



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116234587 A

(43) 申请公布日 2023.06.06

(21) 申请号 202180049865.5

(22) 申请日 2021.07.13

(30) 优先权数据

63/051,351 2020.07.13 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.01.13

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2021/041487 2021.07.13

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/015766 EN 2022.01.20

(71) 申请人 俄勒冈健康与科学大学

地址 美国俄勒冈州

申请人 PDX制药公司

(72) 发明人 W·扬塔塞 S·雷达 M·雷达

W·思加麦克赫德达恭 王瑞婕

(74) 专利代理机构 北京律盟知识产权代理有限

责任公司 11287

专利代理师 刘媛媛

(51) Int.Cl.

A61K 49/00 (2006.01)

权利要求书4页 说明书49页

序列表15页 附图27页

(54) 发明名称

用于诱导免疫应答的免疫原性构建体、组合物和方法

(57) 摘要

公开了免疫原性构建体,其包含:纳米颗粒;阳离子聚合物,所述阳离子聚合物与所述纳米颗粒的外表面静电地结合;以及稳定剂,所述稳定剂与所述纳米颗粒的所述外表面结合;以及抗原或抗原产生剂。任选地,所述构建体可以包含佐剂和/或一或多种功能性寡核苷酸(例如,sRNA或pDNA)。还公开了使用所提供的免疫原性构建体将佐剂、抗原以及任选地sRNA共同递送到细胞、诱导受试者的免疫应答以及治疗或预防受试者的感染性疾病的方法。

1. 一种免疫原性构建体,其包括:
纳米颗粒平台(NP),所述NP包括:
纳米颗粒;
一定量的交联阳离子聚合物,所述交联阳离子聚合物包括与所述纳米颗粒的外表面静电地结合的聚乙烯亚胺(PEI),并且其中PEI含量占所述NP的至少10重量%;以及
一定量的稳定剂,所述稳定剂包括与所述交联PEI共价结合的聚乙二醇(PEG);以及
感染原的抗原或抗原产生剂,
其中所述构建体的流体动力学大小不超过1微米。
2. 根据权利要求1所述的免疫原性构建体,其中所述纳米颗粒是介孔二氧化硅纳米颗粒(MSNP)。
3. 一种免疫原性构建体,其包括:
纳米颗粒平台(NP),所述NP包括:
纳米颗粒;
交联阳离子聚合物,所述交联阳离子聚合物与所述纳米颗粒的外表面结合;以及
稳定剂,所述稳定剂与所述交联阳离子聚合物或所述纳米颗粒的所述外表面结合;以及
感染原的抗原或抗原产生剂。
4. 根据权利要求1或权利要求3所述的免疫原性构建体,其进一步包括佐剂。
5. 根据权利要求4所述的免疫原性构建体,其中所述佐剂包括以下各项中的一或多种:
CpG寡核苷酸、含有CpG序列的DNA TLR激动剂、非CpG DNA TLR激动剂、RNA TLR激动剂、铝盐、抗CD40抗体、融合蛋白、细胞因子、小分子TLR激动剂、基于油或表面活性剂的佐剂、脂多糖、植物提取物或其衍生物。
6. 根据权利要求5所述的免疫原性构建体,其中所述佐剂包括CpG寡核苷酸。
7. 根据权利要求4所述的免疫原性构建体,其中所述佐剂包括poly I:C。
8. 根据权利要求4所述的免疫原性构建体,其中所述佐剂以占所述NP的1-20wt.%存在。
9. 根据权利要求1或权利要求3所述的免疫原性构建体,其中所述纳米颗粒是二氧化硅纳米颗粒、硅纳米颗粒、氧化铁纳米颗粒、金纳米颗粒、银纳米颗粒、碳酸钙纳米颗粒、磷酸钙纳米颗粒、碳纳米管或佐剂纳米颗粒。
10. 根据权利要求9所述的免疫原性构建体,其中所述纳米颗粒是介孔二氧化硅纳米颗粒(MSNP)。
11. 根据权利要求10所述的免疫原性构建体,其中MSNP的平均孔径为2-6nm、7nm或小于7nm。
12. 根据权利要求9所述的免疫原性构建体,其中所述纳米颗粒是氧化铁纳米颗粒。
13. 根据权利要求1或权利要求3所述的免疫原性构建体,其中所述阳离子聚合物包括PEI、壳聚糖、聚丙烯亚胺、聚赖氨酸、聚酰胺胺、聚(烯丙胺)、聚(二烯丙基二甲基氯化铵)、聚(N-异丙基丙烯酰胺-共-丙烯酰胺)、聚(N-异丙基丙烯酰胺-共-丙烯酸)、二乙基氨基乙基-葡聚糖、聚-(N-乙基-乙基吡啶溴化铵)、聚甲基丙烯酸(二甲基氨基)乙酯、聚(乙二醇)-共-聚(三甲基氨基乙基甲基丙烯酸酯氯化物)或其两种或两种以上的混合物。

14. 根据权利要求1或权利要求3所述的免疫原性构建体,其中所述阳离子聚合物是或包括PEI。

15. 根据权利要求1或权利要求3所述的免疫原性构建体,其中所述阳离子聚合物的分子量为约0.8kDa至约25kDa。

16. 根据权利要求1或权利要求3所述的免疫原性构建体,其中所述阳离子聚合物以占所述NP的1-50wt.%存在。

17. 根据权利要求1或权利要求3所述的免疫原性构建体,其中所述稳定剂包括PEG、葡聚糖、多唾液酸、透明质酸、聚乙烯吡咯烷酮、聚乙烯醇、聚丙烯酰胺或其两种或两种以上的混合物。

18. 根据权利要求17所述的免疫原性构建体,其中所述稳定剂是PEG。

19. 根据权利要求1或权利要求3所述的免疫原性构建体,其中所述稳定剂的分子量为约1kDa至约20kDa或约5kDa。

20. 根据权利要求1或权利要求3所述的免疫原性构建体,其中所述稳定剂以占所述NP的1-50wt.%、约10-30wt.%、约5至20wt.%、约15wt.%或约20wt.%存在。

21. 根据权利要求1或权利要求3所述的免疫原性构建体,其中所述抗原包括蛋白质,并且所述蛋白质抗原缀合到所述稳定剂上。

22. 根据权利要求1或权利要求3所述的免疫原性构建体,其中所述抗原是肽,并且所述肽抗原与所述交联阳离子聚合物静电地结合。

23. 根据权利要求1或权利要求3所述的免疫原性构建体,其中所述抗原产生剂是mRNA或pDNA,并且所述抗原产生剂与所述交联阳离子聚合物静电地结合。

24. 根据权利要求1或权利要求3所述的免疫原性构建体,其中所述感染原是病毒。

25. 根据权利要求24所述的免疫原性构建体,其中所述感染原是β-冠状病毒。

26. 根据权利要求25所述的免疫原性构建体,其中所述感染原是SARS-CoV-2、SARS-CoV-1或MERS-CoV。

27. 根据权利要求26所述的免疫原性构建体,其中所述感染原是SARS-CoV-2。

28. 根据权利要求27所述的免疫原性构建体,其中所述抗原是重组全长SARS-CoV-2蛋白,或者所述抗原产生剂编码所述重组全长SARS-CoV-2蛋白。

29. 根据权利要求21所述的免疫原性构建体,其中所述全长SARS-CoV-2蛋白是SARS-CoV-2刺突糖蛋白、SARS-CoV-2核衣壳蛋白或SARS-CoV-2膜蛋白。

30. 根据权利要求27所述的免疫原性构建体,其中所述抗原是蛋白质亚基,或者所述抗原产生剂编码所述蛋白质亚基。

31. 根据权利要求30所述的免疫原性构建体,其中所述蛋白质亚基对应于SARS-CoV-2刺突糖蛋白S1区、S2区或受体结合结构域(RBD)区。

32. 根据权利要求27所述的免疫原性构建体,其中所述抗原是对应于SARS-CoV-2刺突糖蛋白的免疫原性序列的肽,或者所述抗原产生剂编码所述肽。

33. 根据权利要求32所述的免疫原性构建体,其中所述肽包括SEQ ID NO:1-8中的任一者的序列。

34. 根据权利要求27所述的免疫原性构建体,其中所述抗原产生剂是mRNA或pDNA。

35. 根据权利要求1或权利要求3所述的免疫原性构建体,其中所述感染原是细菌、寄生

虫、原生动物或真菌。

36. 根据权利要求1或权利要求3所述的免疫原性构建体,其中所述抗原或所述抗原产生剂以占所述NP的0.5-20wt.%存在。

37. 根据权利要求1或权利要求3所述的免疫原性构建体,其中所述免疫原性构建体进一步包括至少一种寡核苷酸。

38. 根据权利要求37所述的免疫原性构建体,其中所述至少一种寡核苷酸与所述阳离子聚合物静电地结合。

39. 根据权利要求38所述的免疫原性构建体,其中所述至少一种寡核苷酸包括siRNA、miRNA、miRNA模拟物或反义寡核苷酸。

40. 根据权利要求38所述的免疫原性构建体,其中所述至少一种寡核苷酸包括siRNA。

41. 根据权利要求40所述的免疫原性构建体,其中所述siRNA抑制或下调基因,所述基因的表达或上调与细胞的免疫抑制相关。

42. 根据权利要求41所述的免疫原性构建体,其中所述细胞是抗原呈递细胞。

43. 根据权利要求42所述的免疫原性构建体,其中所述抗原呈递细胞是树突细胞或巨噬细胞。

44. 根据权利要求43所述的免疫原性构建体,其中所述基因是STAT3、IDO-1、IL-6或PD-L1。

45. 根据权利要求37所述的免疫原性构建体,其中所述寡核苷酸以占所述NP的1-10wt.%存在。

46. 根据权利要求1或权利要求3所述的免疫原性构建体,其中所述免疫原性构建体进一步包括细胞的靶向剂。

47. 根据权利要求46所述的免疫原性构建体,其中所述细胞是抗原呈递细胞。

48. 根据权利要求47所述的免疫原性构建体,其中所述抗原呈递细胞是树突细胞或巨噬细胞。

49. 根据权利要求48所述的免疫原性构建体,其中所述靶向剂包括甘露糖、识别在所述抗原呈递细胞上展示的表位或与所述表位结合的单克隆或多克隆抗体或其片段、或与所述抗原呈递细胞上的表面受体结合的配体中的至少一种。

50. 根据权利要求3所述的免疫原性构建体,其流体动力学直径为约10nm至约10微米。

51. 根据权利要求1或权利要求3所述的免疫原性构建体,其流体动力学直径为约30nm至约200nm。

52. 根据权利要求1或权利要求3所述的免疫原性构建体,其流体动力学直径为约80nm至约999nm。

53. 一种免疫原性组合物,其包括多个根据权利要求1或权利要求3所述的免疫原性构建体。

54. 一种组合物,其包括:根据权利要求1或权利要求3所述的免疫原性构建体;以及至少一种生物学或药学上可接受的赋形剂。

55. 一种疫苗,其包括:根据权利要求1或权利要求3所述的免疫原性构建体;以及药学上可接受的赋形剂。

56. 一种将抗原和佐剂共同递送到细胞的方法,所述方法包括:使所述细胞与根据权利

要求1或权利要求3所述的免疫原性构建体接触。

57. 根据权利要求56所述的方法,其中所述细胞是抗原呈递细胞。

58. 根据权利要求57所述的方法,其中所述细胞是树突细胞或巨噬细胞。

59. 根据权利要求56所述的方法,其中所述细胞是肌细胞。

60. 一种方法,其包括向受试者施用免疫刺激量的根据权利要求1或权利要求3所述的免疫原性构建体。

61. 根据权利要求60所述的方法,其诱导针对所述受试者体内的感染原的免疫应答。

62. 根据权利要求60所述的方法,其治疗或预防所述受试者的感染性疾病。

63. 根据权利要求62所述的方法,其中所述受试者是人。

64. 根据权利要求62所述的方法,其中所述受试者是免疫受损的。

65. 根据权利要求62所述的方法,其中所述免疫原性构建体是经皮、肌肉、通过吸入或鼻内施用。

用于诱导免疫应答的免疫原性构建体、组合物和方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2020年7月13日提交的美国临时申请第63/051,351号的优先权和权益,所述美国临时申请以全文引用的方式并入本文。

[0003] 关于联邦政府资助研究的声明

[0004] 本发明是根据美国国立卫生研究院(National Institutes of Health)授予的授权号R44CA217534在政府支持下进行的。政府拥有本发明的某些权利。

背景技术

[0005] 在2020年前几周期间,世界已经证实由高致病性β-冠状病毒引起的产生足够动物传染病溢出以引起流行病的新型人类病原体的出现。2019新型冠状病毒(SARS-CoV-2),即被称为COVID-19的高传染性疾病的病因是β-冠状病毒的新成员,所述β-冠状病毒包含严重急性呼吸道综合征冠状病毒(SARS-CoV-1)和中东呼吸道综合征(MERS-CoV)。

[0006] COVID-19的迅速传播已经导致>1300万确诊病例和超过五十万人死亡(截至2020年7月)。迫切需要针对此新型病毒的安全且有效的治疗剂和预防剂。

[0007] 因此,需要适用于此病毒并且用于新兴感染性疾病的新型免疫原性策略。

发明内容

[0008] 本公开提供了用于诱导针对感染原的免疫应答的免疫原性构建体、组合物和方法。例如,本公开的组合物可以用于诱导针对β-冠状病毒感染(例如,由SARS-CoV-2、SARS-CoV-1、MERS-CoV和相关病毒引起的感染)的免疫应答。所公开的技术还适用于其它当前感染性疾病,如登革热(Dengue fever)、疟疾以及动物(如宠物和家畜)的感染性疾病。

[0009] 一方面,本公开的特征在于一种免疫原性构建体,所述免疫原性构建体含有:纳米颗粒;交联阳离子聚合物,所述交联阳离子聚合物与所述纳米颗粒的外表面结合;稳定剂,所述稳定剂与所述交联阳离子聚合物或所述纳米颗粒的所述外表面结合;以及感染原的抗原(例如,全长蛋白质、蛋白质亚基、多肽、肽或其混合物)或抗原产生剂(如抗原产生核酸,例如mRNA或pDNA)。

[0010] 在一些实施例中,所述免疫原性构建体进一步包含佐剂。在一些实施例中,所述佐剂包含以下中的一或多种:CpG寡核苷酸、含有CpG序列的DNA TLR激动剂、非CpG DNA TLR激动剂、RNA TLR激动剂、铝盐、抗CD40抗体、融合蛋白、细胞因子、小分子TLR激动剂、基于油或表面活性剂的佐剂、脂多糖、植物提取物或其衍生物。在一些实施例中,所述佐剂包含CpG寡核苷酸(例如,CpG ODN 1826或CpG ODN 7909/2006)。在一些实施例中,所述佐剂包含poly I:C。在一些实施例中,所述佐剂以所述纳米颗粒平台(NP或聚合物/稳定剂涂覆的纳米颗粒)的1-20wt.%(例如,1-10wt.%,2-7wt.%,2-4wt.%,2-10wt.%,5-10wt.%,10-20wt.%;或约4wt.%,约5wt.%,约6wt.%,约7wt.%,约10wt.%或约20wt.%)存在。在一些实施例中,所述佐剂以所述NP的2-10wt.%存在。

[0011] 在一些实施例中,所述纳米颗粒是二氧化硅纳米颗粒(例如,介孔二氧化硅纳米颗

粒)、硅纳米颗粒、氧化铁纳米颗粒、金纳米颗粒、银纳米颗粒、碳纳米颗粒或碳纳米管。在各个实施例中,所述介孔纳米颗粒的孔径为2、3、4、5、6、7、8、9、10、2-5、2-7、6-10、11-15、16-20、21-30或31-50nm。

[0012] 在实施例中,所述纳米颗粒是佐剂纳米颗粒或免疫刺激纳米颗粒(例如,脂质体、脂质复合物颗粒、基于脂质的颗粒、多聚复合物颗粒、基于聚合物的颗粒、无机颗粒(例如,磷酸钙或碳酸钙纳米颗粒、铝盐颗粒、二氧化硅颗粒)、病毒体或病毒样颗粒或包括以下中的一或多种的纳米颗粒:1,2-二油酰基-3-三甲基铵丙烷(DOTAP)、胆固醇、3 β -[N-(N',N'-二甲基氨基乙烷)-氨基甲酰基]胆固醇、磷脂酰胆碱/胆固醇、壳聚糖、聚- γ -谷氨酸(γ -PGA)、透明质酸、聚乙烯亚胺(PEI)、聚(丙基丙烯酸)、硫化聚丙烯、聚(乳酸-共-乙醇酸)(PLGA)、支链淀粉、麦芽糊精、聚苯乙烯、金、氧化钴、明矾、三-棕榈酰基-S-甘油基半胱氨酸(PAM₃Cys)、鲨烯、Montanide ISA 50V、Montanide ISA51、Montanide ISA 201、Montanide ISA 206和Montanide ISA 720)。

[0013] 在一些实施例中,所述阳离子聚合物选自由以下组成的组:聚乙烯亚胺(PEI)、壳聚糖、聚丙烯亚胺、聚赖氨酸、聚酰胺胺、聚(烯丙胺)、聚(二烯丙基二甲基氯化铵)、聚(N-异丙基丙烯酰胺-共-丙烯酰胺)、聚(N-异丙基丙烯酰胺-共-丙烯酸)、二乙基氨基乙基-葡聚糖、聚-(N-乙基-乙烯基吡啶溴化铵)、聚(二甲基氨基)乙基甲基丙烯酸酯和聚(乙二醇)-共-聚(三甲基氨基乙基甲基丙烯酸酯氯化物)。在一些实施例中,所述阳离子聚合物是PEI。在一些实施例中,所述阳离子聚合物的分子量为约0.8kDa至约25kDa(例如,约0.8kDa至约10kDa、约0.8kDa至约5kDa、约0.8kDa至约2.5kDa、约2.5kDa至约10kDa或约5kDa至约10kDa)。在一些实施例中,所述阳离子聚合物以所述NP的1至50wt.%(例如,5至40wt. %、10至30wt. %、20至30wt. %、5至10wt. %、5至15wt. %、5至20wt. %、5至25wt. %、5至30wt. %、10至20wt. %、10至25wt. %或25至40wt. %;或约5、10、15、20、25、30或35wt. %)存在。在一些实施例中,所述阳离子聚合物以所述NP的10至20wt. %存在。

[0014] 在一些实施例中,所述稳定剂选自由以下组成的组:聚乙二醇(PEG)、葡聚糖、多唾液酸、透明质酸、聚乙烯吡咯烷酮、聚乙烯醇和聚丙烯酰胺。在一些实施例中,所述稳定剂是所述PEG。在一些实施例中,所述稳定剂的分子量为约1kDa至约20kDa(例如,约0.8kDa至约10kDa、约0.8kDa至约5kDa、约2kDa至约10kDa、约0.8kDa至约2.5kDa、约2.5kDa至约10kDa或约5kDa至约10kDa)。在一些实施例中,所述稳定剂以所述NP的1至50wt.%(例如,5至30wt. %、10至20wt. %、10至25wt. %、5至15wt. %、5至20wt. %、5至25wt. %、或1至10wt. %、或约5、10、15、20、25、35、40或45wt. %)存在。所述稳定剂可以在货物装载之前或之后或两者引入。

[0015] 在一些实施例中,所述感染原是病毒,如 β -冠状病毒(例如,SARS-CoV-2、SARS-CoV-1或MERS-CoV)。在一些实施例中,所述抗原是重组全长蛋白,例如全长SARS-CoV-2刺突糖蛋白、SARS-CoV-2核衣壳蛋白或SARS-CoV-2膜蛋白。在一些实施例中,所述抗原是蛋白质亚基,例如对应于SARS-CoV-2刺突糖蛋白的S1、S2或受体结合结构域(RBD)区的蛋白质亚基。在一些实施例中,所述抗原是肽或对应于感染原的免疫原性序列的肽的混合物。例如,所述感染原是SARS-CoV-2,并且所述抗原具有SEQ ID NO:1、2、3、4、5、6、7和/或8的肽序列。在一些实施例中,所述抗原产生剂是mRNA或pDNA,例如在体外(例如,DC)或在体内(例如,DC、肌细胞)表达或翻译到抗原中的mRNA或pDNA。在一些实施例中,所述抗原或所述抗原产

生剂以所述NP的0.5-20wt.% (例如,0.5-10wt.%、1-6wt.%、1-15wt.%、1.5-10wt.%或2-5wt.%)存在。在一些实施例中,所述抗原可以包含蛋白质亚基和肽的混合物。

[0016] 在一些实施例中,所述免疫原性构建体包含至少一种类型的选自siRNA、miRNA、miRNA模拟物或反义寡核苷酸的寡核苷酸。在一些实施例中,所述至少一种类型的寡核苷酸与所述阳离子聚合物静电地结合。在一些实施例中,所述至少一种类型的寡核苷酸包含siRNA,例如抑制或下调与细胞,如抗原呈递细胞(例如,树突细胞或巨噬细胞)的免疫抑制相关的基因的siRNA。在一些实施例中,所述基因是STAT3、IDO-1、IL-6或PD-L1。在一些实施例中,所述至少一种类型的寡核苷酸以所述NP的约1-50wt.% (例如,2wt.%、3wt.%、4wt.%、5wt.%、2-5wt.%、2-8wt.%、2至10wt.%、2至25wt.%或2至50wt.%)存在。

[0017] 在一些实施例中,所述免疫原性构建体进一步包含细胞,如抗原呈递细胞(例如,树突细胞或巨噬细胞)的靶向剂。在一些实施例中,所述靶向剂是甘露糖、识别在所述抗原呈递细胞的表面上展示的表位或与所述表位结合的单克隆或多克隆抗体或其片段、适体和与所述抗原呈递细胞上的表面受体结合的配体。在一些实施例中,所述靶向剂以所述NP的0.1-20wt.% (例如,0.1至1wt.%、0.2至2wt.%、1至5wt.%或1至10wt.%;或约1、2、3、4、5、6、7、8或9wt.%)存在。

[0018] 在一些实施例中,所述免疫原性构建体进一步包含标记剂。在一些实施例中,所述标记剂是荧光染料和/或金属探针(例如,镧系元素探针、量子点、金纳米颗粒或钆螯合物)。

[0019] 在一些实施例中,所述免疫原性构建体的在水溶液(如PBS、Tris缓冲液或水)中通过动态光散射技术或Zetasizer(马尔文帕纳科公司(Malvern Panalytical))或类似装置测量的流体动力学直径为约10nm至约999nm(例如,约80nm至约200nm或约90nm至约130nm)。在一些实施例中,所述免疫原性构建体的在水溶液(如PBS、Tris缓冲液或水)中测量的流体动力学直径为约1微米至约10微米(例如,约1微米至约2微米)。在一些实施例中,所述纳米颗粒的直径为约5nm至999nm(例如,约20nm至约200nm、约30nm至约60nm、约10nm、约20nm、约30nm、约50nm、约60nm、约200至约750nm或约500至999nm),例如如通过透射电子显微镜测量的。

[0020] 本公开的特征进一步在于一种免疫原性构建体,所述免疫原性构建体含有纳米颗粒、脂质层以及感染原的抗原(例如,全长蛋白、蛋白质亚基、多肽或肽)或抗原产生剂(如抗原产生核酸,例如mRNA或pDNA)。

[0021] 在一些实施例中,所述免疫原性构建体进一步含有佐剂。在一些实施例中,所述佐剂包含以下中的一或多种:CpG寡核苷酸、含有CpG序列的DNA TLR激动剂、非CpG DNA TLR激动剂、RNA TLR激动剂、铝盐、抗CD40抗体、融合蛋白、细胞因子、小分子TLR激动剂、基于油或表面活性剂的佐剂、脂多糖、植物提取物或其衍生物。在一些实施例中,所述佐剂包含CpG寡核苷酸(例如,CpG ODN 1826或CpG ODN 7909/2006)。在一些实施例中,所述佐剂装载到所述NP中。在一些实施例中,所述佐剂装载到所述脂质层上或所述脂质层内。在一些实施例中,所述佐剂以所述NP的1-20wt.% (例如,1-10wt.%、2-7wt.%、2-4wt.%、2-10wt.%、5-10wt.%、10-20wt.%;或约4wt.%、约5wt.%、约6wt.%、约7wt.%、约10wt.%或约20wt.%)存在。在一些实施例中,所述佐剂以所述NP的2-10wt.%存在。

[0022] 在一些实施例中,所述纳米颗粒是二氧化硅纳米颗粒(例如,介孔二氧化硅纳米颗粒)、硅纳米颗粒、氧化铁纳米颗粒、金纳米颗粒、银纳米颗粒或碳纳米管。

[0023] 在一些实施例中,所述纳米颗粒是佐剂纳米颗粒或免疫刺激纳米颗粒(例如,脂质体、脂质复合物颗粒、基于脂质的颗粒、多聚复合物颗粒、基于聚合物的颗粒、无机颗粒(例如,磷酸钙纳米颗粒、铝盐颗粒、二氧化硅颗粒)、病毒样颗粒或包括以下中的一或多种的纳米颗粒:1,2-二油酰基-3-三甲基铵丙烷(DOTAP)、胆固醇、3 β -[N-(N',N'-二甲基氨基乙烷)-氨基甲酰基]胆固醇、磷脂酰胆碱/胆固醇、壳聚糖、聚- γ -谷氨酸(γ -PGA)、透明质酸、聚乙烯亚胺(PEI)、聚(丙基丙烯酸)、硫化聚丙烯(PPS)、聚(乳酸-共-乙醇酸)(PLGA)、支链淀粉、麦芽糊精、聚苯乙烯、金、氧化钴、明矾、三-棕榈酰基-S-甘油基半胱氨酸(PAM₃Cys)、鲨烯、Montanide ISA 50V、Montanide ISA51、Montanide ISA 201、Montanide ISA 206和Montanide ISA 720)。

[0024] 在一些实施例中,所述脂质层是单层或多层膜,所述单层或多层膜包括选自以下的脂质中的一或多种脂质:中性脂质(前列腺素、类二十烷酸或甘油酯)、脂肪酸改性的脂质(例如,2-二植烷酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱或1-(12-生物素基(氨基十二烷酰基))-2-油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺)、磷脂(例如,磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱或1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺)、脂肪酸(例如,硬脂酸或月桂酸)、可聚合脂质(例如,胆固醇-PEG或二硬脂酰基-rac-甘油-PEG2K)、阳离子脂质(例如,1,2-二油酰基-3-三甲基铵-丙烷或二甲基二十八烷基溴化铵)、鞘脂(例如,鞘磷脂或神经酰胺)以及甾醇(例如,胆固醇或甾醇)。在一些实施例中,所述脂质层包括1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、二甲基二十八烷基溴化铵、胆固醇、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱以及二硬脂酰基-rac-甘油-PEG2K。在一些实施例中,所述脂质层以所述NP的0.1-99.9wt.%存在。

[0025] 在一些实施例中,所述感染原是病毒,如 β -冠状病毒(例如,SARS-CoV-2、SARS-CoV-1或MERS-CoV)。在一些实施例中,所述抗原是重组全长蛋白,例如全长SARS-CoV-2刺突糖蛋白、SARS-CoV-2核衣壳蛋白或SARS-CoV-2膜蛋白。在一些实施例中,抗原(例如,1种、2种、3种、4种、5种、6种、7种、8种、9种、10种或更多种不同抗原)的组合用于调配物中。在一些实施例中,所述抗原是蛋白质亚基,例如对应于SARS-CoV-2刺突糖蛋白的S1、S2或RBD区的蛋白质亚基。在一些实施例中,所述抗原是肽或对应于感染原的免疫原性序列的肽的混合物。例如,所述感染原是SARS-CoV-2,并且所述抗原具有SEQ ID NO:1、2、3、4、5、6、7和/或8的肽序列。在一些实施例中,所述抗原产生剂是mRNA或pDNA,例如在体外(例如,DC)或在体内(例如,DC、肌细胞)表达或翻译到抗原中的mRNA或pDNA。在一些实施例中,所述抗原或所述抗原产生剂以所述NP的0.5-20wt.% (例如,1-15wt.%、1.5-10wt.%或2-5wt.%)存在。在一些实施例中,所述抗原可以包括蛋白质亚基和肽的混合物。

[0026] 在一些实施例中,所述感染原是细菌。在一些实施例中,所述抗原是类毒素,例如旨在针对某些细菌毒素进行免疫的灭活毒素。在一些实施例中,所述抗原是旨在产生针对细菌的糖包衣的免疫的细菌多糖。在一些实施例中,所述抗原由来自细菌的一或多种重组蛋白组成。

[0027] 在一些实施例中,所述免疫原性构建体包含至少一种类型的选自siRNA、miRNA、miRNA模拟物或反义寡核苷酸的寡核苷酸。在一些实施例中,所述至少一种类型的寡核苷酸包含siRNA,例如抑制或下调与细胞,如抗原呈递细胞(例如,树突细胞或巨噬细胞)的免疫抑制相关的基因的siRNA。在一些实施例中,所述基因是STAT3、IDO-1、IL-6或PD-L1。在一些

实施例中,所述至少一种类型的寡核苷酸装载到所述NP上。在一些实施例中,所述至少一种类型的寡核苷酸装载到所述脂质层上或所述脂质层内。在一些实施例中,所述至少一种类型的寡核苷酸以所述NP的0.01至10wt.%存在。

[0028] 在一些实施例中,所述免疫原性构建体进一步包含细胞,如抗原呈递细胞(例如,树突细胞或巨噬细胞)的靶向剂。在一些实施例中,所述靶向剂是甘露糖、识别在所述抗原呈递细胞的表面上展示的表位或与所述表位结合的单克隆或多克隆抗体或其片段、适体或与所述抗原呈递细胞上的表面受体结合的配体。

[0029] 在一些实施例中,所述免疫原性构建体进一步包含标记剂。在一些实施例中,所述标记剂是荧光染料和/或金属探针(例如,镧系元素探针、量子点、金纳米颗粒或钆螯合物)。

[0030] 在一些实施例中,所述免疫原性构建体的流体动力学直径为10nm至10微米。在一些实施例中,所述免疫原性构建体的在水溶液(如PBS、Tris缓冲液或水)中测量的流体动力学直径为约10nm至约999nm(例如,约80nm至约200nm或约90nm至约150nm)。在一些实施例中,所述免疫原性构建体的在水溶液(如PBS、Tris缓冲液或水)中测量的流体动力学直径为约1微米至约10微米(例如,约1微米至约2微米)。在一些实施例中,所述纳米颗粒的直径为约5nm至999nm(例如,约20nm至约200nm、约30nm至约60nm、约200至约750nm或约500至999nm),例如如通过透射电子显微镜测量的。

[0031] 在一些实施例中,所述纳米颗粒是抗氧化剂纳米颗粒。

[0032] 另一方面,本公开的特征在于一种药物组合物,所述药物组合物包含本公开的免疫原性构建体以及药学上可接受的赋形剂。在一些实施例中,所述药物组合物进一步包含所描述的未结合的佐剂。

[0033] 另一方面,本公开的特征在于一种疫苗,所述疫苗包含本公开的免疫原性构建体以及药学上可接受的赋形剂。

[0034] 另一方面,本公开的特征在于一种将寡核苷酸(例如,siRNA)、抗原或抗原产生剂(例如,mRNA或pDNA)和/或佐剂共同递送到细胞(例如,肌细胞或抗原呈递细胞,如树突细胞或巨噬细胞)的方法。所述方法包含使所述细胞与本公开的免疫原性构建体接触。在一些实施例中,所述免疫原性构建体包含至少一种抗原产生剂(例如,mRNA或pDNA),并且肌内施用于受试者并被肌细胞吸收,其中所述免疫原性构建体诱导所述肌细胞产生至少一种抗原以供后续免疫细胞激活。

[0035] 另一方面,本公开的特征在于一种诱导针对受试者体内的感染原的免疫应答的方法。所述方法包含向所述受试者施用免疫原性量的本公开的免疫原性构建体。在一些实施例中,所述受试者是人。在一些实施例中,所述受试者是免疫受损的(例如,年长或老年受试者,例如超过50岁、55岁、60岁、65岁、70岁、75岁或80岁,或患有潜在医学病状(如糖尿病和癌症)的已知免疫受损和易于感染的受试者)。在一些实施例中,通过肌内注射施用所述免疫原性构建体。

[0036] 另一方面,本公开的特征在于一种增加针对受试者体内的感染原的免疫应答的方法。所述方法包含向所述受试者施用有效量的本公开的免疫原性构建体。在一些实施例中,所述受试者是人。在一些实施例中,所述受试者是免疫受损的(例如,年老或老年受试者,例如超过50岁、55岁、60岁、65岁、70岁、75岁或80岁,或患有潜在医学病状的已知免疫受损和易于感染的受试者)。在一些实施例中,通过肌内注射施用所述免疫原性构建体。在一些实

施例中,通过吸入施用所述免疫原性构建体。

[0037] 另一方面,本公开的特征在于一种对受试者接种针对感染原的疫苗的方法。所述方法包含向所述受试者施用有效量的本公开的免疫原性构建体。在一些实施例中,所述受试者是人。在一些实施例中,所述受试者是免疫受损的(例如,年长或老年受试者,例如超过50岁、55岁、60岁、65岁、70岁、75岁或80岁,或患有潜在医学病状的已知免疫受损和易于感染的受试者)。在一些实施例中,通过肌肉注射施用所述免疫原性构建体。在一些实施例中,通过吸入施用所述免疫原性构建体。

附图说明

[0038] 图1是展示根据本公开的实施例的免疫原性构建体在诱导针对(使用SARS-CoV-2(也称为CoV)进行的病毒感染所展示的)感染的免疫应答中的用途的方案。在肌肉或皮下注射后,免疫原性构建体(AIRISE-CoV)被抗原呈递细胞(APC,例如树突细胞或巨噬细胞)吸收。APC中通过CpG进行的免疫激活和通过siRNA对免疫抑制基因进行的抑制增强了其处理所递送的抗原以供呈递的活性(A)。经激活的抗原装载的APC从注射部位行进到淋巴结(B),并且随后激活抗原特异性CD8+T细胞(C),随后其增殖到针对病毒的效应物和记忆T细胞中。经激活的APC还激活B细胞和CD4+T细胞,后者可以进一步激活CD8+T细胞和B细胞,所述B细胞进而在身体(如肺(E))中的每个地方产生针对病毒感染(当前和未来)的体液免疫应答(抗体,D)。如果构建体递送抗原产生剂(如mRNA和pDNA),那么肌细胞还将吸收所注射的构建体并且产生将被APC处理的抗原,随后所述APC处理A-E。

[0039] 图2是示出用PEI和装载有SIINFEKL肽(SEQ ID NO:90;SF,Anaspec)和CpG 1826(英杰公司(Invivogen))的PEG(纳米颗粒平台;NP)涂覆的介孔二氧化硅纳米颗粒的流体动力学大小(直径或Z均直径)的图。

[0040] 图3示出了装载有在PBS中测量的占NP约2wt.%和9wt.%的poly I:C的NP(MSNP-PEI-PEG)的流体动力学大小。

[0041] 图4A-4D示出了使用装载有针对STAT3(siSTAT3)的siRNA的(图4A)NP和装载有siSTAT3和CpG的(图4B)NP在多个物种中的多个细胞中在48小时时的STAT3敲低。D-17(狗骨肉瘤)、BMDC(来自小鼠的骨髓源性树突细胞)、J774(小鼠巨噬细胞)、B16F10(小鼠黑色素瘤)和HCC1954(人乳腺癌),用对应物种的引物对STAT3和HPRT mRNA进行qRT-PCR分析。在整个过程中使用单个siSTAT3序列。siSCR=乱序siRNA对照。*** $p < 0.001$;**** $p < 0.0001$ 。siSTAT3的剂量为50nM,并且CpG的剂量为220nM。图4C是示出通过NP或Dharmafect将非靶向乱序siRNA(siSCR)和CpG共同递送到从C3H/HEJ小鼠采集的树突细胞中的图。在2.0wt.%的NP下,每个siRNA的剂量为50nM,并且CpG的剂量为4wt.%的NP。按照制造商的方案制备siRNA-Dharmafect调配物。在处理48小时用qRT-PCR对mRNA进行分析。图4D是示出除了siSTAT3之外,NP还可以递送针对PD-L1(siPDL1)的siRNA,从而使LLC-JSP细胞中的PD-L1蛋白表达(如通过流式细胞术测量的)有效敲低的图。用含有针对PD-L1(siPDL1)的30nM siRNA或在2wt.% siRNA下的30nM乱序siRNA(siSCR)的NP处理细胞。在处理72小时,采集细胞并通过流式细胞术评估PD-L1蛋白表达。RFU=相对荧光单位。“NP”表示如在恩甘切尔德拉克尔(Ngamcherdtrakul)等人,先进功能材料,25(18):2646-2659,2015和美国专利申请公开第2017/0173169号中所述的涂覆有交联PEI和PEG的介孔二氧化硅纳米颗粒。

[0042] 图5A-5C示出siSTAT3-CpG-NP诱导的免疫原性效应大于递送单独的siSTAT3或CpG的NP的免疫原性效应。向患有双侧B16F10黑色素瘤的小鼠的仅一个肿瘤进行瘤内注射,总计3个剂量,间隔3天。(图5A)局部处理的肿瘤和(图5B)远隔未经处理的肿瘤的肿瘤生长曲线绘制为平均值 \pm SEM。(图5C)小鼠的存活率曲线。剂量(每次注射):20 μ g CpG;4 μ g siSTAT3;0.22mg NP。对于CpG-NP对siSTAT3-CpG-NP,* p <0.05,*** p <0.0001。

[0043] 图6A-6C示出,相较于递送单独的siSTAT3或CpG的NP,siSTAT3-CpG-NP增强CD8⁺T细胞在肿瘤和引流淋巴结(DLN)中的增殖。模型、治疗剂量和时间表如图5A-5C中所示。首次处理后7天,分析从局部(经处理)肿瘤和远隔(未经处理)肿瘤两者的肿瘤和DLN中采集的细胞,以确定在肿瘤(图6A)和DLN(图6B)的活CD45⁺CD3⁺T细胞群体中的CD8⁺T细胞与CD4⁺FoxP3⁺调节性T细胞的比率以及淋巴结(图6C)中的效应物(CD44⁺)CD8⁺T细胞的增殖状态(Ki-67)。除非括号中另有说明,否则对于siSTAT3-CpG-NP对生理盐水,* p <0.05,** p <0.01,*** p <0.001,**** p <0.0001(n =3只/组)。

[0044] 图7是示出在存在SF(SEQ ID NO:90)的情况下温育后IFN γ 激活的CD8⁺T细胞的百分比的图。从未经处理的小鼠、用装载有SF和CpG的NP(CpG-SF-NP)、装载有SF的NP(SF-NP)、装载有CpG的NP(CpG-NP)处理的小鼠以及用不完全弗氏佐剂(Incomplete Freund's Adjuvant)调配的SF(IFA/SF)处理的小鼠NP中获得细胞。* p <0.05。所使用的剂量:16 μ g CpG和40 μ g SF。

[0045] 图8A和8B示出(图8A)1)用PEI和PEG(NP)涂覆并装载有约3wt.%SARS-CoV-2刺突蛋白、2wt.%siRNA和4wt.%CpG的介孔二氧化硅纳米颗粒的流体动力学大小;以及(图8B)在以2wt.%siRNA用通过刺突蛋白缀合的NP(刺突-NP)递送的30或60nM siLUC(针对荧光素酶的siRNA)处理后LM2-4luc+/H2N中的荧光素酶的成功沉默。siSCR=乱序siRNA对照。

[0046] 图9A和9B示出(图9A)用表5中的CaP-L递送的荧光素酶siRNA敲低至H2N(乳腺)细胞系的荧光素酶基因。图9B示出处理对细胞无毒,如相较于未经处理的细胞,通过经处理的细胞的未改变的总蛋白质水平指示的。siRNA剂量为50nM;蛋白质分析为处理后两天。

[0047] 图10示出了在用CpG、siSTAT3-NP、CpG-NP、siSTAT3-CpG-NP(AIRISE-02)或AIRISE-CoV(含有刺突蛋白、siSTAT3和CpG的免疫原性构建体)处理后经激活的树突细胞(MHCII+CD80+CD11c+细胞)的群体。不同处理通过足垫注射(footpad injection)施用于小鼠。剂量为0.5mg NP(2wt.%siSTAT3、4wt.%CpG和/或3wt.%SARS-CoV-2刺突蛋白抗原)。处理后两天,收集引流淋巴结(DLN)和非引流淋巴结(NDLN)并将其处理到单个细胞中以进行流式细胞术分析。相对于生理盐水,* p <0.05(每组 n =3只)。

[0048] 图11示出了疫苗接种AIRISE-CoV的BALB/c小鼠中的针对SARS-CoV-2刺突(S)抗原的体液应答。通过足垫注射80 μ l AIRISE-CoV(0.5mg NP、2wt.%siSTAT3、4wt.%CpG、3wt.%SARS-CoV-2刺突蛋白抗原)对8周龄大的BALB/c小鼠进行疫苗接种(剂量1:第0天;剂量2:第17天)。在第16天(剂量1效应)和第38天(剂量2效应)收集血清以在连续稀释血清之后通过ELISA评估SARS-CoV-2S IgG抗体的水平。对于 n =2(未经处理的)和 n =3(AIRISE-CoV),数据表示平均OD₄₅₀ nm值(平均值 \pm SD)。

[0049] 图12A和12B示出了疫苗接种AIRISE-CoV的BALB/c小鼠在12周之后针对SARS-CoV-2刺突(S)抗原的体液应答。通过足垫注射(图12A)80 μ l AIRISE-CoV(0.5mgNP、2wt.%siSTAT3、4wt.%CpG、3wt.%SARS-CoV-2刺突蛋白抗原)或(图12B)80 μ l利用2SARS-CoV-2刺

突肽作为抗原(0.5mg NP、2wt.% siSTAT3、4wt.% CpG、3wt.% SARS-CoV-2刺突肽抗原)的AIRISE-CoV对8周龄大的BALB/c小鼠(M1-M3表示小鼠1、2和3)进行疫苗接种(剂量1:第0天;剂量2:第17天)。在第80天收集血清以通过ELISA评估SARS-CoV-2S IgG抗体的水平。对于每个免疫或原初小鼠,数据表示2个实验复制品的平均OD₄₅₀ nm值(平均值±SD)。

[0050] 图13示出了疫苗接种两个剂量的AIRISE-CoV的BALB/c小鼠中的针对SARS-CoV-2刺突(S)抗原的体液应答。通过足垫(f.p.)注射AIRISE-CoV(0.5mg NP、2wt.% siSTAT3、4wt.% CpG、3wt.% SARS-CoV-2刺突蛋白抗原)对8周龄大的BALB/c小鼠进行疫苗接种(剂量1:第0天;剂量2:第17天)。在疫苗接种后不同周(第3-54周)收集血清以通过ELISA评估SARS-CoV-2S IgG抗体的水平。数据表示5只免疫小鼠和一只原初小鼠的平均OD₄₅₀ nm值(平均值±SD)。

[0051] 图14A-C示出了分别疫苗接种单个剂量的AIRISE-CoV、siSTAT3-刺突-NP或CpG-刺突-NP的BALB/c小鼠中的针对SARS-CoV-2刺突(S)抗原的体液应答。通过肌肉(i.m.)注射单个剂量的以下各项对8周龄大的BALB/c小鼠进行疫苗接种:(A) AIRISE-CoV(0.4mg NP、2wt.% siSTAT3、4wt.% CpG、3wt.% SARS-CoV-2刺突蛋白抗原;n=4);(B) siSTAT3-Spike-NP(0.4mg NP、2wt.% siSTAT3、3wt.% 刺突蛋白抗原;n=3);或(C) CpG-Spike-NP(0.4mg NP、4wt.% CpG、3wt.% 刺突蛋白抗原;n=3)。在疫苗接种后不同周(第6-36周)收集血清以通过ELISA评估SARS-CoV-2S IgG抗体的水平。数据表示3-4只免疫小鼠和一只未经处理的小鼠的平均OD₄₅₀ nm值(平均值±SD)。

[0052] 图15示出了通过免疫血清(来自图11)对HEK293-hACE2细胞的SARS-CoV-2假病毒感染的抑制。图示出了在来自用AIRISE-CoV免疫的小鼠相对于未经处理的小鼠的血清的不同稀释度下的GFP+细胞%。表6中呈现了经计算的中和滴度(中和50%病毒所需的稀释度;NT₅₀)值。

[0053] 图16A和16B是展示在用siSTAT3-NP或siSTAT3-CpG-NP处理后BMDC(图16A)和J774(图16B)的细胞活力的图。处理后2天,NP剂量为35μg/ml(2wt.% siRNA;7wt.% CpG)。

[0054] 序列表的引用

[0055] 使用如在37C.F.R. §1.822中所定义的标准字母缩写示出本文所描述的核酸和/或氨基酸序列。每个核酸序列仅示出了一条链,但互补链被理解为包含在适当的实施例中。在2021年7月12日或前后创建的文件大小为16KB、标题为“2IS9696.txt (Sequence Listing.txt)”的计算机可读文本文件含有本申请的序列表并特此以全文引用的方式并入。

[0056] SEQ ID NO:1-8是来自刺突蛋白(SEQ ID NO:1-5)、核衣壳蛋白(SEQ ID NO:6)、膜蛋白(SEQ ID NO:7)和包膜蛋白(SEQ ID NO:8)的代表性SARS-CoV-2T细胞和/或B细胞表位的氨基酸序列。

[0057] SEQ ID NO:8-89和91是对应于如表2(下文)中所描述的示范性siRNA的核酸序列。尽管不包含在序列表中的每个序列中,但是每个siRNA可以任选地包含脱氧胸苷二核苷酸(dTdT)或其它在3'末端处突出的脱氧二核苷酸(例如,dTdG)。

[0058] SEQ ID NO:90是用于刺激T细胞的卵清蛋白肽。

具体实施方式

[0059] 本文描述了用于诱导(例如用于治疗或预防)针对感染原(例如,病毒,如 β -冠状病毒感染,如SARS-CoV-2感染、SARS-CoV-1感染、MERS-CoV感染或其它病毒或病原体)的免疫应答的免疫原性构建体。这些用于感染性疾病的新免疫原性构建体利用单一递送载剂来递送抗原、佐剂以及在一些实施例中siRNA以调节免疫抑制基因,以便刺激免疫力。

[0060] 免疫原性构建体含有:纳米颗粒(例如,介孔二氧化硅纳米颗粒(MSNP))、阳离子聚合物(例如,PEI)、稳定剂(例如,PEG)和抗原以及在一些实施例中至少一种佐剂(例如,CpG)和/或寡核苷酸(例如,siRNA)。还设想到各种另外的药剂的组合。本公开的免疫原性构建体还可以包含多于一种类似的阳离子聚合物、稳定剂、抗原、佐剂和/或寡核苷酸。例如,免疫原性构建体可以包含多种不同的作用于相同或不同的靶感染原的寡核苷酸和/或抗原。此类另外的抗原的使用可以提供相加或协同效应。

[0061] 本公开的免疫原性构建体可以用于共同递送佐剂(例如,CpG寡核苷酸)、病毒抗原(例如,蛋白质或肽)或抗原产生剂(例如,mRNA或pDNA)以及任选地siRNA以诱导针对新型感染性疾病的有效持久的免疫力(图1)。免疫原性构建体引发身体的抗原呈递细胞(例如,树突细胞、B细胞和巨噬细胞)利用抗原来激活效应物和记忆T淋巴细胞和识别感染原蛋白的体液免疫应答。此类免疫原性构建体可以预防另外的感染或降低疾病严重程度。

[0062] 现在参考如下另外的细节和选项描述本公开的方面:(I)定义;(II)纳米颗粒;(III)阳离子聚合物;(IV)稳定剂;(V)佐剂;(VI)抗原和抗原产生剂;(VII)寡核苷酸;(VIII)靶向剂;(IX)标记剂;(X)免疫原性构建体合成;(XI)包含脂质涂覆的纳米颗粒的免疫原性构建体;(XII)免疫原性构建体调配物和使用方法;(XIII)示范性实施例;(XIV)实验实例(包含实例1-8);以及(XV)结尾段落。这些标题不限定本公开的解释,并且仅出于组织目的而提供。

[0063] I. 定义

[0064] 为了便于理解本公开,下面定义了许多术语。本文中所定义的术语具有与本公开相关的领域的普通技术人员通常所理解的含义。本文中的术语用于描述本公开的具体实施例,但除了权利要求中所概述的之外,其用途不限制本公开。

[0065] 短语“CpG基序”是指通过磷酸二酯核苷酸间键或磷酸二酯衍生物核苷酸间键与3' G核苷酸连接的5' C核苷酸。在一些实施例中,CpG基序包含磷酸二酯核苷酸间键。在一些实施例中,CpG基序包含磷酸二酯衍生物核苷酸间键。

[0066] 如本文所使用的,术语“A类CpG ODN(Class A CpG ODN)”(也称为“A类CpG ODN(A-class CpG ODN)”、“D型CpG ODN”或“A类CpG DNA序列”)根据其在生物学和化学科学中的共同含义使用并且指代以下:包含寡脱氧核苷酸的CpG基序,所述寡脱氧核苷酸包含在5'、3'或两端处的一或多个poly-G序列;包含CpG基序的内部回文序列;或一或多种连接脱氧核苷酸的磷酸二酯衍生物。在一些实施例中,A类CpG ODN包含:在5'、3'或两端处的poly-G序列;包含CpG基序的内部回文序列;以及连接脱氧核苷酸的一或多种磷酸二酯衍生物。在一些实施例中,磷酸二酯衍生物是硫代磷酸酯。A类CpG ODN的实例包含ODN D19、ODN 1585、ODN 2216和ODN 2336。

[0067] 术语“B类CpG ODN(Class B CpG ODN)”或“B类CpG ODN(B-class CpG ODN)”或“K型CpG ODN”或“B类CpG DNA序列”根据其在生物学和化学科学中的共同含义使用并且指代

以下:包含寡脱氧核苷酸的CpG基序,所述寡脱氧核苷酸包含一或多个包含CpG基序的6聚体基序;连接所有脱氧核苷酸的磷酸二酯衍生物。在一些实施例中,B类CpG ODN包含6聚体基序的一或多个拷贝,所述6聚体基序包含CpG基序和连接所有脱氧核苷酸的磷酸二酯衍生物。在一些实施例中,磷酸二酯衍生物是硫代磷酸酯。在一些实施例中,B类CpG ODN包含一个包含CpG基序的6聚体基序。在一些实施例中,B类CpG ODN包含含有CpG基序的6聚体基序的两个拷贝。在一些实施例中,B类CpG ODN包含含有CpG基序的6聚体基序的三个拷贝。在一些实施例中,B类CpG ODN包含含有CpG基序的6聚体基序的四个拷贝。B类CpG ODN的实例包含ODN 1668、ODN 1826、ODN 2006和ODN 2007。

[0068] 术语“C类CpG ODN(Class C CpG ODN)”或“C类CpG ODN(C-class CpG ODN)”或“C型CpG DNA序列”根据其在生物学和化学科学中的共同含义使用并且指代包含回文序列的寡脱氧核苷酸,所述回文序列包含CpG基序和连接所有脱氧核苷酸的磷酸二酯衍生物(硫代磷酸酯)。C类CpG ODN的实例包含ODN 2395和ODN M362。

[0069] 如本文所使用的,“免疫原性”是指药剂(例如,免疫原性构建体、其组分或含有免疫原性构建体的组合物)触发免疫应答的能力,例如,如通过体外测定(例如,混合淋巴细胞反应;细胞毒性T细胞杀伤;在用抗原刺激免疫细胞时细胞因子的上调等)、离体测定(例如,通过微量中和测定产生的抗体中和滴度;通过ELISA测定产生的抗原特异性抗体和分泌抗体的B细胞)以及确认细胞和体液免疫的成功诱导(例如,免疫以保护活样本免受病毒激发的能力)的体内测定。

[0070] 如本文所使用的,术语“免疫原性量”是指诱导受试者体内的免疫应答(例如,通过受试者体内的抗体滴度的增加所反映的,如通过常规技术(如ELISA)确定的)的免疫原性构建体或组合物的量。

[0071] 如本文所使用的,术语“感染原”是指引起感染和/或疾病的因子。感染原包含病毒、细菌、真菌和寄生虫或其组合。在一些实施例中,所述感染原是细菌。本文中讨论了另外的感染原,和/或本领域普通技术人员将了解另外的感染原。在实例中,感染原可以被称为如本文所描述的免疫原性构建体的“靶标”。例如,病毒靶标可以是冠状病毒、棒状杆菌属(*corynebacterium*)、埃博拉病毒、正粘病毒、肝病毒、嗜血杆菌属细菌、HIV、HPV、麻疹病毒、分支杆菌属(*mycobacterium*)、脑膜炎球菌细菌、正腮腺炎病毒(*orthorubulavirus*)、诺如病毒、链球菌属(*streptococcus*)、肠病毒、正肺炎病毒(*orthopneumovirus*)、轮状病毒、风疹病毒、疱疹病毒、梭菌属细菌、博代氏杆菌属细菌或黄病毒。病原体也被称为感染原。

[0072] 如本文所使用的,术语“感染性疾病”是指由感染原(如细菌、病毒、寄生虫或真菌)引起的疾病。在一些实施例中,感染性疾病是病毒感染。感染性疾病的实例包含:基于冠状病毒的感染(如中东呼吸道综合征(MERS)、严重急性呼吸道综合征(SARS)和冠状病毒疾病(例如,COVID-19));基于棒状杆菌属的感染(如白喉);基于埃博拉病毒的感染(如埃博拉);或基于正粘病毒科病毒的感染(如甲型流感、乙型流感或丙型流感);基于肝病毒A、B、C、D或E的感染(如肝炎);基于嗜血杆菌属的感染(如hib疾病);基于人免疫缺陷病毒(HIV)的感染(如获得性免疫缺陷综合征(AIDS));基于人乳头瘤病毒(HPV)的感染;基于麻疹病毒的感染(如麻疹);基于分支杆菌属的感染(如结核病);基于奈瑟氏菌属的感染(如脑膜炎);基于正腮腺炎病毒的感染(如流行性腮腺炎);基于诺如病毒的感染;基于链球菌属的感染;基于肠病毒的感染(如脊髓灰质炎);基于正肺炎病毒的感染;基于轮状病毒的感染;基于风疹病毒

的感染(如风疹);基于疱疹病毒的感染(如疱疹、水痘和带状疱疹);基于梭菌属的感染(如破伤风和肉毒中毒);基于博代氏杆菌属的感染(如百日咳);基于黄病毒的感染(如寨卡病毒);等等。本文中讨论了另外的感染性疾病,和/或本领域普通技术人员将了解另外的感染性疾病(例如,帕蒂(Pati)等人,免疫学前沿(Front Immunol.) 9:2224,2018(16页)以及其中引用的参考)。

[0073] 如本文所使用的,术语“生物学上可接受的赋形剂”和“药学上可接受的赋形剂”是指具有对受试者而言无毒和非炎性的特性的非活性成分(例如,能够悬浮免疫原性构建体的媒剂)。典型赋形剂包含例如:载剂、粘合剂、填料、润滑剂、乳化剂、悬浮剂、甜味剂、调味剂、防腐剂、缓冲剂、润湿剂、崩解剂、发泡剂以及其它常规赋形剂和添加剂和/或其它可以增强稳定性、递送、吸收、半衰期、功效、药代动力学和/或药效动力学、减少不良副作用或提供其它生物学和/或药学和/或膳食补充用途的优点的添加剂。在一些实施例中,可接受的赋形剂包含不与免疫原性构建体结合的佐剂。

[0074] 如本文所使用的,“pDNA”是指质粒DNA,例如编码感染原的至少一种抗原的质粒。

[0075] 如本文所使用的,术语“预防”意指降低患上感染性疾病,例如病毒感染(如由 β -冠状病毒,如SARS-CoV-2、SARS-CoV-1、MERS-CoV或相关病毒引起的感染)、细菌感染、真菌感染或寄生虫感染的风险(例如,1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、97%、99%或约100%)。为了确定预防是否有效,可以在接受本公开的组合物的受试者与未接受组合物的类似情况的受试者(例如,有病毒感染(如SARS-CoV-2、SARS-CoV-1或MERS-CoV感染)或由相关病毒引起的感染的风险的受试者)之间进行比较。还可以在接受组合物的受试者与对照、基线或已知水平的测量之间进行比较。

[0076] 如本文所使用的,术语“受试者”可以是人、非人灵长类动物或非灵长类动物哺乳动物,如狗、猫、马、奶牛、猪、马、山羊、猴子、大鼠、小鼠和/或绵羊。在一些实施例中,所述受试者是人。

[0077] 如本文所使用的,术语“结合TLR的DNA取代基”是指能够与Toll样受体(“TLR”,包含至少一种脱氧核糖核酸)结合的取代基或部分。在一些实施例中,结合TLR的DNA取代基是核酸。在一些实施例中,结合TLR的DNA取代基包含至少一种核酸类似物。在一些实施例中,结合TLR的DNA取代基包含至少一种具有替代主链的核酸类似物(例如,磷酸二酯衍生物(例如,氨基磷酸酯、磷酸二酰胺、硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、磷酰基羧酸、磷酰基羧化物、磷酰基乙酸、膦甲酸纳、甲基膦酸酯、硼膦酸酯或O-甲基亚磷酰胺)、肽核酸主链、LNA或键)。在一些实施例中,结合TLR的DNA取代基包含DNA。在一些实施例中,结合TLR的DNA取代基中的所有核苷酸是脱氧核苷酸。在一些实施例中,结合TLR的DNA取代基包含或是具有选自磷酸二酯和磷酸二酯衍生物(例如,氨基磷酸酯、磷酸二酰胺、硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、磷酰基羧酸、磷酰基羧化物、磷酰基乙酸、膦甲酸纳、甲基膦酸酯、硼膦酸酯、O-甲基亚磷酰胺或其组合)的核苷酸间键的DNA。在一些实施例中,结合TLR的DNA取代基包含具有选自磷酸二酯和硫代磷酸酯的核苷酸间键的DNA。在一些实施例中,结合TLR的DNA取代基包含或是具有选自磷酸二酯、硫代磷酸酯和二硫代磷酸酯的主链键的DNA。在一些实施例中,结合TLR的DNA取代基包含或是包含磷酸二酯主链键的DNA。在一些实施例中,结合TLR的DNA取代基包含或是包含硫代磷酸酯主链键的DNA。在一些实施例中,结合TLR的DNA取代基包含或是包含二硫

代磷酸酯主链键的DNA。在一些实施例中,与其它TLR相比,结合TLR的DNA取代基优先地与TLR9结合。在一些实施例中,结合TLR的DNA取代基特异性地与TLR9结合。在一些实施例中,结合TLR的DNA取代基特异性地与TLR3结合。在一些实施例中,结合TLR的DNA取代基特异性地与TLR7结合。在一些实施例中,结合TLR的DNA取代基特异性地与TLR8结合。在一些实施例中,结合TLR的DNA取代基特异性地结合细胞亚区室(例如,内体)相关的TLR(例如,TLR3、TLR7、TLR8或TLR9)。在一些实施例中,结合TLR的DNA取代基包含或是富含G的寡核苷酸。在一些实施例中,结合TLR的DNA取代基包含CpG基序(即是CpG寡脱氧核苷酸(ODN))。在一些实施例中,CpG基序是未甲基化的。在一些实施例中,结合TLR的DNA取代基是A类CpG寡脱氧核苷酸(ODN)。在一些实施例中,结合TLR的DNA取代基是B类CpG寡脱氧核苷酸(ODN)。在一些实施例中,结合TLR的DNA取代基是C类CpG寡脱氧核苷酸(ODN)。在一些实施例中,结合TLR的DNA取代基(例如,结合TLR9的DNA取代基)包含具有A、G、C或T碱基和磷酸二酯键和/或磷酸二酯衍生物键(例如,硫代磷酸酯键)的脱氧核糖核酸。

[0078] 如本文所使用的,术语“治疗(treatment)”或“治疗(treating)”是指降低、减少、减少感染性疾病,例如病毒感染,例如β-冠状病毒(例如,SARS-CoV-2、SARS-CoV-1或MERS-CoV感染或相关病毒)感染的进展或减少其副作用(例如,减少1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、97%、99%或约100%)。为了确定治疗是否有效,可以在经治疗的受试者与未接受治疗的类似情况的受试者(例如,患有或有风险患有病毒感染(如SARS-CoV-2、SARS-CoV-1或MERS-CoV感染)或由相关病毒感染引起的感染的受试者)之间进行比较。还可以在经过治疗的受试者与对照、基线或已知水平或测量之间进行比较。治疗病毒感染(例如,β-冠状病毒感染,如SARS-CoV-2、SARS-CoV-1或MERS-CoV感染,或由相关病毒引起的感染)包含以下中的一项或多项:降低病毒载量(例如,1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、97%、99%或约100%)、减少受试者住院天数(例如,1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、20天、30天、40天、50天或更多天)、减少受试者需要抗病毒疗法的天数(例如,1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、20天、30天、40天、50天或更多天)和/或减少受试者需要的抗病毒疗法的剂量。

[0079] 如本文所使用的,术语“疫苗”是指能够诱导针对受试者体内的感染原的免疫应答和/或治疗和/或预防与感染原相关的感染和/或疾病的药剂(例如,免疫原性构建体、其组分或含有免疫原性构建体的组合物)。

[0080] II. 纳米颗粒

[0081] 本公开的组合物和方法中可用的纳米颗粒包含但不限于介孔二氧化硅纳米颗粒(例如,MSNP)、氧化铁纳米颗粒、银纳米颗粒、金纳米颗粒、磷酸钙、无机纳米颗粒、碳纳米管、脂质体、脂质纳米颗粒或阳离子聚合物颗粒。纳米颗粒可以或可以不是多孔的。纳米颗粒核的示范性大小为约5nm至约999nm、约5nm至约90nm、约5nm至约20nm、约20nm至约400nm、约20nm至约500nm、约20nm至约100nm、约20nm至200nm、约30nm至约100nm、约30nm至约80nm、约30nm至约60nm、约40nm至约80nm、约50nm至400nm、约50至500nm、约70nm至约90nm、约100nm至约200nm、约200nm至约500nm、约500nm至约999nm或约5nm、约10nm、约20nm、约30nm、约40nm、约50nm、约60nm、约70nm、约80nm、约90nm或约100nm。通常,纳米颗粒核是球形的,即使也可以使用其它形状,如杆和盘。在一些实施例中,纳米颗粒是介孔二氧化硅纳米颗粒

(MSNP)。

[0082] 在一些实施例中,纳米颗粒具有佐剂或免疫刺激特性。具有佐剂或免疫刺激特性的示范性纳米颗粒包含脂质体、脂质复合物、基于脂质的颗粒、多聚复合物、聚合物颗粒、无机颗粒(例如,铝盐颗粒和磷酸钙纳米颗粒)、病毒样颗粒或由以下中的一或多种形成的纳米颗粒:1,2-二油酰基-3-三甲基铵丙烷(DOTAP)、胆固醇、3 β -[N-(N',N'-二甲基氨基乙烷)-氨基甲酰基]胆固醇、磷脂酰胆碱/胆固醇、壳聚糖、聚- γ -谷氨酸(γ -PGA)、透明质酸、聚乙烯亚胺(PEI)、聚(丙基丙烯酸)、硫化聚丙烯(PPS)、聚(乳酸-共-乙醇酸)(PLGA)、支链淀粉、麦芽糊精、聚苯乙烯、金、氧化钴、明矾、三-棕榈酰基-S-甘油基半胱氨酸(PAM3Cys)、鲨烯、Montanide ISA 50V、Montanide ISA 51、Montanide ISA 201、Montanide ISA 206和Montanide ISA 720。

[0083] 为了制备纳米颗粒平台(NP),通过各种机制将另外的组合共价地或非共价地附着到纳米颗粒。例如,阳离子聚合物可以通过电荷附着到纳米颗粒,例如二氧化硅或氧化铁纳米颗粒。可替代地,可以改变纳米颗粒的表面以包含用于与阳离子聚合物缀合的反应性部分和/或其它组分,或者阳离子聚合物或其它组分可以包含与纳米颗粒结合的部分。例如,在与阳离子聚合物和其它组分附着之前,纳米颗粒核(如二氧化硅纳米颗粒、硅纳米颗粒、金纳米颗粒、氧化铁纳米颗粒和银纳米颗粒)以及碳纳米管可以用反应性部分(如硫醇、磷酸酯、羧酸酯和胺)进行修饰。在与纳米颗粒核结合之前,阳离子聚合物和其它组分可以被修饰以包含这些或其它部分,包含马来酰亚胺、N-羟基琥珀酰亚胺基(NHS)酯或叠氮化物。组分可以在表面上或孔(如果存在的话)内直接附着到纳米颗粒。大分子货物(如蛋白质、mRNA或质粒DNA(pDNA))附着在纳米颗粒的外表面上(或任选地,在施涂到纳米颗粒核的涂层上-也就是说,装载到NP上),而较小分子(如染料)可以附着在纳米颗粒或NP的孔内以及外表面上。在装载另外的组分之后,本公开的免疫原性构建体有利地维持其亚微米大小。

[0084] III. 阳离子聚合物

[0085] 在一些实施例中,纳米颗粒(如MSNP)涂覆有阳离子聚合物或其它化合物。阳离子聚合物可以使用任何合适的方式与纳米颗粒的表面结合。在一些实施例中,阳离子聚合物通过静电相互作用与纳米颗粒结合。阳离子聚合物可以是任何带正电荷的聚合物,如但不限于PEI、聚酰胺-胺、聚(烯丙胺)、聚(二烯丙基二甲基氯化铵)、壳聚糖、聚(N-异丙基丙烯酰胺-共-丙烯酰胺)、聚(N-异丙基丙烯酰胺-共-丙烯酸)、聚(L-赖氨酸)、二乙基氨基乙基-葡聚糖、聚-(N-乙基-乙烯吡啶溴化铵)、聚(二甲基氨基)乙基甲基丙烯酸酯)或聚(乙二醇)-共-聚(三甲基胺-乙基甲基丙烯酸酯氯化物)。其它阳离子聚合物对本领域技术人员而言将是显而易见的,并且可以在例如由布兰德鲁普(Brandrup)、E.H.伊默古特(E.H.Immergut)和E.A.格拉库(E.A.Grukke)编辑的聚合物手册(Polymer Handbook),第4版,约翰威立父子公司(John Wiley&Sons),2003中找到。

[0086] 阳离子聚合物可以是线性的或支化的。在一些实施例中,阳离子聚合物的尺寸的范围可以为约500Da至25kDa并且可以是支化的或线性的。例如,平均大小为1.8kDa至10kDa的支化PEI可以装载到纳米颗粒上(产生纳米颗粒平台;NP)。阳离子聚合物与纳米颗粒的比率可以根据期望的结果而变化。阳离子聚合物可以以NP的1至50wt.%存在,例如5至40wt.%、10至30wt.%、20至30wt.%、5至15wt.%、5至20wt.%、5至25wt.%、5至30wt.%、10至20wt.%、10至25wt.%或25至40wt.%,例如约5wt.%、10wt.%、15wt.%、20wt.%、

25wt.%、30wt.%或35wt.%。在一些实施例中,阳离子聚合物以NP的10至20wt.%存在。

[0087] 在一些实施例中,阳离子聚合物例如与预涂覆在纳米颗粒上或在纳米颗粒上涂覆后的可裂解的二硫键交联。在一些实施例中,在与纳米颗粒(例如,MSNP)结合之后,所附着的阳离子聚合物使用例如DSP(二硫代双[琥珀酰亚胺基丙酸酯])、DTSSP(3,3'-二硫代双(磺基琥珀酰亚胺基丙酸酯)和DTBP(二甲基3,3'-二硫代双丙亚氨酸二甲酯)交联。交联可以在溶液中不存在或存在游离阳离子聚合物的情况下发生。在其它实施例中,阳离子聚合物未交联。

[0088] IV. 稳定剂

[0089] 稳定剂可以与纳米颗粒和/或阳离子聚合物例如通过任何合适的方式缀合。在一些实施例中,稳定剂与涂覆在纳米颗粒(例如,MSNP)上的交联阳离子聚合物的胺或其它反应基缀合。示范性稳定剂包含PEG、葡聚糖、聚唾液酸、透明质酸、聚乙烯吡咯烷酮、聚乙烯醇和聚丙烯酰胺或其组合。

[0090] 稳定剂可以具有多个化学反应基,例如用于附着于纳米颗粒、阳离子聚合物和/或其它组分。例如,反应性稳定剂,例如PEG衍生物,可以具有两个功能性部分,如每个末端含有马来酰亚胺和活化酯两者的马来酰亚胺-PEG-N-羟基琥珀酰亚胺酯(Mal-PEG-NHS)。与本公开的组合物和方法结合使用的稳定剂(例如,PEG)的分子量的范围通常在500Da-40kDa之间,例如2-10kDa。稳定剂可以以NP的1至50wt.%存在,例如,5至30wt.%、10至20wt.%、10至25wt.%、5至15wt.%、5至20wt.%、5至25wt.%或1至10wt.%,例如约5wt.%、10wt.%、15wt.%、20wt.%、25wt.%、35wt.%、40wt.%或45wt.%。

[0091] 在一些实施例中,稳定剂(例如,PEG)被引入以增强NP稳定性(例如,减少聚集和沉淀)和/或保护货物分子(如siRNA、miRNA、mRNA和pDNA)免于例如酶促降解。

[0092] 与本公开的组合物和方法结合使用的稳定剂(例如,PEG)的分子量的范围通常在500Da-40kDa之间,例如5kDa、2-5kDa、2-10kDa、5-10kDa。在各个实施例中,稳定剂可以以纳米颗粒平台(NP)的1至50wt.%存在,例如,5至30wt.%、10至20wt.%、10至25wt.%、5至15wt.%、5至20wt.%、5至25wt.%或1至10wt.%,例如约5wt.%、10wt.%、15wt.%、20wt.%、25wt.%、35wt.%、40wt.%或45wt.%。稳定剂和大小和密度可以被优化以容纳大货物,如蛋白质和mRNA。

[0093] 在一些实施例中,稳定剂在货物装载之前引入。在一些实施例中,稳定剂在货物装载之后引入。在一些实施例中,稳定剂在货物装载之前和之后两者引入,和/或与至少一种货物分子的装载同时引入。

[0094] 一些纳米颗粒(如涂覆有PEI和PEG的介孔二氧化硅纳米颗粒和氧化铁纳米颗粒)可以保护抗原和抗原产生剂在运输期间长期储存,使得不需要在非常低的温度(例如,-80℃)下储存材料。

[0095] V. 佐剂

[0096] 本文所提供的构建体抗原包含至少一种佐剂。佐剂可以包含在纳米颗粒内或通过非共价或共价相互作用(包含氢键结合、范德华相互作用(Van der Waals interaction)、静电相互作用、疏水相互作用和与纳米颗粒上的部分化学缀合)在其它方面与纳米颗粒、阳离子聚合物或稳定剂缔合。化学缀合包含硫醇-马来酰亚胺、NHS酯-胺、叠氮化物-炔烃和其它点击化学。在一些实施例中,佐剂是硫醇化的,并且通过硫醇-马来酰亚胺反应与含有马

来酰亚胺基团的稳定剂缀合(参见国际申请第PCT/US2016/022655号,其以全文引用的方式并入本文)。在一些实施例中,佐剂静电地装载在涂覆于纳米颗粒上的阳离子聚合物上。佐剂可以以NP的1-20wt.%存在,例如,1-10wt.%、2-7wt.%、2-4wt.%、2-10wt.%、5-10wt.%、10-20wt.%,例如约4wt.%、5wt.%、6wt.%、7wt.%、10wt.%或20wt.%。

[0097] 佐剂也可以是敲低靶基因的治疗剂(例如,寡核苷酸,如siRNA)的一部分或与所述治疗剂缀合,可以被设计成含有免疫刺激序列。

[0098] 通常,佐剂是任何物质,其混合到疫苗组合中会增加或以其它方式修饰针对抗原的免疫应答。佐剂增加对抗原的免疫应答的能力通常表现为免疫介导的反应的显著增加或疾病症状的减少。例如,体液免疫的增加典型地表现为针对抗原产生的抗体的效价显著增加,而T细胞活性的增加典型地表现为抗原特异性T细胞增殖、靶细胞死亡或细胞因子分泌增加。佐剂还可以例如通过将初次体液或Th2应答变为初次细胞或Th1应答来改变免疫应答。

[0099] 合适的佐剂包含结合TLR的DNA取代基,如CpG寡核苷酸(例如,ISS 1018; Amplivax; CpG ODN 7909、CpG ODN 1826、CpG ODN D19、CpG ODN 1585、CpG ODN 2216、CpG ODN 2336、ODN 1668、ODN 1826、ODN 2006、ODN 2007、ODN 2395、ODN M362和SD-101)、含有CpG序列的DNA TLR激动剂(例如,dSLIM)、非CpG DNA TLR激动剂(例如,EnanDIM)和阳离子肽缀合的CpG寡核苷酸(例如,IC30、IC31);RNA TLR激动剂(例如,Poly I:C和Poly-ICLC);铝盐(例如,氢氧化铝、磷酸铝、氯化铝和硫酸铝钾);抗CD40抗体(例如,CP-870,893);细胞因子,如粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF);小分子TLR激动剂(例如,咪喹莫特(imiquimod)、瑞喹莫特(resiquimod)、嘎德莫特(gardiquimod)和3M-052);融合蛋白(例如,ImuFact IMP321、CyaA和ONTAK);基于油或表面活性剂的佐剂,如MF59、Montanide IMS 1312、Montanide ISA 206、Montanide ISA 50V和Montanide ISA-51;植物提取物,如源自皂苷的QS21刺激元(美国马萨诸塞州伍斯特阿奎拉生物技术公司(Aquila Biotech, Worcester, Mass., USA));分枝杆菌提取物和合成细菌细胞壁模拟物,如脂多糖(例如,单磷酸基脂质A、OM-174、OM-197-MP-EC和Pam3Cys);咕吨酮衍生物(例如,Vadmezanvadimezan);其混合物(例如,AS-15);以及其它专有佐剂,如里比公司(Ribi)的Detox、Quil或Superfos。先前已经描述了若干种免疫佐剂(例如,对树突细胞具有特异性的MF59及其制剂)(杜普伊(Dupuis)等人,细胞免疫学(Cell Immunol.) 186(1):18-27, 1998;艾莉森(Allison),生物标准化进展(Dev Biol Stand.);92:3-11,1998)。还可以使用细胞因子。已经将若干细胞因子直接与影响树突细胞向淋巴组织的迁移(例如,TNF- α)、加速树突细胞成熟为T淋巴细胞的有效抗原呈递细胞(例如,GM-CSF、IL-1和IL-4)(美国专利第5,849,589号)以及充当免疫佐剂(例如,IL-12)(加布里洛维奇(Gabrilovich)等人,侧重于肿瘤免疫学的免疫疗法杂志(J Immunother Emphasis Tumor Immunol.) (6):414-418, 1996)相联系。Toll样受体(TLR)或激活TLR的药剂也可以用作佐剂,并且是模式识别受体(PRR)家族的重要成员,所述PRR识别许多微生物共用的保守基序,且称为“病原体相关的分子模式(PAMP)”。

[0100] 在一些实施例中,佐剂包含CpG寡核苷酸。据报道,CpG免疫刺激性寡核苷酸也可以增强疫苗环境中佐剂的效果。不受任何特定机械理论的束缚,CpG寡核苷酸至少部分地经由Toll样受体(TLR)(主要是TLR9)通过激活先天性(非适应性)免疫系统而起作用。CpG触发的

TLR9激活增强了对多种抗原的抗原特异性体液和细胞应答,包含预防性疫苗和治疗性疫苗两者中的肽或蛋白抗原、活病毒或灭活病毒、树突细胞疫苗、自体细胞疫苗以及多糖缀合物。更重要的是,其增强了树突细胞的成熟和分化,从而导致TH1细胞的激活增强和强大的细胞毒性T淋巴细胞(CTL)产生,即使在不存在CD4辅助T细胞的情况下也是如此。即使在不存在如明矾或不完全弗氏佐剂(IFA)等通常促进TH2偏倚的疫苗佐剂的情况下,由TLR9刺激诱导的TH1偏倚也得以维持。CpG寡核苷酸在与其它佐剂一起调配或共同施用时或在如微粒、纳米颗粒、脂质乳剂或类似调配物等调配物中展示出了极高的佐剂活性,当抗原相对较弱时,这对于诱导强烈应答尤其必要。其还加速了免疫应答并使抗原剂量降低两个数量级,在一些实验中,在没有CpG的情况下对全剂量疫苗产生相当的抗体应答(克里格(Krieg),自然评论药物发现(Nature Reviews, Drug Discovery),5:471-484,2006)。美国专利第6,406,705号描述了组合使用CpG寡核苷酸、非核酸佐剂和抗原来诱导抗原特异性免疫应答。可商购获得的CpG TLR9拮抗剂是Mologen(德国柏林(Berlin, GERMANY))的dSLIM(双茎环免疫调节剂)。也可以使用其它TLR结合分子,如结合RNA的TLR 7、TLR 8和/或TLR 9。

[0101] 根据本公开的实施例,咕吨酮衍生物,例如瓦德美赞或AsA404(也称为5,6-二甲基咕吨酮-4-乙酸(DMXAA))也可以用作佐剂。可替代地,此类衍生物也可以例如通过全身或瘤内递送与本公开的疫苗并行施用,以刺激肿瘤部位处的免疫。在不受理论束缚的情况下,据信此类咕吨酮衍生物通过经由IFN基因ISTING受体的刺激物刺激干扰素(IFN)产生而起作用(参见例如康伦(Conlon)等人,免疫学杂志(J Immunology),190:5216-5225,2013;以及金姆(Kim)等人,美国化学学会化学生物学杂志(ACS Chem Biol),8:1396-1401,2013)。其它有用佐剂的实例包含经化学修饰的CpG(例如,CpR、Idera)、PolyI:C(例如,polyi:CI2U)、非CpG细菌DNA或RNA以及可以在治疗上起作用和/或作为佐剂起作用的免疫活性小分子和抗体,如环磷酰胺、舒尼替尼、贝伐单抗(bevacizumab)、CelebrexTM、NCX-4016、西地那非(sildenafil)、他达拉非(tadalafil)、伐地那非(vardenafil)、索拉非尼(sorafenib)、XL-999、CP-547632、帕唑帕尼(pazopanib)、ZD2171、AZD2171、伊匹单抗(ipilimumab)、曲美木单抗(tremelimumab)和SC58175。本领域技术人员可以在无需过度实验的情况下容易地确定在本公开的上下文中有用的佐剂和添加剂的量和浓度。另外的佐剂包含集落刺激因子,如粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF,沙格司亭(sargramostim))。

[0102] 在一些实施例中,佐剂包含poly-ICLC。Poly-ICLC是一种合成制备的双链RNA,其包含平均长度为5000个核苷酸的polyI和polyC链,已经通过添加聚赖氨酸和羧甲基纤维素使其对血清核酸酶的热变性和水解具有稳定性。所述化合物激活TLR3和MDA5的RNA解旋酶结构域,这两个都是PAMP家族的成员,从而导致DC和自然杀伤(NK)细胞激活并产生I型干扰素、细胞因子和趋化因子的“天然混合物”。此外,poly-ICLC通过两个IFN诱导型核酶系统,即2'5'-OAS和P1/eIF2a激酶(也称为PKR(4-6))以及RIG-I解旋酶和MDA5发挥更直接、更广泛的宿主靶向抗感染和可能的抗肿瘤作用。

[0103] 可以与免疫原性构建体相关的免疫佐剂的实例包含TLR配体、C型凝集素受体配体、NOD样受体配体、RLR配体和RAGE配体。TLR配体可以包含脂多糖(LPS)及其衍生物以及脂质A及其衍生物,包含单磷酸基脂质A(MPL)、吡葡亚硝脲基(glycopyranosyl)脂质A、PET-脂质A和3-O-去酰基-4'-单磷酸基脂质A。在一个特定实施例中,免疫佐剂是MPL。在另一个实施例中,免疫佐剂是LPS。TLR配体还可以包含TLR3配体(例如,聚肌-聚胞苷酸(poly I:C)、

TLR7配体(例如,咪喹莫特和瑞喹莫特)和TLR9配体。

[0104] VI. 抗原和抗原产生剂

[0105] 本文所提供的免疫原性构建体包含至少一种抗原或抗原产生剂;示范性构建体包含至少一种抗原和至少一种抗原产生剂两者。在免疫原性构建体含有多于一种抗原和/或抗原产生剂的实施例中,这些抗原可以对应于/衍生自不同感染原,或者这些抗原可以对应于/衍生自相同感染原。当抗原能够引发针对对应因子的免疫应答——例如,当抗原(或抗原产生剂)是合成的、工程化的、重组的和/或在实验室中产生时或当抗原从自身感染原中分离或提取时,抗原或抗原产生剂可以被认为“属于”或“来自”感染原。

[0106] 抗原或抗原产生剂可以部分地或完全地包含在纳米颗粒内或通过非共价或共价相互作用(包含氢键结合、范德华相互作用(Van der Waals interaction)、静电相互作用、疏水相互作用和与纳米颗粒上的部分化学缀合)在其它方面与纳米颗粒、阳离子聚合物和/或稳定剂缔合。化学缀合包含硫醇-马来酰亚胺、NHS酯-胺、叠氮化物-炔烃和其它点击化学。在一些实施例中,抗原或抗原产生剂是硫醇化的,并且通过硫醇-马来酰亚胺反应与含有马来酰亚胺基团的稳定剂缀合(参见国际申请第PCT/US2016/022655号)。在一些实施例中,抗原或抗原产生剂通过与纳米颗粒的疏水相互作用装载在阳离子聚合物上。在一些实施例中,抗原或抗原产生剂静电地装载在阳离子聚合物上。抗原或抗原产生剂可以以NP的2wt.%、3wt.%、4wt.%、5wt.%、0.5-20wt.%存在,例如1-15wt.%、1.5-10wt.%、1-6wt.%或2-5wt.%。

[0107] 抗原是被身体识别为“外来”并且最后通过身体的免疫细胞引发抗原特异性免疫应答的任何物质。抗原通常被身体的抗原呈递细胞(例如,树突细胞)吞噬并且处理到表位中,所述表位通过主要组织相容性复合物呈递到T细胞和/或B细胞以诱导抗原特异性免疫。免疫应答可以是细胞和/或体液的。细胞免疫的增强通常由抗原特异性T细胞活性、增殖的增加表现,并且增强T细胞识别和消除抗原的能力。体液免疫的增强通常由抗原特异性B细胞活性和增殖的增加表现,所述抗原特异性B细胞产生能够识别和中和所关注的抗原的抗体。

[0108] 一种类别的抗原是重组全长蛋白或对应于与所关注的感染原(靶标)相关(或衍生自所述感染原)的特异性蛋白质的蛋白质亚基。例如,抗原可以是全长SARS-CoV-2刺突糖蛋白,所述刺突糖蛋白已经被鉴定为免疫原性的(格里芬尼(Grifoni)等人细胞宿主微生物(Cell Host Microbe.) 2020;27(4):671-80;欧(Ou)等人自然通讯(Nat Commun.) 2020,11(1):1620;沃尔斯(Walls)等人.细胞(Cell) 2020;181(2):281-92)。另外,抗原可以对应于SARS-CoV-2核衣壳蛋白、膜蛋白等。抗原还可以对应于蛋白质(即蛋白质亚基或蛋白质结构域)的特异性功能区。例如,抗原可以对应于SARS-CoV-2刺突糖蛋白的S1、S2或RBD区。

[0109] 抗原还可以是对应于(衍生自)所关注感染原(靶感染原)中的免疫原性序列的肽(或若干种肽)。肽充当可以引发各种免疫应答的表位。抗原可以是基于所预测的免疫原性选择的表位,如通过生物信息学方法和/或涉及其在免疫细胞刺激中的实验数据分析的。例如,肽可以表示在细胞免疫原性和体液免疫原性两者中预测的SARS-CoV-2刺突糖蛋白的位置494-508或1056-1070(法斯特(Fast)等人.bioRxiv.2020:2020.02.19.955484)。

[0110] 关于由若干种肽构成的抗原,抗原可以是涵盖整个(或几乎全部)蛋白质的重叠(或非重叠)肽的混合物,或者抗原可以是对应于单个蛋白质或两个或两个以上不同蛋白质

(其可以靶向一个或不同的靶感染性生物体)的免疫原性区的肽的混合物。例如,抗原可以是包含SARS-CoV-2刺突蛋白、核衣壳蛋白和膜蛋白的肽的混合物。表1中示出了基于生物信息学预测方法(如免疫表位数据库和分析资源(IEDB)和Discotope 2.0预测算法以及在表位应答方面最佳表征冠状病毒的与SARS-CoV-1的高序列相似性(例如,>90%、>80%、>70%、>60%或>50%))预测为免疫原性的SARS-CoV-2T细胞和/或B细胞表位的实例(格里芬尼等人细胞宿主微生物2020;27(4):671-80;法斯特等人bioRxiv.2020:2020.02.19.955484)。

[0111] 表1:

基因	序列	位置	SEQ ID NO
[0112] 刺突(S)	KLPDDFTGCV	424-433	1
	SQSIHAYTMSLGAEN	689-703	2
	IPTNFTISVTTEILP	714-728	3
	FGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIG	888-909	4
	APHGVVFLHVTYVPA	1056-1070	5
核衣壳(N)	ATKAYNVTQAFGRRG	267-281	6
膜(M)	IASFRLFARTRSMWS	97-111	7
包膜(E)	VKPSFYVYSRVKLN	52-66	8

[0113] 所预测的免疫原性表位的其它实例可以在整个文献(普利彻(Prachar)等人bioRxiv.2020:2020.03.20.000794;库尔(Chour)等人medRxiv.2020:2020.05.04.20085779)和SARS-CoV-2抗原供应商网站(例如,义翘神州生物公司(Sino Biological)、创新诊断公司(Creative Diagnostics)、Sengenics公司(Sengenics)、爱博泰克生物科技有限公司(ABclonal Technology))中找到。还可以广泛获得用于基于MHC结合能力鉴定免疫原性区的预测工具。

[0114] 在各个实施例中,抗原产生剂是编码对应于靶感染原或对靶感染原具有特异性的特异性蛋白质或肽的核酸,如mRNA或pDNA。一旦施用于受试者,mRNA或pDNA进入细胞的细胞质,在所述细胞质中表达(针对mRNA翻译或针对pDNA转录/翻译)到可以最终激活细胞和体液免疫应答的所期望的蛋白质中。抗原编码序列可以是对特异性蛋白质或蛋白质亚基进行编码的任何序列;例如,编码SARS-CoV-2刺突蛋白、刺突RBD结构域、刺突S1结构域等的mRNA或pDNA。为了增加效力、稳定性和蛋白质产率,mRNA或pDNA可以经受密码子优化、经修饰的核苷的使用、聚腺苷酸化等。例如,5'UTR和3'UTR的设计对mRNA稳定性、翻译、蛋白质产生和结构而言是至关重要的;存在基于所关注的mRNA优化5'UTR和3'UTR的设计的若干种在线工具。对于有效的抗原表达,mRNA将被合成以包括以下:5'帽-5'非翻译区(UTR)-抗原编码序列-3'非翻译区(UTR)-poly A尾。mRNA还可以是非修饰的、核苷修饰的或自我扩增的。例如,可以并入经修饰的尿苷或经修饰的胞苷以通过先天免疫分子避免过早识别并且改善翻译效率。

[0115] 合适的另外的靶抗原是本领域已知的(例如,帕蒂等人,免疫学前沿9:2224,2018(第16页)以及其中引用的参考),并且可从商业政府和科学来源获得。下文提供了另外的示范性抗原。

[0116] 示范性病毒抗原:病毒抗原可以从病毒中分离,包括但不限于来自以下病毒科中的任一种的病毒:腺病毒、沙粒病毒科(Arenaviridae)、动脉炎病毒属(Arterivirus)、星状病毒科(Astroviridae)、杆状病毒科(Baculoviridae)、杆状病毒(Badnavirus)、杆菌状核

糖核酸病毒科 (Barnaviridae)、双核糖核酸病毒科 (Birnaviridae)、雀麦花叶病毒科 (Bromoviridae)、布尼亚病毒科 (Bunyaviridae)、杯状病毒科 (Caliciviridae)、线形病毒属 (Capillovirus)、香石竹潜病毒组 (Carlavirus)、花椰菜花叶病毒组 (Caulimovirus)、圆环病毒科 (Circoviridae)、线性病毒组 (Closterovirus)、豇豆镶嵌病毒科 (Comoviridae)、冠状病毒科 (Coronaviridae) (例如,冠状病毒,如严重急性呼吸道综合征 (SARS) 病毒,包含 COVID-19)、被脂病毒科 (Corticoviridae)、囊状噬菌科 (Cystoviridae)、德尔塔病毒 (Deltavirus)、香石竹病毒组 (Dianthovirus)、碗豆耳突花叶病毒组 (Enamovirus)、丝状病毒科 (Filoviridae) (例如,马尔堡病毒 (Marburg virus) 和埃博拉病毒 (Ebola virus) (例如,扎伊尔 (Zaire)、雷斯顿 (Reston)、象牙海岸 (Ivory Coast) 或苏丹 (Sudan) 菌株))、黄病毒科 (Flaviviridae) (例如,丙型肝炎病毒 (Hepatitis C virus)、登革热病毒1 (Dengue virus 1)、登革热病毒2、登革热病毒3和登革热病毒4)、汉坦病毒科 (Hantaviridae) (例如,汉坦病毒 (hantavirus))、嗜肝DNA病毒科 (Hepadnaviridae)、疱疹病毒科 (Herpesviridae) (例如,人疱疹病毒1、3、4、5和6以及巨细胞病毒)、减毒病毒科 (Hypoviridae)、虹彩病毒科 (Iridoviridae)、光滑噬菌体科 (Leviviridae)、脂毛噬菌体科 (Lipothrixviridae)、微小噬菌体科 (Microviridae)、正粘病毒科 (Orthomyxoviridae) (例如,甲型流感病毒和乙型流感病毒以及丙型流感病毒)、人乳头瘤病毒科 (Papillomaviridae) (包含人乳头瘤病毒 (HPV) 和动物乳头瘤病毒两者)、乳多空病毒科 (Papovaviridae)、副粘病毒科 (Paramyxoviridae) (例如,麻疹、流行性腮腺炎和人呼吸道合胞体病毒)、细小病毒科 (Parvoviridae)、小核糖核酸病毒科 (Picornaviridae) (例如,脊髓灰质炎病毒、鼻病毒、肝病毒和口蹄疫病毒)、痘病毒科 (Poxviridae) (例如,牛痘和天花病毒)、呼肠孤病毒科 (Reoviridae) (例如,轮状病毒)、逆转录病毒科 (Retroviridae) (例如,慢病毒,如人类免疫缺陷病毒 (HIV) 1和HIV 2)、弹状病毒科 (Rhabdoviridae) (例如,狂犬病病毒、麻疹病毒、呼吸道合胞体病毒等)、轮状病毒科 (Rotaviridae) (例如,轮状病毒A-J)、披膜病毒科 (Togaviridae) (例如,风疹病毒、登革热病毒等)、海绵状病毒 (Spongiform virus) 和单分体病毒科 (Totiviridae)。合适的病毒抗原还包含登革热蛋白M和蛋白E、登革热D1NS1、登革热D1NS2和登革热D1NS3中的全部或部分。

[0117] 病毒抗原可以衍生自特定菌株,如乳头瘤病毒、疱疹病毒,例如单纯性疱疹1和2;肝炎病毒,例如甲型肝炎病毒 (HAV)、乙型肝炎病毒 (HBV)、丙型肝炎病毒 (HCV)、丁型肝炎病毒 (HDV)、戊型肝炎病毒 (HEV) 和庚型肝炎病毒 (HGV)、蜱传脑炎病毒;副流感病毒、水痘带状疱疹 (varicella-zoster)、巨细胞病毒、埃-巴二氏病毒 (Epstein-Barr)、轮状病毒、鼻病毒、腺病毒、柯萨奇病毒 (coxsackievirus)、马脑炎、日本脑炎、黄热病、裂谷热 (Rift Valley fever) 和淋巴细胞性脉络丛脑膜炎。在另外的实施例中,病毒抗原标志物包含由CMV、感冒病毒、埃-巴二氏病毒、流感病毒、甲型肝炎病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、单纯性疱疹、HIV、流感、日本脑炎、麻疹、脊髓灰质炎、狂犬病、呼吸道合胞体、风疹、天花、水痘带状疱疹或西尼罗河病毒 (West Nile virus) 表达的肽。

[0118] 如特定实例中进一步所述的,巨细胞病毒抗原包含包膜糖蛋白B和CMV pp65;埃-巴二氏病毒抗原包含EBV EBNA1、EBV P18和EBV P23;肝炎抗原包含HBV的S、M和L蛋白、HBV的前S抗原、HBCAG DELTA、HBV HBE、丙型肝炎病毒RNA、HCV NS3和HCV NS4;单纯性疱疹病毒抗原包含即刻早期蛋白和糖蛋白D;HIV抗原包含gag、pol和env基因的基因产物,如HIV

gp32、HIV gp41、HIV gp120、HIV gp160、HIV P17/24、HIV P24、HIV P55 GAG、HIV P66 POL、HIV TAT、HIV GP36、Nef蛋白和逆转录酶；流感抗原包含血细胞凝集素和神经氨酸苷酶；日本脑炎病毒抗原包含蛋白E、M-E、M-E-NS1、NS1、NS1-NS2A和80% E；麻疹抗原包含麻疹病毒融合蛋白；狂犬病抗原包含狂犬病糖蛋白和狂犬病核蛋白；呼吸道合胞体病毒抗原包含RSV融合蛋白和M2蛋白；轮状病毒抗原包含VP7sc；风疹抗原包含蛋白E1和E2；并且水痘带状疱疹病毒抗原包含gpI和gpII。另外的特定示范性病毒抗原序列包含：Nef (66-97)；Nef (116-145)；Gag p17 (17-35)；Gag p17-p24 (253-284)；以及Pol 325-355 (RT 158-188)。对于病毒抗原的另外的实例，参见基础病毒学 (Fundamental Virology)，第二版，编辑·菲尔茨 (Fields)，B.N.和奈普 (Knipe)，D.M. (纽约的瑞文出版社 (Raven Press, New York)，1991)。

[0119] 示范性细菌抗原：细菌抗原可以源自任何细菌，包含放线菌属 (Actinomyces)、鱼腥藻属 (Anabaena)、芽孢杆菌属 (Bacillus)、拟杆菌属 (Bacteroides)、蛭弧菌属 (Bdellovibrio)、博代氏杆菌属 (Bordetella)、疏螺旋体属 (Borrelia)、弯曲菌属 (Campylobacter)、柄杆菌属 (Caulobacter)、衣原体属 (Chlamydia)、绿菌属 (Chlorobium)、着色菌属 (Chromatium)、梭菌属 (Clostridium)、棒状杆菌属 (Corynebacterium)、噬胞菌属 (Cytophaga)、异常球菌属 (Deinococcus)、埃希氏杆菌属 (Escherichia)、弗朗西斯氏菌属 (Francisella)、盐杆菌属 (Halobacterium)、螺杆菌属 (Heliobacter)、嗜血杆菌属 (Haemophilus)、B型流感嗜血杆菌 (HIB)、生丝微菌属 (Hyphomicrobium)、军团菌属 (Legionella)、钩端螺旋体病 (Leptospirosis)、李斯特菌属 (Listeria)、脑膜炎球菌A、B和C (Meningococcus A, B and C)、甲烷杆菌属 (Methanobacterium)、微球菌属 (Micrococcus)、分枝杆菌属 (Mycobacterium)、支原菌 (Mycoplasma)、粘球菌属 (Myxococcus)、奈瑟氏菌属 (Neisseria)、硝化杆菌属 (Nitrobacter)、颤蓝细菌属 (Oscillatoria)、原绿藻 (Prochloron)、变形杆菌属 (Proteus)、假单胞菌属 (Pseudomonas)、红螺菌属 (Rhodospirillum)、立克次氏体 (Rickettsia)、沙门氏菌属 (Salmonella)、志贺氏菌属 (Shigella)、螺菌属 (Spirillum)、螺旋体属 (Spirochaeta)、葡萄球菌属 (Staphylococcus)、链球菌属 (Streptococcus)、链霉菌属 (Streptomyces)、硫化叶菌属 (Sulfolobus)、热原体属 (Thermoplasma)、硫杆菌属 (Thiobacillus) 和密螺旋体属 (Treponema)、弧菌属 (Vibrio) 以及耶尔森氏菌属 (Yersinia)。靶向抗原的细菌可以衍生自例如炭疽、革兰氏阴性杆菌、衣原体属、白喉、幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*)、结核分支杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*)、百日咳毒素、肺炎球菌属 (pneumococcus)、立克次体 (rickettsiae)、葡萄球菌属、链球菌属和破伤风。

[0120] 针对主题免疫原性构建体和方法可以使用的细菌感染可以包含革兰氏阴性细菌和革兰氏阳性细菌两者。革兰氏阳性细菌的实例包含巴氏杆菌 (*Pasteurella* spp.)、葡萄球菌 (*Staphylococci* spp.) 和链球菌 (*Streptococci* spp.)。革兰氏阴性细菌的实例包含大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、假单胞菌 (*Pseudomonas* spp.) 和沙门氏菌 (*Salmonella* spp.)。

[0121] 感染性细菌的具体实例包含衣氏放线菌 (*Actinomyces israelii*)、炭疽杆菌 (*Bacillus anthracis*)、拟杆菌 (*Bacteroides* spp.)、伯氏疏螺旋体 (*Borrelia burgdorferi*)、致病性弯曲杆菌 (pathogenic *Campylobacter* spp.)、产气荚膜梭菌 (*Clostridium perfringens*)、破伤风梭菌 (*Clostridium tetani*)、白喉杆菌

(*Corynebacterium diphtheriae*)、棒状杆菌(*Corynebacterium* spp.)、肠球菌(*Enterococcus* spp.)、产气肠杆菌(*Enterobacter aerogenes*)、猪红斑丹毒丝菌(*Erysipelothrix rhusiopathiae*)、大肠杆菌、具核梭杆菌(*Fusobacterium nucleatum*)、流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*)、幽门螺杆菌、肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)、嗜肺军团菌(*Legionella pneumophila*)、钩端螺旋体属(*Leptospira*)、单核细胞增多性李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*)、分枝杆菌(*Mycobacteria* spp.) (例如, 结核分枝杆菌(*M. tuberculosis*)、鸟型结核分枝杆菌(*M. avium*)、胞内分枝杆菌(*M. intracellulare*)、堪萨斯分枝杆菌(*M. kansasii*)、戈登分枝杆菌(*M. goodii*))、淋病奈瑟氏菌(*Neisseria gonorrhoeae*)、脑膜炎奈瑟氏菌(*Neisseria meningitidis*)、多杀巴斯德菌(*Pasteurella multocida*)、立克次氏体、弗氏志贺菌(*Shigella flexneri*)、痢疾志贺菌(*Shigella dysenteriae*)、金黄色酿脓葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、酿脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*) (A群链球菌)、无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*) (B群链球菌)、链球菌属(草绿色组)、粪链球菌(*Streptococcus faecalis*)、牛链球菌(*Streptococcus bovis*)、链球菌属(厌氧属)、肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)、念珠状链杆菌(*Streptobacillus moniliformis*)、梅毒螺旋体(*Treponema pallidum*)和雅司螺旋体(*Treponema pertense*)、霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)。

[0122] 如细菌抗原的特定实例中所述的, 炭疽抗原包含炭疽保护性抗原; 革兰氏阴性杆菌包含脂多糖; 白喉抗原包含白喉毒素; 结核分枝杆菌抗原包含霉菌酸、热休克蛋白65 (HSP65)、30kDa主要分泌蛋白和抗原85A; 百日咳毒素抗原包含血细胞凝集素、百日咳杆菌粘附素、FIM2、FIM3和腺苷酸环化酶; 肺炎球菌抗原包含肺炎球菌溶血素和肺炎球菌荚膜多糖; 立克次体抗原包含rmpA; 链球菌抗原包含M蛋白; 并且破伤风抗原包含破伤风毒素。

[0123] 示范性寄生虫抗原: 寄生虫抗原可以从任何寄生虫获得, 如从田鼠巴贝虫(*Babesia microti*)、分岐巴贝虫(*Babesia divergens*)、白色念珠菌(*Candida albicans*)、热带念珠菌(*Candida tropicalis*)、鹦鹉热衣原体(*Chlamydia psittaci*)、沙眼衣原体(*Chlamydia trachomatis*)、新型隐球菌(*Cryptococcus neoformans*)、痢疾变形虫(*Entamoeba histolytica*)、兰伯氏贾第虫(*Giardia lamblia*)、组织胞浆菌(*Histoplasma capsulatum*)、热带利什曼虫(*Leishmania tropica*)、利什曼原虫(*Leishmania* spp.)、巴西利什曼虫(*Leishmania braziliensis*)、杜氏利什曼虫(*Leishmania donovani*)、肺炎支原体(*Mycoplasma pneumoniae*)、星形诺卡菌(*Nocardia asteroides*)、镰状疟原虫(*Plasmodium falciparum*)、三日疟原虫(*Plasmodium malariae*)、卵形疟原虫(*Plasmodium ovale*)、间日疟原虫(*Plasmodium vivax*)、立氏立克次体(*Rickettsia rickettsii*)、斑疹伤寒立克次氏体(*Rickettsia typhi*)、曼氏裂体吸虫(*Schistosoma mansoni*)、刚地弓形虫(*Toxoplasma gondii*)、阴道毛滴虫(*Trichomonas vaginalis*)、布氏锥虫(*Trypanosoma brucei*)、克氏锥虫(*Trypanosoma cruzi*)、冈比亚锥虫(*Trypanosoma gambiense*)、罗得西亚锥虫(*Trypanosoma rhodesiense*) (非洲昏睡病)、克氏锥虫(恰克氏病(*Chagas' disease*))、癣(癣菌病)、扁形虫和线虫获得的抗原。寄生虫可以是引起疾病的肠虫生物体或蠕虫或生物体, 所述疾病包含但不限于钩虫病(*Ancylostomiasis*)/钩虫病(*Hookworm*)、异尖线虫病(*Anisakiasis*)、线虫-寄生虫肺炎、线虫-贝蛔虫病(*Baylisascariasis*)、绦虫-绦虫感染、支睾吸虫病(*Clonorchiasis*)、巨大肾脏虫感染(*Dioctophyme renalis*)

infection)、裂头绦虫病(Diphyllobothriasis)-绦虫、麦地那龙线虫-麦地那龙线虫病(Dracunculiasis)、包虫病(Echinococcosis)-绦虫、蛲虫-蛲虫病(Enterobiasis)、肝吸虫-肝片吸虫病(Fasciolosis)、姜片虫病(Fasciolopsiasis)-肠吸虫、颚口线虫病(Gnathostomiasis)、膜壳绦虫病(Hymenolepiasis)、罗阿丝虫病(Loa loa filariasis)、卡拉巴丝虫性肿块(Calabar swellings)、曼氏丝虫病(Mansonelliiasis)、丝虫病(Filariasis)、后殖吸虫病(Metagonimiasis)-肠吸虫、河盲症(River blindness)、中华肝吸虫(Chinese Liver Fluke)、肺吸虫病(Paragonimiasis)、肺吸虫、血吸虫病(Schistosomiasis)-血吸虫、裂体吸虫病(bilharziosis)或血吸虫病(snail fever)(所有类型)、肠血吸虫病(intestinal schistosomiasis)、尿路血吸虫病(urinary schistosomiasis)、由日本血吸虫(*Schistosoma japonicum*)引起的血吸虫病(Schistosomiasis)、亚洲肠血吸虫病(Asian intestinal schistosomiasis)、裂头蚴病(Sparganosis, Strongyloidiasis)-寄生虫肺炎、牛肉绦虫、猪肉绦虫、弓蛔虫病(Toxocariasis)、旋毛虫病(Trichinosis)、泳痒(Swimmer's itch)、鞭虫和象皮病(Elephantiasis Lymphatic filariasis)。寄生虫可以是引起疾病的一或多种生物体,所述疾病包含肠内寄生虫、哈佐综合征(Halzoun Syndrome)、蝇蛆病(Myiasis)、沙蚤(Chigoe flea)、人肤蝇(Human Botfly)和寄生鲶(Candiru)。寄生虫可以是引起疾病的体表寄生虫或生物体,所述疾病包含臭虫(Bedbug)、头虱-虱病(Pediculosis)、体虱-虱病、阴虱-虱病、蠕形螨-蠕形螨病、疥疮(Scabies)、旋丽蝇幼虫(Screwworm)和锥蝇属(Cochliomyia)。

[0124] 抗原包含孢子虫抗原、疟原虫抗原,如环子孢子蛋白、孢子体表面蛋白、肝期抗原、顶端膜相关蛋白或裂殖子表面蛋白中的全部或部分。组织胞浆菌属抗原(histoplasma antigen)包含热休克蛋白60(HSP60);利什曼原虫属抗原(leishmania antigen)包含gp63和脂磷聚糖;镰状疟原虫抗原包含裂殖子表面抗原、孢子体表面抗原、环子孢子抗原、配子体/配子表面抗原、原生动物和其它寄生虫抗原,包含血期抗原pf 155/RESA;血吸虫抗原包含谷胱甘肽-S-转移酶和副肌球蛋白;弓形虫抗原包含SAG-1和p30;并且克氏锥虫抗原包含75-77kDa抗原和56kDa抗原;癣抗原包含发癣菌素。

[0125] 示范性真菌抗原:真菌病原体的实例包含曲霉(*Aspergillus* spp.)、皮炎芽生菌(*Blastomyces dermatitidis*)、粗球孢子菌(*Coccidioides immitis*)、新型隐球菌、白色念珠菌和其它念珠菌(*Candida* spp.)、沙眼衣原体、组织胞浆菌、沙眼衣原体、诺卡氏菌(*Nocardia* spp.)和卡氏肺孢子虫(*Pneumocystis carinii*)。靶向抗原的真菌可以衍生自例如念珠菌属(*candida*)、球孢子菌属(*coccidioides*)、隐球菌属(*cryptococcus*)和组织胞浆菌属。如真菌抗原的特定实例中所述的,球孢子菌属抗原包含小球抗原;并且隐球菌抗原包含荚膜多糖。

[0126] 如上文所述,来自细菌、病毒、真菌和寄生虫的抗原可以调配到本公开的疫苗中并且根据本公开的方法施用。抗原的非限制性实例包含来自感染如以下动物的感染原的抗原:

[0127] 猪:猪红斑丹毒丝菌、胸膜肺炎放线杆菌(*Actinobacillus pleuropneumoniae*)、猪肺炎支原体(*Mycoplasma hyopneumoniae*)、大肠杆菌K88、K99、F41和987P、c型产气荚膜梭菌、猪霍乱沙门氏菌(*Salmonella choleraesuls*)、多杀巴斯德菌、支气管炎博德特菌(*Bordetella bronchiseptica*)、伯拉第斯拉瓦钩端螺旋体(*Leptospira bratislava*)、犬

钩端螺旋体 (*Leptospira canicola*)、感冒伤寒型钩端螺旋体 (*Leptospira grippotyphosa*)、哈德焦钩端螺旋体 (*Leptospira hardjo*)、波莫纳钩端螺旋体 (*Leptospira promona*)、黄疸钩端螺旋体 (*Leptospira ictero*)、猪流感病毒 (*Porcine Influenza virus*)、环状病毒、猪繁殖和呼吸道综合征病毒 (PRRSV)、猪痘、轮状病毒、猪呼吸道冠状病毒、细小病毒、假狂犬病、传染性胃肠炎病原体。

[0128] 马：马链球菌、破伤风梭菌、马流感病毒A1和A2菌株、马鼻肺炎1、1b和4型、东方马脑脊髓炎、西方马脑脊髓炎、委内瑞拉马脑脊髓炎、马轮状病毒、马疱疹病毒、马传染性贫血病毒、西尼罗河病毒、白色念珠菌、曲霉属 (*Aspergillus*)、粗球孢子菌、新型隐球菌、马皮疽组织胞浆菌 (*Histoplasma farciminosum*)。

[0129] 牛：大肠杆菌0157:H7、多杀巴斯德菌、溶血性巴斯德氏菌 (*Pasteurella haemolytica*)、犬钩端螺旋体、感冒伤寒型钩端螺旋体、哈德焦钩端螺旋体、波莫纳钩端螺旋体、黄疸钩端螺旋体、C型产气荚膜梭菌、D型产气荚膜梭菌、气肿疽梭菌 (*Clostridium chauvoei*)、诺维氏梭菌 (*Clostridium novyi*)、腐败梭菌 (*Clostridium septicum*)、破伤风梭菌 (*Clostridium tetanus*)、溶血梭状芽孢杆菌 (*Clostridium haemolyticum*)、索氏梭菌 (*Clostridium sordellii*)、都柏林沙门菌 (*Salmonella dublin*) 和鼠伤寒、牛轮状病毒、牛冠状病毒、牛鼻气管炎、牛腹泻病毒、副流感病毒-3、呼吸道合胞体病毒、疣状癣菌 (*Trichophyton verrucosum*)。

[0130] 家禽：鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*)、厌氧性肠道螺旋体 (*Serpulina pilosicoli*)、马立克氏病病毒 (Marek's disease virus)、传染性法氏囊病、传染性支气管炎、新城鸡瘟病毒 (Newcastle disease virus)、Reo病毒、火鸡鼻气管炎、球虫病。

[0131] 狗：犬钩端螺旋体、感冒伤寒型钩端螺旋体、哈德焦钩端螺旋体、波莫纳钩端螺旋体、黄疸钩端螺旋体、犬伯氏疏螺旋体、犬埃立克氏菌 (*Canine Ehrlichia canis*)、犬气管炎博德特菌、犬兰伯氏贾第虫、犬瘟热、犬腺病毒、犬冠状病毒、犬副流感病毒、犬细小病毒、犬狂犬病、跳蚤、贾第虫属 (*Giardia*)、肺线虫、犬钩虫、狭头刺口钩虫、犬小孢子菌。

[0132] 猫：猫科动物感染性腹膜炎病毒、猫科动物鼻气管炎、猫科动物泛白细胞减少症、猫科动物杯状病毒、猫科动物冠状病毒、猫科动物 α 疱疹病毒1、猫科动物免疫缺陷病毒、猫科动物白血病病毒、狂犬病狂犬病毒。博代氏杆菌属、芽孢杆菌属、巴尔通氏体属 (*Bartonella*)、伯克氏菌属 (*Burkholderia*)、衣原体属、梭菌属、棒状杆菌属、沙门氏菌属、变形杆菌属、埃希氏杆菌属、变形杆菌属、莫拉克斯氏菌属 (*Moraxella*)、诺卡氏菌属 (*Nocardia*)、巴氏杆菌属 (*Pasteurella*)、嗜血杆菌属、巴氏杆菌属、假单胞菌属、葡萄球菌属、链球菌属、犬小孢子菌、石膏样奈尼兹皮真菌 (*Nannizzia gyps*)、萱草奈尼兹皮真菌 (*Nannizzia fulva*)、科利奈尼兹皮真菌 (*Nannizzia nana*)、须毛癣菌 (*Trichophyton mentagrophytes*)、疣状癣菌、犬钩虫、隐孢子虫 (*Cryptosporidium*)、犬恶丝虫 (*Dirofilaria immitis*)、跳蚤、贾第虫属、等孢子球虫 (*Isospora sp.*)、肺线虫、三尖瓣环 (*Ollanulus tricuspis*)、粗毛泡翼线虫 (*Physaloptera hispida*)、人疥螨 (*Sarcoptes scabiei*)、绦虫、狮蛔虫 (*Toxascaris leonina*)、猫弓蛔线虫 (*Toxocara cati*)、刚地弓形虫、狭头刺口钩虫 (*Uncinaria stenocephala*) 和鞭虫。

[0133] VII. 寡核苷酸

[0134] 在一些实施例中,免疫原性构建体包含一种或多种寡核苷酸,例如siRNA、miRNA、miRNA模拟物或反义寡核苷酸。寡核苷酸抗原通过任何方式附着。在一些实施例中,带负电荷的siRNA可以使用静电相互作用附着到纳米颗粒(例如,MSNP)上的带正电荷的阳离子聚合物。寡核苷酸可以靶向在细胞中表达的一或多个基因,例如抑制或下调与抗原呈递细胞(例如,树突细胞)的免疫抑制相关的基因,如STAT3、PD-L1、IDO-1和IL-6。在一些实施例中,单个寡核苷酸可以以不同效力靶向多个基因。在其它实施例中,多个寡核苷酸可以靶向单个基因。在另外的实施例中,多个寡核苷酸可以靶向多个基因。

[0135] 寡核苷酸可以以NP的约1重量%至10重量%存在,例如约2重量%至约6重量%。在一些实施例中,例如,在结合过程期间,每种siRNA的NP(NP/siRNA)以范围介于约10:1至约100:1之间的重量比使用,从而实现完全结合。每种NP的siRNA可以实现至多40wt.%的完全结合。

[0136] 典型地,寡核苷酸抑制或下调基因,所述基因的上调与抗原呈递细胞(例如,树突细胞)的免疫抑制的一些方面相关。本领域普通技术人员将理解如何访问这些靶标的代表性序列,所述代表性序列可在公共序列数据库中容易获得。在一些实施例中,寡核苷酸是siRNA,如STAT3、PD-L1、IDO-1、IL-6等。表2中示出了示范性siRNA。

[0137] 表2

名称	代表性基因库登录号	siRNA 序列 SEQ ID NO:
信号转导物和转录激活剂 3 (STAT3)	NM_003150.3; NM_139276.2; NM_213662.1; XM_005257616.3; XM_005257617.3; XM_011525145.2; XM_011525146.2; XM_017024972.1; XM_017024973.1; XM_017024974.1; XM_017024975.1; XM_017024976.1	9 和 10
程序性死亡配体 1 (PD-L1)	NM_001267706.1; NM_001314029.2; NM_014143.4; NR_052005.2	11-14
程序性死亡配体 2 (PD-L2)	NM_025239.4; XM_005251600.3; XP_005251657.1	15-18
[0138] 吡啶胺 2,3-双加氧酶 1 (IDO-1)	NM_002164.6; NG_028155.1	19-22
细胞因子信号传导 1 的抑制物(SOCS-1)	NM_003745.1; DQ086801.1; U88326.1; NP_003736.1	23-29
转化生长因子 β 1 (TGF- β)	NM_000660.7; XM_011527242.2;	30 和 31
TGF β 受体 1 (TGFB1)	NM_004612.4; NM_001130916.3; NM_001306210.2; XM_011518948.2; XP_011517250.1; XM_011518949.2; XP_011517251.1	32-36
TGF β 受体 2 (TGFB2)	NM_003242.6; NM_001024847.2; XM_011534043.2; XP_011532345.1; XM_011534045.3; XP_011532347.1; XM_017007106.1; XP_016862595.1	37-40

名称	代表性基因库登录号	siRNA 序列 SEQ ID NO:
白介素-10 (IL-10)	NG_012088.1; NM_000572.3; NM_001382624.1; NR_168466.1; NR_168467.1	41-45
白介素 10 受体亚基 α (IL-10RA)	NM_001558.4; NR_026691.2; XM_024448493.1; XP_024304261.1	46 和 47
精氨酸酶-1 (ARG-1)	NG_007086.2; NM_000045.4; NM_001244438.2; NM_001369020.1; NR_160934.1	48-51
半乳凝素-1 (LGALS1)	NM_002305.4; NP_002296.1	52-54
半乳凝素-3 (LGALS3)	NG_017089.1; NM_001357678.2; NP_001344607.1; NM_002306.4; NP_002297.2; NR_003225.2	55-51
白介素-6 (IL-6)	NG_011640.1; NM_000600.5; NM_001318095.2; NP_001305024.1; NM_001371096.1; NP_001358025.1	62-66
含有 T 细胞激活抑制 剂的 V 集合结构域 (VTCN-1)	NM_024626.4; NP_078902.2; NM_001253849.1; NP_001240778.1; NM_001253850.1; NP_001240779.1	67 和 68
诱导性一氧化氮合酶 (iNOS 或 NOS2)	NG_011470.1; NM_000625.4; NP_000616.3	69-75
臂板蛋白-4A (SEMA4A)	NM_022367.4; NM_001193300.2; NM_001193301.1; NM_001193302.1; NP_001180231.1; NM_001370567.1	
Bcl-2 同源拮抗剂杀 手(BAK1)	NM_001188.4; NP_001179.1; XM_011514779.3; XP_011513081.1; XM_011514780.1; XP_011513082.1	76-78
Bcl-2 相关 X 蛋白 (BAX)	NM_138761.4; NP_620116.1; NM_004324.4; NP_004315.1; NM_138763.4; NP_620118.1; NM_138764.5; NP_620119.2; NM_001291428.2; NP_001278357.1	79-81
Bcl-2 样蛋白 11 (BIM 或 BCL2L11)	NM_138621.5; NP_619527.1; NM_006538.5; NP_006529.1; NM_138622.3; NP_619528.1; NM_138623.3; NP_619529.1; NM_138624.3; NP_619530.1	82-85、91
(磷酸酶和张力蛋白 同源物) PTEN	NM_000314.8; NP_000305.3; NM_001304717.5; NP_001291646.4; NM_001304718.2; NP_001291647.1	86-89

[0140] VIII. 靶向剂

[0141] 在一些实施例中,免疫原性构建体可以进一步包含靶向剂以例如将免疫原性构建体特异性递送到靶位点。靶向剂可以用于靶向位点以及任选地帮助或诱导到细胞中的内化。

[0142] 示范性靶向剂包含单克隆抗体、单链可变片段 (scFv) 抗体、抗体的其它抗原结合片段、适体、小靶向分子 (例如,与细胞表面受体,如N-乙酰半乳糖胺、甘露糖、转铁蛋白和叶酸结合的配体)、适体、碳水化合物以及与细胞或组织,例如免疫细胞,如抗原呈递细胞 (例如,树突细胞或巨噬细胞) 具有结合亲和力的肽。

[0143] 在一些实施例中,靶向剂靶向免疫细胞,如抗原呈递细胞 (例如,树突细胞或巨噬细胞)。靶向剂包含识别在免疫细胞的表面上展示的表位或与所述表位结合的单克隆或多克隆抗体或其片段和与免疫细胞上的细胞表面受体结合的配体。一种此类受体,即凝集素 DEC-205,已经被用于体外和小鼠体内,以将体液 (基于抗体) 和细胞 (CD8 T细胞) 应答两者

增强2-4个数量级(哈维格(Hawiger)等人,实验医学杂志(J.Exp.Med.),194(6):769-79,2001;博尼法兹(Bonifaz)等人,实验医学杂志,196(12):1627-38 2002;博尼法兹等人,实验医学杂志,199(6):815-24,2004)。在这些报告中,抗原与抗DEC205重链融合,并且使用重组抗体分子进行免疫。

[0144] 包含甘露糖特异性凝集素(甘露糖受体)和IgG Fc受体的多种其它内吞受体也已经以此方式靶向,其中抗原呈递效率类似地增强。可以靶向的其它合适的受体和表面蛋白包含DC-SIGN、33D1、SIGLEC-H、DCIR、CD11c、CD40、DEC-205、热休克蛋白受体和清道夫受体。这些受体的靶向部分可以附着于免疫原性构建体,以便其优先吸收到表达这些受体的免疫细胞中。实例是甘露糖附着于免疫原性构建体,以靶向递送到具有高水平甘露糖受体的巨噬细胞和DC。

[0145] 可能被靶向的其它受体包含toll样受体(TLR)。TLR识别并结合病原体相关分子模式(PAMP)。PAMP靶向树突细胞表面上的TLR并在内部发出信号,由此潜在地增加DC抗原摄取、成熟和T细胞刺激能力。与颗粒表面缀合或共包封的PAMP包含未甲基化的CpG DNA(细菌)、双链RNA(病毒)、脂多糖(细菌)、肽聚糖(细菌)、脂阿拉伯甘露聚糖(细菌)、酵母聚糖(酵母)、支原体脂蛋白,如MALP-2(细菌)、鞭毛蛋白(细菌)、聚(肌苷-胞苷)酸(细菌)、脂磷壁酸(细菌)或咪唑并喹啉(合成的)。

[0146] 靶向剂可以通过任何方式附着于免疫原性构建体,并且合适的缀合化学是本领域已知的并且在本文中进行描述。在一些实施例中,靶向剂是硫醇化的,并且随后通过硫醇-马来酰亚胺反应与Mal-PEG-PEI-MSNP缀合。在一些实施例中,靶向剂在通过NHS酯和胺的反应与NP缀合之前附着于PEG稳定剂。靶向剂可以以NP的0.1至10wt.%存在,例如0.1至1wt.%或1至5wt.%,例如,对于抗体,1至10wt.%,或对于scFV,0.1至2wt.%,例如约1、2、3、4、5、6、7、8或9wt.%。

[0147] IX. 标记剂

[0148] 在一些实施例中,免疫原性构建体可以用例如镧系元素、荧光染料、量子点、放射性示踪剂或金纳米颗粒进行标记。标记可以是能够帮助机器、检测器、传感器、装置、柱的任何物质,或增强或未增强人眼区分标记的组合物与未标记的组合物。标记的实例包含放射性同位素(例如,PET示踪剂)、染料、染色剂、量子点、金纳米颗粒、酶、非放射性金属(例如,MRI造影剂)、磁体、生物素、蛋白质标签、任何抗体表位或其任何组合。示范性荧光染料包含FITC、RITC、CyTM染料、胺反应性Dylight®染料和胺反应性Alexa Fluor®染料。在一些实施例中,镧系元素可以通过共价键合或吸附装载到纳米颗粒(例如,MSNP)的羟基、硫醇、胺或磷酸酯基团上。镧系元素可以例如通过质谱法以高灵敏度和分辨率进行样品检测,同时荧光染料允许通过荧光成像技术进行样品定量。含有镧系元素,如钆的免疫原性构建体还可以充当MRI造影剂以对疾病部位进行成像。

[0149] 在一些实施例中,标记(如荧光染料)通过例如一或多个纳米颗粒结合的胺与附加到荧光染料的经激活的酯部分(如NHS酯)之间的亲核酰基取代装载在纳米颗粒(例如,胺-MSNP)的孔内。此类标记产生可以使用荧光成像技术跟踪的免疫原性构建体。此类标记可以在装载阳离子聚合物和/或稳定剂之前或之后添加(也就是说,标记可以应用于纳米颗粒或NP)。在另外的实施例中,标记可以在其附着于纳米颗粒之前通过任何适当的方式附着于NP的阳离子聚合物、稳定剂或其它组分(例如,寡核苷酸)。

[0150] X. 免疫原性构建体合成

[0151] 组分可以通过任何方式(包含共价和静电结合)与NP或免疫原性构建体的纳米颗粒或其它组分结合。各种缀合化学是本领域已知的并且在本文中描述。在一些实施例中,所述组分中的一或多种组分与纳米颗粒或NP的表面结合。在其它实施例中,所述组分中的一或多种组分结合在纳米颗粒(例如,MSNP)的孔内。在另外的实施例中,所述组分中的一或多种组分彼此结合。在一些实施例中,佐剂和/或抗原或抗原产生剂与稳定剂共价结合。稳定剂可以与阳离子聚合物(例如,通过胺)共价结合,所述阳离子聚合物可以进而与纳米颗粒的外部静电地结合。在一些实施例中,佐剂和/或抗原或抗原产生剂通过化学缀合、静电相互作用、疏水相互作用、氢键结合或范德华相互作用与阳离子聚合物结合。例如,抗原或抗原产生剂可以与稳定剂共价结合,同时佐剂与阳离子聚合物静电地或疏水地结合。

[0152] 在纳米颗粒具有孔的一些实施例中,孔具有在纳米颗粒(例如,MSNP)的外表面上的第一位置处的第一开口和在纳米颗粒的外表面上的第二位置处的第二不同的开口。组分可以沿孔的内部的长度在任何地方结合,即使孔的大小和组分的大小将影响结合。

[0153] 虽然纳米颗粒(如MSNP)可以在商业上获取或通过任何方法产生,在一些实施例中,MSNP通过以下产生:将第一表面活性剂与第二不同的表面活性剂组合以形成第一混合物;加热第一混合物并将二氧化硅前体添加到第一混合物以形成第二混合物;保持温度持续一定时间段以产生MSNP;以及通过离心回收MSNP。表面活性剂可以通过在回流条件下在酸性溶剂中混合MSNP来去除。在一些实施例中,第一混合物可以在添加二氧化硅前体之前加热。在其它实施例中,第一混合物可以在室温下,并且第二混合物可以被加热。所产生的MSNP可以具有均匀或不均匀的粒径以及高孔隙率。

[0154] 例如,为了形成均匀的MSNP,十六烷基三甲基氯化铵(CTAC)可以与三乙醇胺(TEA)在水中组合,并且加热到95°C,同时添加正硅酸四乙酯。在保持CTAC的量恒定的同时TEA的量的变化可以用于改变所产生的MSNP的大小。在一些实施例中,TEA的量介于约100至约600 μL之间、介于约200至约450 μL之间或介于约200至约350 μL之间。在一些实施例中,TEA的量为0.1-1% v/v,例如0.35% v/v。不均匀的MSNP可以使用强碱,如NaOH产生。例如,十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)可以用作表面活性剂,并且NaOH可以用作碱催化剂。

[0155] 氧化铁纳米颗粒可以被购买(例如,Feraheme)或合成。金纳米颗粒或银纳米颗粒可以遵循各个公开的方案合成或从供应商,如西格玛奥德里奇公司(Sigma Aldrich)、Nanocs公司(Nanocs)、nanoComposix公司(nanoComposix)购买。碳纳米管可以遵循各个公开的方案合成或从供应商,如西格玛奥德里奇公司、美国研究纳米材料公司(US Research nanomaterial)和美国元素公司(American Elements)购买。

[0156] 在一些实施例中,官能团(如但不限于硫醇、胺、羧酸酯或磷酸酯)可以在合成期间通过使用一或多种试剂(例如,有机硅烷,如(3-氨丙基)三乙氧基硅烷和(3-氨丙基)三甲氧基硅烷)添加到纳米颗粒(例如,MSNP)的外表面。有机硅烷可以在从MSNP去除表面活性剂之前或之后添加。类似试剂和其它有机试剂(如谷胱甘肽、巯基丙酸、DMSA、PEG-硫醇、油酸和葡聚糖)可以用于修饰氧化铁纳米颗粒、银纳米颗粒、金纳米颗粒和碳纳米管。官能化的纳米颗粒还可以直接购买,例如具有用羧酸、酰胺、聚氨基苯磺酸、十八胺修饰的表面的碳纳米管,并且PEG可以从西格玛奥德里奇公司购买。

[0157] 所产生的NP(例如,在表面修饰之后MSNP)可以具有任何适当的大小,例如约20nm

至约200nm、约20nm至约400nm、约20nm至约500nm、约20nm至约100nm、约30nm至约100nm、约40nm至约200nm、约50nm至约200nm、约50nm至400nm、约50至500nm、约30nm至约80nm、40nm至约80nm、约30nm、约40nm、约30nm至约60nm、约50nm、约60nm、约80nm、约100nm、约120nm或约150nm。

[0158] 所产生的免疫原性构建体(例如,装载有抗原或抗原产生剂的NP)可以具有任何适当的大小,例如约20nm至约200nm、约30nm至约100nm、约40nm至约200nm、约50nm至约200nm、约30nm至约80nm、40nm至约80nm、约30nm、约40nm、约30nm至约60nm、约100nm至200nm、约100nm至约500nm、约100nm至约999nm、约100nm至约400nm、约50nm、约60nm、约80nm、约100nm、约120nm、约150nm、约200nm、约300nm、约400nm、约500nm、约600nm、约700nm、约800nm、约900nm、约999nm。

[0159] XI. 包含脂质涂覆的纳米颗粒的免疫原性构建体

[0160] 本文中公开了包含脂质涂覆的纳米颗粒核(例如,本文所公开的纳米颗粒中的任何纳米颗粒)的免疫原性构建体。在一些实施例中,包含脂质涂覆的磷酸钙的免疫原性构建体由磷酸钙核(CaP-L)构成,其中核例如通过 CaCl_2 和 Na_2HPO_4 与周围脂质层之间的反应形成。Ca/P摩尔比的范围可以为10至200。CaP核纳米颗粒的大小的范围可以为5至999nm(例如,约20nm至约200nm、约30nm至约100nm、约40nm至约200nm、约50nm至约200nm、约30nm至约80nm、40nm至约80nm、约30nm、约40nm、约30nm至约60nm、约50nm或约60nm)。脂质层厚度的范围可以为1至999nm(例如,约20nm至约200nm、约30nm至约100nm、约40nm至约200nm、约50nm至约200nm、约30nm至约80nm、40nm至约80nm、约200至约750nm、约500至999nm、约30nm、约40nm、约30nm至约60nm、约50nm或约60nm)。脂质层包含以下中的一或多种:阳离子聚合物(例如, DOTAP、二甲基二十八烷基溴化铵、D-Lin-MC3-DMA)、聚乙二醇化脂质(例如, DMG-PEG 2000、DSG-PEG 2000)、具有官能基团的官能化聚乙二醇化脂质(例如, -SH、-NH₂、-COOH)、与靶向剂(例如,甘露糖或本文所公开的任何靶向剂)缀合的聚乙二醇化脂质、磷脂(例如, 1, 2-二硬脂酰基-sn-3-磷酸胆碱(DSPC)、二油酰基磷脂酸(DOPA)或二油酰基磷脂酰乙醇胺(DOPE))和胆固醇。上述脂质中的每种脂质可以占脂质层的0-100% (w/w)(例如, 0-10%、0-20%、0-30%、0-40%、0-50%、0-60%、0-70%、0-80%、0-90%、5-15%、5-25%、10-50%、25-75%、50-90%或约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%、约80%、约90%或100%)。虽然聚乙二醇化脂质/官能化聚乙二醇化脂质/所靶向的聚乙二醇化脂质增强稳定性并且延长免疫原性构建体在血液中的循环,但是磷脂组合物和胆固醇形成并稳定脂质涂层结构。官能化聚乙二醇化脂质用于与核酸和/或抗原进一步缀合。所靶向的聚乙二醇化脂质用于增强到所靶向的细胞中的摄取功效。磷酸钙核可以占CaP-L的0.1-99.9% (w/w)(例如, 0-10%、0-20%、0-30%、0-40%、0-50%、0-60%、0-70%、0-80%、0-90%、5-15%、5-25%、10-50%、25-75%、50-90%或约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%、约80%、约90%或99.9%)。脂质层可以占CaP-L的0.1-99.9% (w/w)(例如, 0-10%、0-20%、0-30%、0-40%、0-50%、0-60%、0-70%、0-80%、0-90%、5-15%、5-25%、10-50%、25-75%、50-90%或约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%、约80%、约90%或99.9%)。一或多种类型的表面活性剂(例如, Tween80、Tween 20、Span 80、Span 20、PVP、SDS、SLS、PEG)可以被包含以帮助形成CaP-L。表面活性剂:CaP-L重量比可以在0-50%的范围内。具有/不具有所装载的货物的CaP-L的流体动力学大小可以在10nm至10

微米的范围内(例如,约80nm至约200nm、或约90nm至约150nm、约1微米至约2微米)。

[0161] 在一些实施例中,一或多种类型的寡核苷酸(例如,siRNA、mRNA、shRNA、miRNA、DNA和CpG寡核苷酸中的一或多种)装载到纳米颗粒核(例如,磷酸钙核,通过Ca²⁺阳离子与寡核苷酸的核酸主链的磷酸酯基团之间的离子相互作用)中。在一些实施例中,一或多种类型的寡核苷酸(例如,siRNA、mRNA、shRNA、miRNA、DNA和CpG寡核苷酸中的一或多种)通过阳离子脂质与核酸主链的磷酸酯基团之间的离子相互作用装载到脂质层中。在一些实施例中,一或多种类型的寡核苷酸(例如,siRNA、mRNA、shRNA、miRNA、DNA和CpG寡核苷酸中的一或多种)与脂质层的官能化聚乙二醇化脂质缀合。所述一或多种类型的寡核苷酸到例如CaP-L中的装载可以在纳米颗粒的0.01至10wt.%的范围内。

[0162] 在一些实施例中,一或多种类型的抗原或抗原产生剂(例如,肽、蛋白质和多糖中的一或多种)装载到纳米颗粒核(例如,磷酸钙核)中。在一些实施例中,具有适当的亲水-亲脂平衡的一或多种类型的抗原或抗原产生剂(例如,肽、蛋白质和多糖中的一或多种)插入到脂质层中。在一些实施例中,一或多种类型的抗原或抗原产生剂(例如,肽、蛋白质和多糖中的一或多种)吸附在纳米颗粒(例如,磷酸钙纳米颗粒,通过与磷酸钙核的Ca²⁺离子的范德华相互作用和/或离子相互作用)的表面上。在一些实施例中,一或多种类型的抗原或抗原产生剂(例如,肽、蛋白质和多糖中的一或多种)可以通过共价键与脂质层的官能化聚乙二醇化脂质缀合。所述一或多种类型的抗原或抗原产生剂到纳米颗粒(例如,磷酸钙纳米颗粒)中的装载可以在纳米颗粒的0.01至10wt.%的范围内。

[0163] XII. 免疫原性构建体调配物和使用方法

[0164] 免疫原性构建体可以如本领域已知的调配以用于治疗、诊断或研究用途。免疫原性构建体可以用于体内或离体用途。免疫原性构建体中含有的药剂的效应可以在细胞内或在细胞外发生。

[0165] 免疫原性构建体可以在调配后立即使用或可以储存。在一些实施例中,免疫原性构建体可以使用冻干保护剂(如糖样海藻糖)冻干成干燥状态。与新鲜制备的材料相比,最优的海藻糖和冻干条件可以在粒径和电荷以及功效方面(例如,在含有某些siRNA的免疫原性构建体的基因敲低功效方面)保持免疫原性构建体。本公开的免疫原性构建体在冻干时稳定至少6个月。

[0166] 免疫原性构建体可以与药学上有效的赋形剂一起调配在药物组合物中。药物组合物可以包含活性剂,例如不与免疫原性构建体结合的佐剂、冻干保护剂、稳定剂、防腐剂和/或增溶剂。根据例如临床和患者特异性因素,用于治疗施用的免疫原性构建体的有效量可以由本领域普通技术人员容易地确定。

[0167] 这些和其它有效单位剂量可以以单个剂量或以每天多个剂量、每周或每月剂量,例如以每周两次持续3周循环的给药方案施用。在另外的实施例中,根据临床和患者特异性因素,剂量可以与其它治疗方案配合以任何适当的剂量方案施用。包括免疫原性量的免疫原性构建体的本公开的组合物量、定时和递送模式将常规地根据此类因素,如体重、年龄、性别和个体状况、疾病和/或相关症状的锐度在个体基础上(无论施用是预防性的还是治疗性的)并且在其它已知影响药物递送、吸收、药代动力学(包含半衰期和功效)的因素的基础上调整。

[0168] 本公开的调配物通常将被选择以接近必需且足以基本上预防或缓解哺乳动物受

试者(包含人类)的疾病(包含癌症、纤维化和炎症)的症状的最小给药方案。治疗剂量和施用方案通常将包含在若干天或甚至一或多周或多年的过程内重复给药。有效治疗方案还可以涉及在多天、多周、多月或甚至多年的过程内持续在一天或在每天基础上多个剂量施用的预防性剂量。

[0169] 在一些实施例中,本公开的免疫原性构建体被调配用于肠胃外施用,例如静脉内、肌内、瘤内、鼻内、皮下、皮内或腹膜内施用,包含水性和非水性无菌可注射溶液,与许多其它所设想的本公开的组合物一样,所述溶液可以任选地含有使调配物与哺乳动物受试者的血液等渗的抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂和/或溶质;以及可以包含悬浮剂和/或增稠剂的水性和非水性无菌悬浮液。调配物可以呈现在单位剂量或多剂量容器中。本公开的另外的组合物和调配物可以包含在肠胃外施用之后缓释的聚合物。肠胃外制剂可以是适于此类施用的溶液、分散剂或乳剂。主题药剂还可以被调配成在肠胃外施用之后缓释的聚合物。药学上可接受的调配物和成分通常将是无菌的或可容易灭菌的、生物学上惰性的并且易于施用。此类材料是药学复合领域普通技术人员众所周知的。肠胃外制剂通常含有缓冲剂和防腐剂以及药学上和生理学上可接受的可注射流体,如水、生理盐水、均衡盐溶液、水性葡萄糖、甘油等。可以由前述种类的无菌粉末、颗粒体和片剂制备临时注射溶液、乳剂和悬浮液。优选的单位剂量调配物是含有活性成分的如本文所描述的每日剂量或单位、每日亚剂量或其适当的级分的调配物。

[0170] 在一些实施例中,免疫原性构建体被调配用于口服施用,并且可以呈任何口服可接受的剂型,包含胶囊、片剂、乳剂和水性悬浮液、分散剂和溶液。在一些实施例中,剂型是口服剂型,如压片、硬或软凝胶胶囊、肠溶包衣片、渗透释放胶囊或赋形剂的独特组合。在片剂的情况下,常用赋形剂包含乳糖、甘露醇和玉米淀粉。通常还添加润滑剂,如但不限于硬脂酸镁。对于呈胶囊形式的口服施用,有用的稀释剂包含乳糖、甘露醇、葡萄糖、蔗糖、玉米淀粉、马铃薯淀粉或纤维素。在另外的实施例中,剂型包含胶囊,其中胶囊含有材料的混合物以提供期望的缓释调配物。当口服施用水性悬浮液或乳液时,可将活性成分悬浮或溶解在与乳化剂或悬浮剂结合的油相中。如果期望,可以添加某些甜味剂、调味剂或着色剂。

[0171] 在一些实施例中,免疫原性构建体被调配用于鼻内施用或吸入。用于鼻施用或吸入的组合物可以常规地调配为气溶胶、滴剂、凝胶和粉末。气溶胶调配物通常包含活性物质在生理上可接受的水性或非水性溶剂中的溶液或精细悬浮液,并且通常以无菌形式以单剂量或多剂量呈现于密封容器中,所述密封容器可以采取药筒形式或与雾化装置一起再填充使用。可替代地,密封容器可以是单一分配装置,如单剂量鼻吸入器或装配有计量阀的气溶胶分配器,所述计量阀旨在用于在使用后处置。在剂型包含气溶胶分配器的情况下,其将含有推进剂,所述推进剂可以为压缩气体,如压缩空气或有机推进剂,如氟-氯-烃。气溶胶剂型还可以采取泵-雾化器的形式。

[0172] 局部载剂可以用于递送免疫原性构建体。在一些实施例中,局部载剂为乳剂、凝胶或软膏。在其它实施例中,免疫原性构建体可以调配在喷雾调配物中。乳剂,如乳膏和乳液是分散系统,所述分散系统包括至少两种不混溶的相,一种相以液滴形式分散在另一种相中,所述液滴的直径在0.1 μ m至100 μ m的范围内。通常包含乳化剂以改进稳定性。当水为分散相并且油为分散介质时,乳剂被称为油包水乳剂。当油以液滴的形式分散在水相中作为液滴时,乳剂被称为水包油乳剂。可以用作局部载剂的乳剂,如乳膏和乳液以及其制剂公开于

雷明顿:药学的科学与实践 (Remington:The Science and Practice of Pharmacy) (劳埃德(Lloyd)V. 艾伦(Allen)第22版2012)中,其特此通过引用并入本文。

[0173] 软膏可以是均匀、粘性、半固体的制剂,最常见的是油脂、粘稠的具有高粘度的油(油80%-水20%)。软膏可以用作润肤剂或用于在期望一定程度的阻塞时出于保护、治疗或预防目的将活性成分施涂于皮肤。

[0174] 乳膏是油和水以大约相等的比例混合而成的乳剂。其很好地穿透皮肤的角质层外层。乳膏通常比软膏薄,并且在从其容器中取出后仍维持其形状。

[0175] 软膏/乳膏的媒剂称为软膏基质。基质的选择取决于软膏的临床适应症。不同类型的软膏基质包含:烃基质,例如硬石蜡、软石蜡、微晶蜡和地蜡;吸收基质,例如羊毛脂、蜂蜡;水溶性基质,例如聚乙二醇200、300和400;以及乳化基质,例如乳化蜡、植物油(如橄榄油、椰子油、芝麻油、杏仁油和花生油)。免疫原性构建体分散在基质中,并且之后在药物渗透到伤口中之后被分散。软膏/乳膏可以被调配,从而纳入疏水、亲水或水乳化基质,以提供与皮肤分泌物不相混、混溶或可乳化的制剂。其也可以衍生自脂肪烃、吸收、水可移除或水溶性基质。例如,除其它成分之外,乳膏/软膏基质可以含有活性剂、白色凡士林、水、尿囊素、EDTA、硬脂醇、Brij 721、Brij 72、甲基纤维素、豆蔻酸异丙酯、山梨醇单油酸酯、聚氧乙烯40硬脂酸酯、丁基化羟基甲苯、丙二醇、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、去离子水(至100%)以及缓冲液以达到中性pH。

[0176] 在另一个实施例中,用于递送本公开的免疫原性构建体的局部载剂是凝胶,例如两相凝胶或单相凝胶。凝胶是由通过液体互相渗透的小的无机颗粒或大的有机分子的悬浮液组成的半固体系统。当凝胶团块包含小的离散的无机颗粒网络时,凝胶被归类为两相凝胶。在一些实施例中,液体可以为水或另一种水性介质,并且凝胶团块被定义为水凝胶。水凝胶可以包含海藻酸盐、聚丙烯酸酯、聚环氧烷和/或聚N-乙基吡咯烷酮。水凝胶还可以为非晶形的,即相对于固体(如含有如丙二醇或甘油等保湿剂的羧甲基纤维素调配物)的粘性凝胶。示范性非晶形水凝胶包含麦芽糖- β -葡聚糖、乙酰吗喃(acemannan)、羧甲基纤维素、果胶、黄原胶、胶原蛋白、角蛋白和蜂蜜。

[0177] 免疫原性构建体可以包装成可生物降解胶囊以供口服施用。可替代地,可以在膀胱内置入免疫原性构建体悬浮液。这类似于膀胱内化疗,其中施用于膀胱的药物将直接与膀胱衬里中的癌细胞接触。

[0178] 将下文示范性实施例和实例包含在内以说明本公开的特定实施例。根据本公开,本领域普通技术人员应理解,在不脱离本公开的精神和范围的情况下,可以对本文公开的具体实施例进行许多改变并且仍然获得相似或类似的结果。在以下实例中,并且出于解释的目的,阐述了许多具体细节以提供对本公开的各个方面的透彻理解。然而,相关领域的技术人员应了解,本公开可以在没有这些具体细节情况下实践。在一些实例中,更通常地示出或讨论了已知的结构和装置以便避免模糊本发明。应注意,存在许多不同和替代性配置、装置和技术,所公开的发明可以应用于所述配置、装置和技术。以下实例是所公开的方法的说明。根据本公开,本领域技术人员将认识到,可以实现所公开的方法的这些实例和其它实例的变化,而无需过度实验。

[0179] XIII. 示范性实施例

[0180] 示范性实施例集合1:

[0181] 1. 一种免疫原性构建体,其包含:纳米颗粒;交联阳离子聚合物,所述交联阳离子聚合物与所述纳米颗粒的外表面结合;稳定剂,所述稳定剂与所述交联阳离子聚合物或所述纳米颗粒的所述外表面结合;以及感染原的抗原或抗原产生剂。

[0182] 2. 根据实施例1所述的免疫原性构建体,其进一步包含佐剂。

[0183] 3. 根据实施例2所述的免疫原性构建体,其中所述佐剂包含以下中的一或多种:CpG寡核苷酸、含有CpG序列的DNATLR激动剂、非CpG DNA TLR激动剂、RNA TLR激动剂、铝盐、抗CD40抗体、融合蛋白、细胞因子、小分子TLR激动剂、基于油或表面活性剂的佐剂、脂多糖、植物提取物或其衍生物。

[0184] 4. 根据实施例2或3所述的免疫原性构建体,其中所述佐剂包含CpG寡核苷酸。

[0185] 5. 根据实施例2至4中任一实施例所述的免疫原性构建体,其中所述佐剂包含poly I:C。

[0186] 6. 根据实施例2至5中任一实施例所述的免疫原性构建体,其中所述佐剂以所述纳米颗粒的1-20wt.%存在。

[0187] 7. 根据实施例1至6中任一实施例所述的免疫原性构建体,其中所述纳米颗粒是二氧化硅纳米颗粒、硅纳米颗粒、氧化铁纳米颗粒、金纳米颗粒、银纳米颗粒、碳纳米管或佐剂纳米颗粒。

[0188] 8. 根据实施例1至7中任一实施例所述的免疫原性构建体,其中所述纳米颗粒是介孔二氧化硅纳米颗粒。

[0189] 9. 根据实施例1至8中任一实施例所述的免疫原性构建体,其中所述阳离子聚合物选自由以下组成的组:PEI、壳聚糖、聚丙烯亚胺、聚赖氨酸、聚酰胺胺、聚(烯丙胺)、聚(二烯丙基二甲基氯化铵)、聚(N-异丙基丙烯酰胺-共-丙烯酰胺)、聚(N-异丙基丙烯酰胺-共-丙烯酸)、二乙基氨基乙基-葡聚糖、聚-(N-乙基-乙烯基吡啶溴化铵)、聚(二甲基氨基)乙基甲基丙烯酸酯和聚(乙二醇)-共-聚(三甲基氨基乙基甲基丙烯酸酯氯化物)。

[0190] 10. 根据实施例1至9中任一实施例所述的免疫原性构建体,其中所述阳离子聚合物是PEI。

[0191] 11. 根据实施例1至10中任一实施例所述的免疫原性构建体,其中所述阳离子聚合物的分子量为约0.8kDa至约25kDa。

[0192] 12. 根据实施例1至11中任一实施例所述的免疫原性构建体,其中所述阳离子聚合物以所述纳米颗粒的1-50wt.%存在。

[0193] 13. 根据实施例1至12中任一实施例所述的免疫原性构建体,其中所述稳定剂选自由以下组成的组:PEG、葡聚糖、多唾液酸、透明质酸、聚乙烯吡咯烷酮、聚乙烯醇和聚丙烯酰胺。

[0194] 14. 根据实施例1至13中任一实施例所述的免疫原性构建体,其中所述稳定剂是PEG。

[0195] 15. 根据实施例1至14中任一实施例所述的免疫原性构建体,其中所述稳定剂的分子量为约1kDa至约20kDa。

[0196] 16. 根据实施例1至15中任一实施例所述的免疫原性构建体,其中所述稳定剂以所述纳米颗粒的1-50wt.%存在。

[0197] 17. 根据实施例1至16中任一实施例所述的免疫原性构建体,其中所述感染原是病

毒。

[0198] 18. 根据实施例1至17中任一实施例所述的免疫原性构建体,其中所述感染原是β-冠状病毒。

[0199] 19. 根据实施例1至18中任一实施例所述的免疫原性构建体,其中所述感染原是SARS-CoV-2、SARS-CoV-1或MERS-CoV。

[0200] 20. 根据实施例1至19中任一实施例所述的免疫原性构建体,其中所述感染原是SARS-CoV-2。

[0201] 21. 根据实施例20所述的免疫原性构建体,其中所述抗原或所述抗原产生剂是重组全长蛋白。

[0202] 22. 根据实施例21所述的免疫原性构建体,其中所述抗原或所述抗原产生剂是全长SARS-CoV-2刺突糖蛋白、SARS-CoV-2核衣壳蛋白或SARS-CoV-2膜蛋白。

[0203] 23. 根据实施例20所述的免疫原性构建体,其中所述抗原或所述抗原产生剂是蛋白质亚基。

[0204] 24. 根据实施例23所述的免疫原性构建体,其中所述抗原或所述抗原产生剂是对应于所述SARS-CoV-2刺突糖蛋白的S1、S2或RBD区的蛋白质亚基。

[0205] 25. 根据实施例20所述的免疫原性构建体,其中所述抗原或所述抗原产生剂是对应于SARS-CoV-2刺突糖蛋白的免疫原性序列的肽。

[0206] 26. 根据实施例25所述的免疫原性构建体,其中所述抗原或所述抗原产生剂具有SEQ ID NO:1-8中的任一者的肽序列。

[0207] 27. 根据实施例20所述的免疫原性构建体,其中所述抗原或所述抗原产生剂是mRNA或pDNA。

[0208] 28. 根据实施例1至27中任一实施例所述的免疫原性构建体,其中所述抗原或所述抗原产生剂以所述纳米颗粒的0.5-20wt.%存在。

[0209] 29. 根据实施例1至28中任一实施例所述的免疫原性构建体,其中所述免疫原性构建体进一步包含至少一种类型的寡核苷酸。

[0210] 30. 根据实施例29所述的免疫原性构建体,其中所述至少一种类型的寡核苷酸与所述阳离子聚合物静电地结合。

[0211] 31. 根据实施例30所述的免疫原性构建体,其中所述至少一种类型的寡核苷酸包含siRNA、miRNA、miRNA模拟物或反义寡核苷酸。

[0212] 32. 根据实施例31所述的免疫原性构建体,其中所述至少一种类型的寡核苷酸包含siRNA。

[0213] 33. 根据实施例32所述的免疫原性构建体,其中所述siRNA抑制或下调基因,所述基因的上调与细胞的免疫抑制相关。

[0214] 34. 根据实施例33所述的免疫原性构建体,其中所述细胞是抗原呈递细胞。

[0215] 35. 根据实施例34所述的免疫原性构建体,其中所述抗原呈递细胞是树突细胞或巨噬细胞。

[0216] 36. 根据实施例35所述的免疫原性构建体,其中所述基因是STAT3、IDO-1、IL-6或PD-L1。

[0217] 37. 根据实施例29至35中任一实施例所述的免疫原性构建体,其中所述至少一种

类型的寡核苷酸以所述纳米颗粒的1-10wt.%存在。

[0218] 38. 根据实施例1至37中任一实施例所述的免疫原性构建体,其中所述免疫原性构建体进一步包含细胞的靶向剂。

[0219] 39. 根据实施例38所述的免疫原性构建体,其中所述细胞是抗原呈递细胞。

[0220] 40. 根据实施例39所述的免疫原性构建体,其中所述抗原呈递细胞是树突细胞或巨噬细胞。

[0221] 41. 根据实施例39或40所述的免疫原性构建体,其中所述靶向剂包括甘露糖、识别在所述抗原呈递细胞上展示的表位或与所述表位结合的单克隆或多克隆抗体或其片段、或与所述抗原呈递细胞上的表面受体结合的配体中的至少一种。

[0222] 42. 根据实施例38至41中任一实施例所述的免疫原性构建体,其中所述靶向剂以所述纳米颗粒的0.1至10wt.%存在。

[0223] 43. 根据实施例1至42中任一实施例所述的免疫原性构建体,其中所述免疫原性构建体进一步包含标记剂。

[0224] 44. 根据实施例43所述的免疫原性构建体,其中所述标记剂是荧光染料和/或金属探针。

[0225] 45. 根据实施例1至44中任一实施例所述的免疫原性构建体,其流体动力学直径为约10nm至约10微米。

[0226] 46. 根据实施例45所述的免疫原性构建体,其流体动力学直径为约90nm至约150nm。

[0227] 47. 根据实施例1至46中任一实施例所述的免疫原性构建体,其中所述纳米颗粒的直径为约5至约999nm。

[0228] 48. 一种免疫原性构建体,其包含:纳米颗粒;脂质层,所述脂质层涂覆所述纳米颗粒的外表面;以及感染原的抗原或抗原产生剂。

[0229] 49. 根据实施例40所述的免疫原性构建体,其进一步包含佐剂。

[0230] 50. 根据实施例49所述的免疫原性构建体,其中所述佐剂包含以下中的一或多种:CpG寡核苷酸、含有CpG序列的DNATLR激动剂、非CpG DNA TLR激动剂、RNA TLR激动剂、铝盐、抗CD40抗体、融合蛋白、细胞因子、小分子TLR激动剂、基于油或表面活性剂的佐剂、脂多糖、植物提取物或其衍生物。

[0231] 51. 根据实施例49或50所述的免疫原性构建体,其中所述佐剂包含CpG寡核苷酸。

[0232] 52. 根据实施例49至51中任一实施例所述的免疫原性构建体,其中所述佐剂装载到所述纳米颗粒上。

[0233] 53. 根据实施例49至52中任一实施例所述的免疫原性构建体,其中所述佐剂装载到所述脂质层上或所述脂质层内。

[0234] 54. 根据实施例49至53中任一实施例所述的免疫原性构建体,其中所述佐剂以所述纳米颗粒的1-20wt.%存在。

[0235] 55. 根据实施例48至54中任一实施例所述的免疫原性构建体,其中所述纳米颗粒是二氧化硅纳米颗粒、硅纳米颗粒、氧化铁纳米颗粒、金纳米颗粒、银纳米颗粒、碳纳米管或佐剂纳米颗粒。

[0236] 56. 根据实施例55所述的免疫原性构建体,其中所述纳米颗粒是磷酸钙纳米颗粒。

[0237] 57. 根据实施例48至56中任一实施例所述的免疫原性构建体,其中所述脂质层是单层或多层膜,所述单层或多层膜包含选自以下的脂质中的一或多种脂质:中性脂质、脂肪酸改性的脂质、磷脂、脂肪酸、可聚合脂质、阳离子脂质、鞘脂以及甾醇。

[0238] 58. 根据实施例57所述的免疫原性构建体,其中所述中性脂质是前列腺素、类二十烷酸或甘油酯;所述脂肪酸改性的脂质是1,2-二植烷酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱或1-(12-生物素基(氨基十二烷酰基))-2-油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺;所述磷脂是磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱或1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺;所述脂肪酸是硬脂酸或月桂酸;所述可聚合脂质是胆固醇-PEG或二硬脂酰基-rac-甘油-PEG2K;所述阳离子脂质是1,2-二油酰基-3-三甲胺-丙烷或二甲基二十八烷基溴化铵;所述鞘脂是鞘磷脂或神经酰胺;并且所述甾醇是胆固醇或豆甾醇。

[0239] 59. 根据实施例58所述的免疫原性构建体,其中所述脂质层包含1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、二甲基二十八烷基溴化铵、胆固醇、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱以及二硬脂酰基-rac-甘油-PEG2K。

[0240] 60. 根据实施例48至59中任一实施例所述的免疫原性构建体,其中所述脂质层以所述纳米颗粒的0.1-99.9wt.%存在。

[0241] 61. 根据实施例48至60中任一实施例所述的免疫原性构建体,其中所述感染原是病毒。

[0242] 62. 根据实施例48至61中任一实施例所述的免疫原性构建体,其中所述感染原是 β -冠状病毒。

[0243] 63. 根据实施例48至62中任一实施例所述的免疫原性构建体,其中所述感染原是SARS-CoV-2、SARS-CoV-1或MERS-CoV。

[0244] 64. 根据实施例48至63中任一实施例所述的免疫原性构建体,其中所述感染原是SARS-CoV-2。

[0245] 65. 根据实施例64所述的免疫原性构建体,其中所述抗原或所述抗原产生剂是重组全长蛋白。

[0246] 66. 根据实施例65所述的免疫原性构建体,其中所述抗原或所述抗原产生剂是全长SARS-CoV-2刺突糖蛋白、SARS-CoV-2核衣壳蛋白或SARS-CoV-2膜蛋白。

[0247] 67. 根据实施例64所述的免疫原性构建体,其中所述抗原或所述抗原产生剂是蛋白质亚基。

[0248] 68. 根据实施例67所述的免疫原性构建体,其中所述抗原或所述抗原产生剂是对应于所述SARS-CoV-2刺突糖蛋白的S1、S2或RBD区的蛋白质亚基。

[0249] 69. 根据实施例64所述的免疫原性构建体,其中所述抗原或所述抗原产生剂是对应于SARS-CoV-2刺突糖蛋白的免疫原性序列的肽。

[0250] 70. 根据实施例69所述的免疫原性构建体,其中所述抗原或所述抗原产生剂具有SEQ ID NO:1-8中的任一者的肽序列。

[0251] 71. 根据实施例64所述的免疫原性构建体,其中所述抗原或所述抗原产生剂是mRNA或pDNA。

[0252] 72. 根据实施例48至71中任一实施例所述的免疫原性构建体,其中所述抗原或所述抗原产生剂装载到所述纳米颗粒上。

- [0253] 73. 根据实施例48至72中任一实施例所述的免疫原性构建体,其中所述抗原或所述抗原产生剂装载到所述脂质层上或所述脂质层内。
- [0254] 74. 根据实施例48至73中任一实施例所述的免疫原性构建体,其中所述抗原或所述抗原产生剂以所述纳米颗粒的0.01至10wt.%存在。
- [0255] 75. 根据实施例48至74中任一实施例所述的免疫原性构建体,其中所述免疫原性构建体进一步包含至少一种类型的寡核苷酸。
- [0256] 76. 根据实施例75所述的免疫原性构建体,其中所述至少一种类型的寡核苷酸包含siRNA。
- [0257] 77. 根据实施例76所述的免疫原性构建体,其中所述siRNA抑制或下调基因,所述基因的上调与细胞的免疫抑制相关。
- [0258] 78. 根据实施例77所述的免疫原性构建体,其中所述细胞是抗原呈递细胞。
- [0259] 79. 根据实施例78所述的免疫原性构建体,其中所述抗原呈递细胞是树突细胞或巨噬细胞。
- [0260] 80. 根据实施例79所述的免疫原性构建体,其中所述基因是STAT3、IDO-1、IL-6或PD-L1。
- [0261] 81. 根据实施例74至80中任一实施例所述的免疫原性构建体,其中所述至少一种类型的寡核苷酸以所述纳米颗粒的0.01至10wt.%存在。
- [0262] 82. 根据实施例48至81中任一实施例所述的免疫原性构建体,其中所述免疫原性构建体进一步包含细胞的靶向剂。
- [0263] 83. 根据实施例82所述的免疫原性构建体,其中所述细胞是抗原呈递细胞。
- [0264] 84. 根据实施例83所述的免疫原性构建体,其中所述抗原呈递细胞是树突细胞或巨噬细胞。
- [0265] 85. 根据实施例84所述的免疫原性构建体,其中所述靶向剂包括甘露糖、识别在所述抗原呈递细胞上展示的表位或与所述表位结合的单克隆或多克隆抗体或其片段、或与所述抗原呈递细胞上的表面受体结合的配体中的至少一种。
- [0266] 86. 根据实施例48至85中任一实施例所述的免疫原性构建体,其中所述免疫原性构建体进一步包含标记剂。
- [0267] 87. 根据实施例86所述的免疫原性构建体,其中所述标记剂是荧光染料和/或金属探针。
- [0268] 88. 根据实施例48至87中任一实施例所述的免疫原性构建体,其流体动力学直径为约10nm至约10微米。
- [0269] 89. 根据实施例88所述的免疫原性构建体,其流体动力学直径为约90nm至约150nm。
- [0270] 90. 根据实施例1至89中任一实施例所述的免疫原性构建体,其中所述纳米颗粒的大小为约5nm至999nm。
- [0271] 91. 一种药物组合物,其包含根据实施例1至90中任一实施例所述的免疫原性构建体以及药学上可接受的赋形剂。
- [0272] 92. 一种疫苗,其包含根据实施例1至90中任一实施例所述的免疫原性构建体以及药学上可接受的赋形剂。

- [0273] 93. 一种将抗原和佐剂共同递送到细胞的方法,所述方法包含使所述细胞与根据实施例1至90中任一实施例所述的免疫原性构建体接触。
- [0274] 94. 根据实施例93所述的方法,其中所述细胞是抗原呈递细胞。
- [0275] 95. 根据实施例94所述的方法,其中所述细胞是树突细胞或巨噬细胞。
- [0276] 96. 根据实施例93所述的方法,其中所述细胞是肌细胞。
- [0277] 97. 一种诱导针对受试者体内的感染原的免疫应答的方法,所述方法包含向所述受试者施用免疫原性量的根据实施例1至90中任一实施例所述的免疫原性构建体。
- [0278] 98. 根据实施例97所述的方法,其中所述受试者是人。
- [0279] 99. 根据实施例97或98所述的方法,其中所述受试者是免疫受损的。
- [0280] 100. 根据实施例97到99中任一项所述的方法,其中所述免疫原性构建体通过肌肉注射施用。
- [0281] 101. 一种治疗或预防受试者的感染性疾病的方法,所述方法包含向所述受试者施用免疫原性量的根据实施例1至90中任一实施例所述的免疫原性构建体。
- [0282] 102. 根据实施例101所述的方法,其中所述受试者是人。
- [0283] 103. 根据实施例101或102所述的方法,其中所述受试者是免疫受损的。
- [0284] 104. 根据实施例101至103中任一实施例所述的方法,其中所述免疫原性构建体肌肉内、通过吸入或鼻内施用。
- [0285] 示范性实施例集合2:
- [0286] 1. 一种免疫原性构建体,其包含:纳米颗粒平台(NP),所述NP包含:纳米颗粒;一定量的交联阳离子聚合物,所述交联阳离子聚合物包含与所述纳米颗粒的外表面静电地结合的聚乙烯亚胺(PEI),并且其中PEI含量占所述NP的至少10重量%;以及一定量的稳定剂,所述稳定剂包含与所述交联PEI共价结合的聚乙二醇(PEG);以及感染原的抗原或抗原产生剂,其中所述构建体的流体动力学大小不超过1微米。
- [0287] 2. 根据实施例1所述的免疫原性构建体,其中所述纳米颗粒是介孔二氧化硅纳米颗粒(MSNP)。
- [0288] 3. 一种免疫原性构建体,其包含:纳米颗粒平台(NP),所述NP包含:纳米颗粒;交联阳离子聚合物,所述交联阳离子聚合物与所述纳米颗粒的外表面结合;以及稳定剂,所述稳定剂与所述交联阳离子聚合物或所述纳米颗粒的所述外表面结合;以及感染原的抗原或抗原产生剂。
- [0289] 4. 根据实施例1或实施例3所述的免疫原性构建体,其进一步包含佐剂。
- [0290] 5. 根据实施例4所述的免疫原性构建体,其中所述佐剂包含以下中的一或多种:CpG寡核苷酸、含有CpG序列的DNATLR激动剂、非CpG DNA TLR激动剂、RNA TLR激动剂、铝盐、抗CD40抗体、融合蛋白、细胞因子、小分子TLR激动剂、基于油或表面活性剂的佐剂、脂多糖、植物提取物或其衍生物。
- [0291] 6. 根据实施例5所述的免疫原性构建体,其中所述佐剂包含CpG寡核苷酸。
- [0292] 7. 根据实施例4所述的免疫原性构建体,其中所述佐剂包含poly I:C。
- [0293] 8. 根据实施例4至7中任一实施例所述的免疫原性构建体,其中所述佐剂以所述NP的1-20wt.%存在。
- [0294] 9. 根据实施例1或实施例3或此集合中的任何其它实施例所述的免疫原性构建体,

其中所述纳米颗粒是二氧化硅纳米颗粒、硅纳米颗粒、氧化铁纳米颗粒、金纳米颗粒、银纳米颗粒、碳酸钙纳米颗粒、磷酸钙纳米颗粒、碳纳米管或佐剂纳米颗粒。

[0295] 10. 根据实施例9所述的免疫原性构建体,其中所述纳米颗粒是介孔二氧化硅纳米颗粒(MSNP)。

[0296] 11. 根据实施例10所述的免疫原性构建体,其中MSNP的平均孔径为2-6nm、7nm或小于7nm。

[0297] 12. 根据实施例9所述的免疫原性构建体,其中所述纳米颗粒是氧化铁纳米颗粒。

[0298] 13. 根据实施例1或实施例3或此集合中的任何其它实施例所述的免疫原性构建体,其中所述阳离子聚合物包含PEI、壳聚糖、聚丙烯亚胺、聚赖氨酸、聚酰胺胺、聚(烯丙胺)、聚(二烯丙基二甲基氯化铵)、聚(N-异丙基丙烯酰胺-共-丙烯酰胺)、聚(N-异丙基丙烯酰胺-共-丙烯酸)、二乙基氨基乙基-葡聚糖、聚-(N-乙基-乙烯基吡啶溴化铵)、聚(二甲基氨基)乙基甲基丙烯酸酯、聚(乙二醇)-共-聚(三甲基氨基乙基甲基丙烯酸酯氯化物)或其两种或两种以上的混合物。

[0299] 14. 根据实施例1或实施例3所述的免疫原性构建体,其中所述阳离子聚合物是或包含PEI。

[0300] 15. 根据实施例1或实施例3或此集合中的任何其它实施例所述的免疫原性构建体,其中所述阳离子聚合物的分子量为约0.8kDa至约25kDa。

[0301] 16. 根据实施例1或实施例3或此集合中的任何其它实施例所述的免疫原性构建体,其中所述阳离子聚合物以所述NP的1-50wt.%存在。

[0302] 17. 根据实施例1或实施例3或此集合中的任何其它实施例所述的免疫原性构建体,其中所述稳定剂包含PEG、葡聚糖、多唾液酸、透明质酸、聚乙烯吡咯烷酮、聚乙烯醇、聚丙烯酰胺或其两种或两种以上的混合物。

[0303] 18. 根据实施例17所述的免疫原性构建体,其中所述稳定剂是PEG。

[0304] 19. 根据实施例1或实施例3或此集合中的任何其它实施例所述的免疫原性构建体,其中所述稳定剂的分子量为约1kDa至约20kDa或约5kDa。

[0305] 20. 根据实施例1或实施例3或此集合中的任何其它实施例所述的免疫原性构建体,其中所述稳定剂以所述NP的1-50wt.%、约10-30wt.%、约5至20wt.%、约15wt.%或约20wt.%存在。

[0306] 21. 根据实施例1或实施例3或此集合中的任何其它实施例所述的免疫原性构建体,其中所述抗原包含蛋白质,并且所述蛋白质抗原缀合到所述稳定剂上。

[0307] 22. 根据实施例1或实施例3所述的免疫原性构建体,其中所述抗原是肽,并且所述肽抗原与所述交联阳离子聚合物静电地结合。23. 根据实施例1或实施例3或此集合中的任何其它实施例所述的免疫原性构建体,其中所述抗原产生剂是mRNA或pDNA,并且所述抗原产生剂与所述交联阳离子聚合物静电地结合。

[0308] 24. 根据实施例1或实施例3或此集合中的任何其它实施例所述的免疫原性构建体,其中所述感染原是病毒。

[0309] 25. 根据实施例24所述的免疫原性构建体,其中所述感染原是β-冠状病毒。

[0310] 26. 根据实施例25所述的免疫原性构建体,其中所述感染原是SARS-CoV-2、SARS-CoV-1或MERS-CoV。

- [0311] 27. 根据实施例26所述的免疫原性构建体,其中所述感染原是SARS-CoV-2。
- [0312] 28. 根据实施例27所述的免疫原性构建体,其中所述抗原是重组全长SARS-CoV-2蛋白,或者所述抗原产生剂编码所述重组全长SARS-CoV-2蛋白。
- [0313] 29. 根据实施例21或此集合中的任何其它实施例所述的免疫原性构建体,其中所述全长SARS-CoV-2蛋白是SARS-CoV-2刺突糖蛋白、SARS-CoV-2核衣壳蛋白或SARS-CoV-2膜蛋白。
- [0314] 30. 根据实施例27所述的免疫原性构建体,其中所述抗原是蛋白质亚基,或者所述抗原产生剂编码所述蛋白质亚基。
- [0315] 31. 根据实施例30所述的免疫原性构建体,其中所述蛋白质亚基对应于SARS-CoV-2刺突糖蛋白S1区、S2区或受体结合结构域(RBD)区。
- [0316] 32. 根据实施例27或此集合中的任何其它实施例所述的免疫原性构建体,其中所述抗原是对应于SARS-CoV-2刺突糖蛋白的免疫原性序列的肽,或者所述抗原产生剂编码所述肽。
- [0317] 33. 根据实施例32所述的免疫原性构建体,其中所述肽包含SEQ ID NO:1-8中的任一者的序列。
- [0318] 34. 根据实施例27所述的免疫原性构建体,其中所述抗原产生剂是mRNA或pDNA。
- [0319] 35. 根据实施例1或实施例3或此集合中的任何其它实施例所述的免疫原性构建体,其中所述感染原是细菌、寄生虫、原生动物或真菌。
- [0320] 36. 根据实施例1或实施例3或此集合中的任何其它实施例所述的免疫原性构建体,其中所述抗原或所述抗原产生剂以所述NP的0.5-20wt.%存在。
- [0321] 37. 根据实施例1或实施例3所述的免疫原性构建体,其中所述免疫原性构建体进一步包含至少一种寡核苷酸。
- [0322] 38. 根据实施例37所述的免疫原性构建体,其中所述至少一种寡核苷酸与所述阳离子聚合物静电地结合。
- [0323] 39. 根据实施例38所述的免疫原性构建体,其中所述至少一种寡核苷酸包含siRNA、miRNA、miRNA模拟物或反义寡核苷酸。
- [0324] 40. 根据实施例38所述的免疫原性构建体,其中所述至少一种寡核苷酸包含siRNA。
- [0325] 41. 根据实施例40所述的免疫原性构建体,其中所述siRNA抑制或下调基因,所述基因的表达或上调与细胞的免疫抑制相关。
- [0326] 42. 根据实施例41所述的免疫原性构建体,其中所述细胞是抗原呈递细胞。
- [0327] 43. 根据实施例42所述的免疫原性构建体,其中所述抗原呈递细胞是树突细胞或巨噬细胞。
- [0328] 44. 根据实施例43所述的免疫原性构建体,其中所述基因是STAT3、IDO-1、IL-6或PD-L1。
- [0329] 45. 根据实施例37所述的免疫原性构建体,其中所述寡核苷酸以所述NP的1-10wt.%存在。
- [0330] 46. 根据实施例1或实施例3或此集合中的任何其它实施例所述的免疫原性构建体,其中所述免疫原性构建体进一步包含细胞的靶向剂。

- [0331] 47. 根据实施例46所述的免疫原性构建体,其中所述细胞是抗原呈递细胞。
- [0332] 48. 根据实施例47所述的免疫原性构建体,其中所述抗原呈递细胞是树突细胞或巨噬细胞。
- [0333] 49. 根据48所述的免疫原性构建体,其中所述靶向剂包含甘露糖、识别在所述抗原呈递细胞上展示的表位或与所述表位结合的单克隆或多克隆抗体或其片段、或与所述抗原呈递细胞上的表面受体结合的配体中的至少一种。
- [0334] 50. 根据实施例3所述的免疫原性构建体,其流体动力学直径为约10nm至约10微米。
- [0335] 51. 根据实施例1或实施例3或此集中的任何其它实施例所述的免疫原性构建体,其流体动力学直径为约30nm至约200nm。
- [0336] 52. 根据实施例1或实施例3或此集中的任何其它实施例所述的免疫原性构建体,其流体动力学直径为约80nm至约999nm。
- [0337] 53. 一种免疫原性组合物,其包含多个根据实施例1或实施例3或此集中的任何其它实施例所述的免疫原性构建体。
- [0338] 54. 一种组合物,其包含:根据实施例1或实施例3或此集中的任何其它实施例所述的免疫原性构建体;以及至少一种生物学或药学上可接受的赋形剂。
- [0339] 55. 一种疫苗,其包含:根据实施例1或实施例3或此集中的任何其它实施例所述的免疫原性构建体;以及药学上可接受的赋形剂。
- [0340] 56. 一种将抗原和佐剂共同递送到细胞的方法,所述方法包含使所述细胞与根据实施例1或实施例3或此集中的任何其它实施例所述的免疫原性构建体接触。
- [0341] 57. 根据实施例56所述的方法,其中所述细胞是抗原呈递细胞。
- [0342] 58. 根据实施例57所述的方法,其中所述细胞是树突细胞或巨噬细胞。
- [0343] 59. 根据实施例56所述的方法,其中所述细胞是肌细胞。
- [0344] 60. 一种方法,其包含向受试者施用免疫刺激量的根据实施例1或实施例3或此集中的任何其它实施例所述的免疫原性构建体。
- [0345] 61. 根据实施例60所述的方法,其诱导针对所述受试者体内的感染原的免疫应答。
- [0346] 62. 根据实施例60所述的方法,其治疗或预防所述受试者的感染性疾病。
- [0347] 63. 根据实施例62所述的方法,其中所述受试者是人。
- [0348] 64. 根据实施例62所述的方法,其中所述受试者是免疫受损的。
- [0349] 65. 根据实施例62所述的方法,其中所述免疫原性构建体经皮、肌肉、通过吸入或鼻内施用。

[0350] XIV. 实验实例

[0351] 实例1. 免疫原性构建体的制备

[0352] 如先前所描述的合成涂覆有PEI和PEG的基于介孔二氧化硅的纳米颗粒(参见例如国际申请第PCT/US2016/022655号,其以全文引用的方式并入本文)。简而言之,介孔二氧化硅纳米颗粒(MSNP)是通过溶胶-凝胶合成(sol-gel synthesis)而合成的。MSNP核被聚乙烯亚胺(PEI)和聚乙二醇(PEG)逐层涂覆。MSNP上的PEI也进行交联(主要与其自身),以增强寡核苷酸递送功效和安全性(参见恩甘切尔德拉库尔等人,先进功能材料,25(18):2646-2659,2015)。此类交联增加了货物的缓冲能力和内体逃逸,并且也减少了纳米颗粒平台

(NP)的表面电荷。减少NP或免疫原性构建体的表面电荷提高抗原呈递细胞的安全性,这对疫苗接种具有重要意义(参见图16)。本实例中使用的MSNP的孔径通过TEM测量为2-3nm,并且通过Barrett-Joyner-Halenda (BJH)孔径分析(例如,通过氮吸附和解吸)测量为6.6nm。涂覆有交联PEI和PEG的MSNP此后被称为纳米颗粒平台或“NP”。

[0353] CpG 1826(小鼠序列;英杰公司)通过10分钟混合静电地装载在NP上,即使较短的时间(2-5分钟)也是有效的。在通过离心分离装载货物的NP后,如通过上清液中游离货物分子的不存在所证实的,以完全结合的方式进行装载。将siRNA与Dy677染料(Dharmacon公司(Dharmacon))缀合,并且因此通过荧光信号进行定量。通过Nanodrop分光光度计、微板分光光度计或凝胶电泳测量上清液中未结合的CpG和siRNA货物含量。通过与NP混合2小时,SIINFEKL(SF;SEQ ID NO:90)肽通过与NP的非共价相互作用(在PEI层上)进行装载,即使较短的时间也是有效的。大蛋白质(抗体、全长蛋白)通常通过共价键合装载(实例4),但非共价键合也是可能的。大的蛋白质货物(如刺突蛋白)没有包封在介孔二氧化硅的小孔(例如,2-6nm)中,而是附着到材料的表面(例如,缀合或静电地结合在PEG-PEI层上,或吸附到外部二氧化硅表面上)。

[0354] 上清液中未结合的肽或蛋白质的量(在离心后)通过肽/蛋白质上缀合的荧光染料的荧光信号或BCA测定来表征。还可以使用其它蛋白质测定。在多种类型的货物装载的情况下,所产生的免疫原性构建体的流体动力学大小(直径)保持在适于细胞摄取的五微米以下(例如,在一微米以下)。如图2所示,当NP装载有5wt.%SF(通过非共价结合)和2wt.%CpG时,它们维持约100nm的流体动力学大小。如表3所示,纳米颗粒平台(通过热重分析(TGA)表征的MSNP-PEI-PEG[装载有15wt.%交联的PEI和10wt.%PEG的MSNP])装载有约3wt.%的刺突蛋白(例如通过共价键合)、2wt.%siRNA和4wt.%CpG,并且维持小于150nm的流体动力学大小。免疫原性构建体在最后装载siRNA和CpG。在约2-4wt.%的siRNA装载的情况下,CpG可以从约4-9wt.%装载,同时维持低于150nm的大小(表4)。CpG、siRNA和肽通过如之前所描述的以完全结合的方式与NP溶液混合(通过离心后上清液中没有未结合的货物证实的)以对应的最终wt.%装载。在整个实例1-4中使用CpG 1826(小鼠序列),但也对CpG 7909/2006(人类序列)进行评估并产生了类似的特性。所有装载百分比以NP的重量计。

[0355] 表3示出了以下的流体动力学大小:1)涂覆有15wt.%交联的PEI和10wt.%PEG(NP)的介孔二氧化硅纳米颗粒;2)装载有约2wt.%siRNA和约6wt.%CpG的NP;3)刺突蛋白(3wt.%)缀合的NP(刺突-NP);以及4)装载有约2wt.%siRNA和约4wt.%CpG的刺突-NP。平均大小(Z-平均值)和多分散指数(PDI)由使用马尔文Zetasizer的三个测量结果示出。所有装载按纳米颗粒平台(NP或PEG-PEI-MSNP)的重量计。

[0356] 表3:

[0357]

材料	流体动力学大小	PDI
NP	90.1±0.8	0.17±0.03
(2%) siRNA- (6%) CpG-NP	106.6±0.4	0.15±0.01
刺突-NP	84.4±0.5	0.12±0.01
刺突- (2%) siRNA- (4%) CpG-NP	146.1±6.1	0.18±0.01

[0358] 表4示出了涂覆有PEI和PEG(NP)并且按NP的重量计装载有约2-4wt.%siRNA和约4-9wt.%CpG的介孔二氧化硅纳米颗粒的流体动力学大小。

[0359] 表4:

材料	流体动力学大小	PDI
(2%) siRNA- (4%) CpG-NP	95.5±1.3	0.14±0.01
(2%) siRNA- (6%) CpG-NP	106.6±0.4	0.15±0.01
(2%) siRNA- (9%) CpG-NP	146.7±1.5	0.22±0.03
(4%) siRNA- (6%) CpG-NP	120.4±1.7	0.17±0.02

[0361] 除了CpG之外,其它佐剂,如Poly I:C(艾迪珀国际公司(Adipogen))可以非共价地装载在免疫原性构建体上。通过将Poly I:C溶液与NP溶液混合10分钟,将Poly I:C静电地且以完全结合方式装载在NP上。流体动力学大小在约2wt.%装载下保持小(88nm),但在约9wt.%装载下显著增加(4.8微米)(图3)。

[0362] 实例2.NP共同递送CpG和寡核苷酸(例如,siRNA)以敲低免疫抑制基因(例如,STAT3、PD-L1)

[0363] STAT3被认为是强大的免疫抑制基因。为了确定装载有针对STAT3的siRNA(siSTAT3)的NP的敲低功效,在RNA分离和qRT-PCR之前用siSTAT3-NP(来自实例1的涂覆有PEI和PEG的介孔二氧化硅)处理免疫细胞(即,树突细胞、巨噬细胞)和各种癌细胞(B16-F10、HCC1954、D17)持续48小时以确定细胞系中STAT3的敲低功效。如图4A所示,免疫原性构建体(siSTAT3-NP)使免疫和癌细胞系两者中的靶基因敲低>70%。相同的siSTAT3序列可以敲低人、犬和小鼠细胞中的STAT3基因(图4A)。相同的装载有siRNA和CpG两者的免疫原性构建体在敲低免疫细胞和癌细胞两者中的STAT3方面仍然是有效的(图4B)。有趣的是,发现siSCR-NP还降低DC中的STAT3水平(参见图4C)。这不是由NP毒性引起的,因为与未经处理的对照相比,细胞活力没有改变,并且STAT3 mRNA用管家mRNA进行归一化。不受任何解释的束缚,提出这可能是由于介孔二氧化硅纳米颗粒的抗氧化特性,因为之前有报道称抗氧化剂可以抵消免疫抑制途径,包含STAT3激活(尹(Yoon)等人,自噬(Autophagy),6(8):1125-1138,2010)。另一方面,发现Dharmefect(Horizon Discovery公司的基于阳离子脂质(非抗氧化剂)的商业转染剂)增加了DC中STAT3的表达(图4C),这可能导致不期望的免疫抑制TME。图4D示出纳米颗粒还可以用于递送PD-L1 siRNA,以敲低肺细胞中的PD-L1蛋白表达。这表明使用恩甘切尔德拉库尔等人,先进功能材料,25(18):2646-2659,2015和莫里(Morry)等人生物材料(Biomaterials),66:41-52,2015中描述的抗氧化介孔二氧化硅纳米颗粒平台可能比脂质纳米颗粒更有利于控制STAT3介导的途径。

[0364] NP(PEG-PEI-MSN)可以装载有2-4wt.%siRNA和4-9wt.%NP,同时维持免疫原性构建体的流体动力学大小低于150nm(表4)。体内NP共同递送CpG和siSTAT3比NP递送单独的CpG或siSTAT3更能触发适应性免疫,如图5和6中所示。C57BL/6小鼠的双肩上移植有250K和100K B16F10黑色素瘤细胞以分别建模局部(原发性)和远隔(转移性)肿瘤。在肿瘤移植后八天,将处理瘤内注射到局部肿瘤中,总计三个剂量,每个剂量间隔三天,而远隔肿瘤不进行处理。每周至少两次监测肿瘤大小和存活率,如图5A-C所示。图5示出,与NP递送单独的CpG(CpG-NP)或siTAT3(siSTAT3-NP)相比,NP共同递送siSTAT3和CpG(siSTAT3-CpG-NP)(通过siSTAT3)调节免疫抑制环境,从而产生更强的全身抗肿瘤免疫应答,这通过在两种局部经处理的肿瘤(图5A)和远隔肿瘤(图5B)中的较大的肿瘤缩小和更大的存活率(图5C)证实。图6示出siSTAT3-CpG-NP处理引起在局部(经处理的)和远隔(未经处理的)肿瘤(图6A)两者

和相关引流淋巴结(DLN)中的CD8/Treg比率显著更高(相对于生理盐水, $p < 0.05$) (图6B), 证实原位肿瘤疫苗接种成功。调节性T细胞(Treg)通常在患者肿瘤中升高并抑制抗肿瘤免疫应答, 包含CD8⁺T细胞活性。经激活的T细胞在肿瘤引流淋巴结中也更加增殖(图6C)。这些结果证明免疫原性构建体敲低免疫细胞和其它细胞(例如, 癌细胞或肌细胞)中的靶基因的能力, 并为使用本公开的免疫原性构建体共同递送siRNA和佐剂(例如, CpG)提供了理论基础。应注意, 对于图5和6中的原位癌疫苗接种, 肿瘤依赖于抗原储库(因此不向构建体中添加外部抗原)。

[0365] 实例3. NP共同递送CpG和抗原以诱导适应性(抗原特异性)免疫应答

[0366] 进行研究以确定CpG-SF-NP(装载有CpG和SF的NP)诱导全身抗原特异性免疫的能力。简而言之, C57BL/6小鼠($n = 3$ 只/组)通过足垫注射CpG-SF-NP的免疫原性构建体、装载有SF的NP(SF-NP)或装载有单独的CpG的NP(CpG-NP)以及用不完全弗氏佐剂(IFA)调配的SF(IFA/SF)。未经处理的小鼠作为对照包含在内。处理后一周, 从小鼠脾脏中采集细胞, 所述小鼠用高尔基体(Golgi block)处理并在存在或不存在SF的情况下温育6小时。通过流式细胞术分析细胞内IFN γ , 即对应于CD8⁺T细胞应答的产生。如图7所示, CpG-SF-NP在离体肽再刺激之后诱导优越的CD8⁺T细胞应答。来自实例1-3的结果为使用本公开的免疫原性构建体共同递送佐剂、抗原和/或寡核苷酸提供了强有力的理论基础。

[0367] 实例4. 刺突蛋白缀合的NP(免疫原性构建体)的合成

[0368] 作为实例, 全长SARS-CoV-2刺突糖蛋白(义翘神州生物公司)与NP(PEI-PEG-MSNP)共价连接。简而言之, 在与NP混合并在4°C下振荡过夜之前, 使刺突蛋白硫醇化1小时。振荡后, 洗涤最终免疫原性构建体, 并且基于如通过上清液的BCA测定所确定的未结合的蛋白质的量, 将最终刺突蛋白含量确定为NP的3wt. %。最后通过静电相互作用(在室温下振荡5-10分钟)将siRNA(针对荧光素酶或非靶标乱序siRNA)和CpG装载在免疫原性构建体上。刺突缀合的NP的流体动力学大小小于100nm, 并且在装载刺突糖蛋白之后仍小于150nm(表3和图8A)。刺突-NP可以有效递送siRNA以敲低人细胞中的模型基因(荧光素酶)(图8B)。简而言之, 细胞以每孔3500个细胞进行平板接种并且在37°C下温育过夜。第二天, 以30或60nM的siRNA剂量用刺突-NP处理细胞。处理后48小时, 细胞裂解并通过荧光素酶发光测定试剂盒(赛默飞世尔科技公司(ThermoFisher Scientific))分析荧光素酶活性, 并且通过BCA蛋白测定试剂盒遵循制造方案(赛默飞世尔科技公司)分析蛋白质浓度。使裂解物的荧光素酶活性相对于相同孔中的对应蛋白质浓度归一化, 并报告为未经处理的对照的百分比。所有处理一式四份地进行。

[0369] 实例5. 脂质涂覆的磷酸钙纳米颗粒平台(CaP-L)的合成

[0370] 在油包水微乳剂中合成磷酸钙纳米颗粒(CaPNP)。简而言之, 将60 μ L的2.5M CaCl₂(美国飞世尔科技公司(Fisher Scientific, USA))分散于4mL环己烷(美国西格玛公司(Sigma, USA))/Igepal CO-520(美国西格玛公司)(71:29, v/v)中以形成钙相。将60 μ L的12.5mM Na₂HPO₄(美国飞世尔科技公司)分散于另一4mL环己烷/Igepal CO-520(71:29, v/v)中以形成磷酸盐相。将40 μ L的含20mM 1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(美国Avanti极性脂质公司(Avanti Polar Lipids, USA))的CHCl₃(美国飞世尔科技公司)添加到磷酸盐相中。然后将磷酸盐相逐滴添加到钙相中。将混合物在室温下搅拌0分钟、10分钟、15分钟或20分钟。添加等体积的乙醇(美国Decon Labs公司(Decon Labs, USA))以分散微乳剂。通过

以21,000g离心收集CaPNP持续15分钟,并且然后用无水乙醇洗涤3次以去除残余油相。将沉淀物悬浮于100 μ L的CHCl₃中。CaP-L通过以下形成:将10 μ L的含CaPNP的CHCl₃与1.4 μ L的20mM二甲基二十八烷基溴化铵(美国西格玛公司)、1.4 μ L的20mM胆固醇(美国西格玛公司)、2.8L的20mM二硬脂酰基-rac-甘油-PEG2K(美国Avanti极性脂质公司)和0.7 μ L的含20mM 1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(美国西格玛公司)的CHCl₃混合,随后进行轻微的浴超声处理。然后在减压下去除CHCl₃,并且通过用100 μ L的PBS 1X(pH=7.2)水合来形成CaP-L。使用Zetasizer(英国马尔文ZS-90/马尔文公司(ZS-90/Malvern, Malvern, U.K.))测量CaP-L的流体动力学大小(表5)。

[0371] 表5示出了脂质涂覆的磷酸钙NP(CaP-L)和装载有占CaP-L的0.3重量%的siRNA的CaP-L的流体动力学大小。

[0372] 表5:

材料	流体动力学大小	PDI
CaP-L	98.1 \pm 0.6	0.25 \pm 0.02
siRNA/CaP-L	90.6 \pm 2.8	0.26 \pm 0.03

[0374] 装载有脂质涂覆的CaP-L的siRNA(siRNA-CaP-L)的合成

[0375] 在油包水微乳剂中合成装载siRNA的磷酸钙纳米颗粒。简而言之,将5 μ L的siRNA添加到60 μ L的2.5M CaCl₂(美国飞世尔科技公司)中,并且随后将所产生的溶液分散于4mL环己烷/Igepal C0-520(美国西格玛公司)(71:29, v/v)中以形成钙相。将60 μ L的12.5mM Na₂HPO₄(美国飞世尔科技公司)分散于另一4mL环己烷/Igepal C0-520(71:29, v/v)中以形成磷酸盐相。将40 μ L的含20mM 1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(美国Avanti极性脂质公司)的CHCl₃(美国飞世尔科技公司)添加到磷酸盐相中,并且然后将磷酸盐相逐滴添加到钙相中。在室温下将混合物搅拌10分钟,之后添加等体积的乙醇(美国Decon Labs公司)以分散微乳剂。通过以21,000g离心收集所产生的siRNA-CaPNP持续15分钟,并且然后用无水乙醇洗涤三次以去除残余油相。将因此获得的沉淀物悬浮于100 μ L的CHCl₃中。siRNA-CaP-L通过以下形成:将101的含siRNA-CaPNP的CHCl₃与1.41的20mM二甲基二十八烷基溴化铵(美国西格玛公司)、1.4 μ L的20mM胆固醇(美国西格玛公司)、2.8 μ L的20mM二硬脂酰基-rac-甘油-PEG2K(美国Avanti极性脂质公司)和0.7 μ L的含20mM 1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(美国西格玛公司)的CHCl₃混合,随后进行轻微的浴超声处理。然后通过减压去除CHCl₃,并且通过用100 μ L的PBS 1X(pH=7.2)水合来形成CaP-L。使用Zetasizer(英国马尔文ZS-90/马尔文公司)测量siRNA-CaP-L的流体动力学大小(表5)。材料能够敲低人细胞中的荧光素酶(作为模型蛋白)(图9A)并且发现其对细胞是安全的(图9B)。

[0376] 装载有脂质涂覆的CaP-L的siRNA/CpG(siRNA-CaP-L)的合成

[0377] 在油包水微乳剂中合成装载siRNA的磷酸钙纳米颗粒(siRNA-CaPNP)。简而言之,将5 μ g的siRNA(乱序siRNA)添加到60 μ L的2.5M CaCl₂(美国飞世尔科技公司)中。随后将上述溶液分散于4mL环己烷(美国西格玛公司)/Igepal C0-520(美国西格玛公司)(71:29, v/v)中以形成钙相。将60 μ L的12.5mM Na₂HPO₄(美国飞世尔科技公司)分散于另一4mL环己烷/Igepal C0-520(71:29, v/v)中以形成磷酸盐相。将40 μ L的含20mM 1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(美国Avanti极性脂质公司)的CHCl₃(美国飞世尔科技公司)添加到磷酸盐相中。然后将磷酸盐相逐滴添加到钙相中,并且将混合物在室温下搅拌10分钟。添加等体积的

乙醇(美国Decon Labs公司)以分散微乳剂,并且通过以21,000g离心收集因此获得的siRNA-CaPNP持续15分钟,并且然后用无水乙醇洗涤3次以去除残余油相。将所产生的沉淀物悬浮于100 μ L的CHCl₃中。siRNA/CaP-L通过以下形成:将10 μ L的含siRNA-CaPNP的CHCl₃与1.4 μ L的20mM二甲基二十八烷基溴化铵(美国西格玛公司)、1.4 μ L的20mM胆固醇(美国西格玛公司)、2.8 μ L的20mM二硬脂酰基-rac-甘油-PEG2K(美国Avanti极性脂质公司)和0.7 μ L的含20mM 1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(美国西格玛公司)的CHCl₃混合,随后进行轻微的浴超声处理。然后通过减压去除CHCl₃,并且通过用100 μ L的含有2 μ g CpG(CpG 7909/2006)的PBS 1X(pH=7.2)水合来形成siRNA/CpG-CaP-L。

[0378] 装载有脂质涂覆的CaPNP的mRNA/siRNA/CpG(mRNA/siRNA/CpG-CaP-L)的合成

[0379] 在油包水微乳剂中合成装载mRNA/siRNA的磷酸钙核(mRNA/siRNA-CaPNP)。将2.5 μ g的siRNA(乱序siRNA)和2.5 μ g的mRNA(萤火虫荧光素酶mRNA)添加到60 μ L的2.5M CaCl₂(美国飞世尔科技公司)中。随后将上述溶液分散于4mL环己烷/Igepal CO-520(美国西格玛公司)(71:29,v/v)中以形成钙相。将60 μ L的12.5mM Na₂HPO₄(美国飞世尔科技公司)分散于另一4mL环己烷/Igepal CO-520(71:29,v/v)中以形成磷酸盐相。将40 μ L的含20mM 1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(美国Avanti极性脂质公司)的CHCl₃(美国飞世尔科技公司)添加到磷酸盐相中。然后将磷酸盐相逐滴添加到钙相中。将混合物在室温下搅拌10分钟。添加等体积的乙醇(美国Decon Labs公司)以分散微乳剂。通过以21,000g离心收集mRNA/siRNA-CaPNP持续15分钟,并且然后用无水乙醇洗涤3次以去除残余油相。将沉淀物悬浮于100 μ L的CHCl₃中。mRNA/siRNA/CaP-L通过以下形成:将10 μ L的含mRNA/siRNA-CaPNP的CHCl₃与1.4 μ L的20mM二甲基二十八烷基溴化铵(美国西格玛公司)、1.4 μ L的20mM胆固醇(美国西格玛公司)、2.8 μ L的20mM二硬脂酰基-rac-甘油-PEG2K(美国Avanti极性脂质公司)和0.7 μ L的含20mM 1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(美国西格玛公司)的CHCl₃混合,随后进行轻微的浴超声处理。然后在减压下去除CHCl₃,并且通过用100 μ L的含有1 μ g CpG(CpG7909/2006)的PBS 1X(pH=7.2)水合来形成mRNA/siRNA/CpG-CaP-L。

[0380] 实例6.COVID-19疫苗(AIRISE-CoV)的免疫原性构建体

[0381] AIRISE-CoV合成和表征。AIRISE-CoV由涂覆有交联聚乙烯亚胺(PEI)和聚乙二醇(PEG)聚合物层的介孔二氧化硅纳米颗粒(MSNP,50nm)核组成。SARS-CoV-2刺突糖蛋白抗原(S)通过以下装载:与外部上的PEG缀合,这类似于之前工作中的抗体装载(恩甘切尔德拉库尔等人,先进功能材料,25(18):2646-2659,2015和美国专利申请公开第2017/0173169号),随后通过与PEI的静电相互作用装载CpG寡核苷酸和siRNA,并且通过PEG层保护其免于酶促降解。生物可还原交联允许使用小分子量PEI(10kDa)来实现siRNA或蛋白质内体逃逸到细胞溶质所需的大分子量PEI(25kDa)的功效而没有毒性。纳米颗粒平台因其在维持小粒径(约200nm)的同时装载和保护多种类型的货物(siRNA,CpG)的多功能性而用于癌症疫苗递送。在癌症疫苗应用中,不将抗原装载在构建体上,而是依赖于肿瘤内部的抗原(通过瘤内注射)来产生疫苗效果。AIRISE-CoV的最终组成为15% PEI、10% PEG(通过TGA)、3% 刺突蛋白(通过二喹啉甲酸测定(BCA))(全部按NP的重量计)。CpG和siRNA分别以按NP的重量计4%和2%装载(通过nanodrop确认的完全结合)。

[0382] 纳米颗粒上的siSTAT3和CpG有效促进DC激活。图10中示出,在足垫注射时,相较于递送单一组分的NP,装载有siSTAT3和CpG两者的NP可以更有效地激活引流淋巴结(DLN)中

的DC。与生理盐水相比,仅经AIRISE处理的小鼠示出引流淋巴结中的经激活的DC的比例显著更高($p < 0.05$)。在非引流淋巴结(NDLN)中似乎没有活性,表明DC引发的局部效应。用于定量免疫细胞群体的抗体染色方法遵循所公开的报告(恩甘切尔德拉库尔等人,先进材料(Advanced Material),2021;doi:10.1002/adma.202100628)。

[0383] 用AIRISE-CoV疫苗接种的小鼠中的SARS-CoV-2IgG抗体的存在。如图11所示,用AIRISE-CoV疫苗接种的BALB/c小鼠的血清中产生高水平的SARS-CoV-2结合IgG抗体,如通过ELISA中的端点滴度所评估的。端点滴度代表可检测到SARS-CoV-2结合抗体的血清稀释倍数,并且广泛用于评估体液免疫原性的诱导(抗体产生)。AIRISE-CoV在1个和2个剂量之后分别引发 10^5 和 10^6 的端点滴度(图11),这与其它先导COVID-19疫苗候选物相当或更好(表6)。

[0384] 在图12A中示出,高水平的IgG抗体在第一剂量之后维持在所有经免疫的小鼠中持续至多12周。另外,示出用两种免疫原性刺突肽(424-433和891-906,来自JPT肽技术公司(JPT Peptide Technologies))替换全长刺突蛋白抗原未引发显著的抗体滴度(图12B),这为使用全长刺突蛋白抗原提供了强有力的理论基础。两种肽通过静电相互作用装载在纳米构建体上。不受任何解释的束缚,两种肽不引发强烈的应答。然而,相同的NP先前已被证明用于有效的肽递送以触发抗原特异性免疫应答(例如,SF递送,图7)。

[0385] 发现通过足垫(图13,总共2个剂量)或肌肉(图14A,仅一个剂量)注射AIRISE-CoV的小鼠迄今为止仍具有持续高水平的抗体(即通过足垫施用途径达到54周,并且通过肌肉途径达到36周)。这表明抗体产生和体液免疫的诱导是持久的。

[0386] 表6. 先导COVID-19疫苗或疫苗候选物的抗体(Ab)应答

名称 (公司)	疫苗类型	人中的 Ab 滴度 (相对于恢复期)	小鼠中的 Ab 滴度 (端点滴度)
mRNA-1273 (莫德纳公司(Moderna))	编码 mRNA 的刺突 (S)蛋白	5.5 倍	约 10^5
ChAdOx1 nCoV-19 (阿斯利康公司/剑桥 (AstraZeneca/Oxford))	表达 S 蛋白的腺病 毒载体	类似	约 10^2 - 10^3
BNT162b1 (辉瑞/生物科技(Pfizer/BioNTech))	编码 mRNA 的三聚 体 S-RBD	约 2 至 5 倍	N/A
NVX-CoV2373 (诺瓦瓦克斯公司(Novavax))	具有三聚体 S 蛋白 的重组 NP	6 倍	约 10^5
INO-4800 (伊诺维奥公司(Inovio))	编码 S 蛋白的 DNA 疫苗	N/A	约 10^3

[0388] 具有刺突蛋白、siSTAT3和CpG的AIRISE-CoV被开发用于免疫抑制或免疫受损的受试者(例如老年受试者或患有导致其免疫系统受损的疾病和病状的受试者)的有效疫苗接种。然而,在被测的正常免疫小鼠中,发现涂覆有PEI和PEG的装载有单独的刺突蛋白、刺突蛋白和siSTAT3(图14B)或刺突蛋白和CpG(图14C)的介孔二氧化硅纳米颗粒(NP)也可以在这些小鼠中产生高且持久的抗体水平,表明与游离抗原(无np)相比,NP可以更有效地用于抗原递送以产生疫苗。如图14B-14C中所示,用一个剂量的装载siSTAT3的刺突-NP(图14B)或一个剂量的装载CpG的刺突-NP(图14C)进行的疫苗接种还可以引发高水平的持续至少36周的SARS-CoV-2IgG抗体。这进一步表明抗体产生和体液免疫的诱导是持久的。这可能由于

NP保护和保留货物并有效地将其递送到抗原呈递细胞的能力。

[0389] 通过免疫血清中和SARS-CoV-2假病毒。为了确定SARS-CoV-2特异性IgG抗体是否有效中和SARS-CoV-2, 构建假病毒(CoV2-S-PsV)中和测定, 所述测定是评估免疫血清抑制SARS-CoV-2假病毒转染表达人ACE2(刺突蛋白结合受体)的HEK293衍生的细胞系的能力的广泛使用的方法。所述测定利用通过SARS-CoV-2刺突蛋白(S)伪分型的复制缺陷型GFP编码报道基因慢病毒。因此, 中和能力由GFP+细胞%确定(即, 低GFP+%表明由于中和抗体的存在, 假病毒无法转染HEK293-hACE2细胞)。图15示出从用AIRISE-CoV疫苗接种的小鼠中获得的血清中的抗体滴度如何可以有效中和CoV2-S-PsV感染(即抑制与ACE2受体的结合), 而来自原初小鼠的血清没有此效应。此外, 发现两个剂量后的中和滴度(中和50%病毒所需的稀释度; NT₅₀) 高于在恢复期患者血清中发现的中和滴度或与其相当, 如表7所示。

[0390] 表7示出了来自图15的样品的中和滴度(中和50%病毒所需的稀释度; NT₅₀)。

[0391] 表7:

[0392]

血清样品	NT ₅₀
恢复期样品1	3.3×10^2
恢复期样品2	2.2×10^3
AIRISE-CoV M1(1个剂量)	5.74×10^1
AIRISE-CoV M2(1个剂量)	7.57×10^1
AIRISE-CoV M3(1个剂量)	3.02×10^2
AIRISE-CoV M1(2个剂量)	1.11×10^3
AIRISE-CoV M2(2个剂量)	6.09×10^3
AIRISE-CoV M3(2个剂量)	6.34×10^3

[0393] 实例7. 具有交联PEI和PEG的纳米颗粒(NP)对抗原呈递细胞而言是安全的。

[0394] 如图16所示, 本文所描述的装载有siSTAT3或siSTAT3+CpG的NP对骨髓源性树突细胞(BMDC, 图16A)和巨噬细胞(J774, 图16B)两者而言是安全的。NP剂量为35μg/ml(2wt.% siRNA; 7wt.% CpG)。遵循制造商的方案, 在处理2天后通过CellTiter-Glo测定评估活力。

[0395] 实例8. 装载mRNA的MSNP构建体的合成

[0396] 涂覆有交联PEI(MSNP-PEI)或交联PEI和PEG(MSNP-PEI-PEG)的介孔二氧化硅可以用于mRNA递送以产生疫苗。在室温下将MSNP-PEI或MSNP-PEI-PEG与萤火虫荧光素酶mRNA(1wt.%的纳米颗粒)在PBS中在轨道振荡器上以350rpm混合15-60分钟。mRNA与颗粒的外表面静电地结合。使用Zetasizer测量在与mRNA混合之前和之后的粒径(表8)。在使混合物离心之后获得含有未结合的mRNA的上清液。使用NanoDrop(ND-1000, 赛默飞世尔科技公司)分析上清液中的mRNA浓度。超过97%的mRNA与MSNP-PEI或MSNP-PEI-PEG结合。

[0397] 表8示出了装载有mRNA的纳米颗粒的流体动力学大小。

[0398] 表8:

[0399]

材料	Z-平均值(nm)	PDI
MSNP-PEI	100.7 ± 0.5	0.18 ± 0.01
MSNP-PEI-PEG	102.9 ± 1.8	0.16 ± 0.02
MSNP-PEI+1wt.%mRNA	222.9 ± 5.4	0.30 ± 0.04
MSNP-PEI-PEG+1wt.%mRNA	157.9 ± 2.2	0.35 ± 0.02

[0400] XV. 结尾段落

[0401] 如本领域普通技术人员将理解的,本文公开的每个实施例可以包括其特定陈述的要素、步骤、成分或组分、基本上由其组成或由其组成。因此,术语“包含(include)”或“包含(including)”应被解释为叙述:“包括、由...组成或基本上由...组成。”过渡术语“包括(comprise/comprises)”是指具有但不限于,并允许包含未指定的要素、步骤、成分或组分,即使是主要量。过渡性短语“由...组成”不包括任何未指定的要素、步骤、成分或组分。过渡短语“基本上由...组成”将实施例的范围限制为指定的要素、步骤、成分或组分,并且限制为不实质上影响实施例的要素、步骤、成分或组分。材料效应将产生如所述的纳米颗粒构建体/平台的活性(例如,免疫原性)的统计学显著变化。

[0402] 除非另有说明,否则说明书和权利要求书中使用的表示成分数量、性质(如分子量)、反应条件等的所有数字应理解为在所有情况下都被术语“约”修饰。因此,除非相反指出,否则说明书和所附权利要求中阐述的数值参数是可以根据本发明寻求获得的期望性质而变化的近似值。至少,并且并非试图将等同原则的应用限制于权利要求书的范围,每个数字参数至少应根据所报告的有效数字的数目并通过应用普通的舍入技术来解释。当需要进一步阐明时,术语“约”具有当与所述数值或范围结合使用时由本领域的技术人员合理地赋予其的含义,即表示稍微大于或稍微小于所述值或范围,在所述值的 $\pm 20\%$ 的范围内;在所述值的 $\pm 19\%$ 的范围内;在所述值的 $\pm 18\%$ 的范围内;在所述值的 $\pm 17\%$ 的范围内;在所述值的 $\pm 16\%$ 的范围内;在所述值的 $\pm 15\%$ 的范围内;在所述值的 $\pm 14\%$ 的范围内;在所述值的 $\pm 13\%$ 的范围内;在所述值的 $\pm 12\%$ 的范围内;在所述值的 $\pm 11\%$ 的范围内;在所述值的 $\pm 10\%$ 的范围内;在所述值的 $\pm 9\%$ 的范围内;在所述值的 $\pm 8\%$ 的范围内;在所述值的 $\pm 7\%$ 的范围内;在所述值的 $\pm 6\%$ 的范围内;在所述值的 $\pm 5\%$ 的范围内;在所述值的 $\pm 4\%$ 的范围内;在所述值的 $\pm 3\%$ 的范围内;在所述值的 $\pm 2\%$ 的范围内;或在所述值的 $\pm 1\%$ 的范围内。

[0403] 尽管阐述本发明的广泛范围的数值范围和参数是近似值,但具体实例中阐述的数值是尽可能精确地报告的。然而,任何数值固有地含有必然由其相应的测试测量中发现的标准偏差引起的某些误差。

[0404] 除非本文中另有所指或明显与上下文相矛盾,否则在描述本发明的上下文中(特别是在以下权利要求的上下文中)使用的术语“一个/一种(a/an)”和“所述(the)”以及类似的指代词应被解释为涵盖单数和复数两者。本文中对值的范围的叙述仅旨在充当一种单独指代落入所述范围内的每个单独的值的简化方法。除非本文另外指明,否则将每个单独的值并入本说明书中,就好像每个单独的值是在本文中单独引用的一样。除非本文中另外指明或明显与上下文相矛盾,否则本文所述的所有方法均可以以任何合适的顺序执行。除非另外要求,否则本文提供的任何和所有实例或示范性语言(例如,“如”)的使用仅旨在更好地说明本发明并且不对本发明的范围构成限制。说明书中的任何语言都不应当解释为指示任何未要求保护的要素为实践本发明所必需的。

[0405] 本文公开的本发明的替代性要素或实施例的分组不应被解释为限制。每个组成员可以被单独地或者以与所述组中的其它成员或本文发现的其它要素进行任何组合的方式被引用和保护。出于便利性和/或专利性的目的,预计组中的一或多个成员可以被包含在组中或从组中删除。当进行任何这种包含或删除时,将说明书视为含有修改后的组,从而满足

在所附权利要求中使用的所有马库什组的书面描述。

[0406] 本文描述了本发明的某些实施例,包含诸位发明人已知的用于执行本发明的最佳模式。当然,对于本领域普通技术人员来说,在阅读前述描述后,这些描述的实施例的变型将变得清楚。发明人期望熟练的技术人员在适当时采用这些变化,并且诸位发明人的意图是以与本文具体描述的方式不同的方式来实践本发明。因此,在适用法律允许的情况下,本发明包含对所附权利要求书所叙述的主题的所有修改和等效物。此外,本发明涵盖以上描述的要素在其所有可能的变体中的任意组合,除非另外在本文中指出或另外明确地与上下文相矛盾。

[0407] 此外,本说明书中对专利、印刷出版物、杂志文章、其它书面文本和网站内容(本文中的参考资料)进行了大量参考。自包含具体参考的优先权链中的第一申请的提交日起,每个参考材料单独以全文引用的方式并入本文中,以供参考教学之用。例如,关于在公共数据库中可用的本文所引用的化合物和核酸或氨基酸序列,自数据库标识符首先包含在优先权链中的应用的文本中的日期起,本文以引用方式并入所引用的数据库条目中的信息。

[0408] 应当理解,本文公开的本发明的实施例是对本发明原理的说明。可以采用的其它修改也在本发明的范围内。因此,作为实例而非限制,根据本文的教导,可以利用本发明的替代性配置。因此,本发明不限于精确地如所示出和描述的那样。

[0409] 本文示出的细节仅作为实例,并且仅用于本发明的优选实施例的说明性讨论,并且是为了提供被认为是对本发明的各个实施例的原理和概念方面最有用和最容易理解的描述而呈现的。在此方面,并未试图以比对基本理解本发明所需的细节更详细地示出了本发明的结构细节,结合附图和/或实例进行的描述使得本领域技术人员清楚如何可以将本发明的若干种形式体现在实践中。

[0410] 除非在实例中明确地修改,或者当含义的应用使任何构造无意义或基本上无意义时,本公开中使用的定义和解释意在并旨在控制任何未来的构造。如果术语的构造会使其无意义或本质上无意义,则定义应取自韦氏词典(Webster's Dictionary)第11版或本领域普通技术人员已知的词典,如牛津生物化学和分子生物学词典(Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology)第2版(安东尼·史密斯(Anthony Smith)编辑,牛津的牛津大学出版社(Oxford University Press,Oxford),2006)和/或化学词典(A Dictionary of Chemistry),第8版(J.劳(Law)和R.伦尼(Rennie)编辑,牛津大学出版社,2020)。

序列表

<110> 俄勒冈健康与科学大学(Oregon Health & Science University)
PDX制药公司(PDX Pharmaceuticals, Inc.)

<120> 用于诱导免疫应答的免疫原性构建体、组合物和方法

<130> 0046-0041PCT

<150> US 63/051,351

<151> 2020-07-13

<160> 91

<170> PatentIn 3.5版

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> SARS-CoV-2

<400> 1

Lys Leu Pro Asp Asp Phe Thr Gly Cys Val
1 5 10

[0001]

<210> 2

<211> 15

<212> PRT

<213> SARS-CoV-2

<400> 2

Ser Gln Ser Ile Ile Ala Tyr Thr Met Ser Leu Gly Ala Glu Asn
1 5 10 15

<210> 3

<211> 15

<212> PRT

<213> SARS-CoV-2

<400> 3

Ile Pro Thr Asn Phe Thr Ile Ser Val Thr Thr Glu Ile Leu Pro
1 5 10 15

<210> 4

<211> 23

<212> PRT

<213> SARS-CoV-2

<400> 4

Phe Gly Ala Gly Ala Ala Leu Gln Ile Pro Phe Ala Met Gln Met Ala

	ggaucuagaa cagaaaaug	19
	<210> 10	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 智人(Homo sapiens)	
	<400> 10	
	cauuuucugu ucuagaucc	19
	<210> 11	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 小家鼠(Mus musculus)	
	<400> 11	
	cccacauaaa aaacaguug	19
	<210> 12	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 小家鼠(Mus musculus)	
[0003]	<400> 12	
	caacuguuuu uuauguggg	19
	<210> 13	
	<211> 25	
	<212> RNA	
	<213> 智人(Homo sapiens)	
	<400> 13	
	ccuacuggca uuugcugaac gcauu	25
	<210> 14	
	<211> 25	
	<212> RNA	
	<213> 智人(Homo sapiens)	
	<400> 14	
	aaugcguuca gcaaaugcca guagg	25
	<210> 15	
	<211> 25	
	<212> RNA	
	<213> 智人(Homo sapiens)	
	<400> 15	
	cccuccugca ucauugcuuu cauuu	25

	<210> 16	
	<211> 25	
	<212> RNA	
	<213> 智人(Homo sapiens)	
	<400> 16	
	aaaugaaagc aaugaugcag gaggg	25
	<210> 17	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 小家鼠(Mus musculus)	
	<400> 17	
	ccucugaagu ucuaauuaa	19
	<210> 18	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 小家鼠(Mus musculus)	
	<400> 18	
	ucggagacuu caagauuaa u	21
[0004]	<210> 19	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 小家鼠(Mus musculus)	
	<400> 19	
	gggcuucuuc cugucucu	19
	<210> 20	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 小家鼠(Mus musculus)	
	<400> 20	
	agagacgagg aagaagccc	19
	<210> 21	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 智人(Homo sapiens)	
	<400> 21	
	ccgugaguuu guccuuuca	19
	<210> 22	
	<211> 19	
	<212> RNA	

	<213> 智人(Homo sapiens)	
	<400> 22 ugaaaggaca aacucacgg	19
	<210> 23 <211> 17 <212> RNA <213> 智人(Homo sapiens)	
	<400> 23 cacuuccgca cauuccg	17
	<210> 24 <211> 19 <212> RNA <213> 智人(Homo sapiens)	
	<400> 24 cugggaugcc guguuauuu	19
	<210> 25 <211> 21 <212> RNA <213> 智人(Homo sapiens)	
[0005]	<400> 25 acuaccugag cuccuucccc u	21
	<210> 26 <211> 21 <212> RNA <213> 智人(Homo sapiens)	
	<400> 26 gcauccgcu gcacuuuau u	21
	<210> 27 <211> 21 <212> RNA <213> 智人(Homo sapiens)	
	<400> 27 aaugaaagug cacgcggaug c	21
	<210> 28 <211> 23 <212> RNA <213> 小家鼠(Mus musculus)	
	<400> 28	

	gagcccuccu cguccucguc uuc	23
	<210> 29	
	<211> 23	
	<212> RNA	
	<213> 小家鼠(Mus musculus)	
	<400> 29	
	gaagacgagg acgaggaggg cuc	23
	<210> 30	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 小家鼠(Mus musculus)	
	<400> 30	
	aaucaagugu ggagcaacau u	21
	<210> 31	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 小家鼠(Mus musculus)	
[0006]	<400> 31	
	uguugcucca cacuugauuu u	21
	<210> 32	
	<211> 25	
	<212> RNA	
	<213> 智人(Homo sapiens)	
	<400> 32	
	gacaucuaug caaugggcuu aguau	25
	<210> 33	
	<211> 25	
	<212> RNA	
	<213> 智人(Homo sapiens)	
	<400> 33	
	gcaucucacu cauguugaug gucua	25
	<210> 34	
	<211> 25	
	<212> RNA	
	<213> 智人(Homo sapiens)	
	<400> 34	
	aguaagacau gauucagcca cagau	25

	<210> 35	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 小家鼠(Mus musculus)	
	<400> 35	
	agaauaucuu ggugaagaa	19
	<210> 36	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 小家鼠(Mus musculus)	
	<400> 36	
	uucuucacca agauauucu	19
	<210> 37	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 智人(Homo sapiens)	
	<400> 37	
	gaccucaaga gcuccaaua	19
[0007]	<210> 38	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 智人(Homo sapiens)	
	<400> 38	
	uauuggagcu cuugagguc	19
	<210> 39	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 智人(Homo sapiens)	
	<400> 39	
	cgacaugaua gucacugac	19
	<210> 40	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 智人(Homo sapiens)	
	<400> 40	
	gucagugacu aucaugucg	19
	<210> 41	
	<211> 21	
	<212> RNA	

	<213> 小家鼠(Mus musculus)	
	<400> 41 aauaagcucc aagagaaagg c	21
	<210> 42 <211> 18 <212> RNA <213> 智人(Homo sapiens)	
	<400> 42 uuauaagcu ccagagaa	18
	<210> 43 <211> 19 <212> RNA <213> 智人(Homo sapiens)	
	<400> 43 uggaggacuu uaaggguaa	19
	<210> 44 <211> 19 <212> RNA <213> 智人(Homo sapiens)	
[0008]	<400> 44 cauagaagcc uacaugaca	19
	<210> 45 <211> 19 <212> RNA <213> 智人(Homo sapiens)	
	<400> 45 ucacggcgcgu gucaucgau	19
	<210> 46 <211> 19 <212> RNA <213> 小家鼠(Mus musculus)	
	<400> 46 ccugagcauc uuagucaua	19
	<210> 47 <211> 19 <212> RNA <213> 小家鼠(Mus musculus)	
	<400> 47	

	uaugacuaag augcucagg	19
	<210> 48	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 智人(Homo sapiens)	
	<400> 48	
	ggacuggacc caucuuuca	19
	<210> 49	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 智人(Homo sapiens)	
	<400> 49	
	gggcggagac cacaguuug	19
	<210> 50	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 智人(Homo sapiens)	
[0009]	<400> 50	
	gggcuacucu caggauuag	19
	<210> 51	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 智人(Homo sapiens)	
	<400> 51	
	gaaguaacuc gaacaguga	19
	<210> 52	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 智人(Homo sapiens)	
	<400> 52	
	cgccaacacc aucgugugca a	21
	<210> 53	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 智人(Homo sapiens)	
	<400> 53	
	cgccagcaac cugaaucuca a	21

	<210> 54	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 小家鼠(Mus musculus)	
	<400> 54	
	accugugccu acacuucaa	19
	<210> 55	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 智人(Homo sapiens)	
	<400> 55	
	ccucgcaugc ugaucaaa	19
	<210> 56	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 小家鼠(Mus musculus)	
	<400> 56	
	gauguugccu uccacuuua	19
[0010]	<210> 57	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 小家鼠(Mus musculus)	
	<400> 57	
	uaaaguggaa ggcaacauc	19
	<210> 58	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 小家鼠(Mus musculus)	
	<400> 58	
	gcagacagcu uuucgcuua	19
	<210> 59	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 小家鼠(Mus musculus)	
	<400> 59	
	uaagcgaaaa gcugucugc	19
	<210> 60	
	<211> 19	
	<212> RNA	

	<213> 小家鼠(Mus musculus)	
	<400> 60	
	ggucaacgau gcucaccua	19
	<210> 61	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 小家鼠(Mus musculus)	
	<400> 61	
	uaggugagca ucguugacc	19
	<210> 62	
	<211> 66	
	<212> RNA	
	<213> 智人(Homo sapiens)	
	<400> 62	
	gaucgccguau gagcguuagg acacuuugau auccgagugu ccuaacgcuc aaacuuiuuu	60
	uccaaa	66
[0011]	<210> 63	
	<211> 65	
	<212> RNA	
	<213> 智人(Homo sapiens)	
	<400> 63	
	ggcauacucg caauccugug aaacuauagg cucacaggau ugcgaguauug aaaaaagguu	60
	uucga	65
	<210> 64	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 小家鼠(Mus musculus)	
	<400> 64	
	agucggaggc uuaauuaca	19
	<210> 65	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 小家鼠(Mus musculus)	
	<400> 65	
	caggaauiuu gccuauuga	19
	<210> 66	
	<211> 19	

	<212> RNA		
	<213> 小家鼠(Mus musculus)		
	<400> 66		
	uaaggaccaa gaccaucca		19
	<210> 67		
	<211> 25		
	<212> RNA		
	<213> 智人(Homo sapiens)		
	<400> 67		
	gggagacacu ccaucacagu cacua		25
	<210> 68		
	<211> 25		
	<212> RNA		
	<213> 智人(Homo sapiens)		
	<400> 68		
	uagugacugu gauggagugu cuccc		25
	<210> 69		
	<211> 19		
[0012]	<212> RNA		
	<213> 智人(Homo sapiens)		
	<400> 69		
	cggcauguga ggaucaaaa		19
	<210> 70		
	<211> 19		
	<212> RNA		
	<213> 智人(Homo sapiens)		
	<400> 70		
	uuuugauccu cacaugccg		19
	<210> 71		
	<211> 19		
	<212> RNA		
	<213> 智人(Homo sapiens)		
	<400> 71		
	gcgggaugac uuuccaaga		19
	<210> 72		
	<211> 19		
	<212> RNA		
	<213> 智人(Homo sapiens)		

	<400> 72 ucuuggaaag ucauccgc	19
	<210> 73 <211> 19 <212> RNA <213> 智人(Homo sapiens)	
	<400> 73 gcuaucgaau uugucaacc	19
	<210> 74 <211> 18 <212> RNA <213> 智人(Homo sapiens)	
	<400> 74 gguugacaaa uucgauag	18
	<210> 75 <211> 25 <212> RNA <213> 小家鼠(Mus musculus)	
[0013]	<400> 75 uuucaaagac cucuggaucu ugacc	25
	<210> 76 <211> 19 <212> RNA <213> 小家鼠(Mus musculus)	
	<400> 76 ugccuacgaa cucuucacc	19
	<210> 77 <211> 19 <212> RNA <213> 小家鼠(Mus musculus)	
	<400> 77 ggugaagagu ucguaggca	19
	<210> 78 <211> 19 <212> RNA <213> 智人(Homo sapiens)	
	<400> 78 gcuucguggu cgacuucau	19

	<210> 79	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 小家鼠(Mus musculus)	
	<400> 79	
	uauggagcug cagaggaug	19
	<210> 80	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 小家鼠(Mus musculus)	
	<400> 80	
	cauccucugc agcuccaau	19
	<210> 81	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 智人(Homo sapiens)	
	<400> 81	
	ccaucauggg cuggacauu	19
[0014]	<210> 82	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 智人(Homo sapiens)	
	<400> 82	
	gcaaccuucu gauguaagu	19
	<210> 83	
	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> 智人(Homo sapiens)	
	<400> 83	
	cuaccuccu acagacaga	19
	<210> 84	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 小家鼠(Mus musculus)	
	<400> 84	
	ggguguuugc aaaugauuau u	21
	<210> 85	
	<211> 21	

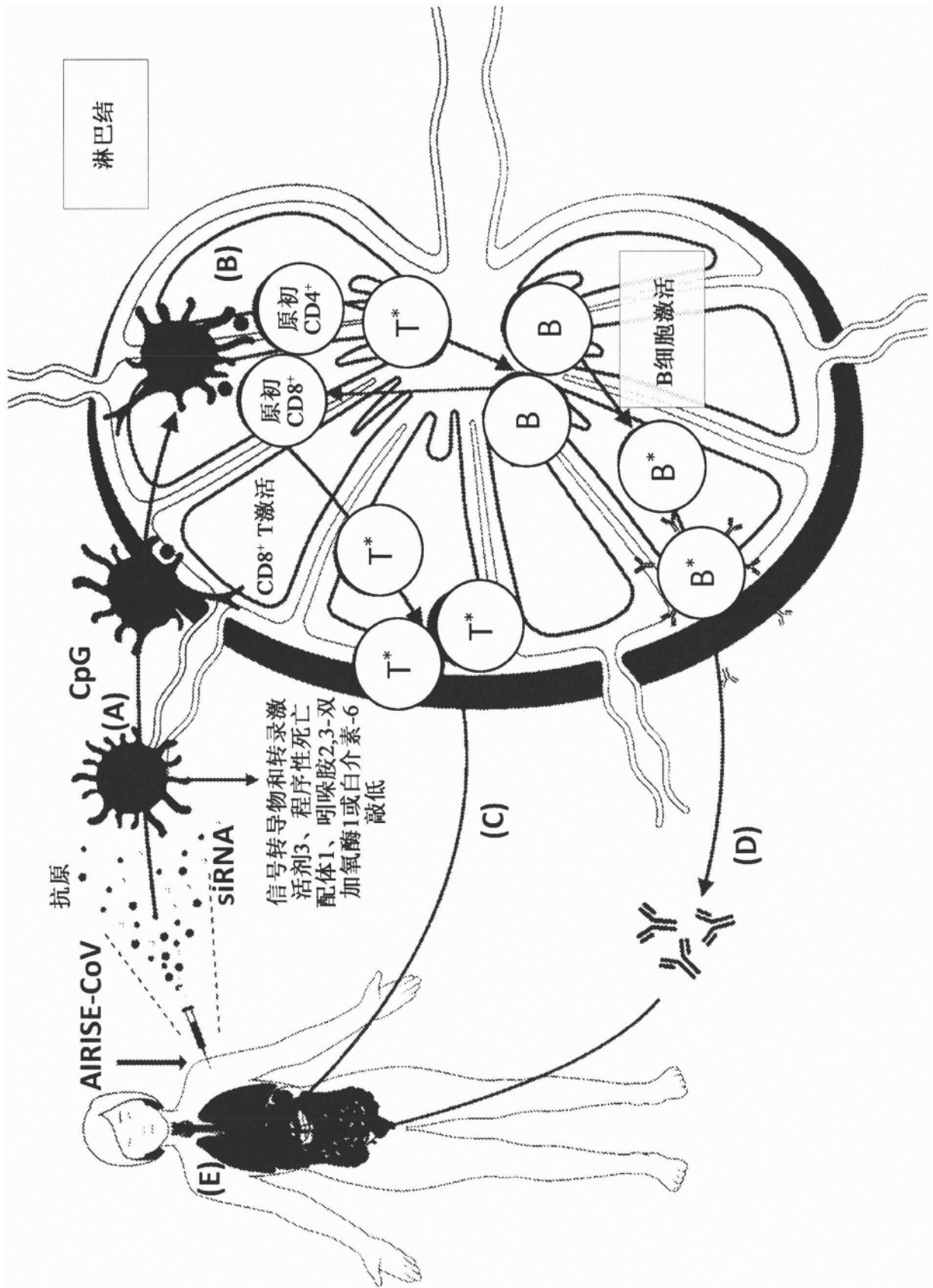


图1

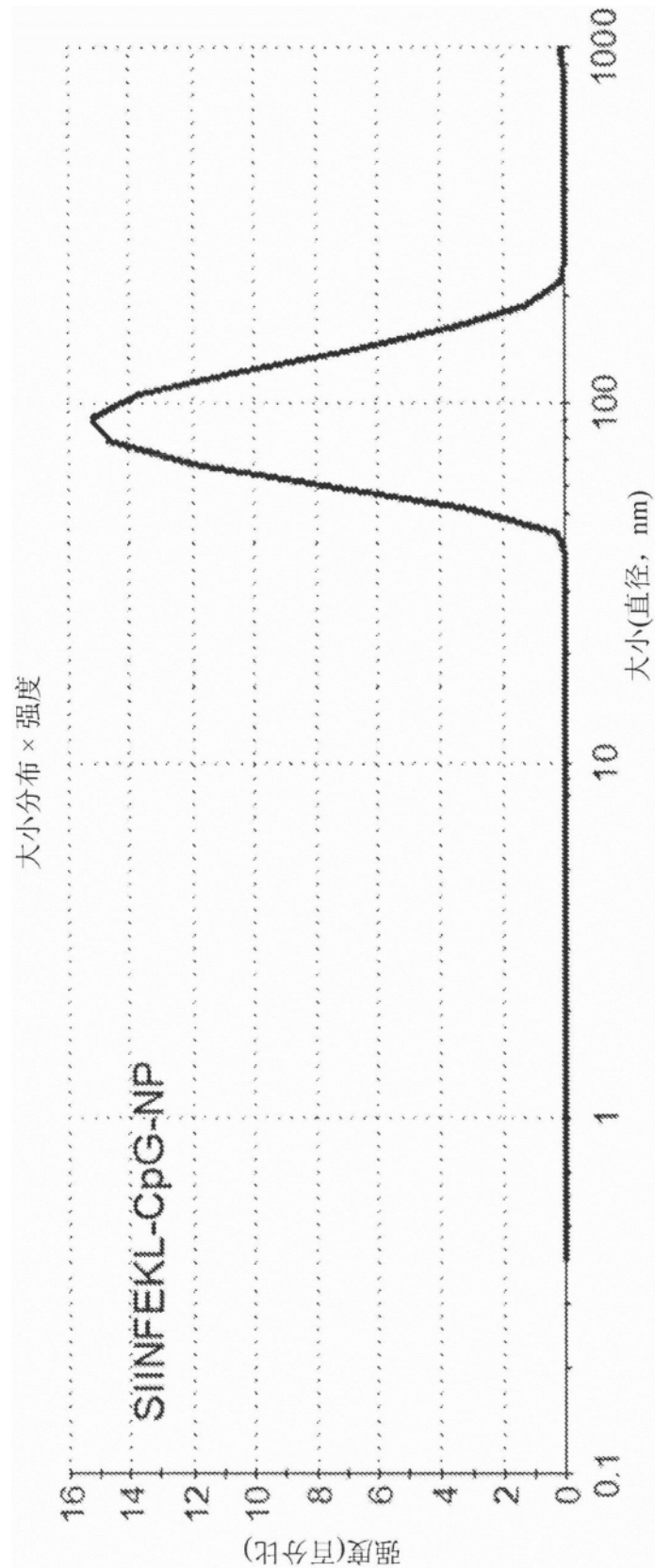


图2

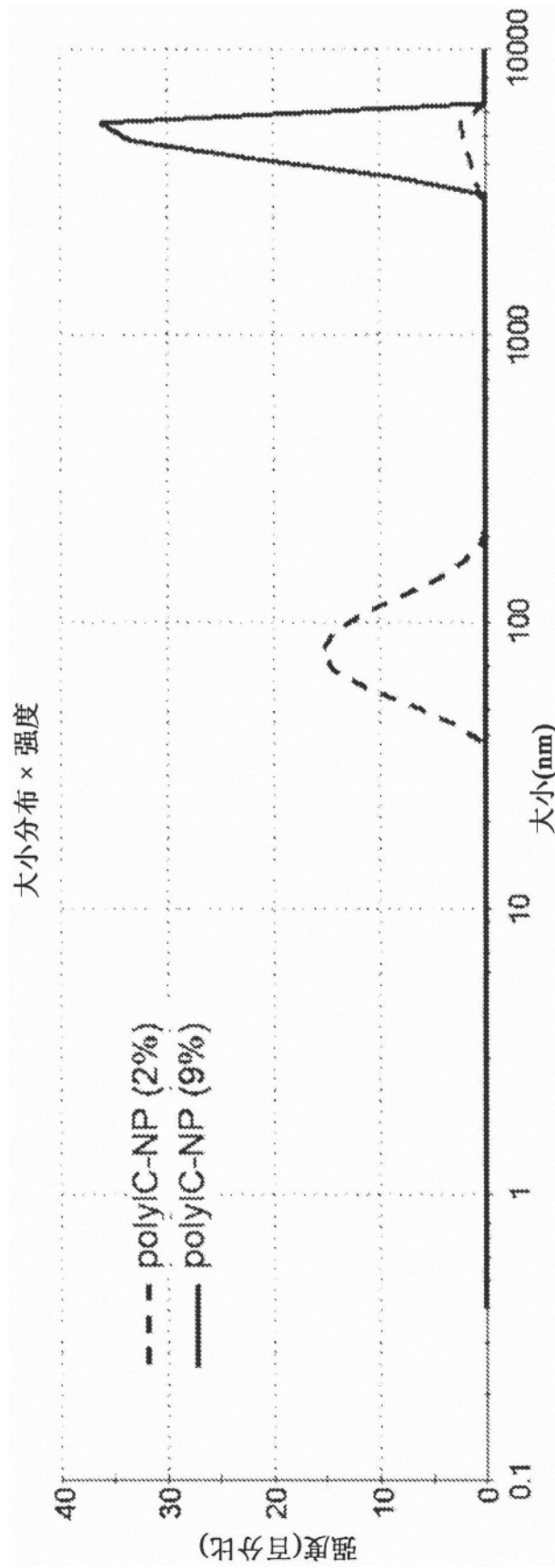


图3

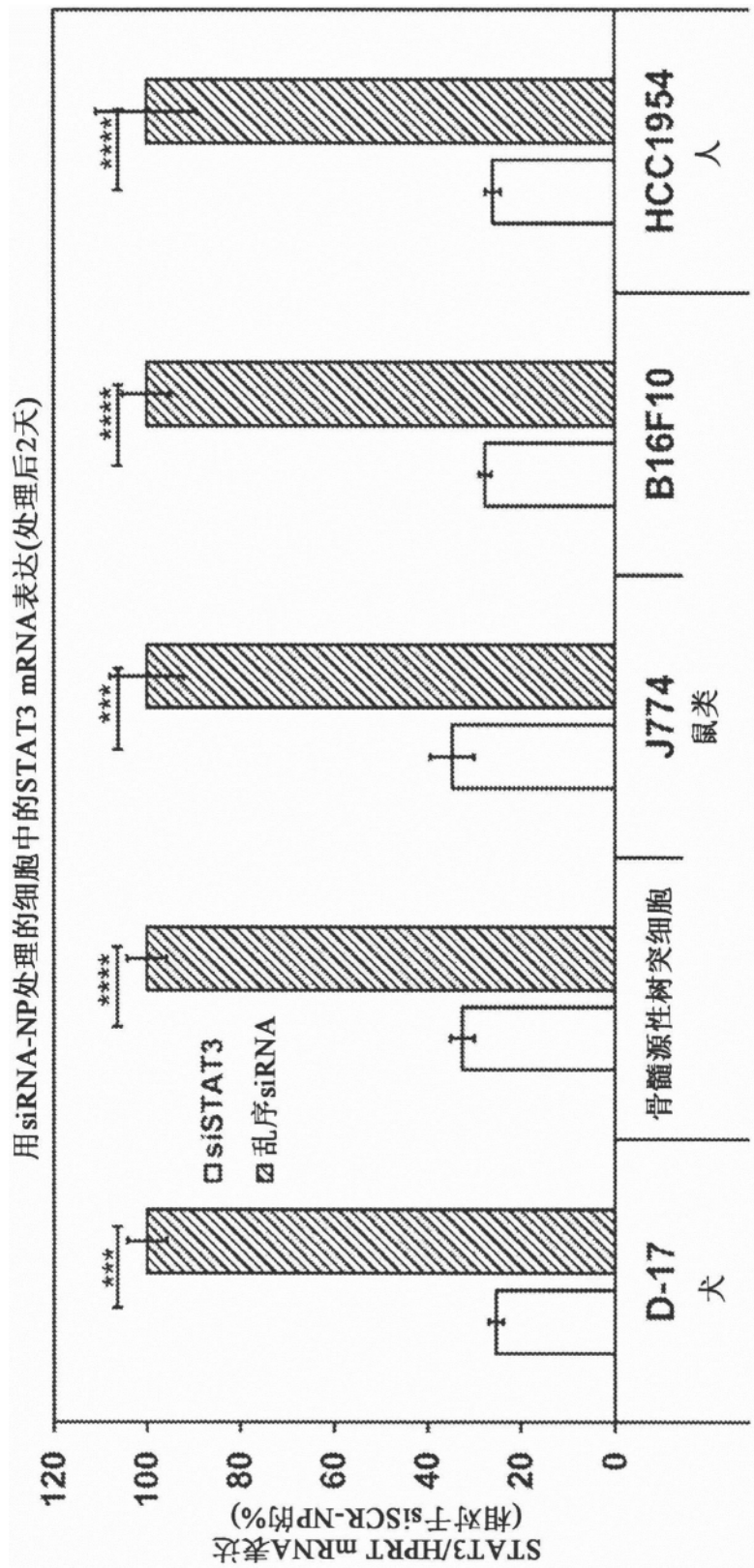


图4A

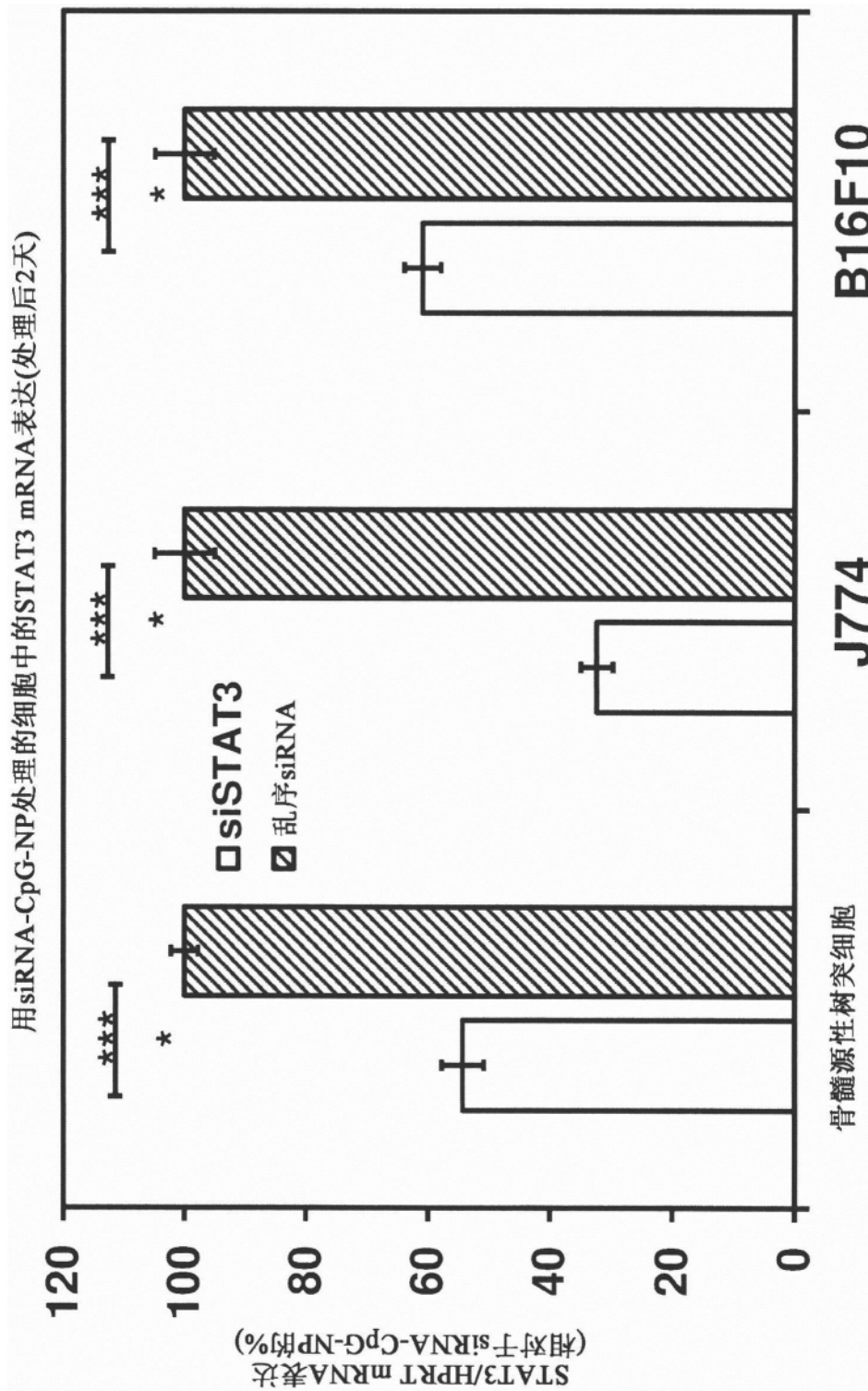


图4B

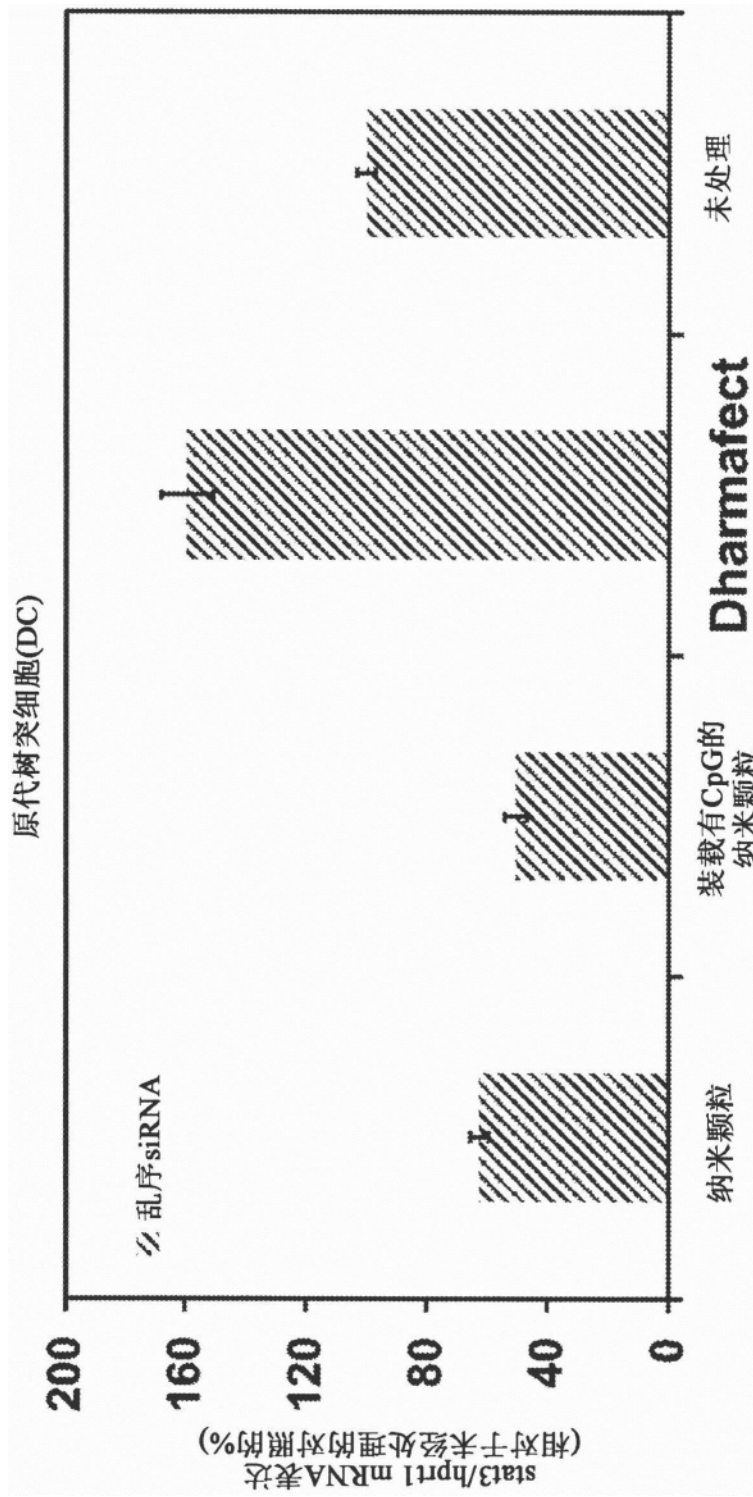


图4C

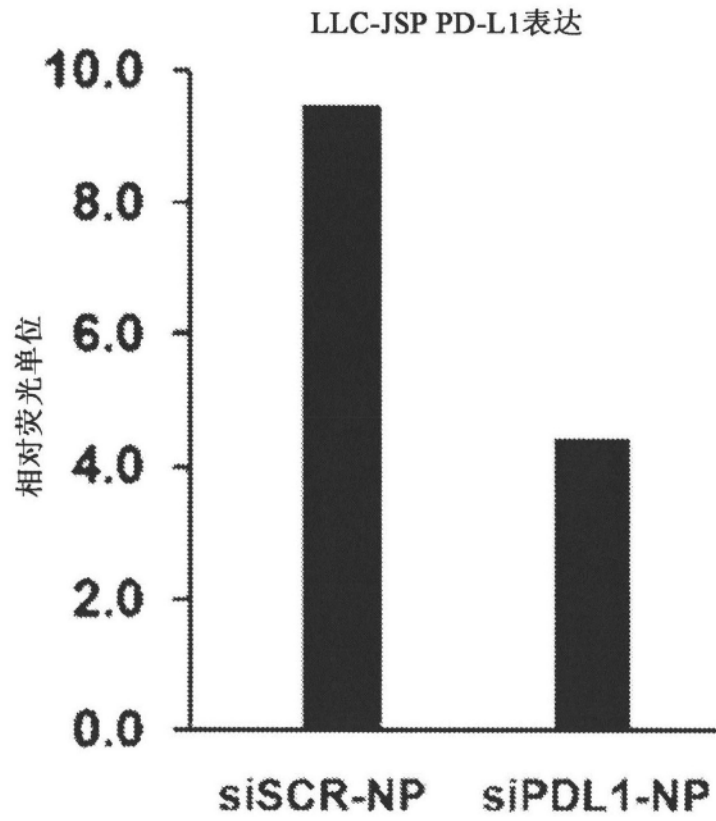


图4D

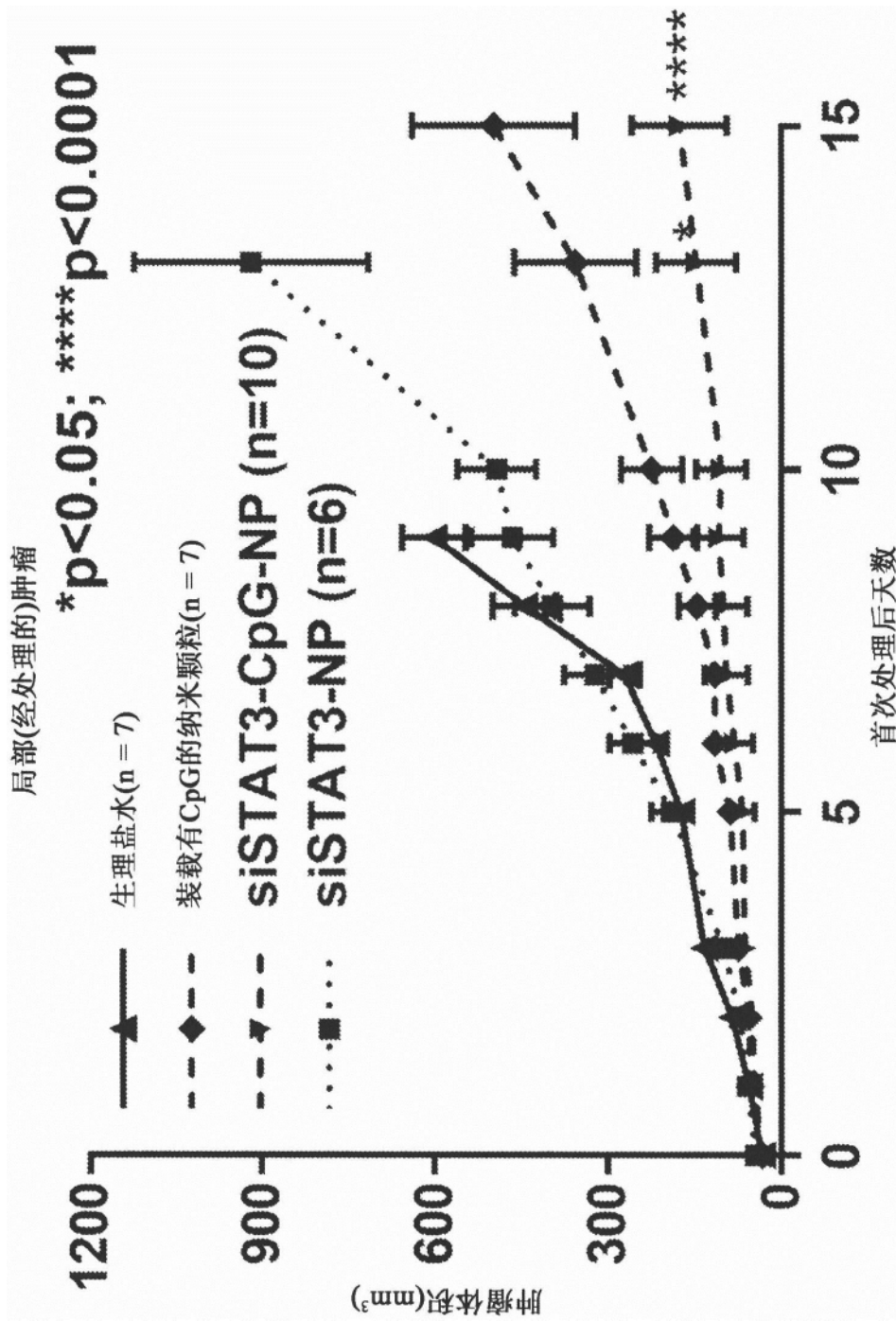


图5A

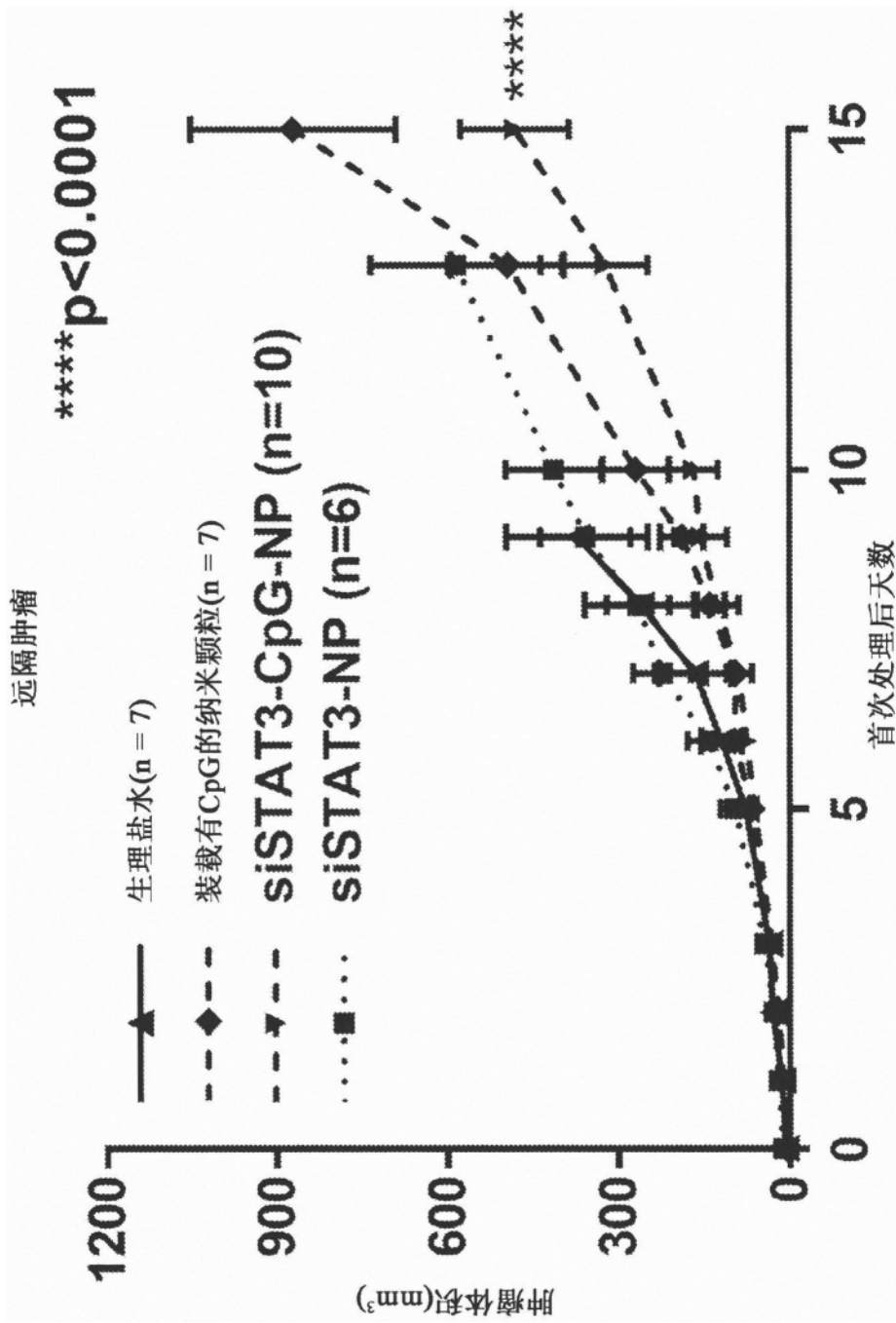


图5B

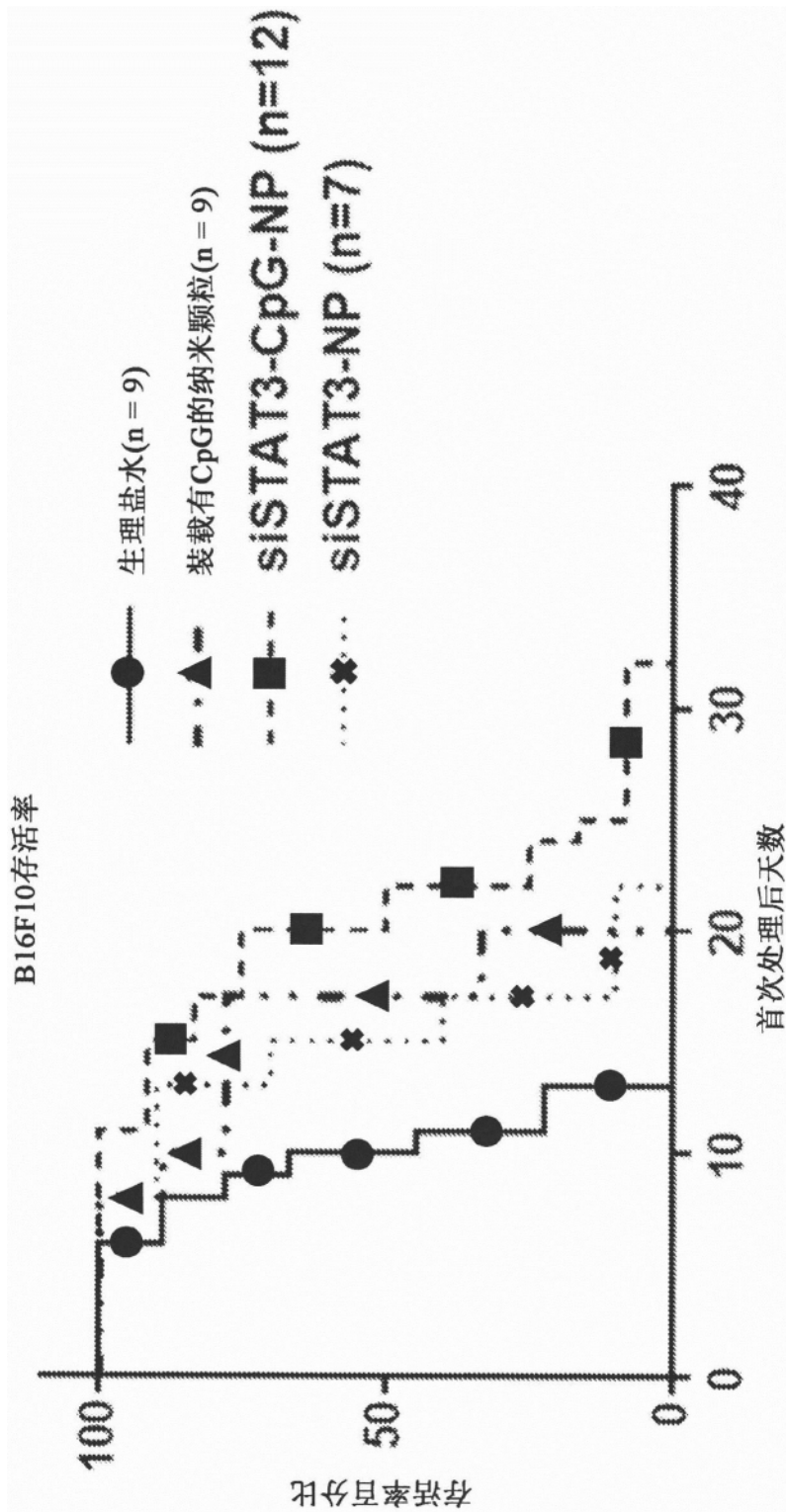


图5C

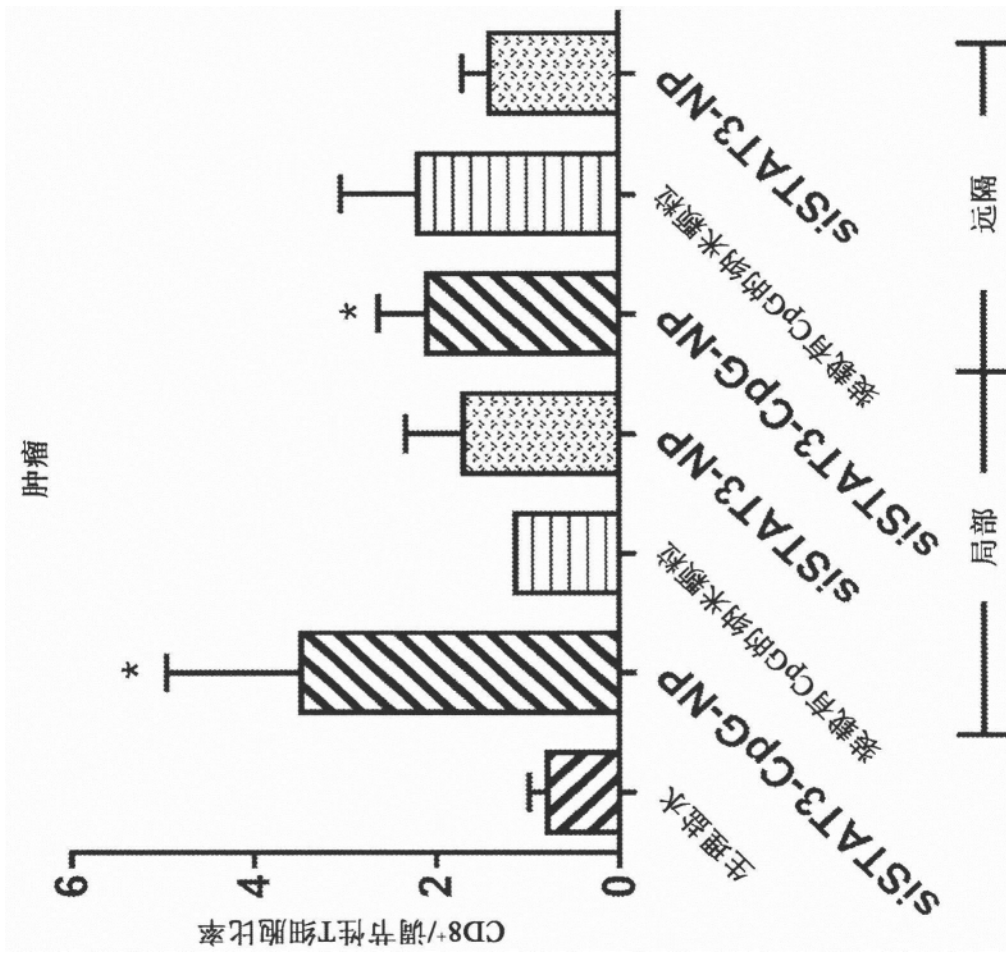


图6A

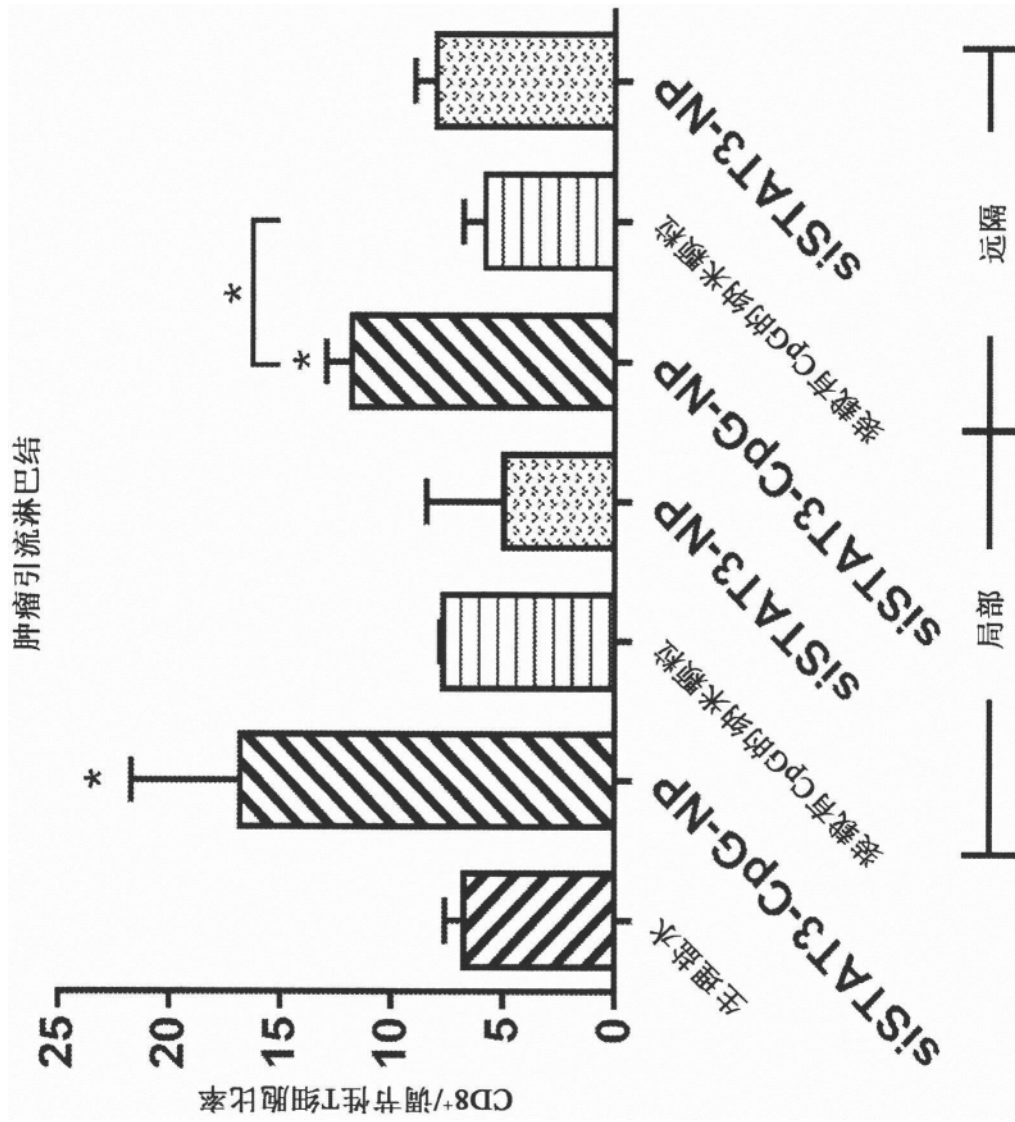


图6B

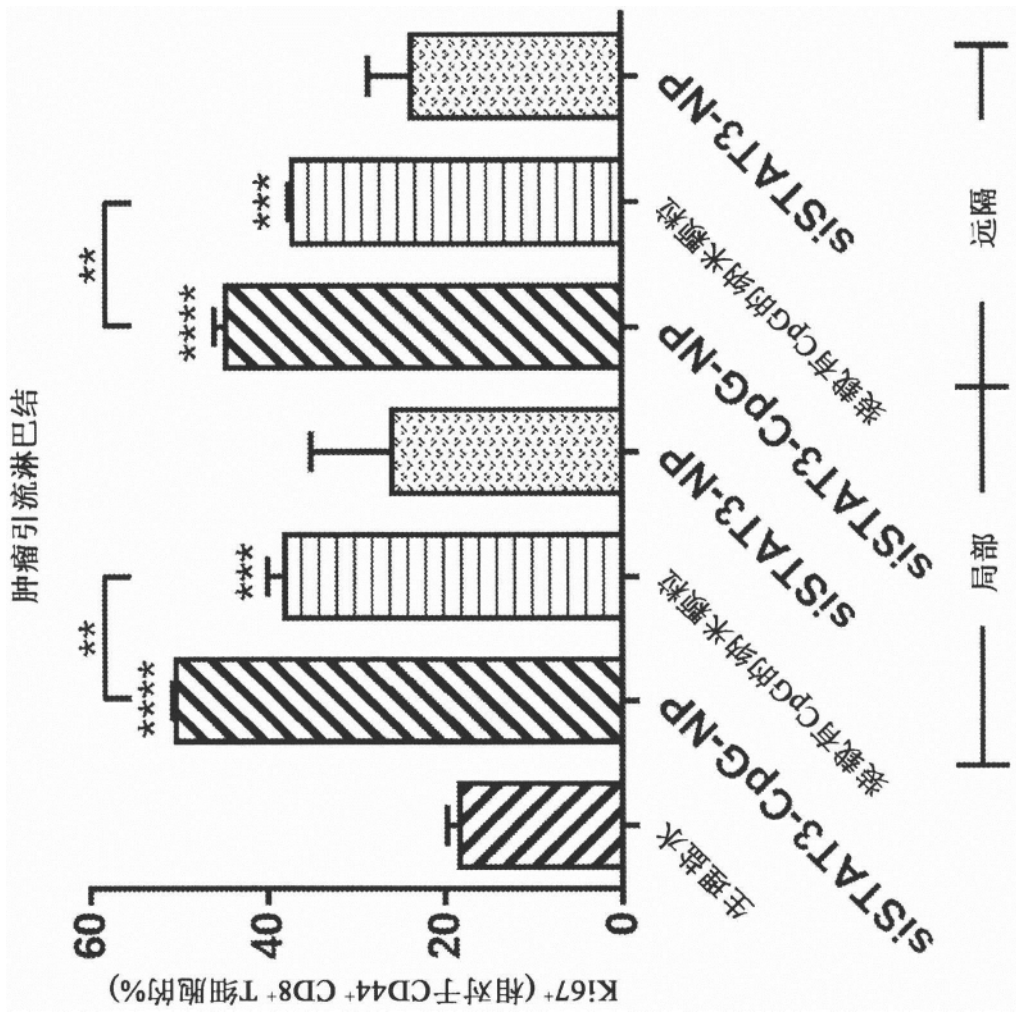


图6C

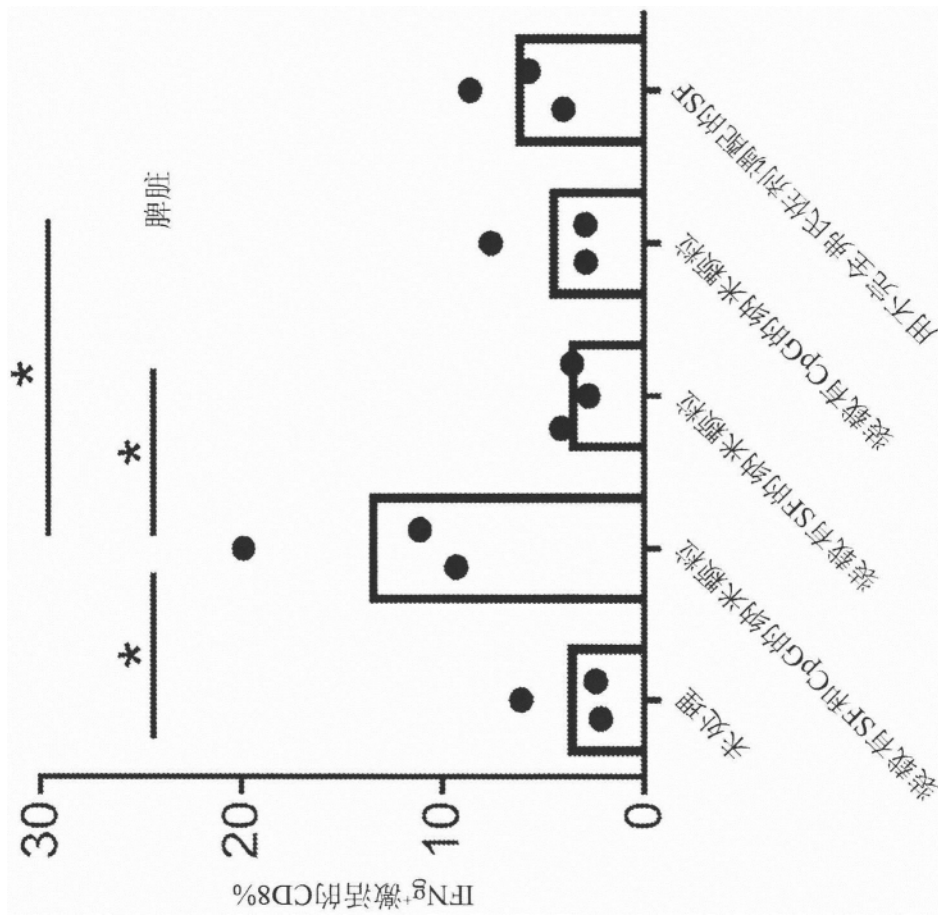


图7

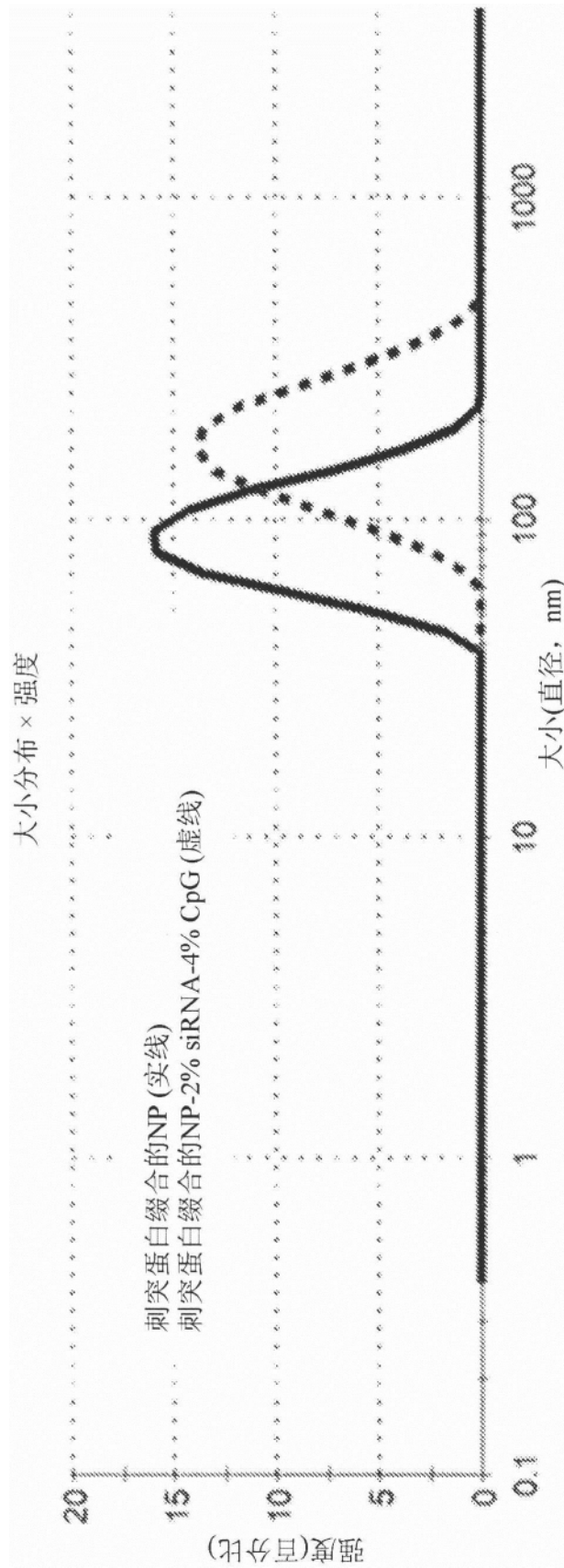


图8A

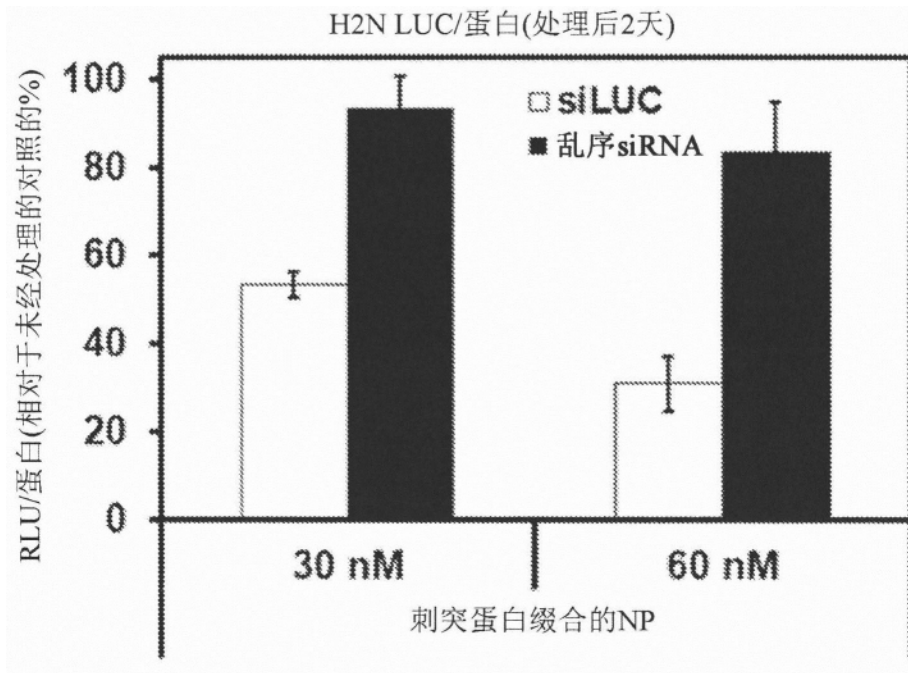


图8B

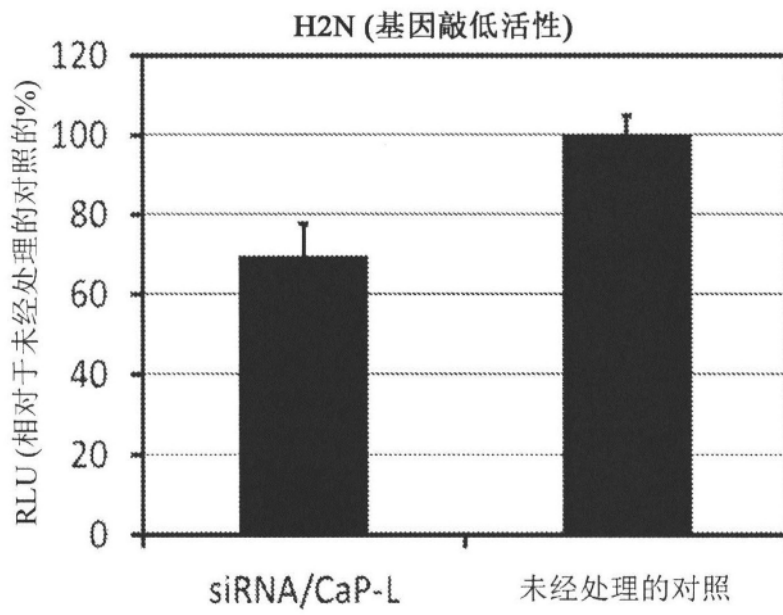


图9A

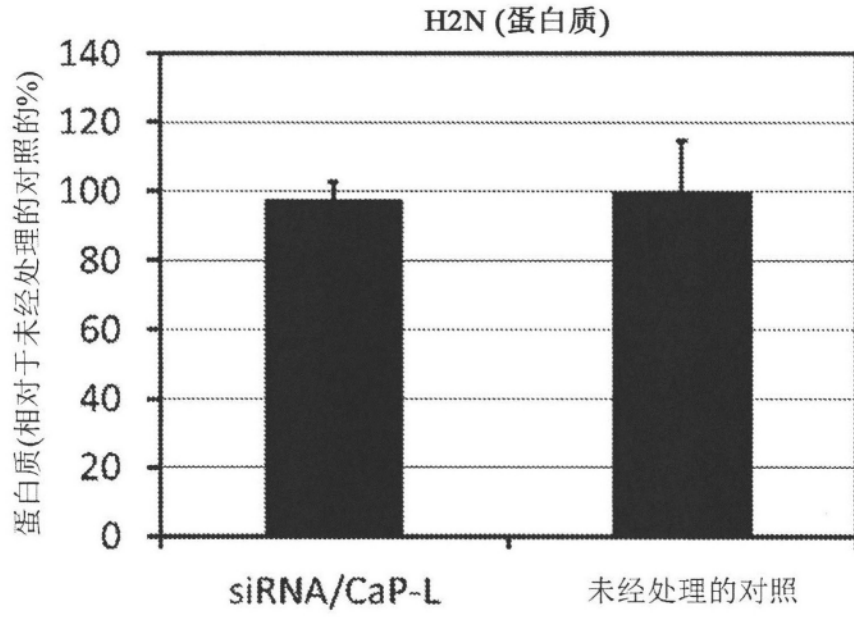


图9B

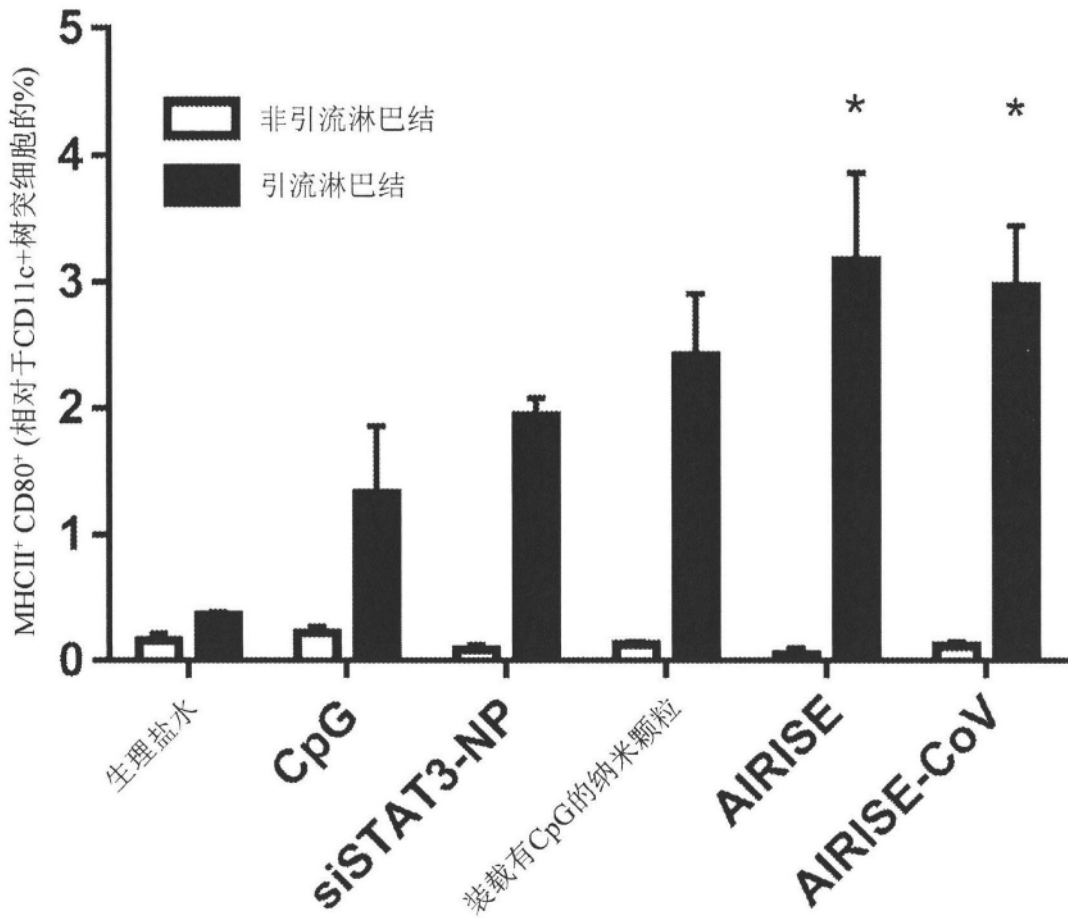


图10

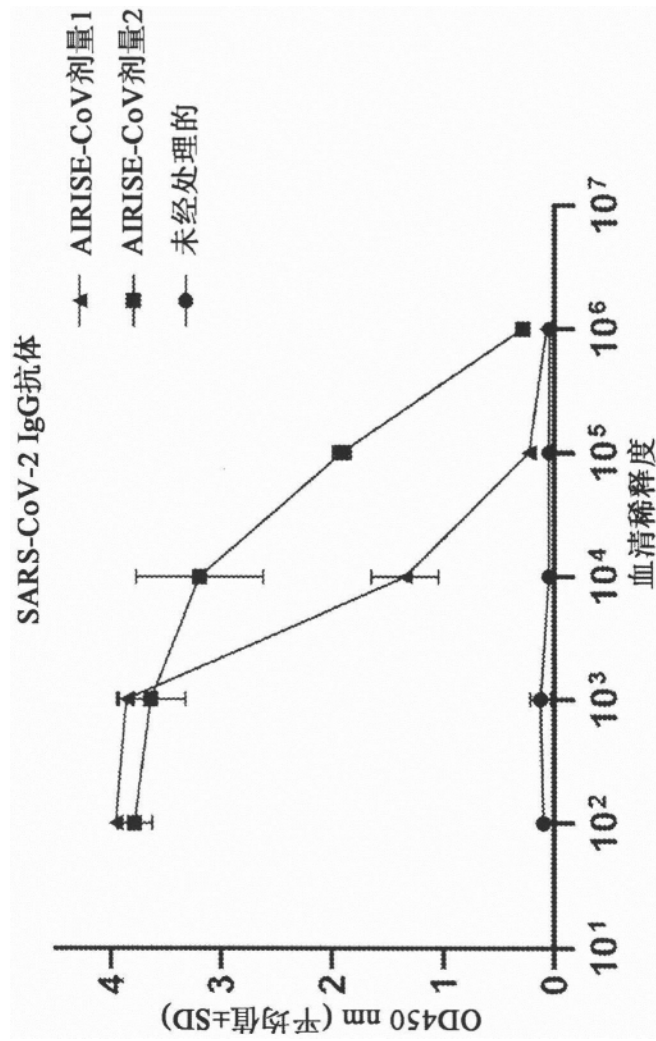


图11

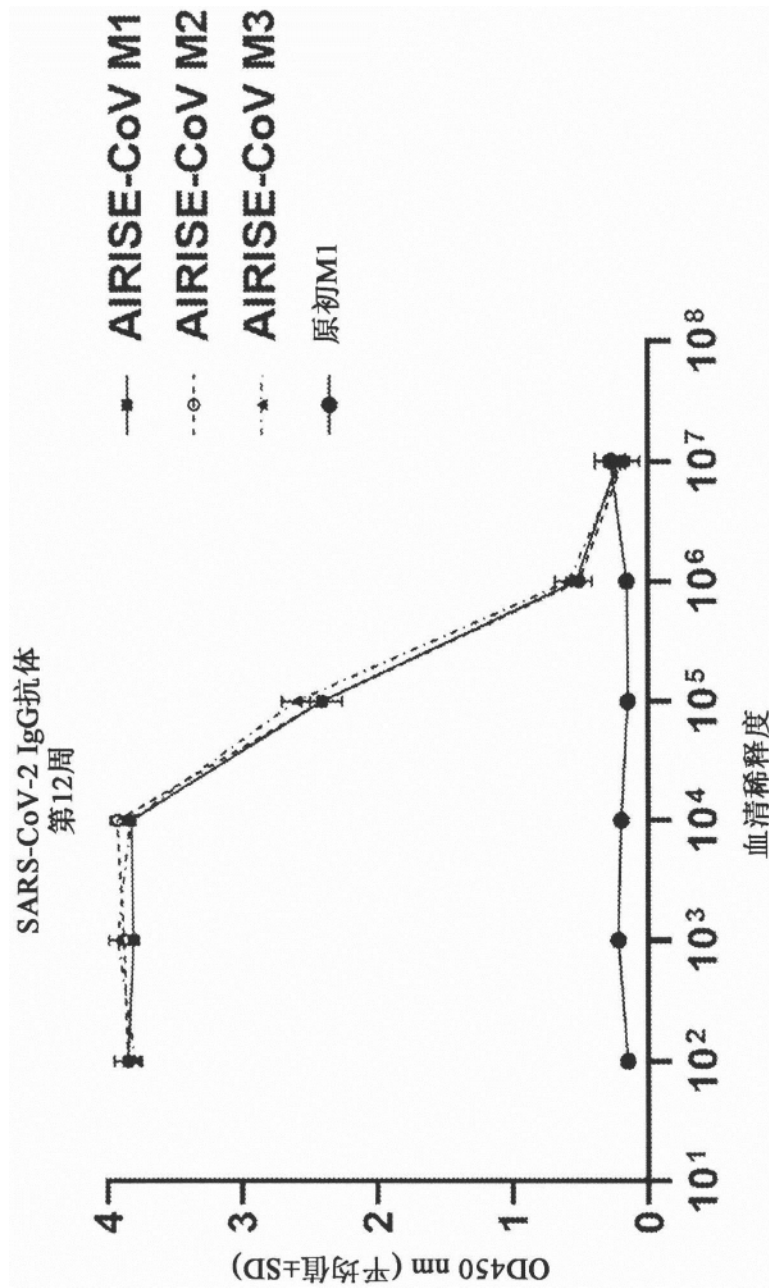


图12A

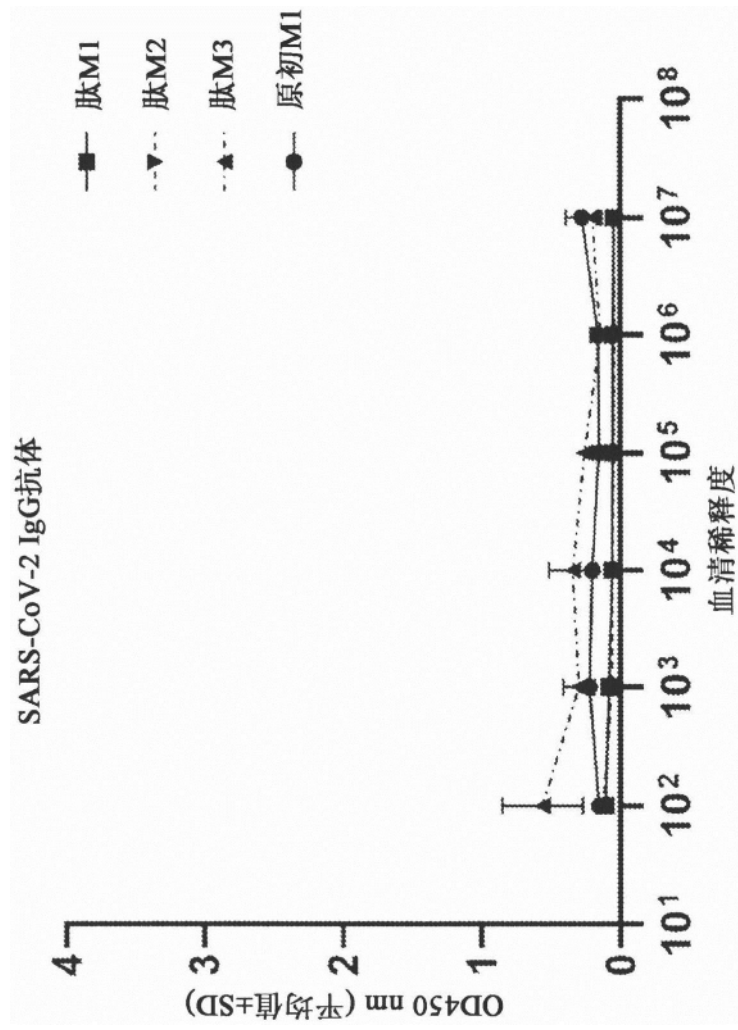


图12B

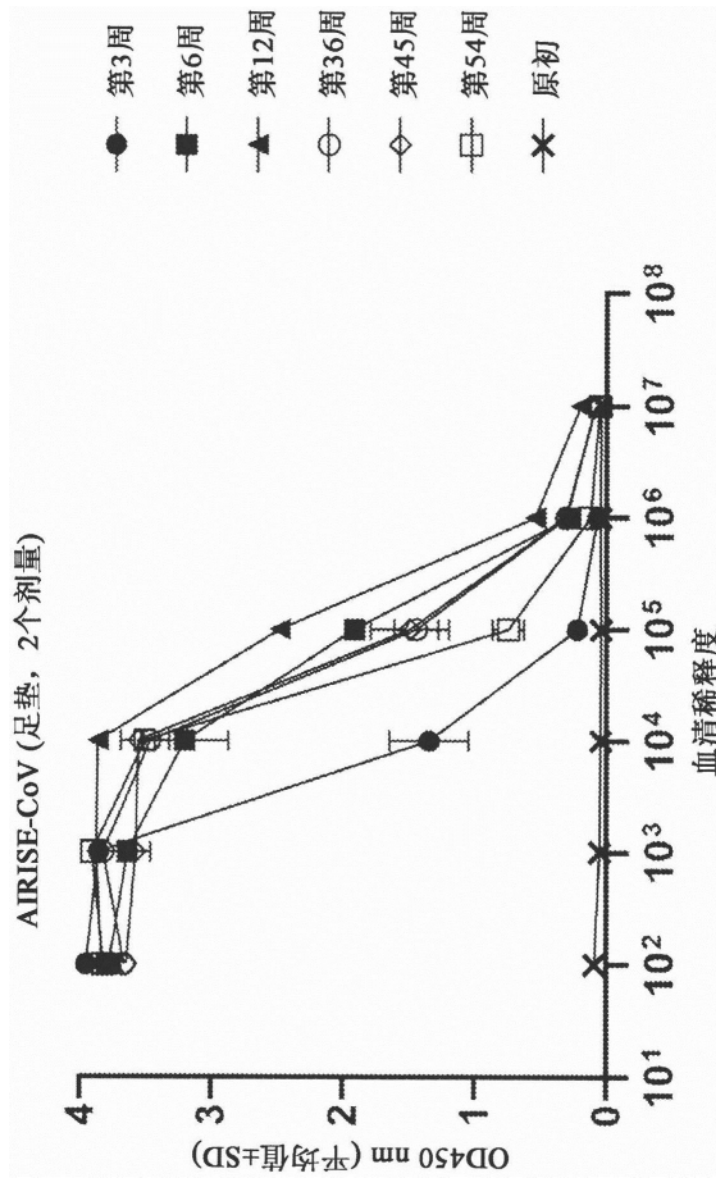


图13

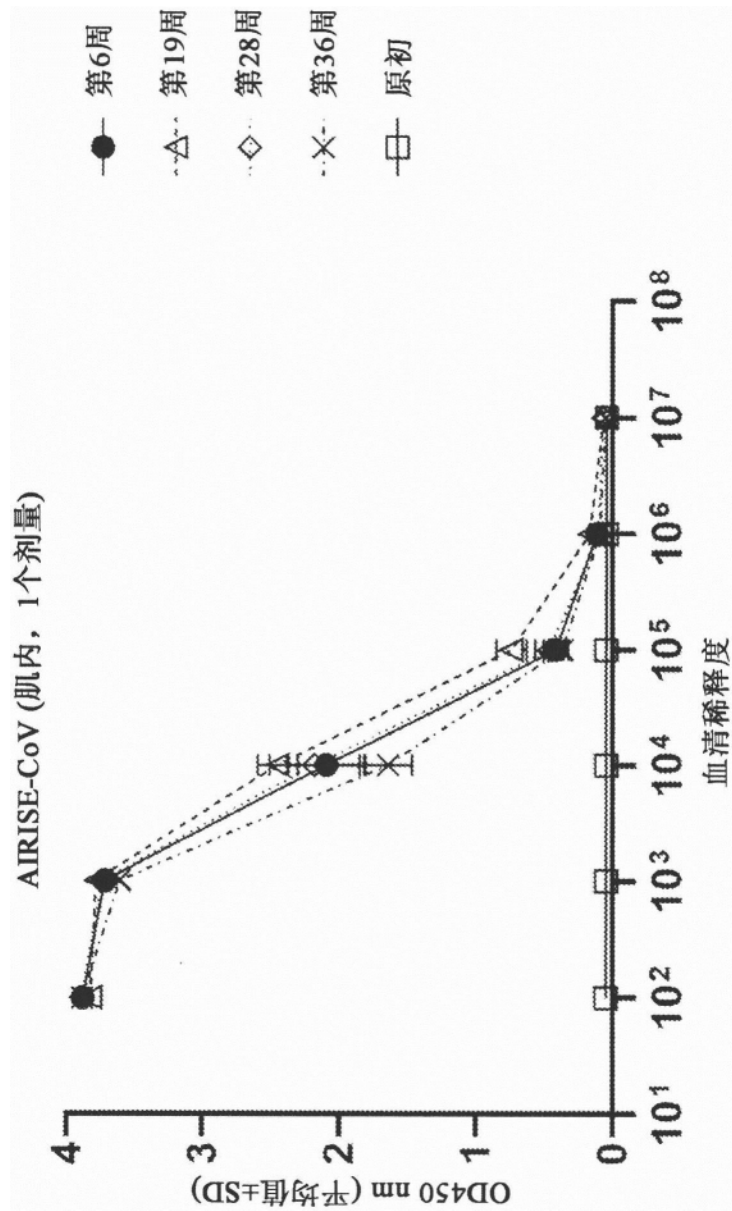


图14A

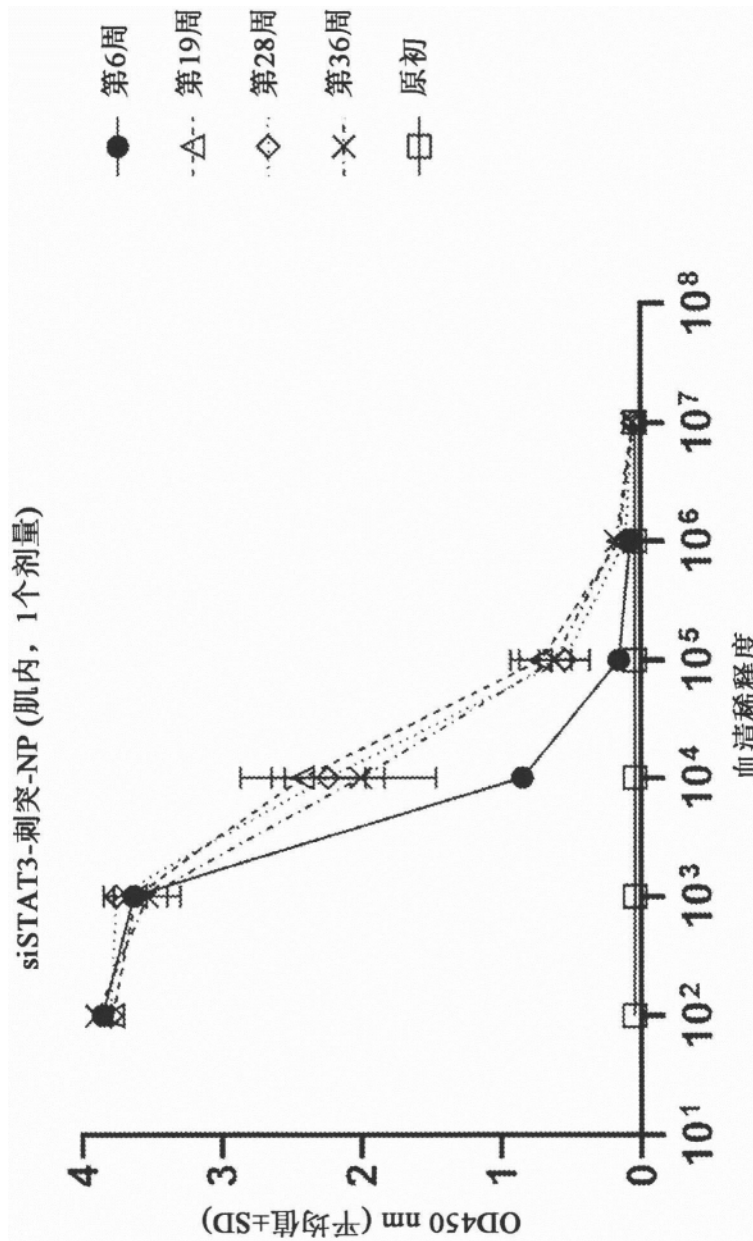


图14B

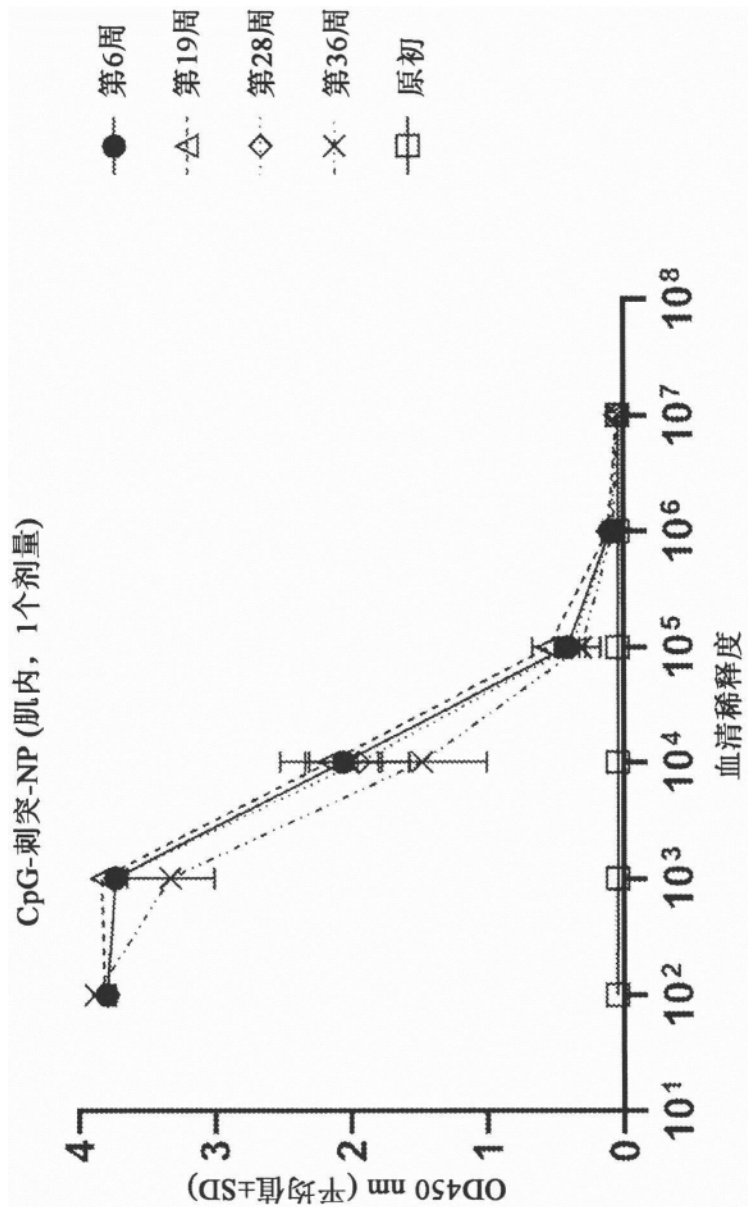


图14C

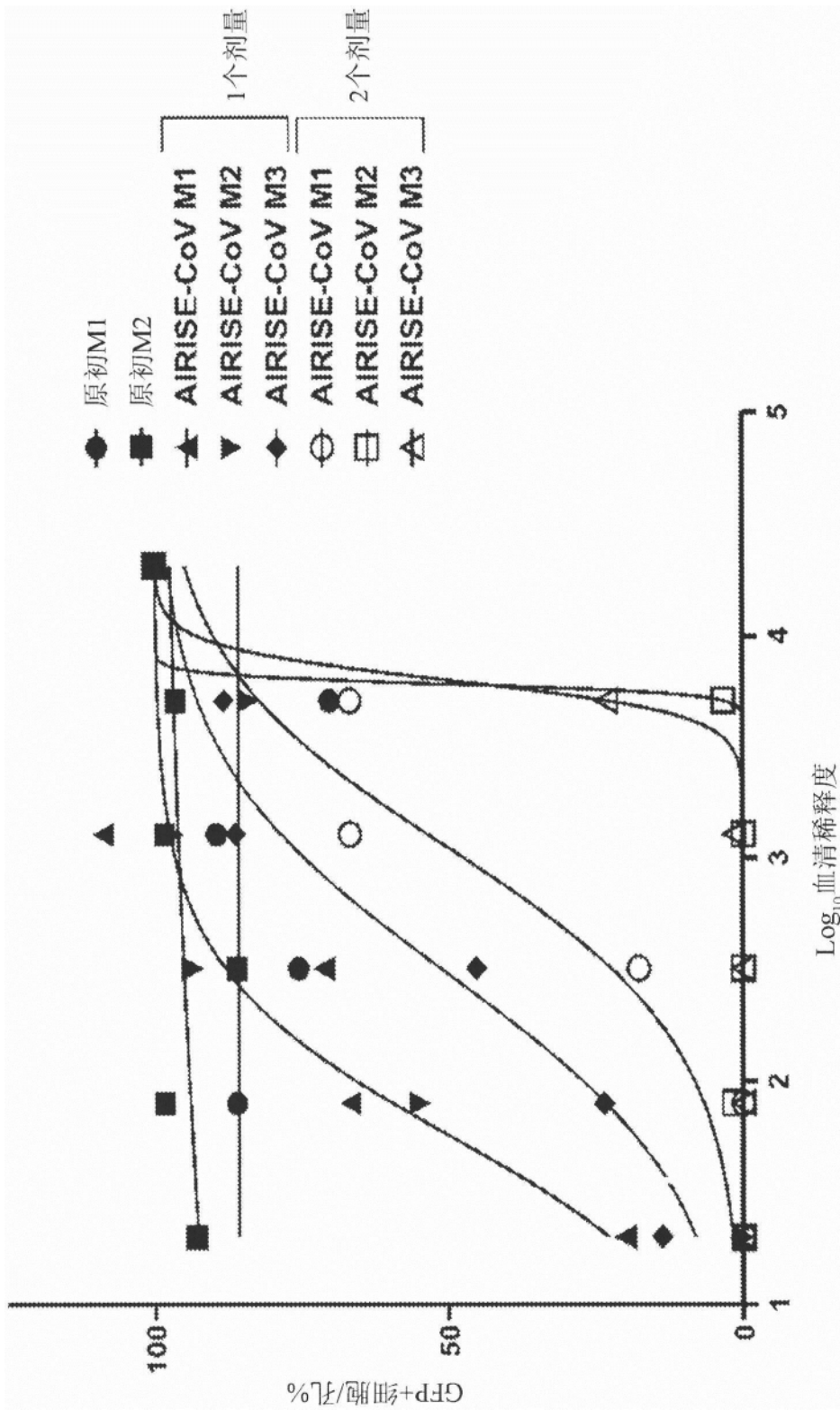


图15

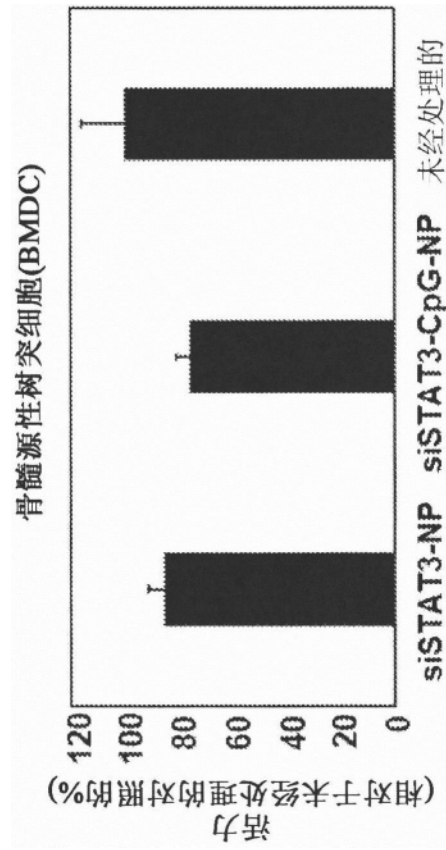


图16A

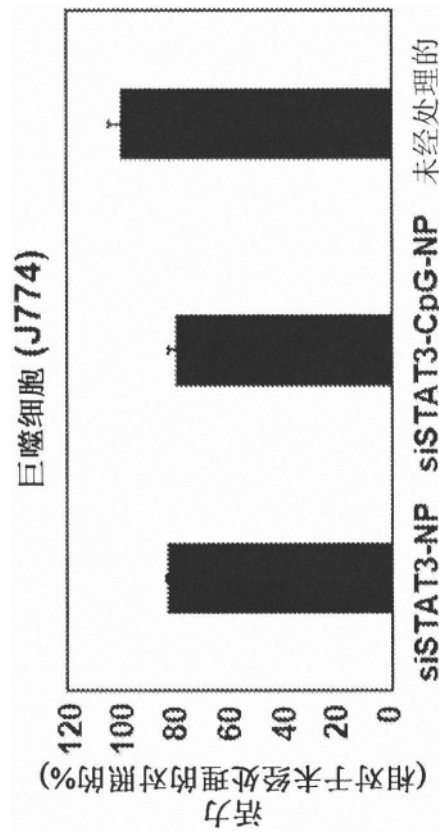


图16B