



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118382701 A

(43) 申请公布日 2024. 07. 23

(21) 申请号 202280074018.9

(22) 申请日 2022.11.08

(30) 优先权数据

63/277,116 2021.11.08 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.05.06

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2022/079505 2022.11.08

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2023/081935 EN 2023.05.11

(71) 申请人 磨石生物公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 S-J·洪 M·菲丹扎 K·朱斯

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所
11256

专利代理师 陈文平

(51) Int.Cl.

C12N 15/86 (2006.01)

A61K 9/127 (2006.01)

A61K 31/7105 (2006.01)

A61K 31/7115 (2006.01)

A61K 39/215 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

C12N 15/113 (2006.01)

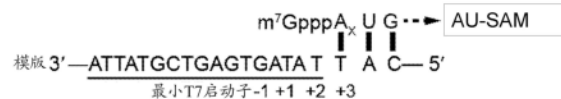
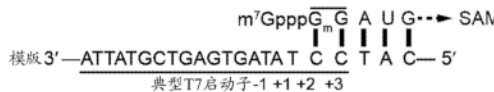
权利要求书13页 说明书76页 附图14页

(54) 发明名称

自扩增RNA组合物及其使用方法

(57) 摘要

本公开尤其包括RNA多核苷酸组合物,其(A)包含经修饰核苷;和/或(B)已使用色谱系统和/或基于亲和力的分离系统纯化。还提供了与其相关的产生和治疗方法。



1. 一种用于递送包含单链RNA (ssRNA) 载体的自扩增表达系统的组合物, 其中所述ssRNA载体包含7-甲基鸟苷酸 (m⁷G帽)、聚腺苷酸化 (聚A) 尾、自扩增骨架以及一种或多种经修饰核苷, 其中所述一种或多种经修饰核苷包括m5C并且不包括其他经修饰核苷酸, 任选地除了m⁷G帽类似物之外。

2. 一种用于递送包含单链RNA (ssRNA) 载体的自扩增表达系统的组合物, 其中所述ssRNA载体包含7-甲基鸟苷酸 (m⁷G帽)、聚腺苷酸化 (聚A) 尾、自扩增骨架和一种或多种经修饰核苷。

3. 如权利要求1或2所述的组合物, 其中所述自扩增骨架包含选自自复制RNA病毒的多核苷酸。

4. 如权利要求1-3中任一项所述的组合物, 其中所述自复制RNA病毒选自包括甲病毒、黄病毒、麻疹病毒和弹状病毒的组。

5. 如权利要求2-4中任一项所述的组合物, 其中所述一种或多种经修饰核苷包括甲基-5-胞嘧啶 (m5C)、甲基-6-腺苷 (m6A)、核糖-甲基化 (2'-O-Me)、s-硫尿苷 (s2U)、5-甲基尿苷 (m5U)、N1-甲基假尿苷 (m1Ψ)、假尿苷 (Ψ) 或其任何组合。

6. 如权利要求2-4中任一项所述的组合物, 其中所述一种或多种经修饰核苷包括m5C。

7. 如权利要求2-4中任一项所述的组合物, 其中所述一种或多种经修饰核苷包括m5C并且不包括其他经修饰核苷酸, 任选地除了m⁷G帽类似物之外。

8. 如上述权利要求中任一项所述的组合物, 其中所述ssRNA载体是纯化的。

9. 如权利要求8所述的组合物, 其中所述ssRNA载体通过色谱来纯化。

10. 如权利要求9所述的组合物, 其中所述色谱包括纤维素色谱系统或基于亲和力的分离系统。

11. 如权利要求10所述的组合物, 其中所述基于亲和力的分离系统是脱氧胸苷 (dT) 寡核苷酸 (Oligo (dT)) 系统。

12. 如上述权利要求中任一项所述的组合物, 其中所述ssRNA载体大于10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或100%的腺嘌呤、鸟嘌呤、胞苷和/或尿苷核苷是经修饰核苷。

13. 如上述权利要求中任一项所述的组合物, 其中所述ssRNA载体大于25%的腺苷、鸟苷、胞苷和/或尿苷核苷包含经修饰核苷。

14. 如权利要求13所述的组合物, 其中所述ssRNA载体100%的腺嘌呤、鸟嘌呤、胞苷和/或尿苷核苷包含经修饰核苷。

15. 如上述权利要求中任一项所述的组合物, 其中所述ssRNA载体包含10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或100%的胞苷核苷包含经修饰核苷。

16. 如上述权利要求中任一项所述的组合物, 其中所述ssRNA载体大于25%的胞苷核苷包含经修饰核苷。

17. 如上述权利要求中任一项所述的组合物, 其中所述ssRNA包含100%的胞苷核苷是经修饰核苷。

18. 如上述权利要求中任一项所述的组合物, 其中所述组合物包含小于30%、小于25%、小于20%、小于15%、小于10%、小于5%、小于2%、小于1%、小于0.5%、或小于0.1%的污染物。

19. 如权利要求18所述的组合物,其中所述污染物包括盐、洗涤剂 and/或双链RNA(dsRNA)。

20. 如权利要求18所述的组合物,其中所述污染物包括dsRNA。

21. 如上述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述ssRNA载体占所述组合物中存在的总RNA的70%或更多、80%或更多、85%或更多、90%或更多、或95%或更多。

22. 如上述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述ssRNA载体占所述组合物中存在的总RNA的97%或更多、98%或更多、99%或更多、或99.5%或更多。

23. 如上述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述ssRNA载体是所述组合物中存在的唯一RNA种类。

24. 如权利要求18-23中任一项所述的组合物,其中所述总RNA、dsRNA和/或ssRNA含量通过斑点印迹或ELISA来评估,任选地其中所述斑点印迹或ELISA评估包括用对RNA、dsRNA和/或ssRNA具有特异性的抗体进行检测。

25. 如权利要求18-23中任一项所述的组合物,其中所述总RNA、dsRNA和/或ssRNA含量通过毛细管电泳来评估。

26. 如权利要求18-23中任一项所述的组合物,其中所述总RNA、dsRNA和/或ssRNA含量通过液相色谱来评估。

27. 如权利要求24或26中任一项所述的组合物,其中所述RNA、dsRNA和/或ssRNA含量被量化为曲线下面积(AUC)。

28. 如上述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述ssRNA载体通过体外转录产生。

29. 如上述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述m⁷G帽包含m⁷G帽类似物。

30. 如权利要求29所述的组合物,其中所述m⁷G帽类似物包括三核苷酸m⁷G-ppp-A-U帽类似物或二核苷酸m⁷G-ppp-A帽类似物。

31. 如上述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述ssRNA载体包含盒,所述盒包含至少一种用于递送的核酸序列,任选地其中所述至少一种核酸序列包含多肽编码核酸序列,任选地其中所述多肽编码核酸序列是抗原编码核酸序列,并且其中所述盒可操作地连接至所述自扩增骨架或可操作地插入至所述自扩增骨架中。

32. 如上述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述自扩增骨架包含选自自复制RNA病毒的多核苷酸,其包含至少一种由下式从5'至3'描述的核酸序列:

$m^7G-ppp-N_1-N_2-N_v$, 其中

m^7G 是7-甲基鸟苷酸(m^7G)帽,

ppp是三磷酸桥,

N_1 是所述自扩增骨架的第一核苷酸,对应于所述自复制RNA病毒的第一内源性5'核苷酸,

N_2 是所述自扩增骨架的第二核苷酸,对应于所述自复制RNA病毒的第二内源性5'核苷酸,并且

N_v 包含(1)所述自扩增骨架的一种或多种额外核酸序列,以及(2)包含至少一种用于递送的核酸序列的盒,任选地其中所述至少一种核酸序列包含多肽编码核酸序列,任选地其中所述多肽编码核酸序列是抗原编码核酸序列,并且其中所述盒可操作地连接至所述自扩增骨架或可操作地插入至所述自扩增骨架中。

33. 如上述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述组合物还包含纳米粒子递送媒介物。

34. 如权利要求33所述的组合物,其中所述纳米粒子递送媒介物是脂质纳米粒子(LNP)。

35. 一种药物组合物,所述药物组合物包含如前述权利要求中任一项所述的组合物和药学上可接受的载剂。

36. 一种用于治疗患有疾病的受试者的方法,所述方法包括向所述受试者施用一定量的如前述组合物权利要求中任一项所述的组合物或如权利要求35所述的药物组合物。

37. 如权利要求36所述的方法,其中所述疾病为癌症或感染性疾病。

38. 如权利要求37所述的方法,其中所述感染性疾病由选自包括以下的组的病毒引起:HPV、流感、TB、CMV、HMPV、PIV、基孔肯雅病毒、寨卡病毒、SARS-CoV-2和冠状病毒。

39. 如权利要求36-38中任一项所述的方法,其中所述组合物中的所述ssRNA载体的量为1000 μ g或更少、100 μ g或更少、50 μ g或更少、30 μ g或更少、10 μ g或更少、5 μ g或更少、或1 μ g或更少。

40. 如权利要求36-39中任一项所述的方法,其中与接受包含不含经修饰核苷的核酸序列的对照受试者相比,所述受试者中的先天性免疫响应降低。

41. 如权利要求40所述的方法,其中所述先天性免疫响应是IFN响应。

42. 如权利要求41所述的方法,其中所述IFN响应是IRF-3表达、IRF-7表达或其组合。

43. 如权利要求36-42中任一项所述的方法,其中与包含另外相同的ssRNA载体但不包含经修饰核苷的对照组合物相比,所述ssRNA载体的复制增加。

44. 一种从核酸混合物中纯化自扩增表达系统的方法,所述方法包括通过纤维素色谱系统或基于亲和力的分离系统纯化所述自扩增表达系统,其中所述自扩增表达系统包含单链RNA(ssRNA)载体,并且其中所述ssRNA载体包含m⁷G帽、聚A尾和自扩增骨架。

45. 一种减少核酸混合物中的双链RNA(dsRNA)的方法,所述方法包括:

(A) 通过纤维素色谱系统或基于亲和力的分离系统纯化所述自扩增表达系统;和/或

(B) 产生所述自扩增表达系统,使得所述自扩增表达系统包含经修饰核苷;并且

其中所述自扩增表达系统包含单链RNA(ssRNA)载体,其中所述ssRNA载体包含m⁷G帽、聚A尾和自扩增骨架。

46. 如权利要求44或45所述的方法,其中所述基于亲和力的分离系统包括脱氧胸苷(dT)寡核苷酸(Oligo(dT))系统。

47. 如权利要求44所述的方法,其中所述ssRNA载体包含经修饰核苷。

48. 如权利要求45-47中任一项所述的方法,其中所述经修饰核苷包括甲基-5-胞嘧啶(m5C)、甲基-6-腺苷(m6A)、核糖-甲基化(2'-O-Me)、s-硫尿苷(s2U)、5-甲基尿苷(m5U)、N1-甲基假尿苷(m1 Ψ)、假尿苷(Ψ)或其任何组合。

49. 如权利要求45-47中任一项所述的方法,其中所述经修饰核苷由甲基-5-胞嘧啶(m5C)组成。

50. 一种组合物混合物,其中所述组合物包含自扩增表达系统,所述自扩增表达系统包含:

(a) 单链RNA(ssRNA)载体,其中所述ssRNA载体包含m⁷G帽、聚腺苷酸化(聚A)尾和自扩增

骨架;以及

(b) 双链RNA (dsRNA), 并且

其中所述dsRNA占所述混合物中存在的总RNA的小于20%、小于10%、小于5%、小于2%、小于1%、小于0.5%或小于0.1%。

51. 一种组合物混合物, 其中所述组合物包含自扩增表达系统, 所述自扩增表达系统包含:

(a) 单链RNA (ssRNA) 载体, 其中所述ssRNA载体包含m⁷G帽、聚腺苷酸化(聚A)尾和自扩增骨架;以及

(b) 双链RNA (dsRNA), 并且

其中所述ssRNA载体占所述混合物中存在的总RNA的70%或更多、80%或更多、85%或更多、90%或更多、95%或更多、97%或更多、98%或更多、99%或更多、或99.5%或更多。

52. 如权利要求50或51所述的混合物, 其中所述唯一可检测的RNA包含所述ssRNA载体。

53. 如上述权利要求中任一项所述的混合物, 其中所述总RNA、dsRNA和/或ssRNA含量通过斑点印迹或ELISA来评估, 任选地其中所述斑点印迹或ELISA评估包括用对RNA、dsRNA和/或ssRNA具有特异性的抗体进行检测。

54. 如上述权利要求中任一项所述的混合物, 其中所述总RNA、dsRNA和/或ssRNA含量通过毛细管电泳来评估。

55. 如上述权利要求中任一项所述的混合物, 其中所述总RNA、dsRNA和/或ssRNA含量通过液相色谱来评估。

56. 如权利要求53-55中任一项所述的组合物, 其中所述RNA、dsRNA和/或ssRNA含量被量化为曲线下面积(AUC)。

57. 如上述权利要求中任一项所述的混合物, 其中所述ssRNA通过体外转录产生。

58. 如上述权利要求中任一项所述的混合物, 其中所述m⁷G帽包含m⁷G帽类似物。

59. 如权利要求58所述的混合物, 其中所述m⁷G帽类似物包括三核苷酸m⁷G-ppp-A-U帽类似物或二核苷酸m⁷G-ppp-A帽类似物。

60. 如上述权利要求中任一项所述的混合物, 其中所述ssRNA载体包含盒, 所述盒包含至少一种用于递送的核酸序列, 任选地其中所述至少一种核酸序列包含多肽编码核酸序列, 任选地其中所述多肽编码核酸序列是抗原编码核酸序列, 并且其中所述盒可操作地连接至所述自扩增骨架或可操作地插入至所述自扩增骨架中。

61. 如上述权利要求中任一项所述的混合物, 其中所述自扩增骨架包含选自自复制RNA病毒的多核苷酸, 其包含至少一种由下式从5'至3'描述的核酸序列:

m⁷G-ppp-N₁-N₂-N_v, 其中

m⁷G是7-甲基鸟苷酸(m⁷G)帽,

ppp是三磷酸桥,

N₁是所述自扩增骨架的第一核苷酸, 对应于所述自复制RNA病毒的第一内源性5'核苷酸,

N₂是所述自扩增骨架的第二核苷酸, 对应于所述自复制RNA病毒的第二内源性5'核苷酸, 并且

N_v包含(1)所述自扩增骨架的一种或多种额外核酸序列, 以及(2)包含至少一种用于递

送的核酸序列的盒,任选地其中所述至少一种核酸序列包含多肽编码核酸序列,任选地其中所述多肽编码核酸序列是抗原编码核酸序列,并且其中所述盒可操作地连接至所述自扩增骨架或可操作地插入至所述自扩增骨架中。

62. 如上述权利要求中任一项所述的混合物,其中所述ssRNA载体包含一种或多种经修饰核苷。

63. 如权利要求62所述的混合物,其中所述一种或多种经修饰核苷包括甲基-5-胞嘧啶(m5C)、甲基-6-腺苷(m6A)、核糖-甲基化(2'-O-Me)、s-硫尿苷(s2U)、5-甲基尿苷(m5U)、N1-甲基假尿苷(m1Ψ)、假尿苷(Ψ)或其任何组合。

64. 如权利要求62所述的混合物,其中所述一种或多种经修饰核苷包括m5C。

65. 如权利要求62所述的混合物,其中所述一种或多种经修饰核苷包括m5C并且不包括其他经修饰核苷酸,任选地除了帽类似物之外。

66. 如上述权利要求中任一项所述的混合物,其中所述ssRNA载体是纯化的。

67. 如权利要求66所述的混合物,其中所述ssRNA载体通过色谱来纯化。

68. 如权利要求67所述的混合物,其中所述色谱包括纤维素色谱系统或基于亲和力的分离系统。

69. 如权利要求68所述的混合物,其中所述基于亲和力的分离系统是脱氧胸苷(dT)寡核苷酸(Oligo(dT))系统。

70. 如上述权利要求中任一项所述的组合物、混合物或方法,

其中用于递送所述自扩增表达系统的所述组合物包含:

(A) 所述自扩增表达系统,其中所述自扩增表达系统包含一种或多种自扩增mRNA(SAM)载体,其中所述一种或多种SAM载体包含:

(a) 所述自扩增骨架,其中所述自扩增骨架包含以SEQ ID NO:6所示的核酸序列,其中所述自扩增骨架序列包含亚基因组启动子核苷酸序列和聚(A)序列,其中所述亚基因组启动子序列对于所述自复制RNA病毒是内源的,其中所述聚(A)序列对于所述自复制RNA病毒骨架是内源的;和

(b) 整合在所述亚基因组启动子核苷酸序列与所述聚(A)序列之间的盒,其中所述盒可操作地连接至所述亚基因组启动子核苷酸序列,并且任选地其中所述盒包含至少一种抗原编码核酸序列,所述抗原编码核酸序列包含:

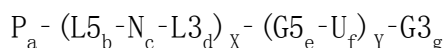
a. 表位编码核酸序列,任选地包含:(1)使所编码的表位序列与由野生型核酸序列编码的相应肽序列不同的至少一种改变,或(2)编码感染性疾病生物体肽的核酸序列,所述肽选自以下各项组成的组:病原体衍生肽、病毒衍生肽、细菌衍生肽、真菌衍生肽和寄生虫衍生肽,

b. 任选的5'接头序列,和

c. 任选的3'接头序列;和

(B) 任选地,脂质纳米粒子(LNP),其中所述LNP包封自扩增表达系统。

71. 如上述权利要求中任一项所述的组合物、混合物或方法,其中用于递送所述自扩增表达系统的所述组合物中的所述盒的每个元件的有序序列描述于下式,从5'至3'包含:



其中P包含第二启动子核苷酸序列,其中a=0或1,

N包含所述表位编码核酸序列之一,其中所述表位编码核酸序列包含MHC I类表位编码核酸序列,其中 $c=1$,

L5包含5'接头序列,其中 $b=0$ 或 1 ,

L3包含3'接头序列,其中 $d=0$ 或 1 ,

G5包含编码GPPGG氨基酸接头的至少一种核酸序列之一,其中 $e=0$ 或 1 ,

G3包含编码GPPGG氨基酸接头的至少一种核酸序列之一,其中 $g=0$ 或 1 ,

U包含至少一种MHC II类表位编码核酸序列之一,其中 $f=1$,

$X=1$ 至 400 ,其中对于每个 X ,相应的 N_c 是MHC I类表位编码核酸序列,并且

$Y=0,1$ 或 2 ,其中对于每个 Y ,相应的 U_f 是MHC II类表位编码核酸序列。

72.如权利要求71所述的组合物,其中对于每个 X ,相应的 N_c 是不同的MHC I类表位编码核酸序列。

73.如权利要求71或72所述的组合物,其中对于每个 Y ,相应的 U_f 是不同的MHC II类表位编码核酸序列。

74.如权利要求71-73中任一项所述的组合物,其中

$a=0, b=1, d=1, e=1, g=1, h=1, X=10, Y=2$,

所述至少一种启动子核苷酸序列是由所述自扩增骨架提供的单个亚基因组启动子核苷酸序列,

所述至少一种聚腺苷酸化聚(A)序列是由所述自扩增骨架提供的至少80个连续A核苷酸的聚(A)序列,

所述盒整合在所述亚基因组启动子核苷酸序列和所述聚(A)序列之间,其中所述盒可操作地连接至所述亚基因组启动子核苷酸序列和所述聚(A)序列,

每个N编码长度为7-15个氨基酸的MHC I类表位,

L5是编码所述MHC I表位的原生N末端氨基酸序列的原生5'接头序列,并且其中所述5'接头序列编码长度为至少3个氨基酸的肽,

L3是编码所述MHC I表位的原生C末端氨基酸序列的原生3'接头序列,并且其中所述3'接头序列编码长度为至少3个氨基酸的肽,

U是PADRE II类序列和破伤风类毒素MHC II类序列中的每一者,

所述自扩增骨架是以SEQ ID NO:6所示的序列,并且

所述MHC I类表位编码核酸序列中的每一者编码长度为13至25个氨基酸的多肽。

75.如上述权利要求中任一项所述的组合物、混合物或方法,其中用于递送的所述至少一种核酸序列包含多肽编码核酸序列。

76.如权利要求75所述的组合物,其中所述多肽编码核酸序列编码所述抗原编码核酸序列。

77.如权利要求76所述的组合物,其中所述抗原编码核酸序列包含MHC I类表位、MHC II类表位、能够刺激B细胞响应的表位或其组合。

78.如权利要求76或77所述的组合物,其中所述抗原编码核酸序列包含编码全长蛋白质、蛋白质亚基、蛋白质结构域或其组合的序列。

79.如权利要求75所述的组合物,其中所述多肽编码核酸序列编码全长蛋白质或其功能部分。

80. 如权利要求79所述的组合物,其中所述全长蛋白质或其功能部分选自自由以下各项组成的组:抗体、细胞因子、嵌合抗原受体(CAR)、T细胞受体和基因组编辑系统核酸酶。

81. 如上述权利要求中任一项所述的组合物、混合物或方法,其中用于递送的所述至少一种核酸序列包含至少一种包含非编码核酸序列的核酸序列。

82. 如权利要求81所述的组合物,其中所述非编码核酸序列是RNA干扰(RNAi)多核苷酸或基因组编辑系统多核苷酸。

83. 如上述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述LNP包含选自自由以下各项组成的组的脂质:可电离氨基脂质、磷脂酰胆碱、胆固醇、基于PEG的外壳脂质或其组合。

84. 如上述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述LNP包含可电离氨基脂质、磷脂酰胆碱、胆固醇和基于PEG的外壳脂质。

85. 如权利要求83或84所述的组合物,其中所述可电离氨基脂质包含MC3样(二亚油醇甲基-4-二甲基氨基丁酸酯)分子。

86. 如上述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述LNP包封的表达系统具有60-140nm之间的直径。

87. 如上述权利要求中任一项所述的组合物,其中用于递送所述自扩增表达系统的所述组合物被配制用于肌内(IM)、皮内(ID)、皮下(SC)、玻璃体内(IVT)、鞘内或静脉内(IV)施用。

88. 如上述权利要求中任一项所述的组合物,其中用于递送所述自扩增表达系统的所述组合物被配制用于肌内(IM)施用。

89. 如上述权利要求中任一项所述的组合物、混合物或方法,其中所述盒整合在所述至少一种启动子核苷酸序列和所述至少一种聚(A)序列之间。

90. 如上述权利要求中任一项所述的组合物、混合物或方法,其中所述至少一种启动子核苷酸序列可操作地连接至所述盒。

91. 如上述权利要求中任一项所述的组合物、混合物或方法,其中所述ssRNA载体包含正链RNA载体。

92. 如上述权利要求中任一项所述的组合物、混合物或方法,其中所述ssRNA载体包含负链RNA载体。

93. 如权利要求92所述的组合物,其中所述负链RNA载体包含麻疹病毒或弹状病毒的至少一种多核苷酸序列。

94. 如上述权利要求中任一项所述的组合物、混合物或方法,其中所述ssRNA载体在哺乳动物细胞内自扩增。

95. 如上述权利要求中任一项所述的组合物、混合物或方法,其中所述自复制RNA病毒选自自由以下各项组成的组:甲病毒;黄病毒、麻疹病毒和弹状病毒。

96. 如上述权利要求中任一项所述的组合物、混合物或方法,其中所述自扩增骨架包含甲病毒的至少一种多核苷酸序列,任选地其中所述甲病毒选自自由以下各项组成的组:奥拉病毒、摩根堡病毒、委内瑞拉马脑炎病毒、罗斯河病毒、塞姆利基森林病毒、辛德毕斯病毒和马雅罗病毒。

97. 如上述权利要求中任一项所述的组合物、混合物或方法,其中所述自扩增骨架包含委内瑞拉马脑炎病毒的至少一种核苷酸序列。

98. 如权利要求96或97所述的组合物,其中所述自扩增骨架至少包含由所述奥拉病毒、所述摩根堡病毒、所述委内瑞拉马脑炎病毒、所述罗斯河病毒、所述塞姆利基森林病毒、所述辛德毕斯病毒或所述马雅罗病毒的核苷酸序列编码的用于非结构蛋白介导的扩增的序列、亚基因组启动子序列、聚(A)序列、非结构蛋白1(nsP1)基因、nsP2基因、nsP3基因和nsP4基因。

99. 如权利要求96或97所述的组合物,其中所述自扩增骨架至少包含由所述奥拉病毒、所述摩根堡病毒、所述委内瑞拉马脑炎病毒、所述罗斯河病毒、所述塞姆利基森林病毒、所述辛德毕斯病毒或所述马雅罗病毒的核苷酸序列编码的用于非结构蛋白介导的扩增的序列、亚基因组启动子序列和聚(A)序列。

100. 如权利要求98或99所述的组合物,其中用于非结构蛋白介导的扩增的序列选自由以下各项组成的组:甲病毒5' UTR、51-nt CSE、24-nt CSE、26S亚基因组启动子序列、19-nt CSE、甲病毒3' UTR或其组合。

101. 如权利要求98-100中任一项所述的组合物,其中所述自扩增骨架不编码结构性病毒粒子蛋白衣壳E2和E1,任选地其中E1是全长E1,或不编码结构性病毒粒子蛋白衣壳E3、E2、6K。

102. 如权利要求101所述的组合物,其中所述盒被插入以代替所述奥拉病毒、所述摩根堡病毒、所述委内瑞拉马脑炎病毒、所述罗斯河病毒、所述塞姆利基森林病毒、所述辛德毕斯病毒或所述马雅罗病毒的多核苷酸序列内的结构性病毒粒子蛋白。

103. 如权利要求96或97所述的组合物,其中所述委内瑞拉马脑炎病毒包含SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:5的序列。

104. 如权利要求96或97所述的组合物,其中所述委内瑞拉马脑炎病毒包含SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:5的序列,其还包含碱基对7544和11175之间的缺失。

105. 如权利要求104所述的组合物,其中所述自扩增骨架包含SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:7所示的序列。

106. 如权利要求104或105的组合物,其中所述盒被插入在SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:7中的位置7544处。

107. 如权利要求102-106所述的组合物,其中所述盒的插入提供了包含nsP1-4基因和至少一种核酸序列的多顺反子RNA的转录,其中所述nsP1-4基因和用于递送的所述至少一种核酸序列在单独的开放阅读框中。

108. 如上述权利要求中任一项所述的组合物、混合物或方法,其中所述ssRNA载体包含至少一种启动子核苷酸序列。

109. 如权利要求108中任一项所述的组合物、混合物或方法,其中所述至少一种启动子核苷酸序列包含由所述自复制RNA病毒编码的原生启动子核苷酸序列,任选地其中所述原生启动子核苷酸序列是亚基因组启动子核苷酸序列。

110. 如权利要求108中任一项所述的组合物、混合物或方法,其中所述至少一种启动子核苷酸序列是外源RNA启动子。

111. 如上述权利要求中任一项所述的组合物、混合物或方法,其中所述ssRNA载体包含第二启动子序列,任选地其中所述第二启动子核苷酸序列是亚基因组启动子核苷酸序列。

112. 如权利要求111所述的组合物、混合物或方法,其中所述第二启动子核苷酸序列包

含多个亚基因组启动子核苷酸序列,其中每个亚基因组启动子核苷酸序列提供所述单独的开放阅读框中的一者或多者的转录。

113. 如上述权利要求中任一项所述的组合物、混合物或方法,其中所述至少一种抗原编码核酸序列包含两种或更多种抗原编码核酸序列。

114. 如权利要求113所述的组合物,其中每种抗原编码核酸序列彼此直接连接。

115. 如上述权利要求中任一项所述的组合物、混合物或方法,其中每种抗原编码核酸序列用编码接头的核酸序列连接至不同的抗原编码核酸序列。

116. 如权利要求115所述的组合物,其中所述接头将两个MHC I类表位编码核酸序列或一个MHC I类表位编码核酸序列连接至一个MHC II类表位编码核酸序列。

117. 如权利要求116所述的组合物,其中所述接头选自由以下各项组成的组:(1)连续甘氨酸残基,长度为至少2、3、4、5、6、7、8、9或10个残基;(2)连续丙氨酸残基,长度为至少2、3、4、5、6、7、8、9或10个残基;(3)两个精氨酸残基(RR);(4)丙氨酸、丙氨酸、酪氨酸(AAY);(5)由哺乳动物蛋白酶体有效加工的长度为至少2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸残基的共有序列;和(6)侧接源自同源蛋白的抗原并且长度为至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20个或2-20个氨基酸残基的一种或多种原生序列。

118. 如权利要求116所述的组合物,其中所述接头包含一种或多种原生序列,所述原生序列侧接源自来源同源蛋白的抗原并且长度为至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20个或2-20个氨基酸残基。

119. 如权利要求115所述的组合物,其中所述接头将两个MHCII类表位编码核酸序列或一个MHC II类序列连接至一个MHC I类表位编码核酸序列。

120. 如权利要求119所述的组合物,其中所述接头包含序列GPPGG。

121. 如上述权利要求中任一项所述的组合物、混合物或方法,其中所述抗原编码核酸序列可操作地或直接地连接至增强所述表位编码核酸序列的表达、稳定性、细胞运输、加工和呈递和/或免疫原性的单独或连续的序列。

122. 如权利要求121所述的组合物,其中所述单独或连续的序列包含以下中的至少一者:泛素序列、经修饰以增加蛋白酶体靶向的泛素序列(例如,所述泛素序列在位置76处含有Gly至Ala取代)、免疫球蛋白信号序列(例如,IgK)、主要组织相容性I类序列、溶酶体相关膜蛋白(LAMP)-1、人树突状细胞溶酶体相关膜蛋白和主要组织相容性II类序列;任选地其中所述经修饰以增加蛋白酶体靶向的泛素序列是A76。

123. 如上述权利要求中任一项所述的组合物、混合物或方法,其中所述至少一种抗原编码核酸序列包含至少2-10、2、3、4、5、6、7、8、9或10种抗原编码核酸序列,任选地其中每种抗原编码核酸序列编码不同的抗原编码核酸序列。

124. 如上述权利要求中任一项所述的组合物、混合物或方法,其中所述至少一种抗原编码核酸序列包含至少11-20、15-20、11-100、11-200、11-300、11-400、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或至多400种抗原编码核酸序列,任选地其中每种抗原编码核酸序列编码不同的抗原编码核酸序列。

125. 如上述权利要求中任一项所述的组合物、混合物或方法,其中所述至少一种抗原编码核酸序列包含至少11-20、15-20、11-100、11-200、11-300、11-400、11、12、13、14、15、

16、17、18、19、20或至多400种抗原编码核酸序列。

126. 如上述权利要求中任一项所述的组合物、混合物或方法,其中所述至少一种抗原编码核酸序列包含至少2-400种抗原编码核酸序列,并且其中所述抗原编码核酸序列中的至少两者编码由MHC I类呈递在细胞表面上的表位序列或其部分。

127. 如上述权利要求中任一项所述的组合物、混合物或方法,其中每种抗原编码核酸序列独立地包含至少2-10、2、3、4、5、6、7、8、9或10种表位编码核酸序列,任选地其中每种表位编码核酸序列编码不同的表位编码核酸序列。

128. 如上述权利要求中任一项所述的组合物、混合物或方法,其中每种抗原编码核酸序列独立地包含至少11-20、15-20、11-100、11-200、11-300、11-400、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或至多400种表位编码核酸序列,任选地其中每种表位编码核酸序列编码不同的表位编码核酸序列。

129. 如上述权利要求中任一项所述的组合物、混合物或方法,其中每种抗原编码核酸序列独立地包含至少11-20、15-20、11-100、11-200、11-300、11-400、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或至多400种表位编码核酸序列。

130. 如上述权利要求中任一项所述的组合物、混合物或方法,其中每种抗原编码核酸序列独立地包含至少2-400种表位编码核酸序列,并且其中所述表位编码核酸序列中的至少两者编码由MHC I类呈递在细胞表面上的表位序列或其部分。

131. 如74所述的组合物,其中所述MHC I类表位中的至少两者由MHC I类呈递在细胞表面、任选地肿瘤细胞表面或受感染细胞表面上。

132. 如上述权利要求中任一项所述的组合物、混合物或方法,其中所述表位编码核酸序列包含至少一种MHC I类表位编码核酸序列,并且其中每种抗原编码核酸序列编码长度为8至35个氨基酸,任选地长度为9-17、9-25、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34或35个氨基酸的多肽序列。

133. 如权利要求71-73或83-132中任一项所述的组合物,其中存在所述至少一种MHC II类表位编码核酸序列。

134. 如权利要求71-73或83-132中任一项所述的组合物,其中所述至少一种MHC II类表位编码核酸序列存在并包含至少一种MHC II类表位编码核酸序列,所述MHC II类表位编码核酸序列包含使所编码的表位序列与由野生型核酸序列编码的相应肽序列不同的至少一种改变。

135. 如上述权利要求中任一项所述的组合物、混合物或方法,其中所述表位编码核酸序列包含MHC II类表位编码核酸序列,并且其中每种抗原编码核酸序列编码长度为12-20、12、13、14、15、16、17、18、19、20或20-40个氨基酸的多肽序列。

136. 如上述权利要求中任一项所述的组合物、混合物或方法,其中所述表位编码核酸序列包含MHC II类表位编码核酸序列,其中存在至少一种MHC II类表位编码核酸序列,并且其中所述至少一种MHC II类表位编码核酸序列包含至少一种通用MHC II类表位编码核酸序列,任选地其中所述至少一种通用序列包含破伤风类毒素和PADRE中的至少一者。

137. 如上述权利要求中任一项所述的组合物、混合物或方法,其中所述至少一种启动子核苷酸序列或所述第二启动子核苷酸序列是诱导型的。

138. 如上述权利要求中任一项所述的组合物、混合物或方法,其中所述至少一种启动

子核苷酸序列或所述第二启动子核苷酸序列是非诱导型的。

139. 如上述权利要求中任一项所述的组合物、混合物或方法,其中所述聚(A)序列包含所述自复制病毒原生的聚(A)序列。

140. 如上述权利要求中任一项所述的组合物、混合物或方法,其中所述至少一种聚(A)序列包含所述自复制病毒外源的聚(A)序列。

141. 如上述权利要求中任一项所述的组合物、混合物或方法,其中所述至少一种聚(A)序列可操作地连接至所述至少一种核酸序列中的至少一者。

142. 如上述权利要求中任一项所述的组合物、混合物或方法,其中所述至少一种聚(A)序列是至少20个、至少30个、至少40个、至少50个、至少60个、至少70个、至少80个、至少90个、至少100个、至少110个或至少120个连续A核苷酸。

143. 如上述权利要求中任一项所述的组合物、混合物或方法,其中所述至少一种聚(A)序列是至少80个连续A核苷酸。

144. 如上述权利要求中任一项所述的组合物、混合物或方法,其中所述表位编码核酸序列包含MHC I类表位编码核酸序列,并且其中所述MHC I类表位编码核酸序列是通过执行以下步骤来选择的:

(a) 从肿瘤、受感染细胞或感染性疾病生物体获得外显子组、转录组或全基因组核苷酸测序数据中的至少一者,其中所述核苷酸测序数据用于获得代表一组表位中的每一者的肽序列的数据;

(b) 将每个表位的肽序列输入到呈递模型中,以产生所述表位中的每一者由MHC等位基因中的一者或多者在细胞表面、任选地肿瘤细胞表面或受感染细胞表面上呈递的数值可能性集合,所述数值可能性集合已至少基于所接收的质谱数据进行鉴定;以及

(c) 基于所述数值可能性集合选择所述表位集合的子集以产生经选择表位集合,所述经选择表位用于产生所述MHC I类表位编码核酸序列。

145. 如权利要求74所述的组合物,其中所述MHC I类表位编码核酸序列中的每一者是通过执行以下步骤来选择:

(a) 从肿瘤、受感染细胞或感染性疾病生物体获得外显子组、转录组或全基因组核苷酸测序数据中的至少一者,其中所述核苷酸测序数据用于获得代表一组表位中的每一者的肽序列的数据;

(b) 将每个表位的肽序列输入到呈递模型中,以产生所述表位中的每一者由MHC等位基因中的一者或多者在细胞表面、任选地肿瘤细胞表面或受感染细胞表面上呈递的数值可能性集合,所述数值可能性集合已至少基于所接收的质谱数据进行鉴定;以及

(c) 基于所述数值可能性集合选择所述表位集合的子集以产生经选择表位集合,所述经选择表位用于产生至少20种MHC I类表位编码核酸序列。

146. 如权利要求144所述的组合物,其中所述经选择表位集合的数目为2-20。

147. 如权利要求144-146中任一项所述的组合物,其中所述呈递模型表示以下两者之间的依赖性:

(a) 所述MHC等位基因中的特定一者和在肽序列的特定位置处的特定氨基酸的一对的存在;和

(b) 由所述对的MHC等位基因中的所述特定一者将在所述特定位置处包含所述特定氨

基酸的所述肽序列呈递在细胞表面、任选地肿瘤细胞表面或受感染细胞表面上的可能性。

148. 如权利要求144-147中任一项所述的组合物,其中选择所述经选择表位集合包括基于所述呈递模型选择相对于未选择的表位被呈递在细胞表面、任选地肿瘤细胞表面或受感染细胞表面上的可能性增加的表位。

149. 如权利要求144-148中任一项所述的组合物,其中选择所述经选择表位集合包括基于所述呈递模型选择相对于未选择的表位能够在受试者中刺激肿瘤特异性或感染性疾病生物体特异性免疫响应的可能性增加的表位。

150. 如权利要求144-149中任一项所述的组合物,其中选择所述经选择表位集合包括基于所述呈递模型选择相对于未选择的表位能够由专职抗原呈递细胞(APC)呈递给初始T细胞的可能性增加的表位,任选地其中所述APC是树突状细胞(DC)。

151. 如权利要求144-150中任一项所述的组合物,其中选择所述经选择表位集合包括基于所述呈递模型选择相对于未选择的表位经由中心或外周耐受性受抑制的可能性降低的表位。

152. 如权利要求144-151中任一项所述的组合物,其中选择所述经选择表位集合包括基于所述呈递模型选择相对于未选择的表位能够在受试者中刺激对正常组织的自身免疫响应的可能性降低的表位。

153. 如权利要求144-152中任一项所述的组合物,其中外显子组或转录组核苷酸测序数据是通过肿瘤细胞或组织、受感染细胞或感染性疾病生物体进行测序而获得的。

154. 如权利要求153所述的组合物,其中所述测序是下一代测序(NGS)或任何大规模并行测序方法。

155. 如上述权利要求中任一项所述的组合物、混合物或方法,其中用于递送所述自扩增表达系统的所述组合物作为初免疫苗施用。

156. 如上述权利要求中任一项所述的组合物、混合物或方法,其中所述方法还包括施用第二组合物,任选地其中所述第二组合物是疫苗组合物。

157. 如权利要求156所述的方法,其中所述第二组合物是在用于递送所述自扩增表达系统的所述组合物之前施用的。

158. 如权利要求156所述的方法,其中所述第二组合物是在施用用于递送所述自扩增表达系统的所述组合物之后施用的。

159. 如权利要求156-158中任一项所述的方法,其中所述第二组合物与用于递送所述自扩增表达系统的所述组合物相同。

160. 如权利要求156-158中任一项所述的方法,其中所述第二组合物与用于递送所述自扩增表达系统的所述组合物不同。

161. 如权利要求160所述的方法,其中所述第二组合物包含所述自扩增表达系统的盒,任选地其中所述第二组合物包含编码所述自扩增表达系统的盒的黑猩猩腺病毒载体。

162. 如权利要求156-161中任一项所述的方法,其中施用两种或更多种第二组合物,任选地其中用于递送所述自扩增表达系统的所述组合物作为初免疫苗施用。

163. 如上述权利要求中任一项所述的方法,其中用于递送所述自扩增表达系统的所述组合物是肌内(IM)、皮内(ID)、皮下(SC)、玻璃体内(IVT)、鞘内或静脉内(IV)施用的。

164. 如上述权利要求中任一项所述的方法,其中所述方法还包括施用免疫调节剂,任

选地其中所述免疫调节剂是抗CTLA4抗体或其抗原结合片段、抗PD-1抗体或其抗原结合片段、抗PD-L1抗体或其抗原结合片段、抗4-1BB抗体或其抗原结合片段、抗OX-40抗体或其抗原结合片段、或细胞因子,任选地其中所述细胞因子是IL-2、IL-7、IL-12、IL-15或IL-21或其变体中的至少一者。

165. 如上述权利要求中任一项所述的方法,其中所述方法还包括施用佐剂。

自扩增RNA组合物及其使用方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求11月8日提交的美国临时申请第63/277,116号的权益,所述临时申请出于所有目的特此以引用的方式整体并入。

[0003] 序列表

[0004] 本申请含有已经以电子方式以ASCII格式提交并且特此以引用的方式整体并入的序列表。所述ASCII副本创建于####,命名为####,并且大小为###字节。

背景技术

[0005] 编码用于治疗应用的生理上重要的蛋白质的信使RNA (mRNA),与基于DNA的质粒和病毒载体相比,在递送遗传物质方面显示出显著优势。然而,基于mRNA的疗法可能存在潜在缺点,例如脱靶刺激先天性免疫响应,这可能会干扰治疗功效。

[0006] 因此,业界需要改进的mRNA疗法和生产方法。

发明内容

[0007] 本文提供了用于递送包含单链RNA (ssRNA) 载体的自扩增表达系统的组合物,其中所述ssRNA载体包含7-甲基鸟苷酸 (m⁷G帽)、聚腺苷酸化 (聚A) 尾、自扩增骨架以及一种或多种经修饰核苷,其中所述一种或多种经修饰核苷包括m5C并且不包括其他经修饰核苷酸,任选地除了m⁷G帽类似物之外。

[0008] 本文还提供了用于递送包含单链RNA (ssRNA) 载体的自扩增表达系统的组合物,其中所述ssRNA载体包括7-甲基鸟苷酸 (m⁷G帽)、聚腺苷酸化 (聚A) 尾、自扩增骨架和一种或多种经修饰核苷。

[0009] 在一些方面,自扩增骨架包括选自自复制RNA病毒的多核苷酸。在一些方面,自复制RNA病毒选自包括甲病毒、黄病毒、麻疹病毒和弹状病毒的组。

[0010] 在一些方面,一种或多种经修饰核苷包括甲基-5-胞嘧啶 (m5C)、甲基-6-腺苷 (m6A)、核糖-甲基化 (2'-O-Me)、s-硫尿苷 (s2U)、5-甲基尿苷 (m5U)、N1-甲基假尿苷 (m1Ψ)、假尿苷 (Ψ) 或其任何组合。在一些方面,一种或多种经修饰核苷包括m5C。在一些方面,一种或多种经修饰核苷包括m5C并且不包括其他经修饰核苷酸,任选地除了m⁷G帽类似物之外。

[0011] 在一些方面,ssRNA载体是纯化的。在一些方面,ssRNA载体通过色谱来纯化。在一些方面,色谱包括纤维素色谱系统或基于亲和力的分离系统。在一些方面,基于亲和力的分离系统是脱氧胸苷 (dT) 寡核苷酸 (Oligo (dT)) 系统。

[0012] 在一些方面,ssRNA载体大于10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或100%的腺嘌呤、鸟嘌呤、胞苷和/或尿苷核苷是经修饰核苷。在一些方面,ssRNA载体大于25%的腺苷、鸟苷、胞苷和/或尿苷核苷包含经修饰核苷。在一些方面,ssRNA载体的100%的腺嘌呤、鸟嘌呤、胞苷和/或尿苷核苷包含经修饰核苷。在一些方面,ssRNA载体包含10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或100%的胞苷核苷包含经修饰核苷。在一些方面,ssRNA载体中大于25%的胞苷核苷包含经修饰核苷。在一

些方面,ssRNA包含100%的胞苷核苷是经修饰核苷。

[0013] 在一些方面,组合物包含小于30%、小于25%、小于20%、小于15%、小于10%、小于5%、小于2%、小于1%、小于0.5%、或小于0.1%的污染物。在一些方面,污染物包括盐、洗涤剂和/或双链RNA(dsRNA)。在一些方面,污染物包括dsRNA。

[0014] 在一些方面,ssRNA载体占组合物中存在的总RNA的70%或更多、80%或更多、85%或更多、90%或更多、或95%或更多。在一些方面,ssRNA载体占组合物中存在的总RNA的97%或更多、98%或更多、99%或更多、或99.5%或更多。在一些方面,ssRNA载体是组合物中存在的唯一RNA种类。在一些方面,总RNA、dsRNA和/或ssRNA含量通过斑点印迹或ELISA来评估,任选地其中斑点印迹或ELISA评估包括用对RNA、dsRNA和/或ssRNA具有特异性的抗体进行检测。在一些方面,总RNA、dsRNA和/或ssRNA含量通过毛细管电泳来评估。在一些方面,总RNA、dsRNA和/或ssRNA含量通过液相色谱来评估。在一些方面,RNA、dsRNA和/或ssRNA含量被量化为曲线下面积(AUC)。

[0015] 在一些方面,ssRNA载体通过体外转录产生。在一些方面, m^7G 帽包含 m^7G 帽类似物。在一些方面, m^7G 帽类似物包括三核苷酸 m^7G -ppp-A-U帽类似物或二核苷酸 m^7G -ppp-A帽类似物。

[0016] 在一些方面,ssRNA载体包含盒,所述盒包含至少一种用于递送的核酸序列,任选地其中所述至少一种核酸序列包含多肽编码核酸序列,任选地其中所述多肽编码核酸序列是抗原编码核酸序列,并且其中所述盒可操作地连接至自扩增骨架或可操作地插入至自扩增骨架中。

[0017] 在一些方面,自扩增骨架包含选自自复制RNA病毒的多核苷酸,其包含至少一种由下式从5'至3'描述的核酸序列:

[0018] m^7G -ppp- N_1 - N_2 - N_v ,其中

[0019] m^7G 是7-甲基鸟苷酸(m^7G)帽,

[0020] ppp是三磷酸桥,

[0021] N_1 是所述自扩增骨架的第一核苷酸,对应于所述自复制RNA病毒的第一内源性5'核苷酸,

[0022] N_2 是所述自扩增骨架的第二核苷酸,对应于所述自复制RNA病毒的第二内源性5'核苷酸,并且

[0023] N_v 包含(1)所述自扩增骨架的一种或多种额外核酸序列,以及(2)包含至少一种用于递送的核酸序列的盒,任选地其中所述至少一种核酸序列包含多肽编码核酸序列,任选地其中所述多肽编码核酸序列是抗原编码核酸序列,并且其中所述盒可操作地连接至所述自扩增骨架或可操作地插入至所述自扩增骨架中。

[0024] 在一些方面,组合物还包含纳米粒子递送媒介物。在一些方面,纳米粒子递送媒介物是脂质纳米粒子(LNP)。

[0025] 本文还提供了药物组合物,其包含本文所述的任一种组合物和药学上可接受的载剂。

[0026] 本文还提供了用于治疗患有疾病的受试者的方法,所述方法包括向受试者施用一定量的本文所述的任一种组合物或本文所述的任一种药物组合物。在一些方面,所述疾病是癌症或感染性疾病。在一些方面,感染性疾病由选自包括以下的组的病毒引起:HPV、流

感、TB、CMV、HMPV、PIV、基孔肯雅病毒(chikungunya virus)、寨卡病毒(Zika virus)、SARS-CoV-2和泛冠状病毒。

[0027] 在一些方面,组合物中ssRNA载体的量为1000 μ g或更少、100 μ g或更少、50 μ g或更少、30 μ g或更少、10 μ g或更少、5 μ g或更少、或1 μ g或更少。

[0028] 在一些方面,与接受包含不含经修饰核苷的核酸序列的对照受试者相比,受试者中的先天性免疫响应降低。在一些方面,先天性免疫响应是IFN响应。在一些方面,IFN响应是IRF-3表达、IRF-7表达或其组合。

[0029] 在一些方面,与包含另外相同的ssRNA载体但不包含经修饰核苷的对照组合物相比,ssRNA载体的复制增加。

[0030] 本文还提供了从核酸混合物中纯化自扩增表达系统的方法,所述方法包括通过纤维素色谱系统或基于亲和力的分离系统纯化所述自扩增表达系统,其中所述自扩增表达系统包含单链RNA(ssRNA)载体,并且其中所述ssRNA载体包含m⁷G帽、聚A尾和自扩增骨架。

[0031] 本文还提供了一种减少核酸混合物中的双链RNA(dsRNA)的方法,所述方法包括:

[0032] (A) 通过纤维素色谱系统或基于亲和力的分离系统纯化所述自扩增表达系统;和/或

[0033] (B) 产生所述自扩增表达系统,使得所述自扩增表达系统包含经修饰核苷;并且

[0034] 其中所述自扩增表达系统包含单链RNA(ssRNA)载体,其中所述ssRNA载体包含m⁷G帽、聚A尾和自扩增骨架。

[0035] 在一些方面,基于亲和力的分离系统包括脱氧胸苷(dT)寡核苷酸(Oligo(dT))系统。在一些方面,ssRNA载体包含经修饰核苷。在一些方面,经修饰核苷包括甲基-5-胞嘧啶(m5C)、甲基-6-腺苷(m6A)、核糖-甲基化(2'-O-Me)、s-硫尿苷(s2U)、5-甲基尿苷(m5U)、N1-甲基假尿苷(m1 Ψ)、假尿苷(Ψ)或其任何组合。在一些方面,经修饰核苷由甲基-5-胞嘧啶(m5C)组成。

[0036] 本文还提供了一种组合物混合物,其中所述组合物包含自扩增表达系统,其包含:

[0037] (a) 单链RNA(ssRNA)载体,其中所述ssRNA载体包含m⁷G帽、聚腺苷酸化(聚A)尾和自扩增骨架;以及

[0038] (b) 双链RNA(dsRNA),并且

[0039] 其中所述dsRNA占所述混合物中存在的总RNA的小于20%、小于10%、小于5%、小于2%、小于1%、小于0.5%或小于0.1%。

[0040] 本文还提供了一种组合物混合物,其中所述组合物包含自扩增表达系统,其包含:

[0041] (a) 单链RNA(ssRNA)载体,其中所述ssRNA载体包含m⁷G帽、聚腺苷酸化(聚A)尾和自扩增骨架;以及

[0042] (b) 双链RNA(dsRNA),并且

[0043] 其中所述ssRNA载体占所述混合物中存在的总RNA的70%或更多、80%或更多、85%或更多、90%或更多、95%或更多、97%或更多、98%或更多、99%或更多、或99.5%或更多。

[0044] 在一些方面,唯一可检测的RNA包含ssRNA载体。在一些方面,总RNA、dsRNA和/或ssRNA含量通过斑点印迹或ELISA来评估,任选地其中斑点印迹或ELISA评估包括用对RNA、dsRNA和/或ssRNA具有特异性的抗体进行检测。在一些方面,总RNA、dsRNA和/或ssRNA含量

通过毛细管电泳来评估。在一些方面,总RNA、dsRNA和/或ssRNA含量通过液相色谱来评估。在一些方面,dsRNA和/或ssRNA含量被量化为曲线下面积(AUC)。

[0045] 在一些方面,ssRNA通过体外转录产生。在一些方面, m^7G 帽包含 m^7G 帽类似物。在一些方面, m^7G 帽类似物包括三核苷酸 m^7G -ppp-A-U帽类似物或二核苷酸 m^7G -ppp-A帽类似物。

[0046] 在一些方面,ssRNA载体包含盒,所述盒包含至少一种用于递送的核酸序列,任选地其中所述至少一种核酸序列包含多肽编码核酸序列,任选地其中所述多肽编码核酸序列是抗原编码核酸序列,并且其中所述盒可操作地连接至自扩增骨架或可操作地插入至自扩增骨架中。在一些方面,自扩增骨架包含选自自复制RNA病毒的多核苷酸,其包含至少一种由下式从5'至3'描述的核酸序列:

[0047] m^7G -ppp- N_1 - N_2 - N_V ,其中

[0048] m^7G 是7-甲基鸟苷酸(m^7G)帽,

[0049] ppp是三磷酸桥,

[0050] N_1 是所述自扩增骨架的第一核苷酸,对应于所述自复制RNA病毒的第一内源性5'核苷酸,

[0051] N_2 是所述自扩增骨架的第二核苷酸,对应于所述自复制RNA病毒的第二内源性5'核苷酸,并且

[0052] N_V 包含(1)所述自扩增骨架的一种或多种额外核酸序列,以及(2)包含至少一种用于递送的核酸序列的盒,任选地其中所述至少一种核酸序列包含多肽编码核酸序列,任选地其中所述多肽编码核酸序列是抗原编码核酸序列,并且其中所述盒可操作地连接至所述自扩增骨架或可操作地插入至所述自扩增骨架中。

[0053] 在一些方面,ssRNA载体包含一种或多种经修饰核苷。在一些方面,一种或多种经修饰核苷包括甲基-5-胞嘧啶(m5C)、甲基-6-腺苷(m6A)、核糖-甲基化(2'-O-Me)、s-硫尿苷(s2U)、5-甲基尿苷(m5U)、N1-甲基假尿苷(m1 Ψ)、假尿苷(Ψ)或其任何组合。在一些方面,一种或多种经修饰核苷包括m5C。在一些方面,一种或多种经修饰核苷包括m5C并且不包括其他经修饰核苷酸,任选地除了帽类似物之外。

[0054] 在一些方面,ssRNA载体是纯化的。在一些方面,ssRNA载体通过色谱来纯化。在一些方面,色谱包括纤维素色谱系统或基于亲和力的分离系统。在一些方面,基于亲和力的分离系统是脱氧胸苷(dT)寡核苷酸(Oligo(dT))系统

[0055] 在一些方面,用于递送自扩增表达系统的组合物包含:

[0056] (A)所述自扩增表达系统,其中所述自扩增表达系统包含一种或多种自扩增mRNA(SAM)载体,其中所述一种或多种SAM载体包含:

[0057] (a)所述自扩增骨架,其中所述自扩增骨架包含以SEQ ID NO:6所示的核酸序列,其中所述自扩增骨架序列包含亚基因组启动子核苷酸序列和聚(A)序列,其中所述亚基因组启动子序列对于所述自复制RNA病毒是内源的,其中所述聚(A)序列对于所述自复制RNA病毒骨架是内源的;和

[0058] (b)整合在所述亚基因组启动子核苷酸序列与所述聚(A)序列之间的盒,其中所述盒可操作地连接至所述亚基因组启动子核苷酸序列,并且任选地其中所述盒包含至少一种抗原编码核酸序列,所述抗原编码核酸序列包含:

[0059] a.表位编码核酸序列,任选地包含:(1)使所编码的表位序列与由野生型核酸序列

编码的相应肽序列不同的至少一种改变,或(2)编码感染性疾病生物体肽的核酸序列,所述肽选自以下各项组成的组:病原体衍生肽、病毒衍生肽、细菌衍生肽、真菌衍生肽和寄生虫衍生肽,

[0060] b.任选的5'接头序列,和

[0061] c.任选的3'接头序列;和

[0062] (B)任选地,脂质纳米粒子(LNP),其中所述LNP包封自扩增表达系统。

[0063] 在一些方面,用于递送所述自扩增表达系统的所述组合物中的所述盒的每个元件的有序序列描述于下式,从5'至3'包含:

[0064] $P_a - (L5_b - N_c - L3_d)_X - (G5_e - U_f)_Y - G3_g$

[0065] 其中P包含第二启动子核苷酸序列,其中a=0或1,

[0066] N包含表位编码核酸序列之一,其中所述表位编码核酸序列包含MHC I类表位编码核酸序列,其中c=1,

[0067] L5包含5'接头序列,其中b=0或1,

[0068] L3包含3'接头序列,其中d=0或1,

[0069] G5包含编码GPPGG氨基酸接头的至少一种核酸序列之一,其中e=0或1,

[0070] G3包含编码GPPGG氨基酸接头的至少一种核酸序列之一,其中g=0或1,

[0071] U包含至少一种MHC II类表位编码核酸序列之一,其中f=1,

[0072] X=1至400,其中对于每个X,相应的 N_c 是MHC I类表位编码核酸序列,并且

[0073] Y=0、1或2,其中对于每个Y,相应的 U_f 是MHC II类表位编码核酸序列。

[0074] 在一些方面,对于每个X,相应的 N_c 是不同的MHC I类表位编码核酸序列。在一些方面,对于每个Y,相应的 U_f 是不同的MHC II类表位编码核酸序列。

[0075] 在一些方面,a=0,b=1,d=1,e=1,g=1,h=1,X=10,Y=2,所述至少一种启动子核苷酸序列是由所述自扩增骨架提供的单个亚基因组启动子核苷酸序列,所述至少一种聚腺苷酸化聚(A)序列是由所述自扩增骨架提供的至少80个连续A核苷酸的聚(A)序列,所述盒整合在所述亚基因组启动子核苷酸序列和所述聚(A)序列之间,其中所述盒可操作地连接至所述亚基因组启动子核苷酸序列和所述聚(A)序列,每个N编码长度为7-15个氨基酸的MHC I类表位,L5是编码所述MHC I表位的原生N末端氨基酸序列的原生5'接头序列,并且其中所述5'接头序列编码长度为至少3个氨基酸的肽,L3是编码所述MHC I表位的原生C末端氨基酸序列的原生3'接头序列,并且其中所述3'接头序列编码长度为至少3个氨基酸的肽,U是PADRE II类序列和破伤风类毒素MHC II类序列中的每一者,所述自扩增骨架是以SEQ ID NO:6所示的序列,并且所述MHC I类表位编码核酸序列中的每一者编码长度为13至25个氨基酸的多肽。

[0076] 在一些方面,用于递送的至少一种核酸序列包含多肽编码核酸序列。在一些方面,所述多肽编码核酸序列编码抗原编码核酸序列。在一些方面,所述抗原编码核酸序列包含MHC I类表位、MHC II类表位、能够刺激B细胞响应的表位或其组合。在一些方面,所述抗原编码核酸序列包含编码全长蛋白质、蛋白质亚基、蛋白质结构域或其组合的序列。在一些方面,所述多肽编码核酸序列编码全长蛋白质或其功能部分。在一些方面,所述全长蛋白质或其功能部分选自以下各项组成的组:抗体、细胞因子、嵌合抗原受体(CAR)、T细胞受体和基因组编辑系统核酸酶。

[0077] 在一些方面,用于递送的至少一种核酸序列包含至少一种包含非编码核酸序列的核酸序列。在一些方面,所述非编码核酸序列是RNA干扰(RNAi)多核苷酸或基因组编辑系统多核苷酸。

[0078] 在一些方面,所述LNP包含选自由以下各项组成的组的脂质:可电离氨基脂质、磷脂酰胆碱、胆固醇、基于PEG的外壳脂质或其组合。在一些方面,所述LNP包含可电离氨基脂质、磷脂酰胆碱、胆固醇和基于PEG的外壳脂质。在一些方面,所述可电离氨基脂质包含MC3样(二亚油醇甲基-4-二甲基氨基丁酸酯)分子。在一些方面,LNP包封的表达系统的直径在60-140nm之间。

[0079] 在一些方面,用于递送所述自扩增表达系统的所述组合物被配制用于肌肉(IM)、皮内(ID)、皮下(SC)、玻璃体内(IVT)、鞘内或静脉内(IV)施用。在一些方面,用于递送所述自扩增表达系统的所述组合物被配制用于肌肉(IM)施用。

[0080] 在一些方面,所述盒整合在所述至少一种启动子核苷酸序列和所述至少一种聚(A)序列之间。在一些方面,所述至少一种启动子核苷酸序列可操作地连接至所述盒。

[0081] 在一些方面,ssRNA载体包含正链RNA载体。在一些方面,ssRNA载体包含负链RNA载体。在一些方面,负链RNA载体包含麻疹病毒或弹状病毒的至少一种多核苷酸序列。在一些方面,ssRNA载体在哺乳动物细胞内自扩增。在一些方面,所述自复制RNA病毒选自由以下各项组成的组:甲病毒;黄病毒、麻疹病毒和弹状病毒。在一些方面,所述自扩增骨架包含甲病毒的至少一种多核苷酸序列,任选地其中所述甲病毒选自由以下各项组成的组:奥拉病毒(Aura virus)、摩根堡病毒(Fort Morgan virus)、委内瑞拉马脑炎病毒(Venezuelan equine encephalitis virus)、罗斯河病毒(Ross River virus)、塞姆利基森林病毒(Semiliki Forest virus)、辛德毕斯病毒(Sindbis virus)和马雅罗病毒(Mayaro virus)。在一些方面,所述自扩增骨架包含委内瑞拉马脑炎病毒的至少一种核苷酸序列。在一些方面,所述自扩增骨架至少包含由所述奥拉病毒、所述摩根堡病毒、所述委内瑞拉马脑炎病毒、所述罗斯河病毒、所述塞姆利基森林病毒、所述辛德毕斯病毒或所述马雅罗病毒的核苷酸序列编码的用于非结构蛋白介导的扩增的序列、亚基因组启动子序列、聚(A)序列、非结构蛋白1(nsP1)基因、nsP2基因、nsP3基因和nsP4基因。在一些方面,所述自扩增骨架至少包含由所述奥拉病毒、所述摩根堡病毒、所述委内瑞拉马脑炎病毒、所述罗斯河病毒、所述塞姆利基森林病毒、所述辛德毕斯病毒或所述马雅罗病毒的核苷酸序列编码的用于非结构蛋白介导的扩增的序列、亚基因组启动子序列和聚(A)序列。在一些方面,所述用于非结构蛋白介导的扩增的序列选自由以下各项组成的组:甲病毒5' UTR、51-nt CSE、24-nt CSE、26S亚基因组启动子序列、19-nt CSE、甲病毒3' UTR或其组合。在一些方面,所述自扩增骨架不编码结构性病毒粒子蛋白衣壳E2和E1,任选地其中E1是全长E1,或不编码结构性病毒粒子蛋白衣壳E3、E2、6K。在一些方面,所述盒被插入以代替所述奥拉病毒、所述摩根堡病毒、所述委内瑞拉马脑炎病毒、所述罗斯河病毒、所述塞姆利基森林病毒、所述辛德毕斯病毒或所述马雅罗病毒的多核苷酸序列内的结构性病毒粒子蛋白。在一些方面,所述委内瑞拉马脑炎病毒包含SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:5的序列。在一些方面,所述委内瑞拉马脑炎病毒包含SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:5的序列,其还包含碱基对7544和11175之间的缺失。在一些方面,所述自扩增骨架包含以SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:7所示的序列。在一些方面,所述盒被插入在SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:7中的位置7544处。在一些方面,所述盒的插入提供了

包含nsP1-4基因和至少一种核酸序列的多顺反子RNA的转录,其中所述nsP1-4基因和所述用于递送的至少一种核酸序列在单独的开放阅读框中。

[0082] 在一些方面,ssRNA载体包含至少一种启动子核苷酸序列。在一些方面,至少一种启动子核苷酸序列包括由自复制RNA病毒编码的原生启动子核苷酸序列,任选地其中所述原生启动子核苷酸序列是亚基因组启动子核苷酸序列。在一些方面,至少一种启动子核苷酸序列是外源RNA启动子。在一些方面,ssRNA载体包含第二启动子序列,任选地其中第二启动子核苷酸序列是亚基因组启动子核苷酸序列。在一些方面,所述第二启动子核苷酸序列包含多个亚基因组启动子核苷酸序列,其中每个亚基因组启动子核苷酸序列提供所述单独的开放阅读框中的一者或多者的转录。

[0083] 在一些方面,ssRNA载体的大小为至少300nt。在一些方面,ssRNA载体的大小为至少1kb。在一些方面,ssRNA载体的大小为至少2kb。在一些方面,ssRNA载体的大小为小于5kb。

[0084] 在一些方面,至少一种抗原编码核酸序列包含两种或更多种抗原编码核酸序列。在一些方面,每种抗原编码核酸序列彼此直接连接。在一些方面,每种抗原编码核酸序列通过编码接头的核酸序列与不同的抗原编码核酸序列连接。在一些方面,接头将两个MHC I类表位编码核酸序列或一个MHC I类表位编码核酸序列连接至一个MHC II类表位编码核酸序列。在一些方面,接头选自由以下各项组成的组:(1)连续甘氨酸残基,长度为至少2、3、4、5、6、7、8、9或10个残基;(2)连续丙氨酸残基,长度为至少2、3、4、5、6、7、8、9或10个残基;(3)两个精氨酸残基(RR);(4)丙氨酸、丙氨酸、酪氨酸(AAY);(5)由哺乳动物蛋白酶体有效加工的长度为至少2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸残基的共有序列;和(6)侧接源自同源蛋白的抗原并且长度为至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20个或2-20个氨基酸残基的一种或多种原生序列。在一些方面,接头包含一种或多种原生序列,所述天然序列侧接自来来源同源蛋白的抗原并且长度为至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20个或2-20个氨基酸残基。在一些方面,接头将两个MHC II类表位编码核酸序列或一个MHC II类序列连接至MHC I类表位编码核酸序列。在一些方面,接头包含序列GPPGG。

[0085] 在一些方面,抗原编码核酸序列可操作地或直接地连接至增强表位编码核酸序列的表达、稳定性、细胞运输、加工和呈递和/或免疫原性的单独或连续的序列。在一些方面,所述单独或连续的序列包含以下至少一者:泛素序列、经修饰以增加蛋白酶体靶向的泛素序列(例如泛素序列在位置76处含有Gly至Ala取代)、免疫球蛋白信号序列(例如IgK)、主要组织相容性I类序列、溶酶体相关膜蛋白(LAMP)-1、人树突细胞溶酶体相关膜蛋白以及主要组织相容性II类序列;任选地其中经修饰以增加蛋白酶体靶向的泛素序列是A76。

[0086] 在一些方面,所述至少一种抗原编码核酸序列包含至少2-10、2、3、4、5、6、7、8、9或10种抗原编码核酸序列,任选地其中每种抗原-编码核酸序列编码不同的抗原编码核酸序列。在一些方面,所述至少一种抗原编码核酸序列包含至少11-20、15-20、11-100、11-200、11-300、11-400、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或至多400种抗原编码核酸序列,任选地其中每种抗原编码核酸序列编码不同的抗原编码核酸序列。在一些方面,所述至少一种抗原编码核酸序列包含至少11-20、15-20、11-100、11-200、11-300、11-400、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或至多400种抗原编码核酸序列。在一些方面,至少一种抗原编码核酸序列

包含至少2-400种抗原编码核酸序列,并且其中所述抗原编码核酸序列中的至少两者编码由MHC I类呈递在细胞表面上的表位序列或其部分。在一些方面,每种抗原编码核酸序列独立地包含至少2-10、2、3、4、5、6、7、8、9或10种表位编码核酸序列,任选地其中每种表位编码核酸序列编码不同的表位编码核酸序列。在一些方面,每种抗原编码核酸序列独立地包含至少11-20、15-20、11-100、11-200、11-300、11-400、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或至多400种表位编码核酸序列,任选地其中每种表位编码核酸序列编码不同的表位编码核酸序列。在一些方面,每种抗原编码核酸序列独立地包含至少11-20、15-20、11-100、11-200、11-300、11-400、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或至多400种表位编码核酸序列。在一些方面,每种抗原编码核酸序列独立地包含至少2-400种表位编码核酸序列,并且其中所述表位编码核酸序列中的至少两者编码由MHC I类呈递在细胞表面上的表位序列或其部分。在一些方面,所述MHC I类表位中的至少两者由MHC I类呈递在细胞表面、任选地肿瘤细胞表面或受感染细胞表面上。

[0087] 在一些方面,所述表位编码核酸序列包含至少一种MHC I类表位编码核酸序列,并且其中每种抗原编码核酸序列编码长度为8至35个氨基酸,任选地长度为9-17、9-25、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34或35个氨基酸的多肽序列。在一些方面,存在至少一种MHC II类表位编码核酸序列。在一些方面,所述至少一种MHC II类表位编码核酸序列存在并包含至少一种MHC II类表位编码核酸序列,所述MHC II类表位编码核酸序列包含使所编码的表位序列与由野生型核酸序列编码的相应肽序列不同的至少一种改变。

[0088] 在一些方面,所述表位编码核酸序列包含MHC II类表位编码核酸序列,并且其中每种抗原编码核酸序列编码长度为12-20、12、13、14、15、16、17、18、19、20或20-40个氨基酸的多肽序列。

[0089] 在一些方面,所述表位编码核酸序列包含MHC II类表位编码核酸序列,其中存在至少一种MHC II类表位编码核酸序列,并且其中所述至少一种MHC II类表位编码核酸序列包含至少一种通用MHC II类表位编码核酸序列,任选地其中所述至少一种通用序列包含破伤风类毒素和PADRE中的至少一者。

[0090] 在一些方面,所述至少一种启动子核苷酸序列或所述第二启动子核苷酸序列是诱导型的。在一些方面,所述至少一种启动子核苷酸序列或所述第二启动子核苷酸序列是非诱导型的。在一些方面,聚(A)序列包含所述自复制病毒原生的聚(A)序列。在一些方面,所述至少一种聚(A)序列包含所述自复制病毒外源的聚(A)序列。在一些方面,所述至少一种聚(A)序列可操作地连接至所述至少一种核酸序列中的至少一者。在一些方面,所述至少一种聚(A)序列是至少20个、至少30个、至少40个、至少50个、至少60个、至少70个、至少80个、至少90个、至少100个、至少110个或至少120个连续A核苷酸。在一些方面,所述至少一种聚(A)序列是至少80个连续A核苷酸。

[0091] 在一些方面,所述表位编码核酸序列包含MHC I类表位编码核酸序列,并且其中所述MHC I类表位编码核酸序列是通过执行以下步骤来选择的:

[0092] (a) 从肿瘤、受感染细胞或感染性疾病生物体获得外显子组、转录组或全基因组核苷酸测序数据中的至少一者,其中所述核苷酸测序数据用于获得代表一组表位中的每一者的肽序列的数据;

[0093] (b) 将每个表位的肽序列输入到呈递模型中,以产生所述表位中的每一者由MHC等位基因中的一者或多者在细胞表面、任选地肿瘤细胞表面或受感染细胞表面上呈递的数值可能性集合,所述数值可能性集合已至少基于所接收的质谱数据进行鉴定;以及

[0094] (c) 基于所述数值可能性集合选择所述表位集合的子集以产生经选择表位集合,所述经选择表位用于产生所述MHC I类表位编码核酸序列。

[0095] 在一些方面,所述MHC I类表位编码核酸序列中的每一者是通过执行以下步骤来选择:

[0096] (a) 从肿瘤、受感染细胞或感染性疾病生物体获得外显子组、转录组或全基因组核苷酸测序数据中的至少一者,其中所述核苷酸测序数据用于获得代表一组表位中的每一者的肽序列的数据;

[0097] (b) 将每个表位的肽序列输入到呈递模型中,以产生所述表位中的每一者由MHC等位基因中的一者或多者在细胞表面、任选地肿瘤细胞表面或受感染细胞表面上呈递的数值可能性集合,所述数值可能性集合已至少基于所接收的质谱数据进行鉴定;以及

[0098] (c) 基于所述数值可能性集合选择所述表位集合的子集以产生经选择表位集合,所述经选择表位用于产生至少20种MHC I类表位编码核酸序列。

[0099] 在一些方面,所述经选择表位集合的数目为2-20。在一些方面,所述呈递模型表示以下两者之间的依赖性:

[0100] (a) 所述MHC等位基因中的特定一者和在肽序列的特定位置处的特定氨基酸的一对的存在;和

[0101] (b) 由所述对的所述MHC等位基因中的所述特定一者将在所述特定位置处包含所述特定氨基酸的所述肽序列呈递在细胞表面、任选地肿瘤细胞表面或受感染细胞表面上的可能性。

[0102] 在一些方面,选择所述经选择表位集合包括基于所述呈递模型选择相对于未选择的表位被呈递在细胞表面、任选地肿瘤细胞表面或受感染细胞表面上的可能性增加的表位。在一些方面,选择所述经选择表位集合包括基于所述呈递模型选择相对于未选择的表位能够在受试者中刺激肿瘤特异性或感染性疾病生物体特异性免疫反应的可能性增加的表位。在一些方面,选择所述经选择表位集合包括基于所述呈递模型选择相对于未选择的表位能够由专职抗原呈递细胞(APC)呈递给初始T细胞的可能性增加的表位,任选地其中所述APC是树突状细胞(DC)。在一些方面,选择所述经选择表位集合包括基于所述呈递模型选择相对于未选择的表位经由中心或外周耐受性受抑制的可能性降低的表位。在一些方面,选择所述经选择表位集合包括基于所述呈递模型选择相对于未选择的表位能够在受试者中刺激对正常组织的自身免疫反应的可能性降低的表位。在一些方面,外显子组或转录组核苷酸测序数据是通过肿瘤细胞或组织、受感染细胞或感染性疾病生物体进行测序而获得的。在一些方面,所述测序是下一代测序(NGS)或任何大规模并行测序方法。

[0103] 在一些方面,用于递送所述自扩增表达系统的所述组合物作为初免疫苗施用。在一些方面,所述方法还包括施用第二组合物,任选地其中所述第二组合物是疫苗组合物。在一些方面,所述第二组合物是在用于递送所述自扩增表达系统的所述组合物之前施用的。在一些方面,所述第二组合物是在施用用于递送所述自扩增表达系统的所述组合物之后施用的。在一些方面,所述第二组合物与用于递送所述自扩增表达系统的所述组合物相同。在

一些方面,所述第二组合物与用于递送所述自扩增表达系统的所述组合物不同。在一些方面,所述第二组合物包含所述自扩增表达系统的盒,任选地其中所述第二组合物包含编码所述自扩增表达系统的盒的黑猩猩腺病毒载体。在一些方面,施用两种或更多种第二组合物,任选地其中用于递送所述自扩增表达系统的所述组合物作为初免疫苗施用。

[0104] 在一些方面,用于递送所述自扩增表达系统的所述组合物是肌内(IM)、皮内(ID)、皮下(SC)、玻璃体内(IVT)、鞘内或静脉内(IV)施用的。在一些方面,所述方法还包括施用免疫调节剂,任选地其中所述免疫调节剂是抗CTLA4抗体或其抗原结合片段、抗PD-1抗体或其抗原结合片段、抗PD-L1抗体或其抗原结合片段、抗4-1BB抗体或其抗原结合片段、抗OX-40抗体或其抗原结合片段、或细胞因子,任选地其中所述细胞因子是IL-2、IL-7、IL-12、IL-15或IL-21或其变体中的至少一者。在一些方面,所述方法还包括施用佐剂。

附图说明

[0105] 关于以下描述和附图将更好地理解本发明的这些和其他特征、方面和优势,在所述附图中:

[0106] 图(FIG.) 1图示了使用典型T7启动子或修饰的(“最小”)T7启动子进行的SAM载体转录。

[0107] 图2提供了代表性的AU-SAM载体的示意图。

[0108] 图3显示了核苷经修饰SAM编码GFP或 β -Spike的毛细管电泳RNA谱。通过毛细管电泳分离3ng体外转录的不含或含有 Ψ 、m1 Ψ 和m5C经修饰核苷的SAM-GFP或 β -Spike。U*SAM骨架包含催化失活的nsP4。

[0109] 图4显示转染后通过RT-qPCR测量的SAM活性。BHK-21细胞用11ng指定的SAM转染。用转染后20小时分离的总RNA进行RT-qPCR,以测量RNA拷贝数。结果以2个独立实验的每组的平均值 \pm 标准偏差表示。

[0110] 图5显示体外转录的SAM的基于FPLC的Oligo(dT)亲和色谱。通过基于FPLC的Oligo(dT)亲和色谱纯化了总共5mg或11,760nt长的含U的IVT SAM。图5A—显示使用编码 β -Spike的SAM进行亲和纯化的代表性UV色谱图。将收集的含有IVT污染物的级分标记为流过物(Flow through)和洗涤物(Wash)。将用水洗脱的Oligo(dT)结合的全长SAM标记为洗脱物。图5B—通过毛细管电泳分析收集的级分。

[0111] 图6显示通过斑点印迹评估SAM的纯度。二氧化硅和Oligo(dT)纯化的SAM-GFP或 β -Spike中的dsRNA副产物,其不含或含有m5C或m1 Ψ 经修饰核苷,如通过斑点印迹法所分析:(图6A) J2 dsDNA特异性单克隆抗体;和(图6B) 每组1,000ng斑点中dsRNA含量的相对定量。

[0112] 图7A显示SAM转染的MoDC中先天性免疫响应的诱导。在Oligo(dT)纯化之前,用含有指定的SAM(10 μ g)的LNP转染人类MoDC。IRF7的平均荧光强度(MFI)在转染后24小时通过流式细胞术测定。结果以4个独立实验的每组平均值 \pm 标准偏差表示。

[0113] 图7B显示SAM转染的MoDC中先天性免疫响应的诱导。在Oligo(dT)纯化之后,用含有指定的SAM(10 μ g)的LNP转染人类MoDC。IRF7的平均荧光强度(MFI)在转染后24小时通过流式细胞术测定。结果以4个独立实验的每组平均值 \pm 标准偏差表示。

[0114] 图7C显示SAM转染的MoDC中先天性免疫响应的诱导。在使用Oligo(dT)介导的亲和纯化(左图)或基于纤维素的纯化(右图)进行纯化之前(“ β -Spike”)和纯化之后(“ β -Spike-

ssRNA”),用含有指定的SAM(10 μ g)的LNP转染人类MoDC。显示转染后24小时的代表性流式细胞术。

[0115] 图8显示MoDC中编码GFP的SAM的翻译。用LNP包封的SAM(10 μ g)转染人类MoDC。转染后48小时通过流式细胞术测定GFP表达。结果以3-4个独立实验的每组平均值 \pm 标准偏差表示。

[0116] 图9显示在用1或10mg SAM-LNP免疫后6或14天Balb/c小鼠中针对SARS-CoV-2 β -Spike表位的抗原特异性细胞免疫响应。显示IFN γ ELISpot响应。基于纤维素的纯化称为“纯化A”,且基于oligo(dT)的纯化称为“纯化B”。

[0117] 图10显示在用1mg samRNA-LNP免疫后5或12天,用跨越SARS-CoV-2 β -Spike表位的重叠肽库刺激后Balb/c小鼠的脾细胞中的细胞内细胞因子染色。方框代表四分位距(IQR)(25-75%),带有中线,须线代表范围。

[0118] 图11显示用1mg samRNA-LNP免疫后4或8周Balb/c小鼠中的血清假病毒中和效价(50%抑制)。每组n=6只独立动物的几何平均值和几何SD。

[0119] 图12显示在用1mg samRNA-LNP免疫后3、7、10和14天,在Balb/c小鼠中用四聚体AH1抗原刺激后Balb/c小鼠的脾细胞中的细胞内细胞因子染色。方框代表四分位距(IQR)(25-75%),带有中线,须线代表范围。

具体实施方式

[0120] 定义

[0121] 如本文所用,术语“药学上可接受的盐”是指在合理的医学判断范围内,适用于与人类和低等动物的组织接触而没有过度毒性、刺激性、过敏反应等并且与合理的益处/风险比相称的那些盐。药学上可接受的盐是本领域结构域熟知的。例如,S.M. Berge等人在J. Pharmaceutical Sciences,1977,66,1-19(通过引用并入本文)中详细描述了药学上可接受的盐。本公开的化合物的药学上可接受的盐包括衍生自合适的无机和有机酸和碱的那些。药学上可接受的无毒酸加成盐的示例是氨基基团与无机酸(诸如盐酸、氢溴酸、磷酸、硫酸和高氯酸)或与有机酸(诸如乙酸、草酸、马来酸、酒石酸、柠檬酸、琥珀酸或丙二酸)或通过使用本领域结构域中使用的其他方法(诸如离子交换)形成的盐。其他药学上可接受的盐包括己二酸盐、藻酸盐、抗坏血酸盐、天冬氨酸盐、苯磺酸盐、苯甲酸盐、硫酸氢盐、硼酸盐、丁酸盐、樟脑酸盐、樟脑磺酸盐、柠檬酸盐、环戊烷丙酸盐、二葡萄糖酸盐、十二烷基硫酸盐、乙磺酸盐、甲酸盐、富马酸盐、葡庚酸盐、甘油磷酸盐、葡萄糖酸盐、半硫酸盐、庚酸盐、己酸盐、氢碘化物、2-羟基-乙磺酸盐、乳糖酸盐、乳酸盐、月桂酸盐、月桂基硫酸盐、苹果酸盐、马来酸盐、丙二酸盐、甲磺酸盐、2-萘磺酸盐、烟酸盐、硝酸盐、油酸盐、草酸盐、棕榈酸盐、双羟萘酸盐、果胶酸盐、过硫酸盐、3-苯基丙酸盐、磷酸盐、新戊酸盐、丙酸盐、硬脂酸盐、琥珀酸盐、硫酸盐、酒石酸盐、硫氰酸盐、对甲苯磺酸盐、十一烷酸盐、戊酸盐等。

[0122] 衍生自适当碱的盐包括碱金属、碱土金属、铵和N(C1-4烷基)4盐。代表性碱金属或碱土金属盐包括钠、锂、钾、钙、镁等。其他药学上可接受的盐在适当时包括无毒的铵盐、季铵盐和使用抗衡离子如卤离子、氢氧根离子、羧酸根离子、硫酸根离子、磷酸根离子、硝酸根离子、低级烷基磺酸根离子和芳基磺酸根离子形成的胺阳离子。

[0123] 在本文的任何变量定义中叙述的化学基团列表包括将该变量定义为任何单个基

团或所列基团的组合。本文中对变量的实施方案的叙述包括作为任何单个实施方案或与任何其他实施方案或其部分组合的实施方案。

[0124] 如本文所用,术语“生物样品”包括但不限于细胞培养物或其提取物;获自哺乳动物或其提取物的活检材料;以及血液、唾液、尿液、粪便、精液、眼泪或其他体液或其提取物。

[0125] 如本文所用,“治疗有效量”意指刺激所需生物响应的物质(例如,治疗剂、组合物和/或制剂)的量。在一些实施方案中,物质的治疗有效量是当作为给药方案的一部分施用于患有或易患疾病、病症和/或疾患的受试者时足以治疗、诊断、预防和/或延迟疾病、病症和/或疾患的发作的量。如本领域结构域普通技术人员将理解的,物质的有效量可以根据例如期望的生物学终点、待递送的物质、目标细胞或组织等因素而变化。例如,用于治疗疾病、病症和/或疾患的制剂中提供的化合物的有效量是减轻、改善、缓解、抑制、预防、延迟疾病、病症和/或疾患的一种或多种症状或特征的发作,降低其严重程度和/或降低其发生率的量。在一些实施方案中,“治疗有效量”是所提供的化合物或含有所提供的化合物的组合物的至少最小量,其足以治疗疾病或病症的一种或多种症状。

[0126] 疾病、病症和疾患在本文中可互换使用。

[0127] 如本文所用,术语“治疗(treatment/treat/treating)”是指如本文所述的病症或疾患或者所述病症或疾患的一种或多种症状的部分或完全减轻、抑制、延迟发作、预防、改善和/或缓解。在一些实施方案中,治疗可在一种或多种症状已发展之后施用。在一些实施方案中,术语“治疗”包括预防或阻止疾病或病症的进展。在其他实施方案中,治疗可在没有症状的情况下施用。例如,治疗可在症状发作之前(例如,根据症状史和/或根据遗传或其他易感性因素)施用于易感个体。也可在症状已消退后继续治疗,例如以预防或延迟其复发。因此,在一些实施方案中,术语“治疗”包括预防疾病或病症的复发或再发生。

[0128] 考虑施用的“受试者”包括但不限于人类(即任何年龄组的男性或女性,例如儿科受试者(例如,婴儿、儿童、青少年)或成年受试者(例如,青年、中年或老年))和/或非人类动物,例如哺乳动物如灵长类动物(例如食蟹猴、恒河猴)、牛、猪、马、绵羊、山羊、啮齿动物、猫和/或狗。在某些实施方案中,受试者是人类。在某些实施方案中,受试者是非人类动物。术语“患者”和“受试者”在本文中可互换使用。

[0129] 术语“药学上可接受的载剂、佐剂或媒介物”是指不破坏与其配制的化合物的药理学活性的无毒载剂、佐剂或媒介物。可用于本文公开的化合物的组合物中的药学上可接受的载剂、佐剂或媒介物包括但不限于离子交换剂、氧化铝、硬脂酸铝、卵磷脂、血清蛋白如人血清白蛋白、缓冲物质如磷酸盐、甘氨酸、山梨酸、山梨酸钾、饱和植物脂肪酸的部分甘油酯混合物、水、盐或电解质,例如硫酸鱼精蛋白、磷酸氢二钠、磷酸氢钾、氯化钠、锌盐、胶体二氧化硅、三硅酸镁、聚乙烯吡咯烷酮、纤维素基物质、聚乙二醇、羧甲基纤维素钠、聚丙烯酸酯、蜡、聚乙烯-聚氧丙烯嵌段聚合物、聚乙二醇和羊毛脂。

[0130] 替代实施方案

[0131] 在替代实施方案中,本文描述的化合物还可以包含一个或多个同位素取代。例如,氢可以是 ^2H (D或氘)或 ^3H (T或氚);碳可以是例如 ^{13}C 或 ^{14}C ;氧可以是例如 ^{18}O ;氮可以是例如 ^{15}N 等。在其他实施方案中,特定同位素(例如, ^3H 、 ^{13}C 、 ^{14}C 、 ^{18}O 或 ^{15}N)可代表占据化合物特定位点的元素的总同位素丰度的至少1%、至少5%、至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少60%、至少65%、至少70%、至少

75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少99%或至少99.9%。

[0132] 药物组合物

[0133] 在一些实施方案中,本公开提供一种组合物,其包含本文所述的任何组合物(例如,本文所述的任何ssRNA SAM疫苗组合物)和药学上可接受的载剂、佐剂或媒介物。为了易于施用和剂量的均匀性,本公开的化合物优选地被配制成剂量单位形式。

[0134] 使用本公开的化合物的方法-RNA核苷酸的合成

[0135] 一般而言,本文所述的方法可用于制备体外转录的RNA。在一些实施方案中,本文所述的方法可用于制备单链RNA(ssRNA)。在一些实施方案中,本文所述的方法可用于制备自扩增表达系统,例如包括ssRNA的自扩增表达系统(例如源自自复制RNA病毒的ssRNA载体)。在一些实施方案中,本文所述的方法可用于制备修饰的RNA,例如掺入经修饰核苷的RNA(例如ssRNA)。在一些实施方案中,本文所述的方法可用于制备修饰的RNA,例如掺入经修饰核苷的RNA(例如ssRNA)。

[0136] 在一些实施方案中,本文描述的方法可用于制备5'加帽的RNA。本文考虑的用于制备5'加帽的RNA的方法和组合物包括但不限于mRNA、小核RNA(snRNA)、小核仁RNA(snoRNA)、小卡哈尔体(cajal body)特异性RNA(scaRNA)。在一些实施方案中,一种方法涉及使用含有寡核苷酸引物、核苷5'-三磷酸(NTP)和RNA聚合酶的帽用于DNA模板化和启动子控制的RNA合成。在某些方面,一种方法使用在RNA合成、特别是加帽mRNA的合成中提供效用的起始加帽寡核苷酸引物。

[0137] 在一些实施方案中,本文所述的方法可用于制备RNA的方法中,所述RNA包括但不限于mRNA、snRNA、snoRNA、scaRNA、转移RNA(tRNA)、核糖体RNA(rRNA)和转移-信使RNA(tmRNA),其在分子的5'端处或附近携带修饰。在一些实施方案中,一种方法涉及使用带有或不带有帽、核苷5'-三磷酸(NTP)和RNA聚合酶的起始寡核苷酸引物用于DNA模板化和启动子控制的RNA合成。在某些方面,一种方法使用修饰的起始寡核苷酸引物,其携带在RNA合成、特别是5'-修饰的RNA合成中提供效用的结构修饰。

[0138] 起始加帽寡核苷酸引物具有开放的3'-OH基团,其通过在引物的3'端添加核苷酸单元而允许在DNA模板上起始RNA聚合酶介导的RNA合成。起始加帽寡核苷酸引物在转录起始位点(即,起始位点位于更接近启动子序列的3'末端并且可与启动子序列重叠)与模板DNA序列基本互补,在某些实施方案中,起始加帽寡核苷酸引物主要从引物的3'端开始在一个方向(“正向”)指导RNA的合成。在某些方面和实施方案中,起始加帽寡核苷酸引物在起始RNA合成方面胜过任何核苷5'-三磷酸,从而使以起始加帽寡核苷酸引物开始的RNA产生最大化并且使以5'-三磷酸核苷(通常是GTP)开始的RNA产生最小化。

[0139] 本公开的起始加帽寡核苷酸引物具有杂交序列,该杂交序列可与起始位点处的DNA模板上的序列互补。杂交序列的存在迫使起始加帽寡核苷酸引物主要与起始位点处的DNA模板的互补序列仅在所需方向(即“正向”方向)上对齐。在正向方向上,RNA转录物以倒置的鸟苷残基(即^{7m}G(5')ppp(5')N.....)开始。通过杂交复合物的热力学维持了DNA模板上引物对齐的正向方向相对于不正确的“反向”方向的优势。后者由起始加帽寡核苷酸引物的杂交序列的长度和参与与DNA模板杂交的碱基的身份确定。所需正向方向的杂交也可能取决于在体外转录期间DNA模板和起始加帽寡核苷酸引物杂交或使用的温度和反应条件。

[0140] 与使用标准GTP、ATP、CTP或UTP的起始功效相比,本公开的起始加帽寡核苷酸引物

增强了转录起始功效。在一些实施方案中,当RNA的合成主要从起始加帽寡核苷酸引物而不是从转录混合物中的任何NTP开始时,转录的起始被认为是增强的。转录起始效率的增强导致RNA转录物的产量更高。在无起始加帽引物的情况下,相比于使用常规方法合成RNA,增强的转录起始效率可增加到约10%、约20%、约40%、约60%、约80%、约90%、约100%、约150%、约200%或约500%。在某些实施方案中,“起始加帽寡核苷酸引物”在起始转录方面胜过任何NTP(包括GTP)。本领结构域普通技术人员能够容易地确定底物活性水平和起始加帽寡核苷酸引物的功效。在某些实施方案中,起始从加帽寡核苷酸引物而不是NTP发生,这导致转录的mRNA的更高水平的加帽。

[0141] 在一些方面,提供了其中利用具有取代或修饰的起始加帽寡核苷酸引物合成RNA的方法。在一些方面,起始加帽寡核苷酸引物的取代和修饰基本上不损害RNA的合成。可预先形成常规测试合成以确定使用修饰的起始加帽寡核苷酸引物是否可获得期望的合成结果。本领结构域技术人员可进行这样的常规实验以确定是否可获得期望的结果。起始加帽寡核苷酸引物的取代或修饰包括例如一种或多种经修饰核苷碱基、一种或多种修饰的糖、一种或多种经修饰核苷酸间键和/或一种或多种修饰的三磷酸桥。

[0142] 可包括本文提供的方法和组合物的一个或多个修饰基团的修饰的起始加帽寡核苷酸引物可通过将NTP并入到开放的3'-OH基团上而在DNA模板上由RNA聚合酶延长。起始加帽寡核苷酸引物可包括天然RNA和DNA核苷、经修饰核苷或核苷类似物。起始加帽寡核苷酸引物可含有天然核苷酸间磷酸二酯键或其修饰,或其组合。

[0143] 使用本公开化合物的方法—治疗方法

[0144] 在一些实施方案中,本公开提供了用于治疗患者的疾病或疾患(例如癌症或感染)或减轻其严重性的方法,所述方法包括向所述患者施用RNA多核苷酸的步骤。在一些实施方案中,本公开提供了用于治疗疾病或疾患的预防性方法,例如预防性疫苗接种。

[0145] 一般而言,本文所述的方法可用于制备体外转录的RNA,以用于治疗疾病或疾患或减轻其严重性的药物组合物。在一些实施方案中,本文所述的方法可用于制备用于药物组合物的单链RNA(ssRNA)。在一些实施方案中,本文所述的方法可用于制备用于药物组合物的自扩增表达系统,例如包括ssRNA的自扩增表达系统(例如源自自复制RNA病毒的ssRNA载体)。在一些实施方案中,本文所述的方法可用于制备用于药物组合物的修饰的RNA,例如掺入经修饰核苷的RNA(例如ssRNA)。在一些实施方案中,本文所述的方法可用于制备用于药物组合物的纯化的ssRNA,例如掺入经修饰核苷的ssRNA。

[0146] 在一些实施方案中,根据本公开的方法的化合物和组合物可使用有效治疗癌症或减轻其严重程度的任何量和任何施用途径施用。在一些实施方案中,癌症选自以下各项组成的组:肺癌、黑色素瘤、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、肾癌、胃癌、结肠癌、睾丸癌、头颈癌、胰腺癌、膀胱癌、脑癌、B细胞淋巴瘤、急性髓细胞白血病、成人急性淋巴母细胞白血病、慢性髓细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、T细胞淋巴细胞白血病、非小细胞肺癌和小细胞肺癌。

[0147] 在一些实施方案中,癌症是实体肿瘤。在一些实施方案中,癌症选自以下各项组成的组:微卫星稳定结直肠癌(MSS-CRC)、非小细胞肺癌(NSCLC)、胰腺导管腺癌(PDA)和胃食管腺癌(GEA)。在一些实施方案中,癌症选自以下各项组成的组:MSS-CRC、NSCLC和PDA。

[0148] 在一些实施方案中,将本文所述的RNA多核苷酸组合物,例如本文所述的任何核苷修饰的和/或纯化的RNA组合物(例如本文所述的任何ssRNA SAM疫苗组合物)施用于患有选

自由以下各项组成的组的癌症的患者：肺癌、黑色素瘤、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、肾癌、胃癌、结肠癌、直肠癌、睾丸癌、头颈癌、胰腺癌、膀胱癌、脑癌、B细胞淋巴瘤、急性髓细胞白血病、成人急性淋巴母细胞白血病、慢性髓细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、骨髓瘤、T细胞淋巴细胞白血病、非小细胞肺癌和小细胞肺癌。

[0149] 在一些实施方案中，将本文所述的任何RNA多核苷酸组合物，例如本文所述的任何核苷修饰的和/或纯化的RNA组合物（例如本文所述的任何ssRNA SAM疫苗组合物）施用于患有感染的患者。在一些实施方案中，感染是病毒感染、真菌感染或细菌感染。在一些实施方案中，感染是病毒感染。在一些实施方案中，病毒感染是病毒感染，其中病毒是HPV。在一些实施方案中，病毒感染是被病毒感染，其中病毒是流感病毒。在一些实施方案中，病毒感染是被病毒感染，其中所述病毒是冠状病毒（例如严重急性呼吸综合征（SARS）2002相关物种、SARS-CoV-2分离株和亚分离株、中东呼吸综合征（MERS）2012相关物种和/或其他冠状病毒物种）。在一些实施方案中，将本文所述的任何组合物（例如本文所述的任何ssRNA SAM疫苗组合物）施用于患有COVID-19的受试者。在一些实施方案中，将本文所述的任何组合物（例如本文所述的任何ssRNA SAM疫苗组合物）施用于有感染COVID-19的风险的受试者。在一些实施方案中，将本文所述的任何组合物（例如本文所述的任何ssRNA SAM疫苗组合物）作为针对COVID-19的预防性疫苗接种施用于受试者。

[0150] 在一些实施方案中，本公开涉及使生物样品与本文所述的RNA多核苷酸组合物，例如本文所述的任何核苷修饰的和/或纯化的RNA组合物（例如本文所述的任何ssRNA SAM疫苗组合物）接触的方法。

[0151] 在一些实施方案中，一种或多种额外治疗剂还可与本文所述的RNA多核苷酸组合物，例如本文所述的任何核苷修饰的和/或纯化的RNA组合物，例如本文所述的任何核苷修饰的和/或纯化的RNA组合物（例如本文所述的任何ssRNA SAM疫苗组合物）组合施用。在一些实施方案中，本文所述的RNA多核苷酸组合物和一种或多种额外治疗剂可作为多剂量方案的一部分施用。在一些实施方案中，本文所述的RNA多核苷酸组合物和一种或多种额外治疗剂可同时、依次或在一段时间内施用。在一些实施方案中，本文所述的RNA多核苷酸组合物和一种或多种额外治疗剂可在彼此的五小时内施用。在一些实施方案中，本文所述的RNA多核苷酸组合物和一种或多种额外治疗剂可在彼此的24小时内施用。在一些实施方案中，本文所述的RNA多核苷酸组合物和一种或多种额外治疗剂可在彼此的一周内施用。

[0152] 自扩增mRNA载体

[0153] 一般而言，所有自扩增RNA (SAM) 载体都含有源自自复制病毒的自扩增骨架。术语“自扩增骨架”是指允许病毒基因组自复制自复制病毒的最小序列。例如，允许甲病毒自复制最小序列可包括用于非结构蛋白介导的扩增的保守序列（例如非结构蛋白1 (nsP1) 基因、nsP2基因、nsP3基因、nsP4基因、5' 未翻译区 (UTR)、3' UTR和/或聚A序列）。自扩增骨架还可包括用于表达亚基因组病毒RNA的序列（例如甲病毒的亚基因组启动子，如26S启动子元件）。SAM载体可以是正义RNA多核苷酸或负义RNA多核苷酸，例如具有源自正义或负义自复制病毒的骨架的载体。自复制病毒包括但不限于甲病毒、黄病毒（例如昆津病毒 (Kunjin virus)）、麻疹病毒和弹状病毒（例如狂犬病病毒和水疱性口炎病毒）。源自自复制病毒的SAM载体系统的实例更详细地描述于Lundstrom (Molecules. 2018年12月13日; 23 (12) .pii: E3310.doi:10.3390/molecules23123310)，其出于所有目的通过引用并入本文。

[0154] 体外自扩增产生

[0155] 本领结构域中熟知的用于RNA产生的技术是体外转录 (IVT)。在这种技术中,首先通过本领结构域技术人员熟知的技术产生所需载体的DNA模板,包括标准分子生物学技术,例如克隆、限制性消化、连接、基因合成(例如化学和/或酶促合成)和聚合酶链反应(PCR)。

[0156] DNA模板在需要转录为RNA的序列的5'端含有一个RNA聚合酶启动子(例如SAM)。启动子包括但不限于噬菌体聚合酶启动子,例如T3、T7、SP6或K11。取决于所选的特定RNA聚合酶启动子序列,除了所需序列外,还可转录额外的5'核苷酸。例如,典型的T7启动子可用序列TAATACGACTCACTATAGG提及,其中使用DNA模板TAATACGACTCACTATAGG_{N_v}用于产生所需序列N的IVT反应将产生mRNA序列GG-N_v。一般而言,并且不希望受理论束缚,T7聚合酶更有效地转录以鸟苷开始的RNA转录物。然而,额外的5'核苷酸可能不需要和/或可能是有害的。因此,包含在DNA模板中的RNA聚合酶启动子可以是导致转录物仅含有所需序列的5'核苷酸的序列,例如,具有SAM载体所来源的自复制病毒的内源性(也称为“原生”或“基因组”)5'序列的SAM,是指自复制病毒的原生基因组序列(例如,具有内源5'VEEV核苷酸AU,也称为“AU-SAM”)。例如,最小T7启动子可由序列TAATACGACTCACTATA(定向5'-3'; ϕ 6.5T7启动子)指代,其中使用DNA模板TAATACGACTCACTATAN₁N₂N_v用于产生所需序列N的IVT反应将产生mRNA序列N₁N₂N_v。另一种最小T7启动子可由序列TAATACGACTCACTATT(定向5'-3'; ϕ 2.5T7启动子)指代。同样,由序列ATTTAGGTGACACTATA指代的最小SP6启动子可用于在不存在额外5'核苷酸下产生转录物。同样,由序列AATTAGGGCACACTATA指代的最小K11启动子可用于在不存在额外5'核苷酸下产生转录物。在典型的IVT反应中,DNA模板与适当的RNA聚合酶、缓冲剂和核苷酸(NTP)一起孵育。

[0157] 所得的RNA多核苷酸可任选地进一步经修饰,包括但不限于添加5'帽结构,例如7-甲基鸟苷或相关结构,以及任选地修饰3'端以包括聚腺苷酸(聚A)尾。在改进的IVT反应中,通过在IVT期间添加帽类似物,RNA以5'帽结构共转录加帽。帽类似物可包括二核苷酸(m⁷G-ppp-N)帽类似物或三核苷酸(m⁷G-ppp-N₁-N₂)帽类似物,其中N表示核苷酸或经修饰核苷酸(例如,核糖核苷,包括但不限于腺苷、鸟苷、胞苷和尿苷)。经修饰核苷酸可包括修饰的腺苷,例如2'-OH-甲基化N⁶-甲基腺苷。在包括三核苷酸(m⁷G-ppp-N₁-N₂)帽类似物的说明性非限制性实例中,N₁可以是2'-OH-甲基化N⁶-甲基腺苷。帽类似物可包括本文所述的任何结构或式。示例性帽类似物及其在IVT反应中的用途也更详细地描述于美国专利第10,519,189号中,其出于所有目的通过引用并入本文。如所讨论的,T7聚合酶更有效地转录以鸟苷开始的RNA转录物。为了提高不以鸟苷开始的模板中的转录效率,可使用三核苷酸帽类似物(m⁷G-ppp-N-N)。三核苷酸帽类似物可相对于使用二核苷酸帽类似物(m⁷G-ppp-N)的IVT反应提高转录效率2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20倍或更多倍。

[0158] 转录后也可添加5'帽结构,例如使用含有mRNA 2'-O-甲基转移酶和S-腺苷甲硫氨酸的牛痘加帽系统(例如,NEB目录号M2080)。

[0159] 经修饰核苷

[0160] 用于产生SAM载体的体外转录反应可补充有具有经修饰核苷的三磷酸核苷(ATP、CTP、UTP、GTP)。不希望受理论束缚,掺入经修饰核苷的RNA可改善稳定性、减少刺激先天性免疫途径、和/或改善靶细胞转染后RNA载体的病毒蛋白介导的RNA复制/扩增。

[0161] 经修饰核苷包括但不限于次黄嘌呤、肌苷、8-氧代-腺嘌呤、其7-取代的衍生物、二氢尿嘧啶、假尿嘧啶、2-硫尿嘧啶、4-硫尿嘧啶、5-氨基尿嘧啶、5-(C1-C6)-烷基尿嘧啶、5-甲基尿嘧啶、5-(C2-C6)-烯基尿嘧啶、5-(C2-C6)-炔基尿嘧啶、5-(羟甲基)尿嘧啶、5-氯尿嘧啶、5-氟尿嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-羟基胞嘧啶、5-(C1-C6)-烷基胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、5-(C2-C6)-烯基胞嘧啶、5-(C2-C6)炔基胞嘧啶、5-氯胞嘧啶、5-氟胞嘧啶、5-溴胞嘧啶、N2-二甲基鸟嘌呤、7-脱氮鸟嘌呤、8-氮杂鸟嘌呤、7-脱氮-7-取代的鸟嘌呤、7-脱氮-7-(C2-C6)炔基鸟嘌呤、7-脱氮-8-取代的鸟嘌呤、8-羟基鸟嘌呤、6-硫代鸟嘌呤、8-氧代鸟嘌呤、2-氨基嘌呤、2-氨基-6-氯嘌呤、2,4-二氨基嘌呤、2,6-二氨基嘌呤、8-氮杂嘌呤、取代的7-脱氮嘌呤、7-脱氮-7-取代的嘌呤、7-脱氮-8-取代的嘌呤、氢(无碱基残基)。经修饰核苷酸可包括甲基-5-胞嘧啶(m5C)、甲基-6-腺苷(m6A)、核糖-甲基化(2'-O-Me)、s-硫尿苷(s2U)、5-甲基尿苷(m5U)或N1-甲基假尿苷(m1Ψ)、假尿苷(Ψ)。经修饰核苷酸可包括m5C。经修饰核苷酸可包括m6A。经修饰核苷酸可包括2'-O-Me。经修饰核苷酸可包括s-硫尿苷。经修饰核苷酸可包括m5U。经修饰核苷酸可包括m1Ψ。经修饰核苷酸可包括Ψ。

[0162] 体外转录反应可补充有单一不同的经修饰核苷连同未经修饰核苷。例如,作为说明性非限制性实例,体外转录反应可仅补充有m5C经修饰核苷且不补充其他经修饰核苷(例如,与未修饰的ATP、UTP和GTP一起)。体外转录反应可补充有多种经修饰核苷。体外转录反应可补充有多种经修饰核苷连同未经修饰核苷。未经修饰核苷可包括或排除包含化学修饰的m⁷G帽类似物。

[0163] 掺入经修饰核苷的ssRNA可使ssRNA的大于10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或100%的腺苷、鸟苷、胞苷和/或尿苷核苷为经修饰核苷。掺入经修饰核苷的ssRNA可使ssRNA的大于10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或100%的腺苷核苷为经修饰核苷。掺入经修饰核苷的ssRNA可使ssRNA的大于10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或100%的鸟苷核苷为经修饰核苷。掺入经修饰核苷的ssRNA可使ssRNA的大于10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或100%的胞苷核苷为经修饰核苷。掺入经修饰核苷的ssRNA可使ssRNA的大于10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或100%的尿苷核苷为经修饰核苷。

[0164] 掺入经修饰核苷的ssRNA可使ssRNA的大于25%的腺苷核苷为经修饰核苷。掺入经修饰核苷的ssRNA可使ssRNA的大于50%的腺苷核苷为经修饰核苷。掺入经修饰核苷的ssRNA可使ssRNA的大于75%的腺苷核苷为经修饰核苷。掺入经修饰核苷的ssRNA可使ssRNA的大于95%的腺苷核苷为经修饰核苷。掺入经修饰核苷的ssRNA可使ssRNA的大于99%的腺苷核苷为经修饰核苷。掺入经修饰核苷的ssRNA可使ssRNA的100%的腺苷核苷为经修饰核苷。

[0165] 掺入经修饰核苷的ssRNA可使ssRNA的大于25%的鸟苷核苷为经修饰核苷。掺入经修饰核苷的ssRNA可使ssRNA的大于50%的鸟苷核苷为经修饰核苷。掺入经修饰核苷的ssRNA可使ssRNA的大于75%的鸟苷核苷为经修饰核苷。掺入经修饰核苷的ssRNA可使ssRNA的大于95%的鸟苷核苷为经修饰核苷。掺入经修饰核苷的ssRNA可使ssRNA的大于99%的鸟苷核苷为经修饰核苷。掺入经修饰核苷的ssRNA可使ssRNA的100%的鸟苷核苷为经修饰核苷。

[0166] 掺入经修饰核苷的ssRNA可使ssRNA的大于25%的胞苷核苷为经修饰核苷。掺入经

修饰核苷的ssRNA可使ssRNA的大于50%的胞苷核苷为经修饰核苷。掺入经修饰核苷的ssRNA可使ssRNA的大于75%的胞苷核苷为经修饰核苷。掺入经修饰核苷的ssRNA可使ssRNA的大于95%的胞苷核苷为经修饰核苷。掺入经修饰核苷的ssRNA可使ssRNA的大于99%的胞苷核苷为经修饰核苷。掺入经修饰核苷的ssRNA可使ssRNA的100%的胞苷核苷为经修饰核苷。

[0167] 掺入经修饰核苷的ssRNA可使ssRNA的大于25%的尿苷核苷为经修饰核苷。掺入经修饰核苷的ssRNA可使ssRNA的大于50%的尿苷核苷为经修饰核苷。掺入经修饰核苷的ssRNA可使ssRNA的大于75%的尿苷核苷为经修饰核苷。掺入经修饰核苷的ssRNA可使ssRNA的大于95%的尿苷核苷为经修饰核苷。掺入经修饰核苷的ssRNA可使ssRNA的大于99%的尿苷核苷为经修饰核苷。掺入经修饰核苷的ssRNA可使ssRNA的100%的尿苷核苷为经修饰核苷。

[0168] 掺入经修饰核苷的ssRNA可使ssRNA的大于25%的胞苷核苷为m5c。掺入经修饰核苷的ssRNA可使ssRNA的大于50%的胞苷核苷为m5c。掺入经修饰核苷的ssRNA可使ssRNA的大于75%的胞苷核苷为m5c。掺入经修饰核苷的ssRNA可使ssRNA的大于95%的胞苷核苷为m5c。掺入经修饰核苷的ssRNA可使ssRNA的大于99%的胞苷核苷为m5c。掺入经修饰核苷的ssRNA可使ssRNA的100%的胞苷核苷为m5c。

[0169] ssRNA纯化

[0170] SAM载体体外转录后, 无论是否带有经修饰核苷, RNA均可经纯化。不希望受理论束缚, 所需SAM载体是单链RNA (ssRNA), 其包含m⁷G帽和对应于由产生载体编码的全长构建体的聚腺苷酸化(聚A)尾。此外, 不受理论束缚, 纯化去除了体外转录的所有非所需双链RNA副产物, 包括在转染靶细胞后可能导致非所需免疫刺激和/或降低的病毒蛋白介导的RNA复制/RNA载体扩增的副产物。例如, 可评估RNA IVT产物对先天免疫系统的刺激, 例如通过评估IFN响应进行。IFN响应可通过分析干扰素表达、IRF-3表达、IRF-7表达或其组合(例如, 通过RT-qPCR、流式细胞术、蛋白质印迹分析或其组合)来评估。可评估SAM ssRNA载体复制的改进, 例如通过比较SAM ssRNA, 所述SAM ssRNA(A)包含经修饰核苷; 和/或(B)相对于包含另外相同的ssRNA载体但不包含经修饰核苷的对照组合物, 已使用色谱系统和/或基于亲和力的分离系统纯化和/或未经纯化。

[0171] 纯化可使用基于色谱的系统, 例如FPLC或HPLC系统。一般来说, FPLC对于本文描述的典型SAM ssRNA载体大小将是有利的。本领结构域技术人员将认识到可采用的适用的FPLC系统和HPLC系统, 例如Äkta avant 25FPLC系统(Cytiva), 以及如何使用所述系统(例如, 洗涤、平衡、洗脱等)。

[0172] 基于色谱的系统包括基于纤维素的色谱系统。基于色谱的系统包括基于亲和力的分离系统。基于亲和力的分离系统的说明性非限制性实例是基于脱氧胸苷(dT)寡核苷酸(Oligo(dT))的系统, 其结合RNA的聚A尾, 例如POROS OligodT (25) GoPure柱(Thermo Fisher Scientific)。

[0173] 纯化策略, 例如基于色谱的策略可用于产生不含污染物, 例如IVT反应副产物(例如, dsRNA、盐、洗涤剂)的纯或基本纯的ssRNA。纯化策略, 例如基于色谱的策略可用于产生含有SAM ssRNA的组合物或混合物, 其中污染物为组合物或混合物的小于20%、小于10%、小于5%、小于2%、小于1%、小于0.5%或小于0.1%。纯化策略可用于产生包含SAM

ssRNA以及dsRNA两者的混合物,但其中dsRNA为组合物或混合物的小于20%、小于10%、小于5%、小于2%、小于1%、小于0.5%或小于0.1%。

[0174] 纯化策略可用于产生含有SAM ssRNA的组合物或混合物,其中所需ssRNA载体(例如,包括m⁷G帽和聚A尾两者的全长ssRNA载体)占组合物或混合物中存在的总RNA的70%或更多、80%或更多、85%或更多、90%或更多、或95%或更多。纯化策略可用于生产含有SAM ssRNA的组合物或混合物,其中所需ssRNA载体占组合物或混合物的组成中存在的总RNA的97%或更多、98%或更多、99%或更多、或99.5%或更多。

[0175] 纯化策略可用于产生包含SAM ssRNA和dsRNA两者的混合物,但其中ssRNA占混合物中存在的RNA的70%或更多、80%或更多、85%或更多、90%或更多、或95%或更多。纯化策略可用于产生包含SAM ssRNA和dsRNA两者的混合物,但其中ssRNA占混合物中存在的RNA的97%或更多、98%或更多、99%或更多、或99.5%或更多。

[0176] 纯化策略可用于产生含有SAM ssRNA的组合物或混合物,其中所需ssRNA载体是组合物或混合物的组成中存在的唯一可检测的RNA种类。纯化策略可用于产生含有SAM ssRNA的组合物或混合物,其中所需ssRNA载体是组合物或混合物的组成中存在的唯一RNA种类。

[0177] 可评估纯化后的ssRNA纯度,例如遵循基于色谱的策略。RNA(例如总RNA、dsRNA和/或ssRNA)的质量和浓度可使用包括但不限于毛细管电泳、液相色谱(例如FPLC或HPLC)、斑点印迹和/或ELISA的方法来评估。斑点印迹和ELISA可使用包括对RNA、dsRNA和/或ssRNA具有特异性的抗体的检测方法。量化可包括确定曲线下面积(AUC),例如FPLC光谱峰、带强度和/或点强度。

[0178] RNA纯化过程还可包括所述领结构域中众所周知的其他纯化技术,例如苯酚-氯仿提取。

[0179] 甲病毒生物学

[0180] 甲病毒是披膜病毒科(Togaviridae)的成员,并且是正义单链RNA病毒。成员通常分类为旧世界,例如辛德毕斯、罗斯河、马雅罗、基孔肯雅(Chikungunya)和塞姆利基森林病毒,或新世界,例如东部马脑炎、奥拉、摩根堡或委内瑞拉马脑炎及其衍生菌株TC-83(Strauss Microbial Review 1994)。天然甲病毒基因组通常约12kb长,其中前三分之二含有编码非结构蛋白(nsP)的基因,所述非结构蛋白形成用于病毒基因组自复制RNA复制复合物,并且最后三分之一含有编码用于病毒粒子产生的结构蛋白的亚基因组表达盒(Frolov RNA 2001)。

[0181] 甲病毒的模型生命周期涉及数个不同步骤(Strauss Microbial Review 1994, Jose Future Microbiol 2009)。在病毒附着于宿主细胞后,病毒粒子与内饮区室内的膜融合,导致基因组RNA最终释放至细胞溶质中。以正链定向并包含5' 甲基鸟苷酸帽和3' 聚A尾部的基因组RNA被翻译以产生形成复制复合物的非结构蛋白nsP1-4。在感染早期,正链然后由复合物复制到负链模板中。在当前模型中,复制复合物随着感染进展被进一步加工,使得所得经加工的复合物转换成将负链转录成全长正链基因组RNA以及含有结构基因的26S亚基因组正链RNA。甲病毒的数个保守序列元件(CSE)已鉴定为可能在各种RNA复制步骤中起作用,包括:从负链模板复制正链RNA中的5' UTR的互补序列、从基因组模板复制负链合成中的51-nt CSE、从负链转录亚基因组RNA中的在nsP与26S RNA之间的接合区中的24-nt CSE、和从正链模板的负链合成中的3' 19-nt CSE。

[0182] 在各种RNA物种复制后,病毒粒子然后通常在病毒的天然生命周期中组装。26S RNA被翻译并且所得蛋白质经进一步加工以产生结构蛋白,其包括衣壳蛋白、糖蛋白E1和E2以及两个小多肽E3和6K(Strauss 1994)。发生病毒RNA的衣壳化,衣壳蛋白通常仅特异性针对所包装的基因组RNA,接着病毒粒子组装并在膜表面出芽。

[0183] 甲病毒递送载体

[0184] 甲病毒(包括甲病毒序列、特征和其他元件)可用于产生基于甲病毒的递送载体(也称为甲病毒载体、甲病毒病毒载体、甲病毒疫苗载体、自复制RNA(srRNA)载体或自扩增mRNA(SAM)载体)。甲病毒先前已被工程化以用作表达载体系统(Pushko 1997, Rheme 2004)。甲病毒提供数种优势,特别是在可能需要异源抗原表达的疫苗环境中。由于在宿主细胞溶质中自复制的能力,因此甲病毒载体通常能够在细胞内产生高拷贝数的表达盒,从而导致高水平的异源抗原产生。另外,载体通常是瞬时的,从而使得生物安全性得以提高以及减少对载体的免疫耐受性的诱导。与其他标准病毒载体(例如人类腺病毒)相比,公众通常还缺乏对甲病毒载体预先存在的免疫性。基于甲病毒的载体也通常导致对受感染细胞的细胞毒性响应。在一定程度上,细胞毒性在疫苗环境中对于适当刺激对所表达的异源抗原的免疫响应可为重要的。然而,所需细胞毒性的程度可为平衡作用,并且因此已开发数种减毒甲病毒,包括VEEV的TC-83菌株。因此,本文所述的抗原表达载体的实例可利用甲病毒骨架,其允许高水平的抗原表达、刺激对抗原的稳固免疫响应、不刺激对载体本身的免疫响应,并且可以安全方式使用。此外,抗原表达盒可经设计以通过优化载体使用的甲病毒序列(包括但不限于源自VEEV或其减毒衍生物TC-83的序列)而刺激不同水平的免疫响应。

[0185] 已使用甲病毒序列对数种表达载体设计策略进行工程化(Pushko1997)。在一种策略中,甲病毒载体设计包括在结构蛋白基因下游插入26S启动子序列元件的第二拷贝,接着是异源基因(Frolov 1993)。因此,除天然非结构蛋白和结构蛋白之外,还产生表达异源蛋白的额外亚基因组RNA。在这种系统中,存在用于产生感染性病毒粒子的所有元件,并且因此可能发生在非感染细胞中表达载体的反复轮感染。

[0186] 另一种表达载体设计利用辅助病毒系统(Pushko 1997)。在这种策略中,结构蛋白由异源基因代替。因此,在由仍完整的非结构基因介导病毒RNA的自复制之后,26S亚基因组RNA提供异源蛋白的表达。传统上,表达结构蛋白的额外载体然后例如通过细胞系的共转染以反式供应,以产生感染性病毒。系统详细描述于USPN 8,093,021中,其出于所有目的通过引用整体并入本文。辅助载体系统提供限制形成感染性粒子的可能性的益处,因此提高生物安全性。另外,辅助载体系统减小总载体长度,潜在提高复制和表达效率。因此,本文所述的抗原表达载体的实例可利用结构蛋白由抗原盒代替的甲病毒骨架,所得载体降低生物安全问题,同时由于整体表达载体尺寸减小而促进有效表达。

[0187] 经由脂质纳米粒子(LNP)递送

[0188] 在疫苗载体设计中考虑的一个重要方面是针对载体本身的免疫性(Riley 2017)。这可呈对载体本身(例如某些人类腺病毒系统)预先存在的免疫性形式,或呈在疫苗施用后对载体产生免疫性的形式。如果进行相同疫苗的多次施用(例如分开的初免和增强剂量),或者如果使用相同疫苗载体系统递送不同抗原盒,则后者是重要的考虑因素。

[0189] 在甲病毒载体的情况下,标准的递送方法是前面讨论的辅助病毒系统,其以反式提供衣壳、E1和E2蛋白以产生感染性病毒粒子。然而,重要的是要注意E1和E2蛋白通常是中

和抗体的主要靶标 (Strauss1994)。因此,如果感染性粒子被中和抗体靶向,则使用甲病毒载体将目标抗原递送至目标细胞的功效可能会降低。

[0190] 病毒粒子介导的基因递送的替代方案是使用纳米材料递送表达载体 (Riley 2017)。重要的是,纳米材料媒介物可由非免疫原性材料制成并且通常避免引发对递送载体本身的免疫性。这些材料可包括但不限于脂质、无机纳米材料和其他聚合物。脂质可为阳离子、阴离子或中性的。材料可为合成或天然来源的,并且在一些情况下是可生物降解的。脂质可包括脂肪、胆固醇、磷脂、脂质缀合物,包括但不限于聚乙二醇 (PEG) 缀合物 (聚乙二醇化脂质)、蜡、油、甘油酯和脂溶性维生素。

[0191] 脂质纳米粒子 (LNP) 是一种有吸引力的递送系统,因为脂质的两亲性使得能够形成膜和囊泡状结构 (Riley 2017)。一般而言,这些囊泡通过吸收至目标细胞的膜中并且将核酸释放至细胞溶质中来递送表达载体。另外,LNP可被进一步修饰或官能化以有助于靶向特定细胞类型。作为说明性实例,LNP的选择性和靶向递送可通过以下实现:1) 将脂质缀合配体 (例如,甘露糖) 结合到细胞类型特异性受体至LNP中,和/或2) 将与靶向抗体相互作用的膜束缚脂蛋白 (锚) 结合到LNP中。所述锚可以是蛋白质A/G和任何结构形式的抗体,包括 scFv、Fab和VHH单结构域抗体或具有在其N末端或在其C末端编码的外在脂化信号 (例如,棕榈酰化、异戊二烯化和肉豆蔻酰化) 的纳米抗体。LNP设计中的另一个考虑因素是靶向效率与细胞毒性之间的平衡。脂质组合物通常包括阳离子、中性、阴离子和两性脂质的限定混合物。在一些情况下,包括特定脂质以防止LNP聚集、防止脂质氧化、或提供有助于额外部分附着的功能性化学基团。脂质组合物可影响整体LNP大小和稳定性。在一个实例中,脂质组合物包含二亚油醇甲基-4-二甲基氨基丁酸酯 (MC3) 和MC3样分子。MC3和MC3样脂质组合物可经配制以包括一种或多种其他脂质,例如PEG或PEG缀合脂质、磷酸胆碱、磷酸乙醇胺、固醇或中性脂质。

[0192] 直接暴露于血清的核酸载体 (例如表达载体) 可具有数种不期望的结果,包括核酸由血清核酸酶降解或游离核酸对免疫系统的脱靶刺激。因此,包封甲病毒载体可用于避免降解,同时还避免潜在的脱靶效应。在某些实例中,甲病毒载体完全包封在递送媒介物内,例如在LNP的含水内部。甲病毒载体包封在LNP内可通过本领域结构域技术人员熟知的技术来进行,例如在微流液滴生成装置上进行的微流体混合和液滴生成。此类装置包括但不限于标准T形接头装置或流动聚焦装置。在一个实例中,所需脂质制剂 (例如含有MC3或MC3样的组合物) 与甲病毒递送载体和其他所需药剂并行提供至液滴生成装置,使得递送载体和所需药剂完全包封在基于MC3或MC3样的LNP内部。在一个实例中,液滴生成装置可控制所产生的LNP的尺寸范围和尺寸分布。例如,LNP的尺寸可在1至1000纳米直径范围内,例如1、10、50、100、500或1000纳米。在液滴生成后,包封表达载体的递送媒介物可经进一步处理或修饰以使其准备用于施用。

[0193] 其他载体

[0194] 本文所述的基于自扩增mRNA (SAM) 的组合物可与具有不同 (例如,非SAM) 载体骨架的其他组合物一起使用。例如,SAM组合物可用作疫苗策略的一部分,所述疫苗策略还使用黑猩猩来源的载体骨架来编码抗原盒。黑猩猩C68腺病毒 (本文也称为ChAdV68) 的核苷酸序列可用于抗原递送的疫苗组合物中 (参见SEQ ID NO:1)。源自C68腺病毒的载体的使用进一步描述于USPN 6,083,716、美国申请公开第US20200197500A1号和国际专利申请公开

W02020/243719中,所述文献各自出于所有目的通过引用整体并入本文。

[0195] 抗原

[0196] 抗原可包括核苷酸或多肽。例如,抗原可为编码多肽序列的RNA序列。可用于疫苗中的抗原可因此包括核苷酸序列或多肽序列。

[0197] 本文公开了包含通过本文公开的方法鉴定的肿瘤特异性突变的分离肽、包含已知肿瘤特异性突变的肽和通过本文公开的方法鉴定的突变多肽或其片段。新抗原肽可描述于其编码序列的上下文中,其中新抗原包括编码相关多肽序列的核苷酸序列(例如DNA或RNA)。

[0198] 本文还公开了这样的肽,其源自已知或已发现与正常细胞或组织相比在肿瘤细胞或癌组织中具有改变表达的任何多肽,例如已知或已发现与正常细胞或组织相比在肿瘤细胞或癌组织中异常表达的任何多肽。可例如在COSMIC数据库中发现可获得抗原肽的合适的多肽。COSMIC整理了关于人类癌症体细胞突变的全面信息。肽可含有肿瘤特异性突变。肿瘤抗原(例如,共有肿瘤抗原和肿瘤新抗原)可包括但不限于美国申请第17/058,128号中描述的那些,所述文献出于所有目的通过引用并入本文。

[0199] 本文还公开了衍生自与感染性疾病生物体、受试者中的感染或受试者的受感染细胞相关的任何多肽的肽。抗原可来源于感染性疾病生物体的核苷酸序列或多肽序列。感染性疾病生物体的多肽序列包括但不限于病原体衍生肽、病毒衍生肽、细菌衍生肽、真菌衍生肽和/或寄生虫衍生肽。感染性疾病生物体包括但不限于严重急性呼吸综合征相关冠状病毒(SARS)、严重急性呼吸综合征冠状病毒2(SARS-CoV-2)、埃博拉、HIV、乙型肝炎病毒(HBV)、流感、丙型肝炎病毒(HCV)、人乳头瘤病毒(HPV)、巨细胞病毒(CMV)、基孔肯雅病毒、呼吸道合胞病毒(RSV)、登革热病毒、正粘病毒科病毒和肺结核。

[0200] 本文公开了包含通过本文公开的方法鉴定的感染性疾病生物体特异性抗原或表位的分离肽、包含已知感染性疾病生物体特异性抗原或表位的肽、以及通过本文公开的方法鉴定的突变多肽或其片段。抗原肽可以在其编码序列的背景下进行描述,其中抗原包括编码相关多肽序列的核苷酸序列(例如,DNA或RNA)。

[0201] 本文所述的载体和相关组合物可用于递送来自任何生物体的抗原,包括它们的毒素或其他副产物,以预防和/或治疗与生物体或其副产物相关的感染或其他不良反应。

[0202] 可并入疫苗(例如,编码在盒中)的抗原包括可用于使人类或非人类动物免疫以抵抗病毒,例如感染人类和非人类脊椎动物的病原病毒的免疫原。抗原可选自多种病毒家族。需要免疫响应的理想病毒家族的实例包括小核糖核酸病毒家族,其包括引起约50%普通感冒病例的鼻病毒属;肠道病毒属,其包括脊髓灰质炎病毒、柯萨奇病毒(coxsackievirus)、埃可病毒(echovirus)和人类肠道病毒如甲型肝炎病毒;以及口蹄疫病毒属,其主要在非人类动物中引起口蹄疫。在小核糖核酸病毒家族中,靶抗原包括VP1、VP2、VP3、VP4和VPG。另一个病毒家族包括杯状病毒家族,其涵盖诺沃克(Norwalk)病毒群,它们是流行性胃肠炎的重要病原体。另一个可用于靶向抗原以在人类和非人类动物中刺激免疫响应的理想病毒家族是披膜病毒家族,其包括甲病毒属,其包括辛德毕斯病毒、罗斯河病毒和委内瑞拉、东方和西方马脑炎,以及风疹病毒属(rubivirus),包括风疹病毒。黄病毒科包括登革热、黄热病、日本脑炎、圣路易斯脑炎和蜱传脑炎病毒。其他靶抗原可能产生自丙型肝炎或冠状病毒家族,其包括多种非人类病毒,例如传染性支气管炎病毒(家禽)、猪传染性胃肠病毒(猪)、猪

血凝性脑脊髓炎病毒(猪)、猫传染性腹膜炎病毒(猫)、猫肠道冠状病毒(猫)、犬冠状病毒(狗)和人类呼吸道冠状病毒,其可导致普通感冒和/或非甲、乙或丙型肝炎。在冠状病毒家族中,靶抗原包括E1(也称为M或基质蛋白)、E2(也称为S或刺突蛋白)、E3(也称为HE或血凝素-埃尔特糖(elterose))糖蛋白(并非在所有冠状病毒中都存在)或N(核衣壳)。还有其他抗原可靶向弹状病毒家族,其包括水疱病毒属(例如,水疱性口炎病毒)和一般的狂犬病病毒(例如,狂犬病)。在弹状病毒家族中,合适的抗原可来源于G蛋白或N蛋白。丝状病毒科(其包括出血热病毒如马尔堡病毒和埃博拉病毒)可能是合适的抗原来源。副粘病毒家族包括1型副流感病毒、3型副流感病毒、3型牛副流感病毒、风疹病毒(腮腺炎病毒)、2型副流感病毒、4型副流感病毒、新城疫病毒(鸡)、牛瘟、麻疹病毒,其包括麻疹和犬瘟热,以及肺炎病毒,其包括呼吸道合胞病毒(例如,糖(G)蛋白和融合(F)蛋白,其序列可从GenBank获得)。流感病毒属于正粘病毒科并且可以是合适的抗原来源(例如,HA蛋白、N1蛋白)。布尼亚病毒家族包括布尼亚病毒属(加利福尼亚脑炎、拉克罗斯(La Crosse))、白蛉病毒(裂谷热)、汉坦病毒(普马拉病毒是一种血红热病毒)、内罗病毒(内罗毕绵羊病)和各种未指定的布尼亚病毒(bungavirus)。沙粒病毒家族提供了抗LCM和拉沙热病毒的抗原来源。呼肠孤病毒家族包括呼肠孤病毒属、轮状病毒属(其导致儿童急性胃肠炎)、环状病毒和培养病毒(科罗拉多多婢热、利庞博(Lebombo)(人类)、马脑病、蓝舌病)。逆转录病毒家族包括涵盖人类和兽医学疾病如猫白血病病毒、HTLVI和HTLVII、慢病毒(其包括人类免疫缺陷病毒(HIV)、猿免疫缺陷病毒(SIV)、猫免疫缺陷病毒(FIV)、马传染性贫血病毒和泡沫病毒(spumavirinal))的致癌病毒亚科。在慢病毒中,已经描述了许多合适的抗原并且可容易地选择。乳多空病毒家族包括多瘤病毒亚科(BKU和JCU病毒)和乳头瘤病毒亚科(与癌症或乳头瘤的恶性进展相关)。腺病毒家族包括引起呼吸道疾病和/或肠炎的病毒(EX、AD7、ARD、O.B.)。细小病毒家族猫细小病毒(猫肠炎)、猫泛白细胞减少病毒、犬细小病毒和猪细小病毒。疱疹病毒家族包括 α 疱疹病毒亚科,其涵盖单纯病毒属(HSVI、HSVII)、水痘病毒(伪狂犬病、水痘带状疱疹),和 β 疱疹病毒亚科,其包括巨细胞病毒属(人CMV、鼠巨细胞病毒),和 γ 疱疹病毒亚科,其包括淋巴潜隐病毒属、EBV(伯基特淋巴瘤)、传染性鼻气管炎、马立克氏病(Marek's disease)病毒和细长病毒属(rhadinovirus)。痘病毒家族包括脊索动物痘病毒亚科(chordopoxvirinae),其涵盖正痘病毒属(天花(Variola/Smallpox)和牛痘(Vaccinia/Cowpox))、副痘病毒、禽痘病毒、山羊痘病毒、兔痘病毒、猪痘病毒和昆虫痘病毒亚科。肝炎病毒病毒包括乙型肝炎病毒。一种可能是合适的抗原来源的未分类病毒是丁型肝炎病毒。其他病毒来源可包括禽传染性法氏囊病病毒以及猪呼吸和生殖综合征病毒。甲病毒家族包括马动脉炎病毒和各种脑炎病毒。

[0203] 可并入疫苗中(例如,编码在盒中)的抗原还包括可用于免疫人类或非人类动物以抵抗病原体的免疫原,所述病原体包括感染人类和非人类脊椎动物的细菌、真菌、寄生微生物或多细胞寄生虫。细菌病原体的实例包括致病性革兰氏阳性球菌,包括肺炎球菌;葡萄球菌;和链球菌。致病性革兰氏阴性球菌包括脑膜炎球菌;淋球菌。致病性肠道革兰氏阴性杆菌包括肠杆菌科(enterobacteriaceae);假单胞菌属(pseudomonas)、不动杆菌属(acinetobacteria)和艾肯氏菌属(eikenella);类鼻疽;沙门氏菌属(salmonella);志贺氏菌属(shigella);嗜血杆菌属(haemophilus)(流感嗜血杆菌(Haemophilus influenzae)、睡眠嗜血杆菌(Haemophilus somnus));莫拉菌属(moraxella);杜克雷嗜血杆菌

(*H. ducreyi*) (其导致软下疳);布鲁氏菌属(*brucella*);土拉热弗朗西斯菌(*Francisella tularensis*) (其导致土拉菌病);耶尔森氏菌属(*Yersinia*) (巴氏杆菌属(*Pasteurella*));串珠状链杆菌(*Streptobacillus moniliformis*)和螺旋菌属(*Spirillum*)。革兰氏阳性杆菌包括单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*);红斑丹毒丝菌(*Erysipelothrix rhusiopathiae*);白喉棒状杆菌(*Corynebacterium diphtheriae*) (白喉);霍乱;炭疽芽胞杆菌(*B. anthracis*) (炭疽病);多诺瓦斯病(*Donovanosis*) (腹股沟肉芽肿);和巴尔通体病(*Bartonellosis*)。由致病性厌氧菌引起的疾病包括破伤风;肉毒杆菌中毒;其他梭菌;肺结核;麻风;和其他分枝杆菌。具体细菌种类的实例是但不限于肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)、化脓性链球菌(*Streptococcus pyogenes*)、无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)、粪链球菌(*Streptococcus faecalis*)、卡他莫拉菌(*Moraxella catarrhalis*)、幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*)、脑膜炎奈瑟菌(*Neisseria meningitidis*)、淋病奈瑟菌(*Neisseria gonorrhoeae*)、沙眼衣原体(*Chlamydia trachomatis*)、肺炎衣原体(*Chlamydia pneumoniae*)、鹦鹉热衣原体(*Chlamydia psittaci*)、百日咳杆菌(*Bordetella pertussis*)、伤寒杆菌(*Salmonella typhi*)、鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)、霍乱沙门氏菌(*Salmonella choleraesuis*)、大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*)、志贺氏菌(*Shigella*)、霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)、白喉棒状杆菌(*Corynebacterium diphtheriae*)、结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)、鸟分枝杆菌(*Mycobacterium avium*)、胞内分枝杆菌(*Mycobacterium intracellulare*)复合体、奇异变形杆菌(*Proteus mirabilis*)、普通变形杆菌(*Proteus vulgaris*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、破伤风梭菌(*Clostridium tetani*)、问号钩端螺旋体(*Leptospira interrogans*)、伯氏疏螺旋体(*Borrelia burgdorferi*)、溶血巴斯德菌(*Pasteurella haemolytica*)、多杀巴斯德菌(*Pasteurella multocida*)、胸膜肺炎放线杆菌(*Actinobacillus pleuropneumoniae*)和鸡毒支原体(*Mycoplasma gallisepticum*)。致病性螺旋体疾病包括梅毒;密螺旋体病:雅司病(*yaws*)、品他病(*pinta*)和地方性梅毒;和钩端螺旋体病。由高等病原体细菌和病原真菌引起的其他感染包括放线菌病;诺卡氏菌病;隐球菌病(隐球菌)、芽生菌病(芽生菌)、组织胞浆菌病(组织胞浆菌)和球孢子菌病(球孢子菌);念珠菌病(念珠菌)、曲霉病(曲霉)和毛霉菌病;孢子丝菌病;副球孢子菌病、皮氏菌病、圆球菌病、足菌肿和色霉菌病;和皮肤癣菌病。立克次体感染包括斑疹伤寒、落基山斑疹热、Q热和立克次体痘。支原体和衣原体感染的实例包括:肺炎支原体(*Mycoplasma pneumoniae*);性病性淋巴肉芽肿;鹦鹉热;和围产期衣原体感染。致病性真核生物涵盖致病性原生动物和蠕虫,并且由此产生的感染包括:阿米巴病;疟疾;利什曼病(例如,由硕大利什曼原虫(*Leishmania major*)引起);锥虫病;弓形虫病(例如,由刚地弓形虫(*Toxoplasma gondii*)引起);卡氏肺孢子虫(*Pneumocystis carinii*);Trichans;刚地弓形虫;巴贝虫病;贾第鞭毛虫病(例如,由贾第鞭毛虫(*Giardia*)引起);旋毛虫病(例如,由滴虫(*Trichomonas*)引起);丝虫病;血吸虫病(例如,由血吸虫(*Schistosoma*)引起);线虫;吸虫(trematodes/fluke);和绦虫(cestode/tapeworm)感染。其他寄生虫感染可能由蛔虫(*Ascaris*)、鞭虫(*Trichuris*)、隐孢子虫(*Cryptosporidium*)和卡氏肺孢子虫等引起。

[0204] 本文还公开了衍生自与感染性疾病生物体、受试者中的感染或受试者的受感染细

胞相关的任何多肽的肽。抗原可来源于感染性疾病生物体的核酸序列或多肽序列。感染性疾病生物体的多肽序列包括但不限于病原体衍生肽、病毒衍生肽、细菌衍生肽、真菌衍生肽和/或寄生虫衍生肽。感染性疾病生物体包括但不限于严重急性呼吸综合征相关冠状病毒(SARS)、严重急性呼吸综合征冠状病毒2(SARS-CoV-2)、埃博拉、HIV、乙型肝炎病毒(HBV)、流感、丙型肝炎病毒(HCV)、人乳头瘤病毒(HPV)、巨细胞病毒(CMV)、基孔肯雅病毒、呼吸道合胞病毒(RSV)、登革热病毒、正粘病毒科家族病毒和肺结核。

[0205] 可选择预计呈递在细胞例如肿瘤细胞、受感染细胞或免疫细胞(包括专职抗原呈递细胞如树突状细胞)的细胞表面上的抗原。可选择预计具有免疫原性的抗原。

[0206] 由抗原核苷酸序列编码的一种或多种多肽可包含以下中的至少一者:IC50值小于1000nM的与MHC的结合亲和力,对于MHC I类肽,长度为8-15、8、9、10、11、12、13、14或15个氨基酸,在肽内或肽附近存在促进蛋白酶体切割的序列基序,以及存在促进TAP转运的序列基序。对于长度为6-30、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个氨基酸的MHC II类肽,在肽内或附近存在促进通过胞外或溶酶体蛋白酶(例如组织蛋白酶)切割或HLA-DM催化的HLA结合的序列基序。

[0207] 一种或多种抗原可呈递在肿瘤的表面。一种或多种抗原可呈递在受感染细胞的表面上。

[0208] 一种或多种抗原在患有肿瘤的受试者中可以是免疫原性的,例如,能够在受试者中刺激T细胞响应和/或B细胞响应。一种或多种抗原在患有或怀疑患有感染的受试者中可以是免疫原性的,例如,能够在受试者中刺激T细胞响应和/或B细胞响应。一种或多种抗原在处于感染风险的受试者中可以是免疫原性的,例如,能够在受试者中刺激T细胞响应和/或B细胞响应,从而提供针对感染的免疫保护(即免疫性),例如,刺激记忆T细胞、记忆B细胞和/或感染特异性抗体的产生。

[0209] 一种或多种抗原能够刺激B细胞响应,例如产生识别所述一种或多种抗原的抗体(例如识别感染性疾病抗原的抗体)。抗体可识别线性多肽序列或识别二级和三级结构。因此,B细胞抗原可包括线性多肽序列或具有二级和三级结构的多肽,包括但不限于全长蛋白质、蛋白质亚基、蛋白质结构域或已知或预测具有二级和三级结构的任何多肽序列。能够刺激B细胞对感染的响应的抗原可为在感染性疾病生物体表面发现的抗原。能够引发B细胞对感染的响应的抗原可为在感染性疾病生物体中表达的细胞内抗原。

[0210] 一种或多种抗原可包括能够刺激T细胞响应的抗原(例如,包括预测的T细胞表位序列的肽)和能够刺激B细胞响应的不同抗原(例如,全长蛋白质、蛋白质亚基、蛋白质结构域)的组合。

[0211] 在针对受试者产生疫苗的情况下,可排除在受试者中刺激自身免疫响应的一种或多种抗原。

[0212] 至少一种抗原肽分子(例如,表位序列)的大小可包含但不限于约5、约6、约7、约8、约9、约10、约11、约12、约13、约14、约15、约16、约17、约18、约19、约20、约21、约22、约23、约24、约25、约26、约27、约28、约29、约30、约31、约32、约33、约34、约35、约36、约37、约38、约39、约40、约41、约42、约43、约44、约45、约46、约47、约48、约49、约50、约60、约70、约80、约90、约100、约110、约120或更多个氨基分子残基,和可源自其中的任何范围。在具体实施方案中,抗原肽分子等于或小于50个氨基酸。

[0213] 抗原肽和多肽可为：对于MHC I类，15个残基或更少的长度并且通常由约8个至约11个残基、特别是9或10个残基组成；对于MHC II类，6-30个残基（包括端值）。

[0214] 如果需要，则可一以数种方式设计较长的肽。在一种情况下，当HLA等位基因上肽的呈递可能性经预测或已知时，较长的肽可由以下任一者组成：(1) 个别呈递的具有朝向每个相应基因产物的N末端和C末端延伸2-5个氨基酸的肽；(2) 所呈递的肽中的一些或全部与各自的延伸序列的串接。在另一种情况下，当测序揭示肿瘤中存在长(>10个残基)新表位序列（例如归因于产生新颖肽序列的移码、通读或内含子包含）时，较长的肽将由以下组成：(3) 新型肿瘤特异性或感染性疾病特异性氨基酸的整个区段，从而绕过了对最强HLA呈递的较短肽的基于计算或体外测试的选择的需要。在这两种情况下，使用较长的肽允许患者细胞进行内源性加工，并且可引起更有效的抗原呈递和刺激T细胞响应。较长的肽还可包括肽的全长蛋白质、蛋白质亚基、蛋白质结构域和其组合，例如在感染性疾病生物体中表达的那些。可包括较长的肽（例如，全长蛋白质、蛋白质亚基、蛋白质结构域）和其组合以刺激B细胞响应。

[0215] 抗原肽和多肽可呈递在HLA蛋白上。在一些方面，抗原肽和多肽以比野生型肽更大的亲和力呈递在HLA蛋白上。在一些方面，抗原肽或多肽的IC50可至少小于5000nM、至少小于1000nM、至少小于500nM、至少小于250nM、至少小于200nM、至少小于150nM、至少小于100nM、至少小于50nM或更小。

[0216] 在一些方面，抗原肽和多肽在施用至受试者时不刺激自身免疫响应和/或引起免疫耐受性。

[0217] 还提供了包含至少两种或更多种抗原肽的组合物。在一些实施方案中，所述组合物含有至少两种不同的肽。至少两种不同的肽可衍生自相同的多肽。不同的多肽是指肽因长度、氨基酸序列或两者而异。肿瘤特异性肽可衍生自已知或已发现含有肿瘤特异性突变的任何多肽，或衍生自已知或已发现与正常细胞或组织相比在肿瘤细胞或癌组织中具有改变表达的任何多肽的肽，例如已知或已发现与正常细胞或组织相比在肿瘤细胞或癌组织中异常表达的任何多肽。肽可衍生自已知或怀疑与感染性疾病生物体相关的任何多肽，或衍生自已知或已发现与正常细胞或组织相比在受感染细胞中具有改变表达的任何多肽（例如，感染性疾病多核苷酸或多肽，包括在宿主细胞中表达受限的感染性疾病多核苷酸或多肽）的肽。可衍生抗原肽的合适多肽可见于例如COSMIC数据库或AACR基因组学证据瘤形成信息交换(Genomics Evidence Neoplasia Information Exchange, GENIE)数据库。COSMIC整理了关于人类癌症体细胞突变的全面信息。AACR GENIE汇总临床级癌症基因组数据并将其与数万名癌症患者的临床结果联系起来。肽可包括肿瘤特异性突变。在一些方面，所述肿瘤特异性突变是特定癌症类型的驱动突变。

[0218] 具有所需活性或特性的抗原肽和多肽可经修饰以提供某些所需属性，例如改善的药理学特征，同时增加或至少保留基本上所有未经修饰的肽与所需MHC分子结合和激活适当T细胞的生物活性。例如，抗原肽和多肽可进行各种变化，例如保守或非保守取代，其中此类变化可在其使用中提供某些优势，例如改进的MHC结合、稳定性或呈递。保守取代意指用生物和/或化学类似的另一氨基酸残基置换氨基酸残基（例如，一个疏水性残基置换另一个氨基酸残基，或一个极性残基置换另一氨基酸残基）。取代包括以下组合，例如Gly、Ala；Val、Ile、Leu、Met；Asp、Glu；Asn、Gln；Ser、Thr；Lys、Arg；和Phe、Tyr。单氨基酸取代的效应

也可使用D-氨基酸探测。此类修饰可使用熟知的肽合成程序进行,如例如Merrifield, Science 232:341-347(1986),Barany和Merrifield,The Peptides,Gross和Meienhofer编(N.Y.,Academic Press),第1-284页(1979);以及Stewart和Young,Solid Phase Peptide Synthesis,(Rockford,Ill.,Pierce),第2版(1984)中所述。

[0219] 肽和多肽用各种氨基酸模拟物或非天然氨基酸修饰可在提高肽和多肽的体内稳定性方面特别有用。稳定性可以多种方式加以测定。例如,肽酶和各种生物介质(例如人类血浆和血清)已用于测试稳定性。参见例如Verhoef等人,Eur.J Drug Metab Pharmacokin.11:291-302(1986)。肽的半衰期可使用25%人类血清(v/v)测定方便地确定。方案一般如下。汇集的人类血清(AB型,非热灭活)在使用之前通过离心去脂。血清然后用RPMI组织培养基稀释至25%并用于测试肽稳定性。在预定时间间隔下,移出少量反应溶液并添加至6%三氯乙酸或乙醇水溶液中。将混浊的反应样品冷却(4°C)15分钟,并且然后旋转集结沉淀的血清蛋白质。然后使用稳定性特定的色谱条件通过反相HPLC来判定肽的存在。

[0220] 肽和多肽可经修饰以提供除改进的血清半衰期以外的所需属性。例如,肽刺激CTL活性的能力可通过与含有至少一个能够刺激T辅助细胞响应的表位的序列连接来增强。免疫原性肽/T辅助细胞缀合物可通过间隔分子连接。间隔子通常由相对较小的中性分子(例如氨基酸或氨基酸模拟物)构成,其在生理条件下基本上不带电。间隔子通常选自例如Ala、Gly或非极性氨基酸或中性极性氨基酸的其他中性间隔子。应理解,任选存在的间隔子无需由相同残基组成,并且因此可为杂寡聚物或均寡聚物。当存在时,间隔子将通常是至少一个或两个残基,更通常是三至六个残基。或者,肽可在无间隔子的情况下连接至T辅助肽。

[0221] 抗原肽可直接或经由在肽的氨基或羧基端处的间隔子连接至T辅助肽。抗原肽或T辅助肽的氨基端可被酰化。示例性T辅助肽包括破伤风类毒素830-843、流感307-319、疟疾孢子382-398和378-389。

[0222] 蛋白质或肽可通过本领结构域技术人员已知的任何技术制造,包括经由标准分子生物学技术表达蛋白质、多肽或肽;从天然来源分离蛋白质或肽;或化学合成蛋白质或肽。先前已公开对应于各种基因的核苷酸和蛋白质、多肽和肽序列,并且可见于本领结构域普通技术人员已知的计算机化数据库中。一种此类数据库是位于美国国家卫生研究院(National Institutes of Health)网站的美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information)的Genbank和GenPept数据库。已知基因的编码区可使用本文所公开或本领结构域普通技术人员应知晓的技术扩增和/或表达。或者,蛋白质、多肽和肽的各种市售制剂是本领域结构域技术人员已知的。

[0223] 在另一方面,抗原包括编码抗原肽或其部分的核酸(例如多核苷酸)。多核苷酸可为例如DNA、cDNA、PNA、CNA、RNA(例如mRNA)、单链和/或双链、或原生或稳定化形式的多核苷酸,例如具有硫代磷酸骨架的多核苷酸,或其组合,并且其可含有或可不含内含子。可对编码抗原的多核苷酸序列进行序列优化以改进表达,例如通过改进转录、翻译、转录后加工和/或RNA稳定性。例如,可对编码抗原的多核苷酸序列进行密码子优化。本文中的“密码子优化”是指就给定生物体的密码子偏倚而言,用经常使用的同义密码子替换不经常使用的密码子。可对多核苷酸序列进行优化以改进转录后加工,例如优化以减少意外剪接,例如通过去除剪接基序(例如,典型和/或隐秘/非典型剪接供体、分支和/或受体序列)和/或引入

外源剪接基序(例如剪接供体、分支和/或受体序列)以偏向偏好的剪接事件。外源内含子序列包括但不限于源自SV40(例如,SV40微型内含子)和源自免疫球蛋白(例如,人 β -珠蛋白基因)的那些。外源内含子序列可并入在启动子/增强子序列和抗原序列之间。Callendret等人(Virology.2007年7月5日;363(2):288-302)更详细地描述了用于表达载体的外源内含子序列,所述文献出于所有目的通过引用并入本文。可对多核苷酸序列进行优化以改进转录物稳定性,例如通过去除RNA不稳定性基序(例如,富含AU的元件和3' UTR基序)和/或重复核苷酸序列。可对多核苷酸序列进行优化以改进准确转录,例如通过去除隐秘的转录起始子和/或终止子。可对多核苷酸序列进行优化以改进翻译和翻译准确性,例如通过去除隐秘的AUG起始密码子、过早的聚A序列和/或二级结构基序。可对多核苷酸序列进行优化以改进转录物的核输出,例如通过添加组成型转运元件(CTE)、RNA转运元件(RTE)或土拨鼠转录后调控元件(WPRE)。Callendret等人(Virology.2007年7月5日;363(2):288-302)更详细地描述了用于表达载体的核输出信号,所述文献出于所有目的通过引用并入本文。多核苷酸序列可关于GC含量进行优化,例如以反映给定生物体的平均GC含量。序列优化可平衡一种或多种序列特性,例如转录、翻译、转录后加工和/或RNA稳定性。序列优化可产生平衡了转录、翻译、转录后加工和RNA稳定性中的每一者的最佳序列。序列优化算法是本领域结构域技术人员已知的,例如GeneArt(Thermo Fisher)、Codon Optimization Tool(IDT)、Cool Tool(University of Singapore)、SGI-DNA(La Jolla California)。可分别对抗原编码蛋白的一个或多个区结构域进行序列优化。

[0224] 另一方面提供了一种能够表达多肽或其部分的表达载体。不同细胞类型的表达载体在本领域结构域中是熟知的并且无需过度实验便可选择。一般而言,DNA以适当定向插入至表达载体(例如质粒)中并以正确阅读框进行表达。如果需要,DNA可连接至由所需宿主识别的适当转录和翻译调节控制核苷酸序列,但此类控制件通常可用于表达载体中。载体然后经由标准技术引入至宿主中。指导可见于例如Sambrook等人(1989)Molecular Cloning,A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory,Cold Spring Harbor,N.Y.中。

[0225] 疫苗组合物

[0226] 本文还公开了一种免疫原性组合物,例如疫苗组合物,其能够引起特异性免疫反应,例如肿瘤特异性免疫反应或感染性疾病生物体特异性免疫反应。疫苗组合物通常包含一种或多种抗原,例如,使用本文描述的方法选择或选自病原体衍生肽、病毒衍生肽、细菌衍生肽、真菌衍生肽和/或寄生虫衍生肽。疫苗组合物也可以称为疫苗。

[0227] 疫苗可含有1至30种肽;2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30种不同的肽;6、7、8、9、10、11、12、13或14种不同的肽;或12、13或14种不同的肽。肽可包括翻译后修饰。疫苗可含有1至100或更多种核苷酸序列;2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100或更多种不同的核苷酸序列;6、7、8、9、10、11、12、13或14种不同的核苷酸序列;或12、13或14种不同的核苷酸序列。疫苗可含有1至30种抗原序列;2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、

45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100或更多种不同的抗原序列；6、7、8、9、10、11、12、13或14种不同的抗原序列；或12、13或14种不同的抗原序列。

[0228] 疫苗可含有1至30种抗原编码核酸序列；2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100或更多种不同的抗原编码核酸序列；6、7、8、9、10、11、12、13或14种不同的抗原编码核酸序列；或12、13或14种不同的抗原编码核酸序列。抗原编码核酸序列可指抗原“盒”的抗原编码部分。本文更详细地描述了抗原盒的特征。抗原编码核酸序列可含有一种或多种表位编码核酸序列(例如,编码串接的T细胞表位的抗原编码核酸序列)。

[0229] 疫苗可含有1至30种不同的表位编码核酸序列；2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100或更多种不同的表位编码核酸序列；6、7、8、9、10、11、12、13或14种不同的表位编码核酸序列；或12、13或14种不同的表位编码核酸序列。表位编码核酸序列可指单个表位序列的序列,例如编码串接的T细胞表位的抗原编码核酸序列中的T细胞表位中的每一者。

[0230] 疫苗可含有表位编码核酸序列的至少两个重复序列。如本文所用,“重复序列”是指抗原编码核酸序列内相同的核酸表位编码核酸序列(包括本文所述的任选的5'接头序列和/或任选的3'接头序列)的两次或更多次迭代。在一个实例中,盒的抗原编码核酸序列部分编码表位编码核酸序列的至少两个重复序列。在进一步的非限制性实例中,盒的抗原编码核酸序列部分编码超过一个不同的表位,并且至少一个不同的表位由编码所述不同表位的核酸序列的至少两个重复序列编码(即,至少两个不同的表位编码核酸序列)。在说明性的非限制性实例中,抗原编码核酸序列编码由表位编码核酸序列表位编码序列A(E_A)、表位编码序列B(E_B)和表位编码序列C(E_C)编码的表位A、B和C,并且具有至少一个不同表位的重复序列的示例性抗原编码核酸序列由但不限于下式说明:

[0231] -一个不同表位的重复序列(表位A的重复序列):

[0232] $E_A-E_B-E_C-E_A$;或

[0233] $E_A-E_A-E_B-E_C$

[0234] -多个不同表位的重复序列(表位A、B和C的重复序列):

[0235] $E_A-E_B-E_C-E_A-E_B-E_C$;或

[0236] $E_A-E_A-E_B-E_B-E_C-E_C$

[0237] -多个不同表位的多次重复序列(表位A、B和C的重复序列):

[0238] $E_A-E_B-E_C-E_A-E_B-E_C-E_A-E_B-E_C$;或

[0239] $E_A-E_A-E_A-E_B-E_B-E_B-E_C-E_C-E_C$

[0240] 上述实例不是限制性的,并且具有至少一个不同表位的重复序列的抗原编码核酸序列可以任何顺序或频率编码每个不同表位。例如,顺序和频率可以是不同表位的随机排列,例如,在具有表位A、B和C的实例中,通过式 $E_A-E_B-E_C-E_C-E_A-E_B-E_A-E_C-E_A-E_C-E_C-E_B$ 。

[0241] 本文还提供了一种抗原编码盒,所述抗原编码盒具有至少一个由下式从5'至3'描述的抗原编码核酸序列:

$$[0242] \quad (E_x - (E_n^N)_y)_z$$

[0243] 其中E表示包含至少一种不同的表位编码核酸序列中的至少一者的核苷酸序列,

[0244] n表示单独的不同的表位编码核酸序列的数目并且是包括0的任何整数,

[0245] E^N 表示包含对于每个相应n的单独不同的表位编码核酸序列的核苷酸序列,

[0246] 对于z的每次迭代: $x=0$ 或 1 ,对于每个n, $y=0$ 或 1 ,和x或 $y=1$ 中的至少一者,并且

[0247] $z=2$ 或更大,其中所述抗原编码核酸序列包含E、给定 E^N 或其组合的至少两次迭代。

[0248] 每个E或 E^N 可独立地包含本文所述的任何表位编码核酸序列(例如编码感染性疾病T细胞表位和/或新抗原表位的肽)。例如,每个E或 E^N 可独立地包含由式 $(L5_b - N_c - L3_d)$ 从5'至3'描述的核苷酸序列,其中N包含与每个E或 E^N 相关的不同表位编码核酸序列,其中 $c=1$,L5包含5'接头序列,其中 $b=0$ 或 1 ,并且L3包含3'接头序列,其中 $d=0$ 或 1 。本文进一步描述了可使用的表位和接头。

[0249] 表位编码核酸序列的重复序列(包括任选的5'接头序列和/或任选的3'接头序列)可彼此直接线性连接(例如,如上所示的 $E_A - E_A - \dots$)。表位编码核酸序列的重复序列可被一个或多个额外的核苷酸序列分开。一般而言,表位编码核酸序列的重复序列可被适用于本文所述组合物的任何大小的核苷酸序列分开。在一个实例中,表位编码核酸序列的重复序列可由单独的不同的表位编码核酸序列分开(例如,如上所示的 $E_A - E_B - E_C - E_A \dots$)。在重复序列被单个单独的不同表位编码核酸序列分开并且每个表位编码核酸序列(包括任选的5'接头序列和/或任选的3'接头序列)编码长度为25个氨基酸的肽的实例中,重复序列可被75个核苷酸分开,例如在以 $E_A - E_B - E_A \dots$ 表示的抗原编码核酸中, E_A 被75个核苷酸分开。在一个说明性实例中,具有编码25聚体抗原Trp1(VTNTMFVTAPDNLGYMYEVQWPGQ)和Trp2(TQPQIANCSVYDFVWLHYYSVRDT)的重复序列的序列VTNTMFVTAPDNLGYMYEVQWPGQTQPQIANCSVYDFVWLHYYSVRDTVTNTMFVTAPDNLGYMYEVQWPGQTQPQIANCSVYDFVWLHYYSVRDT的抗原编码核酸序列,Trp1的重复序列由25聚体Trp2分开并且因此Trp1表位编码核酸序列的重复序列由75个核苷酸的Trp2表位编码核酸序列分开。在重复序列由2、3、4、5、6、7、8或9个单独的不同表位编码核酸序列分开并且每个表位编码核酸序列(包括任选的5'接头序列和/或任选的3'接头序列)编码长度为25个氨基酸的肽的实例中,所述重复序列可分别由150、225、300、375、450、525、600或675个核苷酸分开。

[0250] 在一个实施方案中,选择不同肽和/或多肽或编码其的核苷酸序列,使得肽和/或多肽能够与不同MHC分子(例如不同MHC I类分子和/或不同MHC II类分子)结合。在一些方面,一种疫苗组合物包含能够与最常出现的MHC I类分子和/或不同MHC II类分子缔合的肽和/或多肽的编码序列。因此,疫苗组合物可包含能够与至少2个优选的、至少3个优选的或至少4个优选的MHC I类分子和/或不同MHC II类分子缔合的不同片段。

[0251] 疫苗组合物能够刺激特异性细胞毒性T细胞响应和/或特异性辅助T细胞响应。疫

苗组合物能够刺激特异性细胞毒性T细胞响应和特异性辅助T细胞响应。

[0252] 疫苗组合物能够刺激特异性B细胞响应(例如,抗体响应)。

[0253] 疫苗组合物能够刺激特异性细胞毒性T细胞响应、特异性辅助T细胞响应和/或特异性B细胞响应。疫苗组合物能够刺激特异性细胞毒性T细胞响应和特异性B细胞响应。疫苗组合物能够刺激特异性辅助T细胞响应和特异性B细胞响应。疫苗组合物能够刺激特异性细胞毒性T细胞响应、特异性辅助T细胞响应和特异性B细胞响应。

[0254] 疫苗组合物还可包含佐剂和/或载剂。有用的佐剂和载剂的实例在下文中给出。组合物可与载剂缔合,例如蛋白质或抗原呈递细胞,例如能够将肽呈递至T细胞的树突状细胞(DC)。

[0255] 佐剂是混合至疫苗组合物中增加或以其他方式修饰对抗原的免疫响应的任何物质。载剂可为支架结构,例如能够与抗原缔合的多肽或多糖。任选地,佐剂是共价或非共价缀合的。

[0256] 佐剂提高对抗原的免疫响应的能力通常显现为免疫介导性响应的显著或实质性增加或疾病症状的减少。例如,体液免疫的增强典型地显现为针对抗原所产生的抗体滴度的显著增大,并且T细胞活性的增强典型地显现为细胞增殖或细胞性细胞毒性或细胞因子分泌的增强。佐剂还可改变免疫响应,例如通过将主要体液或Th响应变为主要细胞或Th响应。

[0257] 合适的佐剂包括但不限于1018ISS、明矾、铝盐、Amplivax、AS15、BCG、CP-870,893、CpG7909、CyaA、dSLIM、GM-CSF、IC30、IC31、咪喹莫特(Imiquimod)、ImuFact IMP321、IS Patch、ISS、ISCOMATRIX、JuvImmune、LipoVac、MF59、单磷酸基脂质A、Montanide IMS1312、Montanide ISA 206、Montanide ISA 50V、Montanide ISA-51、OK-432、OM-174、OM-197-MP-EC、ONTAK、PepTel载体系统、PLG微粒、雷西莫特(resiquimod)、SRL172、病毒粒子和其他病毒样粒子、YF-17D、VEGF捕获剂、R848、 β -葡聚糖、Pam3Cys、Aquila的源自皂素的QS21刺激子(Aquila Biotech, Worcester, Mass., USA)、分支杆菌提取物和合成细菌细胞壁模拟物,以及其他专用佐剂,例如Ribi的Detox.Quil或Superfos。例如弗氏(Freund's)不完全或GM-CSF的佐剂是有用的。先前已描述对树突状细胞具有特异性的数种免疫佐剂(例如MF59)及其制备(Dupuis M等人,Cell Immunol.1998;186(1):18-27;Allison A C;Dev Biol Stand.1998;92:3-11)。还可使用细胞因子。数种细胞因子已直接关联于:影响树突状细胞迁移至淋巴组织(例如TNF- α)、加速树突状细胞成熟变为T-淋巴细胞的有效抗原呈递细胞(例如GM-CSF、IL-1和IL-4)(美国专利第5,849,589号,其通过引用整体明确并入本文)以及充当免疫佐剂(例如IL-12)(Gabrilovich D I等人,J Immunother Emphasis Tumor Immunol.1996(6):414-418)。

[0258] 还已报道CpG免疫刺激性寡核苷酸增强佐剂在疫苗环境中的效应。还可使用其他TLR结合分子,例如结合RNA的TLR 7、TLR 8和/或TLR 9。

[0259] 有用佐剂的其他实例包括但不限于经化学修饰的CpG(例如CpR、Idera)、聚(I:C)(例如聚i:CI2U)、非CpG细菌DNA或RNA以及免疫活性小分子和抗体,例如环磷酰胺、舒尼替尼(sunitinib)、贝伐单抗(bevacizumab)、西乐葆(celebrex)、NCX-4016、西地那非(sildenafil)、他达拉非(tadalafil)、伐地那非(vardenafil)、索拉菲尼(sorafenib)、XL-999、CP-547632、帕佐洋尼(pazopanib)、ZD2171、AZD2171、伊匹单抗、曲美木单抗

(tremelimumab)和SC58175,其可起治疗作用和/或充当佐剂。佐剂和添加剂的量和浓度可容易由本领域结构域技术人员确定而无需过度实验。额外佐剂包括集落刺激因子,例如颗粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF,沙格司亭(sargramostim))。

[0260] 疫苗组合物可包含超过一种的不同佐剂。此外,治疗性组合物可包含任何佐剂物质,包括以上各者中的任一者或其组合。还预期,疫苗和佐剂可一起或以任何适当的顺序分开施用。

[0261] 载剂(或赋形剂)可独立于佐剂存在。载剂的功能可例如是增加特定突变体的分子量以提高活性或免疫原性、赋予稳定性、增加生物活性或增加血清半衰期。此外,载剂可辅助呈递肽至T细胞。载剂可为本领域结构域技术人员已知的任何合适的载剂,例如蛋白质或抗原呈递细胞。载剂蛋白质可为但不限于匙孔螺血氰蛋白、血清蛋白质(例如转铁蛋白)、牛血清白蛋白、人类血清白蛋白、甲状腺球蛋白或卵白蛋白、免疫球蛋白或激素,例如胰岛素或棕榈酸。对于人类免疫,载剂通常是生理学上可接受的载剂,其为人类可接受的并且安全的。然而,破伤风类毒素和/或白喉类毒素是合适的载剂。或者,载剂可为葡聚糖,例如琼脂糖。

[0262] 细胞毒性T细胞(CTL)识别呈结合至MHC分子的肽形式而非完整外来抗原自身的抗原。MHC分子本身位于抗原呈递细胞的细胞表面上。因此,如果存在肽抗原、MHC分子和APC的三聚体复合物,则可能激活CTL。相应地,如果不仅将肽用于激活CTL,而且如果另外添加具有相应MHC分子的APC,则可加强免疫响应。因此,在一些实施方案中,疫苗组合物另外含有至少一种抗原呈递细胞。

[0263] 抗原还可包括于基于病毒载体的疫苗平台中,例如牛痘、禽痘、自复制甲病毒、马拉巴病毒(marabavirus)、腺病毒(参见例如Tatsis等人,Adenoviruses, Molecular Therapy (2004) 10, 616-629)或慢病毒,包括但不限于第二、第三或杂交第二/第三代慢病毒和任一代的重组慢病毒,其设计成靶向特定细胞类型或受体(参见例如Hu等人, Immunization Delivered by Lentiviral Vectors for Cancer and Infectious Diseases, Immunol Rev. (2011) 239(1):45-61; Sakuma等人, Lentiviral vectors: basic to translational, Biochem J. (2012) 443(3):603-18; Cooper等人, Rescue of splicing-mediated intron loss maximizes expression in lentiviral vectors containing the human ubiquitin C promoter, Nucl. Acids Res. (2015) 43(1):682-690; Zufferey等人, Self-Inactivating Lentivirus Vector for Safe and Efficient In Vivo Gene Delivery, J. Virol. (1998) 72(12):9873-9880)。取决于上述基于病毒载体的疫苗平台的包装能力,这种方法可递送编码一种或多种抗原肽的一种或多种核苷酸序列。序列可侧接非突变序列,可由接头分开或者可在前面有一种或多种靶向亚细胞区室的序列(参见例如Gros等人, Prospective identification of neoantigen-specific lymphocytes in the peripheral blood of melanoma patients, Nat Med. (2016) 22(4):433-8; Stronen等人, Targeting of cancer neoantigens with donor-derived T cell receptor repertoires, Science. (2016) 352(6291):1337-41; Lu等人, Efficient identification of mutated cancer antigens recognized by T cells associated with durable tumor regressions, Clin Cancer Res. (2014) 20(13):3401-10)。在引入宿主中后,受感染细胞表达抗原,从而刺激针对一种或多种肽的宿主免疫(例如CTL)响应。可用于免疫方案中

的牛痘载体和方法描述于例如美国专利第4,722,848号中。另一种载体是卡介苗(Bacille Calmet te Guerin,BCG)。BCG载体描述于Stover等人(Nature 351:456-460(1991))中。根据本文描述,可用于抗原的治疗性施用或免疫的各种其他疫苗载体,例如伤寒沙门氏菌载体等,对于本领结构域技术人员将是显而易见的。

[0264] 抗原盒

[0265] 鉴于本文提供的教导,用于选择一种或多种抗原、“抗原盒”的克隆和构建以及将其插入病毒载体中的方法在本领结构域技术范围内。“抗原盒”是指经选择的抗原或多种抗原(例如,抗原编码核酸序列)与转录抗原和表达转录产物所必需的其他调控元件的组合。经选择的抗原或多种抗原可指不同的表位序列,例如,盒中的抗原编码核酸序列可编码表位编码核酸序列(或多个表位编码核酸序列),使得表位被转录和表达。一种抗原或多种抗原可以允许转录的方式可操作地连接至调控组件。此类组件包括可驱动一种或多种抗原在用病毒载体转染的细胞中表达的常规调控元件。因此,抗原盒还可含有经选择的启动子,所述启动子与一种或多种抗原连接并且与其他任选的调控元件一起位于重组载体的经选择的病毒序列内。盒可包括一种或多种抗原,例如一种或多种病原体衍生肽、病毒衍生肽、细菌衍生肽、真菌衍生肽、寄生虫衍生肽和/或肿瘤衍生肽。盒可具有一种或多种抗原编码核酸序列,例如含有多个抗原编码核酸序列的盒,每个抗原编码核酸序列独立地可操作地连接至单独的启动子和/或使用其他多顺反子系统例如2A核糖体跳跃序列元件(例如,E2A、P2A、F2A或T2A序列)或内部核糖体进入位点(IRES)序列元件连接在一起。接头也可具有切割位点,例如TEV或弗林蛋白酶切割位点。具有切割位点的接头可与其他元件组合使用,例如多顺反子系统的那些。在一个非限制性说明性实例中,弗林蛋白酶切割位点可与2A核糖体跳跃序列元件结合使用,使得弗林蛋白酶切割位点被配置为促进翻译后2A序列的去除。在含有超过一个抗原编码核酸序列的盒中,每个抗原编码核酸序列可含有一种或多种表位编码核酸序列(例如,编码串接的T细胞表位的抗原编码核酸序列)。

[0266] 有用的启动子可为组成型启动子或经调控(诱导型)启动子,其将能够控制有待表达的抗原的量。例如,合乎需要的启动子是巨细胞病毒立即早期启动子/增强子的启动子[参见例如Boshart等人,Cell,41:521-530(1985)]。另一种合乎需要的启动子包括劳斯肉瘤(Rous sarcoma)病毒LTR启动子/增强子。另一种启动子/增强子序列是鸡细胞质 β -肌动蛋白启动子[T.A.Kost等人,Nucl.Acids Res.,11(23):8287(1983)]。其他适合或合乎需要的启动子可由本领结构域技术人员选择。

[0267] 抗原盒还可包括对病毒载体序列异源的核酸序列,包括提供转录物的有效聚腺苷酸化(聚(A)、聚-A或pA)的信号的序列和具有功能性剪接供体和受体位点的内含子。本发明的示例性载体中采用的普通聚-A序列是源自乳多泡病毒SV-40的聚-A序列。聚-A序列通常可在基于抗原的序列之后和在病毒载体序列之前插入盒中。普通内含子序列也可源自SV-40,并且被称为SV-40T内含子序列。抗原盒还可含有此类内含子,位于启动子/增强子序列与抗原之间。这些和其他普通载体元件的选择是常规的[参见例如Sambrook等人,“Molecular Cloning.A Laboratory Manual.”,第2版,Cold Spring Harbor Laboratory,New York(1989)和其中引用的参考文献]并且许多此类序列可从商业和工业来源以及Genbank获得。

[0268] 抗原盒可具有一种或多种抗原。例如,给定盒可包括1-10、1-20、1-30、10-20、15-

25、15-20、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或更多种抗原。抗原可直接彼此连接。抗原也可利用接头彼此连接。抗原相对于彼此可处于任何方向,包括N至C或C至N。

[0269] 如本文别处所述,抗原盒可定位于病毒载体中的任何经选择缺失的位点中,例如VEEV骨架的缺失结构蛋白或基于ChAd的载体的E1基因区缺失或E3基因区缺失的位点,以及可选择的其他位点。

[0270] 抗原盒可使用下式描述以描述每个元件的有序序列,从5'至3' :

$$[0271] \quad (P_a - (L5_b - N_c - L3_d)_X)_Z - (P2_h - (G5_e - U_f)_Y)_W - G3_g$$

[0272] 其中P和P2包含启动子核苷酸序列,N包含MHC I类表位编码核酸序列,L5包含5'接头序列,L3包含3'接头序列,G5包含编码氨基酸接头的核酸序列,G3包含编码氨基酸接头的至少一个核酸序列中的一者,U包含MHC II类抗原编码核酸序列,其中对于每个X,相应Nc是表位编码核酸序列,其中对于每个Y,相应Uf是通用MHC II类表位编码核酸序列。通用序列可包含破伤风类毒素和PADRE中的至少一者。通用序列可包含破伤风类毒素肽。通用序列可包含PADRE肽。通用序列可包含破伤风类毒素和PADRE肽。所述组合物和有序序列可进一步通过选择存在元件的数目来定义,例如其中a=0或1,其中b=0或1,其中c=1,其中d=0或1,其中e=0或1,其中f=1,其中g=0或1,其中h=0或1,X=1至400,Y=0、1、2、3、4或5,Z=1至400,并且W=0、1、2、3、4或5。

[0273] 在一个实例中,存在的元件包括其中a=0,b=1,d=1,e=1,g=1,h=0,X=10,Y=2,Z=1,和W=1,其描述其中无额外启动子存在(例如,仅存在由载体骨架如RNA甲病毒骨架提供的启动子核苷酸序列),存在10个MHC I类表位,每个N存在5'接头,每个N存在3'接头,存在2个MHC II类表位,存在连接两个MHC II类表位的接头,存在将两个MHC II类表位的5'端连接至最终MHC I类表位的3'接头的接头,并且存在将两个MHC II类表位的3'端连接至载体骨架(例如,RNA甲病毒骨架)的接头。将抗原盒的3'端连接至载体骨架(例如,RNA甲病毒骨架)的实例包括直接连接至由载体骨架提供的3' UTR元件(例如3' 19-nt CSE)。将抗原盒的5'端连接至载体骨架(例如,RNA甲病毒骨架)的实例包括直接连接至载体骨架的启动子或5' UTR元件,例如亚基因组启动子序列(例如,26S亚基因组启动子序列)、甲病毒5' UTR、51-nt CSE或24-nt CSE。

[0274] 其他实例包括:其中a=1,描述其中存在除载体骨架(例如,RNA甲病毒骨架)所提供的启动子核苷酸序列以外的启动子;其中a=1并且Z大于1,其中存在除载体骨架所提供的启动子核苷酸序列以外的多个启动子,其各自驱动1个或多个不同MHC I类表位编码核酸序列的表达;其中h=1,描述其中存在单独启动子以驱动MHC II类表位编码核酸序列的表达;以及其中g=0,描述MHC II类表位编码核酸序列(如果存在)直接连接至载体骨架(例如,RNA甲病毒骨架)。

[0275] 其他实例包括其中所存在的每个MHC I类表位可具有5'接头、3'接头,两者都不具有,或具有两者。在其中同一抗原盒中存在超过一种MHC I类表位的实例中,一些MHC I类表位可具有5'接头和3'接头两者,而其他MHC I类表位可具有5'接头、3'接头或两者均不具有。在其中同一抗原盒中存在超过一种MHC I类表位的其他实例中,一些MHC I类表位可具有5'接头或3'接头,而其他MHC I类表位可具有5'接头、3'接头或两者均不具有。

[0276] 在其中同一抗原盒中存在超过一种MHC II类表位的实例中,一些MHC II类表位可

具有5'接头和3'接头两者,而其他MHC II类表位可具有5'接头、3'接头或两者均不具有。在其中同一抗原盒中存在超过一种MHC II类表位的其他实例中,一些MHC II类表位可具有5'接头或3'接头,而其他MHC II类表位可具有5'接头、3'接头或两者均不具有。

[0277] 其他实例包括其中所存在的每个抗原可具有5'接头、3'接头,两者都不具有,或具有两者。在其中同一抗原盒中存在超过一种抗原的实例中,一些抗原可具有5'接头和3'接头两者,而其他抗原可具有5'接头、3'接头或两者均不具有。在其中同一抗原盒中存在超过一种抗原的其他实例中,一些抗原可具有5'接头或3'接头,而其他抗原可具有5'接头、3'接头或两者均不具有。

[0278] 启动子核苷酸序列P和/或P2可与载体骨架如RNA甲病毒骨架所提供的启动子核苷酸序列相同。例如,由载体骨架提供的启动子序列Pn和P2可各自包含亚基因组启动子序列(例如,26S亚基因组启动子序列)或CMV启动子。启动子核苷酸序列P和/或P2可不同于载体骨架(例如,RNA甲病毒骨架)所提供的启动子核苷酸序列,以及可彼此不同。

[0279] 5'接头L5可为原生序列或非天然序列。非天然序列包括但不限于AAY、RR和DPP。3'接头L3也可为原生序列或非天然序列。另外,L5和L3可两者均为原生序列,两者均为非天然序列,或者一者可为原生的并且另一者可为非天然的。对于每个X,氨基酸接头的长度可为2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100或更多个氨基酸。对于每个X,氨基酸接头的长度也可为至少3、至少4、至少5、至少6、至少7、至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少16、至少17、至少18、至少19、至少20、至少21、至少22、至少23、至少24、至少25、至少26、至少27、至少28、至少29、或至少30个氨基酸。

[0280] 对于每个Y,氨基酸接头G5的长度可为2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100或更多个氨基酸。对于每个Y,氨基酸接头的长度也可为至少3、至少4、至少5、至少6、至少7、至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少16、至少17、至少18、至少19、至少20、至少21、至少22、至少23、至少24、至少25、至少26、至少27、至少28、至少29、或至少30个氨基酸。

[0281] 氨基酸接头G3的长度可为2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100或更多个氨基酸。G3的长度也可为至少3、至少4、至少5、至少6、至少7、至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少16、至少17、至少18、至少19、至少20、至少21、至少22、至少23、至少24、至少25、至少26、至少27、至少28、至少29、或至少30个氨基酸。

[0282] 对于每个X,每个N可编码MHC I类表位、MHC II类表位、能够刺激B细胞响应的表位/抗原,或其组合。对于每个X,每个N可编码MHC I类表位、MHC II类表位和能够刺激B细胞响应的表位/抗原的组合。对于每个X,每个N可编码MHC I类表位和MHC II类表位的组合。对于每个X,每个N可编码MHC I类表位和能够刺激B细胞响应的表位/抗原的组合。对于每个X,每个N可编码MHC II类表位和能够刺激B细胞响应的表位/抗原的组合。对于每个X,每个N可编码MHC II类表位。对于每个X,每个N可编码能够刺激B细胞响应的表位/抗原。对于每个X,每个N可编码长度为7-15个氨基酸的MHC I类表位。对于每个X,每个N还可编码长度为5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个氨基酸的MHC I类表位。对于每个X,每个N也可编码长度为至少5、至少6、至少7、至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少16、至少17、至少18、至少19、至少20、至少21、至少22、至少23、至少24、至少25、至少26、至少27、至少28、至少29或至少30个氨基酸的MHC I类表位。

[0283] 编码一种或多种抗原的盒可以是700个核苷酸或更短。编码一种或多种抗原的盒可以是700个核苷酸或更短并编码2个不同的表位编码核酸序列(例如,编码2个不同的感染性疾病或肿瘤衍生的编码免疫原性多肽的核酸序列)。编码一种或多种抗原的盒可以是700个核苷酸或更短并编码至少2个不同的表位编码核酸序列。编码一种或多种抗原的盒可以是700个核苷酸或更短并编码3个不同的表位编码核酸序列。编码一种或多种抗原的盒可以是700个核苷酸或更短并编码至少3个不同的表位编码核酸序列。编码一种或多种抗原的盒可以是700个核苷酸或更短并且包括1-10、1-5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多种抗原。

[0284] 编码一种或多种抗原的盒的长度可在375-700个核苷酸之间。编码一种或多种抗原的盒的长度可在375-700个核苷酸之间并编码2个不同的表位编码核酸序列。编码一种或多种抗原的盒的长度可在375-700个核苷酸之间并编码至少2个不同的表位编码核酸序列。编码一种或多种抗原的盒的长度可在375-700个核苷酸之间并编码3个不同的表位编码核酸序列。编码一种或多种抗原的盒的长度在375-700个核苷酸之间并编码至少3个不同的表位编码核酸序列。编码一种或多种抗原的盒的长度可在375-700个核苷酸之间并且包括1-10、1-5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多种抗原。

[0285] 编码一种或多种抗原的盒的长度可以是600、500、400、300、200或100个核苷酸或更短。编码一种或多种抗原的盒的长度可以是600、500、400、300、200或100个核苷酸或更短并编码2个不同的表位编码核酸序列。编码一种或多种抗原的盒的长度可以是600、500、400、300、200或100个核苷酸或更短并编码至少2个不同的表位编码核酸序列。编码一种或多种抗原的盒的长度可以是600、500、400、300、200或100个核苷酸或更短并编码3个不同的表位编码核酸序列。编码一种或多种抗原的盒的长度可以是600、500、400、300、200或100个核苷酸或更短并编码至少3个不同的表位编码核酸序列。编码一种或多种抗原的盒的长度可以是600、500、400、300、200或100个核苷酸或更短并且包括1-10、1-5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多种抗原。

[0286] 编码一种或多种抗原的盒的长度可为375-600、375-500或375-400个核苷酸。编码一种或多种抗原的盒的长度可为375-600、375-500或375-400个核苷酸并编码2个不同的表位编码核酸序列。编码一种或多种抗原的盒的长度可为375-600、375-500或375-400个核苷酸并编码至少2个不同的表位编码核酸序列。编码一种或多种抗原的盒的长度可为375-

600、375-500或375-400个核苷酸并编码3个不同的表位编码核酸序列。编码一种或多种抗原的盒的长度可为375-600、375-500或375-400个核苷酸并编码至少3个不同的表位编码核酸序列。编码一种或多种抗原的盒的长度可为375-600、375-500或375-400个核苷酸并且包括1-10、1-5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多种抗原。

[0287] 免疫调节剂

[0288] 本文所述的载体,例如本文所述的C68载体或本文所述的甲病毒载体,可包含编码至少一种抗原的核酸,并且相同或单独的载体可包含编码至少一种免疫调节剂的核酸。免疫调节剂可包括结合于并阻断免疫检查点分子的活性的结合分子(例如,抗体如scFv)。免疫调节剂可包括细胞因子,例如IL-2、IL-7、IL-12(包括IL-12p35、p40、p70和/或p70-融合构建体)、IL-15或IL-21。免疫调节剂可包括修饰的细胞因子(例如,pegIL-2)。载体可包含抗原盒和一种或多种编码免疫调节剂的核酸分子。

[0289] 可靶向用于阻断或抑制的说明性免疫检查点分子包括但不限于CTLA-4、4-1BB(CD137)、4-1BBL(CD137L)、PDL1、PDL2、PD1、B7-H3、B7-H4、BTLA、HVEM、TIM3、GAL9、LAG3、TIM3、B7H3、B7H4、VISTA、KIR、2B4(属于CD2分子家族并且在所有NK、 $\gamma\delta$ 和记忆CD8+ ($\alpha\beta$) T细胞上表达)、CD160(也称为BY55)和CGEN-15049。免疫检查点抑制剂包括抗体或其抗原结合片段或其他结合蛋白,其结合于并阻断或抑制CTLA-4、PDL1、PDL2、PD1、B7-H3、B7-H4、BTLA、HVEM、TIM3、GAL9、LAG3、TIM3、B7H3、B7H4、VISTA、KIR、2B4、CD160和CGEN-15049中的一者或多者的活性。说明性免疫检查点抑制剂包括曲美木单抗(CTLA-4阻断抗体)、抗OX40、PD-L1单克隆抗体(抗B7-H1;MEDI4736)、伊匹单抗、MK-3475(PD-1阻断剂)、纳武单抗(Nivolumab)(抗PD1抗体)、CT-011(抗PD1抗体)、BY55单克隆抗体、AMP224(抗PDL1抗体)、BMS-936559(抗PDL1抗体)、MPLDL3280A(抗PDL1抗体)、MSB0010718C(抗PDL1抗体)和Yervoy/伊匹单抗(抗CTLA-4检查点抑制剂)。可使用本领域结构域普通技术将抗体编码序列工程化到例如C68的载体中。一种示例性方法描述于Fang等人,Stable antibody expression at therapeutic levels using the 2A peptide.Nat Biotechnol.2005年5月;23(5):584-90.电子版2005年4月17日;出于所有目的通过引用并入本文。

[0290] 有效载荷编码SAM组合物

[0291] 本文还公开了具有SAM载体所来源的自复制病毒的内源5'序列的SAM载体(例如,具有内源5'VEEV核苷酸AU,也称为“AU-SAM”),其例如在盒中编码一种或多种有效载荷核酸序列。“盒”是指所选择的多核苷酸(例如,抗原编码核酸序列)和转录所述多核苷酸并且通常在编码序列的情况下表达所转录的产物所需的其他调控元件的组合。本文还公开了能够递送一种或多种有效载荷核酸序列的SAM载体递送组合物。有效载荷核酸序列可以是希望被递送至目标细胞的任何核酸序列。一般而言,有效载荷是与启动子或任何翻译工具(例如IRES、任何2A自切割肽序列如P2A、E2A、F2A和T2A)连接以驱动核酸序列表达的核酸序列。有效载荷核酸序列可编码多肽(即,能够被转录和翻译成蛋白质的核酸序列)。通常,编码肽的有效载荷核酸序列可编码任何希望在细胞中表达的蛋白质。蛋白质的实例包括但不限于抗原(例如,MHCI类表位、MHC II类表位或能够刺激B细胞响应的表位)、抗体、细胞因子、嵌合抗原受体(CAR)、T细胞受体或基因组编辑系统组件(例如,基因组编辑系统中使用的核酸酶)。基因组编辑系统包括但不限于CRISPR系统、锌指系统、大范围核酸酶系统或TALEN系统。有效载荷核酸序列可以是非编码的(即,能够转录但不翻译成蛋白质的核酸序列)。一般

而言,非编码有效载荷核酸序列可以是希望在细胞中表达的任何非编码多核苷酸。非编码多核苷酸的实例包括但不限于RNA干扰(RNAi)多核苷酸(例如,反义寡核苷酸、shRNA、siRNA、miRNA等)或基因组编辑系统多核苷酸(例如,具有各种/不同长度的指导RNA[gRNA]、单指导RNA[sgRNA]、反式激活CRISPR[tracrRNA]和/或CRISPR RNA[crRNA])。有效载荷核酸序列可编码两个或更多个(例如,2、3、4、5或更多个)不同的多肽(例如,两个或更多个连接在一起的不同表位序列)或含有两个或更多个不同的非编码核酸序列(例如,两个或更多个不同的RNAi多核苷酸)。有效载荷核酸序列可具有多肽编码核酸序列和非编码核酸序列的组合。

[0292] 抗原鉴定

[0293] 肿瘤和正常外显子组和转录组的NGS分析研究方法已被描述并应用于抗原鉴定领域。^{6,14,15}可考虑某些优化以提高临床环境中抗原鉴定的灵敏度和特异性。这些优化可分为两个领域,与实验室过程相关的领域和与NGS数据分析相关的领域。所描述的研究方法也可应用于鉴定其他环境中的抗原,例如鉴定来自感染性疾病生物体、受试者中的感染或受试者的受感染细胞的抗原的鉴定。优化的实例对于本领域技术人员来说是已知的,例如在美国专利第10,055,540号、美国申请公开第US20200010849A1号以及国际专利申请公开W0/2018/195357和W0/2018/208856中更详细描述的方法,所述文献各自出于所有目的通过引用整体并入本文。

[0294] 用于鉴定抗原(例如,源自肿瘤或感染性疾病生物体的抗原)的方法包括鉴定可能呈递在细胞表面上(例如,由MHC呈递在肿瘤细胞、受感染细胞或免疫细胞(包括专职抗原呈递细胞如树突状细胞)上)和/或可能具免疫原性的抗原。举例来说,一种这样的方法可包括以下步骤:从肿瘤、受感染细胞或感染性疾病生物体中获得外显子组、转录组或全基因组核苷酸测序和/或表达数据中的至少一者,其中所述核苷酸测序数据和/或表达数据用于获得代表一组抗原(例如,源自肿瘤或感染性疾病生物体的抗原)中的每一者的肽序列的数据;将每种抗原的肽序列输入到一个或多个呈递模型中,以产生所述抗原中的每一者由一种或多种MHC等位基因在受试者的细胞表面、例如肿瘤细胞或受感染细胞上呈递的数值可能性集合,所述数值可能性集合已至少基于所接收的质谱数据进行鉴定;以及基于所述数值可能性集合选择所述抗原集合的子集以产生经选择抗原集合。

[0295] 躯干肽,意指由所有或大多数亚克隆呈递的肽,可优先排序以纳入疫苗中。任选地,如果没有预测呈递且以高概率具有免疫原性的躯干肽,或者如果预测呈递且以高概率具有免疫原性的躯干肽数目足够小,使得可在疫苗中包括额外的非躯干肽,则可通过估计亚克隆的数目和身份并选择肽来优先排序更多的肽,以使疫苗覆盖的亚克隆数目最大化。

[0296] 在应用了所有上述抗原过滤器之后,可能仍有比疫苗技术可支持的更多候选抗原可用于疫苗包涵。另外,可保留关于抗原分析的各个方面的不确定性,并且候选疫苗抗原的不同特性之间可存在折衷。因此,可考虑整合式多维模型代替选择过程的每个步骤中的预定过滤器,将候选抗原置于具有至少以下轴的空间中并使用整合方法优化选择。

[0297] 1. 自身免疫或耐受性的风险(生殖系的风险)(自身免疫的风险较低通常是优选的)

[0298] 2. 测序伪影的概率(伪影的概率较低通常是优选的)

[0299] 3. 免疫原性的概率(免疫原性的概率较高通常是优选的)

[0300] 4.呈递的概率(呈递的概率较高通常是优选的)

[0301] 5.基因表达(较高表达通常是优选的)

[0302] 6.HLA基因的覆盖率(参与抗原集合呈递的HLA分子数目较大可降低肿瘤、感染性疾病和/或受感染细胞经由HLA分子的下调或突变逃避免疫攻击的概率)

[0303] 7.HLA类别的覆盖率(覆盖HLA-I和HLA-II两者可增加治疗响应的概率并降低肿瘤或感染性疾病逃避的概率)

[0304] 另外,任选地,如果预测抗原将由在患者的全部或部分肿瘤或受感染细胞中丢失或失活的HLA等位基因呈递,则可从疫苗接种去除所述抗原的优先排序(例如排除所述抗原)。HLA等位基因损失可通过体细胞突变、杂合性缺失或基因座的同型接合缺失发生。用于检测HLA等位基因体细胞突变的方法是本领结构域中所熟知,例如(Shukla等人,2015)。用于检测体细胞LOH和同型接合缺失(包括HLA基因座)的方法同样被充分描述。(Carter等人,2012;McGranahan等人,2017;Van Loo等人,2010)。如果质谱数据表明所预测的抗原未被预测的HLA等位基因呈递,则还可去除抗原的优先排序。

[0305] 治疗和制造方法

[0306] 还提供了一种通过向受试者施用一种或多种抗原(例如使用本文公开的方法鉴定的多种抗原)而在受试者中刺激肿瘤特异性免疫响应、针对肿瘤进行疫苗接种、治疗和/或减轻受试者中的癌症症状的方法。

[0307] 还提供了一种通过向受试者施用一种或多种抗原(例如使用本文公开的方法鉴定的多种抗原)而在受试者中刺激感染性疾病生物体特异性免疫响应、针对感染性疾病生物体进行疫苗接种、治疗和/或减轻与感染性疾病生物体相关的感染症状的方法。

[0308] 在一些方面,受试者已诊断患有癌症或具有患癌症的风险。受试者可为人、狗、猫、马或需要肿瘤特异性免疫响应的任何动物。肿瘤可为任何实体肿瘤,例如乳房肿瘤、卵巢肿瘤、前列腺肿瘤、肺肿瘤、肾脏肿瘤、胃肿瘤、结肠肿瘤、睾丸肿瘤、头颈部肿瘤、胰腺肿瘤、脑肿瘤、黑色素瘤和其他组织器官肿瘤,以及血液肿瘤,例如淋巴瘤和白血病,包括急性髓细胞白血病、慢性髓细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、T细胞淋巴细胞白血病和B细胞淋巴瘤。

[0309] 在一些方面,受试者已被诊断患有感染或处于感染风险中,例如年龄、地理/旅行和/或工作相关的感染风险或易感性增加,或处于季节性和/或新型疾病感染风险中。

[0310] 可以足以刺激CTL响应的量施用抗原。可以足以刺激T细胞响应的量施用抗原。可以足以刺激B细胞响应的量施用抗原。

[0311] 抗原可以单独施用或与其他治疗剂组合施用。治疗剂可包括靶向感染性疾病生物体的那些,例如抗病毒剂或抗生素剂。

[0312] 此外,可进一步向受试者施用抗免疫抑制/免疫刺激剂,例如检查点抑制剂。例如,可进一步向受试者施用抗CTLA抗体或抗PD-1或抗PD-L1。抗体对CTLA-4或PD-L1的阻断可增强患者对癌细胞的免疫响应。特别地,在遵循疫苗接种方案时,CTLA-4阻断已被证明是有效的。可确定检查点抑制剂给药方案的最佳量。例如,检查点抑制剂组合物可制备用于静脉内(i.v.)注射、皮下(s.c.)注射、皮内(i.d.)注射、腹膜内(i.p.)注射、肌肉(i.m.)注射。注射方法包括s.c.、i.d.、i.p.、i.m.和i.v.。

[0313] 可确定疫苗组合物中待包含的每种抗原的最佳量和最佳给药方案。例如,抗原或

其变体可制备用于静脉内(i.v.)注射、皮下(s.c.)注射、皮内(i.d.)注射、腹膜内(i.p.)注射、肌肉(i.m.)注射。注射方法包括s.c.、i.d.、i.p.、i.m.和i.v.。DNA或RNA注射方法包括i.d.、i.m.、s.c.、i.p.和i.v.。其他施用疫苗组合物的方法是本领域结构域技术人员已知的。

[0314] 可对疫苗进行编译,使得组合物中存在的抗原的选择、数目和/或量具组织、癌症、感染性疾病和/或患者特异性。例如,肽的精确选择可由给定组织中亲本蛋白的表达模式指导,或者由患者的突变或疾病状态指导。选择可取决于特定的癌症类型、特定的感染性疾病(例如,受试者感染或有感染风险的特定感染性疾病分离株/菌株)、疾病状态、疫苗接种的目标(例如,预防性或针对正在进行的疾病)、早期治疗方案、患者的免疫状态,当然还有患者的HLA-单倍型。此外,根据特定患者的个人需要,疫苗可含有个性化组分。实例包括根据特定患者中抗原的表达来改变抗原的选择或在第一轮或治疗方案之后调整二次治疗。

[0315] 通过使用各种诊断方法,例如下文进一步描述的患者选择方法,可鉴定患者是否施用抗原疫苗。患者选择可涉及鉴定一种或多种基因的突变或表达模式。患者选择可涉及鉴定正在进行的感染的感染性疾病。患者选择可涉及鉴定感染性疾病感染的风险。在一些情况下,患者选择涉及鉴定患者的单倍型。可并行执行各种患者选择方法,例如,测序诊断可鉴定患者的突变和单倍型。各种患者选择方法可按顺序进行,例如,一种诊断测试鉴定突变并且另一种诊断测试鉴定患者的单倍型,并且其中每个测试可以相同(例如,高通量测序)或不同(例如,一种高通量测序和另一种Sanger测序)诊断方法。

[0316] 对于用作癌症或感染性疾病疫苗的组合物,在本文所述的组合物中可避免或以低量存在在正常组织中大量表达的具有类似正常自身肽的抗原。另一方面,如果已知患者的肿瘤或受感染细胞表达大量的某种抗原,则用于治疗这种癌症或感染的相应药物组合物可以大量存在和/或可包括多于一种对这种特定抗原或这种抗原途径具特异性的抗原。

[0317] 可将包含抗原的组合物施用于已经患有癌症或感染的个体。在治疗性应用中,将组合物以足以刺激对肿瘤抗原或感染性疾病生物体抗原的有效CTL响应并治愈或至少部分阻遏症状和/或并发症的量施用于患者。足以实现这一点的量被定义为“治疗有效剂量”。对该用途有效的量将取决于例如组合物、施用方式、所治疗疾病的阶段和严重程度、患者的体重和一般健康状况以及处方医生的判断。应记住,组合物通常可用于严重疾病状态,即危及生命或可能危及生命的情况,尤其是当癌症已转移或感染性疾病生物体已诱发器官损伤和/或其他免疫病理学时。在这些情况下,鉴于外来物质的最小化和抗原的相对无毒性质,主治医师可以并且认为需要施用实质过量的这些组合物。

[0318] 对于治疗用途,可在检测或手术切除肿瘤时或者在检测或治疗感染时开始施用。这之后可为加强剂量直到至少症状基本上减轻并且持续此后一段时间,或认为提供了免疫性(例如,记忆B细胞或T细胞群,或产生抗原特异性B细胞或抗体)。

[0319] 用于治疗性治疗的药物组合物(例如疫苗组合物)旨在用于肠胃外、局部、经鼻、口服或局部施用。药物组合物可经肠胃外施用,例如静脉内、皮下、皮内或肌肉施用。组合物可施用在手术切除部位以刺激针对肿瘤的局部免疫响应。可施用组合物以靶向受试者的特定感染组织和/或细胞。本文公开了用于肠胃外施用的组合物,其包含抗原溶液,并且将疫苗组合物溶解或悬浮在可接受的载剂例如水性载剂中。可使用多种水性载剂,例如水、缓冲水、0.9%盐水、0.3%甘氨酸、透明质酸等。这些组合物可通过常规的熟知灭菌技术灭菌,或者可经无菌过滤。所得水溶液可以原样包装使用,或冻干,冻干制剂在施用之前与无菌溶液

组合。组合物可根据需要含有药学上可接受的辅助物质以接近生理条件,例如pH调节剂和缓冲剂、张力调节剂、润湿剂等,例如乙酸钠、乳酸钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙、脱水山梨糖醇单月桂酸酯、三乙醇胺油酸酯等。

[0320] 抗原也可经由脂质体施用,脂质体将它们靶向特定的细胞组织,例如淋巴组织。脂质体也可用于增加半衰期。脂质体包括乳液、发泡体、胶束、不溶性单层、液晶、磷脂分散体、层状层等。在这些制剂中,待递送的抗原作为脂质体的一部分被并入,单独或联合与结合于例如淋巴样细胞中普遍存在的受体的分子,例如结合于CD45抗原的单克隆抗体,或联合其他治疗性或免疫原性组合物。因此,可将填充有所需抗原的脂质体导向淋巴样细胞的部位,然后所述脂质体在该部位递送选定的治疗性/免疫原性组合物。脂质体可由标准的囊泡形成脂质形成,其通常包括中性和带负电荷的磷脂和固醇,例如胆固醇。脂质的选择通常通过考虑例如脂质体大小、酸不稳定性和脂质体在血流中的稳定性来指导。多种方法可用于制备脂质体,如例如Szoka等人, *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 9;467 (1980), 美国专利第4,235,871号、第4,501,728号、第4,501,728号、第4,837,028号和第5,019,369号中所述。

[0321] 为了靶向免疫细胞,要并入脂质体中的配体可包括例如对所需免疫系统细胞的细胞表面决定簇特异的抗体或其片段。脂质体悬浮液可以静脉内、局部、表面等施用,其剂量尤其根据施用方式、所递送的肽和所治疗疾病的阶段而变化。

[0322] 出于治疗或免疫目的,编码肽和任选地一种或多种本文所述肽的核酸也可施用于患者。许多方法可方便地用于将核酸递送至患者。例如,核酸可作为“裸DNA”直接递送。例如在Wolff等人, *Science* 247:1465-1468 (1990) 以及美国专利第5,580,859号和第5,589,466号中描述了这种方法。核酸也可使用弹道递送来施用,如例如美国专利第5,204,253号中所述。可施用仅由DNA组成的粒子。或者,可将DNA粘附到粒子如金粒子上。用于递送核酸序列的方法可包括带有或不带有电穿孔的病毒载体、mRNA载体和DNA载体。

[0323] 还可将核酸与阳离子化合物例如阳离子脂质复合递送。脂质介导的基因递送方法描述于例如9618372WOAWO 96/18372;9324640WOAWO 93/24640;Mannino和Gould-Fogerite, *BioTechniques* 6(7):682-691 (1988); 美国专利第5,279,833号Rose美国专利第5,279,833号;9106309WOAWO 91/06309;和Felgner等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7413-7414 (1987)。

[0324] 抗原还可包括于基于病毒载体的疫苗平台中,例如牛痘、禽痘、自复制甲病毒、马拉巴病毒 (marabavirus)、腺病毒 (参见例如Tatsis等人, *Adenoviruses, Molecular Therapy* (2004) 10,616-629) 或慢病毒,包括但不限于第二、第三或杂交第二/第三代慢病毒和任一一代的重组慢病毒,其设计成靶向特定细胞类型或受体 (参见例如Hu等人, *Immunization Delivered by Lentiviral Vectors for Cancer and Infectious Diseases, Immunol Rev.* (2011) 239(1):45-61; Sakuma等人, *Lentiviral vectors: basic to translational, Biochem J.* (2012) 443(3):603-18; Cooper等人, *Rescue of splicing-mediated intron loss maximizes expression in lentiviral vectors containing the human ubiquitin C promoter, Nucl. Acids Res.* (2015) 43(1):682-690; Zufferey等人, *Self-Inactivating Lentivirus Vector for Safe and Efficient In Vivo Gene Delivery, J. Virol.* (1998) 72(12):9873-9880)。取决于上述基于病毒载体的疫苗平台的包装能力,这种方法可递送编码一种或多种抗原肽的一种或多种核苷酸序列。序列可侧接非

突变序列,可由接头分开或者可在前面有一种或多种靶向亚细胞区室的序列(参见例如Gros等人,Prospective identification of neoantigen-specific lymphocytes in the peripheral blood of melanoma patients,Nat Med.(2016)22(4):433-8;Stronen等人,Targeting of cancer neoantigens with donor-derived T cell receptor repertoires,Science.(2016)352(6291):1337-41;Lu等人,Efficient identification of mutated cancer antigens recognized by T cells associated with durable tumor regressions,Clin Cancer Res.(2014)20(13):3401-10)。在引入宿主中后,受感染细胞表达抗原,从而刺激针对一种或多种肽的宿主免疫(例如CTL)响应。可用于免疫方案中的牛痘载体和方法描述于例如美国专利第4,722,848号中。另一种载体是卡介苗(Bacille Calmet te Guerin,BCG)。BCG载体描述于Stover等人(Nature 351:456-460(1991))中。根据本文描述,可用于抗原的治疗性施用或免疫的各种其他疫苗载体,例如伤寒沙门氏菌载体等,对于本领结构域技术人员将是显而易见的。

[0325] 一种施用核酸的方法使用编码一个或多个表位的微型基因构建体。为了创建编码所选CTL表位(微型基因)以在人类细胞中表达的DNA序列,将表位的氨基酸序列进行反向翻译。人类密码子使用表用于指导每个氨基酸的密码子选择。这些表位编码DNA序列直接相连,形成一个连续的多肽序列。为了优化表达和/或免疫原性,可在微型基因设计中并入额外的元件。可反向翻译并包括在微型基因序列中的氨基酸序列的实例包括:辅助T淋巴细胞、表位、前导(信号)序列和内质网保留信号。另外,可通过包括与CTL表位相邻的合成(例如聚丙烯酰胺)或天然存在的侧翼序列来改进CTL表位的MHC呈递。通过组装编码微型基因正链和负链的寡核苷酸,将微型基因序列转化为DNA。使用熟知技术在适当的条件下合成、磷酸化、纯化和退火重叠的寡核苷酸(30-100个碱基长)。使用T4 DNA连接酶连接寡核苷酸的末端。然后可将这种编码CTL表位多肽的合成微型基因克隆到所需的表达载体中。

[0326] 纯化的质粒DNA可使用多种配方制备用于注射。其中最简单的是在无菌磷酸盐缓冲液(PBS)中重建冻干DNA。已经描述了多种方法,并且可使用新技术。如上所述,核酸方便地与阳离子脂质一起配制。此外,糖脂、融合脂质体、肽和统称为保护性、相互作用、非缩合(PINC)的化合物也可与纯化的质粒DNA复合,以影响例如稳定性、肌内分散或运输到特定器官或细胞类型的变量。

[0327] 还公开了一种制造疫苗的方法,所述方法包括执行本文公开的方法的步骤;以及生产包含多种抗原或多种抗原子集的疫苗。

[0328] 本文公开的抗原可使用本领结构域已知的方法制造。例如,本文公开的产生抗原或载体(例如,包括至少一种编码一种或多种抗原的序列的载体)的方法可包括在适合表达抗原或载体的条件下培养宿主细胞,其中所述宿主细胞包含至少一种编码抗原或载体的多核苷酸,并纯化所述抗原或载体。标准纯化方法包括色谱技术、电泳、免疫学、沉淀、透析、过滤、浓缩和色谱聚焦技术。

[0329] 宿主细胞可包括中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、NS0细胞、酵母或HEK293细胞。宿主细胞可用一种或多种多核苷酸转化,所述多核苷酸包含至少一种编码本文公开的抗原或载体的核酸序列,任选地其中经分离的多核苷酸还包含可操作地连接至至少一种编码所述抗原或载体的核酸序列的启动子序列。在某些实施方案中,经分离的多核苷酸可为cDNA。

[0330] 抗原使用和施用

[0331] 疫苗接种方案可用于向受试者给与一种或多种抗原。可使用初免疫苗和加强疫苗对受试者进行给药。

[0332] 初免疫苗可基于本文所述的SAM疫苗组合物,其中SAM具有SAM载体所来源的自复制病毒的内源5' 序列(例如,内源5' VEEV核苷酸AU,也称为“AU-SAM”)。

[0333] 加强疫苗(包括两次或更多次加强施用)可基于本文所述的SAM疫苗组合物,其中SAM具有SAM载体所来源的自复制病毒的内源5' 序列(例如,内源5' VEEV核苷酸AU,也称为“AU-SAM”)。

[0334] 疫苗接种方案可包括初免疫苗和加强疫苗两者,各自基于本文所述的SAM疫苗组合物,其中SAM具有SAM载体所来源的自复制病毒的内源5' 序列(例如,内源5' VEEV核苷酸AU,也称为“AU-SAM”)。

[0335] 初免疫苗(包括与具有内源5' 序列的SAM组合使用)也可基于C68(例如,SEQ ID NO:1或2所示的序列)或SAM(例如,SEQ ID NO:3或4所示的序列)。加强疫苗(包括与具有内源5' 序列的SAM组合使用)也可基于C68(例如,SEQ ID NO:1或2所示的序列)或SAM(例如,SEQ ID NO:3或4所示的序列)。

[0336] 初免/加强策略中的每个载体通常包括包含抗原的盒。盒可包括约1-50种抗原,由间隔子例如通常围绕每种抗原的天然序列或其他非天然间隔子序列如AAY分开。盒还可包括MHCII抗原,例如破伤风类毒素抗原和PADRE抗原,它们可被认为是通用II类抗原。盒还可包括靶向序列,例如泛素靶向序列。此外,每个疫苗剂量可与免疫调节剂一起(例如,同时、之前或之后)施用于受试者。每个疫苗剂量可与检查点抑制剂(CPI)一起(例如,同时、之前或之后)施用于受试者。CPI可包括抑制CTLA4、PD1和/或PDL1的那些,例如抗体或其抗原结合部分。此类抗体可包括曲美木单抗或德瓦鲁单抗(durvalumab)。CPI可经由静脉内(i.v.)注射、皮下(s.c.)注射、皮内(i.d.)注射、腹膜内(i.p.)注射、肌肉(i.m.)注射来施用。每个疫苗剂量可与细胞因子如IL-2、IL-7、IL-12(包括IL-12p35、p40、p70和/或p70融合构建体)、IL-15或IL-21一起(例如,同时、之前或之后)施用于受试者。每个疫苗剂量可与修饰的细胞因子(例如pegIL-2)一起(例如,同时、之前或之后)施用于受试者。

[0337] 初免疫苗可注射(例如肌肉)于受试者。每剂量可使用单侧注射或双侧注射。可使用一次或多次ChAdV68(C68)注射(例如总剂量 1×10^{12} 个病毒粒子);可使用选自0.001至1 μ g RNA范围的低疫苗剂量的一次或多次SAM载体注射。

[0338] 可在初免疫苗接种之后注射(例如肌肉)疫苗加强剂(加强疫苗)。加强疫苗可在初免后约每1、2、3、4、5、6、7、8、9或10周,例如每4周和/或8周施用。每剂量可使用单侧注射或双侧注射。例如,可使用一次或多次ChAdV68(C68)注射(例如总剂量 1×10^{12} 个病毒粒子);选自0.001至1 μ g RNA范围的低疫苗剂量的一次或多次SAM载体注射。

[0339] SAM剂量可作为初免剂量或作为一次或多次加强剂量施用。初免剂量和加强剂量可为相同量的SAM或不同量的SAM。每次加强剂量可为相同量的SAM或不同量的SAM。可施用10-30 μ g、10-100 μ g、10-300 μ g、30-100 μ g、30-300 μ g或100-300 μ g RNA之间的SAM剂量。可施用10-500 μ g、10-1000 μ g、30-500 μ g、30-1000 μ g或500-1000 μ g RNA之间的SAM剂量。可施用1-30 μ g、1-100 μ g、1-300 μ g RNA之间的SAM剂量。可施用1-500 μ g或1-1000 μ g RNA之间的SAM剂量。可施用至少400 μ g、至少500 μ g、至少600 μ g、至少700 μ g、至少800 μ g、至少900 μ g、至少1000 μ g RNA的SAM剂量。可施用至少1 μ g、3 μ g、10 μ g或30 μ g RNA的SAM剂量。可施用1 μ g、3 μ g、10 μ g

或30 μ g RNA的SAM剂量。可施用1-3 μ g、1-10 μ g、1-30 μ g、3-10 μ g、3-30 μ g或10-30 μ g RNA之间的SAM剂量。可施用10 μ g、30 μ g、100 μ g或300 μ g RNA的SAM剂量。可施用300 μ g RNA的SAM剂量。可施用100 μ g RNA的SAM剂量。可施用30 μ g RNA的SAM剂量。可施用10 μ g RNA的SAM剂量。可施用3 μ g RNA的SAM剂量。可施用1 μ g RNA的SAM剂量。可施用至少300 μ g RNA的SAM剂量。可施用至少100 μ g RNA的SAM剂量。可施用至少30 μ g RNA的SAM剂量。可施用至少10 μ g RNA的SAM剂量。可施用至少3 μ g RNA的SAM剂量。可施用至少1 μ g RNA的SAM剂量。可施用小于或等于300 μ g RNA的SAM剂量。

[0340] 也可向受试者施用抗CTLA-4 (例如, 曲美木单抗)。例如, 抗CTLA4可在肌肉疫苗注射 (ChAdV68初免或SAM低剂量) 部位附近皮下施用, 以确保引流到同一淋巴结。曲美木单抗是CTLA-4的选择性人类IgG2 mAb抑制剂。靶向抗CTLA-4 (曲美木单抗) 皮下剂量通常为70-75mg (特别是75mg), 剂量范围例如1-100mg或5-420mg。

[0341] 在某些情况下, 可使用抗PD-L1抗体, 例如德瓦鲁单抗 (MEDI4736)。德瓦鲁单抗是一种选择性、高亲和力的人类IgG1 mAb, 其阻断PD-L1与PD-1和CD80的结合。德瓦鲁单抗通常每4周以20mg/kg i.v. 施用。

[0342] 免疫监测可在疫苗施用之前、期间和/或之后进行。这种监测可告知安全性和功效以及其他参数。

[0343] 为了进行免疫监测, 通常使用PBMC。PBMC可在初免疫苗接种之前和在初免疫苗接种之后 (例如4周和8周) 分离。PBMC可在即将加强疫苗接种之前和在每次加强疫苗接种之后 (例如4周和8周) 收集。

[0344] 免疫响应, 例如T细胞响应和B细胞响应, 可作为免疫监测方案的一部分进行评估。例如, 可监测和/或评估本文所述的疫苗组合刺激免疫响应的能力。如本文所用, “刺激免疫响应” 是指免疫响应的任何增加, 例如引发免疫响应 (例如, 在未接受过治疗的受试者中刺激引发免疫响应的初免疫苗) 或增强免疫响应 (例如, 在对抗原具有预先存在的免疫响应, 例如由初免疫苗引发的预先存在的免疫响应的受试者中刺激免疫响应增强的加强疫苗)。可使用本领结构域中已知的一种或多种方法测量T细胞响应, 例如ELISpot、细胞内细胞因子染色、细胞因子分泌和细胞表面捕捉、T细胞增殖、MHC多聚体染色或通过细胞毒性测定。针对疫苗中编码的表位的T细胞响应可通过使用ELISpot测定来测量细胞因子 (例如IFN- γ) 的诱导而从PBMC监测。针对疫苗中编码的表位的特异性CD4或CD8 T细胞响应可通过使用流式细胞术测量胞内或胞外捕捉的细胞因子 (例如IFN- γ) 的诱导而从PBMC监测。针对疫苗中编码的表位的特异性CD4或CD8 T细胞响应可通过使用MHC多聚体染色测量表达特异性针对表位/MHC I类复合物的T细胞受体的T细胞群体而从PBMC监测。针对疫苗中编码的表位的特异性CD4或CD8 T细胞响应可通过在3H-胸苷、溴脱氧尿苷和羧基荧光素-二乙酸酯-琥珀酰亚胺酯 (CFSE) 并入后测量T细胞群的离体扩增而从PBMC监测。特异性针对疫苗中编码的表位的源自PBMC的T细胞的抗原识别能力和溶解活性可通过铬释放测定或替代性比色细胞毒性测定来功能性评估。

[0345] B细胞响应可使用本领结构域已知的一种或多种方法测量, 例如用于确定B细胞分化 (例如, 分化为浆细胞)、B细胞或浆细胞增殖、B细胞或浆细胞激活 (例如, 共刺激标志物如CD80或CD86的上调)、抗体类别转换和/或抗体产生 (例如, ELISA) 的测定法。也可评估抗体的功能, 例如评估中和能力。

[0346] 范例

[0347] 为了可以更充分地理解本文所述的本公开,提出以下实施例。本申请中描述的合成和生物学实施例被提供用于说明本文提供的化合物、药物组合物和方法,而不应以任何方式解释为限制它们的范围。

[0348] 材料和方法

[0349] 本文提供的化合物可使用以下一般方法和程序从容易获得的起始材料制备。应理解,在给出典型或优选的工艺条件(即,反应温度、时间、反应物的摩尔比、溶剂、压力等)时,除非另有说明,否则还可使用其他的工艺条件。最佳反应条件可随所用的特定反应物或溶剂而变化,但此类条件可由本领结构域技术人员通过常规优化来确定。

[0350] 此外,如对本领结构域技术人员显而易见的,常规保护基团可能是必要的以防止某些官能团发生不希望的反应。针对特定官能团选择合适的保护基团以及保护和脱保护的合适条件是本领结构域所熟知的。例如,T.W.Greene和P.G.M.Wuts,Protecting Groups in Organic Synthesis,第二版,Wiley,New York,1991和其中引用的参考文献中描述了许多保护基团及其引入和去除。

[0351] 本文提供的化合物可通过已知的标准程序分离和纯化。此类程序包括(但不限于)湿磨、柱色谱、HPLC或超临界流体色谱法(SFC)。本文提供的化合物可由有机合成领域结构域的技术人员从已知或可商购获得的起始材料和试剂制备。

[0352] 实施例1.自扩增表达系统

[0353] A.自复制RNA病毒骨架和SAM生成

[0354] 在本发明的一种实现方式中,用于表达系统的RNA甲病毒骨架由自复制委内瑞拉马脑炎病毒(“VEEV”;Kinney,1986,Virology 152:400-413)通过缺失位于26S亚基因组启动子3'的VEEV的结构蛋白(除了E1的最后50个氨基酸)而生成(VEEV序列7544至11,176缺失;编号基于Kinney等人,1986;SEQ ID NO:6)。为了生成自扩增mRNA(“SAM”)ssRNA载体,将缺失序列替换为有效载荷序列。含有20种模型抗原的代表性SAM载体是“VEE-MAG25聚体”(SEQ ID NO:4)。将缺少典型3'二核苷酸GG的经修饰T7 RNA聚合酶启动子(TAATACGACTCACTATA)添加到SAM载体的5'端以生成体外转录模板DNA(SEQ ID NO:57;7544至11,176缺失,无插入的盒)。产生额外的模板生产载体,添加PCR正向引物序列和3'限制性位点(SEQ ID NO:58;7544至11,176缺失,无插入的盒)。

[0355] 使用上述模板产生的RNA含有与内源5'VEEV核苷酸序列直接连接的m⁷G帽,即,在m⁷G帽与内源5'VEEV核苷酸序列之间不存在额外的中间核苷酸,例如当使用典型的T7 RNA聚合酶时通常存在的二核苷酸GG。具有以内源核苷酸AUG开始并使用典型的或修饰的(“最小的”)T7启动子的骨架的SAM载体的ssRNA生产在图1中说明。不具有位于m⁷G帽与内源5'AU核苷酸之间的额外中间核苷酸的SAM载体在本文中称为“AU-SAM”载体。代表性AU-SAM载体的示意图示于图2中。

[0356] 使用以下步骤共转录产生加帽的AU-SAM ssRNA载体,其中含有编码代表性有效载荷序列(例如GFP或β-Spike)的盒:

[0357] -通过将目标抗原盒克隆到体外转录模板DNA(SEQ ID NO:57)中产生DNA模板

[0358] -加帽的RNA是通过体外转录(IVT)产生的,概述如下:

[0359] ○反应含有:使用最终浓度为1x T7 RNA聚合酶混合物(目录号E2040S;New

England Biolabs)的1x转录缓冲液(40mM Tris (pH 7.9)、10mM二硫苏糖醇、2mM亚精胺、0.002% Triton X-100和27mM氯化镁);0.025mg/mL DNA转录模板(通过限制性消化来线性化或PCR扩增);8mM三核苷酸^m7G-ppp-A-U帽类似物(CleanCap Reagent AU;目录号N-7114;TriLink)和各10mmol/l最终浓度的三磷酸腺嘌呤(ATP)、三磷酸胞苷(CTP)、三磷酸鸟嘌呤(GTP)和三磷酸尿苷(UTP)(HiScribe T7 Quick High Yield RNA Synthesis Kit;New England Biolabs)

[0360] ○具有经修饰核苷的SAM,通过用以下经修饰核苷的相应三磷酸衍生物替换一个或两个三磷酸核苷酸来组装转录反应:5-甲基胞苷(m5C)、5-甲氧基胞苷(mo5C)、假尿苷(Ψ)、N1-甲基假尿苷(m1 Ψ)、5-甲基尿苷(m5U)、5-甲氧基尿苷(mo5U)、2-硫尿苷(s2U)或6-甲基腺嘌呤(m6A)(TriLink)。

[0361] ○IVT反应条件:将转录反应物在37°C下孵育2小时并在37°C下用DNA酶I缓冲液中的最终2U DNA酶I(目录号AM2239;Thermo Fisher Scientific)/0.001mg DNA转录模板处理1小时。

[0362] ○使用Turbo DNA酶(Thermo Fisher Scientific)消化,然后使用RNeasy Maxi Kit(目录号75162;Qiagen)或液相色谱来纯化经加帽/修饰的AU-SAM。

[0363] 将编码来自SARS-CoV-2变体的绿色荧光蛋白(GFP)和 β -Spike的模型有效载荷插入至VEEV骨架的缺失区中。如上所述,使用三核苷酸^m7G-ppp-AU帽类似物产生加帽的AU-SAM RNA。

[0364] 使用Nanodrop分光光度计(Thermo Fisher Scientific)测定SAM的数量和质量。所有RNA样品均通过毛细管电泳进行分析,以确保RNA结构完整性并代表所有SAM。

[0365] 所有RNA样品均通过毛细管电泳进行分析,以确保RNA结构完整性并代表研究中使用的所有SAM(图3)。在使用蛋白质编码质粒和RNA聚合酶的一系列转录反应中,获得了包含 Ψ 、m1 Ψ 和m5C的全长转录物。通过毛细管电泳分析的经修饰SAM与其未修饰的对应物没有区别,因为所有这些都是完整的,并且基于其大小按预期迁移。

[0366] B.通过RT-qPCR确定的SAM的复制活性

[0367] 转染至BHK-21细胞中后,通过RT-qPCR测量编码绿色荧光蛋白(GFP)的经核苷修饰的SAM的复制活性。将BHK-21细胞用与Lipofectamine MessengerMAX转染试剂(目录号LMRNA008;Thermo Fisher Scientific)复合的11ng SAM转染,且接着根据制造商的方案使用RNeasy Micro Kit(目录号74004;Qiagen)分离总RNA。为了测量SAM的复制活性(即,RNA的自扩增),对分离的RNA进行逆转录并通过qPCR进行分析,以测量转染后20小时GFP转录物的RNA拷贝数。SAM拷贝数与含有无法自扩增的催化失活聚合酶亚基nsP4的SAM对照相关。如图4中所示,虽然所有具有经修饰核苷的SAM均可复制,但仅含有m5C的SAM(“GFP-m5C”)比其未修饰的对应物(“GFP-U”)更有效地复制,使得转录物多出24%。GFP-m5C也比含有 Ψ 、m1 Ψ 或m5C+m1 Ψ 的SAM更有效地复制。

[0368] C.SAM的亲纯化

[0369] 亲和色谱方法对合成SAM ssRNA载体的适用性尚不清楚,所述载体是典型的非扩增mRNA的3至4倍。因此,研究了亲和色谱纯化方法去除体外转录(IVT)过程中产生的副产物(污染物)、降低先天免疫和/或提高合成SAM的翻译和疫苗接种功效的能力。使用POROS OligodT(25)GoPure柱(Thermo Fisher Scientific)和含有10mM HEPES(pH 7.3)、1mM

EDTA和100mM NaCl (缓冲液B) 或500mM NaCl (缓冲液A) 的色谱缓冲液进行从SAM中去除IVT污染物(例如盐、洗涤剂和/或dsRNA)。将柱连接到 Äkta avant 25 FPLC系统(Cytiva), 并用5倍柱体积的缓冲液A以2.5mL/min的流速进行平衡。接着将缓冲液A中的SAM样品以1.5mL/min的流速装载到柱中, 并用3倍柱体积的缓冲液A洗涤, 然后用5倍柱体积的缓冲液B以2.5mL/min的流速洗涤。将色谱缓冲液换成无核酸酶水, 以1.5mL/min的流速释放Oligo(dT)结合的SAM。在260nm处监测流过物和洗涤物级分的紫外吸光度, 并收集与洗脱的SAM相对应的峰级分。为了进一步分析, 通过添加0.1体积的3M NaOAc (pH 5.5) 和1体积的异丙醇, 然后沉淀而从收集的色谱峰中回收核酸。

[0370] 编码 β -Spike的SAM的FPLC色谱图展示了用水洗脱的主峰(图5A), 其被收集并使用毛细管电泳鉴定为预期的SAM产物(图5B, “洗脱物”)。编码不同序列的具有或不具有核苷修饰SAM产生相似的模式, 并且前峰和后峰的相对高度不同。还观察到相对于主要SAM产物具有更短和更长滞留时间的额外紫外吸收产物。

[0371] RNA质量和纯化效率通过毛细管电泳进行评估(每泳道上样3ng总RNA, 并在Agilent Fragment Analyzer上进行分析)。如图5B中所示, 观察到低于预期ssRNA载体产物的条带或涂片。然而, 如下表A中所定量, 当将SAM纯度与输入SAM(“ β -Spike输入”)进行比较时, oligo(dT)纯化的ssRNA载体(“洗脱物”)展示预期产物的纯度与总RNA信号(100nt-13000nt)相比提高了20%, 如通过核苷酸长度8500与13000nt之间的曲线下面积(AUC)所测量。

[0372] 表A-毛细管电泳RNA定量

样品标识	范围	总计%
β -Spike输入	100nt至8499nt	35.1%
β -Spike输入	8500nt至13000nt	63.7%
β -Spike洗脱物	100nt至8499nt	22.7%
β -Spike洗脱物	8500nt至13000nt	76.8%

[0374] D. 核苷修饰和亲和纯化对SAM先天性免疫原性的影响

[0375] 使用识别dsRNA的J2单克隆抗体(mAb)进行斑点印迹测定, 以确定体外转录的SAM是否含有dsRNA。测试不含核苷修饰、含有m1 Ψ 或m5C核苷修饰的 β -Spike和GFP编码体外转录物, 所有样品均含有序列依赖性dsRNA污染(图6A)。未纯化的IVT m1 Ψ 或m5C SAM比相应的含U的SAM含有显著更少的dsRNA污染物(图6B), 表明m1 Ψ 或m5C抑制dsRNA副产物形成。未修饰和核苷经修饰SAM的亲和纯化进一步降低了dsRNA特异性mAb的染色(图6B)。

[0376] 人类单核细胞衍生的树突状细胞(MoDC)用于测量先天性免疫响应, 特别是RNA传感途径。在LNP包封的SAM ssRNA载体转染后24小时, 通过流式细胞术评估IRF7(调控干扰素转录的激活标记)表达水平。与通过斑点印迹进行dsRNA定量的结果一致(图6B), FACS分析表明仅含有m1 Ψ 或m5C的SAM(图7A), 或各自与亲和纯化组合(图7B)诱导的IRF7表达与未经修饰SAM相比减少54-77%。m1 Ψ 修饰比m5C修饰更有效地减少RNA介导的MoDC激活, 可能是由于观察到SAM复制活性降低(图4), 产生更少的dsRNA中间体。相对于LNP介导的未纯化SAM转染, 仅用编码 β -Spike的SAM ssRNA载体的Oligo(dT)介导的亲和力纯化或基于纤维素的纯化诱导了IRF7表达也减少约70%(图7C, 分别为左图和右图)。

[0377] E. 通过Oligo (dT) 亲和纯化的经核苷修饰的SAM的翻译效力

[0378] LNP介导的SAM递送后48小时对MoDC的FACS分析表明,与相应的对照或含m1Ψ的转录物相比,经m5C修饰的SAM与Oligo (dT) 纯化组合显著提高了SAM-GFP的翻译能力(图8)。当使用m5C经修饰SAM时,不仅有更多的细胞表达GFP,而且细胞表现出更强烈的染色,表明细胞内GFP水平更高。阳性细胞数量和强度中的GFP染色水平均与添加至MoDC中的经递送SAM-GFP的量成正比(数据未显示)。

[0379] F. 小鼠中的自扩增mRNA病毒载体评价

[0380] 在小鼠中评估自扩增表达系统的功效,所述表达系统包括编码β-Spike的ssRNA载体(SAM),其具有(A)经修饰的核苷;和/或(B)已纯化如本文所述的色谱系统和/或基于亲和力的分离系统。通过监测T细胞响应来评估功效。

[0381] 免疫

[0382] 将Balb/c小鼠(每组n=12)用SAM-LNP进行免疫。SAM包括经修饰核苷和/或色谱纯化的SAM ssRNA。将SAM-LNP复合物(1μg和10μg)以100μL体积以双侧肌内注射(每条腿50μL)施用。免疫组示于下表B中(基于纤维素的纯化称为“经纯化A”,且基于oligo (dT)的纯化称为“经纯化B”)。

[0383] 表B-具有经修饰核苷和/或经色谱纯化的SAM ssRNA的SAM的体内评估组(Balb/c小鼠)

组	第0天的初免	剂量	读数
1	SAM-β Spike	1αg	第6天和第14天的T细胞: 使用S1和S2抗原的ELISPOT和 ICS
2	SAM-β Spike	10αg	
3	纤维素纯化的SAM-β Spike	1αg	
4	纤维素纯化的SAM-β Spike	10αg	
5	纤维素纯化的SAM-β Spike-m1Ψ	1αg	
6	纤维素纯化的SAM-β Spike-m1Ψ	10αg	
7	纤维素纯化的SAM-β Spike-m5C	1αg	
8	纤维素纯化的SAM-β Spike-m1Ψ	10αg	
9	Oligo(dT)纯化的SAM-β Spike	1αg	
10	Oligo(dT)纯化的SAM-β Spike	10αg	

[0384] 脾细胞解离

[0385] 在免疫后6天(n=6)和12天(n=6)分离脾细胞。将每只小鼠的脾脏汇集在3mL的完整RPMI (RPMI、10% FBS、青霉素/链霉素)中。使用gentleMACSDissociator (Miltenyi Biotec) 遵循制造商的方案进行机械解离。通过40微米过滤器过滤解离的细胞并将红细胞用ACK裂解缓冲液(150mM NH₄Cl, 10mM KHCO₃, 0.1mM Na₂EDTA)裂解。将细胞再次通过30微米过滤器过滤,且接着重悬于完全RPMI中。使用碘化丙锭染色在Cytoflex LX (Beckman Coulter) 上对细胞进行计数,以排除死亡细胞和凋亡细胞。接着将细胞调整至适当的活细胞浓度以进行后续分析。

[0386] 离体酶联免疫斑点(ELISpot)分析

[0387] 根据ELISPOT协调指南{DOI:10.1038/nprot.2015.068},使用小鼠IFN γ ELISpotPLUS试剂盒(MABTECH)进行ELISPOT分析。在96孔IFN γ 抗体包被的板中,用10uMβ-Spike肽离体刺激5×10⁴个脾细胞16小时。使用碱性磷酸酶使斑点显现。将反应定为10分钟并通过在自来水下冲板来终止反应。使用AID vSpot Reader Spectrum来对斑点进行计数。对于ELISPOT分析,饱和度>50%的孔被记录为“太多而无法计数”。重复孔偏差>10%的样品

被排除在分析之外。接着使用以下公式对斑点计数进行孔汇合度校正:斑点计数+2×(斑点计数×汇合度%/[100%-汇合度%])。通过从抗原刺激孔中减去负肽刺激孔中的斑点计数来校正负背景。最后,标记太多而无法计数的孔被设置为最高的观测校正值,四舍五入到最接近的百位。

[0389] G. 小鼠的免疫原性结果

[0390] 在用1或10mg SAM-LNP免疫后6或14天时,在Balb/c小鼠中测量针对SARS-CoV-2 β -Spike表位的抗原特异性细胞免疫响应。如图9中所示,通过IFN γ ELISpot测量的免疫响应显示出表位特异性T细胞响应的趋势,表明相对于评估的其他SAM组合物,用oligo(dT)纯化的SAM免疫改善了T细胞响应。

[0391] 使用标准“传统”方案生产和纯化或者使用m5C生产并用oligo(dT)纯化的1mg SAM-LNP(“Oligo(dT)纯化的m5C- β -Spike samRNA”)进行免疫后,在Balb/c小鼠中进一步测量针对SARS-CoV-2 β -Spike表位的抗原特异性细胞免疫响应。图10显示在免疫后5或12天,通过对Balb/c小鼠进行细胞内细胞因子染色测量针对跨越SARS-CoV-2 β -Spike表位的重叠肽池的免疫响应。图11显示免疫后4或8周Balb/c小鼠中的假病毒中和效价(50%抑制)。

[0392] 在用如下产生的1mg SAM-LNP进行免疫后,进一步测量Balb/c小鼠对模型抗原盒的抗原特异性细胞免疫响应:用标准的“传统”方案产生和纯化;用m5C产生并用oligo(dT)纯化(“Oligo(dT)纯化的m5C-MAG samRNA”);或用m1 Ψ 产生并用oligo(dT)纯化(“Oligo(dT)纯化的m1 Ψ -MAG samRNA”)。图12显示在用四聚体AH1抗原刺激后,通过Balb/c小鼠脾细胞中的细胞内细胞因子染色测量的免疫响应。

[0393] 结果表明用m5C产生并用oligo(dT)纯化或者用m1 Ψ 产生并用oligo(dT)纯化的samRNA刺激了免疫响应。

[0394] H. 非人类灵长类动物疫苗功效评价

[0395] 在非人类灵长类动物中评价了含有编码免疫原的盒的疫苗的功效和安全性。具体而言,评估了包括ssRNA载体(SAM)的自扩增表达系统,所述载体(A)包含经修饰核苷;和/或(B)已使用如本文所述的色谱系统和/或基于亲和力的分离系统纯化。通过监测T细胞和/或B细胞响应来评估功效。

[0396] 免疫

[0397] 对于印度恒河猴的SAM疫苗(例如,Mamu-A*01),SAM以双侧肌肉注射的方式施用至股四头肌中,包括但不限于以每只动物总共1mg、每条腿1mL的剂量施用。

[0398] 恒河猴的免疫监测

[0399] 对于免疫监测,将10-20mL血液收集到含有肝素的真空采血管中,并保持在室温下直至分离。使用淋巴细胞分离培养基(LSM)和Leucosep分离管通过密度梯度离心分离PBMC。将PBMC用碘化丙锭染色,并使用Cytoflex LX(Beckman Coulter)对活细胞计数。然后在RPMI完全(10% FBS)中以 4×10^6 个细胞/mL重悬样品。

[0400] IFN γ ELISPOT测定是使用预包装的96孔板(MAbtech,猴IFN γ ELISPOT PLUS,ALP(试剂盒批号36,板批号19))按照制造商的方案进行的。对于每个样品和刺激物,每孔 1×10^5 个PBMC一式三份地与10 μ g/mL肽刺激物(GenScript)一起涂铺,并在完全RPMI中孵育过夜。将样品与SAM ssRNA载体编码的10 μ M相应肽一起孵育过夜。将仅DMSO用作每个样品的阴性对照。将板用PBS洗涤并与抗猴IFN γ MAb生物素(MAbtech)一起孵育两小时,接着再次洗

涤并与链霉亲和素-ALP (MAbtech) 一起孵育一小时。最后一次洗涤后,将板与BCIP/NBT (MAbtech) 一起孵育十分钟以使免疫斑点显现并在37°C下干燥过夜。使用AID读取器 (Autoimmun Diagnostika) 对斑点进行成像和计数。

[0401] 其中重复孔变异性(变异性=方差/[中位数+1])大于10并且中位数大于10的样品被排除在外。斑点值基于孔饱和度根据下式进行调整:调整斑点=原始斑点+2*(原始斑点*饱和度/[100-饱和度])。孔饱和度大于33%的孔被认为是“数量众多而难以计数”(TNTC)并被排除在外。通过减去阴性对照肽孔的平均值对每个样品进行背景校正。通过将校正的斑点数乘以 1×10^6 /涂铺细胞数,将数据相对于每 1×10^6 个PBMC的斑点形成集落(SFC)进行归一化。对于总体总结分析,利用通过以 1×10^5 个细胞/孔涂铺细胞而产生的计算值,除非当样品是TNTC时,在这种情况下,由以 2.5×10^4 个细胞涂铺细胞产生的值用于该特定样品/刺激物/时间点。使用R编程语言执行数据处理。

[0402] 还进行细胞内细胞因子测定。PBMC以每孔 1×10^6 个细胞分布至V形底96孔板中。将细胞沉淀并重悬于100 μ l含有上述编码肽的完全RPMI中。将DMSO用作每个样品的阴性对照。1小时后添加布雷非德菌素A(Biolegend)至5 μ g/mL的最终浓度,并将细胞孵育过夜。存活力染色后,在FACS缓冲液(PBS+2% FBS+2mM EDTA)中进行细胞外染色。使用eBiosciences固定/透化溶液试剂盒对细胞进行洗涤、固定和透化。进行细胞内染色。评估样品的存活力、CD3、CD4、CD8、IFN γ 、TNF α 、IL-2、穿孔素、CD107a、CCR7和CD45RA。

[0403] 还监测了血清细胞因子标记。采用标准多重分析来测量血清细胞因子和趋化因子水平。在疫苗接种后0小时(基线)、2小时、8小时、24小时和48小时收集血清并进行标记分析。评估的细胞因子是白介素-1 β (IL-1 β)、白介素-1(IL-10)、白介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、干扰素 γ (IFN- γ)、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、干扰素 γ 诱导蛋白10(IP-10)、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)、巨噬细胞炎性蛋白1 β (MIP-1 β)和IFN- α (干扰素- α 2a)。

[0404] I.NHP的免疫原性结果

[0405] 包括具有经修饰核苷和/或已使用色谱系统和/或基于亲和力的分离系统纯化的ssRNA载体的自扩增表达系统展示了改善的疫苗功效,如通过监测T细胞和/或B细胞响应所评估。

[0406] 序列

[0407] 本文提及的载体、盒和抗体在下文描述并由SEQ ID NO指代。参考SEQ ID NO。还参考美国临时申请第63/277,116号中的序列列表,所述临时申请出于所有目的特此以引用的方式并入。

[0408]

曲美木单抗 VL (SEQ ID NO:16)
曲美木单抗 VH (SEQ ID NO:17)
曲美木单抗 VH CDR1 (SEQ ID NO:18)
曲美木单抗 VH CDR2 (SEQ ID NO:19)
曲美木单抗 VH CDR3 (SEQ ID NO:20)
曲美木单抗 VL CDR1 (SEQ ID NO:21)
曲美木单抗 VL CDR2 (SEQ ID NO:22)
曲美木单抗 VL CDR3 (SEQ ID NO:23)
德瓦鲁单抗(MEDI4736) VL (SEQ ID NO:24)
MEDI4736 VH (SEQ ID NO:25)
MEDI4736 VH CDR1 (SEQ ID NO:26)
MEDI4736 VH CDR2 (SEQ ID NO:27)

[0409]

MEDI4736 VH CDR3 (SEQ ID NO:28)
MEDI4736 VL CDR1 (SEQ ID NO:29)
MEDI4736 VL CDR2 (SEQ ID NO:30)
MEDI4736 VL CDR3 (SEQ ID NO:31)
UbA76-25 聚体 PDTT 核苷酸(SEQ ID NO:32)
UbA76-25 聚体 PDTT 多肽(SEQ ID NO:33)
MAG-25 聚体 PDTT 核苷酸(SEQ ID NO:34)
MAG-25 聚体 PDTT 多肽(SEQ ID NO:35)
Ub7625 聚体 PDTT_NoSFL 核苷酸(SEQ ID NO:36)
Ub7625 聚体 PDTT_NoSFL 多肽(SEQ ID NO:37)
ChAdV68.5WTnt.MAG25 聚体(SEQ ID NO:2); 具有 E1 (nt 577 至 3403)和 E3 (nt 27,125- 31,825)序列缺失的 AC_000011.1; 在五个位置处被取代的相应 ATCC VR-594 核苷酸; 被插入以代替缺失 E1 的 CMV 启动子/增强子控制下的模型新抗原盒; 盒的 SV40 聚 A 3'
委内瑞拉马脑炎病毒[VEEV] (SEQ ID NO:3) GenBank: L01442.2
VEE-MAG25 聚体(SEQ ID NO:4); 含有 MAG-25 聚体 PDTT 核苷酸(碱基 30-1755)
委内瑞拉马脑炎病毒株 TC-83 [TC-83](SEQ ID NO:5) GenBank: L01443.1
VEEV 递送载体(SEQ ID NO:6); 具有核苷酸 7544-11175 缺失的 VEEV 基因组[甲病毒结构蛋白被去除, 除了 E1 的最后 50 个氨基酸]
ATGggcggcgcgatgagagaagcccagaccaattacctacccaaaATGGagaaagtacggtgacatcgaggaagacagcccattcctcagagctttgcagcggagcttcccgcagtttgaggtagaagccaagcaggtcactgataatgaccatgctaatgccagagcgttttcgcatctggcttcaaaactgatgaaacggaggtggacccatccgacacgatccttgacattggaagtgcgcccggcgcagaatgtattc taagcacaagtatcattgtatctgtccgatgagatgtgcggaagatccggacagattgtataagtatgc aactaagctgaagaaaaactgtaaggaaataactgataaggaattggacaagaaaatgaaggagct cggcggcgtcatgagcggaccctgacctggaaactgagactatgtgctccacgacgacgagtcgtg tcgctacgaagggcaagtcgctgtttaccaggatgtatacgcggttgacggaccgacaagtcctatc accaagccaataagggagttagatgcctactggataggctttgacaccaccctttatgtttaaga acttggtggagcatatccatcactctaccaactgggcccacgaaaccgtgtaacggctcgtaac ataggcctatgcagctctgacgttatggagcggtcacgtagagggatgtccattcttagaagaagtat ttgaaaccatccaacaatgttctattctctgttgctcgaccatctaccacgagaagagggactactga ggagctggcactgccgtctgtatttcacttacgtggcaagcaaaattacacatgtcgggtgtgagacta tagttagttgcgacgggtacgtcgftaaaagaatagctatcagtcaggcctgtatgggaagcctcag gctatgtctgctacgatgcaccgcgagggattctgtgctgcaaaagtacagacacattgaacgggga gagggtctctttcccgtgtgcacgtatgtgccagctacattgtgtgaccaaataactgactggcactactggc aacagatgtcagtcgagcgcgcaaaaactgctggtgggctcaaccagcgtatagtcgtcaa cggtcgcaccagagaaacaccaataccatgaaaattacctttgcccgtagtggcccaggcattg

[0410]

```

ctaggtgggcaaaggaatataaggaagatcaagaagatgaaaggccactaggactacgagataga
cagttagtcatgggggtgttgggcttttagaaggcacaagataacatctattataagcggcgata
cccaaacatcatcaaagtgaacagcgattccactcattcgtgctgccagggataggcagtaacaca
ttggagatcgggctgagaacaagaatcaggaaaatgtagaggagcacaaggagccgtcacctctc
attaccgccgaggacgtacaagaagctaagtgcgcagccgatgaggctaaggaggtgctggaagc
cgaggagtgcgcgcagctctaccaccttggcagctgatgtgaggagccactctggaagccgat
gtcgacttgatgttacaagaggctggggccggtcagtgaggagacacctcgtgcttgataaaggta
ccagctacgctggcgaggacaagatcggctcttacgctgtgctttctccgagggctgtactcaagagt
gaaaaattatcttgcacccctctcgtgaacaagtcatagtataacacactctggccgaaaagg
gcgttatgccgtggaaccataccatggtaaagtagtggtgccagagggacatgcaataccgctccag
gactttcaagctctgagtgaagtgccaccattgtgtacaacgaacgtgagttcgtaaacaggtacctg
caccatattgccacacatggaggagcgtgaacactgatgaagaatattacaaaactgtcaagccca
gcgagcacgcagcggcgaataacctgtacgacatcgacaggaaacagtgctcaagaagaactagtc
actgggctagggctcacaggcagctggtggatcctccttccatgaattcgcctacgagagtctga
gaacacgaccagcgccttaccagtagtaaccaataggggtgtatggcgtgccaggatcaggca
agtctggcatcattaaaagcgcagtcacaaaaaagatctagtggtagcgcgaagaagaagaact
gtgcagaaattataagggacgtcaagaaaatgaaagggtggacgtcaatgccagaactgtggact
cagtgctcttgaatggatgcaaacaccccgtagagacctgtatattgacgaagcttttgcctgtatgc
aggtactctcagagcgtcatagccattataagacctaaaaaggcagtgctctgcggggatcccaaa
cagtgccggttttttaacatgatgtgctgaaagtgcattttaaccacgagatttgcacacaagcttcca
caaaagcatctctcggcgttgcactaaatctgtgactcggctcgtctcaacctgttttacgacaaaaaa
atgagaacgacgaatccgaaagagactaagattgtgattgacactaccggcagtagcaaacctaagc
aggacgatctcattctcacttgttcagaggggtgggtgaagcagttgcaaatagattacaaaggcaac
gaaataatgacggcagctgcctctcaagggctgaccctgaaaggtgtgtatgccgttcggtacaagg
tgaatgaaaatcctctgtacgcaccacctcagaacatgtgaacgtcctactgaccgcacggagga
ccgcatcgtgtggaaaactagccggcgacctatggataaaaaactgactgccaagtacctgg
gaattcactgccacgatagaggagtggcaagcagagcatgatgccatcatgaggcacatcttgag
agaccggacctaccgacgtctccagaataaggcaaacgtgtgtggccaaggctttagtccgg
tgctgaagaccgctggcatagacatgacctgaacaatggaacactgtgattatttgaaacggac
aaagctcactcagcagatagatattgaaccaactatgcgtgaggttctttgactcgtatcggactcc
ggtctattttctgaccactgttccgttatccattaggaataatcactgggataactccccgtgcctaa
catgtacgggctgaataaagaagtggcctcagctctctcgcaggtaccacaactgcctcgggca
ggtgccactggaagagtctatgacatgaacactggtacactgcgcaattatgatccgcgataaacct
agtacctgtaaacagaagactgcctcatgcttagtctccaccataatgaacaccacagagtgactt
ttctcattcgtcagcaaattgaaggcagaactgtcctgggtggtcgggaaaagtgtcctccag
gcaaaatgggtgactgggtgacagaccggcctgaggctaccttcagagctcggctggatttaggcac
ccaggtgatgtgcccataatgacataatatttgaatgtgaggacctatataataaccatcactatc
agcagtgtagaacatgccattaagcttagcatgttgaccaagaaagctgtctgcatctgaatcccg
gcggaacctgtgtcagcataggttatggttacgctgacagggccagcgaagcatcattggtgctata
gcgcggcagttcaagtttccgggtatgcaaacgaaatcctcacttgaagagacggaagttctgttt
gtattcattgggtacgatcgaaggcccgtacgcacaatcctacaagcttcatcaaccttgaccaac
atttatacaggttcagactccacgaagccgatgtgcacctcatatcatgtggtgcgaggggatatt
gccacggccaccgaaggagtgattataatgctgctaacagcaaaggacaacctggcggaggggt

```

[0411]

```

gtgCGGagcGctgtataagaaattcccGgaaGcttcGatttacagccgatcgaagtaggaaaagcG
cgactggTcaaaggtGcagctaaacatacattcatgccgtaggaccaaactcaacaaagtttcgga
ggttgaaggtGacaaacagttggcagaggcttatgagTccatcGctaaGattgtcaacgataacaatt
acaagtcagtagcGattccactgttGtcaccggcatctttccgggaacaaagatcGactaacccaat
cattgaaccatttGctgacagctttagacaccactgatGcagatgtagccatatactGcagggacaag
aaatgggaaatgactctcaaggaagcagTggctagGagagaagcagTggaggagatatGcatatcc
gacgactcttcagTgacagaacctgatGcagagctggTgagggtGcatccgaagagTtctttggctG
gaaggaaaggGctacagcacaagcGatggcaaaactttctcatatttGgaaggGaccaagttcacc
ggcggccaagGatataGcagaaattaatgccatgtggcccgttGcaacggaggccaatgagcaggt
atGcatgtatatcctcggagaaagcatgagcagTattagTcGaaatgccccGtGaaGagTcggaa
gcctccacaccactagcagctGccttGcttGtGcatccatgccatgactccagaaagagTacagc
gcctaaaagcctcagTccagaacaaattactgtTgTcTcTcttccattGccgaagTatagaatc
tggtTgTcagaagatccaatGtcccagcctatattGttctaccGaaagTgctGcgtatattcTca
aggaagTatctcgtGgaaacaccaccggtagacGagactccggagccatcggcagagaaccaatc
cacagagggGacacctgaacaaccaccactataaccgaggatgagaccaggactagaacgcctG
agccgatcatcatcgaagaggaagaagagGatagcataagTttGctGcagatggcccGaccacc
aggtGctGcaagTcagggcagacattcacgggcccGcctctgtatctagTcTcctGgtccattcctc
atGcatccgactttgatTggacagTttatcatacttgacacctggaggGagctagcgtgaccagc
ggggcaacGtcagccGagactaactcttacttcGcaaagagTatggagTttctggcGcGaccggTgc
ctGcGctcGaacagTattcaggaacctccacatcccGctccGcGcacaagaacaccGtacttGc
accagcagggcctGctcGagaaccagcctagTtccaccccGccaggcGtgaatagggtgatc
tagagaggagctcGaggcGcttaccGctacGcactcctagcaggtcggTctcGagaaccagcct
ggTctccaaccGccaggcGtaaatagggtGattacaagagaggagTttgaggcGttcgtagcaca
caaatGacggTttgatGcgggtGcatacatctttctccGacaccggTcaagggcatttacaaca
aatcagTaaaggcaaacggTgctatccgaagTggTgttgagaggaccgaattggagattcGtatGc
cccGcGctcGaccaagaaaaagaagaattactacGcaagaattacagTtaaattccacacctGct
aacagaagcagataaccagTccaggaaggtggagaacatgaaagccataacagctagacgtattctG
caaggcctaggGcattatttgaaggcagaaggaaaagTggagTgctaccgaacctGcTcctGttc
ctttGattcatctagTgtgaaccGtGcctttcaagcccGaggtcGcagTggaagcctGtaacGccat
gttGaaagagaactttccGactgtGgcttcttactgtattattccagagTacgatGcctatttggacatGgt
tgacggagcttcatGctGcttagacactGccagTtttGccctGcaaagctGcGcagcttccaaGaa
aacctcctatttGgaaccacaatacGatcggcagTgcttcagcGatccagaacacGtccagaac
gtcctggcagctGccacaaaaagaaattGcaatGtcacGcaaatgagagaattGcccGtattggattc
ggcggccttfaatgtggaatGcttcaagaaatatGcgtGtaataatgaatattgggaaacGttaaagaa
aaccctatcaggcttactgaagaaaacgtGgtaaattacattaccaatGaaagGacaaaagctGc
tgctcttttGcgaagacacataatttgaatatgttGcaggacataccaatggacaggttGtaatggact
taaagagagacgtGaaagTactccaggaacaaaacatactgaagaacggccaaggtacaggtG
atccaggctGccgatccGctagcaacagcGtatctgtGcggaatccaccGagagctGgttaggagat
taaTgCggtcctGctccGaacattcatacactgtttgatatGtcggctgaagactttgacGctattata
gccgagcattccagcctggggattgtGttctGgaaactGacatcGcGtcGtttGataaaaagTgagga
cgacGccatggctctGaccGcttaatGattctGgaagacttaggtGtgGacGcagagctGttgacGc
tgattgaggcGgctttcggcGaaatttcatcaatacatttGccactaaaactaaatttaaattcggagcc
atgatGaaatctGgaatGttcctcacactgtttGtgaacacagTcattaacattGtaatcGcaagcagag

```

```

tgttgagagaacggctaaccggatcacatgtgcagcattcattggagatgacaatatcgtgaaagga
gtcaaatcggacaaattaatggcagacaggtgcgccacctggttgaatatggaagtcaagattataga
tgctgtggtgggcgagaaaagcgccttatttctgtggagggtttattttgtgtgactccgtgaccggcaca
gcgtgccgtgtggcagaccccctaaaaagctgtttaagcttggcaaacctctggcagcagacgatg
aacatgatgatgacaggagaagggcattgcatgaagagtcaacacgctggaaccgagtgggtattct
ttcagagctgtgcaaggcagtagaatcaaggatgaaaccgtaggaacttccatcatagttatggccat
gactactctagctagcagtgttaaatcattcagctacctgagagggggcccctataactctctacggcT
AAcctgaatggactacgacgtatcacgcccacatttacagccggtgtcaaaaaccgctgg
acgtggtaacatccctgctgggaggatcagccgtaattattataattggcttggctgctggtactattgt
ggccatgtacgtgctgaccaaccagaaacataattgaatacagcagcaattggcaagctgcttacata
gaactcgcggcgattggcatgccgccttaaaattttattttttttttttttttttttcgaateggattttgtt
ttaatattcAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAA

```

TC-83 递送载体(SEQ ID NO:7); 具有核苷酸 7544-11175 缺失的 TC-83 基因组[甲病毒结构蛋白被去除]

[0412]

```

ATAGGCGGCGCATGAGAGAAGCCCAGACCAATTACCTACCCA
AAATGGAGAAAGTTCACGTTGACATCGAGGAAGACAGCCCAT
TCCTCAGAGCTTTGCAGCGGAGCTTCCCGCAGTTTGAGGTAG
AAGCCAAGCAGGTCACTGATAATGACCATGCTAATGCCAGAG
CGTTTTTCGCATCTGGCTTCAAACACTGATCGAAACGGAGGTGG
ACCCATCCGACACGATCCTTGACATTGGAAGTGCGCCCGCCC
GCAGAATGTATTCTAAGCACAAGTATCATTGTATCTGTCCGATG
AGATGTGCGGAAGATCCGGACAGATTGTATAAGTATGCAACTA
AGCTGAAGAAAACTGTAAGGAAATAACTGATAAGGAATTGG
ACAAGAAAATGAAGGAGCTCGCCGCCGTCATGAGCGACCCT
GACCTGGAAACTGAGACTATGTGCCTCCACGACGACGAGTCG
TGTCGCTACGAAGGGCAAGTCGCTGTTTACCAGGATGTATACG
CGTTTGACGGACCGACAAGTCTCTATCACCAAGCCAATAAGG
GAGTTAGAGTCGCCTACTGGATAGGCTTTGACACCACCCTTT
TATGTTTAAAGAACTTGGCTGGAGCATATCCATCATACTCTACCA
ACTGGGCCGACGAAACCGTGTTAACGGCTCGTAACATAGGCC
TATGCAGCTCTGACGTTATGGAGCGGTCACGTAGAGGGATGT
CCATTCTTAGAAAGAAGTATTTGAAACCATCCAACAATGTTCT
ATTCTCTGTTGGCTCGACCATCTACCACGAGAAGAGGGACTT
ACTGAGGAGCTGGCACCTGCCGCTGTGATTTCACTTACGTGGC
AAGCAAATTACACATGTCGGTGTGAGACTATAGTTAGTTGCG
ACGGGTACGTCGTAAAAGAATAGCTATCAGTCCAGGCCTGTA
TGGAAGCCTTCAGGCTATGCTGCTACGATGCACCGCGAGGG
ATTCTTGTGCTGCAAAGTGACAGACACATTGAACGGGGAGAG
GGTCTCTTTTCCCGTGTGCACGTATGTGCCAGCTACATTGTGT
GACCAAATGACTGGCATACTGGCAACAGATGTCAGTGCGGAC

```

[0413]

GACGCGCAAAAACCTGCTGGTTGGGCTCAACCAGCGTATAGTC
GTCAACGGTCGCACCCAGAGAAACACCAATACCATGAAAAAT
TACCTTTTGCCCGTAGTGGCCAGGCATTTGCTAGGTGGGCAA
AGGAATATAAGGAAGATCAAGAAGATGAAAGGCCACTAGGA
CTACGAGATAGACAGTTAGTCATGGGGTGTGTTGGGCTTTTA
GAAGGCACAAGATAACATCTATTTATAAGCGCCCGGATACCCA
AACCATCATCAAAGTGAACAGCGATTTCCACTCATTTCGTGCTG
CCCAGGATAGGCAGTAACACATTGGAGATCGGGCTGAGAACA
AGAATCAGGAAAATGTTAGAGGAGCACAAGGAGCCGTCACC
TCTCATTACCGCCGAGGACGTACAAGAAGCTAAGTGCGCAGC
CGATGAGGCTAAGGAGGTGCGTGAAGCCGAGGAGTTGCGCG
CAGCTCTACCACCTTTGGCAGCTGATGTTGAGGAGCCCACTC
TGGAAGCCGATGTCGACTTGATGTTACAAGAGGCTGGGGCCG
GCTCAGTGGAGACACCTCGTGGCTTGATAAAGGTTACCAGCT
ACGATGGCGAGGACAAGATCGGCTCTTACGCTGTGCTTTCTC
CGCAGGCTGTAICTAAGAGTGAAAAATTATCTTGCATCCACCC
TCTCGCTGAACAAGTCATAGTGATAACACACTCTGGCCGAAA
AGGGCGTTATGCCGTGGAACCATAACCATGGTAAAGTAGTGGT
GCCAGAGGGACATGCAATACCCGTCCAGGACTTTCAAGCTCT
GAGTGAAAGTGCCACCATTGTGTACAACGAACGTGAGTTCGT
AAACAGGTACCTGCACCATATTGCCACACATGGAGGAGCGCT
GAACACTGATGAAGAATATTACAAAACCTGTCAAGCCCAGCGA
GCACGACGGCGAATACCTGTACGACATCGACAGGAAACAGTG
CGTCAAGAAAGAACTAGTCACTGGGCTAGGGCTCACAGGCG
AGCTGGTGGATCCTCCCTTCCATGAATTGCCTACGAGAGTCT
GAGAACACGACCAGCCGCTCCTTACCAAGTACCAACCATAGG
GGTGTATGGCGTGCCAGGATCAGGCAAGTCTGGCATCATTAA
AAGCGCAGTCACCAAAAAAGATCTAGTGGTGAGCGCCAAGA
AAGAAAACCTGTGCAGAAATTATAAGGGACGTCAAGAAAATG
AAAGGGCTGGACGTCAATGCCAGAACTGTGGACTCAGTGCTC
TTGAATGGATGCAAACACCCCGTAGAGACCCTGTATATTGACG
AAGCTTTTGCTTGTTCATGCAGGTACTCTCAGAGCGCTCATAGC
CATTATAAGACCTAAAAAGGCAGTGCTCTGCGGGGATCCCAA
ACAGTGCGGTTTTTTTTAACATGATGTGCCTGAAAGTGCATTTT
AACCACGAGATTTGCACACAAGTCTTCCACAAAAGCATCTCT
CGCCGTTGCACTAAATCTGTGACTTCGGTCGTCTCAACCTTGT
TTACGACAAAAAATGAGAACGACGAATCCGAAAGAGACT
AAGATTGTGATTGACACTACCGGCAGTACCAAACCTAAGCAG
GACGATCTCATTCTCACTTGTTTCAGAGGGTGGGTGAAGCAG
TTGCAAATAGATTACAAAGGCAACGAAATAATGACGGCAGCT
GCCTCTCAAGGGCTGACCCGTAAAGGTGTGTATGCCGTTCCG
TACAAGGTGAATGAAAATCCTCTGTACGCACCCACCTCAGAA
CATGTGAACGTCCTACTGACCCGCACGGAGGACCGCATCGTG

[0414]

TGGAAAACACTAGCCGGCGACCCATGGATAAAAACACTGACT
GCCAAGTACCCTGGGAATTTCACTGCCACGATAGAGGAGTGG
CAAGCAGAGCATGATGCCATCATGAGGCACATCTTGGAGAGA
CCGGACCCTACCGACGTCTTCCAGAATAAGGCAAACGTGTGT
TGGGCCAAGGCTTTAGTGCCGGTGCTGAAGACCGCTGGCATA
GACATGACCACTGAACAATGGAACACTGTGGATTATTTTGAA
ACGGACAAAGCTCACTCAGCAGAGATAGTATTGAACCAACTA
TGCGTGAGGTTCTTTGGACTCGATCTGGACTCCGGTCTATTTT
CTGCACCCACTGTTCCGTTATCCATTAGGAATAATCACTGGGAT
AACTCCCCGTCGCCTAACATGTACGGGCTGAATAAAGAAGTG
GTCCGTCAGCTCTCTCGCAGGTACCCACAACCTGCCTCGGGCA
GTTGCCACTGGAAGAGTCTATGACATGAACACTGGTACACTG
CGCAATTATGATCCGCGCATAAACCTAGTACCTGTAAACAGAA
GACTGCCTCATGCTTTAGTCCTCCACCATAATGAACACCCACA
GAGTGACTTTTCTTCATTCGTCAGCAAATTGAAGGGCAGAAC
TGTCTGGTGGTCGGGGAAAAGTTGTCCGTCCCAGGCAAAT
GGTTGACTGGTTGTCAGACCGGCCTGAGGCTACCTTCAGAGC
TCGGCTGGATTTAGGCATCCCAGGTGATGTGCCCAAATATGAC
ATAATATTTGTTAATGTGAGGACCCCATATAAATACCATCACTA
TCAGCAGTGTGAAGACCATGCCATTAAGCTTAGCATGTTGACC
AAGAAAGCTTGTCTGCATCTGAATCCCGGCGGAACCTGTGTC
AGCATAGGTTATGGTTACGCTGACAGGGCCAGCGAAAGCATC
ATTGGTGCTATAGCGCGGCAGTTC AAGTTTTCCCGGGTATGCA
AACCGAAATCCTCACTTGAAGAGACGGAAGTTCTGTTTGTAT
TCATTGGGTACGATCGCAAGGCCCGTACGCACAATCCTTACAA
GCTTTCATCAACCTTGACCAACATTTATAACAGGTTCCAGACTC
CACGAAGCCGGATGTGCACCCTCATATCATGTGGTGCGAGGG
GATATTGCCACGGCCACCGAAGGAGTGATTATAAATGCTGCTA
ACAGCAAAGGACAACCTGGCGGAGGGGTGTGCGGAGCGCTG
TATAAGAAATTCCCGGAAAGCTTCGATTTACAGCCGATCGAAG
TAGGAAAAGCGCGACTGGTCAAAGGTGCAGCTAAACATATCA
TTCATGCCGTAGGACCAAACCTTCAACAAAGTTTTCGGAGGTTG
AAGGTGACAAACAGTTGGCAGAGGCTTATGAGTCCATCGCTA
AGATTGTCAACGATAACAATTACAAGTCAGTAGCGATTCCACT
GTTGTCCACCGGCATCTTTTCCGGGAACAAAGATCGACTAAC
CCAATCATTGAACCATTTGCTGACAGCTTTAGACACCACTGAT
GCAGATGTAGCCATATACTGCAGGGACAAGAAATGGGAAATG
ACTCTCAAGGAAGCAGTGGCTAGGAGAGAAGCAGTGGAGGA
GATATGCATATCCGACGACTCTTCAGTGACAGAACCTGATGCA
GAGCTGGTGAGGGTGCATCCGAAGAGTTCTTTGGCTGGAAGG
AAGGGCTACAGCACAAGCGATGGCAAACCTTTCTCATATTTG
GAAGGGACCAAGTTTACCAGGCGGCCAAGGATATAGCAGA
AATTAATGCCATGTGGCCCGTTGCAACGGAGGCCAATGAGCA

[0415]

GGTATGCATGTATATCCTCGGAGAAAGCATGAGCAGTATTAGG
TCGAAATGCCCGTTCGAAGAGTCGGAAGCCTCCACACCACCT
AGCACGCTGCCTTGCTTGTGCATCCATGCCATGACTCCAGAA
AGAGTACAGCGCCTAAAAGCCTCACGTCCAGAACAAATTACT
GTGTGCTCATCCTTTCCATTGCCGAAGTATAGAATCACTGGTG
TGCAGAAGATCCAATGCTCCCAGCCTATATTGTTCTCACCGAA
AGTGCCTGCGTATATTCATCCAAGGAAGTATCTCGTGGAACA
CCACCGGTAGACGAGACTCCGGAGCCATCGGCAGAGAACCA
ATCCACAGAGGGGACACCTGAACAACCACCTTATAACCGA
GGATGAGACCAGGACTAGAACGCCTGAGCCGATCATCATCGA
AGAGGAAGAAGAGGATAGCATAAGTTTGCTGTCAGATGGCCC
GACCCACCAGGTGCTGCAAGTCGAGGCAGACATTCACGGGC
CGCCCTCTGTATCTAGCTCATCCTGGTCCATTCTCATGCATCC
GACTTTGATGTGGACAGTTTATCCATACTTGACACCCTGGAGG
GAGCTAGCGTGACCAGCGGGGCAACGTCAGCCGAGACTAAC
TCTTACTTCGCAAAGAGTATGGAGTTTCTGGCGCGACCGGTG
CCTGCGCCTCGAACAGTATTCAGGAACCCTCCACATCCCGCT
CCGCGCACAAGAACACCGTCACTTGCACCCAGCAGGGCCTG
CTCGAGAACCAGCCTAGTTTCCACCCCGCCAGGCGTGAATAG
GGTGATCACTAGAGAGGAGCTCGAGGCGCTTACCCCGTCACG
CACTCCTAGCAGGTCCGGTCTCGAGAACCAGCCTGGTCTCCAA
CCCGCCAGGCGTAAATAGGGTGATTACAAGAGAGGAGTTTGA
GGCGTTTCGTAGCACAACAACAATGACGGTTTGATGCGGGTGC
ATACATCTTTTCCCTCCGACACCGGTCAAGGGCATTTACAACAA
AAATCAGTAAGGCAAACGGTGCTATCCGAAGTGGTGTGGAG
AGGACCGAATTGGAGATTCGTATGCCCCGCGCCTCGACCAA
GAAAAAGAAGAATTACTACGCAAGAAATTACAGTTAAATCCC
ACACCTGCTAACAGAAGCAGATAACCAGTCCAGGAAGGTGGA
GAACATGAAAGCCATAACAGCTAGACGTATTCTGCAAGGCCT
AGGGCATTATTTGAAGGCAGAAGGAAAAGTGGAGTGCTACCG
AACCTGCATCCTGTTCCCTTTGTATTTCATCTAGTGTGAACCGT
GCCTTTTCAAGCCCCAAGGTCGCAGTGGAAGCCTGTAACGCC
ATGTTGAAAGAGAATTTCGACTGTGGCTTCTTACTGTATTA
TTCCAGAGTACGATGCCTATTTGGACATGGTTGACGGAGCTTC
ATGCTGCTTAGACACTGCCAGTTTTTTGCCCTGCAAAGCTGCG
CAGCTTTCCAAAGAAACACTCCTATTTGGAACCCACAATACG
ATCGGCAGTGCCTTCAGCGATCCAGAACACGCTCCAGAACGT
CCTGGCAGCTGCCACAAAAGAAATTGCAATGTCACGCAAAT
GAGAGAATTGCCCGTATTGGATTCGGCGGCCTTTAATGTGGAA
TGCTTCAAGAAATATGCGTGTAATAATGAATATTGGGAAACGT
TTAAAGAAAACCCCATCAGGCTTACTGAAGAAAACGTGGTAA
ATTACATTACCAAATTAAGGACCAAAAGCTGCTGCTCTTTT
TGCGAAGACACATAATTTGAATATGTTGCAGGACATACCAATG

[0416]

GACAGGTTTGTAATGGACTTAAAGAGAGACGTGAAAGTGACT
 CCAGGAACAAAACATACTGAAGAACGGCCCAAGGTACAGGT
 GATCCAGGCTGCCGATCCGCTAGCAACAGCGTATCTGTGCGG
 AATCCACCGAGAGCTGGTTAGGAGATTAAATGCGGTCCTGCT
 TCCGAACATTCATACTGTTTGATATGTCGGCTGAAGACTTT
 GACGCTATTATAGCCGAGCACTTCCAGCCTGGGGATTGTGTTT
 TGGAAACTGACATCGCGTCGTTTGATAAAAGTGAGGACGACG
 CCATGGCTCTGACCGCGTTAATGATTCTGGAAGACTTAGGTGT
 GGACGCAGAGCTGTTGACGCTGATTGAGGCGGCTTTCGGCGA
 AATTTTCATCAATACATTTGCCCACTAAAATAAATTTAAATTCG
 GAGCCATGATGAAATCTGGAATGTTCCCTCACACTGTTTGTGAA
 CACAGTCATTAACATTGTAATCGCAAGCAGAGTGTTGAGAGA
 ACGGCTAACCGGATCACCATGTGCAGCATTTCATTGGAGATGA
 CAATATCGTGAAAGGAGTCAAATCGGACAAATTAATGGCAGA
 CAGGTGCGCCACCTGGTTGAATATGGAAGTCAAGATTATAGAT
 GCTGTGGTGGGCGAGAAAGCGCCTTATTTCTGTGGAGGGTTT
 ATTTTGTGTGACTCCGTGACCGGCACAGCGTGCCGTGTGGCA
 GACCCCTAAAAAGGCTGTTTAAGCTTGGCAAACCTCTGGCA
 GCAGACGATGAACATGATGATGACAGGAGAAGGGCATTGCAT
 GAAGAGTCAACACGCTGGAACCGAGTGGGTATTCTTTCAGAG
 CTGTGCAAGGCAGTAGAATCAAGGTATGAAACCGTAGGAACT
 TCCATCATAGTTATGGCCATGACTACTCTAGCTAGCAGTGTTAA
 ATCATTACAGCTACCTGAGAGGGGGCCCCTATAACTCTCTACGGC
 TAACCTGAATGGACTACGACATAGTCTAGTCCGCCAAGATGTT
 CCCGTTCCAGCCAATGTATCCGATGCAGCCAATGCCCTATCGC
 AACCCGTTTCGCGGCCCGCGCAGGCCCTGGTTCCCCAGAACC
 GACCCTTTTCTGGCGATGCAGGTGCAGGAATTAACCCGCTCG
 ATGGCTAACCTGACGTTCAAGCAACGCCGGGACGCGCCACCT
 GAGGGGCCATCCGCTAAGAAACCGAAGAAGGAGGCCTCGCA
 AAAACAGAAAGGGGGAGGCCAAGGGAAGAAGAAGAAGAAC
 CAAGGGAAGAAGAAGGCTAAGACAGGGCCGCCTAATCCGAA
 GGCACAGAATGGAAACAAGAAGAAGACCAACAAGAAACCA
 GGCAAGAGACAGCGCATGGTCATGAAATTGGAATCTGACAAG
 ACGTTCCCAATCATGTTGGAAGGGAAGATAAACGGCTACGCT
 TGTGTGGTCGGAGGGAAGTTATTCAGGCCGATGCATGTGGAA
 GGCAAGATCGACAACGACGTTCTGGCCGCGCTTAAGACGAA
 GAAAGCATCCAAATACGATCTTGAGTATGCAGATGTGCCACA
 GAACATGCGGGCCGATACATTCAAATACACCCATGAGAAACC
 CCAAGGCTATTACAGCTGGCATCATGGAGCAGTCCAATATGAA
 AATGGGCGTTTCACGGTGCCGAAAGGAGTTGGGGCCAAGGG
 AGACAGCGGACGACCCATTCTGGATAACCAGGGACGGGTGG
 TCGCTATTGTGCTGGGAGGTGTGAATGAAGGATCTAGGACAG
 CCCTTTCAGTCGTCATGTGGAACGAGAAGGGAGTTACCGTGA

[0417]

AGTATACTCCGGAGAACTGCGAGCAATGGTCACTAGTGACCA
CCATGTGTCTGCTCGCCAATGTGACGTTCCCATGTGCTCAACC
ACCAATTTGCTACGACAGAAAACCAGCAGAGACTTTGGCCAT
GCTCAGCGTTAACGTTGACAACCCGGGCTACGATGAGCTGCT
GGAAGCAGCTGTAAAGTGCCCCGGAAGGAAAAGGAGATCCA
CCGAGGAGCTGTTTAATGAGTATAAGCTAACGCGCCCTTACAT
GGCCAGATGCATCAGATGTGCAGTTGGGAGCTGCCATAGTCC
AATAGCAATCGAGGCAGTAAAGAGCGACGGGCACGACGGTTA
TGTTAGACTTCAGACTTCCTCGCAGTATGGCCTGGATTCCCTCC
GGCAACTTAAAGGGCAGGACCATGCGGTATGACATGCACGGG
ACCATTAAGAGATAACCACTACATCAAGTGTCACCTCTATACAT
CTCGCCCGTGTCACATTGTGGATGGGCACGGTTATTTCCCTGCT
TGCCAGGTGCCCGGCAGGGGACTCCATCACCATGGAATTTAA
GAAAGATTCCGTCAGACACTCCTGCTCGGTGCCGTATGAAGT
GAAATTTAATCCTGTAGGCAGAGAACTCTATACTCATCCCCA
GAACACGGAGTAGAGCAAGCGTGCCAAGTCTACGCACATGAT
GCACAGAACAGAGGAGCTTATGTTCGAGATGCACCTCCCGGGC
TCAGAAGTGGACAGCAGTTTGGTTTCCTTGAGCGGCAGTTCA
GTCACCGTGACACCTCCTGATGGGACTAGCGCCCTGGTGGAA
TGCGAGTGTGGCGGCACAAAGATCTCCGAGACCATCAACAA
GACAAAACAGTTCAGCCAGTGCACAAAGAAGGAGCAGTGCA
GAGCATATCGGCTGCAGAACGATAAGTGGGTGTATAATTCTGA
CAAACCTGCCCAAAGCAGCGGGAGCCACCTTAAAAGGAAAAC
TGCATGTCCCATTCTTGCTGGCAGACGGCAAATGCACCGTGC
CTCTAGCACCAGAACCTATGATAACCTTCGGTTTCAGATCAGT
GTCACTGAAACTGCACCCTAAGAATCCACATATCTAATCACC
CGCCAACTTGCTGATGAGCCTCACTACACGCACGAGCTCATAT
CTGAACCAGCTGTTAGGAATTTTACCGTCACCGAAAAAGGGT
GGGAGTTTGTATGGGGAAACCACCCGCCGAAAAGGTTTTGGG
CACAGGAAACAGCACCCGGAAATCCACATGGGCTACCGCAC
GAGGTGATAACTCATTATTACCACAGATACCCTATGTCCACCAT
CCTGGGTTTGTCAATTTGTGCCGCCATTGCAACCGTTTCCGTT
GCAGCGTCTACCTGGCTGTTTTGCAGATCTAGAGTTGCGTGCC
TAACTCCTTACCGGCTAACACCTAACGCTAGGATACCATTTTG
TCTGGCTGTGCTTTGCTGCGCCCGCACTGCCCGGGCCGAGAC
CACCTGGGAGTCCTTGGATCACCTATGGAACAATAACCAACA
GATGTTCTGGATTCAATTGCTGATCCCTCTGGCCGCCTTGATC
GTAGTGACTCGCCTGCTCAGGTGCGTGTGCTGTGTCGTGCCT
TTTTTAGTCATGGCCGGCGCCGCAGGCGCCGGCGCCTACGAG
CACGCGACCACGATGCCGAGCCAAGCGGGAATCTCGTATAAC
ACTATAGTCAACAGAGCAGGCTACGCACCACTCCCTATCAGC
ATAACACCAACAAAGATCAAGCTGATACCTACAGTGAACCTG
GAGTACGTCACCTGCCACTACAAAACAGGAATGGATTCACCA

[0418]

GCCATCAAATGCTGCGGATCTCAGGAATGCACTCCAACCTTAC
 AGGCCTGATGAACAGTGCAAAGTCTTCACAGGGGTTTACCCG
 TTCATGTGGGGTGGTGCATATTGCTTTTGCGACACTGAGAACA
 CCCAAGTCAGCAAGGCCTACGTAATGAAATCTGACGACTGCC
 TTGCGGATCATGCTGAAGCATATAAAGCGCACACAGCCTCAG
 TGCAGGCGTTCCTCAACATCACAGTGGGAGAACACTCTATTG
 TGACTIONCGTGTATGTGAATGGAGAAACTCCTGTGAATTTCAA
 TGGGGTCAAATAACTGCAGGTCCGCTTTCCACAGCTTGGAC
 ACCCTTTGATCGCAAATCGTGCAGTATGCCGGGGAGATCTAT
 AATTATGATTTTCTGAGTATGGGGCAGGACAACCAGGAGCAT
 TTGGAGATATACAATCCAGAACAGTCTCAAGCTCTGATCTGTA
 TGCCAATACCAACCTAGTGCTGCAGAGACCCAAAGCAGGAGC
 GATCCACGTGCCATACTCAGGCACCTTCGGGTTTTGAGCA
 ATGGAAGAAAGATAAAGCTCCATCATTGAAATTTACCGCCCCT
 TTCGGATGCGAAATATATACAAACCCCATTCGCGCCGAAAAC
 GTGCTGTAGGGTCAATTCCATTAGCCTTTGACATTCCCGACGC
 CTTGTTCCAGGGGTGTCAGAAACACCGACACTTTCAGCGGC
 CGAATGCACTCTTAACGAGTGCCTGTATTCTTCCGACTTTGGT
 GGGATCGCCACGGTCAAGTACTCGGCCAGCAAGTCAGGCAA
 GTGCGCAGTCCATGTGCCATCAGGGACTGCTACCCTAAAAGA
 AGCAGCAGTCGAGCTAACCGAGCAAGGGTTCGGCGACTATCCA
 TTTCTCGACCGCAAATATCCACCCGGAGTTCAGGCTCCAAATA
 TGCACATCATATGTTACGTGCAAAGGTGATTGTCACCCCCGA
 AAGACCATATTGTGACACACCCTCAGTATCACGCCAAACATT
 TACAGCCGCGGTGTCAAAAACCGCGTGGACGTGGTTAACATC
 CCTGCTGGGAGGATCAGCCGTAATTATTATAATTGGCTTGGTG
 CTGGCTACTATTGTGGCCATGTACGTGCTGACCAACCAGAAA
 CATAATTGAATACAGCAGCAATTGGCAAGCTGCTTACATAGAA
 CTCGCGGCGATTGGCATGCCGCCTTAAAATTTTATTTTATTTT
 TCTTTTCTTTTCCGAATCGGATTTTGTTTTTAATATTTT

VEEV 生产载体(SEQ ID NO:8); 具有核苷酸 7544-11175 缺失的
 VEEV 基因组, 加 5' T7-启动子, 加 3'限制性位点

TAATACGACTCACTATAGGATGggcggecatgagagaagcccagaccaattac
 ctacccaaaATGGagaaagttcacgttgacatcgaggaagacageccattcctcagagctttgca
 geggagcttccgcagtttgaggtagaagccaagcaggtcactgataatgacctgtaatgccaga
 gcgttttcgcatctggettcaaaaactgatcgaacggaggtggacctccgacacgatccttgacatt
 ggaagtgcgccccgcagaatgtattctaagcacaagtatcattgtatctgtccgatgagatgtgc
 ggaagatccggacagattgtataagtatgcaactaagctgaagaaaaactgtaaggaaataactgata
 aggaattggacaagaaaatgaaggagctcgccgccgcatgagcgacctgacctggaaactgag
 actatgtcctccacgacgacgagtcgtgctacgaagggcaagtcgctgtttaccaggatgtata
 cgcggttgacggaccgacaagtctctatcaccaagccaataagggaggttagagtcgcctactggata
 ggctttgacaccaccctttatgtttaagaacttgctggagcatatccatcatacttaccactgggc

[0419]

cgacgaaaccgtgtaaacggctcgtaacataggcctatgcagctctgacgttatggagcggtcacgta
gagggatgtccattcttagaaagaagtatttgaaccatccaacaatgttctattctctgttgctcacc
atctaccacgagaagaggactactgaggagctggcacctgccgtctgtatttcaacttacgtggcaa
gcaaaattacacatgtcgggtgagactatagttagttgcgacgggtacgtcgttaaaagaatagctat
cagtccaggcctgtatgggaagccttcaggctatgctgtacgatgcaccgcgagggattcttgtgct
gcaaagtgcagacacattgaacggggagagggtctctttccgtgtgcacgtatgtccagctac
attgtgtgacaaatgactggcactactggcaacagatgtcagtgcggacgacgcgcaaaaactgctg
gttgggctcaaccagcgtatagtcgtcaacggctgcaccagagaaacaccaatccatgaaaaatt
acctttgcccgtagtggcccaggcatttgcctaggtgggcaaaggaatataaggaagatcaagaaga
tgaaaggccactaggactacgagatagacagttagtcattgggggtgtgttgggcttttagaaggcaca
agataacatctattataagcggccgatacccaaacatcatcaaaagtgaacagcgatttccactcatt
cgtgctgccaggataggcagtaaacacattggagatcgggctgagaacaagaatcaggaaaatgtt
agaggagcacaaggagccgtcactctcattaccgccaggacgtacaagaagctaaagtgcgcag
ccgatgaggctaaggaggtgcgtgaagccgaggagttgcgcgcagctctaccaccttggcagctg
atgttgaggagcccactctggaagccgatgtcgaactgtttacaagaggctggggccggctcagt
ggagacacctcgtggcttgataaaggttaccagctacgtggcgaggacaagatcggctcttacgct
gtgctttcccgaggctgtactcaagagtgaaaaaattatcttgcacccacctcgtgaacaagtea
tagtgataacacactctggccgaaaagggcgttatgccgtggaaccataccatggtaaagtagtgg
gccagagggacatgcaatacccgccaggaacttcaagctctgagtgaagtgccaccattgtgtac
aacgaacgtgagttcgtaaacaggtacctgcaccatattgccacacatggaggagcgtgaacactg
atgaagaatattacaaaactgtcaagcccagcgcagcagcggcgaataacctgtacgacatcgaca
ggaaacagtgcgtcaagaaagaactagtcactgggctagggtcacagggagctggtggatcctc
cctccatgaattegcctacgagagtctgagaacacgaccagccgctccttaccagtaaccaaccata
gggggtgtatggcgtgccaggatcaggcaagtctggcatcattaaaagcgcagtcaccaaaaaagat
ctagtgtgagcgccaagaaagaaaactgtgcagaaattataagggacgtcaagaaaatgaaaggg
ctggacgtcaatgccagaactgtggactcagtctcttgaatggatgcaaacaccccgtagagacc
tgtatattgacgaagctttgtctgtcatgcaggtactctcagagcgtcatagccattataagacctaaa
aaggcagtgctctcggggatcccaaacagtgccggttttttaacatgatgtcctgaaagtgcatttta
accacgagattgcacacaagtctccacaaaagcatctctcgccttgcactaaatctgtgacttcggt
cgtctcaacctgtttacgacaaaaaaatgagaacgacgaatccgaaagagactaagattgtgattga
cactaccggcagttaccaaacctaagcaggacgatctcattctcactgtttcagaggggtgggtgaagc
agttgcaaatagattacaaaggcaacgaaataatgacggcagctgcctctcaagggctgacctgtaa
aggtgtgtatgccgttcggtacaaggtgaatgaaatectctgtacgccaccacctcagaacatgtga
acgtcctactgacctgcagggagaccgcatcgtgtggaaaactagccggcgacctatggata
aaaactgactgccaagtacctgggaatttactgccacgatagaggagtggcaagcagagcat
gatgccatcatgaggcacatcttggagagaccggacctaccgacgtcttcagaataaggcaaac
gtgtgtggccaaggttagtgcgggtgctgaagaccgctggcatagacatgacctgaacaat
ggaactgtggatttttgaacggacaaagctcactcagcagagatagtattgaaccaactatgc
gtgaggtcttggactcgtctggactccggtctattttctgcacctgttcggtatccattaggaat
aatcactgggataactccccgtcgcctaactgtacgggctgaataaagaagtggtccgctcagctctc
tcgcaggtaccacaactgcctcgggcagttgccactggaagagtctatgacatgaacactggtaca
ctgcgaattatgatccgcgataaacctagctacgtgaaacagaagactgcctcatgcttttagctctc
accataatgaacaccacagagtgacttttcttctcgtcagcaaatgaagggcagaactgtcctgg

[0420]

tggtcggggaaaagtgtccgtcccaggcaaaatggttgactggtgtcagaccggcctgaggetac
 cttcagagctcggctggatttaggcaccccaggatgatgtgccaaatatgacataatatttgtaatgtg
 aggacccatataaataccatcactatcagcagtgtaagaccatgccattaagcttagcatgttgacc
 aagaaagcttgtctgcatctgaatcccggcggaacctgtgtcagcataggttatggttacgtgacag
 ggccagcgaagcatcattggtgctatagcgcggcagttcaagtttcccgggtatgcaaaccgaaat
 cctcactgaagagacggaagttctgtttgtattcattgggtacgatcgcaaggcccgtacgcacaatc
 cttacaagctttcatcaaccttgaccaacatttatacaggttccagactccacgaagccggatgtgcac
 cctcatatcatgtggtgaggggatattgccacggccaccgaaggagtattataatgtctgtaac
 agcaaaggacaacctggcgggaggggtgtgaggagcgtgtataagaaattcccggaaagcttcgat
 ttacagccgatcgaagtaggaaaagcgcgactggcacaaggtgcagctaaacatattcatgccg
 taggaccaaactcaacaaagtctggagggtgaaggtgacaaacagttggcagaggcttatgagtc
 atcgtaagattgtcaacgataacaattacaagtcagtagcattccactgttgcaccggcactcttcc
 cgggaacaaagatcgaactaaccaatcattgaaccattgtgacagctttagacaccactgatgcag
 atgtagccatatactgcagggacaagaaatgggaaatgactctcaagggaagcagtggttaggagag
 aagcagtgaggagatagcatatccgacgactctcagtgacagaacctgatgcagagctggtgag
 ggtgcatccgaagagttcttggctggaaggaagggtacagcacaagcagtgccaaaactttctca
 tatttggaaaggaccaagttcaccaggcggccaaggatatagcagaaattaatgccatgtggcccgt
 tgcaacggaggccaatgagcaggtatgcatgtatatctcggagaaagcatgagcagtttaggtcg
 aaatgccccgtcgaagagtcggaagcctccacaccactagcacgctgccttgcctgtgcatccatg
 ccatgactccagaaagagtacagcgcctaaaagcctcacgtccagaacaaataactgtgtgctcacc
 ttccattgccgaagtatagaatcactggtgtgcagaagatccaatgctcccagcctatattgttctcacc
 gaaagtgcctgcgtatattcatccaaggaagtatctcgtggaacaccaccggtagacgagactccg
 gagccatcggcagagaaccaatccacagaggggacacctgaacaaccaccacttataaccgagga
 tgagaccaggactagaacgctgagccgatcatcatcgaagaggaagaagaggatagcataagttt
 gctgtcagatggcccgaccaccagggtgctgcaagtcgaggcagacattcacgggccgacctctgt
 atctagctcactcctggtccattcctcatgcatccgactttgatgtggacagttatccatacttgacacct
 ggaggagctagcgtgaccagcggggcaacgtcagccgagactaactcttacttcgcaaagagtat
 ggagttctggcgcgaccgggtgctgcctcgaacagtattcaggaacctccacatcccgtccg
 cgcacaagaacaccgtcactgcaccagcagggcctgctcagaaaccagcctagtttccaccccg
 ccaggcgtgaatagggatcactagagaggagctcagggcgttaccctgcacgactcctagc
 aggtcggctcgcagaaccagcctggtctcaaccgccaggcgtaaataggggtgattacaagagag
 gagtttagggcgttcgtagcacaacaacaatgacggttgatgcgggtgcatacatctttcctccgac
 accggtcaagggcatttacaacaaaaatcagtaaggcaaacgggtgctatccgaagtgggtgtggaga
 ggaccgaattggagatttcgtatgccccgcgctcgaacaaagaaagaataactacgcaaga
 aattacagttaaatcccacacctgtaacagaagcagataaccagtccaggaaggtggagaacatgaa
 agccataacagctagacgtattctgcaaggcctagggcattattgaaaggcagaaggaaaagtggag
 tgcaccgaacctgcatctgttctttgtattcatctagtgtgaaccgtgcctttcaagccccagggt
 cgcagtggaagcctgtaacgccatgttgaagagaacttccgactgtggcttcttactgtattattca
 ggtacgatgcctatttgacatgggtgacggagcttcatgctgcttagacactgccagttttgcctg
 caaagctgcgcagcttccaaagaacactcctatttggaaaccacaatacagatcggcagtgccctca
 gcgatccagaacacgctccagaacgtcctggcagctgccacaaaagaaattgcaatgtcacgcaa
 atgagagaattgcccgtattggattcggcggcctttaatgtggaatgctcaagaaatatgctgtaata
 atgaatattgggaaacgtttaaagaaaacccatcaggccttactgaagaaaacgtggtaattacatta

[0421]

```

ccaaattaaaaggacccaaaagctgctgctcttttgcgaagacacataattgaatatgttgaggacat
accaatggacaggtttgtaatggactaaagagagacgtgaaagtgactccaggaacaaaacatact
gaagaacggcccaagggtacaggtgatccaggctgccgatccgctagcaacagcgtatctgtgcgg
aatccaccgagagctggttaggagattaatgcggctctgcttccgaacattcatacactgtttgatatg
tcggctgaagactttgacgctattatagccgagcacttccagcctggggattgtgttctggaactgac
atcgctctgtttgataaaagtgaggacgacgccatggctctgaccgcttaatgattctggaagactta
ggtgtggacgcagagctgtgacgctgattgaggcggcttccggcgaatttcatcaatacatttccc
actaaaactaaatttaattcggagccatgatgaaatctggaatgttctcacactgtttgtgaacacagt
cattaacattgtaatcgaagcagagtgtgagagaacggctaaccggatcacatgtgcagcattca
ttggagatgacaatategtgaaaggagtcaaatcggacaaattaatggcagacaggtgcgccacctg
gttgaatatggaagtcaagattatagatgctgtgtgtggcgagaaagcgccttattctgtggagggtt
atlttggtgactccgtgaccggcacagcgtgccgtgtggcagaccccctaaaaggctgtttaagctt
ggcaaacctctggcagcagacgatgaacatgatgatgacaggagaagggcattgcatgaagagtc
aacacgctggaaccgagtggtattcttccagagctgtgcaaggcagtagaatcaaggtatgaaacc
gtaggaacttccatcatagttatggccatgactactctagctagcagtgtaaatcattcagctacctga
gaggggcccctataactctctacggcTAActgtaaggactacgacgtatcacgcccacattta
cagccgcggtgtcaaaaaccgctggacgtggttaacatccctgctgggaggatcagccgtaattat
tataattggcttggctgctgactattgtggccatgtagctgctgaccaaccagaacataattgaata
cagcagcaattggcaagctgcttacatagaactcgcggcgattggcatgccgccttaaaattttatltt
atltttcttttctttccgaatcggattttgttttaatatlttAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

TC-83 生产载体(SEQ ID NO:9); 具有核苷酸 7544-11175 缺失的 TC-83 基因组, 加 5' T7-启动子, 加 3'限制性位点

```

ATAGGCGGCGCATGAGAGAAGCCCAGACCAATTACCTACCCA
AAATGGAGAAAGTTCACGTTGACATCGAGGAAGACAGCCCAT
TCCTCAGAGCTTTGCAGCGGAGCTTCCCGCAGTTTGAGGTAG
AAGCCAAGCAGGTCACTGATAATGACCATGCTAATGCCAGAG
CGTTTTTCGCATCTGGCTTCAAACACTGATCGAAACGGAGGTGG
ACCCATCCGACACGATCCTTGACATTGGAAGTGCGCCCGCCC
GCAGAATGTATTCTAAGCACAAGTATCATTGTATCTGTCCGATG
AGATGTGCGGAAGATCCGGACAGATTGTATAAGTATGCAACTA
AGCTGAAGAAAACTGTAAGGAAATAACTGATAAGGAATTGG
ACAAGAAAATGAAGGAGCTCGCCGCCGTCATGAGCGACCCT
GACCTGGAAACTGAGACTATGTGCCTCCACGACGACGAGTCG
TGTCGCTACGAAGGGCAAGTCGCTGTTTACCAGGATGTATACG
CGTTTGACGGACCGACAAGTCTCTATACCAAGCCAATAAGG
GAGTTAGAGTCGCCTACTGGATAGGCTTTGACACCACCCTTT
TATGTTTAAGAACTTGGCTGGAGCATATCCATCACTCTACCA
ACTGGGCCGACGAAACCGTGTTAACGGCTCGTAACATAGGCC
TATGCAGCTCTGACGTTATGGAGCGGTCACGTAGAGGGATGT
CCATTCTTAGAAAGAAGTATTTGAAACCATCCAACAATGTTCT

```

[0422]

ATTCTCTGTTGGCTCGACCATCTACCACGAGAAGAGGGACTT
 ACTGAGGAGCTGGCACCTGCCGTCTGTATTTCACTTACGTGGC
 AAGCAAATTACACATGTCGGTGTGAGACTATAGTTAGTTGCG
 ACGGGTACGTCGTTAAAAGAATAGCTATCAGTCCAGGCCTGTA
 TGGGAAGCCTTCAGGCTATGCTGCTACGATGCACCGCGAGGG
 ATTCTTGTGCTGCAAAGTGACAGACACATTGAACGGGGAGAG
 GGTCTCTTTTCCCGTGTGCACGTATGTGCCAGCTACATTGTGT
 GACCAAATGACTGGCATACTGGCAACAGATGTCAGTGCGGAC
 GACGCGCAAAAAGTGTGGTTGGGCTCAACCAGCGTATAGTC
 GTCAACGGTCGCACCCAGAGAAACACCAATACCATGAAAAAT
 TACCTTTTGGCCGTAGTGGCCCAGGCATTTGCTAGGTGGGCAA
 AGGAATATAAGGAAGATCAAGAAGATGAAAGGCCACTAGGA
 CTACGAGATAGACAGTTAGTCATGGGGTGTGTTGGGCTTTTA
 GAAGGCACAAGATAACATCTATTTATAAGCGCCCGGATACCCA
 AACCATCATCAAAGTGAACAGCGATTTCCACTCATTTCGTGCTG
 CCCAGGATAGGCAGTAACACATTGGAGATCGGGCTGAGAACA
 AGAATCAGGAAAATGTTAGAGGAGCACAAGGAGCCGTCACC
 TCTCATTACCGCCGAGGACGTACAAGAAGCTAAGTGCGCAGC
 CGATGAGGCTAAGGAGGTGCGTGAAGCCGAGGAGTTGCGCG
 CAGCTCTACCACCTTTGGCAGCTGATGTTGAGGAGCCCACTC
 TGAAGCCGATGTCGACTTGATGTTACAAGAGGCTGGGGCCG
 GCTCAGTGGAGACACCTCGTGGCTTGATAAAGGTTACCAGCT
 ACGATGGCGAGGACAAGATCGGCTCTTACGCTGTGCTTTCTC
 CGCAGGCTGTAICTAAGAGTGAAAAATTATCTTGCATCCACCC
 TCTCGCTGAACAAGTCATAGTGATAACACACTCTGGCCGAAA
 AGGGCGTTATGCCGTGGAACCATAACCATGGTAAAGTAGTGGT
 GCCAGAGGGACATGCAATACCCGTCCAGGACTTTCAAGCTCT
 GAGTGAAAGTGCCACCATTGTGTACAACGAACGTGAGTTTCGT
 AACAGGTACCTGCACCATATTGCCACACATGGAGGAGCGCT
 GAACACTGATGAAGAATATTACAAAAGTGTCAAGCCCAGCGA
 GCACGACGGCGAATACCTGTACGACATCGACAGGAAACAGTG
 CGTCAAGAAAGAACTAGTCACTGGGCTAGGGCTCACAGGCG
 AGCTGGTGGATCCTCCCTTCCATGAATTGCCTACGAGAGTCT
 GAGAACACGACCAGCCGCTCCTTACCAAGTACCAACCATAGG
 GGTGTATGGCGTGCCAGGATCAGGCAAGTCTGGCATCATTA
 AAGCGCAGTCACCAAAAAAGATCTAGTGGTGAGCGCCAAGA
 AAGAAAAGTGTGCAGAAATTATAAGGGACGTCAAGAAAATG
 AAAGGGCTGGACGTCAATGCCAGAAGTGTGGACTCAGTGCTC
 TTGAATGGATGCAAACACCCCGTAGAGACCCTGTATATTGACG
 AAGCTTTTGTTCATGCAGGTAICTCTCAGAGCGCTCATAGC
 CATTATAAGACCTAAAAGGCAGTGCTCTGCGGGGATCCCAA
 ACAGTGCGGTTTTTTTAAACATGATGTGCCTGAAAGTGCATTTT
 AACCACGAGATTTGCACACAAGTCTTCCACAAAAGCATCTCT

[0423]

CGCCGTTGCACTAAATCTGTGACTTCGGTTCGTCTCAACCTTGT
TTTACGACAAAAAATGAGAACGACGAATCCGAAAGAGACT
AAGATTGTGATTGACACTACCGGCAGTACCAAACCTAAGCAG
GACGATCTCATTCTCACTTGTTTCAGAGGGTGGGTGAAGCAG
TTGCAAATAGATTACAAAGGCAACGAAATAATGACGGCAGCT
GCCTCTCAAGGGCTGACCCGTAAAGGTGTGTATGCCGTTCCGG
TACAAGGTGAATGAAAATCCTCTGTACGCACCCACCTCAGAA
CATGTGAACGTCCTACTGACCCGCACGGAGGACCGCATCGTG
TGGAAAACACTAGCCGGCGACCCATGGATAAAAACACTGACT
GCCAAGTACCCTGGGAATTTCACTGCCACGATAGAGGAGTGG
CAAGCAGAGCATGATGCCATCATGAGGCACATCTTGGAGAGA
CCGGACCCTACCGACGTCTTCCAGAATAAGGCAAACGTGTGT
TGGGCCAAGGCTTTAGTGCCGGTGCTGAAGACCGCTGGCATA
GACATGACCACTGAACAATGGAACACTGTGGATTATTTTGA
ACGGACAAAGCTCACTCAGCAGAGATAGTATTGAACCAACTA
TGCGTGAGGTTCTTTGGACTCGATCTGGACTCCGGTCTATTTT
CTGCACCCACTGTTCCGTTATCCATTAGGAATAATCACTGGGAT
AACTCCCCGTCGCCTAACATGTACGGGCTGAATAAAGAAGTG
GTCCGTCAGCTCTCTCGCAGGTACCCACAACCTGCCTCGGGCA
GTTGCCACTGGAAGAGTCTATGACATGAACACTGGTACACTG
CGCAATTATGATCCGCGCATAAACCTAGTACCTGTAAACAGAA
GACTGCCTCATGCTTTAGTCTCCACCATAATGAACACCCACA
GAGTGACTTTTCTTCATTCGTCAGCAAATTGAAGGGCAGAAC
TGTCCTGGTGGTCGGGGAAAAGTTGTCCGTCCCAGGCAAAT
GGTTGACTGGTTGTCAGACCGGCCTGAGGCTACCTTCAGAGC
TCGGCTGGATTTAGGCATCCCAGGTGATGTGCCCAAATATGAC
ATAATATTTGTTAATGTGAGGACCCCATATAAATACCATCACTA
TCAGCAGTGTGAAGACCATGCCATTAAGCTTAGCATGTTGACC
AAGAAAGCTTGTCTGCATCTGAATCCCGGCAGAACCTGTGTC
AGCATAGGTTATGGTTACGCTGACAGGGCCAGCGAAAGCATC
ATTGGTGCTATAGCGCGGCAGTTCAAGTTTTCCCGGGTATGCA
AACCGAAATCCTCACTTGAAGAGACGGAAGTTCTGTTTGTAT
TCATTGGGTACGATCGCAAGGCCCGTACGCACAATCCTTACAA
GCTTTCATCAACCTTGACCAACATTTATAACAGGTTCCAGACTC
CACGAAGCCGGATGTGCACCCTCATATCATGTGGTGCAGGG
GATATTGCCACGGCCACCGAAGGAGTGATTATAAATGCTGCTA
ACAGCAAAGGACAACCTGGCGGAGGGGTGTGCGGAGCGCTG
TATAAGAAATTCCCGGAAAGCTTCGATTTACAGCCGATCGAAG
TAGGAAAAGCGCGACTGGTCAAAGGTGCAGCTAAACATATCA
TTCATGCCGTAGGACCAAACCTTCAACAAAGTTTCCGGAGGTTG
AAGGTGACAAACAGTTGGCAGAGGCTTATGAGTCCATCGCTA
AGATTGTCAACGATAACAATTACAAGTCAGTAGCGATTCCACT
GTTGTCCACCGGCATCTTTTCCGGGAACAAAGATCGACTAAC

[0424]

CCAATCATTGAACCATTTGCTGACAGCTTTAGACACCACTGAT
GCAGATGTAGCCATATACTGCAGGGACAAGAAATGGGAAATG
ACTCTCAAGGAAGCAGTGGCTAGGAGAGAAGCAGTGGAGGA
GATATGCATATCCGACGACTCTTCAGTGACAGAACCTGATGCA
GAGCTGGTGAGGGTGCATCCGAAGAGTTCTTTGGCTGGAAGG
AAGGGCTACAGCACAAGCGATGGCAAACTTTCTCATATTTG
GAAGGGACCAAGTTTCACCAGGCGGCCAAGGATATAGCAGA
AATTAATGCCATGTGGCCCGTTGCAACGGAGGCCAATGAGCA
GGTATGCATGTATATCCTCGGAGAAAGCATGAGCAGTATTAGG
TCGAAATGCCCCGTCGAAGAGTCGGAAGCCTCCACACCACCT
AGCACGCTGCCTTGCTTGTGCATCCATGCCATGACTCCAGAA
AGAGTACAGCGCCTAAAAGCCTCACGTCCAGAACAAATTACT
GTGTGCTCATCCTTTCCATTGCCGAAGTATAGAATCACTGGTG
TGCAGAAGATCCAATGCTCCCAGCCTATATTGTTCTCACCGAA
AGTGCCTGCGTATATTCATCCAAGGAAGTATCTCGTGGAAACA
CCACCGGTAGACGAGACTCCGGAGCCATCGGCAGAGAACCA
ATCCACAGAGGGGACACCTGAACAACCACCACTTATAACCGA
GGATGAGACCAGGACTAGAACGCCTGAGCCGATCATCATCGA
AGAGGAAGAAGAGGATAGCATAAGTTTGCTGTCAGATGGCCC
GACCCACCAGGTGCTGCAAGTCGAGGCAGACATTCACGGGC
CGCCCTCTGTATCTAGCTCATCCTGGTCCATTCTCATGCATCC
GACTTTGATGTGGACAGTTTATCCATACTTGACACCCTGGAGG
GAGCTAGCGTGACCAGCGGGGCAACGTCAGCCGAGACTAAC
TCTTACTTCGCAAAGAGTATGGAGTTTCTGGCGCGACCGGTG
CCTGCGCCTCGAACAGTATTCAGGAACCCTCCACATCCCGCT
CCGCGCACAAGAACACCGTCACTTGCACCCAGCAGGGCCTG
CTCGAGAACCAGCCTAGTTTCCACCCCGCCAGGCGTGAATAG
GGTGATCACTAGAGAGGAGCTCGAGGCGCTTACCCCGTCACG
CACTCCTAGCAGGTCCGGTCTCGAGAACCAGCCTGGTCTCCAA
CCCGCCAGGCGTAAATAGGGTGATTACAAGAGAGGAGTTTGA
GGCGTTTCGTAGCACAACAACAATGACGGTTTGATGCGGGTGC
ATACATCTTTTCCCTCCGACACCGGTCAAGGGCATTTACAACAA
AAATCAGTAAGGCAAACGGTGCTATCCGAAGTGGTGTGGAG
AGGACCGAATTGGAGATTTTCGTATGCCCCGCGCCTCGACCAA
GAAAAAGAAGAATTACTACGCAAGAAATTACAGTTAAATCCC
ACACCTGCTAACAGAAGCAGATAACAGTCCAGGAAGGTGGA
GAACATGAAAGCCATAACAGCTAGACGTATTCTGCAAGGCCT
AGGGCATTATTTGAAGGCAGAAGGAAAAGTGGAGTGCTACCG
AACCTGCATCCTGTTCTTTGTATTCATCTAGTGTGAACCGT
GCCTTTTCAAGCCCCAAGGTCGCAGTGGAAGCCTGTAACGCC
ATGTTGAAAGAGAATTTCGACTGTGGCTTCTTACTGTATTA
TTCCAGAGTACGATGCCTATTTGGACATGGTTGACGGAGCTTC
ATGCTGCTTAGACACTGCCAGTTTTTGGCCTGCAAAGCTGCG

[0425]

CAGCTTTCCAAAGAAACACTCCTATTTGGAACCCACAATACG
 ATCGGCAGTGCCTTCAGCGATCCAGAACACGCTCCAGAACGT
 CCTGGCAGCTGCCACAAAAGAAATTGCAATGTCACGCAAAT
 GAGAGAATTGCCCGTATTGGATTCGGCGGCCTTTAATGTGGAA
 TGCTTCAAGAAATATGCGTGTAATAATGAATATTGGGAAACGT
 TAAAGAAAACCCCATCAGGCTTACTGAAGAAAACGTGGTAA
 ATTACATTACCAAATTAAGGACCAAAGCTGCTGCTCTTTT
 TGCGAAGACACATAATTTGAATATGTTGCAGGACATACCAATG
 GACAGGTTTGTAAATGGACTTAAAGAGAGACGTGAAAGTGACT
 CCAGGAACAAAACATACTGAAGAACGGCCCAAGGTACAGGT
 GATCCAGGCTGCCGATCCGCTAGCAACAGCGTATCTGTGCGG
 AATCCACCGAGAGCTGGTTAGGAGATTAAATGCGGTCCTGCT
 TCCGAACATTCATACACTGTTTGATATGTCGGCTGAAGACTTT
 GACGCTATTATAGCCGAGCACTTCCAGCCTGGGGATTGTGTTT
 TGGAAACTGACATCGCGTCGTTTGATAAAAGTGAGGACGACG
 CCATGGCTCTGACCGCGTTAATGATTCTGGAAGACTTAGGTGT
 GGACGCAGAGCTGTTGACGCTGATTGAGGCGGCTTTCGGCGA
 AATTTTCATCAATACATTTGCCCACTAAACTAAATTTAAATTCG
 GAGCCATGATGAAATCTGGAATGTTCCCTCACACTGTTTGTGAA
 CACAGTCATTAACATTGTAATCGCAAGCAGAGTGTTGAGAGA
 ACGGCTAACCGGATCACCATGTGCAGCATTTCATTGGAGATGA
 CAATATCGTGAAAGGAGTCAAATCGGACAAATTAATGGCAGA
 CAGGTGCGCCACCTGGTTGAATATGGAAGTCAAGATTATAGAT
 GCTGTGGTGGGCGAGAAAGCGCCTTATTTCTGTGGAGGGTTT
 ATTTTGTGTGACTCCGTGACCGGCACAGCGTGCCGTGTGGCA
 GACCCCTAAAAAGGCTGTTTAAGCTTGGCAAACCTCTGGCA
 GCAGACGATGAACATGATGATGACAGGAGAAGGGCATTGCAT
 GAAGAGTCAACACGCTGGAACCGAGTGGGTATTCTTTCAGAG
 CTGTGCAAGGCAGTAGAATCAAGGTATGAAACCGTAGGAACT
 TCCATCATAGTTATGGCCATGACTACTCTAGCTAGCAGTGTTAA
 ATCATTACAGCTACCTGAGAGGGGCCCCTATAACTCTCTACGGC
 TAACCTGAATGGACTACGACGTATCACGCCCAAACATTTACAG
 CCGCGGTGTCAAAAACCGCGTGGACGTGGTTAACATCCCTGC
 TGGGAGGATCAGCCGTAATTATTATAATTGGCTTGGTGCTGGC
 TACTATTGTGGCCATGTACGTGCTGACCAACCAGAAACATAAT
 TGAATACAGCAGCAATTGGCAAGCTGCTTACATAGAACTCGC
 GGCGATTGGCATGCCGCCTTAAATTTTTTATTTTATTTTCTTTT
 CTTTTCCGAATCGGATTTTGTTTTAAATTTTCAAAAAAAAAA
 AA
 AA

VEE-UbAAY (SEQ ID NO:14); 具有 MHC I 类小鼠肿瘤表位 SIINFEKL 和 AH1-A5 插入的 VEEV 递送载体

[0426]

VEE-荧光素酶(SEQ ID NO:15); 具有插入在 7545 处的荧光素酶基因的 VEEV 递送载体
泛素(SEQ ID NO:38)>UbG76 0-228
泛素 A76 (SEQ ID NO:39)>UbA76 0-228
HLA-A2 (MHC I 类)信号肽(SEQ ID NO:40)>MHC 信号肽 0-78
HLA-A2 (MHC I 类)跨膜结构域(SEQ ID NO:41)>HLA A2 TM 结构域 0-201
IgK 前导序列(SEQ ID NO:42)>IgK 前导序列 0-60
人类 DC-Lamp (SEQ ID NO:43)>人类 DCLAMP 0-3178
小鼠 LAMP1 (SEQ ID NO:44)>小鼠 Lamp1 0-1858
人类 Lamp1 cDNA (SEQ ID NO:45)>人类 Lamp1 0-2339
破伤风类毒素核酸序列(SEQ ID NO:46)
破伤风类毒素氨基酸序列(SEQ ID NO:47)
PADRE 核苷酸序列(SEQ ID NO:48)
PADRE 氨基酸序列(SEQ ID NO:49)
WPRE (SEQ ID NO:50)>WPRE 0-593
IRES (SEQ ID NO:51)>eGFP_IRES_SEAP_插入 1746-2335
GFP (SEQ ID NO:52)
SEAP (SEQ ID NO:53)
萤火虫荧光素酶(SEQ ID NO:54)
FMDV 2A (SEQ ID NO:55)
GPGPG 接头(SEQ ID NO:56)
SAM 体外转录模板 DNA (SEQ ID NO:57); 具有核苷酸 7544-11175 缺失的 VEEV 基因组, 加最小 5' T7-启动子(粗斜体)
<i>TAATACGACTCACTATAATGggcggcgcgatgagagaagcccagaccaattacctac</i> <i>ccaaaATGGagaaagttcacggtgacatcgaggaagacagcccattcctcagagctttgcagcgg</i> <i>agcttcccgcagtttgaggtagaagccaagcaggtcactgataatgacctgctaagccagagcgtt</i> <i>ttcgcatctggctcaaaactgatcgaaacggaggtggaccatccgacacgatccttgacattggaa</i> <i>gtgcgccccgcgcagaatgtattctaagcacaagtatcattgtatctgtccgatgagatgtgcggaa</i> <i>gatccggacagattgtataagtatgcaactaagctgaagaaaaactgtaaggaaataactgataagga</i> <i>attggacaagaaaatgaaggagctcgcgcgctcatgagcgaccctgacctggaaactgagactat</i> <i>gtgctccacgacgacgagtcgtgctcagaaagggcaagtcgctgtttaccaggatgtatacgcg</i> <i>gttgacggaccgacaagtcctatcaccagccaataagggagttagagtcgcctactggataggctt</i> <i>tgacaccaccctttatgtttaagaacttggtgagcatatccatcactctaccaactgggcccgcac</i> <i>gaaaccgtgtaacggctcgtaacataggcctatgcagctctgacgttatggagcggctacgtagag</i> <i>ggatgtccattctagaagaagatattgaaaccatccaacaatgtctattctctgttgctcgacctct</i> <i>accacgagaagagggacttactgaggagctggcacctgccgtctgtatttacttacgtggcaagca</i> <i>aaattacacatgctcgtgtgagactatagttagttgcgacgggtacgtcgttaaaagaatagctatcag</i> <i>ccaggcctgtatgggaagccttcaggctatgctgctacgatgcaccgcgagggtattctgtgctgcaa</i> <i>agtgacagacacattgaacggggagagggtctctttcccgtgtgcacgtatgtccagctacattgt</i>

[0427]

```

gtgaccaaataactggcactggaacagatgtcagtgccgacgacgcgcaaaaactgctggtg
ggctcaaccagcgtatagtcgtcaacggctgcacccagagaaacaccaatacatgaaaattacct
ttgcccgtagtgcccaggcatttgctagtgggcaaaaggaatataaggaagatcaagaagatgaa
aggccactaggactacgagatagacagttagtcaggggtgtgtgggcttttagaaggcacaagat
aacatctattataagcgcccggatacccaaacatcatcaaagtgaacagcgaattccactcattcgt
gctgccaggataggcagtaaacacattggagatcgggctgagaacaagaatcaggaaaatgtaga
ggagcacaaggagccgtcacctctcattaccgccgaggacgtacaagaagctaatgctgcgcagccg
atgaggctaaggaggtgctgaagccgaggagttgcgcgcagctctaccacctttggcagctgatgt
tgaggagcccactctggaagccgatgtcgaactgatgttacaagaggctggggccggctcagtgga
gacacctgctggcttgataaaggtaccagctacgctggcgaggacaagatcgctcttacgctgtg
ctttctccgcaggctgtactcaagagtgaaaaattatcttgcaccacctctcgtgaacaagtcatag
tgataacacactctggccgaaaaggcgcttatgccgtggaaccataccatggtaaagtagtggtgcc
agagggacatgcaatacccgctccaggacttcaagctctgagtgaagtgccaccattgtgtacaac
gaacgtgagttcgtaaacaggtacctgcaccatattgccacacatggaggagcgcgtgaacactgatg
aagaatattacaaaactgtcaagcccagcgcagcagcggcgaataacctgtacgacatcgacagga
aacagtgcgtcaagaaagaactagtcactgggctagggtcacaggcgagctgggtggatcctccctt
ccatgaattcgcctacgagagctctgagaacacgaccagccgctccttaccagtagccaacataggg
gtgtatggcgtgccaggatcaggcaagcttgccatcattaaaagcgcagtcaccaaaaaagatctag
tggtgagcgcgaagaaagaaaactgtgcagaaattataaggacgtcaagaaaatgaaagggtg
gacgtcaatgccagaactgtggactcagtgctcttgatggatgcaaacaccccgtagagaccctgt
atattgacgaagcttttctgtcatgcaggtactctcagagcgcctcatagccattataagacctaataaa
ggcagtgctctcggggatcccaaacagtgccggttttttaacatgatgtgctgaaagtgcattttaac
cacgagattgcacacaagtctccacaaaagcatctctcggcgttgcactaaatctgtgactcggctc
gtctcaacctgttttacgacaaaaaaatgagaacgacgaatccgaaagagactaagattgtgattgac
actaccggcagtagcaaacctaagcaggacgatctcattctcactgtttcagaggggtgggtgaaagca
gttgcaaatagattacaaaggcaacgaaataatgacggcagctgcctctcaagggctgaccgtaaa
gggtgtatgccgttcggtacaaggtgaatgaaaatcctctgtacgcaccacctcagaacatgtgaa
cgtctactgaccgcacggaggaccgcatcgtgtggaacactagccggcgaccatggataa
aaacactgactccaagtacctgggaattcactgccacgatagaggagtggcaagcagagcatg
atgccatcatgaggcacatcttgagagaccggaccctaccgacgtcttcagaataaggcaaacgt
gtgtgggccaaggcttttagtgccggtgctgaagaccgctggcatagacatgaccactgaacaatgg
aacactgtgattatgtgaaacggacaaagctcactcagcagagatagtattgaaccaactatgcgtg
aggttctttgactcagctggactcgggtctatcttctgcaccactgttccgttatccattaggaataat
cactgggataactccccgtgcctaacaatgtacgggctgaataaagaagtgggtccgctcagctctctc
caggtaccacaactgcctcgggcagttgccactggaagagtctatgacatgaacactggtagactg
cgcaattatgatccgcgcataaacctagtagctgtaaacagaagactgcctcatgctttagctccac
cataatgaacaccacagagtgactttcttctcgtcagcaaatgaagggcagaactgtcctgggtg
gtcggggaaaagtgtccgtcccaggcaaaatggtgactggtgtcagaccggcctgaggctacctt
cagagctcggctggatttaggcatccagggtgatgtgccaaatgatgacataatattgttaatgtgag
gacccatataaataccatcactatcagcagtgtaagaccatgccattaagcttagcatgttgaccaa
gaaagctgtctgcatctgaatccggcggaacctgtgtcagcataggttatggttacgctgacaggg
ccagcgaagcatcattggtgctatagcgcggcagttcaagtttcccgggtatgcaaacgaaatcc
tacttgaagagacggaagttctgtttgtattcattgggtacgatcgaaggcccgtacgcacaatcctt

```

[0428]

```

acaagctttcatcaaccttgaccaacatttatacaggttccagactccacgaagccggatgtgcacct
catatcatgtggtgaggggatattgccacggccaccgaaggagtattataaatgctgctaacag
caaaggacaacctggcggagggtgtgaggagcgtgtataagaaattcccggaaagcttcgattt
acagccgatcgaagtaggaaaagcgcgactggtcaaaggtgcagctaaacatatcattcatgccgta
ggacaaactcaacaaagtctcgagggtgaaggtgacaaacagttggcagaggcttatgagtcacat
cgctaagattgtcaacgataacaattacaagtcagtagcattccactgtgtccaccggcattttcc
gggaacaaagatcgactaaccaatcattgaaccatttgcagagcttttagacaccactgatgcaga
ttagccatatactgcagggacaagaaatgggaaatgactctcaaggagcagtggttaggagaga
agcagtgaggagatagcatatccgacgactctcagtgacagaacctgatgcagagctggtgag
gggtcatccgaagagttcttggctggaaggaagggtacagcacaagcagtgccaaaactttctca
tatttgaaggaccaggttaccaggcggccaaggatatagcagaaattaatgccatgtggcccgt
tgcaacggaggccaatgagcaggtatgcatgtatatcctcggagaaagcagtagcagtaggctg
aaatgccccgtcgaagagtcggaagcctccacaccactagcacgctgccttgccttgcctcatg
ccatgactccagaaagtagcagcgcctaaaagcctcacgtccagaacaaactactgtgtgctcacc
ttccattgccgaagtatagaatcactggtgtgcagaagatccaatgctcccagcctatattgttctacc
gaaagtgctcgtatattcatccaaggaagtatctcgtggaacaccaccggtagacgagactccg
gagccatcggcagagaaccaatccacagaggggacacctgaacaaccaccacttataaccgagga
tgagaccaggactagaacgcctgagccgatcatcgaagaggaagaagaggatagcataagttt
gctgtcagatggcccgaccaccagggtgctgcaagtcgaggcagacattcacggccgcccctctgt
atctagctcactcctggtccattcctcatgcatccgactttgatgtggacagttatccatacttgacacct
ggaggagctagcgtgaccagcggggcaacgtcagccgagactaactcttacttcgcaaagagtag
ggagttctggcgcgaccgggtgcctgcgcctcgaacagtattcaggaaccctccacatcccgtccg
cgcacaagaacaccgtcacttgaccagcagggcctgctcagaaccagcctagttccaccccg
ccaggcgtgaatagggtagcactagagaggagctcagggcgttaaccccgtcacgcactcctagc
aggtcggtctcagaaccagcctggtctcaacccgccagcgtaaatagggtagtacaagagag
gagtttgaggcgttcgtagcacaacaacaatgacggttgatgcgggtgcatacatctttcctccgac
accggtcaagggcattacaacaaaaatcagtaaggcaaacgggtgctatccgaagtgggtgtggaga
ggaccgaattggagatttcgtatgccccgcgctcgaaccaagaaaaagaagaattactacgcaaga
aattacagttaaatcccacacctgtaacagaagcagataaccagtccaggaaggtggagaacatgaa
agccataacagctagacgtattctgcaaggcctagggcattattgaaaggcagaaggaaaagtggag
tgctaccgaacctgcatcctgttctttgtatcattagtgtaaccgtgcctttcaagcccaaggt
cgcagtggaagcctgtaacgccatgtgaaagagaactttccgactgtggcttcttactgtattatcca
gagtacgatgcctatttgacatggttgacggagcttcatgctgcttagacactgccagttttgcctg
caaagctgcgcagctttccaaagaacactcctatttggaaaccacaatacagatcggcagtgcttca
gcgatccagaacacgctccagaacgctctggcagctgccacaaaaagaattgcaatgtcacgcaa
atgagagaattgcccgtattggattcggcgccctttaatgtggaatgctcaagaaatagcgtgtaata
atgaatattgggaaacgtttaagaaaacccatcaggcttactgaagaaaacgtggtaaattacatta
ccaaataaaaggaccaaaagctgctgctcttttgcgaagacacataattgaaatggttcaggacat
accaatggacaggtttgtaatggacttaaagagagacgtgaaagtactccaggaacaaaacatact
gaagaacggcccaaggtagcaggtgatccaggctgccgatccgctagcaacagcgtatctgtcggg
aatccaccgagagctggttaggagattaaatgcggtcctgcttccgaacattcatactgtttgatag
tcggctgaagactttgacgctattatagccgagcactccagcctggggattgtgttctgaaactgac
atcgcgctgtttgataaaagtgaggacgacgccatggctctgaccgcgttaattgattctggaagactta

```

```

ggtgtggacgcagagctgttgacgctgattgaggcgctttcggcgaaattcatcaatacatttggcc
actaaaactaaattaaattcggagccatgatgaaatctggaatgttctcacactgtttgaacacagt
cattaacattgtaatcgaagcagagtgttgagagaacggctaaccggatcacatgtgcagcattca
ttggagatgacaatatcgtgaaaggagtcaaatcggacaaattaatggcagacaggtgcgccacctg
gttgaatatggaagtcaagattatagatgctgtggtggcgagaaagcgccttatttctgtggagggtt
atthtgtgactccgtgaccggcacagcgtgccgtgtggcagaccccctaaaaaggctgtttaagctt
ggcaaacctctggcagcagacgatgaacatgatgatgacaggagaagggcattgcatgaagagtc
aacacgctggaaccgagtgggtattcttcagagctgtgcaaggcagtagaatcaaggatgaaacc
gtaggaacttccatcatagttatggccatgactactctagctagcagtgtaaatcattcagctacctga
gaggggcccctataactctctacggcTAActgaaatggactacgactTatcacgcccacacatta
cagccgcggtgtcaaaaaccgcgtggacgtgggttaacatccctgctgggaggatcagccgtaattat
tataattggcttggctggctactattgtggccatgtacgtgctgaccaaccagaaacataattgaata
cagcagcaattggcaagctgcttacatagaactcggcgattggcatgcccgccttaaaatthtthttht
atthtthtthtthtthtccgaatcggatthtthtthtthtthtthtthtthtthtthtthtthtthttht
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

SAM 模板生产载体(SEQ ID NO:58); 具有核苷酸 7544-11175 缺失的 VEEV 基因组, 加 5' T7-启动子(粗斜体)和正向引物结合位点, 加 3'限制性位点

[0429]

```

ggttatgtggacgcgcccgcTAATACGACTCACTATAATGggcggcgcgatgagag
aagcccagaccaattacctacccaaaATGGagaaagttcacgttgacatcgaggaagacagccc
attctcagagctttgcagcggagcttcccgcagtttgaggtagaagccaagcaggtcactgataatg
accatgtaatgccagagcgttttcgcatctggctcaaaaactgatcgaaacggaggtggacctacc
gacacgatccttgacattggaagtgcgcccggcgcagaatgtattctaagcacaagtatcattgtatc
tgccgatgagatgtgcggaagatccggacagattgtataagtatgcaactaagctgaagaaaactg
taaggaaataactgataaggaattggacaagaaaatgaaggagctcggcggcgtcatgagcagccc
tgacctggaactgagactatgtgctccacgacgacgagtcgtgctgctacgaagggcaagtcgct
gttaccaggatgtatacgcggttgacggaccgacaagtctctatcaccagccaataaggagtag
agtcgctactggataggctttgacaccacccctttatgtttaagaactggctggagcatatccatcat
acttaccactggcggcagcgaaacctgttaacggctcgtaacataggcctatgcagctctgacgtt
atggagcggctacgtagaggatgtccattcttagaaagaagtattgaaaccatccaacaatgttcta
ttctctgttgctcgacctaccacgagaagaggacttactgaggagctggcacctgccgtctgt
attcacttacgtggcaagcaaaattacacatgtcgggtgtgagactatagttagtgcagcgggtacgtc
gttaaaagaatagctatcagtcaggcctgtatgggaagccttcaggctatgctgctacgatgcaccg
cgagggattcttgtgctgcaaaagtacagacacattgaacggggagagggtctctttcccggtgca
cgtatgtccagctacattgtgtgaccaaatgactggcactggaacagatgtcagtgccggacgac
gcgcaaaaactgctggtgggctcaaccagcgtatagtcgtcaacggctcgcaccagagaaacacc
aatacatgaaaaattacctttgcccgtagtggccaggcatttctaggtgggcaaggaatataag
gaagatcaagaagatgaaaggccactaggactacgagatagacagttagtcatgggggtgtgtggg
ctttagaaggcacaagataacatctattataagcggcggataccaaacatcatcaaaagtgaaca
gcgatttccactcattcgtgctgcccaggataggcagtaacacattggagatcgggctgagaacaag

```

[0430]

```

aatcaggaaaatgtagaggagcacaaggagccgtcacctctcattaccgccgaggacgtacaaga
agctaagtgcgcagccgatgaggctaaggagggtgcgtgaagccgaggagtgcgcgcagctctac
cacctttggcagctgatgtagaggagccactctggaagccgatgtcgcactgatgttacaagaggct
ggggccggctcagtgagacacctcgtggcttgataaagggtaccagctacgctggcgaggacia
gatcggctcttacgctgtgctttctccgcaggctgtactcaagagtgaaaaattatcttgcacccacct
ctcgtgaacaagtcatagtgataacacactctggccgaaaagggcgttatgccgtggaaccataacc
atggtaaagtagtggtgccagaggacatgcaatacccgtccaggactttcaagctctgagtgaag
tgccaccattgtgtacaacgaacgtgagttcgtaaacaggtacctgcaccataattgccacacatggag
gagcgtgaacactgatgaagaatattacaaaactgtcaagcccagcgagcacgacggcgaatacc
tgtacgacatcgacaggaaacagtcgctcaagaaagaactagtcactgggctagggctcacaggcg
agctggtggatcctccctccatgaattcgcctacgagagtctgagaacacgaccagccgctcctac
caagtaccaacctaggggtgatggcgtgccaggatcaggcaagtctggcaccataaaagcgca
gtcaccaaaaaagatctagtggtagcgccaagaaagaaaactgtgcagaaattataagggacgtc
aagaaaatgaaagggctggacgtcaatgccagaactgtggactcagtgctcttgaatggatgcaaac
acccgtagagaccctgtatattgacgaagcttttcttgcacaggtactctcagagcgtcatag
ccattataagacctaaaaaggcagtgctctcggggatcccaaacagtcgggttttttaacatgatgt
gectgaaagtgcatttaaccacgagattgcacacaagtctccacaaaagcatctctcggcgttgca
ctaaatctgtgacttcggtcgtctcaacctgttttacgacaaaaaatgagaacgacgaatccgaaag
agactaagattgtgattgacactaccggcagtaccaaacctaagcaggacgatctcattctcactgtt
cagaggggtgggtgaagcagttgcaaatagattacaaaggcaacgaaataatgacggcagctgcctc
tcaagggctgacctgtaaaggtgtgatgccgttcggtaacaaggtgaatgaaaatcctctgtacgcac
ccacctcagaacatgtgaacgtcctactgacctgcacggaggaccgcatcgtgtgaaaacactag
ccggcgacctatggataaaaactgactgccaagtacctgggaattcactgccacgatagagg
agtggcaagcagagcatgatgccatcatgaggcacatcttggagagaccggacctaccgacgtct
tcagaataaggcaaacgtgtgttggccaaggcttttagtgcgggtgctgaagaccgctggcataga
catgacctgaacaatggaacactgtggatttttgaaacggacaaaagctcactcagcagagatag
tattgaaccaactatgcgtgaggttcttggactcgatctggactcgggtctattttctgaccactgtc
cgttatecattaggaataatcactgggataactccccgtcgcctaacatgtacgggctgaataaagaa
gtgttcgctcagctctctcgcaggtaccacaactgcctcgggcagttgccactggaagagtctatga
catgaacactggtacactgcgcaattatgatccgcgcataaacctagtaacctgtaaacagaagactgc
ctcatgctttagctcaccataatgaacaccacagagtactttcttcattcgtcagcaaatgaag
ggcagaactgtctcgtggtcggggaaaagttgtccgtcccaggcaaaatggtgactggtgtcag
accggcctgaggctacctcagagctcggctggatttaggcacccaggtgatgtcccaaatatgac
ataatattgttaatgtgaggacccatataaataccatcactatcagcagtggaagaccatgccatta
agcttagcatggtgaccaagaaagcttctcgtcgtcatctgaatcccggcggaacctgtgtcagcataggtt
atggttacgctgacagggccagcgaaagcatcattggtgctatagcgcggcagttcaagtttcccgg
gtatgcaaaccgaaatcctcacttgaagagacggaagttctgtttgtattcattgggtacgatcgaag
gcccgtacgcacaatccttacaagctttcatcaacctgaccaacattatacaggttccagactccacg
aagccggatgtgcacctcatatcatgtggtgcgaggggatattgccacggccaccgaaggagtga
ttataatgctgctaacagcaaaggacaacctggcggaggggtgtgcggagcgtgtataagaat
cccggaaagcttcgattacagccgatcgaagtaggaaaagcgcgactggtcaaaggtgcagctaa
acatacattcatccgtaggaccaaacctcaacaaaagtttcggaggtgaaggtgacaaaacgttgg
cagaggcttatgagtcacgctaagattgtcaacgataacaattacaagtcagtagcgattccactgtt

```

[0431]

```

gtccaccggcatctttccgggaacaaagatcgactaacccaatcattgaaccatttgctgacagcttta
gacaccactgatgcagatgtagccatatactgcagggacaagaaatgggaaatgactctcaaggaa
gcagtggctaggagagaagcagtgaggagatgcatatccgacgactcttcagtacagaacct
gatgcagagctggtgaggggtcatccgaagagttcttggctggaaggaagggctacagcacaagc
gatggcaaaacttttcatatttgaagggaccaagttaccaggcgccaaggatatagcagaat
taatgccatgtggcccgttgaacggaggccaatgagcaggtatgcatgtatatcctcggagaaagc
atgagcagtattaggtcgaaatgccccgtcgaagagtcggaagcctccacaccacctagcagctg
ccttgccttgcatccatgccatgactccagaaagagtacagcgcctaaaagcctcacgtccagaaca
aactactgtgtcctcatctttccattgccgaagtatagaatcactggtgtgcagaagatccaatgctcc
cagcctatattgttccaccgaaagtgcctgcgtatattcaatccaaggaagtatctcgtggaaacacca
ccggtagacgagactccggagccatcggcagagaaccaatccacagagggggacacctgaacaac
caccactataaccgaggtgagaccaggactagaacgcctgagccgatcatcatcgaagaggaag
aagaggatagcataagtttgcctgtagatggcccagccaccagggtgctgcaagtcgagggcagaca
ttcacgggcccctctgtatctagctcatcctggtccattctcatgcatccgactttgatgtggacagt
ttatccatacttgacacctggaggagctagcgtgaccagcggggcaacgtcagccgagactaac
tcttacttcgaaagagtatggagttctggcgcgaccggtgctgcgctcgaacagtattcaggaa
ccctccacatcccgtccgcgcacaagaacaccgtcacttgaccaccagcagggcctgctcgagaac
cagcctagttccaccccggcaggtgaaatagggtgactactagagaggagctcgagggccttac
cccgtcacgcactcctagcaggtcgggtcgcgagaaccagcctggtctccaacccgccaggcgtaaa
taggggtgattacaagagaggagttgagcgttcgtagcacaacaacaatgacggttgatgcgggt
gcatacatcttttcccgacaccggcaagggcattacaacaaaaatcagtaaggcaaacgggtgct
atccgaagtgggttggagaggaccgaattggagatttcgtatgccccgcgctcgaccaagaaaaa
gaagaattactacgcaagaaattacagttaaatcccacacctgctaacagaagcagataaccagtcca
ggaaggtggagaacatgaaagccataacagctagacgtattctgcaaggcctagggcattatttgaa
ggcagaagggaaaagtggagtgtaccgaacctgcatcctgttctttgtattcatctagtgtgaaccg
tgcttttcaagccccaggtcgcagtggaagcctgtaacgccatgtgaaagagaactttccgactgt
ggcttctactgtattattccagagtagatgcctatttggacatggttgacggagcttcatgctgcttag
aactgccagttttgccctgcaaagctgcgcagctttccaaagaaacactctatttggaaaccacaa
tacgatcggcagtgcttcagcgtaccagaacacgctccagaacgtcctggcagctgccacaaaaa
gaaattgcaatgtcacgcaatgagagaattgcccgattggattcggcggccttfaatgtggaatgct
tcaagaaatagcgtgtaataatgaatattgggaaacgtttaagaaaacccatcaggcttactgaag
aaaacgtggtaaaattacattaccaataaaaggacaaaaagctgctgctcttttgcgaagacacata
atftgaatatgttgcaggacataccaatggacaggttgtaatggacttaagagagacgtgaaagtga
ctccaggaacaaaacatactgaagaacggccaaggtacaggtgatccaggtgccgatccgctag
caacagcgtatctgtgcggaatccaccgagagctggttaggagattaaatgcggtcctgcttccgaac
atcatacactgtttgatatgtcggtgaagactttgacgctattatagccgagcacttccagcctgggg
attgtgtctggaactgacatcgcgtcgtttgataaaagtgaggacgacgccatggctctgaccgcgt
taatgattctggaagacttaggtgtggacgcagagctgttgacgctgattgagggcgttctcggcgaa
atftcatcaatacatttgcactaaaactaaattaaatcggagccatgatgaaatctggaatgttctc
aactgtttgtgaacacagtcattaacattgtaatcgaagcagagtggtgagagaacggctaaccgg
atccatgtgcagcattcattggagatgacaatatcgtgaaaggagtcaaatcggacaaattaatgg
cagacaggtgcgccacctggtgaaatggaagtcaagattatagatgctgtgtggggcgagaaagc
gcctatttctgtggagggttatttgtgtgactccgtgaccggcacagcgtgccgtgtggcagacc

```

[0432]

```

cctaaaaaggctgtttaagcttggcaaacctctggcagcagacgatgaacatgatgatgacaggaga
agggcattgcatgaagagtcaacacgctggaaccgagtgggtattcttcagagctgtgcaaggcag
tagaatcaaggatgaaaccgtaggaacttccatcatagttatggccatgactactctagctagcagtg
taaatacctcagctacctgagaggggcccctataactctctacggcTAAcctgaatggactacgact
Tatcacgcccacacatttacagccgcggtgcaaaaaccgctggacgtgggtaacatccctgctgg
gaggatcagccgtaattattataattggcttggctgctggctactattgtggccatgtacgtgctgacca
ccagaaacataattgaatacagcagcaattggcaagctgctacatagaactcgcggcgattggcatg
ccgcctaaaattttttttttttttttttttttccgaatcggattttgttttaatttcAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAtacgtagtt
taaac

```

[0433] 等效方案和范围

[0434] 在权利要求书中,除非指示相反情形或从上下文中另外明显可见,否则例如“(a)”、“一(an)”和“所述”的冠词可意指一个或多个。除非指示相反情形或从上下文中另外明显可见,否则如果一个、多于一个或所有组成员存在于、用于给定产物或工艺或以其他方式与给定产物或工艺相关,则认为其符合在组的一个或多个成员之间包括“或”的权利要求书或说明书。本公开包括其中恰好一个组成员存在于、用于给定产物或工艺或以其他方式与给定产物或工艺相关的实施方案。本公开包括其中多于一个或所有的组成员存在于、用于给定产物或工艺或以其他方式与给定产物或工艺相关的实施方案。

[0435] 此外,本公开涵盖其中将来自一项或多项所列示权利要求的一种或多种限制、要素、条款和说明性术语引入到另一项权利要求中的所有变化形式、组合和排列。例如,从属于另一项权利要求的任何权利要求可修改为包括一种或多种在从属于同一基本权利要求的任何其他权利要求中所发现的限制。在要素以列表形式(例如以马库什组(Markush group)格式)呈现的情况下,还公开了所述要素的每个亚组,并且可从所述组中移除任何要素。应理解,一般而言,在本公开或本公开的方面被称为包括特定要素和/或特征的情况下,本公开的某些实施方案或本公开的方面由此类要素和/或特征组成或基本上由其组成。出于简单性目的,那些实施方案在本文中未以所述语言明确陈述。还应注意,术语“包含”和“含有”旨在为开放性的并允许包括其他要素或步骤。在给出范围的情况下,端点包括在内。此外,除非另有指示或从上下文和本领域结构域技术人员的理解另外显而易见,否则表示为范围的值在本公开的不同实施方案中可采用所陈述范围内的任何具体值或子范围,除非上下文另外明确地指明,否则精确到所述范围下限单位的十分之一。

[0436] 本申请涉及各种已颁布专利、公开专利申请、期刊文章和其他出版物,所有这些都通过引用并入本文。如果所并入的任何参考文献与本说明书之间存在冲突,则应以本说明书为准。另外,可从任何一项或多项权利要求中明确地排除属于现有技术的本公开的任何特定实施方案。因为这样的实施方案被认为是本领域结构域普通技术人员已知的,所以即使在本文中未明确阐述排除,它们也可被排除。出于任何原因,无论是否与现有技术的相关,本公开的任何特定实施方案都可从任何权利要求中排除。

[0437] 本领域结构域技术人员将认识到或能够仅使用常规实验来确定本文所阐述的具体实施方案的许多等效形式。本文所阐述的本发明实施方案的范围不旨在限于上述说明书,

而是如所附权利要求中所陈述的。本领结构域普通技术人员将理解,在不脱离如以下权利要求所限定的本公开的精神或范围的情况下,可对本说明书进行各种改变和修改。

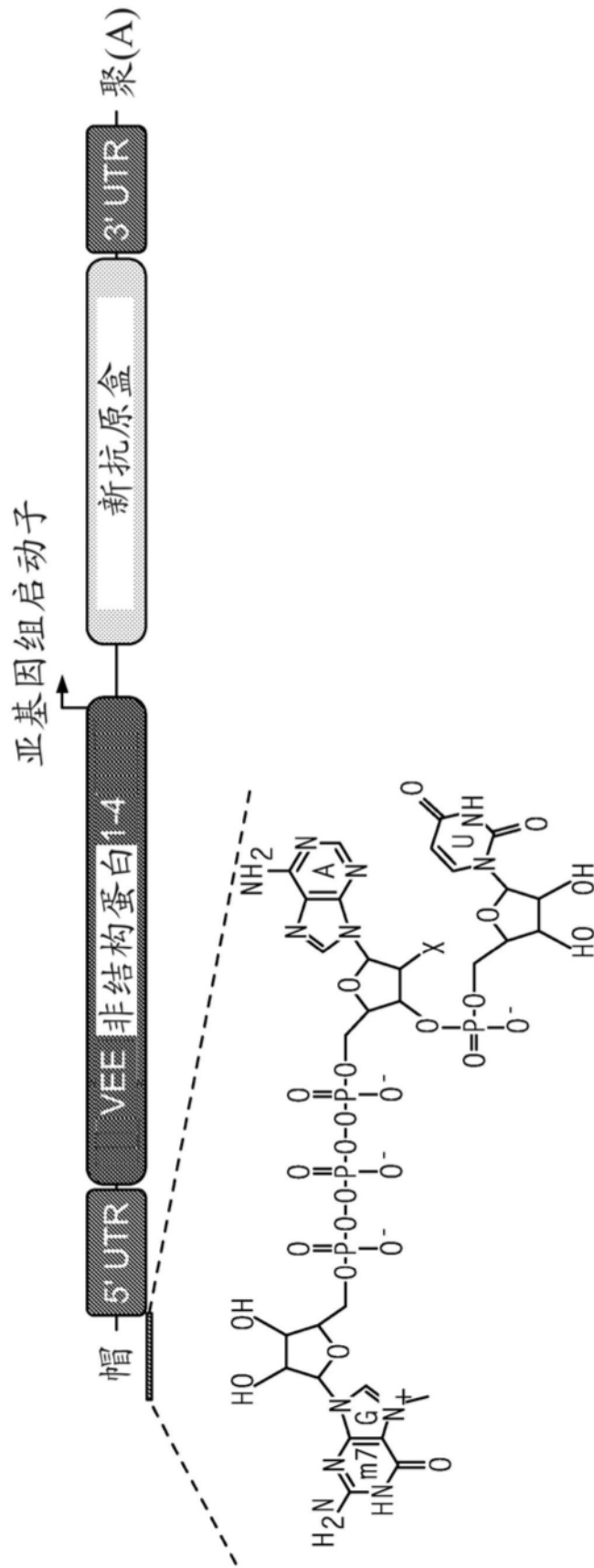


图2

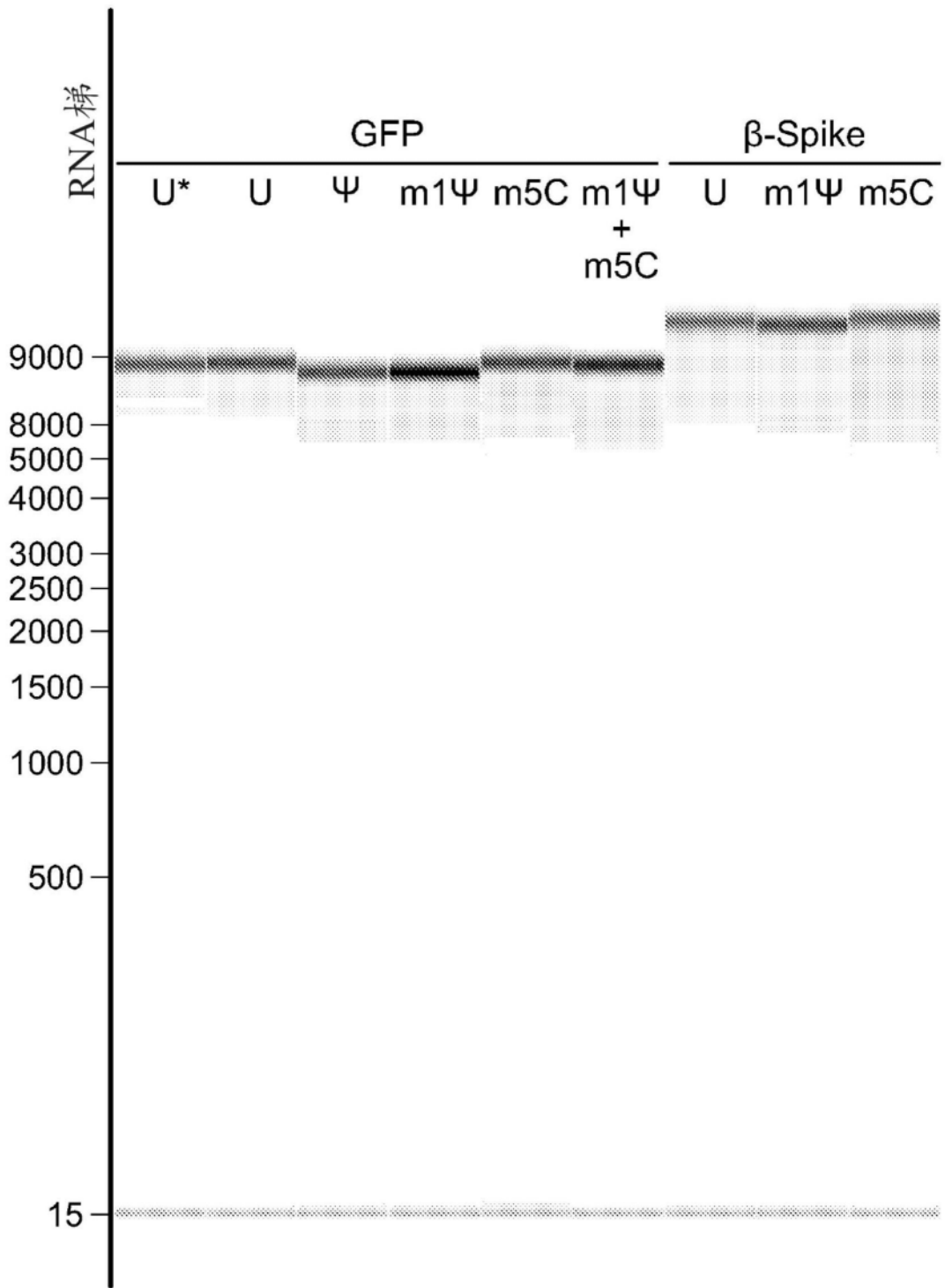


图3

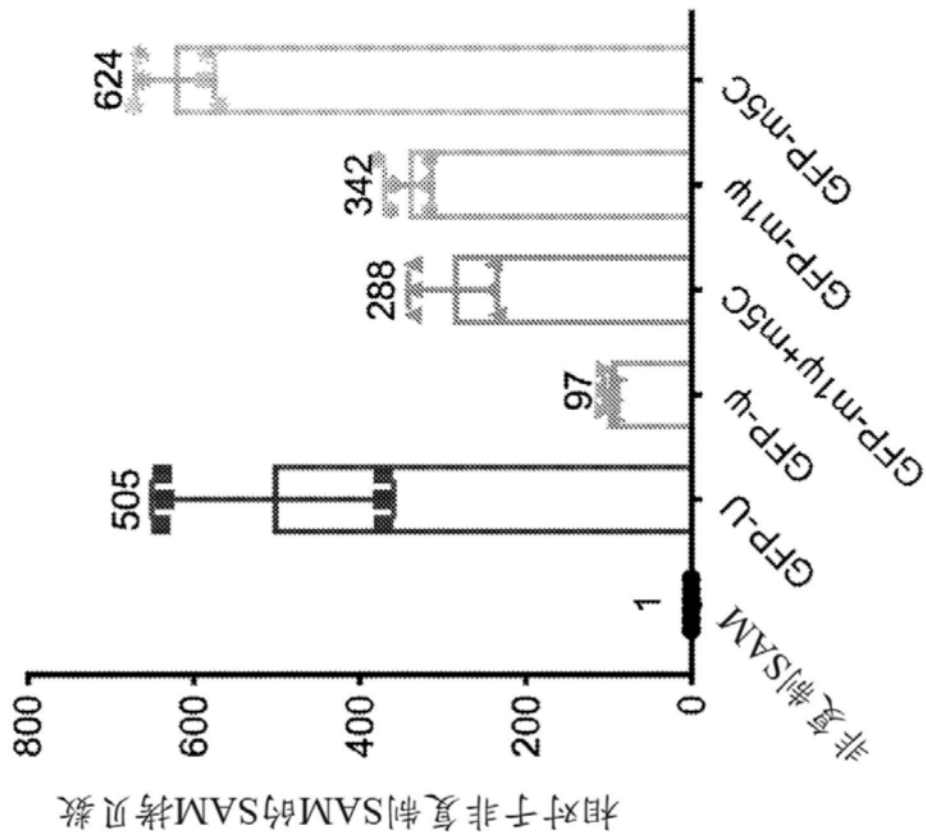


图4

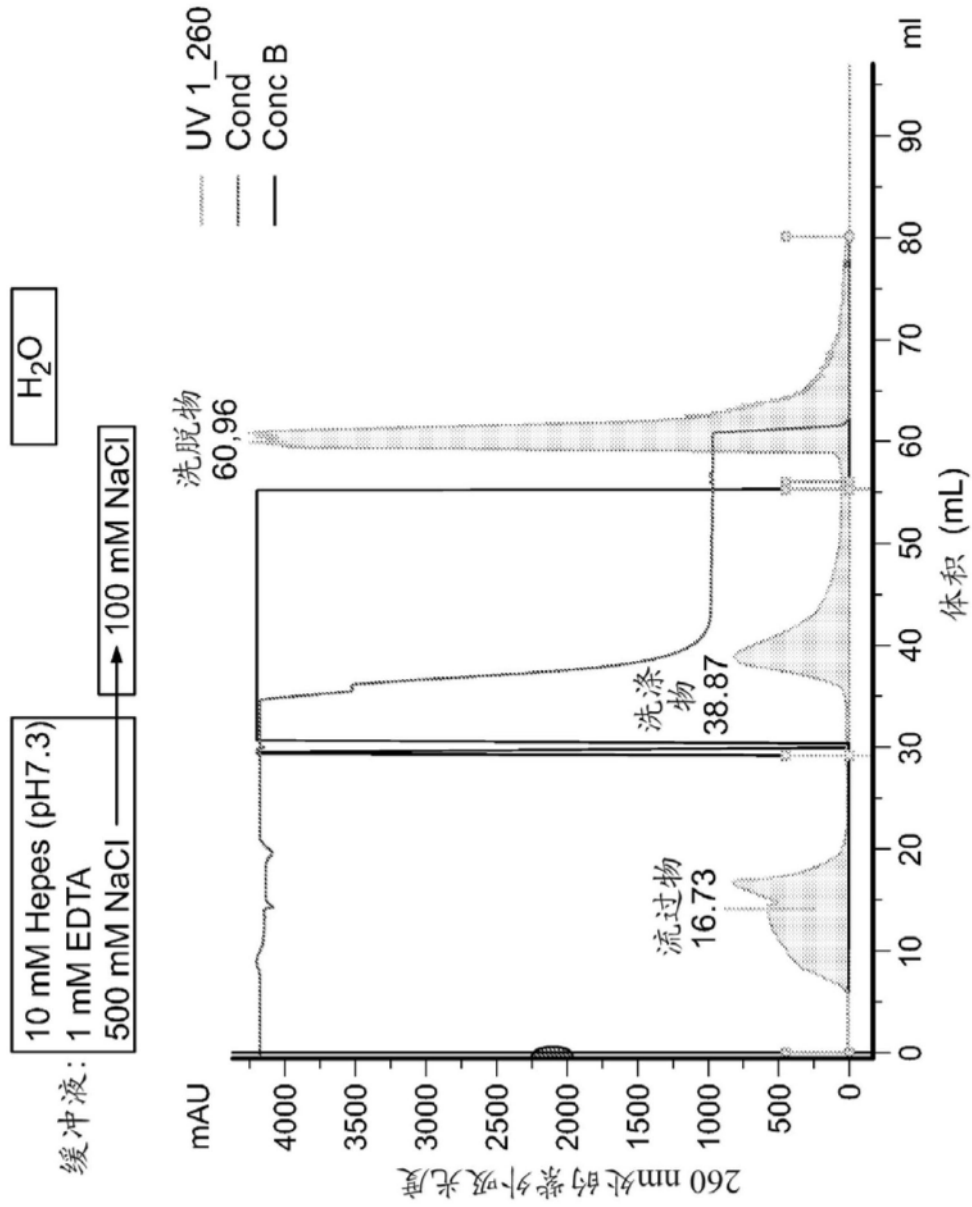


图5A

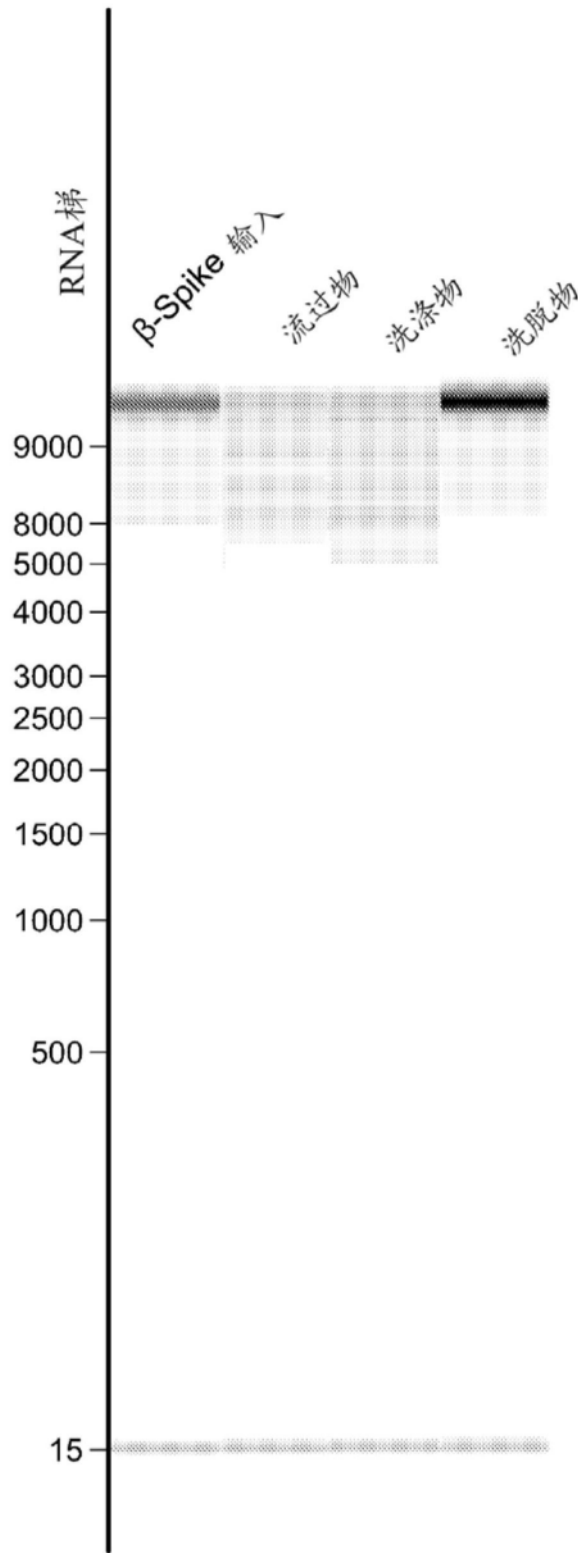


图5B

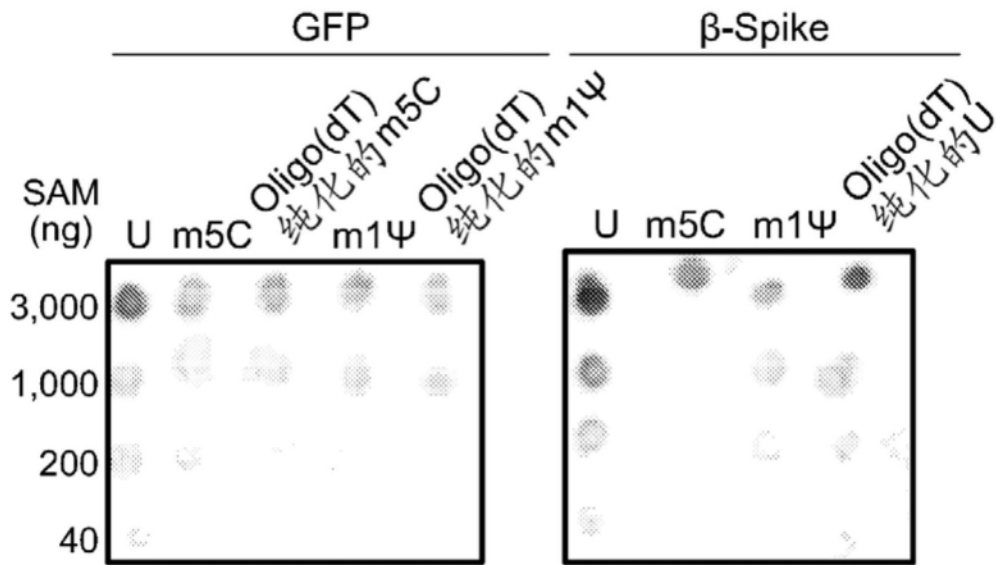


图6A

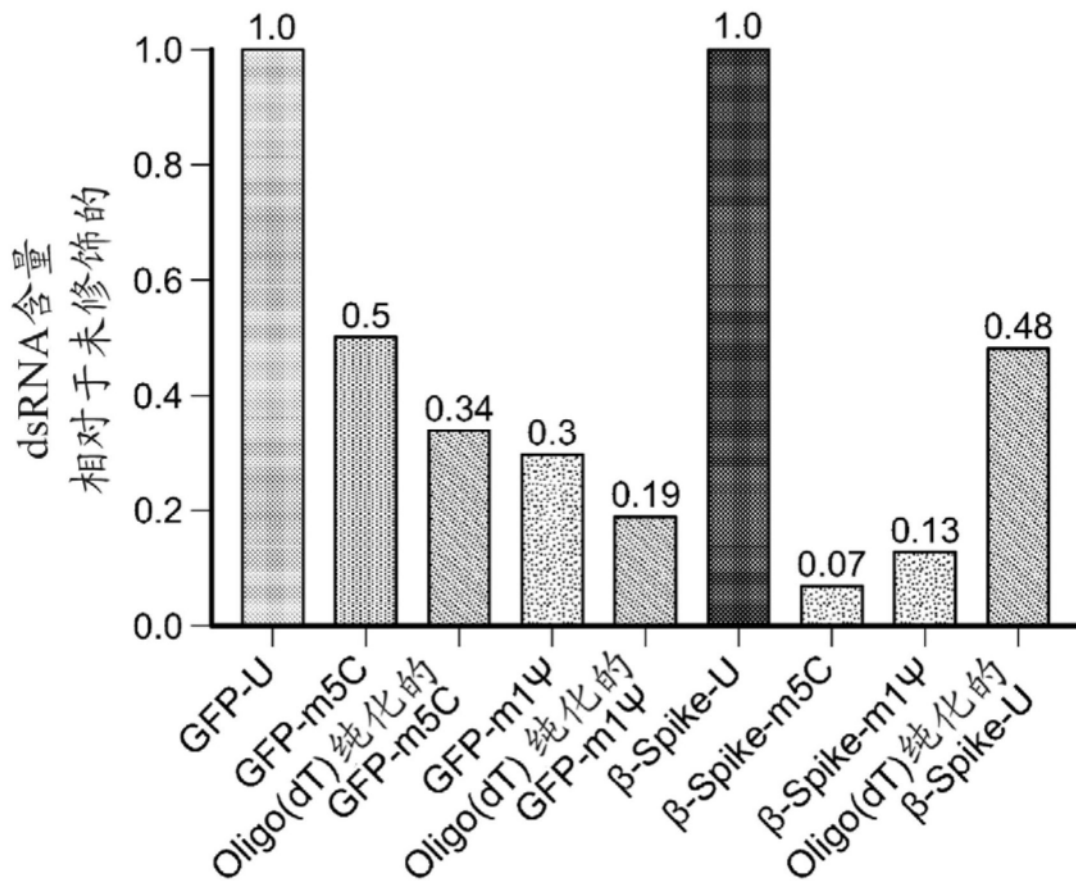


图6B

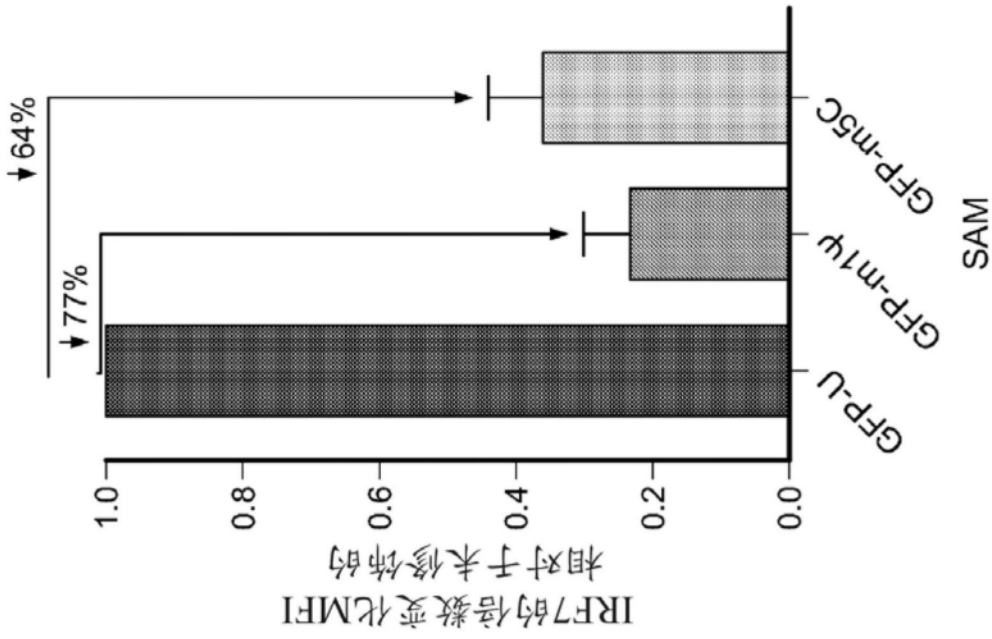


图7A

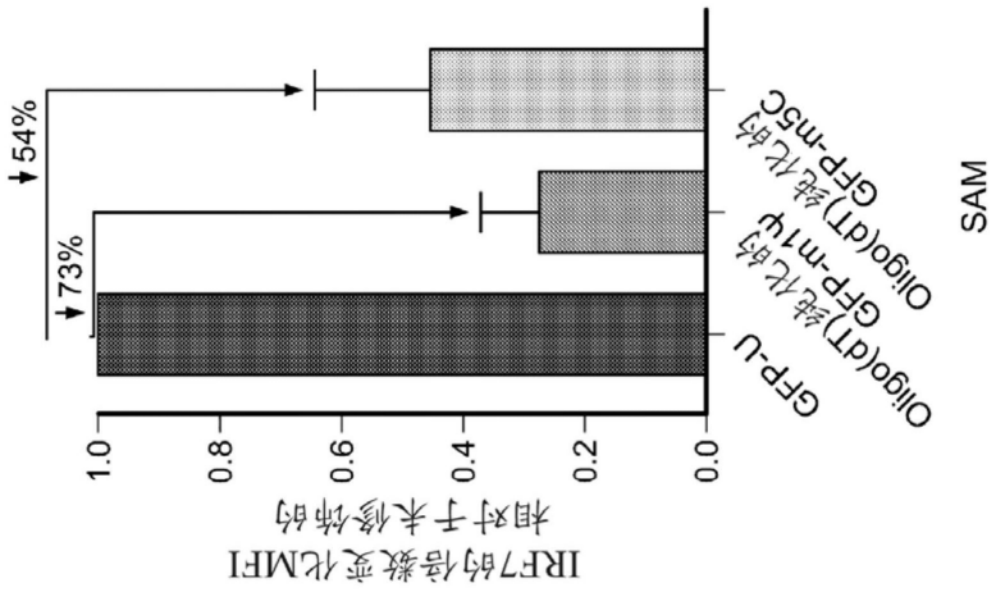


图7B

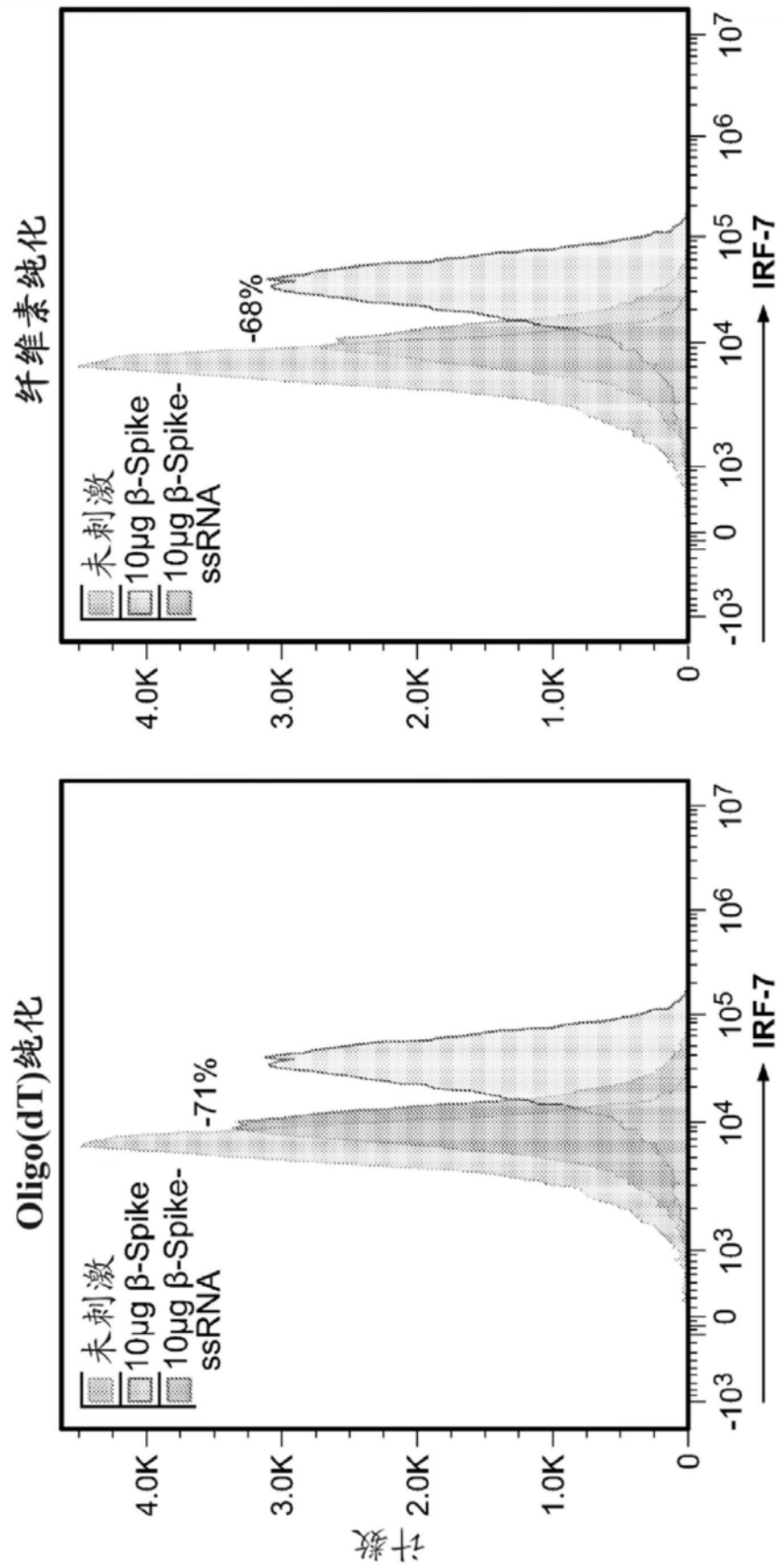


图7C

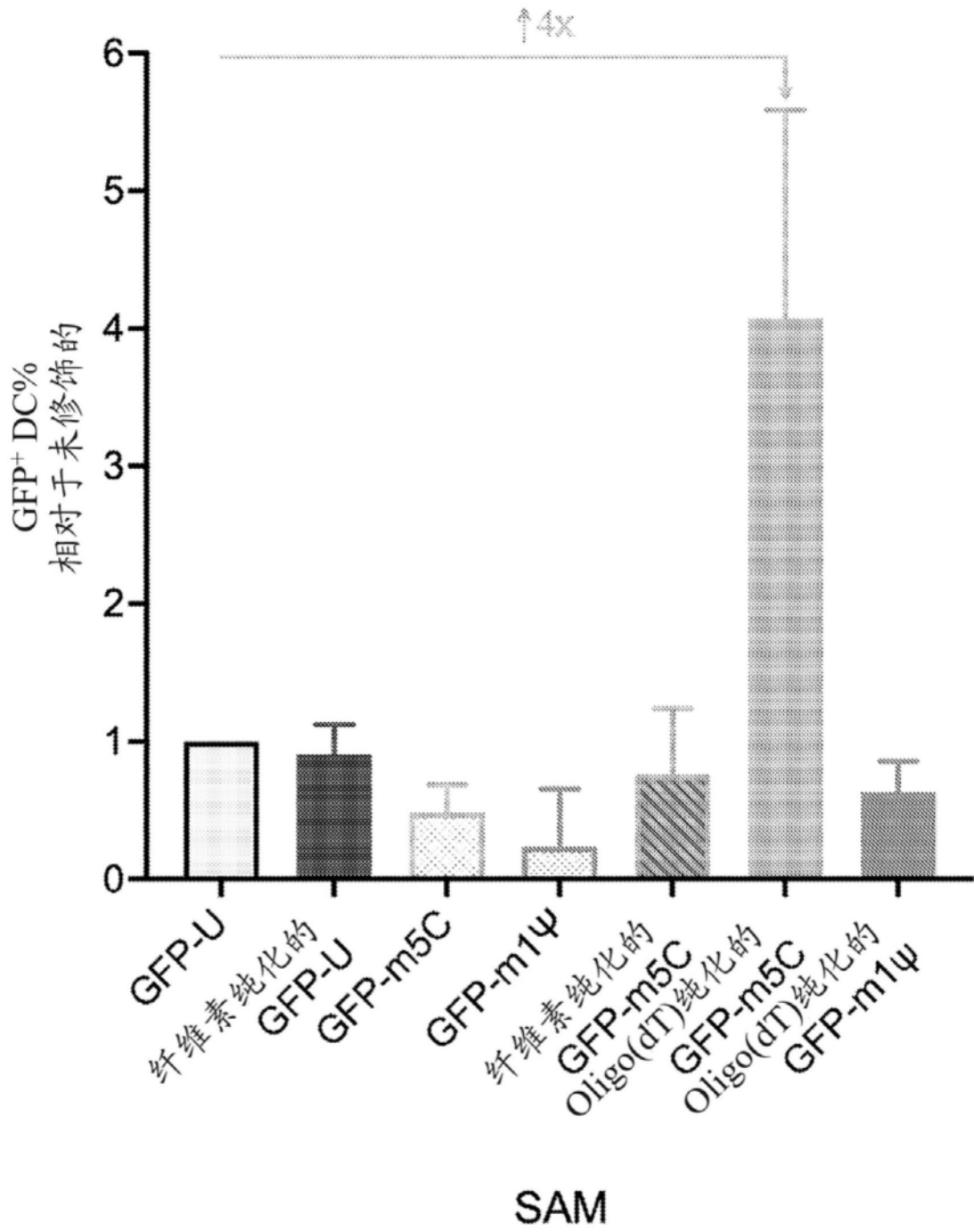


图8

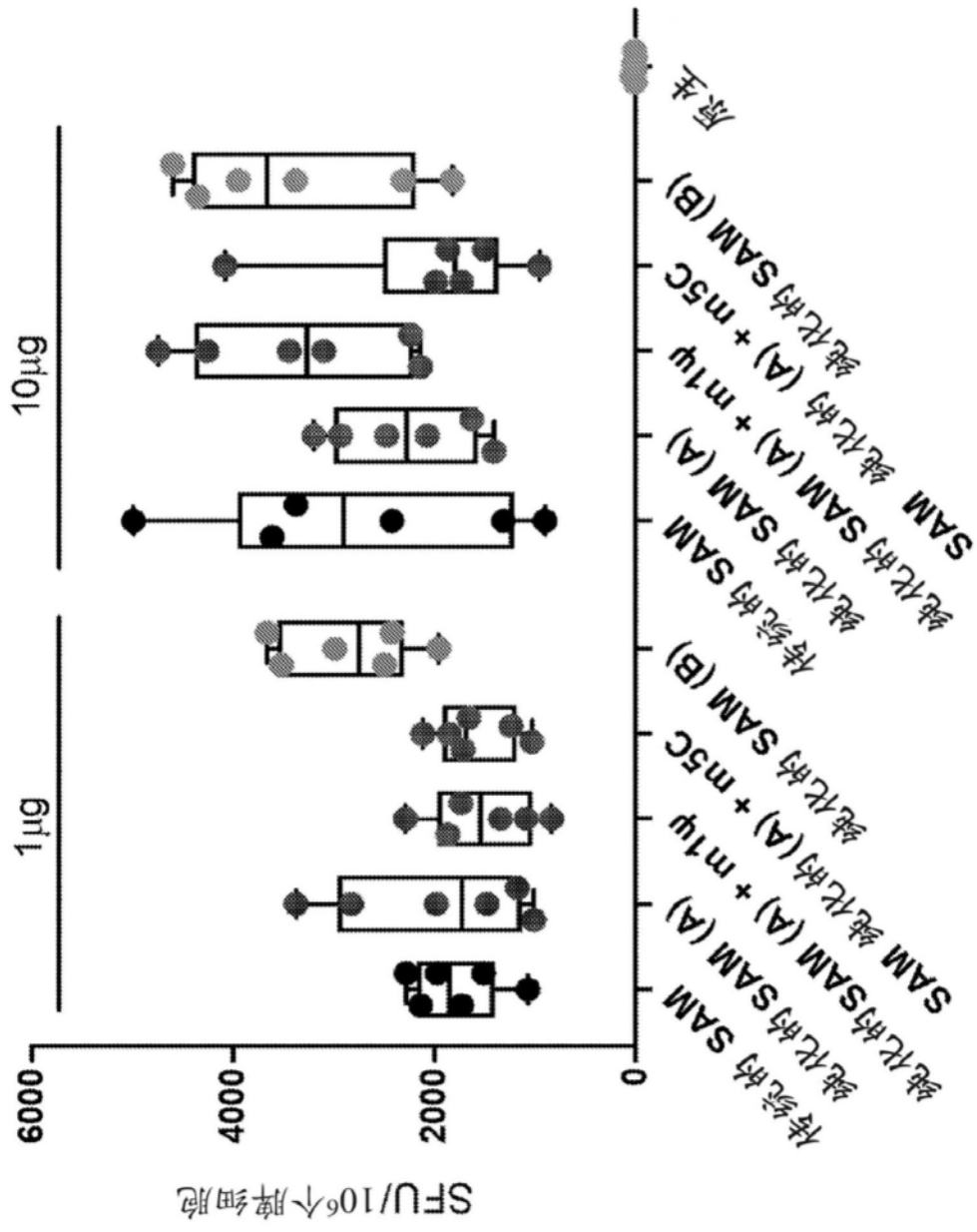


图9

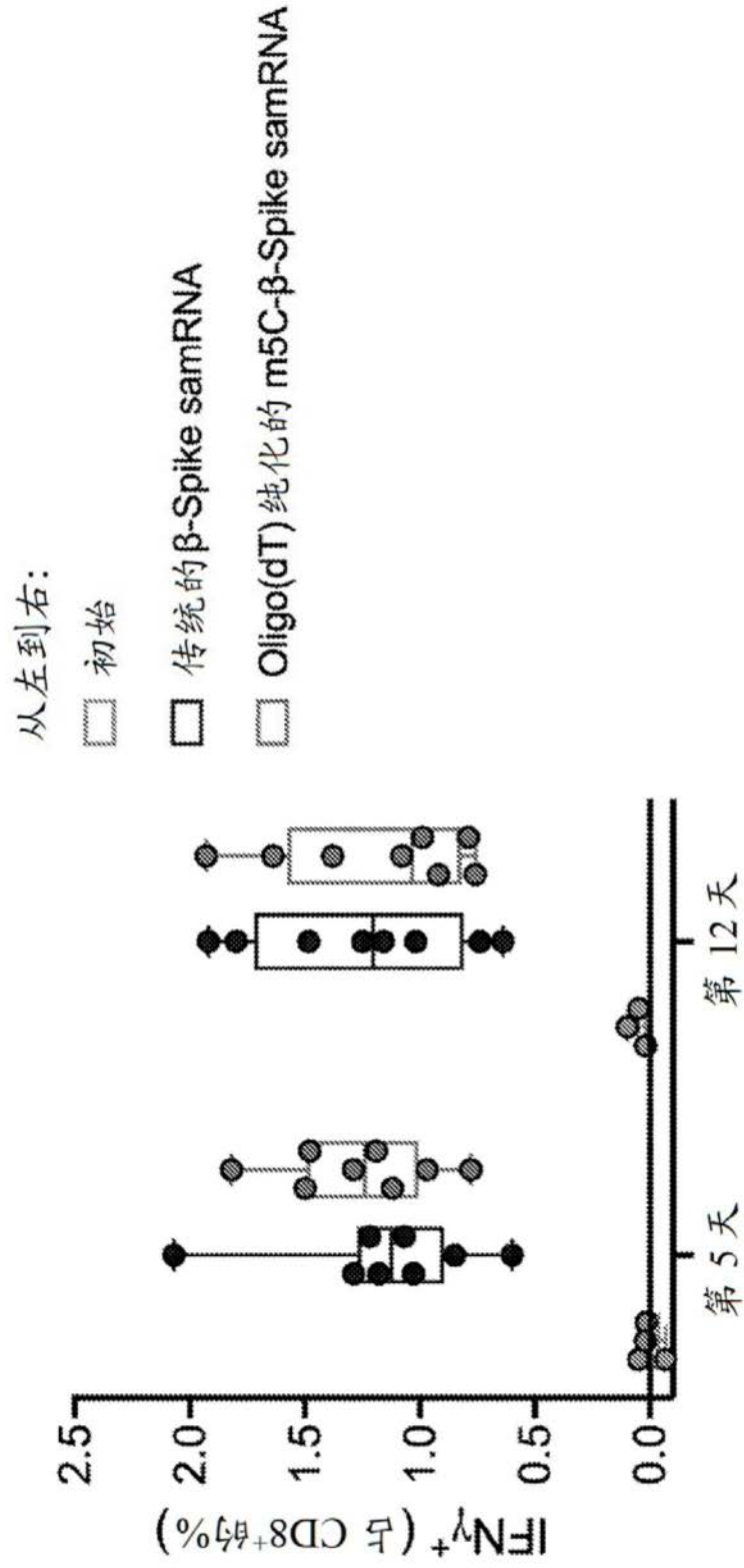


图10

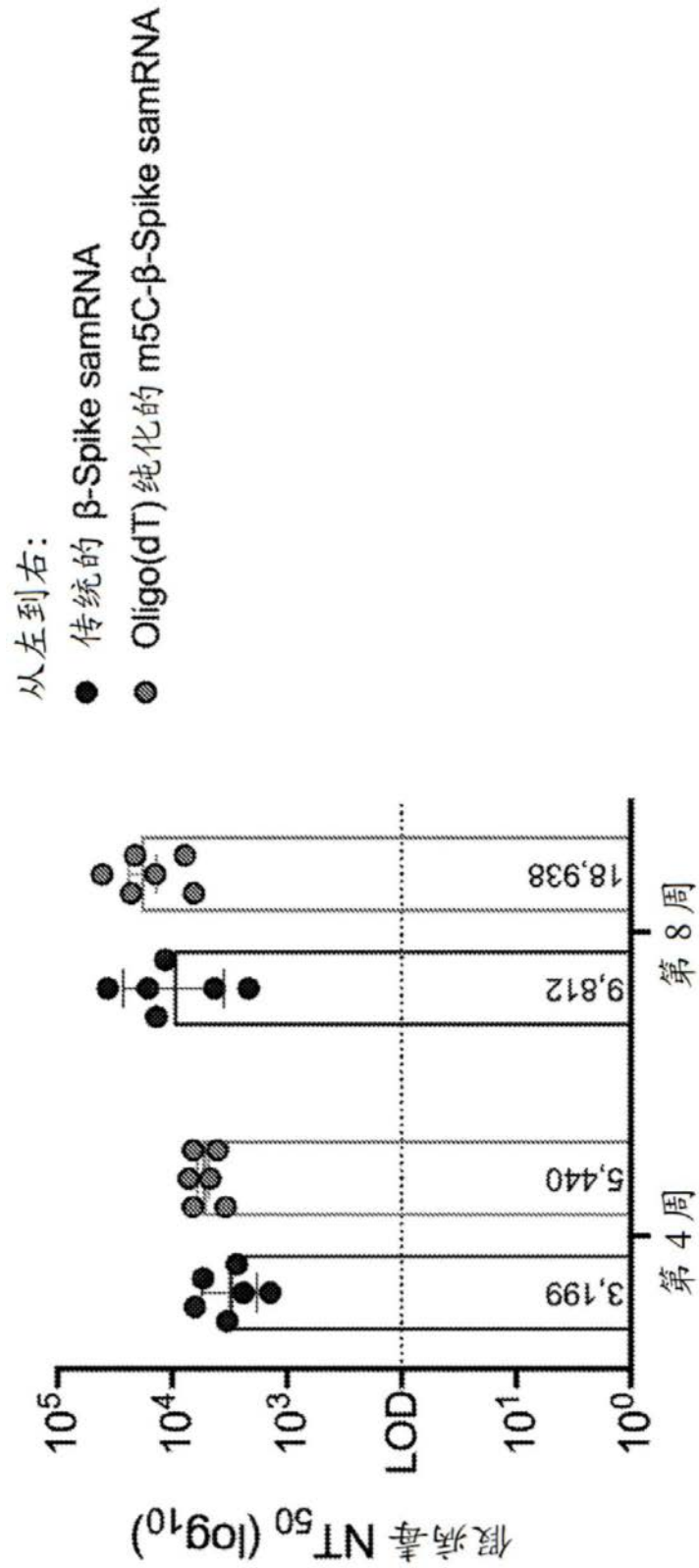


图11

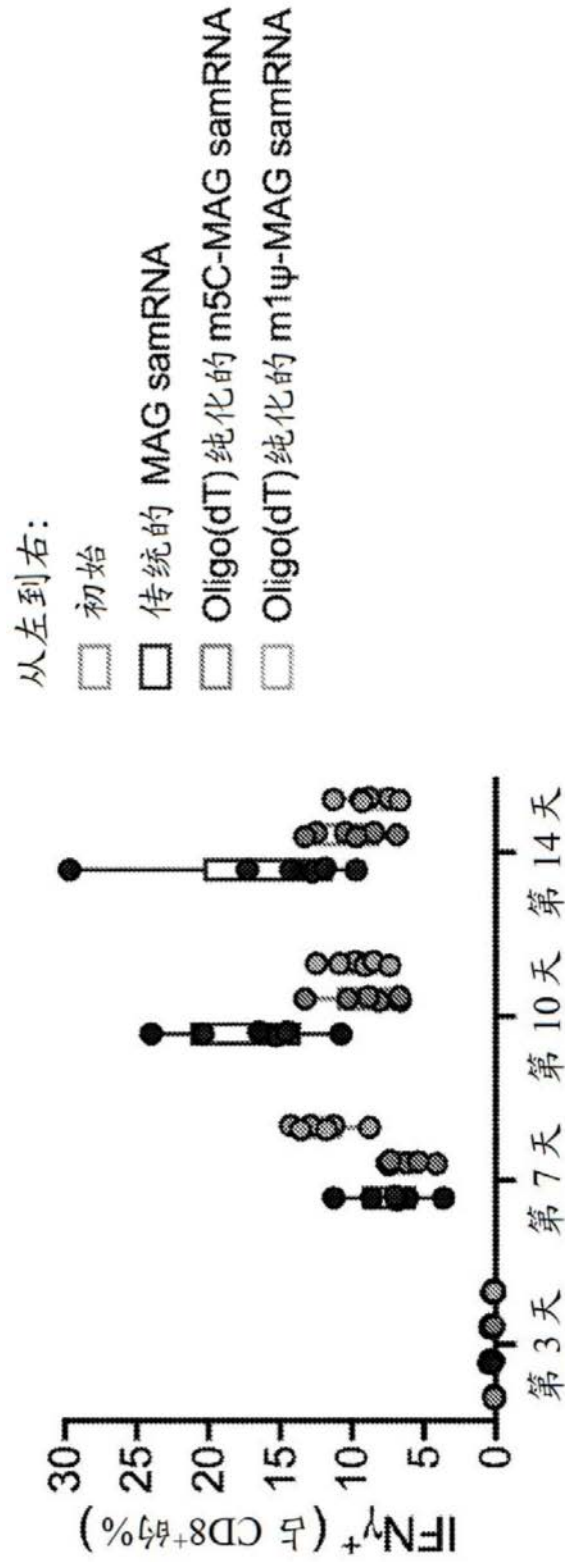


图12