



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103781470 A

(43) 申请公布日 2014. 05. 07

(21) 申请号 201280043221. 6

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2012. 07. 06

A61K 9/127(2006. 01)

A61K 39/00(2006. 01)

(30) 优先权数据

61/505, 091 2011. 07. 06 US

61/585, 639 2012. 01. 11 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 03. 05

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2012/045840 2012. 07. 06

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/006834 EN 2013. 01. 10

(71) 申请人 诺华股份有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72) 发明人 L·布里托 M·陈 A·吉尔

德里克·奥黑根 M·辛格

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公

司 31100

代理人 杨昀

权利要求书2页 说明书49页

序列表20页 附图5页

(54) 发明名称

包含核酸的水包油乳液

(57) 摘要

本发明一般涉及阳离子水包油乳液,其可用于递送核酸分子如 RNA 分子。所述乳液颗粒包括油核心和阳离子脂质。所述乳液粒子的平均直径为约 80nm ~ 约 180nm,并且所述乳液的 N/P 比例为至少 1.1 : 1。

1. 一种免疫原性阳离子水包油乳液,所述乳液包含乳液颗粒和与所述乳液颗粒复合的核酸分子,所述乳液颗粒含有油核心和阳离子脂质,并且其中所述乳液颗粒的平均直径为约 80nm~约 180nm,并且所述乳液的 N/P 为至少 4:1;前提是所述核酸分子不编码分泌型碱性磷酸酶,并且另一个前提是所述核酸分子不是由质粒 A317 编码的 RNA,所述质粒 A317 的序列示于美国专利申请号 61/361,892 的图 7A。

2. 如权利要求 1 所述的免疫原性阳离子水包油乳液,其特征在于,所述核酸分子编码抗原。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的免疫原性阳离子水包油乳液,其特征在于,所述核酸分子是 RNA。

4. 如权利要求 3 所述的免疫原性阳离子水包油乳液,其特征在于,所述 RNA 是自复制 RNA。

5. 如前述权利要求中任一项所述的免疫原性阳离子水包油乳液,其特征在于,所述免疫原性阳离子水包油乳液受缓冲,并且 pH 为约 6.0~约 8.0。

6. 如权利要求 5 所述的免疫原性阳离子水包油乳液,其特征在于,所述免疫原性阳离子水包油乳液包含选自下组的缓冲液:柠檬酸盐缓冲液、琥珀酸盐缓冲液、乙酸盐缓冲液及其组合。

7. 如权利要求 5 或 6 所述的免疫原性阳离子水包油乳液,其特征在于,所述缓冲液是柠檬酸盐缓冲液且 pH 约为 6.5。

8. 如权利要求 1~6 中任一项所述的免疫原性阳离子水包油乳液,其特征在于,还包含无机盐。

9. 如权利要求 8 所述的免疫原性阳离子水包油乳液,其特征在于,所述无机盐的浓度不大于 30mM。

10. 如权利要求 1~9 中任一项所述的免疫原性阳离子水包油乳液,其特征在于,还包含非离子型等张剂。

11. 如权利要求 10 所述的免疫原性阳离子水包油乳液,其特征在于,所述非离子型等张剂是糖、糖醇或其组合。

12. 如权利要求 11 所述的免疫原性阳离子水包油乳液,其特征在于,所述非离子型等张剂选自下组:蔗糖、海藻糖、山梨糖醇、右旋糖及其组合。

13. 如权利要求 1~12 中任一项所述的免疫原性阳离子水包油乳液,其特征在于,还包含水相中的聚合物。

14. 如权利要求 13 所述的免疫原性阳离子水包油乳液,其特征在于,所述聚合物是泊洛沙姆。

15. 如权利要求 13 或 14 所述的免疫原性阳离子水包油乳液,其特征在于,所述聚合物是普流罗尼克 F127。

16. 如权利要求 13~15 中任一项所述的免疫原性阳离子水包油乳液,其特征在于,所述乳液包含约 0.05%~约 20%(w/v) 的聚合物。

17. 如权利要求 1~16 中任一项所述的免疫原性阳离子水包油乳液,其特征在于,所述乳液颗粒的平均直径为约 80nm~约 130nm。

18. 如权利要求 1~17 中任一项所述的免疫原性阳离子水包油乳液,其特征在于,所述

乳液的 N/P 是 4:1 ~ 约 20:1。

19. 如权利要求 1 ~ 18 中任一项所述的免疫原性阳离子水包油乳液, 其特征在于, 所述乳液的 N/P 是 4:1 ~ 约 15:1。

20. 如权利要求 1 ~ 19 中任一项所述的免疫原性阳离子水包油乳液, 其特征在于, 所述阳离子水包油乳液是等张的。

21. 如权利要求 1 ~ 20 中任一项所述的免疫原性阳离子水包油乳液, 其特征在于, 所述油核心包含选自下组的油: 蓖麻油、椰子油、玉米油、棉籽油、月见草油、鱼油、霍霍巴油、猪油、亚麻子油、橄榄油、花生油、红花油、芝麻油、大豆油、鲨烯、角鲨烷、葵花子油、小麦胚芽油及其组合。

22. 如权利要求 21 所述的免疫原性阳离子水包油乳液, 其特征在于, 所述油是鲨烯。

23. 如权利要求 1 ~ 22 中任一项所述的免疫原性阳离子水包油乳液, 其特征在于, 所述阳离子脂质选自下组: 1, 2- 二油酰氧基 -3-(三甲基胺基) 丙烷 (DOTAP)、 3β -[N-(N', N'- 二甲基氨基乙基)- 氨甲酰基] 胆固醇 (DC 胆固醇)、二甲基双十八烷基铵 (DDA)、1, 2- 二肉豆蔻酰 -3- 三甲基铵丙烷 (DMTAP)、二棕榈酰 ($C_{16:0}$) 三甲基铵丙烷 (DPTAP)、二硬脂酰三甲基铵丙烷 (DSTAP)、N-[1-(2, 3- 二油烯氧基) 丙基]-N, N, N- 三甲基氯化铵 (DOTMA)、N, N- 二油酰 -N, N- 二甲基氯化铵 (DODAC)、1, 2- 二油酰 -sn- 甘油 -3- 乙基磷酸胆碱 (DOEPC)、1, 2- 二油酰 -3- 二甲基铵 - 丙烷 (DODAP)、1, 2- 二亚油氧基 -3- 二甲基氨基丙烷 (DLinDMA)、脂质 E0001-E0118 及其组合。

24. 如权利要求 1 ~ 22 中任一项所述免疫原性阳离子水包油乳液, 其特征在于, 所述阳离子脂质包含季胺。

25. 如权利要求 23 所述的免疫原性阳离子水包油乳液, 其特征在于, 所述阳离子脂质是 DOTAP。

26. 如权利要求 1 ~ 25 中任一项所述的免疫原性阳离子水包油乳液, 其特征在于, 所述颗粒还包含表面活性剂。

27. 如权利要求 26 所述的免疫原性阳离子水包油乳液, 其特征在于, 所述表面活性剂是非离子型表面活性剂。

28. 如权利要求 27 所述的免疫原性阳离子水包油乳液, 其特征在于, 所述表面活性剂是司盘 85 (失水山梨糖醇三油酸酯)、吐温 80 (聚山梨酯 80) 或其组合。

29. 如前述权利要求中任一项所述的免疫原性阳离子水包油乳液, 其特征在于, 所述乳液还包含抗氧化剂。

30. 一种制备如权利要求 1 ~ 29 中任一项所述的免疫原性阳离子水包油乳液的方法, 所述方法包括: 提供 (i) 包含乳液颗粒的阳离子水包油乳液, 所述乳液颗粒包含油核心和阳离子脂质, 和 (ii) 包含核酸的水性溶液, 和合并 (i) 和 (ii) 从而制备所述免疫原性阳离子水包油乳液。

31. 一种在对象内产生免疫应答的方法, 所述方法包括给予所述对象有效量的如权利要求 1 ~ 29 中任一项所述的免疫原性水包油乳液。

包含核酸的水包油乳液

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求 2011 年 7 月 6 日提交的美国临时申请号 61/505,091, 和 2012 年 1 月 11 日提交的美国临时申请号 61/585,639 的权益, 各前述专利申请通过引用全文纳入本文。

[0003] 序列表

[0004] 本申请包含通过 EFS-Web 以 ASCII 格式提交的序列表, 并通过引用全文纳入本文。所述 ASCII 副本创建于 2012 年 7 月 5 日, 命名为 PAT054719.txt, 大小为 32,421 字节。

[0005] 发明背景

[0006] 核酸治疗在治疗从遗传紊乱到获得性病症的疾病中具有前景, 所述疾病如癌症、感染性紊乱 (AIDS)、心脏病、关节炎、和神经变性疾病 (如帕金森病和阿尔茨海默病)。不仅可递送功能基因来修复遗传缺陷或诱导外源基因产物表达, 而且还可递送核酸来抑制内源基因表达以提供治疗效果。基因表达的抑制可通过例如反义寡核苷酸、双链 RNA (如 siRNAs、miRNAs) 或核酶来介导。

[0007] 此类治疗的关键步骤是体内递送核酸分子到细胞中。然而, 体内递送核酸分子, 尤其是 RNA 分子, 面临许多技术障碍。首先, 由于细胞和血清核酸酶, 体内注入的 RNA 的半衰期仅约 70 秒 (参见例如 Kurreck, Eur. J. Biochem. 270:1628-44(2003))。已试图通过使用化学修饰来提高注射 RNA 的稳定性; 然而, 数个化学变化的例子导致细胞毒性效果增强或功能丧失或降低。在一个具体示例中, 细胞不耐受 RNAi 双链的剂量, 该双链中每个第二磷酸被替换为硫代磷酸酯 (Harborth 等, Antisense Nucleic Acid Drug Rev. 13(2):83-105(2003))。因此, 需要开发能体内递送足量核酸分子 (尤其是 RNA 分子) 以引起治疗响应, 但对宿主没有毒性的递送系统。

[0008] 基于核酸的疫苗是疫苗的诱人替代方案。例如, 肌肉内 (IM) 免疫接种编码抗原的质粒 DNA 可诱导细胞和体液免疫应答并保护抵御攻击。DNA 疫苗比使用蛋白抗原或减毒病原体的传统疫苗具有一些优势。例如, 与蛋白疫苗相比, DNA 疫苗可更有效地产生以天然构型正确折叠的抗原和产生细胞免疫应答。DNA 疫苗还不具有灭活或减毒病原体相关的一些安全问题。例如, 灭活的病毒制剂可包含残留的活病毒, 且减毒病毒可变异并回复为致病表型。

[0009] 基于核酸的疫苗的另一限制是在非人灵长类和人中通常需要大剂量的核酸以获得有效的免疫应答。因此, 需要递送系统和佐剂来提高基于核酸的疫苗的效力。已开发各种方法用于将核酸分子导入细胞, 如磷酸钙转染、聚戊二烯转染、原生质体融合、电穿孔、微注射和脂质转染。

[0010] 阳离子脂质已被广泛配置为脂质体来递送基因到细胞中。然而, 由于血清含阴离子材料, 即使少量血清 (~10%) 也可显著降低脂质体/DNA 复合物的转染活性。近期, 开发了阳离子脂质乳液来递送 DNA 分子到细胞中。参见例如, Kim 等, International Journal of Pharmaceutics, 295, 35-45(2005)。

[0011] 美国专利号 6,753,015 和 6,855,492 描述了用阳离子微粒递送核酸分子到脊椎动物对象中的方法。所述微粒包括聚合物如聚(α -羟基酸)、聚羟基丁酸、聚己内酯、聚原酸

酯、聚酯等,并用阳离子表面活性剂来形成。核酸分子吸附在所述微粒的表面。

[0012] Kim等(Pharmaceutical Research, 18卷,54-60页,2001)和Chung等(Journal of Controlled Release, 71卷,339-350页,2001)描述了用于提高DNA分子体外和体内转染效力的各种水包油乳液制剂。

[0013] Ott等(Journal of Controlled Release, 79卷,1-5页,2002)描述了用阳离子亚微米乳液作为DNA的递送系统/佐剂的方案。所述亚微米乳液方案基于MF59,一种有效的水包鲨烯佐剂,其被大范围加工且已用于市售批准的产物中(Fluad[®])。1,2-二油酰-3-三甲基铵-丙烷(DOTAP)用于促进质粒DNA的胞内递送。

[0014] 尽管基于DNA的疫苗在预防和治疗疾病中保持较高的前景,有关其安全性已被广泛关注。引入的DNA分子可能整合到所述宿主基因组中或,由于其分布到各组织中而引起不需要的持续抗原表达。此外,某些DNA病毒还用作递送DNA分子的载体。由于其感染性质,该病毒可实现非常高的转染率。所用病毒被遗传修饰使得在转染细胞中不形成功能性感染颗粒。尽管采用这些预防措施,仍不可能排除引入基因和病毒基因不受控繁殖的风险,例如,由于潜在的重组事件。这还产生了DNA通过例如重组而被插入宿主细胞基因组的完整基因中的风险,结果是该基因可能突变并因此完全或部分失活或可产生错误信息。换言之,对细胞重要的基因产物的合成可能被完全抑制,或者表达已改变或不正确的基因产物。此外,通常难以放大临床级病毒载体的生产和纯化。

[0015] 具体风险在DNA整合入涉及调节细胞生长的基因时发生。在该情况中,所述宿主细胞可能退化并引起癌症或形成肿瘤。此外,若引入细胞的DNA待表达,需要对应的DNA载体包含强启动子,如病毒CMV启动子。此类启动子整合到所处理细胞的基因组中可引起细胞中基因表达调节的不需要的改变。使用DNA作为试剂诱导免疫应答(如作为疫苗)的另一风险是在已引入外源DNA的患者中引起致病的抗DNA抗体,从而会引起不需要的免疫应答。

[0016] 编码抗原或其衍生物的RNA分子也可用作疫苗。RNA疫苗比DNA疫苗具有某些优势。首先, RNA不能整合到宿主基因组中,因此消除了恶性化的风险。第二,由于RNA的快速降解,外源基因的表达通常寿命短,避免了抗原不受控的长期表达。第三, RNA分子仅需要被递送到胞质以表达编码的抗原,而DNA分子必需穿过核膜。

[0017] 然而,与基于DNA的疫苗相比,对基于RNA的疫苗的关注相对较少。RNA和寡核苷酸是亲水的负电荷分子,其作为治疗剂或疫苗给予时很易受核酶影响而被降解。此外, RNA和寡核苷酸不能主动的运输到细胞中。参见,例如Vajdy, M.等Mucosal adjuvants and delivery systems for protein-, DNA- and RNA-based vaccines(基于蛋白、DNA和RNA的疫苗的粘膜佐剂和递送系统), Immunol Cell Biol, 2004. 82(6):p. 617-27。

[0018] Ying等(Nature Medicine, 5卷, 823-827页, 1999)描述了自复制RNA疫苗,其中递送编码 β -半乳糖苷酶的裸RNA,并报道了CD8⁺细胞的引发。

[0019] Montana等(Bioconjugate Chem. 2007, 18, 302-308页)描述了用阳离子固体-脂质纳米颗粒作为RNA载体用于基因转移。显示固体-脂质纳米颗粒保护RNA分子抵御降解,且在微注射RNA-颗粒复合物到海胆卵后检测到报道蛋白(荧光素)的表达。

[0020] WO2010/009277公开了纳米脂质肽颗粒(NLPP),其包括(a)两亲性肽,(b)脂质,和(c)至少一种免疫原性物质。在某些实施方式中,NLPP还纳入正电荷“捕获剂”如阳离子

脂质。所述捕获剂用于锚定负电荷免疫原性物质（如 DNA 分子或 RNA 分子）。NLPP 的制备需要两性肽，其用于溶解所述脂质组分并形成纳米颗粒。

[0021] 因此，需要提供用于核酸分子的递送系统。所述递送系统可用于基于核酸的疫苗，尤其是基于 RNA 的疫苗。

发明内容

[0022] 本发明一般涉及阳离子水包油乳液，其中核酸分子与所述乳液颗粒复合。所述乳液可用于递送核酸分子（例如 RNA 分子）至细胞。所述乳液颗粒包括油核心和阳离子脂质。所述阳离子脂质可与带负电分子相互作用，从而将所述分子锚定到所述乳液颗粒。所述乳液颗粒的平均直径为约 80nm ~ 约 180nm，并且所述乳液的 N/P 比为至少 4:1。

[0023] 在一些实施方式中，所述乳液颗粒的平均直径为约 80nm ~ 约 180nm，并且所述乳液的 N/P 比为至少 1.1:1、至少 1.5:1、至少 2:1、至少 2.5:1、至少 3:1 或至少 3.5:1。

[0024] 本发明提供免疫原性阳离子水包油乳液，所述乳液包含乳液颗粒和与所述乳液颗粒复合的核酸分子，所述乳液颗粒含有油核心和阳离子脂质，并且其中所述乳液颗粒的平均直径为约 80nm ~ 约 180nm，并且所述乳液的 N/P 为至少 4:1；前提是所述核酸分子不编码分泌型碱性磷酸酶，并且进一步的前提是所述核酸分子不是由质粒 A317 编码的 RNA（其序列示于美国专利申请号 61/361,892 的图 7A）。在一些实施方式中，本发明包括进一步前提：所述核酸分子不编码 RSV F 蛋白抗原，和 / 或进一步前提：所述核酸分子不编码 RSV 蛋白。优选地，所述核酸分子编码抗原，并且是 RNA 分子，例如自复制 RNA。

[0025] 所述免疫原性阳离子水包油乳液可以有缓冲（例如，采用柠檬酸盐缓冲液、琥珀酸盐缓冲液、乙酸盐缓冲液）并且 pH 为约 6.0 ~ 约 8.0，优选为约 6.2 ~ 约 6.8。可任选地，所述免疫原性阳离子水包油乳液还包含无机盐，浓度优选为不超过 30mM。替代或补充地，所述免疫原性阳离子水包油乳液在水相中还包含非离子型等张剂，例如糖、糖醇或其组合，和或聚合物，例如泊洛沙姆（poloxamer）。若存在，所述聚合物可以约 0.05% ~ 约 20% (w/v) 存在。在一些实施方式中，免疫原性阳离子水包油乳液是等张的。在其它实施方式中，免疫原性阳离子水包油乳液是低渗或高渗的。

[0026] 在一些实施方式中，所述乳液颗粒的油核心包含选自下组的油：蓖麻油、椰子油、玉米油、棉花籽油、月见草油、鱼油、荷荷芭油、猪油、亚麻籽油、橄榄油、花生油、红花油、芝麻油、大豆油、鲨烯、角鲨烷、葵花油、小麦胚芽油及其组合。在特定的实施方式中，所述油核心是鲨烯。所述阳离子脂质可选自下组：1,2-二油酰氧基-3-(三甲基胺基)丙烷 (DOTAP)、3 β -[N-(N',N'-二甲基氨基乙基)-氨甲酰基]胆固醇 (DC 胆固醇)、二甲基双十八烷基铵 (DDA)、1,2-二肉豆蔻酰-3-三甲基铵丙烷 (DMTAP)、二棕榈酰 (C_{16:0}) 三甲基铵丙烷 (DPTAP)、二硬脂酰三甲基铵丙烷 (DSTAP)、N-[1-(2,3-二油烯氧基)丙基]-N,N,N-三甲基氯化铵 (DOTMA)、N,N-二油酰-N,N-二甲基氯化铵 (DODAC)、1,2-二油酰-sn-甘油-3-乙基磷酸胆碱 (DOEPC)、1,2-二油酰-3-二甲基铵-丙烷 (DODAP)、1,2-二亚油氧基-3-二甲基氨基丙烷 (DLinDMA)、脂质 E0001-E0118 及其组合。在一个优选实施方式中，所述阳离子脂质是 DOTAP。

[0027] 所述乳液颗粒还可包含表面活性剂，例如非离子表面活性剂。优选所述表面活性剂不是聚乙二醇 (PEG)-脂质。表面活性剂存在量可为约 0.01 到约 2.5% (w/v)。在一些实

施方式中,所述表面活性剂是司盘 (SPAN) 85 (失水山梨糖醇三油酸酯)、吐温 80 (聚山梨酯 80)、或其组合。在一些实施方式中,所述水包油乳液含有等量的司盘 85 (失水山梨糖醇三油酸酯) 和吐温 80 (聚山梨酯 80),例如还包含表面活性剂的颗粒各含 0.5% (w/v)。

[0028] 本发明还涉及用于制备免疫原性阳离子水包油乳液的方法,所述乳液包含乳液颗粒和与所述乳液颗粒复合的核酸分子,所述乳液颗粒含有油核心和阳离子脂质,并且其中所述乳液颗粒的平均直径为约 80nm ~ 约 180nm,并且所述乳液的 N/P 为至少 4:1;前提是所述核酸分子不编码分泌型碱性磷酸酶,并且进一步的前提是所述核酸分子不是由质粒 A317 编码的 RNA (其序列示于美国专利申请号 61/361,892 的图 7A)。所述方法包括:提供 (i) 阳离子水包油乳液,其包含本文所述的含有油核心和阳离子脂质的乳液颗粒,和 (ii) 包含核酸的水性溶液,以及使 (i) 和 (ii) 合并从而制得所述免疫原性阳离子水包油乳液。本发明还涉及用于在对象内产生免疫应答的方法,所述方法包括给予所述对象有效量的本文所述的免疫原性阳离子水包油乳液。

[0029] 附图简述

[0030] 图 1A 显示体内 SEAP 试验的结果,所述试验使用 1 μ g 的 RNA 复制子 vA306,所述复制子与 CNE17 以 10:1 的 N:P 比例复合。图 1B 显示用 RNA 复制子 A317 免疫之后的 2wp1 和 2wp2 时间点的 BALB/c 小鼠中的总 IgG 效价,所述 A317 编码 RSV F 蛋白,与 CNE17 复合。这些数据显示,由于粒径增加,SEAP 表达降低,并且对 RSV F 蛋白的免疫应答降低。

[0031] 图 2A-2C 显示 RNA 复合和不同缓冲组合物对粒径的影响。图 2A 显示, RNA 复合使 CNE17 乳液中的粒径增加,而糖和 / 或低盐 (NaCl, 10mM) 使粒径减小。普流罗尼克 (Pluronic) F127 的添加使粒径减小至复合前的尺寸。图 2B 显示柠檬酸盐缓冲液对粒径的影响。图 2C 显示聚合物对粒径的影响。发明详述

[0032] 1. 概述

[0033] 本发明一般涉及阳离子水包油乳液,其中将核酸分子与所述乳液颗粒复合,所述乳液颗粒的平均直径为约 80nm ~ 约 180nm,并且所述乳液的 N/P 比例为至少 4:1。所述乳液颗粒包括油核心和阳离子脂质。所述阳离子脂质可与带负电分子相互作用,从而将所述分子锚定到所述乳液颗粒。所述乳液可用于递送核酸分子 (例如 RNA 分子) 至细胞。

[0034] 本发明基于以下发现:对于由 RNA 编码的抗原,在向个体给予含有编码所述抗原的 RNA 分子的阳离子水包油乳液时,该抗原所引起的免疫应答受到所述乳液性质的影响,所述乳液性质包括所述乳液颗粒的平均直径和与所述乳液颗粒复合的 RNA 的量 (即, N/P 比例)。经本发明人测定,当 RNA 分子与所述乳液复合时,所述乳液颗粒的平均直径增加,而较大直径颗粒导致较低的中和效价。平均粒径为约 80nm ~ 约 180nm 的乳液提供良好中和效价。即使在该范围内,也较不优选平均粒径在所述范围高端 (high end) 乳液,而特别优选约 100nm 的平均粒径。还优选平均粒径在约 100nm ~ 约 130nm。本发明人吃惊地发现,所述免疫应答与所述乳液复合的 RNA 的量之间不具有直接线性关系。4:1 的 N/P 比例使得对所编码的抗原产生良好免疫应答,但更高的 N/P 比例并不一定导致更高的中和效价。当 RNA 分子与所述乳液复合时,阳离子水包油乳液颗粒的平均直径增加。可通过在所述乳液中纳入无机盐来减小该影响。然而,无机盐会抑制核酸分子与所述乳液颗粒的结合,因此,一种或多种所述无机盐应仅以低浓度 (例如,不超过约 30mM) 存在。必要时,可使用亲水性聚合物来减小由核酸复合所致的粒径增加。同样地,亲水性聚合物会抑制核酸分子与所述乳

液颗粒的结合,因此,一种或多种亲水性聚合物应仅以低浓度(例如,约 0.05%~约 20%(w/v))存在。

[0035] 可向个体给予包含编码所述抗原的 RNA 分子的阳离子水包油乳液,以诱导针对所述编码的抗原的免疫应答。当所述阳离子水包油乳液用于该目的时,优选它们是等张的。然而,由于无机盐会抑制核酸分子与所述乳液颗粒的结合,优选非离子型等张剂调节张性。在优选的实施方式中,包含 RNA 分子的阳离子水包油乳液用糖、糖醇或其组合调节至 250mOsm/kg 水~约 320mOsm/kg。

[0036] 2. 定义

[0037] 如本文所用,单数形式的“一个”、“一种”和“该”包括复数指代物,除非内容中另有明确规定。

[0038] 本文所用的术语“约”指某数值的 $\pm 10\%$ 。

[0039] 术语“表面活性剂”是本领域术语并通常指同时具有亲水基团(如极性基团)和疏水基团的任何分子,亲水基团在能量上倾向于被水溶剂化,而疏水基团不能被水良好溶剂化。术语“非离子表面活性剂”是本领域已知术语并通常指其亲水基团(如极性基团)不带静电荷的表面活性剂分子。

[0040] 术语“聚合物”指由相同或不同的个体化学部分连接在一起所组成的分子。如本文所用,术语“聚合物”指那些首尾相连而形成线性分子的个体化学部分,以及以分支(如“多臂”或“星型”)结构形式连接在一起的个体化学部分。示例性聚合物包括,例如,泊洛沙姆。泊洛沙姆是非离子三嵌段共聚物,其具有聚氧丙烯(聚(环氧丙烷))中央疏水链,侧连两条聚氧乙烯(聚(环氧乙烷))亲水链。

[0041] “缓冲液”指抗拒溶液 pH 变化的水性溶液。

[0042] 本文中所用的“核苷酸类似物”或“修饰的核苷酸”指在核苷的含氮碱基(如胞嘧啶(C)、胸腺嘧啶(T)或尿嘧啶(U),腺嘌呤(A)或鸟嘌呤(G))中或其上含一种或多种化学修饰(如取代)的核苷酸。核苷酸类似物还可在核苷的糖部分(如核糖、脱氧核糖、修饰的核糖、修饰的脱氧核糖、6 元糖类似物或开链糖类似物)、或磷酸酯中或其上含化学修饰。

[0043] 如本文所述,糖“(saccharide)”涵盖单糖、寡糖或以直链或环形或其组合的形式形成糖链的多糖。寡糖是具有 2 种或更多单糖残基的糖。糖的示例包括葡萄糖、麦芽糖、麦芽三糖、麦芽四糖、蔗糖和海藻糖。

[0044] 术语“自复制 RNA”、“RNA 复制子”或“RNA 载体”是本领域术语,通常指在体内,通常在靶细胞内,能指导其自身扩增或自体复制的 RNA 分子。所述 RNA 复制子直接使用,无需将 DNA 引入细胞并转运到可发生转录的核中。通过使用 RNA 载体直接递送入宿主细胞的胞质,可有效发生异源核酸序列的自主复制和翻译。 α 病毒衍生的自复制 RNA 可按序列顺序包含下述元件:顺式复制所需的 5' 病毒序列(背景中还称为 5' CSE)、表达时编码生物活性 α 病毒非结构蛋白(如 nsP1, nsP2, nsP3, nsP4)的序列,顺式复制所需的 3' 病毒序列(背景中还称为 3' CSE),和多腺苷酸化尾。 α 病毒衍生的自复制 RNA 还可含病毒亚基因组“连接区域”启动子、来自一种或多种结构蛋白基因或其部分的序列、大小足够产生重组 α 病毒颗粒的外源核酸分子、以及待表达的异源序列。

[0045] 术语“佐剂”指协助或改良药物作用的任何物质,包括但不限于免疫佐剂,其能使对抗原的免疫应答增强和/或多样化。因此,免疫佐剂包括能增强对抗原免疫应答的化合

物。免疫佐剂可增强体液和 / 或细胞免疫。刺激先天免疫应答的物质包括在本文免疫佐剂的定义中。免疫佐剂还可称为“免疫增强剂”。

[0046] 本文中所用的“抗原”指含一个或多个表位（例如，线性、构象或兼有）的分子。本文中所用的“表位”是给定物质（例如，抗原性分子或抗原性复合物）中确定其免疫学特异性的部分。表位包含在所述抗原的定义范围内。本文中所用的术语“抗原”包括亚基抗原，即自该抗原天然相关联的全生物体中分离且离散的抗原。

[0047] “免疫学应答”或“免疫应答”是对象中发生对抗原或免疫原性佐剂的体液和 / 或细胞免疫应答。

[0048] 免疫应答包括先天和适应性免疫应答。先天免疫应答是为免疫系统提供一线防御的快速作用应答。相反，适应性免疫采用选择和克隆扩增含体细胞重排受体基因的免疫细胞（例如 T- 和 B- 细胞受体）来提供特异性和免疫记忆，所述受体基因识别给定病原或疾病（例如肿瘤）的抗原。先天免疫应答有很多效应，包括引起炎性细胞因子的快速突释并活化抗原呈递细胞（APC）如巨噬细胞和树突细胞。为区分病原体 and 自身组分，先天免疫系统利用多种相对不变的受体检测病原体的特征物，这些特征物称为病原体相关分子模式或 PAMP。已知实验性疫苗中添加微生物组分导致发生强烈且持续的适应性免疫应答。据报道，这种免疫应答增强的机理涉及模式识别受体（PRR），其在包括嗜中性粒细胞、巨噬细胞、树突细胞、自然杀伤细胞、B 细胞和一些非免疫细胞如上皮和内皮细胞在内的多种免疫细胞上差异表达。PRR 的参与导致这类细胞中一些被活化并分泌细胞因子和趋化因子，以及其它细胞成熟并迁移。这以串联方式产生炎性环境导致适应性免疫应答的确立。PRR 包括非吞噬细胞受体，如 Toll 样受体（TLR）和核苷酸结合寡聚结构域（NOD）蛋白，和诱发吞噬作用的受体如清除受体、甘露糖受体和 β - 葡聚糖受体。已报道的 TLR（伴以一些已报道配体的示例，这些配体可在本发明的不同实施方式中用作免疫原性分子）包括如下：TLR1（来自分枝杆菌（Mycobacteria）、奈瑟菌（Neisseria）的细菌脂蛋白），TLR2（酵母聚糖酵母颗粒、肽聚糖、脂蛋白、脂肽、糖脂、脂多糖），TLR3（病毒双链 RNA、聚 IC），TLR4（细菌脂多糖、植物产物紫杉醇），TLR5（细菌鞭毛），TLR6（酵母聚糖颗粒、脂磷壁质酸、支原体的脂肽），TLR7（单链 RNA、咪喹莫特、雷索咪喹莫特（resiquimod）和其它合成化合物如洛索立宾和溴匹立明），TLR8（单链 RNA、雷索咪喹莫特）和 TLR9（CpG 寡核苷酸）等。树突细胞被视为在启动初免初始 CD4⁺ 辅助 T（TH）细胞和诱导 CD8⁺ T 细胞分化成杀伤细胞中最重要的细胞类型。据报道，TLR 信号传递在确定这些辅助 T 细胞应答的特性中起重要作用，例如 TLR 信号的特性决定所观察到 T_H 应答的具体类型（例如，T_H1 与 T_H2 应答）。产生抗体（体液）与细胞免疫的组合作为 T_H1 型应答的部分，而 T_H2 型应答主要是抗体应答。已记录不同 TLR 配体如 CpG DNA（TLR9）和咪唑喹啉（TLR7，TLR8）在体外刺激免疫细胞产生细胞因子。咪唑喹啉是显示为 TLR 激动剂的第一种类似药物的小化合物。进一步的信息参见例如 A. Pashine, N. M. Valiante 和 J. B. Ulmer, *Nature Medicine*, 11, S63-S68 (2005), K. S. Rosenthal 和 D. H. Zimmerman, *Clinical and Vaccine Immunology*, 13(8), 821-829 (2006) 及其所引文献。

[0049] 出于本发明的目的，体液免疫应答指由抗体分子介导的免疫应答，而细胞免疫应答是 T- 淋巴细胞和 / 或其它白细胞介导的免疫应答。细胞免疫的一个重要方面涉及细胞溶解 T 细胞（CTL）的抗原特异性应答。CTL 有针对肽抗原的特异性，所述肽抗原与主要组织

相容性复合体 (MHC) 编码并在细胞表面表达的蛋白关联呈递。CTL 帮助诱导并促进胞内微生物的胞内破坏,或感染此类微生物的细胞的裂解。细胞免疫的另一方面涉及辅助 T 细胞的抗原特异性反应。辅助 T 细胞作用于帮助刺激非特异性效应细胞的功能并集中其活性,所述细胞针对在其表面展示 MHC 分子相关肽抗原的细胞。”细胞免疫应答”也指由活化的 T 细胞和 / 或包括 CD4⁺ 和 CD8⁺T 细胞衍生细胞在内的其它白细胞产生细胞因子、趋化因子和其它此类分子。

[0050] 因此,引起细胞免疫应答的组合物如免疫原性组合物或疫苗可通过在细胞表面呈递 MHC 分子相关抗原而使脊椎动物对象致敏。细胞介导的免疫应答针对在其表面呈递抗原的细胞或其附近。此外,可产生抗原特异性 T 淋巴细胞用于经免疫宿主此后的保护。特定抗原或组合物刺激细胞介导免疫应答的能力可通过本领域已知的多种试验确定,例如通过淋巴增殖(淋巴细胞活化)试验、CTL 细胞毒性细胞试验,通过测定致敏对象中抗原特异性的 T- 淋巴细胞,或通过测量 T 细胞响应抗原再刺激的细胞因子生成。这些试验为本领域熟知。参见例如 Erickson 等, (1993) J. Immunol. 151:4189-4199 ;Doe 等, (1994) Eur. J. Immunol. 24:2369-2376。因此,本文所用的免疫学应答可以是刺激 CTL 生成和 / 或辅助 T 细胞产生或激活。感兴趣的抗原还可引发抗体介导的免疫应答。因此,免疫学应答可包括例如以下一种或多种效果:由例如 B- 细胞生产抗体;和 / 或特异性针对感兴趣组合物或疫苗中的一种或多种抗原的抑制 T- 细胞和 / 或 γ δ T- 细胞的激活。例如,这些应答可用以中和感染性和 / 或介导抗体-补体或抗体依赖性细胞毒性 (ADCC) 来为经免疫宿主提供保护。这些应答可采用本领域熟知的标准免疫试验和中和试验确定。

[0051] 与不同组合物中等量抗原(如将抗原作为可溶蛋白给予)所引起的免疫应答相比,本发明组合物具有的引发免疫应答的能力更强时,该组合物对给定抗原显示“增强的免疫原性”。因此,组合物可例如因为所述组合物产生更强的免疫应答或因为在给予对象中实现免疫应答所需抗原剂量更低或次数更少而显示“增强的免疫原性”。可通过例如将本发明的组合物和抗原对照给予动物并比较二者的试验结果来测定所述增强的免疫原性。

[0052] 3. 阳离子水包油乳液

[0053] 本文公开的阳离子水包油乳液一般以本领域常见方式,通过制备所述乳液所用的组分浓度来描述。本领域应理解在包括灭菌和其它下游过程在内的乳液生产工艺中,可能损失少量油(如鲨烯)、阳离子脂质(如 DOTAP)、或其它组分,且这些组分在最终产物(如待给予的包装灭菌乳液)中的实际浓度可稍低于起始含量,有时相差最多约 10% 或最多约 20%。

[0054] 所述阳离子水包油乳液颗粒包含油核心和阳离子脂质。所述阳离子脂质可与所述核酸分子,例如通过静电力和疏水性 / 亲水性相互作用来相互作用,从而使所述核酸分子锚定至所述乳液颗粒。本文所述的阳离子乳液特别适合于体内递送核酸分子(例如编码抗原的 RNA 分子或小干扰 RNA) 至细胞。例如,本文所述的阳离子乳液提供递送编码抗原的 RNA 作为疫苗的优势,所述 RNA 包括自复制 RNA。

[0055] 所述水包油乳液的颗粒可能类似具有油中央核心的胶束。所述油核心包被有阳离子脂质,其将所述油滴作为胶束样液滴分散在水(连续)相中。所述乳液中可存在一种或多种任选组分,如下述表面活性剂和 / 或磷脂。例如,一种或多种表面活性剂可用于促进颗粒形成和 / 或稳定乳液颗粒。在该情况中,所述油核心包被有阳离子脂质以及表面活性剂

以形成胶束样液滴。类似地,若一种或多种脂质(如中性脂质、醇脂或磷脂)用作分散油滴的乳化剂,所述脂质也可存在于所述乳液颗粒的表面。

[0056] 所述水包油乳液颗粒具有约 80nm~约 180nm、约 80nm~150nm、约 80nm~130nm 或约 80nm~120nm 的平均直径(即,直径平均数)。特别优选的平均粒径是约 100nm。

[0057] 所述乳液颗粒的大小可通过改变表面活性剂与油的比例(提高比例则降低液滴大小)、均质化的操作压力(增加均质化的操作压力通常降低液滴大小)、温度(升高温度则减小液滴大小)、改变油的类型、增加通过微流化器的次数,以及其它工艺参数而变化,如本文所述。水相中包括某些类型缓冲液也可影响颗粒大小。

[0058] 本文所述的乳液颗粒可与核酸分子复合,这在本文中有更详细的描述。一般而言,使阳离子水包油乳液与包含一种或多种核酸分子的水性溶液合并以形成包含与所述乳液颗粒复合的核酸分子的乳液。包含一种或多种所述核酸分子的水性溶液含有将导致 N/P 比例为至少 4:1 的复合乳液的核酸浓度,例如所述复合乳液的 N/P 比例为 4:1~20:1 或 4:1~15:1。这可容易地被实现,因为所述乳液中的氮(N)的量可采用任何合适的方法(例如本文所述用于定量 DOTAP 的 HPLC 法)来定量。然后,可制备核酸分子的水性溶液,所述溶液包含的核酸的量足以提供达到所需 N/P 比例需要的磷酸酯(P)的量。

[0059] 本发明的示例性阳离子乳液为 CNE17。CNE17 的油核心是鲨烯(4.3%w/v)且阳离子脂质是 DOTAP(1.4mg/mL)。CNE17 还包括表面活性剂司盘 85((失水山梨糖醇三油酸酯)0.5%v/v)和吐温 80((聚山梨酯 80;聚氧乙烯去水山梨糖醇单油酸酯)0.5%v/v)。因此,CNE17 的颗粒包含包被有司盘 85、Tween80 和 DOTAP 的鲨烯核心。显示 RNA 分子在 4:1N/P 比和 10:1N/P 比时有效复合 CNE17 颗粒。本发明的另一个示例性阳离子乳液在本文中称为“CMF32”。CMF32 的油是鲨烯(4.3%w/v)且阳离子脂质是 DOTAP(3.2mg/mL)。CMF32 还包括表面活性剂司盘 85((失水山梨糖醇三油酸酯)0.5%v/v)和吐温 80((聚山梨酯 80;聚氧乙烯去水山梨糖醇单油酸酯)0.5%v/v)。因此,CMF32 的乳液颗粒包含有鲨烯、司盘 85、吐温 80 和 DOTAP。RNA 分子显示在 N/P 比 4:1、6:1、8:1、10:1、12:1 和 14:1 下与 CMF32 颗粒有效复合。其它示例性阳离子乳液包括,例如,本文称为“CMF34”(4.3%w/v 鲨烯、0.5%吐温 80、0.5%司盘 85 和 4.4mg/mL DOTAP)、“CMF35”(4.3%w/v 鲨烯、0.5%吐温 80、0.5%司盘 85、5.0mg/mL DOTAP)的乳液和本文描述的其它乳液。

[0060] 本发明的一种特定阳离子水包油乳液含有 DOTAP 和鲨烯,其浓度分别为 2.1mg/ml 到 2.84mg/ml(优选 2.23mg/ml 到 2.71mg/ml)和 30.92mg/ml 到 41.92mg/ml(优选 32.82mg/ml 到约 40.02mg/ml),且还含有等量的司盘 85 和吐温 80(例如,各约 0.5%)。本发明的另一特定阳离子水包油乳液含有 DOTAP 和鲨烯,其浓度分别为 2.78mg/ml 到 3.76mg/ml(优选 2.94mg/ml 到 3.6mg/ml)和 18.6mg/ml 到 25.16mg/ml(优选 19.69mg/ml 到约 24.07mg/ml),且还含有等量的司盘 85 和吐温 80(例如,各约 0.5%)。优选地,这些乳液的颗粒的平均直径为约 80nm~约 180nm。

[0061] 本发明水包油乳液的个体组分为本领域已知,尽管未以本文所述的方式组合出此类组合物。因此,尽管下面针对优选实施方式一般述及并有些许详述,但个体组分为本领域熟知,且本文所用术语如油核心、表面活性剂、磷脂等为本领域技术人员充分熟知而不需进一步描述。此外,虽然提供了个体乳液组分的优选含量范围,具体乳液组分的实际比例可能需要调节,使得可正确地形成具有所需大小和物理性质的乳液颗粒。例如,若使用具体含量

的油（如 5%v/v 油），则表面活性剂的含量应为足以将油滴分散在水相中以形成稳定乳液的水平。将油滴分散在水相中所需的表面活性剂的实际量取决于乳液所用的表面活性剂类型和油核心类型；且油的量还可根据液滴大小而变化（因为这会改变两相之间的表面积）。所需乳液中组分的实际含量和相对比例可由技术人员容易地确定。

[0062] A. 油核心

[0063] 阳离子水包油乳液的颗粒包含油核心。

[0064] 所述油优选在 1℃或以上为液相，并且与水不互溶。

[0065] 优选地，所述油是可代谢、无毒的油；更优选一种约 6～约 30 个碳原子的，包括但不限于烷烃、烯烃、炔烃及其相应的酸和醇、其醚和酯、及其混合物。所述油可以是可被给予所述乳液的对象身体所代谢，且对所述对象无毒的任何植物油、鱼油、动物油或合成制备油。所述对象可为动物，通常是哺乳动物，并优选人。

[0066] 在某些实施方式中，所述油核心 25℃时为液相。所述油核心 25℃时为液相，当保存于 25℃时其表现出液体特性（不同于固体和气体；且具有确定体积但没有确定形状）。然而所述乳液可在任何合适温度储存和使用。优选所述油核心 4℃时为液相。

[0067] 所述油可为任何长链烷烃、烯烃或炔烃，或其酸或醇衍生物，无论是游离酸、其盐或酯如单或双或三酯，例如 1, 2- 丙二醇或类似的多羟基醇的甘油三酯和各种酯。醇可用单或多官能酸例如乙酸、丙酸、柠檬酸等来酰化。还可使用是油并满足本文所述其它标准的长链醇衍生醚。

[0068] 个体烷烃、烯烃或炔烃部分及其酸或醇衍生物通常具有约 6～约 30 个碳原子。所述部分可具有直链或支链结构。其可完全饱和或具有一个或多个双键或三键。在使用单或聚酯或醚基油时，约 6～约 30 个碳的限制适用于个体脂肪酸或脂肪醇部分，并非所有碳计数。

[0069] 特别理想的是所述油可被给予所述乳液的宿主代谢。

[0070] 可使用来自动物、鱼或植物来源的任何合适油。植物油的来源包括坚果、种子和谷物，和合适的油，例如花生油、大豆油、椰油和橄榄油等。其它合适的种籽油包括红花油、棉花籽油、葵花籽油、芝麻籽油等。在谷物组中还可采用玉米油和其它谷类如小麦、燕麦、裸麦、稻、画眉草、黑小麦等的油。获取植物油的技术已充分开发且熟知。这些和其它相似油的组合物可参见例如《默克索引》(the Merck Index)，以及食品、营养品和食品技术的原始资料。

[0071] 甘油和 1, 2- 丙二醇的约 6～约 10 碳脂肪酸酯尽管不是种籽油中天然产生的，但可以从坚果和种籽油开始，通过对合适材料进行水解、分离和酯化而制得。这些产品市售可得，以名称 NEOBEES 出自新泽西州 Boongon 迪威臣街 416 号的 PVO 国际公司 (PVO International, Inc.) 化学专业部，及其它产品。

[0072] 动物油和脂肪通常由于以甘油三酯存在且比来自鱼或植物的油有更高的饱和度而在生理温度下为固相。然而，脂肪酸可获自动物脂肪，通过部分或完全甘油三酯皂化提供游离脂肪酸。来自哺乳动物乳汁的脂肪和油类是可代谢的，因此可以用于实施本发明。获得动物来源纯油所必需的分离、纯化、皂化和其它方法的过程为本领域熟知。

[0073] 大多数鱼类含有容易回收的可代谢油。例如，鳕鱼肝油、鲨鱼肝油和诸如鲸蜡的鲸油是本文可使用的几种鱼油的示例。通过生化途径用 5- 碳异戊二烯单位合成许多支链油，

其总称为萜类。鲨烯(2, 6, 10, 15, 19, 23-六甲基-2, 6, 10, 14, 18, 22-二十四碳六烯)是分支不饱和萜类,为本文所特别优选。鲨烯的主要来源是鲨鱼肝油,尽管包括苋菜种籽、米糠、小麦胚芽和橄榄油在内的植物油(主要是植物油)也是合适的来源。鲨烯也可获自酵母或其它合适的微生物。在一些实施方式中,鲨烯优选获自非动物来源,例如橄榄、橄榄油或酵母。鲨烯的饱和类似物角鲨烷也是优选的。包括鲨烯和鲨烷在内的鱼油易于从市售来源获得,或可以通过本领域已知的方法获得。

[0074] 在某些实施方式中,所述油核心包含选自下组的油:蓖麻油、椰子油、玉米油、棉籽油、月见草油、鱼油、霍霍巴油、猪油、亚麻子油、橄榄油、花生油、红花油、芝麻油、大豆油、鲨烯、角鲨烷、葵花子油、小麦胚芽油和矿物油。在示例性实施方式中,所述油核心包含大豆油、葵花籽油、橄榄油、鲨烯、角鲨烷或其组合。角鲨烷也可作为油使用。在示例性实施方式中,所述油核心包括鲨烯、角鲨烷或其组合。

[0075] 所述乳液的油组分可以约0.2%~约20%(v/v)的含量存在。例如,阳离子水包油乳液可包含约0.2%~约20%(v/v)油、约0.2%~约15%(v/v)油、约0.2%~约10%(v/v)油、约0.2%~约9%(v/v)油、约0.2%~约8%(v/v)油、约0.2%~约7%(v/v)油、约0.2%~约6%(v/v)油、约0.2%~约5%(v/v)油、约0.2%~约4.3%(v/v)油、约0.3%~约20%(v/v)油、约0.4%~约20%(v/v)油、约0.5%~约20%(v/v)油、约1%~约20%(v/v)油、约2%~约20%(v/v)油、约3%~约20%(v/v)油、约4%~约20%(v/v)油、约4.3%~约20%(v/v)油、约5%~约20%(v/v)油、约0.5%(v/v)油、约1%(v/v)油、约1.5%(v/v)油、约2%(v/v)油、约2.5%(v/v)油、约3%(v/v)油、约3.5%(v/v)油、约4%(v/v)油、约4.3%(v/v)油、约5%(v/v)油、或约10%(v/v)油。

[0076] 或者,阳离子水包油乳液可包含约0.2%~约10%(w/v)油、约0.2%~约9%(w/v)油、约0.2%~约8%(w/v)油、约0.2%~约7%(w/v)油、约0.2%~约6%(w/v)油、约0.2%~约5%(w/v)油、约0.2%~约4.3%(w/v)油、或约4.3%(w/v)油。

[0077] 在一个示例性实施方式中,所述阳离子水包油乳液包含约0.5%(v/v)油。在另一个示例性实施方式中,所述阳离子水包油乳液包含约4.3%(v/v)油。在另一个示例性实施方式中,所述阳离子水包油乳液包含约5%(v/v)油。在另一个示例性实施方式中,所述阳离子水包油乳液包含约4.3%(w/v)鲨烯。

[0078] 如上所述,上述油的百分比根据制备乳液所用油的起始含量确定。本领域应理解终产物(如待给予的包装灭菌乳液)中油的实际浓度可稍低,有时低最多约10%或约20%。

[0079] B. 阳离子脂质

[0080] 本文所述乳液颗粒包含阳离子脂质,其可与所述带负电分子相互作用,从而将所述分子锚定到所述乳液颗粒。

[0081] 所述阳离子脂质可在pH约12、pH约11、pH约10、pH约9、pH约8、pH约7、或pH约6下带正电。

[0082] 可以使用任意合适的阳离子脂质。通常,阳离子脂质含生理条件下带正电的氮原子。合适的阳离子脂质包括苯扎氯铵(BAK)、氯化苄乙铵、溴棕三甲铵(其含十四烷基三甲基溴化铵和可能的少量十二烷基三甲基溴化铵和十六烷基三甲基溴化铵)、十六烷基氯化吡啶鎓(CPC)、十六烷基三甲基氯化铵(CTAC)、伯胺、仲胺、叔胺,包括但不限于N,N',N'-聚氧乙烯(10)-N-牛油-1,3-二氨基丙烷、其它季胺盐包括但不限于十二烷基三甲基溴化

铵、十六烷基三甲基溴化铵、混合的烷基-三甲基-溴化铵、苄基二甲基十二烷基氯化铵、苄基二甲基十六烷基-氯化铵、苄基三甲基甲醇铵、十六烷基二甲基乙基溴化铵、二甲基双十八烷基溴化铵 (DDAB)、甲基氯化苄乙铵、氯化十烃季铵、甲基混合的三烷基氯化铵、甲基三辛基氯化铵)、N,N-二甲基-N-[2(2-甲基-4-(1,1,3,3-四甲基丁基)-苯氧基)-乙氧基)-乙基]-苄甲烷-氯化铵 (DEBDA)、二烷基二甲基铵盐、[1-(2,3-二油烯基氧基)-丙基]-N,N,N-三甲基氯化铵、1,2-二酰基-3-(三甲基铵)丙烷(酰基基团=二肉豆蔻酰、二棕榈酰、二硬脂酰、二油酰)、1,2-二酰基-3-(二甲基铵)丙烷(酰基基团=二肉豆蔻酰、二棕榈酰、二硬脂酰、二油酰)、1,2-二油酰-3-(4'-三甲基-铵)丁酰-sn-甘油、1,2-二油酰-3-琥珀酰-sn-甘油胆碱酯、(4'-三甲基铵)丁酸胆固醇)、N-烷基吡啶鎓盐(如溴化十六烷基吡啶鎓和氯化十六烷基吡啶鎓)、N-烷基哌啶鎓盐、二价阳离子 bola 型电解质($C_{12}Me_6$; $C_{12}BU_6$)、二烷基甘油基磷酸胆碱、溶血卵磷脂、L- α -二油酰磷脂酰乙醇胺、胆固醇半琥珀酸胆碱酯、脂聚胺,包括但不限于双十八烷基酰氨基甘氨酸精胺(DOGS)、二棕榈酰磷脂酰乙醇-酰氨基精胺(DPPES)、脂聚-L(或D)-赖氨酸(LPLL、LPDL)、聚(L(或D)-赖氨酸偶联N-戊二酰磷脂酰乙醇胺、具有侧接氨基基团的双十二烷基谷氨酸酯($C_{12}GluPhC_n^+$)、具有侧接氨基基团的双十四烷基谷氨酸酯($C_{14}GluC_n^+$)、胆固醇阳离子衍生物,包括但不限于胆固醇基-3 β -氧琥珀酰氨基乙烯基三甲基铵盐、胆固醇基-3 β -氧琥珀酰氨基乙烯基-二甲基铵、胆固醇基-3 β -羧基酰氨基乙烯基三甲基铵盐、和胆固醇基-3 β -羧基酰氨基乙烯基二甲基铵和3 γ -[N-(N',N'-二甲基氨基乙基)-氨甲酰基]胆固醇(DC-胆固醇),1,2-二油酰氧基-3-(三甲基胺基)丙烷(DOTAP)、二甲基双十八烷基铵(DDA)、1,2-二肉豆蔻酰-3-三甲基铵丙烷(DMTAP)、二棕榈酰($C_{16:0}$)三甲基铵丙烷(DPTAP)、二硬脂酰三甲基铵丙烷(DSTAP),及其组合。

[0083] 适用于本发明的其它阳离子脂质包括例如美国专利公开 2008/0085870(2008 年 4 月 10 日公开)和 2008/0057080(2008 年 3 月 6 日公开)所述的阳离子脂质。

[0084] 适用于本发明的其它阳离子脂质包括例如 WO2011/076807(还公开制备和使用这些阳离子脂质的方法)的表 6(112-139 页)所述脂质 E0001-E0118 或 E0119-E0180。其它合适的阳离子脂质包括 N-[1-(2,3-二油烯基氧基)丙基]-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTMA)、N,N-二油酰-N,N-二甲基氯化铵(DODAC)、1,2-二油酰-sn-甘油-3-乙基磷酸胆碱(DOEPG)、1,2-二油酰-3-二甲基铵-丙烷(DODAP)、1,2-二亚油基-3-二甲基氨基丙烷(DLinDMA)。

[0085] 所述乳液可包含本文所述阳离子脂质中两种或更多的任意组合。

[0086] 在一些实施方式中,所述阳离子脂质包含季胺。

[0087] 在优选实施方式中,所述阳离子脂质选自下组:1,2-二油酰氧基-3-(三甲基胺基)丙烷(DOTAP)、3 β -[N-(N',N'-二甲基氨基乙基)-氨甲酰基]胆固醇(DC-胆固醇)、二甲基双十八烷基铵(DDA)、1,2-二肉豆蔻酰-3-三甲基铵丙烷(DMTAP)、二棕榈酰($C_{16:0}$)三甲基铵丙烷(DPTAP)、二硬脂酰三甲基铵丙烷(DSTAP)、WO2011/076807 的表 6(112-139 页)中公开的脂质 E0001-E0118 或 E0119-E0180,和其组合。

[0088] 在其它优选实施方式中,所述阳离子脂质选自下组:1,2-二油酰氧基-3-(三甲基胺基)丙烷(DOTAP)、3 β -[N-(N',N'-二甲基氨基乙基)-氨甲酰基]胆固醇(DC-胆固醇)、二甲基双十八烷基铵(DDA)、1,2-二肉豆蔻酰-3-三甲基铵丙烷(DMTAP)、二棕榈酰

(C16:0) 三甲基铵丙烷 (DPTAP)、二硬脂酰三甲基铵丙烷 (DSTAP)、N-[1-(2,3-二油烯氧基)丙基]-N,N,N-三甲基氯化铵 (DOTMA)、N,N-二油酰-N,N-二甲基氯化铵 (DODAC)、1,2-二油酰-sn-甘油-3-乙基磷酸胆碱 (DOEPC)、1,2-二油酰-3-二甲基铵-丙烷 (DODAP)、1,2-二亚油氧基-3-二甲基氨丙烷 (DLinDMA)、W02011/076807(通过引用纳入本文)的表 6(112-139 页)中公开的脂质 E0001-E0118 或 E0119-E0180 及其组合。

[0089] 在某些实施方式中,所述阳离子脂质为 DOTAP。所述阳离子水包油乳液可含约 0.5mg/ml ~ 约 25mg/ml 的 DOTAP。例如,所述阳离子水包油乳液包含的 DOTAP 可为约 0.5mg/ml ~ 约 25mg/ml、约 0.6mg/ml ~ 约 25mg/ml、约 0.7mg/ml ~ 约 25mg/ml、约 0.8mg/ml ~ 约 25mg/ml、约 0.9mg/ml ~ 约 25mg/ml、约 1.0mg/ml ~ 约 25mg/ml、约 1.1mg/ml ~ 约 25mg/ml、约 1.2mg/ml ~ 约 25mg/ml、约 1.3mg/ml ~ 约 25mg/ml、约 1.4mg/ml ~ 约 25mg/ml、约 1.5mg/ml ~ 约 25mg/ml、约 1.6mg/ml ~ 约 25mg/ml、约 1.7mg/ml ~ 约 25mg/ml、约 0.5mg/ml ~ 约 24mg/ml、约 0.5mg/ml ~ 约 22mg/ml、约 0.5mg/ml ~ 约 20mg/ml、约 0.5mg/ml ~ 约 18mg/ml、约 0.5mg/ml ~ 约 15mg/ml、约 0.5mg/ml ~ 约 12mg/ml、约 0.5mg/ml ~ 约 10mg/ml、约 0.5mg/ml ~ 约 5mg/ml、约 0.5mg/ml ~ 约 2mg/ml、约 0.5mg/ml ~ 约 1.9mg/ml、约 0.5mg/ml ~ 约 1.8mg/ml、约 0.5mg/ml ~ 约 1.7mg/ml、约 0.5mg/ml ~ 约 1.6mg/ml、约 0.6mg/ml ~ 约 1.6mg/ml、约 0.7mg/ml ~ 约 1.6mg/ml、约 0.8mg/ml ~ 约 1.6mg/ml、约 0.8mg/ml ~ 约 3.0mg/ml、约 0.5mg/ml、约 0.6mg/ml、约 0.7mg/ml、约 0.8mg/ml、约 0.9mg/ml、约 1.0mg/ml、约 1.1mg/ml、约 1.2mg/ml、约 1.3mg/ml、约 1.4mg/ml、约 1.5mg/ml、约 1.6mg/ml、约 12mg/ml、约 18mg/ml、约 20mg/ml、约 21.8mg/ml、约 24mg/ml 等。

[0090] 在一个示例性实施方式中,所述阳离子水包油乳液包含约 0.8mg/ml ~ 约 1.6mg/ml DOTAP,如 0.8mg/ml、1.2mg/ml、1.4mg/ml 或 1.6mg/ml。

[0091] 在某些实施方式中,所述阳离子脂质为 DC 胆固醇。所述阳离子水包油乳液可含约 0.1mg/ml ~ 约 5mg/ml 的 DC 胆固醇。例如,所述阳离子水包油乳液包含的 DC 胆固醇可为约 0.1mg/ml ~ 约 5mg/ml、约 0.2mg/ml ~ 约 5mg/ml、约 0.3mg/ml ~ 约 5mg/ml、约 0.4mg/ml ~ 约 5mg/ml、约 0.5mg/ml ~ 约 5mg/ml、约 0.62mg/ml ~ 约 5mg/ml、约 1mg/ml ~ 约 5mg/ml、约 1.5mg/ml ~ 约 5mg/ml、约 2mg/ml ~ 约 5mg/ml、约 2.46mg/ml ~ 约 5mg/ml、约 3mg/ml ~ 约 5mg/ml、约 3.5mg/ml ~ 约 5mg/ml、约 4mg/ml ~ 约 5mg/ml、约 4.5mg/ml ~ 约 5mg/ml、约 0.1mg/ml ~ 约 4.92mg/ml、约 0.1mg/ml ~ 约 4.5mg/ml、约 0.1mg/ml ~ 约 4mg/ml、约 0.1mg/ml ~ 约 3.5mg/ml、约 0.1mg/ml ~ 约 3mg/ml、约 0.1mg/ml ~ 约 2.46mg/ml、约 0.1mg/ml ~ 约 2mg/ml、约 0.1mg/ml ~ 约 1.5mg/ml、约 0.1mg/ml ~ 约 1mg/ml、约 0.1mg/ml ~ 约 0.62mg/ml、约 0.15mg/ml、约 0.3mg/ml、约 0.6mg/ml、约 0.62mg/ml、约 0.9mg/ml、约 1.2mg/ml、约 2.46mg/ml、约 4.92mg/ml 等。

[0092] 在一个示例性实施方式中,所述阳离子水包油乳液包含约 0.62mg/ml ~ 约 4.92mg/ml DC 胆固醇,如 2.46mg/ml。

[0093] 在某些实施方式中,所述阳离子脂质为 DDA。所述阳离子水包油乳液可含约 0.1mg/ml ~ 约 5mg/ml 的 DDA。例如,所述阳离子水包油乳液包含的 DDA 可为约 0.1mg/ml ~ 约 5mg/ml、约 0.1mg/ml ~ 约 4.5mg/ml、约 0.1mg/ml ~ 约 4mg/ml、约 0.1mg/ml ~ 约 3.5mg/ml、约 0.1mg/ml ~ 约 3mg/ml、约 0.1mg/ml ~ 约 2.5mg/ml、约 0.1mg/ml ~ 约 2mg/ml、约 0.1mg/ml ~ 约 1.5mg/ml、约 0.1mg/ml ~ 约 1.45mg/ml、约 0.2mg/ml ~ 约 5mg/ml、约

0.3mg/ml ~ 约 5mg/ml、约 0.4mg/ml ~ 约 5mg/ml、约 0.5mg/ml ~ 约 5mg/ml、约 0.6mg/ml ~ 约 5mg/ml、约 0.73mg/ml ~ 约 5mg/ml、约 0.8mg/ml ~ 约 5mg/ml、约 0.9mg/ml ~ 约 5mg/ml、约 1.0mg/ml ~ 约 5mg/ml、约 1.2mg/ml ~ 约 5mg/ml、约 1.45mg/ml ~ 约 5mg/ml、约 2mg/ml ~ 约 5mg/ml、约 2.5mg/ml ~ 约 5mg/ml、约 3mg/ml ~ 约 5mg/ml、约 3.5mg/ml ~ 约 5mg/ml、约 4mg/ml ~ 约 5mg/ml、约 4.5mg/ml ~ 约 5mg/ml、约 1.2mg/ml、约 1.45mg/ml 等。或者,所述阳离子水包油乳液可包含约 20mg/ml、约 21mg/ml、约 21.5mg/ml、约 21.6mg/ml、约 25mg/ml DDA。

[0094] 在一个示例性实施方式中,所述阳离子水包油乳液包含约 0.73mg/ml ~ 约 1.45mg/ml DDA,如 1.45mg/ml。

[0095] 在某些实施方式中,所述阳离子脂质为 DOTMA。所述阳离子水包油乳液可含约 0.5mg/ml ~ 约 25mg/ml 的 DOTMA。例如,所述阳离子水包油乳液包含的 DOTMA 可为约 0.5mg/ml ~ 约 25mg/ml、约 0.6mg/ml ~ 约 25mg/ml、约 0.7mg/ml ~ 约 25mg/ml、约 0.8mg/ml ~ 约 25mg/ml、约 0.9mg/ml ~ 约 25mg/ml、约 1.0mg/ml ~ 约 25mg/ml、约 1.1mg/ml ~ 约 25mg/ml、约 1.2mg/ml ~ 约 25mg/ml、约 1.3mg/ml ~ 约 25mg/ml、约 1.4mg/ml ~ 约 25mg/ml、约 1.5mg/ml ~ 约 25mg/ml、约 1.6mg/ml ~ 约 25mg/ml、约 1.7mg/ml ~ 约 25mg/ml、约 0.5mg/ml ~ 约 24mg/ml、约 0.5mg/ml ~ 约 22mg/ml、约 0.5mg/ml ~ 约 20mg/ml、约 0.5mg/ml ~ 约 18mg/ml、约 0.5mg/ml ~ 约 15mg/ml、约 0.5mg/ml ~ 约 12mg/ml、约 0.5mg/ml ~ 约 10mg/ml、约 0.5mg/ml ~ 约 5mg/ml、约 0.5mg/ml ~ 约 2mg/ml、约 0.5mg/ml ~ 约 1.9mg/ml、约 0.5mg/ml ~ 约 1.8mg/ml、约 0.5mg/ml ~ 约 1.7mg/ml、约 0.5mg/ml ~ 约 1.6mg/ml、约 0.6mg/ml ~ 约 1.6mg/ml、约 0.7mg/ml ~ 约 1.6mg/ml、约 0.8mg/ml ~ 约 1.6mg/ml、约 0.8mg/ml ~ 约 3.0mg/ml、约 0.5mg/ml、约 0.6mg/ml、约 0.7mg/ml、约 0.8mg/ml、约 0.9mg/ml、约 1.0mg/ml、约 1.1mg/ml、约 1.2mg/ml、约 1.3mg/ml、约 1.35mg/ml、约 1.4mg/ml、约 1.5mg/ml、约 1.6mg/ml、约 12mg/ml、约 18mg/ml、约 20mg/ml、约 22.5mg/ml、约 25mg/ml 等。

[0096] 在一个示例性实施方式中,所述阳离子水包油乳液包含约 0.8mg/ml ~ 约 1.6mg/ml DOTMA,如 0.8mg/ml、1.2mg/ml、1.4mg/ml 或 1.6mg/ml。

[0097] 在某些实施方式中,所述阳离子脂质为 DOEPC。所述阳离子水包油乳液可含约 0.5mg/ml ~ 约 25mg/ml 的 DOEPC。例如,所述阳离子水包油乳液包含的 DOEPC 可为约 0.5mg/ml ~ 约 25mg/ml、约 0.6mg/ml ~ 约 25mg/ml、约 0.7mg/ml ~ 约 25mg/ml、约 0.8mg/ml ~ 约 25mg/ml、约 0.9mg/ml ~ 约 25mg/ml、约 1.0mg/ml ~ 约 25mg/ml、约 1.1mg/ml ~ 约 25mg/ml、约 1.2mg/ml ~ 约 25mg/ml、约 1.3mg/ml ~ 约 25mg/ml、约 1.4mg/ml ~ 约 25mg/ml、约 1.5mg/ml ~ 约 25mg/ml、约 1.6mg/ml ~ 约 25mg/ml、约 1.7mg/ml ~ 约 25mg/ml、约 0.5mg/ml ~ 约 24mg/ml、约 0.5mg/ml ~ 约 22mg/ml、约 0.5mg/ml ~ 约 20mg/ml、约 0.5mg/ml ~ 约 18mg/ml、约 0.5mg/ml ~ 约 15mg/ml、约 0.5mg/ml ~ 约 12mg/ml、约 0.5mg/ml ~ 约 10mg/ml、约 0.5mg/ml ~ 约 5mg/ml、约 0.5mg/ml ~ 约 4mg/ml、约 0.5mg/ml ~ 约 3mg/ml、约 0.5mg/ml ~ 约 2mg/ml、约 0.5mg/ml ~ 约 1.9mg/ml、约 0.5mg/ml ~ 约 1.8mg/ml、约 0.5mg/ml ~ 约 1.7mg/ml、约 0.5mg/ml ~ 约 1.6mg/ml、约 0.6mg/ml ~ 约 1.7mg/ml、约 0.7mg/ml ~ 约 1.7mg/ml、约 0.8mg/ml ~ 约 1.7mg/ml、约 0.8mg/ml ~ 约 3.0mg/ml、约 0.5mg/ml、约 0.6mg/ml、约 0.7mg/ml、约 0.8mg/ml、约 0.9mg/ml、约 1.0mg/ml、约 1.1mg/ml、约 1.2mg/ml、约 1.3mg/ml、约 1.4mg/ml、约 1.5mg/ml、约 1.6mg/ml、约 1.7mg/ml、约 1.8mg/ml、约 1.9mg/ml、约 2.0mg/ml、约 12mg/ml

ml、约 18mg/ml、约 20mg/ml、约 22.5mg/ml、约 25mg/ml 等。

[0098] 在一个示例性实施方式中,所述阳离子水包油乳液包含约 0.8mg/ml ~ 约 1.8mg/ml DOEPC,如 0.8mg/ml、1.2mg/ml、1.4mg/ml、1.6mg/ml、1.7mg/ml 或 1.8mg/ml。

[0099] 在某些实施方式中,所述阳离子脂质为 DSTAP。所述阳离子水包油乳液可含约 0.5mg/ml ~ 约 50mg/ml 的 DSTAP。例如,所述阳离子水包油乳液包含的 DSTAP 可为约 0.5mg/ml ~ 约 25mg/ml、约 0.6mg/ml ~ 约 25mg/ml、约 0.7mg/ml ~ 约 25mg/ml、约 0.8mg/ml ~ 约 25mg/ml、约 0.9mg/ml ~ 约 25mg/ml、约 1.0mg/ml ~ 约 25mg/ml、约 1.1mg/ml ~ 约 25mg/ml、约 1.2mg/ml ~ 约 25mg/ml、约 1.3mg/ml ~ 约 25mg/ml、约 1.4mg/ml ~ 约 25mg/ml、约 1.5mg/ml ~ 约 25mg/ml、约 1.6mg/ml ~ 约 25mg/ml、约 1.7mg/ml ~ 约 25mg/ml、约 0.5mg/ml ~ 约 24mg/ml、约 0.5mg/ml ~ 约 22mg/ml、约 0.5mg/ml ~ 约 20mg/ml、约 0.5mg/ml ~ 约 18mg/ml、约 0.5mg/ml ~ 约 15mg/ml、约 0.5mg/ml ~ 约 12mg/ml、约 0.5mg/ml ~ 约 10mg/ml、约 0.5mg/ml ~ 约 5mg/ml、约 0.5mg/ml ~ 约 4mg/ml、约 0.5mg/ml ~ 约 3mg/ml、约 0.5mg/ml ~ 约 2mg/ml、约 0.5mg/ml ~ 约 1.9mg/ml、约 0.5mg/ml ~ 约 1.8mg/ml、约 0.5mg/ml ~ 约 1.7mg/ml、约 0.5mg/ml ~ 约 1.6mg/ml、约 0.6mg/ml ~ 约 1.7mg/ml、约 0.7mg/ml ~ 约 1.7mg/ml、约 0.8mg/ml ~ 约 1.7mg/ml、约 0.8mg/ml ~ 约 3.0mg/ml、约 0.5mg/ml、约 0.6mg/ml、约 0.7mg/ml、约 0.8mg/ml、约 0.9mg/ml、约 1.0mg/ml、约 1.1mg/ml、约 1.2mg/ml、约 1.3mg/ml、约 1.4mg/ml、约 1.5mg/ml、约 1.6mg/ml、约 1.7mg/ml、约 1.8mg/ml、约 1.9mg/ml、约 2.0mg/ml、约 12mg/ml、约 18mg/ml、约 20mg/ml、约 22.5mg/ml、约 25mg/ml 等。

[0100] 在一个示例性实施方式中,所述阳离子水包油乳液包含约 0.8mg/ml ~ 约 1.6mg/ml DSTAP,如 0.8mg/ml、1.2mg/ml、1.4mg/ml 或 1.6mg/ml。

[0101] 在某些实施方式中,所述阳离子脂质为 DODAC。所述阳离子水包油乳液可含约 0.5mg/ml ~ 约 50mg/ml 的 DODAC。例如,所述阳离子水包油乳液包含的 DODAC 可为约 0.5mg/ml ~ 约 25mg/ml、约 0.6mg/ml ~ 约 25mg/ml、约 0.7mg/ml ~ 约 25mg/ml、约 0.8mg/ml ~ 约 25mg/ml、约 0.9mg/ml ~ 约 25mg/ml、约 1.0mg/ml ~ 约 25mg/ml、约 1.1mg/ml ~ 约 25mg/ml、约 1.2mg/ml ~ 约 25mg/ml、约 1.3mg/ml ~ 约 25mg/ml、约 1.4mg/ml ~ 约 25mg/ml、约 1.5mg/ml ~ 约 25mg/ml、约 1.6mg/ml ~ 约 25mg/ml、约 1.7mg/ml ~ 约 25mg/ml、约 0.5mg/ml ~ 约 24mg/ml、约 0.5mg/ml ~ 约 22mg/ml、约 0.5mg/ml ~ 约 20mg/ml、约 0.5mg/ml ~ 约 18mg/ml、约 0.5mg/ml ~ 约 15mg/ml、约 0.5mg/ml ~ 约 12mg/ml、约 0.5mg/ml ~ 约 10mg/ml、约 0.5mg/ml ~ 约 5mg/ml、约 0.5mg/ml ~ 约 4mg/ml、约 0.5mg/ml ~ 约 3mg/ml、约 0.5mg/ml ~ 约 2mg/ml、约 0.5mg/ml ~ 约 1.9mg/ml、约 0.5mg/ml ~ 约 1.8mg/ml、约 0.5mg/ml ~ 约 1.7mg/ml、约 0.5mg/ml ~ 约 1.6mg/ml、约 0.6mg/ml ~ 约 1.7mg/ml、约 0.7mg/ml ~ 约 1.7mg/ml、约 0.8mg/ml ~ 约 1.7mg/ml、约 0.8mg/ml ~ 约 3.0mg/ml、约 0.5mg/ml、约 0.6mg/ml、约 0.7mg/ml、约 0.8mg/ml、约 0.9mg/ml、约 1.0mg/ml、约 1.1mg/ml、约 1.15mg/ml、约 1.16mg/ml、约 1.17mg/ml、约 1.2mg/ml、约 1.3mg/ml、约 1.4mg/ml、约 1.5mg/ml、约 1.6mg/ml、约 1.7mg/ml、约 1.8mg/ml、约 1.9mg/ml、约 2.0mg/ml、约 12mg/ml、约 18mg/ml、约 20mg/ml、约 22.5mg/ml、约 25mg/ml 等。

[0102] 在一个示例性实施方式中,所述阳离子水包油乳液包含约 0.73mg/ml ~ 约 1.45mg/ml DODAC,如 1.45mg/ml。

[0103] 在某些实施方式中,所述阳离子脂质为 DODAP。所述阳离子水包油乳液可含约

0.5mg/ml ~ 约 50mg/ml 的 DODAP。例如,所述阳离子水包油乳液包含的 DODAP 可为约 0.5mg/ml ~ 约 25mg/ml、约 0.6mg/ml ~ 约 25mg/ml、约 0.7mg/ml ~ 约 25mg/ml、约 0.8mg/ml ~ 约 25mg/ml、约 0.9mg/ml ~ 约 25mg/ml、约 1.0mg/ml ~ 约 25mg/ml、约 1.1mg/ml ~ 约 25mg/ml、约 1.2mg/ml ~ 约 25mg/ml、约 1.3mg/ml ~ 约 25mg/ml、约 1.4mg/ml ~ 约 25mg/ml、约 1.5mg/ml ~ 约 25mg/ml、约 1.6mg/ml ~ 约 25mg/ml、约 1.7mg/ml ~ 约 25mg/ml、约 0.5mg/ml ~ 约 24mg/ml、约 0.5mg/ml ~ 约 22mg/ml、约 0.5mg/ml ~ 约 20mg/ml、约 0.5mg/ml ~ 约 18mg/ml、约 0.5mg/ml ~ 约 15mg/ml、约 0.5mg/ml ~ 约 12mg/ml、约 0.5mg/ml ~ 约 10mg/ml、约 0.5mg/ml ~ 约 5mg/ml、约 0.5mg/ml ~ 约 4mg/ml、约 0.5mg/ml ~ 约 3mg/ml、约 0.5mg/ml ~ 约 2mg/ml、约 0.5mg/ml ~ 约 1.9mg/ml、约 0.5mg/ml ~ 约 1.8mg/ml、约 0.5mg/ml ~ 约 1.7mg/ml、约 0.5mg/ml ~ 约 1.6mg/ml、约 0.6mg/ml ~ 约 1.7mg/ml、约 0.7mg/ml ~ 约 1.7mg/ml、约 0.8mg/ml ~ 约 1.7mg/ml、约 0.8mg/ml ~ 约 3.0mg/ml、约 0.5mg/ml、约 0.6mg/ml、约 0.7mg/ml、约 0.8mg/ml、约 0.9mg/ml、约 1.0mg/ml、约 1.1mg/ml、约 1.2mg/ml、约 1.3mg/ml、约 1.4mg/ml、约 1.5mg/ml、约 1.6mg/ml、约 1.7mg/ml、约 1.8mg/ml、约 1.9mg/ml、约 2.0mg/ml、约 12mg/ml、约 18mg/ml、约 20mg/ml、约 22.5mg/ml、约 25mg/ml 等。

[0104] 在一个示例性实施方式中,所述阳离子水包油乳液包含约 0.8mg/ml ~ 约 1.6mg/ml DODAP,如 0.8mg/ml、1.2mg/ml、1.4mg/ml 或 1.6mg/ml。

[0105] 在一些情况中,可能需要使用可溶于油核心的阳离子脂质。例如, DOTAP、DOEPC、DODAC 和 DOTMA 可溶于鲨烯或角鲨烷。在其它情况中,可能需要使用不溶于油核心的阳离子脂质。例如 DDA 和 DSTAP 不溶于鲨烯。确定具体脂质溶于或不溶于油以及由此选择合适的油和脂质组合在本领域认识范围内。例如,溶解度可根据所述脂质和油的结构来预测(如脂质的溶解度可通过其尾部的结构来确定)。例如,具有一个或两个不饱和脂肪链(如油酰尾)的脂质如 DOTAP、DOEPC、DODAC、DOTMA,可溶于鲨烯或鲨烷;而具有饱和脂肪酸链(如硬脂酰尾)的脂质不溶于鲨烯。或者,溶解度可根据溶于给定量油以形成饱和溶液的脂质的量来确定。

[0106] 如上所述,上述脂质的浓度根据制备乳液所用脂质的初始量确定。本领域应理解终产物(如待给予的包装灭菌乳液)中油的浓度可稍低,有时低最多约 20%。

[0107] C. 其它组分

[0108] 本文所述阳离子水包油乳液还可包含其它组分。例如,所述乳液可包含能够促进颗粒形成、改善所述核酸分子与所述阳离子颗粒间的复合或提高所述核酸分子的稳定性(例如,防止 RNA 分子降解)的组分。必要时,所述阳离子水包油乳液可含有抗氧化剂,如柠檬酸盐、抗坏血酸或其盐。

[0109] 表面活性剂

[0110] 在某些实施方式中,所述阳离子水包油乳液的颗粒还包含表面活性剂。

[0111] 大量表面活性剂已用于药物科学。这些包括天然衍生的材料如树胶、植物蛋白、基于糖的聚合物如海藻酸盐和纤维素等。在碳主链上具有氢氧根或其它亲水取代基的某些氧聚合物或聚合物具有表面活性剂活性,例如聚维酮、聚乙烯醇和基于醇醚的单和多官能化合物。长链脂肪酸衍生的化合物形成本发明可用的第三大组乳化和悬浮剂。

[0112] 合适表面活性剂的特定例子包括下列:

[0113] 1. 水溶性皂如高级脂肪酸($C_{10} \sim C_{22}$)的钠、钾、铵和烷醇铵的盐,尤其是钠和钾牛

脂和椰子皂。

[0114] 2. 阴离子合成非皂表面活性剂,其可由有机硫磺酸反应产物的水溶性盐代表,其分子结构中具有含约 8 ~ 22 碳原子的烷基基团和选自磺酸和硫酸酯基团的基团。这些的示例是牛脂或椰子油衍生的烷基硫酸钠或钾;烷基苯磺酸钠或钾;烷基甘油醚磺酸钠;椰子油脂肪酸单甘酯磺酸或硫酸钠;1 摩尔高级脂肪醇和约 1 ~ 6 摩尔环氧乙烷的反应产物的硫酸酯的钠或钾盐;烷基苯酚环氧乙烷醚磺酸钠或钾,每摩尔具有 1 ~ 10 单元的环氧乙烷且其中所述烷基基团含 8 ~ 12 个碳原子;脂肪酸以羟乙基磺酸酯化并以氢氧化钠中和的反应产物;甲基牛磺酸的脂肪酸酰胺的钠或钾盐;和 SO_3^- 磺化 $\text{C}_{10}-\text{C}_{24}$ α -烯烃的钠和钾盐。

[0115] 3. 环氧烷基团与有机疏水化合物缩合产生的非离子合成表面活性剂。典型疏水基团包括烷基酚、丙二醇与环氧丙烷的缩合产物,和脂肪酸的酰胺和具有 8 ~ 22 个碳原子的脂族醇、乙二胺和环氧丙烷的缩合产物。

[0116] 4. 具有半极性特征的非离子表面活性剂,如氧化胺、氧化膦和亚砷。长链氧化叔胺的具体示例包括二甲基十二烷基氧化胺和二(2-羟乙基)十二烷基胺。氧化膦的具体示例参见 1967 年 2 月 14 日授权的美国专利号 3,304,263,且包括二甲基十二烷基氧化膦和二甲基-(2-羟基十二烷基)氧化膦。

[0117] 5. 长链亚砷,包括对应化学式 $\text{R}^1-\text{SO}-\text{R}^2$ 的那些,其中 R^1 和 R^2 由烷基基团取代或未取代,前者含约 10 ~ 约 28 个碳原子,而 R^2 含 1 ~ 3 个碳原子。这些亚砷的具体示例包括十二烷基甲基亚砷和 3-羟基十三烷基甲基亚砷。

[0118] 6. 两性合成表面活性剂如 3-十二烷基氨基丙酸钠和 3-十二烷基氨基丙烷磺酸钠。

[0119] 7. 两性离子合成表面活性剂,如 3-(N,N-二甲基-N-十六烷基胺基)丙烷-1-磺酸盐/酯和 3-(N,N-二甲基-N-十六烷基胺基)-2-羟丙烷-1-磺酸盐/酯。

[0120] 此外,下述类型的表面活性剂都可用于本发明的组合物:(a) 脂肪酸、松香酸和妥尔油的皂(即碱性盐);(b) 烷基芳烃磺酸盐;(c) 烷基硫酸盐,包括具有支链和直链疏水基团以及一代和二代硫酸基团的表面活性剂;(d) 疏水与亲水基团之间含中间连接的硫酸盐/酯和磺酸盐/酯,如脂肪酰基化的甲基牛磺酸和硫酸化的脂肪单甘酯;(e) 聚乙二醇的长链酸酯,尤其是妥儿油酯;(f) 烷基酚的聚乙二醇醚;(g) 长链醇和硫醇的聚乙二醇醚;和(h) 脂肪酰基二乙醇酰胺。由于表面活性剂可用多于一种方法分类,本段所列的许多表面活性剂类别与前述的表面活性剂类别有重叠。

[0121] 有许多为生物条件特别设计且常用于生物条件的表面活性剂。此类表面活性剂分为四种基本类型:阴离子、阳离子、两性离子(两性)和非离子。示例性阴离子表面活性剂包括例如,全氟辛酸盐(PFOA 或 PFO)、全氟辛烷磺酸盐(PFOS),烷基硫酸盐如十二烷基硫酸钠(SDS)或月桂基硫酸铵,月桂醇聚醚硫酸钠(也称月桂基醚硫酸钠,SLES),烷基苯磺酸盐和脂肪酸盐。示例性阳离子表面活性剂包括例如,烷基三甲基铵盐如鲸蜡基三甲基溴化铵(CTAB,或十六烷基溴化三甲基铵),氯化鲸蜡基吡啶(CPC),聚乙氧基化牛油胺(POEA),苯扎氯铵(BAC)和苄索氯铵(BZT)。示例性两性离子(两性)表面活性剂包括例如,十二烷基甜菜碱,椰油酰胺丙基甜菜碱和椰油两性甘氨酸盐。示例性非离子型表面活性剂包括例如,烷基聚(环氧乙烯)、烷基苯酚聚(环氧乙烯)、聚(环氧乙烯)和聚(环氧丙烯)的共聚物[商品名为泊洛沙姆(Poloxamer)或泊洛沙胺(Poloxamine)]、烷基聚葡萄糖苷(如辛

基葡萄糖苷和癸基麦芽糖苷)、脂肪醇(例如鲸蜡醇和油醇)、椰油酰胺 MEA、椰油酰胺 DEA, **Pluronic®** F68(聚氧乙烯-聚氧丙烯嵌段共聚物)和聚山梨醇酯,如吐温(Tween)-20(聚山梨醇酯 20)、吐温-80(聚山梨醇酯 80,聚氧乙烯去水山梨糖醇单油酸酯)、十二烷基二甲基氧化胺和维生素 E 生育酚丙二醇琥珀酸酯(维生素 E TPGS)。

[0122] 一组特别有用的表面活性剂是基于去水山梨糖醇的非离子表面活性剂。这些表面活性剂通过山梨糖醇脱水产生 1,4-去水山梨糖醇,然后与一种或多种脂肪酸等价物反应来制得。脂肪酸取代的部分还可与环氧乙烷反应产生第二组表面活性剂。

[0123] 制备脂肪酸取代的去水山梨糖醇表面活性剂是通过 1,4-去水山梨糖醇和脂肪酸如月桂酸、棕榈酸、硬脂酸、油酸或相似长链脂肪酸反应,产生 1,4-去水山梨糖醇单酯、1,4-去水山梨糖醇倍半酯或 1,4-去水山梨糖醇三酯。这些表面活性剂的常用名包括例如去水山梨糖醇单月桂酸酯、去水山梨糖醇单棕榈酯、去水山梨糖醇单硬脂酸酯、去水山梨糖醇单油酸酯、去水山梨糖醇倍半油脂和去水山梨糖醇三油酸酯。这些表面活性剂市售可得,名为 **SPAN®**(司盘)或 **ARLACEL®**,通常有字母或数字标号来区别各种单、双和三酯取代的去水山梨糖醇。

[0124] **SPAN®**和 **ARLACEL®**表面活性剂是亲水的并通常可溶或可分散在油中。它们还可溶于大多数有机溶剂。在水中它们通常不可溶但可分散。通常这些表面活性剂的亲水-亲脂平衡(HLB)数为 1.8~8.6。此类表面活性剂可通过本领域已知的手段方便地制得或市售可得。

[0125] 一组相关表面活性剂包含聚氧乙烯(olyoxyethylene)去水山梨糖醇单酯和聚氧乙烯去水山梨糖醇三酯。这些材料通过添加环氧乙烷到 1,4-去水山梨糖醇单酯或三酯中来制备。添加聚氧乙烯将亲脂去水山梨糖醇单或三酯表面活性剂转变为亲水表面活性剂,后者通常可溶或可分散在水中并以不同程度可溶于有机液体中。

[0126] 这些材料以商标 **TWEEN®** 市售可得,可用于制备水包油乳液和分散体,或用于溶解油并使无水药膏变为水溶性或可清洗。**TWEEN®**表面活性剂可与相关去水山梨糖醇单酯或三酯表面活性剂组合以促进乳液稳定性。**TWEEN®**表面活性剂的 HLB 值通常落在 9.6~16.7 之间。**TWEEN®**表面活性剂可市售购得。

[0127] 可单独使用或与 **SPAN®**、**ARLACEL®**和 **TWEEN®**表面活性剂联用的第三组非离子表面活性剂是通过环氧乙烷与长链脂肪酸反应制得的聚氧乙烯脂肪酸。该类型的最常见表面活性剂是名为 **MYRJ®** 的固体并且是硬脂酸的聚氧乙烯衍生物。**MYRJ®**表面活性剂是亲水的且可溶或可分散在水中,类似 **TWEEN®** 表面活性剂。**MYRJ®**表面活性剂可与 **TWEEN®** 表面活性剂或与 **TWEEN®/SPAN®**或 **ARLACEL®**表面活性剂混合物相混用于形成乳液。**MYRJ®**表面活性剂可通过本领域已知方法制备或市售购得。

[0128] 第四组基于聚氧乙烯的非离子表面活性剂是衍生自月桂酰、乙酰、硬脂酰、和油酰醇的聚氧乙烯脂肪酸酯。这些材料如上通过添加环氧乙烷到脂肪醇中来制备。这些表面活性剂的商品名为 **BRIJ®**。**BRIJ®**表面活性剂可为亲水或亲脂,取决于所述表面活性剂中聚氧乙烯部分的大小。这些化合物的制备在本领域可得,同时其还可容易地获自商业来源。

[0129] 可潜在使用的其它非离子表面活性剂是例如,聚氧乙烯、多元醇脂肪酸酯、聚氧乙

烯醚、聚氧丙烯脂肪醚、含聚氧乙烯的蜂蜡衍生物、聚氧乙烯羊毛脂衍生物、聚氧乙烯脂肪甘油酯、丙三醇脂肪酸酯或 12 ~ 22 个碳原子长链脂肪酸的其它聚氧乙烯酸醇或醚衍生物。

[0130] 由于本发明的乳液和制剂意在为多相系统,优选选择形成乳液的非离子表面活性剂,其 HLB 值在约 7 ~ 16 范围内。该值可通过使用单一非离子表面活性剂如 **TWEEN®** 表面活性剂来获得,或可通过使用表面活性剂混合物来实现,例如有基于去水山梨糖醇单、双或三酯的表面活性剂;去水山梨糖醇酯聚氧乙烯脂肪酸;去水山梨糖醇酯与聚氧乙烯羊毛脂衍生表面活性剂组合;去水山梨糖醇酯表面活性剂与高 HLB 聚氧乙烯脂肪醚表面活性剂组合;或聚氧乙烯脂肪醚表面活性剂或聚氧乙烯去水山梨糖醇脂肪酸。

[0131] 在某些实施方式中,乳液含单一非离子表面活性剂,最具体的有 **TWEEN®** 表面活性剂,作为乳液稳定用非离子表面活性剂。在示例性实施方式中,乳液含 **TWEEN® 80**,或称为聚山梨酯 80 或聚氧乙烯 20 去水山梨糖醇单酯。在其它实施方式中,乳液含两种或多种非离子表面活性剂,尤其是 **TWEEN®** 表面活性剂和 **SPAN®** 表面活性剂。在示例性实施方式中,乳液含 **TWEEN® 80** 和 **SPAN® 85**。

[0132] 水包油乳液可包含约 0.01% ~ 约 2.5% 表面活性剂 (v/v 或 w/v),约 0.01% ~ 约 2% 表面活性剂,0.01% ~ 约 1.5% 表面活性剂,0.01% ~ 约 1% 表面活性剂,0.01% ~ 约 0.5% 表面活性剂,0.05% ~ 约 0.5% 表面活性剂,0.08% ~ 约 0.5% 表面活性剂,约 0.08% 表面活性剂,约 0.1% 表面活性剂,约 0.2% 表面活性剂,约 0.3% 表面活性剂,约 0.4% 表面活性剂,约 0.5% 表面活性剂,约 0.6% 表面活性剂,约 0.7% 表面活性剂,约 0.8% 表面活性剂,约 0.9% 表面活性剂,或约 1% 表面活性剂。

[0133] 或者或此外,所述水包油乳液可包含 0.05% ~ 约 1%、0.05% ~ 约 0.9%、0.05% ~ 约 0.8%、0.05% ~ 约 0.7%、0.05% ~ 约 0.6%、0.05% ~ 约 0.5%、约 0.08%、约 0.1%、约 0.2%、约 0.3%、约 0.4%、约 0.5%、约 0.6%、约 0.7%、约 0.8%、约 0.9%、或约 1% 吐温 80 (聚山梨酯 80;聚氧乙烯去水山梨糖醇单油脂)。

[0134] 在一个示例性实施方式中,所述水包油乳液含 0.08% 吐温 80。

[0135] 或者或此外,所述水包油乳液可包含 0.05% ~ 约 1%、0.05% ~ 约 0.9%、0.05% ~ 约 0.8%、0.05% ~ 约 0.7%、0.05% ~ 约 0.6%、0.05% ~ 约 0.5%、约 0.08%、约 0.1%、约 0.2%、约 0.3%、约 0.4%、约 0.5%、约 0.6%、约 0.7%、约 0.8%、约 0.9%、或约 1% 司盘 85 (去水山梨糖醇三油脂)。

[0136] 或者或此外,所述水包油乳液可包含本文所述表面活性剂的组合。例如,可使用吐温 80 (聚山梨酯 80,聚氧乙烯去水山梨糖醇单油酸酯) 和司盘 85 (失水山梨糖醇三油酸酯) 的组合。所述乳液可含各种量的 **Tween® 80** 和司盘 85 (如上面所示例的那些),包括等量的这些表面活性剂。例如,所述水包油乳液可包含约 0.05% **Tween® 80** 和约 0.05% **SPAN® 85**、约 0.1% **Tween® 80** 和约 0.1% **SPAN® 85**、约 0.2% **Tween® 80** 和约 0.2% **SPAN® 85**、约 0.3% **Tween® 80** 和约 0.3% **SPAN® 85**、约 0.4% **Tween® 80** 和约 0.4% **SPAN® 85**、约 0.5% **Tween® 80** 和约 0.5% **SPAN® 85**、约 0.6% **Tween® 80** 和约 0.6% **SPAN® 85**、约 0.7% **Tween® 80** 和约 0.7% **SPAN® 85**、约 0.8% **Tween® 80** 和约 0.8% **SPAN® 85**。

85、约 0.9% Tween® 80 和约 0.9% SPAN® 85 或约 1% Tween® 80 和约 1.0% SPAN® 85。

[0137] 聚乙二醇 (PEG)- 脂质, 如 PEG 偶联二烷氧基丙基 (PEG-DAA)、PEG 偶联二酰甘油 (PEG-DAG)、PEG 偶联磷脂酰乙醇胺 (PE) (PEG-PE) 或一些其它磷脂 (PEG- 磷脂)、PEG 偶联神经酰胺 (PEG-Cer)、或其组合也可用作表面活性剂 (参见例如美国专利号 5,885,613; 美国专利申请公开号 2003/0077829, 2005/0175682 和 2006/0025366)。其它合适的 PEG- 脂质包括例如 PEG- 二烷氧基丙基 (DAA) 脂质或 PEG- 二酰甘油 (DAG) 脂质。示例性 PEG-DAG 脂质包括例如 PEG- 二月桂酰甘油 (C₁₂) 脂质、PEG- 二肉豆蔻酰甘油 (C₁₄) 脂质、PEG- 二棕榈酰甘油 (C₁₆) 脂质、或 PEG- 二硬脂酰甘油 (C₁₈) 脂质。示例性 PEG-DAA 脂质包括例如 PEG- 二月桂酰丙基 (C₁₂) 脂质、PEG- 二肉豆蔻酰丙基 (C₁₄) 脂质、PEG- 二棕榈酰丙基 (C₁₆) 脂质、或 PEG- 二硬脂酰丙基 (C₁₈) 脂质。

[0138] PEG 根据其分子量分类; 例如, PEG2000 平均分子量为约 2,000 道尔顿, PEG5000 平均分子量为约 5,000 道尔顿。PEG 可从西格玛化学公司 (Sigma Chemical Co.) 以及其它公司市售获得, 包括例如下列: 单甲氧基聚乙二醇 (MePEG-OH)、单甲氧基聚乙二醇-琥珀酸酯 (MePEG-S)、单甲氧基聚乙二醇-琥珀酰亚胺基琥珀酸酯 (MePEG-S-NHS)、单甲氧基聚乙二醇-氨 (MePEG-NH₂)、单甲氧基聚乙二醇-三氟乙基磺酸酯 (tresylate) (MePEG-TRES)、和单甲氧基聚乙二醇-咪唑基-羧酸酯 (MePEG-IM)。此外, 单甲氧基聚乙二醇-乙酸 (MePEG-CH₂COOH) 对于制备 PEG- 脂质偶联物, 包括例如 PEG-DAA 偶联物特别有用。

[0139] 优选地, PEG 平均分子量为约 1000 - 约 5000 道尔顿 (如 PEG₁₀₀₀、PEG₂₀₀₀、PEG₃₀₀₀、PEG₄₀₀₀、PEG₅₀₀₀)。PEG 能任选被烷基、烷氧基、酰基或芳基基团取代。PEG 可直接偶联脂质或可通过接头部分连接脂质。可使用适用于偶联 PEG 与脂质的任何接头部分, 包括例如不含酯的接头部分和含酯的接头部分。

[0140] 在示例性实施方式中, PEG₂₀₀₀PE、PEG₅₀₀₀PE、PEG₁₀₀₀DMG、PEG₂₀₀₀DMG、PEG₃₀₀₀DMG、或其组合作为表面活性剂。在某些示例性实施方式中, 所述水包油乳液包含约 1mg/ml - 约 80mg/ml PEG₂₀₀₀PE、PEG₅₀₀₀PE、PEG₁₀₀₀DMG、PEG₂₀₀₀DMG、或 PEG₃₀₀₀DMG。

[0141] 磷脂

[0142] 在某些实施方式中, 所述阳离子水包油乳液的颗粒还包含磷脂。

[0143] 磷脂是脂肪酸的酯, 其中分子的醇组分包含磷酸基团。磷脂包括甘油磷脂 (含甘油) 和鞘磷脂 (含鞘氨醇)。示例性磷脂包括磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸和鞘磷脂; 和合成磷脂, 包含二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱、二棕榈酰磷脂酰胆碱、二硬脂酰磷脂酰胆碱、二硬脂酰磷脂酰甘油、二棕榈酰磷脂酰甘油、二肉豆蔻酰磷脂酰丝氨酸、二硬脂酰磷脂酰丝氨酸和二棕榈酰丝氨酸。

[0144] 可使用下列示例性磷脂。

[0145]

DDPC	1,2-二癸酰-sn-甘油-3-磷脂酰胆碱
DEPA-NA	1,2-二芥酰-sn-甘油-3-磷酸盐(钠盐)
DEPC	1,2-芥酰-sn-甘油-3-磷脂酰胆碱
DEPE	1,2-二芥酰-sn-甘油-3-磷脂酰乙醇胺
DEPG-NA	1,2-二芥酰-sn-甘油-3[磷脂酰-外消旋-(1-甘油...)]
DLOPC	1,2-亚麻酰-sn-甘油-3-磷脂酰胆碱
DLPA-NA	1,2-二月桂酰-sn-甘油-3-磷酸盐(钠盐)
DLPC	1,2-二月桂酰-sn-甘油-3-磷脂酰胆碱
DLPE	1,2-二月桂酰-sn-甘油-3-磷脂酰乙醇胺
DLPG-NA	1,2-二月桂酰-sn-甘油-3[磷脂酰-外消旋-(1-甘油...)](钠盐)
DLPG-NH4	1,2-二月桂酰-sn-甘油-3[磷脂酰-外消旋-(1-甘油...)]
DLPS-NA	1,2-二月桂酰-sn-甘油-3-磷酸酰丝氨酸(钠盐)
DMPA-NA	1,2-二肉豆蔻酰-sn-甘油-3-磷酸盐(钠盐)
DMPC	1,2-二肉豆蔻酰-sn-甘油-3-磷脂酰胆碱
DMPE	1,2-二肉豆蔻酰-sn-甘油-3-磷脂酰乙醇胺

[0146]

DMPG-NA	1,2-肉豆蔻酰-sn-甘油-3[磷脂酰-外消旋-(1-甘油...)]
DMPG-NH ₄	1,2-肉豆蔻酰-sn-甘油-3[磷脂酰-外消旋-(1-甘油...)]
DMPG-NH ₄ /NA	1,2-肉豆蔻酰-sn-甘油-3[磷脂酰-外消旋-(1-甘油...)]
DMPS-NA	1,2-二肉豆蔻酰-sn-甘油-3-磷酸酰丝氨酸(钠盐)
DOPA-NA	1,2-二油酰-sn-甘油-3-磷酸盐(钠盐)
DOPC	1,2-二油酰-sn-甘油-3-磷脂酰胆碱
DOPE	1,2-二油酰-sn-甘油-3-磷脂酰乙醇胺
DOPG-NA	1,2-二油酰-sn-甘油-3[磷脂酰-外消旋-(1-甘油...)]
DOPS-NA	1,2-二油酰-sn-甘油-3-磷酸酰丝氨酸(钠盐)
DPPA-NA	1,2-二棕榈酰-sn-甘油-3-磷酸盐(钠盐)
DPPC	1,2-二棕榈酰-sn-甘油-3-磷脂酰胆碱
DPPE	1,2-二棕榈酰-sn-甘油-3-磷脂酰乙醇胺
DPPG-NA	1,2-二棕榈酰-sn-甘油-3[磷脂酰-外消旋-(1-甘油...)]
DPPG-NH ₄	1,2-二棕榈酰-sn-甘油-3[磷脂酰-外消旋-(1-甘油...)]
DPPS-NA	1,2-二棕榈酰-sn-甘油-3-磷酸酰丝氨酸(钠盐)
DPyPE	1,2-二植烷酰-sn-甘油-3-磷脂酰乙醇胺
DSPA-NA	1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸盐(钠盐)
DSPC	1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷脂酰胆碱
DSPE	1,2-二硬脂酰(Diostearyl)-sn-甘油-3-磷脂酰乙醇胺
DSPG-NA	1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3[磷脂酰-外消旋-(1-甘油...)]
DSPG-NH ₄	1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3[磷脂酰-外消旋-(1-甘油...)]
DSPS-NA	1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷脂酰丝氨酸(钠盐)
EPC	蛋-PC
HEPC	氢化蛋PC
HSPC	高纯度氢化大豆PC
HSPC	氢化大豆PC
LYSOPC MYRISTIC	1-肉豆蔻酰-sn-甘油-3-磷脂酰胆碱
LYSOPC PALMITIC	1-棕榈酰-sn-甘油-3-磷脂酰胆碱
LYSOPC STEARIC	1-硬脂酰-sn-甘油-3-磷脂酰胆碱
Milk Sphingomyelin	1-肉豆蔻酰,2-棕榈酰-sn-甘油3-磷脂酰胆碱

[0147]

MPPC	
MSPC	1-肉豆蔻酰,2-硬脂酰-sn-甘油-3-磷脂酰胆碱
PMPC	1-棕榈酰,2-肉豆蔻酰-sn-甘油-3-磷脂酰胆碱
POPC	1-棕榈酰,2-油酰-sn-甘油-3-磷脂酰胆碱
POPE	1-棕榈酰,2-油酰-sn-甘油-3-磷脂酰乙醇胺
POPG-NA	1,2-二油酰-sn-甘油-3-[磷脂酰-外消旋-(1-甘油)...](钠盐)
PSPC	1-棕榈酰,2-硬脂酰-sn-甘油-3-磷脂酰胆碱
SMPC	1-硬脂酰,2-肉豆蔻酰-sn-甘油-3-磷脂酰胆碱
SOPC	1-硬脂酰,2-油酰-sn-甘油-3-磷脂酰胆碱
SPPC	1-硬脂酰,2-棕榈酰-sn-甘油-3-磷脂酰胆碱

[0148] 在某些实施方式中,使用中性脂质具有优势。使用磷脂也可具有优势,包括两性离子磷脂,例如含一种或多种长度为约 12 ~ 约 22 碳(如约 12 ~ 约 14、约 12 ~ 约 16、约 12 ~ 约 18、约 12 ~ 约 20、约 12 ~ 约 22 碳)的烷基或烯基基团的磷脂,这些基团可包含例如 0-1-2-3 个双键。使用两性磷脂可具有优势。

[0149] 优选的磷脂包括例如 1, 2- 二油酰 -sn- 甘油 -3- 磷脂酰乙醇胺 (DOPE)、蛋磷脂酰胆碱(蛋 PC)、棕榈酰油酰磷脂酰胆碱(POPC)、二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱(DMPC)、二油酰磷脂酰胆碱(DOPC)、DPPC、二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)、棕榈酰亚油酰磷脂酰胆碱(PLPC)、DPyPE,或其组合。

[0150] 在某些实施方式中,磷脂是 DOPE。所述阳离子水包油乳液可含约 0.1mg/ml ~ 约 20mg/ml 的 DOPE。例如,所述阳离子水包油乳液可包含约 0.5mg/ml ~ 约 10mg/ml、约 0.1mg/ml ~ 约 10mg/ml、或约 1.5mg/ml ~ 约 7.5mg/ml DOPE。

[0151] 在一个示例性实施方式中,所述阳离子水包油乳液包含约 1.5mg/ml DOPE。

[0152] 在某些实施方式中,磷脂是蛋 PC。所述阳离子水包油乳液可含约 0.1mg/ml ~ 约 20mg/ml 的蛋 PC。例如,所述阳离子水包油乳液可包含约 0.1mg/ml ~ 约 10mg/ml、约 1.0mg/ml ~ 约 10mg/ml、或约 1.5mg/ml ~ 约 3.5mg/ml 的蛋 PC。

[0153] 在一个示例性实施方式中,所述阳离子水包油乳液包含约 1.55mg/ml 蛋 PC。

[0154] 在某些实施方式中,磷脂是 DPyPE。所述阳离子水包油乳液可含约 0.1mg/ml ~ 约 20mg/ml 的 DPyPE。例如,所述阳离子水包油乳液可包含约 0.1mg/ml ~ 约 10mg/ml、约 1.5mg/ml ~ 约 10mg/ml、或约 1.5mg/ml ~ 约 5mg/ml DPyPE。

[0155] 在一个示例性实施方式中,所述阳离子水包油乳液包含约 1.6mg/ml DPyPE。

[0156] 在某些实施方式中,乳液颗粒可包含本文所述表面活性剂和磷脂的组合。

[0157] D. 水相(连续相)

[0158] 水包油乳液的水相(连续相)是缓冲盐溶液(如盐水)或水。缓冲的盐溶液是包含盐(如 NaCl)、缓冲剂(如柠檬酸盐缓冲剂)的水性溶液,且还能包含渗透压调节剂(如

糖)、聚合物、表面活性剂或其组合。所述水相可含有抗氧化剂,如柠檬酸盐、抗坏血酸或其盐。若配置乳液用于胃肠道外给药,优选调配最终的带缓冲溶液使得张力即渗透压与正常生理液体基本相同,以防止不需要的给药后结果,如给药后肿胀或组合物快速吸收。还优选缓冲所述水相以维持与正常生理条件相容的 pH。而且,在某些情况中,可能需要将 pH 维持在特定水平从而确保乳液中某些组分的稳定性。

[0159] 例如,可能需要制备等张(即可渗透溶质(如盐)浓度与身体和血液的正常细胞相同)和等渗压的乳液。为了控制张力,乳液可包含生理盐如钠盐。例如可使用约 0.9%(w/v)的氯化钠(NaCl)(生理盐水)。可以存在的其它盐包括氯化钾、磷酸二氢钾、磷酸氢二钠、氯化镁、氯化钙等。非离子等张剂也可用于控制张力。本领域通常已知许多非离子张力调节剂。这些通常为各种类型的碳水化合物(参见例如 Voet 和 Voet (1990) Biochemistry (《生物化学》)(纽约威立公司 (John Wiley & Sons)))。分类为醛糖的单糖如葡萄糖、甘露糖、阿拉伯糖和核糖,以及分类为酮糖的单糖如果糖、山梨糖和木酮糖可在本发明中用作非离子等张剂。也可使用二糖如蔗糖、麦芽糖、海藻糖和乳糖。此外,醛糖醇(无环多羟基醇,也称为糖醇)如丙三醇、甘露醇、木糖醇和山梨糖醇是本文可用的非离子等张剂。非离子等张调节剂可根据所用试剂以约 0.1%~约 10% 或约 1%~约 10% 的浓度存在。

[0160] 水相可带缓冲。本文可用任何生理上可接受的缓冲液,如水、柠檬酸盐缓冲液、磷酸盐缓冲液、乙酸盐缓冲液、Tris 缓冲液、碳酸氢盐缓冲液、碳酸盐缓冲液、琥珀酸盐缓冲液等。水性组分的 pH 优选为 6.0~8.0,优选约 6.2~约 6.8。在示例性实施方式中,所述缓冲液为 pH6.5 的 10mM 柠檬酸盐缓冲液。在另一示例性实施方式中,所述水相为无 RNA 酶的水或 DEPC 处理水或所述缓冲液由其制备。在一些情况中,缓冲液中的高盐可干扰核酸分子与所述乳液颗粒的复合因此需避免。在其它情况中,缓冲液中可包括一定量的盐。

[0161] 在示例性实施方式中,所述缓冲液为 pH6.5 的 10mM 柠檬酸盐缓冲液。在另一示例性实施方式中,所述水相为无 RNA 酶的水或 DEPC 处理水或所述缓冲液由其制备。

[0162] 所述水相还可包含其它组分如改变水相渗透压的分子或稳定复合后核酸分子的分子。优选地,所述水相的渗透压调节采用非离子等张剂调剂如糖(如海藻糖、蔗糖、右旋糖、果糖、还原帕拉金糖等)、糖醇(如甘露醇、山梨糖醇、木糖醇、赤藓糖醇、乳糖醇、麦芽糖醇、丙三醇等)或其组合。必要时,可使用非离子聚合物(如聚(烷基醇)例如聚乙二醇、聚丙二醇或聚丁二醇)或非离子表面活性剂。

[0163] 在一些情况中,乳液初始制备时,可能优选无杂质(unadulterated)的水用作乳液的水相。例如,增加盐浓度或糖浓度可能使得所需粒度(如小于约 200nm)更难达到。

[0164] 在某些实施方式中,所述阳离子水包油乳液的水相还包括聚合物或表面活性剂或其组合。在示例性实施方式中,所述水包油乳液含泊洛沙姆。泊洛沙姆是非离子三嵌段共聚物,其具有聚氧丙烯(聚(环氧丙烷))中央疏水链,侧连两条聚氧乙烯(聚(环氧乙烷))亲水链。泊洛沙姆又称为商品名 **Pluronic®** 聚合物。泊洛沙姆聚合物可导致 RNA 复合后 RNA 分子的更高稳定性并对 RNA 酶的抗性增强。

[0165] 替代或补充地,所述阳离子水包油乳液可包含约 0.1%~约 20%(w/v) 聚合物、或约 0.05%~约 10%(w/v) 聚合物。例如,所述阳离子水包油乳液可包含约 0.1%~约 20%(w/v)、约 0.1%~约 10%(w/v)、约 0.05%~约 10%(w/v)、或约 0.05%~约 5%(w/v) 聚合物(如泊洛沙姆例如 **Pluronic®** F127)。

[0166] 在一个示例性实施方式中,所述阳离子水包油乳液包含约 4%(w/v)、或约 8%(w/v) Pluronic® F127。

[0167] 这些组合物中使用的水性组分的量为使组合物的值合一所需的量。即,足以配至 100% 的水性组分量与上述其它组分混合,从而将组合物定容。

[0168] 4. 核酸分子

[0169] 尽管不希望受限于任何具体理论,据信核酸分子通过非共价、离子电荷相互作用(静电力)与所述阳离子脂质相互作用,而且复合物的强度以及可与颗粒复合的核酸分子的量与颗粒中阳离子脂质的含量有关。此外,核酸分子和颗粒表面的疏水/亲水相互作用也可发挥作用。

[0170] 可与所述乳液颗粒复合的核酸分子包括单链或双链 RNA 或 DNA。在优选的方面,所述核酸是 RNA 分子,如编码肽、多肽或蛋白质的 RNA,包括自复制 RNA 分子或小干扰 RNA。

[0171] 可使用本领域已知的技术形成复合物,其示例在本文中有描述。例如,核酸-颗粒复合物可通过混合阳离子乳液与核酸分子来形成,例如通过涡旋。可调节或优化所述乳液中的核酸分子和阳离子脂质的量以提供所需的结合强度和结合容量。

[0172] 例如,如本文所述和所示例,示例性 RNA-颗粒复合物通过改变 RNA: 阳离子脂质的比例(按“N/P 比”度量)来产生。术语 N/P 比例指在阳离子脂质中可质子化氮原子的含量(摩尔)除以 RNA 上磷酸酯的含量(摩尔)。所述 N/P 比例至少是,例如,4:1 ~ 20:1 或 4:1 ~ 15:1。

[0173] 在一些实施方式中,所述 N/P 比例是 1.1:1 ~ 20:1、1.1:1 ~ 15:1、1.5:1 ~ 20:1、1.5:1 ~ 15:1、2:1 ~ 20:1、2:1 ~ 15:1、2.5:1 ~ 20:1、2.5:1 ~ 15:1、3:1 ~ 20:1、3:1 ~ 15:1、3.5:1 ~ 20:1 或 3.5:1 ~ 15:1。

[0174] 本文所述阳离子水包油乳液尤其适于配制基于核酸的疫苗(如 DNA 疫苗, RNA 疫苗)。核酸-乳液颗粒复合物的形成促进宿主细胞摄入核酸,并保护所述核酸分子免受核酸酶降解。转染的细胞随后可表达所述核酸分子编码的抗原,其可产生对所述抗原的免疫应答。与活或减毒病毒类似,基于核酸的疫苗可有效参与 MHC-I 和 MHC-II 通路,能诱导 CD8⁺ 和 CD4⁺T 细胞应答,而以可溶形式存在的抗原如重组蛋白通常仅诱导体液应答。

[0175] 所述核酸分子(例如, RNA 分子)的序列可经密码子优化或去优化以在需要的宿主(如人细胞)中表达。

[0176] 在某些实施方式中,所述核酸分子是 RNA 分子。在某些实施方式中, RNA 分子编码抗原(肽、多肽或蛋白)且阳离子水包油乳液适于用作基于 RNA 的疫苗。所述组合物可包含多于一种编码抗原的 RNA 分子,如 2、3、4、5 或 10 种与乳液颗粒复合的 RNA 分子。即,所述组合物可含一种或多种不同种类的 RNA 分子,每个 RNA 分子编码不同的抗原。替代或补充地,一种 RNA 分子还可编码多于一种抗原,例如,编码不同或相同抗原的双顺反子或三顺反子 RNA 分子。因此,所述阳离子水包油乳液适用作基于 RNA 的单价或多价疫苗。

[0177] 所述 RNA 分子的序列可按需修饰,例如用于增加 RNA 表达或复制的效力或提供额外稳定性或对于降解的抗性。例如, RNA 序列可针对其密码子使用来修饰,例如用于提高 RNA 的翻译效力和半衰期。聚 A 尾(如具有约 30 个或更多个腺嘌呤残基)(SEQ ID NO:3)可连接在 RNA 的 3' 末端以提高其半衰期。RNA 的 5' 末端可用修饰的核糖核苷酸加帽,所述修饰的核糖核苷酸具有结构 m⁷G(5')ppp(5')N(帽 0 结构)或其衍生物,其可在 RNA 合成中

纳入或可在 RNA 转录后用酶促方法工程改造（如通过使用由 mRNA 三磷酸酶、鸟苷酰基-转移酶和鸟嘌呤-7-甲基转移酶组成的痘苗病毒加帽酶（VCE），其催化 N7-单甲基化帽 0 结构的构建）。帽 0 结构在维持 RNA 分子的稳定性和翻译效力中起重要作用。RNA 分子的 5' 帽还可由 2'-O-甲基转移酶修饰，该修饰生成帽 1 结构 (m7Gppp[m2'-O]N)，其可进一步提高翻译效力。

[0178] 必要时，RNA 分子可在任何 5' 帽结构外还包括一种或多种修饰的核苷酸。哺乳动物 RNA 上发现有超过 96 种天然产生的核苷酸修饰。参见例如，Limbach 等，Nucleic Acids Research, 22(12):2183-2196(1994)。核苷酸和经修饰的核苷酸及核苷的制备为本领域熟知，例如美国专利号 4373071、4458066、4500707、4668777、4973679、5047524、5132418、5153319、5262530、5700642，这些都通过引用全文纳入本文，并且许多修饰的核苷和修饰的核苷酸市售可得。

[0179] 经修饰核苷和核苷酸中可纳入和 RNA 分子中可存在的经修饰核碱基包括：m5C(5-甲基胞苷)、m5U(5-甲基尿苷)、m6A(N6-甲基腺苷)、s2U(2-硫尿苷)、Um(2'-O-甲基尿苷)、m1A(1-甲基腺苷)；m2A(2-甲基腺苷)；Am(2-1-O-甲基腺苷)；ms2m6A(2-甲基硫-N6-甲基腺苷)；i6A(N6-异戊烯基腺苷)；ms2i6A(2-甲基硫-N6-异戊烯基腺苷)；io6A(N6-(顺-羟基异戊烯基)腺苷)；ms2io6A(2-甲基硫-N6-(顺-羟基异戊烯基)腺苷)；g6A(N6-甘氨酸氨甲酰基腺苷)；t6A(N6-苏氨酸氨甲酰基腺苷)；ms2t6A(2-甲基硫-N6-苏氨酸氨甲酰基腺苷)；m6t6A(N6-甲基-N6-苏氨酸氨甲酰基腺苷)；hn6A(N6-羟基正缬氨酸氨甲酰基腺苷)；ms2hn6A(2-甲基硫-N6-羟基正缬氨酸氨甲酰基腺苷)；Ar(p)(2'-O-核糖基腺苷(磷酸盐))；I(肌苷)；m1I(1-甲基肌苷)；m'Im(1,2'-O-二甲基肌苷)；m3C(3-甲基胞苷)；Cm(2T-O-甲基胞苷)；s2C(2-硫胞苷)；ac4C(N4-乙酰胞苷)；f5C(5-甲酰基胞苷)；m5Cm(5,2'-O-二甲基胞苷)；ac4Cm(N4-乙酰 2T0 甲基胞苷)；k2C(赖胞苷)；m1G(1-甲基鸟苷)；m2G(N2-甲基鸟苷)；m7G(7-甲基鸟苷)；Gm(2'-O-甲基鸟苷)；m22G(N2,N2-二甲基鸟苷)；m2Gm(N2,2'-O-二甲基鸟苷)；m22Gm(N2,N2,2'-O-三甲基鸟苷)；Gr(p)(2'-O-核糖基鸟苷(磷酸盐))；yW(怀丁苷(wybutoxosine))；o2yW(过氧化怀丁苷)；OHyW(羟基怀丁苷)；OHyW*(修饰不足的羟基怀丁苷)；imG(γ 苷)；mimG(甲基鸟苷)；Q(嘌呤)；oQ(环氧嘌呤)；galQ(半乳糖基-嘌呤)；manQ(甘露糖-嘌呤)；preQo(7-氰基-7-脱氮(deaza)鸟苷)；preQi(7-氨基-7-脱氮鸟苷)；G*(古嘌呤)；D(二氢尿苷)；m5Um(5,2'-O-二甲基尿苷)；s4U(4-硫尿苷)；m5s2U(5-甲基-2-硫尿苷)；s2Um(2-硫-2'-O-甲基尿苷)；acp3U(3-(3-氨基-3-羧基丙基)尿苷)；ho5U(5-羟基尿苷)；mo5U(5-甲氧基尿苷)；cmo5U(尿苷 5-氧乙酸)；mcmo5U(尿苷 5-氧乙酸甲酯)；chm5U(5-(羧基羟基甲基)尿苷)；mchm5U(5-(羧基羟基甲基)尿苷甲酯)；mcm5U(5-甲氧基羰基甲基尿苷)；mcm5Um(S-甲氧基羰基甲基-2'-O-甲基尿苷)；mcm5s2U(5-甲氧基羰基甲基-2-硫尿苷)；nm5s2U(5-氨基甲基-2-硫尿苷)；mnm5U(5-甲基氨基甲基尿苷)；mnm5s2U(5-甲基氨基甲基-2-硫尿苷)；mnm5se2U(5-甲基氨基甲基-2-硒尿苷)；ncm5U(5-氨基甲酰基甲基尿苷)；ncm5Um(5-氨基甲酰基甲基-2'-O-甲基尿苷)；cmnm5U(5-羧甲基氨基甲基尿苷)；cnmm5Um(5-羧甲基氨基甲基-2-L-O-甲基尿苷)；cmnm5s2U(5-羧甲基氨基甲基-2-硫尿苷)；m62A(N6,N6-二甲基腺苷)；Tm(2'-O-甲基肌苷)；m4C(N4-甲基胞苷)；m4Cm(N4,2'-O-二甲基胞苷)；hm5C(5-羟甲基胞苷)；m3U(3-甲基尿苷)；cm5U(5-羧甲基

尿苷);m6Am(N6, T-0- 二甲基腺苷);rn62Am(N6, N6, 0-2- 三甲基腺苷);m2' 7G(N2, 7- 二甲基鸟苷);m2' 2' 7G(N2, N2, 7- 三甲基鸟苷);m3Um(3, 2T-0- 二甲基尿苷);m5D(5- 甲基二氢尿苷);f5Cm(5- 甲酰基 -2' -0- 甲基胞苷);m1Gm(1, 2' -0- 二甲基鸟苷);m' Am(1, 2-0- 二甲基腺苷)伊立(irino)甲基尿苷);tm5s2U(S- 牛磺(taurino)甲基 -2- 硫尿苷));imG-14(4- 去甲基鸟苷);imG2(异鸟苷);ac6A(N6- 乙酰腺苷)、次黄嘌呤、肌苷、8- 氧代- 腺嘌呤、其 7- 取代的衍生物、二氢尿嘧啶、假尿嘧啶、2- 硫尿嘧啶、4- 硫尿嘧啶、5- 氨基尿嘧啶、5-(C₁-C₆)- 烷基尿嘧啶、5- 甲基尿嘧啶、5-(C₂-C₆)- 烯基尿嘧啶、5-(C₂-C₆)- 炔基尿嘧啶、5-(羟甲基)尿嘧啶、5- 氯尿嘧啶、5- 氟尿嘧啶、5- 溴尿嘧啶、5- 羟基胞嘧啶、5-(C₁-C₆)- 烷基胞嘧啶、5- 甲基胞嘧啶、5-(C₂-C₆)- 烯基胞嘧啶、5-(C₂-C₆)- 炔基胞嘧啶、5- 氯胞嘧啶、5- 氟胞嘧啶、5- 溴胞嘧啶、N²- 二甲基鸟嘌呤、7- 脱氮鸟嘌呤、8- 氮杂鸟嘌呤、7- 脱氮 -7- 取代的鸟嘌呤、7- 脱氮 -7-(C₂-C₆) 炔基鸟嘌呤、7- 脱氮 -8- 取代的鸟嘌呤、8- 羟基鸟嘌呤、6- 硫鸟嘌呤、8- 氧代鸟嘌呤、2- 氨基嘌呤、2- 氨基 -6- 氯嘌呤、2, 4- 二氨基嘌呤、2, 6- 二氨基嘌呤、8- 氮杂嘌呤、取代的 7- 脱氮嘌呤、7- 脱氮 δ -7- 取代的嘌呤、7- 脱氮 -8- 取代的嘌呤、氢(脱碱基残基)、m5C、m5U、m6A、s2U、W、或 2' -0- 甲基 -U。许多这些经修饰核碱基和其对应的核糖核苷从市场供应商可得。参见例如 W02011/005799, 其通过引用全文纳入本文。

[0180] 本发明所用的 RNA 理想上仅包括核苷之间的磷酸二酯连接,但在一些实施方式中其可含氨基磷酸酯、硫代磷酸酯和 / 或甲基磷酸酯连接。

[0181] 在一些实施方式中, RNA 分子不包括修饰的核苷酸,如不包括修饰的核碱基,且 RNA 分子中所有核苷酸均为常规标准核糖核苷酸 A、U、G 和 C,任选的 5' 帽是例外,其可包括例如 7- 甲基鸟苷。在其它实施方式中,该 RNA 可包括含 7- 甲基鸟苷的 5' 帽,且起始 1、2 或 3 个 5' 个核糖核苷酸可在核糖的 2' 位置被甲基化。

[0182] A. 自复制 RNA

[0183] 在一些方面,阳离子水包油乳液含自复制 RNA 分子。在某些实施方式中,所述自复制 RNA 分子源自或基于 α 病毒。

[0184] 自复制 RNA 分子为本领域熟知且可通过使用源自例如 α 病毒的复制元件并用编码感兴趣蛋白的核苷酸序列取代结构病毒蛋白来生产。自复制 RNA 分子通常是 (+) 链分子,其递送到细胞后能直接翻译,且该翻译提供 RNA 依赖性 RNA 聚合酶,所述酶然后从所递送 RNA 生成反义和正义转录本。因此所递送 RNA 引起多个子 RNA 生成。这些子 RNA 以及共线亚基因组转录本可以自身翻译以提供编码抗原的原位表达,或可转录以进一步提供与所递送 RNA 同义的转录本,其经翻译提供抗原的原位表达。此系列转录的总体结果是引入的复制子 RNA 数量大幅扩增,因此编码的抗原变为细胞的主要多肽产物。用自复制 RNA 转染的细胞简短生成抗原后经历细胞凋亡性死亡。此类死亡可能是必需双链(ds)RNA 中间体的结果,这在超活化的树突细胞中也观察到。因此,自复制 RNA 的免疫原性增强可能是促炎 dsRNA 生成的结果,所述促炎 dsRNA 生成模仿 RNA 病毒感染宿主细胞。

[0185] 有利地,细胞机制被自复制 RNA 分子用于产生指数式增长的编码基因产物,如蛋白质或抗原,其可在细胞中积累或从细胞分泌。通过自复制 RNA 分子过表达蛋白利用免疫刺激佐剂效应,包括通过 RNA 复制和扩增以及翻译的产物刺激 toll 样受体(TLR)3、7 和 8 和非 TLR 通路(如 RIG-1, MD-5),这一刺激诱导转染细胞的凋亡。

[0186] 所述自复制 RNA 通常含至少一种或多种选自下组的基因：病毒复制酶、病毒蛋白酶、病毒解旋酶和其它非结构性病毒蛋白，还含有 5' - 和 3' - 末端顺式激活复制序列，和若需要时，编码所需氨基酸序列（如感兴趣的抗原）的异源序列。引导所述异源序列表达的亚基因组启动子可包括在所述自复制 RNA 中。必要时，所述异源序列（如感兴趣的抗原）可框内融合到所述自复制 RNA 中的其它编码区域和 / 或可在内部核糖体进入位点 (IRES) 的控制下。

[0187] 在某些实施方式中，所述自复制 RNA 分子未包封在病毒样颗粒中。本发明的自复制 RNA 分子可设计成使所述自复制 RNA 分子不能诱导感染性病毒颗粒生成。这可通过例如在所述自复制 RNA 中省略病毒颗粒生成所必需的一种或多种结构蛋白编码病毒基因来实现。例如，所述自复制 RNA 分子基于 α 病毒如辛德毕斯病毒 (SIN)、西门利克森林病毒和委内瑞拉马脑炎病毒 (VEE) 时，可省略一种或多种编码病毒结构蛋白如衣壳或包膜糖蛋白的基因。

[0188] 必要时，本发明的自复制 RNA 分子可设计成诱导生成减毒或毒性的感染性病毒颗粒，或生成能进行单轮后续感染的病毒颗粒。

[0189] 以此方式实现自复制的一种合适系统为使用基于 α 病毒的复制子。 α 病毒包括披盖病毒科的一组遗传、结构和血清学上相关的节肢动物媒介病毒。 α 病毒属内已鉴定 26 种已知的病毒和病毒亚型，包括辛德毕斯病毒 (Sindbis virus)、西门利克森林病毒 (Semliki Forest virus)、罗斯河病毒 (Ross River virus) 和委内瑞拉马脑炎病毒 (Venezuelan equine encephalitis virus)。因此，本发明的自复制 RNA 可纳入源自西门利克森林病毒 (SFV)、辛德毕斯病毒 (SIN)、委内瑞拉马脑炎病毒 (VEE)、罗斯河病毒 (RRV)、东部马脑炎病毒或属于 α 病毒科其它病毒的 RNA 复制酶。

[0190] 基于 α 病毒的“复制子”表达载体可用于本发明。复制子载体可以数种形式利用，包括 DNA、RNA 和重组复制子颗粒。这类复制子载体源自包括例如下列的 α 病毒：辛德毕斯病毒 (Xiong 等 (1989) Science 243:1188-1191 ;Dubensky 等, (1996) J. Virol. 70:508-519 ; Hariharan 等 (1998) J. Virol. 72:950-958 ;Polo 等 (1999) PNAS 96:4598-4603)、西门利克森林病毒 (Liljestrom (1991) Bio/Technology 9:1356-1361 ;Berglund 等 (1998) Nat. Biotech. 16:562-565)、和委内瑞拉马脑炎病毒 (Pushko 等 (1997) Virology 239:389-401)。 α 病毒来源的复制子通常整体特征（如结构、复制）较相似，个体 α 病毒可表现一些独特的具体特性（如受体结合、干扰素敏感性和疾病概况）。因此，采用不同病毒科制备的嵌合 α 病毒复制子也可是有用的。

[0191] 基于 α 病毒的 RNA 复制子通常为 (+) 链 RNA，其在递送至细胞后引起复制酶（或复制酶 - 转录酶）的翻译。复制酶翻译为聚蛋白，其自切割以提高复制复合物，所述复合物形成所述 (+) 链递送 RNA 的基因组 (-) 链拷贝。这些 (-) 链转录本可自身转录以得到所述 (+) 链亲本 RNA 的更多拷贝和产生编码所述抗原的亚基因组转录本。因此所述亚基因组转录本的翻译引起所述感染细胞原位表达抗原。合适的 α 病毒复制子可使用来自辛德毕斯病毒、西门利克森林病毒、东部马脑炎病毒、委内瑞拉马脑炎病毒等的复制酶。

[0192] RNA 复制子优选包括来自小核糖核酸病毒、外衣病毒、黄病毒、冠状病毒、副粘病毒、黄热病毒或 α 病毒（如辛德毕斯病毒、西门利克森林病毒、委内瑞拉马脑炎病毒或罗斯河病毒）的 RNA 基因组，其已用编码感兴趣产物的选定异源核酸序列替代一种或多种结构

蛋白基因进行修饰。

[0193] 优选的复制子编码 (i) 能从复制子转录 RNA 的 RNA- 依赖性 RNA 聚合酶和 (ii) 抗原。所述聚合酶可为 α 病毒复制酶, 例如包括一种或多种 α 病毒蛋白 nsP1、nsP2、nsP3 和 nsP4。尽管除了所述非结构复制酶聚蛋白, 天然 α 病毒基因组还编码结构病毒体蛋白, 但优选复制子不编码 α 病毒结构蛋白。因此优选的复制子可引起细胞中基因组 RNA 拷贝本身的生成, 但不引起含 RNA 的病毒粒子生成。不能生成这些病毒粒子说明所述优选复制子不像野生型 α 病毒, 其自身不能以感染形式永存。在优选的复制子中缺失野生型病毒永存必需的 α 病毒结构蛋白, 他们的位置被编码感兴趣抗原的基因占据, 从而所述亚基因组转录本编码抗原而不是所述结构 α 病毒病毒粒子蛋白。

[0194] 本发明使用的复制子可具有两个开放阅读框。第一 (5') 开放阅读框编码复制酶; 第二 (3') 开放阅读框编码抗原。在一些实施方式中, 所述 RNA 可具有额外的 (例如, 下游) 开放阅读框用于例如编码其它抗原或编码辅助多肽。

[0195] 优选的复制子具有 5' 帽 (如 7- 甲基鸟苷), 其常可提高 RNA 的体内翻译。在一些实施方式中, 可能需要选择复制子的 5' 序列以确保与所编码复制酶的相容性。

[0196] 复制子可具有 3' 聚 A 尾。其还可包括在 3' 末端附近的聚合酶识别序列聚 A (如 AAUAAA)。

[0197] 复制子可具有各种长度, 但其通常为 5000 ~ 25000 核苷酸长度, 如 8000 ~ 15000 核苷酸或 9000 ~ 12000 核苷酸。

[0198] 复制子通常可通过体外转录 (IVT) 方便地制备。IVT 可使用细菌中以质粒形式产生和增殖, 或合成产生 (例如通过基因合成和 / 或聚合酶链式反应 (PCR) 工程方法) 的 (cDNA) 模板。例如, DNA 依赖性 RNA 聚合酶 (如噬菌体 T7、T3 或 SP6RNA 聚合酶) 可用于从 DNA 模板转录复制子。合适的加帽和聚 A 加成反应可按需使用 (尽管所述复制子的聚 A 通常在 DNA 模板内编码)。这些 RNA 聚合酶可对转录的 5' 核苷酸有严格的要求, 且在一些实施方式中这些要求必须与所编码复制酶的要求匹配, 以确保 IVT- 转录的 RNA 能有效作为其自身编码复制酶的底物发挥作用。具体示例包括基于辛德毕斯病毒的质粒 (pSIN) 如 pSINCP, 其描述参见例如美国专利号 5, 814, 482 和 6, 015, 686, 以及国际公开号 W097/38087、W099/18226 和 W002/26209 所述的。此类复制子的构建在美国专利号 5, 814, 482 和 6, 015, 686 中有一般描述。

[0199] 在其它方面, 所述自复制 RNA 分子源自或基于 α 病毒以外的病毒, 优选正链 RNA 病毒, 更优选小 RNA 病毒、黄病毒、风疹病毒、痘病毒、丙型肝炎病毒、萆状病毒或冠状病毒。合适的野生型 α 病毒序列熟知且可从序列保藏机构如马里兰州罗克维尔的美国典型培养物保藏中心 (American Type Culture Collection) 获得。合适 α 病毒的代表性示例包括奥拉病毒 (ATCC VR-368)、贝巴鲁病毒 (ATCC VR-600、ATCC VR-1240)、犏狨病毒 (ATCC VR-922)、基孔肯雅病毒 (ATCC VR-64、ATCC VR-1241)、东方马脑脊髓炎病毒 (Eastern equine encephalomyelitis virus) (ATCC VR-65、ATCC VR-1242)、摩根堡病毒 (ATCC VR-924)、格塔病毒 (ATCC VR-369、ATCC VR-1243)、克泽拉格齐病毒 (ATCC VR-927)、马亚罗 (Mayaro) (ATCC VR-66)、马亚罗病毒 (ATCC VR-1277)、米德尔堡病毒 (Middleburg) (ATCC VR-370)、穆坎博病毒 (ATCC VR-580、ATCC VR-1244)、恩杜姆病毒 (Ndumu) (ATCC VR-371)、皮春纳病毒 (ATCC VR-372、ATCC VR-1245)、罗斯河病毒 (ATCC VR-373、ATCC VR-1246)、

西门利克森林病毒 (ATCC VR-67、ATCC VR-1247)、辛德比斯病毒 (ATCC VR-68、ATCC VR-1248)、托纳特 (ATCC VR-925)、特里尼蒂病毒 (ATCC VR-469)、乌纳病毒 (ATCC VR-374)、委内瑞拉马脑脊髓炎病毒 (ATCC VR-69、ATCC VR-923、ATCC VR-1250ATCC VR-1249、ATCC VR-532)、西马脑脊髓炎病毒 (ATCC VR-70、ATCC VR-1251、ATCC VR-622、ATCC VR-1252)、沃达罗河病毒 (ATCC VR-926) 和 Y-62-33 (ATCC VR-375)。

[0200] 本发明的自复制 RNA 分子比用经修饰核苷酸制备的其它 RNA 类型 (如 mRNA) 更大。通常,本发明的自复制 RNA 分子含至少约 4kb。例如,自复制 RNA 可含至少约 5kb、至少约 6kb、至少约 7kb、至少约 8kb、至少约 9kb、至少约 10kb、至少约 11kb、至少约 12kb 或多于 12kb。在某些示例中,自复制 RNA 为约 4kb ~ 约 12kb、约 5kb ~ 约 12kb、约 6kb ~ 约 12kb、约 7kb ~ 约 12kb、约 8kb ~ 约 12kb、约 9kb ~ 约 12kb、约 10kb ~ 约 12kb、约 11kb ~ 约 12kb、约 5kb ~ 约 11kb、约 5kb ~ 约 10kb、约 5kb ~ 约 9kb、约 5kb ~ 约 8kb、约 5kb ~ 约 7kb、约 5kb ~ 约 6kb、约 6kb ~ 约 12kb、约 6kb ~ 约 11kb、约 6kb ~ 约 10kb、约 6kb ~ 约 9kb、约 6kb ~ 约 8kb、约 6kb ~ 约 7kb、约 7kb ~ 约 11kb、约 7kb ~ 约 10kb、约 7kb ~ 约 9kb、约 7kb ~ 约 8kb、约 8kb ~ 约 11kb、约 8kb ~ 约 10kb、约 8kb ~ 约 9kb、约 9kb ~ 约 11kb、约 9kb ~ 约 10kb 或约 10kb ~ 约 11kb。

[0201] 本发明的自复制 RNA 分子可包括一种或多种类型的经修饰的核苷酸 (如假尿苷、N6- 甲基腺苷、5- 甲基胞苷、5- 甲基尿苷)。

[0202] 自复制 RNA 分子可编码单一异源多肽抗原,或任选地两种或更多连接在一起的异源多肽抗原,连接方式使得各序列在表达为氨基酸序列时保持其特性 (如顺序连接)。然后自复制 RNA 产生的异源多肽可生成为融合多肽或以产生分开多肽或肽序列的方法进行工程改造。

[0203] 本发明的自复制 RNA 可编码一种或多种含一定范围表位的多肽抗原。优选能引起辅助 T 细胞应答或细胞毒性 T 细胞应答或二者的表位。

[0204] 本文所述自复制 RNA 分子可进行工程改造以从两个或更多开放阅读框表达多个核苷酸序列,从而能够共表达蛋白,例如两种或更多抗原和细胞因子或其它免疫调节剂一起表达,这可增强免疫应答的产生。该自复制 RNA 分子可能特别有用,例如用于同时生成不同的基因产物 (如蛋白质),如作为二价或多价疫苗。

[0205] 本发明的自复制 RNA 分子可用任何合适方法制备。本领域已知生产含修饰核苷酸的 RNA 分子的数种合适方法。例如,含修饰核苷酸的自复制 RNA 分子可通过用合适的 DNA 依赖性 RNA 聚合酶转录 (如体外转录) 编码自复制 RNA 分子的 DNA 来制得,所述酶例如 T7 噬菌体 RNA 聚合酶、SP6 噬菌体 RNA 聚合酶、T3 噬菌体 RNA 聚合酶等,或能将经修饰核苷酸有效纳入 RNA 分子的这些聚合酶的突变体。所述转录反应将包含核苷酸和修饰的核苷酸,和支持所选聚合酶活性的其它组分,如合适的缓冲液和合适的盐。将核苷酸类似物纳入自复制 RNA 可经工程改造以 (例如) 改变此类 RNA 分子的稳定性、提高对 RNA 酶的抗性、在导入合适宿主细胞后确立复制 (RNA 的“感染性”)、和 / 或诱导或降低先天和适应性免疫应答。

[0206] 合适的合成方法可单独使用,或与一种或多种其它方法 (如重组 DNA 或 RNA 技术) 联用,来生产本发明的自复制 RNA 分子。合适的从头合成方法为本领域熟知且可调整适用于具体应用。示例性方法包括例如化学合成,使用合适保护基团例如 CEM (Masuda 等 (2007) Nucleic Acids Symposium Series 51:3-4)、 β - 氰乙基亚磷酸胺方法 (Beaucage S L 等

(1981)Tetrahedron Lett22:1859);核苷H-磷酸酯方法(Garegg P等(1986)Tetrahedron Lett27:4051-4;Froehler B C等(1986)Nucl Acid Res14:5399-407;Garegg P等(1986)Tetrahedron Lett27:4055-8;Gaffney B L等(1988)Tetrahedron Lett29:2619-22)。这些化学法能运行或调整适用于市售可得的自动核酸合成仪。额外的合适合成方法公开于Uhlmann等(1990)Chem Rev90:544-84,和Goodchild J(1990)Bioconjugate Chem1:165。核酸合成还可使用本领域熟知和常规的合适重组方法进行,所述方法包括多核苷酸和该多核苷酸所编码基因产物的克隆、加工和/或表达。通过随机片段化的DNA改组以及基因片段和合成多核苷酸的PCR重组装是能用于设计和工程改造多核苷酸序列的已知技术示例。可采用定点诱变来改变核酸和所编码的蛋白,例如用于插入新的限制性位点、改变糖基化模式、改变密码子偏好、产生剪接变体、导入突变等。转录、翻译和表达核酸序列的合适方法为本领域已知且常规。(通常参见,Current Protocols in Molecular Biology(《新编分子生物学实验指南》),第2卷,Ausubel等编,格林出版集团和威力出版公司(Greene Publish. Assoc.&Wiley Interscience),第13章,1988;Glover,DNA Cloning(《DNA克隆》),第II卷,华盛顿特区IRL出版社(IRL Press),第3章,1986;Bitter等,Methods in Enzymology(《酶学方法》)153:516-544(1987);The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces(《酿酒酵母分子生物学》),Strathern等编,冷泉港出版社(Cold Spring Harbor Press),卷I和II,1982;和Sambrook等,Molecular Cloning:A Laboratory Manual(《分子克隆:实验室手册》),冷泉港出版社,1989)。

[0207] 可用任何合适的方法确定自复制RNA分子中一种或多种经修饰核苷酸的存在和/或含量。例如,自复制RNA可消化成单磷酸酯(如使用核酸酶P1)并去磷酸化(如使用合适的磷酸酶如CIAP),得到的核苷用反相HPLC分析(例如使用YMC Pack ODS-AQ柱(5微米,4.6X250mm),且使用梯度洗脱,30%B(0~5分钟)-100%B(5~13分钟)和100%B(13~40)分钟,流速(0.7毫升/分钟),UV检测(波长:260nm),柱温(30℃))。缓冲液A(20mM乙酸-乙酸铵,pH3.5),缓冲液B(20mM乙酸-乙酸铵,pH3.5/甲醇[90/10]))。

[0208] 可任选地,本发明的自复制RNA分子可包括一种或多种修饰的核苷酸从而所述自复制RNA分子在引入或进入宿主细胞(如人类细胞)后相比不含修饰核苷酸的对应自复制RNA分子具有更小的免疫调节活性。

[0209] 必要时,自复制RNA分子可用本领域技术人员已知的各种体外或体内测试方法筛选或分析以确定其治疗和预防特性。例如,含自复制RNA分子的疫苗可就其诱导感兴趣的特定淋巴细胞类型的增殖或效应功能的影响进行测试,所述淋巴细胞类型如B细胞、T细胞、T细胞系和T细胞克隆。例如,可分离经免疫小鼠的脾细胞并分析细胞毒性T淋巴细胞裂解自体靶细胞的能力,所述靶细胞含编码多肽抗原的自复制RNA分子。此外,T辅助细胞分化可通过测量增殖或用ELISA测定TH1(IL-2和IFN- γ)和/或TH2(IL-4和IL-5)细胞因子的生成或直接在CD4+T细胞中通过胞质细胞因子染色和流式细胞术来分析。

[0210] 还可测试编码多肽抗原的自复制RNA分子诱导体液免疫应答的能力,通过例如诱导B细胞产生对感兴趣抗原的特异性抗体来证实。这些试验可用例如来自免疫个体的外周B淋巴细胞进行。此类试验方法为本领域技术人员已知。能用于表征本发明自复制RNA分子的其它试验可涉及检测靶细胞所编码抗原的表达。例如,FACS可用于检测细胞表面或胞内的抗原表达。FACS选择的另一优势是可就不同表达水平进行分选;有时可能需要较低的

表达。鉴定表达具体抗原的细胞的其它合适方法涉及用平板上的单克隆抗体淘选或用包被有单克隆抗体的磁珠捕获。

[0211] B. 抗原

[0212] 在某些实施方式中,本文所述的核酸分子是编码抗原的核酸分子(如 RNA 分子)。合适的抗原包括但不限于细菌抗原、病毒抗原、真菌抗原、原生动物抗原、植物抗原、癌抗原或其组合。

[0213] 合适的抗原包括来自病原体如病毒、细菌、真菌、原生动物、植物或肿瘤的蛋白和肽。可由自复制 RNA 分子编码的病毒抗原和免疫原包括但不限于来自下述病毒的蛋白质和肽:正粘病毒如流感病毒 A、B 和 C;副粘病毒科病毒,如肺炎病毒(RSV)、副粘病毒(PIV)、偏肺病毒和麻疹病毒(如麻疹);肺炎病毒如呼吸道合胞病毒(RSV)、牛呼吸道合胞病毒、小鼠肺炎病毒和火鸡鼻气管炎病毒;副粘病毒如 1-4 型副流感病毒(PIV)、腮腺炎病毒、仙台病毒、猴病毒 5、牛副流感病毒、尼帕病毒、亨尼帕病毒和新城疫病毒;痘病毒科,包括正痘病毒(Orthopoxvirus)如天花病毒(*Variola vera*)(包括但不限于,重型天花(*Variola major*)和轻型天花(*Variola minor*));偏肺病毒,如人偏肺病毒(hMPV)和禽偏肺病毒(aMPV);麻疹病毒如麻疹;小核糖核酸病毒,如肠道病毒、鼻病毒、嗜肝 RNA 病毒、副肠孤病毒、心脏病毒和口蹄疫病毒;肠道病毒,如 1、2 或 3 型脊髓灰质炎病毒、1-22 型和 24 型柯萨奇病毒 A、1-6 型柯萨奇病毒 B、1-9、11-27 和 29-34 型艾柯(ECHO)病毒和肠道病毒 68-71 型,布尼亚病毒,包括正布尼亚病毒(Orthobunyavirus)如加利福尼亚脑炎病毒;白蛉病毒(Phlebovirus)如裂谷热病毒;内罗病毒(Nairovirus)如克里米亚-刚果出血热病毒(Crimean-Congo hemorrhagic fever);嗜肝 RNA 病毒如甲肝病毒(HAV);披膜病毒(风疹病毒),如风疹病毒、 α 病毒或动脉炎病毒;黄病毒,如蜱媒脑炎(TBE)病毒、登革热(1、2、3 或 4 型)病毒、黄热病毒、日本脑炎病毒、开萨诺森林病毒、西尼罗河脑炎病毒、圣路易斯脑炎病毒、俄罗斯春夏型脑炎病毒、波瓦生脑炎病毒;瘟病毒、如牛病毒性腹泻(BVDV)、经典猪瘟(CSFV)或边界病(BDV);肝 DNA 病毒,如乙肝病毒、丙肝病毒;弹状病毒,如恐水病病毒(狂犬病病毒)和水泡病毒(VSV),杯状病毒如诺沃克病毒,和诺沃克样病毒如夏威夷病毒和雪山病毒;冠状病毒,如 SARS、人呼吸道冠状病毒、禽传染性支气管炎(IBV)、小鼠肝炎病毒(MHV)、和猪传染性肠胃炎病毒(TGEV);逆转录病毒如肿瘤病毒、慢病毒或泡沫病毒;呼吸道肠道病毒,如正呼肠孤病毒、轮状病毒、环状病毒、或科罗拉多壁虱热病毒(Coltivirus);细小病毒,如细小病毒 B19;丁肝病毒(HDV);戊肝病毒(HEV);庚肝病毒(HGV);人疱疹病毒,如单纯疱疹病毒(HSV)、水痘带状疱疹病毒(VZV)、EB 病毒(EBV)、巨细胞病毒(CMV)、人疱疹病毒 6(HHV6)、人疱疹病毒 7(HHV7)、和人疱疹病毒 8(HHV8);乳头状多瘤空泡病毒,如乳头瘤病毒和多瘤病毒、腺病毒和沙粒病毒。

[0214] 在一些实施方式中,抗原引起的免疫应答针对感染鱼的病毒,如:传染性鲑鱼贫血病毒(ISAV)、鲑鱼胰腺疾病病毒(SPDV)、传染性胰腺坏死病毒(IPNV)、斑点叉尾鲷病毒(CCV)、鱼淋巴囊肿病毒(FLDV)、传染性造血组织坏死病病毒(IHNV)、锦鲤疱疹病毒、鲑鱼小 RNA 样病毒(又称为大西洋鲑鱼小 RNA 样病毒)、陆封鲑鱼病毒(LSV)、大西洋鲑鱼轮状病毒(ASR)、鳟鱼草莓病病毒(TSD)、银鲑鱼肿瘤病毒(CSTV)、或病毒性出血性败血症病毒(VHSV)。

[0215] 在一些实施方式中,所述抗原引起的免疫应答针对来自疟原虫(*Plasmodium*)

属的寄生虫,如恶性疟原虫 (*P. falciparum*)、间日疟原虫 (*P. vivax*)、三日疟原虫 (*P. malariae*) 或卵圆疟原虫 (*P. ovale*)。因此本发明可用于针对疟疾的免疫。在一些实施方式中,所述抗原引起的免疫应答针对来自鱼虱科的寄生虫,特别是来自疮痂鱼虱属和鱼虱属的那些,如海虱例如鲑疮痂鱼虱 (*Lepeophtheirus salmonis*) 或智利鱼虱 (*Caligus rogercresseyi*)。

[0216] 可由自复制 RNA 分子编码的细菌抗原和免疫原包括但不限于来自下述的蛋白和肽:脑膜炎奈瑟球菌 (*Neisseria meningitidis*)、肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*)、化脓性链球菌 (*Streptococcus pyogenes*)、粘膜炎莫拉菌 (*Moraxella catarrhalis*)、百日咳博德特菌 (*Bordetella pertussis*)、伯克霍尔德氏菌 (*Burkholderia* sp.) (如鼻疽伯克霍尔德氏菌 (*Burkholderia mallei*)、假鼻疽伯克霍尔德氏菌 (*Burkholderia pseudomallei*) 和洋葱伯克霍尔德氏菌 (*Burkholderia cepacia*))、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、表皮葡萄球菌 (*Staphylococcus epidermis*)、流感嗜血杆菌 (*Haemophilus influenzae*)、破伤风梭菌 (*Clostridium tetani* (破伤风))、产气荚膜梭菌 (*Clostridium perfringens*)、肉毒梭菌 (*Clostridium botulinum* (肉毒杆菌))、白喉棒状杆菌 (*Corynebacterium diphtheriae* (白喉))、绿脓假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、嗜肺军团菌 (*Legionella pneumophila*)、伯内特科克斯立克次体 (*Coxiella burnetii*)、布鲁氏菌 (*Brucella* sp.) (如流产布鲁氏菌 (*B. abortus*)、狗布鲁氏菌 (*B. canis*)、马耳他布鲁氏菌 (*B. melitensis*)、木鼠布鲁氏菌 (*B. neotomae*)、羊布鲁氏菌 (*B. ovis*)、猪布鲁氏菌 (*B. suis*) 和鳍足类海洋布鲁氏菌 (*B. pinnipediae*))、弗朗西斯氏菌 (*Francisella* sp.) (如新凶手弗朗西斯氏菌 (*F. novicida*)、蜃楼弗朗西斯氏菌 (*F. philomiragia*) 和土拉热弗朗西斯氏菌 (*F. tularensis*))、无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*)、淋病奈瑟球菌 (*Neisseria gonorrhoeae*)、沙眼衣原体 (*Chlamydia trachomatis*)、苍白密螺旋体 (*Treponema pallidum* (梅毒))、杜氏嗜血菌 (*Haemophilus ducreyi*)、粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis*)、尿肠球菌 (*Enterococcus faecium*)、幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*)、腐生葡萄球菌 (*Staphylococcus saprophyticus*)、小肠结肠炎耶尔森菌 (*Yersinia enterocolitica*)、大肠杆菌 (*E. coli*) 如产毒性大肠杆菌 (ETEC), 肠聚集性大肠杆菌 (EAggEC), 弥散性粘着大肠杆菌 (DAEC), 肠致病性大肠杆菌 (EPEC), 肠外致病性大肠杆菌 (ExPEC; 如尿致病性大肠杆菌 (UPEC) 和脑膜炎 / 败血症 - 相关大肠杆菌 (MNEC)), 和 / 或肠出血性大肠杆菌 (EHEC)、炭疽杆菌 (*Bacillus anthracis* (炭疽))、鼠疫耶尔森菌 (*Yersinia pestis* (鼠疫))、结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*)、立克次体 (*Rickettsia*)、单核细胞增生利斯特菌 (*Listeria monocytogenes*)、肺炎衣原体 (*Chlamydia pneumoniae*)、霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*)、鼠伤寒沙门菌 (*Salmonella typhi* (伤寒))、布氏疏螺旋体 (*Borrelia burgdorferi*)、牙龈卟啉单胞菌 (*Porphyromonas gingivalis*)、克雷伯菌 (*Klebsiella*)、肺炎支原体 (*Mycoplasma pneumoniae*) 等。

[0217] 可由自复制 RNA 分子编码的真菌抗原和免疫原包括但不限于来自皮肤真菌的蛋白质和肽,包括:絮状表皮霉菌 (*Epidermophyton floccosum*), 奥杜安氏小孢子菌 (*Microsporum audouinii*), 犬小孢子菌 (*Microsporum canis*), 扭曲小孢子菌 (*Microsporum distortum*), 马小孢子菌 (*Microsporum equinum*), 石膏样小孢子菌 (*Microsporum*

gypsum), 矮小小孢子菌 (*Microsporum nanum*), 同心性毛癣菌 (*Trichophyton concentricum*), 马毛癣菌 (*Trichophyton equinum*), 鸡毛癣菌 (*Trichophyton gallinae*), 石膏样毛癣菌 (*Trichophyton gypseum*), 麦格尼毛癣菌 (*Trichophyton megnini*), 须癣毛癣菌 (*Trichophyton mentagrophytes*), 昆克毛癣菌 (*Trichophyton quinckeanum*), 红色毛癣菌 (*Trichophyton rubrum*), 许兰毛癣菌 (*Trichophyton schoenleinii*), 断发毛癣菌 (*Trichophyton tonsurans*), 疣状毛癣菌 (*Trichophyton verrucosum*), 疣状毛癣菌 (*T. verrucosum*) 白变种 (*var. album*)、盘状变种 (*var. discoides*)、赭黄变种 (*var. ochraceum*), 紫色毛癣菌 (*Trichophyton violaceum*) 和 / 或蜜块状毛癣菌 (*Trichophyton faviforme*); 或来自烟曲霉 (*Aspergillus fumigatus*)、黄曲霉 (*Aspergillus flavus*)、黑曲霉 (*Aspergillus niger*)、构巢曲霉 (*Aspergillus nidulans*)、土曲霉 (*Aspergillus terreus*)、聚多曲霉 (*Aspergillus sydowi*)、黄曲菌 (*Aspergillus flavatus*)、灰绿曲霉 (*Aspergillus glaucus*)、头状芽裂殖菌 (*Blastoschizomyces capitatus*)、白假丝酵母 (*Candida albicans*)、烯醇酶假丝酵母 (*Candida enolase*)、热带假丝酵母 (*Candida tropicalis*)、光滑假丝酵母 (*Candida glabrata*)、克柔假丝酵母 (*Candida krusei*)、近平滑假丝酵母 (*Candida parapsilosis*)、类星形假丝酵母 (*Candida stellatoidea*)、克鲁斯假丝酵母 (*Candida kusei*)、帕拉克斯假丝酵母 (*Candida parakwsei*)、葡萄牙假丝酵母 (*Candida lusitanae*)、伪热带假丝酵母 (*Candida pseudotropicalis*)、季也蒙假丝酵母 (*Candida guilliermondii*)、卡氏枝孢霉 (*Cladosporium carrionii*)、粗球孢子菌 (*Coccidioides immitis*)、皮炎芽生菌 (*Blastomyces dermatidis*)、新型隐球菌 (*Cryptococcus neoformans*)、棒地霉 (*Geotrichum clavatum*)、荚膜组织胞浆菌 (*Histoplasma capsulatum*)、肺炎克雷伯菌 (*Klebsiella pneumoniae*)、微孢子虫 (*Microsporidia*)、脑炎微孢子虫属 (*Encephalitozoon spp.*)、肠间隔微孢子虫 (*Septata intestinalis*) 和毕氏肠微孢子虫 (*Enterocytozoon bieneusi*); 较不常见的有短粒虫属 (*Brachiola spp.*)、微孢子虫属 (*Microsporidium spp.*)、微孢子虫属 (*Nosema spp.*)、皮里虫属 (*Pleistophora spp.*)、气管普孢虫属 (*Trachipleistophora spp.*)、条孢虫属 (*Vittaforma spp.*)、巴西芽生菌 (*Paracoccidioides brasiliensis*)、卡氏肺孢子虫 (*Pneumocystis carinii*)、苜蓿腐酶 (*Pythium insidiosum*)、皮屑芽胞菌 (*Pityrosporum ovale*)、酿酒酵母 (*Sacharomyces cerevisiae*)、布拉酵母 (*Saccharomyces boulardii*)、粟酒酵母 (*Saccharomyces pombe*)、尖端赛多孢子菌 (*Scedosporium apiospermum*)、申克孢子丝菌 (*Sporothrix schenckii*)、白吉利丝孢酵母 (*Trichosporon beigeli*)、弓形虫 (*Toxoplasma gondii*)、马尔尼菲青霉菌 (*Penicillium marneffeii*)、马拉色菌属 (*Malassezia spp.*)、着色真菌属 (*Fonsecaea spp.*)、王氏霉菌属 (*Wangiella spp.*)、孢子丝菌属 (*Sporothrix spp.*)、蛙粪霉属 (*Basidiobolus spp.*)、耳霉属 (*Conidiobolus spp.*)、根霉属 (*Rhizopus spp.*)、毛霉属 (*Mucor spp.*)、犁头霉属 (*Absidia spp.*)、被孢霉属 (*Mortierella spp.*)、小克银汉霉属 (*Cunninghamella spp.*)、瓶霉属 (*Saksenaea spp.*)、链格孢菌属 (*Alternaria spp.*)、弯孢菌属 (*Curvularia spp.*)、长蠕孢菌属 (*Helminthosporium spp.*)、镰孢菌属 (*Fusarium spp.*)、曲霉属 (*Aspergillus spp.*)、青霉属 (*Penicillium spp.*)、链核盘菌属 (*Monolinia spp.*)、丝核菌属 (*Rhizoctonia spp.*)、拟青霉属 (*Paecilomyces spp.*)、皮司霉属 (*Pithomyces spp.*) 和枝孢属 (*Cladosporium*

spp.)。

[0218] 可由自复制 RNA 分子编码的原生动物抗原和免疫原包括但不限于来自痢疾内变形虫 (*Entamoeba histolytica*)、贾第鞭毛虫 (*Giardia lamblia*)、小隐孢子虫 (*Cryptosporidium parvum*)、卡宴环孢子球虫 (*Cyclospora cayatanensis*) 和弓形虫 (*Toxoplasma*) 的蛋白质和肽。

[0219] 可由自复制 RNA 分子编码的植物抗原和免疫原包括但不限于来自蓖麻 (*Ricinus communis*) 的蛋白质和肽。

[0220] 合适的抗原包括来自例如下述病毒的蛋白质和肽：人体免疫缺陷病毒 (HIV)、甲肝病毒 (HAV)、乙肝病毒 (HBV)、丙肝病毒 (HCV)、单纯疱疹病毒 (HSV)、巨细胞病毒 (CMV)、流感病毒 (flu)、呼吸道合胞病毒 (RSV)、细小病毒、诺如病毒、人乳头瘤病毒 (HPV)、鼻病毒、黄热病毒、狂犬病病毒、登革热病毒、麻疹病毒、流行性腮腺炎病毒、风疹病毒、水痘-带状疱疹病毒、肠道病毒 (如肠道病毒 71)、埃博拉病毒、和牛性腹泻病毒。优选地，抗原物质选自下组：HSV 糖蛋白 gD、HIV 糖蛋白 gp120、HIV 糖蛋白 gp40、HIV p55gag、和来自 pol 和 tat 区域的多肽。在本发明其它优选实施方式中，抗原是源自细菌的蛋白质或肽，所述细菌例如幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*)、流感嗜血杆菌 (*Haemophilus influenza*)、霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae* (霍乱))、白喉棒状杆菌 (*C. diphtheriae* (白喉))、破伤风梭菌 (*C. tetani* (破伤风))、脑膜炎奈瑟球菌 (*Neisseria meningitidis*)、百日咳博德特菌 (*B. pertussis*)、结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 等。

[0221] 可由本发明的自复制 RNA 分子编码的 HIV 抗原描述于 1990 年 3 月 9 日提交的美国申请序列号 490,858 和公开的欧洲申请号 181150 (1986 年 5 月 14 日)，以及美国申请序列号 60/168,471 ;09/475,515 ;09/475,504 ;和 09/610,313，它们的公开内容通过引用全文纳入本文。

[0222] 可由本发明的自复制 RNA 分子编码的巨细胞病毒抗原描述于美国专利号 4,689,225,1989 年 6 月 16 日提交的美国申请序列号 367,363 和 PCT 公开 W089/07143，它们的公开内容通过引用全文纳入本文。

[0223] 可由本发明的自复制 RNA 分子编码的丙肝病毒抗原描述于 PCT/US88/04125，公开的欧洲申请号 318216 (1989 年 5 月 31 日)，1988 年 11 月 18 日提交的公开日本申请号 1-500565，加拿大申请 583,561，和 EP0388,232，它们的公开内容通过引用全文纳入本文。一组不同的 HCV 抗原描述于 1990 年 3 月 16 日提交的欧洲专利申请 90/302866.0 和 1989 年 12 月 21 日提交的美国申请序列号 456,637，和 PCT/US90/01348，它们的公开内容通过引用全文纳入本文。

[0224] 在一些实施方式中，抗原源自变应原，如花粉变应原 (树、草本、杂草和草花粉变应原)；昆虫或蜘蛛类变应原 (吸入、唾液和毒液变应原如螨虫变应原、蟑螂和蠨变应原、膜翅目昆虫毒液变应原)；动物毛发和皮屑变应原 (来自例如狗、猫、马、大鼠、小鼠等)；和食物变应原 (如麸朊)。来自树、草和草本的重要花粉变应原是那些源自分类目壳斗目、木犀目、松杉目和悬铃木目的，包括但不限于白桦 (桦属)，赤杨 (桤木)，榛子 (榛属)，鹅耳枥 (鹅耳枥属) 和橄榄 (木犀榄属)，雪松 (柳杉属和圆柏属)，法国梧桐 (悬铃木)，禾本目包括黑麦属 (*Lolium*)、猫尾属、早熟禾属、狗牙根属、鸭茅属、绒毛草属、子藨草属、黑麦属 (*Secale*) 和高粱属的草，菊目和荨麻目包括草本植物豚草属、蒿属和欧蓍草属。其它重要的

吸入变应原是来自主尘螨属和欧尘螨属的屋尘螨、仓储螨如害嗜鳞螨、食甜螨和食酪螨,来自蟑螂、蠨和跳蚤例如德国小蠨、大蠨、摇蚊和猫栉头蚤的那些,以及来自哺乳动物如猫、狗和马的那些,毒液变应原包括源自针昆虫或咬虫的那些如源自膜翅目的那些,包括蜜蜂(蜜蜂科(Apidae))、黄蜂(胡蜂科(Vespidae))和蚂蚁(蚁总科(Formicoidae))。

[0225] 在某些实施方式中,肿瘤免疫原或抗原,或者癌免疫原或抗原可由所述自复制 RNA 分子编码。在某些实施方式中,肿瘤免疫原和抗原是含肽的肿瘤抗原,如多肽肿瘤抗原或糖蛋白肿瘤抗原。

[0226] 适用于本文的肿瘤免疫原和抗原包括各种分子,如 (a) 含多肽的肿瘤抗原,包括多肽(长度范围可以是(例如)8~20 个氨基酸,虽然超出此范围以外的长度也常见)、脂多肽和糖蛋白。

[0227] 在某些实施方式中,肿瘤免疫原是例如:(a) 与癌细胞相关的全长分子,(b) 其同源物和修饰形式,包括含有缺失、添加和/或取代部分的分子,以及(c) 其片段。肿瘤免疫原包括例如:CD8+ 淋巴细胞识别的 I 型-限制性抗原或 CD4+ 淋巴细胞识别的 II 型-限制性抗原。

[0228] 在某些实施方式中,肿瘤免疫原包括但不限于 (a) 睾丸癌抗原如 NY-ESO-1、SSX2、SCP1 以及 RAGE、BAGE、GAGE 和 MAGE 家族多肽,如 GAGE-1、GAGE-2、MAGE-1、MAGE-2、MAGE-3、MAGE-4、MAGE-5、MAGE-6 和 MAGE-12(其可用于例如,检测黑色素瘤、肺肿瘤、头颈肿瘤、NSCLC、乳腺肿瘤、胃肠道肿瘤和膀胱肿瘤),(b) 突变抗原,例如 p53(与各种实体瘤如结直肠癌、肺癌、头颈癌有关)、p21/Ras(例如,与黑色素瘤、胰腺癌和结直肠癌有关)、CDK4(例如,与黑色素瘤有关)、MUM1(例如,与黑色素瘤有关)、胱冬酶-8(例如,与头颈癌有关)、CIA0205(例如,与膀胱癌有关)、HLA-A2-R1701、 β 联蛋白(例如,与黑色素瘤有关)、TCR(例如,与 T-细胞非霍奇金淋巴瘤有关)、BCR-ab1(例如,与慢性髓细胞性白血病有关)、磷酸丙糖异构酶、KIA0205、CDC-27 和 LDLR-FUT,(c) 过表达抗原,例如半乳糖凝集素 4(例如,与结直肠癌有关)、半乳糖凝集素 9(例如,与霍奇金病有关)、蛋白酶 3(例如,与慢性髓细胞性白血病有关)、WT1(例如,与多种白血病有关)、碳酸酐酶(例如,与肾癌有关)、醛缩酶 A(例如,与肺癌有关)、PRAME(例如,与黑色素瘤有关)、HER-2/neu(例如,与乳腺癌、结肠癌、肺癌与卵巢癌有关)、甲胎蛋白(例如,与肝细胞癌有关)、KSA(例如,与结直肠癌有关)、胃泌素(例如,与胰腺癌和胃癌有关)、端粒酶催化蛋白、MUC-1(例如,与乳腺癌和卵巢癌有关)、G-250(例如,与肾细胞癌有关)、p53(例如,与乳腺癌和结肠癌有关)和癌胚抗原(例如,与乳腺癌、肺癌和胃肠道癌如结直肠癌有关),(d) 共有抗原,例如黑色素瘤-黑素细胞分化抗原如 MART-1/Melan A、gp100、MC1R、黑素细胞-刺激激素受体、酪氨酸酶、酪氨酸酶相关蛋白-1/TRP1 和酪氨酸酶相关蛋白-2/TRP2(例如,与黑色素瘤有关),(e) 前列腺相关抗原如 PAP、PSA、PSMA、PSH-P1、PSM-P1、PSM-P2,例如与前列腺癌有关,(f) 免疫球蛋白独特型(例如,与骨髓瘤和 B 细胞淋巴瘤有关)。

[0229] 在某些实施方式中,肿瘤免疫原包括但不限于 p15、Hom/Mel-40、H-Ras、E2A-PRL、H4-RET、IGH-IGK、MYL-RAR、EB 病毒抗原、EBNA、人乳头瘤病毒(HPV) 抗原,包括 E6 和 E7、乙肝和丙肝病毒抗原、人嗜 T 淋巴细胞病毒抗原、TSP-180、p185erbB2、p180erbB-3、c-met、mn-23H1、TAG-72-4、CA19-9、CA72-4、CAM17.1、NuMa、K-ras、p16、TAGE、PSCA、CT7、43-9F、5T4、791Tgp72、 β -HCG、BCA225、BTAA、CA125、CA15-3(CA27.29\BCAA)、CA195、CA242、CA-50、

CAM43、CD68\KP1、CO-029、FGF-5、Ga733 (EpCAM)、HTgp-175、M344、MA-50、MG7-Ag、MOV18、NB/70K、NY-CO-1、RCAS1、SDCCAG16、TA-90 (Mac-2 结合蛋白 \ 亲环蛋白 C 相关蛋白)、TAAL6、TAG72、TLP、TPS 等。

[0230] C. 核酸分子的水性溶液

[0231] 所述核酸分子 (如 RNA) 通常以水性溶液形式或可易溶于水性溶液中的形式 (如冻干) 来提供。所述水性溶液可为水中的或包含盐 (如 NaCl)、缓冲剂 (如柠檬酸盐缓冲剂)、非离子等张剂 (如糖)、聚合物、表面活性剂或其组合的水性溶液。若所述制剂旨在体内给予, 优选所述水性溶液为保持与正常生理条件相容性 pH 的生理上可接受的缓冲液。而且, 在某些情况中, 可能需要将 pH 维持在特定水平从而确保制剂中某些组分的稳定性。

[0232] 例如, 可能需要制备等张和 / 或等渗的水性溶液。高渗和低渗溶液有时会在注射时引起并发症和不良影响, 如组合物和生理液体之间不同离子浓度引起的给药后肿胀或组合物快速吸收。为了控制张力, 所述乳液可包含生理盐如钠盐。例如可使用约 0.9%(w/v) 的氯化钠 (NaCl) (生理盐水)。可存在的其它盐包括氯化钾、磷酸二氢钾、无水磷酸氢二钠、氯化镁、氯化钙等。在示例性实施方式中, 水性溶液含 10mM NaCl 和其它盐或非离子型等张剂。如前所述, 非离子型等张剂也可用于控制张力。在一个实施方式中, 混合高渗和低渗溶液 (例如, 高渗 RNA 和低渗乳液; 低渗 RNA 和高渗乳液), 使其一旦混合即形成等渗溶液。

[0233] 水性溶液可经缓冲。本文可用任何生理上可接受的缓冲剂, 如柠檬酸盐缓冲剂、磷酸盐缓冲剂、乙酸盐缓冲剂、琥珀酸盐缓冲剂、Tris 缓冲剂、碳酸氢盐缓冲剂、碳酸盐缓冲剂等。水性溶液的 pH 优选为 6.0 ~ 8.0, 优选约 6.2 ~ 约 6.8。在一些情况中, 缓冲液中可包括一定量的盐。在其它情况中, 缓冲液中的盐可干扰核酸分子与所述乳液颗粒的复合, 因此需避免。

[0234] 所述水性溶液还可包含其它组分如改变水性溶液渗透压的分子或稳定复合后核酸分子的分子。例如, 可用非离子等张剂调节渗透压, 所述等张剂通常为碳水化合物但也可可为聚合物。(参见例如, Voet 和 Voet (1990) Biochemistry (纽约 John Wiley & Sons 公司)。合适的非离子型等张剂示例包括糖 (如海藻糖、蔗糖、右旋糖、果糖、还原帕拉金糖等)、糖醇 (如甘露醇、山梨糖醇、木糖醇、赤藓糖醇、乳糖醇、麦芽糖醇、丙三醇等), 或其组合必要时, 可使用非离子聚合物 (如聚 (烷基二醇) 例如聚乙二醇、聚丙二醇或聚丁二醇) 或非离子表面活性剂。这些类型的试剂尤其是糖和糖醇也是冷冻保护剂, 能在冻干时保护 RNA 和其它核酸分子。在示例性实施方式中, 所述缓冲液包括约 560mM - 600mM 海藻糖、蔗糖、山梨糖醇或右旋糖。

[0235] 在一些情况中, 可优选将含核酸分子的水性溶液制备为高渗溶液, 并用无杂质的水或低渗溶液制备阳离子乳液。当所述乳液与核酸分子组合时, 所述混合物变为等渗的。例如, 含 RNA 的水性溶液可为 2X 高渗溶液, 且阳离子乳液可用 10mM 柠檬酸盐缓冲液制备。当 RNA 溶液和乳液 1:1 (v/v) 混合时, 组合物变为等渗。根据乳液与含核酸分子的水性溶液的所需相对量 (如 1:1 (v/v) 混合、2:1 (v/v) 混合、1:2 (v/v) 混合等), 可容易地确定实现等张混合物所需的水性溶液的张力。

[0236] 相似地, 具有生理渗透压的组合物可能是体内给予所需。生理渗透压为约 255mOsm/kg 水 ~ 约 315mOsm/kg 水。有时, 可优选将含核酸分子的水性溶液制备为高渗溶液, 并用无杂质的水或低渗缓冲液制备阳离子乳液。当乳液和核酸分子组合时, 实现生理渗

透压。当然,这也可使用低渗性核酸溶液和高渗性缓冲液来实现。根据乳液与含核酸分子的水性溶液的所需相对量(如 1:1(v/v)混合,2:1(v/v)混合,1:2(v/v)混合等),可容易地确定实现等渗混合物所需的水性溶液的渗透压。

[0237] 在某些实施方式中,含核酸分子的水性溶液还可包括聚合物或表面活性剂或其组合。在示例性实施方式中,所述水包油乳液含泊洛沙姆。具体地,发明人发现添加 **Pluronic®** F127 到 RNA 水性溶液中然后与阳离子乳液颗粒复合引起 RNA 分子的稳定性增强和对 RNA 酶的抗性增强。还发现添加普流罗尼克 F127 到 RNA 水性溶液中会降低 RNA/CNE 复合物的粒度。泊洛沙姆聚合物还可促进 RNA 分子的恰当去复合/释放,防止乳液颗粒聚集,并具有免疫调节效应。可用的其它聚合物包括例如 **Pluronic®** F68 或 PEG300。

[0238] 替代或补充地,含核酸分子的水性溶液可包括约 0.05%~约 20%(w/v) 聚合物。例如,阳离子水包油乳液可包括约 0.05%~约 10%(w/v),如 0.05%、0.5%、1%或 5%的聚合物(如泊洛沙姆例如 **Pluronic®** F127、**Pluronic®** F68,或 PEG300)。

[0239] 缓冲系统可包括两种或更多上述分子(盐、缓冲剂、糖、聚合物等)的任何组合。在优选的实施方式中,所述缓冲液包括 560mM 蔗糖、20mM NaCl 和 2mM 柠檬酸盐,其可与本文所述阳离子水包油乳液混合,产生包含 280mM 蔗糖、10mM NaCl 和 1mM 柠檬酸盐的最终水相。在其它实施方式中,所述缓冲液包含约 2~20mM 柠檬酸盐,其可与阳离子油在本文所述的水乳液中混合,以产生最终的水相,所述水相包含约 1~10mM 柠檬酸盐。

[0240] 5. 制备方法

[0241] 在另一方面,本发明提供制备组合物的方法,所述组合物包含以至少 4:1 的 N/P 比例与阳离子水包油乳液颗粒复合的核酸分子,且平均粒径为约 80nm~约 150nm,所述方法包括:制备阳离子水包油乳液,其中所述乳液包括:(1) 约 0.2%~约 20%(v/v) 油、(2) 约 0.01%~约 2.5%(v/v) 表面活性剂,和 (3) 阳离子脂质;向所述阳离子水包油乳液中添加所述核酸分子,从而所述核酸分子与所述乳液的颗粒复合。

[0242] 生成阳离子水包油乳液的一种示例性方法通过包括以下的过程进行:(1) 组合所述油和所述阳离子脂质,形成所述乳液的油相;(2) 提供水相来形成所述乳液的水相;和 (3) 将所述油相分散在所述水相中,例如通过均质化。可用任何合适方法实现均质化,例如使用市售的均质机(如 IKA T25 均质机,可获自 VWR 国际公司(VWR International)(宾夕法尼亚州西切斯特))。

[0243] 阳离子脂质可溶于合适的溶剂,如氯仿(CHCl_3)、二氯甲烷(DCM)、乙醇、丙酮、四氢呋喃(THF)、2,2,2-三氟乙醇、乙腈、乙酸乙酯、己烷、二甲基甲酰胺(DMF)、二甲亚砜(DMSO)等,并直接添加到乳液的油组分中。或者,所述阳离子脂质可添加到合适溶剂中形成脂质体悬液;然后所述脂质体悬液可加入所述乳液的油组分。所述阳离子脂质还可直接溶解在所述油中。

[0244] 可能需要将所述油加热到约 30°C - 约 65°C 温度以有利于所述脂质的溶解。

[0245] 可测量阳离子脂质(如 DOTAP)的所需含量且可溶于溶剂、水或直接溶于油中以达到本文所述和示例的所需终浓度。

[0246] 溶剂如氯仿(CHCl_3)或二氯甲烷(DCM)可在合并所述水相和油相前或在均质化前从油相中移除,例如通过蒸发。或者,在脂质溶解度可能是问题的情况中,初级乳液制备时

溶剂（如 DCM）可以仍在所述油相中。在该情况中，所述溶剂可在二次均质化前从初级乳液中移除（如使之挥发）。

[0247] 若乳液含一种或多种表面活性剂，所述表面活性剂可根据本领域常规实践包括在油相或水相中。例如，**SPAN®** 85 可溶于油相（如鲨烯），吐温 80 可溶于水相（如在柠檬酸盐缓冲液中）。

[0248] 在另一方面，本发明提供制备组合物的方法，所述组合物包含与阳离子水包油乳液颗粒复合的核酸分子（如 RNA），所述方法包括：(i) 提供本文所述阳离子水包油乳液；(ii) 提供含核酸分子（如 RNA）的水性溶液；和 (iii) 组合 (i) 的水包油乳液和 (iii) 的水性溶液，从而所述核酸分子与乳液颗粒复合。例如，阳离子水包油乳液可与含核酸分子的水性溶液（如 RNA 水性溶液）以任何需要的相对量组合，如约 1:1(v/v)、约 1.5:1(v/v)、约 2:1(v/v)、约 2.5:1(v/v)、约 3:1(v/v)、约 3.5:1(v/v)、约 4:1(v/v)、约 5:1(v/v)、约 10:1(v/v)、约 1:1.5(v/v)、约 1:2(v/v)、约 1:2.5(v/v)、约 1:3(v/v)、约 1:3.5(v/v)、约 1:4(v/v)、约 1:1.5(v/v) 或约 1:1.10(v/v) 等。

[0249] 复合后组合物（如 RNA-乳液复合物）的各组分浓度可根据所用的复合前水包油乳液和含核酸分子的水溶液（如 RNA 水性溶液）的相对量而容易确定。例如，阳离子水包油乳液与含核酸分子的水溶液（如 RNA 水性溶液）以 1:1(v:v) 比例组合时，所述油和阳离子脂质的浓度变为复合前乳液的一半。因此，若含 4.3%(w/v) 鲨烯、1.4mg/mL DOTAP、0.5%v/v **SPAN®** 85 和 0.5%v/v 吐温 80 的乳液（本文称为“CNE17”）与含 560mM 蔗糖，20mM NaCl，2mM 柠檬酸盐 1%(w/v) 普流罗尼克 F127 的 RNA 水性溶液以 1:1(v:v) 组合，则复合后组合物含 2.15%(w/v) 鲨烯、0.7mg/mL DOTAP、0.25%v/v SPAN85、0.25%v/v 吐温 80、280mM 蔗糖、10mMNaCl、1mM 柠檬酸盐和 0.5%(w/v) 普流罗尼克 F127。

[0250] 可包括其它任选步骤以促进颗粒形成、改善核酸分子和阳离子颗粒之间的复合、提高核酸分子的稳定性（如防止 RNA 分子降解）、促进核酸分子（如 RNA 分子）的合适去复合/释放、或防止乳液颗粒的聚集。例如，聚合物（如**Pluronic®** F127）或表面活性剂可加入含核酸分子（如 RNA）的水溶液中。在一个示例性实施方式中，将**Pluronic®** F127 加入所述 RNA 分子中然后与所述乳液颗粒复合。

[0251] 所述乳液颗粒的大小可通过改变表面活性剂与油的比例（提高比例则降低液滴大小）、操作压力（增加操作压力则降低液滴大小）、温度（提高温度则降低液滴大小）和其它工艺参数而变化。实际粒度还随着所用的具体表面活性剂、油和阳离子脂质以及所选的具体操作条件而变化。乳液粒度可通过利用分粒仪器来证实，此类仪器如库尔特公司（Coulter Corporation）生产的市售亚微米颗粒分析仪（N4MD 型），且可利用上述指导改变参数直至颗粒的平均直径为 80nm ~ 180nm。

[0252] 制备阳离子水包油乳液（复合前乳液）或核酸分子-乳液复合物的可选过程包括例如灭菌、粒度选择（如移除大颗粒）、填充、包装和标记等。

[0253] 例如，若配制复合前乳液或核酸分子-乳液复合物用于体内给药，其可灭菌，例如通过灭菌级的滤器过滤（如通过 0.22 微米滤器）。其它灭菌技术包括热方法或放射灭菌方法或使用脉冲光来产生灭菌组合物。

[0254] 本文所述阳离子水包油乳液可用于生产疫苗。灭菌和/或临床级阳离子水包油乳

液可用与 MF59 相似的方法制备。参见例如, Ott 等, *Methods in Molecular Medicine* (《分子医学方法》), 2000 年, 卷 42, 211-228, 收录于 *Vaccine Adjuvants* (《疫苗佐剂》), (O'Hagan 编辑), 胡马纳出版公司 (Humana Press)。例如, 与 MF59 生产方法相似, 可合并乳液的油相和水相且在内部均质器中加工以产生粗乳液。粗乳液然后可加入微流化床中, 可在其中进一步加工获得稳定的亚微米乳液。粗乳液可重复通过微流化床的相互作用室直到获得需要的粒度。批量乳液此后可以过滤 (如氮气下通过 $0.22\ \mu\text{m}$ 滤器) 以移除大颗粒, 产生可填充入合适容器 (如玻璃瓶) 的散装乳液。对于在水包油乳液存在下自储存已证明有长期稳定性的疫苗抗原, 可将抗原和乳液组合并灭菌过滤 (如通过 $0.22\ \mu\text{m}$ 滤膜)。已组合的单瓶疫苗可装入单剂量的容器中。对于未证实长期稳定性的疫苗抗原, 乳液可作为单独药瓶提供。在此类情况中, 散装乳液可过滤灭菌 (如通过 $0.22\ \mu\text{m}$ 滤膜)、填充、并包装在最终的单剂量药瓶中。

[0255] 任选在散装乳液或混合疫苗的小样品上进行质量控制, 只有在样品通过质量控制检测后才将散装或混合疫苗包装成药剂。

[0256] 6. 药物组合物和给药

[0257] 另一方面, 如本文所述, 本发明提供包含与阳离子水包油乳液颗粒复合的核酸分子的药物组合物, 并且还包括一种或多种药学上可接受载体、稀释剂或赋形剂。在优选的实施方式中, 药物组合物是能用作疫苗的免疫原性组合物。

[0258] 本文所述的组合物可用于递送核酸至细胞。例如, 核酸分子 (如 DNA 或 RNA) 可递送到细胞以用于各种目的, 如诱导所需基因产物 (如蛋白) 生成、调节基因表达、用于基因治疗等。本文所述组合物还可用于递送核酸分子 (如 DNA 或 RNA) 到细胞以用于治疗目的, 如治疗疾病如癌症或增殖性紊乱、代谢疾病、心血管疾病、感染、过敏, 诱导免疫应答等。例如, 核酸分子可递送到细胞以抑制靶基因表达。此类核酸分子包括例如反义寡核苷酸、双链 RNA 如小干扰 RNA 等。双链 RNA 分子如小干扰 RNA 可引起 RNA 干扰, 其使对应靶基因特异沉默 (基因敲减)。反义寡核苷酸是与选定序列互补的单链 DNA 或 RNA。通常, 反义 RNA 可通过结合某些信使 RNA 链来阻止其蛋白翻译。反义 DNA 可用于靶向特定的互补 (编码或非编码) RNA。因此, 本文所述阳离子乳液可用于递送反义寡核苷酸或双链 RNA 以治疗, 例如通过抑制肿瘤靶标生成来治疗癌症。

[0259] 本文提供的药物组合物可以单独给药或与一种或多种其它治疗试剂联合给药。给药的方法包括但不限于口服给药、直肠给药、胃肠外给药、皮下给药、静脉内给药、玻璃体内给药、肌肉内给药、吸入、鼻内给药、局部给药、眼部给药和耳部给药。

[0260] 本文所述组合物的治疗有效量根据所针对的疾病、疾病严重程度、对象年龄和相对健康状况、所给予化合物的效力、给药方式和所需治疗等而会不同。

[0261] 在其它实施方式中, 本发明所述药物组合物可与一种或多种其它治疗剂联合给药。其它治疗试剂可包括但不限于抗生素、抗菌剂、止吐剂、抗真菌剂、消炎剂、抗病毒剂、免疫调节剂、细胞因子、抗抑郁药、激素、烷化剂、抗代谢物、抗肿瘤抗生素、抗有丝分裂剂、拓扑异构酶抑制剂、细胞生长抑制剂、抗入侵剂、抗血管新生剂、生长因子功能抑制剂、病毒复制抑制剂、病毒酶抑制剂、抗癌剂、 α 干扰素、 β 干扰素、利巴韦林、激素、其它 Toll 样受体调节剂、免疫球蛋白 (Ig) 和调节 Ig 功能的抗体 (例如抗 IgE (奥马珠单抗))。

[0262] 在某些实施方式中, 本文提供的药物组合物用于治疗传染病, 包括但不限于: 本文

公开的病原体引起的疾病,包括病毒疾病如生殖器疣、寻常疣、脚底疣、狂犬病、呼吸道合胞病毒(RSV)、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、登革病毒、黄热病、单纯疱疹病毒(仅举例来说,HSV-I、HSV-II、CMV、或VZV)、传染性软疣、牛痘、天花、慢病毒、人免疫缺陷病毒(HIV)、人乳头瘤病毒(HPV)、肝炎病毒(丙肝病毒、乙肝病毒、甲肝病毒)、巨细胞病毒(CMV)、水痘带状疱疹病毒(VZV)、鼻病毒、肠病毒(如EV71)、腺病毒、冠状病毒(如SARS)、流感病毒、副流感病毒、腮腺炎病毒、麻疹病毒、风疹病毒、乳多空病毒、嗜肝DNA病毒、黄病毒、逆转录病毒、沙粒病毒(仅举例来说,LCM、胡宁病毒、马丘博病毒、瓜纳瑞托病毒(Guanarito virus)和拉沙热)和纤丝病毒(仅举例来说,埃博拉病毒或马尔堡病毒)。

[0263] 在某些实施方式中,本文提供的药物组合物用于治疗细菌、真菌和原生动物感染,包括但不限于:疟疾、肺结核和鸟分枝杆菌病,麻疯病;卡氏肺囊虫肺炎(*pneumocystis carinii*),隐孢子虫病,组织胞浆菌病,弓形体病,锥虫病感染,利什曼病,埃希氏菌属(*Escherichia*)、肠细菌属(*Enterobacter*)、沙门氏菌属(*Salmonella*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、克氏杆菌属(*Klebsiella*)、变形杆菌属(*Proteus*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、链球菌属(*Streptococcus*)和衣原体属(*Chlamydia*)的细菌引起的感染,和真菌感染如念珠菌病(*candidiasis*)、曲霉病(*aspergillosis*)、组织胞浆菌病(*histoplasmosis*)、隐球菌脑膜炎(*cryptococcal meningitis*)。

[0264] 某些实施方式中,本文提供的药物组合物用于治疗呼吸疾病和/或紊乱、皮肤病、眼睛疾病和/或紊乱、泌尿生殖系统疾病和/或紊乱,包括同种异体移植排斥,自身免疫和过敏,癌症,或皮肤损伤或老化如疤痕和皱纹。

[0265] 另一方面,本发明提供在有需要的对象如哺乳动物中产生或增强免疫应答的方法,包括给予有效量的本文所公开组合物。所述免疫应答优选为保护性,并优选涉及抗体和/或细胞介导免疫。本方法可用于诱导初级免疫应答和/或加强免疫应答。

[0266] 在某些实施方式中,本文所述组合物可用作药物,如用于在有需要的对象如哺乳动物中引起或增加免疫应答。

[0267] 在某些实施方式中,本文所述组合物也可以用于生产在有需要的对象如哺乳动物中引起或增强免疫应答的药物。

[0268] 本发明还提供了一种预填充有本发明所述组合物和疫苗的递送装置。

[0269] 所述哺乳动物优选人,但可以是如牛、猪、鸡、猫或狗,因为本文涵盖的病原体可能在广泛的物种中是有问题的。当疫苗用于预防性用途时,人优选为儿童(如幼童或婴儿)、青少年或成人;当疫苗用于治疗性用途时,人优选为青少年或成人。用于儿童的疫苗也可给予成人,例如,以评估其安全性、剂量、免疫原性等。

[0270] 检测治疗性处理功效的一种方式包括在给予本发明所述组合物或疫苗后监测病原体感染。检测预防性处理功效的一种方式包括监测针对抗原的全身免疫应答(如监测IgG1和IgG2a生成水平)和/或粘膜免疫应答(如监测IgA生成水平)。通常,在免疫后但在刺激前测定抗原特异性血清抗体应答,而在免疫后且刺激后测定抗原特异性粘膜抗体应答。

[0271] 在核酸分子(如RNA)编码蛋白抗原时,评价本文所述组合物或疫苗的免疫原性的另一方法是重组表达所述蛋白抗原以通过免疫印迹和/或微阵列筛查患者血清或粘膜分泌。蛋白质和患者样品间的阳性反应表明患者已经产生对受试蛋白的免疫应答。该方法也

可用于鉴定免疫显性抗原和 / 或蛋白质抗原内的表位。

[0272] 所述组合物的功效还可通过攻击感兴趣病原体感染的合适动物模型来体内确定。

[0273] 可以通过单剂量方案或多剂量方案进行给药。多剂量可用于初免方案和 / 或加强免疫方案。在多剂量方案中, 可通过相同或不同的途径给予各剂量, 例如胃肠道外初免和粘膜加强、粘膜初免和胃肠道外加强等。多个剂量的给予一般间隔至少 1 周 (例如约 2 周、约 3 周、约 4 周、约 6 周、约 8 周、约 10 周、约 12 周、约 16 周等)。

[0274] 包括一种或多种抗原或者与一种或多种抗原联用的本文所述组合物可用于治疗儿童和成人。因此, 人类对象可以小于 1 岁、1 ~ 5 岁、5 ~ 15 岁、15 ~ 55 岁或至少 55 岁。接受所述组合物的对象优选老年人 (如 >50 岁, >60 岁并优选 >65 岁), 年轻人 (如 <5 岁), 住院病人、保健护理人员、武装部队和军人、孕妇、慢性病人或免疫缺陷病人。然而所述组合物不仅适用于这些人群, 还可用于更广泛的群体。

[0275] 包括一种或多种抗原或者与一种或多种抗原联用的本文所述组合物可与其它疫苗基本上同时 (在健康护理专业人员或疫苗接种中心的同一医疗咨询或问诊期间) 给予患者, 例如与麻疹疫苗、腮腺炎疫苗、风疹疫苗、MMR 疫苗、水痘疫苗、MMRV 疫苗、白喉疫苗、破伤风疫苗、百日咳疫苗、DTP 疫苗、偶联的 B 型流感嗜血杆菌疫苗、脊髓灰质炎病毒灭活疫苗、乙型肝炎病毒疫苗、脑膜炎球菌偶联疫苗 (如四价 A-C-W135-Y 疫苗)、呼吸道合胞病毒疫苗等基本上同时给药。

[0276] 在某些实施方式中, 本文提供的组合物包括或任选包括一种或多种免疫调节剂如佐剂。示例性佐剂包括但不限于 TH1 佐剂和 / 或 TH2 佐剂, 其在下文中进一步讨论。在某些实施方式中, 用于本文所提供免疫原性组合物的佐剂包括但不限于:

- [0277] 1. 含矿物质的组合物;
- [0278] 2. 油乳剂;
- [0279] 3. 皂苷制剂;
- [0280] 4. 病毒体和病毒样颗粒;
- [0281] 5. 细菌或微生物衍生物;
- [0282] 6. 生物粘着剂和粘膜粘着剂;
- [0283] 7. 脂质体;
- [0284] 8. 聚氧乙烯醚和聚氧乙烯酯制剂;
- [0285] 9. 聚磷腈 (PCPP);
- [0286] 10. 胞壁酰肽;
- [0287] 11. 咪唑并喹诺酮化合物;
- [0288] 12. 缩氨基硫脲化合物;
- [0289] 13. 色胺酮化合物;
- [0290] 14. 人免疫调节剂;
- [0291] 15. 脂肽;
- [0292] 16. 苯并蔡啶;
- [0293] 17. 微粒
- [0294] 18. 免疫刺激多核苷酸 (如 RNA 或 DNA; 如含 CpG 的寡核苷酸)

实施例

[0295] 现已总体描述了本发明,参考以下实施例更易于理解本发明,这些实施例只是用于说明本发明的某些方面与实施方式,而非意在限制本发明。

[0296] 实施例 1:阳离子水包油乳液

[0297] 角鲨烯、去水山梨糖醇三油酸酯(司盘 85)和聚氧乙烯去水山梨糖醇单油酸酯(吐温 80)获自西格玛公司(美国密苏里州圣路易斯)。1,2-二油酰-3-三甲基铵-丙烷(DOTAP)购自类脂公司(Lipoid)(德国路德维希)。

[0298] 这些研究中所用乳液的成分示于表 1。

[0299] 表 1

[0300]

CNE	阳离子脂质(+)	mg/ml +脂质	表面活性剂	鲨烯	缓冲液/水
CNE17	DOTAP (在DCM中)	1.40	0.5% 司盘85 0.5% 吐温80	4.3%	10mM 柠檬 酸盐缓冲液 pH 6.5
CMF3 2	DOTAP	3.2	0.5% 司盘85 0.5% 吐温80	4.3%	10mM 柠檬 酸盐缓冲液 pH 6.5
CMF3 4	DOTAP	4.4	0.5% 司盘85 0.5% 吐温80	4.3%	10mM 柠檬 酸盐缓冲液 pH 6.5
CMF3 5	DOTAP	5.0	0.5% 司盘85 0.5% 吐温80	4.3%	10mM 柠檬 酸盐缓冲液 pH 6.5

[0301] CNE 的制备类似于此前所述带电 MF59 的制备(Ott 等, Journal of Controlled Release, 79 卷, 1-5 页, 2002)。所述工艺中, CMF32、34 和 35 的制备有一项主要改变。使 DOTAP 直接溶解于鲨烯, 并且不使用有机溶剂。发现在含有超过 1.6mg/ml DOTAP 的乳液中纳入溶剂产生泡沫状料液, 无法微流体化产生乳液。加热鲨烯至 37°C 使得 DOTAP 能直接溶解于鲨烯, 且此后油相能成功分散在水相中(例如, 通过均质化)以产生乳液。DOTAP 可溶于鲨烯, 且能在鲨烯中实现比表 1 所示更高的 DOTAP 浓度。但是, 已有报道高剂量的 DOTAP 可能具有毒性作用。参见例如 Lappalainen 等, Pharm. Res., 卷 11(8):1127-31(1994)。

[0302] 简要来说, 鲨烯被加热到 37°C, 且在司盘 85 存在下将 DOTAP 直接溶于鲨烯。所得油相随后与水相(含吐温 80 的柠檬酸盐缓冲液)混合并立即用 IKA T25 匀浆机在 24K RPM 下均质化 2 分钟以产生均质料液(初步乳液)。所述初步乳液 3-5 次通过带冰浴冷却盘管的 M-110S 微流化器或 M-110P 微流化器(微流化公司(Microfluidics), 马萨诸塞州牛顿市), 均质压力为约 15k-20k PSI。从单元中移出 20ml 批料样品并存于 4°C。

[0303] 需要注意,表 1 所述的 CNE 的成分浓度是按照制备乳液所用这些成分的初始用量计算所得浓度。应理解在乳液生产工艺中,或者过滤灭菌过程中,可能损失少量的鲨烯、DOTAP、或其它成分,从而这些成分在终产物(如待给予的包装灭菌乳液)中的实际浓度可能稍低,通常降低最多约 20%。有时,终产物中的所述成分的实际浓度可能稍降低最多约 25%,或最多约 35%。但是,本领域的常规实践是基于制备乳液所用成分的初始用量来描述特定成分的浓度,而不是最终产物中的实际浓度。

[0304] RNA 合成

[0305] 编码 α 病毒复制子(自复制 RNA)的质粒 DNA 用作体外合成 RNA 的模板。各复制子含 RNA 复制所需的遗传元件但缺少编码颗粒装配所需基因产物的序列。 α 病毒基因组的结构基因被替换为编码异源蛋白的序列(其表达由 α 病毒亚基因组启动子驱动)。在所述复制子递送给真核细胞后,正义链 RNA 翻译产生 4 种非结构性蛋白,它们一起复制基因组 RNA 并转录大量编码异源蛋白的亚基因组 mRNA。由于缺少 α 病毒结构蛋白的表达,复制子不能产生感染性颗粒。噬菌体 T7 启动子定位于所述 α 病毒 cDNA 上游以促进所述复制子 RNA 体外合成,且位置紧邻聚(A)尾下游的丁型肝炎病毒(HDV)核酶通过其自切割活性产生正确的 3' 末端。

[0306] 所述 HDV 核酶下游的质粒 DNA 用合适的限制性内切核酸酶线性化后,用 T7 或 SP6 噬菌体衍生 DNA 依赖性 RNA 聚合酶体外合成失控(run-off)转录本。按照生产商(得克萨斯州奥斯汀的安碧公司(Ambion))提供的说明,在各三磷酸核苷(ATP、CTP、GTP 和 UTP)终浓度 7.5mM(T7RNA 聚合酶)或 5mM(SP6RNA 聚合酶)存在时于 37°C 进行 2 小时转录。转录后,用 TURBO DNA 酶(得克萨斯州奥斯汀的安碧公司)消化模板 DNA。用 LiCl 沉淀所述复制子 RNA 并在无核酸酶的水中重建。如用户手册所述,未加帽的 RNA 用 ScriptCap m⁷G 加帽系统(威斯康星州麦迪逊的艾比森得(Epicentre)生物技术公司)在转录后通过牛痘加帽酶(VCE)加帽。用 LiCl 沉淀转录后加帽的 RNA 并在无核酸酶的水中重建。或者,复制子的加帽可通过向转录反应补充不可逆帽结构类似物 m⁷G(5')ppp(5')G(NEB 公司(New England Biolabs),马萨诸塞州贝弗利)6mM(用于 T7RNA 聚合酶)或 4mM(用于 SP6RNA 聚合酶)并降低三磷酸鸟苷的浓度到 1.5mM(用于 T7RNA 聚合酶)或 1mM(用于 SP6RNA 聚合酶)来进行。然后转录物可用 TURBO DNA 酶(得克萨斯州奥斯汀的安碧公司(Ambion))消化后用 LiCl 沉淀并在 75% 乙醇中清洗得以纯化。

[0307] RNA 样品的浓度通过测量 260nm 下的光密度来确定。体外转录本的完整性通过变性琼脂糖凝胶电泳全长构建体的存在来确认。

[0308] RNA 复合

[0309] 从所述阳离子脂质浓度计算溶液中氮的量,例如 DOTAP 每分子有 1 个可质子化的氮。所述 RNA 浓度用于计算溶液中磷酸根的量,利用每微克 RNA 约 3nmol 磷酸根的估值。通过改变 RNA: 脂质的量,可以调节 N/P 比例。RNA 在一定范围的氮/磷酸根比(N/P)下与 CNE 复合。N/P 比的计算通过计算每毫升乳液中可质子化氮的摩尔数来进行。为了计算磷酸根的数量,使用每微克 RNA 3nmol 磷酸根这一常数。确定值后,将合适比例的乳液加入 RNA。利用这些值,所述 RNA 被稀释到合适的浓度,并在轻微涡旋时直接加入等体积乳液中。使该溶液在室温静置约 2 小时。一旦复合后,将得到的溶液稀释到合适的浓度并在 1 小时内使用。

[0310] 粒度试验

[0311] 乳液的粒度用 Zetasizer Nano ZS(英国伍斯特郡的马尔文仪器公司(Malvern Instruments))根据生产商说明来测量。粒度报道为含多分散性指数(pdi)的 Z-平均值(ZAve)。所有样品于测量前稀释在水中。此外,乳液的粒度用 Horiba LA-930 粒度仪(堀场科技公司(Horiba Scientific),美国)来测量。样品于测量前稀释在水中。 ζ 电势根据生产商说明用 Zetasizer Nano ZS 测量,使用稀释的样品。

[0312] 分泌型碱性磷酸酶(SEAP) 试验

[0313] 为了评估抗原生产的动力学和量,与和与不制剂一起肌肉内给予小鼠编码 SEAP 的 RNA 复制子。8-10 周龄且体重为约 20g 的 3 或 5 只雌性 Balb/C 小鼠组用复合有 SEAP 编码复制子 RNA 的 CNE 免疫。裸 RNA 配制在无 RNA 酶的 1X PBS 中。将 100 μ l 剂量给予各小鼠四头肌(每位点 50 μ l)。注射后第 1、3 和 6 天取血液样品。收集后立即从血液中分离血清,使用前储存在 -30°C 。

[0314] 化学发光 SEAP 试验 Phospha-Light 系统(应用生物系统公司(Applied Biosystems),马萨诸塞州贝德福德)用于分析血清。小鼠血清在 1X Phospha-Light 稀释缓冲液中 1:4 稀释。样品置于用铝封箔密封的水浴中并 65°C 热灭活 30 分钟。冰上冷却 3 分钟并平衡到室温后,将 50uL Phospha-Light 试验缓冲液加入孔并将样品室温放置 5 分钟。然后,加入含 1:20 CSPD®(化学发光碱金属磷酸盐底物)的 50uL 反应缓冲液,并在室温孵育 20 分钟后测量发光。发光在 Berthold Centro LB960 发光计(田纳西州橡树岭(Oak Ridge, TN))上测量,每孔积分 1 秒。各样品中 SEAP 的活性进行一式两份测量并显示这两次测量的均值。

[0315] 实施例 2:粒度对免疫原性的影响

[0316] 本实施例显示粒度影响 CNE/RNA 制剂的免疫原性。

[0317] A. 粒度试验和体内 SEAP 试验的操作方案如实施例 1 所述。鼠免疫原性研究的操作方案如实施例 3 所述。图 1A 显示体内 SEAP 试验的结果(算术平均)。图 1B 显示 BALB/c 小鼠中个体动物在 2wp1 和 2wp2 时间点的总 IgG 效价。

[0318] RNA 与 CNE17 复合使所述乳液颗粒的大小增加,从约 220nm 到约 300nm。如图 1A 和图 1B 所示,随着粒度增加,SEAP 的表达水平下降,且宿主免疫应答也降低。

[0319] B. 以不同大小制备的 CMF34 与编码 RSV-F 的 RNA 以 7:1 的理论 N/P 比例复合,并双侧注射进入 Balb/C 小鼠的四头肌(0.05ml/注射点)。通过增加所述微流化器的处理压强来调节乳液粒度。数据(表 2)显示,当所述乳液粒度较小(参见 120nm 和 90nm 颗粒)时,在初次免疫后两周产生的抗 RSV F 效价最高。表 2

[0320]

制剂	RNA 剂 量	N/P比例	2wp1 GMT	2wp2 GMT
1ug vA375 第1批	1ug	7:1	16	151
1ug vA375 第1批 + CMF34 (5k PSI 处理- 200nm 大小)	1ug	7:1	162	1644
1ug vA375 第1批 + CMF34 (7k PSI 处理- 150nm 大小)	1ug	7:1	183	2540
1ug vA375 第1批 + CMF34 (12k PSI 处理- 120nm 大小)	1ug	7:1	465	3563
1ug vA375 第1批 + CMF34 (20k PSI 处理- 90nm 大小)	1ug	7:1	548	2542

[0321] 实施例 3 :缓冲液组成对免疫原性和粒度的影响

[0322] 本实施例中,制备各种基于 CNE17 但有不同缓冲液组分的乳液。表 3 显示缓冲液改变的乳液组成。

[0323] 表 3

[0324]

基础缓冲液	缓冲液/水
CNE17: 4.3%鲨烯、0.5%司盘85, 0.5%吐温80、1.4 mg/ml DOTAP	0 mM柠檬酸盐缓冲液 (在无RNA酶的dH ₂ O中, 无DCM)
CNE17: 4.3%鲨烯、0.5%司盘85, 0.5%吐温80、1.4 mg/ml DOTAP	1 mM柠檬酸盐缓冲液 (在无RNA酶的dH ₂ O中, 无DCM)
CNE17: 4.3%鲨烯、0.5%司盘85, 0.5%吐温80、1.4 mg/ml DOTAP	5 mM柠檬酸盐缓冲液 (在无RNA酶的dH ₂ O中, 无DCM)
CNE17: 4.3%鲨烯、0.5%司盘85, 0.5%吐温80、1.4 mg/ml DOTAP	10mM柠檬酸盐缓冲液 pH 6.5 300mM海藻糖
CNE17: 4.3%鲨烯、0.5%司盘85, 0.5%吐温80、1.4 mg/ml DOTAP	10mM柠檬酸盐缓冲液 pH 6.5 300mM蔗糖
CNE17: 4.3%鲨烯、0.5%司盘85, 0.5%吐温80、1.4 mg/ml DOTAP	10mM柠檬酸盐缓冲液 pH 6.5 300mM山梨糖醇
CNE17: 4.3%鲨烯、0.5%司盘85, 0.5%吐温80、1.4 mg/ml DOTAP	10mM柠檬酸盐缓冲液 pH 6.5 300mM右旋糖

[0325] 体外结合试验显示降低柠檬酸盐缓冲液浓度引起 RNA 结合更紧密。

[0326] 鼠免疫原性研究的结果显示添加糖到 CNE17 中没有显著影响 CNE17- 配制的 RNA 的免疫原性 (表 4, 组 9 ~ 12)。添加山梨醇和右旋糖观察到 IgG 效价稍稍提高。

[0327] 表 4

[0328]

[0329]

组#	说明		2wp1	2wp2	2wp2/2wp1 比例
	乳液	N:P 比例			
1	1ug vA317	-	77	1,710	22.2
2	RV01(15)	-	3,441	59,557	17.3
3	CNE17 DOTAP	10:1	1,474	6,512	4.4
4	CNE13 DDA	18:1	482	8,385	17.4
5	CMF37 DOTMA	10:1	474	6,556	13.8
6	CNE16 DOEPC	12:1	1,145	9,673	8.4
7	CMF42 DSTAP	10:1	22	148	6.7
8	DDA脂质体	18:1	898	5,333	5.9
9	含 300mM 海藻糖 的 CNE17	10:1	1,807	6,445	3.6
10	含 300mM 蔗糖 的 CNE17	10:1	1,042	5,515	5.3
11	含 300mM 山梨糖醇 的CNE17	10:1	1,209	8,874	7.3
12	含 300mM 右旋糖 的 CNE17	10:1	1,247	7,956	6.4

[0330] 组 1 ~ 8 中每组有 5 只动物, 且组 9 ~ 12 中每组有 10 只动物。

[0331] 表 5 概括了用不同缓冲系统制备 CNE17- 配制的 RNA 时鼠免疫原性研究的结果。

[0332] 表 5

[0333]

组#	说明			2wp1	2wp2	2wp2/2wp1 比例
	RNA	乳液	N:P 比例			
1	1 μ g RSV-F*	PBS	-	100	2269	23
2	RV01(15)	PBS	-	8388	105949	13
3	1 μ g RSV-F*	含 280mM 蔗糖 的 CNE17	10:1	898	9384	10
4		含 280mM 蔗糖 、 10mM NaCl、1mM柠 檬酸盐的CNE17,	10:1	1032	3184	3.1
5	1 μ g RSV-F**	含 280mM 蔗糖 、 10mM NaCl、1mM柠 檬酸盐、0.5% (w/v) 和普流罗尼克F127的 CNE17	10:1	79	895	11.3

[0334] *vA375 复制子, **vA317 复制子。复制子在 HEPES 缓冲液中转录 (安碧 (Ambion)), 然后 (i) LiCl 沉淀, (ii) Tris 缓冲液中加帽, 和 (iii) LiCl 沉淀。所有组中每组有 8 只动物。

[0335] 不同缓冲液组成也影响粒度。如图 2A 所示, 添加糖 (蔗糖) 降低 RNA/CNE 复合物的粒度; 添加低浓度 NaCl (10mM) 也降低 RNA/CNE 复合物的粒度 (图 2A)。柠檬酸盐缓冲液不影响 RNA/CNE 复合物的粒度 (图 2B)。

[0336] 聚合物对粒度的影响示于图 2C。具体地, 添加 0.5% 普朗尼克 (pleuronic) F127 到 RNA 缓冲液使 RNA/CNE 复合物的粒度减小到复合前尺寸 (无 RNA 的 CNE 颗粒)。

[0337] 优选缓冲体系: 280mM 蔗糖, 10mM NaCl, 和 1mM 柠檬酸盐; 或 280mM 蔗糖, 10mM NaCl, 1mM 柠檬酸盐, 和 0.5% (w/v) 普流罗尼克 F127 中, CNE17 的总抗体效价和中和抗体效价示于表 5 (组 4 和 5)。

[0338] 实施例 4: N/P 比例对免疫原性的影响

[0339] 在该实施例中, 将编码 RSV F 抗原的 RNA 复制子 vA375 制成脂质体 (RV01), 其与 CNE17 以 10:1 的 N/P 复合, 并与 CMF32 或 CMF34 以 12:1、10:1、8:1、6:1 和 4:1 的理论 N/P 复合。理论 N/P 比例反映按制备制剂所用 DOTAP 和 RNA 的初始用量计算所得的 N/P 比例。实测 N/P 比例稍低于理论 N/P 比例, 因为在乳液制备过程中有少量 DOTAP 损失。GMT 数据反映各组内个体小鼠的平均 $\log_{10}$ 效价 (每组 8 只小鼠)。所有制剂在免疫之前用蔗糖调节至 300mOsm/kg。用 CMF32 或 CMF34 均未见明显的耐受性问题 (例如, 体重、早期血清细胞因

子)。

[0340] 实测 N/P 比例通过用带荷电气溶胶检测器 (Corona Ultra, 马萨诸塞州切姆斯福德) 的 HPLC 对 CNE 或 CMF 批次中的 DOTAP 成分进行定量来测定。CNE 和 CMF 样品稀释于异丙醇中, 并上样至 XTera C184.6x150mm3.5um 柱 (沃特世公司 (Waters), 马萨诸塞州米尔福德)。取色谱图中 DOTAP 峰的曲线下面积并用 DOTAP 标准曲线内插出浓度。用实测 DOTAP 浓度计算得到实测 N/P 比例。

[0341] 表 6 中的免疫原性数据显示, 当实测 N/P 比例为至少 4:1 时得到最佳效价。

[0342] 表 6

[0343]

制剂	RNA (μg/ 剂量)	理论 N/P 比例	实测 N/P 比例	2wp1 GMT	2wp2 GMT	2wp2/2wp1 (加强)
裸露	1	--	--	68	1019	15
RV01	1	--	--	9883	68116	7
CNE17	1	10:1	--	1496	6422	4
CMF3 2	1	12:1	9.4:1	2617	14246	5
	1	10:1 (第1 批)	6.0:1	1537	10575	7
	1	10:1 (第2 批)	8.0:1	2047	16244	8
	1	8:1	6.3:1	2669	7656	3
	1	6:1	4.7:1	1713	4715	3
	1	4:1	3.1:1	872	3773	4
CMF34	1	12:1	7.4:1	3141	10134	3
	1	10:1 (第1 批)	6.1:1	1906	11081	6

[0344]

制剂	RNA (μg/ 剂量)	理论 N/P 比例	实测 N/P 比例	2wp1 GMT	2wp2 GMT	2wp2/2wp1 (加强)
		批)				
	1	10:1 (第2 批)	7.0:1	2388	9857	4
	1	8:1	5:1	1913	8180	4
	1	6:1	3.7:1	1764	6209	4
	1	4:1	2.5:1	1148	4936	4

[0345] 序列

[0346] A317 (SEQ ID NO:1)

[0347] A375 (SEQ ID NO:2)

[0348] 可根据说明书内所引用参考文献的讲述最充分理解本说明书。说明书内的实施方式提供本发明实施方式的说明,并且不会对本发明范围构成限制。技术人员容易认识到本发明也包括许多其它实施方式。本公开引用的所有发表物和专利通过引用全文纳入本文。通过引用纳入的材料与本说明书冲突或不一致时,本说明书取代任何此类材料。本文引用任何参考文献并不视作承认这些文献是本发明的在先技术。

[0349] 本领域技术人员应了解或能够确定仅采用常规实验即可获得本文所述的本发明具体实施方式的许多等同形式。这类等同形式应包含在下列实施方式的范围内。

[0001]

序列表

<110> 诺华股份有限公司 (NOVARTIS AG)

<120> 包含核酸的水包油乳液

<130> PAT054719-WO-PCT

<140>

<141>

<150> 61/585,639

<151> 2012-01-11

<150> 61/505,091

<151> 2011-07-06

<160> 3

<170> PatentIn 3.5 版

<210> 1

<211> 12463

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注="人工序列说明: 合成的多核苷酸"

<400> 1

ataggcggcg catgagagaa gccagacca attacctacc caaaatggag aaagttcacg 60

ttgacatcga ggaagacagc ccattcctca gagctttgca gcggagcttc ccgcagtttg 120

aggtagaagc caagcaggtc actgataatg accatgctaa tgccagagcg ttttcgcac 180

tggtttcaaa actgatcgaa acggaggtgg acccatccga cacgatcctt gacattggaa 240

gtgcgcccgc ccgcagaatg tattctaage acaagtatca ttgtatctgt ccgatgagat 300

gtgcggaaga tccggacaga ttgtataagt atgcaactaa gctgaagaaa aactgtaagg 360

aaataactga taaggaattg gacaagaaaa tgaaggagct cggcggcgtc atgagcgacc 420

[0002]

ctgacctgga aactgagact atgtgcctcc acgacgacga gtcgtgtcgc tacgaagggc	480
aagtcgtgtg ttaccaggat gtatacgcggt ttgacggacc gacaagtctc tatcaccaag	540
ccaataaggg agtttagagtc gcctactgga taggctttga caccaccctt tttatgttta	600
agaacttgge tggagcatal ccatacact ctaccaactg ggccgaagaa accgtgttaa	660
cggctcgtaa cataggccta tgcagctctg acgttatgga gcggtcacgt agagggatgt	720
ccattcttag aaagaagtat ttgaaacat ccaacaatgt tctattctct gttagctcga	780
ccatctacca cgagaagagg gacttactga ggagctggca cctgccgtct gtatttcact	840
tacgtggcaa gcaaaattac acatgtcggt gtgagactat agttagtgc gacgggtacg	900
tcgttaaaag aatagctatc agtccaggcc tgtatgggaa gccttcaggc tatgtgcta	960
cgatgcaccg cgagggttc ttgtgtgca aagtgcaga cacattgaac ggggagaggg	1020
tctcttttcc cgtgtgcacg tatgtgccag ctacattgtg tgaccaaatg actggcatac	1080
tggcaacaga tgtcagtgcg gacgacgcgc aaaaactgct ggttgggctc aaccagcgta	1140
tagtcgtcaa cggtcgcacc cagagaaaca ccaataccat gaaaaattac cttttgccg	1200
tagtggccca ggcatttgc aggtgggcaa aggaatataa ggaagatcaa gaagatgaaa	1260
ggccactagg actacgagat agacagttag tcatgggtg ttgttgggt tttagaaggc	1320
acaagataac atctatttat aagcggccg ataccctaac catcataaa gtgaacagcg	1380
atttcactc attcgtgctg ccaggatag gcagtaacac attggagatc gggctgagaa	1440
caagaatcag gaaaatgtta gaggagcaca aggagccgtc acctctcatt accgccgagg	1500
acgtacaaga agctaagtgc gcagccgatg aggetaagga ggtgcgtgaa gccgaggagt	1560
tgcgcgcage tetaccacct ttggcagctg atgttgagga gccactctg gaagccgatg	1620
tagacttgat gtacaagag gctggggccg gctcagtgga gacacctcgt ggcttgataa	1680
aggttaccag ctacgatggc gaggacaaga tcggctctta cgtgtgctt tctccgcagg	1740

[0003]

ctgtactcaa gaggtaaaaa ttatcttgca tccacctctt cgctgaacaa gtcatagtga	1800
taacacactc tggccgaaaa gggcggttatg ccgtggaacc ataccatggt aaagtagtgg	1860
tgccagaggg acatgcaata cccgtccagg actttcaagc tctgagtga agtgccacca	1920
ttgtgtacaa cgaacgtgag ttcgtaaaca ggtacctgca ccatattgcc acacatggag	1980
gagcgtgaa cactgatgaa gaataattaca aaactgtcaa gccagcgag cagcagggcg	2040
aatacctgta cgacatcgac aggaaacagt gcgtcaagaa agaactagtc actgggctag	2100
ggctcacagg cgagctgggt gatcctecct tccatgaatt cgcctacgag agtetgagaa	2160
cacgaccage cgctccttac caagtaccaa ccataggggt gtatggcggt ccaggatcag	2220
gcaagtctgg catcattaaa agcgcagtca ccaaaaaaga tctagtgggt agcgccaaga	2280
aagaaaactg tgcagaaatt ataagggacg tcaagaaaat gaaagggctg gacgtcaatg	2340
ccagaactgt ggactcagtg ctcttgaatg gatgcaacaa ccccgtagag accctgtata	2400
ttgacgaage ttttgcctgt catgcaggta ctctcagagc gctcatagcc attataagac	2460
ctaaaaaggc agtgctctgc ggggatccca aacagtgcgg tttttttaac atgatgtgcc	2520
tgaagtgc ttttaaccac gagatttgca cacaagtctt ccacaaaage atctctcgcc	2580
gttgactaa atctgtgact tcggctgtct caaccttggt ttacgacaaa aaaatgagaa	2640
cgacgaatcc gaaagagact aagattgtga ttgacactac cggcagtacc aaacctaacg	2700
aggacgatct cattctcact tgtttcagag ggtgggtgaa gcagttgcaa atagattaca	2760
aaggcaacga aataatgacg gcagctgcct ctcaagggt gacccgtaaa ggtgtgtatg	2820
ccgttcggta caaggatgaat gaaaatcttc tgtacgcacc cacctcagaa catgtgaacg	2880
tcctactgac ccgcacggag gaccgcatcg tgtggaaaac actagccggc gacctatgga	2940
taaaaacact gactgccaag taccctggga atttcactgc cacgatagag gagtggcaag	3000
cagagcatga tgccatcatg aggcacatct tggagagacc ggacctacc gacgtcttcc	3060

[0004]

agaataaggc aaacgtgtgt tgggccaagg ctttagtgcc ggtgctgaag accgctggca	3120
tagacatgac cactgaacaa tggaacactg tggattatit tgaaacggac aaagctcact	3180
cagcagagat agtatitgaac caactatgcg tgaggttctt tggactcgat ctggactccg	3240
gtctatititc tgcacccact gtcccgttat ccattaggaa taatcaetgg gataactccc	3300
cgtcgcctaa catgtacggg ctgaataaag aagtggtcgg tcagctctct cgcaggtacc	3360
cacaactgcc tcgggcagtt gccactggaa gagtctatga catgaacact ggtacactgc	3420
gcaattatga tccgcgcata aacctagtac ctgtaaacag aagactgcct catgctttag	3480
tcctccacca taatgaacac ccacagagtg actttttctt attcgtcagc aaattgaagg	3540
gcagaactgt cctggtggtc ggggaaaagt tgtccgtccc aggcaaaatg gttgactggt	3600
tgtcagaccg gccctagagct accttcagag ctccgctgga tttaggcctc ccaggtgatg	3660
tgcccaaata tgacataata tttgttaatg tgaggacccc atataaatac catcactatc	3720
agcagtgtga agaccatgcc attaagctta gcatgttgac caagaaagct tgtctgcctc	3780
tgaatcccg cggaacctgt gtcagcatag gttatggtta cgctgacagg gccagcgaaa	3840
gcatcattgg tgctatagcg cggcagttca agttttcccg ggtatgcaaa ccgaaatcct	3900
cacttgaaga gacggaagtt ctgtttgtat tcattgggta cgatcgcaag gcccgtacgc	3960
acaatectta caagctttca tcaaccttga ccaacattta tacaggttcc agactccacg	4020
aagccggatg tgcacctca tatcatgttg tgcgagggga tattgccacg gccaccgaag	4080
gagtgattat aaatgctgct aacagcaaag gacaacctgg cggaggggtg tgcggagcgc	4140
tgtataagaa attcccggaa agcttcgatt tacagccgat cgaagtagga aaagcgcgac	4200
tggtaaaagg tgcagctaaa catatcatte atgccgtagg accaaaacttc aacaaagttt	4260
cggagggtta aggtgacaaa cagttggcag aggettatga gtccatcgct aagattgtca	4320
acgataacaa ttacaagtca gtagcgattc cactgtttgc caccggcctc ttttccggga	4380

[0005]

acaaagatcg actaacccaa tcattgaacc atttgctgac agcttttagac accactgatg	4440
cagatgtagc catatactgc agggacaaga aatgggaaat gactctcaag gaagcagtgg	4500
ctaggagaga agcagtggag gagataigca tatccgacga ctcttcagtg acagaacctg	4560
atgcagagct ggtgagggtg catccgaaga gttcttttggc tggaaggaag ggctacagca	4620
caagcgatgg caaaactttc tcataatttg aagggaccaa gtttcaccag gcggccaagg	4680
atatagcaga aattaatgcc atgtggcccg ttgcaacgga ggccaatgag caggtatgca	4740
tgtatatcct cggagaaaagc atgagcagta ttaggtcgaa atgccccgtc gaagagtcgg	4800
aagccitccac accacctage acgtgcctt gcttgtgcat ccatgccatg actccagaaa	4860
gagtacagcg cctaaaagcc tcacgtccag aacaaattac tgtgtgctca tcctttccat	4920
tgccgaagta tagaatcact ggtgtgcaga agatccaatg ctcccagcct atattgttct	4980
caccgaaagt gcctgcgtat attcatccaa ggaagtatct cgtggaaaca ccaccggtag	5040
acgagactcc ggagccatcg gcagagaacc aatccacaga ggggacacct gaacaaccac	5100
cacttataac cgaggatgag accaggacta gaacgcctga gccgatcacc atcgaagagg	5160
aagaagagga tagcataagt ttgctgtcag atggcccgcac ccaccaggtg ctgcaagtgc	5220
aggcagacat tcacgggccc cctctgtat ctagctcacc ctggtccatt cctcatgcat	5280
ccgactttga tgtggacagt ttatccatac ttgacacctt ggaggagct agcgtgacca	5340
gcggggcaac gtcagccgag actaactctt acttcgcaaa gattatggag ttictggcgc	5400
gaccggtgcc tgcgcctcga acagtattca ggaacctcc acatcccgct ccgcgcacaa	5460
gaacaccgtc acttgcaccc agcagggcct gctcgagaac cagcctagtt tccacccgc	5520
caggcgtgaa tagggtgate actagagagg agctcgaggc gcttaccgcc tcacgeactc	5580
ctagcaggtc ggtctcgaga accagcctgg tctccaaccc gccaggcgta aatagggtga	5640
ttacaagaga ggagtttgag gcgttcgtag cacaacaaca atgacgggtt gatgcgggtg	5700

[0006]

catacatctt ttctctcgac accggtcaag ggcatttaca acaaaaatca gtaaggcaaa	5760
cgggtgctatc cgaagtgggtg ttggagagga ccgaattgga gatttcgtat gccccgcgc	5820
tcgaccaaga aaaagaagaa ttactacgca agaaattaca gttaaatccc acacctgcta	5880
acagaagcag ataccagtcc aggaaggtgg agaacatgaa agccataaca gctagacgta	5940
ttctgcaagg cctagggcat tatttgaagg cagaaggaaa agtggagtgc taccgaaccc	6000
tgcatectgt tcctttgtat tcactagtgt tgaaccgtgc cttttcaage cccaaggteg	6060
cagtgggaagc ctgtaacgcc atgttgaaag agaactttcc gactgtggct tcttactgta	6120
ttattccaga gtacgatgcc tatttggaca tggttgacgg agcttcatgc tgccttagaca	6180
ctgccagttt ttgccctgca aagctgcgca gcittccaaa gaaacactcc tatttggaac	6240
ccacaatacg atcggcagtg ccttcagcga tccagaacac gctccagaac gtccctggcag	6300
ctgccacaaa aagaaatgc aatgtcacgc aaatgagaga attgcccgta ttggattcgg	6360
cggcctttta tgtggaatgc ttcaagaaat atgcgtgtaa taatgaatat tgggaaacgt	6420
ttaaagaaaa ccccatcagg ctactgaag aaaacgtggt aaattacatt accaaattaa	6480
aaggacaaaa agctgctgct ctttttgcga agacacataa tttgaatatg ttgcaggaca	6540
taccaatgga caggtttgta atggacttaa agagagacgt gaaagtgact ccaggaacaa	6600
aacatactga agaacggccc aaggtacagg tgatccagge tgccgatecg ctagcaacag	6660
cgtatctgtg cggaatccac cgagagctgg ttaggagatt aaatgcggtc ctgcttccga	6720
acattcatac actgtttgat atgtcggctg aagactttga cgtattata gccgagcact	6780
tccagcctgg ggatttgttt ctggaaactg acatcgcgtc gtttgataaa agtgaggacg	6840
acgccatggc tctgaccgcg ttaatgattc tggaagactt aggtgtggac gcagagctgt	6900
tgacgctgat tgaggcggct ttccgcgaaa tticatcaat acatttgccc actaaaacta	6960
aatttaaatt cggagccatg atgaaatctg gaatgttccct cacactgttt gtgaacacag	7020

[0007]

tcattaacat tgtaatcgca agcagagtgt tgagagaacg gctaaccgga tcaccatgtg	7080
cagcattcat tggagatgac aatatcgtga aaggagtcaa atcggacaaa ttaatggcag	7140
acaggtgcgc cacctggttg aatatggaag tcaagattat agatgctgtg gtgggcgaga	7200
aagcgccetta tttctgtgga gggtttattt tgtgtgaactc cgtgaccggc acagcgtgcc	7260
gtgtggcaga cccctaaaa aggcgtgtta agcttgcaa acctctggca gcagacgatg	7320
aacatgatga tgacaggaga agggcattgc atgaagagtc aacacgctgg aaccgagtgg	7380
gtattctttc agagcigtgc aaggcagtag aatcaaggta tgaaacgta ggaacttcca	7440
tcatagttat ggccatgact actctagcta gcagtgttaa atcattcagc tacctgagag	7500
gggcccctat aactctctac ggctaacctg aatggactac gacatagtct agtcgacgcc	7560
accatggaac tctgtatcct gaaggccaac gccatcacca ccatcctgac cgccgtgacc	7620
ttctgcttcg ccagcggcca gaacatcacc gaggaattct accagagcac ctgcagcgcc	7680
gtgagcaagg gctacctgag cgccctgcgg aceggctggt acaccagcgt gatcaccatc	7740
gagctgtcca acatcaaaga aaacaagtgc aacggcacccg acgccaaggt gaaactgac	7800
aagcaggaac tggacaagta caagaacgcc gtgaccgagc tgcagctgct gatgcagagc	7860
acccccgcca ccaacaaccg ggccagaaga gagctgcccc ggttcatgaa ctacacctg	7920
aacaacgcca agaaaaccaa cgtgaccctg agcaagaagc ggaagcggcg gttcctgggc	7980
ttcctgctgg gcgtgggcag cgccatcgcc agcgggggtg ccgtgtccaa ggctctgcac	8040
ctggaaggcg aggtgaacaa gatcaagtcc gccctgctgt ccaccaacaa ggccgtggtg	8100
tcctgagca acggcgtgag cgtgctgacc agcaaggctc tggatctgaa gaactacatc	8160
gacaagcagc tgctgcccac cgtgaacaag cagagctgca gcacagcaa catcgagacc	8220
gtgatcgagt tccagcagaa gaacaaccgg ctgctggaaa tcacccggga gttcagcgtg	8280
aacgccggcg tgaccacccc cgtgagcacc tacatgtgta ccaacagcga gctgctgtcc	8340

[0008]

ctgatcaatg acatgcccac caccaacgac cagaaaaagc tgatgagcaa caacgtgcag	8400
atcgtgcggc agcagagcta ctccatcatg agcatcatca aagaagaggt gctggcctac	8460
gtgggtgcage tgeccctgta cggcgtgate gacacccctt gctggaagct gcacaccage	8520
ccctgtgca ccaccaaac caaagagggc agcaacatct gectgaccg gaccgaccg	8580
ggctgggtact ggcacaacgc cggcagcgtg agcttcttcc cccaagccga gacctgcaag	8640
gtgcagagca accgggtggt ctgcgacacc atgaacagcc tgacctgcc ctccgaggtg	8700
aacctgtgca acgtggacat cttaacccc aagtacgact gcaagatcat gacctccaag	8760
accgacgtga gcagctccgt gatcacctcc ctgggcgcca tcgtgagctg ctacggcaag	8820
accaagtgca ccgccagcaa caagaaccgg ggcatcatca agaccttcag caacggctgc	8880
gactacgtga gcaacaaggc cgtggacacc gtgagcgtgg gcaacacact gtactacgtg	8940
aataagcagg aaggcaagag cctgtacgtg aagggcgagc ccatcatcaa ctctacgac	9000
ccctggtgt tcccagcga cgagttcgac gccagcatca gccaggtaa cgagaagatc	9060
aaccagagcc tggecttcat ccggaagagc gacgagctgc tgcacaatgt gaatgccggc	9120
aagagcacca ccaatatcat gateaccaca atcatcatcg tgatcattgt gatcctgctg	9180
tctctgattg ccgtgggcct gctgctgtac tgcaaggccc gcagcaccct tctgacctg	9240
tccaaggacc agctgtccgg catcaacaat ategccttct ccaactgaag tctagacggc	9300
gcgcccacc agcgccgca tacagcagca attggaagc tgcttacata gaactcggg	9360
cgattggcat gccgccttaa aatttttatt ttatttttct tttcttttcc gaatcggatt	9420
ttgtttttta tatttcaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa agggtcggca	9480
tgcatctcc acctctcgc ggtccgacct ggcatccga aggaggacgc acgtccactc	9540
ggatggctaa gggagagcca cgtttaaacc agctccaatt cgccttatag tgagtcgtat	9600
tacgcgcgct cactggccgt cgttttaciaa cgtcgtgact gggaaaaccc tggcgttacc	9660

[0009]

caacttaatc gccttgcagc acatccccct ttgccagct ggcgtaatag cgaagaggcc	9720
cgcaccgata gcccttccca acagttgcgc agcctgaatg gcgaatggga cgcgccctgt	9780
agcggcgeat taagcgcggc ggggtgtggtg gttacgcgca gcgtgaccgc tacacttgcc	9840
agcgccctag cgccegetcc tttegettte ttcccttccct ttctogccac gttegcgggc	9900
tttccccgtc aagctctaaa tcgggggctc cctttagggt tccgatttag tgctttacgg	9960
cacctcgacc ccaaaaaact tgattagggt gatggttcac gtagtgggcc atcgccctga	10020
tagacggttt ttgcctttt gacgttggag tccacgttct ttaatagtgg actcttgctc	10080
caaactggaa caacactcaa ccctatctcg gtctattctt ttgatttata agggattttg	10140
ccgatttcgg cctattgggt aaaaaatgag ctgatttaac aaaaatttaa cgcgaatttt	10200
aacaaaatat taacgcttac aatttaggtg gcacttttcg gggaaatgtg cgcggaacce	10260
ctatttggtt atttttctaa atacattcaa atatgtatcc gctcatgaga caataaccct	10320
gataaatgct tcaataatat tgaaaaagga agagtatgag tattcaacat ttccgtgtcg	10380
cccttattcc cttttttgcg gcattttgcc ttctgtttt tgctcaccca gaaacgttg	10440
tgaaagtaaa agatgetgaa gatcagttgg gtgcacgagt gggttacatc gaactggatc	10500
tcaacagcgg taagatcctt gagagttttc gcccgaaga acgttttcca atgatgagca	10560
cttttaaagt tctgtatgt ggcgcggtat tatccgtat tgacgcggg caagagcaac	10620
tcggtcgccg catacactat tctcagaatg acttggttga gtactacca gtcacagaaa	10680
agcatcttac ggatggcatg acagtaagag aattatgcag tgctgccata accatgagt	10740
ataacactgc ggccaactta cttctgacaa cgatcggagg accgaaggag ctaaccgtt	10800
ttttgcacaa catgggggat catgtaactc gccttgatcg ttgggaaccg gagctgaatg	10860
aagccatacc aaacgacgag cgtgacacca cgatgcctgt agcaatggca acaacgttgc	10920
gcaaactatt aactggcgaa ctacttactc tagcttcccg gcaacaatta atagactgga	10980

[0010]

tggaggcgga taaagttgca ggaccacttc tgcgctcggc cettccggct ggctggttta	11040
ttgctgataa atctggagcc ggtgagcgtg ggtctcggg tatcattgca gcactggggc	11100
cagatggtaa gccctcccgat atcgtagtta tetacacgac ggggagtcag gcaactatgg	11160
atgaacgaaa tagacagatc gctgagatag gtgcctcact gattaagcat tggtaactgt	11220
cagaccaagt ttactcatat ataactttaga ttgatttaaa acttcatttt taatttaaaa	11280
ggatctaggt gaagatccct tttgataatc tcatgaccaa aatcccttaa cgtgagtttt	11340
cgttccactg agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga gatcttttt	11400
ttctgcgctt aatctgctgc ttgcaaacaa aaaaaccacc gctaccagcg gtggtttggt	11460
tgccggatca agagctacca actctttttc cgaaggtaac tggtctcagc agagcgcaga	11520
taccaaatac tgttttctta gtgtagccgt agttaggcca ccacttcaag aactctgtag	11580
caccgcctac atacctcgtc ctgctaatec tgttaccagt ggctgctgcc agtggcgata	11640
agtctgtctt taccgggttg gactcaagac gatagttacc ggataaggcg cagcggtcgg	11700
gctgaacggg gggttcgtgc acacagccca gcttgagcg aacgacctac accgaactga	11760
gataacctaca gcgtgagcta tgagaaagcg ccacgettcc cgaagggaga aaggcggaca	11820
ggtatccggt aagcggcagg gtcggaacag gagagcgac gagggagctt ccagggggaa	11880
acgcctggta tctttatagt cctgtcgggt ttgccacct ctgacttgag cgtcgatttt	11940
tgtgatgctc gtcagggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg gcctttttac	12000
ggttcctggc cttttgctgg ccttttctc acatgttctt tcttgcgtta tccccgatt	12060
ctgtggataa ccgtattacc gcctttgagt gagetgatac cgtcgcgcgc agccgaacga	12120
ccgagcgcag cgagtcagtg agcgaggaag cggaagagcg cccaatacgc aaaccgcctc	12180
tccccgcgcg ttggccgatt cattaatgca gctggcacga caggtttccc gactggaaag	12240
cgggcagtga gcgcaacgca attaatgtga gttagctcac tcattaggca ccccaggctt	12300

[0011]

tacactttat gctcccggt cgtatgttgt gtggaattgt gagcggataa caatttcaca	12360
caggaaacag ctatgaccat gattacgcca agcgcgcaat taaccctcac taaagggaac	12420
aaaagctggg taccgggccc acgcgtaata cgactcacta tag	12463

<210> 2

<211> 11702

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注="人工序列说明：合成的多核苷酸"

<400> 2

gcagtcacca aaaaagatct agtgggtgagc gccaaagaaag aaaactgtgc agaaattata	60
agggacgtca agaaaaatgaa agggctggac gtcaatgccca gaactgtgga ctcaagtctc	120
ttgaatggat gcaaacaccc cgtagagacc ctgtatattg acgaagcttt tgcctgtcat	180
gcaggtactc tcagagcgct catagccatt ataagaccta aaaaggcagt gctctgcggg	240
gatcccaaac agtgcggttt ttttaacatg atgtgcctga aagtgcattt taaccacgag	300
atttgcacac aagtcttcca caaaagcatc tctcgcggtt gcactaaatc tgtgacttgc	360
gtcgtctcaa ccttgtttta cgacaaaaaa atgagaacga cgaatccgaa agagactaag	420
attgtgattg acactaccgg cagtacccaa cctaagcagg acgatctcat tctcaattgt	480
ttcagagggt gggatgaagca gttgcaaata gattacaaag gcaacgaaat aatgacggca	540
gctgccctctc aagggtgac ccgtaaaggt gtgtatgccg ttcggtacaa ggtgaatgaa	600
aatcctctgt acgcacccac ctcaaacat gtgaacgtcc tactgaccgc cacggaggac	660
cgcacgtgt ggaaaacact agccggcgac ccatggataa aaacactgac tgccaagtac	720
cctgggaatt tcactgccac gatagaggag tggcaagcag agcatgatgc catcatgagg	780

[0012]

cacatcttgg agagaccgga ccctaccgac gtcttecaga ataaggcaaa cgtgtgttgg	840
gccaaaggctt tagtgccggt gctgaagacc gctggcatag acatgaccac tgaacaatgg	900
aacactgtgg attatittga aacggacaaa gctcactcag cagagatagt atigaaccaa	960
ctatgcgtga ggttctttgg actcgatctg gactccggtc tattttctgc acccactgtt	1020
ccgttatcca ttaggaataa tcaactgggat aactccccgt cgcctaacat gtaegggtg	1080
aataaagaag tggtcctga gctctctcgc aggtaccac aactgcctcg ggcagttgcc	1140
actggaagag tctatgacat gaacactggt acactgcgca attatgatcc gcgcataaac	1200
ctagtacctg taaacagaag actgcctcat gctttagtc tccaccataa tgaacacca	1260
cagagtgaact ttctctcatt cgtcagcaaa ttgaagggca gaactgtcct ggtggtcggg	1320
gaaaagtgtt ccgtcccagg caaaatggtt gactggtgt cagaccggcc tgaggctacc	1380
ttcagagctc ggctggattt aggcattcca ggtgatgtgc ccaaatatga cataatat	1440
gttaatgtga ggacccata taaataccat cactatcagc agtgtgaaga ccatgccatt	1500
aagcttagca tgttgaccaa gaaagcttgt ctgcactga atcccggcgg aacctgtgtc	1560
agcataggtt atggttacgc tgacagggcc agcgaagca tcattggtgc tatagcggg	1620
cagttcaagt ttcccggt atgcaaaccg aaatcctcac ttgaagagac ggaagttctg	1680
ttgtattca ttgggtacga tcgcaaggcc cgtacgcaca atccttaca gctttcatca	1740
acctgaacca acatttatac aggttccaga ctccacgaag ccggatgtgc accctcatat	1800
catgtggtgc gagggatat tgcacggcc accgaaggag tgattataaa tgctgctaac	1860
agcaaaggac aacctggcgg aggggtgtgc ggagcgtgt ataagaaatt cccggaaagc	1920
ttcgatttac agccgatcga agtaggaaaa gcgcgactgg tcaaaggtgc agctaaacat	1980
atcattcatg ccgtaggacc aaacttcaac aaagtttcgg aggttgaagg tgacaaacag	2040
ttggcagagg cttatgagtc catcgctaag attgtcaacg ataacaatta caagtcagta	2100

[0013]

gcgattccac tgttgtccac eggcatcttt tccgggaaca aagatcgact aacccaatca	2160
ttgaaccatt tgctgacagc tttagacacc actgatgcag atgtagccat atactgcagg	2220
gacaagaaat gggaaatgac tctcaaggaa gcagtggcta ggagagaagc agtggaggag	2280
atatgcatat ccgacgactc ttcagtgaca gaacctgatg cagagctggg gaggggtgcat	2340
ccgaagagtt ctttggctgg aaggaagggc tacagcaca gcgatggcaa aactttctca	2400
tatttgaag ggaccaagtt tcaccaggcg gccaaagata tagcagaaat taatgccatg	2460
tggcccgttg caacggaggc caatgagcag gtatgcatgt atatcctcgg agaaagcatg	2520
agcagtatta ggtegaatg ccccgtcgaa gagtcggaag cctccacacc acctagcacg	2580
ctgccittgt tgtgcatcca tgccatgact ccagaaagag tacagcgcct aaaagcctca	2640
cgtccagaac aaattactgt gtgctcatcc tttccattgc cgaagtatag aatcactggg	2700
gtgcagaaga tccaatgctc ccagcctata ttgtttctac cgaaagtgcc tgcgtatatt	2760
catccaagga agtatctcgt ggaaacacca ccggtagacg agactccgga gccatcggca	2820
gagaaccaat ccacagaggg gacacctgaa caaccaccac ttataaccga ggatgagacc	2880
aggactagaa cgcctgagcc gatcatcatc gaagaggaag aagaggatag cataagtttg	2940
ctgtcagatg gcccgaccca ccaggigctg caagtcgagg cagacattca cgggccgccc	3000
tctgtateta gctcatcctg gtccattcct catgcatccg actttgatgt ggacagtta	3060
tccatacttg acacctgga gggagctagc gtgaccagcg gggcaacgtc agccgagact	3120
aactcttact tcgcaaagag tatggagttt ctggcgcgac cggtcctgc gcctcgaaca	3180
gtattcagga acctccaca tcccgctccg cgcacaagaa caccgteact tgcaccagc	3240
agggcctgct cgagaaccag cctagtttcc accccgccag gcgtgaatag ggtgatcact	3300
agagaggagc tcgaggcgct taccctgtca cgcactccta gcaggtcggt ctcgagaacc	3360
agcctgggtct ccaaccgcc aggcgtaaat agggtgattt caagagagga gtttgaggcg	3420

[0014]

ttcgtagcac aacaacaatg acggtttgat gcggtgcat acatcttttc ctccgacacc	3480
ggtcaagggc atttacaaca aaaatcagta aggcaaacgg tgctatccga agtgggtgtg	3540
gagaggaccg aattggagat ttcgtatgcc ccgcgcctcg accaagaaaa agaagaatta	3600
ctacgcaaga aattacagtt aaatcccaca cctgctaaca gaagcagata ccagtccagg	3660
aagggtggaga acatgaaagc cataacagct agacgtattc tgcaaggcct agggcattat	3720
ttgaaggcag aaggaaaagt ggagtgtac cgaacctgc atcctgttcc ttigtattca	3780
tctagtgtga accgtgccit ttcaagcccc aaggtcgcag tggaagcctg taacgccatg	3840
ttgaaagaga actttccgac tgttgcttct tactgtatta ttccagagta cgatgcctat	3900
ttggacatgg ttgacggagc ttcattgtgc ttagacactg ccagtitttg ccttgcaaag	3960
ctgcgcagct ttccaaagaa acactcctat ttggaacca caatagatc ggcagtgcct	4020
tcagcgatcc agaacacgtc ccagaacgtc ctggcagctg ccacaaaaag aaattgcaat	4080
gtcacgcaaa tgagagaatt gcccgatttg gattcggcgg cctttaatgt ggaatgttc	4140
aagaaatatg cgtgtataaa tgaatattgg gaaacgttta aagaaaacce catcaggett	4200
actgaagaaa acgtggtaaa ttacattacc aaattaaaag gaccaaaagc tgctgtctct	4260
tttgcaaga cacataattt gaatatgttg caggacatac caatggacag gtitgtaatg	4320
gacttaaaga gagacgtgaa agtgactcca ggaacaaaac atactgaaga acggcccaag	4380
gtacaggatga tccaggtgc cgatccgcta gcaacagcgt atctgtgcgg aatccaccga	4440
gagctggtta ggagattaaa tgcggctctg ctccgaaca ttcatacact gtttgatatg	4500
tcggctgaag actttgacgc tattatagcc gagcacttcc agcctgggga ttgtgttctg	4560
gaaactgaca tcgcgtcgtt tgataaaaagt gaggacgacg ccatggctct gaccgcgtta	4620
atgattctgg aagacttagg tgtggacgca gagctgttga cgttgattga ggcggtttc	4680
ggcgaaattt catcaataca ttgcccact aaaactaaat ttaaattcgg agccatgatg	4740

[0015]

aaatctggaa tgttccctcac actgtttgtg aacacagtc ttaacattgt aatcgcaagc	4800
agagtgttga gagaacggct aaccggatca ccatgtgcag cattcattgg agatgacaat	4860
atcgtgaaag gagtcaaate ggacaaatta atggcagaca ggtgcgccac ctggttgaat	4920
atggaagtca agattataga tgctgtggtg ggcgagaaaag cgccttattt ctgtggaggg	4980
tttattttgt gtgactccgt gaccggcaca gcgtgccgtg tggcagaccc cctaaaaagg	5040
ctgtttaagc ttggcaaacc tctggcagca gacgatgaac atgatgatga caggagaagg	5100
gcattgcatg aagagtc aac acgtggaac cgagtgggta ttctttcaga gctgtgcaag	5160
gcagtagaat caaggtatga aaccgtagga acttccatca tagttatgge catgactact	5220
ctagctagca gtgttaaate attcagctac ctgagagggg cccctataac tctctacggc	5280
taacctgaat ggactacgac atagtctagt cgacgccacc atggaaactgc tgatcctgaa	5340
ggccaacgcc atcaccacca tctgaccgc cgtgaccttc tgcttcgcca gcggccagaa	5400
catcaccgag gaattctacc agagcacctg cagcgccgtg agcaagggt acctgagcgc	5460
cctgoggacc ggctgttaca ccagcgtgat caccatcgag ctgtccaaca tcaaagaaaa	5520
caagtgcaac ggcaccgacg ccaaggtgaa actgatcaag caggaaactgg acaagtacaa	5580
gaacgccgtg accgagctgc agctgctgat gcagagcacc cccgccacca acaaccgggc	5640
cagaagagag ctgccccggt tcatgaacta caccctgaac aacgccaaga aaaccaacgt	5700
gaccctgagc aagaagcgga agcggcggag cgccatcgcc agcgggggtg ccgtgtccaa	5760
ggtgctgcac ctggaaggcg aggtgaacaa gatcaagtcc gccctgctgt ccaccaacaa	5820
ggcctgtgtg tccctgagca acggcgtgag cgtgctgacc agcaagggtc tggatctgaa	5880
gaactacatc gacaagcagc tgctgcccac cgtgaacaag cagagctgca gcatcagcaa	5940
catcgagacc gtgatcgagt tccagcagaa gaacaaccgg ctgctggaag tcacccggga	6000
gttcagcgtg aacgccggcg tgaccacccc cgtgagcacc tacatgctga ccaacagcga	6060

[0016]

gctgctgtcc ctgatcaatg acatgcccac caccaacgac cagaaaaagc tgatgagcaa	6120
caacgtgcag atcgtgcggc agcagagcta ctccatcatg agcatcatca aagaagaggt	6180
gctggcctac gtgggtgcage tgccccgtga cggcgtgacgac gacaccccct gctggaagct	6240
gcacaccagc cccctgtgca ccaccaacac caaagagggc agcaacatct gctgacccg	6300
gaccgaccgg ggctgggtact gcgacaacgc cggcagcgtg agctttctcc occaagccga	6360
gacctgcaag gtgcagagca accgggtgtt ctgcgacacc atgaacagcc tgacctgcc	6420
ctccgagggtg aacctgtgca acgtggacat ctccaacccc aagtacgact gcaagatcat	6480
gacctccaag accgaagtga gcagctccgt gateacctcc ctgggcgcca tegtgagctg	6540
ctacggcaag accaagtgca ccgccagcaa caagaaccgg ggcatcatca agaccttcag	6600
caacggctgc gactacgtga gcaacaaggc cgtggacacc gtgagcgtgg gcaacacact	6660
gtactacgtg aataagcagg aaggcaagag cctgtacgtg aagggcgagc ccatcatcaa	6720
cttctacgac cccctgggtg tccccagcga cgagttcgac gccagcatca gccaggctaa	6780
cgagaagatc aaccagagcc tggccttcat ccggaagtcg gacgagctgc tgcacaatgt	6840
gaatgccggc aagagcacca ccaatatcat gatcaccaca atcatcatcg tgatcattgt	6900
gatcctgctg tctctgattg ccgtgggcct gctgctgtac tgcaaggccc gcagcacccc	6960
tgtgacctg tccaaggacc agctgtccgg catcaacaat atcgcttctt ccaactgaag	7020
tctagaeggc gcgccaccc agcggcgcga tacagcagca attggcaagc tgettacata	7080
gaactcgcgg cgattggcat gccgccitaa aatttttatt ttatttttct ttctttttcc	7140
gaatcggatt ttgtttttta ttttcaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	7200
aaaaaagaag agcgtttaaa cacgtgatat ctggcctcat gggccttctt ttactgccc	7260
gctttccagt cgggaaacct gtcgtgccag ctgcattaac atggtcatag ctgttttctt	7320
gcgtattggg cgctctccgc ttctctgctc actgactcgc tgcgctcggt cgttcgggta	7380

[0017]

aagcctgggg tgcetaatga gcaaaaggcc agcaaaaggc caggaaccgt aaaaaggccg	7440
cggtgctggc gtttttccat aggtccgcc cccctgacga gcatacaaaa aatcgacgt	7500
caagtcagag giggcgaaac ccgacaggac tataaagata ccaggcggtt cccctggaa	7560
gtccctctgt gcgtctctct gtccgaccc tgccgtttac cggataacct tccgccttc	7620
tcccttcggg aagcgtggcg cttctcata gctcacgtg taggtatctc agttcggtgt	7680
aggctgttcg ctccaagctg ggctgtgtgc acgaacccc cgttcagccc gaccgtgcg	7740
ctttatccgg taactatctt cttgagtcca acccggttaag acacgaacta tcgccactgg	7800
cagcagccac tggtaacagg attagcagag cgaggtatgt aggcggtgt acagagtct	7860
tgaagtgggt gcctaaactac ggctacacta gaagaacagt atttggatc tgcgtctgc	7920
tgaagccagt taccttcgga aaaagagttg gtagctcttg atccggcaaa caaaccaccg	7980
ctggtagcgg tggttttttt gtttgcagc agcagattac gcgcagaaaa aaaggatctc	8040
aagaagatcc tttgatcttt tctacggggt ctgacgtca gtggaacgaa aactcacgtt	8100
aagggttttt ggtcatgaat acacgggtgcc tgactgcgtt agcaatttaa ctgtgataaa	8160
ctaccgcatt aaagcttata gatgataagc tgtcaaacat gagaattctt agaaaaactc	8220
atcgagcacc aaatgaaact gcaatttatt catatcagga ttatcaatac catatttttg	8280
aaaaagccgt ttctgtaatg aaggagaaaa ctcaccgagg cagttccata ggatggcaag	8340
atcctgggtat cggctctgca ttcgactcg tccaacatca atacaacct ttaatttccc	8400
ctcgtcaaaa ataaggttat caagtgagaa atcaccatga gtgacgactg aatccggtga	8460
gaatggcaaa agcttatgca tttctttcca gacttggtca acaggccagc cattacgtc	8520
gtcatcaaaa tactctcat caaccaaacc gttattcatt cgtgattgcg cctgagcgag	8580
acgaaatagc cgatcgtgtg taaaaggaca attacaaaca ggaatcgaat gcaaccggcg	8640
caggaacact gccagcgcat caacaatatt ttcacctgaa tcaggatatt ctctaatatc	8700

[0018]

ctggaatgct gttttcccg ggcacgcagt ggtgagtaac catgcatcat caggagtacg	8760
gataaaatgc ttgatggtcg gaagaggcat aaattccgtc agccagtta gtctgacat	8820
ctcatctgta acatcattgg caacgtacc ttigccatgt ttcagaaaca acictggcgc	8880
atcggtcttc ccatacaatc gatagattgt cgcacctgat tgcccagacat tatcgcgagc	8940
ccatttatac ccatataaat cagcatecat gttggaattt aatcgcgcc tcgagcaaga	9000
cgtttcccg tgaatatggc tcataacacc cctgtatta ctgtttatgt aagcagacag	9060
ttttattgtt catgagcgga tacatatttg aatgtattta gaaaaataaa caaatagggg	9120
ttccgcgcac atttcccga aaagtgcac cttaaattga agcgttaata tttgttaaa	9180
attcgcgta aatttttgtt aaatcagctc attttttaac caataggccg aaatcggcaa	9240
aatcccttat aaatcaaaag aatagaccga gatagggttg agtggccgct acaggcgct	9300
cccattcgcc attcaggctg cgcaactgtt gggaaggcg tttcgggtcg ggcctcttcg	9360
ctattacgcc agctggcgaa agggggatgt gctgcaaggc gattaagttg ggtaacgcca	9420
gggttttccc agtcacacgc gtaatacgac tcaactataga taggcggcgc atgagagaag	9480
cccagaccaa ttacctacc aaaatggaga aagttcacgt tgacatcgag gaagacagcc	9540
cattcctcag agctttgcag cggagcttcc cgcagttga ggtagaagcc aagcaggtca	9600
ctgataatga ccatgcta at gccagagcgt tttegcattt ggttcaaaa ctgatcgaaa	9660
cggagggtga cccatccgac acgatacttg acattggaag tgcgcccgc cgcagaatgt	9720
attctaagca caagtatcat tgtatctgtc cgatgagatg tgcggaagat ccggacagat	9780
tgtataagta tgcaactaag ctgaagaaaa actgtaagga nataactgat aaggaattgg	9840
acaagaaaat gaaggagctc gccccgtca tgagcgacce tgacctggaa actgagacta	9900
tgtgcctcca cgacgacgag tcgtgtcgct acgaagggca agtcgctgtt taccaggatg	9960
tatacgcggt tgacggaccg acaagtctct atcaccaagc caataaggga gttagagtcg	10020

[0019]

cctactggat aggcctttgac accacccctt ttatgtttaa gaacttggct ggagcatatc	10080
catcatactc taccaactgg gccgacgaaa cegtgttaac ggctcgtaac ataggcctat	10140
gcagctctga cgttatggag cggtcacgta gagggatgic cattcttaga aagaagtatt	10200
tgaaaaccatc caacaatgtt ctattctctg ttggctcgac catctaccac gagaagaggg	10260
acttactgag gagctggcac ctgccgtctg tatttcactt acgtggcaag caaaattaca	10320
catgtcgggtg tgagactata gttagtgcg acgggtacgt cgtaaaga atagctatca	10380
gtccaggcct gtaagggaag cttcaggct atgtgtctac gatgcaccgc gagggattct	10440
tgtgtgcaa agtgacagac acattgaacg gggagagggt ctcttttccc gtgtgcacgt	10500
atgtgccagc tacatttgtt gaccaaata ctggcatact ggcaacagat gtcagtgcgg	10560
acgacgcgca aaaactgtg gttgggtca accagcgtat agtcgtcaac ggctgcaccc	10620
agagaaacac caatacatg aaaaattacc ttttgccgt agtggcccag gcatttgcta	10680
ggtgggcaaa ggaatataag gaagatcaag aagatgaaag gccactagga ctacgagata	10740
gacagttagt catgggtgtg tttgggctt ttagaaggca caagataaca tetatttata	10800
agcggccgga taccacaaacc atcatcaaag tgaacagcga tttccactca ttcgtgtgc	10860
ccaggatagg cagtaacaca ttggagatcg ggctgagaac aagaatcagg aaaatgttag	10920
aggagcacia ggagccgtca cctctcatta ccgccgagga cgtacaagaa gctaagtgcg	10980
cagccgatga ggctaaggag gtgcgtgaag ccgaggagt gcgcgcagct ctaccacctt	11040
tggcagctga tgttgaggag ccactcttg aagccgatgt agacttgatg ttacaagagg	11100
ctggggccgg ctacagtgag acacctctg gcttgataaa ggttaccagc tacgatggcg	11160
aggacaagat cggctcttac gctgtgctt ctccgcaggc tgtactcaag agtgaaaaat	11220
tatcttgcat ccacctctc gctgaacaag tcatagtgt aacacactct ggccgaaaag	11280
ggcgttatgc cgtggaacca taccatggta aagtagtgg gccagaggga catgcaatac	11340

[0020]

ccgtccagga ctttcaagct ctgagtgaaa gtgccaccat tgtgtacaac gaacgtgagt	11400
tcgtaaacag gtacctgcac catattgccca cacatggagg agcgctgaac actgatgaag	11460
aatattacaa aactgtcaag cccagcgagc acgacggcga atacctgtac gacategaca	11520
ggaaacagtg cgtcaagaaa gaactagtca ctgggctagg gctcacagc gagctggtg	11580
atcctccett ccatgaattc gcctacgaga gtctgagaac acgaccagcc gctccttacc	11640
aagtaccaac cataggggtg tatggcgtgc caggatcagg caagtctggc atcattaaaa	11700
gc	11702

<210> 3

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注="人工序列说明：合成的寡核苷酸"

<400> 3

aaaaaaaaa. aaaaaaaaaa. aaaaaaaaaa.

30

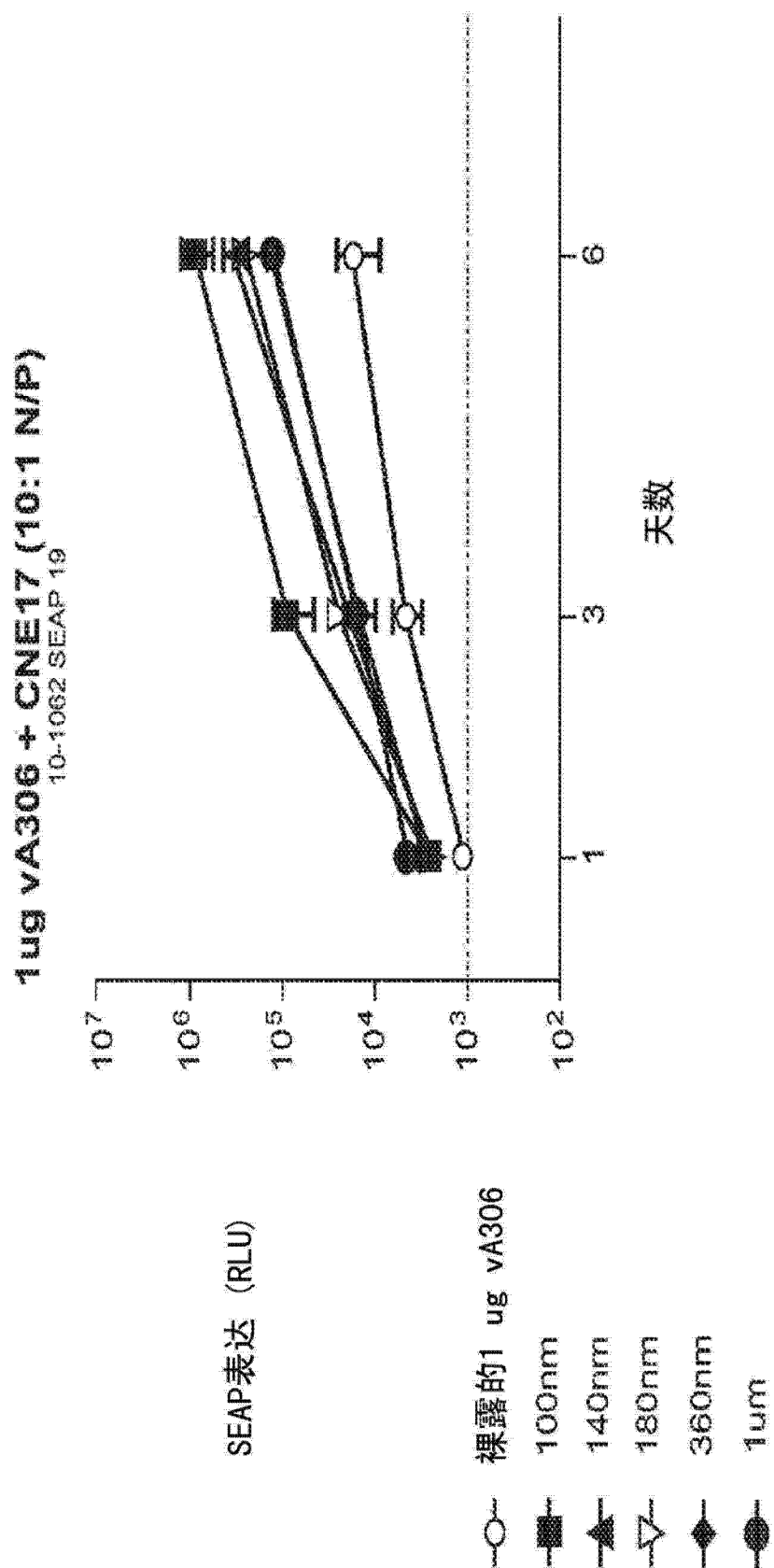


图 1A

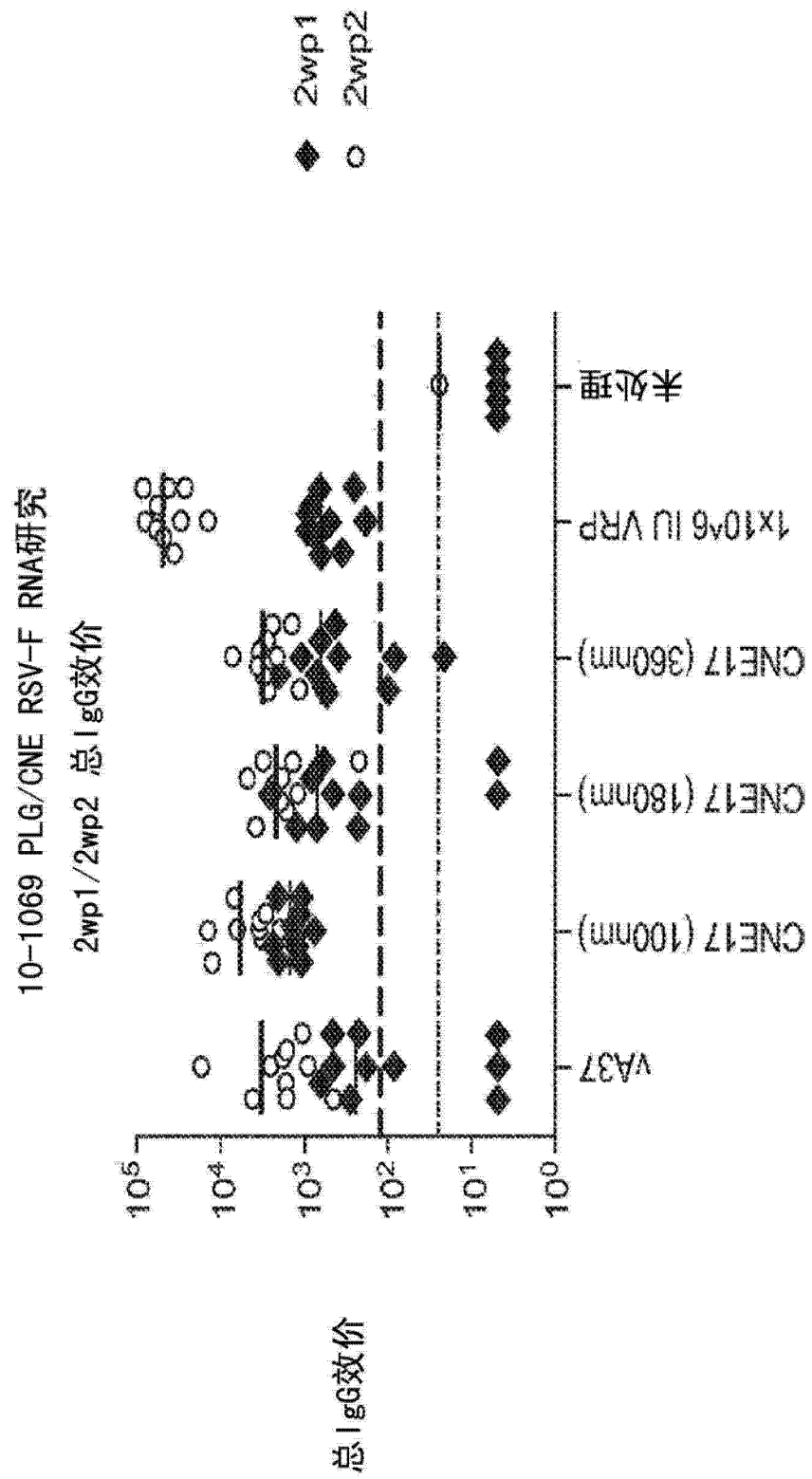


图 1B

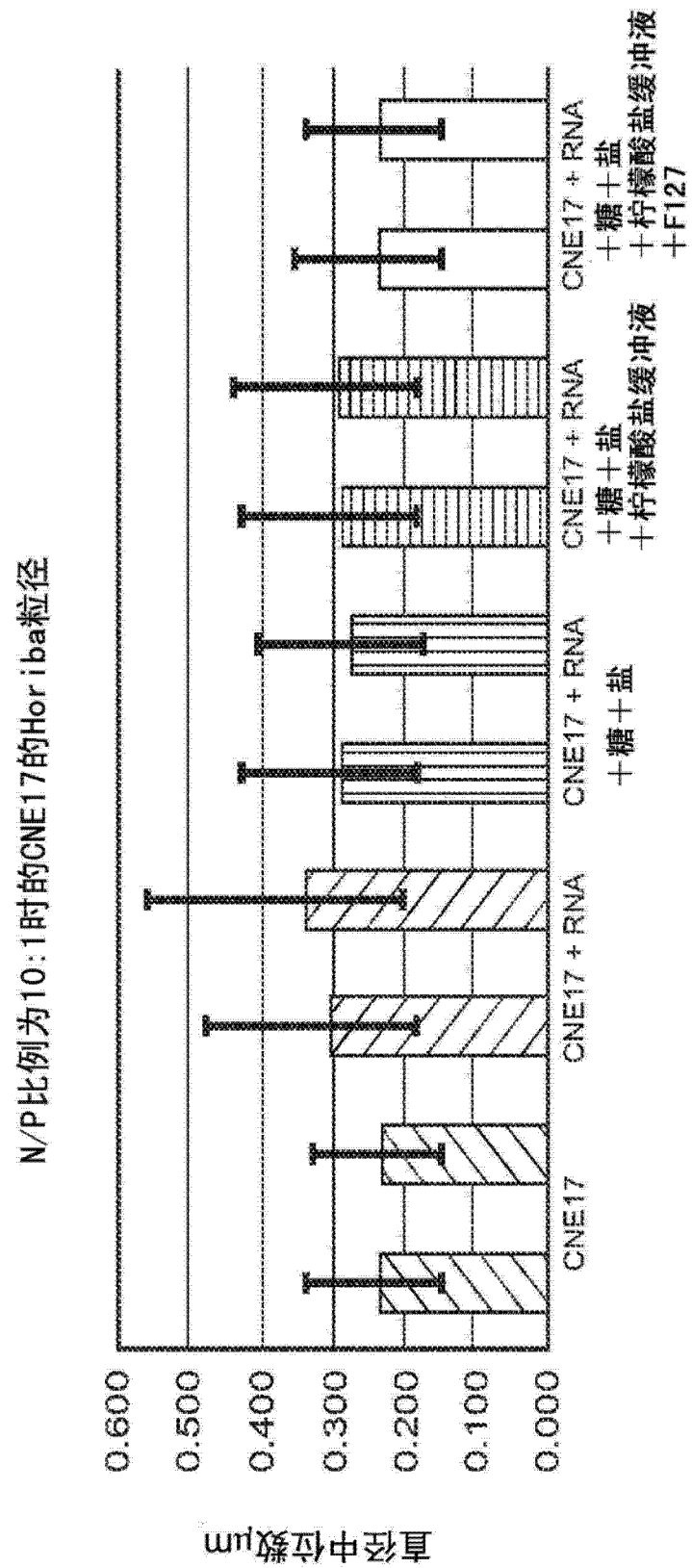


图 2A

含蔗糖和山梨糖醇缓冲液及不同柠檬酸盐浓度的CNE17的Horiba粒径

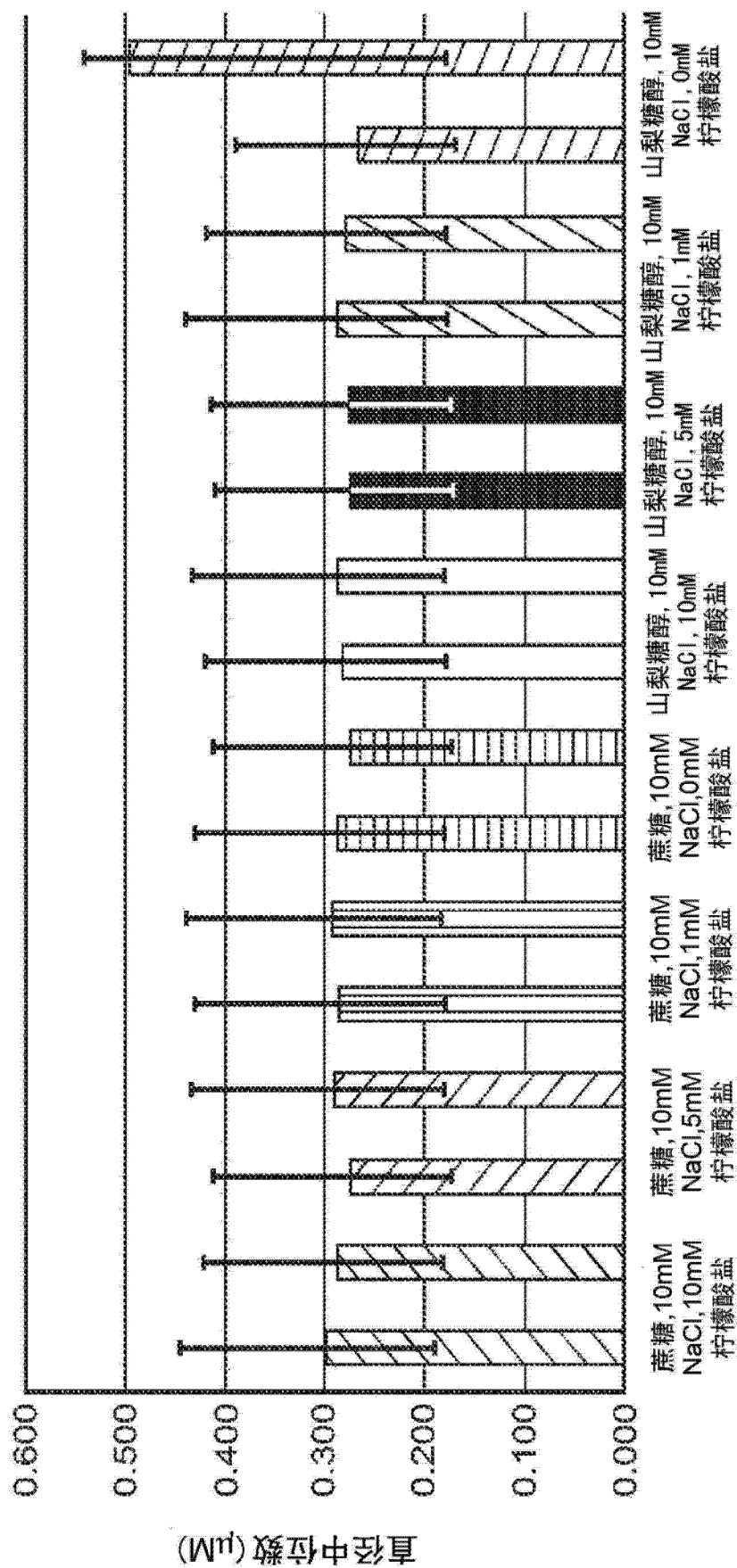


图 2B

含280 mM蔗糖、10 mM NaCl、1 mM柠檬酸盐和聚合物赋形剂的CNE17的Horiba粒径

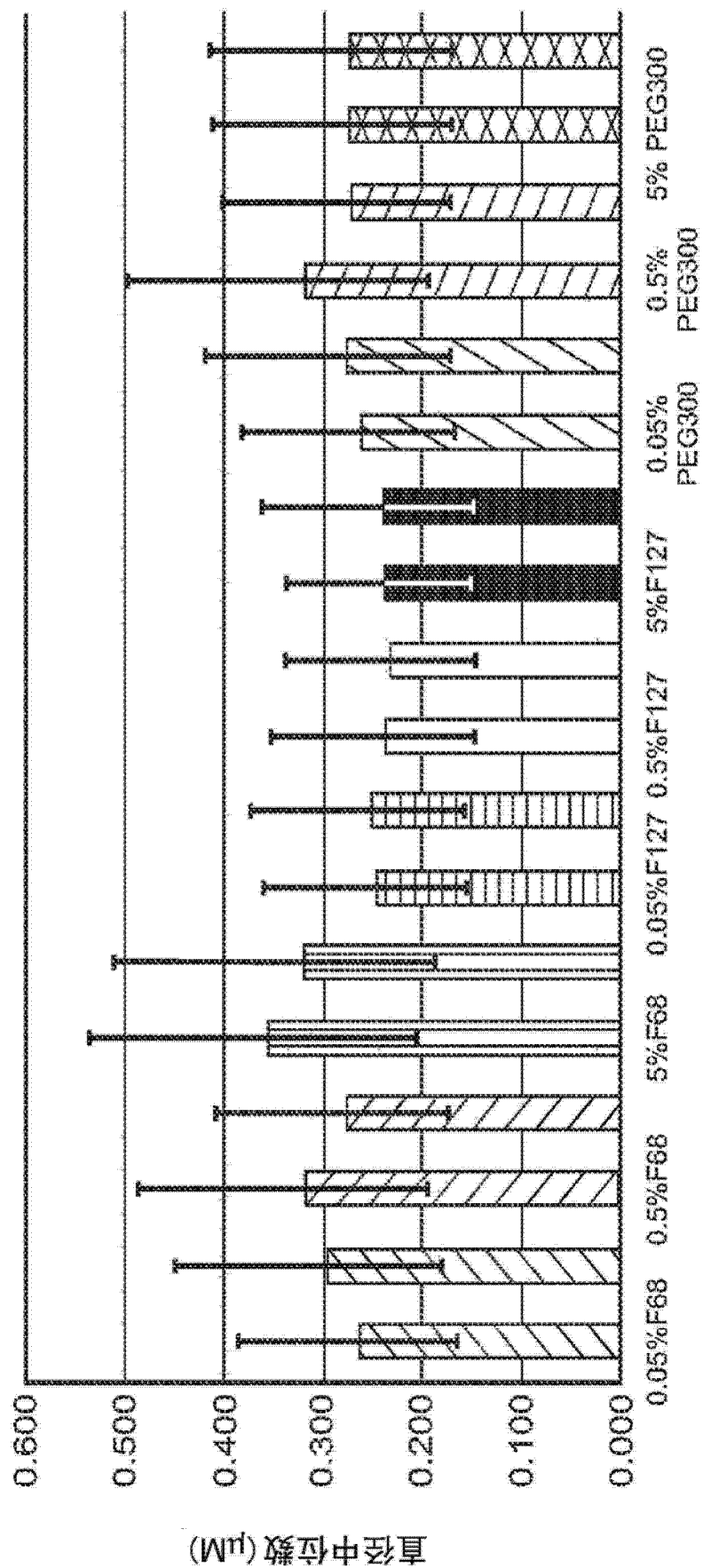


图 2C