



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117897494 A

(43) 申请公布日 2024. 04. 16

(21) 申请号 202280059307.1

(22) 申请日 2022.07.08

(30) 优先权数据

63/220,139 2021.07.09 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.02.29

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2022/073563 2022.07.08

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/283641 EN 2023.01.12

(71) 申请人 瑞普利科特生物科学公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 N·S·王 S·J·米亚克斯通纳

P·阿利亚赫马德

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

专利代理师 封新琴

(51) Int.Cl.

C12N 15/86 (2006.01)

C07K 14/005 (2006.01)

C12N 7/00 (2006.01)

C12N 15/90 (2006.01)

C07K 14/08 (2006.01)

权利要求书4页 说明书35页

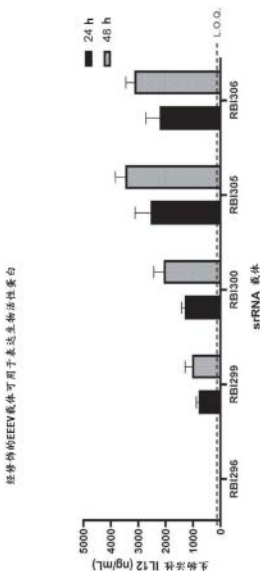
序列表(电子公布) 附图13页

(54) 发明名称

经修饰的东方马脑炎病毒、自复制RNA构建体及其用途

(57) 摘要

本公开文本涉及分子病毒学领域,包括包含经修饰的病毒基因组或复制子(例如,自复制RNA)的核酸分子、含有所述核酸分子的药物组合物、以及此类核酸分子和组合物用于在细胞培养物中或在活体中产生所需产物的用途。还提供了用于引发有需要的受试者的免疫应答的方法,以及用于预防和/或治疗各种健康病症的方法。



1. 一种核酸构建体,所述核酸构建体包含编码经修饰的东方马脑炎病毒(EEEV)基因组或复制子RNA的核酸序列,其中所述经修饰的EEEV基因组或复制子RNA缺乏编码一种或多种病毒结构蛋白的核酸序列的至少一部分。

2. 根据权利要求1所述的核酸构建体,其中所述经修饰的病毒基因组或复制子RNA缺乏编码一种或多种病毒结构蛋白的核酸序列的实质部分。

3. 根据权利要求1-2中任一项所述的核酸构建体,其中所述经修饰的病毒基因组或复制子RNA不包含编码病毒结构蛋白的核酸序列。

4. 根据权利要求1-3中任一项所述的核酸构建体,所述核酸构建体进一步包含一个或多个表达盒,其中所述表达盒中的每一个均包含与异源核酸序列可操作连接的启动子。

5. 根据权利要求4所述的核酸构建体,其中所述表达盒中的至少一个包含与异源核酸序列可操作连接的亚基因组(sg)启动子。

6. 根据权利要求5所述的核酸构建体,其中所述sg启动子是26S亚基因组启动子。

7. 根据权利要求1-6中任一项所述的核酸构建体,所述核酸构建体进一步包含一个或多个非翻译区(UTR)。

8. 根据权利要求7所述的核酸构建体,其中所述UTR中的至少一个是异源UTR。

9. 根据权利要求4-8中任一项所述的核酸构建体,其中表达盒中的至少一个包含目的基因(GOI)的编码序列。

10. 根据权利要求9所述的核酸构建体,其中所述GOI编码选自以下的多肽:治疗性多肽、预防性多肽、诊断性多肽、营养保健性多肽、工业酶和报告多肽。

11. 根据权利要求9-10中任一项所述的核酸构建体,其中所述GOI编码选自以下的多肽:抗体、抗原、免疫调节剂、酶、信号传导蛋白和细胞因子。

12. 根据权利要求9-11中任一项所述的核酸构建体,其中所述GOI的编码序列被优化以用于以高于参考编码序列的表达水平的水平表达。

13. 根据权利要求9-12中任一项所述的核酸构建体,其中所述GOI的编码序列被优化以用于增强RNA稳定性。

14. 根据权利要求1-13中任一项所述的核酸构建体,其中将所述核酸构建体掺入载体中。

15. 根据权利要求14所述的核酸构建体,其中所述载体是自复制RNA(srRNA)载体。

16. 根据权利要求1-15中任一项所述的核酸构建体,其中所述核酸序列与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:18的核酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性。

17. 一种重组细胞,所述重组细胞包含根据权利要求1-16中任一项所述的核酸构建体。

18. 根据权利要求17所述的重组细胞,其中所述重组细胞是真核细胞。

19. 根据权利要求18所述的重组细胞,其中所述重组细胞是动物细胞。

20. 根据权利要求19所述的重组细胞,其中所述动物细胞是脊椎动物细胞或无脊椎动物细胞。

21. 根据权利要求20所述的重组细胞,其中所述重组细胞是昆虫细胞。

22. 根据权利要求21所述的重组细胞,其中所述重组细胞是蚊细胞。

23. 根据权利要求20所述的重组细胞,其中所述重组细胞是哺乳动物细胞。

24. 根据权利要求20所述的重组细胞,其中所述重组细胞选自SV40转化的猴肾CV1细胞(COS-7)、人胚肾细胞(例如,HEK 293或HEK 293细胞)、幼仓鼠肾细胞(BHK)、小鼠支持细胞(例如,TM4细胞)、猴肾细胞(CV1)、人宫颈癌细胞(HeLa)、犬肾细胞(MDCK)、水牛大鼠肝细胞(BRL 3A)、人肺细胞(W138)、人肝细胞(Hep G2)、小鼠乳腺肿瘤细胞(MMT 060562)、TRI细胞、FS4细胞、中国仓鼠卵巢细胞(CHO细胞)、非洲绿猴肾细胞(Vero细胞)、人A549细胞、人宫颈细胞、人CHME5细胞、人PER.C6细胞、NS0鼠骨髓瘤细胞、人表皮样喉细胞、人成纤维细胞、人HUH-7细胞、人MRC-5细胞、人肌肉细胞、人内皮细胞、人星形胶质细胞、人巨噬细胞、人RAW 264.7细胞、小鼠3T3细胞、小鼠L929细胞、小鼠结缔组织细胞、小鼠肌肉细胞和兔肾细胞。

25. 一种细胞培养物,所述细胞培养物包含至少一种根据权利要求17-24中任一项所述的重组细胞和培养基。

26. 一种转基因动物,所述转基因动物包含根据权利要求1-16中任一项所述的核酸构建体。

27. 根据权利要求26所述的转基因动物,其中所述动物是脊椎动物或无脊椎动物。

28. 根据权利要求26所述的转基因动物,其中所述动物是昆虫。

29. 根据权利要求27所述的转基因动物,其中所述动物是哺乳动物。

30. 根据权利要求29所述的转基因动物,其中所述哺乳动物是非人哺乳动物。

31. 一种用于产生目的多肽的方法,所述方法包括(i) 饲养根据权利要求26-30中任一项所述的转基因动物,或(ii) 将包含根据权利要求10-16中任一项所述的核酸构建体的重组细胞在一定条件下培养,在所述条件中所述转基因动物或所述重组细胞产生由所述GOI编码的多肽。

32. 一种用于在受试者中产生目的多肽的方法,所述方法包括向所述受试者施用根据权利要求10-16中任一项所述的核酸构建体。

33. 根据权利要求29-32中任一项所述的方法,其中所述受试者是脊椎动物或无脊椎动物。

34. 根据权利要求29-31中任一项所述的方法,其中所述受试者是昆虫。

35. 根据权利要求29-33中任一项所述的方法,其中所述受试者是哺乳动物受试者。

36. 根据权利要求35所述的方法,其中所述哺乳动物受试者是人类受试者。

37. 一种通过根据权利要求29-36中任一项所述的方法产生的重组多肽。

38. 一种药物组合物,所述药物组合物包含药学上可接受的赋形剂和:

a) 根据权利要求1-16中任一项所述的核酸构建体;

b) 根据权利要求17-24中任一项所述的重组细胞;和/或

c) 根据权利要求37所述的重组多肽。

39. 根据权利要求38所述的药物组合物,所述药物组合物包含根据权利要求1-16中任一项所述的核酸构建体和药学上可接受的赋形剂。

40. 根据权利要求38所述的药物组合物,所述药物组合物包含根据权利要求17-24中任一项所述的重组细胞和药学上可接受的赋形剂。

41. 根据权利要求38所述的药物组合物,所述药物组合物包含根据权利要求37所述的重组多肽和药学上可接受的赋形剂。

42. 根据权利要求38-41中任一项所述的药物组合物,其中所述组合物被配制在脂质体、基于脂质的纳米颗粒(LNP)或聚合物纳米颗粒中。

43. 根据权利要求38-42中任一项所述的药物组合物,其中所述组合物是免疫原性组合物。

44. 根据权利要求43所述的药物组合物,其中所述免疫原性组合物被配制为疫苗。

45. 根据权利要求38-42中任一项所述的药物组合物,其中所述组合物对受试者是基本上非免疫原性的。

46. 根据权利要求38-45中任一项所述的药物组合物,其中所述药物组合物被配制为佐剂。

47. 根据权利要求38-46中任一项所述的药物组合物,其中所述药物组合物被配制用于以下中的一种或多种:鼻内施用、透皮施用、腹膜内施用、肌肉内施用、结节内施用、瘤内施用、关节内施用、静脉内施用、皮下施用、阴道内施用和口服施用。

48. 一种用于诱导有需要的受试者的药效学效应的方法,所述方法包括向所述受试者施用包含以下的组合物:

- a) 根据权利要求1-16中任一项所述的核酸构建体;
- b) 根据权利要求17-24中任一项所述的重组细胞;
- c) 根据权利要求37所述的重组多肽;和/或
- d) 根据权利要求38-47中任一项所述的药物组合物。

49. 根据权利要求48所述的方法,其中所述药效学效应包括引发所述受试者的免疫应答。

50. 一种用于预防和/或治疗有需要的受试者的健康病症的方法,所述方法包括向所述受试者预防性地或治疗性地施用包含以下的组合物:

- a) 根据权利要求1-16中任一项所述的核酸构建体;
- b) 根据权利要求17-24中任一项所述的重组细胞;
- c) 根据权利要求37所述的重组多肽;和/或
- d) 根据权利要求38-46中任一项所述的药物组合物。

51. 根据权利要求48-50中任一项所述的方法,其中所述病症是增殖性障碍或微生物感染。

52. 根据权利要求48-51中任一项所述的方法,其中所述受试者患有或怀疑患有与增殖性障碍或微生物感染相关的病症。

53. 根据权利要求48-52中任一项所述的方法,其中所施用的组合物导致所述受试者中干扰素的产生增加。

54. 根据权利要求48-53中任一项所述的方法,其中将所述组合物作为单一疗法(单药疗法)单独地或作为第一疗法与至少一种另外的疗法组合地施用于所述受试者。

55. 根据权利要求54所述的方法,其中所述至少一种另外的疗法选自化学疗法、放射疗法、免疫疗法、激素疗法、毒素疗法、靶向疗法和手术。

56. 一种用于诱导药效学效应、引发免疫应答、用于预防和/或用于治疗健康病症或微生物感染的试剂盒,所述试剂盒包含:

- a) 根据权利要求1-16中任一项所述的核酸构建体;

- b) 根据权利要求17-24中任一项所述的重组细胞；
- c) 根据权利要求37所述的重组多肽；和/或
- d) 根据权利要求38-46中任一项所述的药物组合物。

经修饰的东方马脑炎病毒、自复制RNA构建体及其用途

相关申请的交叉引用

[0001] 本申请要求2021年7月9日提交的美国临时专利申请序列号63/220,139的优先权权益。将上文引用的申请的公开内容通过引用以其整体(包括任何附图)明确地并入本文。

技术领域

[0002] 本公开文本涉及分子病毒学和免疫学领域,并且尤其涉及编码经修饰的病毒基因组和复制子(例如,自复制RNA)的核酸分子、含有所述核酸分子的药物组合物、以及此类核酸分子和组合物用于在细胞培养物或活体中产生所需产物的用途。还提供了用于诱导有需要的受试者的药效学效应(例如,引发免疫应答)的方法,以及用于预防和/或治疗各种健康病症的方法。

序列表的并入

[0003] 所附序列表中的材料通过引用特此并入本申请。所附名称为Sequence_Listing_058462-502001W0_ST26.xml的序列表文本文件创建于2022年7月8日,并且为93KB。

背景技术

[0004] 近年来,已将若干个不同类的动物病毒通过其基因组的同源重组或直接工程化进行基因操纵。DNA和RNA病毒两者的反向遗传系统的可用性为使用重组病毒(例如,作为疫苗、表达载体、抗肿瘤剂、基因疗法载体和药物递送媒介物)创造了新的前景。

[0005] 例如,许多基于病毒的表达载体已被开发用于在培养的重组细胞中表达异源蛋白。例如,经修饰的病毒载体在宿主细胞中用于基因表达的应用不断扩大。这方面的最新进展包括进一步开发用于产生多亚基蛋白质复合物以及共表达蛋白质修饰酶的技术和系统以改善异源蛋白产生。关于病毒表达载体技术的其他最新进展包括用于控制基因表达、制备病毒载体、体内基因疗法应用以及产生疫苗递送载体的许多先进的基因组工程化应用。

[0006] 然而,据报道,宿主细胞可以形成复杂而强大的机制来检测和抵抗病原体入侵。据进一步报道,病毒、特别是致病性病毒已经与宿主细胞一起进化,以对抗这些细胞对感染和复制的防御。作为感染的结果,许多宿主细胞关闭细胞蛋白质翻译机制,以控制可能传播到其他细胞的子代的病毒复制和/或病毒产生。这种现象通常被称为“先天性免疫应答”。受感染的细胞还向其他细胞局部地和全身地发出危险信号,以建立抗病毒状态并控制感染。尽管这些细胞抗病毒系统有益于宿主细胞,但是它们也可能对旨在表达有益疫苗抗原或治疗剂的自扩增RNA(称为复制子或自复制RNA)产生负面影响。例如,如果细胞检测到表达有益蛋白的复制子RNA(例如,自复制RNA)并激活其先天免疫防御机制,则这种细胞中有益蛋白的表达可能受到影响,并且复制子的功效可能受到损害。

[0007] 因此,仍然需要用于在基于RNA复制子的表达平台中表达目的产物的更有效的方法和系统。

发明内容

[0008] 本公开文本总体上涉及开发免疫治疗剂(如重组核酸构建体和包含其的药物组合物)以用于预防和管理各种健康病症如增殖性障碍和微生物感染。特别地,如下文更详细描述,本公开文本的一些实施方案提供了含有编码甲病毒东方马脑炎病毒(EEEV)的经修饰的基因组或复制子(例如,自复制RNA)的序列的核酸构建体,所述经修饰的基因组或复制子缺乏编码所述病毒的一种或多种结构蛋白的病毒核酸序列的至少一部分。还公开了重组细胞和转基因动物,所述重组细胞和转基因动物已经被工程化以包含本文公开的一种或多种核酸构建体(例如,载体或srRNA分子);用于产生目的分子的方法;包含以下中的一种或多种的药物组合物:(a)本公开文本的核酸构建体,(b)本公开文本的多肽,(c)本公开文本的重组细胞。本公开文本的具体方面进一步提供了用于诱导有需要的受试者的药效学效应(例如,引发免疫应答)和/或用于预防和/或治疗各种健康病症(包括增殖性障碍(例如癌症)和慢性感染)的组合物和方法。

[0009] 在本公开文本的一个方面,本文提供了核酸构建体,所述核酸构建体包含编码经修饰的东方马脑炎病毒(EEEV)基因组或复制子RNA(例如,自复制RNA)的核酸序列,其中所述经修饰的EEEV基因组或复制子RNA缺乏编码一种或多种病毒结构蛋白的核酸序列的至少一部分。

[0010] 本公开文本的核酸构建体的非限制性示例性实施方案可以包含以下特征中的一个或多个。在一些实施方案中,所述经修饰的病毒基因组或复制子RNA(例如,自复制RNA)缺乏编码一种或多种病毒结构蛋白的核酸序列的实质部分。在一些实施方案中,所述经修饰的病毒基因组或复制子RNA不包含编码病毒结构蛋白的核酸序列。在一些实施方案中,本公开文本的核酸分子进一步包含一个或多个表达盒,其中所述表达盒中的每一个均包含与异源核酸序列可操作连接的启动子。在一些实施方案中,所述表达盒中的至少一个包含与异源核酸序列可操作连接的亚基因组(sg)启动子。在一些实施方案中,所述sg启动子是26S亚基因组启动子。在一些实施方案中,本公开文本的核酸分子进一步包含一个或多个非翻译区(UTR)。在一些实施方案中,所述UTR中的至少一个是异源UTR。

[0011] 在一些实施方案中,表达盒中的至少一个包含目的基因(GOI)的编码序列。在一些实施方案中,所述GOI编码选自以下的多肽:治疗性多肽、预防性多肽、诊断性多肽、营养保健性多肽、工业酶和报告多肽。在一些实施方案中,所述GOI编码选自以下的多肽:抗体、抗原、免疫调节剂、酶、信号传导蛋白和细胞因子。在一些实施方案中,所述GOI的编码序列被优化以用于以高于参考编码序列的表达水平的水平表达。在一些实施方案中,所述GOI的编码序列被优化以用于增强RNA稳定性。

[0012] 在一些实施方案中,将本公开文本的核酸构建体掺入载体中。在一些实施方案中,所述载体是自复制RNA(srRNA)载体。

[0013] 在一些实施方案中,本公开文本的核酸构建体包括与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:18的核酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的核酸序列。

[0014] 在一个方面,本文提供了重组细胞,所述重组细胞包含如本文公开的核酸构建体。在一些实施方案中,所述重组细胞是真核细胞。在一些实施方案中,所述重组细胞是动物细

胞。在一些实施方案中,所述动物细胞是脊椎动物细胞或无脊椎动物细胞。在一些实施方案中,所述重组细胞是哺乳动物细胞。在一些实施方案中,所述重组细胞选自由SV40转化的猴肾CV1细胞(COS-7)、人胚肾细胞(例如,HEK 293或HEK 293细胞)、幼仓鼠肾细胞(BHK)、小鼠支持细胞(例如,TM4细胞)、猴肾细胞(CV1)、人宫颈癌细胞(HeLa)、犬肾细胞(MDCK)、水牛大鼠肝细胞(BRL 3A)、人肺细胞(W138)、人肝细胞(Hep G2)、小鼠乳腺肿瘤细胞(MMT 060562)、TRI细胞、FS4细胞、中国仓鼠卵巢细胞(CHO细胞)、非洲绿猴肾细胞(Vero细胞)、人A549细胞、人宫颈细胞、人CHME5细胞、人PER.C6细胞、NS0鼠骨髓瘤细胞、人表皮样喉细胞、人成纤维细胞、人HUH-7细胞、人MRC-5细胞、人肌肉细胞、人内皮细胞、人星形胶质细胞、人巨噬细胞、人RAW 264.7细胞、小鼠3T3细胞、小鼠L929细胞、小鼠结缔组织细胞、小鼠肌肉细胞和兔肾细胞。在相关方面,还提供了细胞培养物,所述细胞培养物包含至少一种如本文公开的重组细胞和培养基。

[0015] 在一些实施方案中,所述重组细胞是昆虫细胞。在一些实施方案中,所述重组细胞是蚊细胞。

[0016] 在另一方面,本文提供了包含如本文所述的核酸构建体的转基因动物。在一些实施方案中,所述转基因动物是脊椎动物或无脊椎动物。在一些实施方案中,所述转基因动物是哺乳动物。在一些实施方案中,所述转基因哺乳动物是非人哺乳动物。在一些实施方案中,所述转基因动物是昆虫。在一些实施方案中,所述转基因昆虫是转基因蚊。在另一方面,本文提供了用于产生目的多肽的方法,其中所述方法包括(i)饲养如本文公开的转基因动物,或(ii)将包含如本文公开的核酸构建体的重组细胞在一定条件下培养,在所述条件中所述转基因动物或重组细胞产生由所述GOI编码的多肽。

[0017] 在另一方面,本文提供了用于在受试者中产生目的多肽的方法,其中所述方法包括向所述受试者施用如本文公开的核酸构建体。在一些实施方案中,所述受试者是脊椎动物或无脊椎动物。在一些实施方案中,所述受试者是昆虫。在一些实施方案中,所述昆虫是蚊。在一些实施方案中,所述受试者是哺乳动物受试者。在一些实施方案中,所述哺乳动物受试者是人类受试者。在又另一方面,本文提供了通过本公开文本的方法产生的重组多肽。

[0018] 在又另一方面,本文提供了药物组合物,所述药物组合物包含药学上可接受的赋形剂和:a)本公开文本的核酸构建体;b)本公开文本的重组细胞;和/或c)本公开文本的重组多肽。

[0019] 本公开文本的药物组合物的非限制性示例性实施方案可以包括以下特征中的一个或多个。在一些实施方案中,本文提供了组合物,所述组合物包含如本文公开的核酸构建体和药学上可接受的赋形剂。在一些实施方案中,本文提供了组合物,所述组合物包含如本文公开的重组细胞和药学上可接受的赋形剂。在一些实施方案中,所述组合物包含如本文公开的重组多肽和药学上可接受的赋形剂。在一些实施方案中,本文提供了组合物,所述组合物被配制在脂质体、基于脂质的纳米颗粒(LNP)或聚合物纳米颗粒中。在一些实施方案中,所述组合物是免疫原性组合物。在一些实施方案中,所述免疫原性组合物被配制为疫苗。在一些实施方案中,所述免疫原性组合物对于受试者是基本上非免疫原性的。在一些实施方案中,所述药物组合物被配制为佐剂。在一些实施方案中,所述药物组合物被配制用于以下中的一种或多种:鼻内施用、透皮施用、腹膜内施用、肌肉内施用、结节内施用、瘤内施用、关节内施用、静脉内施用、皮下施用、阴道内施用、眼内施用、直肠施用和口服施用。

[0020] 在另一方面,本文提供了用于诱导受试者的药效学效应的方法,以及特别地用于引发有需要的受试者的免疫应答的方法,所述方法包括向所述受试者施用包含以下的组合物:a)本公开文本的核酸构建体;b)本公开文本的重组细胞;c)本公开文本的重组多肽;和/或d)本公开文本的药物组合物。

[0021] 在又另一方面,本文提供了用于预防和/或治疗有需要的受试者的健康病症的方法,所述方法包括向所述受试者预防性地或治疗性地施用包含以下的组合物:a)本公开文本的核酸构建体;b)本公开文本的重组细胞;c)本公开文本的重组多肽;和/或d)本公开文本的任一项的药物组合物。

[0022] 本公开文本的方法的非限制性示例性实施方案可以包括以下特征中的一个或多个。在一些实施方案中,所述病症是增殖性障碍或微生物感染。在一些实施方案中,所述受试者患有或怀疑患有与增殖性障碍或微生物感染相关的病症。在一些实施方案中,所施用的组合物导致所述受试者中干扰素的产生增加。在一些实施方案中,将所述组合物作为单一疗法(单药疗法)单独地或作为第一疗法与至少一种另外的疗法组合地施用于所述受试者。在一些实施方案中,所述至少一种另外的疗法选自化学疗法、放射疗法、免疫疗法、激素疗法、毒素疗法、靶向疗法和手术。

[0023] 在又另一方面,本文提供了用于诱导药效学效应、用于引发免疫应答、用于预防和/或用于治疗健康病症或微生物感染的试剂盒,所述试剂盒包含:a)本公开文本的核酸构建体;b)本公开文本的重组细胞;c)本公开文本的重组多肽;和/或d)本公开文本的药物组合物。

[0024] 除非明确地或清楚地从实施方案或方面的上下文中排除,否则本文所述的方面和实施方案中的每一个能够一起使用。

[0025] 前述发明内容仅是说明性的,并不旨在以任何方式进行限制。除了本文描述的说明性实施方案和特征之外,根据附图、具体实施方式和权利要求,本公开文本的其他方面、实施方案、目的和特征将变得完全清楚。

附图说明

[0026] 图1是根据本公开文本的一些实施方案的经修饰的EEEV基因组设计的非限制性例子的图形表示,其中编码原始病毒的病毒结构蛋白的核酸序列已经完全缺失。此图中显示的经修饰的EEEV设计含有源自EEEV毒株FL93-939的天然5'UTR和3'UTR,并且进一步含有置于26S亚基因组启动子控制下的异源目的基因(GOI)。示出了非结构蛋白nsP1、nsP2、nsP3和nsP4的编码序列。

[0027] 图2A-图2B是根据本公开文本的一些实施方案的基于EEEV RNA复制子的非限制性示例性设计的图形说明,其中编码来自FL93-939毒株的经修饰的EEEV基因组的序列被掺入质粒DNA载体中(图2A),所述质粒DNA载体还包括示例性目的基因(GOI)(例如,甲型流感病毒H5N1的血凝素前体(HA))的编码序列(图2B)。

[0028] 图3A-图3B是已经用EEEV RNA复制子(例如,自复制RNA)转化的BHK-21的等值线图。在图3A中,通过电穿孔转化不含GOI的EEEV复制子RNA,并且在转化之后20小时,将细胞固定并且透性化处理,并且使用PE缀合的抗dsRNA小鼠单克隆抗体(J2, Scicons)进行染色,以通过荧光流式细胞术定量dsRNA+细胞的频率。在图3B中,将包含HA的编码序列的EEEV复

制子RNA类似地转化到BHK-21细胞中,并且除了dsRNA检测之外,使用APC缀合的抗HA小鼠单克隆抗体(2B7, Abcam)来检测转基因表达。单独细胞被抗dsRNA抗体和抗HA抗体二者阳性染色证明,本文所述的经修饰的EEEV设计是可行的合成复制子,并且能够经历RNA复制并且表达转基因。

[0029] 图4A-图4B示意性地总结了实验结果,所述结果证明,根据本公开文本的一些实施方案设计的经修饰的EEEV载体可以用于表达两种示例性生物活性蛋白:(i)白细胞介素-1受体拮抗蛋白(IL-1RA)和(ii)白细胞介素-12(IL-12)。图4A-图4B是说明来自用EEEV自复制RNA(srRNA)转化的BHK-21的分泌蛋白生物活性的定量的条形图。在图4A-图4B中示出的srRNA是EEEV srRNA(RBI305、RBI306),其各自编码呈两种不同构型的两种蛋白质IL-1RA和IL-12。这些实验中还包括如下四种基于VEEV的对照srRNA:编码呈两种构型的IL-1RA和IL-12二者的VEEV srRNA(RBI299、RBI300)和具有对照转基因的VEEV srRNA(RBI296、RBI298)。图4A示出了srRNA转化之后24和48小时细胞培养基中生物活性IL-1RA的定量。图4B示出了srRNA转化之后24和48小时细胞培养基中生物活性IL-12的定量。

[0030] 图5A-图5B是说明编码示例性病毒抗原的一组srRNA的体内免疫原性的条形图,所述示例性病毒抗原是狂犬病毒的包膜糖蛋白G(RABV-G)。所述组包括源自委内瑞拉马脑炎病毒(VEE.TC83)、基孔肯亚病毒株S27(CHIK.S27)和DRDE-06(CHIK.DRDE)、辛德比斯病毒株Girdwood(SIN.GW)和AR87(SIN.AR86)以及东方脑炎病毒(EEE.FL93)的srRNA。图5A示出了两次免疫接种后通过ELISpot评价的抗原特异性脾T细胞应答的定量。图5B示出了两次免疫接种后来自血清的抗狂犬病中和抗体滴度。

[0031] 图6A-图6C是示出编码示例性肿瘤相关抗原的一组srRNA的体内免疫原性的条形图,所述srRNA用作疫苗,例如用于引发受试者的免疫应答。所述组包括源自东方脑炎病毒(EEE.FL93)和其他五种甲病毒的srRNA:委内瑞拉马脑炎病毒(VEE.TC83)、基孔肯亚病毒株S27(CHIK.S27)和DRDE-06(CHIK.DRDE)、辛德比斯病毒株Girdwood(SIN.GW)和AR87(SIN.AR86)。每个srRNA包括编码三种多肽的序列:雌激素受体1(ESR1)、人表皮生长因子2(HER2)和人表皮生长因子2(HER3)的序列。图6A-图6C示出在已经接受两次免疫接种的小鼠中使用ELISpot分析确定的对这三种抗原的脾T细胞应答,以及在测试的每种抗原之间的统计学比较。

[0032] 图7是说明来自编码示例性生物治疗性蛋白(人IL-12)的一组srRNA的白细胞介素-12(IL-12)的体内表达水平的条形图。所述组包括源自委内瑞拉马脑炎病毒(VEE.TC83)、基孔肯亚病毒株S27(CHIK.S27)和DRDE-06(CHIK.DRDE)、辛德比斯病毒株Girdwood(SIN.GW)和AR87(SIN.AR86)以及东方脑炎病毒(EEE.FL93)的srRNA。在小鼠中肌肉内施用所述srRNA,并且在第7天收集血清以检测蛋白质的全身性水平。

[0033] 图8是说明从编码另一种示例性生物治疗性蛋白(小鼠IL-12)的EEEV srRNA载体表达的IL-12的体内活性的条形图。通过评估作为下游药效学标记物的IFN γ 的诱导来测量IL-12的功能性。来自施用srRNA后第3天的小鼠的血清示出可检测水平的IFN γ 。

具体实施方式

[0034] 本文尤其提供了具有优异表达潜力的病毒表达系统,其适于在重组细胞中表达异源分子,例如像疫苗和治疗性多肽。例如,本公开文本的一些实施方案涉及核酸构建体(例

如像表达构建体和载体),所述核酸构建体含有东方马脑炎病毒(EEEV)的经修饰的基因组或复制子RNA(自复制RNA),其中所述病毒的编码结构蛋白的原始病毒序列中的至少一些已经缺失。在本公开文本的一些实施方案中还提供了基于病毒的表达载体,所述表达载体包含一个或多个编码异源多肽的表达盒。进一步提供了重组细胞,所述重组细胞经基因工程化以包含一种或多种本文公开的核酸分子。源自此类重组细胞的生物材料和重组产物也在本申请的范围内。还提供了可用于诱导有需要的受试者的药效学效应(例如,引发免疫应答)的组合物和方法,以及用于预防和/或治疗各种健康病症的方法。

[0035] 基于RNA病毒(例如甲病毒)的自扩增RNA(例如,复制子或自复制RNA)可以用作稳健的表达系统。例如,据报道,使用甲病毒(如EEEV)作为病毒表达载体的优势在于,它们可以引导重组宿主细胞中大量异源蛋白的合成。除其他优点外,如果在体内以高水平表达,则多肽(如治疗性单链抗体)可能是最有效的。另外,对于产生从培养(离体)的细胞纯化的重组抗体,复制子RNA的高蛋白表达可以增加抗体产物的总产量。此外,如果所表达的蛋白质是疫苗抗原,则高水平表达可以在体内诱导最稳健的免疫应答。

[0036] 甲病毒利用其UTR、结构区域和非结构区域中包含的基序来影响其在宿主细胞中的复制。这些区域还包含逃避宿主细胞先天性免疫的机制。然而,据报道甲病毒物种之间存在显著差异。例如,新世界和旧世界甲病毒已经进化出不同的组分以利用细胞内的应激颗粒、JAK-STAT信号传导、FXR和G3BP蛋白来组装病毒复制复合物。基因组的哪一部分包含这些组分在甲病毒之间也有所不同。例如,绕过PKR的激活和随后的EIF2 α 磷酸化在一些旧世界甲病毒(例如辛德比斯)中是经由下游回路完成的,但是在缺乏可识别DLP的基孔肯亚中绕过此通路被认为是经由nsP4完成的。另外,除了单独甲病毒之间的变异之外,通常在甲病毒的毒株内也存在差异,所述差异可以解释诸如毒力的特征的变化。作为例子,新世界东方马脑炎病毒(EEEV)的北美毒株与南美毒株之间的序列变异改变了调节STAT1通路的能力,导致I型干扰素的差异性诱导并引起毒力变化。

[0037] 鉴于宿主细胞限制因子在甲病毒的非结构区域和结构区域中的差异性存在,使结构基因缺失以允许合成载体中的异源基因表达将对单独载体产生不同的影响。在非结构区域中具有不同宿主限制因子的合成复制子(例如,自复制RNA)在诱导对所表达的异源基因的免疫应答方面具有不同的优势。例如,虽然宿主细胞功能的关闭与旧世界病毒中的nsP2有关,但是在新世界病毒(如VEEV和EEEV)中,这主要与衣壳蛋白(C)相关,所述衣壳蛋白(C)在合成载体中部分或全部缺失。nsP3蛋白的高变结构域(HVD)具有每种甲病毒特有的宿主相互作用。尤其已显示EEEV nsP3与细胞FXR和G3BP蛋白家族、DDX3、S100A4、IKK β 、PGAM5以及细胞骨架重组和囊泡运输蛋白相互作用。值得注意的是,在甲病毒中以及在表征的EEEV毒株中EEEV被认为最具致病性,FL93-939在小鼠中诱导最高的IFN水平。虽然FL939-939和其他北美毒株诱导高水平的IFN,但感染的野生型小鼠与IFN缺陷型小鼠的病毒血症或死亡率方面几乎没有差异,这表明与南美EEEV毒株相比,IFN在针对这些毒株的保护方面几乎没有作用。北美毒株(FL93-939)和南美毒株(BeAr436087)的嵌合体展现对IFN的中等敏感性,并在小鼠中显示出神经毒力和组织嗜性的差异,这证明结构和非结构蛋白均有助于表型变异。总体上,EEEV干扰应激颗粒的能力、对IFN的毒株依赖性不可知论以及导致其强致病性的其他尚未描述的机制表明,EEEV将成为用于疫苗或生物治疗应用的异源蛋白的表达的有利载体。到目前为止,完全未探索过且未预测过这种载体赋予的优势。

[0038] 如下文更详细描述,初步观察到,可公开获得的甲病毒基因组数据并不总是提供能够用目的基因(GOI)直接替代编码结构蛋白的核酸序列以得到自复制RNA和表达转基因的复制子的核苷酸序列。例如,使用可获得的已公开序列用异源基因简单替代EEEV结构蛋白不一定足以产生功能性复制子。换句话说,产生适于在疫苗和治疗剂中使用的复制子系统将需要进一步的工程化,如使用异源5'和/或3'UTR序列。

[0039] 如下文更详细描述,本公开文本的一些实施方案涉及已被工程化以表达一种或多种异源目的基因(GOI)的经修饰的EEEV基因组或复制子RNA(例如,自复制RNA)。例如,发现可以用甲型流感病毒H5N1基因的合成血凝素前体(HA)替代EEV毒株FL93-939中的结构多蛋白基因(参见例如,图2B),以产生能够在转染的BHK-21细胞中进行RNA复制和转基因表达的自复制载体(参见例如,图3B)。另外,如下文更详细描述,如本文所述的一些基于EEEV的srRNA构建体可用于表达抗原并配制成在体内具有测量的药效学效应的疫苗(参见例如,图5和图6)。此外,图4A-图4B中描述的实验数据证明,基于EEEV的srRNA载体可用于表达多种蛋白质,所述蛋白质的编码序列在单个开放阅读框内(例如,在多顺反子ORF中)彼此可操作地连接,并且具有如通过体内药效学效应测量的生物活性(参见例如,图6)。另外,本公开文本的基于EEEV的srRNA载体也可用于表达具有经确认的体内生物活性(参见例如,图8)生物治疗性蛋白(参见例如,图7)。总之,这些研究进一步证明了EEEV srRNA在治疗和疫苗应用中的用途。

定义

[0040] 除非另有定义,否则本文使用的所有技术术语、符号和其他科学术语或用辞旨在具有本申请所属领域的技术人员通常理解的含义。在一些情况下,为了清楚和/或为了便于引用而在本文中定义具有通常理解的含义的术语,并且本文中包含的这些定义不必被解释为代表与本领域通常所理解的意义有实质性差异。本文描述或提及的许多技术和程序是本领域技术人员很好理解的并且通常由本领域技术人员使用常规方法加以采用。

[0041] 除非上下文另外明确规定,否则单数形式“一个/一种(a)”、“一个/一种(an)”和“所述”包括复数指示物。例如,术语“细胞”包括一个或多个细胞,包括其混合物。本文中使用“A和/或B”来包括所有的以下替代形式:“A”、“B”、“A或B”以及“A和B”。

[0042] 如本文所用,术语“施用(administration)”和“施用(administering)”是指生物活性组合物或配制品通过施用途径的递送,所述施用途径包括但不限于鼻内、透皮、静脉内、动脉内、肌肉内、结节内、腹膜内、皮下、肌肉内、口服、阴道内和外用施用或其组合。所述术语包括但不限于由医学专业人员进行施用和自我施用。

[0043] 术语“细胞”、“细胞培养物”和“细胞系”不仅指代特定的主题细胞、细胞培养物或细胞系,而且指代这样的细胞、细胞培养物或细胞系的后代或潜在后代,而不考虑培养中的转移或传代次数。应当理解的是,并非所有后代都与亲代细胞完全相同。这是因为在后续世代中可能由于突变(例如,故意或无意的突变)或环境影响(例如,甲基化或其他表观遗传修饰)而发生某些修饰,使得后代可能实际上与亲本细胞不同,但是仍被包括在如本文所用的所述术语的范围内,只要所述后代保留与原始细胞、细胞培养物或细胞系的功能性相同的功能性即可。

[0044] 术语本公开文本的组合物(例如,核酸构建体(例如,载体或srRNA分子)、重组细胞、重组多肽和/或药物组合物)的“有效量”、“治疗有效量”或“药学有效量”通常是指所述

组合物相对于不存在所述组合物的情况足以实现所述目的(例如,实现施用所述组合物要达到的效果,刺激免疫应答,预防或治疗疾病,或者减轻疾病、障碍、感染或健康病症的一种或多种症状)的量。“有效量”的例子是足以促成对疾病的一种或多种症状的治疗、预防或减轻的量,其也可以称为“治疗有效量”。症状的“减轻”意指一种或多种症状的严重程度或频率的降低或者一种或多种症状的消除。组合物的确切量(包括“治疗有效量”)将取决于治疗的目的,并且将可由本领域技术人员使用已知技术来确定(参见例如,Lieberman, *Pharmaceutical Dosage Forms* (第1-3卷,1992);Lloyd, *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding* (1999);Pickar, *Dosage Calculations* (1999);以及Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 第20版,2003, Gennaro 编辑, Lippincott, Williams & Wilkins)。

[0045] 在提供值范围的情况下,应理解的是除非上下文另外明确规定,否则在该范围的上限值与下限值之间的每个中间值(至下限值的单位的十分之一)以及所陈述的范围内的任何其他所陈述的或中间值都被涵盖在本公开文本内。这些更小范围的上限值和下限值可以独立地被包括在更小范围内,并且也被涵盖在本公开文本内,服从于在所陈述的范围内任何确切排除的限值。在所陈述的范围包括一个或两个限值的情况下,排除那些被包括的限值中的任一个或两个的范围也被包括在本公开文本中。

[0046] 本文给出了某些范围,其数值前面是术语“约”,如本文所用,所述约具有大约的普通含义。术语“约”用于对其后的精确数值以及接近或近似于所述术语后的数值提供文字支持。在确定数字是否接近或近似于具体列举的数字时,接近或近似的未列举的数字可以是在呈现它的上下文中提供具体列举的数字的基本等效形式的数字。如果根据上下文原本不清楚近似程度,则“约”意指在提供的值的正负10%以内,或四舍五入到最接近的有效数字,在所有情况下包括所提供的值。在一些实施方案中,术语“约”指示指定值 $\pm$ 至多10%、至多 $\pm$ 5%或至多 $\pm$ 1%。

[0047] 术语“构建体”是指包含来自异源的一个或多个分离的核酸序列的重组分子。例如,核酸构建体可以是嵌合核酸分子,其中两个或更多个不同来源的核酸序列被组装成单个核酸分子。因此,代表性核酸构建体包括含有以下的任何构建体:(1)核酸序列,包括未发现彼此天然邻接的调控序列和编码序列(例如,所述核苷酸序列中的至少一个相对于它的其他核苷酸序列中的至少一个是异源的),或(2)编码未天然邻接的功能性RNA分子或蛋白质的部分的序列,或(3)未天然邻接的启动子的部分。代表性核酸构建体可以包含任何重组核酸分子,其是线性或环状、单链或双链DNA或RNA核酸分子,源自任何来源(如质粒、粘粒、病毒、自主复制的多核苷酸分子、噬菌体),能够进行基因组整合或自主复制,包含其中一个或多个核酸序列已经可操作连接的核酸分子。本公开文本的构建体可以包含必要的元件以引导也包含在构建体中的目的核酸序列的表达。此类元件可以包括控制元件,如与目的核酸序列可操作连接(以引导其转录)的启动子,并且任选地包括多腺苷酸化序列。

[0048] 在本公开文本的一些实施方案中,可以将核酸构建体掺入载体内。术语“载体”在本文中用于指能够转移或转运另一种核酸分子的核酸分子或序列。因此,术语“载体”涵盖基于DNA的载体和基于RNA的载体二者。术语“载体”包括克隆载体和表达载体以及病毒载体和整合载体。“表达载体”是包含调节区,从而能够在体外、离体和/或在体内表达DNA序列和片段的载体。在一些实施方案中,载体可以包括引导在细胞中自主复制的序列,例如像质粒

(基于DNA的载体)或自复制RNA载体。在一些实施方案中,载体可以包括足以允许整合到宿主细胞DNA中的序列。在一些实施方案中,载体可以包括可以在体外和/或在体内转录成RNA的DNA序列。有用的载体包括例如质粒(例如,DNA质粒或RNA质粒)、转座子、粘粒、细菌人工染色体和病毒载体。在一些实施方案中,本公开文本的载体可以是单链载体(例如,ssDNA或ssRNA)。在一些实施方案中,本公开文本的载体可以是双链载体(例如,dsDNA或dsRNA)。在一些实施方案中,载体是基因递送载体。在一些实施方案中,载体用作基因递送媒介物以将基因转移至细胞中。

[0049] 除了构建体的组分之外,所述载体可以包括例如一种或多种选择性标记物、一个或多个复制起点(如原核和真核起点)、至少一个多克隆位点和/或用于促进所述构建体稳定整合到细胞基因组中的元件。可以将两个或更多个构建体掺入单个核酸分子(如单个载体)内,或者可以包含在两个或更多个单独的核酸分子(如两个或更多个单独的载体)内。“表达构建体”通常包括可操作连接至目的核苷酸序列的至少一个控制序列。以这种方式,例如,在表达构建体中提供与待表达的核苷酸序列可操作连接的启动子,用于在细胞中表达。对于本公开文本的实施,用于制备和使用构建体和细胞的组合物和方法对于本领域技术人员是已知的。

[0050] 如本文所用,术语“可操作地连接”表示两个或更多个元件(例如,多肽序列或多核苷酸序列)之间的物理或功能连接,其允许它们以其预期方式操作。例如,当在本文所述的核酸分子或核酸分子中的编码序列和启动子序列的上下文中使用时,术语“可操作地连接”意指编码序列和启动子序列是框内的并且在远离的适当空间和距离内,以允许通过转录因子或RNA聚合酶的相应结合对转录施加影响。应当理解,可操作地连接的元件可以是连续的或非连续的(例如,通过接头彼此连接)。在多肽构建体的上下文中,“可操作地连接”是指氨基酸序列(例如,不同区段、部分、区域或结构域)之间的物理连接(例如,直接或间接连接)以提供构建体的所需活性。本文公开的多肽或核酸分子的可操作地连接的区段、部分、区域和结构域可以是连续的或非连续的(例如,通过接头彼此连接)。

[0051] 如本文所用的术语“部分(portion)”是指一部分(a fraction)。关于其特定结构(如多核苷酸序列或氨基酸序列或蛋白质)的术语“部分”可以表示所述结构的连续或不连续部分。例如,氨基酸序列的一部分包含所述氨基酸序列的至少1%、至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%和至少90%的氨基酸。另外地或可替代地,如果所述部分是不连续部分,则所述不连续部分由结构(例如蛋白质的结构域)的2、3、4、5、6、7、8或更多个部分构成,每个部分都是结构的连续元件。例如,氨基酸序列的不连续部分可以由2、3、4、5、6、7、8或更多个,例如不超过4个部分的所述氨基酸序列构成,其中每个部分包含所述氨基酸序列的至少1个、至少2个、至少3个、至少4个、至少5个连续氨基酸、至少10个连续氨基酸、至少20个连续氨基酸、或至少30个连续氨基酸。

[0052] 在提供值范围的情况下,应理解的是除非上下文另外明确规定,否则在该范围的上限值与下限值之间的每个中间值(至下限值的单位的十分之一)以及所陈述的范围内的任何其他所陈述的或中间值都被涵盖在本公开文本内。这些更小范围的上限值和下限值可以独立地被包括在更小范围内,并且也被涵盖在本公开文本内,服从于在所陈述的范围内任何确切排除的限值。在所陈述的范围包括一个或两个限值的情况下,排除那些被包括的限值中的任一个或两个的范围也被包括在本公开文本中。

[0053] 某些范围在本文中通过前面带有术语“约”的数值呈现。本文中使用术语“约”是为了对其后的精确数字以及接近或近似所述术语后的数字的数字提供文字支持。在确定数字是否接近或近似于具体列举的数字时,接近或近似的未列举的数字可以是在呈现它的上下文中提供具体列举的数字的基本等效形式的数字。

[0054] 在两种或更多种核酸或蛋白质的上下文中,如本文所用的术语“同一性百分比”是指两个或更多个序列或子序列相同或具有指定百分比的相同核苷酸或氨基酸(例如,当在比较窗口或指定区域中比较且对齐以获得最大对应时,在指定区域中的约60%序列同一性、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性),如使用下文所述的BLAST或BLAST 2.0序列比较算法以默认参数所测量,或通过手动比对和目视检查所测量。参见例如,NCBI网站ncbi.nlm.nih.gov/BLAST。则将此序列称为“基本上相同的”。此定义也涉及或可以应用于序列的互补体。此定义还包括具有缺失和/或添加的序列以及具有取代的那些序列。可以使用已公布的技术和广泛可用的计算机程序来计算序列同一性,所述计算机程序如GCS程序包(Devereux等人,Nucleic Acids Res.12:387,1984)、BLASTP、BLASTN、FASTA(Atschul等人,J Mol Biol 215:403,1990)。可以使用序列分析软件采用其默认参数来测量序列同一性,所述序列分析软件如University of Wisconsin Biotechnology Center(大学大道1710号,威斯康星州麦迪逊,53705)的Genetics Computer Group的序列分析软件包。

[0055] 如本文所用的术语“药学上可接受的赋形剂”是指提供用于向受试者施用一种或多种目的化合物的药学上可接受的载体、添加剂或稀释剂的任何合适的物质。因此,“药学上可接受的赋形剂”可以涵盖被称为药学上可接受的稀释剂、药学上可接受的添加剂和药学上可接受的载体的物质。如本文所用,术语“药学上可接受的载体”包括但不限于与药物施用相容的盐水、溶剂、分散介质、包衣、抗细菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。也可以将补充活性化合物(例如,抗生素和另外的治疗剂)掺入组合物中。

[0056] 当与细胞、核酸、蛋白质或载体一起使用时,术语“重组的”表明所述细胞、核酸、蛋白质或载体已经通过人干预而改变或产生,如例如已经通过实验室方法进行修饰或者是实验室方法的结果。因此,例如,重组蛋白质和核酸包括通过实验室方法产生的蛋白质和核酸。重组蛋白质可以包括在所述蛋白质的天然(非重组或野生型)形式内未发现的氨基酸残基,或者可以包括已经被修饰例如被标记的氨基酸残基。所述术语可以包括对肽、蛋白质或核酸序列的任何修饰。此类修饰可以包括以下:肽、蛋白质或核酸序列的任何化学修饰,包括一个或多个氨基酸、脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸的化学修饰;在肽或蛋白质中一个或多个氨基酸的添加、缺失和/或取代;融合蛋白(例如,包含抗体片段的融合蛋白)的产生;以及在核酸序列中一个或多个核酸的添加、缺失和/或取代。当关于细胞使用时,术语“重组”不旨在包括天然存在的细胞,但涵盖已经被工程化/修饰以包含或表达如果未进行工程化/修饰则不会存在于细胞中的多肽或核酸的细胞。

[0057] 如本文所用,术语“复制子RNA”是指如下RNA,所述RNA含有引导其在允许细胞内的自身扩增或自复制所需的全部遗传信息。因此,复制子RNA有时也称为“自扩增RNA”(saRNA)或“自复制RNA”(srRNA)。为了引导其自身的复制,所述RNA分子1) 编码聚合酶、复制酶或者可以与病毒或宿主细胞来源的蛋白质、核酸或核糖核蛋白相互作用以催化RNA扩增过程的其他蛋白质;并且2) 含有亚基因组复制子编码的RNA的复制和转录所需的顺式作用RNA序

列。这些序列可以在复制过程中与其自身编码的蛋白质或非自身编码的细胞来源的蛋白质、核酸或核糖核蛋白或任何这些组分之间的复合物结合。在本公开文本的一些实施方案中,甲病毒复制子RNA分子(例如,srRNA或saRNA分子)通常含有以下有序元件:复制需要呈顺式的一种或多种5'病毒RNA序列、编码生物活性甲病毒非结构蛋白(例如,nsP1、nsP2、nsP3和nsP4)的序列、亚基因组RNA(sgRNA)的启动子、复制需要呈顺式的3'病毒序列以及聚腺苷酸束(聚(A))。在一些情况下,引导异源序列表达的亚基因组启动子(sg)可以包含在本公开文本的srRNA构建体中。此外,术语复制子RNA(例如,srRNA或saRNA)通常是指正极性或“信息”有义的分子,并且复制子RNA的长度可能与任何已知的、天然存在的甲病毒的复制子RNA的长度不同。在本公开文本的一些实施方案中,复制子RNA不含至少一种结构病毒蛋白的序列;编码结构基因的序列可能被异源序列取代。在那些情况下,在复制子RNA被包装到重组甲病毒颗粒中的情况下,它可以含有一个或多个序列,即所谓的包装信号,用于启动与甲病毒结构蛋白的相互作用,从而导致颗粒形成。

[0058] 如本文所用,“受试者”或“个体”包括动物,如人(例如,人个体)和非人动物。在一些实施方案中,“受试者”或“个体”是在医生的护理下的患者。因此,所述受试者可以是患有、有风险患上或怀疑患有目的健康病症(例如,癌症或感染)和/或健康病症的一种或多种症状的人患者或个体。受试者也可以是在诊断时或之后被诊断为有目的健康病症的风险的个体。术语“非人动物”包括所有脊椎动物,例如哺乳动物(例如啮齿动物,例如小鼠,非人灵长类动物)和其他哺乳动物(例如像,绵羊、狗、牛、鸡)以及非哺乳动物(如两栖动物、爬行动物等)。

[0059] 应理解,本文描述的本公开文本的方面和实施方案包括“包含(comprising)方面和实施方案”,“由方面和实施方案组成(consisting)”,以及“基本上由方面和实施方案组成(consisting essentially of)”。如本文所用,“包含”与“包括”、“含有”或“特征在于”同义,并且是包含性的或开放式的,并且不排除另外的、未列举的要素或方法步骤。如本文所用,“由……组成”排除在要求保护的组合物或方法中未指定的任何要素、步骤或成分。如本文所用,“基本上由……组成”并不排除不会实质性地影响要求保护的组合物或方法的基本和新颖特征的材料或步骤。术语“包含”在本文中的任何叙述,特别是在组合物的组分的描述中或在方法的步骤的描述中,被理解为涵盖基本上由所列举组分或步骤组成以及由所列举组分或步骤组成的那些组合物和方法。

[0060] 呈现标题(例如,(a)、(b)、(i)等)只是为了便于阅读说明书和权利要求。说明书或权利要求中的标题的使用不要求步骤或要素按字母或数字顺序或它们呈现的顺序进行。

[0061] 应了解,为明确起见在单独实施方案的上下文中描述的本公开文本的某些特征也可以在单个实施方案中组合提供。相反,为简洁起见在单个实施方案的上下文中描述的本公开文本的各种特征还可以分开地或以任何合适的子组合提供。属于本公开文本的实施方案的所有组合确切地涵盖在本公开文本中并且在本文中公开如同每个和每一种组合均单独地和明确地公开一样。另外,各种实施方案及其要素的所有子组合也确切地涵盖在本公开文本中并且在本文中公开如同每个和每一种这样的子组合均单独地和明确地在本文中公开一样。

东方马脑炎病毒(EEEV)

[0062] 东方马脑炎病毒(EEEV)是属于甲病毒属(Alphavirus)的蚊媒病毒,甲病毒属包括

披膜病毒科(Togaviridae)的一组在遗传、结构和血清学上相关的病毒。目前,甲病毒属尤其包括辛德比斯病毒(SINV)、塞姆利基森林病毒(SFV)、罗斯河病毒(RRV)、委内瑞拉马脑炎病毒(VEEV)和东方马脑炎病毒(EEEV),它们都是密切相关的并且能够感染各种脊椎动物(如哺乳动物、啮齿动物、鱼类、鸟类物种和大型哺乳动物(如人和马))以及无脊椎动物(如昆虫)。特别地,EEEV已经被广泛研究,并且这些病毒的生命周期、复制模式等都得到良好表征。在这方面的更多信息可以在例如Corrin T.等人,Vector-Borne and Zoonotic Diseases,第21卷,第5期,2021中找到。另外,已经表明甲病毒可在动物细胞中非常高效地复制,这使得它们作为在此类细胞中产生蛋白质和核酸的载体很有价值。物种与个体之间的传播主要是经由蚊进行,从而使甲病毒成为收集虫媒病毒或节肢动物传播病毒的贡献者。

[0063] 这些甲病毒中的每一种都具有正极性的单链RNA基因组,所述单链RNA基因组被封装在由含有病毒刺突蛋白的包膜包围的核衣壳中。甲病毒颗粒是包膜的,倾向于球形(尽管略呈多形性),并具有等轴核衣壳。甲病毒基因组是长度为约11-12kb的正极性的单链RNA,包含5'帽、3'聚A尾和两个开放阅读框,其中第一框编码具有酶促功能的非结构蛋白并且第二框编码病毒结构蛋白(例如,衣壳蛋白CP、E1糖蛋白、E2糖蛋白、E3蛋白和6K蛋白)。例如,EEEV具有大约11.7kb的单链正义RNA基因组,其在5'端加帽并且在3'端聚腺苷酸化。EEEV通过受感染的蚊叮咬传播,并且大多数溢出传播发生在有阔叶树的低洼地区和有利于蚊幼虫发育的沼泽。顾名思义,EEEV可以感染马,引起发烧、行为变化和其他脑炎症状。野生鸟类是EEEV的主要储库。然而,感染对马而言往往是致命的。

[0064] 甲病毒基因组的5'端三分之二编码病毒RNA转录和复制所必需的多种非结构蛋白。这些蛋白质直接从RNA翻译,并且与细胞蛋白一起形成RNA依赖性RNA聚合酶,所述酶对于病毒基因组复制和亚基因组RNA转录至关重要。四个非结构蛋白(nsP1-4)作为单个多蛋白产生,构成病毒的复制机制。多蛋白的加工以高度调节的方式发生,其中P2/3连接处的切割会影响基因组复制期间RNA模板的使用。此位点位于狭窄的裂口的底部并且不易到达。一旦被切割,nsP3就会产生环绕nsP2的环形结构。这两种蛋白质具有广泛的界面。产生非细胞致病变病毒或温度敏感表型的nsP2中的突变在P2/P3界面区域聚集。与nsP2非细胞致病变突变的位置相对的P3突变阻止了P2/3的有效切割。这进而会影响RNA感染性,从而改变病毒RNA产生水平。

[0065] 基因组的3'三分之一包含用作形成病毒颗粒所需的所有结构蛋白(核心核衣壳蛋白C,以及作为异二聚体缔合的包膜蛋白P62和E1)的翻译模板的亚基因组RNA。病毒膜锚定的表面糖蛋白负责受体识别并且通过膜融合进入靶细胞。亚基因组RNA从存在于编码nsP4蛋白的RNA序列3'末端处的p26S亚基因组启动子转录。P62向E2和E3的蛋白水解成熟会导致病毒表面发生变化。E1、E2、和有时E3、糖蛋白“刺突”一起形成E1/E2二聚体或E1/E2/E3三聚体,其中E2从中心延伸到顶点,E1填充顶点之间的空间,以及E3(如果存在)位于刺突的远端。当病毒暴露于内涵体的酸度时,E1与E2解离以形成E1同三聚体,这对于驱动细胞膜与病毒膜一起的融合步骤是必需的。甲病毒糖蛋白E1是II类病毒融合蛋白,其在结构上与在流感病毒和HIV中发现的I类融合蛋白不同。E2糖蛋白通过其胞质结构域与核衣壳相互作用起作用,而其胞外结构域则负责结合细胞受体。大多数甲病毒失去外周蛋白E3,而在塞姆利基病毒中,它仍然与病毒表面缔合。

[0066] 据报道,甲病毒复制发生在宿主细胞内的膜表面上。在感染周期的第一步中,基因组RNA的5'端被翻译成具有RNA聚合酶活性的多蛋白(nsP1-4),其产生与基因组RNA互补的负链。在第二步中,将负链分别用作产生以下两种RNA的模板:(1)与通过翻译产生其他nsP蛋白的次级病毒的基因组相对应并且充当病毒基因组的阳性基因组RNA;和(2)编码形成感染颗粒的病毒的结构蛋白的亚基因组RNA。阳性基因组RNA/亚基因组RNA比率通过多蛋白与nsP1、nsP2、nsP3和nsP4的蛋白水解自切割调节。实际上,病毒基因表达分两个阶段进行。在第一阶段,主要合成正性基因组链和负链。在第二阶段期间,亚基因组RNA的合成实际上是排他性的,因此导致产生大量的结构蛋白。

本公开文本的组合物

[0067] 如下文更详细描述,本公开文本的一个方面涉及包含编码经修饰的病毒基因组或复制子RNA(例如,自复制RNA)的核酸序列的核酸构建体,其中所述经修饰的基因组或复制子RNA缺乏(例如,不包括)编码相应的未经修饰的病毒基因组或复制子RNA的一种或多种结构蛋白的核酸序列的至少一部分。本公开文本的一些实施方案提供了一种经修饰的甲病毒基因组或复制子RNA,其中存在非结构蛋白nsP1、nsP2、nsP3和nsP4的编码序列,然而编码一种或多种结构蛋白的序列的至少一部分或整个序列是不存在的。还提供了重组细胞和细胞培养物,所述重组细胞和细胞培养物已经被工程化以包括如本文公开的核酸构建体。

A. 核酸构建体

[0068] 如下文更详细地描述的,本公开文本的一个方面涉及新型核酸构建体,所述核酸构建体包含编码甲病毒(如东方马脑炎病毒(EEEV))的经修饰的基因组或复制子RNA(例如,自复制RNA)的核酸序列。例如,在一些实施方案中,经修饰的甲病毒基因组可以包括亲本甲病毒基因组的一个或多个基因组区域中的一个或多个缺失、一个或多个取代和/或一个或多个插入。

[0069] 本公开文本的核酸构建体的非限制性示例性实施方案可以包含以下特征中的一个或多个。在一些实施方案中,所述核酸构建体包含编码经修饰的EEEV基因组或复制子RNA(例如,自复制RNA)的核酸序列,其中所述经修饰的EEEV基因组或复制子RNA缺乏编码未经修饰的EEEV基因组或复制子RNA的一种或多种结构蛋白的核酸序列的至少一部分,例如所述经修饰的EEEV基因组或复制子RNA不包含EEEV结构蛋白CP、E1、E2、E3和6K中的一种或多种的编码序列的至少一部分。有毒力的和无毒力的EEEV毒株都是合适的。适合于本公开文本的组合物和方法的EEEV毒株的非限制性例子包括EEEV 792138、EEEV 783372、BeAn5122、BeAr300851、BeAr436087、C-49、FL91-4679、FL93-939、GML903836、MP-9、PE6和V105-00210。另外的合适的EEEV毒株包括但不限于在病毒病原体资源(Virus Pathogen Resource)网站(ViPR;其可在www.viprbrc.org/brc/vipr_genome_search.spg?method=SubmitForm&blockId=868&decorator=toga公开获得)中描述的毒株。在一些实施方案中,所述经修饰的EEEV基因组或复制子RNA源自EEEV毒株FL93-939。

[0070] 本公开文本的核酸构建体的非限制性示例性实施方案可以包含以下特征中的一个或多个。在一些实施方案中,所述经修饰的病毒基因组或复制子RNA(例如,自复制RNA)缺乏编码所述未经修饰的病毒基因组或复制子RNA的病毒结构蛋白CP、E1、E2、E3和6K中的一种或多种的核酸序列的至少一部分。在一些实施方案中,所述经修饰的病毒基因组或复制子RNA缺乏编码CP的序列的一部分或整个序列。在一些实施方案中,所述经修饰的病毒基因

组或复制子RNA缺乏编码E1的序列的一部分或整个序列。在一些实施方案中,所述经修饰的病毒基因组或复制子RNA缺乏编码E2的序列的一部分或整个序列。在一些实施方案中,所述经修饰的病毒基因组或复制子RNA缺乏编码E3的序列的一部分或整个序列。在一些实施方案中,所述经修饰的病毒基因组或复制子RNA缺乏编码6K的序列的一部分或整个序列。在一些实施方案中,所述经修饰的病毒基因组或复制子RNA缺乏编码CP、E1、E2、E3和6K的组合的序列的一部分或整个序列。本公开文本的一些实施方案提供了一种经修饰的EEEV基因组或复制子RNA,其中存在未经修饰的EEEV基因组或复制子RNA的非结构蛋白nsP1、nsP2、nsP3和nsP4的编码序列,然而编码EEEV基因组或复制子RNA的一种或多种结构蛋白(例如,CP、E1、E2、E3和6K)的序列的至少一部分或整个序列是不存在的。本公开文本的一些实施方案提供了一种经修饰的EEEV基因组或复制子RNA,其中存在未经修饰的EEEV基因组或复制子RNA的非结构蛋白nsP1、nsP2、nsP3和nsP4的编码序列,然而编码EEEV基因组或复制子RNA的一种或多种结构蛋白(例如,CP、E1、E2、E3和6K)的序列的至少一部分或整个序列是不存在的。

[0071] 在一些实施方案中,所述经修饰的病毒基因组或复制子RNA(例如,自复制RNA)缺乏编码一种或多种病毒结构蛋白的核酸序列的实质部分。熟练技术人员将理解,编码病毒结构多肽的核酸序列的实质部分可以包含足够大的编码病毒结构多肽的核酸序列,以提供该多肽的推定鉴定,抑或通过由本领域技术人员对序列进行手动评价,抑或通过使用诸如BLAST(参见例如,“Basic Local Alignment Search Tool”;Altschul SF等人, J.Mol.Biol.215:403-410,1993)的算法进行计算机自动序列比较和鉴定。因此,核苷酸序列的实质部分包含足够的序列以提供包含所述序列的核酸片段的特异性鉴定和/或分离。例如,核酸序列的实质部分可以包含全长核酸序列的至少约20%,例如约30%、约40%、约50%、约60%、约70%、约80%、约90%、约95%。如上文所述,本公开文本提供了核酸分子和构建体,所述核酸分子和构建体缺乏编码一种或多种病毒结构蛋白的部分或完整的核酸序列。熟练技术人员,受益于如本文公开的序列,可以容易地将所公开的序列的全部或实质部分用于本公开文本的组合物和方法。因此,本申请包括如本文公开的完整序列,例如在随附序列列表中示出的那些序列,以及如上文所定义的那些序列的实质部分。

[0072] 在一些实施方案中,所述经修饰的病毒基因组或复制子RNA(例如,自复制RNA)缺乏编码病毒结构蛋白的整个序列,例如,所述经修饰的病毒基因组或复制子RNA不包含编码未经修饰的病毒基因组或复制子RNA的结构蛋白的核酸序列。

[0073] 本公开文本的核酸构建体(例如,载体或srRNA构建体)的长度通常为至少约2kb。例如,核酸构建体(例如,载体或srRNA)的长度可以为至少约2kb、至少约3kb、至少约4kb、至少约5kb、至少约6kb、至少约7kb、至少约8kb、至少约9kb、至少约10kb、至少约11kb、至少约12kb或超过12kb。在一些实施方案中,核酸构建体(例如,载体或srRNA)的长度可以为约4kb至约20kb、约4kb至约18kb、约5kb至约16kb、约6kb至约14kb、约7kb至约12kb、约8kb至约16kb、约9kb至约14kb、约10kb至约18kb、约11kb至约16kb、约5kb至约18kb、约6kb至约20kb、约5kb至约10kb、约5kb至约8kb、约5kb至约7kb、约5kb至约6kb、约6kb至约12kb、约6kb至约11kb、约6kb至约10kb、约6kb至约9kb、约6kb至约8kb、约6kb至约7kb、约7kb至约11kb、约7kb至约10kb、约7kb至约9kb、约7kb至约8kb、约8kb至约11kb、约8kb至约10kb、约8kb至约9kb、约9kb至约11kb、约9kb至约10kb或约10kb至约11kb。在一些实施方案中,核酸构建体(例如,载体或srRNA)的长度可以为约6kb至约14kb。在一些实施方案中,核酸构建体(例如,载体或

srRNA)的长度可以为约6kb至约16kb。

[0074] 在一些实施方案中,本公开文本的核酸构建体进一步包含一个或多个表达盒。原则上,本文公开的核酸构建体通常可以包含任何数量的表达盒。在一些实施方案中,本文公开的核酸构建体可以包含至少两个、至少三个、至少四个、至少五个或至少六个表达盒。熟练技术人员将理解,术语“表达盒”是指遗传物质的构建体,其含有编码序列和足够的调节信息以引导编码序列在体内和/或离体的细胞中恰当转录和/或翻译。可以将所述表达盒插入用于靶向期望的宿主细胞的载体中和/或受试者中。因此,在一些实施方案中,术语表达盒可以与术语“表达构建体”互换使用。在一些实施方案中,术语“表达盒”是指这样的核酸构建体,其包含与调节元件(例如像,启动子和/或终止信号,并且任选地,影响基因转录或翻译的任何其他核酸序列或其他核酸序列的组合)可操作连接的编码蛋白质的基因或功能RNA。

[0075] 在一些实施方案中,所述表达盒中的至少一个包含与异源核酸序列可操作连接的启动子。因此,发现如本文提供的核酸构建体可以用作例如表达载体,当表达载体包含与异源核酸序列可操作连接的调节元件(例如启动子)时,所述表达载体可以影响所述异源核酸序列的表达。在一些实施方案中,所述表达盒中的至少一个包含与异源核酸序列可操作连接的亚基因组(sg)启动子。在一些实施方案中,所述sg启动子是26S亚基因组启动子。在一些实施方案中,本公开文本的核酸分子进一步包含一个或多个非翻译区(UTR)。在一些实施方案中,所述UTR中的至少一个是异源UTR。

[0076] 在一些实施方案中,表达盒中的至少一个包含目的基因(GOI)的编码序列。在一些实施方案中,重新设计和/或优化GOI的编码序列以获得所需特性,如增加的稳定性、效力和表达(例如,翻译效率),这进而可以使产生、递送和施用生物治疗剂的影响最大化。例如,在一些实施方案中,GOI的编码序列被优化以用于以高于参考编码序列的表达水平的水平表达。关于核苷酸序列的序列优化,遗传密码的简并性提供了将编码蛋白质的基因序列的至少一个碱基用不同的碱基取代而不会导致由所述基因产生的多肽的氨基酸序列被改变的可能性。因此,本公开文本的核酸构建体还可以具有根据遗传密码的简并性通过取代从本文公开的任何多核苷酸序列改变的任何碱基序列。易于公开获得描述密码子使用的参考文献。在一些实施方案中,可以出于多种原因产生多核苷酸序列变体,例如以优化特定宿主的表达(例如,将甲病毒mRNA中的密码子使用改变为其他生物体(例如人、非人灵长类动物、仓鼠、小鼠或猴)优选的那些)。因此,在一些实施方案中,GOI的编码序列被优化用于以高于参考编码序列的表达水平的水平表达,所述参考编码序列例如像靶宿主细胞中尚未通过使用针对表达优化的密码子进行密码子优化的编码序列。在一些实施方案中,与未经密码子优化的参考编码序列相比,GOI的密码子优化的序列导致表达水平增加至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%或至少100%。在一些实施方案中,与未经密码子优化的参考编码序列相比,GOI的密码子优化的序列导致表达水平增加至少2倍、至少3倍、至少4倍或至少5倍。

[0077] 用于使用最佳用于宿主细胞表达的优选的密码子构建编码GOI的合成核酸序列的技术可以通过本领域熟知的技术通过分析编码宿主细胞基因组的天然蛋白质的密码子使用的简并性及其相对丰度的计算方法来确定。密码子使用数据库(<http://www.kazusa.or.jp/codon>)可用于生成哺乳动物细胞环境中的密码子优化的序列。此外,各

种软件工具可用于将一种生物体的序列转换为用于不同宿主生物体的最佳密码子,如JCat密码子优化工具(www.jcat.de)、集成DNA技术(IDT)密码子优化工具(<https://www.idtdna.com/CodonOpt>)或优化器在线密码子优化工具(<http://genomes.urv.es/OPTIMIZER>)。这种合成序列可以通过本领域已知的用于构建合成核酸分子的技术来构建,并且可以从各种商业供应商获得。

[0078] 在一些实施方案中,GOI的编码序列被优化以用于增强RNA稳定性和/或表达。RNA的稳定性通常与RNA的“半衰期”相关。“半衰期”涉及消除分子活性、数量或数量的一半所需的时间。在本公开文本的上下文中,RNA的半衰期指示所述RNA的稳定性。RNA的半衰期可能会影响RNA的“表达持续时间”。关于用于在增强RNA稳定性中使用的原理、策略和方法的另外的信息可以在例如以下文献中找到:Leppek K.等人,Combinatorial optimization of mRNA structure, stability, and translation for RNA-based therapeutics. bioRxiv. (预印本). 2021年3月30日. doi:10.1101/2021.03.29.437587。

[0079] 由GOI编码的多肽通常可以是任何多肽,并且可以是例如治疗性多肽、预防性多肽、诊断性多肽、营养保健性多肽、工业酶和报告多肽。在一些实施方案中,所述GOI编码多肽,所述多肽可以是:抗体、抗原、免疫调节剂、酶、信号传导蛋白或细胞因子。在一些实施方案中,所述GOI可以编码微生物蛋白、病毒蛋白、细菌蛋白、真菌蛋白、哺乳动物蛋白及其任何组合。在一些实施方案中,所述GOI编码甲型流感病毒H5N1的血凝素前体(HA)。GOI的非限制性例子包括白细胞介素和相互作用蛋白,所述白细胞介素和相互作用蛋白包括:G-CSF、GM-CSF、IL-1、IL-10、IL-10样、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、IL-18BP、IL-1样、IL-1RA、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-2、IL-20、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-6样、IL-7、IL-9、IL-21、IL-22、IL-33、IL-37、IL-38、LIF和OSM。另外的合适的GOI包括但不限于干扰素(例如,IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ)、TNF(例如,CD154、LT- β 、TNF- α 、TNF- β 、4-1BBL、APRIL、CD70、CD153、CD178、GITRL、LIGHT、OX40L、TALL-1、TRAIL、TWEAK和TRANCE)、TGF- β (例如,TGF- β 1、TGF- β 2和TGF- β 3)、促红细胞生成素(例如,Epo、Tpo、Flt-3L、SCF、M-CSF、MSP)、趋化因子及其受体(例如,XCL1、XCL2、CCL1、CCL2、CCL3、CCL4、CCL5、CCL7、CCL8、CCL11、CCL13、CCL14、CCL15、CCL16、CCL17、CCL18、CCL19、CCL20、CCL21、CCL22、CCL23、CCL24、CCL25、CCL26、CCL27、CXCL1、CXCL2、CXCL3、CXCL4、CXCL5、CXCL6、CXCL7、CXCL8、CXCL9、CXCL10、CXCL11、CXCL12、CXCL13、CXCL14和CX3CL1)、免疫抑制基因产物和相关转录因子(例如,PECAM1、FCGR3A、FOS、NFKB1、JUN、HIF1A、PD-L1、mTOR、STAT5B和STAT4)。适合于本公开文本的组合物和方法的另外的GOI包括但不限于免疫刺激基因产物(例如,CD27/CD70、CD40、CD40L、B7.1、BTLA、MAVS、OX40、OX40L、RIG-I和STING)、基因的耐药突变体/变体(如ABCB1、ABCC1、ABCG2、AKT1、ALK、BAFF、BCR-ABL、BRAF、CCND1、cMET、EGFR、ERBB2、ERBB3、ERK2、ESR1、GRB2、KRAS、MDR1、MRP1、NTRK1、PDC4、P-gp、PI3K、PTEN、RET、ROS1、RSK1、RSK2、SHIP和STK11)。适合于本公开文本的组合物和方法的还包括编码病毒蛋白(特别是刺突蛋白、纤维蛋白、结构蛋白和吸附蛋白)的序列。

[0080] 在一些实施方案中,所述GOI可以编码抗体或抗体变体(例如,单链Fv、双特异性抗体、骆驼科抗体、Fab和HCAb)。在一些实施方案中,所述抗体靶向与癌症相关或上调的表面分子,或者与感染性疾病相关的表面分子。在一些实施方案中,所述抗体靶向具有免疫刺激功能或具有免疫抑制功能的表面分子。

[0081] 在一些实施方案中,所述GOI可以编码酶,所述酶的缺失或突变与疾病或健康病症相关,所述酶例如像阿加糖酶(agalsidase) β 、阿加糖酶 α 、伊米苷酶(imiglucerase)、他利苷酶(taliglucerase) α 、维拉苷酶(velaglucerase) α 、阿糖脑苷酶、赛贝利酶(sebelipase) α 、拉罗尼酶、艾度硫酸酯酶、依洛硫酸酯酶(elosulfase) α 、戈硫酸酯酶(galsulfase)、阿葡萄糖苷酶(alglucosidase) α 和CTFR。

[0082] 在一些实施方案中,所述GOI可以编码选自抗原分子、生物治疗性分子或其任何组合的多肽。在一些实施方案中,所述GOI可以编码选自肿瘤相关抗原、肿瘤特异性抗原、新抗原及其任何组合的多肽。在一些实施方案中,所述GOI可以编码选自雌激素受体、细胞内信号转导酶和人表皮生长受体的多肽。在一些实施方案中,所述GOI可以编码选自免疫调节剂、血管生成调节剂、细胞外基质调节剂、代谢调节剂、神经调节剂及其任何组合的生物治疗性多肽。在一些实施方案中,所述GOI可以编码选自趋化因子、干扰素、白细胞介素、淋巴因子和肿瘤坏死因子的细胞因子。在一些实施方案中,所述GOI可以编码选自IL-1 α 、IL-1 β 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-15、IL-15、IL-17、IL-23、IL-27、IL-35、IFN γ 及其任何亚基的白细胞介素。在一些实施方案中,所述GOI可以编码选自IL-12A、IL-12B、IL-1RA及其任何组合的生物治疗性多肽。

[0083] 在一些实施方案中,可以将本公开文本的核酸构建体掺于载体内。在一些实施方案中,本公开文本的载体可以是单链载体(例如,ssDNA载体或ssRNA载体)。在一些实施方案中,本公开文本的载体可以是双链载体(例如,dsDNA载体或dsRNA载体)。在一些实施方案中,本公开文本的载体可以是质粒。如下文更详细描述,本公开文本的载体可以使用重组DNA技术(例如,聚合酶链反应(PCR)扩增、滚环扩增(RCA)、分子克隆等)或化学合成来产生。因此,在一些实施方案中,本公开文本的载体可以是全合成载体(例如,全合成ssDNA载体)。在一些实施方案中,本公开文本的载体可以是全合成dsDNA载体。在一些实施方案中,本公开文本的载体可以是PCR反应的产物。在一些实施方案中,本公开文本的载体可以是RCA反应的产物。在一些实施方案中,载体可以是基因递送载体。在一些实施方案中,载体可以用作基因递送媒介物以将基因转移到细胞中。

[0084] 在一些实施方案中,本公开文本的核酸构建体包含与SEQ ID NO:1的核酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的编码经修饰的EEEV的核酸序列。在一些实施方案中,本公开文本的核酸构建体包含与SEQ ID NO:2的核酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的编码经修饰的EEEV的核酸序列。在一些实施方案中,本公开文本的核酸构建体包含与SEQ ID NO:15的核酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的编码经修饰的EEEV的核酸序列。在一些实施方案中,本公开文本的核酸构建体包含与SEQ ID NO:16的核酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的编码经修饰的EEEV的核酸序列。在一些实施方案中,本公开文本的核酸构建体包含与SEQ ID NO:17的核酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的编码经修饰的EEEV的核酸序列。在一些实施方案中,本公开文本的核酸构建体包含与SEQ ID NO:18的核酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少

97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的编码经修饰的EEEV的核酸序列。

表1:序列表中序列的简要描述。

SEQ ID NO	描述
1	编码源自毒株FL93-939的EEEV复制子(自复制RNA)的DNA序列; 源自Genbank 登录号EF151502; 不含目的基因(GOI)的编码序列
2	编码源自毒株FL93-939的EEEV复制子(自复制RNA)的DNA序列; 源自Genbank 登录号EF151502; 包括来自流感的HA蛋白的编码序列
3	5'衔接子序列
4	3'衔接子序列
5	噬菌体T7 RNA聚合酶启动子
6	T7终止子序列
7	人IL-12 p35亚基
8	人IL-12 p35亚基及其信号序列
9	人IL-12 p40亚基
10	人IL-12 p40亚基及其信号序列; 也参见图4B
11	由IL1RN转录物1编码的人IL-1RA; 也参见图4A
12	由IL1RN转录物2编码的人IL-1RA
13	由IL1RN转录物3编码的人IL-1RA
14	由IL1RN转录物4编码的人IL-1RA
15	编码源自毒株FL93-939的EEEV复制子(自复制RNA)的DNA序列; 包括人IL-12 的编码序列; 也参见图7
16	编码源自毒株FL93-939的EEEV复制子(自复制RNA)的DNA序列; 包括癌症相关抗原ESR1、HER2和HER3的编码序列; 也参见图6
17	编码源自毒株FL93-939的EEEV复制子(自复制RNA)的DNA序列; 包括病毒抗原RABV-G的编码序列; 也参见图5
18	编码源自毒株FL93-939的EEEV复制子(自复制RNA)的DNA序列; 包括小鼠 IL-12的编码序列; 也参见图8

[0085] 与经修饰的EEEV的目的序列具有高度序列同一性(例如,至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)的核酸序列可以通过以下方式进行鉴定和/或分离:使用本文鉴定的序列(例如,SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:18)或本身为本领域已知的任何其他序列,通过基因组序列分析、杂交和/或使用来自在相应EEEV基因组中鉴定的序列的简并引物或基因特异性引物进行的PCR。

[0086] 用于组装和表征这些新的核酸构建体的分子技术和方法更全面地描述于本申请在本文中的实施例中。

[0087] 在一些实施方案中,所述核酸分子是重组核酸分子。如上文所述,术语重组核酸分子意指来自人工操作或因人工操作而产生(不论多么间接)的任何核酸分子(例如,DNA、RNA)。作为非限制性例子,cDNA是重组DNA分子,如下任何核酸分子也是重组DNA分子:已通过一个或多个体外聚合酶反应产生的,或已与接头连接的,或已整合至载体(如克隆载体或表达载体)中的。作为非限制性例子,重组核酸分子:1)已经在体外合成或修饰,例如,使用化学或酶技术(例如,通过使用化学核酸合成,或通过使用酶进行核酸分子的复制、聚合、核酸外切消化、核酸内切消化、连接、逆转录、转录、碱基修饰(包括例如甲基化)或重组(包括同源重组和位点特异性重组));2)包含在自然界中不连结的连结的核苷酸序列;3)已经使用分子克隆技术进行工程化,使得其关于天然存在的核苷酸序列缺乏一个或多个核苷酸;和/或4)已经使用分子克隆技术进行操作,使得其关于天然存在的核苷酸序列具有一个或

多个序列变化或重排。

[0088] 在一些实施方案中,使用重组DNA技术(例如,聚合酶链反应(PCR)扩增、克隆等)或化学合成产生本文公开的核酸分子。本文公开的核酸分子包括天然核酸分子及其同源物,所述天然核酸分子及其同源物包括但不限于天然等位基因变体和经修饰的核酸分子,其中一个或多个核苷酸残基已被插入、缺失和/或取代,所述插入、缺失和/或取代的方式使得此类修饰在实现如本文所述的生物活性方面提供所需的特性。

[0089] 可以使用本领域技术人员已知的许多方法产生核酸分子,包括天然存在的核酸序列的变体(参见例如,Sambrook等人,Molecular Cloning,A Laboratory Manual,第2版,Cold Spring Harbor Press,Cold Spring Harbor,N.Y.(1989))。核酸分子的序列可以使用多种技术相对于衍生出所述核酸分子的天然存在的序列进行修饰,所述技术包括但不限于经典诱变技术和重组DNA技术,例如但不限于定点诱变、对核酸分子进行化学处理以诱导突变、核酸片段的限制性酶切割、核酸片段的连接、核酸序列中所选区域的PCR扩增和/或诱变、重组克隆,以及化学合成(包括寡核苷酸混合物的化学合成和混合物组的连接以“构建”核酸分子的混合物),以及其组合。可以通过以下方式从经修饰的核酸分子的混合物选择核酸分子同源物:针对由核酸分子编码的蛋白质或复制子(例如,srRNA)的功能进行筛选,和/或与野生型基因或其片段杂交,或者使用与靶标或野生型核酸分子或序列具有同源性的引物进行PCR。

B. 重组细胞

[0090] 如下文更详细描述,本公开文本的一个方面涉及重组细胞,所述重组细胞已经被工程化,以包括如本文所述的核酸构建体和/或包括(例如,表达)如本文所述的核酸构建体。在一些实施方案中,可以将本公开文本的核酸构建体(例如,载体或srRNA)引入到宿主细胞中,以产生含有所述核酸构建体和/或srRNA构建体的重组细胞。例如,可以将本公开文本的核酸构建体引入到宿主细胞中以产生含有所述核酸分子的重组细胞。因此,含有编码如本文所述的经修饰的EEEV基因组的核酸构建体的原核细胞或真核细胞也是本公开文本的特征。在相关方面,本文公开的一些实施方案涉及转化细胞的方法,所述方法包括将如本文提供的核酸构建体引入宿主细胞(如动物细胞)中,然后选择或筛选转化的细胞。将本公开文本的核酸构建体引入细胞可以通过本领域技术人员已知的方法进行,所述方法例如像病毒感染、转染、缀合、原生质体融合、脂质体转染、电穿孔、核转染、磷酸钙沉淀、聚乙烯亚胺(PEI)介导的转染、DEAE-葡聚糖介导的转染、脂质体介导的转染、粒子枪技术、直接显微注射、纳米颗粒介导的核酸递送等。

[0091] 在一个方面,本公开文本的一些实施方案涉及包含本文所述的核酸构建体的重组细胞,例如,重组真核细胞,例如,动物细胞。例如,核酸构建体可以稳定地整合到宿主基因组中、或者可以以附加体复制、或者作为微环表达载体存在于重组宿主细胞中以用于稳定或瞬时表达。因此,在本文公开的一些实施方案中,将所述核酸构建体在重组宿主细胞中作为附加体单元维持和复制。在一些实施方案中,将所述核酸构建体稳定地整合到所述重组细胞的基因组中。稳定整合可以使用经典随机基因组重组技术或更精确的基因组编辑技术(如使用指导RNA引导的CRISPR/Cas9、或TALEN基因组编辑)完成。在一些实施方案中,核酸构建体作为微环表达载体存在于重组宿主细胞中以用于稳定或瞬时表达。

[0092] 宿主细胞可以是未转化的细胞或已经用至少一种核酸分子转染的细胞。因此,在

一些实施方案中,宿主细胞可以用至少一种核酸分子进行基因工程化的改造(例如,转导或转化或转染)。

[0093] 用于克隆或表达如本文所述的目的蛋白的合适宿主细胞包括本文所述的原核或真核细胞。因此,在一些实施方案中,所述重组细胞是原核细胞(如细菌大肠杆菌(*E. coli*))或真核细胞(如昆虫细胞(例如,蚊细胞或Sf21细胞)或哺乳动物细胞(例如,COS细胞、NIH 3T3细胞或HeLa细胞))。在一些实施方案中,所述细胞在体内。在一些实施方案中,所述细胞是离体的,例如已经作为单个细胞或作为器官或组织的一部分从活体或生物体提取用于治疗或程序,然后返回到所述活体或生物体。在一些实施方案中,所述细胞在体外(例如,从储库中获得)。在一些实施方案中,所述重组细胞是真核细胞。在一些实施方案中,所述重组细胞是动物细胞。在一些实施方案中,所述动物细胞是脊椎动物细胞或无脊椎动物细胞。在一些实施方案中,所述重组细胞是哺乳动物细胞。用于表达糖基化蛋白的合适的宿主细胞可以源自多细胞生物体(无脊椎动物和脊椎动物)。无脊椎动物细胞的例子包括昆虫细胞。

[0094] 脊椎动物细胞也可以用作宿主。就此而言,适于悬浮生长的哺乳动物细胞系可以是有用的。在一些实施方案中,所述重组细胞是动物细胞。在一些实施方案中,所述动物细胞是脊椎动物细胞或无脊椎动物细胞。在一些实施方案中,所述重组细胞是哺乳动物细胞。在一些实施方案中,所述动物细胞是人细胞。在一些实施方案中,所述动物细胞是非人动物细胞。在一些实施方案中,所述细胞是非人灵长类动物细胞。有用的哺乳动物宿主细胞系的另外的例子是由SV40转化的猴肾CV1细胞(COS-7)、人胚肾细胞(例如,HEK 293或HEK 293细胞)、幼仓鼠肾细胞(BHK)、小鼠支持细胞(例如,TM4细胞)、猴肾细胞(CV1)、人宫颈癌细胞(HeLa)、犬肾细胞(MDCK)、水牛大鼠肝细胞(BRL 3A)、人肺细胞(W138)、人肝细胞(Hep G2)、小鼠乳腺肿瘤(MMT 060562)、TRI细胞、FS4细胞、中国仓鼠卵巢细胞(CHO细胞)、非洲绿猴肾细胞(Vero细胞)、人A549细胞、人宫颈细胞、人CHME5细胞、人PER.C6细胞、NS0鼠骨髓瘤细胞、人表皮样喉细胞、人成纤维细胞、人HUH-7细胞、人MRC-5细胞、人肌肉细胞、人内皮细胞、人星形胶质细胞、人巨噬细胞、人RAW 264.7细胞、小鼠3T3细胞、小鼠L929细胞、小鼠结缔组织细胞、小鼠肌肉细胞和兔肾细胞。

[0095] 在一些实施方案中,重组细胞选自非洲绿猴肾细胞(Vero细胞)、幼仓鼠肾(BHK)细胞、中国仓鼠卵巢细胞(CHO细胞)、人A549细胞、人宫颈细胞、人CHME5细胞、人表皮样喉细胞、人成纤维细胞、人HEK-293细胞、人HeLa细胞、人HepG2细胞、人HUH-7细胞、人MRC-5细胞、人肌细胞、小鼠3T3细胞、小鼠结缔组织细胞、小鼠肌细胞和兔肾细胞。

[0096] 在一些实施方案中,所述重组细胞是昆虫细胞,例如,昆虫细胞系的细胞。在一些实施方案中,所述重组细胞是Sf21细胞。另外的合适的昆虫细胞系包括但不限于,从昆虫目双翅目(Diptera)、鳞翅目(Lepidoptera)和半翅目(Hemiptera)建立的细胞系,并且可以源自不同的组织来源。在一些实施方案中,所述重组细胞是鳞翅目细胞系的细胞。在过去的几十年中,所述鳞翅目昆虫细胞系的可用性以每十年约50个系增加。关于可用的鳞翅目昆虫细胞系的更多信息可以在例如Lynn D.E., Available lepidopteran insect cell lines. *Methods Mol Biol.* 2007;388:117-38中找到,将所述文献通过引用并入本文。在一些实施方案中,所述重组细胞是蚊细胞,例如,按蚊属(*Anopheles*, An.)、库蚊属(*Culex*, Cx.)和伊蚊属(*Aedes*) (覆蚊亚属(*Stegomyia*)) (Ae.) 内的蚊物种的细胞。适用于本文所述的组合物和方法的示例性蚊细胞系包括来自以下蚊物种的细胞系:埃及伊蚊(*Aedes*

aegypti)、白纹伊蚊 (*Aedes albopictus*)、伪盾纹伊蚊 (*Aedes pseudoscutellaris*)、三序伊蚊 (*Aedes triseriatus*)、刺扰伊蚊 (*Aedes vexans*)、冈比亚按蚊 (*Anopheles gambiae*)、斯氏按蚊 (*Anopheles stephensi*)、白魔按蚊 (*Anopheles albimanus*)、致倦库蚊 (*Culex quinquefasciatus*)、希氏库蚊 (*Culex theileri*)、三带喙库蚊 (*Culex tritaeniorhynchus*)、二带喙库蚊 (*Culex bitaeniorhynchus*) 和安邦巨蚊 (*Toxorhynchites amboinensis*)。合适的蚊细胞系包括但不限于 CCL-125、Aag-2、RML-12、C6/26、C6/36、C7-10、AP-61、A.t.GRIP-1、A.t.GRIP-2、UM-AVE1、Mos.55、Sua1B、4a-3B、Mos.43、MSQ43 和 LSB-AA695BB。在一些实施方案中,所述蚊细胞是 C6/26 细胞系的细胞。

[0097] 在另一个方面,本文提供了包括至少一种如本文公开的重组细胞和培养基的细胞培养物。通常,培养基可以是用于培养本文所述的细胞的任何合适的培养基。用于转化各种各样的上文提到的宿主细胞和物种的技术是本领域已知的并且描述于技术和科学文献中。因此,包括至少一种如本文公开的重组细胞的细胞培养物也在本申请的范围内。适合于产生和维持细胞培养物的方法和系统是本领域已知的。

C. 转基因动物

[0098] 在另一方面,还提供了包括如本文所述的核酸构建体的转基因动物。在一些实施方案中,所述转基因动物是脊椎动物或无脊椎动物。在一些实施方案中,所述转基因动物是昆虫。在一些实施方案中,所述昆虫是蚊。在一些实施方案中,所述转基因动物是哺乳动物。在一些实施方案中,所述转基因哺乳动物是非人哺乳动物。在一些实施方案中,所述转基因动物产生如本文所述的目的蛋白。

[0099] 使用本领域已知的用于将外源核酸引入非人动物的基因组中的标准方法来制备本公开文本的转基因非人宿主动物。在一些实施方案中,本公开文本的非人动物是非人灵长类动物。适用于本公开文本的组合物和方法的其他动物物种包括这样的动物,其 (i) 适用于转基因作用,并且 (ii) 能够将免疫球蛋白基因区段重排以产生抗体应答。此类物种的例子包括但不限于小鼠、大鼠、仓鼠、兔、鸡、山羊、猪、绵羊和牛。用于制备转基因非人动物的方式和方法是本领域已知的。示例性方法包括原核显微注射、DNA 显微注射、慢病毒载体介导的将 DNA 转移至早期胚胎中和精子介导的转基因作用、腺病毒介导的将 DNA 引入动物精子中 (例如,在猪中)、逆转录病毒载体 (例如,鸟类物种)、体细胞核转移 (例如,在山羊中)。转基因家畜农场动物的制备中的最新技术水平综述于 Niemann, H. 等人 (2005) Rev. Sci. Tech. 24:285-298 中。

[0100] 在一些实施方案中,动物是脊椎动物或无脊椎动物。在一些实施方案中,所述动物是昆虫。在一些实施方案中,所述昆虫是蚊。在一些实施方案中,动物是哺乳动物受试者。在一些实施方案中,哺乳动物是非人动物。在一些实施方案中,哺乳动物是非人灵长类动物。在一些实施方案中,本公开文本的转基因动物可以使用经典随机基因组重组技术或者用更精确的技术来制备,所述更精确的技术如指导 RNA 引导的 CRISPR/Cas 基因组编辑,或采用 NgAgo (格氏嗜盐碱杆菌 (*Natronobacterium gregoryi*) 阿尔古蛋白) 的 DNA 指导的核酸内切酶基因组编辑,或 TALEN 基因组编辑 (转录激活因子样效应物核酸酶)。在一些实施方案中,本公开文本的转基因动物可以使用转基因显微注射技术来制备,并且不需要使用同源重组技术,因此被认为比使用同源重组的方法更易于制备和选择。在另一方面,本文提供了用于产生目的多肽的方法,其中所述方法包括 (i) 饲养如本文公开的转基因动物,或 (ii) 将包含

如本文公开的核酸构建体的重组细胞在一定条件下培养,在所述条件中所述转基因动物或所述重组细胞产生由所述GOI编码的多肽。

[0101] 在另一方面,本文提供了用于在受试者中产生目的多肽的方法,其中所述方法包括向所述受试者施用如本文公开的核酸构建体。在一些实施方案中,所述受试者是脊椎动物或无脊椎动物。在一些实施方案中,所述受试者是昆虫。在一些实施方案中,所述昆虫是蚊。在一些实施方案中,所述受试者是哺乳动物受试者。在一些实施方案中,所述哺乳动物受试者是人类受试者。因此,通过本文公开的方法产生的重组多肽也在本公开文本的范围内。

[0102] 所公开的用于产生重组多肽的方法的非限制性示例性实施方案可以包括以下特征中的一个或多个。在一些实施方案中,用于产生本公开文本的重组多肽的方法进一步包括分离和/或纯化所产生的多肽。在一些实施方案中,用于产生本公开文本的多肽的方法进一步包括在结构上修饰所产生的多肽以延长半衰期。在一些实施方案中,所产生的多肽的N末端可以被进一步化学或酶促修饰以增加半衰期。在一些实施方案中,所产生的多肽的C末端被化学或酶促修饰以增加半衰期。适合于本文所述方法的化学和酶促修饰的非限制性例子包括PEG化、XTEN化、PAS化®、ELP化和HAP化。适合于这些修饰的技术、系统和试剂是本领域已知的。因此,在一些实施方案中,通过本文所述的方法产生的多肽可以被PEG化、XTEN化、PAS化、ELP化和/或HAP化以增加半衰期。在一些实施方案中,所产生的多肽与另一种蛋白质或肽(例如,血清白蛋白、抗体Fc结构域、转铁蛋白、GLK或CTP肽)缀合以增加半衰期。

D. 药物组合物

[0103] 可以将本公开文本的核酸构建体、重组细胞、重组多肽掺入组合物(包括药物组合物)中。此类组合物通常包括本文所述和提供的核酸构建体(例如,载体或srRNA分子)、重组细胞、重组多肽中的一种或多种以及药学上可接受的赋形剂例如载体。在一些实施方案中,本公开文本的组合物被配制用于预防、治疗或管理健康病症,如免疫性疾病或微生物感染(例如,病毒感染、微真菌感染或细菌感染)。例如,本公开文本的组合物可以被配制为包含药学上可接受的赋形剂的预防性组合物、治疗性组合物或药物组合物或其混合物。在一些实施方案中,本公开文本的组合物被配制用作疫苗。在一些实施方案中,本申请的组合物被配制用作佐剂。

[0104] 因此,在一个方面,本文提供了药物组合物,所述药物组合物包含药学上可接受的赋形剂和:a)本公开文本的核酸构建体(例如,载体或srRNA分子);b)本公开文本的重组细胞;和/或c)本公开文本的重组多肽。

[0105] 本公开文本的药物组合物的非限制性示例性实施方案可以包括以下特征中的一个或多个。在一些实施方案中,本文提供了组合物,所述组合物包含如本文公开的核酸构建体(例如,载体或srRNA分子)和药学上可接受的赋形剂。在一些实施方案中,本文提供了组合物,所述组合物包含如本文公开的重组细胞和药学上可接受的赋形剂。在一些实施方案中,所述组合物包含如本文公开的重组多肽和药学上可接受的赋形剂。在一些实施方案中,本公开文本的核酸构建体(例如,载体或srRNA分子)可以以裸形式使用或与递送媒介物一起配制。适用于本公开文本的组合物和方法的示例性递送媒介物包括但不限于脂质体(例如,中性或阴离子脂质体)、微球体、免疫刺激复合物(ISCOMS)、基于脂质的纳米颗粒(LNP)、固体脂质纳米颗粒(SLN)、polyplex、聚合物纳米颗粒、病毒复制子颗粒(VRP)或与生物活性

配体缀合(这可以促进递送和/或增强免疫应答)。这些化合物是本领域技术人员容易获得的;例如,参见Liposomes:A Practical Approach,RCP New Ed,IRL press(1990)。也使用除了脂质体等之外的佐剂,并且是本领域已知的。佐剂可以通过将抗原(例如,核酸构建体、载体、srRNA分子)隔离在局部沉积物中来保护抗原免于快速扩散,或者它们可以含有刺激宿主分泌对巨噬细胞和免疫系统的其他组分具有趋化性的因子的物质。本领域技术人员可以适当地例如从以下描述的那些中选择。

[0106] 在一些实施方案中,本公开文本的组合物可以包括以下中的一种或多种:生理缓冲液、脂质体、基于脂质的纳米颗粒(LNP)、固体脂质纳米颗粒(SLN)、polyplex、聚合物纳米颗粒、病毒复制子颗粒(VRP)、微球体、免疫刺激复合物(ISCOM)、生物活性配体的缀合物或其任何组合。

[0107] 本公开文本的组合物可以配制成与其预期施用途径相容的形式,如脂质体、基于脂质的纳米颗粒(LNP)或聚合物纳米颗粒。因此,在一些实施方案中,本公开文本的组合物被配制在脂质体中。在一些实施方案中,本公开文本的组合物被配制在基于脂质的纳米颗粒(LNP)中。LNP的免疫原性通常低于病毒颗粒。尽管许多人对病毒颗粒具有预先存在的免疫力,但是对LNP却没有预先存在的免疫力。另外,不太可能发生针对LNP的适应性免疫应答,因此使得LNP能够重复给药。

[0108] 适用于本文所述的组合物和方法的脂质可以是阳离子脂质、可电离的阳离子脂质、阴离子脂质或中性脂质。

[0109] 在一些实施方案中,本公开文本的LNP可以包括一种或多种可电离脂质。如本文所用,术语“可电离脂质”是指当pH降低到脂质的可电离基团的pKa之下时为阳离子的或变得可电离(质子化)但在更高的pH值下更呈中性的脂质。在低于pKa的pH值下,所述脂质则能够与带负电荷的核酸(例如寡核苷酸)缔合。如本文所用,术语“可电离脂质”包括在pH从生理pH降低时呈现正电荷的脂质,以及在选择性pH(如生理pH)下携带净正电荷的多种脂质中的任一种。如DOTMA等永久性阳离子脂质已证明对于临床使用毒性太大。可电离脂质可存在于根据其他实施方案所述的脂质配制品中,优选地以约30至约70mol%的比率,在一些实施方案中约30mol%,在其他实施方案中,约40mol%,在其他实施方案中,约45mol%,在其他实施方案中,约47.5mol%,在再其他实施方式中,约50mol%,并且在又其他实施方案中约60mol% (“mol%”意指特定组分的摩尔占总摩尔的百分比)。本段中的术语“约”表示5mol%的正或负范围。DODMA或1,2-二油酰基氧基-3-二甲基氨基丙烷是可电离脂质,DLin-MC3-DMA或0-(Z,Z,Z,Z-三十七烷-6,9,26,29-四烯-19-基)-4-(N,N-二甲基氨基) (“MC3”)也是如此。

[0110] 适用于本公开文本的组合物和方法的示例性可电离脂质包括以下中描述的可电离脂质:PCT公开案WO 2020252589A1和WO 2021000041A1、美国专利号8,450,298和10,844,028、以及Love K.T.等人,Proc Natl Acad Sci USA,2010年2月2日107(5)1864-1869,将所有文献通过引用以其整体特此并入。因此,在一些实施方案中,本公开文本的LNP包括Love K.T.等人(2010,同上)中描述的一种或多种脂质化合物,如C16-96、C14-110和C12-200。在一些实施方案中,LNP包含选自以下的可电离阳离子脂质:ALC-0315、C12-200、LN16、MC3、MD1、SM-102及其任何组合。在一些实施方案中,本公开文本的LNP包括C12-200脂质。C12-200脂质的结构是本领域已知的,并且描述在例如美国专利号8,450,298和10,844,028中,

将所述文献通过引用以其整体特此并入。在一些实施方案中,C12-200与胆固醇、C14-PEG2000和DOPE组合。在一些实施方案中,C12-200与DSPC和DMG-PEG2000组合。

[0111] 在一些实施方案中,本公开文本的LNP包括一种或多种阳离子脂质。已经开发出几种不同的可电离阳离子脂质用于LNP。合适的阳离子脂质包括但不限于98N12-5、C12-200、C14-PEG2000、DLin-KC2-DMA (KC2)、DLin-MC3-DMA (MC3)、XTC、MD1和7C1。在一种类型的LNP中,GalNAc部分附接至LNP的外部,并且充当配体以供经由去唾液酸糖蛋白(asialyloglycoprotein)受体吸收到肝脏中。这些阳离子脂质中的任一种可用于配制LNP以供递送本公开文本的srRNA构建体和核酸构建体。

[0112] 在一些实施方案中,本公开文本的LNP包括一种或多种中性脂质。适用于本公开文本的组合物和方法的非限制性中性脂质包括DPSC、DPPC、POPC、DOPE和SM。在一些实施方案中,本公开文本的LNP包括PCT公开案WO 2020252589A1和WO 2021000041A1中描述的一种或多种可电离脂质化合物。

[0113] 本领域已知的许多其他脂质或脂质的组合可用于产生LNP。适合用于产生LNP的脂质的非限制性例子包括DOTMA、DOSPA、DOTAP、DMRIE、DC-胆固醇、DOTAP-胆固醇、GAP-DMORIE-DPyPE和GL67A-DOPE-DMPE-聚乙二醇(PEG)。阳离子脂质的另外的非限制性例子包括98N12-5、C12-200、C14-PEG2000、DLin-KC2-DMA (KC2)、DLin-MC3-DMA (MC3)、XTC、MD1、7C1及其任何组合。中性脂质的另外的非限制性例子包括DPSC、DPPC、POPC、DOPE和SM。PEG修饰的脂质的非限制性例子包括PEG-DMG、PEG-CerC14和PEG-CerC20。

[0114] 在一些实施方案中,LNP递送系统中脂质与核酸的质量比是约100:1至约3:1、约70:1至10:1或16:1至4:1。在一些实施方案中,LNP递送系统中脂质与核酸的质量比是约16:1至4:1。在一些实施方案中,LNP递送系统中脂质与核酸的质量比是约20:1。在一些实施方案中,LNP递送系统中脂质与核酸的质量比是约8:1。在一些实施方案中,基于脂质的纳米颗粒具有小于约1000nm、约500nm、约250nm、约200nm、约150nm、约100nm、约75nm、约50nm或约25nm的平均直径。在一些实施方案中,LNP的平均直径范围是约70nm至100nm。在一些实施方案中,LNP的平均直径范围是约88nm至约92nm、82nm至约86nm或约80nm至约95nm。

[0115] 在一些实施方案中,本公开文本的组合物被配制在聚合物纳米颗粒中。在一些实施方案中,所述组合物是免疫原性组合物,例如,可以刺激受试者的免疫应答的组合物。在一些实施方案中,所述免疫原性组合物被配制为疫苗。在一些实施方案中,所述药物组合物被配制为佐剂。在一些实施方案中,所述免疫原性组合物被配制为生物治疗剂,例如,用于具有生物活性的不同分子的基因递送的媒介物。生物治疗剂的非限制性例子包括细胞因子、趋化因子和其他可溶性免疫调节剂、酶、肽和蛋白激动剂、肽和蛋白质拮抗剂、激素、受体、抗体和抗体衍生物、生长因子、转录因子和基因沉默/编辑分子。在一些实施方案中,所述药物组合物被配制为佐剂。

[0116] 在一些实施方案中,所述免疫原性组合物基本上是非免疫原性或最小免疫原性的(例如,最小地刺激受试者的免疫应答的组合物)。在一些实施方案中,所述非免疫原性或最小免疫原性组合物被配制为生物治疗剂。在一些实施方案中,所述药物组合物被配制用于以下中的一种或多种:鼻内施用、透皮施用、腹膜内施用、肌肉内施用、结节内施用、瘤内施用、关节内施用、静脉内施用、皮下施用、阴道内施用和口服施用。

[0117] 适用于注射使用的药物组合物包括无菌水性溶液或分散体,以及用于无菌可注射

溶液或分散体的临时制备的无菌粉末。对于静脉内施用,合适的载体包括生理盐水、抑菌水、Cremophor EL™ (BASF, 新泽西州帕西帕尼) 或磷酸盐缓冲盐水 (PBS)。在这些情况下,所述组合物应是无菌的并且应是易于注射的程度的流体。它可以在制造和储存的条件下稳定,并且可以抵抗微生物(如细菌和真菌)的污染作用而被保存。所述载体可以是溶剂或分散介质,所述溶剂或分散介质含有例如水、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)及其合适的混合物。例如,可以通过使用包衣(如卵磷脂)、通过在分散体的情况下维持所需的粒度以及通过使用表面活性剂(例如,十二烷基硫酸钠)来维持适当的流动性。防止微生物的作用可以通过各种抗细菌剂和抗真菌剂(例如,对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞等)来实现。在许多情况下,组合物中通常将包含等渗剂,例如糖、多元醇(如甘露醇、山梨醇)和/或氯化钠。通过在组合物中包括延迟吸收的药剂(例如,单硬脂酸铝和明胶),可以实现可注射组合物的延长吸收。

[0118] 无菌可注射溶液可以通过以下方式制备:将活性化合物以所需量掺入视需要具有上文所列举成分中的一种或组合的适当溶剂中,然后过滤灭菌。通常,通过将活性化合物并入无菌媒介物中来制备分散体,所述无菌媒介物含有基础分散介质和来自以上列举的那些的所需其他成分。

[0119] 在一些实施方案中,本公开文本的药物组合物被配制用于吸入,如气溶胶、喷雾剂、雾剂(mist)、液体或散剂。通过吸入施用可以呈干粉或气溶胶配制品的形式,其由受试者(例如,患者)通过使用吸入装置(例如,微喷雾器、压力定量吸入器或雾化器)吸入。

[0120] 在一些实施方案中,组合物被配制用于以下中的一种或多种:鼻内施用、透皮施用、肌肉内施用、结节内施用、静脉内施用、腹膜内施用、口服施用、阴道内或颅内施用。在一些实施方案中,所施用的组合物导致受试者中干扰素的产生增加。

本公开文本的方法

[0121] 本文所述的治疗性组合物(例如,核酸构建体(例如,载体或srRNA分子)、重组细胞、重组多肽和/或药物组合物)中的任一种的施用可用于治疗相关健康病症,如增殖性障碍(例如癌症)、感染性疾病(例如,急性感染、慢性感染或病毒感染)、罕见疾病和/或自身免疫性疾病和/或炎性疾病。在一些实施方案中,如本文所述的核酸构建体(例如,载体或srRNA分子)、重组细胞、重组多肽和/或药物组合物可以用于诱导受试者的药效学效应。在一些实施方案中,如本文所述的核酸构建体(例如,载体或srRNA分子)、重组细胞、重组多肽和/或药物组合物可以用于调节(例如,引发或压制)有需要的受试者的免疫应答。

[0122] 可以在体内和/或离体进行本文所述组合物赋予药效学效应的能力的分析。可以分析的药效学效应的例子包括:免疫原性效应(例如,在体内引发免疫应答)、生物标记物反应、治疗效果、预防效果、期望效果、不期望的影响、不良影响和在疾病模型中的作用。在一些实施方案中,药效学效应的评估包括评估体内免疫应答的诱导(参见例如,实施例1-4)。在一些实施方案中,药效学效应的评估包括评估可以增强免疫应答并预防血管生成和转移的细胞因子途径的诱导(参见例如,实施例1-4)。

[0123] 在一些实施方案中,可以将如本文所述的核酸构建体(例如,载体或srRNA分子)、重组细胞、重组多肽和/或药物组合物掺入治疗剂中以用于治疗受试者的方法中,所述受试者患有、怀疑患有或者可能有高风险患上一种或多种相关健康病症或疾病。示例性健康病症或疾病可以包括但不限于癌症、免疫性疾病、自身免疫性疾病、炎性疾病、基因疗法、基因

替代、心血管疾病、年龄相关病理学、罕见疾病、急性感染和慢性感染。在一些实施方案中，所述受试者是在医生照料下的患者。

[0124] 适合于本公开文本的方法的自身免疫性疾病的例子包括但不限于类风湿性关节炎、骨关节炎、斯蒂尔病、家族性地中海热、系统性硬化病、多发性硬化、强直性脊柱炎、桥本氏甲状腺炎、系统性红斑狼疮、舍格伦综合征、糖尿病性视网膜病变、糖尿病性血管病变、糖尿病性神经痛、胰岛炎、银屑病、斑秃、温型和冷型自身免疫性溶血性贫血(AIHA)、恶性贫血、急性炎性疾病、自身免疫性肾上腺炎、慢性炎性脱髓鞘性多发性神经病变(CIDP)、兰伯特-伊顿综合征、硬化性苔藓、莱姆病、格雷夫斯病、白塞病、梅尼埃病(Ménière's disease)、反应性关节炎(赖特综合征)、查尔格-施特劳斯综合征、科根综合征(Cogan syndrome)、CREST综合征、寻常型天疱疮和落叶型天疱疮、大疱性类天疱疮、风湿性多肌痛、多肌炎、原发性胆汁性肝硬化、胰腺炎、腹膜炎、银屑病关节炎、风湿热、结节病、Sjögrensen综合征、硬皮病、乳糜泻、僵人综合征、大动脉炎、短期麸质不耐受(transient gluten intolerance)、自身免疫性葡萄膜炎、白癜风、多软骨炎、疱疹样皮炎(DH)或杜林病、纤维肌痛、肺出血肾炎综合征、吉兰-巴雷综合征、桥本甲状腺炎、自身免疫性肝炎、炎性肠病(IBD)、克罗恩病、溃疡性结肠炎、重症肌无力、免疫复合物障碍、肾小球肾炎、结节性多动脉炎、抗磷脂综合征、多腺性自身免疫综合征、特发性肺纤维化、特发性血小板减少性紫癜(ITP)、荨麻疹、自身免疫性不孕症、幼年型类风湿性关节炎、结节病和自身免疫性心肌病。

[0125] 适合于本公开文本的方法的感染的非限制性例子包括病毒感染，所述病毒如人类免疫缺陷病毒(HIV)、乙型肝炎病毒(HBV)、丙型肝炎病毒(HCV)、巨细胞病毒(CMV)、呼吸道合胞病毒(RSV)、人乳头瘤病毒(HPV)、EB病毒(EBV)、严重急性呼吸综合征冠状病毒2(SARS-CoV2)、严重急性呼吸综合征冠状病毒(SARS-CoV)、中东呼吸综合征(MERS)、流感病毒和埃博拉病毒。适合于本公开文本的方法的另外的感染包括细胞内寄生物感染，所述细胞内寄生物如利什曼原虫属(*Leishmania*)、立克次体属(*Rickettsia*)、衣原体属(*Chlamydia*)、柯克斯体属(*Coxiella*)、疟原虫属(*Plasmodium*)、布鲁氏菌属(*Brucella*)、分枝杆菌(*mycobacteria*)、李斯特菌属(*Listeria*)、弓形虫属(*Toxoplasma*)和锥体虫属(*Trypanosoma*)。

[0126] 在一些实施方案中，所述核酸构建体(例如，载体或srRNA分子)、重组细胞、重组多肽和/或药物组合物可用于治疗和/或预防免疫性疾病、自身免疫性疾病或炎性疾病，例如像肾小球肾炎、炎性肠病、肾炎、腹膜炎、银屑病关节炎、骨关节炎、斯蒂尔病、家族性地中海热、系统性硬皮病和硬化病、炎性肠病(IBD)、克罗恩病、溃疡性结肠炎、急性肺损伤、脑膜炎、脑炎、葡萄膜炎、多发性骨髓瘤、肾小球肾炎、肾炎、哮喘、动脉粥样硬化、白细胞黏附缺陷症、多发性硬化、雷诺氏综合征、舍格伦综合征、幼年型糖尿病、莱特尔氏病、白塞病、免疫复合物肾炎、IgA肾病、IgM多发性神经病、免疫介导的血小板减少症、溶血性贫血、重症肌无力、狼疮性肾炎、红蝴蝶疮、类风湿性关节炎(RA)、强直性脊柱炎、天疱疮、格雷夫斯病、桥本氏甲状腺炎、小血管炎、奥梅恩综合征(Omen's syndrome)、慢性肾衰竭、自身免疫性甲状腺疾病、急性感染性单核细胞增多症、HIV、疱疹病毒相关疾病、人类病毒感染、冠状病毒、其他肠道病毒、疱疹病毒、流感病毒、副流感病毒、呼吸道合胞病毒或腺病毒感染、细菌性肺炎、伤口、脓毒症、脑中风/脑水肿、缺血再灌注损伤和丙型肝炎。

[0127] 适合于本公开文本的方法的炎性的非限制性例子包括炎性疾病，如哮喘、炎性肠

病 (IBD)、慢性结肠炎、脾肿大和类风湿性关节炎。

[0128] 因此,在一个方面,本文提供了用于调节(例如,引发)有需要的受试者的免疫应答的方法,所述方法包括向所述受试者施用包含以下的组合物:a)本公开文本的核酸构建体;b)本公开文本的重组细胞;c)本公开文本的重组多肽;和/或d)本公开文本的药物组合物。

[0129] 在另一方面,本文提供了用于预防和/或治疗有需要的受试者的健康病症的方法,所述方法包括向所述受试者预防性或治疗性地施用包含以下的组合物:a)本公开文本的核酸构建体;b)本公开文本的重组细胞;c)本公开文本的重组多肽;和/或d)本公开文本的任一项的药物组合物。

[0130] 在一些实施方案中,健康病症是增殖性障碍或微生物感染(例如,细菌感染、微真菌感染或病毒感染)。在一些实施方案中,受试者患有或怀疑患有与增殖性障碍或微生物感染(例如,细菌感染、微真菌感染或病毒感染)相关的病症。

[0131] 在一些实施方案中,健康病症是罕见疾病,例如在美国影响少于200,000人的疾病或病症,根据孤儿药法案(The Orphan Drug Act) (www.fda.gov/patients/rare-diseases-fda) 所定义,和/或炎性和/或自身免疫性障碍。在一些实施方案中,受试者患有或怀疑患有与炎性和/或自身免疫性障碍和/或罕见疾病(例如,包括但不限于家族性地中海热或成年发作性斯蒂尔病)相关的病症。

[0132] 在一些实施方案中,所公开的组合物被配制为与其预期的施用途径相容。例如,本公开文本的核酸构建体、重组细胞、重组多肽和/或药物组合物可以口服或通过吸入给予,但更可能的是,它们将通过肠胃外途径施用。肠胃外施用途径的例子包括例如静脉内、结节内、皮内、皮下、透皮(外用)、经粘膜、阴道内和直肠施用。用于肠胃外应用的溶液或悬浮液可以包含以下组分:无菌稀释剂,如注射用水、盐水溶液、固定油、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其他合成溶剂;抗菌剂,如苯甲醇或对羟基苯甲酸甲酯;抗氧化剂,如抗坏血酸或亚硫酸氢钠;螯合剂,如乙二胺四乙酸(EDTA);缓冲液,如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐,和用于调节张力的药剂(如氯化钠或右旋糖)。可以用酸或碱(如磷酸二氢钠和/或磷酸二钠、盐酸或氢氧化钠)来调节pH(例如,调节至约7.2-7.8,例如7.5的pH)。可以将肠胃外制剂封装在由玻璃或塑料制成的安瓿、一次性注射器或多剂量小瓶中。

[0133] 本公开文本的此类主题核酸构建体(例如,载体或srRNA分子)、重组细胞、重组多肽和/或药物组合物的剂量、毒性和治疗功效可以在细胞培养物或实验动物(例如,用于确定LD₅₀(对50%群体致死的剂量)和ED₅₀(在50%的群体中治疗有效的剂量))中通过标准药理学程序来确定。毒性效应与治疗效果之间的剂量比率是治疗指数,并且其可以被表示为比率LD₅₀/ED₅₀。展现高治疗指数的化合物通常是合适的。尽管可以使用展现毒性副作用的化合物,但是应谨慎设计将这样的化合物靶向至受影响组织部位的递送系统,以使对未感染细胞的潜在损伤降至最低,并且由此减小副作用。

[0134] 例如,从细胞培养测定和动物研究获得的数据可以用于配制用于人的剂量范围。此类化合物的剂量通常处于包括ED₅₀而具有很小或没有毒性的循环浓度范围内。剂量可以根据所采用的剂型和所利用的施用途径在此范围内变化。对于在本公开文本的方法中使用的任何化合物,治疗有效剂量可以首先根据细胞培养测定估计。可以在动物模型中配制剂量以实现循环血浆浓度范围,包括如在细胞培养中测定的IC₅₀(即,实现症状的半最大抑制的测试化合物浓度)。这样的信息可以用于更准确地确定在人的有用剂量。可以例如通

过高效液相色谱测量血浆中的水平。

[0135] 本文所述的治疗组合物(例如,核酸构建体(例如,载体或srRNA分子)、重组细胞、重组多肽和/或药物组合物)可以每天施用一次或多次至每周施用一次或多次;包括每隔一天施用一次。熟练技术人员将理解,某些因素可能影响有效治疗受试者所需的剂量和时间安排,所述因素包括但不限于疾病的严重性、先前治疗、受试者的一般健康状况和/或年龄以及存在的其他疾病。此外,使用治疗有效量的本公开文本的主题多价多肽和多价抗体治疗受试者可以包括单一治疗,或者可以包括一系列治疗。在一些实施方案中,将组合物每8小时施用持续五天,随后是2至14天(例如9天)的休息时间,然后另外五天每8小时施用。关于核酸构建体(例如,载体或srRNA分子)和重组多肽,本公开文本的核酸构建体或重组多肽的治疗有效量(例如,有效剂量)取决于所选择的核酸构建体或重组多肽。例如,可以施用约0.001至0.1mg/kg患者体重范围内的单一剂量量。在一些实施方案中,可以施用约0.005、0.01、0.05mg/kg。在一些实施方案中,可以施用约0.03 μ g至300 μ g/kg患者体重范围内的单一剂量量。在一些实施方案中,可以施用约0.3mg至3mg/kg患者体重范围内的单一剂量量。

[0136] 如上文所讨论的,治疗有效量包括治疗性组合物当施用于受试者时足以促进特定作用的量,所述受试者是如患有、怀疑患有或有风险患上健康病症(例如,疾病或感染)的受试者。在一些实施方案中,有效量包括足以预防或延迟疾病或感染的症状的发展、改变疾病或感染的症状的进程(例如但不限于,减缓疾病或感染的症状的进展)或逆转疾病或感染的症状的量。应理解,对于任何给定的病例,本领域普通技术人员使用常规实验可以确定适当的有效量。

[0137] 包括所公开组合物的用于治疗疾病或感染的治疗的功效可以通过熟练的临床医生确定。然而,如果疾病的至少任何一种或全部体征或症状得到改善或改进,则治疗被认为是有效的治疗。还可以通过如住院治疗或对医疗干预的需要(例如,疾病或感染进展停止或至少减缓)所评估的个体恶化的失败来测量功效。测量这些指示物的方法是本领域技术人员已知的和/或在本文中描述。治疗包括对受试者或动物的疾病或感染的任何治疗(一些非限制性例子包括人或哺乳动物)并且包括:(1)抑制疾病或感染,例如,停止或减缓症状的进展;或(2)缓解疾病或感染,例如,导致症状消退;以及(3)预防或减少症状发展的可能性。

[0138] 在一些实施方案中,可以将本公开文本的核酸构建体(例如,载体或srRNA分子)、重组细胞、重组多肽和/或药物组合物在具有药学上可接受的载体的组合物中并且以有效刺激免疫应答的量施用于受试者。总体上,受试者可以通过最初的一系列注射(或通过下文所述的其他途径之一施用)进行免疫,并且随后给予增强剂以增加最初的一系列施用所提供的保护。以刺激受试者的免疫应答所必需的剂量和并且经刺激受试者的免疫应答所必需的时间段施用初始系列的注射和随后的增强剂。在一些实施方案中,与尚未被施用所述组合物的受试者的干扰素产生相比,所施用的组合物导致受试者中干扰素的产生增加,例如,增加至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%或至少100%。在所公开的方法的一些实施方案中,所述受试者是哺乳动物。在一些实施方案中,所述哺乳动物是人类受试者。

[0139] 如上所述,适用于注射使用的药学上可接受的载体包括无菌水溶液(水溶性的)或分散体,以及用于临时制备无菌可注射溶液或分散体的无菌粉末。在这些情况下,组合物必须是无菌的并且应当是易于注射的程度的流体。所述组合物在制造和储存条件下必须也是

稳定的并且必须抵抗微生物(如细菌和真菌)的污染作用而保存。载体可以是溶剂或分散介质,所述溶剂或分散介质含有例如水、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)、其合适的混合物以及植物油。例如通过使用包衣(如卵磷脂),在分散体的情况下通过维持所需的粒度,以及通过使用表面活性剂,可以维持适当的流动性。防止微生物的作用可以通过各种抗菌剂和抗真菌剂(例如,对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞等)来实现。

[0140] 无菌可注射溶液可以通过以下方式制备:将核酸构建体(例如,载体或srRNA分子)、重组细胞和/或重组多肽以所需量掺入根据需要具有上文所列举的成分中的一种或组合的适当溶剂中,随后过滤灭菌。

[0141] 当核酸构建体(例如,载体或srRNA分子)、重组细胞、重组多肽和/或药物组合物如上文所述进行适当保护时,它们可以口服施用,例如,用惰性稀释剂或可同化的可食用载体施用。也可以将核酸构建体(例如,载体或srRNA分子)、重组细胞、重组多肽和/或药物组合物和其他成分封装在硬或软壳明胶胶囊中,压缩成片剂,或直接掺入个体的饮食中。对于口服治疗施用,可以将活性化合物与赋形剂一起掺入并且以可摄入片剂、口含片剂、锭剂、胶囊、酏剂、混悬剂、糖浆、糯米纸囊剂(wafer)等形式使用。

[0142] 在一些实施方案中,本公开文本的核酸构建体(例如,载体或srRNA分子)和重组多肽可以通过基于脂质的纳米颗粒(LNP)递送至细胞或受试者。LNP的免疫原性通常低于病毒颗粒。尽管许多人对病毒颗粒具有预先存在的免疫力,但是对LNP却没有预先存在的免疫力。另外,不太可能发生针对LNP的适应性免疫应答,因此使得LNP能够重复给药。

[0143] 已经开发出几种不同的可电离阳离子脂质用于LNP。这些尤其包括C12-200、MC3、LN16和MD1。例如,在一种类型的LNP中,GalNAc部分附接至LNP的外部,并且充当配体,以经由去唾液酸糖蛋白受体吸收到肝脏中。这些阳离子脂质中的任一种可用于配制LNP以将本公开文本的核酸构建体(例如,载体或srRNA分子)和重组多肽递送至肝脏。

[0144] 在一些实施方案中,LNP是指直径小于1000nm、500nm、250nm、200nm、150nm、100nm、75nm、50nm或25nm的任何颗粒。可替代地,纳米颗粒的尺寸可以在1-1000nm、1-500nm、1-250nm、25-200nm、25-100nm、35-75nm或25-60nm的范围内。

[0145] LNP可以由阳离子、阴离子或中性脂质制成。中性脂质(如促融合磷脂DOPE或膜组分胆固醇)可以作为“辅助脂质”被包含在LNP中以增强转染活性和纳米颗粒稳定性。阳离子脂质的局限性包括由于稳定性差和快速清除而导致的低功效,以及产生炎性应答或抗炎性应答。LNP也可以具有疏水性脂质、亲水性脂质、或既疏水又亲水的脂质。

[0146] 本领域已知的许多脂质或脂质的组合可用于产生LNP。适合用于产生LNP的脂质的非限制性例子包括DOTMA、DOSPA、DOTAP、DMRIE、DC-胆固醇、DOTAP-胆固醇、GAP-DMORIE-DPyPE和GL67A-DOPE-DMPE-聚乙二醇(PEG)。阳离子脂质的非限制性例子包括98N12-5、C12-200、DLin-KC2-DMA(KC2)、DLin-MC3-DMA(MC3)、XTC、MD1和7C1。中性脂质的非限制性例子包括DPSC、DPPC、POPC、DOPE和SM。PEG修饰的脂质的非限制性例子包括PEG-DMG、PEG-CerC14和PEG-CerC20。

[0147] 在一些实施方案中,脂质可以任意数目的摩尔比率组合以产生LNP。另外,一种或多种多核苷酸可以以宽范围的摩尔比率与一种或多种脂质组合以产生LNP。

[0148] 在一些实施方案中,可以将本文所述的治疗性组合物(例如,核酸构建体(例如,载

体或srRNA分子)、重组细胞、重组多肽和/或药物组合物)掺入治疗性组合物中以用于在预防或治疗患有、怀疑患有或者可能有高风险患上癌症、自身免疫性疾病和/或感染的受试者的方法中使用。

[0149] 在一些实施方案中,将本文所述的治疗性组合物(例如,核酸构建体(例如,载体或srRNA分子)、重组细胞、重组多肽和/或药物组合物)掺入治疗性组合物中以用于在预防或治疗患有、怀疑患有或可能有高风险患上微生物感染的受试者的方法中使用。在一些实施方案中,所述微生物感染是细菌感染。在一些实施方案中,所述微生物感染是真菌感染。在一些实施方案中,所述微生物感染是病毒感染。

另外的疗法

[0150] 在一些实施方案中,将根据本公开文本的组合物作为单一疗法(单药疗法)单独地或作为第一疗法与至少一种另外的疗法(例如,第二疗法)组合地施用于所述受试者。在一些实施方案中,所述第二疗法选自化学疗法、放射疗法、免疫疗法、激素疗法、毒素疗法、靶向疗法和手术。在一些实施方案中,所述第二疗法选自化学疗法、放射疗法、免疫疗法、激素疗法、毒素疗法或手术。在一些实施方案中,将所述第一疗法和所述第二疗法伴随施用。在一些实施方案中,将所述第一疗法与所述第二疗法同时施用。在一些实施方案中,将所述第一疗法和所述第二疗法依序施用。在一些实施方案中,在所述第二疗法之前施用所述第一疗法。在一些实施方案中,在所述第二疗法之后施用所述第一疗法。在一些实施方案中,在所述第二疗法之前和/或之后施用所述第一疗法。在一些实施方案中,将所述第一疗法和所述第二疗法轮流施用。在一些实施方案中,将所述第一疗法和所述第二疗法以单一配制品一起施用。

试剂盒

[0151] 本文还提供了用于实践本文所述方法的各种试剂盒以及用于制造和使用试剂盒的书面说明。具体地,本公开文本的一些实施方案提供了用于调节受试者的免疫应答的试剂盒。一些其他实施方案涉及用于预防有需要的受试者的健康病症的试剂盒。一些其他实施方案涉及用于治疗有需要的受试者的健康病症的方法的试剂盒。例如,在一些实施方案中,本文提供了试剂盒,所述试剂盒包含如本文提供和描述的核酸构建体(例如,载体或srRNA分子)、重组细胞、重组多肽和/或药物组合物中的一种或多种,以及制备和使用它们的书面说明书。

[0152] 在一些实施方案中,本公开文本的试剂盒进一步包含可用于将所提供的核酸构建体(例如,载体或srRNA分子)、重组细胞、重组多肽和/或药物组合物中的任一种施用于受试者的一种或多种手段。例如,在一些实施方案中,本公开文本的试剂盒进一步包含一个或多个注射器(包括预充注射器)和/或导管(包括预充注射器),以用于将所提供的核酸构建体(例如,载体或srRNA分子)、重组细胞、重组多肽和/或药物组合物中的任一种施用于受试者。在一些实施方案中,试剂盒可以具有一种或多种另外的治疗剂,所述一种或多种另外的治疗剂可与其他试剂盒组分同时或依序施用以用于期望目的,例如,用于诊断、预防或治疗有需要的受试者的病症。

[0153] 上述试剂盒中的任一种可以进一步包含一种或多种另外的试剂,其中此类另外的试剂可以选自:稀释缓冲液;重构溶液、洗涤缓冲液、对照试剂、对照表达载体、阴性对照、阳性对照、适合于本公开文本所提供的核酸构建体(例如,载体或srRNA分子)、重组细胞、重组

多肽和/或药物组合物的体外产生的试剂。

[0154] 在一些实施方案中,试剂盒的组分可以在单独容器中。在一些其他实施方案中,试剂盒的组分可以组合在单一容器中。因此,在本公开文本的一些实施方案中,试剂盒包括在一个容器中(例如,在无菌玻璃或塑料小瓶中)的如本文所提供和描述的核酸构建体(例如,载体或srRNA分子)、重组细胞、重组多肽和/或药物组合物中的一种或多种以及在另一个容器中(例如,在无菌玻璃或塑料小瓶中)的另一种治疗剂。

[0155] 在另一个实施方案中,试剂盒包括在单个共用容器中的本文所述的组合物的组合,所述组合包括一种或多种本公开文本的核酸构建体(例如,载体或srRNA分子)、重组细胞和/或重组多肽与一种或多种另外的治疗剂的组合,将它们配制在一起,任选地,配制于药物组合物中。

[0156] 如果试剂盒包括用于肠胃外施用至受试者的药物组合物,则所述试剂盒可以包括用于进行这样的施用的装置(例如,注射装置或导管)。例如,试剂盒可以包括含有一种或多种本公开文本的核酸构建体(例如,载体或srRNA分子)、重组细胞和/或重组多肽的一个或多个皮下注射针或如上所讨论的其他注射装置。

[0157] 在一些实施方案中,试剂盒还可以包含使用试剂盒的组分来实践本文所公开方法的说明书。例如,试剂盒可以包括包含关于试剂盒中的药物组合物和剂型的信息的药品说明书。通常,这样的信息帮助患者和医师有效且安全地使用封装的药物组合物和剂型。例如,关于本公开文本的組合的以下信息可以在药品说明书中提供:药代动力学、药效学、临床研究、功效参数、适应症和用法、禁忌证、警告、注意事项、不良反应、过量用药、适当的剂量和施用、如何供应、适当的储存条件、参考文献、制造商/经销商信息以及知识产权信息。

[0158] 用于实践所述方法的说明书通常记录在合适的记录介质上。例如,所述说明书可以印刷在基材上,如纸或塑料等。所述说明书可以作为包装插入物存在于试剂盒中、试剂盒的容器或其组分的标签中(例如,与包装或分包装相关联)等。所述说明书可以作为存在于合适的计算机可读存储介质(例如,CD-ROM、软盘、闪存驱动器等)上的电子存储数据文件而存在。在一些情形下,实际说明书不存在于所述试剂盒中,而是可以提供用于从远程源(例如,经由互联网)获得所述说明书的装置。此实施方案的例子是包括网址的试剂盒,在所述网址中可以查看说明书和/或可以从其下载说明书。与说明书一样,可以将这种用于获得说明书的手段记录在合适的基材上。

[0159] 将本公开文本中提到的所有出版物和专利申请都通过引用并入本文,并入程度如同确切且单独地指示每个单独出版物或专利申请都通过引用并入一般。

[0160] 不承认本文引用的任何参考文献构成现有技术。参考文献的讨论内容陈述了其作者所主张的观点,并且本申请人保留对所引用文件的准确性和针对性提出质疑的权利。应清楚地理解的是,尽管在本文中提及许多信息源,包括科学期刊文章、专利文件和教科书;但此提及并不构成承认任何这些文件构成本领域公知常识的一部分。

[0161] 本文给出的一般方法的讨论仅旨在用于说明目的。在审阅本公开文本后,其他替代方法和替代方案对于本领域技术人员而言将是清楚的,并且将被包括在本申请的精神和范围内。

[0162] 在以下实施例中进行进一步详细公开了另外的实施方案,所述实施例仅以说明方式提供,而并非旨在以任何方式限制本公开文本或权利要求的范围。

实施例

[0163] 除非另有说明,否则本发明的实践将采用本领域技术人员熟知的分子生物学、微生物学、细胞生物学、生物化学、核酸化学和免疫学的常规技术。这样的技术充分解释于文献中,如Sambrook,J.,&Russell,D.W. (2012).Molecular Cloning:A Laboratory Manual (第4版).Cold Spring Harbor,NY:Cold Spring Harbor Laboratory以及Sambrook,J.和Russell,D.W. (2001).Molecular Cloning:A Laboratory Manual (第3版).Cold Spring Harbor,NY:Cold Spring Harbor Laboratory(在本文中联合称为“Sambrook”);Ausubel,F.M. (1987).Current Protocols in Molecular Biology.New York,NY:Wiley(包括至2014年的补充);Bollag,D.M.等人(1996).Protein Methods.New York,NY:Wiley-Liss;Huang,L.等人(2005).Nonviral Vectors for Gene Therapy.San Diego:Academic Press;Kaplitt,M.G.等人(1995).Viral Vectors:Gene Therapy and Neuroscience Applications.San Diego,CA:Academic Press;Lefkovits,I. (1997).The Immunology Methods Manual:The Comprehensive Sourcebook of Techniques.San Diego,CA:Academic Press;Doyle,A.等人(1998).Cell and Tissue Culture:Laboratory Procedures in Biotechnology.New York,NY:Wiley;Mullis,K.B.,Ferré,F.和Gibbs,R. (1994).PCR:The Polymerase Chain Reaction.Boston:Birkhauser Publisher;Greenfield,E.A. (2014).Antibodies:A Laboratory Manual (第2版).New York,NY:Cold Spring Harbor Laboratory Press;Beaucage,S.L.等人(2000).Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry.New York,NY:Wiley,(包括至2014年的补充);以及Makrides,S.C. (2003).Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells.Amsterdam,NL:Elsevier Sciences B.V.,将文献的公开内容通过引用并入本文。

[0164] 在以下实施例中进一步详细公开了另外的实施方案,所述实施例仅以说明方式提供,而并非旨在以任何方式限制本公开文本或权利要求的范围。

实施例1

EEEV载体的构建

[0165] 本实施例描述了为构建基础EEEV载体(例如,没有异源基因)而进行的实验的结果,所述基础EEEV载体随后用于构建具有目的基因(例如,甲型流感病毒H5N1的血凝素前体(HA))表达的EEEV载体。

[0166] 初步观察到,公开可得的甲病毒基因组数据并不总是提供能够用目的基因(GOI)直接替代编码结构蛋白的核酸序列以得到自复制RNA和表达转基因的复制子的核苷酸序列。如下面更详细描述,可以用来自甲型流感病毒H5N1的血凝素(HA)基因替代EEEV毒株FL93-939中的结构多蛋白基因(参见例如,图2B),以产生够在BHK-21细胞中进行RNA复制和转基因表达的复制子(例如,自复制RNA)(参见例如,图3B)。如下构建基础EEEV载体(即不含异源目的基因):从具有几个修饰的参考序列(Genbank EF151502)以四个约4kb的部分(Twist Bioscience)从头合成基础EEEV载体(参见例如,图2A)。掺入沉默G301A、G4516A和G7399A突变以消除SapI限制性酶切位点。掺入沉默A3550C突变以消除SpeI限制性酶切位点。掺入沉默G5725A突变以消除Esp3I限制性酶切位点。掺入独特的限制性酶切位点(SpeI, 5'-A'CTAG,T-3')来代替天然EEEV结构基因的编码序列(其中5'A与结构多蛋白ATG起始密码子的位置匹配,并且3'T与结构多蛋白终止密码子TAA的位置匹配)。将5'衔接子序列(5'-

CTGGAGACGTGGAGGAGAACCCTGGACCT-3';SEQ ID NO:3)插入SpeI位点的上游,并且将3'衔接子序列(5'-GACCGCTACGCCCCAATGACCCGACCAGC-3';SEQ ID NO:4)插入SpeI位点的下游,用于随后的Gibson Assembly®程序(Gibson等人,Nat.Methods 6,343-345,2009)。将噬菌体T7 RNA聚合酶启动子(5'-TAATACGACTCACTATAG-3';SEQ ID NO:5)包含在EEEV基因组序列的上游,并且下游含有聚(A)序列,随后是在识别位点上游切割的SapI位点。紧邻SapI位点下游的是T7终止子序列(5'-AACCCCTCTCTAAACGGAGGGGTTTTTTT-3';SEQ ID NO:6),随后是独特的限制性酶切位点(NotI,5'-GC'GGCC,GC-3')。将这些部分在五件式Gibson Assembly®反应(线性化的pYL骨架和四个合成片段)中合并以得到EEEV基础载体。

[0167] 如下进行含有异源基因的EEEV载体的构建:通过SpeI消化将图2A中的空EEEV载体线性化,来构建图2B中描述的EEEV载体。在计算机中对来自流感的血凝素(HA)基因(Genbank AY651334)进行密码子优化/重构以供人类表达,并且从头合成(IDT)。使用将5'和3'衔接子序列添加至HA基因末端的引物扩增合成产物。将消化产物和PCR产物通过Gibson Assembly®程序合并以产生最终载体。

实施例2

经修饰的EEEV载体的体外评价

[0168] 本实施例描述了为了评价上文实施例1中描述的合成EEEV复制子构建体(例如,自复制RNA)的表达水平以及为了研究其各种差异性行为(例如,复制和蛋白质表达)而进行的体外实验的结果。

[0169] 在这些实验中,设计并随后评价了源自EEEV毒株FL93-939的合成复制子构建体(例如,自复制RNA)。

[0170] 体外转录:srRNA是用噬菌体T7聚合酶从SapI线性化质粒模板通过体外转录来制备,具有5'ARCA帽(HiScribe™T7 ARCA mRNA试剂盒,NEB),或者通过无帽转录(HiScribe™T7高产量RNA合成试剂盒,NEB)制备,然后添加5'帽1(牛痘加帽系统(Vaccinia Capping System),mRNA帽2'-O-甲基转移酶,NEB)。然后使用苯酚/氯仿萃取、LiCl沉淀或柱纯化(Monarch®RNA纯化试剂盒,NEB)来纯化srRNA。通过在260nm处的吸光度来确定srRNA浓度(Nanodrop,Thermo Fisher Scientific)。

[0171] 复制:通过电穿孔将srRNA转化到BHK-21或Vero细胞中(例如,4D-Nucleofector™,Lonza)。在转化后18-20小时,将细胞固定并且透性化处理(eBioscience™Foxp3/转录因子染色缓冲液组,Invitrogen),随后使用PE缀合的抗dsRNA小鼠单克隆抗体(J2,Scicons)进行染色,以通过荧光流式细胞术定量dsRNA+细胞的频率和单个细胞中的dsRNA的平均荧光强度(MFI)。

[0172] 蛋白质表达:通过电穿孔将srRNA转化到BHK-21或Vero细胞中(例如,4D-Nucleofector™,Lonza)。在转化后18-20小时,将细胞固定并且透性化处理(eBioscience™Foxp3/转录因子染色缓冲液组,Invitrogen),并且使用APC缀合的抗HA小鼠单克隆抗体(2B7,Abcam)染色,以通过荧光流式细胞术定量表达HA蛋白的细胞的频率和单个细胞中的HA蛋白的平均荧光强度(MFI)。

[0173] 另外的实验:在RNA电穿孔之前,将BHK-21或Vero细胞用重组干扰素(IFN)的滴定曲线预处理,并且使用上文所述的测定来测量对载体的复制和蛋白质表达的影响。

[0174] 上文所述实验结果说明,展现出RNA复制(例如,通过如上文所述的流式细胞术检

测)的自复制RNA(srRNA)构建体可以被认为是诱导药代动力学效应的有希望的实用载体。另外,展现出一种或多种转基因的蛋白质表达的srRNA构建体可以被认为是诱导另外的药代动力学效应(例如,引发宿主的免疫应答)的有希望的实用载体。

实施例3

经修饰的EEEV载体的体外评价

[0175] 本实施例描述了为了评价合成EEEV自复制RNA(srRNA)的表达水平以及为了研究其各种差异性行为(例如,复制和蛋白质表达)而进行的体外实验的结果。

[0176] 在这些实验中,设计并且随后评价了源自EEEV毒株FL93-939的合成srRNA,包括表达两种参考转基因的对照VEEV srRNA(RBI296、RBI298)、编码呈两种构型的IL-1RA和IL-12二者的VEEV srRNA(RBI299、RBI300)以及编码呈两种构型的IL-1RA和IL-12二者的EEEV srRNA(RBI305、RBI306)。

[0177] 体外转录:srRNA是用噬菌体T7聚合酶从SapI线性化质粒模板通过体外转录来制备,通过无帽转录(HiScribe™T7高产量RNA合成试剂盒,NEB),然后添加5'帽1(牛痘加帽系统,mRNA帽2'-O-甲基转移酶,NEB)。然后通过LiCl沉淀纯化srRNA。通过在260nm处的吸光度确定srRNA浓度(Nanodrop,Thermo Fisher Scientific)。

[0178] 蛋白质表达:通过电穿孔将srRNA转化到BHK-21细胞中(例如,4D-Nucleofector™,Lonza)。在转化之后24和48小时,从细胞收集条件培养基。通过将HEK-Blue™IL-1R细胞(InvivoGen)与一系列浓度的重组IL-1RA(Peprotech)或条件培养基一起预孵育,在生物活性测定中评价分泌的IL-1RA。将重组IL-1B(Invivogen)添加至细胞并且孵育过夜,然后使用QUANTI-Blue™(Invivogen)定量SEAP报告基因(参见例如,图4A)。

[0179] 通过将一系列浓度的重组IL-12(Peprotech)或条件培养基在IL-12生物测定细胞(Promega)上在DMEM中孵育过夜,在生物活性测定中评价分泌的IL-12,然后使用Bio-Glo™荧光素酶(Promega)定量荧光素酶报告基因(参见例如,图4B)。

[0180] 上文所述实验结果说明,展现出一种或多种转基因的蛋白质表达的srRNA构建体可以被认为是诱导药代动力学效应(例如,引发宿主的免疫应答)的有希望的实用载体。评价从srRNA载体表达的蛋白质的活性对于验证表达的蛋白质保留引起药代动力学效应的预期功能是重要的。载体之间相对蛋白质表达的差异可以提供优势(例如,用更低的剂量实现同等蛋白质表达水平)。

实施例4

经修饰的EEEV载体的体内评价

[0181] 本实施例描述了为了评价用上文实施例1和2中所述的合成EEEV复制子构建体(例如,自复制RNA)(例如,未配制的载体和LNP配制的载体二者)进行疫苗接种后的任何差异性免疫应答而进行的体内实验的结果。

[0182] 在这些实验中,设计并随后评价了源自EEEV毒株FL93-939的合成复制子构建体(例如,自复制RNA)。

[0183] 小鼠和注射.雌性C57BL/6或BALB/c小鼠购自Charles River Labs或Jackson Laboratories。在给药当天,将0.1-10μg之间的材料分开肌肉内注射到两个四头肌中。载体未配制形式在盐水中施用,或以LNP配制的形式施用。在整个研究过程中,监测动物的体重和其他总体观察。对于免疫原性研究,在第0天和第21天向动物给药。在第14天和/或第35天

收集脾,并且在第14天和/或第35天分离血清。编码病毒抗原狂犬病糖蛋白G的srRNA的体内免疫原性通过两次免疫接种后通过ELISpot评价抗原特异性脾T细胞应答(图5A)和来自血清的抗狂犬病中和抗体滴度(参见例如,图5B)来评估。与盐水对照相比,所有srRNA免疫组均显示稳健的T细胞应答(参见例如,图5A),但是在srRNA疫苗之间观察到差异性应答。类似地,所有srRNA免疫组均显示保护性中和抗体滴度,但在srRNA疫苗之间存在一些差异(参见例如,图5B)。除了感染性疾病抗原外,还评估了基于srRNA的疫苗对癌症抗原的免疫原性(图6A-图6C)。每种srRNA疫苗共编码来自ESR1、HER2和HER3的序列。在已经接受两次免疫接种的小鼠中,使用ELISpot分析确定对这三种抗原的脾T细胞应答。观察到对所有三种靶标稳健的T细胞应答,而应答模式在srRNA载体之间不同(参见例如,图6A-图6C)。

[0184] 对于蛋白质表达研究,在第0天向动物给药,并在第3天和/或第7天通过血清ELISA评估蛋白质表达。在小鼠中,肌肉内施用编码人IL12A和IL12B以形成IL-12p70的srRNA。在第7天收集血清以检测全身蛋白质水平(参见例如,图7)。为了证实srRNA编码的生物治疗性蛋白的功能性,向动物施用源自EEEV FL93-939的具有物种匹配的小鼠I112a和I112b基因的编码序列的srRNA。通过评估作为下游药效学标记物的IFN γ 的诱导来测量IL-12的功能性。来自施用srRNA后第3天的小鼠的血清示出可检测水平的IFN γ (参见例如,图8)。

[0185] LNP配制.对于一些研究,将复制子RNA(例如,自复制RNA)使用微流体混合器配制在脂质纳米颗粒中,并且分析粒度、多分散性(使用动态光散射)和包封效率。LNP由可电离脂质、胆固醇、PEG-2K和DOPE构成。

[0186] ELISpot.为了测量抗原特异性T细胞应答的强度,根据制造商的说明使用小鼠IFN γ ELISpot PLUS试剂盒(HRP) (MabTech)进行IFN γ ELISpot分析。简言之,分离脾细胞,并且将其在培养基中重悬至 $2-5 \times 10^6$ 个细胞/mL的浓度,所述培养基含有代表对应于狂犬病糖蛋白G、ESR1、HER2或HER3的肽库的肽、作为阳性对照的PMA/离子霉素、或作为模拟刺激的DMSO。

[0187] 抗体.使用快速荧光灶抑制测试来测量对狂犬病毒的中和抗体应答。简言之,将血清稀释液与标准量的活狂犬病毒混合并且孵育。如果存在中和抗狂犬病抗体,则它们将中和所述病毒。接下来,添加培养的细胞,并将血清/病毒/细胞一起孵育。未包被的狂犬病毒(即,尚未被抗体中和)将感染所述细胞,并且这可以通过显微镜检查来可视化。根据在载玻片上观察到的病毒感染细胞的百分比计算终点滴度。

[0188] ELISA.使用来自R&D Systems的商业试剂盒人IL-12p70 DuoSet ELISA(DY1270)来进行人IL-12p70的检测。使用来自R&D Systems的商业试剂盒(小鼠IFN- γ DuoSet)来进行小鼠血清IFN γ 的检测。

[0189] 总之,这些数据证明,基于EEEV的srRNA载体可用于编码一种或多种抗原和生物治疗性蛋白,并且分别用作疫苗和治疗剂二者的载体,以在体内产生所需的药效学效应。

[0190] 虽然已经公开了本公开文本的特定替代方案,但应理解的是,各种修改和组合是可能的并且被考虑在所附权利要求的真实精神和范围内。因此,无意限制于本文呈现的确切摘要和公开文本。

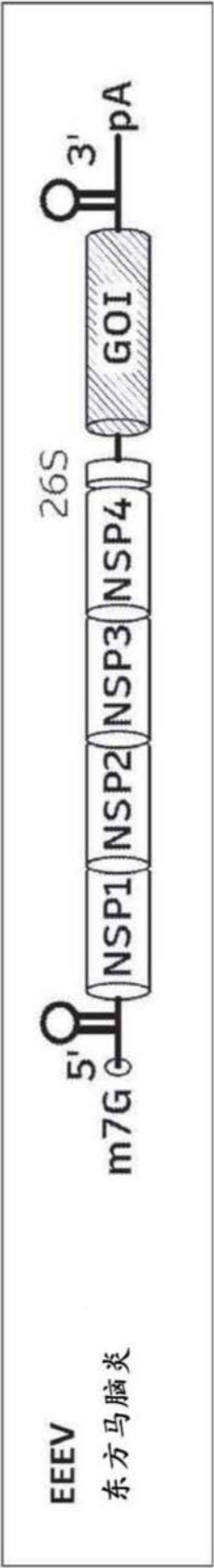


图1

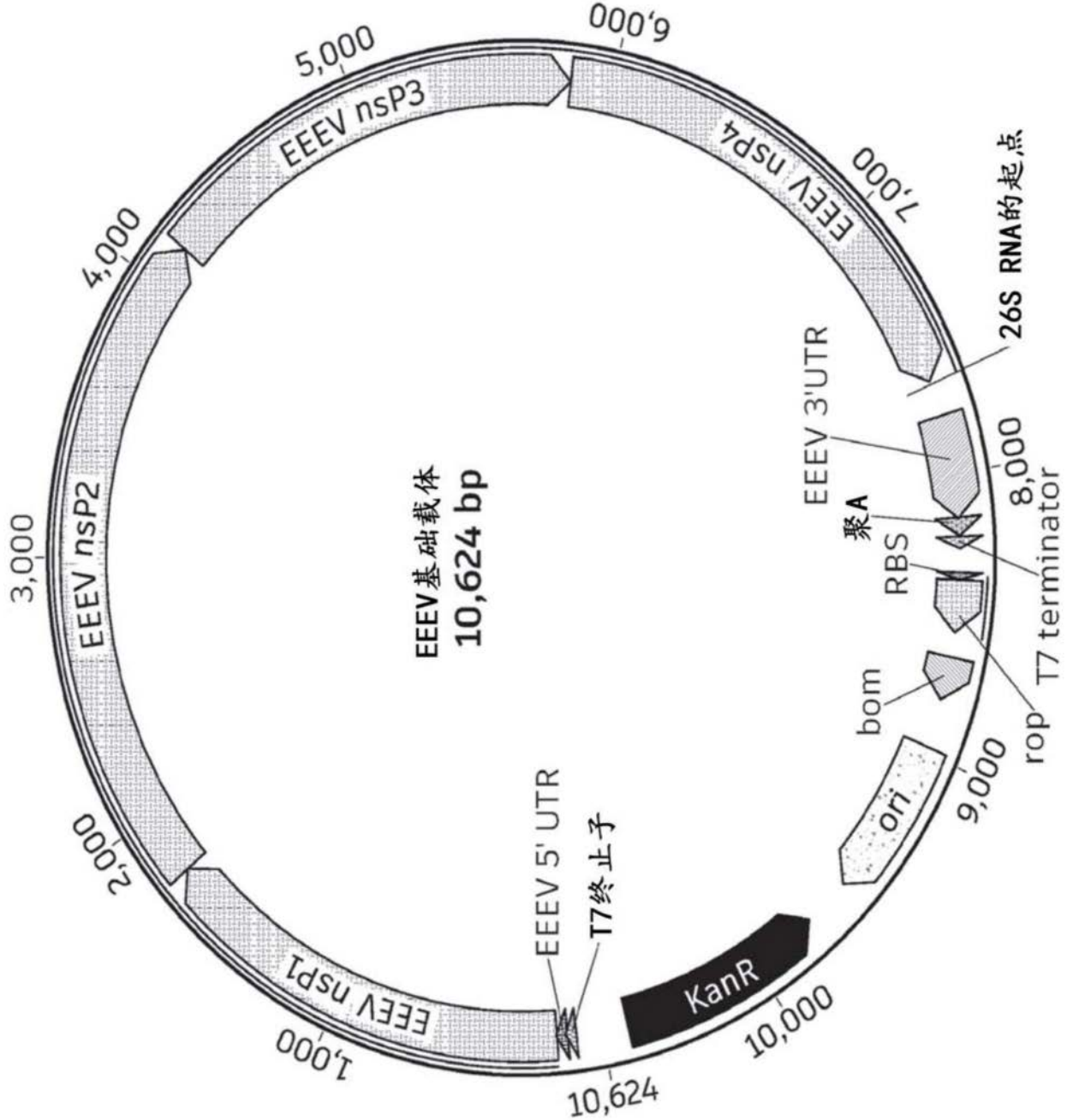


图2A

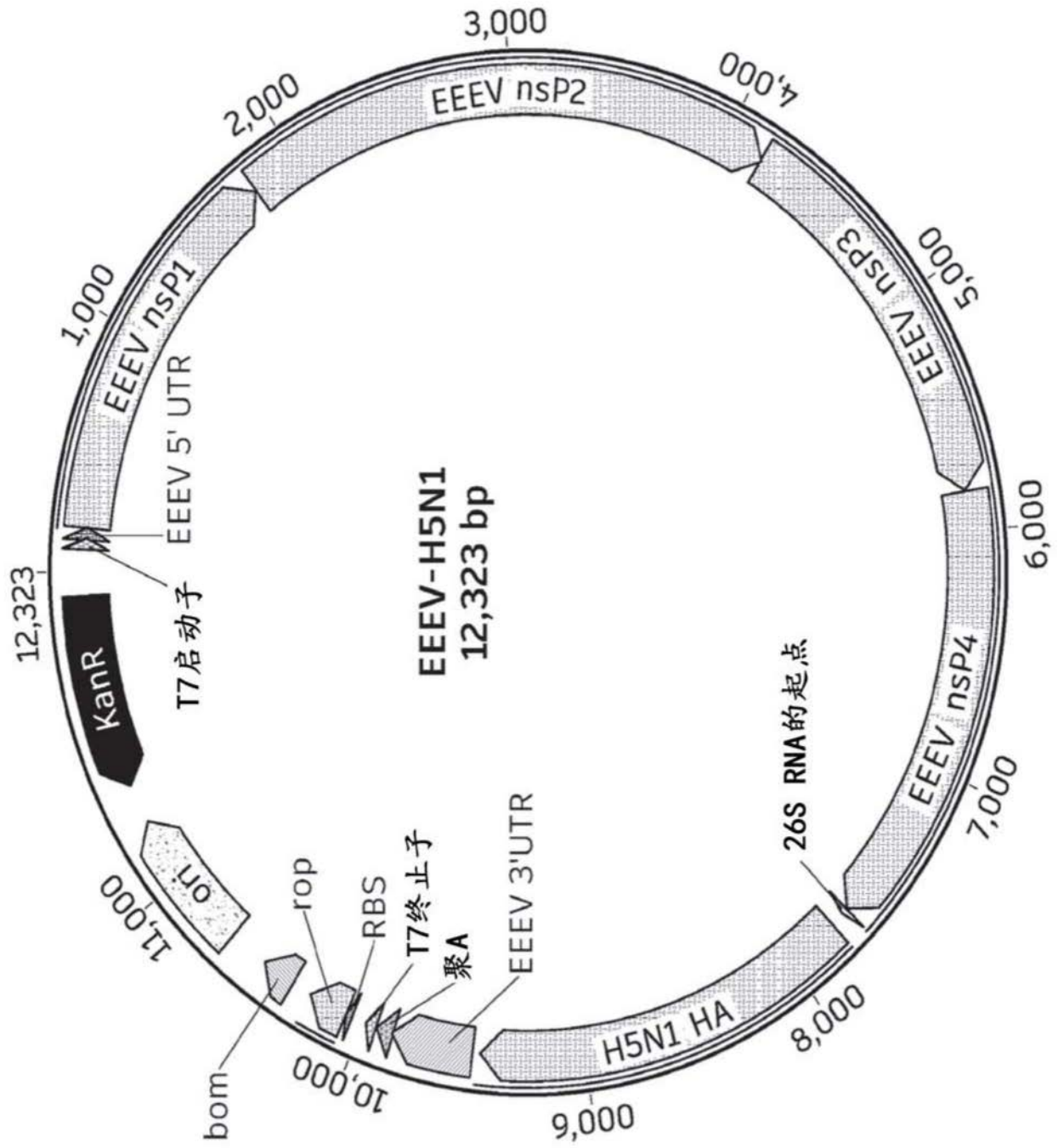


图2B

来自FL93-939毒株的经修饰的EEEEV载体是可行的复制子

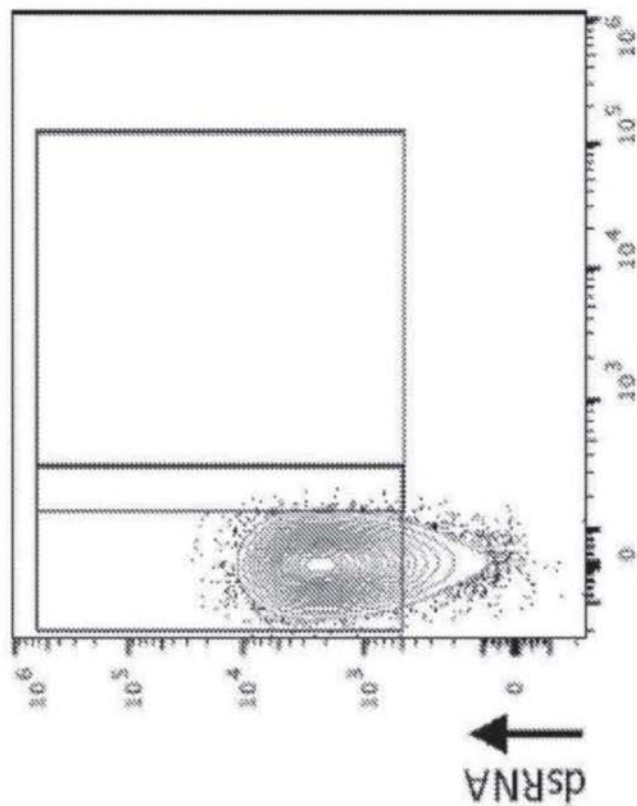


图3A

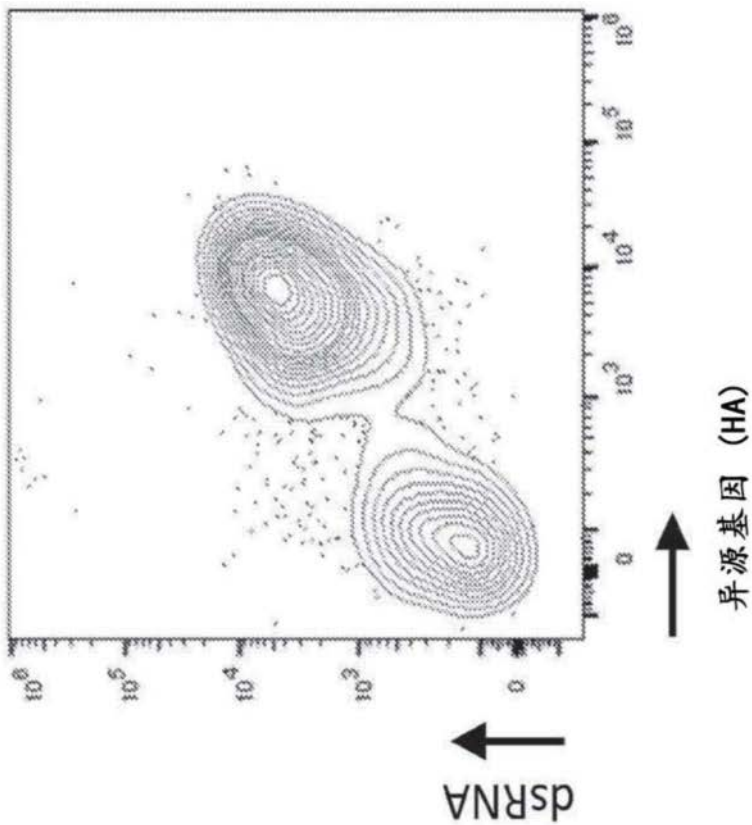


图3B

经修饰的EEEV载体可用于表达生物活性蛋白

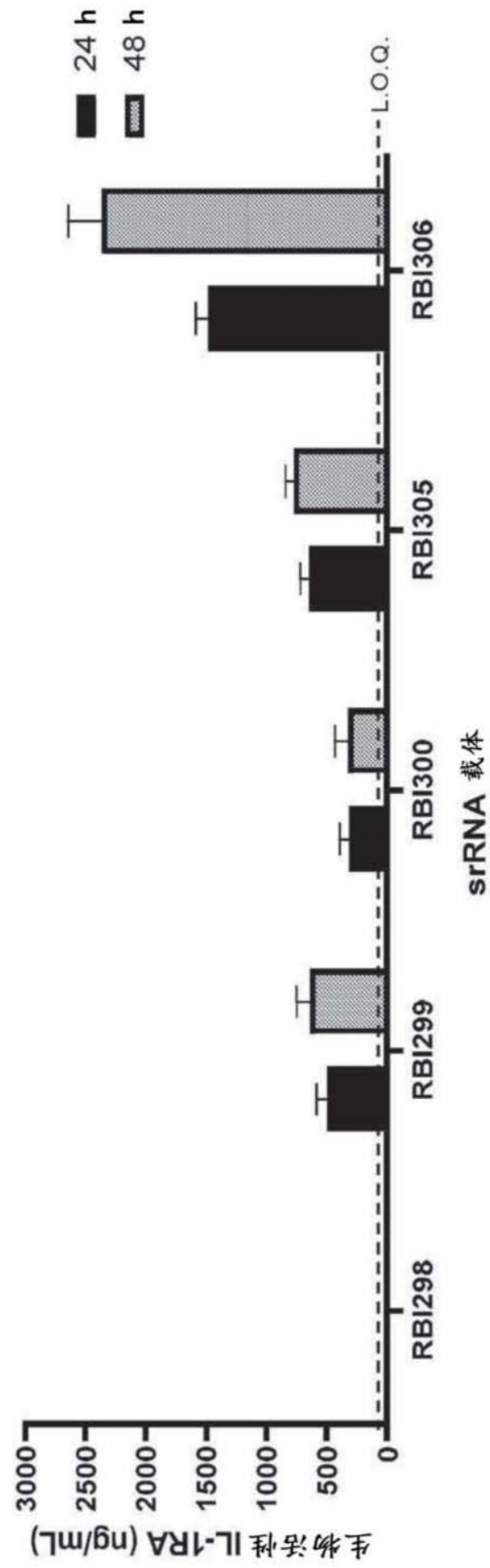


图4A

经修饰的EEEV载体可用于表达生物活性蛋白

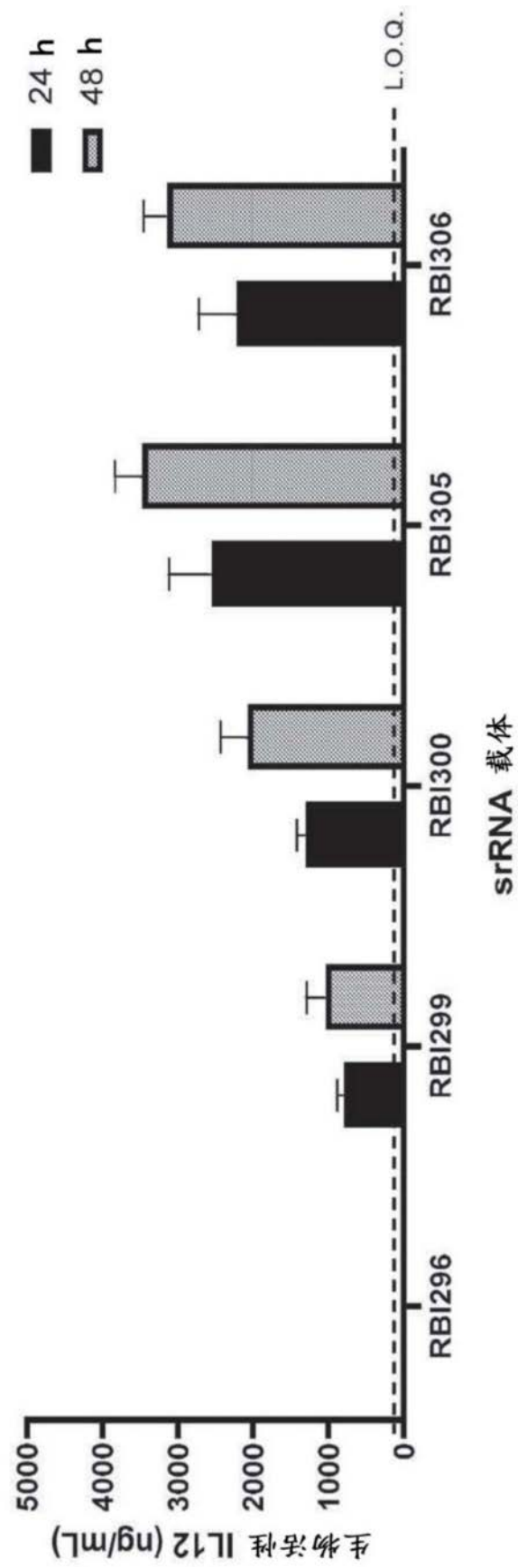
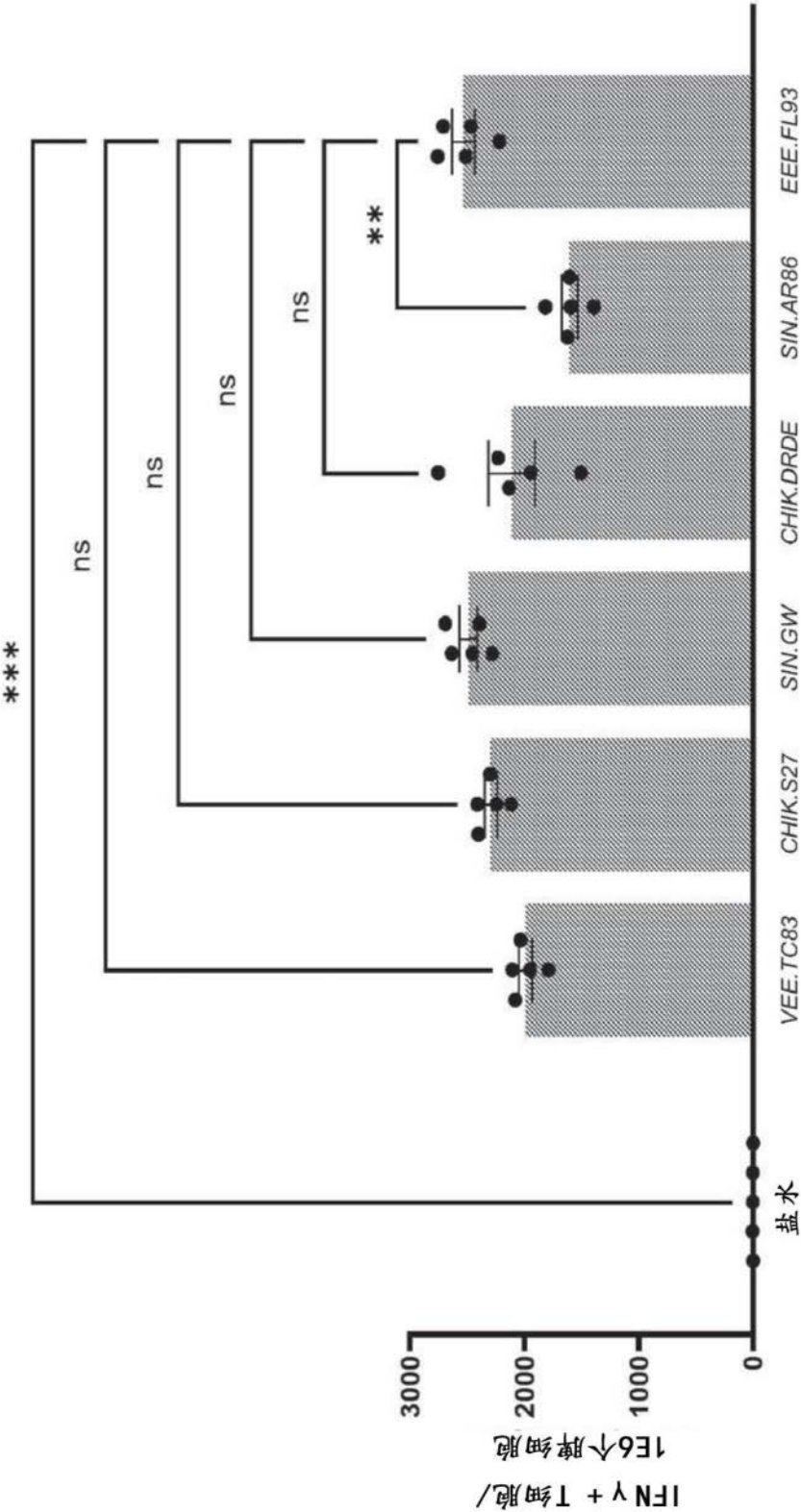


图4B

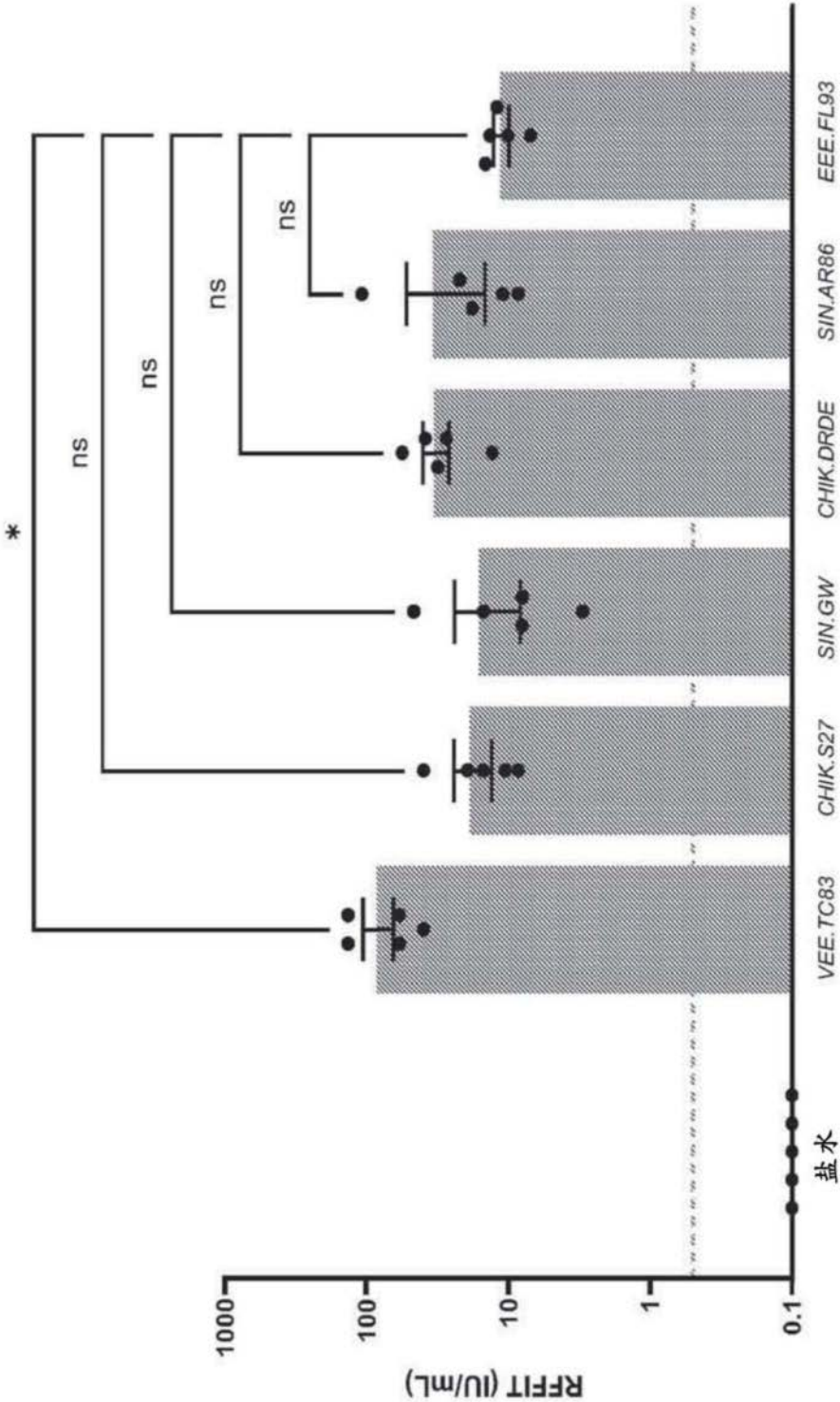
表达病毒抗原的不同srRNA载体的免疫原性



肽刺激库：狂犬病毒糖蛋白G
显示：符号表示单独动物，条形表示平均值和SEM
统计学：克鲁斯卡尔-沃利斯检验

图5A

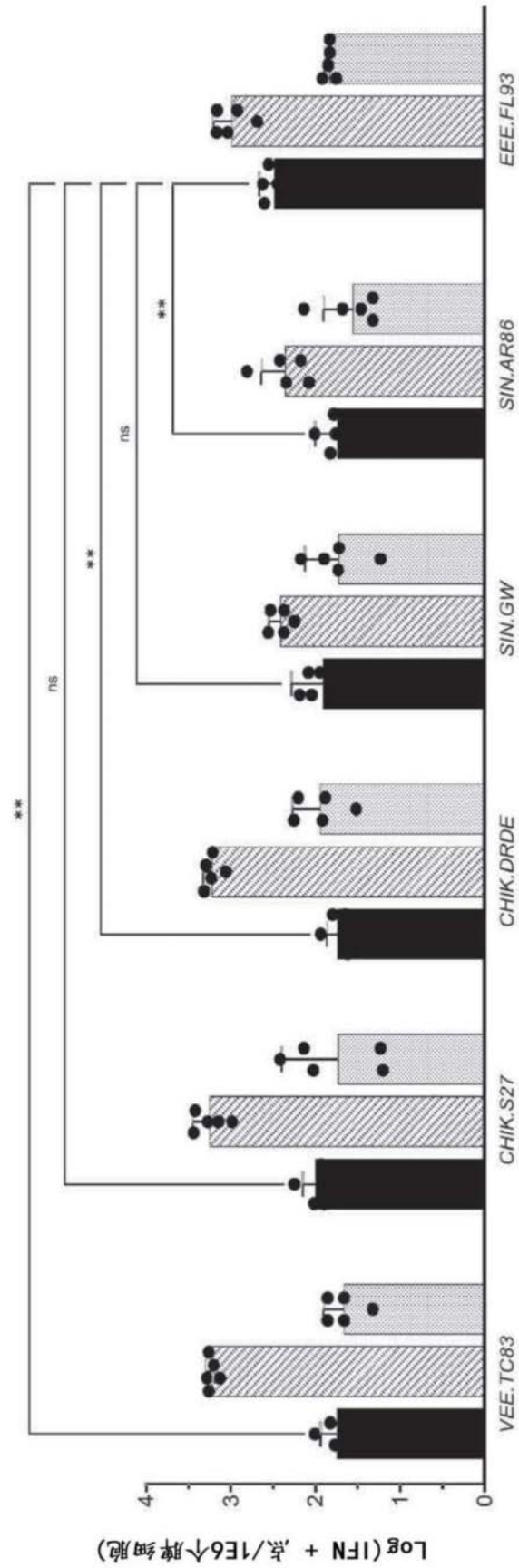
表达病毒抗原的不同srRNA载体的免疫原性



虚线表示0.5 IU/ml的保护性滴度
显示：符号表示单独动物，条形表示几何平均值和几何SD
统计学：克鲁斯卡尔-沃利斯检验

图5B

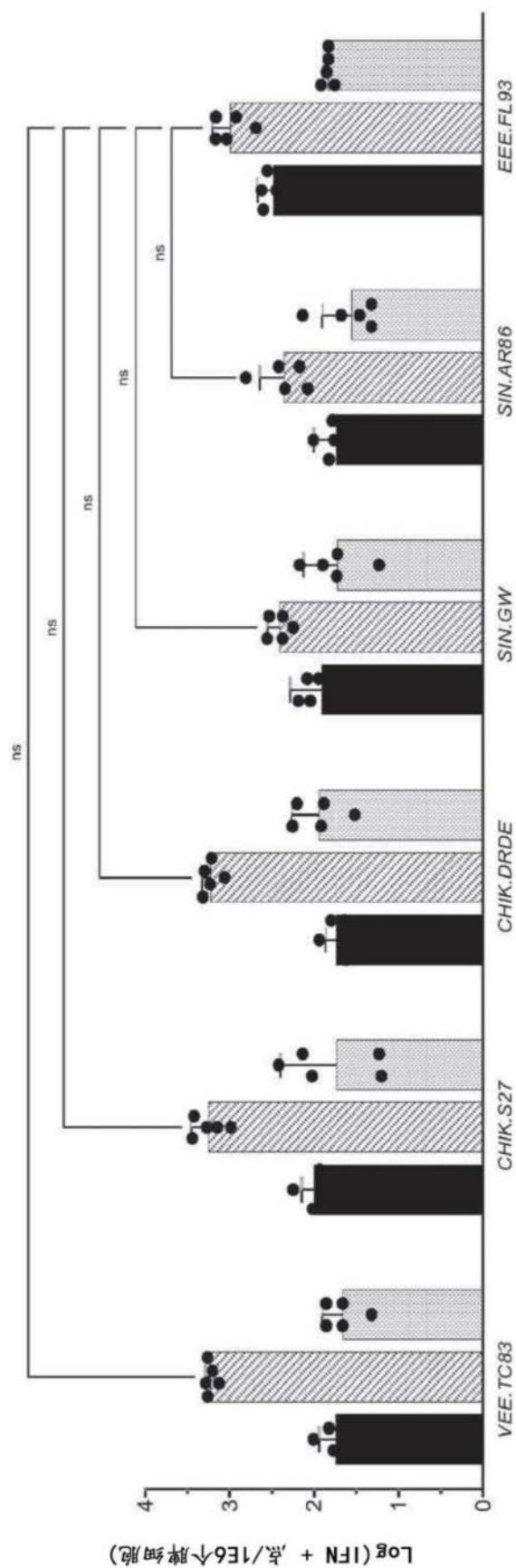
表达癌症相关抗原的不同srRNA载体的免疫原性



肽刺激库: ESR1、HER2 (阴影线)、HER3
 显示: 符号表示单独动物, 条形表示几何平均值和几何SD
 统计学: 克鲁斯卡尔-沃利斯检验

图6A

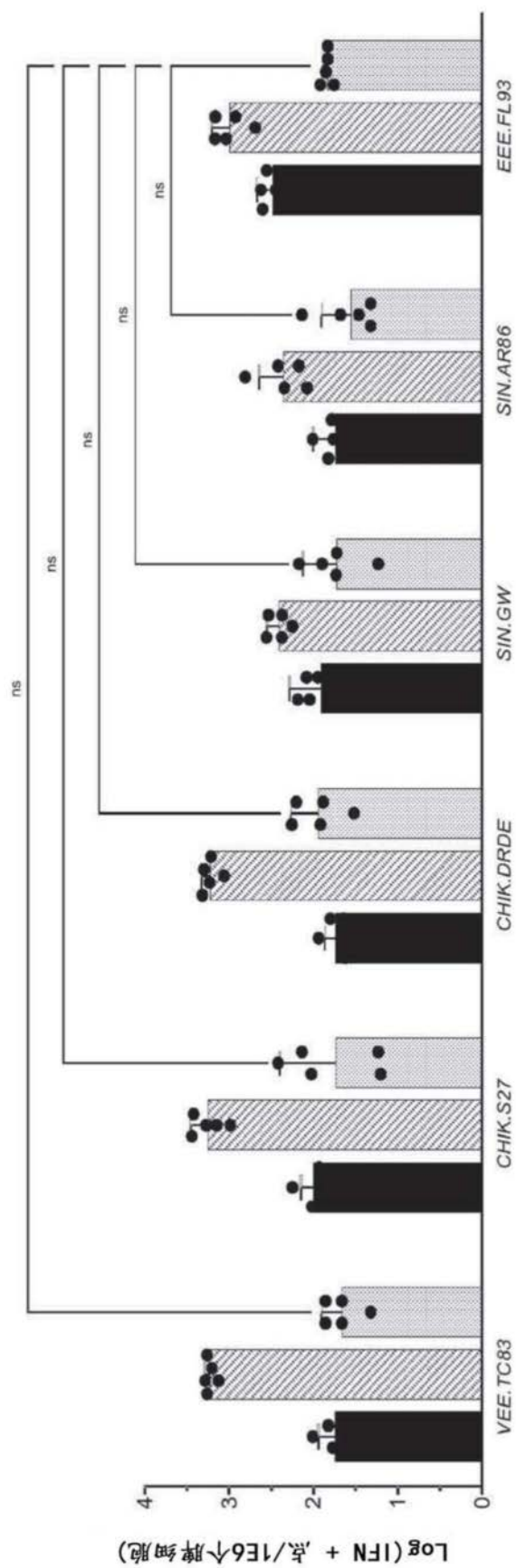
表达癌症相关抗原的不同srRNA载体的免疫原性



肽刺激库: ESR1、HER2 (阴影线)、HER3
 显示: 符号表示单独动物, 条形表示几何平均值和几何SD
 统计学: 克鲁斯卡尔-沃利斯检验

图6B

表达癌症相关抗原的不同srRNA载体的免疫原性



肽刺激库：ESR1、HER2（阴影线）、HER3
 显示：符号表示单独动物，条形表示几何平均值和几何SD
 统计学：克鲁斯卡尔-沃利斯检验

图6C

来自不同srRNA载体的示例性生物治疗性蛋白的体内表达

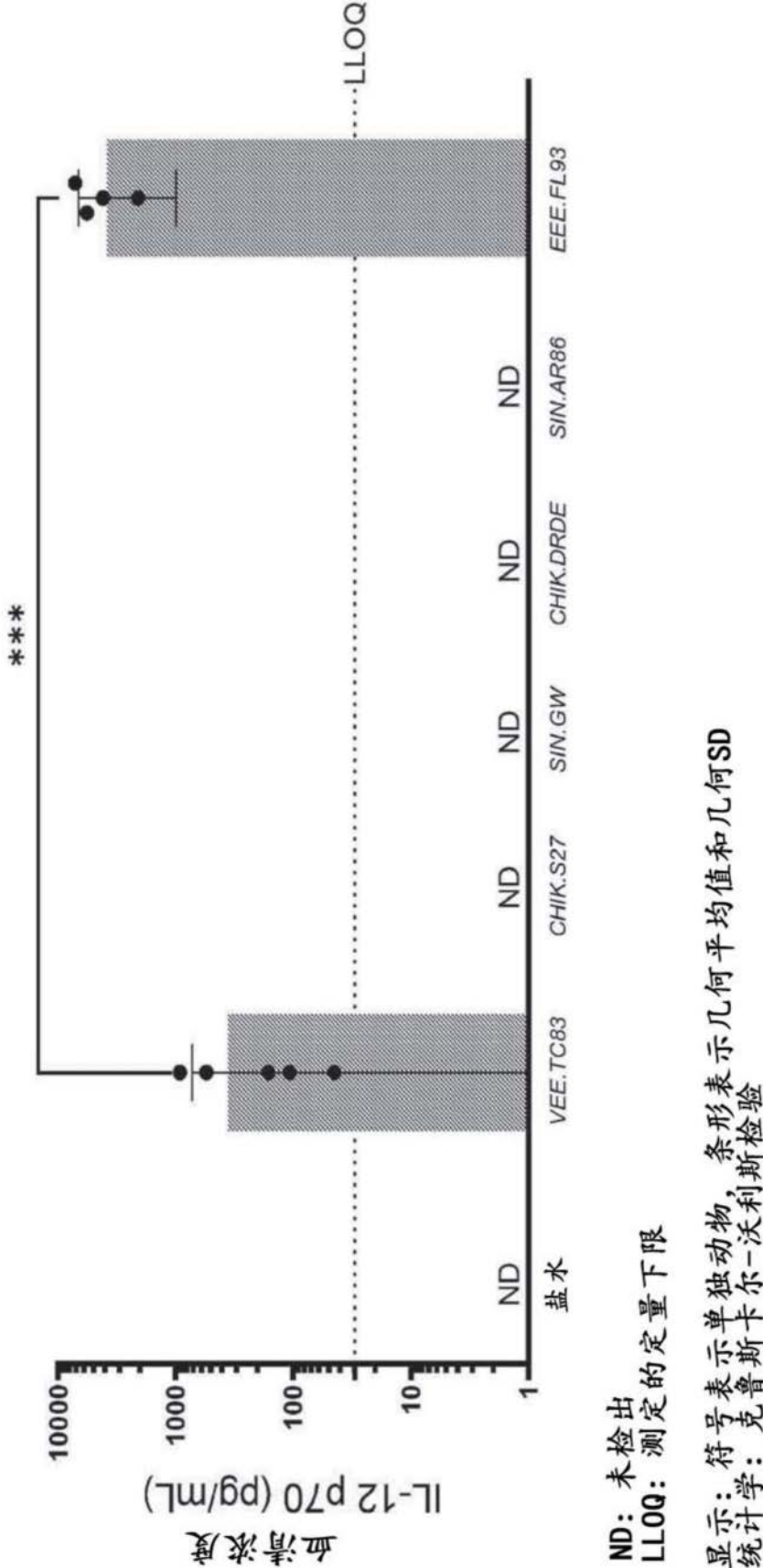
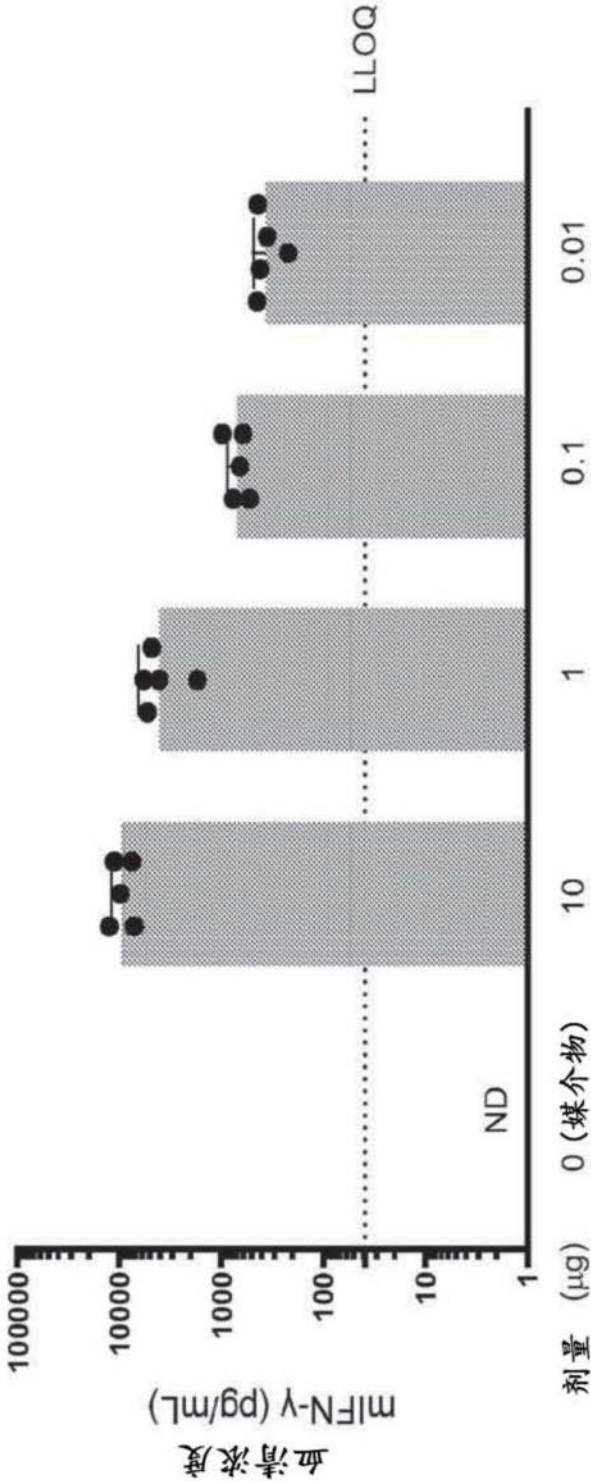


图7

作为由基于EEEEV的srRNA载体编码的生物治疗性蛋白的功能结局的药效学标记物的体内检测



LLOQ: 测定的定量下限
ND: 未检出

显示: 符号表示单独动物, 条形表示几何平均值和几何SD

图8