



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119497629 A

(43) 申请公布日 2025. 02. 21

(21) 申请号 202380050168.0

(22) 申请日 2023.05.12

(30) 优先权数据

63/341,984 2022.05.13 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.12.26

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2023/066975 2023.05.12

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/220747 EN 2023.11.16

(71) 申请人 科纳治疗公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 E·戈斯林 D·日瓦基 J·周

A·尼基福罗夫 D·森古普塔

(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.

A61K 39/39 (2006.01)

A61P 37/04 (2006.01)

C12N 9/12 (2006.01)

C12N 15/88 (2006.01)

权利要求书6页 说明书32页

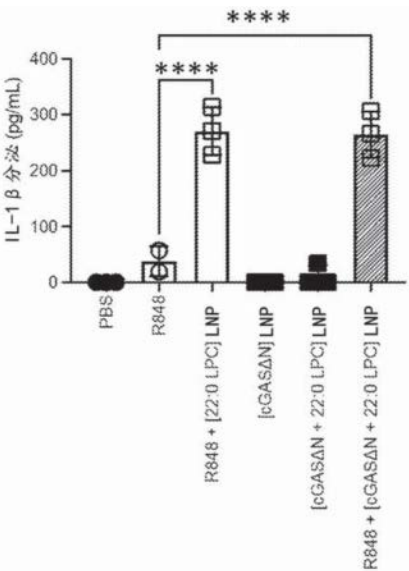
序列表(电子公布) 附图13页

(54) 发明名称

编码组成型活性环状GMP-AMP合酶的核酸及其免疫原性递送媒介物

(57) 摘要

本公开文本涉及用于在哺乳动物受试者的细胞中表达组成型活性环状GMP-AMP合酶的组合物以及其用于增强mRNA疫苗的免疫原性的用途。所述mRNA可以包封在脂质纳米颗粒(LNP)中或可以与脂质复合(RNA-Lipoplex)。本公开文本还涉及进一步包含溶血磷脂酰胆碱(LPC)化合物和病原体识别受体激动剂中的一种或两种的组合物。



1. 一种组合物,所述组合物包含包封在脂质纳米颗粒(LNP)中的mRNA,其中所述mRNA包含组成型活性环状GMP-AMP合酶(cGAS)的编码区,并且所述LNP包含第一磷脂和选自以下的至少一种脂质:可电离脂质、聚乙二醇化脂质、结构脂质、第二磷脂及其混合物,其中所述第一磷脂包含具有单条C13-C24酰基链的溶血磷脂酰胆碱(LPC)。

2. 一种组合物,所述组合物包含包封在脂质纳米颗粒(LNP)中的第一mRNA和第二mRNA,其中所述第一mRNA包含组成型活性环状GMP-AMP合酶(cGAS)的编码区,所述第二mRNA包含抗原的编码区;并且所述LNP包含第一磷脂和选自以下的至少一种脂质:可电离脂质、聚乙二醇化脂质、结构脂质、第二磷脂及其混合物,其中所述第一磷脂包含具有单条C13-C24酰基链的溶血磷脂酰胆碱(LPC)。

3. 一种组合物,所述组合物包含包封在脂质纳米颗粒(LNP)中的mRNA,其中所述mRNA包含由2A样序列隔开的第一编码区和第二编码区,其中所述第一编码区是组成型活性环状GMP-AMP合酶(cGAS)的编码区,并且所述第二编码区是抗原的编码区;或者所述第一编码区是抗原的编码区,并且所述第二编码区是组成型活性环状GMP-AMP合酶(cGAS)的编码区,并且所述LNP包含第一磷脂和选自以下的至少一种脂质:可电离脂质、聚乙二醇化脂质、结构脂质、第二磷脂及其混合物,其中所述第一磷脂包含具有单条C13-C24酰基链的溶血磷脂酰胆碱(LPC)。

4. 根据权利要求1-3中任一项所述的组合物,其中所述至少一种脂质包含可电离脂质、第二磷脂、聚乙二醇化脂质和结构脂质。

5. 根据权利要求1-4中任一项所述的组合物,其中所述可电离脂质包含:

i) 8-[(2-羟乙基)[6-氧代-6-(十一烷氧基)己基]氨基]辛酸1-辛基壬基酯(SM-102)或其类似物或衍生物;和/或

ii) 6-((2-己基癸酰基)氧基)-N-(6-((2-己基癸酰基)氧基)己基)-N-(4-羟基丁基)己烷-1-铵(ALC-0315)或其类似物或衍生物;和/或

iii) (6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七烷-6,9,28,31-四烯-19-基4-(二甲基氨基)丁酸酯(DLin-MC3-DMA)或其类似物或衍生物。

6. 根据权利要求1-5中任一项所述的组合物,其中所述聚乙二醇化脂质选自PEG修饰的磷脂酰乙醇胺、PEG修饰的磷脂酸、PEG修饰的神经酰胺、PEG修饰的二烷基胺、PEG修饰的二酰基甘油、PEG修饰的二烷基甘油及其组合。

7. 根据权利要求1-5中任一项所述的组合物,其中所述聚乙二醇化脂质包含聚乙二醇[PEG]2000二肉豆蔻酰基甘油[DMG]。

8. 根据权利要求1-7中任一项所述的组合物,其中所述结构脂质选自:胆固醇、粪甾醇、谷固醇、麦角甾醇、菜油甾醇、豆固醇、菜籽固醇、番茄碱、乌苏酸、 $\alpha$ -生育酚及其组合。

9. 根据权利要求1-7中任一项所述的组合物,其中所述结构脂质包括胆固醇。

10. 根据权利要求1-9中任一项所述的组合物,其中所述第二磷脂包含:

i) 亲水头部部分,所述亲水头部部分选自磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰甘油、磷脂酰丝氨酸、磷脂酸、2-溶血磷脂酰胆碱和鞘磷脂;以及

ii) 一种或多种脂肪酸尾部部分,所述一种或多种脂肪酸尾部部分选自月桂酸、肉豆蔻酸、肉豆蔻脑酸、棕榈酸、棕榈油酸、硬脂酸、油酸、亚油酸、 $\alpha$ -亚麻酸、芥子酸、花生酸、花生四烯酸、植烷酸、二十碳五烯酸、山嵛酸、二十二碳五烯酸和二十二碳六烯酸。

11. 根据权利要求1-9中任一项所述的组合物,其中所述第二磷脂选自:

1,2-二亚油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DLPC)、  
1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油-磷酸胆碱(DMPC)、  
1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DOPC)、  
1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DPPC)、  
1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DSPC)、  
1,2-双十一酰基-sn-甘油-磷酸胆碱(DUPC)、  
1-棕榈酰基-2-油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(POPC)、  
1,2-二-0-十八碳烯基-sn-甘油-3-磷酸胆碱、  
1-油酰基-2-胆固醇琥珀酸单酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱、  
1,2-二亚麻酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱、  
1,2-二花生四烯酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱、  
1,2-双二十二碳六烯酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱、  
1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DOPE)、  
1,2-二植烷酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、  
1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、  
1,2-二亚油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、  
1,2-二亚麻酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、  
1,2-二花生四烯酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、  
1,2-双二十二碳六烯酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、  
1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸-外消旋-(1-甘油)钠盐(DOPG)、  
鞘磷脂及  
其组合。

12. 根据权利要求11所述的组合物,其中所述第二磷脂包含1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DSPC)。

13. 根据权利要求1-12中任一项所述的组合物,其中所述组合物进一步包含至少一种赋形剂。

14. 根据权利要求13所述的组合物,其中所述赋形剂包括蔗糖。

15. 一种组合物,所述组合物包含:

i) 与一种或多种脂质复合的mRNA(RNA-Lipoplex);以及

ii) 具有单条C13-C24酰基链的溶血磷脂酰胆碱(LPC),

其中所述mRNA包含组成型活性环状GMP-AMP合酶(cGAS)的编码区,并且所述一种或多种脂质包含第一脂质和第二脂质。

16. 一种组合物,所述组合物包含:

i) 与一种或多种脂质复合的第一mRNA和第二mRNA(RNA-Lipoplex);以及

ii) 具有单条C13-C24酰基链的溶血磷脂酰胆碱(LPC);

其中所述第一mRNA包含组成型活性环状GMP-AMP合酶(cGAS)的编码区,并且所述第二mRNA包含抗原的编码区,并且所述一种或多种脂质包含第一脂质和第二脂质。

17. 一种组合物,所述组合物包含:

- i) 与一种或多种脂质复合的mRNA (RNA-Lipoplex); 以及
- ii) 具有单条C13-C24酰基链的溶血磷脂酰胆碱 (LPC),

其中所述mRNA包含由2A样序列隔开的第一编码区和第二编码区, 所述第一编码区是组成型活性环状GMP-AMP合酶 (cGAS) 的编码区, 并且所述第二编码区是抗原的编码区; 或者所述第一编码区是抗原的编码区, 并且所述第二编码区是组成型活性环状GMP-AMP合酶 (cGAS) 的编码区, 并且所述一种或多种脂质包含第一脂质和第二脂质。

18. 根据权利要求15-17中任一项所述的组合物, 其中所述第一脂质是阳离子脂质, 并且所述第二脂质是中性或阴离子脂质。

19. 根据权利要求18所述的组合物, 其中所述阳离子脂质包含以下中的一者或两者:

- i) 1,2-二-0-十八碳烯基-3-三甲基铵丙烷 (DOTMA) 或其类似物或衍生物; 以及
- ii) 1,2-二油酰基-3-三甲基铵丙烷 (DOTAP) 或其类似物或衍生物。

20. 根据权利要求18或权利要求19所述的组合物, 其中所述中性或阴离子脂质包含:

i) 1,2-二-(9Z-十八碳烯酰基)-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺 (DOPE) 或其类似物或衍生物; 和/或

ii) 胆固醇或其类似物或衍生物; 和/或

iii) 1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱 (DOPC) 或其类似物或衍生物。

21. 根据权利要求1-20中任一项所述的组合物, 其中所述LPC的酰基链是C21-C24酰基链。

22. 根据权利要求1-20中任一项所述的组合物, 其中所述LPC的酰基链是C22酰基链。

23. 根据权利要求1-22中任一项所述的组合物, 其中所述LPC的酰基链是完全饱和的。

24. 根据权利要求23所述的组合物, 其中所述LPC包括1-山嵛酰基-2-羟基-sn-甘油-3-磷酸胆碱 [LPC (22:0)]。

25. 根据权利要求1-24中任一项所述的组合物, 所述组合物进一步包含TLR7/8激动剂。

26. 根据权利要求25所述的组合物, 其中所述TLR7/8激动剂是分子量为900道尔顿或更小的小分子。

27. 根据权利要求26所述的组合物, 其中所述TLR7/8激动剂包括咪唑并喹啉化合物。

28. 根据权利要求27所述的组合物, 其中所述TLR7/8激动剂包括瑞喹莫德 (R848)。

29. 根据权利要求25-28中任一项所述的组合物, 其中所述LPC包括LPC (22:0), 并且所述TLR7/8激动剂包括瑞喹莫德 (R848)。

30. 根据权利要求1-29中任一项所述的组合物, 其中所述mRNA或所述第一mRNA和所述第二mRNA包含5'非翻译区 (5'UTR) 和3'非翻译区 (3'UTR)。

31. 根据权利要求1-30中任一项所述的组合物, 其中所述mRNA包含5'帽结构。

32. 根据权利要求1-31中任一项所述的组合物, 其中所述mRNA包含多聚A尾。

33. 根据权利要求1-32中任一项所述的组合物, 其中所述mRNA是核苷修饰的mRNA。

34. 一种核酸, 所述核酸包含: i) 抗原的编码区, 和 ii) 组成型活性环状GMP-AMP合酶 (cGAS) 的编码区, 任选地其中所述核酸是mRNA, 任选地其中所述核酸是DNA。

35. 一种表达载体, 所述表达载体包含根据权利要求34所述的核酸。

36. 根据权利要求1-35中任一项所述的组合物, 其中所述组成型活性cGAS具有比其野生型对应物更大的自身DNA反应性倾向。

37. 根据权利要求1-36中任一项所述的组合物,其中所述cGAS是缺乏氨基末端磷酸肌醇结合结构域的截短的cGAS (cGAS  $\Delta$ N)。

38. 根据权利要求37所述的组合物,其中所述cGAS  $\Delta$ N包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列或与SEQ ID NO:1至少85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。

39. 根据权利要求38所述的组合物,其中所述cGAS  $\Delta$ N包含:

(i) SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:8的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:8至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列;或

(ii) SEQ ID NO:9的共有氨基酸序列。

40. 根据权利要求38所述的组合物,其中所述cGAS  $\Delta$ N由SEQ ID NO:17的核苷酸序列编码。

41. 根据权利要求37-40中任一项所述的组合物,其中所述cGAS  $\Delta$ N的编码区与起始密码子(ATG)可操作地组合。

42. 根据权利要求1-41中任一项所述的组合物,其中所述抗原是肿瘤抗原。

43. 根据权利要求42所述的组合物,其中所述肿瘤抗原是肿瘤相关抗原。

44. 根据权利要求42所述的组合物,其中所述肿瘤抗原是新抗原。

45. 根据权利要求1-41中任一项所述的组合物,其中所述抗原包括微生物抗原。

46. 根据权利要求44所述的组合物,其中所述微生物抗原包括病毒抗原、细菌抗原、原生动物抗原或真菌抗原。

47. 根据权利要求1-41中任一项所述的组合物,其中所述抗原包含病原体的表面蛋白或其片段。

48. 根据权利要求47所述的组合物,其中所述病原体能够在人受试者中引起疾病。

49. 根据权利要求47或权利要求48所述的组合物,其中所述病原体是病毒。

50. 根据权利要求49所述的组合物,其中所述病毒是SARS-CoV-2。

51. 根据权利要求50所述的组合物,其中所述抗原是SARS-CoV-2的刺突(S)糖蛋白,任选地其中所述刺突糖蛋白是融合前稳定的变体。

52. 根据权利要求1-51中任一项所述的组合物,其中所述组合物不包含脂多糖(LPS)或单磷酸脂质A(MPLA)。

53. 根据权利要求1-52中任一项所述的组合物,其中所述组合物不包含氧化的1-棕榈酰基-2-花生四烯酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(oxPAPC)或oxPAPC的种类。

54. 根据权利要求53所述的组合物,其中所述组合物不包含2-[[ (2R)-2-[(E)-7-羧基-5-羟基庚-6-烯酰基]氧基-3-十六酰基氧基丙氧基]-羟基磷酰基]氧基乙基-三甲基氮鎓(HOdiA-PC)、[(2R)-2-[(E)-7-羧基-5-氧代庚-6-烯酰基]氧基-3-十六酰基氧基丙基]2-(三甲基氮鎓基)乙基磷酸酯(KOdiA-PC)、1-棕榈酰基-2-(5-羟基-8-氧代-辛烯酰基)-sn-甘油-3-磷酸胆碱(HOOA-PC)、2-[[ (2R)-2-[(E)-5,8-二氧代辛-6-烯酰基]氧基-3-十六酰基氧基丙基]-羟基磷酰基]氧基乙基-三甲基氮鎓(KOOA-PC)、[(2R)-3-十六酰基氧基-2-(5-氧代戊酰基氧基)丙基]2-(三甲基氮鎓基)乙基磷酸酯(POVPC)、[(2R)-2-(4-羧基丁酰

基氧基)-3-十六酰基氧基丙基]2-(三甲基氮鎓基)乙基磷酸酯(PGPC)、[(2R)-3-十六酰基氧基-2-[4-[3-[(E)-[2-[(Z)-辛-2-烯基]-5-氧代环戊-3-烯-1-亚基]甲基]环氧乙烷-2-基]丁酰基氧基]丙基]2-(三甲基氮鎓基)乙基磷酸酯(PECPC)、[(2R)-3-十六酰基氧基-2-[4-[3-[(E)-[3-羟基-2-[(Z)-辛-2-烯基]-5-氧代亚环戊基]甲基]环氧乙烷-2-基]丁酰基氧基]丙基]2-(三甲基氮鎓基)乙基磷酸酯(PEIPC)和/或1-棕榈酰基-2-壬二酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(PAzePC)。

55.一种药物配制品,所述药物配制品包含根据权利要求1-54中任一项所述的组合物和药学上可接受的赋形剂。

56.一种用于产生超激活的树突细胞的方法,所述方法包括使树突细胞与有效量的根据权利要求1-54中任一项、权利要求25-54中任一项所述的组合物或根据权利要求55所述的配制品接触以产生超激活的树突细胞,其中所述超激活的树突细胞在暴露的约48小时内分泌IL-1 $\beta$ 而不经历细胞死亡。

57.根据权利要求56所述的方法,其中使所述树突细胞:

- (i) 与所述组合物在体内接触;或
- (ii) 与所述组合物离体接触。

58.根据权利要求56或权利要求57所述的方法,其中所述超激活的树突细胞:

(i) 比未刺激的树突细胞或与空LNP接触的树突细胞分泌更高水平的IL-6、TNF $\alpha$ 、RANTES和IP-10中的一种或多种;和/或

(ii) 表达更高水平的选自以下的至少一种细胞表面标志物:CCR7、CD40、CD80、CD83、CD86、MHC II类、MHC I类及其组合。

59.一种药物配制品,所述药物配制品包含至少 $10^3$ 、 $10^4$ 、 $10^5$ 或 $10^6$ 个通过根据权利要求56-58中任一项所述的方法产生的超激活的树突细胞以及药学上可接受的赋形剂。

60.一种刺激针对抗原的免疫应答的方法,所述方法包括向有需要的个体施用有效量的根据权利要求55或权利要求59所述的药物配制品以刺激针对所述抗原的免疫应答。

61.一种治疗癌症的方法,所述方法包括向有需要的个体施用有效量的根据权利要求55或权利要求59所述的药物配制品以治疗所述癌症。

62.一种抑制异常细胞增殖的方法,所述方法包括向有需要的个体施用有效量的根据权利要求55或权利要求59所述的药物配制品以抑制异常细胞增殖。

63.一种治疗或预防感染性疾病的方法,所述方法包括向有需要的个体施用有效量的根据权利要求55所述的药物配制品以治疗或预防所述感染性疾病。

64.根据权利要求63所述的方法,其中所述感染性疾病是病毒性疾病。

65.根据权利要求63所述的方法,其中所述感染性疾病是细菌性疾病。

66.根据权利要求56-62中任一项所述的方法或药物配制品,其中所述树突细胞是哺乳动物细胞。

67.根据权利要求66所述的方法或药物配制品,其中所述哺乳动物细胞是人细胞。

68.根据权利要求60-66中任一项所述的方法,其中所述个体是哺乳动物。

69.根据权利要求68所述的方法,其中所述哺乳动物是人。

70.根据权利要求68所述的方法,其中所述哺乳动物是狗或猫。

71.根据权利要求1-70中任一项所述的组合物、配制品或方法,其中所述第二磷脂包含

1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DSPC),并且所述至少一种脂质包含8-[(2-羟乙基)[6-氧代-6-(十一烷氧基)己基]氨基]辛酸1-辛基壬基酯(SM-102)或其类似物或衍生物和胆固醇。

72.根据权利要求71所述的组合物、配制品或方法,其中所述至少一种脂质进一步包含聚乙二醇化脂质,任选地其中所述聚乙二醇化脂质包含聚乙二醇[PEG]2000二肉豆蔻酰基甘油[DMG]。

73.根据权利要求1-72中任一项所述的组合物、配制品或方法,其中所述LNP具有小于约250纳米、任选约25至约250纳米、任选约50至约200纳米或任选约75至约175纳米的有效直径。

74.根据权利要求73所述的组合物、配制品或方法,其中所述LNP具有小于约200纳米的有效直径。

75.根据权利要求73所述的组合物、配制品或方法,其中所述LNP具有小于约150纳米的有效直径。

## 编码组成型活性环状GMP-AMP合酶的核酸及其免疫原性递送媒介物

### 相关申请的交叉引用

[0001] 本申请要求2022年5月13日提交的美国临时专利申请号63/341,984的优先权和权益,将其通过引用以其整体并入本文。

### ASCII文本文件序列列表的提交

[0002] 将电子序列列表(165532000240SEQLIST.xml;大小:22,341字节;以及创建日期:2023年5月11日)的内容通过引用以其整体并入本文。

### 技术领域

[0003] 本公开文本涉及用于在哺乳动物受试者的细胞中表达组成型活性环状GMP-AMP合酶的组合物以及其用于增强mRNA疫苗的免疫原性的用途。所述mRNA可以包封在脂质纳米颗粒(LNP)中或可以与脂质复合(RNA-Lipoplex)。本公开文本还涉及进一步包含溶血磷脂酰胆碱(LPC)化合物和病原体识别受体激动剂中的一种或两种的组合物。

### 背景技术

[0004] mRNA化学和递送系统的进展已经使得能够快速生产几种有效的mRNA COVID-19疫苗(Hou等人,Nature Review Materials,6:1078-1094,2021)。然而,最近的报道发现,在接种疫苗的、未感染的个体中,T细胞对SARS-CoV-2刺突蛋白的反应性显著低于先前被SARS-CoV-2感染的个体(Naranbhai等人,Cell,185:1-11,2022)。考虑到发现更高水平的SARS-CoV-2反应性CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞免疫应答与更轻微的COVID-19疾病相关,这一点是令人担忧的(Rydyznski Moderbacher等人,Cell,183(4):996-1012,2020)。

[0005] 因此,本领域需要用于增强由mRNA疫苗引发的细胞免疫应答的配制品。特别地,适合于增加对核酸编码的抗原的适应性免疫应答的佐剂是期望的。

### 发明内容

[0006] 本公开文本涉及用于在哺乳动物受试者的细胞中表达组成型活性环状GMP-AMP合酶的组合物以及其用于增强mRNA疫苗的免疫原性的用途。所述mRNA可以包封在脂质纳米颗粒(LNP)中或可以与脂质复合(RNA-Lipoplex)。本公开文本还涉及进一步包含溶血磷脂酰胆碱(LPC)化合物和病原体识别受体激动剂中的一种或两种的组合物。

### 附图说明

[0007] 图1是灵长类动物cGAS ΔN蛋白的氨基酸序列的比对,所述序列包括:人(智人(Homo sapiens),SEQ ID NO:1);恒河猴(Rhesus monkey)(猕猴(Macaca mulatta),SEQ ID NO:2);东非狒狒(olive baboon,Papio anubis,SEQ ID NO:3);北白颊长臂猿(northern white-cheeked gibbon,Nomascus leucogenys,SEQ ID NO:4);普通长臂猿(common gibbon)(白掌长臂猿(Hylobates lar),SEQ ID NO:5);苏门答腊猩猩(Sumatran

orangutan, *Pongo abelii*, SEQ ID NO:6); 黑猩猩 (*chimpanzee*, *Pan troglodytes*, SEQ ID NO:7); 西部大猩猩 (*western gorilla*) (大猩猩 (*Gorilla*), SEQ ID NO:8); 和 cGAS  $\Delta$ N 共有序列 (SEQ ID NO:9)。

[0008] 图2是描绘了通过环状GAMP-AMP合酶 (cGAS) 激活干扰素基因刺激因子 (STING) 先天免疫信号传导途径的卡通图, 所述cGAS已通过去除其氨基末端磷酸肌醇结合结构域而被工程化为具有组成型活性。cGAS  $\Delta$ N 定位于线粒体, 在线粒体中其结合DNA, 导致cGAMP的产生。

[0009] 图3A-图3C描绘了加载有22:0LPC和/或cGAS  $\Delta$ N mRNA的脂质纳米颗粒 (LNP) 的特征。图3A示出了加载有22:0LPC和/或cGAS  $\Delta$ N mRNA的LNP的直径均小于150nm。图3B示出了在仅加载有cGAS  $\Delta$ N mRNA的LNP与加载有cGAS  $\Delta$ N mRNA和22:0LPC二者的LNP之间, mRNA加载效率 (实际加载与理论加载相比) 是类似的。图3C示出了在仅加载有22:0LPC的LNP与加载有cGAS  $\Delta$ N mRNA和22:0LPC二者的LNP之间, 22:0LPC加载效率 (实际加载与理论加载相比) 是类似的。来自加载有cGAS  $\Delta$ N mRNA和22:0LPC二者的LNP ([cGAS  $\Delta$ N+22:0LPC]LNP) 的数据用斜条纹示出。

[0010] 图4A-图4B示出了用R848与加载有22:0LPC的LNP组合处理鼠树突细胞 (DC) 导致超激活, 超激活定义为DC在保持活力的同时分泌IL-1 $\beta$ 的能力。将鼠骨髓衍生的树突细胞 (BMDC) 与对照 (PBS或R848) 或者具有或不具有R848的LNP一起培养48h。图4A示出了用R848与加载有22:0LPC的LNP ([22:0LPC]LNP) 或加载有cGAS  $\Delta$ N mRNA和22:0LPC二者的LNP ([cGAS  $\Delta$ N+22:0LPC]LNP) 组合刺激BMDC诱导IL-1 $\beta$ 的分泌。相比之下, 用仅加载有编码cGAS  $\Delta$ N的mRNA的LNP ([cGAS  $\Delta$ N]LNP) 或用[cGAS  $\Delta$ N+22:0LPC]LNP处理BMDC对诱导IL-1 $\beta$ 分泌的刺激不足。图4B示出了BMDC的活力, 如通过在收集细胞培养上清液时测量LDH释放所确定。相对于PBS对照, 大多数处理条件导致相对类似的细胞活力水平, 但是用[cGAS  $\Delta$ N+22:0LPC]LNP处理除外, 其导致细胞活力降低。将由各种处理条件导致的细胞因子分泌的变化与用仅R848处理进行比较。 $p < 0.0001$ \*\*\*\*。使用单因素方差分析与用于多重比较的Tukey事后检验完成统计。来自用加载有cGAS  $\Delta$ N mRNA和22:0LPC二者的LNP ([cGAS  $\Delta$ N+22:0LPC]LNP) 处理的DC的数据用斜条纹示出。

[0011] 图5A-图5C示出了各种处理对鼠DC的细胞因子分泌的作用。将鼠BMDC与对照 (PBS或R848) 或者具有或不具有R848的LNP一起培养48h。图5A和图5B示出了在存在或不存在其他刺激物的情况下用R848刺激BDMC诱导IL-6和TNF $\alpha$ 的分泌。图5C和图5D示出了在存在或不存在其他刺激物的情况下用R848刺激BMDC诱导RANTES和IP-10的分泌。有趣的是, 在不存在R848的情况下, [cGAS  $\Delta$ N]LNP刺激RANTES和IP-10的分泌, 而在不存在R848的情况下, [cGAS  $\Delta$ N+22:0LPC]LNP不刺激RANTES和IP-10的分泌。将由各种处理条件导致的细胞因子分泌的变化与用仅R848处理进行比较。 $p < 0.05$ \*,  $p < 0.0001$ \*\*\*\*。使用单因素方差分析与用于多重比较的Tukey事后检验完成统计。来自用加载有cGAS  $\Delta$ N mRNA和22:0LPC二者的LNP ([cGAS  $\Delta$ N+22:0LPC]LNP) 处理的DC的数据用斜条纹示出。

[0012] 图6A-图6C示出了人单核细胞衍生的树突细胞 (moDC) 可以同时介导cGAS/STING信号传导和超激活。将人moDC与对照 (PBS或R848) 或者具有或不具有R848的LNP一起培养48h。图6A示出了moDC在所有处理条件下均维持高水平的活力, 如通过测量LDH释放所确定的。图6B示出了R848和22:0LPC是诱导moDC分泌IL-1 $\beta$ 所必需的, 并且将cGAS  $\Delta$ N mRNA添加至LNP

不是抑制性的。图6C示出了即使在与超激活性刺激物R848和22:0LPC组合时,用加载有cGAS  $\Delta$  N mRNA的LNP处理moDC也会刺激IP-10分泌。将由各种处理条件导致的细胞因子分泌的变化与用仅R848处理进行比较。 $p<0.05^*$ ,  $p<0.0001^{****}$ 。使用单因素方差分析与用于多重比较的Tukey事后检验完成统计。来自用加载有cGAS  $\Delta$  N mRNA和22:0LPC二者的LNP ([cGAS  $\Delta$  N +22:0LPC]LNP) 处理的DC的数据用斜条纹示出。

[0013] 图7A-图7C示出了当超激活与cGAS/STING信号传导组合时,人moDC的细胞表面标志物表达维持或升高。将人moDC与对照(PBS或R848)或者具有或不具有R848的LNP一起培养48h,然后针对参与DC功能的细胞表面蛋白的表达染色。图7A示出了由各种处理条件导致的moDC的CCR7的表达,CCR7是细胞迁移至淋巴结所需的趋化因子受体。图7B示出了由各种处理条件导致的moDC的CD40的表达,CD40是在T细胞激活过程中接合T细胞表达的CD40L并且导致进一步增强T细胞激活的信号传导的受体。图7C示出了由各种处理条件导致的moDC的CD83的表达,CD83是参与T细胞激活的DC成熟的标志物。将由各种处理条件导致的细胞表面标志物表达的变化与仅R848刺激进行比较。 $p<0.05^*$ ,  $p<0.01^{**}$ ,  $p<0.0001^{****}$ 。使用单因素方差分析与用于多重比较的Tukey事后检验完成统计。来自用加载有cGAS  $\Delta$  N mRNA和22:0LPC二者的LNP ([cGAS  $\Delta$  N+22:0LPC]LNP) 处理的DC的数据用斜条纹示出。

[0014] 图8A-图8D示出了当超激活与cGAS/STING信号传导组合时,人moDC的抗原呈递和共刺激分子的表达维持或升高。将人moDC与对照(PBS或R848)或者具有或不具有R848的LNP一起培养48h,然后针对参与DC功能的细胞表面蛋白的表达染色。与PBS对照相比,用刺激物的各种组合处理moDC导致CD80(图8A)和CD86(图8B)共刺激分子上调。重要的是,当cGAS/STING信号传导与超激活组合时,moDC维持高水平的CD80和CD86表达。与PBS对照相比,用刺激物的各种组合处理moDC导致HLA-ABC(图8C)和HLA-DR(图8D)上调。HLA-ABC和HLA-DR分别将抗原呈递至CD8+T细胞和CD4+T细胞。当cGAS/STING信号传导与超激活组合时(R848+[cGAS  $\Delta$  N+22:0LPC]LNP),观察到HLA-ABC和HLA-DR表达进一步增加。将由各种处理条件导致的细胞表面标志物表达的变化与仅R848刺激进行比较。 $p<0.05^*$ ,  $p<0.0001^{****}$ 。使用单因素方差分析与用于多重比较的Tukey事后检验完成统计。来自用加载有cGAS  $\Delta$  N mRNA和22:0LPC二者的LNP ([cGAS  $\Delta$  N+22:0LPC]LNP) 处理的DC的数据用斜条纹示出。

[0015] 图9A示出了适用于本公开文本的基于脂质的mRNA递送媒介物的阳离子脂质和可电离脂质的结构。图9B示出了适用于本公开文本的基于脂质的mRNA递送媒介物的其他类型的脂质的结构。还参见Hou等人,Nature Review Materials,6:1078-1094,2021,将其通过引用并入本文。

## 具体实施方式

[0016] 本公开文本涉及用于在哺乳动物受试者的细胞中表达组成型活性环状GMP-AMP合酶的组合物以及其用于增强mRNA疫苗的免疫原性的用途。所述mRNA可以包封在脂质纳米颗粒(LNP)中或可以与脂质复合(RNA-Lipoplex)。本公开文本还涉及进一步包含溶血磷脂酰胆碱(LPC)化合物和病原体识别受体激动剂中的一种或两种的组合物。

[0017] 诱导炎症反应可以是期望的,如对于免疫疗法或疫苗接种。已经证实COVID-19mRNA疫苗(包含加载有编码SARS-CoV-2抗原的mRNA的LNP)在降低感染的频率和严重程度方面是有效的。如本文所述,诱导cGAS-STING先天免疫途径辅助包含加载有编码蛋白质抗

原的mRNA的LNP的组合物,在示例性实施方案中,所述蛋白质抗原是卵清蛋白(OVA)。在所有可能的先天免疫信号传导途径中,STING信号传导是特别令人感兴趣的,因为与一些其他信号传导途径不同,cGAS-STING激活不诱导翻译抑制。

[0018] 为了诱导cGAS-STING信号传导,设计了缺少cGAS的N末端的一部分的cGAS突变体使得其具有组成型活性(cGAS  $\Delta$  N)。将编码所述cGAS突变体的mRNA包装在LNP中用于细胞摄取和蛋白质表达。LNP包装的编码cGAS  $\Delta$  N的mRNA具有辅助经由cGAS-STING途径的免疫应答的能力。重要的是,包含编码组成型活性cGAS(如cGAS  $\Delta$  N)的mRNA通过增加炎症信号来增加加载有编码抗原的mRNA的LNP的效力。

#### 通用技术与定义

[0019] 除非另有指示,否则本公开文本的实践将采用分子生物学(包括重组技术)、微生物学、细胞生物学、生物化学和免疫学的常规技术,其在本领域的技术范围内。

[0020] 如本文和所附权利要求中所用,除非另有指示,否则单数形式“一个/一种(a)”、“一个/一种(an)”和“所述(the)”包括复数指代物。例如,“一种”赋形剂包括一种或多种赋形剂。

[0021] 如本文所用的短语“包含”是开放性的,表明此类实施方案可以包括另外的要素。相比之下,短语“由……组成”是封闭性的,表明此类实施方案不包括另外的要素(除了痕量杂质以外)。短语“基本上由……组成”是部分封闭的,表明这些实施方案可以进一步包括不在实质上改变这些实施方案的基本特征的要素。

[0022] 如本文关于值所用的术语“约”涵盖该值的从90%至110%(例如,约900道尔顿的分子量是指从810道尔顿至990道尔顿的分子量)。

[0023] 物质的“有效量”或“足够量”是足以实现包括临床结果在内的有益的或期望的结果的量,并且因此,“有效量”取决于其应用的背景。例如,在施用包含编码抗原和组成型活性cGAS的一种或多种mRNA的免疫原性组合物的情况下,有效量含有足够的mRNA,以刺激针对所述抗原的免疫应答(例如,抗原反应性抗体和/或细胞免疫应答)。

[0024] 术语“个体”和“受试者”是指哺乳动物。“哺乳动物”包括但不限于人、非人灵长类动物(例如,猴)、家畜、运动动物、啮齿动物(例如,小鼠和大鼠)和宠物(例如,狗和猫)。在一些实施方案中,受试者是人患者,如患有癌症和/或感染性疾病的人患者。

[0025] 如本文关于免疫原性组合物所用的术语“剂量”是指受试者在任何一次服用(施用或接受)的免疫原性组合物的测量部分。

[0026] 如本文所用的术语“分离的”和“纯化的”是指从与其天然缔合的至少一种组分取出(例如,从其原始环境取出)的材料。作为例子,当关于磷脂使用时,分离的磷脂为至少90%、95%、96%、97%、98%或99%纯的,如通过薄层色谱法或气相色谱法所确定。作为进一步的例子,当关于重组蛋白使用时,分离的蛋白质是指已经从产生蛋白质的宿主细胞的培养基中取出的蛋白质。

[0027] 术语“药物配制品”和“药物组合物”是指呈允许活性成分的生物活性有效的形式,并且不含对配制品或组合物所施用的个体具有不可接受的毒性的另外的组分的制剂。此类配制品或组合物旨在是无菌的。

[0028] 如本文所用的“赋形剂”包括药学上可接受的赋形剂、载体、媒介物或稳定剂,它们在所采用的剂量和浓度下对暴露于其的细胞或哺乳动物没有毒性。通常,生理学上可接受

的赋形剂是pH缓冲水性溶液。

[0029] 术语“抗原”是指被抗体或T细胞抗原受体识别并特异性结合的物质。抗原可以包括肽、多肽、蛋白质、糖蛋白、多糖、复合碳水化合物、糖、神经节苷脂、脂质和磷脂；其部分及其组合。在本公开文本的上下文中，术语“抗原”典型地是指由mRNA或DNA的核酸序列编码的多肽。多肽抗原的长度优选地为至少八个氨基酸残基，并且可以包含一个或多个翻译后修饰。

[0030] 术语“激动剂”以其最广泛的含义使用，并且包括激活通过受体的信号传导的任何分子。在一些实施方案中，激动剂与受体结合。例如，TLR8激动剂与TLR8结合并激活TLR8信号传导途径。

[0031] “烷基”是指单价饱和脂族烃基。Cx烷基是指碳原子数为x的烷基。Cx-Cy烷基或Cx-y烷基是指碳原子数在x与y之间（包含端值）的烷基。

[0032] “亚烷基”是指二价饱和脂族烃基。

[0033] “烯基”是指具有至少一个双键(>C=C<)的单价烃基。Cx烯基是指碳原子数为x的烯基。Cx-Cy烯基或Cx-y烯基是指碳原子数在x与y之间（包含端值）的烯基。

[0034] 应答或参数的“刺激”包括当与除了目的参数以外在其他方面都相同的条件相比时或者可替代地与另一种条件相比，引发和/或增强该应答或参数（例如，与不存在TLR激动剂的情况相比，在存在TLR激动剂的情况下TLR信号传导增加）。例如，免疫应答的“刺激”意指应答的增加。取决于所测量的参数，增加可以是2倍至2,000倍或从5倍至500倍或更多，或从2、5、10、50或100倍至500、1,000、2,000、5,000或10,000倍。

[0035] 相反，应答或参数的“抑制”包括当与除了目的参数之外在其他方面都相同的条件相比时或者可替代地与另一种条件相比，降低和/或阻遏该应答或参数（例如，与施用安慰剂组合物或无治疗相比，施用本公开文本的组合物后异常细胞增殖减少）。例如，免疫应答的“抑制”意指应答的减少。取决于所测量的参数，减少可以是2倍至2,000倍或从5倍至500倍或更多，或从2、5、10、50或100倍至500、1,000、2,000、5,000或10,000倍。

[0036] 相对术语“更高”和“更低”分别是指当与除了目的参数以外在其他方面都相同的条件相比时或者可替代地与另一种条件相比，应答或参数的可测量的增加或减少。例如，“更高水平的DC超激活”是指作为处理条件的结果的DC超激活水平比作为对照条件的结果的DC超激活水平高至少2、3、4、5、6、7、8、9或10倍。同样，“更低水平的DC超激活”是指作为处理条件的结果的DC超激活水平比作为对照条件的结果的DC超激活水平低至少2、3、4、5、6、7、8、9或10倍。

[0037] 如本文所用，术语“免疫”是指增加哺乳动物受试者对抗原的免疫应答，并且因此改善其抵抗或克服感染和/或抵抗疾病的能力的过程。

[0038] 如本文所用的术语“疫苗接种”是指将疫苗引入哺乳动物受试者的体内。

[0039] “佐剂”是指这样一种物质，当将所述物质添加到包含抗原或编码抗原的核酸的组合物中时，其会提高或增强哺乳动物接受者在暴露后对抗原的免疫应答。

[0040] 术语疾病的“治疗(treating)”或“治疗(treatment)”是指执行方案，所述方案可包括向个体（人或其他个体）施用一种或多种治疗剂，以努力在所述个体中获得有益的或期望的结果，包括临床结果。有益的或期望的临床结果包括但不限于减轻或改善疾病的一种或多种体征或症状、降低疾病程度、稳定（即，不恶化）疾病状态、预防疾病传播、延迟或减缓

疾病进展、改善或缓和疾病状态以及缓解(无论是部分的还是完全的)。“治疗”还可以意指与未接受治疗的个体的预期存活期相比延长存活期。此外,“治疗(treating)”和“治疗(treatment)”可以通过施用一个剂量的一种或多种治疗剂发生,或者可以在施用一系列剂量的一种或多种治疗剂时发生。“治疗(treating)”或“治疗(treatment)”不需要完全减轻体征或症状,并且不需要治愈,并且特别包括对个体仅具有缓和作用的方案。“缓和”疾病或障碍意指与预期的未治疗的结局相比,疾病或障碍的程度和/或不期望的临床表现被减轻,和/或疾病或障碍的进展的时程被减慢。

[0041] 如本文关于cGAS所用的术语“组成型活性”是指如下cGAS变体,其与细胞质中的DNA结合并且催化cGAMP合成,即使在天然cGAS几乎没有酶活性的一些条件下。在一些优选的实施方案中,“组成型活性cGAS”是“截短的cGAS”,如在不存在N末端无序结构域的情况下包含C末端DNA结合酶促结构域的cGAS  $\Delta$  N。也就是说,cGAS  $\Delta$  N是一种组成型活性cGAS,其缺乏由全长cGAS的N末端无序结构域赋予的酶活性的调节。

#### I. 组成型活性环状GMP-AMP合酶

[0042] 环状GMP-AMP合酶,也称为cGAMP合酶或cGAS,是胞质DNA的酶感受器。cGAS识别如下双链DNA,所述双链DNA无论其序列如何均导致二聚化、液体样液滴的形成和第二信使2'3'环状GMP-AMP(cGAMP)的产生,cGAMP结合至并且激活STING,导致干扰素和其他炎症介质的表达。人cGAS的长度为522个氨基酸,包括N末端磷酸肌醇结合结构域(残基1-59)和C末端DNA结合酶促结构域(残基160-522)(Barnett等人,Cell,176:1432-1446,2019)。重要的是,发现人白血病单核细胞系中cGAS  $\Delta$  N的表达导致干扰素和干扰素刺激的基因的表达水平更高(Barnett,同上,2019)。

[0043] 人cGAS(GenBank号NP\_612450.2)的氨基酸序列为:MQPWHGKAMQRASEAGATAPKASARNARGAPMDPTESPAAPEAALPKAGKFGPARKSGSRQKKSAPDTQERPPVRATGARAKKAPQRAQDTQPSDATSAPGAEGLEPPAAREPALS RAGSCRQRGARCSTKPRPPPGPVDVPSPLPVSAPILVRRDAAPGASKLRVLEKLKLSRDDISTAAGMVKGVDHLLRLKCD S AFRGVGLLNTGSYYEHVKISAPNEFDVMFKLEVPRIQLEEYSNTRAYYFVKFKRNPKNPLSQFLEGEILSASKMLSKFRKIIKEEINDIKD TDVIMKRKRGGSPAVTLLISEKISVDITLALESKSSWPASTQEGLRIQNWLSAKVRKQLRLKPFYLVPHAKEGNGFQEETWRLSFSHIEKEILNNHGKSKTCCENKEEKCCRKDCLKLMKYLLLEQLKERFKDKKHLDFSSYHVKTAFHFVCTQNPQDSQWDRKDLGLCFDNCV TYFLQCL RTEKLENYFIPEFNL FSSNLIDKRSKEFLTKQIEYERNNEFPVFDEF (SEQ ID NO:10)。

[0044] cGAS的N末端结构域的氨基酸序列为:

MQPWHGKAMQRASEAGATAPKASARNARGAPMDPTESPAAPEAALPKAGKFGPARKSGSRQKKSAPDTQERPPVRATGARAKKAPQRAQDTQPSDATSAPGAEGLEPPAAREPALS RAGSCRQRGARCSTKPRPPPGPVDVPSPLPVSAPILVRRDAA (SEQ ID NO:11)。

[0045] cGAS(cGAS  $\Delta$  N)的C末端结构域的氨基酸序列为:

PGASKLRVLEKLKLSRDDISTAAGMVKGVDHLLRLKCD S AFRGVGLLNTGSYYEHVKISAPNEFDVMFKLEVPRIQLEEYSNTRAYYFVKFKRNPKNPLSQFLEGEILSASKMLSKFRKIIKEEINDIKD TDVIMKRKRGGSPAVTLLISEKISVDITLALESKSSWPASTQEGLRIQNWLSAKVRKQLRLKPFYLVPHAKEGNGFQEETWRLSFSHIEKEILNNHGKSKTCCENKEEKCCRKDCLKLMKYLLLEQLKERFKDKKHLDFSSYHVKTAFHFVCTQNPQDSQWDRKDLGLCFDNCV TYFLQCL RTEKLENYFIPEFNL FSSNLIDKRSKEFLTKQIEYERNNEFPVFDEF (SEQ ID NO:1)。

[0046] 经密码子优化以在小鼠细胞中表达的编码人cGAS  $\Delta$  N的核苷酸序列如SEQ ID NO: 17所示。具有该核苷酸序列的DNA模板用于制备编码人cGAS  $\Delta$  N的mRNA,将所述mRNA加载到LNP中并且进行测试,如实施例所述。

[0047] 本公开文本的组合物和方法包含编码组成型活性cGAS的核酸作为催化佐剂,以用于改善由mRNA疫苗引发的适应性免疫应答。在一些优选的实施方案中,组成型活性cGAS是缺乏N末端磷酸肌醇结合结构域的截短的cGAS (cGAS  $\Delta$  N)。在一些优选的实施方案中,组成型活性cGAS是包含C末端DNA结合酶促结构域的截短的cGAS (cGAS  $\Delta$  N)。

[0048] cGAS的同源物在动物界的物种中表达,并且cGAS氨基酸序列在高级灵长类动物中是保守的。人cGAS的c末端结构域的氨基酸序列与多种非人灵长类动物cGAS蛋白的c末端结构域的氨基酸序列的比对示出于图1中。

表I.通过Clustal 12.1创建的同源性百分比矩阵<sup>^</sup>

| 编号 | 物种     | 1      | 2      | 3      | 4      | 5      | 6      | 7      | 8      |
|----|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 1  | 猕猴     | 100.00 | 96.42  | 87.53  | 85.95  | 88.71  | 87.26  | 86.78  | 86.50  |
| 2  | 东非狒狒   | 96.42  | 100.00 | 87.53  | 86.23  | 88.98  | 88.09  | 87.88  | 87.33  |
| 3  | 北白颊长臂猿 | 87.53  | 87.53  | 100.00 | 96.14  | 93.37  | 89.97  | 90.03  | 90.30  |
| 4  | 白掌长臂猿  | 85.95  | 86.23  | 96.14  | 100.00 | 92.31  | 88.92  | 88.98  | 88.71  |
| 5  | 苏门答腊猩猩 | 88.71  | 88.98  | 93.37  | 92.31  | 100.00 | 93.07  | 93.39  | 92.84  |
| 6  | 黑猩猩    | 87.26  | 88.09  | 89.97  | 88.92  | 93.07  | 100.00 | 97.51  | 96.95  |
| 7  | 智人     | 86.78  | 87.88  | 90.03  | 88.98  | 93.39  | 97.51  | 100.00 | 98.35  |
| 8  | 大猩猩    | 86.50  | 87.33  | 90.30  | 88.71  | 92.84  | 96.95  | 98.35  | 100.00 |

<sup>^</sup>此表中的编号不是SEQ ID NO。

[0049] 在一些优选的实施方案中,组成型活性cGAS是缺乏N末端结构域的截短的人cGAS (SEQ ID NO:11)。在一些优选的实施方案中,组成型活性cGAS是包含C末端结构域的截短的人cGAS (SEQ ID NO:1)。在一些优选的实施方案中,cGAS  $\Delta$  N包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列或与SEQ ID NO:1至少85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。在一些优选的实施方案中,cGAS  $\Delta$  N包含SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:8的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:8至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。在一些优选的实施方案中,cGAS  $\Delta$  N包含SEQ ID NO:9的共有氨基酸序列。为了在转染细胞中表达,编码cGAS  $\Delta$  N的核酸与起始密码子(ATG)可操作地组合。

[0050] 关于参考多肽序列的“序列同一性百分比(%)”被定义为在将候选序列与参考多肽序列比对并引入空位(如果需要)以实现最大序列同一性百分比之后,并且不将任何保守取代视为序列同一性的一部分,所述候选序列中与所述参考多肽序列中的氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分比。用于确定氨基酸序列同一性百分比的目的的比对可以以本领域技术内的多种方式来实现,例如,使用公众可获得的计算机软件,如BLAST、BLAST-2、ALIGN或Megalign(DNASTAR)软件。本领域技术人员可以确定用于比对序列的适当参数,包括在所比较序列的全长中实现最大比对所需的任何算法。例如,给定氨基酸序列A与(to、with或against)给定氨基酸序列B的序列同一性%(其可以可替代地表示为与(to、with或

against) 给定氨基酸序列B具有或包含一定序列同一性%的给定氨基酸序列A) 计算如下: 100乘以分数X/Y, 其中X是在该程序的A和B的比对中按序列被评为相同匹配的氨基酸残基的数量, 并且其中Y是B中氨基酸残基的总数。将理解, 在氨基酸序列A的长度不等于氨基酸序列B的长度的情况下, A与B的序列同一性%将不等于B与A的序列同一性%。

## II. 编码抗原的mRNA

[0051] 本公开文本的组合物和方法可以包含编码抗原的mRNA, 或者在其他方面适合于与包含编码抗原的mRNA的配制品一起使用。在一些实施方案中, 抗原是蛋白质抗原。术语“多肽”和“蛋白质”在本文中可互换地用于指代包含长度为至少8个氨基酸的肽链的抗原。在一些实施方案中, 抗原的长度为从8至1800个氨基酸、9至1000个氨基酸或10至100个氨基酸。可以对多肽进行翻译后修饰, 如通过磷酸化、羟基化、磺化、棕榈酰化和/或糖基化进行修饰。

[0052] 在一些实施方案中, 抗原是包含至少一种全长蛋白质或其片段的氨基酸序列的肿瘤抗原。在一些实施方案中, 肿瘤抗原包含来自癌蛋白的氨基酸序列或其片段。在一些实施方案中, 哺乳动物抗原是新抗原或由相对于来自哺乳动物受试者的正常细胞中存在的基因而言包含突变的基因编码。新抗原被认为在使得T细胞能够区分癌细胞和非癌细胞方面特别有用(参见例如, Schumacher和Schreiber, Science, 348:69-74, 2015)。在其他实施方案中, 肿瘤抗原包括病毒抗原, 如致癌病毒的抗原。

[0053] 在一些实施方案中, 肿瘤抗原是包含两种或更多种多肽的融合蛋白, 其中每种多肽包含来自不同肿瘤抗原的氨基酸序列或来自相同肿瘤抗原的非连续氨基酸序列。在这些实施方案中的一些中, 融合蛋白包含第一多肽和第二多肽, 其中每种多肽包含来自相同肿瘤抗原的非连续氨基酸序列。

[0054] 在一些实施方案中, 抗原是微生物抗原。在一些实施方案中, 微生物抗原包括病毒抗原、细菌抗原、原生动物抗原、真菌抗原或其组合。在一些实施方案中, 微生物抗原包括微生物的表面蛋白或其他抗原亚基。

[0055] 在一些优选的实施方案中, mRNA包含在编码区的5'末端的5'非翻译区(5'UTR)和在编码区的3'末端的3'非翻译区(3'UTR)。在一些优选的实施方案中, mRNA包含5'帽结构和多聚A尾中的一者或两者。

[0056] 在一些实施方案中, mRNA进一步编码核糖体跳跃序列, 如SEQ ID NO:12所示的2A样(2AL)序列。另外的2AL序列示出于SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:15中。在其中mRNA包含两个或更多个编码区的一些实施方案中, 所述编码区可以由2AL序列隔开。例如, 2AL序列可以位于组成型活性环状GMP-AMP合酶(cGAS)的编码区与抗原的编码区之间(例如, cGAS ΔN-2AL-抗原或抗原-2AL-cGAS ΔN)。类似地, 在其中mRNA包含两种或更多种抗原的编码区的一些实施方案中, 所述编码区可以由2AL序列隔开(例如, 抗原1-2AL-抗原2)。在本公开文本的mRNA中使用的另外的2AL序列是本领域已知的(参见例如, Luke等人, J.Gen.Virol, 89:1036-1042, 2008, 图2的2AL序列通过引用并入本文)。

## III. 基于脂质的递送媒介物

[0057] 本公开文本的组合物和方法可以包含用于mRNA疫苗的基于脂质的递送媒介物。在一些实施方案中, 媒介物是脂质纳米颗粒(LNP)。在其他实施方案中, 媒介物是与mRNA形成复合物(RNA-Lipoplex)的脂质。

[0058] 在一些实施方案中,LNP包含选自以下的至少一种脂质:可电离脂质、阳离子脂质、磷脂、聚乙二醇化脂质、结构脂质及其混合物。在一些实施方案中,所述至少一种脂质包含可电离脂质。在一些实施方案中,所述至少一种脂质包含阳离子脂质。在一些实施方案中,所述至少一种脂质包含磷脂。在一些实施方案中,所述至少一种脂质包含聚乙二醇化脂质。在一些实施方案中,所述至少一种脂质包含结构脂质。在一些实施方案中,所述至少一种脂质包含可电离脂质、磷脂、聚乙二醇化脂质和结构脂质。

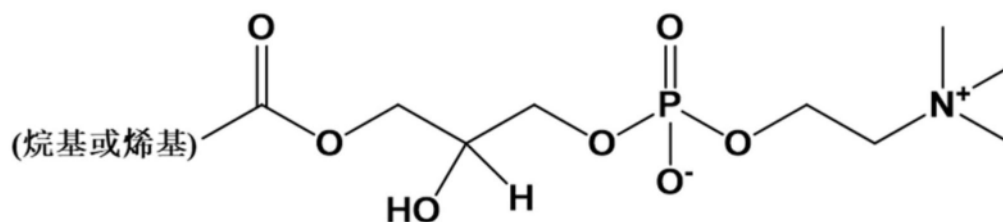
[0059] 在一些实施方案中,RNA-Lipoplex的脂质组分包含一种或多种脂质。在一些优选的实施方案中,所述一种或多种脂质包含第一脂质和第二脂质,其中所述第一脂质不同于所述第二脂质。在一些实施方案中,第一脂质是阳离子脂质,并且第二脂质是中性或阴离子脂质。

[0060] 适用于本公开文本的基于脂质的mRNA递送媒介物的脂质的结构描述于图9A和图9B中,所述图是自Hou等人,Nature Review Materials,6:1078-1094,2021的图2修改的。

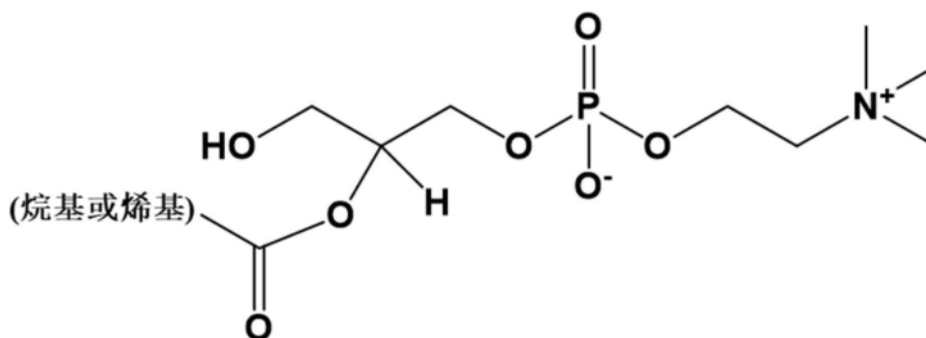
#### IV. 溶血磷脂酰胆碱化合物

[0061] 本公开文本的组合物和方法可以包含磷脂,优选溶血磷脂酰胆碱。“溶血磷脂酰胆碱”(LPC)或“溶血磷脂酰胆碱分子”是指在甘油的羟基上携带一个磷酸胆碱基团并且在甘油的另外两个羟基中的一个上携带一个酰基的甘油分子。其余羟基未被取代。

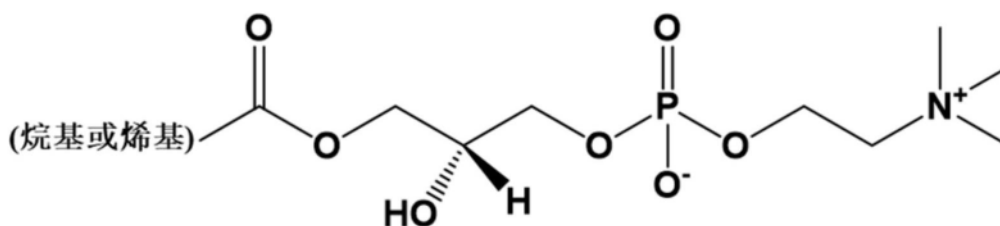
[0062] 在一些实施方案中,具有单条酰基链的分离的溶血磷脂酰胆碱(LPC)具有以下形式:



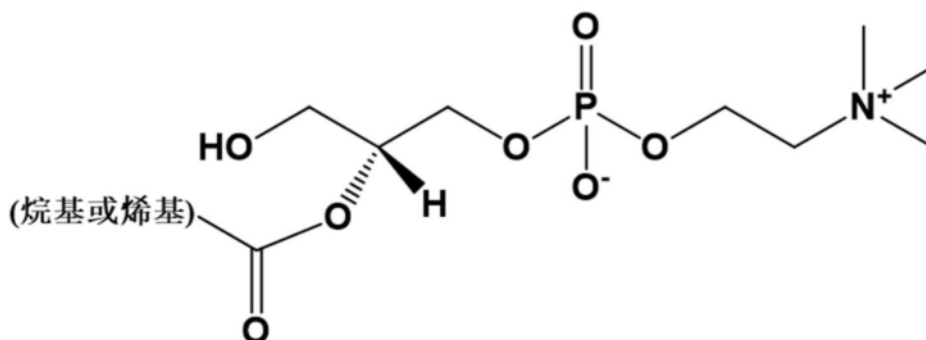
或



[0063] 在一些实施方案中,具有单条酰基链的分离的溶血磷脂酰胆碱(LPC)具有以下形式:



或



[0064] 烷基或烯基链与羰基碳一起形成比烷基或烯基链长一个碳原子的酰基链。例如，(C23烷基)-C(=O)-基团形成C24酰基链。因此，当基团“(烷基或亚烷基)”是C12-C23烷基(如C12-C19烷基或C20-C23烷基)时，(C12-C23烷基)-C(=O)-基团形成C13-C24酰基链(如C13-C20酰基链或C21-C24酰基链)。当基团“(烷基或亚烷基)”是C12-C23烯基(如C12-C19烯基或C20-C23烯基)时，(C12-C23烯基)-C(=O)-基团形成C13-C24酰基链(如C13-C20酰基链或C21-C24酰基链)。酰基链可以被称为饱和酰基或不饱和酰基，以区分含烷基的酰基和含烯基的酰基。标准 $\delta$ 符号或 $\omega$ 符号可以用于指示一个或多个双键在不饱和酰基链中的位置。

[0065] 本公开文本的溶血磷脂酰胆碱(LPC)化合物具有单条酰基链，其中酰基链是C13-C22酰基链或C13-C24酰基链。在一些实施方案中，酰基链是C18-C22酰基链或C21-C24酰基链。在一些优选的实施方案中，酰基链是C22酰基链。

#### V. 病原体识别受体激动剂

[0066] 本公开文本的组合物和方法可以包含另外的病原体识别受体(PRR)激动剂。在一些实施方案中，PRR激动剂包含Toll样受体(TLR)、NOD样受体(NLR)、RIG-I样受体(RLR)或C型凝集素受体(CLR)的激动剂。在一些实施方案中，PRR激动剂包括TLR7/8激动剂。

##### A. TLR7/8激动剂

[0067] 如本文所用的术语“TLR7/8激动剂”是指TLR7和/或TLR8的激动剂。在一个方面，TLR7/8激动剂是TLR7激动剂。在另一个方面，TLR7/8激动剂是TLR8激动剂。在进一步的方面，TLR7/8激动剂是TLR7和TLR8两者的激动剂。本公开文本的TLR7/8激动剂适合于在存在LPC的情况下超激活人树突细胞。

[0068] 在一些方面，TLR7/8激动剂是小分子。在一些实施方案中，TLR7/8激动剂是分子量为900道尔顿或更小的小分子或其盐。也就是说，小分子TLR7/8激动剂不是像重组蛋白或合成寡核苷酸那样的大分子，所述大分子可由美国FDA生物制品评价与研究中心(U.S.FDA's Center for Biologics Evaluation and Research)管控。相反，小分子TLR7/8激动剂可由FDA药物评价与研究中心(FDA's Center for Drug Evaluation and Research)管控。在一些实施方案中，小分子的分子量为从约90至约900道尔顿。在一些实施方案中，TLR7/8激动剂包括咪唑并喹啉化合物。在一些优选的实施方案中，TLR7/8激动剂包括瑞喹莫德(R848)。

##### B. 其他PRR激动剂

[0069] 在一些方面，病原体识别受体(PRR)激动剂包括Toll样受体(TLR)激动剂，条件是TLR激动剂不包括TLR7/8激动剂。在一些实施方案中，TLR激动剂包括TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR9和TLR13中的一种或多种的激动剂。在一些实施方案中，PRR激动剂是TLR2/6激动

剂,如Pam2CSK4。在其他实施方案中,TLR激动剂是TLR4激动剂,如单磷酸脂质A (MPLA)。然而,在优选的实施方案中,TLR激动剂不是TLR2、TLR4和/或TLR9的激动剂。例如,在优选的实施方案中,TLR9激动剂不是TLR4配体,如LPS (内毒素)。

[0070] 在其他方面,PRR激动剂包括NOD样受体 (NLR) 激动剂。在进一步的方面,PRR激动剂包括RIG-I样受体 (RLR) 激动剂。在另外的方面,PRR激动剂包括C型凝集素受体 (CLR) 激动剂。

## VI. 药物配制品

[0071] 本公开文本的一些组合物是包含药学上可接受的赋形剂的药物配制品。本公开文本的药物配制品可以呈溶液或悬浮液的形式。可替代地,药物配制品可以是脱水固体(例如,冷冻干燥的或喷雾干燥的固体)。本公开文本的药物配制品优选地是无菌的,并且优选地基本上不含内毒素。术语“药物配制品”在本文中可与术语“医药产品”和“药剂”互换地使用。在一些实施方案中,基于配制品的预期目的,药物配制品包含特定比率的各种组分。

[0072] 本公开文本的药学上可接受的赋形剂包括例如溶剂、缓冲剂、张力调节剂、填充剂和防腐剂(参见例如,Pramanick等人,Pharma Times,45:65-77,2013)。在一些实施方案中,药物配制品可以包含赋形剂,其用作溶剂、缓冲剂、张力调节剂和填充剂中的一种或多种(例如,盐水中的氯化钠既可以充当水性媒介物又可以充当张力调节剂)。

[0073] 在一些实施方案中,药物配制品包含水性媒介物作为溶剂。合适的媒介物包括例如无菌水、盐水溶液、磷酸盐缓冲盐水和林格氏溶液。在一些实施方案中,组合物是等渗的。

[0074] 药物配制品可以包含缓冲剂。缓冲剂控制pH以在加工、储存和任选地重构过程中抑制活性剂的降解。合适的缓冲液包括例如盐,包括乙酸盐、柠檬酸盐、磷酸盐或硫酸盐。其他合适的缓冲液包括例如氨基酸,如精氨酸、甘氨酸、组氨酸和赖氨酸。缓冲剂可以进一步包括盐酸或氢氧化钠。在一些实施方案中,缓冲剂使组合物的pH保持在6至9的范围内。在一些实施方案中,pH大于(下限)6、7或8。在一些实施方案中,pH小于(上限)9、8或7。也就是说,pH在从约6至9的范围内,其中下限小于上限。

[0075] 药物组合物可以包含张力调节剂。合适的张力调节剂包括例如右旋糖、甘油、氯化钠、甘油和甘露醇。

[0076] 药物配制品可以包含填充剂。当要在施用前冻干药物组合物时,填充剂特别有用。在一些实施方案中,填充剂是在冷冻或喷雾干燥过程中和/或在储存过程中帮助稳定活性剂并防止活性剂降解的保护剂。合适的填充剂是糖(单糖、二糖和多糖),如蔗糖、乳糖、海藻糖、甘露糖醇、山梨糖醇、葡萄糖和棉子糖。

[0077] 药物配制品可以包含防腐剂。合适的防腐剂包括例如抗氧化剂和抗微生物剂。然而,在优选的实施方案中,药物配制品在无菌条件下制备并且存放于一次性容器中,因此不需要包含防腐剂。

[0078] 本公开文本的药物配制品适合于肠胃外施用。也就是说,本公开文本的药物配制品不旨在用于肠内施用(例如,不通过口服、胃或直肠施用)。

## VII. 使用方法

[0079] 在一些方面,本公开文本涉及本文所述的任一种组合物或配制品的使用方法。使用方法适合于涉及刺激免疫应答的多种用途。在一些实施方案中,使用方法包括治疗癌症的方法。在一些实施方案中,使用方法包括抑制异常细胞增殖的方法。在一些实施方案中,

使用方法包括治疗或预防感染性疾病的方法。所述方法包括向有需要的个体施用有效量的本文所述的配制品或组合物以实现特定结局。个体是哺乳动物受试者,如人患者。在其他实施方案中,个体是非人患者。在一些实施方案中,个体是犬类患者。也就是说,在一些实施方案中,使用方法涉及临床使用,而在其他实施方案中,使用方法涉及临床前和/或兽医使用。对于临床前使用,哺乳动物受试者可以是非人灵长类动物(例如,猴或猿)或啮齿动物(例如,小鼠或大鼠)。对于兽医使用,哺乳动物受试者可以是农场动物(例如,牛)、运动动物(例如,马)或宠物(例如,伴生动物,如狗或猫)。

#### A. 刺激免疫应答

[0080] 简而言之,本公开文本提供了刺激个体的免疫应答的方法,所述方法包括以足够刺激个体的免疫应答的量向个体施用本文所述的组合物或配制品。“刺激”免疫应答(可与“引发”免疫应答互换地使用)意指增加免疫应答,其可以通过引发从头免疫应答(例如,作为初始疫苗接种方案的结果)或增强现有的免疫应答(例如,作为加强疫苗接种方案的结果)而产生。在一些实施方案中,刺激免疫应答包括以下中的一种或多种:刺激细胞因子产生;刺激B淋巴细胞增殖;刺激干扰素途径相关基因表达;刺激化学引诱物相关基因表达;以及刺激树突细胞(DC)成熟。用于测量免疫应答的刺激的方法是本领域已知的。

[0081] 例如,本公开文本提供了通过以足够在个体中诱导抗原特异性免疫应答的量向个体施用本文所述的组合物或配制品来在个体中诱导抗原特异性免疫应答的方法。在优选的实施方案中,组合物或配制品包含抗原。在一些实施方案中,将包含抗原的组合物或配制品施用至个体的组织。免疫应答可以包括抗原特异性抗体应答、抗原特异性细胞毒性T淋巴细胞(CTL)应答和抗原特异性辅助T(Th)细胞应答中的一种或多种。“诱导”抗原特异性抗体应答意指将抗原特异性抗体的滴度增加至高于阈值水平(如施用前基线滴度或血清保护水平)。“诱导”抗原特异性CTL应答意指将在外周血中发现的抗原特异性CTL的频率增加至高于施用前基线频率。“诱导”抗原特异性Th细胞应答意指将在外周血中发现的抗原特异性Th细胞的频率增加至高于施用前基线频率。

[0082] 免疫应答的分析(定性和定量两者)可以通过本领域已知的任何方法进行,所述方法包括但不限于测量抗原特异性抗体产生(包括测量特异性抗体亚类),特定淋巴细胞(如B细胞和辅助性T细胞)群体的激活,细胞因子(如IFN- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-6、IL-12)的产生和/或组胺的释放。用于测量抗原特异性抗体应答的方法包括酶联免疫吸附测定(ELISA)。可以通过增殖测定以及荧光激活细胞分选(FACS)测量特定淋巴细胞群体的激活。还可以通过ELISA测量细胞因子的产生。在一些实施方案中,刺激免疫应答的方法包括刺激单核细胞衍生的树突细胞或外周血单个核细胞的白介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )分泌、干扰素- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )分泌和/或肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )分泌。在一些优选的实施方案中,至少50%、55%、60%、65%、70%或75%的与本公开文本的组合物接触的细胞在接触后40-56小时(或约48小时)保持有活力。

[0083] 在一些实施方案中,所述方法适合于刺激抗肿瘤免疫应答。在其他实施方案中,所述方法适合于刺激抗微生物免疫应答。在一些实施方案中,抗微生物应答是抗细菌免疫应答。在一些实施方案中,抗微生物应答是抗真菌免疫应答。在一些实施方案中,抗微生物应答是抗病毒免疫应答。在一些实施方案中,抗微生物应答是抗原生动物免疫应答。

#### B. 治疗或预防疾病

[0084] 本公开文本进一步提供了治疗或预防个体的疾病的方法,所述方法包括以足够治

疗或预防个体的疾病的量向个体施用本文所述的组合物或配制品。在一些实施方案中,疾病是癌症。在一些实施方案中,疾病是异常细胞增殖。在其他实施方案中,疾病是感染性疾病。

[0085] 在一些实施方案中,所述方法涉及治疗个体的癌症或以其他方式治疗患有癌症的哺乳动物受试者。在一些实施方案中,癌症是血液癌症,如淋巴瘤、白血病或骨髓瘤。在其他实施方案中,癌症是非血液癌症,如肉瘤、癌或黑色素瘤。在一些实施方案中,癌症是恶性的。

[0086] 在一些实施方案中,所述方法涉及抑制个体中的异常细胞增殖。“异常细胞增殖”是指良性肿瘤或恶性肿瘤的增殖。恶性肿瘤可以是转移性肿瘤。

[0087] 在一些实施方案中,所述方法涉及治疗或预防个体的感染性疾病。在一些实施方案中,感染性疾病由病毒感染导致。在其他实施方案中,感染性疾病由细菌感染导致。在进一步的实施方案中,感染性疾病由真菌感染导致。在仍进一步的实施方案中,感染性疾病由原生动物感染导致。特别重要的是由感染人以及其他动物(如哺乳动物或鸟类)的动物源性病原体导致的感染性疾病。在一些实施方案中,动物源性病原体经由中间物种(载体)传播至人。

#### 列举的实施方案

1. 一种组合物,所述组合物包含包封在脂质纳米颗粒(LNP)中的mRNA,其中所述mRNA包含组成型活性环状GMP-AMP合酶(cGAS)的编码区,并且所述LNP包含第一磷脂和选自以下的至少一种脂质:可电离脂质、聚乙二醇化脂质、结构脂质、第二磷脂及其混合物,其中所述第一磷脂包含具有单条C13-C24酰基链的溶血磷脂酰胆碱(LPC)。

2. 一种组合物,所述组合物包含包封在脂质纳米颗粒(LNP)中的第一mRNA和第二mRNA,其中所述第一mRNA包含组成型活性环状GMP-AMP合酶(cGAS)的编码区,所述第二mRNA包含抗原的编码区;并且所述LNP包含第一磷脂和选自以下的至少一种脂质:可电离脂质、聚乙二醇化脂质、结构脂质、第二磷脂及其混合物,其中所述第一磷脂包含具有单条C13-C24酰基链的溶血磷脂酰胆碱(LPC)。

3. 一种组合物,所述组合物包含包封在脂质纳米颗粒(LNP)中的mRNA,其中所述mRNA包含由2A样序列隔开的第一编码区和第二编码区,其中所述第一编码区是组成型活性环状GMP-AMP合酶(cGAS)的编码区,并且所述第二编码区是抗原的编码区;或者所述第一编码区是抗原的编码区,并且所述第二编码区是组成型活性环状GMP-AMP合酶(cGAS)的编码区,并且所述LNP包含第一磷脂和选自以下的至少一种脂质:可电离脂质、聚乙二醇化脂质、结构脂质、第二磷脂及其混合物,其中所述第一磷脂包含具有单条C13-C24酰基链的溶血磷脂酰胆碱(LPC)。

4. 根据实施方案1-3中任一项所述的组合物,其中所述至少一种脂质包含可电离脂质、第二磷脂、聚乙二醇化脂质和结构脂质。

5. 根据实施方案1-4中任一项所述的组合物,其中所述可电离脂质包含:

i) 8-[(2-羟乙基)[6-氧代-6-(十一烷氧基)己基]氨基]辛酸1-辛基壬基酯(SM-102)或其类似物或衍生物;和/或

ii) 6-((2-己基癸酰基)氧基)-N-(6-((2-己基癸酰基)氧基)己基)-N-(4-羟基丁基)己烷-1-胺(ALC-0315)或其类似物或衍生物;和/或

iii) (6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七烷-6,9,28,31-四烯-19-基4-(二甲基氨基)丁酸酯(DLin-MC3-DMA)或其类似物或衍生物。

6.根据实施方案1-5中任一项所述的组合物,其中所述聚乙二醇化脂质选自PEG修饰的磷脂酰乙醇胺、PEG修饰的磷脂酸、PEG修饰的神经酰胺、PEG修饰的二烷基胺、PEG修饰的二酰基甘油、PEG修饰的二烷基甘油及其组合。

7.根据实施方案1-5中任一项所述的组合物,其中所述聚乙二醇化脂质包含聚乙二醇[PEG]2000二肉豆蔻酰基甘油[DMG]。

8.根据实施方案1-7中任一项所述的组合物,其中所述结构脂质选自:胆固醇、粪甾醇、谷固醇、麦角甾醇、菜油甾醇、豆固醇、菜籽固醇、番茄碱、乌苏酸、 $\alpha$ -生育酚及其组合。

9.根据实施方案1-7中任一项所述的组合物,其中所述结构脂质包括胆固醇。

10.根据实施方案1-9中任一项所述的组合物,其中所述第二磷脂包含:

i)亲水头部部分,所述亲水头部部分选自磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰甘油、磷脂酰丝氨酸、磷脂酸、2-溶血磷脂酰胆碱和鞘磷脂;以及

ii)一种或多种脂肪酸尾部部分,所述一种或多种脂肪酸尾部部分选自月桂酸、肉豆蔻酸、肉豆蔻脑酸、棕榈酸、棕榈油酸、硬脂酸、油酸、亚油酸、 $\alpha$ -亚麻酸、芥子酸、花生酸、花生四烯酸、植烷酸、二十碳五烯酸、山嵛酸、二十二碳五烯酸和二十二碳六烯酸。

11.根据实施方案1-9中任一项所述的组合物,其中所述第二磷脂选自:

1,2-二亚油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DLPC)、  
1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DMPC)、  
1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DOPC)、  
1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DPPC)、  
1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DSPC)、  
1,2-双十一酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DUPC)、  
1-棕榈酰基-2-油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(POPC)、  
1,2-二-0-十八碳烯基-sn-甘油-3-磷酸胆碱、  
1-油酰基-2-胆固醇琥珀酸单酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱、  
1,2-二亚麻酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱、  
1,2-二花生四烯酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱、  
1,2-双二十二碳六烯酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱、  
1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DOPE)、  
1,2-二植烷酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、  
1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、  
1,2-二亚油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、  
1,2-二亚麻酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、  
1,2-二花生四烯酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、  
1,2-双二十二碳六烯酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、  
1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸-外消旋-(1-甘油)钠盐(DOPG)、鞘磷脂及其组合。

12.根据实施方案11所述的组合物,其中所述第二磷脂包含1,2-二硬脂酰基-sn-

甘油-3-磷酸胆碱(DSPC)。

13.根据实施方案1-12中任一项所述的组合物,其中所述组合物进一步包含至少一种赋形剂。

14.根据实施方案13所述的组合物,其中所述赋形剂包括蔗糖。

15.一种组合物,所述组合物包含:

i) 与一种或多种脂质复合的mRNA(RNA-Lipoplex);以及

ii) 具有单条C13-C24酰基链的溶血磷脂酰胆碱(LPC),其中所述mRNA包含组成型活性环状GMP-AMP合酶(cGAS)的编码区,并且所述一种或多种脂质包含第一脂质和第二脂质。

16.一种组合物,所述组合物包含:

i) 与一种或多种脂质复合的第一mRNA和第二mRNA(RNA-Lipoplex);以及

ii) 具有单条C13-C24酰基链的溶血磷脂酰胆碱(LPC);

其中所述第一mRNA包含组成型活性环状GMP-AMP合酶(cGAS)的编码区,并且所述第二mRNA包含抗原的编码区,并且所述一种或多种脂质包含第一脂质和第二脂质。

17.一种组合物,所述组合物包含:

i) 与一种或多种脂质复合的mRNA(RNA-Lipoplex);以及

ii) 具有单条C13-C24酰基链的溶血磷脂酰胆碱(LPC),其中所述mRNA包含由2A样序列隔开的第一编码区和第二编码区,所述第一编码区是组成型活性环状GMP-AMP合酶(cGAS)的编码区,并且所述第二编码区是抗原的编码区;或者所述第一编码区是抗原的编码区,并且所述第二编码区是组成型活性环状GMP-AMP合酶(cGAS)的编码区,并且所述一种或多种脂质包含第一脂质和第二脂质。

18.根据实施方案15-17中任一项所述的组合物,其中所述第一脂质是阳离子脂质,并且所述第二脂质是中性或阴离子脂质。

19.根据实施方案18所述的组合物,其中所述阳离子脂质包含以下中的一者或两者:

i) 1,2-二-0-十八碳烯基-3-三甲基铵丙烷(DOTMA)或其类似物或衍生物;以及

ii) 1,2-二油酰基-3-三甲基铵丙烷(DOTAP)或其类似物或衍生物。

20.根据实施方案18或实施方案19所述的组合物,其中所述中性或阴离子脂质包含:

i) 1,2-二-(9Z-十八碳烯酰基)-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DOPE)或其类似物或衍生物;和/或

ii) 胆固醇或其类似物或衍生物;和/或

iii) 1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DOPC)或其类似物或衍生物。

21.根据实施方案1-20中任一项所述的组合物,其中所述LPC的酰基链是C21-C24酰基链。

22.根据实施方案1-20中任一项所述的组合物,其中所述LPC的酰基链是C22酰基链。

23.根据实施方案1-22中任一项所述的组合物,其中所述LPC的酰基链是完全饱和的。

24. 根据实施方案23所述的组合物,其中所述LPC包括1-山嵛酰基-2-羟基-sn-甘油-3-磷酸胆碱[LPC(22:0)]。

25. 根据实施方案1-24中任一项所述的组合物,所述组合物进一步包含TLR7/8激动剂。

26. 根据实施方案25所述的组合物,其中所述TLR7/8激动剂是分子量为900道尔顿或更小的小分子。

27. 根据实施方案26所述的组合物,其中所述TLR7/8激动剂包括咪唑并喹啉化合物。

28. 根据实施方案27所述的组合物,其中所述TLR7/8激动剂包括瑞喹莫德(R848)。

29. 根据实施方案25-28中任一项所述的组合物,其中所述LPC包括LPC(22:0),并且所述TLR7/8激动剂包括瑞喹莫德(R848)。

30. 根据实施方案1-29中任一项所述的组合物,其中所述mRNA或所述第一mRNA和所述第二mRNA包含5'非翻译区(5'UTR)和3'非翻译区(3'UTR)。

31. 根据实施方案1-30中任一项所述的组合物,其中所述mRNA包含5'帽结构。

32. 根据实施方案1-31中任一项所述的组合物,其中所述mRNA包含多聚A尾。

33. 根据实施方案1-32中任一项所述的组合物,其中所述mRNA是核苷修饰的mRNA。

34. 一种核酸,所述核酸包含:i) 抗原的编码区,和ii) 组成型活性环状GMP-AMP合酶(cGAS)的编码区,任选地其中所述核酸是mRNA,任选地其中所述核酸是DNA。

35. 一种表达载体,其包含根据实施方案34所述的核酸。

36. 根据实施方案1-35中任一项所述的组合物,其中所述组成型活性cGAS具有比其野生型对应物更大的自身DNA反应性倾向。

37. 根据实施方案1-36中任一项所述的组合物,其中所述cGAS是缺乏氨基末端磷酸肌醇结合结构域的截短的cGAS(cGAS ΔN)。

38. 根据实施方案37所述的组合物,其中所述cGAS ΔN包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列或与SEQ ID NO:1至少85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。

39. 根据实施方案38所述的组合物,其中所述cGAS ΔN包含:

(i) SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:8的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:8至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列;或

(ii) SEQ ID NO:9的共有氨基酸序列。

40. 根据实施方案38所述的组合物,其中所述cGAS ΔN由SEQ ID NO:17的核苷酸序列编码。

41. 根据实施方案37-40中任一项所述的组合物,其中所述cGAS ΔN的编码区与起始密码子(ATG)可操作地组合。

42. 根据实施方案1-41中任一项所述的组合物,其中所述抗原是肿瘤抗原。

43. 根据实施方案42所述的组合物,其中所述肿瘤抗原是肿瘤相关抗原。

44. 根据实施方案42所述的组合物,其中所述肿瘤抗原是新抗原。

45. 根据实施方案1-41中任一项所述的组合物,其中所述抗原包括微生物抗原。

46. 根据实施方案44所述的组合物,其中所述微生物抗原包括病毒抗原、细菌抗原、原生动物抗原或真菌抗原。

47. 根据实施方案1-41中任一项所述的组合物,其中所述抗原包含病原体的表面蛋白或其片段。

48. 根据实施方案47所述的组合物,其中所述病原体能够在人受试者中引起疾病。

49. 根据实施方案47或实施方案48所述的组合物,其中所述病原体是病毒。

50. 根据实施方案49所述的组合物,其中所述病毒是SARS-CoV-2。

51. 根据实施方案50所述的组合物,其中所述抗原是SARS-CoV-2的刺突(S)糖蛋白,任选地其中所述刺突糖蛋白是融合前稳定的变体。

52. 根据实施方案1-51中任一项所述的组合物,其中所述组合物不包含脂多糖(LPS)或单磷酸脂质A(MPLA)。

53. 根据实施方案1-52中任一项所述的组合物,其中所述组合物不包含氧化的1-棕榈酰基-2-花生四烯酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(oxPAPC)或oxPAPC的种类。

54. 根据实施方案53所述的组合物,其中所述组合物不包含2-[[[(2R)-2-[(E)-7-羧基-5-羟基庚-6-烯酰基]氧基-3-十六酰基氧基丙氧基]-羟基磷酰基]氧基乙基-三甲基氮鎓(HOdiA-PC)、[(2R)-2-[(E)-7-羧基-5-氧代庚-6-烯酰基]氧基-3-十六酰基氧基丙基]2-(三甲基氮鎓基)乙基磷酸酯(KOdiA-PC)、1-棕榈酰基-2-(5-羟基-8-氧代-辛烯酰基)-sn-甘油-3-磷酸胆碱(HOOA-PC)、2-[[[(2R)-2-[(E)-5,8-二氧化代辛-6-烯酰基]氧基-3-十六酰基氧基丙氧基]-羟基磷酰基]氧基乙基-三甲基氮鎓(KOOA-PC)、[(2R)-3-十六酰基氧基-2-(5-氧代戊酰基氧基)丙基]2-(三甲基氮鎓基)乙基磷酸酯(POVPC)、[(2R)-2-(4-羧基丁酰基氧基)-3-十六酰基氧基丙基]2-(三甲基氮鎓基)乙基磷酸酯(PGPC)、[(2R)-3-十六酰基氧基-2-[4-[3-[(E)-[2-[(Z)-辛-2-烯基]-5-氧代环戊-3-烯-1-亚基]甲基]环氧乙烷-2-基]丁酰基氧基]丙基]2-(三甲基氮鎓基)乙基磷酸酯(PECPC)、[(2R)-3-十六酰基氧基-2-[4-[3-[(E)-[3-羟基-2-[(Z)-辛-2-烯基]-5-氧代亚环戊基]甲基]环氧乙烷-2-基]丁酰基氧基]丙基]2-(三甲基氮鎓基)乙基磷酸酯(PEIPC)和/或1-棕榈酰基-2-壬二酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(PAzePC)。

55. 一种药物配制品,所述药物配制品包含根据实施方案1-54中任一项所述的组合物以及药学上可接受的赋形剂。

56. 一种用于产生超激活的树突细胞的方法,所述方法包括使树突细胞与有效量的根据实施方案1-54中任一项、实施方案25-54中任一项所述的组合物或根据实施方案55所述的配制品接触以产生超激活的树突细胞,其中所述超激活的树突细胞在暴露的约48小时内分泌IL-1 $\beta$ 而不经历细胞死亡。

57. 根据实施方案56所述的方法,其中使所述树突细胞:

(i) 与所述组合物在体内接触;或

(ii) 与所述组合物离体接触。

58. 根据实施方案56或实施方案57所述的方法,其中所述超激活的树突细胞:

(i) 比未刺激的树突细胞或与空LNP接触的树突细胞分泌更高水平的IL-6、TNF $\alpha$ 、RANTES和IP-10中的一种或多种;和/或

(ii) 表达更高水平的选自以下的至少一种细胞表面标志物:CCR7、CD40、CD80、CD83、CD86、MHC II类、MHC I类及其组合。

59. 一种药物配制品,所述药物配制品包含至少 $10^3$ 、 $10^4$ 、 $10^5$ 或 $10^6$ 个通过根据实施方案56-58中任一项所述的方法产生的超激活的树突细胞以及药学上可接受的赋形剂。

60. 一种刺激针对抗原的免疫应答的方法,所述方法包括向有需要的个体施用有效量的根据实施方案55或实施方案59所述的药物配制品以刺激针对所述抗原的免疫应答。

61. 一种治疗癌症的方法,所述方法包括向有需要的个体施用有效量的根据实施方案55或实施方案59所述的药物配制品以治疗所述癌症。

62. 一种抑制异常细胞增殖的方法,所述方法包括向有需要的个体施用有效量的根据实施方案55或实施方案59所述的药物配制品以抑制异常细胞增殖。

63. 一种治疗或预防感染性疾病的方法,所述方法包括向有需要的个体施用有效量的根据实施方案55所述的药物配制品以治疗或预防所述感染性疾病。

64. 根据实施方案63所述的方法,其中所述感染性疾病是病毒性疾病。

65. 根据实施方案63所述的方法,其中所述感染性疾病是细菌性疾病。

66. 根据实施方案56-62中任一项所述的方法或药物配制品,其中所述树突细胞是哺乳动物细胞。

67. 根据实施方案66所述的方法或药物配制品,其中所述哺乳动物细胞是人细胞。

68. 根据实施方案60-66中任一项所述的方法,其中所述个体是哺乳动物。

69. 根据实施方案68所述的方法,其中所述哺乳动物是人。

70. 根据实施方案68所述的方法,其中所述哺乳动物是狗或猫。

71. 根据实施方案1-70中任一项所述的组合物、配制品或方法,其中所述第二磷脂包含1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DSPC),并且所述至少一种脂质包含8-[(2-羟乙基)[6-氧代-6-(十一烷氧基)己基]氨基]辛酸1-辛基壬基酯(SM-102)或其类似物或衍生物和胆固醇。

72. 根据实施方案71所述的组合物、配制品或方法,其中所述至少一种脂质进一步包含聚乙二醇化脂质,任选地其中所述聚乙二醇化脂质包含聚乙二醇[PEG]2000二肉豆蔻酰基甘油[DMG]。

73. 根据实施方案1-72中任一项所述的组合物、配制品或方法,其中所述LNP具有小于约250纳米、任选约25至约250纳米、任选约50至约200纳米或任选约75至约175纳米的有效直径。

74. 根据实施方案73所述的组合物、配制品或方法,其中所述LNP具有小于约200纳米的有效直径。

75. 根据实施方案73所述的组合物、配制品或方法,其中所述LNP具有小于约150纳米的有效直径。

#### 实施例

[0088] 缩写:BMDC(骨髓衍生的树突细胞);CDS(胞质DNA感受器);环状GMP-AMP合酶(cGAS);CLR(C型凝集素受体);DAMP(损伤相关分子模式);DC(树突细胞);dLN(引流淋巴结);DLS(动态光散射);DMG-PEG-2000(聚乙二醇[PEG]2000二肉豆蔻酰基甘油[DMG]);DSPC

(1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱);ELSD(蒸发光散射检测器);FLT3L(Fms相关酪氨酸激酶3配体);GFP(绿色荧光蛋白);GV(GenVoy ILM<sup>TM</sup>配制品);H0diA-PC(1-棕榈酰基-2-(5-羟基-8-氧代-6-辛烯二酰基)-sn-甘油-3-磷脂酰胆碱);H00A-PC(1-棕榈酰基-2-(5-羟基-8-氧代辛-6-烯酰基)-sn-甘油-3-磷酸胆碱);IFN $\gamma$ (干扰素- $\gamma$ );IL-1b/IL1- $\beta$ /IL-1 $\beta$ (白介素-1 $\beta$ );K0diA-PC(1-(棕榈酰基)-2-(5-酮基-6-辛烯二酰基)磷脂酰胆碱);K00A-PC(1-棕榈酰基-(5-酮基-8-氧代-6-辛烯酰基)-sn-甘油-3-磷酸胆碱);LNP(脂质纳米颗粒);LPC/Lyso PC(溶血磷脂酰胆碱);Lyso PC(22:0)(1-山嵛酰基-2-羟基-sn-甘油-3-磷酸胆碱);LPS(脂多糖);MC3((6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七烷-6,9,28,31-四烯-19-基4-(二甲基氨基)丁酸酯,也称为DLin-MC3-DMA);mcg或 $\mu$ g(微克);moDC(单核细胞衍生的树突细胞);MPLA(单磷酰脂质A);NLR(NOD样受体);OVA(卵清蛋白);oxPAPC(氧化的1-棕榈酰基-2-花生酰基-sn-甘油-3-磷酰胆碱);PAMP(病原体相关分子模式);PBMC(外周血单个核细胞);PGPC(1-棕榈酰基-2-戊二酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱);POVPC(1-棕榈酰基-2-(5'-氧代-戊酰基)-sn-甘油-3-磷酸胆碱);PRR(病原体识别受体);RLR(RIG-I样受体);R848(瑞喹莫德);SC(皮下地);STING(干扰素基因刺激因子);TNF $\alpha$ (肿瘤坏死因子- $\alpha$ );以及TLR(Toll样受体)。

[0089] 尽管为了清楚和理解的目的,已经通过说明和举例的方式详细地描述了本公开文本,但对于本领域技术人员而言将清楚的是,可以实施某些改变和修改。因此,以下实施例不应当被解释为限制本公开文本的范围,本公开文本的范围由所附权利要求限定。

实施例1:具有单条酰基链的溶血磷脂酰胆碱(LPC)和TLR7/8激动剂的组合超激活哺乳动物外周血单个核细胞

[0090] 本实施例描述了用脂质DAMP与小分子PAMP的组合超激活犬和人外周血单个核细胞(PBMC)。

#### 材料和方法

[0091] 从全血中分离PBMC。使用Ficoll-Paque PLUS(Cytivia)的密度梯度离心从全血中分离PBMC。将全血用PBS以1:1稀释,铺在Ficoll-Paque PLUS的顶部上,并且在室温下以1000x g离心30分钟。将PBMC收集,在PBS中洗涤两次,并且用Ack裂解缓冲液(Lonza)孵育以除去任何剩余的红细胞。

[0092] 细胞培养和刺激。分离后,立即将PBMC铺板在含有10% FBS、50单位/mL青霉素、50mg/mL链霉素、2mM L-谷氨酰胺、1mM丙酮酸钠和50mM $\beta$ -巯基乙醇的RPMI培养基(R10培养基)中。将细胞以每孔 $1 \times 10^5$ (犬细胞)或 $1 \times 10^6$ (人细胞)铺板在96孔平底组织培养板中。根据制造商的建议将冻干的Vaccigrade R848(Invivogen)重构并且稀释,并且以 $1 \mu$ g/mL的终浓度添加至细胞中。紧接着,将22:0LYSO PC以 $82.5 \mu$ M的终浓度添加至细胞中。根据制造商的建议将另外的先天激动剂在R10培养基中稀释,并且如下添加至细胞中:以10ng/mL的终浓度添加人GM-CSF(Peprotech);以 $15 \mu$ g/mL的终浓度添加2'3'cGAMP(Invivogen);以 $1 \mu$ g/mL的终浓度添加LPS血清型055:B5(Enzo Life Sciences);以 $30 \mu$ g/mL的终浓度添加铝佐剂氢氧化物(Invivogen)。将细胞在37°C、5% CO<sub>2</sub>下孵育两天。然后将细胞培养物用于终点分析。

[0093] 终点分析。将PBMC用PAMP和DAMP培养两天后,收集上清液和细胞样品用于分析。通过以400x g离心5分钟沉淀培养物中的细胞。收集孔中的一半培养基体积用于通过酶联免

疫吸附测定 (ELISA) 或Lumit<sup>TM</sup>生物发光测定进行细胞因子量化,而将其余培养基和细胞用于通过评估代谢活性来量化细胞活力。

[0094] 细胞因子分泌的量化。使用以下试剂盒之一评估人PBMC的IL-1 $\beta$ 分泌:ELISA MAX Deluxe Set人IL-1 $\beta$ 试剂盒 (Biolegend)、Invitrogen人IL-1 $\beta$ 试剂盒或Lumit<sup>TM</sup>人IL-1 $\beta$ 免疫测定 (Promega)。使用ELISA MAX Deluxe Set人IFN  $\gamma$  (Biolegend) 评估人PBMC的IFN  $\gamma$  分泌,并且使用人TNF $\alpha$ 未包被的ELISA试剂盒 (Invitrogen) 评估人PBMC的TNF $\alpha$ 分泌。根据制造商的说明书进行ELISA,但有以下修改:i) 将用于孵育的总样品+缓冲液体积从100 $\mu$ L减少至50 $\mu$ L;ii) 以500pg/mL制备最高标准品,两倍稀释至7.8pg/mL;以及iii) 在4 $^{\circ}$ C下在定轨摇床上完成样品过夜孵育。根据制造商的说明书进行Lumit<sup>TM</sup>测定。根据制造商的说明书使用犬IL-1 $\beta$ /IL-1F2 DuoSet ELISA (R&D) 评估犬PBMC的IL-1 $\beta$ 分泌,但有以下修改:i) 将用于孵育的总样品+缓冲液体积从100 $\mu$ L减少至50 $\mu$ L;ii) 在4 $^{\circ}$ C下在定轨摇床上完成样品过夜孵育。对于所有ELISA,使用Spectramax M5e读板仪 (Molecular Devices) 在450nm下测量吸光度,在570nm下进行校正。对于Lumit<sup>TM</sup>测定,使用Spectramax M5e读板仪 (Molecular Devices) 以500ms的积分时间测量所有波长下的发光。为了确定上清液中的细胞因子浓度,使用标准曲线经由在GraphPad Prism 9(GraphPad Software) 上的4PL分析对样品浓度进行内插。然后针对对上清液做的任何稀释对样品的内插结果进行调整。

[0095] 细胞活力的量化。通过使用CellTiter-Glo发光细胞活力测定 (Promega) 量化作为代谢活性细胞的指标的ATP的存在来评估细胞活力。遵循制造商的说明书评估代谢活性。将CellTiter-Glo试剂与细胞沉淀和新鲜培养基混合,然后转移至白色不透明96孔板中。使用500ms的积分时间在Spectramax M5e读板仪 (Molecular Devices) 上测量所有波长下的发光。计算相对于用R848处理的PBMC的对照条件的活力百分比。

[0096] 统计分析。对于每种条件,将来自每个供体的细胞以一式三份铺板以供测试。对于细胞因子量化,将一式三份重复值用于内插,并且将数据绘制为总浓度 (pg/mL) 或相对于仅R848的对照条件每个供体的变化倍数。对于活力量化,对每个供体一式三份重复取平均值,并且将平均值用作一个供体测量值。测试了多个供体,并且柱状图上的每个数据点表示供体的值。为了测试测试条件的差异,将测试结果与仅R848的对照条件进行比较。使用混合效应单因素方差分析计算P值,使用Dunnett检验对多重比较进行校正。

结果-用22:0LYSO PC和R848处理超激活犬PBMC

[0097] 发现22:0LYSO PC (DAMP) 和TLR7/8激动剂R848 (PAMP) 的组合在人moDC中具有强效超刺激活性。为了评估这种超刺激活性是否转化到其他临床相关的物种,评估22:0LYSO PC +R848超激活从犬全血中分离的PBMC的能力。对于每个数据集,由于缺乏可用于诱导真正的犬moDC的犬专用试剂,使用来自多个供体的PBMC代替moDC。简而言之,使用密度梯度离心从全血中分离PBMC,然后将其用目的超激活性刺激物培养两天。

[0098] 培养两天后,通过量化细胞培养物上清液中的IL-1 $\beta$ 并且测量细胞活力来评估超激活。当用22:0LYSO PC和R848一起处理时,与所测试的每种其他刺激物相比,犬PBMC分泌可比或更高水平的IL-1 $\beta$ ,无论是以每mL浓度计,还是以每个供体相对于仅R848的变化倍数计。与先前研究显示占PBMC 5%-10%的单核细胞可以响应于用R848激活而释放IL-1 $\beta$ 一致,与未处理的细胞相比,在仅R848的情况下犬PBMC的IL-1 $\beta$ 分泌水平升高。正如所预期的,LPS+铝佐剂的焦亡组合引发高水平的IL-1 $\beta$ 。值得注意的是,虽然与仅R848相比,PGPC+R848

引发类似水平的IL-1 $\beta$ ,但与未处理的细胞相比,GM-CSF和2'3'cGAMP都没有诱导犬PBMC的显著IL-1 $\beta$ 分泌。

[0099] 尽管在细胞培养物上清液中可以在超激活犬PBMC后一天检测到IL-1 $\beta$ ,但在超激活后两天评价细胞活力以确保IL-1 $\beta$ 分泌后的持久活力。22:0LYSO+R848没有显著降低相对细胞活力。有趣的是,虽然证明PGPC与R848的组合对犬PBMC略有毒性,但没有观察到它对人moDC或人PBMC有毒性。这些数据一起证明,22:0LYSO+R848引发犬PBMC的高水平IL-1 $\beta$ 分泌,这表明超激活。结果-用22:0LYSO PC和R848处理超激活人PBMC

[0100] 还用从人供体获得的全血分离的PBMC进行超激活实验。简而言之,通过密度梯度离心从来自多个人供体的全血中分离PBMC,并且将其用目的超激活性刺激物培养两天。

[0101] 像人moDC和犬PBMC一样,人PBMC以与所测试的所有其他刺激物相比更高或可比的水平分泌IL-1 $\beta$ 。与犬PBMC类似,由于单核细胞激活,人PBMC响应于仅R848而分泌IL-1 $\beta$ ,并且此因添加22:0LYSO PC而升高。正如所预期的,LPS+铝佐剂的焦亡组合引发高水平的IL-1 $\beta$ 。与在犬PBMC中的观察结果一致,PGPC+R848没有诱导比仅R848显著更高水平的IL-1 $\beta$ 。GM-CSF没有诱导人PBMC分泌水平显著高于由未处理的细胞产生的背景水平的IL-1 $\beta$ 。

[0102] 还在超激活后两天评估人PBMC的活力以确保IL-1 $\beta$ 分泌后人PBMC的持久活力。用任何刺激物处理后,没有观察到人PBMC活力的显著降低。这些数据一起证明,人和犬PBMC两者都被22:0LYSO PC+R848超激活。有趣的是,犬PBMC被22:0LYSO PC+R848比被PGPC+R848超激活的程度更大。

[0103] 因为激活的人PBMC可以分泌除IL-1 $\beta$ 之外的其他细胞因子,所以在超激活后两天测量细胞培养物上清液中促炎性细胞因子IFN  $\gamma$  和TNF $\alpha$ 的分泌。与所测试的所有其他刺激物相比,相对于仅R848,22:0LYSO PC+R848的组合在IFN  $\gamma$  分泌和TNF $\alpha$ 分泌两方面诱导每个供体的最高变化倍数。值得注意的是,尽管LPS+铝佐剂诱导人PBMC分泌高水平的IL-1 $\beta$ ,但这种刺激物组合没有诱导IFN  $\gamma$  或TNF $\alpha$ 分泌的倍数增加。此外,相对于仅R848,GM-CSF和2'3'cGAMP都没有引发IFN  $\gamma$  分泌的实质性倍数变化。这些数据表明,22:0LYSO PC+R848的组合在诱导人PBMC分泌促炎性细胞因子IFN  $\gamma$  和TNF $\alpha$ 方面是优越的。

实施例2:cGAS  $\Delta$  N mRNA和22:0LPC二者均可以加载到脂质纳米颗粒(LNP)中  
材料与方法

[0104] 材料。LNP的脂质购自Cayman Chemicals (SM102) 或Avanti (22:0LPC, DSPC, DMG-PEG2000)。胆固醇购自Sigma。cGAS  $\Delta$  N mRNA是定制的,并且经由体外转录从线性化模板DNA (Trilink) 合成。人cGAS  $\Delta$  N序列经密码子优化以在鼠细胞中表达,并且合成的核苷酸序列如SEQ ID NO:17所示。使用Trilink专有的Clean Cap mRNA技术,用N1-甲基假尿苷碱基修饰和120个残基的多聚A尾对mRNA序列进行加帽。所述序列含有Bbs1限制性酶切位点。序列信息用于构建质粒,由所述质粒以合成方式合成mRNA。合成后对mRNA进行磷酸酶处理。

[0105] LNP合成。使用定制的LNP脂质混合物(表2-1)制备脂质纳米颗粒(LNP)。在pH 4的柠檬酸钠缓冲液中以0.02mg/mL制备cGAS  $\Delta$  N mRNA。以12.5mM制备定制的LNP脂质混合物。mRNA/22:0LPC的比率是基于先前确定每种组分的体外活性的实验来选择的。使用NanoAssemblr Ignite仪器(Precision Nanosystems)合成LNP。将乙醇中的脂质与mRNA溶液以1:3体积比单独组合,使用12mL/min的流速。将LNP在10体积的pH 7.4的磷酸盐缓冲盐水(PBS)中洗涤,以除去残余的乙醇,然后使用Amicon 10K MWCO离心过滤器浓缩。LNP在使

用前通过0.2 $\mu$ m过滤器过滤。

表2-1.LNP配制品

|             | 22:0LPC LNP | cGAS $\Delta$ N LNP | 22:0LPC+cGAS $\Delta$ N LNP |
|-------------|-------------|---------------------|-----------------------------|
| 脂质混合物       |             |                     |                             |
| SM102       | 40%         | 40%                 | 40%                         |
| DSPC        | 0%          | 35%                 | 0%                          |
| 胆固醇         | 28.5%       | 28.5%               | 28.5%                       |
| DMG-PEG2000 | 1.5%        | 1.5%                | 1.5%                        |
| 22:0LPC     | 35%         | 0%                  | 35%                         |
| mRNA        | N/A         | cGAS $\Delta$ N     | cGAS $\Delta$ N             |

[0106] LNP表征。遵循制造商的方案,使用RiboGreen测定(ThermoFisher)量化LNP中的mRNA加载。将样品稀释以落入标准曲线的范围内。使用Triton X-100裂解LNP以评估LNP中的mRNA包封。对总mRNA和包封的mRNA进行量化。在NanoBrook Omni (Brookhaven)上使用动态光散射(DLS)评估LNP的尺寸。在DLS上运行之前,将LNP在PBS中1:10稀释。每个样品记录三次90秒测量。

#### 结果

[0107] LNP可以以与加载cGAS  $\Delta$  N mRNA或22:0 LPC的LNP类似的水平加载cGAS  $\Delta$  N mRNA和22:0 LPC。所有LNP(即22:0LPC LNP、cGAS  $\Delta$  N LNP和cGAS  $\Delta$  N+22:0LPC LNP)均示出类似的尺寸,所有LNP尺寸均<150nm(图3A),且具有相对均匀的分布(PDI<0.3)。cGAS  $\Delta$  N LNP和cGAS  $\Delta$  N+22:0LPC加载的LNP示出了类似的mRNA加载水平,但当将22:0LPC也添加至LNP中时,总体加载效率(实际/理论加载)略有降低(图3B)。对于22:0LPC,22:0LPC LNP和cGAS  $\Delta$  N+22:0LPC LNP示出了类似的加载水平和效率(实际/理论)(图3C)。

实施例3:小鼠树突细胞通过用编码cGAS  $\Delta$  N的mRNA和超激活性刺激物处理达到独特的激活状态

#### 材料与方法

[0108] 小鼠骨髓衍生的树突细胞(BMDC)的生成。将腿股骨和胫骨从小鼠中取出,用剪刀剪碎并且冲进无菌管中。将骨髓悬浮液用ACK裂解缓冲液处理1分钟,然后通过40 $\mu$ m细胞过滤器。对细胞进行计数,并且将其重悬于由含有10%FBS、青霉素和链霉素以及L-谷氨酰胺和丙酮酸钠的补充物的完全IMDM组成的培养基(I10)中。然后将细胞以每孔8E6个骨髓细胞铺板在P12板中。将重组小鼠FLT3L(Miltenyi)以200ng/mL添加至培养物中。在第9天使用分化的细胞进行后续测定。使用BD SymphonyA3通过流式细胞术监测分化的效率,并且CD11c<sup>+</sup>MHC-II<sup>+</sup>细胞常规地高于活细胞的80%。对于每个实验,使用5至15只小鼠从骨髓产生DC。

[0109] 鼠BMDC的超激活和cGAS  $\Delta$  N递送。在分化后第9天收获BMDC,用PBS洗涤并以2x10<sup>5</sup>个细胞/孔的浓度再铺板于完全IMDM培养基(I10)中。在存在或不存在加载有100 $\mu$ M 22:0LPC LNP且加载有或不加载约1 $\mu$ g/mL的cGAS  $\Delta$  N mRNA的LNP的情况下培养细胞(表3-1)。在某些条件下,以1 $\mu$ g/mL终浓度添加R848。刺激后48小时,收集上清液用于细胞因子分泌评估。遵循制造商的说明书使用夹心ELISA(Invitrogen)测量BMDC的IL-1 $\beta$ 细胞因子分泌。根据制造商的说明书,使用LEGENDplex小鼠抗病毒应答板(Biolegend)测量另外的细胞因子。根据制造商的说明书,通过使用CyQUANT LDH细胞毒性测定(Invitrogen)测量释放到新鲜

上清液中的LDH来评估细胞活力。

表3-1. 鼠BMDC的体外给药

|            | 22:0LPC LNP | cGAS $\Delta$ N LNP | 22:0LPC+cGAS $\Delta$ N LNP |
|------------|-------------|---------------------|-----------------------------|
| 22:0 LPC剂量 | 100 $\mu$ M | N/A                 | 100 $\mu$ M                 |
| mRNA剂量     | N/A         | 0.91 $\mu$ g/mL     | 0.91 $\mu$ g/mL             |

结果

[0110] 在以前的工作中,发现使用R848和22:0LPC的DC超激活激活了转录因子NF- $\kappa$ B,导致了炎性细胞因子(如IL-6和TNF $\alpha$ )的产生。此外,NLRP3炎性小体被激活,导致IL-1 $\beta$ 的产生。与这些细胞应答不同,cGAS激活和产生的STING信号传导激活转录因子IRF3,IRF3与NF- $\kappa$ B共调节一些基因,但也独立于NF- $\kappa$ B调节独特的基因集。cGAS  $\Delta$  N是组成型活性的经修饰的cGAS。使用配制有cGAS  $\Delta$  N mRNA且具有和没有22:0LPC的LNP,假设cGAS信号传导和超激活可以诱导一组互补的炎性信号。

[0111] 为了检验我们的假设,使用FLT3L将小鼠骨髓细胞分化成DC。然后用R848、22:0LPC和cGAS  $\Delta$  N mRNA以各种组合刺激BMDC。如实施例2中所述,将cGAS  $\Delta$  N mRNA和22:0LPC单独或组合配制在LNP中。

[0112] 用R848和[cGAS  $\Delta$  N+22:0 LPC] LNP处理的F1t3L BMDC可以被超激活。评估了DC响应于用R848+[cGAS  $\Delta$  N+22:0LPC]LNP处理而被超激活的潜力;超激活表示为DC在保持活力的同时分泌IL-1 $\beta$ 的能力。用PBS(未刺激)处理或用仅R848处理的DC产生极少IL-1 $\beta$ 或不产生IL-1 $\beta$ 。正如所预期的,将R848和22:0LPC处理组合在48小时后导致IL-1 $\beta$ 产生(图4A)。使用含有cGAS  $\Delta$  N mRNA的LNP处理细胞不诱导IL-1  $\beta$ 。cGAS  $\Delta$  N处理与22:0LPC组合也不导致IL-1  $\beta$ 释放(图4A)。cGAS/STING信号传导可能不足以产生22:0LPC介导的成熟IL-1 $\beta$ 释放所需的IL-1 $\beta$ 蛋白的前体形式(pro-form)。然而,将所有三种刺激物(R848、cGAS  $\Delta$  N和22:0LPC)组合导致IL-1 $\beta$ 释放(图4A)。该结果证明cGAS  $\Delta$  N处理不会抑制超激活。接下来,使用LDH释放测定来评估细胞活力,以确认细胞是超激活的并且不是焦亡的。在所测试的处理条件下,DC与未刺激的细胞具有类似的活力概况,从而证实DC是超激活的(图4B)。总之,这些数据表明,DC可以同时用R848、22:0LPC和cGAS  $\Delta$  N mRNA处理并且是超激活的。

[0113] [cGAS  $\Delta$  N和22:0LPC]LNP+R848处理激活F1t3L BMDC中的NF- $\kappa$ B信号传导和cGAS-STING途径。为了进一步确认单独的刺激物的活性,对IL-6和TNF $\alpha$ 产生进行了量化。这两个基因主要由NF- $\kappa$ B调节,并且因此由R848刺激调节。当添加R848作为处理时,产生了IL-6和TNF $\alpha$ (图5A-图5B)。将含有22:0LPC的LNP添加至R848处理增加了IL-6和TNF $\alpha$ 二者的分泌。仅cGAS  $\Delta$  N不刺激IL-6和TNF $\alpha$ 分泌(图5A-图5B)。cGAS/STING信号传导主要激活IRF3而非NF- $\kappa$ B。此外,测量了已知受cGAS/STING信号传导调节的RANTES和IP-10的分泌。用PBS(未刺激)处理的细胞不表达RANTES或IP-10。相比之下,cGAS  $\Delta$  N刺激诱导RANTES和IP-10的表达,从而证实我们的mRNA转录物编码成功递送至细胞并且表达的活性cGAS(图5C-图5D)。出乎意料的是,当cGAS  $\Delta$  N与22:0LPC一起递送时,与单一cGAS  $\Delta$  N处理相比,RANTES和IP-10表达被抑制。当在超激活中用单独的或与22:0LPC组合的R848刺激细胞时,细胞产生RANTES和IP-10,未观察到22:0LPC介导的抑制。尽管当cGAS  $\Delta$  N与22:0LPC组合时观察到出人意料的抑制,但将所有三者组合导致RANTES和IP-10的表达(图5C-图5D)。

[0114] 总之,用R848、22:0 LPC和cGAS  $\Delta$  N的各种组合处理鼠DC证明了几件事。首先,cGAS

$\Delta N$  mRNA被成功地配制在LNP中,用于递送到DC中,并且被翻译成蛋白质。cGAS  $\Delta N$ 蛋白是有活性的,如由所述处理诱导RANTES和IP-10产生的能力所指示的。第二,与超激活性刺激物组合,cGAS  $\Delta N$ 处理没有减少关键的超激活细胞因子IL-1 $\beta$ 的分泌。最后,当用所有三种刺激物刺激细胞时,由一种刺激物调节的炎性基因没有因其他两种刺激物的影响而受损。这些数据表明,cGAS  $\Delta N$ 处理可以与超激活性刺激物组合,以引导DC同时产生两个过程的炎性环境。这种组合导致独特的DC激活状态,其可以在免疫应答中具有潜在的优势。

实施例4:用cGAS  $\Delta N$ 和超激活性刺激物处理人树突细胞导致NLRP3炎性小体和cGAS-STING途径的激活

#### 材料与方法

[0115] 人单核细胞衍生的树突细胞 (moDC) 产生。根据制造商的说明书使用StraightFrom Leukopak CD14微珠试剂盒从购自Miltenyi Inc. (圣何塞,加利福尼亚州) 的Leukopaks分离人单核细胞。然后将单核细胞等分并且在含有10%二甲基亚砜的胎牛血清中冷冻。对于使用单核细胞衍生的树突细胞 (moDC) 培养物的研究,将单核细胞解冻并在含有10% FBS、50单位/mL青霉素、50mg/mL链霉素、2mM L-谷氨酰胺、1mM丙酮酸钠、50mM $\beta$ -巯基乙醇、10mM HEPES和Gibco MEM非必需氨基酸的RPMI培养基 (R10培养基) 中培养。为了使单核细胞分化为moDC,将重组人GM-CSF (50ng/mL) 和IL-4 (25ng/mL) 添加至R10培养基。将细胞与GM-CSF和IL-4一起培养6天,在第3天用含有GM-CSF和IL-4的R10培养基进行另外的细胞喂养。在分化的第6天,收集moDC以供使用,并且将一部分染色以确认分化成功。常规地,通过流式细胞术使用BD Symphony A3,>80%的活细胞是CD11c+CD209+。

[0116] moDC的超激活和cGAS  $\Delta N$ 递送。从单核细胞分化后六天,收集moDC并且进行计数。将细胞以100,000个细胞/孔铺板在96孔板中。用1 $\mu$ g/mL R848和含有22:0LPC和/或cGAS  $\Delta N$  mRNA的LNP处理moDC。刺激后48小时,收集细胞培养上清液。根据制造商的说明书,使用LEGENDplex人抗病毒应答板 (Biolegend) 测量细胞因子表达。根据制造商的说明书,通过使用CyQUANT LDH细胞毒性测定 (Invitrogen) 测量释放到新鲜上清液中的LDH来评估细胞活力。收集细胞并且染色,以测量参与T细胞激活的DC分子 (如CD40、CD80、CD83、CD86、CCR7、HLA-ABC和HLA-DR) 的表达,通过流式细胞术使用BD Symphony A3加以评估。

#### 结果

[0117] 假设将cGAS  $\Delta N$ 介导的STING信号传导与超激活组合可以帮助建立免疫疗法和疫苗,从而可以提供比当前可用的选择更好的保护。因此,测试将cGAS  $\Delta N$ 疗法与对人DC的超激活组合。作为DC的来源,通过在含有重组GM-CSF和IL-4的R10培养基中培养六天使人单核细胞分化成DC。在第6天通过CD11c和CD209染色证实细胞是DC,并且将细胞用于以下三种目的刺激物进行处理:R848、22:0LPC和cGAS  $\Delta N$ 。

[0118] 用R848和[cGAS  $\Delta N$ +22:0LPC]LNP处理的moDC被超激活,并且允许cGAS-STING途径激活。首先通过确认使用鼠DC获得的主要结论开始。与用PBS (未刺激) 处理的DC相比,这三种处理 (R848、22:0LPC和cGAS  $\Delta N$ ) 的组合对人DC活力具有类似的影响 (图6A)。当测量IL-1 $\beta$ 释放时,观察到用PBS (无刺激) 或R848处理产生极少的IL-1 $\beta$  (图6B)。正如所预期的,R848和经由LNP递送的22:0LPC的组合诱导IL-1 $\beta$ 分泌。与小鼠类似,单独的或与22:0LPC组合的cGAS  $\Delta N$ 处理未诱导IL-1 $\beta$ 的分泌 (图6B)。当cGAS  $\Delta N$ 与R848和22:0LPC的超激活组合组合时,IL-1 $\beta$ 分泌得以维持或增加 (图6B)。对IP-10分泌进行量化以确保在LNP中配制的cGAS  $\Delta$

N mRNA可以诱导信号传导。仅cGAS  $\Delta$  N处理诱导IP-10表达。与鼠数据相比,将22:0LPC添加至cGAS  $\Delta$  N LNP未抑制IP-10表达(图6C)。此外,与鼠数据相比,R848处理(单独的或与22:0LPC组合)不足以诱导IP-10表达(图6C)。当所有三种刺激物组合时,cGAS  $\Delta$  N、R848和22:0LPC能够诱导IP-10表达(图6C)。对于所示的供体,与仅cGAS  $\Delta$  N处理相比,当所有三种刺激物组合时,观察到IP-10减少。然而,在测试的4个供体中并未始终观察到该减少。不管这种减少,cGAS  $\Delta$  N、R848和22:0LPC的组合导致IP-10表达显著高于在未刺激条件下检测到的表达(图6C)。总之,这些结果表明,像在鼠DC中一样,人DC能够介导cGAS/STING激活,同时也被超激活。

[0119] 用R848和[cGAS  $\Delta$  N+22:0LPC]LNP处理的moDC上调T细胞激活所需的表面蛋白。除了产生特定的细胞因子环境外,DC还需要表达在T细胞激活中重要的细胞表面蛋白。一种这样的蛋白质是DC从外周组织运输至淋巴结所需的趋化因子受体CCR7,在淋巴结中DC可以对T细胞进行初免。在用R848、22:0LPC和cGAS  $\Delta$  N的各种组合处理后,针对CCR7表达对DC进行染色。如先前观察到的,用仅R848处理增加了CCR7表达,并且用R848与22:0LPC的组合进行的超激活处理导致CCR7进一步增加(图7A)。与未刺激的细胞相比,cGAS  $\Delta$  N处理也增加了CCR7表达,并且添加22:0LPC对CCR7表达没有显著影响(图7A)。有趣的是,将cGAS  $\Delta$  N处理与R848和22:0LPC组合导致CCR7表达的最大变化(图7A)。重要的是,将cGAS  $\Delta$  N与超激活组合未抑制CCR7表达,并且CCR7表达增加可以使DC能够更有效地迁移至淋巴结。

[0120] 继续检查树突细胞上对其功能重要的其他关键细胞表面蛋白。CD40是接合CD4<sup>+</sup> T细胞上的CD40L并且最终增强T细胞应答的受体。CD83还参与T细胞激活,并且通常用作DC激活的指标。与未刺激的细胞相比,当用具有或不具有22:0LPC的R848处理DC时,CD40表达上调,并且当用具有或不具有22:0LPC的cGAS  $\Delta$  N处理细胞时,观察到进一步增强(图7B)。与未刺激的细胞相比,将cGAS信号传导与超激活组合也导致CD40表达的增加(图7B)。与CD40染色相比,CD83表达更可变,但将cGAS  $\Delta$  N处理与超激活处理组合仍未消除CD83的表达(图7C)。

[0121] CD80和CD86是在抗原呈递过程中接合T细胞的共刺激分子,并且充当呈递的非自身抗原确实危险的确认信号。当用R848或cGAS  $\Delta$  N激活DC时或当用R848和22:0LPC超激活DC时,CD80和CD86表达增加(图8A-图8B)。当将cGAS  $\Delta$  N和超激活处理组合时,与未刺激的细胞相比,DC继续上调CD80和CD86(图8A-图8B)。因此,当执行两个细胞过程时,DC仍然能够为T细胞供应共刺激信号。

[0122] 最后,将DC针对HLA-ABC和HLA-DR染色,HLA-ABC和HLA-DR分别是将抗原呈递至CD8和CD4<sup>+</sup> T细胞的I类和II类MHC分子。与未刺激的细胞相比,添加或不添加22:0LPC的R848处理增加了HLA-ABC的表达(图8C)。用具有或不具有22:0LPC的cGAS  $\Delta$  N处理DC也对HLA-ABC表达具有类似的影响(图8C)。出人意料的是,当将cGAS  $\Delta$  N处理和超激活组合时,与其他刺激物组合相比,观察到HLA-ABC显著增加。当分析HLA-DR染色时,观察到与未刺激的细胞相比,R848处理增加了HLA-DR表达(图8D)。当用R848和22:0LPC的组合超激活时,则观察到进一步的增加(图8D)。cGAS  $\Delta$  N处理比单独的或作为超激活的一部分的R848处理更有效(图8D)。与仅cGAS  $\Delta$  N处理相比,将22:0LPC添加至cGAS  $\Delta$  N处理进一步增加了HLA-DR表达(图8D)。最后,将cGAS  $\Delta$  N处理与超激活组合导致所有实验条件的最高HLA-DR表达(图8D)。组合所有三种刺激物导致MHC I类和II类分子的最高表达,这可以使得能够更有效地将抗原呈递至T细

胞。

[0123] 使用人DC的研究表明,与小鼠DC相比,人DC通常对cGAS  $\Delta$  N、R848和22:0LPC有类似反应。一个出乎意料的差异是用具有或不具有22:0LPC的cGAS  $\Delta$  N处理细胞时。当添加22:0LPC时,小鼠DC示出IP-10抑制,而人DC没有相同结果。更重要的是,将cGAS  $\Delta$  N、R848和22:0LPC组合没有阻止人DC超激活并产生细胞因子(如IL-1 $\beta$ 和IP-10)。针对参与T细胞激活的关键蛋白质的细胞表面表达对人DC的进一步分析表明,三种刺激物的组合不抑制表达。这些蛋白质仍然是可诱导的,并且在一些情况如HLA-ABC和HLA-DR下,与仅cGAS  $\Delta$  N处理或超激活相比,表达进一步增加。总之,从人DC处理收集的这些数据表明,cGAS  $\Delta$  N处理可以与超激活组合以诱导如下细胞状态,其中两个过程相互补充,并且可能潜在地对用于诱导适应性免疫应答的细胞功能具有加性效应。

实施例5:将cGAS  $\Delta$  N mRNA和超激活组合作为疫苗接种策略以改善免疫应答

[0124] 通过利用编码cGAS  $\Delta$  N的mRNA,可以激活DC以产生促进T细胞效应子应答的化学信号。DC的超激活产生一组互补的化学信号。特别地,超激活诱导促炎性细胞因子并且将IL-1 $\beta$ 添加至它们的细胞因子库中,IL-1 $\beta$ 是记忆T细胞形成的关键细胞因子。通过组合刺激物以参与cGAS/STING信号传导和超激活,可以产生更广泛的炎症信号组以最大化由DC引发的免疫应答。

[0125] 为了测试该模型,在体内比较利用cGAS  $\Delta$  N、R848和22:0LPC的各种组合作为佐剂的疫苗接种策略。疫苗接种的目标是引导针对目的抗原或目的抗原的复杂来源(例如,模型抗原、肿瘤相关抗原、新抗原、微生物衍生的抗原等)的免疫应答。免疫应答使用公认的免疫学方法和常用试剂(例如,四聚体染色、ELISpot测定、ELISA、流式细胞术等)容易地检测。制备免疫原性组合物,例如,通过将编码目的抗原的mRNA转录物加载到脂质纳米颗粒(LNP)中来制备。这些LNP适用于施用至哺乳动物受试者,以实现目的抗原的体内表达,用于引发适应性免疫应答。

[0126] 该实验的目的是测试作为LNP中的mRNA递送的cGAS  $\Delta$  N是否可以用作疫苗佐剂以改善对模型抗原的免疫应答。认为cGAS  $\Delta$  N、R848和22:0LPC可通过增强从头T细胞激活和记忆T细胞再激活来改善DC功能。这些改善可以对效应子和记忆T细胞应答具有积极的下游效应。当B细胞经历需要T细胞接合的生发中心反应时,改善的T细胞激活还可以对B细胞具有进一步的积极下游效应。

表5-1. 免疫策略

| 组别 | 抗原  | DC 刺激物                            | 先天途径                  | 效应子应答 | 记忆应答 |
|----|-----|-----------------------------------|-----------------------|-------|------|
| 1  | 无   | [GFP]对照 LNP                       | 无                     | -     | -    |
| 2  | OVA | [GFP]对照 LNP                       | 无                     | +     | -    |
| 3  | OVA | R848 +<br>[GFP]对照 LNP             | NFkB                  | +     | -    |
| 4  | OVA | R848 +<br>[22:0 LPC] LNP          | NFkB<br>NLRP3         | ++    | ++   |
| 5  | OVA | [cGASΔN] LNP                      | IRF3                  | +++   | +    |
| 6  | OVA | [cGASΔN + 22:0 LPC] LNP           | IRF3                  | +++   | +    |
| 7  | OVA | R848 +<br>[cGASΔN] LNP            | NFkB<br>NLRP3<br>IRF3 | ++++  | +++  |
| 8  | OVA | R848 +<br>[cGASΔN + 22:0 LPC] LNP | NFkB<br>NLRP3<br>IRF3 | +++++ | ++++ |

### 方法

[0127] 用[cGAS ΔN+22:0LPC]LNP加在LNP中的mRNA抗原进行体内免疫。用表5-1中详述的LNP皮下免疫C57BL/6J小鼠。与含有佐剂cGAS ΔN mRNA或非辅助GFP mRNA的LNP组合,使用加载OVA mRNA的LNP递送用于体内产生OVA抗原的转录物。OVA mRNA剂量固定为5μg/小鼠,而佐剂cGAS ΔNmRNA以约1.5μg/小鼠给药,并且22:0LPC以约60μg/小鼠给药(表5-1)。在第0天给予小鼠初次免疫,在第7天给予相同剂量的加强免疫。为了评估短期效应子应答,在第14天,收集血液和次级淋巴器官。为了评估长期记忆应答,在第40天,收集血液和次级淋巴器官。收集血液用于测量抗体和T细胞应答。使用血清分离管从血液中收集血清,而使用K2EDTA管收集用于细胞分析的血液。收集血液后,将小鼠安乐死,并且收集引流淋巴结和脾脏并且加工成单细胞悬浮液。预期的应答示出于表5-1中。

[0128] OVA特异性T细胞四聚体评估。在初次免疫后14和40天评估接受OVA LNP免疫的小鼠的血液和引流淋巴结中的OVA特异性T细胞。通过使用SIINFEKL-四聚体染色在血液和dLN中量化对SIINFEKL (SEQ ID NO:17) (卵清蛋白 (OVA) 的MHC-I限制性T细胞表位) 具有特异性的CD8<sup>+</sup>T细胞。简言之,使用RBC裂解缓冲液裂解红细胞,且完成两次裂解以除去血液中的所有RBC。洗涤细胞,然后针对活力(Live/Dead)、SIINFEKL-四聚体结合(MBL)以及CD3、CD4和CD8表达进行染色。用4%多聚甲醛固定细胞,并且在运行前添加计数珠以允许确定总细胞计数。使用BD FACS Symphony收集数据并且使用Flowjo (BD) 分析。

[0129] 效应和记忆T细胞测量。在接受OVALNP免疫的小鼠的血液和引流淋巴结中,通过流式细胞术评估T效应细胞和T记忆细胞的频率。简言之,将细胞悬浮液用CD3、CD4、CD8、CD62L和CD44抗体染色,以使用BD FACS Symphony仪器测量T效应细胞(CD44<sup>低</sup>CD62L<sup>+</sup>)和T记忆细胞(CD44<sup>高</sup>CD62L<sup>+</sup>)的频率,并且使用Flowjo (BD) 分析数据。

[0130] OVA特异性抗体评估。在初次免疫后14和40天评估接受OVALNP免疫的小鼠的血清中的OVA特异性抗体。通过ELISA评估OVA特异性总IgG、IgG1和IgG2b。简言之,将ELISA板用10 $\mu$ g/mL的Endofit卵清蛋白(Invivogen)包被过夜,然后洗涤并且用2%牛血清白蛋白封闭。再次洗涤板,并且然后将血清以1:500稀释度添加至板中,随后以1:5稀释度进行总共7次血清稀释。将样品洗涤,然后用与HRP(Southern Biotech)缀合的对IgG、IgG1或IgG2b具有特异性的检测抗体孵育,以分别检测总、Th2优势型和Th1优势型OVA特异性抗体。将板洗涤,然后用TMB孵育,并且在显色完成后立即添加终止溶液。

[0131] OVA特异性T细胞应答。从次级淋巴器官活性确定OVA特异性T细胞应答。免疫后,在早期(第14天)和晚期(第40天)时间点从小鼠收集引流淋巴结和脾脏。将收获的淋巴结和脾脏解离成单细胞悬浮液,其用于ELISPOT测定。ELISPOT用于检测T细胞的IFN  $\gamma$  和IL-5分泌,二者分别指示Th1和Th2应答。将来自引流淋巴结和脾脏的细胞铺板于含有10% FBS、50单位/mL青霉素、50mg/mL链霉素、2mM L-谷氨酰胺、1mM丙酮酸钠、50mM $\beta$ -巯基乙醇、10mM HEPES和Gibco MEM非必需氨基酸的RPMI培养基(R10培养基)中。将细胞以200,000个细胞/孔铺板于96孔ELISPOT板中,并且用10mcg/mL OVA peptivator或1mcg/mL OVA肽抗原进行再刺激。作为对照,将另外的铺板的细胞保持未刺激或用无关抗原(未用于疫苗接种的)刺激。所述测定的完成产生可以在视觉上量化的斑点,其中T细胞分泌细胞因子,作为量化响应再刺激的T细胞的数量。的方法。

#### 结果

[0132] 使用上述测定来评估短期(疫苗接种后2周)和长期(疫苗接种后>4周)适应性T细胞免疫,分析效应子应答和记忆应答。表5-1列出了待包括在研究中的实验组。作为阴性对照,组1的小鼠接受不含抗原并且不含佐剂的假注射以充当基线,其中预期几乎不会引发抗原特异性免疫应答。组2小鼠接受配制在LNP中的编码模型抗原(OVA)的mRNA,其代表标准LNP疫苗接种方案。其余组均接受与佐剂组合的加载有编码OVA的mRNA的LNP。根据施用的刺激物的类型,预期以下中的一种或多种:i)激活细胞(诱导NFkB信号传导);ii)超激活DC(诱导NLRP3途径激活);和iii)在DC中诱导IRF3信号传导。例如,组4小鼠接受R848+22:0LPC,预期其会超激活DC,从而除了NFkB途径之外还激活NLRP3途径,导致常规促炎性细胞因子分泌(IL-6和TNF $\alpha$ )和IL-1 $\beta$ 产生。组5小鼠接受编码cGAS  $\Delta$  N的LNP,预期其诱导经由IRF3的I型IFN应答。组6和组7的小鼠接受三种刺激物中的两种,而组8的小鼠接受所有三种刺激物(R848、22:0LPC和cGAS  $\Delta$  N)。

[0133] 认为体内cGAS  $\Delta$  N表达会刺激对即时效应子免疫应答特别有益的DC信号。还认为超激活条件会有益于效应子应答,即使是在不存在I型IFN信号传导的情况下。此外,超激活诱导的IL-1 $\beta$ 信号传导导致改善的记忆形成。因此,通过将cGAS信号传导和超激活组合,认为会引发非常强的效应子应答和持久的记忆应答。通过用假处理进行免疫(组1),可能观察到几乎没有效应子和记忆应答,并且考虑用单独的或与R848组合的抗原mRNA进行免疫(组2和组3)会导致较小效应子应答和极小记忆形成。组4处理超激活DC,并且预期是相对于组2处理的改善。相比之下,组5和组6处理仅参与DC中的cGAS信号传导,并且因此被认为会导致强效应子应答,但记忆应答不如组4处理持久。组7是超激活处理条件。鉴于组7和组8参与cGAS和超激活途径二者,认为它们会产生最强的效应子和记忆应答。由于超激活性脂质参与NLRP3激活之外的细胞过程,因此认为包括22:0LPC在内的组8处理会导致优异的效应子

和记忆应答。

[0134] 三种辅助刺激物可以以各种方式配制。例如, cGAS  $\Delta$  N mRNA可以单独或与22:0LPC组合包封在LNP中。R848可以作为单独的组分、在LNP内或在含有一种或两种其他刺激物的LNP内施用。此外, 施用刺激物的时间顺序可以变化。例如, 以下可能是有益的: 在初免注射中将加载抗原mRNA的LNP与加载cGAS  $\Delta$  N mRNA的LNP和R848组合施用以提供经由I型IFN的强效应子信号, 随后进行加载抗原mRNA的LNP与加载22:0LPC的LNP和R848组合的加强注射以提供产生持久免疫所需的记忆信号。

[0135] 研究T细胞和B细胞对疫苗接种的应答产生了体内数据, 认为所述数据证明, 将超激活与cGAS信号传导组合将导致抗原特异性免疫应答的改善。通过测量免疫小鼠血清中的总抗原特异性IgG抗体以及抗体同种型如IgG1 (与TH2应答相关) 和IgG2b (与TH1应答相关) 来完成对各种DC刺激物的施用如何影响B细胞应答的评估。基于使用cGAS  $\Delta$  N LNP的先前研究, 预期用加载有编码抗原的mRNA和编码cGAS  $\Delta$  N的mRNA的LNP免疫的小鼠会产生TH1优势型应答。

序列

SEQ ID NO:1

>人

PGASKLRVLEKLLSRDDISTAAGMVKGVDHLLRLKCDSAFRGVGLLNTGSYYEHVKISAPNEFDV  
MFKLEVPRIQLEEYSNTRAYYFVKFKRNPKNPLSQFLEGEILSASKMLSKFRKIIKEEINDIKDTDVIMKRKRGG  
PAVTLLISEKISVDITLALESKSSWPASTQEGRLIQNWLSAKVRKQLRLKPFYLVPKHAKENGFGQETWRLSFSHI  
EKEILNNHGKSKTCCENKEEKCCRKDCLKMKYLLQLKERFKDKKHLDFSSYHVKTAFHFVCTQNPQDSQWDRKD  
LGLCFDNCVTFYFLQCLRTEKLENYFIPEFNLFSSNLDKRSKEFLTKQIEYERNNEFPVFDEF

SEQ ID NO:2

>猕猴

PGARKLRVLEKLLRLSHQDISKAAKVNVGVGHLLRRLKCEPEFGGVEQLHTGSYYEHVKISAPNEFDV  
MFKLQVPRIQLEEYSDTGAYYFVKFKRNPKNPLSLFLEDEILSASKMLSKFRKIIKEEINNIDKDVQPDADVIMKRK  
RPGSPAVTLLINKEISVDITLALELKTSWPASTQEGLAIKNWLSAKVRQQLRLKPFYLVPKHAKENGFGQETWRLS  
FSHIEKEILSNHGKSKTCCENKEMKCCRKDCLKMKYLLQLKEKFKDKKHLDFSSYHVKTAFHFLCTENPQDSQW  
DPKDLGLCFDNCVTFYFLECLRTEQLKKNYFIPGFNLFSSNLDKTSKEFLSKQIEYERNNEFPVFGEF

SEQ ID NO:3

>东非狒狒

PGARKLRVLEKLLRLSHQDISKAAKVNVGVGHLLHRLKCESEFEGVEQLHTGSYYEHVKISAPNEFDV  
MFKLQVPRIQLEEYSDTGAYYFVKFKRNPKNPLSQFLEDEILSASKMLSKFRKIIKEEINNIDKTDVIMKRKRGG  
PAVTLLINKEISVDITLALELKTSWPASTQEGLAIKNWLSAKVRQQLRLKPFYLVPKHAKENGFGQETWRLSFSHI  
EKEILSNHGKSKTCCENKEMKCCRKDCLKMKYLLQLKEKFKDKKHLDFSSYHVKTAFHFLCTENPQDSQWDPKD  
LGLCFDNCVTHFLQCLRTEKLANYFIPGFNLFSSNLDKSSKEFLSKQIEYERNNEFPVFGEF

SEQ ID NO:4

>北白颊长臂猿

PGARKLRVLEKLLSRQEI SEAAEVNVGVVDHLLRRLQKCDSEFRGVGLLRTGSYYEHVKISAPNEFD  
VMFKLEVPRIQLEEYSNTGAYYFVKFKRNPKNPLSQFLEGEILSASKMLSKFRKIIKEEINNIDKTDVIMKRKRGG

SPAVTLLISEKISVDITLALESNSNSWPASTQEGLPIKDWLSGKVRRLRLKPFYLVPKHAKENGFGQEEWRLSFS  
HIEKEILNNHGKTKTCENKNVKCCRKDCLKMKYLLEQLKERFKDKKHLDFSSYHVKTAFHHVCTENPQDSQWDP  
KNLGFCDKCVIYFLKCLRTEQLGNYFIPGFNLFSSNLIDKRSKEFLSKQIEYERNNEYPVFG

SEQ ID NO:5

>白掌长臂猿

PGARKLPVLEKLLSRQ

EICEAAEVVNGVVDHLLRRLQKCDSEFRGVGLLRTGSYYEHVKISAPNEFDVMFKLEVPRIQLEEYSNT  
GAYYFVKFKRNPKNPLCQFLEGEILSASKMLSKFRKI I KEE INNIKDTDVILKRKRGGSPAVTLLISEKISVDITL  
ALESKSSWPASTQEGLPIKDWLSGKVRTQLRLKPFYLVPKHAKENGFGQEEWRLSFSHIEKEILNNHGETKTCCE  
NKKVKCCRKDCLKMKYLLEQLKERFKDKKHLDFSSYHVKTAFHHVCTENPKDSQWDPKDLGLCFDCKVIYFLQCL  
STEQLGNYFIPGFNLFSSNLIDKRSKEFLSKQIEYERNNEYPVFGK

SEQ ID NO:6

>苏门答腊猩猩

PGASKLRAVLEKLLSRLEISKAAEVVNRVVDHLLRRLQKYNSEFRGVGLLRTGSYYEHVKISAPNEFD  
VMFKLEVPRIQLEEYSNTGAYYFVKFKRNPKNPLSQFLEGEILSASKMLSKFRKI I KEE INNIKDTDVIMKRKRGG  
SPAVTLLISEEISVDITLALESKSSWPASTQEGLPIKNWLSAKVRKQLRLKPFYLVPKHAKENGFGQEEWRLSFSH  
IEKEILNNHGKSKTCCEDKEVKCCRKDCLKMKYLLEQLKERFKDKKHLDFSSYHVKTAFHHVCTQNPQDSQWDPK  
DLGLCFDNCVITYFLQCLRTEQLGNYFIPGFNLFSSNLIDKRSKEFLTKQIEYERNNEFPVFDEF

SEQ ID NO:7

>黑猩猩

PGASKLRAVLEKLLSRDDISTAAGMVKGVDHLLRLKCDSAFRGVGLLNTGSYYEHVKISAPNEFDV  
MFKLEVPRIQLEEYSNTRAYYFVKFKRNPKNPLSQFLEGEILSASKMLSKFRKI I KEE INNIKDVIMKRKRGGSPA  
VTLLISEKISVDITLALESKSSWPASTQEGLPIKNWLSAKVRKQLRLKPFYLVPKHAKENGFGQEEWRLSFSHIEK  
EILNNHGKSKTCCCEIKEAKCCRKDCLKMKYLLEQLKEKFKDKKHLDFSSYHVKTAFHHVCTENPQDSQWDRKDLG  
LCFDNCVITYFLQCLRIEKENYFIPEFNLFSSDLIDKRSKEFLTKQIEYERNNEFPVFDEF

SEQ ID NO:8

>大猩猩

PGASKLRAVLEKLLSRDDISTAAGMVKGVDHLLRLKCDSAFRGVGLLNTGSYYEHVKISAPNEFDV  
MFKLEVPRIQLEEYSNTRAYYFVKFKRNPKNPLSQFLEGEILSASKMLSKFRKI I KEE INNIKDTDVIMKRKRGG  
PAVTLLISEKISVDITLALESKSSWPASTQEGLRIQNWLSAKVRRLRLKPFYLVPKHAKENGFGQEEWRLSFSHI  
EKEILNNHGKSKTCCENKEAKCCRKDCLKMKYLLEQLKERFKDKKHLDFSSYHVKTAFHHVCTQNPQDSQWDRKQ  
LGLCFDNCVITYFLQCLRTERLENYFIPEFNLFSRNLIDKRSKEFLTKQIEYERNNEFPVFDEF

SEQ ID NO:9

>CGAS ΔN\_共有序列

PGAXKLXAVLEKLLSXXXIXXAAXVXXVXXHLLXRLXXXXXXFXGVXXLTGSYYEHVKISAPNEFD  
VMFKLXVPRIQLEEYSXTXAYYFVKFKRNPXXNPLXXFLEXEILSASKMLSXFRKI I KEE INXIKXXXXXXDVIXKR  
KRXGSPAVTLLIXXXISVDITLALEXXXSWPASTQEGLXIXXWLSXKVRXQLRLKPFYLVPKHAKENGFGQEEWRL  
LSFSHIEKEILXNHGXXKTCCEXXXXCCRKDCLKMKYLLEQLKEXFKDKKHLDFSSYHVKTAFHHXCTXNPXDS  
QWDXXLXGXCDFXCVTXFLXCLXXEXLXNYFIPXFNLFSSXLIDKXSKEFLXKQIEYERNNEXPVFXXX

SEQ ID NO:10

>人CGAS\_全长

MQPWHGKAMQRASEAGATAPKASARNARGAPMDPTESPAAPEAALPKAGKFGPARKSGSRQKKSAPDTQ  
ERPPVRATGARAKKAPQRAQDTQPSDATSAPGAEGLEPPAAREPALS RAGSCRQRGARCSTKPRPPPGWDVPSPGL  
PVSAPILVRRDAAPGASKLRVLEKLKLSRDDISTAAGMVKGVDHLLRLKCD S AFRGVLLNTGSYYEHVKISAP  
NEFDVMFKLEVPRIQLEEYSNTRAYYFVKFKRNPKNPLSQFLEGEILSASKMLSKFRKI I KEEINDIKD TDVIMKR  
KRGGSPAVTLLISEKISVDITLALESKSSWPASTQEGLRIQNWLSAKVRKQLRLKPFYLV PKHAKEGNGFQEETWRL  
SFSHIEKEILNNHGKSKTCCENKEEKCCRKDCLKMKYLLEQLKERFKDKKHLDKFSSYHVKT AFFHVCTQNPQDSQ  
WDRKDLGLCFDNCVTYFLQCLRTEKLENYFIPEFNLFSSNLIDKRSKEFLTKQIEYERNNEFPVFDEF

SEQ ID NO:11

>人CGAS\_N末端

MQPWHGKAMQRASEAGATAPKASARNARGAPMDPTESPAAPEAALPKAGKFGPARKSGSRQKKSAPDTQ  
ERPPVRATGARAKKAPQRAQDTQPSDATSAPGAEGLEPPAAREPALS RAGSCRQRGARCSTKPRPPPGWDVPSPGL  
PVSAPILVRRDAA

SEQ ID NO:12

>明脉扁刺蛾β四体病毒T2A核糖体跳跃肽

[GSG]EGRGSLLTCGDVEENPGP

SEQ ID NO:13

>猪捷申病毒-1P2A核糖体跳跃肽

[GSG]ATNFSLLKQAGDVEENPGP

SEQ ID NO:14

>马甲型鼻炎病毒E2A核糖体跳跃肽

[GSG]QCTNYALLKLAGDVESNPGP

SEQ ID NO:15

>口蹄疫病毒F2A核糖体跳跃肽

[GSG]VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP

SEQ ID NO:16

>原鸡卵清蛋白肽

SIINFEKL

SEQ ID NO:17

>合成CGAS ΔN

ATGCCCGGCCGAGCAAGCTGAGGGCCGTGCTGGAGAAGCTGAAGCTGAGCAGGGACGACATCAGCACC  
GCCGCCGGCATGGTGAAGGGCGTGGTGGACCACCTGCTGCTGAGGCTGAAGTGCACAGCGCCTTCAGGGGCGTGGG  
CCTGCTGAACACCGGCAGCTACTACGAGCACGTGAAGATCAGCGCCCCAACGAGTTCGACGTGATGTTCAAGCTGG  
AGGTGCCCAGGATCCAGCTGGAGGAGTACAGCAACACCAGGGCCTACTACTTCGTGAAGTTCAAGAGGAACCCCAAG  
GAGAACCCCTGAGCCAGTTCTGAGGGGCGAGATCCTGAGCGCCAGCAAGATGCTGAGCAAGTTCAGGAAGATCAT  
CAAGGAGGAGATCAACGACATCAAGGACACCGACGTGATCATGAAGAGGAAGAGGGGCGGCAGCCCCGCCGTGACCC  
TGCTGATCAGCGAGAAGATCAGCGTGGACATCACCTGGCCCTGGAGAGCAAGAGCAGCTGGCCCGCCAGCACCCAG  
GAGGGCCTGAGGATCCAGAACTGGCTGAGCGCCAAGGTGAGGAAGCAGCTGAGGCTGAAGCCCTTCTACCTGGTGCC

CAAGCACGCCAAGGAGGGCAACGGCTTCCAGGAGGAGACCTGGAGGCTGAGCTTCAGCCACATCGAGAAGGAGATCC  
TGAACAACCACGGCAAGAGCAAGACCTGCTGCGAGAACAAAGGAGGAGAAGTGCTGCAGGAAGGACTGCCTGAAGCTG  
ATGAAGTACCTGCTGGAGCAGCTGAAGGAGAGGTTCAAGGACAAGAAGCACCTGGACAAGTTCAGCAGCTACCACGT  
GAAGACCGCCTTCTTCCACGTGTGCACCCAGAACCCCCAGGACAGCCAGTGGGACAGGAAGGACCTGGGCCTGTGCT  
TCGACAACTGCGTGACCTACTTCCTGCAGTGCCTGAGGACCGAGAAGCTGGAGAACTACTTCATCCCCGAGTTCAAC  
CTGTTTCAGCAGCAACCTGATCGACAAGAGGAGCAAGGAGTTCCTGACCAAGCAGATCGAGTACGAGAGGAACAACGA  
GTTCCCCGTGTTTCGACGAGTTCTAATGA

|        |                                                                |     |
|--------|----------------------------------------------------------------|-----|
| 猕猴     | PGARKLRAVLEKLRSLHQDISKAAKVNGVGVHLLRRLK-CEPEFGGVEQLHTGSYYEHV    | 59  |
| 东非狒狒   | PGARKLRAVLEKLRSLHQDISKAAKVNGVGVHLLRRLK-CESEFEGVEQLHTGSYYEHV    | 59  |
| 北白颊长臂猿 | PGARKLRAVLEKLRSLRQEI SEAAEVVNGVVDHLLRRLQKCDSEFRGVGLLRTGSYYEHV  | 60  |
| 白掌长臂猿  | PGARKLPAVLEKLRSLRQEI CEAAEVVNGVVDHLLRRLQKCDSEFRGVGLLRTGSYYEHV  | 60  |
| 苏门答腊猩猩 | PGASKLRAVLEKLRSLRLEISKAAEVVNRVVDHLLRRLQKYNSEFRGVGLLRTGSYYEHV   | 60  |
| 黑猩猩    | PGASKLRAVLEKLRSDDIS TAAGMVKGVDHLLRRLK-CDSA FRGVGLLNTGSYYEHV    | 59  |
| 大猩猩    | PGASKLRAVLEKLRSDDIS TAAGMVKGVDHLLRRLK-CDSA FRGVGLLNTGSYYEHV    | 59  |
| 智人     | PGASKLRAVLEKLRSDDIS TAAGMVKGVDHLLRRLK-CDSA FRGVGLLNTGSYYEHV    | 59  |
| 共有序列   | *** ** *****: ** : *. ** : *: **.*** ** : : * ** *.*****       |     |
|        | PGAxKLxAVLEKLxLSxxxIxxAAxxVxxVVxHLLxRLxxxxxxFxGVxxLxTGSYYEHV   |     |
| 猕猴     | KISAPNEFDVMFKLQVPRIQLEEYS DTGAYYFVKFKRNPENPLSFLFEDEILSASKMLS   | 119 |
| 东非狒狒   | KISAPNEFDVMFKLQVPRIQLEEYS DTGAYYFVKFKRNPKNPLSQFLEDEILSASKMLS   | 119 |
| 北白颊长臂猿 | KISAPNEFDVMFKLEV PRIQLEEYSNTGAYYFVKFKRNPKNPLSQFLEGEILSASKMLS   | 120 |
| 白掌长臂猿  | KISAPNEFDVMFKLEV PRIQLEEYSNTGAYYFVKFKRNPKNPLCQFLEGEILSASKMLS   | 120 |
| 苏门答腊猩猩 | KISAPNEFDVMFKLEV PRIQLEEYSNTGAYYFVKFKRNPKNPLSQFLEGEILSASKMLS   | 120 |
| 黑猩猩    | KISAPNEFDVMFKLEV PRIQLEEYSNTRAYYFVKFKRNPKNPLSQFLEGEILSASKMLS   | 119 |
| 大猩猩    | KISAPNEFDVMFKLEV PRIQLEEYSNTRAYYFVKFKRNPKNPLSQFLEGEILSASKMLS   | 119 |
| 智人     | KISAPNEFDVMFKLEV PRIQLEEYSNTRAYYFVKFKRNPKNPLSQFLEGEILSASKMLS   | 119 |
| 共有序列   | *****: *****: * *****: ***. ***.*****                          |     |
|        | KISAPNEFDVMFKLxVPRIQLEEYSxTxAYYFVKFKRNPxxNPLxxFLExEILSASKMLS   |     |
| 猕猴     | KFRKIIKEEINNIKD VQPDADVIMKRKRPGSPAVTLLINKEISVDITLAL ELK-TSWPAS | 178 |
| 东非狒狒   | QFRKIIKEEINNIKD ----TDVIMKRKRGGSPAVTLLINKEISVDITLAL ELK-TSWPAS | 174 |
| 北白颊长臂猿 | KFRKIIKEEINNIKD ----TDVIMKRKRGGSPAVTLLISEKISVDITLALESNSNSWPAS  | 176 |
| 白掌长臂猿  | KFRKIIKEEINNIKD ----TDVILKRKRGGSPAVTLLISEKISVDITLALESKSSSWPAS  | 176 |
| 苏门答腊猩猩 | KFRKIIKEEINNIKD ----TDVIMKRKRGGSPAVTLLISEEISVDITLALESK-SSWPAS  | 175 |
| 黑猩猩    | KFRKIIKEEINNIK ----DVIMKRKRGGSPAVTLLISEKISVDITLALESK-SSWPAS    | 172 |
| 大猩猩    | KFRKIIKEEINNIKD ----TDVIMKRKRGGSPAVTLLISEKISVDITLALESK-SSWPAS  | 174 |
| 智人     | KFRKIIKEEINDIKD ----TDVIMKRKRGGSPAVTLLISEKISVDITLALESK-SSWPAS  | 174 |
| 共有序列   | : *****: ** ***: **** *****. : ***** : .*****                  |     |
|        | xFRKIIKEEINxIKxxxxxxDVIxKRKRxGSPAVTLLIxxxISVDITLALExxxxSWPAS   |     |
| 猕猴     | TQEGLAIKNWLSAKVRQQLRLKPFYLV PKHAKEGNGFQEETWRLSFSHIEKEILSNHGKS  | 238 |
| 东非狒狒   | TQEGLAIKNWLSAKVRQQLRLKPFYLV PKHAKEGNGFQEETWRLSFSHIEKEILSNHGKS  | 234 |
| 北白颊长臂猿 | TQEGLPIKD WLSGKVRRQLRLKPFYLV PKHAKEGNGFQEETWRLSFSHIEKEILNNHGKT | 236 |
| 白掌长臂猿  | TQEGLPIKD WLSGKVRTQLRLKPFYLV PKHAKEGNGFQEETWRLSFSHIEKEILNNHGET | 236 |
| 苏门答腊猩猩 | TQEGLPIKNWLSAKVRKQLRLKPFYLV PKHAKEGNGFQEETWRLSFSHIEKEILNNHGKS  | 235 |
| 黑猩猩    | TQEGLPIKNWLSAKVRKQLRLKPFYLV PKHAKEGNGFQEETWRLSFSHIEKEILNNHGKS  | 232 |
| 大猩猩    | TQEGLRIQNWLSAKVRRQLRLKPFYLV PKHAKEGNGFQEETWRLSFSHIEKEILNNHGKS  | 234 |
| 智人     | TQEGLRIQNWLSAKVRKQLRLKPFYLV PKHAKEGNGFQEETWRLSFSHIEKEILNNHGKS  | 234 |
| 共有序列   | ***** *: **: *.*** ********** *****. *****: :                  |     |
|        | TQEGLxIxxWLSxKVRxQLRLKPFYLV PKHAKEGNGFQEETWRLSFSHIEKEILxNHGxx  |     |

图1

|        |                                                               |     |
|--------|---------------------------------------------------------------|-----|
| 猕猴     | KTCCENKEMKCCRKDCLKLMKYLLLEQLKEKFKDKKHLDFSSYHVKTAFFHLCTENPQDS  | 298 |
| 东非狒狒   | KTCCENKEMKCCRKDCLKLMKYLLLEQLKEKFKDKKHLDFSSYHVKTAFFHLCTENPQDS  | 294 |
| 北白颊长臂猿 | KTCCENKNVKCCRKDCLKLMKYLLLEQLKERFKDKKHLDFSSYHVKTAFFHVCTENPQDS  | 296 |
| 白掌长臂猿  | KTCCENKKVKCCRKDCLKLMKYLLLEQLKERFKDKKHLDFSSYHVKTAFFHVCTENPKDS  | 296 |
| 苏门答腊猩猩 | KTCCEDKEVKCCRKDCLKLMKYLLLEQLKERFKDKKHLDFSSYHVKTAFFHVCTQNPQDS  | 295 |
| 黑猩猩    | KTCCEIKEAKCCRKDCLKLMKYLLLEQLKEKFKDKKHLDFSSYHVKTAFFHVCTENPQDS  | 292 |
| 大猩猩    | KTCCENKEAKCCRKDCLKLMKYLLLEQLKERFKDKKHLDFSSYHVKTAFFHVCTQNPQDS  | 294 |
| 智人     | KTCCENKEEKCCRKDCLKLMKYLLLEQLKERFKDKKHLDFSSYHVKTAFFHVCTQNPQDS  | 294 |
|        | ***** *: *****; *****; *: **:                                 |     |
| 共有序列   | KTCCExKxxKCCRKDCLKLMKYLLLEQLKExFKDKKHLDFSSYHVKTAFFHxCTxNPxDS  |     |
| 猕猴     | QWDPKDLGLCFDNCVITYFLECLRTEQLKNYFIPGFNLFSSNLIDKTSKEFLSKQIEYERN | 358 |
| 东非狒狒   | QWDPKDLGLCFDNCVTHFLQCLRTEKLANYFIPGFNLFSSNLIDKSSKEFLSKQIEYERN  | 354 |
| 北白颊长臂猿 | QWDPKNLGFCFDKCVIYFLKCLRTEQLGNYFIPGFNLFSSNLIDKRSKEFLSKQIEYERN  | 356 |
| 白掌长臂猿  | QWDPKDLGLCFDNCVITYFLECLRTEQLGNYFIPGFNLFSSNLIDKRSKEFLSKQIEYERN | 356 |
| 苏门答腊猩猩 | QWDPKDLGLCFDNCVITYFLECLRTEQLGNYFIPGFNLFSSNLIDKRSKEFLTKQIEYERN | 355 |
| 黑猩猩    | QWDRKDLGLCFDNCVITYFLECLRIEKLNYFIPEFNLFSSDLIDKRSKEFLTKQIEYERN  | 352 |
| 大猩猩    | QWDRKQLGLCFDNCVITYFLECLRTERLENYFIPEFNLFSSNLIDKRSKEFLTKQIEYERN | 354 |
| 智人     | QWDRKDLGLCFDNCVITYFLECLRTEKLENYFIPEFNLFSSNLIDKRSKEFLTKQIEYERN | 354 |
|        | *** *: **; ***: ** : **; ** *: * ***** : **** *****; *****    |     |
| 共有序列   | QWDxKxLGxCFDxCVTxFLxCLxExLxNYFIPxFNLFSSxLIDKxSKEFLxKQIEYERN   |     |
| 猕猴     | NEFPVFGEF                                                     | 367 |
| 东非狒狒   | NEFPVFGEF                                                     | 363 |
| 北白颊长臂猿 | NEYPVFG---                                                    | 363 |
| 白掌长臂猿  | NEYPVFGKC                                                     | 365 |
| 苏门答腊猩猩 | NEFPVFDEF                                                     | 364 |
| 黑猩猩    | NEFPVFDEF                                                     | 361 |
| 大猩猩    | NEFPVFDEF                                                     | 363 |
| 智人     | NEFPVFDEF                                                     | 363 |
|        | ** : ***.                                                     |     |
| 共有序列   | NExPVFxxx                                                     |     |

图1续

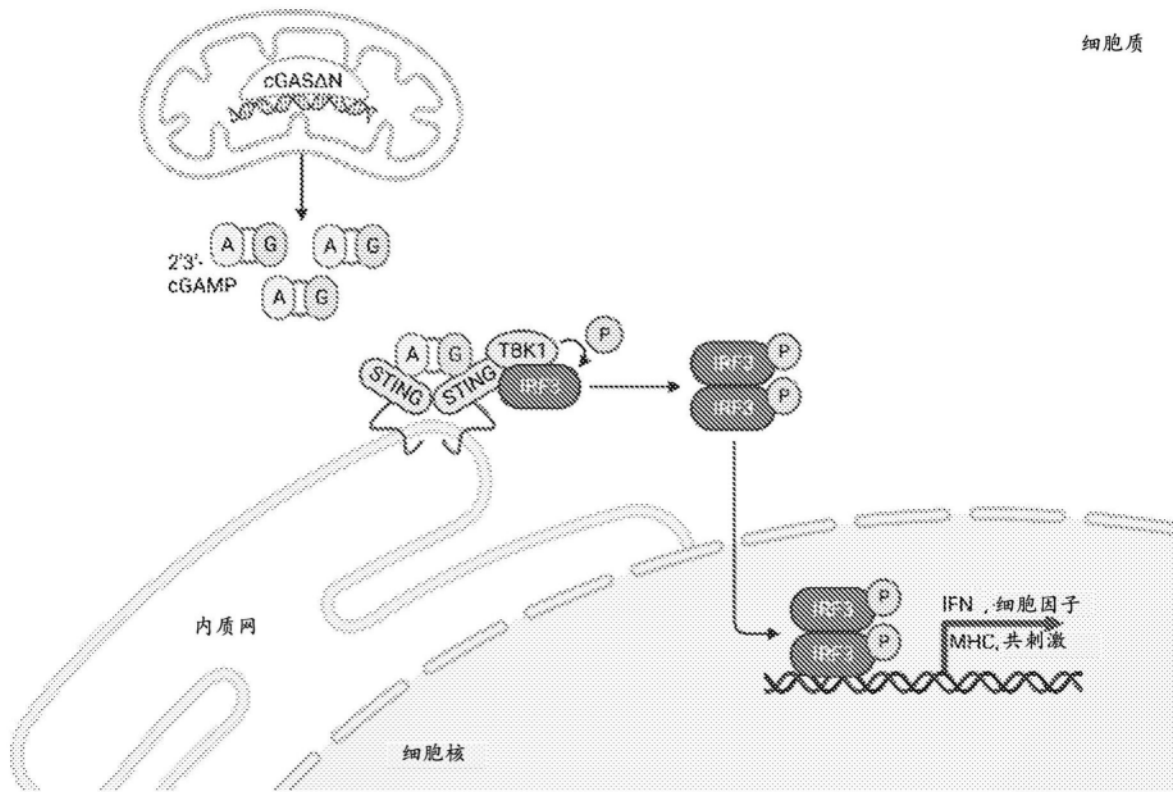


图2

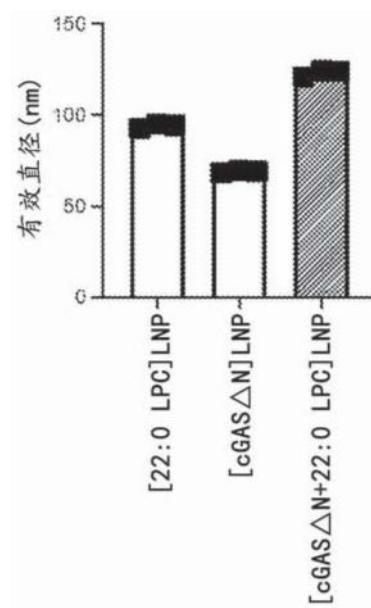


图3A

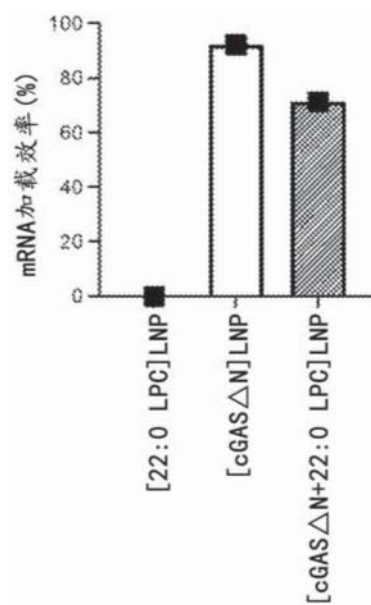


图3B

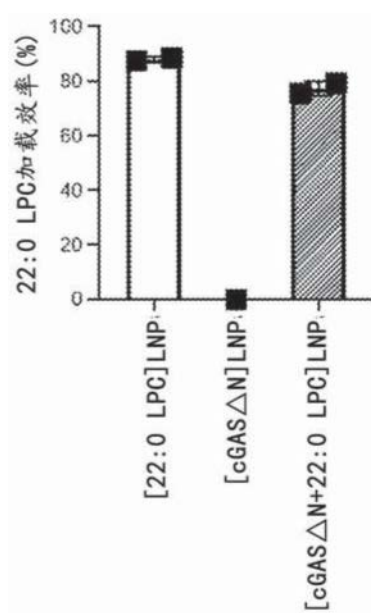


图3C

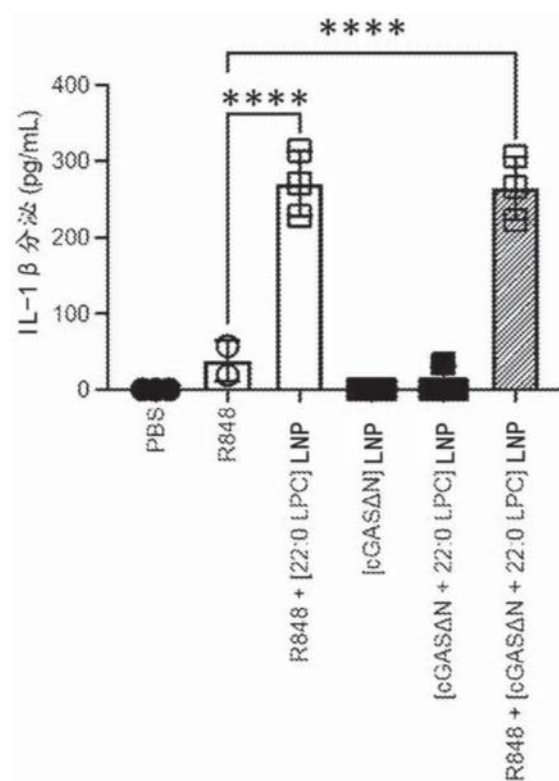


图4A

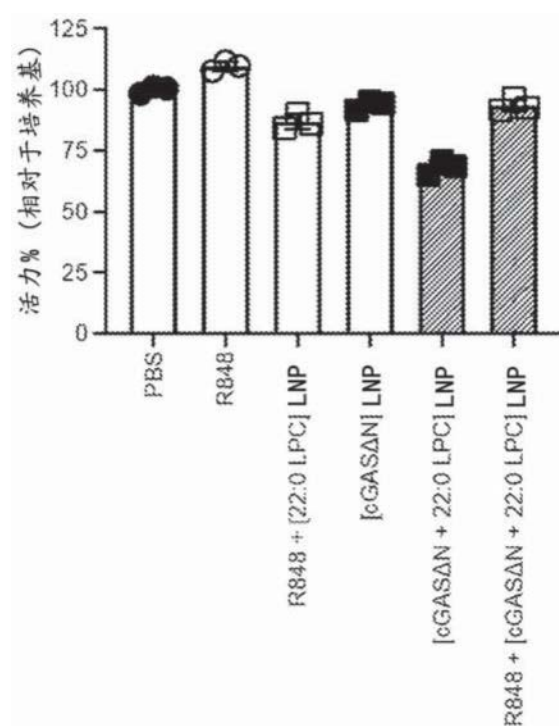


图4B

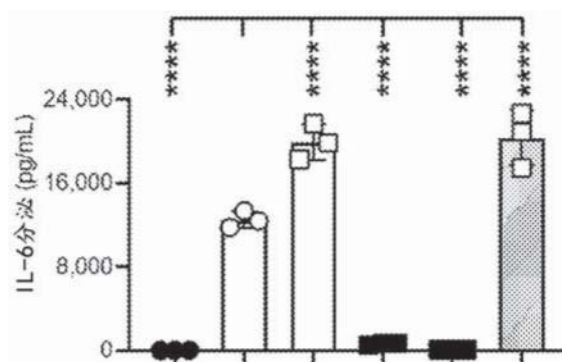


图5A

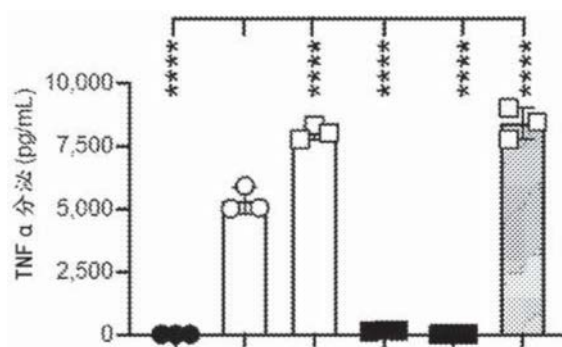


图5B

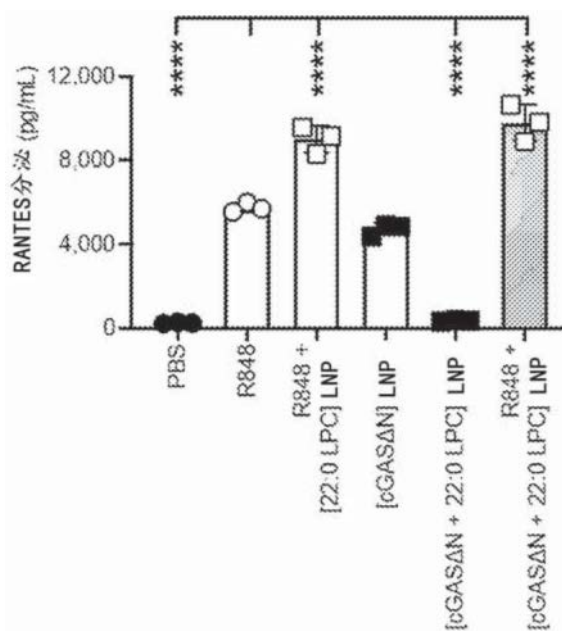


图5C

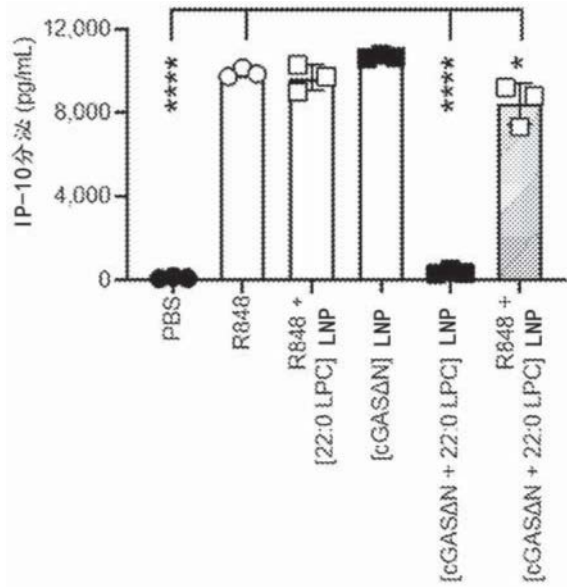


图5D

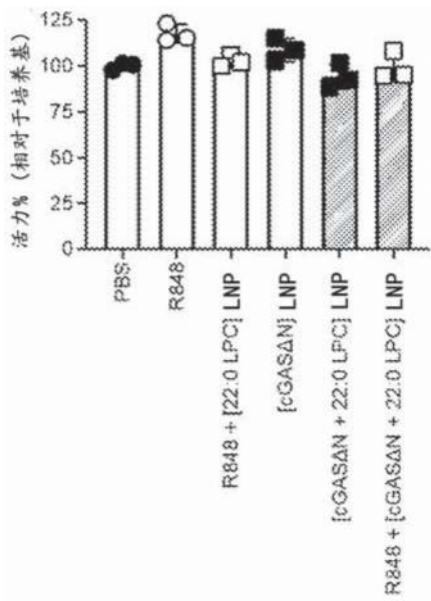


图6A

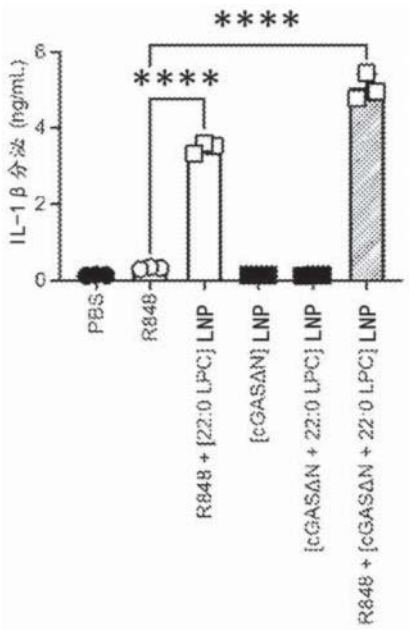


图6B

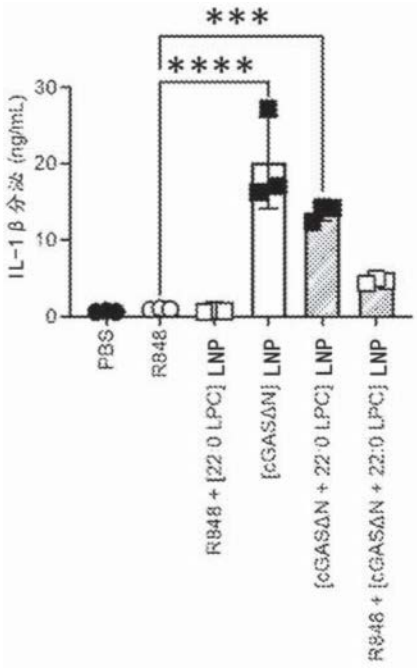


图6C

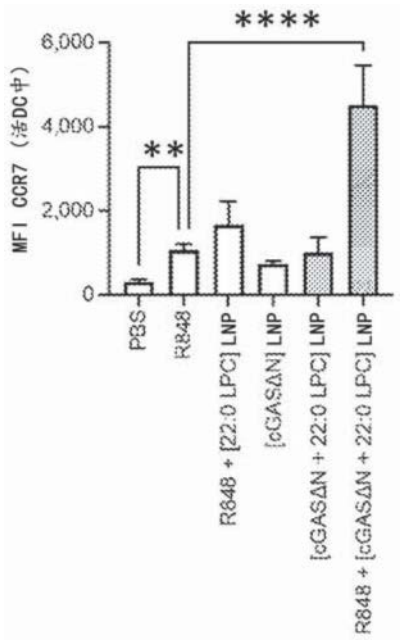


图7A

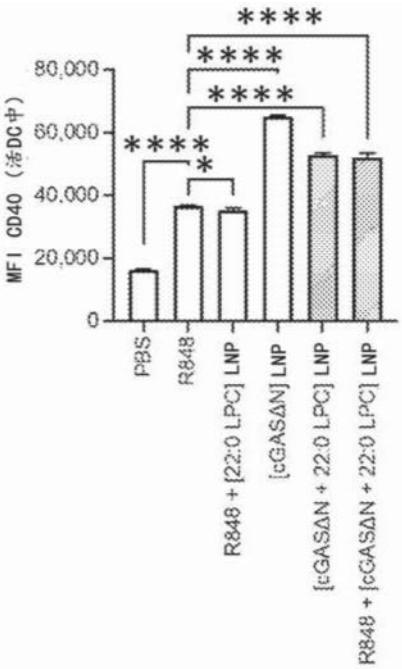


图7B

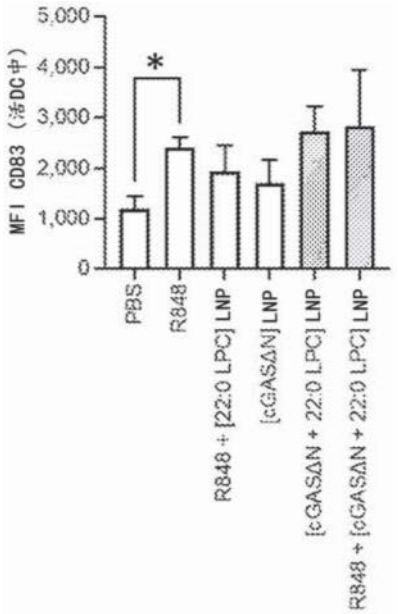


图7C

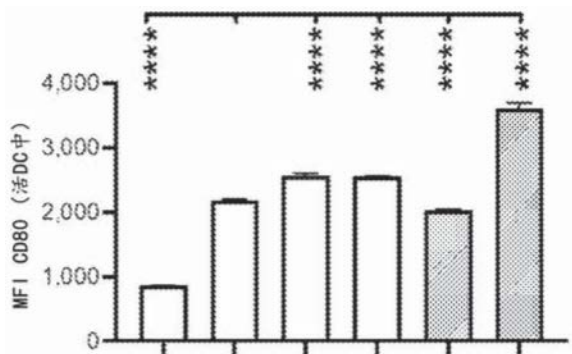


图8A

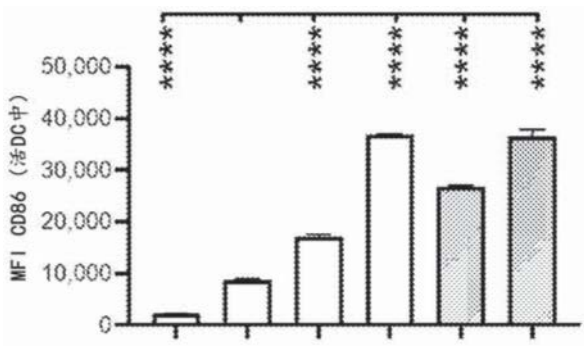


图8B

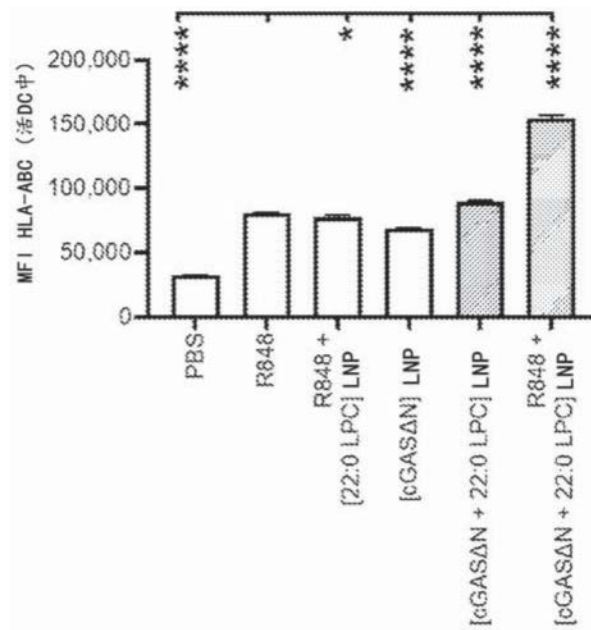


图8C

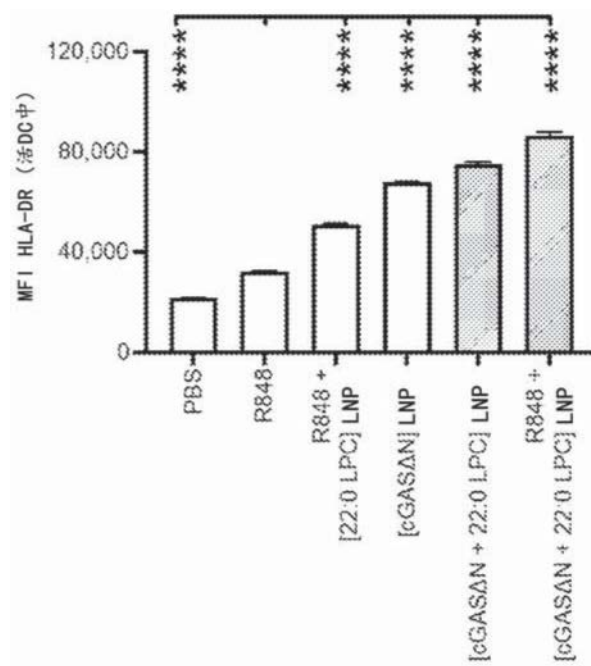


图8D

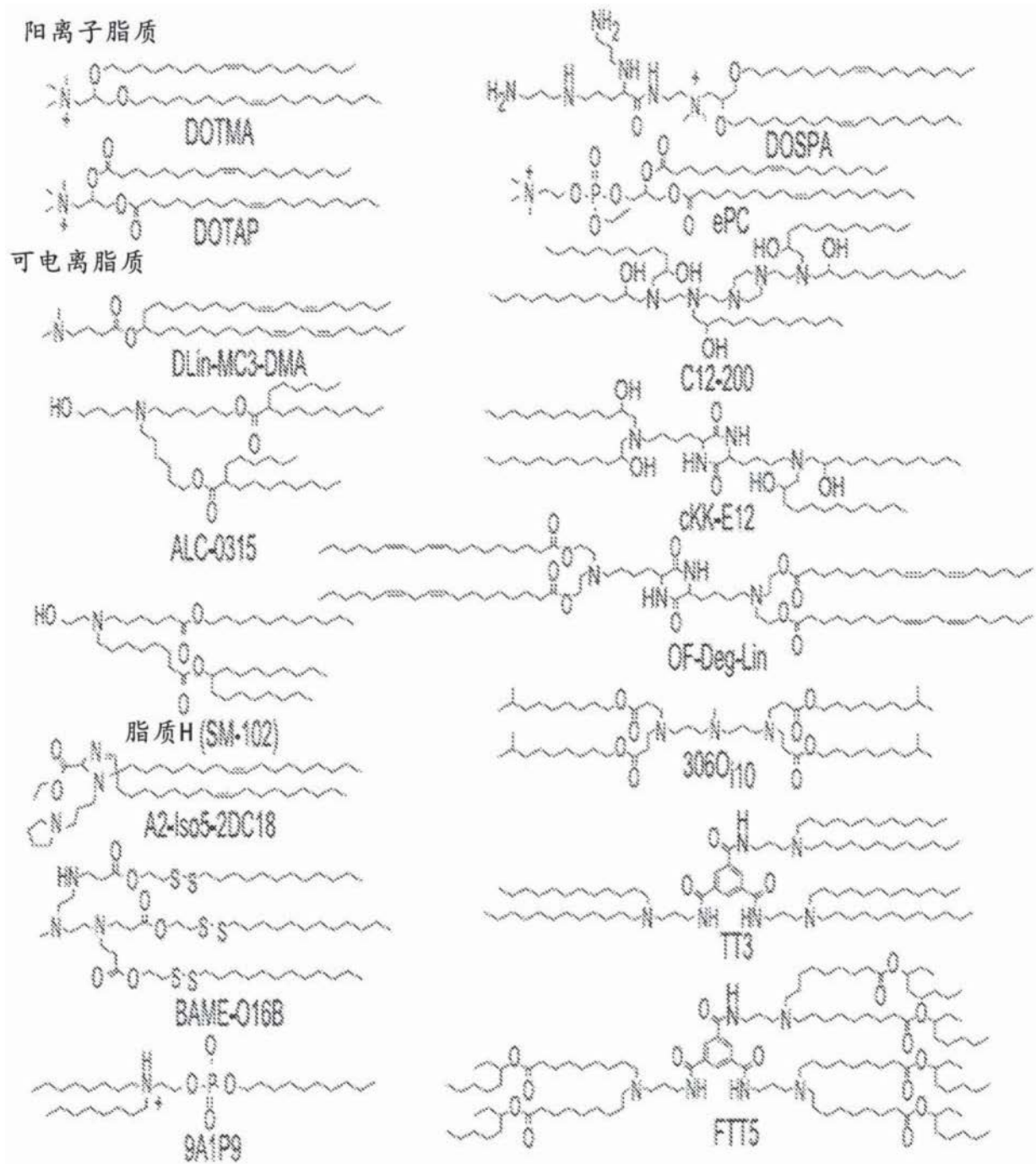


图9A

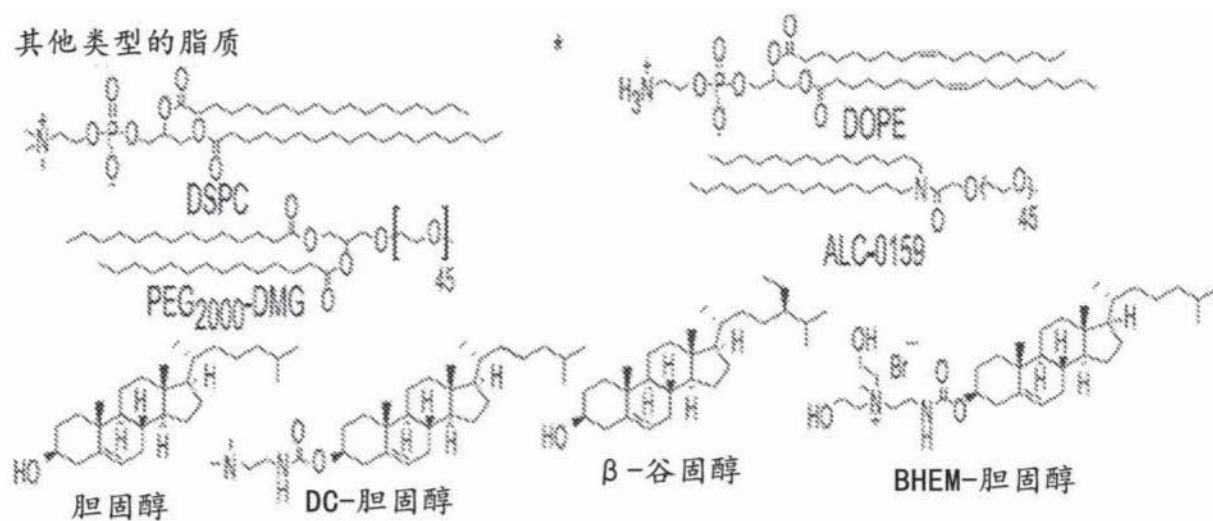


图9B