



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118541381 A

(43) 申请公布日 2024. 08. 23

(21) 申请号 202280089068.4

(22) 申请日 2022.11.28

(30) 优先权数据

63/283,660 2021.11.29 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.07.16

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2022/080515 2022.11.28

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/097317 EN 2023.06.01

(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.

C07K 14/18 (2006.01)

C12N 7/04 (2006.01)

C12N 15/86 (2006.01)

权利要求书6页 说明书45页

序列表(电子公布) 附图28页

(54) 发明名称

产生自复制RNA分子的方法

(57) 摘要

本公开文本总体上涉及用于产生具有优异表达特性的自复制RNA(srRNA)系统的新方法。本公开文本还提供了表达此类srRNA构建体的核酸和重组细胞以及含有它们的药物组合物。进一步提供了用于在受试者中诱导药效学作用以及用于预防和/或治疗多种健康状况的组合物和方法。

提供多个srRNA表达构建体,每个srRNA表达构建体包含可操作地插入到甲病毒srRNA载体中的目的多肽构建体的编码序列,其中所述甲病毒结构蛋白的编码序列的至少一部分已被所述PCI的编码序列替代

分析从所述多个srRNA表达构建体表达的PCI的水平和/或功能,以鉴定具有限定特性的一个或多个候选PCI

将能够表达在(b)中鉴定的所述候选PCI的所述srRNA表达构建体与至少一种递送媒介物合并,以创建递送系统的组合集合

分析所述递送系统在受试者中赋予至少一种药效学作用的能力,以鉴定能够赋予所需药效学作用的srRNA表达构建体

1. 一种用于鉴定和/或表征自复制RNA(srRNA)构建体的方法,所述方法包括:
 - a) 提供多个srRNA表达构建体,每个srRNA表达构建体包含可操作地插入到甲病毒srRNA载体中的目的多肽构建体(PCI)的编码序列,其中所述甲病毒结构蛋白的编码序列的至少一部分已经被所述PCI的编码序列替代;
 - b) 分析从所述多个srRNA表达构建体表达的所述PCI的水平和/或功能,以鉴定具有有限定特性的一个或多个候选PCI;
 - c) 将能够表达在(b)中鉴定的所述候选PCI的srRNA表达构建体与至少一种递送媒介物合并,以创建递送系统的组合集合;以及
 - d) 分析所述递送系统在受试者中赋予至少一种药效学作用的能力,以鉴定能够赋予所需药效学作用的srRNA表达构建体。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述PCI的编码序列包含单个多肽的编码序列或多个多肽的编码序列。
3. 根据权利要求2所述的方法,其中所述多个多肽的编码序列在单个开放阅读框内(即,在多顺反子ORF中)彼此可操作地连接。
4. 根据权利要求2所述的方法,其中所述多个多肽通过一个或多个连接序列彼此可操作地连接。
5. 根据权利要求4所述的方法,其中所述多个连接序列中的连接序列包括自我蛋白水解肽序列。
6. 根据权利要求5所述的方法,其中所述自我蛋白水解肽序列包含源自以下的一个或多个自我蛋白水解切割序列:钙依赖性丝氨酸内切蛋白酶(弗林蛋白酶)、猪捷申病毒-1 2A(P2A)、口蹄疫病毒(FMDV) 2A(F2A)、马甲型鼻炎病毒(ERAV) 2A(E2A)、明脉扁刺蛾 β 四体病毒 2A(T2A)、质型多角体病毒2A(BmCPV2A)、软化病病毒2A(BmIFV2A)或其组合。
7. 根据权利要求4至6中任一项所述的方法,其中所述多个多肽的编码序列通过一个或多个内部核糖体进入位点(IRES)彼此可操作地连接。
8. 根据权利要求7所述的方法,其中所述一个或多个IRES选自病毒IRES、细胞IRES和人工IRES。
9. 根据权利要求7至8中任一项所述的方法,其中所述一个或多个IRES选自卡波西肉瘤相关疱疹病毒(KSHV) IRES、肝炎病毒IRES、瘟病毒属IRES、蟋蟀麻痹病毒属IRES、禾谷缢管蚜(Rhopalosiphum padi)病毒IRES、成纤维细胞生长因子IRES、血小板源性生长因子IRES、血管内皮生长因子IRES、胰岛素样生长因子IRES、小RNA病毒IRES、脑心肌炎病毒(EMCV) IRES、Pim-1 IRES、p53 IRES、Apaf-1 IRES、TDP2 IRES、L-myc IRES和c-myc IRES。
10. 根据权利要求1至9中任一项所述的方法,其中所述PCI包含选自微生物蛋白、病毒蛋白、细菌蛋白、真菌蛋白、哺乳动物蛋白以及其中任何项的组合的一种或多种多肽。
11. 根据权利要求1至10中任一项所述的方法,其中所述PCI包含选自抗原分子、生物治疗分子或其中任何项的组合的一种或多种多肽。
12. 根据权利要求1至11中任一项所述的方法,其中所述PCI包含选自肿瘤相关抗原、肿瘤特异性抗原、新抗原以及其中任何项的组合的一种或多种抗原多肽。
13. 根据权利要求12所述的方法,其中所述一种或多种抗原多肽包含雌激素受体、细胞内信号转导酶和人表皮生长受体。

14. 根据权利要求10至13中任一项所述的方法, 其中所述一种或多种抗原多肽选自 ESR1、PI3K、HER2、HER3、其中任何项的变体以及其中任何项的组合。

15. 根据权利要求1至11中任一项所述的方法, 其中所述PCI包含选自以下的一种或多种生物治疗性多肽: 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、神经调节剂以及其中任何项的组合。

16. 根据权利要求15所述的方法, 其中所述PCI包含选自以下的一种或多种细胞因子: 趋化因子、干扰素、白细胞介素、淋巴因子和肿瘤坏死因子。

17. 根据权利要求16所述的方法, 其中所述PCI包含选自 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的一种或多种白细胞介素、IFN γ 以及其中任一种的亚基。

18. 根据权利要求10至17中任一项所述的方法, 其中所述一种或多种生物治疗性多肽选自 IL-12A、IL-12B、IL-1RA以及其中任何项的组合。

19. 根据权利要求1至18中任一项所述的方法, 其中步骤(a) 包括提供多个srRNA表达构建体, 每个srRNA表达构建体包含所述PCI的变体的编码序列。

20. 根据权利要求19所述的方法, 其中(a) 中的提供包括:

i) 获得甲病毒srRNA表达载体, 其中所述甲病毒结构蛋白的编码序列的至少一部分已经被目的多肽构建体(PCI) 的编码序列替代; 以及

ii) 产生多个srRNA表达构建体, 每个srRNA表达构建体包含所述PCI的变体的编码序列。

21. 根据权利要求19所述的方法, 其中(a) 中的提供包括:

i) 获得目的多肽构建体(PCI) 的多个变体的编码序列; 以及

ii) 产生多个srRNA表达构建体, 每个srRNA表达构建体包含可操作地插入到甲病毒srRNA载体中的来自(a) 的所述多个PCI变体中的PCI变体的编码序列, 其中所述甲病毒结构蛋白的编码序列的至少一部分已经被所述PCI变体的编码序列替代。

22. 根据权利要求20至21中任一项所述的方法, 其中所述多个PCI变体中的PCI变体包含一个或多个分子改变。

23. 根据权利要求22所述的方法, 其中所述PCI变体中的一个或多个分子改变选自缺失、取代、插入、重复、突变、移码变体、剪接变体以及其中任何项的组合。

24. 根据权利要求22至23中任一项所述的方法, 其中所述一个或多个分子改变被配置成沿着所述抗原序列的长度串联布置的多个改变盒。

25. 根据权利要求24所述的方法, 其中所述多个改变盒中的改变盒包含一个、两个、三个、四个、五个或更多个分子改变。

26. 根据权利要求24至25中任一项所述的方法, 其中所述多个改变盒通过一个或多个接头彼此可操作地连接。

27. 根据权利要求26所述的方法, 其中所述一个或多个接头中的接头包含合成的化合物接头或肽接头。

28. 根据权利要求27所述的方法, 其中所述肽接头包含选自以下的氨基酸序列: AAY、EAAAK (SEQ ID NO:1)、RVRR (SEQ ID NO:2)、GGGS (SEQ ID NO:3) 和GPGPG (SEQ ID NO:4)。

29. 根据权利要求1至28中任一项所述的方法, 其中步骤(b) 中的所述分析所述PCI的水

平和/或功能在体外、体内或离体进行。

30. 根据权利要求29所述的方法, 其中所述分析所述PCI的水平和/或功能包括免疫印迹分析、荧光流式细胞术分析、酶联免疫测定分析、免疫原性分析、生物活性分析和/或疾病模型中的功效。

31. 根据权利要求1至29中任一项所述的方法, 其中步骤(d)中的所述递送系统赋予至少一种药效学作用的能力的所述分析在体内或离体进行。

32. 根据权利要求1至31中任一项所述的方法, 其中所述至少一种药效学作用包括以下中的一种或多种: 免疫原性作用、生物标志物反应、治疗作用、预防作用、期望的作用、不期望的作用、副作用和在疾病模型中的作用。

33. 根据权利要求32所述的方法, 其中所述至少一种药效学作用包括诱导免疫应答。

34. 根据权利要求1至33中任一项所述的方法, 其中所述递送系统包含生理缓冲液、脂质体、基于脂质的纳米颗粒(LNP)、聚合物纳米颗粒、病毒复制子颗粒(VRP)、微球、免疫刺激复合物(ISCAM)、生物活性配体的缀合物或其中任何项的组合。

35. 根据权利要求34所述的方法, 其中所述LNP递送系统包含阳离子脂质、可电离的阳离子脂质、阴离子脂质或中性脂质。

36. 根据权利要求34所述的方法, 其中所述LNP递送系统包含选自以下的可电离阳离子脂质: ALC-0315、C12-200、LN16、MC3、MD1、SM-102以及其中任何项的组合。

37. 根据权利要求34所述的方法, 其中所述LNP包含选自以下的阳离子脂质: 98N12-5、C12-200、C14-PEG2000、DLin-KC2-DMA (KC2)、DLin-MC3-DMA (MC3)、XTC、MD1、7C1以及其中任何项的组合。

38. 根据权利要求34所述的方法, 其中所述LNP包含选自以下的中性脂质: DPSC、DPPC、POPC、DOPE、SM以及其中任何项的组合。

39. 根据权利要求34所述的方法, 其中所述LNP包含选自以下的脂质: C12-200、C14-PEG2000、DOPE、DMG-PEG2000、DSPC、DOTMA、DOSPA、DOTAP、DMRIE、DC-胆固醇、DOTAP-胆固醇、GAP-DMRIE-DPyPE和GL67A-DOPE-DMPE-聚乙二醇(PEG)。

40. 根据权利要求34至39中任一项所述的方法, 其中在所述LNP递送系统中, 脂质与核酸的质量比为约100:1至约3:1、约70:1至10:1或16:1至4:1。

41. 根据权利要求40所述的方法, 其中在所述LNP递送系统中, 脂质与核酸的质量比为约16:1至4:1。

42. 根据权利要求40至41中任一项所述的方法, 其中在所述LNP递送系统中, 脂质与核酸的质量比为约20:1。

43. 根据权利要求40至41中任一项所述的方法, 其中在所述LNP递送系统中, 脂质与核酸的质量比为约8:1。

44. 根据权利要求34至43中任一项所述的方法, 其中所述基于脂质的纳米颗粒(LNP)的平均直径小于约1000nm、约500nm、约250nm、约200nm、约150nm、约100nm、约75nm、约50nm或约25nm。

45. 根据权利要求44所述的方法, 其中所述LNP的平均直径的范围为约70nm至100nm。

46. 根据权利要求45所述的方法, 其中所述LNP的平均直径的范围为约88nm至约92nm、82nm至约86nm或约80nm至约95nm。

47. 根据权利要求1至46中任一项所述的方法, 其中所述重组甲病毒srRNA是属于披膜病毒科的甲病毒属的病毒的重组甲病毒srRNA。

48. 根据权利要求47所述的方法, 其中所述重组甲病毒srRNA是属于VEEV/EEEV组、或SFV组或SINV组的甲病毒的重组甲病毒srRNA。

49. 根据权利要求48所述的方法, 其中所述甲病毒是东方马脑炎病毒(EEEV)、委内瑞拉马脑炎病毒(VEEV)、大沼泽地病毒(EVEV)、穆坎布病毒(MUCV)、皮克孙纳病毒(Pixunavirus)(PIXV)、米德尔堡病毒(MIDV)、基孔肯亚病毒(CHIKV)、阿良良病毒(ONNV)、罗斯河病毒(RRV)、巴马森林病毒(BF)、盖他病毒(GET)、鹭山病毒(SAGV)、贝巴鲁病毒(BEBV)、马雅罗病毒(MAYV)、乌纳病毒(UNAV)、辛德比斯病毒(SINV)、奥拉病毒(AURAV)、怀塔罗瓦病毒(WHAV)、巴班肯病毒(BABV)、孜拉加奇病毒(KYZV)、西方马脑炎病毒(WEEV)、高地J病毒(HJV)、摩根堡病毒(FMV)、恩杜茂病毒(NDUV)、马达里亚加病毒(MADV)或博吉河病毒。

50. 根据权利要求49所述的方法, 其中所述甲病毒是委内瑞拉马脑炎病毒(VEEV)、东方马脑炎病毒(EEEV)、基孔肯亚病毒(CHIKV)或辛德比斯病毒(SINV)。

51. 根据权利要求1至50中任一项所述的方法, 其中所述srRNA表达载体被鉴定为具有适于预防用途和/或治疗用途的免疫诱导活性。

52. 一种根据权利要求1至51所述的方法鉴定的自复制RNA(srRNA)构建体。

53. 一种编码根据权利要求52所述的srRNA构建体的核酸。

54. 一种重组细胞, 所述重组细胞包含:

a) 根据权利要求52所述的自复制RNA构建体; 和/或

b) 根据权利要求53所述的核酸。

55. 根据权利要求54所述的重组细胞, 其中所述重组细胞是真核细胞。

56. 根据权利要求54至55中任一项所述的重组细胞, 其中所述重组细胞是动物细胞。

57. 根据权利要求56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。

58. 根据权利要求56所述的重组细胞, 其中所述动物细胞是哺乳动物细胞。

59. 根据权利要求56所述的重组细胞, 其中所述动物细胞是昆虫细胞。

60. 根据权利要求59所述的重组细胞, 其中所述昆虫细胞是蚊细胞。

61. 根据权利要求56所述的重组细胞, 其中所述动物细胞是免疫细胞。

62. 根据权利要求61所述的重组细胞, 其中所述免疫细胞是B细胞、单核细胞、自然杀伤(NK)细胞、自然杀伤T(NKT)细胞、嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜中性粒细胞、树突细胞(DC)、巨噬细胞、调节性T细胞、辅助性T细胞(T_H)、细胞毒性T细胞(T_{CTL})、记忆性T细胞、伽马-德尔塔($\gamma\delta$)T细胞、造血干细胞或造血干细胞祖细胞。

63. 根据权利要求62所述的重组细胞, 其中所述免疫细胞是B细胞、T细胞或树突细胞(DC)。

64. 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54至63中任一项所述的重组细胞和细胞培养基。

65. 一种组合物, 所述组合物包含治疗上可接受的赋形剂和:

a) 根据权利要求52所述的自复制RNA构建体;

b) 根据权利要求53所述的核酸; 和/或

- b) 根据权利要求54至63中任一项所述的重组细胞。
66. 根据权利要求65所述的组合物, 其中所述组合物被配制为疫苗。
67. 根据权利要求66所述的组合物, 其中所述疫苗是治疗性疫苗。
68. 根据权利要求65至67中任一项所述的组合物, 其中所述组合物被配制为免疫原性组合物。
69. 根据权利要求65至66中任一项所述的组合物, 其中所述组合物被配制为生物治疗剂。
70. 根据权利要求65至69中任一项所述的组合物, 其中将所述组合物与递送媒介物一起配制成递送系统。
71. 根据权利要求70所述的组合物, 其中所述递送系统包含生理缓冲液、脂质体、基于脂质的纳米颗粒 (LNP)、聚合物纳米颗粒、病毒复制子颗粒 (VRP)、微球、免疫刺激复合物 (ISCOM)、生物活性配体的缀合物或其中任何项的组合。
72. 根据权利要求71所述的组合物, 其中所述LNP递送系统包含阳离子脂质、可电离的阳离子脂质、阴离子脂质或中性脂质。
73. 根据权利要求71所述的组合物, 其中所述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以及其中任何项的组合。
74. 根据权利要求71所述的组合物, 其中所述LNP包含选自以下的阳离子脂质: 98N12-5、C12-200、C14-PEG2000、DLin-KC2-DMA (KC2)、DLin-MC3-DMA (MC3)、XTC、MD1、7C1以及其中任何项的组合。
75. 根据权利要求71所述的组合物, 其中所述LNP包含选自以下的中性脂质: DPSC、DPPC、POPC、DOPE、SM以及其中任何项的组合。
76. 根据权利要求71所述的组合物, 其中所述LNP包含选自以下的脂质: C12-200、C14-PEG2000、DOPE、DMG-PEG2000、DSPC、DOTMA、DOSPA、DOTAP、DMRIE、DC-胆固醇、DOTAP-胆固醇、GAP-DMORIE-DPyPE、GL67A-DOPE-DMPE-聚乙二醇 (PEG) 以及其中任何项的组合。
77. 根据权利要求71至76中任一项所述的组合物, 其中在所述LNP递送系统中, 脂质与核酸的质量比为约100:1至约3:1、约70:1至10:1或16:1至4:1。
78. 根据权利要求77所述的组合物, 其中在所述LNP递送系统中, 脂质与核酸的质量比为约16:1至4:1。
79. 根据权利要求78所述的组合物, 其中在所述LNP递送系统中, 脂质与核酸的质量比为约20:1。
80. 根据权利要求78所述的组合物, 其中在所述LNP递送系统中, 脂质与核酸的质量比为约8:1。
81. 根据权利要求71至80中任一项所述的组合物, 其中所述基于脂质的纳米颗粒 (LNP) 的平均直径小于约1000nm、约500nm、约250nm、约200nm、约150nm、约100nm、约75nm、约50nm或约25nm。
82. 根据权利要求81所述的组合物, 其中所述LNP的平均直径的范围为约70nm至100nm。
83. 根据权利要求82所述的组合物, 其中所述LNP的平均直径的范围为约88nm至约92nm、82nm至约86nm或约80nm至约95nm。
84. 一种用于在受试者中诱导药效学作用的方法, 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52所述的自复制RNA构建体；
- b) 根据权利要求53所述的核酸；
- c) 根据权利要求54至63中任一项所述的重组细胞；和/或
- d) 根据权利要求65至83中任一项所述的药物组合物。

85. 根据权利要求84所述的方法，其中所述药效学作用包括在所述受试者中引发免疫应答。

86. 一种用于预防或治疗受试者的健康状况的方法，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52所述的自复制RNA构建体；
- b) 根据权利要求53所述的核酸；
- c) 根据权利要求54至63中任一项所述的重组细胞；和/或
- d) 根据权利要求65至83中任一项所述的药物组合物。

87. 根据权利要求86所述的方法，其中所施用的组合物在所述受试者中引起免疫应答。

88. 根据权利要求84至87中任一项所述的方法，其中所施用的组合物在所述受试者中诱导一种或多种促炎性分子的产生。

89. 根据权利要求88所述的方法，其中所述一种或多种促炎性分子包括干扰素 γ (IFN γ)、细胞因子、TNF- α 、GM-CSF、和MIP1 α 、颗粒酶B、颗粒酶A、穿孔素或其中任何项的组合。

90. 根据权利要求84至89中任一项所述的方法，其中所述受试者先前已经用一种或多种疗法治疗，并且已经对所述一种或多种疗法产生至少部分耐药性。

91. 根据权利要求90所述的方法，其中所述一种或多种疗法中的至少一种包括小分子。

92. 根据权利要求84至91中任一项所述的方法，其中所述健康状况是增殖性障碍、炎症性障碍、自身免疫性障碍或微生物感染。

93. 根据权利要求84至92中任一项所述的方法，其中所述受试者患有或疑似患有与增殖性障碍、炎症性障碍、自身免疫性障碍或微生物感染相关的健康状况。

94. 根据权利要求92至93中任一项所述的方法，其中所述增殖性障碍是癌症。

95. 根据权利要求94所述的方法，其中所述癌症是乳腺癌。

96. 根据权利要求84至95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。

97. 根据权利要求96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。

98. 一种用于诱导药效学作用、引起免疫应答和/或用于预防和/或治疗健康状况的试剂盒，所述试剂盒包含以下中的一种或多种：

- a) 根据权利要求52所述的自扩增RNA构建体；
- b) 根据权利要求53所述的核酸；
- c) 根据权利要求54至63中任一项所述的重组细胞；以及
- d) 根据权利要求65至83中任一项所述的药物组合物。

产生自复制RNA分子的方法

相关申请的交叉引用

[0001] 本申请要求2021年11月29日提交的美国临时专利申请序列号63/283,660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] 本公开文本涉及免疫学和医学领域,并且尤其涉及用于产生具有优异表达特性的复制子(例如,自复制RNA(srRNA)分子)的新方法。本公开文本还提供了表达此类srRNA分子的核酸和重组细胞以及含有它们的药物组合物。进一步提供了用于在受试者中诱导药效学作用以及用于预防和/或治疗多种健康状况的组合物和方法。

序列表的并入

[0003] 将所附序列表中的材料通过引用特此并入本申请。所附的名称为058462-506001W0_Sequence Listing_ST26.xml的序列表文本文件创建于2022年11月22日,并且为14KB。

背景技术

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

[0005] 这方面的最新进展包括重组复制子(例如,自复制RNA(srRNA)),其源自正链RNA病毒的基因组,并且代表了用于获得新型安全有效疫苗和药物递送媒介物的有力工具。特别地,srRNA维持源自RNA病毒载体的自复制活性,因此可以在宿主细胞中复制,导致编码所需基因产物的RNA的量的扩增,并且可以用于增强RNA递送的效率和/或所编码基因产物的表达,以用于治疗和/或预防应用。例如,在疫苗应用中,基于srRNA的疫苗与非复制型RNA(例如,mRNA)相比是有益的,因为其维持了mRNA疫苗的优势,如快速开发、模块化设计和无细胞合成,但由于具有自复制特性,因此需要的RNA剂量更低。这减少了原料药和产品两者的制造负担,并且在大流行病应对的背景下可能是有利的,因为其将使得能够在更短时间内对更大百分比的人群进行疫苗接种。

[0006] 虽然近年来srRNA技术取得了巨大进展,但仍需要快速产生新的基于srRNA的表达工具的另外的方法,所述表达工具用于以足以产生治疗和/或预防益处的量和时间段在体内或离体表达基因产物(如治疗性多肽)。

发明内容

[0007] 本公开文本总体上涉及用于鉴定和/或表征具有优异表达特性的自复制RNA(srRNA)构建体(例如,复制子)的新方法,所述优异表达特性适用于在细胞培养物中或在活

体中表达目的重组多肽(如例如抗原分子和生物治疗分子),所述构建体用于预防和/或治疗应用。还公开了表达此类srRNA构建体的核酸和重组细胞以及含有它们的药物组合物。本文还公开了用于在受试者中诱导药效学作用的方法,特别是,用于在有需要的受试者中引起免疫应答的方法和用于预防和/或治疗有需要的受试者的健康状况的方法,其中所述方法包括预防性或治疗性施用本公开文本的srRNA构建体、核酸构建体、重组细胞和/或药物组合物中的一种或多种。

[0008] 在本公开文本的一个方面,本文提供了用于鉴定和/或表征自复制(srRNA)RNA构建体(例如,复制子)的方法,所述方法包括:(a)提供多个srRNA表达构建体,每个srRNA表达构建体包括可操作地插入到甲病毒srRNA载体中的目的多肽构建体(PCI)的编码序列,其中所述甲病毒结构蛋白的编码序列的至少一部分已经被所述PCI的编码序列替代;(b)分析从所述多个srRNA表达构建体表达的PCI的水平和/或功能,以鉴定具有限定特性的一个或多个候选PCI;(c)将能够表达在(b)中鉴定的所述候选PCI的所述srRNA表达构建体与至少一种递送媒介物合并,以创建递送系统的组合集合;以及(d)分析所述递送系统在受试者中赋予至少一种药效学作用的能力,以鉴定能够赋予所需药效学作用的srRNA表达构建体。

[0009] 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PCI的编码序列包括单个多肽(例如,单基因PCI)的编码序列或多个多肽(例如,多基因PCI)的编码序列。在一些实施方案中,多个多肽的编码序列在单个开放阅读框内(即,在多顺反子ORF中)彼此可操作地连接。在一些实施方案中,所述多个多肽通过一个或多个连接序列彼此可操作地连接。在一些实施方案中,所述多个连接序列中的连接序列包括自我蛋白水解肽序列。在一些实施方案中,所述自我蛋白水解肽序列包含源自以下的一个或多个自我蛋白水解切割序列:钙依赖性丝氨酸内切蛋白酶(弗林蛋白酶)、猪捷申病毒-1 2A(P2A)、口蹄疫病毒(FMDV) 2A(F2A)、马甲型鼻炎病毒(ERAV) 2A(E2A)、明脉扁刺蛾 β 四体病毒2A(T2A)、质型多角体病毒2A(BmCPV2A)、软化病病毒2A(BmIFV2A)或其组合。

[0010] 在一些实施方案中,多种多肽的编码序列通过一个或多个内部核糖体进入位点(IRES)彼此可操作地连接。在一些实施方案中,所述一个或多个IRES选自病毒IRES、细胞IRES和人工IRES。在一些实施方案中,所述一个或多个IRES选自卡波西肉瘤相关疱疹病毒(KSHV) IRES、肝炎病毒IRES、痘病毒属(Pestivirus) IRES、蟋蟀麻痹病毒属(Cripavirus) IRES、禾谷缢管蚜(Rhopalosiphum padi)病毒IRES、成纤维细胞生长因子IRES、血小板源性生长因子IRES、血管内皮生长因子IRES、胰岛素样生长因子IRES、小RNA病毒IRES、脑心肌炎病毒(EMCV) IRES、Pim-1 IRES、p53 IRES、Apaf-1 IRES、TDP2 IRES、L-myc IRES和c-myc IRES。

[0011] 在一些实施方案中,所述PCI包括选自微生物蛋白、病毒蛋白、细菌蛋白、真菌蛋白、哺乳动物蛋白以及其中任何项的组合的一种或多种多肽。在一些实施方案中,所述PCI包括选自抗原分子、生物治疗性分子或其中任何项的组合的一种或多种多肽。在一些实施方案中,所述PCI包括选自肿瘤相关抗原、肿瘤特异性抗原、新抗原以及其中任何项的组合的一种或多种抗原多肽。在一些实施方案中,所述一种或多种抗原多肽包含雌激素受体、细胞内信号转导酶和人表皮生长受体。在一些实施方案中,所述一种或多种抗原多肽选自ESR1、PI3K、HER2、HER3、其中任何项的变体以及其中任何项的组合。在一些实施方案中,所

述PCI包括选自以下的一种或多种生物治疗性多肽: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、神经调节剂以及其中任何项的组合。在一些实施方案中,所述PCI包括选自以下的一种或多种细胞因子:趋化因子、干扰素、白细胞介素、淋巴因子和肿瘤坏死因子。在一些实施方案中,所述PCI包括选自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的一种或多种白细胞介素、IFN γ 以及其中任一种的亚基。在一些实施方案中,所述一种或多种生物治疗性多肽选自IL-12A、IL-12B、IL-1RA以及其中任何项的组合。

[0012] 在一些实施方案中,本文所述方法的步骤(a)包括提供多个srRNA表达构建体,每个srRNA表达构建体包含PCI的变体的编码序列。在一些实施方案中,(a)中的提供包括:(i)获得甲病毒srRNA表达载体,其中所述甲病毒结构蛋白的编码序列的至少一部分已经被目的多肽构建体(PCI)的编码序列替代;以及(ii)产生多个srRNA表达构建体,每个srRNA表达构建体包含PCI的变体的编码序列。在一些实施方案中,(a)中的提供包括:(i)获得目的多肽构建体(PCI)的多个变体的编码序列;以及(ii)产生多个srRNA表达构建体,每个srRNA表达构建体包含可操作地插入到甲病毒srRNA载体中的来自(a)的所述多个PCI变体中的PCI变体的编码序列,其中所述甲病毒结构蛋白的编码序列的至少一部分已经被所述PCI变体的编码序列替代。

[0013] 在本文所述方法的一些实施方案中,所述多个PCI变体中的PCI变体包含一个或多个分子改变。在一些实施方案中,所述PCI变体中的所述一个或多个分子改变选自缺失、取代、插入、重复、突变、移码变体、剪接变体以及其中任何项的组合。在一些实施方案中,所述一个或多个分子改变被配置到沿着所述抗原序列的长度串联布置的多个改变盒中。在一些实施方案中,所述多个改变盒中的改变盒包含一个、两个、三个、四个、五个或更多个分子改变。在一些实施方案中,所述多个改变盒通过一个或多个接头彼此可操作地连接。在一些实施方案中,所述一个或多个接头的接头包括合成的化合物接头或肽接头。在一些实施方案中,所述肽接头包含选自以下的氨基酸序列:AAY、EAAAK (SEQ ID NO:1)、RVRR (SEQ ID NO:2)、GGGS (SEQ ID NO:3) 和GPGPG (SEQ ID NO:4)。

[0014] 在一些实施方案中,步骤(b)中的所述分析所述PCI的水平和/或功能在体外、体内或离体进行。在一些实施方案中,所述分析所述PCI的水平和/或功能包括免疫印迹分析、荧光流式细胞术分析、酶联免疫测定分析、免疫原性分析、生物活性分析和/或疾病模型中的功效。在一些实施方案中,步骤(d)中的对所述递送系统赋予至少一种药效学作用的能力的所述分析在体内或离体进行。在一些实施方案中,所述至少一种药效学作用包括以下中的一种或多种:免疫原性作用、生物标志物反应、治疗作用、预防作用、期望的作用、不期望的作用、副作用和在疾病模型中的作用。在一些实施方案中,所述至少一种药效学作用包括诱导免疫应答。

[0015] 在本文所述方法的一些实施方案中,所述递送系统包含生理缓冲液、脂质体、基于脂质的纳米颗粒(LNP)、聚合物纳米颗粒、病毒复制子颗粒(VRP)、微球、免疫刺激复合物(ISCIM)、生物活性配体的缀合物或其中任何项的组合。在一些实施方案中,所述LNP递送系统包含阳离子脂质、可电离的阳离子脂质、阴离子脂质或中性脂质。在一些实施方案中,所述LNP递送系统包含选自以下的可电离阳离子脂质:ALC-0315、C12-200、LN16、MC3、MD1、SM-102以及其中任何项的组合。在一些实施方案中,所述LNP包含选自以下的阳离子脂质:

98N12-5、C12-200、C14-PEG2000、DLin-KC2-DMA (KC2)、DLin-MC3-DMA (MC3)、XTC、MD1、7C1以及其中任何项的组合。在一些实施方案中,所述LNP包含选自以下的中性脂质:DPSC、DPPC、POPC、DOPE、SM以及其中任何项的组合。在一些实施方案中,所述LNP包含选自以下的脂质:C12-200、C14-PEG2000、DOPE、DMG-PEG2000、DSPC、DOTMA、DOSPA、DOTAP、DMRIE、DC-胆固醇、DOTAP-胆固醇、GAP-DMRIE-DPyPE和GL67A-DOPE-DMPE-聚乙二醇(PEG)。

[0016] 在一些实施方案中,脂质可以以任何数量的摩尔比组合以产生LNP。此外,一种或多种多核苷酸可以以宽范围的摩尔比与一种或多种脂质组合以产生LNP。在本文所述的递送系统包含LNP的一些实施方案中,LNP递送系统中脂质与核酸的质量比为约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,在LNP递送系统中,脂质与核酸的质量比为约16:1至4:1。在一些实施方案中,在LNP递送系统中,脂质与核酸的质量比为约20:1。在一些实施方案中,在LNP递送系统中,脂质与核酸的质量比为约8:1。

[0017] 在一些实施方案中,基于脂质的纳米颗粒(LNP)的平均直径小于约1000nm、约500nm、约250nm、约200nm、约150nm、约100nm、约75nm、约50nm或约25nm。在一些实施方案中,LNP的平均直径的范围为约70nm至100nm。在一些实施方案中,LNP的平均直径的范围为约88nm至约92nm、82nm至约86nm或约80nm至约95nm。

[0018] 在本文所述方法的一些实施方案中,所述重组甲病毒srRNA是属于披膜病毒科(Togaviridae)的甲病毒属(Alphavirus)的病毒的重组甲病毒srRNA。在一些实施方案中,所述重组甲病毒srRNA是属于VEEV/EEEV组、或SFV组或SINV组的甲病毒的srRNA。在一些实施方案中,所述甲病毒是东方马脑炎病毒(EEEV)、委内瑞拉马脑炎病毒(VEEV)、大沼泽地病毒(EVEV)、穆坎布病毒(MUCV)、皮克孙纳病毒(Pixuna virus)(PIXV)、米德尔堡病毒(MIDV)、基孔肯亚病毒(CHIKV)、阿良良病毒(ONNV)、罗斯河病毒(RRV)、巴马森林病毒(BF)、盖他病毒(GET)、鹭山病毒(SAGV)、贝巴鲁病毒(BEBV)、马雅罗病毒(MAYV)、乌纳病毒(UNAV)、辛德比斯病毒(SINV)、奥拉病毒(AURAV)、怀塔罗瓦病毒(WHAV)、巴班肯病毒(BABV)、孜拉加奇病毒(KYZV)、西方马脑炎病毒(WEEV)、高地J病毒(HJV)、摩根堡病毒(FMV)、恩杜茂病毒(NDUV)、马达里亚加病毒(MADV)或博吉河病毒。在一些实施方案中,所述甲病毒是VEEV、EEEV、CHIKV或SINV。在一些实施方案中,所述甲病毒是VEEV。在一些实施方案中,所述甲病毒是EEEV。在一些实施方案中,所述甲病毒是CHIKV。在一些实施方案中,所述甲病毒是SINV。

[0019] 在本文所述方法的一些实施方案中,所述srRNA表达载体被鉴定为具有适于预防用途和/或治疗用途的免疫诱导活性。在一些实施方案中,所述srRNA表达载体被鉴定为具有适于预防用途的免疫诱导活性。在一些实施方案中,所述srRNA表达载体被鉴定为具有适于治疗用途的免疫诱导活性。

[0020] 在一个方面,本文提供了根据本文所述的方法鉴定的srRNA构建体。

[0021] 在另一个方面,本文提供了编码本文所述的srRNA构建体的核酸。

[0022] 在又一个方面,本文提供了重组细胞,所述重组细胞包含:(a)如本文所述的RNA构建体;和/或(b)如本文所述的核酸。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,重组细胞是真核细胞。在一些实施方案中,重组细胞是动物细胞。在一些实施方案中,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,动物细胞是哺乳动物细胞。在一些实施方案中,所述动物细胞是昆

虫细胞。在一些实施方案中,所述昆虫细胞是蚊细胞。在一些实施方案中,所述动物细胞是免疫细胞。在一些实施方案中,所述免疫细胞是B细胞、单核细胞、自然杀伤(NK)细胞、自然杀伤T(NKT)细胞、嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜中性粒细胞、树突细胞(DC)、巨噬细胞、调节性T细胞、辅助性T细胞(T_H)、细胞毒性T细胞(T_{CTL})、记忆性T细胞、伽马-德尔塔($\gamma\delta$)T细胞、造血干细胞或造血干细胞祖细胞。在一些实施方案中,所述免疫细胞是B细胞、T细胞或树突细胞(DC)。

[0023] 在相关方面,本文提供了包含至少一种如本文所公开的重组细胞和细胞培养基的细胞培养物。

[0024] 在又一个方面,本文提供了组合物(例如,药物组合物),所述组合物包含治疗上可接受的赋形剂以及以下中的一种或多种:(a)如本文所述的RNA构建体;和/或(b)如本文所述的核酸;以及(c)如本文所述的重组细胞。

[0025] 如本文所述的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种或多种。在一些实施方案中,所述组合物被配制为疫苗。在一些实施方案中,所述疫苗是治疗性疫苗。在一些实施方案中,所述组合物被配制为免疫原性组合物。在一些实施方案中,所述组合物被配制为生物治疗剂。在一些实施方案中,将所述组合物与递送媒介物一起配制成递送系统。在一些实施方案中,所述递送系统包含生理缓冲液、脂质体、基于脂质的纳米颗粒(LNP)、聚合物纳米颗粒、病毒复制子颗粒(VRP)、微球、免疫刺激复合物(ISCOM)、生物活性配体的缀合物或其中任何项的组合。在一些实施方案中,所述LNP递送系统包含阳离子脂质、可电离的阳离子脂质、阴离子脂质或中性脂质。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以及其中任何项的组合。在一些实施方案中,所述LNP包含选自以下的阳离子脂质:98N12-5、C12-200、C14-PEG2000、DLin-KC2-DMA(KC2)、DLin-MC3-DMA(MC3)、XTC、MD1、7C1以及其中任何项的组合。在一些实施方案中,所述LNP包含选自以下的中性脂质:DPSC、DPPC、POPC、DOPE、SM以及其中任何项的组合。在一些实施方案中,所述LNP包含选自以下的脂质:C12-200、C14-PEG2000、DOPE、DMG-PEG2000、DSPC、DOTMA、DOSPA、DOTAP、DMRIE、DC-胆固醇、DOTAP-胆固醇、GAP-DMORIE-DPyPE、GL67A-DOPE-DMPE-聚乙二醇(PEG)以及其中任何项的组合。在一些实施方案中,在LNP递送系统中,脂质与核酸的质量比为约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,在LNP递送系统中,脂质与核酸的质量比为约16:1至4:1。在一些实施方案中,在LNP递送系统中,脂质与核酸的质量比为约20:1。在一些实施方案中,在LNP递送系统中,脂质与核酸的质量比为约8:1。在一些实施方案中,基于脂质的纳米颗粒(LNP)的平均直径小于约1000nm、约500nm、约250nm、约200nm、约150nm、约100nm、约75nm、约50nm或约25nm。在一些实施方案中,LNP的平均直径的范围为约70nm至100nm。在一些实施方案中,LNP的平均直径的范围为约88nm至约92nm、82nm至约86nm或约80nm至约95nm。

[0026] 在另一个方面,本文提供了用于在受试者中诱导药效学作用的方法,所述方法包括向所述受试者施用包含以下中的一种或多种的组合物:(a)如本文所述的srRNA构建体;(b)如本文所述的核酸;(c)如本文所述的重组细胞;以及(d)如本文所述的药物组合物。在一些实施方案中,药效学作用包括在受试者中引起免疫应答。在另一个方面,本文提供了用于预防或治疗受试者的健康状况的方法,所述方法包括向所述受试者预防性或治疗性施用包含以下中的一种或多种的组合物:(a)如本文所述的srRNA构建体;(b)如本文所述的核

酸；(c) 如本文所述的重组细胞；以及 (d) 如本文所述的药物组合物。

[0027] 如本文所述的用于在受试者中诱导药效学作用和/或预防和/或治疗受试者的健康状况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,所施用的组合物在受试者中诱导一种或多种促炎性分子的产生。在一些实施方案中,一种或多种促炎性分子包括干扰素 γ (IFN γ)、细胞因子、TNF- α 、GM-CSF、和MIP1 α 、颗粒酶B、颗粒酶A、穿孔素或其中任何项的组合。在一些实施方案中,受试者先前已经用一种或多种疗法治疗,并且已经对所述一种或多种疗法产生至少部分耐药性。在一些实施方案中,所述一种或多种疗法中的至少一种包括小分子。在一些实施方案中,所述健康状况是增殖性障碍、炎性障碍、自身免疫性障碍或微生物感染。在一些实施方案中,所述受试者患有或疑似患有与增殖性障碍、炎性障碍、自身免疫性障碍或微生物感染相关的健康状况。在一些实施方案中,所述增殖性障碍是癌症。在一些实施方案中,所述癌症是乳腺癌。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。

[0028] 在另一个方面,本文提供了用于实践本公开文本的方法(例如,用于引起免疫应答、用于预防和/或治疗健康状况)的试剂盒,所述试剂盒包含以下中的一种或多种:(a) 如本文所述的srRNA构建体;(b) 如本文所述的核酸构建体;(c) 如本文所述的重组细胞;以及 (d) 如本文所述的药物组合物。

[0029] 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。除了本文所述的说明性实施方案和特征之外,根据附图和具体实施方式以及权利要求,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

[0030] 图1是示出根据本公开文本的一些实施方案的用于鉴定和/或表征自复制RNA (srRNA) 构建体的方法的非限制性例子的流程图。

[0031] 图2是用于优化突变型ESR1抗原盒设计的小鼠的免疫原性的图形表示。X轴列出了在基因盒内ESR1突变K303R、E380Q、Y537C、Y537S、Y537N和D538G的序数(ordinality),以及连接这些突变的接头的使用。Y轴示出了在ELISpot测定中使用肽编码ESR1序列的总T细胞应答。

[0032] 图3是显示来自BHK-21细胞的蛋白质表达的图,所述细胞用来自一组具有多种分子配置的构建体的编码ESR1、PI3K、HER2和HER3的单基因、双基因或四基因srRNA转染,并将它们与单基因构建体进行比较。将单基因构建体的蛋白质表达水平指定为值“1”,并且将双基因或四基因配置中每个基因的相对表达与单基因构建体蛋白质表达水平进行比较。图3A是ESR1蛋白质表达的免疫印迹。图3B是显示基于免疫印迹条带的信号强度的相对ESR1表达的图。图3C是PI3K蛋白质表达的免疫印迹。图3D是显示基于免疫印迹条带的信号强度的相对PI3K表达的图。图3E是显示基于在用Alexa Fluor® 488 (AF488) 标记的HER2特异性抗体染色后,通过荧光流式细胞术 (FFC) 定量的平均荧光强度 (MFI) 的HER2的相对表达的图。图3F是显示基于在用别藻蓝蛋白 (APC) 标记的HER3特异性抗体染色后,通过FFC定量的MFI的HER3的相对表达的图。图3G是总结该组构建体中ESR1、PI3K、HER2和HER3的蛋白质表达读数

的蜘蛛图。

[0033] 图4是在被施用具有各种分子配置的构建体的小鼠中的T细胞应答的图形表示。X轴示出了具有ESR1、PI3K、HER2和HER3的不同序数的呈单基因、双基因或四基因形式的不同构建体。Y轴示出了在ELISpot测定中对源自ESR1突变、HER2和HER3的肽编码序列的总T细胞应答。在此实验中未测量PI3K应答,因为它在BALB/c小鼠中不形成应答。

[0034] 图5是示例性新抗原盒的示意图。将含有突变的肽通过接头隔开以产生单个盒。

[0035] 图6是在被施用具有不同srRNA载体并且在两种不同的脂质纳米颗粒(组成的不同之处在于阳离子脂质为LNP1 (“L1”)或LNP2 (“L2”))中配制的构建体的小鼠中的T细胞应答的图形表示。

[0036] 图7是描述用于对人类疾病建模的两种类型(即,治疗性和预防性)的雌激素受体阳性乳腺癌功效研究的示意图。

[0037] 图8A-图8B是来自单基因和多基因VEEV srRNA构建体的体外蛋白质表达的图形表示。将用每种srRNA构建体转染的BHK-21细胞的上清液用于测量通过ELISA确定的蛋白质表达。图8A示出了来自IL-12ELISA的结果。x轴示出了测试的不同构建体。图8B示出了来自IL-RA ELISA的结果。x轴示出了测试的不同构建体。

[0038] 图9A-图9B是来自VEE中的单基因和多基因构建体的体外蛋白质生物活性的图形表示。将用每种srRNA构建体转染的BHK-21细胞的上清液用于测量细胞因子在表达所述细胞因子的同源受体的报告细胞上的蛋白质生物活性。图9A示出了来自IL-12生物测定的结果。x轴示出了测试的不同构建体。图9B示出了来自IL-1RA生物活性测定的结果。x轴示出了测试的不同构建体。

[0039] 图10是来自srRNA构建体的组合的IL-12生物活性和IL-1RA表达数据的图形表示。

[0040] 图11A-图11B是来自克隆到六种不同srRNA载体中的两种最佳多基因配置的蛋白质表达的图形表示。图11A示出了来自IL-12ELISA的结果。x轴示出了测试的不同构建体。图11B示出了来自IL-RA ELISA的结果。x轴示出了测试的不同构建体。

[0041] 图12A-图12B是来自克隆到六种不同srRNA载体中的两种最佳多基因配置的蛋白质生物活性的图形表示。图12A示出了来自IL-12生物测定的结果。x轴示出了测试的不同构建体。图12B示出了来自IL-RA生物测定的结果。x轴示出了测试的不同构建体。

[0042] 图13是总结了六种不同srRNA载体中的两种最佳多基因配置的IL-12和IL-1RA生物活性的图形表示。

[0043] 图14A-图14B是六种不同srRNA载体中的两种最佳双基因配置在小鼠血清中的体内蛋白质表达的图形表示。图14A示出了来自IL-12ELISA的结果。x轴示出了测试的不同构建体。图14B示出了来自IL-1RA ELISA的结果。x轴示出了测试的不同构建体。

[0044] 图15A-图15B是来自最佳srRNA构建体的不同配制品的体内蛋白质表达的图形表示。图15A示出了来自IL-12ELISA的结果。x轴示出了测试的不同构建体和配制品。图15B示出了来自IL-RA ELISA的结果。x轴示出了测试的不同构建体和配制品。

[0045] 图16A-图16B是展示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病毒的包膜糖蛋白G(RABV-G)。该组包括源自委内瑞拉马脑炎病毒(VEE.TC83)、基孔肯亚病毒毒株S27(CHIK.S27)和DRDE-06(CHIK.DRDE)、辛德比斯病毒毒株Girdwood(SIN.GW)和AR86-Girdwood杂交体1(SIN.AR86)以及东方马脑炎病毒

(EEE.FL93)的srRNA。图16A示出了两次免疫后通过ELISpot评价的抗原特异性脾T细胞应答的定量。图16B示出了两次免疫后来自血清的抗狂犬病中和抗体滴度。

具体实施方式

[0046] 本公开文本总体上涉及用于鉴定和/或表征具有优异表达特性的自复制RNA (srRNA) 构建体 (例如, 复制子) 的新方法, 所述优异表达特性适用于在细胞培养物中或在活体中表达目的重组多肽 (如例如抗原分子和生物治疗分子), 所述构建体用于预防和/或治疗应用。因此, 通过本文公开的方法鉴定的srRNA构建体也在本公开文本的范围内。本公开文本的一些方面和实施方案涉及已被工程化以表达本文所公开的srRNA构建体的重组核酸和重组细胞以及含有它们的药物组合物。本公开文本的一些其他方面和实施方案涉及用于在受试者中诱导药效学作用和用于预防和/或治疗多种健康状况的组合物和方法。

[0047] 如上文所述, 近年来针对DNA和RNA病毒两者的反向遗传学系统的可用性已经为使用重组病毒 (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。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。特别地, 许多基于病毒的表达载体已经被部署用于在培养的重组细胞中表达异源蛋白。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。

[0048] 如本文所述的自扩增RNA (srRNA) 构建体 (例如, 当被递送到细胞 (例如, 宿主细胞) 或受试者中时) 可以在宿主细胞或受试者中扩增自身并启动异源基因产物的表达和/或过表达。与mRNA不同, 本公开文本的自复制RNA构建体 (例如, 复制子) 使用其自身编码的病毒聚合酶来扩增自身。本公开文本的特定srRNA构建体 (如基于甲病毒的srRNA构建体) 产生大量的亚基因组mRNA, 从中可以表达大量的异源蛋白。

[0049] 在一些实施方案中, 如本文所述的srRNA基于RNA病毒 (例如, 甲病毒) 并且可以用作稳健表达系统。例如, 据报道, 使用甲病毒 (如基孔肯雅病毒 (CHIKV)、东方马脑炎病毒 (EEEV)、辛德比斯病毒 (SINV)) 作为病毒表达载体的优点是它们可以在重组宿主细胞中指导合成大量重组蛋白。除这些优势外, 多肽 (如治疗性单链抗体) 如果在体内以高水平表达则可以是最有效的。此外, 对于产生从培养 (离体) 的细胞纯化的重组抗体, 来自srRNA (例如, 复制子) 的高蛋白质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。

[0050] 在以下具体实施方式中, 参考形成其一部分的附图。在附图中, 除非上下文另外规定, 否则相似的符号通常标识相似的组分。在具体实施方式、附图和权利要求中描述的说明性替代方案并不意在是限制性的。在不脱离在此呈现的主题的精神或范围的情况下, 可以使用其他替代方案并且可以进行其他改变。将容易理解的是, 如在本文总体上描述的以及在附图中展示的方面可以以各种各样的不同配置来布置、取代、组合和设计, 所有这些都明确地考虑并构成本申请的一部分。

定义

[0051] 除非另外定义, 否则本文所用的所有技术术语、符号和其他科学术语或用辞都旨

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/或为了便于参考而在本文中定义具有通常理解的含义的术语,并且在本文中包括此类定义不一定应当被解释为表示与本领域通常理解的实质性差异。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。

[0052] 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“一个细胞”包括一个或多个细胞,包括其混合物。在本文中使用“A和/或B”来包括所有以下替代形式:“A”、“B”、“A或B”以及“A和B”。

[0053] 应理解,本文所述的本公开文本的方面和实施方案包括“包含方面和实施方案”、“由方面和实施方案组成”和“基本上由方面和实施方案组成”。如本文所用,“包含”与“包括”、“含有”或“其特征在于”同义,并且是包含性的或开放式的,并不排除另外的、未列举的要素或方法步骤。如本文所用,“由……组成”排除不在所要求保护的组合物或方法中指定的任何要素、步骤或成分。如本文所用,“基本上由……组成”不排除不实质上影响所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。在本文中、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对术语“包含”的任何表述都应理解为涵盖那些基本上由所列举的组分或步骤组成以及由所列举的组分或步骤组成的组合物和方法。

[0054] 如本文所用,术语“施用”及其任何语法变体是指通过施用途径递送生物活性组合物或配制品,所述施用途径包括但不限于鼻内、透皮、静脉内、动脉内、肌内、结内、腹膜内、皮下、肌内、口服、阴道内和局部施用或其组合。所述术语包括但不限于由医学专业人员施用和自我施用。

[0055] 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子代或潜在子代,而不考虑培养中的转移或传代次数。应当理解,并非所有子代都与亲代细胞完全相同。这是因为某些修饰可能由于突变(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)而在后代中发生,使得子代实际上可能与亲本细胞不同,但是仍然被包括在如本文所用的术语的范围内,只要子代保留与原始细胞、细胞培养物或细胞系的功能相同的功能即可。

[0056] 术语“构建体”是指包含来自异源来源的一个或多个核酸序列或氨基酸序列的重组分子(例如,重组核酸或多肽)。例如,多肽构建体可以是嵌合多肽分子,其中两个或更多个不同起源的氨基酸序列在单个多肽构建体中彼此可操作地连接。类似地,核酸构建体可以是嵌合核酸分子,其中两个或更多个不同起源的核酸序列被组装成单个核酸分子。代表性核酸构建体可以包括衍生自能够进行基因组整合或自主复制的任何来源(如质粒、粘粒、病毒、自主复制多核苷酸分子、噬菌体)的任何重组核酸分子(线性或环状的单链或双链DNA或RNA核酸分子),包括一个或多个核酸序列已经可操作地连接的核酸分子。在一些实施方案中,可以将一个或多个核酸构建体掺入(例如,插入)单个核酸分子(如单个载体)内,或者可以将其掺入(例如,插入)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。术语“载体”在本文中用于指代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的载体两者。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、离体地和/或在体内表达DNA序列和片段的载体。在一些实施方案中,载体可以包含在细胞中指导自主复制的序列,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

含足以允许整合到宿主细胞DNA中的序列。在一些实施方案中,载体可以包含可以在体外和/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,将载体用作基因递送媒介物以将基因转移至细胞中。在一些实施方案中,本公开文本的载体是自复制RNA(srRNA)载体。

[0057] 术语本公开文本的组合物(例如,srRNA构建体、核酸构建体、重组细胞和/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足以相对于不存在所述组合物的情况实现陈述的目的(例如,实现其施用所为的效果、刺激免疫应答、预防或治疗疾病或者减轻疾病、障碍、感染或健康状况的一种或多种症状)的量。“有效量”的例子是足以促成治疗、预防或减轻疾病的一种或多种症状的量,其也可以被称为“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的技术来确定(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)。

[0058] 当提及核酸时,如本文所用的术语“裸”是基本上不含其他大分子(如脂质、聚合物和蛋白质)。“裸”核酸(如自复制RNA(例如,复制子))不与其他大分子一起配制,以改善细胞摄取。因此,裸核酸不被包封在脂质体、微粒、纳米颗粒、阳离子乳液等中,不吸附在其上或不与其结合。

[0059] 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,其允许它们以它们预期的方式操作。例如,当在本文所述的核酸分子和srRNA构建体或核酸构建体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在框内,并且相距适当的空间和距离,以允许转录因子或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)。

[0060] 在多肽构建体的上下文中,“可操作地连接”是指在氨基酸序列(例如,不同的区段、部分或结构域)之间的物理连接(例如,直接或间接地连接),以提供构建体的所描述的活性。在本公开文本中,本公开文本的构建体的区域或结构域可以可操作地连接以保留构建体在细胞中的正确折叠、加工、靶向、表达、结合和其他功能特性。除非另有说明,否则本公开文本的构建体的区段、部分和结构域彼此可操作地连接。本文公开的构建体的可操作地连接的区段、部分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)。

[0061] 如本文所用的术语“部分”是指片断(fraction)。关于特定结构(如多核苷酸序列或氨基酸序列或多肽),术语其“部分”可以表示所述结构的连续或不连续片断。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(portion)是不连续片断,则所述不连续片断由结构(例如,蛋白质的结构

域)的2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个或更多个部分(part)构成,每个部分(part)都是所述结构的连续元件。例如,氨基酸序列的不连续片断可以由所述氨基酸序列的2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个或更多个(例如,不多于4个)部分构成,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。

[0062] 如本文所用的术语“药学上可接受的赋形剂”是指提供药学上可接受的载体、添加剂或稀释剂以用于向受试者施用一种或多种目的化合物的任何合适的物质。因此,“药学上可接受的赋形剂”可以涵盖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、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。也可以将补充性活性化合物(例如,抗生素和另外的治疗剂)掺入组合物中。

[0063] 当关于细胞、核酸、蛋白质或载体使用时,术语“重组的”表明细胞、核酸、蛋白质或载体已经通过人干预而改变或产生,例如像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。重组蛋白可以包含在蛋白质的天然(非重组或野生型)形式内未发现的氨基酸残基,或者可以包含已经被修饰(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:对肽、蛋白质或核酸序列的任何化学修饰,包括对一个或多个氨基酸、脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸的任何化学修饰;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“重组的”并不旨在包括天然存在的细胞,但是涵盖已经被工程化/修饰以包含或表达在细胞未被工程化/修饰时不存在于细胞中的多肽或核酸的细胞。

[0064] 如本文所用,“受试者”或“个体”包括动物,如人(例如,人类个体)和非人动物。在一些实施方案中,“受试者”或“个体”是在医生护理下的患者。因此,受试者可以是患有、有风险患上或怀疑患有目的健康状况(例如,癌症或感染)和/或健康状况的一种或多种症状的人类患者或个体。受试者也可以是在诊断时或之后被诊断为有目的健康状况和/或疾病的风险的个体。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)、家畜、家养动物和宠物、非人灵长类动物和其他哺乳动物,例如像绵羊、猫、狗、牛、鸡,以及非哺乳动物,如两栖动物、爬行动物等。

[0065] 在提供值范围的情况下,应理解,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)以及该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。

[0066] 某些范围在本文中通过前面带有术语“约”的数值呈现。在本文中使用术语“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。如果根据上下文原本不清楚近似度,

则“约”意指在所提供值的 $\pm 10\%$ 内,或者四舍五入到最接近的有效数字,在所有情况下都包括所提供的值。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 $\pm 1\%$ 。

[0067] 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。

[0068] 应理解,本文所述的本公开文本的方面和实施方案包括“包含方面和实施方案”、“由方面和实施方案组成”和“基本上由方面和实施方案组成”。如本文所用,“包含”与“包括”、“含有”或“其特征不在于”同义,并且是包含性的或开放式的,并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”排除不在所要求保护的组合物或方法中指定的任何要素、步骤或成分。如本文所用,“基本上由……组成”不排除不实质上影响所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。在本文中、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对术语“包含”的任何表述都应理解为涵盖那些基本上由所列举的组分或步骤组成以及由所列举的组分或步骤组成的组合物和方法。

[0069] 本文公开的所有基因、基因名称和基因产物都旨在对应于来自本文公开的组合物和方法适用的任何物种的同源物。因此,所述术语包括但不限于来自人和小鼠的基因和基因产物。应理解,当公开来自特定物种的基因或基因产物时,除非其出现的上下文明确指示,否则本公开文本仅旨在是示例性的,并不应被解释为限制。因此,例如,本文公开的基因或基因产物(其在一些实施方案中涉及哺乳动物核酸和氨基酸序列)旨在涵盖来自其他动物(包括但不限于其他哺乳动物、鱼类、两栖动物、爬行动物和鸟类)的同源和/或直系同源基因和基因产物。在一些实施方案中,基因、核酸序列、氨基酸序列、肽、多肽和蛋白质是人的。术语“基因”还旨在包括其变体。

[0070] 应理解,为清楚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也可以单独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都确切地被本公开文本所涵盖并且在本文中公开,如同每一个组合都单独且明确地公开一样。另外,各种实施方案及其要素的所有子组合也确切地被本公开文本所涵盖并且在本文中公开,如同每一个这样的子组合都单独且明确地在本文中公开一样。

甲病毒

[0071] 甲病毒是具有单链正义RNA基因组的小包膜RNA病毒。甲病毒属(alphavirus)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),其都是密切相关的并且能够感染多种脊椎动物(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,辛德比斯和塞姆利基森林病毒已经被广泛研究,并且这些病毒的生命周期、复制模式等是良好表征的。适用于本文公开的组合物和方法的非限制性示例性甲病毒物种包括奥拉病毒(AURAV)、巴班肯病毒(BABV)、巴马森林病毒(BFV)、比巴鲁病毒(BEBV)、博吉河病毒、卡因瓜病毒、卡巴斯欧病毒、基孔肯亚病毒(CHIKV)、东方马脑炎病毒(EEEV)、埃拉特病毒、沼泽地病毒(EVEV)、摩根堡病毒(FMV)、盖塔病毒(GETV)、高地J病毒(HJV)、克孜拉加奇病毒(KYZV)、马达里亚加病毒(MADV)、马雅罗病毒(MAYV)、米德尔堡病毒(MIDV)、莫斯达斯佩德拉斯病毒、穆坎布病毒(MUCV)、恩杜姆病毒(NDUV)、阿尼昂尼昂病毒(ONNV)、皮春纳病毒

(PIXV)、里奥内格罗病毒(RNV)、罗斯河病毒(RRV)、鲑鱼胰腺病病毒(SPDV)、塞姆利基森林病毒(SFV)、辛德比斯病毒(SINV)、嗜睡症病毒(SDV)、南方象海豹病毒(SESV)、大森林病毒(TFV)、图那特病毒、特罗卡拉病毒、乌纳病毒(UNAV)、委内瑞拉马脑炎病毒(VEEV)、西方马脑炎病毒(WEEV)和瓦塔罗阿病毒(WHAV)。

[0072] 甲病毒基因组长大约12kb,并且它由以下两个开放阅读框(ORF)组成:7kb编码非结构蛋白(nsP)的框和4kb编码结构多蛋白的框。非结构多蛋白(nsP)被切割成四种不同的蛋白质(nsP1、nsP2、nsP3和nsP4),其是病毒mRNA在宿主细胞的细胞质内转录和翻译所必需的。

[0073] nsP1蛋白是具有鸟嘌呤-7-甲基转移酶(MTase)和鸟苷酸转移酶(GTase)两种活性的mRNA加帽酶,这两种活性指导新合成的病毒基因组和亚基因组RNA的甲基化和加帽。nsP1的N末端结构域中的MTase基序催化甲基从S-腺苷甲硫氨酸(AdoMet)转移到GTP分子的N7位置(m7Gppp)。GTase然后结合m7Gppp,与催化组氨酸形成共价连接(m7Gp-GTase)并且释放PPi。然后GTase将m7Gp分子转移到5'-二磷酸RNA,以产生m7GpppNp-RNA。所得帽结构对于病毒mRNA翻译至关重要,并且防止mRNA被细胞5'外切核酸酶降解。在N末端结构域之后是允许nsP1蛋白与细胞膜缔合的特征。 α 螺旋两亲性环和棕榈酰化位点的存在允许nsP1蛋白和含有nsP1的复制复合物可能通过nsP1与膜阴离子磷脂的相互作用锚定在质膜上。

[0074] nsP2蛋白具有多种酶活性和功能作用。N末端区域含有具有超家族1(SF1)解旋酶的七个特征基序的解旋酶结构域。它作为进行第一个病毒RNA加帽反应的RNA三磷酸酶发挥作用。它还作为核苷酸三磷酸酶(NTPase)发挥作用,增强RNA解旋酶活性。nsP2的C末端区域含有木瓜蛋白酶样半胱氨酸蛋白酶,其负责加工病毒非结构多蛋白。所述蛋白酶识别多蛋白内的保守基序。这种蛋白水解功能是高度受调节的,并且由nsP2的其他结构域调节。甲病毒nsP2蛋白也已经被描述为毒力因子,负责受感染的宿主细胞中的转录和翻译关闭,以及干扰素(IFN)介导的抗病毒应答的抑制,有助于病毒因子控制翻译机器。

[0075] 不太清楚甲病毒nsP3蛋白在复制复合物中的一种或多种确切作用。nsP3蛋白具有以下三个识别的结构域:具有磷酸酶活性和核酸结合能力的N末端宏结构域、甲病毒独特结构域(AUD)和C末端高变结构域。已经证明,SFV nsP3中此结构域的缺失导致低病毒致病性,表明其在病毒RNA转录调节中的重要性。

[0076] nsP4聚合酶是甲病毒中保守度最高的蛋白质,当与其他甲病毒nsP4相比时,最大的分歧是氨基酸序列>50%相同。nsP4在C末端含有核心RNA依赖性RNA聚合酶(RdRp)结构域,其被确定为仅负责病毒复制复合物的RNA合成特性。RdRp经由负链RNA参与基因组RNA的复制以及26S亚基因组RNA的转录。N末端结构域是甲病毒特异性的并且可以在结构上部分无序。

[0077] 甲病毒基因组的5'三分之二编码病毒RNA转录和复制所必需的许多非结构蛋白(nsP)。这些蛋白质直接从RNA翻译,并且与细胞蛋白一起形成对于病毒基因组复制和亚基因组RNA转录至关重要的RNA依赖性RNA聚合酶。四种非结构蛋白(nsP1、nsP2、nsP3、nsP4)作为单个多蛋白产生,构成病毒的复制机器。多蛋白的加工以高度受调节的方式进行,其中P2/3连接处的切割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。产生非致细胞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

非致细胞病变突变的位置相对的P3突变阻止了P2/3的有效切割。这进而可能影响RNA感染性,改变病毒RNA产生水平。

[0078] 基因组的3'端三分之一包含亚基因组RNA,其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和作为异二聚体缔合的包膜蛋白P62和E1)的翻译模板。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'端的p26S亚基因组启动子转录。P62蛋白水解成熟为E2和E3引起病毒表面的变化。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,并且E3(如果存在)位于刺突的远端。当病毒暴露于内体的酸度时,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在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,其与流感病毒和HIV中发现的I类融合蛋白在结构上不同。E2糖蛋白通过其胞质结构域发挥功能以与核衣壳相互作用,而其胞外结构域负责结合细胞受体。大多数甲病毒失去周边蛋白E3,而在塞姆利基病毒中,它仍然与病毒表面缔合。

[0079] 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,将基因组RNA的5'端翻译成具有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的次级病毒的基因组相对应并且充当病毒基因组的正基因组RNA;以及(2)编码形成感染颗粒的病毒的结构蛋白的亚基因组RNA。通过多蛋白到nsP1、nsP2、nsP3和nsP4的蛋白水解自切割来调节正基因组RNA/亚基因组RNA比率。实际上,病毒基因表达分两个阶段进行。在第一阶段中,主要合成正基因组链和负链。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。

自复制RNA

[0080] 正如熟练技术人员将了解的,术语“自复制RNA”是指含有在允许细胞内引导其自身的扩增或自复制所需的所有遗传信息的RNA分子。因此,srRNA有时也被称为“自扩增RNA”(saRNA)。在一些实施方案中,srRNA是“复制子”,其可以是DNA或RNA的作为单元依序复制的线性或环状部分。复制子的非限制性例子包括“复制子RNA”或“RNA复制子”。为了引导其自身的复制,srRNA通常(1)编码聚合酶、复制酶或其他可以与病毒或宿主细胞衍生的蛋白质、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期间结合至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。在本公开文本的一些实施方案中,复制子(例如,srRNA)源自甲病毒。在本公开文本的一些实施方案中,甲病毒srRNA构建体(例如,srRNA、saRNA或复制子分子)通常含有以下元件:复制顺式需要的一个或多个5'病毒或缺陷干扰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)的亚基因组启动子(sg)、复制顺式需要的3'病毒序列以及任选地聚腺苷酸束(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。

[0081] 此外,术语srRNA分子(例如,srRNA、saRNA或复制子分子)通常是指正极性或“信息”含义的分子,并且srRNA的长度可以不同于任何已知的天然存在的甲病毒的长度。在本公开文本的一些实施方案中,srRNA不含有一种或多种甲病毒结构蛋白的编码序列的至少

一部分;和/或编码结构基因的序列可以被异源序列取代。在那些情形下,在srRNA将被包装成重组甲病毒颗粒的情况下,它可以含有一个或多个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的序列(所谓的包装信号)。

[0082] 本公开文本的srRNA构建体的长度通常为至少约2kb。例如,srRNA可以具有至少约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的长度。在一些实施方案中,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,srRNA可以具有约6kb至约14kb的长度。在一些实施方案中,srRNA可以具有约6kb至约16kb的长度。

用于鉴定和/或表征srRNA构建体的方法

[0083] 如下文更详细描述,本公开文本的一个方面涉及用于鉴定和/或表征srRNA构建体(例如,具有所需表达特性的srRNA构建体)的方法,所述表达特性适用于在宿主细胞、细胞培养物、离体无细胞表达系统中或在受试者中表达目的重组多肽(例如抗原分子和生物治疗分子),所述构建体用于预防和/或治疗应用。

[0084] 图1是示出本文公开的用于鉴定和/或表征自复制RNA(srRNA,例如,复制子)构建体的方法的非限制性例子的流程图。如图1所示,在一些实施方案中,本公开文本的方法可以包括以下操作:(a)提供多个srRNA表达构建体,每个srRNA表达构建体包括可操作地插入到甲病毒srRNA载体中的目的多肽构建体(PCI)的编码序列,其中所述甲病毒结构蛋白的编码序列的至少一部分已经被所述PCI的编码序列替代;(b)分析从所述多个srRNA表达构建体表达的PCI的水平和/或功能,以鉴定具有限定特性的一个或多个候选PCI;(c)将能够表达在(b)中鉴定的所述候选PCI的所述srRNA表达构建体与至少一种递送媒介物合并,以创建递送系统的组合集合;以及(d)分析所述递送系统在受试者中赋予至少一种药效学作用的能力,以鉴定能够赋予所需药效学作用的srRNA表达构建体。

[0085] 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,甲病毒srRNA载体缺乏编码甲病毒srRNA载体的病毒结构蛋白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,甲病毒srRNA载体缺乏编码CP的部分或整个序列。在一些实施方案中,甲病毒srRNA载体缺乏编码E1的部分或整个序列。在一些实施方案中,甲病毒srRNA载体缺乏编码E2的部分或整个序列。在一些实施方案中,甲病毒srRNA载体缺乏编码E3的部分或整个序列。在一些实施方案中,甲病毒srRNA载体缺乏编码6K的部分或整个序列。在一些实施方案中,甲病毒srRNA载体缺乏编码CP、E1、E2、E3和6K的组的部分或整个序列。在本公开文本的一些实施方案中,存在甲病毒srRNA载体的非结构蛋白nsP1、nsP2、nsP3和nsP4的编码序列,然而不存在编码甲病毒srRNA载体的一种或多种结构蛋白(例如,CP、E1、E2、E3和6K)的至少部分或整个序列。

[0086] 在一些实施方案中,甲病毒srRNA载体缺乏编码一种或多种病毒结构蛋白的核酸

序列的大部分。熟练技术人员将理解,编码病毒结构多肽的核酸序列的很大一部分可以包含足够的编码病毒结构多肽的核酸序列,以提供对该多肽的推定鉴定,通过由本领域技术人员对序列的手动评价或者通过使用诸如BLAST(参见例如,“Basic Local Alignment Search Tool”;Altschul SF等人,J.Mol.Biol.215:403-410,1993)的算法的计算机自动序列比较和鉴定来进行。因此,核苷酸序列的很大一部分包含足够的序列以提供包含序列的核酸片段的特异性鉴定和/或分离。例如,核酸序列的很大一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%。

[0087] 在一些实施方案中,甲病毒srRNA载体缺乏编码病毒结构蛋白的整个序列,例如,甲病毒srRNA载体不包含编码病毒结构蛋白的核酸序列。

[0088] 在一些实施方案中,PCI的编码序列包括单个多肽(例如,单基因PCI)的编码序列。在一些实施方案中,PCI的编码序列包括多个多肽(例如,多基因(例如,双基因、三基因或四基因等)PCI)的编码序列。在一些实施方案中,多种多肽的编码序列中的每一个都可操作地连接至单独的启动子序列。在一些实施方案中,多种多肽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。在一些实施方案中,多顺反子ORF的编码序列可操作地连接至启动子序列。在一些实施方案中,启动子序列中的至少一个是亚基因组(sg)启动子。在一些实施方案中,sg启动子是26S基因组启动子。

[0089] 在一些实施方案中,多种多肽可以彼此直接或间接地(例如,经由一个或多个连接序列)连接。例如,在一些实施方案中,多种多肽可以彼此直接连接,例如彼此相邻地连接。在一些实施方案中,多种多肽中的至少两种(例如,2、3、4或5种)通过一个或多个连接序列彼此可操作地连接。在一些实施方案中,可以优化连接序列的长度和氨基酸组成以改变多肽相对于彼此的取向、柔性和/或接近度,以实现PCI的所需活性或特性。在一些实施方案中,多个连接序列中的连接序列包括一个或多个自我蛋白水解肽序列。适用于本公开文本的方法和组合物的自我蛋白水解肽序列的非限制性例子包括源自钙依赖性丝氨酸内切蛋白酶(弗林蛋白酶)、猪捷申病毒-1 2A(P2A)、口蹄疫病毒(FMDV) 2A(F2A)、马甲型鼻炎病毒(ERAV) 2A(E2A)、明脉扁刺蛾 β 四体病毒2A(T2A)、质型多角体病毒2A(BmCPV2A)和软化病病毒2A(BmIFV2A)的自我蛋白水解切割序列。在一些实施方案中,多种多肽中的至少两种经由P2A自我蛋白水解切割序列彼此可操作地连接。

[0090] 在一些实施方案中,多种多肽的编码序列通过一个或多个内部核糖体进入位点(IRES)彼此可操作地连接。适用于本公开文本的方法和组合物的IRES的非限制性例子包括病毒IRES序列、细胞IRES序列和人工IRES序列。合适的IRES序列的例子包括但不限于卡波西肉瘤相关疱疹病毒(KSHV) IRES、肝炎病毒IRES、瘟病毒属(Pestivirus) IRES、蟋蟀麻痹病毒属(Cripavirus) IRES、禾谷缢管蚜(Rhopalosiphum padi) 病毒IRES、成纤维细胞生长因子IRES、血小板源性生长因子IRES、血管内皮生长因子IRES、胰岛素样生长因子IRES、小RNA病毒IRES、脑心肌炎病毒(EMCV) IRES、Pim-1 IRES、p53 IRES、Apaf-1 IRES、TDP2 IRES、L-myc IRES和c-myc IRES。

目的多肽构建体(PCI)

[0091] 如下文更详细描述,目的多肽构建体(PCI)可以包含一种或多种多肽的氨基酸序列。原则上,对于可以由本公开文本的srRNA构建体表达的合适的多肽没有特别的限制。适用于本公开文本的组合物和方法的多肽的示例性类型包括微生物蛋白、病毒蛋白、细菌

蛋白、真菌蛋白、哺乳动物蛋白及其任何组合。例如,PCI可以包括一种或多种抗原分子和/或生物治疗性分子,如细胞因子、细胞毒素、趋化因子、免疫调节剂、促凋亡因子、抗凋亡因子、激素、分化因子、去分化因子、免疫细胞受体或报告物或其中任何项的组合。

[0092] 在一些实施方案中,PCI可以包括一种或多种白细胞介素和相互作用蛋白,如G-CSF、GM-CSF、IL-1、IL-10、IL-10样蛋白、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、IL-18BP、IL-1样蛋白、IL-1RA、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-2、IL-20、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-6样蛋白、IL-7、IL-9、IL-21、IL-22、IL-33、IL-37、IL-38、LIF和OSM。另外的合适的多肽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)。

[0093] 适用于本公开文本的组合物和方法的另外的多肽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),基因的耐药性突变体/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。适用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。在一些实施方案中,PCT可以包含一种或多种表面暴露的病毒抗原,例如,表面暴露的病毒蛋白。在一些实施方案中,所述病毒蛋白是糖蛋白。在一些实施方案中,PCT可以包含表面糖蛋白。在一些实施方案中,所述病毒糖蛋白是狂犬病病毒糖蛋白。在一些实施方案中,所述病毒糖蛋白是狂犬病病毒的包膜糖蛋白G(RABV-G)。

[0094] 在一些实施方案中,PCI可以包括一种或多种抗体或抗体变体(例如,单链Fv、双特异型、骆驼型、Fab和HCAb)的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗体靶向与癌症相关或在癌症中上调的分子,或与感染性疾病相关的分子。在一些实施方案中,抗体靶向具有免疫刺激功能或具有免疫抑制功能的分子。

[0095] 在一些实施方案中,PCI可以包括如下酶的氨基酸序列,所述酶的缺乏或突变与疾病或健康状况相关,例如像阿加糖酶 β (agalsidase beta)、阿加糖酶 α (agalsidase alfa)、伊米苷酶、他利苷酶 α (taliglucerase alfa)、维拉苷酶 α (velaglucerase alfa)、阿糖脑苷酶、色贝脂酶 α (sebelipase alfa)、拉罗尼酶、艾度硫酸酯酶、依洛硫酸酯酶 α (elosulfase alfa)、加硫酶、阿糖苷酶 α 和CTFR。

[0096] 在一些实施方案中,PCI可以包括选自抗原分子、生物治疗分子或其中任何项的组合的多肽的氨基酸序列。在一些实施方案中,PCI可以包括选自肿瘤相关抗原、肿瘤特异性抗原、新抗原以及其中任何项的组合的多肽的氨基酸序列。在一些实施方案中,PCI可以包括选自雌激素受体、细胞内信号转导酶和人表皮生长受体的多肽的氨基酸序列。在一些实施方案中,PCI可以包括选自免疫调节剂、血管生成调节剂、细胞外基质调节剂、代谢调节

剂、神经调节剂以及其中任何项的组合的生物治疗性多肽的氨基酸序列。在一些实施方案中,PCI可以包括选自趋化因子、干扰素、白细胞介素、淋巴因子和肿瘤坏死因子的细胞因子的氨基酸序列。在一些实施方案中,PCI可以包括选自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的白细胞介素、IFN γ 以及其中任一种的亚基的氨基酸序列。在一些实施方案中,PCI可以包括选自IL-12A、IL-12B、IL-1RA以及其中任何项的组合的生物治疗性多肽的氨基酸序列。

[0097] 在一些实施方案中,PCI可以包括一种或多种抗原多肽。如上所述,原则上,对于可以由本公开文本的srRNA构建体表达的合适的抗原多肽没有特别的限制。因此,在一些实施方案中,PCI可以包括一种或多种抗原多肽,其可以是肿瘤相关抗原(TAA)、肿瘤特异性抗原(TSA)、新抗原以及其中任何项的组合。如熟练技术人员将理解的,TAA包括存在于肿瘤细胞和正常细胞上,或者存在于许多正常细胞上但浓度远低于肿瘤细胞上的分子(例如,蛋白质)。相比之下,TSA通常包括存在于肿瘤细胞上但不存在于正常细胞上的分子(例如,蛋白质)。肿瘤相关抗原可以是与例如以下的癌细胞相关的抗原:乳腺癌细胞、B细胞淋巴瘤、胰腺癌、霍奇金淋巴瘤细胞、卵巢癌细胞、前列腺癌细胞、间皮瘤、肺癌细胞、非霍奇金B细胞淋巴瘤(B-NHL)细胞、卵巢癌细胞、前列腺癌细胞、间皮瘤细胞、黑色素瘤细胞、慢性淋巴细胞白血病细胞、急性淋巴细胞白血病细胞、神经母细胞瘤细胞、神经胶质瘤、胶质母细胞瘤、结直肠癌细胞等。还将理解,在一些情况下,肿瘤相关抗原也可以由非癌细胞表达。

[0098] 在一些实施方案中,所述一种或多种抗原多肽包含雌激素受体、细胞内信号转导酶和人表皮生长受体。在一些实施方案中,所述一种或多种抗原多肽选自ESR1、PI3K、HER2、HER3、其中任何项的变体以及其中任何项的组合。在一些实施方案中,所述ESR1变体的编码序列包含一个或多个促进配体非依赖性受体活性的分子改变。在一些实施方案中,所述一个或多个分子改变包括选自以下的激活突变:K303R、E380Q、Y537C、Y537S、Y537N和D538G。在一些实施方案中,所述PI3K变体的编码序列包含一个或多个促进配体非依赖性受体活性的分子改变。在一些实施方案中,所述一个或多个分子改变包括选自以下的激活突变:E542K、E545K、H1047L和H1047R。在一些实施方案中,所述HER2变体包含胞外结构域和跨膜结构域的编码序列。在一些实施方案中,所述HER3变体包含无激酶活性HER3的编码序列。在一些实施方案中,所述PCI的编码序列在5'至3'方向上包含:a) PI3K变体的编码序列,所述PI3K变体包含一个或多个选自E542K、H1047L、E545K和H1047R的激活分子改变;b) 自我蛋白水解肽P2A的编码序列;c) HER2变体的编码序列,所述HER2变体包含HER2的胞外结构域和跨膜结构域;d) 自我蛋白水解肽P2A的编码序列;e) HER3的无激酶活性变体的编码序列;f) 内部核糖体进入位点(IRES)的编码序列;以及g) ESR1变体的编码序列,所述ESR1变体包含一个或多个选自Y537C、E380Q、K303R、Y537S、D538G和Y537N的激活分子改变。

[0099] 在一些实施方案中,所述PCI包括一种或多种生物治疗性多肽。通常,对于可以由本公开文本的srRNA构建体表达的合适的生物治疗性多肽没有特别的限制。适用于本公开文本的组合物和方法的生物治疗性多肽的例子包括但不限于免疫调节剂、血管生成调节剂、细胞外基质调节剂、代谢调节剂、神经调节剂以及其中任何项的组合。在一些实施方案中,PCI包括一种或多种细胞因子。细胞因子的非限制性例子包含来自趋化因子、干扰素、白细胞介素、淋巴因子和肿瘤坏死因子。在一些实施方案中,PCI包括一种或多种白细胞介素。合适的白细胞介素包括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 以及其中任一种的亚基。在一些实施方案中,所述一种或多种生物治疗性多肽选自白细胞介素12的p35亚基(p35或IL-12A)、白细胞介素12的p40亚基(p40或IL-12B)、白细胞介素-1受体拮抗剂(IL-1RA)、其中任何项的变体以及其中任何项的组合。在一些实施方案中,所述目的多肽构建体在N端至C端方向上包含:a) IL-12A多肽、IL-12B多肽和IL-1RA多肽;或b) IL-1RA多肽、IL-12B多肽和IL-12A多肽;其中所述IL-12A多肽、所述IL-12B多肽和所述IL-1RA多肽通过一个或多个自我蛋白水解切割序列或内部核糖体进入位点彼此可操作地连接。

[0100] 在一些实施方案中,本文所述方法的步骤(a)包括提供多个srRNA表达构建体,每个srRNA表达构建体包含PCI的变体的编码序列。术语PCI的“变体”是指多肽构建体,其中与原始PCT的氨基酸序列相比,存在一种或多种分子改变(例如,氨基酸缺失、取代、插入、重复和/或突变)。术语变体还包括移码变体和剪接变体。在一些实施方案中,(a)中的提供包括:(i)获得甲病毒srRNA表达载体,其中所述甲病毒结构蛋白的编码序列的至少一部分已经被目的多肽构建体(PCI)的编码序列替代;以及(ii)产生多个srRNA表达构建体,每个srRNA表达构建体包含PCI的变体的编码序列。

[0101] 在一些实施方案中,本文所述方法的步骤(a)包括提供多个srRNA表达构建体,每个srRNA表达构建体包含PCI的变体的编码序列,其中(a)中的提供包括:(i)获得目的多肽构建体(PCI)的多个变体的编码序列;以及(ii)产生多个srRNA表达构建体,每个srRNA表达构建体包含可操作地插入到甲病毒srRNA载体中的来自(a)的所述多个PCI变体中的PCI变体的编码序列,其中所述甲病毒结构蛋白的编码序列的至少一部分已经被所述PCI变体的编码序列替代。

[0102] 在本文所述方法的一些实施方案中,所述多个PCI变体中的PCI变体包含一个或多个分子改变。PCI变体中的分子改变的示例性类型可以是缺失、取代、插入、重复、突变、移码变体、剪接变体以及其中任何项的组合中的一种或多种。

[0103] 在本文所述方法的一些实施方案中,所述一种或多种分子改变被配置到多个改变盒中。在一些实施方案中,所述多个改变盒沿着PCI序列的长度串联布置。在一些实施方案中,可以优化改变盒的长度和氨基酸组成,以实现PCI或PCI变体的所需活性或特性。在一些实施方案中,所述多个改变盒中的改变盒包含含有约1至约30个氨基酸残基(例如,2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20个等氨基酸残基)的单链多肽序列。在一些实施方案中,所述多个改变盒中的改变盒包含约2至约50个氨基酸残基,如约5至约45、约10至约40、约15至约30、约20至约50、约2至约30、约3至约25、约4至约20、约5至约15、约6至约10、约3至约15、约4至约10、约5至约30、约2至约5、约3至约5、约4至约8个氨基酸残基。在一些实施方案中,所述多个改变盒中的改变盒包含31个氨基酸残基。在一些实施方案中,所述多个改变盒中的改变盒包含一个、两个、三个、四个、五个或更多个分子改变。

[0104] 在一些实施方案中,重构和/或优化PCI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,PCI的编码序列被优化以用于以比参考编码序列的表达水平高(例如,比参考编码序列高20%、高30%、高40%、高50%、高60%、高70%、高80%、高90%或高95%)的水平进行表达。在一些实施方案中,参考编码序列是野生型非优化序列。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已经从本文公开的任何多核苷酸序列改变的任何碱基序列。可容易地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(如人、非人灵长类动物、仓鼠、小鼠或猴)优选的密码子使用)。因此,在一些实施方案中,PCI的编码序列被优化以用于以高于参考编码序列(例如像在靶宿主细胞中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)的表达水平的水平表达。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,PCI的经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,PCI的经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。

[0105] 在一些实施方案中,PCI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”是指消除分子活性、量或数量的一半所需的时间段。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的半衰期可以影响RNA的“表达持续时间”。可用于评价RNA稳定性的几种方法和技术是已知的,包括各种计算机方法和/或具有不同PCI密码子使用的复制子(例如,自复制RNA)的储存及其对srRNA效力(例如,转染后检查细胞中的dsRNA)和基因表达的影响的经验压力测试(stress-testing)。在这方面的另外的信息可见于例如Wayment-Steele, H.等人(2021). Cold Spring Harbor Laboratory (doi.org/10.1101/2020.08.22.262931)。关于用于在增强RNA稳定性中使用的原理、策略和方法的进一步的信息可见于例如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。

[0106] 在一些实施方案中,所述多个改变盒通过一个或多个接头彼此可操作地连接。在一些实施方案中,所述一个或多个接头的接头包括合成的化合物接头或肽接头。在一些实施方案中,所述接头可以是合成化合物接头,例如像化学交联剂。市场上可获得的合适的交联剂的非限制性例子包括N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、二琥珀酰亚胺辛二酸酯(DSS)、双(磺基琥珀酰亚胺基)辛二酸酯(BS3)、二硫代双(琥珀酰亚胺基丙酸酯)(DSP)、二硫代双(磺基琥珀酰亚胺基丙酸酯)(DTSSP)、乙二醇双(琥珀酰亚胺基琥珀酸酯)(EGS)、乙二醇双(磺基琥珀酰亚胺基琥珀酸酯)(磺基-EGS)、二琥珀酰亚胺酒石酸酯(DST)、二磺基琥珀酰亚胺酒石酸酯(磺基-DST)、双[2-(琥珀酰亚胺氧基羰基氧基)乙基]砒(BSOCOES)和双[2-(磺基琥珀酰亚胺氧基羰基氧基)乙基]砒(磺基-BSOCOES)。

[0107] 在一些实施方案中,如本文所述,所述接头可以是肽接头,其将两个相邻的改变盒连接在一起。在一些实施方案中,可以优化肽接头序列的长度和氨基酸组成以改变改变盒相对于彼此的取向、柔性和/或接近度,以实现PCI或PCI变体的所需活性或特性。

[0108] 在一些实施方案中,多肽接头包含含有约1至约30个氨基酸残基(例如,2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20个等氨基酸残基)的单链多肽序列。在一些实施方案中,接头序列包含约2至30、约3至25、约4至20、约5至15、约6至10、约3至15、约4至

USA, 2010年2月2日107 (5) 1864-1869, 将其通过引用以其整体并入本文。

[0115] 因此, 在一些实施方案中, 本公开文本的LNP包含一种或多种在Love K.T.等人, 2010同上中描述的脂质化合物(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以及其中任何项的组合。在一些实施方案中, 本公开文本的LNP包含C12-200。

[0116] 在一些实施方案中, 本公开文本的LNP包含一种或多种阳离子脂质。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。

[0117] 在一些实施方案中, 本公开文本的LNP包含一种或多种中性脂质。如上文所述, 在一些实施方案中, 也可以将中性脂质(也称为“结构脂质”或“辅助脂质”)掺入脂质配制品和脂质颗粒中。脂质配制品和脂质颗粒可以包含为组合物的约10Mol%至40Mol%的一种或多种结构脂质。合适的结构脂质支持在制造期间形成颗粒。结构脂质是指在生理pH下以阴离子、不带电或中性两性离子形式存在的许多脂质种类中的任何一种。代表性结构脂质包括二酰基磷脂酰胆碱、二酰基磷脂酰乙醇胺、二酰基磷脂酰甘油、神经酰胺、鞘磷脂、二氢鞘磷脂、脑磷脂和脑苷脂。

[0118] 示例性结构脂质包括两性离子脂质, 例如二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC)、二油酰磷脂酰胆碱(DOPC)、二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)、二油酰磷脂酰乙醇胺(DOPE)、棕榈酰油酰磷脂酰胆碱(POPC)、棕榈酰油酰磷脂酰乙醇胺(POPE)和二油酰磷脂酰乙醇胺4-(N-马来酰亚胺基甲基)-环己烷-1-甲酸酯(DOPE-mal)、二棕榈酰磷脂酰乙醇胺(DPPE)、二肉豆蔻酰磷酸乙醇胺(DMPE)、二硬脂酰磷脂酰乙醇胺(DSPE)、16-0-单甲基PE、16-0-二甲基PE、18-1-反式PE、1-硬脂酰-2-油酰-磷脂酰乙醇胺(SOPE)以及1,2-二反油酰(dielaidoyl)-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(反式DOPE)。

[0119] 在另一个实施方案中, 结构脂质可以是在生理pH下带负电的任何脂质。这些脂质包括磷脂酰甘油, 如二油酰磷脂酰甘油(DOPG)、二棕榈酰磷脂酰甘油(DPPG)、棕榈酰油酰磷脂酰甘油(POPG)、心磷脂、磷脂酰肌醇、二酰基磷脂酰丝氨酸、二酰基磷脂酸和其他连接至中性脂质的阴离子修饰基团。其他合适的结构脂质包括糖脂(例如, 单唾液酸神经节苷脂GM1)。

[0120] 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包含一种或多种在PCT公开案W0 2020252589A1和W0 2021000041A1中描述的可电离脂质化合物, 将所述公开案通过引用以其整体并入本文。

[0121] 在一些实施方案中, 本公开文本的LNP包含至少一种选自以下的脂质: C12-200、C14-PEG2000、DOPE、DMG-PEG2000、DSPC、DOTMA、DOSPA、DOTAP、DMRIE、DC-胆固醇、DOTAP-胆固醇、GAP-DMRIE-DPyPE和GL67A-DOPE-DMPE-聚乙二醇(PEG)。

[0122] 在本文所述的递送系统包含LNP的一些实施方案中, LNP递送系统中脂质与核酸的质量比为约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, 在LNP递送系统中, 脂质与核酸的质量比为约16:1至4:1。在一些实施方案中, 在LNP递送系统中, 脂质与核酸的质量比为约20:1。在一些实施方案中, 在LNP递送系统中, 脂质与核酸的质量比为约8:1。在一些实施方案中, 基于脂质的纳米颗粒(LNP)的平均直径小于约1000nm、约500nm、约

250nm、约200nm、约150nm、约100nm、约75nm、约50nm或约25nm。在一些实施方案中,LNP的平均直径的范围为约70nm至100nm。在一些实施方案中,LNP的平均直径的范围为约88nm至约92nm、82nm至约86nm或约80nm至约95nm。

[0123] 稳定剂可以被包含在脂质配制品实施方案中,以确保混合物的完整性。稳定剂是一类破坏或帮助形成分子之间的疏水-亲水相互作用的分子。合适的稳定剂包括但不限于聚山梨醇酯80(也称为Tween 80,IUPAC名称2-[2-[3,4-双(2-羟乙氧基)氧戊环-2-基]-2-(2-羟乙氧基)乙氧基]乙基十八碳-9-烯酸酯)、Myr j52(聚氧乙烯(40)硬脂酸酯)和BrijTMS10(聚氧乙烯(10)硬脂基醚)。也可以使用聚乙二醇缀合的脂质。稳定剂可以单独使用或彼此组合使用。

[0124] 在一些实施方案中,稳定剂占总体脂质混合物的约.1Mol%至3Mol%。在一些实施方案中,稳定剂占总体脂质混合物的约0.5Mol%至2.5Mol%。在一些实施方案中,稳定剂以大于2.5Mol%存在。在一些实施方案中,稳定剂以5Mol%存在。在一些实施方案中,稳定剂以10Mol%存在。在一些实施方案中,稳定剂为约0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5等。在其他实施方案中,稳定剂占脂质混合物的2.6Mol%-10Mol%。在其他实施方案中,稳定剂以大于脂质混合物的10Mol%存在。

[0125] 类固醇也可以被包含在脂质组合物中以用于某些应用,并且由其制备的脂质颗粒包含固醇(如胆固醇和植物固醇)。

药效学作用的体内或离体评估

[0126] 如上文所述,本公开文本的方法的一些实施方案包括分析递送系统在受试者中赋予至少一种药效学作用的能力以鉴定能够赋予所需药效学作用的srRNA表达构建体的过程。在一些实施方案中,步骤(d)中的对所述递送系统赋予至少一种药效学作用的能力的所述分析在体内或离体进行。可以分析的药效学作用的例子包括:免疫原性作用(例如,在体内引发免疫应答)、生物标志物应答、治疗作用、预防作用、期望的作用、不期望的作用、副作用和在疾病模型中的作用。在一些实施方案中,药效学作用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,药效学作用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5-7)。

[0127] 在本文所述方法的一些实施方案中,所述重组甲病毒srRNA是属于披膜病毒科的甲病毒属的病毒的重组甲病毒srRNA。在一些实施方案中,所述重组甲病毒srRNA是属于VEEV/EEEV组、或SFV组或SINV组的甲病毒的srRNA。在一些实施方案中,所述甲病毒是东方马脑炎病毒(EEEV)、委内瑞拉马脑炎病毒(VEEV)、大沼泽地病毒(EVEV)、穆坎布病毒(MUCV)、皮克孙纳病毒(Pixuna virus)(PIXV)、米德尔堡病毒(MIDV)、基孔肯亚病毒(CHIKV)、阿良良病毒(ONNV)、罗斯河病毒(RRV)、巴马森林病毒(BF)、盖他病毒(GET)、鹭山病毒(SAGV)、贝巴鲁病毒(BEBV)、马雅罗病毒(MAYV)、乌纳病毒(UNAV)、辛德比斯病毒(SINV)、奥拉病毒(AURAV)、怀塔罗瓦病毒(WHAV)、巴班肯病毒(BABV)、孜拉加奇病毒(KYZV)、西方马脑炎病毒(WEEV)、高地J病毒(HJV)、摩根堡病毒(FMV)、恩杜茂病毒(NDUV)、马达里亚加病毒(MADV)或博吉河病毒。在一些实施方案中,所述甲病毒是VEEV、EEEV、CHIKV或SINV。在一些实施方案中,所述甲病毒是VEEV。在一些实施方案中,所述甲病毒是EEEV。在一些实施方案中,所述甲病毒是CHIKV。在一些实施方案中,所述甲病毒是SINV。

[0128] 合适的野生型甲病毒序列是人们熟知的,并且可从序列保藏机构(如美国马里兰州罗克维尔市的美国典型培养物保藏中心(the American Type Culture Collection))获得。合适的甲病毒的代表性例子包括奥拉病毒(ATCC VR-368)、贝巴鲁病毒(ATCC VR-600, ATCC VR-1240)、卡巴斯欧病毒(ATCC VR-922)、基孔肯亚病毒(ATCC VR-64, ATCC VR-1241)、东方马脑炎病毒(ATCC VR-65, ATCC VR-1242)、摩根堡病毒(ATCC VR-924)、盖他病毒(ATCC VR-369, ATCC VR-1243)、孜拉加奇病毒(ATCC VR-927)、马雅罗病毒(ATCC VR-66)、马雅罗病毒(ATCC VR-1277)、米德尔堡病毒(ATCC VR-370)、穆坎布病毒(ATCC VR-580, ATCC VR-1244)、恩杜茂病毒(ATCC VR-371)、皮克孙纳病毒(ATCC VR-372, ATCC VR-1245)、罗斯河病毒(ATCC VR-373, ATCC VR-1246)、塞姆利基森林病毒(ATCC VR-67, ATCC VR-1247)、辛德比斯病毒(ATCC VR-68, ATCC VR-1248)、图那特病毒(ATCC VR-925)、垂尼蒂病毒(Trinita) (ATCC VR-469)、乌纳病毒(ATCC VR-374)、委内瑞拉马脑炎病毒(ATCC VR-69, ATCC VR-923, ATCC VR-1250, ATCC VR-1249, ATCC VR-532)、西方马脑炎病毒(ATCC VR-70, ATCC VR-1251, ATCC VR-622, ATCC VR-1252)、怀塔罗瓦病毒(ATCC VR-926)和Y-62-33 (ATCC VR-375)。

[0129] 在一些实施方案中,甲病毒是基孔肯亚病毒(CHIKV)。适用于本公开文本的组合物和方法的CHIKV毒株的非限制性例子包括CHIKV S27、CHIKV LR2006-OPY-1、CHIKV Y0123223、CHIKV DRDE、CHIKV 37997、CHIKV 99653、CHIKV Ag41855和Nagpur(印度)653496毒株。强毒和无毒的CHIKV毒株都是合适的。适用于本公开文本的组合物和方法的CHIKV毒株的另外的例子包括但不限于以下文献中所述的那些毒株: Afreen等人, Microbiol. Immunol. 2014, 58:688-696; Lanciotti和Lambert ASTMH 2016, 94(4):800-803; 以及Langsjoen等人, mBio. 2018, 9(2):e02449-17。在一些实施方案中,经修饰的CHIKV基因组或复制子(例如,自复制RNA)源自CHIKV毒株S27。在一些实施方案中,经修饰的CHIKV基因组或srRNA源自CHIKV毒株DRDE。在一些实施方案中,经修饰的CHIKV基因组或srRNA源自CHIKV毒株DRDE-06。在一些实施方案中,经修饰的CHIKV基因组或srRNA源自CHIKV毒株DRDE-07。

[0130] 在一些实施方案中,甲病毒是东方马脑炎病毒(EEEV)或马达里亚加病毒(MADV)。适用于本公开文本的组合物和方法的EEEV和MADV毒株的非限制性例子包括EEEV792138、EEEV783372、BeAn5122、BeAr300851、BeAr436087、C-49、FL91-4679、FL93-939、GML903836、MP-9、PE6和V105-00210。强毒和无毒的EEEV毒株都是合适的。另外的合适的EEEV毒株包括但不限于在病毒病原体资源网站(Virus Pathogen Resource, 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,经修饰的EEEV基因组或复制子(例如,自复制RNA)源自EEEV毒株FL93-939。另外的合适的MADV毒株包括但不限于以下文献中描述的那些毒株: Arrigo等人, J. Virology, 2010年1月, 1014-1025, 将其通过引用并入本文。在一些实施方案中,经修饰的MADV基因组或复制子(例如,自复制RNA)源自MADV毒株BeAr300851。

[0131] 在一些实施方案中,甲病毒是辛德比斯病毒(SINV)。在一些实施方案中,经修饰的基因组或复制子(例如,自复制RNA)属于SINV毒株。适用于本公开文本的组合物和方法的SINV毒株的非限制性例子包括SINV毒株AR339、AR86和Girdwood。适用于本公开文本的组合物

物和方法的SINV毒株的例子包括但不限于以下文献中所述的那些毒株：Sammels等人，J.Gen.Virol.1999,80(3):739-748；Lundström和Pfeffer Vector Borne Zoonotic Dis.2010,10(9):889-907；Sigei等人，Arch.of Virol.2018,163:2465-2469；以及Ling等人，J.Virol.2019,93:e00620-19。另外的合适的SINV毒株包括但不限于病毒病原体资源网站(ViPR)中描述的那些毒株。强毒和无毒的SINV毒株都是合适的。在一些实施方案中，经修饰的基因组或srRNA属于SINV毒株Girdwood。在一些实施方案中，经修饰的基因组或srRNA属于SINV毒株AR86。在一些实施方案中，经修饰的SINV基因组或srRNA源自SINV毒株Girdwood。在一些实施方案中，经修饰的SINV基因组或srRNA源自SINV毒株AR86。在一些实施方案中，经修饰的基因组或srRNA的至少一种异源nsP或其部分源自SINV毒株AR86。在一些实施方案中，至少一种异源nsP或其部分是nsP1、nsP3、nsP4或其中任一种的一部分，或任何前述的组合。在一些实施方案中，经修饰的基因组或srRNA属于SINV毒株AR86。

[0132] 在一些实施方案中，甲病毒是西方马脑炎病毒(WEEV)。适用于本公开文本的组合物和方法的WEEV毒株的非限制性例子包括WEEV California、McMillan、IMP181、Imperial、Imperial181、IMPR441、71V-1658、AG80-646、BFS932、COA592、EP-6、E1416、BFS1703、BFS2005、BSF3060、BSF09997、CHLV53、KERN5547、85452NM、Montana-64、S8-122和TBT-235。适用于本公开文本的组合物和方法的WEEV毒株的另外的例子包括5614、93A27、93A30、93A38、93A79、B628(C1 15)、CBA87、CNTR34、C0921356、Fleming、Lake43、PV012357A、PV02808A、PV72102、R02PV001807A、R02PV002957B、R02PV003422B、R05PV003422B、R0PV003814A和R0PV00384A。强毒和无毒的WEEV毒株都是合适的。另外的合适的WEEV毒株包括但不限于以下文献中所述的那些毒株：Bergren NA等人，J.Virol.88(16):9260-9267，2014年8月，以及病毒病原体资源网站(ViPR)。在一些实施方案中，经修饰的WEEV基因组或srRNA源自WEEV毒株Imperia。

[0133] 在本文所述方法的一些实施方案中，所述srRNA表达载体被鉴定为具有适于预防用途和/或治疗用途的免疫诱导活性。在一些实施方案中，所述srRNA表达载体被鉴定为具有适于预防用途的免疫诱导活性。在一些实施方案中，所述srRNA表达载体被鉴定为具有适于治疗用途的免疫诱导活性。

本公开文本的组合物

核酸构建体

[0134] 如下文更详细描述，本公开文本的一个方面涉及核酸构建体，所述核酸构建体包含编码如本文所述的srRNA构建体的核酸序列。在一些实施方案中，编码srRNA构建体的序列可以可操作地连接，例如置于表达所需的元件(例如，启动子序列)的控制下，所述元件允许srRNA构建体在宿主细胞中、在受试者中或在离体无细胞表达系统中进行表达。

[0135] 术语“核酸分子”和“多核苷酸”在本文中可互换使用，并且是指RNA分子和DNA分子两者，包括包含以下的核酸分子：cDNA、基因组DNA、合成DNA、以及含有核酸类似物的DNA或RNA分子。核酸分子可以是双链的或单链的(例如，有义链或反义链)。核酸分子可以含有非常规或经修饰的核苷酸。如本文所用的术语“多核苷酸序列”和“核酸序列”可互换地指多核苷酸分子的序列。本文公开的多核苷酸和多肽序列使用如37CFR§1.82中所述用于核苷酸碱基和氨基酸的标准字母缩写来显示，所述规定通过引用并入WIPO标准ST.25(1998)附录2的表1-表6。

[0136] 本公开文本的核酸分子可以是任何长度的核酸分子,包括长度通常在约2kb与50kb之间,例如在约5kb与约40kb之间、在约5kb与约30kb之间、在约5kb与约20kb之间或在约10kb与约50kb之间,例如在约15kb至30kb之间、在约20kb与约50kb之间、在约20kb与约40kb之间、在约5kb与约25kb之间或在约30kb与约50kb之间的核酸分子。在一些实施方案中,核酸分子的长度为至少6kb。在一些实施方案中,核酸分子在约6kb与约20kb之间。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或多于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。

[0137] 在一些实施方案中,将编码srRNA构建体的核酸序列掺入表达盒或表达载体中。应理解,表达盒通常包含遗传物质的构建体,所述构建体含有srRNA的编码序列和足够的调控信息以引导所述编码序列在体内和/或离体的受体细胞中正确转录和/或翻译。通常,可以将表达盒插入用于靶向所需宿主细胞的载体中和/或插入受试者或个体中。在一些实施方案中,术语表达盒可以与术语“表达构建体”可互换地使用。因此,在一些实施方案中,本公开文本的表达盒包含如本文公开的srRNA的编码序列,所述编码序列可操作地连接至表达控制元件(如启动子)以及任选地影响所述编码序列的转录或翻译的其他核酸序列中的一个或组合。

[0138] 在一些实施方案中,所述核苷酸序列被并入表达载体中。本领域技术人员将理解,术语“载体”通常是指如下重组多核苷酸构建体,其被设计用于在宿主细胞之间转移并且可用于转化的目的,例如将异源DNA引入宿主细胞中。因此,在一些实施方案中,载体可以是复制子(例如,srRNA),如质粒、噬菌体或粘粒,可以将另一个DNA区段插入所述载体中以引起插入区段的复制。在一些实施方案中,表达载体可以是整合载体。

[0139] 可以用来组装和表征本公开文本的核酸构建体的分子技术和方法更全面地描述于本申请的本文实施例中。

[0140] 在一些实施方案中,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操纵或产生自(然而不是间接的)人操纵的任何核酸分子(例如,DNA、RNA)。作为非限制性例子,cDNA是重组DNA分子,如已经通过一个或多个体外聚合酶反应产生或已经与接头附接或已经整合到载体(如克隆载体或表达载体)中的任何核酸分子。作为非限制性例子,重组核酸分子:1)已经在体外例如使用化学或酶促技术合成或修饰,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

在自然界中不连接的连接的核苷酸序列;3)已经使用分子克隆技术进行工程化,使得相对于天然存在的核苷酸序列,它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纵,使得相对于天然存在的核苷酸序列,它具有一个或多个序列变化或重排。

[0141] 在一些实施方案中,使用重组DNA技术(例如,聚合酶链式反应(PCR)扩增、克隆等)或化学合成产生本文公开的核酸分子。如本文所公开的核酸分子包括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,在所述经修饰的核酸分子中一个或多个核苷酸残基已经以这样的方式被插入、缺失和/或取代,使得此类修饰提供了实现如本文所述的生物活性的所需特性。

[0142] 本领域技术人员将理解,核酸分子(包括天然存在的核酸序列的变体)可以使用本领域技术人员已知的多种方法来产生(参见例如,Sambrook等人,于: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它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,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、核酸序列的所选区域的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组的连接以“构建”核酸分子的混合物;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,自复制RNA)的功能进行筛选,和/或与野生型基因或其片段杂交,或使用与靶或野生型核酸分子或序列具有同源性的引物进行PCR。

重组细胞

[0143] 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srRNA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和/或srRNA构建体引入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。因此,含有如本文所述的srRNA构建体和/或编码如本文所述的srRNA构建体的核酸构建体的原核或真核细胞也是本公开文本的特征。将本公开文本的srRNA构建体和核酸构建体引入细胞中可以通过本领域技术人员已知的方法来实现,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。

[0144] 因此,本公开文本的一些实施方案涉及重组细胞,例如重组真核细胞,例如包含本文所述的srRNA构建体和/或核酸构建体的昆虫细胞或动物细胞。在一些实施方案中,所述重组细胞包含核酸构建体,其中核酸构建体可以稳定地整合于宿主基因组中,或者可以以附加体复制,或者作为用于稳定或瞬时表达的微环表达载体存在于重组宿主细胞中。因此,在本公开文本的一些实施方案中,将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,将核酸构建体稳定地整合到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用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。

[0145] 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(例如,转导或转化或转染)。

[0146] 用于克隆或表达如本文所述的目的多肽的合适的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,本公开文本的重组细胞是原核细胞(如细菌大肠杆菌(*E. coli*))或真核宿细胞(如昆虫细胞(例如,蚊子细胞或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,细胞是在体内的,例如活体中的重组细胞,例如转基因受试者的细胞。在一些实施方案中,受试者是脊椎动物或无脊椎动物。在一些实施方案中,受试者是昆虫。在一些实施方案中,受试者是哺乳动物受试者。在一些实施方案中,哺乳动物受试者是人类受试者。在一些实施方案中,细胞是离体的,例如已经作为单独的细胞或作为器官或组织的一部分,从活体或生物体中提取出来进行治疗或程序,然后再返回至活体或生物体中。在一些实施方案中,细胞是在体外的,例如从储存库获得。

[0147] 在本发明的一些实施方案中,本公开文本的重组细胞是真核细胞。在一些实施方案中,重组细胞是动物细胞。在一些实施方案中,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,重组动物细胞是哺乳动物细胞。在一些实施方案中,本公开文本的重组细胞的非限制性例子包括由SV40转化的猴肾CV1细胞(例如,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(例如,HeLa)、犬肾细胞(例如,MDCK)、水牛大鼠肝细胞(例如,BRL 3A)、人肺细胞(例如,W138)、人肝细胞(例如,Hep G2)、小鼠乳腺肿瘤细胞(例如,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(例如,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。

[0148] 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、人肌肉细胞、小鼠3T3细胞、小鼠结缔组织细胞、小鼠肌肉细胞和兔肾细胞。在一些实施方案中,重组细胞是源自上文所述的细胞的细胞(即,本文所述的原始细胞的衍生细胞),例如像从原始细胞的克隆(原始细胞的工程化形式)扩增或作为原始细胞在已经经历广泛传代或已经通过另一种宿主传代后的重新分类的细胞。

[0149] 在本公开文本的一些实施方案中,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,昆虫细胞是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,本公开文本的重组细胞是鳞翅目细胞系的细胞。在过去的几十年里,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见于例如,Lynn D.E., Available lepidopteran insect cell lines. *Methods Mol. Biol.* 2007;388:117-38,将其内容通过引用并入本文。在一些实施方案中,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*)、假鳞斑伊蚊 (*Aedes pseudoscutellaris*)、三列伊蚊 (*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*)、泰氏库蚊 (*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, 蚊细胞是 C6/26 细胞系的细胞。

细胞培养

[0150] 在另一个方面, 本文提供了包含至少一种如本文所公开的重组细胞和培养物的细胞培养物。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, 包含至少一种如本文所公开的重组细胞的细胞培养物也在本申请的范围内。适用于产生和维持细胞培养物的方法和系统是本领域已知的。

转基因动物

[0151] 在另一个方面, 还提供了包含编码如本文所述的 srRNA 构建体 (例如, 载体或 srRNA 分子) 的核酸序列的转基因动物。在一些实施方案中, 转基因动物是脊椎动物或无脊椎动物。在一些实施方案中, 转基因动物是哺乳动物。在一些实施方案中, 转基因哺乳动物是非人哺乳动物。通常, 本公开文本的转基因动物可以是本领域已知的任何非人动物。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。适用于本公开文本的组合物和方法的非人动物的另外的例子可以包括但不限于实验动物 (例如, 小鼠、大鼠、仓鼠、沙鼠、豚鼠等)、家畜 (例如, 马、牛、猪、绵羊、山羊、鸭、鹅、鸡等)、家养动物和宠物 (例如, 猫、狗等)、非人灵长类动物 (例如, 猿、黑猩猩、猩猩、猴等)、鱼类、两栖动物 (例如, 青蛙、蝾螈等)、爬行动物 (例如, 蛇、蜥蜴等) 和其他动物 (例如, 狐狸、黄鼠狼、兔、水貂、海狸、白鼬、水獭、黑貂、海豹、土狼、毛丝鼠、鹿、麝鼠、负鼠等)。

[0152] 在一些实施方案中, 转基因动物是昆虫。在一些实施方案中, 昆虫是蚊。在一些实施方案中, 本公开文本的转基因动物是嵌合转基因动物。在一些实施方案中, 本公开文本的转基因动物是具有这样的生殖细胞和体细胞的转基因动物, 所述生殖细胞和体细胞含有一种或多种 (例如, 一种或多种、两种或更多种、三种或更多种、四种或更多种等) 本公开文本的核酸构建体。在一些实施方案中, 将一种或多种核酸构建体稳定地整合到转基因动物的基因组中。在一些实施方案中, 本公开文本的转基因动物的基因组可以包含本公开文本的一种或多种核酸构建体的 1 个、2 个、3 个、4 个、5 个、6 个、7 个、8 个、9 个、10 个、11 个、12 个、13 个、14 个、15 个或更多个拷贝中的任一者。

[0153] 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的最新技术水平综述于Niemann,H.等人(2005)Rev.Sci.Tech.24:285-298中。在一些实施方案中,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产生,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*) Argonaute)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。在一些实施方案中,转基因动物产生如本文所述的目的蛋白。

药物组合物

[0154] 本公开文本的srRNA构建体、核酸构建体和重组细胞可以并入组合物(包括药物组合物)。此类组合物通常包括本文描述和提供的srRNA构建体、核酸构建体和重组细胞中的一种或多种和药学上可接受的赋形剂(例如,载体)。因此,在本公开文本的一个方面,本文提供了包含治疗上可接受的赋形剂和以下中的一种或多种的药物组合物:(1)如本文所公开的srRNA构建体,(2)如本文所公开的核酸,(3)如本文所公开的重组细胞。在一些实施方案中,本文提供了包含如本文所公开的srRNA构建体和药学上可接受的赋形剂的组合物。在一些实施方案中,本文提供了包含如本文所公开的核酸构建体和药学上可接受的赋形剂的组合物。在一些实施方案中,本文提供了包含如本文所公开的重组细胞和药学上可接受的赋形剂的组合物。

[0155] 如本文所述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种或多种。本公开文本的srRNA构建体可以以裸形式使用或与递送媒介物一起配制。示例性途径,抑或以游离形式使用,例如插入核酸(例如,载体)中。例如,如下文更详细描述,本文所述的srRNA构建体可以用作疫苗。

[0156] 在一些实施方案中,本公开文本的组合物被配制用于预防、治疗或管理健康状况,如免疫性疾病或微生物感染。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。

[0157] 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。在一些实施方案中,本公开文本的组合物被配制用作免疫原性组合物。在一些实施方案中,本申请的组合物被配制用作生物治疗剂。

[0158] 为了在本公开文本的药物组合物中使用,可以将如本文所述的srRNA构建体、核酸或重组细胞配制到递送媒介物中或与递送媒介物一起配制。适合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、免疫刺激复合物(ISCAM)、基于脂质的纳米颗粒(LNP)、聚合物纳米颗粒、病毒复制子颗粒(VRP)或与生物活性配体的缀合物,其可以促进递送和/或增强免疫应答。这些化合物是本领域技术人员可容易获得的;例如,参见Liposomes:A Practical Approach,RCP New Ed,IRL press (1990)。也使用除脂质体等之外的佐剂,并且所述佐剂是本领域已知的。佐剂可以通过将抗原(例如,srRNA构建体)隔离在局部沉积物中而保护其免于快速扩散,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例如从下文所述的那些中进行适当的选择。

[0159] 因此,在一些实施方案中,本公开文本的组合物可以包含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)、聚合物纳米颗粒、病毒复制子颗粒(VRP)、微球、免疫刺激复合物(ISCOM)、生物活性配体的缀合物或其中任何项的组合。

[0160] 在一些实施方案中,可以将本公开文本的srRNA构建体和核酸构建体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。虽然许多人对病毒颗粒具有预先存在的免疫力,但对LNP却没有预先存在的免疫力。此外,不太可能发生针对LNP的适应性免疫应答,这使得能够重复给药LNP。

[0161] 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、可电离阳离子脂质、阴离子脂质或中性脂质。

[0162] 在一些实施方案中,本公开文本的LNP可以包含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降低至脂质的可电离基团的pKa以下时为阳离子的或变得可电离(质子化)但在较高的pH值下更中性的脂质。在低于pKa的pH值下,脂质然后能够与带负电的核酸(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)下携带净正电荷的许多脂质种类中的任何一种。永久阳离子脂质(如DOTMA)已经被证明对于临床使用毒性太大。可电离脂质可以存在于根据其他实施方案的脂质配制品中,优选地比率在一些实施方案中为约30mol%至约70mol%,在其他实施方案中为约30mol%,在其他实施方案中为约40mol%,在其他实施方案中为约45mol%,在其他实施方案中为约47.5mol%,在仍其他实施方案中为约50mol%,以及在又其他实施方案中为约60mol% (“mol%”意指特定组分的总摩尔的百分比)。在此段落中的术语“约”表示5mol%的正负范围。DODMA或1,2-二油烯基氧基-3-二甲基氨基丙烷是可电离脂质,DLin-MC3-DMA或O-(Z,Z,Z,Z-三十七-6,9,26,29-四烯-19-基)-4-(N,N-二甲基氨基) (“MC3”)也是可电离脂质。

[0163] 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文献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,将其全部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以及其中任何项的组合。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,并且描述于例如美国专利号8,450,298和10,844,028中,将所述专利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,将C12-200与DSPC和DMG-PEG2000组合。

[0164] 在一些实施方案中,本公开文本的LNP包含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以用于在LNP中使用。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,以经由脱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都可以用于配制LNP以递送本公开文本的srRNA构

建体和核酸构建体。

[0165] 在一些实施方案中,本公开文本的LNP包含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包含一种或多种在PCT公开案WO 2020252589A1和WO 2021000041A1中描述的可电离脂质化合物。

[0166] 本领域已知的许多其他脂质或脂质组合可以用于产生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。经PEG修饰的脂质的非限制性例子包括PEG-DMG、PEG-CerC14和PEG-CerC20。

[0167] 在一些实施方案中,在LNP递送系统中,脂质与核酸的质量比为约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,在LNP递送系统中,脂质与核酸的质量比为约16:1至4:1。在一些实施方案中,在LNP递送系统中,脂质与核酸的质量比为约20:1。在一些实施方案中,在LNP递送系统中,脂质与核酸的质量比为约8:1。在一些实施方案中,基于脂质的纳米颗粒的平均直径小于约1000nm、约500nm、约250nm、约200nm、约150nm、约100nm、约75nm、约50nm或约25nm。在一些实施方案中,LNP的平均直径的范围为约70nm至100nm。在一些实施方案中,LNP的平均直径的范围为约88nm至约92nm、82nm至约86nm或约80nm至约95nm。

[0168] 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,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,免疫原性组合物被配制为疫苗。在一些实施方案中,药物组合物被配制为佐剂。

[0169] 在一些实施方案中,免疫原性组合物对受试者基本上是非免疫原性的,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,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鼻内施用、透皮施用、腹膜内施用、肌肉施用、气管内施用、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中的一种或多种。

[0170] 适用于注射使用的药物组合物包括无菌水性溶液或分散液以及用于临时制备无菌可注射溶液或分散液的无菌粉末。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,组合物应当是无菌的并且应当是易于注射的程度的流体。它在制造和储存的条件下可以是稳定的,并且可以抵抗微生物(如细菌和真菌)的污染作用而被保存。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)及其合适的混合物。例如,可以通过使用包衣(如卵磷脂)、通过在分散液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。通过在组合物中包含延迟吸收的试剂(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。

[0171] 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枚举成分中的一种或其组合的适当溶剂中，然后过滤灭菌。通常，通过将活性化合物掺入无菌媒介物中来制备分散液，所述无菌媒介物含有基本分散介质和来自上文所枚举成分的所需其他成分。

[0172] 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，如气雾剂、喷雾剂、雾剂、液体或散剂。通过吸入施用可以呈干粉或气雾剂配制品的形式，所述干粉或气雾剂配制品由受试者（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。

[0173] 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、肌内施用、结内施用、瘤内施用、关节内施用、静脉内施用、腹膜内施用、气管内施用、口服施用、阴道内施用、眼内施用、直肠施用或颅内施用。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。

试剂盒

[0174] 本文还提供了用于实践本文所述的方法的各种试剂盒。具体地，本公开文本的一些实施方案提供了用于在受试者中引发免疫应答的试剂盒。一些其他实施方案涉及用于预防有需要的受试者的健康状况的试剂盒。一些其他实施方案涉及用于治疗有需要的受试者的健康状况的方法的试剂盒。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srRNA构建体、核酸构建体、重组细胞和/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。

[0175] 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向受试者施用所提供的srRNA构建体、核酸构建体、重组细胞和/或药物组合物中的任何一种的一种或多种手段。例如，在一些实施方案中，本公开文本的试剂盒进一步包含用于向受试者施用所提供的srRNA构建体、核酸构建体、重组细胞和/或药物组合物中的任何一种的一个或多个注射器（包括载药注射器）和/或导管（包括载药注射器）。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，其可以与其他试剂盒组分同时或依序施用以用于所需目的，例如用于在有需要的受试者中引起免疫应答、用于预防或治疗有需要的受试者的病症。

[0176] 任何上文所述的试剂盒都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、适合于体外产生本公开文本的所提供的srRNA构建体、核酸构建体、重组细胞和/或药物组合物的试剂。

[0177] 在一些实施方案中，试剂盒的组分可以在单独的容器中。在一些其他实施方案中，试剂盒的组分可以在单个容器中组合。因此，在本公开文本的一些实施方案中，试剂盒包含在一个容器中（例如，在无菌玻璃或塑料小瓶中）的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在另一个容器中（例如，在无菌玻璃或塑料小瓶中）的另一治疗剂。

[0178] 在另一个实施方案中，试剂盒包含以药物组合物形式并且任选地在单个共同容器中一起配制的本文所述的组合物（包含本公开文本的一种或多种核酸构建体（例如，载体或srRNA分子）、重组细胞和/或重组多肽）与一种或多种其他治疗剂组合的组合。

[0179] 如果试剂盒包含用于向受试者肠胃外施用的药物组合物，则试剂盒可以包含用于

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。

[0180] 在一些实施方案中,试剂盒可以进一步包含使用试剂盒的组分来实践本文公开的方法的说明书。例如,试剂盒可以包含含有关于试剂盒中的药物组合物和剂型的信息的包装插页。通常,这样的信息帮助患者和医生有效且安全地使用经封装的药物组合物和剂型。例如,可以在插页中提供以下关于本公开文本的组合的信息:药代动力学、药效学、临床研究、功效参数、适应证和用法、禁忌证、警告、注意事项、不良反应、用药过量、正确的剂量和施用、供应规格、正确的储存条件、参考、制造商/经销商信息和知识产权信息。

[0181] 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,说明书可以印刷在基材(如纸或塑料等)上。说明书可以作为包装插页存在于试剂盒中,可以存在于试剂盒或其组分的容器的标签中(例如,与包装或子包装相关)等。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存在。在一些情形下,真实的说明书不存在于试剂盒中,而是可以提供用于从远程源(例如,经由因特网)获得说明书的手段。此实施方案的例子是包含网址的试剂盒,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。

用于诱导免疫应答、预防或治疗健康状况的方法

[0182] 施用本文所述的任何一种组合物(例如,srRNA构建体、核酸构建体、重组细胞和/或药物组合物)可以用于治疗相关的健康状况,如增殖性疾病(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/或炎症性疾病。在一些实施方案中,如本文所述的srRNA构建体、核酸构建体、重组细胞和/或药物组合物可以用于在受试者中诱导药效学作用。在一些实施方案中,如本文所述的srRNA构建体、核酸构建体、重组细胞和/或药物组合物可以用于在有需要的受试者中调节(例如,引起或抑制)免疫应答。在一些实施方案中,可以将如本文所述的srRNA构建体、核酸构建体、重组细胞和/或药物组合物掺入治疗剂中,用于在治疗患有、疑似患有、或者可能有高风险患上一种或多种相关健康状况或疾病的受试者的方法中使用。示例性健康状况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、炎症性疾病、基因疗法、基因置换、心血管疾病、年龄相关性病状、罕见疾病、急性感染和慢性感染。在一些实施方案中,受试者是在医生护理下的患者。

[0183] 适用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、急性炎症性疾病、自身免疫性肾上腺炎、慢性炎症性脱髓鞘性多发性神经病(CIDP)、兰伯特-伊顿综合征、硬化性苔癣、莱姆病、格雷夫斯病、白塞病、梅尼埃病、反应性关节炎(赖特综合征)、许尔-斯特劳斯综合征、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、薛根森综合征(Sjögensen syndrome)、硬皮病、乳糜泻、僵人综合征、大动脉炎、短暂缺血性不耐症、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、古德帕斯丘综合征、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、多腺体自身免疫性综合征、特发性肺纤维化、特发性血小板减少性紫癜 (ITP)、荨麻疹、自身免疫性不孕不育症、幼年型类风湿性关节炎、结节病和自身免疫性心肌病。

[0184] 适用于本公开文本的方法的感染的非限制性例子包括诸如以下的病毒的感染：人类免疫缺陷病毒 (HIV)、乙型肝炎病毒 (HBV)、乙型肝炎病毒 (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。适用于本公开文本的方法的另外的感染包括诸如以下的细胞内寄生虫的感染：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、李斯特菌属 (*Listeria*)、弓形虫属 (*Toxoplasma*) 和锥虫属 (*Trypanosoma*)。在一些实施方案中，srRNA 构建体、核酸构建体、重组细胞和/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、白细胞粘附缺陷症、多发性硬化、雷诺综合征、舍格伦综合征、幼年型糖尿病、赖特病、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、红斑狼疮、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、急性传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、创伤、脓毒症、脑卒中/脑水肿、缺血-再灌注损伤和丙型肝炎。

[0185] 适用于本公开文本的方法的炎性疾病的非限制性例子包括诸如哮喘、炎性肠病 (IBD)、慢性结肠炎、脾肿大和类风湿性关节炎的炎性疾病。

[0186] 在一个方面，本文提供了用于在受试者中诱导药效学作用的方法，所述方法包括向所述受试者施用包含以下中的一种或多种的组合物：(a) 如本文所述的复制子，例如，自复制RNA (srRNA) 构建体；(b) 如本文所述的核酸；(c) 如本文所述的重组细胞；以及 (d) 如本文所述的药物组合物。在一些实施方案中，药效学作用包括在受试者中引起免疫应答。

[0187] 在另一个方面，本文提供了用于预防或治疗受试者的健康状况的方法，所述方法包括向受试者预防性地或治疗性地施用包含以下中的一种或多种的组合物：(a) 如本文所述的复制子，例如自复制RNA (srRNA) 构建体；(b) 如本文所述的核酸；(c) 如本文所述的重组细胞；以及 (d) 如本文所述的药物组合物。

[0188] 如本文所述的用于在受试者中诱导药效学作用和/或预防和/或治疗受试者的健康状况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，所施用的组合物在受试者中诱导一种或多种促炎性分子的产生。在一些实施方案中，一种或多种促炎性分子包括干扰素 γ (IFN γ)、细胞因子、TNF- α 、GM-CSF、和MIP1 α 、颗粒酶B、颗粒酶A、穿孔素或其中任何项的组合。在一些实施方案中，受试者先前已经用一种或

多种疗法治疗,并且已经对所述一种或多种疗法产生至少部分耐药性。在一些实施方案中,所述一种或多种疗法中的至少一种包括小分子。在一些实施方案中,所述健康状况是增殖性障碍、炎性障碍、自身免疫性障碍或微生物感染。在一些实施方案中,所述受试者患有或疑似患有与增殖性障碍、炎性障碍、自身免疫性障碍或微生物感染相关的健康状况。在一些实施方案中,所述增殖性障碍是癌症。在一些实施方案中,所述癌症是乳腺癌。

[0189] 适合于本公开文本的方法的乳腺癌的非限制性例子包括乳腺导管癌、乳腺小叶癌、乳腺未分化癌、乳腺小叶肉瘤、乳腺血管肉瘤和原发性乳腺淋巴瘤。乳腺癌可以包括I期、II期、IIIA期、IIIB期、IIIC期和IV期乳腺癌。乳腺导管癌可以包括侵袭性癌症类型、以腺内组分为主的侵袭性原位癌、炎性乳腺癌和乳腺导管癌。乳腺导管癌可以包括以原位组分为主的侵袭性小叶癌、侵袭性小叶癌和浸润性小叶癌。乳腺癌可以包括佩吉特病、乳房外佩吉特病、佩吉特病伴腺内癌和佩吉特病伴侵袭性导管癌。乳腺癌可以包括具有组织学和超结构异质性(例如,混合细胞类型)的乳腺肿瘤。乳腺癌可以被分类为基底细胞样、管腔A型、管腔B型、ERBB2/Her2+或正常乳腺样分子亚型。

[0190] 在一些实施方案中,所公开的组合物可以配制成与其预期的施用途径相容。例如,本公开文本的srRNA构建体、核酸构建体、重组细胞和/或药物组合物可以口服、通过吸入或通过肠胃外途径给予。肠胃外施用途径的例子包括例如肌内、瘤内、眼内、静脉内、结内、皮内、皮下、透皮(局部)、经粘膜、阴道内和直肠施用。在一些实施方案中,肌内施用组合物。在一些实施方案中,瘤内施用组合物。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、不挥发油、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、磷酸盐、tris、蔗糖;以及用于调节张力的试剂,如氯化钠或右旋糖。可以用酸或碱(如磷酸二氢钠和/或磷酸氢二钠、盐酸或氢氧化钠)调节pH(例如,调节至pH为约7.2-7.8,例如7.5)。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。

[0191] 可以每天施用一次或多次至每周一次或多次(包括每隔一天施用一次)本文所述的组合物,例如srRNA构建体、核酸构建体、重组细胞和/或药物组合物。用治疗有效量的本公开文本的主题srRNA构建体、核酸构建体、重组细胞和/或药物组合物治疗受试者可以包括单次治疗,或者可以包括一系列治疗。在一些实施方案中,以每周间隔施用组合物,例如以1至2、2至3或3至4周间隔给予1至2、2至3或3至4剂。这之后可以每1、2、3或4个月进行另外的施用。在一些实施方案中,可以以3至4周间隔肌内施用3剂,随后每3个月进行肌内施用。可替代地,可以以较短间隔施用组合物,例如每8小时施用持续五天,随后是2至14天(例如,9天)的休息期,随后另外五天每8小时施用。关于srRNA构建体和核酸构建体,本公开文本的srRNA构建体和核酸构建体的治疗有效量(例如,有效剂量)取决于所选择的srRNA构建体和核酸构建体。

[0192] 如上文所讨论,治疗有效量包括治疗组合物当施用于受试者时足以促进特定作用的量,所述受试者如患有、怀疑患有或有风险患上健康状况(例如,癌症)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症状的发展、改变疾病症状的进程(例如但不限于减缓疾病症状的进展)或逆转疾病症状的量。

[0193] 如果疾病的至少任何一种或全部体征或症状得到改进或改善,则治疗被认为是

效的治疗。也可以通过如住院治疗或对医疗干预的需要所评估的个体恶化的失败(例如,疾病进展停止或至少减缓)来测量功效。测量这些指标的方法是本领域技术人员已知的和/或在本文中有描述。治疗包括对受试者或动物(一些非限制性例子包括人或哺乳动物)的任何治疗,并且包括:(1)抑制疾病,例如停止或减缓症状的进展;或(2)缓解疾病,例如导致症状消退;以及(3)预防症状的发展或降低其可能性。

[0194] 在一些实施方案中,可以将本公开文本的srRNA构建体、核酸构建体、重组细胞和/或药物组合物以具有药学上可接受的载体的组合物并且以有效刺激免疫应答的量施用于受试者。通常,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,随后给予加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并且经刺激受试者的免疫应答所必需的时间段施用最初的一系列注射和随后的加强剂。在所公开的方法的一些实施方案中,受试者是哺乳动物。在一些实施方案中,哺乳动物是人类受试者。

[0195] 如上文所述,适用于注射使用的药学上可接受的载体包括无菌水性溶液(在水溶性的情况下)或分散液以及用于临时制备无菌可注射溶液或分散液的无菌粉末。在这些情况下,组合物必须是无菌的并且必须是易于注射的程度的流体。组合物在制造和储存的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)的污染作用而被保存。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,可以通过使用包衣(如卵磷脂)、通过在分散液的情况下维持所需的粒度以及通过使用表面活性剂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。

[0196] 无菌可注射溶液可以通过以下方式制备:将在适当溶剂中的所需量的srRNA构建体、核酸构建体、重组细胞和/或药物组合物视需要与上文所列举成分中的一种或组合合并,随后进行过滤灭菌。

[0197] 当srRNA构建体、核酸构建体、重组细胞和/或药物组合物如上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来施用。也可以将srRNA构建体、核酸构建体、重组细胞和/或药物组合物和其他成分封装在硬壳或软壳明胶胶囊中,压缩成片剂,或者直接掺入个体的饮食中。对于口服治疗施用,活性化合物可以与赋形剂合并并且以可摄入片剂、口含片剂、锭剂、胶囊剂、酏剂、混悬剂、糖浆剂、糯米纸囊剂(wafer)等形式使用。

另外的疗法

[0198] 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)组合地施用于受试者。在一些实施方案中,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,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,将第一疗法和第二疗法伴随施用。在一些实施方案中,将第一疗法与第二疗法同时施用。在一些实施方案中,将第一疗法和第二疗法依序施用。在一些实施方案中,在第二疗法之前施用第一疗法。在一些实施方案中,在第二疗法之后施用第一疗法。在一些实施方案中,在第二疗法之前和/或之后施用第一疗法。在一些实施方案中,将

第一疗法和第二疗法轮流施用。在一些实施方案中,将第一疗法和第二疗法以单一配制品一起施用。

实施例

[0199] 除非另外指示,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Russel,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。

[0200] 在以下实施例中进一步详细公开了另外的实施方案,所述实施例仅通过说明的方式提供,并不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

用于疫苗应用的编码srRNA构建体的EEEV载体的构建

[0201] 本实施例描述了为了构建基础EEEV载体(例如,不含异源基因)而进行的实验,所述基础EEEV载体随后用于构建表达一种或多种目的基因(例如,ESR1或其变体、PI3K或其变体、HER2或其变体和HER3或其变体)的EEEV载体。

[0202] 如下构建基础EEEV载体(即,不含目的异源基因):从参考序列(Genbank EF151502)进行几个修饰以四个约4kb的部分(Twist Bioscience)从头合成基础EEEV载体。掺入沉默突变G301A、A3550C、G4516A、G5725A和G7399A以消除限制性内切酶切割位点。掺入独特的限制性内切酶切割位点(SpeI,5' -A' CTAG,T-3')代替天然EEEV结构基因的编码序列(其中5' A匹配结构多蛋白ATG起始密码子的位置,并且3' T匹配结构多蛋白终止密码子TAA的位置)。将5' 衔接子序列(5' -CTGGAGACGTGGAGGAG AACCTGGACCT-3';SEQ ID NO:5)插入SpeI位点的上游,并将3' 衔接子序列(5' -GACCGCTACGCCCCAATGACCCGACCAGC-3';SEQ ID NO:6)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)。噬菌体T7 RNA聚合酶启动子(5' -TAATACGACTCACTATAG-3';SEQ ID NO:

7) 被包括在EEEV基因组序列的上游,并且在下游含有聚(A)序列,随后是SapI位点,其在识别位点的上游进行切割。紧接SapI位点下游的是T7终止子序列(5'-AACCCCTCTCTAAACGGAGGGGTTTTTTT-3';SEQ ID NO:8),随后是独特的限制性内切酶切割位点(NotI,5'-GC'GGCC,GC-3')。将这些部分在五件式(five-piece)Gibson Assembly®反应(线性化的pYL骨架和四个合成片段)中合并以产生EEEV基础载体。

[0203] 如下进行含有异源基因的EEEV载体的构建:通过SpeI消化将基础EEEV基础载体线性化。对ESR1、PI3K、HER2和HER3变体进行密码子优化/重构,以用于计算机模拟人表达,并且与EMCV IRES一起从头合成(GeneArt, IDT)。使用将5'和3'衔接子序列添加至基因末端的引物或将P2A序列和/或同源序列添加至相邻基因插入片段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

编码疫苗srRNA构建体的EEEV载体的体外评价

[0204] 本实施例描述了为了评价上文实施例1中描述的合成EEEV srRNA构建体的表达水平以及为了研究其任何差异性行为(例如,复制和蛋白质表达)而进行的体外实验的结果。

[0205] 体外转录:利用5' ARCA帽(HiScribe™T7 ARCA mRNA试剂盒,NEB)或通过无帽转录(HiScribe™T7高产量RNA合成试剂盒,NEB)随后添加5'帽1(牛痘病毒加帽系统,mRNA帽2'-O-甲基转移酶,NEB)采用噬菌体T7聚合酶通过从SapI线性化的质粒模板体外转录来制备RNA。然后使用苯酚/氯仿提取或柱纯化(Monarch®RNA清除试剂盒,NEB)来纯化RNA。通过在260nm处的吸光度(Nanodrop,Thermo Fisher Scientific)测定RNA浓度。

[0206] 复制:通过电穿孔将RNA转化到BHK-21或Vero细胞中(例如,4D-Nucleofector™,Lonza)。在转化后15-22小时,将细胞固定并透化(eBioscience™Foxy3/转录因子染色缓冲液组,Invitrogen),并且使用PE缀合的抗dsRNA小鼠单克隆抗体(J2,Scicons)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dsRNA的平均荧光强度(MFI)。

[0207] 蛋白质表达:通过电穿孔将RNA转化到BHK-21或Vero细胞中(例如,4D-Nucleofector™,Lonza)。ESR1:在转化后15-22小时,收集细胞,并且使其在RIPA缓冲液中裂解。将裂解物蛋白质浓度归一化,然后用抗ERα兔抗体(A300-497A,Bethyl)在免疫印迹中探测,并且使用AF800缀合的抗兔山羊抗体(A32735,Thermo)成像(图3A)。使用来自自由表达ESR1的合成单基因EEEV复制子转化的细胞样品的荧光信号归一化表达水平,以评价来自一组双基因和四基因复制子的相对ESR1表达(图3B)。PI3K:在转化后15-22小时,收集细胞,并且使其在RIPA缓冲液中裂解。将裂解物蛋白质浓度归一化,然后用抗PI3KCA兔抗体(PA587398,Thermo)在免疫印迹中探测,并且使用AF800缀合的抗兔山羊抗体(A32735,Thermo)成像(图3C)。使用来自自由表达PI3K的合成单基因EEEV复制子转化的细胞样品的荧光信号归一化表达水平,以评价来自一组双基因和四基因复制子的相对PI3K表达(图3D)。HER2:在转化后15-22小时,将细胞固定并透化(eBioscience™Foxy3/转录因子染色缓冲液组,Invitrogen),并且使用AF488缀合的抗HER2小鼠单克隆抗体(24D2,Biolegend)染色。将AF488的平均荧光强度(MFI)用作HER2表达的读数。使用由表达HER2的合成单基因EEEV复制子转化的细胞的MFI归一化表达水平,以评价来自一组双基因和四基因复制子的相对HER2表达(图3E)。HER3:在转化后15-22小时,将细胞固定并透化(eBioscience™Foxy3/转录因子染色缓冲液组,Invitrogen),并且使用APC缀合的抗HER3小鼠单克隆抗体(1B4C3,

Biolegend) 染色。将APC的平均荧光强度(MFI) 用作HER3表达的读数。使用由表达HER3的合成单基因EEEV复制子转化的细胞的MFI归一化表达水平,以评价来自一组双基因和四基因复制子的相对HER3表达(图3F)。将归一化的来自四基因复制子的ESR1、PI3K、HER2和HER3表达数据在蜘蛛图上可视化(图3G)。

实施例3

编码疫苗srRNA构建体的EEEV载体的体内评价

[0208] 本实施例描述了为了评价用本文所述的合成EEEV复制子构建体(例如,未配制的载体和LNP配制的载体)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。

[0209] 在这些实验中,设计衍生自EEEV毒株FL93-939的合成复制子构建体,随后对其进行评价。

[0210] 小鼠和注射。BALB/c小鼠购自Charles River Labs、Envigo或Jackson Laboratories。在给药当天,将0.01-10 μ g之间的材料肌内注射到一块股四头肌肌肉中或分开肌内注射到两块股四头肌肌肉中。以在盐水中未配制的形式或LNP配制的形式施用载体。在整个研究过程中,对动物进行体重监测和其他综合观察。对于免疫原性研究,仅在第0天或第0天和第21天向动物给药。

[0211] LNP配制品。将复制子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)和包封率。将脂质悬浮于乙醇中。对于C12-200,将RNA以172 μ g/ml的浓度悬浮于10mM柠檬酸盐缓冲液(pH 5.0)中,并且以3:1(水性:有机)的流速混合。对于L2,将RNA以82 μ g/ml的浓度悬浮于250mM NaOAc(pH 4.0)中,并且以3:1(水性:有机)的流速混合。

[0212] ELISpot。为了测量ESR1、HER2和HER3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 5×10^6 个细胞/mL的浓度,所述培养基含有源自ESR1、HER2和HER3的肽、作为阳性对照的PMA/离子霉素或作为模拟刺激的DMSO。

接头的评价

[0213] 在肌内注射编码不同序数且通过不同接头相互连接的ESR1突变的单基因复制子RNA后14天如通过对应于应答者脾T细胞的斑点形成单位所测量的小鼠IFN γ 检测ELISpot测定的结果在图2中示出。在含有K303R、E380Q、Y537C、Y537S、Y537N和D538G突变的ESR1抗原盒中以不同序数测试AAY、EAAAK(SEQ ID NO:1)、RVRR(SEQ ID NO:2)、GGGS(SEQ ID NO:3)和GPGPG(SEQ ID NO:4) 接头。每个盒的列对应于以下刺激条件,其中单个肽的顺序为K303R、E380Q、Y537N、Y537S、Y537C、D538G、野生型ESR1和培养基。总T细胞应答(绘制为每百万个细胞计数的斑点形成单位)显示在Y轴上。GGGS(SEQ ID NO:3) 接头序数产生最稳健的T细胞应答。

基因的数量和序数的评价

[0214] 在两次肌内注射编码ESR1、HER2和HER3的复制子RNA后第35天如通过对应于应答者脾T细胞的斑点形成单位所测量的小鼠IFN γ 检测ELISpot测定的结果在图4中示出。对具有ESR1、PI3K、HER2和HER3的不同序数和连接序列的呈单基因、双基因或四基因形式的不同构建体进行测试,以确定构建体中的哪种基因配置在刺激时产生最稳健的T细胞应答。Y轴示出了总T细胞应答。在此实验中未测量PI3K应答,因为它在BALB/c小鼠中不形成应答。

基因和脂质配制品的序数的评价

[0215] 在两次肌内注射编码ESR1、PI3K、HER2和HER3的复制子RNA(在盐水中,或在两种不同的LNP组合物L1或L2中配制)后第35天如通过对应于应答者脾T细胞的斑点形成单位所测量的小鼠IFN γ 检测ELISpot测定的结果在图6中示出。对具有不同复制子载体骨架的不同四基因构建体进行测试,以确定哪种RNA复制子载体和配制品在刺激时产生最稳健的T细胞应答。

实施例4

雌激素受体阳性乳腺癌功效

[0216] 两种功效模型在图7中示出,以模拟两种临床场景。在治疗模型中,首先植入表达被疫苗靶向的耐药性突变的肿瘤细胞系。随后进行疫苗接种。这模拟治疗具有预先存在的突变的患者的场景。在预防模型中,进行疫苗接种,之后植入编码疫苗中包含的耐药性突变的肿瘤细胞系。此场景模拟在获得性突变出现之前治疗患者。编码由肿瘤细胞系表达的一种或多种突变的复制子RNA的施用应当在小鼠中引发稳健的T细胞应答,这将导致肿瘤生长的延迟。如果肿瘤生长未被延迟,则有可能是肿瘤细胞系已经进化到失去靶向突变,表明复制子RNA能够通过免疫系统施加选择压力以失去激活突变。

实施例5

用于生物治疗应用的编码srRNA构建体的基础甲病毒载体的构建

[0217] 本实施例描述了为了构建基础甲病毒载体(例如,不含异源基因)而进行的实验,所述基础甲病毒载体随后用于构建表达一种或多种目的基因(例如,IL-12p35亚基或其功能变体、IL-12p40亚基或其功能变体、以及IL-1RA或其功能变体)的载体。

EEEV基础载体

[0218] 如下构建基础EEEV载体(即,不含目的异源基因):从参考序列(Genbank EF151502)进行几个修饰以四个约4kb的部分(Twist Bioscience)从头合成基础EEEV载体。掺入沉默突变G301A、A3550C、G4516A、G5725A、G7399A突变以消除限制性酶切位点。掺入独特的限制性内切酶切割位点(SpeI, 5' -A' CTAG, T-3')代替天然EEEV结构基因的编码序列(其中5' A匹配结构多蛋白ATG起始密码子的位置,并且3' T匹配结构多蛋白终止密码子TAA的位置)。将5' 衔接子序列(5' -CTGGAGACGTGGAGGAG AACCTGGACCT-3'; SEQ ID NO:5)插入SpeI位点的上游,并将3' 衔接子序列(5' -GACCGCTACGCCCCAATGACCCGACCAGC-3'; SEQ ID NO:6)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)。噬菌体T7 RNA聚合酶启动子(5' -TAATACGACTCACTATAG-3'; SEQ ID NO:7)被包括在EEEV基因组序列的上游,并且在下游含有聚(A)序列,随后是SapI位点,其在识别位点的上游进行切割。紧接SapI位点下游的是T7终止子序列(5' -AACCCTCTCTAAAC GGAGGGGTTTTTTT-3'; SEQ ID NO:8),随后是独特的限制性内切酶切割位点(NotI, 5' -GC' GGCC, GC-3')。将这些部分在五件式(five-piece)Gibson Assembly®反应(线性化的pYL骨架和四个合成片段)中合并以产生EEEV基础载体。

CHIKV基础载体

[0219] 从具有沉默A5366G突变且具有独特的限制性内切酶切位点(SpeI, 5' -A' CTAG, T-3')的参考序列(Genbank AF369024)以四个约4kb的部分(Twist Bioscience, Thermo Fisher GeneArt)从头合成基础CHIKV S27载体,所述独特的限制性酶切位点替代CHIKV结

构基因的编码序列(其中5' A与结构多蛋白的ATG起始密码子的位置匹配,并且3' T与结构多蛋白的终止密码子TAA的位置匹配)。将5' 衔接子序列(5' -

CTGGAGACGTGGAGGAGAACCCTGGACCT-3';SEQ ID NO:5)插入SpeI位点的上游,并将3' 衔接子序列(5' -GACCGCTACGCCCCAATGACCCGACCAGC-3';SEQ ID NO:6)插入SpeI位点的下游,用于随后的Gibson **Assembly**®程序。噬菌体T7 RNA聚合酶启动子(5' -TAATACGACTCACTATAG-3';SEQ ID NO:7)被包括在CHIKV基因组序列的上游,并且在下游含有聚(A)序列,随后是SapI位点,其在识别位点的上游进行切割。紧接SapI位点下游的是T7终止子序列(5' -AACCCCTCTCTAAACGGAGGGGTTTTTTT-3';SEQ ID NO:8),随后是独特的限制性内切酶切割位点(NotI,5' -GC' GGCC,GC-3')。将所述部分在五件式Gibson **Assembly**®反应(线性化的pYL骨架和四个合成片段)中合并以产生CHIKV S27基础载体。

[0220] CHIKV DRDE基础载体类似地由参考序列(Genbank EF210157)构建,不同之处在于使用S27 3' UTR替代DRDE 3' UTR。

SINV基础载体

[0221] 从具有独特的限制性酶切割位点(SpeI,5' -A' CTAG,T-3')的Girdwood毒株参考序列(Genbank MF459683)以四个约4kb的部分(Twist Bioscience,Thermo Fisher GeneArt)从头合成基础SINV Girdwood载体,该独特的限制性酶切割位点替代SINV结构基因的编码序列(其中5' A是在结构多蛋白基因的核苷酸93之后的P2A序列之后的下一个核苷酸,并且3' T与结构多蛋白的终止密码子TGA的位置匹配)。噬菌体T7 RNA聚合酶启动子(5' -TAATACGACTCACTATAG-3';SEQ ID NO:7)被包括在SINV基因组序列的上游,并且在下游含有聚(A)序列,随后是SapI位点,其在识别位点的上游进行切割。紧接SapI位点下游的是T7终止子序列(5' -AACCCCTCTCTAAACGGAGGGGTTTTTTT-3';SEQ ID NO:8),随后是独特的限制性内切酶切割位点(NotI,5' -GC' GGCC,GC-3')。将所述部分在五件式Gibson **Assembly**®反应(例如,线性化pYL骨架和四个合成片段)中组合以产生SINV Girdwood基础载体。

[0222] 基础SINV AR86载体类似地由参考序列(Genbank U38305)构建,不同之处在于nsP2编码序列源自Girdwood参考序列。

VEE基础载体

[0223] 从具有沉默A2087G突变和独特的限制性酶切位点(SpeI,5' -A' CTAG,T-3')的TC-83株参考序列(Genbank L01443)以四个约4kb的部分(Twist Bioscience,Thermo Fisher GeneArt)从头合成基础VEE载体,所述独特的限制性酶切位点替代VEE结构基因的编码序列(其中5' A是在结构多蛋白基因的核苷酸93之后的P2A序列之后的下一个核苷酸,并且3' T与结构多蛋白的终止密码子TGA的位置匹配)。将5' 衔接子序列(5' -CTGGAGACGTGGAGGAGAACCCTGGACCT-3';SEQ ID NO:5)插入SpeI位点的上游,并将3' 衔接子序列(5' -GACCGCTACGCCCCAATGACCCGACCAGC-3';SEQ ID NO:6)插入SpeI位点的下游,用于随后的Gibson **Assembly**®程序。噬菌体T7 RNA聚合酶启动子(5' -TAATACGACTCACTATAG-3';SEQ ID NO:7)被包括在VEE基因组序列的上游,并且在下游含有聚(A)序列,随后是SapI位点,其在识别位点的上游进行切割。紧接SapI位点下游的是T7终止子序列(5' -AACCCCTCTCTAAACGGAGGGGTTTTTTT-3';SEQ ID NO:8),随后是独特的限制性内切酶切割位点(NotI,5' -GC' GGCC,GC-3')。将所述部分在五件式Gibson **Assembly**®反应(例如,线性化pYL骨架和四个合成片段)中组合以产生VEE基础载体。

最终载体

[0224] 如下进行含有异源基因的载体的构建:通过SpeI消化将空基础载体线性化。对IL-12A、IL12-B、IL-1RN基因进行密码子优化/重构,以用于计算机模拟人表达,并且与EMCV IRES一起从头合成(IDT)。使用将5'和3'衔接子序列添加至基因末端的引物或将P2A序列和/或同源序列添加至相邻基因插入片段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6

编码生物治疗srRNA构建体的EEEV载体的体外评价

[0225] 本实施例描述了为了评价上文实施例5中描述的合成srRNA构建体的表达水平以及为了研究其任何差异性行为(例如,复制和蛋白质表达)而进行的体外实验的结果。

[0226] 体外转录:利用5' ARCA帽(HiScribe™T7 ARCA mRNA试剂盒,NEB)或通过无帽转录(HiScribe™T7高产量RNA合成试剂盒,NEB)随后添加5'帽1(牛痘病毒加帽系统,mRNA帽2'-O-甲基转移酶,NEB)采用噬菌体T7聚合酶通过从SapI线性化的质粒模板体外转录来制备RNA。然后使用苯酚/氯仿提取或柱纯化(Monarch®RNA清除试剂盒,NEB)来纯化RNA。通过在260nm处的吸光度(Nanodrop,Thermo Fisher Scientific)测定RNA浓度。

[0227] 复制:通过电穿孔将RNA转化到BHK-21或Vero细胞中(例如,4D-Nucleofector™,Lonza)。在转化后15-22小时,将细胞固定并透化(eBioscience™Foxp3/转录因子染色缓冲液组,Invitrogen),并且使用PE缀合的抗dsRNA小鼠单克隆抗体(J2,Scicons)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dsRNA的平均荧光强度(MFI)。

[0228] 通过ELISA确定的蛋白质表达:

[0229] 从用500ng的srRNA单基因或多基因构建体电穿孔的BHK-21细胞检测人IL-12p70和IL-1RA。在转染后大约24和48小时收获上清液,并用来自RnD系统的人IL-12p70(目录号DY1270)和来自RnD系统的人IL-1ra/IL-1F3 DuoSet ELISA(目录号DY280)测定所述上清液。

[0230] 生物活性测定:

[0231] 从用500ng的srRNA单基因或多基因构建体电穿孔的BHK-21细胞检测人IL-12p70和IL-1RA。在转染后大约24和48小时收获上清液,并用来自Promega的GloMax生物测定法测定IL-12(目录号JA2601)。按照制造商的方案,使用与4ng/ml IL1β(最终为1ng/mL)预孵育的IL-1β报告物HEK 293细胞(Invivogen,hkb-il1bv2)和来自转染的BHK细胞的上清液测定IL-1RA。

基因的数量和序数的评价

[0232] 从转染的BHK-21细胞测量的小鼠IL-12和IL-1RA检测ELISA测定的结果显示在图8A、图8B、图11A和图11B中。对具有IL-12亚基p35、IL-12亚基p40和IL-1RA的不同序数的呈单基因或多基因形式的不同构建体进行测试,以确定构建体中的哪种基因配置产生IL-12和IL-1RA的最稳健表达。Y轴示出了以ng/mL为单位的IL-12或IL-1RA浓度。图10示出了从每种测试的构建体测量的对应的IL-12和IL-1RA浓度。

[0233] 从用不同srRNA构建体转染的BHK-21细胞的上清液测量小鼠IL-12和IL-1RA检测生物活性,所述srRNA构建体在表达不同细胞因子受体的报告细胞上测试。结果示于图9A、图9B、图12A和图12B中。图13示出了从每种测试的构建体测量的对应的IL-12和IL-1RA生物

活性。

实施例7

编码生物治疗srRNA构建体的甲病毒载体的体内评价

[0234] 此实施例描述了为了评价本文所述的srRNA构建体(例如,未配制和LNP配制的载体)而进行的体内实验的结果。

[0235] 在这些实验中,设计并随后评价了源自各种甲病毒株的合成srRNA构建体。

[0236] 小鼠和注射。BALB/c小鼠购自Charles River Labs、Envigo或Jackson Laboratories。在给药当天,将0.01-40 μ g之间的材料肌内注射到一块股四头肌肌肉中或分开肌内注射到两块股四头肌肌肉中。以在盐水中未配制的形式或LNP配制的形式施用载体。在整个研究过程中,对动物进行体重监测和其他综合观察。对于药代动力学研究,仅在第0天对动物给药。

[0237] LNP配制品。将复制子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)和包封率。将脂质悬浮于乙醇中。对于L1,将RNA以172 μ g/ml的浓度悬浮于10mM柠檬酸盐缓冲液(pH 5.0)中,并且以3:1(水性:有机)的流速混合。对于L2,将RNA以82 μ g/ml的浓度悬浮于250mM NaOAc(pH 4.0)中,并且以3:1(水性:有机)的流速混合。

[0238] ELISA。为了测量IL-12和IL-1RA的血清浓度,根据制造商的方案,使用人IL-12p70 DuoSet ELISA(RnD系统目录号DY1270)和人IL-1ra ELISA试剂盒(Abcam,ab211650)进行ELISA分析。

基因和脂质配制品的序数的评价

[0239] 然后针对在小鼠血清中的蛋白质表达在体内在六种不同的srRNA载体中测试来自体外测定的两种最佳多基因配置。结果示于图14A和图14B中。观察到在一些情形下未检测到IL-1RA,这可能是由于蛋白质半衰期短所致。

[0240] 然后在不同配制品中测试多基因配置,并通过ELISA分析体内蛋白质表达。结果示于图15A和图15B中。

实施例8

具有异源非结构蛋白基因的经修饰的srRNA载体的体内评价

[0241] 此实施例描述了为了评价从多个LNP配制的srRNA表达构建体表达的目的多肽构建体(PCI)在疫苗接种后引起免疫应答并建立免疫保护的差异性功能而进行的体内实验的结果。

[0242] 在这些实验中,设计并随后评价了源自委内瑞拉马脑炎病毒(VEE.TC83)、基孔肯亚病毒毒株S27(CHIK.S27)和DRDE-06(CHIK.DRDE)、辛德比斯病毒毒株Girdwood(SIN.GW)和AR86-Girdwood杂交体1(SIN.AR86)以及东方马脑炎病毒(EEE.FL93)的合成srRNA构建体。

[0243] 小鼠和注射。雌性BALB/c小鼠购自Charles River Labs或Jackson Laboratories。在给药当天,将0.15-1.5 μ g之间的材料分开肌内注射到两块股四头肌肌肉中。用LNP配制载体。在整个研究过程中,对动物进行体重监测和其他综合观察。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天收集脾脏,并且在第14天和/或第35天分离血清。

[0244] LNP配制品。将srRNA使用微流体混合器配制在脂质纳米颗粒(LNP)中,并且分析粒度、多分散性(使用动态光散射)和包封率。LNP由可电离脂质、胆固醇、PEG-2K和DOPE构成。

[0245] 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 $1-5 \times 10^6$ 个细胞/mL的浓度,所述培养基含有对应于狂犬病病毒糖蛋白G的肽库、作为阳性对照的PMA/离子霉素或作为模拟刺激的DMSO。

[0246] 抗体。使用快速荧光灶抑制试验测量中和抗体对狂犬病病毒的反应。简言之,将血清稀释液与标准量的活狂犬病病毒混合并且孵育。如果存在中和抗狂犬病病毒抗体,它们将中和病毒。接着,添加培养的细胞,并且将血清/病毒/细胞一起孵育。未包被的狂犬病病毒(即,未被抗体中和的狂犬病病毒)将感染细胞,并且这可以通过显微术可视化。由在载玻片上观察到的病毒感染的细胞的百分比进行终点滴度的计算。

[0247] 两次免疫后通过用ELISpot评价抗原特异性脾T细胞应答(图16A)和来自血清的抗狂犬病中和抗体滴度(图16B)来评估编码病毒抗原(即狂犬病病毒糖蛋白G)的多个srRNA的体内免疫原性。与盐水对照相比,所有srRNA免疫的组都显示出稳健的T细胞应答(图16A),但是在srRNA疫苗之间观察到差异性应答。类似地,所有srRNA免疫的组都显示出保护性中和抗体滴度,但在srRNA疫苗之间存在一定差异(图16B)。

[0248] 虽然已经公开了本公开文本的特定替代方案,但应理解,各种修改和组合都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。

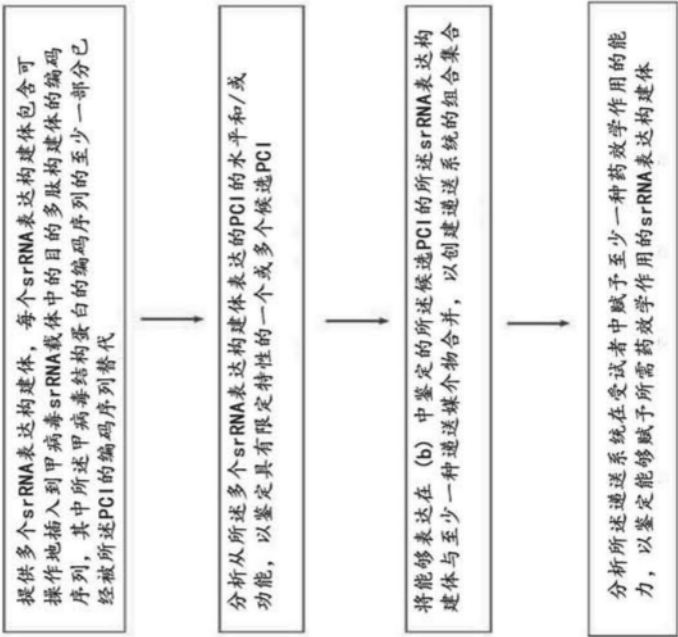


图1

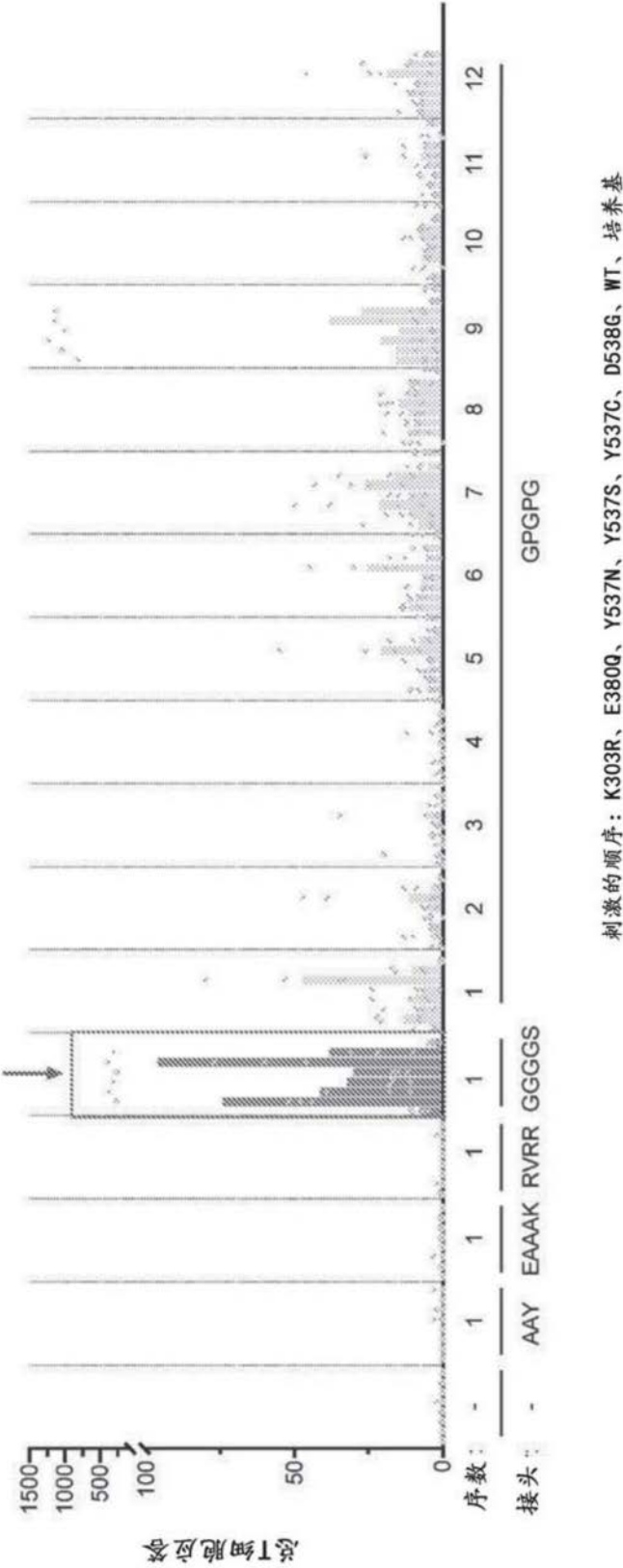


图2

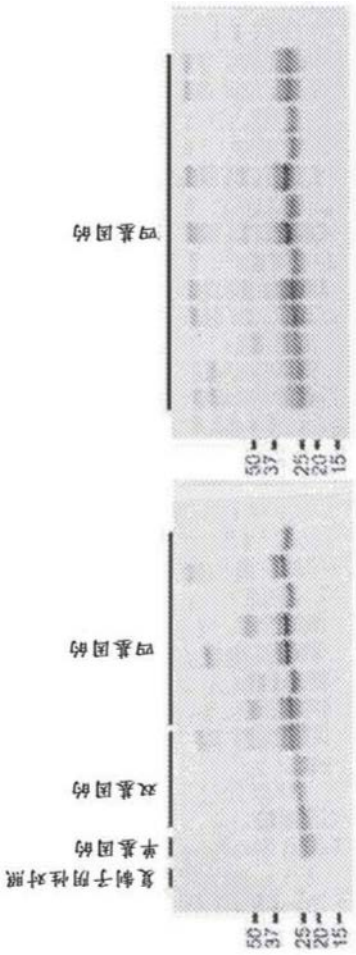


图3A

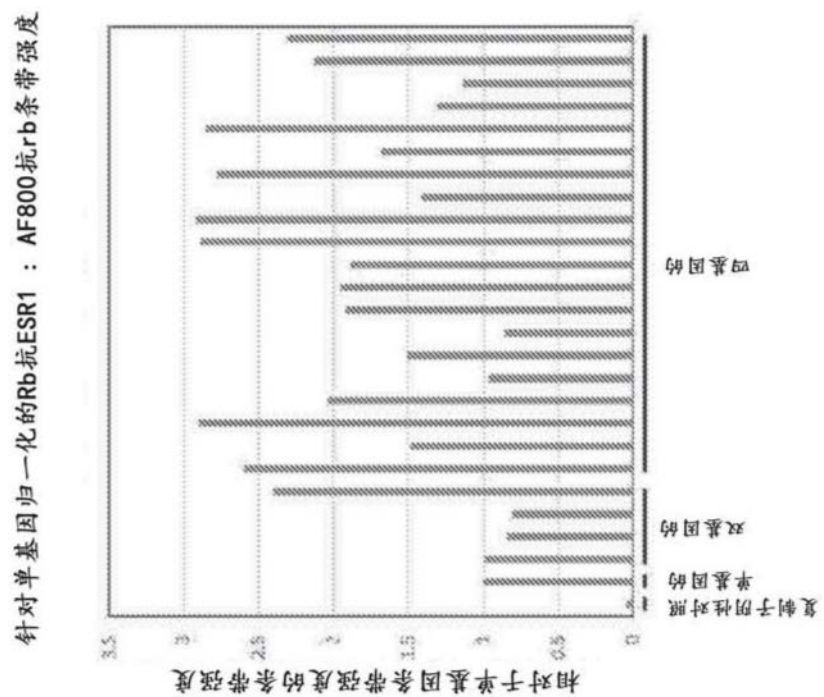


图3B

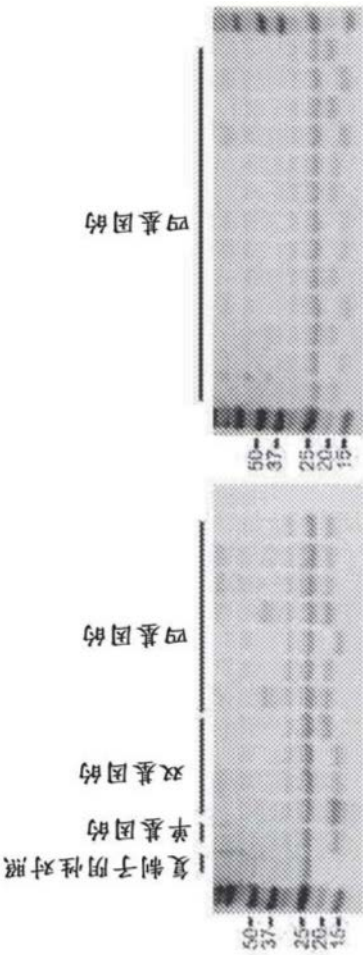


图3C

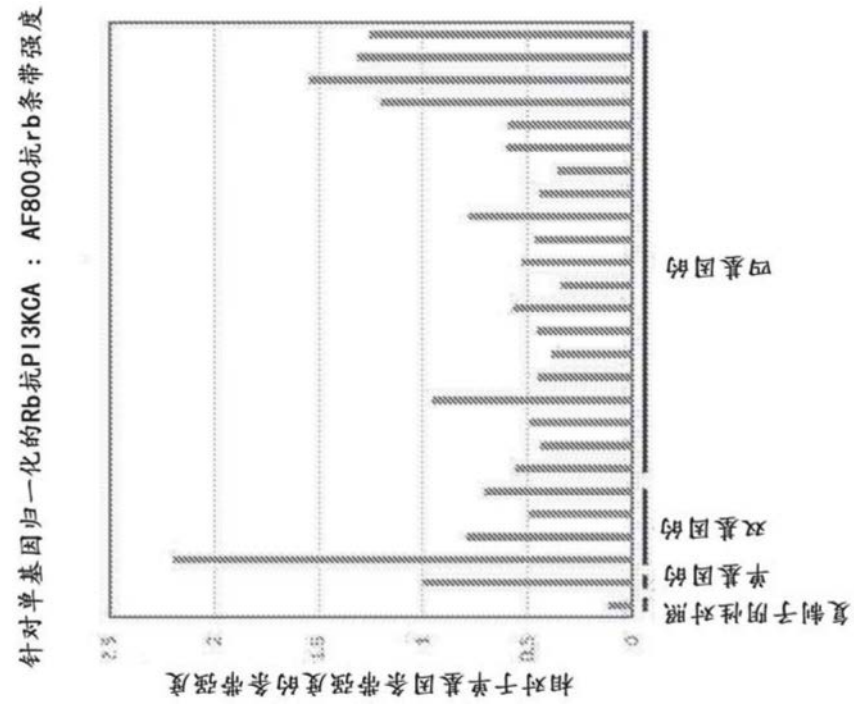


图3D

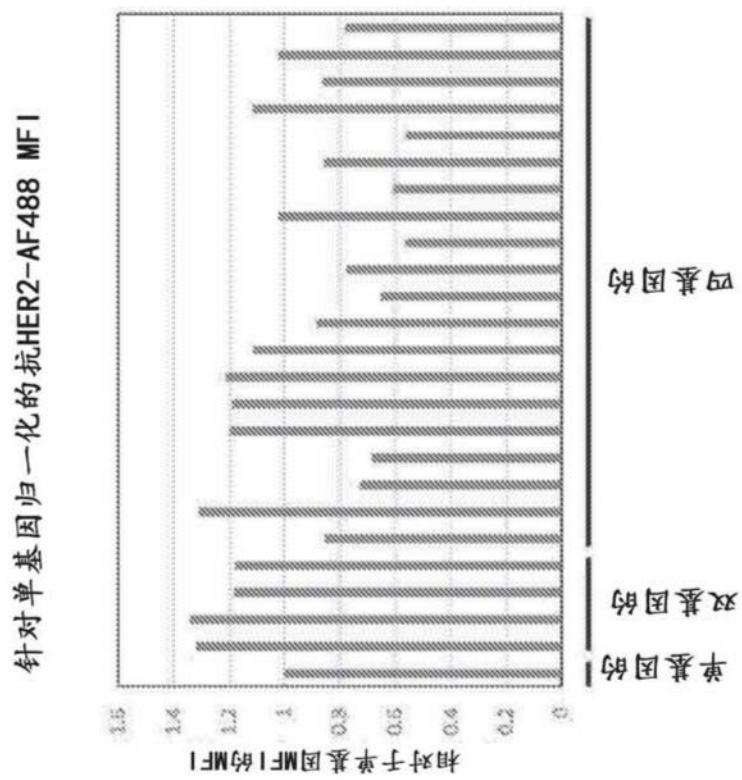


图3E

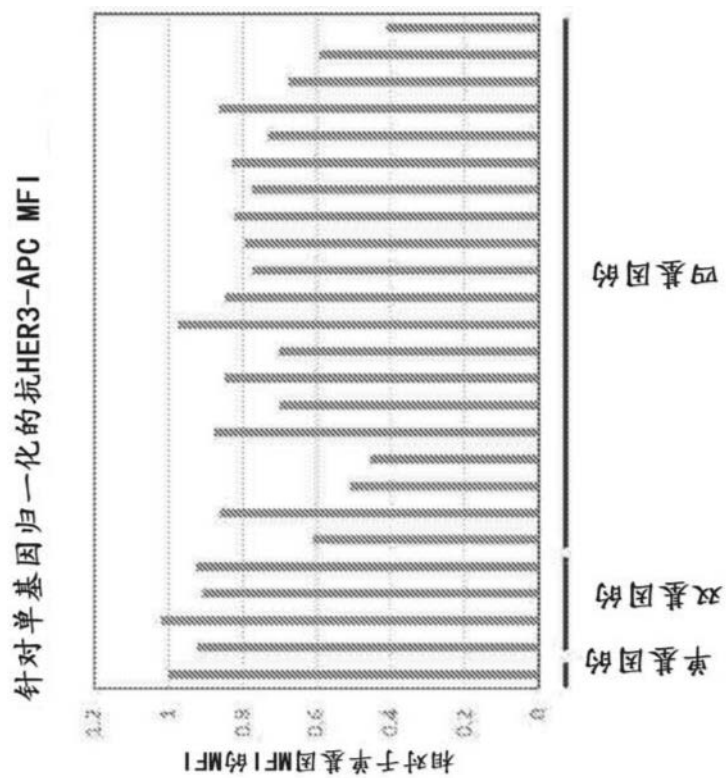


图3F

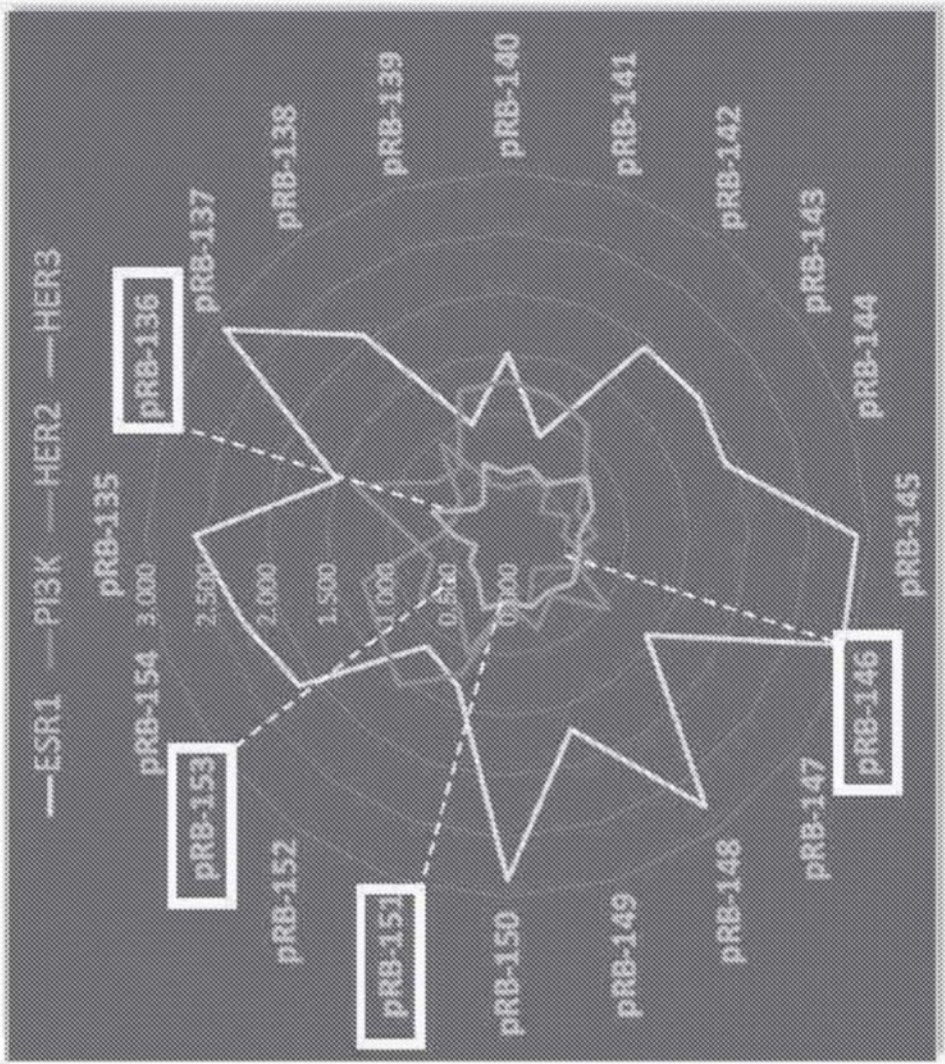


图3G

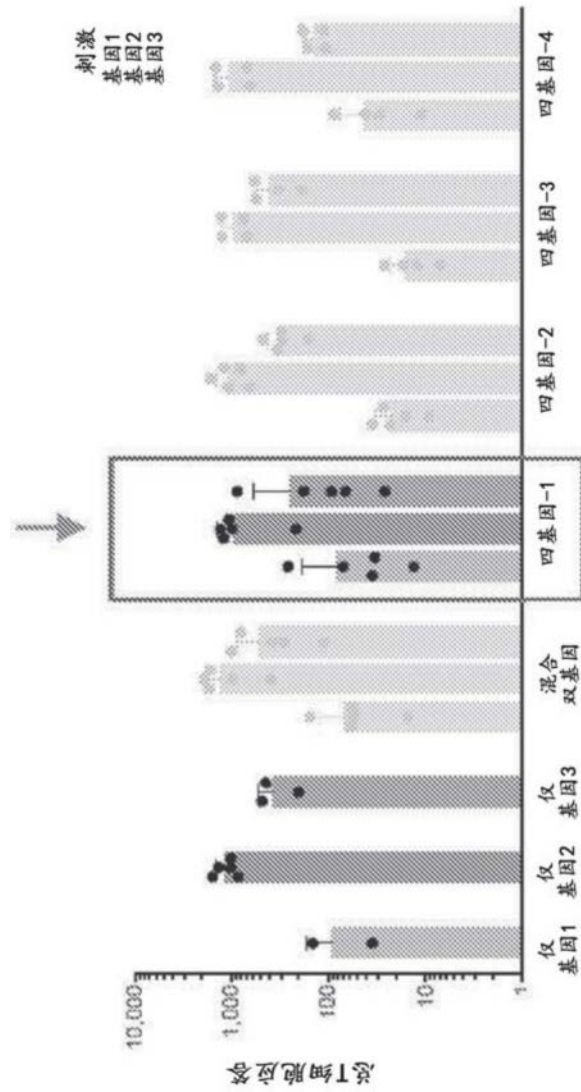


图4

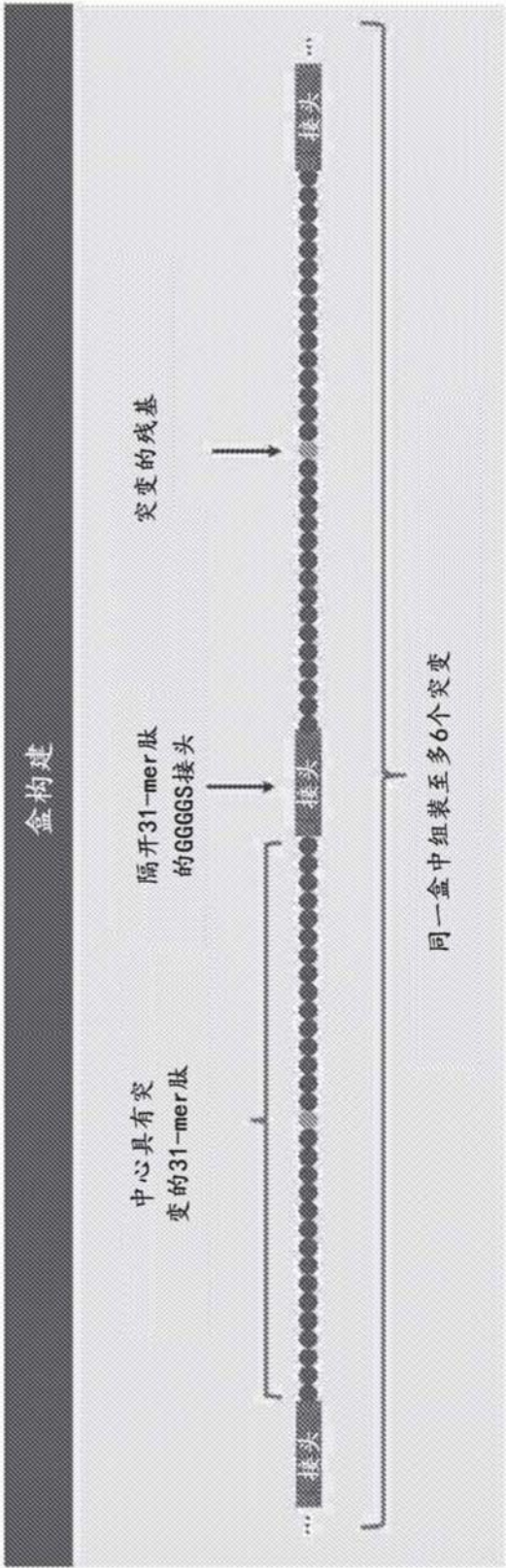


图5

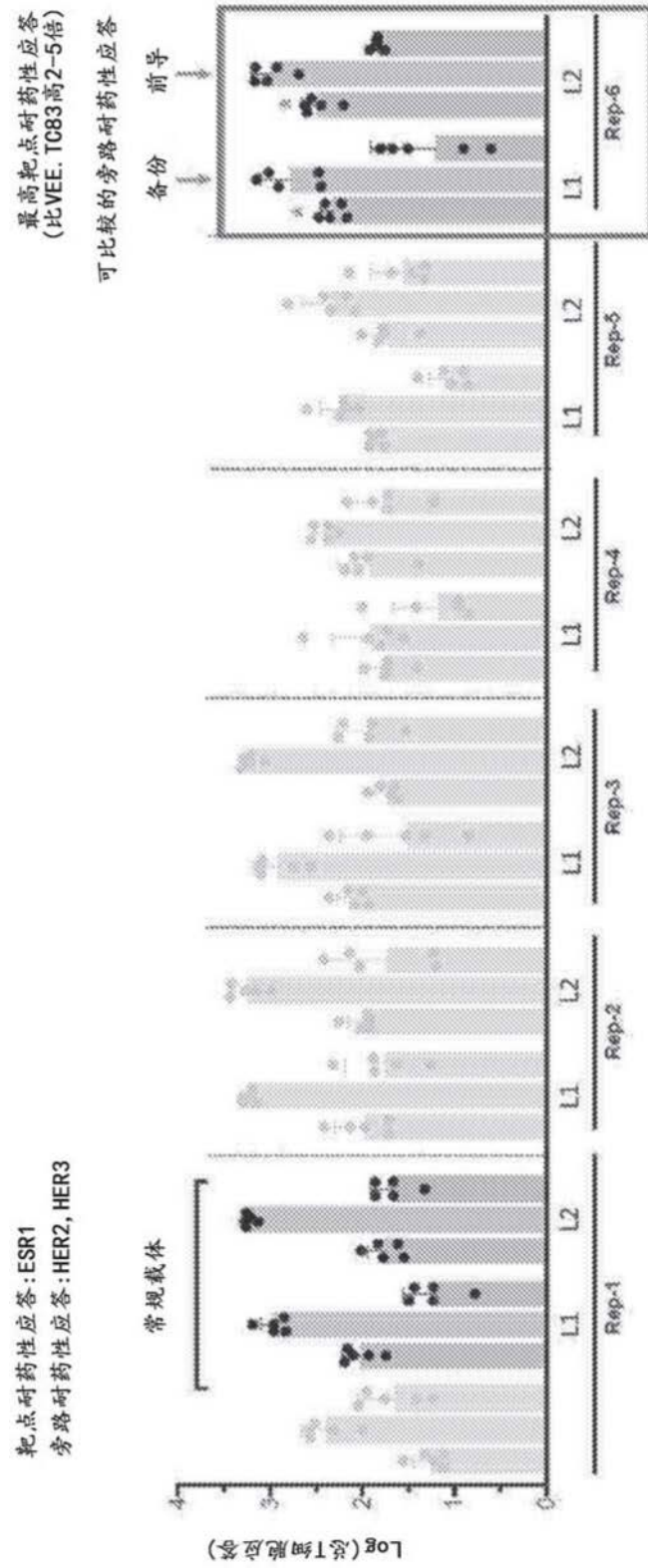


图6

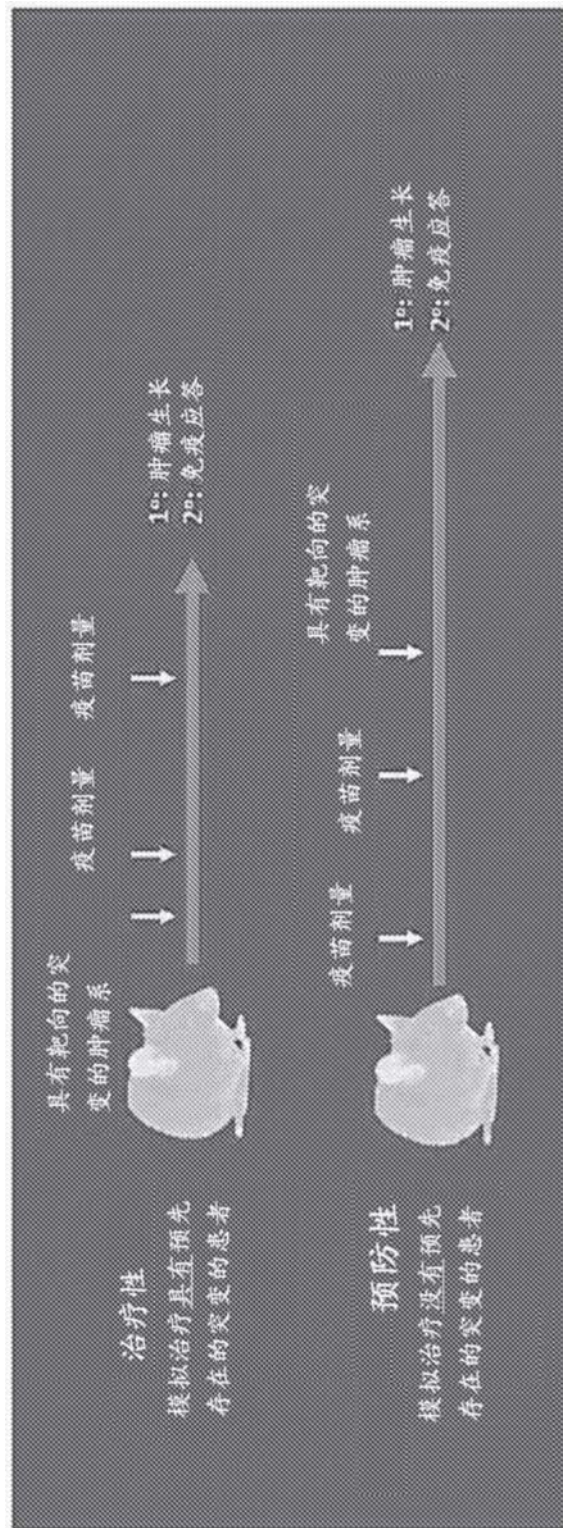


图7

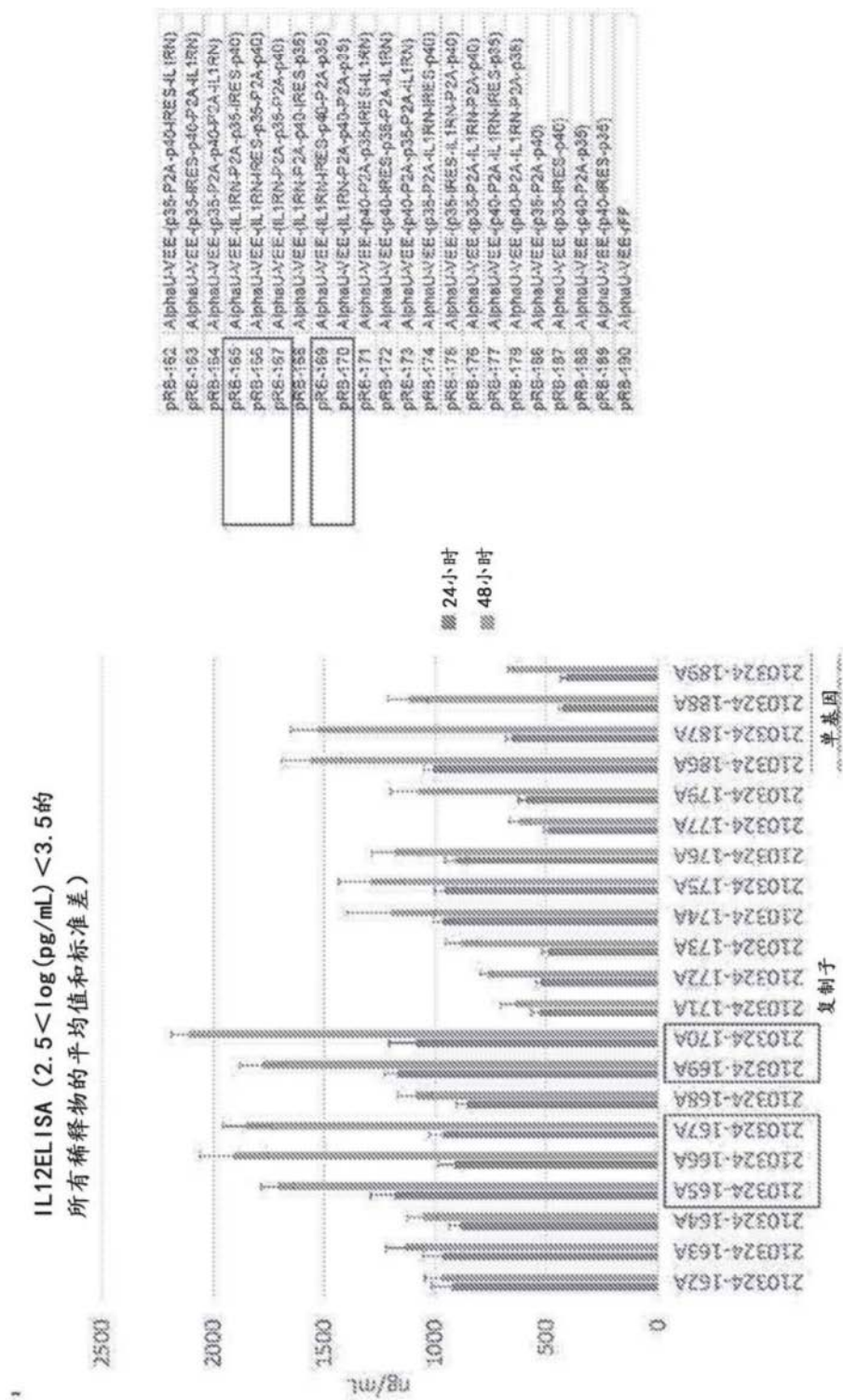


图8A

IL1raELISA (2.5<log (pg/mL)<3.5) 的所
有稀释物的平均值和标准差)

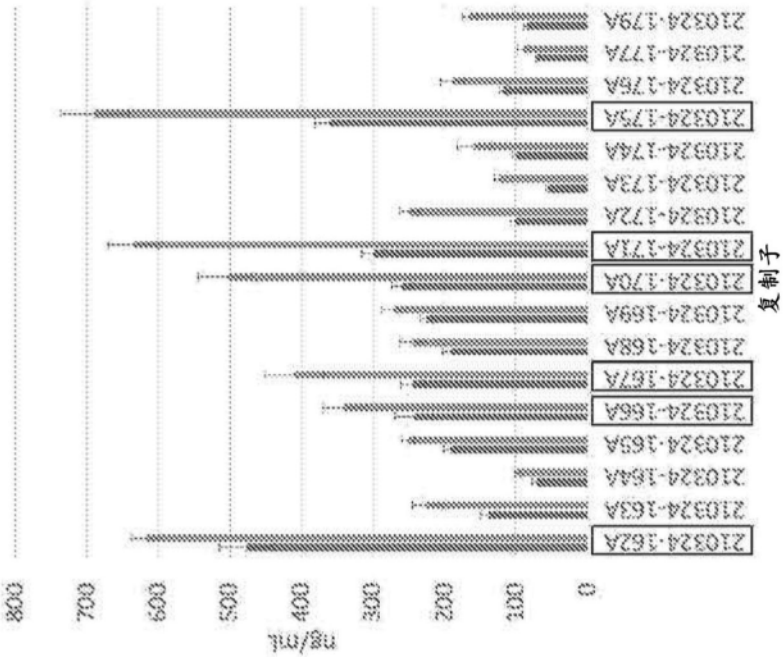


图8B

PRB-162	AlphaU-VEE-(p35-P2A-p40-IRES-IL1RN)
PRB-163	AlphaU-VEE-(p35-IRES-p40-P2A-IL1RN)
PRB-164	AlphaU-VEE-(p35-P2A-p40-P2A-IL1RN)
PRB-165	AlphaU-VEE-IL1RN-P2A-p35-IRES-p40
PRB-166	AlphaU-VEE-IL1RN-IRES-p35-P2A-p40
PRB-167	AlphaU-VEE-IL1RN-P2A-p35-P2A-p40
PRB-168	AlphaU-VEE-IL1RN-P2A-p40-IRES-p35
PRB-169	AlphaU-VEE-IL1RN-IRES-p40-P2A-p35
PRB-170	AlphaU-VEE-IL1RN-P2A-p40-P2A-p35
PRB-171	AlphaU-VEE-(p40-P2A-p35-IRES-IL1RN)
PRB-172	AlphaU-VEE-(p40-IRES-p35-P2A-IL1RN)
PRB-173	AlphaU-VEE-(p40-P2A-p35-P2A-IL1RN)
PRB-174	AlphaU-VEE-(p35-P2A-IL1RN-IRES-p40)
PRB-175	AlphaU-VEE-(p35-IRES-IL1RN-P2A-p40)
PRB-176	AlphaU-VEE-(p35-P2A-IL1RN-P2A-p40)
PRB-177	AlphaU-VEE-(p40-P2A-IL1RN-IRES-p35)
PRB-178	AlphaU-VEE-(p40-P2A-IL1RN-P2A-p35)
PRB-179	AlphaU-VEE-(p35-P2A-p40)
PRB-180	AlphaU-VEE-(p40-P2A-p35)
PRB-181	AlphaU-VEE-(p40-IRES-p35)
PRB-182	AlphaU-VEE-pFF

- IRES后的IL1ra表达更好

IL12生物测定 (log (pg/mL) <4.7的
所有稀释物的平均值/标准差)

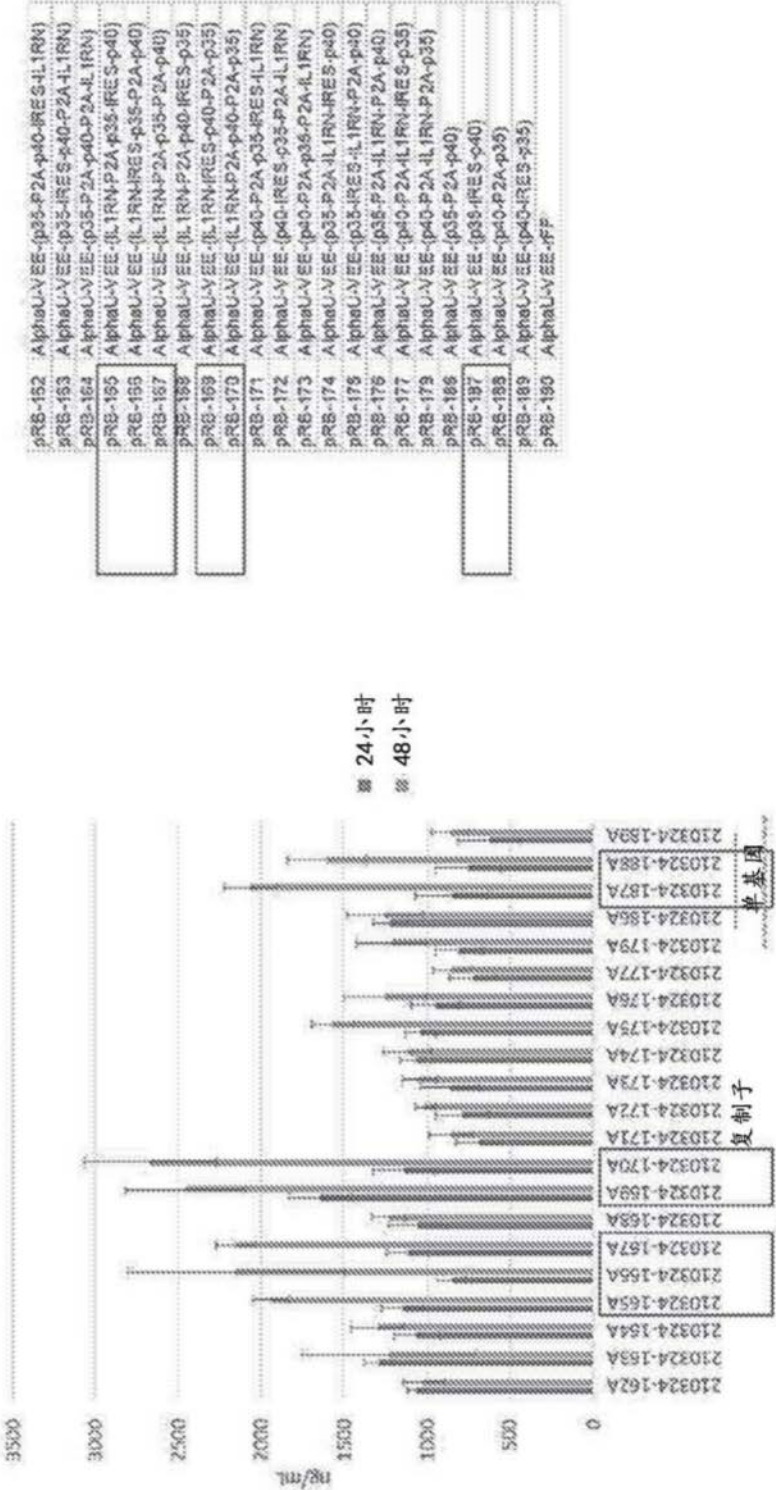


图9A

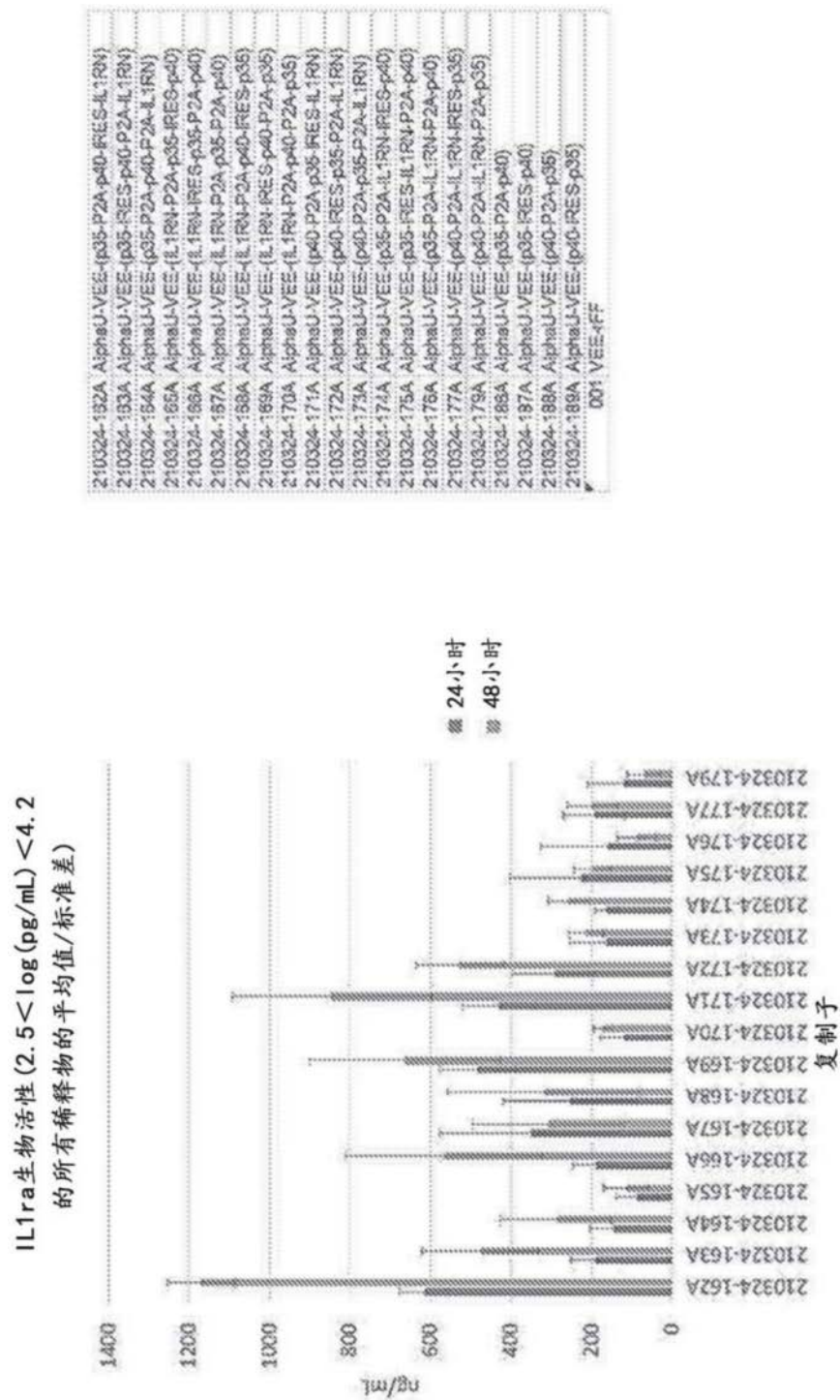


图9B

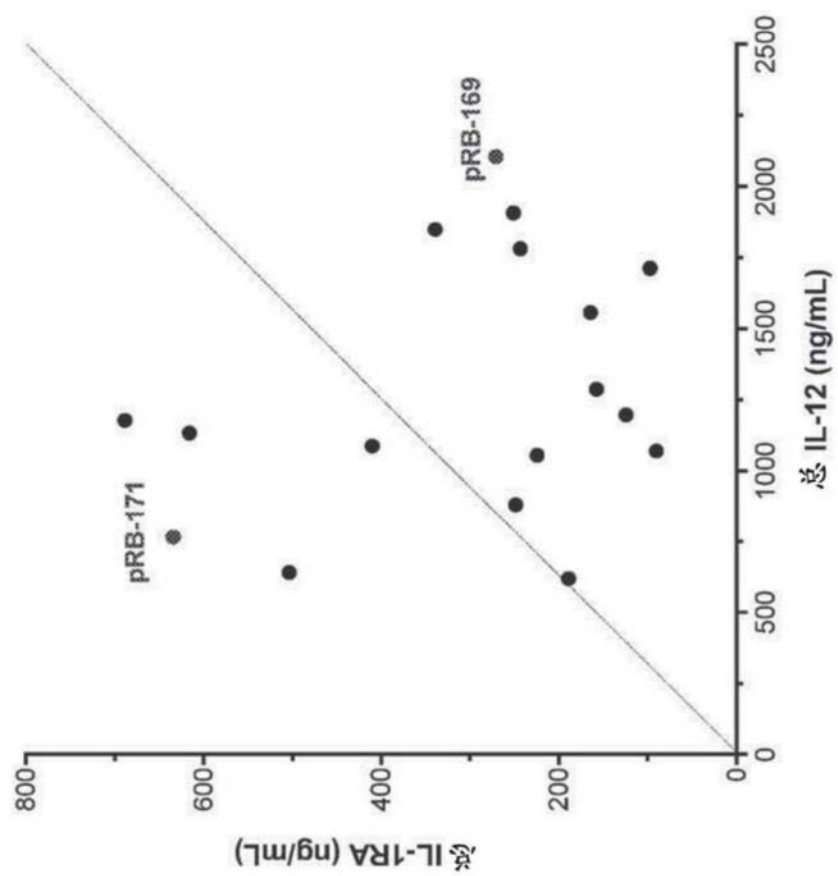


图10

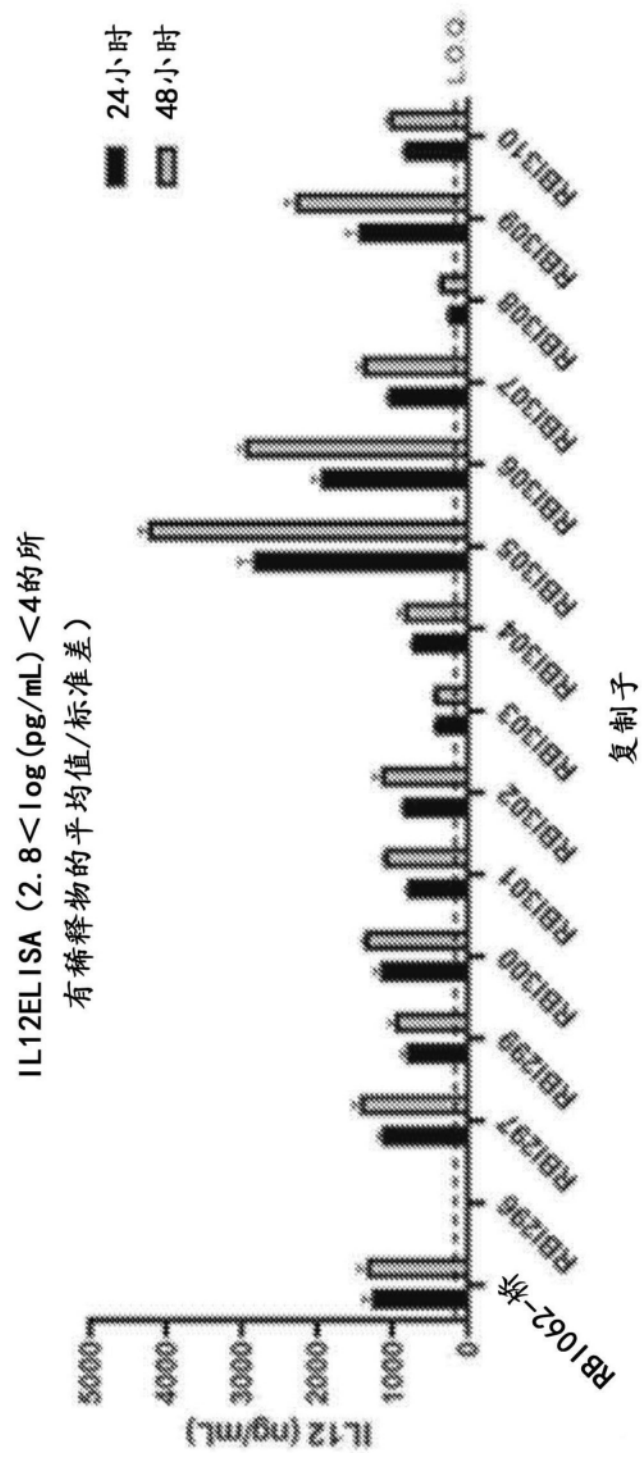


图11A

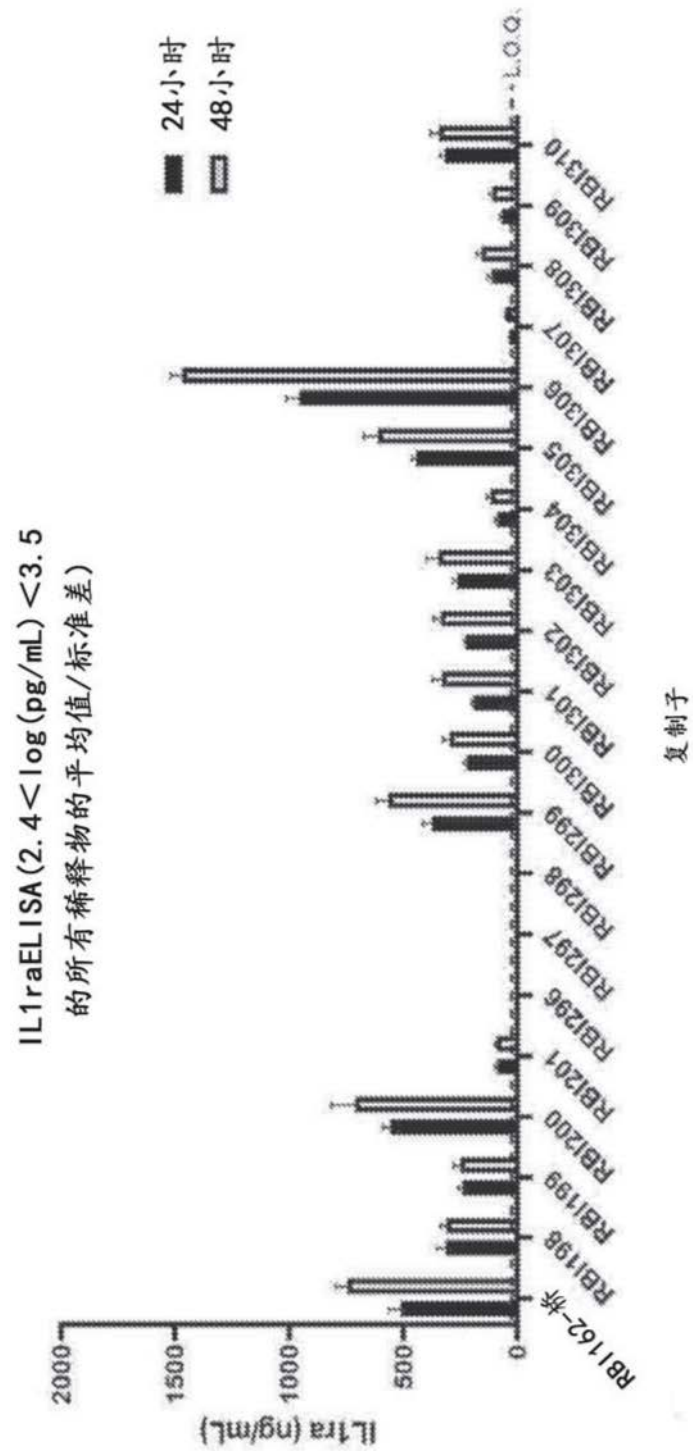


图11B

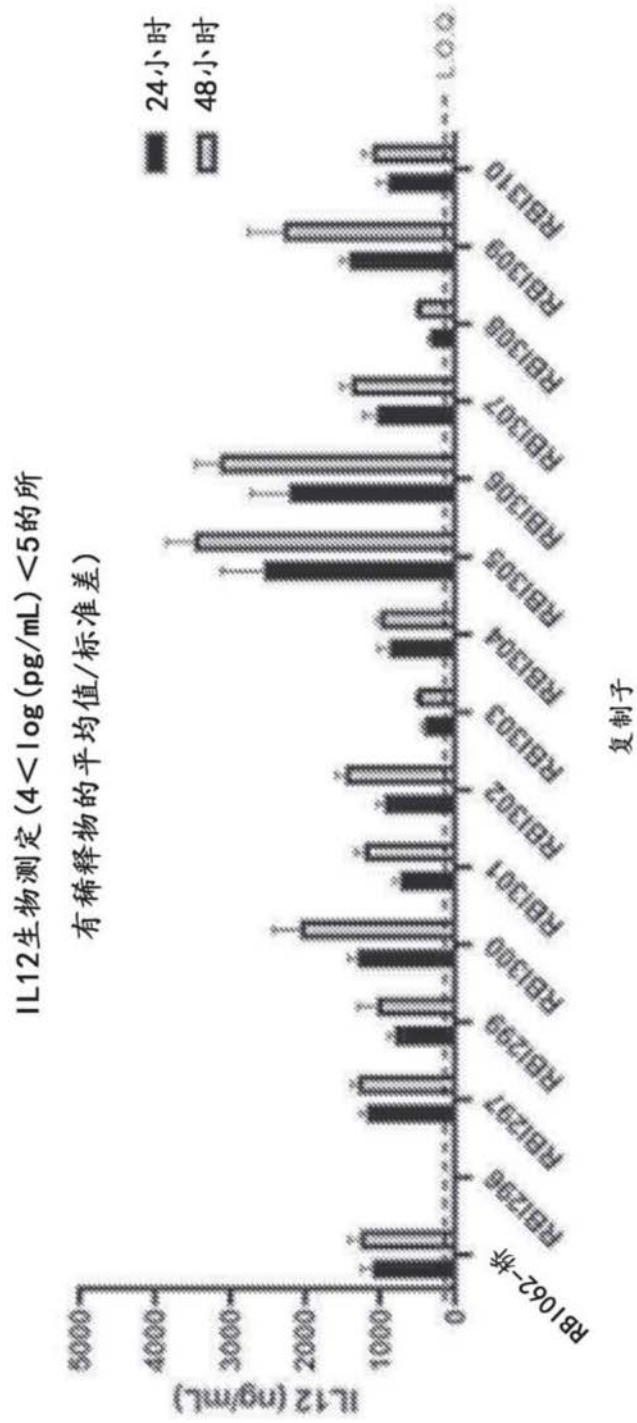


图12A

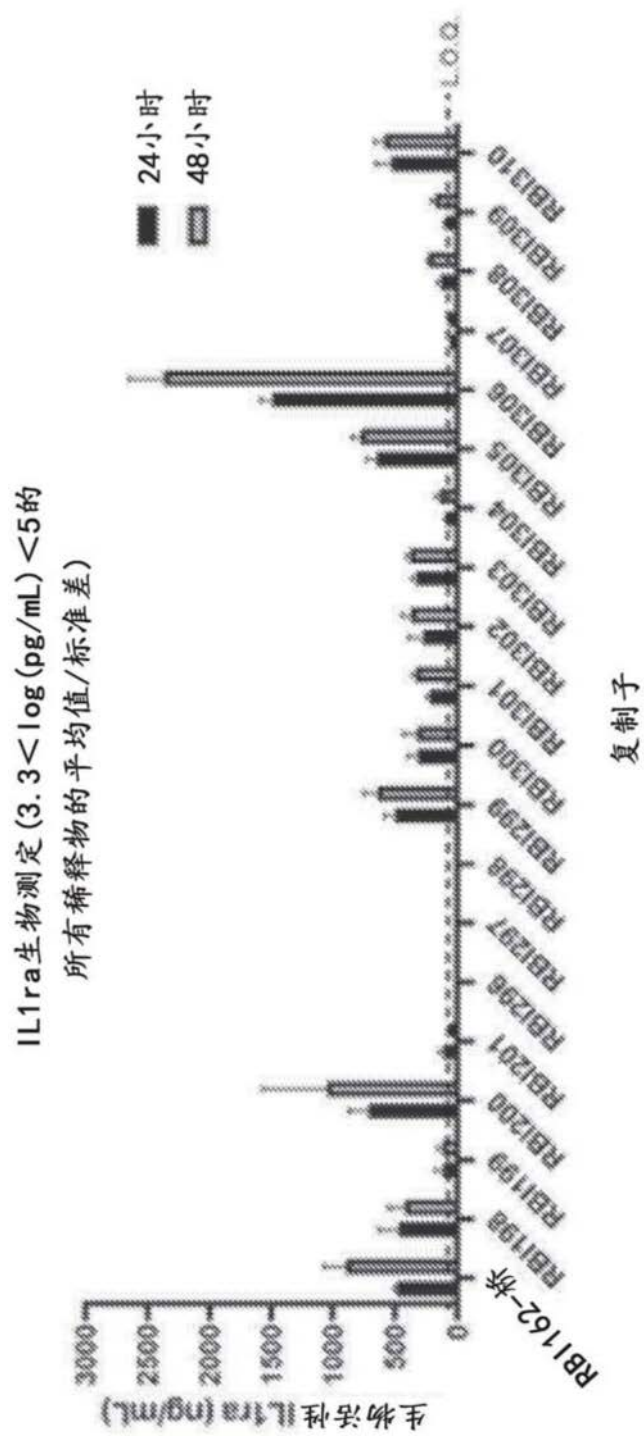


图12B

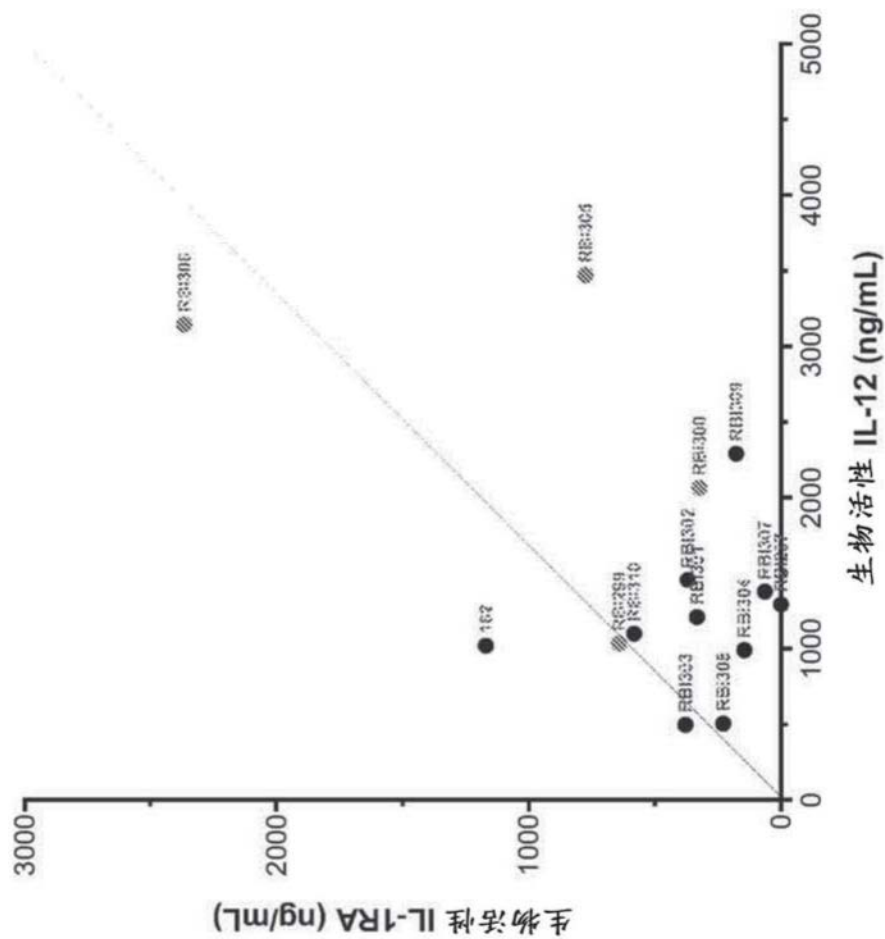


图13

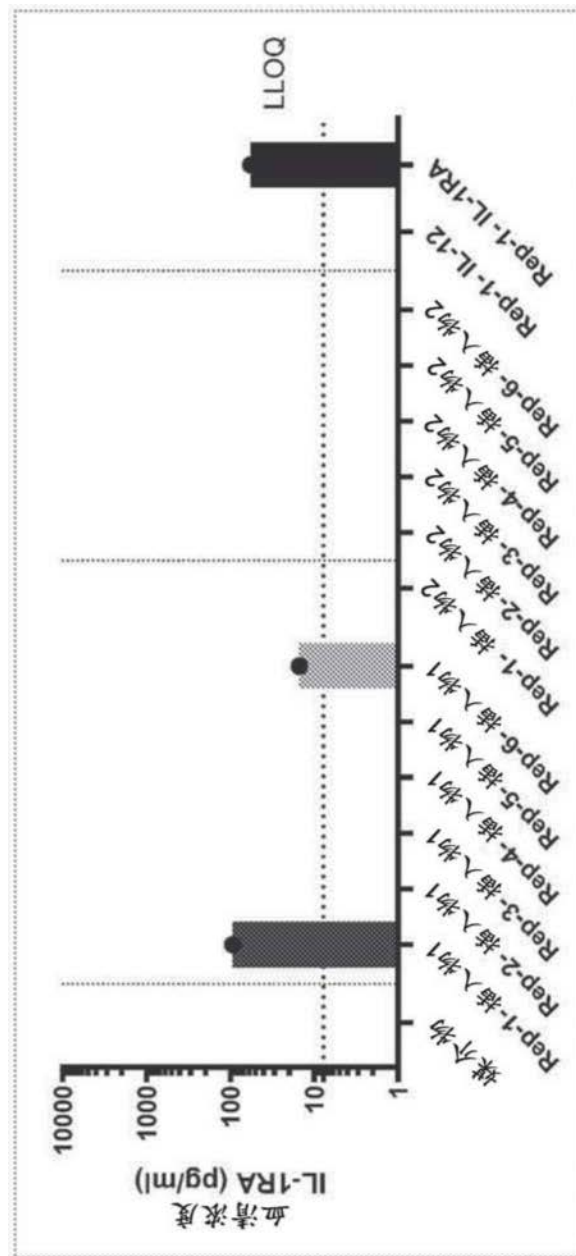


图14B

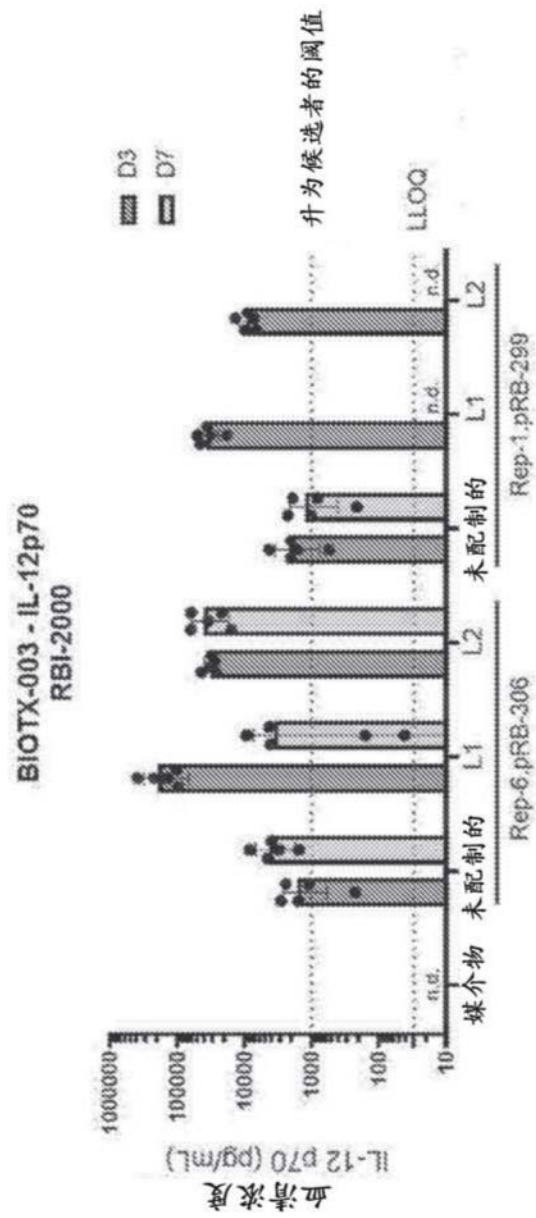


图15A

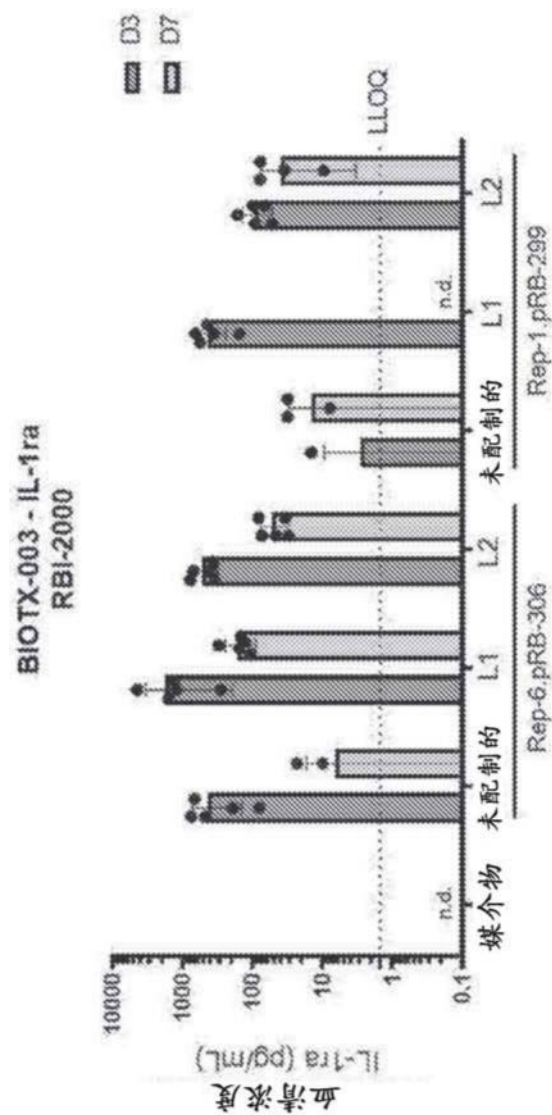


图15B

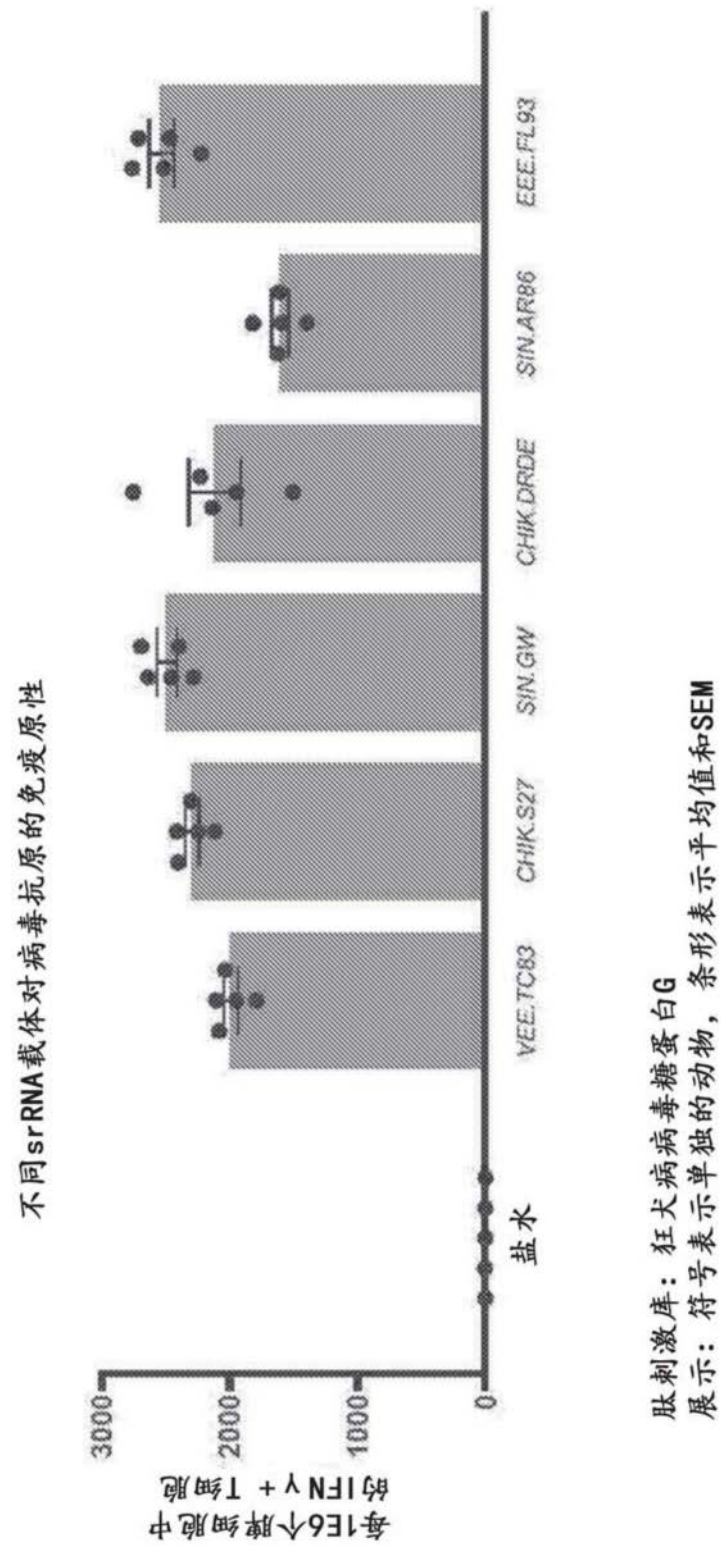
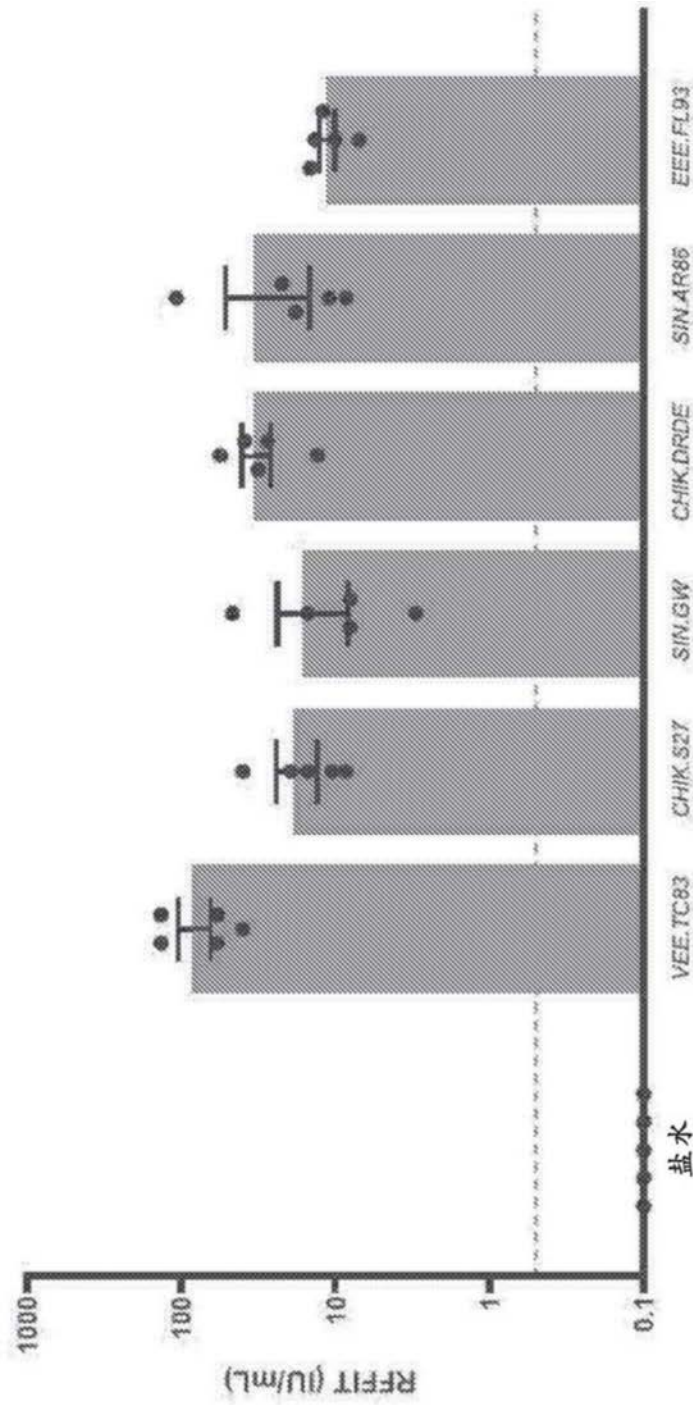


图16A

不同srRNA载体对病毒抗原的免疫原性



虚线表示0.5 IU/ml保护滴度
 展示：符号表示单独的动物，条形表示几何平均值和几何SD

图16B