



(21)申請案號：112104167

(22)申請日：中華民國 112 (2023) 年 02 月 06 日

(51)Int. Cl. : A61K48/00 (2006.01)

A61K9/127 (2006.01)

A61P43/00 (2006.01)

(30)優先權：2022/02/07 美國

63/307,578

(71)申請人：美商科納療法股份有限公司 (美國) CORNER THERAPEUTICS, INC. (US)
美國(72)發明人：康福思 安德魯 N CORNFORTH, ANDREW N. (US)；戈瑟琳 艾蜜莉 A
GOSSELIN, EMILY A. (US)

(74)代理人：陳長文；張哲倫；劉君怡

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：62 項 圖式數：6 共 69 頁

(54)名稱

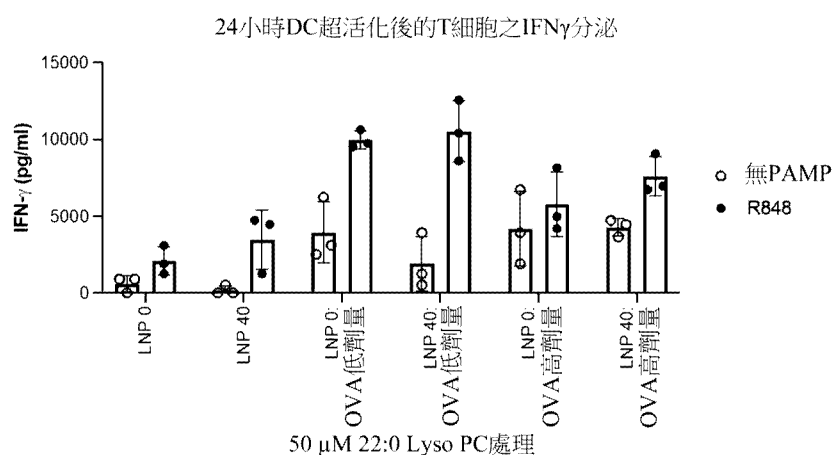
免疫原性 mRNA 遞送載體

(57)摘要

本發明係關於用於 mRNA 疫苗之基於脂質之遞送載體，其包括用於增強疫苗免疫原性之溶血磷脂醯膽鹼(LPC)化合物。本發明亦關於使用該等 mRNA 疫苗之方法。

The present disclosure relates to lipid-based delivery vehicles for mRNA vaccines, which include a lysophosphatidylcholine (LPC) compound for enhancing vaccine immunogenicity. The present disclosure also relates to methods for use of the mRNA vaccines.

指定代表圖：





【發明摘要】

【中文發明名稱】

免疫原性mRNA遞送載體

【英文發明名稱】

IMMUNOGENIC MRNA DELIVERY VEHICLES

【中文】

本發明係關於用於mRNA疫苗之基於脂質之遞送載體，其包括用於增強疫苗免疫原性之溶血磷脂醯膽鹼(LPC)化合物。本發明亦關於使用該等mRNA疫苗之方法。

【英文】

The present disclosure relates to lipid-based delivery vehicles for mRNA vaccines, which include a lysophosphatidylcholine (LPC) compound for enhancing vaccine immunogenicity. The present disclosure also relates to methods for use of the mRNA vaccines.

【指定代表圖】

圖6A

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

免疫原性mRNA遞送載體

【英文發明名稱】

IMMUNOGENIC MRNA DELIVERY VEHICLES

【技術領域】

【0001】 本發明係關於用於mRNA疫苗之基於脂質之遞送載體，其包括用於增強疫苗免疫原性之溶血磷脂醯膽鹼(LPC)化合物。本發明亦係關於使用mRNA疫苗之方法。

【先前技術】

【0002】 mRNA疫苗具有優於傳統疫苗之若干優點。舉例而言，可快速地開發、便宜地產生且安全地投與mRNA疫苗(Pardi等人, Nat Reg Drug Discov, 17(4):261-279, 2018)。然而，裸mRNA不穩定且在投與之後快速降解。幸運的是，mRNA化學及遞送系統之發展能夠快速產生若干有效之 mRNA COVID-19 疫苗(Hou 等人, Nature Review Materials, 6:1078-1094, 2021)。

【0003】 儘管如此，用於遞送mRNA疫苗之基於脂質之調配物仍存在改進空間。特定言之，需要更多免疫原性及/或更少反應原性調配物。

【發明內容】

【0004】 本發明係關於用於mRNA疫苗之基於脂質之遞送載體，其包括用於增強疫苗免疫原性之溶血磷脂醯膽鹼(LPC)化合物。本發明亦係關於使用mRNA疫苗之方法。

【圖式簡單說明】

【0005】 圖1A至圖1B展示負載有22:0 Lyso PC及mRNA兩者之脂質奈米粒子(LNP)保持奈米粒子之尺寸($< 125\text{ nm}$)且直徑相對均勻($\text{PDI} < 0.3$)。圖1A展示負載有mRNA之LNP大於缺乏mRNA之LNP，且將22:0 LPC添加至LNP增加負載mRNA之LNP的尺寸。圖1B展示所有測試調配物均含有具有相對均勻尺寸之LNP。

【0006】 圖2A至圖2F展示用22:0 Lyso PC負載LNP增加LNP調配物之免疫原性，此係由允許人類單核球衍生之樹突狀細胞(moDC)之超活化來實現。用負載有50 μM 或100 μM 22:0 Lyso PC之LNP培養之人類moDC相對於單獨用R848處理之人類moDC (例示性PAMP)的存活率分別展示於圖2A及圖2B中。在添加或不添加R848之情況下，用負載有50 μM 或100 μM 22:0 Lyso PC之LNP培養之人類moDC的IL-1 β 分泌分別展示於圖2C及圖2D中。在添加或不添加R848之情況下，用負載有50 μM 或100 μM 22:0 Lyso PC之LNP培養之人類moDC的IL-6分泌分別展示於圖2E及圖2F中。用編碼GFP之mRNA或不用mRNA製備LNP，且用各種含量之22:0 Lyso PC (LNP中之0%、30%、40%莫耳比之22:0 Lyso PC)製備。投與無22:0 Lyso PC之LNP (LNP 0)以提供與負載有22:0 Lyso PC之LNP類似的總脂質含量。所有調配物類型中之mRNA劑量類似(約5 $\mu\text{g/mL}$)。

【0007】 圖3A至圖3D展示將22:0 Lyso PC負載於含有mRNA之LNP中不會阻止mRNA轉譯。分別如圖3A及圖3B中所示，在存在負載有50 μM 或100 μM 22:0 Lyso PC之LNP的情況下培養48小時後，以GFP-陽性moDC之百分比評估綠色螢光蛋白(GFP)之表現。分別如圖3C及圖3D中所示，在存在負載有50 μM 或100 μM 22:0 Lyso PC之LNP的情況下培養48小時後，亦以moDC中之中值螢光強度(MFI)評估GFP之表現。用編碼

GFP 之 mRNA 或不用 mRNA 製備 LNP，且用各種含量之 22:0 Lyso PC (LNP 中之 0%、30%、40% 莫耳比之 22:0 Lyso PC) 製備 LNP。投與無 22:0 Lyso PC 之 LNP (LNP 0) 以提供與負載有 22:0 Lyso PC 之 LNP 類似的總脂質含量。所有調配物類型中之 mRNA 劑量類似(約 5 µg/mL)。

【0008】 圖4A至圖4H展示將 22:0 Lyso PC 負載於含有 mRNA 之 LNP 中增加 moDC 之活化標記物及抗原呈現分子表現。特定言之，將 22:0 Lyso PC 負載於 LNP 中增加用 50 µM 或 100 µM 22:0 Lyso PC 處理之 moDC 中的 CD86 表現(圖4A至圖4B)、CD40 表現(圖4C至圖4D)、HLA-DR 表現(圖4E至圖4F)及 HLA-ABC 表現(圖4G至圖4H)。用各種含量之 22:0 Lyso PC (LNP 中之 0%、30%、40% 莫耳比之 22:0 Lyso PC) 製備 LNP。投與無 22:0 Lyso PC 之 LNP (LNP 0) 以提供與負載有 22:0 Lyso PC 之 LNP 類似的總脂質含量。所有調配物類型中之 mRNA 劑量類似(約 5 µg/mL)。

【0009】 圖5A至圖5B展示負載有 22:0 Lyso PC 及 OVA mRNA 之 LNP 促進表現 T 細胞受體的未經處理之轉殖基因鼠類 T 細胞(OT-I T 細胞)的活化，該等 T 細胞受體識別 OVA 抗原決定基。**圖5A**展示在存在或不存在 R848 之情況下，用負載有 50 µM 或 100 µM 22:0 Lyso PC 及 0、低或高量之 OVA mRNA 的 LNP 培養的鼠類骨髓衍生之樹突狀細胞(BMDC)的 IL-1β 分泌。**圖5B**展示在添加或不添加 R848 之情況下，與 BMDC 共同培養 72 小時之對 OVA 具有特異性的 OT-I T 細胞的 IFNγ 分泌，該等 BMDC 已用含有 OVA mRNA 及負載有 50 µM 22:0 Lyso PC 之 LNP 超活化 48 小時。用各種含量之 22:0 Lyso PC (LNP 中之 0%、40% 莫耳比之 22:0 Lyso PC) 製備 LNP。投與無 22:0 Lyso PC 之 LNP (LNP 0) 以提供與負載有 22:0 Lyso PC 之 LNP 類似的總脂質含量。所測試之 OVA mRNA 劑量包括：0、低劑量

(約0.25 µg/mL)及高劑量(約2.5 µg/mL)。

【0010】 圖6A至圖6B展示負載有22:0 Lyso PC及OVA mRNA之LNP再活化對OVA具有特異性之T細胞，該等T細胞係來自先前已針對OVA進行免疫接種之小鼠。圖6A展示在添加或不添加R848之情況下，先前暴露於OVA且與BMDC共同培養96小時之T細胞的IFN γ 分泌，該等BMDC已用負載有50 µM 22:0 Lyso PC之LNP超活化24小時。圖6B展示在添加或不添加R848之情況下，先前暴露於OVA且與BMDC共同培養96小時之T細胞的IFN γ 分泌，該等BMDC已用負載有50 µM 22:0 Lyso PC之LNP超活化48小時。用各種含量之22:0 Lyso PC (LNP中之0%、40%莫耳比之22:0 Lyso PC)製備LNP。投與無22:0 Lyso PC之LNP (LNP 0)以提供與負載有22:0 Lyso PC之LNP類似的總脂質含量。所測試之OVA mRNA劑量包括：0、低劑量(約0.25 µg/mL)及高劑量(約2.5 µg/mL)。

【實施方式】

相關申請案之交互參照

【0011】 本申請案主張2022年2月7日申請之美國臨時專利申請案第63/307,578號之優先權及權利，其以全文引用之方式併入本文中。

【0012】 本發明係關於用於mRNA疫苗之基於脂質之遞送載體，其包括用於增強疫苗免疫原性之溶血磷脂醯膽鹼(LPC)化合物。本發明亦係關於使用mRNA疫苗之方法。

通用技術及定義

【0013】 除非另外指示，否則本發明之實踐將使用分子生物學(包括重組技術)、微生物學、細胞生物學、生物化學及免疫學之習知技術，其屬於此項技術之範圍內。

【0014】 除非另外指示，否則如本文及隨附申請專利範圍中所使用之單數形式「一(a)」、「一(an)」及「該(the)」包括複數個參考物。舉例而言，「一(an)」賦形劑包括一或多種賦形劑。

【0015】 如本文中所使用之片語「包含(comprising)」為開放式的，表明此類實施例可包括其他元素。相比之下，片語「由……組成(consisting of)」為封閉式的，表明此類實施例不包括其他元素(微量雜質除外)。片語「基本上由……組成(consisting essentially of)」為部分封閉式的，表明此類實施例可進一步包含不會實質上改變此類實施例之基本特徵的元素。

【0016】 如本文中參考數值所使用之術語「約(about)」涵蓋該值之90%至110% (例如，約900道爾頓(dalton)之分子量係指810道爾頓至990道爾頓之分子量)。

【0017】 物質之「有效量」或「足夠量」為足以實現有益或所需結果，包括臨床結果之量，且因此「有效量」視其所應用之上下文而定。舉例而言，在投與免疫原性組合物之上下文中，有效量含有足夠抗原，以及溶血磷脂醯膽鹼(LPC)化合物及PRR促效劑中之一或兩者，以刺激針對抗原之免疫反應(例如，抗原反應性抗體及/或細胞免疫反應)。

【0018】 術語「個體(individual)」及「個體(subject)」係指哺乳動物。「哺乳動物」包括(但不限於)人類、非人類靈長類動物(例如猴)、農場動物、運動型動物、嚙齒動物(例如小鼠及大鼠)及寵物(例如狗及貓)。在一些實施例中，個體為人類患者，諸如罹患癌症及/或傳染病之人類患者。

【0019】 如本文中參考免疫原性組合物所使用之術語「劑量」係指

個體在任一時間服用(向個體投與或由個體接受)之免疫原性組合物的量測部分。

【0020】 如本文中所使用之術語「分離」及「純化」係指將物質自與其天然相關之至少一種組分移除(例如，自其原始環境移除)。作為一實例，當參考LPC使用時，分離之LPC具有藉由薄層層析法或氣相層析法所測定之至少90%、95%、96%、97%、98%或99%之純度。作為另一實例，當參考重組蛋白使用時，分離之蛋白質係指已自產生蛋白質之宿主細胞的培養基移除的蛋白質。

【0021】 術語「醫藥調配物」及「醫藥組合物」係指製劑，其呈准許活性成分之生物活性有效之形式，且不含對將投與調配物或組合物之個體具有不可接受毒性之額外組分。此類調配物或組合物意欲為無菌的。

【0022】 如本文中所使用之「賦形劑」包括醫藥學上可接受之賦形劑、載劑、媒劑或穩定劑，其在所使用之劑量及濃度下對暴露於其之細胞或哺乳動物無毒性。通常生理學上可接受之賦形劑為水性pH緩衝溶液。

【0023】 術語「抗原」係指由抗體或由T細胞抗原受體特異性識別及結合之物質。抗原可包括肽、多肽、蛋白質、醣蛋白、多醣、複合碳水化合物、糖、神經節苷脂、脂質及磷脂；其部分及其組合。在存在於本發明之組合物中時，抗原可為合成的或自自然界中分離。適用於在本發明之方法中投與之抗原包括任何能夠引發抗原特異性B細胞或T細胞反應之分子。半抗原包括於「抗原」之範疇內。「半抗原」為低分子量化合物，其本身無免疫原性但在與通常較大之免疫原性分子(載劑)結合時呈現免疫原性。

【0024】 「多肽抗原」可包括經純化之原生肽、合成肽、重組肽、

粗肽提取物或呈部分純化或未純化活性狀態之肽(諸如作為減毒或不活化病毒、微生物或細胞之一部分的肽)或此類肽之片段。多肽抗原之長度較佳為至少八個胺基酸殘基。

【0025】術語「促效劑」係以最廣泛的意義使用且包括活化經由受體進行之傳訊的任何分子。在一些實施例中，促效劑結合至受體。舉例而言，TLR8促效劑結合至TLR8受體且活化TLR8傳訊路徑。

【0026】「烷基」係指單價飽和脂族烴基。Cx烷基係指具有x數目個碳原子之烷基。Cx-Cy烷基或Cx-y烷基係指具有x數目與y數目之間(包括端點)的碳原子之烷基。

【0027】「伸烷基」係指二價飽和脂族烴基。

【0028】「烯基」係指具有至少一個雙鍵(>C=C<)之單價烴基。Cx烯基係指具有x數目個碳原子之烯基。Cx-Cy烯基或Cx-y烯基係指具有x數目與y數目之間(包括端點)的碳原子之烯基。

【0029】反應或參數之「刺激」包括在與除了所關注之參數以外的其他相同條件相比時，或替代地，與另一條件(例如，與不存在TLR促效劑相比，在存在TLR促效劑之情況下之TLR傳訊增加)相比時，引發及/或促進該反應或參數。舉例而言，免疫反應之「刺激」意謂反應增加。視所量測之參數而定，增加可為2倍至2,000倍，或5倍至500倍或更多倍，或2、5、10、50或100倍至500、1,000、2,000、5,000或10,000倍。

【0030】相反地，反應或參數之「抑制」包括在與除了所關注之參數以外的其他相同條件相比時，或替代地，與另一條件(例如，與投與安慰劑組合物或未治療相比，投與包含LPC化合物以及病原體識別受體促效劑、抗原及人類樹突狀細胞中之一或多者的組合物後，異常細胞增殖減

少)相比時，減少及/或抑制該反應或參數。舉例而言，免疫反應之「抑制」意謂反應減少。視所量測之參數而定，減少可為2倍至2,000倍，或5倍至500倍或更多倍，或2、5、10、50或100倍至500、1,000、2,000、5,000或10,000倍。

【0031】 相對術語「較高」及「較低」係指在與除了所關注之參數以外的其他相同條件相比時，或替代地，與另一條件相比時，反應或參數分別可量測地增加或減少。舉例而言，「較高含量之DC超活化」係指由治療條件(包含本發明之LPC化合物)引起之DC超活化含量，其比對照條件(例如，無LPC、PGPC、oxPAPC等)引起之DC超活化含量高至少2、3、4、5、6、7、8、9或10倍。同樣地，「較低含量之DC超活化」係指由治療條件(包含本發明之LPC化合物)引起之DC超活化含量，其比對照條件(例如，無LPC、PGPC、oxPAPC等)引起之DC超活化含量低至少2、3、4、5、6、7、8、9或10倍。

【0032】 如本文中所使用，術語「免疫接種」係指提高哺乳動物個體對抗原之反應的方法，且因此改進其抵抗或克服感染及/或抵抗疾病之能力。

【0033】 如本文中所使用之術語「疫苗接種」係指將疫苗引入至哺乳動物個體內。

【0034】 「佐劑」係指在暴露後，當被添加至包含抗原之組合物中時增強或加強對哺乳動物受體中之抗原之免疫反應的物質。

【0035】 術語疾病之「治療(treating)」或「治療(treatment)」係指實行一種方案，其可包括向個體(人類或其他個體)投與一或多種治療劑以致力於在該等個體中獲得有益或所需結果，包括臨床結果。有益或所需臨

δ 標記法或 ω 標記法可用於指示不飽和醯基鏈中之一或多個雙鍵之位置。

【0040】 本發明之溶血磷脂醯膽鹼(LPC)化合物具有單一醯基鏈，其中醯基鏈為C13-C22醯基鏈或C13-C24醯基鏈。在一些實施例中，醯基鏈為C18-C22醯基鏈或C21-C24醯基鏈。在一些較佳實施例中，醯基鏈為C22醯基鏈。將包括於本發明之LNP中的例示性LPC化合物之名稱及結構，以及其化學摘要服務社(Chemical Abstract Service；CAS)登記號列為國際申請案第PCT/US2022/071664號之表I的化合物#30至#43，視情況選用之#30至#42，該國際申請案以引用之方式併入本文中。已知若干用於合成溶血磷脂之方法(參見例如，D'Arrigo等人，「Synthesis of lysophospholipids」，Molecules, 15(3):1354-77, 2010；及Yang等人，「Lysophosphatidylcholine synthesis by lipase-catalyzed ethanolysis」，J Oleo Sci., 64(4):443-7, 2015，以及其中所引用之參考文獻)。另外，許多溶血磷脂為可商購的。

II.病原體識別受體促效劑

【0041】 本發明之組合物及方法可進一步包含病原體識別受體(PRR)促效劑。在一些實施例中，PRR促效劑包含鐸樣受體(TLR)、NOD樣受體(NLR)、RIG-I樣受體(RLR)或C型凝集素受體(CLR)之促效劑。在其他實施例中，PRR促效劑包含胞溶質DNA感測器(CDS)或IFN基因之刺激劑(STING)。在一些實施例中，PRR促效劑包含TLR7/8促效劑。

A. TLR7/8促效劑

【0042】 如本文中所使用之術語「TLR7/8促效劑」係指TLR7及/或TLR8之促效劑。在一個態樣中，TLR7/8促效劑為TLR7促效劑。在另一態樣中，TLR7/8促效劑為TLR8促效劑。在另一態樣中，TLR7/8促效劑

為TLR7及TLR8兩者之促效劑。本發明之TLR7/8促效劑適合於在存在LPC之情況下超活化人類樹突狀細胞。

【0043】 在一些態樣中，TLR7/8促效劑為小分子。在一些實施例中，TLR7/8促效劑為具有900道爾頓或更低之分子量的小分子或其鹽。亦即，小分子TLR7/8促效劑並非類似重組蛋白或合成寡核苷酸之大分子，其可由美國FDA之生物製劑評估及研究中心(Center for Biologics Evaluation and Research)調節。相反地，小分子TLR7/8促效劑可由FDA之藥物評估及研究中心(Center for Drug Evaluation and Research)調節。在一些實施例中，小分子具有約90至約900道爾頓之分子量。在一些實施例中，TLR7/8促效劑包含咪唑并喹啉化合物。在一些較佳實施例中，TLR7/8促效劑包含瑞西喹莫特(resiquimod) (R848)。

B.其他PRR促效劑

【0044】 在一些態樣中，病原體識別受體(PRR)促效劑包含鐸樣受體(TLR)促效劑，其限制條件為TLR促效劑不包含TLR7/8促效劑。在一些實施例中，TLR促效劑包含TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR9及TLR13中之一或多者的促效劑。在一些實施例中，PRR促效劑為TLR2/6促效劑，諸如Pam2CSK4。在其他實施例中，TLR促效劑為TLR4促效劑，諸如單磷醯基脂質A (MPLA)。然而，在較佳實施例中，TLR促效劑不為TLR2、TLR4及/或TLR9之促效劑。舉例而言，在較佳實施例中，TLR9促效劑不為TLR4配位體，諸如LPS (內毒素)。

【0045】 在其他態樣中，PRR促效劑包含NOD樣受體(NLR)促效劑。在其他態樣中，PRR促效劑包含RIG-I樣受體(RLR)促效劑。在額外態樣中，PRR促效劑包含C型凝集素受體(CLR)促效劑。在另外其他態樣

中，PRR促效劑包含CDS促效劑或STING促效劑。

III. 編碼抗原之mRNA

【0046】 本發明之組合物及方法包含編碼抗原之mRNA或另外適合於與包含編碼抗原之mRNA的調配物一起使用。在一些實施例中，抗原為蛋白質抗原。參考包含長度為至少8個胺基酸之肽鏈的抗原，術語「多肽」及「蛋白質」在本文中可互換地使用。在一些實施例中，抗原之長度為8至1800個胺基酸、9至1000個胺基酸或10至100個胺基酸。多肽可諸如藉由磷酸化、羥基化、磺化、棕櫚醯化及/或糖基化進行轉譯後修飾。

【0047】 在一些實施例中，抗原為包含至少一個全長蛋白質或其片段之胺基酸序列的腫瘤抗原。在一些實施例中，腫瘤抗原包含來自致癌蛋白之胺基酸序列或其片段。在一些實施例中，哺乳動物抗原為新抗原或由基因編碼，該基因包含相對於來自哺乳動物個體之正常細胞中所存在之基因的突變。認為新抗原特別適用於使T細胞能夠區分癌細胞與非癌細胞(參見例如，Schumacher及Schreiber, *Science*, 348:69-74, 2015)。在其他實施例中，腫瘤抗原包含病毒抗原，諸如致癌病毒之抗原。

【0048】 在一些實施例中，腫瘤抗原為包含兩種或更多種多肽之融合蛋白，其中各多肽包含來自不同腫瘤抗原之胺基酸序列或來自相同腫瘤抗原之非連續胺基酸序列。在此等實施例中之一些中，融合蛋白包含第一多肽及第二多肽，其中各多肽包含來自相同腫瘤抗原之非連續胺基酸序列。

【0049】 在一些實施例中，抗原為微生物抗原。在一些實施例中，微生物抗原包含病毒抗原、細菌抗原、原蟲抗原、真菌抗原或其組合。在一些實施例中，微生物抗原包含微生物之表面蛋白或其他抗原次單元。

【0050】 在一些較佳實施例中，mRNA包含處於編碼區之5'端的5'非轉譯區(5'UTR)且包含處於編碼區之3'端的3'非轉譯區(3'UTR)。在一些較佳實施例中，mRNA包含5'帽結構及多腺苷酸尾(polyA tail)中之一或兩者。

IV.基於脂質之遞送載體

【0051】 本發明之組合物及方法包含用於mRNA疫苗之基於脂質之遞送載體。在一些實施例中，載體為脂質奈米粒子(LNP)。在其他實施例中，載體為脂質，其與mRNA形成複合物(RNA-脂質複合物)。

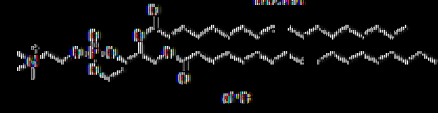
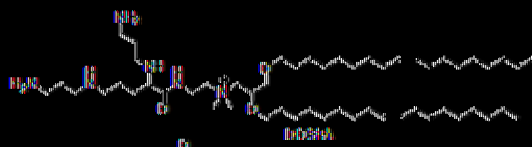
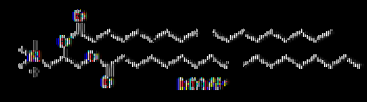
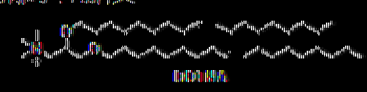
【0052】 在一些實施例中，LNP包含第一磷脂(具有單一C13-C24醯基鏈之溶血磷脂醯膽鹼) [LPC:C13-C24]及至少一種選自由以下組成之群的脂質：可電離脂質、陽離子型脂質、第二磷脂、聚乙二醇化脂質、結構性脂質及其混合物。在一些實施例中，至少一種脂質包含可電離脂質。在一些實施例中，至少一種脂質包含陽離子型脂質。在一些實施例中，至少一種脂質包含第二磷脂。在一些實施例中，至少一種脂質包含聚乙二醇化脂質。在一些實施例中，至少一種脂質包含結構性脂質。在一些實施例中，至少一種脂質包含可電離脂質、第二磷脂、聚乙二醇化脂質及結構性脂質。

【0053】 在一些實施例中，RNA-脂質複合物之脂質組分包含一或多種脂質。在一些較佳實施例中，一或多種脂質包含第一脂質及第二脂質，其中第一脂質不同於第二脂質。在一些實施例中，第一脂質為陽離子型脂質，且第二脂質為中性或陰離子型脂質。

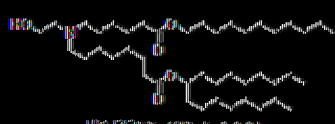
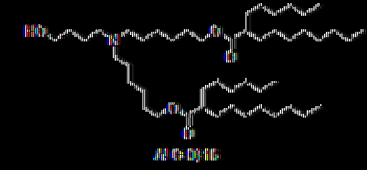
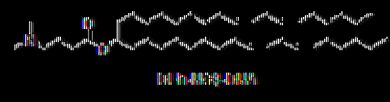
【0054】 適用於本發明之基於脂質之mRNA遞送載體的脂質結構展示如下(複製於Hou等人, Nature Review Materials, 6:1078-1094, 2021之

圖2)。

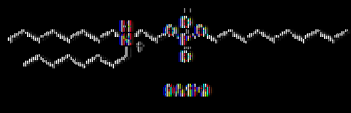
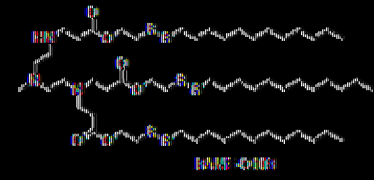
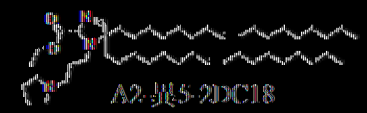
陽離子型脂質



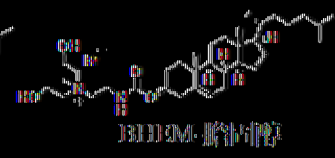
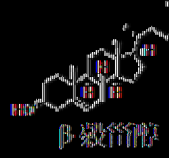
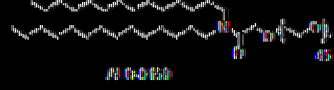
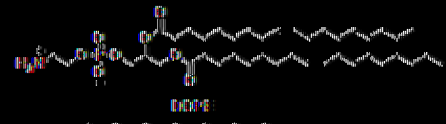
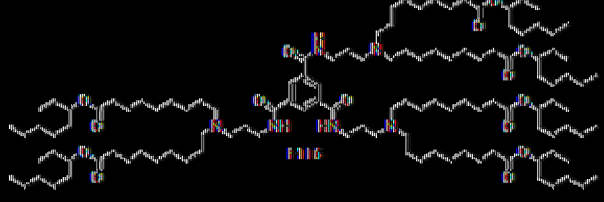
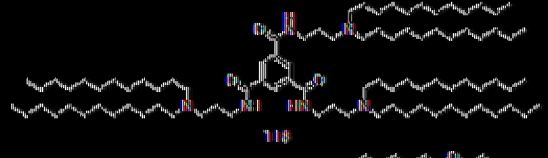
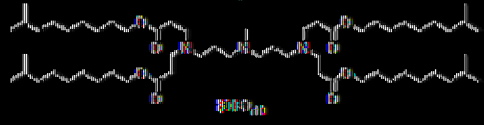
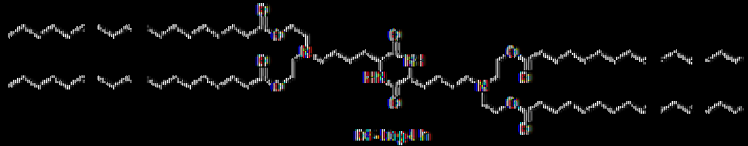
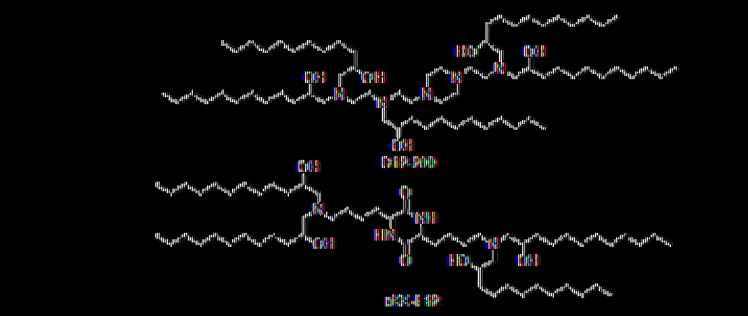
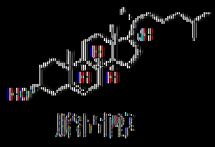
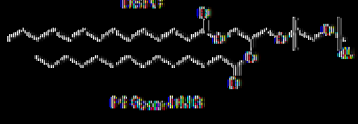
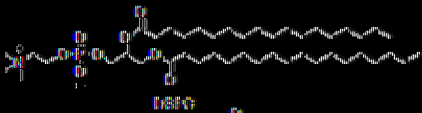
可電離脂質



脂質D (SM-102)



其他類型之脂質



V. 醫藥調配物

【0055】 本發明之一些組合物為包含醫藥學上可接受之賦形劑的醫藥調配物。本發明之醫藥調配物可呈溶液或懸浮液形式。或者，醫藥調配物可為脫水固體(例如冷凍乾燥或噴霧乾燥之固體)。本發明之醫藥調配物較佳為無菌的，且較佳基本上不含內毒素。術語「醫藥調配物」與術語「藥品」及「藥物」在本文中可互換地使用。在一些實施例中，基於調配物之預期目的，醫藥調配物包含特定比率之各種組分。

【0056】 本發明之醫藥學上可接受之賦形劑包括例如溶劑、緩衝劑、張力調節劑、增積劑及防腐劑(參見例如Pramanick等人, *Pharma Times*, 45:65-77, 2013)。在一些實施例中，醫藥調配物可包含賦形劑，其用作溶劑、緩衝劑、張力調節劑及增積劑中之一或多者(例如，鹽水中之氯化鈉可用作水性媒劑及張力調節劑兩者)。

【0057】 在一些實施例中，醫藥調配物包含水性媒劑作為溶劑。適合之媒劑包括例如無菌水、鹽水溶液、磷酸鹽緩衝鹽水，及林格氏溶液(Ringer's solution)。在一些實施例中，組合物為等張的。

【0058】 醫藥調配物可包含緩衝劑。緩衝劑控制pH以抑制活性劑在加工、儲存及視情況復原期間的降解。適合之緩衝劑包括例如包含乙酸鹽、檸檬酸鹽、磷酸鹽或硫酸鹽之鹽。其他適合之緩衝液包括例如胺基酸，諸如精胺酸、甘胺酸、組胺酸及離胺酸。緩衝劑可進一步包含鹽酸或氫氧化鈉。在一些實施例中，緩衝劑將組合物之pH維持在6至9之範圍內。在一些實施例中，pH大於(下限) 6、7或8。在一些實施例中，pH小於(上限) 9、8或7。亦即，pH在約6至9之範圍內，其中下限小於上限。

【0059】 醫藥組合物可包含張力調節劑。適合之張力調節劑包括例如右旋糖、丙三醇、氯化鈉、甘油及甘露糖醇。

【0060】醫藥調配物可包含增積劑。當醫藥組合物在投與前凍乾時，增積劑尤其適用。在一些實施例中，增積劑為保護劑，其有助於在冷凍或噴霧乾燥期間及/或在儲存期間穩定及防止活性劑之降解。適合之增積劑為糖(單糖、二糖及多糖)，諸如蔗糖、乳糖、海藻糖、甘露糖醇、山梨糖醇、葡萄糖及棉子糖。

【0061】醫藥調配物可包含防腐劑。適合之防腐劑包括例如抗氧化劑及抗微生物劑。然而，在較佳實施例中，醫藥調配物係在無菌條件下製備且在一次性容器中，且因此不需要包括防腐劑。

【0062】本發明之醫藥調配物適合於非經腸投與。亦即，本發明之醫藥調配物並不意欲用於經腸投與(例如，不藉由經口、胃內或經直腸投與)。

VI.使用方法

【0063】在一些態樣中，本發明係關於使用本文中所描述之組合物或調配物中之任一者的方法。使用方法適合於涉及刺激免疫反應之複數種用途。在一些實施例中，使用方法包含治療癌症之方法。在一些實施例中，使用方法包含抑制異常細胞增殖之方法。在一些實施例中，使用方法包含治療或預防傳染病之方法。方法包含向有需要之個體投與有效量之本文中所描述之調配物或組合物以達成特定結果。個體為哺乳動物個體，諸如人類患者。在其他實施例中，個體為非人類患者。在一些實施例中，個體為犬科患者。亦即，在一些實施例中，使用方法涉及臨床用途，而在其他實施例中，使用方法涉及臨床前及/或獸醫學用途。對於臨床前用途，哺乳動物個體可為非人類靈長類動物(例如猴或猿)或啮齒動物(例如小鼠或大鼠)。對於獸醫學用途，哺乳動物個體可為農場動物(例如牛)、運動

型動物(例如馬)、寵物(例如伴侶動物，諸如狗或貓)。

A. 免疫反應之刺激

【0064】簡言之，本發明提供刺激個體中之免疫反應的方法，其包含以足以刺激個體中之免疫反應的量向個體投與本文中所描述之組合物或調配物。「刺激」免疫反應(可與「引發」免疫反應互換地使用)意謂增加免疫反應，其可源於引發新生免疫反應(例如，由初始疫苗接種方案引起)或增強現有免疫反應(例如，由加強疫苗接種方案引起)。在一些實施例中，刺激免疫反應包含由以下組成之群中之一或多者：刺激細胞介素產生；刺激B淋巴細胞增殖；刺激干擾素路徑相關之基因表現；刺激化學吸引因數相關之基因表現；及刺激樹突狀細胞DC成熟。用於量測免疫反應之刺激的方法為此項技術中已知的。

【0065】舉例而言，本發明提供誘導個體中之抗原特異性免疫反應的方法，其係藉由以足以在個體中誘導抗原特異性免疫反應之量向個體投與本文中所描述之組合物或調配物進行。在較佳實施例中，組合物或調配物包含抗原。在一些實施例中，向包含抗原之個體的組織投與組合物或調配物。免疫反應可包含抗原特異性抗體反應及抗原特異性細胞毒性T淋巴細胞(CTL)反應中之一或兩者。「誘導」抗原特異性抗體反應意謂將抗原特異性抗體之效價提高至高於臨限值含量，諸如投與前之基線效價或血清保護性含量。「誘導」抗原特異性CTL反應意謂將周邊血液中發現之抗原特異性CTL的頻率增加至高於投與前之基線頻率。

【0066】可藉由此項技術中已知的任何方法進行免疫反應之分析(定性及定量兩者)，該方法包括(但不限於)量測抗原特異性抗體產生(包括量測特異性抗體子類)、諸如B細胞及輔助T細胞之特定淋巴細胞群體的活

化、細胞介素(諸如IFN- α 、IFN- γ 、IL-6、IL-12)之產生及/或組織胺之釋放。用於量測抗原特異性抗體反應之方法包括酶聯結免疫吸附分析法(ELISA)。可藉由增殖分析法及用螢光活化細胞分選(FACS)來量測特異性淋巴細胞群體之活化。亦可藉由ELISA來量測細胞介素之產生。在一些實施例中，刺激免疫反應之方法包含藉由單核球衍生之樹突狀細胞或外周血液單核細胞刺激介白素-1 β (IL-1 β)分泌、干擾素- γ (IFN- γ)分泌及/或腫瘤壞死因子- α (TNF- α)分泌。在一些較佳實施例中，與本發明之組合物接觸的至少50%、55%、60%、65%、70%或75%之細胞在接觸後40至56小時(或約48小時)仍保持存活。在一些較佳實施例中，與本發明之組合物接觸的至少75%之細胞在接觸後40至56小時(或約48小時)仍保持存活。

【0067】 在一些實施例中，方法適合於刺激抗腫瘤免疫反應。在其他實施例中，方法適合於刺激抗微生物免疫反應。在一些實施例中，抗微生物免疫反應為抗細菌免疫反應。在一些實施例中，抗微生物反應為抗真菌免疫反應。在一些實施例中，抗微生物反應為抗病毒免疫反應。在一些實施例中，抗微生物反應為抗原蟲免疫反應。

B.治療或預防疾病

【0068】 本發明進一步提供治療或預防個體中之疾病之方法，其包含以足以治療或預防個體中之疾病的量向個體投與本文中所描述之組合物或調配物。在一些實施例中，疾病為癌症。在一些實施例中，疾病為異常細胞增殖。在其他實施例中，疾病為傳染病。在一個態樣中，方法可包含向有需要之個體投與組合物。

【0069】 在一些實施例中，方法涉及治療個體中之癌症或以其他方式治療患有癌症之哺乳動物個體。在一些實施例中，癌症為血液癌，諸如

淋巴瘤、白血病或骨髓瘤。在其他實施例中，癌症為非血液癌，諸如肉瘤、癌瘤或黑色素瘤。在一些實施例中，癌症為惡性的。

【0070】 在一些實施例中，方法涉及抑制個體中之異常細胞增殖。

「異常細胞增殖」係指良性腫瘤或惡性腫瘤之增殖。惡性腫瘤可為轉移性腫瘤。

【0071】 在一些實施例中，方法涉及治療或預防個體中之傳染病。

在一些實施例中，傳染病係由病毒感染引起。在其他實施例中，傳染病係由細菌感染引起。在其他實施例中，傳染病係由真菌感染引起。在另外其他實施例中，傳染病係由原蟲感染引起。尤其重要的係由感染人類以及其他動物(諸如哺乳動物或鳥類)之人畜共通病原體所引起之傳染病。在一些實施例中，人畜共通病原體係經由中間物種(載體)傳播給人類。

列舉之實施例

1. 一種組合物，其包含囊封於脂質奈米粒子(LNP)中之mRNA，其中mRNA包含抗原之編碼區，且LNP包含第一磷脂及選自由以下組成之群的至少一種脂質：可電離脂質、第二磷脂、聚乙二醇化脂質、結構性脂質及其混合物，其中第一磷脂包含具有單一醯基鏈之溶血磷脂醯膽鹼(LPC)，且醯基鏈為C13-C24醯基鏈。

2. 一種組合物，其包含囊封於脂質奈米粒子(LNP)中之mRNA及TLR7/8促效劑，其中mRNA包含抗原之編碼區，且LNP包含第一磷脂及選自由以下組成之群的至少一種脂質：可電離脂質、第二磷脂、聚乙二醇化脂質、結構性脂質及其混合物，其中第一磷脂包含具有單一醯基鏈之溶血磷脂醯膽鹼(LPC)，且醯基鏈為C13-C24醯基鏈。

3. 一種組合物，其包含囊封於脂質奈米粒子(LNP)中之mRNA及

TLR7/8促效劑，其中mRNA包含抗原之編碼區，且LNP包含第一磷脂及選自由以下組成之群的至少一種脂質：可電離脂質、第二磷脂、聚乙二醇化脂質、結構性脂質及其混合物，其中第一磷脂包含具有單一醯基鏈之溶血磷脂醯膽鹼(LPC)，且醯基鏈為C13-C24醯基鏈。

4. 一種組合物，其包含囊封於脂質奈米粒子(LNP)中之TLR7/8促效劑，且LNP包含第一磷脂及選自由以下組成之群的至少一種脂質：可電離脂質、第二磷脂、聚乙二醇化脂質、結構性脂質及其混合物，其中第一磷脂包含具有單一醯基鏈之溶血磷脂醯膽鹼(LPC)，且醯基鏈為C13-C24醯基鏈。

5. 一種組合物，其包含脂質奈米粒子(LNP)及TLR7/8促效劑，其中LNP包含第一磷脂及選自由以下組成之群的至少一種脂質：可電離脂質、第二磷脂、聚乙二醇化脂質、結構性脂質及其混合物，其中第一磷脂包含具有單一醯基鏈之溶血磷脂醯膽鹼(LPC)，且醯基鏈為C13-C24醯基鏈。

6. 如實施例1至5中任一項之組合物，其中該至少一種脂質包含可電離脂質、第二磷脂、聚乙二醇化脂質及結構性脂質。

7. 如實施例1至6中任一項之組合物，其中可電離脂質包含：

i) SM-102或其類似物或衍生物；及/或

ii) ALC-0315或其類似物或衍生物。

8. 如實施例1至7中任一項之組合物，其中聚乙二醇化脂質係選自由以下組成之群：經PEG修飾之磷脂醯乙醇胺、經PEG修飾之磷脂酸、經PEG修飾之神經醯胺、經PEG修飾之二烷基胺、經PEG修飾之二醯基甘油、經PEG修飾之二烷基甘油及其組合。

9. 如實施例1至7中任一項之組合物，其中聚乙二醇化脂質包含聚乙二醇[PEG] 2000二肉豆蔻醯基甘油[DMG]。

10. 如實施例1至9中任一項之組合物，其中結構性脂質係選自由以下組成之群：膽固醇、糞固醇、 β -穀固醇、麥角固醇、菜油固醇、豆固醇、菜籽固醇、番茄鹼、熊果酸、 α -生育酚及其組合。

11. 如實施例1至9中任一項之組合物，其中結構性脂質包含膽固醇。

12. 如實施例1至11中任一項之組合物，其中第二磷脂包含：

i)親水性頭部部分，其係選自由以下組成之群：磷脂醯基膽鹼、磷脂醯基乙醇胺、磷脂醯基甘油、磷脂醯基絲胺酸、磷脂酸、2-溶血磷脂醯基膽鹼及神經鞘磷脂；及

ii)一或多個脂肪酸尾部部分，其係選自由以下組成之群：月桂酸、肉豆蔻酸、肉豆蔻油酸、棕櫚酸、棕櫚油酸、硬脂酸、油酸、亞麻油酸、 α -次亞麻油酸、芥子酸、花生酸、花生四烯酸、植烷酸、二十碳五烯酸、二十二烷酸、二十二碳五烯酸及二十二碳六烯酸。

13. 如實施例1至11中任一項之組合物，其中第二磷脂係選自由以下組成之群：

1,2-二亞油醯基-sn-甘油-3-磷酸膽鹼(DLPC)、

1,2-二肉豆蔻醯基-sn-甘油-3-磷酸膽鹼(DMPC)、

1,2-二油醯基-sn-甘油-3-磷酸膽鹼(DOPC)、

1,2-二軟脂醯基-sn-甘油-3-磷酸膽鹼(DPPC)、

1,2-二硬脂醯基-sn-甘油-3-磷酸膽鹼(DSPC)、

1,2-雙十一醯基-sn-甘油-3-磷酸膽鹼(DUPC)、

1-軟脂醯基-2-油醯基-sn-甘油-3-磷酸膽鹼(POPC)、
 1,2-二-O-十八烯基-sn-甘油-3-磷酸膽鹼、
 1-油醯基-2-膽固醇半丁二醯基-sn-甘油-3-磷酸膽鹼、
 1,2-二次亞麻醯基-sn-甘油-3-磷酸膽鹼、
 1,2-二花生四烯醯基-sn-甘油-3-磷酸膽鹼、
 1,2-雙二十二碳六烯醯基-sn-甘油-3-磷酸膽鹼、
 1,2-二油醯基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DOPE)、
 1,2-二植烷醯基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、
 1,2-二硬脂醯基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、
 1,2-二亞油醯基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、
 1,2-二次亞麻醯基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、
 1,2-二花生四烯醯基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、
 1,2-雙二十二碳六烯醯基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、
 1,2-二油醯基-sn-甘油-3-磷酸基-外消旋-(1-甘油)鈉鹽(DOPG)、
 神經鞘磷脂，及
 其組合。

14. 如實施例1至13中任一項之組合物，其中第二磷脂包含1,2-二硬脂醯基-sn-甘油-3-磷酸膽鹼(DSPC)。

15. 如實施例1至14中任一項之組合物，其中組合物進一步包含至少一種賦形劑。

16. 如實施例15之組合物，其中賦形劑包含蔗糖。

17. 一種組合物，其包含：

i)與一或多種脂質複合之mRNA (RNA-脂質複合物)；及

ii)具有單一C13-C24醯基鏈之溶血磷脂醯膽鹼(LPC)，

其中mRNA包含抗原之編碼區，且一或多種脂質包含第一脂質及第二脂質。

18. 一種組合物，其包含：

i)與一或多種脂質複合之mRNA (RNA-脂質複合物)；

ii)具有單一C13-C24醯基鏈之溶血磷脂醯膽鹼(LPC)；及

iii) TLR7/8促效劑，

其中mRNA包含抗原之編碼區，且一或多種脂質包含第一脂質及第二脂質。

19. 如實施例17或實施例18之組合物，其中第一脂質為陽離子型脂質，且第二脂質為中性或陰離子型脂質。

20. 如實施例19之組合物，其中陽離子型脂質包含以下中之一或兩者：

i) 1,2-二-O-十八烯基-3-三甲銨丙烷(DOTMA)或其類似物或衍生物；及

ii) 1,2-二油醯基-3-三甲銨丙烷(DOTAP)或其類似物或衍生物。

21. 如實施例19或實施例20之組合物，其中中性或陰離子型脂質包含：

i) 1,2-二-(9Z-十八烯醯基)-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DOPE)或其類似物或衍生物；及/或

ii)膽固醇或其類似物或衍生物；及/或

iii) 1,2-二油醯基-sn-甘油-3-磷酸膽鹼(DOPC)或其類似物或衍生物。

22. 如實施例1至21中任一項之組合物，其中LPC之醯基鏈為C21-C24醯基鏈。

23. 如實施例1至21中任一項之組合物，其中LPC之醯基鏈為C22醯基鏈。

24. 如實施例1至23中任一項之組合物，其中LPC之醯基鏈完全飽和。

25. 如實施例24之組合物，其中LPC包含1-二十二烷醯基-2-羥基-sn-甘油-3-磷酸膽鹼[LPC(22:0)]。

26. 如實施例1至25中任一項之組合物，其中TLR7/8促效劑為具有900道爾頓或更低之分子量的小分子。

27. 如實施例1至25中任一項之組合物，其中TLR7/8促效劑包含咪唑并喹啉化合物。

28. 如實施例27之組合物，其中TLR7/8促效劑包含瑞西喹莫特(R848)。

29. 如實施例1至28中任一項之組合物，其中LPC包含LPC(22:0)，且TLR7/8促效劑包含瑞西喹莫特(R848)。

30. 如實施例1至28中任一項之組合物，其中抗原為腫瘤抗原。

31. 如實施例1至28中任一項之組合物，其中腫瘤抗原為新抗原。

32. 如實施例1至28中任一項之組合物，其中抗原包含微生物抗原。

33. 如實施例32之組合物，其中微生物抗原包含病毒抗原、細菌抗原、原蟲抗原或真菌抗原。

34. 如實施例32之組合物，其中微生物抗原包含表面抗原。

35. 如實施例1至34中任一項之組合物，其中mRNA包含處於編碼區

之5'端的5'非轉譯區(5'UTR)且包含處於編碼區之3'端的3'非轉譯區(3'UTR)。

36. 如實施例1至35中任一項之組合物，其中mRNA包含5'帽結構。

37. 如實施例1至36中任一項之組合物，其中mRNA包含多腺苷酸尾。

38. 如實施例1至37中任一項之組合物，其中組合物不包含脂多醣(LPS)或單磷醯基脂質A (MPLA)。

39. 如實施例1至38中任一項之組合物，其中組合物不包含經氧化之1-軟脂醯基-2-花生四烯醯基-sn-甘油-3-磷酸膽鹼(oxPAPC)或oxPAPC之物種。

40. 如實施例39之組合物，其中組合物不包含2-[(2R)-2-[(E)-7-羧基-5-羥基庚-6-烯醯基]氧基-3-十六烷醯基氧基丙氧基]-羥基磷醯基]氧基乙基-三甲基銨根(azanium)(HODiA-PC)、磷酸[(2R)-2-[(E)-7-羧基-5-側氧基庚-6-烯醯基]氧基-3-十六烷醯基氧基丙基]2-(三甲基銨基)乙酯(KODiA-PC)、1-軟脂醯基-2-(5-羥基-8-側氧基-辛烯醯基)-sn-甘油-3-磷醯膽鹼(HOOA-PC)、2-[(2R)-2-[(E)-5,8-二側氧基辛-6-烯醯基]氧基-3-十六烷醯基氧基丙氧基]-羥基磷醯基]氧基乙基-三甲基銨(KOOA-PC)、磷酸[(2R)-3-十六烷醯基氧基-2-(5-側氧基戊醯基氧基)丙基]2-(三甲基銨基)乙酯(POVPC)、磷酸[(2R)-2-(4-羧基丁醯基氧基)-3-十六烷醯基氧基丙基]2-(三甲基銨基)乙酯(PGPC)、磷酸[(2R)-3-十六烷醯基氧基-2-[4-[3-[(E)-[2-[(Z)-辛-2-烯基]-5-側氧基亞環戊-3-烯-1-基]甲基]環氧乙烷-2-基]丁醯基氧基]丙基]2-(三甲基銨基)乙酯(PECPC)、磷酸[(2R)-3-十六烷醯基氧基-2-[4-[3-[(E)-[3-羥基-2-[(Z)-辛-2-烯基]-5-側氧基亞環戊基]甲基]環氧乙烷-

2-基]丁醯基氧基]丙基]2-(三甲基鉍基)乙酯(PEIPC)及/或1-軟脂醯基-2-壬二醯基-sn-甘油-3-磷酸膽鹼(PAzePC)。

41. 如實施例1至40中任一項之組合物，其中組合物不包含抗原。

42. 一種醫藥調配物，其包含如實施例1至41中任一項之組合物及醫藥學上可接受之賦形劑。

43. 一種用於產生超活化樹突狀細胞之方法，該方法包含使樹突狀細胞與有效量之如前述實施例中任一項之組合物接觸以產生超活化樹突狀細胞，其中超活化樹突狀細胞在不經歷細胞死亡之情況下在暴露約48小時內分泌IL-1 β 。

44. 如實施例43之方法，其中使樹突狀細胞與組合物活體內接觸。

45. 如實施例43之方法，其中使樹突狀細胞與組合物離體接觸。

46. 一種醫藥調配物，其包含藉由如實施例45之方法產生的至少 10^3 、 10^4 、 10^5 或 10^6 個超活化樹突狀細胞及醫藥學上可接受之賦形劑。

47. 一種刺激針對抗原之免疫反應之方法，其包含向有需要之個體投與有效量之如實施例42或實施例46之醫藥調配物以刺激針對抗原之免疫反應。

48. 一種治療癌症之方法，其包含向有需要之個體投與有效量之如實施例42或實施例46之醫藥調配物以治療癌症。

49. 一種抑制異常細胞增殖之方法，其包含向有需要之個體投與有效量之如實施例42或實施例46之醫藥調配物以抑制異常細胞增殖。

50. 一種治療或預防傳染病之方法，其包含向有需要之個體投與有效量之如實施例42之醫藥調配物以治療或預防傳染病。

51. 如實施例50之方法，其中傳染病為病毒性疾病。

52. 如實施例51之方法，其中傳染病為細菌性疾病。

53. 如實施例43至49中任一項之方法或醫藥調配物，其中樹突狀細胞為哺乳動物細胞。

54. 如實施例53之方法或醫藥調配物，其中哺乳動物細胞為人類細胞。

55. 如實施例47至53中任一項之方法，其中個體為哺乳動物。

56. 如實施例55之方法，其中哺乳動物為人類。

57. 如實施例55之方法，其中哺乳動物為狗或貓。

58. 如實施例1至57中任一項之組合物、調配物或方法或用途，其中組合物不包含蛋白質。

59. 如實施例1至58中任一項之組合物、調配物、方法或用途，其中LNP具有小於約500奈米，視情況約5至約500奈米、視情況約10至約400奈米、視情況約20至約300奈米或視情況約25至約250奈米之有效直徑。

60. 如實施例59之組合物、調配物、方法或用途，其中LNP具有小於約250奈米之有效直徑。

61. 如實施例60之組合物、調配物、方法或用途，其中LNP具有小於約125奈米之有效直徑。

62. 如實施例61之組合物、調配物、方法或用途，其中LNP具有約20至約120奈米之有效直徑。

實例

【0072】 縮寫：骨髓衍生之樹突狀細胞(bone marrow-derived dendritic cell；BMDC)；胞溶質DNA感測器(cytosolic DNA sensor；CDS)；C型凝集素受體(C-type lectin receptor；CLR)；損傷相關分子模

式(damage-associated molecular pattern ; DAMP) ; 樹突狀細胞(dendritic cell ; DC) ; 1,2-二肉豆蔻醯基-外消旋-甘油-3-甲氧基聚乙二醇-2000 (1,2-dimyristoyl-rac-glycerol-3-methoxypolyethylene glycol-2000 ; DMG-PEG2000) ; 1,2-二硬脂醯基-sn-甘油-3-磷酸膽鹼(1,2-distearoyl-sn-glycerol-3-phosphocholine ; DSPC) ; 綠色螢光蛋白(green fluorescent protein ; GFP) ; 1-軟脂醯基-2-(5-羥基-8-側氧基-6-辛烯二醯基)-sn-甘油-3-膽鹼磷脂(1-Palmitoyl-2-(5-hydroxy-8-oxo-6-octenedioyl)-sn-glycerol-3-phosphatidylcholine ; HODiA-PC) ; 1-軟脂醯基-2-(5-羥基-8-側氧基辛-6-烯醯基)-sn-甘油-3-磷酸膽鹼(1-palmitoyl-2-(5-hydroxy-8-oxooct-6-enoyl)-sn-glycerol-3-phosphocholine ; HOOA-PC) ; 干擾素- γ (interferon-gamma ; IFN γ) ; 介白素-1 β (Interleukin-1beta ; IL-1 β /IL-1 β) ; 1-(軟脂醯基)-2-(5-酮-6-辛烯-二醯基)膽鹼磷脂(1-(Palmitoyl)-2-(5-keto-6-octene-dioyl) phosphatidylcholine ; KODiA-PC) ; 1-軟脂醯基-(5-酮-8-側氧基-6-辛烯醯基)-sn-甘油-3-磷酸膽鹼(1-palmitoyl-(5-keto-8-oxo-6-octenoyl)-sn-glycerol-3-phosphocholine ; KOOA-PC) ; 脂質奈米粒子(lipid nanoparticle ; LNP) ; 溶血磷脂醯膽鹼(lysophosphatidylcholine ; LPC/Lyso PC) ; 1-二十二烷醯基-2-羥基-sn-甘油-3-磷酸膽鹼(1-behenoyl-2-hydroxy-sn-glycerol-3-phosphocholine ; Lyso PC(22:0)) ; 脂多醣(lipopolysaccharide ; LPS) ; 單核球衍生之樹突狀細胞(monocyte-derived dendritic cell ; moDC) ; 單磷醯基脂質 A (monophosphoryl lipid A ; MPLA) ; NOD樣受體(NOD-like receptor ; NLR) ; 卵白蛋白(ovalbumin ; OVA) ; 經氧化之1-軟脂醯基-2-二十碳四烯基-sn-甘油-3-磷酸膽鹼(oxidized 1-palmitoyl-2-arachidonyl-sn-glycerol-3-phosphorylcholine ;

oxPAPC)；病原體相關之分子模式(pathogen-associated molecular pattern；PAMP)；周邊血液單核細胞(peripheral blood mononuclear cell；PBMC)；多分散性指數(polydispersity index；PDI)；1-軟脂醯基-2-戊二醯基-sn-甘油-3-磷酸膽鹼(1-palmitoyl-2-glutaryl-sn-glycero-3-phosphocholine；PGPC)；1-軟脂醯基-2-(5'-側氧基-戊醯基)-sn-甘油-3-磷酸膽鹼(1-palmitoyl-2-(5'-oxo-valeroyl)-sn-glycero-3-phosphocholine；POVPC)；病原體識別受體(pathogen recognition receptor；PRR)；RIG-I樣受體(RIG-I-like receptor；RLR)；瑞西喹莫特(resiquimod；R848)；(8-[(2-羥基乙基)[6-側氧基-6-(十一烷氧基)己基]胺基]-辛酸)，1-辛基壬基酯((8-[(2-hydroxyethyl)[6-oxo-6-(undecyloxy)hexyl]amino]-octanoic acid), 1-octylnonyl ester；SM102)；IFN基因之刺激劑(stimulator of IFN genes；STING)；腫瘤壞死因子- α (tumor necrosis factor-alpha；TNF α)；及鐸樣受體(toll-like receptor；TLR)。

【0073】 儘管出於明晰及理解之目的已藉助於說明及實例相當詳細地描述本發明，但對於熟習此項技術者而言顯而易見的是，可實踐某些改變及修改。因此，實例不應視為限制隨附申請專利範圍所敘述之本發明的範疇。

實例1：具有單一醯基鏈之溶血磷脂醯膽鹼(LPC)及TLR7/8促效劑之組合超活化哺乳動物周邊血液單核細胞

【0074】 此實例描述用脂質DAMP與小分子PAMP組合超活化犬科動物及人類周邊血液單核細胞(PBMC)。

物質及方法

【0075】自人類及犬全血分離PBMC。使用Ficoll-Paque PLUS (Cytivia)進行密度梯度離心自全血中分離PBMC。全血用PBS 1:1稀釋，在Ficoll-Paque PLUS上分層且在室溫以1000×g離心30分鐘。收集PBMC，在PBS中洗兩次，且用Ack溶解緩衝液(Lonza)培育以移除任何殘留紅血球。

【0076】細胞培養及刺激. 在分離之後，立即將PBMC接種於含有10% FBS、50單位/mL青黴素、50 mg/mL鏈黴素、2 mM L-麩醯胺酸、1 mM丙酮酸鈉及50 mM β-巰基乙醇之RPMI培養基(R10培養基)中。細胞以每孔 1×10^5 個(犬科動物細胞)或 1×10^6 個(人類細胞)接種於96孔平底組織培養盤中。根據製造商之建議將凍乾之Vaccigrade R848 (Invivogen)復原且稀釋且以1 μg/mL之最終濃度添加至細胞中。隨後，立即將22:0 LYSO PC (1-二十二烷醯基-2-羥基-sn-甘油-3-磷酸膽鹼)以82.5 μM之最終濃度添加至細胞中。根據製造商之建議將另外固有促效劑稀釋於R10培養基中且如下添加至細胞中：以10 ng/mL之最終濃度添加人類GM-CSF (Peprotech)；以15 μg/mL之最終濃度添加2'3' cGAMP (Invivogen)；以1 μg/mL之最終濃度添加LPS、血清型O55:B5 (Enzo Life Sciences)；以30 μg/mL之最終濃度添加氫氧化鋁(Invivogen)。在37℃、5% CO₂下培育細胞兩天。接著將細胞培養物用於終點分析。

【0077】終點分析. 在用PAMP及DAMP培養PBMC兩天之後，收集上清液及細胞樣品用於分析。藉由在400×g離心5分鐘集結培養物中之細胞。收集各孔中之一半培養基體積用於藉由酶聯結免疫吸附分析法(ELISA)或Lumit™生物發光分析法定量細胞介素，同時剩餘之培養基及細胞用於藉由評估代謝活性來定量細胞存活力。

【0078】細胞介素分泌之定量。使用以下套組中之一者評估來自人類 PBMC 之 IL-1 β 分泌：ELISA MAX Deluxe Set 人類 IL-1 β 套組 (Biolegend)、Invitrogen 人類 IL-1 β 套組或 Lumit™ 人類 IL-1 β 免疫分析法 (Promega)。使用 ELISA MAX Deluxe Set 人類 IFN γ (Biolegend) 評估來自人類 PBMC 之 IFN γ 分泌，且使用人類 TNF α 未包覆之 ELISA 套組 (Invitrogen) 評估來自人類 PBMC 之 TNF α 分泌。根據製造商之說明書進行 ELISA，其中進行以下修改：i) 將用於培育之總樣品+緩衝液體積自 100 μ L 降低至 50 μ L；ii) 在 500 pg/mL 下製備最高標準物，其中兩倍稀釋至 7.8 pg/mL；及 iii) 在定軌振盪器上在 4°C 過夜完成樣品培育。根據製造商之說明書進行 Lumit™ 分析法。根據製造商之說明書使用犬科 IL-1 β /IL-1F2 DuoSet ELISA (R&D) 評估來自犬科 PBMC 之 IL-1 β 分泌，其中進行以下修改：i) 將用於培育之總樣品+緩衝液體積自 100 μ L 降低至 50 μ L；ii) 在定軌振盪器上在 4°C 下隔夜完成樣品培育。對於所有 ELISA，使用 Spectramax M5e 盤讀取器 (Molecular Devices)，在 450 nm 下以 570 nm 校正來量測吸光度。對於 Lumit™ 分析法，使用 Spectramax M5e 盤讀取器 (Molecular Devices) 以 500 ms 之積分時間在所有波長上量測發光。為測定上清液中之細胞介素濃度，在 GraphPad Prism 9 (GraphPad Software) 上經由 4PL 分析使用標準曲線來內插樣品濃度。接著針對對上清液進行之任何稀釋調節樣品之內插結果。

【0079】細胞存活力之定量。使用 CellTiter-Glo 發光細胞存活力分析法 (Promega) 藉由量化 ATP 之存在作為代謝活性細胞之指標來評估細胞存活力。遵循製造商之說明書評估代謝活性。將 CellTiter-Glo 試劑與細胞集結粒及新鮮培養基混合，接著轉移至白色、不透光 96 孔盤中。使用 500

ms之積分時間在Spectramax M5e盤讀取器(Molecular Devices)上在所有波長上量測發光。相對於用R848處理之PBMC的對照條件計算存活力百分比。

【0080】 統計分析. 對於各條件，接種三份來自各供體之細胞以用於測試。對於細胞介素定量，使用三份之值以用於內插，且資料繪製為總濃度(pg/mL)或每個供體相對於單獨R848之對照條件的倍數變化。對於存活力定量，求三份各供體之平均值，且將平均值用作一個供體量測值。測試多個供體且柱狀圖上之各資料點表示供體之值。為了測試測試條件中之差異，將測試結果與單獨R848之對照條件相比較。使用混合效應單因子ANOVA計算P值，其中使用鄧奈特檢定(Dunnett's test)進行多重比較之校正。

結果-用22:0 LYSO PC及R848進行之處理超活化犬科PBMC

【0081】 先前發現22:0 LYSO PC (DAMP)及TLR7/8促效劑R848 (PAMP)之組合在人類moDC中具有有效高刺激活性。為了評估此高刺激活性是否轉譯成其他臨床上相關之物種，評估22:0 LYSO PC+R848超活化自犬科全血中分離之PBMC的能力。對於各資料集，由於缺乏可用於誘導骨髓犬科moDC之犬科特異性試劑，因此使用來自多個供體之PBMC代替moDC。簡言之，使用密度梯度離心自全血中分離PBMC，且接著用所關注之超活化刺激物培養兩天。

【0082】 在培養兩天之後，藉由細胞培養物上清液中之IL-1 β 之定量及細胞存活力之量測來評估超活化。當用22:0 LYSO PC及R848一起處理時，與所測試之每一其他刺激物相比，犬科PBMC分泌類似或較高含量之IL-1 β ，兩者均以每mL之濃度形式，以及每個供體相對於單獨R848之

倍數變化之形式表示。先前研究表明構成PBMC之5%至10%的單核球可回應於用R848進行之活化而釋放IL-1 β ，與該等先前研究一致的是，單獨用R848之犬科PBMC與未處理之細胞相比具有較高含量之IL-1 β 分泌。如所預期，LPS+鋁之熱解組合引發高含量之IL-1 β 。值得注意的是，雖然與單獨R848相比，PGPC+R848引發類似含量之IL-1 β ，但與未處理之細胞相比，GM-CSF及2'3'cGAMP均未誘發來自犬科PBMC之顯著IL-1 β 分泌。

【0083】 儘管在細胞培養物上清液中之犬科PBMC超活化後一天可偵測到IL-1 β ，但在超活化後兩天仍評估細胞存活力以確保IL-1 β 分泌後的持久存活力。22:0 LYSO+R848並不顯著降低相對細胞存活力。有趣的是，儘管未觀測到對人類moDC或人類PBMC具有毒性，但仍證實PGPC與R848之組合對犬科PBMC具有略微毒性。然而，值得注意的是，解釋測試混合細胞群體之存活力問題的觀測結果可能具有挑戰性，因為無法自該混合物確定所關注之特定細胞群體(在此情況下，吾人懷疑單核球對IL-1 β 反應)的存活力。此等資料共同表明22:0 LYSO+R848引發犬科PBMC分泌高含量之IL-1 β ，其指示超活化。

結果-用22:0 LYSO PC及R848進行之處理超活化人類PBMC

【0084】 亦用自人類供體獲得之全血中分離的PBMC進行超活化實驗。簡言之，藉由密度梯度離心自來自多個人類供體之全血中分離PBMC，且用所關注之超活化刺激物培養兩天。

【0085】 人類PBMC (如人類moDC及犬科PBMC)係以高於或與所有其他測試之刺激物類似之含量分泌IL-1 β 。與犬科PBMC類似，人類PBMC係由於單核球活化回應於單獨R848而分泌IL-1 β ，且此係藉由添加

22:0 LYSO PC而升高。如所預期，LPS+鋁之熱解組合引發高含量之IL-1 β 。與犬科PBMC中之觀測結果一致，PGPC+R848並未實質上誘導比單獨R848更高含量之IL-1 β 。GM-CSF並未誘導來自人類PBMC之IL-1 β 分泌含量顯著高於未處理之細胞所產生之背景含量。

【0086】亦在超活化後兩天評估人類PBMC存活力以確保IL-1 β 分泌後的人類PBMC的存活力。在用刺激物中之任一者處理後未觀測到人類PBMC存活力之顯著降低。然而，解釋來自測試混合細胞群體之觀測結果具有挑戰性，因為無法自用混合物獲得之結果中確定所關注之特定細胞群體(在此情況下為單核球)的存活力。此等資料共同表明人類及犬科PBMC兩者均由22:0 LYSO PC+R848超活化。有趣的是，與PGPC+R848相比，22:0 LYSO PC+R848對犬科PBMC之超活化程度更高。

【0087】由於活化之人類PBMC還可分泌除IL-1 β 之外的其他細胞介素，因而在超活化後兩天仍量測細胞培養物上清液中之促炎性細胞介素IFN γ 及TNF α 的分泌。與所有其他測試之刺激物相比，22:0 LYSO PC+R848之組合相對於單獨R848在IFN γ 分泌及TNF α 分泌方面均誘導每個供體之最高倍數變化。值得注意的是，儘管LPS+鋁誘導人類PBMC分泌高含量之IL-1 β ，但此刺激物之組合未誘導IFN γ 或TNF α 分泌之倍數增加。此外，GM-CSF及2'3'cGAMP均不引發超過單獨R848之IFN γ 分泌之實質性倍數變化。此等資料表明22:0 LYSO PC+R848之組合在誘導人類PBMC分泌促炎性細胞介素IFN γ 及TNF α 方面為優異的。

實例2：在存在mRNA之情況下將LPC與單一醯基鏈併入脂質奈米粒子中以用於哺乳動物樹突狀細胞之超活化

【0088】此實例描述脂質奈米粒子(LNP)之製備及測試，該等脂質

奈米粒子含有具有單一醯基鏈之溶血磷脂醯膽鹼(LPC)化合物(例如22:0 Lyso PC)及編碼抗原之mRNA。LPC/mRNA負載之LNP適合於超活化哺乳動物樹突狀細胞與小分子PAMP (例如，R848)之組合。

物質及方法

【0089】 LNP合成.藉由將以下組分與或不與1-二十二烷醯基-2-羥基-sn-甘油-3-磷酸膽鹼組合來製備LNP：

(CAS 登記號 125146-65-8，在本文中稱為「22:0 Lyso PC」)
(Avanti)

(8-[(2-羥基乙基)[6-側氧基-6-(十一烷氧基)己基]胺基]-辛酸)，1-辛基壬基酯

(CAS 登記號 2089251-47-6，在本文中稱為「SM102」)(Cayman Chemical)；

1,2-二硬脂醯基-sn-甘油-3-磷酸膽鹼

(CAS登記號816-94-4，在本文中稱為「DSPC」)(Avanti)；

膽固醇(Sigma)；及

1,2-二肉豆蔻醯基-外消旋-甘油-3-甲氧基聚乙二醇-2000

(CAS 登記號 160743-62-4，在本文中稱為「DMG-PEG2000」)
(Avanti)。

表2-1詳述所測試之各LNP調配物之各組分的莫耳百分比。在無22:0 Lyso PC之情況下製備LNP或在LNP中負載20%、30%或40%莫耳比之22:0 Lyso PC以確定22:0 Lyso PC負載是否可有意地改變。在無mRNA、具有編碼綠色螢光蛋白(GFP)之mRNA或具有編碼卵白蛋白(OVA)之mRNA的情況下，在各種負載量下製備LNP以確定包括22:0 Lyso PC是

否將影響LNP mRNA負載。

【0090】 使用NanoAssemblr Ignite儀器(Precision Nanosystems)合成LNP。首先將脂質溶解於乙醇中，且接著根據表2-1中所示之莫耳濃度組合物進行組合。將於乙醇中之脂質在12 mL/min之流動速率下與含有mRNA之檸檬酸鈉緩衝液(pH 4)以1:3之體積比組合。將增強型GFP mRNA (Trilink)添加至檸檬酸鈉緩衝液中達到0.053 mg/mL之濃度以用於負載至LNP中。將OVA mRNA (Trilink)添加至檸檬酸鈉緩衝液中達到0.035 mg/mL或0.004 mg/mL之濃度以用於負載LNP。在10體積之PBS (pH 7.4)中洗滌LNP以移除殘餘乙醇，且接著使用Amicon 10K MWCO離心過濾器濃縮。

表2-1. LNP調配物中之脂質的莫耳濃度百分比

脂質	LNP載體 LNP 0	22:0 Lyso PC LNP 20	22:0 Lyso PC LNP 30	22:0 Lyso PC LNP 40
SM102	35%	35%	35%	30%
DSPC	33%	13%	3%	0%
膽固醇	30.5%	30.5%	30.5%	28.5%
DMG-PEG2000	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%
22:0 Lyso PC	0%	20%	30%	40%

【0091】 LNP表徵.使用HPLC評估LNP中之22:0 Lyso PC的負載。在-20℃下冷凍含LNP之PBS，直至定量。藉由將1份乙醇添加至含LNP之PBS來溶解LNP。在添加以匹配樣品製備之1:1乙醇:PBS中製備22:0 Lyso PC之七點標準曲線。經由0.45 μm過濾器過濾標準物及樣品，隨後在HPLC上操作。使用裝配有1260 Infinity II蒸發光散射偵測器之Agilent 1260 Infinity II HPLC進行HPLC定量。使用具有30℃管柱溫度之Luna 5μm NH2 100Å，150×4.6 mm LC管柱(Phenomenex)偵測樣品。使用兩種溶離劑：A，100%水；及B，100%乙腈。使用包含5%/95% A/B之初始移

動相負載管柱，其中在2.5分鐘之後梯度達到24%/76% A/B。在2.5至6分鐘使用更淺之梯度，其中A/B在該時間範圍期間緩慢達到25%/75%。在下次樣品操作之前，使用3分鐘之後置時間將梯度恢復到起始條件。流動速率設定成1 mL/min，且樣品及標準物之注射體積為2.5 µL。蒸發光散射偵測器(ELSD)使用50℃之蒸發器溫度、30℃之噴霧器溫度及0.9標準L/min之氣流速率。Agilent CDS 2.6軟體適用於HPLC儀器對照、資料獲取及處理。

【0092】 遵循製造商之方案，使用 RiboGreen 分析法 (ThermoFisher) 定量 mRNA 於 LNP 中之負載。將樣品稀釋至處於標準曲線之範圍內。使用 Triton X-100 裂解 LNP 以評估 mRNA 於 LNP 中之囊封。定量總 mRNA 及囊封 mRNA 兩者。使用 NanoBrook Omni (Brookhaven) 上之動態光散射 (DLS) 評估 LNP 之尺寸。LNP 係以 1:10 稀釋於 PBS 中，隨後在 DLS 上操作。記錄各樣品之三個 90 秒量測值。

【0093】 人類單核球衍生之樹突狀細胞 (moDC) 產生。根據製造商之說明書使用 StraightFrom® Leukopak® CD14 微珠粒套組自購自 Miltenyi Inc. (San Jose, CA) 之 Leukopak 分離人類單核球。接著將單核球等分且冷凍於含有 10% 二甲亞砷之 FBS 中。測試之前，將單核球解凍且在含有 10% FBS、50 單位/mL 青黴素、50 mg/mL 鏈黴素、2 mM L-麩醯胺酸、1 mM 丙酮酸鈉、50 mM β-巯基乙醇、10 mM HEPES 及 Gibco MEM 非必需胺基酸之 RPMI 培養基 (R10 培養基) 中進行培養。為了使單核球分化成 moDC，向 R10 培養基中添加重組人類 GM-CSF (50 ng/mL) 及 IL-4 (25 ng/mL)。用 GM-CSF 及 IL-4 培養細胞 6 天，其中在第 3 天額外饋入含有 GM-CSF 及 IL-4 之 R10 培養基。

【0094】 人類單核球衍生之樹突狀細胞(moDC)超活化.分化後六天，收集moDC且計數。細胞係以 1×10^5 個細胞/孔接種於96孔平底盤中。在存在或不存在eGFP mRNA之情況下，用或不用 $1 \mu\text{g/mL}$ R848 (最終)、用或不用負載有超活化脂質之LNP (或載體對照)處理細胞。在用LNP培養48小時後量測由LNP誘導之超活化。遵循製造商之說明書使用LDH CyQuant套組(Invitrogen)評估細胞存活力。使用IL-1 β 及IL-6 Lumit分析法(Promega)量測moDC細胞培養物上清液中存在之IL-1 β 及IL-6。重複三次地測試實驗條件且繪製來自兩個人類供體之平均值結果。資料表示來自兩個實驗之結果。

【0095】 除超活化以外，在BD FACS Symphony A3裝置上使用流式細胞分析技術(flow cytometry)定量moDC中之GFP表現。在用LNP培養48小時之後收集moDC，且用活/死染料染色以鑑別活細胞，隨後用對CD11c、CD40、CD86、HLA-DR及HLA-ABC具有特異性之抗體染色。選擇活細胞用於分析，且接著評估CD11c⁺細胞之GFP表現以確定當LNP負載有22:0 Lyso PC時LNP之mRNA是否可轉譯成GFP蛋白。使用對HLA-DR及HLA-ABC具有特異性之抗體評估抗原呈現以確定超活化是否將干擾抗原呈現。藉由對CD40及CD86染色來評估活化以確定超活化是否將增加活化標記物之表現。

【0096】 鼠類骨髓衍生之FLT3L-DC (BMDC)之產生.自小鼠移除腿部股骨及脛骨，用剪刀切割，且沖洗至無菌試管中。用ACK裂解緩衝液處理骨髓懸浮液1分鐘，接著通過 $40 \mu\text{m}$ 之細胞過濾器。對細胞計數且使其再懸浮於由完全IMDM組成之培養基中，該完全IMDM含有10% FBS、青黴素及鏈黴素，以及L-麩醯胺酸及丙酮酸鈉(I10)之補充劑。接著將細

胞以 8×10^6 個細胞/孔接種於P12盤中。將重組小鼠FLT3L (Miltenyi)以200 ng/mL添加至培養物中。在第8天，將分化細胞用於後續分析法。使用BD Symphony A3 裝置藉由流式細胞分析技術監測分化之效率，且CD11c⁺MHC-II⁺細胞通常高於80%之活細胞。對於各實驗，使用5至15隻小鼠產生BMDC。

【0097】 鼠類骨髓衍生之FLT3L-DC及T細胞共同培養物之超活化。分化後第8天及第9天收穫BMDC，用PBS洗滌且以 2×10^5 個細胞/孔之濃度再接種於完全IMDM培養基(I10)中。在存在或不存在負載有22:0 Lyso PC LNP之LNP的情況下以50 μ M培養細胞，且在有或無OVA mRNA之情況下以高或低劑量之mRNA培養(表2-2)。在刺激後24及48小時，收集上清液及BMDC。遵循製造商之說明書使用夾心ELISA (Invitrogen)量測BMDC之IL-1 β 細胞介素分泌。將約 2×10^4 個超活化BMDC接種於圓底96孔盤之孔中以用於與T細胞共同培養。

【0098】 自轉殖基因OT-I小鼠之脾臟及淋巴結收集CD8⁺ T細胞，其表現對H2-K^b所呈現之卵白蛋白肽(殘基257至264)具有特異性之T細胞受體(TCR)。OT-I小鼠之所有CD8⁺ T細胞為對卵白蛋白肽具有特異性之未經處理之細胞。藉由將 6×10^4 個CD8⁺ T細胞添加至含有BMDC之各孔來建立T細胞共同培養物。超活化BMDC係與T細胞共同培養72小時，其後收集共培養上清液。

【0099】 另外，遵循製造商之方案，使用小鼠CD8⁺ T細胞分離套組(Miltenyi)自先前用弗氏不完全佐劑(incomplete freund's adjuvant ; IFA)中之卵白蛋白(OVA)免疫接種之小鼠的脾臟及淋巴結中收集CD8⁺ T細胞。免疫接種引發含有OVA特異性T細胞之CD8⁺ T細胞群體，該等OVA

特異性T細胞先前係以生理學上相關含量暴露於抗原。藉由將 1.6×10^5 個CD8+ T細胞添加至含有BMDC之各孔來建立T細胞共同培養物。將超活化BMDC與CD8+ T細胞共同培養96小時，其後收集共培養上清液。

【0100】 根據製造商之說明書使用小鼠Lumit IFN γ 套組(Promega)評估CD8+ T細胞回應於由BMDC呈現之OVA而進行之IFN γ 分泌。使用Spectramax M5e盤讀取器(Molecular Devices)量測500 ms之所有波長的發光。為測定上清液中之IFN γ 濃度，在GraphPad Prism 9 (GraphPad Software)上經由4PL分析使用標準曲線來內插樣品濃度。接著針對對上清液進行之任何稀釋調節樣品之內插結果。

結果

【0101】 脂質奈米粒子(LNP)已成為一種重要的疫苗遞送工具，尤其在mRNA疫苗之情形下，其在全球範圍內對抗COVID-19中已發揮很大作用。LNP尤其適用於將mRNA貨物遞送至細胞中。然而，儘管基於LNP之mRNA疫苗有效誘導針對其編碼之抗原的抗體反應，但mRNA疫苗通常引起有限之抗原特異性T細胞反應，其不利地影響其功效及壽命。為了解決此問題，本發明描述將具有單一醯基鏈之溶血磷脂醯膽鹼(LPC)化合物(諸如22:0 Lyso PC)添加至含有編碼抗原之mRNA的LNP調配物中以增強其免疫原性。

【0102】 基於例示性脂質之結構，預期22:0 Lyso PC可併入LNP中且各種LNP組分之調節將影響物理特徵，以及負載有22:0 Lyso PC之LNP的生物活性。預期負載量及負載LNP之數目兩者均係影響遞送至細胞中之22:0 Lyso PC有效負載的關鍵變量。

【0103】 22:0 Lyso PC可負載至LNP中.藉由組合以下各者用或不用

22:0 Lyso PC製備LNP：SM102、DPSC、膽固醇及DMG-PEG2000。此等LNP調配物之輸入莫耳比列於表2-1中。由於22:0 Lyso PC在結構上最類似於DSPC，隨著添加至LNP中之22:0 Lyso PC的量增加，22:0 Lyso PC在調配物中置換DSPC。為了確定22:0 Lyso PC之負載量是否可有意地改變且為瞭解負載量將如何影響LNP之生物活性，製備含有各種含量之22:0 Lyso PC的若干種不同之LNP組合物。LNP係在無22:0 Lyso PC (LNP 0)之情況下製備，或經20% (LNP 20)、30% (LNP 30)或40% (LNP 40)莫耳比之22:0 Lyso PC負載。在無mRNA、或具有編碼GFP之mRNA (GFP mRNA)或具有編碼OVA之mRNA (OVA mRNA)的情況下，在各種負載量下製備LNP，以確定包括22:0 Lyso PC是否將影響LNP中之mRNA負載。

【0104】表2-2詳述所測試調配物之22:0 Lyso PC與mRNA之負載比。測試各種負載量之mRNA/22:0 Lyso PC以鑑別其中mRNA及22:0 Lyso PC兩者將具有生物活性之條件。在所有情況下，mRNA及22:0 Lyso PC兩者均負載於LNP中，如分別藉由Ribogreen及HPLC所評估。除22:0 Lyso PC LNP 20之外，所有LNP調配物之mRNA負載係>75%，且22:0 Lyso PC負載係>80%。

表2-2. LNP調配物之相對負載量^

LNP調配物	貨物輸入比率： mRNA/22:0 Lyso PC	mRNA負載效率	22:0 Lyso PC負載 效率
22:0 Lyso PC LNP 0： GFP mRNA	--	75.5%	--
22:0 Lyso PC LNP 20： GFP mRNA	0.110	69.4%	76.7%
22:0 Lyso PC LNP 30： GFP mRNA	0.074	76.6%	82.1%
22:0 Lyso PC LNP 40： GFP mRNA	0.055	77.7%	92.4%
22:0 Lyso PC LNP 40： OVA mRNA高劑量	0.044	103.0%	86.5%
22:0 Lyso PC LNP 40： OVA mRNA低劑量	0.005	115.7%	86.3%

^製備不含mRNA (LNP 0、LNP 30、LNP 40)之LNP。此等LNP係以與含有mRNA之LNP類似的效率負載22:0 Lyso PC。

【0105】 重要的是，在不大幅度增加LNP之尺寸或多分散性指數(PDI)之情況下，將22:0 Lyso PC及mRNA兩者均負載於LNP中(圖1A至圖1B)。在所有情況下，用mRNA製備之LNP均較大，且在將22:0 Lyso PC添加至LNP中時有效直徑略微增加(圖1A)。所有LNP仍為奈米粒子之尺寸，其中所有直徑均<125 nm。添加22:0 Lyso PC不影響LNP之PDI (圖1B)，且所有LNP調配物產生相對均勻之粒子群體(PDI<0.3)。在大多數情況下，除了無mRNA之LNP 20調配物，藉由動態光散射(DLS)進行之LNP之所有尺寸讀數均相對接近。因此，在一些實施例中，22:0 Lyso PC係以高於20%，較佳高於25%且更佳至少30%之莫耳濃度包括於LNP調配物內。

【0106】 22:0 Lyso PC LNP允許人類moDC之超活化.自Leukopak分離之人類單核球在用GM-CSF及IL-4培養6天內分化成單核球衍生之DC (moDC)。分化六天後，收集moDC且以1×10⁵個細胞/孔接種於96孔平底

盤中。在存在或不存在eGFP mRNA之情況下，用或不用1 $\mu\text{g/mL}$ R848及用或不用負載有超活化脂質之LNP (或LNP載體對照)處理moDC。基於LNP之負載量，投與LNP之總量為50 μM 或100 μM 22:0 Lyso PC。在用LNP培養48小時後，藉由評估來自活moDC之細胞介素分泌來量測由LNP誘導之超活化。

【0107】 藉由上清液中存在之LDH來評估細胞存活力，且相對於單獨用R848 (無LNP)處理之孔而標準化。在50 μM 處理條件下，與LNP或LNP中之22:0 Lyso PC存在無關，所有孔均具有與單獨R848處理條件類似的存活力(圖2A)。在100 μM 劑量下，大多數含有R848之處理與細胞存活力 $>75\%$ 相關(圖2B)。儘管在無R848之情況下培養時，LNP 40條件之存活力下降至低於75%，但在將R848添加至孔中時，細胞存活力高於75%。為量測在LNP中遞送之22:0 Lyso PC超活化moDC的能力，在細胞培養物上清液中量測IL-1 β 細胞介素分泌。重要的是，僅用R848及含有22:0 Lyso PC之LNP處理之活細胞能夠產生IL-1 β (圖2C至圖2D)。IL-1 β 分泌為劑量依賴性的，其中用100 μM 22:0 Lyso PC處理之細胞能夠比用50 μM 22:0 Lyso PC處理之細胞產生更多的IL-1 β 。重要的是，IL-1 β 分泌不受LNP中之mRNA之存在影響，指示與缺乏22:0 Lyso PC之LNP相比，負載有22:0 Lyso PC之LNP及mRNA具有增加之免疫原性。另外，LNP中之22:0 Lyso PC之莫耳比增加引起IL-1 β 分泌增加，指示即使遞送相同總劑量之22:0 Lyso PC，改變LNP中之22:0 Lyso PC之量仍可改變LNP之免疫原性。

【0108】 除了IL-1 β 之外，在48小時後在細胞培養物上清液中量測IL-6分泌。有趣的是，將22:0 Lyso PC添加至LNP中增加回應於R848而分泌之IL-6的量(圖2E至圖2F)。用無22:0 Lyso PC之LNP處理的moDC與單

獨用R848處理之細胞產生類似含量之IL-6，指示LNP自身未必具有強免疫原性。然而，當LNP亦負載有22:0 Lyso PC時，分泌之IL-6量顯著增加。另外，此反應為劑量依賴性的，其中用100 μ M 22:0 Lyso PC處理之細胞能夠比用50 μ M 22:0 Lyso PC處理之細胞產生更多的IL-6。

【0109】 22:0 Lyso PC LNP允許mRNA轉譯且增加人類moDC中之活化標記物之表面表現。為了確定moDC之超活化是否將影響mRNA表現，量測GFP之含量。僅用含有GFP mRNA之LNP處理的細胞產生GFP表現(圖3A至圖3B)。儘管用含有22:0 Lyso PC之LNP (LNP mRNA 30及LNP mRNA 40)處理會降低GFP呈陽性之細胞百分比，但用mRNA LNP處理之大部分細胞能夠將GFP mRNA轉譯為蛋白質。重要的是，雖然對於含有22:0 Lyso PC之LNP，GFP之中值螢光強度(MFI)較低(圖3C至圖3D)，但表現mRNA之細胞的百分比保持較高，指示即使在較低速率下，細胞仍繼續表現GFP。鑒於此等moDC在其產生GFP的同時超活化，預期較低含量之GFP表現不會轉譯成細胞表面處明顯較低含量之抗原(GFP)呈現。有趣的是，發現此為劑量依賴性的，因為22:0 Lyso PC之量增加產生較低含量之GFP表現，同時增加IL-6及IL-1 β 分泌之含量。重要的是，用GFP mRNA負載之LNP處理的moDC能夠表現GFP，與負載於LNP中之22:0 Lyso PC無關。

【0110】 與上文所描述之研究並行地，在用LNP培養48小時後收集moDC，且評估活CD11c⁺細胞之CD40、CD86、HLA-DR及HLA-ABC之表面表現。量測moDC上之CD86及CD40含量以確定超活化是否將影響活化標記物表現。使用由兩個人類供體之樣品製備之moDC，用22:0 Lyso PC負載之LNP處理增加CD86 (圖4A至圖4B)及CD40 (圖4C至圖4D)兩者

之中值螢光強度(MFI)，其指示超活化後的共刺激及活化標記物表現增加。另外，CD86及CD40之增加為劑量依賴性的，因為用100 μ M 22:0 Lyso PC處理進一步增加CD86及CD40表面表現。量測moDC上之HLA-DR及HLA-ABC含量以確定超活化是否將干擾主要組織相容性複合物(MHC)表現且因此干擾抗原呈現。與活化標記物表現類似，用22:0 Lyso PC負載之LNP處理moDC增加HLA-DR (MHC-II) (圖4E至圖4F)及HLA-ABC (MHC-I) (圖4G至圖4H)兩者之MFI，其指示超活化後的抗原呈現分子之表現增加。亦觀測到增加為劑量依賴性的，因為用100 μ M 22:0 Lyso PC處理進一步增加HLA-DR及HLA-ABC表現。

【0111】 鼠類DC:T細胞共同培養物允許用22:0 LPC負載之LNP活化抗原特異性T細胞。為了擴展在人類moDC系統中所得之觀測結果，亦在鼠類系統中進行研究。LNP負載有22:0 Lyso PC及兩種不同濃度之OVA mRNA (表2-2)。接著用R848及經由含有低劑量或高劑量之OVA mRNA之LNP遞送的22:0 Lyso PC以50 μ M或100 μ M來超活化鼠類骨髓衍生之樹突狀細胞(BMDC) (表2-2)。在刺激後約48小時，收集上清液以用於量測IL-1 β 分泌。重要的是，僅用R848及含有22:0 Lyso PC之LNP處理之BMDC能夠以高含量產生IL-1 β (圖5A)。用不含有22:0 Lyso PC之LNP (LNP 0調配物)處理之細胞比單獨用R848處理之細胞產生更多的IL-1 β 。將22:0 Lyso PC添加至LNP中引起顯著更多的IL-1 β 產生。如人類moDC中亦可見，IL-1 β 分泌為劑量依賴性的，其中用100 μ M 22:0 Lyso PC處理之細胞比用50 μ M處理之細胞產生更多的IL-1 β 。另外，IL-1 β 分泌不受LNP中之mRNA之存在或劑量影響。此指示負載有22:0 Lyso PC及mRNA之LNP比缺乏22:0 Lyso PC之LNP更具免疫原性。

【0112】 另外，用含有22:0 Lyso PC之LNP及不同劑量之OVA mRNA超活化48小時的BMDC係與自OT-I小鼠之脾臟及淋巴結收集之OT-I CD8+ T細胞共同培養。OT-I小鼠之所有CD8+ T細胞均為未經處理的(抗原未經歷的)且對OVA肽具有特異性。將超活化DC與CD8+ T細胞共同培養72小時，其後收集共培養上清液。評估CD8+ T細胞回應於由BMDC呈現之OVA而進行之IFN γ 分泌。如所預期，CD8+ T細胞之IFN γ 分泌係由LNP中存在之OVA mRNA驅動(圖5B)。重要的是，活化CD8+ T細胞之IFN γ 分泌不受LNP中存在之22:0 Lyso PC影響。有趣的是，低OVA mRNA劑量與高OVA mRNA劑量之間的mRNA中之10倍劑量差異不影響IFN γ 分泌。總體而言，此等結果表明將22:0 Lyso PC負載至LNP中不會使抗原表現降低至某一含量，其中其將對DC細胞表面處之抗原呈現產生不利影響，且因此允許未經處理之抗原特異性CD8+ T細胞的活化。

【0113】 用含有22:0 Lyso PC之LNP及不同劑量之OVA mRNA超活化48小時的BMDC亦與CD8+ T細胞共同培養，該等CD8+ T細胞係自先前用IFA中之卵白蛋白免疫接種之小鼠的脾臟及淋巴結中收集。OVA-IFA免疫接種流程產生生理學上相關含量之抗原經歷之OVA特異性CD8+ T細胞群體。將超活化BMDC與CD8+ T細胞共同培養96小時，其後收集共培養上清液。評估再活化之CD8+ T細胞回應於由BMDC呈現之OVA而進行之IFN γ 分泌。重要的是，再活化之CD8+ T細胞之IFN γ 分泌很大程度上係由所遞送之OVA mRNA之劑量驅動，且不受LNP中存在之22:0 Lyso PC影響(圖6A至圖6B)。同樣，此資料表明將22:0 Lyso PC負載至LNP中不會干擾來自編碼抗原之mRNA的抗原表現及呈現。

【0114】 綜合而言，此等結果表明，除編碼抗原之mRNA之外，使

用負載有具有單一醯基鏈之LPC (例如，22:0 Lyso PC)的更具免疫原性之LNP具有優於不含有超活化脂質之LNP的益處。預期超活化LNP之影響在活體內更明顯。特定言之，預期增強向淋巴結之遷移及已吸收超活化LNP之DC的IL-1 β 分泌會更強力地引導新生抗原特異性記憶T細胞之產生及抗原特異性T細胞之再活化。

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種組合物，其包含mRNA囊封於脂質奈米粒子(LNP)中，其中該mRNA包含抗原之編碼區，且該LNP包含第一磷脂及至少一種選自由以下組成之群的脂質：可電離脂質、第二磷脂、聚乙二醇化脂質、結構性脂質及其混合物，其中該第一磷脂包含具有單一醯基鏈之溶血磷脂醯膽鹼(LPC)，且該醯基鏈為C13-C24醯基鏈。

【請求項2】

一種組合物，其包含mRNA及TLR7/8促效劑囊封於脂質奈米粒子(LNP)中，其中該mRNA包含抗原之編碼區，且該LNP包含第一磷脂及至少一種選自由以下組成之群的脂質：可電離脂質、第二磷脂、聚乙二醇化脂質、結構性脂質及其混合物，其中該第一磷脂包含具有單一醯基鏈之溶血磷脂醯膽鹼(LPC)，且該醯基鏈為C13-C24醯基鏈。

【請求項3】

一種組合物，其包含mRNA囊封於脂質奈米粒子(LNP)中及TLR7/8促效劑，其中該mRNA包含抗原之編碼區，且該LNP包含第一磷脂及至少一種選自由以下組成之群的脂質：可電離脂質、第二磷脂、聚乙二醇化脂質、結構性脂質及其混合物，其中該第一磷脂包含具有單一醯基鏈之溶血磷脂醯膽鹼(LPC)，且該醯基鏈為C13-C24醯基鏈。

【請求項4】

一種組合物，其包含TLR7/8促效劑囊封於脂質奈米粒子(LNP)中，且該LNP包含第一磷脂及至少一種選自由以下組成之群的脂質：可電離脂質、第二磷脂、聚乙二醇化脂質、結構性脂質及其混合物，其中該第一磷

脂包含具有單一醯基鏈之溶血磷脂醯膽鹼(LPC)，且該醯基鏈為C13-C24醯基鏈。

【請求項5】

一種組合物，其包含脂質奈米粒子(LNP)及TLR7/8促效劑，其中該LNP包含第一磷脂及至少一種選自由以下組成之群的脂質：可電離脂質、第二磷脂、聚乙二醇化脂質、結構性脂質及其混合物，其中該第一磷脂包含具有單一醯基鏈之溶血磷脂醯膽鹼(LPC)，且該醯基鏈為C13-C24醯基鏈。

【請求項6】

如請求項1至5中任一項之組合物，其中該至少一種脂質包含可電離脂質、第二磷脂、聚乙二醇化脂質及結構性脂質。

【請求項7】

如請求項1至6中任一項之組合物，其中該可電離脂質包含：

- i) 8-[(2-羥基乙基)[6-側氧基(oxo)-6-(十一烷氧基)己基]胺基]-辛酸、1-辛基壬基酯(SM-102)或其類似物或衍生物；及/或
- ii) 6-((2-己基癸醯基)氧基)-N-(6-((2-己基癸醯基)氧基)己基)-N-(4-羥基丁基)己-1-胺鎗(aminium)(ALC-0315)或其類似物或衍生物。

【請求項8】

如請求項1至7中任一項之組合物，其中該聚乙二醇化脂質係選自由以下組成之群：經PEG修飾之磷脂醯乙醇胺、經PEG修飾之磷脂酸、經PEG修飾之神經醯胺、經PEG修飾之二烷基胺、經PEG修飾之二醯基甘油、經PEG修飾之二烷基甘油，及其組合。

【請求項9】

如請求項1至7中任一項之組合物，其中該聚乙二醇化脂質包含聚乙二醇[PEG] 2000二肉豆蔻醯基甘油[DMG]。

【請求項10】

如請求項1至9中任一項之組合物，其中該結構性脂質係選自由以下組成之群：膽固醇、糞固醇(fecosterol)、穀固醇(sitosterol)、麥角固醇、菜油固醇(campersterol)、豆固醇、菜籽固醇(brassicasterol)、番茄鹼(tomatidine)、熊果酸(ursolic acid)、 α -生育酚，及其組合。

【請求項11】

如請求項1至9中任一項之組合物，其中該結構性脂質包含膽固醇。

【請求項12】

如請求項1至11中任一項之組合物，其中該第二磷脂包含：

i)親水性頭部分，其係選自由以下組成之群：磷脂醯基膽鹼、磷脂醯基乙醇胺、磷脂醯基甘油、磷脂醯基絲胺酸、磷脂酸、2-溶血磷脂醯基膽鹼及神經鞘磷脂；及

ii)一或多個脂肪酸尾部分，其係選自由以下組成之群：月桂酸、肉豆蔻酸、肉豆蔻油酸、棕櫚酸、棕櫚油酸、硬脂酸、油酸、亞麻油酸、 α -次亞麻油酸、芥子酸、花生酸、花生四烯酸、植烷酸(phytanoic acid)、二十碳五烯酸、二十二烷酸(behenic acid)、二十二碳五烯酸及二十二碳六烯酸。

【請求項13】

如請求項1至11中任一項之組合物，其中該第二磷脂係選自由以下組成之群：

1,2-二亞油醯基(dilinoleoyl)-sn-甘油-3-磷酸膽鹼(DLPC)、

1,2-二肉豆蔻醯基-sn-甘油-磷酸膽鹼(DMPC)、
 1,2-二油醯基-sn-甘油-3-磷酸膽鹼(DOPC)、
 1,2-二軟脂醯基-sn-甘油-3-磷酸膽鹼(DPPC)、
 1,2-二硬脂醯基-sn-甘油-3-磷酸膽鹼(DSPC)、
 1,2-雙十一醯基-sn-甘油-磷酸膽鹼(DUPC)、
 1-軟脂醯基-2-油醯基-sn-甘油-3-磷酸膽鹼(POPC)、
 1,2-二-O-十八烯基-sn-甘油-3-磷酸膽鹼、
 1-油醯基-2-膽固醇半丁二醯基-sn-甘油-3-磷酸膽鹼、
 1,2-二次亞麻醯基(dilinolenoyl)-sn-甘油-3-磷酸膽鹼、
 1,2-二花生四烯醯基-sn-甘油-3-磷酸膽鹼、
 1,2-雙二十二碳六烯醯基-sn-甘油-3-磷酸膽鹼、
 1,2-二油醯基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DOPE)、
 1,2-二植烷醯基(diphytanoyl)-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、
 1,2-二硬脂醯基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、
 1,2-二亞油醯基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、
 1,2-二次亞麻醯基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、
 1,2-二花生四烯醯基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、
 1,2-雙二十二碳六烯醯基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、
 1,2-二油醯基-sn-甘油-3-磷酸基(phospho)-外消旋-(1-甘油)鈉鹽
 (DOPG)、
 神經鞘磷脂，及
 其組合。

【請求項14】

如請求項1至13中任一項之組合物，其中該第二磷脂包含1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸膽鹼(DSPC)。

【請求項15】

如請求項1至14中任一項之組合物，其中該組合物進一步包含至少一種賦形劑。

【請求項16】

如請求項15之組合物，其中該賦形劑包含蔗糖。

【請求項17】

一種組合物，其包含：

- i) mRNA與一或多種脂質複合(RNA-脂質複合物)；及
- ii)具有單一C13-C24酰基鏈之溶血磷脂酰膽鹼(LPC)，

其中該mRNA包含抗原之編碼區，且該一或多種脂質包含第一脂質及第二脂質。

【請求項18】

一種組合物，其包含：

- i) mRNA與一或多種脂質複合 (RNA-脂質複合物)；
- ii)具有單一C13-C24酰基鏈之溶血磷脂酰膽鹼(LPC)；及
- iii) TLR7/8促效劑，

其中該mRNA包含抗原之編碼區，且該一或多種脂質包含第一脂質及第二脂質。

【請求項19】

如請求項17或請求項18之組合物，其中該第一脂質為陽離子型脂質，且該第二脂質為中性或陰離子型脂質。

【請求項20】

如請求項19之組合物，其中該陽離子型脂質包含以下中之一或兩者：

i) 1,2-二-O-十八烯基-3-三甲銨丙烷(DOTMA)或其類似物或衍生物；及

ii) 1,2-二油醯基-3-三甲銨丙烷(DOTAP)或其類似物或衍生物。

【請求項21】

如請求項19或請求項20之組合物，其中該中性或陰離子型脂質包含：

i) 1,2-二-(9Z-十八烯醯基)-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DOPE)或其類似物或衍生物；及/或

ii) 膽固醇或其類似物或衍生物；及/或

iii) 1,2-二油醯基-sn-甘油-3-磷酸膽鹼(DOPC)或其類似物或衍生物。

【請求項22】

如請求項1至21中任一項之組合物，其中該LPC之醯基鏈為C21-C24醯基鏈。

【請求項23】

如請求項1至21中任一項之組合物，其中該LPC之醯基鏈為C22醯基鏈。

【請求項24】

如請求項1至23中任一項之組合物，其中該LPC之醯基鏈完全飽和。

【請求項25】

如請求項24之組合物，其中該LPC包含1-二十二烷醯基-2-羥基-sn-

甘油-3-磷酸膽鹼[LPC(22:0)]。

【請求項26】

如請求項1至25中任一項之組合物，其中該TLR7/8促效劑為具有900道爾頓或更低之分子量的小分子。

【請求項27】

如請求項1至25中任一項之組合物，其中該TLR7/8促效劑包含咪唑并喹啉化合物。

【請求項28】

如請求項27之組合物，其中該TLR7/8促效劑包含瑞西喹莫特(resiquimod) (R848)。

【請求項29】

如請求項1至28中任一項之組合物，其中該LPC包含LPC(22:0)，且該TLR7/8促效劑包含瑞西喹莫特(R848)。

【請求項30】

如請求項1至28中任一項之組合物，其中該抗原為腫瘤抗原。

【請求項31】

如請求項1至28中任一項之組合物，其中該腫瘤抗原為新抗原(neoantigen)。

【請求項32】

如請求項1至28中任一項之組合物，其中該抗原包含微生物抗原。

【請求項33】

如請求項32之組合物，其中該微生物抗原包含病毒抗原、細菌抗原、原蟲抗原或真菌抗原。

【請求項34】

如請求項32之組合物，其中該微生物抗原包含表面抗原。

【請求項35】

如請求項1至34中任一項之組合物，其中該mRNA包含於該編碼區之5'端的5'非轉譯區(5'UTR)及於該編碼區之3'端的3'非轉譯區(3'UTR)。

【請求項36】

如請求項1至35中任一項之組合物，其中該mRNA包含5'帽結構。

【請求項37】

如請求項1至36中任一項之組合物，其中該mRNA包含多腺苷酸尾。

【請求項38】

如請求項1至37中任一項之組合物，其中該組合物不包含脂多醣(LPS)或單磷醯基脂質A (MPLA)。

【請求項39】

如請求項1至38中任一項之組合物，其中該組合物不包含經氧化之1-軟脂醯基-2-花生四烯醯基-sn-甘油-3-磷酸膽鹼(oxPAPC)或oxPAPC之物種。

【請求項40】

如請求項39之組合物，其中該組合物不包含2-[[[(2R)-2-[(E)-7-羧基-5-羥基庚-6-烯醯基]氧基-3-十六烷醯基氧基丙氧基]-羥基磷醯基]氧基乙基-三甲基銨根(azanium)(HODiA-PC)、磷酸[(2R)-2-[(E)-7-羧基-5-側氧基庚-6-烯醯基]氧基-3-十六烷醯基氧基丙基]2-(三甲基銨基(azaniumyl))乙酯(KODiA-PC)、1-軟脂醯基-2-(5-羥基-8-側氧基-辛烯醯基)-sn-甘油-3-磷醯膽鹼(HOOA-PC)、2-[[[(2R)-2-[(E)-5,8-二側氧基辛-6-烯醯基]氧基-3-

十六烷醯基氧基丙氧基]-羥基磷醯基]氧基乙基-三甲基銨(KOOA-PC)、磷酸[(2R)-3-十六烷醯基氧基-2-(5-側氧基戊醯基氧基)丙基]2-(三甲基銨基)乙酯(POVPC)、磷酸[(2R)-2-(4-羧基丁醯基氧基)-3-十六烷醯基氧基丙基]2-(三甲基銨基)乙酯(PGPC)、磷酸[(2R)-3-十六烷醯基氧基-2-[4-[3-[(E)-[2-[(Z)-辛-2-烯基]-5-側氧基亞環戊-3-烯-1-基]甲基]環氧乙烷-2-基]丁醯基氧基]丙基]2-(三甲基銨基)乙酯(PECPC)、磷酸[(2R)-3-十六烷醯基氧基-2-[4-[3-[(E)-[3-羥基-2-[(Z)-辛-2-烯基]-5-側氧基亞環戊基]甲基]環氧乙烷-2-基]丁醯基氧基]丙基]2-(三甲基銨基)乙酯(PEIPC)及/或1-軟脂醯基-2-壬二醯基(azelaoyl)-sn-甘油-3-磷酸膽鹼(PAzePC)。

【請求項41】

如請求項1至40中任一項之組合物，其中該組合物不包含抗原。

【請求項42】

一種醫藥調配物，其包含如請求項1至41中任一項之組合物及醫藥學上可接受之賦形劑。

【請求項43】

一種用於產生超活化樹突狀細胞之方法，該方法包含使該等樹突狀細胞與有效量之如前述請求項中任一項之組合物接觸以產生超活化樹突狀細胞，其中該等超活化樹突狀細胞在不經歷細胞死亡下在暴露約48小時內分泌IL-1 β 。

【請求項44】

如請求項43之方法，其中使該等樹突狀細胞與該組合物在活體內接觸。

【請求項45】

如請求項43之方法，其中使該等樹突狀細胞與該組合物離體(ex vivo)接觸。

【請求項46】

一種醫藥調配物，其包含藉由如請求項45之方法產生的至少 10^3 、 10^4 、 10^5 或 10^6 個該等超活化樹突狀細胞及醫藥學上可接受之賦形劑。

【請求項47】

一種刺激針對抗原之免疫反應之方法，其包含向有需要之個體投與有效量之如請求項42或請求項46之醫藥調配物以刺激針對該抗原之免疫反應。

【請求項48】

一種治療癌症之方法，其包含向有需要之個體投與有效量之如請求項42或請求項46之醫藥調配物以治療該癌症。

【請求項49】

一種抑制異常細胞增殖之方法，其包含向有需要之個體投與有效量之如請求項42或請求項46之醫藥調配物以抑制異常細胞增殖。

【請求項50】

一種治療或預防傳染病之方法，其包含向有需要之個體投與有效量之如請求項42之醫藥調配物以治療或預防該傳染病。

【請求項51】

如請求項50之方法，其中該傳染病為病毒性疾病。

【請求項52】

如請求項51之方法，其中該傳染病為細菌性疾病。

【請求項53】

如請求項43至49中任一項之方法或醫藥調配物，其中該等樹突狀細胞為哺乳動物細胞。

【請求項54】

如請求項53之方法或醫藥調配物，其中該等哺乳動物細胞為人類細胞。

【請求項55】

如請求項47至53中任一項之方法，其中該個體為哺乳動物。

【請求項56】

如請求項55之方法，其中該哺乳動物為人類。

【請求項57】

如請求項55之方法，其中該哺乳動物為狗或貓。

【請求項58】

如請求項1至57中任一項之組合物、調配物或方法或用途，其中該組合物不包含蛋白質。

【請求項59】

如請求項1至58中任一項之組合物、調配物、方法或用途，其中該LNP具有小於約500奈米，視情況約5至約500奈米、視情況約10至約400奈米、視情況約20至約300奈米或視情況約25至約250奈米之有效直徑。

【請求項60】

如請求項59之組合物、調配物、方法或用途，其中該LNP具有小於約250奈米之有效直徑。

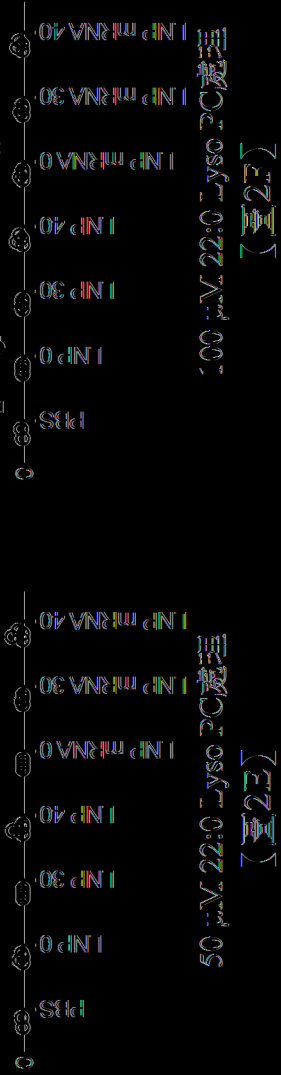
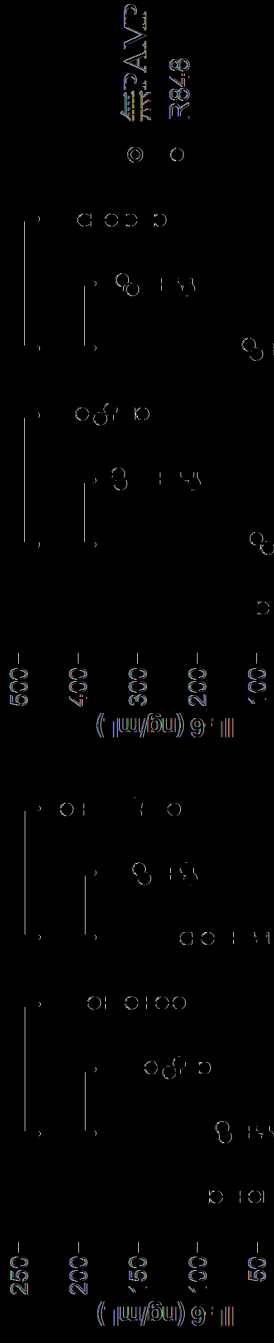
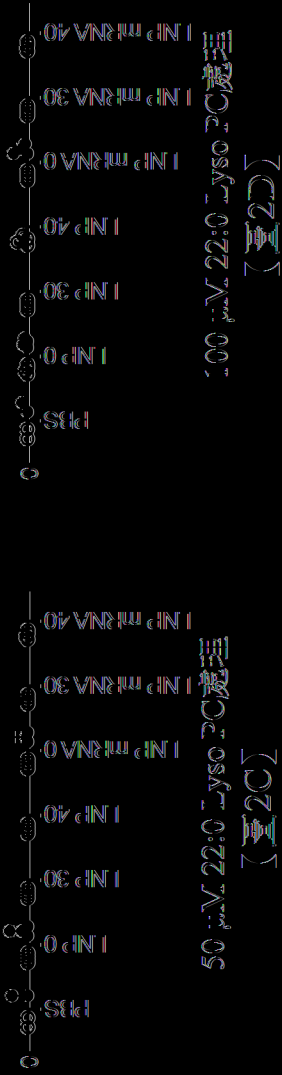
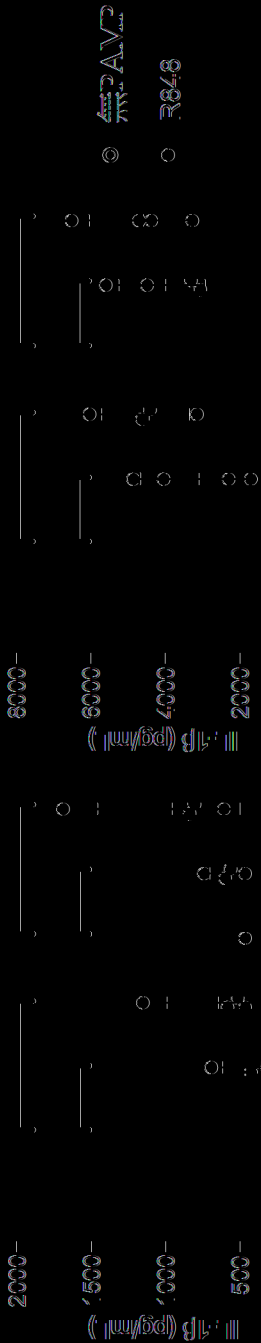
【請求項61】

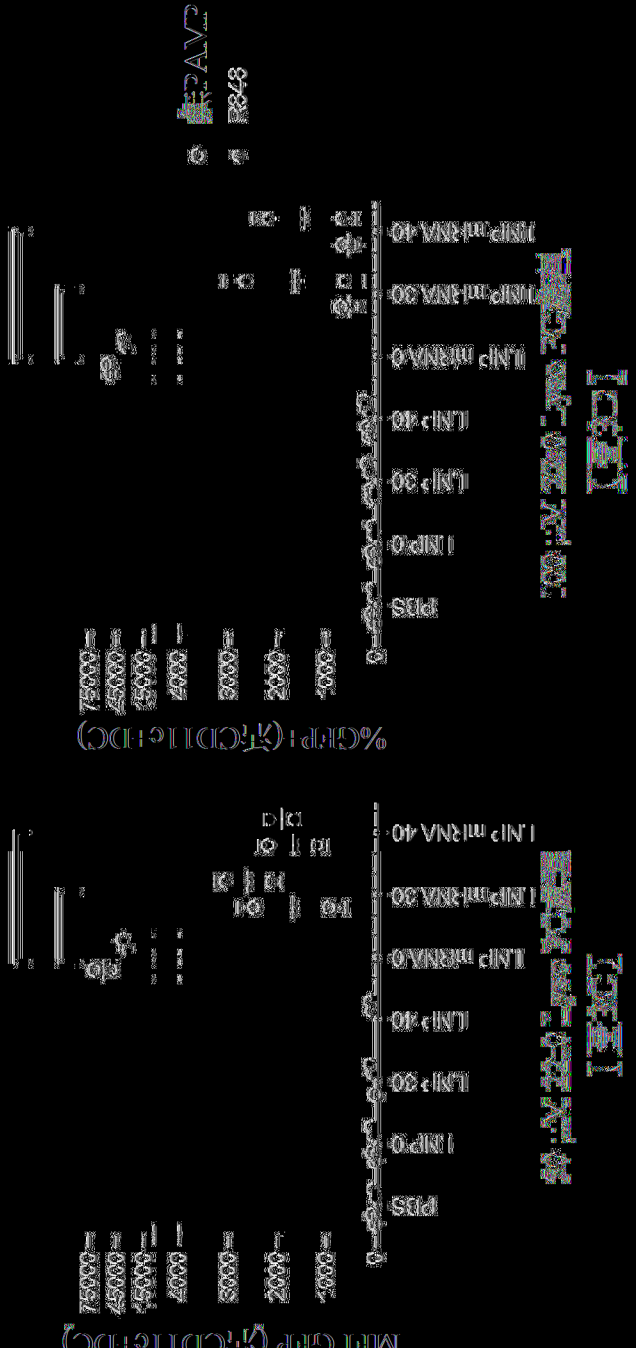
如請求項60之組合物、調配物、方法或用途，其中該LNP具有小於

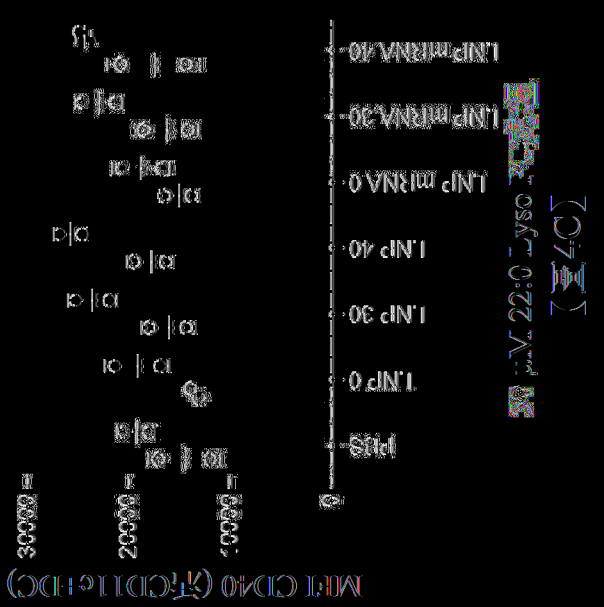
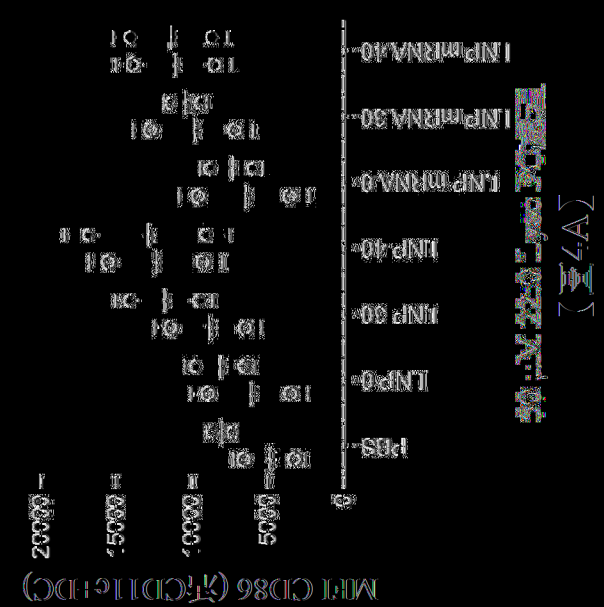
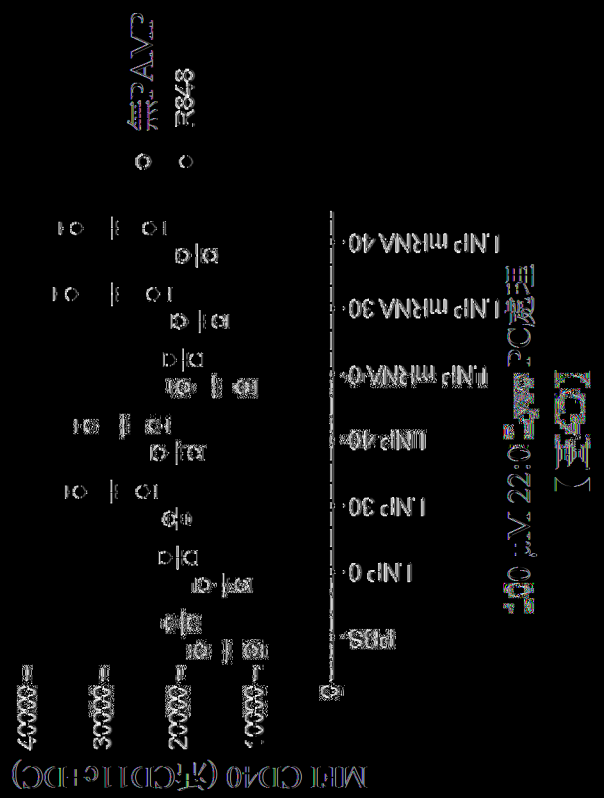
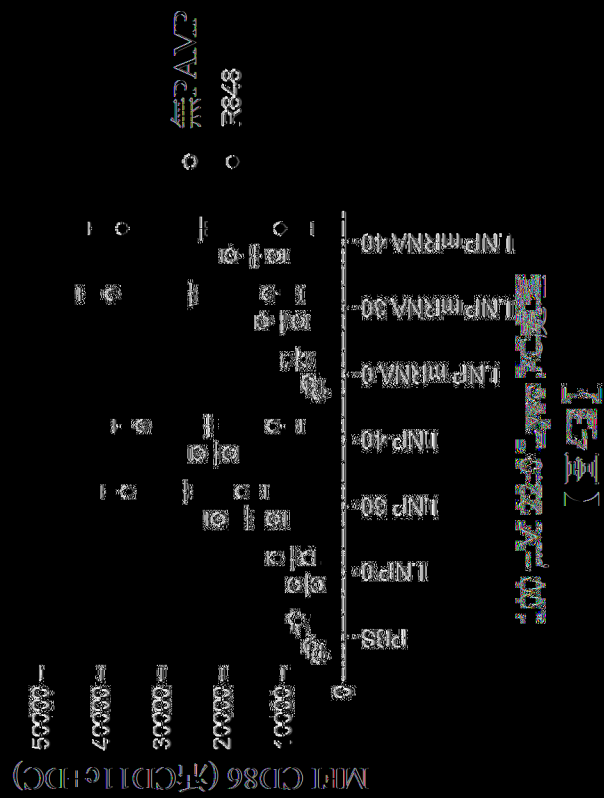
約125奈米之有效直徑。

【請求項62】

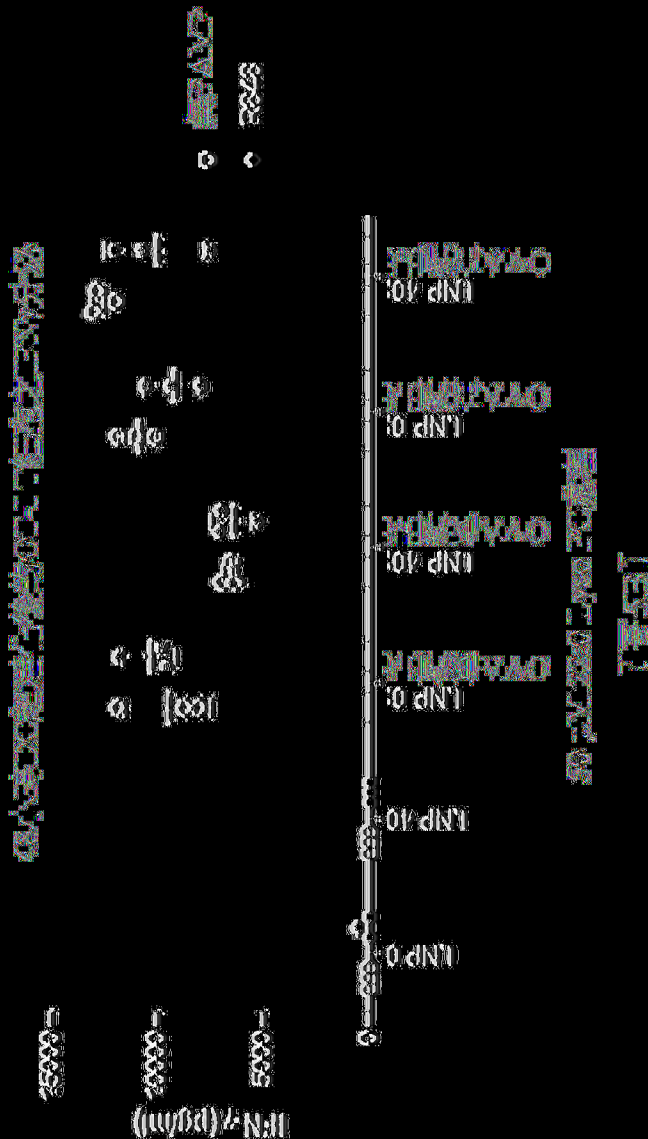
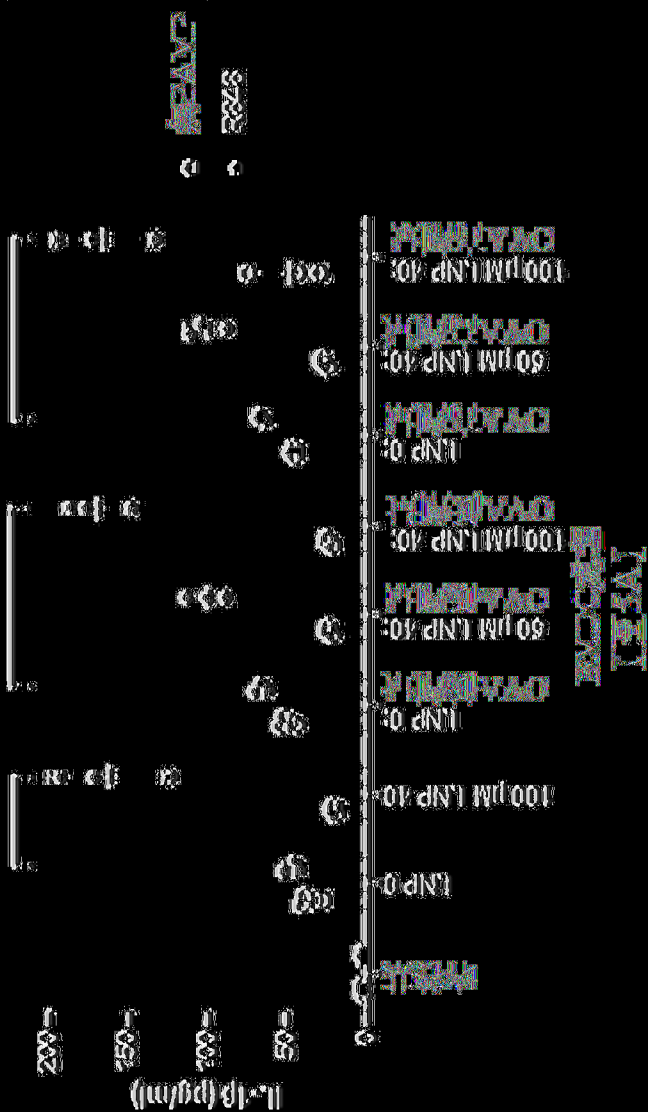
如請求項61之組合物、調配物、方法或用途，其中該LNP具有約20至約120奈米之有效直徑。



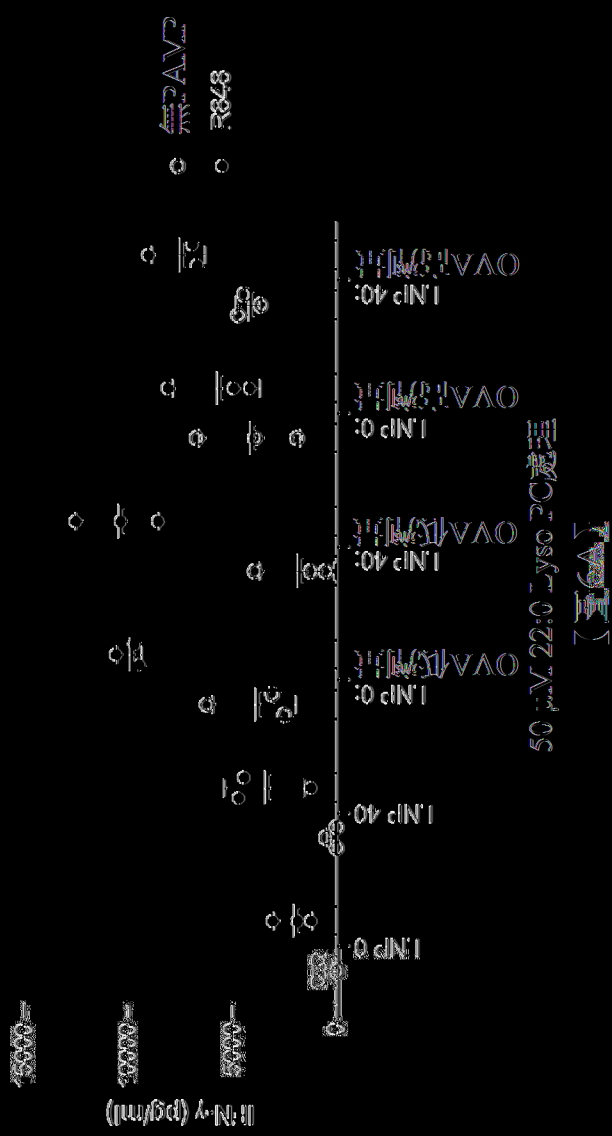








24小時DC超活化後的T細胞之IL-17分泌



24小時DC超活化後的T細胞之IL-17分泌

