



(12) 发明专利

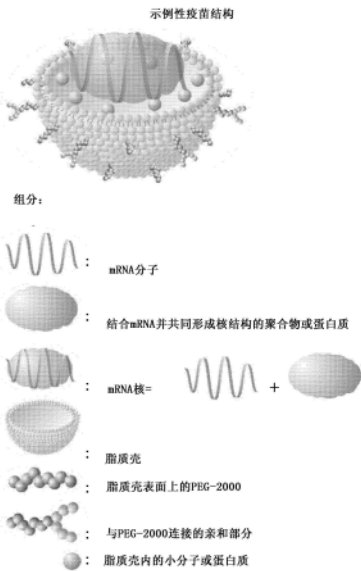
(10) 授权公告号 CN 109152830 B

(45) 授权公告日 2023. 11. 03

| | |
|---|------------------------------------|
| (21) 申请号 201880001680.5 | (72) 发明人 沈海法 |
| (22) 申请日 2018.01.26 | (74) 专利代理机构 北京永新同创知识产权代理有限公司 11376 |
| (65) 同一申请的已公布的文献号 申请公布号 CN 109152830 A | 专利代理师 杨胜军 |
| (43) 申请公布日 2019.01.04 | (51) Int.Cl. |
| (30) 优先权数据 62/451,575 2017.01.27 US | A61K 39/39 (2006.01) |
| (85) PCT国际申请进入国家阶段日 2018.10.18 | A61K 9/127 (2006.01) |
| (86) PCT国际申请的申请数据 PCT/US2018/015601 2018.01.26 | A61K 9/51 (2006.01) |
| (87) PCT国际申请的公布数据 W02018/140826 EN 2018.08.02 | A61P 35/00 (2006.01) |
| (73) 专利权人 卫理公会医院 地址 美国德克萨斯州 | (56) 对比文件 |
| | US 2011250225 A1, 2011.10.13 |
| | WO 2016161391 A2, 2016.10.06 |
| | 审查员 郝明媚 |
| | 权利要求书3页 说明书38页 |
| | 序列表3页 附图25页 |

(54) 发明名称
用于免疫疗法的核/壳结构平台

(57) 摘要
本发明公开了适用于将mRNA分子群体递送至哺乳动物细胞的生物相容性核/壳组合物。所公开的核-壳结构多组分组合物被优化用于将编码一种或多种癌症或肿瘤特异性抗原的mRNA递送至抗原呈递细胞群体,所述抗原呈递细胞包括例如人树突细胞、巨噬细胞和B细胞。本发明还公开了使用这些组合物作为治疗性癌症疫苗的方法。



1. 一种包含治疗性癌症疫苗的组合物,所述治疗性癌症疫苗包含编码至少第一肿瘤抗原的mRNA分子群体,其中所述群体包含在多个多聚复合物或蛋白质核粒子内,所述多聚复合物或蛋白质核粒子含有至少第一带正电荷的聚合物或蛋白质,并且其中所述多个多聚复合物或蛋白质核粒子本身被囊封在第一生物相容性脂质双层壳中;其中

所述生物相容性脂质双层包含:

(a) 45%至55%的1,2-二油酰-sn-甘油-3-乙基磷酸胆碱(EDOPC);

(b) 45%至55%的1,2-二油酰-sn-甘油-3-磷脂酰乙醇胺(DOPE);和

(c) 1%至2%的1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[氨基(聚乙二醇)-2000](DSPE-PEG)。

2. 权利要求1的组合物,其还包含囊封在所述生物相容性脂质双层内的选自CpG、聚(I:C)、明矾及其任何组合的佐剂。

3. 权利要求1或2的组合物,其还包含囊封在所述生物相容性脂质双层之间的空间内的免疫调节化合物。

4. 权利要求3的组合物,其中所述免疫调节化合物包含IL-12p70蛋白质、FLT3配体、或吡咯胺2,3-双加氧酶(IDO-1)抑制剂。

5. 权利要求4的组合物,其中所述吡咯胺2,3-双加氧酶(IDO-1)抑制剂是GDC-0919、INCB24360或其组合。

6. 权利要求1的组合物,其中所述带正电荷的聚合物或蛋白质包含鱼精蛋白、聚乙烯亚胺、聚(B-氨基酯)或其任何组合。

7. 权利要求1的组合物,其中所述mRNA分子群体编码至少一种对哺乳动物癌细胞具有特异性的抗原。

8. 权利要求7的组合物,其中所述mRNA分子群体编码至少一种癌症特异性肽或者其抗原性片段。

9. 权利要求7的组合物,其中所述mRNA分子群体编码至少一种肿瘤特异性肽或者其抗原性片段。

10. 权利要求7的组合物,其中所述mRNA分子群体编码至少一种癌症特异性多肽或者其抗原性片段。

11. 权利要求7的组合物,其中所述mRNA分子群体编码至少一种肿瘤特异性多肽或者其抗原性片段。

12. 权利要求7的组合物,其中所述mRNA分子群体编码至少一种癌症特异性蛋白质或者其抗原性片段。

13. 权利要求7的组合物,其中所述mRNA分子群体编码至少一种肿瘤特异性蛋白质或者其抗原性片段。

14. 权利要求7的组合物,其中所述mRNA分子群体编码至少一种选自HER2p66、HER2E75、HER2^{YVMA}、TRP2、p66及其任何组合的人肿瘤特异性肽。

15. 权利要求7的组合物,其中所述mRNA分子群体编码至少一种选自HER2p66、HER2E75、HER2^{YVMA}、TRP2、p66及其任何组合的人肿瘤特异性多肽。

16. 权利要求1的组合物,其还包含治疗剂。

17. 权利要求16的组合物,其中所述治疗剂包含选自以下的药剂:抗肿瘤剂,神经活性

剂,抗炎剂,抗血脂剂,抗感染剂,或其任何组合。

18. 权利要求16的组合物,其中所述治疗剂包含免疫调节剂,细胞毒剂,细胞生长抑制剂,或其任何组合。

19. 权利要求16的组合物,其中所述治疗剂包含激素。

20. 权利要求16的组合物,其中所述治疗剂包含受体激动剂,受体拮抗剂,或其任何组合。

21. 权利要求16的组合物,其中所述治疗剂包含肽。

22. 权利要求16的组合物,其中所述治疗剂包含蛋白质。

23. 权利要求16的组合物,其中所述治疗剂包含抗体,抗原结合片段,酶,或其任何组合。

24. 权利要求16的组合物,其中所述治疗剂包含DNA, RNA, 或其任何组合。

25. 权利要求16的组合物,其中所述治疗剂包含siRNA, mRNA, 核酶, 或其任何组合。

26. 权利要求16的组合物,其中所述治疗剂包含辅因子,类固醇,反义分子,或其任何组合。

27. 权利要求16的组合物,其中所述治疗剂包含选自以下的化合物:环磷酰胺,多柔比星,5-氟尿嘧啶,多西紫杉醇,紫杉醇,曲妥珠单抗,甲氨蝶呤,表柔比星,顺铂,卡铂,长春瑞滨,卡培他滨,吉西他滨,米托蒽醌,伊沙匹隆,艾日布林,拉帕替尼,卡莫司汀,氮芥,硫芥,四硝酸铂,长春碱,依托泊苷,喜树碱,及其任何组合。

28. 权利要求1的组合物,其还包含抗原性肽或其片段。

29. 权利要求1的组合物,其还包含抗原性融合多肽或其片段。

30. 权利要求1的组合物,其还包含一种或多种药学上可接受的载体、缓冲剂或者稀释剂。

31. 权利要求1的组合物,其还包含一种或多种药学上可接受的介质。

32. 权利要求1的组合物,其还包含一种或多种药学上可接受的赋形剂。

33. 权利要求1的组合物,其被配制用于向哺乳动物全身施用。

34. 权利要求1的组合物,其被配制用于向人类皮内或静脉内施用。

35. 一种分离的哺乳动物细胞群体,其包含权利要求1-34中任一项的组合物,其被表征为抗原呈递细胞。

36. 权利要求35的哺乳动物细胞群体,其为人树突细胞、巨噬细胞、B细胞或其组合。

37. 权利要求1-34中任一项的组合物在制造用于治疗哺乳动物对象中疾病、病症或功能障碍的药物中的应用;其中

所述疾病、病症或功能障碍为癌症的至少一种症状。

38. 权利要求37的应用,其中所述疾病被诊断为或被鉴定为难治性、转移性、复发性或治疗耐受性癌症。

39. 权利要求37的应用,其中所述癌症是转移性乳腺癌、转移性肺癌或转移性黑素瘤。

40. 权利要求37的应用,其中所述哺乳动物对象是人类、非人灵长类动物、伴侣动物、家畜或供食用动物。

41. 权利要求37的应用,其中所述组合物还包含化疗剂或第二种不同的治疗性癌症疫苗。

42. 一种试剂盒,其包含:1) 权利要求1-34中任一项的组合物;和2) 关于将所述组合物施用于有需要的哺乳动物的说明书,作为预防或者治疗哺乳动物中疾病、病症、异常病况或功能障碍的方案的一部分,其中所述疾病、病症、异常病况或功能障碍为癌症的一种或多种症状。

用于免疫疗法的核/壳结构平台

[0001] 发明背景

[0002] 相关申请的交叉参考

[0003] 本申请要求PCT国际专利申请号PCT/US2018/015601 (待审; 同期提交的, 代理人档案号37182.215W001) 以及2017年1月27日提交的美国临时专利申请号62/451,575 (待审; 代理人档案号37182.215PV01) 的优先权, 所述申请的内容通过对其明确引用而以其整体特别并入本文。

[0004] 关于联邦资助的研究或开发的声明

[0005] 本发明是在美国国防部(United States Department of Defense)授予的资助号W81XWH-12-1-0414和美国国立卫生研究院(National Institutes of Health)授予的资助号1R01-CA193880-01A1和U43-CA210181下由政府支持完成的。政府享有本发明的一定权利。

[0006] 联合研究协议各方的名称

[0007] 不适用。

技术领域

[0008] 本公开涉及分子生物学、肿瘤学并特别是针对mRNA疫苗优化的多组分组合物的领域。还公开了包括这些组合物的制剂和药物, 以及向哺乳动物细胞有效递送基于mRNA的疫苗的方法, 和用于治疗 and/或改善患病哺乳动物中一种或多种癌症或肿瘤的症状的方法。

背景技术

[0009] 治疗性疫苗

[0010] 疫苗通常由能够被身体免疫系统识别的抗原和一种或多种能够加强身体免疫反应的佐剂组成。然而, 治疗性癌症疫苗与用于预防传染性疾病的预防性疫苗完全不同, 因为该疫苗必须足以强大到生成杀伤癌细胞的免疫细胞而不是产生对抗病原体的抗体。治疗性疫苗在治疗多种类型的危及生命的疾病——包括癌症和传染病中具有巨大的潜力。决定癌症疫苗接种成功的关键问题是有力诱导针对选定抗原的抗肿瘤应答。蛋白质肽和DNA质粒二者传统上作为用于疫苗开发的抗原(Melero等人, 2014; Schwartzentruber等人, 2011; Kantoff等人, 2010)。蛋白质和肽相对容易制备并且可以大规模生产; 然而, 抗原肽的选择取决于患者独特的主要组织相容性复合物(MHC) 蛋白质的类型, 因此需要定制来与个体患者匹配。另一方面, DNA疫苗遭受低效力的困扰并冒着不受控制的基因组整合的风险(McNamara等人, 2015)。

[0011] 基于mRNA的癌症疫苗

[0012] mRNA近来已作为治疗性癌症疫苗的理想抗原来源而脱颖而出(Sullenger和Nair, 2016)。mRNA分子可被定制为编码多种抗原, 并通过触发抗原呈递细胞中的Toll样受体(TLR) 信号转导而充当佐剂(Heil等人, 2004; Diebold等人, 2004)。另外, mRNA介导的基因转移由于不需要核转位和转录而可以在非分裂细胞中发生, 而质粒DNA介导的基因转移在分

裂细胞中最有效(McNamara等人,2015;Kallen和Thess,2014)。

[0013] 由于带负电荷的mRNA分子不能直接进入抗原呈递细胞,所以通常通过电穿孔将mRNA分子转染到患者来源的树突细胞(DC)中来制备基于mRNA的疫苗(Van Tendeloo等人,2001)。然后将DC疫苗重新引回至患者用于肿瘤抗原合成、加工和呈递。许多DC疫苗已达到临床试验的不同阶段(Wilgenhof等人,2013)。然而,这种程序不允许大量生产现成的治疗性疫苗。

[0014] 制备mRNA疫苗的另一种途径是将mRNA分子包装在纳米粒子中并将它们直接接种到体内,疫苗在体内被抗原呈递细胞摄取。这种途径利用了抗原呈递细胞的高吞噬能力。鱼精蛋白凝聚的mRNA疫苗构成该组的重要部分,并且它们中的一些处于临床前研究和临床试验的不同阶段(Weide等人,2009)。用鱼精蛋白包装mRNA不仅能够使细胞摄取疫苗粒子,而且促进宿主细胞中MyD88依赖性TLR-7/8信号转导的刺激(Scheel等人,2005)。然而,mRNA降解是潜在的顾虑,因为裸mRNA的一部分暴露于体液并且易受血浆和组织RNA酶的攻击。另外,mRNA分子暴露于非抗原呈递细胞会冒着引发体内不良反应的风险。

[0015] 现有技术的不足

[0016] 工业界和学术界长期以来一直致力于开发有效的治疗性癌症疫苗,但到目前为止几乎没有取得成功。正在临床前和临床研究中测试的一种治疗性癌症疫苗类型是mRNA疫苗,其由凝聚在核结构(范围从~20纳米到几百纳米)中的mRNA分子构成。一旦mRNA疫苗被抗原呈递细胞摄取,mRNA就会在这些细胞内释放,然后用作模板来产生所编码的抗原。这种疫苗的一个实例是CuraVac mRNA疫苗。

[0017] 此类疫苗的主要问题是:1)mRNA分子暴露于体液,因此易受到组织、细胞和/或血浆酶的降解;2)“裸”mRNA分子能够与所有类型的免疫细胞相互作用,这可能引起不想要的副作用(例如分泌高水平的细胞因子);以及3)这样的mRNA没有被抗原呈递细胞很有效地内化。

[0018] 由于大规模癌症基因组测序工作和在预测免疫原性肿瘤突变中的技术进步,不断鉴定出肿瘤相关的新抗原(参见例如,Schumacher和Schreiber,2015;Shukla等人,2015;Yadav等人,2014)。这种资源已经为开发新的和改进的癌症疫苗提供了前所未有的机会。不幸的是,癌症疫苗的促成技术的发展已经落后。

[0019] 然而,诸如本文中公开的免疫疗法代表了癌症治疗的新途径。这些治疗剂可以基于特定癌细胞的独特遗传特征,从而使身体免受常规标准化疗药物的不必要攻击。本文公开的基于mRNA的疫苗具有在同一构建体内包含多种新抗原的灵活性,并且能够基于个体患者的独特突变谱来定制抗原肽的选择,使得精准或“个性化”医学成为可能。

发明内容

[0020] 本文所述的生物相容性壳/核多组分疫苗递送平台通过提供在一般意义上用于在刺激抗癌免疫的方法中将mRNA有效递送至抗原呈递细胞(例如树突细胞)并被所述抗原呈递细胞有效摄取的组合物,代表了克服本领域中这些和其他固有限制的重大进步。

[0021] 在总体和一般意义上,所公开的核/壳组合物可以将包装在“核”结构内并用含有外亲水性脂质双层的“壳”囊封的核酸分子(包括,例如,编码一种或多种癌症或肿瘤特异性抗原的mRNA)有效递送至一种或多种选定的哺乳动物细胞(包括,例如,一种或多种抗原呈

递细胞,如树突细胞、巨噬细胞和B细胞,但不限于此)。囊封所述内部疏水核的亲脂壳的存在保护所述核酸免于被组织酶降解或与其他免疫细胞相互作用。此外,当与常规的基于mRNA的治疗性疫苗相比,所述亲脂性壳还提供了所述组合物被抗原呈递细胞内化的增加,并刺激更有力的抗肿瘤免疫。

[0022] 在一个超越现有技术的重要进步中,所公开的核/壳多组分疫苗递送系统通过刺激强大的抗肿瘤免疫而准许了一种当前基于mRNA的癌症疫苗开发“瓶颈”的替代物,其优于构成现有基于mRNA的疫苗的常规单组分“仅核+核酸”结构。这些多组分亲水/疏水-壳/核有助于制备在刺激树突细胞成熟上以及因此在抗原加工和呈递上比常规mRNA疫苗明显更有力的mRNA疫苗。

[0023] 在特定实施方式中,本公开提供了核-壳结构的mRNA疫苗,其在刺激干扰素- β 、干扰素- α 和白细胞介素-12上明显比常规mRNA-核疫苗更有力。这样的多组分基于mRNA的、编码肿瘤抗原的治疗性疫苗在制备用于治疗哺乳动物的一种或多种疾病、特别是用于治疗/或改善哺乳动物癌症的一种或多种症状的药物中具有特别的用途。

[0024] 包含治疗性癌症疫苗的组合,其包含编码至少第一肿瘤抗原的mRNA分子群体,其中所述群体包含在多个多聚复合物(Polyplex)核粒子内,所述多聚复合物核粒子含有至少第一带正电荷的聚合物,并且其中所述多个多聚复合物核粒子本身被囊封在第一生物相容性脂质双层壳中。

[0025] 优选地,所述第一生物相容性脂质双层壳促进一种或多种哺乳动物抗原呈递细胞对所述多个多聚复合物核粒子的巨胞饮作用,所述抗原呈递细胞包括人树突细胞、人巨噬细胞和人B细胞,但不限于此。

[0026] 这样的组合物也可以进一步任选包含一种或多种佐剂,例如CpG、聚(I:C)、明矾、环GMP-AMP(cGAMP)、脂多糖(LPS)、单磷酸脂质A(MPLA)或其任何组合,所述佐剂囊封在所述生物相容性脂质双层内、包含在所述mRNA核内、或包含在所述核粒子和包围/围绕它们的包封亲水性磷脂双层之间的空间内。

[0027] 在某些实施方式中,用于制备所述核粒子的带正电荷的药剂将包括鱼精蛋白、聚乙烯亚胺、聚(B-氨基酯)、聚精氨酸、聚赖氨酸及其组合中的一种或多种。

[0028] 类似地,用于制备所述亲水壳组分的生物相容性磷脂将优选包括以下中的一种或多种:1,2-二油酰-sn-甘油-3-乙基磷酸胆碱(EDOPC);1,2-二油酰-sn-甘油-3-磷脂酰乙醇胺(DOPE);1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺N-[氨基(聚乙二醇)-2000](DSPE-PEG);1,2-二棕榈酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DPPC),1,2-二棕榈酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DPPE),0-乙基磷脂酰胆碱(EDPPC),胆固醇,及其组合。

[0029] 在某些实施方式中,所述生物相容性磷脂双层将优选包括:

[0030] (a) 约30%至约70%的1,2-二油酰-sn-甘油-3-乙基磷酸胆碱(“EDOPC”);

[0031] (b) 约70%至约30%的1,2-二油酰-sn-甘油-3-磷脂酰乙醇胺(“DOPE”);或

[0032] (c) 约0.5%至约5%的1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺N-[氨基(聚乙二醇)-2000](“DSPE-PEG”)。

[0033] 或者,所述生物相容性脂质双层可以优选包括:

[0034] (a) 约45%至约55%的EDOPC;

[0035] (b) 约55%至约45%的DOPE;和

[0036] (c)约1%至约2%的DSPE-PEG。

[0037] 在本发明的实践中,本文公开的组合物将优选包括编码至少一种抗原的核酸分子群体,所述核酸分子例如mRNA,所述抗原对一种或多种哺乳动物癌症或肿瘤细胞具有特异性。示例性的癌细胞特异性抗原包括但不限于肿瘤相关抗原,例如乳腺癌特异性HER2抗原E75和p66、黑素瘤特异性抗原TRP2以及肿瘤突变抗原[新抗原]例如在乳腺癌和肺癌的外显子20中有YVMA插入片段的HER2[HER2YVMA],以及由于癌症基因组中的突变而生成的那些抗原。示例性的癌症和肿瘤特异性抗原包括但不限于:HER2E75、HER2p66、HER2YVMA和TRP2。

[0038] 例如,本文公开的组合物优选适合于,当被引入合适的哺乳动物细胞时,增加I型干扰素(IFN-I)表达的水平;并且优选适合于增加IFN- α 4、IFN- β 以及它们的下游细胞因子如CCL-5中的一种或多种的表达。

[0039] 在某些实施方式中,所公开的组合物将适合于被引入到一种或多种类型的哺乳动物细胞群体中。这样的细胞包括但不限于树突细胞、巨噬细胞、B细胞、癌细胞或其组合。

[0040] 本文公开的组合物可以进一步任选包括一种或多种另外的治疗剂,包括,例如但不限于:药剂如免疫调节剂,抗肿瘤剂,神经活性剂,细胞毒剂,细胞生长抑制剂,抗炎剂,抗血脂剂,激素,受体激动剂,受体拮抗剂,抗感染剂,蛋白质,肽,抗体,抗原结合片段,酶, RNA, DNA, siRNA, mRNA, 核酶, 激素, 辅因子, 类固醇, 反义分子, 或其任何组合。在优选的实施方式中,所述免疫调节剂是选自以下的化合物:IL-12p70、蛋白质、FLT3配体[FLT3L]以及吡咯胺2,3-双加氧酶[IDO-1]的小分子抑制剂例如GDC-0919或INCB24360。

[0041] 在某些实施方式中,所述治疗剂可以包括(但不限于)一种或多种化合物如环磷酰胺、多柔比星、5-氟尿嘧啶、多西紫杉醇、紫杉醇、曲妥珠单抗、甲氨蝶呤、表柔比星、卡铂、长春瑞滨、卡培他滨、吉西他滨、米托蒽醌、伊沙匹隆(isabepilone)、艾日布林、拉帕替尼、卡莫司汀、氮芥、硫芥、四硝酸铂(例如顺铂)、长春碱、依托泊苷、喜树碱或其任何组合。

[0042] 在其他实施方式中,所述组合物可以进一步任选包括一种或多种抗原、抗原性多肽或其抗原性肽片段,包括例如由细胞单独[即,来自不同mRNA分子]或一起[即,来自一个mRNA分子]产生的多种抗原性肽。这样的抗原可以是可溶的,其中它们可以被纳入到由核的外部与所述外脂质双层的内表面限定的腔或容积中,或者在不溶性抗原的情况下,可以被纳入所述核结构内和/或所述脂质双层本身内。

[0043] 可溶性抗原的实例包括但不限于p66HER2抗原肽(HER2p66)及其同源物或抗原性片段。

[0044] 微溶性抗原的实例包括但不限于E75HER2抗原肽(HER2E75)及其同源物或抗原性片段。

[0045] 在某些实施方式中,本文公开的癌症疫苗递送组合物可以与一种或多种药学上可接受的载体、缓冲剂、稀释剂、介质或赋形剂混合,或与一种或多种表面活性剂、脂质体、类脂质体(niosomes)、醇质体(ethosomes)、转运体(transfersomes)、磷脂、鞘体(sphingosomes)、外泌体或由细胞自身产生的其他类型的囊泡混合。

[0046] 这样的组合物优选被配制用于向哺乳动物全身施用,并优选用于皮内或静脉内施用,肌肉内、腹膜内、结内或眼内施用,或者,以皮肤贴剂的形式施用于人类,并且特别是被配制用于与一种或多种抗原呈递细胞接触并被其摄取,所述抗原呈递细胞包括但不限于人树突细胞、巨噬细胞和B细胞。

[0047] 在某些实施方式中,所公开的基于mRNA的疫苗组合物可以被改变并配置为治疗试剂盒的一部分,所述治疗试剂盒包括所述组合物以及关于将所述组合物施用于有需要的哺乳动物例如人类癌症患者的至少第一套说明书。这样的试剂盒可用作预防、诊断、治疗或改善哺乳动物中癌症、过度增殖性病症或其他疾病、功能障碍、损伤或异常病况的一种或多种症状的方案的一部分,所述其他疾病包括但不限于传染性疾病[例如用于西尼罗病毒和锥虫病(Chagas)的疫苗]、心血管疾病[例如,预防心力衰竭的HSP60疫苗]等。

[0048] 本公开的另一方面是用于治疗或改善有需要的动物中的一种或多种癌症症状的方法。在总体和一般意义上,这种方法一般至少包括向所述动物施用有效量的一种或多种本文公开的基于mRNA的治疗性癌症疫苗组合物达足以治疗或改善所述动物中所述一种或多种癌症症状的时间的步骤。在一些实施方式中,所述癌症可以被诊断为或被鉴定为难治性、转移性、复发性或治疗耐受性癌症。

[0049] 这样的癌症的实例包括但不限于患病哺乳动物的乳腺癌、肺癌、结直肠癌、胃癌、胰腺癌、胶质母细胞瘤、头颈癌、白血病、淋巴瘤、多发性骨髓瘤、肝癌、肾癌、膀胱癌、黑素瘤和相关病况。

[0050] 在某些实施方式中,所述癌症可以是患病哺乳动物的转移性癌症如转移性乳腺癌、转移性肺癌、转移性黑素瘤或转移性结直肠癌、胃癌、胰腺癌、胶质母细胞瘤、头颈癌、肝癌、肾癌、膀胱癌或一种或多种相关病况。

[0051] 这样的方法可以进一步任选包括向所述动物施用治疗有效量的放射或另外的化学治疗剂的步骤,以单次施用,或在一天或多天的时期内、在一周或多周的时期内、或在一个月或多个月或更长的时期内以一系列多次施用。

[0052] 这种方法也可任选包括向受治疗的患病哺乳动物施用第二种不同的化疗剂或第二种不同的治疗性癌症疫苗的步骤。

[0053] 在另一个实施方式中,本公开还提供了向有需要的哺乳动物对象的一种或多种细胞、组织、器官或系统施用活性剂、并且特别是一种或多种抗癌抗原或一种或多种编码这种抗癌抗原的mRNA的方法。所述方法一般包括向有需要的哺乳动物对象提供一种或多种本文公开的组合物,其量和时间有效地将所述mRNA疫苗施用于存在于所述对象体内或体周围的一种或多种选定的组织、器官、系统或细胞中的细胞(例如,抗原呈递细胞,如树突细胞)群体。在特别优选的实施方式中,所述对象是人类,并且所述组合物包含mRNA抗原编码组分,所述组分包含在多聚复合物核粒子群体内,所述多聚复合物核粒子群体本身包含在外脂质双层内。

[0054] 所公开的组合物在各种体外、离体和体内治疗方案中具有特别的用途,并且它们可以被单独配制,或者,与一种或多种另外的药剂组合配制,所述另外的药剂包括但不限于一种或多种抗癌抗原、一种或多种抗原性肽、一种或多种诊断剂、一种或多种治疗剂、一种或多种细胞毒性剂、一种或多种化学治疗剂、一种或多种佐剂、一种或多种免疫刺激剂、一种或多种免疫调节剂或其任何组合,以用于各种治疗适应症,包括但不限于治疗或改善一种或多种人类癌症、过度增殖性病症、感染性疾病、心脏病等的症状。

[0055] 如本文所述,所公开的疫苗体系可以进一步任选包括一种或多种活性剂,例如,一种或多种预防剂、一种或多种治疗剂、一种或多种诊断剂、一种或多种疫苗、一种或多种显像剂、一种或多种放射标记物、一种或多种辅助剂、一种或多种化疗剂、一种或多种细胞毒

性剂、一种或多种检查点抑制剂药物[例如抗PD-1抗体,抗PD-L1抗体,抗-CTLA-4抗体等]或其任何组合。

[0056] 在相关实施方式中,本发明还提供治疗和/或治疗试剂盒,其包括一种或多种本文公开的基于核/壳的mRNA疫苗递送系统,通常与以下各项组合:一种或多种可药用的载体、一种或多种用于向目标对象施用所述组合物的装置以及关于在诊断或治疗哺乳动物疾病例如癌症等中使用所述组合物的一套或多套说明书。

[0057] 本发明还在总体和一般意义上提供了用于将mRNA分子群体有效递送至哺乳动物体内的哺乳动物细胞(包括,例如,树突细胞、巨噬细胞、B细胞或肿瘤细胞)群体的组合物和方法。这样的组合物优选以有效治疗或改善所述哺乳动物对象的一种或多种疾病或异常情况的量和时间施用于所述对象。在某些实施方式中,所述对象有风险、被诊断有或怀疑患有的一种或多种异常细胞增殖性病况,包括例如一种或多种癌症或其他过度增殖性病况。

[0058] 如本文所述,本公开的组合物可通过任何一种或多种常规施用方法施用于所述对象,所述施用方法包括但不限于静脉内、皮肤、皮下、或通过直接注射至所述对象体内或体周围的一种或多种细胞或一种或多种组织、器官或肿瘤。

[0059] 如本文进一步所述,在某些应用中,可能需要将从对象获得的细胞群体与本文公开的疫苗组合物离体接触,然后,随后将所生成的接触细胞重新引入所述对象体内。特别考虑这样的离体疗法可用于将所公开的mRNA疫苗引入人树突细胞群体,使所述活性成分与所述细胞接触,然后将所生成的转化细胞重新引回所述动物体内。优选地,被提取用于这种离体操作的树突细胞将是正在接受治疗的实际患者的树突细胞。

[0060] 在特定的实施方式中,本发明的mRNA疫苗组合物可以配制用于药物施用,并且优选用于施用于人类。这样的组合物可进一步包括一种或多种另外的治疗剂、化疗剂、佐剂或第二种不同的mRNA疫苗。

[0061] 本文公开的mRNA疫苗也可以在体外用于扩增肿瘤抗原特异性T细胞群体。所述应用的一个实例是与人类患者来源的T细胞共培养,以扩增肿瘤抗原特异性T细胞群体,然后将它们输回至患者。

[0062] 另外,所公开的mRNA疫苗也可用于分离肿瘤抗原特异性T细胞受体以用于T细胞工程。一个实例是含有mRNA疫苗的树突细胞与人T细胞共培养,并从中分离出具有高结合能力的T细胞。一旦分离出所述T细胞,就可以通过测序确定它们的T细胞受体,并用于生成TCR-T细胞(癌症免疫疗法的另一个分支)。

附图说明

[0063] 以下附图构成本说明书的一部分,并且包括在内以示范本发明的某些方面。为了促进对本发明原理的理解,现在将参考附图中所示的实施方式或示例,并且将使用特定语言来描述它们。然而,应理解的是,不打算以此限制本发明的范围。所描述的实施方式中的任何变更和进一步的修改,以及如本文所述的本发明的原理的任何进一步的应用,被视为是本发明相关领域的普通技术人员会正常想到的。通过结合附图参考以下描述可以更好地理解本发明,其中相同的数字标记代表相同的要素,并且其中:

[0064] 图1A、图1B、图1C、图1D、图1E、图1F、图1G、图1H、图1I、图1J、图1K、和图1L显示了脂质多聚复合物(lipopolyplex)mRNA疫苗的结构和特征。图1A是根据本发明的一个方面制备

的基于脂质多聚复合物-mRNA的疫苗的示意图。示例性疫苗包括通过带正电荷的PbAE聚合物和带负电荷的mRNA分子之间的静电相互作用组装的多聚复合物疏脂性“核”。然后将所生成的多聚复合物-mRNA核囊封在亲水性脂质双层“壳”中。图1B显示了对示例性多聚复合物-mRNA结合的凝胶阻滞分析。样品按以下顺序装载：游离mRNA，以10、20、30和40（重量/重量）的多聚复合物/mRNA。图1C、图1D、和图1E显示了空脂质体壳（图1C）、多聚复合物/mRNA核（重量/重量=20）（图1D）和脂质多聚复合物/mRNA核-壳结构（图1E）的透射电子显微镜（TEM）图像。图1F、图1G、图1H、图1I、图1J和图1K示出了用mRNA包装的粒子处理的DC2.4细胞中的eGFP表达。DC2.4细胞用PBS对照（图1F）、PbAE/eGFP mRNA核（图1G）、EDOPC/DOPE-包装的PbAE/eGFP mRNA（图1H）、DOTAP/Chol-包装的PbAE/eGFP mRNA（图1I）、CHEMS/DOPE/R8-包装的PbAE/eGFP mRNA（图1J）或鱼精蛋白/eGFP mRNA核（图1K）处理，并在24小时后通过荧光显微术检测eGFP表达。图1L示出了用各种粒子类型处理后的DC2.4存活率；

[0065] 图2示出了示例性脂质多聚复合物/mRNA核-壳疫苗被哺乳动物树突细胞群体优先摄取。DC2.4、MDA-MB-231和mDMEC细胞在细胞分选之前与脂质多聚复合物/eGFP mRNA温育24小时之后，对GFP阳性细胞进行流式细胞术分析；在小鼠皮下注射LPP/Luc后48小时，利用生物发光图像来检测荧光素酶表达。左侧是对照小鼠；右侧是LPP/Luc处理的小鼠。

[0066] 图3A、图3B、图3C、图3D、图3E、图3F、图3G和图3H显示了细胞进入的机制。图3A-图3F表示在模拟对照（图3A）、阿米洛利（图3B）、氯丙嗪（图3C）、氯喹（图3D）、染料木黄酮（图3E）和匹莫齐特（图3F）存在下用LPP/0.5 μ g FAM-标记的eGFP mRNA处理的DC2.4细胞的图像。图3G显示了FAM阳性细胞的Image J分析，而图3H示出了DC2.4细胞对LPP/FAM标记的eGFP mRNA的时间依赖性摄取。误差棒表示一式三份实验的平均值 \pm 标准偏差；

[0067] 图4A、图4B和图4C显示了LPP/mRNA疫苗对DC的刺激。图4A显示了用LPP/OVA（用OVA mRNA包装的EDOPC/DOPE/DSPE-PEG）和对照处理的BMDC中的细胞因子分泌；图4B显示了TLR7/8抑制剂ODN2087对IL-12和IFN- β 表达的抑制；图4C是LPP/OVA mRNA和LPP/OVA蛋白对DC刺激之间的比较；显示了DC成熟标志物的流式细胞术分析。误差棒表示一式三份实验的平均值 \pm 标准偏差；

[0068] 图5A、图5B和图5C显示了LPP/mRNA疫苗对DC抗原交叉呈递的刺激。图5A是H-2kb-OVA257-264呈递的流式细胞术分析。图5B显示了与处理后的BMDC共温育后OVA特异性CD4⁺和CD8⁺T细胞的时间依赖性IL-2分泌。B3Z：OVA特异性CD8⁺T细胞；DOBW：OVA特异性CD4⁺T细胞。图5C显示了与处理后的DC2.4细胞共温育后OVA特异性CD4⁺和CD8⁺T细胞的时间依赖性IL-2分泌；显示了在与用LPP/OVA mRNA或LPP/OVA蛋白预处理的DC2.4细胞共温育后，OVA特异性CD8⁺T细胞的IL-2分泌的比较；

[0069] 图6A和图6B显示了LPP/OVA的体外和体内抗肿瘤活性。图6A显示了在皮下LPP/OVA mRNA疫苗接种后3、6和24小时的血清IFN- β 水平；图6B示出了LPP/OVA mRNA对B16-OVA黑素瘤肺转移的抑制。显示了治疗程序（上图）和来自治疗后小鼠的肺的代表性图像（中图），并总结了肺中肿瘤结节的平均数量（下图）。数据按平均值 \pm SEM呈现。每组中有5只小鼠；

[0070] 图7显示了将mRNA分子与递增量的聚合物（PbAE）混合，并且将样品通过琼脂糖凝胶电泳分离。未结合的mRNA分子移动到底部，而与所述聚合物结合的mRNA分子停留在顶部。泳道#1：游离mRNA，泳道2-5：具有递增量的聚合物的mRNA分子；

[0071] 图8A和图8B分别显示了非靶向和靶向的mRNA疫苗纳米粒子的尺寸分析；

[0072] 图9A、图9B和图9C分别显示了根据本公开的一个方面的示例性空脂壳(左)、mRNA核(中)和完整mRNA疫苗纳米粒子的透射电子显微镜(TEM)图像;

[0073] 图10A、图10B、图10C、图10D、图10E、和图10F显示了将DC2.4树突细胞与mRNA核形式(PbAE/mRNA核或鱼精蛋白/mRNA核)或包装在脂质壳(我们的mRNA疫苗、DOTAP/胆固醇囊封的mRNA或CHEMS/DOPE/R8囊封的mRNA)中的相同量的EGFP(绿色荧光蛋白)mRNA共温育。24小时后在荧光显微镜下监测EGFP表达;

[0074] 图11显示了将DC2.4细胞与裸mRNA核或包装的mRNA一起温育,并在24小时后测定细胞存活率;

[0075] 图12A和图12B显示了将Cy5标记的mRNA包装到非靶向或靶向疫苗中。然后将荧光疫苗粒子与DC2.4细胞一起温育4小时。测量用荧光mRNA疫苗粒子内化的细胞的百分比(图12A)和具有总荧光的细胞(图12B);

[0076] 图13示出了mRNA疫苗刺激树突细胞成熟。用mRNA疫苗或疫苗的单组分处理骨髓来源的树突细胞(BMDC),并通过酶联免疫吸附分析(ELISA)测量I型干扰素细胞因子干扰素- β (IFN- β)和树突细胞成熟标记物IL-12p70的分泌;

[0077] 图14证明了TLR7/8抑制剂ODN2095对mRNA疫苗介导的树突细胞刺激的抑制。用卵清蛋白(OVA)、TLR7/8抑制剂ODN2095、表达OVA的mRNA疫苗或mRNA疫苗和ODN2095的组合处理BMDC,并通过ELISA测量I型干扰素细胞因子干扰素- β (IFN- β)和树突状细胞成熟标志物IL-12p70的分泌;

[0078] 图15显示用PBS阴性对照、鱼精蛋白/mRNA核或OVA特异性mRNA疫苗(表达OVA蛋白的mRNA疫苗)处理的BMDC;然后应用流式细胞术检测也显示MHC I-OVA表位的CD11c阳性树突细胞;

[0079] 图16A显示BMDC细胞并且图16B显示用OVA mRNA疫苗处理的DC2.4细胞,所述细胞与OVA特异性CD4T细胞(DOBW)和CD8T细胞(B3Z)共温育24或48小时。然后通过ELISA检测T细胞的IL-2表达并定量;

[0080] 图17显示将OVA mRNA疫苗与IDO1抑制剂INCB024360共同包装,并用于处理BMDC。然后将BMDC与OVA特异性T细胞共温育,并通过ELISA测量IL-2分泌;

[0081] 图18A和图18B显示将C57BL6小鼠用PBS、OVA蛋白或OVA mRNA疫苗处理3次,并分离来自脾和淋巴结的细胞(包括活化的T细胞)并用于测试T细胞刺激状态和肿瘤细胞杀伤活性。在图18A中,用OTI和OTII OVA特异性抗原肽挑战(即共温育)所述分离细胞后的干扰素- γ 分泌。在图18B中,将分离的T细胞与B16-OVA肿瘤细胞共温育,并测量细胞存活率;

[0082] 图19显示将有B16-OVA肿瘤肺转移的C57BL6小鼠用OVA mRNA疫苗处理3次(在第3、7和10天)。在第18天将小鼠安乐死,并计数肺中的肿瘤结节。上面的时间线显示了处理程序。来自PBS对照组和OVA mRNA疫苗治疗组的代表性肺显示在图像的中间;显示了基于肺中肿瘤结节的数量的定量以用于比较;

[0083] 图20显示了根据本公开的一个具体方面的疫苗结构的示例性示意图。其中,可视化了由(1)中心的mRNA核、(2)外部的脂质壳(有或没有寻靶部分)和(3)之间的小分子和/或蛋白质组成的mRNA疫苗纳米粒子的概览;以及

[0084] 图21显示了与单独的单一抗原疫苗相比,将编码IL12p70的mRNA共包装进一步促进了mRNA疫苗活性。

[0085] 序列简要说明

[0086] SEQ ID NO:1是源自野生型TP53肽的示例性细胞毒性T细胞表位,并且其根据本公开的一个或多个方面是有用的;

[0087] SEQ ID NO:2是源自突变的TP53肽的示例性细胞毒性T细胞表位,并且其根据本公开的一个或多个方面是有用的;

[0088] SEQ ID NO:3是源自野生型TP53肽的示例性细胞毒性T细胞表位,并且其根据本公开的一个或多个方面是有用的;

[0089] SEQ ID NO:4是源自突变的TP53肽的示例性细胞毒性T细胞表位,并且其根据本公开的一个或多个方面是有用的;

[0090] SEQ ID NO:5是源自野生型PIK3CA肽的示例性细胞毒性T细胞表位,并且其根据本公开的一个或多个方面是有用的;

[0091] SEQ ID NO:6是源自突变的PIK3CA肽的示例性细胞毒性T细胞表位,并且其根据本公开的一个或多个方面是有用的;

[0092] SEQ ID NO:7是源自野生型PIK3CA肽的示例性细胞毒性T细胞表位,并且其根据本公开的一个或多个方面是有用的;

[0093] SEQ ID NO:8是源自突变的PIK3CA肽的示例性细胞毒性T细胞表位,并且其根据本公开的一个或多个方面是有用的;

[0094] SEQ ID NO:9是源自野生型PTEN肽的示例性细胞毒性T细胞表位,并且其根据本公开的一个或多个方面是有用的;以及

[0095] SEQ ID NO:10是源自突变的PTEN肽的示例性细胞毒性T细胞表位,并且其根据本公开的一个或多个方面是有用的。

具体实施方式

[0096] 下面描述本发明的说明性实施方式。为了清楚起见,在本说明书中并未描述实际实施的所有特征。当然要领会,在开发任何这样的实际实施方式中,必须做出许多特定于实施的决定来达到开发者的特定目标,例如遵守与系统相关的和与商业相关的约束,这些约束将因实施而异。此外,应领会,这样的开发工作可能是复杂且耗时的,但对受益于本公开的本领域普通技术人员来说,将是例行任务。

[0097] 癌症

[0098] 癌症可以认为是全球公众健康的最大威胁之一。癌症转移是恶性肿瘤的关键特征,并造成超过90%的实体肿瘤相关死亡。由于对癌症转移的机制知之甚少,因此对于有效控制肿瘤转移没有诊断/预后标签和专门的治疗可用。事实上,转移是一个复杂的过程,涉及良好协调的事件序列,其中一些肿瘤细胞离开原发病灶并在远处的部位居留。因为原发肿瘤中的并非所有细胞都具有转移能力,因此推测转移性癌细胞可能具有能够提供有价值的治疗靶标的特殊特征。

[0099] 基于mRNA的治疗性癌症疫苗

[0100] 基于mRNA的治疗性癌症疫苗具有触发强大的抗癌免疫的益处,而没有来自DNA疫苗的基因组整合的潜在危险或来自肽疫苗的抗原选择的局限性。然而,由带正电荷的蛋白质核结构中凝聚的mRNA分子组成的常规mRNA疫苗不被抗原呈递细胞有效内化,因此不能为

所述mRNA分子提供充分的保护以免受血浆和组织酶的降解。

[0101] 用于包装mRNA的脂质多聚复合物组合物

[0102] 在一个方面,本公开提供了基于脂质多聚复合物-(LPP)和蛋白质的壳/核递送系统,其被设计成将核酸分子(包括,例如mRNA)包装在聚合的多聚复合物“核”中,然后将其装载到由磷脂双层组成的“壳”结构中。图1A中显示了说明性的系统,并且图20中显示了这样的疫苗递送系统的一般化示意图。这些组合物不仅可以保护疏水性多聚复合物核结构内部的mRNA分子免受RNA酶的攻击和随后的降解,而且包围所述核的包封性磷脂双层壳结构的存在也有助于使载体被抗原呈递细胞(包括但不限于巨噬细胞、B细胞,树突细胞等)更有效地内化,并促进粒子通过囊泡状系统转运以及mRNA分子从所述核结构最终释放到胞质溶胶中以促进所编码的抗原的产生。

[0103] 在实施例1中,已经系统地表征了特定LPP的组成和形态,并且还研究了DC对LPP/mRNA的细胞摄取以及所编码的肽抗原在DC中的最终蛋白质合成。通过应用卵清蛋白(OVA)作为抗原模型,在细胞培养中检查对所述LPP/OVA mRNA疫苗的免疫应答,并且还在用OVA表达性B16黑素瘤细胞建立的黑素瘤肺转移的鼠模型中评价抗肿瘤免疫。

[0104] 药物制剂

[0105] 在某些实施方式中,本公开涉及以可药用制剂制备的疫苗递送组合物,其用于单独地或与一种或多种其他形式的诊断、预防和/或疗法组合施用于动物的一种或多种细胞或组织。可药用的赋形剂和载体溶液的制剂是本领域普通技术人员公知的,开发合适的剂量和治疗方案以在各种诊断和癌症预后方案中使用本文所述的特定的基于LPP-mRNA的疫苗组合物也是如此。

[0106] 在某些情况下,希望通过一种或多种标准递送装置将所公开的基于聚合的多聚复合物核/磷脂双层壳的疫苗递送系统在适当配制的药物介质中递送,包括但不限于皮下、肠胃外、静脉内、肌内、鞘内、肿瘤内、腹膜内、透皮、局部、通过口或鼻吸入或通过直接注射至动物、并优选人类体内或体周围的一种或多种细胞、组织或器官。

[0107] 所述施用方法也可以包括如美国专利号5,543,158;5,641,515,和5,399,363中所述的那些方式,所述美国专利各自通过对其明确的引用以其整体特别并入本文。作为游离碱或可药用盐的所述活性化合物的溶液可以在无菌水中制备,并且可以适当地与一种或多种表面活性剂如羟丙基纤维素混合。也可以在甘油、液体聚乙二醇、油或其混合物中制备分散体。在平常的储存和使用条件下,这些制剂含有防腐剂以防止微生物生长。

[0108] 对于可注射水溶液的施用,并非限制地,所述溶液如有必要可被适当地缓冲,并且所述液体稀释剂首先用足够的盐水或葡萄糖使之等渗。这些特定的水溶液尤其适合用于静脉内、肌内、皮下、透皮、真皮下和/或腹膜内施用。对此,本发明的组合物可以配制在一种或多种可药用的介质中,包括例如无菌水性介质、缓冲剂、稀释剂等(参见,例如,“雷明顿药物科学(REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES)”第15版,第1035-1038和1570-1580页)。虽然取决于所治疗的对象的病况、治疗的程度和施用的部位,必然会发生一些剂量变化,但是负责施用的人将能够利用医学和药学领域的普通知识来确定适合于个体对象的正确给药方案。

[0109] 无菌注射组合物可以通过将所需量的所公开的疫苗组合物根据需要与上面列举的若干其它成分一起掺入适当的溶剂中,然后过滤灭菌来制备。通常,可以通过将选定的已

灭菌的活性成分掺入无菌介质中来制备分散体,所述无菌介质含有基础分散介质和所需的来自上面列举的那些的其他成分。本文公开的疫苗组合物也可以以中性或盐形式配制。

[0110] 可药用盐包括(与蛋白质的游离氨基形成的)酸加成盐,并且其是用无机酸例如但不限于盐酸或磷酸,或者有机酸例如但不限于乙酸、草酸、酒石酸、扁桃酸等形成的。与游离羧基形成的盐也可以由无机碱例如但不限于氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化铵、氢氧化钙或氢氧化铁,以及诸如异丙胺、三甲胺、组氨酸、普鲁卡因等的有机碱衍生而来。在配制时,溶液将以与所述剂量制剂相容的方式并且以对预期应用有效的量施用。本发明化合物的制剂可以容易地以多种剂型施用,所述剂型例如可注射溶液、局部制剂、口服制剂包括缓释胶囊、水凝胶、胶体、粘性凝胶、透皮试剂、鼻内和吸入制剂等等。

[0111] 本文公开的疫苗组合物的量、给药方案、制剂和施用将在受益于本教导的普通技术人员的权限内。然而,有可能可以通过单次施用来实现施用诊断有效(即,药学上有效)量的一种或多种所公开的基于mRNA的疫苗组合物,例如但不限于向有此需要的患者单次注射足量的所递送药剂以提供期望的益处。或者,在一些情况下,可能希望在相对短的或甚至相对延长的时期内提供多次或连续施用所公开的组合物,这可由对此类组合物向正经历这种程序的选定个人的施用进行监督的执业医师来决定。

[0112] 通常,一种或多种本文所述的基于聚合的多聚复合物核/磷脂双层壳的疫苗递送系统的制剂将至少含有有效量的第一活性剂。优选地,所述制剂可含有至少约0.001%的各活性成分,优选至少约0.01%的所述活性成分,然而所述活性成分的百分比当然可以变化,并且可以基于总制剂适宜地以约0.01至约90重量%或体积%或约0.1至约80重量%或体积%或更优选地约0.2至约60重量%或体积%的量存在。自然,各组合物中活性化合物的量可以按照在任何给定单位剂量的化合物中将会获得合适的剂量这样的方式制备。制备此类药物制剂领域的普通技术人员将考虑诸如溶解度、生物利用度、生物 $t_{1/2}$ 、施用途径、产品储存期限以及其他药理学考虑的因素,并因此,可以需要各种各样的剂量和治疗方案。在优选的实施方式中,所述活性剂是包含在所述内部多聚复合物内的mRNA疫苗组分。

[0113] 虽然预期全身施用在本发明的许多实施方式中是有效的,但也预期本文公开的制剂适合于直接注射到体内的一种或多种器官、组织或细胞类型中。将所公开的组合物直接施用于体内特定的不连续位置,或直接施用于肿瘤或癌组织,例如,可以利用相关医学肿瘤学领域中普通技术人员知晓的合适手段进行。

[0114] 本发明的药物制剂可进一步包含一种或多种赋形剂、缓冲剂或稀释剂,它们被特别配制用来与哺乳动物细胞、特别是人类细胞接触,和/或用来施用于哺乳动物对象如人类患者。组合物可以进一步任选包含一种或多种诊断或预后剂,和/或可以被配制在微球、微粒、纳米球或纳米粒子群体内,并且可以被配制用来施用于一种或多种细胞、组织、器官或特别是人体。

[0115] 可药用赋形剂和载体溶液的配制是本领域技术人员公知的,开发合适的给药、诊断和/或治疗方案用于以各种方式包括例如但不限于口服、肠胃外、静脉内、鼻内、肿瘤内和肌内施用途径使用本文所述的特定组合物也是如此。

[0116] 使用所公开的疫苗制剂的组合物具体组合物使用量、具体施用时间或给药方案,将在受益于本教导的本领域普通技术人员的权限内。然而,有可能可以,在向正进行这种治疗的患者有效提供期望的益处的时间期间,通过施用一剂或多剂的所述制剂来完成所

公开制剂的施用。这样的给药方案可以取决于具体病况或患者、施行的疗法的程度或期限等,由监督所述化合物的施用的执业医师决定。

[0117] 包含一种或多种如本文公开的活性成分的药物制剂不以任何方式限于仅用于人类,或甚至仅用于灵长类动物或哺乳动物。在某些实施方式中,可以使用禽类、两栖动物、爬行动物或其他动物物种来采用本文公开的方法和组合物。然而,在优选的实施方式中,本发明的组合物优选被配制用于以各种方案施用于哺乳动物并特别是人类,以调节癌细胞的转移潜力。如上所述,这样的组合物不仅限于在人类中使用,而且也可以被配制用于兽医施用,包括但不限于选定的牲畜、外来或家养动物、伴侣动物(包括宠物等)、非人类的灵长类动物以及动物园或其他圈养样本等。

[0118] 用于制备药物的组合物

[0119] 本发明的另一个重要方面涉及使用所公开的组合物(以及包含它们的制剂)制备用于预防、诊断、治疗和/或改善动物、包括例如脊椎哺乳动物的一种或多种疾病、功能障碍、异常病况或病症的一种或多种症状的药物的方法。所公开的组合物的用途特别被考虑用于癌症的诊断和/或预后、癌症转移的检测或预测或其程度监测和/或为了抑制一种或多种癌细胞类型的转移潜能。

[0120] 这样的用途一般涉及以足以诊断、治疗、减轻或改善患病哺乳动物的一种或多种癌症症状的量和时间向有需要的哺乳动物施用一种或多种所公开的疫苗组合物。

[0121] 包含一种或多种所公开的基于mRNA的疫苗组合物的药物制剂也构成本发明的一部分,特别是那些进一步包含至少第一可药用赋形剂以用于治疗 and/或改善患病哺乳动物中一种或多种癌症症状的那些组合物。

[0122] 示例性定义

[0123] 根据本发明,多核苷酸、核酸区段、核酸序列等包括但不限于DNA(包括但不限于基因组或基因组外DNA)、基因、肽核酸(PNA)、RNA(包括但不限于rRNA、mRNA和tRNA)、核苷以及合适的核酸区段,其得自天然来源、化学合成、修饰或以其它方式全部或部分由人工制备或合成。

[0124] 除非另有定义,否则本文中使用的所有技术和科学术语所具有的含义与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的相同。以下参考文献为本领域技术人员提供了本发明中使用的许多术语的一般定义:生物化学与分子生物学词典(Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology), (第2版)J.Stenesch(编著),Wiley-Interscience(1989);微生物学与分子生物学词典(Dictionary of Microbiology and Molecular Biology) (第3版), P.Singleton和D.Sainsbury(编著),Wiley-Interscience(2007);钱伯斯科技词典(Chambers Dictionary of Science and Technology) (第2版),P.Walker(编著), Chambers(2007);遗传学词汇(Glossary of Genetics) (第5版),R.Rieger等(编著), Springer-Verlag(1991);以及哈珀柯林斯生物学词典(The HarperCollins Dictionary of Biology),W.G.Hale和J.P.Margham,(编著),HarperCollins(1991)。

[0125] 尽管与本文所描述的类似或等效的任何方法和组合物可用于本发明的实践或检验,但本文描述了优选的方法和组合物。出于本发明的目的,下面为了清楚和便于参考起见对以下术语加以定义:

[0126] 根据长期以来的专利法惯例,当在本申请包括权利要求书中使用不带数量指示的

指称物时,表示“一或多”。

[0127] 术语“约”和“近似”用于本文中时是可互换的,并且一般应理解是指一个给定数字周围的数字范围,以及所叙述的数字范围内的所有数字(例如,“约5至15”意味着“约5至约15”,除非另有说明)。此外,本文中的所有数值范围应理解为包括该范围内的各个整数。

[0128] 用于本文中时,“抗原性多肽”或“免疫原性多肽”是这样的多肽,当其被引入脊椎动物时,与脊椎动物的免疫系统分子反应,即是抗原性的,和/或在该脊椎动物中诱导免疫应答,即是免疫原性的。

[0129] “生物相容”是指下述物质,当暴露于活细胞时将支持细胞的适当细胞活性而不会在细胞中引起不想要的效应如细胞生命周期的变化、细胞增殖速率的变化或细胞毒性效应。

[0130] 术语“生物功能等效”在本领域中是公知的,并且在本文中进一步详细定义。因此,具有约85%至约90%、或更优选约91%至约95%、或甚至更优选约96%至约99%的核苷酸与本文提供的一种或多种核苷酸序列一致或功能等效的序列,被特别考虑可用于本申请中阐述的方法和组合物的实践。

[0131] 用于本文时,术语“缓冲剂”包括一种或多种组合物或其水溶液,当将酸或碱添加到包含所述缓冲剂的溶液或组合物中时,所述缓冲剂抵抗pH的波动。这种对pH变化的抗性是由于这种溶液的缓冲性质,并且可以是包含在所述组合物中的一种或多种特定化合物的功能。因此,表现出缓冲活性的溶液或其他组合物被称为缓冲剂或缓冲溶液。缓冲剂一般不具有无限的维持溶液或组合物的pH的能力;而是,它们通常能够将pH维持在一定范围内,例如约5至7的pH。

[0132] 用于本文时,术语“载体(carrier)”旨在包括药学上可接受用于向相关动物施用或者如果适用的话可接受用于治疗或诊断目的的任何溶剂、分散介质、包衣、稀释剂、缓冲剂、等渗剂、溶液、悬浮液、胶体、惰性体等,或其组合。

[0133] 用于本文时,术语“DNA区段”是指已经从特定物种的总基因组DNA分离出来的DNA分子。因此,使用本文公开的组合物之一从生物样品获得的DNA区段是指一种或多种已经从从其获得它们的特定物种的总基因组DNA中分离出来或纯化出来的DNA区段。术语“DNA区段”内包括DNA区段和这种区段的较小片段,以及重组载体,包括例如质粒、粘粒、噬菌体、病毒等。

[0134] 术语“有效量”,用于本文时,是指能够治疗或改善疾病或病况或者能够产生预期治疗效果的量。

[0135] 用于本文时,术语“表位”是指给定免疫原性物质的一部分,通过本领域已知的任何方法确定,所述部分是已对所述给定的免疫原性物质发动免疫应答的宿主免疫系统的抗体或细胞表面受体的靶标,即被所述抗体或细胞表面受体结合。进一步地,表位可以被定义为免疫原性物质的一部分,如通过本领域可利用的任何方法所确定(参见,例如,Geysen等人,1984),所述部分在动物中引发抗体应答或诱导T细胞应答。表位可以是任何免疫原性物质的一部分,所述免疫原性物质例如蛋白质、多核苷酸、多糖、有机或无机化学物质或其任何组合。术语“表位”也可以与“抗原决定簇”或“抗原决定簇位点”可互换地使用。

[0136] 术语“例如”用于本文时仅用于举例而非意图限制,并且不应被解释为仅仅是指在说明书中明确列举的那些项。

[0137] 用于本文时,“异源的”是相对于预定的参考核酸序列定义的。例如,对于结构基因序列,异源启动子被定义为不会与所述参考结构基因相邻地天然存在、但通过实验室操作将其放置的启动子。同样地,异源基因或核酸区段被定义为不会与参考启动子和/或增强子元件相邻地天然存在的基因或区段。

[0138] 用于本文时,当提及多核苷酸时,“同源的”是指尽管来自不同来源,但具有相同的基本核苷酸序列的序列。通常,同源核酸序列源自于具有一个或多个基本相似的基因组序列的密切相关的基因或生物体。相反,“同功的 (analogous)”多核苷酸是与来自不同物种或生物体的多核苷酸共有相同功能、但可具有明显不同的一级核苷酸序列的多核苷酸,其编码一种或多种实现相似功能或具有相似生物活性的蛋白质或多肽。同功多核苷酸经常可以源自于两种或更多种(例如,遗传上或系统发育上)不密切相关的生物体。

[0139] 用于本文时,术语“同源性”是指两个或更多个多核苷酸或多肽序列之间的互补性程度。当第一核酸或氨基酸序列具有与第二核酸或氨基酸序列完全相同的一级序列时,词语“同一性”可以代替词语“同源性”。序列同源性和序列同一性可通过使用本领域已知的算法和计算机程序分析两个或更多个序列来确定。这样的方法可用于评估给定序列是否与另一选定序列具有同一性或同源性。

[0140] 在两个或更多个核酸或多肽序列的环境下,术语“同一”或“同一性”百分比是指当使用下面描述的序列比较算法之一(或普通技术人员可用的其他算法)或通过视觉检查测量进行比较和比对最大对应性时,两个或更多个序列或子序列相同或具有特定百分比的相同的氨基酸残基或核苷酸。

[0141] 用于本文时,短语“需要治疗”是指由护理人员例如医生或兽医做出的判断,患者需要(或将以一种或多种方式受益于)治疗。这样的判断可以基于护理人员的专业知识领域中的各种因素做出,并且可以包括下述认识,即患者因可由一种或多种化合物或药物组合物例如本文陈述的那些进行治疗的疾病状态而抱病。

[0142] 短语“分离的”或“生物纯的”是指物质基本上或实质上不含在天然状态下通常伴随该物质存在的组分。因此,根据本公开的分离的多核苷酸或多肽优选不含在它们的天然或原位环境中通常与那些多核苷酸或多肽关联的物质。

[0143] 用于本文时,术语“试剂盒”可用于描述便携式自备外壳的变体,其包括至少一组本发明的试剂、组分或药学上配制的组合物。任选地,这样的试剂盒可包括一套或多套说明书,所述说明书关于,例如在实验室或临床应用中,使用所封装的组合物。

[0144] “联接”或“接合”是指本领域已知的用于功能性连接一种或多种蛋白质、肽、核酸或多核苷酸的任何方法,包括但不限于重组融合、共价键合、二硫键键合、离子键合、氢键键合、静电键合等。

[0145] 本文所用的术语“天然存在”在应用于物体时是指物体可以在自然界中存在的事实。例如,存在于生物体(包括病毒)中、能够从自然界中的来源分离并且未在实验室中经人工有意修饰的多肽或多核苷酸序列是天然存在的。用于本文时,已经根据经典遗传学选择性繁殖的啮齿动物实验室品种被认为是天然存在的动物。

[0146] 用于本文时,术语“核酸”包括以下的一种或多种类型:多脱氧核糖核苷酸(含有2-脱氧-D-核糖)、多核糖核苷酸(含有D-核糖)以及任何其他类型的多核苷酸,其是嘌呤或嘧啶碱基或者修饰的嘌呤或嘧啶碱基(包括无碱基位点)的N-糖苷。术语“核酸”,用于本文时,

也包括核糖核苷或脱氧核糖核苷的共价键合的聚合物,所述共价键合通常通过亚基之间的磷酸二酯键,但在有些情况下通过硫代磷酸酯、甲基膦酸酯等键合。“核酸”包括单链和双链DNA以及单链和双链RNA。示例性核酸包括但不限于gDNA;hnRNA;mRNA;rRNA,tRNA,微小RNA(miRNA),小干扰RNA(siRNA),小核仁RNA(snORNA),小核RNA(snRNA)和小时序RNA(stRNA)等,及其任何组合。

[0147] 术语“可操作地联接”,用于本文时,是指所联接的核酸序列通常是邻接的或基本上邻接的,并且在需要接合两个蛋白质编码区的情况下,是邻接的并且在阅读框内。然而,由于增强子一般在与启动子分隔数千碱基时起作用,并且内含子序列可以具有可变长度,因此一些多核苷酸元件可以可操作地联接但不邻接。

[0148] 用于本文时,术语“患者”(也可互换地称为“接受者”、“宿主”或“对象”)是指可作为本文所论述的一种或多种血管进入装置的接受者的任何宿主。在某些方面,所述接受者将是脊椎动物,其旨在表示任何动物物种(并且优选地,哺乳动物物种,例如人类)。在某些实施方式中,“患者”是指任何动物宿主,包括但不限于,人类和非人类灵长类动物、禽类、爬行动物、两栖动物、牛、犬、山羊(caprines)、cavines、乌鸦、epines、马属动物、猫科动物、山羊(hircines)、兔、野兔(leporines)、狼(lupines)、鼠科动物、绵羊、猪、racines、狐狸等,包括但不限于家养的牲畜、放牧或迁徙的动物或鸟类、外来或动物园样本以及伴侣动物、宠物和任何受执业兽医护理的动物。

[0149] 短语“可药用的”是指当施用于人时,特别是当施用于人眼时,不产生过敏或类似的不良反应的分子实体和组合物。含有蛋白质作为活性成分的水性组合物的制备在本领域中是公知的。通常,将这样的组合物制备成注射剂,或作为液体溶液或作为悬液。或者,它们可以被制备成适合在注射前溶解或悬浮于液体中的固体形式。

[0150] 用于本文时,“可药用盐”是指保留想要的母体化合物生物活性并且不产生任何不想要的毒理学效应的盐。这样的盐的实例包括但不限于与无机酸例如盐酸、氢溴酸、硫酸、磷酸、硝酸等形成的酸加成盐;以及与有机酸例如乙酸、草酸、酒石酸、琥珀酸、马来酸、富马酸、葡萄糖酸、柠檬酸、苹果酸、抗坏血酸、苯甲酸、鞣酸、扑酸(亚甲基双羟萘酸)、藻酸、萘甲酸、聚谷氨酸、萘磺酸、萘二磺酸、聚半乳糖醛酸形成的盐;与多价金属阳离子例如锌、钙、铋、钡、镁、铝、铜、钴、镍、镉等的盐;与由N,N'-二苄基乙二胺或乙二胺形成的有机阳离子形成的盐;及其组合。

[0151] 用于本文时,术语“质粒”或“载体(vector)”是指由遗传物质(即核酸)组成的遗传构建体。通常,质粒或载体含有在细菌宿主细胞、例如大肠杆菌中有功能的复制起点,以及用于检测包含所述质粒的细菌宿主细胞的选择性标志。本发明的质粒和载体可包括一个或多个如本文所述的遗传元件,安排所述遗传元件使得插入的编码序列可在合适的表达细胞中转录和翻译。另外,所述质粒或载体可包括一个或多个核酸区段、基因、启动子、增强子、激活子、多克隆区或其任何组合,包括从一种或多种天然和/或人工来源获得或衍生的区段。

[0152] 用于本文时,术语“多肽”旨在包涵单数“多肽”以及复数“多肽”,并且包括两个或更多个氨基酸的任何链。因此,用于本文时,包括但不限于“肽”、“二肽”、“三肽”、“蛋白质”、“酶”、“氨基酸链”和“连续氨基酸序列”的术语都包涵在“多肽”的定义内,并且术语“多肽”可以代替这些术语中的任何一个或者可以与这些术语中的任何一个可互换地使用。该术语

还包括已经历一种或多种翻译后修饰或通过包含一种或多种非天然存在的氨基酸进行修饰的多肽,所述翻译后修饰包括,例如但不限于,糖化、乙酰化、磷酸化、酰胺化、衍生化、蛋白水解切割、翻译后加工。本领域中存在对于多核苷酸和多肽结构的常规命名法。

[0153] 例如,一字母和三字母缩写被广泛用于描述氨基酸:丙氨酸(A;Ala),精氨酸(R;Arg),天冬酰胺(N;Asn),天冬氨酸(D;Asp),半胱氨酸(C;Cys),谷氨酰胺(Q;Gln),谷氨酸(E;Glu),甘氨酸(G;Gly),组氨酸(H;His),异亮氨酸(I;Ile),亮氨酸(L;Leu),甲硫氨酸(M;Met),苯丙氨酸(F;Phe),脯氨酸(P;Pro),丝氨酸(S;Ser),苏氨酸(T;Thr),色氨酸(W;Trp),酪氨酸(Y;Tyr),缬氨酸(V;Val),和赖氨酸(K;Lys)。本文所述的氨基酸残基优选是“1”异构形式。然而,“d”异构形式的残基可以取代L氨基酸残基,条件是保留想要的多肽性质。

[0154] 用于本文时,术语“预防”和“抑制”用于本文时是指在疾病状态的临床症状发作之前施用单独的或包含在药物组合物中的化合物,以阻止所述疾病状态的任何症状、方面或特征。这样的预防和抑制不需要是绝对被认为是医学上有用的。

[0155] “蛋白质”在本文中可与“肽”和“多肽”互换使用,并包括合成、重组或体外产生的肽和多肽二者,以及在将核酸序列施用于宿主动物或人类对象后在体内表达的肽和多肽。术语“多肽”优选意指任何氨基酸链长度,包括长度从约2至约20个氨基酸残基的短肽,长度从约10至约100个氨基酸残基的寡肽,以及包括长度约100个氨基酸残基或更多的更长的多肽。此外,该术语还旨在包括酶,即包括至少一种氨基酸聚合物的功能性生物分子。本发明的多肽和蛋白质也包括被翻译后修饰或已经被翻译后修饰的多肽和蛋白质,并且包括添加到主链氨基酸链中的任何糖或其他衍生物或缀合物。

[0156] “纯化”,用于本文时,意味着与许多其他化合物或实体分开。化合物或实体可以是部分纯化的、基本纯化的或纯的。当化合物或实体从基本上所有其他化合物或实体中除去时,其被认为是纯的,即优选至少约90%,更优选至少约91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%,或大于99%纯。部分或基本上纯化的化合物或实体可以除去天然与其一起存在的物质例如细胞物质如细胞蛋白质和/或核酸的至少50%、至少60%、至少70%或至少80%。

[0157] 术语“重组”表明通过人为干预人工或(非天然)合成改变的物质(例如,多核苷酸或多肽)。所述改变可以对在其自然环境或天然状态下的物质进行,或对从其自然环境或天然状态移除的物质进行。具体地,例如,当启动子序列通过表达被人工工程化的核酸区段而产生时,它是“重组的”。例如,“重组核酸”是通过在例如克隆、DNA改组或其他程序期间的核酸重组、或通过化学或其他诱变制成的;“重组多肽”或“重组蛋白质”是通过重组核酸的表达而产生的多肽或蛋白质;以及“重组病毒”,例如重组AAV病毒,是通过重组核酸的表达而产生的。

[0158] 术语“调节元件”,用于本文时,是指调节转录的核酸序列的区域。示例性调节元件包括但不限于增强子、转录后元件、转录控制序列等。

[0159] 术语“RNA区段”是指已经从特定物种的总细胞RNA分离的RNA分子。因此,RNA区段可以指一种或多种已经从其他RNA分离出来或纯化出来的RNA区段(天然或合成来源)。术语“RNA区段”包括RNA区段和这种区段的较小片段。

[0160] 当提及氨基酸时,术语“序列”涉及给定氨基酸链、例如多肽或蛋白质内氨基酸的线性N-末端至C-末端顺序的全部或一部分;“子序列”意指序列内任何连续的氨基酸段,例

如给定蛋白质或多肽序列内的至少3个连续氨基酸。关于核苷酸链,“序列”和“子序列”具有与5'至3'核苷酸顺序相关的相似含义。

[0161] 术语“基本上如SEQ ID NO:X所示的序列”是指该序列基本上对应于SEQ ID NO:X的一部分并且有相对很少的核苷酸(或在多肽序列的情况下为氨基酸)与SEQ ID NO:X的核苷酸(或氨基酸)不一致或为SEQ ID NO:X的核苷酸(或氨基酸)的生物学功能等效物。术语“生物学功能等效物”在本领域中是公知的,并且在本文中进一步详细定义。因此,具有约85%至约90%、或更优选约91%至约95%、或甚至更优选约96%至约99%的核苷酸与本文提供的一种或多种核苷酸序列一致或功能等效的序列,被特别考虑可用于本发明的实践。

[0162] 用于本发明的适合的标准核酸杂交条件包括,例如,在50%甲酰胺、5×邓波特(Denhardt's)溶液、5×SSC、25mM磷酸钠、0.1%SDS和100μg/mL变性鲑鱼精子DNA中在42℃下杂交16小时,然后用0.1×SSC、0.1%SDS溶液在60℃下连续洗涤1小时以除去要求量的背景信号。严格性较低的本发明杂交条件包括,例如,在35%甲酰胺、5×邓波特溶液、5×SSC、25mM磷酸钠、0.1%SDS和100μg/mL变性鲑鱼精子DNA或大肠杆菌DNA中在42℃下杂交16小时,然后用0.8×SSC、0.1%SDS在55℃下连续洗涤。本领域普通技术人员将认识到,可以容易地调节这样的杂交条件以获得针对特定应用的所需严格性水平。

[0163] 用于本文时,术语“结构基因”旨在一般性描述被表达而产生所编码的肽、多肽、蛋白质、核酶、催化性RNA分子或反义分子的多核苷酸,例如基因。

[0164] 术语“对象”,用于本文时,描述了可以对其提供使用本发明组合物的治疗的生物体,包括哺乳动物例如灵长类动物。可以从所公开的治疗方法中受益的哺乳动物物种包括但不限于,猿;黑猩猩;猩猩;人类;猴子;家养动物例如狗和猫;牲畜例如马、牛、猪、绵羊、山羊和鸡;以及其他动物,例如小鼠、大鼠、豚鼠和仓鼠。

[0165] 术语“基本互补”,当用于定义氨基酸或核酸序列时,意指特定的目标序列,例如寡核苷酸序列,与选定序列的全部或一部分基本互补,并因此将与编码所述选定序列的mRNA的一部分特异性结合。因此,通常所述序列将与mRNA“靶”序列高度互补,并且在所述序列的互补部分中将具有不超过约1、约2、约3、约4、约5、约6、约7、约8、约9、或约10个等的碱基错配。在许多情况下,可能希望所述序列是精确匹配的,即与所述寡核苷酸特异性结合的序列完全互补,因此沿互补链段具有零错配。因而,高度互补的序列通常将相当特异性地与mRNA的靶序列区域结合,因此将会高效地降低和/或甚至抑制靶mRNA序列翻译成多肽产物。

[0166] 基本互补的核酸序列将与和所述核酸特异性结合的相应核酸靶序列大于约80%互补(或“%精确匹配”),并将更优选与和所述核酸特异性结合的相应靶序列大于约85%互补。在某些方面,如上所述,将会希望具有甚至更基本互补的核酸序列以用于本发明的实践,并且在这样的情况下,所述核酸序列将与和所述核酸特异性结合的相应靶序列大于约90%互补,并且在某些实施方式中可以与和所述核酸特异性结合的相应靶序列大于约95%互补,并且甚至高达并包括与和所设计的核酸特异性结合的靶序列的全部或部分约96%、约97%、约98%、约99%和甚至约100%的精确匹配互补。

[0167] 任何所公开的核酸序列的相似性百分比或互补百分比可以,例如,通过使用可从威斯康星大学遗传学计算机小组(University of Wisconsin Genetics Computer Group, UWCG)获得的GAP计算机程序6.0版比较序列信息来确定。GAP程序利用Needleman和Wunsch的比对方法(1970)。简而言之,GAP程序将相似性定义为相似的比对符号(即,核苷酸或氨基

酸)的数量除以两个序列的较短序列中的符号总数。GAP程序的优选默认参数包括:(1)核苷酸的一元比较矩阵(包含表示同一性的值1和表示非同一性的值0),和Gribskov和Burgess的加权比较矩阵(1986),2)每个间隙的罚分为3.0并且每个间隙中每个符号的额外0.10罚分;以及(3)末端间隙没有罚分。

[0168] 自然,本发明也包括与至少一种或多种本文具体阐述的特定核苷酸序列互补、本质互补和/或基本互补的核酸区段。“互补”的核酸序列是能够根据标准Watson-Crick互补规则进行碱基配对的核酸序列。用于本文时,术语“互补序列”是指基本互补的核酸序列,这可以通过上文阐述的相同核苷酸比较来评估,或定义为能够在比较严格的条件、例如上面刚刚描述的那些条件下与一种或多种本文公开的特定核酸区段杂交。

[0169] 用于本文时,与组分的量有关的术语“基本不含”或“本质不含”优选是指组合物含有小于约10重量%、优选小于约5重量%、更优选小于约1重量%的某种化合物。在优选的实施方式中,这些术语是指小于约0.5重量%、小于约0.1重量%或小于约0.01重量%。

[0170] 用于本发明的探针和引物可具有任何合适的长度。通过为序列分配数值,例如,第一个残基是1,第二个残基是2等,可以提出限定给定序列内含有的所有探针或引物的算法:

[0171] n 至 $n+y$,其中 n 是从1到序列的最后一个数的整数, y 是探针或引物的长度减去1,其中 $n+y$ 不超过序列的最后一个数。因此,对于25个碱基对的探针或引物(即“25聚体”)而言,探针或引物的集合在序列的整个长度上对应于碱基1至25、碱基2至26、碱基3至27、碱基4至28等等。类似地,对于35个碱基对的探针或引物(即“35聚体”)而言,示例性的引物或探针序列包括但不限于在序列的整个长度上对应于碱基1至35、碱基2至36、碱基3至37、碱基4至38等等的序列。同样地,对于40聚体而言,这样的探针或引物可以对应于从第一个碱基对到bp 40、从序列的第二个bp到bp 41、从第三个bp到bp 42等等的核苷酸,而对于50聚体而言,这样的探针或引物可以对应于从bp 1至bp 50、从bp 2至bp 51、从bp 3至bp 52、从bp 4至bp 53延伸的核苷酸序列,等等。

[0172] 术语“基本对应于”、“基本同源的”或“基本同一性”,用于本文时,表示核酸或氨基酸序列的特征,其中选定的核酸或氨基酸序列与选定的参考核酸或氨基酸序列相比具有至少约70或约75%的序列同一性。更通常地,所述选定的序列和参考序列将具有至少约76、77、78、79、80、81、82、83、84或甚至85%的序列同一性,更优选至少约86、87、88、89、90、91、92、93、94或95%的序列同一性。还更优选地,高度同源序列在选定的序列和与它作比较的参考序列之间经常共有大于至少约96、97、98或99%的序列同一性。

[0173] 用于本文时,“合成的”应该是指该物质不是人类或动物来源的。

[0174] 术语“治疗实践期”是指一种或多种活性剂对于治疗有效所必需的时间周期。术语“治疗有效”是指降低一种或多种症状的严重性和/或频率,消除一种或多种症状和/或潜在病因,预防症状和/或其潜在病因的发生,以及改善或修复损伤。

[0175] “治疗剂”可以是任何生理或药理活性物质,其可以在对象的靶向部位产生期望的生物效应。所述治疗剂可以是化疗剂、免疫抑制剂、细胞因子、细胞毒性剂、核溶解化合物、放射性同位素、受体和前药活化酶,其可以是天然存在的或通过合成或重组方法产生的或其任何组合。受经典多药耐药影响的药物,例如长春花生物碱(例如长春碱和长春新碱)、蒽环霉素(例如多柔比星和柔红霉素)、RNA转录抑制剂(例如放线菌素-D)和微管稳定药物(例如紫杉醇),可具有作为治疗剂的特定用途。细胞因子也可用作治疗剂。这样的细胞因子的

实例是淋巴因子、单核因子和传统的多肽激素。癌症化疗剂可以是优选的治疗剂。对于抗癌剂和其他治疗剂的更详细描述,本领域技术人员可参考许多指导性手册,包括但不限于,医师案头参考(Physician's Desk Reference)以及Goodman和Gilman的“治疗学的药理基础(Pharmacological Basis of Therapeutics)”,第十版,Hardman等(编著)(2001)。

[0176] 用于本文时,“转录因子识别位点”和“转录因子结合位点”是指多核苷酸序列或序列基序,其被鉴定为是一个或多个转录因子的序列特异性相互作用的位点,经常采取直接蛋白质-DNA结合的形式。通常,转录因子结合位点可以通过DNA足迹法、凝胶迁移率变动分析等鉴定,和/或可以基于已知的共有序列基序或通过本领域普通技术人员已知的其他方法预测。

[0177] “转录调节元件”是指单独或与一种或多种其他核酸序列组合来激活转录的多核苷酸序列。转录调节元件可以,例如,包含一个或多个启动子、一个或多个响应元件、一个或多个负调节元件和/或一个或多个增强子。

[0178] “转录单元”是指包含至少第一结构基因的多核苷酸序列,所述第一结构基因与至少第一顺式作用启动子序列可操作地联接并任选与有效转录所述结构基因序列所必需的一个或多个其他顺式作用核酸序列可操作地联接,以及如可能是将所述结构基因序列的适当组织特异性和发育性转录可操作地置于启动子和/或增强子元件控制下所需要的至少第一远端调节元件,以及有效转录和翻译所必需的任何另外的顺式序列(例如,多腺苷酸化位点,mRNA稳定性控制序列等)。

[0179] 用于本文时,术语“转化”旨在一般性地描述将外源多核苷酸序列(例如,病毒载体、质粒或重组DNA或RNA分子)引入宿主细胞或原生质体中的方法,在所述宿主细胞或原生质体中所述外源多核苷酸并入至少第一染色体中或能够在转化的宿主细胞内自主复制。转染、电穿孔和“裸”核酸摄取都表示用于用一种或多种多核苷酸转化宿主细胞的技术的实例。

[0180] 用于本文时,术语“转化细胞”意指已通过将一种或多种外源多核苷酸引入该细胞而改变其核酸互补的宿主细胞。

[0181] “治疗”用于本文时是指向对象提供任何类型的医疗或手术管理。治疗可包括但不限于向对象施用包含治疗剂的组合物。“治疗”包括为了诸如治愈、逆转、缓解、减轻疾病、病症或病况或者疾病、病症或病况的一种或多种症状或表现的严重性、抑制其进展或降低其可能性的目的而向对象施用或应用本发明的化合物或组合物。在某些方面,本发明的组合物也可以被预防性施用,即,在病况的任何症状或表现形成之前施用,其中这样的预防是有保证的。通常,在这样的情况下,所述对象将是由于家族史、病历或完成一项或多项指示随后产生这样的疾病或病症的倾向性的诊断或预后检验而被诊断为“有风险”产生这样的疾病或病症的对象。

[0182] 术语“载体(vector)”用于本文时是指核酸分子(通常由DNA组成),其能够在宿主细胞中复制和/或可以与另一核酸区段在操作上联接从而引起相连区段的复制。质粒、粘粒或病毒是示例性的载体。

[0183] 如应用于来自所公开的疫苗递送组合物的活性剂的释放动力学的表述“零级”或“接近零级”,旨在包括在施用所述组合物后的治疗实践时间周期内所述活性剂以受控方式释放的速率,以此达到所述活性剂的治疗有效性血浆浓度。

[0184] 在某些实施方式中,将本发明的一种或多种核酸区段与合适的可检测标志(即“标记物”)组合使用将是有利的,例如在杂交分析中使用标记的多核苷酸探针确定给定的靶序列的存在的情况下。本领域已知多种适当的指示剂化合物和组合物用于标记寡核苷酸探针,包括但不限于荧光配体、放射性配体、酶配体或其他配体,例如亲和素/生物素等,它们能够在合适的分析中被检测到。在具体的实施方案中,也可以使用一种或多种荧光标记物或酶标签,例如脲酶、碱性磷酸酶或过氧化物酶,代替放射性或其他环境上不太理想的试剂。在酶标签的情况下,已知比色、显色或荧光指示剂底物可用于提供人眼可见或通过分析方法如闪烁扫描、荧光测定法、分光光度测定法等来检测样品的方法,以鉴定与含有一种或多种互补或基本互补的核酸序列的样品的特异性杂交。在同时或依次检测两种或更多种标记探针的所谓“多重”分析情况下,可能需要用具有第一检测性质或参数(例如,发射和/或激发光谱最大值)的第一标记物标记第一寡核苷酸探针,其也用具有不同的(即与第一标记物不相关或可辨别)的第二检测性质或参数的第二标记物标记第二寡核苷酸。多重分析的使用,特别是在遗传扩增/检测方案的环境下,是分子遗传学领域的普通技术人员所公知的。

[0185] 生物功能等效物

[0186] 可以对核酸的结构或包含它们的载体以及由它们编码的mRNA、多肽或治疗剂进行修饰和改变,并仍然获得含有一种或多种具有期望特性的治疗剂的功能性疫苗递送系统。如上所述,经常希望将一个或多个突变引入特定的多核苷酸序列中。在某些情况下,该突变改变所生成的编码的多肽序列,或者在其他情况下,编码多核苷酸中的一个或多个突变不改变所述多肽的序列。

[0187] 当期望改变多肽的氨基酸序列以产生等效的或甚至改进的第二代分子时,可以根据表格1,通过改变编码DNA序列的一个或多个密码子来实现氨基酸改变。

[0188] 例如,某些氨基酸可以替换蛋白质结构中的其他氨基酸而不会明显丧失与结构例如抗体的抗原结合区或底物分子上的结合位点的相互作用结合能力。由于蛋白质的相互作用能力和性质决定了蛋白质的生物功能活性,因此可以在蛋白质序列中进行某些氨基酸序列替换,并且当然,也可以在其基础DNA编码序列中进行,并仍然获得具有相似性质的蛋白质。因此,发明人考虑,可以对所公开组合物的肽序列或编码所述肽的相应DNA序列进行各种改变,而不明显丧失它们的生物学效用或活性。

[0189] 表1

| 氨基酸 | | | 密码子 | | | | | | |
|------------|-----|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| 丙氨酸 | Ala | A | GCA | GCC | GCG | GCU | | | |
| 半胱氨酸 | Cys | C | UGC | UGU | | | | | |
| 天冬氨酸 | Asp | D | GAC | GAU | | | | | |
| 谷氨酸 | Glu | E | GAA | GAG | | | | | |
| 苯丙氨酸 | Phe | F | UUC | UUU | | | | | |
| 甘氨酸 | Gly | G | GGA | GGC | GGG | GGU | | | |
| 组氨酸 | His | H | CAC | CAU | | | | | |
| 异亮氨酸 | Ile | I | AUA | AUC | AUU | | | | |
| 赖氨酸 | Lys | K | AAA | AAG | | | | | |
| [0190] 亮氨酸 | Leu | L | UUA | UUG | CUA | CUC | CUG | CUU | |
| 甲硫氨酸 | Met | M | AUG | | | | | | |
| 天冬酰胺 | Asn | N | AAC | AAU | | | | | |
| 脯氨酸 | Pro | P | CCA | CCC | CCG | CCU | | | |
| 谷氨酰胺 | Gln | Q | CAA | CAG | | | | | |
| 精氨酸 | Arg | R | AGA | AGG | CGA | CGC | CGG | CGU | |
| 丝氨酸 | Ser | S | AGC | AGU | UCA | UCC | UCG | UCU | |
| 苏氨酸 | Thr | T | ACA | ACC | ACG | ACU | | | |
| 缬氨酸 | Val | V | GUA | GUC | GUG | GUU | | | |
| 色氨酸 | Trp | W | UGG | | | | | | |
| 酪氨酸 | Tyr | Y | UAC | UAU | | | | | |

[0191] 在进行这样的改变时,可以考虑氨基酸的亲水指数。亲水氨基酸指数在赋予蛋白质相互作用生物功能方面的重要性在本领域中被普遍理解(Kyte和Doolittle,1982,通过引用并入本文)。要接受的是,氨基酸的相对亲水特性对所生成的蛋白质的二级结构有贡献,二级结构又限定了蛋白质与其他分子例如酶、底物、受体、DNA、抗体、抗原等的相互作用。每种氨基酸已基于其疏水性和电荷特征被指定亲水指数(Kyte和Doolittle,1982)。这些值是:异亮氨酸(+4.5);缬氨酸(+4.2);亮氨酸(+3.8);苯丙氨酸(+2.8);半胱氨酸/胱氨酸(+2.5);甲硫氨酸(+1.9);丙氨酸(+1.8);甘氨酸(-0.4);苏氨酸(-0.7);丝氨酸(-0.8);色氨酸(-0.9);酪氨酸(-1.3);脯氨酸(-1.6);组氨酸(-3.2);谷氨酸(-3.5);谷氨酰胺(-3.5);天冬氨酸(-3.5);天冬酰胺(-3.5);赖氨酸(-3.9);和精氨酸(-4.5)。

[0192] 本领域已知,某些氨基酸可被具有相似亲水指数或评分的其它氨基酸替换,并仍然产生具有相似生物活性的蛋白质,即仍然获得生物功能等效的蛋白质。在进行这样的改变时,优选亲水指数在 ± 2 以内的氨基酸的替换,特别优选在 ± 1 以内的氨基酸替换,甚至更特别优选在 ± 0.5 以内的氨基酸替换。本领域还了解,可以基于亲水性有效地进行类似氨基酸的替换。美国专利号4,554,101(通过对其明确引用以其整体特别并入本文),指出蛋白质的最大局部平均亲水性,由其相邻氨基酸的亲水性支配,与该蛋白质的生物学性质相关。

[0193] 如美国专利号4,554,101中所详述,将以下亲水性值指定给氨基酸残基:精氨酸(+3.0);赖氨酸(+3.0);天冬氨酸(+3.0±1);谷氨酸(+3.0±1);丝氨酸(+0.3);天冬酰胺(+0.2);谷氨酰胺(+0.2);甘氨酸(0);苏氨酸(-0.4);脯氨酸(-0.5±1);丙氨酸(-0.5);组氨酸(-0.5);半胱氨酸(-1.0);甲硫氨酸(-1.3);缬氨酸(-1.5);亮氨酸(-1.8);异亮氨酸(-1.8);酪氨酸(-2.3);苯丙氨酸(-2.5);色氨酸(-3.4)。应理解,氨基酸可以替换具有相似亲水性值的另一种氨基酸,并且仍然获得生物学上等效、特别是免疫学上等效的蛋白质。在这样的改变中,优选亲水性值在±2以内的氨基酸的替换,特别优选在±1以内的氨基酸替换,甚至更特别优选在±0.5以内的氨基酸替换。

[0194] 如上所述,氨基酸替换因此通常基于氨基酸侧链取代基的相对相似性,例如它们的疏水性、亲水性、电荷、尺寸等。考虑一种或多种前述特征的示例性替换是本领域普通技术人员公知的,并包括精氨酸和赖氨酸;谷氨酸和天冬氨酸;丝氨酸和苏氨酸;谷氨酰胺和天冬酰胺;以及缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸。

[0195] 贯穿全文使用的章节标题仅用于组织目的,不应解释为限制所描述的主题。本申请中引用的所有文献或文献的部分(包括但不限于专利、专利申请、文章、书籍和论文)通过对其明确引用而以其整体明确地并入本文。如果一个或多个所并入的文献和类似材料与本申请中术语的定义相矛盾的方式定义该术语,则以本申请为准。

[0196] 实施例

[0197] 包括以下实施例以说明本发明的说明性实施方式。本领域普通技术人员应该理解,这些实施例中公开的技术代表被发现在本发明的实践中很好地起作用的技术,并因此可以认为构成其实践的优选模式。然而,根据本公开,本领域普通技术人员应该领会,在不背离本发明的精神和范围下,可在所公开的具体实施方式中做出许多改变并仍然获得同样的或相似的结果。

[0198] 实施例1-脂质多聚复合物加强基于mRNA的疫苗的抗肿瘤免疫

[0199] 在该实施例中,描述了一种脂质多聚复合物mRNA疫苗,其由囊封在1,2-二油酰-sn-甘油-3-乙基磷酸胆碱/1,2-二油酰-sn-甘油-3-磷脂酰乙醇胺/1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[氨基(聚乙二醇)-2000(EDOPC/DOPE/DSPE-PEG)脂质壳中的聚(β-氨基酯)聚合物mRNA核组成。这种核-壳结构的mRNA疫苗通过巨胞饮作用进入树突细胞。它通过Toll样受体7/8信号转导有力刺激树突细胞中干扰素-α和白细胞介素-12的表达,从而显示出内在的佐剂活性。用所述mRNA疫苗处理的树突细胞显示出增强的抗原呈递能力。将携带表达卵清蛋白抗原的肺转移性B16-OVA肿瘤的小鼠用脂质多聚复合物mRNA处理,观察到肿瘤结节减小超过90%。总的来说,这种核-壳结构提供了用于将mRNA疫苗递送至哺乳动物细胞的优异系统。

[0200] 图1A示意性地示出了根据本发明一个方面的示例性壳/核-mRNA脂质多聚复合物疫苗组合物的合成。在所述壳/核-mRNA疫苗中,带负电荷的mRNA凝聚在带正电荷的聚合物内,它们一起形成直径为几纳米到几百纳米的紧密多聚复合物“核”结构。然后由亲水性磷脂双层“壳”囊封该多聚复合物核,所述壳既增强树突细胞的摄取,又保护内核内的mRNA分子不被细胞的核酸酶降解。还可以通过将一种或多种可溶性佐剂加载到所述多聚复合物-mRNA内核和外脂质壳之间的空间中来进一步修饰所生成的三组分壳/核/mRNA组合物,以进一步增强抗肿瘤免疫。

[0201] 与常规的压缩核-mRNA疫苗相比,本文所述的结果揭示了所公开的壳/核-mRNA-多聚复合物结构疫苗系统的多种优点。将所述多聚复合物核-mRNA粒子囊封到磷脂外壳中不仅保护所述核mRNA分子免于降解,而且还显著改善了抗原呈递树突细胞对疫苗粒子的摄取(图1A)。另外,囊封所述核的脂质壳结构的存在阻止了所述核-mRNA分子与非DC免疫细胞相互作用,这限制了潜在的不想要的副作用。此外,本文公开的LPP-mRNA疫苗组合物在刺激IFN- α 和IL-12(通过促进DC成熟在介导抗肿瘤免疫中起重要作用的细胞因子)的表达方面比常规的“裸”mRNA-核疫苗更为有力(图4A)。此外,所述LPP-mRNA疫苗在介导肿瘤细胞杀伤方面非常有力。最后,每当需要进一步增强抗原呈递细胞的活性时,本文所述的壳/核/mRNA多组分疫苗组合物还提供了将可溶性佐剂或其他刺激分子囊封在所述脂质壳中的有效选项。所有这些性质突出了这种治疗性疫苗平台在快速发展的精准医学时代中创造新的免疫治疗剂中的效用。

[0202] 材料和方法

[0203] 聚(β -氨基酯)聚合物(PbAE)的合成.PbAE(MW \sim 4kDa)如以前所述以两步反应程序合成(Kamat等人,2013)。在第一步中,通过将1,4-丁二醇二丙烯酸酯(Sigma-Aldrich)与5-氨基-1-戊醇(Sigma-Aldrich)以1.2:1的摩尔比混合来合成基础聚合物。将反应在配有特氟隆(teflon)搅拌棒的玻璃闪烁小瓶中在90 $^{\circ}$ C下维持24hr。将所述基础聚合物干燥,然后以167mg/mL的终浓度溶解在无水二甲基亚砷(DMSO)中。在第二步中,将480 μ L的所述基础聚合物溶液与320 μ L的0.5mol/L(PEO)4-双胺(Molecular Biosciences,Boulder,CO,美国)在1.5mL Eppendorf管中混合,并在室温下反应24hr。所述聚合物混合物首先在透析管(MWCO 3,500Da)中对Milli-Q水进行透析以除去大部分游离试剂,然后与4 \times 体积的乙醚(Sigma-Aldrich)混合并剧烈涡旋,然后以4,000rpm离心5min,以进一步除去上清液中未反应的单体。将纯化的聚合物真空干燥,然后溶于pH 5.2的25mM乙酸钠中。

[0204] PbAE/mRNA多聚复合物的制备.通过将一体积的所述PbAE聚合物与两体积的mRNA分子(Trilink Biotechnologies,San Diego,CA,美国)混合来制备PbAE/mRNA多聚复合物。在20 $^{\circ}$ C温育20min后,使用Malvern Zetasizer Nano ZS动态光散射仪(Malvern Instruments,Inc.,Worcestershire,英国)分析所述多聚复合物的尺寸分布和 ζ 电位。还将所述PbAE/mRNA多聚复合物在凝胶阻滞分析中进行分析。简言之,将含有250ng mRNA的多聚复合物样品加载到每个孔中,并通过在具有1 \times TBE缓冲液(BioRad,Hercules,CA,美国)的0.7%琼脂糖凝胶中电泳而分离。将RNA条带用Gelred核酸凝胶染色剂(Biotium,Hayward,CA,美国)染色,并用GelDoc系统(BioRad,Hercules,CA,美国)可视化。

[0205] LPP/mRNA疫苗的制备和表征.脂质1,2-二油酰-sn-甘油-3-乙基磷酸胆碱(EDO PC)、1,2-二油酰-sn-甘油-3-磷脂酰乙醇胺(DOPE)、1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[氨基(聚乙二醇)-2000(DSPE-PEG-2000)、胆固醇半琥珀酸酯(CHEMS)和1,2-二油酰-3-三甲基铵-丙烷(DOTAP)购自Avanti Polar Lipids(Birmingham,AL,美国)。胆固醇得自Sigma-Aldrich(St.Louis,MO,美国)。将所述试剂以20mg/mL的终浓度溶解在氯仿中,并在部分真空下在Buchi Rotavapor(Oldham,UNITED KINGDOM)中通过旋转蒸发施用用来制备薄脂质膜。所述薄脂质膜由49%EDO PC、49%DOPE和2%DSPE-PEG组成。所述脂质膜用含有PbAE/mRNA多聚复合物的溶液再水化以制备脂质多聚复合物mRNA疫苗。用DLS和透射电子显微镜(TEM)测量所述LPP/mRNA疫苗的尺寸分布和 ζ 电位。将相同的程序应用于制备CHEMS/

DOPE/八聚精氨酸(CHEMS/DOPE/R8)和DOTAP/胆固醇/DSPE-PEG-2000(DOTAP/Chol/DSPE-PEG-2000)脂质多聚复合物。为了制备鱼精蛋白/mRNA复合物,将硫酸鱼精蛋白(X级,Sigma Aldrich)与mRNA以2:1的重量比在10mM Tris-HCL缓冲液中混合,然后在室温下温育30min。

[0206] LPP/mRNA疫苗的体外细胞摄取.应用永生生化DC2.4(鼠骨髓来源的树突细胞系)细胞对来自所述LPP/mRNA疫苗的蛋白质表达进行测试。简言之,将细胞以 1.5×10^5 细胞/孔的接种密度接种在24孔板中,并维持在1mL RPMI-1640完全培养基(补充有10%胎牛血清[FBS,Atlas Biological,Fort Collins,CO,美国]、1%青霉素/链霉素[10,000单位青霉素和10mg链霉素,Sigma-Aldrich]和0.1% β -巯基乙醇[Sigma-Aldrich])中。将细胞与包装有0.5 μ g eGFPmRNA的LPP(LPP/eGFP mRNA)一起温育24hr,并使用Eclipse TE2000-S荧光显微镜(Nikon Corporation,Tokyo,日本)可视化eGFP表达。使用Accuri C6流式细胞仪(Becton Dickinson,Franklin Lakes,NJ,美国)进行流式细胞术以测量GFP阳性细胞的百分比。同样的程序也应用于测定人MDA-MB-231乳腺癌细胞(美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection);Manassas,VA,USA)和鼠mDMEC皮肤内皮细胞在它们分别与LPP/eGFP mRNA温育后的eGFP表达。

[0207] 为了确定所述LPP/mRNA疫苗的细胞内化途径,将DC2.4细胞以 1.5×10^5 细胞/孔的密度接种在24孔板中并在37℃温育24hr。然后将它们用包装在LPP中的FAM标记mRNA(LPP/FAM-mRNA)和下列小分子抑制剂之一处理:阿米洛利(0.2mM),氯喹(100mM),染料木黄酮(50 μ M),氯丙嗪(15 μ M),或匹莫齐特(10 μ M)。让细胞生长4hr,然后用冰冷的PBS洗涤并应用于经由荧光显微术确定粒子摄取。

[0208] LPP/mRNA的体外细胞毒性.为了测试来自LPP/mRNA疫苗的潜在细胞毒性,将DC2.4、MDA-MB-231和内皮细胞以 3×10^4 细胞/孔的接种密度接种在96孔板中,并用LPP/0.1 μ g mRNA处理。24小时后,按照制造商的说明书,用基于四唑鎓的CellTiter96® Aqueous One Solution Cell Proliferation(MTS)分析(Promega,Inc.,Madison,WI,美国)测量细胞存活率。

[0209] 骨髓来源的树突细胞(BMDC)的制备.如以前所述(Xia等人,2015)从C57BL/6小鼠制备BMDC。简而言之,使用注射器用含2%FBS的磷酸盐缓冲盐水(PBS)冲洗出股骨和胫骨的骨髓细胞。将细胞以 $500 \times g$ 离心4min,用ACK裂解缓冲液(Lonza,Inc.)处理以除去血红细胞,并在补充有10%FBS、0.5% β -巯基乙醇、1%青霉素/链霉素、20ng/mL粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)和20ng/mL白细胞介素-4(IL4)的RPMI-1640培养基中重悬浮。将它们以 1×10^6 细胞/毫升的接种密度接种到6孔板中,并且每隔一天更换生长培养基。在第5天收获非贴壁的树突细胞。

[0210] 促炎细胞因子的测量.将BMDC以 3×10^5 细胞/孔的密度接种在24孔板中,并用LPP/0.5 μ g OVA mRNA处理。所述LPP/mRNA疫苗的解散组分(脂质体壳和多聚复合物核)用作阴性对照。温育24hr后,收集上清液,用测量细胞因子的ELISA试剂盒(eBioscience,San Diego,CA,美国)测量IL-6、TNF- α 、IFN- β 和IL-12浓度。

[0211] TLR7/8抑制.将DC2.4细胞以 1.5×10^5 细胞/1mL RPMI-1640完全培养基的密度接种在24孔板中,并在37℃温育24hr。然后将细胞用TLR7/8抑制剂ODN 2087(Militenly Biotec,San Diego,CA,美国)以2.5 μ M的终浓度在37℃处理1hr。随后,将LPP/0.5 μ g OVA mRNA加入培养物中,并将细胞生长再维持24hr,然后收集细胞培养基用于细胞因子分析。未

经TLR抑制剂处理的树突细胞充当阳性对照,未经LPP/OVA mRNA处理的细胞用作阴性对照。

[0212] 树突细胞成熟的评价.将DC2.4细胞以 1.5×10^5 细胞/孔的密度接种在24孔板中,所述孔供给有1mL RPMI完全培养基。将它们用LPP/0.5 μ g mRNA处理并在37℃温育24hr。然后将细胞用PBS洗涤,用对CD11c、CD40、CD86和MHC II特异的抗体(BD Bioscience)染色,并应用于使用BD Accuri C6流式细胞仪(Becton Dickinson, Inc., Franklin Lakes, NJ, 美国)的流式细胞术分析。

[0213] MHC I和II限制性抗原呈递分析.为了测量抗原呈递,将用LPP/OVA mRNA处理的BMDC在室温下用识别OVA257-264-H-2Kb复合物的五聚体(H-2Kb/SIINFEKL, BD Bioscience, San Jose, CA, 美国)染色10min。然后将细胞用抗CD11c抗体(BD Bioscience)染色30分钟并使用Accuri C6流式细胞仪分析。

[0214] 为了测定T细胞活化,用LPP/0.5 μ g OVA mRNA处理BMDC和DC2.4细胞24hr。将细胞用PBS洗涤,并与B3Z OVA特异性CD8T细胞或DOBW OVA特异性CD4T细胞以1:1的DC/T细胞比率共培养。进行ELISA以测量活化的T细胞的IL-2分泌。所有样品一式三份地测量。

[0215] 细胞毒性T细胞对B16-OVA黑素瘤细胞的体外杀伤.将DC2.4以 1.5×10^5 细胞/孔的密度接种在24孔板中。温育过夜后,将细胞在37℃用LPP/0.5 μ g OVA mRNA处理24hr。随后将这些DC2.4细胞与B3Z T细胞以1:2的DC2.4/T细胞比率共培养。温育24hr后,将活化的T细胞应用于与B16黑素瘤细胞以5:1的T细胞/肿瘤细胞比率在37℃共培养4、8或24hr。然后使用如上所述的MTS甲臞存活率分析(Promega, Inc., Madison, WI, 美国)测定肿瘤细胞存活率。用未活化的T细胞或用HER2乳腺癌抗原肽活化的T细胞处理的肿瘤细胞充当阴性对照。所有样品一式三份地测量。

[0216] 小鼠肺转移性黑素瘤模型的疗效试验.按照以前描述的方案(Overwijk和Restifo, 2001),通过尾静脉注射向8周龄雄性和雌性C57BL/6小鼠接种 2.5×10^5 B16-OVA黑素瘤肿瘤细胞来建立肺转移瘤。肿瘤接种后3天,将小鼠皮下疫苗接种LPP/OVA mRNA(1 μ g)。在第7天和第10天用另外两次接种加强疫苗接种。在第18天将小鼠安乐死,收获肺脏并用4%多聚甲醛固定。在解剖显微镜下计数肺转移性肿瘤结节的数量。

[0217] 活体小鼠的生物发光成像.向BALB/c小鼠皮下施用10 μ g加载到LPP中的荧光素酶mRNA(LPP/Luc mRNA)。24或48小时后,将小鼠腹膜内注射30 μ g RediJect D-luciferin Ultra(Perkin-Elmer),并在Xenogen IVIS-200成像系统中测量生物发光。

[0218] 鼠肺转移性黑素瘤模型的功效试验.将8周龄雄性和雌性C57BL/6小鼠通过尾静脉注射接种 2.5×10^5 B16-OVA黑素瘤肿瘤细胞来建立肺转移瘤。肿瘤接种后3天,将小鼠皮下疫苗接种LPP/OVA mRNA(1mg)。在第7天和第10天用另外两次接种加强疫苗接种。在第18天将小鼠安乐死,收获肺脏并用4%多聚甲醛固定。在解剖显微镜下计数肺转移性肿瘤结节的数量。

[0219] 体内T细胞活化分析.为了确定T细胞活化状态,将C57BL/6小鼠用2.5mg LPP/OVA mRNA皮下免疫。为了通过表面标志物确定T细胞活化,24小时后将小鼠安乐死,收集脾脏和淋巴结,加工,并用抗鼠CD3、CD4、CD8或CD69抗体(Ebioscience)在4℃染色30min,然后使用BD Accuri C6流式细胞仪(BD Bioscience, San Jose, CA, 美国)通过流式细胞术进行分析。为了通过IFN- γ 分泌来测量T细胞活化,将C57BL/6小鼠在第1、4和7天用LPP/OVA mRNA或LPP/TRP2mRNA皮下免疫。在最后一次免疫后一周,收集脾脏、淋巴结和PBMC并进行加工用于

单细胞分析。将细胞用OT-I (OVA257-264)、OT-II (OVA323-339) 或PMA-离子霉素在37℃再刺激48hr。通过ELISA(eBioscience)分析IFN- γ 分泌。

[0220] 统计分析.应用双尾学生t检验进行实验组之间的比较。 $P < 0.05$ 被认为具有统计显著性。

[0221] 结果

[0222] 基于脂质多聚复合物的mRNA疫苗对于树突细胞摄取和蛋白质表达是最佳的.描述了基于mRNA的疫苗的平台,所述疫苗包含包装在脂质双层包膜中的PbAE/mRNA多聚复合物核结构(图1A)。进行琼脂糖凝胶电泳以检查mRNA与阳离子PbAE聚合物的结合能力,并且确定,当PbAE/mRNA比率(重量/重量)为20或更高时,mRNA被完全囊封在PbAE中(图1B)。因此,在本研究的其余部分中,选择PbAE/mRNA比率为20来制备LPP mRNA疫苗。TEM分析检测到50-nm PbAE/mRNA多聚复合物核(图1C)被EDOPC/DOPE/DSPE-PEG-2000脂质壳包围(图1D,图1E,和图1F)。

[0223] 将LPP/mRNA疫苗的脂质壳在EDOPC/DOPE/DSPE-PEG-2000、DOTAP/Chol/DSPE-PEG-2000和CHEMS/DOPE/R8之中进行比较。DOTAP/Chol/DSPE-PEG-2000形成阳离子脂质壳,CHEMS/DOPE/R8是具有活性寻靶部分的脂质壳;两者均在以前已应用于RNA递送(Wang等人,2013;Hayashi等人,2015)。DC2.4充当抗原呈递细胞,并且应用编码eGFP蛋白的mRNA分子来制备所述多聚复合物核。与PbAE/mRNA核一起温育的细胞没有表达可检测水平的eGFP(图1G)。虽然用EDOPC/DOPE/DSPE-PEG-2000和DOTAP/Chol/DSPE-PEG-2000包装的粒子处理的细胞表达明亮的eGFP蛋白,但与CHEMS/DOPE/R8包装的多聚复合物一起温育的细胞不具有可检测水平的eGFP(图1H,图1I,和图J)。有趣的是,用鱼精蛋白/eGFP处理的细胞也没有高水平的eGFP表达(图1K),尽管所述基于鱼精蛋白的mRNA疫苗处于临床试验的不同阶段(Kallen和Thess,2014)。另外,从DOTAP/Chol/DSPE-PEG-2000制剂检测到高水平的细胞毒性(图1L)。因此,在所有后续研究中选择EDOPC/DOPE/DSPE-PEG-2000用于LPP/mRNA疫苗制备。

[0224] LPP/mRNA疫苗通过巨胞饮作用进入树突细胞.研究了不同细胞类型对LPP/mRNA疫苗粒子的摄取。将等量的包装有PbAE/eGFPmRNA的EDOPC/DOPE/DSPE-PEG-2000粒子加入DC2.4细胞、MDA-MB-231人乳腺癌细胞或mDMEC鼠内皮细胞的培养物中,并在24hr后检测表达eGFP的细胞。与DC是具有高吞噬潜能的最有效抗原呈递细胞的观点(Banchereau和Steinman,1998)相符,所有DC2.4细胞都内化了疫苗粒子并表达了绿色荧光蛋白;相比之下,大约一半数量的MDA-MB-231细胞为GFP阳性,而仅有一小部分内皮细胞合成GFP(图2)。

[0225] 通过用胞吞作用、巨胞饮作用和吞噬作用的抑制剂处理DC2.4细胞来考查细胞摄取的机制。用阿米洛利——一种巨胞饮作用抑制剂(Koivusalo等人,2010)处理,将EDOPC/DOPE/DSPE-PEG-2000-包装的、FAM-荧光染料标记的mRNA(LPP/FAM-mRNA)的细胞摄取减少了70%。相比之下,所述粒子的细胞摄取不受蛋白介导的胞吞作用抑制剂——染料木黄酮、网格蛋白介导的胞吞作用抑制剂——氯丙嗪、或吞噬作用抑制剂——匹莫齐特的显著影响(参见图3A,图3B,图3C,图3D,图3E,图3F和图3G)。

[0226] 这些结果表明,巨胞饮作用是所公开的基于LPP mRNA的疫苗进入细胞的主要途径。值得注意的是,氯喹——一种阻止内体酸化和成熟的试剂,不影响mRNA蓄积(图3A,图3B,图3C,图3D,图3E,图3F和图3G)。氯喹处理的细胞的时间依赖性监测显示延迟的荧光强

度增加,温育后120min达到峰值强度(图3H)。该结果表明所述mRNA分子成功地离开内体并进入胞质溶胶。

[0227] LPP mRNA疫苗促进DC成熟.过表达卵清蛋白(OVA)的鼠肿瘤模型已被广泛应用于测试癌症疫苗的有效性(Kim等人,2015;Avci等人,2011;Uhlig等人,2015)。应用OVA mRNA以组装所述治疗性mRNA疫苗(LPP/OVA),并在体外和体内考查抗肿瘤免疫。在体外环境中,将骨髓来源的DC(BMDC)与LPP/OVA或对照共温育,并测量细胞生长培养基中的细胞因子水平。有趣的是,多聚复合物/OVA核和LPP/OVA二者以及鱼精蛋白/OVA都可以引发显著的TNF- α 表达(图4A)。以前已经报道,TNF- α 依赖性DC成熟对于激活针对病毒感染的适应性免疫应答(Trevejo等人,2001)和对于抗肿瘤免疫(Brunner等人,2000)是至关重要的。然而,多聚复合物/OVA和鱼精蛋白/OVA二者在刺激IFN- β 和IL-12表达上均不如LPP/OVA有力(图4A)。以前已经表明,I型干扰素IFN- β 促进DC成熟、抗原加工和呈递,以及刺激T细胞克隆扩增(Xia等人,2015)。同样,IL-12是Th1细胞因子之一(Mills和Ley,2014),而产生IL-12的DC促进I型CD8⁺T细胞免疫(Carreno等人,2013;Carreno等人,2015)。结果表明,为了使疫苗的佐剂效应最大化,需要多聚复合物/mRNA核和脂质壳两者。LPP/mRNA介导的佐剂效应是通过激活TLR-7/8信号转导介导的,与鱼精蛋白凝聚的mRNA粒子一致(Scheel等人,2005;Fotin-Mleczek等人,1997),因为用短的单链寡脱氧核苷酸TLR7/8抑制剂ODN2087处理完全抑制了LPP/OVA刺激的IL12和IFN β 表达(图4B)。

[0228] 还在LPP/OVA处理的DC2.4细胞中考查了DC成熟标志物。处理后细胞显示出急剧增加的MHC II表达水平(图4C)。已经报道,DC在活化后表达较高水平的载有源自质膜上抗原的肽的MHC II(Trombetta和Mellman,2005)。另外,所述处理细胞中其他DC成熟标志物——CD40和CD86的水平也更高(图4C)。

[0229] LPP mRNA疫苗刺激抗原呈递.在用LPP/OVA处理的BMDC中分析抗原加工和呈递。流式细胞术检测到CD11c⁺DC,其也在细胞表面上显示MHCI-OVA表位(图5A)。当所述处理后细胞与OVA特异性的CD4⁺或CD8⁺T细胞共温育时,我们检测到所述抗原特异性T细胞分泌IL-2的显著增加(图5B),表明所述DC已成功加工并呈递出可被T细胞识别的OVA表位。这些结果证明BMDC可以正确翻译mRNA抗原,以及加工和呈递所述抗原表位。在另一项分开的研究中,用处理后DC2.4细胞观察到类似的效应(图5C)。

[0230] LPP mRNA疫苗具有强有力的抗肿瘤活性.为了体外测试肿瘤细胞杀伤,将活化的OVA特异性T细胞与B16-OVA黑素瘤细胞以5:1的效应T细胞/肿瘤细胞的比率共培养,并检查时间依赖性肿瘤细胞杀伤。早在共温育后4小时就观察到B16-OVA肿瘤细胞存活率显著降低,并且在24-hr时间点大多数肿瘤细胞死亡(图6A)。

[0231] 相比之下,用原初T细胞处理的肿瘤细胞未显示出显著的细胞死亡。为了确认抗原特异性肿瘤细胞杀伤,将B16-OVA细胞与对HER2乳腺癌抗原而不是OVA具有特异性的T细胞共温育,未观察到细胞死亡。

[0232] 在B16-OVA黑素瘤肺转移模型中进一步评价抗肿瘤活性。小鼠以皮下注射LPP/OVA三次进行处理,并在最后一次处理后8天安乐死以检查肺中的肿瘤生长。PBS对照组中的小鼠发生广泛的肺转移;相比之下,用LPP/OVA mRNA处理的小鼠显示肺中肿瘤结节数减少96%(图6B),证明了LPP mRNA疫苗在治疗转移性肿瘤中的能力。。

[0233] 在另一项分开的研究中,用另一种靶向TRP2的mRNA疫苗(LPP/TRP2mRNA)处理携带

B16黑素瘤的C57BL6小鼠。在接种疫苗的小鼠中检测到显著的PBMC的IFN- γ 表达水平。约4%的总PBMC是TRP2特异性CD8 α T细胞。这些结果表明,LPP/mRNA平台不局限于一种特定的mRNA,表明它在对抗癌症中有广泛的应用潜能。

[0234] 实施例2-脂质多聚复合物加强基于mRNA的疫苗的抗肿瘤免疫

[0235] 图8A和图8B显示非靶向和靶向mRNA疫苗粒子的尺寸分布。靶向mRNA疫苗在脂质壳的表面上具有甘露糖。由于树突细胞表达甘露糖受体并且倾向于与表面上具有甘露糖部分的粒子以高结合亲和力结合。它按照与非靶向mRNA疫苗相同的程序制备。用于所述壳的脂质组合物是49%EDOPC、49%DOPE、1%DSPE-PEG和1%DSPE-PEG-甘露糖。非靶向和靶向mRNA疫苗粒子二者均在40-200nm范围内,而靶向粒子的中位数尺寸比非靶向粒子大。

[0236] 图12A和图12B显示了树突细胞摄取靶向mRNA疫苗比非靶向mRNA疫苗更有效。靶向mRNA疫苗在脂质壳的表面上具有甘露糖。它按照与非靶向mRNA疫苗相同的程序制备。用于所述壳的脂质组合物是49%EDOPC、49%DOPE、1%DSPE-PEG和1%DSPE-PEG-甘露糖。将Cy5荧光染料标记的mRNA分子包装在非靶向或靶向疫苗中。将所述疫苗与DC2.4细胞(永生化树突细胞系)一起温育4小时,并进行流式细胞术以检测已摄取所述荧光疫苗粒子的细胞。用所述荧光mRNA疫苗内化的DC2.4细胞的百分比在图12A中显示,而图12B显示DC2.4细胞中的总荧光强度。这些结果表明亲和部分(即甘露糖)的表面缀合是增强树突细胞摄取疫苗粒子的有效途径。

[0237] 图17显示了IDO1抑制剂增强树突细胞的抗原呈递。mRNA疫苗通过将OVA mRNA核和IDO1抑制剂INCB024360囊封在所述脂质壳内来制备。将有或者没有INCB024360的mRNA疫苗用于处理BMDC,然后将所述BMDC应用于与B3Z OVA特异性T细胞共温育。被刺激的T细胞将IL-2分泌到生长培养基中,并且应用ELISA来测量IL-2水平。基于该结果,包含IDO1抑制剂可以进一步刺激T细胞活化。

[0238] 图18A和图18B显示来自OVA mRNA疫苗的抗肿瘤免疫应答。将C57BL6小鼠在第1、4和7天用OVA蛋白或OVA mRNA疫苗处理。最后一次处理后一周,对小鼠实施安乐死,并收集脾脏、淋巴结和外周血样品。(图18A)将从脾脏和淋巴结制备的单细胞用OTI (OVA₂₅₇₋₂₆₄₀) 或OTII (OVA₃₂₃₋₃₃₉) 肽再刺激48小时,并应用ELISA测量培养基中分泌的干扰素- γ 水平。(图18B)将来自外周血的T细胞与B16-OVA肿瘤细胞共温育,并在24hr后测量细胞存活率。该结果表明用OVA mRNA疫苗而不是OVA蛋白处理促进了OVA抗原特异性T细胞的生成,其有效杀伤表达抗原的肿瘤细胞。

[0239] 实施例3-mRNA疫苗平台的一般性描述

[0240] 图20示出了本文公开的mRNA疫苗平台的总体描述。所述疫苗优选由多个疏水“核”结构(每个包含至少一种编码目标抗原的mRNA)组成,所述“核”结构包含在亲水性“壳”结构(由脂质体-双层组成并配制成将所述核结构有效囊封在其中)内。所述疏水性“核”优选包含带负电荷的mRNA分子和带正电荷的多聚复合物(例如PbAE)或蛋白质(例如鱼精蛋白)分子的群体,而所述亲水性“壳”优选由以预先选择和优化的比率的脂质和/或磷脂的组合组成。在某些实施方式中,可能期望将所述脂质壳的表面通过将个或多个亲和部分与其缀合(例如,糖部分例如甘露糖、结合蛋白或对一种或多种DC表达表位具有特异性的抗体)进行“官能化”,以通过增强疫苗粒子与所述疫苗核/壳复合物要靶向的抗原呈递细胞(例如树突细胞、巨噬细胞和B细胞)之间的相互作用和/或增加它们之间的结合。在含有mRNA的内部

核和外部脂质体双层壳之间形成的“胞质”空间也可以被优化,以含有一种或多种细胞因子(例如CpG)、蛋白质(例如FLT3L)或小分子(例如免疫调节剂如IDO-1抑制剂),从而进一步增强/扩展所述疫苗在选定的细胞和患者中的活性。

[0241] 在优选的实施方式中,确定 $\geq 20:1$ 聚合物比mRNA分子(或者, $\geq 1:1$ 鱼精蛋白比mRNA分子)的比率以在制备用于本文公开的治疗组合物的壳/核递送构建体时提供最理想的结果。同样地,约1 μ g mRNA与2 μ g鱼精蛋白与20 μ g脂质的比率显示出在配制用于人类施用的疫苗中特别有利。

[0242] 实施例4-两种mRNA可被共同包装在单个壳中用于双重免疫疗法

[0243] 在图21所示的研究中,将500ng OVA mRNA与递增量的编码IL12p70的mRNA混合以制备鱼精蛋白/mRNA核,然后将所述核包装到脂质壳中。因此所生成的mRNA疫苗含有两种不同的mRNA分子:编码OVA抗原的mRNA和编码树突细胞刺激细胞因子IL12p70的mRNA。首先用所述mRNA疫苗处理DC2.4细胞,然后与B3Z OVA特异性T细胞共温育。24hr后测量细胞生长培养基中的IL-2水平。结果显示500ng IL12p70mRNA的共包装提升了疫苗活性。这证明了1)可以将两种不同类型的mRNA分子包装在一个疫苗粒子中;和2)这两种类型的mRNA分子可以用于不同的目的--一种用于抗原产生,另一种用于树突细胞刺激。

[0244] 该结果证明了本发明的一个重要方面,特别是关于为特定患者创建的“个性化”癌症免疫疗法的设计。这种应用在以下实施例描述的研究中进一步扩展:

[0245] 实施例5-用于个性化癌症免疫疗法的基于mRNA的疫苗

[0246] 从癌症基因组中鉴定体细胞突变和预测免疫原性肿瘤突变上的进步为开发用于个体化癌症免疫疗法的治疗性疫苗提供了前所未有的机会。然而,制备传统的基于蛋白质或肽的疫苗以在给定肿瘤中靶向具有异质突变谱的癌细胞是一项艰巨的任务。所公开的mRNA疫苗平台已为此目的而专门设计。在此,这种高效的平台被用来检验这样的假设,即通过基于患者独特的癌症基因组特征定制的疫苗接种可以实现个性化乳腺癌治疗。

[0247] 本实施例解决了乳腺癌研究中的三个主要挑战:

[0248] a) 改革治疗方案,用更有效、毒性更小并且影响存活的治疗方案取而代之;

[0249] b) 消除与转移性乳腺癌相关的死亡;和

[0250] c) 确定乳腺癌细胞潜伏多年然后重新出现的原因和方式,并利用这些信息来防止这种复发。

[0251] 近年来,癌症免疫疗法在多种类型的癌症中实现了前所未有的临床疗效。然而,只有少数癌症患者受益于免疫疗法,并且许多患者未能应答或发动有效的抗肿瘤免疫应答。多条证据显示,肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)的存在充当预后标志物并预测对不同疗法包括免疫疗法和化学疗法的反应。缺乏TIL的肿瘤已被表征为“冷的(non-inflamed)”,并且一般与治疗失败和预后不良相关。例如,检查点阻断抗体在具有相对较少TIL的乳腺癌患者中的功效与黑素瘤或非小细胞肺癌患者相比有效性低得多,后者是具有丰富TIL并且被表征为“热(inflamed)”的肿瘤类型。因此,促进T细胞浸润和维持T细胞在肿瘤微环境中的功能的手段是开发有效免疫疗法的焦点,尤其是对于包括乳腺癌在内的“冷”肿瘤类型而言。

[0252] 治疗性癌症疫苗具有刺激强有力的抗肿瘤免疫的潜力。在最近的一项研究中,利用含有p66HER2抗原肽的基于纳米技术的树突细胞疫苗(纳米DC疫苗)靶向HER2阳性乳腺癌,并检测到抗原特异性CD8⁺T细胞的大量肿瘤浸润以及刺激Th1-偏向型细胞因子,导致在

乳腺癌鼠模型中强有力地抑制HER2阳性肿瘤生长。

[0253] 一项随访研究也证明了用癌症疫苗治疗和用抗PD-1抗体治疗之间在进一步促进T细胞的肿瘤浸润中的协同作用,如通过肿瘤相关CD45⁺细胞群体内CD3⁺T细胞增加所证明的。

[0254] 在个性化免疫疗法的新时代中的治疗性mRNA疫苗.虽然乳腺癌中的整体突变负荷不如黑素瘤或非小细胞肺癌中那么重,但最近对560个乳腺癌全基因组序列的研究鉴定出93个癌基因中1,628个可能的驱动突变,而TP53是雌激素受体(ER)阴性乳腺癌中最常见的突变驱动癌基因.这一结果与以前的报告很好地匹配,即TP53突变在HER2阳性(72%)和基底样(80%)乳腺癌中更经常发生,而PIK3CA突变在基底样乳腺癌中(9%)与其他亚型(29-45%)相比罕见.使用基于蛋白酶体切割基序的在线工具,已经鉴定了多种在人和鼠蛋白质之间100%保守的细胞毒性T细胞表位,包括在TP53、PIK3CA和PTEN中的那些(表2)。这些表位充当开发“下一代”免疫治疗剂的最佳试剂,并且从使用鼠肿瘤模型的功效研究获得的结果可以直接被应用于预测患者反应。

[0255] 表2

[0256] BC中的细胞毒性T细胞表位

| 肽名称 | 肽序列* | SEQ ID NO: X |
|--------------------|---------------------|---------------|
| TP53-170 | TEVVRRCPH | SEQ ID NO: 1 |
| TP53-170* | TEVV <u>H</u> RCPH | SEQ ID NO: 2 |
| TP53-258 | TLEDSSGN | SEQ ID NO: 3 |
| TP53-258* | T <u>D</u> EDSSGN | SEQ ID NO: 4 |
| PIK3CA-106 | GNREEKNRE | SEQ ID NO: 5 |
| [0257] PIK3CA-106* | GNRE <u>N</u> KNRE | SEQ ID NO: 6 |
| PIK3CA-721 | QEKLKDETQK | SEQ ID NO: 7 |
| PIK3CA-721* | QEKLKD <u>K</u> TQK | SEQ ID NO: 8 |
| PTEN-63 | NHYKIYNLC | SEQ ID NO: 9 |
| PTEN-63* | NHY <u>N</u> IYNLC | SEQ ID NO: 10 |

[0258] *提供野生型蛋白质的氨基酸序列作为参考,突变氨基酸加下划线。

[0259] 为此目的,理想地开发了本文公开的基于mRNA的疫苗平台。使用LPP mRNA疫苗,所

述疫苗由脂质体壳结构中的mRNA核组成,其中多聚复合物/mRNA核由聚(β-氨基酯)聚合物/mRNA(PBAE/mRNA)或鱼精蛋白/mRNA组成,并且脂质体壳由中性和带正电荷的磷脂的混合物组成,所述平台允许从mRNA分子稳固地表达蛋白质。与常规基于肽的疫苗相比,基于mRNA的疫苗具有在一个小基因构建体中纳入多个抗原表位的优点,因此可以基于患者在个体癌基因组中的突变谱快速定制以满足个体患者的需要。它们与传统的质粒衍生疫苗的不同还在于(除了其他优点之外),它们在分裂和非分裂细胞两者中都起作用,同时也没有基因组整合的风险。有趣的是,虽然基于鱼精蛋白的mRNA疫苗产品已被测试了多年,但来自裸鱼精蛋白/mRNA的蛋白质抗原表达仅是LPP/mRNA的几分之一。可能的原因在于所述裸构建体中的mRNA分子易受血浆RNA酶的攻击。

[0260] 或者,LPP/mRNA触发DC以表达高得多的水平的IL-12,IL-12是对于抗原呈递细胞的最大抗原加工和呈递活性必不可少的细胞因子。mRNA核还通过激活Toll样受体7和8(TLR7/8)信号转导来作为疫苗的强佐剂,如通过TLR7/8抑制剂ODN2095抑制细胞因子表达所证明的。为了测试mRNA疫苗的活性,应用卵清蛋白(OVA)作为模型抗原,并将骨髓来源的树突细胞(BMDC)与LPP/OVA一起温育来确定抗原呈递和T细胞活化。与LPP/OVA但不是鱼精蛋白/OVA一起温育的BMDC在表面上展现出高水平的主要组织相容性复合物I型(MHCI)-OVA表位。用LPP/OVA mRNA疫苗处理引起脾脏和淋巴结中CD4⁺和CD8⁺T细胞的刺激。该疫苗还有效抑制表达OVA的肿瘤的生长。尽管近期有杰出的著作发表了用于癌症和传染性疾病的具有相似结构和组成的脂质体mRNA疫苗,但在一项单独的研究中,显示所公开的LPP/mRNA疫苗比简单的脂质体mRNA疫苗(即那些缺乏mRNA保护性核结构的疫苗)在促进抗原表达和刺激DC活化方面更有效。总之,这些数据显示LPP/mRNA疫苗平台通过强有力的抗原加工和呈递提供强健的抗肿瘤免疫。所述多聚复合物/mRNA核-脂质体壳结构在刺激抗肿瘤免疫方面远远优于其它基于mRNA的平台(裸鱼精蛋白/mRNA和脂质体囊封的mRNA)。

[0261] 众所周知,人类癌症在分子和结构特征两个方面是异质的,并且在肿瘤生长、克隆扩增和药物治疗期间经常发生基因突变/扩增/缺失。加重这种复杂性的是每种癌症类型都有其独特的特征。例如,三阴性乳腺癌(TNBC,缺乏雌激素受体、孕酮受体或HER2/neu的表达)具有高的TP53突变率,并与多种基因中的低频突变组合。这些突变事件最有可能会导致在单个肿瘤中形成具有特定基因扩增/突变特征的不同克隆(一些显性和一些未充分表现)。因此,在同一患者的不同的肿瘤结节中或原发性和转移性肿瘤之间鉴定出不同的突变谱并不罕见。癌症免疫疗法的目标是高效消除肿瘤中的所有克隆,并且所述mRNA癌症疫苗非常好地适合这一目的,因为可以工程改造一种单一疫苗构建体来靶向多种抗原以匹配每个患者中癌基因组的复杂性。

[0262] 在免疫活性小鼠中产生原发性和转移性肿瘤:4T1鼠乳腺肿瘤细胞(p53null)将被工程改造以用CRISPR/Cas9技术在PIK3CA或PTEN基因中生成点突变,所述技术是一种在实验室中常规进行的实践。然后用携带突变TP53基因和荧光素酶基因的逆转录病毒感染具有野生型或PIK3CA和PTEN突变的4T1细胞。所生成的同基因4T1细胞将携带TP53基因中的单个突变(4T1/TP53*)、TP53基因和PIK3CA或PTEN中的双重突变(4T1/TP53*PIK3CA*或4T1/TP53*PTEN*)或所有三个基因中的突变(4T1/TP53*PIK3CA*PTEN*)。将所有四种同基因系以1:1:1:1的比率汇集在一起,并接种到6至8周龄雌性BALB/c小鼠的乳腺脂肪垫中以生成原发性肿瘤。如以前的例子所证明的,4T1原发性肿瘤高效率地转移至肝和肺。进行组织学分

析以表征原发性肿瘤和转移性肿瘤结节,并与亲代4T1肿瘤进行比较。来自肿瘤的单细胞可以使用聚合酶链反应(PCR)分离和定量,以测量在给定肿瘤中携带单个TP53*突变或双重或三重突变的肿瘤细胞的百分比。

[0263] 体外免疫应答试验:在mRNA疫苗应用于处理携带肿瘤的鼠模型之前可进行基于细胞的研究,以确保它们可以发挥其预期的功能。可以将单独的mRNA疫苗与骨髓来源的树突细胞(BMDC)一起温育6hr,然后将BMDC与鼠T细胞共温育。DC成熟可以通过对CD40和CD86表达的流式细胞术分析和通过对白细胞介素-12(IL-12)表达的ELISA来确定。T细胞活化通过干扰素(IFN- γ)和白细胞介素-2(IL-2)表达来测定。

[0264] 检查mRNA疫苗的体内免疫应答: BALB/c小鼠将在乳腺脂肪垫中接种包含4种同基因克隆的混合物的4T1细胞。当原发性肿瘤达到200-300mm³时,将小鼠分成4组(n=10只小鼠/组)并用4种mRNA疫苗皮内处理,一周后将再一次疫苗接种进行加强。血样在第二次疫苗接种之前收集一次,并在实验完成时再收集一次。小鼠将在第二次疫苗接种后3天实施安乐死,并将收集脾脏、淋巴结和肿瘤样品。所有样品将应用于使用EasySepTM小鼠T细胞分离试剂盒(StemCell Technologies)来分离CD3⁺T细胞,并遵照与我们描述的相同的方案,基于IL-2和IFN- γ 表达水平或表面成熟标志或利用ELISPOT测定来检测活化细胞。还将检测检查点抑制蛋白的表达水平。

[0265] 评价mRNA疫苗的抗肿瘤活性: BALB/c小鼠将用亲本4T1肿瘤或来源于4种同基因克隆的混合物的肿瘤(n=10只小鼠/组)接种,将被分成4组,并每周用4种mRNA疫苗皮内(id)处理,为期4周。维持小鼠以监测肿瘤生长(基于肿瘤尺寸)和肿瘤转移到远处器官(使用Xenogen IVIS-200成像系统)。当原发肿瘤的重量(基于肿瘤体积计算,假设密度为1g/cm³)超过体重的10%、肿瘤溃烂或患病迹象包括无精打采、弓背和皮毛发皱时,将对小鼠实施安乐死。

[0266] HLA-A2转基因小鼠中对mRNA疫苗的免疫应答:来自Jackson Laboratories的HLA-A2转基因小鼠(C57BL/6-Tg[HAL-A2.1]1Enge/J)在来自脾脏、骨髓和胸腺的细胞上表达人HLA-A2.1MHC I 白细胞抗原。为了预测患者对所述mRNA疫苗的免疫应答,用四种列出的mRNA疫苗处理HLA-A2小鼠(n=10只小鼠/组),收集血液和组织样品并检查抗原特异性T细胞活性。

[0267] 鼠肿瘤模型:用混合的同基因克隆接种的小鼠将产生具有混合分子特征的肿瘤。在来自一个同基因克隆的肿瘤细胞比其余克隆生长得快得多的情况下,这将基于肿瘤样品的PCR分析被检测到,则可以在肿瘤细胞接种之前调整这些克隆的比率。如果来自原发性肿瘤的信号干扰转移性结节的检测,则当原发性肿瘤达到500cm³时可以将它们手术切除,并通过发光测定来监测肿瘤转移。

[0268] 抗肿瘤免疫:对免疫应答的分析揭示,mRNA疫苗可以发挥强大的抗肿瘤免疫。与具有单一表位(即LPP/p53)的疫苗相比,预期编码多个新抗原表位(例如LPP/p53-PI3K-PTEN)的疫苗具有促进更强的抗肿瘤免疫的优势,并且该效应将通过T细胞活性测量以及抑制肿瘤生长和转移来反映。如果用某些疫苗如LPP/p53或LPP/p53-PI3K处理仅导致肿瘤生长的部分抑制,则可以从疫苗接种后的小鼠收集肿瘤组织,并分析肿瘤组成,重点关注来自4种单独的同基因克隆的肿瘤细胞的百分比。肿瘤组成的变化将表明来自某种(某些)疫苗的功效(或缺乏功效)。用mRNA疫苗的一个潜在风险在于MHC I 新抗原表位是基于一组算法选择

的,但尚未以生物学研究加以证实。在基于来自特定体外研究的结果将观察到从选定的表位没有应答或应答非常弱的情况下,则可以在重复的所述研究中使用替代表位,直到获得许多成功的候选表位。或者,可以用单个氨基酸替换来修饰抗原表位以增强MHC结合,该策略已成功应用于开发WT1MHC I抗原。

[0269] 用HLA-A2小鼠进行研究:由于覆盖所述MHC I新抗原表位区域的肽序列在人类蛋白质和小鼠同源物之间是保守的,我们期望从BALB/c小鼠和HLA-A2转基因小鼠中观察到类似的免疫应答。

[0270] 治疗性癌症疫苗必须激活抗原呈递细胞,主要是DC,以发挥它们的抗肿瘤活性。为了完全了解基于mRNA的治疗性癌症疫苗的作用机制并鉴定进一步改善该新型治疗剂活性的途径,首先有必要鉴定驱动抗肿瘤免疫所必需的DC亚群。在该研究中,选择实验来确定3个主要DC亚群在mRNA疫苗活性中的作用:常规CD8⁺和CD8⁻DC(cDC)以及浆细胞样DC(pDC)。从Jackson Laboratories得到了三个基因工程改造的小鼠系用于该研究:Batf3^{-/-}敲除,zDC-DTR(在Zbt646基因的3'非翻译区中的白喉毒素受体[DTR]),和Cd11c-DTR(在CD11c启动子控制下的DTR)。Batf3^{-/-}敲除小鼠不生成CD8⁺DC。用白喉毒素(DT)处理zDC-DTR小鼠清除来自骨髓的两种类型的cDC,但不影响pDC,而Cd11c-DTR小鼠的DT处理将从动物体清除所有DC。

[0271] 野生型和基因工程改造小鼠的抗肿瘤免疫:为了评估CD8⁺DC在抗肿瘤免疫中的作用,将4T1肿瘤细胞接种于BALB/c背景的Batf3^{-/-}敲除小鼠或对照野生型小鼠(n=10只小鼠/组)中,并用LPP/p53-PI3K-PTEN mRNA疫苗每周一次地处理动物,为期4周。为了评价cDC和pDC对mRNA疫苗活性的影响,将携带肿瘤的zDC-DTR和Cd11c-DTR小鼠每系分成2个处理组(n=10只小鼠/组)。对照组中的小鼠不接受用DT处理,而处理组中的小鼠在疫苗接种前24hr用DT给药(20μg/kg, i.p.)。在全规模功效研究之前,通过流式细胞术分析确认DC亚群的清除。监测肿瘤生长和转移,并且当小鼠显示出患病迹象时将它们安乐死。

[0272] 基于mRNA疫苗的作用机制,清除Cd11c-DTR小鼠中的所有DC应该完全消除mRNA疫苗的抗肿瘤免疫。来自Batf3^{-/-}敲除和zDC-DTR小鼠的结果应说明哪个DC亚群在促进mRNA疫苗活性中起必要作用。在先前的实施例,从BMDC观察到对mRNA疫苗治疗的强烈应答,表明涉及CD8⁺DC。如果在20μg/kg DT处理(多个实验室使用的方案)后在zDC-DTR或Cd11c-DTR小鼠中未完全去除DC的目标亚群,则可根据需要调整DT剂量和/或给药方案。

[0273] 参考文献

[0274] 以下参考文献,在它们提供对本文所阐述的进行补充的示例程序性或其他细节的程度上,通过对其明确引用以其整体特别并入本文:

[0275] ALTSCHUL, SF等人,“缺口BLAST和PSI-BLAST:新一代蛋白质数据库搜索程序(Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs)”,Nucl. Acids Res., 25(17):3389-3402(1997)。

[0276] ANGUILLÉ, S.等人,“树突细胞在癌症疗法中的临床应用(Clinical use of dendritic cells for cancer therapy)”,Lancet Oncol., 15(7):e257e67(2014)。

[0277] AVCI, FY等人,“糖缀合物疫苗激活适应性免疫系统的机制及其对疫苗设计的意义(A mechanism for glycoconjugate vaccine activation of the adaptive immune system and its implications for vaccine design)”,Nat. Med., 17(12):1602-1609

(2011) .

[0278] BANCHEREAU, J和STEINMAN, RM, “(树突细胞和免疫的控制)”, *Nature*, 392(6673) : 245-252(1998) .

[0279] BENTEYN, D. 等人, “基于mRNA的树突细胞疫苗 (mRNA-based dendritic cell vaccines)”, *Expert Rev. Vaccines*, 14(2) : 161e176(2015) .

[0280] BROOS, K. 等人, “尽管诱导了I型干扰素, 粒子介导的抗原mRNA静脉内递送导致强抗原特异性T细胞应答 (Particle-mediated intravenous delivery of antigen mRNA results in strong antigen-specific t-cell responses despite the induction of type I inter-feron)”, *Mol. Ther. Nucleic Acids*, 5:e326(2016) .

[0281] BRUNNER, C等人, “通过TNF- α 或胞苷-磷酸-鸟苷DNA增强的树突细胞成熟驱动体外T细胞活化和体内治疗性抗肿瘤免疫应答 (Enhanced dendritic cell maturation by TNF-alpha or cytidine-phosphate-guanosine DNA drives T cell activation in vitro and therapeutic anti-tumor immune responses in vivo)”, *J. Immunol.*, 165(11) : 6278-6286(2000) .

[0282] CARRENO, BM等人, “产生IL-12p70的患者DC疫苗引发Tc1极化免疫 (IL-12p70-producing patient DC vaccine elicits Tc1-polarized immunity)”, *J. Clin. Invest.*, 123(8) : 3383-3394(2013) .

[0283] CARRENO, BM等人, “癌症免疫疗法. 树突细胞疫苗增加黑素瘤新抗原特异性T细胞的广度和多样性 (Cancer immunotherapy. A dendritic cell vaccine increases the breadth and diversity of melanoma neoantigen-specific T cells)”, *Science*, 348(6236) : 803-808(2015) .

[0284] DE BEUCKELAER, A. 等人, “I型干扰素干扰mRNA脂质复合物疫苗引发细胞溶解性T细胞应答的能力 (Type I interferons interfere with the capacity of mRNA lipoplex vaccines to elicit cytolytic T cell responses)”, *Mol. Ther.*, 24(11) : 2012e2020. (2016) .

[0285] DEVOLDERE, J. 等人, “避免非病毒mRNA递送中的先天免疫: 不要射击信使 (Evading innate immunity in nonviral mRNA delivery: don't shoot the messenger)”, *Drug Discov. Today*, 21(1) : 11e25(2016) .

[0286] DIEBOLD, SS等人, “借助于TLR7介导的单链RNA识别的先天抗病毒反应 (Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA)”, *Science*, 303(5663) : 1529-1531(2004) .

[0287] FOTIN-MLECZEK, M等人, “具有双重活性的基于信使RNA的疫苗诱导平衡的TLR-7依赖性适应性免疫应答并提供抗肿瘤活性 (Messenger RNA-based vaccines with dual activity induce balanced TLR-7 dependent adaptive immune responses and provide antitumor activity)”, *J. Immunother. (Hagerstown, MD)*, 34(1) : 1-15(1997) .

[0288] GRIBSKOV, M, 和BURGESS, RR, “来自大肠杆菌、枯草杆菌、噬菌体SP01和噬菌体T4的Sigma因子是同源蛋白质 (Sigma factors from E.coli, B.subtilis, phage SP01, and phage T4 are homologous proteins)”, *Nucleic Acids Res.*, 14(16) : 6745-6763(1986) .

[0289] HALE, WG, 和MARGHAM, JP, “HARPER COLLINS生物学词典 (HARPER COLLINS

DICTIONARY OF BIOLOGY)”,HarperPerennial,New York(1991) .

[0290] HARDMAN,JG,和LIMBIRD,LE,(编著),“GOODMAN和GILMAN的治疗药理学基础(GOODMAN AND GILMAN’S THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS)”第十版,McGraw-Hill,New York(2001) .

[0291] HAYASHI,Y等人,“多功能包络型纳米装置:从非选择性到主动靶向系统的演变(Multifunctional envelope-type nano device:evolution from nonselective to active targeting system)”,Bioconjug,Chem.,26(7):1266-1276(2015) .

[0292] HEIL,F等人,“通过Toll样受体7和8的单链RNA的物种特异性识别(Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7and 8)”,Science,303(5663):1526-1529(2004) .

[0293] KALLEN,KJ和THESS,A,“可能演变为医学革命的发展:mRNA作为基于核苷酸的新型疫苗和药物的基础(A development that may evolve into a revolution in medicine:mRNA as the basis for novel,nucleotide-based vaccines and drugs)”,Ther.Adv.Vaccines,2(1):10-31(2014) .

[0294] KAMAT,CD等人,“TP53的聚(β -氨基酯)纳米粒子递送在体外和体内具有对抗小细胞肺癌的活性(Poly(beta-amino ester)nanoparticle delivery of TP53has activity against small cell lung cancer in vitro and in vivo)”,Mol.Cancer Therapeut.,12(4):405-415(2013) .

[0295] KANTOFF,PW等人,“用于去势抵抗性前列腺癌的Sipuleucel-T免疫疗法(Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer)”,N.Engl.J.Med.,363(5):411-422(2010) .

[0296] KIM,J等人,“可注射的、自发组装的无机支架在体内调节免疫细胞并增加疫苗功效(Injectable,spontaneously assembling,inorganic scaffolds modulate immune cells in vivo and increase vaccine efficacy)”,Nat.Biotechnol.,33(1):64-72(2015) .

[0297] KOIVUSALO,M等人,“阿米洛利通过降低膜下pH以及阻止Rac1和Cdc42信号转导来抑制巨胞饮(Amiloride inhibits macropinocytosis by lowering submembranous pH and preventing Rac1and Cdc42signaling)”,J.Cell Biol.,188(4):547-563(2010) .

[0298] KRANZ,LM等人,“系统性RNA递送至树突细胞开发抗病毒防御用于癌症免疫疗法(Systemic RNA delivery to dendritic cells exploits antiviral defence for cancer immunotherapy)”,Nature,534(7607):396e401(2016) .

[0299] KREITER,A等人,“用裸抗原编码RNA的结内接种引发强有力的预防性和治疗性抗肿瘤免疫(Intranodal vaccination with naked antigen-encoding RNA elicits potent pro-phylactic and therapeutic antitumoral immunity)”,Cancer Res.,70(22):9031e9040(2010) .

[0300] KYTE,J,和DOOLITTLE,RF,“一种用于显示蛋白质水疗特性的简单方法(A simple method for displaying the hydropathic character of a protein)”,J.Mol.Biol.,157(1):105-132(1982) .

[0301] MCNAMARA,M等人,“癌症免疫疗法中的基于RNA的疫苗(RNA-based vaccines in

cancer immunotherapy)”, J. Immunol. Res., 2015:794528 (2015).

[0302] MELERO, I 等人, “癌症治疗疫苗: 临床试验概述 (Therapeutic vaccines for cancer: an overview of clinical trials)”, Nat. Rev. Clin. Oncol., 11 (9): 509-524 (2014).

[0303] MILLS, CD 和 LEY, K, “M1 和 M2 巨噬细胞: 免疫的因与果 (M1 and M2 macrophages: the chicken and the egg of immunity)”, J. Innate Immun., 6 (6): 716-726 (2014).

[0304] NEEDLEMAN, SB 和 WUNSCH, CD, “可应用于搜索两种蛋白质的氨基酸序列相似性的通用方法 (A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins)”, J. Mol. Biol., 48 (3): 443-453 (1970).

[0305] OVERWIJK, WW 和 RESTIFO, NP, “B16 作为人黑素瘤的小鼠模型 (B16 as a mouse model for human melanoma)”, Curr. Protocols Immunol., 20 (20): 1 (2001).

[0306] PROBST, J. 等人, “皮肤表面上的核糖核酸酶活性表征 (Characterization of the ribonuclease activity on the skin surface)”, Genet. Vaccines Ther., 4: 1524753 (2006).

[0307] RYCHLIK, W 和 RHOADS, RE, “选择用于 DNA 的滤膜杂交、测序和体外扩增的最佳寡核苷酸的计算机程序 (A computer program for choosing optimal oligonucleotides for filter hybridization, sequencing and in vitro amplification of DNA)”, Nucl. Acids Res., 17: 8543-8551 (1989).

[0308] SCHEEL, B 等人, “鱼精蛋白凝聚的 mRNA 对几种人血细胞类型的 Toll 样受体依赖性激活 (Toll-like receptor-dependent activation of several human blood cell types by protamine-condensed mRNA)”, Eur. J. Immunol., 35 (5): 1557-1566 (2005).

[0309] SCHRODINGER 2013. Schrodinger, LLC: New York, NY (2013).

[0310] SCHUMACHER, TN 和 SCHREIBER, RD, “癌症免疫疗法中的新抗原 (Neoantigens in cancer immunotherapy)”, Science, 348 (6230): 69-74 (2015).

[0311] SCHWARTZENTRUBER, DJ 等人, “晚期黑素瘤患者中的 gp100 肽疫苗和白介素-2 (gp100 peptide vaccine and interleukin-2 in patients with advanced melanoma)”, N. Engl. J. Med., 364 (22): 2119-2127 (2011).

[0312] SHUKLA, SA 等人, “综合分析 I 类 HLA 基因中与癌症相关的体细胞突变 (Comprehensive analysis of cancer-associated somatic mutations in class I HLA genes)”, Nat. Biotechnol., 33 (11): 1152-1158 (2015).

[0313] SINGLETON, P 和 SAINSBURY, D, “微生物学和分子生物学词典 (DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY)”, 第二版, John Wiley and Sons, New York (1987).

[0314] SULLENGER, BA 和 NAIR, S “从 RNA 世界到临床 (From the RNA world to the clinic)”, Science, 352 (6292): 1417-1420 (2016).

[0315] TREVEJO, JM 等人, “局部树突细胞的 TNF- α 依赖性成熟是激活针对病毒感染的适应性免疫应答的关键 (TNF- α -dependent maturation of local dendritic cells is critical for activating the adaptive immune response to virus infection)”, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98 (21): 12162-12167 (2001).

[0316] TROMBETTA,ES和MELLMAN,I,“体外和体内抗原加工的细胞生物学(Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo)”,Annu.Rev.Immunol.,23:975-1028 (2005) .

[0317] UHLIG,KM等人,“慢病毒蛋白转移载体是有效的疫苗平台并且诱导强抗原特异性细胞毒性T细胞应答(Lentiviral protein transfer vectors are an efficient vaccine platform and induce a strong antigen-specific cytotoxic T cell response)”,J.Virol.,89(17):9044-9060(2015) .

[0318] VAN LINT,C.等人,“TriMix和基于抗原mRNA的抗肿瘤疗法的临床前评价(Preclinical evaluation of TriMix and antigen mRNA-based antitumor therapy)”,Cancer Res.,72(7):1661e1671(2012) .

[0319] VAN TENDELOO,VF等人,“通过mRNA电穿孔在人造血细胞中的高效基因递送:优于脂质转染和mRNA的被动脉冲并优于用于树突细胞的肿瘤抗原负载的质粒cDNA的电穿孔”,Blood,98(1):49-56(2001) .

[0320] WANG,Y等人,“用于靶向癌症基因疗法的编码单纯疱疹病毒1胸苷激酶的修饰mRNA的全身递送(Systemic delivery of modified mRNA encoding herpes simplex virus 1 thymidine kinase for targeted cancer gene therapy)”,Molec.Ther.,21(2):358-367(2013) .

[0321] WEIDE,B等人,“直接注射鱼精蛋白保护的mRNA:转移性黑素瘤患者的1/2期疫苗接种试验的结果(Direct injection of protamine-protected mRNA:results of a phase 1/2 vaccination trial in metastatic melanoma patients)”,J.Immunother.,32(5):498-507(2009) .

[0322] WILGENHOF,S等人,“在预处理的晚期黑素瘤患者中进行静脉内合成mRNA电穿孔树突细胞免疫疗法的IB期研究(A phase IB study on intravenous synthetic mRNA electroporated dendritic cell immunotherapy in pretreated advanced melanoma patients)”,Ann.Oncol.,24(10):2686-2693(2013) .

[0323] XIA,X等人,“多孔硅微粒通过增强交叉呈递和诱导I型干扰素应答来加强抗肿瘤免疫(porous silicon microparticle potentiates anti-tumor immunity by enhancing cross-presentation and inducing Type I interferon response)”,Cell Rep.,11:957-966(2015) .

[0324] YADAV,M等人,“通过将质谱和外显子组测序相结合预测免疫原性肿瘤突变(Predicting immunogenic tumour mutations by combining mass spectrometry and exome sequencing)”,Nature,515(7528):572-576(2014) .

[0325] 应当理解,本文描述的实施例和实施方式仅用于说明目的,并且根据其的各种修改或改变是本领域技术人员将会想到的并将包括在本申请的精神和范围内以及所附权利要求书的范围内。

[0326] 在本文中引用的所有参考文献,包括出版物、专利申请和专利,在此通过引用并入,其程度如同每个参考文献被单独和具体地指明通过引用并入并以其整体在本文中阐述一样。

[0327] 除非本文另有说明,否则本文中对数值范围的列举仅旨在用作单独提及落入该范

围内的每个单独值的简写方法,并且每个单独的值并入本说明书中,如同其在本文中被单独列举一样。

[0328] 本文中对于要素使用术语如“包含”、“具有”、“包括”或“含有”的本发明任何方面或实施方式的描述旨在提供对于“由...组成”、“基本上由...组成”或“基本上包含”该特定元素的本发明的类似方面或实施方式的支持,除非另有说明或与上下文明显矛盾(例如,本文中被描述为包含特定要素的组合物应理解为也描述含有和/或包括该特定要素的组合物,除非另有详细说明,或明确与上下文相矛盾)。

[0329] 根据本公开,无需过度实验即可制备和实施本文公开和要求保护的所有组合物和方法。虽然已经根据优选实施方式描述了本发明的组合物和方法,但是对于本领域技术人员显而易见的是,在不背离本发明的概念、精神和范围的情况下,可以将变化应用于本文所述方法的组合物和方法以及步骤或步骤顺序。更具体地,显而易见的是,化学和/或生理学相关的某些药剂可以代替本文所述的药剂,同时将会实现相同或相似的结果。对于本领域技术人员显而易见的所有这样类似的替代和修改都被认为是在由所附权利要求书限定的本发明的精神、范围和概念之内。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 卫理公会医院(The Methodist Hospital)
- [0003] <120> CORE/SHELL STRUCTURE PLATFORM FOR IMMUNOTHERAPY
- [0004] <130> 37182.215W001
- [0005] <150> 62/451,575
- [0006] <151> 2017-01-27
- [0007] <160> 10
- [0008] <170> PatentIn version 3.5
- [0009] <210> 1
- [0010] <211> 9
- [0011] <212> PRT
- [0012] <213> 智人(Homo sapiens)
- [0013] <400> 1
- [0014] Thr Glu Val Val Arg Arg Cys Pro His
- [0015] 1 5
- [0016] <210> 2
- [0017] <211> 9
- [0018] <212> PRT
- [0019] <213> 智人(Homo sapiens)
- [0020] <400> 2
- [0021] Thr Glu Val Val His Arg Cys Pro His
- [0022] 1 5
- [0023] <210> 3
- [0024] <211> 8
- [0025] <212> PRT
- [0026] <213> 智人(Homo sapiens)
- [0027] <400> 3
- [0028] Thr Leu Glu Asp Ser Ser Gly Asn
- [0029] 1 5
- [0030] <210> 4
- [0031] <211> 8
- [0032] <212> PRT
- [0033] <213> 智人(Homo sapiens)
- [0034] <400> 4
- [0035] Thr Asp Glu Asp Ser Ser Gly Asn
- [0036] 1 5
- [0037] <210> 5
- [0038] <211> 9

[0039] <212> PRT
[0040] <213> 智人(Homo sapiens)
[0041] <400> 5
[0042] Gly Asn Arg Glu Glu Lys Asn Arg Glu
[0043] 1 5
[0044] <210> 6
[0045] <211> 9
[0046] <212> PRT
[0047] <213> 智人(Homo sapiens)
[0048] <400> 6
[0049] Gly Asn Arg Glu Asn Lys Asn Arg Glu
[0050] 1 5
[0051] <210> 7
[0052] <211> 10
[0053] <212> PRT
[0054] <213> 智人(Homo sapiens)
[0055] <400> 7
[0056] Gln Glu Lys Leu Lys Asp Glu Thr Gln Lys
[0057] 1 5 10
[0058] <210> 8
[0059] <211> 10
[0060] <212> PRT
[0061] <213> 智人(Homo sapiens)
[0062] <400> 8
[0063] Gln Glu Lys Leu Lys Asp Lys Thr Gln Lys
[0064] 1 5 10
[0065] <210> 9
[0066] <211> 9
[0067] <212> PRT
[0068] <213> 智人(Homo sapiens)
[0069] <400> 9
[0070] Asn His Tyr Lys Ile Tyr Asn Leu Cys
[0071] 1 5
[0072] <210> 10
[0073] <211> 9
[0074] <212> PRT
[0075] <213> 智人(Homo sapiens)
[0076] <400> 10
[0077] Asn His Tyr Asn Ile Tyr Asn Leu Cys

| | | |
|--------|---|---|
| [0078] | 1 | 5 |
|--------|---|---|

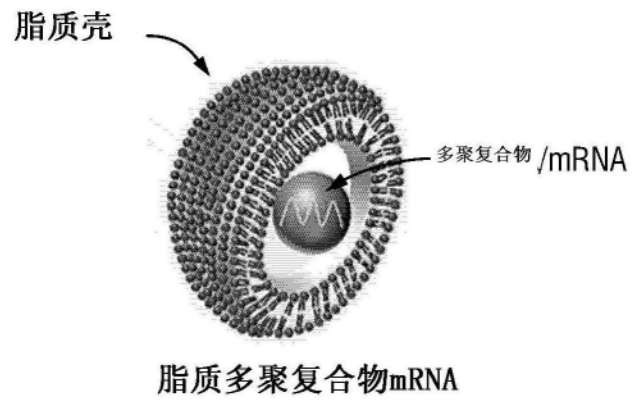


图1A

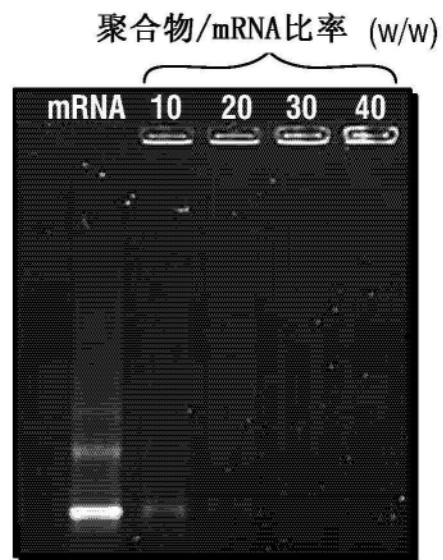


图1B

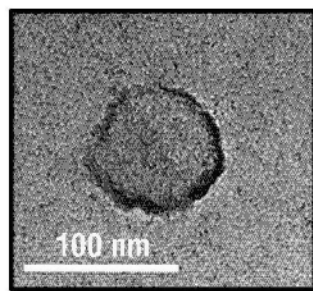


图1C

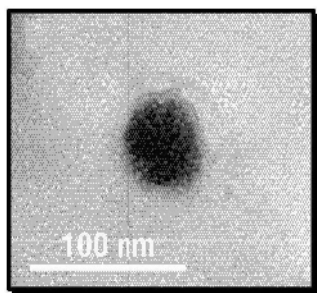


图1D

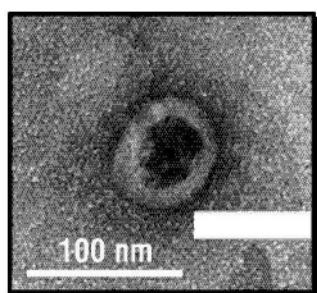


图1E

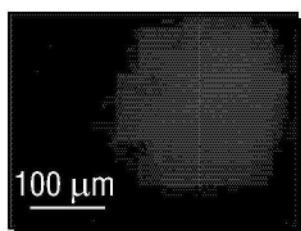


图1F

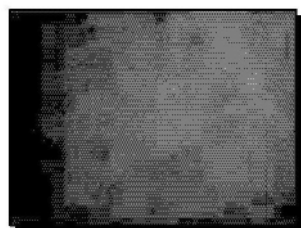


图1G

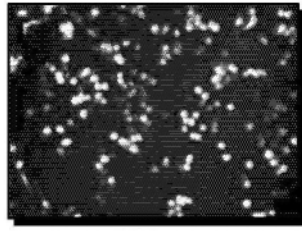


图1H

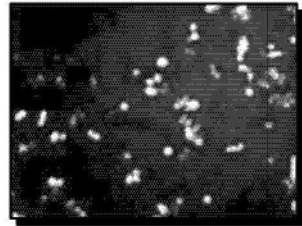


图1I

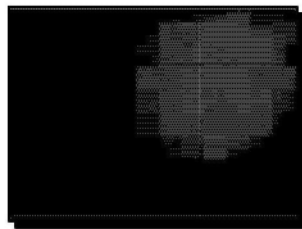


图1J

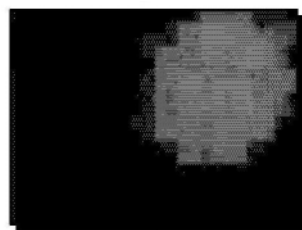


图1K

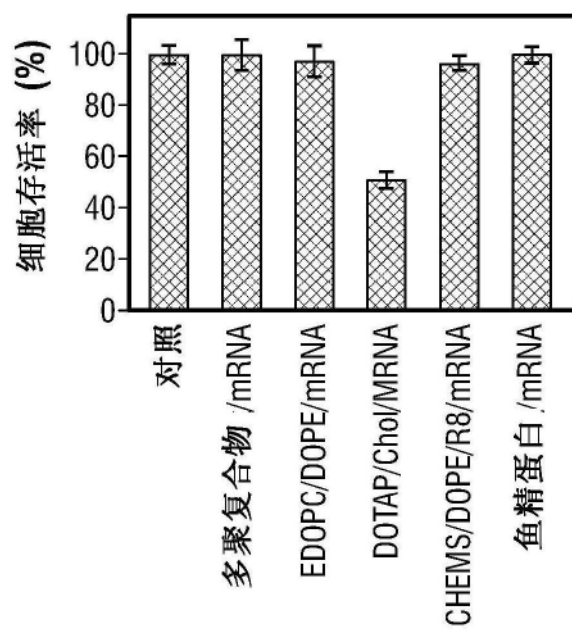


图1L

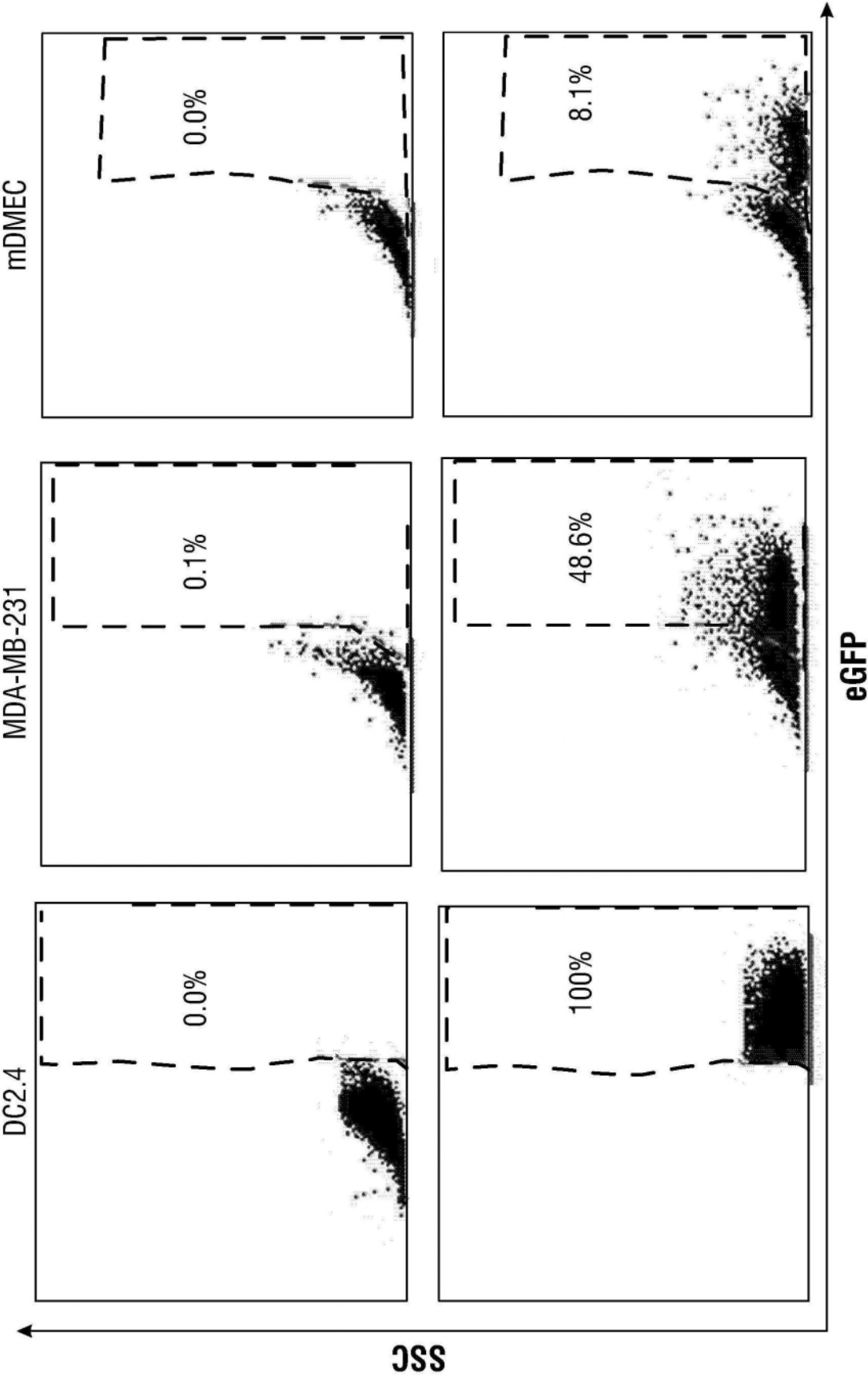


图2

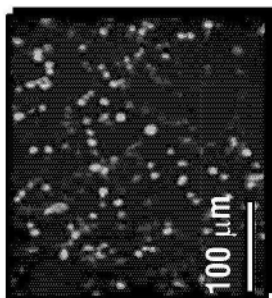


图3A

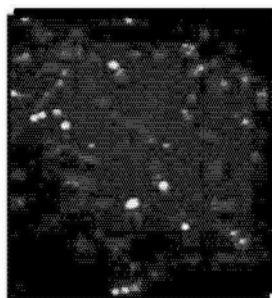


图3B

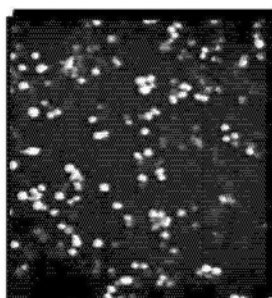


图3C

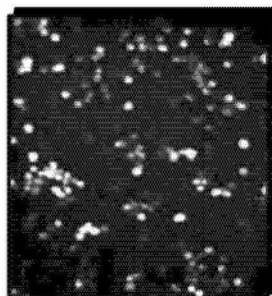


图3D

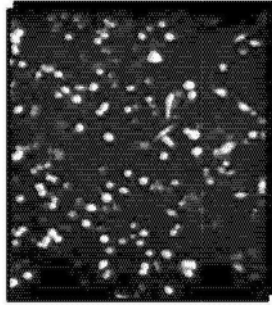


图3E

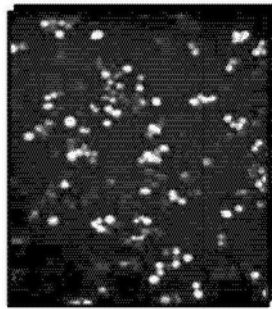


图3F

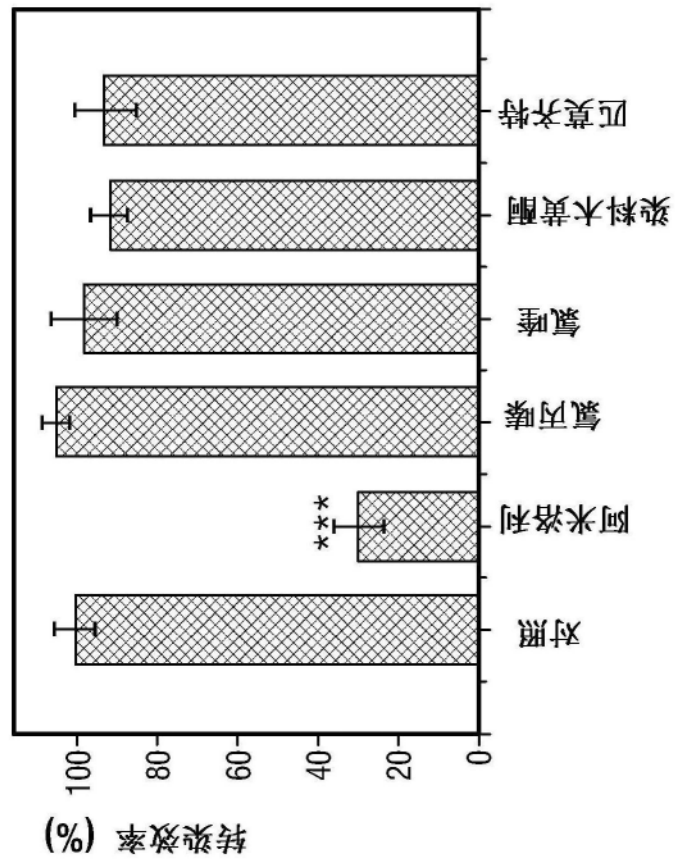


图3G

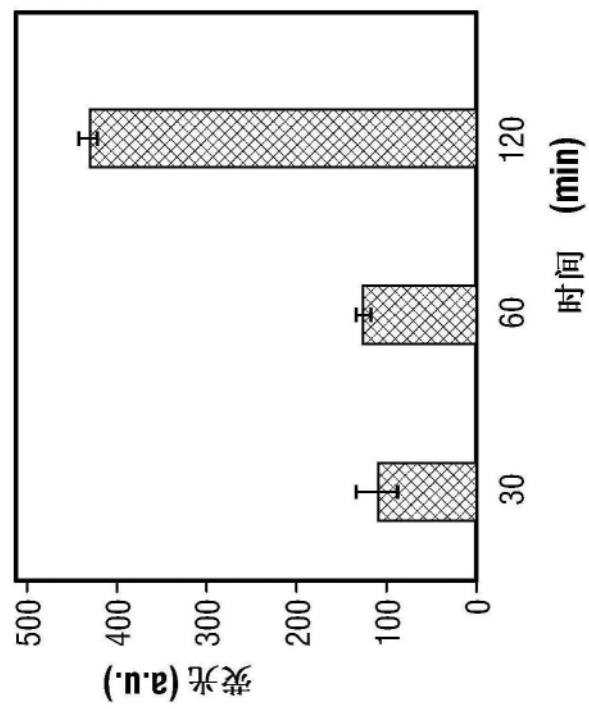


图3H

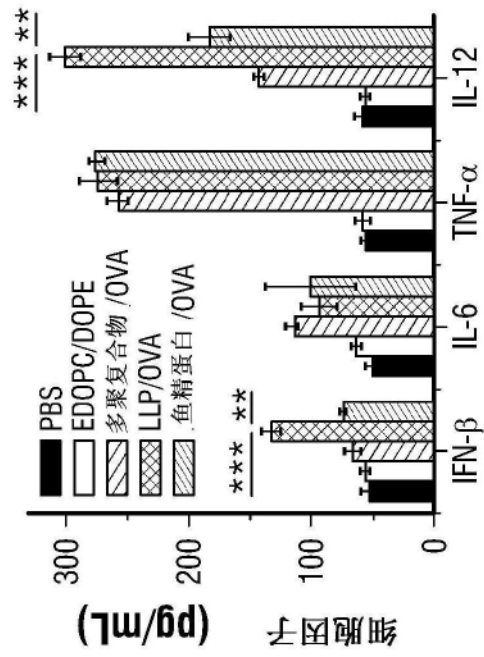


图4A

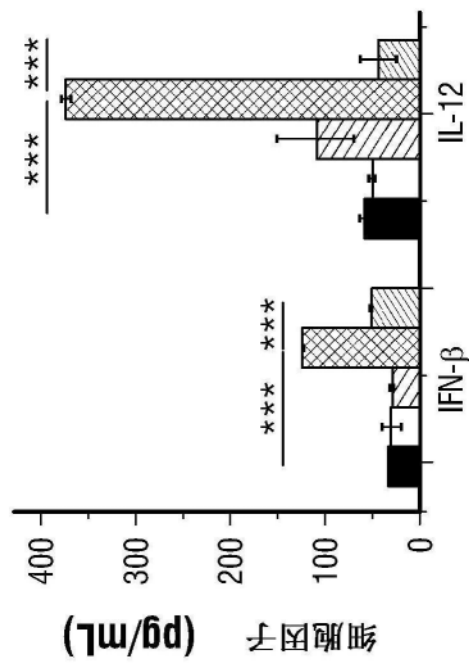


图4B

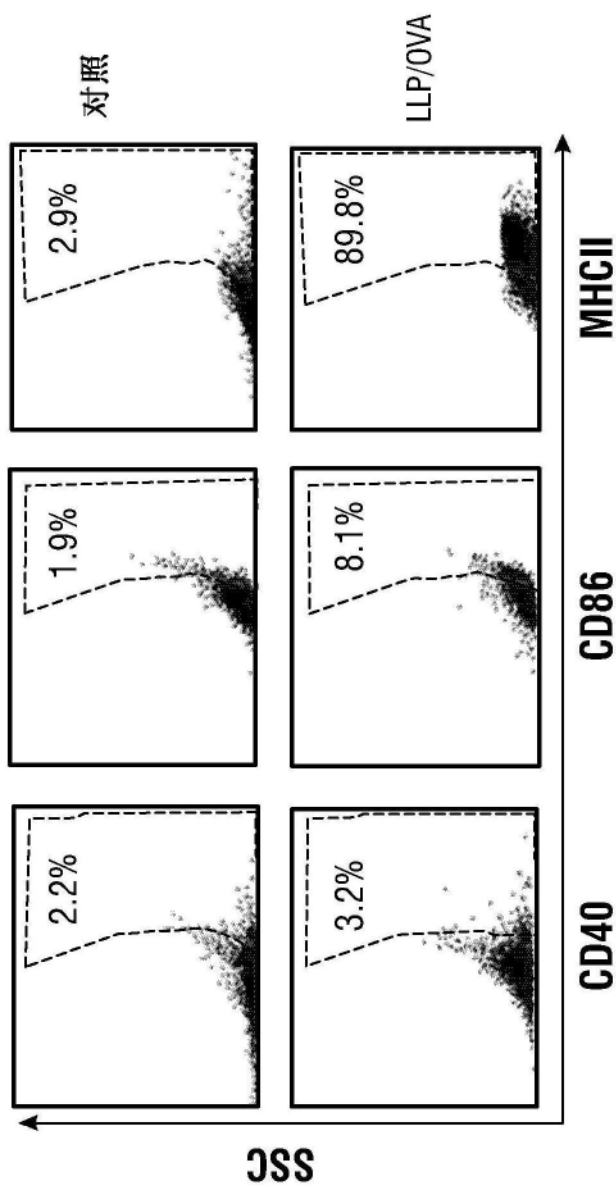


图4C

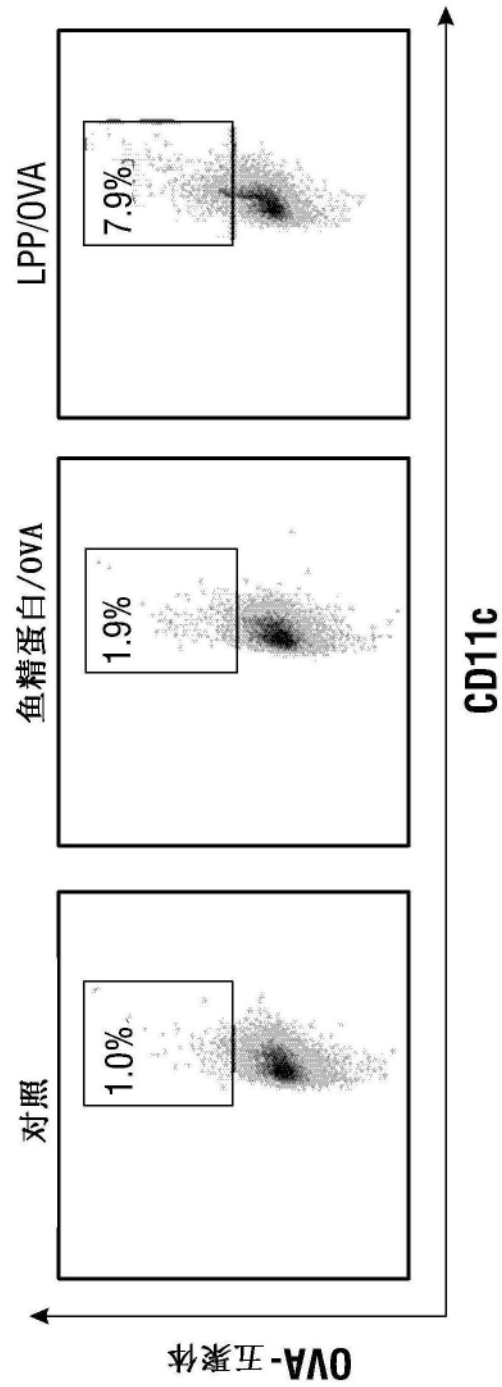


图5A

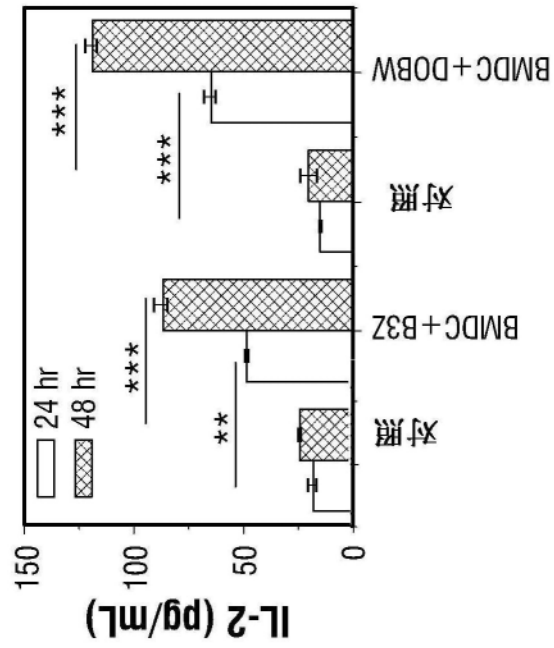


图5B

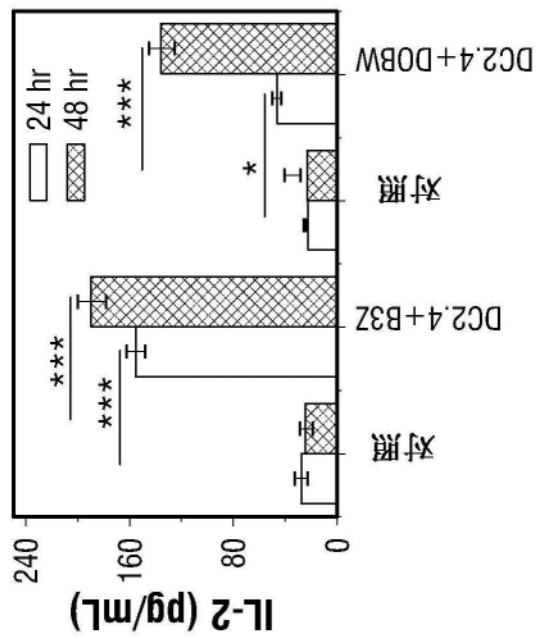


图5C

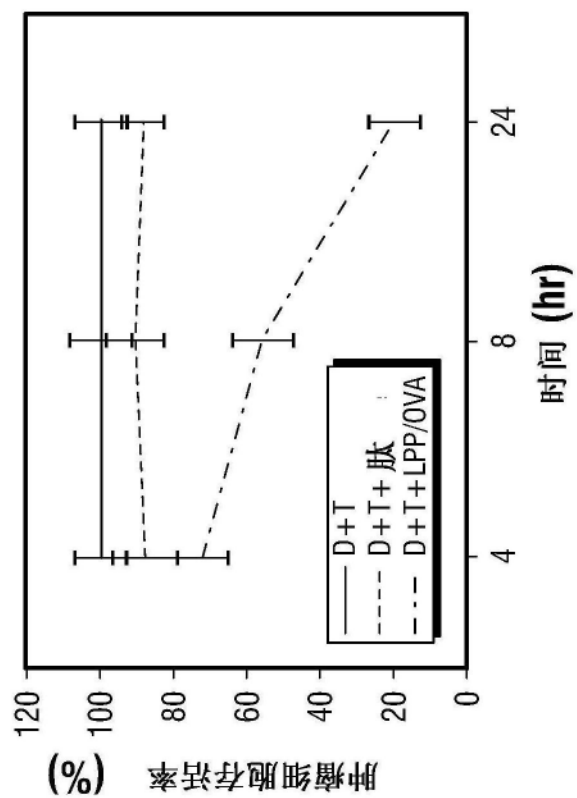


图6A

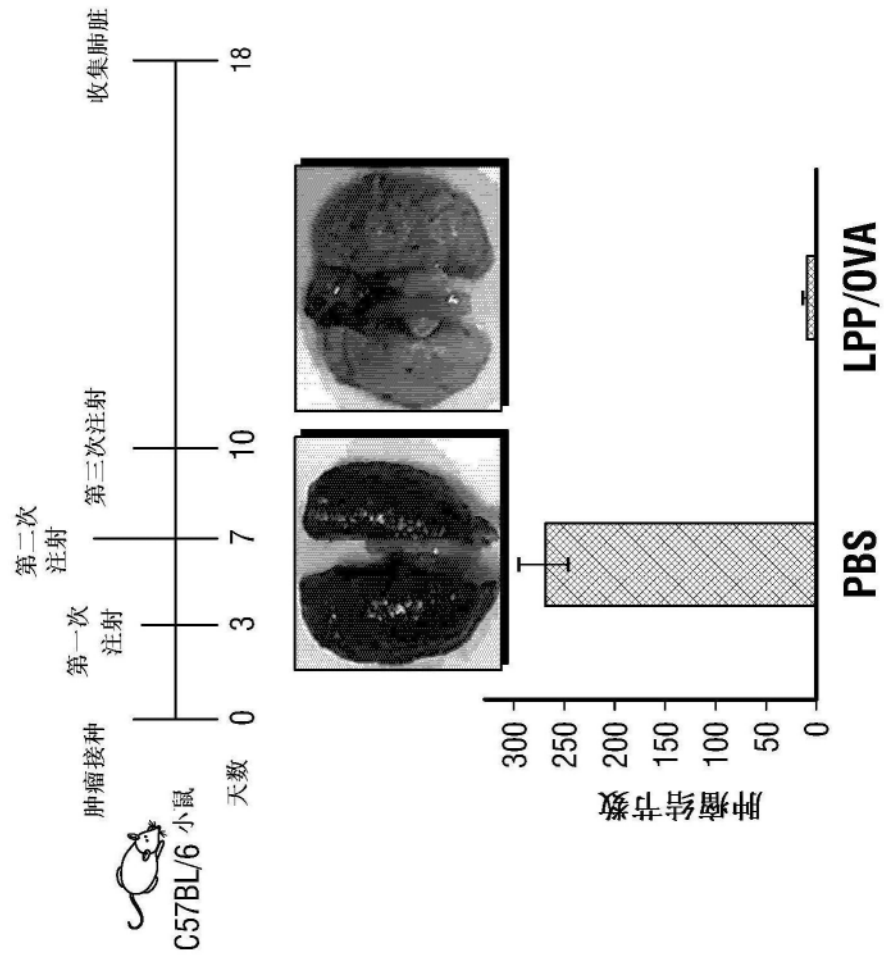


图6B

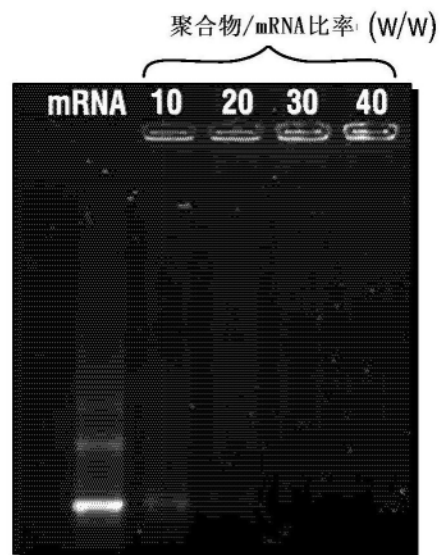


图7

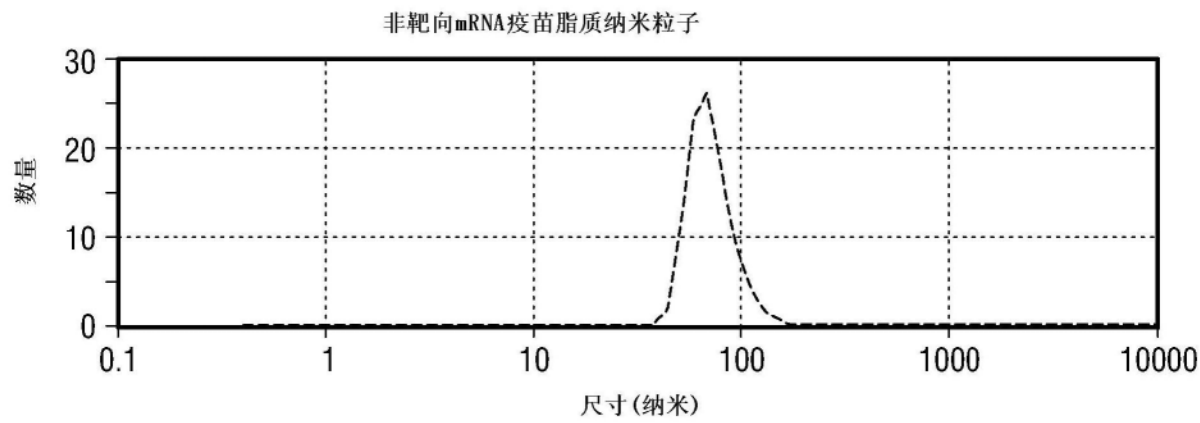


图8A

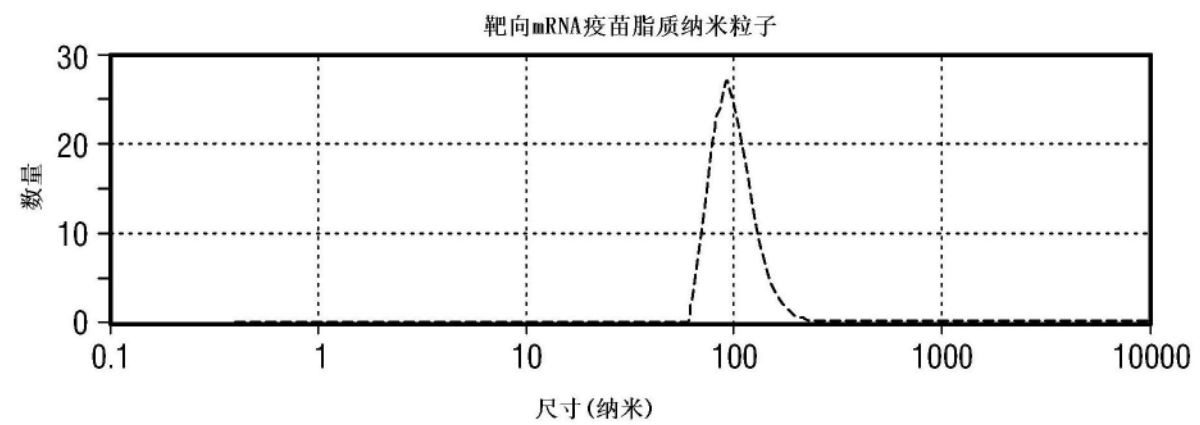


图8B

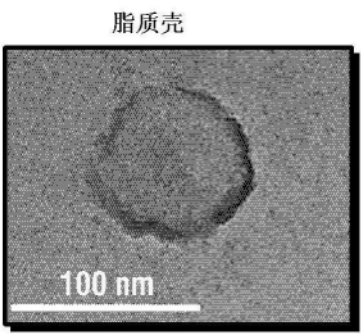


图9A

mRNA 核

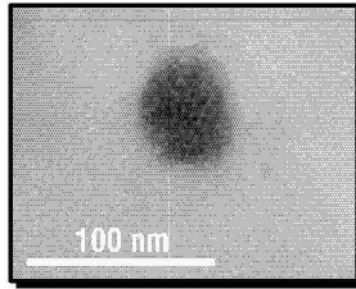


图9B

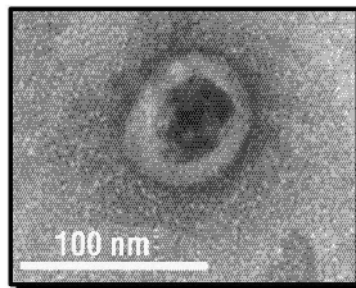
mRNA
疫苗纳米粒子

图9C

PBS 对照



图10A

PbAE mRNA 核



图10B

鱼精蛋白 mRNA 核



图10C

mRNA 疫苗

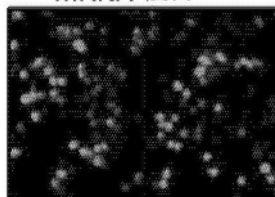


图10D

DOTAP/胆固醇
中的mRNA核



图10E

CHEMS/DOPE/
R8中的mRNA核



图10F

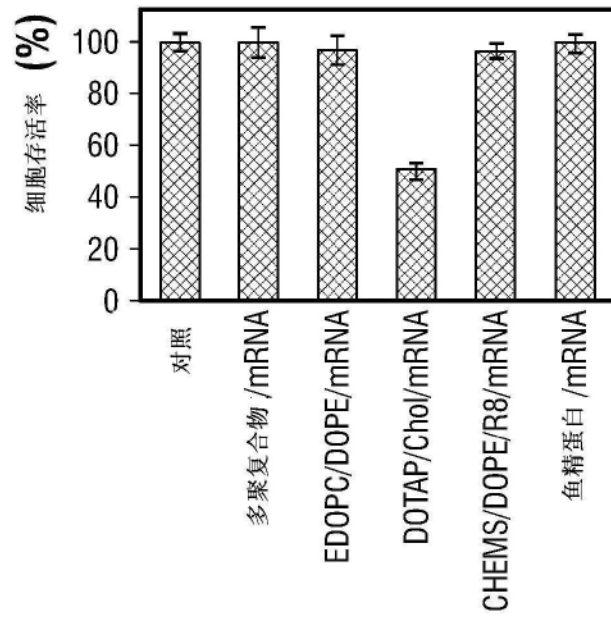


图11

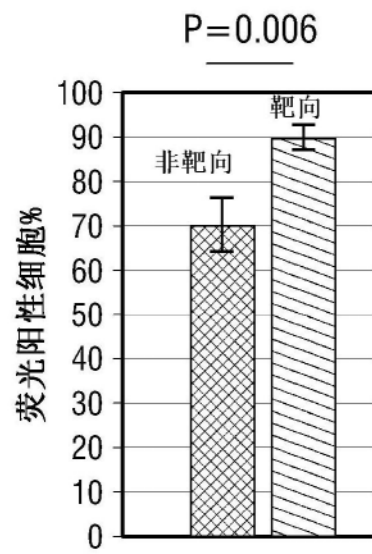


图12A

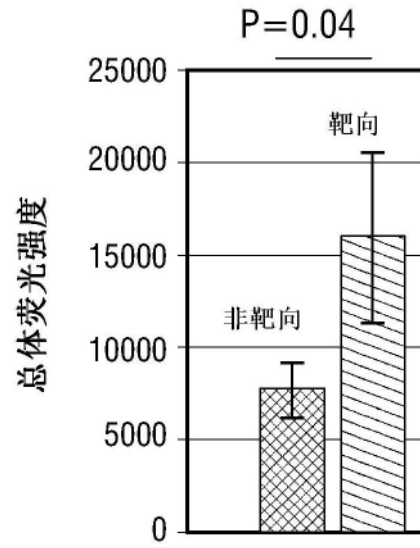


图12B

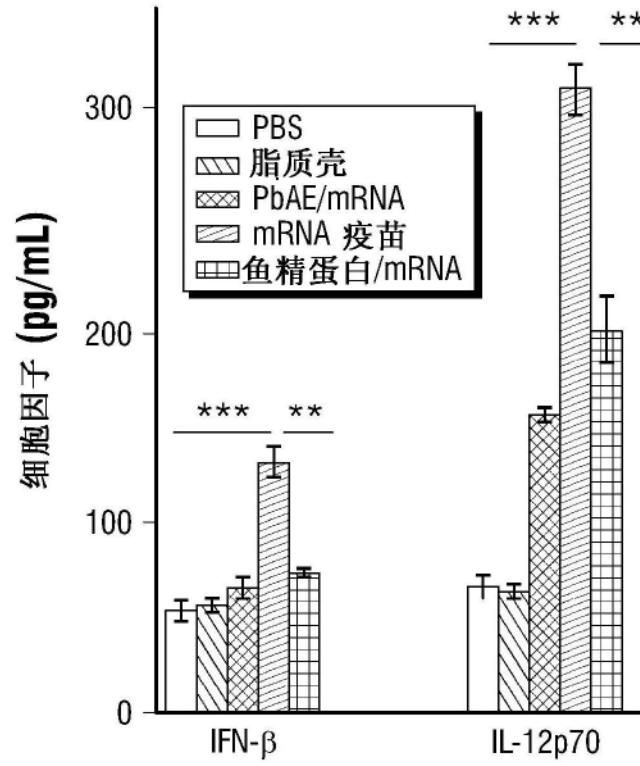


图13

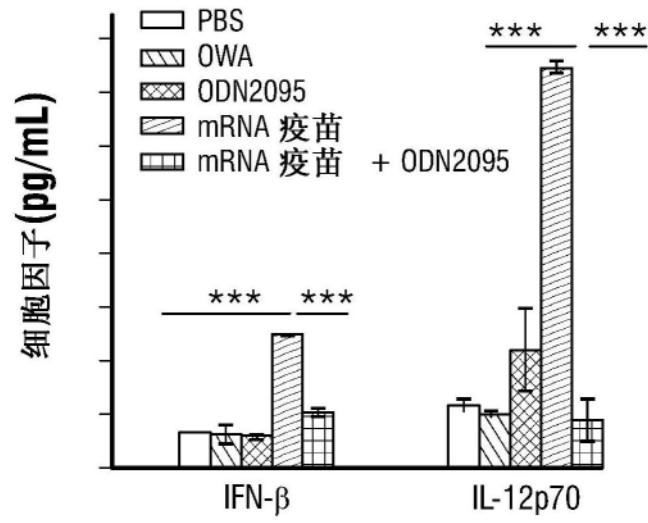


图14

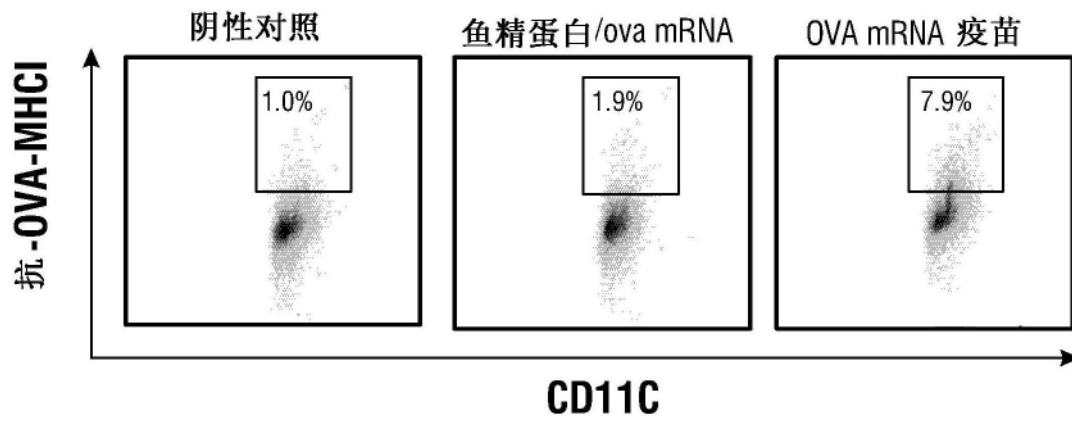


图15

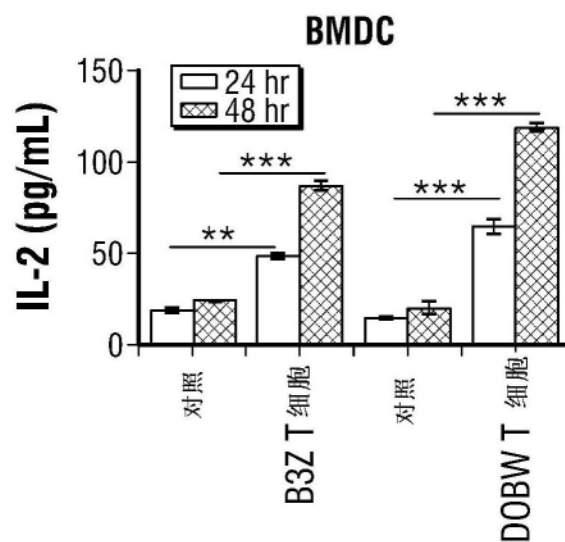


图16A

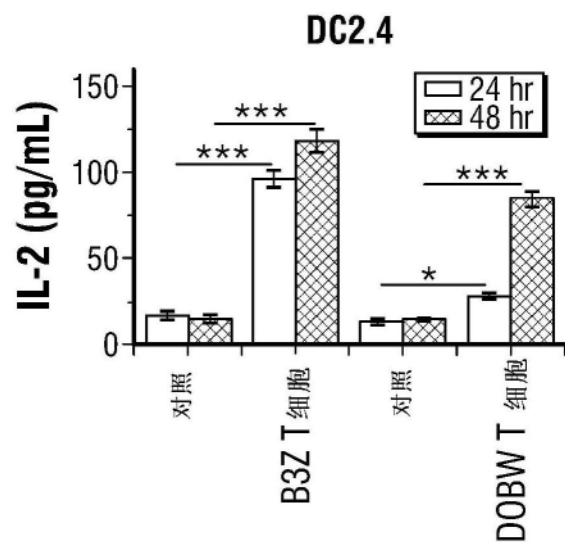


图16B

BMDC和B3Z共培养后的IL-2分泌

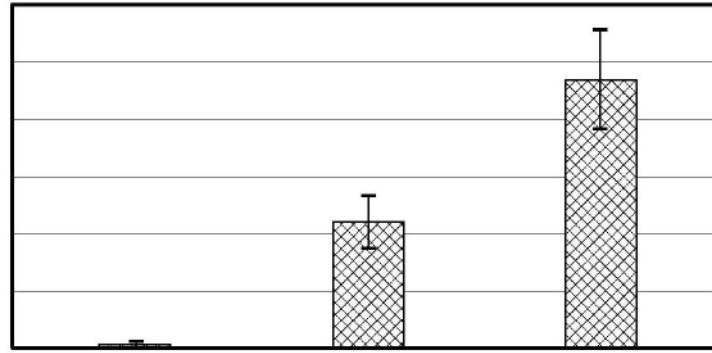


图17

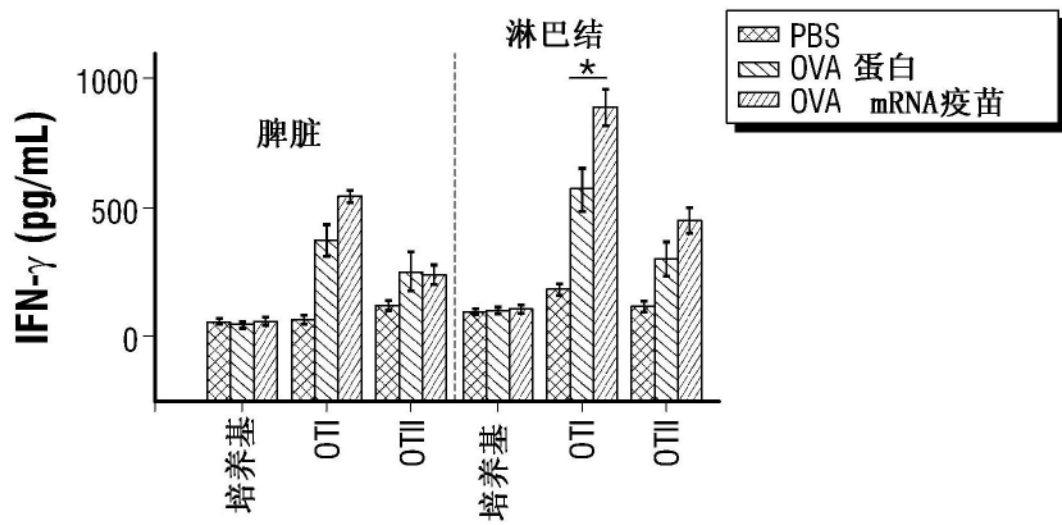


图18A

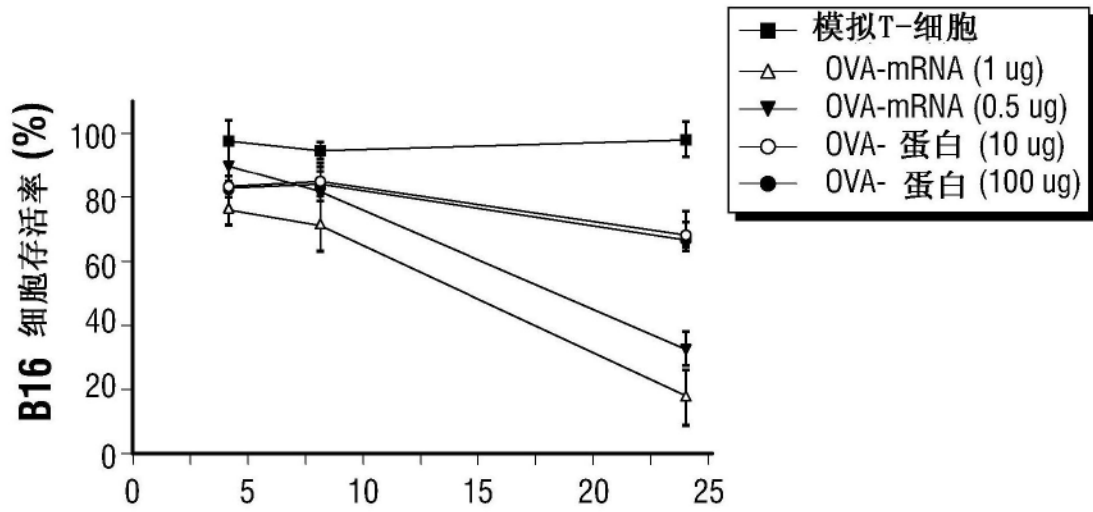


图18B

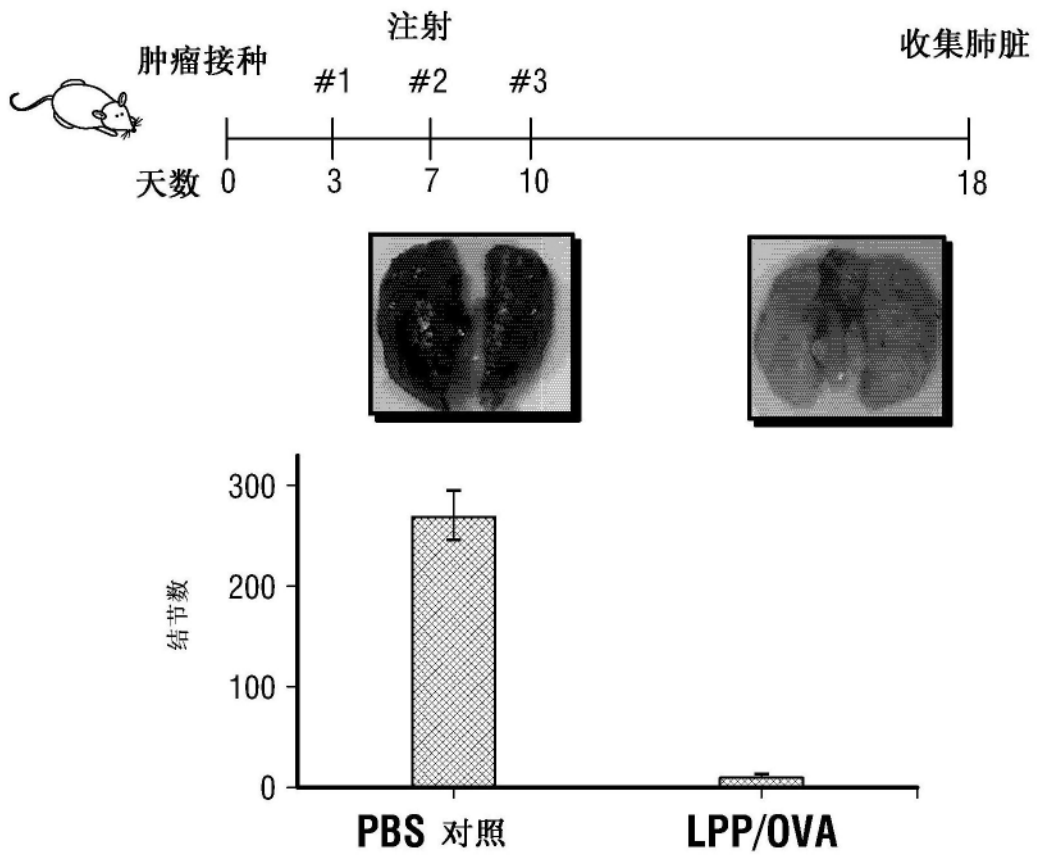
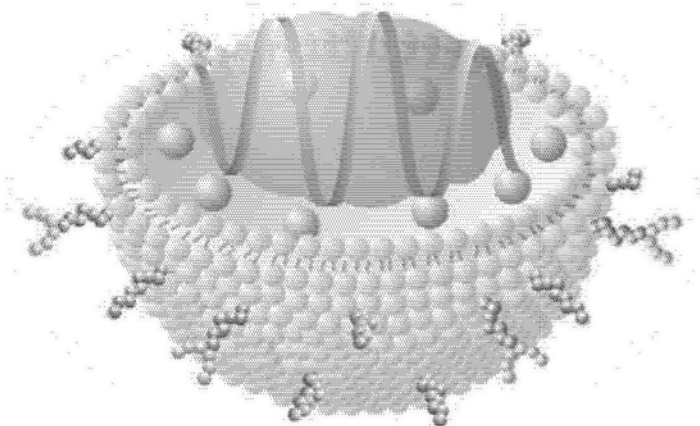


图19

示例性疫苗结构



组分:

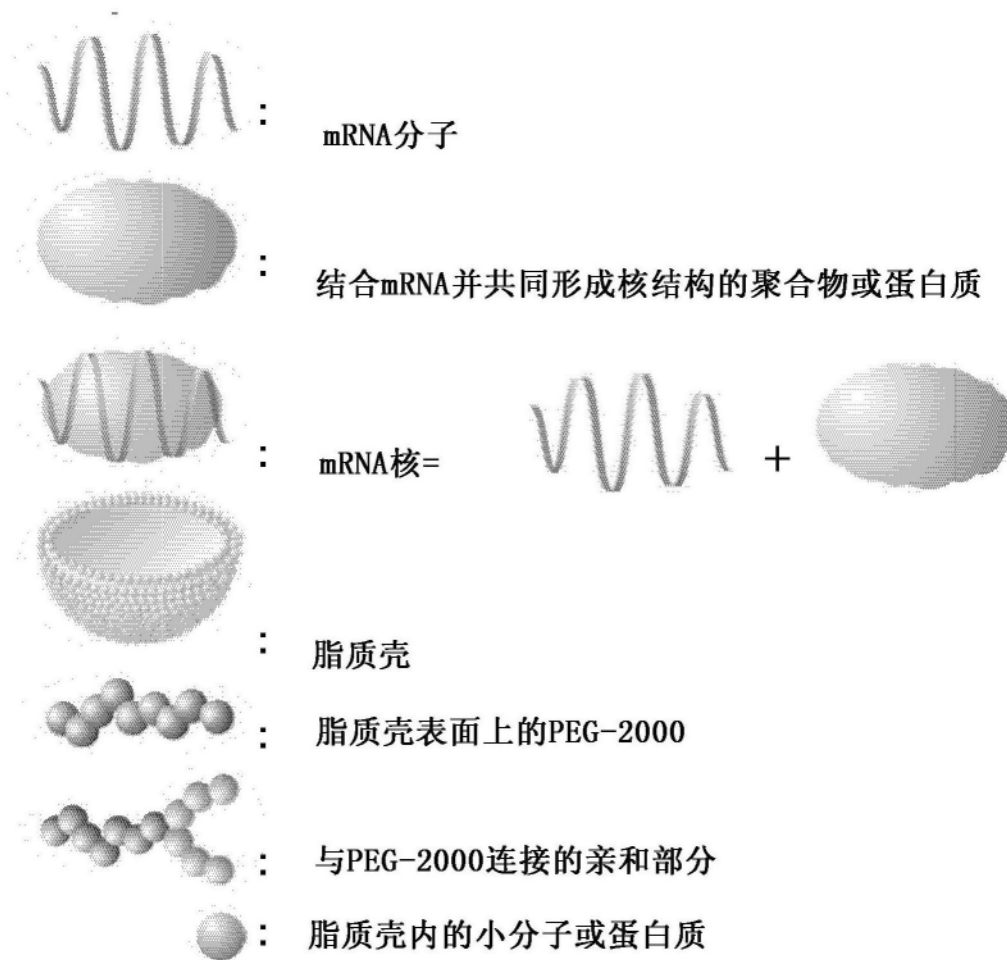


图20

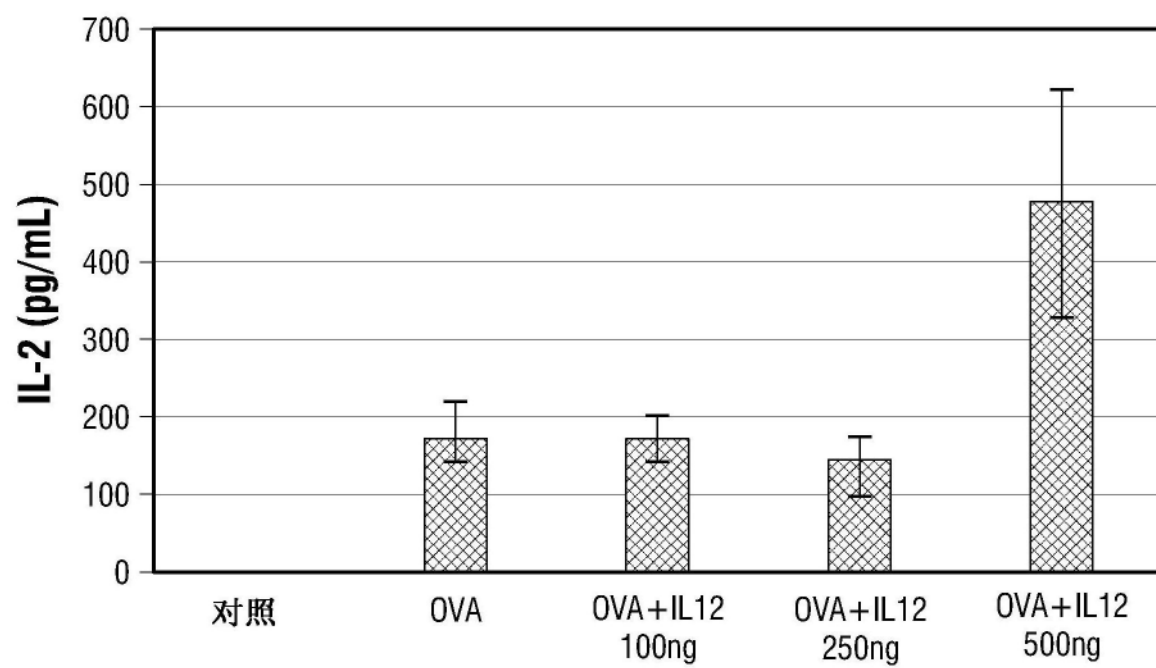


图21