年或十五年；或者例如，以天、月或年为单位的任何时间段范围，其中所述范围的下限是介于14天与15年之间的任何时间段，并且所述范围的上限介于15天与20年之间(例如，4周与15年之间，6个月与20年之间)。在一些情况下，在患者的余生施用本发明的化合物可能是有利的。在优选的实施例中，监测患者以检查疾病或病症的进展，并相应地调整剂量。在优选的实施例中，根据本发明的治疗在至少两周、三周、一个月、两个月、三个月、四个月、五个月、六个月、一年、两年、三年、四年或五年、十年、十五年、二十年或受试者的余生中有效。

[0175] 肿瘤疫苗可以以含有常规药学上可接受的载体、佐剂和媒剂的剂量单位调配物的形式通过注射、口服、肠胃外、通过吸入喷雾、直肠、阴道或局部施用。如本文所用，术语肠胃外包含进入一个或多个淋巴结、皮下、静脉内、肌内、胸骨内、输注技术、腹膜内、眼部或眼内、玻璃体内、口腔内、经皮、鼻内、进入大脑(包含颅内和硬膜内)、进入关节(包含踝、膝、髋、肩、肘、腕)、直接进入肿瘤等，以及以栓剂形式。

[0176] 手术切除使用外科手术去除如纵隔肿瘤、神经源性肿瘤或生殖细胞肿瘤或胸腺瘤等癌症中的异常组织。在某些实施例中，肿瘤疫苗或免疫原性组合物的施用在肿瘤切除之后1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15周或更多周开始。优选地，肿瘤疫苗或免疫原性组合物的施用在肿瘤切除之后1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12周开始。在一些实施例中，肿瘤可能不能被完全切除，并且肿瘤疫苗的施用发生在肿瘤仍然存在于患者中的时候。

[0177] 初始/加强方案是指连续施用疫苗或免疫原性或免疫组合物。在某些实施例中，肿瘤疫苗或免疫原性组合物的施用采用初始/加强给药方案，例如肿瘤疫苗或免疫原性组合物在第1周、第2周、第3周或第4周作为引物施用，并且肿瘤疫苗或免疫原性组合物在第2个

月、第3个月或第4个月作为加强剂施用。在另一个实施例中，异源引发-加强策略用于引发更强的细胞毒性T细胞应答(参见Schneider等人，使用异源引发-加强免疫策略诱导CD8+ T细胞，《免疫学评论(Immunological Reviews)》第170卷，第1期，第29-38页，1999年8月)。在另一个实施例中，编码肿瘤疫苗的DNA用于引发，随后进行蛋白质加强。在另一个实施例中，蛋白质用于引发，随后用编码肿瘤疫苗的病毒加强。在另一个实施例中，编码肿瘤疫苗的病毒用于引发，并且另一种病毒用于加强。在另一个实施例中，蛋白质用于引发，并且DNA用于加强。在优选的实施例中，DNA疫苗或免疫原性组合物用于引发T细胞应答，并且重组病毒疫苗或免疫原性组合物用于加强应答。在另一个优选实施例中，病毒疫苗或免疫原性组合物与蛋白质或DNA疫苗或免疫原性组合物共同施用，以充当蛋白质或DNA疫苗或免疫原性组合物的佐剂。然后可以用病毒疫苗或免疫原性组合物、蛋白质或DNA疫苗或免疫原性组合物加强患者(参见Hutchings等人，蛋白质和病毒疫苗的组合诱导了有效的细胞和体液免疫应答并且增强了保护免于鼠疟疾攻击(Combination of protein and viral vaccines induces potent cellular and humoral immune responses and enhanced protection from murine malaria challenge.)《传染与免疫(Infect Immun.)》2007年12月;75(12):5819-26.电子版2007年10月1日)。

[0178] 药物组合物可以按照常规的药学方法进行加工，以产生用于向包含人和其它哺乳动物的有需要的患者施用的药剂。

[0179] 用本文所描述的方法产生的肿瘤疫苗可以含有一种或多种新抗原。在某些实施例中，所述药物组合物进一步包括免疫调节剂或佐剂。在某些实施例中，免疫调节剂或佐剂选自由以下组成的组：poly-ICLC、1018ISS、铝盐、Amplivax、AS15、BCG、CP-870,893、CpG7909、CyaA、dSLIM、GM-CSF、IC30、IC31、咪喹莫特、ImuFact IMP321、IS贴剂、ISS、ISCOMATRIX、JuvImmune、LipoVac、MF59、单磷酰基脂质A、蒙塔尼德IMS1312、蒙塔尼德ISA206、蒙塔尼德ISA 50V、蒙塔尼德ISA-51、OK-432、OM-174、OM-197-MP-EC、ONTAK、PEPTEL、载体系统、PLGA微粒、瑞喹莫德、SRL172、病毒颗粒和其它病毒样颗粒、YF-17D、VEGF陷阱、R848、β-葡聚糖、Pam3Cys和阿奎拉的QS21刺激子。在某些实施例中，免疫调节剂或佐剂包括poly-ICLC。

[0180] 根据本发明的实施例，呫吨酮衍生物，例如瓦德美赞或AsA404(也被称为5,6-二甲基呫吨酮-4-乙酸(DMXAA))也可以用作佐剂。可替代地，此类衍生物也可以例如通过全身或瘤内递送与本发明的疫苗或免疫原性组合物并行施用，以刺激肿瘤部位处的免疫。在不受理论束缚的情况下，据信此类呫吨酮衍生物通过经由IFN基因ISTING受体的刺激物刺激干扰素(IFN)产生而起作用(参见例如Conlon等人(2013)小鼠，而不是人STING，结合并响应于血管破坏剂5,6-二甲基呫吨酮-4-乙酸发出信号(Mouse,but not Human STING,Binds and Signals in Response to the Vascular Disrupting Agent5,6-Dimethylxanthenone-4-Acetic Acid)《免疫学杂志》,190:5216-25以及Kim等人(2013)抗癌类黄酮是小鼠选择性STING激动剂(Anticancer Flavonoids are Mouse-Selective STING Agonists),8:1396-1401)。

[0181] 肿瘤疫苗或免疫组合物还可以包含选自丙烯酸或甲基丙烯酸聚合物以及马来酸酐和烯基衍生物的共聚物的佐剂化合物。它具体地是丙烯酸或甲基丙烯酸与糖或多元醇的聚烯基醚(卡波姆(carbomer))交联的聚合物，具体地是与烯丙基蔗糖或与烯丙基季戊四醇交联的聚合物。它也可以是例如马来酸酐和乙烯与二乙烯基醚交联的共聚物(参见美国专

利第6,713,068号,所述美国专利特此通过引用整体并入)。

[0182] 药物组合物包括用于治疗本文疾病和病状(例如,肿瘤)的治疗有效量的本文所描述的肿瘤疫苗,其任选地与药学上可接受的添加剂、载体和/或赋形剂组合。本领域的普通技术人员从本公开和本领域的知识将认识到,根据本发明的一种或多种化合物的治疗有效量可以随要治疗的病状、其严重程度、要采用的治疗方案、所用药剂的药代动力学以及接受治疗的患者(动物或人)而变化。

[0183] 为了制备根据本发明的药物组合物,治疗有效量的一种或多种根据本发明的化合物优选地根据常规药物混合技术与药学上可接受的载体紧密混合以产生剂量。根据施用所期望的制剂形式,载体可以采取多种形式,例如,眼用、口服、局部或肠胃外施用,包含凝胶、乳膏、软膏、洗剂和定时释放的植入式制剂等。在制备呈口服剂型的药物组合物时,可以使用任何常用的药物介质。因此对于液体口服制剂如(悬浮液、酏剂和溶液),可以使用包含水、乙二醇、油、醇、调味剂、防腐剂、着色剂等的合适的载体和添加剂。对于固体口服制剂如粉末、片剂、胶囊并且对于固体制剂如栓剂,可以使用合适的载体和添加剂,所述载体和添加剂包含淀粉、糖载体如葡萄糖、甘露醇、乳糖和相关载体、稀释剂、制粒剂、润滑剂、粘合剂、崩解剂等。如果期望的话,片剂或胶囊可以通过标准技术进行肠溶包衣或持续释放。

[0184] 活性化合物以足以向患者递送治疗有效量的针对期望适应症的量包含在药学上可接受的载体或稀释剂中,而不会在被治疗的患者中引起严重的毒性作用。

[0185] 口服组合物通常包含惰性稀释剂或可食用载体。它们可以封装在明胶胶囊中或压制成片剂。出于口服治疗施用的目的,可以将活性化合物或其前药衍生物与赋形剂一起并入并以片剂、锭剂或胶囊的形式使用。可以包含药学上相容的粘结剂和/或佐剂材料作为组合物的一部分。

[0186] 片剂、丸剂、胶囊剂、锭剂等可以含有以下成分中的任何成分或者具有类似性质的化合物:粘合剂,如微晶纤维素、黄蓍胶或明胶;赋形剂,如淀粉或乳糖;分散剂,如海藻酸、或玉米淀粉;润滑剂,如硬脂酸镁或;助流剂,如胶体二氧化硅;甜味剂,如蔗糖或糖精;或调味剂,如薄荷、水杨酸甲酯或橙味调味剂。当剂量单位形式是胶囊时,除了本文所讨论的材料之外,还可以含有液体载体如脂肪油。另外,剂量单位形式可以含有改变剂量单位的物理形式的各种其它材料,例如糖、紫胶或肠溶剂的包衣。

[0187] 适合用于口服施用的本发明的调配物可以呈离散单位的形式,如各自含有预先确定的量的活性成分的胶囊、扁囊剂或片剂;呈粉末或颗粒的形式;呈水性液体或非水性液体中的溶液或悬浮液的形式;或呈水包油型液体乳剂或油包水型乳剂的形式以及呈团注的形式等。

[0188] 片剂可以通过任选地与一种或多种辅助成分压缩或模制来制备。可以通过在适合的机器中压制任选地与结合剂、润滑剂、惰性稀释剂、防腐剂、表面活性剂或分散剂混合的呈自由流动形式的-活性成分(如粉末或颗粒)来制备压制片剂。模制的片剂可以通过在适合的机器中模制用惰性液体稀释剂润湿的粉末状化合物的混合物来制造。片剂任选地可以进行包衣或刻痕并且可以调配成使活性成分在其中缓慢释放或控制释放。

[0189] 调配药物活性成分的此类缓释或控释组合物的方法是本领域已知的,并且描述于几个已授权的美国专利中,所述专利中的一些专利包含但不限于美国专利第3,870,790号;第4,226,859号;第4,369,172号;第4,842,866号;以及第5,705,190号,所述专利的公开内

容通过引用整体并入本文。包衣可以用于将化合物递送至肠道(参见例如,美国专利第6,638,534号、第5,541,171号、第5,217,720号和第6,569,457号,以及其中引用的参考文献)。

[0190] 活性化合物或其药学上可接受的盐还可以作为酏剂、悬浮液、糖浆、薄片、口香糖等的组分施用。除了活性化合物之外,糖浆还可以含有蔗糖或果糖作为甜味剂以及某些防腐剂、染料和着色剂和调味剂。

[0191] 用于眼内、肠胃外、皮内、皮下或局部施加的溶液或悬浮液可以包含以下组分:无菌稀释剂,如注射用水、盐水溶液、固定油、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其它合成溶剂;抗菌剂,如苄醇或对羟基苯甲酸甲酯;抗氧化剂,如抗坏血酸或亚硫酸氢钠;螯合剂,如乙二胺四乙酸;缓冲剂,如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐;以及用于调节渗透压的药剂,如氯化钠或右旋糖。

[0192] 在某些实施例中,药学上可接受的载体是水性溶剂,即包括水的溶剂,任选地含有另外的助溶剂。示例性药学上可接受的载体包含水、水中的缓冲溶液(如磷酸盐缓冲盐水(PBS))和5%葡萄糖水溶液(D5W)或10%海藻糖或10%蔗糖。在某些实施例中,水性溶剂进一步包括例如量为约1-4%或1-3%的二甲基亚砜(DMSO)。在某些实施例中,药学上可接受的载体是等渗的(即,具有与体液如血浆基本上相同的渗透压)。

[0193] 在一个实施例中,将活性组合物与保护化合物免于从体内快速消除的载体(如控释调配物,包含植入物和微囊化的递送系统)一起制备。可以使用可生物降解的生物相容的聚合物,如乙烯乙酸乙烯酯、聚酸酐、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯、聚乳酸和聚乳酸-共-乙醇酸(PLGA)。鉴于本公开和本领域的知识,用于制备此类调配物的方法在技术人员的能力范围内。

[0194] 根据本公开和本领域的知识,本领域的技术人员认识到,除了片剂之外,可以调配其它剂型来提供活性成分的缓慢或受控释放。此类剂型包含但不限于胶囊、颗粒和软胶囊(gel-cap)。

[0195] 脂质体悬浮液也可以是药学上可接受的载体。这些脂质体悬浮液可以根据本领域技术人员已知的方法制备。例如,可以通过将适当的脂质溶于无机溶剂中来制备脂质体调配物,所述无机溶剂然后被蒸发,从而在容器的表面上留下干燥脂质的薄膜。然后,将活性化合物的水溶液引入容器中。然后用手旋转容器以从容器的侧面释放脂质材料并且分散脂质聚集体,从而形成脂质体悬浮液。本领域普通技术人员熟知的其它制备方法也可以用于本发明的这一方面。

[0196] 所述调配物可以方便地以单位剂型呈现,并且可以通过常规制药技术制备。此类技术包含使活性成分和药物载体或赋形剂关联的步骤。通常,通过使活性成分与液体载体或精细分散的固体载体或两者均匀且紧密地关联以及然后在必要时使产品成形来制备配制品。

[0197] 适合于在口中局部施用的调配物和组合物包含:锭剂,所述锭剂包括调味基质(通常是蔗糖和阿拉伯胶或黄蓍胶)中的成分,通常为蔗糖和阿拉伯胶或黄蓍胶;软锭剂,所述软锭剂包括在惰性基质中的活性成分,所述惰性基质如明胶和甘油,或蔗糖和阿拉伯胶;以及在合适的液体载体中包括要施用的成分的漱口剂。

[0198] 适于局部施用于皮肤的调配物可以以软膏、霜剂、凝胶和糊剂的形式呈现,其在药学上可接受的载体中包括要施用的成分的。优选的局部递送系统是含有要施用的成分的透

皮贴剂。

[0199] 用于直肠施用的调配物可以呈现为具有适合的基质(包括例如,可可脂或水杨酸酯)的栓剂形式。

[0200] 其中载体是固体的适用于鼻腔施用的调配物包含粒度例如在20至500微米范围内的粗粉,所述粗粉以施用鼻烟的方式施用,即通过鼻道从靠近鼻子的粉末容器中快速吸入。用于施用的合适调配物,其中载体是液体,例如鼻喷雾剂或滴鼻剂,包含活性成分的水性或油性溶液。

[0201] 适用于阴道施用的调配物可以呈现为阴道栓剂、卫生棉条、乳膏、凝胶、糊剂、泡沫或喷雾调配物的形式,其除了活性成分还含有如本领域已知适当的载体。

[0202] 肠胃外制剂可以包封在由玻璃或塑料制成的安瓿、一次性注射器或多剂量小瓶中。如果静脉内施用,则优选的载体包含例如生理盐水或磷酸盐缓冲盐水(PBS)。

[0203] 对于肠胃外调配物,载体通常包括无菌水或氯化钠水溶液,尽管也可以包含其它成分,所述其它成分包含有助于分散的成分。当然,在使用无菌水并维持无菌的情况下,组合物和载体也是无菌的。也可以制备可注射悬浮液,在所述情况下,可以采用适当的液体载体、悬浮剂等。

[0204] 适合用于肠胃外施用的调配物包含水性和非水性无菌注射溶液,这些注射溶液可以含有抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂以及使该调配物与预期接受者的血液等渗的溶质;以及水性和非水性无菌悬浮液,这些悬浮液可以包含悬浮剂和增稠剂。所述调配物可以存在于单位剂量或多剂量容器中,例如密封的安瓿瓶和小瓶,并且可以储存在仅需要紧接着在使用之前添加无菌液体载体(例如,注射用水)的冷冻-干燥(冻干)条件下。可以由前述种类的无菌粉末、颗粒和片剂制备临时注射溶液和悬浮液。

[0205] 活性化合物的施用范围可以为连续(静脉内滴注)到每天若干次口服施用(例如眼,Q.I.D.)并且可以包含口服、局部、眼部或眼内、肠胃外、肌内、静脉内、皮下、透皮(其可能包含渗透促进剂)、颊和栓剂施用等其它施用途径,包含通过眼部或眼内途径。

[0206] 肿瘤疫苗或免疫原性组合物可以以含有常规药学上可接受的载体、佐剂和媒剂的剂量单位调配物的形式通过注射、口服、肠胃外、通过吸入喷雾、直肠、阴道或局部施用。如本文所用,术语肠胃外包含进入一个或多个淋巴结、皮下、静脉内、肌内、胸骨内、输注技术、腹膜内、眼部或眼内、玻璃体内、口腔内、经皮、鼻内、进入大脑(包含颅内和硬膜内)、进入关节(包含踝、膝、髋、肩、肘、腕)、直接进入肿瘤等,以及以栓剂形式。

[0207] 可以使用各种技术在所关注的位点处提供主题组合物,如注射、使用导管、套管针、投射体(projectile)、普朗尼克凝胶(pluronic gel)、支架、持续药物释放聚合物(sustained drug release polymer)或提供用于内部进入的其它装置。在器官或组织由于从患者体内移除而可接近的情况下,此类器官或组织可以浸泡在含有主题组合物的介质中,主题组合物可以涂在器官上,或者可以以任何方便的方式施涂。

[0208] 肿瘤疫苗可以通过适于组合物的控制和持续释放的装置施用,所述组合物能有效获得期望的局部或全身生理或药理效果。所述方法包含将持续释放药物递送系统定位在其中需要释放药剂的区域,并且允许所述药剂通过所述装置到达期望的治疗区域。

[0209] 治疗方法

[0210] 本发明提供了通过向受试者施用肿瘤疫苗或编码根据本文所描述的方法产生的

肿瘤疫苗的载体来诱导所述受试者的肿瘤特异性免疫应答、针对肿瘤进行疫苗接种、治疗和/或减轻所述受试者的癌症的症状的方法。

[0211] 根据本发明，本文所描述的肿瘤疫苗或编码肿瘤疫苗的载体可以用于已被诊断为患有癌症或有患上癌症的风险的患者。

[0212] 可以使用这种肿瘤疫苗或编码肿瘤疫苗的载体治疗的癌症可以包含用其它化学治疗剂难以治疗的病例。如本文所用，术语“难治的”是指在在用另一种化学治疗剂治疗之后不显示出或仅显示出弱的抗增殖应答(例如，不显示出或仅显示出弱的肿瘤生长抑制)的癌症(和/或其转移瘤)。这些是不能用其它化学治疗剂满意地治疗的癌症。难治性癌症不仅涵盖(i)在患者的治疗期间一种或多种化学治疗剂已经失效的癌症，还涵盖(ii)可以通过其它方式，例如活检和在存在化学治疗剂的情况下的培养显示为难治的癌症。

[0213] 本文所描述的肿瘤疫苗或编码肿瘤疫苗的载体也可适用于治疗有需要且之前未接受过治疗的患者。

[0214] 本文所描述的肿瘤疫苗或编码肿瘤疫苗的载体也适用于受试者没有可检测到的肿瘤但具有疾病复发高风险的情况。

[0215] 还特别关注的是对经历了自体造血干细胞移植(AHSCT)的有需要的患者，并且具体地是在经历AHSCT之后展现出残留疾病的患者的治疗。AHSCT后设置的特征在于残留疾病量低，免疫细胞输注到稳态扩张状态，以及不存在任何标准的延缓复发疗法。这些特征提供了使用所描述的肿瘤疫苗或免疫原性组合物来延迟疾病复发的独特机会。

[0216] 在某些实施例中，本文所描述的药物组合物、肿瘤疫苗或编码肿瘤疫苗的载体可以与任何其它常规抗癌治疗(如例如放射疗法和肿瘤手术切除)结合施用。这些治疗可以根据需要和/或指示进行，并且可以在施用本文所描述的药物组合物、肿瘤疫苗、编码肿瘤疫苗的载体、剂型和试剂盒之前、同时或之后发生。

[0217] 本文所描述的肿瘤疫苗或编码肿瘤疫苗的载体的有效剂量是肿瘤疫苗或编码肿瘤疫苗的载体的对于特定患者、组合物和施用模式而言可有效实现期望的治疗应答且对患者的毒性最小的量。有效剂量水平可以使用本文所描述的方法来鉴定并且取决于各种药代动力学因素，包含：所施用的特定组合物的活性；施用途径；施用时间；所采用的特定组合物的排泄速率；治疗持续时间；与所采用的特定化合物组合使用的其它药物、化合物和/或材料；所治疗的患者的年龄、性别、体重、病况、一般健康状况以及先前病史；以及医学领域中熟知的类似因素。通常，癌症疗法的有效剂量是有效产生治疗效果的最低剂量的治疗剂的量。此类有效剂量通常取决于上述因素。

[0218] 施用途径的实例包含口服施用、直肠施用、局部施用、吸入(鼻)或注射。通过注射施用包含静脉内(IV)、病灶内、癌周、肌内(IM)和皮下(SC)施用。本文所描述的组合物可以通过任何有效途径以任何形式施用，包含但不限于口服、肠胃外、肠内、静脉内、肿瘤内、腹膜内、局部、透皮(例如，使用任何标准贴剂)、皮内、眼用、鼻(内)、局部、非口服，如气雾剂、吸入剂、皮下、肌内、口腔、舌下、(经)直肠、阴道、动脉内和鞘内、经粘膜(例如，舌下、舌、(经)口腔)、(经)尿道、阴道(例如经阴道和阴道周围)、植入、膀胱内、肺内、十二指肠内、胃内和支气管内。在一些实施例中，本文所描述的药物组合物、肿瘤疫苗或疫苗编码载体通过口服、直肠、局部、膀胱内、通过注射到引流淋巴结中或引流淋巴结附近、静脉内、通过吸入或气雾剂或皮下施用。在一些实施例中，施用是肠胃外施用(例如，皮下施用)。施用可以是

瘤内注射或瘤周注射。

[0219] 剂量方案可以是多种方法和量中的任何一种，并且可以由本领域技术人员根据已知的临床因素来确定。如医学领域已知的，任何一个患者的剂量取决于许多因素，包含受试者的物种、大小、体表面积、年龄、性别、免疫能力、肿瘤尺寸和总体健康状况、要施用的特定微生物、施用的持续时间和途径、疾病的种类和阶段，例如肿瘤大小，以及其它化合物如同时施用的药物。

[0220] 本文所描述的治疗方法可以适于治疗原发性肿瘤、继发性肿瘤或转移瘤，以及复发性肿瘤或癌症。本文所描述的药物组合物的剂量可以根据剂型、施用途径、目标疾病的程度或阶段等适当设定或调整。

[0221] 在一些实施例中，施用于受试者的剂量足以预防癌症、延迟其发作、或减缓或停止其进展、或预防癌症复发或有助于受试者的总体存活。本领域技术人员将认识到剂量将取决于多种因素，包含所采用的特定化合物的强度以及受试者的年龄、物种、状况和体重。剂量的大小也将通过施用途径、定时和频率以及可能伴随特定化合物施用的任何不利副作用和期望的生理作用的存在、性质和程度来确定。

[0222] 可以通过本领域普通技术人员已知的常规测距技术确定合适的剂量和给药方案。通常，治疗开始于比化合物的最优剂量小的较小剂量。此后，以小增量增加剂量，直到在这种情况下达到最佳效果为止。有效剂量和治疗方案可以通过惯例和常规方式来确定，例如，在实验室动物中以低剂量开始，并且然后在监测效果的同时增加剂量，以及系统地改变剂量方案。动物研究通常用于确定生物活性剂每千克体重的最大耐受剂量(“MTD”)。本领域技术人员定期推断在包含人类在内的其它物种中的功效剂量，同时避免毒性。

[0223] 根据上文所述，在治疗应用中，本文所提供的肿瘤疫苗或编码肿瘤疫苗的载体的剂量可以根据所施用的特定肿瘤疫苗或编码肿瘤疫苗的载体、接受患者的年龄、体重和临床状况和施用疗法的临床医生或从业者的经验和判断以及影响所选剂量的其它因素而变化。通常，剂量应足以导致肿瘤生长减缓，并且优选地消退，并且最优选地引起癌症的完全消退。

[0224] 可以通过本文所描述的方法治疗的癌症的实例包含但不限于血液恶性肿瘤、急性非淋巴细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、急性粒细胞白血病、慢性粒细胞白血病、急性早幼粒细胞白血病、成人T细胞白血病、白血病、白细胞白血病、嗜碱性白血病、胚细胞白血病、牛白血病、慢性粒细胞白血病、皮肤白血病、胚胎性白血病、嗜酸性白血病、格罗氏(Gross’leukemia)、里德尔细胞白血病、希林氏白血病(Schilling’s leukemia)、干细胞白血病、亚白血病、未分化细胞白血病、毛细胞白血病、成血细胞白血病、成血细胞白血病、组织细胞白血病、干细胞白血病、急性单核细胞白血病、白细胞减少性白血病、淋巴性白血病、淋巴母细胞性白血病、淋巴细胞性白血病、淋巴性白血病、淋巴肉瘤细胞性白血病、肥大细胞性白血病、巨核细胞性白血病、微髓细胞性白血病、单核细胞性白血病、髓细胞性白血病、髓细胞性白血病、髓样粒细胞白血病、粒单核细胞白血病、奈格列白血病、浆细胞白血病、浆细胞白血病、早幼粒细胞白血病、腺泡癌、腺泡癌、腺性囊性癌、腺样囊性癌、腺瘤癌、肾上腺皮质癌、肺泡癌、肺泡细胞癌、基底细胞癌、基底细胞癌、基底样癌、基底鳞状细胞癌、细支气管肺泡癌、细支气管癌、支气管癌、脑样癌、胆管细胞癌、绒毛膜癌、胶质细胞癌、粉刺癌、实体癌、筛状癌、胸壁癌、皮肤癌、柱状癌、柱状细胞癌、导管癌、硬癌、胚胎癌、脑样癌、上皮样癌、腺样

上皮癌、外生性癌、溃疡癌、纤维瘤、胶状癌、胶状癌、巨细胞癌、印戒细胞癌、单纯癌、小细胞癌、茄样癌、球形细胞癌、梭形细胞癌、海绵状癌、鳞状细胞癌、线状癌、毛细血管扩张癌、毛细血管外胚层癌、移行细胞癌、结节癌、结节性癌、疣状癌、绒毛状癌、巨细胞癌、腺癌、颗粒细胞癌、毛发基质癌、类血癌、肝细胞癌、许特尔细胞癌(Hurthle cell carcinoma)、透明细胞癌、高肾样癌、婴儿胚胎癌、原位癌、表皮内癌、上皮内癌、克龙派切尔氏癌(Krompecher's carcinoma)、库尔奇茨基细胞癌(Kulchitzky-cell carcinoma)、大细胞癌、透镜状癌、豆状癌、脂肪瘤癌、淋巴上皮癌、髓质癌、黑色素癌、软骨癌、粘液癌、粘液癌、粘液细胞癌、粘液表皮样癌、粘液癌、粘液癌、粘液样癌、鼻咽癌、燕麦细胞癌、骨化癌、骨样癌、乳头状癌、门静脉周围癌、浸润前癌、棘细胞癌、肺腺癌、肾细胞癌、储备细胞癌、肉瘤样癌、施奈德癌(schneiderian carcinoma)、硬癌、阴囊癌、软骨肉瘤、纤维肉瘤、淋巴肉瘤、黑色素肉瘤、粘液肉瘤、骨肉瘤、子宫内膜肉瘤、间质肉瘤、尤文氏肉瘤、筋膜肉瘤、成纤维细胞肉瘤、巨细胞肉瘤、阿贝西氏肉瘤、脂肉瘤、脂肪肉瘤、腺泡状软组织肉瘤、成釉细胞肉瘤、葡萄状肉瘤、绿色肉瘤、绒毛膜癌、胚胎肉瘤、肾母细胞瘤肉瘤、粒细胞肉瘤、霍奇金氏肉瘤、特发性多发性色素出血性肉瘤、B细胞免疫母细胞肉瘤、淋巴瘤、T细胞免疫母细胞肉瘤、詹森氏肉瘤、卡波济氏肉瘤、库普弗细胞肉瘤、血管肉瘤、白肉瘤、恶性间质瘤肉瘤、骨旁肉瘤、网状细胞肉瘤、横纹肌肉瘤、浆液囊肉瘤、滑膜肉瘤、毛细血管扩张肉瘤、霍奇金氏病、非霍奇金氏淋巴瘤、多发性骨髓瘤、成神经细胞瘤、膀胱癌、乳腺癌、卵巢癌、肺癌、结肠直肠癌、横纹肌肉瘤、原发性血小板增多症、原发性巨球蛋白血症、小细胞肺癌、原发性脑肿瘤、胃癌、结肠癌、恶性胰腺岛细胞瘤、恶性类癌、癌前皮肤病变、睾丸癌、淋巴瘤、甲状腺癌、神经母细胞瘤、食道癌、泌尿生殖道癌、恶性高钙血症、宫颈癌、子宫内膜癌、肾上腺皮质癌、哈丁-帕西黑色素瘤(Harding-Passey melanoma)、幼年黑色素瘤、恶性雀斑样黑色素瘤、恶性黑色素瘤、肢端雀斑样黑色素瘤、无色素性黑色素瘤、良性幼年黑色素瘤、克劳德曼黑色素瘤(Cloudman's melanoma)、S91黑色素瘤、结节性黑色素瘤、指甲下黑色素瘤、浅表扩散性黑色素瘤、浆细胞瘤、结肠直肠癌、直肠癌。

[0225] 在一些实施例中,本文所提供的方法和组合物涉及肉瘤的治疗。术语"肉瘤"通常是指由类似于胚胎结缔组织的物质组成并且通常由包埋在纤丝状、异质或均质物质中的紧密压积细胞构成的肿瘤。肉瘤包含但不限于软骨肉瘤、纤维肉瘤、淋巴肉瘤、黑色素肉瘤、粘液肉瘤、骨肉瘤、子宫内膜肉瘤、间质肉瘤、尤文氏肉瘤(Ewing's sarcoma)、筋膜肉瘤、成纤维细胞肉瘤、巨细胞肉瘤、阿贝西氏肉瘤(Abemethy's sarcoma)、脂肉瘤、脂肪肉瘤、腺泡状软组织肉瘤、成釉细胞肉瘤、葡萄状肉瘤、绿色肉瘤、绒毛膜癌、胚胎肉瘤、肾母细胞瘤肉瘤、粒细胞肉瘤、霍奇金氏肉瘤、特发性多发性色素沉着出血性肉瘤、B细胞的免疫母细胞肉瘤、淋巴瘤、T细胞的免疫母细胞肉瘤、詹森氏肉瘤(Jensen's sarcoma)、卡波西氏肉瘤(Kaposi's sarcoma)、库普弗细胞肉瘤(Kupffer cell sarcoma)、血管肉瘤、白血病性肉瘤(leukosarcoma)、恶性间皮瘤肉瘤、骨膜外肉瘤、网状细胞肉瘤、劳斯氏肉瘤(Rous sarcoma)、浆液性囊肿肉瘤(serocystic sarcoma)、滑膜肉瘤和毛细血管扩张性肉瘤(telangiectaltic sarcoma)。

[0226] 可以使用本文所描述的方法和组合物治疗的另外的示例性肿瘤包含霍奇金氏病、非霍奇金氏淋巴瘤、多发性骨髓瘤、神经母细胞瘤、乳腺癌、卵巢癌、肺癌、横纹肌肉瘤、原发性血小板增多症、原发性巨球蛋白血症、小细胞肺肿瘤、原发性脑肿瘤、胃癌、结肠癌、恶性

胰脏胰岛素瘤、恶性类癌、癌前皮肤病变、睾丸癌、淋巴瘤、甲状腺癌、成神经细胞瘤、食道癌、泌尿生殖道癌、恶性高钙血症、宫颈癌、子宫内膜癌和肾上腺皮质癌。

[0227] 在一些实施例中，所治疗的癌症是黑色素瘤。术语“黑色素瘤”意指由皮肤和其它器官的黑色素细胞体系引起的肿瘤。黑色素瘤的非限制性实例是哈丁-帕西黑色素瘤、幼年黑色素瘤、恶性雀斑样黑色素瘤、恶性黑色素瘤、肢端雀斑样黑色素瘤、无色素性黑色素瘤、良性幼年黑色素瘤、克劳德曼黑色素瘤、S91黑色素瘤、结节性黑色素瘤、指甲下黑色素瘤和浅表扩散性黑色素瘤。

[0228] 可以使用本文所描述的方法和组合物治疗的特定种类的肿瘤包含淋巴增生性疾病、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、宫颈癌、子宫内膜癌、骨癌、肝癌、胃癌、结肠癌、结肠直肠癌、胰腺癌、甲状腺癌、头颈癌、中枢神经系统癌、外周神经系统癌、皮肤癌、肾癌以及上述所有癌症的转移瘤。特定类型的肿瘤包含肝细胞癌、肝癌、肝母细胞瘤、横纹肌肉瘤、食道癌、甲状腺癌、神经节细胞瘤、纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、成骨肉瘤、脊索瘤、血管肉瘤、内皮肉瘤、尤文氏瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、浸润性导管癌、乳头状腺癌、黑色素瘤、肺鳞癌、基底细胞癌、腺癌(高分化、中分化、低分化或未分化)、细支气管肺泡癌、肾细胞癌、高肾瘤、高肾样腺癌、胆管癌、绒毛膜癌、精原细胞瘤、胚胎癌、维尔姆斯瘤、睾丸肿瘤、肺癌，包括小细胞、非小细胞和大细胞肺癌、膀胱癌、神经胶质瘤、星形细胞瘤、髓母细胞瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤、松果体瘤、视网膜母细胞瘤、神经母细胞瘤、结肠癌、直肠癌、造血系统恶性肿瘤，包含所有类型的白血病和淋巴瘤，包含：急性髓性白血病、急性髓性白血病、急性淋巴细胞白血病、慢性髓性白血病、慢性淋巴细胞白血病、肥大细胞白血病、多发性骨髓瘤、骨髓淋巴瘤、霍奇金氏淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤。

[0229] 在某些实施例中所治疗的癌症还包含癌前病变，例如，光化性角化病(日光性角化病)、痣(发育异常痣)、痤疮性唇炎(农民唇)、皮角、巴雷特食管(Barrett’s esophagus)、萎缩性胃炎、先天性角化不良、缺铁性咽下困难、扁平苔藓、口腔粘膜下纤维化、光化性(日光性)弹性组织变性和宫颈非典型增生。

[0230] 在一些实施例中所治疗的癌症包含非癌性或良性肿瘤，例如，内胚层、外胚层或间充质来源的肿瘤，包含但不限于胆管细胞瘤、结肠息肉、腺瘤、乳头状瘤、囊腺瘤、肝细胞腺瘤、葡萄胎、肾小管腺瘤、鳞状细胞乳头状瘤、胃息肉、血管瘤、骨瘤、软骨瘤、脂肪瘤、纤维瘤、淋巴管瘤、平滑肌瘤、横纹肌瘤、星形细胞瘤、色素痣、脑膜瘤和神经节瘤。

[0231] 特别关注的是黑色素瘤、乳腺癌、前列腺癌、胰腺癌、胶质母细胞瘤、肾细胞癌和结肠直肠癌的治疗。

[0232] 实例

[0233] 通过参考以下实例，将更容易理解现在总体上描述的本发明，这些实例仅出于说明本发明的某些方面和实施例的目的而被包含在内，并且不旨在限制本发明。因此，将显而易见的是，任何所公开的有益物质和疗法都可以在本公开的范围内被取代。

[0234] 实例1

[0235] 如图1和2所展示，由来自细胞的RNA或来自患者的新鲜冷冻石蜡包埋(FFPE)组织切片制备外显子组选择的链特异性cDNA片段的集合，其编码由细胞表达的蛋白质的全部或所选择部分。在一些情况下，通过视觉技术或通过放大(激光捕获)来富集FFPE中含有高浓度肿瘤细胞的区域。如果细胞是肿瘤细胞，文库包含所有或几乎所有新抗原以及肿瘤相关

抗原和内含子附近和非翻译区中的另外的基因组区域,所述另外的基因座区域可以含有不容易通过核酸测序和使用抗原预测算法确定的新抗原翻译产物。

[0236] 任选地,如图2所展示,来自肿瘤细胞的外显子组捕获的片段首先通过与来自细菌物种的蛋白质MutS一起温育而富集错配的异源双链体片段,所述细菌物种如但不限于大肠杆菌或耐辐射奇球菌(D.radionurans),所述蛋白质能够与错配的双链寡核苷酸和不完全匹配的双链体选择性地结合,从而允许错配的双链寡核苷酸的物理分离和富集以及含有突变的片段的富集。

[0237] 存在几种方法来设计外显子组捕获探针。可用的标准外显子组捕获探针基于参考基因组序列,并且主要捕获所有已知CDS的编码区外显子。这具有三个含义:(1)参考基因组与患者基因组之间的SNP因此也因MutS而富集;(2)5'和3'UTR缺失,并且5'和3'外显子-内含子连接的长度覆盖有限;(3)因为任何给定的肿瘤组织学通常表达比完整CDS更有限的一组基因,所以有可能设计组织学特异性捕获探针。这可以基于对多个"纯"肿瘤样品的序列分析,并且仅包含那些在某个基线阈值以上表达的基因。这可以消除一些患者的肿瘤中异常表达的基因。如果使用组织学特异性捕获组,一些潜在的"基质相关"基因(例如,来自癌症相关成纤维细胞的可能含有有用的表位靶标的成纤维细胞活化蛋白(FAP))可能不包含在内。这些可能需要单独包含。

[0238] 可替代地,为了减少SNP的MutS富集(除移植应用外的通常情况),基于SNP的已知位置和频率设计外显子组捕获探针组。此探针组是围绕这些SNP的位置设计的,使得不会出现SNP错配区域。分析了围绕其设计的SNP频率的深度。设计了包含5'和3'UTR以及更延长的内含子区域的捕获探针。一组定义的相关基质相关靶基因可以包含在每个组织学特异性组中。

[0239] 如图3所展示,通过PCR或克隆将链特异性片段以正确的朝向插入在上游区域与下游区域之间,所述上游区域含有用于T7 RNA聚合酶起始的启动子,随后是翻译起始位点(夏因-达尔加诺核糖体结合位点或等效物)、ATG(起始)密码子和不具有小的可溶性蛋白编码结构域的末端终止密码子的编码序列(所述小蛋白编码结构域在两个框外阅读框中都含有翻译终止序列);所述下游区域含有所定义的衔接子序列,所述衔接子序列可以用于增强随后的RNA/DNA连接。不具有小的可溶性蛋白编码结构域的末端终止密码子的编码序列(所述小蛋白编码结构域在两个框外阅读框中都含有翻译终止序列)也可以位于链特异性片段的下游。在此替代性设计中,小蛋白编码序列的3'端可以用于增强随后的RNA/DNA连接,并且衔接子序列是任选的。

[0240] 如图3所展示,PCR/克隆产物用于由T7起始位点产生RNA。然后在存在桥接RNA和含嘌呤霉素的DNA寡核苷酸的夹板DNA寡核苷酸的情况下,将RNA产物与在其3'端处含有嘌呤霉素分子的DNA寡核苷酸(示例性序列dA21dCdC-嘌呤霉素[5'至3'])连接,并且然后从过量的连接子和其它反应组分中纯化。

[0241] 如图4所展示,所述RNA用于体外翻译反应(兔网织红细胞裂解物、小麦胚芽、大肠杆菌或等效物),并且任何完全阅读小蛋白结构域并到达所连接的DNA寡核苷酸而没有遇到框外翻译终止密码子的转录物将在DNA序列处暂停,允许嘌呤霉素进入核糖体的A位点并通过正常的肽基转移酶活性与新生多肽链连接,将成功翻译的RNA与多肽链连接。

[0242] 如图5所展示,任何成功连接的mRNA/多肽链分子通过与含有小蛋白质结构域的亲

和试剂的柱结合而富集，产生具有框内翻译能力的RNA文库。如果RNA来自肿瘤细胞，则所述文库可以用作“全肿瘤细胞”疫苗，其可以由小的、储存的活检样品制备，而不需要采集显著量的新鲜组织，不需要测序或生物信息学，并且不需要合成多个定义的序列的寡核苷酸，并且因此可以快速且便宜地制备。以链特异性的方式使用逆转录和PCR来扩增成功的RNA插入物，并且将经扩增的产物克隆到克隆载体中，以产生含有微型蛋白质组(AMPL-NA)的RNA文库。

[0243] 实例2

[0244] 总RNA由具有完整外显子组测序数据和相当丰富且经证实的突变负荷的人类肿瘤细胞系制备。制备Illumina TruSeq RNA外显子组文库(链式)。进行外显子组捕获。在外显子组测序之后的文库的样品被保存用于预富集测序。

[0245] 进行单轮RNA展示，并且获得经PCR扩增的富集文库。对预富集和富集的文库进行测序和分析。

[0246] 分析了进入和退出适当阅读框架并支持全框架通读的片段的富集。也进行了类似的分析，集中在已知的含突变的区域，或通过外显子组捕获探针序列和细胞系序列的比较鉴定的SNP。

[0247] 实例3

[0248] 总RNA由具有完整外显子组测序数据和相当丰富且经证实的突变负荷的人类肿瘤细胞系制备。制备Illumina TruSeq RNA外显子组文库(链式)。RNA外显子组文库(链式)然后与外显子组捕获探针杂交。然后加工样品的一半(或另一个确定部分)用于用作未富集的样品的外显子组捕获。然后将样品的另一半或剩余部分与His标记的MutS(理想地使用耐辐射奇球菌)结合，并与镍包被的ELISA板结合。然后将所述文库用枯草杆菌蛋白酶洗涤和消化，并且加工用于外显子组捕获和突变富集，对经外显子组捕获的样品进行PCR扩增。对预富集和富集的文库进行测序和分析。分析含有已知突变的序列的富集(#每总读段数的读段数)。也进行了类似的分析，集中通过外显子组捕获探针序列和细胞系序列的比较鉴定的SNP。

[0249] 实例4

[0250] 总RNA由FFPE嵌段制备，针对所述嵌段平行进行标准全外显子测序(WES)。制备Illumina TruSeq RNA外显子组文库(链式)。进行外显子组捕获。在外显子组测序之后的文库的样品被保存用于预富集测序。进行单轮RNA展示，并且获得经PCR扩增的富集文库。对预富集和富集的文库进行测序和分析。

[0251] 分析了进入和退出适当阅读框架并支持全框架通读的片段的富集。也进行了类似的分析，集中在已知的含突变的区域，或通过外显子组捕获探针序列和细胞系序列的比较鉴定的SNP。

[0252] 实例5

[0253] 图6、87和8呈现了一种用于为框内成员富集cDNA片段文库的替代性方法。在这些图中，细菌表面展示的方法用于富集框内文库成员。利用本领域技术人员已知的特定修饰，如在例如美国专利US8710017、US8685893和US8372954(所有这些专利通过引用并入本文)中描述的那些修饰，类似步骤和基因构建体可以用于进行噬菌体展示以富集框内文库成员。

[0254] 如图6所展示，通过PCR延伸链特异性片段以添加定向克隆位点。然后使用克隆位点将文库DNA片段插入到克隆载体中，使得文库DNA定位于文库DNA上游的启动子、夏因-达尔加诺(SD)序列、ATG起始密码子和编码多肽的核苷酸序列与文库DNA下游的编码膜呈递蛋白的序列(例如，AIDA)之间。

[0255] 如图7所展示，将质粒转化到细菌菌株如大肠杆菌中，并且在生长并被启动子诱导表达后，如果文库与编码多肽的核苷酸序列和编码膜呈递蛋白的序列位于框内，则文库被呈递在细菌的外膜上。如果翻译起始于ATG并在框内持续到编码膜呈递蛋白的序列的末端(框内)，膜呈递蛋白被插入到膜中，并且编码多肽的序列被呈递在细菌的表面上。如果在膜呈递蛋白被翻译之前遇到终止密码子，或者编码膜呈递蛋白的序列的翻译位于错误的阅读框中，则不产生膜蛋白，并且膜呈递蛋白不呈递在细胞的表面上。

[0256] 如图8所展示，将含有框内编码质粒和框外编码质粒的细菌集合暴露于与由编码多肽的核苷酸序列编码的多肽结合的亲和试剂。与亲和试剂结合的细胞与含有位于框外的质粒的细胞分离，并且因此不与亲和试剂结合。在一些实施例中，磁珠可以附着到亲和试剂上，允许进行磁分离以将与亲和试剂结合的细胞与未与亲和试剂结合的细胞分离。从与亲和试剂结合的细胞中回收DNA，并且然后对DNA进行PCR扩增以制备富集的链式文库片段，为富集的文库的构建做准备。

[0257] 实例6

[0258] 文库的制备

[0259] 使用RNeasy Mini试剂盒(凯杰公司(Qiagen)74104)从黑色素瘤细胞系13240-011提取总RNA。在使用NEBNext rRNA耗竭试剂盒v2(新英格兰生物实验室(New England BioLabs)E7405)耗竭核糖体RNA之后，使用SEQuoia全链RNA文库制备型试剂盒(伯乐公司(Bio-Rad)17005726)制备RNA-seq文库。使用Twist综合外显子组试剂盒(Twist生物科技公司102031)从文库中富集含外显子组的片段，所述试剂盒采用基于共有编码序列(CCDS)数据库的诱饵[Pujar等人，《核酸研究(Nucleic Acids Res.)46(D1):D221-D228,2018,doi:10.1093/nar/gkx1031]。使用具有带尾引物的PCR向文库片段添加5'和3'延伸，以构建具有图9所示结构的文库。

[0260] 体外转录

[0261] 使用转录文库作为模板，使用HiScribe T7高产量RNA合成试剂盒(新英格兰生物实验室E2040S)合成RNA。具体地，将8μL 74ng/μL外显子组捕获转录文库与2μL10×反应缓冲液、2μL 100mM ATP、2μL 100mM GTP、2μL 100mM UTP、2μL 100mM CTP和2μL T7 RNA聚合酶混合物混合，然后在37℃下温育2小时。使用Monarch RNA Cleanup试剂盒(新英格兰生物实验室T2030S)纯化RNA，并在20μL水中回收。将1μL等分试样用于制备稀释液，以通过生物分析仪(RNA 6000Pico试剂盒，安捷伦(Agilent)5067-1513)进行分析，并且剩余部分储存在-80℃下。

[0262] RNA与嘌呤霉素寡核苷酸的连接

[0263] 使用从集成DNA技术公司(IDT)获得的以下两种DNA寡核苷酸将嘌呤霉素添加到体外转录的RNA的3'端：A27.C2.Puro(AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACC/3Puro/)和T10.ExPepSplint(TTTTTTTTTTCCAGTCGCTATAG)。T10.ExPepSplint的3'端处的13个核苷酸的序列与体外转录RNA的3'端处的13个核苷酸的序列互补。通过混合5μL水、2μL 20μ

MA27.C2.Puro、1μL 10×T4多核苷酸激酶反应缓冲液、1μL 10mM ATP和1μL 10单位/μLT4多核苷酸激酶(新英格兰生物实验室M0201S)将寡核苷酸A27.C2.Puro磷酸化,在37℃下温育30分钟,并转移到冰上。添加了以下组分:7μL水、50μL聚乙二醇8000(来自T4 RNA连接酶2试剂盒,新英格兰生物实验室M0373L)、2μL 20μMT10.ExPepSplint、4μL 20单位/μL SUPERase•In RNA酶抑制剂(赛默飞世尔公司(Thermo Fisher),AM2696)和8μL 1.8μg/μL体外转录的RNA。通过上下移液充分混合之后,将混合物在65℃下温育2分钟。在仍然温热时,添加10μL 10×T4 RNA连接酶反应缓冲液(来自T4 RNA连接酶2试剂盒),然后通过上下移液将溶液充分混合,并置于冰上持续10分钟。在室温下温育5分钟之后,添加9μL 25单位/μL SplintR连接酶(新英格兰生物实验室M0375S),然后通过上下移液将溶液充分混合,并在室温下温育2小时。通过添加2.5μL 500mM EDTA(pH 8.0)并充分混合来终止反应。使用NEBNext Poly(A)mRNA磁性分离模块(新英格兰生物实验室E7490L)按照通过所述模块提供的方案纯化RNA-嘌呤霉素产物。为了纯化100μL连接反应,使用100μL良好重悬的NEBNext磁性寡核苷酸d(T)25珠粒。在按照用于与珠粒结合并洗涤的方案之后,将RNA-嘌呤霉素产物用20μL无核酸酶的水洗脱,并转移到新试管中。将1μL等分试样用于制备稀释液,以通过生物分析仪(RNA 6000Pico试剂盒,安捷伦(Agilent)5067-1513)进行分析,并且剩余部分储存在-80℃下。所连接的产物的产率为51.4%。

[0264] RNA展示

[0265] 使用PURExpress体外蛋白质合成试剂盒(新英格兰生物实验室E6800L)的组分进行体外翻译。通过混合以下来组装反应:10μL溶液A、7.5μL溶液B、1μL 20单位/μLSUPERase•In RNA酶抑制剂(赛默飞世尔公司,AM2696)和6.5μL 375ng/μL RNA-嘌呤霉素产物。在37℃下温育30分钟后,添加3.1μL 1M $MgCl_2$和34.4μL 1M KCl以促进经翻译的肽与嘌呤霉素之间的共价连接。将所述反应在室温下温育30分钟,然后在-20℃下温育过夜。使用NEBNext Poly(A)mRNA磁性分离模块(新英格兰生物实验室E7490L)按照通过所述模块提供的方案纯化肽-RNA融合产物。为了纯化62.5-μL翻译反应,使用40μL良好重悬的NEBNext磁性寡核苷酸d(T)25珠粒。在按照用于与珠粒结合并洗涤的方案之后,用20μL 1mM二硫苏糖醇(天惠华公司(Teknova)D9750)洗脱肽-RNA产物,并转移至新管中。使用肽-RNA产物的RNA部分作为模板,使用从IDT获得的DNA寡核苷酸ExPep RT引物(CCAGTCGCTATAGCTGGCGTA)和5×RT缓冲液(75mM Tris-HCl,pH 8.4,375mM KCl,50mM M $MgCl_2$,25%(v/v)甘油)合成cDNA。对于cDNA反应,通过混合15.4μL水、2μL 10% NP-40(赛默飞世尔公司28324)、各1.6μL 25mM dNTP(赛默飞世尔公司FERR1121)和1μL 10μM ExPep RT引物来制备杂交混合物。将10μL等份的肽-RNA融合样品与10μL杂交混合物混合,并在65℃下温育1分钟,随后在4℃下保持。通过混合26.5μL水、20μL 5×RT缓冲液、1μL 1M二硫苏糖醇(天惠华公司D9750)、2μL 40U/μL RNaseOUT RNA酶抑制剂(赛默飞世尔公司10777019)和0.5μL 200U/μL SuperScript II逆转录酶(赛默飞世尔公司18064014)来制备RT混合物。在将20μL肽-RNA/杂交混合物样品与20μL RT混合物混合之后,将反应在42℃下温育60分钟,在85℃下温育5分钟,随后在4℃下保持。为了特异性选择肽-RNA-cDNA产物,使用MagStrep“3型”XT珠粒(Strep-Tactin XT包被的磁珠,IBA生命科学公司(IBA LifeSciences)24090002)固定肽部分中的Twin-Strep-tag。在将25μL良好悬浮的珠粒转移到试管中并置于磁性支架中之后,丢弃上清液。通过在200μL洗涤缓冲液(100mM 1M Tris-HCl,pH 8.0,150mM NaCl,1mM

EDTA)中重悬来将珠粒洗涤两次,放置在磁性支架中,并丢弃上清液。将40μL逆转录酶反应添加到珠粒中,并在冰上温育30分钟,周期性地轻轻地轻弹试管以重悬珠粒。将样品放置在磁性支架上,并且丢弃上清液。通过在100μL洗涤缓冲液中重悬来将珠粒洗涤三次,放置在磁性支架中,并丢弃上清液。将珠粒重悬在20μL水中,并保持在冰上。对于所选择的肽-RNA-cDNA产物,使用rhPCR扩增恢复测序文库[Dobosy等人,《BMC生物技术(BMC Biotechnol.)》11:80,2011,doi:10.1186/1472-6750-11-80]。此扩增使用从IDT获得的以下两种寡核苷酸:P5.IDT312.Rd1x.x1引物(AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACCTGACACAACACTCTTTCCCTACrACG ACa/3SpC3/,rA是riboA)和P7.IDT024.Rd2x.x1引物(CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATAGCACTGGTGACTGGAGTTCAGArCGTGTa/3SpC3/,rC是riboC)。这些寡核苷酸的3'端分别引发了来自肽-RNA-cDNA产物中发现的cDNA的Read1和Read2区段中的DNA合成(参见图9)。引物分别附加了PCR产物上进行Illumina测序所需的P5和P7区段。扩增还使用了20×rhPCR缓冲液(300mM Tris-HCl,pH 8.4,500mM KCl,80mM $MgCl_2$)和含有RNA酶H2酶和RNA酶H2稀释缓冲液的RNA酶H2酶试剂盒(IDT 11-02-12-01)。通过混合1μL 2单位/μL RNA酶H2酶和99μL H2稀释缓冲液,将RNA酶H2稀释至20mU/μL,然后保持在冰上。将含有肽-RNA-cDNA产物的MagStrep珠粒悬浮液的10μL等分试样与各2.5μL 6μMP5.IDT312.Rd1x.x1/P7.IDT024.Rd2x.x1引物混合。在通过组合59.1μL水、4μL 20×rhPCR缓冲液、各1.3μL 25mM dNTP(赛默飞世尔公司FERR1121)、2μL 20mU/μL RNA酶H2和1.6μL 5单位/μL热启动Taq DNA聚合酶(新英格兰实验室M0495L)制备rhPCR混合物之后,将37.5μL rhPCR混合物添加到珠粒悬浮液/引物样品中。使用热方案进行PCR扩增:95℃30秒;18个循环(96℃20秒,62℃1分钟,72℃1分钟);4℃保持。将反应管放置于磁性支架中,并将上清液转移至新试管中。使用ProNex大小选择性纯化系统(普洛麦格NG2003)纯化PCR产物。将50μL扩增反应与70μL(1.4×)ProNex珠粒混合,并按照ProNex方案进行加工。用20μL ProNex洗脱缓冲液洗脱由PCR产生的RNA展示测序文库。用生物分析仪(高灵敏度DNA试剂盒,安捷伦5067-4626)对1μL等份试样进行分析,并且剩余部分储存在-20℃下。按照制造商的说明书,使用300循环MiSeq试剂试剂盒v2(Illumina MS-102-2022),在Illumina MiSeq上对文库进行测序。测序参数为read1 150个循环,index1 8个循环,index2 8个循环,read2 150个循环。分析测序结果以检测文库插入物是否具有完整的开放阅读框(ORF)。图10示出了在外显子组捕获之后("在RNA展示之前")和RNA展示后("在RNA展示之后")构建体的全长插入物与目标阅读框中的完整ORF的检测比较结果。

[0266] 不具有终止密码子("不含终止子")的文库插入物的比例从RNA展示之前的28%增加至RNA展示之后的37%($p<0.001$)。这些结果证明,RNA展示可以在由患有癌症的患者制备的外显子组捕获的RNASeq文库中富集具有开放阅读框的人cDNA片段。

[0267] 通过引用并入

[0268] 本文所提及的所有公开、专利以及专利申请特此通过引用整体并入,如同每个单独的公开、专利或专利申请被专门地且单独地指示通过引用并入。在冲突的情况下,以本申请(包含本文中的任何定义)为准。

[0269] 等效物

[0270] 本领域技术人员将认识到或仅使用常规实验就能够确定本文所描述的本发明的具体实施例的许多等效形式。此类等效形式旨在由以下权利要求书涵盖。

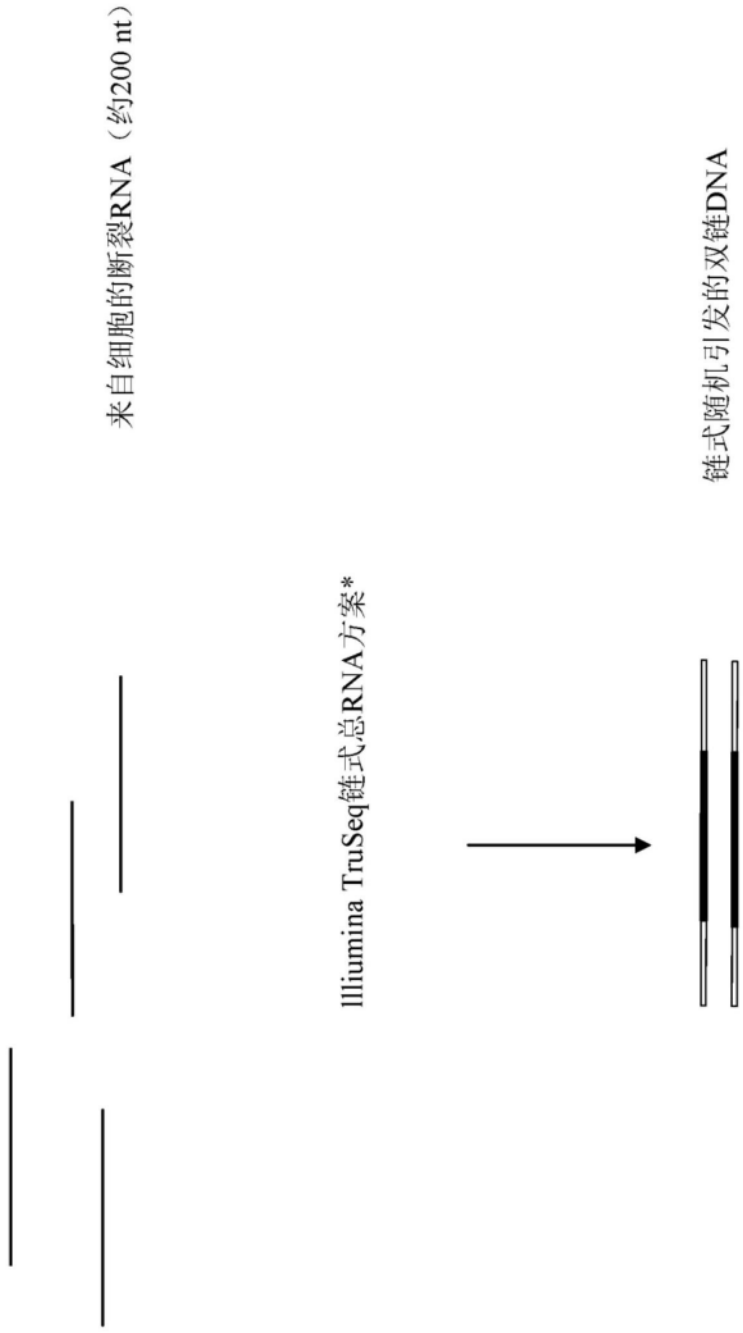

来自细胞的断裂RNA（约200 nt）
Illiumina TruSeq链式总RNA方案*
链式随机引发的双链DNA

图1

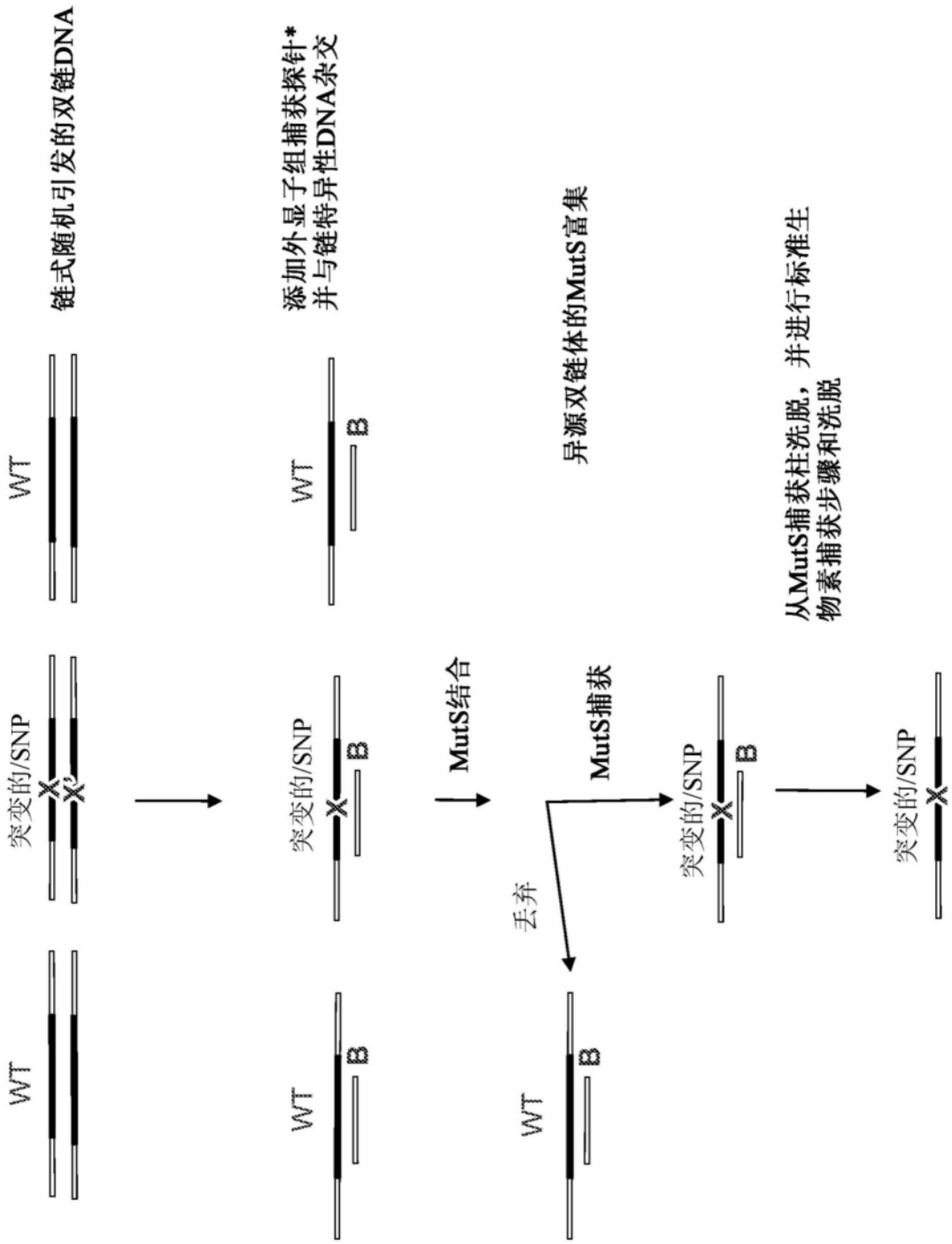

链式随机引发的双链DNA
添加外显子组捕获探针*
并与链特异性DNA杂交
异源双链体的MutS富集
从MutS捕获柱洗脱，并进行标准生
物素捕获步骤和洗脱
MutS结合
MutS捕获
丢弃
WT
突变的/SNP
B

图2

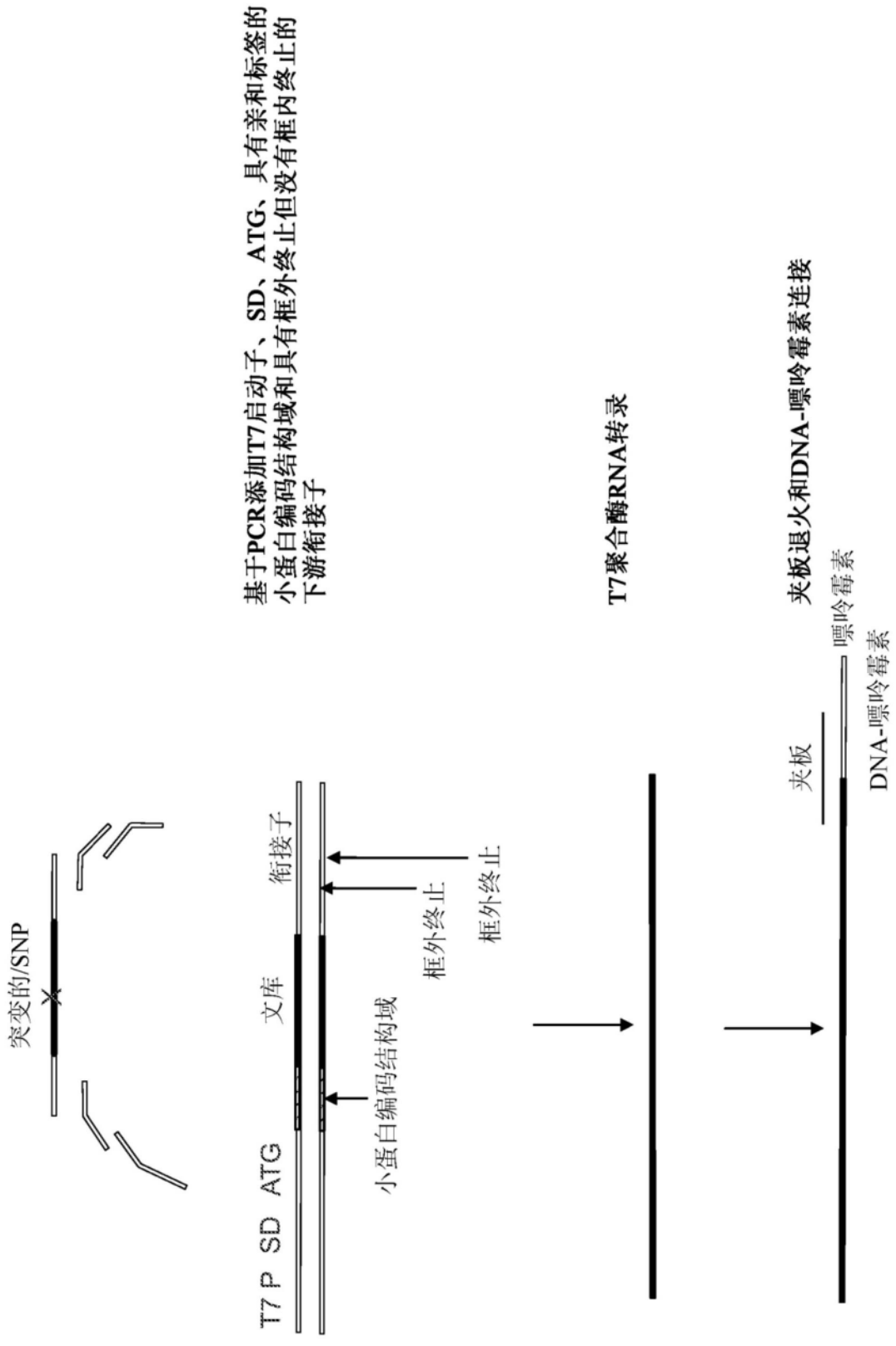

突变的/SNP
T7 P SD ATG
文库
衔接子
小蛋白编码结构域
框外终止
框外终止
基于PCR添加T7启动子、SD、ATG、具有亲和标签的小蛋白编码结构域和具有框外终止但没有框内终止的下游衔接子
T7聚合酶RNA转录
夹板
DNA-嘌呤霉素
嘌呤霉素
夹板退火和DNA-嘌呤霉素连接

图3

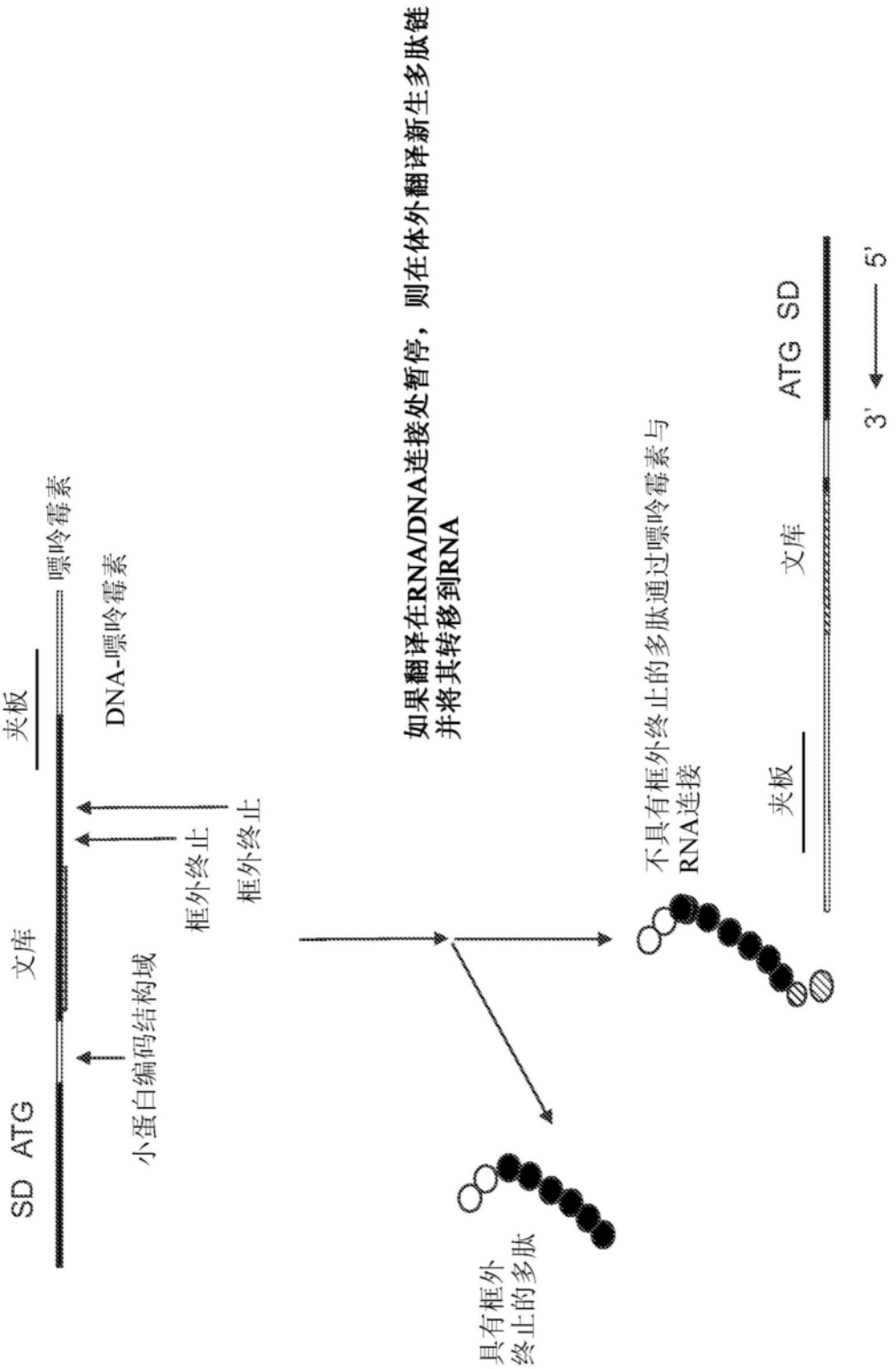

SD ATG
文库
夹板
嘌呤霉素
DNA-嘌呤霉素
小蛋白编码结构域
框外终止
框外终止
如果翻译在RNA/DNA连接处暂停，则在体外翻译新生多肽链并将其转移到RNA
具有框外终止的多肽
不具有框外终止的多肽通过嘌呤霉素与RNA连接
夹板
文库
ATG SD
3'
5'

图4

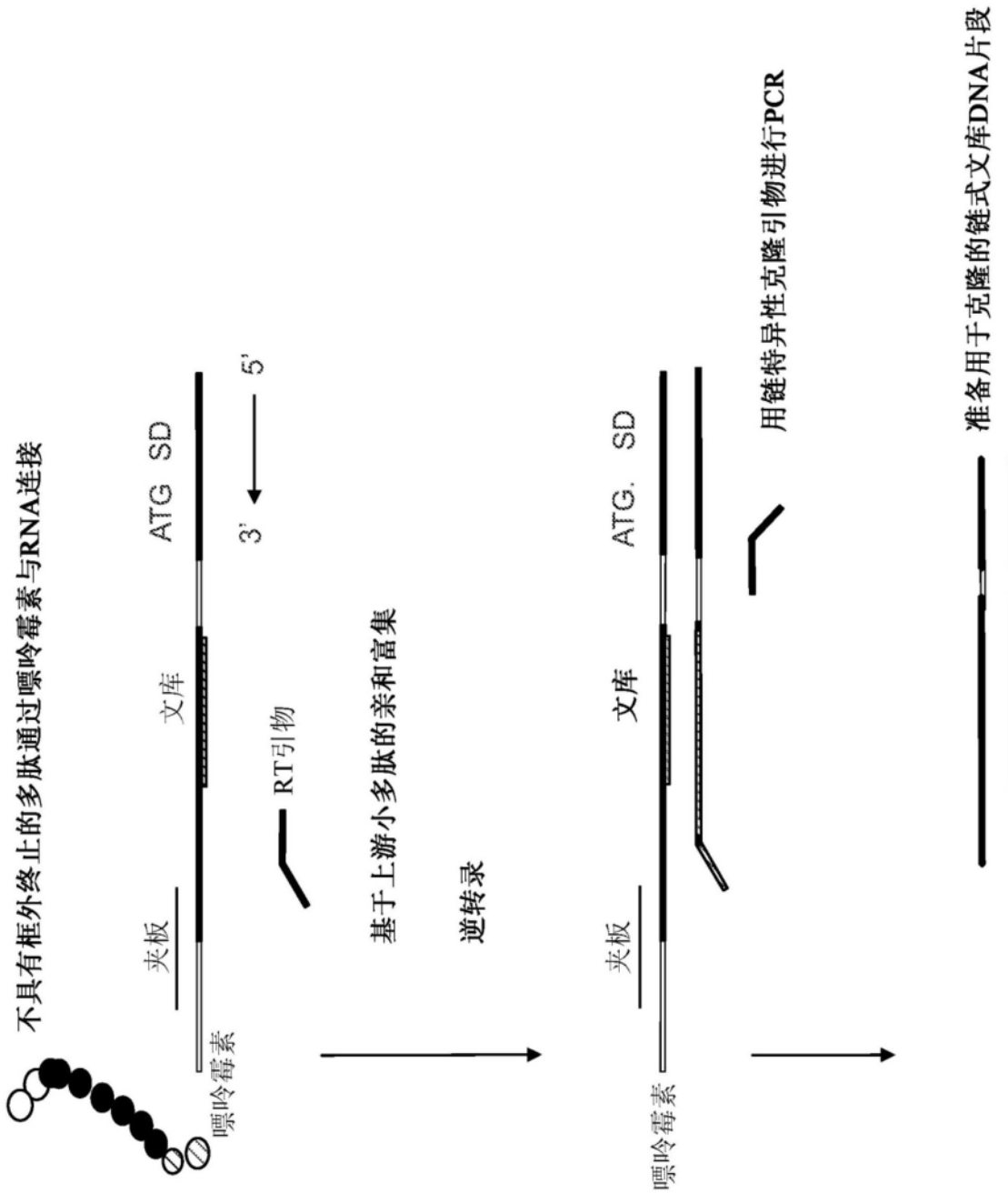

不具有框外终止的多肽通过嘌呤霉素与RNA连接
夹板
文库
ATG SD
嘌呤霉素
3'
5'
RT引物
基于上游小多肽的亲和富集
逆转录
夹板
文库
ATG. SD
嘌呤霉素
用链特异性克隆引物进行PCR
准备用于克隆的链式文库DNA片段

图5

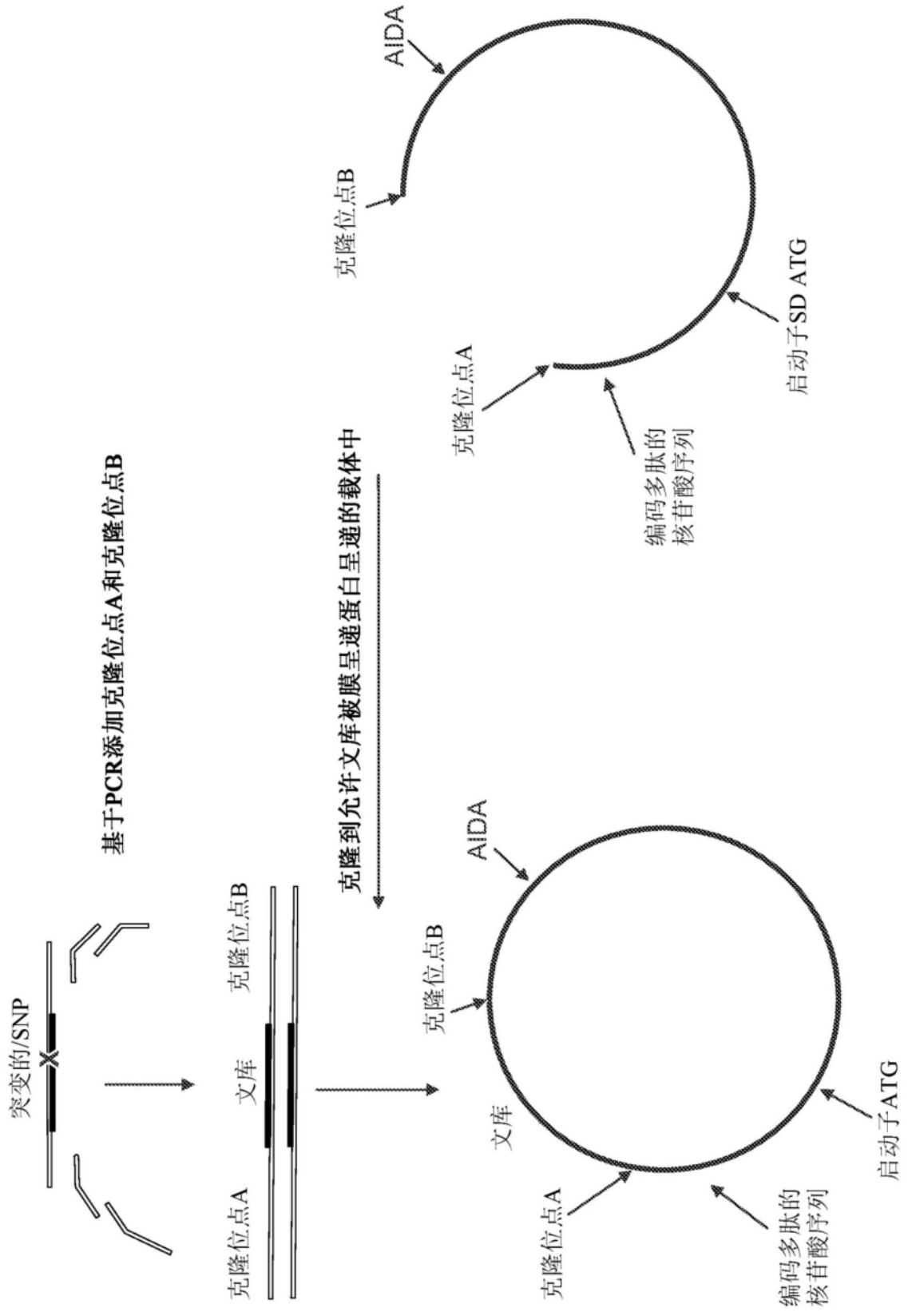

突变的/SNP
基于PCR添加克隆位点A和克隆位点B
克隆位点A
文库
克隆位点B
克隆到允许文库被膜呈递蛋白呈递的载体中
克隆位点B
AIDA
文库
克隆位点A
编码多肽的
核苷酸序列
启动子ATG
克隆位点B
AIDA
克隆位点A
编码多肽的
核苷酸序列
启动子SD ATG

图6

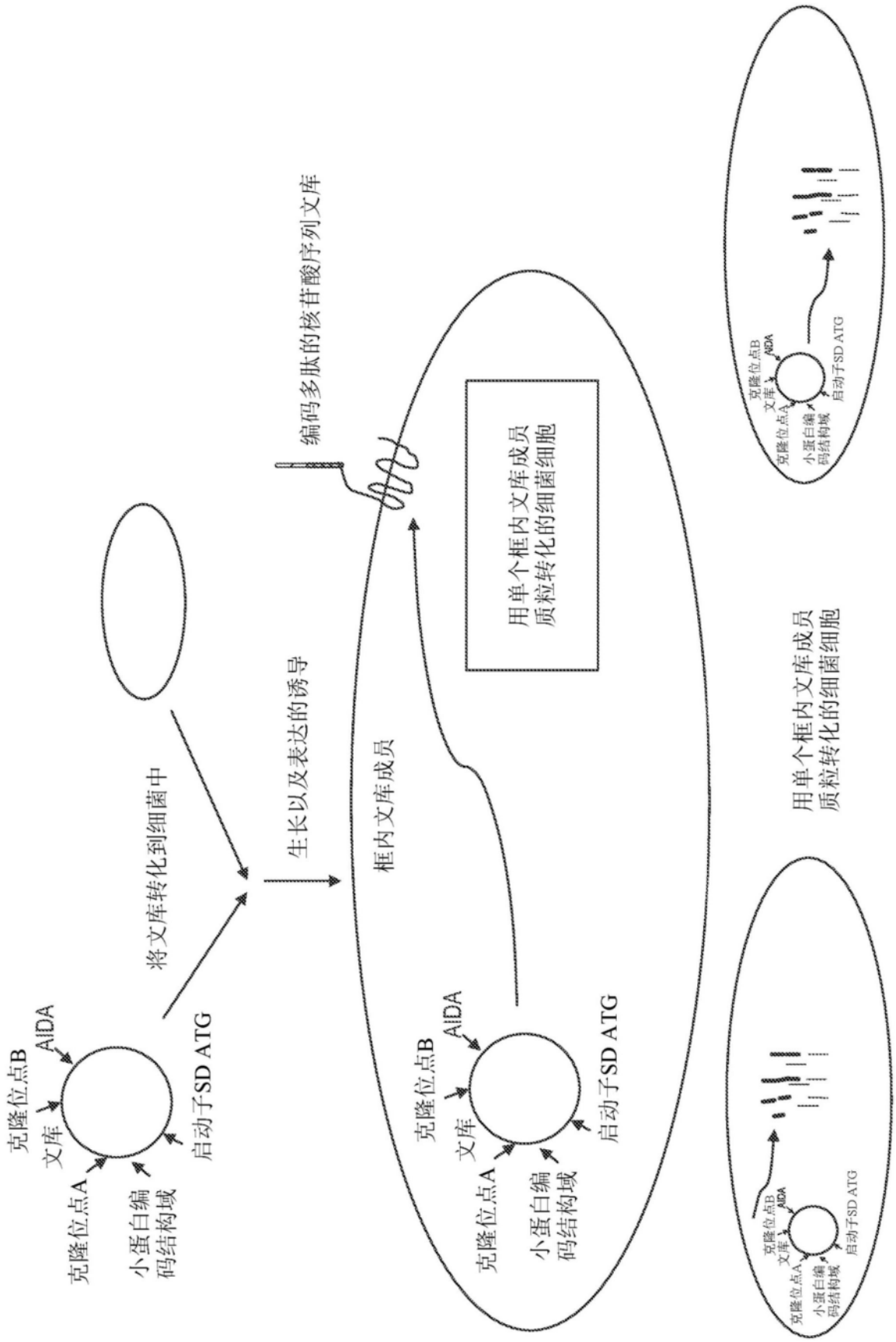

克隆位点B
AIDA
文库
克隆位点A
小蛋白编码结构域
启动子SD ATG
将文库转化到细菌中
生长以及表达的诱导
编码多肽的核苷酸序列文库
框内文库成员
用单个框内文库成员质粒转化的细菌细胞

图7

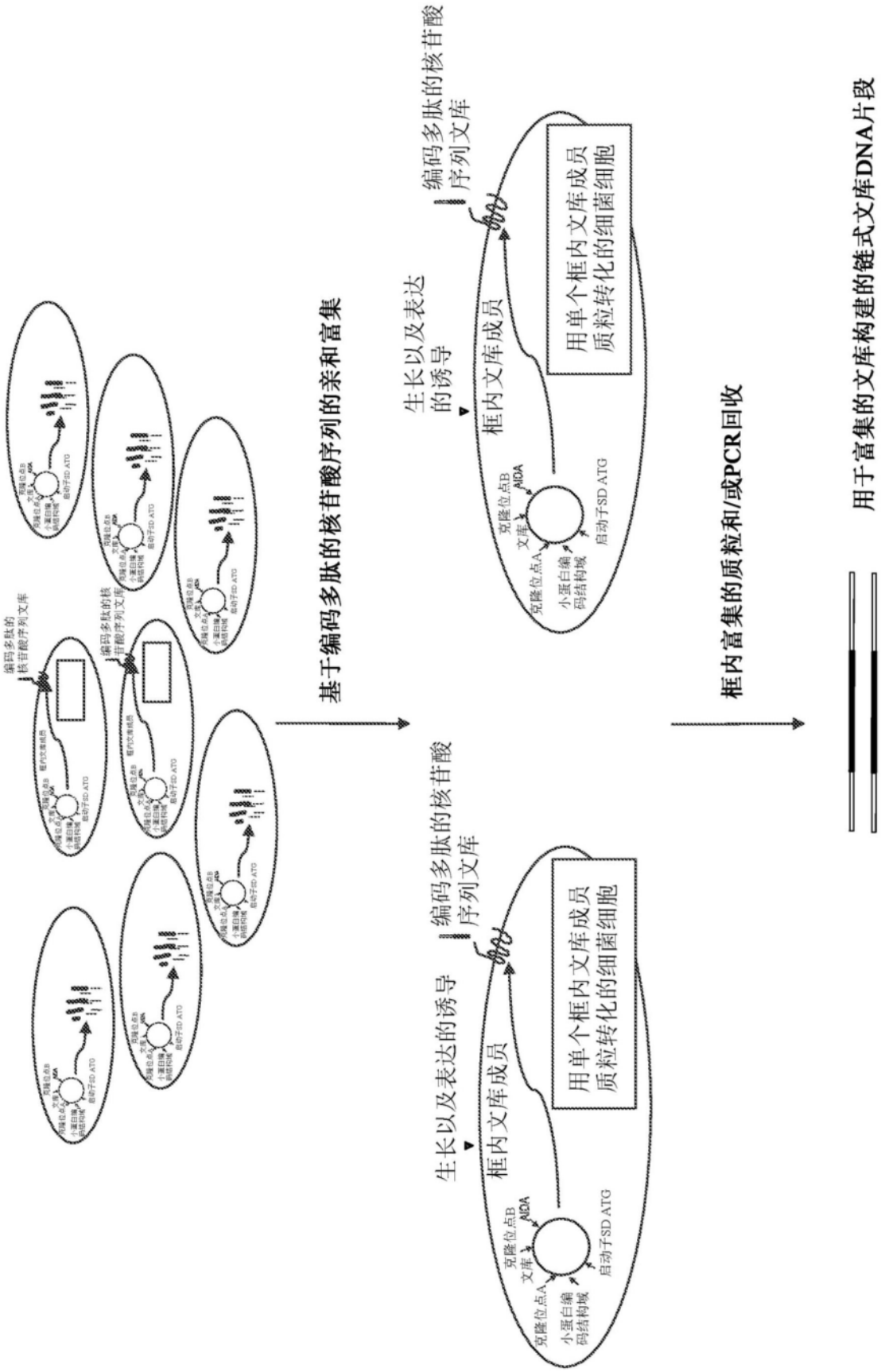

编码多肽的核苷酸序列文库
编码多肽的核苷酸序列文库
基于编码多肽的核苷酸序列的亲和富集
生长以及表达的诱导
框内文库成员
编码多肽的核苷酸序列文库
用单个框内文库成员质粒转化的细菌细胞
克隆位点B
AIDA
文库
克隆位点A
小蛋白编码结构域
启动子SD ATG
生长以及表达的诱导
框内文库成员
编码多肽的核苷酸序列文库
用单个框内文库成员质粒转化的细菌细胞
克隆位点B
AIDA
文库
克隆位点A
小蛋白编码结构域
启动子SD ATG
框内富集的质粒和/或PCR回收
用于富集的文库构建的链式文库DNA片段

图8



图9

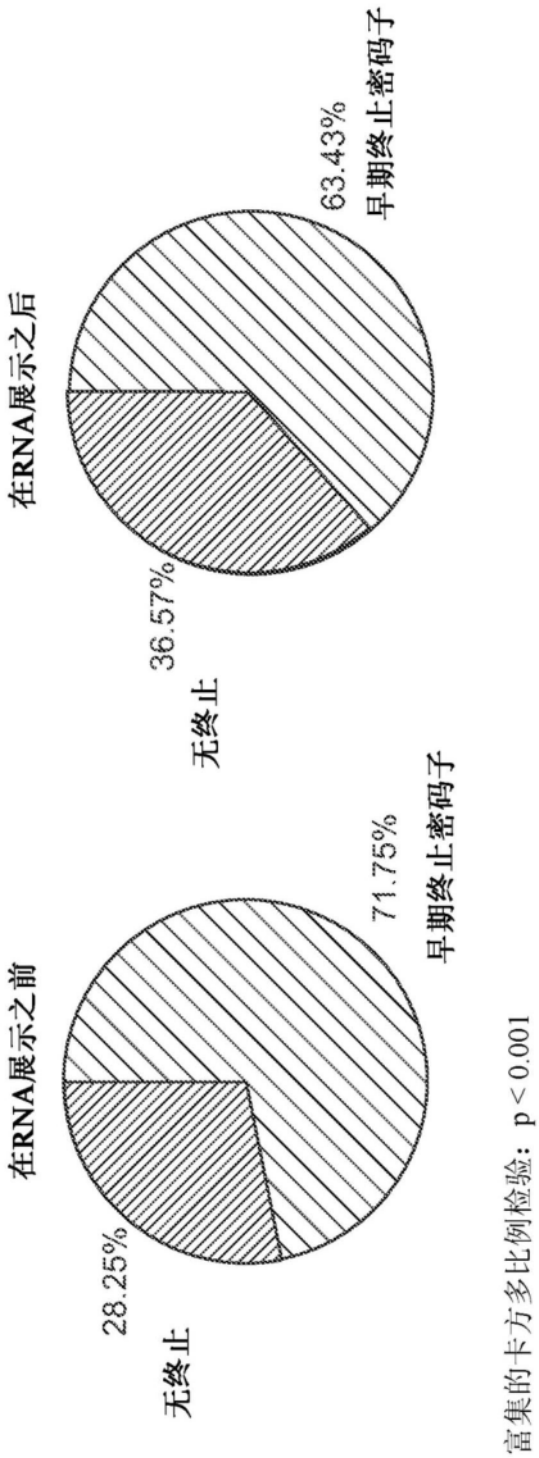

在RNA展示之后
63.43%
早期终止密码子
36.57%
无终止
在RNA展示之前
71.75%
早期终止密码子
28.25%
无终止
富集的卡方多比例检验：p < 0.001

图10