



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111212650 A

(43)申请公布日 2020.05.29

(21)申请号 201880066146.2

(22)申请日 2018.09.06

(30)优先权数据

1714430.4 2017.09.07 GB

62/632,056 2018.02.19 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2020.04.10

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2018/049772 2018.09.06

(87)PCT国际申请的公布数据

W02019/051100 EN 2019.03.14

(71)申请人 联合治疗公司

地址 美国特拉华州

(72)发明人 R·米科尔 S·安托斯奇克

(74)专利代理机构 隆天知识产权代理有限公司

72003

代理人 吴小瑛 付文川

(51)Int.Cl.

A61K 31/7088(2006.01)

C12N 15/11(2006.01)

A61K 48/00(2006.01)

权利要求书5页 说明书32页

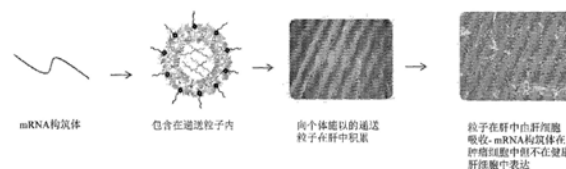
序列表4页 附图22页

(54)发明名称

用于编码核糖核酸在组织中的靶向递送、表达和调节的组合物和方法

(57)摘要

一种用于在靶器官内表达多肽的组合物,所述组合物包含递送粒子和至少一个第一mRNA序列,其与所述递送粒子复合、由所述递送粒子封装或以其它方式与所述递送粒子结合。mRNA序列包含编码所述多肽的编码序列、至少一个第一非翻译区(UTR)序列和至少一个微RNA(miRNA)结合位点序列,其中所述miRNA结合位点序列位于所述第一UTR序列内、紧邻所述第一UTR序列的5'或紧邻所述第一UTR序列的3'。选择所述miRNA结合位点序列,以便提供所述编码序列在所述靶器官内包含的第一细胞类型与第二细胞类型之间的差异表达。组合物可与其它治疗方法组合使用或组合物用以补充其它治疗方法,包括化学疗法、溶瘤病毒疗法和细胞疗法。提供制备和使用所述组合物的方法,特别是在如肝癌、脑癌、肺癌、乳腺癌和胰腺癌的癌症的疾病的治疗中。



1. 一种用于靶器官内的多肽表达的组合物,所述组合物包含:
递送粒子;和
至少一个mRNA序列,其与所述递送粒子复合、由所述递送粒子封装或以其它方式与所述递送粒子结合,所述mRNA序列包含:
编码所述多肽的编码序列;
至少一第一非翻译区(UTR)序列;
至少一个微RNA(miRNA)结合位点序列;
其中所述miRNA结合位点序列位于所述第一UTR序列内、紧邻所述第一UTR序列的5'或紧邻所述第一UTR序列的3';和
其中所述miRNA结合位点序列提供所述编码序列在所述靶器官内包含的第一细胞类型与第二细胞类型之间的差异表达。
2. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述递送粒子包含氨基醇类脂质。
3. 根据权利要求1或2所述的组合物,其中所述mRNA序列由所述递送粒子封装。
4. 根据权利要求1到3中任一项所述的组合物,其中所述递送粒子靶向所述靶器官。
5. 根据权利要求4中任一项所述的组合物,其中:
所述递送粒子包含选自以下的靶向剂:蛋白质、肽、碳水化合物、糖蛋白、脂质、小分子和核酸;和
其中所述靶向剂优先与所述靶器官中的细胞结合。
6. 根据权利要求1到5中任一项所述的组合物,其中所述miRNA结合位点序列包含多个miRNA结合位点序列,任选地大于两个、适合地大于三个、通常大于四个结合位点序列。
7. 根据权利要求6所述的组合物,其中所述多个miRNA结合位点序列由大体上相同序列的重复序列构成。
8. 根据权利要求6所述的组合物,其中所述多个miRNA结合位点序列包含多个大体上不同的序列。
9. 根据权利要求1到8中任一项所述的组合物,其中所述第一细胞类型和第二细胞类型为选自由以下组成的组的不同选择:非赘生性细胞表型、癌前细胞表型和赘生性表型。
10. 根据权利要求1到8中任一项所述的组合物,其中所述靶器官包含呈现不同miRNA表达谱的第一细胞类型和第二细胞类型。
11. 根据权利要求1到10中任一项所述的组合物,其中所述靶器官选自由以下组成的组:肝、脑、肺、乳房和胰脏。
12. 根据权利要求1到11所述的组合物,其中所述至少一个微RNA(miRNA)结合位点序列包含一个或多个miRNA-122结合位点序列,包括其变异体和同源物。
13. 根据权利要求1到12中任一项所述的组合物,其中所述第一UTR序列位于所述编码序列的3'处。
14. 根据权利要求1到12中任一项所述的组合物,其中所述第一UTR序列位于所述编码序列的5'处。
15. 根据权利要求1到14中任一项所述的组合物,其中所述mRNA序列进一步包含第二UTR序列,其与所述靶器官内的所述至少第一细胞类型与第二细胞类型中的一个中所表达的UTR序列具有至少90%相似性。

16. 根据权利要求1到15中任一项所述的组合物,其中所述多肽包含治疗增强因子。

17. 根据权利要求16所述的组合物,其中所述治疗增强因子选自:肿瘤抑制蛋白、程序性细胞死亡蛋白、程序性细胞死亡途径的抑制剂、单克隆抗体或其片段或衍生物、序列特异性核酸酶、溶瘤病毒毒性因子、细胞因子、趋化因子、荧光标记蛋白和其组合。

18. 根据权利要求16到17中任一项所述的组合物,其中所述治疗增强因子为选自由以下组成的组的免疫调节分子:

(i) 涉及免疫反应和发炎的细胞因子,其选自以下中的一种或多种:TNF α 、TNF β 、IFN α 、IFN β 、IFN γ 、IL1、IL2、IL3、IL4、IL5、IL6、IL7、IL8、IL9、IL10、IL11、IL12、CCL2、CCL3、CCL4、CCL5、CXCL9和CXCL10;

(ii) 树突细胞活化剂,其选自以下中的一种或多种:GM-CSF、TLR7和TLR9;

(iii) 靶向选自以下中的一种或多种的细胞受体和其配体的分子:CD40、CD40L、CD160、2B4、Tim-3、GP-2、B7H3和B7H4;

(iv) TGF β 抑制剂;

(v) T细胞膜蛋白3抑制剂;

(vi) 程序性死亡受体1 (PD1)、程序性死亡配体1 (PDL1)、程序性死亡配体2 (PDL2)、细胞毒素T-淋巴细胞抗原4 (CTLA4) 和淋巴细胞活化基因3 (LAG3) 的抑制剂;和

(vii) NF- κ B抑制剂。

19. 根据权利要求1到18中任一项所述的组合物,其进一步包含溶瘤病毒,适合地选自病毒的巴尔的摩分类的第I-VII组中的任一者的病毒。

20. 根据权利要求19所述的组合物,其中所述溶瘤病毒选自包含以下中的一种或多种的组:水泡性口炎病毒、马拉巴病毒、脊髓灰质炎病毒、里奥病毒、麻疹病毒、新城疫病毒、柯萨奇病毒A21、细小病毒、单纯疱疹病毒1型和腺病毒。

21. 一种用于靶器官内的多肽表达的分离mRNA序列,所述序列包含:

编码所述多肽的至少一个编码序列;

至少一第一非翻译区 (UTR) 序列;

至少一个微RNA (miRNA) 结合位点序列;

其中所述miRNA结合位点序列位于所述第一UTR序列内、紧邻所述第一UTR序列的5'或紧邻所述第一UTR序列的3';和

其中所述miRNA结合位点序列允许所述编码序列在所述靶器官内的不同细胞类型中的差异表达。

22. 根据权利要求21所述的分离mRNA序列,其中mRNA序列包含多个微RNA (miRNA) 结合位点序列。

23. 根据权利要求22所述的分离mRNA序列,其中所述mRNA序列包含大于两个、适合地大于三个、通常大于四个结合位点序列。

24. 根据权利要求17所述的分离mRNA序列,其中所述多个miRNA结合位点序列包含多个大体上不同的序列。

25. 根据权利要求21到24中任一项所述的分离mRNA序列,其中所述第一细胞类型和第二细胞类型为选自包含以下的组的不同选择:非赘生性细胞、转化细胞表型、癌前表型和赘生性表型。

26. 根据权利要求21到25所述的分离mRNA序列,其中所述靶器官选自由以下组成的组:肝、脑、肺、乳房和胰脏。

27. 根据权利要求21到26所述的分离mRNA序列,其中所述多肽包含治疗增强因子。

28. 根据权利要求27所述的分离mRNA序列,其中所述治疗增强因子为选自由以下组成的组的免疫调节分子:

(i) 涉及免疫反应和发炎的细胞因子,其选自以下中的一种或多种:TNF α 、TNF β 、IFN α 、IFN β 、IFN γ 、IL1、IL2、IL3、IL4、IL5、IL6、IL7、IL8、IL9、IL10、IL11、IL12、CCL 2、CCL3、CCL4、CCL5、CXCL 9和CXCL10;

(ii) 树突细胞活化剂,其选自以下中的一种或多种:GM-CSF、TLR7和TLR9;

(iii) 靶向选自以下中的一种或多种的细胞受体和其配体的分子:CD40、CD40L、CD160、2B4、Tim-3、GP-2、B7H3和B7H4;

(iv) TGF β 抑制剂;

(v) T细胞膜蛋白3抑制剂;

(vi) 程序性死亡受体1 (PD1)、程序性死亡配体1 (PDL1)、程序性死亡配体2 (PDL2)、细胞毒素T-淋巴细胞抗原4 (CTLA4) 和淋巴细胞活化基因3 (LAG3) 的抑制剂;和

(vii) NF- κ B抑制剂。

29. 根据权利要求21到28所述的分离mRNA序列,其中所述mRNA包含多个编码序列。

30. 根据权利要求21所述的分离mRNA序列,其中所述mRNA选自由以下组成的组中的一个:SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:5。

31. 一种多核苷酸表达载体构筑体,其编码根据权利要求21到30中任一项所述的mRNA序列。

32. 一种治疗癌症的方法,所述方法包含向有需要的个体施以根据权利要求1到20中任一项所述的组合物。

33. 根据权利要求32所述的方法,所述方法进一步包含向所述个体施以疗法或治疗剂。

34. 根据权利要求33所述的方法,其中所述疗法或治疗剂选自化学疗法、放射线疗法、生物制剂、溶瘤病毒、小分子药物、CAR-T或过继细胞疗法和其组合。

35. 根据权利要求32到34中任一项所述的方法,其中所述个体为人类。

36. 根据权利要求32到34中任一项所述的方法,其中所述个体为非人类动物。

37. 根据权利要求32到36中任一项所述的方法,其中所述癌症选自由以下组成的组:肝癌、脑癌、肺癌、乳癌和胰脏癌。

38. 根据权利要求37所述的方法,其中所述癌症为肝癌。

39. 根据权利要求38所述的方法,其中所述肝癌为原发性肝癌或继发性肝癌。

40. 根据权利要求38或39所述的方法,其中所述肝癌是原发性肝癌。

41. 根据权利要求38或39所述的方法,其中所述肝癌是继发性肝癌。

42. 根据权利要求40所述的方法,其中所述原发性肝癌选自由以下组成的组:肝癌、肝母细胞瘤、胆管癌和血管肉瘤。

43. 根据权利要求41所述的方法,其中所述继发性肝癌是来自已知或未知的原发性实体瘤的转移性肝癌。

44. 根据权利要求1到20中任一项所述的组合物或根据权利要求21到30中任一项所述

的分离mRNA,其用于药品。

45. 根据权利要求1到20中任一项所述的组合物或根据权利要求21到30中任一项所述的分离mRNA,其用于治疗癌症,适合地其中所述癌症选自自由以下组成的组:肝癌、脑癌、肺癌、乳癌和胰脏癌。

46. 一种用于制备根据权利要求1所述的包含多个递送粒子的组合物的方法,所述方法包含:

(i) 提供封装组合物;

(ii) 提供包含mRNA序列的溶液,其中所述mRNA序列用于在靶器官内表达多肽,所述mRNA序列包含:

编码所述多肽的至少一个编码序列;

至少一第一非翻译区 (UTR) 序列;

至少一个微RNA (miRNA) 结合位点序列;

其中所述miRNA结合位点序列位于所述第一UTR序列内或紧邻所述第一UTR序列的5';

和

其中所述miRNA结合位点序列允许所述编码序列在所述靶器官内的不同细胞类型中差异表达;

(iii) 将所述封装组合物与包含所述mRNA序列的所述溶液组合,以便在所述封装组合物与所述mRNA序列之间形成复合物;和

(iv) 分散 (iii) 的所述复合物以便产生多个递送粒子。

47. 根据权利要求46所述的方法,其中所述封装组合物包含氨基醇类脂质。

48. 根据权利要求47所述的方法,其中所述封装组合物包含包括C12-200的氨基醇类脂质。

49. 根据权利要求46到48中任一项所述的方法,其中所述多个递送粒子包含平均直径为至少约1纳米并且至多约150nm的递送粒子。

50. 一种用于治疗个体内的靶器官的方法,其中所述靶器官包含未病变细胞和病变细胞,所述方法包含:

提供包含以下之组合物:

递送粒子;和

mRNA序列,其与所述递送粒子复合、由所述递送粒子封装或以其它方式与所述递送粒子结合,所述mRNA序列包含:

编码多肽的至少一个编码序列;

至少一第一非翻译区 (UTR) 序列;

至少一个微RNA (miRNA) 结合位点序列;

其中所述至少一个miRNA结合位点序列位于所述第一UTR序列内、紧邻所述第一UTR序列的5'或紧邻所述第一UTR序列的3';和

其中所述miRNA结合位点序列提供所述编码序列在所述未病变细胞与所述病变细胞之间的差异表达;

所述方法进一步包含:

向个体施以所述组合物和溶瘤病毒。

51. 根据权利要求50所述的方法, 其中所述mRNA序列编码增加所述溶瘤病毒的功效的治疗剂。

52. 根据权利要求50或51所述的方法, 其中所述溶瘤病毒已通过一种或多种毒性基因的突变而减弱。

53. 根据权利要求52所述的方法, 其中所述mRNA序列编码所述一种或多种毒性基因或其等效物或同源物。

54. 根据权利要求50到53中任一项所述的方法, 其中所述mRNA序列编码选自由以下组成的组的一种或多种免疫调节分子:

(i) 涉及选自以下中的一种或多种的免疫反应和发炎的细胞因子: $\text{TNF}\alpha$ 、 $\text{TNF}\beta$ 、 $\text{IFN}\alpha$ 、 $\text{IFN}\beta$ 、 $\text{IFN}\gamma$ 、 IL1 、 IL2 、 IL3 、 IL4 、 IL5 、 IL6 、 IL7 、 IL8 、 IL9 、 IL10 、 IL11 、 IL12 、 CCL2 、 CCL3 、 CCL4 、 CCL5 、 CXCL9 和 CXCL10 ;

(ii) 树突细胞活化剂, 其选自以下中的一种或多种: GM-CSF 、 TLR7 和 TLR9 ;

(iii) 靶向选自以下中的一种或多种的细胞受体和其配体的分子: CD40 、 CD40L 、 CD160 、 2B4 、 Tim-3 、 GP-2 、 B7H3 和 B7H4 ;

(iv) $\text{TGF}\beta$ 抑制剂;

(v) T细胞膜蛋白3抑制剂;

(vi) 程序性死亡受体1 (PD1)、程序性死亡配体1 (PDL1)、程序性死亡配体2 (PDL2)、细胞毒素T-淋巴细胞抗原4 (CTLA4) 和淋巴细胞活化基因3 (LAG3) 的抑制剂; 和

(vii) $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 抑制剂。

55. 根据权利要求50到54中任一项所述的方法, 其中所述mRNA序列在所述靶器官内的病变细胞中的表达水平高于在所述靶器官内的非病变细胞中的表达水平。

56. 根据权利要求50到55中任一项所述的方法, 其中所述溶瘤病毒选自病毒的巴尔的摩分类的第I-VII组中的任一者。

57. 根据权利要求50到56中任一项所述的方法, 其中所述溶瘤病毒选自包含以下中的一种或多种的组: 水泡性口炎病毒、马拉巴病毒、脊髓灰质炎病毒、里奥病毒、麻疹病毒、新城疫病毒、柯萨奇病毒A21、细小病毒、单纯疱疹病毒1型和腺病毒。

58. 根据权利要求50到57中任一项所述的方法, 其中所述溶瘤病毒为单纯疱疹病毒。

59. 根据权利要求58所述的方法, 其中所述编码序列对US3进行编码。

60. 根据权利要求59所述的方法, 其中所述mRNA序列包含SEQ ID NO:4。

61. 根据权利要求58到60中任一权利要求所述的方法, 其中所述编码序列对ICP6进行编码。

62. 根据权利要求61所述的方法, 其中所述mRNA序列包含SEQ ID NO:5。

63. 根据权利要求50到62中任一项所述的方法, 其中所述病变细胞包含赘生性细胞。

64. 根据权利要求50到63中任一项所述的方法, 所述靶器官选自由以下组成的组: 肝、脑、肺、乳房和胰脏。

用于编码核糖核酸在组织中的靶向递送、表达和调节的组合 物和方法

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求2017年9月7日提交的英国专利申请第1714430.4号和2018年2月19日提交的美国临时专利申请第62/632,056号的优先权益,其通过引用的方式以全文并入本文中。

技术领域

[0003] 本发明涉及信使核糖核酸(mRNA)递送技术,通常基于纳米粒子的递送,和在多种治疗、诊断和预防适应症中制造和使用这些mRNA递送技术的方法。此类递送系统可用作独立干预,或与其它治疗组分组合。

背景技术

[0004] 基因疗法为将编码多核苷酸引入到患者的细胞中以便治疗疾病的过程。举例来说,突变和/或无功能的基因可以在靶细胞中被完整的复本替换。基因疗法通常依赖于病毒载体将译码多核苷酸引入到靶细胞中,但存在其它技术以在不使用病毒的情况下将多核苷酸递送到细胞。病毒的优点包括相对较高的可能转染速率,以及通过控制病毒进入靶细胞的结合蛋白将病毒靶向到特定细胞类型的能力。相比之下,将编码多核苷酸引入到细胞中的非病毒方法可能具有低转染速率的问题,以及具有针对特定器官和细胞类型的靶向表达的有限选择。然而,病毒干预的性质携带毒性和发炎的风险,但还具有对引入因子的表达的持续时间和程度的有限控制。

[0005] 基于生物方法的肿瘤疗法具有优于传统化学治疗剂的优点,因为其可采用许多不同机制来更精确地靶向和消灭癌症,例如经由直接细胞溶解、细胞毒素免疫效应机制和血管收缩等。结果,临床研究的数量已经大大增加了此类方法的潜力。然而,归因于治疗活动的不同范围,临床前和临床研究是复杂的,因为多个参数可能影响其治疗潜力,并且因此,很难确定治疗失败的原因或可能增强治疗活性的方法。维持目标活性、肿瘤特异性和减少副作用也是此类实验和强大疗法的主要挑战。

[0006] 在非临床情形中,也经常需要诱导特定基因产物(如特定靶组织或器官中的多肽)的表达的能力。在许多情况下,靶组织或器官将包含多于一种类型的细胞,并且在此类情况下,通常还需要在不同细胞类型中将基因产物表达达到不同程度,也就是说,提供不同细胞类型中的差异表达。尽管存在活体外和活体内引入多核苷酸的方法,但其具有与上文所论述相同的限制。

[0007] 因此,需要进一步开发用于将多核苷酸序列(如mRNA)递送到特定器官和/或组织的方法和组合物,以及调节所递送的多核苷酸序列在特定细胞中的表达的方法。

发明内容

[0008] 本发明因此提供能够将可表达的信使RNA(mRNA)递送到靶器官中的细胞并且使用

微RNA介导的表达调节的细胞系统来驱动靶器官内的不同细胞、细胞类型和/或组织中的差异表达的组合物和方法。将包含mRNA的纳米尺寸递送系统用于实现靶器官的细胞内的递送。通过供应mRNA,本发明允许来自不同细胞类型(例如癌性、非癌性、病变或健康细胞)内的所供应mRNA的多肽基因产物的可控制且有限的外源性表达。

[0009] 本发明可用于增强或调节各种辅助、共施以或同时施以疗法的功能。举例来说,本发明可以与溶瘤病毒疗法、化学疗法、抗体疗法或放射线疗法结合使用。在一实例中,可以在癌细胞中选择性地表达编码增加向患者施以的溶瘤病毒的功效的因子的mRNA,因此增加癌细胞的病毒溶解同时保持非癌性和/或健康细胞。可以使用这种方法,使得毒性减弱的溶瘤病毒在癌细胞中恢复到完全有效,但在相邻的非癌性或健康细胞中不能恢复。此方法的主要优点是它减少了目标作用并提高了治疗效果的效力,从而使得剂量和相关副作用的减少。

[0010] 根据本发明的第一方面,提供一种用于靶器官内的多肽表达的组合物,所述组合物包含递送粒子;和至少一个第一mRNA序列,其与所述递送粒子复合、由所述递送粒子封装或以其它方式与所述递送粒子结合。mRNA序列包含编码所述多肽的编码序列、至少一个第一非翻译区(UTR)序列和至少一个微RNA(miRNA)结合位点序列,其中所述miRNA结合位点序列位于所述第一UTR序列内、紧邻所述第一UTR序列的5'或紧邻所述第一UTR序列的3'。选择所述miRNA结合位点序列提供所述编码序列在所述靶器官内包含的第一细胞类型与第二细胞类型之间的差异表达。

[0011] 在本发明的一个实施例中,mRNA序列可以由递送粒子封装。递送粒子可包含氨基醇类脂质。在一些实施例中,递送粒子靶向靶器官,并且可进一步包含一种或多种选自以下的靶向剂:蛋白质、肽、碳水化合物、糖蛋白、脂质、小分子和核酸,其中这些靶向剂优先与靶器官中的细胞结合。

[0012] 在本发明的一个实施例中,miRNA结合位点序列包含多个miRNA结合位点序列。多个miRNA结合位点序列可包含大于两个、适合地大于三个、通常大于四个结合位点序列。多个miRNA结合位点序列可能各自是大体上相同的序列,或可能是一个或多个大体上不同的序列。多个miRNA结合位点序列可能是靶向相同miRNA物种或靶向相同miRNA物种的不同变异体的序列的不同变异体。在本发明的一个实施例中,miRNA结合位点序列可包含一个或多个miRNA-122结合位点序列,包括其变异体和同源物。

[0013] 靶器官中的不同细胞类型可包含非赘生性细胞、赘生性(癌前或癌)细胞和其组合。确切地说,第一细胞类型和第二细胞类型可能是来自包含非赘生性细胞、转化细胞表型、癌前表型和赘生性表型的组的不同选择。可能将非赘生性细胞视为健康细胞,或者可能包括非健康(例如,硬化、发炎或感染)但非癌性细胞。

[0014] 根据本发明的一个实施例,靶器官包含至少一个第一细胞表型和至少一个第二细胞表型;任选地,靶器官包含至少第三、第四、第五、第六、第七和第八细胞表型;适合地,靶器官包含多个细胞表型。在本发明涉及包含多个细胞表型的实施例的情况下,差异表达在所述多个细胞表型中的至少一个中在可检测水平下发生,但在其它细胞表型中在较小程度上或在不可检测水平下发生。

[0015] 在本发明的实施例中,靶器官包含呈现不同miRNA表达模式的第一细胞类型和第二细胞类型。靶器官可能选自肝、脑、肺、乳房或胰脏。靶器官可能是肝,在此实施例中,粒子

和mRNA两者都适于促进包含在个体患者或动物的肝内的细胞类型或组织内编码序列的差异表达。

[0016] 第一UTR序列可能位于编码序列的3'处。在其它实施例中,第一UTR序列可能位于与编码序列的5'处。在本发明的一个实施例中,mRNA序列进一步包含第二UTR序列,其与靶器官内的不同细胞类型中的至少一个中发现的UTR序列具有至少90%的相似性。任选地,第二UTR序列与靶器官内的至少一种非病变细胞类型中的UTR序列具有至少90%相似性。任选地,第二UTR序列与靶器官内的至少一种病变细胞类型中的UTR序列具有至少90%相似性。

[0017] 在一些实施例中,多肽包含治疗增强因子。治疗增强因子可能选自:肿瘤抑制蛋白、程序性细胞死亡蛋白、程序性细胞死亡途径的抑制剂、单克隆抗体或其片段或衍生物、序列特异性核酸酶、溶瘤病毒毒性因子、细胞因子、趋化因子、荧光标记蛋白和其组合。在一个实施例中,治疗增强因子是选自由以下组成的组的免疫调节分子:

[0018] (i) 涉及免疫反应和发炎的细胞因子,其选自以下中的一种或多种:TNF α 、TNF β 、IFN α 、IFN β 、IFN γ 、IL1、IL2、IL3、IL4、IL5、IL6、IL7、IL8、IL9、IL10、IL11、IL12、CCL 2、CCL3、CCL4、CCL5、CXCL 9和CXCL10;

[0019] (ii) 树突状细胞活化剂,其选自以下中的一种或多种:GM-CSF、TLR7和TLR9;

[0020] (iii) 靶向以下细胞受体和其配体的分子,其选自以下中的一种或多种:CD40、CD40L、CD160、2B4、Tim-3、GP-2、B7H3和B7H4;

[0021] (iv) TGF β 抑制剂;

[0022] (v) T细胞膜蛋白3抑制剂;

[0023] (vi) 程序性死亡1 (PD1)、程序性死亡配体1 (PDL1)、程序性死亡配体2 (PDL2)、细胞毒素T-淋巴细胞抗原4 (CTLA4) 和淋巴细胞活化基因3 (LAG3) 的抑制剂;和

[0024] (vii) NF- κ B抑制剂。

[0025] 在一个实施例中,根据本发明的组合物可能进一步包含溶瘤病毒。适合地,病毒选自病毒的巴尔的摩分类的第I-VII组中的任一组。任选地,溶瘤病毒选自包含以下中的一种或多种的组:水泡性口炎病毒、马拉巴病毒 (Maraba virus)、脊髓灰质炎病毒、里奥病毒 (Reovirus)、麻疹病毒、新城疫病毒、柯萨奇病毒A21 (Coxsackievirus A21)、细小病毒、单纯疱疹病毒1型和腺病毒。

[0026] 在本发明的另一个方面中,提供用于在靶器官内表达多肽的分离mRNA序列。序列包含至少一个编码所述多肽的编码序列、至少一个第一非翻译区 (UTR) 序列和至少一个微RNA (miRNA) 结合位点序列,其中所述miRNA结合位点序列位于所述第一UTR序列内、紧邻所述第一UTR序列的5'或紧邻所述第一UTR序列的3'。miRNA结合位点序列允许编码序列在靶器官内的不同细胞类型中的差异表达。在本发明的一个实施例中还设想编码此mRNA序列的多核苷酸表达构筑体。希望此方面可进一步包含上文关于本发明的其它实施例的mRNA序列所论述的特征中的任一个。在另一实施例中,多肽可能编码荧光标记蛋白,如mCherry,如SEQ ID NO:3中所公开。

[0027] 在本发明的另一个方面中,提供一种治疗癌症、预防癌症或延缓癌症的发病或进展,或缓解与癌症相关的症状的方法,所述方法包含向有需要的个体施以根据以上方面和实施例所论述的组合物。在某些实施例中,多肽可能编码治疗增强因子,如免疫调节分子或如先前所描述的其它因子。

[0028] 在本发明的另一实施例中，mRNA包含可编码相同或不同多肽的多个编码序列。

[0029] 在本发明的一个方面中，提供编码所描述的mRNA序列的多核苷酸表达载体构筑体。合适地，多核苷酸表达载体包含DNA质粒。

[0030] 在本发明的实施例中，个体可以是人类或非人类动物。癌症可能选自肝癌、脑癌、肺癌、乳癌或胰腺癌。癌症可能是肝癌，其可能适当地为肝癌或转移性肝癌。肝癌可以是原发性癌症，如肝癌或肝母细胞瘤，或肝中的继发性/转移性癌症。转移性癌症可能来自已知或未知的原发性实体肿瘤。方法可能进一步包含向个体施以疗法或治疗剂，如化学疗法、溶瘤病毒、放射线疗法、生物、溶瘤病毒、小分子药物、过继细胞疗法（如CAR-T细胞疗法、CAR-NK疗法）和其组合。

[0031] 在本发明的一个方面中，根据以上方面和实施例所论述的组合物和化合物适用于药物，适合于治疗癌症。所述癌症可能是肝癌，其可能适当地为原发性癌症，如肝癌、肝母细胞瘤、胆管癌、血管肉瘤或肝中的继发性/转移性癌症。

[0032] 在本发明的另一个方面中，提供一种用于制备包含多个如本文所描述的递送粒子的组合物的过程，所述过程包含：

[0033] (i) 提供一个封装组合物；

[0034] (ii) 提供包含mRNA序列的溶液，其中所述mRNA序列用于在靶器官内表达多肽，所述mRNA序列包含：

[0035] 编码所述多肽的至少一个编码序列；

[0036] 至少一第一非翻译区（UTR）序列；

[0037] 至少一个微RNA（miRNA）结合位点序列；

[0038] 其中所述miRNA结合位点序列位于所述第一UTR序列内、紧邻所述第一UTR序列的5'或紧邻所述第一UTR序列的3'；和

[0039] 其中所述miRNA结合位点序列允许所述编码序列在所述靶器官内的不同细胞类型中的差异表达；

[0040] (iii) 将所述封装组合物与包含所述mRNA序列的所述溶液组合，以便在所述封装组合物与所述mRNA序列之间形成复合物；和

[0041] (iv) 分散(iii)的所述复合物以便产生多个递送粒子。

[0042] 合适地，所述封装组合物由氨基醇类脂质构成，任选地包含C12-200氨基醇类脂质的乙醇溶液。通常，多个递送粒子包含平均直径为至少约1纳米（nm）、合适地至少约30nm、任选地至少约50nm且至多约150nm的递送粒子。

[0043] 在本发明的另一个方面中，提供一种治疗癌症、预防癌症、延迟癌症发病或进展，或缓解与癌症相关的症状的方法，所述方法包含提供根据以上方面和实施例所论述的组合物，并且向有需要的个体施以与溶瘤病毒组合的组合物或同时施以。

[0044] 在一个实施例中，mRNA序列编码增加溶瘤病毒的功效的治疗剂。溶瘤病毒可能已经通过缺失一种或多种毒性基因而毒性减弱，并且mRNA序列可能编码一种或多种毒性基因或其等效物。

[0045] 在一些实施例中，溶瘤病毒选自病毒的巴尔的摩分类的第I-VII组中的任一组。任选地，溶瘤病毒可能选自包含以下中的一种或多种的组：水泡性口炎病毒、马拉巴病毒（Maraba virus）、脊髓灰质炎病毒、里奥病毒、麻疹病毒、新城疫病毒、柯萨奇病毒A21、细小

病毒、单纯疱疹病毒1型和腺病毒。在一个实施例中,溶瘤病毒是单纯疱疹病毒,并且mRNA序列对US3进行编码,并且可能包含SEQ ID NO:4。在另一实施例中,溶瘤病毒为单纯疱疹病毒,并且mRNA序列对ICP6进行编码,并且可能包含SEQ ID NO:5。

附图说明

[0046] 通过参考附图进一步说明本发明,其中:

[0047] 图1展示根据本发明的一个实施例施以类脂质封装mRNA组合物的方法的示意图。

[0048] 图2展示产生DNA合成载体的克隆方法的实例,所述载体用于产生根据本发明的实施例的mRNA构筑体。

[0049] 图3展示本发明的实施例中使用和图4中所说明的mRNA构筑体的三个变异体,和位于编码序列的3'处的UTR序列内或邻近于其的一对miRNA结合序列(此处结合到miR122的序列)的插入点的可能的选择方案。

[0050] 图4展示用于产生图3中所描绘的mRNA构筑体的DNA质粒、模板质粒以及合成载体的实例。

[0051] 图5、6和7展示可能用于产生如图3中所描绘的mRNA构筑体变异体的合成载体的方法的实例。

[0052] 图8展示根据本发明的实施例可用于制备递送粒子的组成化合物的实例的化学式。

[0053] 图9A展示根据本发明的实施例制备包含mRNA的递送粒子的纳米调配物的方法。

[0054] 图9B展示根据本发明的实施例的包含mRNA的递送粒子的横截面的结构,并且进一步包含图8中所描绘的封装组成化合物。

[0055] 图10A荧光显微图像指示实验的结果,其中用根据本发明的实施例的组合物在活体外转染来自健康人类肝细胞培养物(人类可水解肝细胞、HMCPP5)、人类肝癌(Hep3B)和人类肝母细胞瘤(HepG2)细胞的细胞。施以两种递送粒子:一种含有编码荧光蛋白mCherry的mRNA(mRNA-mCh-DMP^{CTx}),和一种含有编码荧光蛋白mCherry的mRNA,但其中差异表达由靶细胞中的miRNA-122内含物(mRNA-mCh-122-DMP^{CTx})控制。

[0056] 图10B展示根据图10A的实验转染的细胞在48小时之后荧光强度的定量。结果展示为平均值±SD。使用t测试测定统计显著性。星号指示转染细胞中mRNA-mCherry、mRNA-mCherry-122表达之间的统计学上显著差异(****p<0.0001,***p<0.001)。

[0057] 图11展示来自实验的结果的图表,其中人类肝细胞(HMCPP5)用图10A中所使用的递送粒子多次(MPT)或单独(ST)转染。mCherry的表达通过转染后24、28、72、96和144小时测量的荧光强度水平来测定。结果展示为平均值±SD。使用t测试测定统计显著性。星号指示转染细胞中mRNA-mCherry、mRNA-mCherry-122表达之间的统计学上显著差异(*p<0.01,**p<0.05)。

[0058] 图12A展示指示实验的结果的荧光显微图像,其中健康小鼠肝细胞(AML12细胞系)用图10A中所使用的递送粒子活体外转染,其中转染后24小时展示mCherry的相对表达水平。

[0059] 图12B展示了提供荧光强度的定量的图表,所述荧光强度是针对图12A的结果以及另外的72小时转染后时间点计数的像素百分比。

[0060] 图13展示在两个实验(表示为操作1和操作2)中的蛋白质印迹的结果,其中人类肝细胞(HMCP5)、人类肝母细胞瘤(HepG2)和人类肝癌(Hep3B)细胞用根据本发明的一个实施例的组合物转染,所述组合物包含在miRNA差异表达控制下编码25kDa分子质量的示例性人类多核苷酸的mRNA。

[0061] 图14展示单纯疱疹病毒变异体R7041对来自肝癌(Hep3B)和肝母细胞瘤(HepG2)模型的人类细胞的活力的影响。展示病毒应用对相对细胞活力的影响。

[0062] 图15展示活体外实验的时间表,其中来自肝癌模型的人类细胞用根据本发明的实施例的组合物和方法处理并且接着通过MTS比色分析测试。

[0063] 图16A和16B展示活体外实验的结果,其中遵循图15的时间表,来自肝母细胞瘤模型(图16A)和肝癌(图16B)的人类细胞单独用病毒或与根据本发明的实施例的组合物组合处理。组合物是包含编码US3(US3 mRNA DMP^{CTx})的mRNA的递送粒子。展示处理对细胞活力的影响。

[0064] 图17A和17B展示使用人类肝癌的小鼠模型的活体内实验的结果。图17A展示肿瘤生长(用荧光素酶标记Hep3B细胞)。图17B展示使用编码mCherry的mRNA的健康小鼠肝的荧光显微图像,当使用mCherry-DMP^{CTx}-miRNA122组合物时未检测到荧光。

[0065] 图18展示使用与图17A中所展示相同的小鼠模型的活体内实验的免疫组织化学显微图结果。包含编码US3的mRNA(US3 mRNA DMP^{CTx} miRNA-122)的递送粒子通过尾静脉施以并且提供非病变肝细胞与肿瘤肝组织之间的差异表达,如通过肿瘤组织中的US3蛋白质的较深染色所证明。肿瘤组织与非病变组织之间的边界用虚线示出。

具体实施方式

[0066] 除非另外指明,否则本发明的实践采用在所属领域的技术人员的能力内的化学、分子生物学、微生物学、重组DNA技术和化学方法的常规技术。此类技术在文献中也有解释,例如,MR Green, J. Sambrook, 2012,《分子克隆:实验指南(Molecular Cloning: A Laboratory Manual)》,第四版,书1-3,冷泉港实验室出版社,冷泉港, NY; Ausubel, F.M. 等人(1995年和定期增刊;《现代分子生物学实验技术(Current Protocols in Molecular Biology)》,第9、13和16章, John Wiley & Sons, 纽约, N.Y.); B. Roe, J. Crabtree, and A. Kahn, 1996年,《DNA分离和测序:基本技术(DNA Isolation and Sequencing: Essential Techniques)》, John Wiley & Sons; J.M. Polak and James O'D. McGee, 1990年,《原位杂交:原理与实践(In Situ Hybridisation: Principles and Practice)》, 牛津大学出版社; M.J. Gait (编辑), 1984年,《寡核苷酸合成:一种实用方法(Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach)》, IRL出版社; 以及 D.M.J. Lilley 和 J.E. Dahlberg, 1992年,《酶学方法:DNA结构A部分:酶学中DNA方法的合成和物理分析(Methods of Enzymology: DNA Structure Part A: Synthesis and Physical Analysis of DNA Methods in Enzymology)》, 学术出版社。这些一般文本中的每一者以引用的方式并入本文中。

[0067] 在阐述本发明之前,提供将帮助理解本发明的多个定义。本文中引用的所有参考文献全文以引用的方式并入本文中。除非另外定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的相同的含义。

[0068] 如本文所使用,术语‘包含’是指必须包括任何所列举的要素,并且还可能任选地

包括其它要素。‘基本上由...组成’是指必须包括任何所列举的要素,将实质上影响所列举要素的基本和新颖特征的要素排除在外,并且可能任选地包括其他要素。‘由...组成’是指除所列要素外的所有要素。由这些术语中的每一个定义的实施例都在本发明的范围内。

[0069] 当应用于多核苷酸序列时,术语‘分离的’是指序列已从其天然来源的生物体中移出,并且因此没有外来或不需要的编码或调节序列。分离的序列适合于在重组DNA过程中和在基因工程改造的蛋白质合成系统内使用。此类分离的序列包括cDNA、mRNA和基因组克隆。分离的序列可以仅限于蛋白质编码序列,或还可以包括5’和3’调节序列,如启动子和转录终止子。在进一步阐述本发明之前,提供将帮助理解本发明的多个定义。

[0070] ‘多核苷酸’为核苷酸的单链或双链共价键结序列,其中每一核苷酸上3’和5’端通过磷酸二酯键接合。多核苷酸可能由脱氧核糖核苷酸碱基或核糖核苷酸碱基组成。多核苷酸包括DNA和RNA,并且可在活体外合成地制造或从天然来源分离。多核苷酸的尺寸通常表示为双链多核苷酸的碱基对(bp)的数目,或在单链多核苷酸的情况下表示为核苷酸(nt)的数目。一千个bp或nt等于一千碱基(kb)。长度小于约40个核苷酸的多核苷酸通常称为‘寡核苷酸’。如本文所使用的术语‘核酸序列’为核苷酸的单链或双链共价键结序列,其中每一核苷酸上的3’和5’端通过磷酸二酯键接合。多核苷酸可能由脱氧核糖核苷酸碱基或核糖核苷酸碱基组成。核酸序列可能包括DNA和RNA,并且可能在活体外合成地制造或从天然来源分离。核酸序列的尺寸,在本文中也称为‘多核苷酸’,通常表示为双链多核苷酸的碱基对(bp)的数目,或者在单链多核苷酸的情况下表示为核苷酸(nt)的数目。一千个bp或nt等于一千碱基(kb)。长度小于约40个核苷酸的多核苷酸通常称为‘寡核苷酸’,并且可能包含用于DNA操纵(例如通过聚合酶链反应(PCR))的引物。

[0071] 如本文所使用的术语‘核酸’为核苷酸的单链或双链共价键结序列,其中每一核苷酸上的3’和5’端通过磷酸二酯键接合。多核苷酸可能由脱氧核糖核苷酸碱基或核糖核苷酸碱基组成。核酸可能包括DNA和RNA,并且可能在活体外合成地制造或从天然来源分离。核酸可进一步包括修饰的DNA或RNA,例如已被甲基化的DNA或RNA,或已进行翻译后修饰的RNA,例如用7-甲基鸟苷进行5’加帽,3’加工(例如裂解)聚腺苷酸化和剪接。核酸还可能包括合成核酸(XNA),如己糖醇核酸(HNA)、环己烯核酸(CeNA)、苏糖核酸(TNA)、甘油核酸(GNA)、锁核酸(LNA)和肽核酸(PNA)。核酸的尺寸,在本文中也称为‘多核苷酸’,通常表示为双链多核苷酸的碱基对(bp)的数目,或者在单链多核苷酸的情况下表示为核苷酸(nt)的数目。一千个bp或nt等于一千碱基(kb)。长度小于约100个核苷酸的多核苷酸通常称为‘寡核苷酸’,并且可能包含用于DNA操纵(例如通过聚合酶链反应(PCR))的引物。在本发明的具体实施例中,核酸序列包含信使RNA(mRNA)。

[0072] 根据本发明,与本文所述的核酸序列的同源性不限于100%序列一致性。尽管具有明显较低的序列一致性,许多核酸序列仍可证明彼此具有生物化学等效性。在本发明中,将同源核酸序列视为在低严格性条件下将彼此杂交的那些序列(Sambrook J.等人,同上)。

[0073] 术语‘可操作地连接’当应用于例如表达构筑体中的核酸序列时,表示序列经排列成以使得其协同作用以实现其预期目的。举例来说,在DNA载体中,启动子序列允许起始转录,所述转录通过连接的编码序列进行直至终止序列。在RNA序列的情况下,一个或多个非翻译区(UTRs)可关于称作开放阅读框架(ORF)的连接蛋白质编码序列而排列。给定mRNA可能包含多于一个ORF,所谓的多顺反子RNA。UTR可能相对于可操作地连接的编码序列ORF位

于5'或3'处。UTR可能包含通常在自然界中发现的mRNA序列中发现的序列,例如克扎克共同序列(Kozak consensus sequence)、起始密码子、顺式作用调节元件、聚-A尾部、内部核糖体进入位点(IRES)、调节mRNA寿命的结构、指导mRNA定位的序列等等。mRNA可能包含相同或不同的多个UTR。

[0074] 在本发明的情形下,术语‘表达多肽’指产生本文所述的多核苷酸序列所编码的多肽。通常,这涉及通过将序列递送到细胞的核糖体机制翻译提供的mRNA序列。

[0075] 如本文所用,术语‘递送粒子’是指这样的粒子,其可以通过封装、保持在基质中、形成复合物或通过其它方式包含治疗组分,并且将治疗组分(例如编码核酸序列)递送至靶细胞中。递送粒子可按微米级,但在特定实施例中可通常按纳米级,即纳米粒子。纳米粒子的尺寸通常为至少50nm(纳米),合适地至少为约100nm,并且通常为至多150nm、200nm,尽管任选地直径最大为300nm。在本发明的一个实施例中,纳米粒子的平均直径为约至少60nm。这些尺寸的优点是,这意味着粒子低于网状内皮系统(单核吞噬细胞系统)电气间隙的阈值,即,粒子足够小,不会被吞噬细胞破坏,这是人体防御机制的一部分。这有利于将静脉内递送途径用于本发明的组合物。

[0076] 纳米粒子的组合物的替代可能性包括聚乳酸(PLA)、聚(乳糖-共-乙醇酸)(PLGA)、基于脂质或磷脂的粒子(如脂质体)、基于蛋白质和/或糖蛋白的粒子(如胶原蛋白、白蛋白、明胶、弹性蛋白、麦胶蛋白、角蛋白、豆球蛋白、玉米蛋白、大豆蛋白、乳蛋白(如酪蛋白)等)(Lohcharoenkal等人,《生物医学研究国际(BioMed Research International)》;第2014卷(2014))、以及基于金属或金属化合物的粒子(如金、银、铝、氧化铜等)。

[0077] 特别地,已经研究了包含聚乙烯亚胺(PEI)的聚合物用于核酸的递送。由聚(β-氨基酯)(PBAE)组成的纳米粒子载体也已被证明适用于核酸递送,尤其是在与聚乙二醇(PEG)共配制时(Kaczmarek JC等人,《应用化学国际英文版(Angew Chem Int Ed Engl.)》2016; 55(44):13808-13812)。此类共配制品的粒子已经用于将mRNA递送到肺。

[0078] 还考虑基于多糖和其衍生物的粒子,如纤维素、甲壳素和壳聚糖。壳聚糖是一种通过甲壳素部分脱乙酰化而获得的阳离子线性多糖,其中包含这种物质的纳米粒子具有良好的药物递送特性,如生物相容性、低毒性和小尺寸(Felt等人,《药物研发和工业(PharmacyDrug Development and Industrial Pharmacy)》,第24卷,1998年-第11期)。可以预见,可以使用上述成分之间的组合。

[0079] US2010/0331234、US2011/0293703和US2015/0203439-其通过引用方式并入本文中-描述通过以环氧基封端的化合物的胺反应产生氨基醇类脂质。可以用这些类脂质制备复合物、胶束、脂质体和粒子(包括纳米粒子),并且它们的化学结构使其特别适合于将‘货物’(例如编码mRNA的核酸)递送到人类或动物个体体内的靶细胞类型。考虑到叔胺可用于质子化从而形成阳离子部分,包含氨基醇类脂质化合物的递送平台特别适用于净带负电荷的货物分子的递送。举例来说,氨基醇类脂质化合物可用于制备粒子组合物以将DNA、RNA或其它多核苷酸货物递送到个体或靶细胞或组织。适合的粒子可呈微米粒子、纳米粒子、脂质体或胶束的形式。

[0080] 基于氨基醇类脂质的递送粒子具有可与多核苷酸货物(例如编码mRNA)相互作用的叔胺。在适合形成多核苷酸/类脂质复合物的条件下,使多核苷酸或其衍生物与氨基醇类脂质化合物接触。类脂质优选地至少部分质子化以便与带负电多核苷酸形成复合物。以这

种方式,多核苷酸/类脂质复合物形成可用于将货物多核苷酸递送到细胞和组织的粒子。在某些实施例中,多个氨基醇类脂质分子可与多核苷酸分子结合。复合物可能包括至少1、至少5、至少10、至少20、至少50或适当地至少100种氨基醇类脂质分子。复合物可能包括至多10,000、至多5000、至多2000、至多1000、至多500或通常至多100种氨基醇类脂质分子。

[0081] 所属领域的一般技术人员将了解,粒子的群体遵循粒度分布的原理。广泛使用的描述粒度分布的领域公认的方法包括例如平均直径和D值,例如D50值,其通常用于表示给定样品的粒度范围的平均直径。在某些实施例中,纳米粒子的直径为10-500nm,更合适地,粒子的直径为10-1200nm,特别是50-150nm。在一些实施例中,纳米粒子的平均直径为至少约10nm,适合地至少约30nm。在一些实施例中,纳米粒子具有平均直径小于约150nm且平均大于50nm的平均直径。

[0082] 粒子可进一步与靶向剂结合以促进递送粒子与靶细胞类型的结合。如本文所用,术语‘靶向’是指物体或组合物,例如包含递送粒子,其旨在与体内特定器官、组织或细胞类型内的细胞结合并促进其转染。在一个特定实施例中,递送粒子(如递送纳米粒子)可能靶向以将其货物仅递送到某一器官、组织或细胞类型。靶向可能是地理的,例如通过将目标对象直接递送到特定组织,或可能通过优先与靶细胞或组织结合的靶向剂或结合部分以化学方式介导。

[0083] 将医药组合物引导到特定细胞的多种靶向剂为所属领域中已知的(参见例如公司Cotten等人《方法酶(Methods Enzym.)》217:618,1993年;Wagner等人《高级药物输送评论(Advanced Drug Delivery Reviews)》,第14卷,第1期,1994年4月到5月,第113-135页;Fiume等人《高级药物输送评论》,第14卷,第1期,1994年4月到5月,第51-65页)。靶向剂可以包括于整个粒子中或可以仅定位于表面上。靶向剂可能为蛋白质、肽、碳水化合物、糖蛋白、脂质、小分子或核酸等。靶向剂可能用于靶向特定细胞或组织或可能用于促进粒子的内饮作用或吞噬作用。靶向剂的实例包括(但不限于)抗体、抗体片段、低密度脂蛋白(LL)、转铁蛋白、唾液酸蛋白、人类免疫缺陷病毒(HIV)的gp120包膜蛋白质、碳水化合物、受体配体、唾液酸、适体等。如果靶向剂分布于整个粒子中,那么靶向剂可包括于用于形成粒子的混合物或复合物中。如果靶向剂仅位于表面上,那么靶向剂可使用标准化学技术(例如,通过共价结合、疏水性、氢键结合、范德华力(van der Waals)、生物素-抗生物素蛋白键或其它相互作用)与所形成的粒子相结合。

[0084] 本发明的某些实施例的粒子组合物可适当地在一段时间内递送封装mRNA货物,所述时间段可由封装生物可降解无毒聚合物或生物相容性材料的特定选择或调配物控制。举例来说,粒状组合物可在至少30分钟、至少1小时、至少2小时、至少6小时、至少12小时或至少1天内释放封装mRNA货物。粒状组合物可释放封装mRNA货物至多2天、至多3天或至多7天。

[0085] 本文所用的术语‘病变’,如‘病变细胞’和/或‘病变组织’,是指表现出异常、不健康或疾病病理的组织和器官(或其部分)和细胞。例如,病变细胞可能由病毒、细菌、朊病毒或真核寄生虫感染;可能包含有害突变;和/或可以是癌性、癌前性、肿瘤性或赘生性。另外与正常细胞或所谓的健康细胞相比,病变细胞可能包含改变的细胞内miRNA环境。在某些情况下,病变细胞在病理上可能是正常的,但包含将代表疾病前体状态的细胞内miRNA环境改变为病变。病变组织可能包含已由病变细胞从另一器官或器官系统渗透的健康组织。举例来说,许多发炎疾病包含其中以其它方式使健康器官经历用免疫细胞(如T细胞和嗜中性白

细胞) 渗透的病理。作为另一实例, 经受狭窄或硬化病变的器官和组织可能包含极为接近的健康和病变细胞两者。

[0086] 如本文所用, 术语‘癌症’是指组织中的肿瘤, 包括恶性肿瘤, 其可以是始于特定组织原发性癌症, 或者是通过转移从其他地方扩散而来的继发性癌症。术语癌症、肿瘤和恶性肿瘤在本文可互换使用。癌症可以表示位于肿瘤内或具有与肿瘤相关的特性的组织或细胞。肿瘤通常具有将其与正常组织和正常细胞区分开的特征。其中这些特征包括但不限于: 发育不全的程度、形态变化、形状不规则、细胞粘附性降低、转移能力和细胞增殖提高。与‘癌症’有关并且经常与‘癌症’同义的术语包括肉瘤、癌、恶性肿瘤、上皮瘤、白血病、淋巴瘤、转型、肿瘤等。如本文所用, 术语‘癌症’包括癌前和/或癌变前肿瘤以及恶性癌症。

[0087] 本文所用的术语‘健康’, 如在‘健康细胞’和/或‘健康组织’中是指自身未患病并且近似于典型的正常功能表型的组织和器官(或其部分)和细胞。可以理解的是, 在本发明的情形下, 术语‘健康的’是相对的, 例如, 受肿瘤影响的组织中的非赘生性细胞在绝对意义上可能不是完全健康的。因此, ‘非健康细胞’是指本身不是赘生性、癌性或癌前性的细胞, 但可能是例如肝硬化、发炎或感染或以其它方式病变的细胞。同样, ‘健康或不健康的组织’是指没有肿瘤、赘生性、癌细胞或癌前细胞的组织或其部分; 或其它上述疾病; 无论整体健康状况如何。例如, 在包含癌性和纤维化组织的器官的背景下, 与癌性组织相比, 可以认为纤维化组织内包含的细胞相对‘健康’。

[0088] 在另一个实施例中, 细胞、细胞类型、组织和/或器官的健康状况通过miRNA表达的定量来确定。在某些疾病类型(例如癌症)中, 特定miRNA种类的表达会受到影响, 并且与未受影响的细胞相比, 可以上调或下调。miRNA转录组的这种差异可用于识别相对健康状况, 和/或追踪健康细胞、细胞类型、组织和/或器官向疾病状态的发展。疾病状态可以包括转化为赘生性细胞的各个阶段。在本发明的实施例中, 利用给定器官或器官系统中包含的细胞类型的miRNA转录组的差异性变异, 以控制不同细胞类型中的蛋白质表达。

[0089] 如本文中所使用, 术语‘器官’与‘器官系统’同义, 并且是指组织和/或细胞类型的组合, 所述组织和/或细胞类型可以在个体体内分区以提供生物功能, 如生理、结构、动态平衡或内分泌功能。适合地, 器官或器官系统可以意味着血管化的内部器官, 如肝或胰脏。通常, 器官包含表现出器官表型特征的至少两种组织类型和/或多种细胞类型。

[0090] 如本文所用, 术语‘治疗病毒’是指能够感染和杀死癌细胞的病毒, 有时通过直接病毒裂解(溶瘤), 但还包括通过刺激宿主抗肿瘤反应而间接杀死。与健康细胞相比, 溶瘤病毒通常特征在于在病变细胞包括癌细胞)中具有增强的活性。

[0091] 溶瘤病毒的实例包括表1中提供的溶瘤病毒及其亚型。

[0092] 表1

[0093]

溶瘤病毒	类型
水泡性口炎病毒	包膜RNA
马拉巴病毒	包膜弹状病毒
脊髓灰质炎病毒	非包膜RNA
里奥病毒	非包膜RNA
麻疹病毒	包膜RNA
新城疫病毒	包膜RNA

柯萨奇病毒A21	非包膜RNA
细小病毒	非包膜DNA
单纯疱疹病毒1型	包膜DNA
腺病毒	非包膜DNA

[0094] 在本发明的实施例中，病毒可能选自病毒的巴尔的摩分类的第I-VII组中的任一组(巴尔的摩D(1971)，“动物病毒基因组的表达”。《细菌综述(Bacteriol Rev.)》35(3)：235-41)。在本发明的特定实施例中，合适的病毒可能选自巴尔的摩第I组，其特征在于具有双链DNA病毒基因组；第IV组，其具有单链阳性RNA基因组；和第V组，其具有单链阴性RNA基因组。

[0095] 如本文所用，术语‘毒力基因’或‘毒力因子’是指基因或基因产物，其有助于在其感染的细胞内复制治疗病毒(如溶瘤病毒)或使其裂解。术语‘复制因子’在本文中用作同义词。毒力因子通常可以是病毒基因组编码的病毒基因。毒力因子可能参与功能，例如细胞内免疫系统抑制和逃逸、病毒基因组复制、病毒体的传播或传播、结构外壳蛋白的产生或组装、潜伏状态下的病毒激活、病毒潜伏期的预防以及接管宿主细胞进程过程。几种毒力因子具有细胞或其他等同物，如果缺少病毒基因组，则可以补偿这些基因的功能。一些病毒可以用外源毒力基因修饰，从而增加其复制、裂解细胞和扩散的能力。

[0096] 在本发明的具体实施例中，所述组合物通过蛋白质或多肽的差异表达来增强或维持病毒在位于器官内的肿瘤中的溶瘤效力，所述蛋白质或多肽优先地增强了病毒体在肿瘤中的复制。在本发明的其他实施例中，组合物可以编码控制肿瘤内宿主免疫细胞和溶瘤病毒之间相互作用的基因产物。在另一个实施例中，本发明的组合物可用于产生调节溶瘤病毒活性的不同模式以及通过病毒体、外源或通过本发明的递送粒子施以的免疫共刺激分子的表达的基因产物。

[0097] 本文所用的术语‘多肽’是通过肽键连接的氨基酸残基的聚合物，无论是天然产生的还是体外合成产生的。长度小于约12个氨基酸残基的多肽通常称为“肽”，而长度在约12到约30个氨基酸残基之间的多肽可以称为“寡肽”。如本文所用，术语“多肽”表示天然存在的多肽、前体形式或前蛋白的产物。多肽还可经历成熟或翻译后修饰过程，其可包括但不限于：糖基化、蛋白水解裂解、脂质化、信号肽裂解、原肽裂解、磷酸化等。本文使用的术语“蛋白质”是指包含一个或多个多肽链的大分子。

[0098] 本文所用的术语‘基因产物’是指包含在本文所述的mRNA构筑体中的编码序列或ORF的产物。基因产物可能包含多肽或蛋白质。多顺反子mRNA构筑体可能使得多种基因产物产生。

[0099] 将mRNA直接递送到细胞允许细胞中所需基因产物(例如多肽和/或蛋白质)的直接和可控翻译。确切地说，提供mRNA不仅允许使用细胞表达调节机制，例如miRNA介导的控制(如以下特定实施例中所述)，而且还代表了产物的有限和可耗尽供应，而不是永久地改变可能提供游离型或基因组插入DNA载体的靶细胞的转录物组。

[0100] 在本发明的实施例中，提供了一种mRNA序列，所述mRNA序列包含编码至少一种多肽的序列，所述序列与可赋予组织特异性和整个核酸序列稳定性的一个或多个非翻译区(UTR)有效结合。‘组织特异性’是指根据UTR的存在来调节由mRNA编码的蛋白质产物的翻译。调节可以包括允许、减少或甚至阻断mRNA向蛋白质产物中的可检测翻译。UTR可以直接

与顺式mRNA相连-即在同一条多核苷酸链上。在替代性实施例中,提供编码基因产物的第一序列,并且提供与第一序列的一部分杂交的另一第二序列,其包含赋予整个核酸序列组织特异性的一个或多个UTR。在这后一个实施例中,UTR与反式编码基因产物的序列可操作地连接。

[0101] 根据本发明的特定实施例,提供一种mRNA,其包含按需要可操作地连接到其上的此类相关核酸序列,以预防或减少未病变肝组织中(例如健康肝细胞中)的基因产物的表达。因此,提供mRNA构筑体或转录物,其包含核糖体补充和组织特异性表达(通常(但非排他地)位于ORF的3')所必需的5'帽和UTR,以及分别定义ORF的起始和终止密码子。当将构筑体引入到非病变肝中时,防止或减少基因产物的表达。相反,肝中包含的赘生性细胞通常不符合正常的非病变肝细胞表达模式,构成了完全不同的miRNA转录组。在这些癌细胞中特异性翻译基因产物,但在邻近的健康肝细胞中不翻译。可以通过本文所述的粒子递送平台将mRNA构筑体递送到肝组织。细胞类型特异性表达可以通过微RNA调节机制调节,例如以下更详细描述的那些。

[0102] 本文所定义的‘治疗组分’或‘治疗剂’是指分子、物质、细胞或生物,当作为治疗干预的一部分施以个体人类或其它动物时,其有助于对个体人类或其它动物产生治疗效果。治疗效果可以由治疗组分本身或由治疗干预的另一组分引起。治疗组分可以是编码核酸组分,特别是mRNA。编码核酸组分可以编码治疗增强因子,如下文所定义。治疗组分还可能包含药物,任选地化学治疗药物,例如小分子或单克隆抗体(或其片段)。在一些实施例中,治疗组分可能包含细胞,如重组修饰的免疫效应细胞,例如CAR-T细胞。在本发明的其它实施例中,治疗剂包含治疗病毒,例如溶瘤病毒或病毒载体。

[0103] 术语‘治疗效果’是指药理学或治疗活性剂在动物个体(通常是人类)中引起的局部或全身作用,所述药理学或治疗活性剂包括已施以个体的物质、分子、组合物、细胞或生物体,并且术语‘治疗干预’是指施以这种物质、分子、组合物、细胞或生物。因此,所述术语是指用于诊断、治愈、缓解、治疗或预防动物或人类个体之疾病或增强其所需的身体或精神发育和状况的任何试剂。短语‘治疗有效量’是指在适用于任何治疗的合理的效益/风险比下产生期望的局部或全身作用的这种试剂的量。在某些实施例中,试剂的治疗有效量将取决于其治疗指数、溶解度等。例如,本发明的某些治疗剂可以足以产生适用于这种治疗的合理的效益/风险比的量施以。在特定的癌症治疗情形下,‘治疗效果’可以通过多种方式表现出来,包括但不限于实体瘤体积减少、癌细胞数量减少、所观察到的癌转移数量减少、预期寿命的增加、癌细胞增殖的减少、癌细胞存活的减少、肿瘤细胞标志物的表达的减少和/或与癌症状况相关的各种生理症状的改善。

[0104] 在一个实施例中,施以疗法的个体是哺乳动物(例如,小鼠、大鼠、灵长类动物、非人类哺乳动物、家畜或牲畜,例如狗、猫、牛、马、绵羊、山羊等),并且合适地为人类。在另一实施例中,个体为癌症的动物模型。例如,动物模型可以是人源性癌症,合适地是肝癌的原位异种移植动物模型。

[0105] 在本发明的方法的特定实施例中,个体尚未经历治疗性治疗,例如治疗性病毒疗法、化学疗法、放射疗法、靶向疗法和/或抗免疫检查点疗法。在再一实施例中,个体经历治疗性治疗,如前述治疗。

[0106] 在其它实施例中,个体已经进行了手术以去除癌性或癌前组织。在其它实施例中,

癌组织尚未去除,例如,癌组织可位于身体的不可操作区域中,例如在如果进行手术干预可能损害个体的生命的组织中,或在外科手术将会造成相当大的永久性伤害风险的区域中。

[0107] 在一些实施例中,提供的mRNA可以编码‘治疗增强因子’。根据本发明,治疗增强因子为可以增强或促进另一种共施以的治疗剂对给定细胞(适当地为靶细胞)发挥治疗效果的能力的基因产物或多肽。当引入到靶细胞中或靶细胞附近时,治疗增强因子的表达可以与共施以的治疗剂协作,由此实现或增强该治疗剂的治疗活性。在一些实施例中,治疗增强因子可以增强共施以的溶瘤病毒溶解癌细胞的能力。在本发明的其它实施例中,治疗增强因子可影响肿瘤微环境的改变,以便帮助或募集个体的自身免疫反应。在后一实施例中,肿瘤微环境的改变可以帮助共施以溶瘤病毒或CAR-T或其它基于过继细胞的疗法。在一些实施例中,治疗增强因子可以使得前药能够转化成活性形式。

[0108] 根据本发明的具体实施例,可以将多种治疗增强因子组合在组合物中。在此类实施例中,用于每一治疗增强因子的编码序列可能存在于单独mRNA分子中。在一些实施例中,多于一种治疗增强因子的序列可存在于同一mRNA分子上。在此类情况下,多顺反子mRNA分子进一步包含表达所有编码序列所必要的序列,例如内部核糖体进入位点(IRES)。

[0109] 在多个不同mRNA分子包含于一个或多个递送粒子中的实施例中,预期每一递送粒子可能包含一种或多种类型的mRNA分子;也就是说,在特定实施例中,并非每一递送粒子将必定包含所述实施例中提供的所有mRNA分子。

[0110] 本发明的某些实施例的mRNA构筑体可以由可以是例如DNA质体的多核苷酸表达构筑体合成。这一表达构筑体可能包含起始转录所必需的任何启动子序列和对应的终止序列,使得mRNA构筑体的转录可发生。预期此类多核苷酸表达构筑体本身就包含本发明的实施例。

[0111] 由mRNA编码的基因产物通常是肽、多肽或蛋白质。在特定蛋白质由多于一个子单元组成的情况下,mRNA可能编码一或多个子单元。

[0112] 由mRNA编码的基因产物可以是适合于产生治疗效果的任何类型。在治疗癌症的情形下,由mRNA编码的基因产物可以适当地包括当由癌细胞表达时引起或帮助破坏癌细胞的基因。

[0113] 肿瘤抑制基因(如p53)可以由本发明的构筑体提供。p53在包括细胞凋亡和基因组稳定性的细胞过程中起作用。其涉及DNA修复过程响应于基因组损伤的活化,并且可以阻止细胞生长和繁殖。

[0114] 本发明的组合物和构筑体也可以提供通过细胞凋亡促进细胞死亡的基因,即所谓的自杀基因,其表达时会引起细胞激活细胞凋亡过程。癌细胞通常具有这些细胞凋亡相关基因的突变和/或无功能的版本,并且因此无法响应于外部信号而经历细胞凋亡。自杀基因疗法还可以指引入允许将无毒化合物或前药转化成致死药物的基因(Duarte等人《癌症快报(Cancer Letters)》,2012)。根据本发明的实施例,此类基因产物可以选择性地引入病变细胞(例如赘生性细胞)中,通过诱导的细胞凋亡或其它无毒化合物或前药的递送来标记其用于破坏。

[0115] 在本发明的特定实施例中,mRNA可编码程序性细胞死亡途径的抑制剂,如PD-1受体(CD279)或其配体PD-L1(B7-H1;CD274)和PD-L2(B7-DC;CD273)的抑制剂。因此,mRNA可以编码结合到或以其它方式干扰靶器官内的病变或赘生性细胞内的PD-1/PDL-1或PD-1/PDL-

2轴的功能的蛋白质或多肽。适合的蛋白质或多肽可能包括抗体,其可能是单克隆或多克隆或其抗原结合片段,或结合到PD-1受体、PDL-1、PDL-2或配体和受体的复合物的其它抗原结合微蛋白。也可以通过使用细胞毒素T淋巴细胞抗原4 (CTLA4) 途径的蛋白质或多肽抑制剂(另一种所谓的免疫检查点)来观察这种效果。已知抑制任一途径或两种途径都会导致肿瘤微环境内免疫反应的改变,从而可能对患者的健康产生积极的影响。另外,通过调节个体中的免疫反应,本发明的组合物可以在具有其它抗癌治疗方法的组合疗法(例如放射线疗法或化学疗法)中展示特定效用。FDA批准的抗PD1途径抑制剂包括帕博利珠单抗(pembrolizumab)和纳武单抗(nivolumab)。已知的抗PDL-1抑制剂包括MPDL-3280A、BMS-936559和阿特珠单抗(atezolizumab)。抗CTLA4治疗抑制剂包括伊匹单抗(ipilimumab)和曲美木单抗(tremelimumab)。本发明的组合物可用于通过利用那些细胞中的不同miRNA环境将此类型程序性细胞死亡途径抑制剂选择性地递送到个体的靶器官内的病变细胞。

[0116] 嵌合抗原受体T细胞(CAR-T细胞)是免疫细胞,通常是T淋巴细胞,其已经修饰以表达靶向癌细胞的受体。

[0117] 涉及活体外产生的自体抗原特异性T细胞的转移的过继性免疫疗法是治疗病毒感染和癌症的有前景的策略。用于过继性免疫疗法的T细胞可以通过抗原特异性T细胞的扩增或通过基因工程改造重定向T细胞产生(参见例如Park, T.S., S.A. Rosenberg等人(2011). “用基因工程改造的T细胞治疗癌症。”《生物技术趋势(Trends Biotechnol)》29(11):550-7)。

[0118] 通过转基因T细胞受体或嵌合抗原受体(CARs)的基因转移已成功产生了T细胞中的新特异性,也称为免疫效应细胞(参见例如Jena, B., G. Dotti等人(2010). “通过引入肿瘤特异性嵌合抗原受体来重定向T细胞特异性。”《血液(Blood)》116(7):1035-44)。CAR是由至少三个部分组成的合成受体:细胞外抗原识别域(也称为胞外域)、跨膜域和细胞内T细胞活化域(也称为胞内域)。在一些实施例中,经工程改造的T细胞包含特定类型的T细胞,例如 $\gamma\delta$ T细胞,其为选择性目标肿瘤细胞而不影响健康细胞的T细胞的亚型。CAR已成功地允许T细胞针对来自各种恶性肿瘤(包括淋巴瘤和实体瘤)的肿瘤细胞表面表达的抗原重定向(Jena, Dotti等人同上)。在一些实施例中,经工程改造的T细胞包含至少一组自体T细胞,其中CAR-T细胞经工程改造以消除内源性 $\alpha\beta$ T细胞受体(TCR)的表达,以防止移植物抗宿主反应而没有损害依赖于CAR的效应子功能。在一些实施例中,经工程改造的T细胞包含至少一组同种异体T细胞。在一些实施例中,经工程改造的T细胞包含至少一组自体T细胞和一组同种异体T细胞。

[0119] 通常,细胞外抗原识别域是靶向部分,其与来自结合特定靶标(通常是肿瘤相关靶标)的抗体、受体或配体域的一个或多个信号传递域相关联。在一些实施例中,细胞外抗原识别域为来源于单链抗体(scFv)的抗原结合域的单链片段变体(scFv),其包含由柔性连接子接合的单克隆抗体的较轻和较可变片段。在一些实施例中,在一些实施例中,细胞外抗原识别域通过连接子(例如柔性连接子,如IgG1铰链连接子)连接到跨膜域。在一些实施例中,跨膜是或衍生自CD28跨膜域。在一些实施例中,胞内域包括经设计以增强免疫反应的共刺激域,例如通过增强CAR修饰的T细胞的存活和增加增殖,和经设计以在T细胞结合到所要目标时活化T细胞的内部T细胞活化域。在一些实施例中,共刺激域为或来源于CD28共刺激域、OX-40 (CD134) 共刺激域、ICOS共刺激域、4-1BB (CD137) 共刺激

域或其任何组合。在一些实施例中,细胞内T细胞活化域包含CD3 ζ (CD3 ζ) 域或其生物活性部分。在一些实施例中,T细胞活化产生免疫细胞活化,其中炎性细胞因子由T细胞释放以促进发炎和/或免疫反应。在一些实施例中,T细胞活化产生细胞毒素活性,其中细胞毒素由T细胞释放以促进癌细胞的细胞凋亡。在一些实施例中,T细胞活化产生增殖,其中T细胞释放白介素以促进细胞发育和分裂。在一些实施例中,T细胞活化产生免疫细胞活化、细胞毒素活性和/或增殖中的至少两种的组合。

[0120] 在一些实施例中,细胞外抗原识别域特异性地结合到CD19。CD19为免疫疗法的有吸引力的目标,因为绝大部分B急性淋巴母细胞白血病(B-ALL) 均一地表达CD19,而在非造血细胞以及骨髓、红细胞和T细胞以及骨髓干细胞上不存在表达。在B细胞恶性肿瘤上靶向CD19的临床试验是以促进抗肿瘤反应的方式进行的。在临床试验中评估的许多当前CAR-T疗法使用经遗传修饰以表达具有来源于CD19特异性小鼠单克隆抗体FMC63的scFv区域的特异性的嵌合抗原受体(CAR) 的T细胞(参见例如Nicholson,Lenton等人(1997);“B谱系白血病和淋巴瘤免疫治疗的功能性CD19特异性单链Fv片段的构建和表征。”《分子免疫学(Mol Immunol)》.1997年11-12月;34(16-17):1157-65;Cooper,Topp等人(2003)。“可以使T细胞克隆特异于CD19:选择性增强抑制物移植物相对于B谱系白血病的作用。”《血液(Blood)》.2003年2月15日;101(4):1637-44;Cooper,Jena等人(2012)(国际申请:W02013/126712)。

[0121] 在一些实施例中,细胞外抗原识别域特异性地结合到CD22。CD22为属于凝集素的Siglec家族并且特异性结合唾液酸与其N端七个细胞外免疫球蛋白域的跨膜磷糖蛋白。其主要充当B细胞活化和信号传导的抑制性受体并且调节B细胞与T细胞和抗原呈递细胞(APC) 的相互作用。与CD19相似,CD22是B细胞谱系限制的标志物,由B淋巴细胞从前B到成熟B细胞阶段明确表达。但是,其在分化为浆细胞的过程中会丢失。CD22在大多数B恶性肿瘤中普遍地表达,包括急性淋巴母细胞性白血病(ALL)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL) 和非霍奇金淋巴瘤(NHL) 的各种亚型,例如弥漫性大B细胞淋巴瘤。在抗CD22单克隆抗体(例如,依帕珠单抗) 和免疫毒素(例如,BL22、HA22) 的临床试验中,已经通过阳性结果证实了靶向CD22作为B细胞恶性肿瘤的有吸引力的治疗目标。已显示CD22在用抗CD19 CAR-T细胞治疗后丧失CD19表达的ALL细胞上表达,这使得抗CD22 CAR-T细胞适合于抗CD19 CAR-T的组合和/或后续治疗。

[0122] 然而,尽管许多临床研究已经证明了CAR T细胞的过继转移在癌症治疗中的潜力,但它们也增加了与细胞因子释放综合征(CRS) 和“靶外脱瘤”效应相关的风险。

[0123] 本文所提供的mRNA纳米粒子递送组合物适用于改良CAR-T细胞的安全性和功效。举例来说,本文所述的实施例的mRNA纳米粒子递送系统可能用于将特定免疫细胞或免疫细胞(如CAR-T细胞) 的经修饰子集募集到肿瘤微环境。另外,mRNA纳米粒子递送系统可用于抑制内源性T细胞受体(TCR) 的表达,从而避免移植物抗宿主疾病和/或选择性删除这些细胞中的免疫检查点基因,以增强它们在抑制性肿瘤环境中的抗癌活性。(参见例如Moffett,Coon等人(2017)“使用mRNA纳米载体对治疗细胞试剂进行即时操作。”《自然通信(Nature Communications)》.8:389.)。

[0124] 在一些实施例中,编码mRNA和递送粒子用于将CAR-T细胞吸引到个体中的特定部位。在一些实施例中,编码mRNA和递送粒子用于克服免疫细胞对肿瘤微环境的不充分迁移。响应于特定趋化因子,不同免疫细胞子集迁移到肿瘤微环境中并且以空间方式调节肿瘤免

疫反应。此外,趋化因子可以在肿瘤微环境中直接靶向非免疫细胞,包括肿瘤细胞和血管内皮细胞,并且其已经显示调节肿瘤细胞增殖、癌干样细胞特性、癌症侵袭性和癌转移。在一些实施例中,免疫细胞为T细胞、自然杀伤(NK)细胞、B细胞、抗原呈递细胞(APC)(如巨噬细胞或树突状细胞)或其任何组合。

[0125] 在一些实施例中,编码mRNA和递送粒子用于克服CAR T细胞对肿瘤微环境的不充分迁移。在一些实施例中,递送粒子特定地靶向肿瘤微环境,并且编码mRNA编码将CAR-T细胞吸引或以其它方式募集到肿瘤微环境的基因产物。在一些实施例中,编码mRNA表达趋化因子。借助于非限制性实例,编码mRNA可编码吸引如CCL2、CCL3、CCL4、CCL5、CCL20、CCL22、CCL28、CXCL8、CXCL9、CXCL10、CXCL11、CXCL12、XCL1和其任何组合的T细胞的趋化因子。在需要逆作用的情况下,例如在自身免疫疾病中,编码mRNA可以表达上述因子的阻断剂、拮抗剂和/或抑制剂。

[0126] 在一些实施例中,编码mRNA和递送粒子用于瞬时表达肿瘤微环境中的编码mRNA。在一些实施例中,编码mRNA编码涉及调节肿瘤反应中的免疫细胞(例如活化T细胞和NK细胞)的存活、增殖和/或分化的细胞因子或其它基因产物。借助于非限制性实例,编码mRNA可以对如IL-1、IL-2、IL-4、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12、IL-17、IL-33、IL-35、TGF- β 和其任何组合的细胞因子进行编码。同样在需要逆作用的情况下,例如在自身免疫疾病中,编码mRNA可以表达上述因子的阻断剂、拮抗剂和/或抑制剂。

[0127] 在本发明的一些实施例中,编码mRNA和递送粒子与CAR-T或其它过继细胞疗法一起使用以提供编码mRNA的瞬时表达。

[0128] 在一些实施例中,mRNA纳米粒子递送系统将编码遗传编辑剂的mRNA递送到靶细胞群体。在一些实施例中,mRNA编码靶向基因轨迹并且破坏靶细胞群体中产生的一种或多种内源性基因的表达的序列特异性核酸酶。在一些实施例中,mRNA编码靶向T细胞受体(TCR)相关基因轨迹的序列特异性核酸酶,由此破坏TCR中的一个或多个域的表达。

[0129] 在一些实施例中,mRNA纳米粒子递送组合物可用于递送编码朝向所要表型的经程式化工程改造的T细胞的一种或多种试剂的mRNA。在一些实施例中,mRNA纳米粒子递送组合物可用于诱导表征所要T细胞表型标记和转录模式。在一些实施例中,mRNA纳米粒子递送组合物可用于促进CD26L+中枢记忆T细胞(Tcm)的开发,其已展示改进CAR-T治疗。(参见例如Moffett,Coon同上)。

[0130] 在一些实施例中,mRNA纳米粒子递送组合物包括对T细胞标志物(例如在T细胞上发现的表面抗原)具有特异性的表面锚定靶向域。在一些实施例中,表面锚定的靶向域对选择性地结合纳米粒子到T细胞并且引发受体诱导的内吞作用以内化mRNA纳米粒子递送组合物的抗原具有特异性。在一些实施例中,表面锚定的靶向域选择性地结合CD3、CD8或其组合。在一些实施例中,表面锚定靶向域为或来源于选择性结合CD3、CD8或其组合的抗体。

[0131] 微RNA(miRNA)为一类非编码RNA,其各自含有约20到25个核苷酸,其中一些被认为参与通过结合到目标mRNA的3'非翻译区(3'UTR)中的互补序列的基因表达的转录后调节,使得其沉默。这些序列在本文中也可称作miRNA结合位点或miRNA结合位点序列。某些miRNA在其表达中具有高度组织特异性;例如miR-122和其变异体在肝中丰富并且在其它组织中不频繁地表达(Lagos-Quintana(2002),《当代生物学(Current Biology)》,第12卷,4月)。

[0132] miRNA系统因此提供稳固平台,通过所述稳固平台,引入到细胞中的核酸可以在靶

组织中的所选择的细胞类型中沉默并且在其它细胞类型中表达。通过将特定给定miRNA序列的结合位点包括到待引入到靶细胞中的mRNA构筑体中,确切地说,在UTR中或紧邻UTR的5'或紧邻UTR的3',可以在一些细胞类型中降低或大体上消除某些所引入的基因的表达,同时保留于其它细胞类型中(Brown和Naldini,《自然综述遗传学(Nature Reviews)》,第10卷,第578-585页(2009))。术语‘紧邻’的使用应理解为与术语‘高度接近’或‘非常接近’同义。当提及5'或3'相对于UTR序列的定位时,其涵盖其中通常至多约二十个,适合地不超过五十个,可以将中间核苷酸碱基置于miRNA结合序列与邻近UTR之间的变异体。预期一种或多种这样的miRNA结合位点序列可以包括在mRNA构筑体中。当存在多个miRNA结合位点序列时,这多个可能包括例如大于二、大于三、通常大于四个miRNA结合位点序列。这些miRNA结合位点序列可以在mRNA构筑体内的指定UTR内的3'或5'处连续地、串联地或在预定位置处排列。

[0133] 尽管miR-122在健康的未病变的肝组织中含量很高,但在大多数肝癌以及病变细胞中降低(Braconi等人2011,《肿瘤学研讨(Semin Oncol)》;38(6):752-763,Brown和Naldini《自然》2009;10 578)。通过上述方法,已发现当靶组织为肝时,通过在其3'UTR中或与其3'UTR相邻地包括miRNA-122结合位点(例如SEQ ID NO:1),所引入的mRNA序列的翻译可以在癌细胞中促进并且在经转染的健康细胞中减少或大体上消除。

[0134] 在所引入的多核苷酸的疾病特异性表达的情形下,考虑用于在特定疾病中破坏的任何miRNA序列的结合序列,即,与未病变细胞相比,在病变细胞(如肿瘤细胞)中上调或下调的结合序列适用于本发明。表2论述可以用于本发明的实施例中的这种类型的肿瘤相关miRNA结合序列的实例。然而,应了解,本发明不仅限于给定miRNA或miRNA类别在第一细胞类型中相对于给定器官或器官系统内的第二细胞类型下调的情况。相反,仅需要在器官或器官系统中包含的第一细胞类型与第二细胞类型之间存在调节性miRNA的差异表达模式。可以使用本文所述的组合物和方法来利用miRNA的差异表达,以使蛋白质产物在那些细胞中能够相应地差异翻译。

[0135] 已发现健康细胞与癌细胞之间的类似差异miRNA表达的证据的癌症的实例包括乳腺癌(Nygaard等人,《BMC医学基因组学(BMC Med Genomics)》,2009年6月9日;2:35)、卵巢癌(Wyman等人,《公共科学图书馆综合(PloS One)》,2009;4(4):e5311)、前列腺癌(Watahiki等人,《公共科学图书馆综合》,2011;6(9):e24950)和颈癌(Lui等人《癌症研究(Cancer Research)》,2007年7月1日;67(13):6031-43)。WO 2017/132552A1描述了在各种癌细胞中具有不同表达水平的广泛范围的miRNA。

[0136] 表2

[0137]	组织/癌症类型	涉及的 miRNA	表达概况	参考
	肝	miRNA-122	在癌细胞中减少	Braconi, 2011, Brown, 2009
	肝	miRNA-125	在肝癌中减少	Coppola N. Oncotarget, 2017,第 8 卷
	脑	miRNA-124a	在胶质母细胞瘤中减少	Mazzacurati L.分子疗法 23, 2015
	肺, 乳房	Let-7	在癌细胞中减少	Edge RE 等人《分子治疗学 (Mol Ther)》2008;16:1437 Yu F. Cell 2007; 131(6):1109-23
	胰腺	miRNA-375	在癌细胞中减少	Song S, Zhou J 等人《生物医学报告 (Biomed Reports)》: 393-398, 2013 年

[0138] 在胰腺中,已表明miRNA-375在正常胰腺细胞中高表达,而在病变和/或癌组织中则明显降低(Song,Zhou等人,2013年)。已经表明此表达与癌症的阶段有关,随着晚期癌症的表达进一步降低。据认为,miRNA-375通过靶向3-磷酸肌醇依赖性蛋白激酶-1(PDK1)mRNA从而参与调节胰腺β细胞中葡萄糖诱导的生物学反应,从而影响PI 3-激酶/PKB级联反应(El Ouaamari等人,《糖尿病(Diabetes)》57:2708-2717,2008年)。这种假定的作用方式与miRNA-375的抗增殖作用有关,这可能解释了其在癌细胞中的下调。

[0139] 可以选择由本发明提供的mRNA序列的UTR,使其与在靶器官内的一种细胞类型中表达的部分或全部UTR序列具有相似性,例如大于90%的相似性。特定的细胞类型可以具有在表达中上调或下调的基因,并且UTR序列可以介导这种调节,例如通过促进相关mRNA序列的稳定性或降解。

[0140] 例如,与已知在癌细胞中上调的基因相关的UTR可以具有一个或多个特征,例如miRNA结合位点序列,其促进了它们在这些癌细胞中的稳定性和翻译。通过将相似的序列并入到提供的mRNA序列中,可以改善癌细胞中的稳定性和翻译,但不能改善非癌细胞或健康细胞的稳定性和翻译。

[0141] 还考虑到,待由本发明治疗的癌症可以是靶组织中的继发性癌症,即,来自除靶组织以外的其它地方的癌症的癌转移。例如,肝转移可能源自食道癌、胃癌、结肠癌、直肠癌、乳腺癌、肾癌、皮肤癌、胰腺癌或肺癌,并且可能是腺癌或其他类型的癌症。在这些情况下,可能需要选择替代性miRNA序列以便提供健康的、非癌性和/或癌细胞中的差异表达。实际上,在此类情况下,由于转移细胞的不同组织来源,可以增加候选miRNA序列的选择。

[0142] 在某些情形下,有可能存在在靶组织中在不同细胞类型中展现不同表达的miRNA序列的超过一个候选物。在此类情况下,可能有利的是多个miRNA结合位点序列包括于mRNA构筑体中,并且这些序列可以是大体上不同的序列。然而,还可以设想多个miRNA结合位点序列中的每一个可以是大体上相同的序列。

[0143] 组合疗法

[0144] 溶瘤病毒

[0145] 如上所述,溶瘤病毒疗法是使用病毒以感染和杀死癌细胞的过程,有时通过直接病毒裂解,但也包括通过刺激宿主抗肿瘤反应而间接杀死。尽管溶瘤病毒的特征通常是与

健康细胞相比在癌细胞中具有增加的活性,但已记录到由破坏健康细胞引起的脱靶效应(Russell等人,《自然生物技术(Nature Biotechnology)》,2012)。

[0146] 为了增加安全性和减少脱靶作用,可以例如通过删除毒性因子或参与如细胞内免疫系统抑制和逃避、病毒基因组复制和宿主细胞过程的接管的功能的基因来修改或选择溶瘤病毒以降低其毒性。用于疫苗接种的安全形式的活病毒的历史生产为毒性减弱病毒的另一来源。在其它情况下,已发现特定突变或甚至额外基因以增强溶瘤活性,尤其是溶瘤病毒。表3中列出了通常在溶瘤病毒中添加、突变或缺失的毒性基因的非穷尽性实例。

[0147] 表3

溶瘤病毒	突变	参考
水泡性口腔炎病毒、 马拉巴病毒	G 蛋白(Q242R 突变) M 蛋白(L123W 突变)	Brun 等人 2010 年,《分子疗法》; 18(8): 1440-1449。
麻疹病毒	NIS 基因-人类甲状腺碘化物同向 转运蛋白	Aref 等人 2016 年,《病毒 (Viruses)》8, 294
新城疫病毒	融合蛋白(F)切割位点	Vigil 等人 2007 年《癌症研究 (Cancer Res)》; 67: (17)。
细小病毒	NS 蛋白 NS1	Marchini 等人 2015 年《病毒学 杂志(Virology Journal)》12:6
[0148] 单纯疱疹病毒 1 型 (HSV-1)	病毒核糖核苷酸还原酶(ICP6) 失活; 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (US3) 失活; ICP34.5 和 ICP47 失活(神经毒力 和免疫系统逃避); UL43 失活(细胞融合)失活; UL49.5 失活(T 细胞逃逸)失活; UL55 和 UL56	Liu 等人(2003)《基因疗法 (Gene Therapy)》第 10 卷, 292-303; Goldsmith 等人 1998 J Exp Med. 187(3): 341-348;
腺病毒	E1B-55、E3、E1a 启动子、E3 gp19kD、E1A 924bp)、E1A、E3 和 E4 中的缺失、E3 拟缺失、嵌 合 ad3/Ad11p E2B 区、E3-6.7K + gp19K E1A	Baker 等人 2018 年,《癌症 (Cancers)》, 10, 201

[0149] 以这种方式减弱或修饰溶瘤病毒可在溶瘤病毒对癌细胞的选择性中发挥作用:由于癌变过程通常涉及使对两种癌症均起保护作用的基因失活(例如通过调节细胞分裂或细胞凋亡)和病毒感染,由于这些细胞中缺少通常的抗病毒基因,因此已描述的减毒溶瘤病毒可以在癌细胞中保留其毒力。因此,在健康细胞中,毒性减弱病毒无法防御正常的抗病毒反应,因此可以消除,而在癌细胞中则没有这种反应,并且病毒可以裂解细胞。但是,这种方法很少能完全有效,因为首先,癌细胞中抗病毒反应的部分失活比完全缺乏抗病毒活性更为普遍(Haralambieva等人,《分子治疗(Mol. Ther.)》,2007),这意味着仍然可以降低这些细胞中的毒力,并且其次仍会感染健康细胞。

[0150] 类似地,因为病毒通常利用宿主细胞的细胞机制以复制其基因组,但此机制通常在不复制其自身基因组的健康、静态、非复制细胞中下调,许多病毒具有再活化或补偿宿主机制的基因。举例来说,核糖核苷酸还原酶为从核糖核苷酸生产脱氧核糖核苷酸所必需的;这些酶通常在静态宿主细胞中下调,并且若干病毒具有用于其自身的这种类型的酶的基因,以便具有脱氧核糖核苷酸源。因为复制癌细胞可能使这些酶再活化,所以所缺失的具有其自身的核糖核苷酸还原酶基因的毒性减弱溶瘤病毒仍可以在癌细胞中复制。然而,由于

与上述相似的原因,此方法可能在保护健康细胞免于感染或恢复癌细胞的毒力方面不是完全有效的。例如,并非肿瘤中的所有细胞在任何给定时间都在复制,并且因此在大多数癌细胞中可能没有足够的脱氧核糖核苷酸用于病毒复制。

[0151] 遵循以上所述,当根据本发明的组合物或方法与溶瘤病毒疗法结合使用时,由本发明的构筑体提供的治疗增强因子可以是增加溶瘤病毒在癌细胞中的功效的因子,例如增强病毒的复制,或增强病毒溶解其所在细胞的能力。确切地说,其中溶瘤病毒已经被修饰以减弱其功能,例如通过删除毒性因子的一种或多种基因,治疗因子可以用mRNA替换删除的基因,所述mRNA是病毒基因产物的复制,或与删除的基因具有基本上同源性的基因产物,或以其它方式补偿基因的删除。在这样的实施例中,通过本发明使在健康细胞和癌细胞中的差异表达成为可能,替换基因产物只能在癌细胞中表达,从而增强了在这些细胞中而不是在健康细胞中的病毒活性和裂解,其中miRNA结合位点的存在会抑制所提供的mRNA的表达。

[0152] 通过类似的方式,编码增加细胞对溶瘤病毒的抗性的因子的mRNA可以在健康细胞中优先表达,与健康细胞相比,可以再次促进癌细胞中的病毒活性。

[0153] 这种方法的优点是,与以前使用溶瘤病毒的疗法不同,它不依赖于可能由于致癌作用而使细胞抗病毒基因和过程失活,也不依赖于可能在某些癌细胞而不是其他癌细胞中被激活的细胞复制过程。结果,允许更大范围的毒力基因可以从溶瘤病毒中删除。因此,溶瘤病毒可以被修饰为在健康细胞中完全缺乏复制能力,并且,在通过本发明替代缺失的毒力基因的功能的癌细胞中,病毒可以恢复到完全效力。结果,可以减少副作用,并且提高功效。类似地,由于所提供的mRNA的差异表达依赖于癌细胞与健康细胞之间的miRNA表达差异,因此可以在所有转染的癌细胞中恢复毒力,并且不仅可以恢复例如在施以时正在复制的癌细胞。

[0154] 在一个特定实施例中,溶瘤病毒是HSV-1,疱疹病毒家族的部分。HSV的毒性减弱形式可以经工程改造或选择使其缺乏ICP6,其编码病毒核糖核苷酸还原酶(Aghi等人,《癌基因(Oncogene)》,2008)和/或在US3中,其编码丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,并且在病毒的生命周期中起多种作用,包括阻断宿主细胞细胞凋亡(Kasuya等人,《癌症基因疗法(Cancer Gene Therapy)》,2007)。

[0155] 细胞因子

[0156] 预期如本文所述的组合物和方法可以起诱导针对疾病的免疫反应的作用。确切地说,可以诱导针对癌细胞的免疫反应。癌变过程通常涉及癌细胞试图逃避免疫系统的方式,涉及由这些细胞产生和展示的抗原的变化,

[0157] 在一些实施例中,本发明提供的mRNA包含至少一种多核苷酸,其编码为双特异性T细胞衔接子(BiTE)的蛋白、抗免疫抑制蛋白或免疫原性抗原。如本文所用,术语“抗免疫抑制蛋白”是抑制免疫抑制途径的蛋白。

[0158] 本发明涵盖提供编码抗免疫抑制蛋白的mRNA的组合物,所述抗免疫抑制蛋白为抗调节T细胞(Treg)蛋白或抗骨髓衍生的抑制细胞(MDSC)蛋白。在一些实施例中,抗免疫抑制蛋白是VHH来源的阻断剂或VHH来源的BiTE。

[0159] 如本文所用,术语“免疫原性抗原”是指增加发炎或免疫原性免疫反应的蛋白质。在特定实施例中,抗免疫抑制和免疫原性抗原诱导抗肿瘤免疫反应。此类蛋白的实例包括与免疫检查点受体(例如CTLA4、LAG3、PD1、PDL1等)结合并抑制其的抗体或其抗原结合片

段、促炎细胞因子(例如IFN γ 、IFN α 、IFN β 、TNF α 、IL-12、IL-2、IL-6、IL-8、GM-CSF等)或与活化受体(例如Fc γ RI、Fc γ IIa、Fc γ IIIa、Fc γ IVa、共刺激受体等)结合并活化其的蛋白质。在特定实施例中,蛋白质选自以下各者:EpCAM、叶酸、萘外、抗CTLA-4、抗PD1、A2A、抗FGF2、抗FGFR/FGFR2b、抗SEMA4D、CCL5、CD137、CD200、CD38、CD44、CSF-1R、CXCL10、CXCL13、内皮素B受体、IL-12、IL-15、IL-2、IL-21、IL-35、ISRE7、LFA-1、NG2(也称为SPEG4)、SMAD、STING、TGF β 和VCAM1。

[0160] 本发明涵盖向基于细胞的治疗中使用的靶细胞群体提供编码功能性大分子的mRNA的组合物。在一些实施例中,靶细胞群体为经基因工程改造的T细胞群体。在一些实施例中,靶细胞群体为一群嵌合抗原受体T细胞(CAR-T细胞)。

[0161] 编码mRNA和递送粒子可用于将一群免疫细胞或免疫细胞群体的组合吸引到个体的特定部位。在一些实施例中,编码mRNA和递送粒子用于将免疫细胞吸引到肿瘤微环境。在一些实施例中,编码mRNA和递送粒子用于克服免疫细胞对肿瘤微环境的不充分迁移。在一些实施例中,免疫细胞为T细胞、自然杀伤(NK)细胞、B细胞、抗原呈递细胞(APC)(如巨噬细胞或树突状细胞)或其任何组合。在一些实施例中,编码mRNA和递送粒子用于将CAR-T细胞吸引到肿瘤微环境。

[0162] 可能将编码mRNA和递送粒子用于克服CAR-T细胞对肿瘤微环境的不充分迁移。在一些实施例中,递送粒子特定地靶向肿瘤微环境,并且编码mRNA编码将CAR-T细胞吸引或以其它方式募集到肿瘤微环境的基因产物。在一些实施例中,编码mRNA表达趋化因子。借助于非限制性实例,编码mRNA可编码吸引如CCL2、CCL3、CCL4、CCL5、CCL20、CCL22、CCL28、CXCL8、CXCL9、CXCL10、CXCL11、CXCL12、XCL1和其任何组合的T细胞的趋化因子。在需要逆作用的情况下,例如在自身免疫疾病中,编码mRNA可以表达上述因子的阻断剂、拮抗剂和/或抑制剂。

[0163] 编码mRNA和递送粒子可能用于瞬时表达肿瘤微环境中的编码mRNA。在一些实施例中,编码mRNA编码涉及调节肿瘤反应中的免疫细胞(例如活化T细胞和NK细胞)的存活、增殖和/或分化的细胞因子或其它基因产物。借助于非限制性实例,编码mRNA可以对如IL-1、IL-2、IL-4、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12、IL-17、IL-33、IL-35、TGF- β 和其任何组合的细胞因子进行编码。同样在需要逆作用的情况下,例如在自身免疫疾病中,编码mRNA可以表达上述因子的阻断剂、拮抗剂和/或抑制剂。

[0164] 可以将提供mRNA的组合物设计为靶向特定的细胞亚型,并在与它们结合后刺激受体介导的内饮作用,从而将它们携带的合成mRNA引入细胞,所述细胞现在可以表达合成的mRNA。因为不需要转基因的核转运和转录,所以此过程快速并且有效。

[0165] 在一些实施例中,mRNA纳米粒子递送系统将编码遗传编辑剂的mRNA递送到靶细胞群体。在一些实施例中,mRNA编码靶向基因轨迹并且破坏靶细胞群体中产生的一种或多种内源性基因的表达的序列特异性核酸酶。在一些实施例中,mRNA编码靶向T细胞受体(TCR)相关基因轨迹的序列特异性核酸酶,由此破坏TCR中的一个或多个域的表达。

[0166] 在一些实施例中,mRNA纳米粒子递送组合物可用于递送编码朝向所要表型的经程式化工程改造的T细胞的一种或多种试剂的mRNA。在一些实施例中,mRNA纳米粒子递送组合物可用于诱导表征所要T细胞表型标记和转录模式。在一些实施例中,mRNA纳米粒子递送组合物可用于促进CD26L+中枢记忆T细胞(Tcm)的开发,其已展示改进CAR-T治疗。(参见例如Moffett,Coon同上)。在一些实施例中,组合物提供编码一种或多种转录因子的mRNA以控制

靶细胞群体中的细胞分化。在一些实施例中,转录因子是Foxo1,其控制CD8 T细胞中的显影效应子到记忆体的转变。

[0167] 在一些实施例中,mRNA纳米粒子递送组合物包括对T细胞标志物(例如在T细胞上发现的表面抗原)具有特异性的表面锚定靶向域。在一些实施例中,表面锚定的靶向域对选择性地将纳米粒子结合到T细胞并且引发受体诱导的内饮作用以内化mRNA纳米粒子递送组合物的抗原具有特异性。在一些实施例中,表面锚定的靶向域选择性地结合CD3、CD8或其组合。在一些实施例中,表面锚定靶向域为或来源于选择性结合CD3、CD8或其组合的抗体。

[0168] 借助于本发明,上述基因产物的差异表达可以在不同细胞类型中实现,例如在健康细胞、非病变细胞、病变细胞和癌细胞中实现。通过这种方法,可以触发靶向病变细胞的免疫反应,同时避开未病变或健康的细胞。

[0169] 将编码核苷酸序列引入到靶细胞中最通常需要使用递送剂以将所要物质从胞外空间转移到胞内环境。通常,这类递送剂为递送粒子的形式,其可经历吞噬作用和/或与靶细胞融合。递送粒子可能通过封装或通过包含基质或结构内的物质而含有所要物质。

[0170] 本发明的递送粒子可能靶向靶组织的细胞。此靶向可以通过递送粒子表面上的靶向剂介导,所述靶向剂可以是蛋白质、肽、碳水化合物、糖蛋白、脂质、小分子、核酸等。靶向剂可以用于靶向特定细胞或组织或可以用于促进粒子的内饮作用或吞噬作用。靶向剂的实例包括但不限于抗体、抗体片段、低密度脂蛋白(LDL)、转铁蛋白、唾液酸蛋白、人类免疫缺陷病毒(HIV)的gp120包膜蛋白质、碳水化合物、受体配体、唾液酸、适体等。

[0171] 通常,递送粒子包含氨基醇类脂质。这些化合物可以用于形成包括纳米粒子、脂质体和胶束的粒子,其尤其适合于递送核酸。根据本发明的一些实施例的用于制备包含粒子的纳米调配物的说明性实例可在实例中发现。

[0172] 当向个体施以时,治疗组分适合地作为包含医药学上可接受的媒剂的组合物的一部分施以。可接受的医药媒剂可以是液体,如水和油,包括石油、动物、植物或合成来源的那些,如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等。医药媒剂可以是盐水、阿拉伯树胶、明胶、淀粉糊、滑石、角蛋白、胶体二氧化硅、尿素等。另外,可以使用助剂、稳定剂、增稠剂、润滑剂和着色剂。当施以个体时,医药学上可接受的媒剂优选是无菌的。当静脉内施以本发明化合物时,水是优选的媒剂。盐水溶液以及葡萄糖和甘油水溶液也可用作液体媒剂,特别是用于可注射溶液。合适的医药媒剂还包括赋形剂,如淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、稻米、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、滑石、氯化钠、无水脱脂奶、甘油、丙二醇、乙二醇、水、乙醇等。如果需要,医药组合物还可含有少量的润湿剂或乳化剂或缓冲剂。

[0173] 本发明的药剂和医药组合物可呈以下形式:液体、溶液、悬浮液、凝胶、调节释放调配物(如缓慢或持续释放)、乳液、胶囊(例如含有液体或凝胶的胶囊)、脂质体、微米粒子、纳米粒子或此项技术中已知的任何其它适合调配物。合适的医药媒剂的其他实例描述于《雷明顿的药物科学(Remington's Pharmaceutical Sciences)》,Alfonso R.Gennaro编辑,马克出版公司Easton,Pa.,第19版,1995年,参见例如第1447-1676页。

[0174] 对于本文所述的任何化合物或组合物,治疗有效量可以首先从活体外细胞培养测定确定。目标浓度将是能够实现本文所描述的方法的活性组分的浓度,如使用本文所描述或所属领域中已知的方法所测量。

[0175] 如所属领域中众所周知,还可从动物模型确定用于人类个体的治疗有效量。举例

来说,可以配制用于人类的剂量以实现已经发现在动物中有效的浓度。如上文所描述,人体内的剂量可通过监测化合物效果和上调或下调剂量来调整。基于上文所描述的方法和其它方法调整在人体内实现最大功效的剂量完全在所属领域的一般技术人员的能力内。

[0176] 预期本发明的实施例可包括经调配以用于药品的组合物。这样,可以将本发明的组合物悬浮在生物相容性溶液中以形成可以靶向细胞,组织内或患者或动物体内的位置的组合物(即组合物可以用于体外、离体或体内)。适合地,生物相容性溶液可能是磷酸盐缓冲盐水或任何其它医药学上可接受的载剂溶液。一种或多种额外医药学上可接受的载剂(如稀释剂、佐剂、赋形剂或媒剂)可与本发明的组合物在医药组合物中组合。合适的医药载剂在E.W.Martin的‘雷明顿的药物科学’中有所描述。本发明的医药调配物和组合物经调配以符合监管标准并且可以经口、静脉内、局部、瘤内或皮下或通过其它标准途径施以。施以可以是全身性或局部或鼻内或鞘内的。

[0177] 还希望有这样的实施例,其中将本发明的一些实施例的组合物单独地或与替代的抗肿瘤或其它抗癌治疗组分组合施以。这些组分可包括溶瘤病毒、小分子药物、化学治疗剂、放射治疗剂或生物试剂。组分可与本发明的组合物同时施以,并且可包含于递送粒子内,或可在施以本发明的组合物之前或之后通过任何适合手段单独施以。

[0178] 还预期本发明的一些实施例的组合物可以在活体外和/或活体外方法,例如在实验室环境中使用。体内方法的实例为其中将包含如本文所述的递送粒子和mRNA序列的组合物施以到目标活体外细胞,并且包含于mRNA序列中的miRNA结合位点序列允许在目标活体外细胞内的不同细胞类型中mRNA的编码序列的不同表达。类似地,预期一种方法,其中将包含如本文所述的递送粒子和mRNA序列的组合物施以到取自动物的目标离体样品,并且包含于mRNA序列中的miRNA结合位点序列允许不同细胞类型中的mRNA的编码序列在靶样品内的差异表达。

[0179] 本发明的装置通过但不限于以下实例来举例说明。

[0180] 实例

[0181] 通用协议

[0182] 细胞系

[0183] 人类肝癌(HCC) HepG2 (ATCC[®] HB-8065[™]) 和Hep3B (ATCC[®] HB-8064[™]) 细胞购自ATCC。将细胞在伊格尔最低必需培养基(EMEM) (Cellgro, USA), 10% FBS (HyClone, USA)、链霉素(100 μ g/mL)和青霉素(100U/mL⁻¹) (Cellgro) 中在37 $^{\circ}$ C下在5% CO₂的氛围中以单层形式培养。将HepG2细胞以5 μ g/cm²的胶原蛋白浓度生长于经胶原蛋白(Gibco, USA)涂布的板上。

[0184] HMCPP5(合并的可培养的人类肝细胞;通过合并来自5个个别供体的细胞产生的可培养的原发性肝细胞的混合物)购自美国新泽尔科技公司(ThermoFisher Scientific, USA)。将细胞接种于补充有5% FBS、1 μ M地塞米松和混合液A(青霉素/链霉素、人类重组胰岛素、格鲁塔玛(GlutaMax)和HEPES、pH 7.4)的威廉姆斯E培养基(Williams E Medium, WEM)中。在接种后24小时,将WEM/混合液A培养基改变为补充有0.1 μ M地塞米松和混合液B(青霉素/链霉素、ITS(人类重组胰岛素、人类转铁蛋白、硒酸、BSA、亚油酸)、格鲁塔玛和HEPES、pH 7.4)在37 $^{\circ}$ C下在5% CO₂的氛围中以单层形式的维持/培育培养基WEM。在所有实验期间,将细胞在WEM/混合液B培养基中培养,但在用纳米配制的mRNA转染期间除外。每3天更换一次WEM/混合液B培养基以为新鲜的。HMCPP5细胞在蛋白浓度为5 μ g/cm²的胶原蛋白(Gibco)涂

层板上生长。

[0185] Aml12 (小鼠健康的肝细胞) 购自美国ATCC。将细胞以 1×10^5 个/孔的密度接种到12孔板中。

[0186] 载体构筑体

[0187] pMRNA-CTx-mRNA模板的构建

[0188] 根据市售的mRNAExpress™mRNA合成试剂盒 (美国SBI), 构建用于体外合成实验中所有mRNA的质粒pMRNA-CTx-mRNA模板形成基质。所有质粒在大肠杆菌 (Invitrogen, USA) 中繁殖并且使用Qiagen Mini或Maxi试剂盒 (Qiagen, USA) 纯化。使用pDRAW32软件 (www.acaclone.com) 产生所有质粒的限制性图谱。

[0189] 克隆方法1-限制性核酸内切酶

[0190] 如图2中所示, 通过公司基因技术 (无密码子优化) 合成一种或多种基因的序列, 并且作为质粒DNA (称为DNA质粒或载体) 递送, 所述基因的序列与Kozak序列侧接以用于在5'端处的ATG密码子或在基因的3'端处的终止密码子 (TAA、TAG、TGA) 之前的最优翻译, 如图2中作为pMA-T-CTx-展示。侧接编码序列的专有5'和3'UTR区域包括于所有合成序列中 (未在所附序列中示出)。5'UTR是合成的, 并且含有Kozak序列, 并且3'UTR是基于小鼠α球蛋白UTR并且还包含120个碱基的聚A尾。为了产生图2中展示为pMRNA-CTx-mRNA的合成载体, 使用限制性核酸内切酶从DNA质粒切出含有基因的核苷酸片段或基因, 此处EcoRI和NheI, 并且亚克隆到pMRNA模板质粒中的EcoRI/NheI限制性位点中, 此模板质粒包含由T7 RNA聚合酶识别的T7启动子、5'和3'UTR和polyA序列。

[0191] 克隆方法2-冷融合

[0192] 如在具有Kozak序列和终止密码子 (TAA、TAG、TGA) 的克隆方法1中侧接的一种或多种基因的序列由公司基因技术合成 (无密码子优化) 并且作为质粒DNA pMAT-CTx-基因递送, 其中此质粒的主链与上文所描述相同。为了构建pMRNA-CTx-mRNA模板载体, 部署了冷融合克隆试剂盒 (美国SBI)。简单来说, 来自DNA质粒的基因序列通过具有特定引物的PCR扩增, 引物向基因序列的每个末端添加14个同源碱基的延伸。这些14个碱基被设计成与通过位于5'与3'UTR之间的多克隆位点中的限制性核酸内切酶切割分解模板质粒产生的线性化载体的末端同源。为了产生合成载体, 经预测的PCR产物通过PCR纯化试剂盒 (Qiagen, USA) 纯化并且根据制造商的方案在冷融合反应 (同源性重组) 之后并入到pMRNA模板质粒中。

[0193] 构建含有miRNA结合位点序列的模板

[0194] 对于产生包含miRNA结合位点序列的mRNA序列, 其中使用miR122的实例展示于图3中, 下文论述产生三种变异体的示范性方法。在变异体1中, miRNA结合位点序列的两个复本包括在终止密码子与3'UTR的+1位置之间。在变异体2中, miRNA结合位点序列的两个复本包括在3'UTR的开始或5'端处, 并且在变异体3中, miRNA结合位点序列的两个复本包括在3'UTR的末端或3'端处。

[0195] 图4展示使用约1400个碱基对的基因作为示例性蛋白质B的包含这三种变异体的合成载体的实例。

[0196] 变异体1

[0197] 如图5中所示, 如在具有Kozak序列和终止密码子 (TAA、TAG、TGA) 的以上方法中侧

接并且另外包含在终止密码子之后miRNA结合位点序列的两个复本的一种或多种基因的序列由公司基因技术(无密码子优化)合成并且作为质粒(此处再次用蛋白质A说明)DNA pMAT-CTx基因,其中所述质粒的主链与以上所述的质粒的主链相同。然后将此序列克隆到模板质粒中以通过上文所描述的任一方法产生合成载体。

[0198] 变异体2和3

[0199] 如具有Kozak序列和终止密码子(TAA、TAG、TGA)的以上方法中侧接的一种或多种基因的序列,并且另外包含3'UTR,包括在此区域的开始/5'端处的miRNA结合位点序列的两个复本(如图6中所示的变异体2)或在此区域的末端/3'端处的miRNA结合位点序列(如图7中所示的变异体3)通过公司基因技术(无密码子优化)合成并且作为质粒DNA pMAT-CTx基因,其中所述质粒的主链与以上所述的质粒的主链相同。然后将这个序列克隆到模板质粒中,通过上述两种方法之一建立合成载体,并进行修饰,选择限制性酶(此处为EcoRI和NotI)以从模板载体中去除3'UTR,从而使来自提供的DNA序列的3'UTR将存在于最终的合成载体中,因为它含有miRNA结合位点序列。

[0200] mRNA的体外转录(IVT)和体外mRNA合成

[0201] 为了在具有或不具有miRNA修饰的3'UTR的情况下执行mRNA的IVT,使用可商购的mRNAExpress™mRNA合成试剂盒。IVT载体的DNA模板的构建方法如上的方案中所述。体外mRNA合成的程序根据制造商的方案进行。简单来说,使用具有特定5'和3'引物(配备有试剂盒)的PCR反应物将polyA尾添加到DNA序列中。在活体外转录期间,DNA模板上的合成mRNA用反向帽类似物(ARCA)修饰的核苷酸(5-甲基胞啶-5'-三磷酸)戴帽。在活体外转录的mRNA中并入帽类似物、假尿苷-5'-三磷酸和多腺苷酸尾部以提高稳定性并且降低宿主细胞的免疫反应。

[0202] DMP^{CTx}的合成和mRNA的调配

[0203] 组合疗法(DMP^{CTx})调配物的递送和调节平台为可电离脂质样物质C12-200、磷脂DOPE、胆固醇和脂质锚定聚乙二醇C14-PEG-DSPE2000混合物的多组分纳米粒子。优化了DMP^{CTx}和C12-200的特定重量比(10:1)的这一特定组合物:mRNA和脂质样材料、磷脂、胆固醇和PEG的摩尔[%]组合物(表4),并且已展现了体内调配物的高效率(Kauffman K.J.,《纳米信件(Nano Letter.)》2015,15,7300-7306)。这些例示性组分的化学结构显示于图8中。

[0204] 为了合成如图9A所示的DMP^{CTx},制备C12-200(中国无锡)的乙醇溶液(混合物A)、磷脂DOPE(1,2-烯丙基-sn-glycero-3-磷酸乙醇胺)(阿凡提极性脂类(Avanti Polar Lipids),阿拉巴斯特,AL,美国)、胆固醇(Sigma,美国)和C14-PEG-DSPE2000(阿凡提极性脂类,阿拉巴斯特,AL,美国)和于(10mM柠檬酸盐,pH 4.5)中的mRNA(混合物B)的水性缓冲溶液。使用注射泵和微流体芯片装置将比例为3:1的乙醇混合物A和水性混合物B混合/组合(Chen D等人,《美国化学学会杂志(J. Am. Chem. Soc.)》2012,134(16),6948-6951)。将来自微流体芯片的纳米配制的mRNA的乙醇溶液收集到1.5mL试管。

[0205] 表4

[0206]	化合物	重量比	调配物 摩尔组合物[%]
	C12-200:mRNA	10:1	n/a
	C12:200	n/a	35
	DOPE		16
	胆固醇		46.5
	C14-PEG-DSPE200		2.5

[0207] 为了在调配之后去除乙醇,将DMP^{CTx}-mRNA混合物转移到Slide-A-Lyzer®透析盒G2并且在室温下在磁力搅拌器上在PBS中透析4小时。随后,使用带有18号规格,1英寸斜角针头的注射器将调配的mRNA转移到新的1.5mL试管中,并且以备表征。

[0208] 为了计算mRNA封装的功效,根据制造方案使用了RiboGreen RNA分析(Invitrogen)。使用动态光散射(ZetaPALS, Brookhaven, Instruments)测量脂质纳米粒子的多分散性(PDI)和尺寸。使用相同的仪器测量DMP^{CTx}的表面电荷(ζ电位)。分别由1.05和1mg/ml储备液来制备mRNA序列的溶液,所述mRNA序列具有或不具有通过连接子(SEQ ID NO:2)连接并且插入在编码mRNA序列的终止密码子之后的miR-122序列的两个复本。在封装包含mCherry (mCh) 序列的mRNA序列、约25kDa的蛋白质A,人类蛋白质的序列之后的参数的实例展示于表5中,包括组合治疗剂(DMP^{CTx})的递送和调节平台的尺寸、封装效率和多分散性。图9B中可以看到根DMP^{CTx}的递送粒子的说明图。

[0209] 表5

[0210]	mRNA	调配物	浓度 (μg/mL)	封装效率(%)	尺寸 (nm)	多分散性
	蛋白质 A-022	C12-200	202	78	93	0.12
	US3 - 052		172	78	93	0.12
	mCherry - 062		120	76	96	0.12

[0211] 体外递送的mRNA构筑体的差异表达

[0212] 为了研究本发明用构筑体mRNA成功转染靶细胞并随后驱动不同细胞类型中差异表达的潜力,将经miRNA-122结合位点修饰的DMP^{CTx} mRNA平台用于肝癌模型。

[0213] 细胞系转染

[0214] 荧光成像和定量

[0215] 如下进行人类肝癌细胞系HepG2和Hep3B的单次转染:在转染之前一天,分别以 2.7×10^5 个/孔和 2×10^5 个/孔(EMEM/10%FCS)的密度将HepG2和Hep3B细胞单独地接种到12孔板中。第二天,用单独PBS的媒介对照,用0.5μg/孔的mRNA-mCherry-DMP^{CTx}或用0.5μg/孔的mRNA-mCherry-122-DMP^{CTx}转染细胞(包含SEQ ID NO:3的序列)。转染通过将mRNA-DMP^{CTx}直接添加到孔中的经培养的培养基中,按需要平缓地混合经培养的细胞来进行。

[0216] 如下进行HMCPP5(合并的可培养的人类肝细胞)的单次转染:在转染HMCPP5细胞的前一天以 2.5×10^5 个/孔(WEM/混合液B)的密度接种到12孔板中。第二天,用DMP^{CTx} (PBS)的媒介对照,用0.5μg/孔的mRNA-mCherry-DMP^{CTx}或用0.5μg/孔的mRNA-mCherry-122-DMP^{CTx}转染细胞。转染通过将mRNA-DMP^{CTx}直接添加到孔中的经培养的培养基中,按需要平缓地混合经培养的细胞来进行。在HMCPP5转染期间,WEM/混合液B培养基补充有5%FBS。以上针对肝癌细胞所描述的方式进行转染。转染后24小时,培养基再次变成WEM/混合液B。

[0217] 为了评估健康人类肝细胞中的miRNA-122的组成活性的表达,如下进行HMCPP5细胞的多次转染:将HMCPP5细胞接种并且如上所述培养,并且用mRNA-mCherry-DMP^{CTx}或mRNA-mCherry-122-DMP^{CTx}总共转染3次(MPT),在每次转染之间间隔48小时。如上所述,以与HMCPP5的单次转染相同的方式进行转染。

[0218] 健康小鼠肝细胞(AML12, ATCC, USA)的单次转染如下进行:在转染前一天将AML12细胞以 1×10^5 个/孔的密度接种在12孔板中。第二天,用DMP^{CTx}(PBS)的媒介对照,用0.5 μ g/孔的mRNA-mCherry-DMP^{CTx}或用0.5 μ g/孔的mRNA-mCherry-122-DMP^{CTx}转染细胞。转染通过将mRNA-DMP^{CTx}直接添加到孔中的经培养的培养基中,按需要平缓地混合经培养的细胞来进行。

[0219] 在转染之后,使用荧光成像系统(来自EVOS®FL成像系统的应用)检测以上细胞系中的mCherry表达。转染后16、24、48、72、96和144小时拍摄了显示mCherry荧光的图片。

[0220] 使用ImageJ软件(NIH, 美国)从培养板上的3个随机区域(mRNA-mCherry、mRNA-mCherry-122)进行mCherry荧光信号的定量。图10B、图11和图12B展示这种定量的结果。将mCherry转染的孔的像素数设置为100%(mCherry荧光)。使用Student t测试测定统计显著性。结果展示为平均值 \pm SD。显著性差异定义为p值<0.05。星号表示与用mRNA-mCherry-122转染的细胞相比,mRNA-mCherry转染的细胞中mCherry荧光之间的统计显著差异(****, p<0.0001, ***p<0.001, **p<0.01, *p<0.05)。

[0221] 实例1:通过miRNA-122调节的肿瘤特异性基因表达

[0222] miRNA-122是一种丰富的肝特异性miRNA,在人原发性肝癌(HCC)和HCC衍生的细胞系(例如Hep3B和HepG2)中,其表达明显降低。本研究的目的是证明,通过插入miRNA-122靶序列(例如,SEQ ID NO:2,如在图3的顶部,变异体1中说明)的mRNA序列的3'非翻译区(UTR)的改质可能使得翻译抑制和/或脱腺苷化,接着脱帽在正常的肝细胞中,但未在经过测试的HCC细胞系中的外源性mRNA。

[0223] 为了检查健康肝细胞中的内源性miRNA-122活性,使用mCherry(红色荧光蛋白)作为所引入的目的基因并且随时间遵循mCherry(红色荧光蛋白)表达,用根据以上一般方案制备的mRNA-mCherry或mRNA-mCherry-122转染HMCPP5细胞(合并的可培养的人类肝细胞,其为通过合并来自5个个别供体的细胞产生的可培养的原发性肝细胞的混合物)。如图10A所示,在转染后48小时通过荧光显微镜分析mCherry(mCh)表达。在转染后的整个过程中,在用mRNA-mCherry转染的HMCPP5细胞中观察到mCherry表达(也就是说,无3'UTR改质以引入miR-122序列),表明转染和翻译成功。相反,在已知为miRNA-122阳性的健康肝细胞中,即使在转染后3天,与对照未转染的细胞中所见的表达相比,也将mRNA-mCherry-122的表达下调到几乎不可检测的水平。这表明,在插入3'UTR(变异体1)中的mRNA-mCherry-122中存在模拟miRNA-122靶序列阻止mRNA的翻译,最可能归因于受体细胞中的翻译抑制。

[0224] 这些细胞表现出的荧光信号的定量证实了上述。如图10B所示,与用mRNA-mCherry转染的那些细胞相比,在用mRNA-mCherry-122转染的健康细胞中荧光强度大幅度降低。

[0225] 以上实验中所获得的结果显示,miRNA-122的天然表达和miRNA-122靶序列的共定位(变异体1)可以有效调节健康肝细胞中的蛋白质表达,从而显著提高肿瘤特异性基因表达。在以下实验中,评估了miRNA-122在HMCPP5细胞中的组成型表达和活性。将HMCPP5细胞用mRNA-mCherry或mRNA-mCherry-122总共转染3次,每次间隔48小时。第一次转染后六天

(即最后一次转染后48小时)通过荧光显微镜测定mCherry的表达。如前所述,虽然用mRNA-mCherry-构筑体转染的细胞显示出清晰的红色荧光,但是用mRNA-mCherry-122构筑体转染的细胞却没有。在图11中,显示了在最终转染后的五天期间内,在单个转染(ST)和多重转染的细胞(MPT)中,用mRNA-mCherry-122转染的细胞与用mRNA-mCherry转染的细胞之间的比较。当用mRNA-mCherry-122转染作为经单独转染的细胞时,可以看到多重(1)转染的细胞以展现荧光强度的相同急剧降低,其中在多重转染后效果持续更久。如将预期,这指示由miRNA控制机制驱动的差异表达效果对于重复转染事件是稳固的,并且在这些时间范围中可用于驱动此机制的细胞内的miRNA-122的量并未耗尽。

[0226] 为了使用人类肝癌Hep3B和肝母细胞瘤HepG2细胞系来检查内源性miRNA-122活性的影响,进行类似于上文的实验。细胞用mRNA序列mRNA-mCherry、mRNA-mCherry-122(变异体1)转染或经历对照转染。如前所述,在48小时后,使用荧光显微镜确定mCherry在转染的Hep3B和HepG2细胞中的表达,如图10A中所示。在Hep3B细胞(图10A,中间栏)中,在mRNA-mCherry和mRNA-mCherry-122转染系中均清楚地看到了mCherry荧光,表明miRNA-122介导的翻译抑制在这些细胞中不活跃。在HepG2细胞中,在mRNA-mCherry转染系中清楚地看到了mCherry荧光,但是在mRNA-mCherry-122转染细胞中有一些明显的荧光,但似乎仅部分减少,并且明显大于正常肝细胞中所见。其它的证据显示在图10B中,其中在mRNA-mCherry-122转染系中对mCherry荧光的定量表明,在Hep3B细胞中未显示荧光减少,但在HepG2细胞中看到了大约50%的减少。

[0227] 在HepG2细胞中看到的部分下调进一步暗示miRNA-122对翻译的介导作用,因为来自这个细胞系的细胞已经显示保留残余miRNA-122活性(证明HepG2细胞中的“缺失”MIR122基因的存在,《公共科学图书馆综合(PLoS One)》2015;10(3))。

[0228] miRNA-122在脊椎动物物种之间是高度保守的,并且与人类一样,miRNA-122水平的降低与小鼠肝细胞癌相关(Kutay等人,2006)。因此使用小鼠健康的肝细胞细胞系Am112检测了miRNA-122活性的内源性作用。

[0229] 还用封装在DMP^{CTx}中的先前描述的mRNA-Cherry序列,即mRNA-mCherry或mRNA-mCherry-122转染健康小鼠肝细胞。在转染后24和72小时,观察到插入miRNA-122结合位点序列对mCherry荧光的类似影响。

[0230] 如图12A所示,在用mRNA-mCherry转染后观察到荧光。用mRNA-mCherry-122转染后,尽管仍然可以看到一些信号,但显示荧光显著减少。

[0231] 在从每个处理组的培养板上的3个随机区域中转染后24和72小时对mCherry荧光的定量显示(图12B),当用mRNA-mCherry-122转染时,观察到超过70%的翻译抑制。

[0232] 作为初步结论,上述实例表明与健康的肝细胞相比,纳米粒子递送系统的双重靶向特征和在mRNA构筑体中包含miRNA-122靶序列足以在肝癌和肝母细胞瘤细胞中获得蛋白质产物的相当显著的差异表达。在人类细胞系和小鼠细胞系中显而易见差异表达的观测结果。

[0233] 实例2:肿瘤特异性基因表达后的蛋白质表达水平

[0234] 在另一个实验中,采用蛋白质印迹法确定转染后最终表现出的蛋白质表达水平,如下所示。

[0235] 细胞系的转染和免疫印迹-蛋白质A

[0236] 为了评估示例性25kDa人类蛋白质(标示为‘蛋白质A’)的肿瘤特异性表达水平,将肝癌细胞(HepG2和Hep3B)和健康肝细胞(HMCP5)接种到12孔板中,并且用0.5 μ g/孔的纳米调配的表达人类蛋白质A的mRNA,25kDa (mRNA-A-DMP^{CTx})或在3’UTR (SEQ ID NO:2)中包含两个miRNA122结合序列的表达人类蛋白质A(约25kDa的人类蛋白质)的mRNA,变异体1 (mRNA-A-miRNA122-DMP^{CTx})转染,如用于mCherry转染的实例1中所描述。转染后24小时,在提取总蛋白后进行免疫印迹。

[0237] 对于免疫印迹,除去培养基,用冷PBS (Cellgro) 洗涤细胞,并且用蛋白酶抑制剂 (Sigma) 的混合物在RIPA (放射免疫沉淀测定) 缓冲液 (Boston Bioproducts) 中裂解细胞沉淀。通过比色布兰德福德测定法 (colorimetric Bradford assay) 测定蛋白质浓度。通过NovexTM4-12%微型凝胶 (赛默飞世尔科学 (ThermoFisher Scientific)) 分离出总共10mg的蛋白质,并通过电印迹法 (iBlot[®]2凝胶传递装置, 茵维特罗根) 将其转移到PVDF (聚偏二氟乙烯) 膜上。用5%脱脂奶粉在TBS-Tween 20 (Boston Bioproducts) 中封闭后,将膜与抗蛋白A抗体 (1:2000, Abcam) 或 β -肌动蛋白 (Cell Signaling) 在4 $^{\circ}$ C下培育过夜,然后与适当的HRP (辣根过氧化物酶) 轭合的山羊抗兔二抗 (1:10000; Abcam) 在室温下培育1小时。分别使用ClarityTM Western ECL底物 (Bio Rad) 和LI-COR[®] 系统 (LI-COR) 观测和想象蛋白质-抗体复合物。

[0238] 以上结果可见于图13,其中封装在DMP^{CTx}中的以下转染构筑体显示:

[0239] 图13的条带1、4和7:媒介剂 (经过模拟处理,仅PBS),

[0240] 图13的条带2、5和8:mRNA-A (包含蛋白质A的序列的mRNA),和

[0241] 图13的条带3、6和9:mRNA-A-122构筑体 (包含插入在变异体1位置中的蛋白质A和miRNA122的序列,如图3中所说明)。

[0242] 如上所述,每孔使用0.5 μ g mRNA-DMP^{CTx},如上文所描述,在条带1-3的健康的肝细胞 (HMCP5) 中、在条带7到9的肝癌模型Hep3B中、和在来自条带4到6的肝母细胞瘤模型HepG2的细胞中进行转染。转染24小时后,从每个细胞系中提取蛋白质。将10 μ g蛋白质负载到每个条带上,并且数据来自两个独立的实验。当用mRNA-A转染时,在所有测试的细胞系中都检测到了蛋白A,这表明成功实现了转染。尽管用mRNA-A-122转染,但仅在健康肝细胞中但未在Hep3B和HepG2细胞中观察到翻译抑制 (条带3、6和9),指示miRNA-122在测试的肝癌细胞中不实现其功能。然而,对于用mRNA-A-122转染的HepG2细胞,与用mRNA-A转染的细胞相比,蛋白A的表达略有下调,类似于先前在实施例1中看到的mCherry表达的模式。在增强的曝光照片 (底部) 中可以清楚地看到这一点,其显示HepG2细胞中的不完全下调。在HepG2细胞中看到的部分下调进一步暗示miRNA-122对翻译的介导作用,因为来自这个系的细胞已经显示保留残余miRNA-122活性 (证明HepG2细胞中的“缺失”MIR122基因的存在,《公共科学图书馆综合 (PLoS One) 》2015;10 (3))。

[0243] 综上所述,通过插入肝特异性miRNA-122目标序列来修改3’UTR mRNA可显著限制到肝癌Hep3B和肝母细胞瘤HepG2的mRNA翻译,但在正常人类肝细胞中不限制。

[0244] 实例3:体外溶瘤病毒联合疗法

[0245] 本文描述了通过本发明的方法允许的并且在以上实施例中显示的提供的mRNA构筑体的差异表达可以与溶瘤病毒疗法组合使用。特别地,在溶瘤病毒已被修饰以去除毒力基因,减弱其在健康细胞中的复制能力的情况下,本发明可用于在病变细胞例如癌细胞中

恢复那些基因或其等效物的功能。为了研究这种可能性,将缺乏US3的溶瘤病毒HSV-1 (R7041) (参见Leopardi等人,1997,PNAS 94:7891-7896) 和提供编码US3的mRNA构筑体并且用miRNA-122结合位点修饰的DMP^{CTx}平台结合使用于肝癌模型中 (SEQ ID NO:4)。

[0246] 通用协议:

[0247] 细胞培养

[0248] 将人类肝癌 (HCC) HepG2和Hep3B细胞在伊格尔最低必需培养基 (EMEM, Cellgro, USA)、10%FBS、链霉素 (100 μ g/mL) 和青霉素 (100U/mL⁻¹) (Cellgro) 中在37 $^{\circ}$ C下在5%CO₂的氛围中以单层形式培养。HepG2细胞以5 μ g/cm²的胶原蛋白浓度生长于经胶原蛋白涂布的板上。

[0249] 病毒准备

[0250] 将冷冻的R7041病毒在37 $^{\circ}$ C的水浴中解冻,并使用浴超声仪 (Q500超声仪, Qsonica, 美国) 超声处理30秒,然后转移到冰中备用。

[0251] 单独的R7041对人类HCC的毒性

[0252] US3突变体R7041病毒被认为实际上对健康细胞无致病性 (Leopardi等人1997), 甚至在免疫缺陷的无胸腺小鼠中也显示出良好的安全性 (Liu等人2007,《临床癌症研究 (Clin Cancer Res)》2007;13 (19))。为了建立R7041病毒对肝癌细胞的功效的基线,单独用溶瘤病毒处理模型细胞系。将来自Hep3B和HepG2系的细胞一式三份接种到96孔板中,每孔分别为15,000和17,000。

[0253] 24小时后,从MOI 0.37到0.0001694,用3倍连续稀释病毒感染细胞。96小时后感染后,所测试的细胞系的活力通过根据供应商说明书的MTS分析 (CellTiter 96[®] Aqueous One Solution细胞增殖分析, Promega, USA) 测量。在490nm下用96孔板读取器 (BioTek, Cytation 3, USA) 测量吸光度。使用GraphPad Prism, 7.03获得剂量反应曲线和50%有效剂量值 (ED₅₀)。

[0254] 如图14所示, Hep3B和HepG2细胞系均表现出与R7041相似的敏感性, ED₅₀分别为0.01和0.02MOI。但是, 与HepG2细胞相比, Hep3B细胞系对R7041的敏感性更高。

[0255] R7041和mRNA-DMP^{CTx}对人类HCC活力的组合作用

[0256] 在评估R7041病毒和mRNA-US3-DMP^{CTx}对人类肝癌细胞的组合作用之前,我们验证在0.04 μ g/mL mRNA-US3下,用mRNA-US3-DMP^{CTx}转染Hep3B和HepG2细胞对细胞活力无显著影响,如通过MTS分析所测量。

[0257] 将Hep3B和HepG2细胞一式三份接种到96孔板中,每孔分别为15,000和17,000。24小时后,从MOI 0.37到0.0001694,用3倍连续稀释病毒感染细胞。根据如图15中所示的实验时间,在用R7041感染24和48小时之后,用固定剂量的0.04 μ g/mL mRNA-US3-DMP^{CTx}转染两次所测试的细胞系。转染三天后,如上所述通过MTS分析测量了所测试细胞系的活力。对于所测试的人类HCC,两种不同化合物的组合:溶瘤R7041和无毒剂量的mRNA-US3-DMP^{CTx} (0.04 μ g/mL) 在较低病毒滴度下显著增强肿瘤破坏,如图16中所示。在此图中,展示了以0.04 μ g/mL的单独的mRNA-US3-DMP^{CTx} (Y轴交叉点)、以不同稀释度的单独R7041 (灰色三角形/菱形) 以及组合 (黑圈) 对活力的影响。

[0258] 以上实施例表明,毒性减弱溶瘤病毒与缺失的毒力基因的组合以及缺失基因的差异表达替代的供应可显著提高体外溶瘤病毒治疗的功效。特别地,当与本发明的组合物组

合时,在较低的病毒滴度下观察到更大的效果。

[0259] 实例4:递送的荧光蛋白mCherry mRNA构筑体在体内的表达

[0260] 为了确定本发明对于体内方法的适用性,使用原位人类肝细胞癌的小鼠模型。由miRNA-122结合位点驱动的差异表达已经在上文中展示(参见实例1),以适用于活体外健康小鼠Aml12肝细胞中。

[0261] 原位人类肝细胞癌(HCC)模型

[0262] 动物

[0263] 6-8周大的雌性(CB17/Ics-PrkdcSCID/IcrIcoCr1)Fox Chase SCID小鼠购自Charles River,UK。所有体内程序均由在英国的在CrownBio的研究动物照护小组委员会批准。

[0264] 细胞

[0265] 为了生成原位HCC模型,使用了表达萤火虫荧光素酶(Hep3B-cLuX)的人类Hep3B细胞系的生物发光变异体。将细胞在补充有10%热灭活的FBS、2mM L-谷氨酰胺、1%NEAA的EMEM培养基(Sigma,UK)中培养;每周用2 μ g/mL嘌呤霉素(Sigma)处理细胞。

[0266] 肝内注射和肿瘤生长监测

[0267] 在麻醉下,使用29G针将悬浮在20 μ L 1:1PBS:Matrigel™中的人类Hep3B-cLuX细胞(2×10^6)注射到肝的左上叶。使用可吸收明胶海绵(AGS)覆盖注射部位,将肝放回到腹腔中而不干扰AGS,并且将皮肤缝合闭合。每周两次通过生物发光成像(BLI)检查肿瘤生长。

[0268] 简要地,将小鼠麻醉,在成像前15分钟皮下注射150mg/kg D-荧光素。使用Living Image 4.3.1软件(Caliper LS,美国)捕获并处理BLI图像。在给药之前将小鼠每周三次,或每周一次称重。在指定的日子,处死小鼠,并用2%或4%的多聚甲醛溶液(PFA)固定肝,然后在OCT(最佳切割温度化合物-包埋介质)中冷冻以进行进一步的组织病理学分析。

[0269] mRNA的调配物和肿瘤靶向效率的评估

[0270] 将包含mCherry序列的mRNA序列和包含miRNA-122的mCherry的序列(SEQ ID NO: 3)如上文'DMP^{CTx}的合成和mRNA的调配物'段落,和表4中所描述来配制。为了评估选择性靶向肿瘤和避开未病变肝细胞的方法,将配制的mRNA注入患有原位肝癌的小鼠尾静脉。简而言之,如上所述,将悬浮在20 μ L的1:1PBS:Matrigel™中的 2×10^6 个人类Hep3B-cLuX细胞注射到肝的左上叶。然后也如上所述通过BLI成像监测肿瘤生长。八天后,当肿瘤形成时($BLI \geq 6 \times 10^6$),通过尾静脉对每只小鼠注射20 μ g配制的mRNA-mCherry-DMP^{CTx}、mRNA-mCherry-122-DMP^{CTx}或mRNA-A-122-DMP^{CTx},使得递送粒子通过返回血流进入肝。在最后四小时后,进行最后一次BLI,对小鼠进行安乐死,并且切除肝,并且通过BLI离体在局部肝病变处成像。

[0271] 组织学

[0272] 简单来说,在活体外成像后,去除具有肿瘤的左肝叶,用2%PFA固定,在4℃下浸没于30%蔗糖溶液(于PBS中;pH7.4)中,包埋于OCT中并且在用干冰预冷却的异戊烷中冷冻,并且接着储存于-80℃下。用DAPI(VECTASHIELD,载体实验室(Vector Laboratories),USA)或H&E(苏木精曙红端)对5 μ m的冷冻切片(Leica CM300,USA)进行核对比染色。通过使用荧光显微镜和/或软件确定肿瘤和健康肝中的mCherry相对于mCherry-122表达水平来评估肿瘤靶向。通过H&E染色确定肿瘤组织和健康组织。

[0273] 用通过在模拟和mRNA-mCherry-DMP^{CTx}和mRNA-mCherry-122-DMP^{CTx}上的BLI成像监

测的肿瘤生长的实例处理的小鼠。给动物皮下注射D-荧光素,并在15分钟后成像。信号仅存在于动物的中段中,如图17(A)(上图)中所示,所展示的动物在用组合物处理之前。解剖所有在中段中具有类似强度的动物,并且活体外成像肝,图17(A)(下图)。将具有肿瘤的肝的左叶切片并用DAPI对比染色。荧光显微法用于测定在健康肝细胞中和在肝肿瘤细胞中mCherry的表达,在注射调配的mRNA后24小时,如图17(B)中所示。当小鼠用mRNA-mCherry-DMP^{CTx}处理时,在健康肝细胞中检测到mCherry荧光(图17B,中间图)。当用mRNA-mCherry-122-DMP^{CTx}(变异体1)处理时,观察到翻译抑制(图17B,左图)。图17B示出了健康的肝细胞(左到右),其来自模拟处理的,mRNA-mCherry-DMP^{CTx}和mRNA-mCherry-122-DMP^{CTx}的小鼠。

[0274] 总之,本发明的组合物可以在体内施以并且可以成功地转染靶向肝细胞。当用miRNA结合位点修饰时,可以在非病变和肿瘤细胞中实现差异表达。

[0275] 实例5:肝中未病变和病变组织之间体内递送的US3 mRNA构筑体的差异表达

[0276] 将实例4中描述的体内小鼠模型用于施以包含US3 mRNA DMP^{CTx} miRNA-122构筑体的递送粒子组合物。使用抗US3多克隆抗体的免疫组织化学分析了US3在含有Hep3B人类癌症的小鼠肝中的差异表达。结果显示在图18中,可以看出在肿瘤(较暗的染色)和未病变的细胞(较浅的染色)之间,US3蛋白水平存在明显差异。如病理学家独立验证的,差异表达追踪肿瘤的边界。因此,可以得出结论,本发明的组合物可以在哺乳动物个体内成功地驱动体内潜在治疗增强因子的差异表达。

[0277] 免疫组织化学

[0278] 将新鲜的冷冻切片切成5 μ m(微米),并且风干约一小时,然后在室温(RT)下用4%多聚甲醛固定15分钟。将切片在流动的自来水中洗涤,并转移到PBS-0.1%Tween中。将切片用2.5%正常马血清(即用型,ImmPRESS HRP抗兔IgG过氧化物酶聚合物检测试剂盒,Vector MP-7401)培育20分钟。将载玻片排出并且与初级抗体一起培育到1:400稀释的US3(Acris AP55266SU-N)。将抗体用PBS-0.1%Tween稀释,并包括阴性对照,其中忽略第一抗体,并且将载玻片与抗体稀释剂PBS-0.1%Tween一起在室温下培育1小时。将载玻片用PBS-0.1%Tween洗涤,并用0.3%过氧化氢封闭的内源性过氧化物酶用埃尔加水(elga water)稀释10分钟。将载玻片用PBS-0.1%Tween洗涤,并与ImmPress抗兔IgG试剂(即用型,ImmPRESS HRP抗兔IgG过氧化物酶聚合物检测试剂盒,Vector MP-7401)一起在室温下培育30分钟。用PBS-0.1%Tween洗涤载玻片,并与色原体ImmPACT DAB(ImmPACT DAB过氧化物酶(HRP)底物,载体SK-4105)培育5分钟,然后用埃尔加水洗涤,并适当地用Mayer的苏木精对比染色。短暂地在埃尔加水中进一步洗涤,并在流动的自来水中呈蓝色5分钟。将载玻片脱水,清除并固定(95%IMS、99%IMS x2和二甲苯x2),然后盖上盖玻片。

[0279] 尽管已在本文中详细公开了本发明的特定实施例,但这仅是通过实例的方式且出于说明的目的而进行。前述实施例并非旨在限制其遵循的所附权利要求的范围。本发明人预期在不脱离由权利要求所定义的本发明的精神和范围的情况下可做出各种替代、更改和修改。

序列表

<110> 联合治疗公司

<120> 用于编码核糖核酸在组织中的靶向递送、表达和调节的组合物和方法

<130> P44379W0

<150> US62632056

<151> 2018-02-19

<150> GB1714430.4

<151> 2017-09-07

<160> 5

<170> BiSSAP 1.3.6

<210> 1

<211> 22

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 单一miR122结合位点

<400> 1

aacgccauua ucacacuaaa ua 22

<210> 2

<211> 50

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 具有连接子的2x miR-122结合位点

<400> 2

aacgccauua ucacacuaaa uauuuaaaaa cgccauuau acacuaaa 50

<210> 3

<211> 761

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 具有2x miR-122结合位点序列和连接子的mCherry序列

<400> 3

auggugagca agggcgagga ggauaacaug gccaucauca aggaguucau gcgcuucaag 60
gugcacaugg agggcuccgu gaacggccac gaguucgaga ucgagggcga gggcgagggc 120
cgccccuacg agggcaccca gaccgccaag cugaagguga ccaagggugg cccccugccc 180
uucgccuggg acauccuguc cccucaguuc auguacggcu ccaaggccua cgugaagcac 240
cccgccgaca uccccgacua cuugaagcug uccuuccccg agggcuuca gugggagcgc 300

gugaugaacu ucgaggacgg cggcguggug accgugaccc aggacuccuc ccugcaggac 360
 ggcgaguuca ucuacaaggu gaagcugcgc ggcaccaacu uccccuccga cggccccgua 420
 augcagaaga agaccauggg cugggaggcc uccuccgagc ggauguaccc cgaggacggc 480
 gcccuagaagg gcgagaucaa gcagaggcug aagcugaagg acggcggcca cuacgacgu 540
 gaggucaaga ccaccuacaa ggccaagaag cccgugcagc ugcccggcgc cuacaacguc 600
 aacaucaagu uggacaucac cucccacaac gaggacuaca ccaucgugga acaguacgaa 660
 cgcgccgagg gccgccacuc caccggcggc auggacgagc uguacaagua aaacgccauu 720
 aucacacuaa auauuuuuuuu acgccauuuu cacacuaauu a 761

<210> 4

<211> 1496

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 具有2x miR-122结合位点和连接子的US3

<400> 4

auggccuguc gaaaguuuug ucgcguuuac gggggacagg gcaggaggaa ggaggaggcc 60
 gucccgccgg agacaaagcc gucccgggug uuuccucaug gccccuuua uacccagcc 120
 gaggacgcu gccuggacuc cccgcccccg gagacccca aaccuuccca caccacacca 180
 cccggcgaug ccgagcgccu gugucaucug caggagauc uggcccagau guacggaaac 240
 caggacuacc ccuagagga cgaccccgagc gcggaugccg cggacgaugu cgacgaggac 300
 gccccggacg acguggccua uccggaggaa uacgcagagg agcuuuuuc gcccggggac 360
 gcgccccguc cccuuauagg ggccaacgac cacaucuc ccccgugugg cgcaucucc 420
 cccgguaauac gacgacgcag ccgggaugag auuggggcca cgggaauuac cgcggaagaa 480
 cuggacgcca uggacaggga ggcggcucga gccaucagcc gcggcgga gccccucg 540
 accauggcca agcuggugac uggcaugggc uuacgauc acggagcgcu caccagga 600
 ucggaggggu gugucuuga cagcagccac ccagauuacc cccaacgggu aaucgugaag 660
 gcgggguggu acacgagcac gagccagag gcgcgacugc ugaggcgacu ggaccaccc 720
 gcgauccugc ccuccugga ccugcauguc gucuccgggg ucacgugucu gguccuccc 780
 aaguaccagg ccgaccugua uaccuauuc aguaggcgcc ugaacccgc gggacggcg 840
 cagaucgcag cggucucccg gcagcuccua agcgccguug acuacauuca ccgccagggc 900
 auuauccacc gcgacauuaa gaccgaaaau auuuuuuuu acacccccga ggacauuugc 960
 cugggggacu uuggugccgc gugcuucgug caggguucc gaucaagccc cuucccuac 1020
 ggaauccgg gaaccaucga caccaacgcc cccgaggucc ugaccgggga uccguauacc 1080
 accaccgucg acauuuggag cgccggucug gugaucucg agacugccgu ccacaacgcg 1140
 uccuuguucu cggccccccg cggccccaaa agggggccgu gcgacaguc gaucacccgc 1200
 aucauccgac agggccaggu ccacguugac gaguuuucc cgcauccaga aucgcgccuc 1260
 accucgcgu accgcucccg gcggccggg aacaucgcc cgccguacac ccgaccggcc 1320
 uggaccgcgu acuaaagau ggacauagac gucgaaua ugguuugcaa agcccucacc 1380
 uucgacggcg cgcuucgccc cagcgccgca gagcugcuuu guuugccgc guuuaacag 1440

aaaugaaacg ccauuauacac acuaaaauuu uaaaaacgcc auuauacacac uaaaua 1496

<210> 5

<211> 3466

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 具有2x miR-122结合位点序列的ICP6

<400> 5

```

augauggcca gccgcccagc cgcauccucu cccgucgaag cgcgggcccc gguuggggga 60
caggaggccg gcggccccag cgagccacc cagggggagg ccgccggggc ccucucgcc 120
cacggccacc acguguacug ccagcgaguc aauggcguga uggugcuuuc cgacaagacg 180
cccggguccg cguccuaccg caucagcgau agcaacuug uccaugugg uuccaacugc 240
accaugauua ucgacggaga cguggugcgc gggcgcccc aggaccggg ggccgcggca 300
uccccgcuc ccuucguugc ggugacaaac aucggagccg gcagcgacgg cgggaccgcc 360
gucguugcau ucgggggaac cccacgucgc ucggcgggga cgucuaccg uaccagacg 420
gccgacgucc cagccgaggc ccuugggggc cccccuccuc cuccccguu caccugggg 480
ggcggcuguu gcuccugucg cgacacacgg cgccgcucug cgguaucgg gggggagggg 540
gaucccgucg gccccgcgga guucgucucg gacgaccgu cguccgauuc cgacucggau 600
gacucggagg acaccgacuc ggagacgcug ucacacgccu ccucggacgu guccggcggg 660
gccacguacg acgacgccc ugaucggau ucguaucgg augacuccu gcagauagau 720
ggccccgugu gucgcccug gagcaaugac accgcgccc uggauguug ccccgggacc 780
cccggccccg gcgccgacgc cgguggucc ucagcggua acccacacgc gccgacgaca 840
ggggccggcg cuggucuugc ggccgauccc gccguggccc gggacgacgc ggaggggcuu 900
ucggaccccc ggccacgucu gggaacgggc acggccuacc ccguccccc ggaacucacg 960
cccgagaacg cggaggccgu ggcgcgcuu cugggagaug ccgugaacc cgaaccgcg 1020
cucaugcugg aguacuuuug ccggugcgcc cgcgaggaaa ccaagcgugu cccccccagg 1080
acauucugca gccccccucg ccucacggag gacgacuuug ggcuucuaa cuacgcgcuc 1140
guggagaugc agcgccugug ucuggacguu ccuccggucc cgccgaacgc auacaugccc 1200
uauuaucuca gggaguaugu gacgcggcug gucaacgggu ucaagccgu ggugagccgg 1260
uccguucgcc uuuaaccgau ccuggggguu cuggugcacc ugcggauccg gaccgggag 1320
gccuccuuug aggaguggcu gcgauccaag gaaguggccc uggacuugg ccugacggaa 1380
aggcuucgcg agcacgaagc ccagcuggug auccuggccc aggcucugga ccauuacgac 1440
ugucugaucc acagcacacc gcacacgcug gucgagcggg ggcugcaauc ggcccugaag 1500
uaugaggagu uuuaaccuaa gcgcuuugc gggcacuaca uggaguccgu cuuccagaug 1560
uacacccgca ucgccggcuu uuuggccugc cgggccacgc gcggcaugcg ccacaucgcc 1620
cuggggcgag aggggucgug gugggaaaug uucaaguucu uuuccaccg ccucuacgac 1680
caccagaucg uaccgucgac ccccgccaug cugaaccugg ggaccgcaa cuacuacacc 1740
uccagcugcu accugguaaa cccccaggcc accacaaaca aggcgaccu gcgggccauc 1800
accagcaacg ucagugccau ccucgcccgc aacgggggca ucgggcuaug cgugcaggcg 1860

```

uuuaacgacu ccggccccgg gaccgccagc gucaugcccc cccucaaggu ccucgacucg 1920
 cugguggcgg cgacaacaa agagagcgcg guccgaccg gcgcgugcg guaccuggag 1980
 ccguggcaca ccgacgugcg ggccgugcuc cggaugaagg ggguccucgc cggcgaagag 2040
 gcccagcgcg gcgacaauau cuucagcgcc cucuggaugc cagaccuguu uucaagcgc 2100
 cugauucgcc accuggacgg cgagaagaac gucacaugga ccuguucga cggggacacc 2160
 agcaugucgc ucgccgacuu ucacggggag gaguucgaga agcucuacca gcaccucgag 2220
 gucauggggu ucggcgagca gauacccauc caggagcugg ccuauggcau ugugcgcagu 2280
 gcggccacga ccgggagccc cuucgucaug uucaaagac cggugaaccg ccacuacauc 2340
 uacgacaccc agggggcggc caucgccggc uccaaccucu gcaccgagau cguccaucg 2400
 gccuccaagc gauccagugg ggucugcau cugggaagcg ugaaucuggc ccgaugcgc 2460
 uccaggcaga cguuugacuu ugggcggcuc cgcgacgccg ugcaggcgug cgugcugaug 2520
 gugaacauca ugaucgacag cacgcuacaa cccacgccc agugcaccg cggcaacgac 2580
 aaccugcggc ccaugggaau cggcaugcag ggccugcaca cggccugccu gaagcugggg 2640
 cuggaucugg agucugccga auuucaggac cugaacaaac acaucgccga ggugaugcug 2700
 cugucggcga ugaagaccag caacgcgcug ugcguucgcg gggcccgucc cuucaaccac 2760
 uuuaagcgca gcauguaucg gccggccgc uuucacuggg agcgcuuucc ggacgcccg 2820
 ccgcgguacg agggcgagug ggagaugcua cgccagagca ugaugaaaca cggccugcgc 2880
 aacagccagu uuugcgcgcg gaugcccacc gccgccucgg cgcagaucuc ggacgucagc 2940
 gagggcuuug ccccccuguu caccaaccug uuuaagcaagg ugaccggga cggcgagacg 3000
 cugcgcccca acacgcuccu gcuaaaggaa cuggaacgca cguuagcgg gaagcgccuc 3060
 cuggagguga uggacaguuc gacgccaagc agugguccgu ggcgcaggcg cucccgugcc 3120
 uggagcccac ccacccccuc cggcgauuca agaccgcuu ugacuacgac cagaaguugc 3180
 ugaucgaccu gugugcggac cgcgccccu acgucgacca uagccaaucc augaccugu 3240
 augucacgga gaaggcggac gggacccucc cagccuccac ccugguccgc cuucuggucc 3300
 acgcauaa ggcgggacua aaaacaggga uguacuacug caagguucgc aaggcgacca 3360
 acagcggggc cuuugcggc gacgacaaca uuugucgac gagcugcgcg cuguagaacg 3420
 ccauuuacac acuaaaauu uaaaaacgcc auuauacac uaaaua 3466

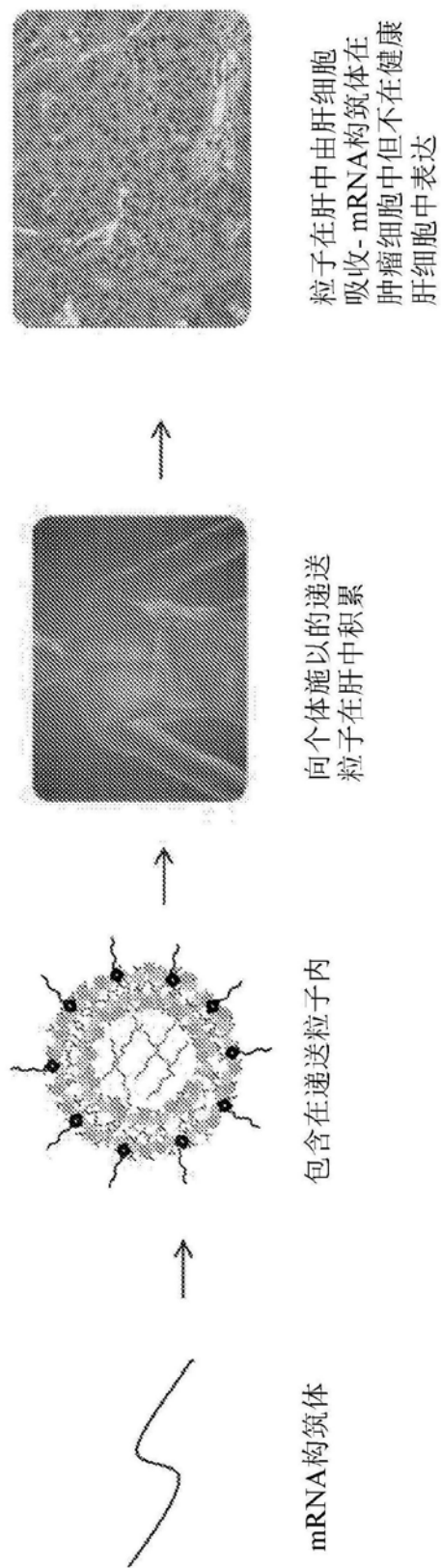


图1

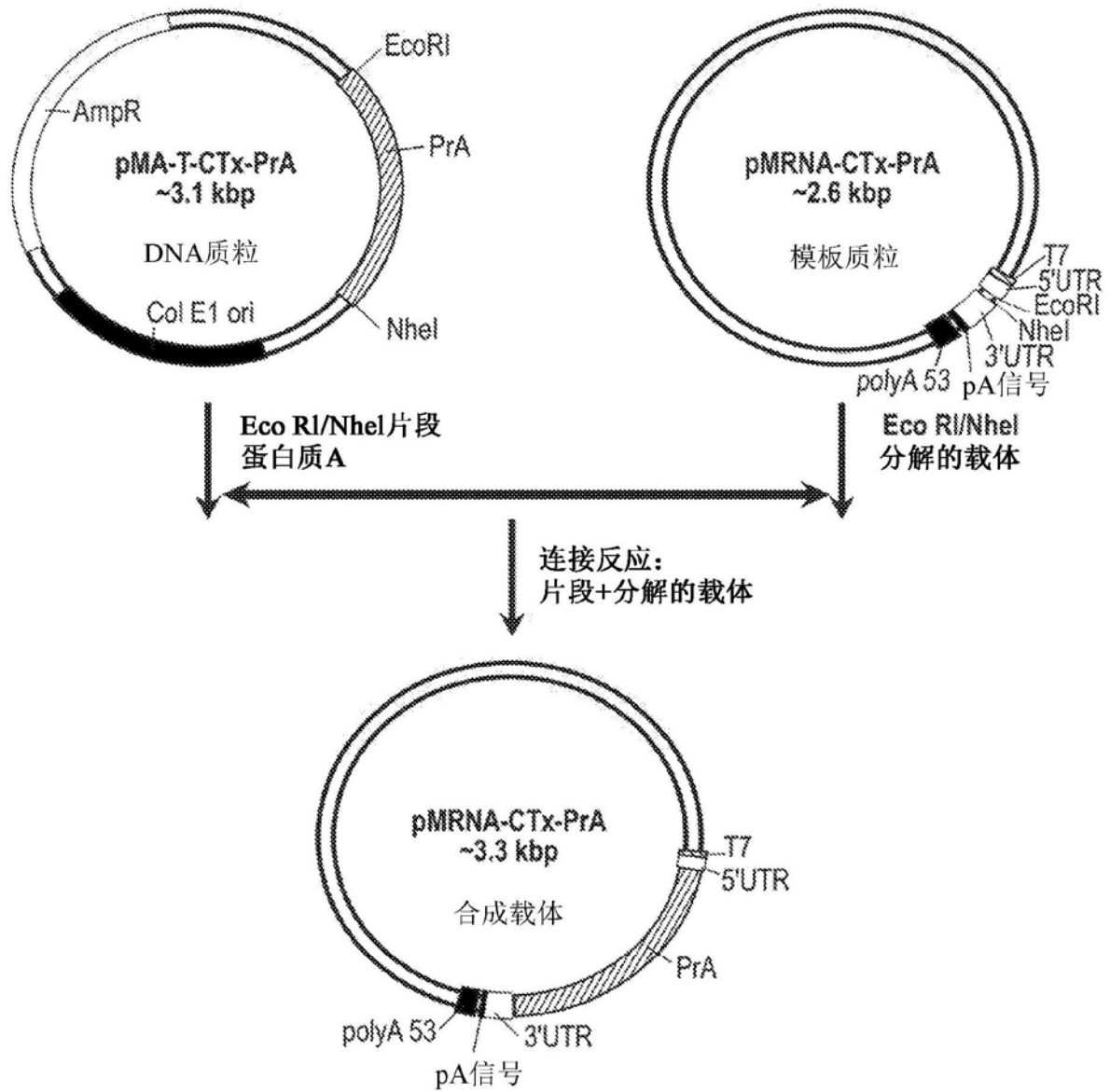


图2

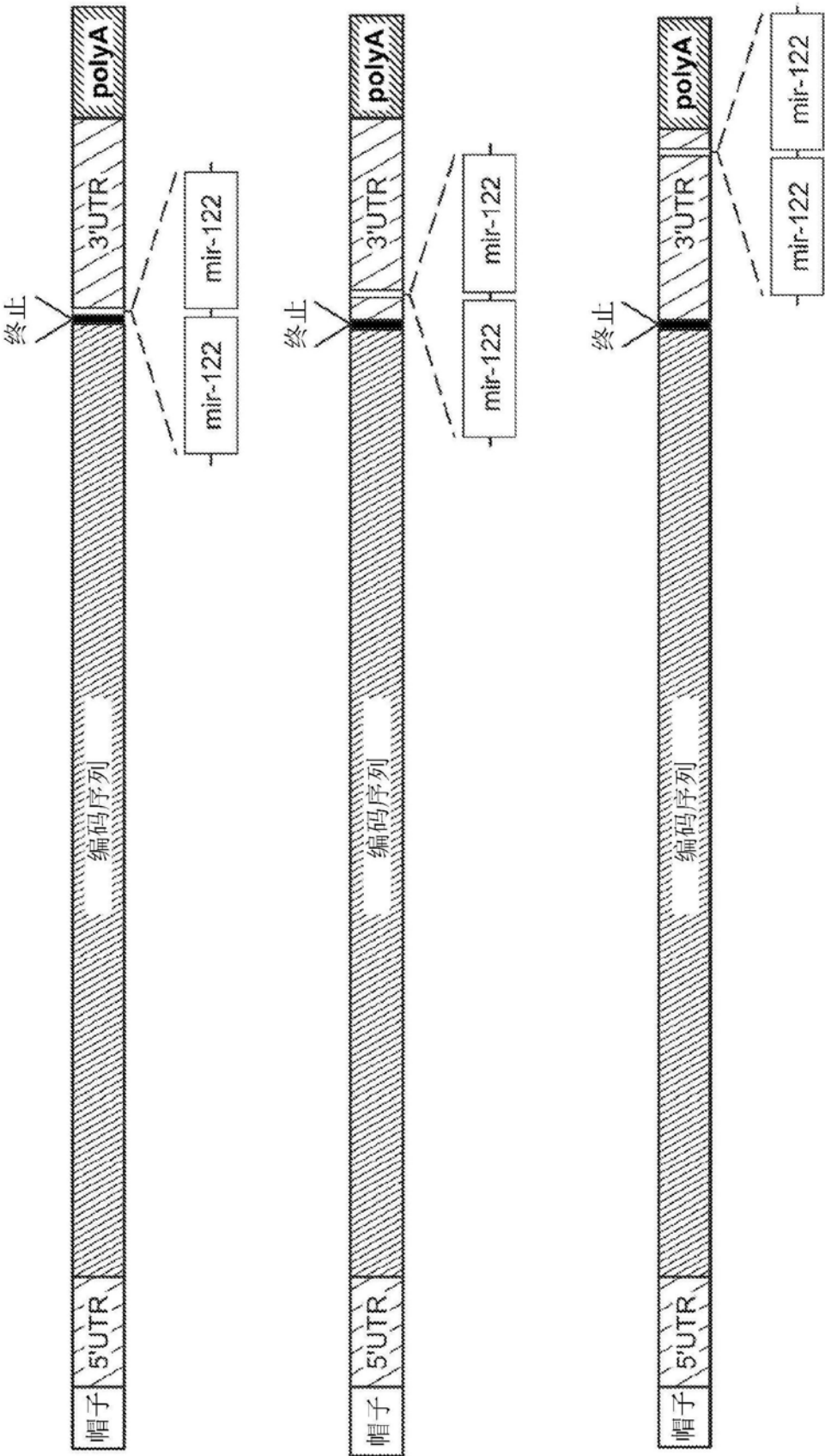


图3

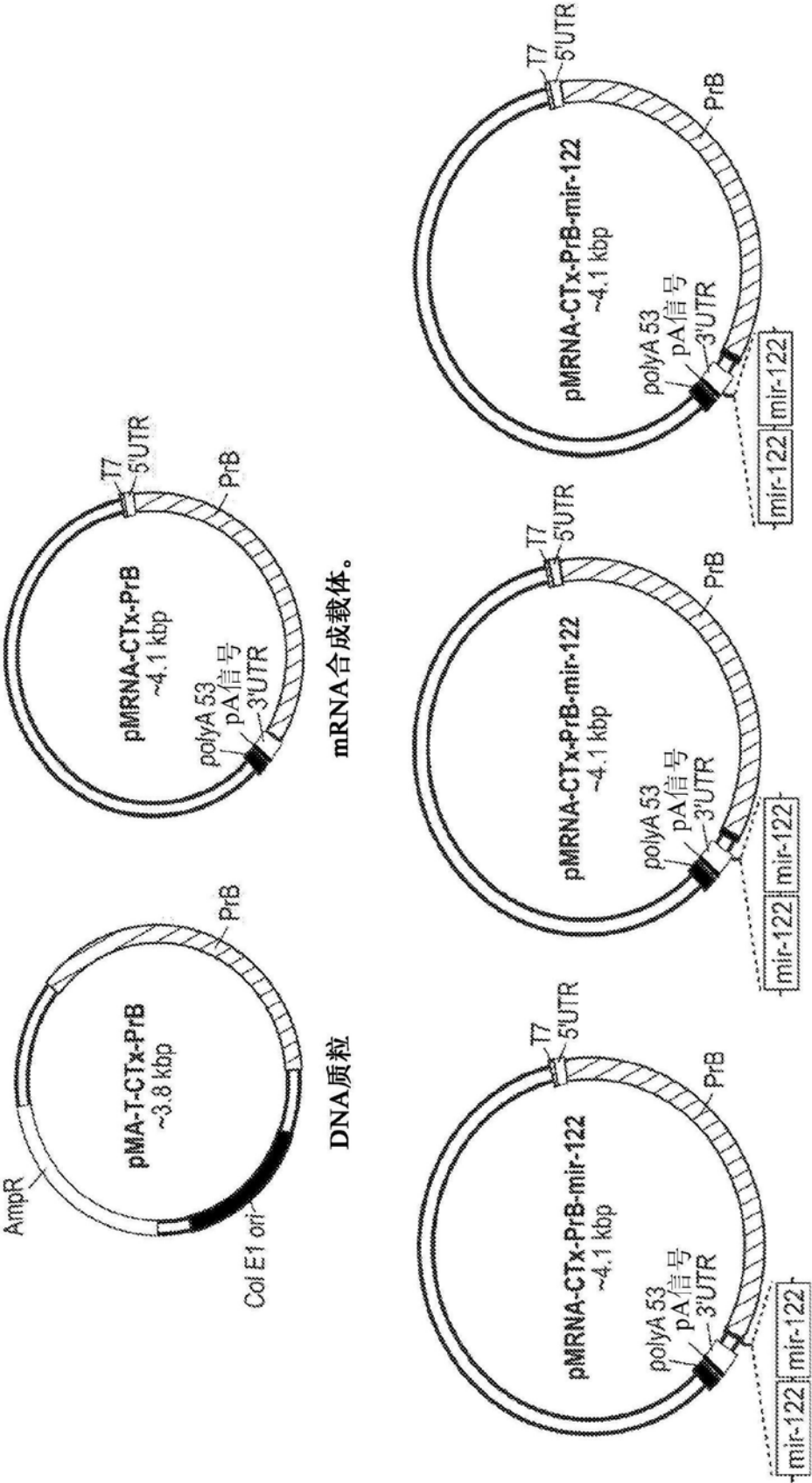


图4

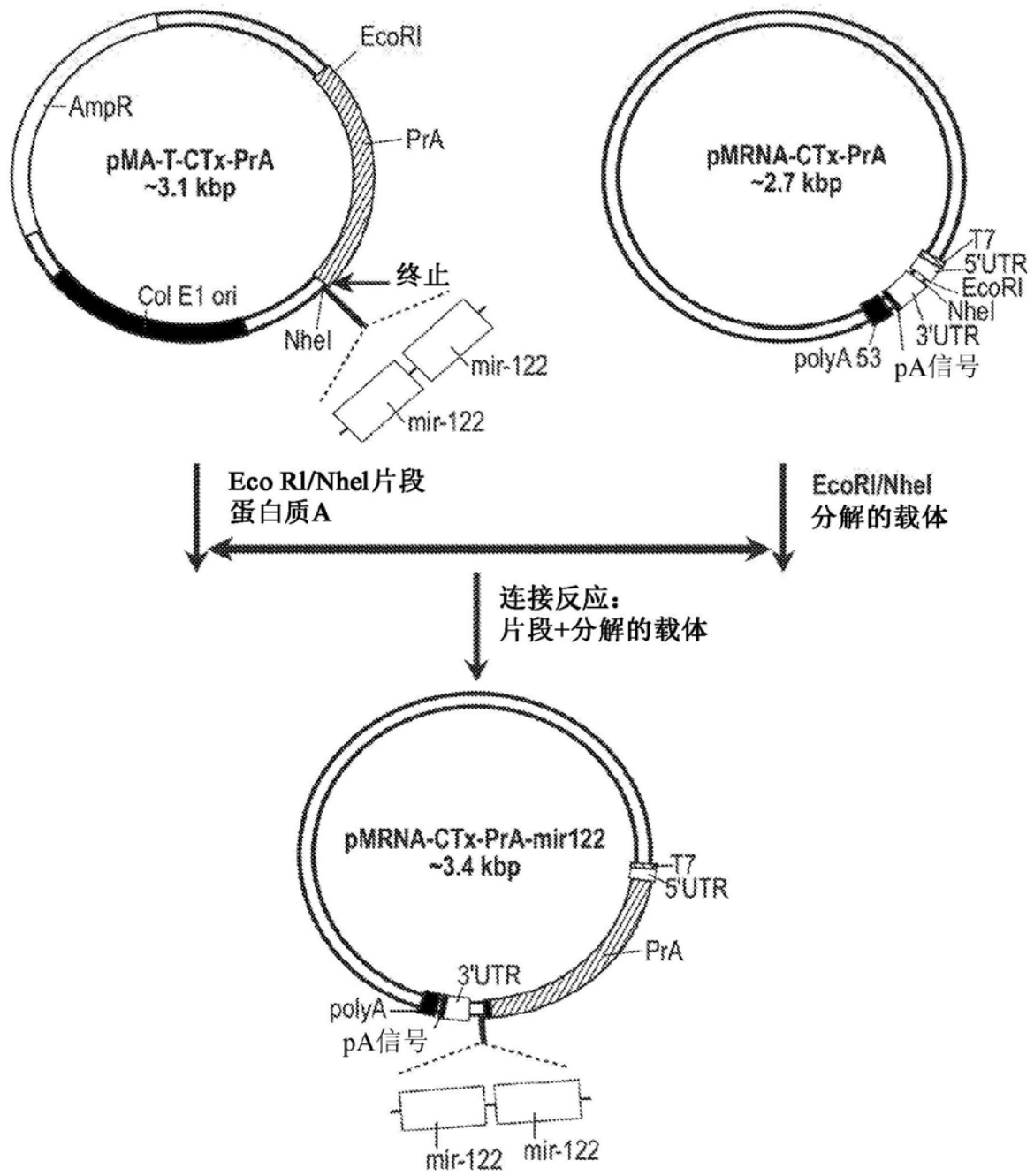


图5

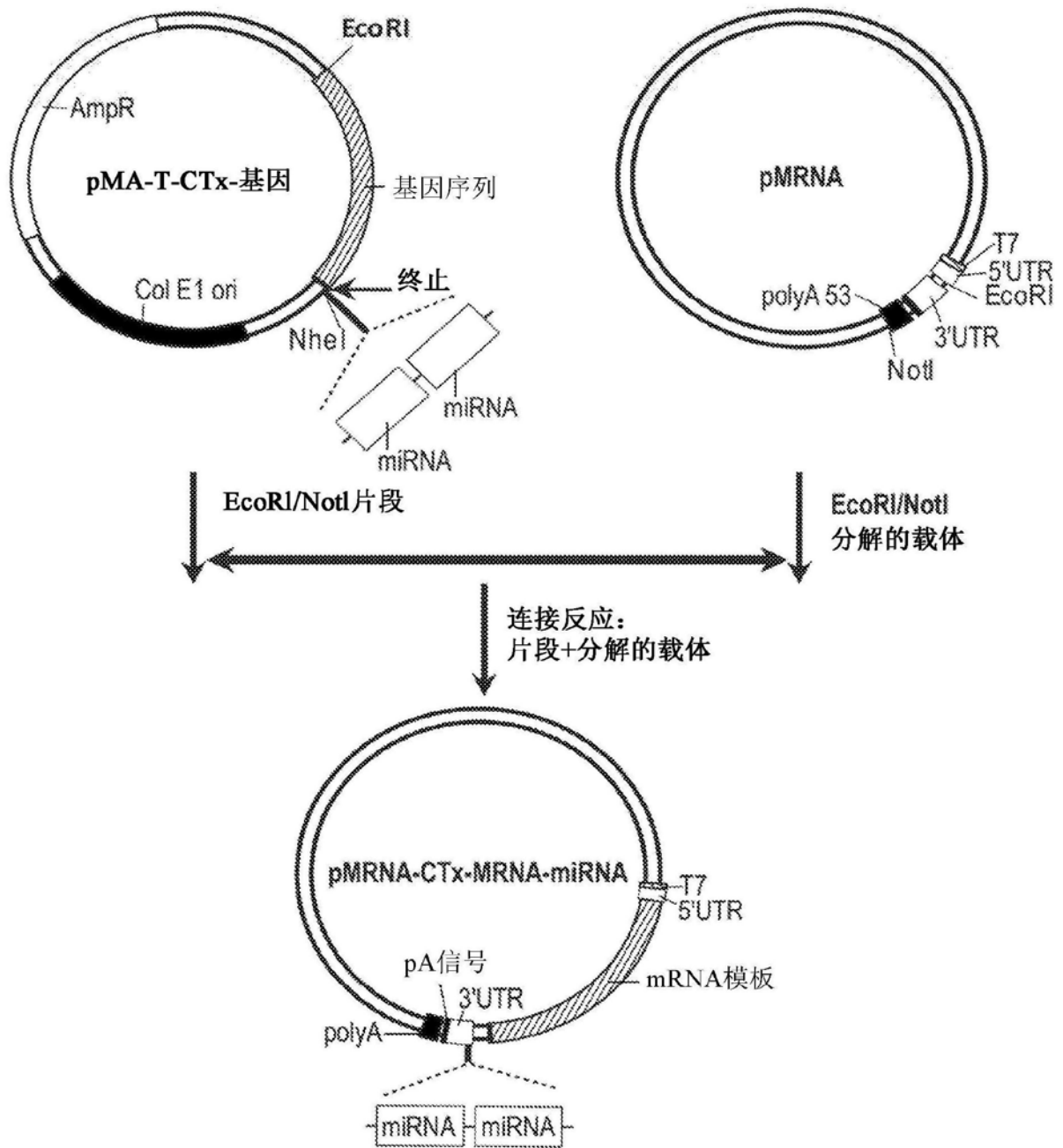


图6

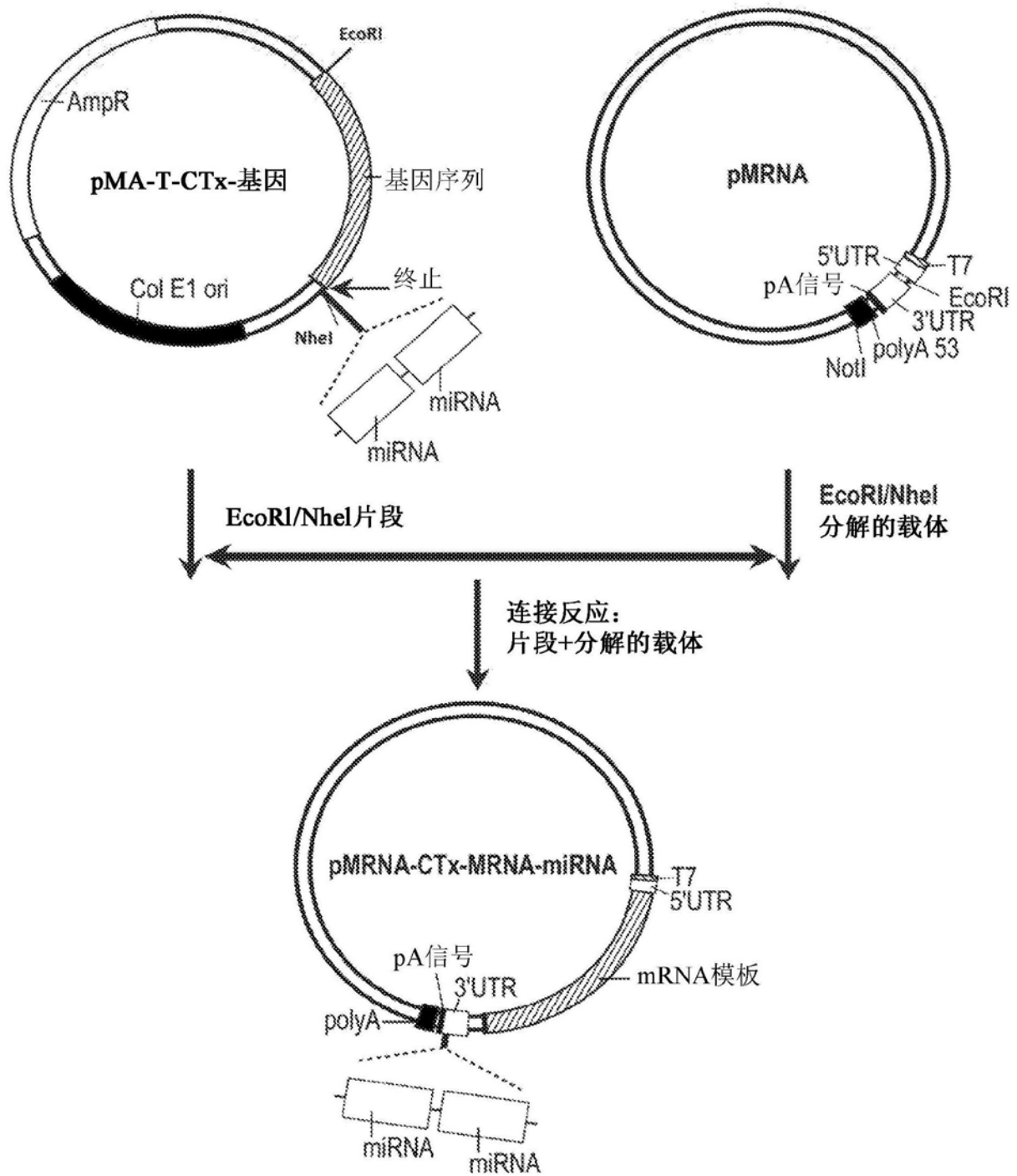


图7

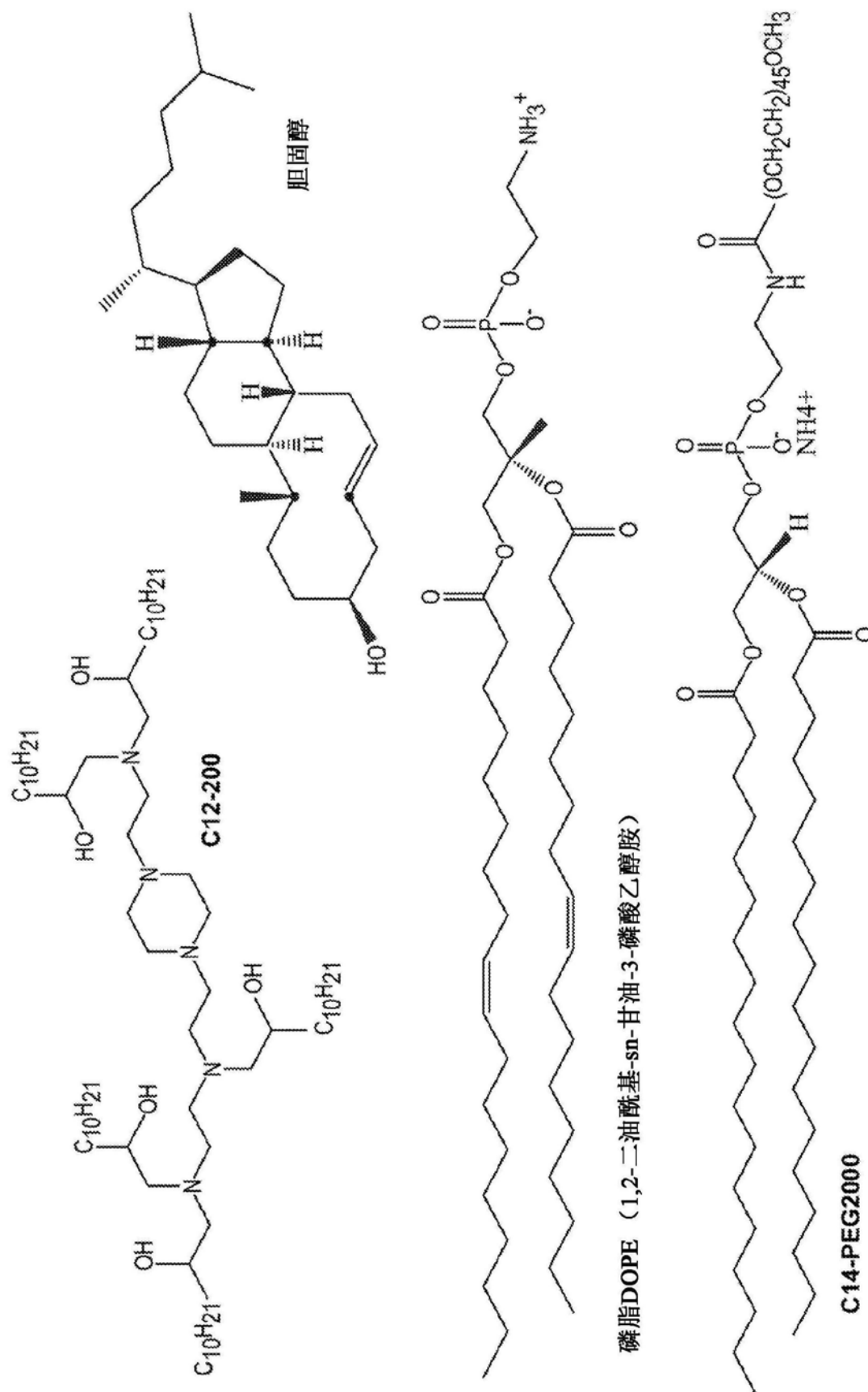


图8

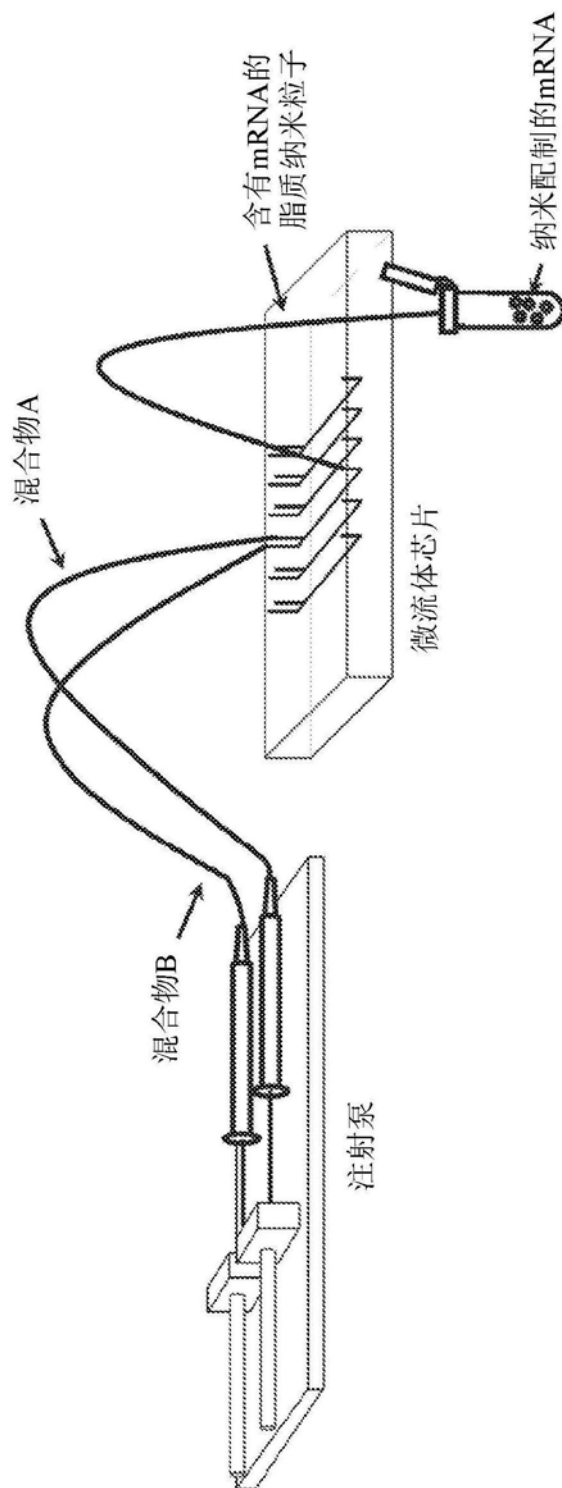


图9A

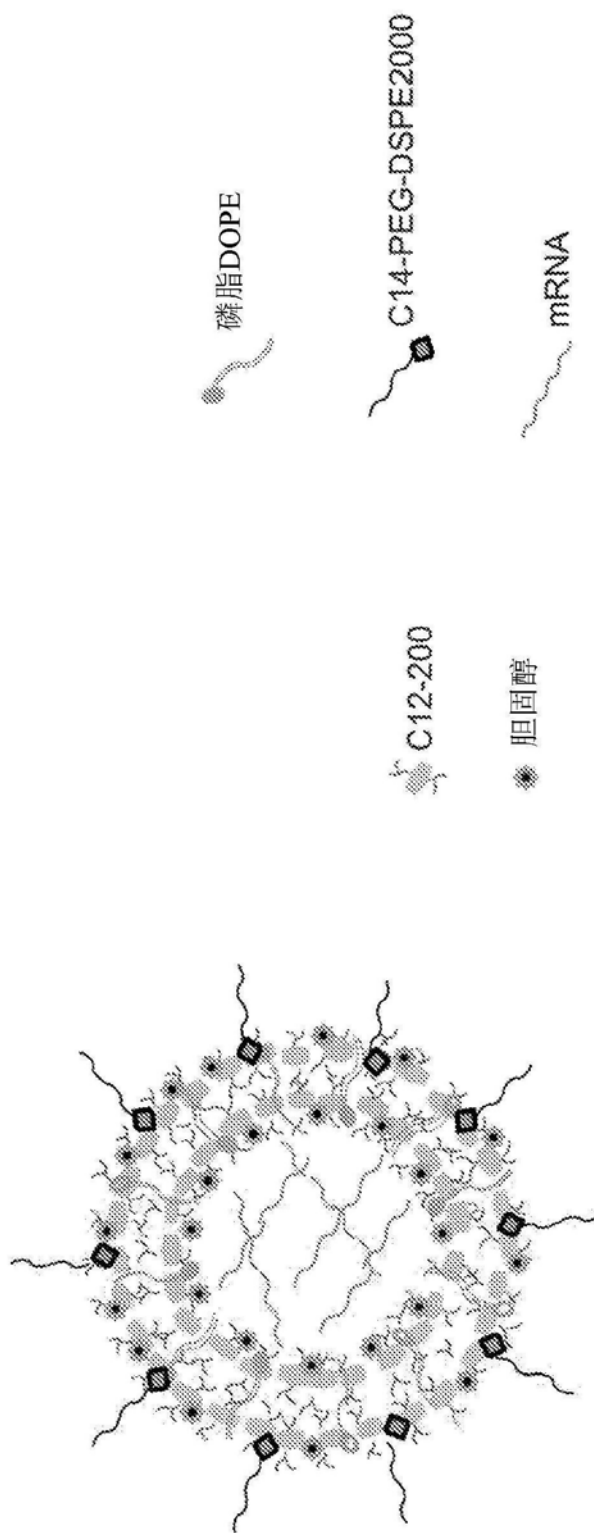


图9B

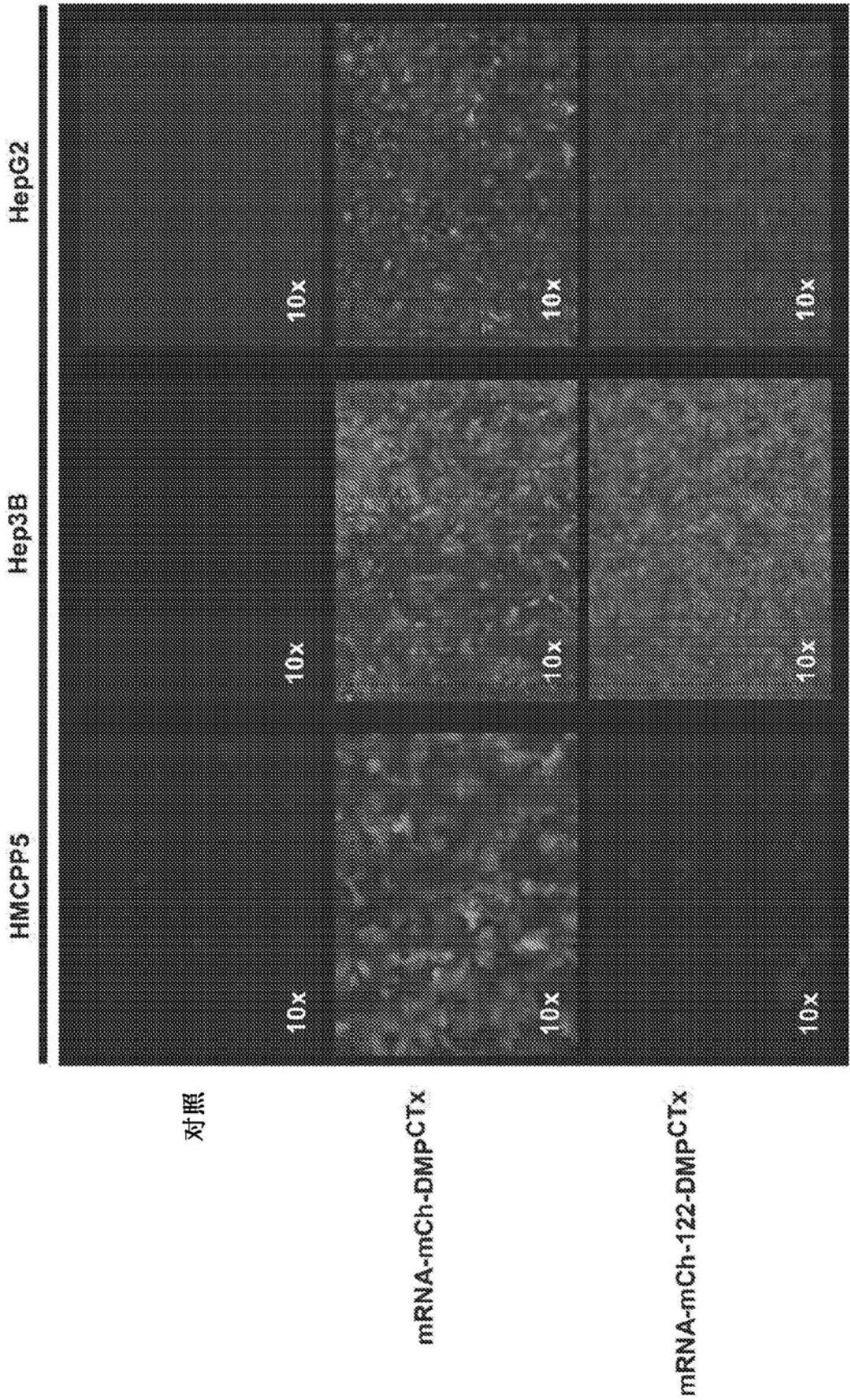


图10A

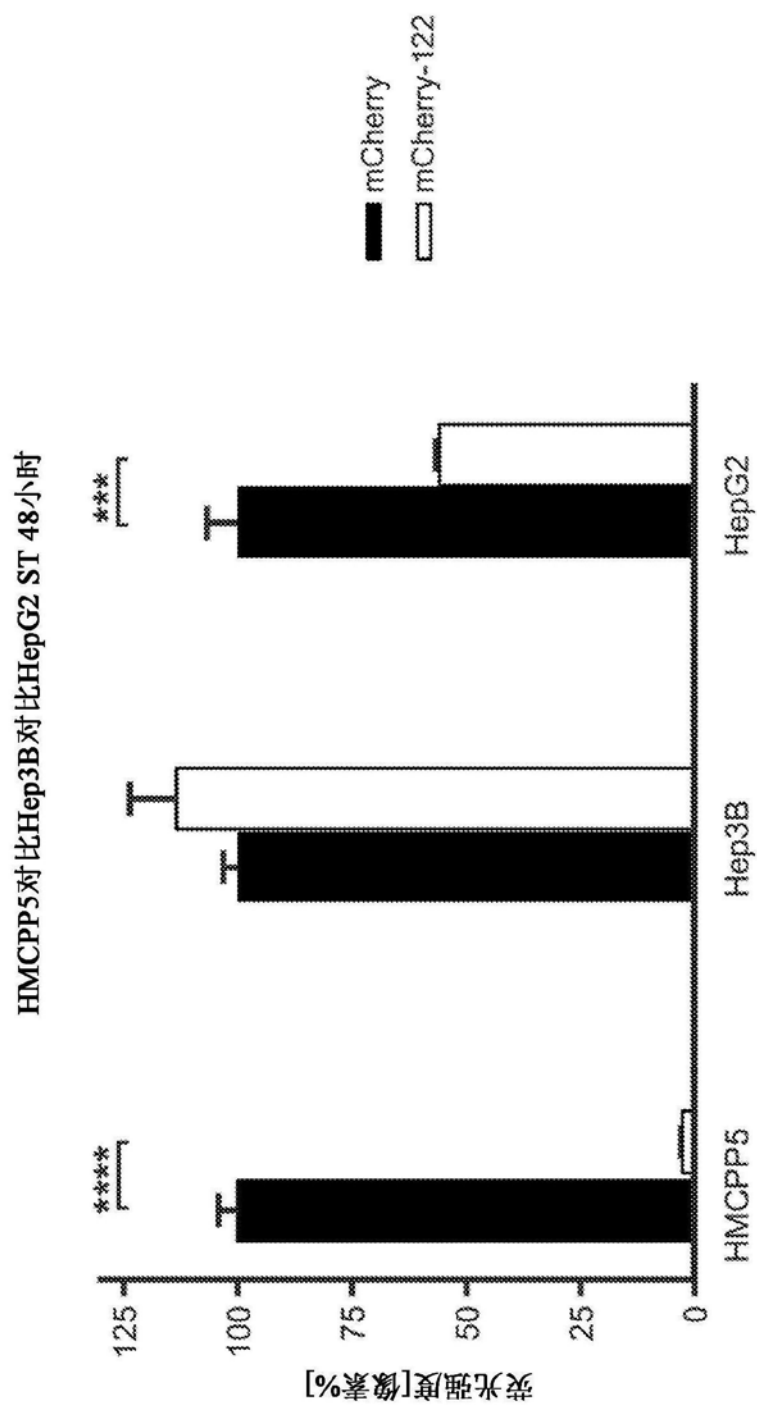


图10B

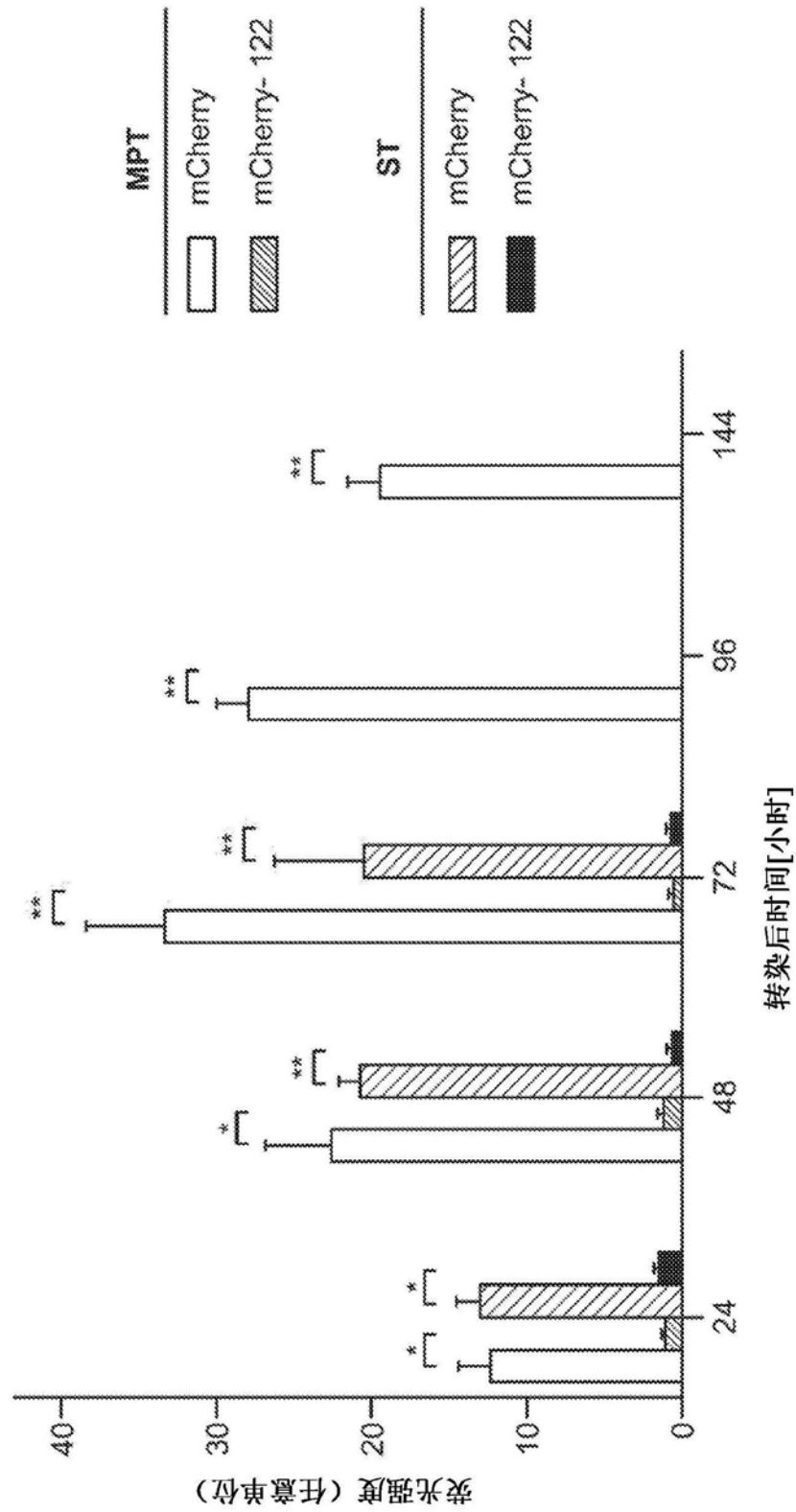


图11

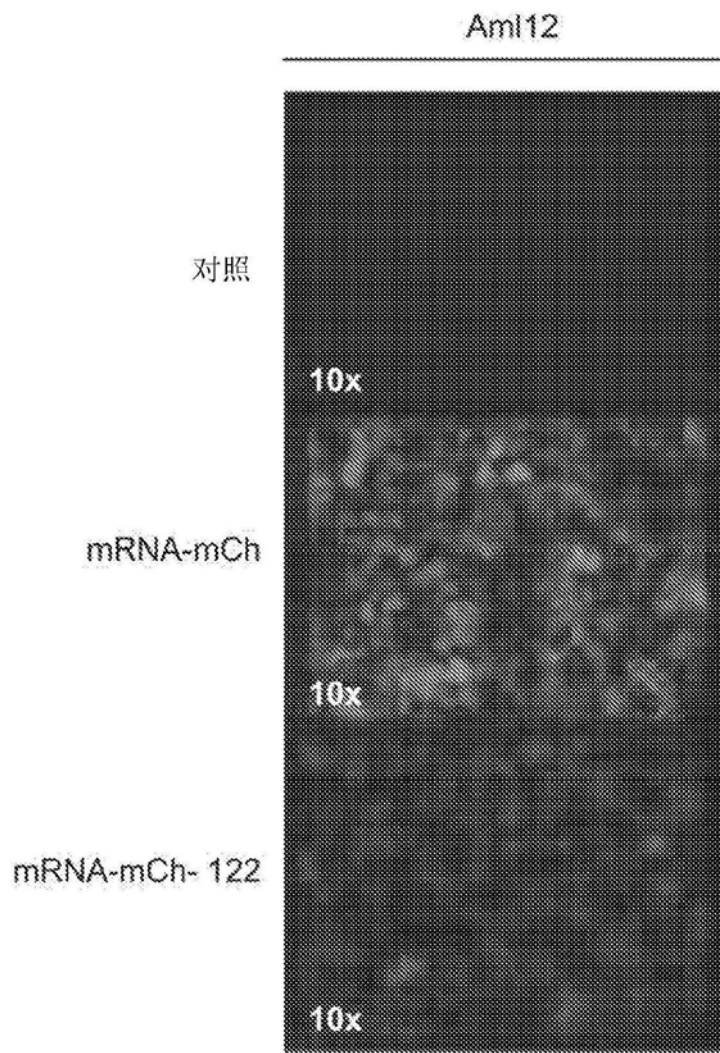


图12A

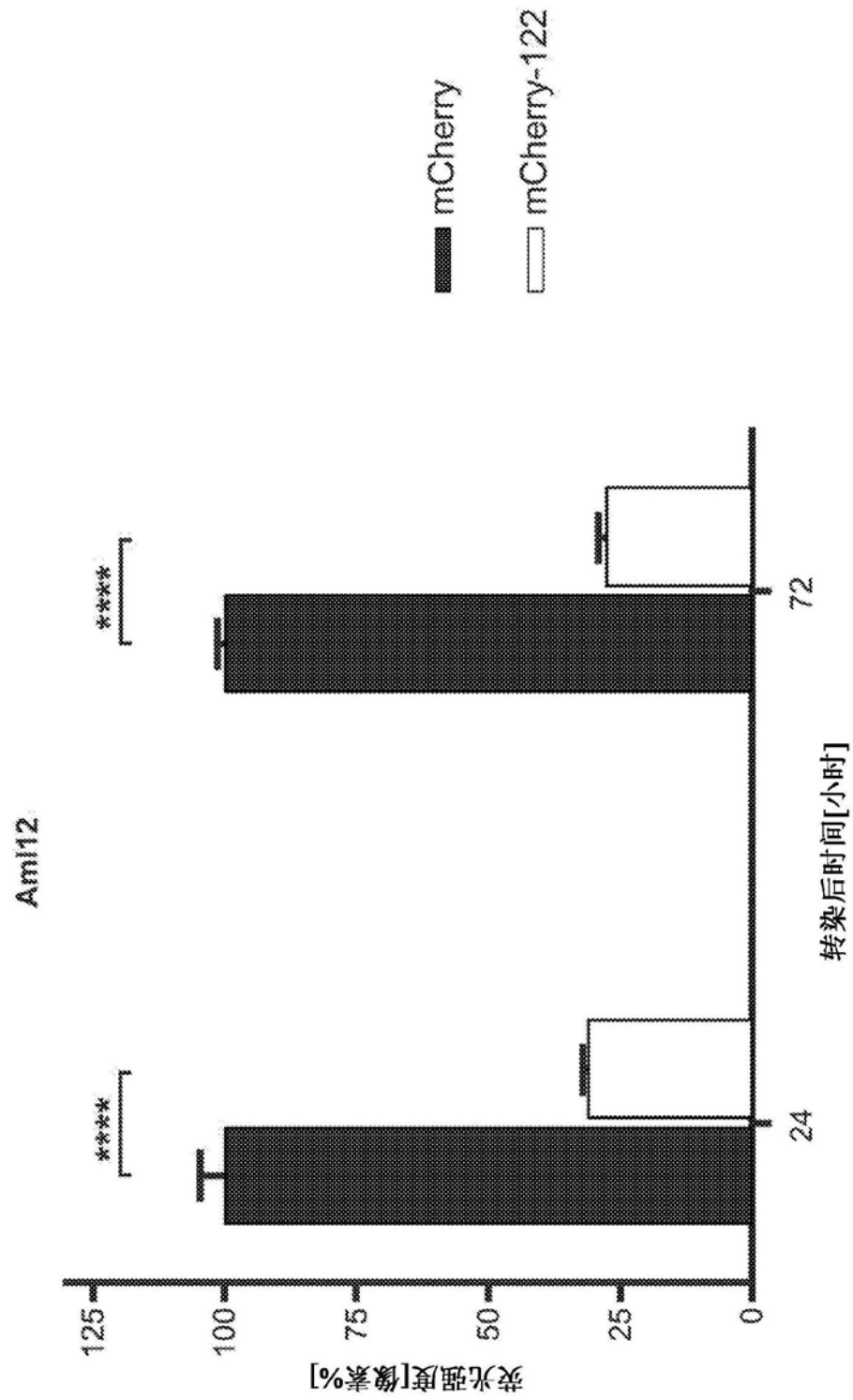


图12B

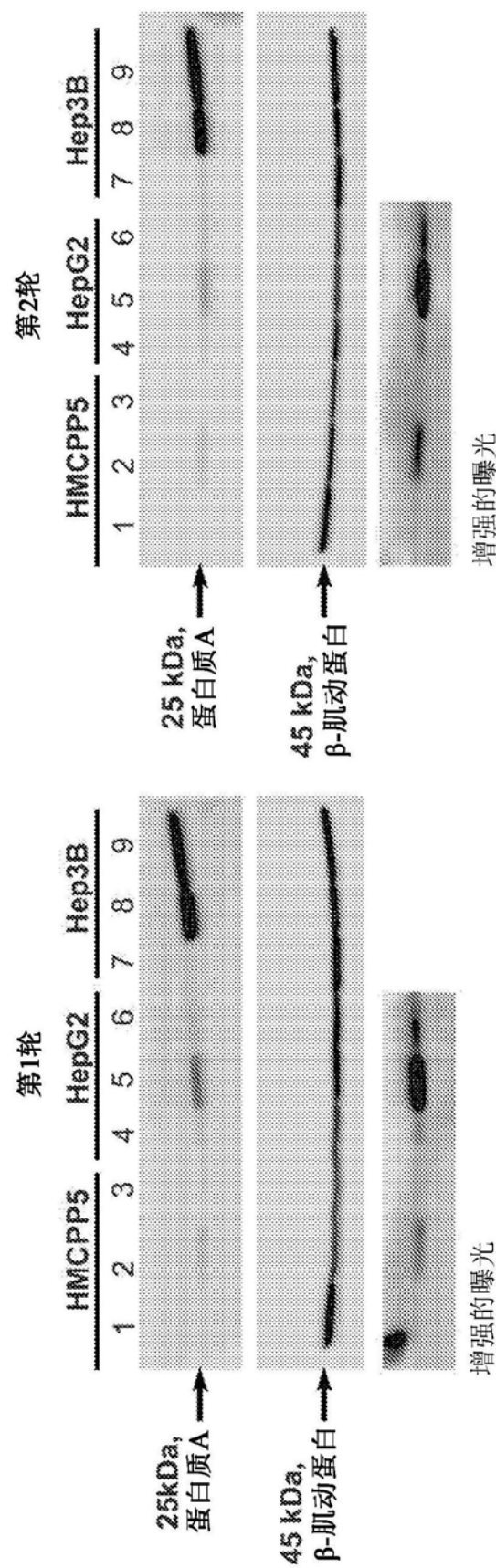


图13

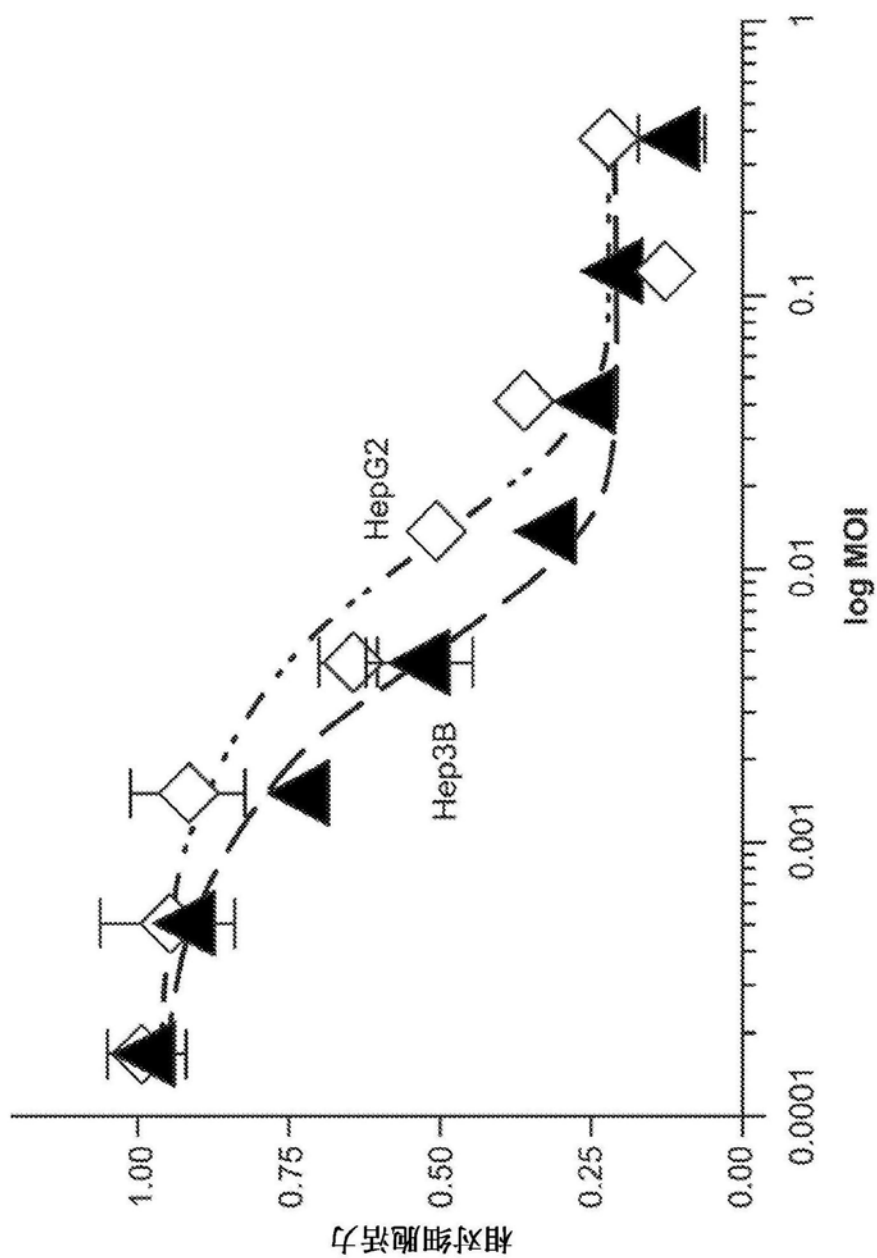


图14

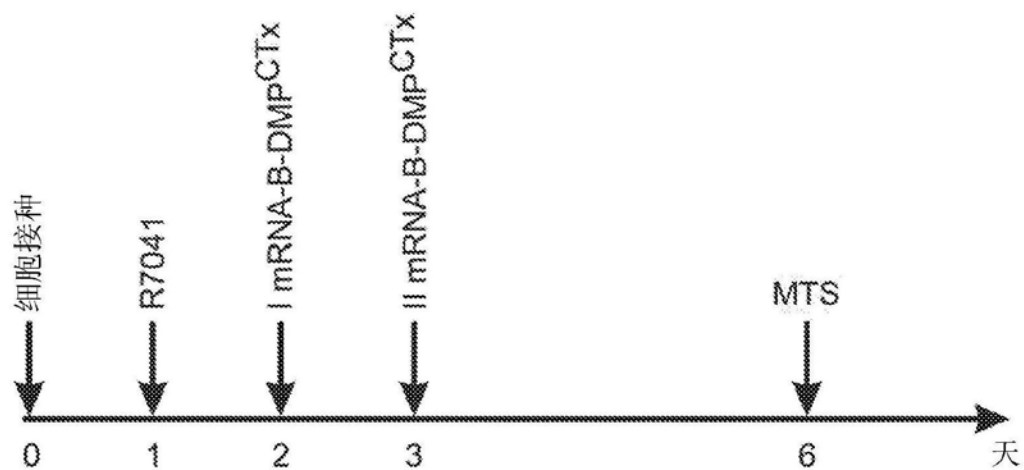


图15

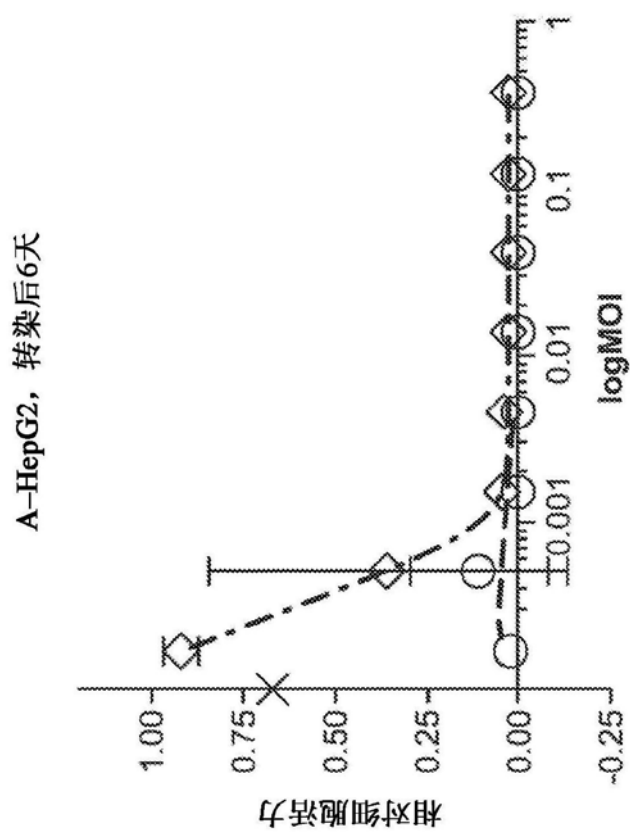


图16A

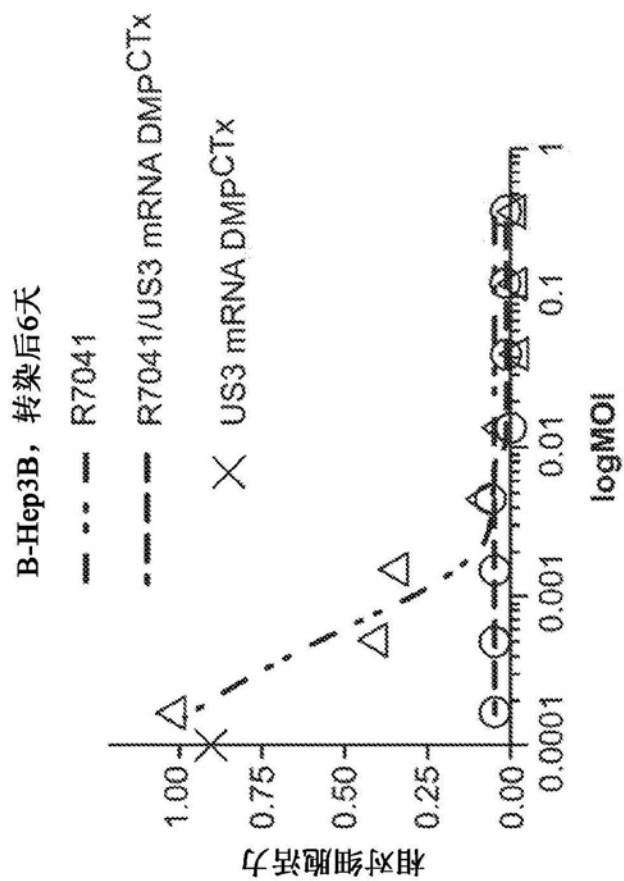


图16B

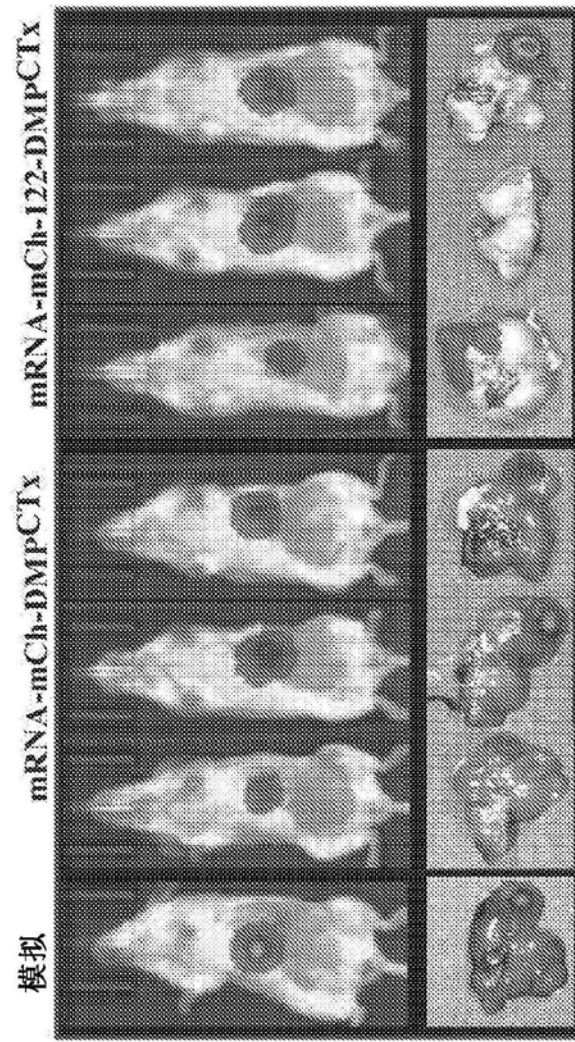


图17A

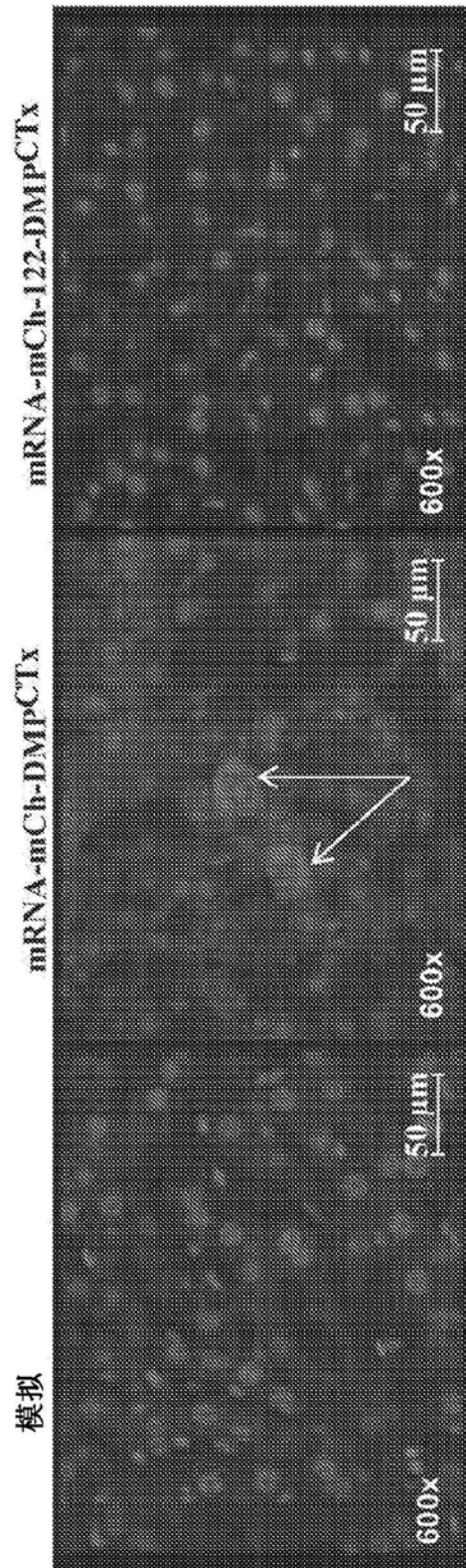


图17B

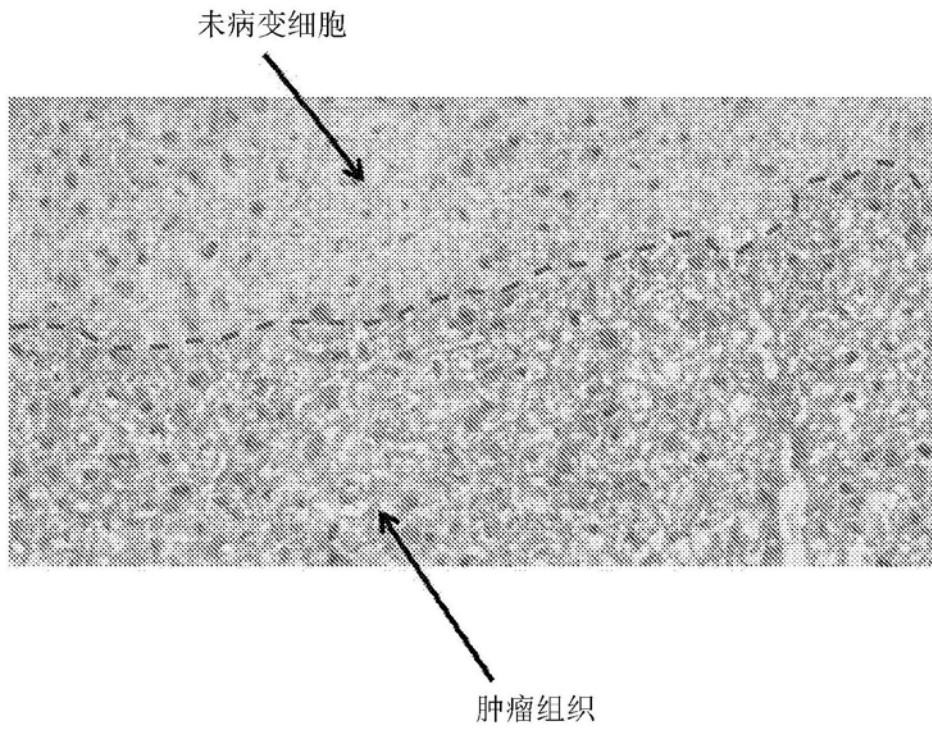


图18