(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110392577 A
(43)申请公布日 2019.10.29

(21)申请号 201880015304.1

(22)申请日 2018.03.16

(30)优先权数据
PCT/EP2017/056427 2017.03.17 EP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2019.09.02

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2018/056774 2018.03.16

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2018/167320 EN 2018.09.20

(71)申请人 库尔维科公司
地址 德国蒂宾根
申请人 柏林格英格翰国际有限公司

(72)发明人 R•海德雷希 K•费德勒
M•福田梅泽 A•科瓦尔茨克
K•埃尔伯斯 M•维尔姆

(74)专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245
代理人 张全信

(51)Int.Cl.
A61K 39/395(2006.01)
A61K 39/00(2006.01)

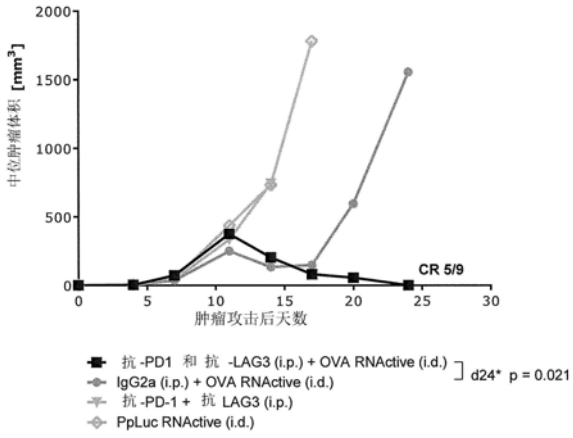
权利要求书7页 说明书101页
序列表29页 附图4页

(54)发明名称

用于组合抗癌疗法的RNA疫苗和免疫检查点抑制剂

(57)摘要

本发明涉及生物医学领域，特别是涉及治疗性核酸领域。本发明提供了编码表位的RNA和免疫检查点抑制剂的新组合。还提供了包含所述组合的药物组合物、疫苗和试剂盒。此外，本发明涉及用于医学，特别是用于治疗和/或预防癌症、感染性疾病和其他疾病和障碍的组合、(药物)组合物、疫苗或试剂盒。



CN 110392577 A

1.一种组合,其包含:

(i)至少一种RNA,所述RNA包含编码抗原的至少一种表位的至少一种编码序列;和

(ii)至少一种PD-1途径抑制剂;和

(iii)至少一种LAG-3途径抑制剂。

2.根据前述权利要求任一项所述的组合,其中所述PD-1途径抑制剂和/或所述LAG-3途径抑制剂选自抗体或编码所述抗体的核酸,蛋白或编码所述蛋白的核酸,肽或编码所述肽的核酸,拮抗性核酸,和小有机分子。

3.根据前述权利要求任一项所述的组合,其中

(a)所述PD-1途径抑制剂是竞争性或非竞争性PD-1拮抗剂;和/或

(b)所述LAG-3途径抑制剂是竞争性或非竞争性LAG-3拮抗剂。

4.根据前述权利要求任一项所述的组合,其中

(a)所述PD-1途径抑制剂结合PD-1、PD-L1和/或PD-L2;和/或

(b)所述LAG-3途径抑制剂结合LAG-3和/或MHC-II。

5.根据前述权利要求任一项所述的组合,其中所述PD-1途径抑制剂是抗体或其变体、片段或其衍生物,特别是其抗原结合变体、片段或衍生物,或编码所述抗体或其变体、片段或衍生物的核酸。

6.根据权利要求5所述的组合,其中所述PD-1途径抑制剂是选自纳武单抗;派姆单抗;匹敌丽珠单抗;BGB-A317;MEDI0680;PDR001;REGN2810;TSR-042;AGEN-2034;AM-0001;BGB-108;BI-754091;CBT-501;ENUM-003;ENUM-388D4;IBI-308;JNJ-63723283;JS-001;JTX-4014;JY-034;MCLA-134;PF-06801591;STIA-1110;244C8和388D4的抗PD1抗体;选自BMS-936559、阿替唑单抗、德瓦鲁单抗、阿维鲁单抗、KD033、STI-A1014、MCLA-145和SP142的抗PDL1抗体;或选自rHIgM12B7的抗PDL2抗体。

7.根据权利要求1至4中任一项所述的组合,其中所述PD-1途径抑制剂是拮抗性结合蛋白,任选地选自融合蛋白和可溶性受体,或编码拮抗性结合蛋白的核酸,任选地选自融合蛋白和可溶性受体。

8.根据权利要求7所述的组合,其中所述融合蛋白包含(i)PD-L1配体或其结构域、片段或变体;和/或(ii)PD-L2配体或其结构域、片段或变体;和任选地(iii)任选地选自Fc免疫球蛋白的进一步实体。

9.根据权利要求8所述的组合,其中所述融合蛋白是AMP-224。

10.根据权利要求7所述的组合,其中所述可溶性受体是可溶性PD-1受体或其片段或变体。

11.根据权利要求1至5中任一项所述的组合,其中所述PD-1途径抑制剂是核酸,优选地RNA和更优选地mRNA,其编码根据权利要求7至11中任一项所述的PD-1途径抑制剂或其片段或变体。

12.根据权利要求1至4中任一项所述的组合,其中所述PD-1途径抑制剂是拮抗性核酸,任选地选自微小RNA、siRNA、shRNA、反义RNA或适配体。

13.根据权利要求1至4中任一项所述的组合,其中所述LAG-3途径抑制剂是抗体或其变体、片段或衍生物,特别是其抗原结合变体、片段或衍生物,或编码抗体或其变体、片段或衍生物的核酸,特别是其抗原结合变体、片段或衍生物。

14.根据权利要求13所述的组合，其中所述抗体是抗LAG-3抗体，其选自BMS-986016、LAG525、GSK2831781、BI-754111、ENUM-006、FS-18、IMP-701、IMP-731、TRL-7117、和TSR-033。

15.根据权利要求5和/或13所述的组合，其中所述抗体是多特异性抗体，优选地双-或三特异性抗体，其特异性结合LAG-3与PD-1、PD-L1和/或PD-L2中至少一个，任选地选自MGD-013和Sym-016。

16.根据权利要求1至4中任一项所述的组合，其中所述LAG-3途径抑制剂是拮抗性结合蛋白或编码拮抗性结合蛋白的核酸。

17.根据权利要求1至4中任一项所述的组合，其中所述LAG-3途径抑制剂是核酸，优选地RNA和更优选地mRNA，其编码根据权利要求13至15中任一项的LAG-3抑制剂或其片段或变体。

18.根据权利要求1至4中任一项所述的组合，其中所述LAG-3途径抑制剂是拮抗性核酸，任选地选自微小RNA、siRNA、shRNA、反义RNA、或适配体。

19.根据前述权利要求任一项所述的组合，其中编码抗原的至少一种表位的所述RNA，和/或编码PD-1途径抑制剂的所述RNA和/或编码LAG-3途径抑制剂的所述RNA是分离的RNA。

20.根据前述权利要求中任一项所述的组合，其中编码抗原的至少一种表位的所述RNA，和/或编码PD-1途径抑制剂的所述RNA和/或编码LAG-3途径抑制剂的所述RNA是稳定的RNA。

21.根据前述权利要求任一项所述的组合，其中编码抗原的至少一种表位的所述RNA，和/或编码PD-1途径抑制剂的所述RNA和/或编码LAG-3途径抑制剂的所述RNA包含修饰的RNA序列，其中在所述修饰的RNA序列中，

(a)与野生型RNA的对应编码序列的G/C相比，所述RNA序列的至少一个可读框的G/C含量增加；和/或

(b)所述修饰的RNA序列的至少一个可读框中的密码子使用适于人密码子使用；和/或

(c)在所述RNA序列的编码序列中所述密码子适应指数(CAI)增加或最大化；

其中与由相应的未修饰的RNA序列编码的氨基酸序列相比，由至少一个修饰的RNA序列编码的氨基酸序列优选地未被修饰。

22.根据前述权利要求任一项所述的组合，其中在编码抗原的至少一种表位的所述RNA中，所述抗原是选自以下的肿瘤抗原：1A01_HLA-A/m；1A02；5T4；ACRBP；AFP；AKAP4；α-辅肌动蛋白-_4/m；α-甲酰基-辅酶_A_消旋酶；ANDR；ART-4；ARTC1/m；AURKB；B2MG；B3GN5；B4GN1；B7H4；BAGE-1；BASI；BCL-2；bcr/abl；β-联蛋白/m；BING-4；BIRC7；BRCA1/m；BY55；钙网蛋白；CAMEL；CASP-8/m；CASPA；组织蛋白酶_B；组织蛋白酶_L；CD1A；CD1B；CD1C；CD1D；CD1E；CD20；CD22；CD276；CD33；CD3E；CD3Z；CD44_同种型_1；CD44_同种型_6；CD4；CD52；CD55；CD56；CD80；CD86；CD8A；CDC27/m；CDE30；CDK4/m；CDKN2A/m；CEA；CEAM6；CH3L2；CLCA2；CML28；CML66；COA-1/m；毛状样_蛋白；胶原_XXIII；COX-2；CP1B1；CSAG2；CT45A1；CT55；CT-_9/BRD6；CTAG2_同种型_LAGE-1A；CTAG2_同种型_LAGE-1B；CTCFL；Cten；细胞周期蛋白_B1；细胞周期蛋白_D1；cyp-B；DAM-10；DEP1A；E7；EF1A2；EFTUD2/m；EGFR；EGLN3；ELF2/m；EMMPRIN；EpCam；EphA2；EphA3；ErbB3；ERBB4；ERG；ETV6；EWS；EZH2；FABP7；FCGR3A_版本_1；FCGR3A_版本_2；FGF5；FGFR2；纤连蛋白；FOS；FOXP3；FUT1；G250；GAGE-1；GAGE-2；GAGE-3；GAGE-4；

GAGE-5;GAGE-6;GAGE7b;GAGE-8_(GAGE-2D);GASR;GnT-V;GPC3;GPNMB/m;GRM3;HAGE;丝氨酸穿膜蛋白酶;Her2/neu;HLA-A2/m;同源异型框_NKX3.1;HOM-TES-85;HPG1;HS71A;HS71B;HST-2;hTERT;iCE;IF2B3;IL10;IL-13Ra2;IL2-RA;IL2-RB;IL2-RG;IL-5;IMP3;ITA5;ITB1;ITB6;激肽释放酶-2;激肽释放酶-4;KI20A;KIAA0205;KIF2C;KK-LC-1;LDLR;LGMN;LIRB2;LY6K;MAGA5;MAGA8;MAGAB;MAGE-A10;MAGE-A12;MAGE-A1;MAGE-A2;MAGE-A3;MAGE-A4;MAGE-A6;MAGE-A9;MAGE-B10;MAGE-B16;MAGE-B17;MAGE-_B1;MAGE-B2;MAGE-B3;MAGE-B4;MAGE-B5;MAGE-B6;MAGE-C1;MAGE-C2;MAGE-C3;MAGE-D1;MAGE-D2;MAGE-D4;MAGE-_E1;MAGE-E1_(MAGE1);MAGE-E2;MAGE-F1;MAGE-H1;MAGEL2;乳腺球蛋白_A;MART-1/melan-A;MART-2;MC1_R;M-CSF;间皮素;MITF;MMP1_1;MMP7;MUC-1;MUM-1/m;MUM-2/m;MYCN;MYO1A;MYO1B;MYO1C;MYO1D;MYO1E;MYO1F;MYO1G;MYO1H;NA17;NA88-A;Neo-PAP;NFYC/m;NGEP;NPM;NRCAM;NSE;NUF2;NY-ESO-1;OA1;OGT;OS-9;骨钙蛋白;骨桥蛋白;p53;PAGE-4;PAI-1;PAI-2;PAP;PATE;PAX3;PAX5;PD1L1;PDCD1;PDEF;PECA1;PGCB;PGFRB;Pim-1_-激酶;Pin-1;PLAC1;PMEL;PML;POTEF;POTE;PRAME;PRDX5/m;PRM2;前列腺特异性蛋白;蛋白酶-3;PSA;PSB9;PSCA;PSGR;PSM;PTPRC;RAB8A;RAGE-1;RARA;RASH;RASK;RASN;RGS5;RHAMM/CD168;RHOC;RSSA;RU1;RU2;RUNX1;S-100;SAGE;SART-_1;SART-2;SART-3;SEPR;SERPINB5;SIA7F;SIA8A;SIAT9;SIRT2/m;SOX10;SP17;SPNXA;SPXN3;SSX-1;SSX-2;SSX3;SSX-4;ST1A1;STAG2;STAMP-1;STEAP-1;存活蛋白-2B;存活蛋白;SYCP1;SYT-SSX-1;SYT-SSX-2;TARP;TCRg;TF2AA;TGFB1;TGFR2;TGM-4;TIE2;TKTL1;TPI/m;TRGV11;TRGV9;TRPC1;TRP-p8;TSG10;TSPY1;TVC_(TRGV3);TX101;酪氨酸酶;TYRP1;TYRP2;UPA;VEGFR1;WT1;和XAGE1或其变体或片段;和其中所述至少一种RNA任选地是单顺反子的、双顺反子的或多顺反子的。

23.根据权利要求22所述的组合,所述组合包含多个至少二种、至少三种、至少四种、至少五种和优选地六种表位编码RNA,所述表位编码RNA优选地是单顺反子的并且编码:

a)NY-ESO-1,或其片段、变体或衍生物的至少一种表位;和

d)MAGE-C1,或其片段、变体或衍生物的至少一种表位;和

e)MAGE-C2,或其片段、变体或衍生物的至少一种表位;和;

f)存活蛋白,或其片段、变体或衍生物的至少一种表位;和任选地

g)5T4,或其片段、变体或衍生物的至少一种表位;和任选地

h)MUC-1,或其片段、变体或衍生物的至少一种表位。

24.根据前述权利要求任一项所述的组合,其中所述RNA是mRNA。

25.根据前述权利要求任一项所述的组合,其中编码抗原的至少一种表位的所述RNA,和/或编码PD-1途径抑制剂的所述RNA和/或编码LAG-3途径抑制剂的所述RNA,包含以下中的一个或多个:

(a)至少一个5'帽结构;和/或

(b)任选地至少一个5'-UTR;和/或

(c)至少一个3'-UTR;和/或

(d)任选地至少一个组蛋白茎环;和

(e)至少一个聚(A)序列和/或聚(C)序列。

26.根据前述权利要求任一项所述的组合,其中编码抗原的至少一种表位的所述RNA,和/或编码PD-1途径抑制剂的所述RNA和/或编码LAG-3途径抑制剂的所述RNA,与选自以下

的至少一种载体复合或缔合：

(a)一种或多种阳离子或聚阳离子化合物，优选地与阳离子或聚阳离子聚合物，包括鱼精蛋白的阳离子或聚阳离子肽或蛋白，阳离子或聚阳离子多糖和/或阳离子或聚阳离子脂质；和/或

(b)一种或多种脂质，并由此形成脂质体、脂质纳米颗粒和/或脂质复合物。

27.药物组合物，其包含根据前述权利要求任一项的组合和药学上可接受的赋形剂，优选地药学上可接受的载体。

28.根据权利要求27所述的药物组合物，进一步包含以下中的一种或多种：药学上可接受的赋形剂、佐剂、进一步抗原、编码表位的进一步核酸、免疫治疗或免疫刺激剂，优选地免疫刺激RNA(isRNA)。

29.根据权利要求27或28中任一项所述的药物组合物，其中所述药物组合物是疫苗。

30.试剂盒，其包含根据权利要求1至26中任一项所述的组合，或根据权利要求27至29中任一项所述的药物组合物。

31.根据权利要求30所述的试剂盒，所述试剂盒包含：

(i)至少一种RNA，所述RNA包含编码抗原的至少一种表位的至少一种编码序列，如前述权利要求中任一项中所限定的；和

(ii)至少一种PD-1途径抑制剂，如前述权利要求中任一项中所限定的；和

(iii)至少一种LAG-3途径抑制剂，如前述权利要求中任一项中所限定的。

32.根据权利要求1至26中任一项所述的组合，根据权利要求27至29中任一项所述的药物组合物，或根据权利要求31所述的试剂盒，其作为药物使用。

33.根据权利要求1至26中任一项所述的组合，根据权利要求27至29中任一项所述的药物组合物，或根据权利要求31所述的试剂盒，其作为疫苗使用。

34.根据权利要求1至26中任一项所述的组合或根据权利要求32或33的使用，根据权利要求27至29中任一项所述的药物组合物或根据权利要求32或33的使用，或根据权利要求所述31的试剂盒或根据权利要求32或33的使用，其用于预防和治疗肿瘤或癌症疾病、感染性疾病、过敏症或自身免疫疾病的方法中。

35.根据权利要求1至26中任一项所述的组合或根据权利要求32至34中任一项的使用，根据权利要求27至29中任一项所述的药物组合物或根据权利要求32至34中任一项的使用，或根据权利要求31所述的试剂盒或根据权利要求32至34中任一项的使用，其中所述癌症选自：急性淋巴母细胞白血病，成人；急性淋巴母细胞白血病，儿童；急性髓性白血病，成人；肾上腺皮质癌；肾上腺皮质癌，儿童；AIDS相关淋巴瘤；AIDS相关恶性肿瘤；肛门癌；星形细胞瘤，儿童小脑；星形细胞瘤，儿童大脑；胆管癌，肝外；膀胱癌；膀胱癌，儿童；骨癌，骨肉瘤/恶性纤维组织细胞瘤；脑干胶质瘤，儿童；脑瘤，成人；脑瘤，脑干胶质瘤，儿童；脑瘤，小脑星形细胞瘤，儿童；脑瘤，大脑星形细胞瘤/恶性胶质瘤，儿童；脑瘤，室管膜瘤，儿童；脑瘤，髓母细胞瘤，儿童；脑瘤，幕上原始神经外胚层肿瘤，儿童；脑瘤，视觉通路和下丘脑胶质瘤，儿童；脑瘤，儿童(其他)；乳腺癌；乳腺癌和怀孕；乳腺癌，儿童；乳腺癌，男性；支气管腺瘤/类癌，儿童：类癌肿瘤，儿童；类癌肿瘤，胃肠道；癌，肾上腺皮质；癌，胰岛细胞；未知原发癌；中枢神经系统淋巴瘤，原发；小脑星形细胞瘤，儿童；大脑星形细胞瘤/恶性胶质瘤，儿童；宫颈癌；儿童癌症；慢性淋巴细胞白血病；慢性骨髓形成白血病；慢性骨髓增生性障碍；肌腱鞘透

明细胞肉瘤;结肠癌;结直肠癌,儿童;皮肤T细胞淋巴瘤;子宫内膜癌;室管膜瘤,儿童;上皮癌,卵巢;食道癌;食道癌,儿童;尤因家族肿瘤;颅外生殖细胞肿瘤,儿童;性腺外生殖细胞肿瘤;肝外胆管癌;眼癌,眼内黑色素瘤;眼癌,视网膜母细胞瘤;胆囊癌;胃(腹部)癌;胃(腹部)癌,儿童;胃肠道类癌肿瘤;生殖细胞肿瘤,颅外,儿童;生殖细胞肿瘤,性腺外;生殖细胞肿瘤,卵巢;妊娠滋养细胞肿瘤;胶质瘤,儿童脑干;胶质瘤,儿童视觉通路和下丘脑;毛细胞白血病;头颈癌;肝细胞(肝)癌,成人(原发);肝细胞(肝)癌,儿童(原发);霍奇金淋巴瘤,成人;霍奇金淋巴瘤,儿童;怀孕期间霍奇金淋巴瘤;下咽癌;下丘脑和视觉通路胶质瘤,儿童;眼内黑色素瘤;胰岛细胞癌(内分泌胰腺);卡波西肉瘤;肾癌;喉癌;喉癌,儿童;白血病,急性淋巴母细胞,成人;白血病,急性淋巴母细胞,儿童;白血病,急性髓性,成人;白血病,急性髓性,儿童;白血病,慢性淋巴细胞;白血病,慢性骨髓形成;白血病,毛细胞;唇腔癌;肝癌,成人(原发);肝癌,儿童(原发);肺癌,非小细胞;肺癌,小细胞;淋巴母细胞白血病,成人急性;淋巴母细胞白血病,儿童急性;淋巴细胞白血病,慢性;淋巴瘤,AIDS相关;淋巴瘤,中枢神经系统(原发);淋巴瘤,皮肤T细胞;淋巴瘤,霍奇金,成人;淋巴瘤,霍奇金;儿童;淋巴瘤,怀孕期间霍奇金;淋巴瘤,非霍奇金,成人;淋巴瘤,非霍奇金,儿童;淋巴瘤,怀孕期间非霍奇金;淋巴瘤,原发中枢神经系统;巨球蛋白血症,瓦尔登斯特伦氏;男性乳腺癌;恶性间皮瘤,成人;恶性间皮瘤,儿童;恶性胸腺瘤;髓母细胞瘤,儿童;黑色素瘤;黑色素瘤,眼内;默尔克细胞癌;间皮瘤,恶性;转移性鳞状颈癌伴隐匿性原发性;多发性内分泌肿瘤综合征,儿童;多发性骨髓瘤/浆细胞瘤;类真菌病;骨髓增生异常综合征;骨髓形成白血病,慢性;髓性白血病,儿童急性;骨髓瘤,多发性;骨髓增生性障碍,慢性;鼻腔和鼻窦癌;鼻咽癌;鼻咽癌,儿童;神经母细胞瘤;神经纤维瘤;非霍奇金淋巴瘤,成人;非霍奇金淋巴瘤,儿童;怀孕期间非霍奇金淋巴瘤;非小细胞肺癌;口腔癌,儿童;口腔和唇癌;口咽癌;骨处骨肉瘤/恶性纤维组织细胞瘤;卵巢癌,儿童;卵巢上皮癌;卵巢生殖细胞肿瘤;卵巢低恶性潜力肿瘤;胰腺癌;胰腺癌,儿童;胰腺癌,胰岛细胞;鼻窦和鼻腔癌;甲状旁腺癌;阴茎癌;嗜铬细胞瘤;松果体幕上原始神经外胚层肿瘤,儿童;垂体肿瘤;浆细胞瘤/多发性骨髓瘤;胸膜肺母细胞瘤;怀孕和乳腺癌;怀孕和霍奇金淋巴瘤;怀孕和非霍奇金淋巴瘤;原发中枢神经系统淋巴瘤;原发肝癌,成人;原发肝癌,儿童;前列腺癌;直肠癌;肾细胞(肾)癌;肾细胞癌,儿童;肾盂和输尿管,移行细胞癌;视网膜母细胞瘤;横纹肌肉瘤,儿童;唾液腺癌;唾液腺癌症,儿童;肉瘤,尤因家族肿瘤;肉瘤,卡波西的;骨处肉瘤(骨肉瘤)/恶性纤维组织细胞瘤;肉瘤,横纹肌肉瘤,儿童;肉瘤,软组织,成人;肉瘤,软组织,儿童;Sezary综合征;皮肤癌;皮肤癌,儿童;皮肤癌(黑色素瘤);皮肤癌,默克尔细胞;小细胞肺癌;小肠癌;软组织肉瘤,成人;软组织肉瘤,儿童;鳞状颈癌伴隐匿性原发性,转移性;腹部(胃)癌;腹部(胃)癌,儿童;幕上原始神经外胚层肿瘤,儿童;T细胞淋巴瘤,皮肤的;睾丸癌;胸腺瘤,儿童;胸腺瘤,恶性;甲状腺癌;甲状腺癌,儿童;肾盂和输尿管的移行细胞癌;滋养母细胞肿瘤,妊娠期;未知原发部位的癌,儿童;儿童的不寻常癌症;输尿管和肾盂,移行细胞癌;尿道癌;子宫肉瘤;阴道癌;视觉通路和下丘脑胶质瘤,儿童;外阴癌;瓦尔登斯特伦氏巨型球蛋白血症;和Wilms氏肿瘤。

36.根据权利要求1至21或23至26中任一项所述的组合或根据权利要求32至34中任一项所述的使用,根据权利要求27至29中任一项所述的药物组合物或根据权利要求32至34中任一项所述的使用,或根据权利要求31所述的试剂盒或根据权利要求32至34中任一项所述的使用,其中所述感染性疾病选自:不动杆菌感染、非洲昏睡病(非洲锥虫病)、AIDS(获得性

免疫缺陷综合征)、阿米巴病、无形体病、炭疽病、阑尾炎、溶血性杆菌感染、阿根廷出血热、蛔虫病、曲霉菌病、星状病毒感染、脚癣、巴贝斯虫病、蜡状芽孢杆菌感染、细菌性脑膜炎、细菌性肺炎、细菌性阴道炎(BV)、类杆菌感染、小袋虫病、贝蛔虫感染、裂体吸虫病、BK病毒感染、黑毛结节病、人芽囊原虫感染、芽生菌病、玻利维亚出血热、疏螺旋体病螺旋体感染(疏螺旋体病)、肉毒杆菌中毒(和婴儿肉毒杆菌中毒)、牛绦虫、巴西出血热、布氏杆菌病、伯克氏菌感染、布鲁里溃疡、杯状病毒感染(诺如病毒和沙波病毒)、弯曲杆菌病、念球菌病(念珠菌病)、犬绦虫感染、猫抓病、恰加斯病(美洲锥虫病)、软下疳、水痘、衣原体感染、沙眼衣原体感染、肺炎衣原体感染、霍乱、着色芽生菌病、气候性腹股沟淋巴结炎、肝吸虫病、难辨梭状芽胞杆菌感染、球孢子菌病、感冒、科罗拉多蜱热(CTF)、普通感冒(急性病毒性鼻咽炎;急性鼻炎)、尖锐湿疣、结膜炎、克雅氏病(CJD)、克里米亚-刚果出血热(CCHF)、隐球菌病、隐孢子虫病、皮肤幼虫移行症(CLM)、皮肤利什曼病、圆孢球虫病、囊虫病、巨细胞病毒感染、登革热、皮肤真菌病、双阿米巴病、白喉症、裂头绦虫病、杜诺凡病、龙线虫病、初夏脑膜脑炎(FSME)、埃博拉出血热、包虫病、恩里克体病、蛲虫病(蛲虫感染)、肠球菌感染、肠道病毒感染、流行性斑疹伤寒、会厌炎、EB病毒感染性单核细胞增多症、感染性红斑(第五疾病)、玫瑰疹、姜片虫病、肝片吸虫病、致命家族性失眠(FFI)、第五疾病、丝虫病、鱼中毒(雪卡毒)、鱼绦虫、流感、产气荚膜梭菌食物中毒、狐狸绦虫、自由生活阿米巴感染、梭杆菌感染、气性坏疽、土霉菌病、格斯特曼-斯特拉斯勒-施茵克综合征(GSS)、贾第虫病、马鼻疽、颚口线虫病、淋病、腹股沟肉芽肿(杜诺凡病)、A组链球菌感染、B组链球菌感染、流感嗜血杆菌感染、手足口病(HFMD)、汉坦病毒肺综合征(HPS)、幽门螺杆菌感染、溶血性尿毒症综合征(HUS)、伴肾综合征出血热(HFRS)、亨尼帕病毒感染、甲肝、乙肝、丙肝、丁肝、戊肝、单纯疱疹、I型单纯疱疹、II型单纯疱疹、带状疱疹、组织胞浆菌病、空心疣、钩虫感染、人博卡病毒感染、人ewingii恩里克体病、人粒细胞无形体病(HGA)、人偏肺病毒感染、人单核细胞恩里克体病、人乳头状瘤病毒(HPV)感染、人副流感病毒感染、膜壳绦虫病、流行性感冒、孢子球虫病、日本脑炎、川崎病、角膜炎、金氏杆菌感染、库鲁、羊羔病(贾第虫病)、拉沙热、军团病(军团疾病、庞蒂亚克热)、利什曼病、麻风、钩端螺旋体病、虱子、李氏杆菌、莱姆疏螺旋体病、莱姆病、淋巴管丝虫病(象皮病)、淋巴细胞脉络丛脑膜炎、疟疾、马尔堡出血热(MHF)、马尔堡病毒、麻疹、类鼻疽(惠特莫尔病)、脑膜炎、脑膜炎球菌病、后殖吸虫病、微孢子病、微型绦虫、流产(前列腺炎症)、传染性软疣(MC)、单核细胞增多症、腮腺炎、鼠斑疹伤寒(地方性斑疹伤寒)、足菌肿、人型支原体、支原体肺炎、蝇蛆病、尿片/尿布皮炎、新生儿结膜炎(新生儿眼炎)、新生儿脓毒病(绒毛膜羊膜炎)、诺卡氏菌病、坏疽性口炎、诺瓦克病毒感染、盘尾丝虫病(河盲症)、骨髓炎、中耳炎、副球孢子菌病(南美芽生菌病)、肺吸虫病、副伤寒、巴氏杆菌病、头虱病(头虱子)、体虱病(体虱子)、阴虱病(阴部虱子、阴虱虱子)、盆腔炎(PID)、百日咳(Whooping cough)、Pfeiffer腺热、鼠疫、肺炎球菌感染、肺孢子虫肺炎(PCP)、肺炎、小儿麻痹(儿童跛足)、骨髓灰质炎、猪绦虫、普氏菌感染、原发阿米巴脑膜脑炎(PAM)、进行性多灶性白质脑病、假格鲁布、鹦鹉热、Q热病、兔热病、狂犬病、鼠咬热、Reiter综合征、呼吸道合胞体病毒感染(RSV)、鼻孢子虫病、鼻病毒感染、立克次氏体感染、立克次氏体痘、裂谷热(RVF)、落基山斑疹热(RMSF)、轮状病毒感染、风疹、沙门氏菌副伤寒、沙门氏菌伤寒、沙门氏菌病、SARS(严重急性呼吸综合征)、疥疮、猩红热、血吸虫病(裂体吸虫病)、擦伤伤寒、脓毒病、志贺氏菌病(细菌性痢疾)、带状疱疹、天花(痘疹)、软下疳、孢子丝菌病、葡萄球菌食物

中毒、金黄色葡萄球菌感染、类圆线虫病、梅毒、绦虫病、破伤风、间日热、蜱传脑炎、须癣(Barber痒)、头癣(头皮癣)、股癣(体癣)、股癣(Jock痒)、手足癣(手癣)、黑癣、足癣(脚癣)、甲癣(甲真菌病)、花斑癣(花斑糠疹)、弓蛔虫病(眼幼虫移行症(OLM)和内脏幼虫移行症(VLM))、弓形虫病、旋毛虫病、滴虫病、鞭虫病(鞭虫感染)、Tripper、锥虫病(昏睡病)、恙虫病、结核病、兔热病、伤寒、伤寒热、解脲脲原体感染、阴道炎(Colpitis)、变体克雅氏病(vCJD、nvCJD)、委内瑞拉马脑炎、委内瑞拉出血热、病毒肺炎、内脏利什曼病、疣、西尼罗河热、西部马脑炎、白毛结节病(白癣)、百日咳、酵母真菌斑点、黄热病、耶尔森菌假结核病感染、耶尔森菌病、和接合菌症。

37.根据权利要求1至26中任一项所述的组合或根据权利要求32至36中任一项的使用，根据权利要求27至29中任一项所述的药物组合物或根据权利要求32至36中任一项的使用，或根据权利要求31所述的试剂盒或根据权利要求32至36中任一项的使用，进一步包含至少一种佐剂。

38.根据权利要求32至37中任一项使用的所述组合或药物组合物或试剂盒，其中所述使用包括顺序或同时向需要其的受试者施用RNA、PD-1途径抑制剂和LAG-3途径抑制剂。

39.根据权利要求32至38中任一项使用的所述组合或药物组合物或试剂盒，其中所述RNA、所述PD-1途径抑制剂和所述LAG-3途径抑制剂通过不同的施用途径施用至需要其的受试者。

40.前述权利要求中任一项限定的PD-1途径抑制剂和/或LAG-3途径抑制剂，在与前述权利要求中任一项限定的RNA组合疗法中使用。

41.前述权利要求中任一项限定的RNA，在与前述权利要求中任一项限定的PD-1途径抑制剂和/或LAG-3途径抑制剂组合疗法中使用。

42.治疗或预防癌症、感染性疾病、自身免疫疾病或过敏症的方法，其包含向需要其的受试者施用治疗有效量的根据前述权利要求中任一项所述的组合、药物组合物或试剂盒。

用于组合抗癌疗法的RNA疫苗和免疫检查点抑制剂

[0001] 本发明涉及包含含有至少一种编码抗原的至少一种表位的编码序列的RNA、至少一种PD-1途径抑制剂和至少一种LAG-3途径抑制剂的组合，包含所述组合的(药物)组合物和试剂盒(kit-of-parts)，以及其在医疗中，特别是各种疾病的治疗疗法中的用途。

[0002] 癌症的一个标志是恶性细胞逃避免疫系统根除的能力。在恶性细胞表面表达的肿瘤抗原的发现引发了癌症免疫监控的假设，其中适应性免疫系统负责预防免疫活性宿主中癌症的发展。尽管最近有免疫检查点引导的方法取得了进展，但“免疫疗法”的概念可以追溯到19世纪，并且包括不同的策略，包括疫苗、非特异性细胞因子和过继细胞疗法。

[0003] 该概念基于以下见解：免疫系统原则上可以被抗原(诸如癌症抗原)激活，并且一旦接触过抗原，就会引发可能影响癌细胞破坏的免疫应答。不幸的是，抗癌免疫性的成功发展常常受到许多因素的阻碍，这些因素可以直接决定免疫应答的充分性。癌细胞可以通过多种机制诱导免疫耐受，包括调节免疫细胞，免疫抑制趋化因子和抑制免疫效应物功能的免疫检查点。癌细胞的一种这样的规避策略涉及某些表面配体的上调，所述表面配体通过与负调节性T细胞表面分子结合而介导T细胞无反应性或耗尽，所述负调节性T细胞表面分子在激活的T细胞中上调以抑制其活性。这些抑制性分子由于与T细胞共刺激分子CD28的同源性而被称为负共刺激分子。这些蛋白质，也称为免疫检查点蛋白，在多种途径中起作用，包括早期激活信号的减弱，正共刺激的竞争和抗原呈递细胞的直接抑制(Bour-Jordan et al.,2011.Immunol Rev.241(1):180-205;PMID:21488898)。该蛋白质家族的一个成员是程序性死亡-1(PD-1)及其配体B7-H1/PD-L1(CD274)和B7-DC/PD-L2(CD273)。PD-1途径的主要功能是阻断T细胞活性。因此，PD-1对激活的T细胞和PD-L1对肿瘤细胞或抗原呈递细胞的相互作用抑制T细胞应答，如，T细胞介导的肿瘤细胞杀伤。另一种免疫检查点蛋白是LAG-3，其在激活的T细胞和自然杀伤细胞的子集上被上调。LAG-3的一种配体是MHC II类，其在抗原呈递细胞上表达。与PD-1信号传导相似，LAG-3途径被认为抑制T细胞活性和效应物功能。

[0004] 免疫检查点疗法旨在通过靶向T细胞中的调节途径(包括PD-1/PD-L1或LAG-3/MHC-II的相互作用)来逆转免疫耐受，从而增强它们的效应物功能。目前正在开发用于实体瘤的各种新的基于免疫的癌症疗法。免疫检查点抑制剂作为实体瘤和其他癌症的治疗选择已经显示出巨大的潜力。特别是，已经开发了几种针对PD-1和PD-L1以及LAG-3的单克隆抗体。所述抗体通常通过阻断或破坏PD-1和LAG-3与它们各自的配体之间的相互作用起作用，从而阻止T细胞抑制和恢复T细胞介导的抗肿瘤免疫应答。

[0005] 迄今为止，两种针对PD-1的检查点抑制剂已获得美国食品和药物管理局(FDA)批准用于先前治疗的转移性NSCLC：纳武单抗(nivolumab)和派姆单抗(pembrolizumab)。然而，尽管在肿瘤免疫治疗领域进行了非凡的发展努力，但实体瘤和其他癌症的治疗仍然代表医疗需求高度未满足的领域。仍然有相当数量的肿瘤和癌症患者不能从单独使用免疫检查点抑制剂的疗法获益治疗。

[0006] 到目前为止，检查点抑制剂的临床试验均显示在晚期疾病阶段的恶性肿瘤分析类型中约10％至40％的客观应答率，包括黑素瘤、非小细胞肺癌、错配修复缺陷的结直肠癌或转移性Merkel细胞癌。因此，治疗患者的实体瘤或其他癌症，特别是那些单独对免疫检查点

抑制无应答的患者，仍然是医疗需求高度未满足的领域。

[0007] (慢性)感染代表另一个主要的临床负担，并且通常以感染性病原体对可用的抗生素或抗病毒治疗剂的抗性为特征。在(慢性)感染中，T细胞暴露于持久性抗原和/或炎症信号。这种情况通常与T细胞功能的恶化有关：称为“耗尽”的状态。耗尽的T细胞失去强大的效应物功能，表达多种抑制性受体，并由改变的转录程序定义。T细胞耗尽通常与持续感染的低效控制有关。目前可用的疗法通常依赖于靶向感染性病原体的小有机分子，但是经常受到快速发展的抗性的阻碍。因此，本领域迫切需要提供能够使耗尽的病原体特异性T细胞恢复活力的新型治疗剂，以使针对持久病原体的T细胞介导的免疫性恢复活力。

[0008] 本发明的一个目的是满足这些需要并提供用于治疗癌症、感染性疾病和本文定义的其他疾病和病症的改进的治疗方法。通过所要求保护的主题实现了本发明的目的。

[0009] 尽管下面详细描述了本发明，但应理解本发明不限于本文所述的特定方法、方案和试剂，因为这些可以变化。还应理解，本文使用的术语不旨在限制本发明的范围，本发明的范围由受所附权利要求的限制。除非另外定义，否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本领域普通技术人员通常理解的含义相同的含义。

[0010] 在下文中，将描述本发明的要素。这些要素与特定实施方式一起列出，然而，应该理解，它们可以以任何方式和任何数量组合以产生另外的实施方式。不应将各种描述的示例和优选实施方式解释为将本发明仅限于明确描述的实施方式。该描述应被理解为支持和包含将明确描述的实施方式与任何数量的所公开和/或优选要素组合的实施方式。此外，除非上下文另有说明，否则本申请中的所有描述的要素的任何排列和组合应该被认为是由本申请的说明书公开。

[0011] 在整个说明书和所附的权利要求中，除非上下文另有要求，否则术语“包含”和诸如“包括”和“含有”的变体将被理解为暗示包含叙述的成员、整数或步骤，但不排除任何其他未叙述的成员、整数或步骤。术语“由.....组成”是术语“包括”的特定实施方式，其中排除任何其他未叙述的成员、整数或步骤。在本发明的上下文中，术语“包含”涵盖术语“由.....组成”。因此，术语“包含”涵盖“包括”以及“由.....组成”，如，“包含”X的组合物可以仅由X组成，或者可以包括另外的一些，如X+Y。

[0012] 除非在本文另有说明或明显与上下文相矛盾，否则在描述本发明的上下文中使用的术语“一个”和“一种”和“该”以及类似的提及(特别是在权利要求的上下文中)应被解释为涵盖单数和复数。本文中对数值范围的描述仅旨在用作单独提及落入该范围内的每个单独值的简写方法。除非本文另有说明，否则每个单独的值被并入说明书中，如同其在本文中单独引用一样。说明书中的任何语言都不应被解释为表示对于本发明的实践必不可少的任何未要求保护的要素。

[0013] 词语“基本上”并不排除“完全地”，如，“基本上不含”Y的组合物可以完全不含Y。必要时，可以从本发明的定义中省略“基本上”一词。

[0014] 与数值x相关的术语“约”表示x±10％。

[0015] 在本发明中，如果没有另外说明，可选方案和实施方式的不同特征可以彼此组合。

[0016] 为了清楚和可读性，提供了以下定义。可以在本发明的每个和全部实施方式上阅读针对这些定义提及的任何技术特征。可以在这些实施方式的上下文中具体提供另外的定义和解释。

[0017] 定义

[0018] 适应性免疫应答:适应性免疫应答通常理解为免疫系统的抗原特异性应答。抗原特异性允许产生针对特定的病原体或病原体感染的细胞定制的应答。在体内通常由“记忆细胞”保留建立(mount)这些定制的应答的能力。如果病原体感染机体超过一次,则这些特异性的记忆细胞通常迅速将其消除。在该情形中,适应性免疫应答的第一步是通过抗原呈递细胞激活首次免疫的(naive)抗原-特异性T细胞或能够诱导抗原特异性免疫应答的不同的免疫细胞。这发生在首次免疫的T细胞经常从中通过的淋巴样组织和器官中。可以作为抗原呈递细胞的三种细胞类型为树突细胞、巨噬细胞和B细胞。这些细胞中的每一种具有不同的引发免疫应答的功能。树突细胞可以通过吞噬作用和大胞饮吸收抗原,并且可以通过例如与外源抗原接触而被刺激,从而迁移到局部淋巴样组织,它们在此处分化为成熟的树突细胞。巨噬细胞摄取微粒抗原,诸如细菌,并且由感染性试剂或其他适当的刺激诱导而表达MHC分子。B细胞特有的通过其受体结合可溶性蛋白抗原并使其内在化的能力对于诱导T细胞也可能是重要的。MHC-分子通常负责将抗原呈递到T细胞。在其中,呈递MHC分子上的抗原导致T细胞的激活,其诱导其增殖并分化为武装效应T细胞。效应T细胞最重要的作用是通过CD8+细胞毒性T细胞杀伤感染的细胞和通过Th1细胞激活巨噬细胞,这共同组成细胞-介导的免疫性,以及通过Th2和Th1细胞二者激活B细胞,从而产生不同种类的抗体,由此驱动体液免疫应答。T细胞通过其T细胞受体识别抗原,所述T细胞受体不直接识别并结合抗原,相反,而是识别与在其他细胞表面上的MHC分子结合的短肽片段,例如,病原体来源的蛋白抗原的短肽片段,例如,所谓的表位。

[0019] 适应性免疫系统:适应性免疫系统基本上致力于消除或防止病原性生长。其通常通过为脊椎动物免疫系统提供识别并记忆特定病原体(以产生免疫性)并且在每次遇到所述病原体时建立更强的攻击的能力而调节适应性免疫应答。由于体细胞高度突变(加速的体细胞突变过程)和V(D)J重组(抗原受体基因片段的不可逆的遗传重组),该系统是高度适应性的。这种机制允许少量的基因产生巨大数量的不同的抗原受体,然后其在每个个体淋巴细胞上独特地表达。由于基因重排导致每种细胞的DNA中的不可逆的改变,则该细胞的所有后代(子代)都将遗传编码相同受体特异性的基因,包括记忆B细胞和记忆T细胞,它们是长久的特异性免疫性的关键。

[0020] 人工核酸分子:人工核酸分子通常可以理解为核酸分子,如,非天然存在的DNA或RNA。换句话说,人工核酸分子可以理解为非天然核酸分子。由于其单独的序列(其非天然存在的)和/或由于其他修饰,如核苷酸的结构修饰(其非天然存在的),这种核酸分子可以是非天然的。人工核酸分子可以是DNA分子、RNA分子或包含DNA和RNA部分的杂合分子。通常,人工核酸分子可以通过基因工程方法设计和/或产生,以对应于所需的人工核苷酸序列(异源序列)。在本文中,人工序列通常是可非天然存在的序列,即它与野生型序列在至少一个核苷酸上不同。术语“野生型”可以理解为天然存在的序列。此外,术语“人工核酸分子”不限于表示“一个单一分子”,而是通常理解为包含相同分子的整体。因此,它可以涉及等分试样中含有的多个相同分子。

[0021] 细胞免疫性/细胞免疫应答:细胞免疫性通常涉及巨噬细胞、天然杀伤细胞(NK)、抗原特异性细胞毒性T淋巴细胞的激活以及响应抗原的各种细胞因子的释放。在更一般的方式中,细胞免疫性不基于抗体而是基于免疫系统细胞的激活。通常,细胞免疫应答可能特

征在于，例如，激活抗原特异性细胞毒性T淋巴细胞，其能够在其表面上展示外源抗原表位的细胞(例如特定的免疫细胞如树突细胞或其他细胞)中诱导凋亡。所述细胞可以是病毒感染的或细胞内细菌感染的，或是展示肿瘤抗原的癌细胞。进一步的特征可以是激活巨噬细胞和天然杀伤细胞，使它们能够破坏病原体，并且能够刺激细胞分泌影响适应性免疫应答和先天性免疫应答所涉及的其他细胞的功能的多种细胞因子。

[0022] DNA:DNA是脱氧核糖核酸的通常缩写。它是核酸分子，即由核苷酸组成的聚合物。这些核苷酸通常是脱氧-腺苷-单磷酸，脱氧-胸苷-单磷酸，脱氧-鸟苷-单磷酸和脱氧-胞苷-单磷酸单体，它们本身由糖部分(脱氧核糖)、碱基部分和磷酸部分组成，并通过特征骨架结构聚合。骨架结构通常通过第一相邻单体的核苷酸(即脱氧核糖)的糖部分和第二相邻单体的磷酸酯部分之间的磷酸二酯键形成。单体的特定顺序，即与糖/磷酸酯骨架连接的碱基的顺序，称为DNA序列。DNA可以是单链或双链的。在双链形式中，第一链的核苷酸通常与第二链的核苷酸杂合，如，通过A/T-碱基配对和G/C-碱基配对。

[0023] 序列的片段:序列的片段通常可以是如核酸分子或氨基酸序列的全长序列的较短部分。因此，片段通常由与全长序列内的对应的一段序列(stretch)同一的序列组成。在本发明的上下文中，序列的优选片段由实体连续的一段序列组成，例如核苷酸或氨基酸，其对应于片段来源的分子中实体的连续的一段序列，其代表至少20％、优选至少30％、更优选至少40％、更优选至少50％、甚至更优选至少60％、甚至更优选至少70％、和最优选至少80％的片段来源的整个(即，全长)分子。

[0024] 异源序列:如果两个序列不是来源自相同基因，则它们通常被理解为“异源的”。即，尽管异源序列可以来源自相同的生物体，但它们天然地(在自然界中)不存在于相同的核酸分子中，例如在相同的mRNA中。

[0025] 体液免疫性/体液免疫应答:体液免疫性通常是指抗体产生和任选地伴随抗体产生的辅助过程。如，体液免疫应答可以通常特征在于Th2激活和细胞因子产生，生殖中心形成和同种异型转换，亲和力成熟和记忆细胞产生。体液免疫性还通常可以指抗体的效应物功能，其包括病原体和毒素中和作用，经典补体激活和吞噬作用及病原体消除的调理促进。

[0026] 免疫原:在本发明的上下文中，免疫原通常可以理解为能够刺激免疫应答的化合物。优选地，免疫原是肽、多肽或蛋白质。在特别优选的实施方式中，本发明意义上的免疫原是提供的核酸分子，优选如本文定义的人工核酸分子的翻译产物。通常，免疫原至少引发适应性免疫应答。

[0027] 免疫刺激组合物:本发明的上下文中，免疫刺激组合物可以通常理解为含有至少一种能够诱导免疫应答的组分或能够诱导免疫应答的组分源自的组分的组合物。此种免疫应答可以优选为先天免疫应答或适应性和先天免疫应答的组合。优选地，本发明的上下文中，免疫刺激组合物含有至少一种人工核酸分子，更优选RNA，例如mRNA分子。免疫刺激组分，诸如mRNA可以与合适的载体复合。因此，免疫刺激组合物可以包含mRNA/载体-复合物。此外，免疫刺激组合物可以包含用于免疫刺激组分，如mRNA的佐剂和/或合适的载体。

[0028] 免疫应答:免疫应答可以通常是针对特定抗原的适应性免疫系统的特异性反应(所谓特异性或适应性免疫应答)或先天免疫系统的非特异性反应(所谓非特异性或先天免疫应答)，或其组合。

[0029] 免疫系统:免疫系统可以保护生物体免受感染。如果病原体成功通过生物体的物

理屏障并进入该生物体，则先天免疫系统提供立即、但非特异性应答。如果病原体避开了该先天应答，则脊椎动物拥有第二层保护，适应性免疫系统。这里，免疫系统在感染过程中适应其应答以改善其对病原体的识别。病原体被消除之后，此种改善的应答随后以免疫记忆的形式保留，并且允许适应性免疫系统每次遭遇该病原体时发起更快速和更强烈的攻击。据此，免疫系统包含先天和适应性免疫系统。这些两部分的每个通常含有所谓的体液和细胞组分。

[0030] 免疫刺激RNA：本发明的上下文中，免疫刺激RNA(isRNA)可以通常是能够诱导先天免疫应答的RNA。其通常不具有可读框并且因此不提供肽-抗原或免疫原，但如通过结合特定类型的Toll样受体(TLR)或其它合适的受体引起免疫应答。然而，当然具有可读框并编码肽/蛋白的mRNA也可以诱导先天免疫应答并且，因此可以是免疫刺激RNA。

[0031] 先天免疫系统：先天免疫系统，也被称为非特异性(或无特异性)免疫系统，通常包含以非特异性的方式保护宿主免受其它生物体感染的细胞和机制。这意味着先天系统的细胞可以以一般的方式识别和响应于病原体，但不像适应性免疫系统，它不赋予宿主持久或保护性免疫。先天免疫系统可以如被以下激活：Toll样受体(TLR)的配体或其它辅助物质如脂多糖、TNF-α、CD40配体、或细胞因子、单核因子、淋巴因子、白细胞介素或趋化因子、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、IL-19、IL-20、IL-21、IL-22、IL-23、IL-24、IL-25、IL-26、IL-27、IL-28、IL-29、IL-30、IL-31、IL-32、IL-33、IFN-α、IFN-β、IFN-γ、GM-CSF、G-CSF、M-CSF、LT-β、TNF-α、生长因子、和hGH、人Toll样受体TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、TLR10的配体、鼠Toll样受体TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、TLR10、TLR11、TLR12或TLR13的配体、NOD样受体的配体、RIG-I样受体的配体、免疫刺激核酸、免疫刺激RNA(isRNA)、CpG-DNA、抗细菌剂、或抗病毒剂。根据本发明的药物组合物可以包含一种或多种此种物质。通常地，先天免疫系统的应答包括：通过产生化学因子招募免疫细胞到感染位点，所述化学因子包括专用的化学介质，称为细胞因子；激活补体级联；通过专门的白细胞鉴别和去除器官、组织、血液和淋巴中的外来物质；激活适应性免疫系统；和/或用作针对感染剂的物理和化学屏障。

[0032] 克隆位点：克隆位点通常理解为适于插入核酸序列，如包含可读框的核酸序列的核酸分子片段。插入可以通过任何本领域技术人员已知的分子生物学方法进行，如通过限制酶切和连接。克隆位点通常地包含一个或多个限制性酶识别位点(限制性位点)。这些一个或多个限制性位点可以被在这些位点切割DNA的限制性酶识别。包含一个或多个限制性位点的克隆位点也可以称为多克隆位点(MCS)或多接头。

[0033] 核酸分子：核酸分子是包含核酸组分，优选由核酸组分组成的分子。术语核酸分子优选指DNA或RNA分子。其优选与术语“多核苷酸”同义使用。优选地，核酸分子是聚合物，包含通过糖/磷酸酯-骨架的磷酸二酯键彼此共价连接的核苷酸单体或由通过糖/磷酸酯-骨架的磷酸二酯键彼此共价连接的核苷酸单体组成。术语“核酸分子”还包括修饰的核酸分子，诸如碱基修饰的、糖修饰的或骨架修饰的等DNA或RNA分子。

[0034] 可读框：本发明上下文中可读框(ORF)可以通常是一些核苷酸三联体的序列，其可以翻译为肽或蛋白。可读框优选在其5′末端含有起始密码子，即通常编码氨基酸甲硫氨酸的三个连续的核苷酸的组合(ATG)，和通常呈现多个3核苷酸长度的紧接的区域。ORF优选由

终止密码子(例如,TAA、TAG、TGA)终止。通常,这是可读框仅有的终止密码子。因此,本发明上下文内可读框优选为核苷酸序列,由可以被三整除的很多核苷酸组成,其以起始密码子(如ATG)起始并且其优选以终止密码子(如,分别为TAA、TGA或TAG)终止。可读框可以是分离的或其可以被整合入更长的核酸序列,例如载体或mRNA中。可读框还可以被称为"(蛋白)编码序列"或优选地"编码序列"。

[0035] 肽:肽或多肽通常是通过肽键连接的氨基酸单体的聚合物。其通常含有少于50个单体单元。尽管如此,术语肽不否认为具有多于50个单体单元的分子。长肽也称为多肽,通常具有50到600个单体单元。

[0036] 蛋白质:蛋白质通常包含一个或多个肽或多肽。蛋白通常折叠为3-维形式,其可以是蛋白质发挥其生物学功能所需的。

[0037] 限制性位点:限制性位点,也称为"限制性酶识别位点",为由限制性酶识别的核苷酸序列。限制性位点通常是短的,优选回文核苷酸序列,如包含4至8个核苷酸的序列。限制性位点优选由限制性酶特异识别。限制性酶通常切割在此位点包含限制性位点的核苷酸序列。在双链核苷酸序列,诸如双链DNA序列中,限制性酶通常切割核苷酸序列的两条链。

[0038] RNA,mRNA:RNA是核糖核酸的常见缩写。其是核酸分子,即由核苷酸组成聚合物。这些核苷酸通常是沿所谓骨架彼此连接的腺苷-单磷酸酯、尿苷-单磷酸酯、鸟苷-单磷酸酯和胞苷-单磷酸酯单体。所述骨架由第一相邻单体的糖,即核糖和第二相邻单体的磷酸酯部分之间的磷酸二酯键形成。单体的特定连续被称为RNA-序列。通常RNA是可以通过如在细胞内DNA-序列的转录可获得的。真核细胞中,转录典型地在细胞核或线粒体中进行。在体内,DNA的转录通常产生所谓的成熟前RNA,其必须被加工为所谓的信使-RNA,通常简写为mRNA。例如在真核生物体中,成熟前RNA的加工包含多种不同转录后修饰如剪接、5′帽、聚腺苷酸化、从细胞核或线粒体输出等。这些过程的总和也称为RNA的成熟。成熟信使RNA通常提供可以被翻译为特定肽或蛋白氨基酸序列的核苷酸序列。通常,成熟mRNA包含5′帽、5′UTR、可读框、3′UTR和聚(A)序列。除了信使RNA外,一些非编码RNA类型存在,其可以参与调节转录和/或翻译。

[0039] 核酸分子序列:核酸分子序列通常理解为特定和独特顺序,即其核苷酸的连续。蛋白或肽序列通常理解为该顺序,即其氨基酸的连续。

[0040] 序列同一性:如果它们呈现相同长度和顺序的核苷酸或氨基酸,则两条以上序列相同。同一性百分数通常描述两条序列相同的程度,即其通常描述与参照序列的相同核苷酸在其序列位置上对应的核苷酸的百分数。为了确定同一性程度,要比较的序列被认为是呈现相同长度,即要比较的序列的最长序列长度。这意味由8个核苷酸组成的第一序列与包含第一序列的由10个核苷酸组成的第二序列80%相同。换句话说,本发明上下文中,序列同一性优选指具有相同长度的两条以上序列中具有相同位置的序列的核苷酸的百分数。通常将缺口认为是不相同的位置,而不考虑其在比对中的真正位置。

[0041] 稳定的核酸分子:稳定的核酸分子是被修饰从而其对例如由环境因素或酶消化,如由核酸外切酶或核酸内切酶降解导致的分解或降解比无修饰的核酸分子更稳定的核酸分子,优选DNA或RNA分子。优选地,本发明范围内,稳定的核酸分子在细胞,如原核或真核细胞中,优选在哺乳动物细胞,如人细胞中稳定。稳定效应也可以在细胞外,例如在缓冲溶液等中,例如在包含所述稳定的核酸分子的药物组合物的制造过程中发挥。

[0042] 转染:术语“转染”指将核酸分子,如DNA或RNA(例如mRNA)分子引入细胞,优选引入真核细胞。在本发明范围内,术语“转染”包括本领域技术人员已知的用于将核酸分子引入细胞,优选引入真核细胞,如引入哺乳动物细胞的任何方法。此种方法包括例如,电穿孔、如基于阳离子脂质和/或脂质体的脂转染、磷酸钙沉淀、基于纳米颗粒的转染、基于病毒的转染、或基于阳离子聚合物(如DEAE-葡聚糖或聚乙烯亚胺)的转染等。优选地,所述引入是非病毒性的。

[0043] 载体:术语“载体”指核酸分子,优选指人工核酸分子。在本发明范围内,载体适于整合或包含所需核酸序列,如包含可读框的核酸序列。此种载体可以是储存载体、表达载体、克隆载体、转移载体等。储存载体是允许方便储存核酸分子(例如mRNA分子)的载体。因此,所述载体可以包含对应于例如所需mRNA序列或其部分的序列,如对应于mRNA的可读框和3′UTR的序列。表达载体可以用于生产表达产物诸如RNA(例如mRNA)、或肽、多肽或蛋白。例如,表达载体可以包含载体的一段序列,如启动子序列(例如RNA启动子序列)的转录所需的序列。克隆载体通常是含有可以用于将核酸序列掺入载体的克隆位点的载体。克隆载体可以是,例如质粒载体或噬菌体载体。转移载体可以是适于将核酸分子转移入细胞或生物体的载体,例如,病毒载体。在本发明范围内,载体可以是,例如RNA载体或DNA载体。优选地,载体是DNA分子。优选地,在本申请的意义中的载体包含克隆位点、选择标记(如抗生素抗性因子)、和适于载体扩增的序列,如复制起点。优选地,本申请范围内的载体是质粒载体。

[0044] 媒介物(vehicle):媒介物通常理解为适于储存、转运、和/或施用化合物,如药学活性化合物的材料。例如,其可以是生理学可接受的适于储存、转运、和/或施用药学活性化合物的液体。

[0045] 本发明部分地基于以下令人惊讶的发现:将编码肿瘤抗原的RNA与PD-1和LAG-3途径抑制剂组合施用能够有效地增强抗肿瘤免疫应答。所述RNA和两种抑制剂的组合不仅导致肿瘤生长显著减少,而且还能够实现完全的肿瘤根除-而在单独施用PD-1和LAG-3检查点抑制剂时没有发生完全的肿瘤缓解。与用非特异性RNA,单一抑制剂或甚至特定RNA的单一处理相比,只有RNA与PD-1和LAG-3阻断的组合起协同作用以诱导存活的显著增加。因此,PD-1和LAG-3的免疫检查点与治疗性RNA疫苗的组合代表了一种有吸引力的治疗方法,不仅可以改善抗肿瘤免疫应答和临床结果,还可以用于对抗感染性疾病和本文描述的其他疾病和病症。

[0046] 在第一方面,本发明因此涉及包含以下的组合:(i)至少一种RNA,所述RNA包含至少一种编码抗原的至少一个表位的编码序列;(ii)至少一种PD-1途径抑制剂;和(iii)至少一种LAG-3途径抑制剂。

[0047] 因此,本发明组合包含至少一种编码至少一个表位的RNA。所述RNA因此可以编码所述RNA的至少一个编码序列(或“编码区”)中的一个或多个表位,诸如2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个表位。因此,RNA可包含编码1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个不同表位的一个编码区。可选地,所述RNA可包含一个以上编码一个以上表位的编码区。所述RNA在本文中也称为“表位编码RNA”。

[0048] 应当理解,术语“RNA”是指核糖核酸分子,其特征在于它们的核苷酸的特定连续连接形成所述分子(即它们的RNA序列)。因此,术语“RNA”可用于指RNA分子或RNA序列,如本领域技术人员在对应的上下文中将容易理解的。例如,在本发明组合的上下文中使用的术语

“至少一种RNA”优选是指存在于所述组合中的至少一种RNA分子(所述分子尤其通过其特定的RNA序列表征)。在序列修饰的上下文中,术语“RNA”将被理解为涉及修饰的RNA序列,但通常还包括所得的RNA分子(其RNA序列被修饰)。

[0049] 术语“表位”或“抗原决定簇”通常是指被适应性免疫系统识别的抗原部分。“抗原”是能够被免疫系统(通常通过其表位)识别的物质,优选地通过适应性免疫系统识别,并且如通过形成抗体和/或抗原特异性T细胞作为适应性免疫应答的一部分能够引发抗原特异性免疫应答,例如抗原特异性免疫应答。通常,抗原可以是或可以包含肽或蛋白质,其可以通过抗原呈递细胞呈递给MHC表面分子上的(抗原特异性)T细胞。在本发明的上下文中,抗原可以是所提供的核酸分子的翻译产物,优选地是本文定义的表位编码RNA。在本文中,包含至少一个表位的抗原(例如肽或蛋白质)的片段或变体也被理解为抗原。

[0050] 如本文所用,术语“表位”特别是指MHC表面分子上呈递的抗原的部分或片段。包含本文所用表位或由表位组成的这种片段通常可包含约5至约20个氨基酸。表位可以被区分为T细胞表位和B细胞表位。在本发明的上下文中,蛋白质的T细胞表位或部分可包含优选长度为约6至约20或甚至更多氨基酸的片段,例如,由MHC I类分子加工和呈递的片段,优选具有约8至约10个氨基酸的长度,例如8、9或10、(或甚至11或12个氨基酸),或由MHC II类分子加工和呈递的片段,优选具有约13个或更多个氨基酸的长度,例如,13、14、15、16、17、18、19、20或甚至更多个氨基酸,其中这些片段可选自氨基酸序列的任何部分。这些片段通常由T细胞以由肽片段和MHC表面分子组成的复合物的形式识别,即片段通常不以其天然形式识别。B细胞表位通常是位于本文定义的(天然)蛋白质或肽抗原外表面上的片段,优选具有5至15个氨基酸,更优选具有5至12个氨基酸,甚至更优选具有6至9个氨基酸,它可以被抗体识别,即以其天然形式识别。术语“表位”包括“构象”(或“不连续”)表位,其由抗原氨基酸的不连续序列组成但以三维结构聚集在一起,和”线性”表位,其通过来自抗原的连续氨基酸序列形成。

[0051] 本发明组合的“表位编码”RNA可编码全长(肽或蛋白质)抗原或其变体或片段。所述全长(肽或蛋白质)抗原或其变体或片段包含至少一个(功能性)表位或由至少一个(功能性)表位组成或提供至少一个(功能性)表位,即所述抗原性肽或蛋白质(或其变体或片段)优选包含或由以下组成:天然表位(优选被B细胞识别)或被加工和/或结合以提供MHC结合的表位(优选被T细胞识别),所述表位优选是功能性的,即能够在受试者中诱导所需的适应性免疫应答。编码的抗原、变体或片段因此可以是任何长度,只要它们包含至少一种功能性表位,由至少一种功能性表位组成,或提供至少一种功能性表位,其能够在受试者中诱导所需的适应性免疫应答。因此,“表位编码”RNA可以编码(i)如本文所定义的全长抗原序列(或其变体),或(ii)如本文所定义的所述抗原序列(或其变体)的片段中的至少一种或多种。所述抗原片段可以是形成线性或构象表位的短链氨基酸的短一段序列,或者可以是由MHC表面分子加工和结合的片段。抗原片段优选包含至少一个“功能性”表位,即能够诱导所需(适应性)免疫应答。

[0052] 全长抗原

[0053] 野生型抗原

[0054] 在优选的实施方式中,本发明组合的表位编码RNA,特别是其RNA序列的至少一种编码序列可包含编码如本文所定义的“全长”抗原的编码序列。如本文所用的术语“全长抗

原”通常是指基本上包含天然存在的(野生型)抗原的完整氨基酸序列的抗原。

[0055] 天然存在的(野生型)抗原可以由天然存在的(野生型)核酸序列,特别是RNA序列,或(由于遗传密码的简并性)由核酸序列“变体”编码。因此,在优选的实施方式中,本发明组合的表位编码RNA包含野生型核酸序列或编码如本文所定义的全长野生型抗原的核酸序列“变体”。根据优选的实施方式,所述抗原选自下面列表1中列出的抗原。

[0056] 变体

[0057] 根据进一步优选的实施方式,表位编码RNA,特别是其RNA序列,包含至少一种编码如本文所定义的抗原变体的编码序列。

[0058] 优选地,抗原“变体”或“序列变体”的序列在作为参比(或“亲本”)序列的天然存在的(野生型)抗原的氨基酸序列的至少一个氨基酸残基上不同。因此,与它们各自的参比序列相比,变体抗原优选包含至少一个氨基酸突变、取代、插入或缺失。优选地,如本文所用的术语“变体”包括如本文所定义的蛋白抗原的任何同系物、同种型或转录物变体,其中同系物、同种型或转录物变体优选分别以一定程度的同一性或同源性为特征,如本文所定义。

[0059] 与野生型(天然存在的)抗原氨基酸序列相比,由本发明组合的RNA的至少一种编码序列编码的抗原“变体”可包含至少一个氨基酸取代。所述取代可选自保守或非保守取代。在一些实施方式中,优选由表位编码RNA的至少一个编码序列编码的蛋白“变体”包含至少一个保守氨基酸取代,其中来自相同类别的氨基酸被彼此交换。特别地,这些是在侧链中或氨基酸具有脂族侧链、带正电荷或带负电荷的侧链、芳族基团的氨基酸,其侧链可以形成氢桥,如,具有羟基官能团的侧链。通过保守取代,如具有极性侧链的氨基酸可以被具有对应极性侧链的另一种氨基酸取代,或者,例如,以疏水侧链为特征的氨基酸可以被具有对应疏水侧链的另一种氨基酸取代(如,丝氨酸(苏氨酸)被苏氨酸(丝氨酸)取代,或亮氨酸(异亮氨酸)被异亮氨酸(亮氨酸)取代)。

[0060] “变体”还可以包含氨基酸突变、插入、缺失和/或非保守取代,特别是在那些序列位置,其不损害编码抗原的表位的功能性。

[0061] 优选地,抗原的“变体”通常可以包含与各自天然存在的(野生型)抗原的氨基酸序列具有至少5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%,优选至少70%、更优选至少80%、甚至更优选至少85%、甚至更优选至少90%、最优选至少95%或甚至97%的序列同一性的氨基酸序列。

[0062] 片段

[0063] 根据进一步优选的实施方式,如本文所定义的表位编码RNA的至少一种编码序列可以编码抗原(或其变体)的片段。所述片段可以是任何长度,条件是它优选包含至少一个功能性表位。

[0064] 在本发明的上下文中,与天然存在的抗原或其变体(或其编码核酸序列)的氨基酸序列相比,抗原(或其变体)的“片段”可以包含如上定义的抗原(或其变体)的序列,这是关于氨基酸序列(或者其编码核酸序列)、N末端、C末端和/或序列间截短。因此,这种截短可以分别在氨基酸水平或核酸水平上发生。因此,关于如本文所定义的此类片段的序列同一性优选指如本文所定义的完整抗原(或其变体)或这种抗原(或其变体)的完整(编码)核酸序列。

[0065] 抗原(或其变体)的“片段”可包含本文定义的所述抗原(或其变体)的氨基酸序列或由其组成,其具有约5至约20或甚至更多氨基酸的长度,并且是优选由MHC复合物加工和呈递。优选地,抗原(或其变体)的片段可包含本文定义的所述抗原(或其变体)的氨基酸序列或由其组成,其具有约6至约20或甚至更多氨基酸的长度,如由MHC I类分子加工和呈递的片段优选具有约8至约10个氨基酸的长度,如约8、9或10(或甚至6、7、11或12个氨基酸),或由MHC II类分子加工和呈递的片段优选具有约13个或更多个氨基酸的长度,如,13、14、15、16、17、18、19、20或甚至更多个氨基酸,其中片段可选自氨基酸序列的任何部分。这些片段通常被由肽片段和MHC分子组成的复合物形式的T细胞识别,即片段通常不以其“天然”或“游离”形式识别,而是以MHC结合形式识别。

[0066] 优选地,由本发明组合的表位编码RNA的至少一个编码序列编码的抗原(或其变体)的“片段”通常可以包含与对应的全长野生型抗原(或其变体)的氨基酸序列具有至少5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%、优选至少70%、更优选至少80%、甚至更优选至少85%、甚至更优选至少90%、最优选至少95%或甚至97%的序列同一性的氨基酸序列或由其组成。

[0067] 设想由表位编码RNA编码的至少一个抗原“片段”可以是(a)野生型抗原或(b)本文所定义的抗原变体的(N末端、C末端和/或序列间)截短的片段。然而,术语“片段”还可包括“片段变体”,其包含与(a)野生型抗原或(b)如本文所定义的抗原变体的片段具有至少为5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%、优选至少70%、更优选至少80%、甚至更优选至少85%、甚至更优选至少90%、最优选至少95%或甚至97%的序列同一性的氨基酸序列,或由其组成。

[0068] 抗原

[0069] 肿瘤抗原

[0070] 本发明人惊奇地发现,编码肿瘤抗原的RNA能够在体内提供肿瘤抗原的表达。出乎意料的是,提供所述RNA作为疫苗与PD-1和LAG-3途径抑制剂组合能够诱导改善的抗肿瘤免疫应答。

[0071] 在优选的实施方式中,由RNA的至少一个编码序列编码的表位是如本文所定义的肿瘤抗原的表位,其源自肿瘤或癌症疾病或与肿瘤或癌症疾病相关。优选地,肿瘤是恶性肿瘤。肿瘤抗原优选是与癌症疾病相关的抗原。本文使用的肿瘤抗原通常源自肿瘤细胞,优选哺乳动物肿瘤细胞。肿瘤抗原优选位于源自哺乳动物,优选来自人肿瘤(例如全身或实体瘤)的肿瘤细胞的表面中或表面上。

[0072] 肿瘤抗原也可选自蛋白,其与正常细胞相比在肿瘤细胞中过表达。此外,表述“肿瘤抗原”还包括在细胞中表达的抗原,其自身(或初始自身不)不简并但与假定的肿瘤相关。与肿瘤供应血管或(重新)形成有关的抗原,特别是那些与新血管形成如生长因子,诸如VEGF、bFGF等有关的抗原也包括在本文中。与肿瘤相关的其他抗原包括来自通常包埋肿瘤的细胞或组织的抗原。此外,一些物质(通常是蛋白质或肽)在患有(知情或不知情)癌症疾病的患者中表达,并且它们在所述患者的体液中以增加的浓度出现。一些物质在本文中也可称为“肿瘤抗原”,而不是免疫应答诱导物质的最严格意义上的的抗原。肿瘤抗原的类别

可以进一步分为肿瘤特异性抗原(TSA)和肿瘤相关抗原(TAA)，两者都包括在本文所用的表述中。TSA只能由肿瘤细胞呈递，而从不由正常的“健康”细胞呈现。它们通常由肿瘤特异性突变引起。更常见的TAA通常由肿瘤和健康细胞呈现。这些抗原被识别，并且抗原呈递细胞可被细胞毒性T细胞破坏。另外，肿瘤抗原也可以以如突变受体的形式存在于肿瘤表面。在这种情况下，它们可被抗体识别。

[0073] 如本文所用，术语“肿瘤抗原”优选是指下面列表1中提供的任何一种肿瘤抗原。本发明组合的表位编码RNA的至少一种编码序列优选编码源自选自列表1中提供的抗原或其片段或变体的肿瘤抗原的表位。

[0074] 在这种情况下，进一步优选表位编码RNA的至少一个编码序列编码肿瘤抗原或其片段或变体，其中肿瘤抗原是选自列表1中列出的抗原的抗原。

[0075] 列表1：肿瘤抗原列表(基因名称(UniProt、RefSeq或Genbank的蛋白质登录号))

[0076] 1A01_HLA-A/m(P30443)；1A02(P01892)；5T4(Q13641)；ACRBP(Q8NEB7)；AFP(P02771)；AKAP4(Q5JQC9)；α-辅肌动蛋白-_4/m(B4DSX0)；α-辅肌动蛋白-_4/m(B4E337)；α-辅肌动蛋白-_4/m(O43707)；α-甲酰基-辅酶_A_消旋酶(A0A024RE16)；α-甲酰基-辅酶_A_消旋酶(A8KAC3)；ANDR(P10275)；ART-4(Q9ULX3)；ARTC1/m(P52961)；AURKB(Q96GD4)；B2MG(P61769)；B3GN5(Q9BYG0)；B4GN1(Q00973)；B7H4(Q7Z7D3)；BAGE-1(Q13072)；BASI(P35613)；BCL-2(A9QXG9)；bcr/abl(A9UEZ4)；bcr/abl(A9UEZ7)；bcr/abl(A9UEZ8)；bcr/abl(A9UEZ9)；bcr/abl(A9UF00)；bcr/abl(A9UF01)；bcr/abl(A9UF03)；bcr/abl(A9UF04)；bcr/abl(A9UF05)；bcr/abl(A9UF06)；bcr/abl(A9UF08)；β-联蛋白/m(P35222)；β-联蛋白/m(Q8WYA6)；BING-4(O15213)；BIRC7(Q96CA5)；BRCA1/m(A0A024R1V0)；BRCA1/m(A0A024R1V7)；BRCA1/m(A0A024R1Z8)；BRCA1/m(A0A068BFX7)；BRCA1/m(C6YB45)；BRCA1/m(C6YB47)；BRCA1/m(G3XAC3)；BY55(O95971)；钙网蛋白(B4DHR1)；钙网蛋白(B4E2Y9)；钙网蛋白(P27797)；钙网蛋白(Q96L12)；CAMEL(O95987)；CASP-8/m(Q14790)；CASPA(Q92851-4)；组织蛋白酶_B(A0A024R374)；组织蛋白酶_B(P07858)；组织蛋白酶_L(A0A024R276)；组织蛋白酶_L(P07711)；组织蛋白酶_L(Q9HBQ7)；CD1A(P06126)；CD1B(P29016)；CD1C(P29017)；CD1D(P15813)；CD1E(P15812)；CD20(P11836)；CD22(O60926)；CD22(P20273)；CD22(Q0EAF5)；CD276(Q5ZPR3)；CD33(B4DF51)；CD33(P20138)；CD33(Q546G0)；CD3E(P07766)；CD3Z(P20963)；CD44_同种型_1(P16070)；CD44_同种型_6(P16070-6)；CD4(P01730)；CD52(P31358)；CD52(Q6IBD0)；CD52(V9HWN9)；CD55(B1AP15)；CD55(D3DT85)；CD55(D3DT86)；CD55(P08174)；CD56(P13591)；CD80(A0N0P2)；CD80(P33681)；CD86(P42081)；CD8A(P01732)；CDC27/m(G5EA36)；CDC27/m(P30260)；CDE30(P28908)；CDK4/m(A0A024RBB6)；CDK4/m(P11802)；CDK4/m(Q6LC83)；CDK4/m(Q96BE9)；CDKN2A/m(D1LYX3)；CDKN2A/m(G3XAG3)；CDKN2A/m(K7PML8)；CDKN2A/m(L8E941)；CDKN2A/m(Q8N726)；CEA(NP_004354)；CEAM6(P40199)；CH3L2(Q15782)；CLCA2(Q9UQC9)；CML28(Q9NQT4)；CML66(Q96RS6)；COA-1/m(Q5T124)；毛状样(coactosin-like)_蛋白(Q14019)；胶原_XXIII(L8EAS4)；胶原_XXIII(Q86Y22)；COX-2(Q6ZYK7)；CP1B1(Q16678)；CSAG2(Q9Y5P2-2)；CSAG2(Q9Y5P2)；CT45A1(Q5HYN5)；CT55(Q8WUE5)；CT-_9/BRD6(Q58F21)；CTAG2_同种型_LAGE-1A(O75638-2)；CTAG2_同种型_LAGE-1B(O75638)；CTCFL(Q8NI51)；Cten(Q8IZW8)；细胞周期蛋白_B1(P14635)；细胞周期蛋白_D1(P24385)；cyp-B(P23284)；DAM-10(P43366)；DEP1A(Q5TB30)；

E7(P03129);E7(P06788);E7(P17387);E7(P06429);E7(P27230);E7(P24837);E7(P21736);E7(P26558);E7(P36831);E7(P36833);E7(Q9QCZ1);E7(Q81965);E7(Q80956);EF1A2(Q05639);EFTUD2/m(Q15029);EGFR(A0A0B4J1Y5);EGFR(E7BSV0);EGFR(L0R6G1);EGFR(P00533-2);EGFR(P00533);EGFR(Q147T7);EGFR(Q504U8);EGFR(Q8NDU8);EGLN3(Q9H6Z9);ELF2/m(B7Z720);EMMPRIN(Q54A51);EpCam(P16422);EphA2(P29317);EphA3(P29320);EphA3(Q6P4R6);ErbB3(B3KWG5);ErbB3(B4DGQ7);ERBB4(Q15303);ERG(P11308);ETV6(P41212);EWS(Q01844);EZH2(F2YMM1);EZH2(G3XAL2);EZH2(L0R855);EZH2(Q15910);EZH2(S4S3R8);FABP7(O15540);FCGR3A(P08637);FGF5(P12034);FGF5(Q60518);FGFR2(P21802);纤连蛋白(A0A024R5I6);纤连蛋白(A0A024RB01);纤连蛋白(A0A024RDT9);纤连蛋白(A0A024RDV5);纤连蛋白(A6NH44);纤连蛋白(A8K6A5);纤连蛋白(B2R627);纤连蛋白(B3KXM5);纤连蛋白(B4DIC5);纤连蛋白(B4DN21);纤连蛋白(B4DS98);纤连蛋白(B4DTH2);纤连蛋白(B4DTK1);纤连蛋白(B4DU16);纤连蛋白(B7Z3W5);纤连蛋白(B7Z939);纤连蛋白(G5E9X3);纤连蛋白(Q9H382);FOS(P01100);FOXP3(Q9BZS1);FUT1(P19526);G250(Q16790);GAGE-1(AAA82744);GAGE-2(Q6NT46);GAGE-3(Q13067);GAGE-4(Q13068);GAGE-5(Q13069);GAGE-6(Q13070);GAGE7b(O76087);GAGE-8_GAGE-2D(Q9UEU5);GASR(P32239);GnT-V(Q09328);GPC3(I6QTG3);GPC3(P51654);GPC3(Q8IYG2);GPNMB/m(A0A024RA55);GPNMB/m(Q14956);GPNMB/m(Q8IXJ5);GPNMB/m(Q96F58);GRM3(Q14832);HAGE(Q9NXZ2);丝氨酸穿膜蛋白酶(hepsin)(B2ZDQ2);丝氨酸穿膜蛋白酶(P05981);Her2/neu(B4DTR1);Her2/neu(L8E8G2);Her2/neu(P04626);Her2/neu(Q9UK79);HLA-A2/m(Q95387);HLA-A2/m(Q9MYF8);同源异型框_NKX3.1(Q99801);HOM-TES-85(B2RBQ6);HOM-TES-85(Q9P127);HPG1 Pubmed:12543784);HS71A(P0DMV8);HS71B(P0DMV9);HST-2(P10767);hTERT(O94807);iCE(O00748);IF2B3(O00425);IL10(P22301);IL-13Ra2(Q14627);IL2-RA(P01589);IL2-RB(P14784);IL2-RG(P31785);IL-5(P05113);IMP3(Q9NV31);ITA5(P08648);ITB1(P05556);ITB6(P18564);激肽释放酶-2(A0A024R4J4);激肽释放酶-2(A0A024R4N3);激肽释放酶-2(B0AZU9);激肽释放酶-2(B4DU77);激肽释放酶-2(P20151);激肽释放酶-2(Q6T774);激肽释放酶-2(Q6T775);激肽释放酶-4(A0A0C4DFQ5);激肽释放酶-4(Q5BQA0);激肽释放酶-4(Q96PT0);激肽释放酶-4(Q96PT1);激肽释放酶-4(Q9Y5K2);KI20A(O95235);KIAA0205(Q92604);KIF2C(Q99661);KK-LC-1(Q5H943);LDLR(P01130);LGMN(Q99538);LIRB2(Q8N423);LY6K(Q17RY6);MAGA5(P43359);MAGA8(P43361);MAGAB(P43364);MAGE-A10(A0A024RC14);MAGE-A12(P43365);MAGE-A1(P43355);MAGE-A2(P43356);MAGE-A3(P43357);MAGE-A4(A0A024RC12);MAGE-A4(P43358);MAGE-A4(Q1RN33);MAGE-A6(A8K072);MAGE-A6(P43360);MAGE-A6(Q6FHI5);MAGE-A9(P43362);MAGE-B10(Q96LZ2);MAGE-B16(A2A368);MAGE-B17(A8MXT2);MAGE-_B1(Q96TG1);MAGE-B2(O15479);MAGE-B3(O15480);MAGE-B4(O15481);MAGE-B5(Q9BZ81);MAGE-B6(Q8N7X4);MAGE-C1(O60732);MAGE-C2(Q9UBF1);MAGE-C3(Q8TD91);MAGE-D1(Q9Y5V3);MAGE-D2(Q9UNF1);MAGE-D4(Q96JG8);MAGE-_E1(Q6IAI7);MAGE-E1_(MAGE1)(Q9HCI5);MAGE-E2(Q8TD90);MAGE-F1(Q9HAY2);MAGE-H1(Q9H213);MAGEL2(Q9UJ55);乳腺球蛋白_A(Q13296);乳腺球蛋白_A(Q6NX70);MART-1/melan-A(Q16655);MART-2(Q5VTY9);MC1_R(Q01726);MC1_R(Q1JUL4);MC1_R(Q1JUL6);MC1_R(Q1JUL8);MC1_R(Q1JUL9);MC1_R(Q1JUM0);MC1_R(Q1JUM2);MC1_R

(Q1JUM3);MC1_R(Q1JUM4);MC1_R(Q1JUM5);MC1_R(Q6UR92);MC1_R(Q6UR94);MC1_R(Q6UR95);MC1_R(Q6UR96);MC1_R(Q6UR97);MC1_R(Q6UR98);MC1_R(Q6UR99);MC1_R(Q6URA0);MC1_R(Q86YW1);MC1_R(V9Q5S2);MC1_R(V9Q671);MC1_R(V9Q783);MC1_R(V9Q7F1);MC1_R(V9Q8N1);MC1_R(V9Q977);MC1_R(V9Q9P5);MC1_R(V9Q9R8);MC1_R(V9QAE0);MC1_R(V9QAR2);MC1_R(V9QAW3);MC1_R(V9QB02);MC1_R(V9QB58);MC1_R(V9QBY6);MC1_R(V9QC17);MC1_R(V9QC66);MC1_R(V9QCQ4);MC1_R(V9QDF4);MC1_R(V9QDN7);MC1_R(V9QDQ6);M-CSF(P09603);间皮素(Q13421);MITF(O75030-8);MITF(O75030-9);MITF(O75030);MMP1_1(B3KQS8);MMP7(P09237);MUC-1(AAA60019);MUM-1/m(NP_116242);MUM-2/m(Q9Y5R8);MYCN(P04198);MYO1A(Q9UBC5);MYO1B(O43795);MYO1C(O00159);MYO1D(O94832);MYO1E(Q12965);MYO1F(O00160);MYO1G(B0I1T2);MYO1H(NP_001094891);NA17(Q3V5L5);NA88-A Pubmed:10790436);Neo-PAP(Q9BWT3);NFYC/m(Q13952);NGEP(Q6IWH7);NPM(P06748);NRCAM(Q92823);NSE(P09104);NUF2(Q9BZD4);NY-ESO-1(P78358);OA1(P51810);OGT(O15294);OS-9(B4DH11);OS-9(B4E321);OS-9(B7Z8E7);OS-9(Q13438);骨钙蛋白(P02818);骨桥蛋白(A0A024RDE2);骨桥蛋白(A0A024RDE6);骨桥蛋白(A0A024RDJ0);骨桥蛋白(B7Z351);骨桥蛋白(F2YQ21);骨桥蛋白(P10451);p53(P04637);PAGE-4(O60829);PAI-1(P05121);PAI-2(P05120);PAP(Q06141);PAP(Q53S56);PATE(Q8WXA2);PAX3(P23760);PAX5(Q02548);PD1L1(Q9NZQ7);PDCD1(Q15116);PDEF(O95238);PECA1(P16284);PGCB(Q96GW7);PGFRB(P09619);Pim-1_-激酶(A0A024RD25);Pin-1(O15428);Pin-1(Q13526);Pin-1(Q49AR7);PLAC1(Q9HBJ0);PMEL(P40967);PML(P29590);POTEF(A5A3E0);POTE(Q86YR6);PRAME(A0A024R1E6);PRAME(P78395);PRDX5/m(P30044);PRM2(P04554);前列腺特异性蛋白(prostein)(Q96JT2);蛋白酶-3(D6CHE9);蛋白酶-3(P24158);PSA(P55786);PSB9(P28065);PSCA(D3DWI6);PSCA(O43653);PSGR(Q9H255);PSM(Q04609);PTPRC(NP_002829);RAB8A(P61006);RAGE-1(Q9UQ07);RARA(P10276);RASH(P01112);RASK(P01116);RASN(P01111);RGS5(O15539);RHAMM/CD168(O75330);RHOC(P08134);RSSA(P08865);RU1(Q9UHJ3);RU2(Q9UHG0);RUNX1(Q01196);S-100(V9HW39);SAGE(Q9NXZ1);SART-_1(O43290);SART-2(Q9UL01);SART-3(Q15020);SEPR(Q12884);SERPINB5(P36952);SIA7F(Q969X2);SIA8A(Q92185);SIAT9(Q9UNP4);SIRT2/m(A0A024R0G8);SIRT2/m(Q8IXJ6);SOX10(P56693);SP17(Q15506);SPNXA(Q9NS26);SPXN3(Q5MJ09);SSX-1(Q16384);SSX-2(Q16385);SSX3(Q99909);SSX-4(O60224);ST1A1(P50225);STAG2(Q8N3U4-2);STAMP-1(Q8NFT2);STEAP-1(A0A024RA63);STEAP-1(Q9UHE8);存活蛋白-2B(O15392-2);存活蛋白(O15392);SYCP1(A0A024R0I2);SYCP1(B7ZLS9);SYCP1(Q15431);SYCP1(Q3MHC4);SYT-SSX-1(A4PIV7);SYT-SSX-1(A4PIV8);SYT-SSX-2(A4PIV9);SYT-SSX-2(A4PIW0);TARP(Q0VGM3);TCRg(A2JGV3);TF2AA(P52655);TGFB1(P01137);TGFR2(P37173);TGM-4(B2R7D1);TIE2(Q02763);TKTL1(P51854);TPI/m(P60174);TRGV11(Q99601);TRGV9(A4D1X2);TRGV9(Q99603);TRGV9(Q99604);TRPC1(P48995);TRP-p8(Q7Z2W7);TSG10(Q9BZW7);TSPY1(Q01534);TVC_TRGV3(M13231.1);TX101(Q9BY14-2);酪氨酸酶(A0A024DBG7);酪氨酸酶(L8B082);酪氨酸酶(L8B086);酪氨酸酶(L8B0B9);酪氨酸酶(O75767);酪氨酸酶(P14679);酪氨酸酶(U3M8N0);酪氨酸酶(U3M9D5);酪氨酸酶(U3M9J2);TYRP1(P17643);TYRP2(P40126);UPA(Q96NZ9);VEGFR1(B5A924);WT1(A0A0H5AUY0);WT1

(P19544);WT1(Q06250)and XAGE1(Q9HD64)。

[0077] 全长和野生型肿瘤抗原

[0078] 根据优选的实施方式,本发明组合的表位编码RNA的至少一种编码序列编码全长肿瘤抗原(并因此编码由其包含的至少一个表位),其中肿瘤抗原是选自列表1中列出的抗原,优选地是选自在列表1的对应列下提供的数据库登录号定义的抗原的抗原。

[0079] 可选地,本发明组合的表位编码RNA的至少一个编码序列包含核酸序列"变体"或由其组成,所述核酸序列"变体"与至少一种核酸残基中的各自天然存在的(野生型)核酸序列不同,优选不导致编码的氨基酸序列的改变(由于简并的遗传密码)。因此,核酸序列"变体"可以编码全长的野生型肿瘤抗原。根据优选的实施方式,所述编码全长野生型肿瘤抗原的"变体"核酸序列包含与如列表1中所定义的编码肿瘤抗原的野生型核酸序列(优选地选自由列表1中的对应列提供的数据库登录号定义的抗原的抗原)或其变体或片段具有至少5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%、优选至少70%、更优选至少80%、甚至更优选至少85%、甚至更优选至少90%、最优选至少95%或甚至97%的序列同一性的核酸序列或由其组成。

[0080] 肿瘤抗原变体

[0081] 根据进一步优选的实施方式,本发明组合的表位编码RNA的至少一个编码序列编码肿瘤抗原的变体(并因此编码由其包含的至少一个表位),其中肿瘤抗原是选自列表1中列出的抗原的抗原,优选地是选自在列表1中各自栏下提供的数据库登录号所定义的抗原的抗原。所述肿瘤抗原的"变体"通常可包含与各自天然存在的(野生型)全长肿瘤抗原的氨基酸序列具有至少5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%、优选至少70%、更优选至少80%、甚至更优选至少85%、甚至更优选至少90%、最优选至少95%或甚至97%的序列同一性的氨基酸序列,其中肿瘤抗原是选自列表1中列举的抗原,优选地是选自在列表1的对应列下提供的数据库登录号定义的抗原的抗原。

[0082] 因此,本发明组合的表位编码RNA的至少一个编码序列可以优选包含编码肿瘤抗原(由其包含的至少一个表位)的变体的核酸序列"变体"或由其组成,其中肿瘤抗原是选自列表1中列出的抗原的抗原,优选地是选自列表1中各列提供的数据库登录号所定义的抗原的抗原。根据优选的实施方式,所述核酸序列"变体"包含与编码如列表1中所定义的肿瘤抗原的野生型氨基酸序列(优选地选自列表1中各栏下提供的数据库登录号所定义的抗原的抗原)或其变体或片段具有至少5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%,优选至少70%、更优选至少80%、甚至更优选至少85%、甚至更优选至少90%、最优选至少95%或甚至97%序列同一性的核酸序列,或由其组成。

[0083] 肿瘤抗原片段

[0084] 根据进一步优选的实施方式,本发明组合的RNA的至少一个编码序列编码优选包含所述肿瘤抗原(或其变体)的至少一个表位的肿瘤抗原(或其变体)的片段,其中肿瘤抗原是选自列表1中列出的抗原的抗原,优选地是选自列表1中数据库登录号所定义的抗原的抗原,或其变体。所述肿瘤抗原(或其变体)的片段通常可包含与各自的全长肿瘤抗原(或其变

体)的氨基酸序列具有至少5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%、优选至少70%、更优选至少80%、甚至更优选至少85%、甚至更优选至少90%、和最优选至少95%或甚至97%的序列同一性的氨基酸序列,或由其组成,其中肿瘤抗原是选自列表1中列出的抗原的抗原,优选地是选自列表1中数据库登录号所定义的抗原的抗原。

[0085] 因此,本发明组合的表位编码RNA的至少一个编码序列可优选地包含编码肿瘤抗原(和由其包含的至少一个表位)的片段的氨基酸序列"片段"或由其组成,其中肿瘤抗原是选自列表1中列举的抗原的抗原,优选地是选自列表1中提供的数据库登录号定义的抗原的抗原。根据优选的实施方式,所述氨基酸序列"片段"包含与编码如列表1中定义的全长肿瘤抗原(或其变体)(优选地选自列表1中提供的数据库登录号定义的抗原的抗原)的氨基酸序列(或其变体)具有至少5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、or 99%、优选至少70%、更优选至少80%、甚至更优选至少85%、甚至更优选至少90%、最优选至少95%或甚至97%的序列同一性的氨基酸序列,或由其组成。

[0086] 根据优选的实施方式,表位编码RNA的至少一个编码序列因此编码肿瘤抗原(或其变体),或所述肿瘤抗原(或其变体)的片段,其中肿瘤抗原优选地选自1A01_HLA-A/m;1A02;5T4;ACRBP;AFP;AKAP4;α-辅肌动蛋白-_4/m;α-甲酰基-辅酶_A_消旋酶;ANDR;ART-4;ARTC1/m;AURKB;B2MG;B3GN5;B4GN1;B7H4;BAGE-1;BASI;BCL-2;bcr/abl;β-联蛋白/m;BING-4;BIRC7;BRCA1/m;BY55;钙网蛋白;CAMEL;CASP-8/m;CASPA;组织蛋白酶_B;组织蛋白酶_L;CD1A;CD1B;CD1C;CD1D;CD1E;CD20;CD22;CD276;CD33;CD3E;CD3Z;CD44_同种型_1;CD44_同种型_6;CD4;CD52;CD55;CD56;CD80;CD86;CD8A;CDC27/m;CDE30;CDK4/m;CDKN2A/m;CEA;CEAM6;CH3L2;CLCA2;CML28;CML66;COA-1/m;毛状样_蛋白;胶原_XXIII;COX-2;CP1B1;CSAG2;CT45A1;CT55;CT-_9/BRD6;CTAG2_同种型_LAGE-1A;CTAG2_同种型_LAGE-1B;CTCFL;Cten;细胞周期蛋白_B1;细胞周期蛋白_D1;cyp-B;DAM-10;DEP1A;E7;EF1A2;EFTUD2/m;EGFR;EGLN3;ELF2/m;EMMPRIN;EpCam;EphA2;EphA3;ErbB3;ERBB4;ERG;ETV6;EWS;EZH2;FABP7;FCGR3A_版本_1;FCGR3A_版本_2;FGF5;FGFR2;纤连蛋白;FOS;FOXP3;FUT1;G250;GAGE-1;GAGE-2;GAGE-3;GAGE-4;GAGE-5;GAGE-6;GAGE7b;GAGE-8_(GAGE-2D);GASR;GnT-V;GPC3;GPNMB/m;GRM3;HAGE;丝氨酸穿膜蛋白酶;Her2/neu;HLA-A2/m;同源异型框_NKX3.1;HOM-TES-85;HPG1;HS71A;HS71B;HST-2;hTERT;iCE;IF2B3;IL10;IL-13Ra2;IL2-RA;IL2-RB;IL2-RG;IL-5;IMP3;ITA5;ITB1;ITB6;激肽释放酶-2;激肽释放酶-4;KI20A;KIAA0205;KIF2C;KK-LC-1;LDLR;LGMN;LIRB2;LY6K;MAGA5;MAGA8;MAGAB;MAGE-A10;MAGE-A12;MAGE-A1;MAGE-A2;MAGE-A3;MAGE-A4;MAGE-A6;MAGE-A9;MAGE-B10;MAGE-B16;MAGE-B17;MAGE-_B1;MAGE-B2;MAGE-B3;MAGE-B4;MAGE-B5;MAGE-B6;MAGE-C1;MAGE-C2;MAGE-C3;MAGE-D1;MAGE-D2;MAGE-D4;MAGE-_E1;MAGE-E1_(MAGE1);MAGE-E2;MAGE-F1;MAGE-H1;MAGEL2;乳腺球蛋白_A;MART-1/melan-A;MART-2;MC1_R;M-CSF;间皮素;MITF;MMP1_1;MMP7;MUC-1;MUM-1/m;MUM-2/m;MYCN;MYO1A;MYO1B;MYO1C;MYO1D;MYO1E;MYO1F;MYO1G;MYO1H;NA17;NA88-A;Neo-PAP;NFYC/m;NGEP;NPM;NRCAM;NSE;NUF2;NY-ESO-1;OA1;OGT;OS-9;骨钙蛋白;骨桥蛋白;p53;PAGE-4;PAI-1;PAI-2;PAP;PATE;PAX3;PAX5;PD1L1;PDCD1;PDEF;PECA1;PGCB;PGFRB;Pim-1_-激酶;Pin-1;PLAC1;PMEL;PML;POTEF;POTE;

PRAME;PRDX5/m;PRM2;前列腺特异性蛋白;蛋白酶-3;PSA;PSB9;PSCA;PSGR;PSM;PTPRC;RAB8A;RAGE-1;RARA;RASH;RASK;RASN;RGS5;RHAMM/CD168;RHOC;RSSA;RU1;RU2;RUNX1;S-100;SAGE;SART-_1;SART-2;SART-3;SEPR;SERPINB5;SIA7F;SIA8A;SIAT9;SIRT2/m;SOX10;SP17;SPNXA;SPXN3;SSX-1;SSX-2;SSX3;SSX-4;ST1A1;STAG2;STAMP-1;STEAP-1;存活蛋白-2B;存活蛋白;SYCP1;SYT-SSX-1;SYT-SSX-2;TARP;TCRg;TF2AA;TGFB1;TGFR2;TGM-4;TIE2;TKTL1;TPI/m;TRGV11;TRGV9;TRPC1;TRP-p8;TSG10;TSPY1;TVC_(TRGV3);TX101;酪氨酸酶;TYRP1;TYRP2;UPA;VEGFR1;WT1;和XAGE1。所述肿瘤抗原或其变体或片段优选地包含至少一个功能表位。

[0087] 其它有用的抗原、其变体、片段和衍生物，以及编码它们的RNA以及包含所述RNA的组合物公开于WO2013120500和WO2013120626中，其通过引用以其整体并入本文，并且所述RNA和组合物同样被设想为本发明组合的部分。

[0088] 在本发明意义上的合适的肿瘤抗原或其变体或片段是根据专利申请WO2017182634的SEQ ID NO:505-4033;4561-4591、专利申请WO2009046974的SEQ ID NO:1-26、和专利申请WO2017182634的SEQ ID NO:505-4033的核酸序列，其通过引用被包括在本文中。

[0089] 肿瘤抗原的组合

[0090] 根据进一步优选的实施方式，本发明组合包括多种、或多于一种、优选地2至20种，更优选地2至20种，最优选地2至6种如本文定义的表位编码RNA。所述组合通常包含多于一种表位编码RNA，其优选地编码优选地包含或提供特定地不同肿瘤抗原或致病抗原的不同表位。

[0091] 根据特别优选的实施方式，本发明组合包含编码选自NY-ESO-1、MAGE-C1、MAGE-C2、存活蛋白、(任选地)5T4和(任选地)MUC-1的肿瘤抗原，或任意前述肿瘤抗原的变体或片段的至少一种RNA。

[0092] 在该上下文中，特别优选地是，本发明组合(具体地当设想用于治疗肺癌，特别地非小细胞肺癌(NSCLC)时)，包含多种(通常至少1、2、3、4、5、6或多于10种，如，2至10种，优选地2至6种)，优选地六种表位编码RNA，和所述表位编码RNA优选地为单顺反子的并且编码：

[0093] a)NY-ESO-1、或其片段、变体或衍生物的至少一种表位；和

[0094] d)MAGE-C1、或其片段、变体或衍生物的至少一种表位；和

[0095] e)MAGE-C2、或其片段、变体或衍生物的至少一种表位；和；

[0096] f)存活蛋白、或其片段、变体或衍生物的至少一种表位；和；和任选地

[0097] g)5T4、或其片段、变体或衍生物的至少一种表位；和；和任选地

[0098] h)MUC-1、或其片段、变体或衍生物的至少一种表位；和；和任选地。

[0099] 在特别优选的实施方式中，组合包含至少一种RNA、优选地至少两种RNA、更优选地至少三种RNA、甚至更优选地至少四种RNA、甚至更优选地至少五种RNA、或甚至更优选地至少六种RNA，每种包含至少一个编码序列，至少一个编码序列选自包括SEQ ID NO:1、2、3、4、5或6(PCT/EP2014/002299的SEQ ID NO:19、20、21、22、23和24)的RNA序列，或与SEQ ID NO:1、2、3、4、5或6(PCT/EP2014/002299的SEQ ID NO:19、20、21、22、23和24)具有至少5％、10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、or 99％、优选地至少70％、更优选地至少80％、甚

至更优选地至少85％、甚至更优选地至少90％和最更优选地至少95％或甚至97％的序列同一性的RNA序列，或由其组成。其它有用的抗原、变体、片段和衍生物，以及编码它们的RNA以及包含所述RNA的组合物公开于PCT/EP2008/008503(公布于WO2009/046974A2)和PCT/EP2014/002299(公布为WO2015/024666A1)，其通过引用以其整体并入本文，并且所述RNA和组合物同样被设想为本发明组合的一部分。

[0100] 在下文中，描述了本发明组合的表位编码RNA的各种实施方式、设计和修改。所述表位编码RNA可以例如是(a)单-，双-或多顺反子的，(b)关于它们的化学和/或序列修饰的，和/或(c)可以包含各种结构元件，例如5'帽、聚(A)序列或信号、聚(C)序列、UTR组蛋白茎环、信号肽等。

[0101] 应注意，本发明组合的PD-1和/或LAG-3抑制剂可以以核酸的形式提供，如，编码所述PD-1和/或LAG-3抑制剂的RNA(例如抗体、融合蛋白或可溶性受体)。此类编码PD-1和/或LAG-3抑制剂的核酸，特别是RNA，可包含与本文表位编码RNA的上下文中所述相同的修饰。也就是说，这种“抑制剂编码”核酸，特别是RNA，可以是(a)单-，双-或多顺反子的，(b)关于其化学和/或序列修饰的和/或(c)可以包括如本文所述的各种结构元件，例如5'帽、聚(A)序列或信号、聚(C)序列、UTR、组蛋白茎环、信号肽等。即，经适当修改后，关于根据下面在表位编码RNA的上下文中描述的(a)-(c)的修改/设计的公开内容同样适用于核酸，和特别是编码PD-1和/或LAG-3抑制剂的RNA。

[0102] 单-、双-或多顺反子RNA

[0103] 根据本发明的一些实施方式，表位编码RNA是单-、双-或多顺反子的，优选如本文所定义。双-或多顺反子RNA通常包含两个(双顺反子)或更多个(多顺反子)可读框(ORF)。在该上下文中的可读框是可翻译成肽或蛋白的密码子序列。双-或多顺反子表位编码RNA中的编码序列优选编码如本文所定义的不同表位(或包含所述表位的抗原或其变体或片段)。双-或甚至多顺反子表位编码RNA可以编码例如本文定义的至少两个、三个、四个、五个、六个或更多个(优选不同的)表位(或包含所述表位的抗原或其变体或片段)。术语“编码两个或更多个表位/途径抑制剂”可以意指(但不限于此)，双-或甚至多顺反子表位编码RNA可以编码例如，至少两个、三个、四个、五个、六个或更多个(优选不同的)表位(或包含所述表位的抗原或其变体或片段)。

[0104] 在一些实施方式中，编码两个或更多个表位(或包含所述表位的抗原或其变体或片段)的编码序列可以在双-或多顺反子RNA中通过至少一个IRES(内部核糖体进入位点)序列分离。术语“IRES”(内部核糖体进入位点)是指允许翻译起始的RNA序列。IRES可以作为唯一的核糖体结合位点起作用，但它也可以用于提供如上定义的双-或甚至多顺反子表位编码RNA，其编码几个表位(或包含所述表位的抗原或其变体或片段)，其被核糖体独立地彼此翻译。可根据本发明使用的IRES序列的实例是来自小核糖核酸病毒(如FMDV)、瘟病毒(CFFV)、脊髓灰质炎病毒(PV)、脑心肌炎病毒(ECMV)、口蹄疫病毒(FMDV)，丙型肝炎病毒(HCV)、经典猪瘟病毒(CSFV)、小鼠白血病病毒(MLV)、猿猴免疫缺陷病毒(SIV)或蟋蟀麻痹病毒(CrPV)的那些序列。

[0105] 根据进一步的实施方式，本发明组合的表位编码RNA的至少一个编码序列可编码与或不与氨基酸接头序列连接的如本文所定义的至少两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个和更多个表位(或包含所述表位的抗原或其变体或片段)，其中所述接头序列可包含刚

性接头、柔性接头、可切割接头(如,自切割肽)或其组合。其中,表位(或包含所述表位的抗原或其变体或片段)可以是相同的或不同的或其组合。

[0106] 优选地,表位编码RNA的长度为约50至约20000、或100至约20000个核苷酸,优选地约250至约20000个核苷酸,更优选地约500至约10000个,甚至更优选地约500至约5000个。

[0107] 本发明组合的表位编码RNA可以进一步是单链或双链的。当作为双链RNA提供时,本发明组合的表位编码RNA优选地包含有义和对应的反义链。

[0108] 在优选实施方式中,本发明组合的表位编码RNA是mRNA、病毒RNA或复制子RNA,优选地是mRNA。

[0109] RNA修饰

[0110] 本文定义的核酸,特别是本发明组合的至少一种表位编码RNA,或本文定义的任何其他核酸,可以以修饰的核酸的形式提供。下文描述了在本发明的上下文中设想的合适的核酸修饰。如上所述,表述"如本文所定义的任何其他核酸"特别指核酸,具体地是RNA,在本文中公开为编码PD-1或LAG-3途径抑制剂(如抗体、拮抗结合蛋白、肽、融合蛋白、溶性受体)。表述可以但通常不是指本文公开的拮抗核酸。

[0111] 根据优选的实施方式,本发明组合的至少一种表位编码RNA(序列)(或任何其他核酸,特别是如本文所定义的RNA)被修饰为本文所定义的。在该上下文中,如本文所定义的修饰优选地导致所述RNA或本文所定义的其他核酸的稳定。更优选地,本发明因此提供包含稳定的表位编码RNA(或任何其他核酸,特别是如本文所定义的RNA)的本发明组合。

[0112] 根据优选的实施方式,本发明组合的表位编码RNA(或任何其他核酸,特别是如本文所定义的RNA)因此可以作为"稳定的"表位编码RNA提供,特别是mRNA,即其基本上对体内降解具有抗性(如通过外切或内切核酸酶)。

[0113] 这种稳定可以例如通过表位编码RNA(或任何其他核酸,特别是如本文定义的RNA)的修饰的磷酸主链实现。与本发明有关的骨架修饰是一种修饰,其中所述RNA(或任何其他核酸,特别是如本文所定义的RNA)中包含的核苷酸骨架的磷酸酯被化学修饰。在可以优选用于该连接中的核苷酸含有如硫代磷酸酯修饰的磷酸骨架、磷酸骨架中含有的磷酸氧之一被硫原子取代。稳定的表位编码RNA(或其他核酸,特别是如本文所定义的RNA)可以进一步包括,例如:非离子磷酸酯类似物,例如烷基和芳基膦酸酯,其中带电荷的膦酸氧被烷基或芳基,或磷酸二酯和烷基磷酸三酯取代,其中带电荷的氧残基以烷基化形式存在。这种骨架修饰通常包括但不限于对甲基膦酸酯、氨基磷酸酯和硫代磷酸酯的修饰(例如胞苷-5'-O-(1-硫代磷酸酯))。

[0114] 下面,描述了具体的修饰,其优选的能够"稳定"本发明组合的表位编码RNA(或任何其他核酸,特别是如本文定义的RNA)。

[0115] 化学修饰

[0116] 如本文所使用的"修饰"可以指包含骨架修饰以及糖修饰或碱基修饰的化学修饰。

[0117] 在该上下文中,"修饰的"表位编码RNA(或任何其他核酸,特别是如本文所定义的RNA)可以含有核苷酸类似物/修饰,如,骨架修饰,糖修饰或碱基修饰。与本发明有关的骨架修饰是这样修饰,其中包含在本文表位编码RNA(或本文定义的任何其他核酸,特别是如本文定义的RNA)中的核苷酸骨架的磷酸酯被化学修饰。与本发明有关的糖修饰是表位编码RNA(或任何其他核酸,特别是如本文定义的RNA)的核苷酸的糖的化学修饰。此外,与本发明

有关的碱基修饰是表位编码RNA(或任何其他核酸,特别是如本文定义的RNA)的核苷酸的碱基部分的化学修饰。在该上下文中,核苷酸类似物或修饰优选选自核苷酸类似物,其适用于转录和/或翻译。

[0118] 糖修饰:

[0119] 可以掺入"修饰的"表位编码RNA(或任何其他核酸,特别是如本文定义的RNA)中的修饰的核苷和核苷酸可以在糖部分中进行修饰。例如,2"羟基(OH)可以被许多不同的"氧基"或"脱氧基"取代基修饰或取代。"氧基"-2"羟基修饰的实例包括但不限于烷氧基或芳氧基(-OR,如R=H,烷基,环烷基,芳基,芳烷基,杂芳基或糖);聚乙二醇(PEG),-O(CH_2CH_2O)$_n$$CH_2CH_2OR$;"锁"核酸(LNA),其中2"羟基如通过亚甲基桥连接至相同核糖的4"碳;和氨基(-O-氨基,其中氨基,如NRR,可以是烷基氨基、二烷基氨基、杂环基、芳基氨基、二芳基氨基、杂芳基氨基或二杂芳基氨基、乙二胺,聚氨基)或氨基烷氧基。

[0120] "脱氧基"修饰包括氢、氨基(例如NH_2;烷基氨基、二烷基氨基、杂环基、芳基氨基、二芳基氨基、杂芳基氨基、二杂芳基氨基或氨基酸);或氨基可通过接头与糖连接,其中接头包含原子C、N和O中的一个或多个。

[0121] 糖基团还可含有一个或多个碳,其具有与核糖中对应碳相反的立体化学构型。因此,修饰的表位编码RNA(或任何其他核酸,特别是如本文所定义的RNA)可包括含有例如阿拉伯糖的核苷酸作为糖。

[0122] 骨架修饰:

[0123] 可以掺入修饰的表位编码RNA(或任何其他核酸,特别是如本文定义的RNA)中的磷酸酯骨架可以进一步在(修饰的)核苷和核苷酸中进行修饰。

[0124] 可以通过用不同的取代基取代一个或多个氧原子来修饰骨架的磷酸酯基团。此外,(经修饰的)核苷和核苷酸可包括用本文所述的经修饰的磷酸酯完全取代未经修饰的磷酸酯部分。

[0125] 修饰的磷酸酯基团的实例包括但不限于硫代磷酸酯、磷酸硒酸酯、硼酸磷酸酯、硼酸磷酸酯类、氢膦酸酯、氨基磷酸酯、烷基或芳基膦酸酯和磷酸三酯。二硫代磷酸酯具有被硫取代的非连接氧。磷酸酯接头也可以通过用氮(桥连的氨基磷酸酯)、硫(桥连的硫代磷酸酯)和碳(桥连的亚甲基-膦酸酯)取代连接氧进行修饰。

[0126] 碱基修饰:

[0127] 可以掺入"修饰的"表位编码RNA(或任何其他核酸,特别是如本文定义的RNA)中的修饰的核苷和核苷酸可以在核碱基部分中进一步进行修饰。

[0128] 在RNA中发现的核碱基的实例包括但不限于腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶和尿嘧啶。例如,本文所述的核苷(核苷)和核苷酸可在大沟面(major groove face)上进行化学改性。在一些实施方式中,大沟化学修饰可包括氨基、硫醇基、烷基或卤素基团。在本发明的一些实施方式中,核苷酸类似物/修饰选自碱基修饰,这些碱基修饰优选地选自:2-氨基-6-氯嘌呤核糖核苷(riboside)-5'-三磷酸酯、2-氨基嘌呤-核糖核苷-5'-三磷酸酯;2-氨基腺苷-5'-三磷酸酯、2"-氨基-2"-脱氧胞苷-三磷酸酯、2-硫代胞苷-5'-三磷酸酯、2-硫代尿苷-5'-三磷酸酯、2"-氟胸苷-5'-三磷酸酯、2"-O-甲基-肌苷-5'-三磷酸酯4-硫代尿苷-5'-三磷酸酯、5-氨基烯丙基胞苷-5'-三磷酸酯、5-氨基烯丙基尿苷-5'-三磷酸酯、5-溴胞苷-5'-三磷酸酯、5-溴尿苷-5'-三磷酸酯、5-溴-2"-脱氧胞苷-5'-三磷酸酯、5-溴-2"-脱氧尿苷-5'-三

磷酸酯、5-碘胞苷-5'-三磷酸酯、5-碘-2"-脱氧胞苷-5'-三磷酸酯、5-碘尿苷-5'-三磷酸酯、5-碘-2"-脱氧尿苷-5'-三磷酸酯、5-甲基胞苷-5'-三磷酸酯、5-甲基尿苷-5'-三磷酸酯、5-丙炔基-2"-脱氧胞苷-5'-三磷酸酯、5-丙炔基-2"-脱氧尿苷-5'-三磷酸酯、6-氮胞苷-5'-三磷酸酯、6-氮尿苷-5'-三磷酸酯、6-氯嘌呤核糖核苷-5'-三磷酸酯、7-脱氮腺苷-5'-三磷酸酯、7-脱氮鸟苷-5'-三磷酸酯、8-氮腺苷-5'-三磷酸酯、8-叠氮腺苷-5'-三磷酸酯、苯并咪唑-核糖核苷-5'-三磷酸酯、N1-甲基腺苷-5'-三磷酸酯、N1-甲基鸟苷-5'-三磷酸酯、N6-甲基腺苷-5'-三磷酸酯、06-甲基鸟苷-5'-三磷酸酯、假尿苷-5'-三磷酸酯、或嘌呤霉素-5'-三磷酸酯、黄苷-5'-三磷酸酯。对于碱基修饰特别优选的核苷酸选自由以下组成的碱基修饰的核苷酸的组:5-甲基胞苷-5'-三磷酸酯、7-脱氮鸟苷-5'-三磷酸酯、5-溴胞苷-5'-三磷酸酯、和假尿苷-5'-三磷酸酯。在一些实施方式中,修饰的核苷包括吡啶-4-酮核糖核苷、5-氮-尿苷、2-硫代-5-氮-尿苷、2-硫代尿苷、4-硫代-假尿苷、2-硫代-假尿苷、5-羟基尿苷、3-甲基尿苷、5-羧甲基-尿苷、1-羧甲基-假尿苷、5-丙炔基-尿苷、1-丙炔基-假尿苷、5-牛磺酸(taurino)甲基尿苷、1-牛磺酸甲基-假尿苷、5-牛磺酸甲基-2-硫代-尿苷、1-牛磺酸甲基-4-硫代-尿苷、5-甲基-尿苷、1-甲基-假尿苷、4-硫代-1-甲基-假尿苷、2-硫代-1-甲基-假尿苷、1-甲基-1-脱氮-假尿苷、2-硫代-1-甲基-1-脱氮-假尿苷、二氢尿苷、二氢假尿苷、2-硫代-二氢尿苷、2-硫代-二氢假尿苷、2-甲氧基尿苷、2-甲氧基-4-硫代-尿苷、4-甲氧基-假尿苷、和4-甲氧基-2-硫代-假尿苷。

[0129] 在一些实施方式中,修饰的核苷包括5-氮-胞苷、假异胞苷(pseudoisocytidine)、3-甲基-胞苷、N4-乙酰基胞苷、5-甲酰基胞苷、N4-甲基胞苷、5-羟基甲基胞苷、1-甲基-假异胞苷、吡咯-胞苷、吡咯-假异胞苷、2-硫代-胞苷、2-硫代-5-甲基-胞苷、4-硫代-假异胞苷、4-硫代-1-甲基-假异胞苷、4-硫代-1-甲基-1-脱氮-假异胞苷、1-甲基-1-脱氮-假异胞苷、zebularine、5-氮-zebularine、5-甲基-zebularine、5-氮-2-硫代-zebularine、2-硫代-zebularine、2-甲氧基-胞苷、2-甲氧基-5-甲基-胞苷、4-甲氧基-假异胞苷、和4-甲氧基-1-甲基-假异胞苷.在其他实施方式中,修饰的核苷包括2-氨基嘌呤、2、6-二氨基嘌呤、7-脱氮-腺嘌呤、7-脱氮-8-氮-腺嘌呤、7-脱氮-2-氨基嘌呤、7-脱氮-8-氮-2-氨基嘌呤、7-脱氮-2,6-二氨基嘌呤、7-脱氮-8-氮-2,6-二氨基嘌呤、1-甲基腺苷、N6-甲基腺苷、N6-异戊烯基腺苷、N6-(顺-羟基异戊烯基)腺苷、2-甲基硫代-N6-(顺-羟基异戊烯基)腺苷、N6-甘氨酸基氨基甲酰基腺苷、N6-苏氨酸基氨基甲酰基腺苷、2-甲基硫代-N6-苏氨酸基氨基甲酰基腺苷、N6,N6-二甲基腺苷、7-甲基腺嘌呤、2-甲基硫代-腺嘌呤、和2-甲氧基-腺嘌呤。在其他实施方式中,修饰的核苷包括肌苷、1-甲基-肌苷、怀俄苷、怀丁苷、7-脱氮-鸟苷、7-脱氮-8-氮-鸟苷、6-硫代-鸟苷、6-硫代-7-脱氮-鸟苷、6-硫代-7-脱氮-8-氮-鸟苷、7-甲基-鸟苷、6-硫代-7-甲基-鸟苷、7-甲基肌苷、6-甲氧基-鸟苷、1-甲基鸟苷、N2-甲基鸟苷、N2,N2-二甲基鸟苷、8-氧-鸟苷、7-甲基-8-氧-鸟苷、1-甲基-6-硫代-鸟苷、N2-甲基-6-硫代-鸟苷、和N2,N2-二甲基-6-硫代-鸟苷。在一些实施方式中,核苷酸可以在大沟面上进行修饰并且可以包括用甲基或卤代基团取代尿嘧啶的C-5上的氢。在具体实施方式中,修饰的核苷是5'-O-(1-硫代磷酸酯)-腺苷、5'-O-(1-硫代磷酸酯)-胞苷、5'-O-(1-硫代磷酸酯)-鸟苷、5'-O-(1-硫代磷酸酯)-尿苷或5'-O-(1-硫代磷酸酯)-假尿苷。

[0130] 在一些实施方式中,修饰的RNA(或任意修饰的其他核酸,特别是如本文定义的RNA)可以包括核苷修饰,其选自6-氮-胞苷、2-硫代-胞苷、α-硫代-胞苷、假-异-胞苷、5-氨

基烯丙基-尿苷、5-碘-尿苷、N1-甲基-假尿苷、5,6-二氢尿苷、α-硫代-尿苷、4-硫代-尿苷、6-氮-尿苷、5-羟基-尿苷、脱氧-胸苷、5-甲基-尿苷、吡咯-胞苷、肌苷、α-硫代-鸟苷、6-甲基-鸟苷、5-甲基-胞苷(cytdine)、8-氧-鸟苷、7-脱氮-鸟苷、N1-甲基-腺苷、2-氨基-6-氯-嘌呤、N6-甲基-2-氨基-嘌呤、假-异-胞苷、6-氯-嘌呤、N6-甲基-腺苷、α-硫代-腺苷、8-叠氮-腺苷、7-脱氮-腺苷。在一些实施方式中,修饰的表位编码RNA(或任意其他核酸,特别是如本文定义的RNA)不包括本文所描述的任何化学修饰。所述修饰的表位编码RNA(或任意其他核酸,特别是如本文定义的RNA)可以包括以下描述的脂质修饰或序列修饰。

[0131] 脂质修饰

[0132] 根据进一步实施方式,修饰的表位编码RNA(或任何其他核酸,特别是如本文所定义的RNA)含有至少一种脂质修饰。

[0133] 这种脂质修饰的表位编码RNA(或所述其他核酸,特别是RNA)通常包含(i)如本文所定义的表位编码RNA(或所述其他核酸,特别是RNA),(ii)与所述表位编码RNA(或所述其他核酸,特别是RNA)共价连接的至少一个接头,和(iii)与对应接头共价连接的至少一种脂质。

[0134] 可选地,脂质修饰的表位编码RNA(或如本文定义的其他核酸)包含至少一个表位编码RNA(或所述其他核酸,特别是RNA)和与所述表位编码RNA(或所述其他核酸,特别是RNA)共价连接(没有接头)的至少一种(双功能)脂质。

[0135] 可选地,脂质修饰的表位编码RNA(或任意其他核酸,特别是如本文定义的RNA)包含(i)表位编码RNA(或所述其他核酸,特别是RNA),(ii)与所述表位编码RNA(或所述其他核酸,特别是RNA)共价连接的至少一个接头,和(iii)与各自接头共价连接的至少一种脂质,以及(iv)与所述表位编码RNA(或所述其他核酸,特别是RNA)共价连接(没有接头)的至少一种(双功能)脂质。

[0136] 在该上下文中,特别优选的是,脂质修饰存在于线性表位编码RNA序列(或如本文定义的任意其他核酸序列)的末端。

[0137] 序列修饰

[0138] 根据优选的实施方式,本发明组合的表位编码RNA,优选地mRNA或本文定义的任何其他核酸(特别是编码如本文所定义的PD-1或LAG-3途径抑制剂的核酸)包含如下所描述的至少一个序列修饰:

[0139] G/C含量修饰(content modification)

[0140] 根据优选的实施方式,通过修饰所述RNA(或所述其他核酸,特别是RNA)的鸟苷/胞嘧啶(G/C)含量,优选地所述RNA(或所述其他核酸,特别是RNA)的至少一种编码序列,可以修饰和因此稳定本发明组合的表位编码RNA,优选地mRNA(或任意其他核酸,特别是如本文定义的RNA)。换句话说,本发明组合的表位编码RNA(或任意其他核酸,特别是如本文定义的RNA)可以进行G/C修饰。

[0141] "G/C-修饰的"RNA通常包含基于修饰的野生型RNA序列的RNA序列,并且与所述野生型RNA序列相比包含改变数量的鸟苷和/或胞嘧啶核苷酸。通过用含有鸟苷或胞嘧啶核苷酸的"同义"密码子取代含有腺苷或胸苷核苷酸的密码子,可以产生这种改变数量的G/C核苷酸。因此,密码子取代优选地不改变编码的氨基酸残基,而是专门改变核酸分子的G/C含量。

[0142] 在本发明的特别优选的实施方式中，与各自野生型RNA的——即未修饰的RNA(或所述其他核酸，特别是RNA的)——编码序列的G/C含量相比，本发明组合的表位编码RNA(或任意其他核酸，特别是如本文定义的RNA)的编码序列的G/C含量被修饰，特别是被增加。与由各自的野生型RNA(或所述其他核酸，特别是RNA)编码的氨基酸序列相比，由RNA(或任意其他核酸，特别是如本文定义的RNA)编码的氨基酸序列优选地不进行修饰。

[0143] 本发明组合的表位编码RNA(或任意其他核酸，特别是如本文定义的RNA)的这种修饰基于以下事实：待翻译的任何RNA(或其他核酸，特别是RNA)区域的序列对于所述RNA(或所述其他核酸，特别是RNA)的有效翻译是重要的。因此，RNA(或所述其他核酸，特别是RNA)的组成和各种核苷酸的序列是重要的。特别地，具有增加的G(鸟苷)/C(胞嘧啶)含量的序列比具有增加的A(腺苷)/U(尿嘧啶)含量的序列更稳定。

[0144] 根据本发明，表位编码RNA(或任意其他核酸，特别是如本文定义的RNA)的密码子因此与各自的野生型RNA(或所述其他核酸，特别是RNA)相比是不同的，同时保留翻译的氨基酸序列，使得它们包括增加量的G/C核苷酸。

[0145] 关于几个密码子编码一种或同一种氨基酸(所谓的遗传密码的变性)的事实，可以确定稳定性的最有利密码子(所谓的替代密码子使用)。取决于待由表位编码RNA(或任意其他核酸，特别是如本文定义的RNA)编码的氨基酸，与其野生型序列相比，存在修饰RNA(或所述其他核酸，特别是RNA)序列的各种可能性。在由仅含有G或C核苷酸的密码子编码的氨基酸的情况下，不需要修饰密码子。

[0146] 因此，由于不存在A或U，Pro(CCC或CCG)、Arg(CGC或CGG)、Ala(GCC或GCG)和Gly(GGC或GGG)的密码子不需要修饰。相反，含有A和/或U核苷酸的密码子可以通过替换其他密码子来修饰，这些密码子编码相同的氨基酸但不含A和/或U。这些的例子是：Pro的密码子可以从CCU或CCA修饰为CCC或CCG；Arg的密码子可以从CGU或CGA或AGA或AGG修饰为CGC或CGG；Ala的密码子可以从GCU或GCA修饰为GCC或GCG；Gly的密码子可以从GGU或GGA修饰为GGC或GGG。在其他情况下，尽管不能从密码子中除去A或U核苷酸，但是可以通过使用含有较低含量的A和/或U核苷酸的密码子来降低A和U含量。这些的例子是：Phe的密码子可以从UUU修饰为UUC；Leu的密码子可以从UUA、UUG、CUU或CUA修饰为CUC或CUG；Ser的密码子可以从UCU或UCA或AGU修饰为UCC、UCG或AGC；Tyr的密码子可以从UAU修饰为UAC；Cys的密码子可以从UGU修饰为UGC；His的密码子可以从CAU修饰为CAC；Gln的密码子可以从CAA修饰为CAG；Ile的密码子可以从AUU或AUA修饰为AUC；Thr的密码子可以从ACU或ACA修饰为ACC或ACG；Asn的密码子可以从AAU修饰为AAC；Lys的密码子可以从AAA修饰为AAG；Val的密码子可以从GUU或GUA修饰为GUC或GUG；Asp的密码子可以从GAU修饰为GAC；Glu的密码子可以从GAA修饰为GAG的修饰；终止密码子UAA可以从UAG修饰为UGA。另一方面，在Met(AUG)和Trp(UGG)的密码子的情况下，没有序列修饰的可能性离子。上面列出的取代可以单独使用或以所有可能的组合使用，以与其特定的野生型RNA(或所述其他核酸，特别是RNA)序列(即原始序列)相比，增加本发明组合的至少一种RNA(或任意其他核酸，特别是如本文定义的RNA)的G/C含量。因此，例如，野生型序列中出现的Thr的所有密码子可以修饰为ACC(或ACG)。优选地，但是，例如，使用上述取代可能性的组合：

[0147] 编码原始序列(野生型RNA)中Thr的所有密码子取代为ACC(或ACG)和

[0148] 原始编码Ser的所有密码子取代为UCC(或UCG或AGC)；编码原始序列中的Ile的所

有密码子取代为AUC和

[0149] 原始编码Lys的所有密码子取代为AAG和

[0150] 原始编码Tyr的所有密码子取代为UAC;编码原始序列中的Val的所有密码子取代为GUC(或GUG)和

[0151] 原始编码Glu的所有密码子取代为GAG和

[0152] 原始编码Ala的所有密码子取代为GCC(或GCG)和

[0153] 原始编码Arg的所有密码子取代为CGC(或CGG);编码原始序列中的Val的所有密码子取代为GUC(或GUG)和

[0154] 原始编码Glu的所有密码子取代为GAG和

[0155] 原始编码Ala的所有密码子取代为GCC(或GCG)和

[0156] 原始编码Gly的所有密码子取代为GGC(或GGG)和

[0157] 原始编码Asn的所有密码子取代为AAC;编码原始序列中的Val的所有密码子取代为GUC(或GUG)和

[0158] 原始编码Phe的所有密码子取代为UUC和

[0159] 原始编码Cys的所有密码子取代为UGC和

[0160] 原始编码Leu的所有密码子取代为CUG(或CUC)和

[0161] 原始编码Gln的所有密码子取代为CAG和

[0162] 原始编码Pro的所有密码子取代为CCC(或CCG);等等。

[0163] 优选地,与编码如本文所定义的至少一个表位的野生型RNA(或所述其他核酸,特别是RNA)的编码序列的G/C含量相比,本发明组合的表位编码RNA(或任意其他核酸,特别是如本文定义的RNA)的编码序列的G/C含量增加至少7%、更优选至少15%、特别优选地至少20%。

[0164] 根据优选的实施方式,取代编码本文定义的表位(或包含所述表位的抗原或其变体或片段)的区域或野生型RNA序列的整个序列中至少5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、更优选地至少70%、甚至更优选地至少80%和最更优选地至少90%、95%或甚至100%的可取代的密码子,由此增加所述序列的G/C含量。

[0165] 在该上下文中,特别优选的是,与野生型序列相比,将本发明组合的表位编码RNA(或任意其他核酸,特别是如本文定义的RNA)的G/C含量,优选地其至少一个编码序列增加至最大值(即,100%的可取代密码子)。

[0166] 本发明组合的表位编码RNA(或任意其他核酸,特别是如本文定义的RNA)的进一步优选修饰基于以下发现:翻译效率也由细胞中tRNA出现的不同频率决定。因此,如果所谓的"稀有密码子"存在于本发明组合的表位编码RNA(或所述其他核酸,特别是RNA)中达增加的程度,则与编码相对"频繁"tRNA的密码子的情况相比,对应的修饰的RNA(或所述其他核酸,尤其是RNA)序列被翻译为显著更差的程度。

[0167] 在一些优选的实施方式中,在本文定义的修饰的表位编码RNA(或任意其他核酸,特别是如本文定义的RNA)中,与野生型RNA(或所述其他核酸,特别是RNA)的对应区域相比,修饰编码表位(或包含所述表位的抗原或其变体或片段)的区域,使的编码细胞中相对稀少的tRNA的野生型序列的至少一个密码子被交换为编码细胞中相对频繁的tRNA并携带与相对稀少tRNA相同氨基酸的密码子。

[0168] 由此，修饰本发明组合的表位编码RNA(或任意其他核酸，特别是如本文定义的RNA)的序列，使得插入频繁出现的tRNA可用的密码子。换言之，根据本发明，通过该修饰，野生型序列的所有密码子(其编码在细胞中相对稀少的tRNA)在每种情况下都可以被交换为编码细胞中相对频繁的tRNA并在每种情况下都携带与相对稀少tRNA相同氨基酸的密码子。在细胞中相对频繁地出现哪个tRNA和相反相对较少出现哪个tRNA是本领域技术人员已知的；参见，如Akashi，Curr.Opin.Genet.Dev.2001，11(6)：660-666。特别优选这样的密码子，其用于特定氨基酸，最频繁出现的tRNA，如，Gly密码子，其使用tRNA，其在(人)细胞中最频繁出现。

[0169] 根据本发明，特别优选将在本发明组合的修饰的表位编码RNA(或任意其他核酸，特别是如本文定义的RNA)中增加，特别是最大化的连续G/C含量与如所述表位编码RNA的编码序列编码的表位(或包含所述表位的抗原或其变体或片段)的没有修饰编码的氨基酸的“频繁”密码子进行连接。这样优选的实施方式允许提供本发明组合的特别有效翻译的和稳定(修饰的)的RNA(或任意其他核酸，特别是如本文定义的RNA)。

[0170] 如上所述确定修饰的表位编码RNA(或任意其他核酸，特别是如本文定义的RNA)(增加的G/C含量；tRNA的交换)可以使用WO 02/098443中解释的计算机程序进行，公开内容包括在本发明的全部范围内。使用该计算机程序，任何所需核酸的核苷酸序列，特别是RNA，可以借助遗传密码或其简并性质进行修饰，使得最大G/C含量结果结合使用编码在细胞中尽可能频繁出现的tRNA的密码子，由修饰的核酸特别是RNA编码的氨基酸序列，与非修饰的序列相比，优选不进行修饰。

[0171] 可选地，还可能的是，与原始序列相比，仅修饰G/C含量或仅密码子使用。在WO 02/098443中还描述了Visual Basic 6.0(使用的研发环境：Microsoft Visual Studio Enterprise 6.0 with Servicepack 3)中的源密码。

[0172] 在本发明的进一步优选实施方式中，本发明组合的表位编码RNA(或任意其他核酸，特别是如本文定义的RNA)的核糖体结合位点的环境中A/U含量与各自野生型RNA(或所述其他核酸，特别是RNA)的核糖体结合位点的环境中A/U含量相比被增加。

[0173] 该修饰(核糖体结合位点周围增加的A/U含量)增加了核糖体与所述表位编码RNA(或任意其他核酸，特别是如本文定义的RNA)结合的效率。核糖体与核糖体结合位点的有效结合(Kozak序列：SEQ ID NO:7；AUG形成起始密码子)又具有表位编码RNA(或任意其他核酸，特别是如本文定义的RNA)的有效翻译效果。

[0174] 根据本发明的进一步实施方式，本发明组合的表位编码RNA(或任意其他核酸，特别是如本文定义的RNA)对于潜在的去稳定序列元件可以进行修饰。特别地，所述表位编码RNA(或所述其他核酸，特别是RNA)的编码序列和/或5’和/或3’非翻译区与各自的野生型RNA(或所述其他野生型核酸)相比可以进行修饰，使其不含去稳定序列元件，修饰的RNA(或所述其他核酸，特别是RNA)的编码的氨基酸序列与其各自的野生型RNA(或所述其他野生型核酸)相比不进行修饰。

[0175] 已知例如在真核RNA的序列中，出现去稳定序列元件(DSE)，其中信号蛋白结合并调节体内RNA的酶促降解。为了进一步稳定修饰的表位编码RNA，任选地，在编码表位的区域(或包含所述表位的抗原或其变体或片段)或本文定义的任何其他核酸，与野生型RNA(或所述其他野生型核酸)的对应区域相比，可以因此进行一个或多个这样的修饰，使得在那里不

含或基本上不含有去稳定序列元件。

[0176] 根据本发明，存在于非翻译区(3'-和/或5'-UTR)中的DSE也可以通过这些修饰从表位编码RNA(或任意其他核酸，特别是如本文定义的RNA)中消除。这种去稳定序列例如是富含AU的序列(AURES)，其出现于许多不稳定RNA的3'-UTR区段中(Caput等，Proc.Natl.Acad.Sci.USA1986,83:1670-1674)。因此，与对应的野生型RNA(或所述对应的其他野生型核酸)相比，本发明组合的表位编码RNA(或任意其他核酸，特别是如本文定义的RNA)优选地进行修饰，使得所述表位编码RNA(或所述其他核酸，特别是RNA)不含此类不稳定序列。这也适用于那些被可能的内切核酸酶识别的序列基序，例如，序列GAACAAG，其包含在编码转铁蛋白受体的基因的3'-UTR区段中(Binder等，EMBO J.1994,13:1969-1980)。这些序列基序也优选从所述表位编码RNA(或任意其他核酸，特别是如本文定义的RNA)中删除。

[0177] 适应人密码子使用的序列：

[0178] 本发明组合的表位编码RNA(或任意其他核酸，特别是如本文定义的RNA)的进一步优选修饰基于以下发现：编码相同氨基酸的密码子通常以不同频率出现。根据进一步优选的实施方式，在修饰的表位编码RNA(或所述其他核酸，特别是RNA)中，与对应野生型RNA的对应区域相比较(或所述其他野生型核酸)，编码序列进行修饰，使得编码相同氨基酸的密码子的频率对应于根据人密码子使用的该密码子的天然存在频率，如表1所示。

[0179] 例如，在氨基酸丙氨酸(Ala)存在于由本发明组合的表位编码RNA(或任意其他核酸，特别是如本文定义的RNA)的至少一个编码序列编码的氨基酸序列中的情况下，野生型编码序列优选地以如下方式适应，密码子“GCC”以0.40的频率使用，密码子“GCT”以0.28的频率使用，密码子“GCA”以0.22的频率使用，密码子“GCG”以0.10的频率使用0.10等(见表1)。

[0180] 表1：人密码子使用表

[0181]

氨基酸	密码子	分数	/1000
Ala	GCG	0.10	7.4
Ala	GCA	0.22	15.8
Ala	GCT	0.28	18.5
Ala	GCC*	0.40	27.7
Cys	TGT	0.42	10.6
Cys	TGC*	0.58	12.6
Asp	GAT	0.44	21.8

[0182]

Asp	GAC*	0.56	25.1
Glu	GAG*	0.59	39.6
Glu	GAA	0.41	29.0
Phe	TTT	0.43	17.6
Phe	TTC*	0.57	20.3
Gly	GGG	0.23	16.5
Gly	GGA	0.26	16.5
Gly	GGT	0.18	10.8
Gly	GGC*	0.33	22.2
His	CAT	0.41	10.9
His	CAC*	0.59	15.1
Ile	ATA	0.14	7.5
Ile	ATT	0.35	16.0
Ile	ATC*	0.52	20.8
Lys	AAG*	0.60	31.9
Lys	AAA	0.40	24.4
Leu	TTG	0.12	12.9
Leu	TTA	0.06	7.7
Leu	CTG*	0.43	39.6
Leu	CTA	0.07	7.2
Leu	CTT	0.12	13.2
Leu	CTC	0.20	19.6
Met	ATG*	1	22.0
Asn	AAT	0.44	17.0
Asn	AAC*	0.56	19.1
Pro	CCG	0.11	6.9
Pro	CCA	0.27	16.9
Pro	CCT	0.29	17.5
Pro	CCC*	0.33	19.8
Gln	CAG*	0.73	34.2
Gln	CAA	0.27	12.3
Arg	AGG	0.22	12.0
Arg	AGA*	0.21	12.1
Arg	CGG	0.19	11.4
Arg	CGA	0.10	6.2
Arg	CGT	0.09	4.5
Arg	CGC	0.19	10.4
Ser	AGT	0.14	12.1
Ser	AGC*	0.25	19.5
Ser	TCG	0.06	4.4
Ser	TCA	0.15	12.2
Ser	TCT	0.18	15.2
Ser	TCC	0.23	17.7
Thr	ACG	0.12	6.1
Thr	ACA	0.27	15.1
Thr	ACT	0.23	13.1
Thr	ACC*	0.38	18.9
Val	GTG*	0.48	28.1
Val	GTA	0.10	7.1

[0183]

Val	GTT	0.17	11.0
Val	GTC	0.25	14.5
Trp	TGG*	1	13.2
Tyr	TAT	0.42	12.2
Tyr	TAC*	0.58	15.3
终止密码子	TGA*	0.61	1.6
终止密码子	TAG	0.17	0.8
终止密码子	TAA	0.22	1.0

[0184] *:最频繁密码子

[0185] 密码子优化的序列：

[0186] 如上所述，根据本发明优选的是，编码tRNA的野生型序列的所有密码子(其在细胞中相对稀少)被交换为编码tRNA的密码子，其在tRNA中相对频繁和其在每种情况下都携带与相对稀少的tRNA相同的氨基酸。

[0187] 因此，特别优选将最频繁的密码子用于每种编码的氨基酸(参见表1，最频繁的密码子用星号标记)。这种优化程序增加了密码子适应指数(CAI)并最终使CAI最大化。在本发明的上下文中，具有增加的或最大化的CAI的序列通常被称为“密码子优化的”序列和/或CAI增加的和/或最大化的序列。根据优选实施方式，本发明组合的表位编码RNA(或任意其他核酸，特别是如本文定义的RNA)包含至少一种编码序列，其中编码序列是如本文所述的密码子优化的。更优选地，所述至少一个编码序列的密码子适应指数(CAI)为至少0.5、至少0.8、至少0.9或至少0.95。最优选地，至少一个编码序列的密码子适应指数(CAI)是1。

[0188] 例如，在氨基酸丙氨酸(Ala)存在于由本发明组合的表位编码RNA(或任意其他核酸，特别是如本文定义的RNA)的至少一个编码序列编码的氨基酸序列中的情况下，野生型编码序列以如下方式适应：最频繁的人密码子“GCC”总是用于所述氨基酸，或对于氨基酸半胱氨酸(Cys)，野生型序列以如下方式适应：最频繁的人类密码子“TGC”总是用于所述氨基酸等。

[0189] C-优化的序列：

[0190] 根据优选的实施方式，本发明组合的表位编码RNA(或任意其他核酸，特别是如本文定义的RNA)通过修饰，优选地增加所述表位编码RNA(或所述其他核酸，特别是RNA)的胞嘧啶(C)含量，特别是在其至少一个编码序列中，而进行修饰。

[0191] 在优选实施方式中，本发明组合的表位编码RNA(或任意其他核酸，特别是如本文定义的RNA)的编码序列的C含量被修饰，优选地被增加，与各自的野生型RNA，即未修饰的RNA(或各自的其他野生型核酸)，的编码序列的C含量相比较。与由各自的野生型mRNA(或各自的其他野生型核酸)编码的氨基酸序列相比，由本发明组合的表位编码RNA的至少一个编码序列编码的氨基酸序列优选地不进行修饰。

[0192] 在优选实施方式中，所述修饰的表位编码RNA(或任意其他核酸，特别是如本文定义的RNA)进行修饰，使得实现至少10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％或80％、或至少90％的理论上可能的最大胞嘧啶-含量或甚至最大胞嘧啶-含量。

[0193] 在进一步优选的实施方式中，野生型RNA序列的至少10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％或甚至100％的密码子(其是“胞嘧啶”含量可优化的)被具有比野生型序列中存在的密码子具有更高胞嘧啶-含量的密码子替换。。

[0194] 在进一步优选的实施方式中，野生型编码序列的一些密码子可以另外进行修饰，使得细胞中相对稀少的tRNA的密码子被交换为细胞中相对频繁的tRNA的密码子，条件是相对频繁的tRNA的取代的密码子携带与原始野生型密码子的相对稀少的tRNA相同的氨基酸。优选地，相对稀有tRNA的所有密码子被细胞中相对频繁的tRNA的密码子替换，除了编码氨基酸的密码子，其仅由不含任何胞嘧啶的密码子编码，或除谷氨酰胺外(Gln)，由两个密码子编码，每个密码子含有相同数量的胞嘧啶。

[0195] 在本发明进一步优选的实施方式中，修饰的表位编码RNA(或任意其他核酸，特别是如本文定义的RNA)进行修饰，使得利用编码细胞中相对频繁的tRNA密码子实现至少80％或至少90％的理论上可能的最大胞嘧啶-含量或甚至最大胞嘧啶-含量，其中氨基酸序列保持未改变。

[0196] 由于遗传密码的天然存在的简并性，一个以上密码子可编码特定的氨基酸。因此，20种天然存在的氨基酸中的18种由一种以上的密码子编码(Tryp和Met除外)，如，由2个密码子(如Cys、Asp、Glu)，3个密码子(如Ile)，4个密码子(如Al、Gly、Pro)或6个密码子(如Leu、Arg、Ser)。然而，并非所有编码相同氨基酸的密码子在体内条件下以相同的频率使用。根据每种单个生物，建立典型的密码子使用概况。

[0197] 在本发明的上下文中使用的术语“胞嘧啶含量可优化密码子”是指这样的密码子，其表现出比编码相同氨基酸的其他密码子更低的胞嘧啶含量。因此，任何野生型密码子，其可被另一个编码相同氨基酸的密码子替换并在该密码子内显示出更高数量的胞嘧啶，被认为是胞嘧啶可优化的(C-可优化的)。通过野生型编码序列内的具体C优化的密码子取代C可优化野生型密码子增加其总C-含量并反映富含C的修饰的RNA序列。

[0198] 根据一些优选的实施方式，本发明组合的表位编码RNA(或任意其他核酸，特别是如本文定义的RNA)，和特别是其至少一种编码序列，包含C-最大化序列或其组成，C-最大化序列含有用于所有潜在的C可优化密码子的C优化的密码子。因此，100％或所有理论上可替换的C可优化密码子在编码序列的整个长度上优选地被C优化的密码子替换。

[0199] 在该上下文中，胞嘧啶-含量可优化密码子是比编码相同氨基酸的其他密码子含有更少数目的胞嘧啶的密码子。

[0200] 任意密码子GCG、GCA、GCU编码氨基酸Ala，其可以被交换为编码相同氨基酸的密码子GCC，和/或

[0201] 编码Cys的密码子UGU可以被交换为编码相同氨基酸的密码子UGC，和/或

[0202] 编码Asp的密码子GAU可以被交换为编码相同氨基酸的密码子GAC，和/或

[0203] 编码Phe的密码子UUU可以被交换为编码相同氨基酸的密码子UUC，和/或

[0204] 编码Gly的任意密码子GGG、GGA、GGU可以被交换为编码相同氨基酸的密码子GGC，和/或

[0205] 编码His的密码子CAU可以被交换为编码相同氨基酸的密码子CAC，和/或

[0206] 编码Ile的任意密码子AUA、AUU可以被交换为密码子AUC，和/或

[0207] 编码Leu的任意密码子UUG、UUA、CUG、CUA、CUU可以被交换为编码相同氨基酸的密码子CUC，和/或

[0208] 编码Asn的密码子AAU可以被交换为编码相同氨基酸的密码子AAC，和/或

[0209] 编码Pro的任意密码子CCG、CCA、CCU可以被交换为编码相同氨基酸的密码子CCC，

和/或

[0210] 编码Arg的任意密码子AGG、AGA、CGG、CGA、CGU可以被交换为编码相同氨基酸的密码子CGC，和/或

[0211] 编码Ser的任意密码子AGU、AGC、UCG、UCA、UCU可以被交换为编码相同氨基酸的密码子UCC，和/或

[0212] 编码Thr的任意密码子ACG、ACA、ACU可以被交换为编码相同氨基酸的密码子ACC，和/或

[0213] 编码Val的任意密码子GUG、GUA、GUU可以被交换为编码相同氨基酸的密码子GUC，和/或

[0214] 编码Tyr的密码子UAU可以被交换为编码相同氨基酸的密码子UAC。

[0215] 在任意上面的例子中，胞嘧啶的数目增加每个密码子1个/交换的密码子。编码序列的所有非C-优化的密码子(对应于C-可优化密码子)的交换导致C最大化序列。在本发明的上下文中，本发明组合的表位编码RNA的至少一个编码序列(或任意其他核酸，特别是如本文定义的RNA)内的至少70％、优选地至少80％、更优选地至少90％的非C-优化的密码子被C-优化的密码子替换。

[0216] 可优选的是，对于一些氨基酸，C可优化密码子被C优化的密码子替换的百分比小于70％，而对于其他氨基酸，替换的密码子的百分比高于70％以满足编码序列的所有C优化的野生型密码子的至少70％的C-优化的的总百分比。

[0217] 优选地，在C-优化的表位编码RNA(或任意其他核酸，特别是如本文定义的RNA)中，对于任意给定氨基酸，至少50％的C可优化野生型密码子被C-优化的密码子替换，如，任意修饰的富含C的RNA(或其他核酸，特别是RNA)优选地在编码上面提到的氨基酸Ala、Cys、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val和Tyr中至少一个的C可优化野生型密码子位置处含有至少50％C-优化的密码子，优选地至少60％。

[0218] 在该上下文中，可以使用编码氨基酸的密码子，其不是胞嘧啶含量可优化的并且然而由至少两个密码子编码，而无需任何进一步的选择过程。然而，编码细胞(如人细胞)中相对稀有的tRNA的野生型序列的密码子可以被交换为编码细胞中相对频繁的tRNA的密码子，其中两者都编码相同的氨基酸。因此，编码Glu的相对稀有的密码子GAA可以被交换为编码相同氨基酸的相对频繁密码子GAG，和/或

[0219] 编码Lys的相对稀少的密码子AAA可以被交换为编码相同氨基酸的相对频繁的密码子AAG，和/或

[0220] 编码Gln的相对稀少的密码子CAA可以被交换为编码相同氨基酸的相对频繁的密码子CAG。

[0221] 在该上下文中，由仅一个密码子编码的氨基酸Met(AUG)和Trp(UGG)每个保持未改变。终止密码子不是胞嘧啶-含量可优化的，但是相对稀少的终止密码子amber、ochre(UAA、UAG)可以被交换为相对频繁的终止密码子opal(UGA)。

[0222] 上面列出的单个取代可以单独使用以及以所有可能的组合使用，以与其各自野生型核酸序列相比，优化修饰的表位编码RNA(或任何其他核酸，特别是如本文所述的RNA)的胞嘧啶含量。

[0223] 因此，与各自野生型RNA(或其他野生型核酸)的编码序列相比，可以以由其中一个

包含一个另外的胞嘧啶的至少两个或更多个密码子编码的氨基酸的方式改变至少一种如本文所定义的编码序列,这种密码子可以被交换为包含一个另外的胞嘧啶的C-优化的密码子,其中与野生型序列相比,氨基酸是优选的。

[0224] 根据特别优选的实施方式,本发明组合包含表位编码RNA,其包含至少一种如本文所定义的编码序列,其中(a)所述表位编码RNA的至少一种编码序列的G/C含量与对应的野生型RNA的对应编码序列的G/C含量相比增加,和/或(b)其中所述表位编码RNA的至少一个编码序列的C含量与对应野生型RNA的对应编码序列的C含量相比增加,和/或(c)其中所述表位编码RNA的至少一个编码序列中的密码子适应于人密码子使用,其中密码子适应指数(CAI)在所述表位编码RNA的至少一个编码序列中优选地增加或最大化,并且其中由所述表位编码RNA编码的氨基酸序列与由对应的野生型RNA编码的氨基酸序列相比优选地不进行修饰。

[0225] 5'帽

[0226] 根据本发明的进一步优选实施方式,如本文定义的修饰的表位编码RNA(或任何其他核酸,特别是RNA)可以通过添加所谓的"5'帽"结构,其优选地稳定本文描述的所述表位编码RNA(或所述其他核酸,特别是RNA)。

[0227] 5'-帽是实体,通常是修饰的核苷酸实体,其一般加帽成熟mRNA的5'-端。5'-帽通常可以由修饰的核苷酸形成,特别是由鸟嘌呤核苷酸的衍生物形成。优选地,5'-帽通过5'-5'-三磷酸酯键与5'-末端连接。5'-帽可以是甲基化的,如m7GpppN,其中N是携带5'-帽的核酸的末端5'核苷酸,通常是mRNA的5'-端。m7GpppN是5'-帽结构,其天然存在于由聚合酶II转录的mRNA中,并因此在本文中不被认为是包含在修饰的mRNA中的修饰。因此,"修饰的"表位编码RNA(或任意其他核酸,特别是如本文定义的RNA)可包含m7GpppN作为5'-帽,但另外所述修饰的表位编码RNA(或其他核酸)通常包含至少一种如本文所定义的进一步修饰。

[0228] 5'帽结构的进一步实例包括甘油、倒置脱氧脱碱基残基(部分)、4",5'亚甲基核苷酸、1-(β-D-红呋喃糖基(erythrofuranosyl))核苷酸、4"-硫代核苷酸、碳环核苷酸、1,5-脱水己糖醇核苷酸、L-核苷酸、α-核苷酸、修饰的碱基核苷酸、苏糖型-戊呋喃糖基(threo-pentofuranosyl)核苷酸、无环3',4"-断核苷酸、无环3,4-二羟基丁基核苷酸、无环3,5二羟基戊基核苷酸、3'-3'-倒置核苷酸部分、3'-3'-倒置脱碱基部分、3'-2"-倒置核苷酸部分、3'-2"-倒置脱碱基部分、1,4-丁二醇磷酸酯、3'-氨基磷酸酯、己基磷酸酯、氨基己基磷酸酯、3'-磷酸酯、3'硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、或桥连或非桥连甲基膦酸酯部分。在本文上下文中,这些修饰的5'-帽结构被视为至少一种修饰。

[0229] 特别优选的修饰的5'-帽结构是帽1(m7G的相邻核苷酸的核糖的甲基化)、帽2(m7G下游的第二核苷酸的核糖的另外的甲基化)、帽3(m7G下游第3核苷酸的核糖的另外甲基化)、帽4(m7G下游的第4核苷酸的核糖的甲基化)、ARCA(抗逆转帽类似物,修饰的ARCA(如硫代磷酸酯修饰的ARCA)、肌苷、N1-甲基-鸟苷、2"-氟-鸟苷、7-脱氮-鸟苷、8-氧-鸟苷、2-氨基-鸟苷、LNA-鸟苷和2-叠氮-鸟苷。

[0230] 聚(A)

[0231] 根据进一步优选的实施方式,本发明组合的表位编码RNA(或任意其他核酸,特别是如本文定义的RNA)含有聚(A)序列或聚(A)尾。

[0232] 聚(A)序列,也称为聚(A)尾或3′-聚(A)尾,通常理解为例如多达约400个腺苷核苷

酸、例如从约20至约400个、优选从约50至约400个，更优选从约50至约300个，甚至更优选从约50至约250个，最优选从约60至约250个腺苷核苷酸的腺苷核苷酸序列。如本文所使用，聚(A)序列可以包含约10至200个腺苷核苷酸、优选地约10至100个腺苷核苷酸、更优选地约40至80个腺苷核苷酸或甚至更优选地约50至70个腺苷核苷酸。聚(A)序列通常位于RNA，特别是mRNA的3'端。

[0233] 因此，在进一步优选的实施方式中，本发明组合的表位编码RNA(或任意其他核酸，特别是如本文定义的RNA)在其3'末端含有通常约10至200个腺苷核苷酸、优选地约10至100个腺苷核苷酸、更优选地约40至80个腺苷核苷酸或甚至更优选地约50至70腺苷核苷酸的聚(A)尾。

[0234] 优选地，本发明组合的表位编码RNA(或所述其他核酸，特别是RNA)中的聚(A)序列通过RNA体外转录来源于DNA模板。可选地，聚(A)序列也可以通过常规的化学合成方法在体外获得，而不必从DNA-祖细胞转录。

[0235] 此外，聚(A)序列或聚(A)尾可以通过本发明组合的表位编码RNA(或所述其他核酸，特别是RNA)的酶促聚腺苷酸化，使用市售的聚腺苷酸化试剂盒和本领域内已知的对应的方案产生。聚腺苷酸化通常被理解为向核酸分子(诸如RNA分子，如向成熟前mRNA)添加聚(A)序列。聚腺苷酸化可以通过所谓的聚腺苷酸化信号诱导。该信号优选地位于mRNA的3'端的一段核苷酸内的，以进行聚腺苷酸化。聚腺苷酸化信号通常包含由腺嘌呤和尿嘧啶/胸腺嘧啶核苷酸组成的六聚体，优选六聚体序列AAUAAA。其他序列，优选地六聚体序列也是可以想到的。聚腺苷酸化通常在前mRNA(也称为成熟前mRNA)的加工过程中发生。通常，RNA成熟(从前mRNA到成熟mRNA)包括聚腺苷酸化步骤。

[0236] 因此，本发明组合的表位编码RNA(或任意其他核酸，特别是如本文定义的RNA)可包含聚腺苷酸化信号，其通过特定的蛋白因子(例如切割和聚腺苷酸化特异性因子(CPSF)、切割刺激因子(CstF)、切割因子I和II(CF I和CF II)、聚(A)聚合酶(PAP))将聚腺苷酸化转运至(转录的)RNA。

[0237] 在该上下文中，优选共有多腺苷酸化信号包含NN(U/T)ANA共有序列。在一个特别优选的方面，聚腺苷酸化信号包括以下序列之一：AA(U/T)AAA或A(U/T)(U/T)AAA(其中尿苷通常存在于RNA中，而胸苷通常存在于DNA中)。

[0238] 聚(C)

[0239] 根据进一步优选的实施方式，本发明组合的表位编码RNA(或任意其他核酸，特别是如本文定义的RNA)包含通常约10至200个胞嘧啶核苷酸、优选地约10至100个胞嘧啶核苷酸、更优选地约20至70个胞嘧啶核苷酸或甚至更优选地约20至60个或甚至10至40个胞嘧啶核苷酸的3'末端上的聚(C)尾。

[0240] UTR

[0241] 根据优选的实施方式，本发明组合的表位编码RNA(或任意其他核酸，特别是如本文定义的RNA)包含至少一个5'-或3'-UTR元件。在该上下文中，UTR元件包含核酸序列，或由核酸序列组成，其来源于任何天然存在的基因的5'-或3'-UTR或其来源于基因的5'-或3'-UTR的片段、同系物或变体。优选地，根据本发明使用的5'-或3'-UTR元件与所述表位编码RNA(或其他核酸，特别是NRA)的至少一个编码序列是异源的。即使来源于天然存在的基因的5'-或3'-UTR元件是优选的，在本发明的上下文中，也可以使用合成工程化的UTR元件。

[0242] 3'UTR

[0243] 根据优选的实施方式,本发明组合的表位编码RNA(或任意其他核酸,特别是如本文定义的RNA)进一步包含至少一个3'UTR元件。

[0244] 术语"3'UTR元件"通常指核酸序列,其包含来源于3'UTR或3'UTR的变体的核酸序列,或由其组成。

[0245] 一般地,术语"3'-UTR"指核酸分子的一部分,其位于可读框的3'(即"下游")并且不翻译成蛋白。在本发明的上下文中,3'-UTR对应于位于蛋白编码序列的终止密码子(优选地紧邻蛋白编码序列的终止密码子3')和表位编码RNA的序列(或任意其他核酸,特别是如本文定义的RNA)的聚(A)之间的序列。

[0246] 术语"对应于"意指3'-UTR序列可以是RNA序列,诸如在用于定义3'-UTR序列的mRNA序列中,或可以是DNA序列,其对应于这种RNA序列。在本发明的上下文中,术语"基因的3'-UTR",诸如"核糖体蛋白基因的3'-UTR",是序列,其对应于来源于该基因的成熟mRNA的3'-UTR,即通过基因转录和成熟前mRNA的成熟获得的mRNA。术语"基因的3'-UTR"包括3'-UTR的DNA序列和RNA序列(有义链和反义链以及成熟和未成熟)。

[0247] 在本发明意义上的3'UTR元件可以代表RNA(优选地mRNA)的3'UTR。因此,在本发明的意义上,优选地,3'UTR元件可以是RNA的3'UTR,优选地mRNA的3'UTR,或者它可以是RNA的3'UTR的转录模板。因此,3'UTR元件优选地是对应于RNA的3'UTR,优选地对应于mRNA(诸如通过基因工程载体构建体的转录获得的mRNA)的3'UTR的核酸序列。优选地,3'UTR元件实现3'UTR的功能或编码实现3'UTR功能的序列。

[0248] 优选地,至少一个3'UTR元件包含来源于自脊索动物基因,优选地脊椎动物基因,更优选地哺乳动物基因,最优选地人基因的3'UTR的核酸序列,或来源于脊索动物基因,优选地脊椎动物基因,更优选地哺乳动物基因,最优选地是人基因的3'UTR的变体的核酸序列,或由其组成。

[0249] 优选地,本发明组合的表位编码RNA(或任意其他核酸,特别是如本文定义的RNA)包含3'UTR元件,其可以来源于与具有增强的半衰期(提供稳定的mRNA)的mRNA相关的基因,例如下文定义和描述的3'UTR元件。优选地,3'UTR元件是来源于基因的3'UTR的核酸序列,其优选地编码稳定的mRNA,或来自所述基因的同系物、片段或变体。

[0250] 在特别优选的实施方式中,3'UTR元件包含核酸序列,或由其组成,所述核酸序列来源于选自以下的基因的3'UTR:白蛋白基因、α-珠蛋白基因、β-珠蛋白基因、酪氨酸羟化酶基因、脂加氧酶基因和胶原α基因,诸如胶原α1(I)基因;或来自选自以下的基因的3'UTR的变体:白蛋白基因、α-珠蛋白基因、β-珠蛋白基因、酪氨酸羟化酶基因、脂加氧酶基因和胶原α基因,诸如如根据专利申请WO2013/143700的SEQ ID No.1369-1390的胶原α1(I)基因,专利申请WO2013/143700的公开内容通过引用并入本文;或者来源于其同系物,片段或变体。

[0251] 术语"来源于[...]基因的3'UTR的核酸序列"优选地是指基于[...]基因或其部分的3'UTR序列的核酸序列,诸如基于白蛋白基因、α-珠蛋白基因,β-珠蛋白基因、酪氨酸羟化酶基因、脂加氧酶基因或胶原α基因(胶原α1(I)基因)的3'UTR,优选地白蛋白基因或其部分。该术语包括对应于基因的3'UTR变体的整个序列的序列,即基因的全长变体3'UTR序列,和对应于基因的变体3'UTR序列的片段的序列。在该上下文中的片段优选地由一段连续的核苷酸组成,其对应于全长变体3'UTR中的一段连续核苷酸,其代表至少20%、优选地至少

30％、更优选地至少40％、更优选地至少50％、甚至更优选地至少60％、甚至更优选地至少70％、甚至更优选地至少80％和最更优选地至少90％的全长变体3'UTR。在本发明的意义上，变体的这种片段优选地是如本文所述的变体的功能片段。

[0252] 白蛋白来源的3'UTR

[0253] 在特别优选的实施方式中，3'UTR元件包含来源于白蛋白基因、优选地脊椎动物白蛋白基因、更优选地哺乳动物白蛋白基因、最优选地根据SEQ ID NO:8的人白蛋白基因或对应的RNA序列的3'UTR的核酸序列，或由其组成。

[0254] 在该上下文中，特别优选的是，本发明组合的表位编码RNA(或任意其他核酸，特别是如本文定义的RNA)包含3'-UTR元件，其包含来源自根据专利申请WO2013/143700的SEQ ID No.1369-1390的核酸或其片段，同系物或变体的对应RNA序列。

[0255] 最优选地，3'-UTR元件包含来源自根据SEQ ID NO:9的人白蛋白基因的片段的核酸序列；

[0256] 在该上下文中，特别优选的是，根据本发明的RNA(或任意其他核酸，特别是如本文定义的RNA)的3'-UTR元件包含根据SEQ ID NO:8或9的核酸序列的对应RNA，或由其组成。

[0257] 珠蛋白来源的3'UTR

[0258] 在另一特别优选的实施方式中，3'UTR元件包含来源自α-珠蛋白基因、优选地脊椎动物α-或β-珠蛋白基因、更优选地哺乳动物α-或β-珠蛋白基因、最优选地根据SEQ ID NO:10、11或12的人α-或β-珠蛋白基因或对应RNA序列的3'UTR的核酸序列，或由其组成；

[0259] 例如，3'UTR元件可以包含α-珠蛋白基因(诸如人α-珠蛋白基因，或(优选地根据SEQ ID NO:13的)α-珠蛋白基因的同系物、片段或变体)的3'UTR的中心α-复合物-结合部分，或由其组成；

[0260] α-珠蛋白基因的3'UTR的中心α-复合物-结合部分(本文也命名为"muag")

[0261] GCCCGATGGGCCTCCCAACGGGCCCTCCTCCCCTCCTTGCACCG(SEQ ID NO:13其对应于专利申请WO2013/143700的SEQ ID No.1393)。

[0262] 在该上下文中，特别优选的是，本发明组合的表位编码RNA(或任意其他核酸，特别是如本文定义的RNA)的3'-UTR元件包含根据SEQ ID NO:13的核酸序列的对应RNA序列或其同系物、片段或变体，或由其组成。

[0263] 在实施方式中，本文定义的RNA包含WO2016/107877中描述的3'-UTR。在该上下文中，涉及3'-UTR序列的WO2016/107877的公开内容在此引入作为参考。特别合适的3'-UTR是专利申请WO2016/107877的SEQ ID NO:1至24和SEQ ID NO:49至318，或这些序列的片段或变体。因此，本发明的RNA的3'-UTR可包含根据专利申请WO2016/107877的SEQ ID NO:1至24和SEQ ID NO:49至318的核酸序列的对应RNA序列。

[0264] 在实施方式中，本文定义的RNA包含WO2017/036580中描述的3'-UTR。在该上下文中，涉及3'-UTR序列的WO2017/036580的公开内容在此引入作为参考。特别合适的3'-UTR是专利申请WO2017/036580的SEQ ID NO:152至204，或这些序列的片段或变体。因此，本发明的RNA的3'-UTR可包含根据专利申请WO2017/036580的SEQ ID NO:152至204的核酸序列的对应RNA序列。

[0265] 5'UTR

[0266] 根据特别优选的实施方式，本发明组合的至少一个表位编码RNA(或任意其他核

酸,特别是如本文定义的RNA)包含至少一个5'-非翻译区元件(5'UTR元件)。

[0267] 5′-UTR通常理解为信使RNA(mRNA)的特定部分。其位于mRNA可读框的5′。通常,5′-UTR以转录起始位点开始并在可读框起始密码子前一个核苷酸结束。5′-UTR可以包含控制基因表达的元件,也称为调节元件。此种调节元件可以是,例如,核糖体结合位点。5′-UTR可以例如通过添加5′帽而被转录后修饰。在本发明上下文中,5′-UTR对应于位于5′帽和起始密码子之间的成熟mRNA序列。优选地,5′-UTR对应于从位于5′帽的3′的核苷酸,优选从紧邻5′帽的3′核苷酸,向位于蛋白编码序列的起始密码子5′的核苷酸,优选向紧接蛋白编码序列的起始密码子5′的核苷酸延伸的序列。位于紧接成熟mRNA 5′帽的3′的核苷酸通常对应于转录起始位点。术语"对应于"意味5′-UTR序列可以是如用于定义5′-UTR序列的mRNA序列中的RNA序列,或与此RNA序列对应的DNA序列。在本发明上下文,术语"基因的5′-UTR"是对应于来源于该基因的成熟mRNA的5′-UTR的序列,所述成熟mRNA即通过基因转录和成熟前mRNA的成熟获得的mRNA。术语"基因的5′-UTR"包括5′-UTR的DNA序列和RNA序列。通过本发明实施方式,这样的5′-UTR可以可以在编码序列的5'末端提供。其长度通常小于500、400、300、250或小于200个核苷酸。在其他实施方式中,其长度可以使在至少10、20、30或40,优选地上至100或150个核苷酸的范围内。

[0268] TOP基因来源的5'UTR

[0269] 根据特别优选的实施方式,本发明组合的表位编码RNA(或任意其他核酸,特别是如本文定义的RNA)包含至少一个5'-非翻译区元件(5'UTR元件),其包含来源于TOP基因的5'UTR,或来源于TOP基因的5'UTR的片段、同系物或变体的核酸序列,或由其组成。

[0270] 5′末端寡嘧啶束(tract)(TOP)通常是位于核酸分子的5′末端区域,如某些mRNA分子的5′末端区域或功能实体的5′末端区域,例如某些基因的转录区的一段嘧啶核苷酸。该序列以通常对应于转录起始位点的胞苷起始,并且接着通常约3至30个嘧啶核苷酸的一段序列。例如,TOP可以包含3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30或甚至更多个核苷酸。所述一段嘧啶序列和由此的5′TOP终止于位于TOP下游的第一个嘌呤核苷酸的5′的一个核苷酸。含有5′-末端寡嘧啶束的信使RNA常被称为TOP mRNA。因此,提供此种信使RNA的基因被称为TOP基因。例如,已经在编码肽延长因子和核糖体蛋白的基因和mRNA中发现了TOP序列。

[0271] TOP基因通常以存在5′末端寡嘧啶束为特征。此外,大多数TOP基因以生长相关翻译调节为特征。然而,还已知TOP基因有组织特异翻译调节。如上文定义的,TOP基因的5′UTR对应于来源自TOP基因的成熟mRNA的5′UTR序列,其优选从位于5′-帽的3′的核苷酸向位于起始密码子5′的核苷酸延伸。TOP基因的5′UTR通常不包含任何起始密码子,优选无上游AUG(uAUG)或上游可读框(uORF)。其中,上游AUG和上游可读框通常理解为存在于应该被翻译的可读框的起始密码子(AUG)5′的AUG和可读框。TOP基因的5′UTR通常相当短。TOP基因的5′UTR的长度可以在20个核苷酸到高达500个核苷酸之间变化,并且通常少于约200个核苷酸,优选少于约150个核苷酸,更优选少于约100个核苷酸。本发明意义中示例性的TOP基因的5′UTR是在根据专利申请WO2013/143700的SEQ ID NO.1-1363的序列中,从位置5的核苷酸到紧接起始密码子(例如ATG)5′侧的核苷酸延伸的核酸序列,其公开内容通过引用并入本文。在该上下文中,TOP基因的5'UTR的特别优选的片段是没有5'TOP基序的TOP基因的5'UTR。术语"TOP基因的5'UTR"或"5'-TOP UTR"优选地指天然存在的TOP基因的5'UTR。

[0272] 在本发明的上下文中，“TOP基序”是对应于如上文定义的5′TOP的核酸序列。因此，本发明上下文中的TOP基序优选为具有3-30个核苷酸长度的一段嘧啶核苷酸。优选地，所述TOP基序由至少3个嘧啶核苷酸、优选至少4个嘧啶核苷酸、优选至少5嘧啶核苷酸、更优选至少6个核苷酸、更优选至少7个核苷酸、最优选至少8个嘧啶核苷酸组成，其中所述一段嘧啶核苷酸优选在其5′端以胞嘧啶核苷酸起始。在TOP基因和TOPmRNA中，TOP-基序优选在其5′端以转录起始位点起始并终止于所述基因或mRNA中的第一个嘌呤残基的5′的一个核苷酸。本发明意义中的TOP基序优选位于表示5′UTR的序列的5′端或位于编码5′UTR的序列的5′端。因此，优选地，从本发明的意义上说，如果该段序列位于各自序列(如人工核酸分子，人工核酸分子的5′UTR元件，或源自如本文描述的TOP基因的5′UTR的核酸序列)的5′端，则一段3个以上嘧啶核苷酸的序列被称为”TOP基序”。换句话说，不位于5′UTR或5′UTR元件的5′端而是位于5′UTR或5′UTR元件内任何位置的一段3个以上嘧啶核苷酸优选不称为“TOP基序”。

[0273] 在特别优选的实施方式中，本发明组合的表位编码RNA(或任意其他核酸，特别是如本文定义的RNA)的5’UTR元件不包含如上定义的TOP-基序或5’TOP。

[0274] 在一些实施方式中，来源自TOP基因的5’UTR的5’UTR元件的核酸序列在其3’端以位于其所源自的基因或mRNA的起始密码子(例如A(U/T)G)上游位置1、2、3、4、5、6、7、8、9或10处的核苷酸终止。因此，所述5′UTR元件不包含蛋白编码区的任何部分。因此，优选地，编码序列仅提供本发明组合的至少一个表位编码RNA(或所述其他核酸，特别是RNA)的氨基酸编码部分。

[0275] 来源自TOP基因的5’UTR的核酸序列优选来源自真核TOP基因，优选植物或动物TOP基因，更优选脊索动物TOP基因，甚至更优选脊椎动物TOP基因，最优选哺乳动物TOP基因，如人TOP基因。

[0276] 例如，5′UTR元件优选选自包含核酸序列或由其组成的5′UTR元件：该核酸序列源自选自专利申请WO2013/143700——其公开内容通过引用并入本文——的SEQ ID NO.1-1363，SEQ ID NO.1395，SEQ ID NO.1421和SEQ ID NO.1422的核酸序列，源自专利申请WO2013/143700的SEQ IDNO.1-1363，SEQ ID NO.1395，SEQ ID NO.1421和SEQ ID NO.1422的同源物，源自其变体，或优选地源自对应RNA序列。术语“专利申请WO2013/143700的SEQ ID NO.1-1363、SEQ ID NO.1395、SEQ ID NO.1421和SEQ ID NO.1422的同源物”指除智人外的其它物种的序列，其与根据专利申请WO2013/143700的SEQ ID NO.1-1363、SEQ ID NO.1395、SEQ ID NO.1421或SEQ ID NO.1422的序列同源。

[0277] 在优选实施方式中，本发明组合的表位编码RNA(或任意其他核酸，特别是如本文定义的RNA)的5′UTR元件包含核酸序列或由其组成：该核酸序列源自选自专利申请WO2013/143700的SEQ ID NO.1-1363、SEQ ID NO.1395、SEQ IDNO.1421或SEQ ID NO.1422，选自专利申请WO2013/143700的SEQ ID NO.1-1363、SEQ ID NO.1395、SEQ ID NO.1421或SEQ ID NO.1422的同源物，选自其变体，或对应RNA序列的核酸序列的从核苷酸位置5(即位于所述序列中位置5的核苷酸)到紧接起始密码子的5′的核苷酸位置(位于所述序列的3’端)，例如紧接ATG序列的5′侧的核苷酸位置延伸的核酸序列。特别优选5′UTR元件源自选自专利申请WO2013/143700的SEQ ID NO.1-1363、SEQ ID NO.1395、SEQ ID NO.1421或SEQID NO.1422，选自专利申请WO2013/143700的SEQ ID NO.1-1363、SEQ ID NO.1395、SEQ ID NO.1421或

SEQ IDNO.1422的同源物，选自其变体或对应RNA序列的核酸序列的从紧接5′TOP 3′侧的核苷酸位置到紧接起始密码子的5′侧的核苷酸位置(位于所述序列的3′端)，例如紧接ATG序列5′侧的核苷酸位置延伸的核酸序列。

[0278] 在特别优选的实施方式中，5'UTR元件包含核酸序列或由其组成，该核酸序列来源自编码核糖体蛋白的TOP基因的5'UTR，或来源自编码核糖体蛋白的TOP基因的5'UTR的变体。例如，5'UTR元件包含核酸序列或由其组成，该核酸序列来源自根据专利申请WO2013/143700的SEQ ID NO:67、170、193、244、259、554、650、675、700、721、913、1016、1063、1120、1138和1284-1360，对应RNA序列，其同源物或如本文所描述的其变体(优选地没有5'TOP基序)中任一项的核酸序列的5'UTR。如上面所描述，从位置5到紧邻ATG 5'的核苷酸(其位于序列的3'端)延伸的序列对应于所述序列的5'UTR。

[0279] 在一些实施方式中，本发明组合的表位编码RNA(或任意其他核酸，特别是如本文定义的RNA)因此包含5'UTR元件，该5'UTR元件包含核酸序列或由其组成，该核酸序列来源自脊椎动物TOP基因的5'UTR，诸如哺乳动物，如，任TOP基因，其选自RPSA、RPS2、RPS3、RPS3A、RPS4、RPS5、RPS6、RPS7、RPS8、RPS9、RPS10、RPS11、RPS12、RPS13、RPS14、RPS15、RPS15A、RPS16、RPS17、RPS18、RPS19、RPS20、RPS21、RPS23、RPS24、RPS25、RPS26、RPS27、RPS27A、RPS28、RPS29、RPS30、RPL3、RPL4、RPL5、RPL6、RPL7、RPL7A、RPL8、RPL9、RPL10、RPL10A、RPL11、RPL12、RPL13、RPL13A、RPL14、RPL15、RPL17、RPL18、RPL18A、RPL19、RPL21、RPL22、RPL23、RPL23A、RPL24、RPL26、RPL27、RPL27A、RPL28、RPL29、RPL30、RPL31、RPL32、RPL34、RPL35、RPL35A、RPL36、RPL36A、RPL37、RPL37A、RPL38、RPL39、RPL40、RPL41、RPLP0、RPLP1、RPLP2、RPLP3、RPLP0、RPLP1、RPLP2、EEF1A1、EEF1B2、EEF1D、EEF1G、EEF2、EIF3E、EIF3F、EIF3H、EIF2S3、EIF3C、EIF3K、EIF3EIP、EIF4A2、PABPC1、HNRNPA1、TPT1、TUBB1、UBA52、NPM1、ATP5G2、GNB2L1、NME2、UQCRB，或选自其同源物或变体，其中优选地5'UTR元件不包含所述基因的TOP-基序或5'TOP，和其中任选地5'UTR元件在其5'-端以位于5'末端寡嘧啶束(TOP)下游的位置1、2、3、4、5、6、7、8、9或10处的核苷酸起始，和其中进一步任选地来源于TOP基因的5'UTR的5'UTR元件在其3'-端以位于其来源的基因的起始密码子(A(U/T)G)的上游位置1、2、3、4、5、6、7、8、9或10处的核苷酸终止。

[0280] 在进一步特别优选的实施方式中，5'UTR元件包含核酸序列或由其组成，该核酸序列来源自核糖体大蛋白32基因(RPL32)，核糖体大蛋白35基因(RPL35)，核糖体大蛋白21基因(RPL21)，ATP合酶、H+转运、线粒体F1复合物、α亚基1、心肌(ATP5A1)基因，羟类固醇(17-β)脱氢酶4基因(HSD17B4)，雄激素-诱导的1基因(AIG1)，细胞色素c氧化酶亚基VIc基因(COX6C)，或N-酰基鞘氨醇酰胺水解酶(酸性神经酰胺酶)1基因(ASAH1)的5′UTR或源自其变体，优选源自脊椎动物核糖体大蛋白32基因(RPL32)，脊椎动物核糖体大蛋白35基因(RPL35)，脊椎动物核糖体大蛋白21基因(RPL21)，脊椎动物ATP合酶、H+转运、线粒体F1复合物、α亚基1、心肌(ATP5A1)基因，脊椎动物羟类固醇(17-β)脱氢酶4基因(HSD17B4)，脊椎动物雄激素-诱导的1基因(AIG1)，脊椎动物细胞色素c氧化酶亚基VIc基因(COX6C)，或脊椎动物N-酰基鞘氨醇酰胺水解酶(酸性神经酰胺酶)1基因(ASAH1)或源自其变体，更优选源自哺乳动物核糖体大蛋白32基因(RPL32)，核糖体大蛋白35基因(RPL35)，核糖体大蛋白21基因(RPL21)，哺乳动物ATP合酶、H+转运、线粒体F1复合物、α亚基1、心肌(ATP5A1)基因，哺乳动物羟类固醇(17-β)脱氢酶4基因(HSD17B4)，哺乳动物雄激素-诱导的1基因(AIG1)，哺乳动

物细胞色素c氧化酶亚基VIc基因(COX6C),或哺乳动物N-酰基鞘氨醇酰胺水解酶(酸性神经酰胺酶)1基因(ASAH1)或源自其变体,最优选源自人核糖体大蛋白32基因(RPL32),人核糖体大蛋白35基因(RPL35),人核糖体大蛋白21基因(RPL21),人ATP合酶、H+转运、线粒体F1复合物、α亚基1、心肌(ATP5A1)基因,人羟类固醇(17-β)脱氢酶4基因(HSD17B4),人雄激素诱导的1基因(AIG1),人细胞色素c氧化酶亚基VIc基因(COX6C),或人N-酰基鞘氨醇酰胺水解酶(酸性神经酰胺酶)1基因(ASAH1)或源自其变体,其中优选地5'UTR元件不包含所述基因的5'TOP。

[0281] ATP5A1来源的5'UTR

[0282] 在一些优选的实施方式中,5'UTR元件包含核酸序列或由其组成,该核酸序列来源自编码线粒体ATP合酶亚基α的TOP基因的5'UTR,或来源自编码线粒体ATP合酶亚基α的TOP基因的5'UTR的同源物或变体,优选地不含5'TOP基序。

[0283] 在该上下文中,5'UTR元件优选地包含核酸序列或由其组成,该核酸序列来源自线粒体ATP合酶亚基α基因的5'UTR,优选地来源自脊椎动物线粒体ATP合酶亚基α(ATP5A1)基因,更优选地来源自线粒体ATP合酶亚基α(ATP5A1)基因,最优选地来源自人线粒体ATP合酶亚基α(ATP5A1)基因,或来源自线粒体ATP合酶亚基α基因的5'UTR,优选地来源自脊椎动物线粒体ATP合酶亚基α(ATP5A1)基因,更优选地来源自哺乳动物线粒体ATP合酶亚基α(ATP5A1)基因,最优选地来源自人线粒体ATP合酶亚基α(ATP5A1)基因的变体,其中优选地5'UTR元件不包含所述基因的5'TOP。

[0284] 因此,在特别优选的实施方式中,5'UTR元件包含核酸序列或由其组成,该核酸序列与根据SEQ ID NO:14(不含5'末端寡嘧啶束的ATP5A1的5'-UTR:GCGGCTCGGCCATTTTGTCCCAGTCAGTCCGGAGGCTGCGGCTGCAGAAGTACCGCCTGCGGAGTAACTGCAAAG;对应于专利申请WO2013/143700的SEQ ID NO.1414)的核酸序列或优选地与对应RNA序列具有至少约40%、优选地至少约50%、优选地至少约60%、优选地至少约70%、更优选地至少约80%、更优选地至少约90%、甚至更优选地至少约95%、甚至更优选地至少约99%的同一性,或其中至少一个5'UTR元件包含核酸序列的片段或由其组成,该核酸序列的片段与根据SEQ ID NO:14的核酸序列或更优选地与对应RNA序列具有至少约40%、优选地至少约50%、优选地至少约60%、优选地至少约70%、更优选地至少约80%、更优选地至少约90%、甚至更优选地至少约95%、甚至更优选地至少约99%的同一性,其中优选地,片段如上所描述,即,代表全长5'UTR的至少20%等的连续的一段核苷酸。优选地,片段展现至少约20个核苷酸或更多,优选地至少约30个核苷酸或更多,更优选地至少约40个核苷酸或更多的长度。优选地,片段是本文所描述的功能片段。

[0285] L32来源的5'UTR

[0286] 在一些优选的实施方式中,5'UTR元件包含核酸序列或由其组成,该核酸序列来源自编码核糖体大蛋白(RPL)的TOP基因的5'UTR,或来源自编码核糖体大蛋白(RPL)的TOP基因的5'UTR的同源物或变体。例如,5'UTR元件包含核酸序列或由其组成,该核酸序列来源自根据专利申请WO2013/143700的SEQ ID NO:67、259、1284-1318、1344、1346、1348-1354、1357、1358、1421和1422,其同源物或如本文所描述的其变体中任一项核酸序列的5'UTR,优选地,不含5'TOP基序。

[0287] 在该上下文中,5'UTR元件优选地包含核酸序列或由其组成,该核酸序列来源自核

糖体大蛋白32基因的5'UTR,优选地来源自脊椎动物核糖体大蛋白32(L32)基因、更优选地来源自哺乳动物核糖体大蛋白32(L32)基因、最优选地来源自人核糖体大蛋白32(L32)基因,或来源自核糖体大蛋白32基因的5'UTR的变体,优选地来源自脊椎动物核糖体大蛋白32(L32)基因,更优选地来源自哺乳动物核糖体大蛋白32(L32)基因,最优选地来源自人核糖体大蛋白32(L32)基因,其中优选地,5'UTR元件不包含所述基因的5'TOP。

[0288] 因此,在一些特别优选的实施方式中,5'UTR元件包含核酸序列或由其组成,该核酸序列与根据SEQ ID NO:15(不含5'末端寡嘧啶束的人核糖体大蛋白32的5'-UTR:GGCGCTGCCTACGGAGGTGGCAGCCATCTCCTTCTCGGCATC;对应于专利申请WO2013/143700的SEQ ID NO.1368)的核酸序列或优选地与对应RNA序列具有至少约40%、优选地至少约50%、优选地至少约60%、优选地至少约70%、更优选地至少约80%、更优选地至少约90%、甚至更优选地至少约95%、甚至更优选地至少约99%的同一性,或其中至少一个5'UTR元件包含核酸序列的片段或由其组成,该核酸序列的片段与根据SEQ ID NO:15的核酸序列或更优选地与对应RNA具有至少约40%、优选地至少约50%、优选地至少约60%、优选地至少约70%、更优选地至少约80%、更优选地至少约90%、甚至更优选地至少约95%、甚至更优选地至少约99%的同一性,其中优选地,片段如上所描述,是代表全长5'UTR的至少20%等的连续的一段核苷酸。优选地,片段展现至少约20个核苷酸或更多,优选地至少约30个核苷酸或更多,更优选地至少约40个核苷酸或更多的长度。优选地,片段是本文所描述的功能片段。

[0289] HSD17B4来源的5'UTR

[0290] 在一些优选的实施方式中,5'UTR元件包含核酸序列或由其组成,该核酸序列来源自编码17-β-羟基羟类固醇脱氢酶4的TOP基因的5'UTR,或来源自编码17-β-羟基类固醇脱氢酶4的TOP基因的5'UTR的同源物或变体,优选地不含5'TOP基序。

[0291] 在该上下文中,5'UTR元件优选地包含核酸序列或由其组成,该核酸序列来源自17-β-羟基类固醇脱氢酶4(也称为过氧化物酶体多功能酶2型)基因的5'UTR,优选地来源自脊椎动物17-β-羟基类固醇脱氢酶4(HSD17B4)基因,更优选地来源自哺乳动物17-β-羟基类固醇脱氢酶4(HSD17B4)基因,最优选地来源自人17-β-羟基类固醇脱氢酶4(HSD17B4)基因,或来源自17-β-羟基类固醇脱氢酶4基因的5'UTR,优选地来源自脊椎动物17-β-羟基类固醇脱氢酶4(HSD17B4)基因,更优选地来源自哺乳动物17-β-羟基类固醇脱氢酶4(HSD17B4)基因,最优选地来源自人17-β-羟基类固醇脱氢酶4(HSD17B4)基因,优选地,5'UTR元件不包含所述基因的5'TOP。

[0292] 因此,在一些特别优选的实施方式中,5'UTR元件包含核酸序列或由其组成,该核酸序列与根据SEQ ID NO:16(不含5'末端寡嘧啶束的人17-β-羟基类固醇脱氢酶4的5'-UTR:GTCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTCGTGTGTGTGTCGTTGCAGGCCTTATTC;对应专利申请WO2013/143700的SEQ ID NO:1415)的核酸序列或优选地对应RNA序列具有至少约40%、优选地至少约50%、优选地至少约60%、优选地至少约70%、更优选地至少约80%、更优选地至少约90%、甚至更优选地至少约95%、甚至更优选地至少约99%的同一性,或其中至少一个5'UTR元件包含核酸序列的片段或由其组成,该核酸序列的片段与SEQ ID NO:16或更优选地与对应RNA序列具有至少约40%、优选地至少约50%、优选地至少约60%、优选地至少约70%、更优选地至少约80%、更优选地至少约90%、甚至更优选地至少约95%、甚至更优选地至少约99%的同一性,其中,优选地,片段如上所描述,即,代表全长5'UTR的至少

20％等的连续的一段核苷酸。优选地，片段展现至少约20个核苷酸或更多，优选地至少约30个核苷酸或更多，更优选地至少约40个核苷酸或更多的长度。优选地，片段是本文所描述的功能片段。

[0293] 在实施方式中，本发明的RNA包含WO2016/107877中描述的5'-UTR。在该上下文中，涉及5'-UTR序列的WO2016/107877的公开内容通过引用并入本文。特别优选的5'-UTR是根据专利申请WO2016/107877的SEQ ID NO:25到30和SEQ ID NO:319到382的核酸序列，或这些序列的片段或变体。在该上下文中，特别优选的是，RNA的5'-UTR包含根据专利申请WO2016/107877的SEQ ID NO:25到30和SEQ ID NO:319到382的核酸序列的对应RNA序列，或由其组成。

[0294] 在实施方式中，本发明的RNA包含WO2017/036580中描述的5'-UTR。在该上下文中，涉及5'-UTR序列的WO2017/036580的公开内容通过引用并入本文。特别优选的5'-UTR是根据专利申请WO2017/036580的SEQ ID NO:1到151的核酸序列，或这些序列的片段或变体。在该上下文中，特别优选的是，RNA的5'-UTR包含根据专利申请WO2017/036580的SEQ ID NO:1到151的核酸序列的对应RNA序列，或由其组成。

[0295] 优选地，至少一个5'UTR元件和至少一个3'UTR元件协同作用以从如上描述的本发明组合的至少一种表位编码RNA(或任意其他核酸，特别是如本文定义的RNA)增加蛋白产生。

[0296] 组蛋白茎环

[0297] 在一些优选的实施方式中，本发明组合的表位编码RNA(或任意其他核酸，特别是如本文定义的RNA)包含组蛋白茎环序列/结构。这类组蛋白茎环序列优选地选自WO 2012/019780中公开的组蛋白茎环序列，其公开内容通过引用并入本文。

[0298] 本发明内使用使用的组蛋白茎环序列优选地选自以下式(I)或(II)中至少一个：

[0299] 式(I)(不具有茎边缘元件的茎环序列)：

[0300] $[N_{0-2}GN_{3-5}]\ [N_{0-4}(U/T)N_{0-4}]\ [N_{3-5}CN_{0-2}]$

茎1 环 茎2

[0301] 式(II)(具有茎边缘元件的茎环序列)：

[0302] $N_{1-6}\ [N_{0-2}GN_{3-5}]\ [N_{0-4}(U/T)N_{0-4}]\ [N_{3-5}CN_{0-2}]\ N_{1-6}$

茎1 茎1 环 茎2 茎2

边缘元件 边缘元件

[0303] 其中：

[0304] 茎1或茎2边缘元件N_{1-6}是1至6、优选地2至6、更优选地2至5、甚至更优选地3至5、最优选地4至5或5个N的连续序列，其中每个N独立地选自从A、U、T、G和C选择的核苷酸，或其核苷酸类似物；

[0305] 茎1$[N_{0-2}GN_{3-5}]$是与元件茎2反向互补或部分反向互补的，并且是5至7个核苷酸之

间的连续序列；

[0306] 其中N_{0-2}是0至2、优选地0至1、更优选地1个N的连续序列，其中每个N独立地选自从A、U、T、G和C选择的核苷酸，或其核苷酸类似物；

[0307] 其中N_{3-5}是3至5、优选地4至5、更优选地4个N的连续序列，其中每个N独立地选自从A、U、T、G和C选择的核苷酸，或其核苷酸类似物，和

[0308] 其中，G是鸟苷或其类似物，并且可任选地被胞苷或其类似物替换，条件是其茎2中的互补核苷酸胞苷被鸟苷替换；

[0309] 环序列$[N_{0-4}(U/T)N_{0-4}]$位于茎1和茎2之间，并且是3至5个核苷酸、更优选4个核苷酸的连续序列；

[0310] 其中每个N_{0-4}彼此独立地是0至4、优选地1至3、更优选地1至2个N的连续序列，其中每个N彼此独立地选自从A、U、T、G和C选择的核苷酸，或其核苷酸类似物；

[0311] 其中U/T表示尿苷，或任选地胸苷；

[0312] 茎2$[N_{3-5}CN_{0-2}]$是与元件茎1反向互补或部分反向互补的，并且是5至7个核苷酸之间的连续序列；

[0313] 其中N_{3-5}是3至5、优选地4至5、更优选地4个N的连续序列，其中每个N彼此独立地选自从A、U、T、G和C选择的核苷酸，或其核苷酸类似物；

[0314] 其中N_{0-2}是0至2、优选地0至1、更优选地1个N的连续序列，其中每个N彼此独立地选自从A、U、T、G和C选择的核苷酸，或其核苷酸类似物；和

[0315] 其中C胞苷或其类似物，并且可任选地被鸟苷或其类似物替换，条件是其茎1中的互补核苷鸟苷被胞苷替换；

[0316] 其中

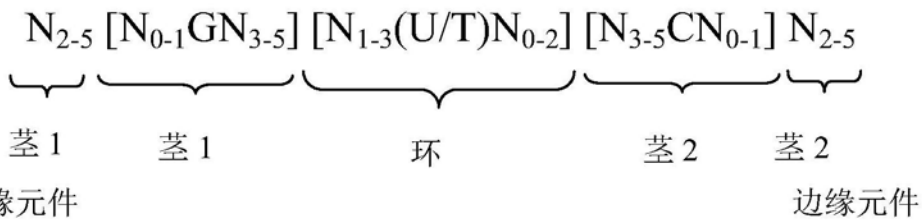
[0317] 茎1和茎2能够彼此碱基配对形成反向互补序列，其中碱基配对可以发生在茎1和茎2之间，如，通过核苷酸A和U/T或G和C的Watson-Crick碱配对或通过非Watson-Crick碱基配对(如摆动碱基配对、反向Watson-Crick碱基配对、Hoogsteen碱基配对、反向Hoogsteen碱基配对)，或茎1和茎2能够彼此碱基配对形成部分反向互补序列，其中不完全碱基配对可以发生在茎1和茎2之间，基础是一个茎中的一个或多个碱基在另一个茎的反向互补序列中不具有互补碱基。

[0318] 根据进一步优选的实施方案，本发明组合的表位编码RNA(或任意其他核酸，特别是如本文定义的RNA)可包含至少一种根据下列具体式(Ia)或(IIa)中的至少一个的组蛋白茎环序列：

[0319] 式(Ia)(不具有茎边缘元件的茎环序列)：

[0320] $$\underbrace{[N_{0-1}GN_{3-5}]}_{\text{茎1}}\ \underbrace{[N_{1-3}(U/T)N_{0-2}]}_{\text{环}}\ \underbrace{[N_{3-5}CN_{0-1}]}_{\text{茎2}}$$

[0321] 式(IIa)(具有茎边缘元件的茎环序列)：

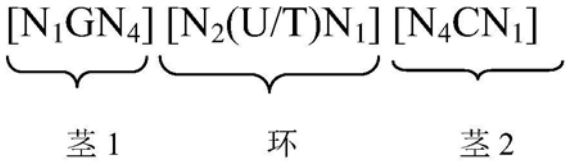
[0322] 

[0323] 其中：

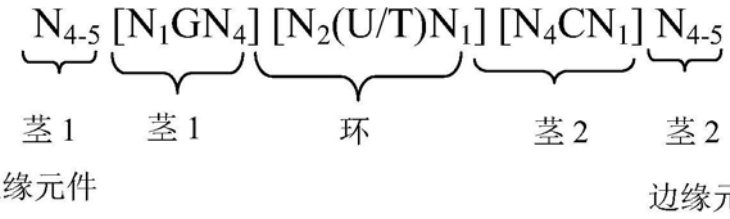
[0324] N、C、G、T和U如上所定义。

[0325] 根据进一步更优选的实施方案，本发明组合的表位编码RNA(或任意其他核酸，特别是如本文定义的RNA)可包含至少一种根据下列具体式(Ib)或(IIb)中的至少一个的组蛋白茎环序列：

[0326] 式(Ib)(不具有茎边缘元件的茎环序列)：

[0327] 

[0328] 式(IIb)(具有茎边缘元件的茎环序列)：

[0329] 

[0330] 其中：

[0331] N、C、G、T和U如上所定义。

[0332] 特别优选的组蛋白茎环序列是序列CAAAGGCTCTTTTCAGAGCCACCA(根据SEQ ID NO：17)或更优选地对应RNA序列CAAAGGCUCUUUUCAGAGCCACCA(根据SEQ ID NO:18)。

[0333] 信号肽

[0334] 根据优选的实施方式，本发明组合的表位编码RNA(或任意其他核酸，特别是如本文定义的RNA)可以额外地或可选地编码分泌信号肽。

[0335] 这类信号肽是通常展现出约15至30个氨基酸的长度，并且优选地位于编码的肽的N末端的序列，但不限于此。如本文所定义的信号肽优选地允许将由至少一个表位编码RNA编码的表位(或包含所述表位的抗原或其变体或片段)转运到限定的细胞区室中，优选细胞表面，内质网(ER)或内体-溶酶体区室。

[0336] 本文定义的分泌信号肽序列的实例包括但不限于经典或非经典MHC分子的信号序列(如MHC I和II分子的信号序列，例如MHC I类分子的信号序列HLA-A*0201)，细胞因子或免疫球蛋白的信号序列，免疫球蛋白或抗体恒定链的信号序列，Lamp1、Tapasin、Erp57、Calretikulin、Calnexin、PLAT、EPO或白蛋白的信号序列以及进一步膜相关蛋白，或与内质网(ER)或内体-溶酶体区室相关的蛋白的进一步膜相关蛋白。最优选地，信号序列来源自(人)HLA-A2；(人)PLAT；(人)sEPO；(人)ALB；(人)IgE-前导序列；(人)CD5；(人)IL2；(人)CTRB2；(人)IgG-HC；(人)Ig-HC；(人)Ig-LC；GpLuc；(人)Igkappa或任何上述蛋白的片段或

变体,特别是HLA-A2;HsPLAT;sHsEPO;HsALB;HsPLAT(aa1-21);HsPLAT(aa1-22);IgE-前导序列;HsCD5(aa1-24);HsIL2(aa1-20);HsCTRB2(aa1-18);IgG的HC(aa1-19);Ig-HC(aa1-19);Ig-LC(aa1-19);GpLuc(1-17);MmIgkappa或其片段或变体。

[0337] 这类信号肽是优选地用于促进编码的抗原(或其变体或片段)的分泌,其包含如本文所述的表位。编码所述信号肽的RNA序列优选地与编码包含所述表位的抗原(或其变体或片段)的序列融合,使得所述表位编码RNA序列表达优选地的产生包含与编码的信号肽融合的表位的抗原(或其变体或片段)。

[0338] 任何上述修饰可以应用于本发明组合的表位编码RNA,并且进一步应用于本发明上下文中使用的任何核酸,特别是RNA,并且如果合适或必要,可以彼此以任何组合相互组合,条件是这些修饰的组合在相应的至少一个表位编码RNA(或所述其他核酸,特别是RNA)中不会彼此干扰。本领域技术人员将能够相应地做出他的选择。

[0339] RNA构建体

[0340] 包含本文定义的至少一种编码序列(或任意其他核酸,特别是如本文定义的RNA)的本发明组合的表位编码RNA可优选地包含5'UTR和/或3'UTR(其任选地含有至少一个组蛋白茎环)。

[0341] 本发明组合的表位编码RNA(或任意其他核酸,特别是如本文定义的RNA)的3'UTR优选地还包含本文定义的聚(A)和/或聚(C)序列。3'UTR的单个元件可以在此沿本发明组合的表位编码RNA(或所述其他核酸,特别是RNA)的序列从5'到3'以任意顺序出现。

[0342] 另外,也可以被含有本文描述的其他元件,诸如本文定义的稳定序列(如,来源自珠蛋白基因的UTR),IRES序列等。每个元件也可以在本发明组合的表位编码RNA(或任意其他核酸,特别是如本文定义的RNA)中重复至少一次(特别地在二-或多顺反子构建体中),优选地二次或多次。作为实力,单个元件可以以如下顺序存在于本发明组合的表位编码RNA(或所述其他核酸,特别是RNA)中:

[0343] 5'-编码序列-组蛋白茎环-聚(A)/(C)序列-3';或

[0344] 5'-编码序列-聚(A)/(C)序列-组蛋白茎环-3';或

[0345] 5'-编码序列-组蛋白茎环-聚腺苷酸化信号-3';或

[0346] 5'-编码序列-聚腺苷酸化信号-组蛋白茎环-3';或

[0347] 5'-编码序列-组蛋白茎环-组蛋白茎环-聚(A)/(C)序列-3';或

[0348] 5'-编码序列-组蛋白茎环-组蛋白茎环-聚腺苷酸化信号-3';或

[0349] 5'-编码序列-稳定序列-聚(A)/(C)序列-组蛋白茎环-3';或

[0350] 5'-编码序列-稳定序列-聚(A)/(C)序列-聚(A)/(C)序列-组蛋白茎环-3';等。

[0351] 根据进一步实施方式,本发明组合的表位编码RNA(或任意其他核酸,特别是如本文定义的RNA)优选地包含至少一个以下结构元件:5'-和/或3'-非翻译区元件(UTR元件),特别是5'-UTR元件,其优选地包含来源自TOP基因的5'-UTR或来源自其片段、同系物或变体的核酸或由其组成,或者5'-和/或3'-UTR元件,其可以优选地来源自提供稳定mRNA的基因,或来源自其同系物、片段或变体;组蛋白-茎环结构,优选地其3'非翻译区中的组蛋白-茎环;5'-帽结构;聚-A尾;或聚(C)序列。

[0352] 根据一些实施方式,特别优选的是,如果除了表位(或包含所述表位的抗原或其变体或片段)之外,本文定义的至少一个编码序列还编码另外的肽或蛋白,则编码的肽或蛋白

优选地没有组合蛋白蛋白、无报告蛋白(如荧光素酶、GFP及其变体(诸如eGFP、RFP或BFP)，和/或无标记或选择蛋白(包括α-珠蛋白、半乳糖激酶和黄嘌呤：鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(GPT)，次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶(HGPRT)，β-半乳糖苷酶，半乳糖激酶，碱性磷酸酶，分泌的胚胎碱性磷酸酶(SEAP)或抗性基因(如抗新霉素，嘌呤霉素，潮霉素和博来霉素(zeocin)的抗性基因)。在优选实施方式中，本发明组合的表位编码RNA不编码报告基因或标记基因。在优选实施方式中，本发明组合的表位编码RNA(或任意其他核酸，特别是如本文定义的RNA)不编码荧光素酶。在其他实施方式中，本发明组合的表位编码RNA(或所述其他核酸，特别是RNA)不编码GFP或其变体。

[0353] 根据优选的实施方式，本发明组合的表位编码RNA(或任意其他核酸，特别是如本文定义的RNA)优选地在5'至3'方向上包含以下元件：

[0354] a)5'-帽结构，优选地m7GpppN，

[0355] b)编码如本文定义的抗原(或PD-1和/或LAG-3抑制剂)或其片段或变体的至少一种表位的至少一个编码序列，

[0356] c)聚(A)尾，优选地由10至200、10至100、40至80或50至70个腺苷核苷酸组成，

[0357] d)任选地聚(C)尾，优选地由10至200个、10至100、20至70、20至60或10至40个胞嘧啶核苷酸组成，和

[0358] e)任选地组蛋白茎环，优选地包含根据SEQ ID NO:18的RNA序列。

[0359] 更优选地，本发明组合的表位编码RNA(或任意其他核酸，特别是如本文定义的RNA)优选地在5'至3'方向上包含以下元件：

[0360] a)5'-帽结构，优选地m7GpppN，

[0361] b)编码如本文定义的抗原(或PD-1和/或LAG-3抑制剂)或其片段或变体的至少一种表位的至少一个编码序列，

[0362] c)3'-UTR元件，其包含来源自α-珠蛋白基因的核酸序列，优选地包含根据SEQ ID NO:13的核酸序列的对应RNA序列，或其同系物、片段或变体，

[0363] d)聚(A)尾，优选地由10至200、10至100、40至80或50至70个腺苷核苷酸组成，

[0364] e)任选地聚(C)尾，优选地由10至200、10至100、20至70、20至60或10至40个胞嘧啶核苷酸组成，和

[0365] f)任选地组蛋白茎环，优选地包含根据SEQ ID NO:18的RNA序列。

[0366] 在进一步优选的实施方式中，本发明组合的表位编码RNA(或任意其他核酸，特别是如本文定义的RNA)优选地在5'至3'方向上包含以下元件：

[0367] a)5'-帽结构，优选地m7GpppN，

[0368] b)5'-UTR元件，其包含来源自TOP基因的5'-UTR的核酸序列或由其组成，优选地包含对应根据SEQ ID NO:15的核酸序列的RNA序列或其同系物、片段或变体，

[0369] c)编码如本文定义的抗原(或PD-1和/或LAG-3抑制剂)或其片段或变体的至少一种表位的至少一个编码序列，

[0370] d)3'-UTR元件，其包含优选地来源自α-珠蛋白基因的核酸序列，优选地包含根据SEQ ID NO:8的核酸序列的对应RNA序列，或其同系物、片段或变体；和/或

[0371] 3'-UTR元件，其包含来源自白蛋白基因的核酸序列，优选地包含根据SEQ ID NO:9的核酸序列的对应RNA序列，或其同系物、片段或变体，

[0372] e)聚(A)尾,优选地由10至200、10至100、40至80或50至70个腺苷核苷酸组成,

[0373] f)任选地聚(C)尾,优选地由10至200、10至100、20至70、20至60或10至40个胞嘧啶核苷酸组成,和

[0374] g)任选地组蛋白茎环,优选地包含根据SEQ ID NO:18的RNA序列。

[0375] 在进一步优选的实施方式中,本发明组合的表位编码RNA(或任意其他核酸,特别是如本文定义的RNA)优选地在5'至3'方向上包含以下元件:

[0376] a)5'-帽结构,优选地m7GpppN,

[0377] b)5'-UTR元件,其优选地包含来源自TOP基因的5'-UTR的核酸序列或由其组成,优选地包含对应根据SEQ ID NO:16的核酸序列的RNA序列或其同系物、片段或变体,

[0378] c)编码如本文定义的抗原(或PD-1和/或LAG-3抑制剂)或其片段或变体的至少一种表位的至少一个编码序列,

[0379] d)聚(A)尾,优选地由10至200、10至100、40至80或50至70个腺苷核苷酸组成。

[0380] 优选地,本文定义的RNA包含包含本文定义的至少一个编码序列,其通常包含约50至约20000、或500至约20000个核苷酸、或约500至约20000个核苷酸、或约500至约10000个核苷酸、或约1000至约10000个核苷酸、或优选地约1000至约5000个核苷酸、或甚至更优选地约1000至约2500个核苷酸的长度。

[0381] 根据优选的实施方式,RNA可以是mRNA、自我复制RNA、环状RNA、或复制子RNA。

[0382] 在实施方式中,RNA是环状RNA。如本文所用,"环状RNA"必须理解为环状多核苷酸,其可编码如本文所定义的至少一种抗原肽或蛋白。因此,在优选的实施方式中,所述环状RNA包含至少一种编码序列,其编码至少一种来源自YFV的抗原肽或蛋白或其如本文所定义的片段或变体。可以使用本领域提供的各种方法进行circRNA的产生。例如,US6210931教导了一种通过将DNA片段插入含有具有自发切割和自环化能力的序列的质粒中来合成circRNA的方法。US5773244教导了通过制备编码RNA环化酶核酶的DNA构建体,将DNA构建体表达为RNA,然后使RNA自我剪接来产生circRNA,其在体外产生不含内含子的circRNA。WO1992001813教导了通过合成线性多核苷酸,在杂交条件下将线性核苷酸与互补的连接寡核苷酸组合,并连接线性多核苷酸来制备单链环状核酸的方法。本领域技术人员还可以使用WO2015034925或WO2016011222中提供的方法来产生环状RNA。因此,US6210931、US5773244、WO1992001813、WO2015034925和WO2016011222中提供的用于产生环状RNA的方法通过引用并入本文。

[0383] 在实施方式中,RNA是复制子RNA。术语"复制子RNA"将被本领域普通技术人员认识和理解,并且例如旨在是优化的自我复制人工RNA构建体。此类构建体包括来源自α病毒的复制元件(复制酶)和用目的人工核酸取代结构病毒蛋白(在本发明的上下文中,包含至少一个编码来源于YFV的抗原肽或蛋白的编码序列的人工核酸)。可选地,复制酶可以提供在独立的构建体上,该构建体包含来源于如下的复制酶RNA序列:如Semliki森林病毒(SFV)、辛德毕斯病毒(SIN)、委内瑞拉马脑炎病毒(VEE)、罗斯河病毒(RRV)或属于α病毒家族的其他病毒。复制酶的下游是控制本发明的人工核酸复制的亚基因组启动子,即包含至少一个编码来源于YFV的抗原肽或蛋白的编码序列的人工核酸。

[0384] 在优选实施方式中,本发明的RNA是mRNA。

[0385] RNA,优选地本发明的mRNA可以使用本领域已知的任何方法制备,包括化学合成,

诸如,固相RNA合成,以及体外方法,诸如RNA体外转录反应。

[0386] 在优选实施方式中,RNA,优选地mRNA通过RNA体外转录获得。因此,本发明的RNA优选地是体外转录的RNA。

[0387] 术语“RNA体外转录”或“体外转录”涉及其中RNA在无细胞系统中合成(体外)的方法。RNA可以通过合适的DNA模板的DNA依赖性体外转录获得,根据本发明,该模板是线性化的质粒DNA模板或PCR扩增的DNA模板。用于控制RNA体外转录的启动子可以是任何DNA依赖性RNA聚合酶的任何启动子。DNA依赖性RNA聚合酶的具体实例是T7,T3,SP6或Syn5 RNA聚合酶。在本发明的一个优选实施方案中,DNA模板用合适的限制酶线性化,然后其进行RNA体外转录。

[0388] 用于RNA体外转录的试剂通常包括:DNA模板(线性化质粒DNA或PCR产物),其具有对其各自的RNA聚合酶(诸如噬菌体编码的RNA聚合酶(T7、T3、SP6、或Syn5))具有高结合亲和力的启动子序列;用于四个碱基(腺嘌呤、胞嘧啶、鸟嘌呤和尿嘧啶)的核糖核苷酸三磷酸酯(NTP);任选地,如本文所定义的帽类似物(如,m7G(5')ppp(5')G(m7G));任选地,如本文所定义的进一步修饰的核苷酸;,能够结合DNA模板(例如T7、T3、SP6、或Syn5 RNA聚合酶)内的启动子序列的DNA依赖性RNA聚合酶;任选地,用于灭活任何可能污染的RNase的核糖核酸酶(RNase)抑制剂;任选地,降解焦磷酸酯的焦磷酸酶,其可抑制RNA体外转录;$MgCl_2$,其供应Mg^{2+}离子作为聚合酶的辅助因子;维持适当的pH值的缓冲液(TRIS或HEPES),其还可含有抗氧化剂(例如DTT),和/或多胺,例如最佳浓度的亚精胺,如WO2017/109161中公开的包含TRIS-柠檬酸盐的缓冲液系统。

[0389] 在实施方式中,用于RNA体外转录的核苷酸混合物可另外含有如本文所定义的修饰的核苷酸。在该上下文中,优选的修饰的核苷酸包含假尿苷(ψ)、N1-甲基假尿苷(m1ψ)、5-甲基胞嘧啶和5-甲氧基尿苷。

[0390] 在优选实施方式中,用于RNA体外转录反应的核苷酸混合物(即,混合物中每种核苷酸的分数)可针对给定的RNA序列优化,优选地,如WO2015/188933所描述。

[0391] 在必须产生多于一种如本文所定义的不同RNA的实施方式中,例如,在必须产生2、3、4、5、6、7、8、9、10或甚至更多不同的人工RNA(如,编码不同的YFV prME抗原)的情况下,可以适当地使用WO2017/109134中描述的方法。

[0392] 在RNA疫苗生产的上下文中,可能需要提供GMP级RNA。GMP级RNA可以使用监管机构批准的制造工艺生产。因此,在特别优选的实施方式中,现有的良好生产规范(GMP)下,在DNA和RNA水平上实施各种质量控制步骤,优选地根据WO2016/180430,进行RNA生产。在优选实施方式中,本发明的RNA是GMP级RNA,特别是GMP级mRNA。

[0393] 使用PureMessenger® (CureVac,Tübingen,德国;RP-HPLC根据WO2008/077592)和/或切向流过滤(如WO2016/193206中所描述)优选地纯化获得的RNA产物。

[0394] 在进一步优选的实施方式中,根据WO2016/165831或WO2011/069586冻干RNA,特别是纯化的RNA,以产生如本文所定义的温度稳定的干燥人工RNA(粉末)。根据WO2016/184575或WO2016184576,还可以使用喷雾干燥或喷雾冷冻干燥来干燥本发明的RNA,特别是纯化的RNA,以产生如本文所定义的温度稳定的RNA(粉末)。因此,在制造和纯化RNA的上下文中,WO2017/109161、WO2015/188933、WO2016/180430、WO2008/077592、WO2016/193206、WO2016/165831、WO2011/069586、WO2016/184575和WO2016184576的公开内容通过引用并入本文。

[0395] 因此，在优选实施方式中，RNA是干燥的RNA，特别是干燥的mRNA。

[0396] 如本文所用的术语“干燥的RNA”必须理解为已经如上定义被冻干、或喷雾干燥、或喷雾冷冻干燥以获得温度稳定的干燥RNA(粉末)的RNA。

[0397] 在优选实施方式中，本发明的人工RNA是纯化的RNA，特别是纯化的mRNA。

[0398] 本文使用的术语“纯化的RNA”或“纯化的mRNA”必须理解为在某些纯化步骤(如，HPLC、TFF、Oligo d(T)纯化、沉淀步骤)之后具有比起始材料(如，体外转录的RNA)更高纯度的RNA。纯化的RNA中基本上不存在的典型杂质包括肽或蛋白(如，来源自DNA依赖性体外转录RNA的酶，如RNA聚合酶、RNA酶、焦磷酸酶，限制性内切核酸酶、DNA酶)、亚精胺、BSA、无效RNA序列、RNA片段(短双链RNA片段、无效序列等)、游离核苷酸(修饰的核苷酸，常规NTP，帽类似物)、模板DNA片段、缓冲组分(HEPES、TRIS、$MgCl_2$)等。其他可能来自如发酵程序的潜在杂质包含细菌杂质(生物负载(bioburden)，细菌DNA)或来源自纯化程序的杂质(有机溶剂等)。因此，在这方面，希望”RNA纯度的程度”尽可能接近100％。对于RNA纯度的程度，还希望全长RNA转录物的量尽可能接近100％。因此，本文使用的”纯化的RNA”具有大于75％、80％、85％、非常特别是90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、和最佳的99％或更高的纯度的程度。纯度的程度可以例如通过分析型HPLC确定，其中上面提供的百分比对应于目标RNA的峰面积与代表副产物的所有峰的总面积之间的比。可选地，纯度的程度可以例如通过分析型琼脂糖凝胶电泳或毛细管凝胶电泳来确定。

[0399] 必须理解的是，如本文定义的“干燥的RNA”和如本文所定义的“纯化的RNA”或如本文定义的“GMP级mRNA”可具有优异的稳定性特性(体外，体内)和改善的效率(如，mRNA体内更好的可翻译性)，并因此特别适用于本发明的上下文中。

[0400] 除了至少一种表位编码RNA(如上所定义)之外，本发明的组合还包含至少一种PD-1途径抑制剂和至少一种LAG-3途径抑制剂。所述途径抑制剂在下面更详细地描述。

[0401] 抑制剂

[0402] PD-1途径

[0403] 程序性死亡-1(PD-1、PDCD1)是I型跨膜蛋白，属于T细胞调节剂扩大的CD28家族。PD-1缺少CD28家族其他成员同型二聚体化所需要的近膜半胱氨酸残基。结构和生物化学分析显示PD-1在溶液中和在细胞表面上是单体的(Okazaki和Honjo，2007.Int Immunol.19(7):813-24)。PD-1在激活的T细胞、B细胞和单核细胞上表达。PD-1的较广泛的表达与其他CD28家族成员对T细胞的限制性表达相反，这表明，与其他CD28家族成员相比，PD-1调节更广谱的免疫应答。

[0404] PD-1通过在与两个配体(PD-L1或PD-L2)相互作用时招募蛋白赖氨酸磷酸酶SHP-2而负调节抗体受体信号传导。

[0405] PD-L1(B7-H1、CD274)和PD-L2(B7-DC、CD273)是由IgC-和IgV-型细胞外结构域组成的I型跨膜糖蛋白。PD-L1和PD-L2共有40％的氨基酸同一性，而PD-L1和PD-L2的人和小鼠直向同系物共有70％的氨基酸同一性。PD-L1和PD-L2都具有短的细胞质尾，而没有已知用于信号转导的基序，这表明这些配体在与PD-1相互作用时不转导任何信号。

[0406] PD-L1与PD-1的相互作用向T细胞提供至关紧要的负共刺激信号，并且作用为细胞死亡诱导剂。低浓度PD-1与PD-L1之间的相互作用导致抑制抗原特异性CD8+细胞增殖的抑制性信号的传递。在较高的浓度，这种相互作用不抑制T细胞增殖，而是减少多种细胞因子

的产生。因此，当抗原刺激弱时，与PD-L1结合可以拮抗B7-CD28信号，并且在下调T细胞应答中起重要作用。

[0407] PD-1和PD-1配体在抑制T细胞激活和增殖中的作用表明，这些蛋白可以作为用于治疗炎症、癌症或感染性疾病的治疗性靶。取决于所需要的治疗结果，需要PD-1途径的上调或下调。在治疗癌症和慢性感染时特别需要免疫系统的上调。例如，这可以通过PD-1阻断或抑制PD-1途径而实现。例如，PD-1途径的抑制可以通过针对PD-1或PD-1配体的抗体实现。在该情形中，PD-1途径抑制剂可以由PD-1信号传导导致的T细胞衰竭，由此恢复或增强T细胞功能(例如，增殖、细胞因子产生、靶细胞杀伤)。另外，可以重新激活不响应抗原刺激的抗原T细胞。

[0408] PD-1途径的成员是与PD-1信号传导相关的所有蛋白。一方面，这些可以是包括诱导PD-1上游的PD-1信号传导的蛋白，诸如例如，PD-1的配体，即PD-L1和PD-L2，和信号转导受体PD-1。另一方面，这些可以是PD-1受体下游的信号转导蛋白。在本发明的情形中特别优选作为PD-1途径成员的是PD-1、PD-L1和PD-L2。

[0409] 在本发明的情形中，“PD-1途径抑制剂”优选在本文中定义为能够损害PD-1途径信号传导、优选由PD-1受体介导的信号传导的化合物。因此，PD-1途径抑制剂可以是能够损害(即，减少、抑制、阻止)PD-1途径信号传导的针对PD-1途径的任何成员的任何抑制剂。PD-1途径抑制剂可以在细胞内起作用(如，通过干扰PD-1途径的细胞内信号传导组分，其通常涉及由PD-1与其各自的配体结合诱导的信号传导)，或者在细胞外起作用(如，通过干扰PD-1或其各自的配体)。在该上下文中，“干扰”在其所有语法术语中意指“与...相互作用”、“调节”或“改变”至各自信号传导途径优选受损害的程度。

[0410] 在该上下文中，抑制剂可以是本文定义的拮抗抗体，其靶向PD-1途径的任意成员，优选地靶向PD-1受体，或其配体PD-L1或PD-L2。PD-1途径抑制剂可以是编码多肽PD-1途径抑制剂，特别是拮抗性抗体的核酸。或者，PD-1途径抑制剂可以是拮抗性结合蛋白，如，可溶性PD-1受体或融合蛋白，或编码所述拮抗性结合蛋白的核酸。PD-L1或PD-L2或其片段或衍生物也可用作PD1途径抑制剂。编码PD-L1或PD-L2的核酸或其片段或衍生物也被设想为本文的PD-1途径抑制剂。此外，PD-1途径抑制剂可以是拮抗性核酸，例如siRNA(小干扰RNA)、shRNA、miRNA或针对PD-1途径成员，优选地PD-1、PD-L1或PD-L2的任何其他反义RNA。另外，PD-1途径抑制剂可以是能够抑制PD-1途径信号传导的小分子抑制剂，如PD-1结合肽或小有机分子。

[0411] 优选地，PD-1途径抑制剂因此选自如本文所定义的拮抗性抗体或编码所述抗体的核酸，如本文所定义的拮抗性结合蛋白或编码所述拮抗性结合蛋白的核酸，肽或编码所述肽的核酸，拮抗性核酸或小有机分子。

[0412] LAG-3途径

[0413] LAG-3(也称为CD223)是免疫球蛋白超家族(IgSF)的成员，并对T细胞功能产生多种生物学影响。LAG-3是与CD4具有结构同源性的跨膜蛋白，包括4个胞外IgG结构域。膜远端IgG结构域含有短的氨基酸序列，即在其他IgG超家族蛋白中未发现的所谓的额外环。已证明LAG-3主要通过定位于D1结构域的一小部分氨基酸以高亲和力与II类MHC结合-这与通过涉及多个残基的相当大的表面与II类MHC相互作用的CD4形成鲜明对比。LAG-3的细胞内结构域相对较短并且含有LAG-3介导的T细胞功能调节所需的独特氨基酸序列(KIEELE)。

[0414] LAG-3是各种免疫检查点受体之一，并且在自然杀伤细胞(NK)、B细胞、T细胞和树突细胞(DC)的细胞膜上表达。LAG-3在许多方面是T细胞激活标记物，在激活后3-4天在CD4+和CD8+T细胞上表达。据报道，LAG-3/MHC II类分子相互作用下调CD4+T淋巴细胞的抗原依赖的但非抗原独立的刺激。已经进一步证明减轻CD4+和CD8+T细胞的体外和体内扩张，从而证实其作为负调节剂的作用。进一步揭示KIEELE结构域在LAG-3的负调节功能中起关键作用;即，缺乏该结构域的LAG-3分子不能在体外或体内负调节T细胞功能(Goldberg和Drake，Curr Top Microbiol Immunol.2011;344:269-278以及He等人，Cancer Sci.2016Sep;107(9):1193-1197)。

[0415] 作为T细胞介导的免疫反应的负调节子，LAG-3可降低机体抵抗感染或对抗癌症的能力。因此，设想损害LAG-3介导的信号传导以增强针对感染性病原体和恶性细胞的免疫应答。本文所述的LAG-3途径抑制剂优选地用于逆转由LAG-3信号传导引起的T细胞衰竭和无反应性，从而恢复或增强癌症或感染性疾病中的T细胞功能(如，增殖、刺激、细胞因子产生，靶细胞杀伤)。

[0416] LAG-3途径的成员与LAG-3信号传导相关的所有蛋白。一方面，这些可能是其诱导LAG-3，如，MHC-II作为LAG-3配体或LAG-3本身上游的LAG-3信号传导的蛋白。另一方面，这些可能是LAG-3受体下游的信号转导蛋白。作为本发明上下文中LAG-3途径的成员，特别优选的是LAG-3。

[0417] 在本发明的情形中，“LAG-3途径抑制剂”优选在本文中定义为能够损害LAG-3途径信号传导、优选由LAG-3受体介导的信号传导的化合物。因此，LAG-3途径抑制剂可以是能够损害(即，减少、抑制、阻止)LAG-3途径信号传导的针对LAG-3途径的任何成员的任何抑制剂。LAG-3途径抑制剂可以在细胞内起作用(如，通过干扰LAG-3途径的细胞内信号传导组分，其通常涉及由LAG-3与其各自的配体结合诱导的信号传导)，或者在细胞外起作用(如，通过干扰LAG-3或其各自的配体)。在该上下文中，“干扰”在其所有语法术语中意指“与...相互作用”、“调节”或“改变”至各自信号传导途径优选受损害的程度。

[0418] 在该上下文中，抑制剂可以是本文定义的拮抗性抗体，其靶向LAG-3途径的任意成员，优选地靶向LAG-3受体，或其配体MHC-II。LAG-3途径抑制剂可以是编码多肽LAG-3途径抑制剂，特别是拮抗性抗体的核酸。或者，LAG-3途径抑制剂可以是拮抗性结合蛋白，如，可溶性LAG-3受体或融合蛋白，或编码所述拮抗性结合蛋白的核酸。MHC-II或其片段或衍生物也可用作PD1途径抑制剂。编码MHC-II或其片段或衍生物的核酸也被设想为本文的LAG-3途径抑制剂。此外，LAG-3途径抑制剂可以是拮抗性核酸，例如siRNA(小干扰RNA)、shRNA、miRNA或针对LAG-3途径成员，优选地LAG-3或MHC-II的任何其他反义RNA。另外，LAG-3途径抑制剂可以是能够抑制LAG-3途径信号传导的小分子抑制剂，如LAG-3结合肽或小有机分子。

[0419] 优选地，LAG-3途径抑制剂因此选自如本文所定义的拮抗性抗体或编码所述抗体的核酸、如本文所定义的拮抗性结合蛋白或编码所述拮抗性结合蛋白的核酸、肽或编码所述肽的核酸、拮抗性核酸或小有机分子。

[0420] PD-1和LAG-3途径抑制剂类型

[0421] 如上所述，本发明组合中包含的PD-1途径抑制剂和/或LAG-3途径抑制剂可以独立地选自抗体(或编码所述抗体的核酸)、蛋白(或编码所述蛋白的核酸)、肽(或编码所述肽的

核酸)、核酸和小有机分子。在下文中,本公开内容通常可将PD-1途径抑制剂和LAG-3途径抑制剂称为“途径抑制剂”或“抑制剂”。通常并且除非另有说明,当提及“途径抑制剂”或“抑制剂”时,本公开涉及PD-1途径抑制剂、LAG-3途径抑制剂或两者。PD-1途径抑制剂优选是能够损害(即减少、抑制、阻止)PD-1途径信号,优选地由PD-1介导的信号传导。它可以作为竞争性或非竞争性PD-1拮抗剂。LAG-3途径抑制剂优选地是能够损害(即减少,抑制,阻止)LAG-3信号传导,优选地由LAG-3介导的信号传导。它可以作为竞争性或非竞争性LAG-3拮抗剂起作用。

[0422] 在该上下文中,“拮抗剂”是通过与靶受体结合来抑制或减少激动剂介导的生物反应的物质;而“激动剂”是与靶受体结合并引发生物反应的物质。在这方面,“竞争性拮抗剂”结合但不激活它们的靶受体。它们通常与可用的激动剂竞争(活性)结合位点,并因此能够从所述结合位点置换激动剂(特别是如果以足够的量存在),导致靶受体激活的频率较低。竞争性拮抗剂包括可逆竞争性拮抗剂(通过非共价相互作用与其靶受体结合)或不可逆竞争性拮抗剂(通过共价相互作用永久地与其靶受体结合)。“非竞争性拮抗剂”与其靶受体的变构位点(即与活性位点不同的结合位点)结合。因此,非竞争性拮抗剂通常不与激动剂在活性位点竞争结合。一旦结合,这种拮抗剂可以诱导或阻止靶受体的构象变化,导致在激动剂结合后受体介导的信号传导损害。

[0423] 抗体和编码其的核酸

[0424] 在优选实施方式中,本发明组合的途径抑制剂独立地选自抗体或其变体、片段或衍生物。所述抗体可选自人、人源化、嵌合、单克隆或多克隆抗体,抗体重链和/或抗体轻链。在进一步优选的实施方式中,本发明组合的途径抑制剂选自编码此类抗体、变体、片段或衍生物的核酸。

[0425] 抗体

[0426] “抗体”可以选自任何抗体,如,本领域已知的任何重组产生的或天然存在的抗体,特别是适用于治疗,诊断或科学目的,特别是针对PD-1、PD-L1或PD-L2(用于PD-1途径抑制剂)或LAG-3(用于LAG-3途径抑制剂)的抗体。本文中,术语“抗体”以其最广泛的含义使用,并且具体涵盖具有多表位特异性的单克隆和多克隆抗体(包括,拮抗剂和阻断或中和抗体)和抗体种类。根据本发明,“抗体”通常包含本领域已知的任何抗体(如,IgM、IgD、IgG、IgA和IgE抗体),例如天然存在的抗体,通过在宿主生物体中免疫产生的抗体,从天然存在的抗体或通过在宿主生物体中通过免疫产生的或通过本领域已知的生物分子方法重组产生的抗体中分离或鉴定的抗体,以及嵌合抗体,人抗体,人源化抗体,双特异性抗体,胞内抗体(即在细胞中表达并任选地定位于特定细胞区室中的抗体),以及上述抗体的片段和变体。一般地,抗体由均具有可变区和恒定结构域的轻链和重链组成。轻链由N-末端可变结构域VL和C-末端恒定结构域CL组成。相反,IgG抗体的重链例如由N-末端可变结构域VH和三个恒定结构域CH1,CH2和CH3组成。根据本发明也可以使用单链抗体。

[0427] 抗体可优选地包含全长抗体,即由完整重链和完整轻链组成的抗体,如上所述。然而,抗体的衍生物,诸如抗体片段、变体或加合物也可用作根据本发明的PD-1途径抑制剂和/或LAG-3途径抑制剂。抗体片段可选自上述(全长)抗体的Fab、Fab”、$F(ab")_2$、Fc、Facb、pFc”、Fd、Fd”和Fv片段。一般地,抗体片段是本领域已知的。例如,Fab(”片段、抗原结合”)片段由重链和轻链中的每一个的一个恒定结构域和一个可变结构域组成。两个可变结构域在

特定抗原上的表位结合。两条链通过二硫键连接。scFv(“单链可变片段”)片段,例如,通常由轻链和重链的可变结构域组成。结构域通过人工键合连接,一般地是多肽键合,例如由15-25个甘氨酸、脯氨酸和/或丝氨酸残基组成的肽。

[0428] 术语“多克隆抗体”通常是指针对特定抗原或免疫原的抗体混合物或蛋白的表位,其通过免疫宿主生物体(例如哺乳动物)产生,如哺乳动物包括山羊、牛、猪、狗、猫、驴、猴子、猿、啮齿动物(如小鼠、仓鼠和兔子)。多克隆抗体一般不相同,并因此通常识别来自相同抗原的不同表位或区。因此,在这种情况下,通常使用不同抗体的混合物(组合物),每种抗体针对特定抗原或免疫原或蛋白的表位,特别是针对PD-1、PD-L1或PD-L2(在PD-1途径抑制剂的情况下)或LAG-3(在LAG-3途径抑制剂的情况下)。

[0429] 本文中的术语“单克隆抗体”通常是指从基本上同质的抗体群体获得的抗体,即除了可能以少量存在的可能的天然存在的突变之外,构成群体的各个抗体是相同的。单克隆抗体针对单个抗原位点是高度特异性的。此外,与通常包括针对不同决定簇(表位)的不同抗体的常规(多克隆)抗体制剂相反,每种单克隆抗体针对抗原上的单一决定簇。例如,如上定义的单克隆抗体可以通过Kohler和Milstein,Nature,256:495(1975)首次描述的杂交瘤方法制备,或者可以通过如美国专利号4,816,567中描述的重组DNA方法制备。例如,“单克隆抗体”也可以使用从McCafferty等,Nature,348:552-554(1990),描述的技术产生的噬菌体文库中分离。根据Kohler和Milstein,将感兴趣的免疫原(抗原)注射到宿主例如小鼠中,并在一段时间后收获响应免疫原产生的B细胞淋巴细胞。将B细胞与获自小鼠的骨髓瘤细胞组合,并导入允许B细胞与骨髓瘤细胞融合的培养基中,产生杂交瘤。然后将这些融合细胞(杂交瘤)置于微量滴定板的不同孔中并生长以产生单克隆抗体。测试单克隆抗体以确定它们中的哪些适合于检测目标抗原。选择后,可以在细胞培养物中或通过将杂交瘤注射到小鼠中来生长单克隆抗体。在本发明的上下文中,特别优选的是针对PD-1、PD-L1和PD-L2(在PD-1途径抑制剂的情况下)或针对LAG-3(在LAG-3途径抑制剂的情况下)的单克隆抗体。

[0430] “嵌合抗体”优选是其中上述抗体的恒定结构域被来自其他生物(优选地人序列)的抗体序列替换的抗体。

[0431] “人源化(非人)抗体”是其中抗体的恒定和可变结构域(除了高变区之外)被人序列取代的抗体。

[0432] “人抗体”可以从人组织或免疫的非人宿主生物体中分离,所述非人宿主生物体是人IgG基因基因座的转基因。另外,可以通过使用噬菌体展示来提供人抗体。

[0433] 在本发明的上下文中,“双特异性抗体”优选是如此抗体,其通过两个不同的抗原结合结构域充当效应子和相应靶之间的衔接子,如为了招募靶向效应细胞(如,CTL、NK细胞、巨噬菌体、粒细胞等)的效应分子(如毒素、药物、细胞因子等)的目的(参见综述:Kontermann RE,Acta Pharmacol.Sin,2005,26(1):1-9)。本文所述的双特异性抗体通常被配置为通过两种不同的抗原结合结构域识别,如,本文所述的两种不同的抗原、免疫原、表位、药物、细胞(或细胞上的受体)或其他分子(或结构)。“双特异性的”或“双特异性”是指抗体的两个抗原结合区对两个不同的表位具有特异性。因此,可以使不同的抗原、免疫原或表位等紧密结合在一起,任选地允许两种组分直接相互作用。例如,诸如效应细胞和靶细胞等不同细胞可通过双特异性抗体连接。本发明包括双特异性抗体或其片段,其在细胞(如肿瘤细胞)的表面上结合如PD-1和/或其配体PD-L1和PD-L2(在PD-1途径抑制剂的情况下)和/或

LAG-3(在LAG-3途径抑制剂的情况下)细胞,条件是所述相互作用优选导致PD-1或LAG-3信号传导途径的损害。

[0434] 在本发明的上下文中,“三特异性抗体”优选是如此抗体,其通过三个不同的抗原结合结构域充当效应子和两个相应靶之间的衔接子,如为了招募靶向效应细胞(如,CTL、NK细胞、巨噬菌体,粒细胞等)的效应分子(如毒素,药物,细胞因子等)的目的(参见综述:Kontermann RE,Acta Pharmacol.Sin,2005,26(1):1-9)。本文所述的三特异性抗体通常被配置为通过三种不同的抗原结合结构域识别,如,本文所述的三种不同的抗原、免疫原、表位、药物、细胞(或细胞上的受体)或其他分子(或结构)。“三特异性的”或“三特异性”是指抗体的三个抗原结合区对三个不同的表位具有特异性。因此,可以使不同的抗原、免疫原或表位等紧密结合在一起,任选地允许两种组分直接相互作用。例如,诸如效应细胞和靶细胞等不同细胞可通过三特异性抗体连接。本发明包括双特异性抗体或其片段,其在细胞(如肿瘤细胞)的表面上结合如,PD-1和/或其配体PD-L1和PD-L2(在PD-1途径抑制剂的情况下)和/或LAG-3(在LAG-3途径抑制剂的情况下)细胞,条件是所述相互作用优选导致PD-1或LAG-3信号传导途径的损害。

[0435] 在本发明组合中用作PD-1和/或LAG-3抑制剂的特别优选的抗体是双或三特异性抗体,其识别两种或三种不同的检查点分子,例如,PD-1、PD-L1、PD-L2、LAG-3、TIM-3、B7-H3(也称为CD276)和B7-H4(也称为B7-S1、B7x和VCTN1)、CTLA4、A2aR等,特别是由Pardoll DM Nat Rev Cancer.2012 Mar 22;12(4):252-64所综述。

[0436] 抗体优选能够特异性结合其靶表位。本文所用的术语“特异性结合”是指试剂(如抗体)更容易与其预期靶(即所述抗体识别的表位)结合而不是与不同的非特异性靶结合。换句话说,如果试剂(如抗体)可特异性结合其靶,那么其优先结合或识别靶,即使在存在可通过可量化测定法测量的其他非靶实体的情况下。例如,结合特异性可以通过各种配体结合测定来确定,例如放射性配体结合测定、ELISA、基于荧光的技术(如荧光偏振(FP)、荧光共振能量转移(FRET))或表面等离子体共振。优选地,特异性结合靶的试剂不会(显著地)与其他非靶实体交叉反应。

[0437] 编码抗体的核酸

[0438] 本文所述的PD-1途径抑制剂和/或LAG-3途径抑制剂可彼此独立地选自编码本文所述的抗体的核酸,或其片段、变体或衍生物。

[0439] 这类核酸优选地选自DNA,如病毒DNA、质粒DNA、PCR产物、cDNA或RNA,更优选地RNA,如病毒RNA、复制子RNA、mRNA,和最优选地mRNA,并且包含至少一个编码序列,其编码各自的抗体(或抗体片段、变体或衍生物)和任选地驱动其表达的调节元件。这类核酸包含转录起始位点,编码抗体的可读框(或抗体片段、变体或衍生物)和转录终止位点。如上所述,在表位编码RNA的背景中描述的所述核酸,特别是RNA,任何修饰,设计或实施方案同样适用于本文所述的编码抗体的核酸,加以必要的变更。

[0440] 因此,所述编码核酸的至少一个编码序列可编码抗体或其片段、变体或衍生物。具体地,核酸的至少一个编码序列可编码(a)如本文所述的抗体、(b)抗体变体,特别是本文所述的抗体的序列变体,(c)如本文所述的抗体的片段(或其变体),特别是抗原结合片段,如Fab、Fab”、F(ab”)2、Facb、Fab/c、Fd、Fd”、Fv、重链抗体、sdAb(纳米抗体),或(d)此类抗体(或其变体)的衍生物或所述抗体(或其变体)的片段,特别是抗原结合衍生物,包括scFv、

scFv”、scFv二聚体(双抗体)、scFv三聚体(三抗体),或微型抗体。

[0441] 下面,提供了适合用作PD-1或LAG-3途径抑制剂的抗体的一些优选实例。因此,所述抗体被设想为本发明组合中的PD-1或LAG-3途径抑制剂。还设想了所述抗体的变体,特别是序列变体或糖基化变体。抗体的“序列变体”是包含与“参考”(或“亲本”)抗体相比改变的氨基酸序列的抗体。设想抗体序列变体包含与亲本抗体的氨基酸序列优选地至少75%、优选地至少80%、优选地至少85%、优选地至少90%、更优选地至少95%、更优选地至少96%、更优选地至少97%同一的氨基酸序列,或由其组成。与亲本抗体的氨基酸序列相比,抗体序列变体可包含至少一个氨基酸修饰,如缺失、取代或插入。氨基酸修饰可以发生在抗体的可变区或恒定区中,包括互补决定区(CDR)、框架区或Fc部分。通常,保守氨基酸取代是优选的。术语“抗体变体”还包括与亲本抗体相比包含不同糖基化模式的“糖基化变体”。术语“抗体变体”还包括与各自的亲本抗体相比包含共价修饰的抗体。这种共价修饰包括,例如,氨基酸的磷酸化、S-亚硝基化、甲基化、N-乙酰化、脂化、二硫键形成、硫酸化、酰化和脱氨基。抗体序列变体优选地表现出与各自亲本抗体相比可比较或甚至改善的抗原结合性质(例如结合亲和力,结合特异性)。

[0442] 此外,所述抗体(或抗体变体)的片段可用作途径抑制剂。“抗体片段”是所述抗体的一段或一部分。优选地,用作途径抑制剂的抗体片段是抗原结合片段,并且优选地保留了全长抗体的抗原结合特性。此外,所述抗体(或其变体或片段)的衍生物可用作途径抑制剂。抗体衍生物包含至少一种抗体(或其变体)或所述抗体的片段,其连接至任选地通过合适的接头优选地赋予新的或另外的功能的部分。抗体衍生物可包含两个或更多个抗体片段。所述抗体衍生物优选地表现出与各自亲本抗体相比可比较或甚至改善的抗原结合性质(例如结合亲和力,结合特异性)。

[0443] PD-1途径抑制剂抗体

[0444] 在优选实施方式中,PD-1途径抑制剂是抗体或编码此类抗体的核酸。

[0445] 用作PD-1途径抑制剂的抗体优选能够特异性结合其各自的靶(即PD-1途径的成员,包括PD-1、PD-L1或PD-L2)并抑制PD-1途径信号传导。

[0446] 因此设想此类抗体特异性结合PD-1(特别是其细胞外结构域)、PD-L1或PD-L2;例如以使PD-1和PD-L1或PD-L2之间的受体-配体相互作用被阻止或破坏的方式,从而损害PD-1途径信号传导。如,PD-1途径抑制剂抗体可以与受体配体相互作用所需的结合位点近端结合。通过空间阻碍受体配体相互作用,和/或将PD1配体从其在PD-1受体上的活性结合位点置换,可以阻止或破坏PD-1介导的信号传导。如,这种拮抗性抗体可以与PD-1上的PD-L1结合位点紧密结合,从而抑制PD-L1与PD-1的结合。

[0447] 用作PD-1途径抑制剂的优选抗体包括:

[0448] (a)抗PD-1抗体,纳武单抗(也称为MDX-1106、BMS-936558、ONO-4538,商标名OPDIVO®,CAS编号946414-94-4)(Brahmer等人,2010.J Clin Oncol.28(19):3167-75);匹敌丽珠单抗(Pidilizumab)(也称为CT-011)(Berger等人,2008.Clin Cancer Res.14(10):3044-51);派姆单抗(也称为MK-3475,商标名KEYTRUDA®,CAS编号1374853-91-4)(Poole RM Drugs.2014;74(16):1973-81);PF-06801591(ClinicalTrials.gov标识符:NCT02573259);mDX-400(Merck&Co),BGB-A317(Desai,J Clin Oncol 34,2016(suppl;abstr 3066),;MEDI0680(也称为AMP-514)(ClinicalTrials.gov标识符:NCT02013804);

PDR001(ClinicalTrials.gov标识符:NCT02678260),;斯巴达单抗(Novartis AG,CAS编号1935694-88-4),西米普利单抗(Cemiplimab)(REGN2810,CAS编号1801342-60-8,(Falchook等人.J Immuother Cancer.2016Nov;4:70);匹敌丽珠单抗(Pfizer,CAS编号1036730-42-3),SHR-1210(Incyte Corp,Jiangsu Hengrui Medicine Co Ltd,ClinicalTrials.gov标识符:NCT02742935),TSR-042(ClinicalTrials.gov标识符:NCT02715284);ANA011(AnaptysBio,Inc.);AGEN-2034(Agenus,Inc.);AM-0001(ARMO Biosciences);BGB-108(BeiGene);AK-104和AK-105(Akeso Biopharma),ABBV-181(AbbVie),BAT-1306(Bio-Thera Solutions),AMP-224(MedImmune),LZM-009(Livzon Pharmaceutical Group),GLS-010(Arcus Biosciences),多斯塔利单抗(Dostarlimab)(Tesaro Inc,CAS编号2022215-59-2),MGA-012(Incyte Corp),替雷利珠单抗(BGB-A317,(BeiGene,CAS编号1858168-59-8);BI-754091(Boehringer Ingelheim);CBT-501(CBT Pharmaceuticals,Inc.);ENUM-003(Enumeral Biomedical Holdings Inc);ENUM-388D4(Enumeral Biomedical Holdings Inc);ENUM-244C8(Enumeral Biomedical Holdings Inc),IBI-308(Eli LillyInnovent Biologics,Inc.);JNJ-63723283(Johnson&JohnsonJanssen Research&Development,LLC,ClinicalTrials.gov标识符NCT02908906);CS-1003(CStone Pharmaceuticals),Sym-016和Sym-021(Symphogen),JS-001(Shanghai Junshi Bioscience Co.,Ltd.,ClinicalTrials.gov标识符NCT02857166,JTX-4014(Jounce Therapeutics,Inc.);JY-034(Beijing Eastern Biotech Co),SSI-361(Lyvgen Biopharma Ltd),YBL-006(Y-Biologics),AK-103(Akeso Biopharma Inc);MCLA-134(Merus);HAB-21(Suzhou Stainwei Biotech Inc),CX-188(CytomX Therapeutics Inc),PF-06801591(Pfizer,ClinicalTrials.gov标识符NCI-2016-00704);HEISCOIII-003(Sichuan Haisco Pharmaceutical Co),XmAb-20717(Xencor Inc,双特异性的,识别CTLA-4和PD1),XmAb-23104(Xencor Inc),MGD-019(MacroGenics Inc,双特异性的,识别CTLA4和PD1),AK-112(Akeso Biopharma,双特异性的),AT-16201(AIMM Therapeutics BV),BCD-100(Biocard),TSR-075(Tesaro Inc,双特异性的,识别LAG3和PD1),MGD-013(MacroGenics;双特异性的;识别PD-1和LAG-3),BH-2922(Beijing Hanmi Pharmaceutical Co,双特异性的,识别EGFR和PD1),BH-2941(Beijing Hanmi Pharmaceutical Co,双特异性的,识别PDL1和PD1),BH-2950(Beijing Hanmi Pharmaceutical Co,双特异性的,识别Her2和PD1),BH-2954(Beijing Hanmi Pharmaceutical Co,双特异性的),STIA-1110(Les Laboratoires Servier SASSorrento Therapeutics);244C8和388D4(参见Scheuplein F等人[摘要].Proc 107th Ann Meet Am Ass Canc Res;2016 Apr 16-20;New Orleans,LA.Philadelphia(PA):AACR;Cancer Res 2016;76(14Suppl):Abstract nr 4871);

[0449] b)抗PDL1抗体,BMS-936559(也称为MDX-1105,ViiV Healthcare UK Ltd)(Brahmer等人.2012.N Engl J Med.366(26):2455-65),阿替唑单抗(Atezolizumab)(也称为MPDL3280A;Roche,商标名TECENTRIQ®,CAS编号1380723-44-3)(Cha等人.Semin Oncol.2015 Jun;42(3):484-7),德瓦鲁单抗(也称为MEDI4736,MedImmune,AstraZeneca,CAS编号1428935-60-7)(Antonia等人.Lancet Oncol.2016 Mar;17(3):299-308);阿维鲁单抗(也称为MSB0010718C,Merck,CAS编号1537032-82-8)(Boyerinas等人.Cancer Immunol Res.2015 Oct;3(10):1148-57);BGBA-333(BeiGene Ltd),CX-072(CytomX

Therapeutics Inc),KD033(Kadmon Corp,LLC),KN-035(ΑMab Co),BCD-135(Biocad);CBA-0710(Sorrento Therapeutics Inc),CK-301(Checkpoint Therapeutics Inc),MSB-2311(MabSpace Biosciences),LY-3300054(Eli Lilly),CS-1001(CStone Pharmaceuticals Co),FAZ-053(Novartis AG),SHR-1316(Jiangsu Hengrui Medicine Co),FS-118(F-star Biotechnology Ltd,双特异性的,识别PD-L1和LAG-3),HLX-10(Shanghai Henlius Biotech Co),STIA-1015(Sorrento Therapeutics),BH-2941(Beijing Hanmi Pharmaceutical Co,双特异性的,识别PDL1和PD1),CBT-502(Chia Tai Tianqing Pharmaceutical Group Co),STT-01(Stcube Inc),JS-003(Shanghai Junshi Bioscience Co,双特异性的),HLX-20(Shanghai Henlius Biotech Co),YBL-007(Y-Biologics),YBL-008(Y-Biologics,双特异性的,识别VEGF和PDL1),IMM-25(ImmuneOnco Bio Pharmaceuticals(Shanghai)Co),KD-036(Kadmon Corp LLC),KY-1003(Kymab Ltd),STIA-1011(Sorrento Therapeutics Inc),PMC-305(PharmAbcine Inc),IKT-203(Icell Kealex Therapeutics),AK-106(Akeso Biopharma Inc),IKT-703(Icell Kealex Therapeutics),MSB-002(MabSpace Biosciences(Suzhou)Co Ltd),STIA-100X(Sorrento Therapeutics Inc),STIA-1010(Sorrento Therapeutics Inc),STIA-1012(Sorrento Therapeutics Inc),STIB-010X(Sorrento Therapeutics Inc),STI-A1014(Sorrento Therapeutics);MCLA-145(Merus,双特异性的);和SP142(Spring Bioscience);

[0450] 以及(c)抗PDL2抗体,rHIgM12B7(Mayo Clinic)和CA-170(Aurigene Discovery Technologies Ltd,Curis)。

[0451] 在该上下文中,特别优选的是针对PD-1、PD-L1或PD-L2为双特异性抗体和/或三特异性抗体,如MCLA-134(双特异性的;识别PD-1和TIM-3);MGD-013(双特异性的;识别PD-1和LAG-3),Sym-016(三特异性的;识别PD-L1、LAG-3和TIM-3),XmAb-20717(双特异性的;识别PD-1和CTLA-4)。

[0452] 在优选实施方式中,PD-1途径抑制剂因此选自(a)如上所述的抗体,(b)抗体变体,特别是如上所述的抗体的序列变体,(c)如上所述的抗体(或其变体)的片段,特别是抗原结合片段,诸如Fab、Fab”、F(ab”)2、Facb、Fab/c、Fd、Fd”、Fv、重链抗体、sdAb(纳米抗体)或(d)这类抗体(或其变体)或所述抗体(或其变体)的片段的衍生物,特别是抗原结合衍生物,包括scFv、scFv”、scFv二聚体(双抗体)、scFv三聚体(三抗体),或微型抗体,或(e)编码(a)、(b)、(c)和/或(d)的核酸(优选地DNA或RNA,特别是mRNA)。

[0453] 在进一步优选的实施方式中,PD-1途径抑制剂抗体包括:

[0454] (a)包括根据SEQ ID NO:19(PCT/EP2016/059711的SEQ ID NO:4761)的氨基酸序列或其变体或片段,或由其组成的抗体重链;和/或包括根据SEQ ID NO:20(PCT/EP2016/059711的4768)的氨基酸序列或其变体或片段,或由其组成的抗体轻链;或者

[0455] (b)包括根据SEQ ID NO:21(PCT/EP2016/059711的4292)的氨基酸序列或其变体或片段,或由其组成的抗体重链;和/或包括根据SEQ ID NO:22(PCT/EP2016/059711的4299)的氨基酸序列或其变体或片段,或由其组成的抗体轻链;或

[0456] (c)包括根据SEQ ID NO:23(PCT/EP2016/059711的5139)的氨基酸序列或其变体或片段,或由其组成的抗体重链;和/或包括根据SEQ ID NO:24(PCT/EP2016/059711的5146)的氨基酸序列或其变体或片段,或由其组成的抗体轻链;或

[0457] (d)包括根据SEQ ID NO:25(PCT/EP2016/059711的4852)的氨基酸序列或其变体或片段,或由其组成的抗体重链;和/或包括根据SEQ ID NO:26(PCT/EP2016/059711的4859)的氨基酸序列或其变体或片段,或由其组成的抗体轻链;或

[0458] (e)包括根据SEQ ID NO:27(PCT/EP2016/059711的1590)的氨基酸序列或其变体或片段,或由其组成的抗体重链;和/或包括根据SEQ ID NO:28(PCT/EP2016/059711的1597)的氨基酸序列或其变体或片段,或由其组成的抗体轻链;或

[0459] (f)包括根据SEQ ID NO:29(PCT/EP2016/059711的379)的氨基酸序列或其变体或片段,或由其组成的抗体重链;和/或包括根据SEQ ID NO:30(PCT/EP2016/059711的368)的氨基酸序列或其变体或片段,或由其组成的抗体轻链;或

[0460] (g)包括根据SEQ ID NO:31(PCT/EP2016/059711的428)的氨基酸序列或其变体或片段,或由其组成的抗体重链;和/或包括根据SEQ ID NO:32(PCT/EP2016/059711的435)的氨基酸序列或其变体或片段,或由其组成的抗体轻链。

[0461] LAG-3途径抑制剂抗体

[0462] 针对LAG-3途径(包括LAG-3)成员的抗体可以用作根据本发明的LAG-3途径抑制剂。用作LAG-3途径抑制剂的抗体优选地能够特异性结合它们各自的靶和抑制LAG-3途径信号传导。

[0463] 因此设想这种抗体特异性结合LAG-3(特别是其细胞外结构域);因此设想此类抗体特异性结合LAG-3(特别是其细胞外结构域);例如以使LAG-3和MHC-II之间的受体-配体相互作用被阻止或破坏的方式,从而损害LAG-3途径信号传导。如,LAG-3途径抑制剂抗体可以与受体配体相互作用所需的结合位点近端结合。通过空间阻碍受体配体相互作用,和/或将LAG-3配体从其在LAG-3受体上的活性结合位点置换,可以阻止或破坏LAG-3介导的信号传导。

[0464] 用作LAG-3途径抑制剂的优选抗体包括BMS-986016,LAG525和GSK2831781(ClinicalTrials.gov标识符:NCT02195349),BI-754111(Boehringer Ingelheim),ENUM-006(Enumeral Biomedical Holdings Inc),FS-18,IMP-701(CoStim Pharmaceuticals;Novartis),IMP-731(Immutep),MGD-013(MacroGenics;双特异性的;识别PD-1和LAG-3),Sym-016(Symphogen;三特异性的;识别PD-L1、LAG-3和TIM-3),TRL-7117(Trellis Bioscience),和TSR-033(Creative Biolabs)。

[0465] 多特异性结合蛋白

[0466] 特别优选的是,PD-1途径抑制剂和LAG-3途径抑制剂包括在相同结合蛋白中,特别是在相同抗体中。因此,在优选实施方式中,PD-1和LAG-3途径抑制剂选自多特异性抗体,优选地双-或三特异性抗体,其特异性结合LAG-3和PD-1、PD-L1和/或PD-L2中任一个,所述双-或三特异性抗体任选地选自MGD-013(双特异性的;识别PD-1和LAG-3),Sym-016(三特异性的;识别PD-L1、LAG-3和TIM-3)。

[0467] 在该上下文中,“多特异性抗体”定义为抗体或抗体片段、变体或衍生物,其能够通过其抗原结合位点特异性识别几个(至少两个)不同表位(以及任选包含该表位的两个不同抗原)。该术语包括如本文其他地方所定义的双特异性和三特异性抗体。

[0468] 在优选实施方式中,LAG-3途径抑制剂因此选自(a)如上所述的抗体,(b)抗体变体,特别是如上所述的抗体的序列变体,(c)如上所述的抗体(或其变体)的片段,特别是抗

原结合片段，诸如Fab、Fab”、F(ab”)2、Facb、Fab/c、Fd、Fd”、Fv、重链抗体、sdAb(纳米抗体)或(d)这类抗体(或其变体)或所述抗体(或其变体)的片段的衍生物，特别是抗原结合衍生物，包括scFv、scFv”、scFv二聚体(双抗体)、scFv三聚体(三抗体)，或微型抗体，或编码(a)、(b)、(c)和/或(d)的核酸(优选地DNA或RNA，特别是mRNA)。

[0469] 拮抗性结合蛋白和编码其的核酸

[0470] 在进一步优选的实施方式中，至少一种PD-1途径抑制剂和/或至少一种LAG-3途径抑制剂彼此独立地选自拮抗性结合蛋白或编码其的核酸。

[0471] 拮抗性结合蛋白

[0472] “拮抗性结合蛋白”是作为拮抗剂(如上定义)起作用的蛋白。术语“蛋白”和“多肽”在本文中可互换使用，是指包含通过肽键彼此连接的至少两个氨基酸的(大)分子。如本文所用，术语“拮抗性结合蛋白”优选地是指能够特异性结合PD-1、PD-L1或PD-L2(在PD-1途径抑制剂的情况下)或LAG-3(在LAG-3抑制剂的情况下)并拮抗它们各自配体的活动，从而损害PD-1或LAG-3信号传导的蛋白。因此，在本发明的上下文中，拮抗性结合蛋白优选能够结合PD-1或LAG-3但是损害PD-1途径信号传导或LAG-3途径信号传导。术语“特异性结合”已在上文抗体的上下文中定义，并且同样适用于本文定义的拮抗性结合蛋白。术语“拮抗性结合蛋白”可以，但优选地不包括如上定义的抗体。设想用于本发明组合的拮抗性结合蛋白可以是单特异性的、双特异性的或多特异性的。拮抗性结合蛋白可以是嵌合融合蛋白，或者可以是本文讨论的受体的片段、变体或衍生物或它们各自的配体。

[0473] 在本发明的上下文中，优选的拮抗性结合蛋白包括融合蛋白和可溶性受体。

[0474] 编码拮抗性结合蛋白的核酸

[0475] 本文所述的PD-1途径抑制剂和/或LAG-3途径抑制剂可以彼此独立地选自如本文所述的编码拮抗性结合蛋白的核酸。

[0476] 这些核酸优选地选自DNA、cDNA或RNA，更优选地RNA，和最优选地mRNA，并且包含至少一个编码相应的拮抗性结合蛋白和任选地驱动其表达的调节元件的编码序列。所述核酸，特别是RNA，可包含上文表位编码RNA的上下文中描述的任何修饰(即化学、脂质或序列修饰)。

[0477] 融合蛋白

[0478] “融合蛋白”或“嵌合蛋白”是通过连接两个或多个最初编码单独的蛋白的“亲本”基因而产生的蛋白。所述融合基因的翻译产生单一多肽(即融合蛋白)。所述融合蛋白可包含由编码“亲本”多肽序列(例如结构域)的一部分或其衍生物的“亲本”基因编码的完整多肽序列，或其片段或变体。因此，融合蛋白可以保留“亲本”基因产物的生物学功能；或者可以包含另外的或替代的生物学功能。融合蛋白可包含融合多肽序列之间的肽接头或(“间隔物”)，以允许正确折叠和/或阻止融合实体的空间位阻。在本发明的上下文中，融合蛋白特别包括重组融合蛋白，即通过重组DNA技术(基因工程)人工产生的融合蛋白。用作抑制PD-1或LAG-3途径的拮抗性结合蛋白的融合蛋白通常包含能够结合PD-1(在PD-1途径抑制剂的情况下)或LAG-3(在LAG-3途径抑制剂的情况)但没有触发相应的信号传导级联的部分。通常，这类融合蛋白可包含PD-1配体或其片段(在PD-1途径抑制剂的情况下)或LAG-3配体或其片段(在LAG-3途径抑制剂的情况下)，其保留所述配体对其各自靶的结合特异性，但抑制或不引发相应的下游信号传导途径，其通常由所述配体与其靶的结合触发。融合蛋白可以

包含可以介导其他靶(例如抗体或其片段或变体,或其他结合蛋白)的结合的其他实体(蛋白片段,蛋白结构域或其他部分),毒性(例如毒素),效应子功能(例如,抗体Fc部分)或优化的药代动力学性质,例如增加的稳定性,生物利用度,吸收;分布和/或降低清除率。

[0479] PD-1途径抑制剂融合蛋白

[0480] 因此,根据本发明用作PD-1途径抑制剂的融合蛋白可包含(i)PD-L1配体或其片段、变体或衍生物;和/或(ii)PD-L2配体或其片段、变体或衍生物;和任选地(iii)任选地选自Fc免疫球蛋白的另一部分。

[0481] 术语“PD-L1”优选地是指人“程序性细胞死亡1配体1”(也称为“B7同系物1”或“B7-H1”,UniProt Acc.No.Q9NZQ7,登陆版本#144最后修改于2016年11月2日,序列版本#1)由CD274基因编码。术语“PD-L2”优选地是指人“程序性细胞死亡1配体2”(也称为“嗜乳脂蛋白”或“B7-DC”,UniProt Acc.No.Q9BQ51;登陆版本#128最后修改于2016年11月2日,序列版本#2)由PDCD1LG2基因编码。

[0482] 设想为PD-1抑制剂的融合蛋白可以包含全长PD-1L和/或PD-2L或其片段、变体或衍生物。术语“片段”、“变体”和“衍生物”已在抗体的背景下定义。各个定义适用于本文所述的融合蛋白,加以必要的变更。

[0483] 这种融合蛋白的优选实例是AMP-224。AMP-224是由PD-1配体程序性细胞死亡配体2(PD-L2,B7-DC)的细胞外结构域和人免疫球蛋白(Ig)G1的Fc区组成的重组融合蛋白,具有潜在的免疫检查点抑制和抗肿瘤活性。据报道抗PD-1融合蛋白AMP-224在慢性刺激的(但不是正常激活的)T细胞上特异性结合PD-1并减少其增殖。这可以恢复免疫功能并且可以导致细胞毒性T细胞的激活和针对肿瘤细胞的细胞介导的免疫应答(参见Smothers等人.Ann Oncol(2013)24(suppl 1):i7以及Mkrtichyan等人,2012.J Immunol.189(5):2338-47)。

[0484] 本发明进一步设想了编码如上所述的融合蛋白的核酸作为PD-1途径抑制剂。

[0485] LAG-3途径抑制剂融合蛋白

[0486] 根据本发明的用作LAG-3途径抑制剂的融合蛋白可包含(i)LAG-3配体或其片段、变体或衍生物;和任选地(ii)进一步任选地选自Fc免疫球蛋白的部分。

[0487] 设想为LAG-3抑制剂的融合蛋白可以例如包含全长MHC-II或其片段、变体或衍生物。术语“片段”、“变体”和“衍生物”已在抗体的背景下定义。各个定义适用于本文所述的融合蛋白,加以必要的变更。

[0488] 本发明进一步设想了编码如上所述的融合蛋白的核酸作为LAG-3途径抑制剂。

[0489] 可溶性PD-1或LAG-3受体

[0490] 本文所述的PD-1或LAG-3的可溶形式(本文也分别称为“可溶性PD-1受体”或“sPD-1”和“可溶性LAG-3受体”或“sLAG-3”)是在本发明的上下文中进一步优选的途径抑制剂。这种可溶形式的PD-1和LAG-3优选地保留了膜结合形式的配体结合能力,因此充当各配体的结合的竞争性抑制剂(即作为竞争性拮抗剂)。因此,sPD-1和sLAG-3优选能够抑制由各配体与其膜结合的PD-1或LAG-3受体的结合引起的信号转导。优选地,sPD-1和sLAG-3表现出与其膜结合的对应物相当的结合亲和力和结合特异性。

[0491] 在本发明的上下文中的sPD-1和sLAG-3优选地保留其膜结合的对应物的细胞外结构域(其序列如下所示),但缺少信号肽、跨膜结构域和细胞质结构域的全部或部分。

[0492] 在本发明的上下文中,可溶性PD-1和LAG-3受体不限于PD-1或LAG-3受体,其包含

展示与如下所描绘的PD-1序列(SEQ ID NO:33)和LAG-3序列(SEQ ID NO:34)(的部分)100%同一性的细胞外结构域,或由其组成。相反,术语"sPD-1"和"sLAG-3"还包括变体,包括序列变体(如包含氨基酸取代(特别是保守取代)、缺失和/或插入)和修饰的变体(包括化学和/或翻译后修饰)。所述术语还分别包括sPD-1和sLAG-3的衍生物,它们被修饰以包括另外的功能,例如,优化的制造性质(包括赋予增加的溶解度或增强的分泌,或允许纯化的部分),或体内使用的药代动力学/药效学(包括赋予增加的稳定性,生物利用度,吸收;分布和/或降低的清除率的部分)。例如,这种可溶性PD-1或LAG-3受体衍生物可以包含其他部分,通常在氨基和/或羧基末端残基处,例如,用作净化标签或稳定剂。

[0493] 本文描述的可溶性受体可以特别是缺乏跨膜和胞质结构域或配体结合不需要的序列的任何其他部分的截短受体,或包含其他部分或结构域的截短受体衍生物,其优选地暗示如所述的额外功能。

[0494] PD-1和LAG-3的可溶形式,包括其变体和衍生物,可以使用众所周知的体外重组DNA技术,使用编码合适多肽或肽的核苷酸序列来制备。可以使用本领域技术人员公知的方法构建含有相关编码序列和适当的转录/翻译控制信号的表达载体。参见,例如Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual(第三版)[Cold Spring Harbor Laboratory,N.Y.,2000]中所描述的技术。.

[0495] 可溶性PD-1受体

[0496] 在优选实施方式中,PD-1途径抑制剂是可溶性PD-1(受体)或其变体衍生物,或编码其的核酸。

[0497] 术语"可溶性PD-1(受体)"或"sPD-1"在本文中用于指基本上不含跨膜和细胞内(细胞质)多肽结构域的PD-1多肽,即缺少足够部分的这些区段,以分别提供膜锚定或信号转导。

[0498] 如本文所用,术语"PD-1"或"PD-1蛋白"或"PD-1多肽"或"PD-1受体"优选地是指人"程序性细胞死亡蛋白1"(UniProt Acc.No.Q15116,登记版本#152,最后修改于2016年11月2日,序列版本#3),由PDCD1基因或其等位基因变体或其直向同系物编码。因此,在本发明的上下文中,可溶性PD-1受体可以包含如下文SEQ ID NO:33中所描绘的以下氨基酸序列(的部分)。

[0499] SEQ ID NO:33

[0500]
```
    10        20        30        40        50
MQIPQAPWPV VWAVLQLGWR PGWFLDSPDR PWNPPTFSPA LLVVTEGDNA
    60        70        80        90       100
TFTCSFSNTS ESFVLNWYRM SPSNQTDKLA AFPEDRSQPG QDCRFRVTQL
    110       120       130       140       150
PNGRDFHMSV VRARRNDSGT YLCGAISLAP KAQIKESLRA ELRVTERRAE
    160       170       180       190       200
VPTAHPSPSP RPAGQFQTLV VGVVGGLLGS LVLLVWVLAV ICSRAARGTI
    210       220       230       240       250
GARRTGQPLK EDPSAVPVFS VDYGELDFQW REKTPEPPVP CVPEQTEYAT
    260       270       280
IVFPSGMGTS SPARRGSADG PRSAQPLRPE DGHCSWPL
```

[0501] 如上所述,还设想了包含上面描绘的多肽序列(以及特别是细胞外结构域)的同种型、变体和衍生物的可溶性受体,只要它们是可溶的并保留PD-1受体的配体结合能力即可。

[0502] 因此，在优选实施方式中，PD-1途径抑制剂是“可溶性PD-1受体”，其包含SEQ ID NO:33中描绘的氨基酸序列的一部分或包含与SEQ ID NO:33中描绘的氨基酸序列的一部分至少75％、优选地至少80％、优选地至少85％、优选地至少90％、更优选地至少95％、更优选地至少96％、更优选地至少97％、更优选地至少98％、最优选地至少99％同一的氨基酸序列。可溶形式的PD-1优选地包含细胞外PD-1结构域和/或可优选地缺少PD-1跨膜结构域和/或PD-1细胞质结构域的全部或部分，细胞外PD-1结构域包含对应于上文描绘SEQ ID NO:33的氨基酸残基21至170的氨基酸残基(下划线)，PD-1跨膜结构域包含对应于上文描绘的SEQ ID NO:33的氨基酸残基171-191的氨基酸残基，PD-1细胞质结构域包含对应于上文描绘的SEQ ID NO:33的氨基酸残基192-288的氨基酸残基。

[0503] 在进一步优选的实施方式中，PD-1途径抑制剂是包括编码如上所定义的可溶性PD-1的至少一个编码序列的核酸，优选地DNA或RNA，特别是mRNA。

[0504] 可溶性LAG-3受体

[0505] 在优选实施方式中，LAG-3途径抑制剂是可溶性LAG-3(受体)或其变体衍生物，或编码其的核酸。

[0506] 如本文所用，术语“LAG-3”或“LAG-3蛋白”或“LAG-3多肽”或“LAG-3受体”优选地是指人“淋巴细胞激活基因3”(UniProt Acc.No.P18627，登陆版本#150最后修改于2016年11月30日，序列版本#5)，由LAG3基因或其等位基因变体或其直向同系物编码。因此，在本发明的上下文中，可溶性LAG-3受体可以包含如下文SEQ ID NO:34中所描绘的以下氨基酸序列(的部分)。

[0507]

```
     10        20        30        40        50
MWEAQFLGLL FLQPLWVAPV KPLQPGAEVP VVWAQEGAPA QLPCSPTIPL
     60        70        80        90       100
QDLSLLRRAG VTWQHQPDSG PPAAAPGHPL APGPHPAAPS SWGPRPRRYT
     110       120       130       140       150
VLSVGPGGLR SGRLPLQPRV QLDERGRQRG DFSLWLRPAR RADAGEYRAA
     160       170       180       190       200
VHLRDRALSC RLRLRLGQAS MTASPPGSLR ASDWVILNCS FSRPDRPASV
     210       220       230       240       250
HWFRNRGQGR VPVRESPHHH LAESFLFLPQ VSPMDSGPWG CILTYRDGFN
     260       270       280       290       300
VSIMYNLTVL GLEPPTPLTV YAGAGSRVGL PCRLPAGVGT RSFLTAKWTP
     310       320       330       340       350
PGGGPDLLVT GDNGDFTLRL EDVSQAQAGT YTCHIHLQEQ QLNATVTLAI
     360       370       380       390       400
ITVTPKSFGS PGSLGKLLCE VTPVSGQERF VWSSLDTPSQ RSFSGPWLEA
     410       420       430       440       450
QEAQLLSQPW QCQLYQGERL LGAAVYFTEL SSPGAQRSGR APGALPAGHL
     460       470       480       490       500
LLFLILGVLS LLLLVTGAFG FHLWRRQWRP RRFSALEQGI HPPQAQSKIE
     510       520
ELEQEPEPEP EPEPEPEPEP EPEQL
```

[0508] 如上所述，本文还设想了包含上面描绘的多肽序列(以及特别是细胞外结构域)的变体、片段和衍生物的可溶性受体，只要它们是可溶的并保留LAG-3受体的配体结合能力即可。

[0509] 因此，在优选实施方式中，LAG-3抑制剂是“可溶性LAG-3受体”，其包含SEQ ID NO:34中描绘的氨基酸序列的一部分或包含与SEQ ID NO:34中描绘的氨基酸序列或其部分至少75％、优选地至少80％、优选地至少85％、优选地至少90％、更优选地至少95％、更优选地至少96％、更优选地至少97％、更优选地至少98％、最优选地至少99％同一的氨基酸序列。

可溶形式的LAG-3优选地包含细胞外LAG-3结构域和/或可优选地缺少LAG-3跨膜结构域和/或LAG-3细胞质结构域的全部或部分，细胞外LAG-3结构域包含对应于上文描绘SEQ ID NO:34的氨基酸残基29至450的氨基酸残基(下划线)，LAG-3跨膜结构域包含对应于上文描绘的SEQ ID NO:34的氨基酸残基451-471的氨基酸残基，LAG-3细胞质结构域包含对应于上文描绘的SEQ ID NO:34的氨基酸残基472-525的氨基酸残基.

[0510] 可溶性LAG-3受体衍生物的优选实例是IMP321。IMP231是可溶性LAG-3衍生的受体，其由与人IgG1的Fc部分融合的人LAG-3的细胞外部分组成。据报道IMP321通过与APC表面上的MHC II结合而拮抗正常的LAG-3信号传导，并且已显示具有强免疫刺激作用(Brignone C等人，J Immunol.2007;179(6):4202-11)。

[0511] 在进一步优选的实施方式中，LAG-3抑制剂是包括编码如上所定义的可溶性LAG-3的至少一个编码序列的核酸，优选地DNA或RNA，特别是mRNA。

[0512] 拮抗性核酸

[0513] 根据进一步优选的实施方式，本发明组合的PD-1途径抑制剂和/或LAG-3途径抑制剂彼此独立地选自拮抗性核酸，任选地选自微小RNA、siRNA、shRNA、反义RNA、或适配体。

[0514] 如本文所用，术语“拮抗性核酸”是指核酸(如上所定义)，其能够通过与靶结合来抑制或减少激动剂介导的生物受体信号传导。在该上下文中，靶可以是编码相应受体激动剂或其配体的核酸(如DNA或RNA)。例如，拮抗性核酸可以与编码PD-1，PD-L1或PD-L2的DNA或RNA序列结合(在PD-1途径抑制剂的情况下)；或编码LAG-3的DNA或RNA序列(在LAG-3抑制剂的情况下)。感兴趣的拮抗性核酸包括反义RNA，特别是微小RNA、siRNA或shRNA。

[0515] “反义RNA”或“asRNA”是单链或双链RNA分子，其表现出与天然存在的mRNA序列优选地至少90％、更优选地95％、尤其100％(dsRNA的核苷酸)的序列同一性。在本发明的上下文中，这种天然存在的mRNA序列可以编码PD-1、PD-L1或PD-L2(在PD-1途径抑制剂的情况下)或LAG-3(在LAG-3途径抑制剂的情况下)。反义RNA通常表现出编码或非编码部分的互补性，然而，在某些情况下，只要它们不消除反义RNA与其靶结合并损害靶向的信号传导途径能力，就可能出现摆动碱基(G:U)配对，核苷酸凸起和/或错配。

[0516] “微小RNA”或“miRNA”是小的(～20-24核苷酸)非编码双链RNA(dsRNA)，其能够将AGO-2 RISC复合物招募到互补的靶转录物中，从而优选地诱导miRNA-介导的RNAi途径。微小RNA通常从pri-微小RNA加工成称为pre-微小RNA的短茎环结构，并最后加工成成熟的miRNA。可以将pre-微小RNA的茎的两条链加工成成熟微小RNA。加工后，与RNA诱导的沉默复合物(RISC)中的Argonaute 2(AGO2)相关的成熟单链微小RNA通常与其胞质mRNA靶的3'UTR结合，导致翻译减少或mRNA转录物的去腺苷酸化和降解。因此，微小RNA的主要功能是通过结合靶mRNA的互补序列来(负)调节蛋白翻译。术语“微小RNA”包括miRNA、成熟单链miRNA、前体miRNA(pre-miRNA)、初级miRNA转录物(pri-miRNA)、双链体miRNA及其变体。特别设想微小RNA能够结合靶核酸的3'非翻译区内的靶位点。

[0517] “小干扰RNA”或“siRNA”是能够诱导RNAi的小的(～12-35核苷酸)非编码RNA分子。siRNA包含通过与磷酸化5'-端和羟基化3'-端，任选地与一个或两个单链悬垂核苷酸的互补碱基配对形成的RNA双链体(双链区)。双链体部分通常包含17和29个之间的核苷酸。siRNA可以从两个杂交在一起的RNA分子产生，或者可以可选地从包括自身杂交部分(shRNA)的单个RNA分子产生。siRNA的双链体部分可以但通常不包括在双链体的一条或两

条链中含有一个或多个未配对和/或错配的核苷酸的一个或多个凸起，或者可以包含一个或多个非互补核苷酸对。siRNA的一条链(称为反义链)包括与靶转录物(如靶mRNA)杂交的部分。反义链可以与靶转录物的互补区精确互补(即siRNA反义链可以与靶序列杂交而没有单个错配、摆动碱基配对或核苷酸凸起)，或在siRNA反义链和靶转录物的互补区之间可以存在一个或多个错配、摆动(G:U)碱基配对和/或核苷酸凸起。

[0518] 根据优选的实施方式，针对PD-1，PD-L1或PD-L2(在PD-1途径抑制剂的情况下)或针对LAG-3(在LAG-3抑制剂的情况下)的siRNA是双链RNA(dsRNA)，其长度为17至29，优选地为19至25，并且与编码PD-1，PD-L1或PD-L2(在PD-1途径抑制剂的情况下)或LAG-3(在LAG-3途径抑制剂的情况下)的天然存在的mRNA序列的部分或者与编码或非编码部分(优选地编码部分)优选地至少90％、更优选地为95％、尤其100％(dsRNA的核苷酸)互补。天然存在的mRNA序列的这类部分在本文中可称为“靶序列”，并且可以是编码PD-1，PD-L1或PD-L2(在PD-1途径抑制剂的情况下)或LAG-3(在LAG-3途径抑制剂的情况下)的天然存在的mRNA的任何部分。然而，根据本发明使用的双链siRNA的序列在其一般结构中与靶序列的一部分完全互补。在该上下文中，复合物的核酸分子可以是具有一般结构5'-(N17-29)-3'，优选地具有一般结构5'-(N19-25)-3'，更优选地具有一般结构5'-(N19-24)-3'，或者又更优选地具有一般结构5'-(N21-23)-3'的dsRNA，其中对于每个一般结构，每个N是靶序列的一部分的(优选地不同的)核苷酸，优选地选自靶序列的一部分的连续数目的17至29个核苷酸，并且以他们天然次序存在于一般结构5'-(N17-29)-3'中。原则上，具有在靶序列中出现的长度为17至29，优选地为19至25个碱基对的所有部分，可用于制备如本文所定义的dsRNA。同样地，用作siRNA的dsRNA也可以针对不位于编码序列中的mRNA序列，特别是不位于靶序列的5'非编码序列中，例如，因此针对具有调节功能的靶序列的非编码序列。用作siRNA的dsRNA的靶序列因此可以位于靶序列的翻译和非翻译区和/或mRNA序列的控制元件区中。用作针对PD-1，PD-L1或PD-L2(在PD-1途径抑制剂的情况下)或LAG-3(在LAG-3途径抑制剂的情况下)的siRNA的dsRNA的靶序列也可以位于非翻译和翻译序列的重叠区；特别地，靶序列可以包含mRNA序列的编码序列的起始三联体上游的至少一个核苷酸。

[0519] “短发夹RNA”或“shRNA”是包含至少两个互补部分的单链RNA分子，所述互补部分杂交或能够杂交以形成足够长以介导RNAi的双链(双链体)结构。这些互补部分的长度通常在17～29个核苷酸之间，通常长度至少为19个碱基对。shRNA还包含至少一个单链部分，通常长度在1～10个核苷酸之间，其形成连接形成双链体部分的互补链的环。双链体部分可以但通常不包含一个或多个由一个或多个未配对的核苷酸组成的凸起。如上所述，认为shRNA被RNAi机器加工成siRNA(参见上文)。因此，shRNA是siRNA前体，并且被认为通过siRNA介导的RNAi途径诱导基因沉默。

[0520] “适配体”或“寡核苷酸适配体”是由RNA或单链DNA寡核苷酸组成的小核酸配体，其对其靶标具有高特异性和亲和力。这些短的化学合成的寡核苷酸折叠成特定的三维(3D)结构。与其他核酸分子探针相反，适配体通过结构识别与其靶相互作用并与其结合，该过程类似于抗原-抗体反应的结构识别。适配体可用于靶向PD-1信号传导途径(在PD-1途径抑制剂的情况下)或LAG-3信号传导途径(在LAG-3途径抑制剂的情况下)的任何成员，从而拮抗PD-1或LAG-3动作。本文所用的术语“适配体”包括单、双和多价适配体，单、双和多特异性适配体，包含与药物(例如化学治疗剂)共价偶连(任选地通过合适的接头)的适配体的适配体-

药物缀合物(ApDC),与高分子量聚合物(如PEG)偶连的适配体,适配体-束缚DNA纳米链(nanotrain)(aptNTrs),与载体(如共聚物、脂质体金属纳米颗粒或病毒样颗粒)相关的适配体,适配体-Fc缀合物和适配体-siRNA或适配体-miRNA嵌合体(参见Sun等人.Molecular Therapy Nucleic Acids(2014)3,e182以查阅)。

[0521] 小分子

[0522] 根据进一步优选的实施方式,本发明组合的PD-1途径抑制剂和/或LAG-3途径抑制剂彼此独立地选自抑制PD-1和/或LAG-3途径信号传导的小分子。

[0523] 在该上下文中,特别优选的实例是:CA-170(口服小分子;PD-L1/PD-L2/VISTA拮抗剂),CA-327(口服小分子;PD-L1/TIM3拮抗剂);和XCE853(合成化合物;PD-1拮抗剂)。

[0524] (药物)组合物

[0525] 在进一步方面,本发明提供了包含根据本发明的组合和至少一种药学上可接受的载体的组合物。根据本发明的组合物优选地作为药物组合物或作为疫苗提供。

[0526] “疫苗”通常被理解为提供抗原,优选地免疫原的至少一个表位的预防或治疗材料。“提供至少一个表位”是指,例如,疫苗包含表位或疫苗包含如编码表位或包含表位的分子的分子。根据本发明的疫苗包含至少一个表位编码RNA,其包含编码表位(或包含所述表位的抗原或其变体或片段)的至少一个编码序列。所述表位(或包含所述表位的抗原或其变体或片段)衍生自感染性病原体或来肿瘤或癌细胞,并触发适应性免疫应答,其优选地消除所述感染性病原体或肿瘤或癌细胞。

[0527] 本文提供的(药物)组合物或疫苗还可包含至少一种药学上可接受的赋形剂、佐剂或其他组分(例如添加剂,辅助物质等)。

[0528] 根据一些优选的实施方式,根据本发明的(药物)组合物或疫苗包含本发明的组合,其中至少一个表位编码RNA的至少一个编码序列编码抗原的至少一个表位,优选地如表1中定义的肿瘤抗原或本文所定义的这些抗原中任一个的片段或变体的至少一个表位。根据本发明的(药物)组合物或疫苗可以因此包含本发明组合的至少一个表位编码RNA,其中RNA编码一个特定表位(或本文定义的抗原或包含所述表位的其变体或片段),连同PD-1和LAG-3途径抑制剂。在这样的实施方式中,(药物)组合物或疫苗优选地包含至少一个表位编码RNA,其包含编码所述表位(或包含所述表位的如本文所定义的抗原或其变体或片段)的本文定义的至少一个编码序列。

[0529] 可选地,除了至少一种PD-1途径抑制剂和至少一种LAG-3途径抑制剂外,本发明的(药物)组合物或疫苗可包含如本文所定义的至少一个表位编码RNA,其中所述至少一个表位编码RNA编码本文所定义的至少两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、十一个或十二个不同的表位(或包含所述表位的抗原或其变体或片段)。在这样的实施方式中,(药物)组合物或疫苗优选地包含与PD-1和LAG-3途径抑制剂组合的几类表位编码RNA,其中每个表位编码RNA种类编码如本文所定义的不同表位(或包含所述表位的抗原或其变体或片段)。

[0530] 在其他实施方式中,包含在(药物)组合物或疫苗中的表位编码RNA是如本文所定义的双或多顺反子RNA,其编码至少两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、十一个或十二个不同的表位(或包含所述表位的抗原或变体或其片段)。

[0531] 还设想了这些实施方式之间的混合物,诸如包含一个以上表位编码RNA种类的组

合物,其中至少一个表位编码RNA种类可以是单顺反子的,而至少一种其他表位编码RNA种类可以是双或多顺反子的。

[0532] 复合

[0533] 在优选实施方式中,本发明组合的至少一个表位编码RNA、(药物的)组合物或疫苗(或任意其他核酸,特别是如本文定义的RNA)以复合形式提供,即与一种或多种(聚)阳离子化合物,优选地与(聚)阳离子聚合物,(聚)阳离子肽或蛋白(如鱼精蛋白),(聚)阳离子多糖和/或(聚)阳离子脂质复合或缔合。在该上下文中,术语"络合"或"缔合"是指至少一个表位编码RNA(或所述其他核酸,特别是RNA)与一种或多种上述化合物的基本稳定组合为复合物或组装体,没有共价结合。

[0534] 脂质

[0535] 根据优选的实施方式,本发明组合的表位编码RNA,(药物的)组合物或疫苗(或任意其他核酸,特别是如本文定义的RNA)与脂质(特别是阳离子和/或中性脂质)复合或缔合,以形成一种或多种脂质体、脂质复合物(lipoplexes)、脂质纳米颗粒、或纳米脂质体。

[0536] 因此,在一些实施方式中,本发明组合的表位编码RNA,(药物)组合物或疫苗(或任意其他核酸,特别是如本文定义的RNA)以包含所述表位编码RNA(或所述其他核酸,特别是RNA)的基于脂质的制剂形式提供,特别是以脂质体、脂质复合物、和/或脂质纳米颗粒的形式。还可以想到提供与脂质复合或缔合的PD-1和/或LAG-3途径抑制剂,以形成一种或多种脂质体、脂质复合物或脂质纳米颗粒。

[0537] 脂质纳米颗粒

[0538] 根据一些优选实施方式,本发明组合的表位编码RNA、(药物)组合物或疫苗(或任意其他核酸,特别是如本文定义的RNA),与脂质(特别是阳离子和/或中性脂质)复合或缔合形成一个或多个脂质纳米颗粒。

[0539] 优选地,脂质纳米颗粒(LNP)包含:(a)本发明组合的至少一种表位编码RNA,(药物)组合物或疫苗(或任意其他核酸,特别是如本文定义的RNA),(b)阳离子脂质,(c)聚集还原剂(诸如聚乙二醇(PEG)脂质或PEG-修饰的脂质),(d)任选地非阳离子脂质(如中性脂质),(e)任选地,固醇。

[0540] 在一些实施方式中,LNP除了包含本发明组合的至少一种表位编码RNA、(药物)组合物或疫苗(或任意其他核酸,特别是如本文定义的RNA)之外,还包含i)至少一种阳离子脂质;(ii)中性脂质;(iii)固醇,如胆固醇;和(iv)PEG-脂质,它们的摩尔比为约20-60%阳离子脂质:5-25%中性脂质:25-55%固醇:0.5-15%PEG-脂质。

[0541] 在一些实施方式中,本发明组合的表位编码RNA、(药物)组合物或疫苗(或任意其他核酸,特别是如本文定义的RNA),可以配制在氨基醇类脂质(脂质oid)中。可用于本发明的氨基醇类脂质可通过美国专利号8,450,298中描述的方法制备,其通过引用以去其全部并入本文。

[0542] (i)阳离子脂质

[0543] LNP可包括适于形成脂质纳米颗粒的任何阳离子脂质。优选地,阳离子脂在约生理pH下带有净正电荷。

[0544] 阳离子脂质可以是氨基脂质。如本文所用,术语"氨基脂质"意指包括具有一个或两个脂肪酸或脂肪烷基链的脂质和可被质子化以形成阳离子的氨基头基(包括烷基氨基或

二烷基氨基)的那些脂质。

[0545] 阳离子脂质可以是例如N,N-二油基-N,N-二甲基氯化铵(DODAC)、N,N-二硬脂基-N,N-二甲基溴化铵(DDAB)、1,2-二油酰基三甲基氯化铵丙烷(DOTAP),也称为N-(2,3-二油酰基氧)丙基)-N,N,N-三甲基氯化铵和1,2-二油基氧-3-三甲基氨基氯化丙烷盐)、N-(1-(2,3-二油基氧)丙基)-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTMA)、N,N-二甲基-2,3-二油基氧)丙基胺(DODMA)、1,2-二亚油基氧-N,N-二甲基氨基丙烷(DLinDMA)、1,2-二亚麻基氧-N,N-二甲基氨基丙烷(DLenDMA),1,2-二-y-亚麻基氧-N,N-二甲基氨基丙烷(γ-DLenDMA)、1,2-二亚油基氨基甲酰基氧-3-二甲基氨基丙烷(DLin-C-DAP)、1,2-二亚油基氧-3-(二甲基氨基)乙酰氧基丙烷(DLin-DAC)、1,2-二亚油基氧-3-吗啉代丙烷(DLin-MA)、1,2-二亚油酰基-3-二甲基氨基丙烷(DLinDAP)、1,2-二亚油基硫代-3-二甲基氨基丙烷(DLin-S-DMA)、1-亚油酰基-2-亚油基l氧-3-二甲基氨基丙烷(DLin-2-DMAP)、1,2-二亚油基氧-3-三甲基氨基氯化丙烷盐(DLin-TMA.Cl)、1,2-二亚油酰基-3-三甲基氨基氯化丙烷盐(DLin-TAP.Cl)、1,2-二亚油基氧-3-(N-甲基哌嗪)丙烷(DLin-MPZ)、或3-(N,N-二亚油基氨基)-1,2-丙烷二醇(DLinAP)、3-(N,N-二油基氨基)-1,2-丙烷二醇(DOAP)、1,2-二亚油基氧-3-(2-N,N-二甲基氨基)乙氧基丙烷(DLin-EG-DMA)、2,2-二亚油基-4-二甲基氨基甲基-[1,3]-二氧戊环(DLin-K-DMA)或其类似物、(3aR,5s,6aS)-N,N-二甲基-2,2-二((9Z,12Z)-十八-9,12-二烯基)四氢-3aH-环戊[d][1,3]二氧戊环-5-胺、(6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七烷基-6,9,28,31-四烯-19-基4-(二甲基氨基)丁酸酯(MC3)、1,1'-(2-(4-(2-((2-(双(2-羟基十二烷基)氨基)乙基)(2-羟基十二烷基)氨基)乙基)哌嗪-1-基)乙基-氮烷二基)双十二-2-醇(C12-200)、2,2-二亚油基-4-(2-二甲基氨基乙基)-[1,3]-二氧戊环(DLin-K-C2-DMA)、2,2-二亚油基-4-二甲基氨基甲基-[1,3]-二氧戊环(DLin-K-DMA)、(6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七烷基-6,9,28,31-四烯-19-基4-(二甲基氨基)丁酸酯(DLin-M-C3-DMA)、3-((6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七烷基-6,9,28,3-1-四烯-19-基氧)-N,N-二甲基丙烷-1-胺(MC3醚)、4-((6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七烷基-6,9,28,31-四烯-19--基氧)-N,N-二甲基丁烷-1-胺(MC4醚)、或前述中任意的组合。

[0546] 其他阳离子脂质包括但不限于N,N-二硬脂基-N,N-二甲基溴化铵(DDAB)、3P-(N-(N',N"-二甲基氨基乙烷)-氨基甲酰基)胆固醇(DC-Chol)、N-(1-(2,3-二油基氧)丙基)-N-2-(精胺-甲酰胺)乙基)-N,N-二甲基铵三氟乙酸酯(DOSPA)、双十八烷基酰氨缩水甘油基羧基精胺(DOGS)、1,2-二油酰基-sn-3-磷酸乙醇胺(DOPE)、1,2-二油酰基-3-二甲基铵丙烷(DODAP)、N-(1,2-双肉豆蔻基氧丙-3-基)-N,N-二甲基-N-羟基乙基溴化铵(DMRIE)、和2,2-二亚油基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧戊环(XTC)。另外地,可以使用阳离子脂质的商业制剂,诸如,如,LIPOFECTIN(包括DOTMA和DOPE,可获得自GIBCO/BRL),和LIPOFECTAMINE(包括DOSPA和DOPE,可获得自GIBCO/BRL)。

[0547] 在国际申请号WO 09/086558、WO 09/127060、WO 10/048536、WO 10/054406、WO 10/088537、WO 10/129709和WO 2011/153493;美国专利申请号2011/0256175、2012/0128760和2012/0027803;美国专利号8,158,601;和Love等人,PNAS,107(5),1864-69,2010中公开了其他适合的阳离子脂质。

[0548] 其他适合的氨基脂质包括具有可选脂肪酸基团和其他二烷基氨基基团的那些,包括其中烷基取代基是不同的那些(如,N-乙基-N-甲基氨基-、和N-丙基-N-乙基氨基-)。一般

地，具有较少饱和酰基链的氨基脂质更容易确定尺寸，特别是当复合物的尺寸必须小于约0.3微米时，用于过滤除菌的目的。可以使用含有碳链长度在C14至C22范围内的不饱和脂肪酸的氨基脂质。其他支架也可用于分离氨基和氨基脂质的脂肪酸或脂肪烷基部分。

[0549] 在一些实施方式中，氨基或阳离子脂质具有至少一个可质子化或可去质子化的基团，使得脂质在生理pH或低于生理pH(例如pH7.4)的pH下带正电荷，并且在优选地在生理pH或高于生理pH值的第二pH下呈中性。当然，应该理解，作为pH的函数的质子的添加或去除是平衡过程，并且对带电或中性脂质的提及是指主要种类的性质并不要求所有的脂质都以带电或中性的形式存在。具有一个以上可质子化或可去质子化的基团或两性离子的脂质不排除在本发明的使用之外。

[0550] 在一些实施方式中，可质子化的脂质具有范围在约4至约11的可质子化基团的pKa，如，约5至约7的pKa。

[0551] LNP可包括两种或更多阳离子脂质。可以选择阳离子脂质以提供不同的有利特性。例如，可以在LNP中可以使用在性质上不同的阳离子脂质，例如胺pKa、化学稳定性、循环半衰期、组织半衰期、组织中的净积累或毒性。特别地，可以选择阳离子脂质，使得混合LNP的性质比个体脂中的单一LNP的性质更理想。

[0552] 在一些实施方式中，阳离子脂质的存在比例为存在于LNP中的总脂质的约20mol％至约70或75mol％或约45至约65mol％或约20、25、30、35、40、45、50、55、60、65或约70mol％。在进一步的实施方式中，LNP包括以摩尔计约25％至约75％的阳离子脂质，如以摩尔计(基于脂质纳米颗粒中脂质的100％总摩尔)约20至约70％、约35至约65％、约45至约65％、60％、约50％或约40％。在一些实施方式中，阳离子脂质与核酸的比例为约3至约15、诸如约5至约13或约7至约11。

[0553] 在WO2009/086558、WO2009/127060、WO2010/048536、WO2010/054406、WO2010/088537、WO2010/129709、WO2011/153493、US2011/0256175、US2012/0128760、US2012/0027803、US8158601、WO2016118724、WO2016118725、WO2017070613、WO2017070620、WO2017099823、和WO2017112865中公开了其他适合的(阳离子)脂质。具体涉及适合用于LNP的(阳离子)脂质的WO2009/086558、WO2009/127060、WO2010/048536、WO2010/054406、WO2010/088537、WO2010/129709、WO2011/153493、US2011/0256175、US2012/0128760、US2012/0027803、US8158601、WO2016118724、WO2016118725、WO2017070613、WO2017070620、WO2017099823、和WO2017112865的公开内容通过引用并入本文。

[0554] (ii)中性和非阳离子脂质

[0555] 非阳离子脂质可以是中性脂质、阴离子脂质或两亲脂质。当存在时，中性脂质可以是许多脂质种类中的任何一种，其在生理pH下以不带电或中性两性离子形式存在。这种脂质包括例如二酰基磷脂酰胆碱、二酰基磷脂酰乙醇胺、神经酰胺、鞘磷脂、二氢鞘磷脂、脑磷脂和脑苷脂。用于本文所述颗粒的中性脂质的选择通常通过考虑例如LNP大小和LNP在血流中的稳定性来指导。优选地，中性脂质是具有两个酰基的脂质(例如，二酰基磷脂酰胆碱和二酰基磷脂酰乙醇胺)。

[0556] 在一些实施方式中，中性脂质含有碳链长度在C10至C20范围内的饱和脂肪酸。在其他实施方式中，使用碳链长度在C10至C20范围内的单或二不饱和脂肪酸的中性脂质。另外，可以使用具有饱和与不饱和脂肪酸链的混合物的中性脂质。

[0557] 适合的中性脂质包括但不限于二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC)、二油酰基磷脂酰胆碱(DOPC)、二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)、二油酰基磷脂酰甘油(DOPG)、二棕榈酰磷脂酰甘油(DPPG)、二油酰基-磷脂酰乙醇胺(DOPE)、棕榈酰油酰基磷脂酰胆碱(POPC)、棕榈酰油酰基磷脂酰乙醇胺(POPE)、二油酰基-磷脂酰乙醇胺4-(N-马来酰亚胺甲基)-环己烷-1-羧酸(DOPE-mal)、二棕榈酰磷脂酰乙醇胺(DPPE)、双肉豆蔻酰基磷酸乙醇胺(DMPE)、双肉豆蔻酰基磷脂酰胆碱(DMPC)、二硬脂酰-磷脂酰-乙醇胺(DSPE)、SM、16-0-单甲基PE、16-0-二甲基PE、18-1-反式PE、1-硬脂酰-2-油酰基-磷脂酰乙醇胺(SOPE)、胆固醇、或其混合物。适合用于LNP中的阴离子脂质包括但不限于磷脂酰甘油、心磷脂、二酰基磷脂酰丝氨酸、二酰基磷脂酸、N-十二酰基磷脂酰乙醇胺、N-琥珀酰基磷脂酰乙醇胺、N-戊二酰磷脂酰乙醇胺、赖氨酰磷脂酰甘油、和接合至中性脂质的其他阴离子改性基团。

[0558] 两亲性脂质是指任何合适的材料,其中脂质材料的疏水部分定向进入疏水相,而亲水部分定向于水相。这类化合物包括但不限于磷脂、氨基脂质、和鞘脂。代表性磷脂包括鞘磷脂、磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇、磷脂酸、棕榈酰油酰基磷脂酰胆碱、溶血磷脂酰胆碱、溶血磷脂酰乙醇胺、二棕榈酰磷脂酰胆碱、二油酰基磷脂酰胆碱、二硬脂酰磷脂酰胆碱,或二亚油酰基磷脂酰胆碱。还可以使用其他不含磷化合物,诸如鞘脂、糖鞘脂家族、二酰基甘油、和β-酰氧基酸。

[0559] 在一些实施方式中,非阳离子脂质的存在比例为存在于LNP中的总脂质的约5mol%至约90mol%、约5mol%至约10mol%,约5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、或约90mol%。

[0560] 在一些实施方式中,LNP包括以摩尔计约0%至约15或45%的中性脂质,如,约3至约12%或约5至约10%。比如,LNP可以包括以摩尔计(基于LNP中脂质的100%总摩尔)约15%、约10%、约7.5%、或约7.1%的中性脂质。

[0561] (iii)固醇

[0562] 固醇优选地是胆固醇。

[0563] 固醇的存在比例可以为LNP的约10mol%至约60mol%或约25mol%至约40mol%。在一些实施方式中,固醇的存在比例为LNP中存在的总脂质的约10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、或约60mol%。在其他实施方式中,LNP包括以摩尔计约5%至约50%的固醇,如以摩尔计(基于LNP中脂质的100%总摩尔)约15%至约45%、约20%至约40%、约48%、约40%、约38.5%、约35%、约34.4%、约31.5%或约31%。

[0564] (iv)聚集减少剂

[0565] 聚集减少剂可以是能够减少聚集的脂质。

[0566] 这类脂质的实例包括但不限于聚乙二醇(PEG)-修饰的脂质,单唾液酸神经节苷脂Gml和聚酰胺低聚物(PAO),诸如美国专利号6,320,017中描述的那些,其通过引用以其全部并入本文。在形成期间防止聚集的具有不带电的、亲水的、空间-阻隔部分的其他化合物,如PEG、Gml或ATTA,也可以与脂质偶连。ATTA-脂质在美国专利号6,320,017中描述,和PEG-脂质缀合物在美国专利号5,820,873、5,534,499和5,885,613中描述,其中每篇通过引用以其整体并入本文。

[0567] 聚集减少剂可以例如选自聚乙二醇(PEG)-脂质,包括但不限于PEG-二酰基甘油(DAG)、PEG-二烷基甘油、PEG-二烷氧基丙基(DAA)、PEG-磷脂、PEG-脑苷脂(Cer)、或a其混合

物(诸如PEG-Cer14或PEG-Cer20)。PEG-DAA缀合物可以是例如PEG-二月桂氧基丙基(C12)、PEG-双肉豆蔻氧基丙基(C14)、PEG-二棕榈氧基丙基(C16)、或PEG-二硬脂氧基丙基(C18)。其它PEG化-脂质包括但不限于聚乙二醇-二双肉豆蔻酰基甘油(C14-PEG或PEG-C14,其中PEG具有2000Da的平均分子量)(PEG-DMG);(R)-2,3-双(十八烷氧基)丙基-1-(甲氧基聚(乙二醇)2000)丙基氨基甲酸酯)(PEG-DSG);PEG-氨基甲酰基-1,2-双肉豆蔻基氧丙基胺,其中PEG具有2000Da的平均分子量PEG-cDMA);N-乙酰基半乳糖胺-((R)-2,3-双(十八烷基氧)丙基-1-(甲氧基聚(乙二醇)2000)丙基氨基甲酸酯))(GalNAc-PEG-DSG);mPEG(mw2000)-二硬脂酰磷脂酰-乙醇胺(PEG-DSPE);和聚乙二醇1-二棕榈酰甘油(PEG-DPG)。

[0568] 在一些实施方式中,聚集减少剂是PEG-DMG。在其他实施方式中,聚集减少剂是PEG-c-DMA。

[0569] 在US20150376115A1和WO2015199952中提供适合在该上下文中的PEG-脂质的进一步实例,其中每篇通过引用以其整体并入本文。

[0570] LNP组合物

[0571] LNP的组合物可以受到阳离子脂质组分的选择、阳离子脂质饱和度、聚乙二醇化的性质、所有组分的比例和生物物理参数(例如其大小)等等的影响。在Semple等人的一个实例中(Semple等人Nature Biotech.2010 28:172-176;通过引用以其整体并入本文),LNP组合物由57.1%阳离子脂质、7.1%二棕榈酰磷脂酰胆碱、34.3%胆固醇、和1.4%PEG-c-DMA组成(Basha等人Mol Ther.2011 19:2186-2200;通过引用以其整体并入本文)。

[0572] 在一些实施方式中,LNP可以包括约35至约45%的阳离子脂质、约40%至约50%的阳离子脂质、约50%至约60%的阳离子脂质和/或约55%至约65%的阳离子脂质。在一些实施方式中,脂质与(表位编码)RNA(或核酸)的比的范围可以是约5:1至约20:1、约10:1至约25:1、约15:1至约30:1和/或至少30:1。

[0573] PEG-修饰的脂质中PEG部分的平均分子量的范围可以为约500至约8,000道尔顿(如,约1,000至约4,000道尔顿)。在一个优选的实施方案中,PEG部分的平均分子量为约2,000道尔顿。

[0574] 聚集减少剂的浓度范围可以为LNP中每100%总摩尔脂质约0.1至约15mol%。在一些实施方式中,基于LNP中脂质的总摩尔,LNP包含少于约3、2或1mol%的PEG或PEG-修饰的脂质。在进一步的实施方式中,LNP包括以摩尔计(基于LNP中脂质的100%总摩尔)约0.1%至约20%的PEG-修饰的脂质,如以摩尔计约0.5至约10%、约0.5至约5%、约10%、约5%、约3.5%、约1.5%、约0.5%或约0.3%。

[0575] 具有以摩尔计(基于脂质纳米颗粒中脂质的总摩尔)不同摩尔比的阳离子脂质、非阳离子(或中性)脂质、固醇(如,胆固醇)和聚集减少剂(如PEG-修饰的脂质)的不同LNP如下表2所示

[0576] 表2:基于脂质的制剂

[0577]

制剂编号	脂质的摩尔比(基于脂质纳米颗粒中脂质的总摩尔)			
	阳离子脂质	非阳离子(或中性)脂质	固醇	聚集减少剂(如，PEG-脂质)
1	约35至约65%	约3至约12或15%	约15至约45%	约0.1至约10%(优选约0.5至约2或3%)
2	约20至约70%	约5至约45%	约20至约55%	约0.1至约10%(优选约0.5至约2或3%)
3	约45至约65%	约5至约10%	约25至约40%	约0.1至约3%
4	约20至约60%	约5至约25%	约25至约55%	约0.1至约5%*(优选约0.1至约3%)
5	约40%	约10%	约40%	约10%
6	约35%	约15%	约40%	约10%
7	约52%	约13%	约30%	约5%
8	约50%	约10%	约38.5%	约1.5%

[0578] 在一些实施方式中，LNP以脂质体或脂质复合物形式出现，如下面所进一步详细描述。

[0579] LNP大小

[0580] 在一些实施方式中，LNP具有约50nm至约300nm，诸如约50nm至约250nm，例如，约50nm至约200nm的中间直径尺寸。

[0581] 在一些实施方式中，可以使用较小LNP。这类颗粒的直径可以包含0.1μm以下至100nm，诸如但不限于小于0.1um、小于1.0um、小于5um、小于10um、小于15um、小于20um、小于25um、小于30um、小于35um、小于40um、小于50um、小于55um、小于60um、小于65um、小于70um、小于75um、小于80um、小于85um、小于90um、小于95um、小于100um、小于125um、小于150um、小于175um、小于200um、小于225um、小于250um、小于275um、小于300um、小于325um、小于350um、小于375um、小于400um、小于425um、小于450um、小于475um、小于500um、小于525um、小于550um、小于575um、小于600um、小于625um、小于650um、小于675um、小于700um、小于725um、小于750um、小于775um、小于800um、小于825um、小于850um、小于875um、小于900um、小于925um、小于950um、小于975um。在另一实施方式中，可以使用较小LNP递送核酸，该较小LNP的直径可以包含约1nm至约100nm、约1nm至约10nm、约1nm至约20nm、约1nm至约30nm、约1nm至约40nm、约1nm至约50nm、约1nm至约60nm、约1nm至约70nm、约1nm至约80nm、约1nm至约90nm、约5nm至约100nm、约5nm至约10nm、约5nm至约20nm、约5nm至约30nm、约5nm至约40nm、约5nm至约50nm、约5nm至约60nm、约5nm至约70nm、约5nm至约80nm、约5nm至约90nm、约10至约50nM、约20至约50nm、约30至约50nm、约40至约50nm、约20至约60nm、约30至约60nm、约40至约60nm、约20至约70nm、约30至约70nm、约40至约70nm、约50至约70nm、约60至约70nm、约20至约80nm、约30至约80nm、约40至约80nm、约50至约80nm、约60至约80nm、约20至约90nm、约30至约90nm、约40至约90nm、约50至约90nm、约60至约90nm和/或约70至约90nm。

[0582] 在一些实施方式中，LNP的直径可以是大于100nm、大于150nm、大于200nm、大于

250nm、大于300nm、大于350nm、大于400nm、大于450nm、大于500nm、大于550nm、大于600nm、大于650nm、大于700nm、大于750nm、大于800nm、大于850nm、大于900nm、大于950nm或大于1000nm。

[0583] 在其他实施方式中,LNP具有单一模式颗粒尺寸分布(即,它们不是双-或多峰的)。

[0584] 其他组分

[0585] LNP除了上面提到的那些还可以进一步包括一种或多种脂质和/或其他组分。

[0586] 脂质体组合物中可包括其它脂质,用于各种目的,诸如防止脂质氧化或将配体连接到脂质体表面上。LNP中可存在许多脂质中的任何一种,包括两亲性、中性、阳离子和阴离子脂质。这类脂质可以单独使用或组合使用。

[0587] 可存在于LNP中的另外组分包括双层稳定组分,诸如聚酰胺低聚物(参见,如,美国专利号6,320,017,其通过引用以其整体并入)、肽、蛋白和洗涤剂。

[0588] 脂质体

[0589] 在一些实施方式中,本发明组合的表位编码RNA、(药物)组合物或疫苗(或任意其他核酸,特别是如本文定义的RNA)配制为脂质体。

[0590] 基于阳离子脂质的脂质体能够通过静电相互作用与带负电荷的核酸(如RNA)复合,产生具有生物相容性、低毒性和体内临床应用所需的大规模生产的复合物。脂质体可以与质膜融合摄取;一旦进入细胞内,脂质体就通过内吞途径处理,然后核酸被从内体/载体释放到细胞质中。脂质体因其优异的生物相容性而长期以来被认为是药物传递载体,因为脂质体基本上是生物膜的类似物,并且可以由天然和合成的磷脂制备(Int J Nanomedicine.2014;9:1833-1843)。

[0591] 脂质体通常由脂质双层组成,该脂质双层可由阳离子、阴离子或中性(磷酸)脂质和胆固醇组成,其包裹水性核。脂质双层和水性空间均可分别掺入疏水性或亲水性化合物。脂质体可具有一个或多个脂质膜。脂质体可以是单层的,称为单层(unilamellar),或多层的,称为多层(multilamellar)。

[0592] 脂质体特性和体内行为可以通过添加亲水性聚合物涂层(如,聚乙二醇(PEG))来修饰,以向脂质体表面赋予空间稳定性。此外,脂质体可通过将配体(如,抗体、肽和碳水化合物)连接到其表面或连接到连接的PEG链的末端而用于特异性靶向(Front Pharmacol.2015 Dec 1;6:286)。

[0593] 脂质体通常作为球形囊泡存在,并且其尺寸范围可以为20nm至几微米。

[0594] 脂质体可以具有不同的尺寸,诸如但不限于多层囊泡(MLV),其直径可以是数百纳米并且可以包含由窄水性隔室分隔的一系列同心双层,直径可小于50nm的小单细胞囊泡(SUV),直径可在50-500nm之间的大单层囊泡(LUV)。脂质体设计可包括但不限于调理素或配体,从而改善脂质体与不健康组织的连接或激活事件,诸如但不限于内吞作用。脂质体可含有低pH或高pH,以改善药物的制剂的递送

[0595] 作为非限制性实例,脂质体诸如合成膜囊泡可以通过在美国专利申请号US20130177638、US20130177637、US20130177636、US20130177635、US20130177634、US20130177633、US20130183375、US20130183373和US20130183372中描述的方法、设备和装置制备,其中每篇的内容通过引用以其整体并入本文。本发明组合的表位编码RNA、(药物)组合物或疫苗(或任意其他核酸,特别是如本文定义的RNA)可以被脂质体包封和/或其可以

被含在水性核中，该水性核然后被脂质体包封(参见国际公开号WO2012031046、WO2012031043、WO2012030901和WO2012006378、以及美国专利公开号US20130189351、US20130195969和US20130202684;其中每篇的内容通过引用以其整体并入本文)。

[0596] 在一些实施方式中，本发明组合的表位编码RNA、(药物)组合物或疫苗(或任意其他核酸，特别是如本文定义的RNA)可以配制在脂质体中，诸如但不限于DiLa2脂质体(Marina Biotech，Bothell，WA)、SMARTICLES® (Marina Biotech，Bothell，WA)、中性DOPC基于(1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱)的脂质体(如，用于卵巢癌的siRNA递送(Landen等人.Cancer Biology&Therapy 2006 5(12)1708-1713);通过引用以其全部并入本文)和透明质酸涂敷的脂质体(Quiet Therapeutics，Israel)。

[0597] 脂质复合物

[0598] 在一些实施方式中，本发明组合的表位编码RNA、(药物)组合物或疫苗(或任意其他核酸，特别是如本文定义的RNA)配制为脂质复合物，即夹心在核酸(如，(表位编码)RNA或DNA)层之间的阳离子脂质双层。

[0599] 阳离子脂质，诸如DOTAP、(1,2-二油酰基-3-三甲基铵-丙烷)和DOTMA(甲基硫酸N-[1-(2,3-二油酰基氧)丙基]-N,N,N-三甲基-铵)可以与带负电荷的核酸形成复合物或脂质复合物，以通过静电相互作用形成纳米颗粒，提供高体外转染效率。

[0600] 纳米脂质体

[0601] 在一些实施方式中，本发明组合的表位编码RNA、(药物)组合物或疫苗(或任意其他核酸，特别是如本文定义的RNA)配制为基于中性脂质的纳米脂质体，诸如基于1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷脂酰胆碱(DOPC)的纳米脂质体(Adv Drug Deliv Rev.2014 Feb;66:110-116)。

[0602] 乳液

[0603] 在一些实施方式中，本发明的表位编码RNA、(药物)组合物或疫苗(或任意其他核酸，特别是如本文定义的RNA)配制为乳液。在另一实施方式中，所述表位编码RNA(和任选地抑制剂)配制在阳离子水包油乳液中，其中乳液颗粒包含油核和阳离子脂质，其可与核酸相互作用，将分子锚定在乳液颗粒上(参见国际公开号WO2012006380;其全部内容通过引用并入本文)。在一些实施方式中，所述RNA配制在油包水乳液中，所述油包水乳液包含在其中亲水相分散的连续疏水相。作为非限制性实例，乳液可以通过国际公开号WO201087791中描述的方法制备，其内容通过引用整体并入本文。

[0604] (聚-)阳离子化合物和载体

[0605] 在优选实施方式中，本发明组合的表位编码RNA、(药物)组合物或疫苗(或任意其他核酸，特别是如本文定义的RNA)与阳离子或聚阳离子化合物(“(聚-)阳离子化合物”)和/或聚合物载体复合或缔合。

[0606] 术语“(聚-)阳离子化合物”通常是指带电荷分子，其在pH值通常为1至9，优选地在pH值为9以下(如5至9)，或8以下(如5至8)，或7以下(如5至7)，最优选地在生理pH下如从7.3到7.4时带正电荷(阳离子)。

[0607] 因此，“(聚-)阳离子化合物”可以是任何带正电荷的化合物或聚合物，优选地是阳离子肽或蛋白，其在生理条件下，特别是在体内生理条件下带正电荷。“(聚-)阳离子肽或蛋白”可含有至少一个带正电荷的氨基酸，或多于一个带正电荷的氨基酸，如，选自Arg、His、

Lys或Orn。

[0608] (聚-)阳离子氨基酸、肽和蛋白

[0609] 是本发明组合的表位编码RNA、(药物)组合物或疫苗(或任意其他核酸,特别是如本文定义的RNA)的复合或缔合的特别优选的试剂的(聚-)阳离子化合物包括鱼精蛋白、核仁蛋白、精胺或亚精胺,或其他阳离子肽或蛋白,诸如聚-L-赖氨酸(PLL)、聚精氨酸、碱性多肽、细胞穿透肽(CPP)、包括HIV结合肽、HIV-1Tat(HIV)、Tat衍生肽、穿透素(Penetratin)、VP22衍生或类似肽、HSV VP22(单纯疱疹)、MAP、KALA或蛋白转导结构域(PTD)、PpT620、富含脯氨酸的肽、富含精氨酸的肽、富含赖氨酸的肽,MPG-肽、Pep-1、L-低聚物、降钙素肽、触角衍生肽(特别是来自果蝇触角(Drosophila antenpedia))、pAntp、pIsl、FGF、乳铁蛋白、转运蛋白、Buforin-2、Bac715-24、SynB、SynB(1)、pVEC、hCT衍生肽、SAP或组蛋白。

[0610] 更优选地,本发明组合的表位编码RNA、(药物)组合物或疫苗(或任意其他核酸,特别是如本文定义的RNA)与一种或多种聚阳离子复合,优选地与鱼精蛋白或低聚粪胺(如下讨论)复合,最优选地与鱼精蛋白复合。在该上下文中,鱼精蛋白是特别优选的。

[0611] 另外地,优选的(聚-)阳离子蛋白或肽可以选自以下蛋白或肽,其具有以下的总式(III):

[0612] $(Arg)_l;(Lys)_m;(His)_n;(Orn)_o;(Xaa)_x$,

[0613] 式(III)

[0614] 其中l+m+n+o+x=8-15,和l、m、n或o彼此间独立地可以是选自0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15的任何数字,条件是Arg、Lys、His和Orn的总含量至少占寡肽的全部氨基酸的50%;和Xaa可以是选自除了Arg、Lys、His或Orn以外的天然(=天然存在的)或非天然氨基酸的任何氨基酸;和x可以是选自0、1、2、3或4的任何数字,条件是Xaa的总含量不超过寡肽的所有氨基酸的50%。在该上下文中,特别优选的阳离子肽是如Arg_7、Arg_8、Arg_9、H_3R_9、R_9H_3、$H_3R_9H_3$、$YSSR_9SSY$、$(RKH)_4$、$Y(RKH)_2R$等。在该上下文中,WO2009/030481的公开内容通过引用并入本文。

[0615] (聚-)阳离子多糖

[0616] 用于与本发明组合的表位编码RNA、(药物)组合物或疫苗(或任意其他核酸,特别是如本文定义的RNA)复合或缔合的进一步优选的(聚-)阳离子化合物包括(聚-)阳离子多糖,如壳聚糖、聚凝胺、阳离子聚合物,如聚乙烯亚胺(PEI)。

[0617] (聚-)阳离子脂质

[0618] 用于与本发明组合的表位编码RNA、(药物)组合物或疫苗(或任意其他核酸,特别是如本文定义的RNA)复合或缔合的进一步优选的(聚-)阳离子化合物包括(聚-)阳离子脂质,如DOTMA:[1-(2,3-硫代丙基)丙基)]-N,N,N-三甲基氯化铵,DMRIE,二-C14-脒,DOTIM,SAINT,DC-Chol,BGTC,CTAP,DOPC,DODAP,DOPE:二油基磷脂酰乙醇胺,DOSPA,DODAB,DOIC,DMEPC,DOGS:双十八烷基酰氨基胰精蛋白,DIMRI:双豆蔻酰-氧丙基二甲基羟基乙基溴,DOTAP:二油酰基氧-3-(三甲基铵)丙烷,DC-6-14:O,O-二十四烷酰基-N-(α-三甲基氨基乙酰基)二乙醇胺氯化物,CLIP1:外消旋-[(2,3-双十八烷氧基丙基)(2-羟基乙基)]-二甲基氯化铵,CLIP6:外消旋-[2(2,3-二十六烷基氧丙基-氧甲基氧)乙基]三甲基铵,CLIP9:外消旋-[2(2,3-二十六烷基氧丙基-氧琥珀氧基)乙基]-三甲基铵,或低聚粪胺。

[0619] (聚-)阳离子聚合物

[0620] 用于与本发明组合的表位编码RNA、(药物)组合物或疫苗(或任意其他核酸,特别是如本文定义的RNA)复合或缔合的进一步优选的(聚-)阳离子化合物包括(聚-)阳离子聚合物,如,修饰的聚氨基酸,诸如,β-氨基酸-聚合物或反向聚酰胺等,修饰的聚乙烯,诸如PVP(聚(N-乙基-4-乙烯基溴化吡啶))等,修饰的丙烯酸酯,诸如pDMAEMA(聚(二甲基氨基乙基甲基丙烯酸酯))等,修饰的酰氨胺,如pAMAM(聚氨酰胺)等,修饰的聚β氨基酯(PBAE),诸如二胺端修饰的1,4丁二醇二丙烯酸酯-5-氨基-1-戊醇聚合物共聚物等,树枝状大分子,如聚丙烯胺树枝状大分子或基于pAMAM的树枝状大分子等,聚亚胺,诸如PEI:聚(乙烯亚胺),聚(丙烯亚胺)等,聚烯丙基胺,糖骨架基聚合物,诸如环糊精基聚合物,葡聚糖基聚合物,壳聚糖等,硅烷骨架基聚合物,诸如PMOXA-PDMS共聚物等,由一个或多个阳离子嵌段(例如选自如上所述的阳离子聚合物)和一个或多个亲水或疏水嵌段(例如聚乙二醇)的组合组成的嵌段聚合物。

[0621] 聚合物载体

[0622] 根据优选的实施方式,本发明组合的表位编码RNA、(药物)组合物或疫苗(或任意其他核酸,特别是如本文定义的RNA)与聚合物载体复合或缔合。

[0623] 根据本发明使用的“聚合物载体”可以是由二硫化物交联的阳离子组分形成的聚合物载体。二硫键交联的阳离子组分可以彼此相同或不同。聚合物载体还可含有其他组分。

[0624] 还特别优选的是,根据本发明使用的聚合物载体包括阳离子肽、蛋白或聚合物和任选地如本文所定义的其他组分的混合物,其通过如本文所述的二硫键交联。在该上下文中,WO2012/013326的公开内容通过引用并入本文。

[0625] 在该上下文中,通过二硫化物交联形成聚合物载体基础的阳离子组分通常选自适用于此目的的任何合适的(聚-)阳离子肽、蛋白或聚合物,特别是能够复合,从而优选地缩合本发明组合的表位编码RNA,(药物的)组合物或疫苗(或任意其他核酸,特别是如本文定义的RNA)的任何(聚-)阳离子肽、蛋白或聚合物。(聚-)阳离子肽、蛋白或聚合物优选是线性分子,然而,也可以使用支化的(聚-)阳离子肽、蛋白或聚合物。

[0626] 交联可用于复合(药物的)组合物或疫苗(或任意其他核酸,特别是如本文的定义的RNA)的表位编码RNA的聚合物载体的(聚-)阳离子蛋白、肽、或聚合物的每个二硫化物含有至少一个-SH部分,最优选地至少一个半胱氨酸残基或任何表现出-SH部分的其他化学基团,能够在与作为本文所提到的聚合物载体的阳离子组分的至少一个其他(聚-)阳离子蛋白、肽或聚合物缩合时形成二硫键。

[0627] 如上所定义,可用于复合本发明组合的表位编码RNA、(药物)组合物或疫苗(或任意其他核酸,特别是如本文定义的RNA)的聚合物载体可以通过二硫化物交联的阳离子(或聚阳离子)组分形成。优选地,包括或另外被修饰以包括至少一个-SH部分的这类聚合物载体的(聚-)阳离子肽或蛋白或聚合物选自本文所定义的蛋白、肽和聚合物。

[0628] 在一些实施方式中,聚合物载体可以选自根据通式(IV)的聚合物载体分子:

[0629] $L-P^1-S-[S-P^2-S]_n-S-P^3-L$

[0630] 式(IV)

[0631] 其中,

[0632] P^1和P^3是彼此不同或相同的,并且代表线性或支化的亲水聚合物链,每个P^1和P^3表现出至少一个-SH-部分,能够在与组分P^2缩合时或者可选地与(AA)、$(AA)_x$或$[(AA)_x]_z$——

如果这些组分用作P1和P2或P3和P2之间的连接体——和/或与其他组分(如(AA)、$(AA)_x$、$[(AA)_x]_z$或L)缩合时形成二硫键,线性或支化亲水聚合物链彼此独立地选自聚乙二醇(PEG)、聚-N-(2-羟基丙基)甲基丙烯酰胺、聚-2-(甲基丙烯酰基氧)乙基磷酰胆碱,聚(羟基烷基L-天冬酰胺)、聚(2-(甲基丙烯酰氧基)乙基磷酸胆碱)、羟基乙基淀粉或聚(羟基烷基L-谷氨酰胺),其中亲水性聚合物链表现出分子量为约1kDa至约100kDa,优选地约2kDa至约25kDa;或更优选地约2kDa至约10kDa,如约5kDa至约25kDa或5kDa至约10kDa;

[0633] P^2是(聚-)阳离子肽或蛋白,如,如上对于用于通过二硫化物交联的阳离子组分形成的聚合物载体所定义,并且选地约3至约100个氨基酸的长度,更优选地具有约3至约50个氨基酸的长度,甚至更优选地具有约3至约25个氨基酸的长度,如约3至10、5至15、10至20或15至25个氨基酸的长度,更优选地约5至约20个的长度和甚至更优选地约10至约20个的长度;或者是(聚-)阳离子聚合物,如,如上对于用于通过二硫化物交联的阳离子组分形成的聚合物载体所定义,通常具有约0.5kDa至约30kDa的分子量,包括约1kDa至约20kDa,甚至更优选地约1.5kDa至约10kDa的分子量,或具有约0.5kDa至约100kDa的分子量,包括约10kDa至约50kDa,甚至更优选地约10kDa至约30kDa的分子量;

[0634] 每个P^2表现出至少两个-SH-部分,其能够在进一步与组分P^2或组分P^1和/或P^3或可选地与进一步组分(如(AA)、$(AA)_x$或$[(AA)_x]_z$)缩合后形成二硫键;

[0635] -S-S-是(可逆)二硫键(为了更好的可读性省略了括号),其中S优选地代表硫或携带-SH部分,其已经形成(可逆)二硫键。(可逆)二硫键优选地通过组分P^1和P^2、P^2和P^2、或P^2和P^3,或任选地如本文定义的进一步组分(如L、(AA)、$(AA)_x$、$[(AA)_x]_z$等)的-SH-部分的缩合形成;-SH-部分可以是这些组分的结构中的一部分货通过如下定义的修饰被添加;

[0636] L是任选的配体,其可以存在或可以不存在,并且可以彼此独立地选自RGD、转铁蛋白、叶酸、信号肽或信号序列、定位信号或序列、核定位信号或序列(NLS)、抗体、细胞穿透肽、(例如TAT或KALA)、受体的配体(如细胞因子、激素、生长因子等)、小分子(如碳水化合物如甘露糖或半乳糖或合成配体)、小分子激动剂、抑制剂或受体的拮抗剂(如RGD肽模拟类似物),或任何进一步的如本文所定义的蛋白等;

[0637] n是整数,通常选自约1至50的范围,优选地约1、2或3至30的范围,更优选地约1、2、3、4或5至25的范围,或约1、2、3、4或5至20的范围,或约1、2、3、4或5至15的范围,或约1、2、3、4或5至10的范围,包括如,约4至9、4至10、3至20、4至20、5至20或10至20的范围,或约3至15、4至15、5至15,或10至15的范围,或约6至11或7至10的范围。最优选地,n在约1、2、3、4或5至10的范围中,更优选地在约1、2、3、或4至9的范围中,在约1、2、3、或4至8的范围中,或在约1、2、或3至7的范围中。

[0638] 在该上下文中,WO2011/026641的公开内容通过引用并入本文。亲水性聚合物P^1和P^3中的每一个通常表现出至少一个-SH-部分,其中至少一个-SH-部分在与组分P^2或与组分(AA)或$(AA)_x$(如果用作如下定义的P^1和P^2或P^3和P^2之间的连接体),和任选地与另外的组分,例如,L和/或(AA)或$(AA)_x$(例如如果含有两个或多个-SH-部分)反应时能够形成二硫键。以下通式(IV)中的以下子式"P^1-S-S-P^2"和"P^2-S-S-P^3"(为了更好的可读性省略了括号),其中S、P^1和P^3中的任何一个如本文所定义,通常表示一种情况,其中亲水性聚合物P^1和P^3的一个-SH-部分与上面通式(IV)的组分P^2的一个-SH-部分缩合,其中这些-SH-部分的两个硫形成如式(IV)中所定义的二硫键-S-S-。这些-SH-部分通常由亲水性聚合物P^1和P^3中的每个提

供，如，内部半胱氨酸或任何进一步(修饰的)氨基酸或带有-SH部分的化合物。因此，子式“P^1-S-S-P^2”和“P^2-S-S-P^3”也可以写作“P^1-Cys-Cys-P^2”和“P^2-Cys-Cys-P^3”，如果-S-部分由半胱氨酸提供，其中术语Cys-Cys代表经由二硫键而不是经由肽偶连的两个半胱氨酸。在该情况下，在这些式中的术语“-S-S-”也可以写作“-S-Cys”、“-Cys-S”或“-Cys-Cys-”。在该上下文中，术语“-Cys-Cys-”不代表肽键，而是两个半胱氨酸经由他们的-SH-部分形成二硫键的键。因此，术语“-Cys-Cys-”也可以一般地理解为“-(Cys-S)-(S-Cys)-”，其中在该具体情况中，S指示半胱氨酸的-SH-部分的硫。同样，术语“-S-Cys”和“-Cys-S”指示含-SH部分和半胱氨酸之间的二硫键，其也可以被写作“-S-(S-Cys)”和“-(Cys-S)-S”。可选地，亲水性聚合物P^1和P^3可以被-SH部分修饰，优选地经由与带-SH部分的化合物的化学反应，使得亲水性聚合物P^1和P^3中的每个携带至少一个这样的-SH部分。携带-SH部分的这类化合物可以是，如，(另外的)半胱氨酸或带有-SH部分的任何进一步(修饰的)氨基酸。这类化合物也可以是任何非氨基化合物或部分，其包含-SH部分或允许将-SH部分引入如本文定义的亲水性聚合物P^1和P^3。这样的非氨基化合物可以经由化合物反应或化合物的结合附着至根据本发明的聚合物载体的式(IV)的亲水性聚合物P^1和P^3，如通过3-硫代丙酸或硫莫林(thioimolane)的结合，通过酰胺形成(如，羧酸、磺酸、胺等)，通过迈克尔加成(如，马来酰亚胺部分，α,β-不饱和羰基等)，通过点击化学(如，叠氮化物或炔烃)，通过烯烃/炔烃易位(methatesis)(例如烯烃或炔烃)，亚胺或腙形成(醛或酮、肼、羟胺、胺)，复合反应(抗生物素蛋白、生物素、蛋白G)，或允许S_n型取代反应的组分(如卤素烷、硫醇、醇、胺、肼、酰肼、磺酸酯、氧鏻盐)或其它可用于连接其它组分的化学部分。在该上下文中，特别优选的PEG衍生物是α-甲氧基-ω-巯基聚(乙二醇)。在每个情况中，任何进一步(修饰的)氨基酸或化合物的如半胱氨酸的SH-部分可以存在于亲水性聚合物P^1和P^3的末端处或内部任何位置。如本文所定义，亲水性聚合物P^1和P^3中的每个通常表现出至少一个-SH部分，优选地在啊一个末端处，但是也可以含有两个或甚至更多个-SH-部分，其可用于另外地附着如本文定义的进一步组分，优选地进一步功能肽或蛋白，如，配体，氨基酸组分(AA)或$(AA)_x$，抗体，细胞穿透肽或增强肽(如，TAT、KALA)等。

[0639] 重量比和N/P比

[0640] 在本发明优选的实施方式中，表位编码RNA(或所述其他核酸，特别是RNA)任选地以选自如下范围的表位编码(或其他)RNA与(聚-)阳离子化合物和/或聚合物载体的重量比与(聚-)阳离子化合物或聚合物载体缔合或复合：约6:1(w/w)至约0.25:1(w/w)，更优选地约5:1(w/w)至约0.5:1(w/w)，甚至更优选地约4:1(w/w)至约1:1(w/w)或约3:1(w/w)至约1:1(w/w)，和最优选地约3:1(w/w)至约2:1(w/w)；或任选地以表位编码(或其他)RNA与(聚-)阳离子化合物和/或聚合物载体的氮/磷酸酯(N/P)比缔合或复合，该氮/磷酸酯(N/P)比在约0.1-10的范围中，优选地在约0.3-4或0.3-1的范围中，和最优选地在约0.5-1或0.7-1的范围中，和甚至最优选地在约0.3-0.9或0.5-0.9的范围中。更优选地，至少一种表位编码(或其他)RNA与一个或多个聚阳离子的N/P比在约0.1至10的范围中，包括约0.3至4、约0.5至2、约0.7至2和约0.7至1.5的范围中。

[0641] 本发明组合的表位编码RNA、(药物)组合物或疫苗(或任意其他核酸，特别是如本文定义的RNA)还可以与运载体、转染或复合试剂缔合，用于增加所述表位编码RNA的转染效率和/或免疫刺激性质。

[0642] 除了至少一种如本文所定义的PD-1途径抑制剂和至少一种LAG-3途径抑制剂之外，本发明组合、(药物)组合物或疫苗还可以包含与一种或多种(聚-)阳离子化合物和/或聚合物载体复合的至少一种与表位编码RNA，和至少一种“游离”表位编码RNA，其中至少一种复合的RNA优选与至少一种“游离”RNA相同。

[0643] 在该上下文中，特别优选的是，本发明组合、(药物)组合物或疫苗包含至少部分与(聚-)阳离子化合物和/或聚合物载体(优选地阳离子蛋白或肽)复合的表位编码RNA。在该上下文中，WO2010/037539和WO2012/113513的公开内容通过引用并入本文。“部分”是指仅所述表位编码RNA的一部分与(聚-)阳离子化合物和/或聚合物载体复合，而所述表位编码RNA的其余部分以未复合形式(“游离”)存在。

[0644] 优选地，复合的表位编码RNA与游离表位编码RNA的摩尔比选自约0.001:1至约1:0.001的摩尔比，包括约1:1的比。更优选地，复合的表位编码RNA与游离表位编码RNA的比选自约5:1(w/w)至约1:10(w/w)的范围，更优选地约4:1(w/w)至约1:8(w/w)的范围，甚至更优选地约3:1(w/w)至约1:5(w/w)或1:3(w/w)的范围，和最优选地，复合的表位编码RNA与游离表位编码RNA的比选自约1:1(w/w)的比。

[0645] 优选地根据以下步骤制备本发明组合的复合的表位编码RNA、(药物)组合物或疫苗，第一步，通过将表位编码RNA与(聚-)阳离子化合物和/或与聚合物载体(优选地如本文所定义)以特定比例复合形成稳定的复合物。在该上下文中，非常优选的是，在复合所述表位编码RNA后，没有游离的(聚-)阳离子化合物或聚合物载体或仅有可忽略的其少量残留在复合的表位编码RNA的部分中。因此，表位编码RNA和(聚-)阳离子化合物和/或聚合物载体在复合RNA部分中的比例通常在一定范围内选择，以使表位编码RNA完全复合并且没有游离(聚-)阳离子化合物或聚合物载体或仅少量可忽略的残留在所述部分中。

[0646] 优选地，本文定义的表位编码RNA与(聚-)阳离子化合物和/或聚合物载体(优选如本文所定义)的比例选自约6:1(w/w)至约0,25:1(w/w)，更优选地约5:1(w/w)至约0,5:1(w/w)，甚至更优选地约4:1(w/w)至约1:1(w/w)或约3:1(w/w)至约1:1(w/w)的范围，和最优选地约3:1(w/w)至约2:1(w/w)的比。

[0647] 可选地，也可以基于整个复合物的氮/磷酸酯比(N/P-比)计算本文所定义的表位编码RNA与(聚-)阳离子化合物和/或聚合物载体的比。在本发明的上下文中，关于表位编码RNA:(聚-)阳离子化合物和/或聚合物载体的比，优选地如本文所定义，在复合物中，N/P-比优选地在约0.1-10的范围内，优选地在约0.3-4的范围内，和最优选地在约0.5-2或0.7-2的范围内，和最优选地在约0.7-1,5、0.5-1或0.7-1的范围内，和甚至最优选地在约0.3-0.9或0.5-0.9的范围之内，优选地条件是复合物中的(聚-)阳离子化合物是如上所定义的(聚-)阳离子蛋白或肽和/或聚合物载体。

[0648] 在其他实施方式中，如本文所定义的本发明组合的表位编码RNA、(药物)组合物或疫苗可以以游离或裸形式使用，而不与任何进一步运载体、转染或复合剂缔合。

[0649] 必须理解和认识到，根据本发明，除了至少一种PD-1途径抑制剂和至少一种LAG-3途径抑制剂之外，本发明组合、(药物)组合物或疫苗可包含至少一种如本文所定义的游离表位编码RNA，优选地mRNA，和/或至少一种如本文所定义的复合表位编码RNA，优选地mRNA，其中本文公开的每种试剂可用于复合。

[0650] 佐剂

[0651] 根据进一步实施方式，本发明组合、(药物)组合物或疫苗可以包含佐剂，其优选地添加以增强所述组合、(药物)组合物或疫苗的免疫刺激性质。

[0652] 最广泛意义上的佐剂或佐剂组分通常是可以修饰(例如，增强其他试剂的作用，例如治疗剂或疫苗)的药理学和/或免疫学试剂。在该上下文中，佐剂可以理解为任何化合物，其适于支持根据本发明的组合物的施用和递送。

[0653] 此外，这种佐剂可以在不与其结合的情况下引发或增加先天免疫系统的免疫应答，即非特异性免疫应答。“佐剂”通常不引起适应性免疫应答。就此而言，“佐剂”不具有作为抗原的资格。换言之，当施用时，本发明组合、(药物)组合物或疫苗通常由于表位而引发适应性免疫应答，所述表位由所述组合中、(药物)组合物或疫苗中含有的表位编码RNA的至少一个编码序列编码。另外地，存在于根据本发明的组合、(药物)组合物或疫苗的佐剂可以产生(支持性)先天免疫应答。此外，本发明组合、(药物)组合物或疫苗的PD-1和LAG-3途径抑制剂优选地通过拮抗免疫检查点PD-1和LAG-3的抑制作用来支持适应性免疫应答。

[0654] 这样的佐剂可以选自本领域技术人员已知并适合用于本案(即，支持哺乳动物中免疫应答的诱导)的任何佐剂。优选地，佐剂可以不受限制地选自TDM、MDP、胞壁酰二肽、pluronics、明矾溶液、氢氧化铝、ADJUMER™(聚磷腈)；磷酸铝凝胶；来自海藻的葡聚糖；藻氨蛋白；氢氧化铝凝胶(明矾)；高度吸附蛋白的氢氧化铝凝胶；低粘度氢氧化铝凝胶；AF或SPT(角鲨烷乳液(5％)，Tween 80(0.2％)，Pluronic L121(1.25％)，磷酸盐-缓冲的盐水，pH 7.4)；AVRIDINE™(丙烷二胺)；BAY R1005™((N-(2-脱氧-2-L-亮氨酰氨基-b-D-吡喃葡糖基)-N-十八烷基-十二烷酰-酰胺乙酸氢盐)；CALCITRIOL™(1-α,25-二羟基-维生素D3)；磷酸钙凝胶；CAP™(磷酸钙纳米颗粒)；霍乱全毒素，霍乱毒素-A1-蛋白-A-D-片段融合蛋白，霍乱毒素的亚单位B；CRL 1005(嵌段共聚物P1205)；含细胞因子的脂质体；DDA(二甲基双十八烷基溴化铵)；DHEA(脱氢表雄酮)；DMPC(双肉豆蔻酰基磷脂酰胆碱)；DMPG(双肉豆蔻酰基磷脂酰甘油)；DOC/明矾复合物(脱氧胆酸钠盐)；弗氏完全佐剂；弗氏不完全佐剂；γ菊粉；Gerbu佐剂(i)N-乙酰基氨基葡糖基-(P1-4)-N-乙酰基胞壁酰-L-丙氨酰-D-谷氨酰胺(GMDP)、ii)二甲基双十八烷基氯化铵(DDA)、iii)锌-L-脯氨酸盐复合物(ZnPro-8)；GM-CSF)；GMDP(N-乙酰基氨基葡糖基-(b1-4)-N-乙酰基胞壁酰-L-丙氨酰-D-异谷氨酰胺的混合物)；咪喹莫特(1-(2-甲基丙基)-1H-咪唑[4,5-c]喹啉-4-胺)；ImmTher™(N-乙酰基氨基葡糖基-N-乙酰基胞壁酰-L-Ala-D-异Glu-L-Ala-甘油双棕榈酸酯)；DRV(由脱水-再水化囊泡制备的免疫脂质体)；干扰素-γ；白介素-1β；白介素-2；白介素-7；白介素-12；ISCOMS™；ISCOPREP 7.0.3.™；脂质体；LOXORIBINE™(7-烯丙基-8-氧鸟苷)；LT口服佐剂(大肠杆菌不稳定的肠毒素-原毒素)；任何组合物的微球和微粒；MF59™；(角鲨烯水乳液)；MONTANIDE ISA 51™(纯化的不完全弗氏佐剂)；MONTANIDE ISA 720™(可代谢的油佐剂)；MPL™(3-Q-去酰基-4”-单磷酰脂质A)；MTP-PE和MTP-PE脂质体((N-乙酰基-L-丙氨酰-D-异谷氨酰胺-L-丙氨酸-2-(1,2-二棕榈酰-sn-甘油-3-(羟基磷酰氧))-乙基酰胺，单钠盐)；MURAMETIDE™(Nac-Mur-L-Ala-D-Gln-OCH3)；MURAPALMITINE™和D-MURAPALMITINE™(Nac-Mur-L-Thr-D-isoGIn-sn-甘油二棕榈酰)；NAGO(神经氨酸酶-半乳糖氧化酶)；任何组合物的纳米球和纳米颗粒；NISV(非离子表面活性剂囊泡)；PLEURAN™(β-葡聚糖)；PLGA、PGA和PLA(乳酸和乙醇酸的均聚-和共聚聚合物；微球/纳米球)；PLURONIC L121™；PMMA(聚甲基丙烯酸甲酯)；PODDS™(类蛋白微球)；聚亚乙基氨基甲酸酯衍生物；聚-rA:聚-rU(聚腺苷酸-聚尿苷酸络合

物)；聚山梨酯80(Tween80)；蛋白耳蜗(Avanti Polar Lipids,Inc.,Alabaster,AL)；STIMULON™(QS-21)；Quil-A(Quil-A皂苷)；S-28463(4-氨基-otec-二甲基-2-乙氧基甲基-1H-咪唑[4,5c]喹啉-1-乙醇)；SAF-1™("Syntex佐剂制剂")；仙台蛋白脂质体和仙台含脂质基质；Span-85(脱水山梨糖醇三油酸酯)；Specol(Marcol 52、Span 85和Tween 85的乳液)；角鲨烯或Robane® (2,6,10,15,19,23-六甲基二十四烃和2,6,10,15,19,23-六甲基-2,6,10,14,18,22-尼生烷(tetracosahexane))；硬脂酰酪氨酸(盐酸十八烷基酪氨酸)；Theramid®(N-乙酰基氨基葡糖基-N-乙酰基胞壁酰-L-Ala-D-异Glu-L-Ala-双棕榈氧基丙基酰胺)；Theronyl-MDP(Termurtide™或[thr 1]-MDP；N-乙酰基胞壁酰-L-苏氨酸基-D-异谷氨酰胺)；Ty颗粒(Ty-VLPs或病毒样颗粒)；Walter-Reed脂质体(含吸附在氢氧化铝上的脂质A的脂质体)，和脂肽，包括Pam3Cys，特别是铝盐，诸如Adju-phos、铝胶、补水凝胶；乳液，包括CFA、SAF、IFA、MF59、Provax、TiterMax、Montanide、Vaxfectin；共聚物，包括Optivax(CRL1005)、L121、Poloaxmer4010)等；脂质体，包括Stealth、耳蜗，包括BIORAL；植物来源佐剂，包括QS21、Quil A、Iscomatrix、ISCOM；适于共刺激的佐剂，包括番茄碱、生物聚合物，包括PLG、PMM、Inulin；微生物来源佐剂，包括罗莫肽、DETOX、MPL、CWS、甘露糖、CpG核酸序列序列、CpG7909、人TLR 1-10的配体、鼠TLR 1-13的配体、ISS-1018、IC31、咪唑喹啉、聚肌胞、Ribi529、IMOxine、IRIV、VLP、霍乱毒素、热不稳定毒素、Pam3Cys、鞭毛蛋白、GPI锚、LNFPIII/路易斯X、抗菌肽、UC-1V150、RSV融合蛋白、cdiGMP；和适于作为拮抗剂的佐剂，包括CGRP神经肽。

[0655] 特别优选的佐剂可以选自这样的佐剂，其支持诱导Th1免疫应答或幼稚T细胞的成熟，诸如GM-CSF、IL-12、IFNγ、如上定义的任何免疫刺激核酸，优选地免疫刺激RNA、CpG DNA等。

[0656] (聚-)阳离子化合物

[0657] 适合的佐剂也可选自如本文所述的(聚-)阳离子化合物，用于复合表位编码RNA(或其他核酸，特别是如本文所定义的RNA)。将(药物)组合物或疫苗的表位编码RNA与本文定义的(聚-)阳离子化合物缔合或复合，优选提供佐剂性质并赋予组合物的RNA稳定作用。

[0658] 特别地，用作佐剂的优选的(聚-)阳离子化合物选自(聚-)阳离子肽或蛋白，如在上文载体的上下文中“(聚-)阳离子氨基酸、肽和蛋白”一节中所公开的。用作佐剂的进一步优选的(聚-)阳离子化合物可包括(聚-)阳离子多糖，如在上文载体的上下文中“(聚-)阳离子多糖”一节中所公开的。用作佐剂的进一步优选的(聚-)阳离子化合物可包括(聚-)阳离子脂质，如在上文载体的上下文“(聚-)阳离子脂质”一节中所公开的。用作佐剂的进一步优选的(聚-)阳离子化合物可包括(聚-)阳离子聚合物，如在上文载体“(聚-)阳离子聚合物”一节中所公开的。

[0659] 表位编码RNA与佐剂组分中(聚-)阳离子化合物的比可以基于整个复合物的氮/磷酸比(N/P比)计算，即(聚-)阳离子化合物的带正电荷的(氮)原子与表位编码RNA的带负电荷的磷酸原子的比。例如，1μg的表位编码RNA通常含有约3nmol磷酸残基，条件是所述RNA表现出碱基的统计分布。另外地，1μg的肽通常含有约x nmol氮残基，取决于基本氨基酸的分子量和数量。当示例性地计算$(Arg)_9$(分子量1424g/mol，9个氮原子)时，1μg$(Arg)_9$含有约700pmol$(Arg)_9$，并因此700×9＝6300pmol基本氨基酸＝6.3nmol氮原子。对于约1:1RNA/$(Arg)_9$的质量比，可以计算约2的N/P比。当示例性计算质量比约为2:1，含2μgRNA的鱼精蛋

白时(分子量约4250g/mol,21个氮原子,当使用来自鲑鱼的鱼精蛋白时),6nmol磷酯用于计算RNA;1μg鱼精蛋白含有约235pmol鱼精蛋白分子,和因此235x21＝4935pmol基本氮原子＝4.9nmol氮原子。对于约2:1RNA/鱼精蛋白的质量比,可以计算约0.81的N/P比。对于约8:1RNA/鱼精蛋白的质量比,可以计算约0.2的N/P比。在本发明的上下文中,关于复合物中RNA:肽的比例,N/P比优选地在约0.1-10范围内,优选地在约0.3-4的范围内,以及最优选地在约0.7-1.5范围内。

[0660] 制备

[0661] 在优选实施方式中,本发明的组合、(药物)组合物或疫苗在两个单独的步骤中获得,以获得有效的免疫刺激作用和包含在所述组合、(药物)组合物或疫苗中的表位编码RNA的有效翻译。

[0662] 在第一步中,RNA以特定比例与(聚-)阳离子化合物复合以形成稳定的复合物("复合的RNA")。所述RNA可以是如本文所定义的表位编码RNA,或不同的RNA。在该上下文中,重要的是,在复合RNA的部分中没有游离的(聚-)阳离子化合物或仅有可忽略的少量(聚-)阳离子化合物。因此,(表位编码)RNA与(聚-)阳离子化合物的比通常选择在(表位编码)RNA完全复合并且在组合物中没有游离的(聚-)阳离子化合物或仅有可忽略的少量(聚-)阳离子化合物残留的范围内。优选地,(表位编码)RNA与(聚-)阳离子化合物的比选自约6:1(w/w)至约0,25:1(w/w)、更优选地约5:1(w/w)至约0,5:1(w/w)、甚至更优选地约4:1(w/w)至约1:1(w/w)或约3:1(w/w)至约1:1(w/w)的范围,和最优选地约3:1(w/w)至约2:1(w/w)的比。

[0663] 根据优选的实施方式,在第二步中,将表位编码RNA添加到复合的(表位编码)RNA中,以形成本发明的(免疫刺激性)组合物。其中,所述添加的表位编码RNA以游离RNA存在,优选地作为游离mRNA存在,其不与其他化合物复合。在添加之前,游离RNA不复合,并且在加入复合的(表位编码)RNA后优选不会发生任何可检测的或显著的复合反应。这是由于(聚-)阳离子化合物与复合(表位编码)RNA的强结合。换句话说,当将游离表位编码RNA添加到复合的(表位编码的)RNA中时,优选地不存在游离的或基本上不存在游离的可以与所述游离表位编码RNA形成复合物的(聚-)阳离子化合物。因此,本发明的(药物的)组合物或疫苗的游离表位编码RNA可以在体内有效转录。其中,游离表位编码RNA,优选地mRNA,可以作为单-、二-或多顺反子(m)RNA出现,即携带一个或多个表位(或抗原)的编码序列的RNA。二-或甚至多顺反子mRNA中的这种编码序列可以被至少一个IRES序列分开,如,如本文所定义。

[0664] 特别优选的实施方式中,包含在本发明的组合、(药物)组合物或疫苗中的如本文所定义的游离表位编码RNA可以与复合的RNA相同或不同,具体取决于具体治疗需要。甚至更优选地,包含在本发明组合、(药物)组合物或疫苗中的游离表位编码RNA与复合的表位编码RNA相同,换句话说,组合、(药物)组合物或疫苗包含游离形式和复合形式的表位编码RNA。

[0665] 在特别优选的实施方式中,因此,本发明的组合、(药物)组合物或疫苗包含如本文所定义的表位编码RNA,其中所述表位编码RNA在所述组合、(药物)组合物或疫苗中存在,部分作为游离RNA和部分作为复合RNA。优选地,如本文所定义的表位编码RNA,优选地mRNA,如上所述进行复合,和然后以游离RNA的形式加入相同的表位编码(m)RNA,其中优选地在添加游离表位编码RNA的时刻,用于复合表位编码RNA的化合物在组合物中不以游离形式存在。

[0666] 可以根据特定疗法的具体要求选择复合的(表位编码)RNA和游离表位编码RNA的

比。通常，选择复合(表位编码)RNA和游离表位编码RNA的比，使得由于复合(表位编码)RNA的存在而引发先天免疫系统的显著刺激。平行地，选择该比使得可以在体内提供显著量的游离表位编码RNA，导致体内表达的表位(或包含其的抗原)的有效翻译和浓缩。优选地，本发明(药物)组合物或疫苗中复合的(表位编码)RNA与游离表位编码RNA的比选自约5:1(w/w)至约1:10(w/w)的范围，更优选地约4:1(w/w)至约1:8(w/w)的范围，甚至更优选地约3:1(w/w)至约1:5(w/w)或1:3(w/w)的范围，和最优选地约1:1(w/w)。

[0667] 另外地或可选地，可以基于整个RNA复合物中氮/磷酸比(N/P-比)计算复合的(表位编码)RNA和游离(表位编码)RNA的比。在本发明的上下文中，关于复合物中，RNA:肽的比，N/P-比优选地在约0.1-10的范围内，优选地约0.3-4的范围内，和最优选地约0.5-2或0.7-2的范围内，和最优选地在约0.7-1.5的范围内。

[0668] 另外地或可选地，复合的(表位编码)RNA与游离表位编码RNA的比可以基于两者RNA与彼此的摩尔比进行选择。通常，复合的(表位编码)RNA与游离表位编码RNA的摩尔比可以进行选择，使得摩尔比满足上面(w/w)和/或N/P-限定。更优选地，复合的(表位编码)RNA与游离表位编码RNA的摩尔比可以如，选自以下摩尔比：约0.001:1、0.01:1、0.1:1、0.2:1、0.3:1、0.4:1、0.5:1、0.6:1、0.7:1、0.8:1、0.9:1、1:1、1:0.9、1:0.8、1:0.7、1:0.6、1:0.5、1:0.4、1:0.3、1:0.2、1:0.1、1:0.01、1:0.001等，或选自由上面值中任意两个形成的任何范围，如，选自约0.001:1至1:0.001的范围，包括约0.01:1至1:0.001、0.1:1至1:0.001、0.2:1至1:0.001、0.3:1至1:0.001、0.4:1至1:0.001、0.5:1至1:0.001、0.6:1至1:0.001、0.7:1至1:0.001、0.8:1至1:0.001、0.9:1至1:0.001、1:1至1:0.001、1:0.9至1:0.001、1:0.8至1:0.001、1:0.7至1:0.001、1:0.6至1:0.001、1:0.5至1:0.001、1:0.4至1:0.001、1:0.3至1:0.001、1:0.2至1:0.001、1:0.1至1:0.001、1:0.01至1:0.001的范围，或约0.01:1至1:0.01、0.1:1至1:0.01、0.2:1至1:0.01、0.3:1至1:0.01、0.4:1至1:0.01、0.5:1至1:0.01、0.6:1至1:0.01、0.7:1至1:0.01、0.8:1至1:0.01、0.9:1至1:0.01、1:1至1:0.01、1:0.9至1:0.01、1:0.8至1:0.01、1:0.7至1:0.01、1:0.6至1:0.01、1:0.5至1:0.01、1:0.4至1:0.01、1:0.3至1:0.01、1:0.2至1:0.01、1:0.1至1:0.01、1:0.01至1:0.01的范围，或包括约0.001:1至1:0.01、0.001:1至1:0.1、0.001:1至1:0.2、0.001:1至1:0.3、0.001:1至1:0.4、0.001:1至1:0.5、0.001:1至1:0.6、0.001:1至1:0.7、0.001:1至1:0.8、0.001:1至1:0.9、0.001:1至1:1、0.001至0.9:1、0.001至0.8:1、0.001至0.7:1、0.001至0.6:1、0.001至0.5:1、0.001至0.4:1、0.001至0.3:1、0.001至0.2:1、0.001至0.1:1的范围，或约0.01:1至1:0.01、0.01:1至1:0.1、0.01:1至1:0.2、0.01:1至1:0.3、0.01:1至1:0.4、0.01:1至1:0.5、0.01:1至1:0.6、0.01:1至1:0.7、0.01:1至1:0.8、0.01:1至1:0.9、0.01:1至1:1、0.001至0.9:1、0.001至0.8:1、0.001至0.7:1、0.001至0.6:1、0.001至0.5:1、0.001至0.4:1、0.001至0.3:1、0.001至0.2:1、0.001至0.1:1的范围等。

[0669] 甚至更优选地，复合的(表位编码)RNA与游离表位编码RNA的摩尔比选自如，约0.01:1至1:0.01的范围。最优选地，复合的(表位编码)RNA与游离的表位编码RNA的摩尔比可以选自如，约1:1的摩尔比。可以适用关于(w/w)和/或N/P的任何上述定义。

[0670] 佐剂核酸

[0671] 根据本发明，核酸可用作佐剂。此类核酸也可称为“免疫刺激”或“is”核酸或RNA。根据特别优选的实施方案，佐剂核酸包含以下式(V)或(VI)的核酸：

[0672] $G_lX_mG_n$

[0673] 式(V)

[0674] 其中：

[0675] G是包含鸟嘌呤、尿嘧啶，或鸟嘌呤或尿嘧啶的类似物的核苷酸；

[0676] X是包含鸟嘌呤、尿嘧啶、腺嘌呤、胸腺嘧啶、胞嘧啶或其类似物的核苷酸；

[0677] l是1至40的整数，

[0678] 其中

[0679] 当l＝1时，G是包含鸟嘌呤或其类似物的核苷酸，

[0680] 当l>1时，至少50％的核苷酸包含鸟嘌呤或其类似物；

[0681] m是整数并且是至少3；

[0682] 其中

[0683] 当m＝3时，X是包含尿嘧啶或其类似物的核苷酸，

[0684] 当m>3时，存在包含尿嘧啶或尿嘧啶的类似物的至少3个连续的核苷酸；

[0685] n是1至40的整数，

[0686] 其中

[0687] 当n＝1时，G是包含鸟嘌呤或其类似物的核苷酸，

[0688] 当n>1，至少50％的核苷酸包含鸟嘌呤或其类似物；

[0689] $C_lX_mC_n$

[0690] 式(VI)

[0691] 其中:

[0692] C是包含胞嘧啶、尿嘧啶、或胞嘧啶或尿嘧啶的类似物的核苷酸；

[0693] X是包含鸟嘌呤、尿嘧啶、腺嘌呤、胸腺嘧啶、胞嘧啶或其类似物的核苷酸；

[0694] l是1至40的整数，

[0695] 其中

[0696] 当l＝1时，C是包含胞嘧啶或其类似物的核苷酸，

[0697] 当l>1时，至少50％的核苷酸包含胞嘧啶或类似物；

[0698] m是是整数并且是至少3；

[0699] 其中

[0700] 当m＝3时，X包含尿嘧啶或其类似物，

[0701] 当m>3时，存在包含尿嘧啶或尿嘧啶的类似物的至少3个连续的核苷酸；

[0702] n是1至40的整数，

[0703] 其中

[0704] 当n＝1时，C是包含胞嘧啶或其类似物的核苷酸，

[0705] 当n>1时，至少50％的核苷酸包含胞嘧啶或类似物。

[0706] 可以用作isRNA的式(V)或(VI)的核酸可以是相对短的核酸分子，其典型长度约为5至100个(但也可以长于100核苷酸，对于特定实施方式，例如高达200个核苷酸)，5至90个或5至80个核苷酸，优选地长度约为5至70个，更优选地长度约为8至60个，更优选地长度约为15至60个核苷酸，更优选地20至60个，最优选地30至60个核苷酸。如果表位编码RNA(或任何其他核酸，特别是如本文所公开的RNA)具有例如100个核苷酸的最大长度，则m通常将≤

98。

[0707] 式(V)的核酸中的核苷酸“G”的数量由l或n确定。l和n彼此独立地各自为1至40的整数，其中当l或n＝1时，G是包含鸟嘌呤或其类似物的核苷酸，和当l或n>1时，至少50％的核苷酸包含鸟嘌呤或其类似物。

[0708] 例如，没有暗示任何限制，当l或n＝4时，Gl或Gn可以是例如，GUGU、GGUU、UGUG、UUGG、GUUG、GGGU、GGUG、GUGG、UGGG或GGGG等；当l或n＝5时，Gl或Gn可以是例如，GGGUU、GGUGU、GUGGU、UGGGU、UGGUG、UGUGG、UUGGG、GUGUG、GGGGU、GGGUG、GGUGG、GUGGG、UGGGG，或GGGGG等；等。

[0709] 式(V)的核酸中与X_m相邻的核苷酸优选地不包含尿嘧啶。

[0710] 类似地，式(VI)的核酸中的核苷酸“C”的数量由l或n确定。l和n彼此独立地各自为1至40的整数，其中当l或n＝1时，C是包含胞嘧啶或其类似物的核苷酸，和当l或n>1时，至少50％的核苷酸包括胞嘧啶或其类似物。

[0711] 例如，没有暗示任何限制，当l或n＝4时，Cl或Cn可以是例如，CUCU、CCUU、UCUC、UUCC、CUUC、CCCU、CCUC、CUCC、UCCC或CCCC等；当l或n＝5时，Cl或Cn可以是例如，CCCUU、CCUCU、CUCCU、UCCCU、UCCUC、UCUCC、UUCCC、CUCUC、CCCCU、CCCUC、CCUCC、CUCCC、UCCCC或CCCCC等。

[0712] 式(VI)的核酸中与X_m相邻的核苷酸优选地不包含尿嘧啶。优选地，对于式(V)，当l或n>1时，至少60％、70％、80％、90％或甚至100％的核苷酸包含鸟嘌呤或其类似物，如上文所定义。

[0713] (当包含鸟嘌呤的核苷酸构成小于100％的核苷酸时)旁侧序列G1和/或Gn中到100％的其余核苷酸是尿苷或其类似物，如前文所定义。还优选地，l和n彼此独立地每个是2至30的整数，更优选地2至20的整数，和仍更优选地2至15的整数。如果需要，l或n的下限可以改变，并且是至少1，优选地至少2，更优选地至少3、4、5、6、7、8、9或10。该定义相应地适用于式(VI)。

[0714] 根据进一步优选的实施方式，如本文所描述的isRNA由式(VII)或(VIII)的核酸组成或包含式(VII)或(VIII)的核酸：

[0715] $(N_uG_lX_mG_nN_v)_a$

[0716] 式(VII)

[0717] 其中：

[0718] G是包含鸟嘌呤、尿嘧啶，或鸟嘌呤或尿嘧啶的类似物，优选地包含鸟嘌呤或其类似物的核苷酸：

[0719] X是包含鸟嘌呤、尿嘧啶、腺嘌呤、胸腺嘧啶、胞嘧啶或其类似物，优选地包含尿嘧啶或其类似物的核苷酸；

[0720] N是长度为约4至50、优选地约4至40、更优选地约4至30或4至20个核酸的核酸序列，每个N独立地选自包含鸟嘌呤、尿嘧啶、腺嘌呤、胸腺嘧啶、胞嘧啶或其类似物的核苷酸；

[0721] a是1至20、优选地1至15、最优选地1至10的整数；

[0722] l是1至40的整数，

[0723] 其中当l＝1时，G是包含鸟嘌呤或其类似物的核苷酸，

[0724] 当l>1时，至少50％的这些核苷酸包含鸟嘌呤或其类似物；

[0725] m是整数并且是至少3；

[0726] 其中当m＝3时，X是包含尿嘧啶或其类似物的核苷酸，和

[0727] 当m>3时，存在包含尿嘧啶或尿嘧啶的类似物的至少3个连续的核苷酸；

[0728] n是1至40的整数，

[0729] 其中当n＝1时，G是包含鸟嘌呤或其类似物的核苷酸，

[0730] 当n>1，至少50％的这些核苷酸包含鸟嘌呤或其类似物；

[0731] u、v可以独立地是0至50的整数，

[0732] 优选地其中当u＝0时，v≥1或当v＝0时，u≥1；

[0733] 其中式(VII)的核酸分子的长度为至少50个核苷酸、优选地至少100个核苷酸、更优选地至少150个核苷酸、甚至更优选地至少200个核苷酸和最更优选地至少250个核苷酸。

[0734] $(N_uC_lX_mC_nN_v)_a$

[0735] 式(VIII)

[0736] 其中：

[0737] C是包含胞嘧啶、尿嘧啶、或胞嘧啶或尿嘧啶的类似物，优选地胞嘧啶或其类似物的核苷酸；

[0738] X是包含鸟嘌呤、尿嘧啶、腺嘌呤、胸腺嘧啶、胞嘧啶或其类似物，优选地包含尿嘧啶或其类似物的核苷酸；

[0739] N是长度为约4至50、优选地约4至40、更优选地约4至30或4至20个核酸的核酸序列，每个N独立地选自包含鸟嘌呤、尿嘧啶、腺嘌呤、胸腺嘧啶、胞嘧啶或其类似物的核苷酸；

[0740] a是1至20、优选地1至15、最优选地1至10的整数；

[0741] l是1至40的整数，

[0742] 其中当l＝1时，C是包含胞嘧啶或其类似物的核苷酸，

[0743] 当l>1时，至少50％的这些核苷酸包含胞嘧啶或其类似物；

[0744] m是整数并且是至少3；

[0745] 其中当m＝3时，X时包含尿嘧啶或其类似物的核苷酸，

[0746] 当m>3，存在包含尿嘧啶或尿嘧啶的类似物的至少3个连续的核苷酸；

[0747] n是1至40的整数，

[0748] 其中当n＝1时，C是包含胞嘧啶或其类似物的核苷酸，

[0749] 当n>1时，至少50％的这些核苷酸包含胞嘧啶或其类似物.

[0750] u、v可以独立地是0至50的整数，

[0751] 优选地其中当u＝0时，v≥1或当v＝0时，u≥1；

[0752] 其中根据本发明的式(VIII)的核酸分子的长度为至少50个核苷酸、优选地至少100个核苷酸、更优选地至少150个核苷酸、甚至更优选地至少200个核苷酸和最更优选地至少250个核苷酸。

[0753] 对于式(VIII)，上文针对元件N(即，N_u和N_v)和X(X_m)，特别是如上所定义的核心结构，以及对于整数a、l、m、n、u和v给出的任何定义类似相应地适用于式(IV)的元件，其中在式(VIII)中，核心结构由$C_lX_mC_n$定义。边缘元件的定义与上面针对N_u和N_v给出的定义相同。

[0754] 特别是，在上面式(V)-(VIII)的上下文中，“核苷酸”被理解为包含含氮气碱基(优选地选自腺嘌呤(A)、胞嘧啶(C)、鸟嘌呤(G)、胸腺嘧啶(T)、或尿嘧啶(U))、戊糖(核糖或脱

氧核糖)和至少一个磷酸基团,或由其组成。“核苷”由核碱基和戊糖组成(即可称为“没有磷酸基团的核苷酸”)。因此,包含特定碱基(A、C、G、T或U)的“核苷酸”除了一个(两个、三个或更多)磷酸基团外也优选地包含相应的核苷(分别腺苷、胞苷、鸟苷、胸苷或尿苷)。

[0755] 也就是说,术语“核苷酸”包括核苷单磷酸酯(AMP、CMP、GMP、TMP和UMP),核苷二磷酸酯(ADP、CDP、GDP、TDP和UDP),核苷三磷酸酯(ATP、CTP、GTP、TTP和UTP)。在上述式(V)-(VIII)的上下文中,特别优选核苷单磷酸酯。表述“包含(...)或其类似物的核苷酸”是指包含修饰的(磷酸酯)骨架,戊糖或核碱基的修饰的核苷酸。在该上下文中,特别优选核碱基的修饰。举例来说,当提及“包含鸟嘌呤、尿嘧啶、腺嘌呤、胸嘧啶、胞嘧啶或其类似物的核苷酸”时,术语“其类似物”是指核苷酸和所述的核碱基,优选指所述的核碱基。

[0756] 进一步试剂

[0757] 在进一步优选的实施方式中,还可能的是,除了至少一个(i)表位编码RNA,(ii)PD-1途径抑制剂和(iii)LAG-3途径抑制剂之外,本发明组合、(药物)组合物或或疫苗还包含进一步试剂或组分,其选自:进一步抗原(例如以肽或蛋白的形式)或进一步表位编码核酸;进一步免疫治疗剂;一种或多种辅助物质或者任何进一步化合物,由于其与人Toll样受体的结合亲和力(作为配体)而已知是免疫刺激的;和/或佐剂核酸,优选免疫刺激性RNA(isRNA)。

[0758] 辅助物质

[0759] 如果需要,本发明组合、(药物)组合物或者疫苗可因此另外含有一种或多种辅助物质,以增加其免疫原性或免疫刺激能力。本文定义的表位编码RNA和抑制剂以及辅助物质的协同作用优选地由此实现,所述辅助物质可以任选地包含在本发明的组合物中。

[0760] 通常,可能使用任何以“危险信号”(LPS,GP96等)或细胞因子(如GM-CFS)的方式影响免疫系统的试剂作为辅助物质,这些试剂允许以靶向方式增强和/或影响免疫应答。特别优选的辅助物质是细胞因子,诸如单核因子、淋巴因子、白介素或趋化因子,其进一步促进先天免疫应答,诸如IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、IL-19、IL-20、IL-21、IL-22、IL-23、IL-24、IL-25、IL-26、IL-27、IL-28、IL-29、IL-30、IL-31、IL-32、IL-33、IFN-α、IFN-β、IFN-γ、GM-CSF、G-CSF、M-CSF、LT-β或TNF-α、生长因子诸如hGH。

[0761] 本发明(药物)组合物或疫苗还可以另外含有任何进一步化合物,其由于其与人Toll样受体(TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、TLR10)的结合亲和力(作为配体),或由于其与鼠Toll样受体(TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、TLR10、TLR11、TLR12或TLR13)的结合亲和力(作为配体)而已知是免疫刺激的。

[0762] 可以添加到本发明(药物的)组合物或疫苗的另一类化合物可以是CpG核酸,特别是CpG-RNA或CpG-DNA。CpG-RNA或CpG-DNA可以是单链CpG-DNA(ss CpG-DNA)、双链CpG-DNA(dsDNA)、单链CpG-RNA(ss CpG-RNA)或双链CpG-RNA(ds CpG-RNA)。CpG核酸优选为CpG-RNA的形式,更优选地为单链CpG-RNA(ss CpG-RNA)的形式。CpG核酸优选地含有至少一个或多个(促有丝分裂的)胞嘧啶/鸟嘌呤二核苷酸序列(CpG基序)。根据第一优选可选方案,这些序列中含有的至少一个CpG基序,即CpG基序的C(胞嘧啶)和G(鸟嘌呤),是非甲基化的。任选地含在这些序列中的所有进一步胞嘧啶或鸟嘌呤可以是甲基化的或非甲基化的。然后,根据进一步优选可选方案,CpG基序的C(胞嘧啶)和G(鸟嘌呤)也可以以甲基化形式存在。

[0763] 可以添加到本发明(药物的)组合物或疫苗的另一类化合物可以因此是免疫刺激性RNA(isRNA),即能够诱导先天免疫应答的RNA。这类免疫刺激性RNA可以任选地包含上面描绘的式(I)-(IV),或由其组成。isRNA通常不包含可读框并因此不提供表位或抗原或免疫原,但是如通过与具体类型的Toll受体(TLR)或其他适合的受体的结合引发免疫应答。然而,当然具有可读框和编码肽/蛋白的mRNA也可以诱导先天免疫应答并因此可以是免疫刺激性RNA。

[0764] 药学上可接受的赋形剂和载体

[0765] 优选地,根据本发明的(药物)组合物或疫苗包含至少一种药学上可接受的赋形剂,特别是至少一种药学上可接受的载体。术语“药学上可接受的”是指与一种或多种活性剂相容的化合物或药剂(此处:表位编码RNA、PD-1和/或LAG-3途径抑制剂)和不干扰和/或大幅减少其药物活性。药学上可接受的载体优选地具有足够高的纯度和足够低的毒性,使得它们适合于施用给待治疗的受试者。

[0766] 药学上可接受的赋形剂可以表现出不同的功能作用,并包括但不限于稀释剂、填料、膨胀剂、载体、崩解剂、粘合剂、润滑剂、助流剂、涂料、溶剂和共溶剂、缓冲剂、防腐剂、佐剂、抗氧化剂、润湿剂、抗发泡剂、增稠剂、甜味剂、调味剂和保湿剂。

[0767] 适合的药学上可接受的载体通常基于(药物)组合物或疫苗的配制进行选择。

[0768] 对于液体形式的(药物)组合物或疫苗,有用的药学上可接受的赋形剂一般包括溶剂,稀释剂或载体,诸如(无热原)水,(等渗)盐水溶液,例如磷酸盐或柠檬酸盐缓冲盐水,固定油,植物油,例如花生油,棉籽油,芝麻油,橄榄油,玉米油,乙醇,多元醇(例如,甘油,丙二醇,聚乙二醇等);卵磷脂;表面活性剂;防腐剂如苯甲醇,对羟基苯甲酸酯,氯丁醇,苯酚,抗坏血酸,硫柳汞等;等渗剂诸如糖类,多元醇如甘露醇,山梨糖醇或氯化钠;单硬脂酸铝或明胶;抗氧化剂如抗坏血酸酸或亚硫酸氢钠;螯合剂如乙基乙二胺四乙酸(EDTA);缓冲剂如乙酸盐,柠檬酸盐或磷酸盐和调节渗透压的试剂如氯化钠或右旋糖。可以用酸或碱调节pH,例如盐酸或氢氧化钠。缓冲液可以是特定参比介质的高渗,等渗或低渗,即缓冲液可以具有相对于特定参比介质更高,相同或更低的盐含量,其中优选地可以使用上述盐的这样的浓度,其由于渗透或其他浓度效应,不会导致细胞损伤。参比介质例如是以“体内”方法存在的液体,例如血液、淋巴液、细胞溶液或其他体液,或者如液体,其可用作“体外”方法中的参比介质,例如常用缓冲液或液体。这种常见的缓冲液或液体是技术人员已知的。特别优选林格-乳酸盐溶液作为液体基础。

[0769] 载体

[0770] 适合的药学上可接受的载体通常基于(药物)组合物或疫苗的配制进行选择。

[0771] 通过注射施用,特别是通过静脉注射施用的液体(药物)组合物或疫苗在制造和储存条件下应该是无菌且稳定的。这种组合物通常配制成肠胃外可接受的水溶液,其无热原,具有合适的pH,是等渗的并且保持活性成分的稳定性。

[0772] 用于根据本发明的液体(药物)组合物或疫苗的特别有用的药学上可接受的载体包括水,通常无热原水;等渗盐水或缓冲(水性)溶液,例如磷酸盐,柠檬酸盐等缓冲溶液。特别是对于注射本发明的(药物)组合物或疫苗,可以使用水或优选地缓冲液,更优选地水性缓冲液,其含有钠盐,优选地至少50mM的钠盐,钙盐,优选地至少0,01mM的钙盐,和任选地钾盐,优选地至少3mM的钾盐。

[0773] 根据优选的实施方式，钠，钙和任意地，钾盐可以以其卤化物的形式存在，例如，氯化物、碘化物或溴化物，以其氢氧化物，碳酸盐，碳酸氢盐或硫酸盐等形式存在。不限于此，钠盐的实例包括例如NaCl、NaI、NaBr、Na_2CO_3、$NaHCO_3$、Na_2SO_4，任选的钾盐的实例包括例如KCl、KI、KBr、K_2CO_3、$KHCO_3$、K_2SO_4，和钙盐的实例包括例如$CaCl_2$、CaI_2、$CaBr_2$、$CaCO_3$、$CaSO_4$、$Ca(OH)_2$。此外，在缓冲液中可以含有前述阳离子的有机阴离子。

[0774] 根据更优选的实施方式，适用于如上定义的注射目的的缓冲剂可以含有选自氯化钠(NaCl)、氯化钙($CaCl_2$)和任选地氯化钾(KCl)的盐，其中，除氯化物外进一步阴离子可以存在。$CaCl_2$也可以用另一种盐如KCl代替。通常，注射缓冲液中的盐以至少50mM氯化钠(NaCl)，至少3mM氯化钾(KCl)和至少0.01mM氯化钙($CaCl_2$)的浓度存在。关于特定参比介质，注射缓冲液可以是高渗的，等渗的或低渗的，即缓冲液可以具有相对于特定参比介质更高，相同或更低的盐含量，其中优选地可以使用前述盐的这样的浓度，其由于渗透或其他浓度效应，不会导致细胞损伤。参比介质例如是在“体内”方法出现的液体中，例如血液、淋巴液、细胞溶液、或其它体液，或者液体，可用作“体外”方法中的参比介质，例如常用缓冲液或液体。这种常见的缓冲液或液体是技术人员已知的。特别优选林格-乳酸盐溶液作为液体基础。

[0775] 对于(半)固体形式的(药物)组合物，有用的药学上可接受的赋形剂包括粘合剂，例如微晶纤维素、黄蓍胶或明胶；淀粉或乳糖；糖，例如乳糖，葡萄糖和蔗糖；淀粉，诸如例如，玉米淀粉或马铃薯淀粉；纤维素及其衍生物，诸如例如，羧甲基纤维素钠、乙基纤维素、乙酸纤维素；崩解剂，例如海藻酸；润滑剂，例如硬脂酸镁；助流剂如硬脂酸、硬脂酸镁；硫酸钙，胶体二氧化硅等；甜味剂如蔗糖或糖精；和/或调味剂如薄荷、水杨酸甲酯或橙子调味剂。

[0776] 制剂

[0777] 用于局部施用的(药物)组合物可以配制成乳膏、软膏、凝胶、糊剂或粉末。用于口服施用的(药物)组合物可以制成片剂、胶囊、液体、粉末或缓释形式。

[0778] 根据优选的实施方式，本发明(药物)组合物或疫苗通过胃肠外施用，特别是通过皮内或肌内注射。因此，本发明的(药物)组合物或疫苗是优选地配制用于肠胃外施用(特别是注射)，并因此通常以液体形式(例如基于脂质或基于盐水的)或冻干形式提供。肠胃外制剂通常存储在小瓶、IV袋、安瓿、药盒或预填充注射器中，并且可以作为注射剂、吸入剂或气溶胶施用，优选注射剂。优选的注射用肠胃外制剂包括水、生理盐水或其混合物的无菌溶液，其生理pH为约7.4。

[0779] 冻干制剂

[0780] 在优选实施方式中，(药物)组合物或疫苗以冻干形式提供。优选地，在施用前，冻干的(药物)组合物或疫苗在合适的缓冲液中重构，有利地基于含水载体，例如，林格-乳酸盐溶液——其是优选地，林格溶液，磷酸盐缓冲溶液。在一些实施方式中，根据本发明的(药物)组合物或疫苗包含以冻干形式提供的至少两种、三种、四种、五种、六种或更多种表位编码RNA，优选地mRNA(任选地连同至少一种进一步添加剂)并且优选地在其使用之前，在合适的缓冲液(例如林格-乳酸盐溶液)中重构，以便允许单独施用每种所述表位编码RNA。

[0781] 液体制剂

[0782] 在进一步优选的实施方式中，(药物)组合物或疫苗以盐水或基于脂质的制剂的形

式提供。基于脂质的制剂可以选自但不限于脂质体、脂质复合物、纳米脂质体和脂质纳米颗粒，它们在上文“复合”部分中描述。

[0783] 剂量

[0784] (药物)组合物或疫苗通常包含安全有效量的表位编码RNA、PD-1和LAG-3途径抑制剂。

[0785] 如本文所用，“安全有效量”是指足以显著诱导待治疗疾病的阳性修饰的活性剂的量。然而，与此同时，“安全有效量”足够小以避免严重的副作用，也就是说允许利益和风险之间的合理关系。

[0786] 在本发明的上下文中，表述“安全有效量”优选地是指适合引发所需治疗效果的活性剂的量，例如在本发明(药物)组合物或疫苗的情况下，以这样的方式刺激适应性免疫系统，即实现不会实现过度或破坏的免疫反应，但是，优选地这种免疫反应也没有低于可测量水平。

[0787] “安全有效量”将根据待治疗的具体病症以及待治疗患者的年龄和身体状况，病症的严重程度，治疗的持续时间，所用治疗的性质，使用的特定要学上可接受的载体的性质，和类似因素而在随附医生的知识和经验范围内变化。

[0788] 具体地，表位编码RNA的“安全有效量”可以进一步根据表位编码RNA的类型选择，例如，单顺反子的，双-或甚至多顺反子RNA，因为与使用等量的单顺反子RNA相比，双或甚至多顺反子RNA可导致编码的抗原的显著更高的表达。

[0789] 试剂盒

[0790] 在另一方面，本发明涉及包含本发明组合、(药物)组合物或疫苗的试剂盒(kit，kit-of-part)。换句话说，试剂盒通常包含(i)至少一种如本文所定义的表位编码RNA，(ii)至少一种如本文所定义的PD-1途径抑制剂和(iii)至少一种如所定义的LAG-3途径抑制剂作为其组分。

[0791] 上述组分可以各自以试剂盒中药物组合物的形式提供。就此而言，上文提供的(药物)组合物或疫苗的定义和解释同样适用于试剂盒的各个组分，加以必要的变更。

[0792] 例如，(i)至少一个表位编码RNA，(ii)PD-1途径抑制剂和(iii)LAG-3途径抑制剂可以彼此独立地以冻干或液体形式提供，任选与药物组合物的上下文中所述的一种或多种药学上可接受的载体、赋形剂、佐剂或进一步药剂一起使用。

[0793] 任选地，试剂盒可以包含至少一种本文在药物组合物、抗微生物剂、RNA酶抑制剂、增溶剂等的上下文中定义的进一步药剂。

[0794] 试剂盒可以是两个或更多个套件的试剂盒，并且通常包括在合适容器中的成分。例如，每个容器可以是小瓶、瓶、挤压瓶、罐、密封套管、封套或小袋、管子或泡罩包装或任何其它合适形式的形式，只要容器配置成防止组分过早混合。可以单独提供每个不同的组分，或者可以一起提供一些不同的组分(即，在同一容器中)。

[0795] 容器也可以是小瓶、管、罐或封套，或套管，或泡罩包装或瓶子内的隔室或腔室，条件是一个隔室的内容物与另一个隔室的内容物在药剂师或医生故意混合之前不能在物理上相关联。

[0796] 试剂盒还可以包含技术说明书，其具有关于其任何组分的施用和剂量的信息。

[0797] 医疗用途和治疗

[0798] 本文定义的本发明组合、(药物组合物)、疫苗或试剂盒可以用于人类,和也可以用于兽医学目的,优选地用于医疗目的。

[0799] 根据进一步方面,本发明因此涉及用作药物的本发明组合、(药物组合物)、疫苗或试剂盒。因此,本发明包括如本文所定义的PD-1途径抑制剂和/或LAG-3途径抑制剂,其用于与本文定义的表位编码RNA组合的治疗。此外,本发明的特征在于如本文所定义的表位编码RNA,其用于与PD-1途径抑制剂和如本文所定义的LAG-3途径抑制剂组合治疗。

[0800] 本发明组合、(药物的)组合物、疫苗或试剂盒尤其可用于治疗和/或预防可受益于在需要其的受试者中刺激或恢复T细胞功能和T细胞介导的免疫应答(例如增殖、细胞因子释放、靶细胞杀伤、效应细胞活化)。

[0801] 根据进一步方面,本发明因此涉及用于预防或治疗肿瘤或癌症疾病、感染性疾病、过敏症或自身免疫性疾病的方法的本发明组合、(药物的)组合物、疫苗或试剂盒。

[0802] 术语“治疗”或“处理”疾病包括防止或预防疾病(即,使临床症状不发展);抑制疾病(即阻止或抑制临床症状的发展);和/或缓解疾病(即,使临床症状消退)。可以理解,由于最终的诱导事件可能是未知的或潜在的,因此并不总是能够区分“防止”和“抑制”疾病或病症。因此,术语“预防”将被理解为构成一种“治疗”,其包括“防止”和“抑制”。术语“治疗”因此包括“预防”。

[0803] 本文所用的术语“受试者”、“患者”或“个体”通常包括人类和非人类动物以及优选地哺乳动物(例如,非人类灵长类动物,包括狨猴、绢毛猴、蜘蛛猴、猫头鹰猴、黑长尾猴、松鼠猴、和狒狒、猕猴、黑猩猩、猩猩、大猩猩;牛;马;绵羊;猪;鸡;猫;狗;小鼠;大鼠;兔;豚鼠;等等),包括嵌合和转基因动物和疾病模型。在本发明的上下文中,术语“受试者”优选地是指非人类灵长类动物或人类,最优选地人类。

[0804] 因此,本发明进一步提供了治疗或预防癌症、感染性疾病、自身免疫疾病或过敏症的方法,其通过向需要其的受试者施用药学上有效量的本发明组合、(药物)组合物、疫苗或试剂盒。这类方法可包括制备本发明组合、(药物)组合物、疫苗或试剂盒的任选的第一步,和第二步,包括向需要其的患者/受试者施用(药学上和/或治疗有效量的)所述组合、(药物)组合物、疫苗或试剂盒。

[0805] 本发明还涉及根据本发明的本发明组合、(药物)组合物、疫苗或试剂盒,优选地用于调节,优选地用于诱导或增强受试者的免疫应答,更优选地用于治疗或预防本文定义的癌症、感染性疾病、过敏症或自身免疫疾病的用途。

[0806] 施用

[0807] 本发明组合、(药物)组合物、疫苗或试剂盒(或它们的组分)可以例如,全身或局部施用。

[0808] 一般用于全身施用的途径包括例如透皮、口服、肠胃外途径,包括皮下、静脉内、肌肉内、动脉内、皮内和腹膜内注射和/或鼻内施用途径。

[0809] 一般用于局部施用的途径包括例如局部施用途径,但也包括皮内、透皮、皮下或肌内注射或病灶内、肿瘤内、颅内、肺内、心内和舌下注射。

[0810] 还可以想到对于本发明的(药物)组合物、疫苗或试剂盒的不同组分使用不同的施用途径,例如在所述(药物)组合物、疫苗或试剂盒包含几种表位编码RNA种类的情况下。

[0811] 根据优选的实施方式,本发明组合、(药物)组合物、疫苗或试剂盒(或它们的组分)

通过肠胃外途径施用，优选地通过皮内、皮下或肌肉内途径施用。优选地，所述组合、(药物)组合物、疫苗或试剂盒通过注射施用，例如，皮下，肌内或皮内注射，其可以是无针和/或针注射。因此，在优选实施方式中，根据本发明的医疗用途和/或治疗方法包括通过皮下、肌内或皮内注射，优选通过肌内或皮内注射，更优选地通过皮内注射施用所述组合、(药物)组合物、疫苗或试剂盒(或其组分)。这种注射可以通过使用常规针注射或快速注射来进行，优选通过使用快速注射进行。

[0812] 施用方案

[0813] 本发明组合，(药物)组合物，疫苗或试剂盒和各自的组分(即表位编码RNA、PD-1途径抑制剂和LAG-3途径抑制剂)可以向有需要的受试者一天、每天，每两天，每周或每月若干次施用。

[0814] 组分可以同时施用(即同时通过相同或不同的施用途径)或分开施用(即，在不同的时间点和/或通过不同的施用途径顺序施用)。顺序施用方案也称为“时间交错”施用。本发明组合、(药物)组合物、疫苗或试剂盒的几种组分的时间交错施用可确保由所述组分引发的分开机制不会相互产生负面影响。时间交错施用可以例如意味着施用一种表位编码RNA种类，例如在施用PD-1和/或LAG-3途径抑制剂之前，同时或之后，和/或在施用不同表位编码RNA种类之前，同时或之后。这个程序优选地允许抗原呈递细胞和T细胞等免疫细胞在通过抑制PD-1和LAG-3途径刺激免疫系统之前遇到RNA编码的表位，即使同时施用或施用(其中在表位编码RNA之前PD-1途径抑制剂和/或LAG-3途径抑制剂被施用)，可导致相同或至少相当的结果。

[0815] 根据一些优选的实施方式，本发明组合、(药物)组合物、疫苗或试剂盒(即至少一表位编码RNA、PD-1途径抑制剂和LAG-3途径抑制剂)的组分同时施用(即同时通过相同或不同的施用途径)。

[0816] 根据一些优选的实施方式，本发明组合、(药物)组合物、疫苗或试剂盒(即至少一表位编码RNA，PD-1途径抑制剂和LAG-3途径抑制剂)的组分分开施用(即顺序地在不同的时间点和/或通过不同的施用)。

[0817] 剂量

[0818] 本发明组合、(药物)组合物、疫苗或试剂盒和各自组分优选以“药学上有效”量向需要其的受试者施用。

[0819] 在本发明的上下文中，“药学上有效量”通常被理解为足以诱导所需药物效应的量，例如免疫应答。优选地，本发明组合、(药物)组合物、疫苗或试剂盒的施用量也是“治疗有效的”，即足以减轻所治疗的疾病或病症的症状和/或用于预防所预防疾病或病症的症状。换句话说，“治疗有效量”是指本发明组合、(药物)组合物、疫苗或试剂盒的量，其足以显著诱导疾病或病症的阳性修饰，即活性成分的量，其引起了正在寻求的组织、系统、动物或人类的生物或药物应答。

[0820] 本发明组合、(药物)组合物、疫苗或试剂盒或各自组分的治疗功效和毒性可通过标准药物的程序在细胞培养物或实验动物中测定，例如，用于测定LD50(50％群体的致死剂量)和ED50(50％群体的治疗有效的剂量)。毒性和治疗效果之间的剂量比是治疗指数，并且可以表示为LD50/ED50比。通常优选组合、(药物)组合物、疫苗或试剂盒，其表现大的治疗指数。从细胞培养测定和动物研究获得的数据可用于配制用于人类的一系列剂量。这些化合

物的剂量优选地在包括ED50的循环浓度范围内，几乎没有或没有毒性。

[0821] 术语还包括足以减少疾病进展——例如减少或抑制肿瘤生长——的本发明组合、(药物)组合物、疫苗或试剂盒的量。然而，同时，“治疗有效量”优选是足够小以避免严重的副作用，即允许优势和风险之间的合理关系。这些限制的确定通常属于合理的医学判断范围。本发明组合、(药物)组合物、疫苗或试剂盒的“治疗有效量”将进一步根据待治疗的具体疾病或病症，患者的特征(包括年龄、身体状况、体重、性别和饮食)，同时治疗，活性剂的药代动力学性质，治疗方案和预期效果(改善与完全缓解)等改变。

[0822] 例如，本发明组合、(药物)组合物、疫苗或试剂盒或本文描述的各自组分的治疗有效剂量的范围可以为约0.001mg至10mg，优选地约0.01mg至5mg，更优选地每剂量单位约0.1mg至2mg或每剂量单位约0.01nmol至1mmol，特别是每剂量单位1nmol至1mmol，优选地每剂量单位优选1μmol至1mmol。还设想本发明组合、(药物)组合物、疫苗或试剂盒(或其组分)的治疗有效剂量范围可以为(每千克体重)约0.01mg/kg至10g/kg，优选地约0.05mg/kg至5g/kg，更优选地约0.1mg/kg至2.5g/kg。

[0823] 根据本发明的本发明组合、(药物)组合物、疫苗或试剂盒或其组分的“药学上有效量”可通过常规实验确定，例如，通过使用动物模型。这些模型包括但不限于兔、绵羊、小鼠、大鼠、狗和非人灵长类动物模型。

[0824] 组合治疗

[0825] 本发明组合、(药物)组合物、疫苗或试剂盒也可用于组合治疗。可用于治疗或预防本文定义的疾病和病症的任何其他疗法可与本文公开的用途和方法组合。

[0826] 例如，接受根据本发明的本发明组合、(药物的)组合物或疫苗的受试者可以是接受化疗(例如，一线或二线化疗)、放疗、放化疗(化疗和放疗的组合)、酪氨酸激酶抑制剂(例如EGFR酪氨酸激酶抑制剂)、抗体疗法和/或抑制和/或刺激检查点分子(例如CTLA4抑制剂)的患有优选地如本文所定义的癌症或相关病症的患者，或在接受上述一种或多种治疗后实现到部分应答或稳定疾病的患者。或者，接受根据本发明的本发明组合、(药物)组合物或疫苗的受试者可以是接受抗生素、抗真菌或抗病毒治疗的患有优选地如本文所定义的感染性疾病的患者。

[0827] 在进一步方面，本发明因此还涉及本发明的组合、(药物的)组合物或疫苗用于支持癌症、感染性疾病、过敏症或自身免疫疾病的另一种疗法的用途。

[0828] 治疗或预防癌症的“支持”可以是例如手术，放疗，化疗(例如一线或二线化疗)、放化疗、用酪氨酸激酶抑制治疗、用抑制和/或刺激检查点分子(优选地CTLA4抑制剂)的治疗、抗体疗法或它们的任意组合的常规癌症治疗方法的任何组合，和使用如本文所定义的本发明组合(药物)组合物或疫苗的疗法。

[0829] 根据本发明的本发明组合、(药物)组合物或疫苗的施用可以在施用另一种治疗剂或者使患者经历另一种可用于治疗特定疾病和待治疗的病症之前，同时和/或之后完成。

[0830] 癌症

[0831] 在优选实施方式中，本发明的组合、(药物)组合物或疫苗用于治疗或预防癌症。

[0832] 如本文所用，术语“癌症”是指肿瘤，其特征在于细胞的不受控制且通常快速增殖，其倾向于侵入周围组织并转移至远处的身体部位。该术语包括良性和恶性肿瘤。癌症中的恶性通常以异常、侵袭性和转移为特征；而良性恶性肿瘤通常不具有这些特性。该术语包括

以肿瘤生长为特征的肿瘤以及血液和淋巴系统的癌症。利用本发明组合、(药物)组合物或疫苗治疗的癌症的具体实例包括:急性淋巴母细胞白血病,成人;急性淋巴母细胞白血病,儿童;急性髓性白血病,成人;肾上腺皮质癌;肾上腺皮质癌,儿童;AIDS相关淋巴瘤;AIDS相关恶性肿瘤;肛门癌;星形细胞瘤,儿童小脑;星形细胞瘤,儿童大脑;胆管癌,肝外;膀胱癌;膀胱癌,儿童;骨癌,骨肉瘤/恶性纤维组织细胞瘤;脑干胶质瘤,儿童;脑瘤,成人;脑瘤,脑干胶质瘤,儿童;脑瘤,小脑星形细胞瘤,儿童;脑瘤,大脑星形细胞瘤/恶性胶质瘤,儿童;脑瘤,室管膜瘤,儿童;脑瘤,髓母细胞瘤,儿童;脑瘤,幕上原始神经外胚层肿瘤,儿童;脑瘤,视觉通路和下丘脑胶质瘤,儿童;脑瘤,儿童(其他);乳腺癌;乳腺癌和怀孕;乳腺癌,儿童;乳腺癌,男性;支气管腺瘤/类癌,儿童:类癌肿瘤,儿童;类癌肿瘤,胃肠道;癌,肾上腺皮质;癌,胰岛细胞;未知原发癌;中枢神经系统淋巴瘤,原发;小脑星形细胞瘤,儿童;大脑星形细胞瘤/恶性胶质瘤,儿童;宫颈癌;儿童癌症;慢性淋巴细胞白血病;慢性骨髓形成白血病;慢性骨髓增生性障碍;肌腱鞘透明细胞肉瘤;结肠癌;结直肠癌,儿童;皮肤T细胞淋巴瘤;子宫内膜癌;室管膜瘤,儿童;上皮癌,卵巢;食道癌;食道癌,儿童;尤因家族肿瘤;脑外生殖细胞肿瘤,儿童;性腺外生殖细胞肿瘤;肝外胆管癌;眼癌,眼内黑色素瘤;眼癌,视网膜母细胞瘤;胆囊癌;胃(腹部)癌;胃(腹部)癌,儿童;胃肠道类癌肿瘤;生殖细胞肿瘤,颅外,儿童;生殖细胞肿瘤,性腺外;生殖细胞肿瘤,卵巢;妊娠滋养细胞肿瘤;胶质瘤,儿童脑干;胶质瘤,儿童视觉通路和下丘脑;毛细胞白血病;头颈癌;肝细胞(肝)癌,成人(原发);肝细胞(肝)癌,儿童(原发);霍奇金淋巴瘤,成人;霍奇金淋巴瘤,儿童;怀孕期间霍奇金淋巴瘤;下咽癌;下丘脑和视觉通路胶质瘤,儿童;眼内黑色素瘤;胰岛细胞癌(内分泌胰腺);卡波西肉瘤;肾癌;喉癌;喉癌,儿童;白血病,急性淋巴母细胞,成人;白血病,急性淋巴母细胞,儿童;白血病,急性髓性,成人;白血病,急性髓性,儿童;白血病,慢性淋巴细胞;白血病,慢性骨髓形成;白血病,毛细胞;唇腔癌;肝癌,成人(原发);肝癌,儿童(原发);肺癌,非小细胞;肺癌,小细胞;淋巴母细胞白血病,成人急性;淋巴母细胞白血病,儿童急性;淋巴细胞白血病,慢性;淋巴瘤,AIDS相关;淋巴瘤,中枢神经系统(原发);淋巴瘤,皮肤T细胞;淋巴瘤,霍奇金,成人;淋巴瘤,霍奇金;儿童;淋巴瘤,怀孕期间霍奇金;淋巴瘤,非霍奇金,成人;淋巴瘤,非霍奇金,儿童;淋巴瘤,怀孕期间非霍奇金;淋巴瘤,原发中枢神经系统;巨球蛋白血症,瓦尔登斯特伦氏;男性乳腺癌;恶性间皮瘤,成人;恶性间皮瘤,儿童;恶性胸腺瘤;髓母细胞瘤,儿童;黑色素瘤;黑色素瘤,眼内;默尔克细胞癌;间皮瘤,恶性;转移性鳞状颈癌伴隐匿性原发性;多发性内分泌肿瘤综合征,儿童;多发性骨髓瘤/浆细胞瘤;类真菌病;骨髓增生异常综合征;骨髓形成白血病,慢性;髓性白血病,儿童急性;骨髓瘤,多发性;骨髓增生性障碍,慢性;鼻腔和鼻窦癌;鼻咽癌;鼻咽癌,儿童;神经母细胞瘤;神经纤维瘤;非霍奇金淋巴瘤,成人;非霍奇金淋巴瘤,儿童;怀孕期间非霍奇金淋巴瘤;非小细胞肺癌;口腔癌,儿童;口腔和唇癌;口咽癌;骨处骨肉瘤/恶性纤维组织细胞瘤;卵巢癌,儿童;卵巢上皮癌;卵巢生殖细胞肿瘤;卵巢低恶性潜力肿瘤;胰腺癌;胰腺癌,儿童“,胰腺癌,胰岛细胞;鼻窦和鼻腔癌;甲状旁腺癌;阴茎癌;嗜铬细胞瘤;松果体幕上原始神经外胚层肿瘤,儿童;垂体肿瘤;浆细胞瘤/多发性骨髓瘤;胸膜肺母细胞瘤;怀孕和乳腺癌;怀孕和霍奇金淋巴瘤;怀孕和非霍奇金淋巴瘤;原发中枢神经系统淋巴瘤;原发肝癌,成人;原发肝癌,儿童;前列腺癌;直肠癌;肾细胞(肾)癌;肾细胞癌,儿童;肾盂和输尿管,移行细胞癌;视网膜母细胞瘤;横纹肌肉瘤,儿童;唾液腺癌;唾液腺癌,儿童;肉瘤,尤因家族肿瘤;肉瘤,卡波西;骨处肉瘤(骨肉瘤)/恶性

纤维组织细胞瘤;肉瘤,横纹肌肉瘤,儿童;肉瘤,软组织,成人;肉瘤,软组织,儿童;Sezary综合征;皮肤癌;皮肤癌,儿童;皮肤癌(黑色素瘤);皮肤癌,默克尔细胞;小细胞肺癌;小肠癌;软组织肉瘤,成人;软组织肉瘤,儿童;鳞状颈癌伴隐匿性原发性,转移性;腹部(胃)癌;腹部(胃)癌,儿童;幕上原始神经外胚层肿瘤,儿童;T细胞淋巴瘤,皮肤的;睾丸癌;胸腺瘤,儿童;胸腺瘤,恶性;甲状腺癌;甲状腺癌,儿童;肾盂和输尿管的移行细胞癌;滋养母细胞肿瘤,妊娠期;未知原发部位的癌,儿童;儿童的不寻常癌症;输尿管和肾盂,移行细胞癌;尿道癌;子宫肉瘤;阴道癌;视觉通路和下丘脑胶质瘤,儿童;外阴癌;瓦尔登斯特伦氏巨型球蛋白血症;和Wilms氏肿瘤。

[0833] 感染性疾病

[0834] 本发明组合、药物组合物或试剂盒也可用于治疗疾病。术语“感染”或“感染性疾病”涉及通常不存在于体内的微生物如细菌、病毒和寄生虫的侵入和增殖。感染可能不会引起任何症状并且是亚临床的,或者它可能引起症状并且在临床上是明显的。感染可以保持局部化,或者可以通过血液或淋巴系统传播以变成全身性的。在该上下文中,感染性疾病优选地包括病毒、细菌、真菌或原生动物感染性疾病。利用本发明组合、(药物)组合物或疫苗治疗的感染性疾病的具体实例包括:不动杆菌感染、非洲昏睡病(非洲锥虫病)、AIDS(获得性免疫缺陷综合征)、阿米巴病、无形体病、炭疽病、阑尾炎、溶血性杆菌感染、阿根廷出血热、蛔虫病、曲霉菌病、星状病毒感染、脚癣、巴贝斯虫病、蜡状芽孢杆菌感染、细菌性脑膜炎、细菌性肺炎、细菌性阴道炎(BV)、类杆菌感染、小袋虫病、贝蛔虫感染、裂体吸虫病、BK病毒感染、黑毛结节病、人芽囊原虫感染、芽生菌病、玻利维亚出血热、疏螺旋体病螺旋体感染(疏螺旋体病)、肉毒杆菌中毒(和婴儿肉毒杆菌中毒)、牛绦虫、巴西出血热、布氏杆菌病、伯克氏菌感染、布鲁里溃疡、杯状病毒感染(诺如病毒和沙波病毒)、弯曲杆菌病、念球菌病(念珠菌病)、犬绦虫感染、猫抓病、恰加斯病(美洲锥虫病)、软下疳、水痘、衣原体感染、沙眼衣原体感染、肺炎衣原体感染、霍乱、着色芽生菌病、气候性腹股沟淋巴结炎、肝吸虫病、难辨梭状芽胞杆菌感染、球孢子菌病、感冒、科罗拉多蜱热(CTF)、普通感冒(急性病毒性鼻咽炎;急性鼻炎)、尖锐湿疣、结膜炎、克雅氏病(CJD)、克里米亚-刚果出血热(CCHF)、隐球菌病、隐孢子虫病、皮肤幼虫移行症(CLM)、皮肤利什曼病、圆孢球虫病、囊虫病,巨细胞病毒感染、登革热、皮肤真菌病、双阿米巴病、白喉症、裂头绦虫病、杜诺凡病、龙线虫病、初夏脑膜脑炎(FSME)、埃博拉出血热、包虫病、恩里克体病、蛲虫病(蛲虫感染)、肠球菌感染、肠道病毒感染、流行性斑疹伤寒、会厌炎、EB病毒感染性单核细胞增多症、感染性红斑(第五疾病)、玫瑰疹、姜片虫病、肝片吸虫病、致命家族性失眠(FFI)、第五疾病、丝虫病、鱼中毒(雪卡毒)、鱼绦虫、流感、产气荚膜梭菌食物中毒、狐狸绦虫、自由生活阿米巴感染、梭杆菌感染、气性坏疽、土霉菌病、格斯特曼-斯特拉斯勒-施茵克综合征(GSS)、贾第虫病、马鼻疽、颚口线虫病、淋病、腹股沟肉芽肿(杜诺凡病)、A组链球菌感染、B组链球菌感染、流感嗜血杆菌感染、手足口病(HFMD)、汉坦病毒肺综合征(HPS)、幽门螺杆菌感染、溶血性尿毒症综合征(HUS)、伴肾综合征出血热(HFRS)、亨尼帕病毒感染、甲肝、乙肝、丙肝、丁肝、戊肝、单纯疱疹、I型单纯疱疹、II型单纯疱疹、带状疱疹、组织胞浆菌病、空心疣、钩虫感染、人博卡病毒感染、人ewingii恩里克体病、人粒细胞无形体病(HGA)、人偏肺病毒感染、人单核细胞恩里克体病、人乳头状瘤病毒(HPV)感染、人副流感病毒感染、膜壳绦虫病、流行性感冒、孢子球虫病、日本脑炎、川崎病、角膜炎、金氏杆菌感染、库鲁、羊羔病(贾第虫病)、拉沙热、军团病(军团疾

病、庞蒂亚克热)、利什曼病、麻风、钩端螺旋体病、虱子、李氏杆菌、莱姆疏螺旋体病、莱姆病、淋巴管丝虫病(象皮病)、淋巴细胞脉络丛脑膜炎、疟疾、马尔堡出血热(MHF)、马尔堡病毒、麻疹、类鼻疽(惠特莫尔病)、脑膜炎、脑膜炎球菌病、后殖吸虫病、微孢子病、微型绦虫、流产(前列腺炎症)、传染性软疣(MC)、单核细胞增多症、腮腺炎、鼠斑疹伤寒(地方性斑疹伤寒)、足菌肿、人型支原体、支原体肺炎、蝇蛆病、尿片/尿布皮炎、新生儿结膜炎(新生儿眼炎)、新生儿脓毒病(绒毛膜羊膜炎)、诺卡氏菌病、坏疽性口炎、诺瓦克病毒感染、盘尾丝虫病(河盲症)、骨髓炎、中耳炎、副球孢子菌病(南美芽生菌病)、肺吸虫病、副伤寒、巴氏杆菌病、头虱病(头虱子)、体虱病(体虱子)、阴虱病(阴部虱子、阴虱虱子)、盆腔炎(PID)、百日咳(Whooping cough)、Pfeiffer腺热、鼠疫、肺炎球菌感染、肺孢子虫肺炎(PCP)、肺炎、小儿麻痹(儿童跛足)、骨髓灰质炎、猪绦虫、普氏菌感染、原发阿米巴脑膜脑炎(PAM)、进行性多灶性白质脑病、假格鲁布、鹦鹉热、Q热病、兔热病、狂犬病、鼠咬热、Reiter综合征、呼吸道合胞体病毒感染(RSV)、鼻孢子虫病、鼻病毒感染、立克次氏体感染、立克次氏体痘、裂谷热(RVF)、落基山斑疹热(RMSF)、轮状病毒感染、风疹、沙门氏菌副伤寒、沙门氏菌伤寒、沙门氏菌病、SARS(严重急性呼吸综合征)、疥疮、猩红热、血吸虫病(裂体吸虫病)、擦伤伤寒、脓毒病、志贺氏菌病(细菌性痢疾)、带状疱疹、天花(痘疹)、软下疳、孢子丝菌病、葡萄球菌食物中毒、金黄色葡萄球菌感染、类圆线虫病、梅毒、绦虫病、破伤风、间日热、蜱传脑炎、须癣(Barber痒)、头癣(头皮癣)、股癣(体癣)、股癣(Jock痒)、手足癣(手癣)、黑癣、足癣(脚癣)、甲癣(甲真菌病)、花斑癣(花斑糠疹)、弓蛔虫病(眼幼虫移行症(OLM)and内脏幼虫移行症(VLM))、弓形虫病、旋毛虫病、滴虫病、鞭虫病(鞭虫感染)、Tripper、锥虫病(昏睡病)、恙虫病、结核病、兔热病、伤寒、伤寒热、解脲脲原体感染、阴道炎(Colpitis)、变体克雅氏病(vCJD、nvCJD)、委内瑞拉马脑炎、委内瑞拉出血热、病毒肺炎、内脏利什曼病、疣、西尼罗河热、西部马脑炎、白毛结节病(白癣)、百日咳、酵母真菌斑点、黄热病、耶尔森菌假结核病感染、耶尔森菌病、和接合菌症。

[0835] 使用本发明组合、(药物)组合物或疫苗来治疗和/或预防本文所述的疾病或病症可以包括向需要其的受试者施用药学上有效量的所述组合、(药物)组合物或疫苗。本文描述的治疗疾病的方法可包括向需要其的受试者施用药学上有效量的所述组合、(药物)组合物或疫苗。合适的施用方式如上所述。

附图说明

[0836] 图1:RNA疫苗接种组合抗PD-1和抗LAG-3治疗降低E.G7-OVA肿瘤模型中的肿瘤生长。将C57BL/6小鼠(每组n≥9)在右胁下用3×10^5同基因的E.G7-OVA淋巴瘤细胞(表达EL4淋巴瘤细胞系的卵白蛋白)进行皮下攻击。肿瘤细胞接种后4天,用OVA编码RNA(“RNActive”)皮内疫苗接种小鼠,并用200μg抗PD-1(BioXcell)和200μg抗LAG-3抗体(BioXcell)腹膜内治疗,每周两次,持续三至四周。用非特异性RNA疫苗接种处理的小鼠作为对照。描绘每组的中位肿瘤体积,直到由于满足研究的伦理终点而必须将单个小鼠排除在实验之外。*非配对双尾Mann-Whitney测试。

[0837] 图2:在E.G7-OVA肿瘤模型中,单独使用PD-1和LAG-3阻断减少肿瘤生长,显著比PD-1和LAG-3抑制与RNA疫苗的结合的效果差低。将C57BL/6小鼠(每组n≥9)在右胁下用3×10^5个同基因的E.G7-OVA淋巴瘤细胞(表达EL4淋巴瘤细胞系的卵白蛋白)进行皮下攻击。肿

瘤细胞接种后4天，用OVA编码RNA(RNActive)皮内疫苗接种小鼠，并用200μg抗PD-1(BioXcell)和200μg抗LAG-3抗体(BioXcell)腹膜内治疗，每周两次，持续三到四周。仅用抗PD1、抗LAG-3或两者的组合处理的小鼠和用非特异性RNA疫苗接种处理的小鼠作为对照。描绘每组的中位肿瘤体积，直到由于满足研究的伦理终点而必须将单个小鼠排除在实验之外。*非配对双尾Mann-Whitney测试。

[0838] 图3:RNA疫苗接种组合抗PD-1和抗LAG-3治疗增加E.G7-OVA肿瘤模型中的肿瘤存活。将C57BL/6小鼠(每组n≥9)在右胁下用3×10^5个同基因的E.G7-OVA淋巴瘤细胞(表达EL4淋巴瘤细胞系的卵白蛋白)进行皮下攻击。肿瘤细胞接种后4天，用OVA编码RNA(RNActive)皮内接种小鼠，并用200μg抗PD-1(BioXcell)和200μg抗LAG-3抗体(BioXcell)腹膜内治疗，每周两次，持续三到四周。用非特异性RNActive疫苗接种处理的小鼠作为对照。呈现了由于满足伦理终点而留在研究中直至排除的小鼠的Kaplan-Meier图。*生存曲线的对数秩比较。

[0839] 图4:PD-1和LAG-3免疫检查点抑制对E.G7-OVA肿瘤模型中的总体存活没有显著影响。将C57BL/6小鼠(每组n≥9)在右胁下用3×10^5个同基因的E.G7-OVA淋巴瘤细胞(表达EL4淋巴瘤细胞系的卵白蛋白)进行皮下攻击。肿瘤细胞接种后4天，用OVA编码RNA(RNActive)皮内接种小鼠，并用200μg抗PD-1(BioXcell)和200μg抗LAG-3抗体(BioXcell)腹膜内治疗，每周两次，持续三到四周。仅用抗PD1、抗LAG-3或两者的组合处理的小鼠和用非特异性RNA疫苗接种处理的小鼠作为对照。呈现了由于满足伦理终点而留在研究中直至排除的小鼠的Kaplan-Meier图。*生存曲线的对数秩比较。

[0840] 项目列表：

[0841] 项目1:一种组合，其包含：

[0842] (i)至少一种RNA，所述RNA包含编码抗原的至少一种表位的至少一种编码序列;和

[0843] (ii)至少一种PD-1途径抑制剂;和

[0844] (iii)至少一种LAG-3途径抑制剂。

[0845] 项目2:根据前述项目中任一项的组合，其中所述PD-1途径抑制剂和/或所述LAG-3途径抑制剂选自抗体或编码所述抗体的核酸，蛋白或编码所述蛋白的核酸，肽或编码所述肽的核酸，拮抗性核酸，和小有机分子。

[0846] 项目3:根据前述项目中任一项的组合，其中

[0847] (a)所述PD-1途径抑制剂是竞争性或非竞争性PD-1拮抗剂;和/或

[0848] (b)所述LAG-3途径抑制剂是竞争性或非竞争性LAG-3拮抗剂。

[0849] 项目4:根据前述项目中任一项的组合，其中

[0850] (a)所述PD-1途径抑制剂结合PD-1、PD-L1和/或PD-L2;和/或

[0851] (b)所述LAG-3途径抑制剂结合LAG-3和/或MHC-II。

[0852] 项目5:根据前述项目中任一项的组合，其中所述PD-1途径抑制剂是抗体或其变体、片段或衍生物，特别是其抗原结合变体、片段或衍生物，或编码所述抗体或其变体、片段或衍生物的核酸。

[0853] 项目6:根据项目5的组合，其中所述PD-1途径抑制剂是选自纳武单抗;派姆单抗;匹敌丽珠单抗;BGB-A317;MEDI0680;PDR001;REGN2810;TSR-042;AGEN-2034;AM-0001;BGB-108;BI-754091;CBT-501;ENUM-003;ENUM-388D4;IBI-308;JNJ-63723283;JS-001;JTX-

4014;JY-034;MCLA-134;PF-06801591;STIA-1110;244C8和88D4的抗PD1抗体:选自BMS-936559,阿替唑单抗,德瓦鲁单抗,阿维鲁单抗,KD033,STI-A1014,MCLA-145,和SP142的抗PDL1抗体;或选自rHIgM12B7的抗PDL2抗体。

[0854] 项目7:根据项目1至4中任一项的组合,其中所述PD-1途径抑制剂是拮抗性结合蛋白,任选地选自融合蛋白和可溶性受体,或编码拮抗性结合蛋白的核酸,任选地选自融合蛋白和可溶性受体。

[0855] 项目8:根据项目7的组合,其中所述融合蛋白包含(i)PD-L1配体或其结构域、片段或变体;和/或(ii)PD-L2配体或其结构域、片段或变体;和任选地(iii)任选地选自Fc免疫球蛋白的进一步实体。

[0856] 项目9:根据项目8的组合,其中所述融合蛋白是AMP-224。

[0857] 项目10:根据项目7的组合,其中所述可溶性受体是可溶性PD-1受体或其片段或变体。

[0858] 项目11:根据项目1至5中任一项的组合,其中所述PD-1途径抑制剂是核酸,优选地RNA和更优选地mRNA,其编码根据项目7至11中任一项的PD-1途径抑制剂或其片段或变体。

[0859] 项目12:根据项目1至4中任一项的组合,其中所述PD-1途径抑制剂是拮抗性核酸,任选地选自微小RNA、siRNA、shRNA、反义RNA或适配体。

[0860] 项目13:根据项目1至4中任一项的组合,其中所述LAG-3途径抑制剂是抗体或其变体、片段或衍生物,特别是其抗原结合变体、片段或衍生物,或编码抗体或其变体、片段或衍生物的核酸,特别是其抗原结合变体、片段或衍生物。

[0861] 项目14:根据项目13的组合,其中所述抗体是选自BMS-986016,LAG525,GSK2831781,BI-754111,ENUM-006,FS-18,IMP-701,IMP-731,TRL-7117和TSR-033的抗LAG-3抗体。

[0862] 项目15:根据项目5和/或13的组合,其中所述抗体是多特异性抗体,优选地双或三特异性抗体,其特异性结合LAG-3与PD-1、PD-L1和/或PD-L2中一个,任选地选自MGD-013和Sym-016。

[0863] 项目16:根据项目1至4中任一项的组合,其中所述LAG-3途径抑制剂是拮抗性结合蛋白或编码拮抗性结合蛋白的核酸。

[0864] 项目17:根据项目1至4中任一项的组合,其中所述LAG-3途径抑制剂是核酸,优选地RNA和更优选地mRNA,其编码根据项目13至15中任一项的LAG-3抑制剂或其片段或变体。

[0865] 项目18:根据项目1至4中任一项的组合,其中所述LAG-3途径抑制剂是拮抗性核酸,任选地选自微小RNA、siRNA、shRNA、反义RNA、或适配体。

[0866] 项目19:根据前述项目中任一项的组合,其中编码抗原的至少一种表位的所述RNA,和/或编码PD-1途径抑制剂的所述RNA和/或编码LAG-3途径抑制剂的所述RNA是分离的RNA。

[0867] 项目20:根据前述项目中任一项的组合,其中编码抗原的至少一种表位的所述RNA,和/或编码PD-1途径抑制剂的所述RNA和/或编码LAG-3途径抑制剂的所述RNA是稳定的RNA。

[0868] 项目21.根据前述项目中任一项的组合,其中编码抗原的至少一种表位的所述RNA,和/或编码PD-1途径抑制剂的所述RNA和/或编码LAG-3途径抑制剂的所述RNA包含修饰

的RNA序列包含修饰的RNA序列，其中在所述修饰的RNA序列中，

[0869] (a)与野生型RNA的对应编码序列的G/C含量相比，所述RNA序列的至少一个可读框的G/C含量增加；和/或

[0870] (b)所述修饰的RNA序列的至少一个可读框中的密码子使用适于人密码子使用；和/或

[0871] (c)在所述RNA序列的编码序列中所述密码子适应指数(CAI)增加或最大化；

[0872] 其中与由相应的未修饰的RNA序列编码的氨基酸序列相比，由至少一个修饰的RNA序列编码的氨基酸序列优选地未被修饰。

[0873] 项目22：根据前述项目中任一项的组合，其中在编码抗原的至少一种表位的所述RNA中，所述抗原是选自以下的肿瘤抗原：1A01_HLA-A/m;1A02;5T4;ACRBP;AFP;AKAP4;α-辅肌动蛋白-_4/m;α-甲酰基-辅酶_A_消旋酶;ANDR;ART-4;ARTC1/m;AURKB;B2MG;B3GN5;B4GN1;B7H4;BAGE-1;BASI;BCL-2;bcr/abl;β-联蛋白/m;BING-4;BIRC7;BRCA1/m;BY55;钙网蛋白;CAMEL;CASP-8/m;CASPA;组织蛋白酶_B;组织蛋白酶_L;CD1A;CD1B;CD1C;CD1D;CD1E;CD20;CD22;CD276;CD33;CD3E;CD3Z;CD44_同种型_1;CD44_同种型_6;CD4;CD52;CD55;CD56;CD80;CD86;CD8A;CDC27/m;CDE30;CDK4/m;CDKN2A/m;CEA;CEAM6;CH3L2;CLCA2;CML28;CML66;COA-1/m;毛状样_蛋白;胶原_XXIII;COX-2;CP1B1;CSAG2;CT45A1;CT55;CT-_9/BRD6;CTAG2_同种型_LAGE-1A;CTAG2_同种型_LAGE-1B;CTCFL;Cten;细胞周期蛋白_B1;细胞周期蛋白_D1;cyp-B;DAM-10;DEP1A;E7;EF1A2;EFTUD2/m;EGFR;EGLN3;ELF2/m;EMMPRIN;EpCam;EphA2;EphA3;ErbB3;ERBB4;ERG;ETV6;EWS;EZH2;FABP7;FCGR3A_版本_1;FCGR3A_版本_2;FGF5;FGFR2;纤连蛋白;FOS;FOXP3;FUT1;G250;GAGE-1;GAGE-2;GAGE-3;GAGE-4;GAGE-5;GAGE-6;GAGE7b;GAGE-8_(GAGE-2D);GASR;GnT-V;GPC3;GPNMB/m;GRM3;HAGE;丝氨酸穿膜蛋白酶;Her2/neu;HLA-A2/m;同源异型框_NKX3.1;HOM-TES-85;HPG1;HS71A;HS71B;HST-2;hTERT;iCE;IF2B3;IL10;IL-13Ra2;IL2-RA;IL2-RB;IL2-RG;IL-5;IMP3;ITA5;ITB1;ITB6;激肽释放酶-2;激肽释放酶-4;KI20A;KIAA0205;KIF2C;KK-LC-1;LDLR;LGMN;LIRB2;LY6K;MAGA5;MAGA8;MAGAB;MAGE-A10;MAGE-A12;MAGE-A1;MAGE-A2;MAGE-A3;MAGE-A4;MAGE-A6;MAGE-A9;MAGE-B10;MAGE-B16;MAGE-B17;MAGE-_B1;MAGE-B2;MAGE-B3;MAGE-B4;MAGE-B5;MAGE-B6;MAGE-C1;MAGE-C2;MAGE-C3;MAGE-D1;MAGE-D2;MAGE-D4;MAGE-_E1;MAGE-E1_(MAGE1);MAGE-E2;MAGE-F1;MAGE-H1;MAGEL2;乳腺球蛋白_A;MART-1/melan-A;MART-2;MC1_R;M-CSF;间皮素;MITF;MMP1_1;MMP7;MUC-1;MUM-1/m;MUM-2/m;MYCN;MYO1A;MYO1B;MYO1C;MYO1D;MYO1E;MYO1F;MYO1G;MYO1H;NA17;NA88-A;Neo-PAP;NFYC/m;NGEP;NPM;NRCAM;NSE;NUF2;NY-ESO-1;OA1;OGT;OS-9;骨钙蛋白;骨桥蛋白;p53;PAGE-4;PAI-1;PAI-2;PAP;PATE;PAX3;PAX5;PD1L1;PDCD1;PDEF;PECA1;PGCB;PGFRB;Pim-1_-激酶;Pin-1;PLAC1;PMEL;PML;POTEF;POTE;PRAME;PRDX5/m;PRM2;前列腺特异性蛋白;蛋白酶-3;PSA;PSB9;PSCA;PSGR;PSM;PTPRC;RAB8A;RAGE-1;RARA;RASH;RASK;RASN;RGS5;RHAMM/CD168;RHOC;RSSA;RU1;RU2;RUNX1;S-100;SAGE;SART-_1;SART-2;SART-3;SEPR;SERPINB5;SIA7F;SIA8A;SIAT9;SIRT2/m;SOX10;SP17;SPNXA;SPXN3;SSX-1;SSX-2;SSX3;SSX-4;ST1A1;STAG2;STAMP-1;STEAP-1;存活蛋白-2B;存活蛋白;SYCP1;SYT-SSX-1;SYT-SSX-2;TARP;TCRg;TF2AA;TGFB1;TGFR2;TGM-4;TIE2;TKTL1;TPI/m;TRGV11;TRGV9;TRPC1;TRP-p8;TSG10;TSPY1;TVC_(TRGV3);TX101;酪氨酸酶;TYRP1;TYRP2;UPA;VEGFR1;WT1;和

XAGE1或其变体或片段;并且其中所述至少一种RNA任选地是单顺反子的、双顺反子的或多顺反子的。

[0874] 项目23:根据项目22的组合,所述组合包含多个至少二种、至少三种、至少四种、至少五种和优选地六种表位编码RNA,所述表位编码RNA优选地是单顺反子的并且编码:

[0875] a)NY-ESO-1,或其片段、变体或衍生物的至少一种表位;和

[0876] d)MAGE-C1,或其片段、变体或衍生物的至少一种表位;和

[0877] e)MAGE-C2,或其片段、变体或衍生物的至少一种表位;和;

[0878] f)存活蛋白,或其片段、变体或衍生物的至少一种表位;和任选地

[0879] g)5T4的至少一种表位,或其片段、变体或衍生物;和任选地

[0880] h)MUC-1的至少一种表位,或其片段、变体或衍生物。

[0881] 项目24:根据前述项目中任一项的组合,其中所述RNA是mRNA。

[0882] 项目25:根据前述项目中任一项的组合,其中编码抗原的至少一种表位的所述RNA,和/或编码PD-1途径抑制剂的所述RNA和/或编码LAG-3途径抑制剂的所述RNA,包含以下种的一个或多个:

[0883] (a)至少一个5'帽结构;和/或

[0884] (b)任选地至少一个5'-UTR;和/或

[0885] (c)至少一个3'-UTR;和/或

[0886] (d)任选地至少一个组蛋白茎环;和

[0887] (e)至少一个聚(A)序列和/或聚(C)序列。

[0888] 项目26:根据前述项目中任一项的组合,其中编码抗原的至少一种表位的所述RNA,和/或编码PD-1途径抑制剂的所述RNA和/或编码LAG-3途径抑制剂的所述RNA,与选自以下的至少一种载体复合或缔合:

[0889] (a)一种或多种阳离子或聚阳离子化合物,优选地与阳离子或聚阳离子聚合物,包括鱼精蛋白的阳离子或聚阳离子肽或蛋白,阳离子或聚阳离子多糖和/或阳离子或聚阳离子脂质;和/或

[0890] (b)一种或多种脂质,并由此形成脂质体、脂质纳米颗粒和/或脂质复合物。

[0891] 项目27:药物组合物,其包含根据前述项目中任一项的组合和药学上可接受的赋形剂,优选地药学上可接受的载体。

[0892] 项目28:根据项目27的药物组合物,进一步包含以下中的一种或多种:药学上可接受的赋形剂、佐剂、进一步抗原、编码表位的进一步核酸、免疫治疗或免疫刺激剂,优选地免疫刺激RNA(isRNA)。

[0893] 项目29:根据项目27或28中任一项的药物组合物,其中所述药物组合物是疫苗。

[0894] 项目30:试剂盒,其包含根据项目1至26中任一项的组合,或根据项目27至29中任一项的药物组合物。

[0895] 项目31:根据项目30的试剂盒,所述试剂盒包含:

[0896] (i)至少一种RNA,所述RNA包含编码抗原的至少一种表位的至少一种编码序列,如前述项目中任一项中所限定;和

[0897] (ii)至少一种PD-1途径抑制剂,如前述项目中任一项中所限定;和

[0898] (iii)至少一种LAG-3途径抑制剂,如前述项目中任一项中所限定。

[0899] 项目32:根据项目1至26中任一项的组合,根据项目27至29中任一项的药物组合物,或根据项目31的试剂盒,其作为药物使用。

[0900] 项目33:根据项目1至26中任一项的组合,根据项目27至29中任一项的药物组合物,或根据项目31的试剂盒,其作为疫苗使用。

[0901] 项目34:根据项目1至26中任一项的组合或根据项目32或33的使用,根据项目27至29中任一项的药物组合物或根据项目32或33的使用,或根据项目31的试剂盒或根据项目32或33的使用,其用于预防和治疗肿瘤或癌症疾病、感染性疾病、过敏症或自身免疫疾病的方法中。

[0902] 项目35:根据项目1至26中任一项的组合或根据项目32至34中任一项的使用,根据项目27至29中任一项的药物组合物或根据项目32至34中任一项的使用,或根据项目31的试剂盒根据项目32至34中任一项的使用,其中所述癌症选自:急性淋巴母细胞白血病,成人;急性淋巴母细胞白血病,儿童;急性髓性白血病,成人;肾上腺皮质癌;肾上腺皮质癌,儿童;AIDS相关淋巴瘤;AIDS相关恶性肿瘤;肛门癌;星形细胞瘤,儿童小脑;星形细胞瘤,儿童大脑;胆管癌,肝外;膀胱癌;膀胱癌,儿童;骨癌,骨肉瘤/恶性纤维组织细胞瘤;脑干胶质瘤,儿童;脑瘤,成人;脑瘤,脑干胶质瘤,儿童;脑瘤,小脑星形细胞瘤,儿童;脑瘤,大脑星形细胞瘤/恶性胶质瘤,儿童;脑瘤,室管膜瘤,儿童;脑瘤,髓母细胞瘤,儿童;脑瘤,幕上原始神经外胚层肿瘤,儿童;脑瘤,视觉通路和下丘脑胶质瘤,儿童;脑瘤,儿童(其他);乳腺癌;乳腺癌和怀孕;乳腺癌,儿童;乳腺癌,男性;支气管腺瘤/类癌,儿童:类癌肿瘤,儿童;类癌肿瘤,胃肠道;癌,肾上腺皮质;癌,胰岛细胞;未知原发癌;中枢神经系统淋巴瘤,原发;小脑星形细胞瘤,儿童;大脑星形细胞瘤/恶性胶质瘤,儿童;宫颈癌;儿童癌症;慢性淋巴细胞白血病;慢性骨髓形成白血病;慢性骨髓增生性障碍;肌腱鞘透明细胞肉瘤;结肠癌;结直肠癌,儿童;皮肤T细胞淋巴瘤;子宫内膜癌;室管膜瘤,儿童;上皮癌,卵巢;食道癌;食道癌,儿童;尤因家族肿瘤s;颅外生殖细胞肿瘤,儿童;性腺外生殖细胞肿瘤;肝外胆管癌;眼癌,眼内黑色素瘤;眼癌,视网膜母细胞瘤;胆囊癌;胃(腹部)癌;胃(腹部)癌,儿童;胃肠道类癌肿瘤;生殖细胞肿瘤,颅外,儿童;生殖细胞肿瘤,性腺外;生殖细胞肿瘤,卵巢;妊娠滋养细胞肿瘤;胶质瘤,儿童脑干;胶质瘤,儿童视觉通路和下丘脑;毛细胞白血病;头颈癌;肝细胞(肝)癌,成人(原发);肝细胞(肝)癌,儿童(原发);霍奇金淋巴瘤,成人;霍奇金淋巴瘤,儿童;怀孕期间霍奇金淋巴瘤;下咽癌;下丘脑和视觉通路胶质瘤,儿童;眼内黑色素瘤;胰岛细胞癌(内分泌胰腺);卡波西肉瘤;肾癌;喉癌;喉癌,儿童;白血病,急性淋巴母细胞,成人;白血病,急性淋巴母细胞,儿童;白血病,急性髓性,成人;白血病,急性髓性,儿童;白血病,慢性淋巴细胞;白血病,慢性骨髓形成;白血病,毛细胞;唇腔癌;肝癌,成人(原发);肝癌,儿童(原发);肺癌,非小细胞;肺癌,小细胞;淋巴母细胞白血病,成人急性;淋巴母细胞白血病,儿童急性;淋巴细胞白血病,慢性;淋巴瘤,AIDS相关;淋巴瘤,中枢神经系统(原发);淋巴瘤,皮肤T细胞;淋巴瘤,霍奇金,成人;淋巴瘤,霍奇金;儿童;淋巴瘤,怀孕期间霍奇金;淋巴瘤,非霍奇金,成人;淋巴瘤,非霍奇金,儿童;淋巴瘤,怀孕期间非霍奇金;淋巴瘤,原发中枢神经系统;巨球蛋白血症,瓦尔登斯特伦氏;男性乳腺癌;恶性间皮瘤,成人;恶性间皮瘤,儿童;恶性胸腺瘤;髓母细胞瘤,儿童;黑色素瘤;黑色素瘤,眼内;默尔克细胞癌;间皮瘤,恶性;转移性鳞状颈癌伴隐匿性原发性;多发性内分泌肿瘤综合征,儿童;多发性骨髓瘤/浆细胞瘤;类真菌病;骨髓增生异常综合征;骨髓形成白血病,慢性;髓性白血病,儿童急性;骨髓

瘤，多发性；骨髓增生性障碍，慢性；鼻腔和鼻窦癌；鼻咽癌；鼻咽癌，儿童；神经母细胞瘤；神经纤维瘤；非霍奇金淋巴瘤，成人；非霍奇金淋巴瘤，儿童；怀孕期间非霍奇金淋巴瘤；非小细胞肺癌；口腔癌，儿童；口腔和唇癌；口咽癌；骨处骨肉瘤/恶性纤维组织细胞瘤；卵巢癌，儿童；卵巢上皮癌；卵巢生殖细胞肿瘤；卵巢低恶性潜力肿瘤；胰腺癌；胰腺癌，儿童；胰腺癌，胰岛细胞；鼻窦和鼻腔癌；甲状旁腺癌；阴茎癌；嗜铬细胞瘤；松果体幕上原始神经外胚层肿瘤，儿童；垂体肿瘤；浆细胞瘤/多发性骨髓瘤；胸膜肺母细胞瘤；怀孕和乳腺癌；怀孕和霍奇金淋巴瘤；怀孕和非霍奇金淋巴瘤；原发中枢神经系统淋巴瘤；原发肝癌，成人；原发肝癌，儿童；前列腺癌；直肠癌；肾细胞(肾)癌；肾细胞癌，儿童；肾盂和输尿管，移行细胞癌；视网膜母细胞瘤；横纹肌肉瘤，儿童；唾液腺癌；唾液腺癌症，儿童；肉瘤，尤因家族肿瘤s；肉瘤，卡波西的；骨处肉瘤(骨肉瘤)/恶性纤维组织细胞瘤；肉瘤，横纹肌肉瘤，儿童；肉瘤，软组织，成人；肉瘤，软组织，儿童；Sezary综合征；皮肤癌；皮肤癌，儿童；皮肤癌(黑色素瘤)；皮肤癌，默克尔细胞；小细胞肺癌；小肠癌；软组织肉瘤，成人；软组织肉瘤，儿童；鳞状颈癌伴隐匿性原发性，转移性；腹部(胃)癌；腹部(胃)癌，儿童；幕上原始神经外胚层肿瘤，儿童；T细胞淋巴瘤，皮肤的；睾丸癌；胸腺瘤，儿童；胸腺瘤，恶性；甲状腺癌；甲状腺癌，儿童；肾盂和输尿管的移行细胞癌；滋养母细胞肿瘤，妊娠期；未知原发部位的癌，儿童；儿童的不寻常癌症；输尿管和肾盂，移行细胞癌；尿道癌；子宫肉瘤；阴道癌；视觉通路和下丘脑胶质瘤，儿童；外阴癌；瓦尔登斯特伦氏巨型球蛋白血症；和Wilms氏肿瘤。

[0903] 项目36：根据项目1至21或23至26中任一项的组合或根据项目32至34中任一项的使用，根据项目27至29中任一项的药物组合物或根据项目32至34中任一项的使用，或根据项目31的试剂盒根据项目32至34中任一项的使用，其中所述感染性疾病选自：不动杆菌感染、非洲昏睡病(非洲锥虫病)、AIDS(获得性免疫缺陷综合征)、阿米巴病、无形体病、炭疽病、阑尾炎、溶血性杆菌感染、阿根廷出血热、蛔虫病、曲霉菌病、星状病毒感染、脚癣、巴贝斯虫病、蜡状芽孢杆菌感染、细菌性脑膜炎、细菌性肺炎、细菌性阴道炎(BV)、类杆菌感染、小袋虫病、贝蛔虫感染、裂体吸虫病、BK病毒感染、黑毛结节病、人芽囊原虫感染、芽生菌病、玻利维亚出血热、疏螺旋体病螺旋体感染(疏螺旋体病)、肉毒杆菌中毒(和婴儿肉毒杆菌中毒)、牛绦虫、巴西出血热、布氏杆菌病、伯克氏菌感染、布鲁里溃疡、杯状病毒感染(诺如病毒和沙波病毒)、弯曲杆菌病、念球菌病(念珠菌病)、犬绦虫感染、猫抓病、恰加斯病(美洲锥虫病)、软下疳、水痘、衣原体感染、沙眼衣原体感染、肺炎衣原体感染、霍乱、着色芽生菌病、气候性腹股沟淋巴结炎、肝吸虫病、难辨梭状芽胞杆菌感染、球孢子菌病、感冒、科罗拉多蜱热(CTF)、普通感冒(急性病毒性鼻咽炎；急性鼻炎)、尖锐湿疣、结膜炎、克雅氏病(CJD)、克里米亚-刚果出血热(CCHF)、隐球菌病、隐孢子虫病、皮肤幼虫移行症(CLM)、皮肤利什曼病、圆孢球虫病、囊虫病，巨细胞病毒感染、登革热、皮肤真菌病、双阿米巴病、白喉症、裂头绦虫病、杜诺凡病、龙线虫病、初夏脑膜脑炎(FSME)、埃博拉出血热、包虫病、恩里克体病、蛲虫病(蛲虫感染)、肠球菌感染、肠道病毒感染、流行性斑疹伤寒、会厌炎、EB病毒感染性单核细胞增多症、感染性红斑(第五疾病)、玫瑰疹、姜片虫病、肝片吸虫病、致命家族性失眠(FFI)、第五疾病、丝虫病、鱼中毒(雪卡毒)、鱼绦虫、流感、产气荚膜梭菌食物中毒、狐狸绦虫、自由生活阿米巴感染、梭杆菌感染、气性坏疽、土霉菌病、格斯特曼-斯特拉斯勒-施茵克综合征(GSS)、贾第虫病、马鼻疽、颚口线虫病、淋病、腹股沟肉芽肿(杜诺凡病)、A组链球菌感染、B组链球菌感染、流感嗜血杆菌感染、手足口病(HFMD)、汉坦病毒肺综合征(HPS)、幽门螺杆菌

感染、溶血性尿毒症综合征(HUS)、伴肾综合征出血热(HFRS)、亨尼帕病毒感染、甲肝、乙肝、丙肝、丁肝、戊肝、单纯疱疹、I型单纯疱疹、II型单纯疱疹、带状疱疹、组织胞浆菌病、空心疣、钩虫感染、人博卡病毒感染、人ewingii恩里克体病、人粒细胞无形体病(HGA)、人偏肺病毒感染、人单核细胞恩里克体病、人乳头状瘤病毒(HPV)感染、人副流感病毒感染、膜壳绦虫病、流行性感冒、孢子球虫病、日本脑炎、川崎病、角膜炎、金氏杆菌感染、库鲁、羊羔病(贾第虫病)、拉沙热、军团病(军团疾病、庞蒂亚克热)、利什曼病、麻风、钩端螺旋体病、虱子、李氏杆菌、莱姆疏螺旋体病、莱姆病、淋巴管丝虫病(象皮病)、淋巴细胞脉络丛脑膜炎、疟疾、马尔堡出血热(MHF)、马尔堡病毒、麻疹、类鼻疽(惠特莫尔病)、脑膜炎、脑膜炎球菌病、后殖吸虫病、微孢子病、微型绦虫、流产(前列腺炎症)、传染性软疣(MC)、单核细胞增多症、腮腺炎、鼠斑疹伤寒(地方性斑疹伤寒)、足菌肿、人型支原体、支原体肺炎、蝇蛆病、尿片/尿布皮炎、新生儿结膜炎(新生儿眼炎)、新生儿脓毒病(绒毛膜羊膜炎)、诺卡氏菌病、坏疽性口炎、诺瓦克病毒感染、盘尾丝虫病(河盲症)、骨髓炎、中耳炎、副球孢子菌病(南美芽生菌病)、肺吸虫病、副伤寒、巴氏杆菌病、头虱病(头虱子)、体虱病(体虱子)、阴虱病(阴部虱子、阴虱虱子)、盆腔炎(PID)、百日咳(Whooping cough)、Pfeiffer腺热、鼠疫、肺炎球菌感染、肺孢子虫肺炎(PCP)、肺炎、小儿麻痹(儿童跛足)、骨髓灰质炎、猪绦虫、普氏菌感染、原发阿米巴脑膜脑炎(PAM)、进行性多灶性白质脑病、假格鲁布、鹦鹉热、Q热病、兔热病、狂犬病、鼠咬热、Reiter综合征、呼吸道合胞体病毒感染(RSV)、鼻孢子虫病、鼻病毒感染、立克次氏体感染、立克次氏体痘、裂谷热(RVF)、落基山斑疹热(RMSF)、轮状病毒感染、风疹、沙门氏菌副伤寒、沙门氏菌伤寒、沙门氏菌病、SARS(严重急性呼吸综合征)、疥疮、猩红热、血吸虫病(裂体吸虫病)、擦伤伤寒、脓毒病、志贺氏菌病(细菌性痢疾)、带状疱疹、天花(痘疹)、软下疳、孢子丝菌病、葡萄球菌食物中毒、金黄色葡萄球菌感染、类圆线虫病、梅毒、绦虫病、破伤风、间日热、蜱传脑炎、须癣(Barber痒)、头癣(头皮癣)、股癣(体癣)、股癣(Jock痒)、手足癣(手癣)、黑癣、足癣(脚癣)、甲癣(甲真菌病)、花斑癣(花斑糠疹)、弓蛔虫病(眼幼虫移行症(OLM)和内脏幼虫移行症(VLM))、弓形虫病、旋毛虫病、滴虫病、鞭虫病(鞭虫感染)、Tripper、锥虫病(昏睡病)、恙虫病、结核病、兔热病、伤寒、伤寒热、解脲脲原体感染、阴道炎(Colpitis)、变体克雅氏病(vCJD、nvCJD)、委内瑞拉马脑炎、委内瑞拉出血热、病毒肺炎、内脏利什曼病、疣、西尼罗河热、西部马脑炎、白毛结节病(白癣)、百日咳、酵母真菌斑点、黄热病、耶尔森菌假结核病感染、耶尔森菌病、和接合菌症。

[0904] 项目37:根据项目1至26中任一项的组合或根据项目32至36中任一项的使用,根据项目27至29中任一项的药物组合物或根据项目32至36中任一项的使用,或根据项目31的试剂盒根据项目32至36中任一项的使用,进一步包括至少一种佐剂。

[0905] 项目38:组合或药物组合物或试剂盒,其用于根据项目32至37中任一项的使用,其中所述使用包括顺序或同时向需要其的受试者施用RNA、PD-1途径抑制剂和LAG-3途径抑制剂。

[0906] 项目39:组合或药物组合物或试剂盒,其用于根据项目32至38中任一项的使用,其中,RNA、PD-1途径抑制剂和LAG-3途径抑制剂通过不同的施用途径施用至需要其的受试者。

[0907] 项目40:前述项目中任一项限定的PD-1途径抑制剂和/或LAG-3途径抑制剂,在与前述项目中任一项限定的RNA的组合疗法中使用。

[0908] 项目41:前述项目中任一项限定的RNA,在与前述项目中任一项限定的PD-1途径抑

制剂和/或LAG-3途径抑制剂的组合疗法中使用。

[0909] 项目42:治疗或预防癌症、感染性疾病、自身免疫疾病或过敏症的方法,其包含向需要其的受试者施用治疗有效量的根据前述项目中任一项的组合、药物组合物或试剂盒。

实施例

[0910] 在下文中,给出了说明本发明的各种实施方式和方面的特定实施例。但是,本发明不限于本文所述的具体实施方式的范围内。给出以下制备和实施例以使本领域技术人员能够更清楚地理解和实施本发明。然而,本发明的范围不受示例性实施方式的限制,其仅用于说明本发明的单个方面,并且功能上等同的方法在本发明的范围内。实际上,根据前面的描述,附图和以下实施例,除了本文所述的那些之外,本发明的各种修改对于本领域技术人员而言将变得显而易见。所有这些修改都落入所附权利要求的范围内。

[0911] 实施例1:

[0912] 1.1 DNA和mRNA构建体的制备

[0913] 对于本发明的实施例,制备编码红原鸡(Gallus gallus)ov白蛋白mRNA(R1710)的DNA序列,并用于随后的体外转录反应。

[0914] 根据第一制备,制备编码上述mRNA的DNA序列。通过引入GC优化的序列用于稳定,然后源自α-珠蛋白-3'-UTR(muag(突变的α-珠蛋白-3'-UTR)、一段64个腺苷(聚-A-序列),一段30胞嘧啶(聚-C-序列)和组蛋白茎环的稳定序列而修饰野生型编码序列,来制备该构建体。在SEQ ID NO:35中显示了相应mRNA的序列。

[0915] 1.2体外转录

[0916] 使用T7聚合酶体外转录根据实施例1制备的各自DNA质粒。随后使用PureMessenger®(CureVac,Tübingen,德国)纯化mRNA。

[0917] 1.3疫苗的制备

[0918] 通过以比例(1:2)(w/w)(佐剂组分)添加鱼精蛋白到mNRA,使mRNA R1710与鱼精蛋白复合。温育10分钟后,加入相同量的用作提供抗原的RNA的游离mRNA R1710。

[0919] OVA-RNActive疫苗(R1710):包含佐剂组分,佐剂组分由以2:1(w/w)的比与鱼精蛋白复合的根据SEQ ID NO.35的编码红原鸡卵白蛋白的mRNA(R1710)和根据SEQ ID NO.35的编码红原鸡卵白蛋白(R1710)的提供抗原的游离mRNA组成(比1:1;复合的RNA:游离的RNA)。

[0920] 实施例2:抗PD1、抗LAG-3抗体和RNA疫苗的组合

[0921] 为了分析RNA疫苗接种与双重免疫检查点抑制组合的功效,将C57BL/6小鼠皮下植入每只小鼠3×10^5个E.G7-OVA淋巴瘤细胞(在PBS中体积100μl)。E.G7-OVA是稳定表达红原鸡卵白蛋白(OVA)的小鼠T细胞淋巴瘤细胞系。

[0922] 用包含OVA mRNA 1710的RNA疫苗进行皮内接种(32μg/小鼠/疫苗接种日)(根据实施例1)并用抗PD-1/CD279单克隆抗体(190μg i.p.)+抗LAG-3抗体(190μg i.p.)处理或同种型对照在第4天开始并在第7、11、14、18和21天重复进行。动物在早晨接受抗体注射,并在下午用RNA疫苗接种。接受编码PpLuc的RNA("PpLuc RNActive")或拮抗性抗体的动物仅作为对照。

[0923] 抗PD-1/CD279抗体(克隆RMP1-14,大鼠IgG2a)、抗LAG-3抗体和同种型对照抗体(克隆2A3,大鼠IgG2a)购自BioXCell(West Lebanon,NH,USA)。

[0924] 肿瘤生长

[0925] 通过使用卡尺测量3维的肿瘤大小来监测肿瘤生长。通过使用卡尺测量3维的肿瘤大小来监测肿瘤生长测量。根据下式计算体积::

[0926] $$体积(mm^3) = \frac{长度(mm)\times\pi\times宽度^2(mm^2)}{6}$$

[0927] 小鼠的健康状况的评分

[0928] 在肿瘤生长期间,通过肿瘤窘迫评分表(观察行为和肿瘤外观和大小)常规评估小鼠的健康状况。如果观察到小鼠和/或肿瘤的异常行为或状况,则记录该分数并将该分数用作安乐死的基础。

[0929] 结果

[0930] 通过与PD-1和LAG-3免疫检查点抑制的组合,RNA疫苗诱导的抗肿瘤应答显著增强。与双PD-1和LAG-3检查点抑制与RNA疫苗的组合相比,用PD-1抑制剂、LAG-3抑制剂或其组合治疗EG.7-OVA肿瘤负载小鼠诱导显著较差的肿瘤生长减少。此外,用PD-1和LAG-3阻断和RNA疫苗的组合治疗在大多数治疗动物中诱导完全肿瘤根除,而在单独用PD-1和LAG-3检查点的抑制治疗的小鼠中未发生完全肿瘤缓解。与使用非特异性RNA疫苗、单一检查点抑制剂或甚至特异性RNA疫苗的单一治疗相比,仅RNA疫苗与PD-1和LAG-3阻断的组合诱导了存活的显著增加。

序列表

<110> 库尔维科公司;柏林格英格翰国际有限公司

<120> 用于组合抗癌疗法的RNA疫苗和免疫检查点抑制剂

<130> CU01P235W01

<160> 35

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1480

<212> RNA

<213> 人工

<220>

<223> 5T4 (GC)-muag-A64-C30-组蛋白SL

<400> 1

gggagaaagc uuaccaugcc cggcgggugc agccggggcc cggccgccgg ggacggccgc 60
cugcggcucg cgcgccuggc ccuggugcuc cugggguggg ucuccagcuc cagccccacc 120
uccagcgccu ccagcuucuc cagcuccgcc cccuuccugg ccagcgcggu guccgcccag 180
cccccgcucc ccgaccagug ccccgcccug ugcgagugca gcgaggccgc gcggaccgug 240
aagugcguca accgcaaccu gacggaggug cccaccgacc ucccggccua cgugcggaac 300
cuguuccuga ccggcaacca gcucgccguc cugcccgccg gcgccuucgc gcgccggccg 360
ccccuggccg agcucgccgc ccugaaccug uccgggagcc gccucgacga ggugcgggcc 420
ggcgcguucg agcaccugcc gucccugcgc cagcucgacc ugagccacaa ccccccuggcc 480
gaccucuccc ccuucgccuu cagcgggagc aacgccuccg ugagcgcccc cuccccgcug 540
gucgagcuga uccucaacca caucgugccc cccgaggacg agcggcagaa ccgcagcuuc 600
gagggcaugg uggucgcggc ccugcuggcc gggcgggccc uccagggccu gcgccggcug 660
gagcucgccu ccaaccacuu ccuguaccug ccccgcgacg ugcucgcgca gcugccgagc 720
cugcggcacc ucgaccuguc caacaacagc cugguguccc ucaccuacgu cagcuuccgc 780
aaccugacgc accuggaguc ccuccaccug gaggacaacg cccugaaggu gcugcacaac 840
ggcacccucg ccgagcugca ggggcugccc cacauccggg uguuccucga caacaacccc 900
ugggucugcg acugccacau ggccgacaug gugaccuggc ugaaggagac cgaggugguc 960
cagggcaagg accgccugac gugcgcguac cccgagaaga ugcggaaccg ggugcuccug 1020
gagcugaaca gcgccgaccu cgacugcgac ccgauccugc cccccucccu gcagaccagc 1080
uacguguucc ucgggaucgu ccuggcccug aucggcgcca ucuuccuccu ggugcuguac 1140
cucaaccgca agggcaucaa gaaguggaug cacaacaucc gggacgccug ccgcgaccac 1200
auggaggggu accacuaccg guacgagauc aacgcggacc cccgccugac caaccugucc 1260
agcaacuccg acgucugacc acuaguuaua agacugacua gcccgauggg ccucccaacg 1320
ggcccuccuc cccuccuugc accgagauua auaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1380
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaugca ucccccccccc ccccccccccc 1440
ccccccccccc ccaaaggcuc uuuucagagc caccagaauu 1480

<210> 2
<211> 646
<212> RNA
<213> 人工
<220>
<223> Survivin (GC)-muag-A64-C30-组蛋白SL
<400> 2
gggagaaagc uuaccauggg cgcccccacc cugccgccgg ccuggcagcc guuccucaag 60
gaccaccgca ucucgaccuu caagaacugg ccguuccugg agggcugcgc gugcaccccg 120
gagcggaugg ccgaggccgg cuucauccac ugccccaccg agaacgagcc ggaccuggcc 180
cagugcuucu ucugcuucaa ggagcuggag ggcugggagc cggacgacga cccgaucgag 240
gagcacaaga agcacagcag cggcugcgcc uuccugagcg ugaagaagca guucgaggag 300
cugacgcucg gggaguuccu gaagcuggac cgggagcggg ccaagaacaa gaucgcgaag 360
gagaccaaca acaagaagaa ggaguucgag gagaccgcca agaaggugcg gcgggccauc 420
gagcagcugg ccgccaugga cugaccacua guuauaagac ugacuagccc gaugggccuc 480
ccaacgggcc cuccuccccu ccuugcaccg agauuaauaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 540
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaugcauccc cccccccccc 600
cccccccccc cccccccccaa aggcucuuuu cagagccacc agaauu 646
<210> 3
<211> 760
<212> RNA
<213> 人工
<220>
<223> NY-ESO-1 (GC)-muag-A64-C30-组蛋白SL
<400> 3
gggagaaagc uuaccaugca ggccgagggc cgcggcaccg gcggcucgac cggcgacgcc 60
gacgggcccg gcggcccggg caucccggac ggcccgggcg ggaacgcggg cggcccgggc 120
gaggccggcg ccaccggcgg gcggggcccg cggggcgccg gcgccgcccg ggcgagcggc 180
cccggcgggg gcgccccgcg gggcccgcac ggcggcgccg ccagcggccu gaacgggugc 240
ugccggugcg gcgcccgcgg cccggagagc cggcuccugg aguucuaccu ggccaugccg 300
uucgcgaccc cgauggaggc cgagcuggcc cggcggagcc uggcccagga cgccccgccg 360
cugcccgugc cgggcgugcu ccugaaggag uucacgguga gcggcaacau ccugaccauc 420
cggcugaccg ccgcggacca ccggcagcug cagcugucga ucagcagcug ccuccagcag 480
cugagccugc ugauguggau cacccagugc uuccugccgg uguuccuggc ccagccgccc 540
agcggccagc gccggugacc acuaguuaua agacugacua gcccgauggg ccucccaacg 600
ggcccuccuc cccuccuugc accgagauua auaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 660
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaugca uccccccccc cccccccccc 720
cccccccccc ccaaaggcuc uuuucagagc caccagaauu 760
<210> 4

<211> 1813
<212> RNA
<213> 人工
<220>
<223> MAGE-C1 (aa 613-1142) (GC)-muag-A64-C30-组蛋白SL
<400> 4
gggagaaagc uuaccaugca gucccccgcug cagggcgagg aguuccagag cucccugcag 60
agccccgugu ccaucugcag cuccagcacc cccuccagcc ucccgcagag cuuccccgag 120
uccagccagu ccccccccga gggcccgguc cagagccccc ugcacucccc gcagagcccc 180
ccggagggga ugcacuccca gagccccccug caguccccccg agagcgcccc cgagggcgag 240
gacucccuca gcccgcugca gauccccccag uccccgcugg agggggagga cagccucucc 300
agccugcacu ucccccaguc cccgcccgag ugggaggaca gccugagccc ccuccacuuc 360
ccccaguucc cgccccaggg cgaggacuuc caguccagcc ugcagucccc cgugagcauc 420
ugcuccagcu ccacgagccu gucccucccc cagagcuucc cggagucccc ccagagcccg 480
cccgaggggc cggcgcaguc cccccugcag cgccccguga gcuccuucuu cagcuacacc 540
cuggccuccc uccugcagag cucccacgag agcccgcaga gcccgcccga gggccccgcc 600
caguccccgc ugcagagccc cgucuccagc uuccccucca gcaccuccag cucccucagc 660
caguccagcc ccguguccag cuuccccgucc agcaccucca gcucccugag caagagcucc 720
cccgagagcc cccugcaguc ccccgugauc agcuucucca gcuccacgag ccucucccccg 780
uucagcgagg aguccagcuc ccccgucgac gaguacacca gcuccagcga cacccugcug 840
gaguccgaca gccucaccga cuccgagagc cugaucgaga gcgagccccu guucaccuac 900
acgcucgacg agaaggugga cgagcuggcc cgguuccugc uccugaagua ccaggugaag 960
cagcccauca ccaaggccga gaugcugacc aacgucaucu cccgcuacac cggcuacuuc 1020
ccggugaucu uccggaaggc gcgcgaguuc aucgagaucc ucuucgggau cagccugcgg 1080
gagguggacc ccgacgacuc cuacgucuuc gugaacacgc uggaccucac cagcgagggc 1140
ugccuguccg acgagcaggg gaugagccag aaccgccugc ucauccugau ccuguccauc 1200
aucuucauca agggcaccua cgccagcgag gaggucaucu gggacgugcu cuccgggauc 1260
ggcgugcggg ccggccgcga gcacuucgcc uucggggagc cccgggagcu gcugaccaag 1320
gucugggugc aggagcacua ccucgaguac cgcgaggugc ccaacagcuc cccgccccgg 1380
uacgaguucc ugugggggccc ccgcgcccac agcgagguca ucaagcggaa ggugguggag 1440
uuccuggcga ugcucaagaa cacggucccc aucaccuucc cguccagcua caaggacgcc 1500
cugaaggacg uggaggagcg ggcccaggcc aucaucgaca ccaccgacga cuccacggcc 1560
accgagagcg cguccagcuc cgugaugagc cccagcuucu ccagcgagug accacuaguu 1620
auaagacuga cuagcccgau gggccuccca acgggcccuc cuccccuccu ugcaccgaga 1680
uuaauaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1740
aaaaaaaaau gcaucccccc ccccccccccc ccccccccccc cccccaaagg cucuuuucag 1800
agccaccaga auu 1813
<210> 5
<211> 1339

<212> RNA
<213> 人工
<220>
<223> MAGE-C2 (GC)-muag-A64-C30-组蛋白SL
<400> 5
gggagaaagc uuaccaugcc cccggugccc ggcguccccu uccggaacgu ggacaacgac 60
agccccaccu ccguggagcu ggaggacugg gucgacgccc agcacccgac cgacgaggag 120
gaggaggagg ccagcuccgc gagcuccacg cucuaccugg uguucagccc cuccagcuuc 180
uccaccagcu ccagccugau ccucgggggc cccgaggagg aggaggugcc cuccgggguc 240
aucccgaacc ugaccgagag caucccccucc agccccccgc agggcccgcc ccaggggccc 300
ucccagagcc cccuguccag cugcugcagc uccuucagcu gguccagcuu cuccgaggag 360
agcuccagcc agaagggcga ggacaccggc acgugccagg ggcucccgga cuccgagagc 420
uccuucaccu acacccugga cgagaaggug gccgagcugg uggaguuccu ccugcugaag 480
uacgaggccg aggagcccgu caccgaggcc gagaugcuca ugaucgugau caaguacaag 540
gacuacuucc ccgugauccu gaagcgcgcc cgggaguuca uggagcugcu cuucggccug 600
gcgcugaucg aggucgggcc cgaccacuuc ugcguguucg ccaacacggu gggccucacc 660
gacgagggga gcgacgacga gggcaugccg gagaacuccc ugcugaucau cauccucagc 720
gucaucuuca ucaagggcaa cugcgccucc gaggagguga ucugggaggu gcugaacgcc 780
gucggggugu acgcgggccg cgagcacuuc guguacgggg agccccggga gcugcucacc 840
aaggucuggg ugcagggcca cuaccuggag uaccgcgagg ugccgcacag cucccccccg 900
uacuacgagu uccugugggg ccccgggccc cacagcgagu ccaucaagaa gaaggcccuc 960
gaguuccugg ccaagcugaa caacaccgug cccagcagcu uccccuccug guacaaggac 1020
gcccucaagg acgucgagga gcgcgugcag gccacgaucg acaccgcgga cgacgccacc 1080
gugauggcca gcgagucccu gagcgucaug uccagcaacg uguccuucag cgagugacca 1140
cuaguuauaa gacugacuag cccgaugggc cucccaacgg gcccuccucc ccuccuugca 1200
ccgagauuaa uaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1260
aaaaaaaaaa aaaaaugcau cccccccccc cccccccccc cccccccccc caaaggcucu 1320
uuucagagcc accagaauu 1339
<210> 6
<211> 1885
<212> RNA
<213> 人工
<220>
<223> MUC1 5 VNTR (GC)-muag-A64-C30-组蛋白SL
<400> 6
gggagaaagc uuaccaugac ccccggcacc cagagcccgu ucuuccugcu ccugcugcuc 60
acggugcuga ccgucgugac cggguccggc cacgccagcu ccacccccgg gggcgagaag 120
gagacgagcg ccacccagcg guccagcgug cccuccagca ccgagaagaa cgcggucucc 180
augaccagcu ccgugcugag cucccacagc cccggguccg gcagcuccac gacccagggc 240

caggacguga cccucgcccc ggccaccgag cccgccagcg gguccgccgc gacguggggc 300
caggacguca ccagcgugcc cgugacccgc cccgcccugg ggagcaccac gccgcccgcc 360
cacgacguca ccuccgcccc cgacaacaag cccgcgccgg gcagcaccgc ccccccccgcc 420
cacgggguga ccuccgcccc cgacacgcgg ccggcccccg gcagcaccgc gccccccgcc 480
cacggcguga ccuccgcccc ggacacccgc cccgcccccg ggagcacggc cccgccggcg 540
cacggcguca ccuccgcccc cgacacccgg cccgcccccg ggagcaccgc cccgcccgcc 600
cacggcguga cguccgcgcc cgacacccgc ccggcccccg gcagcaccgc ccccccccgcc 660
cacgggguga ccuccgcccc ggacacgcgg cccgcgcccg gcagcaccgc cccgccggcc 720
cacgggguca ccuccgcgcc cgacaaccgc cccgcccugg ggagcaccgc cccgcccgug 780
cacaacguga ccuccgccag cggcuccgcg agcggguccg ccagcacccu cguccacaac 840
ggcacguccg cccgggccac caccaccccc gccagcaagu ccacgcccuu cagcaucccg 900
ucccaccaca gcgacacccc caccacccug gcgucccaca gcacgaagac cgacgccucc 960
agcacccacc acuccagcgu gcccccgcug accagcucca accacagcac gucccccgcag 1020
cucagcaccg ggguguccuu cuucuuccug agcuuccaca ucuccaaccu gcaguucaac 1080
agcucccucg aggaccccag caccgacuac uaccaggagc ugcagcggga caucuccgag 1140
auguuccugc agaucuacaa gcagggcggc uuccucgggc ugagcaacau caaguuccgc 1200
cccggcuccg ucguggugca gcugacccuc gccuuccggg aggggacgau caacguccac 1260
gacguggaga cccaguucaa ccaguacaag accgaggccg ccagccgcua caaccugacc 1320
aucuccgacg ugagcgucuc cgacgugccc uucccguuca gcgcgcaguc cggcgccggc 1380
gugcccgggu ggggcaucgc ccugcucguc cuggugugcg ugcuggucgc ccucgccauc 1440
guguaccuga ucgcgcuggc cgugugccag ugccggcgca agaacuacgg gcagcucgac 1500
aucuucccccg cccgggacac guaccacccg augagcgagu acccgaccua ccacacccac 1560
ggccgcuacg ucccccccag cuccaccgac cggagccccu acgagaaggu guccgccggg 1620
aacggcggca gcucccugag cuacaccaac ccggcggugg ccgccgccuc cgccaaccug 1680
ugaccacuag uuauaagacu gacuagcccg augggccucc caacgggccc uccucccccuc 1740
cuugcaccga gauuaauaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1800
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa augcaucccc ccccccccccc ccccccccccc ccccccccaaa 1860
ggcucuuuuc agagccacca gaauu 1885

<210> 7
<211> 13
<212> RNA
<213> 人工
<220>
<223> Kozak序列
<400> 7
gccgccacca ugg 13

<210> 8
<211> 186
<212> DNA

<213> 人
<400> 8
catcacattt aaaagcatct cagcctacca tgagaataag agaaagaaaa tgaagatcaa 60
aagcttattc atctgttttt ctttttcgtt ggtgtaaagc caacaccctg tctaaaaaac 120
ataaatttct ttaatcattt tgcctctttt ctctgtgctt caattaataa aaaatggaaa 180
gaatct 186
<210> 9
<211> 186
<212> DNA
<213> 人
<400> 9
catcacattt aaaagcatct cagcctacca tgagaataag agaaagaaaa tgaagatcaa 60
tagcttattc atctcttttt ctttttcgtt ggtgtaaagc caacaccctg tctaaaaaac 120
ataaatttct ttaatcattt tgcctctttt ctctgtgctt caattaataa aaaatggaaa 180
gaacct 186
<210> 10
<211> 110
<212> DNA
<213> 人
<400> 10
gctggagcct cggtggccat gcttcttgcc ccttgggcct ccccccagcc cctcctcccc 60
ttcctgcacc cgtacccccg tggtctttga ataaagtctg agtgggcggc 110
<210> 11
<211> 108
<212> DNA
<213> 人
<400> 11
gctggagcct cggtagccgt tcctcctgcc cgctgggcct cccaacgggc cctcctcccc 60
tccttgcacc ggcccttcct ggtctttgaa taaagtctga gtgggcag 108
<210> 12
<211> 132
<212> DNA
<213> 人
<400> 12
gctcgctttc ttgctgtcca atttctatta aaggttcctt tgttccctaa gtccaactac 60
taaactgggg gatattatga agggccttga gcatctggat tctgcctaat aaaaaacatt 120
tattttcatt gc 132
<210> 13
<211> 44

<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> α-珠蛋白基因3'UTR的中心α-复合物结合部分
<400> 13
gcccgatggg cctcccaacg ggccctcctc ccctccttgc accg 44
<210> 14
<211> 75
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 不含5'末端寡嘧啶束的人ATP5A1的5'UTR
<400> 14
gcggctcggc cattttgtcc cagtcagtcc ggaggctgcg gctgcagaag taccgcctgc 60
ggagtaactg caaag 75
<210> 15
<211> 42
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 不含5末端寡嘧啶束的人核糖体大蛋白32的5-UTR
<400> 15
ggcgctgcct acggaggtgg cagccatctc cttctcggca tc 42
<210> 16
<211> 62
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 不含5'末端寡嘧啶束的人HSD17B4的5'UTR
<400> 16
gtcccgcagt cggcgtccag cggctctgct tgttcgtgtg tgtgtcgttg caggccttat 60
tc 62
<210> 17
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 组蛋白茎环
<400> 17

caaaggctct tttcagagcc acca 24

<210> 18

<211> 24

<212> RNA

<213> 人工

<220>

<223> 组蛋白茎环

<400> 18

caaaggcucu uuucagagcc acca 24

<210> 19

<211> 447

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 派姆单抗_重链1__任意

<400> 19

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

180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys

195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro

210 215 220

Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val

225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr

245 250 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu

260 265 270

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys

275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser

290 295 300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys

305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile

325 330 335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro

340 345 350

Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu

355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn

370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser

385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg

405 410 415

Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu

420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys

435 440 445

<210> 20

<211> 218

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 派姆单抗_轻链1__任意

<400> 20

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

<210> 21

<211> 440

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 纳武单抗_重链1__任意

<400> 21

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Asp Cys Lys Ala Ser Gly Ile Thr Phe Ser Asn Ser

20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Thr Asn Asp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser
115 120 125

Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
130 135 140

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
145 150 155 160

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
165 170 175

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys
180 185 190

Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
195 200 205

Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala
210 215 220

Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
225 230 235 240

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
245 250 255

Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val
260 265 270

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
275 280 285

Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
290 295 300

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly
305 310 315 320

Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
325 330 335

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr
340 345 350
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
355 360 365
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
370 375 380
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
385 390 395 400
Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe
405 410 415
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
420 425 430
Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440

<210> 22
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工
<220>
<223> 纳武单抗_轻链1__任意
<400> 22
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Asn Trp Pro Arg
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

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

<210> 23
<211> 438
<212> PRT
<213> 人工
<220>
<223> REGN2810_重链1__任意
<400> 23
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Val Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Phe
20 25 30
Gly Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
35 40 45
Gly Ile Ser Gly Gly Gly Arg Asp Thr Tyr Phe Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80
Gln Asn Ser Leu Lys Gly Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Lys
85 90 95
Trp Gly Asn Ile Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110
Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
115 120 125
Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
130 135 140
Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
145 150 155 160
Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
165 170 175

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

<210> 24
<211> 213
<212> PRT
<213> 人工
<220>

<223> REGN2810_轻链1__任意
<400> 24

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

<210> 25
<211> 447
<212> PRT
<213> 人工
<220>
<223> 匹敌丽珠单抗_重链1__任意
<400> 25

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30
Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Gln Trp Met
35 40 45
Gly Trp Ile Asn Thr Asp Ser Gly Glu Ser Thr Tyr Ala Glu Glu Phe
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Ile Thr Ser Leu Thr Ala Glu Asp Thr Gly Met Tyr Phe Cys
85 90 95
Val Arg Val Gly Tyr Asp Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110
Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
115 120 125
Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
130 135 140
Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
145 150 155 160
Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
165 170 175
Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
180 185 190
Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
195 200 205
Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
210 215 220
Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
225 230 235 240
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
245 250 255
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
260 265 270
Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
275 280 285
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
290 295 300
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
305 310 315 320
Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile

325 330 335
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
340 345 350
Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
355 360 365
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
370 375 380
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
385 390 395 400
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
405 410 415
Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
420 425 430
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 26
<211> 213
<212> PRT
<213> 人工
<220>
<223> 匹敌丽珠单抗_轻链1__任意
<400> 26
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Arg Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30
His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Trp Ile Tyr
35 40 45
Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Cys Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu
65 70 75 80
Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Phe Pro Leu Thr
85 90 95
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
100 105 110
Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
115 120 125
Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys

130 135 140

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

<210> 27
<211> 451
<212> PRT
<213> 人工
<220>
<223> 德瓦鲁单抗_重链1__任意
<400> 27

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

165 170 175
Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190
Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
195 200 205
Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly
225 230 235 240
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
260 265 270
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
290 295 300
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser Ile
325 330 335
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445
Pro Gly Lys
450

<210> 28
<211> 215

<212> PRT
<213> 人工
<220>
<223> 德瓦鲁单抗_轻链1__任意
<400> 28

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

<210> 29
<211> 448
<212> PRT
<213> 人工
<220>
<223> 阿替唑单抗_重链1__任意

<400> 29

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser
20 25 30
Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125
Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140
Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160
Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190
Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205
Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
210 215 220
His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

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

<210> 30
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工
<220>
<223> 阿替唑单抗_轻链1__任意
<400> 30

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

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

<210> 31
<211> 450
<212> PRT
<213> 人工
<220>
<223> 阿维鲁单抗_重链1__任意
<400> 31
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ile Met Met Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ser Ile Tyr Pro Ser Gly Gly Ile Thr Phe Tyr Ala Asp Thr Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Ile Lys Leu Gly Thr Val Thr Thr Val Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445
Gly Lys

450

<210> 32
<211> 216
<212> PRT
<213> 人工
<220>
<223> 阿维鲁单抗_轻链1__任意
<400> 32

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

<210> 33
<211> 288
<212> PRT

<213> 人

<400> 33

Met Gln Ile Pro Gln Ala Pro Trp Pro Val Val Trp Ala Val Leu Gln
1 5 10 15
Leu Gly Trp Arg Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp
20 25 30
Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp
35 40 45
Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val
50 55 60
Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala
65 70 75 80
Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg
85 90 95
Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg
100 105 110
Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu
115 120 125
Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val
130 135 140
Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro
145 150 155 160
Arg Pro Ala Gly Gln Phe Gln Thr Leu Val Val Gly Val Val Gly Gly
165 170 175
Leu Leu Gly Ser Leu Val Leu Leu Val Trp Val Leu Ala Val Ile Cys
180 185 190
Ser Arg Ala Ala Arg Gly Thr Ile Gly Ala Arg Arg Thr Gly Gln Pro
195 200 205
Leu Lys Glu Asp Pro Ser Ala Val Pro Val Phe Ser Val Asp Tyr Gly
210 215 220
Glu Leu Asp Phe Gln Trp Arg Glu Lys Thr Pro Glu Pro Pro Val Pro
225 230 235 240
Cys Val Pro Glu Gln Thr Glu Tyr Ala Thr Ile Val Phe Pro Ser Gly
245 250 255
Met Gly Thr Ser Ser Pro Ala Arg Arg Gly Ser Ala Asp Gly Pro Arg
260 265 270
Ser Ala Gln Pro Leu Arg Pro Glu Asp Gly His Cys Ser Trp Pro Leu
275 280 285

<210> 34

<211> 525
<212> PRT
<213> 人
<400> 34

Met Trp Glu Ala Gln Phe Leu Gly Leu Leu Phe Leu Gln Pro Leu Trp
1 5 10 15
Val Ala Pro Val Lys Pro Leu Gln Pro Gly Ala Glu Val Pro Val Val
20 25 30
Trp Ala Gln Glu Gly Ala Pro Ala Gln Leu Pro Cys Ser Pro Thr Ile
35 40 45
Pro Leu Gln Asp Leu Ser Leu Leu Arg Arg Ala Gly Val Thr Trp Gln
50 55 60
His Gln Pro Asp Ser Gly Pro Pro Ala Ala Ala Pro Gly His Pro Leu
65 70 75 80
Ala Pro Gly Pro His Pro Ala Ala Pro Ser Ser Trp Gly Pro Arg Pro
85 90 95
Arg Arg Tyr Thr Val Leu Ser Val Gly Pro Gly Gly Leu Arg Ser Gly
100 105 110
Arg Leu Pro Leu Gln Pro Arg Val Gln Leu Asp Glu Arg Gly Arg Gln
115 120 125
Arg Gly Asp Phe Ser Leu Trp Leu Arg Pro Ala Arg Arg Ala Asp Ala
130 135 140
Gly Glu Tyr Arg Ala Ala Val His Leu Arg Asp Arg Ala Leu Ser Cys
145 150 155 160
Arg Leu Arg Leu Arg Leu Gly Gln Ala Ser Met Thr Ala Ser Pro Pro
165 170 175
Gly Ser Leu Arg Ala Ser Asp Trp Val Ile Leu Asn Cys Ser Phe Ser
180 185 190
Arg Pro Asp Arg Pro Ala Ser Val His Trp Phe Arg Asn Arg Gly Gln
195 200 205
Gly Arg Val Pro Val Arg Glu Ser Pro His His His Leu Ala Glu Ser
210 215 220
Phe Leu Phe Leu Pro Gln Val Ser Pro Met Asp Ser Gly Pro Trp Gly
225 230 235 240
Cys Ile Leu Thr Tyr Arg Asp Gly Phe Asn Val Ser Ile Met Tyr Asn
245 250 255
Leu Thr Val Leu Gly Leu Glu Pro Pro Thr Pro Leu Thr Val Tyr Ala
260 265 270
Gly Ala Gly Ser Arg Val Gly Leu Pro Cys Arg Leu Pro Ala Gly Val

275 280 285

Gly Thr Arg Ser Phe Leu Thr Ala Lys Trp Thr Pro Pro Gly Gly Gly

290 295 300

Pro Asp Leu Leu Val Thr Gly Asp Asn Gly Asp Phe Thr Leu Arg Leu

305 310 315 320

Glu Asp Val Ser Gln Ala Gln Ala Gly Thr Tyr Thr Cys His Ile His

325 330 335

Leu Gln Glu Gln Gln Leu Asn Ala Thr Val Thr Leu Ala Ile Ile Thr

340 345 350

Val Thr Pro Lys Ser Phe Gly Ser Pro Gly Ser Leu Gly Lys Leu Leu

355 360 365

Cys Glu Val Thr Pro Val Ser Gly Gln Glu Arg Phe Val Trp Ser Ser

370 375 380

Leu Asp Thr Pro Ser Gln Arg Ser Phe Ser Gly Pro Trp Leu Glu Ala

385 390 395 400

Gln Glu Ala Gln Leu Leu Ser Gln Pro Trp Gln Cys Gln Leu Tyr Gln

405 410 415

Gly Glu Arg Leu Leu Gly Ala Ala Val Tyr Phe Thr Glu Leu Ser Ser

420 425 430

Pro Gly Ala Gln Arg Ser Gly Arg Ala Pro Gly Ala Leu Pro Ala Gly

435 440 445

His Leu Leu Leu Phe Leu Ile Leu Gly Val Leu Ser Leu Leu Leu Leu

450 455 460

Val Thr Gly Ala Phe Gly Phe His Leu Trp Arg Arg Gln Trp Arg Pro

465 470 475 480

Arg Arg Phe Ser Ala Leu Glu Gln Gly Ile His Pro Pro Gln Ala Gln

485 490 495

Ser Lys Ile Glu Glu Leu Glu Gln Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Pro

500 505 510

Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Gln Leu

515 520 525

<210> 35

<211> 1378

<212> RNA

<213> 人工

<220>

<223> 对应人工DNA构建体的mRNA

<400> 35

gggagaaagc uuaccauggg cagcaucggg gccgcgucga uggaguucug cuucgacgug 60

uucaaggagc ugaaggucca ccacgccaac gagaacaucu ucuacugccc gaucgccauc 120
augagcgcgc ucgccauggu guaccugggc gccaaggaca gcacccggac gcagaucaac 180
aagguggucc gcuucgacaa gcugcccggc uucggggacu cgaucgaggc gcagugcggc 240
accagcguga acgugcacag cucgcuccgg gacauccuga accagaucac caagccgaac 300
gacgucuaca gcuucagccu ggccucgcgg cucuacgccg aggagcgcua cccgauccug 360
cccgaguacc ugcagugcgu gaaggagcuc uaccggggcg ggcuggagcc gaucaacuuc 420
cagacggcgg ccgaccaggc ccgggagcug aucaacagcu ggguggagag ccagaccaac 480
ggcaucaucc gcaacguccu ccagccgucg agcguggaca gccagaccgc gauggugcug 540
gucaacgcca ucguguucaa gggccugugg gagaagacgu ucaaggacga ggacacccag 600
gccaugcccu uccgggugac cgagcaggag ucgaagccgg uccagaugau guaccagauc 660
gggcucuucc ggguggcgag cauggccagc gagaagauga agauccugga gcugccguuc 720
gccucgggca cgaugagcau gcucgugcug cugcccgacg aggucagcgg ccucgagcag 780
cuggagucga ucaucaacuu cgagaagcug accgagugga ccagcagcaa cgugauggag 840
gagcgcaaga ucaaggugua ccucccgcgg augaagaugg aggagaagua caaccugacg 900
ucgguccuga uggcgauggg gaucaccgac guguucagca gcucggccaa ccucagcggc 960
aucagcucgg ccgagagccu gaagaucagc caggcggugc acgccgccca cgcggagauc 1020
aacgaggccg gccgggaggu cguggggucg gccgaggcgg gcguggacgc cgccagcguc 1080
agcgaggagu uccgcgcgga ccacccguuc cuguucugca ucaagcacau cgccaccaac 1140
gccgugcucu ucuucggccg gugcgugucg cccugaccac uaguuauaag acugacuagc 1200
ccgaugggcc ucccaacggg cccuccuccc cuccuugcac cgagauuaau aaaaaaaaaa 1260
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaugcauc 1320
cccccccccc cccccccccc cccccccccc aaaggcucuu uucagagcca ccagaauu 1378

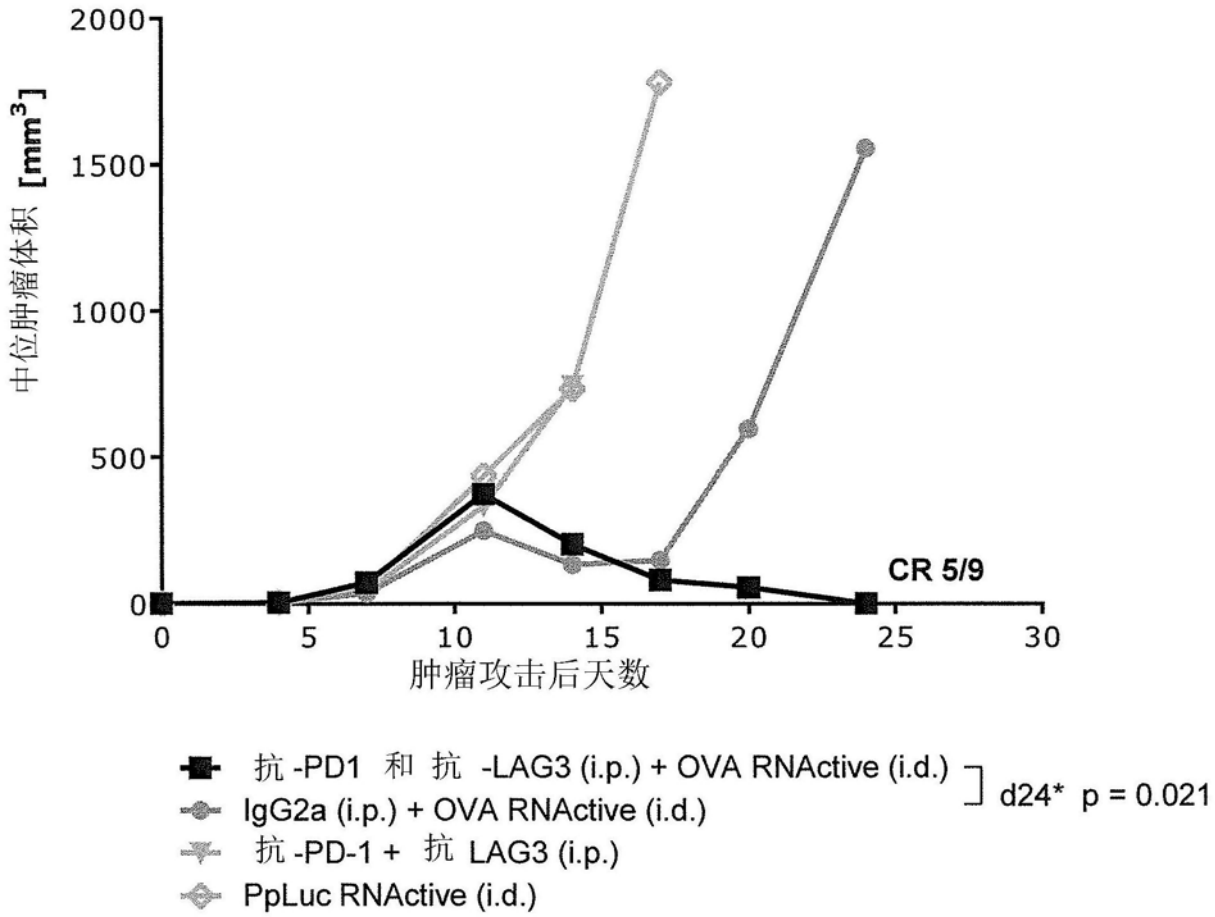

2000
1500
1000
500
0
中位肿瘤体积 [mm3]
0
5
10
15
20
25
30
肿瘤攻击后天数
CR 5/9
抗-PD1 和 抗 -LAG3 (i.p.) + OVA RNActive (i.d.)
IgG2a (i.p.) + OVA RNActive (i.d.)
抗-PD-1 + 抗 LAG3 (i.p.)
PpLuc RNActive (i.d.)
d24* p = 0.021

图1

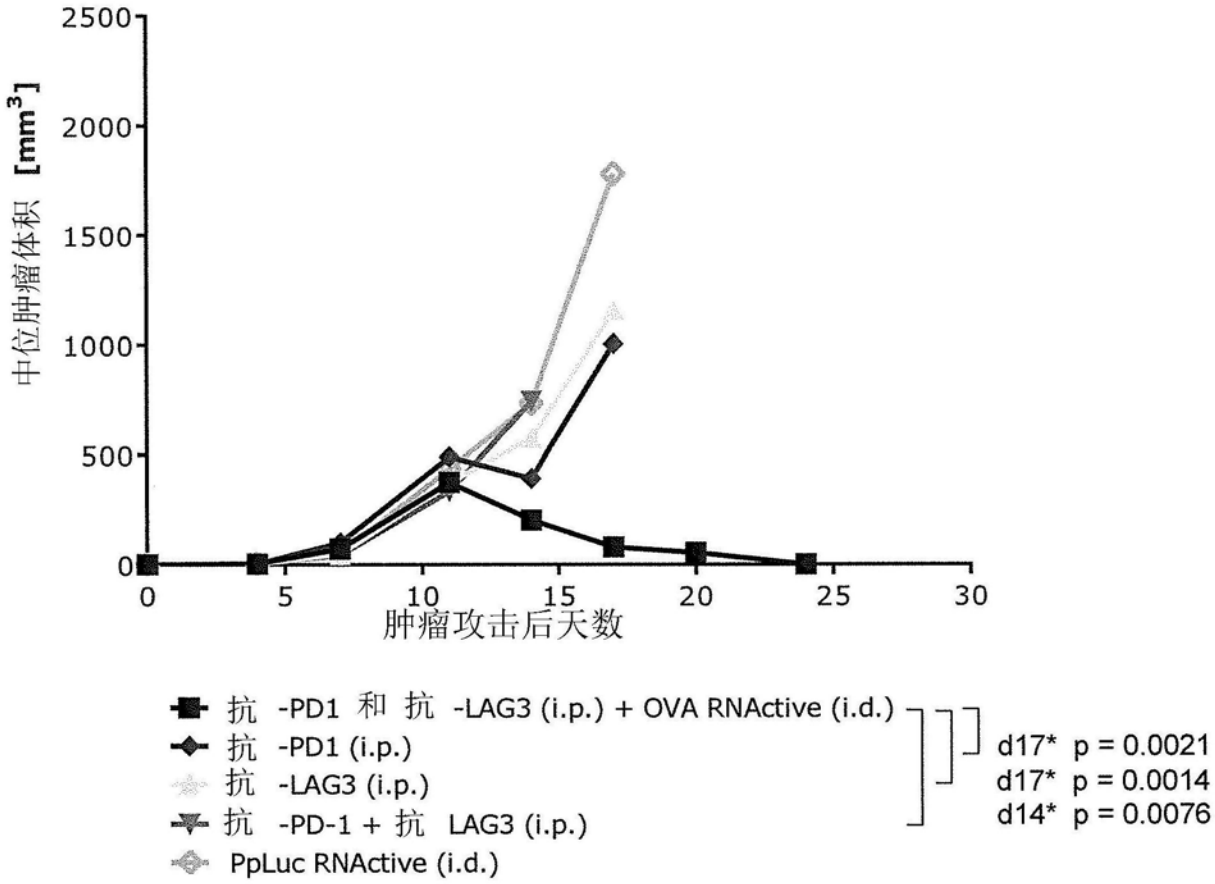

2500
2000
1500
1000
500
0
中位肿瘤体积 [mm³]
0
5
10
15
20
25
30
肿瘤攻击后天数
抗 -PD1 和 抗 -LAG3 (i.p.) + OVA RNActive (i.d.)
抗 -PD1 (i.p.)
抗 -LAG3 (i.p.)
抗 -PD-1 + 抗 LAG3 (i.p.)
PpLuc RNActive (i.d.)
d17* p = 0.0021
d17* p = 0.0014
d14* p = 0.0076

图2

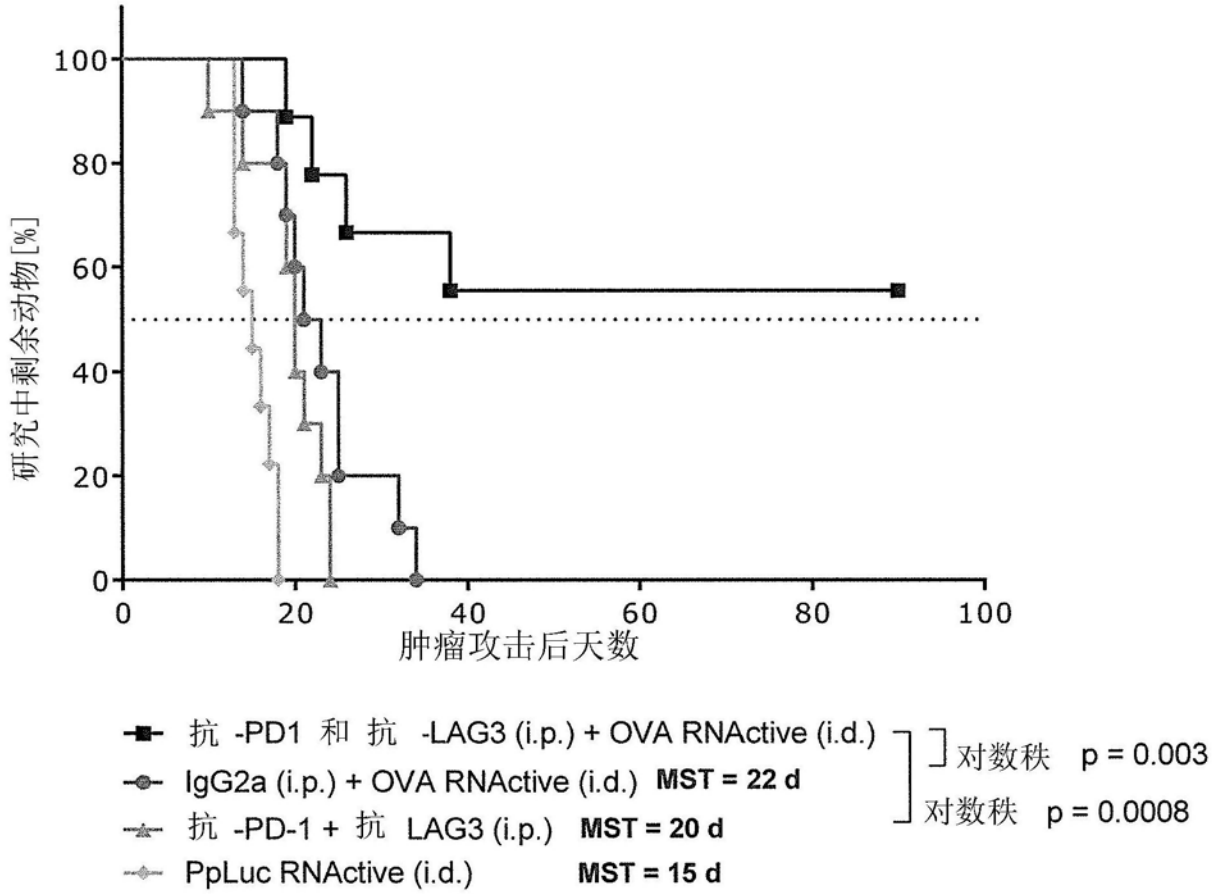

100
80
60
40
20
0
研究中剩余动物[%]
0
20
40
60
80
100
肿瘤攻击后天数
抗 -PD1 和 抗 -LAG3 (i.p.) + OVA RNActive (i.d.)
IgG2a (i.p.) + OVA RNActive (i.d.) MST = 22 d
抗 -PD-1 + 抗 LAG3 (i.p.) MST = 20 d
PpLuc RNActive (i.d.) MST = 15 d
对数秩 p = 0.003
对数秩 p = 0.0008

图3

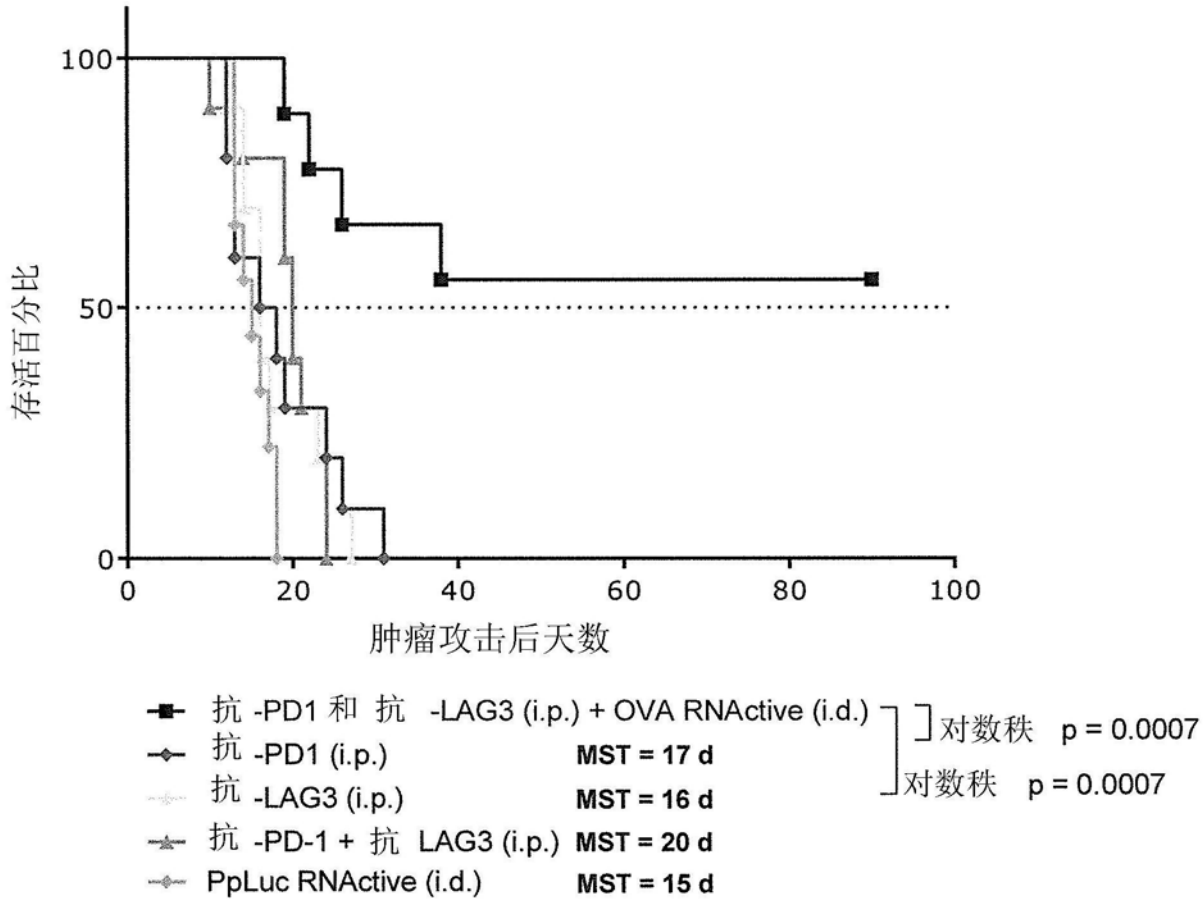

100
50
0
存活百分比
0
20
40
60
80
100
肿瘤攻击后天数
抗 -PD1 和 抗 -LAG3 (i.p.) + OVA RNActive (i.d.)
抗 -PD1 (i.p.) MST = 17 d
抗 -LAG3 (i.p.) MST = 16 d
抗 -PD-1 + 抗 LAG3 (i.p.) MST = 20 d
PpLuc RNActive (i.d.) MST = 15 d
对数秩 p = 0.0007
对数秩 p = 0.0007

图4