(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 115551548 A
(43)申请公布日 2022.12.30

(21)申请号 202180035370.7

(22)申请日 2021.02.22

(30)优先权数据
62/993,307 2020.03.23 US
63/054,754 2020.07.21 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2022.11.14

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2021/019103 2021.02.22

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2021/194672 EN 2021.09.30

(71)申请人 赫德特生物公司
地址 美国华盛顿州

(72)发明人 阿米特·坎达尔 史蒂文·里德 马尔科姆·杜西 杰西·伊拉斯姆斯 达里克·卡特 布莱恩·J·贝鲁布

(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262
专利代理师 王玮玮 郑霞

(51)Int.Cl.
*A61K 39/12*(2006.01)
*A61P 31/14*(2006.01)
*C07K 16/10*(2006.01)

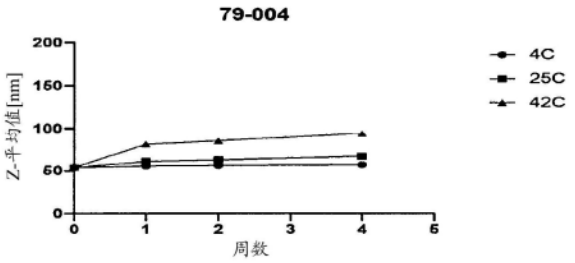
权利要求书3页 说明书29页 附图20页

(54)发明名称

用于RNA递送的组合物和方法

(57)摘要

本公开内容提供了纳米乳剂组合物及其制备方法和使用其向受试者递送生物活性剂诸如核酸的方法。所述纳米乳剂组合物包含允许成像以及递送核酸的在脂质纳米颗粒中的基于无机纳米颗粒的疏水性核。还提供了使用这些颗粒用于治疗和疫苗接种的方法。




CN 115551548 A

1.一种纳米乳剂组合物,所述纳米乳剂组合物包含多于一个纳米乳剂颗粒,每个纳米乳剂颗粒包含:

疏水性核,所述疏水性核包含液体油和一个或更多个无机纳米颗粒的混合物;

一种或更多种脂质;以及

任选地一种或更多种表面活性剂。

2.根据权利要求1所述的纳米乳剂组合物,其中每个纳米乳剂颗粒包含:

疏水性核,所述疏水性核包含液体油和一个或更多个无机纳米颗粒的混合物,所述一个或更多个无机纳米颗粒选自由金属盐、金属氧化物、金属氢氧化物、金属磷酸盐及其组合组成的组;

阳离子脂质;

疏水性表面活性剂;以及

亲水性表面活性剂。

3.根据权利要求2所述的纳米乳剂组合物,其中所述纳米乳剂颗粒包含:

约0.2%w/v至约40%w/v液体油,

约0.001%w/v至约10%w/v无机固体纳米颗粒,

约0.2%w/v至约10%w/v阳离子脂质,

约0.25%w/v至约5%w/v疏水性表面活性剂,以及

约0.5%w/v至约10%w/v亲水性表面活性剂。

4.根据权利要求2所述的纳米乳剂组合物,其中所述阳离子脂质选自由以下组成的组:1,2-二油酰氧基-3-(三甲基铵)丙烷(DOTAP);3β-[N-(N',N'-二甲基氨基乙烷)-氨基甲酰基]胆固醇(DC胆固醇);二甲基二(十八烷基)铵(DDA);1,2-二肉豆蔻酰基-3-三甲基铵丙烷(DMTAP)、二棕榈酰基(C16:0)三甲基铵丙烷(DPTAP);二硬脂酰三甲基铵丙烷(DSTAP);N-[1-(2,3-二油氧基)丙基]-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTMA);N,N-二油酰基-N,N-二甲基氯化铵(DODAC);1,2-二油酰基-sn-甘油-3-乙基磷酸胆碱(DOEPC);1,2-二油酰基-3-二甲基铵-丙烷(DODAP);和1,2-二亚油氧基-3-二甲基氨基丙烷(DLinDMA);1,1'-((2-(4-(2-((2-二(2-羟基十二烷基)氨基)乙基)(2-羟基十二烷基)氨基)乙基)哌嗪-1-基)乙基)氮杂二基)二(十二烷-2-醇)(C12-200);及其组合。

5.根据权利要求2所述的纳米乳剂组合物,其中所述疏水性表面活性剂是失水山梨醇酯,并且其中所述亲水性表面活性剂是聚氧乙烯失水山梨醇酯。

6.根据权利要求2所述的纳米乳剂组合物,其中每个纳米乳剂颗粒包含:

疏水性核,所述疏水性核包含以下的混合物:

一个或更多个无机纳米颗粒,所述一个或更多个无机纳米颗粒包含至少一个金属氧化物纳米颗粒,所述金属氧化物纳米颗粒任选地包被有磷酸封端脂质、磷封端表面活性剂、羧酸封端表面活性剂、硫酸封端表面活性剂或胺封端表面活性剂,以及

液体油,所述液体油包含天然存在的或合成的角鲨烯;

阳离子脂质DOTAP;

疏水性表面活性剂,所述疏水性表面活性剂包括失水山梨醇酯,所述失水山梨醇酯选自由失水山梨醇单硬脂酸酯、失水山梨醇单油酸酯和失水山梨醇三油酸酯组成的组;以及

亲水性表面活性剂,所述亲水性表面活性剂包括聚山梨酯。

7.根据权利要求2所述的纳米乳剂组合物,其中每个纳米乳剂颗粒包含:

疏水性核,所述疏水性核包含以下的混合物:

一个或更多个无机纳米颗粒,所述一个或更多个无机纳米颗粒包含至少一种金属氢氧化物或羟基氧化物纳米颗粒,所述金属氢氧化物或羟基氧化物纳米颗粒任选地包被有磷酸封端脂质、磷封端表面活性剂、羧酸封端表面活性剂、硫酸封端表面活性剂或胺封端表面活性剂,以及

液体油,所述液体油包含天然存在的或合成的角鲨烯;

阳离子脂质DOTAP;

疏水性表面活性剂,所述疏水性表面活性剂包括失水山梨醇酯,所述失水山梨醇酯选自由失水山梨醇单硬脂酸酯、失水山梨醇单油酸酯和失水山梨醇三油酸酯组成的组;以及

亲水性表面活性剂,所述亲水性表面活性剂包括聚山梨酯。

8.根据权利要求2所述的纳米乳剂组合物,其中所述纳米乳剂颗粒具有通过动态光散射测量的范围为约40nm至约80nm的z-平均流体动力学直径,具有范围为约0.2至约0.4的平均多分散指数。

9.一种纳米乳剂组合物,所述纳米乳剂组合物包含:

(i)多于一个纳米乳剂颗粒,每个纳米乳剂颗粒包含:

疏水性核,所述疏水性核包含液体油和一个或更多个无机纳米颗粒的混合物;

一种或更多种脂质;以及

任选地一种或更多种表面活性剂,以及

(ii)与所述纳米乳剂颗粒复合的生物活性剂。

10.根据权利要求9所述的纳米乳剂组合物,其中所述生物活性剂是RNA或DNA。

11.根据权利要求10所述的纳米乳剂组合物,其中所述生物活性剂是mRNA、溶瘤病毒RNA、复制子RNA或非编码RNA。

12.根据权利要求10所述的纳米乳剂组合物,其中所述生物活性剂是编码抗原的RNA或针对抗原的抗体的RNA,其中所述抗原来源于细菌感染/疾病、病毒感染/疾病、原生动物疾病、非传染性疾病、癌症或自身免疫性疾病。

13.根据权利要求10所述的纳米乳剂组合物,其中所述抗原来源于RNA病毒。

14.根据权利要求13所述的纳米乳剂组合物,其中所述RNA病毒选自由肝炎病毒、冠状病毒、蚊传病毒和HIV病毒组成的组。

15.根据权利要求10所述的纳米乳剂组合物,其中所述纳米乳剂颗粒与所述生物活性剂的摩尔比通过氮与磷(N:P)摩尔比表征,范围为约1:1至约150:1。

16.根据权利要求9所述的纳米乳剂组合物,其中所述生物活性剂是佐剂。

17.根据权利要求10所述的纳米乳剂组合物,其中所述生物活性剂是TLR激动剂、RIG-I激动剂、皂苷、肽、蛋白、碳水化合物、碳水化合物聚合物、缀合的碳水化合物、全病毒颗粒、病毒样颗粒、病毒碎片、细胞碎片或其组合。

18.一种药物组合物,所述药物组合物包含根据权利要求9所述的纳米乳剂组合物和药学上可接受的载体。

19.一种疫苗递送系统,所述疫苗递送系统包含根据权利要求9所述的纳米乳剂组合物和任选地一种或更多种疫苗佐剂,其中所述生物活性剂是抗原或编码抗原的核酸分子。

20.一种用于向受试者递送生物活性剂的方法,所述方法包括:

向所述受试者施用根据权利要求9所述的纳米乳剂组合物。

21.一种用于在受试者中产生免疫应答的方法,所述方法包括:

向所述受试者施用治疗有效量的根据权利要求9所述的纳米乳剂组合物和任选地佐剂,其中所述生物活性剂是抗原或编码抗原的核酸分子。

22.一种治疗或预防受试者的疾病的方法,所述方法包括:

向所述受试者施用治疗有效量的根据权利要求9所述的纳米乳剂组合物,以及任选地药学上可接受的载体。

23.一种对受试者中的生物活性剂递送进行成像和/或追踪的方法,所述方法包括:

向所述受试者施用根据权利要求9所述的纳米乳剂组合物,其中所述无机纳米颗粒包含能够经由磁共振成像检测的材料,以及

用磁共振成像检测所述纳米乳剂组合物。

24.根据权利要求23所述的方法,其中所述无机纳米颗粒由铁氧化物、铁葡糖酸盐和/或铁硫酸盐形成。

25.一种制备纳米乳剂组合物的方法,所述方法包括:

(a)将一个或更多个无机纳米颗粒、液体油、一种或更多种脂质和任选地疏水性表面活性剂混合,从而形成油相混合物;以及

(b)将所述油相混合物与水性溶液混合以形成纳米乳剂颗粒,所述水性溶液任选地包含亲水性表面活性剂;以及

(c)任选地,将所述纳米乳剂颗粒与包含生物活性剂的水性溶液混合,从而使所述生物活性剂与所述纳米乳剂颗粒复合。

# 用于RNA递送的组合物和方法

[0001] 本申请要求于2020年3月23日提交的美国临时申请第62/993,307号和于2020年7月21日提交的美国临时申请第62/054,754号的优先权,这两个美国临时申请通过引用以其整体并入本文。

## 发明领域

[0002] 本发明总体涉及RNA递送。更特别地,本发明涉及用药学上可接受的纳米颗粒(其还具有通过使用颗粒内的无机报告物进行成像的能力)进行的纳米颗粒介导的RNA递送。

[0003] 背景

[0004] RNA疫苗和治疗剂是疫苗学和基因疗法中日益增长的令人感兴趣的领域。使用核酸编码的抗原作为疫苗平台的基础具有许多优点:纯化相对简化,并且RNA构建体可以使用DNA合成技术然后是RNA转录和加帽来在几天内构建。这允许对新出现的病原体威胁做出快速反应,在生产中调整改变以适应新的流行株,或者对各种疾病进行个性化治疗干预。虽然这些疫苗和疗法显示出远大前景,但在一些情况下,它们在人体试验中缺乏充分的效力,并且像蛋白疫苗一样可能需要用于增强它们诱导适应性免疫应答的能力的方法。

[0005] 若干方法已经被测试并正在开发,但对于另外的和改进的核酸疫苗和治疗剂仍然存在需求。

[0006] 概述

[0007] 简言之,本公开内容提供了一种结合RNA并将其递送至需要治疗的受试者的基于无机化合物的纳米颗粒。该系统具有许多优点:1)与RNA以其自身提供时或使用其他载体技术诸如纳米结构脂质载体时相比,RNA以高得多效率递送;2)纳米颗粒包含稳定RNA并保护其免于降解的阳离子脂质;以及3)纳米颗粒具有允许在体内对颗粒进行成像和追踪的报告元件。

[0008] 本发明的一方面涉及一种包含多于一个纳米乳剂颗粒的纳米乳剂组合物。每个纳米乳剂颗粒包含

[0009] 疏水性核,所述疏水性核包含液体油和一个或更多个无机纳米颗粒的混合物;

[0010] 一种或更多种脂质(诸如阳离子脂质);以及

[0011] 任选地一种或更多种表面活性剂。

[0012] 本发明的一方面涉及一种纳米乳剂组合物,所述纳米乳剂组合物包含:(i)多于一个纳米乳剂颗粒,以及(ii)与所述纳米乳剂颗粒复合的生物活性剂。每个纳米乳剂颗粒包含:

[0013] 疏水性核,所述疏水性核包含液体油和一个或更多个无机纳米颗粒的混合物;

[0014] 一种或更多种脂质(诸如阳离子脂质);以及

[0015] 任选地一种或更多种表面活性剂。

[0016] 本发明的另一方面涉及一种药物组合物,所述药物组合物包括如本文描述的包含纳米乳剂颗粒和生物活性剂的纳米乳剂组合物,以及任选地,药学上可接受的载体或赋形剂。

[0017] 本发明的另一方面涉及一种疫苗递送系统,所述疫苗递送系统包括如本文描述的包含纳米乳剂颗粒和生物活性剂的纳米乳剂组合物,以及任选地一种或更多种疫苗佐剂,其中生物活性剂是抗原或编码抗原的核酸分子。

[0018] 本发明的另一方面涉及一种向受试者递送生物活性剂的方法,所述方法包括:向受试者施用如本文描述的包含纳米乳剂颗粒和生物活性剂的纳米乳剂组合物。

[0019] 本发明的另一方面涉及一种用于在受试者中产生免疫应答的方法,所述方法包括:向受试者施用如本文描述的包含纳米乳剂颗粒和生物活性剂的纳米乳剂组合物,以及任选地佐剂,其中生物活性剂是抗原或编码抗原的核酸分子。

[0020] 本发明的另一方面涉及一种治疗或预防受试者的感染或疾病的方法,所述方法包括:向受试者施用治疗有效量的如本文描述的包含纳米乳剂颗粒和生物活性剂的纳米乳剂组合物,以及任选地药学上可接受的载体。

[0021] 本发明的另一方面涉及一种对受试者中的生物活性剂递送进行成像和/或追踪的方法,所述方法包括:

[0022] 向受试者施用如本文描述的包含纳米乳剂颗粒和生物活性剂的纳米乳剂组合物,其中无机纳米颗粒包含可经由磁共振成像检测的材料,以及

[0023] 用磁共振成像检测纳米乳剂组合物。

[0024] 本发明的另一方面涉及一种制备纳米乳剂组合物的方法,所述方法包括:

[0025] (a)将一个或更多个无机纳米颗粒、液体油、一种或更多种脂质(诸如阳离子脂质)和任选地疏水性表面活性剂混合,从而形成油相混合物;

[0026] (b)将所述油相混合物与水性溶液混合以形成纳米乳剂颗粒,所述水性溶液任选地包含亲水性表面活性剂;以及

[0027] (c)任选地,将所述纳米乳剂颗粒与包含生物活性剂的水性溶液混合,从而使所述生物活性剂与所述纳米乳剂颗粒复合。

[0028] 附图简述

[0029] 图1A-图1C示出了三种示例性脂质无机纳米颗粒(LION)制剂在不同温度的粒径和稳定性随时间的变化。图1A示出了实施例1中产生的标记为79-004的LION。图1B示出了实施例1中产生的标记为79-006-A的LION。图1C示出了实施例1中产生的标记为79-006-B的LION。

[0030] 图2示出了与裸露(未配制)的RNA相比,示例性LION制剂(如在实施例1中制备的,分别标记为79-004、79-006-A、79-006-B和79-011的LION)与RNA分子以氮:磷(N:P)比为15复合的凝胶电泳,表明了LION制剂保护RNA免受RNA酶作用的能力。

[0031] 图3A示出了肌内注射了用LION制剂(如在实施例1中制备的,标记为79-004的LION)配制的编码SEAP的repRNA的C57BL/6小鼠中的蛋白表达随延长的时间段的变化。图3B示出了肌内注射了用不同SPIO尺寸的不同LION制剂(如在实施例1中制备的,分别标记为79-004、79-006-A和79-006-B的LION)配制的编码SEAP的repRNA的C57BL/6小鼠中的蛋白表达随注射后天数的变化。图3C示出了肌内注射了用LION制剂或用作为对照的纳米结构脂质载体(NLC)配制的编码SEAP的repRNA的C57BL/6小鼠中的蛋白表达随注射后天数的变化。图3D示出了肌内注射了用LION制剂配制的编码SEAP的RepRNA(分别以400ng/μl和40ng/μl的RNA复合物浓度)的C57BL/6小鼠中的蛋白表达随注射后天数的变化。图3E示出了肌内注射

了用LION制剂配制的编码的SEAP的repRNA(分别以0.5μg、2.5μg和12.5μg)的C57BL/6小鼠中的蛋白表达随N:P比的变化。数据显示为平均值和SE。

[0032] 图4A示出了在C57BL/6小鼠中由LION/repRNA复合物(以10μg、1μg和0.1μg srRNA的剂量水平)表达的抗原诱导的针对SARS-CoV-2受体结合结构域的免疫应答。图4B示出了通过抗刺突酶联免疫吸附测定(ELISA)确定的肌内注射了用不同SPIO尺寸的不同LION制剂(分别为LION-10、LION-15、LION-25、LION-5)配制的repSARS-CoV2S的C57BL/6小鼠血清中抗S IgG浓度的结果。数据显示为平均值和SE;每组n＝5。图4C示出了肌内注射了通过不同混合方向(将LION混合至RNA中与将RNA混合至LION中)和稀释(使用蔗糖(Suc)进行1:200稀释与使用右旋糖(Dex)进行1:200稀释)用不同LION制剂配制的repSARS-CoV2S的C57BL/6小鼠在肌内注射之后第14天(每组第一个柱)或第21天(每组第二个柱)通过抗刺突ELISA确定的血清中的抗S IgG浓度的结果。数据显示为平均值和SE;每组n＝5。

[0033] 图5A-图5B示出了T1(图5A)和T2(图5B)弛豫时间随LION制剂中铁浓度的增强。

[0034] 图6A示出了LION-抗体序列RNA复合物在动物中诱导的ZIKV-117抗体。将动物在免疫接种之后7天取血。图6B和图6C示出了通过肌内途径免疫接种了盐水(图6B)或用LION配制的编码BG505 SOSIP.664三聚体的repRNA(图6C)的成年雌性孕兔中的抗BG505 SOSIP.664IgG抗体的量值和动力学。图6D和图6E示出了通过肌内途径免疫接种了盐水(图6D)或用LION配制的编码ZIKV prM-E抗原的repRNA(图6E)的成年雌性孕兔中的抗ZIKV E IgG抗体的量值和动力学。第1周左右的阴影区域标记了兔交配时的时间段。第6周与第7周之间的阴影区域标记了分娩幼兔时的时间段。箭头标记了免疫接种时间点(第0周、第4周和第11周)。图6F和图6G示出了抗SOSIP IgG从雌兔向幼兔子宫内转移的评价结果。图6F示出了在分娩时幼兔的抗SOSIP IgG应答。每个处理组来自每个同窝的最少两只幼兔被安乐死,以评价子宫内抗体转移。图6G示出了展示雌兔和对应的幼兔中抗体水平之间的正相关(Pearson r＝0.94)的XY图。图6H和图6I示出了在先前存在母源抗体的背景下疫苗诱导的应答。在加强后4周(在幼兔断奶之后3周)的幼兔中采集血清抗SOSIP IgG水平。将来自接收盐水的雌兔的幼兔或来自接收LION+RNA-prM/E的雌兔的幼兔分组为先前存在的针对BG505 SOSIP.664的母源抗体阴性(-)。将来自接收LION+RNA-SOSIP或AddaVax佐剂重组BG505 SOSIP.664的雌兔的幼兔分组为先前存在的针对BG505 SOSIP.664的母源抗体阳性(+)。对log10转换后的数据进行常规单因素ANOVA和Tukey多重比较检验。(ns＝不显著的)。

[0035] 图7示出了repRNA-CoV2S的体外表征。图7A示出了与c末端v5表位标签融合的密码子优化的全长刺突(S)开放阅读框(包括对应于SARS-CoV-2分离株Wuhan-Hu-1(GenBank:MN908947.3)中的位置21,536至25,384的S1跨膜(TM)结构域、S2跨膜(TM)结构域和细胞质(CD)结构域)被克隆到编码委内瑞拉马脑炎病毒TC-83毒株的4个非结构蛋白(nsP1-4)基因的甲病毒复制子中。图7B和图7C示出了将repRNA-COV2S转染到BHK细胞中之后24小时后,细胞通过抗v5免疫荧光(图7B)和蛋白印迹(图7C)的分析结果,使用恢复期人类血清或抗v5进行免疫检测。分别使用重组SARS-CoV2刺突蛋白(rCoV2-Spike)和repRNA-GFP作为阳性对照和阴性对照。图7B和图7C中的数据是两个独立实验中的代表。

[0036] 图8A-图8E示出了repRNA的示例性脂质无机纳米颗粒(LION)制剂。图8A是示例性LION和其与repRNA混合之后形成疫苗复合物的图形表示。图8B是示出在4℃、25℃和42℃储存之后,通过动态光散射(DLS)测量的LION粒径的时间演变的图。图8C是示出将LION与

repRNA混合后通过尺寸分布的变化确认复合物形成的图。图8D示出了一式三份的在浓缩RNA酶攻击后从LION提取的repRNA制备物相对于一式三份的剂量匹配的裸露RNA在RNA酶攻击后的制备物的凝胶电泳分析，说明了实质性保护。图8E示出了通过苯酚-氯仿处理提取的repRNA的凝胶电泳。图8F示出了复合物的粒径。图8B、图8E和图8F中的数据来自单个实验，而图8C和图8D中的数据代表三个独立实验。图8B、图8D和图8F中的数据显示为3个技术重复的平均值±s.d.。

[0037] 图9A-图9F示出了LION/repRNA-CoV2S复合物在C57BL/6小鼠中诱导了Th1偏倚和中和抗体。6-8周龄C57BL/6小鼠(n＝5/组)经由肌内途径接收10μg、1μg或0.1μg LION/repRNA-CoV2S。在初免免疫接种之后14天，收获血清。图9A示出了通过酶联免疫吸附测定(ELISA)确定的C57BL/6小鼠的血清中抗S IgG浓度的结果。图9B示出了通过假病毒(SARS-CoV-2Wuhan-Hu-1假型)中和测定确定的C57BL/6小鼠的血清的50％抑制浓度(IC50)。图9C和图9D示出了通过ELISA确定的C57BL/6小鼠的血清中抗S IgG1和IgG2c的浓度(图9C)和IgG2c:IgG1浓度比(图9D)。在第28天，小鼠接收加强免疫接种，并且在12天后，收获脾和肺。图9E和9F示出了在用包括S蛋白并由通过11个氨基酸重叠的15-mer组成的10个肽库刺激18小时后，通过酶联免疫吸附斑点(ELISpot)测量的脾细胞中(图9E)和肺细胞中(图9F)的IFN-β应答的结果。图9A、图9C和图9D中的数据代表三个独立实验，而图9B、图9E和图9F中的数据来自单个实验。所有数据都表示为个体值以及平均值±s.d.。*p<0.05，如通过单因素ANOVA和Tukey多重比较检验确定的。

[0038] 图10示出了LION/repRNA-CoV2S复合物在老龄BALB/C小鼠中诱导了Th1偏倚抗体。2月龄、8月龄或17月龄BALB/C小鼠(n-5/组)经由肌内途径接收10μg或1μg LION/repRNA-CoV2S。在初免免疫接种之后14天，收获血清。图10A、图10B和图10C示出了通过ELISA确定的老龄BALB/C小鼠的血清中抗S IgG浓度(图10A)、IgG1浓度和IgG2a浓度(图10B)以及IgG2a:IgG1浓度比(图10C)的结果。17月龄、8月龄和2月龄BALB/C的数据来自单个实验，并且2月龄BALB/C的数据在第二个实验中重复。所有数据都表示为个体值以及平均值±s.d.。*p<0.05，如在17月龄动物与8月龄或2月龄动物之间通过单因素ANOVA和Tukey多重比较检确定的。

[0039] 图11A-图11D示出了单剂量LION/repRNA-CoV2S复合物在猪尾猕猴(pigtail macaque)中诱导了中和抗体应答。图11A示出了剂量方案，在该方案中，猪尾猕猴经由肌内途径疫苗接种250μg(n＝3)或50μg(n＝2)repRNA-CoV2-S复合物，在第10天、第14天、第28天和第42天采集血液；50μg组在第28天接收加强疫苗接种，14天后采集血液。图11B示出了对免疫接种后样品进行的血清抗S IgG ELISA的结果，对比通过免疫接种前抽血建立的基线。图11C示出了通过假病毒(SARS-CoV-2Wuhan-Hu-1假型)中和测定确定的每个样品的平均50％抑制浓度(IC50)的结果，对比通过免疫接种前抽血建立的基线。图11D示出了在第28天和第42天以及来自从确诊的COVID-19患者采集的7份恢复期人类样品的血清测量的针对SARS-CoV2/WA/2020分离株的80％噬斑减少中和抗体滴度($PRNT_{80}$)。实验进行了一次。图11B和图11C中的每条线代表每只个体动物。图11D中的数据报道为个体值以及平均值±s.d.。*p<0.05，如通过student t检验对在第14天和第28天的250μg组进行比较确定的。在第42天，在所有5只动物中的平均$PRNT_{80}$滴度和来自7个恢复期人类的血清中的滴度之间不存在显著性差异，如通过Mann-Whitney U检验测量的。

[0040] 图12示出了肌内注射了用LION制剂配制的repRNA-SARS-CoV2S(分别以250μg和10μg剂量水平)的兔中的抗刺突IgG水平。将兔在肌内注射之后以规律的间隔取血,并且蛋白表达通过用抗刺突ELISA测定IgG浓度来确定。每个点代表来自个体动物的数据。数据展示为平均值和SEM,每组n=4。

[0041] 图13A示出了肌内注射了与LION制剂复合的2.5μg repRNA-RSV的C57Bl/6和BALB/c小鼠中抗F IgG水平。图13B示出了肌内注射了与LION制剂复合的2.5μg repRNA-RSV的C57Bl/6和BALB/c小鼠中抗G(A2)IgG水平。肌内注射之后28天采集血液,并且制备血清,并且通过ELISA进行评估。复制子编号(645或646)在括号中示出。每个点代表来自个体动物的数据,须(whisker)代表最小值至最大值,箱代表四分位数范围,并且水平条描绘中位数。

[0042] 图14A-图14B示出了PAMP与提供保护免于RNA酶攻击的LION制剂的结合。图14A示出了不同N:P复合比(分别为0.04、0.2、1、5和25)的PAMP-LION复合物在RNA凝胶上运行并评估游离RNA的凝胶电泳分析。图14B示出了用RNA酶A攻击后的PAMP-LION复合物与裸露PAMP(未配制的PAMP)相比的凝胶电泳分析。从LION中提取RNA并且在琼脂糖凝胶上运行以评估RNA降解。

[0043] 图15示出了分别通过上清液中的SEAP活性和萤光素酶活性测量的PAMP-LION复合物对IFN-β启动子和IFIT2的激活随N:P比的变化。虚线代表仅PAMP的激活水平。

[0044] 图16A和图16B示出了分别通过上清液中的SEAP活性和萤光素酶活性测量的与未配制的RNA相比PAMP-LION或Riboxxim-LION制剂对IFN-β启动子(图16A)和IFIT2(图16B)的激活随N:P比的变化。虚线代表培养基对照孔的$OD_{635}$读数。图16C示出了与未配制的Riboxxim相比,Riboxxim-LION制剂对IFIT2的激活随Riboxxim剂量水平的变化。图16D示出了与未经实验的(naïve)对照相比,经处理的小鼠鼻腔内固有免疫基因的剂量依赖性诱导。图16E示出了经处理的小鼠的肺中固有免疫基因的激活。图16F示出了小鼠在连续3天鼻内施用PAMP:LION制剂时保持了体重。

[0045] 图17示出了来自具有编码nLuc的复制子RNA的示例性RNA:LION复合物(使用SPIO(Fe-LION)或TOPO包被的羟基氧化铝纳米颗粒(Al-LION)作为LION制剂的核)的体外蛋白表达。

[0046] 发明详述

[0047] 本公开内容提供了脂质无机纳米颗粒(LION)作为RNA载体的使用。特别地,公开了在缓冲液中具有带电荷包衣的脂质基质中的固体无机核。使用这些纳米颗粒具有许多优点:RNA可以不依赖于颗粒进行复合,并且颗粒可以被设计为具有磁信号,诸如可用于MRI或其他成像技术。RNA受到颗粒保护,并且在提供至细胞或生物体时,它们驱动受保护的RNA表达许多类型的蛋白,包括抗原。

[0048] 本发明的一方面涉及一种包含多于一个纳米乳剂颗粒的纳米乳剂组合物。每个纳米乳剂颗粒包含

[0049] 疏水性核,所述疏水性核包含液体油和一个或更多个无机纳米颗粒的混合物;

[0050] 一种或更多种脂质(例如,阳离子脂质);以及

[0051] 任选地一种或更多种表面活性剂。

[0052] 本发明的另一方面涉及一种纳米乳剂组合物,所述纳米乳剂组合物包含:(i)多于一个纳米乳剂颗粒,以及(ii)与所述纳米乳剂颗粒复合的生物活性剂。每个纳米乳剂颗粒

包含：

[0053] 疏水性核，所述疏水性核包含液体油和一个或更多个无机纳米颗粒的混合物；

[0054] 一种或更多种脂质(例如，阳离子脂质)；以及

[0055] 任选地一种或更多种表面活性剂。

[0056] 纳米乳剂颗粒

[0057] 纳米乳剂颗粒具有疏水性核，所述疏水性核包含液体油和一个或更多个无机固体纳米颗粒的混合物。纳米乳剂颗粒在本文也可以称为脂质无机纳米颗粒(LION)。

[0058] 液体油与一个或更多个无机纳米颗粒混合以形成疏水性核。液体油通常是可代谢的。合适的液体油可以是植物油、动物油或合成制备的油。

[0059] 在一些实施方案中，液体油是鱼油。在一些实施方案中，液体油是天然存在的或合成的萜类。

[0060] 在一些实施方案中，液体油是角鲨烯、甘油三酯(诸如癸酸/辛酸甘油三酯或肉豆蔻酸甘油三酯)、维生素E、月桂酰基聚氧甘油、单酰基甘油、大豆卵磷脂、葵花籽油、大豆油、橄榄油、葡萄籽油或其组合。在一种实施方案中，液体油是角鲨烯、甘油三酯(诸如癸酸/辛酸甘油三酯或肉豆蔻酸甘油三酯)、维生素E、月桂酰基聚氧甘油、单酰基甘油、大豆卵磷脂或其组合。在一种实施方案中，液体油是角鲨烯、甘油三酯(诸如癸酸/辛酸甘油三酯或肉豆蔻酸甘油三酯)、葵花籽油、大豆油、橄榄油、葡萄籽油或其组合。

[0061] 在一些实施方案中，液体油是角鲨烯(天然存在的或合成的，任选地与以上列出的液体油中的任何一种组合)。

[0062] 无机纳米颗粒可以由一种或更多种相同或不同的金属(包括过渡金属的任何金属)形成，诸如由金属盐、金属氧化物、金属氢氧化物和金属磷酸盐形成。实例包括二氧化硅($SiO_2$)、铁氧化物($Fe_3O_4$、$Fe_2O_3$、FeO或其组合)、氧化铝($Al_2O_3$)、羟基氧化铝(AlO(OH))、羟基磷酸铝($Al(OH)_X(PO4)_Y$)、磷酸钙($Ca_3(PO_4)_2$)、羟基磷灰石钙($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$)、铁葡糖酸盐或铁硫酸盐。

[0063] 在一些实施方案中，无机固体纳米颗粒是金属氧化物，诸如过渡金属氧化物。在一种实施方案中，无机固体纳米颗粒是铁氧化物，例如，磁铁($Fe_3O_4$)、磁赤铁(γ-$Fe_2O_3$)、方铁(wüstite，FeO)、赤铁(α-$Fe_2O_3$)或其组合。

[0064] 在一些实施方案中，无机固体纳米颗粒是金属氢氧化物，诸如氢氧化铝或羟基氧化铝。

[0065] 无机固体纳米颗粒可以包含可经由成像方法检测的报告元件，以允许在体内成像和追踪所得的纳米乳剂颗粒。例如，无机固体纳米颗粒可以包含可经由磁共振成像(MRI)检测的报告元件，诸如顺磁性、超顺磁性、亚铁磁性或铁磁性化合物。可MRI检测的示例性无机固体纳米颗粒材料是铁氧化物、铁葡糖酸盐和铁硫酸盐。

[0066] 无机固体纳米颗粒通常具有范围为约3nm至约50nm的平均直径(数字加权平均直径)。例如，无机固体纳米颗粒可以具有约5nm、约10nm、约15nm、约20nm、约25nm、约30nm、约35nm、约40nm、约45nm或约50nm的平均直径。

[0067] 无机固体纳米颗粒可以在与液体油混合之前进行表面改性。例如，如果无机固体纳米颗粒的表面是亲水性的，则无机固体纳米颗粒可以用疏水分子(或表面活性剂)包被，以促进无机固体纳米颗粒与纳米乳剂颗粒的“油”相中的液体油的混溶性。磷酸封端脂质

(诸如磷脂酰化脂质)、磷封端表面活性剂、羧酸封端表面活性剂、硫酸封端表面活性剂或胺封端表面活性剂可以用于无机固体纳米颗粒的表面改性。典型的磷酸封端脂质或磷封端表面活性剂是三辛基氧化膦(TOPO)或二硬脂酰磷脂酸(DSPA)。典型的硫酸封端表面活性剂包括但不限于十二烷基硫酸钠(SDS)。典型的羧酸封端表面活性剂包括油酸。典型的胺封端表面活性剂包括油胺。

[0068] 在一种实施方案中,无机固体纳米颗粒是金属氧化物,诸如铁氧化物,并且使用表面活性剂,诸如油酸、油胺、SDS、DSPA或TOPO来包被无机固体纳米颗粒,然后无机固体纳米颗粒与液体油混合以形成疏水性核。

[0069] 在一种实施方案中,无机固体纳米颗粒是金属氢氧化物,诸如氢氧化铝或羟基氧化铝,并且使用磷酸封端脂质或表面活性剂,诸如油酸、油胺、SDS、TOPO或DSPA来包被无机固体纳米颗粒,然后无机固体纳米颗粒与液体油混合以形成疏水性核。

[0070] 用于形成纳米乳剂颗粒的脂质可以是阳离子脂质、阴离子脂质、中性脂质或其混合物。

[0071] 在一些实施方案中,所使用的脂质是阳离子脂质。例如,可以在纳米乳剂组合物中使用与带负电荷的生物活性剂(诸如DNA或RNA)具有有利的相互作用的带正电荷的脂质。合适的阳离子脂质包括1,2-二油酰氧基-3-(三甲基铵)丙烷(DOTAP);3β-[N-(N',N'-二甲基氨基乙烷)-氨基甲酰基]胆固醇(DC胆固醇);二甲基二(十八烷基)铵(DDA);1,2-二肉豆蔻酰基-3-三甲基铵丙烷(DMTAP)、二棕榈酰基(C16:0)三甲基铵丙烷(DPTAP);二硬脂酰三甲基铵丙烷(DSTAP);N-[1-(2,3-二油氧基)丙基]-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTMA);N,N-二油酰基-N,N-二甲基氯化铵(DODAC);1,2-二油酰基-sn-甘油-3-乙基磷酸胆碱(DOEPC);1,2-二油酰基-3-二甲基铵-丙烷(DODAP);和1,2-二亚油氧基-3-二甲基氨基丙烷(DLinDMA);1,1'-((2-(4-(2-((2-二(2-羟基十二烷基)氨基)乙基)(2-羟基十二烷基)氨基)乙基)哌嗪-1-基)乙基)氮杂二基)二(十二烷-2-醇)(C12-200);及其组合。典型的阳离子脂质是DOTAP。

[0072] 合适的脂质的其他实例包括但不限于磷脂酰胆碱(PC),诸如二硬脂酰基磷脂酰胆碱(DSPC)、二油酰基磷脂酰胆碱(DOPC)、1-棕榈酰基-2-油酰基磷脂酰胆碱(POPC)、二棕榈酰基磷脂酰胆碱(DPPC)、二肉豆蔻酰基磷脂酰胆碱(DMPC)等;磷脂酰乙醇胺(PE),诸如1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DSPE)、二油酰基磷脂酰乙醇胺(DOPE)等;磷脂酰甘油(PG);以及PEG化脂质,包括以上脂质中的任何一种的PEG化形式(例如,DSPE-PEG)。

[0073] 纳米乳剂颗粒还可以包含一种或更多种表面活性剂,所述表面活性剂可以是疏水性表面活性剂或亲水性表面活性剂。在一些实施方案中,纳米乳剂颗粒还包含疏水性表面活性剂。在一些实施方案中,纳米乳剂颗粒还包含亲水性表面活性剂。在一种实施方案中,纳米乳剂颗粒还包含疏水性表面活性剂和亲水性表面活性剂。

[0074] 合适的疏水性表面活性剂包括具有10或更小,例如,5或更小,1至5或4至5的亲水性-亲油性平衡(HLB)值的那些疏水性表面活性剂。示例性疏水性表面活性剂是失水山梨醇酯(诸如失水山梨醇单酯或失水山梨醇三酯)。例如,疏水性表面活性剂可以是具有1至5或4至5的HLB值的失水山梨醇酯。

[0075] 在一些实施方案中,疏水性表面活性剂是失水山梨醇单酯或失水山梨醇三酯。示例性失水山梨醇单酯包括失水山梨醇单硬脂酸酯和失水山梨醇单油酸酯。示例性失水山梨醇三酯包括失水山梨醇三硬脂酸酯和失水山梨醇三油酸酯。

[0076] 合适的亲水性表面活性剂包括那些基于聚环氧乙烷的表面活性剂,例如聚氧乙烯失水山梨醇酯(聚山梨酯)。在一些实施方案中,亲水性表面活性剂是聚山梨酯。示例性聚山梨酯是聚山梨酯80(聚氧乙烯失水山梨醇单油酸酯或Tween 80)、聚山梨酯60(聚氧乙烯失水山梨醇单硬脂酸酯或Tween 60)、聚山梨酯40(聚氧乙烯失水山梨醇单棕榈酸酯或Tween 40)和聚山梨酯20(聚氧乙烯失水山梨醇单月桂酸酯或Tween 20)。在一种实施方案中,亲水性表面活性剂是聚山梨酯80。

[0077] 纳米乳剂颗粒可以具有以下范围的油与表面活性剂的摩尔比:约0.1:1至约20:1、约0.5:1至约12:1、约0.5:1至约9:1、约0.5:1至约5:1、约0.5:1至约3:1或约0.5:1至约1:1。

[0078] 纳米乳剂颗粒可以具有以下范围的亲水性表面活性剂与脂质(例如,阳离子脂质)比:约0.1:1至约2:1、约0.2:1至约1.5:1、约0.3:1至约1:1、约0.5:1至约1:1或约0.6:1至约1:1。

[0079] 纳米乳剂颗粒可以具有以下范围的疏水性表面活性剂与脂质(例如,阳离子脂质)比:约0.1:1至约5:1、约0.2:1至约3:1、约0.3:1至约2:1、约0.5:1至约2:1或约1:1至约2:1。

[0080] 纳米乳剂颗粒可以包含约0.2%w/v至约40%w/v液体油、约0.001%w/v至约10%w/v无机固体纳米颗粒、约0.2%w/v至约10%w/v脂质(例如,阳离子脂质)、约0.25%w/v至约5%w/v疏水性表面活性剂(例如,失水山梨醇酯)和约0.5%w/v至约10%w/v亲水性表面活性剂。

[0081] 在某些实施方案中,纳米乳剂颗粒包含:

[0082] 疏水性核,所述疏水性核包含以下的混合物:

[0083] 一个或更多个无机纳米颗粒,所述一个或更多个无机纳米颗粒包含至少一个金属氧化物纳米颗粒,所述金属氧化物纳米颗粒任选地包被有磷酸封端脂质、磷封端表面活性剂、羧酸封端表面活性剂、硫酸封端表面活性剂或胺封端表面活性剂,以及

[0084] 液体油,所述液体油包含天然存在的或合成的角鲨烯;

[0085] 阳离子脂质,所述阳离子脂质包含DOTAP;

[0086] 疏水性表面活性剂,所述疏水性表面活性剂包括失水山梨醇酯,所述失水山梨醇酯选自由失水山梨醇单硬脂酸酯、失水山梨醇单油酸酯和失水山梨醇三油酸酯组成的组;以及

[0087] 亲水性表面活性剂,所述亲水性表面活性剂包括聚山梨酯。

[0088] 在一种实施方案中,纳米乳剂颗粒包含:

[0089] 疏水性核,所述疏水性核包含以下的混合物:

[0090] 一个或更多个无机纳米颗粒,所述一个或更多个无机纳米颗粒包含铁氧化物纳米颗粒,以及

[0091] 液体油,所述液体油包含天然存在的或合成的角鲨烯;

[0092] 阳离子脂质DOTAP;

[0093] 疏水性表面活性剂,所述疏水性表面活性剂包括失水山梨醇单硬脂酸酯;以及

[0094] 亲水性表面活性剂,所述亲水性表面活性剂包括聚山梨酯80。

[0095] 在该LION组合物中,LION颗粒可以包含约0.2%w/v至约40%w/v角鲨烯、约0.001%w/v至约10%w/v铁氧化物纳米颗粒、约0.2%w/v至约10%w/v DOTAP、约0.25%w/v至约5%w/v失水山梨醇单硬脂酸酯和约0.5%w/v至约10%w/v聚山梨酯80。

[0096] 在一种实施方案中,LION颗粒包含约2%w/v至约6%w/v角鲨烯、约0.01%w/v至约1%w/v铁氧化物纳米颗粒、约0.2%w/v至约1%w/vDOTAP、约0.25%w/v至约1%w/v失水山梨醇单硬脂酸酯和约5%w/v至约5%w/v聚山梨酯80。

[0097] 在某些实施方案中,纳米乳剂颗粒包含:

[0098] 疏水性核,所述疏水性核包含以下的混合物:

[0099] 一个或更多个无机纳米颗粒,所述一个或更多个无机纳米颗粒包含至少一个金属氢氧化物或羟基氧化物纳米颗粒,所述金属氢氧化物或羟基氧化物纳米颗粒任选地包被有磷酸封端脂质、磷封端表面活性剂、羧酸封端表面活性剂、硫酸封端表面活性剂或胺封端表面活性剂,以及

[0100] 液体油,所述液体油包含天然存在的或合成的角鲨烯;

[0101] 阳离子脂质,所述阳离子脂质包含DOTAP;

[0102] 疏水性表面活性剂,所述疏水性表面活性剂包括失水山梨醇酯,所述失水山梨醇酯选自由失水山梨醇单硬脂酸酯、失水山梨醇单油酸酯和失水山梨醇三油酸酯组成的组;以及

[0103] 亲水性表面活性剂,所述亲水性表面活性剂包括聚山梨酯。

[0104] 在一种实施方案中,纳米乳剂颗粒包含:

[0105] 疏水性核,所述疏水性核包含以下的混合物:

[0106] 一个或更多个无机纳米颗粒,所述一个或更多个无机纳米颗粒包含任选地包被有TOPO的氢氧化铝或羟基氧化铝纳米颗粒,以及

[0107] 液体油,所述液体油包含天然存在的或合成的角鲨烯;

[0108] 阳离子脂质DOTAP;

[0109] 疏水性表面活性剂,所述疏水性表面活性剂包括失水山梨醇单硬脂酸酯;以及

[0110] 亲水性表面活性剂,所述亲水性表面活性剂包括聚山梨酯80。

[0111] 在该LION组合物中,LION颗粒可以包含约0.2%w/v至约40%w/v角鲨烯、约0.001%w/v至约10%w/v氢氧化铝或羟基氧化铝纳米颗粒、约0.2%w/v至约10%w/v DOTAP、约0.25%w/v至约5%w/v失水山梨醇单硬脂酸酯和约0.5%w/v至约10%w/v聚山梨酯80。

[0112] 在一种实施方案中,LION颗粒包含约2%w/v至约6%w/v角鲨烯、约0.01%w/v至约1%w/v氢氧化铝或羟基氧化铝纳米颗粒、约0.2%w/v至约1%w/v DOTAP、约0.25%w/v至约1%w/v失水山梨醇单硬脂酸酯和约0.5%w/v至约5%w/v聚山梨酯80。

[0113] 文献中已经描述了纳米颗粒和纳米乳剂,并且该术语在本文中用于指具有小于1000纳米的尺寸的那些颗粒。

[0114] 纳米乳剂颗粒(LION)通常具有范围为约20nm至约200nm的平均直径(通过动态光散射测量的z-平均流体动力学直径)。在一些实施方案中,LION颗粒的z-平均直径范围为约20nm至约150nm、约20nm至约100nm、约20nm至约80nm、约20nm至约60nm。在一些实施方案中,LION颗粒的z-平均直径范围为约40nm至约200nm、约40nm至约150nm、约40nm至约100nm、约40nm至约90nm、约40nm至约80nm或约40nm至约60nm。在一种实施方案中,LION颗粒的z-平均直径为约40nm至约80nm。在一种实施方案中,LION颗粒的z-平均直径为约40nm至约60nm。

[0115] 纳米乳剂颗粒(LION)的平均多分散指数(PDI)范围可以为约0.1至约0.5。例如,

LION颗粒的平均PDI范围可以为约0.2至约0.5、约0.1至约0.4、约0.2至约0.4、约0.2至约0.3或约0.1至约0.3。

[0116] LION-生物活性剂复合物.

[0117] 纳米乳剂组合物可以还包含与纳米乳剂颗粒(LION)缔合/复合的生物活性剂。生物活性剂可以经由非共价相互作用或经由可逆共价相互作用与纳米乳剂颗粒缔合/复合。

[0118] 生物活性剂可以是蛋白或编码蛋白的生物活性剂。例如,生物活性剂可以是蛋白抗原或编码蛋白抗原的生物活性剂。抗原可以来源于以下或与以下免疫交叉反应:感染性病原体和/或与感染、癌症或自身免疫性疾病相关的表位、生物分子、细胞或组织。

[0119] 在一些实施方案中,生物活性剂是核酸,诸如RNA或DNA。各种RNA可以与LION颗粒缔合用于递送,包括调节固有免疫应答的RNA、编码蛋白或抗原的RNA、沉默RNA、微RNA、tRNA、自我复制RNA等。

[0120] 在一种实施方案中,生物活性剂是mRNA。在一种实施方案中,生物活性剂是溶瘤病毒RNA。在一种实施方案中,生物活性剂是复制子RNA。

[0121] 在某些实施方案中,生物活性剂是编码抗原的RNA或抗体的RNA。抗原可以来源于细菌疾病、病毒疾病、原生动物疾病、非传染性疾病、癌症或自身免疫性疾病。在某些实施方案中,抗原来源于RNA病毒,诸如肝炎病毒、冠状病毒、蚊传病毒(例如委内瑞拉马脑炎(VEE)病毒或黄病毒,诸如ZIKV病毒)或HIV病毒。在某些实施方案中,抗原来源于选自由MERS病毒和SARS病毒(诸如SARS-CoV-2)组成的组的冠状病毒。

[0122] 在某些实施方案中,生物活性剂是非编码RNA。

[0123] 生物活性剂也可以是佐剂。合适的佐剂包括TLR激动剂、RIG-I激动剂、皂苷、肽、蛋白、碳水化合物、碳水化合物聚合物、缀合的碳水化合物、全病毒颗粒、病毒样颗粒、病毒碎片、细胞碎片及其组合。

[0124] 在某些实施方案中,佐剂是TLR激动剂或RIG-I激动剂。示例性TLR激动剂包括TLR2、TLR3、TLR4、TLR7、TLR8或TLR9激动剂。典型的TLR激动剂是TLR3激动剂,诸如RIBOXXOL、聚(LC)或Hiltonol®。

[0125] 在某些实施方案中,生物活性剂是双链RNA。

[0126] 在某些实施方案中,生物活性剂是作为免疫刺激物的RNA。免疫刺激物可以是TLR3激动剂(例如,TLR2、TLR3、TLR4、TLR7、TLR8或TLR9激动剂)或RIG-I激动剂(例如,PAMP)。典型的TLR激动剂是TLR3激动剂,诸如RIBOXXOL、聚(LC)或Hiltonol®。

[0127] 作为递送作为抗原的RNA的替代或除了递送作为抗原的RNA之外,可以使用组合物,例如与刺激固有免疫应答的RNA或释放溶瘤病毒或减毒活病毒的RNA组合的RNA抗原。

[0128] 在某些实施方案中,纳米乳剂组合物中的生物活性剂可以包括编码抗原的RNA与可以刺激固有免疫应答或可以释放溶瘤病毒或减毒活病毒的另一RNA的组合。可选地,包含编码抗原的RNA的纳米乳剂组合物可以与包含可以刺激固有免疫应答或可以释放溶瘤病毒或减毒活病毒的另一RNA的制剂组合。

[0129] 在纳米乳剂组合物中,(i)纳米乳剂颗粒(LION)与(ii)生物活性剂的摩尔比可以通过氮与磷(phosphate)摩尔比来表征,其范围可以为约0.01:1至约1000:1,例如,约0.2:1至约500:1、约0.5:1至约150:1、约1:1至约150:1、约1:1至约125:1、约1:1至约100:1、约1:1至约50:1、约1:1至约50:1、约5:1至约50:1、约5:1至约25:1或约10:1至约20:1。可以选择纳

米乳剂颗粒(LION)与生物活性剂的摩尔比,以增加生物活性剂在受试者中的递送效率,增加携带生物活性剂的纳米乳剂组合物在受试者中引发针对抗原免疫应答的能力,增加携带生物活性剂的纳米乳剂组合物在受试者中引发针对抗原的抗体滴度的产生。在某些实施方案中,纳米乳剂颗粒(LION)与生物活性剂的摩尔比通过氮与磷(N:P)摩尔比表征,范围为约1:1至约150:1、约5:1至约25:1或约10:1至约20:1。在一种实施方案中,纳米乳剂组合物的N:P摩尔比为约15:1。

[0130] 通过与生物活性剂复合,纳米乳剂组合物可以将生物活性剂递送至细胞。细胞可以在有需要的受试者中。例如,在生物活性剂是蛋白抗原或编码蛋白抗原时,携带生物活性剂的纳米乳剂组合物可以在受试者中引发针对抗原的免疫应答。纳米乳剂组合物可以通过在受试者中引发针对抗原的抗体滴度,例如,通过在受试者中诱导中和抗体滴度来完成这一点。

[0131] 在一种实施方案中,包含LION的纳米乳剂组合物,当以有效量施用至受试者时,可以引发的针对抗原的免疫应答等于或大于当生物活性剂在没有LION的情况下施用至受试者时引发的免疫应答。

[0132] 不受理论的约束,纳米乳剂组合物中的疏水性表面活性剂可以对以下有贡献:增加纳米乳剂组合物向细胞递送生物活性剂的能力,或增加携带生物活性剂的纳米乳剂组合物在受试者中引发针对抗原的免疫应答的能力(当生物活性剂是蛋白抗原或编码蛋白抗原时)。例如,纳米乳剂组合物中的疏水性表面活性剂可以对增加纳米乳剂组合物携带生物活性剂的能力有贡献。

[0133] 在一种实施方案中,疏水性表面活性剂是失水山梨醇酯,并且与相同的纳米乳剂组合物但没有失水山梨醇酯疏水性表面活性剂相比,以足以增加纳米乳剂组合物向细胞(或受试者)递送生物活性剂的能力的量存在。

[0134] 在一种实施方案中,疏水性表面活性剂是失水山梨醇酯,并且与相同的纳米乳剂组合物但没有失水山梨醇酯疏水性表面活性剂相比,以足以增加携带生物活性剂的纳米乳剂组合物引发针对抗原的免疫应答的能力的量存在。

[0135] 在一种实施方案中,疏水性表面活性剂是失水山梨醇酯,并且当以有效量向受试者施用时,纳米乳剂组合物以比向受试者施用相同纳米乳剂组合物(但没有失水山梨醇酯疏水性表面活性剂)时引发的抗体滴度更高的水平引发针对抗原的抗体滴度。

[0136] 在一种实施方案中,疏水性表面活性剂是失水山梨醇酯,并且当以有效量向受试者施用时,纳米乳剂组合物以比向受试者施用相同纳米乳剂组合物(但没有失水山梨醇酯疏水性表面活性剂)时诱导的中和抗体滴度更高的水平在受试者中诱导中和抗体滴度。

[0137] 制备纳米乳剂组合物

[0138] 本发明的另一方面涉及一种制备纳米乳剂组合物的方法,所述方法包括:

[0139] (a)将一个或更多个无机纳米颗粒、液体油、一种或更多种脂质(例如阳离子脂质)和任选地疏水性表面活性剂混合,从而形成油相混合物;以及

[0140] (b)将所述油相混合物与水性溶液混合以形成纳米乳剂颗粒,所述水性溶液任选地包含亲水性表面活性剂。

[0141] 该方法还可以包括步骤(c)将所述纳米乳剂颗粒与包含生物活性剂的水性溶液混合,从而使所述生物活性剂与所述纳米乳剂颗粒复合。

[0142] 生物活性剂可以经由非共价相互作用或经由可逆共价相互作用与纳米乳剂颗粒缔合/复合。

[0143] 关于以上在本发明涉及包含纳米乳剂颗粒的纳米乳剂组合物的方面以及本发明涉及包含纳米乳剂颗粒和生物活性剂的纳米乳剂组合物的方面中讨论的纳米乳剂组合物、纳米乳剂颗粒(包含液体油、无机纳米颗粒、脂质诸如阳离子脂质、疏水性表面活性剂和亲水性表面活性剂)和生物活性剂的以上所有描述和所有实施方案均适用于本发明的这一方面。

[0144] 所得的纳米乳剂组合物可以以稀释或浓缩的形式制备。

[0145] 在某些实施方案中,纳米乳剂组合物可以(用任何合适的缓冲溶液)稀释至约1倍至约200倍,例如,约1倍至约100倍、约2倍至约50倍、约2倍至约30倍、约2倍至约20倍、约2倍至约10倍、约2倍至约5倍。在一种实施方案中,纳米乳剂组合物以2倍稀释。

[0146] 在某些实施方案中,纳米乳剂组合物可以浓缩约1倍至约100倍,例如,约2倍至约50倍、约2倍至约30倍、约2倍至约20倍、约2倍至约10倍、约2倍至约5倍。

[0147] 纳米乳剂组合物可以具有至少约100μg/ml的对生物活性剂(例如核酸,诸如RNA或DNA)的装载能力。

[0148] 纳米乳剂组合物中生物活性剂(例如核酸,诸如RNA或DNA)的剂量水平的范围可以为约0.001μg/ml至约1000μg/ml,例如,约0.002μg/ml至约500μg/ml、约1μg/ml至约500μg/ml、约2μg/ml至约400μg/ml、约40μg/ml至约400μg/ml或约10μg/ml至约250μg/ml。

[0149] 纳米乳剂组合物的用途

[0150] 本发明的各方面还涉及包含纳米乳剂颗粒和生物活性剂的纳米乳剂组合物的用途,包括例如,在药物组合物中作为疫苗递送系统,将生物活性剂递送至细胞或受试者,在受试者中产生免疫应答,以及治疗有需要的受试者。

[0151] 在一方面,本发明提供了一种药物组合物,所述药物组合物包括如本文描述的包含纳米乳剂颗粒和生物活性剂的纳米乳剂组合物。任选地,药物组合物可以包含药学上可接受的载体或赋形剂。如本文使用的术语“药学上可接受的载体或赋形剂”包括与药物施用相容的溶剂、分散介质、包衣、抗细菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。

[0152] 在另一方面,本发明提供了一种疫苗递送系统,所述疫苗递送系统包括如本文描述的包含纳米乳剂颗粒和生物活性剂的纳米乳剂组合物,以及任选地一种或更多种疫苗佐剂,其中生物活性剂是抗原或编码抗原的核酸分子。

[0153] 关于以上在本发明涉及包含纳米乳剂颗粒的纳米乳剂组合物的方面、本发明涉及包含纳米乳剂颗粒和生物活性剂的纳米乳剂组合物的方面以及本发明涉及制备纳米乳剂组合物的方法的方面中讨论的纳米乳剂组合物、纳米乳剂颗粒(包含液体油、无机纳米颗粒、脂质诸如阳离子脂质、疏水性表面活性剂和亲水性表面活性剂)、生物活性剂和纳米乳剂组合物的制备的以上所有描述和所有实施方案均适用于本发明涉及药物组合物和疫苗递送系统的这两方面。

[0154] 药物组合物和疫苗递送系统可以配制为用于各种施用途径,包括口服施用或肠胃外使用,诸如静脉内、肌内、皮内、皮下、眼内、鼻内、肺部(例如,通过吸入)、腹膜内或直肠内施用。

[0155] 在一种实施方案中,递送途径是肺部递送(例如,至肺),这可以通过不同的方法来

实现，包括使用雾化(nebulized)、气雾化(aerosolized)、胶束(micellular)或基于干粉的制剂。在一种实施方案中，药物组合物或疫苗递送系统被配制为以液体雾化器、基于气雾剂的吸入器和/或干粉分散装置施用。

[0156] 本发明的一方面涉及一种向细胞递送生物活性剂的方法，所述方法包括：使细胞与如本文描述的包含纳米乳剂颗粒和生物活性剂的纳米乳剂组合物接触。

[0157] 本发明的一方面涉及一种向受试者递送生物活性剂的方法，所述方法包括：向受试者施用如本文描述的包含纳米乳剂颗粒和生物活性剂的纳米乳剂组合物。

[0158] 关于以上在本发明涉及包含纳米乳剂颗粒的纳米乳剂组合物的方面、本发明涉及包含纳米乳剂颗粒和生物活性剂的纳米乳剂组合物的方面以及本发明涉及制备纳米乳剂组合物的方法的面中讨论的纳米乳剂组合物、纳米乳剂颗粒(包含液体油、无机纳米颗粒、脂质诸如阳离子脂质、疏水性表面活性剂和亲水性表面活性剂)、生物活性剂和纳米乳剂组合物的制备的以上所有描述和所有实施方案均适用于本发明涉及递送生物活性剂的方法的这两方面。

[0159] 如本文描述的，通过纳米乳剂颗粒向细胞或受试者递送生物活性剂的能力和效率可以通过调节纳米乳剂颗粒的组分、选择纳米乳剂颗粒(LION)与生物活性剂的摩尔比和/或选择生物活性剂的剂量来控制。

[0160] 本发明的一方面涉及一种用于在受试者中产生免疫应答的方法，所述方法包括：向受试者施用如本文描述的包含纳米乳剂颗粒和生物活性剂的纳米乳剂组合物，以及任选地佐剂，其中生物活性剂是抗原或编码抗原的核酸分子。

[0161] 本发明的一方面涉及在受试者中产生免疫应答的方法，所述方法包括：

[0162] (a)向受试者施用治疗有效量的编码蛋白抗原的生物活性剂，以及；

[0163] (b)向受试者施用治疗有效量的如本文描述的包含纳米乳剂颗粒和生物活性剂的纳米乳剂组合物，以及任选地佐剂，其中生物活性剂是蛋白抗原或编码蛋白抗原的核酸分子。

[0164] 关于以上在本发明涉及包含纳米乳剂颗粒的纳米乳剂组合物、涉及包含纳米乳剂颗粒和生物活性剂的纳米乳剂组合物、涉及制备纳米乳剂组合物的方法、涉及药物组合物以及涉及疫苗递送系统的方面中讨论的纳米乳剂组合物、纳米乳剂颗粒(包含液体油、无机纳米颗粒、脂质诸如阳离子脂质、疏水性表面活性剂和亲水性表面活性剂)、生物活性剂、纳米乳剂组合物的制备、药物组合物和疫苗递送系统的以上所有描述和所有实施方案均适用于本发明涉及产生免疫应答的方法的这两方面。

[0165] 这些方法中的施用途径与以上描述的用于施用药物组合物和疫苗递送系统的那些施用途径相同。

[0166] (a)步骤的施用和(b)步骤的施用可以同时发生。可选地，(a)步骤的施用和(b)步骤的施用可以间隔至少1周、至少2周、至少3周、至少1个月、至少6周、至少2个月、至少3个月、至少6个月或至少1年发生。

[0167] 本发明的一方面还涉及一种治疗或预防受试者的感染或疾病的方法，所述方法包括：向受试者施用治疗有效量的如本文描述的包含纳米乳剂颗粒和生物活性剂的纳米乳剂组合物，以及任选地药学上可接受的载体。

[0168] 关于以上在本发明涉及包含纳米乳剂颗粒的纳米乳剂组合物、涉及包含纳米乳剂

颗粒和生物活性剂的纳米乳剂组合物、涉及制备纳米乳剂组合物的方法、涉及药物组合物以及涉及疫苗递送系统的方面中讨论的纳米乳剂组合物、纳米乳剂颗粒(包含液体油、无机纳米颗粒、脂质诸如阳离子脂质、疏水性表面活性剂和亲水性表面活性剂)、生物活性剂、纳米乳剂组合物的制备、药物组合物和疫苗递送系统的以上所有描述和所有实施方案均适用于本发明涉及治疗或预防感染或疾病的方法的这一方面。

[0169] 这些方法中的施用途径与以上描述的用于施用药物组合物和疫苗递送系统的那些施用途径相同。

[0170] 待治疗的感染或疾病可以是细菌感染/疾病、病毒感染/疾病、原生动物疾病、非传染性疾病、癌症或自身免疫性疾病。在一些实施方案中,感染/疾病是由RNA病毒引起的病毒感染/疾病。RNA病毒可以是肝炎病毒、冠状病毒、蚊传病毒(例如委内瑞拉马脑炎(VEE)病毒或黄病毒,诸如ZIKV病毒)或HIV。为了预防或治疗这些疾病,纳米乳剂组合物中的生物活性剂可以是抗原或编码抗原的核酸分子,所述抗原来源于冠状病毒基因组。

[0171] 在某些实施方案中,RNA病毒是选自由MERS病毒和SARS病毒组成的组的冠状病毒。在一种实施方案中,SARS病毒是SARS-CoV-2。

[0172] 在一些实施例中,该方法涉及治疗或预防受试者中的冠状病毒(诸如SARS-CoV-2,“COVID-19”),并且该方法包括:

[0173] 向受试者施用治疗有效量的纳米乳剂组合物,所述纳米乳剂组合物包含纳米乳剂颗粒和生物活性剂,以及任选地佐剂,其中生物活性剂是:作为固有激动剂的RNA、或者抗原或编码抗原的核酸分子,所述抗原来源于冠状病毒基因组(例如,SARS-CoV-2基因组)。

[0174] 在某些实施方案中,生物活性剂是作为固有激动剂的RNA。在一种实施方案中,RNA是RIG-I激动剂,诸如PAMP。在一种实施方案中,RNA是TLR3激动剂,诸如RIBOXXOL、聚(LC)或Hiltonol®。

[0175] 在某些实施方案中,生物活性剂是编码来源于冠状病毒基因组(例如,SARS-CoV-2基因组)的抗原的RNA。在一种实施方案中,RNA是自我复制的。在一种实施方案中,RNA编码整个刺突“S”蛋白或刺突“S”蛋白的一部分。

[0176] 如以上讨论的,当无机固体纳米颗粒包含可经由成像方法检测的报告元件时,在所得的纳米乳剂颗粒施用至体内之后,可以对该纳米乳剂颗粒进行成像和追踪。例如,无机固体纳米颗粒可以包含可经由磁共振成像(MRI)检测的报告元件,诸如顺磁性、超顺磁性、亚铁磁性或铁磁性化合物。

[0177] 因此,本发明的一方面还涉及一种对受试者中的生物活性剂递送进行成像和/或追踪的方法,所述方法包括:

[0178] 向受试者施用如本文描述的包含纳米乳剂颗粒和生物活性剂的纳米乳剂组合物,其中无机纳米颗粒包含可经由磁共振成像检测的材料,以及

[0179] 用磁共振成像检测纳米乳剂组合物。

[0180] 在一种实施方案中,可MRI检测的无机固体纳米颗粒材料是铁氧化物、铁葡糖酸盐和铁硫酸盐。

[0181] 关于以上在本发明涉及包含纳米乳剂颗粒的纳米乳剂组合物、涉及包含纳米乳剂颗粒和生物活性剂的纳米乳剂组合物、涉及制备纳米乳剂组合物的方法、涉及药物组合物以及涉及疫苗递送系统的方面中讨论的纳米乳剂组合物、纳米乳剂颗粒(包含液体油、无机

纳米颗粒、脂质诸如阳离子脂质、疏水性表面活性剂和亲水性表面活性剂)、生物活性剂、纳米乳剂组合物的制备、药物组合物和疫苗递送系统的以上所有描述和所有实施方案均适用于本发明涉及对生物活性剂递送进行成像和/或追踪的方法的这一方面。

[0182] 纳米乳剂组合物的成像应用是非常有用的,因为它们允许实时追踪生物活性剂由纳米乳剂组合物(LION颗粒)在受试者中的递送。因此,LION不仅可以提供递送疗法,还可以通过成像进行自我报道/追踪疾病和治疗。

[0183] 本文已广泛地且一般性地描述了本发明。落入一般性的本公开内容内的每种较窄的种类和亚属的组群也形成本发明的部分。这包括本发明的带有从类(genus)去除任何主题的附带条件和负面限制的一般性描述,无论本文是否具体陈述了被去除(excised)的材料。在有冲突的情况下,应以本说明书包括术语的解释为准。此外,所有材料、方法和实例为说明性的而非意图限制。

## 实施例

[0184] 以下实例是仅为了说明性目的而不意图以任何方式限制本发明的范围。

[0185] 实施例1.实施例中采用的一般生产技术和材料

[0186] 材料。

[0187] 以下材料用于制备脂质无机纳米颗粒(LION)。在氯仿中的25mgFe/ml和不同平均直径(5nm、10nm、15nm、20nm、25nm和30nm)的铁氧化物纳米颗粒从Ocean Nanotech(San Diego,CA)购买。角鲨烯和Span®60(失水山梨醇单硬脂酸酯)从Millipore Sigma购买。Tween®80(聚乙二醇失水山梨醇单油酸酯)和柠檬酸钠二水合物从Fisher Chemical购买。阳离子脂质1,2-二油酰基-3-三甲基铵-丙烷的盐酸盐(DOTAP盐酸盐)从Corden Pharma购买。超纯水(18.2M欧姆-cm阻抗)从Milli-Q水纯化系统(Millipore Sigma)获得。

[0188] 标记为79-004的脂质无机纳米颗粒(LION)的产生。

[0189] 这些LION包含37.5mg/ml角鲨烯、37mg/ml Span®60、37mg/ml Tween®80、30mg/ml DOTAP盐酸盐、0.1mg/ml 10nm铁氧化物纳米颗粒和10mM柠檬酸钠二水合物。LION使用以下程序制备。

[0190] 在200ml烧杯中,添加0.4ml在氯仿中的25mgFe/ml的、具有10nm的数字加权平均直径的铁氧化物纳米颗粒。允许氯仿在通风柜中蒸发,留下干燥的铁氧化物纳米颗粒层。向铁氧化物纳米颗粒中添加3.7克Span®60、3.75克角鲨烯和3克DOTAP盐酸盐以制备“油”相。将油相在预热至60℃的水浴中声处理30分钟。单独地,在1升玻璃瓶中,通过将39克Tween®80添加至用Milli-Q水制备的1,000ml 10mM柠檬酸钠二水合溶液中来制备“水性”相。将水性相搅拌30分钟以允许Tween®80完全溶解。在Tween®80完全溶解之后,将96ml水性相转移至200ml烧杯中,并且在预热至60℃的水浴中孵育。向加热的油相添加96ml预热的水性相。立即使用VWR®200匀浆器(VWR International)将混合物乳化,直到产生乳状外观的均质胶体。胶体随后通过将流体在20,000psi通过LM10微流化器的Y型相互作用室进行处理。将流体通过直到通过动态光散射(Malvern Zetasizer Nano S)测量的z平均流体力学直径为54nm,具有0.2多分散指数。将微流化LION样品用200nm孔径的聚醚砜(PES)注射器式过滤器终端过滤。

[0191] 标记为79-006-A的脂质无机纳米颗粒(LION)的产生。

[0192] 这些LION包含37.5mg/ml角鲨烯、37mg/ml Span®60、37mg/ml Tween®80、30mg/ml DOTAP盐酸盐、0.2mg/ml 15nm铁氧化物纳米颗粒和10mM柠檬酸钠二水合物。LION使用以下程序制备。

[0193] 在200ml烧杯中,添加0.8ml在氯仿中的25mgFe/ml的、具有15nm的数字加权平均直径的铁氧化物纳米颗粒。允许氯仿在通风柜中蒸发,留下干燥的铁氧化物纳米颗粒层。向铁氧化物纳米颗粒中添加3.7克Span®60、3.75克角鲨烯和3克DOTAP盐酸盐以制备“油”相。将油相在预热至60℃的水浴中声处理30分钟。单独地,在1升玻璃瓶中,通过将39克Tween®80添加至用Milli-Q水制备的1,000ml 10mM柠檬酸钠二水合溶液中来制备“水性”相。将水性相搅拌30分钟以允许Tween®80完全溶解。在Tween®80完全溶解之后,将96ml水性相转移至200ml烧杯中,并且在预热至60℃的水浴中孵育。向加热的油相添加96ml预热的水性相。立即使用VWR®200匀浆器(VWR International)将混合物乳化,直到产生乳状外观的均质胶体。胶体随后通过将流体在20,000psi通过LM10微流化器的Y型相互作用室进行处理。将流体通过直到通过动态光散射(Malvern Zetasizer Nano S)测量的z平均流体力学直径为52nm,具有0.2多分散指数。将微流化LION样品用200nm孔径的聚醚砜(PES)注射器式过滤器终端过滤。

[0194] 标记为79-006-B的脂质无机纳米颗粒(LION)的产生。

[0195] 这些LION包含37.5mg/ml角鲨烯、37mg/ml Span®60、37mg/ml Tween®80、30mg/ml DOTAP盐酸盐、0.2mg/ml 15nm铁氧化物纳米颗粒和10mM柠檬酸钠二水合物。LION使用以下程序制备。

[0196] 在200ml烧杯中,添加0.8ml在氯仿中的25mgFe/ml的、具有15nm的数字加权平均直径的铁氧化物纳米颗粒。允许氯仿在通风柜中蒸发,留下干燥的铁氧化物纳米颗粒层。向铁氧化物纳米颗粒中添加3.7克Span®60、3.75克角鲨烯和3克DOTAP盐酸盐以制备“油”相。将油相在预热至60℃的水浴中声处理30分钟。单独地,在1升玻璃瓶中,通过将39克Tween®80添加至用Milli-Q水制备的1,000ml 10mM柠檬酸钠二水合溶液中来制备“水性”相。将水性相搅拌30分钟以允许Tween®80完全溶解。在Tween®80完全溶解之后,将96ml水性相转移至200ml烧杯中,并且在预热至60℃的水浴中孵育。向加热的油相添加96ml预热的水性相。立即使用VWR®200匀浆器(VWR International)将混合物乳化,直到产生乳状外观的均质胶体。胶体随后通过将流体在20,000psi通过LM10微流化器的Y型相互作用室进行处理。将流体通过直到通过动态光散射(Malvern Zetasizer Nano S)测量的z平均流体力学直径为59nm,具有0.2多分散指数。将微流化LION样品用200nm孔径的聚醚砜(PES)注射器式过滤器终端过滤。

[0197] 标记为79-011的脂质无机纳米颗粒(LION)的产生。

[0198] 这些LION包含9.4mg/ml角鲨烯、9.3mg/ml Span®60、9.3mg/ml Tween®80、7.5mg/ml DOTAP盐酸盐、0.05mg/ml 25nm铁氧化物纳米颗粒和10mM柠檬酸钠二水合物。LION使用以下程序制备。

[0199] 在200ml烧杯中，添加0.2ml在氯仿中的25mgFe/ml的、具有25nm的数字加权平均直径的铁氧化物纳米颗粒。允许氯仿在通风柜中蒸发，留下干燥的铁氧化物纳米颗粒层。向铁氧化物纳米颗粒中添加0.93克Span® 60、0.94克角鲨烯和0.75克DOTAP盐酸盐以制备“油”相。将油相在预热至60℃的水浴中声处理30分钟。单独地，在1升玻璃瓶中，通过将10克Tween® 80添加至用Milli-Q水制备的1,000ml 10mM柠檬酸钠二水合溶液中来制备“水性”相。将水性相搅拌30分钟以允许Tween® 80完全溶解。在Tween®80完全溶解之后，将99ml水性相转移至200ml烧杯中，并且在预热至60℃的水浴中孵育。向加热的油相添加96ml预热的水性相。立即使用VWR® 200匀浆器(VWR International)将混合物乳化，直到产生乳状外观的均质胶体。胶体随后通过将流体在20,000psi通过LM10微流化器的Y型相互作用室进行处理。将流体通过直到通过动态光散射(Malvern Zetasizer Nano S)测量的z平均流体力学直径为60nm，具有0.2多分散指数。将微流化LION样品用200nm孔径的聚醚砜(PES)注射器式过滤器终端过滤。

[0200] 标记为79-014-A的脂质无机纳米颗粒(LION)的产生。

[0201] 这些LION包含9.4mg/ml角鲨烯、0.63mg/ml Dynasan® 114(trimyristin)、9.3mg/mlSpan®60、9.3mg/ml Tween®80、7.5mg/ml DOTAP盐酸盐、0.05mg/ml 15nm铁氧化物纳米颗粒和10mM柠檬酸钠二水合物。LION使用以下程序制备。

[0202] 在200ml烧杯中，添加0.2ml在氯仿中的25mgFe/ml的、具有15nm的数字加权平均直径的铁氧化物纳米颗粒。允许氯仿在通风柜中蒸发，留下干燥的铁氧化物纳米颗粒层。向铁氧化物纳米颗粒中添加0.93克Span® 60、0.94克角鲨烯、0.063克Dynasan® 114和0.75克DOTAP盐酸盐以制备“油”相。将油相在预热至60℃的水浴中声处理30分钟。单独地，在1升玻璃瓶中，通过将10克Tween® 80添加至用Milli-Q水制备的1,000ml10mM柠檬酸钠二水合溶液中来制备“水性”相。将水性相搅拌30分钟以允许Tween® 80完全溶解。在Tween® 80完全溶解之后，将99ml水性相转移至200ml烧杯中，并且在预热至60℃的水浴中孵育。向加热的油相添加96ml预热的水性相。立即使用VWR® 200匀浆器(VWR International)将混合物乳化，直到产生乳状外观的均质胶体。胶体随后通过将流体在20,000psi通过LM10微流化器的Y型相互作用室进行处理。将流体通过直到通过动态光散射(Malvern Zetasizer Nano S)测量的z平均流体力学直径为60nm，具有0.2多分散指数。将微流化LION样品用200nm孔径的聚醚砜(PES)注射器式过滤器终端过滤。

[0203] 实施例2.LION制剂的稳定性

[0204] LION制剂是热稳定的。

[0205] 将不同制剂(如在实施例1中制备的，分别标记为79-004、79-006-A和79-006-B的LION)放置到指示温度的稳定室中。稳定性使用动态光散射通过粒径测量来确定。结果显示，LION制剂储存在4℃、25℃和42℃时形成稳定的胶体。如图1A-图1C中展示的，LION制剂中的颗粒在一定温度范围内和时间内显示出卓越的稳定性。

[0206] LION制剂保护RNA免受RNA酶的影响。

[0207] 该实施例显示，LION制剂保护RNA免受核糖核酸酶(RNA酶)催化的降解。免于RNA酶攻击的保护通过凝胶电泳表征。通过以预定的氮:磷(N:P)比混合将RNA分子与LION制剂复

合。使不同的LION制剂与RNA结合，并将复合物暴露于RNA酶。

[0208] 将100μl裸露(未配制)的RNA或与LION制剂(如在实施例1中制备的，分别标记为79-004、79-006-A、79-006-B和79-011的LION)以N:P为15复合的RNA与稀释至10mg/L的RNA酶A溶液(Thermo Scientific,EN053L)一起在室温孵育30分钟。在30分钟之后，添加稀释至1mg/ml的蛋白酶K溶液(Thermo Scientific,EO0491)，并将所有样品加热至55℃，持续10分钟。为了提取RNA，向所有样品中添加0.12ml苯酚:氯仿溶液(Invitrogen,15593-031)；将样品旋涡15秒，并且以13,300rpm离心15分钟。提取20μl上清液并且转移至PCR管中，并且向每个管中添加20μl乙二醛上样染料(Invitrogen,AM8551)。将所有样品在50℃加热20分钟。将包含250ng RNA的样品装载在凝胶电泳盒中的浸入Northern Max Gly Gel Prep运行缓冲液(Ambion,AM8678)中的1％琼脂糖凝胶的孔中。凝胶在120V运行45分钟，并且在凝胶记录系统中成像。结果示于图2中。

[0209] 图2示出了与裸露(未配制)的RNA相比，示例性LION制剂(如在实施例1中制备的，分别标记为79-004、79-006-A、79-006-B和79-011的LION)与RNA分子以氮:磷(N:P)比为15复合的凝胶电泳。图2展示了LION制剂保护的RNA对RNA酶作用的稳定性。如图2中示出的，用RNA酶处理的裸露RNA(没有与LION制剂复合)被完全破坏，而所有LION制剂保护了与其复合的RNA。

[0210] 实施例3.使用LION制剂用于蛋白表达——分泌型胚胎碱性磷酸酶“SEAP”表达

[0211] 该实施例显示，LION制剂驱动高水平的分泌型胚胎碱性磷酸酶(SEAP)表达。将编码感兴趣蛋白的信使RNA分子与LION制剂复合，将其递送到生物体的细胞的细胞质中。信使RNA经历细胞内翻译并产生感兴趣的蛋白。减弱的复制型甲病毒属委内瑞拉马脑炎病毒(TC-83)的子基因组通过用分泌型胚胎碱性磷酸酶(SEAP)取代VEE结构蛋白进行修饰。

[0212] 将1μg修饰的编码SEAP的复制子RNA(RNA-SEAP)与标记为79-004的LION制剂(10nm，实施例1)以N:P为15复合，并且在C57BL/6小鼠(n＝3)中肌内施用(50μl)。将小鼠以规律的间隔取血，并且蛋白表达通过测定在第-1天(注射前)、第3天、第5天、第7天、第9天、第11天、第13天、第15天和第20天的小鼠血清SEAP来确定。小鼠中SEAP表达随注射后的天数的变化的结果示于图3A中。

[0213] 图3A示出了，与LION制剂复合的信使RNA可以在延长时间段(注射之后20天)内表达稳健水平的分泌蛋白。

[0214] 核无机粒径的影响

[0215] 将编码SEAP的RepRNA(1μg)与标记为79-004、79-006-A或79-006-B的LION制剂(具有不同SPIO尺寸，参见实施例1)以N:P比为15复合，并且在C57BL/6小鼠(n＝3/制剂)中肌内施用(50μl)。将小鼠以规律的间隔取血，并且蛋白表达通过测定在第4天、第6天、第8天、第11天、第13天、第15天和第20天的小鼠血清SEAP来确定。小鼠中SEAP表达随注射后的天数的变化的结果示于图3B中。对数转换的数据通过双因素ANOVA和Tukey多重比较检验进行分析。

[0216] 图3B示出了具有不同平均直径的核无机SPIO纳米颗粒的LION制剂都成功地在体内在延长时间段内诱导相似的稳健水平的蛋白表达，其中SEAP表达在三种制剂之间没有统计学上的显著差异。因此，SPIO颗粒的直径表现为不影响LION制剂递送repRNA分子和repRNA分子的蛋白表达水平的能力。

[0217] LION递送与NLC递送

[0218] 将修饰的编码SEAP的repRNA(RNA-SEAP)(1μg)与标记为79-004的LION制剂(10nm，实施例1)以N:P为15复合或与作为对照的纳米结构脂质载体(NLC)复合。将所得RNA-LION制剂在C57BL/6小鼠(n＝3)中肌内施用(50μl)。将小鼠以规律的间隔取血，并且蛋白表达通过测定小鼠血清SEAP来确定。小鼠中SEAP表达随注射后天数的变化的结果示于图3C中。

[0219] 对照是纳米结构脂质载体(NLC)，它是固体脂质(三肉豆蔻酸甘油酯-dynasan)和液体油(角鲨烯)乳化后形成半结晶核的混合物。参见Erasmus等人“ANanostructured Lipid Carrier for Delivery of a Replicating Viral RNA Provides Single,Low-Dose Protection against Zika,”Mol.Ther.26(10):2507-22(2018)中关于NLC的更详细描述，该文献通过引用以其整体并入本文。

[0220] 如图3C中示出的，相比于与NLC复合的编码SEAP的repRNA，与LION制剂复合的编码SEAP的repRNA导致在每个时间点更高的总体SEAP表达水平。这表明与NLC相比，LION制剂充当了用于repRNA分子的更好的递送媒介物。此外，如图3C中示出的，SEAP表达在第8天左右达到峰值，并且到第21天，对于对照NLC组SEAP表达恢复至基线，并且对于LION组SEAP表达恢复至基线的0.5对数。

[0221] RNA复合浓度的影响

[0222] 将编码SEAP的RepRNA与LION制剂(15nm，相似于实施例1中的79-006A)以N:P比为15以不同复合浓度复合。将所得RNA-LION制剂在C57BL/6小鼠(n＝5/制剂)中肌内施用。将小鼠在肌内注射之后以规律的间隔取血，并且蛋白表达通过测定小鼠血清来确认。小鼠中SEAP表达随注射后的天数的变化的结果示于图3D中。

[0223] RNA复合浓度对LION/repRNA复合物的尺寸产生影响。具有10倍高的repRNA浓度(400ng/μl与40ng/μl)的LION/repRNA复合物导致约41％更大的LION/repRNA-SEAP复合物和24％更宽的尺寸分布。

[0224] 如图3D中示出的，对于具有400ng/μl与40ng/μl的浓度的LION/repRNA复合物，在每个时间点的平均SEAP平均浓度不存在显著差异(使用Mann-Whitney检验)，表明复合浓度对repRNA递送和蛋白表达没有显著影响。对于任何一种repRNA浓度(400ng/μl与40ng/μl)，免疫接种了LION/repRNA-SEAP制剂的小鼠血清中SEAP表达浓度在肌内注射后第7天达到峰值，并且到第21天恢复至背景水平。

[0225] N:P和RNA剂量的影响

[0226] 将编码SEAP的RepRNA(分别以0.5μg、2.5μg和12.5μg)与LION制剂(15nm，相似于实施例1中的79-006A)以不同N:P比复合。将所得RNA-LION制剂在C57BL/6小鼠(n＝4/制剂)中肌内施用。将小鼠在肌内注射之后7天取血，并且蛋白表达通过测定小鼠血清来确认。小鼠中SEAP表达随N:P比的变化的结果示于图3E中。

[0227] 图3E示出了N:P比和RNA剂量对LION配制的repRNA的生物活性的影响。

[0228] 实施例4.使用LION制剂用于疫苗递送

[0229] 该实施例显示，由LION复合的RNA表达的抗原是高度免疫原性的，并且诱导抗体。将编码疫苗抗原的RNA分子与LION制剂复合，将其递送到生物体的细胞的细胞质中。RNA经历细胞内翻译，并且产生疫苗抗原。生物体通过产生针对抗原的抗体而产生免疫应答。

[0230] 将编码全长形式的刺突“S”蛋白的自我复制的“sr”RNA制剂与LION混合并配制。将

小鼠肌内免疫接种10μg、1μg和0.1μg剂量水平的srRNA的配制的测试品一次。在免疫接种后14天，将动物取血，制备血清，并且以等分试样储存在-20℃，直到使用。抗原特异性IgG浓度使用针对截短的受体结合结构域(RBD)蛋白片段的多克隆IgG标准品来确定。结果示于图4A中。如在图4A中观察到的，由不同剂量的RNA(分别为10μg、1μg和0.1μg)的LION/repRNA制剂表达的抗原都诱导了针对SARS-CoV-2受体结合结构域的强且稳健的免疫应答。即使在非常低的RNA浓度(0.1μg)也观察到稳健的滴度。

[0231] 核无机粒径的影响;LION递送对比NLC递送

[0232] 将与不同SPIO尺寸的不同LION制剂(分别为LION-10、LION-15、LION-25、LION-5)复合的RepSARS-CoV2S RNA或与作为对照的纳米结构脂质载体(NLC)复合的RepSARS-CoV2S RNA在C57BL/6小鼠中肌内施用。标记为LION-10、LION-15、LION-25和LION-5的制剂分别对应于标记为79-004、79-006-A、79-006-B、79-011、79-014-A的LION组合物(参见下表1;另参见实施例1)。将小鼠在肌内注射之后以规律的间隔取血，并且蛋白表达通过用抗刺突(抗S)酶联免疫吸附测定(ELISA)测定IgG浓度来确定。C57BL/6小鼠血清中抗S IgG浓度随注射后周数的变化的结果示于图4B中。

[0233] 图4B示出了具有不同平均直径的核无机SPIO纳米颗粒的LION制剂都成功地在体内在延长时间段内保留抗原的生物活性并且诱导稳健的免疫应答水平。此外，与LION制剂复合的所有RepSARS-CoV2S RNA都产生比与对照NLC复合的RepSARS-CoV2S RNA更大的应答。

[0234] 混合方向和稀释的影响

[0235] 将通过改变混合方向(将LION混合至RNA中与将RNA混合至LION中)和稀释(使用蔗糖(Suc)进行1:200稀释与使用右旋糖(Dex)进行1:200稀释)制备的与不同LION制剂复合的RepSARS-CoV2S RNA在C57BL/6小鼠中肌内施用。将小鼠在肌内注射之后第14天(每组第一个柱)或第21天(每组第二个柱)取血，并且蛋白表达通过用抗刺突ELISA测定IgG浓度来确定。结果示于图4C中。

[0236] 如图4C中示出的，混合方向(无论是将LION混合至RNA中还是将RNA混合至LION中)不影响抗原的生物活性和LION制剂递送RNA的能力。此外，改变LION-RNA制剂的稀释剂(右旋糖或蔗糖)不影响抗原的生物活性。

[0237] 实施例5.对LION制剂成像

[0238] 该实施例显示，LION制剂可以发射信号用于MRI成像。向生物体施用与RNA分子复合的LION制剂或与纳米颗粒表面的分子或与包封在脂质核中的分子缀合的LION制剂。随后将生物体放置在成像仪器中并暴露于电磁波，并且LION纳米颗粒用于增强对比度。结果示于图5A-图5B中。

[0239] 图5A-图5B示出了T1(图5A)和T2(图5B)弛豫时间随LION制剂中铁浓度的增强。图5A-图5B中鉴定的LION制剂的组合物对应于根据实施例1分别标记为79-004、79-006-A、79-006-B、79-011、79-014-A的每种LION组合物(参见下表1)，不同之处在于LION组合物中铁氧化物的浓度根据图中的X轴而变化。

[0240] 图5总结了使用LION颗粒79-004、79-006-A、79-006-B、79-011和79-014-A在磁共振成像(MRI)中增强T1和T2两者对比度的能力。r1、r2弛豫率和r2/r1比总结于表1中。

[0241] 表1.含有具有不同核直径的铁氧化物核的LION制剂的MR弛豫率(r1和r2)和r2/r1

比。

[0242]

| 制剂 | 79-004 | 79-006-A | 79-006-B | 79-011 | 79-014-A |
|---|---|---|---|---|---|
| 替代名称 | LION-10 | LION-15 | LION-5 | LION-25 | LION/NLC-15 |
| r1[mM-1s-1] | 0.66 | 0.91 | 0.74 | 0.63 | 0.76 |
| r2[mM-1s-1] | 1.12 | 1.59 | 0.46 | 2.47 | 1.60 |
| r2/r1 | 1.70 | 1.75 | 0.63 | 3.94 | 2.10 |

[0243] 实施例6.使用LION制剂用于抗体表达

[0244] 该实施例显示抗体可以从LION-复合物RNA释放出来。将编码抗体的RNA分子与LION制剂复合,并递送到生物体的细胞的细胞质中。信使RNA经历细胞内翻译并产生抗体。

[0245] 具有编码靶向寨卡病毒(Zika virus)的单克隆抗体的复制子RNA的LION制剂

[0246] 图6A示出了识别在用不同SPIO尺寸的LION制剂(分别为LION-10、LION-15、LION-25、LION-5)的LION/抗体序列RNA(以40μg RNA)制剂免疫接种动物之后产生的寨卡病毒的人类单克隆抗体(ZIKV-117)的稳健水平。将动物在免疫接种之后7天取血。结果表明LION制剂可以用于在活生物体中产生抗体。与抗体序列RNA配制的纳米结构脂质载体(NLC)用作对照。如图6A中示出的,相比于与NLC复合的抗体序列RNA,与每种SIPO尺寸的LION制剂复合的抗体序列RNA产生更高的总体ZIKV-117表达水平。这表明与NLC相比,LION制剂充当了用于抗体序列RNA的更好的递送媒介物。

[0247] 在兔模型中用于母源免疫接种的具有HIV和ZIKV候选疫苗的LION制剂

[0248] 图6B和图6C示出了通过肌内途径免疫接种了盐水(图6B)或用LION配制的编码BG505 SOSIP.664三聚体的repRNA(图6C)的成年雌性孕兔中的抗BG505 SOSIP.664IgG抗体的量值和动力学。图6D和图6E示出了通过肌内途径免疫接种了盐水(图6D)或用LION配制的编码ZIKV prM-E抗原的repRNA(图6E)的成年雌性孕兔中的抗ZIKV E IgG抗体的量值和动力学。第1周左右的阴影区域标记了兔交配时的时间段。第6周与第7周之间的阴影区域标记了分娩幼兔时的时间段。箭头标记了免疫接种时间点(第0周、第4周和第11周)。结果显示,对于两种LION/repRNA制剂,由LION/repRNA制剂表达的抗原都诱导了强且稳健的免疫应答,并且都产生了强的抗体水平。

[0249] 图6F和图6G示出了抗SOSIP IgG从雌兔(rabbit doe,female rabbit)向幼兔(rabbit kit,rabbit baby)子宫内转移的评价结果。图6F示出了在分娩时幼兔的抗SOSIP IgG应答。每个处理组来自每个同窝的最少两只幼兔被安乐死,以评价子宫内抗体转移。图6G示出了展示雌兔和对应的幼兔中抗体水平之间的正相关(Pearson r=0.94)的XY图。这些图展示了抗体从繁殖雌兔向幼兔的物质转移。

[0250] 图6H和图6I示出了在先前存在母源抗体的背景下疫苗诱导的应答。在加强后4周(在幼兔断奶之后3周)的幼兔中采集血清抗SOSIP IgG水平。将来自接收盐水的雌兔的幼兔或来自接收LION+RNA-prM/E的雌兔的幼兔分组为先前存在的针对BG505 SOSIP.664的母源抗体阴性(-)。将来自接收LION+RNA-SOSIP或AddaVax佐剂重组BG505 SOSIP.664的雌兔的幼兔分组为先前存在的针对BG505 SOSIP.664的母源抗体阳性(+)。数据显示,先前存在的抗体对疫苗介导的抗体诱导没有显著影响,并且被动转移到幼兔中的抗体在幼兔中对疫苗介导的抗体诱导没有负面影响。

[0251] 实施例7.使用LION制剂用于在非人灵长类动物中疫苗递送——单剂量复制RNA疫

苗在非人灵长类动物中诱导针对SARS-CoV-2的中和抗体

[0252] 该实施例讨论了稳定且高度免疫原性的候选疫苗repRNA-CoV2S的开发，包括用被设计为增强疫苗稳定性、递送性和免疫原性的新型脂质无机纳米颗粒(LION)配制的RNA复制子。

[0253] 疫苗设计、制备和表征

[0254] 由严重急性呼吸综合征冠状病毒-2(SARS-CoV-2)感染引起的冠状病毒疾病2019(COVID-19)已被宣布为世界性流行病。冠状病毒是具有大的基因组和四种主要结构蛋白(刺突(S)、包膜、膜和核壳)的开放阅读框的包膜的单链正义RNA病毒。S蛋白介导冠状病毒与多种细胞类型包括肺泡上皮细胞的表面的血管紧张素转换酶2(ACE2)的结合。可以通过针对S蛋白的中和抗体介导保护，如大多数针对相关SARS-CoV开发的实验疫苗掺入了S蛋白或其受体结合结构域(RBD)，目的是诱导稳健的中和应答。先前的报道显示人类中和抗体保护了用SARS-CoV和中东呼吸综合征(MERS)-CoV攻击的小鼠，表明针对SARS-CoV-2的保护可能是通过抗S抗体介导的。另外，驱动2型辅助性T(Th2)应答的SARS疫苗与用SARS-CoV攻击后肺免疫病理增强相关，而具有1型辅助性T(Th1)偏倚免疫应答的SARS疫苗与不存在免疫病理的保护增强相关。因此，有效的COVID-19疫苗可能需要诱导Th1偏倚免疫应答，包括SARS-CoV-2特异性中和抗体。

[0255] 核酸疫苗已成为快速疫苗设计的理想模式，仅需要靶抗原的基因序列，并且消除了对病原体培养(灭活疫苗或减毒活疫苗)或大规模重组蛋白生产的依赖。此外，核酸疫苗可以避免可以减弱病毒载体疫苗免疫原性的先前存在的免疫。临床试验已经启动了用脂质纳米颗粒(LNP)配制的信使RNA(mRNA)疫苗和通过电穿孔递送的DNA疫苗。然而，mRNA疫苗和DNA疫苗在单次免疫接种之后可能不能在人类中诱导保护效力，因为与灭活疫苗和重组亚基蛋白疫苗相似，它们通常需要在延长时间段内多次施用才能生效。

[0256] 病毒来源的复制子RNA(repRNA)疫苗于1989年首次被描述，并且以病毒样RNA颗粒(VRP)、体外转录(IVT)的RNA和质粒DNA的形式递送。在repRNA中，编码病毒RNA聚合酶复合物(最常见地来自甲病毒属)的开放阅读框是完整的，但结构蛋白基因被抗原编码基因替代。虽然传统mRNA疫苗由进入的RNA分子直接进行翻译，但将repRNA引入到细胞中启动编码抗原的RNA的持续生物合成，导致表达和持续时间显著增加，显著增强体液和细胞免疫应答。此外，repRNA疫苗模拟甲病毒感染，其中触发病毒感应应激因子并且通过Toll样受体和视黄酸诱导型基因(RIG)-I激活固有通路，以产生干扰素、促炎因子和抗原呈递细胞的趋化性，以及促进抗原交叉初免(antigen cross-priming)。因此，repRNA用作其自身的佐剂，在单次剂量之后相对于传统mRNA(通常需要多次和1,000倍高的剂量)引发更稳健的免疫应答。

[0257] 因此，repRNA疫苗被选为阻止像COVID-19的大流行爆发的候选疫苗，因为repRNA疫苗已经被研究，具有一些经验，通常仅需要单次施用就有效，并且可以具有以较少和较低的剂量快速诱导保护性免疫水平的潜力，而同时减少大规模制备的负担。

[0258] 如图7A中示出的，产生了掺入来自SARS-CoV-2刺突(S)蛋白(包括全长S)的序列的repRNA(repRNA-CoV2S)。与c末端v5表位标签融合的密码子优化的全长刺突(S)开放阅读框(包括对应于SARS-CoV-2分离株Wuhan-Hu-1(GenBank:MN908947.3)中的位置21,536至25,384的S1跨膜(TM)结构域、S2跨膜(TM)结构域和细胞质(CD)结构域)被克隆到编码委内瑞拉

马脑炎病毒TC-83毒株的4个非结构蛋白(nsP1-4)基因的甲病毒复制子中。在RNA转录和加帽后,将repRNA-COV2S转染到BHK细胞中。24小时后,将细胞通过抗v5免疫荧光和蛋白印迹进行分析,使用恢复期人类血清或抗v5进行免疫检测,分别使用重组SARS-CoV2刺突蛋白(rCoV2-Spike)和repRNA-GFP作为阳性对照和阴性对照。图7B和7C中的结果显示了加v5标签的S蛋白在BHK细胞中的有效表达。图7C还展示了BHK细胞中S蛋白的内源表达,该S蛋白与天然SARS-CoV-2免疫血清反应,利用COVID-19发作后29天采集的恢复期血清作为免疫检测试剂。

[0259] 用LION配制repRNA-CoV2S

[0260] 接下来,将repRNA-CoV2S用设计为增强疫苗稳定性和疫苗的细胞内递送的示例性脂质无机纳米颗粒(LION)配制。在小鼠中评价了LION/repRNA-CoV2S制剂快速产生抗体和T细胞应答的能力。

[0261] 用于制备LION组合物的一般生产技术和材料遵循实施例1中公开的技术和材料。示例性LION是具有嵌入在疏水性油相中的15nm超顺磁性铁氧化物($Fe_3O_4$)纳米颗粒(SPIO)的非常稳定的阳离子角鲨烯乳剂。图8A是示例性LION和将LION与repRNA混合之后形成疫苗复合物的简要图形表示。角鲨烯是疫苗佐剂。SPIO纳米颗粒在MRI造影和静脉内铁替换疗法中具有临床用途;SPIO的独特的非线性磁特性也使其能够在一系列成像、靶向和疗法应用中具有新型用途。LION还包含阳离子脂质1,2-二油酰基-3-三甲基铵丙烷(DOTAP),在通过1:1(v/v)混合步骤组合时,DOTAP能够与RNA分子静电缔合。如实施例1中公开的,该示例性LION具有通过动态光散射(DLS)测量的52nm的强度加权平均直径(PDI=0.2)。如图8B中示出的,LION制剂在4℃和25℃储存时胶体稳定持续至少3个月。

[0262] 在将LION与repRNA混合时,阴离子repRNA与LION表面的阳离子DOTAP分子之间的静电缔合促进了复合物的立即形成。LION-repRNA复合物的形成通过DLS检测的粒径增加至90nm的强度加权平均直径来确认(参见图8C)。如图8D中示出的,与未配制repRNA(裸露)相比,在浓缩RNA酶攻击之后,通过用苯酚-氯仿处理提取的LION配制的repRNA分子的凝胶电泳分析显示出免受RNA酶催化降解的实质性保护。为了评价配制的疫苗的短期稳定性,repRNA完整性和复合物稳定性在混合并且在4℃和25℃储存之后1天、4天和7天进行评价,如通过用苯酚-氯仿处理提取的repRNA的凝胶电泳和复合物的粒径确定的。如图8E和图8F中示出的,在所有时间点,LION都维持了repRNA分子的完全完整性(图8E),并且复合物维持了其尺寸(图8F),指示配制的疫苗复合物在混合后至少一周是稳定的。

[0263] LION/repRNA-CoV2S在小鼠中的递送

[0264] 向小鼠施用LION/repRNA-CoV2S复合物。6-8周龄C57BL/6小鼠(n=5/组)经由肌内途径接收10μg、1μg或0.1μg LION/repRNA-CoV2S。在初免免疫接种之后14天,收获血清。如图9A中示出的,用10μg或1μgLION/repRNA-CoV2S单次肌内免疫接种C57BL/6小鼠,在免疫接种后14天诱导了100%血清转换和分别具有200μg/ml和109μg/ml的平均结合滴度的稳健的抗S IgG水平,以及在0.1μg剂量的部分血清转换(5只中有2只)。如图9B中示出的,10μg和1μg仅初免剂量两者均诱导了中和抗体,分别具有1:643和1:226的平均50%抑制浓度(IC50),如通过假病毒中和测定(SARS-CoV-2Wuhan-Hu-1假型)测量的。虽然如通过与IgG1相比时显著更高的IgG2c应答指示的(参见图9C),所有剂量都诱导了Th1偏倚的免疫应答,,但如通过较高的IgG2c:IgG1比指示的(参见图9D),存在更高剂量诱导甚至更多Th1偏倚应答的趋势。

[0265] 鉴于如对于SARS和MERS所观察到的，特别是在存在减弱的抗体和记忆性B细胞应答的情况下，T细胞对保护有贡献的潜在作用，还在小鼠中评价了针对LION/repRNA-CoV2S的T细胞应答。在第28天，该同一群组小鼠接收第二次免疫接种。在12天后，收获脾和肺，并且用S蛋白的重叠15-mer肽文库刺激，并且IFN-γ应答通过酶联免疫吸附斑点(ELISpot)测定来测量。如图9E中示出的，接收10μg、1μg和0.1μg初免/加强的小鼠表现出稳健的脾T细胞应答，其中平均IFN-γ斑点数/$10^6$个细胞分别为1698、650和801。在肺中也检测到了稳健的T细胞应答，并且在组之间相似，其中平均IFN-γ斑点数/$10^6$个细胞分别为756、784和777(参见图9F)。

[0266] 老年人是最易感COVID-19的群体，但这一群体的免疫衰老对有效疫苗接种构成了障碍。为了评价免疫衰老对免疫原性的影响，2月龄、8月龄或17月龄BALB/C小鼠(n-5/组)经由肌内途径接收10μg或1μgLION/repRNA-CoV2S。在初免免疫接种之后14天，收获血清，并且测量抗S IgG浓度。如图10A中示出的，当与2月龄和8月龄小鼠相比时，在以两种剂量的17月龄小鼠中观察到显著更低的抗体滴度，表明在免疫衰老程度最高的群体中可能需要较高的剂量和/或另外的加强剂量来诱导足够的免疫。在2月龄与8月龄小鼠之间未观察到差异。尽管BALB/C小鼠在疫苗接种后趋向于发展更多的Th2免疫偏倚应答，但LION/repRNA-CoV2S在所有年龄组的BALB/C小鼠中诱导了大于1的IgG2a:IgG1比(参见图10B和图10C)，指示了Th1偏倚免疫应答。鉴于严重的、威胁生命的COVID-19表现为更常见于老年个体中而与辅助性T应答的类型无关，并且严重的SARS与偏向Th2抗体谱和Th1应答不足相关，LION/repRNA-CoV2S在8月龄和2月龄小鼠中(甚至在Th2偏倚的BALB/c品系中)诱导强的和Th1偏倚应答的能力提供了关于这种疫苗复合物的安全性和免疫原性的积极前景。

[0267] LION/repRNA-CoV2S在非人灵长类动物中的递送

[0268] 用LION/repRNA-CoV2S复合物在小鼠中获得了稳健的免疫原性，然后对猪尾猕猴(豚尾猴(Macaca nemestrina))进行免疫接种，以确定该疫苗复合物是否能够在非人灵长类动物模型(该模型在对疫苗接种的免疫应答方面更类似于人类)中诱导强的免疫应答。

[0269] 在图11A中示出的剂量方案中，三只猕猴在第0周经由肌内途径接收单次250μg剂量的LION/repRNA-CoV2S复合物，并且两只猕猴在第0周经由肌内途径接收50μg初免剂量并在第4周经由肌内途径接收加强剂量。在疫苗接种后10天、14天、28天、42天采集血液，以监测疫苗安全性和免疫原性。50μg组在第28天接收加强疫苗接种，14天后采集血液。直到初免疫苗接种后42天，在疫苗注射部位处未观察到反应，在动物中也没有不良反应。

[0270] 如图11B中示出的，对初免免疫接种之后10天、14天、28天和42天采集的血清进行的ELISA分析，对比通过免疫接种前抽血建立的基线，显示免疫接种了单次250μg剂量的所有三只猕猴早在第10天出现血清转换，到第42天，这三只动物中的抗S IgG浓度继续增加至48μg/ml、51μg/ml和61μg/ml。接收50μg repRNA-CoV2S的两只猕猴在单次剂量之后均出现血清转换，但与250μg组到第28天为7μg/ml、20μg/ml和45μg/ml的抗S IgG浓度相比，在该同一时间点产生了显著更低的抗体应答，抗S IgG浓度为1μg/ml和0.5μg/ml(参见图11B)。然而，在加强免疫接种之后14天，50μg组产生了与在该时间点的250μg仅初免组(48μg/ml、51μg/ml和61μg/ml)相似的抗S IgG浓度水平(18μg/ml和37μg/ml)(参见图11B)。另外，如图11C中示出的，来自免疫接种了仅单次250μg剂量的三只猕猴的血清中和了假病毒(SARS-CoV-2Wuhan-Hu-1假型)对体外细胞的转导，到第28天，倒数IC50滴度为1:38、1:20和1:47，到第

42天，倒数IC50滴度水平增加至1:472、1:108和1:149，而50μg组仅在加强免疫接种之后实现了相似的稳健IC50滴度，到第42天达到1:218和1:358的假病毒IC50滴度。

[0271] 通过80％噬斑减少中和测试(PRNT80)进一步分析疫苗接种后28天和42天采集的血清对野生型SARS-CoV-2/WA/2020的中和作用，并且与来自天然感染后15-64天采集的恢复期人类的血清的中和滴度进行比较。如图11D中示出的，用50μg和250μg LION/repRNA-CoV2S单次免疫接种，到第28天分别诱导了1:32和1:66的平均PRNT80滴度。到第42天，50μg组中的平均PRNT80滴度在加强免疫接种之后显著增加至1:176，并且仅初免250μg组中的平均PRNT80滴度显著增加至1:211。所有5只猕猴均产生了与在7个恢复期人类中测量的滴度相同范围内的PRNT80滴度(<1:20至1:1280，在发作后15天至64天采集)，并且所有5只疫苗接种的猕猴(1:197)和恢复期人类(1:518)之间的平均中和滴度不存在显著差异(P＝0.27，图11D)。最近，在疫苗接种了灭活SARS-CoV-2疫苗之后再次感染或受到攻击的恒河猴中，报道了血清中和滴度，其测量为中和SARS-CoV-2的50％组织培养感染剂量(TCID50)的IC50滴度。在前者的报道中，低至1:8的IC50滴度与保护免于再次感染相关，而在后者中，低至1:50的IC50滴度与减少病毒载量和保护免于肺部病理相关。这些数据表明，250μg仅初免或50μg初免/加强免疫接种LION/repRNA-CoV2疫苗将能够诱导足以保护非人灵长类动物免于感染和疾病的中和抗体水平。

[0272] 针对多种感染性疾病和癌症的repRNA疫苗在临床试验中被显示是安全且有效的，并且repRNA的无细胞和潜在的高度可扩展的制备过程，在与有效的合成制剂诸如LION一起使用时，比mRNA呈现出进一步的益处。双瓶法将提供显著优于包封RNA的LNP的制备和分配优势，因为疫苗可以根据需要储存和现场组合。另外，LION/repRNA-CoV-2复合物在小鼠中诱导了稳健的S特异性T细胞应答。在人类天然感染相关SARS-CoV后，一些个体中的中和抗体和记忆性B细胞应答被报道为是短期的(～3年)，而记忆性T细胞持续至少6年(53)，表明T细胞在长期应答中(特别是在缺乏稳健记忆性B细胞应答的那些中)的潜力作用。另外，针对相关SARS-CoV和MERS-CoV的抗-S的T细胞应答对分别感染SARS-CoV或MERS-CoV的正常以及老年小鼠中的病毒清除有贡献。

[0273] 总之，这些结果展示了LION/repRNA-CoV2S复合物诱导免于SARS-CoV-2感染的快速免疫保护的巨大潜力。能够在年轻和老年群体两者中以单次注射诱导抵抗SARS-CoV-2感染的稳健免疫的可扩大规模且广泛分配的疫苗将提供对大流行直接且有效的遏制。至关重要的是，该疫苗在年轻和老年小鼠两者中都诱导了Th1偏倚抗体和T细胞应答，这一属性与SARS-CoV感染患者中改善的恢复和轻度疾病结果相关。在非人灵长类动物中的单剂量施用引发了有效中和SARS-CoV-2的抗体应答。这些数据支持了LION/repRNA-CoV2S复合物作为用于保护免于SARS-CoV-2感染的疫苗的潜力。

[0274] 实施例8.使用LION制剂用于在兔中疫苗递送

[0275] 动物:8只新西兰白兔(穴兔(Oryctolagus cuniculus))，4只雄性和4只雌性，分为两组，每组2只雄性和2只雌性。组1注射了高剂量LION-RNA制剂(具有LION制剂的250μg repRNA)，并且组2注射了低剂量LION-RNA制剂(具有LION制剂的10μg repRNA)。

[0276] 疫苗制备:将LION载体和repRNA-CoV2S在10mM柠檬酸钠和20％蔗糖缓冲液中以氮与磷摩尔比为15复合，并且以3次0.5mL肌内剂量间隔2周递送至研究动物中。

[0277] ELISA:使用重组SARS-CoV-2S作为捕获抗原，通过ELISA检测抗原特异性IgG应答。

将ELISA板(Nunc,Rochester,Ny)用1μg/mL抗原或用系列稀释的纯化的多克隆IgG包被,在0.1M PBS缓冲液中产生标准曲线,并且用0.2% BSA-PBS封闭。然后,以连续的顺序,在以PBS/Tween洗涤后,将系列稀释的血清样品、抗兔IgG-HRP(Southern Biotech,Birmingham,AL)和TMB过氧化物酶底物添加到板中,然后用HCl淬灭。将板在405nm(ELX808,Bio-Tek Instruments Inc,Winooski,VT)处进行分析。使用来自每个血清稀释点的吸光度值计算滴度。

[0278] 图12示出了肌内注射了用LION制剂配制的repRNA-SARS-CoV2S(分别以250μg和10μg剂量水平)的兔中的抗刺突IgG水平。如实施例中示出的,动物针对注射的疫苗快速产生免疫应答。在第4周,在两个剂量水平中,抗体滴度几乎稳定,并且在第6周或第8周内没有显著增加。

[0279] 实施例9.使用LION制剂用于疫苗递送——RSV疫苗

[0280] 将与LION制剂复合的RSV repRNA(2.5μg)在C57Bl/6和BALB/c小鼠中肌内施用。肌内注射之后28天采集小鼠血液,并且蛋白表达通过用ELISA测定抗F IgG浓度来确定。C57Bl/6和BALB/c小鼠血清中抗F IgG水平的结果示于图13A中。如图13A中示出的,通过复制子646在C57BL/6和BALB/c小鼠两者中均诱导了RSV G蛋白特异性应答。

[0281] 将与LION制剂复合的RSV repRNA(2.5μg)在C57Bl/6和BALB/c小鼠中肌内施用。肌内注射之后28天采集小鼠血液,并且蛋白表达通过用ELISA测定抗G(A2)IgG浓度来确定。C57Bl/6和BALB/c小鼠血清中抗G(A2)IgG水平的结果示于图13B中。如图13B中示出的,通过复制子645在仅BALB/c小鼠中诱导了RSV G A2毒株蛋白特异性应答。

[0282] 实施例10.使用LION制剂用于递送免疫调节性RNA

[0283] LION制剂保护免疫调节性RNA PAMP免受RNA酶影响

[0284] 将RIG-I激动剂PAMP用示例性LION制剂(15nm,类似于实施例1中的79-006A)配制。用于制备LION组合物的一般生产技术和材料遵循实施例1中公开的技术和材料。

[0285] 图14A-图14B示出了PAMP与提供保护免于RNA酶攻击的LION制剂的结合。图14A示出了不同N:P复合比(分别为0.04、0.2、1、5和25)的PAMP-LION复合物在RNA凝胶上运行并评估游离RNA的凝胶电泳分析。如图14A中示出的,对于N:P比为1、5和25的PAMP-LION制剂,不存在游离RNA。图14B示出了用RNA酶A攻击后的PAMP-LION复合物与裸露PAMP(未配制的PAMP)相比的凝胶电泳分析。从LION中提取RNA并且在琼脂糖凝胶上运行以评估RNA降解。结果显示,与未配制的RNA(裸露)相比,PAMP与LION的复合保护了RNA免于RNA酶催化的降解。

[0286] 通过LION递送的RIG-I激动剂PAMP的免疫刺激

[0287] 该实施例说明了当将PAMP-LION复合物添加至A549-Dual细胞时,通过LION制剂递送的RIG-I激动剂PAMP的免疫刺激。A549-Dual细胞包含两个报告物构建体:驱动SEAP表达的IFN-β启动子和驱动萤光素酶表达的IFIT2启动子。

[0288] 将PAMP与LION制剂以不同N:P复合比(0.5、1.5、4.5、13.5、40.5和121.5)配制,并将3.7ng PAMP/LION添加至A549-Dual细胞。图15示出了分别通过上清液中的SEAP活性和萤光素酶活性测量的PAMP-LION复合物对IFN-β启动子和IFIT2的激活随N:P比的变化。结果显示了通过所有N:P比的PAMP-LION制剂递送的RIG-I激动剂PAMP对IFN-β启动子和IFIT2启动子两者的固有免疫刺激,尽管4.5-40.5的N:P比表现出提供了对IFN-β启动子的更好的免疫刺激。

[0289] 通过LION递送的RIG-I激动剂和TLR3激动剂的免疫刺激

[0290] 该实施例说明了当将RNA-LION复合物添加至A549-Dual细胞时，通过LION制剂递送的RIG-I激动剂PAMP和TLR3激动剂Riboxxim的免疫刺激。

[0291] 将未配制的PAMP(RIG-I激动剂)或Riboxxim(TLR3激动剂)(裸露对照)或以N:P比为8与LION制剂配制的PAMP或Riboxxim添加至A549-Dual细胞。图16A和图16B示出了分别通过上清液中的SEAP活性和萤光素酶活性测量的与未配制的RNA相比PAMP-LION制剂或Riboxxim-LION制剂对IFN-β启动子(图16A)和IFIT2(图16B)的激活。结果显示，通过与LION制剂复合递送的RIG-I激动剂PAMP和TLR3激动剂Riboxxim两者(与它们的未配制的裸露对照相比)的固有免疫刺激均成功诱导了固有免疫激活，触发了稳健的报告蛋白表达水平。

[0292] 图16C示出了与未配制的Riboxxim相比，Riboxxim-LION制剂对IFIT2的激活随Riboxxim剂量水平的变化。结果显示，在所有测试剂量水平，与LION制剂复合的Riboxxim与其未配制的对照相比，诱导了更高水平的IFIT2激活，尽管具有更高剂量水平的Riboxxim-LION制剂诱导了更强的IFIT2激活。

[0293] 该实施例说明了当将PAMP-LION复合物鼻内递送至C57BL/6小鼠时，通过LION制剂递送的RIG-I激动剂PAMP的免疫刺激。将PAMP与LION制剂以N:P比为8配制，并将0.2μg、1μg或5μg PAMP/LION递送到C57BL/6小鼠的鼻腔内。8小时后，取出小鼠的鼻腔和肺并立即冰冻，然后提取RNA并进行各种靶基因的PCR。

[0294] 图16D示出了与未经实验的对照相比，经处理的小鼠鼻腔内固有免疫基因的剂量依赖性诱导。图16E示出了经处理的小鼠的肺中的固有免疫基因的激活。图16F示出了小鼠在连续3天鼻内施用PAMP:LION制剂时保持了体重。

[0295] 这些结果表明，LION支持了生物活性PAMP通过鼻内接种的递送；在所有测试剂量水平，与LION制剂复合的PAMP在制剂被鼻内递送至小鼠时，上调了鼻腔和肺内的蛋白表达。

[0296] 实施例11.标记为108-011的具有氢氧化铝核的脂质无机纳米颗粒(LION)的产生。

[0297] 这些LION包含37.5mg/ml角鲨烯、37mg/ml Span®60、37mg/ml Tween®80、30mg/ml DOTAP盐酸盐、目标浓度为1mg Al/ml的TOPO包被的Al(OOH)(Alhydrogel® 2%)颗粒和10mM柠檬酸钠二水合物。LION颗粒使用以下程序制备。

[0298] 在50ml离心管中，添加10ml的Alhydrogel®，并以300rpm离心3分钟。去除上清液水，并用等量甲醇替代。将颗粒再次以300rpm离心3分钟，并去除甲醇上清液，并用等量甲醇替代。将此程序重复另外两次，以去除残余的水，并将Alhydrogel®颗粒重悬于10ml甲醇中。分散在甲醇中的Alhydrogel®的δ电位为+11.5mV。向该分散体中添加1ml的250mg/ml三辛基氧化膦(TOPO)，并将混合物留在维持在37℃和每分钟250转的轨道振荡器中过夜。进行这一过程以通过配体交换反应在Alhydrogel® 表面上包被一层TOPO。分散体中过量的TOPO通过用甲醇洗涤去除。TOPO包被的Al(OOH)颗粒的δ电位被记录为+5mV。δ电位的降低指示TOPO对Alhydrogel®的表面改性是成功的。进行这一过程以将Alhydrogel®的亲水性表面转化为疏水性的，从而促进Alhydrogel®在LION的“油”相中的混溶性。将TOPO包被的Al(OOH)分散体中的甲醇在通风柜中在55摄氏度蒸发45分钟，留下一层干燥的TOPO-Al

(OOH)颗粒。向干燥的TOPO-Al(OOH)颗粒中添加3.7克Span®60、3.75克角鲨烯和3.0克DOTAP盐酸盐以制备“油”相。将油相在预热至65℃的水浴中声处理45分钟。

[0299] 单独地,在1升玻璃瓶中,通过将19.5克Tween®80添加至用Milli-Q水制备的500ml 10mM柠檬酸钠二水合物溶液中来制备“水性”相。将水性相搅拌30分钟以允许Tween®80完全溶解。在Tween®80完全溶解之后,将92ml水性相转移至200ml烧杯中,并在预热至65℃的水浴中孵育。

[0300] 向加热的油相添加92ml预热的水性相。使用VWR®200匀浆器(VWR International)将混合物立即乳化,直到产生具有乳状外观的均质胶体。胶体随后通过将流体在30,000psi通过M110-P微流化器的Y型相互作用室进行处理。将流体通过17次直到通过动态光散射(Malvern Zetasizer Ultra)测量的z平均流体力学直径为61.9nm,多分散指数为0.24。将微流化LION样品用200nm孔径的聚醚砜(PES)注射器式过滤器终端过滤。

[0301] 表2总结了所得Alum-LION纳米颗粒与甲病毒来源的复制子RNA分子复合之前及之后的尺寸和PDI。下表3总结了所得Alum-LION纳米颗粒的特征。

[0302] 表2.Alum-LION与甲病毒来源的复制子RNA分子复合之前及之后的尺寸和PDI。以下的值是三个技术重复的平均值。

[0303]

| 复合之前 Alum-LION 的尺寸 | | 复合之后 Alum-LION 的尺寸 | | 复合之前 Alum-LION 的 PDI | | 复合之后 Alum-LION 的 PDI | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 尺寸 (nm) | SD | 尺寸 (nm) | SD | PDI | SD | PDI | SD |
| 61.92 | 0.488 | 95.48 | 2.129 | 0.241 | 0.003 | 0.271 | 0.009 |

[0304] 表3.Alum-LION制剂的表征。

[0305]

| 特性 | 方法 | 值 |
|---|---|---|
| 粒径 (Z 平均值) | 动态光散射; 三个技术重复的平均值±SD | 61.92 ± 0.5 nm |
| 尺寸分布 (PDI) | 动态光散射; 三个技术重复的平均值±SD | 0.241 ± 0.003 |
| ζ电位 | 动态光散射; 五个技术重复的平均值±SD | 34.98 ± 2.47 mV |

[0306]

| | | |
|---|---|---|
| 铝浓度 | 电感耦合等离子体发射光谱法; 三个样品重复的平均值±SD | 598 ± 14 μg/ml |
| DOTAP 浓度 | 反相高效液相色谱; 三个样品重复的平均值±SD | 20.37 ± 0.57 mg/ml |
| 角鲨烯浓度 | 反相高效液相色谱; 三个样品重复的平均值±SD | 26.38 ± 0.60 mg/ml |

[0307] 实施例12.用示例性LION制剂进行RNA递送

[0308] 将子基因组中包含nLuc序列的VEE复制子RNA稀释至6.4ng/μL,并且与LION以N:P比为15在冰上复合30分钟。使用了两种类型的LION制剂:一种具有15-nm铁氧化物($Fe_3O_4$)纳米颗粒(SPIO)作为核(与根据实施例1制备的79-006A相似),并且另一种具有根据实施例11制备的TOPO包被的羟基氧化铝纳米颗粒作为核。

[0309] 将RNA:LION复合物在缓冲液(10%蔗糖、5mM柠檬酸钠)中以1:10稀释,并将50μL

(16ng RNA)添加至包含150μL Optimem中A549-Dual细胞(Invivogen)的96孔板的孔中。将细胞转染4小时,将培养基用完全Dulbecco改良Eagle培养基(DMEM)(包含10%胎牛血清、L-谷氨酰胺和青霉素/链霉素)替换,并在37℃和5% $CO_2$孵育过夜。次日,去除培养基,并使用Nano-Glo萤光素酶分析系统(Promega)根据制造商的说明评估nLuc表达。板使用Spectramax i3板读取器(Molecular Devices)读取。

[0310] 图17示出了由具有编码nLuc的复制子RNA的RNA:LION复合物(使用SPIO(Fe-LION)或TOPO包被的羟基氧化铝纳米颗粒(Al-LION)作为LION制剂的核)产生的体外蛋白表达。该图显示,包含铁氧化物纳米颗粒或羟基氧化铝纳米颗粒作为核的两种LION制剂在RNA与LION制剂复合时均提供了成功的nLuc复制子的体外递送。

[0311] 本文公开的所有参考文献,包括专利参考文献和非专利参考文献,在此通过引用以其整体并入,如同每个参考文献单独地并入。

[0312] 应当理解的是,本文使用的术语仅为了描述特定实施方案的目的而非意图是限制性的。还应当理解的是,除非本文特别定义,否则本文使用的术语应被赋予其在相关技术领域中已知的传统含义。

[0313] 贯穿本说明书对“一种实施方案(one embodiment)”或“实施方案(an embodiment)”及其变化形式的提及意味着结合该实施方案描述的特定特征、结构或特性包括在至少一种实施方案中,并且不必都指同一实施方案。此外,在一种或更多种实施方案中,特定特征、结构或特性可以以任何合适的方式组合。本文使用缩写“例如(e.g.)”来指示非限制性实例,并且与术语“例如(for example)”同义。

[0314] 如本说明书和所附的权利要求书中使用的,单数形式“一(a)”、“一(an)”和“该(the)”包括复数指代物,即,一个或更多个,并且名词后的字母“s”表示该名词的复数形式和单数形式两者,除非内容和上下文另外明确规定。还应注意的是,连接术语“和”及“或”通常以最广泛的意义用于包括“和/或”,“和/或”意图涵盖包括所有相关的项或构思的实施方案以及包括少于所有相关的项或构思的一种或更多种其他替代实施方案,除非内容和上下文明确规定包括性或排他性(视情况而定)。

[0315] 此外,在本发明的特征或方面按照马库什组描述的情况下,意图的是本发明包括马库什组的任何个体成员和成员的任何子组,并由此也按照马库什组的任何个体成员和成员的任何子组来描述,并且申请人保留修改申请或权利要求书以具体提及马库什组的任何个体成员或成员的任何子组的权利。

[0316] 在本文提供值的范围的情况下,应当理解,除非上下文另外清楚地规定,否则该范围的上限和下限之间的每个中间值(至下限的单位的十分之一)和在所述范围内的任何其他陈述的值或中间值被包括在本发明内。这些较小的范围的上限和下限可以独立地被包括在较小的范围内,也被包括在本发明内,受限于所述范围内的任何特定地排除的限值。在所述范围包括限值中的一个或两个的情况下,排除那些所包括的限值中的任一个或两个的范围也被包括在本发明中。例如,本文提供的任何浓度范围、百分比范围、比例范围或整数范围应当理解为包括所列举范围内的任何整数的值,以及在适当时包括其分数(诸如整数的十分之一和百分之一)的值,除非另外指示。此外,本文列举的涉及与任何物理特征诸如聚合物亚单位、尺寸或厚度的任何数字范围,应当理解为包括所列举范围内的任何整数,除非另外指示。如本文使用的,术语“约”意指所指示的范围、值或结构的±20%,除非另外指示。

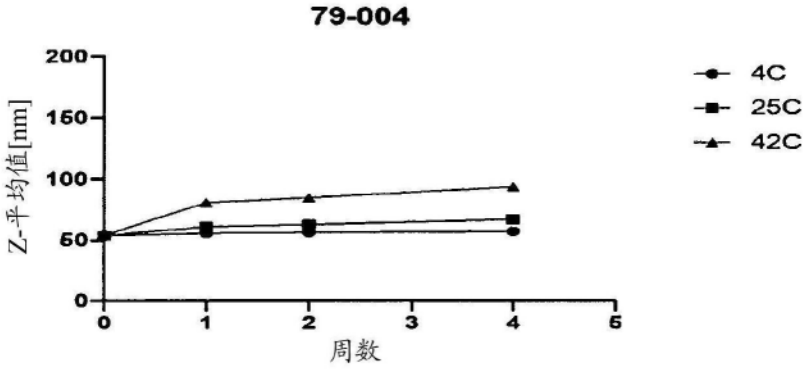

79-004
Z-平均值[nm]
200
150
100
50
0
0
1
2
3
4
5
周数
4C
25C
42C

图1A

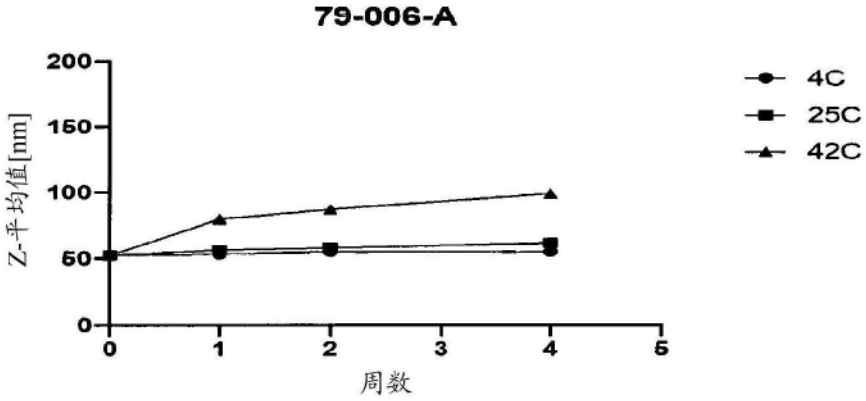

79-006-A
Z-平均值[nm]
200
150
100
50
0
0
1
2
3
4
5
周数
4C
25C
42C

图1B

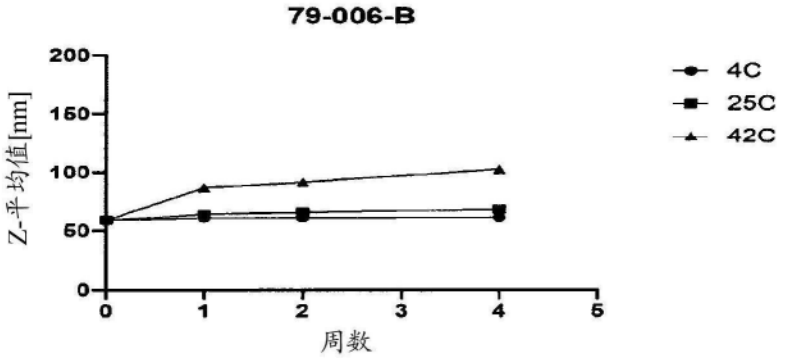

79-006-B
Z-平均值[nm]
200
150
100
50
0
0
1
2
3
4
5
周数
4C
25C
42C

图1C

| | 裸露 | 裸露 | 79-004 | 79-006-A | 79-006-B | 79-011 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| RNA酶 | - | + | + | + | + | + |



图2

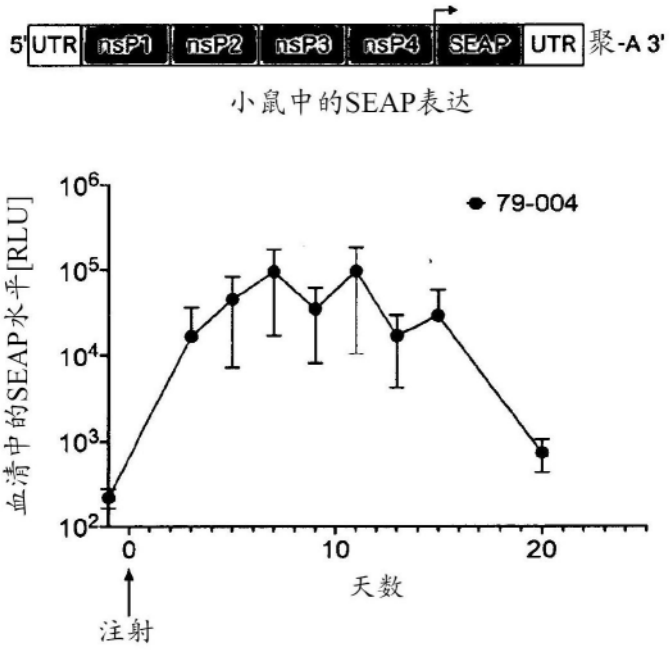
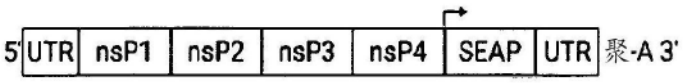



图3A


5'
UTR
nsP1
nsP2
nsP3
nsP4
SEAP
UTR
聚-A 3'

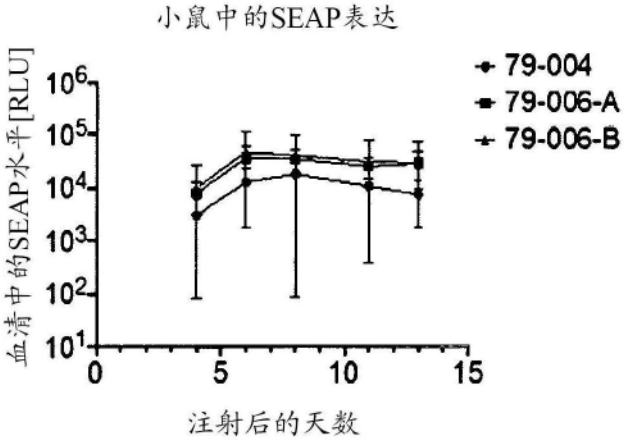

小鼠中的SEAP表达
血清中的SEAP水平[RLU]
79-004
79-006-A
79-006-B
注射后的天数

图3B

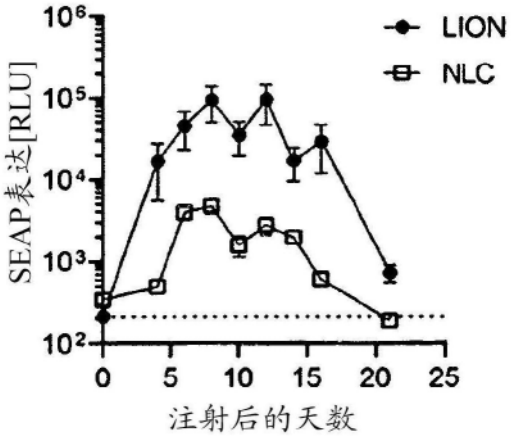

SEAP表达[RLU]
LION
NLC
注射后的天数

图3C

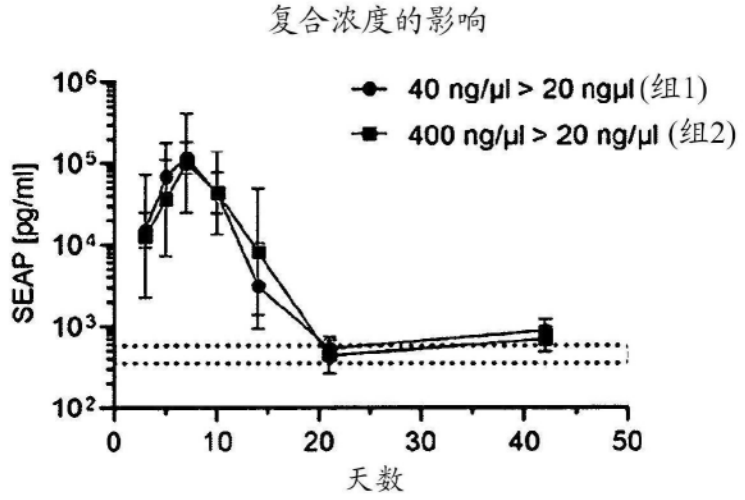

复合浓度的影响
40 ng/μl > 20 ngμl (组1)
400 ng/μl > 20 ng/μl (组2)
SEAP [pg/ml]
$10^6$
$10^5$
$10^4$
$10^3$
$10^2$
0
10
20
30
40
50
天数

图3D

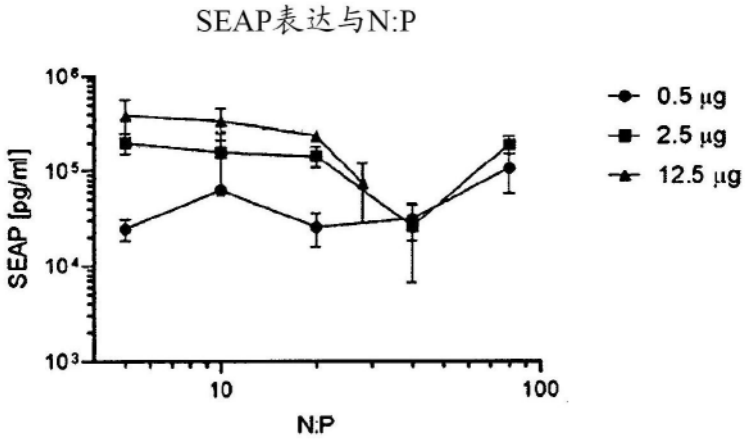

SEAP表达与N:P
0.5 μg
2.5 μg
12.5 μg
SEAP [pg/ml]
$10^6$
$10^5$
$10^4$
$10^3$
10
100
N:P

图3E

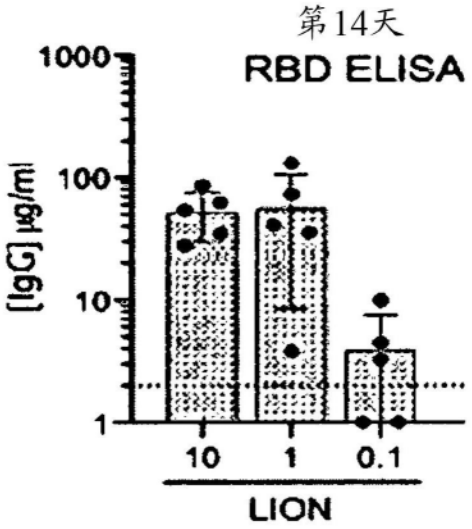

第14天
RBD ELISA
[IgG] μg/ml
1000
100
10
1
10
1
0.1
LION

图4A

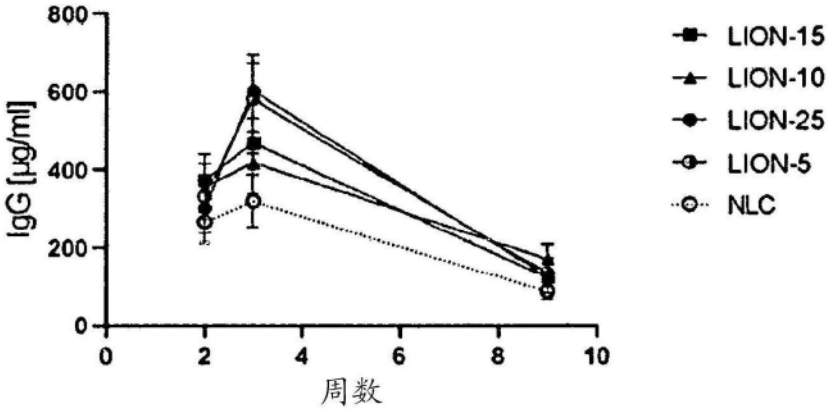

IgG [μg/ml]
800
600
400
200
0
0
2
4
6
8
10
周数
LION-15
LION-10
LION-25
LION-5
NLC

图4B

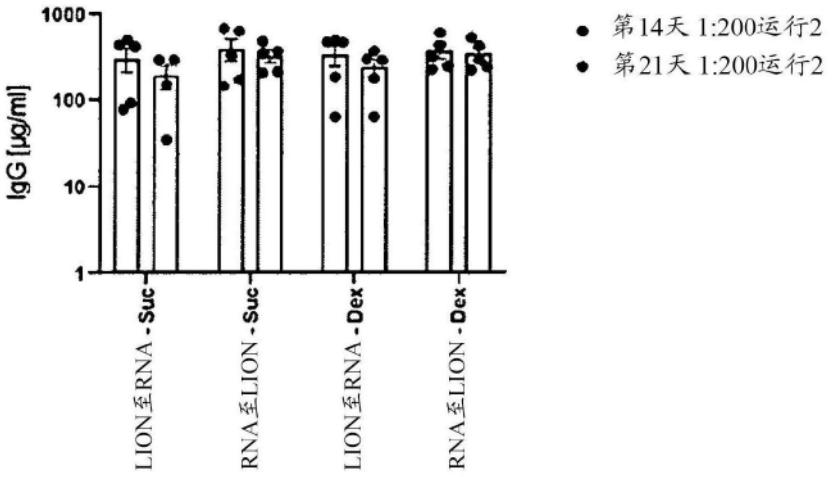

IgG [μg/ml]
1000
100
10
1
LION至RNA - Suc
RNA至LION - Suc
LION至RNA - Dex
RNA至LION - Dex
第14天 1:200运行2
第21天 1:200运行2

图4C

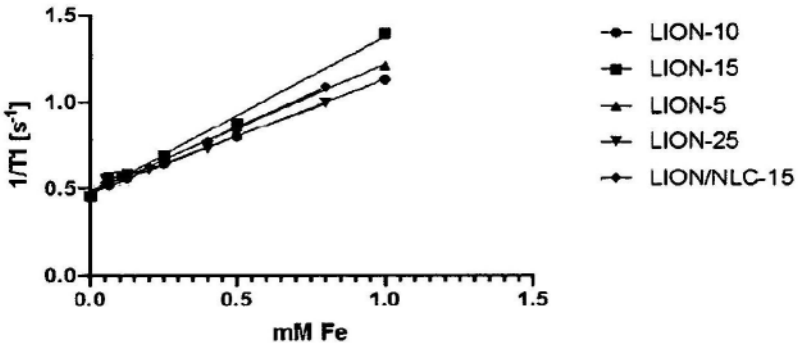

1/T1 [s-1]
1.5
1.0
0.5
0.0
0.0
0.5
1.0
1.5
mM Fe
LION-10
LION-15
LION-5
LION-25
LION/NLC-15

图5A

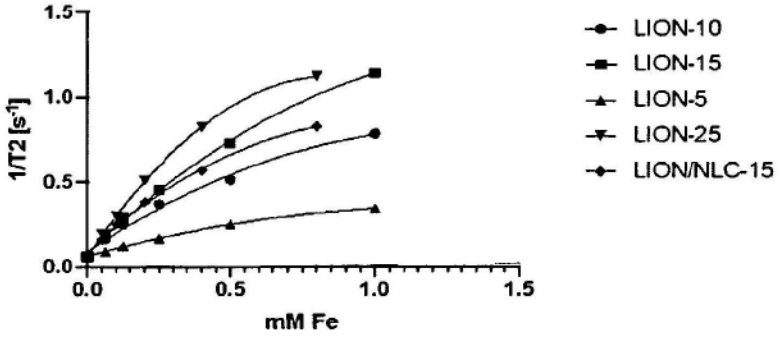

1/T2 [s-1]
1.5
1.0
0.5
0.0
0.0
0.5
1.0
1.5
mM Fe
LION-10
LION-15
LION-5
LION-25
LION/NLC-15

图5B

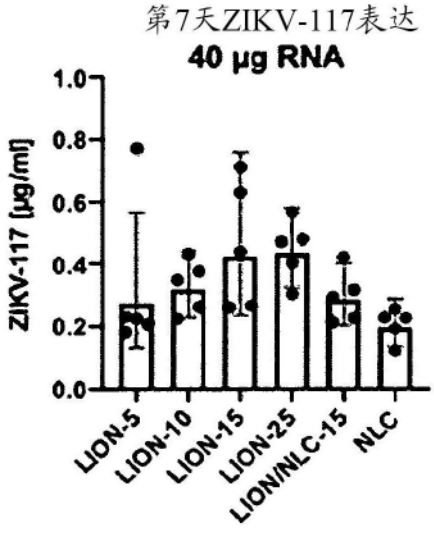

第7天ZIKV-117表达
40 μg RNA
ZIKV-117 [μg/ml]
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
LION-5
LION-10
LION-15
LION-25
LION/NLC-15
NLC

图6A

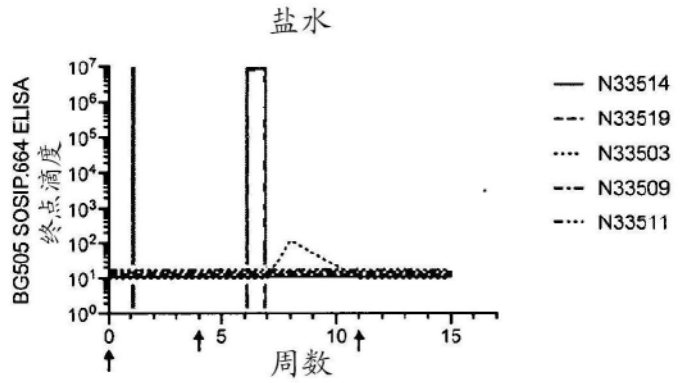

盐水
BG505 SOSIP.664 ELISA
终点滴度
周数
N33514
N33519
N33503
N33509
N33511

图6B

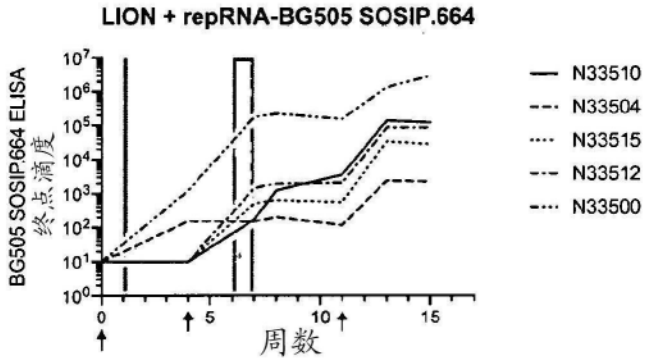

LION + repRNA-BG505 SOSIP.664
BG505 SOSIP664 ELISA
终点滴度
周数
N33510
N33504
N33515
N33512
N33500

图6C

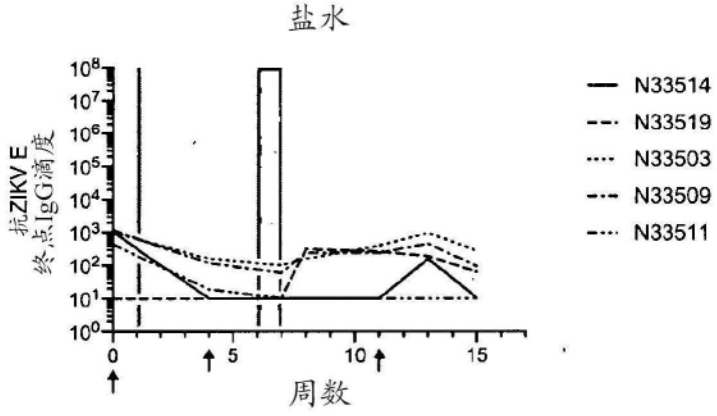

盐水
抗ZIKV E
终点IgG滴度
周数
N33514
N33519
N33503
N33509
N33511

图6D

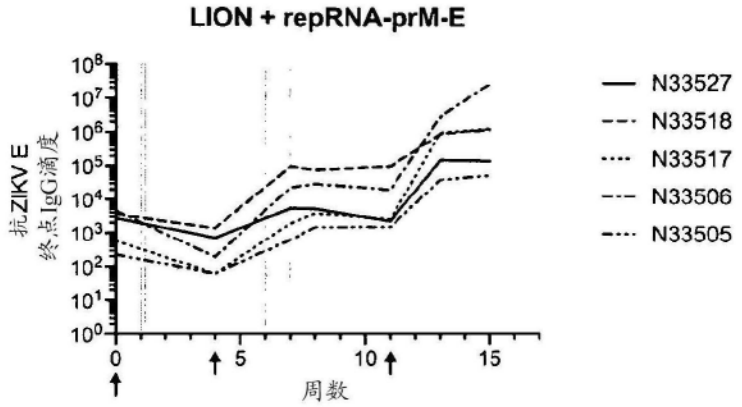

LION + repRNA-prM-E
抗ZIKV E
终点IgG滴度
周数
N33527
N33518
N33517
N33506
N33505

图6E

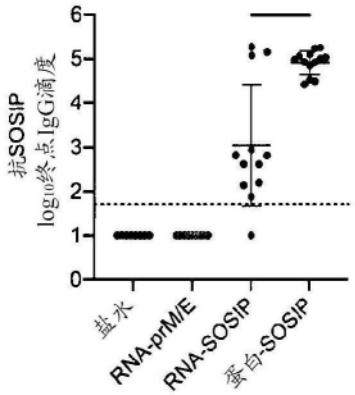

抗SOSIP
log10终点IgG滴度
盐水
RNA-prM/E
RNA-SOSIP
蛋白-SOSIP

图6F

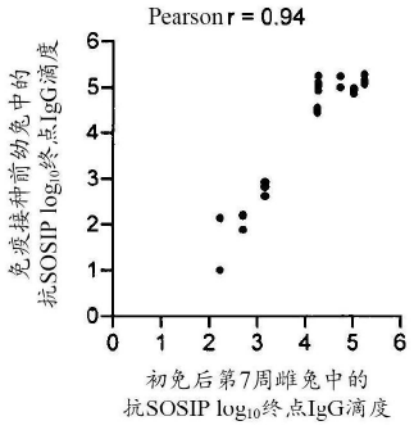

Pearson r = 0.94
免疫接种前幼兔中的
抗SOSIP log10终点IgG滴度
初免后第7周雌兔中的
抗SOSIP log10终点IgG滴度

图6G

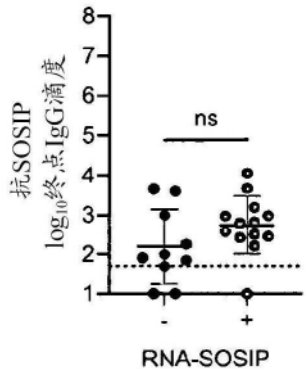

抗SOSIP
log10终点IgG滴度
8
7
6
5
4
3
2
1
ns
-
+
RNA-SOSIP

图6H

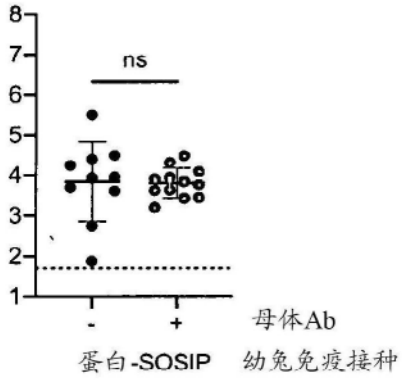

8
7
6
5
4
3
2
1
ns
-
+
母体Ab
蛋白-SOSIP
幼兔免疫接种

图6I

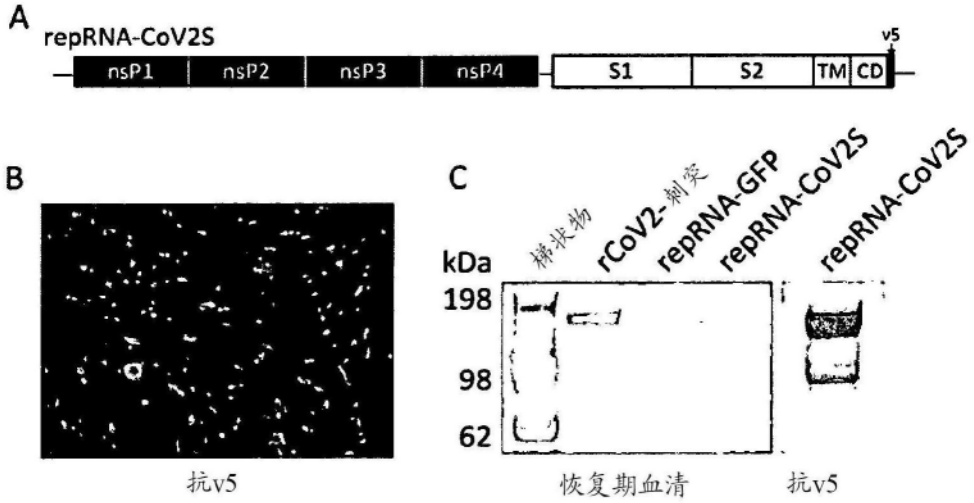

A
repRNA-CoV2S
nsP1
nsP2
nsP3
nsP4
S1
S2
TM
CD
v5
B
抗v5
C
kDa
198
98
62
梯状物
rCoV2-刺突
repRNA-GFP
repRNA-CoV2S
repRNA-CoV2S
恢复期血清
抗v5

图7

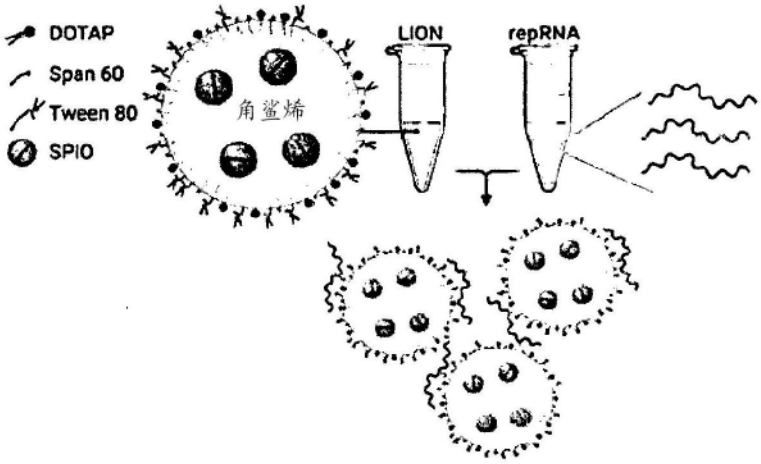

DOTAP
Span 60
Tween 80
SPIO
角鲨烯
LION
repRNA

图8A

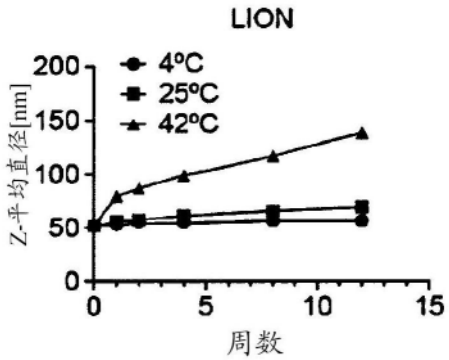

LION
4°C
25°C
42°C
Z-平均直径[nm]
200
150
100
50
0
0
5
10
15
周数

图8B

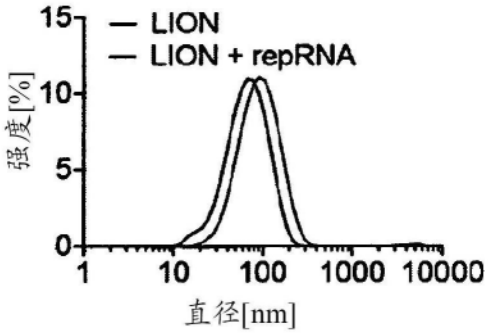

LION
LION + repRNA
强度[%]
15
10
5
0
1
10
100
1000
10000
直径[nm]

图8C

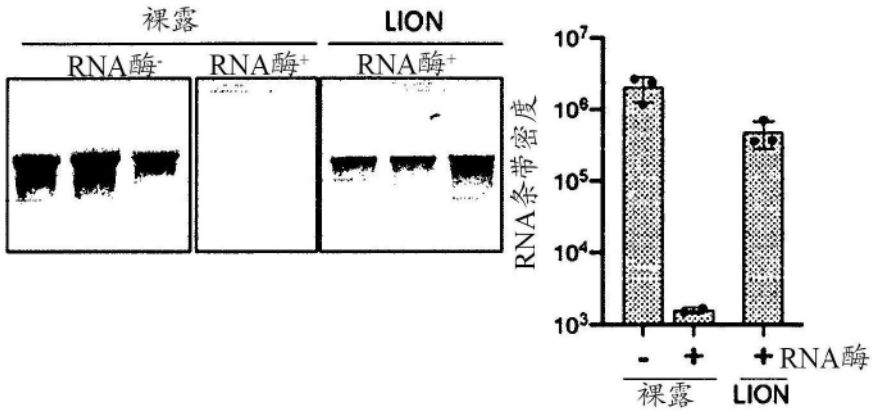

裸露
LION
RNA酶-
RNA酶+
RNA酶+
RNA条带密度
$10^7$
$10^6$
$10^5$
$10^4$
$10^3$
-
+
+RNA酶
裸露
LION

图8D

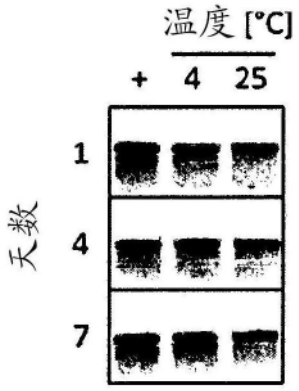

温度 [°C]
+
4
25
1
4
7
天数

图8E

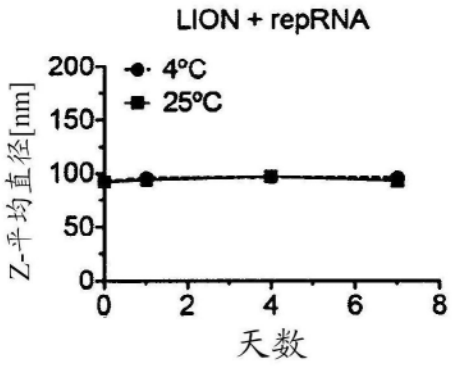

LION + repRNA
4°C
25°C
Z-平均直径[nm]
200
150
100
50
0
0
2
4
6
8
天数

图8F

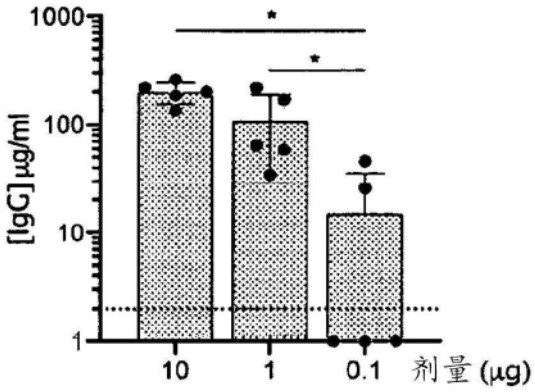

1000
100
10
1
[IgG]μg/ml
*
*
10
1
0.1
剂量(μg)

图9A

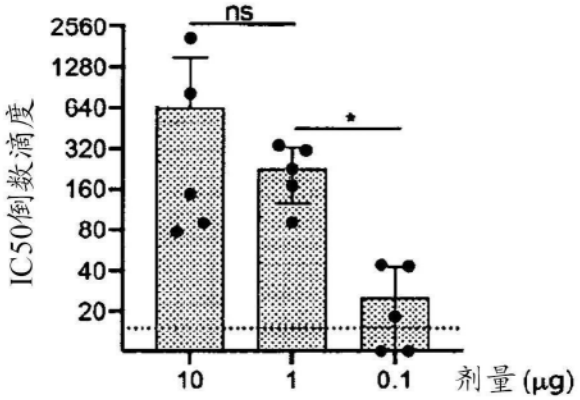

2560
1280
640
320
160
80
40
20
IC50倒数滴度
ns
*
10
1
0.1
剂量(μg)

图9B

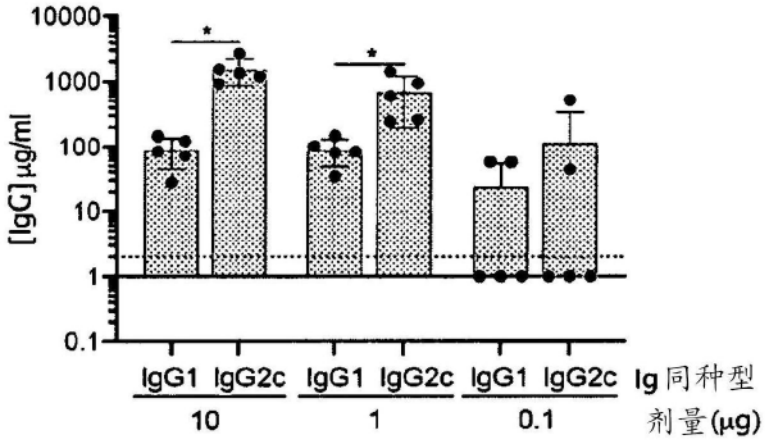

10000
1000
100
10
1
0.1
[IgG]μg/ml
*
*
IgG1 IgG2c IgG1 IgG2c IgG1 IgG2c
Ig同种型
10
1
0.1
剂量(μg)

图9C

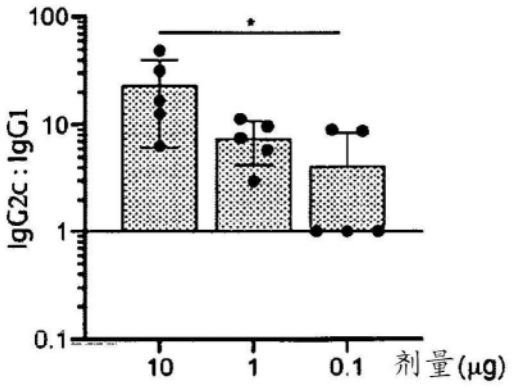

100
10
1
0.1
IgG2c : IgG1
*
10
1
0.1
剂量(μg)

图9D

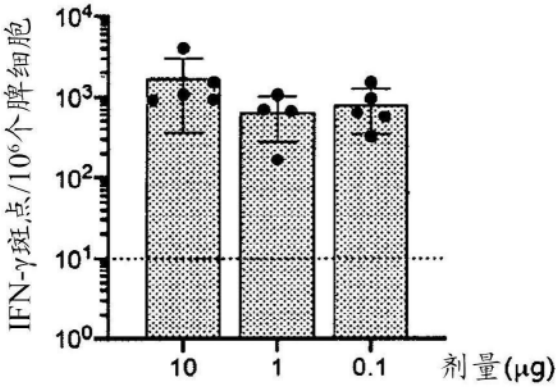

$10^4$
$10^3$
$10^2$
$10^1$
$10^0$
IFN-γ斑点/$10^6$个脾细胞
10
1
0.1
剂量(μg)

图9E

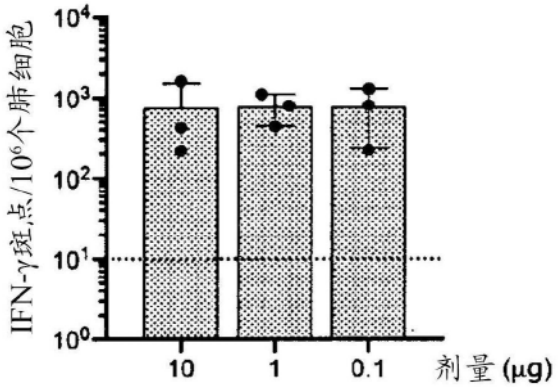

$10^4$
$10^3$
$10^2$
$10^1$
$10^0$
IFN-γ斑点/$10^6$个肺细胞
10
1
0.1
剂量(μg)

图9F

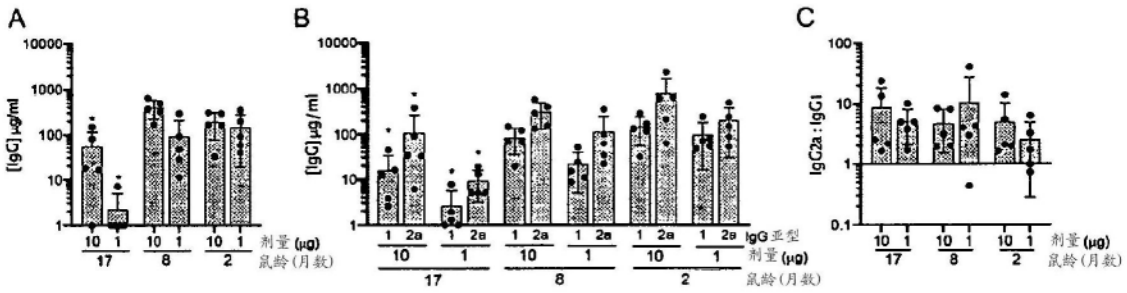



图10

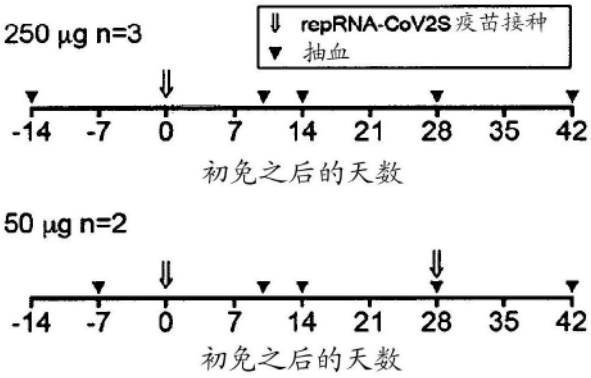



图11A

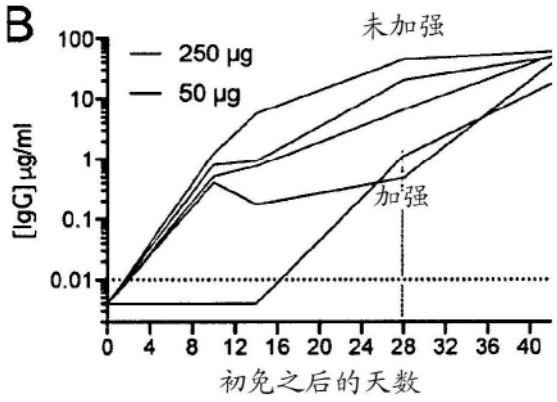



图11B

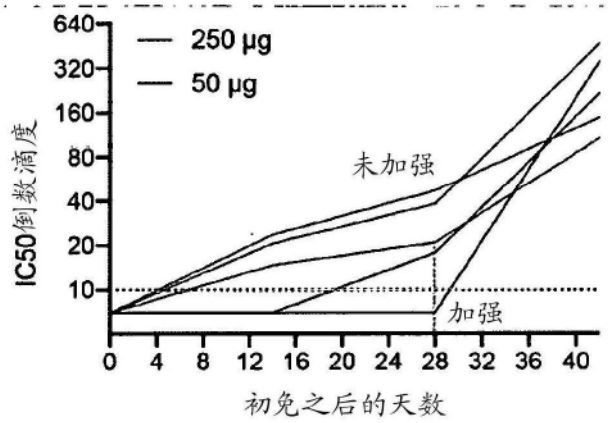



图11C

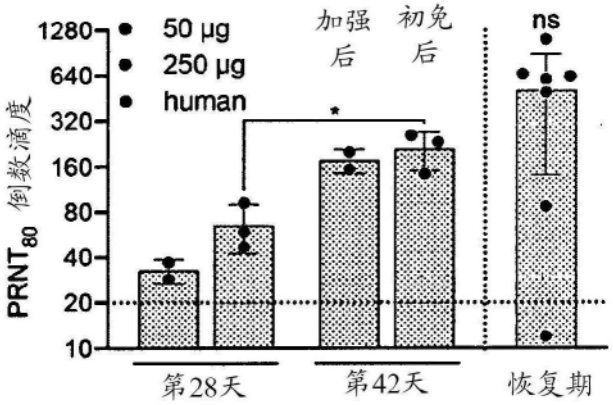



图11D

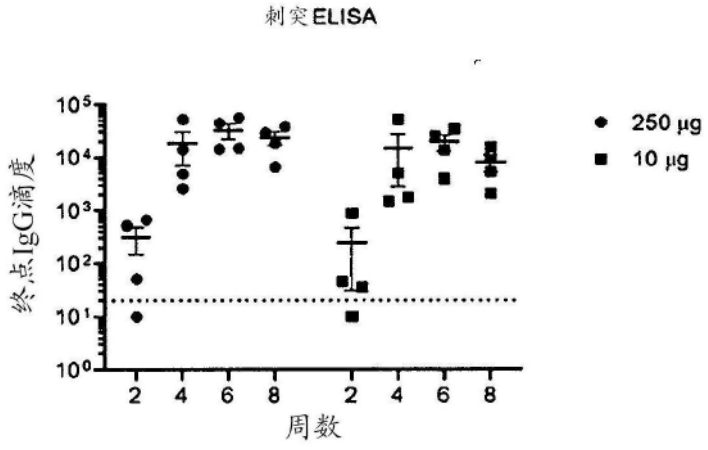



图12

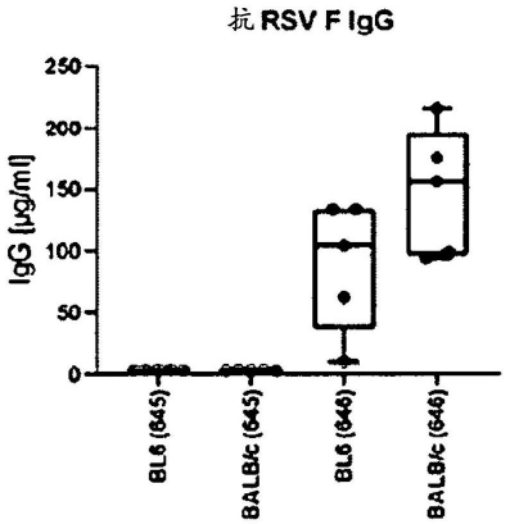

抗 RSV F IgG
IgG [µg/ml]
250
200
150
100
50
0
BL6 (645)
BALB/c (645)
BL6 (646)
BALB/c (646)

图13A

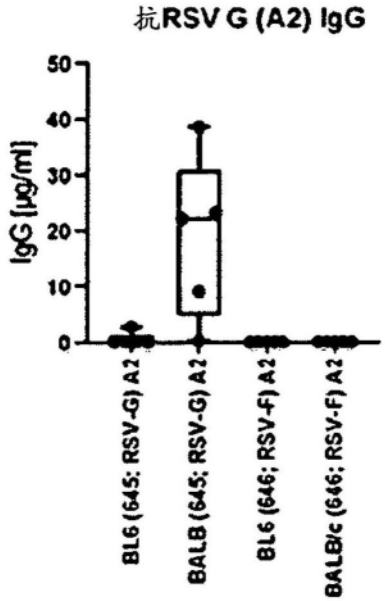

抗RSV G (A2) IgG
IgG [µg/ml]
50
40
30
20
10
0
BL6 (645; RSV-G) A2
BALB (645; RSV-G) A2
BL6 (646; RSV-F) A2
BALB/c (646; RSV-F) A2

图13B

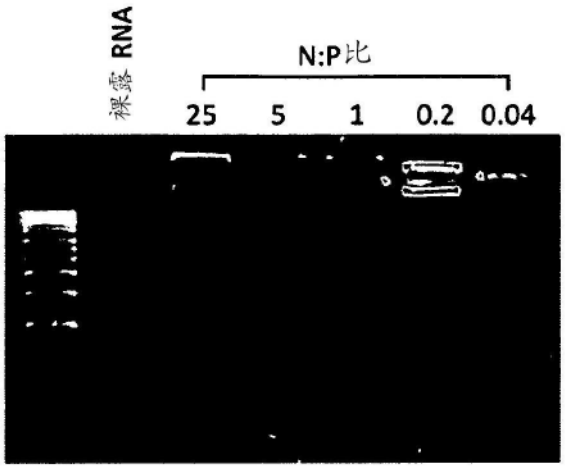



图14A

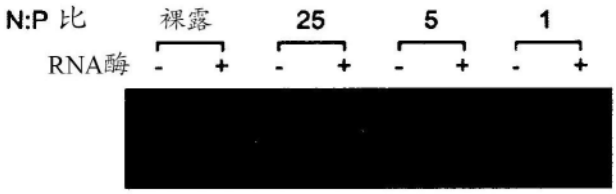



图14B

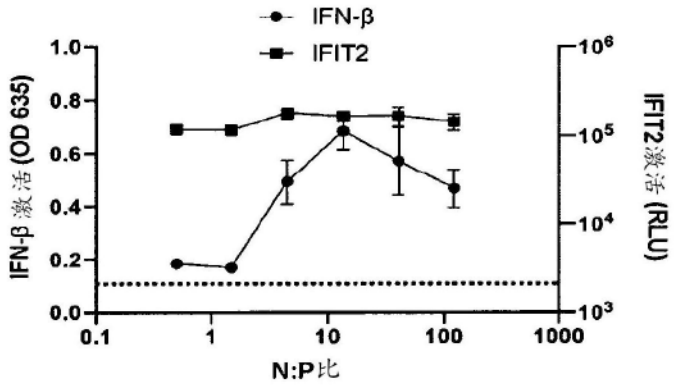



图15

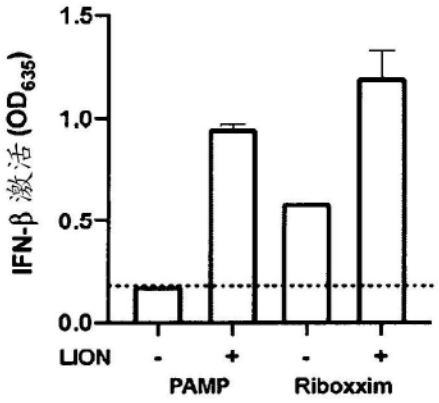



图16A

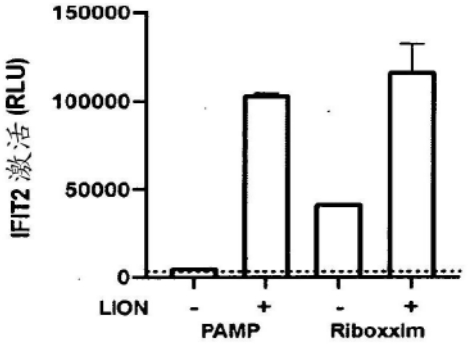



图16B

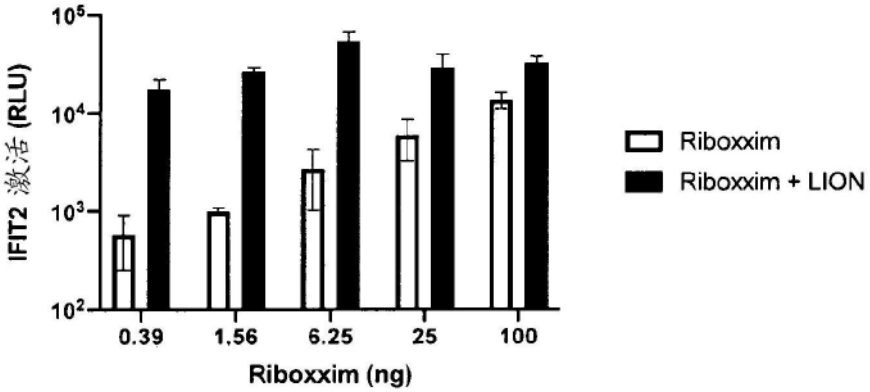



图16C

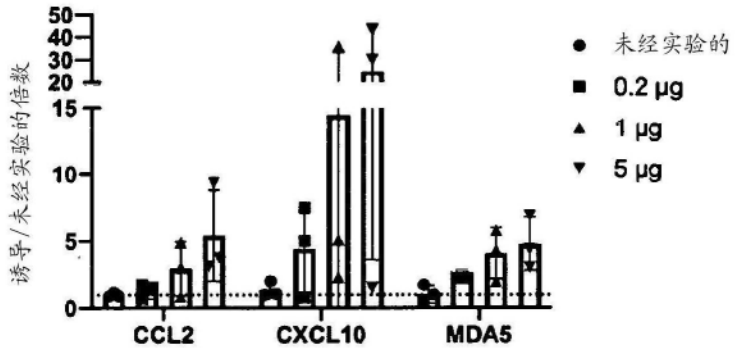



图16D

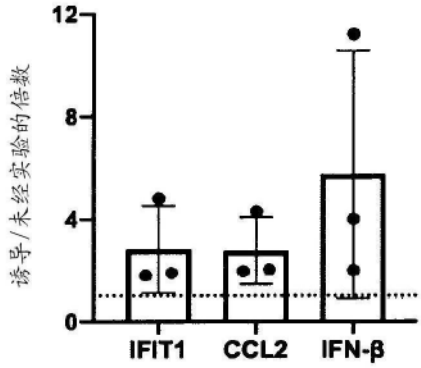



图16E

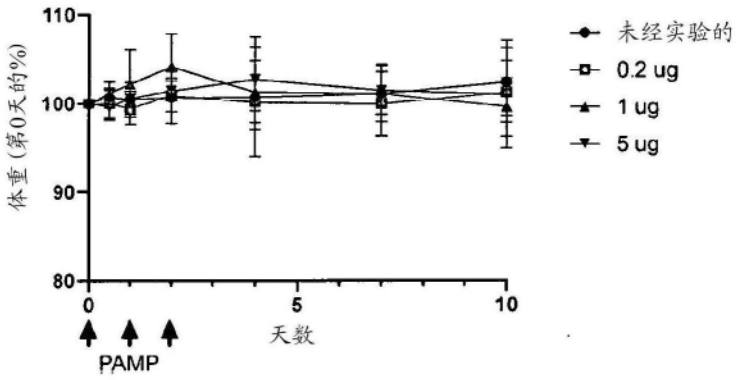



图16F

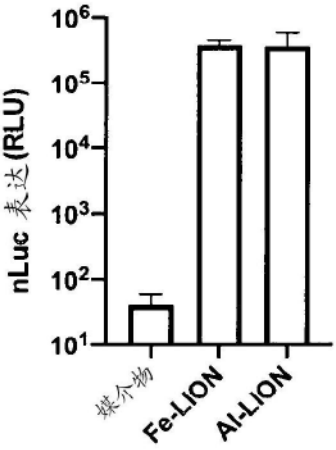



图17