I850316

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本 **(11)證書號數：TW I850316 B**

(45)公告日： 中華民國 113 (2024) 年 08 月 01 日

(21)申請案號：109101808 (22)申請日： 中華民國 109 (2020) 年 01 月 17 日

(51)Int. Cl.： *C07K16/28 (2006.01)* *A61K31/7115 (2006.01)*
A61K45/06 (2006.01) *A61P35/00 (2006.01)*

(30)優先權：2019/01/21 美國 62/794,896
2019/10/25 美國 62/926,379
2019/11/14 歐洲專利局 19306471.4

(71)申請人：法商賽諾菲公司 (法國) SANOFI (FR)
法國

(72)發明人：瑪西亞里 賽瑞拉 MASCIARI, SERENA (US)；約魯克 塞姆拉 YORUK, SEMRA (TR)；許 卡爾 HSU, KARL (US)；瓦格那爾 帝莫西 WAGENAAR, TIMOTHY (US)；阿奎維拉 尼古拉斯 ACQUAVELLA, NICOLAS (VE)；伯納多 瑪麗 BERNARDO, MARIE (US)；賈布洛夫斯基 奧伯特 JABULOWSKY, ROBERT (DE)；沙欣 烏古爾 SAHIN, UGUR (TR)；吉塞克 弗里德里克 GIESEKE, FRIEDERIKE (DE)；特朗科維 祖扎娜 吉拉科娃 TRNKOVA, ZUZANA JIRAKOVA (CZ)

(74)代理人：陳彥希；何愛文

(56)參考文獻：

WO 2018/033254A2 WO 2018/160540A1

審查人員：方冠岳

申請專利範圍項數：37 項 圖式數：11 共 313 頁

(54)名稱

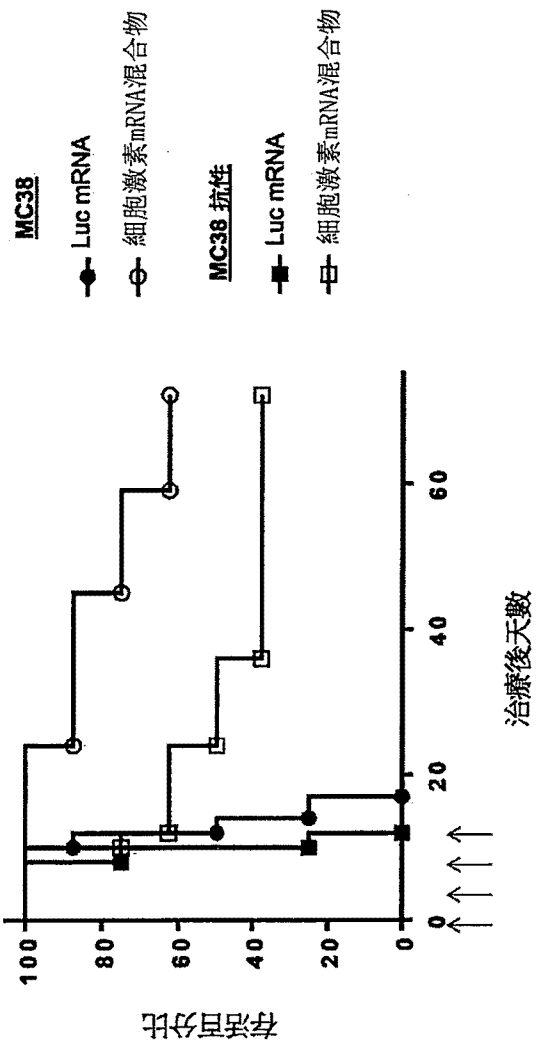
用於晚期實性瘤癌症之治療性 RNA 及抗 PD1 抗體

(57)摘要

本揭露關於治療性 RNA 的領域，該治療性 RNA 用於治療抗計劃性細胞死亡 1(PD-1)或抗計劃性細胞死亡 1 配位基 1(PD-L1)療法、包括先天性和後天型 PD-1 和/或 PD-L1 療法已經失敗或對其變得不耐受、有抗性或難治之受試者以及患有晚期、不可切除或轉移性實性瘤癌症，無論是否抗計劃性細胞死亡 1(PD-1)或抗計劃性細胞死亡 1 配位基 1(PD-L1)療法失敗或對其不耐受、有抗性或難治之受試者。

This disclosure relates to the field of therapeutic RNAs for treatment of subjects that have failed, or become intolerant, resistant, or refractory to an anti-programmed cell death 1 (PD-1) or anti-programmed cell death 1 ligand 1 (PD-L1) therapy, including innate and acquired PD-1 and/or PD-L1 therapy, as well as in subjects with advanced-stage, unresectable, or metastatic solid tumor cancers with or without failure, intolerance, resistance, or refraction to an anti-programmed cell death 1 (PD-1) or anti-programmed cell death 1 ligand 1 (PD-L1) therapy.

指定代表圖：


MC38
Luc mRNA
細胞激素mRNA混合物
MC38 抗性
Luc mRNA
細胞激素mRNA混合物
存活百分比
100
80
60
40
20
0
0
20
40
60
治療後天數

【圖7】

I850316

【發明摘要】

【中文發明名稱】 用於晚期實性瘤癌症之治療性RNA及抗PD1抗體

【英文發明名稱】 THERAPEUTIC RNA AND ANTI-PD1 ANTIBODIES FOR ADVANCED STAGE SOLID TUMOR CANCERS

【中文】

本揭露關於治療性RNA的領域，該治療性RNA用於治療抗計劃性細胞死亡1（PD-1）或抗計劃性細胞死亡1配位基1（PD-L1）療法、包括先天性和後天型PD-1和/或PD-L1療法已經失敗或對其變得不耐受、有抗性或難治之受試者以及患有晚期、不可切除或轉移性實性瘤癌症，無論是否抗計劃性細胞死亡1（PD-1）或抗計劃性細胞死亡1配位基1（PD-L1）療法失敗或對其不耐受、有抗性或難治之受試者。

【英文】

This disclosure relates to the field of therapeutic RNAs for treatment of subjects that have failed, or become intolerant, resistant, or refractory to an anti-programmed cell death 1 (PD-1) or anti-programmed cell death 1 ligand 1 (PD-L1) therapy, including innate and acquired PD-1 and/or PD-L1 therapy, as well as in subjects with advanced-stage, unresectable, or metastatic solid tumor cancers with or without failure, intolerance, resistance, or refraction to an anti-programmed cell death 1 (PD-1) or anti-programmed cell death 1 ligand 1 (PD-L1) therapy.

【指定代表圖】

圖7

【代表圖之符號簡單說明】

無

【特徵化學式】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】 用於晚期實性瘤癌症之治療性RNA及抗PD1抗體

【英文發明名稱】 THERAPEUTIC RNA AND ANTI-PD1 ANTIBODIES FOR ADVANCED STAGE SOLID TUMOR CANCERS

【技術領域】

【0001】 本申請要求2019年1月21日提交的美國臨時申請案號62/794,896、2019年10月25日提交的美國臨時申請案號62/926,379和2019年11月14日提交的歐洲專利申請案號19306471.4之優先權權益，出於所有目的，每項申請之內容藉由引用以其全文併入本文。

【先前技術】

【0002】 本揭露關於用於治療實性瘤癌症的治療性RNA領域，包括，例如，在抗計劃性細胞死亡1（PD-1）或抗計劃性細胞死亡1配位基（PD-L1）療法失敗或對其變得不耐受、有抗性或難治之受試者，包括對抗計劃性細胞死亡1（PD-1）或抗計劃性細胞死亡1配位基（PD-L1）療法具有後天型或先天性抗性之受試者，以及患有晚期或轉移性實性瘤之受試者中之治療。

【0003】 美國國家癌症研究所將實性瘤定義為通常不包含囊腫或液體區域之異常組織塊。實性瘤在身體上可以位於包括卵巢、乳房、結腸和其他組織在內的任何組織或器官中，並且包括黑色素瘤、皮膚鱗狀上皮細胞癌（CSCC）、頭頸部鱗狀上皮細胞癌（HNSCC）、非小細胞肺癌、腎癌、頭頸癌、甲狀腺癌、結腸癌、肝癌、卵巢癌、乳癌。

【0004】 免疫檢查點阻斷（諸如抗PD-1和抗PD-L1）療法在臨床上可引起抗癌反應，但是很大比例的患者無法從治療中受益。已經明確了對檢查點阻斷的先天性和後天型抗性的幾種機制，包括MHC I和IFNγ訊號傳遞途徑的突變。

參見，例如，Sade-Feldman等人 (2017) Nature Communications 8: 1136；另參見Sharma等人 (2017) Cell 168: 707-723。

【0005】 晚期實性瘤癌症特別難治。現有的治療方法包括手術、放射療法、免疫療法和化學療法。單獨手術可能是小的局部腫瘤之合適治療方法，但大的浸潤性腫瘤可能無法藉由手術切除。其他常見的治療方法（諸如放射線療法和化學療法）會帶來不良的副作用以及對健康細胞的損害。

【0006】 雖然外科手術和現有療法有時能夠殺死大部分實性瘤，但其他細胞（包括潛在的癌症幹細胞）可能在治療後存活下來。隨著時間的流逝，該等細胞可能形成新腫瘤，導致癌症復發。儘管採取了多模式常規療法，許多類型的實性瘤的無病生存率仍不到25%。對多模式治療有抗性或在治療後復發的實性瘤更難以治療，長期生存率不到10%。特別是，對於免疫療法，例如，使用針對抗計劃性細胞死亡蛋白1或其配位基的單株抗體進行之免疫療法（抗PD-1或抗PD-L1療法）失敗的患者而言，存在高需求。

【0007】 本文揭露了可以克服目前在實性瘤的治療中存在的缺點之組成物、用途及方法，該實性瘤諸如晚期、不可切除或轉移性實性瘤癌症，該實性瘤之治療包括在抗計劃性細胞死亡1（PD-1）或抗計劃性細胞死亡1配位基（PD-L1）療法已經失敗或對其變得不耐受、有抗性或難治之受試者中之治療。如本文所揭露的治療性RNA的施用可以減小腫瘤大小，延長至疾病進展時間，和/或防止腫瘤的轉移和/或復發，並最終延長生存時間。

【發明內容】

【0008】 除其他內容外，本文提供了治療患有實性瘤癌症之受試者之方法，包括施用有效量之RNA，該RNA包括編碼IL-12sc蛋白的RNA、編碼IL-15 sushi蛋白的RNA、編碼IFNα蛋白的RNA、和編碼GM-CSF蛋白的RNA，以及施用有效量之抗計劃性細胞死亡1（PD-1）抗體，其中該受試者為抗計劃性細胞死亡1

（PD-1）或抗計劃性細胞死亡1配位基（PD-L1）療法已經失敗或對其變得不耐受、有抗性或難治之受試者。

【0009】 在一些實施方式中，提供了在抗計劃性細胞死亡1（PD-1）或抗計劃性細胞死亡1配位基（PD-L1）療法已經失敗或對其變得不耐受、有抗性或難治之受試者中治療實性瘤癌症之方法，包括向抗計劃性細胞死亡1（PD-1）或抗計劃性細胞死亡1配位基（PD-L1）療法已經失敗或對其變得不耐受、有抗性或難治之受試者施用有效量之RNA，該RNA包括編碼IL-12sc蛋白的RNA、編碼IL-15 sushi蛋白的RNA、編碼IFNα蛋白的RNA和編碼GM-CSF蛋白的RNA，以及施用有效量之抗計劃性細胞死亡1（PD-1）抗體。

【0010】 提供了治療患有抗PD-1和/或抗PD-L1抗性實性瘤癌症之受試者之方法，包括向患有抗PD-1和/或抗PD-L1抗性實性瘤癌症之受試者施用有效量之RNA，該RNA包括編碼IL-12sc蛋白的RNA、編碼IL-15 sushi蛋白的RNA、編碼IFNα蛋白的RNA和編碼GM-CSF蛋白的RNA，以及施用有效量之抗計劃性細胞死亡1（PD-1）抗體。

【0011】 本文包括治療對抗PD-1和/或抗PD-L1療法具有後天型抗性的患有實性瘤癌症之受試者之方法，包括向對抗PD-1和/或抗PD-L1療法具有後天型抗性的患有實性瘤癌症之受試者施用有效量之RNA，該RNA包括編碼IL-12sc蛋白的RNA、編碼IL-15 sushi蛋白的RNA、編碼IFNα蛋白的RNA和編碼GM-CSF蛋白的RNA，以及施用有效量之抗計劃性細胞死亡1（PD-1）抗體。

【0012】 在一些實施方式中，提供了治療對抗PD-1和/或抗PD-L1療法具有先天性抗性的患有實性瘤癌症之受試者之方法，包括向對抗PD-1和/或抗PD-L1療法具有先天性抗性的患有實性瘤癌症之受試者施用有效量之RNA，該RNA包括編碼IL-12sc蛋白的RNA、編碼IL-15 sushi蛋白的RNA、編碼IFNα蛋白的RNA和編碼GM-CSF蛋白的RNA，以及施用有效量之抗計劃性細胞死亡1（PD-1）抗體。

【0013】 本文提供之實施方式不受關於不耐受、抗性或難治性的任何科學理論的限制。

【0014】 在一些實施方式中，對抗PD-1和/或抗PD-1療法的不耐受性、抗性、難治性（包括後天型和先天性抗性）係由包含β-2-微球蛋白（B2M）功能之部分或全部損失之癌細胞引起的。在一些實施方式中，受試者具有包含β-2-微球蛋白（B2M）功能之部分或全部損失之癌細胞。在一些實施方式中，該癌細胞具有B2M功能之部分損失。在一些實施方式中，該癌細胞具有B2M功能之全部損失。在一些實施方式中，藉由將癌細胞與來自同一受試者的非癌細胞進行比較來評估B2M功能之部分或全部損失，視需要其中非癌細胞來自癌細胞所源自的相同組織。在一些實施方式中，該癌細胞在實性瘤中，該實性瘤包含具有正常B2M功能之癌細胞。在一些實施方式中，該癌細胞在實性瘤中，其中25%或更多的癌細胞的B2M功能部分或全部損失。在一些實施方式中，該癌細胞在實性瘤中，其中50%或更多的癌細胞的B2M功能部分或全部損失。在一些實施方式中，該癌細胞在實性瘤中，其中75%或更多的癌細胞的B2M功能部分或全部損失。在一些實施方式中，該癌細胞在實性瘤中，其中95%或更多的癌細胞的B2M功能部分或全部損失。在一些實施方式中，與該實性瘤所源自的正常細胞或組織相比，該實性瘤整體上（例如，如在從該實性瘤進行的生物檢體中所評估的）的B2M功能部分或全部損失。在一些實施方式中，該受試者具有B2M基因中的突變（例如，因其導致的功能之部分或全部損失）。該突變可能是取代、插入或缺失。在一些實施方式中，該B2M基因包含異質性消失（LOH）。

【0015】 在一些實施方式中，該突變係框移突變。在一些實施方式中，該框移突變發生在B2M的外顯子1中。在一些實施方式中，該框移突變包含p.Leu13fs和/或p.Ser14fs。在一些實施方式中，與沒有發生B2M功能之部分或全部損失之受試者相比，該受試者具有降低的B2M蛋白水平。

【0016】 在一些情況下，該實性瘤（例如，該實性瘤內的癌細胞）具有降低的細胞表面表現（在本文中也稱為「表面表現」）的主要組織相容性複合物I類（MHC I）的量。在一些實施方式中，實性瘤樣本（例如，包括該實性瘤的癌細胞的生物檢體物）與對照相比，具有降低的MHC I細胞表面表現量，視需要，其

中該對照係來自同一受試者的相應的非癌樣本。在一些實施方式中，該實性瘤中癌細胞之MHC I表面表現量由於B2M基因的突變而降低。在一些實施方式中，受試者的癌細胞具有降低的MHC I表面表現量。在一些實施方式中，該癌細胞沒有表面表現的MHC I。在一些實施方式中，該降低的MHC I表面表現量藉由將癌細胞與來自同一受試者的非癌細胞進行比較來評估，視需要其中該非癌細胞來自該癌細胞所源自的相同組織。在一些實施方式中，該癌細胞在實性瘤中，該實性瘤包含MHC I表面表現量為正常之癌細胞。在一些實施方式中，該癌細胞在實性瘤中，其中25%或更多的癌細胞具有降低的MHC I表面表現量。在一些實施方式中，該癌細胞在實性瘤中，其中50%或更多的癌細胞具有降低的MHC I表面表現量。在一些實施方式中，該癌細胞在實性瘤中，其中75%或更多的癌細胞具有降低的MHC I表面表現量。在一些實施方式中，該癌細胞在實性瘤中，其中95%或更多的癌細胞具有降低的MHC I表面表現量。在一些實施方式中，該實性瘤整體上（例如，如在取自該實性瘤的生物檢體中所評估的），與該實性瘤所源自的正常細胞或組織相比，具有降低的MHC I表面表現量。

【0017】　在一些實施方式中，提供了用於治療患有晚期、不可切除或轉移性實性瘤癌症之受試者之方法，包括施用有效量之RNA，該RNA包括編碼IL-12sc蛋白的RNA、編碼IL-15 sushi蛋白的RNA、編碼IFNα蛋白的RNA和編碼GM-CSF蛋白的RNA，以及向患有晚期、不可切除或轉移性實性瘤癌症之受試者施用有效量之抗計劃性細胞死亡1（PD-1）抗體。

【0018】　在一些實施方式中，該受試者係抗計劃性細胞死亡1（PD-1）療法已經失敗或對其變得不耐受、有抗性或難治的。在一些實施方式中，該受試者係抗計劃性細胞死亡1配位基（PD-L1）療法已經失敗或對其變得不耐受、有抗性或難治的。

【0019】　在一些實施方式中，該受試者的抗計劃性細胞死亡1（PD-1）療法或抗計劃性細胞死亡1配位基（PD-L1）療法已經失敗。

【0020】 在一些實施方式中，該受試者對抗計劃性細胞死亡1（PD-1）或抗計劃性細胞死亡1配位基（PD-L1）療法已變得不耐受。

【0021】 在一些實施方式中，該受試者已變得對抗計劃性細胞死亡1（PD-1）和/或抗計劃性細胞死亡1配位基（PD-L1）療法具有抗性。

【0022】 在一些實施方式中，該受試者對抗計劃性細胞死亡1（PD-1）或抗計劃性細胞死亡1配位基（PD-L1）療法已變得難治。在一些實施方式中，該難治性或抗性癌症係對指定治療無反應之癌症。在一些實施方式中，該難治性從治療的最開始就發生。在一些實施方式中，該難治性在治療期間發生。

【0023】 在一些實施方式中，該癌症在治療開始之前具有抗性。

在一些實施方式中，該受試者患有對抗計劃性細胞死亡1（PD-1）和/或抗計劃性細胞死亡1配位基（PD-L1）療法無反應之癌症。在一些實施方式中，該受試者患有對指定治療變得難治或有抗性之癌症。在一些實施方式中，該指定治療係抗PD1療法。在一些實施方式中，該指定治療係抗PD-L1療法。在一些實施方式中，自首次接受該療法以來，該受試者對該療法的反應減弱。在一些實施方式中，該受試者尚未接受該療法，但是患有普遍地對該療法無反應的一種類型之癌症。

【0024】 在一些實施方式中，該受試者係人類。

【0025】 在一些實施方式中，該受試者先前未曾使用抗PD-1或抗PD-L1療法治療。在一些實施方式中，該實性瘤癌症係抗PD-1或抗PD-L1療法不作為常規使用的一種癌症。

【0026】 在一些實施方式中，該受試者患有轉移性實性瘤。在一些實施方式中，該受試者患有非轉移性實性瘤。在一些實施方式中，該受試者患有不可切除的實性瘤。在一些實施方式中，該受試者患有轉移性且不可切除的實性瘤。在一些實施方式中，該受試者患有非轉移性且不可切除的實性瘤。

【0027】 在一些實施方式中，該實性瘤係上皮腫瘤、前列腺腫瘤、卵巢腫瘤、腎細胞腫瘤、胃腸道腫瘤、肝腫瘤、大腸直腸腫瘤、脈管系統腫瘤、間皮瘤、

胰腺腫瘤、乳房腫瘤、肉瘤、肺腫瘤、結腸腫瘤、黑色素瘤、小細胞肺腫瘤、神經母細胞瘤、睾丸腫瘤、上皮癌腫瘤、腺癌腫瘤、精原細胞瘤、視網膜母細胞瘤、皮膚鱗狀上皮細胞癌（CSCC）、頭頸部鱗狀上皮細胞癌（HNSCC）、頭頸癌、骨肉瘤、皮膚鱗狀細胞癌（CSCC）、非小細胞肺癌、腎腫瘤、甲狀腺腫瘤、肝腫瘤或其他適於瘤內注射的實性瘤。

【0028】 在一些實施方式中，該實性瘤係淋巴瘤，包括非何杰金氏淋巴瘤或何杰金氏淋巴瘤。

【0029】 在一些實施方式中，該實性瘤癌症係黑色素瘤。在一些實施方式中，該黑色素瘤係葡萄膜黑色素瘤或黏膜黑色素瘤。在一些實施方式中，該實性瘤癌症係黑色素瘤，視需要葡萄膜黑色素瘤或黏膜黑色素瘤，並且包括適於瘤內注射的淺表、皮下和/或淋巴結轉移。

【0030】 在一些實施方式中，瘤內注射包括注射到在淋巴結內轉移的實性瘤中。在一些實施方式中，瘤內注射包括注射到淋巴結內的淋巴瘤中。在一些實施方式中，瘤內注射包括注射到受試者皮膚表面10 cm以內的原發性或繼發性實性瘤中。在一些實施方式中，瘤內注射包括注射到受試者皮膚表面5 cm以內的原發性或繼發性實性瘤中。在一些實施方式中，瘤內注射包括注射到皮膚實性瘤中。在一些實施方式中，該皮膚實性瘤係轉移瘤。在一些實施方式中，該皮膚實性瘤係皮膚癌。在一些實施方式中，該皮膚實性瘤不是皮膚癌。在一些實施方式中，瘤內注射包括注射入皮下實性瘤。在一些實施方式中，該皮下實性瘤係轉移瘤。在一些實施方式中，該皮下實性瘤係皮膚癌。在一些實施方式中，該皮下實性瘤不是皮膚癌。

【0031】 在一些實施方式中，該實性瘤係上皮腫瘤。在一些實施方式中，該實性瘤係前列腺腫瘤。在一些實施方式中，該實性瘤係卵巢腫瘤。在一些實施方式中，該實性瘤係腎細胞腫瘤。在一些實施方式中，該實性瘤係胃腸道腫瘤。在一些實施方式中，該實性瘤係肝腫瘤。在一些實施方式中，該實性瘤係大腸直腸腫瘤。在一些實施方式中，該實性瘤係脈管系統腫瘤。在一些實施方式中，

該實性瘤係間皮瘤。在一些實施方式中，該實性瘤係胰腺腫瘤。在一些實施方式中，該實性瘤係乳房腫瘤。在一些實施方式中，該實性瘤係肉瘤。在一些實施方式中，該實性瘤係肺腫瘤。在一些實施方式中，該實性瘤係結腸腫瘤。在一些實施方式中，該實性瘤係黑色素瘤。在一些實施方式中，該實性瘤係小細胞肺腫瘤。在一些實施方式中，該實性瘤係非小細胞肺癌腫瘤。在一些實施方式中，該實性瘤係神經母細胞瘤。在一些實施方式中，該實性瘤係睾丸腫瘤。在一些實施方式中，該實性瘤係上皮癌腫瘤。在一些實施方式中，該實性瘤係腺癌腫瘤。在一些實施方式中，該實性瘤係精原細胞瘤。在一些實施方式中，該實性瘤係視網膜母細胞瘤。在一些實施方式中，該實性瘤係皮膚鱗狀上皮細胞癌（CSCC）。在一些實施方式中，該實性瘤係頭頸部鱗狀上皮細胞癌（HNSCC）。在一些實施方式中，該實性瘤係HNSCC。在一些實施方式中，該實性瘤係頭頸癌。在一些實施方式中，該實性瘤係骨肉瘤。在一些實施方式中，該實性瘤係腎癌。在一些實施方式中，該實性瘤係甲狀腺癌。在一些實施方式中，該實性瘤係間變性甲狀腺癌（ATC）。在一些實施方式中，該實性瘤係肝癌。在一些實施方式中，該實性瘤係結腸腫瘤。在一些實施方式中，該實性瘤係以上任何兩種。在一些實施方式中，該實性瘤係以上任何兩種或更多種。

【0032】　在一些實施方式中，該實性瘤係淋巴瘤。在一些實施方式中，該實性瘤係非何杰金氏淋巴瘤。在一些實施方式中，該實性瘤係何杰金氏淋巴瘤。在一些實施方式中，該實性瘤淋巴瘤不是中樞神經系統淋巴瘤。

【0033】　在一些實施方式中，該實性瘤癌症係HNSCC。在一些實施方式中，該實性瘤癌症係僅在黏膜部位的黏膜黑色素瘤。在一些實施方式中，該實性瘤癌症係HNSCC和僅在黏膜部位的黏膜黑色素瘤。

【0034】　在一些實施方式中，該實性瘤癌症係葡萄膜黑色素瘤或黏膜黑色素瘤。在一些實施方式中，該實性瘤癌症係乳癌。在一些實施方式中，該實性瘤癌症係乳腺肉瘤或三陰性乳癌。

【0035】　在一些實施方式中，將該等RNA與抗PD-1抗體組合施用。

【0036】 在一些實施方式中，該受試者患有多於一種實性瘤。在一些情況下，至少一種腫瘤對PD-1或PD-L1療法有抗性、難治性或不耐受性。在一些實施方式中，至少一種腫瘤對PD-1或PD-L1療法有抗性、難治性或不耐受性，並且至少一種腫瘤對PD-1或PD-L1療法沒有抗性、難治性或不耐受性。在一些實施方式中，當存在多於一種實性瘤時，成功地治療了抗性和非抗性腫瘤（如果存在）。

【0037】 在一些實施方式中，該實性瘤癌症係III期、III期子集、IV期或IV期子集。在一些實施方式中，該實性瘤癌症係IIIB期、IIIC期或IV期癌症。

【0038】 在一些實施方式中，該實性瘤癌症係晚期的。在一些實施方式中，該實性瘤癌症係不可切除的。在一些實施方式中，該實性瘤癌症係晚期且不可切除的。

【0039】 在一些實施方式中，該實性瘤已經從其起源擴散到受試者的另一個部位。

【0040】 在一些實施方式中，該實性瘤癌症具有一處或多處皮膚或皮下病變。在一些實施方式中，該實性瘤癌症已經轉移。在一些實施方式中，該實性瘤癌症已經轉移，但是不是皮膚癌。

【0041】 在一些實施方式中，該受試者沒有其他治療選擇。

【0042】 在一些實施方式中，該實性瘤癌症係常規使用抗PD1或抗PD-L1療法但尚未用該療法治療的一種癌症。

【0043】 在一些實施方式中，該實性瘤癌症係對抗PD-1或抗PD-L1療法具有抗性和/或難治性的IIIB期、IIIC期或不可切除的IV期黑色素瘤。在一些實施方式中，該實性瘤癌症具有淺表或皮下病變和/或轉移。

【0044】 在一些實施方式中，該受試者患有可根據實性瘤反應評價標準（Response Evaluation Criteria in Solid Tumors，RECIST）1.1標準測量的疾病。在一些實施方式中，該受試者的預期壽命超過3個月。在一些實施方式中，該受試者為至少18歲。

【0045】 在一些實施方式中，將該等RNA瘤內注射。

【0046】 在一些實施方式中，僅在實性瘤癌症的黏膜部位將該等RNA瘤內注射。

【0047】 在一些實施方式中，將該等RNA施用約5個月。在一些實施方式中，將該等RNA每週施用一次。在一些實施方式中，將該等RNA施用最多52週。

【0048】 在一些實施方式中，該IFNα蛋白係IFNα2b蛋白。

【0049】 在一些實施方式中，該編碼IL-12sc蛋白的RNA包含SEQ ID NO: 17或18之核苷酸序列，或者與SEQ ID NO: 17或18之核苷酸序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%同一性之核苷酸序列；和/或該IL-12sc蛋白包含SEQ ID NO: 14的胺基酸序列，或者與SEQ ID NO: 14的胺基酸序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%同一性的胺基酸序列；和/或該編碼IL-12sc蛋白的RNA包含與IL-12sc的p40部分（SEQ ID NO: 17或18的核苷酸1至984）具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%同一性以及與IL-12sc的p30部分（SEQ ID NO: 17或18的核苷酸1027至1623）具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%同一性之核苷酸序列，並且進一步包含p40和p35部分之間編碼連接子（linker）多肽之核苷酸。

【0050】 在一些實施方式中，該編碼IL-15 sushi蛋白的RNA包含SEQ ID NO: 26之核苷酸序列，或與SEQ ID NO: 26之核苷酸序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%同一性之核苷酸序列；和/或該IL-15 sushi蛋白包含SEQ ID NO: 24的胺基酸序列，或者與SEQ ID NO: 24的胺基酸序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%同一性的胺基酸序列；和/或該編碼IL-15 sushi蛋白的RNA包含與IL-15受體α的sushi結構域（SEQ ID NO: 26的核苷酸1至321）具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%同一性以及與成熟IL-15（SEQ ID NO: 26的核苷酸382至729）具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%同一性之核苷酸序列，並且視需要進一步包含IL-15的sushi結構域和成熟IL-15之間編碼連接子多肽之核苷酸。

【0051】 在一些實施方式中，該編碼IFNα蛋白的RNA包含SEQ ID NO: 22或23之核苷酸序列，或與SEQ ID NO: 22或23之核苷酸序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%同一性之核苷酸序列，和/或該IFNα蛋白包含SEQ ID NO: 19的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 19的胺基酸序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%同一性的胺基酸序列。

【0052】 在一些實施方式中，該編碼GM-CSF蛋白的RNA包含SEQ ID NO: 29之核苷酸序列，或與SEQ ID NO: 29之核苷酸序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%同一性之核苷酸序列，和/或該GM-CSF蛋白包含SEQ ID NO: 27的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 27的胺基酸序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%同一性的胺基酸序列。

【0053】 在一些實施方式中，至少一種RNA包含取代至少一個尿苷的經修飾核苷。在一些實施方式中，至少一種RNA包含取代每個尿苷的經修飾核苷。在一些實施方式中，每種RNA包含取代至少一個尿苷的經修飾核苷。在一些實施方式中，每種RNA包含取代每個尿苷的經修飾核苷。在一些實施方式中，該經修飾核苷獨立地選自假尿苷（ψ）、N1-甲基-假尿苷（m1ψ）和5-甲基-尿苷（m5U）。在一些實施方式中，至少一種RNA包含多於一種類型的經修飾核苷，其中該等經修飾核苷獨立地選自假尿苷（ψ）、N1-甲基-假尿苷（m1ψ）和5-甲基-尿苷（m5U）。

在一些實施方式中，該經修飾核苷係N1-甲基-假尿苷（m1ψ）。

【0054】 在一些實施方式中，至少一種RNA包含5'帽$m_2^{7,3'\text{-}O}$Gppp($m_1^{2'\text{-}O}$)ApG（有時也稱為$m_2^{7,3'O}$G(5')ppp(5')$m^{2'\text{-}O}$ApG）。在一些實施方式中，每種RNA包含5'帽$m_2^{7,3'\text{-}O}$Gppp($m_1^{2'\text{-}O}$)ApG（有時也稱為$m_2^{7,3'O}$G(5')ppp(5')$m^{2'\text{-}O}$ApG）。

【0055】 在一些實施方式中，至少一種RNA包含5'UTR，該5'UTR包含選自由SEQ ID NO: 4和6組成之群組之核苷酸序列，或與選自由SEQ ID NO: 4和6組成之群組之核苷酸序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%同一性之核苷酸序列。在一些實施方式中，每種RNA包含5'UTR，該5'UTR包含選

自由SEQ ID NO: 4和6組成之群組之核苷酸序列，或與選自由SEQ ID NO: 4和6組成之群組之核苷酸序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%同一性之核苷酸序列。

【0056】 在一些實施方式中，至少一種RNA包含3'UTR，該3'UTR包含SEQ ID NO: 8之核苷酸序列，或與SEQ ID NO: 8之核苷酸序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%同一性之核苷酸序列。在一些實施方式中，每種RNA包含3'UTR，該3'UTR包含SEQ ID NO: 8之核苷酸序列，或與SEQ ID NO: 8之核苷酸序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%同一性之核苷酸序列。

【0057】 在一些實施方式中，至少一種RNA包含聚A尾。在一些實施方式中，每種RNA包含聚A尾。在一些實施方式中，該聚A尾包含至少100個核苷酸。在一些實施方式中，該聚A尾包含SEQ ID NO: 30所示的聚A尾或由其組成。

【0058】 在一些實施方式中，一種或多種RNA包括：

i. 5' 帽，該5' 帽包含m27,3'-OGppp(m12'-O)ApG或3′-O-Me-m7G(5')ppp(5')G；

ii. 5'UTR，該5'UTR包含(i)選自由SEQ ID NO: 4和6組成之群組之核苷酸序列，或(ii)與選自由SEQ ID NO: 4和6組成之群組之核苷酸序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%同一性之核苷酸序列；

iii. 3'UTR，該3'UTR包含(i) SEQ ID NO: 8之核苷酸序列，或(ii)與SEQ ID NO: 8之核苷酸序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%同一性之核苷酸序列；以及

iv. 包含至少100個核苷酸的聚A尾。

【0059】 在一些實施方式中，該聚A尾包含SEQ ID NO: 30或由其組成。

【0060】 在一些實施方式中，在受試者中治療實性瘤包括減小腫瘤大小或預防癌症轉移。

【0061】 在一些實施方式中，該等RNA係同時施用的。在一些實施方式中，藉由注射施用該等RNA。在一些實施方式中，在注射之前將該等RNA在液體溶液中混合在一起。

【0062】 在一些實施方式中，該抗PD1抗體係西米單抗（cemiplimab）、派姆單抗（pembrolizumab）、納武單抗（nivolumab）、MEDI0608、PDR001、PF-06801591、BGB-A317、皮地珠單抗（pidilizumab）、TSR-042、AGEN-2034、A-0001、BGB-108、BI-754091、CBT-501、ENUM-003、ENUM-388D4、IBI-308、JNJ-63723283、JS-001、JTX-4014、JY-034、CLA-134、STIA-1110、244C8或388D4。在一些實施方式中，該抗PD1抗體係西米單抗。

【0063】 在一些實施方式中，該抗PD1抗體以約0.1至600 mg的劑量施用。在一些實施方式中，該抗PD1抗體以200 mg的劑量施用。在一些實施方式中，該抗PD1抗體以240 mg的劑量施用。在一些實施方式中，該抗PD1抗體以350 mg的劑量施用。在一些實施方式中，該抗PD1抗體藉由注射施用。在一些實施方式中，該抗PD1抗體藉由靜脈內施用。在一些實施方式中，該抗PD-1抗體每三週施用一次。在一些實施方式中，該等RNA和抗PD-1抗體持續施用約8個月。

【0064】 本申請的其他實施方式如下：

實施方式A 1. 一種包含編碼IL-12sc蛋白的RNA、編碼IL-15 sushi蛋白的RNA、編碼IFNα蛋白的RNA和編碼GM-CSF蛋白的RNA的組成物，與抗計劃性細胞死亡1（PD-1）抗體組合用於治療患有實性瘤癌症之受試者，其中該受試者係抗計劃性細胞死亡1（PD-1）或抗計劃性細胞死亡1配位基（PD-L1）療法已經失敗或對其變得不耐受、有抗性或難治的。

實施方式A 2. 一種包含編碼IL-12sc蛋白的RNA的組成物，與抗計劃性細胞死亡1（PD-1）抗體組合用於治療抗計劃性細胞死亡1（PD-1）或抗計劃性細胞死亡1配位基（PD-L1）療法已經失敗或對其變得不耐受、有抗性或難治之受試者，其中將該RNA與編碼IL-15 sushi的

RNA、編碼IFNα蛋白的RNA和編碼GM-CSF蛋白的RNA聯合施用。

實施方式A 3. 一種包含編碼IL-15 sushi蛋白的RNA的組成物，與抗計劃性細胞死亡1（PD-1）抗體組合用於治療抗計劃性細胞死亡1（PD-1）或抗計劃性細胞死亡1配位基（PD-L1）療法已經失敗或對其變得不耐受、有抗性或難治之受試者，其中將該RNA與編碼IL-12sc蛋白的RNA、編碼IFNα蛋白的RNA和編碼GM-CSF蛋白的RNA聯合施用。

實施方式A 4. 一種包含編碼IFNα蛋白的RNA的組成物，與抗計劃性細胞死亡1（PD-1）抗體組合用於治療抗計劃性細胞死亡1（PD-1）或抗計劃性細胞死亡1配位基（PD-L1）療法已經失敗或對其變得不耐受、有抗性或難治之受試者，其中將該RNA與編碼IL-12sc蛋白的RNA、編碼IL-15 sushi蛋白的RNA和編碼GM-CSF蛋白的RNA聯合施用。

實施方式A 5. 一種包含編碼GM-CSF蛋白的RNA的組成物，與抗計劃性細胞死亡1（PD-1）抗體組合用於治療抗計劃性細胞死亡1（PD-1）或抗計劃性細胞死亡1配位基（PD-L1）療法已經失敗或對其變得不耐受、有抗性或難治之受試者，其中將該RNA與編碼IL-12sc蛋白的RNA、編碼IL-15 sushi蛋白的RNA和編碼IFNα蛋白的RNA聯合施用。

實施方式A 6. 如實施方式A 1至5中任一項所述之組成物，其中該受試者係抗計劃性細胞死亡1（PD-1）療法已經失敗或對其變得不耐受、有抗性或難治的。

實施方式A 7. 如實施方式A 1至6中任一項所述之組成物，其中該受試者係抗計劃性細胞死亡1配位基（PD-L1）療法已經失敗或對其變得不耐受、有抗性或難治的。

實施方式A 8. 如實施方式A 1至7中任一項所述之組成物，其中該受試者抗計劃性細胞死亡1（PD-1）療法或抗計劃性細胞死亡1配位基（PD-L1）療法已經失敗。

實施方式A 9. 如實施方式A 1至8中任一項所述之組成物，其中該受試者對抗計劃性細胞死亡1（PD-1）或抗計劃性細胞死亡1配位基（PD-L1）療法變得不耐受。

實施方式A 10. 如實施方式A 1至9中任一項所述之組成物，其中該受試者對抗計劃性細胞死亡1（PD-1）或抗計劃性細胞死亡1配位基（PD-L1）療法變得有抗性。

實施方式A 11. 如實施方式A 1至10中任一項所述之組成物，其中該受試者對抗計劃性細胞死亡1（PD-1）或抗計劃性細胞死亡1配位基（PD-L1）療法變得難治。

實施方式A 12. 如實施方式A 1至11中任一項所述之組成物，其中該難治性或抗性癌症係對指定治療無反應的一種癌症。

實施方式A 13. 如實施方式A 1至12中任一項所述之組成物，其中該難治性從治療的最開始發生。

實施方式A 14. 如實施方式A 1至13中任一項所述之組成物，其中該難治性在治療期間發生。

實施方式A 15. 如實施方式A 1至14中任一項所述之組成物，其中該癌症在治療開始之前有抗性。

實施方式A 16. 如實施方式A 1至15中任一項所述之組成物，其中該受試者患有對抗計劃性細胞死亡1（PD-1）和/或抗計劃性細胞死亡1配位基（PD-L1）療法無反應之癌症。

實施方式A 17. 如實施方式A 1至16中任一項所述之組成物，其中該受試者患有對指定治療變得難治或有抗性之癌症。

實施方式A 18. 如實施方式A 17的組成物，其中該指定治療係抗PD1或抗PD-L1療法。

實施方式A 19. 如實施方式A 1至18中任一項所述之組成物，其中該受試者自首次接受該療法以來對該療法的反應減弱。

實施方式A 20. 如實施方式A 1至19中任一項所述之組成物，其中該受試者尚未接受該療法，但是患有普遍地對該療法無反應的一種類型之癌症。

實施方式A 21. 如實施方式A 1至20中任一項所述之組成物，其中該受試者患有抗PD-1和/或抗PD-L1抗性實性瘤癌症。

實施方式A 22. 如實施方式A 1至21中任一項所述之組成物，其中該受試者患有對抗PD-1和/或抗PD-L1療法具有後天型抗性的實性瘤癌症。

實施方式A 23. 如實施方式A 1至22中任一項所述之組成物，其中該受試者患有對抗PD-1和/或抗PD-L1療法具有先天性抗性的實性瘤癌症。

實施方式A 24. 如實施方式A 1至23中任一項所述之組成物，其中該受試者患有晚期、不可切除的或轉移性實性瘤癌症。

實施方式A 25. 如實施方式A 1至24中任一項所述之組成物，進一步包括選擇抗計劃性細胞死亡1（PD-1）或抗計劃性細胞死亡1配位基（PD-L1）療法已經失敗或對其變得不耐受、有抗性或難治之受試者的初始步驟。

實施方式A 26. 如實施方式A 1至25中任一項所述之組成物，其中該受試者係人類。

實施方式A 27. 如實施方式A 1至26中任一項所述之組成物，其中該受試者患有轉移性實性瘤。

實施方式A 28. 如實施方式A 1至27中任一項所述之組成物，其中該受試者患有不可切除的實性瘤。

實施方式A 29. 如實施方式A 1至28中任一項所述之組成物，其中該受試者的癌細胞包含β2-微球蛋白（B2M）功能之部分或全部損失。

實施方式A 30. 如實施方式A 29所述之組成物，其中該癌細胞具有B2M功能之部分損失。

實施方式A 31. 如實施方式A 29所述之組成物，其中該癌細胞具有B2M功能之全部損失。

實施方式A 32. 如實施方式A 1至31中任一項所述之組成物，其中藉由將癌細胞與來自同一受試者的非癌細胞進行比較來評估B2M功能之部分或全部損失，視需要其中該非癌細胞來自該癌細胞所來自的相同組織。

實施方式A 33. 如實施方式A 1至32中任一項所述之組成物，其中該受試者包含B2M基因中的突變。

實施方式A 34. 如實施方式A 1至33中任一項所述之組成物，其中該突變係取代、插入或缺失。

實施方式A 35. 如實施方式A 1至34中任一項所述之組成物，其中該B2M基因包含異質性消失（LOH）。

實施方式A 36. 如實施方式A 1至35中任一項所述之組成物，其中該受試者包含框移突變。

實施方式A 37. 如實施方式A 1至36中任一項所述之組成物，其中該受試者包含B2M的外顯子1中的框移突變。

實施方式A 38. 如實施方式1至37中任一項所述之組成物，其中該受試者包含框移突變，該框移突變包含p.Leu13fs和/或p.Ser14fs。

實施方式A 39. 如實施方式A 1至38中任一項所述之組成物，其中與沒有部分或全部B2M功能損失之受試者相比，該受試者具有降低的B2M蛋白水平。

實施方式A 40. 如實施方式A 1至39中任一項所述之組成物，該受試者具有與對照相比降低的表面表現的主要組織相容性複合物I類（MHC I）水平，視需要其中該對照係來自同一受試者的非癌症樣本。

實施方式A 41. 如實施方式A 1至40中任一項所述之組成物，其中該實性瘤癌症係上皮腫瘤、前列腺腫瘤、卵巢腫瘤、腎細胞腫瘤、胃腸道腫瘤、肝腫瘤、大腸直腸腫瘤、脈管系統腫瘤、間皮瘤、胰腺腫瘤、乳房腫瘤、肉瘤、肺腫瘤、結腸腫瘤、黑色素瘤、小細胞肺腫瘤、非小細胞肺癌、神經母細胞瘤、睾丸腫瘤、上皮癌腫瘤、腺癌腫瘤、精原細胞瘤、視網膜母細胞瘤、皮膚鱗狀上皮細胞癌（CSCC）、頭頸部鱗狀上皮細胞癌（HNSCC）、頭頸癌、骨肉瘤、腎臟腫瘤、甲狀腺腫瘤、間變性甲狀腺癌（ATC）、肝腫瘤、結腸腫瘤或其他適於瘤內注射的實性瘤。

實施方式A 42. 如實施方式A 1至41中任一項所述之組成物，其中該實性瘤癌症係黑色素瘤。

實施方式A 43. 如實施方式A 1至42中任一項所述之組成物，其中該實性瘤癌症不是黑色素瘤。

實施方式A 44. 如實施方式A 1至42中任一項所述之組成物，其中該實性瘤癌症係黑色素瘤，並且其中該黑色素瘤係葡萄膜黑色素瘤或黏膜黑色素瘤。

實施方式A 45. 如實施方式A 1至43中任一項所述之組成物，其中該實性瘤癌症係具有適於瘤內注射的淺表、皮下和/或淋巴結轉移的黑色素瘤。

實施方式A 46. 如實施方式15所述之組成物，其中該實性瘤癌症係僅在黏膜部位的HNSCC和/或黏膜黑色素瘤。

實施方式A 47. 如實施方式A 1至46中任一項所述之組成物，其中該等RNA作為單一療法施用。

實施方式A 48. 如實施方式A 1至47中任一項所述之組成物，其中該受試者患有多於一種實性瘤。

實施方式A 49. 如實施方式A 1至48中任一項所述之組成物，其中至少一種腫瘤對抗PD-1或抗PD-L1療法具有抗性、難治性或不耐受性，並且至少一種腫瘤對抗PD-1或抗PD-L1療法沒有抗性、難治性或不耐受性。

實施方式A 50. 如實施方式A 49所述之組成物，其中抗性和非抗性腫瘤均得到成功治療。

實施方式A 51. 如實施方式A 1至50中任一項所述之組成物，其中該實性瘤癌症係III期、III期子集、IV期或IV期子集。

實施方式A 52. 如實施方式A 1至51中任一項所述之組成物，其中該實性瘤癌症係晚期且不可切除的。

實施方式A 53. 如實施方式A 1至52中任一項所述之組成物，其中該實性瘤已經從其起源擴散到受試者的另一個部位。

實施方式A 54. 如實施方式A 1至53中任一項所述之組成物，其中該實性瘤癌症具有一處或多處皮膚或皮下病變，視需要其中該癌症不是皮膚癌。

實施方式A 55. 如實施方式A 1至54中任一項所述之組成物，其中該實性瘤癌症係IIIB期、IIIC期或IV期黑色素瘤。

實施方式A 56. 如實施方式A 1至55中任一項所述之組成物，其中該受試者先前未曾接受抗PD-1或抗PD-L1療法治療。

實施方式A 57. 如實施方式A 1至56中任一項所述之組成物，其中該實性瘤癌症係抗PD-1或抗PD-L1療法不作為常規使用的一種癌症。

實施方式A 58. 如實施方式A 1至57中任一項所述之組成物，其中該實性瘤癌症不是黑色素瘤、非小細胞肺癌、腎癌、頭頸癌、乳癌或CSCC。

實施方式A 59. 如實施方式A 1至58中任一項所述之組成物，其中該受試者沒有其他治療選擇。

實施方式A 60. 如實施方式A 1至59中任一項所述之組成物，其中：

a. 該實性瘤癌症不是黑色素瘤、CSCC或HNSCC；以及

b. 抗PD-1或抗PD-L1療法不是常規使用的；以及

c. 沒有其他合適的治療選擇。

實施方式A 61. 如實施方式A 1至60中任一項所述之組成物，其中該實性瘤癌症係常規使用抗PD1或抗PD-L1療法但尚未用該療法治療的一種癌症。

實施方式A 62. 如實施方式A 1至61中任一項所述之組成物，其中該實性瘤癌症係對抗PD-1或抗PD-L1療法有抗性和/或難治性的IIIB期、IIIC期或不可切除的IV期黑色素瘤。

實施方式A 63. 如實施方式A 1至62中任一項所述之組成物，其中該實性瘤癌症具有淺表或皮下病變和/或轉移。

實施方式A 64. 如實施方式A 1至63中任一項所述之組成物，其中該受試者患有兩個或三個腫瘤病變。

實施方式A 65. 如實施方式A 1至64中任一項所述之組成物，其中該受試者患有可根據實性瘤反應評價標準（RECIST）1.1標準測量的疾病。

實施方式A 66. 如實施方式A 1至65中任一項所述之組成物，其中該受試者的預期壽命超過3個月。

實施方式A 67. 如實施方式A 1至66中任一項所述之組成物，其中該受試者為至少18歲。

實施方式A 68. 如實施方式A 1至67中任一項所述之組成物，其中：

a. 該編碼IL-12sc蛋白的RNA包含SEQ ID NO: 17或18之核苷酸序列，或者與SEQ ID NO: 17或18之核苷酸序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%同一性之核苷酸序列；和/或

b. 該IL-12sc蛋白包含SEQ ID NO: 14的胺基酸序列，或者與SEQ ID NO: 14的胺基酸序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%同一性的胺基酸序列；和/或

c. 該編碼IL-12sc蛋白的RNA包含與IL-12sc的p40部分（SEQ ID NO: 17或18的核苷酸1至984）具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%同一性以及與IL-12sc的p30部分（SEQ ID NO: 17或18的核苷酸1027至1623）具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%同一性之核苷酸序列，並且進一步包含p40和p35部分之間編碼連接子多肽之核苷酸。

實施方式A 69. 如實施方式A 1至68中任一項所述之組成物，其中：

a. 該編碼IL-15 sushi蛋白的RNA包含SEQ ID NO: 26之核苷酸序列，或與SEQ ID NO: 26之核苷酸序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%同一性之核苷酸序列；和/或

b. 該IL-15 sushi蛋白包含SEQ ID NO: 24的胺基酸序列，或者與SEQ ID NO: 24的胺基酸序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%同一性的胺基酸序列；和/或

c. 該編碼IL-15 sushi蛋白的RNA包含與IL-15受體α的sushi結構域（SEQ ID NO: 26的核苷酸1至321）具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%同一性以及與成熟IL-15（SEQ ID NO: 26的核苷酸382至729）具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%同一性之核苷酸序列，並且視需要進一步包含IL-15的sushi結構域和成熟IL-15之間編碼連接子多肽之核苷酸。

實施方式A 70. 如實施方式A 1至69中任一項所述之組成物，其中：

a. 該編碼IFNα蛋白的RNA包含SEQ ID NO: 22或23之核苷酸序列，或者與SEQ ID NO: 22或23之核苷酸序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%同一性之核苷酸序列，和/或

b. 該IFNα蛋白包含SEQ ID NO: 19的胺基酸序列，或者與SEQ ID NO: 19的胺基酸序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%同一性的胺基酸序列。

實施方式A 71. 如實施方式A 1至70中任一項所述之組成物，其中：

a. 該編碼GM-CSF蛋白的RNA包含SEQ ID NO: 29之核苷酸序列，或者與SEQ ID NO: 29之核苷酸序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%同一性之核苷酸序列，和/或

b. 該GM-CSF蛋白包含SEQ ID NO: 27的胺基酸序列，或者與SEQ ID NO: 27的胺基酸序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%同一性的胺基酸序列。

實施方式A 72. 如實施方式A 1至71中任一項所述之組成物，其中至少一種RNA包含取代至少一個尿苷的經修飾核苷。

實施方式A 73. 如前述實施方式A 1至72中任一項所述之組成物，其中至少一種RNA包含取代每個尿苷的經修飾核苷。

實施方式A 74. 如實施方式A 1至73中任一項所述之組成物，其中每種RNA包含取代至少一個尿苷的經修飾核苷。

實施方式A 75. 如實施方式A 1至74中任一項所述之組成物，其中每種RNA包含取代每個尿苷的經修飾核苷。

實施方式A 76. 如實施方式A 72-75中任一項所述之組成物，其中該經修飾核苷獨立地選自假尿苷（ψ）、N1-甲基-假尿苷（$m^1\psi$）和5-甲基-尿苷（m^5U）。

實施方式A 77. 如實施方式A 1至76中任一項所述之組成物，其中至少一種RNA包含多於一種類型的經修飾核苷，其中該等經修飾核苷獨立地選自假尿苷（ψ）、N1-甲基-假尿苷（$m^1\psi$）和5-甲基-尿苷（m^5U）。

實施方式A 78. 如實施方式A 77所述之組成物，其中該經修飾核苷係N1-甲基-假尿苷（$m^1\psi$）。

實施方式A 79. 如實施方式A 1至78中任一項所述之組成物，其中至少一種RNA包含5'帽$m_2^{7,3'\text{-}O}$Gppp($m_1^{2'\text{-}O}$)ApG或3′-O-Me-m^7G(5')ppp(5')G。

實施方式A 80. 如實施方式A 1至79中任一項所述之組成物，其中每種RNA包含5'帽$m_2^{7,3'\text{-}O}$Gppp($m_1^{2'\text{-}O}$)ApG或3′-O-Me-m^7G(5')ppp(5')G。

實施方式A 81. 如實施方式A 1至80中任一項所述之組成物，其中至少一種RNA包含5'UTR，該5'UTR包含選自由SEQ ID NO: 4和6組成之群組之核苷酸序列，或與選自由SEQ ID NO: 4和6組成之群組之核苷酸序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%同一性之核苷酸序列。

實施方式A 82. 如實施方式A 1至81中任一項所述之組成物，其中每種RNA包含5'UTR，該5'UTR包含選自由SEQ ID NO: 4和6組成之群組之核苷酸序列，或與選自由SEQ ID NO: 4和6組成之群組之核苷酸序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%同一性之核苷酸序列。

實施方式A 83. 如實施方式A 1至82中任一項所述之組成物，其中至少一種RNA包含3'UTR，該3'UTR包含SEQ ID NO: 8之核苷酸序列，或與SEQ ID NO: 8之核苷酸序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%同一性之核苷酸序列。

實施方式A 84. 如實施方式A 1至83中任一項所述之組成物，其中每種RNA包含3'UTR，該3'UTR包含SEQ ID NO: 8之核苷酸序列，或與SEQ ID NO: 8之核苷酸序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%同一性之核苷酸序列。

實施方式A 85. 如實施方式A 1至84中任一項所述之組成物，其中至少一種RNA包含聚A尾。

實施方式A 86. 如實施方式A 1至85中任一項所述之組成物，其中每種RNA包含聚A尾。

實施方式A 87. 如實施方式A 84或A 85所述之組成物，其中該聚A尾包含至少100個核苷酸。

實施方式A 88. 如實施方式A 85-87中任一項所述之組成物，其中該聚A尾包含SEQ ID NO: 30所示的聚A尾。

實施方式A 89. 如實施方式A 1至88中任一項所述之組成物，其中一種或多種RNA包括：

a. 5'帽，該5'帽包含$m_2^{7,3'-O}Gppp(m_1^{2'-O})ApG$或3′-O-Me-$m^7$G(5')ppp(5')G；

b. 5'UTR，該5'UTR包含 (i) 選自由SEQ ID NO: 4和6組成之群組之核苷酸序列，或 (ii) 與選自由SEQ ID NO: 4和6組成之群組之核苷酸序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%同一性之核苷酸序列；

c. 3'UTR，該3'UTR包含 (i) SEQ ID NO: 8之核苷酸序列，或 (ii) 與SEQ ID NO: 8之核苷酸序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%同一性之核苷酸序列；以及

d. 包含至少100個核苷酸的聚A尾。

實施方式A 90. 如實施方式A 89所述之組成物，其中該聚A尾包含SEQ ID NO: 30。

實施方式A 91. 如實施方式A 1至90中任一項所述之組成物，其中該組成物用於治療人的晚期、不可切除或轉移性實性瘤癌症。

實施方式A 92. 如實施方式A 1至91中任一項所述之組成物，其中在受試者中治療實性瘤包括減小腫瘤大小或預防癌症轉移。

實施方式A 93. 如實施方式A 1至92中任一項所述之組成物，其中該等RNA同時施用。

實施方式A 94. 如實施方式A 1至93中任一項所述之組成物，其中該等RNA藉由注射施用。

實施方式A 95. 如實施方式A 93或A 94所述之組成物，其中在注射之前將該等RNA在液體溶液中混合在一起。

實施方式A 96. 如實施方式A1至A96中任一項所述之組成物，其中該實性瘤癌症包括淋巴瘤。

實施方式A 97. 如實施方式A1至A96中任一項所述之組成物，其中該實性瘤癌症包括何杰金氏淋巴瘤。

實施方式A 98. 如實施方式A1至A96中任一項所述之組成物，其中該實性瘤癌症包括非何杰金氏淋巴瘤。

【0065】 本申請的其他實施方式如下：

實施方式B 1. 一種治療晚期、不可切除的或轉移性實性瘤癌症之方法，包括對患有晚期、不可切除的或轉移性實性瘤癌症之受試者施用：

i. 編碼IL-12sc蛋白的RNA、編碼IL-15 sushi蛋白的RNA、編碼IFNα蛋白的RNA和編碼GM-CSF蛋白的RNA；以及

ii. 抗計劃性細胞死亡1（PD-1）抗體，

從而治療晚期、不可切除的或轉移性實體瘤癌症。

實施方式B 2. 如實施方式B 1所述之方法，其中該實性瘤癌症係III期，III期子集，IV期或IV期子集。

實施方式B 3. 如前述實施方式中任一項所述之方法，其中該實性瘤癌症係晚期且不可切除的。

實施方式B 4. 如前述實施方式中任一項所述之方法，其中該實性瘤已經從其起源擴散到受試者的另一個部位。

實施方式B 5. 如前述實施方式中任一項所述之方法，其中該實性瘤癌症係III期、IIIB期、IIIC期或IV期癌症。

實施方式B 6. 如實施方式B5之方法，其中該IV期癌症係不可切除的。

實施方式B 7. 如前述實施方式中任一項所述之方法，其中該實性瘤癌症係黑色素瘤、皮膚鱗狀上皮細胞癌（CSCC）、頭頸部鱗狀上皮細胞癌

（HNSCC）、非小細胞肺癌、腎癌、頭頸癌、甲狀腺癌、結腸癌、肝癌、卵巢癌、乳癌或其他適於瘤內注射的實性瘤。

實施方式B 8. 如前述實施方式中任一項所述之方法，其中該實性瘤癌症係黑色素瘤。

實施方式B 9. 如前述實施方式中任一項所述之方法，其中該實性瘤癌症係乳癌，例如，乳腺肉瘤、三陰性乳癌。

實施方式B 10. 如前述實施方式中任一項所述之方法，其中該實性瘤癌症係卵巢癌。

實施方式B 11. 如實施方式B10所述之方法，其中該卵巢癌對基於鉑的化學療法具有抗性。

實施方式B 12. 如前述實施方式中任一項所述之方法，其中該實性瘤癌症係甲狀腺癌。

實施方式B 13. 如實施方式B12之方法，其中該甲狀腺癌係間變性甲狀腺癌（ATC）。

實施方式B 14. 如前述實施方式中任一項所述之方法，其中該實性瘤癌症具有一處或多處皮膚或皮下病變（例如，轉移），但不是皮膚癌。

實施方式B 15. 如前述實施方式中任一項所述之方法，其中該實性瘤癌症係IIIB期、IIIC期或IV期黑色素瘤。

實施方式B 16. 如前述實施方式中任一項所述之方法，其中該受試者係抗計劃性細胞死亡1（PD-1）或抗計劃性細胞死亡1配位基（PD-L1）療法失敗或對其變得不耐受、有抗性或難治的。

實施方式B 17. 如前述實施方式中任一項所述之方法，其中該實性瘤癌症係黑色素瘤、非小細胞肺癌、腎癌、頭頸癌。

實施方式B 18. 如前述實施方式中任一項所述之方法，其中該受試者先前未曾接受抗PD-1或抗PD-L1療法治療。

實施方式B 19. 如前述實施方式中任一項所述之方法，其中該實性瘤癌症係抗PD-1或抗PD-L1療法不作為常規使用的一種癌症。

實施方式B 20. 如實施方式B19所述之方法，其中該實性瘤癌症不是黑色素瘤、非小細胞肺癌、腎癌、頭頸癌、皮膚鱗狀上皮細胞癌（CSCC）、頭頸部鱗狀上皮細胞癌（HNSCC）。

實施方式B 21. 如前述實施方式中任一項所述之方法，其中該受試者沒有其他治療選擇。

實施方式B 22. 如實施方式B1所述之方法，其中：

a. 該實性瘤癌症不是黑色素瘤、皮膚鱗狀上皮細胞癌或頭頸部鱗狀上皮細胞癌；以及

b. 抗PD-1或抗PD-L1療法不是常規使用的；以及

c. 沒有其他合適的治療選擇。

實施方式B 23. 如前述實施方式中任一項所述之方法，其中該實性瘤癌症係常規使用抗PD1或抗PD-L1療法但尚未用該療法治療的癌症（例如頭頸癌、HNSCC或CSCC）。

實施方式B 24. 如實施方式B1所述之方法，其中該實性瘤癌症係對抗PD-1或抗PD-L1療法有抗性和/或難治性的IIIB期、IIIC期或不可切除的IV期黑色素瘤。

實施方式B 25. 如實施方式B1所述之方法，其中該實性瘤癌症係對抗PD-1或抗PD-L1療法有抗性和/或難治性的皮膚鱗狀上皮細胞癌或頭頸部鱗狀上皮細胞癌的III期或不可切除的IV期。

實施方式B 26. 如前述實施方式中任一項所述之方法，其中該實性瘤癌症具有淺表或皮下病變和/或轉移。

實施方式B 27. 如前述實施方式中任一項所述之方法，其中該實性瘤癌症係上皮腫瘤、前列腺腫瘤、卵巢腫瘤、腎細胞腫瘤、胃腸道腫瘤、肝腫瘤、大腸直腸腫瘤、脈管系統腫瘤、間皮瘤、胰腺腫瘤、乳房腫

瘤、肉瘤、肺腫瘤、結腸腫瘤、黑色素瘤、小細胞肺腫瘤、神經母細胞瘤、睾丸腫瘤、上皮癌腫瘤、腺癌腫瘤、精原細胞瘤、視網膜母細胞瘤、皮膚鱗狀上皮細胞癌（CSCC）、頭頸部鱗狀上皮細胞癌（HNSCC）、頭頸癌或骨肉瘤。

實施方式B 28. 如前述實施方式中任一項所述之方法，其中該受試者患有兩個或三個腫瘤病變。

實施方式B 29. 如前述實施方式中任一項所述之方法，其中該受試者患有可根據實性瘤反應評價標準（RECIST）1.1標準測量的疾病。

實施方式B 30. 如前述實施方式中任一項所述之方法，其中該受試者的預期壽命超過3個月。

實施方式B 31. 如前述實施方式中任一項所述之方法，其中該受試者為至少18歲。

實施方式B 32. 一種治療晚期黑色素瘤、皮膚鱗狀上皮細胞癌或頭頸部鱗狀上皮細胞癌之方法，包括：

對患有晚期黑色素瘤、皮膚鱗狀上皮細胞癌或頭頸部鱗狀上皮細胞癌之受試者施用，

i. 編碼IL-12sc蛋白的RNA、編碼IL-15 sushi蛋白的RNA、編碼IFNα蛋白的RNA和編碼GM-CSF蛋白的RNA；以及

ii. 抗PD1抗體，

其中

a. 該受試者為至少18歲；

b. 該受試者先前的抗PD1或抗PD-L1療法失敗；

c. 該受試者至少有2處病變；以及

d. 該黑色素瘤包括適合於直接瘤內注射的腫瘤。

實施方式B 33. 如實施方式B 32所述之方法，其中該受試者患有可根據實性瘤反應評價標準（RECIST）1.1標準測量的疾病。

實施方式B 34. 如實施方式B 32所述之方法，其中該受試者的預期壽命超過3個月。

實施方式B 35. 如前述實施方式中任一項所述之方法，其中該抗PD1抗體係西米單抗、派姆單抗、納武單抗、MEDI0608、PDR001、PF-06801591、BGB-A317、皮地珠單抗、TSR-042、AGEN-2034、A-0001、BGB-108、BI-754091、CBT-501、ENUM-003、ENUM-388D4、IBI-308、JNJ-63723283、JS-001、JTX-4014、JY-034、CLA-134、STIA-1110、244C8或388D4。

實施方式B 36. 如前述實施方式中任一項所述之方法，其中該抗PD1抗體係西米單抗。

實施方式B 37. 如前述實施方式中任一項所述之方法，其中該抗PD1抗體以約0.1至600 mg的劑量施用。

實施方式B 38. 如前述實施方式中任一項所述之方法，其中該抗PD1抗體以200 mg、240 mg或350 mg的劑量施用。

實施方式B 39. 如前述實施方式中任一項所述之方法，其中該抗PD1抗體藉由注射施用。

實施方式B 40. 如前述實施方式中任一項所述之方法，其中該抗PD1抗體藉由靜脈內施用。

實施方式B 41. 如前述實施方式中任一項所述之方法，其中該抗PD-1抗體每三週施用一次。

實施方式B 42. 如前述實施方式中任一項所述之方法，其中該等RNA係瘤內注射的。

實施方式B 43. 如前述實施方式中任一項所述之方法，其中該等RNA和抗PD-1抗體持續施用約8個月。

實施方式B 44. 如前述中任一項所述之方法，其中該等RNA每週施用一次。

實施方式B 45. 如前述實施方式中任一項所述之方法，其中該等RNA持續施用最多52週。

實施方式B 46. 如前述實施方式中任一項所述之方法，其中該IFNα蛋白係IFNα2b蛋白。

實施方式B 47. 如前述實施方式中任一項所述之方法，其中：

a. 該編碼IL-12sc蛋白的RNA包含SEQ ID NO: 17或18之核苷酸序列，或者與SEQ ID NO: 17或18之核苷酸序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%同一性之核苷酸序列；和/或

b. 該IL-12sc蛋白包含SEQ ID NO: 14的胺基酸序列，或者與SEQ ID NO: 14的胺基酸序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%同一性的胺基酸序列；和/或

c. 該編碼IL-12sc蛋白的RNA包含與IL-12sc的p40部分（SEQ ID NO: 17或18的核苷酸1至984）具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%同一性以及與IL-12sc的p30部分（SEQ ID NO: 17或18的核苷酸1027至1623）具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%同一性之核苷酸序列，並且進一步包含p40和p35部分之間編碼連接子多肽之核苷酸。

實施方式B 48. 如前述實施方式中任一項所述之方法，其中：

a. 該編碼IL-15 sushi蛋白的RNA包含SEQ ID NO: 26之核苷酸序列，或與SEQ ID NO: 26之核苷酸序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%同一性之核苷酸序列；和/或

b. 該IL-15 sushi蛋白包含SEQ ID NO: 24的胺基酸序列，或者與SEQ ID NO: 24的胺基酸序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%同一性的胺基酸序列；和/或

c. 該編碼IL-15 sushi蛋白的RNA包含與IL-15受體α的sushi結構域（SEQ ID NO: 26的核苷酸1至321）具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%同一性以及與成熟IL-15（SEQ ID NO: 26的核苷酸382至729）具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%同一性之核苷酸序列，並且視需要進一步包含IL-15的sushi結構域和成熟IL-15之間編碼連接子多肽之核苷酸。

實施方式B 49. 如前述實施方式中任一項所述之方法，其中：

a. 該編碼IFNα蛋白的RNA包含SEQ ID NO: 22或23之核苷酸序列，或者與SEQ ID NO: 22或23之核苷酸序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%同一性之核苷酸序列，和/或

b. 該IFNα蛋白包含SEQ ID NO: 19的胺基酸序列，或者與SEQ ID NO: 19的胺基酸序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%同一性的胺基酸序列。

實施方式B 50. 如前述實施方式中任一項所述之方法，其中：

a. 該編碼GM-CSF蛋白的RNA包含SEQ ID NO: 29之核苷酸序列，或者與SEQ ID NO: 29之核苷酸序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%同一性之核苷酸序列，和/或

b. 該GM-CSF蛋白包含SEQ ID NO: 27的胺基酸序列，或者與SEQ ID NO: 27的胺基酸序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%同一性的胺基酸序列。

實施方式B 51. 如前述實施方式中任一項所述之方法，其中至少一種RNA包含取代至少一個尿苷的經修飾核苷。

實施方式B 52. 如前述實施方式中任一項所述之方法，其中至少一種RNA包含取代每個尿苷的經修飾核苷。

實施方式B 53. 如前述實施方式中任一項所述之方法，其中每種RNA包含取代至少一個尿苷的經修飾核苷。

實施方式B 54. 如前述實施方式中任一項所述之方法，其中每種RNA包含取代每個尿苷的經修飾核苷。

實施方式B 55. 如實施方式B 51至54中任一項所述之方法，其中該經修飾核苷獨立地選自假尿苷（ψ）、N1-甲基-假尿苷（m1ψ）和5-甲基-尿苷（m5U）。

實施方式B 56. 如前述實施方式中任一項所述之方法，其中至少一種RNA包含多於一種類型的經修飾核苷，其中該等經修飾核苷獨立地選自假尿苷（ψ）、N1-甲基-假尿苷（m1ψ）和5-甲基-尿苷（m5U）。

實施方式B 57. 如實施方式B 56所述之方法，其中該經修飾核苷係N1-甲基-假尿苷（m1ψ）。

實施方式B 58. 如前述實施方式中任一項所述之方法，其中至少一種RNA包含5'帽m27,3'-OGppp(m12'-O)ApG或3′-O-Me-m7G(5')ppp(5')G。

實施方式B 59. 如前述實施方式中任一項所述之方法，其中每種RNA包含5'帽m27,3'-OGppp(m12'-O)ApG或3′-O-Me-m7G(5')ppp(5')G。

實施方式B 60. 如前述實施方式中任一項所述之方法，其中至少一種RNA包含5'UTR，該5'UTR包含選自由SEQ ID NO: 4和6組成之群組之核苷酸序列，或與選自由SEQ ID NO: 4和6組成之群組之核苷酸序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%同一性之核苷酸序列。

實施方式B 61. 如前述實施方式中任一項所述之方法，其中每種RNA包含5'UTR，該5'UTR包含選自由SEQ ID NO: 4和6組成之群組之核苷酸序列，或與選自由SEQ ID NO: 4和6組成之群組之核苷酸序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%同一性之核苷酸序列。

實施方式B 62. 如前述實施方式中任一項所述之方法，其中至少一種RNA包含3'UTR，該3'UTR包含SEQ ID NO: 8之核苷酸序列，或與SEQ ID NO: 8之核苷酸序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%同一性之核苷酸序列。

實施方式B 63. 如前述實施方式中任一項所述之方法，其中每種RNA包含3'UTR，該3'UTR包含SEQ ID NO: 8之核苷酸序列，或與SEQ ID NO: 8之核苷酸序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%同一性之核苷酸序列。

實施方式B 64. 如前述實施方式中任一項所述之方法，其中至少一種RNA包含聚A尾。

實施方式B 65. 如前述實施方式中任一項所述之方法，其中每種RNA包含聚A尾。

實施方式B 66. 如實施方式B 64或65所述之方法，其中該聚A尾包含至少100個核苷酸。

實施方式B 67. 如實施方式B 64或65所述之方法，其中該聚A尾包括SEQ ID NO: 30所示的聚A尾。

實施方式B 68. 如前述實施方式中任一項所述之方法，其中一種或多種RNA包括：

a. 5' 帽，該5' 帽包含m27,3'-OGppp(m12'-O)ApG或3′-O-Me-m7G(5')ppp(5')G；

b. 5'UTR，該5'UTR包含 (i) 選自由SEQ ID NO: 4和6組成之群組之核苷酸序列，或 (ii) 與選自由SEQ ID NO: 4和6組成之群組

之核苷酸序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%同一性之核苷酸序列；

c. 3'UTR，該3'UTR包含 (i) SEQ ID NO: 8之核苷酸序列，或 (ii) 與SEQ ID NO: 8之核苷酸序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%同一性之核苷酸序列；以及

d. 包含至少100個核苷酸的聚A尾。

實施方式B 69. 如實施方式B 68所述之方法，其中該聚A尾包含SEQ ID NO: 30。

實施方式B 70. 如前述實施方式中任一項所述之方法，其中該受試者係人類。

實施方式B 71. 如前述實施方式中任一項所述之方法，其中在受試者中治療實性瘤包括減小腫瘤大小或預防癌症轉移。

實施方式B 72. 如前述實施方式中任一項所述之方法，其中該等RNA同時施用。

實施方式B 73. 如前述實施方式中任一項所述之方法，其中該等RNA藉由注射施用。

實施方式B 74. 如實施方式B 72或73所述之方法，其中在注射之前將該等RNA在液體溶液中混合在一起。

【圖式簡單說明】

【0066】 **圖1A**示出了治療的示例性總體設計。

【0067】 **圖1B**示出了作為單一療法施用細胞激素RNA混合物之示例性治療方案。

【0068】 **圖1C**示出了作為抗PD-1抗體的組合療法施用細胞激素RNA混合物之示例性治療方案。

【0069】 **圖2A至2I**示出了對抗PD-1療法的後天型抗性的鼠類模型的創建和表徵。**圖2A至2B**示出了PD-1抗性腫瘤系的產生。**圖2A**係體內傳代方法之示意圖。簡而言之，對攜帶MC38腫瘤的C57BL6小鼠用抗PD-1抗體（殖株RMP1-14）進行治療，切除生長中的腫瘤，並在植入空白小鼠之前離體培養來自該等腫瘤的

細胞。**圖2B**示出了在用10 mg/kg抗PD-1抗體治療的C57BL6/J小鼠中植入的MC38和MC38抗性腫瘤細胞株之腫瘤生長曲線（n = 5/組）。如箭頭所示施用抗體治療。**圖2C至2E**表明，MC38抗性細胞沒有表現出PD-1抗性的已知分子機制。在體外培養MC38和MC38抗性細胞，並藉由流式細胞分析技術測定不同蛋白質之表現。**圖2C**係示出PD-L1、B2M以及IFNGR1和IFNGR2的表面表現的一系列圖。線條，未染色；填充，染色的樣本。**圖2D**係示出體外IFNγ治療後PD-L1表現之圖。**圖2E**係示出SIINFEKL-MHC I複合物在OVA轉導的細胞中的表現之圖。對細胞進行轉導以表現卵清蛋白，並測定在MHCI中SIINFEKL的呈遞。**圖2F至2I**示出了切除並且藉由RNA定序分析的皮下腫瘤。**圖2F**示出了與親本MC38（n = 16）相比，在抗性腫瘤（n = 13）中失調的許多基因的整體基因表現。**圖2G**顯示在MC38抗性腫瘤中IFNγ目標基因的表現降低。**圖2H**示出了MCPCounter分析，該分析估計了相對免疫豐度，揭示了T、NK、B細胞譜系和單核細胞譜系細胞顯著減少。*，$p < 0.05$。**圖2I**示出了藉由流式細胞分析技術在$CD8^+$ T細胞（$CD45^+CD3^+CD4^-CD8^+$）、$CD4^+$ T細胞（$CD45^+CD3^+CD4^+CD8^-$）、巨噬細胞（$CD45^+CD11b^+F4/80^+$）和自然殺手細胞（$CD45^+CD3^-CD49b^+NK1.1^+$）中的免疫浸潤。結果代表兩個獨立的實驗，每組n = 9。*表示$p < 0.05$，** $p < 0.01$，*** $p < 0.001$和**** $p < 0.0001$。

【0070】　**圖3**顯示MC38抗性細胞不表現PD-L2。在體外培養MC38和MC38抗性細胞，並藉由流式細胞分析技術測定不同蛋白質之表現。示出了IFNγ治療後的PD-L2表現。

【0071】　**圖4A至4B**顯示藉由免疫組織化學染色，抗性腫瘤中免疫細胞之頻率降低。藉由免疫組織化學染色分析了石蠟包埋的MC38和MC38抗性腫瘤對$CD45^+$細胞（深色）之浸潤。結果代表了兩個獨立的實驗；每組n = 10個腫瘤。**圖4A**示出了代表性圖像。**圖4B**示出了定量。

【0072】　**圖5A至5B**顯示抗性腫瘤的免疫原性降低。細胞毒性T淋巴細胞（CTL）培養物係從攜帶親本MC38腫瘤的5隻個體C57BL6小鼠中產生的，該等

小鼠表現出響應於PD-1阻斷的完全消退。將CTL與MC38和抗性腫瘤細胞共培養，並測量殺傷（**圖5A**）和IFNγ釋放（**圖5B**）。

【0073】 **圖6A至6D**顯示，如藉由腫瘤負荷所測量的，藉由瘤內注射細胞激素RNA混合物成功治療了攜帶皮下MC38或MC38抗性腫瘤的C57BL6/J小鼠（**圖6B和6D**）。每四天（如箭頭所示）以40 μg總mRNA的劑量施用mRNA治療。「Luc」（**圖6A和6C**）表示螢光素酶對照mRNA。

【0074】 **圖7**顯示，如藉由總體存活率所測量的，藉由瘤內注射細胞激素RNA混合物成功治療了攜帶皮下MC38或MC38抗性腫瘤的C57BL6/J小鼠。每四天（如箭頭所示）以40 μg總mRNA的劑量施用mRNA治療。「Luc」表示螢光素酶對照mRNA。

【0075】 **圖8A至8B**示出了MC38（**圖8A**）和B2M缺失的MC38（**圖8B**）中β-2微球蛋白（B2M）表面表現的流式細胞分析技術分析。

【0076】 **圖9A至9D**顯示，細胞激素RNA混合物與抗PD-1抗體的組合提高了雙側B16F10癌症模型（**圖9A**）和MC38腫瘤模型（**圖9B**）的存活率。用細胞激素RNA混合物治療的單側MC38-B2M基因敲除（**圖9C**）或帶有MC38-B2M基因敲除/MC38-WT腫瘤的異源雙側模型（**圖9D**）的總體存活率。

【0077】 **圖10**示出了在各種體內實性瘤癌症模型中，在細胞激素mRNA混合物、抗PD-1或者細胞激素mRNA混合物與抗PD-1療法的組合治療後腫瘤體積的變化。數值對應於相對於基線的腫瘤體積變化（ΔT/ΔC，%）。藉由從所有對照小鼠都仍存活的最後一天的腫瘤體積中減去第一次治療當天的腫瘤體積來計算每個治療組（T）和媒介物對照組（C）的每隻動物的腫瘤體積變化。計算治療組之中位數ΔT，並計算媒介物對照組之中位數ΔC。計算比率ΔT/ΔC，並將其用百分比表示。

【0078】 **圖11**示出了「瘤周」（「peri-tumorally」或「peri-tumoral」）區域，該區域約2 mm寬並且與腫瘤週邊的浸潤前沿相鄰。瘤周區域包括宿主組織。

序列說明

【0079】 表1提供了本文引用的某些序列之列表。

表1：序列說明		
SEQ ID NO:	說明	序列
5'UTR		
1	未使用	
2	未使用	
3	5'UTR（DNA）	GGAATAAACTAGTCTCAACACAACATATACAAAACAAACGAATCTCAAGCAATCAAGCATTCTACTTCTATTGC AGCAATTTAAATCATTTCTTTTAAAGCAAAAGCAATTTTCTGAAAATTTTCACCATTTACGAACGATAGCC
4	5'UTR（RNA）	GGAAUAAACUAGUCUCAACACAACAUAUACAAAACAAACGAAUCUCAAGCAAUCAAGCAUUCUACUUCUAUU GCAGCAAUUUAAAUCAUUUCUUUUAAAGCAAAAGCAAUUUUCUGAAAAUUUUCACCAUUUACGAACGAUAGC C
5	替代性的 Mod 5'UTR（DNA）	AGACGAACTAGTATTCTTCTGGTCCCCACAGACTCAGAGAGAACCCGCCACC
6	替代性的 Mod 5'UTR（RNA）	AGACGAACUAGUAUUCUUCUGGUCCCCACAGACUCAGAGAGAACCCGCCACC
3'UTR		
7	3'UTR（DNA）	CTCGAGCTGGTACTGCATGCACGCAATGCTAGCTGCCCCTTTCCCGTCCTGGGTACCCCGAGTCTCCCCCGAC CTCGGGTCCCAGGTATGCTCCCACCTCCACCTGCCCCACTCACCACCTCTGCTAGTTCCAGACACCTCCCAAG CACGCAGCAATGCAGCTCAAAACGCTTAGCCTAGCCACACCCCCACGGGAAACAGCAGTGATTAACCTTTAGC AATAAACGAAAGTTTAACTAAGCTATACTAACCCCAGGGTTGGTCAATTTCGTGCCAGCCACACCGAGACCTG GTCCAGAGTCGCTAGCCGCGTCGCT
8	3'UTR（RNA）	CUCGAGCUGGUACUGCAUGCACGCAAUGCUAGCUGCCCCUUUCCCGUCCUGGGUACCCCGAGUCUCCCCCG ACCUCGGGUCCCAGGUAUGCUCCCACCUCCACCUGCCCCACUCACCACCUCUGCUAGUUCCAGACACCUCCC AAGCACGCAGCAAUGCAGCUCAAAACGCUUAGCCUAGCCACACCCCCACGGGAAACAGCAGUGAUUAACCUU UAGCAAUAAACGAAAGUUUAACUAAGCUAUACUAACCCCAGGGUUGGUCAAUUUCGUGCCAGCCACACCGAG ACCUGGUCCAGAGUCGCUAGCCGCGUCGCU
9至13	未使用	
IL-12sc		
14	人IL-12sc(胺基酸)	MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTL TIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTIST DLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSF FIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNA SISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGSSGGGGSPGGGSSRNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLE FYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEF KTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMS YLNAS

15	人非最佳化 IL-12sc（CDS DNA） *序列注釋* *帽：p40 結構域；* 帽：連接子； 帽：p35。	*ATGTGTCACCAGCAGTTGGTCATCTCTTGGTTTTCCCTGGTTTTTCTGGCATCTCCCCTCGTGGCCATATGGGAACTGAAGAAAGATGTTTATGTC* *GTAGAATTGGATTGGTATCCGGATGCCCCTGGAGAAATGGTGGTCCTCACCTGTGACACCCCTGAAGAAGATGGTATCACCTGGACCTTGGACC* *AGAGCAGTGAGGTCTTAGGCTCTGGCAAAACCCTGACCATCCAAGTCAAAGAGTTTGGAGATGCTGGCCAGTACACCTGTCACAAAGGAGGCG* *AGGTTCTAAGCCATTCGCTCCTGCTGCTTCACAAAAAGGAAGATGGAATTTGGTCCACTGATATTTTAAAGGACCAGAAAGAACCCAAAAATAAG* *ACCTTTCTAAGATGCGAGGCCAAGAATTATTCTGGACGTTTCACCTGCTGGTGGCTGACGACAATCAGTACTGATTTGACATTCAGTGTCAAAAG* *CAGCAGAGGGTCTTCTGACCCCCAAGGGGTGACGTGCGGAGCTGCTACACTCTCTGCAGAGAGAGTCAGAGGGGACAACAAGGAGTATGAGT* *ACTCAGTGGAGTGCCAGGAGGACAGTGCCTGCCCAGCTGCTGAGGAGAGTCTGCCCATTGAGGTCATGGTGGATGCCGTTCACAAGCTCAAGT* *ATGAAAACTACACCAGCAGCTTCTTCATCAGGGACATCATCAAACCTGACCCACCCAAGAACTTGCAGCTGAAGCCATTAAAGAATTCTCGGCAG* *GTGGAGGTCAGCTGGGAGTACCCTGACACCTGGAGTACTCCACATTCCTACTTCTCCCTGACATTCTGCGTTCAGGTCCAGGGCAAGAGCAAGAG* *AGAAAAGAAAGATAGAGTCTTCACGGACAAGACCTCAGCCACGGTCATCTGCCGCAAAAATGCCAGCATTAGCGTGCGGGCCCAGGACCGCTA* *CTATAGCTCATCTTGGAGCGAATGGGCATCTGTGCCCTGCAGT*GGCTCTAGCGGAGGGGGAGGCTCTCCTGGCGGGGGATCTAGC **AGAAACCTCCCCGTGGCCACTCCAGACCCAGGAATGTTCCCATGCCTTCACCACTCCCAAAACCTGCTGAGGG** **CCGTCAGCAACATGCTCCAGAAGGCCAGACAAACTCTAGAATTTTACCCTTGCACTTCTGAGGAAATTGATCA** **TGAAGATATCACAAAAGATAAAACCAGCACAGTGGAGGCCTGTTTACCATTGGAATTAACCAAGAATGAGAGT** **TGCCTAAATTCCAGAGAGACCTCTTTCATAACTAATGGGAGTTGCCTGGCCTCCAGAAAGACCTCTTTTATGA** **TGGCCCTGTGCCTTAGTAGTATTTATGAAGACTTGAAGATGTACCAGGTGGAGTTCAAGACCATGAATGCAAA** **GCTTCTGATGGATCCTAAGAGGCAGATCTTTCTAGATCAAAACATGCTGGCAGTTATTGATGAGCTGATGCAG** **GCCCTGAATTTCAACAGTGAGACTGTGCCACAAAAATCCTCCCTTGAAGAACCGGATTTTTATAAAACTAAAA** **TCAAGCTCTGCATACTTCTTCATGCTTTCAGAATTCGGGCAGTGACTATTGATAGAGTGATGAGCTATCTGAA** **TGCTTCCTGATGA**

16	人最佳化 IL-12sc（CDS DNA） *序列注釋* *帽：p40 結構域；* 帽：連接子； 帽：p35。	*ATGTGTCACCAGCAGCTGGTGATCTCATGGTTCTCCCTGGTATTTCTGGCATCTCCTCTTGTCGCAATCTGGGAACTGAAGAAAGACGTGTATGTC* *GTTGAGCTCGACTGGTATCCGGATGCGCCTGGCGAGATGGTGGTGCTGACCTGTGACACCCCAGAGGAGGATGGGATCACTTGGACCCTTGATC* *AATCCTCCGAAGTGCTCGGGTCTGGCAAGACTCTGACCATACAAGTGAAAGAGTTTGGCGATGCCGGGCAGTACACTTGCCATAAGGGCGGAG* *AAGTTCTGTCCCACTCACTGCTGCTGCTGCACAAGAAAGAGGACGGAATTTGGAGTACCGATATCCTGAAAGATCAGAAAGAGCCCAAGAACAA* *AACCTTCTTGCGGTGCGAAGCCAAGAACTACTCAGGGAGATTTACTTGTTGGTGGCTGACGACGATCAGCACCGATCTGACTTTCTCCGTGAAAT* *CAAGTAGGGGATCATCTGACCCTCAAGGAGTCACATGTGGAGCGGCTACTCTGAGCGCTGAACGCGTAAGAGGGGACAATAAGGAGTACGAGT* *ATAGCGTTGAGTGCCAAGAGGATAGCGCATGCCCCGCCGCCGAAGAATCATTGCCCATTGAAGTGATGGTGGATGCTGTACACAAGCTGAAGT* *ATGAGAACTACACAAGCTCCTTCTTCATCCGTGACATCATCAAACCAGATCCTCCTAAGAACCTCCAGCTTAAACCTCTGAAGAACTCTAGACAGG* *TGGAAGTGTCTTGGGAGTATCCCGACACCTGGTCTACACCACATTCCTACTTCAGTCTCACATTCTGCGTTCAGGTACAGGGCAAGTCCAAAAGG* *GAGAAGAAGGATCGGGTCTTTACAGATAAAACAAGTGCCACCGTTATATGCCGGAAGAATGCCTCTATTTCTGTGCGTGCGCAGGACAGATACT* *ATAGCAGCTCTTGGAGTGAATGGGCCAGTGTCCCATGTTC*AGGGTCATCCGGTGGTGGCGGCAGCCCCGGAGGCGGTAGCTCCA **GAAATCTCCCTGTGGCTACACCTGATCCAGGCATGTTTCCCTGTTTGCACCATAGCCAAAACCTCCTGAGAGC** **AGTCAGCAACATGCTCCAGAAAGCTAGACAAACACTGGAATTCTACCCATGCACCTCCGAGGAAATAGATCAC** **GAGGATATCACTAAGGACAAAACAAGCACTGTCGAAGCATGCCTTCCCTTGGAACTGACAAAGAACGAGAGT** **TGCCTTAATTCAAGAGAAACATCTTTCATTACAAACGGTAGCTGCTTGGCAAGCAGAAAAACATCTTTTATGAT** **GGCCCTTTGTCTGAGCAGTATTTATGAGGATCTCAAAATGTACCAGGTGGAGTTTAAGACCATGAATGCCAAG** **CTGCTGATGGACCCAAAGAGACAGATTTTCCTCGATCAGAATATGCTGGCTGTGATTGATGAACTGATGCAGG** **CCTTGAATTTCAACAGCGAAACCGTTCCCCAGAAAAGCAGTCTTGAAGAACCTGACTTTTATAAGACCAAGAT** **CAAACTGTGTATTCTCCTGCATGCCTTTAGAATCAGAGCAGTCACTATAGATAGAGTGATGTCCTACCTGAAT** **GCTTCCTGATGA**

17	人非最佳化 IL-12sc（編碼 CDS 的 RNA）	AUGUGUCACCAGCAGUUGGUCAUCUCUUGGUUUUCCCUGGUUUUUCUGGCAUCUCCCCUCGUGGCCAUAUG GGAACUGAAGAAAGAUGUUUAUGUCGUAGAAUUGGAUUGGUAUCCGGAUGCCCCUGGAGAAAUGGUGGUCC UCACCUGUGACACCCCUGAAGAAGAUGGUAUCACCUGGACCUUGGACCAGAGCAGUGAGGUCUUAGGCUCU GGCAAAACCCUGACCAUCCAAGUCAAAGAGUUUGGAGAUGCUGGCCAGUACACCUGUCACAAAGGAGGCGA GGUUCUAAGCCAUUCGCUCCUGCUGCUUCACAAAAAGGAAGAUGGAAUUUGGUCCACUGAUAUUUUAAAGGA CCAGAAAGAACCCAAAAAUAAGACCUUUCUAAGAUGCGAGGCCAAGAAUUAUUCUGGACGUUUCACCUGCUG GUGGCUGACGACAAUCAGUACUGAUUUGACAUUCAGUGUCAAAAGCAGCAGAGGGUCUUCUGACCCCCAAG GGGUGACGUGCGGAGCUGCUACACUCUCUGCAGAGAGAGUCAGAGGGGACAACAAGGAGUAUGAGUACUCA GUGGAGUGCCAGGAGGACAGUGCCUGCCCAGCUGCUGAGGAGAGUCUGCCCAUUGAGGUCAUGGUGGAUGC CGUUCACAAGCUCAAGUAUGAAAACUACACCAGCAGCUUCUUCAUCAGGGACAUCAUCAAACCUGACCCACC CAAGAACUUGCAGCUGAAGCCAUUAAAGAAUUCUCGGCAGGUGGAGGUCAGCUGGGAGUACCCUGACACCU GGAGUACUCCACAUUCCUACUUCUCCCUGACAUUCUGCGUUCAGGUCCAGGGCAAGAGCAAGAGAGAAAAG AAAGAUAGAGUCUUCACGGACAAGACCUCAGCCACGGUCAUCUGCCGCAAAAAUGCCAGCAUUAGCGUGCG GGCCCAGGACCGCUACUAUAGCUCAUCUUGGAGCGAAUGGGCAUCUGUGCCCUGCAGUGGCUCUAGCGGAG GGGGAGGCUCUCCUGGCGGGGGAUCUAGCAGAAACCUCCCCGUGGCCACUCCAGACCCAGGAAUGUUCCCA UGCCUUCACCACUCCCAAAACCUGCUGAGGGCCGUCAGCAACAUGCUCCAGAAGGCCAGACAAACUCUAGAA UUUUACCCUUGCACUUCUGAGGAAAUUGAUCAUGAAGAUAUCACAAAAGAUAAAACCAGCACAGUGGAGGCC UGUUUACCAUUGGAAUUAACCAAGAAUGAGAGUUGCCUAAAUUCCAGAGAGACCUCUUUCAUAACUAAUGGG AGUUGCCUGGCCUCCAGAAAGACCUCUUUUAUGAUGGCCCUGUGCCUUAGUAGUAUUUAUGAAGACUUGAA GAUGUACCAGGUGGAGUUCAAGACCAUGAAUGCAAAGCUUCUGAUGGAUCCUAAGAGGCAGAUCUUUCUAG AUCAAAACAUGCUGGCAGUUAUUGAUGAGCUGAUGCAGGCCCUGAAUUUCAACAGUGAGACUGUGCCACAA AAAUCCUCCCUUGAAGAACCGGAUUUUUAUAAAACUAAAAUCAAGCUCUGCAUACUUCUUCAUGCUUUCAGA AUUCGGGCAGUGACUAUUGAUAGAGUGAUGAGCUAUCUGAAUGCUUCCUGAUGA

18	人最佳化 IL-12sc（編碼 CDS 的 RNA）	AUGUGUCACCAGCAGCUGGUGAUCUCAUGGUUCUCCCUGGUAUUUCUGGCAUCUCCUCUUGUCGCAAUCUG GGAACUGAAGAAAGACGUGUAUGUCGUUGAGCUCGACUGGUAUCCGGAUGCGCCUGGCGAGAUGGUGGUGC UGACCUGUGACACCCCAGAGGAGGAUGGGAUCACUUGGACCCUUGAUCAAUCCUCCGAAGUGCUCGGGUCU GGCAAGACUCUGACCAUACAAGUGAAAGAGUUUGGCGAUGCCGGGCAGUACACUUGCCAUAAGGGCGGAGA AGUUCUGUCCCACUCACUGCUGCUGCUGCACAAGAAAGAGGACGGAAUUUGGAGUACCGAUAUCCUGAAAG AUCAGAAAGAGCCCAAGAACAAAACCUUCUUGCGGUGCGAAGCCAAGAACUACUCAGGGAGAUUUACUUGUU GGUGGCUGACGACGAUCAGCACCGAUCUGACUUUCUCCGUGAAAUCAAGUAGGGGAUCAUCUGACCCUCAA GGAGUCACAUGUGGAGCGGCUACUCUGAGCGCUGAACGCGUAAGAGGGGACAAUAAGGAGUACGAGUAUAG CGUUGAGUGCCAAGAGGAUAGCGCAUGCCCCGCCGCCGAAGAAUCAUUGCCCAUUGAAGUGAUGGUGGAUG CUGUACACAAGCUGAAGUAUGAGAACUACACAAGCUCCUUCUUCAUCCGUGACAUCAUCAAACCAGAUCCUC CUAAGAACCUCCAGCUUAAACCUCUGAAGAACUCUAGACAGGUGGAAGUGUCUUGGGAGUAUCCCGACACCU GGUCUACACCACAUUCCUACUUCAGUCUCACAUUCUGCGUUCAGGUACAGGGCAAGUCCAAAAGGGAGAAGA AGGAUCGGGUCUUUACAGAUAAAACAAGUGCCACCGUUAUAUGCCGGAAGAAUGCCUCUAUUUCUGUGCGU GCGCAGGACAGAUACUAUAGCAGCUCUUGGAGUGAAUGGGCCAGUGUCCCAUGUUCAGGGUCAUCCGGUGG UGGCGGCAGCCCCGGAGGCGGUAGCUCCAGAAAUCUCCCUGUGGCUACACCUGAUCCAGGCAUGUUUCCCU GUUUGCACCAUAGCCAAAACCUCCUGAGAGCAGUCAGCAACAUGCUCCAGAAAGCUAGACAAACACUGGAAU UCUACCCAUGCACCUCCGAGGAAAUAGAUCACGAGGAUAUCACUAAGGACAAAACAAGCACUGUCGAAGCAU GCCUUCCCUUGGAACUGACAAAGAACGAGAGUUGCCUUAAUUCAAGAGAAACAUCUUUCAUUACAAACGGUA GCUGCUUGGCAAGCAGAAAAACAUCUUUUAUGAUGGCCCUUUGUCUGAGCAGUAUUUAUGAGGAUCUCAAAA UGUACCAGGUGGAGUUUAAGACCAUGAAUGCCAAGCUGCUGAUGGACCCAAAGAGACAGAUUUUCCUCGAU CAGAAUAUGCUGGCUGUGAUUGAUGAACUGAUGCAGGCCUUGAAUUUCAACAGCGAAACCGUUCCCCAGAA AAGCAGUCUUGAAGAACCUGACUUUUAUAAGACCAAGAUCAAACUGUGUAUUCUCCUGCAUGCCUUUAGAAU CAGAGCAGUCACUAUAGAUAGAGUGAUGUCCUACCUGAAUGCUUCCUGAUGA
IFNα2b（IFNα2b）		
19	人 IFNα2b（胺基酸）	MALTFALLVALLVLSCKSSCSVGCDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETI PVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELYQQLNDLEACVIQGVGVTETPLMKEDSILAVRKYFQRITLYL KEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKE
20	人非最佳化 IFNα2b（CDS DNA）	ATGGCCTTGACCTTTGCTTTACTGGTGGCCCTCCTGGTGCTCAGCTGCAAGTCAAGCTGCTCTGTGGGCTGTG ATCTGCCTCAAACCCACAGCCTGGGTAGCAGGAGGACCTTGATGCTCCTGGCACAGATGAGGAGAATCTCTC TTTTCTCCTGCTTGAAGGACAGACATGACTTTGGATTTCCCCAGGAGGAGTTTGGCAACCAGTTCCAAAAGGC TGAAACCATCCCTGTCCTCCATGAGATGATCCAGCAGATCTTCAACCTTTTCAGCACAAAGGACTCATCTGCT GCTTGGGATGAGACCCTCCTAGACAAATTCTACACTGAACTCTACCAGCAGCTGAATGACCTGGAAGCCTGTG TGATACAGGGGGTGGGGGTGACAGAGACTCCCCTGATGAAGGAGGACTCCATTCTGGCTGTGAGGAAATACT TCCAAAGAATCACTCTCTATCTGAAAGAGAAGAAATACAGCCCTTGTGCCTGGGAGGTTGTCAGAGCAGAAAT CATGAGATCTTTTTCTTTGTCAACAAACTTGCAAGAAAGTTTAAGAAGTAAGGAATGATGA

21	人最佳化 IFNα2b（CDS DNA）	ATGGCCCTGACTTTTGCCCTTCTCGTGGCTTTGTTGGTGCTGAGTTGCAAATCTTCCTGTAGTGTCGGATGTG ATCTGCCTCAAACCCACAGTCTGGGATCTAGGAGAACACTGATGCTGTTGGCACAGATGAGGAGAATTAGCCT CTTTTCCTGCCTGAAGGATAGACATGACTTCGGCTTTCCCCAAGAGGAGTTTGGCAATCAGTTCCAGAAAGCG GAAACGATTCCCGTTCTGCACGAGATGATCCAGCAGATCTTCAACCTCTTTTCAACCAAAGACAGCTCAGCAG CCTGGGATGAGACACTGCTGGACAAATTCTACACAGAACTGTATCAGCAGCTTAACGATCTGGAGGCATGCGT GATCCAAGGGGTTGGTGTGACTGAAACTCCGCTTATGAAGGAGGACTCCATTCTGGCTGTACGGAAGTACTTC CAGAGAATAACCCTCTATCTGAAGGAGAAGAAGTACTCACCATGTGCTTGGGAAGTCGTGAGAGCCGAAATC ATGAGATCCTTCAGCCTTAGCACCAATCTCCAGGAATCTCTGAGAAGCAAAGAGTGATGA
22	人非最佳化 IFNα2b（編碼 CDS 的 RNA）	AUGGCCUUGACCUUUGCUUUACUGGUGGCCCUCCUGGUGCUCAGCUGCAAGUCAAGCUGCUCUGUGGGCUG UGAUCUGCCUCAAACCCACAGCCUGGGUAGCAGGAGGACCUUGAUGCUCCUGGCACAGAUGAGGAGAAUCU CUCUUUUCUCCUGCUUGAAGGACAGACAUGACUUUGGAUUUCCCCAGGAGGAGUUUGGCAACCAGUUCCAAA AGGCUGAAACCAUCCCUGUCCUCCAUGAGAUGAUCCAGCAGAUCUUCAACCUUUUCAGCACAAAGGACUCAU CUGCUGCUUGGGAUGAGACCCUCCUAGACAAAUUCUACACUGAACUCUACCAGCAGCUGAAUGACCUGGAAG CCUGUGUGAUACAGGGGGUGGGGGUGACAGAGACUCCCCUGAUGAAGGAGGACUCCAUUCUGGCUGUGAGG AAAUACUUCCAAAGAAUCACUCUCUAUCUGAAAGAGAAGAAAUACAGCCCUUGUGCCUGGGAGGUUGUCAGA GCAGAAAUCAUGAGAUCUUUUUCUUUGUCAACAAACUUGCAAGAAAGUUUAAGAAGUAAGGAAUGAUGA
23	人最佳化 IFNα2b（編碼 CDS 的 RNA）	AUGGCCCUGACUUUUGCCCUUCUCGUGGCUUUGUUGGUGCUGAGUUGCAAAUCUUCCUGUAGUGUCGGAUG UGAUCUGCCUCAAACCCACAGUCUGGGAUCUAGGAGAACACUGAUGCUGUUGGCACAGAUGAGGAGAAUUA GCCUCUUUUCCUGCCUGAAGGAUAGACAUGACUUCGGCUUUCCCCAAGAGGAGUUUGGCAAUCAGUUCCAG AAAGCGGAAACGAUUCCCGUUCUGCACGAGAUGAUCCAGCAGAUCUUCAACCUCUUUUCAACCAAAGACAGC UCAGCAGCCUGGGAUGAGACACUGCUGGACAAAUUCUACACAGAACUGUAUCAGCAGCUUAACGAUCUGGA GGCAUGCGUGAUCCAAGGGGUUGGUGUGACUGAAACUCCGCUUAUGAAGGAGGACUCCAUUCUGGCUGUAC GGAAGUACUUCCAGAGAAUAACCCUCUAUCUGAAGGAGAAGAAGUACUCACCAUGUGCUUGGGAAGUCGUG AGAGCCGAAAUCAUGAGAUCCUUCAGCCUUAGCACCAAUCUCCAGGAAUCUCUGAGAAGCAAAGAGUGAUGA
IL-15 sushi		
24	人 IL-15 sushi（胺基酸）	MAPRRARGCRTLGLPALLLLLLLRPPATRGITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVL NKATNVAHWTTPSLKCIRDPALVHQRPAPPGGGSGGGGSGGGSGGGGSLQNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATL YTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFV HIVQMFINTS
25	人 IL-15 sushi（CDS DNA） 序列注釋 *帽：IL-15 sushi；* 帽：連接子； 帽：成熟 IL-15	*ATGGCCCCGCGGCGGGCGCGCGGCTGCCGGACCCTCGGTCTCCCGGCGCTGCTACTGCTGCTGCTGCTCCGGCCGCCGGCGACGCGGGGCATCA* *CGTGCCCTCCCCCCATGTCCGTGGAACACGCAGACATCTGGGTCAAGAGCTACAGCTTGTACTCCAGGGAGCGGTACATTTGTAACTCTGGTTTC* *AAGCGTAAAGCCGGCACGTCCAGCCTGACGGAGTGCGTGTTGAACAAGGCCACGAATGTCGCCCACTGGACAACCCCCAGTCTCAAATGCATTA* *GAGACCCTGCCCTGGTTCACCAAAGGCCAGCGCCACCC*GGGGGAGGATCTGGCGGCGGTGGGTCTGGCGGGGGATCTGGCGGA GGAGGAAGCTTACAGAACTGGGTGAATGTAATAAGTGATTTGAAAAAAATTGAAGATCTTATTCAATCTATGCA TATTGATGCTACTTTATATACGGAAAGTGATGTTCACCCCAGTTGCAAAGTAACAGCAATGAAGTGCTTTCTCT TGGAGTTACAAGTTATTTCACTTGAGTCCGGAGATGCAAGTATTCATGATACAGTAGAAAATCTGATCATCCT AGCAAACAACAGTTTGTCTTCTAATGGGAATGTAACAGAATCTGGATGCAAAGAATGTGAGGAACTGGAGGA AAAAAATATTAAAGAATTTTTGCAGAGTTTTGTACATATTGTCCAAATGTTCATCAACACTTCTTGATGA

26	人 IL-15 sushi（編碼 CDS 的 RNA）	AUGGCCCCGCGGCGGGCGCGCGGCUGCCGGACCCUCGGUCUCCCGGCGCUGCUACUGCUGCUGCUGCUCCG GCCGCCGGCGACGCGGGGCAUCACGUGCCCUCCCCCCCAUGUCCGUGGAACACGCAGACAUCUGGGUCAAGA GCUACAGCUUGUACUCCAGGGAGCGGUACAUUUGUAACUCUGGUUUCAAGCGUAAAGCCGGCACGUCCAGC CUGACGGAGUGCGUGUUGAACAAGGCCACGAAUGUCGCCCACUGGACAACCCCCAGUCUCAAAUGCAUUAG AGACCCUGCCCUGGUUCACCAAAGGCCAGCGCCACCCGGGGGAGGAUCUGGCGGCGGUGGGUCUGGCGGG GGAUCUGGCGGAGGAGGAAGCUUACAGAACUGGGUGAAUGUAAUAAGUGAUUUGAAAAAAAUUGAAGAUCU UAUUCAAUCUAUGCAUAUUGAUGCUACUUUAUAUACGGAAAGUGAUGUUCACCCCAGUUGCAAAGUAACAGC AAUGAAGUGCUUUCUCUUGGAGUUACAAGUUAUUUCACUUGAGUCCGGAGAUGCAAGUAUUCAUGAUACAGU AGAAAAUCUGAUCAUCCUAGCAAACAACAGUUUGUCUUCUAAUGGGAAUGUAACAGAAUCUGGAUGCAAAGA AUGUGAGGAACUGGAGGAAAAAAAUAUUAAAGAAUUUUUGCAGAGUUUUGUACAUAUUGUCCAAAUGUUCAU CAACACUUCUUGAUGA
GM-CSF		
27	人 GM-CSF（胺基酸）	MWLQSLLLLGTVACSISAPARSPSPSTQPWEHVNAIQEARRLLNLSRDTAAEMNETVEVISEMFDLQEPTCLQTRLE LYKQGLRGSLTKLKGPLTMMASHYKQHCPPTPETSCATQIITFESFKENLKDFLLVIPFDCWEPVQE
28	人 GM-CSF（CDS DNA）	ATGTGGCTCCAGAGCCTGCTGCTCTTGGGCACTGTGGCCTGCTCCATCTCTGCACCCGCCCGCTCGCCCAGCC CCAGCACGCAGCCCTGGGAGCATGTGAATGCCATCCAGGAGGCCCGGCGTCTGCTGAACCTGAGTAGAGACA CTGCTGCTGAGATGAATGAAACAGTAGAAGTCATCTCAGAAATGTTTGACCTCCAGGAGCCGACCTGCCTACA GACCCGCCTGGAGCTGTACAAGCAGGGCCTGCGGGGCAGCCTCACCAAGCTCAAGGGCCCCTTGACCATGAT GGCCAGCCACTACAAGCAGCACTGCCCTCCAACCCCGGAAACTTCCTGTGCAACCCAGATTATCACCTTTGAA AGTTTCAAAGAGAACCTGAAGGACTTTCTGCTTGTCATCCCCTTTGACTGCTGGGAGCCAGTCCAGGAGTGAT GA
29	人 GM-CSF（編碼 CDS 的 RNA）	AUGUGGCUCCAGAGCCUGCUGCUCUUGGGCACUGUGGCCUGCUCCAUCUCUGCACCCGCCCGCUCGCCCAG CCCCAGCACGCAGCCCUGGGAGCAUGUGAAUGCCAUCCAGGAGGCCCGGCGUCUGCUGAACCUGAGUAGAG ACACUGCUGCUGAGAUGAAUGAAACAGUAGAAGUCAUCUCAGAAAUGUUUGACCUCCAGGAGCCGACCUGC CUACAGACCCGCCUGGAGCUGUACAAGCAGGGCCUGCGGGGCAGCCUCACCAAGCUCAAGGGCCCCUUGAC CAUGAUGGCCAGCCACUACAAGCAGCACUGCCCUCCAACCCCGGAAACUUCCUGUGCAACCCAGAUUAUCAC CUUUGAAAGUUUCAAAGAGAACCUGAAGGACUUUCUGCUUGUCAUCCCCUUUGACUGCUGGGAGCCAGUCCA GGAGUGAUGA
30	示例性聚 A	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCAUAUGACUAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
31	抗 PD1 Mab 重鏈	EVQLLESGGV LVQPGGSLRL SCAASGFTFS NFGMTWVRQA PGKGLEWVSG ISGGGRDTYF ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLKGED TAVYYCVKWG NIYFDYWGQG TLVTVSSAST KGPSVFPLAP CSRSTSESTA ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVVTVPS SSLGTKTYTC NVDHKPSNTK VDKRVESKYG PPCPPCPAPE FLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSQEDPEV QFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQFNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKGLPSSIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SQEEMTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSDGS FFLYSRLTVD KSRWQEGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SLGK
32	抗 PD1 Mab 輕鏈	DIQMTQSPSS LSASVGDSIT ITCRASLSIN TFLNWYQQKP GKAPNLLIYA ASSLHGGVPS RFSGSGSGTD FTLTIRTLQP EDFATYYCQQ SSNTPFTFGP GTVVDFRRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC

33	**HCDR1**	GFTFSNFG
34	**HCDR2**	ISGGGRDT
35	**HCDR3**	VKWGNIYFDY
36	**LCDR1**	LSINTF
37	**LCDR2**	AAS
38	**LCDR3**	QQSSNTPFT
39	**抗 PD1 Mab VH**	EVQLLESGGV LVQPGGSLRL SCAASGFTFS NFGMTWVRQA PGKGLEWVSG ISGGGRDTYF ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLKGED TAVYYCVKWG NIYFDYWGQG TLVTVSS
40	**抗 PD1 Mab VL**	DIQMTQSPSS LSASVGDSIT ITCRASLSIN TFLNWYQQKP GKAPNLLIYA ASSLHGGVPS RFSGSGSGTD FTLTIRTLQP EDFATYYCQQ SSNTPFTFGP GTVVDFR
41	**實例 3 中的 sgRNA**	GGCGTATGTATCAGTCTCAG

【實施方式】

1. 定義

【0080】 如本文所用，「細胞激素RNA混合物」，有時也稱為「細胞激素mRNA混合物」、「mRNA細胞激素混合物」或「RNA細胞激素混合物」，包括編碼IFNα的RNA、編碼IL-15 sushi的RNA、編碼IL-12sc的RNA和編碼GM-CSF的RNA，如本文所述。

【0081】 「PD-1」也可以稱為「計劃性細胞死亡1」或「計劃性細胞死亡-1」。「PD-L1」也可以稱為「計劃性細胞死亡1配位基」、「計劃性細胞死亡-1配位基1」或「計劃性細胞死亡-配位基1」。

【0082】

【0083】 如本文所用，「晚期實性瘤癌症」有時在本文中稱為「晚期實性瘤」或「晚期實性瘤癌」包括按已知的系統，例如美國癌症聯合委員會（AJCC）開發的腫瘤、結節和轉移（TNM）分期系統（參見AJCC Cancer Staging Manual, 第8版）評估，其分期被鑒定為III期、III期子集、IV期或IV期子集的實性瘤癌症。在一些實施方式中，該TNM分期系統用於除黑色素瘤以外的實性瘤癌症。在一些實施方式中，該癌症係黑色素瘤或晚期黑色素瘤，包括按照AJCC黑色素瘤分期（2018年第8版）評估的IIIB期、IIIC期或V期。關於AJCC黑色素瘤分期的非限制性描述提供於Gershenwald JE, Scolyer RA, Hess KR等人 Melanoma of the skin.於: Amin MB編 AJCC Cancer Staging Manual. 第8版, 芝加哥, 伊利諾斯州:AJCC-Springer; 2017:563-585，其全部內容藉由引用併入本文。在一些實施方式中，該癌症係皮膚鱗狀上皮細胞癌（CSCC）或頭頸部鱗狀上皮細胞癌（HNSCC），兩者都可能是晚期的。對於所有主要癌症都存在類似的分期系統，並且通常基於腫瘤的臨床和/或病理學詳情以及該等因子經顯示如何影響生存率。

【0084】 「腫瘤」在本文中也可以稱為「贅生物（neoplasm）」。例如，術語「實性瘤」和「實體贅生物」係可互換的。

【0085】 「不可切除的」（例如，晚期不可切除的）癌症普遍地是無法藉由手術去除的。

【0086】 RECIST（實性瘤（也稱腫瘤）反應評價標準）提供了一種評價實性瘤中癌症治療劑的活性和功效之方法。RECIST指南係由RECIST工作組創建的，包括來自歐洲癌症研究與治療組織、美國國家癌症研究所和加拿大癌症試驗組以及幾家製藥公司的代表，並且RECIST指南在Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J等人 New response evaluation criteria in solid tumours: Revised RECIST guideline (version 1.1) Eur J Cancer. 45 (2009) 228-247中發表，其全部內容藉由引用併入本文。該指南的第4.3.1節（Eisenhauer的第232至233頁）提供了有關目標病變評價的以下內容：

完全反應（CR）：所有目標病變消失。任何病理性淋巴結（無論是目標還是非目標）的短軸都必須減小至 < 10 mm。

部分反應（PR）：以基線總和直徑為參考，目標病變的直徑總和至少減少30%。

疾病進展（PD）：在研究時以最小總和作為參考（如果研究中基線總和最小，則包括基線總和），目標病變直徑總和至少增加20%。除了20%的相對增加外，該總和還必須顯示至少5 mm的絕對增加。（備註：一個或多個新病變的出現也被視為進展）。

疾病穩定（SD）：在研究時以最小直徑總和作為參考，既沒有足以評定PR的縮減，也沒有足以評定PD的增加。

該指南的第4.3.3節（Eisenhauer的第233頁）提供了有關非目標病變評價的以下內容：

儘管一些非目標病變實際上可以測量，但它們無需測量，而應僅在方案中指定的時間點進行定性評估。

完全反應（CR）：所有非目標病變消失，腫瘤標誌物的量正常化。所有淋巴結都必須是非病理性的大小（短軸 < 10 mm）。

非CR/非PD：一個或多個非目標病變的持續存在和/或腫瘤標誌物的量維持在正常界線以上。

疾病進展（PD）：現有非目標病變的明確進展。（備註：一個或多個新病變的出現也視為進展）。

【0087】 對抗PD-1或抗PD-L1療法具有「先天性」或「原發性」抗性之受試者最初不會對抗PD-1或抗PD-L1療法產生反應。具有先天或原發性抗性之受試者從未表現出對PD-1/PD-L1阻斷的臨床反應。參見，例如，Sharma等人 (2017) Cell 168:707-723 第709頁；另請參見，Hugo等人 (2016) Cell 165 (1) 35-44；另請參見，Nowicki等人 (2018) Cancer J. 24(1): 47-53，其全部內容藉由引用併入本文。在一些實施方式中，對抗PD-1或抗PD-L1療法具有先天性抗性之受試者在用抗PD-1或抗PD-L1療法（任何時間長度）治療後的特徵在於根據RECIST標準（1.1版）為疾病進展或疾病穩定。在一些實施方式中，對抗PD-1或抗PD-L1療法具有先天性抗性之受試者在用抗PD-1或抗PD-L1療法（任何時間長度）治療後的特徵在於包含存活癌細胞的非目標病變的非CR/非PD。在一些實施方式中，對抗PD-1療法具有先天性抗性之受試者在用抗PD-1療法（任何時間長度）治療後的特徵在於根據RECIST標準（1.1版）為疾病進展。在一些實施方式中，對抗PD-L1療法具有先天性抗性之受試者在用抗PD-L1療法（任何時間長度）治療後的特徵在於根據RECIST標準（1.1版）為疾病進展。在一些實施方式中，對抗PD-1療法具有先天性抗性之受試者在用抗PD-1療法（任何時間長度）治療後的特徵在於根據RECIST標準（1.1版）為疾病穩定。在一些實施方式中，對抗PD-L1療法具有先天性抗性之受試者在用抗PD-L1療法（任何時間長度）治療後的特徵在於根據RECIST標準（1.1版）為疾病穩定。在一些實施方式中，對抗PD-1或抗PD-L1療法具有先天性抗性之受試者在用抗PD-1或抗PD-L1療法（任何時間長度）治療後的特徵在於實性瘤的最長直徑增加至少20%和/或出現一個或多個新的實性瘤。在一些實施方式中，對抗PD-1具有先天性抗性之受試者在用抗PD-1療法（任何時間長度）治療後的特徵在於實性瘤的最長直徑增加至少20%和/或出現一個或

多個新的實性瘤。在一些實施方式中，對抗PD-L1療法具有先天性抗性之受試者在用抗PD-L1療法（任何時間長度）治療後的特徵在於實性瘤的最長直徑增加至少20%和/或出現一個或多個新的實性瘤。在一些實施方式中，該最長直徑的增加為至少5 mm的增加。在一些實施方式中，該時間長度為約6週、約8週或至少6或8週。在一些實施方式中，該時間長度為2、3、6、12個月或更長。在一些實施方式中，該實性瘤係原發性腫瘤。在一些實施方式中，該實性瘤係可注射腫瘤。在一些實施方式中，已向該實性瘤注射了細胞激素mRNA混合物。在一些實施方式中，已選擇該實性瘤注射細胞激素mRNA混合物。在一些實施方式中，該實性瘤為最長直徑≥0.5 cm的皮下病變。在一些實施方式中，該實性瘤在一組融合的多個可注射合併病變中。在一些實施方式中，該實性瘤在一組融合的多個可注射合併病變中，該病變的最長直徑（所有累及目標病變的直徑的總和）≥0.5 cm。在一些實施方式中，該實性瘤沒有出血或滲液。在一些實施方式中，該實性瘤的最長直徑為至少10 mm（例如，如藉由電腦斷層攝影（CT）掃描或卡尺測量的）。在一些實施方式中，該實性瘤在受試者的胸部中，並且該實性瘤的最長直徑為至少20 mm（例如，如藉由胸部X射線測量的）。在一些實施方式中，該實性瘤在淋巴結中。在一些實施方式中，該淋巴結在短軸上至少為15 mm（例如，當藉由CT掃描評估時）。在一些實施方式中，該實性瘤係淋巴瘤。在一些實施方式中，對抗PD-1或抗PD-L1療法具有先天性抗性之受試者在用抗PD-1或抗PD-L1療法治療（任何時間長度）後的特徵在於根據盧加諾分類為無反應或疾病穩定。本文所提到的盧加諾分類的版本描述於Cheson等人 2014 J Clin Oncol. 2(27):3059-68，其全部內容藉由引用併入本文。在一些實施方式中，對抗PD-1或抗PD-L1療法具有先天性抗性之受試者在用抗PD-1或抗PD-L1療法治療（任何時間長度）後的特徵在於根據盧加諾分類為疾病進展。在一些實施方式中，對抗PD-1或抗PD-L1療法具有先天性抗性之受試者在用抗PD-1或抗PD-L1療法治療（任何時間長度）後的特徵在於根據盧加諾分類為淋巴結內的淋巴瘤。在一些實施方式中，對抗PD-1或抗PD-L1療法具有先天性抗性之受試者在用抗PD-1

或抗PD-L1療法（任意時間長度）治療後的特徵在於患有淋巴結內的淋巴瘤，其中該淋巴結 (i) 大於1.5 cm的最大直徑，並且 (ii) 與最低點垂直直徑（perpendicular diameter，PPD）的乘積相比增加至少50%。在一些實施方式中，該最長直徑的增加係至少5 mm的增加。在一些實施方式中，該時間長度為約6週、約8週或至少6或8週。在一些實施方式中，該時間長度為2、3、6、12個月或更長時間。

【0088】 對抗PD-1或抗PD-L1療法具有「後天型」或「適應性」抗性之受試者最初對治療有反應（例如，任何水平的反應），但是在一段時間後復發並進展。在一些實施方式中，根據RECIST標準（1.1版）評估對治療的反應。在一些實施方式中，在儘管最初為完全反應或部分反應而治療時最終進展（全部根據RECIST標準（1.1版））之受試者中觀察到對抗PD-1或抗PD-L1療法的後天型或適應性抗性。在一些實施方式中，在對重新啟動抗PD-1或抗PD-L1療法治療無反應之受試者中觀察到對抗PD-1或抗PD-L1療法的後天型或適應性抗性。參見，Sharma等人 (2017) Cell 168:707-723 第708頁；另請參見Nowicki等人 (2018) Cancer J. 24(1): 47-53，其全部內容藉由引用併入本文。在一些實施方式中，對抗PD-1療法具有適應性抗性之受試者包含實性瘤，其體積 (i) 在抗PD-1療法開始後持續一段時間減小；並且然後 (ii) 在這段時間後增加，儘管繼續進行抗PD-1療法。在一些實施方式中，對抗PD-L1療法具有適應性抗性之受試者包含實性瘤，其體積 (i) 在抗PD-L1療法開始後持續一段時間減小；並且然後 (ii) 在這段時間後增加，儘管繼續進行抗PD-L1療法。在一些實施方式中，該適應性抗性與獲得的抗性的潛在機制有關。在一些實施方式中，該適應性抗性與突變或表觀遺傳變化有關。在一些實施方式中，該適應性抗性與B2M基因在的突變有關。在一些實施方式中，該時間段為從6個月到12個月。在一些實施方式中，該時間段為從6個月到18個月。在一些實施方式中，該時間段為從6個月到36個月。在一些實施方式中，該時間段為從3個月到9個月。在一些實施方式中，該時間段為從3個月到24個月。在一些實施方式中，該時間段為從12個月到24個月。在一些實施方式中，該時間段為至少約3個月、約4個月、約5個月、約6個月、約7個月、

約8個月、約9個月、約10個月、約11個月、約12個月、約13個月、約14個月、約15個月、約16個月、約17個月、約18個月、約19個月、約20個月、約21個月、約22個月、約23個月或約24個月。在一些實施方式中，該時間段為從至少約4個月。在一些實施方式中，該時間段為從至少約6個月。在一些實施方式中，該時間段為從至少約12個月。在一些實施方式中，該時間段為從至少約24個月。在一些實施方式中，該時間段為從至少約30個月。在一些實施方式中，該時間段為從至少約36個月。在一些實施方式中，對抗PD-1或抗PD-L1療法具有適應性抗性之受試者在治療期間的任何時間點的特徵在於完全反應，並且此後（且在治療期間）的特徵在於疾病進展（全部根據RECIST標準（1.1版））。在一些實施方式中，對抗PD-1或抗PD-L1療法具有適應性抗性之受試者在治療期間的任何時間點的特徵在於部分反應，並且此後（且在治療期間）的特徵在於疾病進展或疾病穩定（根據RECIST標準（1.1版））。在一些實施方式中，對抗PD-1或抗PD-L1療法具有適應性抗性之受試者在治療期間的任何時間點的特徵在於部分反應，並且此後（且在治療期間）的特徵在於疾病進展（根據RECIST標準（1.1版））。在一些實施方式中，對抗PD-1或抗PD-L1療法具有適應性抗性之受試者在治療期間的任何時間點的特徵在於部分反應，並且此後（且在治療期間）的特徵在於疾病穩定（根據RECIST標準（1.1版））。在一些實施方式中，受試者中腫瘤的最長直徑在抗PD-1或抗PD-L1療法開始後減小至少30%，且此後增加。在一些實施方式中，受試者中腫瘤的最長直徑在抗PD-1或抗PD-L1療法開始後減小至少30%，且之後增加至少20%。在一些實施方式中，受試者中腫瘤的最長直徑在抗PD-1或抗PD-L1療法開始後減小至少30%，且之後出現一個或多個新的實性瘤。在一些實施方式中，對抗PD-1或抗PD-L1療法具有適應性抗性的時候在治療期間任何時間點的特徵在於實性瘤的最長直徑減小至少30%，並且之後（且在治療期間）的特徵在於實性瘤的最長直徑增加至少20%和/或出現一個或多個新的實性瘤。在一些實施方式中，最長直徑的增加係至少5 mm的增加。在一些實施方式中，對抗PD-1或抗PD-L1療法具有適應性抗性之受試者在治療期間任何時間點的

特徵在於實性瘤（例如，如果多於一個實性瘤存在，則為存在的每個實性瘤）的消失，並且之後（且在治療期間）的特徵在於實性瘤的重現（例如，在與消失的實性瘤相同的位置）。在一些實施方式中，該實性瘤係原發性腫瘤。在一些實施方式中，該實性瘤係可注射腫瘤。在一些實施方式中，已向該腫瘤注射了細胞激素mRNA混合物。在一些實施方式中，已選擇該腫瘤注射細胞激素mRNA混合物。在一些實施方式中，該實性瘤為最長直徑≥0.5 cm的皮下病變。在一些實施方式中，該實性瘤在一組融合的多個可注射合併病變中。在一些實施方式中，該實性瘤在一組融合的多個可注射合併病變中，該病變的最長直徑（所有累及目標病變的直徑的總和）≥0.5 cm。在一些實施方式中，該實性瘤沒有出血或滲液。在一些實施方式中，該實性瘤的最長直徑為至少10 mm（例如，如藉由電腦斷層攝影（CT）掃描或卡尺測量的）。在一些實施方式中，該實性瘤在受試者的胸部中，並且該實性瘤的最長直徑為至少20 mm（例如，如藉由胸部X光測量的）。在一些實施方式中，該實性瘤在淋巴結中。在一些實施方式中，該淋巴結在短軸上至少為15 mm（例如，當藉由CT掃描評估時）。在一些實施方式中，該實性瘤係淋巴瘤。在一些實施方式中，對抗PD-1或抗PD-L1療法具有適應性抗性之受試者在治療期間的任何時間點的特徵在於完全反應，並且此後（且在治療期間）的特徵在於疾病進展（根據盧加諾分類）。在一些實施方式中，對抗PD-1或抗PD-L1療法具有適應性抗性之受試者在治療期間的任何時間點的特徵在於多個病變（例如，1、2、3、4、5或6個淋巴結或結外部位）垂直直徑（PPD）乘積的總和至少降低50%，並且此後（且在治療期間）的特徵在於淋巴結內有淋巴瘤，其中該淋巴結具有 (i) 最長直徑大於1.5 cm，並且 (ii) 與最低點PPD相比增加至少50%。

【0089】 「難治性」或「抗性」癌症係對指定治療無反應之癌症。在一些實施方式中，難治性從治療的最開始就發生。在一些實施方式中，難治性在治療期間發生。在一些實施方式中，癌症在治療開始之前具有抗性。在一些實施方式中，癌症對抗PD-1療法具有難治性或抗性（即，該癌症對該療法無反應）。

在一些實施方式中，癌症對抗PD-L1療法具有難治性或抗性（即，該癌症對該療法無反應）。在一些實施方式中，受試者患有對指定治療（諸如抗PD1或抗PD-L1療法）變得難治或有抗性的癌症，例如，自首次接受該治療以來，該受試者對治療的反應減弱。在一些實施方式中，受試者尚未接受該治療，但是患有普遍地對該治療無反應之癌症。

【0090】 「淺表」（有時也稱為「皮膚」）病變或轉移係在皮膚內或在皮膚表面的病變或轉移。在一些實施方式中，淺表病變或轉移在表皮內。在一些實施方式中，淺表病變或轉移在真皮內。在一些實施方式中，淺表病變或轉移在上皮內。

【0091】 「皮下」病變或轉移在皮膚之下。在一些實施方式中，皮下病變或轉移存在於皮下組織。

【0092】 在一些實施方式中，並且在實性瘤癌症的情況下，「腫瘤病變」或「病變」係實性瘤，例如，原發性實性瘤或由另一個實性瘤的轉移引起的實性瘤。

【0093】 術語「鱗狀細胞」係指在例如皮膚、眼睛、各種內部器官以及中空器官的內壁和一些腺體的導管中發現的任何薄的扁平細胞。

【0094】 術語「皮膚鱗狀上皮細胞癌」（或「CSCC」）係指始於形成上皮（皮膚外層）的細胞中的所有階段和所有形式之癌症。術語「皮膚鱗狀上皮細胞癌」與術語皮膚的「鱗狀上皮細胞癌」可互換使用。

【0095】 術語「頭頸部的鱗狀上皮細胞癌」（或「頭頸部鱗狀上皮細胞癌」或「HNSCC」或「頭部和頸部鱗狀上皮細胞癌」）係指始於鱗狀細胞的所有階段和所有形式的頭部和頸部之癌症。頭頸部鱗狀上皮細胞癌包括（但不限於）鼻腔、鼻竇、嘴唇、口腔、唾液腺、咽喉和喉嚨（音箱）之癌症。

【0096】 術語「黑色素瘤」係指始於生黑色素細胞的所有階段和所有形式之癌症。黑色素瘤普遍地始於痣（皮膚黑色素瘤），但也可能始於其他色素沈積組織，諸如眼睛或腸內。

【0097】 「涉入腫瘤的區域淋巴結」或「涉入腫瘤的結節」係指含有轉移的區域淋巴結。在一些實施方式中，涉入腫瘤的區域淋巴結係臨床上隱匿的涉入腫瘤的區域淋巴結。在一些實施方式中，涉入腫瘤的區域淋巴結係臨床上可檢測到的涉入腫瘤的區域淋巴結。「臨床上隱匿」的涉入腫瘤的區域淋巴結在沒有區域淋巴結轉移的臨床或影像學證據的情況下描述了顯微鏡下鑒定的區域結節轉移。在一些實施方式中，藉由前哨淋巴結（SLN）生物檢體且在沒有區域結節轉移的臨床或放射學證據的情況下檢測臨床上隱匿的涉入腫瘤的區域淋巴結。在一些實施方式中，「臨床上可檢測到的」結節轉移描述了具有區域結節轉移的患者，該區域結節轉移可藉由臨床、放射線攝影或超音波檢查來鑒定，並且通常（但不是必須）藉由生物檢體來確認。

【0098】 「非結節局部區域」係指由於淋巴管內或血管營養性腫瘤擴散而引起的轉移，包括微衛星轉移、衛星轉移和在途轉移。「衛星」轉移係指在原發性黑色素瘤的2 cm內發生的臨床上明顯的皮膚和/或皮下轉移。

【0099】 「微衛星」轉移係指在對原發部位進行病理檢查時發現的與原發黑色素瘤相鄰或較深的顯微可見的皮膚和/或皮下轉移。在一些實施方式中，微衛星轉移與原發性黑色素瘤完全不連續，而未受影響的基質佔據了它們之間的空間。

【0100】 「在途」轉移係指在區域淋巴結的原發梯級和第一梯級之間的區域中距原發黑色素瘤超過2 cm的距離處鑒定的臨床上明顯的皮膚和/或皮下轉移。在一些實施方式中，衛星轉移或在途轉移可發生在原發性黑色素瘤的遠端。

【0101】 「粗糙結節」係指兩個或多個結節藉由轉移性疾病的涉入而彼此黏附。在一些實施方式中，粗糙結節係在病理實驗室中宏觀檢查樣本時鑒定出的。

【0102】 「遠處轉移」係指已從原發性腫瘤擴散到遠處器官或遠處淋巴結之癌症。在一些實施方式中，該遠處轉移可在皮膚、皮下組織、肌肉或遠處淋巴結中檢測到。在一些實施方式中，該遠處轉移可在肺中檢測到。在一些實施方式中，該遠處轉移可在中樞神經系統（CNS）中檢測到。在一些實施方式中，

該遠處轉移可在除CNS之外的任何其他內臟部位檢測到，包括肺、心臟或消化、排泄、生殖或循環系統的器官。在一些實施方式中，遠處轉移存在於與含有原發性腫瘤的組織或器官不直接接觸（例如，接觸或直接連接）的組織或器官中。

【0103】 在一些實施方式中，轉移（例如，遠處轉移）存在於肝臟中（例如，可在其中檢測到）。

【0104】 「結節外延伸」（ENE）係指轉移性細胞在結節轉移過程中藉由結節被膜向結節周圍組織的延伸。向結節被膜延伸但不破壞結節被膜的囊性轉移可歸為ENE陰性。在一些實施方式中，該ENE陽性包括大的結外血管。在一些實施方式中，該ENE陽性從結節被膜延伸小於2 mm。在一些實施方式中，該ENE陽性從淋巴結被膜延伸超過2 mm或在解剖時肉眼可見。

【0105】 「深度浸潤」係指厚度大於6 mm或浸潤深度超過皮下脂肪。在一些實施方式中，浸潤存在於比真皮更深的大於0.1 mm的神經中。

【0106】 「抑制」、「抑制性」等係指相互作用的全部或部分阻斷，或生物學作用的降低。例如，抑制PD-1與PD-L1結合的抗PD1抗體可能會完全或部分阻斷該相互作用。抑制T細胞活化的阻抑包括阻抑量的任何減少。抑制腫瘤的生長或轉移包括減少或完全停止。

【0107】 術語「有效量」係指提供期望的生物學、治療和/或預防結果的試劑（諸如多種RNA的混合物）之量。該結果可以是疾病（諸如晚期實性瘤癌症）的一種或多種的體徵、症狀或病因的減少、改善、緩解、減輕、延遲、預防和/或緩和。在一些實施方式中，有效量包括足以引起實性瘤/病變縮小之量。在一些實施方式中，有效量係足以降低實性瘤的生長速率（諸如阻抑腫瘤生長）之量。在一些實施方式中，有效量係足以延遲腫瘤發展之量。在一些實施方式中，有效量係足以預防或延遲腫瘤復發之量。在一些實施方式中，有效量係足以增加受試者對腫瘤的免疫反應，從而減少、延遲、改善和/或預防腫瘤生長和/或大小和/或轉移之量。有效量可以一次或分多次施用。在一些實施方式中，施用有效量（例如，包含多種mRNA的組成物）可以：(i) 減少癌細胞的數量；(ii) 縮小

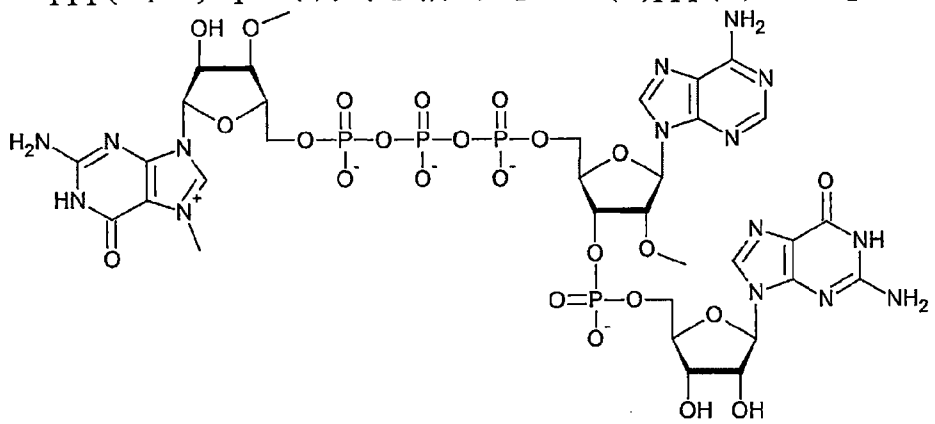
腫瘤大小；(iii) 一定程度上抑制、延緩、減緩，並可以阻止癌細胞浸潤到周圍器官中；(iv) 抑制（例如，一定程度上減緩和/或阻斷或預防）轉移；(v) 抑制腫瘤生長；(vi) 預防或延遲腫瘤的發生和/或復發；和/或 (vii) 一定程度上緩解與癌症有關的一種或多種症狀。

【0108】 本文所用的術語「聯合施用」或「聯合給藥」等係指作為單一制劑的一部分或作為多種製劑藉由相同或不同的途徑施用，同時、同步或基本上同時施用兩種或更多種藥劑。如本文所用，「基本上同時」係指彼此相隔約1分鐘、5分鐘、10分鐘、15分鐘、30分鐘、1小時、2小時或6小時以內。

【0109】 在一些實施方式中，該RNA包含取代至少一個（例如，每個）尿苷的經修飾的核鹼基。在一些實施方式中，該RNA包含該RNA的5'末端的Cap1結構。在一些實施方式中，該RNA包含取代至少一個（例如，每個）尿苷的經修飾的核鹼基和該RNA的5'末端的Cap1結構。在一些實施方式中，該5'UTR包含SEQ ID NO: 4或6。在一些實施方式中，該RNA已經經過處理以減少雙股RNA（dsRNA），例如，藉由纖維素純化（如實例中所述和本領域已知的）或藉由高效液相層析法（HPLC）來處理。該「Cap1」結構可以在體外轉錄後藉由酶促加帽或在體外轉錄（共轉錄加帽）期間生成。

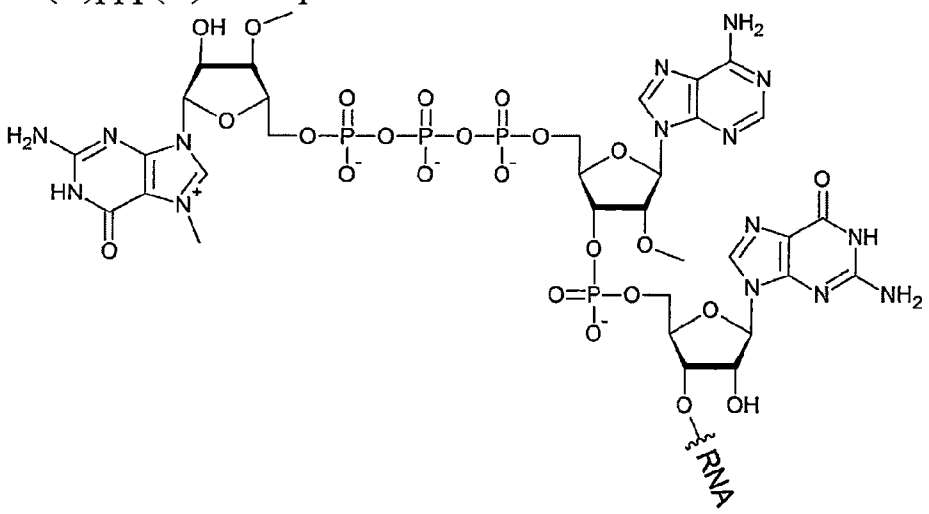
【0110】 在一些實施方式中，用於經修飾的RNA的構件帽如下，當共轉錄加帽時使用：

$m_2^{7,3'\text{-}O}Gppp(m_1^{2'\text{-}O})ApG$（有時也稱為$m_2^{7,3'O}G(5')ppp(5')m^{2'\text{-}O}ApG$），其結構如下：

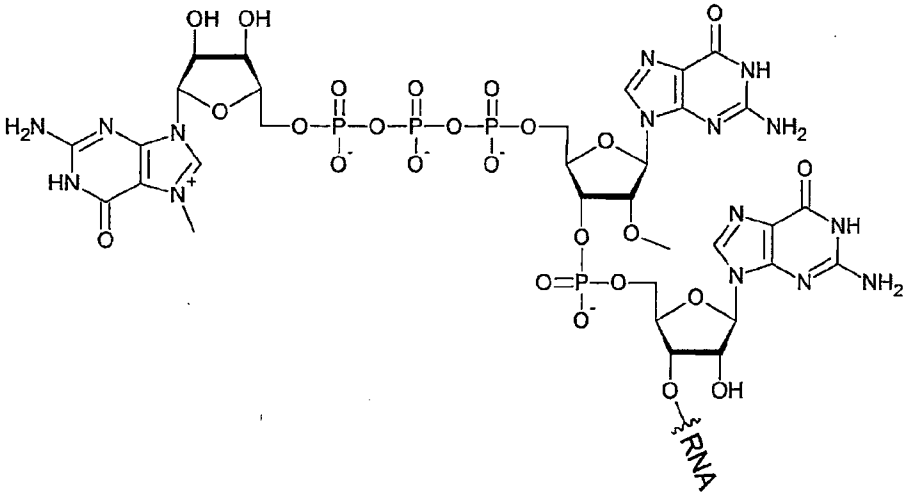


。

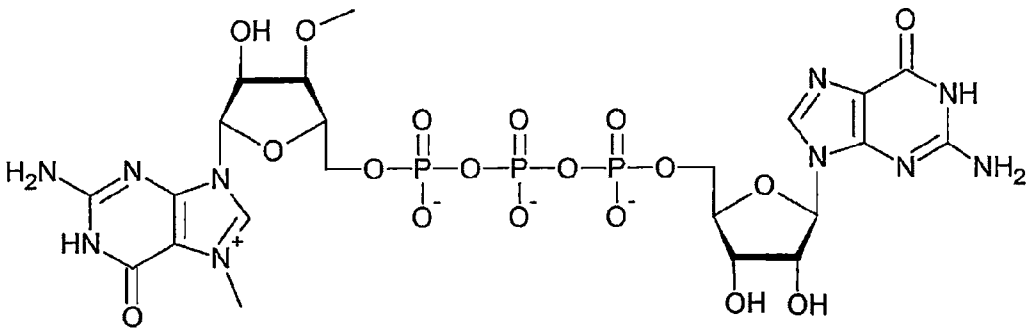
【0111】 以下是共轉錄加帽後的示例性Cap1 RNA，其中包含RNA和$m_2^{7,3`O}G(5')ppp(5')m^{2'-O}ApG$：



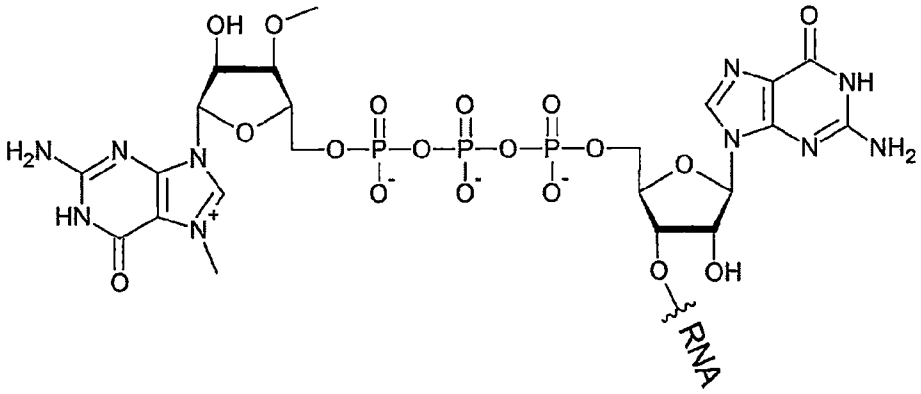
【0112】 以下是酶促加帽後的另一種示例性Cap1 RNA（無帽類似物）：



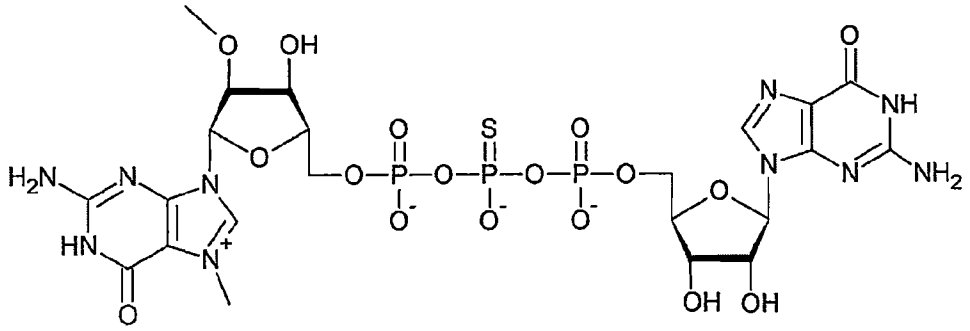
【0113】 在一些實施方式中，該RNA係經「Cap0」結構修飾，該「Cap0」結構藉由使用（在一個實施方式中）帽類似物防反轉帽（ARCA帽（$m_2^{7,3`O}G(5')ppp(5')G$））在體外轉錄（共轉錄加帽）過程中產生，該帽類似物之結構如下：



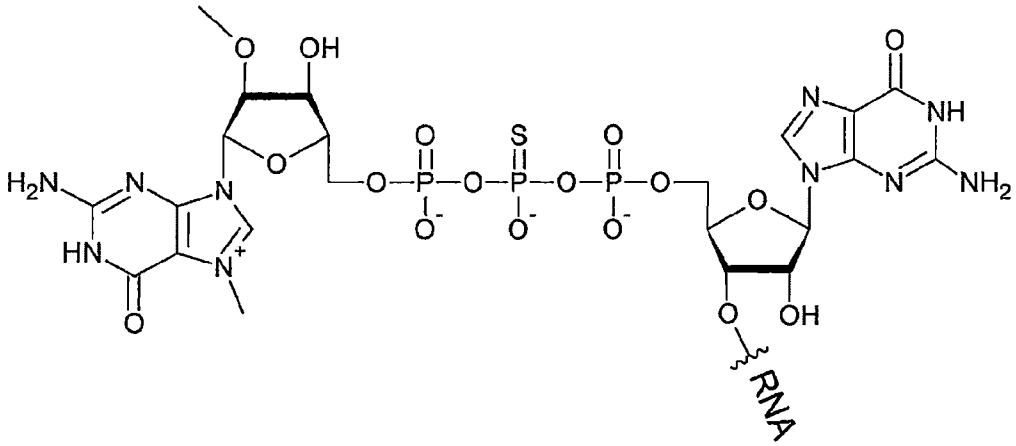
【0114】 以下是包含RNA和$m_2^{7,3'O}$G(5')ppp(5')G的示例性Cap0 RNA：



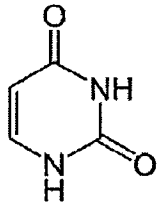
【0115】 在一些實施方式中，該「Cap0」結構係在體外轉錄（共轉錄加帽）過程中，使用帽類似物β-S-ARCA（$m_2^{7,2'O}$G(5')ppSp(5')G）產生的，該帽類似物之結構如下：



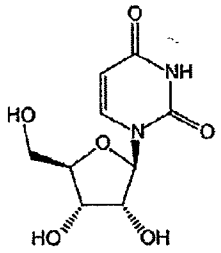
【0116】 下面係包含β-S-ARCA ($m_2^{7,2'O}$G(5')ppSp(5')G)和RNA的示例性Cap0 RNA。



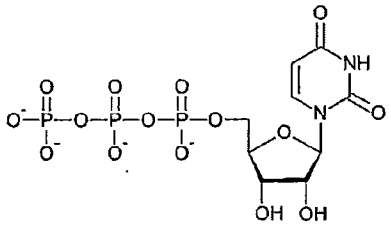
【0117】 如本文所用，術語「尿嘧啶」描述可以在RNA的核酸中出現的核鹼基之一。尿嘧啶之結構為：



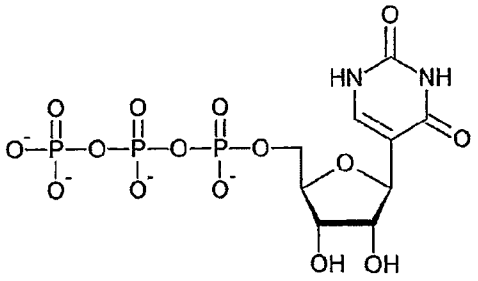
【0118】 如本文所用，術語「尿苷」描述可以在RNA中存在的核苷之一。尿苷之結構為：



【0119】 UTP（尿苷5'-三磷酸酯）具有以下結構：



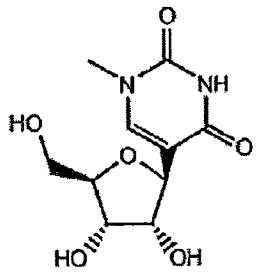
【0120】 假UTP（假尿苷5'-三磷酸酯）具有以下結構：



。

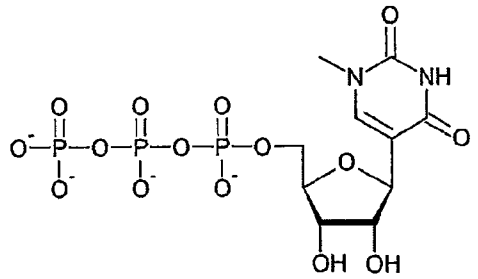
【0121】 「假尿苷」係經修飾核苷的一個實例，它係尿苷的一種異構物，其中尿嘧啶藉由碳-碳鍵而不是氮-碳糖苷鍵連接至戊糖環。假尿苷的描述於，例如，Charette和Gray, *Life*；49:341-351 (2000)。

【0122】 另一個示例性的經修飾核苷係N1-甲基-假尿苷（m1Ψ），它具有以下結構：



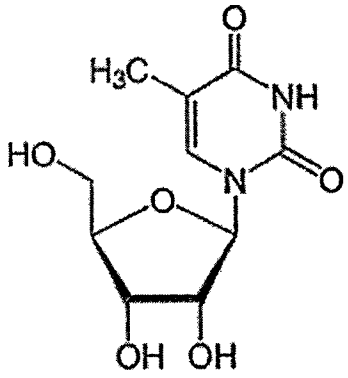
。

【0123】 N1-甲基-假-UTP具有以下結構：



。

【0124】 另一個示例性的經修飾核苷係5-甲基-尿苷（m5U），它具有以下結構：



【0125】 如本文所用，術語「聚A尾」或「聚-A序列」係指腺苷酸殘基的不間斷或間斷序列，該等序列普遍地位於RNA分子的3'端。聚A尾或聚-A序列係熟悉該項技術者已知的，並且可以在本文所述之該等RNA中出現在3'UTR之後。不間斷的聚A尾的特徵在於連續的腺苷酸殘基。本質上，不間斷的聚A尾係典型的。本文揭露的RNA可以具有在轉錄後藉由模板非依賴性RNA聚合酶連接至RNA的游離3'末端的聚A尾，或者具有由DNA編碼並由模板依賴性RNA聚合酶轉錄的聚A尾。

【0126】 已經證明，約120個A核苷酸的聚A尾對轉染的真核細胞中RNA的量以及從該聚A尾的上游（5'）存在的開放閱讀框所轉譯的蛋白質量具有有益的影響（Holtkamp等人, 2006, Blood, 第108卷, 第4009-4017頁）。

【0127】 該聚A尾可以具有任何長度。在一些實施方式中，聚A尾包含，基本上由以下組成，或由以下組成：至少20、至少30、至少40、至少80或至少100且最多500、最多400、最多300、最多200個或最多150個A核苷酸，並且特別地大約120個A核苷酸。在本文中，「基本上由……組成」係指該聚A尾中的大多數核苷酸，普遍地按該聚A尾中的核苷酸的數量至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的核苷酸為A核苷酸，但允許其餘核苷酸為除A核苷酸之外的其他核苷酸，例如U核苷酸（尿苷酸）、G核苷酸（鳥苷酸）或C核苷酸（胞苷酸）。在本文中，「由……組成」係指該聚A尾中的所有核苷酸，即按該聚A尾中的核苷酸數量100%為A核苷酸。術語「核苷酸」或「A」係指腺苷酸。

【0128】 在一些實施方式中，聚A尾係基於在與編碼股互補的股中包含重複的dT核苷酸（去氧胸苷酸）的DNA模板，在RNA轉錄的過程中，例如，在製備體外轉錄的RNA的過程中連接的。該編碼聚A尾（編碼股）的DNA序列稱為聚(A)盒。

【0129】 在一些實施方式中，存在於DNA的編碼股中的該聚(A)盒基本上由dA核苷酸組成，但是由四個核苷酸（dA、dC、dG和dT）的隨機序列中斷。這種隨

機序列的長度可以是5至50、10至30或10至20個核苷酸。這種盒在WO 2016/005324 A1中揭露，藉由引用將其併入本文。WO 2016/005324 A1中揭露的任何聚(A)盒都可以用於本發明。基本上由dA核苷酸組成的，但是由具有平均分配的四個核苷酸（dA、dC、dG、dT）、長度為例如5至50個核苷酸的隨機序列中斷的聚(A)盒顯示在DNA水平上大腸桿菌（*E. coli*）中質體DNA的持續增殖，且在RNA水平上仍與支持RNA穩定性方面的有益特性有關且包含了轉譯效率。因此，在一些實施方式中，本文所描述的RNA分子中包含的聚A尾基本上由A核苷酸組成，但是由四個核苷酸（A，C，G，U）的隨機序列中斷。這種隨機序列的長度可以是5至50、10至30或10至20個核苷酸。

【0130】 在一些實施方式中，除A核苷酸外，沒有核苷酸存在於聚A尾之3'端的側翼，亦即該聚A尾在其3'端沒有被A以外的核苷酸掩蔽或跟隨。

【0131】 在一些實施方式中，聚A尾包含以下序列：AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCAUAUGACUAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

瘤的復發。治療也可以作為有效性的生物標誌物或成像或放射線攝影測量的變化進行測量。

【0135】 如本文所用，術語「單一療法」係指使用一種類型的治療的療法，例如，單獨的RNA療法，單獨的放射療法或單獨的手術，以治療某種疾病或病症（諸如癌症）。在藥物療法中，單一療法係指使用單一藥物（該藥物可以包括多種活性劑，例如，多種RNA的混合物）來治療疾病或病症。在一些實施方式中，該單一療法係為治療癌症，在沒有用於治療該癌症的任何其他療法的情況下而施用的療法。在一些實施方式中，用於治療癌症的單一療法可以視需要與另一種用於減輕該癌症的症狀但不能治療癌症本身（例如，該治療不是意在或預期會影響實性瘤的生長或大小）的治療組合使用，但不得與任何其他針對該癌症的療法（例如，化學治療劑或放射療法）組合使用。在這樣之實施方式中，作為單一療法施用多種RNA的混合物係指在沒有例如放射療法或任何化學治療劑的情況下施用多種RNA的混合物。然而，在這樣之實施方式中，作為單一療法施用多種RNA的混合物並不排除與該多種RNA的混合物同時或同步施用不針對該癌症的藥劑，例如，減輕疼痛的試劑。

【0136】 如本文所用，術語「預防」係指在被認為無癌症之受試者中抑制或阻止包括實性瘤在內的癌症的發展。

【0137】 「轉移」係指癌症從作為原發腫瘤最初起源的部位擴散到身體其他部位的過程。

【0138】 本文所用的術語「瘤內」（「intratumorally」或「intratumoral」）係指進入腫瘤內。例如，瘤內注射係指在接觸腫瘤的任何位置注射治療劑。

【0139】 如本文所用，「淋巴瘤」係源自淋巴細胞的實性瘤癌症。淋巴瘤包括何杰金氏淋巴瘤和非何杰金氏淋巴瘤。淋巴瘤在淋巴結內形成實性瘤/贅生物，轉移時也可在非淋巴結組織中發現。

【0140】 如本文所用，術語「瘤周」（「peri-tumorally」或「peri-tumoral」或「peritumoral」或「peritumorally」）係約2 mm寬且與腫瘤週邊的浸潤前沿相鄰的區域。瘤周區域包括宿主組織。參見，例如，圖11。

【0141】 「施用」係指向受試者提供藥劑或組成物，並且包括但不限於由醫學專業人員施用和自行施用。

【0142】 本揭露分別描述了與給定核酸序列或胺基酸序列（參考序列）具有一定程度同一性的核酸序列和胺基酸序列。

【0143】 兩個核酸序列之間的「序列同一性」表示序列之間相同的核苷酸的百分比。兩個胺基酸序列之間的「序列同一性」表示序列之間相同的胺基酸的百分比。

【0144】 術語「%相同的」、「%同一性」或類似術語特別地意指，要比較的序列之間在最佳比對中相同的核苷酸或胺基酸的百分比。所述百分比純粹係統計上的，並且兩個序列之間的差異可以是但不一定係隨機分佈在要比較的序列的整個長度上。兩個序列的比較通常藉由在最佳比對之後，相對於片段或「比較窗口」比較該等序列來進行，以鑒定相應序列的局部區域。用於比較的最佳比對可以手動進行，也可以借助Smith和Waterman, 1981, Ads App.Math. [應用數學進展] 2, 482的局部同源性演算法，借助Neddleman和Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. [分子生物學雜誌] 48, 443的局部同源性演算法，借助Pearson和Lipman, 1988, Proc. Natl Acad. Sci. USA [美國國家科學院院刊] 88, 2444的相似性搜索演算法，或借助使用所述演算法的電腦程式（位於威斯康辛遺傳學套裝軟體中的GAP、BESTFIT、FASTA、BLAST P、BLAST N和TFASTA，遺傳學電腦集團（Genetics Computer GroupGenetics Computer Group），威斯康辛州麥迪森科學路575號）。在一些實施方式中，使用BLASTN或BLASTP演算法確定兩個序列的同一性百分比，該演算法可在美國國家生物技術資訊中心（NCBI）網站上獲取（例如，blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch&BLAST_SPEC=blast2seq&LINK_LOC=align2seq）。在一些實施方式中，NCBI網站上用於BLASTN演

算法的演算法參數包括：(i) 預期閾值設為10；(ii) 字長設為28；(iii) 查詢範圍內的最大匹配數設為0；(iv) 匹配/不匹配得分設為1, -2；(v) 空位成本（Gap Cost）設為線性；以及 (vi) 所使用的低複雜度區域的過濾器。在一些實施方式中，在NCBI網站上用於BLASTP演算法的演算法參數包括：(i) 期望閾值設為10；(ii) 字長設為3；(iii) 查詢範圍內的最大匹配數設為0；(iv) 矩陣設為BLOSUM62；(v) 空位成本設置為存在: 11延伸: 1；以及 (vi) 有條件的成分評分矩陣調整。

【0145】 百分比同一性係藉由確定要比較的序列對應的相同位置的數目，用該數目除以比較的位置數（例如，參考序列中的位置數），然後將此結果乘以100得到的。

【0146】 在一些實施方式中，一個區域給定的同一性程度係參考序列整個長度的至少約50%、至少約60%、至少約70%、至少約80%、至少約90%或約100%。例如，如果參考核酸序列由200個核苷酸組成，在一些實施方式中，在連續核苷酸中給出至少約100、至少約120、至少約140、至少約160、至少約180或約200個核苷酸的同一性程度。在一些實施方式中，該同一性程度係對於參考序列的整個長度給出的。

【0147】 分別與給定核酸序列或胺基酸序列具有特定同一性程度的核酸序列或胺基酸序列，可以具有所述給定序列的至少一種功能特性，例如，在一些情況下，在功能上等同於所述給定序列。一個重要的特性包括充當細胞激素的能力，特別是當施用於受試者時。在一些實施方式中，與給定核酸序列或胺基酸序列具有特定同一性程度的核酸序列或胺基酸序列在功能上等同於該給定序列。

【0148】 本文使用的術語「抗體」涵蓋各種抗體結構，包括單株抗體、多株抗體、多特異性抗體（例如，雙特異性和三特異性抗體）和抗體片段，只要它們表現出期望的活性即可。

【0149】 術語抗體包括，能夠結合抗原的片段，諸如Fv、單鏈Fv（scFv）、Fab、Fab'、二-scFv、sdAb（單結構域抗體）和(Fab')2（包括化學連接的F(ab')2）。

術語抗體還包括嵌合抗體和人源化抗體，只要它們適合於向人施用即可。抗體片段還包括單鏈scFv的任一取向、串聯二-scFv、雙抗體、串聯三-sdcFv、微型抗體等。抗體片段還包括奈米抗體（sdAb，具有單一單體結構域的抗體，諸如重鏈的一對可變結構域，沒有輕鏈）。

【0150】 術語「單株抗體」係指基本上同質的抗體群的抗體，即，除了可能以少量存在的可能的自然發生的突變以外，構成該抗體群的各個抗體係相同的。單株抗體針對單個抗原位點具有高度特異性。此外，對比於與普遍地包括針對不同決定簇（表位）的不同抗體的多株抗體製劑，每種單株抗體針對抗原上的單一決定簇。因此，單株抗體樣本可以結合抗原上的相同表位。修飾語「單株」指示獲得自實質上均質的抗體群體的抗體的特徵，並且不應理解為要求藉由任何特定方法產生抗體。例如，該等單株抗體可以藉由雜交瘤方法來製備，該方法最先由Kohler和Milstein, 1975, Nature 256:495描述，或者可以藉由重組DNA方法來製備，諸如美國專利號4,816,567中描述的。該等單株抗體也可以從噬菌體庫中分離，該噬菌體庫使用例如McCafferty等人, 1990, Nature 348:552-554中描述的技術生成。

【0151】 術語「CDR」表示藉由熟悉該項技術者的至少一種鑒定方式確定的互補性決定區。抗體中的各種CDR可以藉由其相應的數量和鏈類型來命名，包括但不限於：a) CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3、CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3；b) CDRL1、CDRL2、CDRL3、CDRH1、CDRH2和CDRH3；c) LCDR-1、LCDR-2、LCDR-3、HCDR-1、HCDR-2和HCDR-3；或d) LCDR1、LCDR2、LCDR3、HCDR1、HCDR2和HCDR3；等。本文使用的術語「CDR」還涵蓋HVR或「超可變區」，包括高變環（例如，Chothia和Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)）。

【0152】 如本文所用，術語「重鏈可變區」係指包含至少三個重鏈CDR的區域。在一些實施方式中，該重鏈可變區包括三個CDR和至少FR2和FR3。在一些實施方式中，該重鏈可變區至少包括重鏈HCDR1、框架（FR）2、HCDR2、FR3

和HCDR3。在一些實施方式中，重鏈可變區還包含FR1的至少一部分和/或FR4的至少一部分。

【0153】 如本文所用，術語「重鏈恆定區」係指包含至少三個重鏈恒定結構域CH1、CH2和CH3的區域。當然，除非另外指定，否則該等結構域內不改變功能的缺失和改變涵蓋在術語「重鏈恆定區」的範圍內。非限制性示例性重鏈恆定區包括γ、δ和α。非限制性示例性重鏈恆定區還包括ε和μ。每個重恆定區對應於一個抗體同種型。例如，包含γ恆定區的抗體係IgG抗體，包含δ恆定區的抗體係IgD抗體，並且包含α恆定區的抗體係IgA抗體。此外，包含μ恆定區的抗體係IgM抗體，並且包含ε恆定區的抗體係IgE抗體。某些同種型可以進一步細分為多個亞類。例如，IgG抗體包括但不限於IgG1（包含γ1恆定區）、IgG2（包含γ2恆定區）、IgG3（包含γ3恆定區）和IgG4（包含γ4恆定區）抗體；IgA抗體包括但不限於IgA1（包含α1恆定區）和IgA2（包含α2恆定區）抗體；並且IgM抗體包括但不限於IgM1和IgM2。

【0154】 如本文所用，術語「重鏈」係指包含至少一個重鏈可變區，具有或不具有前導序列的多肽。在一些實施方式中，重鏈包含重鏈恆定區的至少一部分。如本文所用，術語「全長重鏈」係指包含重鏈可變區和重鏈恆定區，具有或不具有前導序列的多肽。

【0155】 如本文所用，術語「輕鏈可變區」係指包含至少三個輕鏈CDR的區域。在一些實施方式中，該輕鏈可變區包括三個CDR和至少FR2和FR3。在一些實施方式中，該輕鏈可變區至少包括輕鏈LCDR1、框架（FR）2、LCDR2、FR3和LCDR3。例如，輕鏈可變區可包含輕鏈CDR1、框架（FR）2、CDR2、FR3和CDR3。在一些實施方式中，輕鏈可變區還包含FR1的至少一部分和/或FR4的至少一部分。

【0156】 如本文所用，術語「輕鏈恆定區」係指包含輕鏈恒定結構域CL的區域。非限制性示例性輕鏈恆定區包括λ和κ。當然，除非另外指定，否則該等結構域內不改變功能的缺失和改變涵蓋在術語「輕鏈恆定區」的範圍內。

【0157】 如本文所用，術語「輕鏈」係指包含至少一個輕鏈可變區，具有或不具有前導序列的多肽。在一些實施方式中，輕鏈包含輕鏈恆定區的至少一部分。如本文所用，術語「全長輕鏈」係指包含輕鏈可變區和輕鏈恆定區，具有或不具有前導序列的多肽。

【0158】 如本文所用，術語「表位」係指靶分子上抗體結合的位點。表位通常包括分子例如胺基酸、多肽或糖側鏈的化學活性表面分組，並且具有特定的三維結構特徵以及特定的電荷特徵。

【0159】 除非在以上說明書中特別指出，否則說明書中列舉「包括」各種元件之實施方式也被認為係「由所列舉元件組成」或「基本上由所列舉元件構成」；說明書中列舉「由各種元件組成」之實施方式也被認為係「包括」或「基本上由所列舉元件組成」；並且說明書中列舉「基本上由各種元件組成」之實施方式也被認為係「由所列舉元件組成」或「包括所列舉元件」（這種互換性不適用於中的該等術語的使用）。如的條款中所使用的，過渡術語「包含」與「包括」、「含有」或「由……表徵」同義，係包含性的或開放式的，並且不排除附加的、未列舉的要素或方法步驟。如在的條款中所使用的，過渡短語「由……組成」排除了中未指定的任何要素、步驟或元件，過渡短語「基本上由……構成」將術語的範圍限制為所列舉的元件以及實質上不影響所要求保護的術語的基本和新穎特徵的那些，正如從說明書中可以理解的。

2. 施用的RNA

【0160】 在一些實施方式中，包括了用於治療晚期實性瘤癌症之方法，包括向患有晚期實體瘤癌症之受試者與抗PD-1抗體組合施用編碼IL-12sc蛋白的RNA、編碼IL-15 sushi蛋白的RNA、編碼IFNα蛋白的RNA以及編碼GM-CSF蛋白的RNA。施用的RNA的詳細資訊如下。

【0161】 在一些實施方式中，施用RNA包括施用編碼IFNα的RNA、編碼IL-15 sushi的RNA、編碼IL-12sc的RNA和編碼GM-CSF的RNA，它們視需要經修飾以具有代替每個尿苷的經修飾的核鹼基和該RNA的5'末端的Cap1結構。

【0162】 在一些實施方式中，施用RNA包括施用編碼IL-12sc的RNA，並且進一步包括施用編碼IFNα、IL-15 sushi和GM-CSF的RNA。

【0163】 在一些實施方式中，施用RNA包括施用編碼IFNα的RNA，並且進一步包括施用編碼IL-12sc、IL-15 sushi和GM-CSF的RNA。

【0164】 在一些實施方式中，施用RNA包括施用編碼IL-15 sushi的RNA，並且進一步包括施用編碼IL-12sc、IFNα和GM-CSF的RNA。

【0165】 在一些實施方式中，施用RNA包括施用編碼GM-CSF的RNA，並且進一步包括施用編碼IL-12sc、IFNα和IL-15 sushi的RNA。

【0166】 在一些實施方式中，該細胞激素RNA混合物中的IFNα蛋白係IFNα2b蛋白，並且該方法包括施用編碼IFNα2b蛋白的RNA。

【0167】 在一些實施方式中，(i) 該編碼IL-12sc蛋白的RNA包含SEQ ID NO: 17或18之核苷酸序列，或與SEQ ID NO: 17或18之核苷酸序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%同一性之核苷酸序列，和/或 (ii) 該IL-12sc蛋白包含SEQ ID NO: 14的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 14的胺基酸序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%同一性的胺基酸序列。

【0168】 在一些實施方式中，(i) 該編碼IL-15 sushi蛋白的RNA包含SEQ ID NO: 26之核苷酸序列，或與SEQ ID NO: 26之核苷酸序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%同一性之核苷酸序列，和/或 (ii) 該IL-15 sushi蛋白包含SEQ ID NO: 24的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 24的胺基酸序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%同一性的胺基酸序列。

【0169】 在一些實施方式中，(i) 該編碼IFNα蛋白的RNA包含SEQ ID NO: 22或23之核苷酸序列，或與SEQ ID NO: 22或23之核苷酸序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%同一性之核苷酸序列，和/或 (ii) 該IFNα蛋

白包含SEQ ID NO: 19的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 19的胺基酸序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%同一性的胺基酸序列。

【0170】 在一些實施方式中，(i) 該編碼GM-CSF蛋白的RNA包含SEQ ID NO: 29之核苷酸序列，或與SEQ ID NO: 29之核苷酸序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%同一性之核苷酸序列，和/或 (ii) 該GM-CSF蛋白包含SEQ ID NO: 27的胺基酸序列或與SEQ ID NO: 27的胺基酸序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%同一性的胺基酸序列。

A. 單鏈介白素-12（IL-12sc）

【0171】 在一些實施方式中，提供了編碼單鏈介白素12（IL-12sc）的RNA。在一些實施方式中，該單鏈介白素-12（IL-12sc）RNA由編碼單鏈介白素-12（IL-12sc）的DNA序列編碼（例如，SEQ ID NO: 14）編碼，該序列包含IL-12 p40（有時稱為IL-12B；由SEQ ID NO: 15的核苷酸1至984編碼）、連接子（諸如GS連接子）和IL-12 p35（有時稱為IL-12A；由SEQ ID NO: 15的核苷酸1027至1623編碼）。在一些實施方式中，該IL-12p40、連接子和IL-12p35係連續的，沒有介於中間之核苷酸。SEQ ID NO: 15提供了示例性的編碼IL-12sc的DNA序列。在一些實施方式中，該單鏈介白素-12（IL-12sc）RNA在SEQ ID NO: 17或18處提供了，兩者均編碼SEQ ID NO: 14的蛋白質。IL-12 p40的RNA序列顯示在SEQ ID NO: 17或18的核苷酸1至984處，並且IL-12 p35的RNA序列顯示在SEQ ID NO: 17或18的核苷酸1027至1623處。

【0172】 在一些實施方式中，該IL-12sc RNA由編碼IL-12sc的密碼子最佳化的DNA序列編碼。在一些實施方式中，該IL-12sc RNA由編碼IL-12 p40的密碼子最佳化的DNA序列編碼。在一些實施方式中，該IL-12sc RNA由編碼IL-12 p35的密碼子最佳化的DNA序列編碼。在一些實施方式中，該密碼子最佳化的DNA序列包含SEQ ID NO: 16或由其組成。在一些實施方式中，該DNA序列包含與SEQ ID NO: 16具有70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一

性的密碼子最佳化的DNA序列。在一些實施方式中，編碼IL-12 p40的密碼子最佳化的DNA序列包含編碼IL-12sc-p40的核苷酸（SEQ ID NO: 16的核苷酸1至984）。在一些實施方式中，編碼IL-12 p35的密碼子最佳化的DNA序列包含編碼IL-12sc-p35的核苷酸（SEQ ID NO: 16的核苷酸1027至1623）。在一些實施方式中，編碼IL-12sc的密碼子最佳化的DNA序列包含編碼SEQ ID NO: 16的IL-12sc-p40（SEQ ID NO: 16的核苷酸1至984）和IL-12sc-p35（SEQ ID NO: 16的核苷酸1027至1623）部分的核苷酸，並且進一步包含p40和p35部分之間的核苷酸（例如，SEQ ID NO: 16的核苷酸985至1026），該p40和p35部分之間的核苷酸編碼連接p40和p35部分的連接子多肽。可以使用熟悉該項技術者已知的任何連接子。該p40部分可能是p35部分的5'或3'。

【0173】 在一些實施方式中，該IL-12sc RNA包含，例如，從編碼IL-12sc的DNA序列轉錄的RNA序列。該RNA也可以重組產生。在一些實施方式中，該RNA序列從包含SEQ ID NO: 15或16之核苷酸序列轉錄。在一些實施方式中，該RNA序列包含SEQ ID NO: 17或18或由其組成。在一些實施方式中，該RNA序列包含與SEQ ID NO: 17或18具有70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的RNA序列或由其組成。在一些實施方式中，該RNA序列包含編碼SEQ ID NO: 17或18的IL-12sc-p40（SEQ ID NO: 17或18的核苷酸1至984）和-p35（SEQ ID NO: 17或18的核苷酸1027至1623）部分之核苷酸。在一些實施方式中，編碼IL-12sc的密碼子最佳化的RNA序列包含編碼SEQ ID NO: 18的IL-12sc-p40（SEQ ID NO: 18的核苷酸1至984）和-p35（SEQ ID NO: 18的核苷酸1027至1623）部分的核苷酸，並且進一步包含p40和p35部分之間的核苷酸，該p40和p35部分之間的核苷酸編碼連接p40和p35部分的連接子多肽。可以使用熟悉該項技術者已知的任何連接子。

【0174】 在一些實施方式中，該IL-12sc RNA中的一個或多個尿苷被本文所述之經修飾核苷替代。在一些實施方式中，該替代尿苷的經修飾核苷係假尿苷（ψ）、N1-甲基-假尿苷（$m^1\psi$）或5-甲基-尿苷（m^5U）。在一些實施方式中，

該RNA包含取代每個尿苷的經修飾核苷。在一些實施方式中，該經修飾核苷係N1-甲基-假尿苷（$m^1\psi$）。

【0175】 在一些實施方式中，該IL-12sc RNA包含5'末端的修飾的核苷。在一些實施方式中，該RNA包含5'帽。可以使用本領域已知的任何5'帽。在一些實施方式中，該5'帽包含5'-5'三磷酸鍵。在一些實施方式中，該5'帽包含包括硫代磷酸酯修飾的5'-5'三磷酸鍵，。在一些實施方式中，該5'帽包含2'-*O*或3'-*O*-核糖-甲基化之核苷酸。在一些實施方式中，該5'帽包含經修飾的鳥苷核苷酸或經修飾的腺苷核苷酸。在一些實施方式中，該5'帽包含7-甲基鳥苷酸酯。在一些實施方式中，該5'帽係Cap0或Cap1。示例性帽結構包括m7G(5')ppp(5')G、m7,2`*O*-mG(5')pp$_S$p(5')G、m7G(5')ppp(5')2`*O*-mG和m7,3`*O*-mG(5')ppp(5')2`*O*-mA。

【0176】 在一些實施方式中，該IL-12sc RNA包含5'非轉譯區（UTR）。在一些實施方式中，該5'UTR在起始密碼子的上游。在一些實施方式中，該5'UTR調節該RNA的轉譯。在一些實施方式中，該5'UTR係穩定序列。在一些實施方式中，該5'UTR增加了RNA的半衰期。可以使用本領域已知的任何5'UTR。在一些實施方式中，該5'UTR RNA序列從SEQ ID NO: 3或5轉錄。在一些實施方式中，該5'UTR RNA序列包含SEQ ID NO: 4或6或由其組成。在一些實施方式中，該5'UTR RNA序列與SEQ ID NO: 4或6至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同。

【0177】 在一些實施方式中，該IL-12sc RNA包含3'UTR。在一些實施方式中，該3'UTR跟在轉譯終止密碼子之後。在一些實施方式中，該3'UTR調節該RNA的聚腺苷酸化、轉譯效率、定位或穩定性。在一些實施方式中，該3'UTR RNA序列從SEQ ID NO: 7轉錄。在一些實施方式中，該3'UTR RNA序列包含SEQ ID NO: 8或由其組成。在一些實施方式中，該3'UTR RNA序列與SEQ ID NO: 8至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同。

【0178】 在一些實施方式中，該IL-12sc RNA既包含5'UTR又包含3'UTR。在一些實施方式中，該IL-12sc RNA僅包含5'UTR。在一些實施方式中，該IL-12sc RNA僅包含3'UTR。

【0179】 在一些實施方式中，該IL-12sc RNA包含聚A尾。在一些實施方式中，該RNA包含至少約25、至少約30、至少約50個核苷酸、至少約70個核苷酸或至少約100個核苷酸的聚A尾。在一些實施方式中，該聚A尾包含200個或更多個核苷酸。在一些實施方式中，該聚A尾包含SEQ ID NO: 30或由其組成。

【0180】 在一些實施方式中，該RNA依次包含5'帽、5'UTR、編碼IL-12sc的核酸、3'UTR和聚A尾。

【0181】 在一些實施方式中，該IL-12sc RNA由DNA序列編碼，該DNA序列包含與SEQ ID NO: 15或16至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同並且與SEQ ID NO: 3或5至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的核酸序列或由其組成。

【0182】 在一些實施方式中，該IL-12sc RNA包含，例如，從DNA序列轉錄的RNA序列，該DNA序列包含與SEQ ID NO: 15或16至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同並且與SEQ ID NO: 3或5至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的核酸序列或由其組成。該RNA也可以重組產生。在一些實施方式中，該IL-12sc RNA中的一個或多個尿苷被本文所述之經修飾核苷替代。在一些實施方式中，該替代尿苷的經修飾核苷係假尿苷（ψ）、N1-甲基-假尿苷（$m^1\psi$）或5-甲基-尿苷（m^5U）。在一些實施方式中，該RNA包含取代每個尿苷的經修飾核苷。在一些實施方式中，該經修飾核苷係N1-甲基-假尿苷（$m^1\psi$）。

【0183】 在一些實施方式中，該IL-12sc RNA由DNA序列編碼，該DNA序列包含與SEQ ID NO: 15或16至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同並且與SEQ ID NO: 7至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的核酸序列或由其組成。

【0184】 在一些實施方式中，該IL-12sc RNA包含，例如，從DNA序列轉錄的RNA序列，該DNA序列包含與SEQ ID NO: 15或16至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同並且與SEQ ID NO: 7至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的核酸序列或由其組成。該RNA也可以重組產生。在一些實施方式中，該IL-12sc RNA中的一個或多個尿苷被本文所述之經修飾核苷替代。在一些實施方式中，該替代尿苷的經修飾核苷係假尿苷（ψ）、N1-甲基-假尿苷（$m^1\psi$）或5-甲基-尿苷（m^5U）。在一些實施方式中，該RNA包含取代每個尿苷的經修飾核苷。在一些實施方式中，該經修飾核苷係N1-甲基-假尿苷（$m^1\psi$）。

【0185】 在一些實施方式中，該IL-12sc RNA由DNA序列編碼，該DNA序列包含與SEQ ID NO: 15或16至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同；與SEQ ID NO: 3或5至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同；且與SEQ ID NO: 7至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的核酸序列或由其組成。

【0186】 在一些實施方式中，該IL-12sc RNA包含，例如，從DNA序列轉錄的RNA序列，該DNA序列包含如下的核酸序列或由其組成，該核酸序列與SEQ ID NO: 15或16至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同；與SEQ ID NO: 3或5至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同；並且與SEQ ID NO: 7至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。該RNA也可以重組產生。在一些實施方式中，該IL-12sc RNA中的一個或多個尿苷被本文所述之經修飾核苷替代。在一些實施方式中，該替代尿苷的經修飾核苷係假尿苷（ψ）、N1-甲基-假尿苷（$m^1\psi$）或5-甲基-尿苷（m^5U）。在一些實施方式中，該RNA包含取代每個尿苷的經修飾核苷。在一些實施方式中，該經修飾核苷係N1-甲基-假尿苷（$m^1\psi$）。

【0187】 在一些實施方式中，該IL-12sc RNA包含RNA序列，該RNA序列包含與SEQ ID NO: 17或18至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的核酸序列或由其組成；與SEQ ID NO: 4或6至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同；並且與SEQ ID NO: 8至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。在一些實施方式中，該IL-12sc RNA中的一個或多個尿苷被本文所述之經修飾核苷替代。在一些實施方式中，該替代尿苷的經修飾核苷係假尿苷（ψ）、N1-甲基-假尿苷（$m^1\psi$）或5-甲基-尿苷（m^5U）。

B. 干擾素α（IFNα）

【0188】 在一些實施方式中，該干擾素α（IFNα）RNA由編碼干擾素α（IFNα）的DNA序列（例如，SEQ ID NO: 19）編碼。SEQ ID NO: 20中提供了編碼該IFNα的示例性DNA序列。

【0189】 在一些實施方式中，該IFNα RNA由編碼IFNα的密碼子最佳化的DNA序列編碼。在一些實施方式中，該密碼子最佳化的DNA序列包含SEQ ID NO: 21的核苷酸或由其組成。在一些實施方式中，該DNA序列包含與SEQ ID NO: 21具有70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的密碼子最佳化的DNA序列或由其組成。

【0190】 在一些實施方式中，該IFNα RNA包含，例如，從編碼IFNα的DNA序列轉錄的RNA序列。該RNA也可以重組產生。在一些實施方式中，該RNA序列從包含SEQ ID NO: 20或21之核苷酸序列轉錄。在一些實施方式中，該RNA序列包含SEQ ID NO: 22或23或由其組成。在一些實施方式中，該RNA序列包含與SEQ ID NO: 22或23具有70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的RNA序列或由其組成。

【0191】 在一些實施方式中，該IFNα RNA中的一個或多個尿苷被本文所述之經修飾核苷替代。在一些實施方式中，該替代尿苷的經修飾核苷係假尿苷（ψ）、

N1-甲基-假尿苷（$m^1\psi$）或5-甲基-尿苷（m^5U）。在一些實施方式中，該RNA中的每個尿苷都是經修飾的。在一些實施方式中，該RNA中的每個尿苷都是經N1-甲基-假尿苷（$m^1\psi$）修飾的。

【0192】 在一些實施方式中，該IFNα RNA包含5'末端的改變之核苷酸。在一些實施方式中，該IFNα RNA包含5'帽。可以使用本領域已知的任何5'帽。在一些實施方式中，該5'帽包含5'-5'三磷酸鍵。在一些實施方式中，該5'帽包含包括硫代磷酸酯修飾的5'-5'三磷酸鍵，。在一些實施方式中，該5'帽包含2'-*O*或3'-*O*-核糖-甲基化之核苷酸。在一些實施方式中，該5'帽包含經修飾的鳥苷核苷酸或經修飾的腺苷核苷酸。在一些實施方式中，該5'帽包含7-甲基鳥苷酸酯。在一些實施方式中，該5'帽係Cap0或Cap1。示例性帽結構包括m7G(5')ppp(5')G、m7,2`*O*-mG(5')ppsp(5')G、m7G(5')ppp(5')2`*O*-mG和m7,3`*O*-mG(5')ppp(5')2`*O*-mA。

【0193】 在一些實施方式中，該IFNα RNA包含5'非轉譯區（UTR）。在一些實施方式中，該5'UTR在起始密碼子的上游。在一些實施方式中，該5'UTR調節該RNA的轉譯。在一些實施方式中，該5'UTR係穩定序列。在一些實施方式中，該5'UTR增加了RNA的半衰期。可以使用本領域已知的任何5'UTR。在一些實施方式中，該5'UTR RNA序列從包含SEQ ID NO: 3或5之核苷酸序列轉錄。在一些實施方式中，該5'UTR RNA序列包含SEQ ID NO: 4或6或由其組成。在一些實施方式中，該5'UTR RNA序列與SEQ ID NO: 4或6至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同。

【0194】 在一些實施方式中，該IFNα RNA包含3'UTR。在一些實施方式中，該3'UTR跟在轉譯終止密碼子之後。在一些實施方式中，該3'UTR調節該RNA的聚腺苷酸化、轉譯效率、定位或穩定性。在一些實施方式中，該3'UTR RNA序列從包含SEQ ID NO: 7之核苷酸序列轉錄。在一些實施方式中，該3'UTR RNA序列包含SEQ ID NO: 8或由其組成。在一些實施方式中，該3'UTR RNA序列與

SEQ ID NO: 8至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同。

【0195】 在一些實施方式中，該IFNα RNA既包含5'UTR又包含3'UTR。在一些實施方式中，該組成物僅包含5'UTR。在一些實施方式中，該組成物僅包含3'UTR。

【0196】 在一些實施方式中，該IFNα RNA包含聚A尾。在一些實施方式中，該IFNα RNA包含至少約25、至少約30、至少約50個核苷酸、至少約70個核苷酸或至少約100個核苷酸的聚A尾。在一些實施方式中，該聚A尾包含200個或更多個核苷酸。在一些實施方式中，該聚A尾包含SEQ ID NO: 30或由其組成。

【0197】 在一些實施方式中，該RNA依次包含5'帽、5'UTR、編碼IFNα的核酸、3'UTR和聚A尾。

【0198】 在一些實施方式中，該IFNα RNA由DNA序列編碼，該DNA序列包含與SEQ ID NO: 20或21至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同並且與SEQ ID NO: 3或5至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的核酸序列或由其組成。

【0199】 在一些實施方式中，該IFNα RNA包含，例如，從DNA序列轉錄的RNA序列，該DNA序列包含與SEQ ID NO: 20或21至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同並且與SEQ ID NO: 3或5至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的核酸序列或由其組成。該RNA也可以重組產生。在一些實施方式中，該IFNα RNA中的一個或多個尿苷被本文所述之經修飾核苷替代。在一些實施方式中，該替代尿苷的經修飾核苷係假尿苷（ψ）、N1-甲基-假尿苷（$m^1\psi$）或5-甲基-尿苷（m^5U）。在一些實施方式中，該RNA包含取代每個尿苷的經修飾核苷。在一些實施方式中，該經修飾核苷係N1-甲基-假尿苷（$m^1\psi$）。

【0200】 在一些實施方式中，該IFNα RNA由DNA序列編碼，該DNA序列包含與SEQ ID NO: 20或21至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、

98%、99%或100%相同並且與SEQ ID NO: 7至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的核酸序列或由其組成。

【0201】 在一些實施方式中，該IFNα RNA包含，例如，從DNA序列轉錄的RNA序列，該DNA序列包含與SEQ ID NO: 20或21至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同並且與SEQ ID NO: 7至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的核酸序列或由其組成。在一些實施方式中，該IFNα RNA中的一個或多個尿苷被本文所述之經修飾核苷替代。在一些實施方式中，該替代尿苷的經修飾核苷係假尿苷（ψ）、N1-甲基-假尿苷（$m^1\psi$）或5-甲基-尿苷（m^5U）。在一些實施方式中，該RNA包含取代每個尿苷的經修飾核苷。在一些實施方式中，該經修飾核苷係N1-甲基-假尿苷（$m^1\psi$）。

【0202】 在一些實施方式中，該IFNα RNA由DNA序列編碼，該DNA序列包含如下的核酸序列或由其組成，該核酸序列與SEQ ID NO: 20或21至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同；與SEQ ID NO: 3或5至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同；並且與SEQ ID NO: 7至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。

【0203】 在一些實施方式中，該IFNα RNA包含，例如，從DNA序列轉錄的RNA序列，該DNA序列包含如下的核酸序列或由其組成，該核酸序列與SEQ ID NO: 20或21至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同；與SEQ ID NO: 3或5至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同；並且與SEQ ID NO: 7至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。該RNA也可以重組產生。在一些實施方式中，該IFNα RNA中的一個或多個尿苷被本文所述之經修飾核苷替代。在一些實施方式中，該替代尿苷的經修飾核苷係假尿苷（ψ）、N1-甲基-假尿苷（$m^1\psi$）或5-甲基-尿苷（m^5U）。在一些實施方式中，該RNA包含取代每個

尿苷的經修飾核苷。在一些實施方式中，該經修飾核苷係N1-甲基-假尿苷（$m^1\psi$）。在一些實施方式中，該組成物包含RNA序列，該RNA序列包含與SEQ ID NO: 22或23至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的核酸序列或由其組成；與SEQ ID NO: 4或6至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同；並且與SEQ ID NO: 8至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。在一些實施方式中，該IFNα RNA中的一個或多個尿苷被本文所述之經修飾核苷替代。在一些實施方式中，該替代尿苷的經修飾核苷係假尿苷（ψ）、N1-甲基-假尿苷（$m^1\psi$）或5-甲基-尿苷（m^5U）。

C. 介白素15（IL-15）sushi

【0204】 在一些實施方式中，施用編碼介白素15（IL-15）sushi的RNA。如本文所用，術語「IL-15 sushi」描述了包含作為融合蛋白的可溶性介白素15（IL-15）受體α sushi結構域和成熟介白素α（IL-15）的構建體。在一些實施方式中，該IL-15 sushi RNA由編碼IL-15 sushi的DNA序列（SEQ ID NO: 24）編碼，該DNA序列包含可溶性IL-15受體α鏈（sushi），後面接的是甘胺酸-絲胺酸（GS）連接子，隨後是IL-15的成熟序列。SEQ ID NO: 25中提供了編碼該IL-15 sushi的DNA序列。

【0205】 在一些實施方式中，該IL-15 sushi RNA係，例如，從編碼IL-15 sushi的DNA序列轉錄的RNA序列。該RNA也可以重組產生。在一些實施方式中，該RNA序列係從包含SEQ ID NO: 25之核苷酸序列轉錄的。在一些實施方式中，該編碼連接子的核苷酸可以完全不存在，或被編碼合適連接子的任何核苷酸部分或全部替代。在一些實施方式中，該RNA序列包含SEQ ID NO: 26或由其組成。在一些實施方式中，該RNA序列包含與SEQ ID NO: 26具有70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的RNA序列。在一些實施方式中，編碼IL-15 sushi的DNA或RNA序列包含編碼IL-15受體α的sushi結構域（例如，SEQ ID NO: 25或26的核苷酸1至321）和成熟的IL-15（例如，SEQ ID NO: 25

或26的核苷酸382至729）之核苷酸。在一些實施方式中，編碼IL-15 sushi的DNA或RNA序列包含編碼IL-15受體α的sushi結構域（例如，SEQ ID NO: 25或26的核苷酸1至321）和成熟的IL-15（例如，SEQ ID NO: 25或26的核苷酸382至729）的核苷酸，並且進一步包含該等部分之間編碼連接該等部分的連接子多肽之核苷酸。在一些實施方式中，該連接子包含SEQ ID NO: 25或26的核苷酸322-381。可以使用熟悉該項技術者已知的任何連接子。

【0206】 在一些實施方式中，該IL-15 sushi RNA中的一個或多個尿苷被本文所述之經修飾核苷替代。在一些實施方式中，該替代尿苷的經修飾核苷係假尿苷（ψ）、N1-甲基-假尿苷（$m^1\psi$）或5-甲基-尿苷（m^5U）。在一些實施方式中，該RNA包含取代每個尿苷的經修飾核苷。在一些實施方式中，該經修飾核苷係N1-甲基-假尿苷（$m^1\psi$）。

【0207】 在一些實施方式中，該IL-15 sushi RNA包含5'末端的改變之核苷酸。在一些實施方式中，該IL-15 sushi RNA包含5'帽。可以使用本領域已知的任何5'帽。在一些實施方式中，該5'帽包含5'-5'三磷酸鍵。在一些實施方式中，該5'帽包含包括硫代磷酸酯修飾的5'-5'三磷酸鍵，。在一些實施方式中，該5'帽包含2'-*O*或3'-*O*-核糖-甲基化之核苷酸。在一些實施方式中，該5'帽包含經修飾的鳥苷核苷酸或經修飾的腺苷核苷酸。在一些實施方式中，該5'帽包含7-甲基鳥苷酸酯。在一些實施方式中，該5'帽係Cap0或Cap1。示例性帽結構包括m7G(5')ppp(5')G、m7,2`*O*-mG(5')pp$_S$p(5')G、m7G(5')ppp(5')2`*O*-mG和m7,3`*O*-mG(5')ppp(5')2`*O*-mA。

【0208】 在一些實施方式中，該IL-15 sushi RNA包含5'非轉譯區（UTR）。在一些實施方式中，該5'UTR在起始密碼子的上游。在一些實施方式中，該5'UTR調節該RNA的轉譯。在一些實施方式中，該5'UTR係穩定序列。在一些實施方式中，該5'UTR增加了RNA的半衰期。可以使用本領域已知的任何5'UTR。在一些實施方式中，該5'UTR RNA序列從SEQ ID NO: 3或5轉錄。在一些實施方式中，該5'UTR RNA序列包含SEQ ID NO: 4或6或由其組成。在一些實施方式中，該

5'UTR RNA序列與SEQ ID NO: 4或6至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同。

【0209】 在一些實施方式中，該IL-15 sushi RNA包含3'UTR。在一些實施方式中，該3'UTR跟在轉譯終止密碼子之後。在一些實施方式中，該3'UTR調節該RNA的聚腺苷酸化、轉譯效率、定位或穩定性。在一些實施方式中，該3'UTR RNA序列從SEQ ID NO: 7轉錄。在一些實施方式中，該3'UTR RNA序列包含SEQ ID NO: 8或由其組成。在一些實施方式中，該3'UTR RNA序列與SEQ ID NO: 8至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同。

【0210】 在一些實施方式中，該IL-15 sushi RNA既包含5'UTR又包含3'UTR。在一些實施方式中，該IL-15 sushi RNA僅包含5'UTR。在一些實施方式中，該IL-15 sushi RNA僅包含3'UTR。

【0211】 在一些實施方式中，該IL-15 sushi RNA包含聚A尾。在一些實施方式中，該RNA包含至少約25、至少約30、至少約50個核苷酸、至少約70個核苷酸或至少約100個核苷酸的聚A尾。在一些實施方式中，該聚A尾包含200個或更多個核苷酸。在一些實施方式中，該聚A尾包含SEQ ID NO: 30或由其組成。

【0212】 在一些實施方式中，該RNA依次包含5'帽、5'UTR、編碼IL-15 sushi的核酸、3'UTR和聚A尾。

【0213】 在一些實施方式中，該IL-15 sushi RNA由DNA序列編碼，該DNA序列包含與SEQ ID NO: 25至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同並且與SEQ ID NO: 3或5至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的核酸序列或由其組成。

【0214】 在一些實施方式中，該IL-15 sushi RNA包含，例如，從DNA序列轉錄的RNA序列，該DNA序列包含與SEQ ID NO: 25至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同並且與SEQ ID NO: 3或5至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的核酸序列或由其組成。該RNA也可以重組產生。在一些實施方式中，該IL-15 sushi RNA

中的一個或多個尿苷被本文所述之經修飾核苷替代。在一些實施方式中，該替代尿苷的經修飾核苷係假尿苷（ψ）、N1-甲基-假尿苷（$m^1\psi$）或5-甲基-尿苷（m^5U）。在一些實施方式中，該RNA包含取代每個尿苷的經修飾核苷。在一些實施方式中，該經修飾核苷係N1-甲基-假尿苷（$m^1\psi$）。

【0215】 在一些實施方式中，該IL-15 sushi RNA包含DNA序列，該DNA序列包含與SEQ ID NO: 25至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同並且與SEQ ID NO: 7至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的核酸序列或由其組成。

【0216】 在一些實施方式中，該IL-15 sushi RNA包含，例如，從DNA序列轉錄的RNA序列，該DNA序列包含與SEQ ID NO: 25至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同並且與SEQ ID NO: 7至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的核酸序列或由其組成。該RNA也可以重組產生。在一些實施方式中，該IL-15 sushi RNA中的一個或多個尿苷被本文所述之經修飾核苷替代。在一些實施方式中，該替代尿苷的經修飾核苷係假尿苷（ψ）、N1-甲基-假尿苷（$m^1\psi$）或5-甲基-尿苷（m^5U）。在一些實施方式中，該RNA包含取代每個尿苷的經修飾核苷。在一些實施方式中，該經修飾核苷係N1-甲基-假尿苷（$m^1\psi$）。

【0217】 在一些實施方式中，該IL-15 sushi RNA包含DNA序列，該DNA序列包含如下的核酸序列或由其組成，該核酸序列與SEQ ID NO: 25至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同；與SEQ ID NO: 3或5至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同；並且與SEQ ID NO: 7至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。

【0218】 在一些實施方式中，該IL-15 sushi RNA包含，例如，從DNA序列轉錄的RNA序列，該DNA序列包含如下的核酸序列或由其組成，該核酸序列與SEQ ID NO: 25至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或

100%相同；與SEQ ID NO: 3或5至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同；並且與SEQ ID NO: 7至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。在一些實施方式中，該IL-15 sushi RNA中的一個或多個尿苷被本文所述之經修飾核苷替代。在一些實施方式中，該替代尿苷的經修飾核苷係假尿苷（ψ）、N1-甲基-假尿苷（$m^1\psi$）或5-甲基-尿苷（m^5U）。在一些實施方式中，該RNA包含取代每個尿苷的經修飾核苷。在一些實施方式中，該經修飾核苷係N1-甲基-假尿苷（$m^1\psi$）。

【0219】 在一些實施方式中，該IL-15 sushi RNA包含RNA序列，該RNA序列包含如下的核酸序列或由其組成，該核酸序列與SEQ ID NO: 26至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同；與SEQ ID NO: 4或6至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同；並且與SEQ ID NO: 8至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。在一些實施方式中，該IL-15 sushi RNA中的一個或多個尿苷被本文所述之經修飾核苷替代。在一些實施方式中，該替代尿苷的經修飾核苷係假尿苷（ψ）、N1-甲基-假尿苷（$m^1\psi$）或5-甲基-尿苷（m^5U）。

D. 粒細胞-巨噬細胞群落刺激因子（GM-CSF）

【0220】 在一些實施方式中，施用編碼粒細胞-巨噬細胞群落刺激因子（GM-CSF）的RNA。在一些實施方式中，該GM-CSF RNA由編碼粒細胞-巨噬細胞群落刺激因子（GM-CSF）的DNA序列（例如，SEQ ID NO: 27）編碼。在一些實施方式中，該編碼GM-CSF的DNA序列在SEQ ID NO: 28中提供。

【0221】 在一些實施方式中，該GM-CSF RNA包含，例如，從編碼GM-CSF的DNA序列轉錄的RNA序列。在一些實施方式中，該RNA序列係從SEQ ID NO: 28轉錄的。該RNA也可以重組產生。在一些實施方式中，該RNA序列包含SEQ ID NO: 29或由其組成。在一些實施方式中，該RNA序列包含與SEQ ID NO: 29具有

70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的RNA序列。

【0222】 在一些實施方式中，該GM-CSF RNA中的一個或多個尿苷被本文所述之經修飾核苷替代。在一些實施方式中，該替代尿苷的經修飾核苷係假尿苷（ψ）、N1-甲基-假尿苷（$m^1\psi$）或5-甲基-尿苷（m^5U）。在一些實施方式中，該RNA包含取代每個尿苷的經修飾核苷。在一些實施方式中，該經修飾核苷係N1-甲基-假尿苷（$m^1\psi$）。在一些實施方式中，該GM-CSF RNA包含5'末端的修飾的核苷。在一些實施方式中，該RNA包含5'帽。可以使用本領域已知的任何5'帽。在一些實施方式中，該5'帽包含5'-5'三磷酸鍵。在一些實施方式中，該5'帽包含包括硫代磷酸酯修飾的5'-5'三磷酸鍵，。在一些實施方式中，該5'帽包含2'-*O*或3'-*O*-核糖-甲基化之核苷酸。在一些實施方式中，該5'帽包含經修飾的鳥苷核苷酸或經修飾的腺苷核苷酸。在一些實施方式中，該5'帽包含7-甲基鳥苷酸酯。在一些實施方式中，該5'帽係Cap0或Cap1。示例性帽結構包括m7G(5')ppp(5')G、m7,2`*O*-mG(5')pp$_S$p(5')G、m7G(5')ppp(5')2`*O*-mG和m7,3`*O*-mG(5')ppp(5')2`*O*-mA。

【0223】 在一些實施方式中，該GM-CSF RNA包含5'非轉譯區（UTR）。在一些實施方式中，該5'UTR在起始密碼子的上游。在一些實施方式中，該5'UTR調節該RNA的轉譯。在一些實施方式中，該5'UTR係穩定序列。在一些實施方式中，該5'UTR增加了RNA的半衰期。可以使用本領域已知的任何5'UTR。在一些實施方式中，該5'UTR RNA序列從SEQ ID NO: 3或5轉錄。在一些實施方式中，該5'UTR RNA序列包含SEQ ID NO: 4或6或由其組成。在一些實施方式中，該5'UTR RNA序列與SEQ ID NO: 4或6至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同。

【0224】 在一些實施方式中，該GM-CSF RNA包含3'UTR。在一些實施方式中，該3'UTR跟在轉譯終止密碼子之後。在一些實施方式中，該3'UTR調節該RNA的聚腺苷酸化、轉譯效率、定位或穩定性。在一些實施方式中，該3'UTR RNA

序列從SEQ ID NO: 7轉錄。在一些實施方式中，該3'UTR RNA序列包含SEQ ID NO: 8或由其組成。在一些實施方式中，該3'UTR RNA序列與SEQ ID NO: 8至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同。

【0225】 在一些實施方式中，該GM-CSF RNA既包含5'UTR又包含3'UTR。在一些實施方式中，該RNA僅包含5'UTR。在一些實施方式中，該組成物僅包含3'UTR。

【0226】 在一些實施方式中，該GM-CSF RNA包含聚A尾。在一些實施方式中，該RNA包含至少約25、至少約30、至少約50個核苷酸、至少約70個核苷酸或至少約100個核苷酸的聚A尾。在一些實施方式中，該聚A尾包含200個或更多個核苷酸。在一些實施方式中，該聚A尾包含SEQ ID NO: 30或由其組成。

【0227】 在一些實施方式中，該GM-CSF RNA依次包含5'帽、5'UTR、編碼GM-CSF的核苷酸、3'UTR和聚A尾。

【0228】 在一些實施方式中，該GM-CSF RNA由DNA序列編碼，該DNA序列包含與SEQ ID NO: 28至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同並且與SEQ ID NO: 3或5至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的核酸序列或由其組成。

【0229】 在一些實施方式中，該GM-CSF RNA包含，例如，從DNA序列轉錄的RNA序列，該DNA序列包含與SEQ ID NO: 28至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同並且與SEQ ID NO: 3或5至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的核酸序列或由其組成。該RNA也可以重組產生。在一些實施方式中，該GM-CSF RNA中的一個或多個尿苷被本文所述之經修飾核苷替代。在一些實施方式中，該替代尿苷的經修飾核苷係假尿苷（ψ）、N1-甲基-假尿苷（$m^1\psi$）或5-甲基-尿苷（m^5U）。在一些實施方式中，該RNA包含取代每個尿苷的經修飾核苷。在一些實施方式中，該經修飾核苷係N1-甲基-假尿苷（$m^1\psi$）。

【0230】 在一些實施方式中，該GM-CSF RNA由DNA序列編碼，該DNA序列包含與SEQ ID NO: 28至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同並且與SEQ ID NO: 7至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的核酸序列或由其組成。

【0231】 在一些實施方式中，該GM-CSF RNA包含，例如，從DNA序列轉錄的RNA序列，該DNA序列包含與SEQ ID NO: 28至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同並且與SEQ ID NO: 7至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的核酸序列或由其組成。該RNA也可以重組產生。在一些實施方式中，該GM-CSF RNA中的一個或多個尿苷被本文所述之經修飾核苷替代。在一些實施方式中，該替代尿苷的經修飾核苷係假尿苷(ψ)、N1-甲基-假尿苷($m^1\psi$)或5-甲基-尿苷(m^5U)。在一些實施方式中，該RNA包含取代每個尿苷的經修飾核苷。在一些實施方式中，該經修飾核苷係N1-甲基-假尿苷（$m^1\psi$）。

【0232】 在一些實施方式中，該GM-CSF RNA包含DNA序列，該DNA序列包含如下的核酸序列或由其組成，該核酸序列與SEQ ID NO: 28至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同；與SEQ ID NO: 3或5至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同；並且與SEQ ID NO: 7至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。

【0233】 在一些實施方式中，該GM-CSF RNA包含，例如，從DNA序列轉錄的RNA序列，該DNA序列包含如下的核酸序列或由其組成，該核酸序列與SEQ ID NO: 28至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同；與SEQ ID NO: 3或5至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同；並且與SEQ ID NO: 7至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。該RNA也可以重組產生。在一些實施方式中，該GM-CSF RNA中的一個或多個尿苷被本文所述之經修飾核

苷替代。在一些實施方式中，該替代尿苷的經修飾核苷係假尿苷（ψ）、N1-甲基-假尿苷（$m^1\psi$）或5-甲基-尿苷（m^5U）。在一些實施方式中，該RNA包含取代每個尿苷的經修飾核苷。在一些實施方式中，該經修飾核苷係N1-甲基-假尿苷（$m^1\psi$）。

【0234】 在一些實施方式中，該GM-CSF RNA包含RNA序列，該RNA序列包含如下的核酸序列或由其組成，該核酸序列與SEQ ID NO: 29至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同；與SEQ ID NO: 4或6至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同；並且與SEQ ID NO: 8至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。在一些實施方式中，該GM-CSF RNA中的一個或多個尿苷被本文所述之經修飾核苷替代。在一些實施方式中，該替代尿苷的經修飾核苷係假尿苷（ψ）、N1-甲基-假尿苷（$m^1\psi$）或5-甲基-尿苷（m^5U）。

E. 修飾

【0235】 本文描述的該等RNA中每一種都可以以熟悉該項技術者已知的任何方式修飾。在一些實施方式中，每種RNA如下修飾：

- 取代每個尿苷的經修飾的核鹼基；
- 該RNA的5'末端的Cap1結構。

【0236】 在一些實施方式中，該5'UTR包含SEQ ID NO: 4或6。在一些實施方式中，該RNA已經經過處理以還原如上所述之雙股RNA（dsRNA）。該「Cap1」結構可以在體外轉錄後藉由酶促加帽或在體外轉錄（共轉錄加帽）過程中生成。

【0237】 在一些實施方式中，該RNA中的一個或多個尿苷被經修飾核苷替代。在一些實施方式中，該經修飾核苷係經修飾的尿苷。

【0238】 在一些實施方式中，該替代尿苷的經修飾的尿苷為假尿苷（ψ）、N1-甲基-假尿苷（m1ψ）或5-甲基-尿苷（m5U）。

【0239】 在一些實施方式中，該RNA中的一個或多個胞嘧啶、腺嘌呤或鳥嘌呤由一個或多個經修飾的核鹼基替代。在一個實施方式中，替代胞嘧啶的經修飾核苷為5-甲基胞嘧啶（m^5C）。在另一個實施方式中，替代腺嘌呤的經修飾核苷為N^6-甲基腺嘌呤（m^6A）。在另一個實施方式中，可以使用本領域已知的用於降低分子的免疫原性的任何其他經修飾的核鹼基。

【0240】 在一些實施方式中，替代該RNA中的一個或多個尿苷的經修飾核苷可以是以下中的任何一種或多種：3-甲基-尿苷（m^3U）、5-甲氧基-尿苷（mo^5U）、5-氮雜-尿苷、6-氮雜-尿苷、2-硫代-5-氮雜-尿苷、2-硫代-尿苷（s^2U）、4-硫代-尿苷（s^4U）、4-硫代-假尿苷、2-硫代-假尿苷、5-羥基-尿苷（ho^5U）、5-胺基烯丙基-尿苷、5-鹵代-尿苷（例如，5-碘代-尿苷或5-溴代-尿苷）、尿苷5-氧乙酸（cmo^5U）、尿苷5-氧乙酸甲酯（$mcmo^5U$）、5-羧甲基-尿苷（cm^5U）、1-羧甲基-假尿苷、5-羧基羥基甲基-尿苷（chm^5U）、5-羧基羥基甲基-尿苷甲酯（$mchm^5U$）、5-甲氧基羰基甲基-尿苷（mcm^5U）、5-甲氧基羰基甲基-2-硫代-尿苷（mcm^5s^2U）、5-胺甲基-2-硫代-尿苷（nm^5s^2U）、5-甲基胺甲基-尿苷（mnm^5U）、1-乙基-假尿苷、5-甲基胺甲基-2-硫代-尿苷（mnm^5s^2U）、5-甲基胺甲基-2-硒基-尿苷（mnm^5se^2U）、5-胺甲醯基甲基-尿苷（ncm^5U）、5-羧甲基胺甲基-尿苷（$cmnm^5U$）、5-羧甲基胺甲基-2-硫代-尿苷（$cmnm^5s^2U$）、5-丙炔基-尿苷、1-丙炔基-假尿苷、5-牛磺酸甲基-尿苷（τm^5U）、1-牛磺酸甲基-假尿苷、5-牛磺酸甲基-2-硫代-尿苷（τm5s2U）、1-牛磺酸甲基-4-硫代-假尿苷）、5-甲基-2-硫代-尿苷（m^5s^2U）、1-甲基-4-硫代-假尿苷（$m^1s^4\psi$）、4-硫代-1-甲基-假尿苷、3-甲基-假尿苷（$m^3\psi$）、2-硫代-1-甲基-假尿苷、1-甲基-1-去氮-假尿苷、2-硫代-1-甲基-1-去氮-假尿苷、二氫尿苷（D）、二氫假尿苷、5,6-二氫尿苷、5-甲基-二氫尿苷（m^5D）、2-硫代-二氫尿苷、2-硫代-二氫假尿苷、2-甲氧基-尿苷、2-甲氧基-4-硫代-尿苷、4-甲氧基-假尿苷、4-甲氧基-2-硫代-假尿苷、N1-甲基-假尿苷、3-(3-胺基-3-羧丙基)尿苷（acp^3U）、1-甲基-3-(3-胺基-3-羧丙基)假尿苷（$acp^3\psi$）、5-(異戊烯基胺甲基)尿苷（inm^5U）、5-(異戊烯基胺甲基)-2-硫代-尿苷（inm^5s^2U）、

α-硫代-尿苷、2'-O-甲基-尿苷（Um）、5,2'-O-二甲基-尿苷（m^5Um）、2'-O-甲基-假尿苷（ψm）、2-硫代-2'-O-甲基-尿苷（s^2Um）、5-甲氧基羰甲基-2'-O-甲基-尿苷（mcm^5Um）、5-胺甲醯基甲基-2'-O-甲基-尿苷（ncm^5Um）、5-羧甲基胺甲基-2'-O-甲基-尿苷（$cmnm^5Um$）、3,2'-O-二甲基-尿苷（m^3Um）、5-(異戊烯基胺甲基)-2'-O-甲基-尿苷（inm^5Um）、1-硫代-尿苷、去氧胸苷、2'-F-阿拉伯糖-尿苷、2'-F-尿苷、2'-OH-阿拉伯糖-尿苷、5-(2-羰基甲氧基乙烯基)尿苷、5-[3-(1-E-丙烯基胺基)尿苷，或本領域已知的任何其他修飾的尿苷。

【0241】 在一些實施方式中，至少一種RNA包含取代至少一個尿苷的經修飾核苷。在一些實施方式中，至少一種RNA包含取代每個尿苷的經修飾核苷。在一些實施方式中，每種RNA包含取代至少一個尿苷的經修飾核苷。在一些實施方式中，每種RNA包含取代每個尿苷的經修飾核苷。

【0242】 在一些實施方式中，該經修飾核苷獨立地選自假尿苷（ψ）、N1-甲基-假尿苷（m1ψ）和5-甲基-尿苷（m5U）。在一些實施方式中，該經修飾核苷包含假尿苷(ψ)。在一些實施方式中，該經修飾核苷包含N1-甲基-假尿苷(m1ψ)。在一些實施方式中，該經修飾核苷包含5-甲基-尿苷（m5U）。在一些實施方式中，至少一種RNA可包含多於一種類型的經修飾核苷，並且該等經修飾核苷獨立地選自假尿苷（ψ）、N1-甲基-假尿苷（m1ψ）和5-甲基-尿苷（m5U）。在一些實施方式中，該等經修飾核苷包含假尿苷（ψ）和N1-甲基-假尿苷（m1ψ）。在一些實施方式中，該等經修飾核苷包含假尿苷（ψ）和5-甲基-尿苷（m5U）。在一些實施方式中，該等經修飾核苷包含N1-甲基-假尿苷（m1ψ）和5-甲基-尿苷（m5U）。在一些實施方式中，該等經修飾核苷包含假尿苷（ψ）、N1-甲基-假尿苷（m1ψ）和5-甲基-尿苷（m5U）。

【0243】 在一些實施方式中，該方法中使用的至少一種RNA包含5'帽$m_2^{7,3'-O}Gppp(m_1^{2'-O})ApG$或3′-O-Me-$m^7G(5')ppp(5')G$。在一些實施方式中，該方法中使用的每種RNA包含5'帽$m_2^{7,3'-O}Gppp(m_1^{2'-O})ApG$或3′-O-Me-$m^7G(5')ppp(5')G$。在一些實施方式中，該方法中使用的每種RNA包含5'帽$m_2^{7,3'-O}Gppp(m_1^{2'-O})ApG$。

在一些實施方式中，該方法中使用的每種RNA包含3'-O-Me-m^7G（5'）ppp（5'）G。在一些實施方式中，該方法中使用的每種RNA均包含5'帽$m_2^{7,3'\text{-}O}$Gppp($m_1^{2'\text{-}O}$)ApG和3′-O-Me-m^7G(5')ppp(5')G。

【0244】 在一些實施方式中，至少一種RNA包含5'UTR，該5'UTR包含選自由SEQ ID NO: 4和6組成之群組之核苷酸序列，或與選自由SEQ ID NO: 4和6組成之群組之核苷酸序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%同一性之核苷酸序列。在一些實施方式中，每種RNA包含5'UTR，該5'UTR包含選自由SEQ ID NO: 4和6組成之群組之核苷酸序列，或與選自由SEQ ID NO: 4和6組成之群組之核苷酸序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%同一性之核苷酸序列。

【0245】 在一些實施方式中，至少一種RNA包含3'UTR，該3'UTR包含SEQ ID NO: 8之核苷酸序列，或與SEQ ID NO: 8之核苷酸序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%同一性之核苷酸序列。在一些實施方式中，每種RNA包含3'UTR，該3'UTR包含SEQ ID NO: 8之核苷酸序列，或與SEQ ID NO: 8之核苷酸序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%同一性之核苷酸序列。

【0246】 在一些實施方式中，至少一種RNA包含聚A尾。在一些實施方式中，每種RNA包含聚A尾。在一些實施方式中，該聚A尾可包含至少20、至少30、至少40、至少80或至少100且最多500、最多400、最多300、最多200或最多150個核苷酸。在一些實施方式中，該聚A尾可基本上由至少20、至少30、至少40、至少80或至少100且最多500、最多400、最多300、最多200或最多150個A核苷酸組成。在一些實施方式中，該聚A尾可由至少20、至少30、至少40、至少80或至少100且最多500、最多400、最多300、最多200或最多150個核苷酸組成。在一些實施方式中，該聚A尾可包含SEQ ID NO: 30中所示的聚A尾。在一些實施方式中，該聚A尾包含至少100個核苷酸。在一些實施方式中，該聚A尾包含約150個核苷酸。在一些實施方式中，該聚A尾包含約120個核苷酸。

【0247】 在一些實施方式中，一種或多種RNA包括：(1) 包含$m_2^{7,3'-O}$Gppp($m_1^{2'-O}$)ApG或3'-O-Me-m^7G(5')ppp(5')G的5'帽；(2) 5'UTR，該5'UTR包含 (i) 選自由SEQ ID NO: 4和6組成之群組之核苷酸序列，或 (ii) 與選自由SEQ ID NO: 4和6組成之群組之核苷酸序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%同一性之核苷酸序列；(3) 3'UTR，該3'UTR包含 (i) SEQ ID NO: 8之核苷酸序列，或 (ii) 與SEQ ID NO: 8之核苷酸序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%同一性之核苷酸序列；(4) 包含至少100個核苷酸的聚A尾。

3. 施用的抗PD-1抗體

【0248】 癌細胞利用多種機制逃避抗腫瘤宿主免疫反應，包括程序性細胞死亡1配位基1（PD-L1）的表現，該配位基為計劃性細胞死亡1受體（PD-1）的主要配位基，在活化的B淋巴細胞和T淋巴細胞以及髓樣細胞上表現。PD-L1與PD-1的相互作用導致免疫反應降低，並有助於腫瘤逃避。抗PD-1抗體係與PD-1結合並抑制PD-1與PD-L1的相互作用的抗體。在施用於受試者時，抗PD-1抗體可以結合PD-1，抑制其與PD-L1的結合，並阻止其下游傳訊途徑的活化，包括T細胞的活化。在一些實施方式中，該細胞激素RNA混合物與抗PD1抗體組合施用。

【0249】 本文包括抗PD1抗體，該抗PD1抗體抑制PD-1與PD-L1的相互作用，並抑制當PD-1與PD-L1相互作用時觸發的免疫應答的阻抑。

【0250】 在一些實施方式中，抗PD1抗體是否抑制免疫應答的阻抑係藉由測量T細胞活化（有時也稱為T細胞增殖）來評估的。這種策略可以在體內（例如，在向人類受試者施用抗PD1抗體之後）或在體外（例如，在基於細胞之測定中）評估。在一些實施方式中，根據Burova等人, (2017) Mol. Cancer 16(5);861-70之方法，使用工程化的T細胞株或原代人T細胞在基於細胞之測定中確定抗PD1抗體抑制免疫應答阻抑的能力。例如，人PD-1蛋白和報導分子在T細胞中表現，並且該等T細胞由，例如，抗CD3x抗CD20雙特異性抗體活化。產生抗原呈遞細胞

（APC），諸如HEK293細胞，以表現人CD20和人PD-L1。施用連續稀釋的測試抗PD1抗體並分析報導分子之表現。

【0251】 在一些實施方式中，該抗PD1抗體可抑制當PD-1與PD-L1相互作用時觸發的免疫應答的阻抑，且與在西米單抗中觀察到的抑制作用相比，抑制至少70%、至少80%、至少90%或至少95%。在一些實施方式中，藉由測量如本文所述之T細胞活化來評估抗體是否抑制當PD-1與PD-L1相互作用時觸發的免疫應答的阻抑，且與在西米單抗中觀察到的抑制作用相比，抑制至少70%、至少80%、至少90%或至少95%。

【0252】 在一些實施方式中，該抗PD1抗體係嵌合、人源化或人抗體。在一些實施方式中，該抗PD-1抗體係分離的和/或重組的抗體。在一些實施方式中，該抗PD1抗體係多特異性抗體，例如，三特異性或雙特異性抗體。

【0253】 抗PD-1抗體的非限制性實例包括西米單抗（參見，例如，美國專利號9,987,500 B2，也稱為REGN2810，參見例如CAS號1801342-60-8，以及Falchook等人, J Immunother Cancer. 2016年11月; 4:70），納武單抗（參見，例如，美國專利號8,008,449），派姆單抗（參見，例如，美國專利號8,354,509），MEDI0608（以前的AMP-514；參見，例如，美國專利號8,609,089和美國專利號9,205,148），斯帕塔利單抗（也稱為PDR001，參見，例如，WO 2015/112900），PF-06801591（參見，例如，WO 2016/092419），以及替雷利珠單抗（也稱為BGB-A317，參見，例如，WO 2015/035606），卡瑞利珠單抗（也稱為SHR-1210；參見，例如，WO 2015/085847），多斯塔利單抗（也稱為TSR-042；參見，例如，WO 2014/179664），信迪利單抗（也稱為IBI308；參見，例如，WO 2017/025016），JS001（參見，例如，WO 2014/206107），MGA012（參見，例如，WO 2017/019846），AGEN2034（參見，例如，WO 2017/040790），以及JNJ-63723283（參見，例如，WO 2017/079112）。術語西米單抗包括西米單抗-rwlc。

【0254】 在一些實施方式中，該抗PD-1抗體係WO 2015/112800中揭露的那些之一（諸如該PCT公開的表1中稱為H1M7789N、H1M7799N、H1M7800N、

H2M7780N、H2M7788N、H2M7790N、H2M7791N、H2M7794N、H2M7795N、H2M7796N、H2M7798N、H4H9019P、H4xH9034P2、H4xH9035P2、H4xH9037P2、H4xH9045P2、H4xH9048P2、H4H9057P2、H4H9068P2、H4xH9119P2、H4xH9120P2、H4xH9128P2、H4xH9135P2、H4xH9145P2、H4xH8992P、H4xH8999P和H4xH9008P的那些，以及該PCT公開的表3中稱為H4H7798N、H4H7795N2、H4H9008P和H4H9048P2的那些）。WO 2015/112800的揭露內容藉由引用以其全文併入本文。例如，WO 2015/112800中揭露的抗體和相關抗體，包括具有CDR、VH和VL序列或該PCT公開中揭露的重鏈和輕鏈序列的抗體和抗原結合片段，以及與該PCT公開中揭露的該等抗體結合相同的PD-1表位的抗體和抗原結合片段，可以與該RNA細胞激素混合物一起用於治療和/或預防癌症。

【0255】 在一些實施方式中，該抗PD-1抗體包含皮地珠單抗（也稱為CT-011）（Berger等人，2008. Clin Cancer Res. 14(10):3044-51）、PF-06801591（ClinicalTrials.gov識別號：NCT02573259）、mDX-400（默克公司（Merck & Co））、MEDI0680（也稱為AMP-514）（ClinicalTrials.gov識別號：NCT02013804）、PDR001（ClinicalTrials.gov識別號：NCT02678260）、斯帕塔利單抗（諾華公司（Novartis AG），CAS號1935694-88-4）、SHR-1210（因塞特醫療公司（Incyte Corp），江蘇恒瑞醫藥有限公司（Jiangsu Hengrui Medicine Co Ltd），ClinicalTrials.gov識別號：NCT02742935）、TSR-042（ClinicalTrials.gov識別號：NCT02715284）、ANA011（阿娜普蒂斯生物有限公司（AnaptysBio, Inc.））、AGEN-2034（艾吉納斯公司（Agenus, Inc.））、AM-0001（ARMO生物科學公司）、BGB-108（百濟神州公司（BeiGene））、AK-104和AK-105（康方生物醫藥公司（Akeso Biopharma））、ABBV-181（艾伯維公司（AbbVie））、BAT-1306（百奧泰公司（Bio-Thera Solutions））、AMP-224（米迪繆尼公司（Medlmmune））、LZM-009（麗珠醫藥集團（Livzon Pharmaceutical Group））、GLS-010（艾庫斯生物科技（Arcus Biosciences））、多斯塔利單抗（特薩羅公司（Tesaro Inc），CAS號2022215-59-2）、MGA-012（因賽特公司）、替雷利珠單抗（BGB-A317，

百濟神州公司，CAS號1858168-59-8）、BI-754091（勃林格殷格翰公司（Boehringer Ingelheim））、CBT-501（CBT製藥公司）、ENUM-003（Enumeral生物醫學控股公司）、ENUM-388D4（Enumeral生物醫學控股公司）、ENUM-244C8（Enumeral生物醫學控股公司）、IBI-308（禮來信達生物製藥有限公司（Eli Lilly Innovent Biologics, Inc.））、JNJ- 63723283（強森研發有限公司，ClinicalTrials.gov識別號NCT02908906）、CS-1003（CStone製藥公司）、Sym-016和Sym-021（Symphogen生物技術公司）、JS-001（上海君實生物醫藥科技股份有限公司（Shanghai Junshi Bioscience Co., Ltd.），ClinicalTrials.gov識別號NCT02857166）、JTX-4014（Jounce治療公司）、JY-034（北京東方百泰生物科技有限公司（Beijing Eastern Biotech Co））、SSI-361（Lyvgen生物製藥有限公司）、YBL-006（Y-Biologics）、AK-103（康方生物醫藥公司（Akeso Biopharma Inc））、MCLA-134（梅魯斯公司（Merus））、HAB-21（蘇州思坦維生物技術有限公司（Suzhou Stainwei Biotech Inc））、CX-188（CytomX治療公司）、PF-06801591（輝瑞公司，ClinicalTrials.gov識別號NCI-2016-00704）、HEISCOIII-003（四川海思科製藥有限公司）、XmAb-20717（Xencor公司，雙特異性，可識別CTLA-4和PD1）、XmAb-23104（Xencor公司）、MGD-019（宏基因公司（MacroGenics Inc,），雙特異性，識別CTLA4和PD1）、AK-112（康方生物醫藥公司，雙特異性）、AT-16201（AIMM治療有限公司）、BCD-100（生物卡）、TSR-075（特薩羅公司（Tesaro Inc），雙特異性，識別LAG3和PD1）、MGD-013（宏基因公司；雙特異性，識別PD-1和LAG-3）、BH-2922（北京韓美藥品有限公司（Beijing Hanmi Pharmaceutical Co），雙特異性，識別EGFR和PD1）、BH-2941（北京韓美藥品有限公司，雙特異性，識別PDL1和PD1）、BH-2950（北京韓美藥品有限公司，雙特異性，識別Her2和PD1）、BH-2954（北京韓美藥品有限公司，雙特異性）、STIA-1110（索倫托醫療公司實驗室（Les Laboratoires Servier SAS Sorrento Therapeutics））、244C8和388D4（參見Scheuplein F等人, Proc 107th Ann Meet Am Ass Cane Res;

2016年4月 16-20; New Orleans, LA. Philadelphia (PA): AACR; Cancer Res 2016;76(增刊14):摘要 nr 4871）。

【0256】 在一些實施方式中，該抗PD-1抗體包含以下分別如SEQ ID NO: 31和32所示的重鏈和輕鏈胺基酸序列；SEQ ID NO: 39和40中的VH和VL序列（以斜體顯示），或SEQ ID NO: 31和32中的一個或多個（例如，全部六個）CDR（以粗體方框顯示）。在一些實施方式中，包括包含以下CDR的抗體：

HCDR1 = GFTFSNFG (SEQ ID NO: 33)

HCDR2 = ISGGGRDT (SEQ ID NO: 34)

HCDR3 = VKWGNIYFDY (SEQ ID NO: 35)

LCDR1 = LSINTF (SEQ ID NO: 36)

LCDR2 = AAS (SEQ ID NO: 37)

LCDR3 = QQSSNTPFT (SEQ ID NO: 38)。

【0257】 在一些實施方式中，該抗PD-1抗體包含HCDR3（SEQ ID NO: 35）。在一些實施方式中，該抗PD-1抗體包含LCDR3（SEQ ID NO: 38）。在一些實施方式中，該抗PD-1抗體包含HCDR3（SEQ ID NO: 35）和LCDR3（SEQ ID NO: 38）。

【0258】 在一些實施方式中，該抗PD1抗體包含HCDR3（SEQ ID NO: 35）和/或LCDR3（SEQ ID NO: 38），並且抑制PD-1與PD-L1的相互作用。在一些實施方式中，該抗PD1抗體包含HCDR3（SEQ ID NO: 35）和/或LCDR3（SEQ ID NO: 38），並且抑制當PD-1與PD-L1相互作用時觸發的免疫應答的阻抑。在一些實施方式中，該抗PD1抗體包含HCDR3（SEQ ID NO: 35）和/或LCDR3（SEQ ID NO: 38），並且抑制PD-1與PD-L1的相互作用，以及抑制當PD-1與PD-L1相互作用時觸發的免疫應答的阻抑。

【0259】 示例性的抗PD-1 Mab重鏈：

*EVQLLESGGV LVQPGGSLRL SCAAS**GFTFS NFG**MTWVRQA PGKGLEWVSG **ISGGGRDT**YF ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLKGED TAVYYC**VKWG NIYFDY**WGQG TLVTVSS*AST

KGPSVFPLAP CSRSTSESTA ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVVTVPS SSLGTKTYTC NVDHKPSNTK VDKRVESKYG PPCPPCPAPE FLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSQEDPEV QFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQFNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKGLPSSIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SQEEMTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSDGS FFLYSRLTVD KSRWQEGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SLGK (SEQ ID NO: 31)

HCDR1 = GFTFSNFG (SEQ ID NO: 33)

HCDR2 = ISGGGRDT (SEQ ID NO: 34)

HCDR3 = VKWGNIYFDY (SEQ ID NO: 35)

【0260】 示例性的抗PD-1 Mab輕鏈：

*DIQMTQSPSS LSASVGDSIT ITCRAS**LSIN TF**LNWYQQKP GKAPNLLIY**A AS**SLHGGVPS RFSGSGSGTD FTLTIRTLQP EDFATYYC**QQ SSNTPFT**FGP GTVVDFR*RTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC (SEQ ID NO: 32)

LCDR1 = LSINTF (SEQ ID NO: 36)

LCDR2 = AAS (SEQ ID NO: 37)

LCDR3 = QQ SSNTPFT (SEQ ID NO: 38)

【0261】 在一些實施方式中，該抗PD1抗體係西米單抗。在一些實施方式中，該抗PD1抗體係與西米單抗結合相同表位的抗體。在一些實施方式中，該抗PD1抗體與西米單抗競爭PD-1結合。在一些實施方式中，根據熟悉該項技術者已知之方法，例如，Burova等人 (2017) Mol. Cancer 16(5);861-70中之方法，藉由ELISA確定抗體是否與西米單抗競爭PD-1結合。簡而言之，將測試抗體、西米單抗和陰性同種型對照抗體與PD-1一起孵育，並轉移至包被PD-L1的ELISA板的孔中。適當清洗並施用標記的二抗後檢測到結合的抗體。

【0262】 在一些實施方式中，該抗PD1抗體可抑制PD-1與PD-L1的相互作用，且與在西米單抗中觀察到的抑制水平相比，抑制至少70%、至少80%、至少90%

或至少95%。在一些實施方式中，藉由如本文所述之ELISA評估抗體是否可抑制PD-1與PD-L1的相互作用，且與在西米單抗中觀察到的抑制水平相比，抑制至少70%、至少80%、至少90%或至少95%。

【0263】 目前正在對西米單抗進行作為單一療法以及與其他抗癌療法相結合的1期臨床研究，以及在晚期皮膚鱗狀上皮細胞癌、基底細胞癌、非小細胞肺癌患者、宮頸癌和其他實性瘤的2期和3期臨床研究中進行研究。在每2週（Q2W）施用1 mg/kg的劑量和3 mg/kg Q2W的劑量下，觀察幾種腫瘤類型（包括非小細胞肺癌）中的初步療效。

【0264】 截至2018年3月27日，757名患者藉由招募並接受西米單抗作為單一療法以及與放射療法和/或不同劑量位準（1、3或10 mg/kg或200 mg Q2W；以及3 mg/kg，250 mg或350 mg Q3W）的其他癌症療法組合。西米單抗對晚期CSCC的療效已在2期研究中明確記錄，並且在2018年9月28日，西米單抗在美國獲得批准用於治療不適合治癒性手術或治癒性放射的轉移性CSCC或局部晚期CSCC的患者。2019年6月28日，西米單抗在歐洲也獲得批准用於相同的適應症。

【0265】 西米單抗的安全性概況與其他PD-1抑制劑相似。在10%或更多的患者中發生的最常見的治療中出現的不良事件（TEAE）係疲勞、噁心、貧血、食欲下降、關節痛、便秘、咳嗽、嘔吐和腹痛。

【0266】 使用和製備西米單抗的組成物和方法在，例如，已公開的美國專利申請案號2015/0203579中揭露，其內容出於任何目的藉由引用以其全文併入本文。

【0267】 該抗PD-1抗體可以用合適的載體、賦形劑和提供合適的轉移、遞送、耐受性等的其他試劑配製。在所有藥劑化學師已知的配方中可以找到許多合適的製劑：Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, 伊斯頓, 賓夕法尼亞州。該等製劑包括，例如，粉劑、糊劑、軟膏劑、凝膠劑、蠟、油、脂質、含囊泡的脂質（陽離子或陰離子）、DNA軛合物（conjugate）、無水吸收糊劑、水包油和油包水乳劑、碳蠟（各種分子量的聚乙二醇）乳劑、半固體

凝膠和含碳蠟的半固態混合物。參見Powell等人「Compendium of excipients for parenteral formulations」PDA (1998) J Pharm Sci Technol 52:238-311。

4. 治療方法

【0268】 本文提供的細胞激素RNA混合物可以與抗PD-1抗體組合用於方法中，例如，治療方法。在一些實施方式中，包括了用於治療晚期、不可切除的或轉移性實性瘤癌症之方法，包括施用該細胞激素RNA混合物和抗PD-1抗體，其中該晚期實性瘤癌症包括上皮腫瘤、前列腺腫瘤、卵巢腫瘤、腎細胞腫瘤、胃腸道腫瘤、肝腫瘤、大腸直腸腫瘤、脈管系統腫瘤、間皮瘤、胰腺腫瘤、乳房腫瘤、肉瘤、肺腫瘤、結腸腫瘤、黑色素瘤、小細胞肺腫瘤、神經母細胞瘤、睾丸腫瘤、上皮癌腫瘤、腺癌腫瘤、精原細胞瘤、視網膜母細胞瘤、皮膚鱗狀上皮細胞癌（CSCC）、淋巴瘤（包括非何杰金氏淋巴瘤和何杰金氏淋巴瘤）、頭頸部鱗狀上皮細胞癌（HNSCC）、頭頸部癌、骨肉瘤、非小細胞肺癌、腎腫瘤、甲狀腺腫瘤、肝腫瘤、其他適於瘤內注射的實性瘤或其組合。

【0269】 在一些實施方式中，該晚期實性瘤癌症包括上皮腫瘤、前列腺腫瘤、卵巢腫瘤、腎細胞腫瘤、胃腸道腫瘤、肝腫瘤、大腸直腸腫瘤、脈管系統腫瘤、間皮瘤、胰腺腫瘤、乳房腫瘤、肉瘤、肺腫瘤、結腸腫瘤、黑色素瘤、小細胞肺腫瘤、神經母細胞瘤、睾丸腫瘤、上皮癌腫瘤、腺癌腫瘤、精原細胞瘤、視網膜母細胞瘤、皮膚鱗狀上皮細胞癌（CSCC）、頭頸部鱗狀上皮細胞癌（HNSCC）、頭頸癌、骨肉瘤、非小細胞肺癌、腎腫瘤、甲狀腺腫瘤、肝腫瘤或其他適於瘤內注射的實性瘤或其組合。

【0270】 在一些實施方式中，該晚期實性瘤癌症包括淋巴瘤，諸如非何杰金氏淋巴瘤或何杰金氏淋巴瘤。

【0271】 在一些實施方式中，該實性瘤癌症係黑色素瘤。在一些實施方式中，該黑色素瘤係葡萄膜黑色素瘤或黏膜黑色素瘤。在一些實施方式中，該實性瘤

癌症係黑色素瘤，視需要葡萄膜黑色素瘤或黏膜黑色素瘤，並且包括適於瘤內注射的淺表、皮下和/或淋巴結轉移。

【0272】 在一些實施方式中，瘤內注射包括注射到在淋巴結內轉移的實性瘤中。在一些實施方式中，瘤內注射包括注射到淋巴結內的淋巴瘤中。在一些實施方式中，瘤內注射包括注射到受試者皮膚表面10 cm以內的原發性或繼發性實性瘤中。在一些實施方式中，瘤內注射包括注射到受試者皮膚表面5 cm以內的原發性或繼發性實性瘤中。在一些實施方式中，瘤內注射包括注射到皮膚實性瘤中。在一些實施方式中，該皮膚實性瘤係轉移瘤。在一些實施方式中，該皮膚實性瘤係皮膚癌。在一些實施方式中，該皮膚實性瘤不是皮膚癌。在一些實施方式中，瘤內注射包括注射入皮下實性瘤。在一些實施方式中，該皮下實性瘤係轉移瘤。在一些實施方式中，該皮下實性瘤係皮膚癌。在一些實施方式中，該皮下實性瘤不是皮膚癌。

【0273】 在一些實施方式中，該實性瘤係上皮腫瘤。在一些實施方式中，該實性瘤係前列腺腫瘤。在一些實施方式中，該實性瘤係卵巢腫瘤。在一些實施方式中，該實性瘤係腎細胞腫瘤。在一些實施方式中，該實性瘤係胃腸道腫瘤。在一些實施方式中，該實性瘤係肝腫瘤。在一些實施方式中，該實性瘤係大腸直腸腫瘤。在一些實施方式中，該實性瘤係脈管系統腫瘤。在一些實施方式中，該實性瘤係間皮瘤。在一些實施方式中，該實性瘤係胰腺腫瘤。在一些實施方式中，該實性瘤係乳房腫瘤。在一些實施方式中，該實性瘤係肉瘤。在一些實施方式中，該實性瘤係肺腫瘤。在一些實施方式中，該實性瘤係結腸腫瘤。在一些實施方式中，該實性瘤係黑色素瘤。在一些實施方式中，該實性瘤係小細胞肺腫瘤。在一些實施方式中，該實性瘤係非小細胞肺癌腫瘤。在一些實施方式中，該實性瘤係神經母細胞瘤。在一些實施方式中，該實性瘤係睾丸腫瘤。在一些實施方式中，該實性瘤係上皮癌腫瘤。在一些實施方式中，該實性瘤係腺癌腫瘤。在一些實施方式中，該實性瘤係精原細胞瘤。在一些實施方式中，該實性瘤係視網膜母細胞瘤。在一些實施方式中，該實性瘤係皮膚鱗狀上皮細

胞癌（CSCC）。在一些實施方式中，該實性瘤係頭頸部鱗狀上皮細胞癌（HNSCC）。在一些實施方式中，該實性瘤係HNSCC。在一些實施方式中，該實性瘤係頭頸癌。在一些實施方式中，該實性瘤係骨肉瘤。在一些實施方式中，該實性瘤係腎癌。在一些實施方式中，該實性瘤係甲狀腺癌。在一些實施方式中，該實性瘤係間變性甲狀腺癌（ATC）。在一些實施方式中，該實性瘤係肝癌。在一些實施方式中，該實性瘤係結腸腫瘤。在一些實施方式中，該實性瘤係以上任何兩種。在一些實施方式中，該實性瘤係以上任何兩種或更多種。

【0274】 在一些實施方式中，該實性瘤係淋巴瘤。在一些實施方式中，該實性瘤係非何杰金氏淋巴瘤。在一些實施方式中，該實性瘤係何杰金氏淋巴瘤。

【0275】 在一些實施方式中，該方法包括與抗PD-1抗體組合使用細胞激素RNA混合物，該細胞激素RNA混合物包含編碼IFNα的RNA、編碼IL-15 sushi的RNA、編碼IL-12sc的RNA和編碼GM-CSF的RNA，該RNA視需要經修飾以具有取代每個尿苷的經修飾的核鹼基和該RNA的5'末端的Cap1結構。

【0276】 在一些實施方式中，提供了用於治療晚期、不可切除的或轉移性實性瘤癌症之方法，該方法包括向患有晚期、不可切除的或轉移性實性瘤癌症之受試者與抗PD-1抗體組合施用編碼IL-12sc蛋白的RNA、編碼IL-15 sushi蛋白的RNA，編碼IFNα蛋白的RNA和編碼GM-CSF蛋白的RNA。

【0277】 在一些實施方式中，包括了用於治療晚期、不可切除的或轉移性實性瘤癌症之方法，該方法包括向患有晚期實性瘤癌症之受試者施用治療有效量之RNA，該RNA包含編碼IL-12sc蛋白的RNA、編碼IL-15 sushi蛋白的RNA、編碼IFNα蛋白的RNA和編碼GM-CSF蛋白的RNA，以及治療有效量之抗PD-1抗體。

【0278】 在一些實施方式中，包括了用於治療晚期、不可切除的或轉移性實性瘤癌症之方法，該方法包括施用編碼IL-12sc的RNA，並進一步施用編碼IFNα、IL-15 sushi和GM-CSF的RNA，以及進一步施用抗PD-1抗體。

【0279】 在一些實施方式中，包括了用於治療晚期、不可切除的或轉移性實性瘤癌症之方法，該方法包括施用編碼IFNα的RNA，並進一步施用編碼IL-12sc、IL-15 sushi和GM-CSF的RNA，以及進一步施用抗PD-1抗體。

【0280】 在一些實施方式中，包括了用於治療晚期、不可切除的或轉移性實性瘤癌症之方法，該方法包括施用編碼IL-15 sushi的RNA，並進一步施用編碼IL-12sc、IFNα和GM-CSF的RNA，以及進一步施用抗PD-1抗體。

【0281】 在一些實施方式中，包括了用於治療晚期、不可切除的或轉移性實性瘤癌症之方法，該方法包括施用編碼GM-CSF的RNA，並進一步施用編碼IL-12sc、IFNα和IL-15 sushi的RNA，以及進一步施用抗PD-1抗體。

【0282】 在一些實施方式中，包括了用於治療晚期、不可切除的或轉移性實性瘤癌症之方法，該方法包括向患有晚期實性瘤癌症之受試者施用治療有效量之 1) RNA，該RNA包含編碼IL-12sc蛋白的RNA、編碼IL-15 sushi蛋白的RNA、編碼IFNα蛋白的RNA和編碼GM-CSF蛋白的RNA，和 2) 抗PD-1抗體。

【0283】 如本文所用，「一種/該等RNA/抗PD-1抗體組合」係指與抗PD1抗體組合施用RNA細胞激素混合物。

【0284】 在一些實施方式中，該等RNA和該一種抗PD-1抗體的聯合施用導致以下一個或多個結果：與未經治療之受試者或施用該等RNA或該抗PD-1抗體作為單一療法之受試者相比，(a) 癌症症狀的嚴重程度降低或持續時間縮短；(b) 腫瘤生長的抑制或腫瘤壞死的增加、腫瘤縮小和/或腫瘤消失；(c) 腫瘤生長和/或發展的延遲；(d) 腫瘤轉移受抑制或阻止或停止；(e) 腫瘤生長復發的預防或延遲；(f) 受試者的存活率上升；和/或 (g) 常規抗癌療法的使用或需求減少（例如，減少或免除了化學療法或細胞毒性劑的使用）。

【0285】 本領域已知的用於治療實性瘤的任何其他治療選擇可以與本文揭露之方法組合使用。在一些情況下，將該細胞激素RNA混合物和抗PD-1抗體與一種或多種其他治療選擇（例如，化學治療劑，包括另一種免疫刺激劑，免疫療法，或檢查點調節劑；或放射治療）組合施用。

A. 施用路徑和時間

【0286】 在一些實施方式中，該等RNA或該細胞激素RNA混合物藉由注射入腫瘤內（例如，瘤內）或腫瘤附近（瘤周）而遞送，並且該抗PD1抗體以相同的方式遞送或全身遞送，例如，靜脈內、腸內或腸胃外，包括藉由注射、輸注和植入遞送。該等RNA和抗體可以聯合施用，例如，同時、同步或順序施用。如果係施用，則可以熟悉該項技術者已知的任何順序和任何適當的時間間隔進行施用。

【0287】 在一些實施方式中，將該等RNA瘤內或瘤周注射並且將該抗PD-1抗體靜脈內施用。在一些實施方式中，將該等RNA腫瘤注射並且將該抗PD-1抗體靜脈內施用。

【0288】 在一些實施方式中，以3或4週的週期每週一次（即，每21天3劑或每28天4劑）將該細胞激素RNA混合物瘤內施用，並且在這21天或28天的週期中僅一次，可以選擇在治療的第一天，將該抗PD1抗體全身施用（例如，靜脈內施用）。在一些實施方式中，該細胞激素RNA混合物每週一次瘤內或瘤周施用，抗PD1抗體在3週週期的第1天靜脈內施用（即，每21天三劑該細胞激素RNA混合物和一劑抗PD1抗體）。在一些實施方式中，該細胞激素RNA混合物每週一次瘤內或瘤周施用，抗PD1抗體在4週週期的第1天靜脈內施用（即，每28天四劑該細胞激素RNA混合物和一劑抗PD1抗體）。在一些實施方式中，瘤內注射每週一次持續進行，直到第二次腫瘤評估，此時可以將該細胞激素RNA混合物的劑量間隔改為每三週一次。在一些實施方式中，以相同的給藥頻率（例如，在相同天一起或分開給藥）施用該等RNA和該抗PD-1抗體。在一些實施方式中，以不同的給藥頻率（例如，在不同天）施用該等RNA和該抗PD-1抗體。在一些實施方式中，該等RNA每週施用一次，並且該抗PD-1抗體每三週施用一次。

【0289】 在一些實施方式中，以3週或4週的週期共同施用該細胞激素RNA混合物和抗PD1，其中該細胞激素RNA混合物每週施用一次，並且該抗PD1抗體僅施用一次。

【0290】 在一些實施方式中，以3週或4週的週期共同施用該細胞激素RNA混合物和抗PD1，其中該細胞激素RNA混合物每2週施用一次，並且該抗PD1抗體僅施用一次。在一些實施方式中，以3週或4週的週期共同施用該細胞激素RNA混合物和抗PD1，其中該細胞激素RNA混合物每3週施用一次，並且該抗PD1抗體僅施用一次。

【0291】 在一些實施方式中，以3週或4週的週期共同施用該細胞激素RNA混合物和抗PD1，其中該細胞激素RNA混合物每4週施用一次，並且該抗PD1抗體僅施用一次。

【0292】 在一些實施方式中，基於等RNA質量（即，1%：1%：1%：1%（w/w/w/w））以1：1：1：1的比例來施用RNA的組合。

【0293】 在一些實施方式中，本文所述之該等RNA/抗PD-1抗體組合施用約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12個月。在一些實施方式中，該等RNA/抗PD-1抗體組合施用約8個月。在一些實施方式中，該等RNA/抗PD-1抗體組合施用最多52週。

【0294】 在一些實施方式中，該抗PD1抗體藉由注射施用。在一些實施方式中，該抗PD1抗體藉由靜脈內施用。在一些實施方式中，該抗PD-1抗體靜脈內施用每三週一次，並且該細胞激素RNA混合物瘤內或瘤周施用每週一次。

【0295】 在一些實施方式中，該抗PD-1抗體每三週一次靜脈內施用，並且該細胞激素RNA混合物每週一次瘤內或瘤周施用。

【0296】 在一些實施方式中，將該等RNA以治療有效量施用。在一些實施方式中，將該抗PD-1抗體以治療有效量施用。在一些實施方式中，該治療有效量係與作為單一療法的每種組分的治療有效量不同之量。

【0297】 在一些實施方式中，以約0.05 mg至約600 mg的劑量施用該抗PD1抗體，例如約0.05 mg、約0.1 mg、約1.0 mg、約1.5 mg、約2.0 mg、約10 mg、約20 mg、約30 mg、約40 mg、約50 mg、約60 mg、約70 mg、約80 mg、約90 mg、約100 mg、約110 mg、約120 mg、約130 mg、約140 mg、約150 mg、約160 mg、約170 mg、約180 mg、約190 mg、約200 mg、約210 mg、約220 mg、約230 mg、約240 mg、約250 mg、約260 mg、約270 mg、約280 mg、約290 mg、約300 mg、約310 mg、約320 mg、約330 mg、約340 mg、約350 mg、約360 mg、約370 mg、約380 mg、約390 mg、約400 mg、約410 mg、約420 mg、約430 mg、約440 mg、約450 mg、約460 mg、約470 mg、約480 mg、約490 mg、約500 mg、約510 mg、約520 mg、約530 mg、約540 mg、約550 mg、約560 mg、約570 mg、約580 mg、約590 mg、或約600 mg。

【0298】 在一些實施方式中，施用200 mg的抗PD-1抗體。在一些實施方式中，施用240 mg的抗PD-1抗體。在一些實施方式中，施用350 mg的抗PD-1抗體。在一些實施方式中，該抗PD-1抗體係西米單抗，並且施用350 mg的西米單抗。

【0299】 包含在該等單獨的劑量內的抗PD-1抗體的量可以以每千克受試者體重抗體的毫克數來表示（即，mg/kg）。在某些實施方式中，本文所述方法中使用的抗PD-1抗體可以約0.0001至約100 mg/kg受試者體重的劑量施用於受試者。例如，抗PD-1抗體可以以約0.1 mg/kg至約20 mg/kg患者體重的劑量施用。

【0300】 在一些實施方式中，該抗PD-1抗體係西米單抗，並且以約3 mg/kg患者體重的劑量施用。

【0301】 在一些實施方式中，可以在限定的時間過程中向受試者施用多個劑量的抗PD-1。在一些實施方式中，一種方法包括向受試者順序施用一個或多個劑量的抗PD-1抗體。如本文所用，「順序施用」係指在不同的時間點，例如，在以預定間隔（例如，小時，天，週或月）分開的不同天，向受試者施用每個劑量的抗體。在一些實施方式中，該等方法包括向患者順序施用單次初始劑量

的抗PD-1抗體，隨後是一個或多個第二劑量的抗PD-1抗體，並且視需要係隨後是一個或多個第三劑量的抗PD-1抗體。

【0302】 術語「初始劑量」、「第二劑量」和「第三劑量」係指施用的時間順序。因此，「初始劑量」係在治療方案開始時施用的劑量（也稱為「基線劑量」）；「第二劑量」係在初始劑量之後施用的劑量；「第三劑量」係在第二劑量之後施用的劑量。初始、第二和第三劑量都可以包含相同量的該抗體（抗PD-1抗體）。然而，在某些實施方式中，初始、第二和/或第三劑量中所含的量在治療過程中彼此不同（例如，適當地上調或下調）。在某些實施方式中，在治療方案開始時以「負荷劑量」施用一個或多個（例如1、2、3、4或5個）劑量，隨後以較低頻率（例如，「維持劑量」）施用後續劑量。例如，可以將抗PD-1抗體以約1-3 mg/kg患者體重的負荷劑量施用於患者，隨後以約0.1至約20 mg/kg患者體重的一個或多個維持劑量施用。

【0303】 在一些實施方式中，每個第二和/或第三劑量在緊接的前一個劑量之後½至14（例如，½、1、1½、2、2½、3、3½、4、4½、5、5½、6、6½、7、7½、8、8½、9、9½、10、10½、11、11½、12、12½、13、13½、14、14½或更多）週施用。如本文所用，短語「緊接的前一個劑量」係指在多次施用的順序中，在施用該順序的下一個劑量之前向患者施用的抗PD-1抗體的劑量，其間無中間劑量。

【0304】 在一些實施方式中，該等方法可以包括向患者施用任何數量的第二劑量和/或第三劑量的抗PD-1抗體。例如，在一些實施方式中，僅向患者施用單個第二劑量。在其他實施方式中，向患者施用兩個或更多個（例如2、3、4、5、6、7、8或更多個）第二劑量。同樣，在某些實施方式中，僅向患者施用單個第三劑量。在其他實施方式中，向患者施用兩個或更多個（例如2、3、4、5、6、7、8或更多個）第三劑量。

【0305】 在一些涉及多個第二劑量之實施方式中，每個第二劑量可以與其他第二劑量相同的頻率施用。例如，每個第二劑量可以在緊接的前一個劑量後1至

2週施用於患者。類似地，在一些涉及多個第三劑量之實施方式中，每個第三劑量可以與其他第三劑量相同的頻率施用。例如，每個第三劑量可以在緊接的前一個劑量後2至4週施用於患者。備選地，向患者施用第二和/或第三劑量的頻率可以在治療方案的過程中變化。在治療過程中，還可以由醫師在臨床檢查後根據個體患者的需要來調整施用的頻率。

【0306】 在一些實施方式中，在治療方案開始時以更頻繁地（一週兩次、一週一次或2週一次）作為「誘導劑量」施用一個或多個劑量的抗PD-1抗體，隨後以更低的頻率（例如，每4-12週一次）施用後續劑量（「合併劑量」或「維持劑量」）。

【0307】 在一些實施方式中，該等RNA在新輔助療法環境中施用。「新輔助療法環境」係指其中在原始/確定性療法之前（例如，在腫瘤的手術切除之前）進行該方法的臨床環境。

【0308】 **抗PD-1抗體給藥**

【0309】 在一些實施方式中，以約0.05 mg至約600 mg的劑量施用該抗PD-1抗體，例如約0.05 mg、約0.1 mg、約1.0 mg、約1.5 mg、約2.0 mg、約10 mg、約20 mg、約30 mg、約40 mg、約50 mg、約60 mg、約70 mg、約80 mg、約90 mg、約100 mg、約110 mg、約120 mg、約130 mg、約140 mg、約150 mg、約160 mg、約170 mg、約180 mg、約190 mg、約200 mg、約210 mg、約220 mg、約230 mg、約240 mg、約250 mg、約260 mg、約270 mg、約280 mg、約290 mg、約300 mg、約310 mg、約320 mg、約330 mg、約340 mg、約350 mg、約360 mg、約370 mg、約380 mg、約390 mg、約400 mg、約410 mg、約420 mg、約430 mg、約440 mg、約450 mg、約460 mg、約470 mg、約480 mg、約490 mg、約500 mg、約510 mg、約520 mg、約530 mg、約540 mg、約550 mg、約560 mg、約570 mg、約580 mg、約590 mg、或約600 mg。

【0310】 在一些實施方式中，施用200 mg的抗PD-1抗體。在一些實施方式中，施用240 mg的抗PD-1抗體。在一些實施方式中，施用350 mg的抗PD-1抗體。在一些實施方式中，該抗PD-1抗體係西米單抗，並且施用350 mg的西米單抗。

【0311】 包含在該等單獨的劑量內的抗PD-1抗體的量可以以每千克受試者體重抗體的毫克數來表示（即，mg/kg）。在某些實施方式中，本文所述方法中使用的抗PD-1抗體可以約0.0001至約100 mg/kg受試者體重的劑量施用於受試者。例如，抗PD-1抗體可以以約0.1 mg/kg至約20 mg/kg患者體重的劑量施用。

【0312】 在一些實施方式中，該抗PD-1抗體係西米單抗，並且以約3 mg/kg患者體重的劑量施用。

【0313】 在一些實施方式中，可以在限定的時間過程中向受試者施用多個劑量的抗PD-1。在一些實施方式中，一種方法包括向受試者順序施用一個或多個劑量的抗PD-1抗體。如本文所用，「順序施用」係指在不同的時間點，例如，在以預定間隔（例如，小時，天，週或月）分開的不同天，向受試者施用每個劑量的抗體。在一些實施方式中，該等方法包括向患者順序施用單次初始劑量的抗PD-1抗體，隨後是一個或多個第二劑量的抗PD-1抗體，並且視需要係隨後是一個或多個第三劑量的抗PD-1抗體。

【0314】 術語「初始劑量」、「第二劑量」和「第三劑量」係指施用的時間順序。因此，「初始劑量」係在治療方案開始時施用的劑量（也稱為「基線劑量」）；「第二劑量」係在初始劑量之後施用的劑量；「第三劑量」係在第二劑量之後施用的劑量。初始、第二和第三劑量都可以包含相同量的該抗體（抗PD-1抗體）。然而，在某些實施方式中，初始、第二和/或第三劑量中所含的量在治療過程中彼此不同（例如，適當地上調或下調）。在某些實施方式中，在治療方案開始時以「負荷劑量」施用一個或多個（例如1、2、3、4或5個）劑量，隨後以較低頻率（例如，「維持劑量」）施用後續劑量。例如，可以將抗PD-1抗體以約1-3 mg/kg患者體重的負荷劑量施用於患者，隨後以約0.1至約20 mg/kg患者體重的一個或多個維持劑量施用。

【0315】 在一些實施方式中，每個第二和/或第三劑量在緊接的前一個劑量之後½至14（例如，½、1、1½、2、2½、3、3½、4、4½、5、5½、6、6½、7、7½、8、8½、9、9½、10、10½、11、11½、12、12½、13、13½、14、14½或更多）週施用。如本文所用，短語「緊接的前一個劑量」係指在多次施用的順序中，在施用該順序的下一個劑量之前向患者施用的抗PD-1抗體的劑量，其間無中間劑量。

【0316】 在一些實施方式中，該等方法可以包括向患者施用任何數量的第二劑量和/或第三劑量的抗PD-1抗體。例如，在一些實施方式中，僅向患者施用單個第二劑量。在其他實施方式中，向患者施用兩個或更多個（例如2、3、4、5、6、7、8或更多個）第二劑量。同樣，在某些實施方式中，僅向患者施用單個第三劑量。在其他實施方式中，向患者施用兩個或更多個（例如2、3、4、5、6、7、8或更多個）第三劑量。

【0317】 在一些涉及多個第二劑量之實施方式中，每個第二劑量可以與其他第二劑量相同的頻率施用。例如，每個第二劑量可以在緊接的前一個劑量後1至2週施用於患者。類似地，在一些涉及多個第三劑量之實施方式中，每個第三劑量可以與其他第三劑量相同的頻率施用。例如，每個第三劑量可以在緊接的前一個劑量後2至4週施用於患者。備選地，向患者施用第二和/或第三劑量的頻率可以在治療方案的過程中變化。在治療過程中，還可以由醫師在臨床檢查後根據個體患者的需要來調整施用的頻率。

【0318】 在一些實施方式中，在治療方案開始時以更頻繁地（一週兩次、一週一次或2週一次）作為「誘導劑量」施用一個或多個劑量的抗PD-1抗體，隨後以更低的頻率（例如，每4-12週一次）施用後續劑量（「合併劑量」或「維持劑量」）。

B. 適應症和患者群體

【0319】 在一些實施方式中，本文提供的RNA/抗PD-1抗體組合用於治療患有實性瘤之受試者之方法。在一些實施方式中，該受試者：

i. 抗計劃性細胞死亡1（PD-1）或抗計劃性細胞死亡1配位基（PD-L1）療法已經失敗，或對其變得不耐受、有抗性或難治；和/或

ii. 患有PD-1和/或PD-L1抗性實性瘤；和/或

iii. 對抗PD-1和/或抗PD-L1療法具有後天型抗性；和/或

iv. 對抗PD-1和/或抗PD-L1療法具有先天性抗性。

【0320】 在一些實施方式中，本文提供的RNA/抗PD-1抗體組合用於在抗計劃性細胞死亡1（PD-1）或抗計劃性細胞死亡1配位基（PD-L1）療法已經失敗之受試者中治療實性瘤之方法。

【0321】 在一些實施方式中，本文提供的RNA/抗PD-1抗體組合用於在對抗計劃性細胞死亡1（PD-1）或抗計劃性細胞死亡1配位基（PD-L1）療法不耐受之受試者中治療實性瘤之方法。

【0322】 在一些實施方式中，本文提供的RNA/抗PD-1抗體組合用於在對抗計劃性細胞死亡1（PD-1）或抗計劃性細胞死亡1配位基（PD-L1）療法有抗性之受試者中治療實性瘤之方法。

【0323】 在一些實施方式中，本文提供的RNA/抗PD-1抗體組合用於在對抗計劃性細胞死亡1（PD-1）或抗計劃性細胞死亡1配位基（PD-L1）療法不耐受之受試者中治療實性瘤之方法。

【0324】 在一些實施方式中，本文提供的RNA/抗PD-1抗體組合用於在患有PD-1和/或PD-L1抗性實性瘤之受試者中治療實性瘤之方法。

【0325】 在一些實施方式中，本文提供的RNA/抗PD-1抗體組合用於在受試者中治療實性瘤之方法，其中該受試者對抗PD-1和/或抗PD-L1療法具有後天型抗性。

【0326】 在一些實施方式中，本文提供的RNA/抗PD-1抗體組合用於在受試者中治療實性瘤之方法，其中該受試者對抗PD-1和/或抗PD-L1療法具有先天性抗性。

【0327】 在一些實施方式中，該受試者患有轉移性實性瘤。在一些實施方式中，該受試者患有不可切除的實性瘤。在一些實施方式中，該受試者患有晚期實性瘤。在一些實施方式中，該受試者患有轉移性實性瘤癌症。在一些實施方式中，該受試者患有晚期、不可切除且有轉移性的實性瘤。在一些實施方式中，該受試者患有晚期且不可切除的實性瘤。在一些實施方式中，該受試者患有晚期且有轉移性的實性瘤。在一些實施方式中，該受試者患有不可切除的且有轉移性的實性瘤。

【0328】 在一些實施方式中，該受試者的癌細胞包含β2-微球蛋白（B2M）功能之部分或全部損失。在一些實施方式中，該受試者的癌細胞具有B2M功能之部分損失。在一些實施方式中，該受試者的癌細胞具有B2M功能之全部損失。在一些實施方式中，藉由將癌細胞與來自同一受試者的非癌細胞進行比較來評估B2M功能之部分或全部損失，其中非癌細胞來自癌細胞所源自的相同組織。在一些實施方式中，藉由將癌細胞與來自同一受試者的非癌細胞進行比較來評估B2M功能之部分或全部損失，其中非癌細胞並非來自癌細胞所源自的相同組織。在一些實施方式中，藉由比較癌細胞與來自不同受試者的非癌細胞來評估B2M功能之部分或全部損失。在一些實施方式中，藉由比較癌細胞與非癌細胞對照來評估B2M功能之部分或全部損失。

【0329】 在一些實施方式中，該癌細胞在實性瘤中，該實性瘤包含具有正常B2M功能之癌細胞。在一些實施方式中，該癌細胞在實性瘤中，其中25%或更多的癌細胞的B2M功能部分或全部損失。在一些實施方式中，該癌細胞在實性瘤中，其中50%或更多的癌細胞的B2M功能部分或全部損失。在一些實施方式中，該癌細胞在實性瘤中，其中75%或更多的癌細胞的B2M功能部分或全部損失。在

一些實施方式中，該癌細胞在實性瘤中，其中95%或更多的癌細胞的B2M功能部分或全部損失。

【0330】 在一些實施方式中，該受試者包含含有B2M基因突變的細胞。

【0331】 在一些實施方式中，該突變係取代、插入或缺失。在一些實施方式中，該B2M基因包含異質性消失（LOH）。在一些實施方式中，該突變係框移突變。在一些實施方式中，該突變係缺失突變。在一些實施方式中，該框移突變發生在B2M的外顯子1中。在一些實施方式中，該框移突變導致B2M的截短。在一些實施方式中，該突變係B2M的全部或部分缺失（例如，截短）。在一些實施方式中，缺失突變在B2M的外顯子1中。在一些實施方式中，該框移突變包含p.Leu13fs和/或p.Ser14fs。在一些實施方式中，根據Middha等人 (2019) JCO Precis Oncol. [臨床腫瘤學雜誌·精密腫瘤學] (doi:10.1200/PO.18.00321)，該框移突變包含V69Wfs*34、L15fs*41、L13P、L15fs*41和/或p.S31*。在一些實施方式中，該突變包括JAK1和/或JAK2的激酶結構域上游的移碼和/或缺失（例如，截短）突變。

【0332】 在一些實施方式中，與沒有發生B2M功能之部分或全部損失之受試者相比，該受試者具有降低的B2M蛋白量。

【0333】 在一些實施方式中，該受試者具有β-2-微球蛋白（B2M）功能之部分或全部損失。在一些實施方式中，該受試者具有B2M功能之部分損失。在一些實施方式中，該受試者具有B2M功能之全部損失。B2M功能之部分或全部損失可藉由與來自同一受試者的組織樣本進行比較來評估。B2M功能之部分或全部損失可以藉由比較來自腫瘤的組織樣本與來自腫瘤樣本所源自的相同組織的組織樣本來評估。

【0334】 在一些實施方式中，與該實性瘤所源自的正常細胞或組織相比，該實性瘤整體上（例如，如在從該實性瘤進行的生物檢體中所評估的）的B2M功能部分或全部損失。在一些實施方式中，該受試者具有B2M基因中的突變（例如，因其導致的功能之部分或全部損失）。

【0335】 在一些實施方式中，腫瘤內的某些細胞具有B2M功能損失。在一些實施方式中，腫瘤內的某些細胞具有B2M功能之部分或全部損失，而腫瘤內的其他細胞則沒有。

【0336】 在一些實施方式中，與對照相比，該受試者具有降低的的主要組織相容性複合物I類（MHC I）表面表現量，視需要其中該對照係來自同一受試者的非癌症樣本。在一些實施方式中，受試者的癌細胞具有降低的MHC I表面表現量。在一些實施方式中，該癌細胞沒有表面表現的MHC I。在一些實施方式中，該降低的MHC I表面表現量係藉由將癌細胞與來自同一受試者的非癌細胞進行比較來評估，視需要其中該非癌細胞來自該癌細胞所源自的相同組織。在一些實施方式中，該癌細胞在實性瘤中，該實性瘤包含MHC I表面表現量為正常之癌細胞。在一些實施方式中，該癌細胞在實性瘤中，其中25%或更多的癌細胞具有降低的MHC I表面表現量。在一些實施方式中，該癌細胞在實性瘤中，其中50%或更多的癌細胞具有降低的MHC I表面表現量。在一些實施方式中，該癌細胞在實性瘤中，其中75%或更多的癌細胞具有降低的MHC I表面表現量。在一些實施方式中，該癌細胞在實性瘤中，其中95%或更多的癌細胞具有降低的MHC I表面表現量。

【0337】 在一些實施方式中，該實性瘤整體上（例如，如在取自該實性瘤的生物檢體中所評估的）與該實性瘤所源自的正常細胞或組織相比，具有降低的MHC I表面表現量。

【0338】 在一些實施方式中，本文提供的RNA/抗PD-1抗體組合用於治療晚期實性瘤癌症之方法。

【0339】 在一些實施方式中，本文提供的RNA/抗PD-1抗體組合用於治療不可切除的實性瘤癌症之方法。

【0340】 在一些實施方式中，本文提供的RNA/抗PD-1抗體組合用於治療轉移性實性瘤癌症之方法。

【0341】 在一些實施方式中，將該細胞激素RNA混合物注射入淋巴結內的一個或多個實性瘤癌症中。

【0342】 在一些實施方式中，該晚期實性瘤癌症包括適合於直接瘤內注射的腫瘤。在一些實施方式中，該晚期實性瘤癌症係III期、III期子集、IV期或IV期子集。在一些實施方式中，該癌症係黑色素瘤。在一些實施方式中，該黑色素瘤係IIIB期、IIIC期或IV期。在一些實施方式中，該癌症係皮膚鱗狀上皮細胞癌（CSCC）。在一些實施方式中，該癌症係頭頸部鱗狀上皮細胞癌（HNSCC）。在一些實施方式中，該CSCC或HNSCC係III期或IV期。在一些實施方式中，該實性瘤癌症係黑色素瘤，視需要其中該黑色素瘤係葡萄膜黑色素瘤或黏膜黑色素瘤；並且包括適於瘤內注射的淺表、皮下和/或淋巴結轉移。在一些實施方式中，該實性瘤癌症係HNSCC和/或僅在黏膜部位的黏膜黑色素瘤。在一些實施方式中，該實性瘤癌症係HNSCC。在一些實施方式中，該實性瘤癌症係葡萄膜黑色素瘤或黏膜黑色素瘤。在一些實施方式中，該實性瘤癌症係葡萄膜黑色素瘤。在一些實施方式中，該實性瘤癌症係黏膜黑色素瘤。在一些實施方式中，僅在該實性瘤癌的黏膜部位瘤內注射該等RNA，其中該實性瘤癌症係HNSCC或黏膜黑色素瘤。

【0343】 在一些實施方式中，該受試者先前抗計劃性細胞死亡1（PD-1）或抗計劃性細胞死亡1配位基（PD-L1）療法已經失敗。在其他實施方式中，該受試者先前未曾接受抗PD-1或抗PD-L1療法治療。在一些實施方式中，該受試者沒有其他治療選擇。

【0344】 在一些實施方式中，該方法可以包括在受試者中減小腫瘤大小或預防癌症轉移。

【0345】 在一些實施方式中，該受試者患有至少兩個腫瘤病變或至少三個腫瘤病變。在一些實施方式中，該受試者患有兩個腫瘤病變。在一些實施方式中，該受試者患有三個腫瘤病變。

【0346】 在一些實施方式中，該受試者患有的疾病可根據如本文所述之實性瘤反應評價標準（RECIST）1.1標準測量。

【0347】 在一些實施方式中，該受試者患有適合於直接瘤內注射的腫瘤。在一些實施方式中，腫瘤是否適合直接瘤內注射可以基於劑量體積確定。在一些實施方式中，如果腫瘤包括適合於注射（即，不出血或滲液）的最長直徑≥0.5 cm的一處皮膚或皮下病變或變為融合且最長直徑（所有累及目標病變直徑的總和）≥0.5 cm的多處皮膚或皮下病變，則適合於直接瘤內注射細胞激素RNA混合物。在一些實施方式中，適合於超音波檢查（USG）引導的瘤內注射並被確認為轉移性疾病的≥1.5 cm的淋巴結也是合適的。在一些實施方式中，該腫瘤係葡萄膜黑色素瘤或黏膜黑色素瘤。在一些實施方式中，該腫瘤係葡萄膜黑色素瘤或黏膜黑色素瘤；並且包括適於瘤內注射的淺表、皮下和/或淋巴結轉移。

【0348】 在一些實施方式中，該受試者係人類。在一些實施方式中，該受試者可具有超過3個月、4個月、5個月或6個月的預期壽命。在一些實施方式中，該受試者的預期壽命超過3個月。在一些實施方式中，該受試者為至少18歲。

【0349】 在一些實施方式中，提供了用於治療晚期黑色素瘤、皮膚鱗狀上皮細胞癌（CSCC）或頭頸部鱗狀上皮細胞癌（HNSCC）之方法，該方法包括向患有晚期黑色素瘤之受試者施用編碼IL-12sc蛋白的RNA、編碼IL-15 sushi蛋白的RNA、編碼IFNα蛋白的RNA和編碼GM-CSF蛋白的RNA以及抗PD-1抗體。在一些實施方式中，(a) 該受試者為至少18歲；(b) 該受試者先前的抗PD1或抗PD-L1療法已經失敗；(c) 該受試者至少有2處病變；(d) 該黑色素瘤、CSCC或HNSCC包含適合直接瘤內注射的腫瘤。

【0350】 在一些實施方式中，該受試者患有可根據實性瘤反應評價標準（RECIST）1.1標準測量的疾病。在一些實施方式中，該受試者的預期壽命超過3個月。

【0351】 在一些實施方式中，該實性瘤係上皮腫瘤、前列腺腫瘤、卵巢腫瘤、腎細胞腫瘤、胃腸道腫瘤、肝腫瘤、大腸直腸腫瘤、脈管系統腫瘤、間皮瘤、

胰腺腫瘤、乳房腫瘤、肉瘤、肺腫瘤、結腸腫瘤、黑色素瘤、小細胞肺腫瘤、神經母細胞瘤、睾丸腫瘤、上皮癌腫瘤、腺癌腫瘤、精原細胞瘤、視網膜母細胞瘤、皮膚鱗狀上皮細胞癌（CSCC）、頭頸部鱗狀上皮細胞癌（HNSCC）、頭頸癌或骨肉瘤。

【0352】 在一些實施方式中，該實性瘤包括任何大小的原發性腫瘤。在一些實施方式中，報告的腫瘤厚度測量值四捨五入到最接近的0.1 mm。在一些實施方式中，該實性瘤包含厚度 ≤ 1.0 mm的原發性腫瘤。在一些實施方式中，該實性瘤包含厚度為0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9或1.0 mm的原發性腫瘤。在一些實施方式中，該實性瘤包含厚度 < 0.8 mm（或小於0.8 mm）的無潰瘍的原發性腫瘤。在一些實施方式中，該實性瘤包含厚度 < 0.8 mm（或小於0.8 mm）的有潰瘍的原發性腫瘤。在一些實施方式中，該實性瘤包含厚度為0.8至1.0 mm的原發性腫瘤。在一些實施方式中，該實性瘤包含厚度為0.8、0.9或1.0 mm的原發性腫瘤。在一些實施方式中，該實性瘤包含厚度為0.8至1.0 mm的無潰瘍或有潰瘍的原發性腫瘤。在一些實施方式中，該實性瘤包含厚度 > 1.0-2.0 mm的原發性腫瘤。在一些實施方式中，該實性瘤包含厚度為1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9或2.0 mm的原發性腫瘤。在一些實施方式中，該實性瘤包含厚度 > 1.0-2.0 mm的無潰瘍或有潰瘍的原發性腫瘤。在一些實施方式中，該實性瘤包含厚度 > 2.0-4.0 mm的原發性腫瘤。在一些實施方式中，該實性瘤包含厚度3.0-4.0 mm的原發性腫瘤。在一些實施方式中，該實性瘤包含厚度為2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9或4.0 mm的原發性腫瘤。在一些實施方式中，該實性瘤包含厚度 > 2.0-4.0 mm的無潰瘍或有潰瘍的原發性腫瘤。在一些實施方式中，該實性瘤包含厚度 > 4.0 mm的原發性腫瘤。在一些實施方式中，該實性瘤包含厚度為4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、7.0、8.0、9.0或10.0 mm的原發性腫瘤。在一些實施方式中，該實性瘤包含厚度 > 4.0 mm的無潰瘍或有潰瘍的原發性腫瘤。在一些實施方式中，該厚度為

腫瘤的最厚（即，最大）的尺寸。在一些實施方式中，該腫瘤係皮膚癌腫瘤，並且厚度係從皮膚表面到腫瘤的最深部分（例如，厚度不是腫瘤的側向擴展）。在一些實施方式中，該腫瘤係除皮膚癌以外的癌症的皮膚轉移，並且腫瘤的厚度係從皮膚表面到腫瘤的最深部分（例如，厚度不是腫瘤的側向擴展）。

【0353】 在一些實施方式中，該實性瘤係黑色素瘤實性瘤。在一些實施方式中，該黑色素瘤包含任何大小的原發性腫瘤。在一些實施方式中，報告的腫瘤厚度測量值四捨五入到最接近的0.1 mm。在一些實施方式中，該黑色素瘤包含厚度 ≤ 1.0 mm的原發性腫瘤。在一些實施方式中，該黑色素瘤包含厚度為0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9或1.0 mm的原發性腫瘤。在一些實施方式中，該黑色素瘤包含厚度 < 0.8 mm（或小於0.8 mm）的無潰瘍的原發性腫瘤。在一些實施方式中，該黑色素瘤包含厚度 < 0.8 mm（或小於0.8 mm）的有潰瘍的原發性腫瘤。在一些實施方式中，該黑色素瘤包含厚度為0.8至1.0 mm的原發性腫瘤。在一些實施方式中，該黑色素瘤包含厚度為0.8、0.9或1.0 mm的原發性腫瘤。在一些實施方式中，該黑色素瘤包含厚度為0.8至1.0 mm的無潰瘍或有潰瘍的原發性腫瘤。在一些實施方式中，該黑色素瘤包含厚度 > 1.0-2.0 mm的原發性腫瘤。在一些實施方式中，該黑色素瘤包含厚度為1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9或2.0 mm的原發性腫瘤。在一些實施方式中，該黑色素瘤包含厚度 > 1.0-2.0 mm的無潰瘍或有潰瘍的原發性腫瘤。在一些實施方式中，該黑色素瘤包含厚度 > 2.0-4.0 mm的原發性腫瘤。在一些實施方式中，該黑色素瘤包含厚度為3.0-4.0 mm的原發性腫瘤。在一些實施方式中，該黑色素瘤包含厚度為2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9或4.0 mm的原發性腫瘤。在一些實施方式中，該黑色素瘤包含厚度 > 2.0-4.0 mm的無潰瘍或有潰瘍的原發性腫瘤。在一些實施方式中，該黑色素瘤包含厚度 > 4.0 mm的原發性腫瘤。在一些實施方式中，該黑色素瘤包含厚度為4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、7.0、8.0、9.0或10.0 mm的原發性腫瘤。在一些實施方式中，

該黑色素瘤包含厚度 > 4.0 mm的無潰瘍或有潰瘍的原發性腫瘤。在一些實施方式中，該厚度係從皮膚表面到腫瘤的最深部分（厚度不是腫瘤的側向擴展）。

【0354】 在一些實施方式中，該黑色素瘤包含一個涉入腫瘤的區域淋巴結或，或包含任何數量的在途、衛星和/或微衛星轉移而無涉入腫瘤的淋巴結。在一些實施方式中，該黑色素瘤包含一個臨床上隱匿的涉入腫瘤的區域淋巴結。在一些實施方式中，該黑色素瘤包含一個臨床上可檢測到的涉入腫瘤的區域淋巴結。在一些實施方式中，該黑色素瘤包含任何數量的在途、衛星和/或微衛星轉移，無涉入腫瘤的淋巴結。在一些實施方式中，該黑色素瘤包含兩個或三個涉入腫瘤的區域淋巴結，或包含任何數量的在途、衛星和/或微衛星轉移而無涉入腫瘤的淋巴結。在一些實施方式中，該黑色素瘤包含兩個或三個臨床上隱匿的涉入腫瘤的區域淋巴結。在一些實施方式中，該黑色素瘤包含兩個或三個涉入腫瘤的區域淋巴結，其中至少一個係臨床上可檢測到的。在一些實施方式中，該黑色素瘤包含兩個或三個涉入腫瘤的區域淋巴結，其中一個係臨床上隱匿的或臨床上可檢測到的，並且存在轉移、衛星和/或微衛星轉移。在一些實施方式中，該黑色素瘤包含任何數量的在途、衛星和/或微衛星轉移，有一個涉入腫瘤的淋巴結。在一些實施方式中，該黑色素瘤包含四個或更多個涉入腫瘤的區域淋巴結，或任意數量的在途、衛星和/或微衛星轉移且具有兩個或更多個涉入腫瘤的淋巴結，或任何數量的粗糙結節且不存在或存在在途、衛星和/或微衛星轉移。在一些實施方式中，該黑色素瘤包含四個或更多個臨床上隱匿的涉入腫瘤的區域淋巴結。在一些實施方式中，該黑色素瘤包含四個或更多個臨床上隱匿的涉入腫瘤的區域淋巴結，其中至少一個係臨床上可檢測到的或存在任何數量的粗糙結節。在一些實施方式中，該黑色素瘤包含兩個或三個涉入腫瘤的區域淋巴結，其中一個係臨床上隱匿的或臨床上可檢測到的。在一些實施方式中，該黑色素瘤包含四個或更多個臨床上隱匿的涉入腫瘤的區域淋巴結，其中兩個或更多個係臨床上隱匿的或臨床上可檢測到的和/或在存在任何數量的粗糙結節，並且存在在途、衛星和/或微衛星轉移。

【0355】 在一些實施方式中，該黑色素瘤：

a. 包含任何大小的原發性腫瘤；

b. 包含一個或多個涉入腫瘤的區域淋巴結；或在途、衛星和/或微衛星轉移，無涉入腫瘤的區域淋巴結；以及

c. 不包含可檢測到的遠處轉移。

【0356】 在一些實施方式中，該黑色素瘤具有可檢測到的遠處轉移。

【0357】 在一些實施方式中，該黑色素瘤：

a. 包含厚度 < 0.8 mm的無潰瘍的原發性腫瘤；或厚度為0.8至1.0 mm的原發性腫瘤和厚度小於0.8 mm並有潰瘍的原發性腫瘤；或厚度 > 1.0至2.0 mm且無潰瘍的原發性腫瘤；

b. 包含一或兩個或三個臨床上隱匿的涉入腫瘤的局部淋巴結；以及

c. 不包含可檢測到的遠處轉移。

【0358】 在一些實施方式中，該黑色素瘤：

a. 包含厚度 < 0.8 mm的無潰瘍的原發性腫瘤；或厚度為0.8至1.0 mm的原發性腫瘤和厚度小於0.8 mm並有潰瘍的原發性腫瘤；或厚度 > 1.0至2.0 mm且無潰瘍的原發性腫瘤；

b. 包含一個臨床上可檢測到的涉入腫瘤的區域淋巴結；或沒有涉入腫瘤的區域淋巴結，存在在途、衛星和/或微衛星轉移；或兩個或三個涉入腫瘤的區域淋巴結，其中至少一個係臨床上可檢測到的；以及

c. 不包含可檢測到的遠處轉移。

【0359】 在一些實施方式中，該黑色素瘤：

a. 包含厚度 > 1.0至2.0 mm的有潰瘍的原發性腫瘤；或厚度 > 2.0至4.0 mm且無潰瘍的原發性腫瘤；

b. 包含一個臨床上可檢測到的或臨床上隱匿的涉入腫瘤的區域淋巴結；或沒有或一個涉入腫瘤的區域淋巴結，存在在途、衛星和/或微衛星轉移；以及

c. 不包含可檢測到的遠處轉移。

【0360】 在一些實施方式中，該黑色素瘤：

a. 包含一個臨床上可檢測到的涉入腫瘤的區域淋巴結；或沒有涉入腫瘤的區域淋巴結，存在在途、衛星和/或微衛星轉移；以及

b. 不包含可檢測到的遠處轉移。

【0361】 在一些實施方式中，該黑色素瘤沒有可檢測到的遠處轉移；並且包含：

a. 兩個或三個涉入腫瘤的區域淋巴結，其中至少一個係臨床上可檢測到的；

b. 一個臨床上隱匿的或可檢測到的涉入腫瘤的區域淋巴結，存在在途、衛星和/或微衛星轉移；

c. 四個或更多個涉入腫瘤的區域淋巴結，其中至少一個係臨床上可檢測到的，或存在一個或多個粗糙結節；或者

d. 兩個或更多個臨床上隱匿的或臨床上可檢測到的涉入腫瘤的區域淋巴結和/或存在一個或多個粗糙結節且存在在途、衛星和/或微衛星轉移。

【0362】 在一些實施方式中，該黑色素瘤包含厚度 < 0.8 mm或 > 1.0至2.0 mm或 > 2.0至4.0 mm的無潰瘍的原發性腫瘤；不包含可檢測到的遠處轉移；並且包含：

a. 一個臨床上隱匿的或臨床上可檢測到的涉入腫瘤的區域淋巴結，存在在途、衛星和/或微衛星轉移；或者

b. 四個或更多個涉入腫瘤的區域淋巴結；或一處或多處在途、衛星和/或微衛星轉移，有兩個或更多個涉入腫瘤的結節；或一個或多個粗糙結節，存在或不存在在途、衛星和/或微衛星轉移。

【0363】 在一些實施方式中，該黑色素瘤：

a. 包含厚度 > 2.0至4.0 mm的有潰瘍的原發性腫瘤或厚度 > 4.0 mm的無潰瘍的原發性腫瘤；

b. 包含一個或多個涉入腫瘤的區域淋巴結；或一處或多處在途、衛星和/或微衛星轉移，可選地有一個或多個涉入腫瘤的區域淋巴結；或一個或多個粗糙結節，存在或不存在在途、衛星和/或微衛星轉移；以及

c. 不包含可檢測到的遠處轉移。

【0364】 在一些實施方式中，該黑色素瘤：

a. 包含厚度 > 4.0 mm的無潰瘍的原發性腫瘤；

b. 包含一或兩個或三個涉入腫瘤的區域淋巴結；或一處或多處在途、衛星和/或微衛星轉移，沒有或有一個涉入腫瘤的區域淋巴結；以及

c. 不包含可檢測到的遠處轉移。

【0365】 在一些實施方式中，該黑色素瘤

a. 包含厚度 > 4.0 mm的有潰瘍的原發性腫瘤；

b. 包含四個或更多格涉入腫瘤的區域淋巴結；或一處或多處在途、衛星和/或微衛星轉移，具有兩個或更多個涉入腫瘤的區域淋巴結，或一個或多個粗糙結節，存在或不存在在途、衛星和/或微衛星轉移；以及

c. 不包含可檢測到的遠處轉移。

【0366】 在一些實施方式中，該皮膚鱗狀上皮細胞癌（CSCC）或頭頸部鱗狀上皮細胞癌（HNSCC）包含任何大小的腫瘤。在一些實施方式中，該CSCC或HNSCC不包含已鑒定的腫瘤。在一些實施方式中，該CSCC或HNSCC包含最大尺寸為2 cm或更小的腫瘤。在一些實施方式中，該CSCC或HNSCC包含最大尺寸大於2 cm但不大於4 cm的腫瘤。在一些實施方式中，該CSCC或HNSCC包含最大尺寸大於4 cm或具有最小的骨侵蝕或神經周圍浸潤或深度浸潤的腫瘤。在一些

實施方式中，該CSCC或HNSCC包含具有大範圍的皮質或髓質骨累及或顱底浸潤或顱底孔浸潤的腫瘤。

【0367】 在一些實施方式中，該皮膚鱗狀上皮細胞癌（CSCC）或頭頸部鱗狀上皮細胞癌（HNSCC）不包含區域淋巴結轉移。在一些實施方式中，該CSCC或HNSCC包含單個同側淋巴結轉移，最大尺寸為3 cm或更小，並且呈ENE陰性。在一些實施方式中，該CSCC或HNSCC包含最大尺寸大於3 cm但不大於6 cm並且呈ENE陰性的單個同側淋巴結轉移。在一些實施方式中，該CSCC或HNSCC包含多個同側淋巴結轉移，該淋巴結最大尺寸不大於6 cm並且呈ENE陰性。在一些實施方式中，該CSCC或HNSCC包含雙側或對側淋巴結轉移，該淋巴結最大尺寸不大於6 cm並且呈ENE陰性。在一些實施方式中，該CSCC或HNSCC包含最大尺寸大於6 cm的淋巴結轉移，並且呈ENE陰性；或任何淋巴結轉移並且呈ENE陰性。在一些實施方式中，該皮膚鱗狀上皮細胞癌（CSCC）或頭頸部鱗狀上皮細胞癌（HNSCC）：

a. 包含最大尺寸大於4 cm或具有最小的骨侵蝕或神經周圍浸潤或深度浸潤的腫瘤；以及

b. 包含：

i. 無區域淋巴結轉移；或者

ii. 單個同側淋巴結轉移，最大尺寸為3 cm或更小，並且呈ENE陰性；以及

c. 不包含可檢測到的遠處轉移。

【0368】 在一些實施方式中，該皮膚鱗狀上皮細胞癌（CSCC）或頭頸部鱗狀上皮細胞癌（HNSCC）包含：

a. 最大尺寸為2 cm或更小的腫瘤；

b. 單個同側淋巴結轉移，最大尺寸為3 cm或更小，並且呈ENE陰性；以及

c. 無可檢測到的遠處轉移。

【0369】 在一些實施方式中，該皮膚鱗狀上皮細胞癌（CSCC）或頭頸部鱗狀上皮細胞癌（HNSCC）包含：

a. 最大尺寸大於2 cm但不大於4 cm的腫瘤；

b. 單個同側淋巴結轉移，最大尺寸為3 cm或更小，並且呈ENE陰性；以及

c. 無可檢測到的遠處轉移。

【0370】 在一些實施方式中，該皮膚鱗狀上皮細胞癌（CSCC）或頭頸部鱗狀上皮細胞癌（HNSCC）

a. 包含：

i. 最大尺寸為2 cm或更小的腫瘤；或者

ii. 最大尺寸大於2 cm但不大於4 cm的腫瘤；或者

iii. 最大尺寸大於4 cm或最小的骨侵蝕或神經周圍浸潤或深度浸潤的腫瘤；以及

b. 包含：

i. 最大尺寸大於3 cm但不大於6 cm的同側淋巴結轉移，並且呈結外擴展（ENE）陰性；或者

ii. 多個同側淋巴結轉移，最大尺寸不大於6 cm，並且呈ENE陰性；或者

iii. 雙側或對側淋巴結轉移，最大尺寸不大於6 cm，並且呈ENE陰性；以及

c. 不包含可檢測到的遠處轉移。

【0371】 在一些實施方式中，該皮膚鱗狀上皮細胞癌（CSCC）或頭頸部鱗狀上皮細胞癌（HNSCC）

a. 包含：

i. 最大尺寸為2 cm或更小的腫瘤；或者

ii. 最大尺寸大於2 cm但不大於4 cm的腫瘤；或者

iii. 最大尺寸大於4 cm或最小的骨侵蝕或神經周圍浸潤或深度浸潤的腫瘤；或者

iv. 具有大範圍的皮質或髓質骨累及或顱底浸潤或顱底孔浸潤的腫瘤；以及

b. 包含最大尺寸大於6 cm的淋巴結轉移，並且呈ENE陰性；或在任何淋巴結中轉移，並且呈ENE陰性；以及

c. 不包含可檢測到的遠處轉移。

【0372】 在一些實施方式中，該皮膚鱗狀上皮細胞癌（CSCC）或頭頸部鱗狀上皮細胞癌（HNSCC）

a. 包含具有大範圍的皮質或髓質骨累及或顱底浸潤或顱底孔浸潤的腫瘤；

b. 包含：

i. 無區域淋巴結轉移；或者

ii. 單個同側淋巴結轉移，最大尺寸為3 cm或更小，並且呈ENE陰性；或者

iii. 最大尺寸大於3 cm但不大於6 cm的同側淋巴結轉移，並且呈ENE陰性；或多個同側淋巴結轉移，最大尺寸不大於6 cm，並且呈ENE陰性；或雙側或對側淋巴結轉移，最大尺寸不大於6 cm，並且呈ENE陰性；或者

iv. 最大尺寸大於6 cm的淋巴結轉移，並且呈ENE陰性；或任何淋巴結轉移並且呈ENE陰性，並且

c. 不包含可檢測到的遠處轉移。

【0373】 在一些實施方式中，該皮膚鱗狀上皮細胞癌（CSCC）或頭頸部鱗狀上皮細胞癌（HNSCC）

a. 包含具有大範圍的皮質或髓質骨累及或顱底浸潤或顱底孔浸潤的腫瘤；以及

b. 不包含可檢測到的遠處轉移。

【0374】 在一些實施方式中，該皮膚鱗狀上皮細胞癌（CSCC）或頭頸部鱗狀上皮細胞癌（HNSCC）

a. 包含：

i. 最大尺寸為2 cm或更小的腫瘤；或者

ii. 最大尺寸大於2 cm但不大於4 cm的腫瘤；或者

iii. 最大尺寸大於4 cm或最小的骨侵蝕或神經周圍浸潤或深度浸潤的腫瘤；或者

iv. 具有大範圍的皮質或髓質骨累及或顱底浸潤或顱底孔浸潤的腫瘤；

b. 包含：

i. 無區域淋巴結轉移；或者

ii. 單個同側淋巴結轉移，最大尺寸為3 cm或更小，並且呈ENE陰性；或者

iii. 最大尺寸大於3 cm但不大於6 cm的同側淋巴結轉移，並且呈ENE陰性；或多個同側淋巴結轉移，最大尺寸不大於6 cm，並且呈ENE陰性；或雙側或對側淋巴結轉移，最大尺寸不大於6 cm，並且呈ENE陰性；

iv. 最大尺寸大於6 cm的淋巴結轉移，並且呈ENE陰性；或任何淋巴結轉移並且呈ENE陰性；以及

c. 包含可檢測到的遠處轉移。

【0375】 在一些實施方式中，該皮膚鱗狀上皮細胞癌（CSCC）或頭頸部鱗狀上皮細胞癌（HNSCC）不包含可檢測到的遠處轉移。

【0376】 在一些實施方式中，該等RNA的治療有效量導致以下一種或多種結果：視需要與未經治療之受試者或僅施用該RNA混合物中該等RNA的1、2或3種之受試者相比，(a) 癌症症狀的嚴重程度降低或持續時間縮短；(b) 腫瘤生長的

抑制或腫瘤壞死的增加、腫瘤縮小和/或腫瘤消失；(c) 腫瘤生長和/或發展的延遲；(d) 腫瘤轉移受抑制或阻止或停止；(e) 腫瘤生長復發的預防或延遲；(f) 受試者的存活率上升；和/或 (g) 常規抗癌療法的使用或需求減少（例如，減少或免除了化學療法或細胞毒性劑的使用）。

***

【0377】 本說明書和示例性實施方式不應被視為限制性的。為了本說明書和所附的目的，除非另外指出，否則在所有情況下，應將表示數量、百分比或比例的所有數字以及在說明書和中使用的其他數值理解為由術語「約」來修飾（只要該等數字和數值沒有如此修飾）。「約」表示基本上不影響所描述主題的性質的差異程度，例如，在10%、5%、2%或1%之內。因此，除非相反地指出，否則以下說明書和所附中列出的數字參數係可以根據試圖獲得的期望特性而有所差異的近似值。至少，並且不試圖將等同原則的應用限制於的範圍，每個數字參數應至少根據所報告的有效數字的數量並藉由應用普通的舍入技術來解釋。

【0378】 值得注意的是，如在本說明書和所附中所使用的，單數形式「一個」、「一種」和「該」以及任何詞的任何單數使用，均包括多個指稱，除非特意地並且明確地限於一個指稱。如本文中所使用的，術語「包括」及其語法變體意在指非限制性的，使得列表中的項目的列舉不排除可以替換或添加到所列項目的其他類似項目。

實例

【0379】 提供以下實例以舉例說明某些揭露之實施方式，並且不應以任何方式解釋為限制本揭露的範圍。在以下討論的實例中，如上文所定義的該細胞激素RNA混合物也可以互換地稱為「該混合物」、「該細胞激素混合物」、「該組成物」或「該藥物」。

實例1 - 細胞激素RNA混合物作為單一療法和與西米單抗組合的劑量遞增和劑量擴展

【0380】 總體設計：進行一項人類中首次開放標籤、劑量遞增和擴展研究，以評價腫瘤內作為單一藥物和與西米單抗組合瘤內施用的細胞激素RNA混合物的最大耐受和施用劑量、安全性、耐受性、藥物動力學、藥效動力學和抗腫瘤活性。

【0381】 參與者的數量：當該細胞激素RNA混合物作為單一藥物施用時，計畫招募最多72名參與者，取決於遞增期研究的劑量位準。當該細胞激素RNA混合物與西米單抗組合施用時，計畫最多招募192名參與者，取決於遞增期研究的劑量位準和擴展期每個群組的完成階段。合計總共招募最多264名參與者。

【0382】 劑量遞增期（單一療法）：劑量遞增期中沒有正式的樣本量計算。將該細胞激素RNA混合物施用於先前基於抗PD-1或抗PD-L1的療法已經失敗的晚期實性瘤患者，和/或對抗PD-1不作為常規使用的該等適應症無其他治療選擇的患者。劑量遞增期招募最多38位可評價劑量限制性毒性（DLT）的參與者，預期評估約8個劑量位準。實際樣本量取決於觀察到的DLT和實際探索的劑量位準的數量。

【0383】 **劑量擴展期（單一療法）：**在擴展期使用了Simon二階段設計，招募了大約34名患有晚期黑色素瘤的參與者，該等參與者先前的抗PD-1/抗PD-L1療法失敗。在第一批16名接受治療的參與者之後，進行一項期中分析，如果在至少2名參與者中觀察到反應，則應計人數繼續到34名參與者的全樣本量。

【0384】 **劑量遞增期（組合療法）：**與西米單抗組合的細胞激素RNA混合物的劑量遞增中的實際樣本量因觀察到的DLT和實際探索的劑量位準的數量而異（大約18至36名可評價DLT的參與者）。

【0385】 **劑量擴展期（組合療法）：**與西米單抗組合的細胞激素RNA混合物的擴展期使用Simon二階段設計，並且招募大約156名患有晚期黑色素瘤、CSCC或HNSCC的參與者進入四個群組。在Simon二階段設計的第1階段結束時，對每

個群組進行期中分析（群組A的26名患者，群組B的14名患者，群組C的10名患者，群組D的26名患者）。所有群組（A、B、C和D）的招募並行進行。

【0386】 干預組和持續時間：參與者的研究的持續時間包括長達28天的篩選期。成功藉由篩選後，參與者可以接受研究干預，直到疾病進展、不可接受的AE、參與者決定停止治療為止，或者如果沒有發生疾病進展，則持續最長1年。對於那些顯然繼續以安全的方式與合理的毒性繼續獲得臨床益處的參與者，研究委員會將逐個病例地考慮1年後繼續使用作為單一藥物以及與西米單抗組合的細胞激素RNA混合物。在中止研究干預後，參與者在上一次IMP施用後大約30天或在參與者接受另一種抗癌療法之前（以較早者為准）返回研究中心進行治療結束評估。如果參與者由於進展以外的其他原因而中止研究干預，則每3個月進行一次隨訪，直至疾病進展、開始另一種抗癌治療或死亡（以最先發生者為准）。

【0387】 受益於該細胞激素RNA混合物和/或西米單抗的參與者的預期治療持續時間可能會根據進展日期而有所不同；但每位參與者的預期研究持續時間中位數估計為9個月（篩選1個月、治療5個月、治療結束後隨訪3個月），組合療法中為12個月（篩選1個月、治療8個月、治療結束隨訪3個月）。

【0388】 在單一療法中，以4週的週期每週一次瘤內施用該細胞激素RNA混合物（即，每28天四劑）。在組合療法中，每週一次瘤內施用該細胞激素RNA混合物，並在3週的週期的第1天靜脈內施用西米單抗（即，每21天三劑該細胞激素RNA混合物和一劑西米單抗）。瘤內注射應每週一次繼續，直到進行第二次腫瘤評估，此時可考慮將該細胞激素RNA混合物的劑量間隔改為每月兩次或一次（在單一療法中）或每三週一次（在組合療法中）；還可以根據可獲得的數據考慮該細胞激素RNA混合物施用的更靈活的劑量間隔。

【0389】 在單一療法和組合療法的遞增期中基於毒性升至更高的劑量位準；也可以考慮中間劑量。在單一療法中，一旦在宣佈為安全的劑量位準觀察到早期療效訊號，則可以進行擴展以確認療效。

【0390】 在整個研究過程中可能會出現劑量遺漏或劑量延遲；劑量限制性毒性（DLT）的出現決定了對該等修飾的需求。經歷DLT的參與者將停止治療（在單一療法或組合療法中），並接受隨訪，直至消退至≤1級或基線狀態。如果在DLT觀察期內觀察到DLT，則將確定地中止研究干預。如果AE符合DLT標準並且發生在DLT觀察期之後，則將逐個病例進行受益-風險評估，以決定是否繼續療法。從不超過兩週的細胞激素RNA混合物的劑量遺漏（即，2次劑量遺漏）恢復後，該參與者可以以相同或更低劑量位準以新的治療週期重新開始療法；此類以更低的劑量位準重新給藥的參與者不允許再次劑量遞增。如果參與者經歷相同的AE導致2週內第二次劑量遺漏（即，2次劑量遺漏），則該參與者可能會永久中止研究治療。接受西米單抗治療的參與者在整個研究治療期間均保持分配的劑量（350 mg Q3W），如果不認為係出於安全性概況考慮的強制性要求，則不允許對西米單抗進行劑量修改；但是，如果出於毒性考慮而需要，可以允許延遲治療週期或西米單抗劑量遺漏。如果參與者發生西米單抗輸注相關的過敏性藥物反應，導致西米單抗治療終止，則該參與者可以繼續以指定的劑量位準接受作為單一療法的細胞激素RNA混合物治療。

【0391】 研究藥品：細胞激素RNA混合物

- 施用路徑：瘤內注射
- 劑量方案：每週一次以指定的劑量位準施用細胞激素RNA混合物，在28天的週期內進行4次注射。

【0392】 研究藥品：西米單抗

- 配製物：西米單抗藥物產品以濃縮溶液（50 mg/mL）呈現，該濃縮溶液含有10 mM組胺酸、5%（重量/體積）蔗糖、1.5%（重量/體積）L-脯胺酸和0.2%（重量/體積）聚山梨酯80，pH為6.0，並且裝在10 mL一次性使用小瓶中，填充至兩種不同的可抽取量之一中：
  - 5.0 mL可抽取（相當於250 mg/小瓶）
  - 7.0 mL可抽取（相當於350 mg/小瓶）

- 施用路徑：靜脈輸注的解決方案。
- 劑量方案：Q3W，每次施用在30分鐘內靜脈輸注350 mg。

【0393】 對於組合群組，西米單抗以350 mg Q3W的固定推薦劑量靜脈內施用，隨後每週一次瘤內施用該細胞激素RNA混合物。在同時用西米單抗和該細胞激素RNA混合物治療的天數中，先施用西米單抗，隨後再施用該細胞激素RNA混合物（同一天）。

【0394】 非研究藥品：沒有施用預定義的前驅用藥。

【0395】 試驗後獲得用藥的機會：本研究招募的所有參與者均接受治療1年或直至疾病進展，以二者最早的為准。

【0396】 統計考慮：單一療法和組合療法的數據將分別進行分析。在劑量擴展期間對組合療法中的每個群組進行單獨的分析。

【0397】

a. 主要分析：

【0398】 劑量遞增（單一療法和組合療法）：在劑量遞增期，按劑量位準總結DLT。DLT的詳細資訊由參與者提供。使用劑量位準的敘述性統計數據總結治療期間的治療中出現的AE/SAE和實驗室異常。

【0399】 劑量擴展（單一療法和組合療法）：根據RECIST 1.1的客觀反應率（ORR）用敘述性統計進行了總結。使用Clopper-Pearson方法計算90%的雙向置信區間。統計推斷基於樣本量計算部分中定義的假設和α水平。

b. 次要終點分析：

【0400】 劑量遞增（單一療法和組合療法）：在評估PK的週期中，用敘述性統計總結了由該細胞激素RNA混合物編碼的該等細胞激素的和西米單抗的濃度和PK參數。描述性地總結了針對由該細胞激素RNA混合物編碼的該等細胞激素的抗藥物抗體（ADA）和針對西米單抗的ADA。

【0401】 劑量擴展（單一療法和組合療法）：使用敘述性統計總結了治療期間的治療中出現的AE/SAE和實驗室異常。使用Kaplan-Meier方法總結了根據RECIST 1.1和iRECIST的DoR和PFS。針對根據RECIST 1.1和iRECIST的DCR，以及根據iRECIST的ORR，提供了與根據RECIST 1.1的ORR類似的分析。在評估PK的週期中，用敘述性統計總結了由該細胞激素混合物編碼的該等細胞激素和西米單抗的PK濃度和參數。描述性地總結了針對由細胞激素RNA混合物編碼的細胞激素的ADA和針對西米單抗的ADA。

【0402】 圖1A顯示了治療的總體設計圖示（上圖：單一療法；下圖：組合療法），圖1B和1C分別示出了用於單一療法和用於組合療法的治療計畫之圖示。

【0403】 單一療法中的劑量遞增期旨在確定作為單一療法每週施用的該細胞激素RNA混合物的MTD或MAD。（圖1A，「a」）。每週施用一次的固定劑量的MTD/MAD在擴展期進行進一步測試。抗PD-1或抗PD-L1失敗後的IIIB-C期或IV期黑色素瘤符合條件。如果在前16名接受治療的參與者中至少觀察到兩例反應，則納入的參與者的數量為最多34名參與者。（圖1A，「b」）。在加速遞增期中，對每個群組的一名參與者評估在週期1中觀察到的毒性的發生。（圖1A，「c」）。在加速遞增DL中的任何一個發生相關的≥2級的AE或DLT（DL1或2，以最先發生者為准）之後，或從DL3開始，將藉由對每個群組至少3名參與者的評價來啟動有超劑量控制的貝葉斯遞增。（圖1A，「d」）。當劑量遞增期結束時，基於安全性確定在遞增期評價的MTD/MAD。（圖1A，「e」）。

【0404】 組合療法中的劑量遞增期旨在確定與每三週一次靜脈內施用的西米單抗組合每週施用一次細胞激素RNA混合物的MTD或MAD。一旦已證明單一療法的一個劑量位準安全且可耐受（基於28天的DLT觀察期）；一旦顯示PK、PDy和/或臨床反應（全身和/或局部）的體徵，則在進行中的單一療法劑量遞增期間，開始與西米單抗組合的細胞激素RNA混合物的劑量遞增。在開始組合遞增期之後，組合探索的DL與單一療法相同。如果該中心同時參與了兩個劑量遞增期（即，研究的單一療法和組合療法部分中的劑量遞增），則優先考慮本研究單

一療法部分中的劑量遞增期。（圖1A，「f」）。在組合研究部分的擴展期，一旦達到MTD，就會啟動以下群組。群組A：抗PD-1/PD-L1失敗後的黑色素瘤，群組B：未接受過抗PD-1/PD L1的黑色素瘤，群組C：未接受過抗PD-1/PD L1的CSCC，群組D：未接受過抗PD-1/PD L1的HNSCC。（圖1A，「g」）。

【0405】 表2和3示出了單一療法的活動時間表（SOA），表2示出了治療流程圖，表3示出了劑量遞增和擴展期的PK和PDy流程圖。表4和表5示出了組合療法的活動時間表（SOA），表4示出了治療流程圖，表5示出了劑量遞增和擴展期的PK和PDy流程圖。

表2：活動時間表（Schedule of Activities，SOA）和治療流程圖 - 單一療法

評價[a]	篩選	治療[b] 週期1 單一療法中週期長度為28天								治療週期2及後續 單一療法中週期長度為28天						EOT[x]	FU[t,y]
		第1週		第2週		第3週		第4週		第1週		第2週	第3週	第4週			
	初始劑量前天數	D1	D2	D8	D9	D15	D16	D22	D23	D1	D2	D8	D15	D22	D24		
納入/排除標準/知情同意	< 28																
人口統計學和醫療/疾病史[c]	< 28																
ECOG PS，體重[d]，身高[e]（僅基線）	< 28	X		X		X		X		X		X	X	X		X	
生命體徵[f]	< 7	X	X	X		X		X		X		X	X	X		X	
體格檢查[g]	< 7	X		X		X		X		X		X	X	X		X	
數位攝影[h]	< 7	數位照片必須符合放射線攝影評估時間點															
血清妊娠檢查[i]	< 7									X						X	
HBsAg和HCV血清學（僅針對德國研究中心的參與者進行HIV檢測）	< 28																
血液學[j]	< 7	X		X		X		X		X		X	X	X		X	
凝血[k]	< 7	X		X		X		X		X		X	X	X		X	
血清化學[l]	< 7	X		X		X		X		X		X	X	X		X	
CRP/鐵蛋白[m]	< 28	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X[m]	X	X	X		X	
次級血漿細胞激素[m]		X	X	X	X					X[m]	X[m]					X	
12導程ECG[n]	< 28	X								X[n]						X	
骨髓生物檢體/抽吸[o]	根據盧加諾2014分類（參見本文）																
頸部、胸部、腹部、骨盆FDG PET/CT，CT[p]	< 28	FDG PET-CT/CT掃描大約每12週一次，以確認CR或PD以及按照臨床指示進行（參見本文）															
B淋巴瘤症狀的評估	< 28	按照疾病反應評估														X	

評價[a]	篩選	治療[b] 週期1 單一療法中週期長度為28天								治療週期2及後續 單一療法中週期長度為28天						EOT[x]	FU[t,y]
		第1週		第2週		第3週		第4週		第1週		第2週	第3週	第4週			
	初始劑量前天數	D1	D2	D8	D9	D15	D16	D22	D23	D1	D2	D8	D15	D22	D24		
尿液分析[q]	< 28	X		X		X		X		X		X	X	X		X	
尿液生物標誌物[r]		X[r]	X	X													
眼科檢查[s]	X																
不良事件評估[t]	X	在整個研究干預過程中持續進行															X[t]
伴隨用藥[u]		在整個研究干預過程中持續進行															
研究藥物施用[v]																	
細胞激素RNA混合物		X		X		X		X		X		X	X	X			
腫瘤評估[w]																	
RECIST1.1和 iRECIST	< 28																X[w, y]
藥物動力學（PK）																	
細胞激素RNA混合物PK評估	參見單一療法PK/PDy流程圖中的詳細資訊（表3）																
藥效動力學																	
藥效動力學（PDy）評估	參見單一療法PK/PDy流程圖中的詳細資訊（表3）																
免疫原性																	
用於針對由該細胞激素RNA混合物編碼的細胞激素的抗體的血液	參見單一療法PK/PDy流程圖中的詳細資訊（表3）																

a 評價：除非另外指出，否則在施用研究藥物之前進行評估。在施用下一個劑量之前，由研究者審查結果。收集腫瘤生物檢體組織用於免疫組織化學、基因組、RNA定序和新抗原分析

b 週期為28天，作為單一療法每週一次瘤內施用該細胞激素RNA混合物。

c **人口統計學**：包括年齡、性別、種族和民族。**醫療/手術史**：包括先前病理和手術的相關歷史記錄。**疾病史**：包括診斷時和研究開始時的階段，以及先前的抗腫瘤療法（類型、持續時間、中止原因和對該療法的反應）。另外，取決於腫瘤類型的特定的突變。

d 在每個週期的第一天的治療之前測量體重。

e 身高僅在基線期間測量。

f 生命體徵包括：溫度、血壓、心率、呼吸頻率。在C1D1期間，每住院24小時期間，每個新劑量位準下必須每6小時檢查一次生命體徵，同時對參與者進行監測以評估急性毒性。

g 體格檢查包括：檢查主要的身體系統，包括心血管系統、消化系統、中樞神經系統、呼吸系統和造血系統（肝腫大、脾腫大、淋巴結病）和皮膚。只有在首次IMP施用時仍存在的體徵和症狀才在eCRF中報告為AE。

h 假設在DL3之後預期會發生中等程度的藥理作用（例如，注入細胞激素RNA混合物的腫瘤病變部位發紅、浮腫或變平），則彩色數位照片必須從單一遞增的DL4開始，從組合遞增中的第一個DL和擴展期期間開始。在細胞激素RNA混合物的首個劑量之前進行篩選時，以及在從表層和/或可見皮下注射病變進行放放射線攝影腫瘤評估時，必須拍攝數位照片，以記錄總體疾病狀況並記錄反應。另外，必須在篩選和腫瘤評估窗口之間拍攝臨時彩色數位照片，以捕獲其他細胞激素RNA混合物可能誘導的變化，例如皮膚發紅和/或浮腫。根據研究參考手冊，臨床中心收集的所有數據必須與申辦方系統地共用，以供審查。

i 對有生育潛力的女性進行血清妊娠檢測。基線評估可以接受七天的窗口。

j 血液學：血紅蛋白、血細胞比容、白血球分類計數（包括絕對中性粒細胞計數[ANC]）、血小板計數。該等測試係在每次IMP施用之前進行的（可接受-1天的窗口）。如果係4級

中性粒細胞減少症，則每2至3天評估一次ANC，直到ANC≥0.5 x 10^9/L，然後每週一次直至恢復。如果基線異常，則在IMP施用後2天內進行週期1第1天評估。

k 凝血：活化部分凝血活酶時間（aPTT）、PT、國際標準化比值（INR）、纖維蛋白原（以及篩選時D-二聚體）。如果基線異常，則在IMP施用後2天內進行週期1第1天評估。

l 血清化學：肝功能檢查：AST、ALT、總膽紅素、直接膽紅素、鹼性磷酸酶（ALP）。腎功能檢查：尿素或BUN和肌酐，以及在需要時確定估計的CrCL（如果肌酐在1.0至1.5 x ULN之間）。電解質：鈉、鉀、總鈣、磷、氯、鎂和碳酸氫鹽。其他：葡萄糖、乳酸脫氫酶（LDH）、白蛋白、總蛋白和澱粉酶。除非臨床指示外，否則在IMP施用之前（可接受-1天的窗口）進行肝功能檢查、腎功能檢查、電解質、葡萄糖、LDH、白蛋白和總蛋白。在肝功能檢查≥3級異常時，每2-3天重複進行附加的檢查，直至恢復到基線值。如果基線異常，則在IMP施用後2天內進行週期1第1天血清化學評估。

m 在指定的時間點並在發生CRS ≥ 2級症狀時，收集血清C反應蛋白（CRP）、鐵蛋白和次級血漿細胞激素（包括介白素-6和干擾素-α）。在週期1（第1-4週每週）和週期3第1週的每次研究干預之前（D1）和24小時（D2）收集血清CRP和鐵蛋白樣本。在其他研究干預日，僅收集給藥前的樣本；只要出現CRS≥2級症狀，就應抽取附加的樣本。次級血漿細胞激素的常規採樣僅在週期1和3以及EOT時進行。收集樣本：在給藥前和在週期1第1週和第2週以及週期3第1週該細胞激素RNA混合物施用後6小時和24小時；EOT時；以及當出現≥2級的CRS症狀時。

n 12導程ECG：在週期1第1天、週期3第1天、週期7第1天和EOT進行篩選和預處理時以及當臨床指示時。

o 骨髓抽吸：僅用於淋巴瘤患者。

p FDG-PET-CT/CT：FDG PET僅適用於根據盧加諾分類的淋巴瘤患者，應在IMP施用後28天內（-7天）並且大約每12週（± 7天）進行一次，以確認CR和PD，以及根據臨床指示進行。

q 尿液分析：在基線時以及每次IMP施用之前和EOT時，藉由量油計在早上進行的量油計（定性）測試。在基線、不均勻的週期、治療結束時以及在量油計測試（定性）中出現異常

的情況下，對晨尿中的白血球和紅血球進行定量尿液分析。在蛋白尿≥++（量油計）時，藉由蛋白尿/24小時尿液收集進行蛋白尿定量。

r 尿液生物標誌物：在週期1第1天（可接受的前7天內）給藥前、首次IMP施用後24小時、首次IMP施用後第8天給藥前評估腎臟損傷分子1（KIM-1）、尿微量白蛋白和尿肌酐（點尿中）。

s 包括席爾梅爾氏試驗在內的眼科檢查在基線時以及在療法期間出現眼部症狀時進行。在每個週期的第1天評估眼部和視覺症狀。

t 不良事件評估：收集不良事件的觀察期從知情同意書（ICF）的簽字開始，一直到研究藥物最後一次施用後的30天為止。如方案中該評估和報告嚴重不良事件。EOT訪視後，將對正在進行的SAE和AESI、相關AE和新的相關AE進行隨訪，直至穩定、恢復或開始進一步療法。

u 伴隨用藥評估：從研究藥物初始劑量之前的14天到最後一次研究藥物施用後30天，正在進行的研究藥物相關不良事件消退或接受另一種抗癌療法時記錄伴隨用藥。

v 研究藥物施用：參與者可以接受本文指定的一種或多種前驅用藥。在週期1和第1天的每個新劑量位準，都要在醫院中對參與者進行至少24小時的監測，以評估急性毒性。在後續的施用中，參與者接受4-6小時的觀察，研究者可自行決定是否選擇住院至24小時。可以在週期1期間的+/-1天的窗口和從週期2開始+/-3天的窗口施用細胞激素RNA混合物。

w 腫瘤評估：在基線時（IMP施用28天+/-7天內）、IMP施用後每8週（-/+7天）直到第24週、然後每12週（-/+7天）以及研究干預結束時進行CT掃描或磁共振成像（MRI）以及臨床上指示的任何其他檢查，以評估疾病狀態，除非已在上一個週期完成。每12週對沒有疾病進展而中止研究干預的患者進行一次隨訪，直到有記錄的疾病進展為止。重複進行腫瘤評估以確認部分或完全反應以及疾病進展（最初記錄的反應後至少4週）。對於沒有內臟/深度淋巴結病變的參與者，如果沒有疾病轉移的臨床體徵，則在24週時進行腹部和胸部的放射腫瘤評估；如果在上一個週期尚未進行過，則在EOT時進行。在出現臨床體徵或實驗室異常時，可以考慮進行間歇性超音波檢查（USG）或臨床上指示的評估，主要是肝功能檢查，以排除潛在的疾病轉移。

x 治療結束（上一次治療後30±5天）：如果在研究的最後一週未進行評估，則獲取治療結束評估。

y 對疾病狀況的研究後隨訪：對在治療訪視結束時無疾病進展記錄且尚未開始使用另一種抗癌療法治療的參與者進行3個月的隨訪，直到開始另一種抗癌療法、疾病進展、死亡或研究截止日期（以最先發生者為准）。

表3：劑量遞增和擴展期的PK和PDy流程圖 - 單一療法

週期	篩選	週期1第1週和週期3第1週							週期1（第2週）					週期1（第3、4週）	週期3之後的後續奇數週期的第1週		週期1第1週第一次施用後的週數		週期6	治療結束	隨訪
天		D1				D2	D3	D5/6	D8			D9	D10	D15，D22	D1		5Wk	8Wk			
時間（小時/分鐘）=RNT		0H	1H	2H	6H	24H	48H	96/120H	0H	2H	6H	24H	48H	0H	0H	6H					
指示性時鐘時間		8:00	9:00	10:00	14:00	8:00	8:00	8:00	8:00	10:00	14:00	8:00	8:00	8:00	8:00	14:00					
研究治療施用																					
細胞激素RNA混合物		X							X					X	X						
藥物動力學																					
用於該細胞激素RNA混合物編碼的細胞激素的目標表現的血液[a]		X[b]	X	X	X[b]	X	X	X	X	X[a]	X	X	X[a]	X	X[b]	X[b]	X[a]		X[a]	X	X[a]
藥效動力學																					
用於PDy細胞激素的血液[c]		X			X	X			X		X	X			X[d]	X[d]				X	X[c]
用於HLA分型和遺傳分析的血液[e]	X																				
用於抗原特異性T細胞的血液[f]	X																X[f]			X	
用於免疫評估和RNA序列分析的腫瘤生物檢體[g]	X																X[g]		X[g]		
免疫原性																					
針對該細胞激素RNA混合物編碼的細胞激素的抗體（ADA）[h]		X													X[h]				X[h]	X	X[h]

a 在週期1第1週的給藥前和IMP施用後1、2、6、24、48和96或120小時，收集所有PK血樣以評價所有招募的研究參與者中該細胞激素RNA混合物編碼的細胞激素的目標表現。在劑量遞增期的週期1第2週，在給藥前以及給藥後2、6、24和48小時收集樣本；在劑量擴展期，僅在給藥前、給藥後6和24小時才進行週期1第2週的採樣。在週期1第3週和後續週期中，請參見註腳[b]。在腫瘤生物檢體之前、EOT和首次隨訪時也要收集樣本。更多資訊在研究實驗室手冊中詳細描述。在第二個研究截止日期後未收集PK樣本（參見本文）。

b 對於PK，對於週期3第1週（即，第一次施用的第9週），重複週期1第1週的時間表。在週期3之後，PK採樣將在每個奇數週期的第1週的第0和第6小時進行。在週期3之後，如果認為可用數據足夠，則可以藉由申辦方通知省略奇數週期的PK樣本。

c 用於免疫評估和循環因子的血樣：在給藥前、週期1第1週和第2週的第6和24小時，EOT和FU時在所有參與者中收集血樣，以評估全身免疫調節，包括IFNγ和IP10。更多資訊在研究實驗室手冊中詳細描述。

d 僅在週期3第1週中，針對免疫評估和循環因子，重複週期1第1週的採樣時間表。在週期3之後，PDy採樣將在每個奇數週期的第1週的第0和第6小時進行。在本研究的單一療法期間，在偶數週期內沒有採集用於PDy細胞激素的血樣。

e 將用於遺傳分析的血液用於建立種系DNA序列和HLA分型。

f 在週期1第1週給藥前、週期2第2週（即，週期1給藥後5週）給藥前和EOT時收集血樣（白血球去除或80 mL血液），以分析抗原特異性T細胞。僅對單一療法遞增期的黑色素瘤參與者和單一療法擴展期的所有參與者（黑色素瘤）進行此分析。

g 用於免疫評估的腫瘤生物檢體：在篩選期間（週期1第1天IMP施用之前），第5週和第8週之間，第6週或疾病進展時（以最先發生者為准）收集生物檢體樣本，以評估免疫調節。腫瘤轉錄組學（RNA定序）、基因組學、新抗原和TIL分離（僅在黑色素瘤患者中擴展）也可以根據可獲得的樣本進行（參見本文）。僅對於黑色素瘤患者，在第5-8週之間進行的單一腫瘤核心生物檢體專用於TIL的分離。這僅適用於有限數量的所選黑色素瘤患者（針對成功分離TIL的不超過10名患者）（單一療法的擴展，並且僅在組合療法擴展的群組A中）。這將不是附加的生物檢體，而是將專用於基因組評估的樣本用於TIL的分離（在

特殊條件下處理 - 未福馬林固定）。這類樣本和測試應用於治療研究者所確定的對治療有臨床反應體徵（腫瘤縮小和/或腫瘤部位發紅）的患者。

h 在週期1、3、6、9、12的第1天給藥前和/或EOT以及FU時（上一次IMP施用後第90天）收集血漿樣本，以監測針對該細胞激素RNA混合物編碼的細胞激素的抗體的產生。如果參與者繼續進行研究的隨訪，則超出該等時間點的其他收集將每3個月進行一次。在第二個研究截止日期後未收集ADA樣本（參見本文）。

表4：活動時間表（SOA）和治療流程圖 - 組合療法

評價[a]	篩選	治療[b]週期1 *組合療法中週期長度為21天*						治療週期2及後續 *組合療法中週期長度為21天*				EOT [bb]	FU[w,cc]
		第1週		第2週		第3週		第1週		第2週	第3週		
	初始劑量前天數	D1	D2	D8	D9	D15	D16	D1	D2	D8	D15		
納入/排除標準/知情同意	≤28												
人口統計學和醫療/疾病史	≤28												
ECOG PS、體重[d]、身高[e]（僅基線）	≤28	X		X		X		X		X	X	X	
生命體徵[f]	≤7	X	X	X		X		X		X	X	X	
體格檢查[g]	≤7	X		X		X		X		X	X	X	
數位攝影[h]	≤7	數位照片必須符合放射線攝影評估時間點											
血清妊娠檢查[i]	≤7							X				X	
HBsAg和HCV血清學（僅針對德國研究中心的參與者進行HIV檢測）	≤28												
血液學[j]	≤7	X		X		X		X		X	X	X	
凝血[k]	≤7	X		X		X		X		X	X	X	
血清化學[l]	≤7	X		X		X		X		X	X	X	
TSH/游離T4/ANA/RF[m]	≤7	X						X				X	X
TMB[n]	≤7												
CRP/鐵蛋白°	≤28	X	X	X	X	X	X	X	X°	X	X	X	
次級血漿細胞激素°		X	X	X	X			X°	X°			X	
12導程ECG和超音波心動圖或MUGA掃描[p]	≤28	X						X[p]				X	
肺功能測試[q]	≤28												
骨髓生物檢體/抽吸[r]	根據盧加諾2014分類（參見本文）												
頸部、胸部、腹部、骨盆FDG PET/CT，CT[s]	≤28	FDG PET-CT/CT掃描大約每12週一次，以確認CR或PD以及按照臨床指示進行（參見本文）											

評價[a]	篩選	治療[b]週期1 *組合療法中週期長度為21天*						治療週期2及後續 *組合療法中週期長度為21天*				EOT [bb]	FU[w,cc]
		第1週		第2週		第3週		第1週		第2週	第3週		
	初始劑量前天數	D1	D2	D8	D9	D15	D16	D1	D2	D8	D15		
B淋巴瘤症狀的評估	≤28	按照疾病反應評估										X	
尿液分析[t]	≤28	X		X		X		X		X	X	X	
尿液生物標誌物[u]		X[u]	X	X									
眼科檢查[v]	X												
不良事件評估[w]	X	在整個研究干預過程中持續進行											X[w]
伴隨用藥[x]		在整個研究干預過程中持續進行											
研究藥物施用													
細胞激素RNA混合物[y]		X		X		X		X		X	X		
西米單抗（組合）[z]		X						X					
腫瘤評估[aa]													
RECIST1.1和iRECIST	≤28												X[aa,bb]
藥物動力學													
細胞激素RNA混合物PK評估	參見表5組合療法PK/PDy流程圖中的詳細資訊												
西米單抗PK評估	參見表5組合療法PK/PDy流程圖中的詳細資訊												
藥效動力學													
藥效動力學評估	參見表5組合療法PK/PDy流程圖中的詳細資訊												
免疫原性													
用於針對由該細胞激素RNA混合物編碼的細胞激素的抗體的血液	參見表5組合療法PK/PDy流程圖中的詳細資訊												
用於針對西米單抗的抗體的血液	參見表5組合療法PK/PDy流程圖中的詳細資訊												

a 評價：除非另外指出，否則在施用研究藥物之前進行評估。在施用下一個劑量之前，由研究者審查結果。收集腫瘤生物檢體組織用於免疫組織化學、基因組、RNA定序和新抗原分析。

b 與西米單抗組合的一個週期為21天，每週一次瘤內施用細胞激素RNA混合物，每3週一次靜脈內以350 mg的固定劑量靜脈注射西米單抗。

c **人口統計學：**包括年齡、性別和種族。**醫療/手術史：**包括先前病理和手術的相關歷史記錄。**疾病史：**包括診斷時和研究開始時的階段，以及先前的抗腫瘤療法（類型、持續時間、中止原因和對該療法的反應）。另外，取決於腫瘤類型的特定的突變。

d 在每個週期的第一天的治療之前測量體重。

e 身高僅在基線期間測量。

f 生命體徵包括：溫度、血壓、心率、呼吸頻率。另外，在研究的組合療法部分中，評估參與者的基線脈搏血氧測定。在C1D1期間，每住院24小時期間，每個新劑量位準下每6小時檢查一次生命體徵，同時對參與者進行監測以評估急性毒性。24小時住院期間無需進行脈搏血氧測定。

g 體格檢查包括：檢查主要的身體系統，包括心血管系統、消化系統、中樞神經系統、呼吸系統、造血系統（肝腫大、脾腫大、淋巴結病）和皮膚。只有在首次IMP施用時仍存在的體徵和症狀才在eCRF中報告為AE。

h 假設在DL3之後預期會發生中等程度的藥理作用（例如，注入細胞激素RNA混合物的腫瘤病變部位發紅、浮腫或變平），則彩色數位照片必須從單一遞增的DL4開始，從組合遞增中的第一個DL和擴展期期間開始。在細胞激素RNA混合物的首個劑量之前進行篩選時，以及在從表層和/或可見皮下注射病變進行放放射線攝影腫瘤評估時，必須拍攝數位照片，以記錄總體疾病狀況並記錄反應。另外，在篩選和腫瘤評估窗口之間拍攝臨時彩色數位照片，以捕獲其他細胞激素RNA混合物可能誘導的變化，例如皮膚發紅和/或浮腫。根據研究參考手冊，臨床中心收集的所有數據與申辦方系統地共用，以供審查。

i 對有生育潛力的女性進行血清妊娠檢測。基線評估可以接受七天的窗口。

j 血液學：血紅蛋白、血細胞比容、白血球分類計數（包括絕對中性粒細胞計數[ANC]）、血小板計數。該等測試係在每次IMP施用之前進行的（可接受-1天的窗口）。如果係4級中性粒細胞減少症，則每2-3天評估一次ANC，直到ANC ≥ 0.5 x 10^9/L，然後每週一次直至恢復。如果基線異常，則在IMP施用後2天內進行週期1第1天評估。

k 凝血（可接受-1天的窗口）：活化部分凝血活酶時間（aPTT）、PT、國際標準化比值（INR）、纖維蛋白原（以及篩選時D-二聚體）。如果基線異常，則在IMP施用後2天內進行週期1第1天評估。

l 血清化學（可接受-1天的窗口）：肝功能檢查：AST、ALT、總膽紅素、直接膽紅素、鹼性磷酸酶（ALP）。腎功能檢查：尿素或BUN和肌酐，以及在需要時確定估計的CrCL（如果肌酐在1.0至1.5 x ULN之間）。電解質：鈉、鉀、總鈣、磷、氯、鎂、碳酸氫鹽和尿酸。其他：葡萄糖、乳酸脫氫酶（LDH）、白蛋白、總蛋白和澱粉酶。除非臨床指示外，否則在IMP施用之前（可接受-1天的窗口）進行肝功能檢查、腎功能檢查、電解質、葡萄糖、LDH、白蛋白和總蛋白。在肝功能檢查≥ 3級異常時，每2-3天重複進行附加的檢查，直至恢復到基線值。如果基線異常，則在IMP施用後2天內進行週期1第1天血清化學評估。

m 評估西米單抗施用時的促甲狀腺激素（TSH）、游離甲狀腺素（游離T4）抗核抗體（ANA）和類風濕因子（RF）的安全性。

n 僅在研究的組合療法部分中評估參與者基線時的腫瘤突變負荷（TMB）。

o 血清C反應蛋白（CRP）、鐵蛋白和次級血漿細胞激素（包括介白素-6和干擾素-γ；參見本文）在指定的時間點以及發生≥ 2級的CRS症狀時收集。在週期1（第1-3週每週）和週期3第1週的每次研究干預之前（D1）和24小時（D2）收集血清CRP和鐵蛋白樣本。在其他研究干預日，僅收集給藥前的樣本；只要出現CRS ≥ 2級症狀，就抽取附加的樣本。次級血漿細胞激素的常規採樣僅在週期1和3以及EOT時進行。收集樣本：在給藥前和在週期1第1週和第2週以及週期3第1週該細胞激素RNA混合物施用後6小時和24小時；EOT時；以及當出現 ≥ 2級的CRS症狀時。

p 12導程ECG：在週期1第1天、週期3第1天、週期7第1天和EOT進行篩選和預處理時以及當臨床指示時。超音波心動圖或MUGA掃描僅在篩選時進行。

q 基線時對先前用博來黴素治療過的淋巴瘤參與者進行肺一氧化碳彌散量（DLCO）測定。

r 骨髓抽吸：僅用於淋巴瘤患者

s FDG-PET-CT/CT：FDG PET僅適用於根據盧加諾分類的淋巴瘤患者，應在IMP施用後28天內（-7天）並且大約每12週（±7天）進行一次，以確認CR和PD，以及根據臨床指示進行。

t 尿液分析：在基線時以及每次IMP施用之前和EOT時，藉由量油計在早上進行的量油計（定性）測試。在基線、不均勻的週期、治療結束時以及在量油計測試（定性）中出現異常的情況下，對晨尿中的白血球和紅血球進行定量尿液分析。在蛋白尿≥++（量油計）時，藉由蛋白尿/24小時尿液收集進行蛋白尿定量。

u 尿液生物標誌物：在週期1第1天（可接受的前7天內）給藥前、首次IMP施用後24小時、首次IMP施用後第8天給藥前評估腎臟損傷分子1（KIM-1）、尿微量白蛋白和尿肌酐（點尿中）。

v 包括席爾梅爾氏試驗在內的眼科檢查在基線時以及在療法期間出現眼部症狀時進行。在每個週期的第1天評估眼部和視覺症狀。

w 不良事件評估：收集不良事件的觀察期從知情同意書（ICF）的簽字開始，一直到研究藥物最後一次施用後的30天為止。如方案中該評估和報告嚴重不良事件。EOT訪視後，將對正在進行的SAE和AESI、相關AE和新的相關AE進行隨訪，直至穩定、恢復或開始進一步療法。在用該細胞激素RNA混合物+西米單抗治療結束（EOT）後，尚未進入另一種IMP的後續臨床試驗或已接受任何其他護理標準的試驗參與者每2週藉由以下研究程序進行一次連續的腎臟損害監測：在定性量油計測試出現異常時進行腎功能檢查[尿素或BUN和肌酐，並在必要時確定估計的Cr CL（如果肌酐在1.0至1.5 x ULN之間）]，尿液分析（晨尿中白血球和紅血球的定量尿液分析）。在蛋白尿 ≥++（量油計）時，藉由蛋白尿/24小時尿液收集進行蛋白尿定量，並在首次IMP施用後的第8天給藥前測試之後進行尿液生物標誌物（腎損傷分子1（KIM-1），尿白蛋白與肌酐比值）測試。

x 伴隨用藥評估：從研究藥物初始劑量之前的14天到最後一次研究藥物施用後30天，正在進行的研究藥物相關不良事件消退或接受另一種抗癌療法時記錄伴隨用藥。

y 細胞激素RNA混合物的施用：參與者可以接受研究方案中指定的前驅用藥。在週期1和第1天的每個新劑量位準，都要在醫院中對參與者進行至少24小時的監測，以評估急性毒性。在後續的施用中，參與者接受4-6小時的觀察，研究者可自行決定是否選擇住院至24小時。在聯合施用的天數中，在完成西米單抗施用後，施用該細胞激素RNA混合物。該細胞激素RNA混合物可在週期1的±1天的窗口以及從週期2開始的±3天的窗口施用。

z 在研究的組合療法部分中，在3週週期中，西米單抗與該細胞激素RNA混合物組合給藥。如註腳*y*所述，西米單抗應在該細胞激素RNA混合物之前施用。

aa 腫瘤評估：進行CT掃描或磁共振成像（MRI）以及臨床上指示的任何其他檢查，以評估基線時的疾病狀態（在IMP施用28天-7天內）、IMP施用後每9週（± 7天）直到第24週、然後每12週（± 7天）以及研究干預結束時進行CT掃描或磁共振成像（MRI）以及臨床上指示的任何其他檢查，以評估疾病狀態，除非已在上一個週期完成。每12週對沒有疾病進展而中止研究干預的患者進行一次隨訪，直到有記錄的疾病進展為止。重複進行腫瘤評估以確認部分或完全反應以及疾病進展（最初記錄的反應後至少4週）。對於沒有內臟/深度淋巴結病變的參與者，如果沒有疾病轉移的臨床體徵，則在24週時進行腹部和胸部的放射腫瘤評估；如果在上一個週期尚未進行過，則在EOT時進行。在出現臨床體徵或實驗室異常時，可以考慮進行間歇性超音波檢查（USG）或臨床上指示的評估，主要是肝功能檢查，以排除潛在的疾病轉移。

bb 治療結束（上一次治療後30±5天）：如果在研究的最後一週未進行評估，則獲取治療結束評估。

cc 對疾病狀況的研究後隨訪：對在治療訪視結束時無疾病進展記錄且尚未開始用另一種抗癌療法治療的參與者進行3個月的隨訪，直到開始另一種抗癌療法、疾病進展、死亡或研究截止日期（以最先發生者為准）。

表5：劑量遞增和擴展期的PK和PDy流程圖 - 組合療法

週期	篩選	週期1第1週和週期3第1週									週期1第2週			週期1第3週	週期2第1週（以及週期3之後的後續奇數週期的第1週）				週期1第1週第一次施用後的週數		週期6	EOT	FU
天		D1						D2	D3	D5/6	D8		D9	D15	D1				5Wk	8Wk			
時間（小時/分鐘）=RNT		SOI	EOI	0H	1H	2H	6H	24H	48H	96/120H	0H	6H	24H	0H	SOI	EOI	0H	6H					
指示性時鐘時間		7:30	8:00	8:00	9:00	10:00	14:00	8:00	8:00	8:00	8:00	14:00	8:00	8:00	7:30	8:00	8:00	14:00					
研究治療施用[a]																							
細胞激素RNA混合物				X							X			X			X[a]				X[a]		
西米單抗（組合）[a]		X													X[a]						X[a]		
藥物動力學																							
密集採樣子集：用於該細胞激素RNA混合物編碼的細胞激素的目標表現的血液[b]				X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X			X[b]	X[b]	X[b]		X[b]	X	X
稀疏採樣子集：用於該細胞激素RNA混合物編碼的細胞激素的目標表現的血液[c]				X[c]			X[c]	X[c]			X[c]	X[c]	X[c]	X[c]			X[c]	X[c]	X[c]		X[c]	X	X
密集採樣子集：用於西米單抗的血液[d]		X[d]	X[d]				X		X		X			X	X[e]	X						X	X
稀疏採樣子集：用於西米單抗的血液[d]		X[d]	X[d]												X[e]	X						X	X
藥效動力學																							

週期	篩選	週期1第1週和週期3第1週									週期1第2週			週期1第3週	週期2第1週（以及週期3之後的後續奇數週期的第1週）				週期1第1週第一次施用後的週數		週期6	EOT	FU
天		D1						D2	D3	D5/6	D8		D9	D15	D1				5Wk	8Wk			
時間（小時/分鐘）=RNT		SOI	EOI	0H	1H	2H	6H	24H	48H	96/120 H	0H	6H	24H	0H	SOI	EOI	0H	6H					
指示性時鐘時間		7:30	8:00	8:00	9:00	10:00	14:00	8:00	8:00	8:00	8:00	14:00	8:00	8:00	7:30	8:00	8:00	14:00					
用於PDy細胞激素的血液[f]				X[g]			X[g]	X			X	X	X				X[g]	X[g]				X	X
用於HLA分型和遺傳分析的血液[h]	X																						
腫瘤生物檢體	X[i]																		X[i]		X[i]		
用於抗原特異性T細胞的血液（僅對群組A）[j]	X																		X[j]			X	
用於RNAseq的血液採樣[k]	X			X						X			X						X		X	X	X
免疫原性																							
針對該細胞激素RNA混合物編碼的細胞激素的抗體（ADA）[l]		X[l]													X[l]							X	X[l]
針對西米單抗的抗體[m]		X[m]													X[m]							X	X[m]

縮寫：SOI：西米單抗輸注開始；EOI：西米單抗輸注結束

a 該細胞激素RNA混合物以3週週期每週施用一次。在研究的組合療法部分中，在3週週期中，西米單抗與細胞激素RNA混合物組合施用（即，西米單抗的施用天數為週期1第1天、週期2第1天及後續）。在聯合施用的天數中，首先要靜脈內施用西米單抗，隨後是瘤內施用該細胞激素RNA混合物。

b 對於細胞激素RNA混合物PK，在組合療法遞增期，所有參與者均進行密集採樣。在擴展期群組A、B、C和D中，每個群組的僅前10名參與者進行了密集採樣（參見本文）（擴展期的其餘參與者進行了稀疏採樣）。在週期3之後，PK採樣將在每個奇數週期的第1週的第0和第6小時進行；並且在第一次施用後的第5週到第8週之間，以及在週期6，在腫瘤生物檢體之前進行PK採樣。在其他週期內沒有進行採樣。在EOT和首次隨訪時也要收集樣本。更多資訊在研究實驗室手冊中詳細描述。在第二個研究截止日期之後未收集PK樣本。

c 對於細胞激素RNA混合物PK，只有在組合療法擴展期群組A、B、C和D中跟隨前10名參與者之後的參與者才進行稀疏採樣。在週期3之後，PK採樣將在每個奇數週期的第1週的第0和第6小時進行；並且在第一次施用後的第5週到第8週之間，以及在週期6，在腫瘤生物檢體之前進行PK採樣。在其他週期內沒有進行採樣。在EOT和首次隨訪時也要收集樣本。在第二個研究截止日期之後未收集PK樣本。

d 如果參與者在密集採樣PK子集中，則遵循密集採樣的時間表；如果參與者不是密集採樣子集的一部分，則遵循稀疏採樣的時間表。在週期1第1週、週期2第1週以及所有後續的奇數週期中測量組合療法研究部分中的西米單抗的PK。在週期3中，僅在SOI和EOI時收集用於西米單抗的血液。對於所有SOI樣本，嚴格在開始西米單抗輸注之前（15分鐘之內）收集西米單抗的PK樣本。對於所有EOI樣本，應在西米單抗實際輸注結束之前（5分鐘之內）收集用於西米單抗的血液。

e 在患者在週期1結束時退出研究的情況下，即使未施用第二次西米單抗輸注，也收集週期2第1天輸注前血液用於西米單抗樣本（0 H）。

f 用於免疫評估和循環因子的血樣：在給藥前、週期1第1週和第2週的第6和24小時，EOT和FU時在所有參與者中收集血樣，以評估全身免疫調節，包括IFNγ和IP10。更多資訊在研究實驗室手冊中詳細描述。

g 僅在週期3第1週中，針對免疫評估和循環因子，重複週期1第1週的採樣時間表。在週期3之後，PDy採樣將在每個奇數週期的第1週的第0和第6小時進行。在週期2或任何偶數週期中未收集用於PDy細胞激素樣本的血液。

h 將用於遺傳分析的血液用於建立種系DNA序列和HLA分型。

i 用於免疫評估的腫瘤生物檢體：在篩選期間（週期1第1天IMP施用之前），第5週和第8週之間，第6週或疾病進展時（以最先發生者為准）收集配對腫瘤生物檢體樣本，以評估免疫調節。腫瘤轉錄組學（RNA定序）、基因組學、新抗原和TIL分離也可以根據可獲得的樣本進行。僅對於黑色素瘤患者，在第5-8週之間進行的單一腫瘤核心生物檢體專用於TIL分離。這僅適用於有限數量的所選黑色素瘤患者（針對成功分離TIL的不超過10名患者）。這不是附加的生物檢體，而是將專用於基因組評估的樣本用於TIL的分離（在特殊條件下處理 - 未福馬林固定）。這類樣本和測試應用於治療研究者所確定的對治療有臨床反應體徵（腫瘤縮小和/或腫瘤部位發紅）的患者。對所有參與者進行強制性腫瘤生物檢體，取決於腫瘤可後天型和醫療可行性。研究手冊中提供了更多資訊。

j 僅在擴展期週期1第1週給藥前、週期2第3週給藥前、週期1第1週施用後5週和EOT時，在群組A（PD-1/PD-L1難治性黑色素瘤）中收集血樣（白血球去除或80 mL血液），用於分析抗原特異性T細胞。

k 用於RNAseq的血液採樣：使用外周血提取RNA進行測試。

l 在週期1、5、9、13、17的輸注前和/或EOT以及上一次IMP施用後第90天收集樣本，以監測針對該細胞激素RNA混合物編碼的細胞激素的ADA的產生。如果參與者繼續進行研究的隨訪，則超出該等時間點的其他收集將每3個月進行一次。在第二個研究截止日期後未收集ADA樣本（參見本文）。

m 在週期1（基線）的輸注前和週期5、9、13、17、EOT和FU的輸注前收集用於監測西米單抗抗體產生的樣本。ADA樣本已存儲，研究結束時可以進行分析。如果參與者中發生免

疫相關不良事件、需要立即治療的超敏反應、和/或過敏症，則在可能的情況下，於事件發生或接近事件發生時和結束時收集血樣，以分析血清中的功能性西米單抗濃度和進行西米單抗的ADA評估。

【0406】 表6示出了治療的目標和終點。

表6：目標和終點

目標	終點
一級	
劑量遞增（單一療法）：確定在基於抗PD-1或PD-L1的療法失敗的晚期實性瘤患者和/或對於抗PD-1不作為常規使用的適應症無其他治療選擇的患者中，當作為單一療法瘤內施用時，該細胞激素RNA混合物的最大耐受劑量（MTD）或最大施用劑量（MAD）以及總體安全性和耐受性概況。	在治療的前28天中DLT的發生率。 MTD定義為最高的劑量位準，在治療的前28天中，真實DLT率在16%至33%目標範圍內，並且真實DLT率大於33%的可能性小於0.25。高於DL8的劑量未經測試，如果此MAD安全，將其視為MTD。 不良事件（AE）/嚴重不良事件（SAE）和實驗室異常。
劑量擴展（單一療法）：確定在先前基於抗PD-1或抗PD-L1療法失敗的晚期抗黑色素瘤患者中以單一療法瘤內施用的該細胞激素RNA混合物的客觀反應率。	藉由根據RECIST 1.1評價抗腫瘤反應資訊來評估客觀反應率（ORR）。
劑量遞增（組合療法）：確定在晚期實性瘤患者中，當與每3週一次（Q3W）靜脈內施用的固定劑量西米單抗350 mg組合瘤內施用時，該細胞激素RNA混合物的最大耐受劑量（MTD）或最大施用劑量（MAD）以及總體安全性和耐受性特徵。	在治療的前28天中DLT的發生率。 MTD定義為最高的劑量位準，在治療的前28天中，真實DLT率在16%至33%目標範圍內，並且真實DLT率大於33%的可能性小於0.25。與西米單抗組合的DL8以上的劑量未經測試，如果發現該MAD安全，則將其視為MTD。不良事件（AE）/嚴重不良事件（SAE）和實驗室異常。
劑量擴展（組合療法）：確定在黑色素瘤、皮膚鱗狀上皮細胞癌（CSCC）或頭頸部鱗狀上皮細胞癌（HNSCC）患者中，靜脈內Q3W施用固定劑量西米單抗350 mg組合瘤內施用的細胞激素RNA混合物的客觀反應率。	藉由根據RECIST 1.1評價抗腫瘤反應資訊來評估客觀反應率（ORR）。

二級	
劑量遞增和擴展（單一療法和組合療法）：表徵由作為單一療法和與西米單抗組合施用的該混合物編碼的該等細胞激素的藥物動力學（PK）特徵。表徵西米單抗與該細胞激素 RNA 混合物組合時的 PK 特徵。	在週期 1 第 1 週和週期 3 第 1 週，該 RNA 混合物編碼的該等細胞激素的 Cmax 和 AUC；在每個週期的 IMP 施用前，RNA 混合物編碼的該等細胞激素的 C 谷值。
劑量遞增和擴展（單一療法和組合療法）：評估當作為單一療法和與西米單抗組合施用時，由該細胞激素 RNA 混合物編碼的細胞激素的免疫原性；並評估組合療法中西米單抗的免疫原性。	在研究干預結束之前和隨訪期間，將評價針對該混合物所編碼的該等細胞激素的人源抗體。
劑量擴展（單一療法和組合療法）：表徵當作為單一療法在晚期黑色素瘤患者中瘤內施用以及與西米單抗的組合治療在 HNSCC、CSCC 和黑色素瘤中瘤內施用時該細胞激素 RNA 混合物的安全性。	AE/SAE 和實驗室異常。
劑量擴展（單一療法和組合療法）：確定在單一療法中和與西米單抗組合時該細胞激素 RNA 混合物的疾病控制率（DCR）、反應持續時間（DoR）和無進展生存期（PFS）。	根據 RECIST 1.1 和 iRECIST 標準評估的 DCR、DoR 和 PFS；根據 iRECIST 標準評估的 ORR。
劑量遞增（單一療法和組合療法）：確定在單一療法中和與西米單抗組合時細胞激素 RNA 混合物的擴展期的推薦劑量。	基於貝葉斯模型定義的 MTD/MAD、總體安全性、活性和 PK/PDy 數據的推薦劑量。
三級/探索性	
劑量遞增（單一療法和組合療法）：藉由根據 RECIST 1.1 和 iRECIST 標準評價該細胞激素 RNA 混合物的抗腫瘤活性來評估初步的臨床益處。	藉由根據 RECIST 1.1 和 iRECIST 標準評價該細胞激素 RNA 混合物單一療法的抗腫瘤反應來評估初步的臨床益處。在參與者中獲得反應類別，諸如完全反應（CR）、部分反應（PR）、疾病穩定（最佳反應）或疾病進展，以評估 ORR 和 DCR。

劑量遞增和擴展（單一療法和組合療法）：藉由測量循環因子（包括細胞激素、趨化因子和其他可溶性蛋白）的變化來評價外周血細胞激素 RNA 混合物的免疫調節相關藥效動力學（PDy）效應，並將其與臨床參數相關聯。	在週期 1 和後續週期的治療前後收集血樣，以評估與免疫調節相關的藥效動力學（PDy）效應（例如 IFNγ 和 IP10），並測量一組循環細胞激素以監測安全性並與臨床參數相關聯。
劑量遞增和擴展（單一療法和組合療法）：分別藉由 RNA 定序（RNAseq）和免疫組織化學（IHC）評價轉錄組譜和腫瘤免疫浸潤的治療相關變化。	在治療前後收集腫瘤生物檢體組織，以確定： • 藉由 RNA 定序確定基因表現譜和腫瘤抗原表現的變化 • 藉由 IHC 確定在腫瘤微環境中免疫細胞的類型、數量和位置的變化 • 藉由ELISPOT得到的表現的細胞激素表現的變化
劑量遞增和擴展（單一療法和組合療法）：藉由檢測外周血（黑色素瘤患者中）的抗原特異性 T 細胞反應，評價針對與各個腫瘤實體相關的腫瘤抗原的免疫反應。	在第一次 IMP 施用之前和週期 1 之後收集血樣，以藉由檢測對共有抗原和腫瘤特異性新抗原的抗原特異性 T 細胞應答來評價免疫應答。
劑量遞增和擴展（組合療法）：藉由 RNAseq 評價針對 PBMC 中該細胞激素 RNA 混合物的免疫應答。	在第一次 IMP 施用之前、週期 1 之後和收集腫瘤生物檢體樣本時，收集冷凍保存的 PBMC，以藉由 RNA 定序評估基因表現譜和腫瘤抗原表現的變化。
劑量遞增和擴展（單一療法和組合療法）：探索基線時的腫瘤遺傳標誌物，包括腫瘤突變負荷（TMB；僅在組合療法中評估）和 HLA 分型（在單一療法和組合療法中均評估）。	從外周血和腫瘤生物檢體組織中提取基因組 DNA 和 RNA，並藉由全外顯子組和 RNA 定序進行分析。藉由確定每個樣本中單核苷酸變體的總數來計算腫瘤突變負荷。使用基於 DNA 之方法確定 HLA 等位基因和等位基因組。

實例1.2 - 遞增期和擴展期中細胞激素RNA混合物的劑量遞增和劑量擴展

【0407】 基於臨床、藥物動力學[PK]、藥效動力學[PDy]和生物標誌物評價，在遞增期的晚期實性瘤患者和擴張階段的晚期黑色素瘤患者中進行該細胞激素RNA混合物的劑量遞增和劑量擴展研究，以評估作為單一療法和與西米單抗組合瘤內施用時細胞激素RNA混合物的安全性和初步活性，並確定作為單一藥劑和與西米單抗組合時的最佳藥物劑量。

【0408】 在參與者接受其第一劑的細胞激素RNA混合物之前，進行長達28天的篩選，並且在4週週期的第1、8、15和22天，以及在3週週期中每週一次與西米單抗組合（西米單抗每3週施用一次），按瘤內藥物施用的時間表進行評價。在單一療法和組合中，治療一直繼續到疾病進展或導致永久中止的AE，否則，將繼續至1年的治療（單一療法為13個週期，組合療法為17個週期）。在組合療法遞增和擴展期，西米單抗以350 mg Q3W固定推薦劑量靜脈內施用，與以預定義劑量每週一次瘤內施用的細胞激素RNA混合物組合。在組合療法中，該細胞激素RNA混合物將在西米單抗輸注結束時施用。在單一療法遞增期，在遞增期使用前兩個劑量位準（DL）的單參與者劑量遞增，隨後使用合理設計將其遞增到更高劑量。

實例1.2A.劑量遞增期

【0409】 在單一療法和與西米單抗組合的劑量遞增過程中，招募了適於瘤內注射的晚期實性瘤參與者，該參與者先前基於抗PD-1/PD-L1的療法失敗。根據研究者的判斷，對於抗PD-1/PD-L1療法不作為常規使用的實性瘤（黑色素瘤除外）如果沒有其他合適的治療選擇的參與者也符合條件。參與者藉由每週瘤內注射作為單一療法或與西米單抗組合施用的細胞激素RNA混合物進行治療。

【0410】 在單一療法中，起始劑量位準（DL1）係根據各種臨床前研究之結果以及使用建模和模擬從小鼠到人的異速生長成比例縮放確定的，該臨床前研究檢查人類異種移植模型中由該細胞激素RNA混合物編碼的細胞激素的PK。

【0411】 實驗包括針對前兩個DL（DL1和DL2）的加速劑量遞增設計，其中一名參與者接受DL治療，並應用兩個劑量位準之間的遞增，直到觀察到任何與IMP相關的 ≥ 2級AE或劑量限制性毒性（DLT）。如果在前兩個DL的任何一個觀察到與IMP相關的 ≥ 2級AE，則以相同的DL治療另外兩名參與者，並且採用適應性合理設計開始進行劑量遞增。如果在前兩個DL中沒有發生與IMP相關的≥2級AE或DLT，則從DL3開始適應性劑量遞增。進行後續群組（DL3-DL8）的劑量遞增。在至少三名接受前一次DL治療的參與者進行了至少1個週期（即，28天）的隨訪之後，在沒有DLT的情況下，才能招募入下一個DL，並且可以針對DLT評估進行評價。不允許參與者內劑量遞增。

【0412】 一旦在宣佈為安全的DL觀察到早期療效訊號，則可以進一步擴展以確認療效。劑量遞增與較低水平的劑量擴展並行進行。

【0413】 在組合療法中，該細胞激素混合物與西米單抗的劑量遞增與正在進行的單藥劑量遞增並行開始，前提係與西米單抗組合的細胞激素混合物的預期起始劑量已進行DLT評價，並且在細胞激素混合物單一療法中的DLT觀察期後清除。當細胞激素混合物單一療法的DL被清除（單一療法的DLT觀察期[28天]已完成），並且觀察到單一療法的PK、PDy和/或臨床反應（全身或局部）的體徵時，選擇與西米單抗組合的細胞激素混合物的起始劑量。

【0414】 與西米單抗組合的細胞激素混合物的起始劑量比單一療法中施用的該細胞激素混合物的MTD或最大施用劑量（MAD）低1劑量，或為單一療法中清除DL。藉由根據RECIST 1.1評價抗腫瘤反應資訊，藉由測量在單一療法中瘤內施用的該細胞激素混合物的客觀反應率來評估全身臨床反應。藉由RECIST 1.1標準測量局部臨床反應，以及局部反應的其他體徵，包括病變變平和炎症體徵。

將該細胞激素混合物與西米單抗組合以350 mg Q3W的固定推薦劑量靜脈內施用。

【0415】 與西米單抗組合的劑量遞增以適應性劑量遞增進行。在單一療法中首先清除該劑量，之後在組合療法中以相同的DL招募。

【0416】 與西米單抗組合的劑量遞增以適應性劑量遞增進行。在單一療法中首先清除該劑量，之後在組合療法中以相同的DL招募。在至少三名接受前一次DL治療的參與者進行了組合中至少28天的隨訪之後，在沒有DLT的情況下，方可招募入下一個DL，並且可以針對DLT評估進行評價。與西米單抗組合的細胞激素混合物的劑量遞增中的實際樣本量可能因觀察到的DLT和實際探索的劑量位準的數量而異（大約18至36名可評價DLT的參與者）。

【0417】 在相同劑量位準下治療的第一名和第二名參與者之間至少有一個星期的間隔。

實例1.2B.待注射的病變

【0418】 所有劑量位準（DL1-DL8）均遵循表7中提供的關於病變大小的指導。根據實性瘤反應評價標準（RECIST 1.1）標準，參與者將最少一個可測量的病變作為目標病變（參見納入標準I 05），以及將最少一個或多個皮膚/皮下病變用於注射和腫瘤生物檢體。根據腫瘤病變的大小選擇參與者，腫瘤的大小必須足以達到給定劑量位準的注射量（表5），並考慮在基線以及第一次病變的第5週至第8週之間對一個病變進行生物檢體作為治療評估。

【0419】 僅在遞增期，如果非目標病變允許反應評估的訊號，則在與研究委員會達成協議的情況下，可以逐個病例對沒有可測量病變的參與者進行評價。僅在用細胞激素RNA混合物時沒有觀察到淺表、皮下和/或淋巴結轉移的明顯炎症的劑量位準下招募僅有黏膜部位用於注射的患者，以最小化氣道阻塞的風險。

實例1.2C.治療

【0420】 對於第一種治療，在3個最小病變中，一個可測量的病變（皮膚、內臟或淋巴結）完好無損，以根據RECIST 1.1標準進行測量，並將一個病變用於生物檢體。如果要注射的病變足夠大以用於生物檢體，而對計畫劑量位準的劑量施用沒有影響，則兩個病變就足以符合條件。最少要對一個病變（應根據參與者的條件符合性來評估每種劑量位準的一個或多個病變的大小）施用該細胞激素RNA混合物。首先用該細胞激素RNA混合物注射最大的一個或多個病變。對於剩餘的一個或多個病變，注射順序取決於病變的大小，直到使用最大注射量為止（參見下表7）。

表7 - 注射量

病變大小（最大直徑）	注射量
> 5 cm	最多4 mL
> 2.5 cm至5 cm	最多2 mL
> 1.5 cm至2.5 cm	最多1 mL
> 0.5 cm至1.5 cm	最多0.5 mL

【0421】 對於所有後續治療（每週一次），將根據病變的大小對病變的注射進行排序，直到使用最大注射量或所有可注射的病變均得到治療為止。

【0422】 要注射的量取決於病變的大小，每次治療訪視的最大注射量不應超過為所有合併的注射病變分配給該DL之量。DL8允許的最大注射量為4 mL。

【0423】 如果病變聚集在一起，則根據上述表和指南將它們作為單一病變注射。

【0424】 根據表5中量和病變大小的比例，每次治療較佳的是只注射一個病變。如果不可能僅注射一個病變，則將量/劑量分為多個病變。每次訪視時，將根據大小從大到小依次優先考慮注射的病變。根據病變大小和劑量位準，以最大注射量注射最大的病變。如果未全部使用該量，則以病變大小允許的最大注射量施用於下一個病變。施用從最大到最小繼續進行，直到已施用整個劑量。

【0425】 如果在每次治療訪視時或整個治療期間均無法注射所有病變，則在後續的治療訪視中注射先前注射和/或未注射的一個或多個病變。每個病變的細胞激素混合物施用的詳細資訊在電子病例報告表（eCRF）中收集。

實例1.2D.劑量遞增決定

【0426】 遞增的決定應考慮臨床安全性之結果。DLT觀察期為治療的前4週（週期1）。如果參與者第一個治療週期（即，DLT期）中接受了他/她的群組中至少70%的計畫的細胞激素混合物劑量（單一療法）或至少70%的計畫的細胞激素混合物劑量和至少70%的計畫的西米單抗劑量（組合療法）並評價1個週期，或者如果DLT更早出現，則被認為可評價以進行DLT評估。在劑量遞增期無法評價以進行DLT評估的參與者（例如，週期1第28天之前的早期疾病進展；任何缺少的DLT評估參數）都將被替換。

【0427】 **單一療法：**對於前兩個DL的遞增，第二個DL在第一個參與者的DLT觀察期結束後開始，且沒有IMP相關的 ≥ 2級的AE或DLT。如果在前兩個DL的任何一個觀察到與IMP相關的 ≥ 2級的AE或任何DLT，則以相同的DL治療另外兩名參與者，並採用適應性設計開始進行劑量遞增。如果在前兩個DL中沒有發生與IMP相關的≥2級的AE，則適應性貝葉斯EWOC從DL3開始。直到DL1或DL2招募的患者已隨訪28天並且可以進行AE評估的評價，且沒有出現與IMP相關的2級AE，方可繼續本研究的單一療法部分的DL2或DL3的招募。

【0428】 確定MTD後，立即停止劑量遞增。如果未確定MTD，則劑量遞增將繼續直至達到MAD。

【0429】 **西米單抗組合療法：**沒有執行初始的加速劑量遞增步驟。使用與單一療法相同的適應性合理設計。

實例1.2E.劑量擴展期

【0430】 **單一療法：**根據MTD/MAD、總體安全性、活性和PK/PDy數據，確定擴展期的推薦劑量。

【0431】 在MAD或MTD中招募了多達34名先前基於抗PD-1/PD-L1療法失敗的晚期黑色素瘤參與者，以進一步評估安全性（尤其是任何累積毒性）、抗腫瘤活性、PDy和PK活性。

【0432】 **西米單抗組合療法：**基於來自組合療法劑量遞增期的安全性數據以及可用的PK和/或PDy數據，確定與西米單抗一起用於擴展期施用的該細胞激素RNA混合物的組合劑量。組合中的劑量擴展包括以下所列的最多4個群組（包括黑色素瘤、CSCC和HNSCC腫瘤患者）；所有群組（A、B、C和D）的招募都是並行進行的。

【0433】 組合療法擴展期的群組包括：

- 隊列A（先前抗PD-1或抗PD-L1療法失敗的晚期黑色素瘤患者）：此群組最多可招募40名參與者。
- 隊列B（先前未接受過抗PD-1或抗PD-L1療法[未接受過抗PD-1/PD-L1]治療的黑色素瘤患者）：此群組最多可招募28名參與者。
- 隊列C（先前未接受過抗PD-1或抗PD-L1療法[未接受過抗PD-1/PD-L1]治療的CSCC患者）：此群組最多可招募29名參與者。
- 隊列D（先前未接受過抗PD-1或抗PD-L1療法[未接受過抗PD-1/PD-L1]治療的HNSCC患者）：預計此群組最多將招募59位參與者。

實例1.2F.研究期持續時間

【0434】 每個參與者的持續時間包括最多28天的篩選期。單一療法週期持續時間為28天，組合療法為21天。在第一個週期完成後，如果認為這種給藥方案係安全的，並且參與者正在取得臨床受益，則參與者可以每週繼續以相同的DL劑量接受該細胞激素RNA混合物的附加施用。受益於作為單一療法或與西米單

抗組合的細胞激素RNA混合物的參與者的預期治療時間可能會根據進展日期而有所不同。

【0435】 中止干預後，參與者在上一次IMP施用後30天（用於治療結束[EOT]評估）和90天（用於ADA樣本）或開始另一種抗癌療法之前（以較早者為准）返回。

【0436】 在EOT訪視之後，可能需要進行額外的隨訪，以監測所有正在進行的相關的和新的相關AE，直到消退或穩定為止（即，持續進行至少3個月無任何變化的事件）。EOT之後，在安全性隨訪期間，要報告、監測和跟蹤直到消退或穩定的事件如下：所有正在進行的AE、SAE或具有特殊意義的事件，無論是否存在關係，以及所有新的AE、SAE或視為相關的具有特殊意義的事件，包括因相關事件導致的死亡。

【0437】 另外，如果參與者由於進展以外的其他原因而中止干預，則每3個月進行一次隨訪，直到進展或開始另一種抗腫瘤治療或死亡（以最先發生者為准）以記錄疾病進展。

【0438】 總的估計招募時間中位數為大約24個月。受益於該細胞激素RNA混合物的參與者的預期治療持續時間可能會根據進展日期而有所不同；但每位參與者的預期治療持續時間中位數估計為單一療法9個月（篩選1個月、治療5個月、EOT和首次隨訪3個月），組合療法中為12個月（篩選1個月、治療8個月、治療結束隨訪3個月）。

【0439】 停止規則：在療法30天內有任何死亡（與疾病進展（PD）相關的死亡除外）時，或在一定劑量位準下所招募患者中有超過三分之一的患者（例如3名患者中有2名）發生4級TEAE時，將暫停參與試驗，直到研究委員會對死亡和毒性原因進行合適的評價並製定出糾正計畫為止。

實例1.2G.起始劑量選擇

【0440】 **細胞激素RNA混合物：**通常根據齧齒類動物和非齧齒類動物物種的毒理學研究結果確定抗癌化合物的起始劑量。藉由瘤內注射施用該細胞激素RNA混合物，且該細胞激素RNA混合物的生物活性取決於所施用的mRNA的攝取和轉譯。臨床前毒理學研究係在非患腫瘤的齧齒類和非齧齒類動物中進行的，並且替代的施用路徑可能無法準確反映瘤內施用路徑。其結果係，確定首次在人類中的起始劑量的常規程序基於國際協調委員會（ICH）關於齧齒類動物中10%的動物的嚴重毒性劑量（STD 10）的1/10的S9建議，且對於局部施用的瘤內mRNA藥物，沒有觀察到不良作用水平（NOAEL）的相關性。

【0441】 為了確定人類的起始劑量，在攜帶人A375黑色素瘤異種移植物的免疫受損的小鼠中進行體內實驗。在A375異種移植物中瘤內施用該細胞激素RNA混合物導致該細胞激素RNA混合物的每個細胞激素組分的轉譯。當該細胞激素混合物在腫瘤內局部表現時，編碼的細胞激素分泌出來並進入循環，導致該等細胞激素的全身暴露。評估由該細胞激素RNA混合物編碼的該等細胞激素的PK參數。該A375異種移植物中細胞激素RNA混合物編碼的細胞激素的血清PK參數顯示出劑量依賴性表現關係。

【0442】 假設小鼠和人類之間的細胞激素RNA混合物編碼的細胞激素具有可比的腫瘤表現潛力，則使用異速生長測定法將小鼠的單個PK模型縮放至人類，並進行模擬以預測在該細胞激素RNA混合物的不同劑量位準下人類細胞激素全身暴露。由於人與動物中藥理活性的不確定性以及與細胞激素有關的種間差異，因此應用了較寬的安全係數，並選擇了人用劑量。

【0443】 西米單抗：根據再生元公司（Regeneron）先前的臨床試驗選擇350 mg Q3W給藥方案。選擇了Q3W給藥間隔。

實例1.2H - 研究結束定義

【0444】 如果參與者完成了所有研究干預期直至最長1年（包括治療結束），或者由於其他原因終止了治療，並且參與者完成了隨訪直至疾病進展，則認為他/她已完成研究。

【0445】 本研究有兩個截止日期：

【0446】 單一療法或組合療法的首次試驗的截止日期係在相應的劑量遞增期治療的最後一名參與者的週期1結束時，以便使所有參與者都具有可評價的DLT數據以確定MTD/MAD。

【0447】 第二個截止日期係在擴展期接受治療的最後一位參與者進行兩次基線後腫瘤評估或治療結束評估時（以最先發生者為准），以評估腫瘤反應。

【0448】 如果在劑量遞增期或擴展期接受治療的參與者在第二次研究截止後繼續受益於治療，則該參與者可以繼續接受研究干預（長達1年的治療）並對其評估IMP相關的AE、任何SAE和血樣的免疫原性測定（如果適用）。

【0449】 研究結束的定義為研究中最後一位參與者的最後一次訪視的日期。

實例1.3 - 研究群體

實例1.3A - 納入標準

【0450】 只有適用如表8所示的以下所有標準，參與者才符合納入研究的條件。

表8 - 納入標準

類別	標準
年齡	I 01. 簽署知情同意書時，參與者必須年滿18週歲（包括18週歲）。
參與者的類型和疾病特徵	I 02. **劑量遞增期（單一療法和組合療法）：**具有組織學確認的、晚期不可切除或轉移性實性瘤（包括淋巴瘤）的參與者，根據國際治療指南並根據研究者的意見，沒有其他合適的治療選擇。
	I 03. **劑量擴展期（單一療法和組合療法）：**
	- 單一療法和組合療法群組A：經組織學確認為晚期

類別	標準
	或轉移性黑色素瘤的參與者（無論BRAF狀態如何），包括按照美國癌症聯合委員會黑色素瘤分期第8版評估為IIIB-C期或不可切除的IV期(如果滿足標準E09，M1a-c和M1d），沒有替代性的合適治療選擇的參與者。符合條件的患者必須不符合或拒絕接受可用的護理標準（SOC）。研究者必須在預期患者參與者參加試驗之前告知其當前SOC治療選擇的可用性。 - 組合療法群組B：經組織學確認為晚期或轉移性黑色素瘤的參與者（無論BRAF狀態如何），包括按照美國癌症聯合委員會黑色素瘤分期第8版評估為IIIB-C期或不可切除的IV期（如果滿足標準0，M1a-c和M1d），尚未接受抗PD1/抗PD-L1療法治療且對其而言沒有可能賦予臨床益處的可用標準療法的參與者，或並非此類可用療法的候選者且對其而言，研究者認為使用單一療法或與西米單抗組合的細胞激素RNA混合物的實驗療法可能有益的參與者。 - 組合療法群組C：經組織學確認為根據I 12的轉移性皮膚鱗狀上皮細胞癌（CSCC）或不可切除的局部和/或區域晚期CSCC之受試者。 - 組合療法群組D：根據I 13經組織學確認為復發或轉移性頭頸部鱗狀上皮細胞癌（HNSCC；口腔、口咽、下嚥、喉）的參與者，對該等參與者而言尚無可能賦予臨床益處的可用標準療法，或研究者認為使用單一療法或與西米單抗組合的該細胞激素RNA混合物的實驗療法可能有益的非此類可用療法候選人的參與者。 I 04. 對於黑色素瘤抗PD-1/PD L1失敗（單一療法的擴展期和組合療法群組A的擴展期），先前接受過抗PD-1/PD-L1治療並且已確認疾病進展的參與者。 - 僅在單一療法劑量擴展期：在黑色素瘤中，對抗PD-1/PD-L1療法不耐受的患者也符合條件。 I 05. 參與者招募時至少有3處病變（或對於所選的一些情況為2處，如下所述），患有定義如下的可測量的疾病：

類別	標準
	- 作為可測量疾病*的目標病變的一處病變，定義為： - 根據RECIST標準作為待測量目標病變的至少1 cm的皮膚病變 或者 一個或多個內臟病變，至少可以二維準確和或連續地進行測量，其最長直徑內臟或軟組織疾病中為≥ 1cm（藉由造影增強或螺旋電腦斷層掃描[CT]測量），或淋巴結短軸中為≥ 1.5 cm。該等內臟病變將用於RECIST標準測量。 - 非嗜FDG淋巴瘤患者必須具有可測量的疾病，其定義為根據盧加諾分類（29），至少一個可測量的結節，該結節必須具有 > 1.5 cm的LDi（最長直徑），和/或可測量的結外病變，藉由造影增強CT，該病變必須具有 > 1 cm的LDi（參見本文）。患有嗜FDG淋巴瘤的患者無需患有可測量的疾病。 *僅在遞增期，如果一個或多個非目標病變適合進行替代的反應評估，則沒有可測量疾病的參與者也將基於與申辦方的逐個病例討論而符合條件。 - 一處病變用於生物檢體（適於生物檢體的皮膚、皮下或淋巴結）；如果可行，該病變也可用於注射，在這種情況下，2處病變對於參與者而言就足以符合條件。 - 至少一處適於瘤內注射的病變，如I06所述。
I 06.	參與者具有可以進行注射的病變（即，根據每個群組的劑量位準和根據研究者的判斷，適合於直接瘤內注射），定義為每次訪視時使用該細胞激素RNA混合物治療的最長直徑 ≥ 0.5 cm的皮膚或皮下病變或者多個變得融合的且適合注射（即不出血或滲液）的最長直徑（所有累及目標病變的直徑之和）≥ 0.5 cm的可注射合併病變。適合於超音波檢查（USG）引導的瘤內注射並被確認為轉移性疾病的 ≥ 1.5 cm的淋巴結也是可接受的。

類別	標準
	I 07. 在研究干預之前和之後，參與者必須能夠並且願意提供強制性腫瘤生物檢體。
	I 08. 符合任何可用治療選擇的條件的參與者（組合療法擴展期群組B、C和D中的抗PD-1/抗PD-L1療法除外），對於該等參與者而言，由於腫瘤特徵、合併症、先存自體免疫性疾病、藥物缺乏或非每個國家的護理標準，該等並非最佳選擇（根據研究者的判斷），以及參與者拒絕接受已經透明地揭露的該等方案的情況。
	I 09. 預期壽命超過3個月的參與者。
性別	I 10. 男性或女性 1) 男性參與者：男性參與者必須同意在干預期間和最後一次研究干預後至少6個月內使用避孕措施，並且在此期間不要捐獻精子。 2) 女性參與者：如果女性參與者沒有懷孕，沒有母乳餵養，並且適用以下至少一項條件，則符合參加條件： - 不是有生育潛力的女性（WOCBP）或 - 同意在干預期間和最後一劑研究干預後至少6個月內遵循避孕指導的WOCBP。
	I 11. 轉移性葡萄膜和黏膜黑色素瘤 - 有轉移性葡萄膜和黏膜黑色素瘤的參與者，如果他們有適於瘤內注射的淺表、皮下和/或淋巴結轉移，則符合參加研究的單一療法劑量遞增部分的條件。經申辦方討論並批准後，患有HNSCC和黏膜黑色素瘤且僅有黏膜部位進行瘤內注射的參與者符合參與研究的單一療法劑量遞增部分的條件。
	I 12. 參與者必須具有足夠的心臟功能，左心室射血分數（LVEF）為至少50%。
知情同意	I 13. 能夠提供簽署的知情同意書，包括遵守知情同意書（ICF）和本方案中列出的要求和限制。
納入標準僅適用於組合	I 14. 對於患有CSCC且未接受過抗PD-1/PD-L1療法的參與者（組合療法群組C）：經組織學確認的轉移性CSCC或局

類別	標準
療法部分	部和/或區域晚期CSCC，不適合進行以下定義的治癒性手術或治癒性放射，並且不適合I 08中所述之其他全身治療選擇 - 認為手術不合適的可接受的理由包括： a) 2次或更多次外科手術後CSCC的復發，並且預期治癒性切除係不太可能的，和/或 b) 預計手術會導致嚴重發病或畸形 - 必須滿足以下至少一項標準，才能證明參與者不適合進行放射療法（必須在招募60天內提交一份關於臨床訪視的多學科評估的放射腫瘤學家的證明或研究者證明副本）： a) 患者先前接受過針對CSCC的放射療法，使得根據放射腫瘤學家的意見，進一步的放射療法將超過可接受的累積劑量閾值。 b) 放射腫瘤學家判斷這種腫瘤不太可能對療法產生反應。 c) 放射療法被認為係禁忌的。研究者的臨床筆記，表明了由多學科團隊進行的個體化受益風險評估。 I 15. 對於患有HNSCC且未接受過抗PD-1/PD-L1療法的參與者（組合療法群組D）： a) 經組織學確認的復發或轉移性HNSCC（口腔、口咽、下嚥、喉），不適於治癒意圖的療法（外科手術或放射療法，伴有或不伴有化學療法），且在重要結構（如頸動脈）附近沒有腫瘤病變。 b) 參與者必須已接受至少1個但不超過3個先前的全身治療方案，包括（但不限於）用於復發或轉移性疾病的含鉑、含紫杉烷、含抗代謝藥物的方案或西妥昔單抗（輔助治療和維持治療視為一個治療線的一部分），在上一次既往治療中或之後記錄了疾病進展。

實例1.3B - 排除標準

【0451】 如果適用表9中所示的任何以下標準，則將參與者排除在研究之外。

表9 - 排除標準

類別	標準
身體狀況	E 01. 美國東岸癌症臨床研究合作組織（ECOG）體能狀態 > 1。
	E 02. 研究者或申辦方（Sponsor）認為，重大且不受控制的伴隨疾病，包括任何精神病症，會對參與者參加研究產生不利影響。
	E 03. 招募前1週內發生活動性感染，包括不明原因的發燒（體溫 > 38.1°C）或接受抗生素療法。
	E 04. 任何先前的器官移植，包括接受同種異體骨髓移植的那些。
	E 05. 最近5年的除本研究中所治療的一種之外的浸潤性惡性腫瘤的病史，但切除/消融的皮膚基底或鱗狀上皮細胞癌或子宮頸原位癌或其他被認為經局部治療治癒的局部腫瘤除外。
	E 06. 已知後天型免疫缺陷綜合症（AIDS）相關疾病或需要抗逆轉錄病毒治療的已知HIV病史，或活動性甲型肝炎、B型肝炎（定義為HBsAg陽性或HBsAg陰性且HBc抗體陽性）或丙型肝炎（定義為已知的丙型肝炎抗體結果陽性和已知的定量HCV RNA結果大於該測定的檢測下限）感染史。篩選時的HIV血清學檢查僅對德國研究中心的參與者進行。
	E 07. 接受過脾切除術的參與者。
	E 08. 待注射的腫瘤病變位於黏膜區域或氣道、主要血管或脊髓附近，研究者認為，如果發生壞死，在腫瘤腫脹或糜爛進入主要血管的情況下可能引起阻塞或壓迫。
	E 09. 未經治療的一處或多處可能認為係活動性腦轉移。先前接受過腦轉移治療的患者可以參加，只要該等轉移係穩定的（即，在研究治療的第一劑之前至少有6週沒有影像學的進展證據，並且任何神經系統症狀都已恢復至基線），並且沒有新的或正在擴大的腦轉移的證據，且該患者在首個劑量的該細胞激素RNA混合物之前的4週內不需要任何全身性皮質類固醇來管理腦轉移。
	E 10. 症狀性充血性心臟衰竭（NYHA 3或4），心肌炎病史，

類別	標準
	嚴重的不受控制的心律不齊，加入研究前6個月的心肌梗塞，不穩定的心絞痛，不受控制或未消退的急性腎衰竭或重大的肺部病症，諸如以下情況： - 未得到控制的慢性肺病 - 間質性肺病的已知病史（過去5年）或任何證據 - 活動性、非感染性肺炎。
	E 11. 正在進行或近期（5年以內）的重大自體免疫性疾病證據，該重大自體免疫性疾病需要採用全身性免疫抑制療法進行治療，這可能表明存在與免疫相關的不良事件的風險。不排除以下：白斑病、已消退的兒童氣喘、僅需激素替代物的殘餘甲狀腺功能減退症或無需全身治療的牛皮癬。
	E 12. 根據美國國家癌症研究所不良事件通用術語標準（NCI CTCAE）5.0版，除脫髮、白斑病、疲勞和活動性甲狀腺功能減退外，任何與先前治療相關的<2級毒性的未消退。
	E 13. 對任何生物藥物的除局部注射部位反應外的全身超敏反應史，以及對該細胞激素RNA混合物中任何成分的已知超敏反應史。
	E 14. 原發性葡萄膜黑色素瘤，無可注射的淺表、皮下或淋巴結轉移性疾病。
先前/伴隨療法	E 15. 與任何其他抗癌療法（包括放射療法或研究藥物）同時治療，或參加另一項干預性臨床研究。
	E 16. 先前抗癌療法（包括化學療法、靶向藥物、放射療法、免疫療法、疫苗接種或任何研究藥物）的清除期少於3週，或半衰期的5倍，以較短者為准。對於先前接受過免疫療法（包括抗PD-1療法）之受試者，在參與者接受IMP之前，需要至少4週的洗脫期。
	E 17. 首個劑量的IMP之前2週內的免疫抑制性皮質類固醇劑量（強的松 > 7.5 mg每天，口服[PO]或靜脈內[IV]，或等效劑量）以及研究期間口服潑尼松龍 > 7.5 mg/天或等效物的維持療法。
	E 18. 使用其他免疫調節藥物的先前治療，該先前治療在首個劑量的IMP前不到4週或不到該藥物的5個半衰期（以較短

類別	標準
	者為准）的時間內。免疫調節藥物的實例包括CTLA-4的阻斷劑、4-1BB（CD137）、OX-40、治療性疫苗或細胞激素治療。
	E 19. 在開始研究干預之前的4週內、治療期間以及最後一個劑量的IMP後3個月內，使用減毒活疫苗的先前治療。
先前/並行的臨床研究經驗	E 20. 本研究的先前招募。
	E 21. 參與者係直接參與方案實施的研究者或任何助理研究者、研究助理、藥劑師、研究協調員、其他人員或其親屬。
診斷評估	E 22. 血液學功能不足，包括中性粒細胞 < 1.5 x 10^9/L；血紅蛋白 < 9.0 g/dL；血小板計數 < 100 x 10^9/L。
	E 23. 腎功能不全，肌酐 ≥ 1.5x ULN或在1.0-1.5 x ULN之間，使用aMDRD公式估算的CrCl < 60 mL/min/1.73 m^2。
	E 24. 肝功能不足或凝血試驗：非捷倍耳氏症候群（在這種情況下，總膽紅素 > 2.5x ULN）的情況下總膽紅素 > 1.5x ULN，或在沒有肝轉移的情況下ALT、AST或ALP > 2.5x ULN。在存在肝轉移的情況下，總膽紅素 < 3x ULN且AST或ALT < 5x ULN係可接受的。只有當研究者判斷與骨轉移的存在相關時，高達2級的鹼性磷酸酶（ALP），即 < 5x ULN才係可接受的。凝血酶原時間（PT）或國際標準化比值（INR）> 1.5x ULN。接受抗凝療法的參與者將被排除在外。不排除接受低劑量阿司匹林（每天 ≤ 100 mg）和預防性低劑量肝素的參與者。

類別	標準
其他排除情況	E 25. 合法收容的囚犯或受試者，或不願或無法遵守計畫的訪視、藥物施用時間表、實驗室測試、其他研究程序和研究限制的人。
	E 26. 中樞神經系統淋巴瘤
	E 27. 針對淋巴瘤患者的先前異基因HSCT。
	E 28. 在開始研究干預之前不到90天的自動HSCT。
僅適用於組合療法部分的排除情況	E 29. 對於患有黑色素瘤、CSCC和HNSCC的未接受過抗PD-1/PD-L1的參與者（群組B、C和D）：任何涉及抗PD-1/PD-L1抑制劑的先前的組合療法。
	E 30. 首個劑量的西米單抗前90天內，使用與≥2級的免疫相關不良事件（ir-AE）有關的，或與導致免疫調節藥物中止使用的毒性有關的其他免疫調節藥物的先前治療。
	E 31. 先前使用博來黴素治療的淋巴瘤參與者的DLCO < 60%。此排除標準僅適用於與西米單抗組合的劑量遞增。
	E 32. 對淋巴瘤患者使用艾代拉裡斯（idelalisib）的先前治療。此排除標準僅適用於招募入組合劑量遞增的淋巴瘤患者。

實例1.4 - 研究干預

【0452】 研究干預的定義為根據研究方案意在對研究參與者施用的任何一種或多種研究干預措施、一種或多種已上市產品、安慰劑或一種或多種醫療器械。

實例1.4A - 施用的一種或多種研究干預

表10 - 施用的研究干預概覽

研究干預名稱	細胞激素RNA混合物	西米單抗（僅組合療法）
劑量配製物	濃縮注射液	注射液
		350 mg/小瓶或 250 mg/小瓶
施用路徑	瘤內注射	靜脈內注射

給藥說明	每週一次以指定的劑量位準施用的一次或多次注射；28天的週期內4劑。[a]	每3週一次350 mg的固定推薦劑量

a 沒有對所有參與者施用預定義的前驅用藥，但對於一些參與者可能推薦進行次級前驅用藥。

【0453】 該細胞激素RNA混合物係研究藥品，它係重量比為1 : 1 : 1 : 1的合成的經化學修飾的mRNA，該mRNA編碼人細胞激素IL-15sushi、IL-12sc、GM-CSF和IFNα2b。

【0454】 以4週的週期每週一次瘤內施用該細胞激素RNA混合物（即，每28天四劑）。在每個治療週期後，瘤內注射的頻率每週一次繼續。但是，在研究開展過程中，基於腫瘤負荷的減少，劑量施用頻率可能會降低至更低頻率的施用，這可能會干擾預期劑量的施用。

【0455】 由於施用路徑係瘤內注射，預計不會出現急性過敏反應，因此沒有對所有參與者施用預定義的前驅用藥；但是，對於一些參與者，可能推薦使用前驅用藥。所有用作前驅用藥的藥物都會輸入到伴隨用藥頁面。

實例1.4A1 - 潛在腫瘤溶解綜合症（TLS）的管理指南

【0456】 對於TLS的情況，應堅持研究治療（細胞激素mRNA混合物），直到所有血清化學物質均已消失。為了確保正常的水合作用，應糾正實驗室異常、液體過多、電解質或酸鹼偏差。必須根據當地中心指南進行管理。允許使用抑制劑（例如，別嘌呤醇）或尿酸氧化酶（例如，拉布立酶）。應監測包括腎臟功能在內的TLS併發症，消退後可以全劑量重新製訂研究治療。

【0457】 表11列出了通常與TLS有關的實驗室異常以及可能與TLS有關的可能的臨床表現。

表11 - 可能與TLS一致的實驗室和臨床異常

實驗室	臨床
尿酸 > 8 mg/dL（> 475.8 μmol/L）	急性腎損傷：血清肌酐水平升高（≥ ULN的1.5

鉀> 6.0 mmol/L 磷 > 4.5 mg/dL（> 1.5 mmol/L） 校正鈣[a] < 7.0 mg/dL（< 1.75 mmol/L）或離子鈣 < 1.12 mg/dL（< 0.3 mmol/L） 血清肌酐水平升高（≥ 正常上限[ULN]的1.5倍	倍）或存在尿少症，定義為6小時內平均尿排出量 < 0.5 mL/kg/小時。可能是或確定係由低鈣血症引起的癲癇發作、心律不齊、神經肌肉興奮（手足抽搐、感覺異常、肌肉抽搐、手足痙攣、特盧梭征、佛斯特徵、喉痙攣、支氣管痙攣）、低血壓或心臟衰竭。 可能是或確定係由高鉀血症引起的心律不整。

a 校正鈣水平（以毫克每分升為單位）= 測得的鈣水平（以克/分升計）+ 0.8 x（4-白蛋白（以克/分升計））

實例1.4B - 伴隨療法

【0458】 受試者招募時正在接受的或研究期間接受的任何藥物（包括非處方藥或處方藥、維生素和/或草藥補品）必須記錄使用原因以及施用日期（包括開始和結束日期）。

【0459】 從研究藥物初始劑量之前的14天到最後一次研究藥物施用後30天，正在進行的研究藥物相關不良事件消退或接受另一種抗癌療法時在eCRF中記錄伴隨用藥。

【0460】 根據以下指南，可以逐個病例考慮使用伴隨用藥：

- 全身性類固醇和TNF-α拮抗劑可能會減弱IMP的潛在益處，但是在緊急情況下，允許治療研究者使用該等藥物。儘管如此，應儘快將其通報申辦方，並共同決定參與者是否以及如何繼續參加研究。
- 如果可行，應始終考慮皮質類固醇的替代品。與申辦方協商後，允許皮質類固醇或替代類固醇的生理劑量。允許使用吸入性類固醇和口服鹽皮質激素（例如，直立性低血壓或腎上腺皮質功能不全的參與者使用氟可的松）。
    - 參與者可能會緊急接受皮質類固醇激素以應對緊急情況、過敏反應或類似情況；在研究期間，參與者可能不會接受潑尼松龍 > 7.5 mg/天（PO或IV）或等效物的維持療法。允許給予用於腎上腺皮質功能不全的相等的生理劑量的皮質類固醇。

- 在治療期間以及治療開始前3週或5個半衰期（以較短者為准），所有參與者禁止使用骨髓抑制化學療法的伴隨治療。
- 允許使用退熱劑的伴隨治療（例如，當參與者發燒≥38.5°C時，使用1 g對乙醯胺基酚/撲熱息痛）。
- 緩解性放射療法可用於緩解目的的疼痛控制。如果正在考慮緩解性放射療法，則應在治療前以及在重新開始研究療法前通知申辦方以獲得事先批准。在任何給定的三週時間內，受照射的區域應盡可能小，並且不得超過骨髓的20%。在所有此類情況下，應藉由對腫瘤的物理和放射學評估排除腫瘤進展的可能性。如果僅對可評價的病變進行照射，則參與者將停止研究干預。照射面積不能用作反應評估的參數。
- 表現為呼吸困難、低血壓、喘息、支氣管痙攣、心動過速、血氧飽和度降低或呼吸窘迫的嚴重事件，應按臨床指示使用支持性療法（例如補充供氧和β_2腎上腺素能促效劑）進行管理。
- 允許參與者接受的針對癌症以外的其他伴隨疾病採取的任何背景療法（例如，激素替代療法、他汀類藥物、抗高血壓藥療法）以穩定劑量繼續。
- 所選的參與者可能需要前驅用藥。

實例1.4C - 先前療法

【0461】 參與者在本研究開始之前接受的任何先前抗癌療法（藥物和療法，包括放射療法）都應輸入eCRF中。

【0462】 任何先前治療都應係按照以下時間線完成的：

- 任何先前的抗癌療法，無論是試驗性的還是已獲批准的，包括化學療法、激素療法和/或放射療法，都必須在開始研究干預之前至少3週結束。
- 如果參與者在進入本研究之前已經接受過研究療法，則應經過至少3週或5個半衰期方可進入本研究。

- 任何草藥療法應在IMP施用前至少1週結束。
- 允許使用細胞激素的先前治療，條件係在計畫的首次IMP施用和最後一次劑量之間已經經過了至少4週或5個該藥物的半衰期（以較短者為准）。
- 允許使用免疫檢查點抑制劑、免疫調節性單株抗體（mAb）和/或mAb衍生的療法的先前治療，前提係到該療法開始已經經過4週或5個半衰期（以較短者為准）。

【0463】 如果參與者接受糖皮質激素維持療法，則只有在首次施用IMP之前2週內劑量可以逐漸減少至 < 7.5 mg/天時該參與者才符合條件，並且該參與者在整個研究期間不應有增加劑量的風險。

實例1.4D - 前驅用藥

【0464】 由於施用路徑係瘤內注射，預計不會出現急性過敏反應，因此沒有對所有參與者施用預定義的前驅用藥；但是，西米單抗靜脈施用的重要的已鑒定風險包括免疫相關反應和輸注相關的超敏反應。根據參與者在第一次施用後是否經歷了炎性反應，可以推薦在第二個週期及之後進行前驅用藥。

【0465】 如果參與者先前曾經歷過藥物誘導的相關過敏反應（即，IMP施用後24小時內出現輕度瘙癢到中度症狀），可以在施用該細胞激素RNA混合物給藥前考慮使用組胺H1拮抗劑（口服苯海拉明50 mg或等效物[例如，右旋氯苯吡胺]，在該細胞激素RNA混合物施用前大約30至60分鐘給予）。如果參與者發生2級事件，包括超敏反應或CRS，則前驅用藥可能還包括口服類固醇（地塞米松20 mg或等效物），以供將來施用。皮質類固醇激素的使用應僅限於治療嚴重的藥物誘導過敏反應或危及生命的病症。

【0466】 對於首次施用IMP後出現發燒和顫抖等炎性症狀的參與者允許使用退熱劑進行前驅用藥。可以基於要注射的一處或多處病變的位置使用局部麻醉劑。

實例1.4E - 禁止的療法

【0467】 在研究過程中禁止使用以下療法：

- 在試驗期間，除姑息性放射療法外，不允許使用意在治療癌症的伴隨療法（例如，化學療法或免疫療法）。
  - 如果參與者在其他方面獲益，則可以考慮採用放射療法以減輕症狀（例如，治療疼痛的骨轉移、阻塞性肺部病變）。
- 在開始研究干預之前的4週內、治療期間以及最後一個劑量的IMP後3個月內，禁止使用減毒活疫苗。如果所有其他疫苗都不是參與者的病症的最佳解決方案，則應避免使用它們。
- 參加研究期間，所有參與者均禁止使用IFN的伴隨治療。
- 在開始干預之前和干預期間，應在4週或5個藥物半衰期（以較長者為准）內禁止使用全身免疫刺激藥物（包括但不限於IFN和IL-2），因為不能排除相互作用，並且可能會導致參與者的風險上升。
- 免疫抑制藥物，包括但不限於環磷醯胺、硫唑嘌呤、胺甲喋呤和沙利度胺。該等藥物可能會改變活性。
- 禁止使用潑尼松龍 > 7.5 mg/天（PO或IV）或等效物的維持療法。
- 全身性粒細胞群落刺激因子（例如，粒細胞群落刺激因子、GM-CSF和/或聚乙二醇非格司亭），因為這可能會改變IMP的活性。
- 不允許本研究的參與者伴隨地接受任何其他IMP。

實例1.4F - 劑量修改

【0468】 **細胞激素RNA混合物的劑量修改**

【0469】 如有必要或在發生與IMP相關的≥2級的AE時，該細胞激素RNA混合物的啟用可以在任何一週的預期治療日期之後延遲不超過3天，並且將2或3天的延遲視為劑量延遲。應在最後一個劑量後7天計畫下一個劑量，以確保兩個劑量之間的間隔為7天。

【0470】 如果該細胞激素RNA混合物劑量需要在每週劑量的預期治療日期之後延遲 ≥ 4天，則需要跳過該劑量並因此將該劑量視為劑量遺漏。如果與IMP相關的 ≥ 2級AE已在可接受的時間內消退為 ≤ 1級（或如果用替代療法控制，則為2級），則該參與者可以重新開始接受細胞激素RNA混合物。在連續兩次遺漏劑量時，如果該AE不會危及生命，並且認為繼續治療對於患者的病症係最好的，則可以重新用細胞激素RNA混合物治療該患者。在連續兩次劑量遺漏時，該細胞激素RNA混合物將被確定地終止。

【0471】 在本研究的單一療法劑量遞增部分經歷DLT的參與者，將停止研究干預，並將跟蹤其隨訪直至毒性消退。

- 如果該DLT發生在自開始使用該細胞激素RNA混合物起的前28天內（遞增期的DLT觀察期），則該細胞激素RNA混合物將被確定地終止。
- 如果在自開始使用該細胞激素RNA混合物起28天（DLT觀察期）後發生符合DLT定義的AE，則可在與申辦方討論並獲得研究委員會的潛在認可，確保符合以下各項標準後，重新開始使用該細胞激素RNA混合物：
    - o AE已消退至 ≤ 1級（或如果採用替代療法控制，則為2級）
    - o 研究者認為，重新開始研究干預符合患者的最佳利益

【0472】 僅適用於劑量遞增（不適用於擴展期），基於與申辦方達成的協議，參與者將以與預防性治療（如果可用）相同劑量的細胞激素RNA混合物或更低劑量位準以新的治療週期重新開始療法。不允許劑量再次遞增。

【0473】 若發生歸因於該細胞激素RNA混合物的DLT且其再次發生並不一定會威脅生命（即，與CRS不相關的皮疹，甲狀腺功能減退、發燒、疲勞、關節痛、頭痛等內分泌病）並恢復至CTCAE ≤ 1級或基線值迅速出現，將逐個病例評價該情況，並確定在相同劑量位準或較低劑量位準下重新開始療法是否安全，以及是否符合參與者的效益/風險平衡。相反，如果DLT的復發可能會危及生命（即細胞激素釋放綜合症、肺炎），則將參與者從進一步治療中移除，並且不會被替換。

【0474】 西米單抗的劑量修改

【0475】 如本文所述，西米單抗的輸注應因如上該不良事件而中斷、撤銷或永久中止（針對不良反應的西米單抗推薦劑量修改）。可以在皮質類固醇減量後完全或部分消退（0至1級）的患者中重新開始使用西米單抗。

【0476】 如果在接受細胞激素RNA混合物之受試者中由於特定的AE（例如，藥物誘導的與輸注相關的過敏反應）而永久中止西米單抗，則受試者將繼續接受該細胞激素RNA混合物直至達到該細胞激素RNA混合物的永久性研究治療中止的確定標準。

【0477】 無論該細胞激素RNA混合物是否在任何一週的預期治療日後最多延遲3天，西米單抗都應與該細胞激素RNA混合物在同一天施用。

【0478】 西米單抗的治療施用窗口為±3天。如有西米單抗被保留，西米單抗的啟用可以在任何一週的預期治療日期之後延遲不超過3天，並且將2或3天的延遲視為劑量延遲。應在最後一個劑量後21天計畫下一個劑量的西米單抗，以確保兩個劑量之間的間隔為21天。

【0479】 如果需要將西米單抗的劑量推遲到預期的治療日期後≥4天，則需要跳過該劑量並因此將該劑量視為劑量遺漏，在下一個計畫的日期施用該細胞激素RNA混合物。如果在推薦的糖皮質激素減量後毒性已完全或部分消退（0至1級），則該參與者可以重新開始使用西米單抗。在發生連續兩次劑量遺漏時，如果該AE不會危及生命，並且認為繼續治療對於患者的病症係最好的，則可以重新用西米單抗治療該患者。在發生連續兩次以上劑量遺漏時，西米單抗將無限期終止。

【0480】 在研究的組合劑量遞增部分中經歷DLT的參與者，將停止給予該細胞激素RNA混合物和西米單抗，並將跟蹤隨訪該患者直至毒性消退。

- 如果該DLT在開始使用該細胞激素RNA混合物加西米單抗後的前28天內發生（DLT觀察期），則該細胞激素RNA混合物和西米單抗都將停止。

在與申辦方討論並獲得研究委員會的潛在認可，確保符合以下各項標準後，僅可重新開始使用西米單抗：

- DLT僅與西米單抗單藥明確相關，與細胞激素mRNA混合物無關
- 根據附錄14，AE已迅速消退至≤ 1級（如果由替代療法控制，則為2級）
- 研究者認為，重新開始研究干預符合患者的最佳利益

- 如果該DLT發生在自開始使用該細胞激素RNA混合物加西米單抗起28天（DLT觀察期）後，則可在與申辦方討論並獲得研究委員會的潛在認可，確保符合以下各項標準後，重新開始使用該細胞激素RNA混合物以及西米單抗：
  - AE已消退至 ≤ 1級（或如果採用替代療法控制，則為2級）
  - 研究者認為，重新開始研究干預符合患者的最佳利益

【0481】 僅適用於劑量遞增（不適用於擴展期），基於與申辦方達成的協議，參與者將以與預防性治療（如果可用）相同劑量的細胞激素RNA混合物和固定劑量的西米單抗（350 mg）或更低劑量位準以新的治療週期重新開始療法。不允許該細胞激素RNA混合物劑量重新遞增。

【0482】 如果確定與西米單抗相關的DLT發生在還正在接受該細胞激素RNA混合物的參與者中並導致西米單抗無限期中止，則該參與者可以繼續接受該細胞激素RNA混合物，直至達到該細胞激素RNA混合物的永久性研究治療中止的確定標準。

【0483】 接受西米單抗治療的參與者在整個研究治療期間均保持分配的劑量（350 mg Q3W），並且不允許對該IMP進行劑量修改。在正在發生的AE干擾研究干預時，治療週期可能會延遲或西米單抗可以省略。

【0484】 西米單抗治療期間可能發生與輸注相關的過敏反應。用於治療該等潛在的不良事件的緊急設備和藥物（例如，抗組胺藥、支氣管擴張藥、靜脈注射鹽水、皮質類固醇、對乙醯胺基酚和/或腎上腺素）可供立即使用。

【0485】 如果觀察到以下任何一種AE，則中斷西米單抗輸注：咳嗽、寒顫/發冷、皮疹、瘙癢、蕁麻疹（例如，蕁麻疹、紅腫或紅腫傷痕）、發汗（出汗）、低血壓、呼吸困難（呼吸急促）、嘔吐或潮紅。該等反應需要對症治療，可以以原始速率的50%重新開始輸注。

【0486】 如果在西米單抗輸注期間或之後立即發生嚴重程度 ≥ 3級的輸注反應，則中止給藥，該患者將永久中止西米單抗治療。對生命體徵進行密切監測。

【0487】 如果參與者發生西米單抗輸注相關的藥物過敏反應，導致終止西米單抗治療，如果基於逐個病例的評估認為繼續療法係對該參與者最佳的選擇，則該參與者可以繼續以指定的劑量位準接受作為單一療法的該細胞激素混合物治療。

實例1.4G - 研究干預的中止和參與者

【0488】 中止/退出。如果IMP中止，則確定該中止是否係暫時的（即，劑量遺漏或週期延遲）；除非達到1年治療期結束，否則在疾病進展之前永久中止IMP係最後的選擇。任何IMP中止都必須在eCRF中完整記錄。在任何情況下，參與者都應保留在研究中，直到記錄到疾病進展為止。

【0489】 研究干預的明確中止：永久性干預中止係指與研究者在研究期間任何時間不將參與者再次暴露於IMP的最終決定或與參與者無論何種原因均不得再次暴露於IMP的最終決定有關的任何干預中止。

【0490】 如果研究者認為，繼續進行研究干預有損於參與者的福祉，則可以中止研究干預，諸如以下任何一種情況：

1. 不可接受的不良事件。
2. 確認的疾病進展。
3. 對研究方案的依從性差。
4. 1年治療期完成。
5. 其他情況（諸如併發疾病）會阻止對研究干預措施的進一步施用。

【0491】 如果參與者臨床穩定，並且從毒性最小的療法中獲得臨床益處，他們將一直接受治療直至疾病進展或1年的最長治療時間（以最先發生者為准）。如果在接受了組合療法之受試者中，該等IMP中只有一種因特定的一例或多例AE（例如，藥物誘導的與輸液相關的過敏反應）而永久中止，則該受試者繼續接受另一種IMP，直到達到永久性研究治療中止的確定標準。

【0492】 當該增加與基礎疾病無關，並且研究者認為符合參與者安全的最大利益時，研究者考慮中止肝功能異常的研究干預。

【0493】 如果參與者決定退出IMP治療，可在任何時間以無論任何原因退出，或者可以由研究者決定是否退出。在以下任何一種情況下，應中止使用IMP進行治療：應參與者的要求，在任何時間以無論任何原因（撤回同意），或應其合法授權代表的要求。

【0494】 「合法授權代表」被認為係根據適用法律授權可以代表潛在參與者同意該參與者參與研究涉及的一個或多個程序的個人或司法機構或其他機構。治療同意的撤回與隨訪訪視同意的撤回和非參與者接觸隨訪（例如病歷檢查）同意的撤回不同。

【0495】 要求退出的參與者被告知，撤回同意隨訪可能會損害本研究的公共衛生價值。向退出的參與者明確詢問可能的AE對他們退出同意的決定的影響，並記錄所引起的任何AE資訊。較佳的是參與者撤回書面同意，並且如果該參與者或該參與者的代表拒絕或無法聯繫到，則該中心記錄並簽署該參與者未能撤回書面同意的原因。

【0496】 根據本方案中指定的研究程序對參與者進行隨訪，直至計畫的研究完成日期，或直至本方案中規定的要跟蹤的任何AE的恢復或穩定，以最晚發生者為准。

【0497】 如果可能，並且在永久中止干預之後，使用通常計畫在最後給藥日進行的程序對參與者進行評估，並酌情使用包括藥物動力學樣本的IMP。

【0498】 所有永久性干預中止的病例在被認為係確認的情況下，由研究者記錄在eCRF的適當頁面中。

實例1.4H - 失訪

【0499】 如果參與者多次未能返回參加計畫的訪視，並且研究中心無法與其取得聯繫，則視為失訪。

【0500】 如果參與者未能返回診所進行必要的研究訪視，則會採取以下措施：

- 本中心嘗試聯繫該參與者並儘快重新安排錯過的訪視，並就保持分配的訪視時間表的重要性向參與者提供諮詢，並確定參與者是否希望和/或應該繼續參與研究。
- 在該參與者被認為失訪之前，研究者或指定人員盡一切努力重新與參與者取得聯繫（可能的話，撥打電話3次，並在必要時給參與者的最後已知的通訊位址發出掛號信或採取當地等效之方法）。該等聯繫嘗試記錄在參與者的病歷中。
- 仍然無法聯繫到的參與者視為已退出研究。

實例1.4I - 研究評估和程序

【0501】 作為參與者常規臨床管理一部分（例如，血細胞計數）進行並且在簽署ICF之前獲得的程序，可用於篩選或基線目的，前提係該等程序符合方案規定的標準，並在SoA中規定的時間範圍內執行。

【0502】 出於安全原因或與樣本有關的技術問題，可能會進行重複或計畫外取樣。

實例1.5 - 療效評估

【0503】 在遞增期，如果基於RECIST 1.1存在可測量的完整病變，則基於RECIST 1.1獲得客觀反應資訊。

【0504】 在擴展期，評估對該細胞激素RNA混合物的反應係主要目標。在擴展期接受治療的所有參與者都必須至少具有一個可測量的完整病變才能納入研究（參見上述納入標準I 05）。以固定的時間間隔按表2和3中的活動時間表（SOA）該進行腫瘤評估，並且評估窗口不受劑量延遲或劑量遺漏的影響。

【0505】 所有腫瘤評估數據均基於RECIST 1.1標準記錄在相關的eCRF頁面。根據RECIST 1.1標準的要求，必須在至少相隔4週的第二次檢查中確認部分或全部反應，以便記錄為確認的對療法的反應。基於RECIST之免疫療法（iRECIST），在沒有臨床疾病進展時，還應在間隔至少4週的第二次檢查中確認疾病進展，以排除假性進展。

【0506】 遵循RECIST 1.1標準進行腫瘤反應的評估，並遵循iRECIST標準報告反應標準作為次要/探索性終點。如果在第二次評估中確認疾病進展，則基於初始評估記錄進展日期。如果未確認疾病進展，則參與者繼續治療，並記錄未確認的疾病進展（iUPD）。

【0507】 測量所有可測量的病變（甚至低於基於RECIST 1.1的可測量性閾值的那些病變），以最佳化研究干預。探索性分析作為ORR方面療效評估的一部分，係藉由評估總腫瘤體積並考慮非目標病變的大小來進行的，而對注射與非注射病變的分析將作為該探索性評估的一部分。測量程序和eCRF記錄在SRM中進行了詳細說明，而統計分析計畫在SAP中進行了詳細說明。

【0508】 次要療效變數包括疾病控制率、反應持續時間和無進展生存期。所有該等參數在SAP中都有詳細說明。

實例1.5A - 淋巴瘤患者的FDG-PET-CT和/或造影增強CT

【0509】 ORR的定義係根據2014年盧加諾分類法使用五分量表評估的反應得出的CR和PR參與者的比例（Cheson BD等人 (2014) J Clin Onc [臨床腫瘤學雜誌] 32(27):3059-68）。

【0510】 腫瘤評估包括嗜FDG淋巴瘤的FDG-PET-CT掃描和非嗜FDG淋巴瘤的造影增強CT。如SoA中所述，以固定的間隔進行腫瘤評估，並且評估窗口不受劑量延遲或劑量遺漏的影響。

【0511】 如果篩選時的CT和/或PET掃描顯示頸部疾病受累為陰性，則後續的CT掃描可以不包括頸部區域。如果篩選時的PET和/或CT掃描顯示頸部疾病受累為陽性，則後續的CT掃描必須包括頸部區域。腫瘤反應評估應在篩選時進行（第一次IMP之前28天[-7天]內），此後每12週（±7天）進行一次。成像時間應遵循日曆天，並且不應因週期延遲而進行調整。對於因PD以外的其他原因中止的參與者，評估應繼續進行，直到參與者記錄了PD或開始新的抗癌療法。如果研究者認為參與者發生臨床進展，可以早於12週進行首次評估。

【0512】 如果參與者有PR或CR，則需要每隔4週進行一次重複掃描以確認，並且患者應繼續進行每12週評估一次的時間表。在參與者臨床穩定但影像顯示第12週出現PD的情況下，由研究者決定可繼續使用研究藥物，直到下一次疾病反應評估。但是，如果臨床上懷疑有進展，則應隨時進行成像。

【0513】 每次疾病反應評估都應評估B淋巴瘤症狀。

【0514】 對於在第12週有PD，並在第12週後繼續研究療法的參與者，在治療中止時進行放射學評估。如果先前的掃描係在中止治療日期之前的4週內獲得的，則在治療中止時不必強制性進行重複掃描。

實例1.5B - 淋巴瘤患者的骨髓生物檢體和抽吸

【0515】 根據盧加諾2014的標準（Cheson BD等人 (2014)），所有參與者可按照臨床指示進行骨髓生物檢體/抽吸。FDG-PET-CT足以確定骨髓受累，並且可以認為對骨髓受累具有高度暗示性。如果在基線時有必要，可以考慮進行骨髓生物檢體確認（如果FDG-PET-CT在骨髓部位呈陰性，則需要進行生物檢體/抽吸以鑒定受累情況）。後續的骨髓評估僅對基線時有骨髓累及的參與者進行。

實例1.5C - 安全性評估

【0516】 本FIH研究的主要目的是基於DLT建立每週一次瘤內注射施用時該細胞激素RNA混合物的生物學最佳劑量。因此，安全性係主要的研究終點，並且會持續進行評估。安全性概況評估係根據體格檢查（最好由同一位醫師進行）之結果和實驗室測試來評估的，並基於發生率、嚴重程度（根據NCI CTCAE版本5.0分級）和AE的累積性質。SOA中提供了所有安全性評估的計畫時間點。

實例1.5D - 體格檢查

【0517】 完整的體格檢查最少應包括對中樞神經系統以及心血管、呼吸系統、胃腸道、造血系統（肝腫大、脾腫大、淋巴結病）和皮膚病學系統的評估。測量身高（僅在基線時）和體重（在每個週期的給藥前）並記錄在eCRF中。

【0518】 在每次IMP施用前都要評估ECOG的狀態，並記錄在eCRF中。研究者要注意與先前嚴重疾病有關的臨床體徵以及皮膚病變的進展。任何新發現或先前發現的惡化都報告為新的不良事件。SOA中描述了體格檢查的時間表。

實例1.5E - 生命體徵

【0519】 在治療期，在就要開始輸注IMP之前和注射結束時監測生命體徵。還根據臨床指示進行監測。評估體溫、脈搏率、呼吸頻率和血壓。參與者在進行血壓和脈搏測量之前應在安靜、無干擾（例如電視、手機）的環境下至少休息5分鐘。

實例1.5F - 心電圖、超音波心動圖和MUGA掃描

【0520】 如SOA中所概述，獲得單12導程ECG。應將簽署ICF後發生的臨床上明顯的異常報告為AE。先存病症應記錄在參與者的病史中。對於本研究的組合部分中的患者而言，僅在篩選時才按照SoA（參見本文）所概述獲得超音波心動圖或MUGA掃描。

實例1.5G - 肺功能檢查

【0521】 對先前用博來黴素治療過的淋巴瘤參與者而言，DLCO在基線時進行。僅在與西米單抗的組合遞增組中的患者中，才需要進行肺功能檢查。

實例1.5H - 臨床安全性實驗室評估

【0522】 研究者審查實驗室報告並記錄此審查。該等實驗室報告與原始文件一起歸檔。實驗室異常僅在以下事件中報告為AE，該等事件：

- 導致研究藥品中止、治療或劑量修改。
- 滿足嚴重或有特別意義的AE（AESI）定義（備註：其餘的實驗室測試在eCRF實驗室頁面中報告）。
- 先前的mRNA和介白素觸發試驗已經顯示血液學參數存在暫態變化；作為作用方式的一部分的該等暫態變化預設情況下不應登記為AE。但是，由臨床研究者決定在特定情況下實驗室變化是否應報告為具有臨床意義和/或AE。
- 在參加研究期間或在最後一次研究干預（即EOT評估）後30天內，將所有具有認為係臨床上明顯異常值的實驗室測試重複進行，直到該等值恢復正常或基線，或研究者或醫學監察員不再認為具有臨床意義。
- 如果在研究者認為合理的時間段內，該等值未恢復到正常/基線，則應確定病因，並通知申辦方。

【0523】 方案要求的所有實驗室評估均根據實驗室手冊和SoA進行。

【0524】 如果在機構的本地實驗室進行的非方案指定實驗室評估中得出的實驗室值需要更改參與者管理或經研究者認為具有臨床意義（例如SAE或AE或劑量修改），則將結果記錄在eCRF中。eCRF中報告了為安全性隨訪或為AE的進一步研究而進行的所有計劃外實驗室測試。

實例1.5I - 劑量限制性毒性（DLT）

【0525】 DLT被定義為以下AE中任一項，該等AE在沒有明確相反證據的情況下與IMP相關，經研究委員會確認，並且與使用NCI CTCAE 版本5.0的疾病進展分級不相關。對於因治療相關的AE而延遲啟動週期2的參與者而言，DLT觀察期的持續時間更長，必須評估該持續時間以確定該事件是否為DLT。使用NCI CTCAE版本5.0評估AE的嚴重程度。

【0526】 血液學毒性：

- ≥ 3級發熱性中性粒細胞減少症或≥ 3級中性粒細胞減少症，並有感染記錄。
- ≥ 3級血液學毒性持續 > 72小時。
- 4級血小板減少症或3級，有出血或需要輸血。

【0527】 非血液學毒性：

- 除3級皮膚反應外，任何≥ 3級免疫相關的AE。
- irAE可能在第一劑後不久或最後一劑治療後數月出現。評估與藥物暴露相關的病因不明的所有AE，以確定可能的免疫病因。如果懷疑係irAE，則在將AE標記為irAE之前，努力排除瘤性、感染性、代謝性、毒素或其他病因。任何其他≥ 3級非血液學毒性：
  - 排除3級噁心、嘔吐和腹瀉，如果使用適當的抗腹瀉療法得到控制並在48小時內消退至≤ 1級。
  - 如果招募的有已知肝轉移的參與者在基線時有2級AST或ALT異常，則僅當AST或ALT的增加大於基線的3倍並且在 ≥ 5天後確認升高時才將AST或ALT的上升視為DLT。
  - 如果招募的患有捷倍耳氏症候群的參與者在基線時患有2級膽紅素異常，則僅當膽紅素的增加大於基線的3倍並且在 ≥ 5天後確認升高時才將膽紅素的上升視為DLT。
- ≥ 2級眼色素層炎。

【0528】 其他「不可分級」毒性：

- 研究委員會認為治療中出現的不良事件具有潛在的臨床意義，因此進一步的劑量遞增將使參與者面臨無法接受的風險。
- 與IMP有關的毒性導致超過1劑的劑量遺漏，無法恢復至基線或≤1級（脫髮、白斑病、疲勞和甲狀腺功能減退除外）。

【0529】 使用在遞增期的前28天治療期間DLT的發生來定義MTD或MAD。在週期1及後續週期中，DLT的出現決定了是否需要劑量遺漏或減少（如果DLT在DLT觀察期內發生，則確定地終止研究干預；超出DLT觀察期）。

【0530】 經歷DLT的參與者將停止該細胞激素RNA混合物的療法，並將繼續進行跟蹤，直到毒性消退至CTCAE≤1級或該參與者的基線值（如果更高）為止。從所討論的毒性恢復後，最多可有2次劑量遺漏，並征得研究委員會的同意，並且如果研究者認為重新開始該細胞激素RNA混合物的療法符合受試者的最佳利益，則基於與申辦方達成的協議，參與者可以以相同劑量位準或更低的劑量位準以新的治療週期重新開始療法。此類重新給藥的參與者不允許再次劑量遞增。

實例1.5J - 全身性反應

【0531】 超敏反應和過敏反應的管理，以及相關的劑量修改，將在下面詳述。

【0532】 **全身性炎性反應**

【0533】 伴隨該細胞激素RNA混合物的施用可能會出現由炎性反應引起的全身性反應。抗原特異性T淋巴細胞應答、TLR介導的傳訊和促炎性細胞激素的暫態釋放可能引起全身性炎性反應。全身性炎性反應的典型臨床症狀可能包括心動過速、血壓降低、呼吸困難、顫抖、嘔吐、頭暈和發燒。

【0534】 在發生全身性炎性反應時，可以採取的措施有：

- 評估重要功能（血壓、心率、呼吸、體溫）
- 用撲熱息痛和/或非甾體類抗炎藥（NSAID）治療

- 收集用於以下項的血樣：IL-6、IFNγ、TNFα、IL-2；GM-CSF、IL-10、IL-8、IL-5、CRP和鐵蛋白；除了該等，還將對接受組合療法的參與者收集用於促甲狀腺激素（TSH）、游離甲狀腺素（T4）、抗核抗體（ANA）和類風濕因子（RF）的血樣
- 根據研究者酌情決定可能需要住院治療直到康復為止，伴隨著例如：
- 密切監測生命機能（血壓、心率、呼吸、體溫）
- NSAID的施用
- 單次大劑量靜脈內注射可的松
- 單劑量的托珠單抗8 mg/kg輸注（如果沒有恢復）

【0535】 **細胞激素釋放綜合症**

【0536】 細胞激素相關的毒性，也稱為CRS，係非抗原特異性毒性，係由於強效的免疫活化而發生的。當大量淋巴細胞（B細胞、T細胞和/或NK細胞）和/或骨髓細胞（巨噬細胞、樹突狀細胞和單核細胞）經活化並釋放出炎性細胞激素時，CRS就會在臨床上顯現出來。傳統上，CRS與治療性單株抗體輸注有關，在該等情況下，症狀發作通普遍地發生在輸注開始後的幾分鐘到幾小時內。儘管預計在瘤內注射該細胞激素RNA混合物後血清細胞激素水平將接近直接注射重組細胞激素後參與者體內觀察到的位準，但在持續的瘤內細胞激素位準提供臨床益處的過程中，參與者可能具有持續位準的全身細胞激素水平，其可能引起不良反應。因此，要密切監測接受瘤內注射細胞激素RNA混合物的參與者的細胞激素相關毒性體徵。如果參與者出現CRS的2級或以上的症狀和體徵，則他/她需要住院。如果CRS ≥ 2級，應持續進行生命體徵監測。如果參與者出現血液動力學或呼吸系統損傷，應將其轉移到重症監護病房（ICU）。該ICU應配備具有治療CRS的經驗的重症監護醫師。此外，該ICU必須具備開始對CRS ≥ 2級的參與者進行即時治療和監測所必要的設備才能將他/她收治到ICU。

【0537】 有關CRS的臨床體徵和症狀，請參見下文。

【0538】 症狀發作的時機和CRS的嚴重程度取決於誘導劑和免疫細胞活化的量級。當患者的腫瘤負荷較大時，該綜合症的發生率和嚴重程度也會更高，大概係因為這會導致更高水平的T細胞活化。與單株抗體療法相關的CRS一樣，與過繼性T細胞療法相關的CRS也與IFNγ、IL-6和TNFα水平升高有關聯；還已經報導了IL-2、GM-CSF、IL-10、IL-8、IL-5和不規則趨化因子（fracktalkine）的上升。新興證據暗示IL-6係CRS毒性的中心介導物；IL-6係一種具有抗炎和促炎特性的多效細胞激素。但是，當前對多種細胞激素的即時分析不會顯著影響當前患有CRS的個體患者的治療，並且治療決策普遍地基於臨床參數。

【0539】 進行血清C反應蛋白（CRP）和鐵蛋白之測定。僅在出現 ≥ 2級CRS症狀時，收集並回顧性分析血漿中包括IL-6和IFNγ在內的細胞激素水平。在初始劑量後和每次增加劑量後進行採樣，以評估CRS的體徵，並且在出現CRS ≥ 2級症狀的情況下進行採樣。CRP係肝臟產生的急性期反應物，主要是對IL-6的反應。血清CRP水平可作為IL-6生物活性增加的替代。在CRS期間，血清CRP水平可能會有幾個對數的增加。血清CRP測定快速、便宜，並且在大多數醫院中都可容易獲得。在一些系列中，CRP峰值水平和CRP倍數變化已鑒定患者有嚴重CRS的風險。然而，重要的是強調，在感染過程中CRP水平也會升高，不能用於區分感染引起的炎症和與CRS相關的炎症。嵌合抗原受體（CAR）T細胞輸注後，在許多患有CRS的患者中觀察到血清鐵蛋白的極端升高，這支持了CRS與巨噬細胞活化綜合症/嗜血淋巴細胞組織細胞增生症（HLH）之間的相似之處。

【0540】 為了評估個體參與者的CRS嚴重程度，使用了基於2014 NCI共識指南的CRS分級系統和緩解策略。對該分級系統進行了修改，以定義輕度、中度、重度和危及生命的CRS（無論引發劑），並指導使用皮質類固醇和/或抗人IL-6單株抗體（如托珠單抗）的治療推薦。

實例1.6 - 不良事件和嚴重不良事件

【0541】 具有特別意義的不良事件

【0542】 AESI係特定於申辦方產品或程式的科學和醫學方面的AE（嚴重或非嚴重），要求研究者持續監測並立即告知申辦方。此類事件可能需要進一步調查以表徵和理解它們。在研究過程中，可以藉由方案修正來添加、修改或清除具有特別意義的不良事件。

- 進入研究的女性受試者的妊娠，以及進入IMP研究的男性受試者的女性伴侶的妊娠，只有符合嚴重性標準（見下文）中的一條時，才被評定為SAE。
  - 如果女性參與者懷孕，則IMP中止。在結果得到確定之前，對女性參與者或男性參與者的女性伴侶強制性進行妊娠隨訪。
- IMP/非研究藥品（NIMP）的症狀性超劑量（嚴重或非嚴重）
  - IMP/NIMP的超劑量（偶然或故意）係研究者懷疑或參與者自發告知的事件，定義為比預期施用劑量高至少30%。
  - 值得注意的是，無症狀超劑量報告為標準AE。
- 其他項目特定的AESI
  - 所有方案定義的潛在或與IMP相關的DLT均視為AESI，無論發生的週期為多長（即，在遞增和擴展期治療的前28天之後）
  - 細胞激素釋放綜合症（任何等級）
  - 在研究的組合療法部分中 ≥ 2級的輸注相關反應
  - 任何 ≥ 2級的自體免疫反應

【0543】 AE由參與者（或在適當情況下，由看護人、代理人或參與者的合法授權代表）報告。

【0544】 研究者和任何有資格的指定人有責任檢測、記錄和記載符合AE或SAE定義的事件，並負責跟進嚴重的、被認為與研究干預或研究程序有關的或導致參與者中止使用細胞激素RNA混合物的AE。

【0545】 **不良事件（AE）**

【0546】 AE係在參與者或臨床研究參與者中發生的任何不幸醫療事件，與研究干預的使用在時間上相關，無論是否與研究干預有關。因此，AE可能是與研究干預的使用在時間上相關的任何不利和意外的體徵（包括異常的實驗室檢查結果）、症狀或疾病（新的或加劇的）。

【0547】 **嚴重不良事件（SAE）**

【0548】 SAE係任何劑量下造成以下結果的任何不幸醫療事件：

- 導致死亡，
- 威脅生命（注：術語「威脅生命」係指參與者在事件/反應發生時有死亡風險的事件/反應；它不是指假設如果更嚴重則可能導致死亡的事件/反應），
- 需要住院治療或導致現有住院時間延長，
- 導致持續或嚴重的殘疾/喪失工作能力，執行正常生命機能的能力的永久或重大（如果係暫時的）且嚴重的破壞。殘疾不意欲包括相對較輕微的經歷，諸如頭痛、噁心、嘔吐或意外的輕微創傷
- 係先天性異常/出生缺陷、胎兒異常或導致流產的任何異常
- 係醫學上重要的事件或反應。在決定是否應將其他情況視為嚴重情況時，應進行醫學和科學判斷，該等情況諸如可能不會立即危及生命或導致死亡或住院，但可能危及參與者或可能需要干預以防止上述定義中列出的其他結果之一的重要醫療事件。研究者負責將醫學上重要的AE評估為嚴重AE（SAE）。實例：在急診室或家中對過敏性支氣管痙攣進行強化治療；沒有住院的血質不調；沒有住院的無症狀ALT上升超過10 x ULN）

【0549】 **治療中出現的不良事件（TEAE）**定義為在最後一劑研究干預後長達30天的治療期期間報告的AE。

【0550】 **相關不良事件：**根據研究者申辦的研究（ISS），存在該產品可能造成此事件的合理可能性。SAE的因果關係（即，它與研究干預的關係）將由完成

CRF的醫師評估。出於監管報告目的，如果關係未知或未闡明，則符合藥物不良反應的定義（可疑關聯-ADR）。

【0551】 **免疫相關不良事件（ir-AE）：**與治療有關的不良事件的一個子集，被定義為與基於免疫的療法（例如，免疫檢查點抑制劑暴露）相關、病因未知且與免疫介導的機制一致的任何器官的有臨床意義的不良事件。

【0552】 **有特殊意義的不良事件（AESI）：**特定於申辦方產品或程式的科學和醫學方面的不良事件（嚴重或非嚴重），為此研究者進行持續的監測和與申辦方快速溝通可能是適當的。此類事件可能需要進一步調查以表徵和理解它們。在研究過程中，可以藉由方案修正來添加或移除AESI。

【0553】 **新的安全性發現：**除應報告的個體病例安全性報告（ICSR）或安全問題以外的任何可能影響已知風險-效益平衡或產品安全性概況的發現。

【0554】 **預期的AE/SAE：**根據當地標籤（如果可用）或歐盟產品特徵概要（SmPC）確定產品在批准的適應症和治療方案下的預期性。當產品以任何未經批准的組合/方案施用，或針對未經批准的適應症/群體或用於未經批准的給藥時，對預期性的確定應基於IB（基於研究方案中定義的參考文件，考慮組合中每個特定上市藥物的標籤）。

【0555】 **懷疑的非預期嚴重不良反應（SUSAR）：**因果關係、嚴重性和預期性係獨立的標準。它係一個組合，定義了向衛生部門的加快報告。

【0556】 **符合AE定義的事件：**

- 任何異常的實驗室測試結果（例如，血液學、臨床化學或尿液分析）或其他安全性評估（例如，ECG、放射掃描、生命體徵測量），包括那些從基線開始惡化的，根據研究者的醫學和科學判斷認為具有臨床意義之結果（即，與潛在疾病的進展無關）。
- 慢性或間歇性先存病症的惡化，包括疾病頻率和/或強度的增加。
- 在研究干預施用後檢測或診斷出的新病症，即使可能在研究開始之前就已經存在。

- 可疑的藥物相互作用的體徵、症狀或臨床後遺症。
- 懷疑超劑量的研究干預或伴隨用藥的體徵、症狀或臨床後遺症。

【0557】 **不符合AE定義的事件：**

- 所研究的疾病/障礙或預期的研究疾病/障礙的進展、體徵或症狀，除非超過參與者的病症的預期嚴重程度。
- 醫療或外科手術（例如，內視鏡檢查，闌尾切除術）：導致該手術的病症係該AE。
- 沒有發生不幸醫療事件的情況（社交和/或入院便利性）。
- 在研究開始時存在或檢測到的且沒有惡化的一種或多種先存疾病或病症的預期每日波動

【0558】 如果事件不是上述定義中的AE，那麼即使滿足嚴重病症（例如，因所研究疾病的體徵/症狀住院、由於疾病進展而死亡），也不能將其視為SAE。

【0559】 **AE和/或SAE的記錄和隨訪**

【0560】 **AE和SAE記錄**

【0561】 發生AE/SAE時，將審核與該事件相關的所有文件（例如，醫院進展記錄、實驗室報告和診斷報告），並在eCRF中記錄所有相關AE/SAE資訊。申辦方可能會要求某些病例的醫療記錄副本。在這種情況下，除參與者編號外，所有參與者識別符都將在病歷副本上刪除，之後再提交給申辦方。研究者嘗試根據體徵、症狀和/或其他臨床資訊確定該事件的診斷。只要有可能，診斷（而非個體體徵/症狀）都按AE/SAE記錄。

【0562】 **強度評估**

【0563】 根據NCI CTCAE 5.0版評估AE/SAE的強度。

【0564】 **因果關係評估**

【0565】 研究者有義務評估研究干預與每個AE/SAE的每次發生之間的關係。關係的「合理可能性」表示存在事實、證據和/或論據暗示因果關係，而不是不能排除關係。研究者使用臨床判斷來確定這種關係。將考慮和調查替代原

因，諸如潛在疾病、伴隨療法和其他風險因子，以及事件與研究干預施用之間的時間關係。研究者在評估時還可以針對已上市產品查閱研究者手冊（IB）和/或產品資訊。

【0566】 對於每個AE/SAE，研究者必須在醫療記錄中說明他/她已經審查了該AE/SAE並提供了因果關係評估。可能存在發生SAE的情況，研究者掌握的資訊極少，無法包含在給申辦方的初始報告中。但是，非常重要的是，研究者總要在將SAE數據首次傳輸給申辦方之前，評估每個事件的因果關係。研究者可以根據隨訪資訊改變其對因果關係的看法，並發送帶有更新的因果關係評估的SAE隨訪報告。

【0567】 **AE和SAE的隨訪**

【0568】 研究者有義務按照醫學指示或監測組代表的要求執行或安排進行補充測量和/或評價，以盡可能充分地闡明AE或SAE的性質和/或因果關係。這可能包括其他實驗室檢查或調查、組織病理學檢查或向其他衛生保健專業人員諮詢。新的或更新的資訊將記錄在最初完成的eCRF中。

【0569】 **SAE報告**

【0570】 藉由電子數據收集工具向申辦方報告SAE。向申辦方報告SAE的主要機制係電子數據收集工具。如果電子系統超過24小時不可用，則本中心將使用紙本SAE數據收集工具（參見下一節）。本中心將在電子系統可用後立即將SAE數據登錄電子系統。在給定中心完成研究後，將電子數據收集工具離線以防止輸入新數據或更改現有數據。如果某個中心從研究參與者處收到有關新SAE的報告，或者在離線電子數據收集工具後收到先前報告的SAE的更新數據，則本中心可以在紙本SAE表格上報告此資訊（參見下一節）或傳真給申辦方或代表。

【0571】 **藉由紙本CRF向申辦方報告SAE**

【0572】 傳真發送SAE紙本CRF係將此資訊發送給申辦方或代表的首選方法。在極少數情況下，在沒有傳真設備的情況下，可以藉由電話通知，並藉由隔夜送達郵件或快遞服務發送SAE數據收集工具的副本。藉由電話進行的初始通

知並不能代替研究者在指定的報告時間範圍內完成並簽署SAE CRF頁面的要求。

實例1.6A - 收集AE和SAE資訊的時間段和頻率

【0573】 在SOA中指定的時間點，從ICF的簽署直到EOT，收集所有AE（包括SAE）。在EOT之後，僅報告與IMP有關的事件或非預期事件（包括與IMP關係不明確的那些事件）。

【0574】 記錄所有SAE和AESI，並在24小時內報告給申辦方或指定人，如下所示。研究者將在獲得任何更新的SAE數據的24小時內將其提交給申辦方。

【0575】 研究參與結束後，研究者沒有義務主動尋找AE或SAE。但是，如果研究者在參與者退出研究後的任何時間得知任何SAE（包括死亡），並且他/她認為該事件與研究干預或研究參與有合理關係，則研究者必須及時通知申辦方。

【0576】 以下提供了記錄、評價和評估AE和SAE因果關係之方法，以及完成和傳送SAE報告的程序。

實例1.6B - 檢測AE和SAE之方法

【0577】 在檢測AE和/或SAE時要小心不要引入偏差。對參與者進行開放式和無主導的口頭提問係詢問AE事件的首選方法。

實例1.6C - AE和SAE的隨訪

【0578】 在最初的AE/SAE報告之後，研究者需要在後續的訪視中主動跟蹤每個參與者。EOT之後，在安全性隨訪期間，要報告、監測和跟蹤直到消退或穩定的事件如下：

- 所有正在進行的AE、SAE或具有特殊意義的事件，無論是否有關係
- 所有被認為相關的新AE、SAE或具有特殊意義的事件，包括因相關事件導致的死亡

【0579】 以下提供了有關隨訪程序的更多資訊。

實例1.6D - 未評定為AE或SAE的與疾病相關的事件和/或與疾病相關之結果

【0580】 以下疾病相關事件（DRE）在患有癌症的參與者中很常見，並且可能會嚴重/危及生命：

- 基礎疾病的進展，因為這係研究的終點。
- 由於基礎疾病的進展而導致的死亡（如果在上一次IMP施用後30天發生）。在上一次研究干預的30天內發生的所有死亡均應報告為SAE。

【0581】 由於該等事件普遍地與所研究的疾病有關，因此即使事件可能符合SAE的定義，也不會按照加快SAE報告的標準程序來報告該等事件。該等事件會在適當的時間範圍內記錄在參與者的eCRF的相應頁面上。

【0582】 但是，如果滿足以下任一條件，則必須記錄該事件並將其報告為SAE（而不是DRE）：研究者認為，該事件的強度、頻率或持續時間大於對個體參與者的預期；或研究者認為該事件很可能與研究干預有關。

【0583】 **妊娠：**

【0584】 在開始研究干預後以及最後一次研究干預後至少6個月，將收集女性參與者以及男性參與者的女性伴侶（如果有）中所有妊娠的詳細資訊。

【0585】 如果報告妊娠，研究者會在得知妊娠後24小時內通知申辦方。異常妊娠結果（例如，自然流產、胎兒死亡、死產、先天性異常、異位妊娠）視為SAE。妊娠隨訪描述了妊娠之結果，包括任何故意或自發終止、出生詳細情況、是否存在任何先天性異常、出生缺陷、母體或新生兒併發症及其與研究藥物的推測關係。

實例1.7 - 藥物動力學

實例1.7A - 採樣時間

【0586】 定義以下血液收集時間點以測量血漿中該細胞激素RNA混合物編碼的細胞激素濃度並進行PK分析：

【0587】 血液收集的採樣時間可以在PK/PDy流程圖中找到（表3）。在指定的時間並按照規範收集所有血樣係至關重要的。

【0588】 記錄因任何原因遺失或丟失的樣本。實際血液收集時間記錄在eCRF中。採樣和給藥的日期和時間也精確記錄。

組合療法的採樣子集

【0589】 對於組合療法擴展期的A、B、C和D組，密集採樣子集由每個群組中最少10名參與者組成，該等參與者在週期1第1週和週期3第1週中進行了密集採樣（表4和表5）。組合療法遞增期的所有參與者都將進行稀疏採樣。

實例1.7B - 生物分析方法

【0590】 生物分析方法總結於表9中。簡而言之，在每個參與者群組中，回顧性監測血漿中從該細胞激素RNA混合物轉譯的四種靶細胞激素（IL-12sc、IL-15 sushi、GM-CSF和IFNα2b）的全身水平。根據檢測靈敏度的需要，在MSD或Quanterix SIMOA平臺上執行該等細胞激素測定(IL-12sc、GM-CSF、IFNα和IL-15 sushi）。對於接受組合療法的參與者，使用再生元公司開發和驗證的免疫分析方法根據PK/PDy流程圖（表5）監測血清中西米單抗的濃度。

表12 - 用於細胞激素RNA混合物所編碼的細胞激素和西米單抗的PK分析之生物分析方法

分析物	IL-15sushi	IL-12sc	GM-CSF	IFNα2b	西米單抗
基質	血漿	血漿	血漿	血漿	血清

分析物	IL-15sushi	IL-12sc	GM-CSF	IFNα2b	西米單抗
分析技術	MSD或類似技術的單一或多重細胞激素測定	MSD或類似技術的單一或多重細胞激素測定	MSD或類似技術的單一或多重細胞激素測定	MSD或類似技術的單一或多重細胞激素測定	免疫測定

實例1.7C - PK參數

【0591】 藥物動力學參數係使用PKDMS軟體（Pharsight），使用非區室方法，從細胞激素RNA混合物編碼的細胞激素的大量採樣血漿濃度和西米單抗的大量採樣血清濃度中計算得出的。

【0592】 細胞激素RNA混合物編碼的細胞激素的PK參數包括但不限於表13中列出的參數。

【0593】

表13 - 藥物動力學參數清單和定義

參數	分析物				定義
	IL-15sushi	IL-12sc	GM-CSF	IFNα2b	
C_{max}	X	X	X	X	在給藥間隔內觀察到的最大血漿濃度
t_{max}	X	X	X	X	達到C_{max}的時間
$C_{上一次}$	X	X	X	X	在給藥間隔內超過定量下限的上一次觀察到的濃度
$t_{上一次}$	X	X	X	X	$C_{上一次}$的時間
$C_{谷值}$	X	X	X	X	在重複給藥過程中在就要治療給藥前觀察到的血漿濃度
AUC_{0-7d}	X	X	X	X	在給藥間隔（7天）內使用梯形法計算的血漿濃度與時間的關係曲線下方的面積

【0594】 群體PK方法可用於由細胞激素RNA混合物編碼的細胞激素。完成後，將在一份或多份獨立報告中報告生成的數據。

【0595】 西米單抗的PK參數包括但不限於表14中列出的參數。

表14 - 藥物動力學參數清單和定義 - 西米單抗

參數	分析物	定義
	西米單抗	
C_{EOI}	X	靜脈輸注結束時觀察到的血清濃度
C_{max}	X	第一次輸注後觀察到的最大血清濃度
t_{max}	X	達到C_{max}的時間
$C_{谷值}$	X	在重複給藥過程中在就要治療給藥前觀察到的血清濃度
AUC_{0-21d}	X	在給藥間隔（21天）內使用梯形法計算的血漿濃度與時間的關係曲線下方的面積

實施方式1.8 - 藥效動力學

【0596】 該細胞激素RNA混合物和西米單抗的目標結合、PDy和安全性生物標誌物對於劑量遞增和PoC試驗成功至關重要。定量或半定量生物標誌物可說明建立劑量位準與目標表現、PDy和PK參數之間的相關性，並有助於確定MTD/MAD。細胞激素RNA混合物單一療法和細胞激素RNA混合物/西米單抗組合療法程式的生物標誌物可大致分為循環目標表現，PDy/安全標誌物和組織衍生的PDy標誌物。

【0597】 在可能的情況下，PDy樣本收集與計畫的PK採樣一致。

實例1.8A - 循環目標結合和安全性生物標誌物監測計畫

【0598】 在每個參與者群組中回顧性監測血漿中從該細胞激素RNA混合物轉譯的四種靶細胞激素（IL-12sc、IL-15sushi、GM-CSF和IFNα2b）及其下游PDy目標（IFNγ和IFNγ誘導的蛋白10 [IP10]）和西米單抗的全身水平。

【0599】 安全性生物標誌物CRP和鐵蛋白與臨床參數（例如發燒、噁心、疲勞、頭痛、肌痛、不適、低氧、低血壓）一起使用可幫助鑒定臨床AE。收集樣本以監測繼發性CRS。僅在發生 ≥ 2級CRS症狀時，才在研究開展過程中回顧性評估一組6種細胞激素（IL-1β、IL-2、IL-6、IL-8、IL-10和TNFα）。針對組合療

法收集樣本以監測潛在的自體免疫性；對於研究的組合療法部分，對ANA、RF、TSH和游離T4進行回顧性評估。

實例1.8B - 用於免疫評估的腫瘤生物檢體

【0600】 在首次IMP施用之前、第5週至第8週之間以及週期6或疾病進展時(以最先發生者為准）收集強制性腫瘤生物檢體。對於治療中的生物檢體樣本（即第5-8週的一個，週期6或疾病進展時的另一個），需要從注射和未注射的病變中獲取生物檢體樣本。較佳的是，在治療中要進行生物檢體的病變之一應該係在基線已經進行過生物檢體的病變。如果這不可行，則可以考慮來自另一個注射病變的組織樣本。如果要進行生物檢體的病變有限，那麼如果之前已經從同一個部位收集了另一個樣本，則只能考慮對未注射的病變進行生物檢體，或者可以在下一個採樣時間點收集。.

【0601】 所有參與者的生物檢體組織均經過蘇木精（hematoxylin）和曙紅（eosin）染色以及CD3、CD8的標準ICH，並且腫瘤細胞將藉由所研究的腫瘤類型相關的SOX10標誌物（對於黑色素瘤）或廣譜細胞角蛋白（對於上皮性腫瘤HNSCC和CSCC的患者為[CK]）和淋巴瘤標誌物來確定；該標準IHC還包括CD68和PD-L1用於組合療法群組。一個子集的參與者生物檢體組織（來自反應者和非反應者）經歷了12種標誌物的多重IHC。對於本研究的單一療法部分，該多重檢組由CD3、CD4、CD8、CD38、CD45、CD45RO、CD56、CD68、FoxP3、PD-1、PD-L1和SOX10或PanCK或淋巴瘤標誌物組成。對於本研究的組合療法部分，該多重組由CD3、CD4、CD8、CD38、CD56、CD68、粒酶B（GZMB）、群落刺激因子1受體（CSF-1R）、淋巴細胞活化基因3（LAG-3）、PD-1、PD-L1以及SOX10（對於黑色素瘤）或PanCK（對於上皮腫瘤HNSCC和CSCC的患者）或淋巴瘤標誌物組成。收集治療前和治療後生物檢體組織的IHC並用於評估腫瘤微環境的變化，特別是評估腫瘤和基質中浸潤性T細胞的頻率和密度。生物檢體前後的T細胞增加係陽性免疫相關因子，用於幫助定義機制的證據。

【0602】 僅對於在單一療法和組合療法的擴展期間的黑色素瘤患者，在5-8週之間進行的單一腫瘤核心生物檢體將專用於TIL分離。這將適用於有限數量（例如，成功完成TIL分離的不超過十名患者）的所選黑色素瘤患者。這將不是附加的生物檢體，而是將專用於基因組評估的樣本用於TIL分離（在特殊條件下處理-未福馬林固定）。這類樣本和測試應用於治療研究者所確定的對治療有臨床反應體徵（腫瘤縮小和/或腫瘤部位發紅）的患者。

【0603】 腫瘤轉錄組學（RNA定序）基因組學和新抗原也基於樣本的可後天型進行分析。

實例1.9 - 基因組學

【0604】 進行了多種分析以分析治療背景下的基因組學，包括體細胞突變和PBMC上的HLA分型；腫瘤RNA定序（RNAseq）；血液RNAseq（僅用於組合療法）。腫瘤轉錄組學和基因組分析也可以根據樣本的可後天型進行。需要腫瘤RNAseq數據（也計畫作為生物標誌物分析的一部分）來確定基因特徵、腫瘤中的新抗原、TMB和TCR多樣性。HLA分型將對血液進行。如果有足夠的樣本材料可用，則參加該等分析係強制性的。

【0605】 對於本研究的單一療法部分，僅在黑色素瘤參與者中評估新抗原。對於本研究的組合療法部分，僅在群組（cohort）A（PD-1/PD-L1難治性）參與者的擴展期評估新抗原。

【0606】 如果DNA或RNA提取失敗，則要求參與者提供替換樣本（腫瘤或血液）。除非原始同意書中包含知情同意書，否則需要簽署知情同意書才能獲得替換樣本。在樣本處理和運輸存在可行性限制時，將不對來自相關臨床中心的樣本進行該等（或其中一些）分析的評估。

實例1.9A - 免疫原性評估

【0607】 在單一療法和組合療法中均評估了針對該細胞激素RNA混合物編碼的細胞激素的抗體，而在組合療法組中則評估了針對西米單抗的抗體。

【0608】 根據SOA在從所有參與者收集的血漿樣本中評估針對細胞激素RNA混合物編碼的細胞激素的抗體。此外，在最終訪視時還將從中止研究干預或退出研究的參與者處收集血漿樣本。該等樣本由申辦方或申辦方指定人員進行測試。在血清樣本中評估針對西米單抗的抗體。測試樣本中針對西米單抗的ADA。

【0609】 在血漿樣本中篩選與從該細胞激素RNA混合物表現的四種細胞激素中的每一種結合的抗體，並報告已確認陽性樣本的滴定度。進行其他分析以進一步表徵該細胞激素RNA混合物的免疫原性。

【0610】 對細胞激素RNA混合物的抗體的檢測和表徵係藉由經驗證之方法由申辦方監督或在申辦方的監督下進行的。進一步表徵和/或評價抗體中和研究干預活性的能力。在最後一位參與者的最後一次研究訪視之後，樣本在申辦方選擇的設施處保存最多5年（或根據當地法規），從而可以進一步分析對該細胞激素RNA混合物和/或西米單抗的免疫反應。

實例1.9B - RNA轉錄組研究

【0611】 使用微陣列和/或替代性等效技術進行探索性轉錄組研究，這有助於同時測量數千種RNA種類的相對豐度，從而為每種組織生物檢體樣本提供轉錄組譜。IHC後殘留的腫瘤組織需要進行RNA定序分析，以評估腫瘤環境內總體基因表現的變化，特別是尋找促炎性和/或IFNγ基因簽名的發展。這使得能夠評價轉錄組譜的變化，該等變化與涉及該細胞激素RNA混合物和/或西米單抗的作用的適應性免疫應答相關。

【0612】 相同的樣本還用於藉由應用替代性技術來確認發現。

【0613】 在本研究的組合療法期間，對血樣進行了相同的RNAseq分析。

實例1.10 - 統計考慮

實例1.10A - 統計假設

【0614】 **劑量遞增**

【0615】 在本研究的劑量遞增期中沒有正式的統計假設。本研究旨在根據觀察到的DLT建立該細胞激素RNA混合物的MTD或MAD。使用前兩個DL的單參與者劑量遞增進行劑量遞增，隨後進行合理設計。

【0616】 對於與西米單抗的組合療法，本研究旨在根據觀察到的DLT建立與西米單抗組合的細胞激素RNA混合物的MTD或MAD。使用合理的設計進行劑量遞增。

【0617】 **劑量擴展**

【0618】 對於單一療法，無效假設係根據RECIST 1.1的真實ORR≤10%，替代性假設係根據RECIST 1.1的真實ORR≥26%。

【0619】 對於組合療法：

- 群組A：零假設係根據RECIST 1.1的真實ORR≤10%，替代性假設係根據RECIST 1.1的真實ORR≥26%。
- 群組B：零假設係根據RECIST 1.1的真實ORR≤30%，替代性假設係根據RECIST 1.1的真實ORR≥55%。
- 群組C：零假設係根據RECIST 1.1的真實ORR≤45%，替代性假設係根據RECIST 1.1的真實ORR≥70%。
- 群組D：零假設係根據RECIST 1.1的真實ORR≤15%，替代性假設係根據RECIST 1.1的真實ORR≥30%。

實例1.10B - 樣本量確定

【0620】 當該細胞激素RNA混合物作為單一藥物施用時，共計招募最多72名參與者，取決於遞增期研究的劑量位準。當將該細胞激素RNA混合物與西米單抗組合施用時，共計招募最多192名參與者，取決於遞增期研究的劑量位準和擴

展期每個群組的完成階段。本研究招募的患者最大數量預計達到264名，如以下各節中進一步詳細介紹的。

【0621】 **劑量遞增期**

【0622】 沒有正式的單一療法劑量遞增期樣本量計算。劑量遞增期招募了大約38位可評價DLT的參與者，評估了約8個DL。實際樣本量取決於觀察到的DLT和實際探索的劑量位準的數量。

【0623】 對於組合療法，與西米單抗組合的細胞激素RNA混合物的劑量遞增中的實際樣本量因觀察到的DLT和實際探索的劑量位準的數量而異（大約18至36名可評價DLT的參與者）。

【0624】 **劑量擴展期**

【0625】 在單一療法劑量擴展期使用合理的設計。針對單側替換檢驗了真實反應率為10%的零假設。在第一階段，累計了16名參與者。如果根據RECIST 1.1標準，在這16名參與者中，有1例或更少的反應，則停止研究。否則，將增加18名參與者，總計34名。如果在34名晚期黑色素瘤參與者中，先前抗PD-1或抗PD-L1療法失敗後觀察到7例或更多反應，則該無效假設將被否定。當真實反應率為26%時，這種設計產生的單側I型錯誤率為5%，效力為80%。

【0626】 組合療法擴展期的樣本量係根據合理的設計計算得出的，其中單側α水平為5%，效力為85%；預計將招募約156名患有晚期實性瘤的參與者。表15提供了ORR的假設、所需的樣本量以及每個階段所需的反應者數量：

表15 - 樣本量的確定

治療	適應症	H_0	H_1	樣本量		所需反應數（%）	
				階段1	最終	階段1	最終
細胞激素混合物	抗PD-1/抗PD-L1失敗後的黑色素瘤	10%	26%	16	34	≥2 (12.5%)	≥7 (20.6%)
細胞激素混合物+西米單抗	群組A：抗PD-1/抗PD-L1失敗後的黑色素瘤	10%	26%	26	40	≥3 (11.5%)	≥8 (20.0%)

治療	適應症	H_0	H_1	樣本量		所需反應數（%）	
				階段1	最終	階段1	最終
細胞激素混合物+西米單抗	群組B：未接受過抗PD-1/抗PD-L1治療的黑色素瘤	30%	55%	14	28	≥5 (35.7%)	≥13 (46.4%)
細胞激素混合物+西米單抗	群組C：未接受過抗PD-1/抗PD-L1治療的CSCC	45%	70%	10	29	≥5 (50.0%)	≥18 (62.1%)
細胞激素混合物+西米單抗	群組D：未接受過抗PD-1/抗PD-L1治療的HNSCC	15%	30%	26	59	≥5 (19.2%)	≥14 (23.7%)

縮寫：CSCC = 皮膚鱗狀上皮細胞癌；HNSCC = 頭頸部鱗狀上皮細胞癌
備註：基於客觀反應的數量和在第1階段的治療群組中觀察到的數據總數，可以決定治療群組進入第2階段。

實例1.10C - 用於分析的群體

【0627】 為了進行分析，定義了以下群體，如表16所示：

表16 - 分析群體

群體	說明
所有治療的	在研究的劑量遞增和劑量擴展期，所有治療的群體將包括所有已給出知情同意並接受至少一劑（甚至不完全）的該細胞激素RNA混合物治療的參與者。 該群體係進行療效和安全性參數分析的主要群體。使用該群體的所有分析將基於在第一個週期中實際接受的劑量位準。
可評價DLT（劑量遞增期）	可評價DLT的群體定義為在治療的前28天內接受至少70%計畫劑量細胞激素RNA混合物的劑量遞增期的參與者，以及在首次IMP施用後完成DLT觀察期的參與者，除非他們因DLT而中止研究干預。劑量擴展期的推薦劑量將根據可評價DLT的群體來確定。
PK	PK群體將包括來自所有治療群體的所有參與者，在第一個劑量的研究干預後，至少有1個可測量的由細胞激素RNA混合物濃縮物編碼的細胞激素。
PDy	藥效動力學群體將包括來自所有治療群體的所有參

	與者，在進行第一個劑量的研究干預後有至少1個藥效動力學標誌物結果。
可評價ADA	可評價ADA的群體包括所有治療的群體中的所有參與者，在進行第一個劑量的研究干預後有至少1個未缺失的ADA結果。
安全性	安全性群體與所有治療的群體相同。

實例1.10D - 統計分析

【0628】 **療效分析**

【0629】 使用敘述性統計總結了基於預選病變（包括注射和未注射的病變）根據RECIST 1.1的客觀反應率（ORR）。使用Clopper-Pearson方法計算90%的雙向置信區間。統計推斷基於樣本量計算部分中定義的假設和α水平。針對根據RECIST 1.1和iRECIST的DCR和根據iRECIST的ORR提供了類似的分析。另外，分別為注射和未注射的病變提供了腫瘤負荷變化的總結作為支持性分析。使用Kaplan-Meier方法總結了DoR和PFS。

表17 - 療效分析

終點	**統計分析方法**
一級	
劑量擴展：根據RECIST 1.1的ORR	敘述性統計和Clopper-Pearson方法
二級	
劑量擴展：根據RECIST 1.1和iRECIST的DoR和PFS	Kaplan-Meier方法
劑量擴展：根據RECIST 1.1和iRECIST的DCR和根據iRECIST的ORR	敘述性統計和Clopper-Pearson方法
探索性	將在數據庫鎖定之前完成的統計分析計畫中描述

【0630】 **安全性分析**

【0631】 所有安全性分析都將針對所有治療的群體進行。

表18 - 安全性分析

終點	統計分析方法
一級	
劑量遞增：DLT	敘述性統計
劑量遞增：AE/SAE和實驗室異常	敘述性統計
二級	
劑量遞增：免疫原性	敘述性統計
劑量擴展：免疫原性	敘述性統計
劑量擴展：AE/SAE和實驗室異常	敘述性統計

【0632】 **劑量限制性毒性**

【0633】 在劑量遞增期（單一療法和組合療法）中，按照單一療法和組合療法以及劑量位準來總結DLT。DLT的詳細資訊由參與者提供。如上所述，DLT係使用NCI CTCAE版本5.0定義的。

【0634】 **不良事件分析**

【0635】 觀察期分為3個部分：篩選、TEAE和治療後。篩選期定義為知情同意書簽署到開始第一個劑量的研究干預之前的時間。治療中出現的不良事件（TEAE）期間定義為從研究干預的第一個劑量到研究干預的最後一個劑量後30天之間的時間。治療後期間定義為從最後一個劑量的研究干預後31天起到研究結束或死亡的時間，以最先發生者為准。

【0636】 治療前AE定義為篩選期的任何不良事件。治療中出現的不良事件定義為在TEAE期間出現、惡化（根據研究者的意見）或變得嚴重的不良事件。治療後不良事件定義為在治療後期間報告的不良事件。AE報告的主要重點係TEAE。分別對治療前和治療後的不良事件進行了描述。

【0637】 該等TEAE根據Medical Dictionary for Regulatory Activities [監管活動醫學詞典]（MedDRA）進行編碼。AE根據NCI CTCAE 5.0版進行分級。總結中考慮了等級。對於多次出現相同較佳項（PT）的參與者，將使用最高等級。

【0638】 提供了TEAE的總體總結。提供了經歷以下任何情況的參與者的數量和百分比：

- TEAE。
- ≥3級的TEAE。
- 3或4級的TEAE。
- 5級的TEAE（在治療期間有致命結果的任何TEAE）。
- 嚴重的TEAE。
- 與治療相關的嚴重TEAE。
- 導致治療中止的TEAE。
- AESI。
- 與治療相關的TEAE。
- 與治療相關的≥3級的TEAE。

【0639】 藉由NCI CTCAE等級（所有等級以及≥3級）總結了按主系統器官分類（SOC）和PT統計的經歷TEAE的參與者的數量和百分比。對於與治療相關的TEAE、AESI、導致治療中止的TEAE、導致劑量修改的TEAE、嚴重的TEAE、具有致命結果的TEAE和在治療後給藥期間發生的AE/SAE，製作了類似的表格。作為研究干預後的治療相關的不良事件的子集，分別總結了本研究的單一療法和組合療法的免疫相關AE（irAE）。

【0640】 **臨床實驗室評價**

【0641】 如果適用，根據NCI CTCAE 5.0版對臨床實驗室結果進行分級。提供了所有治療的群體中在TEAE期間具有使用最差等級的實驗室異常（即所有等級以及≥3級）參與者的數量（%）。

【0642】 如上所述，並非所有基於作用方式的實驗室值的暫態變化都記錄為TEAE；研究者評價實驗室變化是否係臨床相關的，以便將其記錄為TEAE。

【0643】 當NCI CTCAE 5.0版量表不適用時，顯示實驗室異常值超出正常實驗室範圍值的參與者的數量。

實例1.11 - 臨床實驗室測試

【0644】 進行表**19**和**20**中詳述的測試，並將結果輸入eCRF。方案中詳細介紹了納入或排除參與者的方案特定要求。根據研究者的需要或當地法規的要求，可以在研究期間的任何時間進行其他測試。研究者必須記錄對每份實驗室安全性報告的審查。

表19 - 方案要求的安全性實驗室評估

實驗室評估	參數			
血液學	血小板計數		白血球分類（WBC）計數：	
	紅血球（RBC）計數		中性粒細胞	
	血紅蛋白		淋巴細胞	
	血細胞比容		單核細胞	
			嗜酸性粒細胞	
			嗜鹼性粒細胞	
臨床化學[a]	尿素或血液尿素氮（BUN）	鉀	碳酸氫鹽	磷
	肌酐	鈉	鎂	氯化物
	葡萄糖	總鈣	鹼性磷酸酶	總膽紅素和直接膽紅素
		尿酸		
	天冬胺酸轉胺酶（AST）/血清穀草轉胺酶（SGOT）	丙胺酸轉移酶（ALT）/血清穀丙轉胺酶（SGPT）	總蛋白	白蛋白
	乳酸脫氫酶（LDH）	澱粉酶		
常規尿液分析	• 量油計評估 - pH值、葡萄糖、蛋白質、血液、量油計測量的酮 - 白血球和RBC - 微量白蛋白 • 顯微鏡檢查（如果血液或蛋白質異常）			

其他測試	• 血清人絨毛膜促性腺激素（hCG）妊娠檢查（有生育潛力的女性需要） • CRP，鐵蛋白 • 凝血：活化部分凝血活酶時間（aPTT）、PT、國際標準化比值（INR）、以及纖維蛋白原
篩選測試	• 血清學（B型肝炎表面抗原[HBsAg]，肝炎核心抗體[HBcAb]，丙型肝炎病毒抗體，HCV RNA，以及僅在德國研究中心的參與者才測試的HIV抗體） • 凝血：D-二聚體

備註：

a 下文給出了肝化學停止標準、肝停止或監測事件後所需採取的措施以及隨訪評估的詳細資訊。ALT≥3×正常上限（ULN）和膽紅素≥2×ULN（>35%直接膽紅素）或ALT≥3×ULN和國際標準化比值（INR）>1.5的所有事件，如果測量的INR可能指示嚴重肝損傷（可能的海氏定律），則必須報告為SAE。

表20 - 方案要求的評估

實驗室評估	**參數**			
次級血漿細胞激素	IL-6 IL-10	IL-1β TNFα	IL-2	IL-8
PK細胞激素（細胞激素RNA混合物編碼的細胞激素的表現）	IL-12sc	IFNα	IL-15sushi	GM-CSF
PDy細胞激素	IP-10	IFNγ		
PDy抗原特異性T-細胞評估	針對良好表現的免疫原性黑色素瘤相關抗原的CD4/CD8 T細胞應答[a]		HLA表型	
腫瘤突變狀態	TMB[b]			
組合療法的安全性標誌物	TSH	游離T4	ANA	RF
免疫原性	針對由該細胞激素RNA混合物編碼的細胞激素的抗體（即針對IL-12sc、IFNα、IL-15sushi和GM-CSF的ADA）和針對西米單抗的抗體			
用於免疫評估	標準IHC（所有參與者）[c]		多重IHC（參與者子集）[c]	

的腫瘤生物檢體	CD3	CD8	SOX10或CK[d]	CD3	CD4	CD8
				CD38	CD45	CD45RO
	CD68	PD-L1		CD56	CD68	FoxP3
				GZMB	CSF-1R	LAG-3
				PD-1	PD-L1	SOX10或CK[d]
尿液生物標誌物	KIM-1尿肌酐			尿微量白蛋白		

a 對於組合療法，將僅在群組A（抗PD-1/PD-L1療法已經失敗的黑色素瘤參與者）中進行該等評估。

b 在本研究的組合療法部分將評估TMB。對於進行單一療法的患者，可以考慮對剩餘樣本進行此分析。

c 有關在研究的單一療法和組合療法部分中要評估的單一和多重IHC組的描述，參見實例1.8B。

d SOX10係檢測黑色素瘤腫瘤細胞的標誌物；對於上皮腫瘤（HNSCC和CSCC），它將由廣譜細胞角蛋白（CK）替代。

實例1.12 - 避孕指導和妊娠資訊收集

【0645】 有生育潛力的女性（WOCBP）：有生育潛力的女性係有以下情況的女性：

1. 在某個時間點已達到了初潮，

2. 未接受過子宮切除術或雙側卵巢切除術，或

3. 未自然絕經（癌症療法後閉經不排除生育潛力）至少連續24個月（即，在過去24個月內的任何時候有過月經）。

【0646】 避孕指導

- 男性參與者
  - o 如果男性參與者與有生育潛力的女性伴侶同意在干預期間和最後一次研究干預後的6個月內滿足以下中的一項，則符合參加的條件：
    - 戒除陰莖-陰道性交作為慣常和偏愛的生活方式（長期和持續性地戒除），並同意保持禁欲

- 與目前未懷孕的有生育潛力的女性進行陰莖-陰道性交時，同意使用男用避孕套加如下所述之每年失敗率 < 1%的伴侶用避孕方法

o 此外，男性參與者必須在研究期間和最後一個劑量的研究干預後的6個月內不捐獻精子

o 在干預期間和最後一個劑量的研究干預後的6個月內，每次有陰莖插入的情況下，有懷孕或母乳餵養伴侶的男性參與者必須同意不進行陰莖陰道性交或者使用男性避孕套。有妊娠期或哺乳期伴侶的男性參與者必須同意戒除陰莖陰道性交或在每次陰莖插入期間保持使用男用避孕套。

- 女性參與者

o 有生育潛力的女性參與者如果同意始終正確地使用如下所述之一種高效的避孕方法，則符合參加的條件：

【0647】 **使用者依賴性的高效避孕方法**：*如果始終正確使用，每年的失敗率 < 1%。*

i) 與排卵抑制有關的組合（含雌激素和孕激素）激素避孕：口服，陰道內或透皮

ii) 與排卵抑制有關的僅孕激素的激素避孕：口服或注射

【0648】 **非使用者依賴性的高效方法：**

iii) 與排卵抑制有關的僅植入孕激素的激素避孕：宮內節育器（IUD）、宮內激素釋放系統（IUS）或雙側輸卵管阻塞

【0649】 伴侶輸精管切除：伴侶輸精管切除係一種高效的避孕方法，只要該伴侶係WOCBP的唯一男性性伴侶，並且已經確認沒有精子。如果不是，則使用另一種高效的避孕方法。

【0650】 性節制：只有將性節製定義為在與研究干預有關的風險存在的整個期間避免異性性交，才認為性節制係一種高效之方法。根據研究的持續時間以及參與者的偏愛和慣常生活方式來評估性節制的可靠性。

【0651】 備註：典型的使用失敗率可能與始終正確使用時的失敗率不同。使用應符合當地有關參加臨床研究的參與者使用避孕方法的規定。激素避孕可能容易與研究干預相互作用，這可能會降低避孕方法的有效性。在這種情況下，在干預期間以及最後一個劑量的研究干預後至少6個月內，採用兩種高效的避孕方法。口服激素避孕可能容易與研究干預相互作用，這可能會降低避孕方法的有效性。在這種情況下，如果口服避孕藥不能用另一種不同施用路徑的高效避孕方法代替，則在干預期間和最後一劑的研究干預後至少6個月內，必須以男性避孕套（供伴侶用）補充激素避孕方法。

【0652】 妊娠測試：僅在確定月經期和高敏血清妊娠測試陰性後才納入WOCBP。在干預期間的每個治療週期開始時和EOT進行附加的妊娠測試。每當錯過月經週期或懷疑懷孕時，都會進行妊娠測試。根據當地的實驗室程序進行妊娠測試。在參加研究時懷孕的任何女性參與者都應中止研究干預，並退出研究。

【0653】 妊娠資訊的收集：

【0654】 伴侶已懷孕的男性參與者 - 研究者嘗試收集任何男性參與者的女性伴侶在該男性參與者參加本研究期間懷孕的妊娠資訊。這僅適用於接受細胞激素RNA混合物的男性參與者。在直接從懷孕的女性伴侶處獲得必要的簽字的知情同意書後，研究者會在適當的表格上記錄妊娠資訊，並在得知該伴侶的妊娠資訊後24小時內將其提交給申辦方。還要隨訪該女性伴侶以確定妊娠結果。有關母嬰狀態的資訊將轉發給申辦方。通常，隨訪時間不超過估計的分娩日期後的6至8週。對於任何妊娠終止，不論胎兒狀況（有無異常）或是否指示需要手術，都將進行報告。

【0655】 懷孕的女性參與者 - 研究者收集在參加本研究期間懷孕的任何女性參與者的妊娠資訊。資訊記錄在適當的表格上，並在得知參與者妊娠資訊後的24小時內提交給申辦方。隨訪該參與者以確定妊娠結果。研究者將收集有關參與者和新生兒的隨訪資訊，並將該等資訊轉發給申辦方。通常，隨訪時間不需要超過估計的分娩日期後的6至8週。對於任何妊娠終止，不論胎兒狀況（有無異常）或是否指示需要手術，都進行報告。任何妊娠併發症或選擇性終止妊娠均報告為AE或SAE。自發流產通常認為係SAE並將按此報告。研究者認為與研究干預合理相關的任何研究後妊娠相關的SAE均應報告給申辦方。儘管研究者沒有義務在以前的研究參與者中主動尋求該資訊，但他或她可能會藉由自發報告瞭解到SAE。

【0656】 任何女性參與者在參加研究期間懷孕都會中止研究干預，並退出研究。

實例1.13 - 針對藥物相關不良事件的推薦支持性護理或劑量修改指南

表21 - 基於CTCAE v.5.0的超敏反應分級系統和緩解策略

嚴重程度	根據CTCAE v.5.0的等級	毒性	干預
輕度超敏反應	「過敏反應」1級	短暫的潮紅或皮疹，發燒 < 38°C（< 100.4°F）	未指示全身干預。根據研究者密切直接監測參與者後的判斷繼續治療。 如果認為必要，可以隨時停止治療。沒有指示干預，但只有在參與者康復並繼續密切監測後才能重新開始治療。
中度超敏反應	「過敏反應」2級	中度超敏反應，對對症治療迅速反應	停止治療；指示預防性口服干預≤24小時（例如，抗組胺藥、NSAID）。 只有在參與者康復*後、密切監測下以及研究委員會評估之

			後，才能重新開始治療。
*如果參與者從對西米單抗的輸液相關反應[a]中恢復，則以原始比例的50%施用西米單抗。 對於實施預防性前驅用藥後發生的復發性2級事件，確定地停止使用西米單抗。			
嚴重/危及生命的超敏反應	「過敏反應」 3級和4級	3級 - 症狀性支氣管痙攣，伴有或沒有蕁麻疹；指示腸胃外干預；過敏相關性水腫/血管性水腫；低血壓 4級，除3級症狀外，還會威脅生命	**確定中止治療（停止治療）。** 指示緊急干預。 臨床後遺症指示住院治療。指示靜脈內干預。 根據需要使用苯海拉明25 mg IV（或等效劑量）和/或甲基強的松龍100 mg IV（或等效劑量）和/或腎上腺素給予附加藥物治療。
如果毒性係由於對西米單抗的輸注相關反應引起的，確定**地終止使用西米單抗**。 是否繼續細胞激素RNA混合物治療應基於風險受益評估逐個病例評估。 與輸注相關的反應定義為在西米單抗輸注過程中或輸注完成後24小時內發生的任何AE。 如本文所述，必要時應停止西米單抗的輸注。			
嚴重/危及生命的超敏反應	「過敏症」 3級和4級	症狀性支氣管痙攣，伴有或沒有蕁麻疹；指示腸胃外干預；過敏相關性水腫/血管性水腫；低血壓。 4級會造成危及生命的後果。	**確定中止治療（停止治療）。** 指示緊急干預。 根據需要使用苯海拉明25 mg Iv（或等效劑量）和/或甲基強的松龍100 mg IV（或等效劑量）和/或腎上腺素給予附加藥物治療。

【0657】 **CRS的症狀、分級和管理**

【0658】 與CRS相關的臨床體徵和症狀

- 心血管：心動過速、脈壓增寬、低血壓、心輸出量增加（早期）、心輸出量潛在減少（晚期）

- 凝血：D-二聚體升高、低纖維蛋白原血症±出血
- 胃腸道：噁心、嘔吐、腹瀉
- 一般：發燒±寒顫、心神不安、疲勞、厭食、肌痛、關節痛、頭痛
- 肝：轉胺酶、高膽紅素血症
- 神經病學：頭痛、精神狀態改變、意識錯亂、譫妄、喚詞困難或坦率失語、幻覺、震顫、辨距不良、步態改變、癲癇發作
- 腎髒：氮血症
- 呼吸：呼吸急促、低氧血症
- 皮膚：皮疹

【0659】 表22提供了CRS的分級和管理。

表22 - 基於2014 NCI共識指南的CRS分級系統和緩解策略

分級	毒性	干預
1級	• 發燒，伴有或沒有全身症狀（噁心、疲勞、頭痛、肌痛、心神不安，無危及生命的併發症）	• 保持警覺的支持性護理。 • 評估並治療感染（如果存在）。 • 體液補充。 • 必要時提供退燒藥和止痛藥
2級	• 氧氣需求< 40% FiO2 • 對小劑量或單一升壓藥有反應的低血壓 • 2級器官毒性	• 與1級一樣，但密切監測心臟和其他器官功能 • 對於高齡或多種合併症的參與者，考慮使用皮質類固醇和/或抗IL6療法 • 研究委員會應逐個病例評估是否繼續研究干預
3級	• 氧氣需求> 40% FiO2 • 對大劑量或多種升壓藥有反應的低血壓 • 3級器官毒性 • 4級ALT或AST升高	• 與2級一樣，但增加了皮質類固醇和/或抗IL6療法 • **確定中止治療（停止治療）**
4級	• 威脅生命的症狀 • 機械通氣的要求。 • 4級器官毒性，排除ALT或AST上升	• 與2級一樣，但增加了皮質類固醇和/或抗IL6療法 • **確定中止治療（停止治療）**
5級	• 死亡	

【0660】 其他不良事件指南

【0661】 表23提供了眼色素層炎管理的指南；請注意，已盡一切努力排除其他原因，例如轉移性疾病、感染或其他眼部疾病（例如青光眼或白內障）。

【0662】 表24為歸因於該細胞激素RNA混合物的不良事件提供了指導和支持性護理策略。

【0663】 此外，特別是對於本研究的組合部分，如果報告的不良事件被認為與一種IMP有關，根據本研究的單一療法部分可獲得的數據，並且如果基於當前的逐個病例的效益-風險評估認為繼續使用該IMP係對該參與者最佳的選擇，則停止相關的IMP並繼續使用另一種IMP進行研究干預。對於可能被認為與西米單抗相關的irAE的管理，遵循了西米單抗IB和美國國家綜合癌症網路（NCCN）關於「免疫療法相關毒性（免疫檢查點抑制劑相關毒性）的管理」的指南（可在www.nccn.org獲取）。

【0664】 對於發生在48至72小時內對類固醇無反應的嚴重irAE的參與者，應與相關醫學專家協商，以確保及早（即，72小時內）開始抗TNFα療法。

表23 - 眼科（眼色素層炎）AE管理

眼色素層炎 CTCAE v5.1	細胞激素混合物給藥管理	西米單抗給藥管理	措施與指南
1級（輕度）	繼續免疫療法		開始人工淚液，並諮詢眼科醫生。 用局部類固醇治療，諸如1%潑尼松龍混懸液。

眼色素層炎 CTCAE v5.1	細胞激素混合物給藥管理	西米單抗給藥管理	措施與指南
			緊急諮詢眼科醫生
2級（前眼色素層炎）	劑量無變化	推遲治療直至恢復至1級。如果使用局部免疫抑制療法症狀仍持續，並且在再治療期內未改善至1級或需要全身治療，請中止治療。	眼科醫生指導之治療包括眼科和全身性皮質類固醇激素。
≥3級（後眼色素層炎或全眼色素層炎）	延遲或省略劑量直至≤2級	中止治療	緊急諮詢眼科醫生 眼科醫生指導之治療包括眼科和全身性皮質類固醇激素。當症狀改善至≤1級時，開始逐漸減少類固醇激素，並繼續不少於4週。

盡一切努力排除其他原因，例如轉移性疾病、感染或其他眼部疾病（例如青光眼或白內障）。

【0665】

表24：不良事件和劑量修改的支持性護理指導

說明	等級	支持性護理/治療	IMP給藥管理
注射部位反應	1至2級	症狀（例如，疼痛、紅斑、腫脹、疊加細菌感染）之治療。	如果可行，請避免注射相同的病變，否則需要完全恢復才能注射相同的病變。
	3至4級	指示手術干預。	對於3級或4級事件，確定地終止治療。

說明	等級	支持性護理/治療	IMP給藥管理
乾眼症（眼瞼萎縮）	最小化	• 基線Schirmer測試 • 在每次訪視時監測參與者的眼部症狀和體徵。	
	2級（有症狀）	眼科醫生諮詢和多藥物治療。	沒有劑量修改
	3級	眼科醫生諮詢和多藥物治療。	• 省略劑量，直到恢復至≤1級 • 如果發生3級復發事件；確定中止細胞激素RNA混合物的施用
肝炎	2級，且AST或ALT > 3至5 x ULN（如果基線異常，> 3.0至5.0 x 基線），或總膽紅素> 1.5至3 x ULN（如果基線異常，> 1.5至3.0 x 基線）	• 每3天重新檢查一次肝酶、膽紅素和白蛋白。 • 審查可能相關的藥物（他汀類藥物、抗生素、飲酒等）。 • 病毒血清學。 • 考慮對轉移性疾病進行影像學檢查。	保留直到恢復至＜1級
	3級：AST或ALT > 5.0至20.0 x ULN（如果基線異常，則 > 5.0至20.0 x 基線）	• 同上，但每天重複進行肝酶、膽紅素和白蛋白檢測。 • 用多普勒儀執行USG。	• 暫停治療，直至恢復至≤1級或基線值。 • 如果確認與IMP有關，可以由研究委員會討論是否重新挑戰。如果再次發生G3事件，則永久中止。
	4級AST或ALT > 20.0 x ULN（如果基線異常，則 > 20.0 x 基線）	除了3級外，還有： • 肝病學諮詢 • 在參與者病症合適的情況下考慮進行肝生物檢體	確定中止細胞激素RNA混合物的施用。

說明	等級	支持性護理/治療	IMP給藥管理
急性腎臟損傷 理論風險： 腎皮質小管的退化/再生 肌酐上升：	最小化	弱勢群體包括患有糖尿病、嚴重的冠狀動脈或周圍血管疾病以及接受腎毒性藥物治療的參與者。急性腎小管壞死的預防包括維持血容量、避免使用腎毒性藥物、以及必要時用升壓藥支持血壓。 • 密切監測參與者是否有腎臟損傷的體徵和症狀；對於弱勢群體（即患有糖尿病、嚴重的冠狀動脈或周圍血管疾病以及接受腎毒性藥物治療的參與者）需要特殊護理。 • 即時檢測化學參數；維持血容量、避免使用腎毒性藥物、以及必要時用升壓藥支持血壓。 • 為進行生物標誌物Kim-1的探索性測量以及在有肌酐升高或其他腎臟損傷體徵時收集尿液樣本。	
	1級 - 肌酐 > 1至1.5 x 基線；> ULN至1.5 x ULN	如果MDRD計算得出的GFR > 60 mL/min；不採取措施。 如果計算的GFR在40-60 mL/min之間，評價24小時尿液測試（GFR、蛋白質、電解質）。 如上所述對症治療。	如果MDRD計算得出的GFR > 60 mL/min；沒有劑量修改。 GFR < 40 mL/min時，如果對症治療不能改善事件，則延遲週期並考慮中止研究干預。

說明	等級	支持性護理/治療	IMP給藥管理
	2級 - 肌酐比基線高1.5至3倍；> 1.5至3.0 x ULN	如上所述對症治療。	如果事件持續> 7天或惡化，則延遲細胞激素RNA混合物並永久中止。
	• 3級：肌酐> 3 x 基線；> 3.0至6.0 ULN • 4級：肌酐> 6.0 ULN（如果有危及生命的後果，報告為4級急性腎臟損傷）	指示住院治療；可以考慮使用臨時透析來平衡體液和電解質。 指示透析。 如果可能，推薦進行腎臟生物檢體以確保發病機理。	3至4級：中止使用細胞激素RNA混合物。
免疫介導的事件(根據NCI CTCAE v5.0分級進行每個事件的分級） 肺炎 甲狀腺功能減退	最小化：	• 排除潛在的自體免疫性疾病參與者。 • 監測參與者的體徵和症狀。	
-	1級（自體免疫性疾病的無症狀、血清學或其他證據）	無干預，對症管理。	1級-無劑量修改。
-	2級（中度症狀）	指示醫療干預。	2級-無劑量修改。
-	3級（指示嚴重症狀醫療干預和/或住院）	在有主要器官受累（例如肺炎）時，用甲基強的松龍1-2 mg/kg/天進行脈衝；可能指示附加免疫抑制療法	3級 - 延遲劑量直至症狀消退至≤1級事件；如果3級事件導致 > 1劑量遺漏，則確定中止治療。

說明	等級	支持性護理/治療	IMP給藥管理
-	4級（危及生命）		確定中止。
為了協調臨床部位局部腫瘤反應的報告，在細胞激素mRNA混合物瘤內注射後，注射和非注射病變內腫瘤（皮膚、皮下或淋巴結腫瘤）炎症的任何局部體徵將使用CTCAE 5.0版項目報告：皮膚和皮下組織或「注射部位反應」。			

實例1.14 - 實性瘤反應評價標準1.1版

【0666】 在Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R等人 New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). Eur J Cancer. 2009年1月; 45(2):228-47中提供了詳細資訊。

【0667】 **基線時腫瘤的可測量性**

【0668】 在基線，將腫瘤病變/淋巴結分類為可測量或不可測量，如下所述。

【0669】 在最少1個維度（要記錄的測量平面中的最大直徑）上準確測量可測量的病變，最小尺寸為：

- 藉由CT掃描測量的10 mm（CT掃描切片厚度不大於5 mm）。
- 藉由臨床檢查卡尺測量10 mm（使用卡尺無法準確測量的病變應記錄為不可測量的）。
- 藉由胸部X光檢查測量的20 mm。

【0670】 惡性淋巴結：淋巴結藉由CT掃描評估的短軸長度必須≥ 15 mm（推薦CT掃描的切片厚度不大於5 mm）方可認為係病理上可擴大的和可測量的。在基線時和隨訪中，僅測量和跟蹤短軸。

【0671】 不可測量的病變係所有其他病變，包括小病變（最長直徑 < 10 mm或短軸長度≥10至<15 mm的病理淋巴結）以及不可測量的病變。被認為不可測量的病變包括：皮膜腦病、腹水、胸膜或心包積液、炎性乳腺疾病、皮膚或肺部的淋巴管性受累、藉由物理檢查鑒定的無法藉由可再現的成像技術測量的腹部腫塊/腹部器官腫大。

【0672】 **有關病變可測量性的特殊注意事項：**

【0673】 **骨病變：**

- 骨掃描、正電子發射斷層掃描或平片不認為係測量骨病變的適當成像技術。但是，該等技術可用於確認骨病變的存在或消失。
- 如果軟組織成分符合上述可測量性的定義，則可以藉由CT或MRI等橫截面成像技術評價的具有可鑒定軟組織成分的溶骨性病變或混合溶骨-增生性病變可視為可測量的病變。
- 增生性骨病係不可測量的。

【0674】 **囊性病變：**

- 符合放射學定義的簡單囊腫標準的病變不被認為係惡性病變（既不是可測量的也不是不可測量的），因為從定義上講它們係簡單囊腫。
- 如果代表囊性轉移的「囊性病變」符合上述可測量性的定義，則可以認為係可測量的病變。但是，如果同一患者中存在非囊性病變，則較佳的是將該等作為目標病變。

【0675】 **先前接受過局部治療的病變：**

- 除非已證實病變進展，否則位於先前受過照射的區域或接受其他局部療法的區域的腫瘤病變通常被認為係無法測量的。

【0676】 **評估方法**

【0677】 所有測量均以度量符記錄，並且如果臨床評估，則使用卡尺。所有基線評估均應在距治療開始時盡可能近的時間進行，並且切勿在治療開始前超過4週進行。

【0678】 在基線時和隨訪期間，使用相同的評估方法和相同的技術來表徵每個已鑒定和報告的病變。始終執行基於影像的評估而不是臨床檢查，除非所跟蹤的病變無法成像但可以藉由臨床檢查評估。

【0679】 **臨床病變：**只有使用卡尺評估的臨床病變係淺表的且直徑 ≥ 10 mm時才被認為係可測量的。對於皮膚病變，建議藉由彩色攝影記錄，包括尺規，以估計病變的大小。如上所述，當病變既可以藉由臨床檢查又可以藉由影像學

評估時，可以進行影像學評估，因為它更加客觀，並且可以在研究結束時進行複查。

【0680】 **胸部X光片**：胸部CT優於胸部X射線，特別是在進展係重要的終點時，因為CT比X射線更敏感，特別是在鑒定新病變方面。但是，如果胸部X線的病變清晰界定並被充氣的肺包圍，則認為係可測量的。

【0681】 **CT、MRI**：CT係用於測量選擇用於反應評估的病變的現有最好的且可再現之方法。CT掃描上病變的可測量性基於CT切片厚度為5 mm或更小的假設。當CT掃描的切片厚度大於5 mm時，可測量病變的最小尺寸應為切片厚度的兩倍。

【0682】 **超音波檢查**：超音波在評估病變大小方面沒有用，因此不應用作測量方法。如果在研究過程中藉由超音波發現了新的病變，則建議藉由CT或MRI進行確認。

【0683】 **內視鏡、腹腔鏡**：不建議將該等技術用於客觀腫瘤評估。

【0684】 **腫瘤標誌物**：單獨的腫瘤標誌物不能用於評估客觀的腫瘤反應。

【0685】 **細胞學、組織學**：如果方案要求，在極少數情況下，可以使用該等技術來區分PR和CR。

【0686】 **FDG PET-CT/CT掃描**：大約每12週在淋巴瘤患者中進行一次，以確認CR或PD。

【0687】 **「目標」和「非目標」病變的基線記錄**

【0688】 當基線時存在超過1個可測量的病變時，代表所有累及器官的共計最多5個病變（每個器官最多2個病變）的所有病變應被鑒定為目標病變，並將在基線進行記錄和測量。

【0689】 根據目標病變的大小（直徑最長的病變）選擇目標病變，代表所有涉入器官，並使其可再現重複測量。

【0690】 淋巴結值得特別提到係因為它們係正常的解剖結構，即使沒有涉入腫瘤也可以藉由攝影看到。定義為可測量的並可能被鑒定為目標病變的病理結

節必須滿足CT掃描短軸 ≥ 15 mm的標準。僅該等結節的短軸構成基線和。所有其他病理結節（短軸≥10 mm但＜15 mm的結節）均不應視為非目標病變。短軸＜10 mm的結節被認為係非病理性的，不應記錄或跟蹤。

【0691】 計算所有目標病變的直徑總和（非結節病變最長軸，淋巴結短軸），並將其報告為基線直徑和。基線直徑和用作參考，以進一步表徵疾病可測量範圍內的任何客觀腫瘤消退。

【0692】 包括病理性淋巴結在內的所有其他病變（或疾病部位）均被鑒定為非目標病變，並且也在基線時記錄。不需要進行測量，該等病變以「存在」、「不存在」或「明確進展」進行跟蹤。另外，有可能將與同一器官相關的多個非目標病變記錄為病例中的單一項目（例如，「多個盆腔淋巴結腫大」或「多個肝轉移」）。

【0693】 **反應標準**在表25中進行了描述。

表25 - 反應標準

反應標準	目標病變評價
CR	所有目標病變消失。任何病理性淋巴結（無論是目標還是非目標）的短軸都必須減小至＜10 mm。
PR	以基線總和直徑為參考，目標病變的直徑總和至少減少30%。
PD	在研究時以最小總和作為參考（如果研究中基線總和最小，則包括基線總和），目標病變直徑總和至少增加20%。除了20%的相對增加外，該總和還必須顯示至少5 mm的絕對增加。（備註：1種或多種新病變的出現也被視為進展）。
SD	在研究時以最小的直徑總和作為參考，既沒有足以評定PR的自基線研究的縮減，也沒有足以評定PD的增加。

縮寫：CR = 完全反應；PD = 疾病進展；PR = 部分反應；SD = 疾病穩定。

【0694】 **關於目標病變評估的特別說明**

【0695】 識別為目標病變的淋巴結始終記錄實際的短軸測量值，並且在與基線檢查相同的解剖平面中進行測量，即使在研究中該等淋巴結退化到10 mm以下也是如此。這意味著當淋巴結被作為目標病變時，即使滿足CR標準，病變的「和」也可能不會為零，因為正常淋巴結的定義為短軸＜10 mm。對於PR、SD和PD，該等結節的實際短軸測量應包括在目標病變的總和中。

【0696】 變得「太小而無法測量」的目標病變：在基線處記錄的所有病變（淋巴結和非淋巴結）都應在每次後續評估中記錄其實際測量值，即使很小（例如2 mm）。但是，有時在基線CT掃描時被記錄為目標病變的病變或淋巴結變得非常微弱，以至於放射科醫生可能不願意分配精確的測量值，並且可能會將它們報告為「太小而無法測量」。發生這種情況時，在CRF上記錄一個值很重要。如果放射科醫生認為病變可能已經消失，則將測量記錄為0 mm。如果認為該病變存在並且隱約可見，但是太小而無法測量，則將分配5 mm的預設值。

【0697】 當非淋巴結病變「碎片化」時，將碎片部分的最長直徑加在一起以計算目標病變總和。類似地，當病變合併時，在它們之間保持一個平面，該平面將有助於獲得每個單個病變的最大直徑測量值。如果病變已真正合併，以致它們不再可分離，則在這種情況下，最長直徑的向量就是「合併病變」的最大最長直徑。

【0698】 **非目標病變的評價**

【0699】 雖然一些非目標病變可能是可測量的，但無需測量它們，而僅在方案中指定的時間點進行定性評估。

【0700】 **CR**：所有非目標病變消失，腫瘤標誌物水平正常化。所有淋巴結都必須是非病理性的大小（短軸 < 10 mm）。

【0701】 **非CR/非PD**：1個或多個非目標病變的持續存在和/或腫瘤標誌物水平維持在正常範圍以上。

【0702】 **疾病進展**：現有非目標病變的明確進展。（備註：出現1個或多個新病變也被視為進展）。

【0703】 非目標疾病進展的概念需要以下補充說明：

【0704】 當參與者也有可測量的疾病時；在這種情況下，要達到基於非目標疾病的「明確進展」，非目標疾病的總體水平必須顯著惡化，以使即使在目標疾病中存在SD或PR的情況下，整體腫瘤負荷已經增加到需要中止療法的水平。1個或多個非目標病變的大小適度的「增加」通常不足以評定其明確的進展狀態。

【0705】 當參與者只有不可測量的疾病時；為了實現基於非目標疾病的「明確進展」，必須使總體水平顯著惡化，以使總體腫瘤負荷增加到需要中止療法的水平。1個或多個非目標病變的大小適度的「增加」通常不足以評定其明確的進展狀態。由於非目標疾病的惡化無法輕易量化（藉由定義：如果所有病變都確實不可測量），在評估患者的明確進展時可以應用的有用測試係考慮基於不可測量疾病的總體疾病負荷的增加在數量級上與宣佈可測量疾病的PD所需的增加是否相當：也就是說，腫瘤負荷的增加表示「體積」增加了73%（相當於可測量病變的直徑增加了20%）。實例包括胸腔積液從「痕量」增加到「大量」，淋巴管疾病從局部增加到大範圍，或者在方案中被描述為「足以要求療法改變」。如果觀察到「明確的進展」，則認為該患者當時總體PD。

【0706】 **新病變**

【0707】 新出現的惡性病變表示疾病進展。新病變的發現應係明確的：即，並非歸因於掃描技術的差異，成像方式的變化或被認為代表腫瘤以外的其他病變的發現（例如，一些「新」骨病變可能只係癒合或原有病變的惡化）。當參與者的基線病變顯示PR或CR時，這一點特別重要。例如，肝臟病變壞死可能在CT掃描報告中報告為「新的」囊性病變，而它並不是。

【0708】 在隨訪研究中在基線時未掃描的解剖位置發現的病變被認為係新病變，表明疾病進展。這樣的一個實例係患者在基線時患有內臟疾病，並且在研究期間已安排了大腦CT或MRI，顯示發生轉移。即使參與者在基線時沒有進行腦部影像學檢查，也被認為構成PD。

【0709】 如果一個新的病變係可疑的（例如由於其較小），則繼續療法和後續評估可明確其是否代表新疾病。如果重複掃描確認存在新病變，則使用初始掃描的日期宣佈進展。

【0710】 儘管氟去氧葡萄糖-正電子發射斷層掃描（FDG-PET）反應評估需要進一步研究，但有時在評估進展（特別是可能的「新」疾病）時，結合FDG-PET掃描來補充CT掃描係合理的。根據以下演算法鑒定基於FDG-PET成像的新病變：

A. 基線時FDG-PET陰性，而隨訪時FDG-PET陽性係基於新病變的PD的體徵。

B. 基線時無FDG-PET，隨訪時FDG-PET呈陽性：

如果隨訪時FDG-PET陽性對應於藉由CT確認的新疾病部位，則為PD。

如果在隨訪中未將陽性的FDG-PET在CT上確認為新病變，則需要進行附加隨訪CT掃描以確定該部位是否確實發生進展（如果係，則PD的日期將是首次異常FDG-PET掃描的日期）。如果在隨訪時FDG-PET陽性對應於CT上先存疾病部位，其根據解剖學影像尚未進展，則不是PD。

【0711】 **最佳總體反應的評價**

【0712】 時間點反應：應在方案指定的每個時間點進行反應評估。表26總結了基線時患有可測量疾病的患者在每個時間點的總體反應狀態計算。

表26 - 目標疾病患者的反應

目標病變	非目標病變	新病變	總體反應
CR	CR	否	CR
CR	非CR/非PD	否	PR
CR	未評價	否	PR
PR	非PD或未全部評價	否	PR
SD	非PD或未全部評價	否	SD
未全部評價	非PD	否	不可評價
PD	任何	是或否	PD
任何	PD	是或否	PD
任何	任何	是	PD

縮寫：CR = 完全反應；PD = 疾病進展；PR = 部分反應；SD = 疾病穩定。

【0713】 當患者僅具有不可測量的（因此為非目標）疾病時，將使用表27。

表27 - 僅有非目標疾病的患者的反應

非目標病變	新病變	總體反應
CR	否	CR
非CR/非PD	否	非CR/非PD
未全部評價	否	不可評價
明確的PD	是或否	PD
任何	是	PD

縮寫：CR = 完全反應；PD = 疾病進展；PR = 部分反應；SD = 疾病穩定。

【0714】 缺少評估和不可評價的標定：如果在特定時間點根本不進行任何成像/測量，則該時間點的患者不可評價（NE）。

【0715】 如果在評估時僅進行一個子集的病變測量，通常在該時間點也將這種情況視為NE，除非可以令人信服地論證這一個或多個單個缺失病變的貢獻不會改變分配的時間點反應。對於PD，這種情況最有可能發生。如果在特定時間點根本不進行任何成像/測量，則該時間點的患者為NE。

【0716】 如果在評估時僅進行一個子集的病變測量，通常在該時間點也將這種情況視為NE，除非可以令人信服地論證這一個或多個單個缺失病變的貢獻不會改變分配的時間點反應。對於PD，這種情況最有可能發生。

【0717】 **關於反應評估的特別說明**

【0718】 當目標病變的總和中包括結節病並且該等結節縮小至「正常」大小（< 10 mm）時，可能仍會在掃描中報告測量結果。即使結節係正常的，也要記錄該測量結果，以免過分誇大進展（如果它係基於結節大小的增加）。如前所述，這意味著CR的患者在CRF上的總和可能不會為「零」。

【0719】 在需要確認反應的試驗中，重複的「NE」時間點評估可能會使最佳反應的確定更加複雜。該試驗的分析計畫必須解決在確定反應和進展時如何解決缺失的數據/評估。例如，在大多數試驗中，將具有PR-NE-PR時間點反應的患者視為確認反應係合理的。

【0720】 健康狀況全面惡化而需要中止治療而當時無疾病進展的客觀證據的患者報告為「症狀惡化」。即使中止治療，也應盡一切努力記錄客觀進展。有症狀的惡化不是客觀反應的描述語：它係停止研究療法的原因。

【0721】 藉由評價目標疾病和非目標疾病來確定此類患者的客觀反應狀態。對於進展的可疑的發現（例如，非常小的和不確定的新病變；囊性變化或現有病變的壞死），治療可能會繼續到下一次計畫的評估。如果在下一次計畫的評估中確認進展，則進展日期係懷疑進展的較早日期。

【0722】 **反應持續時間**

【0723】 從首次滿足CR/PR的測量標準（以最先記錄的為准）到客觀記錄復發或PD的第一個日期（在研究時將記錄的最小測量值作為PD的參考）的時間，測量總體反應的持續時間。

【0724】 從首次滿足CR的測量標準直到客觀記錄疾病復發的第一個日期，一直測量總CR的持續時間。

【0725】 從治療開始到達到進展標準為止，測量疾病穩定，在研究時將最小和作為參考（如果基線和最小，則這係計算PD的參考）。

【0726】 與RECIST指南有關的非限制性描述參見Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J等人 New response evaluation criteria in solid tumours: Revised RECIST guideline (version 1.1). Eur J Cancer. 2009; 45:228-47，其全部內容藉由引用併入本文。

實例1.15 - 實性瘤中基於免疫的治療的改良的反應評價標準

【0727】 詳細資訊參見Seymour L, Bogaerts J, Perrone A, Ford R, Schwartz LH, Mandrekar S等人 iRECIST: guidelines for response criteria for use in trials testing immunotherapeutics. Lancet Oncol. 2017年3月；18(3): e143-52。

表28 - 實性瘤反應評價標準（RECIST）1.1與改良的基於免疫的療法中實性瘤反應評估標準（iRECIST）的比較

	RECIST 1.1	**iRECIST**
可測量和不可測量疾病的定義；目標疾病的數量和部位	可測量的病變直徑 ≥ 10 mm（淋巴結病變 ≥ 15 mm）；最多5個病變（每個器官2個）；所有其他疾病均視為非目標疾病（淋巴結疾病的短軸必須 ≥ 10 mm）	與RECIST 1.1相同；但是，新病變根據RECIST 1.1進行評估，但單獨記錄在病例報告表中（但不包括基線時確定的目標病變的病變總數）
完全反應、部分反應或疾病穩定	在完全反應、部分反應或疾病穩定之前無法達到進展標準	在iCR、iPR或iSD之前可以有iUPD（一例或多例），但沒有iCPD

	RECIST 1.1	iRECIST
完全反應或部分反應的確認	僅在非隨機試驗中需要	根據RECIST 1.1
疾病穩定的確認	不需要	根據RECIST 1.1
新病變	導致進展；記錄但未測量	導致iUPD，但只有在下次評估時出現新的新病變或發現新病變的大小增加（新目標病變總和≥5 mm或新非目標病變的任何增加）時，才根據該類別分配iCPD；如果以前未記錄任何新病變，則也可以確認iCPD
獨立的盲審和中心掃描集合	在一些情況下推薦 - 例如，在為獲得上市批准而規劃基於進展的終點的一些試驗中	為所有試驗推薦的掃描集合（但不進行獨立審查）
進展確認	不需要（除非可疑）	需要
考慮臨床狀況	不包括在評估中	在決定iUPD後是否繼續治療時考慮臨床穩定性

「i」表示使用iRECIST分配的免疫反應。
縮寫：iCPD = 確認進展；iCR = 完全反應；iPR = 部分反應；iSD = 疾病穩定；iUPD =未確認的進展；RECIST =實性瘤反應評價標準

表29 - 使用改良的基於免疫的療法中實性瘤反應評價標準（iRECIST）對時間點反應的評估

目標病變	非目標病變	新病變	沒有任何類別的先前iUPD的時間點反應	有任何類別的先前iUPD的時間點反應
iCR	iCR	否	iCR	iCR
iCR	非iCR/非iUPD	否	iPR	iPR
iPR	非iCR/非iUPD	否	iPR	iPR
iSD	非iCR/非iUPD	否	iSD	iSD
iUPD無變化，或	iUPD無變化，或與	是	不適用	如果先前鑒定出新病變，並且新病變的大小（新病

與上一個時間點相比有所減少	上一個時間點相比減少			變目標的量度總和≥ 5 mm，新病變非目標的任何增加）或數量增加，則新病變確認iCPD；如果從上一個時間點開始，新病變（大小或數量）沒有變化，則分配仍為iUPD
iSD、iPR、iCR	iUPD	否	iUPD	除非基於非目標疾病的大小進一步增加而確認iCPD（無需滿足RECIST 1.1標準的明確進展），否則仍為iUPD
iUPD	非iCR/非iUPD或iCR	否	iUPD	除非基於測量的總和進一步增加 ≥ 5 mm確認了iCPD，否則仍為iUPD；其他情況，分配仍為iUPD
iUPD	iUPD	否	iUPD	除非根據先前確定的目標病變iUPD進一步增加 ≥ 5 mm或非目標病變iUPD進一步確認iCPD，否則仍為iUPD（先前的評估無需顯示明確進展）
iUPD	iUPD	是	iUPD	除非基於先前鑒定的目標病變iUPD測量總和的進一步增加 ≥ 5 mm、先前鑒定的非目標病變iUPD（無需明確）或先前鑒定的新病變的大小或數量的增加而確認iCPD，否則仍為iUPD
非iUPD或進展	非iUPD或進展	是	iUPD	除非基於先前鑒定的新病變的大小或數量增加而確認iCPD，否則仍為iUPD

a 先前在此時間點之前的評估中確定。

「i」表示使用根據RECIST 1.1原則定義的iRECIST目標病變、非目標病變和新病變分配的免疫反應；如果未發生偽進展，則完全反應、部分反應和疾病穩定的RECIST 1.1和iRECIST類別將相同。

縮寫：iCPD = 確認進展；iCR = 完全反應；iPR = 部分反應；iSD = 疾病穩定；iUPD =未確認的進展；非iCR/非iUPD = CR和PD標準均未滿足；RECIST =實性瘤反應評價標準。

表30 - 美國東岸癌症臨床研究合作組織（Eastern Cooperative Oncology Group）體能狀態量表

體能狀態	說明
0	完全活動性，能夠不受限制地進行所有疾病前的活動。
1	無法進行身體的劇烈活動，但可以走動，並能夠進行輕度或久坐的工作，例如，輕家務、辦公室工作。
2	可以走動，能夠進行所有自我照顧，但無法進行任何工作活動；清醒時間的50%以上可以起床走動。
3	只能進行有限的自我照顧；清醒時間的50%以上只能在床上或椅子。
4	完全殘疾；不能進行任何自我照顧；完全只能在床或椅子上。
5	死亡。

由美國東岸癌症臨床研究合作組織開發，Robert L. Comis，醫學博士，合作組織主席。

表31 - 皮膚黑色素瘤TNM分期（AJCC癌症分期第8版）

黑色素瘤TNM分類

T分類	厚度	潰瘍狀態
Tis	不適用	不適用
T1	≤ 1.0 mm	a：< 0.8 mm，無潰瘍
		b：< 0.8 mm，有潰瘍 0.8-1.0 mm，有或無潰瘍
T2	1.01-2.0 mm	a：無潰瘍
		b：有潰瘍
T3	2.01-4.0 mm	a：無潰瘍
		b：有潰瘍
T4	> 4.0 mm	a：無潰瘍
		b：有潰瘍
N分類	**轉移性結節數**	**結節轉移性腫塊**
N1	1個結節	a：臨床上隱匿[a]
		b：臨床上檢測到[b]

黑色素瘤TNM分類		
		c：在途轉移/衛星，無轉移性結節
N2	2至3個結節	a：臨床上隱匿[a] b：臨床上檢測到[b] c：在途轉移/衛星，有一個轉移性結節
N3	4個或更多的轉移性結節， 或粗糙結節（matted node）， 或有轉移性結節的在途轉移/衛星	

M分類	部位	血清LDH
M1a (0)	遠處的皮膚、皮下或淋巴結轉移	正常
M1a (1)		升高
M1b (0)	肺轉移	正常
M1b (1)		升高
M1c (0)	所有其他內臟轉移	正常
M1c (1)		升高
M1d	轉移至中樞神經	

a 前哨或選擇性淋巴結清掃術後被診斷為臨床上隱匿性。

b 臨床上檢測到的定義為經治療性淋巴結清掃術確認的或當淋巴結轉移表現出明顯的囊外擴張時臨床上可檢測到的淋巴結轉移。

來源：改編自Gershenwald JE, Scolyer RA, Hess KR等人 Melanoma of the skin. 於: Amin MB編 AJCC Cancer Staging Manual.第8版, 芝加哥, 伊利諾斯州:AJCC-Springer; 2017:563-585。

表32 - 黑色素瘤分期/預後組 - IIIB期及以上

黑色素瘤分期/預後組（IIIB期及以上）			
分期	T	N	M
IIIB期	T1-4b	N1a	M0
	T1-4b	N1b	M0
	T1-4a	N1b	M0
	T1-4a	N2c	M0

黑色素瘤分期/預後組（IIIB期及以上）			
IIIC期	T1-4b	N1b	M0
	T1-4b	N2b	M0
	T1-4b	N2c	M0
	任何T	N3	M0
IV期	任何T	任何N	M1

來源：改編自Gershenwald JE, Scolyer RA, Hess KR等人 Melanoma of the skin. 於: Amin MB編 AJCC Cancer Staging Manual. 第8版, 芝加哥, 伊利諾斯州:AJCC-Springer; 2017:563-585。

【0728】 疾病反應將使用盧加諾分類2014（Cheson BD等人 (2014) J. Clinical Oncology 32(27)3059-3068）進行評估。在篩選時和每12週（±7天）進行一次反應評估。

表33 - 疾病評估與盧加諾分類

摘錄自2014年盧加諾分類法，Cheson等人 2014年， 表3.修訂的反應評估標準		
反應和部位	**基於PET-CT的反應**	**基於CT的反應**
完全	**完全代謝反應**	**完全放射學反應（以下所有）**
淋巴結和淋巴外部位	得分為1、2或3 * 在5PS上具有或沒有殘餘質量** 公認的是，在Waldeyer環或具有較高生理吸收或在脾臟或骨髓內活化（例如，藉由化學療法或髓樣群落刺激因子）的結外部位，吸收可能大於正常縱隔和/或肝臟。在這種情況下，如果最初累及部位的攝取量不大於周圍正常組織，即使該組織具有較高的生理攝取量，也可推斷為完全代謝反應	目標結節/結節腫塊必須消退至LDi ≤ 1.5 cm沒有疾病的淋巴外部位
未測量的病變	不適用	不存在
器官擴大	不適用	消退至正常

新病變 骨髓	無 骨髓中無嗜FDG型疾病的證據	無 形態正常；如果不確定，則IHC陰性
部分	**部分代謝反應**	**部分緩解（以下所有）**
淋巴結和淋巴外部位	得分為4或5 **，與基線和任何大小的一個或多個殘餘腫塊相比，攝取量減少 在過渡期間，該等發現提示疾病反應 在治療結束時，該等發現表明殘留疾病	多達6個可測量靶結節和結外部位的SPD降低 ≥ 50% 當病變太小而無法在CT上進行測量時，分配5 mm × 5 mm作為預設值當不再可見時，0 × 0 mm對於 > 5 mm × 5 mm但小於正常值的結節，使用實際測量值進行計算
未測量的病變	不適用	不存在/正常，已消退，但沒有增加
器官擴大	不適用	脾臟的長度必須已消退超出正常長度 > 50%
新病變 骨髓	無 殘留攝取量高於正常骨髓攝取量，但與基線相比降低（允許與化學療法引起的反應性變化相適應的擴散攝取量）。如果在結節反應的情況下骨髓中存在持續的局灶性改變，則應考慮藉由MRI或生物檢體或間隔掃描進一步評估	無 不適用
無反應或疾病穩定	**無代謝反應**	**疾病穩定**
目標結節/結節腫塊，淋巴結外病變	得分為4或5，在治療中期或治療結束時與基線相比，FDG攝取量無明顯變化	多達6個主要的可測量結節和結外部位的SPD相比基線降低 < 50%；不符合疾病進展的標準
未測量的病變	不適用	沒有與進展一致的增加

器官擴大	不適用	沒有與進展一致的增加
新病變 骨髓	無 與基線相比沒有變化	無 不適用
疾病進展	**代謝性疾病進展**	**疾病進展至少需要以下中的1項**
單個目標結節/結節腫塊	得分4或5，與基線相比的攝取強度增加 和/或	PPD進展：
結外病變	在治療中期或治療結束評估時與淋巴瘤一致的新嗜FDG型病灶	單個結節/病變具有以下情況才為異常： LDi > 1.5 cm且從PPD最低點增加 ≥ 50%且LDi或SDi從最低點增加 病變 ≤ 2 cm時0.5 cm 病變 > 2 cm時1.0 cm 在脾腫大的情況下，脾臟長度必須增加超過其先前超出基線的程度的50%以上（例如，15-cm的脾臟必須增加至> 16 cm）。如果之前沒有脾腫大，則必須比基線增加至少2 cm 新發或復發性脾腫大
未測量的病變	無	未測量的先存病變的新的或明顯的進展
新病變	新的與淋巴瘤一致的嗜FDG型病灶，而不是其他病因（例如，感染、炎症）。如果新病變的病因不確定，可以考慮生物檢體或間隔掃描	先前已消退的病變的再生任何軸 > 1.5 cm的新結節任何軸 > 1.0 cm的新結節外部位；如果任何軸 < 1.0 cm，則其存在必須明確並且必須歸因於淋巴瘤明確可歸因於淋巴瘤的任何大小的可評估疾病
骨髓	新的或復發的嗜FDG型病	新的或復發的受累

	灶	

縮寫：5PS，5分制；CT，電腦斷層掃描；FDG，氟去氧葡萄糖；IHC，免疫組織化學；LDi，病變的最長橫徑；MRI，磁共振成像；PET，正電子發射斷層掃描；PPD，LDi與垂直直徑的叉積；SDi，垂直於LDi的最短軸；SPD，多個病變的垂直直徑乘積之和。

*許多患者的3分表明標準治療預後良好，尤其是在進行中期掃描時。但是，在研究遞減的涉及PET的試驗中，可能較佳的是將得分3視為反應不足（以避免治療不足）。測量的主要病變：最多選擇六個最大的主要結節、結節腫塊和結外病變，可按兩個直徑清楚地測量。較佳的是結節應來自身體的不同區域，並且在適用時應包括縱隔和腹膜後區域。非結節病變包括實體器官（例如，肝、脾、腎、肺）的病變、GI受累、皮膚病變或觸診可見的病變。未測量的病變：任何未選擇為所測量的疾病、主要疾病和真正可評估的疾病均應視為未測量。該等部位包括任何未選擇為主要或可測量或不滿足可測量性要求但仍被認為係異常的結節、結節腫塊和結外部位，以及真正可評估的疾病，即任何可能被懷疑有疾病而難以量化地進行測量跟蹤的部位，包括胸腔積液、腹水、骨病變、軟腦膜疾病、腹部腫塊和無法藉由成像確認和跟蹤的其他病變。在Waldeyer環或結外部位（例如，胃腸道、肝臟、骨髓）中，FDG的攝取可能大於在具有完全代謝反應的縱隔中的攝取，但不應高於周圍正常的生理攝取（例如，因化學療法或骨髓生長因子引起的骨髓活化）。

** PET 5PS：1，沒有超出背景的攝取；2，攝取≤縱隔；3，攝取＞縱隔但≤肝臟；4，適度稍＞肝臟；5，攝取明顯高於肝臟和/或新病變；X，不太可能與淋巴瘤有關的新攝取區域。

【0729】 成像時間應遵循日曆天，並且不應因週期延遲而進行調整。對於因PD以外的其他原因中止治療的參與者，評估應繼續進行，直到參與者記錄了PD。如果研究者認為參與者發生臨床進展，可以早於12週進行首次評估。

表34 - 縮寫

ADA：抗藥物抗體
ALT：丙胺轉胺酶
ANC：中性粒細胞絕對計數
AST：天冬胺酸轉胺酶
CAR：嵌合抗原受體
CK：廣譜細胞角蛋白
CRP：C反應蛋白
DL：劑量位準
DL1：起始劑量位準
DLT：劑量限制性毒性

DoR：反應持續時間
DRE：疾病相關事件
ECOG：美國東岸癌症臨床研究合作組織
eCRF：電子病例報告表
EOT：治療結束
HBsAg：B型肝炎表面抗原
hCG：人絨毛膜促性腺激素
HLH：嗜血淋巴組織細胞瘤病
ICF：知情同意書
ICH：國際協調委員會
IP10：INFγ誘導蛋白10
iRECIST：用於免疫療法的RECIST
iUPD：未確認的疾病進展
IV：靜脈內
KIM-1：腎損傷分子-1
LDH：乳酸脫氫酶
MRI：磁共振成像
NCI CTCAE：美國國家癌症研究所不良事件常用術語標準
NOAEL：未觀察到有害作用水平
NSAID：非甾體類抗炎藥
PDy：藥效動力學
PFS：無進展生存期
PK：藥物動力學
PO：口服
RNAseq：RNA定序
SAE：嚴重不良事件
STD 10：在10%的動物中有嚴重毒性的劑量
USG：超音波檢查
WOCBP：有生育潛力的女性

實例2 - 患有後天型抗PD1抗性腫瘤的小鼠中的抗腫瘤活性

【0730】 **後天型抗PD1療法抗性的小鼠模型**

【0731】 對抗PD-1抗體治療顯示出後天型抗性的小鼠腫瘤模型主要如下產生。另請參見，Dunn等人 (2002) Nature Immunology 3: 991-998；和Wang X等人. (2017) Cancer Res 77(4): 839-850。對攜帶MC38腫瘤的雌性C57BL6/J小鼠（傑克遜實驗室（Jackson Laboratory），美國緬因州冷泉港）用抗PD-1抗體（殖株

RMP1-14；在Yamazaki等人 (2005) J Immunol 175(3): 1586-1592 方法中首次描述）治療，切除生長中的腫瘤，用添加10% FBS的含L-麩醯胺酸（生命技術公司（Life Technologies））的RPMI-1640離體培養細胞。將6至8週大的雌性C57BL6/J小鼠飼養在溫度受控的環境中，光照週期為12小時，可以自由獲取食物和無菌水。實驗前，使所有小鼠適應環境至少3天。如果測量，則體重和腫瘤體積每週測量兩次，直到實驗終點。腫瘤體積用以下公式表示為垂直直徑的乘積：$a^2 * b/2$，其中a < b。

【0732】 對於圖2A至3，將一百萬個MC38或MC38抗性細胞懸浮在200 µl DPBS中，並皮下注射到每隻小鼠的右脅腹中。

【0733】 **體內藥物施用**

【0734】 從腫瘤達到60 mm^3的平均值開始，每四天（Q4D）每個腫瘤以50 µl中40 µg瘤內（IT）注射施用四個劑量的小鼠細胞激素mRNA混合物或對照的編碼螢光素酶的mRNA（Luc mRNA）。每週兩次測量小鼠體重和腫瘤體積直至實驗終點。使用以下公式將腫瘤體積表示為垂直直徑的乘積：$a^2 * b/2$，其中a < b。所有程序均由機構動物護理和使用委員會批准，並按照NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals [NIH實驗動物的護理和使用指南]進行。

【0735】 **mRNA的製備**

【0736】 將編碼目的基因的合成DNA片段選殖到一個共同的起始載體中，該起始載體包含5'非轉譯區（UTR）和3'UTR，3'UTR和總共110個核苷酸的多聚A尾。質體DNA的線性化係在聚(dA:dT)下游用IIS類限制性內切酶生成模板進行的，該模板沒有超過聚(dA:dT)的額外核苷酸（參見，例如，Holtkamp等人 (2006) Blood 12月15日; 108(13):4009-17）。將線性化的質體DNA藉由T7 RNA聚合酶（賽默飛世爾公司（Thermo Fisher），美國麻塞諸塞州沃爾瑟姆）進行體外轉錄，按Grudzien-Nogalska等人 (2013) Methods Mol Bio. 969:55-72所述，在存在7.5 mM的ATP、CTP、GTP和N1-甲基-偽尿苷三磷酸的情況下進行。利用磁性粒子純化RNA （ Berensmeier S.(2006) Applied Microbiology and Biotechnology

73(3):495-504），隨後使用痘苗加帽系統（新英格蘭生物實驗室（New England Biolabs），伊普斯維奇，麻塞諸塞州，美國）和mRNA帽的2'-O-甲基化引入Cap1結構。利用基於纖維素的層析法進一步純化該RNA以去除雙股RNA（dsRNA）雜質（參見Day PR等人 (1977) Phytopathology 67:1393；Morris TJ等人 (1979) Phytopathology 69:854-858；以及Castillo A等人 (2011) Virol J. 8:38）。用分光光度法和毛細管電泳系統測定RNA濃度和品質。用dsRNA特異性J2單株抗體（英語與科技諮詢公司（English & Scientific Consulting），KFt. Szirák，匈牙利）在西北斑點雜交測定中評估dsRNA的存在，如Karikó等人 (2011) Nucleic Acids Res. 11月; 39(21):e142所述。

【0737】 **結果**

【0738】 已經確定了對檢查點阻斷的先天性和後天型抗性的幾種機制，包括MHC I和IFNγ訊號傳導途徑的突變。參見，例如，Sharma等人 (2017) Cell 168(4):707-723；Sade-Feldman M等人 (2017) Nat Commun 8(1):1136；Zaretsky JM等人 (2016) N Engl J Med 375(9): 819-29；Gettinger S.等人 (2017) 7(12): 1420-1435；Rodig SJ等人 (2018) Sci Transl Med 10(450)。但是，此類突變發生在患者的頻率較低，因此尚需確定其他機制。為了更好地瞭解對檢查點阻斷的後天型抗性，我們生成了小鼠腫瘤模型，該模型對抗PD-1抗體治療表現出體內抗性。體內連續傳代後，MC38腫瘤獲得了對PD-1阻斷的抗性（圖2A、B）。對PD-1阻斷缺乏敏感性並非歸因於PD-L1或B2M表現的失調，因為兩者在親本和抗性細胞中均以相似的水平表現（圖2C）。類似地，IFNγ傳訊與抗原加工和呈遞途徑在親本和抗性細胞株中均起作用（圖2D、2E）。使用無偏基因表現分析進一步表徵潛在的抗性機制。RNA定序揭示，PD-1抗性腫瘤的總體基因表現存在顯著差異，展示相對於親本MC38腫瘤，免疫相關基因的表現顯著降低（圖2F、2G）。實際上，PD-1抗性腫瘤在包括T細胞和NK細胞在內的多種細胞類型中均表現出降低的免疫浸潤（圖2H、2I）。

【0739】 對該模型進行了進一步的驗證，結果顯示於圖3至5中。簡而言之，MC38抗性細胞經證明不表現PD-L2，並且在IFNγ治療後未誘導表現（圖3）。免疫組織化學染色顯示抗性腫瘤中免疫細胞的頻率降低（圖4A）。藉由免疫組織化學染色分析了石蠟包埋的MC38和MC38抗性腫瘤對CD45+細胞（深色）的浸潤。結果代表了兩個獨立的實驗；n = 10個腫瘤/組。圖4A示出了代表性圖像。圖4B示出了定量。圖5A-5B顯示抗性腫瘤的免疫原性降低。簡而言之，細胞毒性T淋巴細胞（CTL）培養物係從攜帶親本MC38腫瘤的5隻個體C57BL6小鼠中產生的，該等小鼠表現出對PD-1阻斷的反應完全消退。將CTL與MC38和抗性腫瘤細胞共培養，並測量殺傷（圖5A）和IFNγ釋放（圖5B）。

【0740】 使用該經過驗證的模型，將細胞激素RNA混合物作為單一療法進行瘤內施用。與對照相比，鼠細胞激素RNA混合物的單一療法抑制了MC38和MC38抗性腫瘤的生長。參見圖6A-6D。鼠細胞激素RNA混合物的單一療法還顯著延長了患有MC38和MC38抗性腫瘤的小鼠的生存期。參見圖7。八隻中的五隻（62.5%）患有MC38腫瘤的小鼠（圖6B）和八隻中的三隻（37.5%）患有MC38抗性腫瘤的小鼠（圖6D）在實驗結束時腫瘤完全緩解且無腫瘤。另請參見圖7。

實例3 - 患有抗PD1抗性腫瘤的小鼠中的抗腫瘤活性

抗PD1療法抗性的小鼠模型

【0741】 將S. A. Rosenberg博士（美國國立衛生研究院，美國馬里蘭州貝塞斯達）贈予的MC38細胞在含有10% FBS的L-麩醯胺酸（生命技術公司）的RPMI-1640中培養。通常，對於單側腹腫瘤模型，將MC38細胞懸浮在DPBS中，並將200 μl的1 x 10^6個細胞SC植入C57BL/6J小鼠的右脅腹中。通常，對於雙側腹腫瘤MC38模型，在第0天SC右側植入1 x 10^6個細胞且左側植入0.5 x 10^6個細胞。

【0742】 為了生成抗PD-1療法抗性的體內腫瘤模型，使用sgRNA 5'-GGCGTATGTATCAGTCTCAG-3'（SEQ ID NO: 41），藉由CRISPR產生了MC38-B2M-敲除細胞。根據製造商的說明，將MC38細胞用預先複合的Cas9和

sgRNA（GeneArt™Platinum™Cas9核酸酶V.2；賽默飛世爾科技公司（ThermoFisher Scientific））進行暫態轉染（Lipofectamine™CRISPRMAX™；賽默飛世爾科技公司，美國麻塞諸塞州沃爾瑟姆）。使用MACS技術（美天旎生物技術公司（Miltenyi Biotec），德國貝爾吉施格拉德巴赫）富集$B2M^{-/-}$細胞，然後分離單細胞集落並藉由流式細胞分析技術確認敲除。

【0743】 **體內藥物施用**

【0744】 藉由瘤內注射施用細胞激素RNA混合物。除非另有詳細說明，否則每4天用異氟烷麻醉小鼠，並將鹽水溶液中50 μl mRNA中80 μg瘤內（IT）注射到右側腫瘤，共注射4劑。除非另有說明，否則從BioXCell（美國新罕布什爾州西萊巴嫩）獲得抗體，並藉由IP注射施用。對照（MOPC-21）和抗PD-1（RMP1-14）以5 mg/kg的劑量每三天（Q3D）施用一次。

【0745】 **結果**

【0746】 為了研究細胞激素mRNA治療在檢查點抗性環境中的治療效果，在MC38細胞中將B2M基因缺失（圖8），這導致了對抗PD-1治療的體內抗性（圖9C），而攜帶親本腫瘤的小鼠仍然對抗PD-1療法有部分反應（圖9B）。單獨使用細胞激素RNA混合物治療可以使攜帶B2M基因敲除腫瘤的動物的生存期延長，而藉由將細胞激素mRNA與抗PD-1檢查點阻斷相組合，未觀察到生存率的進一步提高（圖9C）。

【0747】 為了模擬通常在人類惡性腫瘤中觀察到的腫瘤間異質性，建立了雙側環境，一側為MC38-B2M敲除腫瘤，對側為MC38-WT腫瘤（圖9D）。向MC38-B2M基因敲除腫瘤注射細胞激素RNA混合物，而對側MC38-WT腫瘤則不予治療。單獨使用抗PD-1療法進行的治療對攜帶腫瘤的小鼠的存活沒有影響，而單獨使用細胞激素RNA混合物可以延長生存期，儘管所有小鼠最終都死於了腫瘤負荷（圖9D）。在這種環境下，組合療法可進一步提高總體生存率，這表明即使由於缺乏MHC I表現而使所治療的病變對T細胞介導的殺傷具有抗性，用細胞激素RNA混合物和抗PD-1抗體組合治療具有遠位效應（圖9D）。

實例4-在另外的鼠類模型中的抗腫瘤活性。

【0748】 **材料和方法**

【0749】 在37°C下空氣中含5% CO_2的大氣中，用不同的培養基（如下所示）在體外維持了十二個同系細胞株。腫瘤細胞將常規每週兩次傳代培養。收穫處於指數生長期的細胞，並對腫瘤接種量計數。用0.1 mL PBS中的腫瘤細胞皮下接種每隻小鼠以使腫瘤發展。接種腫瘤細胞後，每天檢查動物的發病率和死亡率。在常規監測期間，檢查動物的腫瘤生長和治療對行為的影響，諸如活動性、食物和水的消耗、體重增加/減少（體重在隨機分組後每週兩次進行測量）、眼/毛髮脫落和任何其他異常。詳細記錄個體動物的死亡率和觀察到的臨床體徵。隨機分組後，每週兩次用卡尺測量二維腫瘤體積，體積用mm^3表示，公式如下：V = (L x W x W)/2，其中V係腫瘤體積，L係腫瘤長度（最長的腫瘤尺寸），W係腫瘤寬度（垂直於L的最長腫瘤尺寸）。在層流櫃中進行給藥以及腫瘤和體重的測量。使用StudyDirectorTM軟體（版本3.1.399.19）測量體重和腫瘤體積。

表35.培養基和細胞株資訊

細胞株	細胞株供應商	培養基	細胞數量/小鼠	接種部位
CT26	SIBS，上海生命科學研究院	RPMI1640 + 10% FBS	5 × 10e5	右下側
Pan02	NIH	RPMI1640 + 10% FBS	1 × 10e6	右前側
H22	CCTCC，中國典型培養物保藏中心	RPMI1640 + 10% FBS	3 × 10e6	右前側
MC38	FDCC，復旦大學細胞中心	DMEM + 10% FBS	1 × 10e6	右下側
A20	ATCC	RPMI1640 + 10% FBS	5 × 10e5	右下側
B16BL6	南京凱基生物技術	RPMI1640 + 10% FBS	2 × 10e5	右下側
Renca	ATCC	DMEM + 10% FBS	1 × 10e6	右下側
LL/2	SIBS，上海生命	DMEM + 10% FBS	5 × 10e5	右下側

	科學研究院			
EMT-6	ATCC	DMEM + 10% FBS	3 × 10e5	右下側
RM-1	SIBS，上海生命科學研究院	RPMI1640 + 10% FBS	1 × 10e6	右下側
B16F10	SIBS，上海生命科學研究院	DMEM + 10% FBS	2 × 10e5	右下側
Hepa 1-6	SIBS，上海生命科學研究院	DMEM + 10%FBS	5 × 10e6	右前側

表36.研究設計

N	**治療**	**劑量位準（mg/kg）**	**給藥溶液（mg/ml）**	**給藥量（μL/g）**	**ROA**	**給藥頻率和持續時間***
10	細胞激素mRNA混合物	40 μg/腫瘤	40 μg/50 μl	50 μl/腫瘤	*瘤內*	Q4D x 4（第1、5、9、13天）
10	抗PD-1	10	1	10	*i.p.*	BIW x 3週（第1、4、8、11、15、18天）
10	抗PD-1 + 細胞激素mRNA混合物	10 40 μg/腫瘤	1 40 μg/50 μl	10 50 μl/腫瘤	*i.p.* *瘤內*	BIW x 3週（第1、4、8、11、15、18天） Q4D x 4（第1、5、9、13天）

結果

【0750】 為了進一步瞭解腫瘤異質性的影響，測試了十二個小鼠模型對細胞激素mRNA混合物或與抗PD-1抗體組合治療的敏感性。與單獨的抗PD1抗體相比，大多數腫瘤類型對單藥mRNA療法具有敏感性。此外，所有模型均顯示出在用細胞激素mRNA與抗PD1組合治療後腫瘤生長減速（圖10），進一步突顯了編碼細胞激素的局部mRNA療法的多功能性。

【符號說明】

無

【生物材料寄存】

無

序列表

<110> 法商賽諾菲公司（SANOFI）

<120> 用於晚期實性瘤癌症之治療性 RNA 及抗 PD1 抗體

<130> 01183-0031-00PCT

<150> US 62/794,896
<151> 2019-01-21

<150> US 62/926,379
<151> 2019-10-25

<150> EP 19306471.4
<151> 2019-11-14

<160> 41

<170> PatentIn 3.5 版

<210> 1

<400> 1
000

<210> 2

<400> 2
000

<210> 3
<211> 145
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成：5 UTR (DNA)

<400> 3
ggaataaact agtctcaaca caacatatac aaaacaaacg aatctcaagc aatcaagcat 60

tctacttcta ttgcagcaat ttaaatcatt tcttttaaag caaaagcaat tttctgaaaa 120

ttttcaccat ttacgaacga tagcc 145

<210> 4
<211> 145
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成：5 UTR (RNA)

<400> 4
ggaauaaaacu agucucaaca caacauauac aaaacaaacg aaucucaagc aaucaagcau 60

ucuacuucua uugcagcaau uuaaaucauu ucuuuuaaag caaaagcaau uuucugaaaa 120

uuuucaccau uuacgaacga uagcc 145

<210> 5
<211> 52
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成：替代性的 Mod 5 UTR (DNA)

<400> 5
agacgaacta gtattcttct ggtccccaca gactcagaga gaacccgcca cc 52

<210> 6

<211> 52
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成：替代性的 Mod 5 UTR (RNA)

<400> 6
agacgaacua guauucuucu ggucccccaca gacucagaga gaacccgcca cc 52

<210> 7
<211> 317
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成：3 UTR (DNA)

<400> 7
ctcgagctgg tactgcatgc acgcaatgct agctgcccct ttcccgtcct gggtaccccg 60

agtctccccc gacctcgggt cccaggtatg ctcccacctc cacctgcccc actcaccacc 120

tctgctagtt ccagacacct cccaagcacg cagcaatgca gctcaaaacg cttagcctag 180

ccacaccccc acgggaaaca gcagtgatta acctttagca ataaacgaaa gtttaactaa 240

gctatactaa ccccagggtt ggtcaatttc gtgccagcca caccgagacc tggtccagag 300

tcgctagccg cgtcgct 317

<210> 8
<211> 317
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成：3 UTR (RNA)

<400> 8
cucgagcugg uacugcaugc acgcaaugcu agcugccccu uucccguccu ggguaccccg 60

agucuccccc gaccucgggu cccagguaug cucccaccuc caccugcccc acucaccacc 120

ucugcuaguu ccagacaccu cccaagcacg cagcaaugca gcucaaaacg cuuagccuag 180

ccacaccccc acgggaaaca gcagugauua accuuuagca auaaacgaaa guuuaacuaa 240

gcuauacuaa ccccaggguu ggucaauuuc gugccagcca caccgagacc ugguccagag 300

ucgcuagccg cgucgcu 317

<210> 9

<400> 9
000

<210> 10

<400> 10
000

<210> 11

<400> 11
000

<210> 12

<400> 12
000

<210> 13

<400> 13
000

<210> 14
<211> 539
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(539)
<223> 人 IL-12sc（胺基酸）

<400> 14

Met Cys His Gln Gln Leu Val Ile Ser Trp Phe Ser Leu Val Phe Leu
1 5 10 15

Ala Ser Pro Leu Val Ala Ile Trp Glu Leu Lys Lys Asp Val Tyr Val
20 25 30

Val Glu Leu Asp Trp Tyr Pro Asp Ala Pro Gly Glu Met Val Val Leu
35 40 45

Thr Cys Asp Thr Pro Glu Glu Asp Gly Ile Thr Trp Thr Leu Asp Gln
50 55 60

Ser Ser Glu Val Leu Gly Ser Gly Lys Thr Leu Thr Ile Gln Val Lys
65 70 75 80

Glu Phe Gly Asp Ala Gly Gln Tyr Thr Cys His Lys Gly Gly Glu Val

85 90 95

Leu Ser His Ser Leu Leu Leu Leu His Lys Lys Glu Asp Gly Ile Trp
100 105 110

Ser Thr Asp Ile Leu Lys Asp Gln Lys Glu Pro Lys Asn Lys Thr Phe
115 120 125

Leu Arg Cys Glu Ala Lys Asn Tyr Ser Gly Arg Phe Thr Cys Trp Trp
130 135 140

Leu Thr Thr Ile Ser Thr Asp Leu Thr Phe Ser Val Lys Ser Ser Arg
145 150 155 160

Gly Ser Ser Asp Pro Gln Gly Val Thr Cys Gly Ala Ala Thr Leu Ser
165 170 175

Ala Glu Arg Val Arg Gly Asp Asn Lys Glu Tyr Glu Tyr Ser Val Glu
180 185 190

Cys Gln Glu Asp Ser Ala Cys Pro Ala Ala Glu Glu Ser Leu Pro Ile
195 200 205

Glu Val Met Val Asp Ala Val His Lys Leu Lys Tyr Glu Asn Tyr Thr
210 215 220

Ser Ser Phe Phe Ile Arg Asp Ile Ile Lys Pro Asp Pro Pro Lys Asn
225 230 235 240

Leu Gln Leu Lys Pro Leu Lys Asn Ser Arg Gln Val Glu Val Ser Trp
245 250 255

Glu Tyr Pro Asp Thr Trp Ser Thr Pro His Ser Tyr Phe Ser Leu Thr
260 265 270

Phe Cys Val Gln Val Gln Gly Lys Ser Lys Arg Glu Lys Lys Asp Arg
275 280 285

Val Phe Thr Asp Lys Thr Ser Ala Thr Val Ile Cys Arg Lys Asn Ala
290 295 300

Ser Ile Ser Val Arg Ala Gln Asp Arg Tyr Tyr Ser Ser Ser Trp Ser
305 310 315 320

Glu Trp Ala Ser Val Pro Cys Ser Gly Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
325 330 335

Pro Gly Gly Gly Ser Ser Arg Asn Leu Pro Val Ala Thr Pro Asp Pro
340 345 350

Gly Met Phe Pro Cys Leu His His Ser Gln Asn Leu Leu Arg Ala Val
355 360 365

Ser Asn Met Leu Gln Lys Ala Arg Gln Thr Leu Glu Phe Tyr Pro Cys
370 375 380

Thr Ser Glu Glu Ile Asp His Glu Asp Ile Thr Lys Asp Lys Thr Ser

385 390 395 400

Thr Val Glu Ala Cys Leu Pro Leu Glu Leu Thr Lys Asn Glu Ser Cys
405 410 415

Leu Asn Ser Arg Glu Thr Ser Phe Ile Thr Asn Gly Ser Cys Leu Ala
420 425 430

Ser Arg Lys Thr Ser Phe Met Met Ala Leu Cys Leu Ser Ser Ile Tyr
435 440 445

Glu Asp Leu Lys Met Tyr Gln Val Glu Phe Lys Thr Met Asn Ala Lys
450 455 460

Leu Leu Met Asp Pro Lys Arg Gln Ile Phe Leu Asp Gln Asn Met Leu
465 470 475 480

Ala Val Ile Asp Glu Leu Met Gln Ala Leu Asn Phe Asn Ser Glu Thr
485 490 495

Val Pro Gln Lys Ser Ser Leu Glu Glu Pro Asp Phe Tyr Lys Thr Lys
500 505 510

Ile Lys Leu Cys Ile Leu Leu His Ala Phe Arg Ile Arg Ala Val Thr
515 520 525

Ile Asp Arg Val Met Ser Tyr Leu Asn Ala Ser
530 535

<210> 15
<211> 1623
<212> DNA
<213> 智人

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1623)
<223> 人未最佳化的 IL-12sc (CDS DNA)

<400> 15

atgtgtcacc agcagttggt catctcttgg ttttccctgg tttttctggc atctccccтc 60

gtggccatat gggaactgaa gaaagatgtt tatgtcgtag aattggattg gtatccggat 120

gcccctggag aaatggtggt cctcacctgt gacacccctg aagaagatgg tatcacctgg 180

accttggacc agagcagtga ggtcttaggc tctggcaaaa ccctgaccat ccaagtcaaa 240

gagtttggag atgctggcca gtacacctgt cacaaaggag gcgaggttct aagccattcg 300

ctcctgctgc ttcacaaaaa ggaagatgga atttggtcca ctgatatttt aaaggaccag 360

aaagaaccca aaaataagac ctttctaaga tgcgaggcca agaattattc tggacgtttc 420

acctgctggt ggctgacgac aatcagtact gatttgacat tcagtgtcaa aagcagcaga 480

gggtcttctg acccccaagg ggtgacgtgc ggagctgcta cactctctgc agagagagtc 540

agaggggaca acaaggagta tgagtactca gtggagtgcc aggaggacag tgcctgccca 600

gctgctgagg agagtctgcc cattgaggtc atggtggatg ccgttcacaa gctcaagtat 660

gaaaactaca ccagcagctt cttcatcagg gacatcatca aacctgaccc acccaagaac 720

ttgcagctga agccattaaa gaattctcgg caggtggagg tcagctggga gtaccctgac 780

acctggagta ctccacattc ctacttctcc ctgacattct gcgttcaggt ccagggcaag 840

agcaagagag aaaagaaaga tagagtcttc acggacaaga cctcagccac ggtcatctgc 900

cgcaaaaatg ccagcattag cgtgcgggcc caggaccgct actatagctc atcttggagc 960

gaatgggcat ctgtgccctg cagtggctct agcggagggg gaggctctcc tggcgggga 1020

tctagcagaa acctccccgt ggccactcca gacccaggaa tgttcccatg ccttcaccac 1080

tcccaaaacc tgctgagggc cgtcagcaac atgctccaga aggccagaca aactctagaa 1140

ttttaccctt gcacttctga ggaaattgat catgaagata tcacaaaaga taaaaccagc 1200

acagtggagg cctgtttacc attggaatta accaagaatg agagttgcct aaattccaga 1260

gagacctctt tcataactaa tgggagttgc ctggcctcca gaaagacctc ttttatgatg 1320

gccctgtgcc ttagtagtat ttatgaagac ttgaagatgt accaggtgga gttcaagacc 1380

atgaatgcaa agcttctgat ggatcctaag aggcagatct ttctagatca aaacatgctg 1440

gcagttattg atgagctgat gcaggccctg aatttcaaca gtgagactgt gccacaaaaa 1500

tcctcccttg aagaaccgga tttttataaa actaaaatca agctctgcat acttcttcat 1560

gctttcagaa ttcgggcagt gactattgat agagtgatga gctatctgaa tgcttcctga 1620

tga 1623

<210> 16
<211> 1623
<212> DNA
<213> 智人

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1623)
<223> 人最佳化的 IL-12sc (CDS DNA)

<400> 16

atgtgtcacc agcagctggt gatctcatgg ttctccctgg tatttctggc atctcctctt 60

gtcgcaatct gggaactgaa gaaagacgtg tatgtcgttg agctcgactg gtatccggat 120

gcgcctggcg agatggtggt gctgacctgt gacaccccag aggaggatgg gatcacttgg 180

acccttgatc aatcctccga agtgctcggg tctggcaaga ctctgaccat acaagtgaaa 240

gagtttggcg atgccgggca gtacacttgc cataagggcg gagaagttct gtcccactca 300

ctgctgctgc tgcacaagaa agaggacgga atttggagta ccgatatcct gaaagatcag 360

aaagagccca agaacaaaac cttcttgcgg tgcgaagcca agaactactc agggagattt 420

acttgttggt ggctgacgac gatcagcacc gatctgactt tctccgtgaa atcaagtagg 480

ggatcatctg accctcaagg agtcacatgt ggagcggcta ctctgagcgc tgaacgcgta 540

agaggggaca ataaggagta cgagtatagc gttgagtgcc aagaggatag cgcatgcccc 600

gccgccgaag aatcattgcc cattgaagtg atggtggatg ctgtacacaa gctgaagtat 660

gagaactaca caagctcctt cttcatccgt gacatcatca aaccagatcc tcctaagaac 720

ctccagctta aacctctgaa gaactctaga caggtggaag tgtcttggga gtatcccgac 780

acctggtcta caccacattc ctacttcagt ctcacattct gcgttcaggt acagggcaag 840

tccaaaaggg agaagaagga tcgggtcttt acagataaaa caagtgccac cgttatatgc 900

cggaagaatg cctctatttc tgtgcgtgcg caggacagat actatagcag ctcttggagt 960

gaatgggcca gtgtcccatg ttcagggtca tccggtggtg gcggcagccc cggaggcggt 1020

agctccagaa atctccctgt ggctacacct gatccaggca tgtttccctg tttgcaccat 1080

agccaaaacc tcctgagagc agtcagcaac atgctccaga aagctagaca aacactggaa 1140

ttctacccat gcacctccga ggaaatagat cacgaggata tcactaagga caaaacaagc 1200

actgtcgaag catgccttcc cttggaactg acaaagaacg agagttgcct taattcaaga 1260

gaaacatctt tcattacaaa cggtagctgc ttggcaagca gaaaaacatc ttttatgatg 1320

gccctttgtc tgagcagtat ttatgaggat ctcaaaatgt accaggtgga gtttaagacc 1380

atgaatgcca agctgctgat ggacccaaag agacagattt tcctcgatca gaatatgctg 1440

gctgtgattg atgaactgat gcaggccttg aatttcaaca gcgaaaccgt tccccagaaa 1500

agcagtcttg aagaacctga cttttataag accaagatca aactgtgtat tctcctgcat 1560

gcctttagaa tcagagcagt cactatagat agagtgatgt cctacctgaa tgcttcctga 1620

tga 1623

<210> 17
<211> 1623
<212> RNA
<213> 智人

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1623)
<223> 人未最佳化的 IL-12sc（編碼 CDS 的 RNA）

<400> 17
augugucacc agcaguuggu caucucuugg uuuucccugg uuuuucuggc aucuccccuc 60

guggccauau gggaacugaa gaaagauguu uaugucguag aauuggauug guauccggau 120

gccccuggag aaaugguggu ccucaccugu gacaccccug aagaagaugg uaucaccugg 180

accuuggacc agagcaguga ggucuuaggc ucuggcaaaa cccugaccau ccaagucaaa 240

gaguuuggag augcuggcca guacaccugu cacaaaggag gcgagguucu aagccauucg 300

cuccugcugc uucacaaaaa ggaagaugga auuuggucca cugauauuuu aaaggaccag 360

aaagaaccca aaaauaagac cuuucuaaga ugcgaggcca agaauuauuc uggacguuuc 420

accugcuggu ggcugacgac aaucaguacu gauuugacau ucagugucaa aagcagcaga 480

gggucuucug acccccaagg ggugacgugc ggagcugcua cacucucugc agagagaguc 540

agaggggaca acaaggagua ugaguacuca guggagugcc aggaggacag ugccugccca 600

gcugcugagg agagucugcc cauugagguc augguggaug ccguucacaa gcucaaguau 660

gaaaacuaca ccagcagcuu cuucaucagg gacaucauca aaccugaccc acccaagaac 720

uugcagcuga agccauuaaa gaauucucgg cagguggagg ucagcuggga guacccugac 780

accuggagua cuccacauuc cuacuucucc cugacauucu gcguucaggu ccagggcaag 840

agcaagagag aaaagaaaga uagagucuuc acggacaaga ccucagccac ggucaucugc 900

cgcaaaaaug ccagcauuag cgugcgggcc caggaccgcu acuauagcuc aucuuggagc 960

gaaugggcau cugugcccug caguggcucu agcggagggg gaggcucucc uggcggggga 1020

ucuagcagaa accucccccgu ggccacucca gacccaggaa uguucccaug ccuucaccac 1080

ucccaaaacc ugcugagggc cgucagcaac augcuccaga aggccagaca aacucuagaa 1140

uuuuacccuu gcacuucuga ggaaauugau caugaagaua ucacaaaaga uaaaaccagc 1200

acaguggagg ccuguuuacc auuggaauua accaagaaug agaguugccu aaauuccaga 1260

gagaccucuu ucauaacuaa ugggaguugc cuggccucca gaaagaccuc uuuuaugaug 1320

gcccugugcc uuaguaguau uuaugaagac uugaagaugu accaggugga guucaagacc 1380

augaaugcaa agcuucugau ggauccuaag aggcagaucu uucuagauca aaacaugcug 1440

gcaguuauug augagcugau gcaggcccug aauuucaaca gugagacugu gccacaaaaa 1500

uccucccuug aagaaccgga uuuuuauaaa acuaaaauca agcucugcau acuucuucau 1560

gcuuucagaa uucgggcagu gacuauugau agagugauga gcuaucugaa ugcuuccuga 1620

uga 1623

<210> 18
<211> 1623
<212> RNA
<213> 智人

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1623)
<223> 人最佳化的 IL-12sc（編碼 CDS 的 RNA）

<400> 18
augugucacc agcagcuggu gaucucaugg uucucccugg uauuucuggc aucuccucuu 60

gucgcaaucu gggaacugaa gaaagacgug uaugucguug agcucgacug guauccggau 120

gcgccuggcg agaugguggu gcugaccugu gacaccccag aggaggaugg gaucacuugg 180

acccuugauc aauccuccga agugcucggg ucuggcaaga cucugaccau acaagugaaa 240

gaguuuggcg augccgggca guacacuugc cauaagggcg gagaaguucu gucccacuca 300

cugcugcugc ugcacaagaa agaggacgga auuuggagua ccgauauccu gaaagaucag 360

aaagagccca agaacaaaac cuucuugcgg ugcgaagcca agaacuacuc agggagauuu 420

acuuguuggu ggcugacgac gaucagcacc gaucugacuu ucuccgugaa aucaaguagg 480

ggaucaucug acccucaagg agucacaugu ggagcggcua cucugagcgc ugaacgcgua 540

agaggggaca auaaggagua cgaguauagc guugagugcc aagaggauag cgcaugcccc 600

gccgccgaag aaucauugcc cauugaagug augguggaug cuguacacaa gcugaaguau 660

gagaacuaca caagcuccuu cuucauccgu gacaucauca aaccagaucc uccuaagaac 720

cuccagcuua aaccucugaa gaacucuaga cagguggaag ugucuuggga guaucccgac 780

accuggucua caccacauuc cuacuucagu cucacauucu gcguucaggu acagggcaag 840

uccaaaaggg agaagaagga ucgggucuuu acagauaaaa caagugccac cguuauaugc 900

cggaagaaug ccucuauuuc ugugcgugcg caggacagau acuauagcag cucuuggagu 960

gaaugggcca gugucccaug uucaggguca uccgguggug gcggcagccc cggaggcggu 1020

agcuccagaa aucucccugu ggcuacaccu gauccaggca uguuucccug uuugcaccau 1080

agccaaaacc uccugagagc agucagcaac augcuccaga aagcuagaca aacacuggaa 1140

uucuacccau gcaccuccga ggaaauagau cacgaggaua ucacuaagga caaaacaagc 1200

acugucgaag caugccuucc cuuggaacug acaaagaacg agaguugccu uaauucaaga 1260

gaaacaucuu ucauuacaaa cgguagcugc uuggcaagca gaaaaacauc uuuuaugaug 1320

gcccuuuguc ugagcaguau uuaugaggau cucaaaaugu accaggugga guuuaagacc 1380

augaaugcca agcugcugau ggacccaaag agacagauuu uccucgauca gaauaugcug 1440

gcugugauug augaacugau gcaggccuug aauuucaaca gcgaaaccgu uccccagaaa 1500

agcagucuug aagaaccuga cuuuuauaag accaagauca aacuguguau ucuccugcau 1560

gccuuuagaa ucagagcagu cacuauagau agagugaugu ccuaccugaa ugcuuccuga 1620

uga 1623

<210> 19
<211> 188
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(188)
<223> 人 IFN-α-2b（胺基酸）

<400> 19

Met Ala Leu Thr Phe Ala Leu Leu Val Ala Leu Leu Val Leu Ser Cys
1 5 10 15

Lys Ser Ser Cys Ser Val Gly Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu
20 25 30

Gly Ser Arg Arg Thr Leu Met Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser
35 40 45

Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu
50 55 60

Glu Phe Gly Asn Gln Phe Gln Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His
65 70 75 80

Glu Met Ile Gln Gln Ile Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser
85 90 95

Ala Ala Trp Asp Glu Thr Leu Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr
100 105 110

Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly Val
115 120 125

Thr Glu Thr Pro Leu Met Lys Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys
130 135 140

Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro
145 150 155 160

Cys Ala Trp Glu Val Val Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu
165 170 175

Ser Thr Asn Leu Gln Glu Ser Leu Arg Ser Lys Glu
180 185

<210> 20
<211> 570
<212> DNA
<213> 智人

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(570)
<223> 人未最佳化的 IFN-α-2b (CDS DNA)

<400> 20
atggccttga cctttgcttt actggtggcc ctcctggtgc tcagctgcaa gtcaagctgc 60

tctgtgggct gtgatctgcc tcaaacccac agcctgggta gcaggaggac cttgatgctc 120

ctggcacaga tgaggagaat ctctcttttc tcctgcttga aggacagaca tgactttgga 180

tttccccagg aggagtttgg caaccagttc caaaaggctg aaaccatccc tgtcctccat 240

gagatgatcc agcagatctt caacctttc agcacaaagg actcatctgc tgcttgggat 300

gagaccctcc tagacaaatt ctacactgaa ctctaccagc agctgaatga cctggaagcc 360

tgtgtgatac agggggtggg ggtgacagag actcccctga tgaaggagga ctccattctg 420

gctgtgagga aatacttcca aagaatcact ctctatctga aagagaagaa atacagccct 480

tgtgcctggg aggttgtcag agcagaaatc atgagatctt tttctttgtc aacaaacttg 540

caagaaagtt taagaagtaa ggaatgatga 570

<210> 21
<211> 570
<212> DNA
<213> 智人

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(570)

<223> 人最佳化的 IFN-α-2b (CDS DNA)

<400> 21
atggccctga cttttgccct tctcgtggct ttgttggtgc tgagttgcaa atcttcctgt 60

agtgtcggat gtgatctgcc tcaaacccac agtctgggat ctaggagaac actgatgctg 120

ttggcacaga tgaggagaat tagcctcttt tcctgcctga aggatagaca tgacttcggc 180

tttccccaag aggagtttgg caatcagttc cagaaagcgg aaacgattcc cgttctgcac 240

gagatgatcc agcagatctt caacctcttt tcaaccaaag acagctcagc agcctgggat 300

gagacactgc tggacaaatt ctacacagaa ctgtatcagc agcttaacga tctggaggca 360

tgcgtgatcc aaggggttgg tgtgactgaa actccgctta tgaaggagga ctccattctg 420

gctgtacgga agtacttcca gagaataacc ctctatctga aggagaagaa gtactcacca 480

tgtgcttggg aagtcgtgag agccgaaatc atgagatcct tcagccttag caccaatctc 540

caggaatctc tgagaagcaa agagtgatga 570

<210> 22
<211> 570
<212> RNA
<213> 智人

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(570)
<223> 人未最佳化的 IFN-α-2b（編碼 CDS 的 RNA）

<400> 22
auggccuuga ccuuugcuuu acugguggcc cuccuggugc ucagcugcaa gucaagcugc 60

ucugugggcu gugaucugcc ucaaacccac agccugggua gcaggaggac cuugaugcuc 120

cuggcacaga ugaggagaau cucucuuuuc uccugcuuga aggacagaca ugacuuugga 180

uuuccccagg aggaguuugg caaccaguuc caaaaggcug aaaccauccc uguccuccau 240

gagaugaucc agcagaucuu caaccuuuuc agcacaaagg acucaucugc ugcuugggau 300

gagacccucc uagacaaauu cuacacugaa cucuaccagc agcugaauga ccuggaagcc 360

ugugugauac aggggguggg ggugacagag acucccccuga ugaaggagga cuccauucug 420

gcugugagga aauacuucca aagaaucacu cucuaucuga aagagaagaa auacagcccu 480

ugugccuggg agguugucag agcagaaauc augagaucuu uuucuuuguc aacaaacuug 540

caagaaaguu uaagaaguaa ggaaugauga 570

<210> 23
<211> 570
<212> RNA
<213> 智人

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(570)
<223> 人最佳化的 IFN-α-2b（編碼 CDS 的 RNA）

<400> 23
auggcccuga cuuuugcccu ucucguggcu uuguuggugc ugaguugcaa aucuuccugu 60

agugucggau gugaucugcc ucaaacccac agucugggau cuaggagaac acugaugcug 120

uuggcacaga ugaggagaau uagccucuuu uccugccuga aggauagaca ugacuucggc 180

uuuccccaag aggaguuugg caaucaguuc cagaaagcgg aaacgauucc cguucugcac 240

gagaugaucc agcagaucuu caaccucuuu ucaaccaaag acagcucagc agccugggau 300

gagacacugc uggacaaauu cuacacagaa cuguaucagc agcuuaacga ucuggaggca 360

ugcgugaucc aaggggguugg ugugacugaa acuccgcuua ugaaggagga cuccauucug 420

gcuguacgga aguacuucca gagaauaacc cucuaucuga aggagaagaa guacucacca 480

ugugcuuggg aagucgugag agccgaaauc augagauccu ucagccuuag caccaaucuc 540

caggaaucuc ugagaagcaa agagugauga 570

<210> 24
<211> 241
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(241)
<223> 人 IL-15 sushi（胺基酸）

<400> 24

Met Ala Pro Arg Arg Ala Arg Gly Cys Arg Thr Leu Gly Leu Pro Ala
1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Arg Pro Pro Ala Thr Arg Gly Ile Thr
20 25 30

Cys Pro Pro Pro Met Ser Val Glu His Ala Asp Ile Trp Val Lys Ser
35 40 45

Tyr Ser Leu Tyr Ser Arg Glu Arg Tyr Ile Cys Asn Ser Gly Phe Lys
50 55 60

Arg Lys Ala Gly Thr Ser Ser Leu Thr Glu Cys Val Leu Asn Lys Ala
65 70 75 80

Thr Asn Val Ala His Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys Ile Arg Asp
85 90 95

Pro Ala Leu Val His Gln Arg Pro Ala Pro Pro Gly Gly Gly Ser Gly
100 105 110

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Leu Gln Asn
115 120 125

Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu Ile Gln
130 135 140

Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val His Pro
145 150 155 160

Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln Val
165 170 175

Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val Glu Asn
180 185 190

Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn Val Thr

195 200 205

Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn Ile Lys
210 215 220

Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile Asn Thr
225 230 235 240

Ser

<210> 25
<211> 729
<212> DNA
<213> 智人

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(729)
<223> 人 IL-15 sushi (CDS DNA)

<400> 25
atggccccgc ggcgggcgcg cggctgccgg accctcggtc tcccggcgct gctactgctg 60

ctgctgctcc ggccgccggc gacgcggggc atcacgtgcc ctcccccccat gtccgtggaa 120

cacgcagaca tctgggtcaa gagctacagc ttgtactcca gggagcggta catttgtaac 180

tctggtttca agcgtaaagc cggcacgtcc agcctgacgg agtgcgtgtt gaacaaggcc 240

acgaatgtcg cccactggac aacccccagt ctcaaatgca ttagagaccc tgccctggtt 300

caccaaaggc cagcgccacc cgggggagga tctggcggcg gtgggtctgg cgggggatct 360

ggcggaggag gaagcttaca gaactgggtg aatgtaataa gtgatttgaa aaaaattgaa 420

gatcttattc aatctatgca tattgatgct actttatata cggaaagtga tgttcacccc 480

agttgcaaag taacagcaat gaagtgcttt ctcttggagt tacaagttat ttcacttgag 540

tccggagatg caagtattca tgatacagta gaaaatctga tcatcctagc aaacaacagt 600

ttgtcttcta atgggaatgt aacagaatct ggatgcaaag aatgtgagga actggaggaa 660

aaaaatatta aagaattttt gcagagtttt gtacatattg tccaaatgtt catcaacact 720

tcttgatga 729

<210> 26
<211> 729
<212> RNA
<213> 智人

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(729)
<223> 人 IL-15 sushi（編碼 CDS 的 RNA）

<400> 26
auggccccgc ggcgggcgcg cggcugccgg acccucgguc ucccggcgcu gcuacugcug 60

cugcugcucc ggccgccggc gacgcggggc aucacgugcc cucccccccau guccguggaa 120

cacgcagaca ucugggucaa gagcuacagc uuguacucca gggagcggua cauuuguaac 180

ucugguuuca agcguaaagc cggcacgucc agccugacgg agugcguguu gaacaaggcc 240

acgaaugucg cccacuggac aacccccagu cucaaaugca uuagagaccc ugcccugguu 300

caccaaaggc cagcgccacc cgggggagga ucuggcggcg gugggucugg cgggggaucu 360

ggcggaggag gaagcuuaca gaacugggug aauguaauaa gugauuugaa aaaaauugaa 420

gaucuuauuc aaucuaugca uauugaugcu acuuuauaua cggaaaguga uguucacccc 480

aguugcaaag uaacagcaau gaagugcuuu cucuuggagu uacaaguuau uucacuugag 540

uccggagaug caaguauuca ugauacagua gaaaaucuga ucauccuagc aaacaacagu 600

uugucuucua augggaaugu aacagaaucu ggaugcaaag aaugugagga acuggaggaa 660

aaaaauauua aagaauuuuu gcagaguuuu guacauauug uccaaauguu caucaacacu 720

ucuugauga 729

<210> 27
<211> 144
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(144)
<223> 人GM-CSF（胺基酸）

<400> 27

Met Trp Leu Gln Ser Leu Leu Leu Leu Gly Thr Val Ala Cys Ser Ile
1 5 10 15

Ser Ala Pro Ala Arg Ser Pro Ser Pro Ser Thr Gln Pro Trp Glu His
20 25 30

Val Asn Ala Ile Gln Glu Ala Arg Arg Leu Leu Asn Leu Ser Arg Asp
35 40 45

Thr Ala Ala Glu Met Asn Glu Thr Val Glu Val Ile Ser Glu Met Phe
50 55 60

Asp Leu Gln Glu Pro Thr Cys Leu Gln Thr Arg Leu Glu Leu Tyr Lys
65 70 75 80

Gln Gly Leu Arg Gly Ser Leu Thr Lys Leu Lys Gly Pro Leu Thr Met
85 90 95

Met Ala Ser His Tyr Lys Gln His Cys Pro Pro Thr Pro Glu Thr Ser
100 105 110

Cys Ala Thr Gln Ile Ile Thr Phe Glu Ser Phe Lys Glu Asn Leu Lys
115 120 125

Asp Phe Leu Leu Val Ile Pro Phe Asp Cys Trp Glu Pro Val Gln Glu
130 135 140

<210> 28
<211> 438
<212> DNA
<213> 智人

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(438)
<223> 人GM-CSF (CDS DNA)

<400> 28
atgtggctcc agagcctgct gctcttgggc actgtggcct gctccatctc tgcacccgcc 60

cgctcgccca gccccagcac gcagccctgg gagcatgtga atgccatcca ggaggcccgg 120

cgtctgctga acctgagtag agacactgct gctgagatga atgaaacagt agaagtcatc 180

tcagaaatgt ttgacctcca ggagccgacc tgcctacaga cccgcctgga gctgtacaag 240

cagggcctgc ggggcagcct caccaagctc aagggcccct tgaccatgat ggccagccac 300

tacaagcagc actgccctcc aaccccggaa acttcctgtg caacccagat tatcaccttt 360

gaaagtttca aagagaacct gaaggacttt ctgcttgtca tccccttga ctgctgggag 420

ccagtccagg agtgatga 438

<210> 29
<211> 438
<212> RNA
<213> 智人

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(438)
<223> 人 GM-CSF（編碼 CDS 的 RNA）

<400> 29
auguggcucc agagccugcu gcucuugggc acuguggccu gcuccaucuc ugcacccgcc 60

cgcucgccca gccccagcac gcagcccugg gagcauguga augccaucca ggaggcccgg 120

cgucugcuga accugaguag agacacugcu gcugagauga augaaacagu agaagucauc 180

ucagaaaugu uugaccucca ggagccgacc ugccuacaga cccgccugga gcuguacaag 240

cagggccugc ggggcagccu caccaagcuc aagggccccu ugaccaugau ggccagccac 300

uacaagcagc acugcccucc aaccccggaa acuuccugug caacccagau uaucaccuuu 360

gaaaguuuca aagagaaccu gaaggacuuu cugcuuguca uccccuuuga cugcugggag 420

ccaguccagg agugauga 438

<210> 30
<211> 110
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成：示例性聚 A

<400> 30
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa gcauaugacu aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 60

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 110

<210> 31
<211> 444
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成：抗 PD1 Mab 重鏈

<400> 31

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Val Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Phe
20 25 30

Gly Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Gly Ile Ser Gly Gly Gly Arg Asp Thr Tyr Phe Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Gly Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Val Lys Trp Gly Asn Ile Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
115 120 125

Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys
130 135 140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
145 150 155 160

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
165 170 175

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
180 185 190

Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn
195 200 205

Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro
210 215 220

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
225 230 235 240

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
245 250 255

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe
260 265 270

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
275 280 285

Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
290 295 300

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
305 310 315 320

Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
325 330 335

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln
340 345 350

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
355 360 365

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
370 375 380

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
385 390 395 400

Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu
405 410 415

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
420 425 430

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440

<210> 32
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成：抗PD1 Mab輕鏈

<400> 32

```
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1               5                  10                  15

Asp Ser Ile Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Leu Ser Ile Asn Thr Phe
            20                  25                  30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Asn Leu Leu Ile
        35                  40                  45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu His Gly Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Arg Thr Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Asn Thr Pro Phe
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Val Val Asp Phe Arg Arg Thr Val Ala Ala
            100                 105                 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
        115                 120                 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
    130                 135                 140
```

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 33
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成：HCDR1

<400> 33

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Phe Gly
1 5

<210> 34
<211> 8

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成：HCDR2

<400> 34

Ile Ser Gly Gly Gly Arg Asp Thr
1 5

<210> 35
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成：HCDR3

<400> 35

Val Lys Trp Gly Asn Ile Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 36
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成：LCDR1

<400> 36

Leu Ser Ile Asn Thr Phe
1 5

<210> 37
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成：LCDR2

<400> 37

Ala Ala Ser
1

<210> 38
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成：LCDR3

<400> 38

Gln Gln Ser Ser Asn Thr Pro Phe Thr
1 5

<210> 39
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成：抗PD1 Mab VH

<400> 39

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Val Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Phe
20 25 30

Gly Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Gly Ile Ser Gly Gly Gly Arg Asp Thr Tyr Phe Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Gly Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Val Lys Trp Gly Asn Ile Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 40
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成：抗PD1 Mab VL

<400> 40

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Ser Ile Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Leu Ser Ile Asn Thr Phe
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Asn Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu His Gly Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Arg Thr Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Asn Thr Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Val Val Asp Phe Arg
100 105

<210> 41
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成：sgRNA

<400> 41
ggcgtatgta tcagtctcag 20

【發明申請專利範圍】

【請求項1】 一種有效量之RNA用於製備藥物的用途，該RNA包括編碼IL-12sc蛋白的RNA、編碼IL-15 sushi蛋白的RNA、編碼IFNα蛋白的RNA、和編碼GM-CSF蛋白的RNA，其中該受試者係抗計劃性細胞死亡1（PD-1）或抗計劃性細胞死亡1配位基1（PD-L1）療法已經失敗或對其變得不耐受、有抗性或難治的，該藥物與抗計劃性細胞死亡1（PD-1）抗體組合以治療患有實性瘤癌症之受試者。

【請求項2】 如申請專利範圍第1項所述之用途，其中：

i. 該受試者患有(a) 抗PD-1抗性實性瘤癌症、(b) 抗PD-L1抗性實性瘤癌症，或(c) (a)及(b)兩者；或

ii. 該受試者患有(a) 對抗PD-1療法具有後天型抗性的實性瘤癌症、(b) 對抗PD-L1療法具有後天型抗性的實性瘤癌症，或(c) (a)及(b)兩者；或

iii. 該受試者患有(a) 對抗PD-1療法具有先天性抗性的實性瘤癌症、(b) 對抗PD-L1療法具有先天性抗性的實性瘤癌症，或(c) (a)及(b)兩者；或

iv. 該受試者患有晚期、不可切除或轉移性實性瘤癌症；或

v. 該難治性或抗性癌症係對指定治療無反應的一種癌症；或

vi. 該難治性從治療的最開始就發生；或

vii. 該難治性發生在治療期間；或

viii. 該癌症在治療開始之前具有抗性；或

ix. 該受試者患有(a) 對該抗計劃性細胞死亡1（PD-1）療法無反應之癌症、(b) 對抗計劃性細胞死亡1配位基1（PD-L1）療法無反應之癌症，或(c) (a)及(b)兩者；或

x. 該受試者患有對指定治療變得難治或有抗性之癌症，其中該指定治療係抗PD1或抗PD-L1療法；或

xi. 自首次接受該療法以來，該受試者對該療法的反應減弱；或

xii. 該受試者尚未接受該療法，但是患有普遍地對該療法無反應的類型之癌症。

【請求項3】如申請專利範圍第1項所述之用途，其中該用途進一步包括選擇抗計劃性細胞死亡1（PD-1）或抗計劃性細胞死亡1配位基1（PD-L1）療法已經失敗或對其變得不耐受、有抗性或難治之受試者。

【請求項4】如申請專利範圍第1項所述之用途，其中下列(i)至(ix)中一或多者係被滿足：

i. 該受試者係人類；

ii. 該受試者患有轉移性實性瘤；

iii. 該受試者患有不可切除的實性瘤；

iv. 該受試者先前未曾接受過抗PD-1或抗PD-L1療法治療；

v. 該受試者沒有其他治療選擇；

vi. 該受試者患有兩處或三處腫瘤病變；

vii. 該受試者患有可根據實性瘤反應評價標準（RECIST）1.1標準測量的疾病；

viii. 該受試者的預期壽命超過3個月；或

ix. 該受試者為至少18歲。

【請求項5】如申請專利範圍第1項所述之用途，其中該受試者有癌細胞，該癌細胞包含β2-微球蛋白（B2M）功能之部分或全部損失。

【請求項6】如申請專利範圍第1項所述之用途，其中該受試者包含含有B2M基因突變的細胞。

【請求項7】如申請專利範圍第6項所述之用途，其中該突變係取代、插入或缺失。

【請求項8】如申請專利範圍第5項所述之用途，其中該B2M基因包含異質性消失（loss of heterozygosity，LOH）。

【請求項9】如申請專利範圍第6項所述之用途，其中該突變係框移突變。

【請求項10】如申請專利範圍第9項所述之用途，其中下列(i)至(ii)中一或多者係被滿足：

i. 該框移突變在B2M的外顯子1中；或

ii. 該框移突變包含p.Leu13fs、p.Ser14fs，或p.Leu13fs及p.Ser14fs兩者。

【請求項11】如申請專利範圍第5項所述之用途，其中下列(i)至(ii)中一或多者係被滿足：

i. 與沒有發生B2M功能之部分或全部損失之受試者相比，該受試者具有降低的B2M蛋白量；或

ii. 與對照相比，該受試者具有降低的主要組織相容性複合物I類（MHC I）表面表現量，視需要其中該對照係來自同一受試者的非癌症樣本。

【請求項12】如申請專利範圍第1項所述之用途，其中該實性瘤癌症係上皮腫瘤、前列腺腫瘤、卵巢腫瘤、腎細胞腫瘤、胃腸道腫瘤、肝腫瘤、大腸直腸腫瘤、脈管系統腫瘤、間皮瘤、胰腺腫瘤、乳房腫瘤、肉瘤、肺腫瘤、結腸腫瘤、黑色素瘤、小細胞肺腫瘤、非小細胞肺癌、神經母細胞瘤、睾丸腫瘤、上皮癌腫瘤、腺癌腫瘤、精原細胞瘤、視網膜母細胞瘤、皮膚鱗狀上皮細胞癌（CSCC）、頭頸部鱗狀上皮細胞癌（HNSCC）、頭頸癌、骨肉瘤、腎臟腫瘤、甲狀腺腫瘤、間變性甲狀腺癌（ATC）、肝腫瘤、結腸腫瘤或其他適於瘤內注射的實性瘤。

【請求項13】如申請專利範圍第1項所述之用途，其中該實性瘤癌症係淋巴瘤。

【請求項14】如申請專利範圍第13項所述之用途，其中該淋巴瘤係非何杰金氏淋巴瘤或何杰金氏淋巴瘤。

【請求項15】如申請專利範圍第1項所述之用途，其中：

i. 該實性瘤癌症係黑色素瘤；或

ii. 該實性瘤癌症係係葡萄膜黑色素瘤或黏膜黑色素瘤；或

iii. 該實性瘤癌症係黑色素瘤，該黑色素瘤包括(a) 適於瘤內注射的淺表轉移、(b) 適於瘤內注射的皮下轉移、(c) 適於瘤內注射的淋巴結轉移，或(d) (a)至(c)的任意組合；或

iv. 該實性瘤癌症係(a) 僅在黏膜部位的HNSCC、(b) 僅在黏膜部位的黏膜黑色素瘤，或(c) (a)及(b)兩者。

【請求項16】 如申請專利範圍第1項所述之用途，其中該實性瘤癌症不是黑色素瘤。

【請求項17】 如申請專利範圍第1項所述之用途，其中該受試者患有多於一種實性瘤。

【請求項18】 如申請專利範圍第17項所述之用途，其中至少一種腫瘤對抗PD-1或抗PD-L1療法具有抗性、難治性或不耐受性，並且至少一種腫瘤對抗PD-1或抗PD-L1療法沒有抗性、難治性或不耐受性。

【請求項19】 如申請專利範圍第18項所述之用途，其中抗性和非抗性腫瘤均可被成功治療。

【請求項20】 如申請專利範圍第1項所述之用途，其中下列(i)至(iii)中一或多者係被滿足：

i. 該實性瘤癌症係III期、III期子集、IV期或IV期子集；

ii. 該實性瘤癌症係晚期且不可切除的；

iii. 該實性瘤癌症已經從其起源擴散到該受試者的另一個部位。

【請求項21】 如申請專利範圍第1項所述之用途，其中下列(i)至(vii)中一或多者係被滿足：

i. 該實性瘤癌症具有一處或多處皮膚或皮下病變，視需要其中該癌症不是皮膚癌；

ii. 該實性瘤癌症係IIIB期、IIIC期或IV期黑色素瘤；

iii. 該實性瘤癌症係其中抗PD-1或抗PD-L1療法並非常規使用的一種癌症；

iv. 該實性瘤癌症不是黑色素瘤、非小細胞肺癌、腎癌、頭頸癌、乳癌或CSCC；

v. 該實性瘤癌症係常規使用抗PD1或抗PD-L1療法但尚未用該療法治療的一種癌症；

vi. 該實性瘤癌症係對抗PD-1或抗PD-L1療法(a) 具有抗性的IIIB期、IIIC期或不可切除的IV期黑色素瘤、(b) 具有難治性的IIIB期、IIIC期或不可切除的IV期黑色素瘤，或(c) (a)及(b)兩者；或

vii. 該實性瘤癌症具有(a) 淺表或皮下病變、(b) 淺表或皮下轉移，或(c) (a)及(b)兩者。

【請求項22】 如申請專利範圍第1項所述之用途，其中

i. 該實性瘤癌症不是黑色素瘤、CSCC或HNSCC；以及

ii. 抗PD-1或抗PD-L1療法不是常規使用的；以及

iii. 沒有其他合適的治療選擇。

【請求項23】 一種有效量的RNA用於製備藥物的用途，該RNA包括編碼IL-12sc蛋白的RNA、編碼IL-15 sushi蛋白的RNA、編碼IFNα蛋白的RNA和編碼GM-CSF蛋白的RNA，該藥物與抗計劃性細胞死亡1（PD-1）抗體組合用以治療患有晚期黑色素瘤之受試者，其中：

i. 該受試者為至少18歲；

ii. 該受試者先前的抗PD1或抗PD-L1療法失敗；

iii. 該受試者至少有2處病變；以及

iv. 該黑色素瘤包括適合於直接瘤內注射的腫瘤。

【請求項24】 如申請專利範圍第1項所述之用途，其中：

i. 該編碼IL-12sc蛋白的RNA包含SEQ ID NO: 17或18之核苷酸序列，或者與SEQ ID NO: 17或18之核苷酸序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%同一性之核苷酸序列；或

ii. 該IL-12sc蛋白包含SEQ ID NO: 14的胺基酸序列，或者與SEQ ID NO: 14的胺基酸序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%同一性的胺基酸序列；或

iii.該編碼IL-12sc蛋白的RNA包含與IL-12sc的p40部分（SEQ ID NO: 17或18的核苷酸1至984）具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%同一性以及與IL-12sc的p30部分（SEQ ID NO: 17或18的核苷酸1027至1623）具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%同一性之核苷酸序列，並且進一步包含p40和p35部分之間編碼連接子多肽之核苷酸；或

iv.(i)至(iii)的任意組合。

【請求項25】如申請專利範圍第1項所述之用途，其中：

i. 該編碼IL-15 sushi蛋白的RNA包含SEQ ID NO: 26之核苷酸序列，或與SEQ ID NO: 26之核苷酸序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%同一性之核苷酸序列；或

ii. 該IL-15 sushi蛋白包含SEQ ID NO: 24的胺基酸序列，或者與SEQ ID NO: 24的胺基酸序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%同一性的胺基酸序列；或

iii.該編碼IL-15 sushi蛋白的RNA包含與IL-15受體α的sushi結構域（SEQ ID NO: 26的核苷酸1至321）具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%同一性以及與成熟IL-15（SEQ ID NO: 26的核苷酸382至729）具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%同一性之核苷酸序列，並且視需要進一步包含IL-15的sushi結構域和成熟IL-15之間編碼連接子多肽之核苷酸；或

iv.(i)至(iii)的任意組合。

【請求項26】如申請專利範圍第1項所述之用途，其中：

i. 該編碼IFNα蛋白的RNA包含SEQ ID NO: 22或23之核苷酸序列，或者與SEQ ID NO: 22或23之核苷酸序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%同一性之核苷酸序列，或

ii. 該IFNα蛋白包含SEQ ID NO: 19的胺基酸序列，或者與SEQ ID NO: 19的胺基酸序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%同一性的胺基酸序列；或

iii.(i)及(ii)兩者。

【請求項27】 如申請專利範圍第1項所述之用途，其中：

i. 該編碼GM-CSF蛋白的RNA包含SEQ ID NO: 29之核苷酸序列，或者與SEQ ID NO: 29之核苷酸序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%同一性之核苷酸序列，或

ii. 該GM-CSF蛋白包含SEQ ID NO: 27的胺基酸序列，或者與SEQ ID NO: 27的胺基酸序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%同一性的胺基酸序列；或

iii.(i)及(ii)兩者。

【請求項28】 如申請專利範圍第1項所述之用途，其中至少一種RNA包含代替至少一個尿苷的經修飾核苷。

【請求項29】 如申請專利範圍第28項所述之用途，其中該經修飾核苷獨立地選自假尿苷（ψ）、N1至甲基-假尿苷（$m^1\psi$）和5-甲基-尿苷（m^5U）。

【請求項30】 如申請專利範圍第1項所述之用途，其中下列(i)至(vii)中至少一者係被滿足：

i. 至少一種RNA包含5' 帽 $m_2^{7,3'\text{-}O}Gppp(m_1^{2'\text{-}O})ApG$ 或 3´-O-Me-m^7G(5')ppp(5')G；

ii. 每種RNA包含5' 帽 $m_2^{7,3'\text{-}O}Gppp(m_1^{2'\text{-}O})ApG$ 或 3´-O-Me-m^7G(5')ppp(5')G；

iii. 至少一種RNA包含5'UTR，該5'UTR包含選自由SEQ ID NO: 4和6組成之群組之核苷酸序列，或與選自由SEQ ID NO: 4和6組成之群組之核苷酸序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%同一性之核苷酸序列；

iv. 每種RNA包含5'UTR，該5'UTR包含選自由SEQ ID NO: 4和6組成之群組之核苷酸序列，或與選自由SEQ ID NO: 4和6組成之群組之核苷酸序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%同一性之核苷酸序列；

v. 至少一種RNA包含3'UTR，該3'UTR包含SEQ ID NO: 8之核苷酸序列，或與SEQ ID NO: 8之核苷酸序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%同一性之核苷酸序列；

vi. 每種RNA包含3'UTR，該3'UTR包含SEQ ID NO: 8之核苷酸序列，或與SEQ ID NO: 8之核苷酸序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%同一性之核苷酸序列；

vii. 至少一種RNA包含聚A尾。

【請求項31】 如申請專利範圍第1項所述之用途，其中一種或多種RNA包括：

i. 5'帽，該5'帽包含$m_2^{7,3'-O}$Gppp($m_1^{2'-O}$)ApG或3´-O-Me-m^7G(5')ppp(5')G；

ii. 5'UTR，該5'UTR包含 (i) 選自由SEQ ID NO: 4和6組成之群組之核苷酸序列，或 (ii) 與選自由SEQ ID NO: 4和6組成之群組之核苷酸序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%同一性之核苷酸序列；

iii. 3'UTR，該3'UTR包含 (i) SEQ ID NO: 8之核苷酸序列，或 (ii) 與SEQ ID NO: 8之核苷酸序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%或80%同一性之核苷酸序列；以及

iv. 包含至少100個核苷酸的聚A尾。

【請求項32】 如申請專利範圍第1項所述之用途，其中在受試者中治療實性瘤癌症包括減小腫瘤大小或預防癌症轉移。

【請求項33】 如申請專利範圍第1項所述之方法，其中下列(i)至(vii)中一或多者係被滿足：

i. 該等RNA係同時施用的；

ii. 該等RNA係藉由注射施用的，其中在注射之前將該等RNA在液體溶液中混合在一起；或

iii. 該等RNA在新輔助療法環境中施用。

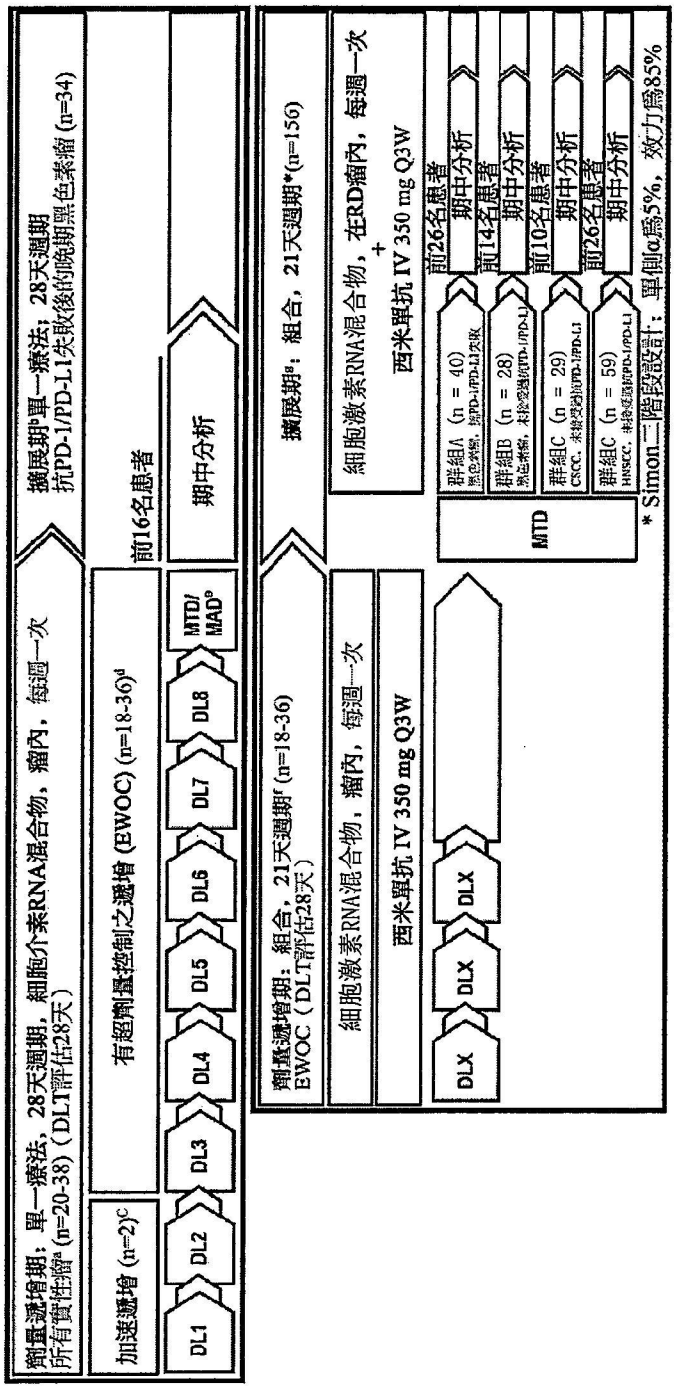
【請求項34】如申請專利範圍第1項所述之用途，其中該抗PD1抗體係西米單抗、派姆單抗、納武單抗、MEDI0608、PDR001、PF-06801591、BGB-A317、皮地珠單抗、TSR-042、AGEN-2034、A-0001、BGB-108、BI-754091、CBT-501、ENUM-003、ENUM-388D4、IBI-308、JNJ-63723283、JS-001、JTX-4014、JY-034、CLA-134、STIA-1110、244C8或388D4。

【請求項35】如申請專利範圍第1項所述之用途，其中該抗PD1抗體(a) 藉由注射施用、(b) 藉由靜脈內施用，或(c) (a)及(b)兩者。

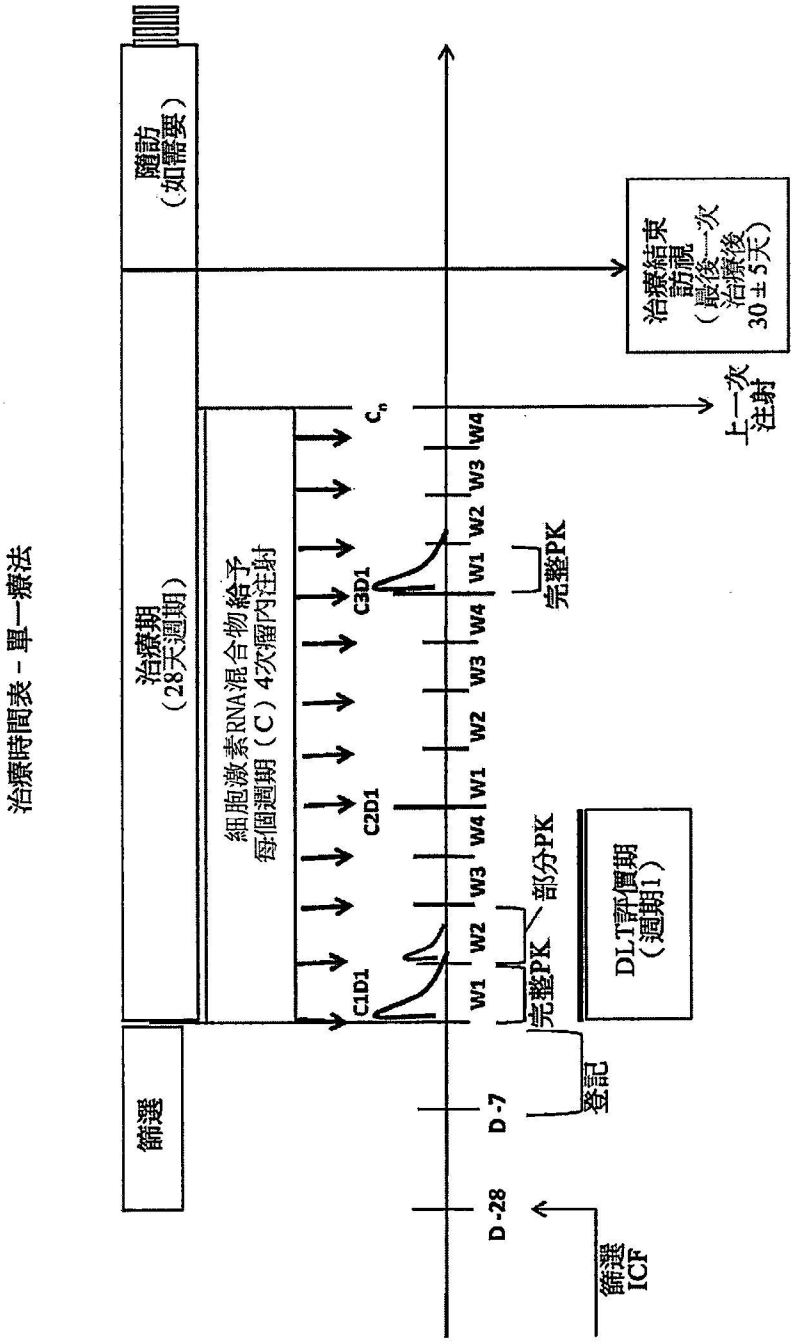
【請求項36】如申請專利範圍第1項所述之用途，其中該等RNA在新輔助療法環境中施用。

【請求項37】如申請專利範圍第1項所述之用途，其中該等RNA係瘤內施用。

【發明圖式】

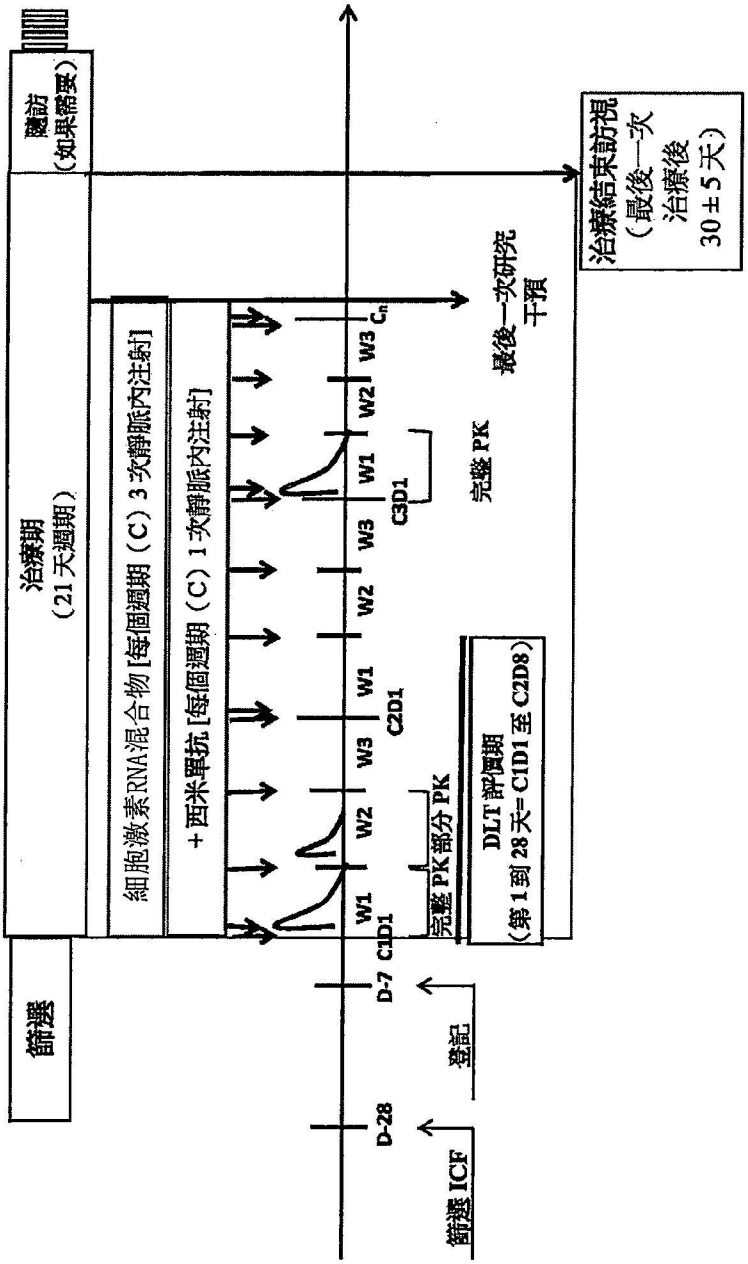

劑量遞增期：單一療法，28天週期，細胞介素RNA混合物，瘤內，每週一次
所有實性瘤[a] (n=20-38) (DLT評估28天)
擴展期[e]單一療法；28天週期
抗PD-1/PD-L1失敗後的晚期黑色素瘤 (n=34)
加速遞增 (n=2)[c]
有超劑量控制之遞增 (EWOC) (n=18-36)[d]
前16名患者
DL1
DL2
DL3
DL4
DL5
DL6
DL7
DL8
MTD/MAD[b]
期中分析
劑量遞增期：組合，21天週期[f] (n=18-36)
EWOC（DLT評估28天）
擴展期[g]：組合，21天週期*(n=156)
細胞激素RNA混合物，瘤內，每週一次
西米單抗 IV 350 mg Q3W
細胞激素RNA混合物，在RD瘤內，每週一次
+
西米單抗 IV 350 mg Q3W
DLX
DLX
DLX
MTD
前26名患者
群組A (n = 40)
期中分析
前14名患者
群組B (n = 28)
期中分析
前10名患者
群組C (n = 29)
期中分析
前26名患者
群組C (n = 59)
期中分析
* Simon二階段設計；單側α爲5%，效力爲85%

【圖1A】

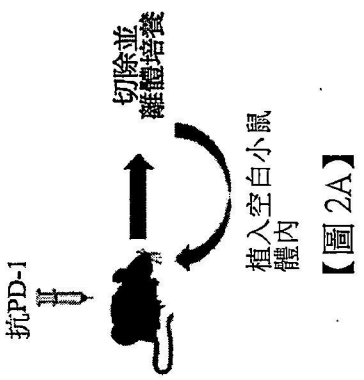

治療時間表 - 單一療法
隨訪
（如需要）
治療期
（28天週期）
細胞激素RNA混合物給予
每個週期（C）4次靜內注射
治療結束
訪視
（最後一次
治療後
30±5天）
上一次
注射
C1D1
C2D1
C3D1
W1
W2
W3
W4
完整PK
部分PK
DLT評價期
（週期1）
篩選
D -7
登記
D -28
篩選
ICF

【圖1B】

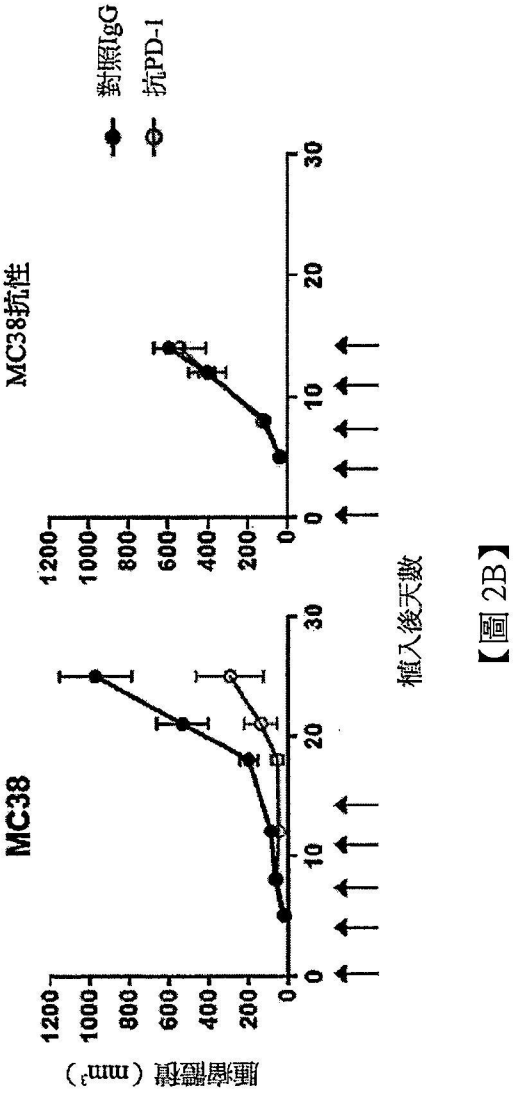
治療時間表-組合療法



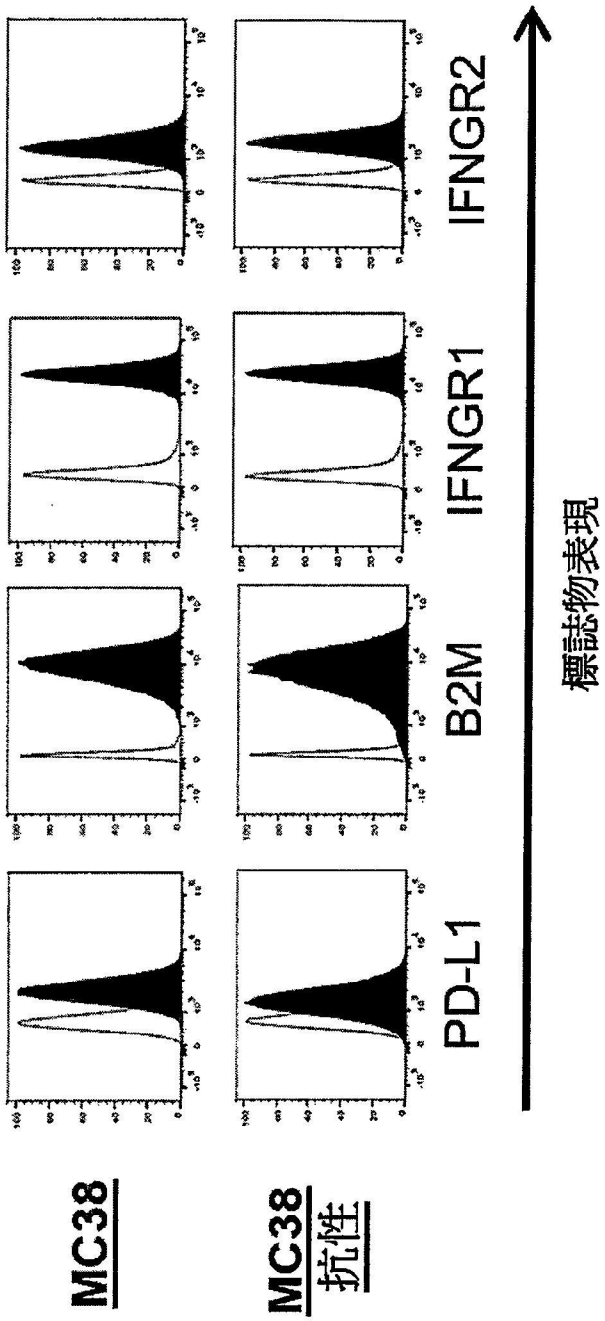
【圖1C】


抗PD-1
切除並
離體培養
植入空白小鼠
體內

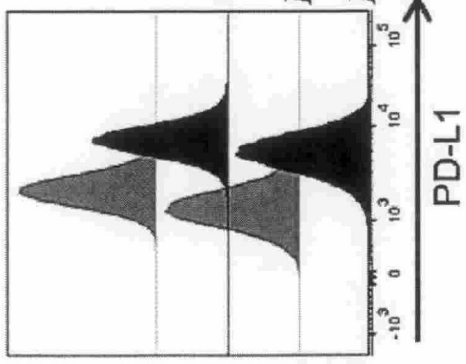
【圖 2A】


MC38抗性
對照IgG
抗PD-1
MC38
腫瘤體積 (mm³)
植入後天數
0
200
400
600
800
1000
1200
10
20
30

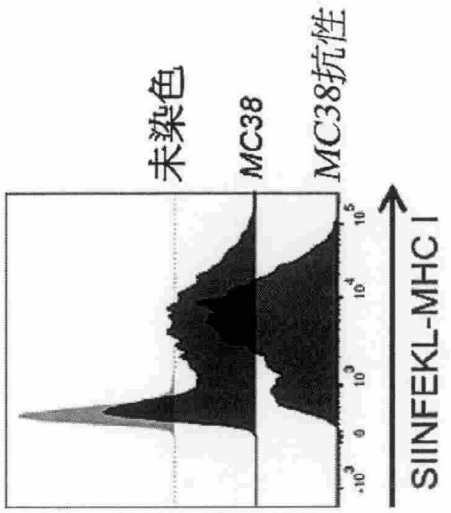
【圖 2B】



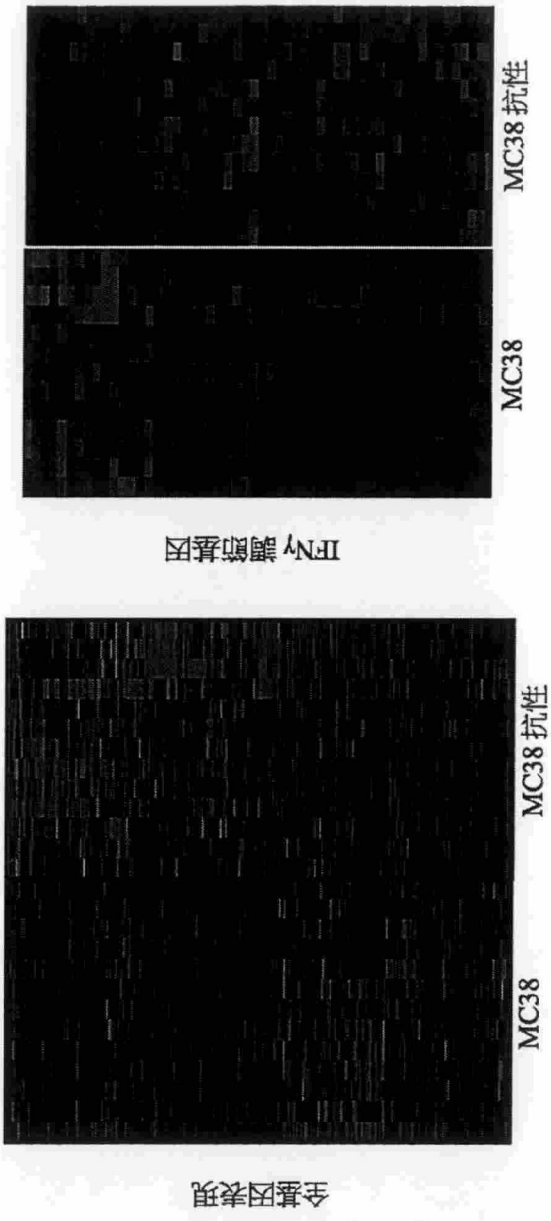
【圖2C】


細胞株
IFNγ
MC38
-
MC38
+
MC38抗性
-
MC38抗性
+
PD-L1

【圖 2D】

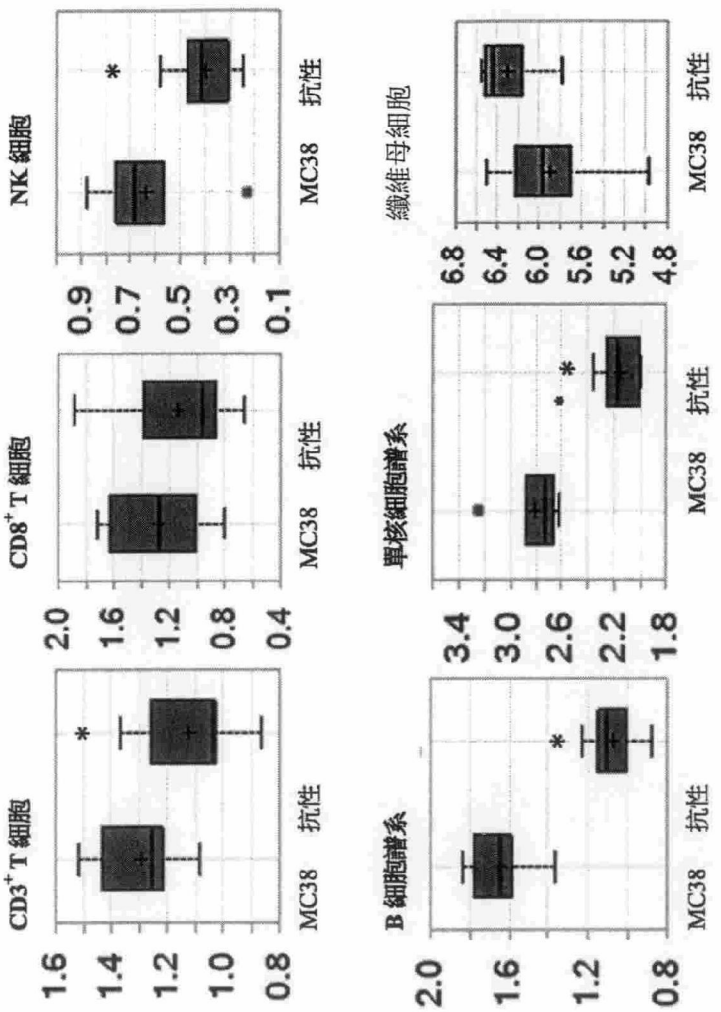

未染色
MC38
MC38抗性
SIINFEKL-MHC I

【圖 2E】

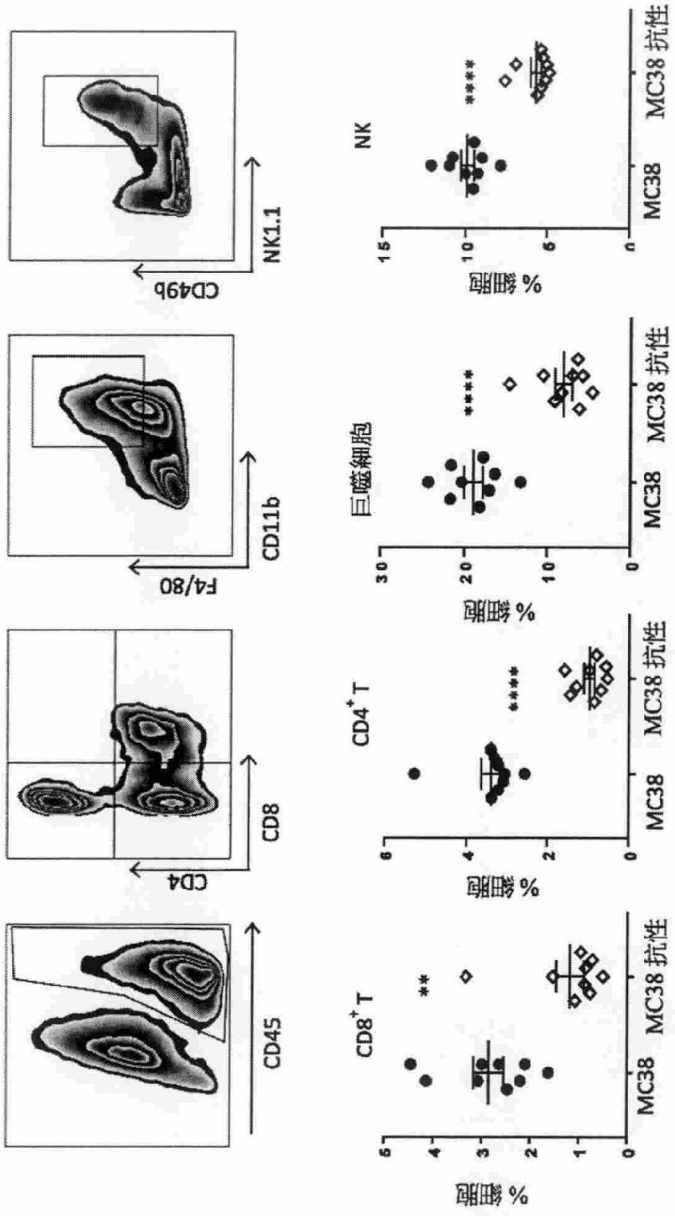


【圖 2G】

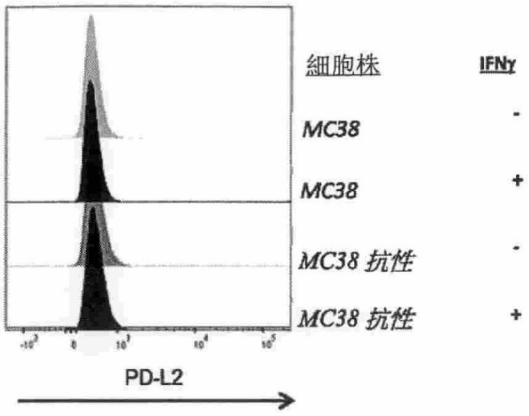
【圖 2F】


CD3+ T 細胞
CD8+ T 細胞
NK 細胞
B 細胞譜系
單核細胞譜系
纖維母細胞
MC38
抗性
MCPCounter得分

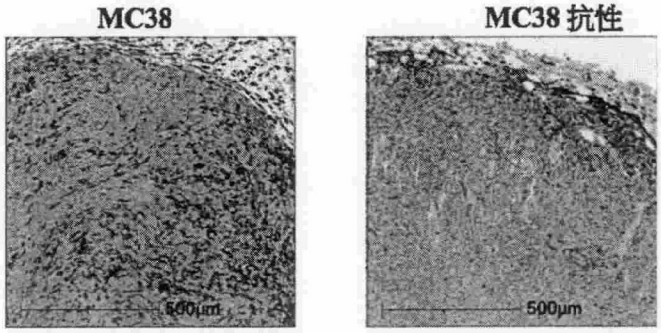
【圖2H】


CD45
CD4
CD8
F4/80
CD11b
CD49b
NK1.1
CD8+ T
CD4+ T
巨噬細胞
NK
% 細胞
MC38
MC38 抗性
**
****

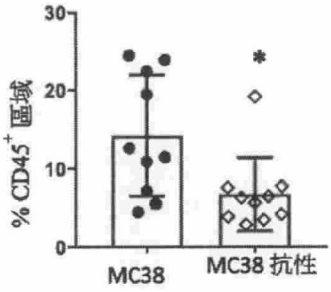
【圖2I】


細胞株
IFNγ
MC38
-
MC38
+
MC38 抗性
-
MC38 抗性
+
PD-L2

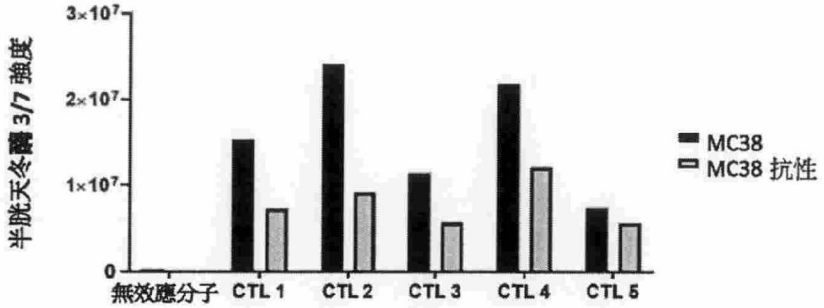
【圖3】


MC38
MC38 抗性
500μm
500μm

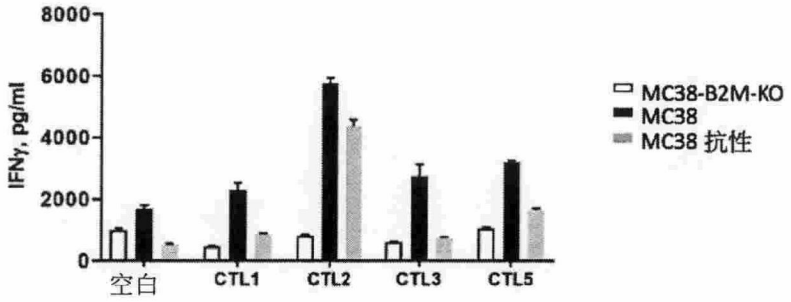
【圖4A】


30
20
10
0
% CD45+ 區域
*
MC38
MC38 抗性

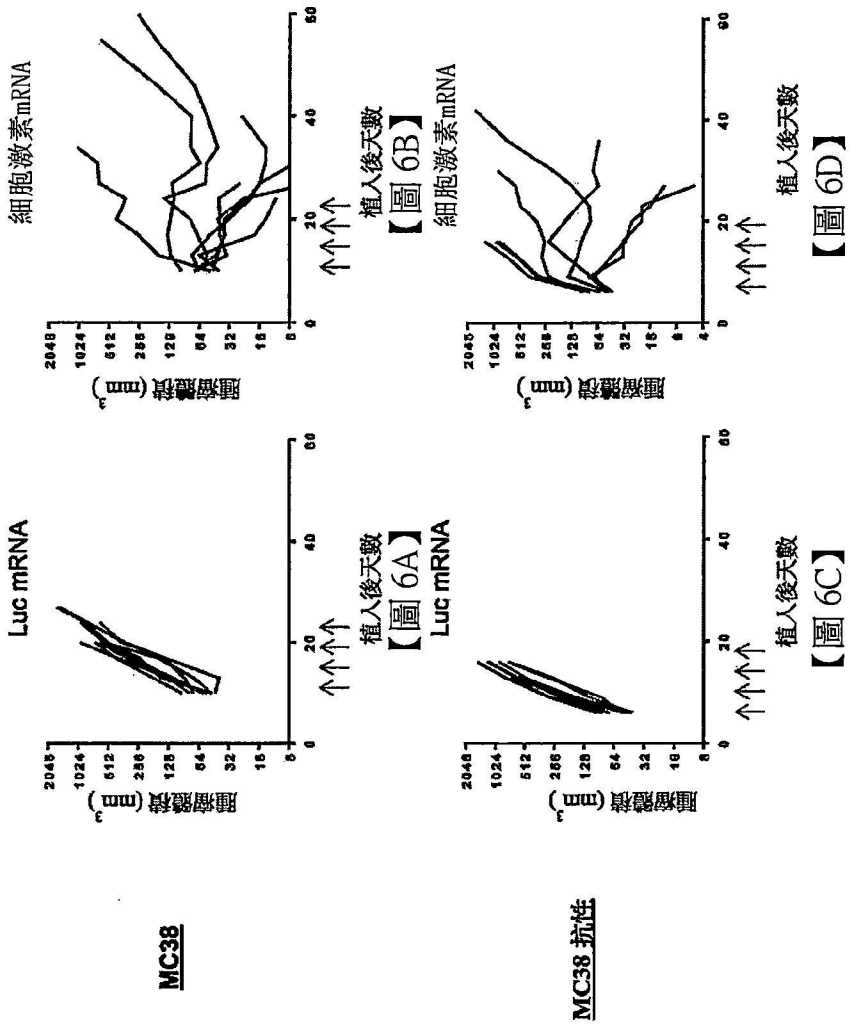
【圖4B】

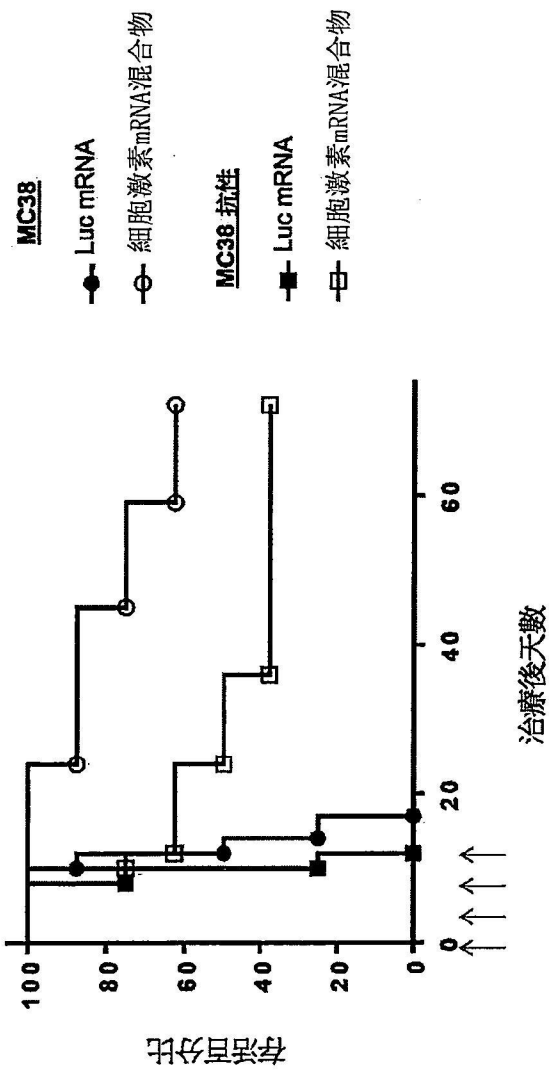

3×10⁷
2×10⁷
1×10⁷
0
半胱天冬酶 3/7 強度
無效應分子
CTL 1
CTL 2
CTL 3
CTL 4
CTL 5
MC38
MC38 抗性

【圖5A】

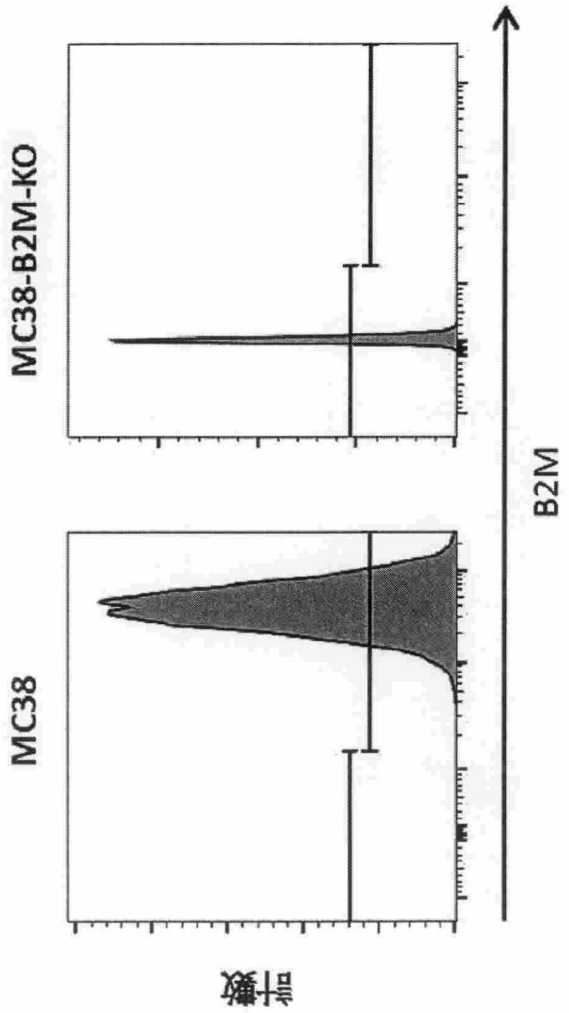

8000
6000
4000
2000
0
IFNγ, pg/ml
空白
CTL1
CTL2
CTL3
CTL5
MC38-B2M-KO
MC38
MC38 抗性

【圖5B】


MC38
Luc mRNA
腫瘤體積 (mm³)
植入後天數
【圖 6A】
細胞激素mRNA
腫瘤體積 (mm³)
植入後天數
【圖 6B】
MC38 抗性
Luc mRNA
腫瘤體積 (mm³)
植入後天數
【圖 6C】
細胞激素mRNA
腫瘤體積 (mm³)
植入後天數
【圖 6D】

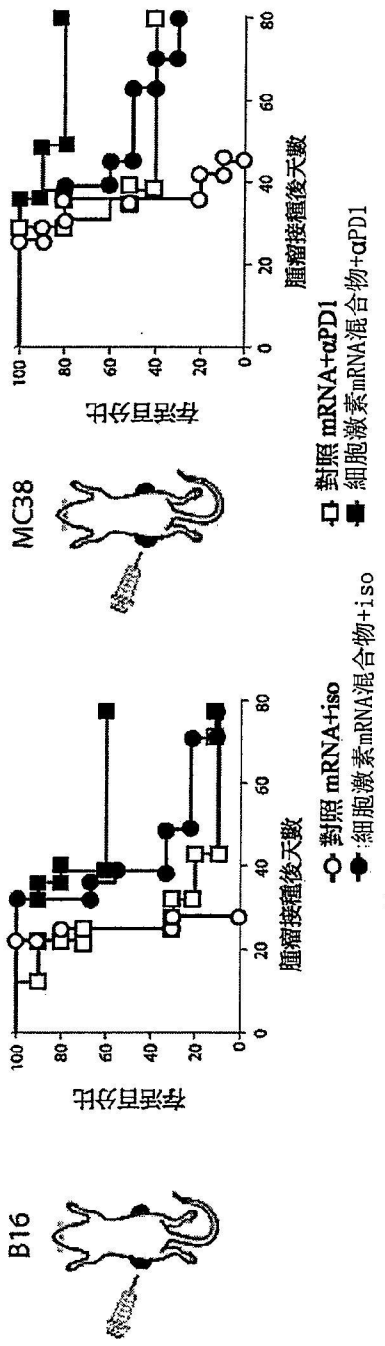

MC38
Luc mRNA
細胞激素mRNA混合物
MC38 抗性
Luc mRNA
細胞激素mRNA混合物
存活百分比
100
80
60
40
20
0
0
20
40
60
治療後天數

【圖7】



【圖 8B】

【圖 8A】



【圖 9A】

【圖 9B】

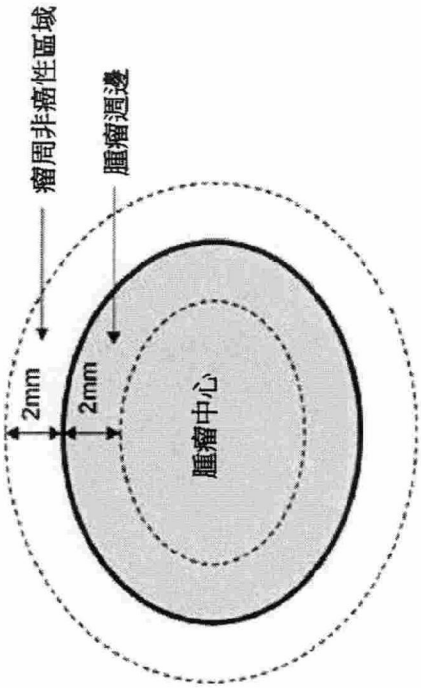


【圖 9C】

【圖 9D】

治療	CT26	H22	Pan02	B16Bl6	RM-1	Renca	B16F10	MC38	Hepa1-6	LL/2	A20	EMT-6
細胞激素mRNA混合物	114	81	10	34	36	74	24	13	19	61	21	18
抗 PD1	64	65	55	82	91	109	93	59	37	103	119	57
細胞激素mRNA混合物+抗PD1	38	33	-1	32	35	62	21	2	17	61	37	2

【圖10】



【圖11】