



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110167587 A

(43)申请公布日 2019.08.23

(21)申请号 201780082821.6

(22)申请日 2017.11.10

(30)优先权数据

62/421,160 2016.11.11 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.07.09

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2017/061182 2017.11.10

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/089851 EN 2018.05.17

(71)申请人 摩登纳特斯有限公司

地址 美国马萨诸塞州

(72)发明人 朱塞佩·恰拉梅拉

(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

代理人 郑斌 蔡胜有

(51)Int.Cl.

A61K 39/145(2006.01)

A61K 31/7105(2006.01)

A61K 31/7115(2006.01)

A61K 9/51(2006.01)

A61P 31/16(2006.01)

权利要求书10页 说明书59页

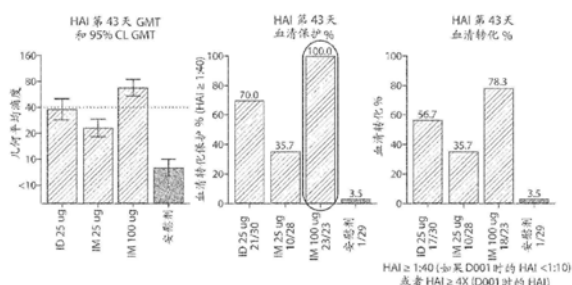
序列表15页 附图5页

(54)发明名称

流感疫苗

(57)摘要

本发明涉及核糖核酸疫苗的组合物及其制备、制造方法和治疗用途,所述核糖核酸疫苗包含编码一种或多种流感抗原如血凝素抗原的多核苷酸分子。



1. 一种诱导人类受试者中的抗原特异性免疫应答的方法,其包括向所述人类受试者施用在阳离子脂质纳米粒子内配制的10-100ug的剂量的核酸疫苗,所述核酸疫苗包含具有编码HA7血凝素抗原的开放阅读框的RNA多核苷酸,其中诱导了保护性HA7抗原特异性免疫应答。

2. 如权利要求1所述的方法,其中所述保护性HA7抗原特异性免疫应答是由在所述人类受试者中产生比基线大至少2倍的中和抗体滴度确定的。

3. 如权利要求1所述的方法,其中所述保护性HA7抗原特异性免疫应答是由在所述人类受试者中产生大于1:20的微量中和值确定的。

4. 如权利要求1所述的方法,其中所述保护性HA7抗原特异性免疫应答是由在所述人类受试者中产生比基线大至少3倍的中和抗体滴度确定的。

5. 如权利要求1所述的方法,其中所述保护性HA7抗原特异性免疫应答是由在所述人类受试者中产生比基线大2-10倍的中和抗体滴度确定的。

6. 如权利要求1所述的方法,其中所述保护性HA7抗原特异性免疫应答是由在所述人类受试者中产生至少1:40的HAI滴度确定的。

7. 如权利要求1所述的方法,其中所述保护性HA7抗原特异性免疫应答是由在所述人类受试者中产生至少1:60的HAI滴度确定的。

8. 如权利要求1所述的方法,其中所述保护性HA7抗原特异性免疫应答是由在所述人类受试者中产生至少1:80的HAI滴度确定的。

9. 如权利要求1所述的方法,其中所述保护性HA7抗原特异性免疫应答是由在所述人类受试者中产生至少1:90的HAI滴度确定的。

10. 如权利要求1所述的方法,其中所述保护性HA7抗原特异性免疫应答是由在所述人类受试者中产生至少1:40-1:200的HAI滴度确定的。

11. 如权利要求1所述的方法,其中所述保护性HA7抗原特异性免疫应答是由在所述人类受试者中产生相对于基线HAI水平而言HAI水平至少4倍的增加确定的。

12. 如权利要求1所述的方法,其中所述保护性HA7抗原特异性免疫应答是由在所述人类受试者中产生相对于基线HAI水平而言HAI水平至少5倍的增加确定的。

13. 如权利要求1所述的方法,其中所述保护性HA7抗原特异性免疫应答是由在所述人类受试者中产生相对于基线HAI水平而言HAI水平至少6倍的增加确定的。

14. 如权利要求1-13中任一项所述的方法,其中所述HA7血凝素抗原是H7N9抗原。

15. 如权利要求1-14中任一项所述的方法,其中所述RNA多核苷酸包含编码与SEQ ID N01具有至少80%序列同一性的氨基酸序列的多核苷酸。

16. 如权利要求1-14中任一项所述的方法,其中所述RNA多核苷酸包含编码SEQ ID N01的氨基酸序列的多核苷酸。

17. 如权利要求1-16中任一项所述的方法,其中所述产生抗原特异性免疫应答的方法涉及单次施用所述疫苗,并且其中以单次施用产生所述保护性免疫应答。

18. 如权利要求1-16中任一项所述的方法,其还包括施用加强剂量的所述疫苗,并且其中以加强施用产生所述保护性免疫应答。

19. 如权利要求1-18中任一项所述的方法,其中通过皮内或肌肉注射向所述受试者施用所述疫苗。

20. 如权利要求1-19中任一项所述的方法,其中向所述受试者施用的所述核酸疫苗中包含25微克的剂量的所述RNA多核苷酸。

21. 如权利要求1-19中任一项所述的方法,其中向所述受试者施用的所述核酸疫苗中包含50微克的剂量的所述RNA多核苷酸。

22. 如权利要求1-19中任一项所述的方法,其中向所述受试者施用的所述核酸疫苗中包含75微克的剂量的所述RNA多核苷酸。

23. 如权利要求1-19中任一项所述的方法,其中向所述受试者施用的所述核酸疫苗中包含100微克的剂量的所述RNA多核苷酸。

24. 如权利要求1-23中任一项所述的方法,其中所述阳离子脂质纳米粒子包括按摩尔比计约50%阳离子脂质、约1.5%经PEG修饰的脂质、约38.5%胆固醇和约10%非阳离子脂质。

25. 如权利要求1-23中任一项所述的方法,其中所述阳离子脂质纳米粒子包括按摩尔比计约55%阳离子脂质、约2.5%PEG脂质、约32.5%胆固醇和约10%非阳离子脂质。

26. 如权利要求1-23中任一项所述的方法,其中所述开放阅读框是经密码子优化的。

27. 如权利要求1-23中任一项所述的方法,其中所述阳离子脂质纳米粒子的多分散性值小于0.4。

28. 如权利要求1-27中任一项所述的方法,其中所述多核苷酸具有长度为80-250个核苷酸的聚-A尾。

29. 如权利要求1-28中任一项所述的方法,其中所述抗原特异性免疫应答包括T细胞应答。

30. 如权利要求1-28中任一项所述的方法,其中所述抗原特异性免疫应答包括B细胞应答。

31. 如权利要求1-30中任一项所述的方法,其中所述多核苷酸包含至少一个5'末端帽和至少一个化学修饰。

32. 如权利要求31所述的方法,其中所述RNA多核苷酸包括选自下组的化学修饰,该组由以下组成:假尿苷、N1-甲基假尿苷、2-硫代尿苷、4'-硫代尿苷、5-甲基胞嘧啶、2-硫代-1-甲基-1-脱氮-假尿苷、2-硫代-1-甲基-假尿苷、2-硫代-5-氮杂-尿苷、2-硫代-二氢假尿苷、2-硫代-二氢尿苷、2-硫代-假尿苷、4-甲氧基-2-硫代-假尿苷、4-甲氧基-假尿苷、4-硫代-1-甲基-假尿苷、4-硫代-假尿苷、5-氮杂-尿苷、二氢假尿苷、5-甲氧基尿苷、和2'-O-甲基尿苷。

33. 如权利要求1-14中任一项所述的方法,其中所述RNA多核苷酸与SEQ ID NO5、6、7、或9具有至少80%序列同一性。

34. 一种诱导人类受试者中的抗原特异性免疫应答的方法,其包括向所述人类受试者施用在阳离子脂质纳米粒子内配制的10-100ug的剂量的核酸疫苗,所述核酸疫苗包含具有编码HA10血凝素抗原的开放阅读框的RNA多核苷酸,其中诱导了保护性HA10抗原特异性免疫应答。

35. 如权利要求34所述的方法,其中所述保护性HA10抗原特异性免疫应答是由在所述人类受试者中产生比基线大至少2倍的中和抗体滴度确定的。

36. 如权利要求34所述的方法,其中所述保护性HA10抗原特异性免疫应答是由在所述

人类受试者中产生大于1:20的微量中和值确定的。

37. 如权利要求34所述的方法, 其中所述保护性HA10抗原特异性免疫应答是由在所述人类受试者中产生比基线大至少3倍的中和抗体滴度确定的。

38. 如权利要求34所述的方法, 其中所述保护性HA10抗原特异性免疫应答是由在所述人类受试者中产生比基线大2-10倍的中和抗体滴度确定的。

39. 如权利要求34所述的方法, 其中所述保护性HA10抗原特异性免疫应答是由在所述人类受试者中产生至少1:40的HAI滴度确定的。

40. 如权利要求34所述的方法, 其中所述保护性HA10抗原特异性免疫应答是由在所述人类受试者中产生至少1:60的HAI滴度确定的。

41. 如权利要求34所述的方法, 其中所述保护性HA10抗原特异性免疫应答是由在所述人类受试者中产生至少1:80的HAI滴度确定的。

42. 如权利要求34所述的方法, 其中所述保护性HA10抗原特异性免疫应答是由在所述人类受试者中产生至少1:90的HAI滴度确定的。

43. 如权利要求34所述的方法, 其中所述保护性HA10抗原特异性免疫应答是由在所述人类受试者中产生至少1:40-1:200的HAI滴度确定的。

44. 如权利要求34所述的方法, 其中所述保护性HA10抗原特异性免疫应答是由在所述人类受试者中产生相对于基线HAI水平而言HAI水平至少4倍的增加确定的。

45. 如权利要求34所述的方法, 其中所述保护性HA10抗原特异性免疫应答是由在所述人类受试者中产生相对于基线HAI水平而言HAI水平至少5倍的增加确定的。

46. 如权利要求34所述的方法, 其中所述保护性HA10抗原特异性免疫应答是由在所述人类受试者中产生相对于基线HAI水平而言HAI水平至少6倍的增加确定的。

47. 如权利要求34-46中任一项所述的方法, 其中所述HA10血凝素抗原是H10N8抗原。

48. 如权利要求34-47中任一项所述的方法, 其中所述RNA多核苷酸包含编码与SEQ ID N04具有至少80%序列同一性的氨基酸序列的多核苷酸。

49. 如权利要求34-47中任一项所述的方法, 其中所述RNA多核苷酸包含编码SEQ ID N04的氨基酸序列的多核苷酸。

50. 如权利要求34-49中任一项所述的方法, 其中所述产生抗原特异性免疫应答的方法涉及单次施用所述疫苗, 并且其中以单次施用产生所述保护性免疫应答。

51. 如权利要求34-49中任一项所述的方法, 其还包括施用加强剂量的所述疫苗, 并且其中以加强施用产生所述保护性免疫应答。

52. 如权利要求34-51中任一项所述的方法, 其中通过皮内或肌内注射向所述受试者施用所述疫苗。

53. 如权利要求34-52中任一项所述的方法, 其中向所述受试者施用的所述核酸疫苗中包含25微克的剂量的所述RNA多核苷酸。

54. 如权利要求34-52中任一项所述的方法, 其中向所述受试者施用的所述核酸疫苗中包含50微克的剂量的所述RNA多核苷酸。

55. 如权利要求34-52中任一项所述的方法, 其中向所述受试者施用的所述核酸疫苗中包含75微克的剂量的所述RNA多核苷酸。

56. 如权利要求34-52中任一项所述的方法, 其中向所述受试者施用的所述核酸疫苗中

包含100微克的剂量的所述RNA多核苷酸。

57. 如权利要求34-56中任一项所述的方法,其中所述阳离子脂质纳米粒子包括按摩尔比计约50%阳离子脂质、约1.5%经PEG修饰的脂质、约38.5%胆固醇和约10%非阳离子脂质。

58. 如权利要求34-56中任一项所述的方法,其中所述阳离子脂质纳米粒子包括按摩尔比计约55%阳离子脂质、约2.5%PEG脂质、约32.5%胆固醇和约10%非阳离子脂质。

59. 如权利要求34-56中任一项所述的方法,其中所述开放阅读框是经密码子优化的。

60. 如权利要求34-56中任一项所述的方法,其中所述阳离子脂质纳米粒子的多分散性值小于0.4。

61. 如权利要求34-60中任一项所述的方法,其中所述多核苷酸具有长度为80-250个核苷酸的聚-A尾。

62. 如权利要求34-61中任一项所述的方法,其中所述抗原特异性免疫应答包括T细胞应答。

63. 如权利要求34-61中任一项所述的方法,其中所述抗原特异性免疫应答包括B细胞应答。

64. 如权利要求34-63中任一项所述的方法,其中所述多核苷酸包含至少一个5'末端帽和至少一个化学修饰。

65. 如权利要求64所述的方法,其中所述RNA多核苷酸包括选自下组的化学修饰,该组由以下组成:假尿苷、N1-甲基假尿苷、2-硫代尿苷、4'-硫代尿苷、5-甲基胞嘧啶、2-硫代-1-甲基-1-脱氮-假尿苷、2-硫代-1-甲基-假尿苷、2-硫代-5-氮杂-尿苷、2-硫代-二氢假尿苷、2-硫代-二氢尿苷、2-硫代-假尿苷、4-甲氧基-2-硫代-假尿苷、4-甲氧基-假尿苷、4-硫代-1-甲基-假尿苷、4-硫代-假尿苷、5-氮杂-尿苷、二氢假尿苷、5-甲氧基尿苷、和2'-O-甲基尿苷。

66. 如权利要求34-47中任一项所述的方法,其中所述RNA多核苷酸与SEQ ID NO2、3、或8具有至少80%序列同一性。

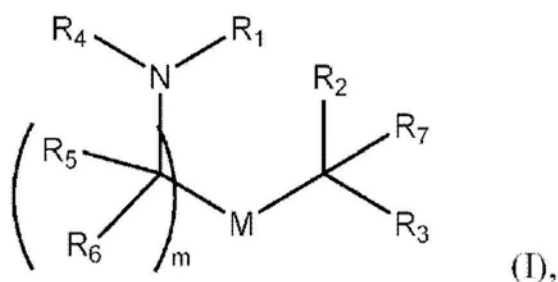
67. 一种诱导受试者中的抗原特异性免疫应答的方法,其包括向所述受试者施用在阳离子脂质纳米粒子内配制的核酸疫苗,所述核酸疫苗包含具有编码流感病毒抗原的开放阅读框的RNA多核苷酸,其中保护性流感病毒抗原特异性免疫应答在所述受试者中维持超过2年。

68. 如权利要求67所述的方法,其中所述保护性流感病毒抗原特异性免疫应答在所述受试者中维持超过4年。

69. 如权利要求67所述的方法,其中所述保护性流感病毒抗原特异性免疫应答在所述受试者中维持超过8年。

70. 如权利要求67所述的方法,其中所述保护性流感病毒抗原特异性免疫应答在所述受试者中维持超过10年。

71. 一种包含编码流感病毒抗原的mRNA的疫苗,其在包含具有化学式(I)的化合物:



或其盐或异构体的脂质纳米粒子中配制,其中:

R₁选自下组,该组由以下组成:C₅₋₃₀烷基、C₅₋₂₀烯基、-R*YR''、-YR''、和-R''M'R';

R₂和R₃独立地选自下组,该组由以下组成:H、C₁₋₁₄烷基、C₂₋₁₄烯基、-R*YR''、-YR''、和-R*OR'',或R₂和R₃连同它们所附接的原子一起形成杂环或碳环;

R₄选自下组,该组由以下组成:C₃₋₆碳环、-(CH₂)_nQ、-(CH₂)_nCHQR、-CHQR、-CQ(R)₂、和未取代的C₁₋₆烷基,其中Q选自碳环、杂环、-OR、-O(CH₂)_nN(R)₂、-C(O)OR、-OC(O)R、-CX₃、-CX₂H、-CXH₂、-CN、-N(R)₂、-C(O)N(R)₂、-N(R)C(O)R、-N(R)S(O)₂R、-N(R)C(O)N(R)₂、-N(R)C(S)N(R)₂、-N(R)R₈、-O(CH₂)_nOR、-N(R)C(=NR₉)N(R)₂、-N(R)C(=CHR₉)N(R)₂、-OC(O)N(R)₂、-N(R)C(O)OR、-N(OR)C(O)R、-N(OR)S(O)₂R、-N(OR)C(O)OR、-N(OR)C(O)N(R)₂、-N(OR)C(S)N(R)₂、-N(OR)C(=NR₉)N(R)₂、-N(OR)C(=CHR₉)N(R)₂、-C(=NR₉)N(R)₂、-C(=NR₉)R、-C(O)N(R)OR、和-C(R)N(R)₂C(O)OR,并且每个n独立地选自1、2、3、4、和5;

每个R₅独立地选自下组,该组由以下组成:C₁₋₃烷基、C₂₋₃烯基、和H;

每个R₆独立地选自下组,该组由以下组成:C₁₋₃烷基、C₂₋₃烯基、和H;

M和M'独立地选自-C(O)O-、-OC(O)-、-C(O)N(R')-、-N(R')C(O)-、-C(O)-、-C(S)-、-C(S)S-、-SC(S)-、-CH(OH)-、-P(O)(OR')O-、-S(O)₂-、-S-S-、芳基基团、和杂芳基基团;

R₇选自下组,该组由以下组成:C₁₋₃烷基、C₂₋₃烯基、和H;

R₈选自下组,该组由以下组成:C₃₋₆碳环和杂环;

R₉选自下组,该组由以下组成:H、CN、NO₂、C₁₋₆烷基、-OR、-S(O)₂R、-S(O)₂N(R)₂、C₂₋₆烯基、C₃₋₆碳环和杂环;

每个R独立地选自下组,该组由以下组成:C₁₋₃烷基、C₂₋₃烯基、和H;

每个R'独立地选自下组,该组由以下组成:C₁₋₁₈烷基、C₂₋₁₈烯基、-R*YR''、-YR''、和H;

每个R''独立地选自下组,该组由以下组成:C₃₋₁₄烷基和C₃₋₁₄烯基;

每个R*独立地选自下组,该组由以下组成:C₁₋₁₂烷基和C₂₋₁₂烯基;

每个Y独立地是C₃₋₆碳环;

每个X独立地选自下组,该组由以下组成:F、Cl、Br、和I;并且

m选自5、6、7、8、9、10、11、12、和13。

72. 如权利要求71所述的疫苗,其中具有化学式(I)的化合物的子集包括以下那些,其中当R₄是-(CH₂)_nQ、-(CH₂)_nCHQR、-CHQR、或-CQ(R)₂时,则(i) Q不是-N(R)₂,此时n是1、2、3、4或5,或(ii) Q不是5元、6元、或7元杂环烷基,此时n是1或2。

73. 如权利要求71所述的疫苗,其中具有化学式(I)的化合物的子集包括以下那些,其中

R₁选自下组,该组由以下组成:C₅₋₃₀烷基、C₅₋₂₀烯基、-R*YR''、-YR''、和-R''M'R';

R₂和R₃独立地选自下组,该组由以下组成:H、C₁₋₁₄烷基、C₂₋₁₄烯基、-R*YR''、-YR''、和-R*

OR", 或R₂和R₃连同它们所附接的原子一起形成杂环或碳环;

R₄选自下组, 该组由以下组成: C₃₋₆碳环、-(CH₂)_nQ、-(CH₂)_nCHQR、-CHQR、-CQ(R)₂、和未取代的C₁₋₆烷基, 其中Q选自C₃₋₆碳环、具有一个或多个选自N、O、和S的杂原子的5元至14元杂芳基、-OR、-O(CH₂)_nN(R)₂、-C(O)OR、-OC(O)R、-CX₃、-CX₂H、-CXH₂、-CN、-C(O)N(R)₂、-N(R)C(O)R、-N(R)S(O)₂R、-N(R)C(O)N(R)₂、-N(R)C(S)N(R)₂、-CRN(R)₂C(O)OR、-N(R)R₈、-O(CH₂)_nOR、-N(R)C(=NR₉)N(R)₂、-N(R)C(=CHR₉)N(R)₂、-OC(O)N(R)₂、-N(R)C(O)OR、-N(OR)C(O)R、-N(OR)S(O)₂R、-N(OR)C(O)OR、-N(OR)C(O)N(R)₂、-N(OR)C(S)N(R)₂、-N(OR)C(=NR₉)N(R)₂、-N(OR)C(=CHR₉)N(R)₂、-C(=NR₉)N(R)₂、-C(=NR₉)R、-C(O)N(R)OR、和具有一个或多个选自N、O、和S的杂原子的5元至14元杂环烷基, 所述5元至14元杂环烷基被选自以下的一个或多个取代基取代: 氧代(=O)、OH、氨基、单-或二-烷基氨基、和C₁₋₃烷基, 并且每个n独立地选自1、2、3、4、和5;

每个R₅独立地选自下组, 该组由以下组成: C₁₋₃烷基、C₂₋₃烯基、和H;

每个R₆独立地选自下组, 该组由以下组成: C₁₋₃烷基、C₂₋₃烯基、和H;

M和M'独立地选自-C(O)O-、-OC(O)-、-C(O)N(R')-、-N(R')C(O)-、-C(O)-、-C(S)-、-C(S)S-、-SC(S)-、-CH(OH)-、-P(O)(OR')O-、-S(O)₂-、-S-S-、芳基基团、和杂芳基基团;

R₇选自下组, 该组由以下组成: C₁₋₃烷基、C₂₋₃烯基、和H;

R₈选自下组, 该组由以下组成: C₃₋₆碳环和杂环;

R₉选自下组, 该组由以下组成: H、CN、NO₂、C₁₋₆烷基、-OR、-S(O)₂R、-S(O)₂N(R)₂、C₂₋₆烯基、C₃₋₆碳环和杂环;

每个R独立地选自下组, 该组由以下组成: C₁₋₃烷基、C₂₋₃烯基、和H;

每个R'独立地选自下组, 该组由以下组成: C₁₋₁₈烷基、C₂₋₁₈烯基、-R*YR"、-YR"、和H;

每个R"独立地选自下组, 该组由以下组成: C₃₋₁₄烷基和C₃₋₁₄烯基;

每个R*独立地选自下组, 该组由以下组成: C₁₋₁₂烷基和C₂₋₁₂烯基;

每个Y独立地是C₃₋₆碳环;

每个X独立地选自下组, 该组由以下组成: F、Cl、Br、和I; 并且

m选自5、6、7、8、9、10、11、12、和13,

或其盐或异构体。

74. 如权利要求71所述的疫苗, 其中具有化学式(I)的化合物的子集包括以下那些, 其中

R₁选自下组, 该组由以下组成: C₅₋₃₀烷基、C₅₋₂₀烯基、-R*YR"、-YR"、和-R"M'R';

R₂和R₃独立地选自下组, 该组由以下组成: H、C₁₋₁₄烷基、C₂₋₁₄烯基、-R*YR"、-YR"、和-R*OR", 或R₂和R₃连同它们所附接的原子一起形成杂环或碳环;

R₄选自下组, 该组由以下组成: C₃₋₆碳环、-(CH₂)_nQ、-(CH₂)_nCHQR、-CHQR、-CQ(R)₂、和未取代的C₁₋₆烷基, 其中Q选自C₃₋₆碳环、具有一个或多个选自N、O、和S的杂原子的5元至14元杂环、-OR、-O(CH₂)_nN(R)₂、-C(O)OR、-OC(O)R、-CX₃、-CX₂H、-CXH₂、-CN、-C(O)N(R)₂、-N(R)C(O)R、-N(R)S(O)₂R、-N(R)C(O)N(R)₂、-N(R)C(S)N(R)₂、-CRN(R)₂C(O)OR、-N(R)R₈、-O(CH₂)_nOR、-N(R)C(=NR₉)N(R)₂、-N(R)C(=CHR₉)N(R)₂、-OC(O)N(R)₂、-N(R)C(O)OR、-N(OR)C(O)R、-N(OR)S(O)₂R、-N(OR)C(O)OR、-N(OR)C(O)N(R)₂、-N(OR)C(S)N(R)₂、-N(OR)C(=NR₉)N(R)₂、-N(OR)C(=CHR₉)N(R)₂、-C(=NR₉)R、-C(O)N(R)OR和-C(=NR₉)N(R)₂, 并且每个n独立地选自1、

2、3、4、和5；并且当Q是5元至14元杂环并且 (i) R_4 是 $-(CH_2)_nQ$ (其中n是1或2) 或 (ii) R_4 是 $-(CH_2)_nCHQR$ (其中n是1) 或 (iii) R_4 是 $-CHQR$ 和 $-CQ(R)_2$ 时, 则Q是5元至14元杂芳基或8元至14元杂环烷基;

每个 R_5 独立地选自下组, 该组由以下组成: C_{1-3} 烷基、 C_{2-3} 烯基、和H;

每个 R_6 独立地选自下组, 该组由以下组成: C_{1-3} 烷基、 C_{2-3} 烯基、和H;

M和M'独立地选自 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-C(O)N(R')-$ 、 $-N(R')C(O)-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-C(S)S-$ 、 $-SC(S)-$ 、 $-CH(OH)-$ 、 $-P(O)(OR')O-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S-S-$ 、芳基基团、和杂芳基基团;

R_7 选自下组, 该组由以下组成: C_{1-3} 烷基、 C_{2-3} 烯基、和H;

R_8 选自下组, 该组由以下组成: C_{3-6} 碳环和杂环;

R_9 选自下组, 该组由以下组成: H、CN、 NO_2 、 C_{1-6} 烷基、 $-OR$ 、 $-S(O)_2R$ 、 $-S(O)_2N(R)_2$ 、 C_{2-6} 烯基、 C_{3-6} 碳环和杂环;

每个R独立地选自下组, 该组由以下组成: C_{1-3} 烷基、 C_{2-3} 烯基、和H;

每个 R' 独立地选自下组, 该组由以下组成: C_{1-18} 烷基、 C_{2-18} 烯基、 $-R^*YR''$ 、 $-YR''$ 、和H;

每个 R'' 独立地选自下组, 该组由以下组成: C_{3-14} 烷基和 C_{3-14} 烯基;

每个 R^* 独立地选自下组, 该组由以下组成: C_{1-12} 烷基和 C_{2-12} 烯基;

每个Y独立地是 C_{3-6} 碳环;

每个X独立地选自下组, 该组由以下组成: F、Cl、Br、和I; 并且

m选自5、6、7、8、9、10、11、12、和13,

或其盐或异构体。

75. 如权利要求71所述的疫苗, 其中具有化学式(I)的化合物的子集包括以下那些, 其中

R_1 选自下组, 该组由以下组成: C_{5-30} 烷基、 C_{5-20} 烯基、 $-R^*YR''$ 、 $-YR''$ 、和 $-R''M'R'$;

R_2 和 R_3 独立地选自下组, 该组由以下组成: H、 C_{1-14} 烷基、 C_{2-14} 烯基、 $-R^*YR''$ 、 $-YR''$ 、和 $-R^*OR''$, 或 R_2 和 R_3 连同它们所附接的原子一起形成杂环或碳环;

R_4 选自下组, 该组由以下组成: C_{3-6} 碳环、 $-(CH_2)_nQ$ 、 $-(CH_2)_nCHQR$ 、 $-CHQR$ 、 $-CQ(R)_2$ 、和未取代的 C_{1-6} 烷基, 其中Q选自 C_{3-6} 碳环、具有一个或多个选自N、O、和S的杂原子的5元至14元杂芳基、 $-OR$ 、 $-O(CH_2)_nN(R)_2$ 、 $-C(O)OR$ 、 $-OC(O)R$ 、 $-CX_3$ 、 $-CX_2H$ 、 $-CXH_2$ 、 $-CN$ 、 $-C(O)N(R)_2$ 、 $-N(R)C(O)R$ 、 $-N(R)S(O)_2R$ 、 $-N(R)C(O)N(R)_2$ 、 $-N(R)C(S)N(R)_2$ 、 $-CRN(R)_2C(O)OR$ 、 $-N(R)R_8$ 、 $-O(CH_2)_nOR$ 、 $-N(R)C(=NR_9)N(R)_2$ 、 $-N(R)C(=CHR_9)N(R)_2$ 、 $-OC(O)N(R)_2$ 、 $-N(R)C(O)OR$ 、 $-N(OR)C(O)R$ 、 $-N(OR)S(O)_2R$ 、 $-N(OR)C(O)OR$ 、 $-N(OR)C(O)N(R)_2$ 、 $-N(OR)C(S)N(R)_2$ 、 $-N(OR)C(=NR_9)N(R)_2$ 、 $-N(OR)C(=CHR_9)N(R)_2$ 、 $-C(=NR_9)R$ 、 $-C(O)N(R)OR$ 、和 $-C(=NR_9)N(R)_2$, 并且每个n独立地选自1、2、3、4、和5;

每个 R_5 独立地选自下组, 该组由以下组成: C_{1-3} 烷基、 C_{2-3} 烯基、和H;

每个 R_6 独立地选自下组, 该组由以下组成: C_{1-3} 烷基、 C_{2-3} 烯基、和H;

M和M'独立地选自 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-C(O)N(R')-$ 、 $-N(R')C(O)-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-C(S)S-$ 、 $-SC(S)-$ 、 $-CH(OH)-$ 、 $-P(O)(OR')O-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S-S-$ 、芳基基团、和杂芳基基团;

R_7 选自下组, 该组由以下组成: C_{1-3} 烷基、 C_{2-3} 烯基、和H;

R_8 选自下组, 该组由以下组成: C_{3-6} 碳环和杂环;

R_9 选自下组, 该组由以下组成: H、CN、 NO_2 、 C_{1-6} 烷基、 $-OR$ 、 $-S(O)_2R$ 、 $-S(O)_2N(R)_2$ 、 C_{2-6} 烯基、

C₃₋₆碳环和杂环；

每个R独立地选自下组，该组由以下组成：C₁₋₃烷基、C₂₋₃烯基、和H；

每个R'独立地选自下组，该组由以下组成：C₁₋₁₈烷基、C₂₋₁₈烯基、-R*YR''、-YR''、和H；

每个R''独立地选自下组，该组由以下组成：C₃₋₁₄烷基和C₃₋₁₄烯基；

每个R*独立地选自下组，该组由以下组成：C₁₋₁₂烷基和C₂₋₁₂烯基；

每个Y独立地是C₃₋₆碳环；

每个X独立地选自下组，该组由以下组成：F、Cl、Br、和I；并且

m选自5、6、7、8、9、10、11、12、和13，

或其盐或异构体。

76. 如权利要求71所述的疫苗，其中具有化学式(I)的化合物的子集包括以下那些，其中

R₁选自下组，该组由以下组成：C₅₋₃₀烷基、C₅₋₂₀烯基、-R*YR''、-YR''、和-R''M'R'；

R₂和R₃独立地选自下组，该组由以下组成：H、C₂₋₁₄烷基、C₂₋₁₄烯基、-R*YR''、-YR''、和-R*OR''，或R₂和R₃连同它们所附接的原子一起形成杂环或碳环；

R₄是-(CH₂)_nQ或-(CH₂)_nCHQR，其中Q是-N(R)₂，并且n选自3、4、和5；

每个R₅独立地选自下组，该组由以下组成：C₁₋₃烷基、C₂₋₃烯基、和H；

每个R₆独立地选自下组，该组由以下组成：C₁₋₃烷基、C₂₋₃烯基、和H；

M和M'独立地选自-C(O)O-、-OC(O)-、-C(O)N(R')-、-N(R')C(O)-、-C(O)-、-C(S)-、-C(S)S-、-SC(S)-、-CH(OH)-、-P(O)(OR')O-、-S(O)₂-、-S-S-、芳基基团、和杂芳基基团；

R₇选自下组，该组由以下组成：C₁₋₃烷基、C₂₋₃烯基、和H；

每个R独立地选自下组，该组由以下组成：C₁₋₃烷基、C₂₋₃烯基、和H；

每个R'独立地选自下组，该组由以下组成：C₁₋₁₈烷基、C₂₋₁₈烯基、-R*YR''、-YR''、和H；

每个R''独立地选自下组，该组由以下组成：C₃₋₁₄烷基和C₃₋₁₄烯基；

每个R*独立地选自下组，该组由以下组成：C₁₋₁₂烷基和C₁₋₁₂烯基；

每个Y独立地是C₃₋₆碳环；

每个X独立地选自下组，该组由以下组成：F、Cl、Br、和I；并且

m选自5、6、7、8、9、10、11、12、和13，

或其盐或异构体。

77. 如权利要求71所述的疫苗，其中具有化学式(I)的化合物的子集包括以下那些，其中

R₁选自下组，该组由以下组成：C₅₋₃₀烷基、C₅₋₂₀烯基、-R*YR''、-YR''、和-R''M'R'；

R₂和R₃独立地选自下组，该组由以下组成：C₁₋₁₄烷基、C₂₋₁₄烯基、-R*YR''、-YR''、和-R*OR''，或R₂和R₃连同它们所附接的原子一起形成杂环或碳环；

R₄选自下组，该组由以下组成：-(CH₂)_nQ、-(CH₂)_nCHQR、-CHQR、和-CQ(R)₂，其中Q是-N(R)₂，并且n选自1、2、3、4、和5；

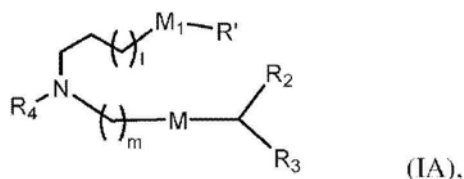
每个R₅独立地选自下组，该组由以下组成：C₁₋₃烷基、C₂₋₃烯基、和H；

每个R₆独立地选自下组，该组由以下组成：C₁₋₃烷基、C₂₋₃烯基、和H；

M和M'独立地选自-C(O)O-、-OC(O)-、-C(O)N(R')-、-N(R')C(O)-、-C(O)-、-C(S)-、-C(S)S-、-SC(S)-、-CH(OH)-、-P(O)(OR')O-、-S(O)₂-、-S-S-、芳基基团、和杂芳基基团；

R₇选自下组,该组由以下组成:C₁₋₃烷基、C₂₋₃烯基、和H;
 每个R独立地选自下组,该组由以下组成:C₁₋₃烷基、C₂₋₃烯基、和H;
 每个R'独立地选自下组,该组由以下组成:C₁₋₁₈烷基、C₂₋₁₈烯基、-R*YR''、-YR''、和H;
 每个R''独立地选自下组,该组由以下组成:C₃₋₁₄烷基和C₃₋₁₄烯基;
 每个R*独立地选自下组,该组由以下组成:C₁₋₁₂烷基和C₁₋₁₂烯基;
 每个Y独立地是C₃₋₆碳环;
 每个X独立地选自下组,该组由以下组成:F、Cl、Br、和I;并且
 m选自5、6、7、8、9、10、11、12、和13,
 或其盐或异构体。

78. 如权利要求71所述的疫苗,其中具有化学式(I)的化合物的子集包括具有化学式(IA)的那些:



或其盐或异构体,其中1是选自1、2、3、4、和5;m是选自5、6、7、8、和9;M₁是一个键或M';R₄是未取代的C₁₋₃烷基或-(CH₂)_nQ,其中Q是OH、-NHC(S)N(R)₂、-NHC(O)N(R)₂、-N(R)C(O)R、-N(R)S(O)₂R、-N(R)R₈、-NHC(=NR₉)N(R)₂、-NHC(=CHR₉)N(R)₂、-OC(O)N(R)₂、-N(R)C(O)OR、杂芳基或杂环烷基;M和M'独立地选自-C(O)O-、-OC(O)-、-C(O)N(R')-、-P(O)(OR')O-、-S-S-、芳基基团、和杂芳基基团;并且R₂和R₃独立地选自下组,该组由以下组成:H、C₁₋₁₄烷基、和C₂₋₁₄烯基。

79. 如权利要求71所述的疫苗,其中编码所述流感病毒抗原的所述mRNA以50微克的剂量存在于所述脂质纳米粒子中。

80. 如权利要求71所述的疫苗,其中编码所述流感病毒抗原的所述mRNA以75微克的剂量存在于所述脂质纳米粒子中。

81. 如权利要求71所述的疫苗,其中编码所述流感病毒抗原的所述mRNA以100微克的剂量存在于所述脂质纳米粒子中。

82. 一种在脂质纳米粒子中配制的包含编码流感病毒抗原的mRNA的疫苗,其中编码所述流感病毒抗原的所述mRNA的剂量为50至100微克,并且其中所述疫苗产生保护性抗原特异性免疫应答,其中所述保护性抗原特异性免疫应答是由在所述人类受试者中产生比基线大至少2、3或4倍的中和抗体滴度确定的。

83. 一种诱导人类受试者中的抗原特异性免疫应答的方法,其包括向所述人类受试者施用在阳离子脂质纳米粒子内配制的10-100ug的剂量的核酸疫苗,所述核酸疫苗包含具有编码血凝素抗原的开放阅读框的RNA多核苷酸,其中诱导了保护性抗原特异性免疫应答。

84. 如权利要求83所述的方法,其中所述核酸疫苗是如权利要求71-78中任一项所述的疫苗。

85. 如权利要求83所述的方法,其中所述保护性抗原特异性免疫应答是由在所述人类受试者中产生比基线大至少2、3、或4倍的中和抗体滴度确定的。

86. 如权利要求83所述的方法,其中所述保护性抗原特异性免疫应答是由在所述人类

受试者中产生大于1:20的微量中和值确定的。

87. 如权利要求83所述的方法, 其中所述保护性抗原特异性免疫应答是由在所述人类受试者中产生比基线大2-10倍的中和抗体滴度确定的。

88. 如权利要求83所述的方法, 其中所述保护性抗原特异性免疫应答是由在所述人类受试者中产生至少1:40、1:60、1:80或1:90或在1:40与1:200之间的HAI滴度确定的。

89. 如权利要求83所述的方法, 其中所述保护性HA7抗原特异性免疫应答是由在所述人类受试者中产生相对于基线HAI水平而言HAI水平至少4、5、或6倍的增加确定的。

90. 如权利要求83-88中任一项所述的方法, 其中所述产生抗原特异性免疫应答的方法涉及单次施用所述疫苗, 并且其中以单次施用产生所述保护性免疫应答。

流感疫苗

[0001] 相关申请

[0002] 本申请根据35U.S.C.119 (e) 要求申请日2016年11月11日提交的名为“INFLUENZA VACCINE[流感疫苗]”的美国临时申请序列号62/421,160的权益,所述申请的完整内容通过引用并入本文。

背景技术

[0003] 甲型流感病毒亚型H7N9是一种具有很高潜力成为大流行的流感。迄今为止,中国已记录到超过600例H7N9流感,死亡率为约1/3人。这可能是由于分散的、不持续的人与人之间的传播造成的。虽然有几种疫苗正在开发中,但在没有添加佐剂的情况下已报道的免疫原性很低。

[0004] 甲型流感病毒亚型H10N8也显示出成为大流行的潜力,但其风险低于甲型流感病毒亚型H7N9。2013年,中国仅报告了3例H10N8流感感染,导致2例死亡。迄今为止,还没有疫苗可用。

发明内容

[0005] 根据本发明提供了RNA流感疫苗和针对流感对受试者接种疫苗的方法。在一些方面,本发明是一种诱导人类受试者中的抗原特异性免疫应答的方法,其包括向所述人类受试者施用在阳离子脂质纳米粒子内配制的10-100ug的剂量的核酸疫苗,所述核酸疫苗包含具有编码血凝素抗原的开放阅读框的RNA多核苷酸,其中诱导了保护性HA抗原特异性免疫应答。

[0006] 在本发明的一些方面中提供了一种诱导人类受试者中的抗原特异性免疫应答的方法,其包括向所述人类受试者施用在阳离子脂质纳米粒子内配制的10-100ug的剂量的核酸疫苗,所述核酸疫苗包含具有编码HA7血凝素抗原的开放阅读框的RNA多核苷酸,其中诱导了保护性HA7抗原特异性免疫应答。

[0007] 在一些实施方案中,所述保护性HA7抗原特异性免疫应答是由在所述人类受试者中产生比基线大至少2、3、4、或5倍的中和抗体滴度确定的。在一些实施方案中,所述保护性HA7抗原特异性免疫应答是由在所述人类受试者中产生比基线大2-10倍的中和抗体滴度确定的。在一些实施方案中,所述保护性HA7抗原特异性免疫应答是由在所述人类受试者中产生大于1:20的微量中和值确定的。在一些实施方案中,所述保护性HA7抗原特异性免疫应答是由在所述人类受试者中产生至少1:40、至少1:60、至少1:80或至少1:90的HAI滴度确定的。在一些实施方案中,所述保护性HA7抗原特异性免疫应答是由在所述人类受试者中产生至少1:40-1:200的HAI滴度确定的。在一些实施方案中,所述保护性HA7抗原特异性免疫应答是由在所述人类受试者中产生相对于基线HAI水平而言HAI水平至少4倍、至少5倍或至少6倍的增加确定的。

[0008] 在一些实施方案中,所述HA7血凝素抗原是H7N9抗原。在其他实施方案中,所述RNA多核苷酸包含编码与SEQ ID NO 1具有至少80%序列同一性的氨基酸序列的多核苷酸。在

其他实施方案中,所述RNA多核苷酸包含编码SEQ ID NO 1的氨基酸序列的多核苷酸。在其他实施方案中,所述RNA多核苷酸与SEQ ID NO 5、6、7、或9具有至少80%序列同一性。

[0009] 在其他方面,本发明是一种诱导人类受试者中的抗原特异性免疫应答的方法,其包括向所述人类受试者施用在阳离子脂质纳米粒子内配制的10-100ug的剂量的核酸疫苗,所述核酸疫苗包含具有编码HA10血凝素抗原的开放阅读框的RNA多核苷酸,其中诱导了保护性HA10抗原特异性免疫应答。

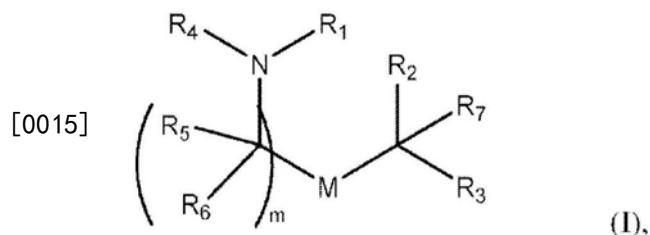
[0010] 在一些实施方案中,所述保护性HA10抗原特异性免疫应答是由在所述人类受试者中产生比基线大至少2、3、4、或5倍的中和抗体滴度确定的。在一些实施方案中,所述保护性HA10抗原特异性免疫应答是由在所述人类受试者中产生比基线大2-10倍的中和抗体滴度确定的。在一些实施方案中,所述保护性HA10抗原特异性免疫应答是由在所述人类受试者中产生大于1:20的微量中和值确定的。在一些实施方案中,所述保护性HA10抗原特异性免疫应答是由在所述人类受试者中产生至少1:40、至少1:60、至少1:80或至少1:90的HAI滴度确定的。在一些实施方案中,所述保护性HA10抗原特异性免疫应答是由在所述人类受试者中产生至少1:40-1:200的HAI滴度确定的。在一些实施方案中,所述保护性HA10抗原特异性免疫应答是由在所述人类受试者中产生相对于基线HAI水平而言HAI水平至少4倍、至少5倍或至少6倍的增加确定的。

[0011] 在一些实施方案中,所述HA10血凝素抗原是H10N8抗原。在一些实施方案中,所述RNA多核苷酸包含编码与SEQ ID NO 4具有至少80%序列同一性的氨基酸序列的多核苷酸。在一些实施方案中,所述RNA多核苷酸包含编码SEQ ID NO 4的氨基酸序列的多核苷酸。在其他实施方案中,所述RNA多核苷酸与SEQ ID NO 2、3、或8具有至少80%序列同一性。

[0012] 在一些实施方案中,所述产生抗原特异性免疫应答的方法涉及单次施用所述疫苗,并且其中以单次给药产生所述保护性免疫应答。在其他实施方案中,施用加强剂量的所述疫苗,并且其中以加强给药产生所述保护性免疫应答。

[0013] 在一些方面,本发明是一种诱导受试者中的抗原特异性免疫应答的方法,其包括向所述受试者施用在阳离子脂质纳米粒子内配制的核酸疫苗,所述核酸疫苗包含具有编码流感病毒抗原的开放阅读框的RNA多核苷酸,其中保护性流感病毒抗原特异性免疫应答在所述受试者中维持超过2年。在一些实施方案中,所述保护性流感病毒抗原特异性免疫应答在所述受试者中维持超过4年。在其他实施方案中,所述保护性流感病毒抗原特异性免疫应答在所述受试者中维持超过8年。在又其他实施方案中,所述保护性流感病毒抗原特异性免疫应答在所述受试者中维持超过10年。

[0014] 在其他方面,本发明是一种包含编码流感病毒抗原的mRNA的疫苗,其在包含具有化学式(I)的化合物:



[0016] 或其盐或异构体的脂质纳米粒子中配制,其中:

[0017] R_1 选自下组,该组由以下组成: C_{5-30} 烷基、 C_{5-20} 烯基、 $-R^*YR''$ 、 $-YR''$ 、和 $-R''M'R'$;

[0018] R_2 和 R_3 独立地选自下组,该组由以下组成: H 、 C_{1-14} 烷基、 C_{2-14} 烯基、 $-R^*YR''$ 、 $-YR''$ 、和 $-R^*OR''$,或 R_2 和 R_3 连同它们所附接的原子一起形成杂环或碳环;

[0019] R_4 选自下组,该组由以下组成: C_{3-6} 碳环、 $-(CH_2)_nQ$ 、 $-(CH_2)_nCHQR$ 、 $-CHQR$ 、 $-CQ(R)_2$ 、和未取代的 C_{1-6} 烷基,其中 Q 选自碳环、杂环、 $-OR$ 、 $-O(CH_2)_nN(R)_2$ 、 $-C(O)OR$ 、 $-OC(O)R$ 、 $-CX_3$ 、 $-CX_2H$ 、 $-CXH_2$ 、 $-CN$ 、 $-N(R)_2$ 、 $-C(O)N(R)_2$ 、 $-N(R)C(O)R$ 、 $-N(R)S(O)_2R$ 、 $-N(R)C(O)N(R)_2$ 、 $-N(R)C(S)N(R)_2$ 、 $-N(R)R_8$ 、 $-O(CH_2)_nOR$ 、 $-N(R)C(=NR_9)N(R)_2$ 、 $-N(R)C(=CHR_9)N(R)_2$ 、 $-OC(O)N(R)_2$ 、 $-N(R)C(O)OR$ 、 $-N(OR)C(O)R$ 、 $-N(OR)S(O)_2R$ 、 $-N(OR)C(O)OR$ 、 $-N(OR)C(O)N(R)_2$ 、 $-N(OR)C(S)N(R)_2$ 、 $-N(OR)C(=NR_9)N(R)_2$ 、 $-N(OR)C(=CHR_9)N(R)_2$ 、 $-C(=NR_9)N(R)_2$ 、 $-C(=NR_9)R$ 、 $-C(O)N(R)OR$ 、和 $-C(R)N(R)_2C(O)OR$,并且每个 n 独立地选自1、2、3、4、和5;

[0020] 每个 R_5 独立地选自下组,该组由以下组成: C_{1-3} 烷基、 C_{2-3} 烯基、和 H ;

[0021] 每个 R_6 独立地选自下组,该组由以下组成: C_{1-3} 烷基、 C_{2-3} 烯基、和 H ;

[0022] M 和 M' 独立地选自 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-C(O)N(R')$ 、 $-N(R')C(O)-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-C(S)S-$ 、 $-SC(S)-$ 、 $-CH(OH)-$ 、 $-P(O)(OR')O-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S-S-$ 、芳基基团、和杂芳基基团;

[0023] R_7 选自下组,该组由以下组成: C_{1-3} 烷基、 C_{2-3} 烯基、和 H ;

[0024] R_8 选自下组,该组由以下组成: C_{3-6} 碳环和杂环;

[0025] R_9 选自下组,该组由以下组成: H 、 CN 、 NO_2 、 C_{1-6} 烷基、 $-OR$ 、 $-S(O)_2R$ 、 $-S(O)_2N(R)_2$ 、 C_{2-6} 烯基、 C_{3-6} 碳环和杂环;

[0026] 每个 R 独立地选自下组,该组由以下组成: C_{1-3} 烷基、 C_{2-3} 烯基、和 H ;

[0027] 每个 R' 独立地选自下组,该组由以下组成: C_{1-18} 烷基、 C_{2-18} 烯基、 $-R^*YR''$ 、 $-YR''$ 、和 H ;

[0028] 每个 R'' 独立地选自下组,该组由以下组成: C_{3-14} 烷基和 C_{3-14} 烯基;

[0029] 每个 R^* 独立地选自下组,该组由以下组成: C_{1-12} 烷基和 C_{2-12} 烯基;

[0030] 每个 Y 独立地是 C_{3-6} 碳环;

[0031] 每个 X 独立地选自下组,该组由以下组成: F 、 Cl 、 Br 、和 I ;并且

[0032] m 选自5、6、7、8、9、10、11、12、和13。

[0033] 在一些实施方案中,具有化学式(I)的化合物的子集包括以下那些,其中当 R_4 是 $-(CH_2)_nQ$ 、 $-(CH_2)_nCHQR$ 、 $-CHQR$ 、或 $-CQ(R)_2$ 时,则(i) Q 不是 $-N(R)_2$,此时 n 是1、2、3、4或5,或(ii) Q 不是5元、6元、或7元杂环烷基,此时 n 是1或2。

[0034] 在一些实施方案中,具有化学式(I)的化合物的子集包括以下那些,其中

[0035] R_1 选自下组,该组由以下组成: C_{5-30} 烷基、 C_{5-20} 烯基、 $-R^*YR''$ 、 $-YR''$ 、和 $-R''M'R'$;

[0036] R_2 和 R_3 独立地选自下组,该组由以下组成: H 、 C_{1-14} 烷基、 C_{2-14} 烯基、 $-R^*YR''$ 、 $-YR''$ 、和 $-R^*OR''$,或 R_2 和 R_3 连同它们所附接的原子一起形成杂环或碳环;

[0037] R_4 选自下组,该组由以下组成: C_{3-6} 碳环、 $-(CH_2)_nQ$ 、 $-(CH_2)_nCHQR$ 、 $-CHQR$ 、 $-CQ(R)_2$ 、和未取代的 C_{1-6} 烷基,其中 Q 选自 C_{3-6} 碳环、具有一个或多个选自 N 、 O 、和 S 的杂原子的5元至14元杂芳基、 $-OR$ 、 $-O(CH_2)_nN(R)_2$ 、 $-C(O)OR$ 、 $-OC(O)R$ 、 $-CX_3$ 、 $-CX_2H$ 、 $-CXH_2$ 、 $-CN$ 、 $-C(O)N(R)_2$ 、 $-N(R)C(O)R$ 、 $-N(R)S(O)_2R$ 、 $-N(R)C(O)N(R)_2$ 、 $-N(R)C(S)N(R)_2$ 、 $-CRN(R)_2C(O)OR$ 、 $-N(R)R_8$ 、 $-O(CH_2)_nOR$ 、 $-N(R)C(=NR_9)N(R)_2$ 、 $-N(R)C(=CHR_9)N(R)_2$ 、 $-OC(O)N(R)_2$ 、 $-N(R)C(O)OR$ 、 $-N(OR)C(O)R$ 、 $-N(OR)S(O)_2R$ 、 $-N(OR)C(O)OR$ 、 $-N(OR)C(O)N(R)_2$ 、 $-N(OR)C(S)N(R)_2$ 、 $-N(OR)C(=NR_9)N(R)_2$ 、 $-N(OR)C(=CHR_9)N(R)_2$ 、 $-C(=NR_9)N(R)_2$ 、 $-C(=NR_9)R$ 、 $-C(O)N(R)OR$ 、和具有一个或多

个选自N、O、和S的杂原子的5元至14元杂环烷基,所述5元至14元杂环烷基被选自以下的一个或多个取代基取代:氧代(=O)、OH、氨基、单-或二-烷基氨基、和C₁₋₃烷基,并且每个n独立地选自1、2、3、4、和5;

[0038] 每个R₅独立地选自下组,该组由以下组成:C₁₋₃烷基、C₂₋₃烯基、和H;

[0039] 每个R₆独立地选自下组,该组由以下组成:C₁₋₃烷基、C₂₋₃烯基、和H;

[0040] M和M'独立地选自-C(O)O-、-OC(O)-、-C(O)N(R')-、-N(R')C(O)-、-C(O)-、-C(S)-、-C(S)S-、-SC(S)-、-CH(OH)-、-P(O)(OR')O-、-S(O)₂-、-S-S-、芳基基团、和杂芳基基团;

[0041] R₇选自下组,该组由以下组成:C₁₋₃烷基、C₂₋₃烯基、和H;

[0042] R₈选自下组,该组由以下组成:C₃₋₆碳环和杂环;

[0043] R₉选自下组,该组由以下组成:H、CN、NO₂、C₁₋₆烷基、-OR、-S(O)₂R、-S(O)₂N(R)₂、C₂₋₆烯基、C₃₋₆碳环和杂环;

[0044] 每个R独立地选自下组,该组由以下组成:C₁₋₃烷基、C₂₋₃烯基、和H;

[0045] 每个R'独立地选自下组,该组由以下组成:C₁₋₁₈烷基、C₂₋₁₈烯基、-R*YR''、-YR''、和H;

[0046] 每个R''独立地选自下组,该组由以下组成:C₃₋₁₄烷基和C₃₋₁₄烯基;

[0047] 每个R*独立地选自下组,该组由以下组成:C₁₋₁₂烷基和C₂₋₁₂烯基;

[0048] 每个Y独立地是C₃₋₆碳环;

[0049] 每个X独立地选自下组,该组由以下组成:F、Cl、Br、和I;并且

[0050] m选自5、6、7、8、9、10、11、12、和13,

[0051] 或其盐或异构体。

[0052] 在一些实施方案中,具有化学式(I)的化合物的子集包括以下那些,其中

[0053] R₁选自下组,该组由以下组成:C₅₋₃₀烷基、C₅₋₂₀烯基、-R*YR''、-YR''、和-R''M'R';

[0054] R₂和R₃独立地选自下组,该组由以下组成:H、C₁₋₁₄烷基、C₂₋₁₄烯基、-R*YR''、-YR''、和-R*OR'',或R₂和R₃连同它们所附接的原子一起形成杂环或碳环;

[0055] R₄选自下组,该组由以下组成:C₃₋₆碳环、-(CH₂)_nQ、-(CH₂)_nCHQR、-CHQR、-CQ(R)₂、和未取代的C₁₋₆烷基,其中Q选自C₃₋₆碳环、具有一个或多个选自N、O、和S的杂原子的5元至14元杂环、-OR、-O(CH₂)_nN(R)₂、-C(O)OR、-OC(O)R、-CX₃、-CX₂H、-CXH₂、-CN、-C(O)N(R)₂、-N(R)C(O)R、-N(R)S(O)₂R、-N(R)C(O)N(R)₂、-N(R)C(S)N(R)₂、-CRN(R)₂C(O)OR、-N(R)R₈、-O(CH₂)_nOR、-N(R)C(=NR₉)N(R)₂、-N(R)C(=CHR₉)N(R)₂、-OC(O)N(R)₂、-N(R)C(O)OR、-N(OR)C(O)R、-N(OR)S(O)₂R、-N(OR)C(O)OR、-N(OR)C(O)N(R)₂、-N(OR)C(S)N(R)₂、-N(OR)C(=NR₉)N(R)₂、-N(OR)C(=CHR₉)N(R)₂、-C(=NR₉)R、-C(O)N(R)OR、和-C(=NR₉)N(R)₂,并且每个n独立地选自1、2、3、4、和5;并且当Q是5元至14元杂环并且(i) R₄是-(CH₂)_nQ(其中n是1或2)或(ii) R₄是-(CH₂)_nCHQR(其中n是1)或(iii) R₄是-CHQR和-CQ(R)₂时,则Q是5元至14元杂芳基或8元至14元杂环烷基;

[0056] 每个R₅独立地选自下组,该组由以下组成:C₁₋₃烷基、C₂₋₃烯基、和H;

[0057] 每个R₆独立地选自下组,该组由以下组成:C₁₋₃烷基、C₂₋₃烯基、和H;

[0058] M和M'独立地选自-C(O)O-、-OC(O)-、-C(O)N(R')-、-N(R')C(O)-、-C(O)-、-C(S)-、-C(S)S-、-SC(S)-、-CH(OH)-、-P(O)(OR')O-、-S(O)₂-、-S-S-、芳基基团、和杂芳基基团;

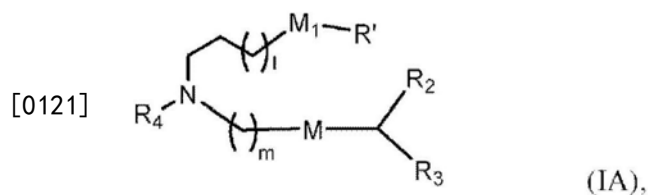
- [0059] R₇选自下组,该组由以下组成:C₁₋₃烷基、C₂₋₃烯基、和H;
- [0060] R₈选自下组,该组由以下组成:C₃₋₆碳环和杂环;
- [0061] R₉选自下组,该组由以下组成:H、CN、NO₂、C₁₋₆烷基、-OR、-S(O)₂R、-S(O)₂N(R)₂、C₂₋₆烯基、C₃₋₆碳环和杂环;
- [0062] 每个R独立地选自下组,该组由以下组成:C₁₋₃烷基、C₂₋₃烯基、和H;
- [0063] 每个R'独立地选自下组,该组由以下组成:C₁₋₁₈烷基、C₂₋₁₈烯基、-R*YR''、-YR''、和H;
- [0064] 每个R''独立地选自下组,该组由以下组成:C₃₋₁₄烷基和C₃₋₁₄烯基;
- [0065] 每个R*独立地选自下组,该组由以下组成:C₁₋₁₂烷基和C₂₋₁₂烯基;
- [0066] 每个Y独立地是C₃₋₆碳环;
- [0067] 每个X独立地选自下组,该组由以下组成:F、Cl、Br、和I;并且
- [0068] m选自5、6、7、8、9、10、11、12、和13,
- [0069] 或其盐或异构体。
- [0070] 在一些实施方案中,具有化学式(I)的化合物的子集包括以下那些,其中
- [0071] R₁选自下组,该组由以下组成:C₅₋₃₀烷基、C₅₋₂₀烯基、-R*YR''、-YR''、和-R''M'R';
- [0072] R₂和R₃独立地选自下组,该组由以下组成:H、C₁₋₁₄烷基、C₂₋₁₄烯基、-R*YR''、-YR''、和-R*OR'',或R₂和R₃连同它们所附接的原子一起形成杂环或碳环;
- [0073] R₄选自下组,该组由以下组成:C₃₋₆碳环、-(CH₂)_nQ、-(CH₂)_nCHQR、-CHQR、-CQ(R)₂、和未取代的C₁₋₆烷基,其中Q选自C₃₋₆碳环、具有一个或多个选自N、O、和S的杂原子的5元至14元杂芳基、-OR、-O(CH₂)_nN(R)₂、-C(O)OR、-OC(O)R、-CX₃、-CX₂H、-CXH₂、-CN、-C(O)N(R)₂、-N(R)C(O)R、-N(R)S(O)₂R、-N(R)C(O)N(R)₂、-N(R)C(S)N(R)₂、-CRN(R)₂C(O)OR、-N(R)R₈、-O(CH₂)_nOR、-N(R)C(=NR₉)N(R)₂、-N(R)C(=CHR₉)N(R)₂、-OC(O)N(R)₂、-N(R)C(O)OR、-N(OR)C(O)R、-N(OR)S(O)₂R、-N(OR)C(O)OR、-N(OR)C(O)N(R)₂、-N(OR)C(S)N(R)₂、-N(OR)C(=NR₉)N(R)₂、-N(OR)C(=CHR₉)N(R)₂、-C(=NR₉)R、-C(O)N(R)OR、和-C(=NR₉)N(R)₂,并且每个n独立地选自1、2、3、4、和5;
- [0074] 每个R₅独立地选自下组,该组由以下组成:C₁₋₃烷基、C₂₋₃烯基、和H;
- [0075] 每个R₆独立地选自下组,该组由以下组成:C₁₋₃烷基、C₂₋₃烯基、和H;
- [0076] M和M'独立地选自-C(O)O-、-OC(O)-、-C(O)N(R')-、-N(R')C(O)-、-C(O)-、-C(S)-、-C(S)S-、-SC(S)-、-CH(OH)-、-P(O)(OR')O-、-S(O)₂-、-S-S-、芳基基团、和杂芳基基团;
- [0077] R₇选自下组,该组由以下组成:C₁₋₃烷基、C₂₋₃烯基、和H;
- [0078] R₈选自下组,该组由以下组成:C₃₋₆碳环和杂环;
- [0079] R₉选自下组,该组由以下组成:H、CN、NO₂、C₁₋₆烷基、-OR、-S(O)₂R、-S(O)₂N(R)₂、C₂₋₆烯基、C₃₋₆碳环和杂环;
- [0080] 每个R独立地选自下组,该组由以下组成:C₁₋₃烷基、C₂₋₃烯基、和H;
- [0081] 每个R'独立地选自下组,该组由以下组成:C₁₋₁₈烷基、C₂₋₁₈烯基、-R*YR''、-YR''、和H;
- [0082] 每个R''独立地选自下组,该组由以下组成:C₃₋₁₄烷基和C₃₋₁₄烯基;
- [0083] 每个R*独立地选自下组,该组由以下组成:C₁₋₁₂烷基和C₂₋₁₂烯基;
- [0084] 每个Y独立地是C₃₋₆碳环;
- [0085] 每个X独立地选自下组,该组由以下组成:F、Cl、Br、和I;并且

- [0086] m选自5、6、7、8、9、10、11、12、和13，
- [0087] 或其盐或异构体。
- [0088] 在一些实施方案中，具有化学式(I)的化合物的子集包括以下那些，其中
- [0089] R_1 选自下组，该组由以下组成： C_{5-30} 烷基、 C_{5-20} 烯基、 $-R^*YR''$ 、 $-YR''$ 、和 $-R''M'R'$ ；
- [0090] R_2 和 R_3 独立地选自下组，该组由以下组成： H 、 C_{2-14} 烷基、 C_{2-14} 烯基、 $-R^*YR''$ 、 $-YR''$ 、和 $-R^*OR''$ ，或 R_2 和 R_3 连同它们所附接的原子一起形成杂环或碳环；
- [0091] R_4 是 $-(CH_2)_nQ$ 或 $-(CH_2)_nCHQR$ ，其中 Q 是 $-N(R)_2$ ，并且 n 选自3、4、和5；
- [0092] 每个 R_5 独立地选自下组，该组由以下组成： C_{1-3} 烷基、 C_{2-3} 烯基、和 H ；
- [0093] 每个 R_6 独立地选自下组，该组由以下组成： C_{1-3} 烷基、 C_{2-3} 烯基、和 H ；
- [0094] M 和 M' 独立地选自 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-C(O)N(R')$ 、 $-N(R')C(O)-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-C(S)S-$ 、 $-SC(S)-$ 、 $-CH(OH)-$ 、 $-P(O)(OR')O-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S-S-$ 、芳基基团、和杂芳基基团；
- [0095] R_7 选自下组，该组由以下组成： C_{1-3} 烷基、 C_{2-3} 烯基、和 H ；
- [0096] 每个 R 独立地选自下组，该组由以下组成： C_{1-3} 烷基、 C_{2-3} 烯基、和 H ；
- [0097] 每个 R' 独立地选自下组，该组由以下组成： C_{1-18} 烷基、 C_{2-18} 烯基、 $-R^*YR''$ 、 $-YR''$ 、和 H ；
- [0098] 每个 R'' 独立地选自下组，该组由以下组成： C_{3-14} 烷基和 C_{3-14} 烯基；
- [0099] 每个 R^* 独立地选自下组，该组由以下组成： C_{1-12} 烷基和 C_{1-12} 烯基；
- [0100] 每个 Y 独立地是 C_{3-6} 碳环；
- [0101] 每个 X 独立地选自下组，该组由以下组成： F 、 Cl 、 Br 、和 I ；并且
- [0102] m选自5、6、7、8、9、10、11、12、和13，
- [0103] 或其盐或异构体。
- [0104] 在一些实施方案中，具有化学式(I)的化合物的子集包括以下那些，其中
- [0105] R_1 选自下组，该组由以下组成： C_{5-30} 烷基、 C_{5-20} 烯基、 $-R^*YR''$ 、 $-YR''$ 、和 $-R''M'R'$ ；
- [0106] R_2 和 R_3 独立地选自下组，该组由以下组成： C_{1-14} 烷基、 C_{2-14} 烯基、 $-R^*YR''$ 、 $-YR''$ 、和 $-R^*OR''$ ，或 R_2 和 R_3 连同它们所附接的原子一起形成杂环或碳环；
- [0107] R_4 选自下组，该组由以下组成： $-(CH_2)_nQ$ 、 $-(CH_2)_nCHQR$ 、 $-CHQR$ 、和 $-CQ(R)_2$ ，其中 Q 是 $-N(R)_2$ ，并且 n 选自1、2、3、4、和5；
- [0108] 每个 R_5 独立地选自下组，该组由以下组成： C_{1-3} 烷基、 C_{2-3} 烯基、和 H ；
- [0109] 每个 R_6 独立地选自下组，该组由以下组成： C_{1-3} 烷基、 C_{2-3} 烯基、和 H ；
- [0110] M 和 M' 独立地选自 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-C(O)N(R')$ 、 $-N(R')C(O)-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-C(S)S-$ 、 $-SC(S)-$ 、 $-CH(OH)-$ 、 $-P(O)(OR')O-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S-S-$ 、芳基基团、和杂芳基基团；
- [0111] R_7 选自下组，该组由以下组成： C_{1-3} 烷基、 C_{2-3} 烯基、和 H ；
- [0112] 每个 R 独立地选自下组，该组由以下组成： C_{1-3} 烷基、 C_{2-3} 烯基、和 H ；
- [0113] 每个 R' 独立地选自下组，该组由以下组成： C_{1-18} 烷基、 C_{2-18} 烯基、 $-R^*YR''$ 、 $-YR''$ 、和 H ；
- [0114] 每个 R'' 独立地选自下组，该组由以下组成： C_{3-14} 烷基和 C_{3-14} 烯基；
- [0115] 每个 R^* 独立地选自下组，该组由以下组成： C_{1-12} 烷基和 C_{1-12} 烯基；
- [0116] 每个 Y 独立地是 C_{3-6} 碳环；
- [0117] 每个 X 独立地选自下组，该组由以下组成： F 、 Cl 、 Br 、和 I ；并且

[0118] m选自5、6、7、8、9、10、11、12、和13，

[0119] 或其盐或异构体。

[0120] 在其他实施方案中，具有化学式 (I) 的化合物的子集包括具有化学式 (IA) 的那些：



[0122] 或其盐或异构体，其中l是选自1、2、3、4、和5；m是选自5、6、7、8、和9；M₁是一个键或M'；R₄是未取代的C₁₋₃烷基或-(CH₂)_nQ，其中Q是OH、-NHC(S)N(R)₂、-NHC(O)N(R)₂、-N(R)C(O)R、-N(R)S(O)₂R、-N(R)R₈、-NHC(=NR₉)N(R)₂、-NHC(=CHR₉)N(R)₂、-OC(O)N(R)₂、-N(R)C(O)OR、杂芳基或杂环烷基；M和M'独立地选自-C(O)O-、-OC(O)-、-C(O)N(R')-、-P(O)(OR')O-、-S-S-、芳基基团、和杂芳基基团；并且R₂和R₃独立地选自下组，该组由以下组成：H、C₁₋₁₄烷基、和C₂₋₁₄烯基。

[0123] 在一些实施方案中，编码所述流感病毒抗原的所述mRNA以50微克的剂量存在于所述脂质纳米粒子中。在一些实施方案中，编码所述流感病毒抗原的所述mRNA以75微克的剂量存在于所述脂质纳米粒子中。在一些实施方案中，编码所述流感病毒抗原的所述mRNA以100微克的剂量存在于所述脂质纳米粒子中。

[0124] 在其他方面，在脂质纳米粒子中配制的所述疫苗包含编码流感病毒抗原的mRNA，其中编码所述流感病毒抗原的所述mRNA的剂量为50至100微克，并且其中所述疫苗产生保护性抗原特异性免疫应答，其中所述保护性抗原特异性免疫应答是由在所述人类受试者中产生比基线大至少2、3或4倍的中和抗体滴度确定的。

[0125] 在其他方面，本发明是一种诱导人类受试者中的抗原特异性免疫应答的方法，其包括向所述人类受试者施用在阳离子脂质纳米粒子内配制的10-100ug的剂量的核酸疫苗，所述核酸疫苗包含具有编码血凝素抗原的开放阅读框的RNA多核苷酸，其中诱导了保护性抗原特异性免疫应答。在一些实施方案中，所述核酸疫苗是一种如本文所述的疫苗。

[0126] 在一些实施方案中，所述保护性抗原特异性免疫应答是由在所述人类受试者中产生大于1:20的微量中和值确定的。在其他实施方案中，所述保护性抗原特异性免疫应答是由在所述人类受试者中产生比基线大至少2、3、或4倍的中和抗体滴度确定的。在其他实施方案中，所述保护性抗原特异性免疫应答是由在所述人类受试者中产生比基线大2-10倍的中和抗体滴度确定的。在又其他实施方案中，所述保护性抗原特异性免疫应答是由在所述人类受试者中产生至少1:40、1:60、1:80或1:90或在1:40与1:200之间的HAI滴度确定的。

[0127] 在一些实施方案中，所述保护性抗原特异性免疫应答是由在所述人类受试者中产生相对于基线HAI水平而言HAI水平至少4、5、或6倍的增加确定的。

[0128] 在其他实施方案中，所述产生抗原特异性免疫应答的方法涉及单次施用所述疫苗，并且其中以单次给药产生所述保护性免疫应答。

[0129] 在一些实施方案中，所述RNA多核苷酸由选自SEQ ID NO:3和5中任一个的核酸序列编码，并具有至少80% (例如，85%、90%、95%、98%、99%) 与这种核酸序列的同源性。

[0130] 在一些实施方案中，所述RNA多核苷酸是选自SEQ ID NO:2、6、7和8中任一个的核酸序列，并具有至少80% (例如，85%、90%、95%、98%、99%) 与这种核酸序列的同源性。

[0131] 在一些实施方案中,至少一种RNA多核苷酸编码与SEQ ID NO:1和4中任一个的氨基酸序列具有至少80%同一性的抗原性多肽。在一些实施方案中,至少一种RNA多核苷酸编码与SEQ ID No:1和4中任一个的氨基酸序列具有至少85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的抗原性多肽。

[0132] 在本文所述的实施方案的任一个中,它们编码的所述RNA多核苷酸和抗原可以进一步包含其他序列,例如,5'和3'非翻译区,一个或多个接头序列或一个或多个序列标签,如FLAG-标签和组氨酸标签。

[0133] 在一些实施方案中,编码流感多肽的开放阅读框是经密码子优化的。

[0134] 本公开的一些实施方案提供一种流感疫苗的用途,所述流感疫苗包括至少一种具有编码至少一种流感抗原性多肽或其免疫原性片段的开放阅读框的核糖核酸(RNA)多核苷酸,其中所述开放阅读框中至少80%(例如,85%、90%、95%、98%、99%、100%)的尿嘧啶具有化学修饰,任选其中所述疫苗在脂质纳米粒子中配制。在一些实施方案中,开放阅读框中100%的尿嘧啶具有化学修饰。在一些实施方案中,化学修饰在尿嘧啶的第5位。在一些实施方案中,化学修饰是N1-甲基假尿苷。在一些实施方案中,化学修饰是N1-乙基假尿苷。

[0135] 本公开的一些实施方案提供了在阳离子脂质纳米粒子内配制的流感疫苗的使用方法。在一些实施方案中,阳离子脂质纳米粒子包含阳离子脂质、经PEG修饰的脂质、固醇和非阳离子脂质。

[0136] 在一些实施方案中,阳离子脂质纳米粒子具有按摩尔比计约20%-60%阳离子脂质、约5%-25%非阳离子脂质、约25%-55%固醇和约0.5%-15%经PEG修饰脂质。在一些实施方案中,纳米粒子具有小于0.4的多分散性值。在一些实施方案中,纳米粒子在中性pH下具有净中性电荷。在一些实施方案中,纳米粒子的平均直径为50-200nm。

[0137] 本公开的一些实施方案提供了诱导受试者中的抗原特异性免疫应答的方法,所述方法包括以有效于产生抗原特异性免疫应答的量向所述受试者施用流感RNA疫苗。在一些实施方案中,抗原特异性免疫应答包括T细胞应答或B细胞应答。在一些实施方案中,抗原特异性免疫应答包括T细胞应答和B细胞应答。在一些实施方案中,产生抗原特异性免疫应答的方法涉及单次施用所述疫苗。在一些实施方案中,方法还包括向受试者施用加强剂量的所述疫苗。在一些实施方案中,通过皮内或肌内注射向受试者施用疫苗。

[0138] 本文还提供了流感RNA疫苗,其用于在诱导受试者中的抗原特异性免疫应答的方法中使用,所述方法包括以有效于产生抗原特异性免疫应答的量向受试者施用所述疫苗。

[0139] 本文进一步提供了流感RNA疫苗在制造用于在诱导受试者中的抗原特异性免疫应答的方法中使用的药剂的用途,所述方法包括以有效于产生抗原特异性免疫应答的量向受试者施用所述疫苗。

[0140] 本文进一步提供了预防或治疗流感感染的方法,包括向受试者施用如本公开中所述的疫苗。

[0141] 本文披露的流感疫苗可以以在受试者中有效于产生抗原特异性免疫应答的量配制。

[0142] 在一些实施方案中,受试者中产生的抗流感抗原性多肽抗体滴度相对于对照增加至少1 log。在一些实施方案中,受试者中产生的抗流感抗原性多肽抗体滴度相对于对照增加1-3 log。在一些实施方案中,受试者中产生的抗流感抗原性多肽抗体滴度相对于对照增

加至少2倍。在一些实施方案中,受试者中产生的抗流感抗原性多肽抗体滴度相对于对照增加至少5倍。在一些实施方案中,受试者中产生的抗流感抗原性多肽抗体滴度相对于对照增加至少10倍。在一些实施方案中,受试者中产生的抗流感抗原性多肽抗体滴度相对于对照增加2-10倍。

[0143] 在一些实施方案中,对照是在尚未被施用流感疫苗的受试者中产生的抗流感抗原性多肽抗体滴度。

[0144] 在一些实施方案中,对照是在已被施用减毒活疫苗或灭活流感疫苗的受试者中产生的抗流感抗原性多肽抗体滴度。

[0145] 在一些实施方案中,对照是在已被施用重组或纯化流感蛋白疫苗的受试者中产生的抗流感抗原性多肽抗体滴度。

[0146] 在一些实施方案中,有效量是相当于重组流感蛋白疫苗的护理标准剂量降低至少2倍的剂量,并且其中在受试者中产生的抗流感抗原性多肽抗体滴度相当于在被施用护理标准剂量的重组或纯化流感蛋白疫苗或减毒活流感疫苗或灭活流感疫苗的对照受试者中产生的抗流感抗原性多肽抗体滴度。

[0147] 在一些实施方案中,有效量是相当于重组流感蛋白疫苗的护理标准剂量降低至少4倍的剂量,并且其中在受试者中产生的抗流感抗原性多肽抗体滴度相当于在被施用护理标准剂量的重组或纯化流感蛋白疫苗或减毒活流感疫苗或灭活流感疫苗的对照受试者中产生的抗流感抗原性多肽抗体滴度。

[0148] 在一些实施方案中,有效量是相当于重组流感蛋白疫苗的护理标准剂量降低至少10倍的剂量,并且其中在受试者中产生的抗流感抗原性多肽抗体滴度相当于在被施用护理标准剂量的重组或纯化流感蛋白疫苗或减毒活流感疫苗或灭活流感疫苗的对照受试者中产生的抗流感抗原性多肽抗体滴度。

[0149] 在一些实施方案中,有效量是相当于重组流感蛋白疫苗的护理标准剂量降低至少100倍的剂量,并且其中在受试者中产生的抗流感抗原性多肽抗体滴度相当于在被施用护理标准剂量的重组或纯化流感蛋白疫苗或减毒活流感疫苗或灭活流感疫苗的对照受试者中产生的抗流感抗原性多肽抗体滴度。

[0150] 在一些实施方案中,有效量是相当于重组流感蛋白疫苗的护理标准剂量降低至少1000倍的剂量,并且其中在受试者中产生的抗流感抗原性多肽抗体滴度相当于在被施用护理标准剂量的重组或纯化流感蛋白疫苗或减毒活流感疫苗或灭活流感疫苗的对照受试者中产生的抗流感抗原性多肽抗体滴度。

[0151] 在一些实施方案中,有效量是相当于重组流感蛋白疫苗的护理标准剂量降低2-1000倍的剂量,并且其中在受试者中产生的抗流感抗原性多肽抗体滴度相当于在被施用护理标准剂量的重组或纯化流感蛋白疫苗或减毒活流感疫苗或灭活流感疫苗的对照受试者中产生的抗流感抗原性多肽抗体滴度。

[0152] 在一些实施方案中,有效量是50-1000 μ g的总剂量。在一些实施方案中,有效量是100 μ g的总剂量。在一些实施方案中,有效量是总计两次向受试者施用的25 μ g的剂量。在一些实施方案中,有效量是总计两次向受试者施用的100 μ g的剂量。在一些实施方案中,有效量是总计两次向受试者施用的400 μ g的剂量。在一些实施方案中,有效量是总计两次向受试者施用的500 μ g的剂量。

[0153] 在一些实施方案中,有效量是1-100 μ g的总剂量。在一些实施方案中,有效量是100 μ g的总剂量。在一些实施方案中,有效量是总计一次或两次向受试者施用的25 μ g的剂量。在一些实施方案中,有效量是总计两次向受试者施用的100 μ g的剂量。在一些实施方案中,有效量是可以总计一次或两次或更多次向受试者施用的1 μ g-10 μ g、1 μ g-20 μ g、1 μ g-30 μ g、5 μ g-10 μ g、5 μ g-20 μ g、5 μ g-30 μ g、5 μ g-40 μ g、5 μ g-50 μ g、10 μ g-15 μ g、10 μ g-20 μ g、10 μ g-25 μ g、10 μ g-30 μ g、10 μ g-40 μ g、10 μ g-50 μ g、10 μ g-60 μ g、15 μ g-20 μ g、15 μ g-25 μ g、15 μ g-30 μ g、15 μ g-40 μ g、15 μ g-50 μ g、20 μ g-25 μ g、20 μ g-30 μ g、20 μ g-40 μ g、20 μ g-50 μ g、20 μ g-60 μ g、20 μ g-70 μ g、20 μ g-75 μ g、30 μ g-35 μ g、30 μ g-40 μ g、30 μ g-45 μ g、30 μ g-50 μ g、30 μ g-60 μ g、30 μ g-70 μ g、30 μ g-75 μ g的剂量。

[0154] 本发明的各个方面提供包含一种或多种具有编码第一抗原性多肽的开放阅读框的RNA多核苷酸的核酸疫苗,其中所述RNA多核苷酸存在于用于体内向宿主施用的配制品中,这对可接受百分比的人类受试者而言,赋予优于针对第一抗原的血清保护的标准的抗体滴度。在一些实施方案中,由本发明的mRNA疫苗产生的抗体滴度是中和抗体滴度。在一些实施方案中,中和抗体滴度大于蛋白疫苗。在其他实施方案中,由本发明的mRNA疫苗产生的中和抗体滴度大于佐剂化蛋白疫苗。在又其他实施方案中,由本发明的mRNA疫苗产生的中和抗体滴度是1,000-10,000、1,200-10,000、1,400-10,000、1,500-10,000、1,000-5,000、1,000-4,000、1,800-10,000、2000-10,000、2,000-5,000、2,000-3,000、2,000-4,000、3,000-5,000、3,000-4,000、或2,000-2,500。典型地将中和滴度表示为实现血小板数目降低50%所需的最高血清稀释度。

[0155] 在优选方面,本发明的疫苗(例如,LNP包封的mRNA疫苗)在已接种疫苗受试者的血液或血清中产生预防有效和/或治疗有效的抗原特异性抗体水平、浓度和/或滴度。如本文所定义,术语抗体滴度是指在受试者(例如人类受试者)中产生的抗原特异性抗体的量。在示例性实施方案中,将抗体滴度表示为仍然产生阳性结果的最大稀释度(在连续稀释中)的倒数。在示例性实施方案中,通过酶联免疫吸附测定(ELISA)来测定或测量抗体滴度。在示例性实施方案中,通过中和测定,例如通过微量中和测定来测定或测量抗体滴度。在某些方面,将抗体滴度测量结果表示为比率,如1:40、1:100等。

[0156] 在本发明的示例性实施方案中,高效疫苗产生大于1:40、大于1:100、大于1:400、大于1:1000、大于1:2000、大于1:3000、大于1:4000、大于1:500、大于1:6000、大于1:7500、大于1:10000的抗体滴度。在示例性实施方案中,截至疫苗接种后10天,截至疫苗接种后20天,截至疫苗接种后30天,截至疫苗接种后40天或截至疫苗接种后50天或更多天,产生或达到所述抗体滴度。在示例性实施方案中,在向受试者施用单剂疫苗后,产生或达到所述滴度。在其他实施方案中,在多次剂量后,例如在第一剂和第二剂(例如加强剂量)后,产生或达到所述滴度。

[0157] 在本发明的示例性方面,抗原特异性抗体以 μ g/ml的单位计量或以IU/L(国际单位/升)或mIU/ml(毫国际单位/每毫升)的单位计量。在本发明的示例性实施方案中,高效疫苗产生 $>0.5\mu$ g/ml、 $>0.1\mu$ g/ml、 $>0.2\mu$ g/ml、 $>0.35\mu$ g/ml、 $>0.5\mu$ g/ml、 $>1\mu$ g/ml、 $>2\mu$ g/ml、 $>5\mu$ g/ml或 $>10\mu$ g/ml。在本发明的示例性实施方案中,高效疫苗产生 >10 mIU/ml、 >20 mIU/ml、 >50 mIU/ml、 >100 mIU/ml、 >200 mIU/ml、 >500 mIU/ml或 >1000 mIU/ml。在示例性实施方案中,截至疫苗接种后10天,截至疫苗接种后20天,截至疫苗接种后30天,截至疫

苗接种后40天或截至疫苗接种后50天或更多天,产生或达到所述抗体水平或浓度。在示例性实施方案中,在向受试者施用单剂疫苗后,产生或达到所述水平或浓度。在其他实施方案中,在多次剂量后,例如在第一剂和第二剂(例如加强剂量)后,产生或达到所述水平或浓度。在示例性实施方案中,通过酶联免疫吸附测定(ELISA)来测定或测量抗体水平或浓度。在示例性实施方案中,通过中和测定,例如通过微量中和测定来测定或测量抗体水平或浓度。

[0158] 本发明的每个限制条件可涵盖本发明的多个实施方案。因此,可预期本发明的涉及任一个元素或元素组合的每个限制条件可包括在本发明的每个方面中。本发明不限制其应用于以下说明中所阐述或附图中所示的构建细节和组分安排。本发明可以具有其他实施方案,且可以按多种方式实施或实行。这些和其他实施方案和方面将在本文中更详细地讨论。

附图说明

[0159] 图1:示出了100 μ g肌肉内(IM)同期组群中1期试验结果的图。

[0160] 图2:示出了基于微量中和(MN)的100 μ g肌肉内(IM)同期组群中1期试验结果的图。

[0161] 图3:示出了基于血凝抑制(HAI)的125 μ g肌肉内(IM)2剂同期组群中1期试验结果的图。

[0162] 图4:示出了基于微量中和(MN)的100 μ g肌肉内(IM)同期组群中1期试验结果的图。

[0163] 图5:长期疫苗接种研究的时间线和示出结果的图。

具体实施方式

[0164] 尽管已经尝试生产功能性RNA疫苗,包括mRNA疫苗和自我复制的RNA疫苗,但尚未开发出在人类中以安全治疗剂量产生有效保护性免疫应答的RNA疫苗。十分令人惊讶的是,本发明者发现了治疗有效的mRNA疫苗,所述疫苗以出乎意料的低剂量产生确定的保护性免疫应答。疫苗产生显著增强的并在许多方面具有协同作用的免疫应答,包括增强的血凝素抗原产生和具有中和能力的功能性抗体产生。即使当施用相较于在其他类别的基于脂质的配制品中使用的mRNA剂量显著更低的剂量的mRNA时,也可实现这些结果。本发明的配制品已证明显著出乎意料的体内免疫应答,其足以确定作为预防剂和治疗剂的功能性mRNA疫苗的功效。

[0165] 在一些方面,本发明涉及编码H7或H10抗原并在脂质纳米粒子(LNP)配制品中配制的RNA以出乎意料的低剂量产生保护性免疫应答的惊人发现。使用若干不同剂量,在人类受试者中考查在LNP中配制的H7或H10抗原mRNA疫苗的功效。本文呈现的结果证明在LNP中配制的mRNA疫苗具有超过其他mRNA疫苗的出乎意料的优越功效,即使在极低剂量如25微克下,其用于研究啮齿动物中的疫苗功效。在这些剂量和更高剂量下产生的保护性免疫应答水平高于在比较研究中对市售疫苗观察到的水平。

[0166] 实施例中显示的数据证明,在人类受试者中观察到显著较强的免疫应答(通过病毒中和测定和HA抑制(HAI)的抗病毒活性),即使是在单一低剂量抗原之后。在单次或双剂施用若干剂量时,获得大于40的HAI滴度,这是被认为足以保护免受致命的流感攻击的剂量。在H7N9期I期试验中,接受2剂25微克的IM组中高达96%的受试者显示出增强的保护作

用。

[0167] H7N9的示例性RNA序列是SEQ ID NO:7的序列:AUGAAUACCCAGAUUCUCGUGUUCGCCCCAUCGCUAUCAUCCCAACCAAUGCCGACAAGAUCUGCUUGGGUCAUCAUGCGGUGUCGAACGGAACCAAGGUCAACACCCUGACCGAGCGGGGAGUGGAAGUGGUCAACGCUACUGAAACGGUGGAAAGGACUAAUAUCCCACGCAUCUGCUCAAAGGGAAAGAAAACUGUGGAUCUCGGACAGUGUGGACUUCUGGGGACCAUCACGGGUCCACCGCAAUGCGAUAGUUUCUGGAGUUCAGCGCAGAUUCUGAUCAUCGAGCGCAGAGAAGGGUCCGACGUUUGUUACCCUGGAAAGUUCGUGAACGAAGAGGCACUGCGCCAAAUCUUGCGGGAGAGCGGCGGCAUUGACAAAAGAGGCCAUGGGAUUCACCUACUCGGGUAUUCGCACUAACGGUGCCACUUCUGCGUGCCGGCGUUCGGGUCCUCCUUCUAUGCCGAGAUGAAGUGGCUCUUGUGCAACACCGACAACGCAGCUUUUCCGCAAUGACUAAGUCCUACAAAAACACUAGAAAGUCGCCGGCACUGAUCGUCUGGGGAAUCCAUCACUCCGUGUCUACUGCGGAGCAAACUAAGCUGUACGGCAGCGGAAACAAGCUCGUGACCGUCGGUUAUCGAACUACCAGCAGAGCUUUGUGCCAAGCCCCGAGCGAGGCCCCAGGUCAACGGGCAGAGCGGACGCAUCGACUCCACUGGCUGAUGCUCUAAUCCGAAUGACACCGUGACCUUCUCGUUCAAUGGCGCCUUAUCGCACCUGACCGCGCCAGCUUCCUGAGAGGAAAGUCAUUGGGCAUACAGUCGGGCGUCCAAGUGGAUGCCAACUGCGAGGGAGACUGCUAUCACUCCGGCGGAACCAUCAUCUCCA AUUUGCCGUUCAAACAUCGACUCGCGCGCAGUGGGAAAGUGUCCGCGAUACGUGAAGCAGAGAUACUGCUGCUGGCCACUGGGGAUGAAGAACGUGCCUGAAAUCCCGAAAGGAAGGGGUUGUUCGGCGCUAUUGCGGGCUUCAUCGAAAACGGAUGGGAGGGGCUCAUCGAUGGUUGGUACGGAUUCAGGCACCAGAACGCGCAGGGGGAAAGGAACGGCCGCGAUUACAAGUCAACUCAAUCGGCCAUGACCAAUACUGGCAAACUGAAUCGCCUGAUCGAAAAGACCAAUCAGCAGUUUGAGUUGAUCGACAACGAAUUAACGAAGUGGAGAAACAGAUUGGCAAUGUCAUCAAUUGGACCAGAGAUAGCAUCACGGAAGUCUGGUCGUACAACGCCGAACUCCUGGUUGCGAUGGAAAAUCAACACACCAUCGACCUGGCCGACUCCGAAAUGGACAAACUCUACGAGCGGGUCAACGCCAGCUGCGCGAAAACGCAGAAGAAGAUUGGAACCGGAUGCUUCGAGAUUUUCAUAAGUGCGACGACGAUUGCAUGGCCAGCAUCCGGAACAAUACCUACGAUCACUCCAAGUACCGGGAGGAAGCGAUGCAAAAUCGGAUCCAGAUUGACCCGGUCAAACUGUCGUCAGGCUACAAGGAUGUGAUCCUUGGUUCUCAUUCGGAGCGUCCUGUUUUAUCCUUCUGGCUAUUGUGAUGGGCCUGGUGUUAUCUGCGUGAAGAACGGAACAUGCGCUGCACUAUCUGCAUC。除了提供增强的免疫应答外,本发明的配制品在单剂量抗原后产生快速免疫应答。另外,已经在动物模型中证明了所述配制品可产生长时间的保护性应答。动物在其寿命的大部分时间内维持保护性应答,如本文提供的实施例中所示。

[0168] 本文描述的研究使用血清学方法如病毒中和和血凝抑制(HAI)来评估疫苗免疫原性。两种测定均基于抗体与流感主要表面糖蛋白血凝素(HA)的结合,并且被认为是用于预测疫苗功效的可靠方法。针对HA的中和抗体是针对流感的保护性免疫的主要介体。病毒中和可以最准确地回答个体是否具有可以中和给定病毒株感染性的抗体的问题。所述测定在检测流感病毒的抗体方面具有几个额外的优点。首先,它主要检测流感病毒HA蛋白的抗体,并因此可以鉴定人类和动物血清中的功能性毒株特异性抗体。

[0169] 因此,在一些实施方案中,本发明是一种通过施用编码流感抗原的mRNA疫苗来治疗流感(预防性或治疗性)的方法。流感感染的症状包括干咳、发烧、发冷、进展为呼吸衰竭的肌痛以及继发性细菌感染(例如,MRSA)的风险。季节性流感是普遍存在的并且由三种主要毒株(A[H1N1]、A[H3N2]和B)组成,这些毒株被每年疫苗涵盖。大流行性流感发生是因为病毒的独特重配能力,从而允许抗原性转变以及禽流感毒株与猪流感毒株之间的转移。东南亚新出现的一个新的担忧是若干新毒株的大流行潜力。这种大流行爆发具有高死亡率,

几乎没有可用治疗。抗病毒仅提供症状缓解并且必须在前48小时内给予。

[0170] 在一些实施方案中,mRNA疫苗可用于通过以非常快速的mRNA疫苗生产过程对新出现的新毒株做出反应来预防大流行性流感。用于治疗或预防性地预防流感爆发(包括新出现的毒株,例如H7N9和H10N8)的新mRNA疫苗可在少于六周内(从抗原鉴别时间到可用疫苗)产生。

[0171] 在一些实施方案中,单次注射编码单一抗原的多核苷酸疫苗可以为整个流感季节提供保护。在其他实施方案中,疫苗接种可以保护个体数年或更久。在其他实施方案中,mRNA疫苗还可用于维持或恢复受试者或群体的抗原性记忆,作为疫苗接种计划的一部分。

[0172] 针对具有大流行潜力的毒株H10N8和H7N9的流感疫苗项目使用来自初试患者群体的流感靶标,并且1:40血凝抑制(HAI)滴度被FDA和WHO用来批准季节性流感疫苗。

[0173] 在一些实施方案中,病毒是甲型流感或乙型流感病或其组合的毒株。在一些实施方案中,甲型流感或乙型流感的毒株与鸟、猪、马、犬、人或非人灵长类动物相关。在一些实施方案中,抗原性多肽编码血凝素蛋白或其片段。在一些实施方案中,血凝素蛋白是H7或H10或其片段。在一些实施方案中,血凝素蛋白包含头部结构域(HA1)的一部分。在一些实施方案中,血凝素蛋白包含细胞质结构域的一部分。在一些实施方案中,截短血凝素蛋白。在一些实施方案中,蛋白质是截短血凝素蛋白,其包含跨膜结构域的一部分。在一些实施方案中,血凝素蛋白或其片段的氨基酸序列包含与SEQ ID NO.1或4的氨基酸序列中的任一个的至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性。在一些实施方案中,病毒选自由H7N9和H10N8组成的组。

[0174] 术语“多肽变体”是指在其氨基酸序列上与天然序列或参考序列不同的分子。与天然序列或参考序列相比,氨基酸序列变体可具有在氨基酸序列内的某些位置处的取代、缺失和/或插入。通常,变体与天然序列或参考序列具有至少50%同一性。在一些实施方案中,变体与天然序列或参考序列共享至少80%或至少90%同一性。

[0175] 在一些实施方案中,提供了“变体模拟物”。如本文所用,术语“变体模拟物”是含有至少一个将模拟活化序列的氨基酸的变体。例如,谷氨酸可以充当磷酸苏氨酸和/或磷酸丝氨酸的模拟物。可选地,变异模拟物可导致去活化,或导致含有所述模拟物的产物失活,例如,苯丙氨酸可充当酪氨酸的失活取代物;或丙氨酸可充当丝氨酸的失活取代物。

[0176] “直系同源物”是指不同物种中通过物种形成而从共同祖先基因进化的基因。通常,直系同源物在进化的过程中保留相同功能。鉴定直系同源物对于可靠预测新测序基因组中的基因功能是重要的。

[0177] “类似物”意在包括因一个或多个氨基酸改变(例如,氨基酸残基的取代、添加或缺失)而不同但仍维持亲本或起始多肽的一种或多种特性的多肽变体。

[0178] 本公开提供了基于多核苷酸或多肽的若干类型的组合物,包括变体和衍生物。这些包括例如取代性、插入性、缺失和共价变体及衍生物。术语“衍生物”与术语“变体”同义使用,但通常是指相对于参考分子或起始分子,已以任何方式修饰和/或改变的分子。

[0179] 因此,在本公开的范围内包括编码相对于参考序列含有取代、插入和/或添加、缺失和共价修饰的肽或多肽、特别是本文公开的多肽序列的多核苷酸。例如,可将序列标签或氨基酸(如一个或多个赖氨酸)添加至肽序列中(例如在N末端或C末端处)。序列标签可用于肽检测、纯化或定位。赖氨酸可用于使肽溶解性增加或允许生物素化。可选地,可任选使位

于肽或蛋白质的氨基酸序列的羧基和氨基末端区域处的氨基酸残基缺失,从而提供截短序列。可使某些氨基酸(例如,C末端或N末端残基)可选地缺失,这取决于序列的使用,如例如作为可溶的或连接至固体支持物的较大序列的一部分的序列的表达。

[0180] 当提及多肽时,“取代性变体”在涉及多肽时是天然或起始序列中至少一个氨基酸残基被移除并且不同氨基酸在同一位置被插入它原来位置的那些。取代可以是单一的,在这种情况下分子中的仅一个氨基酸被取代,或取代可以是多重的,在这种情况下同一分子中的两个或更多个氨基酸被取代。

[0181] 如本文所用,术语“保守性氨基酸取代”是指用具有类似尺寸、电荷或极性的不同氨基酸取代正常存在于序列中的氨基酸。保守性取代的例子包括将非极性(疏水性)残基如异亮氨酸、缬氨酸和亮氨酸取代成另一非极性残基。同样,保守性取代的例子包括将一个极性(亲水性)残基取代成另一残基,如在精氨酸与赖氨酸之间、在谷氨酰胺与天冬酰胺之间、以及在甘氨酸与丝氨酸之间的取代。另外,将碱性残基如赖氨酸、精氨酸或组氨酸取代成另一残基,或将一个酸性残基如天冬氨酸或谷氨酸取代成另一酸性残基是保守性取代的其他例子。非保守性取代的例子包括将非极性(疏水性)氨基酸残基如异亮氨酸、缬氨酸、亮氨酸、丙氨酸、甲硫氨酸取代成极性(亲水性)残基如半胱氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸或赖氨酸,和/或将极性残基取代成非极性残基。

[0182] “特征”在涉及多肽或多核苷酸时分别定义为分子的基于氨基酸序列或基于核苷酸的不同组分。由所述多核苷酸编码的多肽的特征包括表面表现形式、局部构象形状、折叠、环、半环、结构域、半结构域、位点、末端或其任何组合。

[0183] 如本文所用,当涉及多肽时,术语“结构域”是指多肽的具有一种或多种可鉴定结构或功能特征或特性(例如,结合能力,充当蛋白质-蛋白质相互作用的位点)的基序。

[0184] 如本文所用,当涉及多肽时,术语“位点”在涉及基于氨基酸的实施方案时与“氨基酸残基”和“氨基酸侧链”同义使用。如本文所用,当涉及多核苷酸时,术语“位点”在涉及基于核苷酸的实施方案时与“核苷酸”同义使用。位点代表肽或多肽或多核苷酸内的位置,其可在基于多肽或基于多核苷酸的分子内被修饰、操作、改变、衍生化或变化。

[0185] 如本文所用,术语“末端(termini或terminus)”在涉及多肽或多核苷酸时分别是指多肽或多核苷酸的尽头。所述尽头不仅仅限于多肽或多核苷酸的第一位点或最终位点,而还可包括在末端区域中的额外氨基酸或核苷酸。基于多肽的分子可被表征为具有N末端(由具有游离氨基(NH₂)的氨基酸封端)与C末端(由具有游离羧基(COOH)的氨基酸封端)两者。在一些情况下,蛋白质由以二硫键或以非共价力集合的多个多肽链组成(多聚体、寡聚物)。这些蛋白质具有多个N末端和C末端。可选地,可修饰所述多肽的末端以使它们视情况而定以基于非多肽的部分如有机缀合物开始或结束。

[0186] 如本领域技术人员所认识到的,蛋白质片段、功能性蛋白质结构域和同源性蛋白质也被视为在目的多肽的范围内。例如,本文提供长度是10、20、30、40、50、60、70、80、90、100或大于100个氨基酸的参考蛋白质的任何蛋白质片段(意指比参考多肽序列短至少一个氨基酸残基但其他地方相同的多肽序列)。在另一例子中,可根据本公开来利用包括与本文所述的任一序列具有40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或100%同一性的20、30、40、50或100个氨基酸链段的任何蛋白质。在一些实施方案中,多肽包括如任何本文提供或本文参考的序列中所示的2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个突变。

[0187] 在一些实施方案中,流感疫苗包含mRNA ORF,其具有通过本文提供的核酸序列(参见例如序列表)中的任一个识别的核苷酸序列,或具有与通过本文提供序列中的任一个识别的核苷酸序列有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的核苷酸序列。

[0188] 在一些实施方案中,流感疫苗包含mRNA ORF,其具有编码本文提供的氨基酸序列(参见例如序列表)中的任一个的核苷酸序列,或具有与编码本文提供的氨基酸序列中的任一个的核苷酸序列有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的核苷酸序列,或具有与编码所述氨基酸序列中的任一个的核苷酸序列相同或与其具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的核苷酸序列。

[0189] 本公开的多肽或多核苷酸分子可与参考分子(例如参考多肽或参考多核苷酸),例如与本领域所述的分子(例如工程化或设计的分子或野生型分子)共享某一程度的序列类似性或同一性。如本领域中已知的术语“同一性”是指两个或更多个多肽或多核苷酸的序列之间的关系,如通过将序列进行比较所确定。在本领域中,同一性也意指序列之间的相关性程度,如通过具有两个或更多个氨基酸残基或核酸残基的串之间的匹配数所确定。同一性测量两个或更多个序列中的较小者的相同匹配的百分比,采用通过特定数学模型或计算机程序(例如“算法”)处理的空位比对(如果有的话)。相关肽的同一性可易于通过已知方法来计算。“同一性%”在它适用于多肽或多核苷酸序列时定义为在比对序列以及必要时引入空位以实现最大同一性百分比之后,候选氨基酸或核酸序列中与第二序列的氨基酸序列或核酸序列中的残基相同的残基(氨基酸残基或核酸残基)的百分比。用于比对的方法和计算机程序在本领域中是熟知的。应当理解,同一性取决于对同一性百分比的计算,但可由于在计算中引入的空位和罚分而在数值上不同。通常,特定多核苷酸或多肽的变体与特定参考多核苷酸或多肽具有至少40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%但小于100%序列同一性,如通过本文所述以及本领域技术人员已知的序列比对程序和参数所确定。所述比对工具包括BLAST套件的那些(Stephen F. Altschul等人(1997),“Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs”, *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402)。另一普及局部比对技术基于Smith-Waterman算法(Smith, T.F. & Waterman, M.S. (1981) “Identification of common molecular subsequences.” *J. Mol. Biol.* 147:195-197)。基于动态编程的通用全局比对技术是Needleman-Wunsch算法(Needleman, S.B. & Wunsch, C.D. (1970) “A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequences of two proteins.” *J. Mol. Biol.* 48:443-453)。新近开发了快速最优全局序列比对算法(FOGSAA),其据称比包括Needleman-Wunsch算法的其他最优全局比对方法更快产生对核苷酸和蛋白质序列的全局比对。本文描述了其他工具,具体来说,在以下关于“同一性”的定义中描述。

[0190] 如本文所用,术语“同源性”是指聚合物分子之间例如核酸分子(例如DNA分子和/或RNA分子)之间和/或多肽分子之间的总体相关性。共享通过比对匹配残基确定的阈值水平的类似性或同一性的聚合分子(例如核酸分子(例如DNA分子和/或RNA分子)和/或多肽分子)被称为同源。同源性是描述分子之间的关系的定性术语,并且可基于定量类似性或同一

性。类似性或同一性是确定两个所比较序列之间的序列匹配程度的定量术语。在一些实施方案中,如果聚合分子序列至少25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%相同或类似,那么它们被视为彼此“同源”。术语“同源”必须是指至少两个序列(多核苷酸或多肽序列)之间的比较。如果两个多核苷酸序列编码的多肽就至少一个具有至少20个氨基酸的链段来说至少50%、60%、70%、80%、90%、95%或甚至99%相同,那么它们被视为同源。在一些实施方案中,同源性多核苷酸序列的特征在于编码具有至少4-5个独特的指定氨基酸的链段的能力。对于长度小于60个核苷酸的多核苷酸序列,同源性通过编码具有至少4-5个独特的指定氨基酸的链段的能力来确定。如果两个蛋白质就至少一个具有至少20个氨基酸的链段来说至少50%、60%、70%、80%或90%相同,那么所述两个蛋白质序列被视为同源。

[0191] 同源性暗示所比较序列在进化中从共同来源分化。术语“同源物”是指由于从共同祖先序列遗传而与第二氨基酸序列或核酸序列相关的第一氨基酸序列或核酸序列(例如基因(DNA或RNA)或蛋白质序列)。术语“同源物”可适用于通过物种形成事件而分开的基因和/或蛋白质之间的关系,或适用于通过遗传加倍事件而分开的基因和/或蛋白质之间的关系。“直系同源物”是不同物种中通过物种形成而从共同祖先基因(或蛋白质)进化的基因(或蛋白质)。典型地,直系同源物在进化的过程中保留相同功能。“旁系同源物”是由于基因组内的加倍而相关的基因(或蛋白质)。直系同源物在进化的过程中保留相同功能,而旁系同源物进化出新功能,即使这些功能与原始功能相关。

[0192] 术语“同一性”是指聚合分子之间例如多核苷酸分子(例如DNA分子和/或RNA分子)之间和/或多肽分子之间的总体相关性。对两个多核酸序列的同一性百分比的计算例如可通过出于最优比较目的比对两个序列来进行(例如可在第一核酸序列和第二核酸序列中的一者或两者中引入空位以达成最优比对,并且可出于比较目的而忽视非相同序列)。在某些实施方案中,出于比较目的而对齐的序列的长度是参考序列的长度的至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%或100%。然后比较在相应核苷酸位置处的核苷酸。当第一序列中的位置由与第二序列中的相应位置相同的核苷酸占据时,则所述分子在该位置处是相同的。两个序列之间的同一性百分比是在考虑需要被引入以达成两个序列的最优比对的空位的数目和各空位的长度的情况下,由所述序列共享的相同位置的数目的函数。可使用数学算法来实现序列比较以及确定两个序列之间的同一性百分比。例如,两个核酸序列之间的同一性百分比可使用诸如以下中所述的那些的方法确定: Computational Molecular Biology, Lesk, A.M. 编, Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W. 编, Academic Press, New York, 1993; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; Computer Analysis of Sequence Data, 部分I, Griffin, A.M. 和 Griffin, H.G. 编, Humana Press, New Jersey, 1994; 以及 Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. 和 Devereux, J. 编, M Stockton Press, New York, 1991; 其各自通过引用并入本文。例如,可使用 Meyers 和 Miller (CABIOS, 1989, 4:11-17) 的算法来确定两个核酸序列之间的同一性百分比,所述算法已被并入 ALIGN 程序 (2.0 版) 中,使用 PAM120 权重残基表,空位长度罚分 12 和空位罚分 4。两个核酸序列之间的同一性百分比可选地使用 GCG 软件包中的 GAP 程序,使用 NWSgapdna.CMP 矩阵确定。通常用于确定序列之间的同一性百分比的方法包

括但不限于Carillo,H.和Lipman,D.,SIAM J Applied Math.,48:1073(1988)中公开的那些;所述文献通过引用并入本文。用于确定同一性的技术被编纂在可公开获得的计算机程序中。用以确定两个序列之间的同源性的示例性计算机软件包括但不限于GCG程序包(Devereux,J.等人,Nucleic Acids Research,12(1),387(1984))、BLASTP、BLASTN和FASTA(Altschul,S.F.等人,J.Molec.Biol.,215,403(1990))。

[0193] 在一些实施方案中,多肽还包含额外的序列或功能结构域。例如,本公开的流感多肽可包含一个或多个接头序列。在一些实施方案中,本发明的流感可以包含多肽标签,如亲和和标签(几丁质结合蛋白(CBP)、麦芽糖结合蛋白(MBP)、谷胱甘肽-S-转移酶(GST)、SBP标签、Strep标签、AviTag、Calmodulin标签);增溶标签;色谱标签(聚阴离子氨基酸标签,如FLAG标签);表位标签(与高亲和力抗体结合的短肽序列,如V5标签、Myc标签、VSV标签、Xpress标签、E标签、S标签和HA标签);荧光标签(例如,GFP)。在一些实施方案中,本发明的流感可以包含氨基酸标签,如一个或多个赖氨酸、组氨酸或谷氨酸,其可以被添加到多肽序列中(例如,在N末端或C末端处)。赖氨酸可用于使肽溶解性增加或允许生物素化。蛋白标签和氨基酸标签是遗传移植到重组蛋白质上的肽序列。序列标签附接于蛋白质用于各种目的,如肽纯化、鉴定或定位,用于多种应用,包括例如亲和纯化、蛋白质阵列、免疫印迹、免疫荧光和免疫沉淀。随后这些标签可以通过化学试剂或酶促方式去除,如通过特异性蛋白水解或内含肽剪接。

[0194] 可选地,可任选使位于肽或蛋白质的氨基酸序列的羧基和氨基末端区域处的氨基酸残基缺失,从而提供截短序列。可使某些氨基酸(例如,C末端或N末端残基)可选地缺失,这取决于序列的使用,例如作为可溶的或连接至固体支持物的较大序列的一部分的序列的表达。

[0195] 信号肽

[0196] 在一些实施方案中,由流感核酸编码的抗原性多肽包含信号肽。包含蛋白质的N末端15-60个氨基酸的信号肽典型地为跨越分泌路径上的膜进行易位所需,并且因此,在真核生物与原核生物两者中普遍控制大多数蛋白质向分泌路径中的进入。信号肽通常包括三个区域:具有不同长度的N末端区域,其通常包含带正电荷氨基酸;疏水性区域;和短的羧基末端肽区域。在真核生物中,初生前体蛋白质(前蛋白)的信号肽引导核糖体到达粗糙内质网(ER)膜,并且起始增长中的肽链跨越它进行的转运。然而,信号肽不负责成熟蛋白质的最终归宿。在其序列中缺乏进一步地址标签的分泌蛋白默认分泌到外部环境中。信号肽是通过内质网(ER)驻留信号肽酶从前体蛋白质裂解,或它们保持未裂解,并且充当膜锚。在近年期间,已演化出关于信号肽的一种更先进的见解,显示某些信号肽的功能和免疫显性比先前预期要更加多变。

[0197] 本公开的流感疫苗可包含例如编码人工信号肽的RNA多核苷酸,其中所述信号肽编码序列可操作地附接至流感抗原性多肽的编码序列,并且与所述编码序列同框。因此,在一些实施方案中,本公开的流感疫苗产生包括融合于信号肽的流感抗原性多肽的抗原性多肽。在一些实施方案中,使信号肽融合于流感抗原性多肽的N末端。在一些实施方案中,使信号肽融合于流感抗原性多肽的C末端。

[0198] 在一些实施方案中,融合于流感抗原性多肽的信号肽是人工信号肽。在一些实施方案中,融合于由流感RNA疫苗编码的流感抗原性多肽的人工信号肽从免疫球蛋白获得,例

如IgE信号肽或IgG信号肽。在一些实施方案中,融合于由流感mRNA疫苗编码的流感抗原性多肽的信号肽是具有以下序列的Ig重链 ϵ -1信号肽(IgE HC SP):MDWTWILFLVAAATRVHS(SEQ ID NO:18)。在一些实施方案中,融合于由流感RNA疫苗编码的流感抗原性多肽的信号肽是具有以下序列的IgG κ 链V-III区HAH信号肽(IgG κ SP):METPAQLLFLLLLWLPDTTG(SEQ ID NO:19)。在一些实施方案中,融合于由流感RNA疫苗编码的流感抗原性多肽的信号肽具有SEQ ID NO:18或SEQ ID NO:19所阐述的氨基酸序列。本文公开的例子不意在具有限制性,并且本领域中已知的用以促进将蛋白质靶向待加工ER和/或将蛋白质靶向细胞膜的任何信号肽都可根据本公开加以使用。

[0199] 信号肽可具有15-60个氨基酸的长度。例如,信号肽可具有15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、或60个氨基酸的长度。在一些实施方案中,信号肽可具有20-60、25-60、30-60、35-60、40-60、45-60、50-60、55-60、15-55、20-55、25-55、30-55、35-55、40-55、45-55、50-55、15-50、20-50、25-50、30-50、35-50、40-50、45-50、15-45、20-45、25-45、30-45、35-45、40-45、15-40、20-40、25-40、30-40、35-40、15-35、20-35、25-35、30-35、15-30、20-30、25-30、15-25、20-25、或15-20个氨基酸的长度。

[0200] 信号肽典型地在ER加工期间在裂解连结处从初生多肽裂解。由本公开的流感RNA疫苗产生的成熟流感抗原性多肽典型地不包含信号肽。

[0201] 融合蛋白

[0202] 在一些实施方案中,本公开的流感RNA疫苗包括编码抗原性融合蛋白的RNA。因此,编码的抗原或抗原可包括连的两个或更多个接在一起的蛋白质(例如,蛋白质和/或蛋白质片段)。可选地,蛋白抗原融合的蛋白质不会促进对其自身的强烈免疫应答,而促进对流感抗原的强烈免疫应答。在一些实施方案中,抗原融合蛋白保留了每种原始蛋白质的功能特性。

[0203] 支架部分

[0204] 在一些实施方案中,本文提供的RNA(例如,mRNA)疫苗编码融合蛋白,所述融合蛋白包含连接至支架部分的流感抗原。在一些实施方案中,此类支架部分赋予由本公开的核酸编码的抗原所需的特性。例如,支架蛋白可以改善抗原的免疫原性,例如通过改变抗原的结构、改变抗原的摄取和加工,和/或使抗原结合至结合配偶体。

[0205] 在一些实施方案中,支架部分是可以自组装成蛋白质纳米粒子的蛋白质,所述蛋白质纳米粒子是高度对称的、稳定的和在结构上组织化的,具有10-150nm的直径,这是高度适合与免疫系统的多种细胞最优相互作用的大小范围。在一个实施方案中,病毒蛋白或病毒样粒子可用于形成稳定的纳米粒子结构。此类病毒蛋白的例子是本领域已知的。例如,在一些实施方案中,所述支架部分是乙型肝炎表面抗原(HBsAg)。HBsAg形成具有约22nm平均直径的球形粒子,且其缺乏核酸,并因此是非感染性的(Lopez-Sagasetta, J. 等人 Computational and Structural Biotechnology Journal 14(2016) 58-68)。在一些实施方案中,所述支架部分是乙型肝炎核心抗原(HBcAg),自组装成直径为24-31nm的粒子,所述乙型肝炎核心抗原类似于获取自HBV感染人肝脏的病毒核心。HBcAg产生于自组装成两类不同大小的300 Å和360 Å直径的纳米粒子(对应于180或240个原体)中。在一些实施方案中,流感抗原融合于HBsAg或HBcAg以促进显示流感抗原的纳米粒子的自组装。

[0206] 在另一个实施方案中,可以使用细菌蛋白平台。这些自组装蛋白的非限制性例子包括铁蛋白、二氧四氢蝶啶和包封蛋白。

[0207] 铁蛋白是一种蛋白质,其主要功能是细胞内铁储存。铁蛋白由24个亚基组成,每个亚基由四- α -螺旋束组成,其以具有八面体对称的四元结构自组装(Cho K.J.等人J Mol Biol.2009;390:83-98)。已经确定了铁蛋白的几种高分辨率结构,证实幽门螺杆菌铁蛋白由24个相同的原体组成,而在动物中,存在可以单独组装或以不同比例组合成具有24个亚基的粒子的铁蛋白轻链和重链(Granier T.等人J Biol Inorg Chem.2003;8:105-111; Lawson D.M.等人Nature.1991;349:541-544)。铁蛋白自组装成具有稳健的热稳定性和化学稳定性的纳米粒子。因此,铁蛋白纳米粒子非常适合携带和暴露抗原。

[0208] 二氧四氢蝶啶合成酶(LS)也非常适合作为抗原显示的纳米粒子平台。LS负责核黄素生物合成中的倒数第二个催化步骤,是一种存在于多种生物体内的酶,包括古细菌、细菌、真菌、植物和真细菌(Weber S.E.Flavins and Flavoproteins.Methods and Protocols, Series:Methods in Molecular Biology.2014)。LS单体长150个氨基酸,并由 β -折叠连同侧接其侧面的串联 α -螺旋组成。已经报道了LS的许多不同的四元结构,说明了它的形态多样性:从单五聚体直至具有12个五聚体的对称装配(其形成直径为150 Å的衣壳)。甚至已经描述了具有超过100个亚基的LS笼状物(Zhang X.等人J Mol Biol.2006; 362:753-770)。

[0209] 包封蛋白,一种从嗜热生物海栖热袍菌分离的新颖蛋白笼状物纳米粒子,也可用作在自组装纳米粒子表面上呈递抗原的平台。包封蛋白由具有薄且二十面体 $T=1$ 对称的笼状结构的相同31kDa单体的60个拷贝组装而成,其内部和外部直径分别为20和24nm(Sutter M.等人Nat Struct Mol Biol.2008,15:939-947)。虽然海栖热袍菌中的包封蛋白的确切功能尚未了解清楚,其晶体结构最近已被解开,且其功能被假定为包封诸如DyP(染料脱色过氧化物酶)和Flp(铁蛋白样蛋白)等参与氧化应激反应的蛋白质的细胞区室(Rahmanpour R.等人FEBS J.2013,280:2097-2104)。

[0210] 接头和可裂解肽

[0211] 在一些实施方案中,本公开的mRNA编码多于一种多肽,在本文中称为融合蛋白。在一些实施方案中,mRNA进一步编码位于融合蛋白的至少一个或每个结构域之间的接头。接头可以是,例如,可裂解接头或蛋白酶敏感接头。在一些实施方案中,接头选自下组,该组由以下组成:F2A接头、P2A接头、T2A接头、E2A接头及其组合。该自裂解肽接头家族(称为2A肽)已在本领域中描述(参见例如Kim,J.H.等人(2011)PLoS ONE 6:e18556)。在一些实施方案中,接头是F2A接头。在一些实施方案中,接头是GGGS接头(SEQ ID NO:23)。在一些实施方案中,融合蛋白含有三个具有间插接头的结构域,具有以下结构:接头-结构域-接头-结构域。

[0212] 本领域已知的裂解接头可以与本公开结合使用。示例性的此类接头包括:F2A接头、T2A接头、P2A接头、E2A接头(参见例如W02017127750)。技术人员将理解,其他领域公认的接头可适用于本公开的构建体(例如,由本公开的核酸编码)。技术人员还将理解,其他多顺反子构建体(在同一分子内分别编码多于一种抗原/多肽的mRNA)可适用于本文提供的用途。

[0213] 序列优化

[0214] 在一些实施方案中,对本公开的编码抗原的ORF进行密码子优化。密码子优化方法

在本领域中是已知的。例如，可以对本文提供的任何一个或多个序列的ORF进行密码子优化。在一些实施方案中，密码子优化可用于匹配靶标和宿主生物体中的密码子频率，以确保适当折叠；偏好GC含量，以增加mRNA稳定性或减少二级结构；使可损害基因构建或表达的串联重复序列密码子或碱基运行最少化；定制转录和翻译控制区；插入或移除蛋白质移行序列；在所编码蛋白质中移除/添加翻译后修饰位点（例如糖基化位点）；添加、移除或改组蛋白质结构域；插入或缺失限制位点；修饰核糖体结合位点和mRNA降解位点；调整翻译速率以使蛋白质的各结构域适当折叠；或减少或消除多核苷酸内的问题二级结构。密码子优化工具、算法和服务在本领域中是已知的—非限制性例子包括来自GeneArt (Life Technologies) 的服务、DNA2.0 (Menlo Park CA) 和/或专有方法。在一些实施方案中，使用最优化算法使开放阅读框 (ORF) 序列最优化。

[0215] 在一些实施方案中，密码子优化的序列与天然存在的或野生型序列ORF（例如编码流感抗原的天然存在的或野生型mRNA序列）共享小于95%序列同一性。在一些实施方案中，密码子优化的序列与天然存在的或野生型序列（例如编码流感抗原的天然存在的或野生型mRNA序列）共享小于90%序列同一性。在一些实施方案中，密码子优化的序列与天然存在的或野生型序列（例如编码流感抗原的天然存在的或野生型mRNA序列）共享小于85%序列同一性。在一些实施方案中，密码子优化的序列与天然存在的或野生型序列（例如编码流感抗原的天然存在的或野生型mRNA序列）共享小于80%序列同一性。在一些实施方案中，密码子优化的序列与天然存在的或野生型序列（例如编码流感抗原的天然存在的或野生型mRNA序列）共享小于75%序列同一性。

[0216] 在一些实施方案中，密码子优化的序列与天然存在的或野生型序列（例如编码流感抗原的天然存在的或野生型mRNA序列）共享65%至85%（例如，约67%至约85%或约67%至约80%）序列同一性。在一些实施方案中，密码子优化的序列与天然存在的或野生型序列（例如编码流感抗原的天然存在的或野生型mRNA序列）共享65%至75%或约80%序列同一性。

[0217] 在一些实施方案中，由密码子优化的序列编码与由非密码子优化的序列编码的流感抗原至少具有相同免疫原性或更具免疫原性（例如，至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少100%或至少200%）的抗原。

[0218] 当转染到哺乳动物细胞中时，经修饰的mRNA具有在12小时至18小时之间或大于18小时例如24小时、36小时、48小时、60小时、72小时或大于72小时的稳定性。

[0219] 在一些实施方案中，密码子优化的RNA可以是其中G/C的水平得以增强的RNA。核酸分子（例如，mRNA）的G/C含量可影响RNA的稳定性。相比于含有大量腺嘌呤 (A) 和胸腺嘧啶 (T) 或尿嘧啶 (U) 核苷酸的RNA，具有增加量的鸟嘌呤 (G) 和/或胞嘧啶 (C) 残基的RNA可在功能上更稳定。例如，WO 02/098443公开了一种含有通过翻译区中的序列修饰加以稳定的mRNA的药物组合物。归因于遗传密码的简并性，修饰通过将现有密码子取代成促进更大RNA稳定性而不改变所得氨基酸的那些来起作用。所述方法限于RNA的编码区域。

[0220] 未经化学修饰的核苷酸

[0221] 在一些实施方案中，本公开的流感疫苗的至少一种RNA（例如，mRNA）未经化学修饰，并包含由腺苷、鸟苷、胞嘧啶和尿苷组成的标准核糖核苷酸。在一些实施方案中，本公开的核苷酸和核苷包含标准核苷残基，如存在于转录的RNA中的那些（例如A、G、C或U）。在一些

实施方案中,本公开的核苷酸和核苷包含标准脱氧核糖核苷,如存在于DNA中的那些(例如,dA、dG、dC或dT)。

[0222] 化学修饰

[0223] 在一些实施方案中,本公开的流感RNA疫苗包含至少一种核糖核酸(RNA)多核苷酸,所述多核苷酸具有编码至少一种包含至少一个化学修饰的抗原性多肽或其免疫原性片段的开放阅读框。

[0224] 术语“化学修饰”和“经化学修饰的”指关于腺苷(A)、鸟苷(G)、尿苷(U)、胸苷(T)或胞苷(C)核糖核苷或脱氧核糖核苷在它们的位置、图案、百分比或群体中的至少一个方面进行修饰。通常,这些术语不指天然存在的5'末端mRNA帽部分中的核糖核苷酸修饰。关于多肽,术语“修饰”是指相对于典范集合20种氨基酸进行的修饰。如果如本文提供的多肽含有氨基酸取代、插入、或者取代和插入的组合,那么它们也被视为“经修饰”。

[0225] 在一些实施方案中,多核苷酸(例如RNA多核苷酸,如mRNA多核苷酸)包含多种(超过一种)不同修饰。在一些实施方案中,多核苷酸的特定区域含有一个、两个或更多个(任选是不同的)核苷或核苷酸修饰。在一些实施方案中,相对于未经修饰的多核苷酸,引入细胞或生物体中的经修饰的RNA多核苷酸(例如经修饰的mRNA多核苷酸)分别在所述细胞或生物体中展现降解降低。在一些实施方案中,引入细胞或生物体中的经修饰的RNA多核苷酸(例如经修饰的mRNA多核苷酸)可分别在所述细胞或生物体中展现免疫原性降低(例如先天性应答降低)。

[0226] 多核苷酸的修饰包括但不限于本文所述的那些。多核苷酸(例如RNA多核苷酸,如mRNA多核苷酸)可包含天然存在的修饰、非天然存在的修饰,或多核苷酸可包含天然存在的修饰和非天然存在的修饰的组合。多核苷酸可包括例如对糖、核碱基或核苷间连接(例如对连接磷酸酯,对磷酸二酯连接或对磷酸二酯主链)的任何适用修饰。

[0227] 在一些实施方案中,多核苷酸(例如RNA多核苷酸,如mRNA多核苷酸)包含在多核苷酸的合成期间或合成后引入以实现所需功能或特性的非天然经修饰的核苷酸。修饰可存在于核苷酸间连接、嘌呤或嘧啶碱基或糖上。修饰可用化学合成或用聚合酶引入在链的末端或链中任何其他地方。可对多核苷酸的任何区域进行化学修饰。

[0228] 本公开提供多核苷酸(例如RNA多核苷酸,如mRNA多核苷酸)的经修饰的核苷和核苷酸。“核苷”是指含有糖分子(例如戊糖或核糖)或其衍生物与有机碱基(例如嘌呤或嘧啶)或其衍生物(在本文中也称为“核碱基”)组合的化合物。“核苷酸”是指包括磷酸酯基团的核苷。经修饰的核苷酸可通过用以包括一个或多个经修饰的或非天然核苷的任何适用方法(如例如以化学、酶促或重组方式)来合成。多核苷酸可包含一个或多个具有连接的核苷的区域。此类区域可具有可变主链连接。连接可为标准磷酸二酯连接,在所述情况下,多核苷酸将包含多个核苷酸区域。

[0229] 经修饰的核苷酸碱基配对不仅涵盖标准腺苷-胸腺嘧啶、腺苷-尿嘧啶或鸟苷-胞嘧啶碱基对,而且也涵盖在核苷酸和/或包含非标准或经修饰的碱基的经修饰的核苷酸之间形成的碱基对,其中氢键供体和氢键接受体的安排容许在非标准碱基与标准碱基之间或在两个互补非标准碱基结构之间进行氢键合。此类非标准碱基配对的一个例子是在经修饰的核苷酸肌苷与腺嘌呤、胞嘧啶或尿嘧啶之间的碱基配对。碱基/糖或接头的任何组合都可并入本公开的多核苷酸中。

[0230] 在一些实施方案中,多核苷酸(例如RNA多核苷酸,如mRNA多核苷酸)包含至少两个(例如,2、3、4或更多个)前述经修饰的核碱基的组合。

[0231] 在一些实施方案中,多核苷酸中经修饰的核碱基(例如RNA多核苷酸,如mRNA多核苷酸)选自下组,该组由以下组成:假尿苷(ψ)、N1-甲基假尿苷($m^1\psi$)、N1-乙基假尿苷、2-硫代尿苷、4'-硫代尿苷、5-甲基胞嘧啶、2-硫代-1-甲基-1-脱氮-假尿苷、2-硫代-1-甲基-假尿苷、2-硫代-5-氮杂-尿苷、2-硫代-二氢假尿苷、2-硫代-二氢尿苷、2-硫代-假尿苷、4-甲氧基-2-硫代-假尿苷、4-甲氧基-假尿苷、4-硫代-1-甲基-假尿苷、4-硫代-假尿苷、5-氮杂-尿苷、二氢假尿苷、5-甲氧基尿苷以及2'-O-甲基尿苷。在一些实施方案中,多核苷酸(例如RNA多核苷酸,如mRNA多核苷酸)包含至少两个(例如,2、3、4或更多个)前述经修饰的核碱基的组合。

[0232] 在一些实施方案中,多核苷酸中经修饰的核碱基(例如RNA多核苷酸,如mRNA多核苷酸)选自下组,该组由以下组成:1-甲基-假尿苷($m^1\psi$)、5-甲氧基-尿苷(mo^5U)、5-甲基-胞苷(m^5C)、假尿苷(ψ)、 α -硫代-鸟苷以及 α -硫代-腺苷。在一些实施方案中,多核苷酸包含至少两个(例如,2、3、4或更多个)前述经修饰的核碱基的组合。

[0233] 在一些实施方案中,多核苷酸(例如RNA多核苷酸,如mRNA多核苷酸)包含假尿苷(ψ)和5-甲基-胞苷(m^5C)。在一些实施方案中,多核苷酸(例如RNA多核苷酸,如mRNA多核苷酸)包含1-甲基-假尿苷($m^1\psi$)。在一些实施方案中,多核苷酸(例如RNA多核苷酸,如mRNA多核苷酸)包含1-甲基-假尿苷($m^1\psi$)和5-甲基-胞苷(m^5C)。在一些实施方案中,多核苷酸(例如RNA多核苷酸,如mRNA多核苷酸)包含2-硫代尿苷(s^2U)。在一些实施方案中,多核苷酸(例如RNA多核苷酸,如mRNA多核苷酸)包含2-硫代尿苷和5-甲基-胞苷(m^5C)。在一些实施方案中,多核苷酸(例如RNA多核苷酸,如mRNA多核苷酸)包含甲氧基-尿苷(mo^5U)。在一些实施方案中,多核苷酸(例如RNA多核苷酸,如mRNA多核苷酸)包含5-甲氧基-尿苷(mo^5U)和5-甲基-胞苷(m^5C)。在一些实施方案中,多核苷酸(例如, RNA多核苷酸,如mRNA多核苷酸)包含2'-O-甲基尿苷。在一些实施方案中,多核苷酸(例如RNA多核苷酸,如mRNA多核苷酸)包含2'-O-甲基尿苷和5-甲基-胞苷(m^5C)。在一些实施方案中,多核苷酸(例如RNA多核苷酸,如mRNA多核苷酸)包含N6-甲基-腺苷(m^6A)。在一些实施方案中,多核苷酸(例如RNA多核苷酸,如mRNA多核苷酸)包含N6-甲基-腺苷(m^6A)和5-甲基-胞苷(m^5C)。

[0234] 在一些实施方案中,多核苷酸(例如RNA多核苷酸,如mRNA多核苷酸)就特定修饰来说被均一修饰(例如,完全修饰,遍及整个序列加以修饰)。例如,多核苷酸可用5-甲基-胞苷(m^5C)均一修饰,这意味着mRNA序列中的所有胞嘧啶残基都用5-甲基-胞苷(m^5C)替代。类似地,多核苷酸就序列中存在的任何类型的核苷残基来说可通过用经修饰残基(如以上阐述的那些)进行替代而被均一修饰。

[0235] 具有经修饰胞嘧啶的示例性核碱基和核苷包括N4-乙酰基-胞苷($ac4C$)、5-甲基-胞苷($m5C$)、5-卤代-胞苷(例如5-碘代-胞苷)、5-羟基甲基-胞苷($hm5C$)、1-甲基-假异胞苷、2-硫代-胞苷($s2C$)和2-硫代-5-甲基-胞苷。

[0236] 在一些实施方案中,经修饰的核碱基是经修饰的尿苷。示例性的核碱基以及在一些实施方案中经修饰的核碱基是经修饰的胞嘧啶。具有经修饰的尿苷的核苷包括5-氰基尿苷和4'-硫代尿苷。

[0237] 本公开的多核苷酸可沿分子的整个长度加以部分或完全修饰。例如,在本发明的

多核苷酸中,或在给定的其预定序列区域中(例如在包括或排除聚A尾的mRNA中),一种或多种或所有或给定类型的核苷酸(例如嘌呤或嘧啶,或A、G、U、C中的任何一个或多个或所有)可被均一修饰。在一些实施方案中,本披露的多核苷酸中的所有核苷酸X(或在其给定序列区域中)是经修饰的核苷酸,其中X可以是核苷酸A、G、U、C中任一项,或组合A+G、A+U、A+C、G+U、G+C、U+C、A+G+U、A+G+C、G+U+C或A+G+C中任一项。

[0238] 该多核苷酸可含有从约1%至约100%经修饰的核苷酸(关于全部核苷酸内容物或关于一个或多个核苷酸类型,即A、G、U或C中任一个或多个)或介于中间的任何百分数(例如,从1%至20%、从1%至25%、从1%至50%、从1%至60%、从1%至70%、从1%至80%、从1%至90%、从1%至95%、从10%至20%、从10%至25%、从10%至50%、从10%至60%、从10%至70%、从10%至80%、从10%至90%、从10%至95%、从10%至100%、从20%至25%、从20%至50%、从20%至60%、从20%至70%、从20%至80%、从20%至90%、从20%至95%、从20%至100%、从50%至60%、从50%至70%、从50%至80%、从50%至90%、从50%至95%、从50%至100%、从70%至80%、从70%至90%、从70%至95%、从70%至100%、从80%至90%、从80%至95%、从80%至100%、从90%至95%、从90%至100%、和从95%至100%)。应当理解,任何剩余百分比以未经修饰的A、G、U或C的存在来说明。

[0239] 多核苷酸可含有最少1%以及最多100%经修饰的核苷酸,或介于中间的任何百分比,如至少5%经修饰的核苷酸,至少10%经修饰的核苷酸,至少25%经修饰的核苷酸,至少50%经修饰的核苷酸,至少80%经修饰的核苷酸,或至少90%经修饰的核苷酸。例如,多核苷酸可含有经修饰的嘧啶,如经修饰的尿嘧啶或胞嘧啶。在一些实施方案中,多核苷酸中至少5%、至少10%、至少25%、至少50%、至少80%、至少90%或100%的尿嘧啶用经修饰的尿嘧啶(例如5-取代的尿嘧啶)替代。经修饰的尿嘧啶可由具有单一独特结构的化合物替代,或可由具有不同结构(例如2、3、4个或更多个独特结构)的多种化合物替代。在一些实施方案中,多核苷酸中至少5%、至少10%、至少25%、至少50%、至少80%、至少90%或100%的尿嘧啶用经修饰的胞嘧啶(例如5-取代的胞嘧啶)替代。经修饰的胞嘧啶可由具有单一独特结构的化合物替代,或可由具有不同结构(例如2、3、4个或更多个独特结构)的多种化合物替代。

[0240] 非翻译区(UTR)

[0241] 本公开的核酸可包含一个或多个用作或充当非翻译区的区域或部分。在核酸被设计成编码至少一种目的抗原的情况下,所述核酸可包含这些非翻译区(UTR)中的一个或多个。核酸的野生型非翻译区被转录但不被翻译。在mRNA中,5'UTR开始于转录起始位点并且继续至起始密码子但不包括起始密码子;而3'UTR紧随终止密码子开始并且继续直到转录终止信号。关于就核酸分子和翻译的稳定性而言UTR所起的调控作用存在越来越多的证据。UTR的调控特征可并入本公开的多核苷酸中以尤其增强分子的稳定性。在转录物被错误引导至不希望的器官部位的情况下还可并入所述具体特征以确保转录物的受控下调。多种5'UTR和3'UTR序列是本领域已知的并且是可获得的。

[0242] 5'UTR是mRNA的区域,其位于起始密码子(由核糖体翻译的mRNA转录物的第一个密码子)的直接上游(5')。5'UTR不编码蛋白质(为非编码性)。天然5'UTR具有在翻译起始中起作用的特征。它们拥有像Kozak序列的签名,所述Kozak序列通常已知涉及在核糖体起始许多基因的翻译的过程中。Kozak序列具有共有CCR(A/G)CCAUGG(SEQ ID NO:20),其中R是在

起始密码子 (AUG) 的上游三个碱基处的嘌呤 (腺嘌呤或鸟嘌呤), 其之后是另一个 'G'。还已知 5'UTR 形成在延伸因子结合中所涉及的二级结构。

[0243] 在本公开的一些实施方案中, 5'UTR 是异源 UTR, 即, 是天然存在的与不同 ORF 缔合的 UTR。在另一个实施方案中, 5'UTR 是合成 UTR, 即在自然界中不存在。合成 UTR 包括已经突变以改善其特性的 UTR, 例如增加基因表达的 UTR 以及完全合成的 UTR。示例性 5'UTR 包括非洲爪蟾或人源 α -球蛋白或 β -球蛋白 (8278063; 9012219)、人细胞色素 b-245a 多肽和羟基类固醇 (17 β) 脱氢酶以及烟草蚀刻病毒 (US 8278063; 9012219)。还可以使用 CMV 即刻早期 1 (IE1) 基因 (US 20140206753、WO 2013/185069), 序列 GGGAUCCUACC (SEQ ID NO: 21) (WO 2014144196)。在另一个实施方案中, TOP 基因的 5'UTR 是缺乏 5'TOP 基序 (寡嘧啶束) 的 TOP 基因的 5'UTR (例如, WO/2015101414、WO 2015101415、WO/2015/062738、WO2015024667、WO 2015024667); 可以使用衍生自核糖体蛋白大 32 (L32) 基因的 5'UTR 元件 (WO/2015101414、WO 2015101415、WO/2015/062738)、衍生自羟基类固醇 (17- β) 脱氢酶 4 基因 (HSD1784) 的 5'UTR 的 5'UTR 元件 (WO 2015024667) 或衍生自 ATP5A1 的 5'UTR 的 5'UTR 元件 (WO 2015024667)。在一个实施方案中, 使用内部核糖体进入位点 (IRES) 代替 5'UTR。

[0244] 在一些实施方案中, 本公开的 5'UTR 包含选自 SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 14 和 SEQ ID NO: 15 的序列。在一些实施方案中, 本公开的 5'UTR 包含选自 SEQ ID NO: 10 和 SEQ ID NO: 11 的序列, 并且 ORF 编码 H7N9。在一些实施方案中, 本公开的 5'UTR 包含选自 SEQ ID NO: 14 和 SEQ ID NO: 15 的序列, 并且 ORF 编码 H10N8。

[0245] 3'UTR 是 mRNA 的区域, 其位于终止密码子的直接下游 (3') (发出翻译终止信号的 mRNA 转录物的密码子)。3'UTR 不编码蛋白质 (为非编码性)。已知天然或野生型 3'UTR 具有嵌入它们之中的腺苷和尿苷链段。这些富含 AU 的签名在具有高更新率的基因中是特别普遍的。基于其序列特征和功能特性, 富含 AU 的元件 (ARE) 可分成三个类别 (Chen 等人, 1995): I 类 ARE 在富含 U 的区域内包含 AUUUA 基序的若干分散拷贝。C-Myc 和 MyoD 包含 I 类 ARE。II 类 ARE 具有两个或更多个重叠的 UUAUUUA (U/A) (U/A) (SEQ ID NO: 22) 九聚物。含有这种类型的 ARE 的分子包括 GM-CSF 和 TNF- α 。III 类 ARE 的定义不太明确。这些富含 U 的区域不包含 AUUUA 基序。c-Jun 和肌细胞生成素是这种类别的两个被充分研究的例子。已知与 ARE 的大多数蛋白质结合使信使不稳定, 而 ELAV 家族的成员 (最显著的是 HuR) 已被记载增加 mRNA 的稳定性。HuR 结合所有三类的 ARE。将 HuR 特异性结合位点工程化至核酸分子的 3'UTR 中将导致 HuR 结合, 并因此导致体内信使的稳定化。

[0246] 3'UTR 富含 AU 的元件 (ARE) 的引入、去除或修饰可用于调节本公开的核酸 (例如 RNA) 的稳定性。当工程化具体核酸时, 可引入一个或多个拷贝的 ARE 来使本公开的核酸不那么稳定且由此缩减翻译和减少所得蛋白质的产生。同样, ARE 可被鉴别和去除或突变以便增加细胞内稳定性并因此增加翻译和所得蛋白质的产生。可使用本公开的核酸在相关细胞系中进行转染实验, 并且可在转染后的不同时间点测定蛋白质产生。例如, 可用不同的 ARE 工程分子转染细胞, 并且使用针对相关蛋白质的 ELISA 试剂盒测定转染后第 6 小时、第 12 小时、第 24 小时、第 48 小时以及 7 天产生的蛋白质。

[0247] 3'UTR 可以是异源的或合成的。关于 3'UTR, 本领域中已知球蛋白 UTR, 包括非洲爪蟾 β -球蛋白 UTR 和人 β -球蛋白 UTR (8278063; 9012219、US 20110086907)。通过克隆两个连续的头尾相接的人 β -球蛋白 3'UTR, 在一些细胞类型中具有增强的稳定性的经修饰的 β -球蛋

白构建体已经被开发并且是本领域熟知的 (US 2012/0195936、WO 2014/071963)。此外, $\alpha 2$ -球蛋白、 $\alpha 1$ -球蛋白、UTR及其突变体 (WO 2015101415、WO 2015024667) 也是本领域已知的。在非专利文献中的mRNA构建体中描述的其他3'UTR包括CYBA (Ferizi等人, 2015) 和白蛋白 (Thess等人, 2015)。其他示例性3'UTR包括牛或人生长激素 (野生型或经修饰的) (WO 2013/185069、US 20140206753、WO 2014152774)、兔 β 球蛋白和乙型肝炎病毒 (HBV)、 α -球蛋白3'UTR和病毒VEEV 3'UTR序列也是本领域已知的。在一些实施方案中, 使用序列UUUGAAUU (WO 2014144196)。在一些实施方案中, 使用人和小鼠核糖体蛋白的3'UTR。其他例子包括rps93'UTR (WO2015101414)、FIG4 (WO 2015101415) 和人白蛋白7 (WO 2015101415)。

[0248] 在一些实施方案中, 本公开的3'UTR包含选自SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:17的序列。在一些实施方案中, 本公开的3'UTR包含选自SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:11的序列, 并且ORF编码H7N9。在一些实施方案中, 本公开的3'UTR包含选自SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:17的序列, 并且ORF编码H10N8。

[0249] 本领域普通技术人员将理解, 异源或合成5'UTR可以与任何所需的3'UTR序列一起使用。例如, 异源5'UTR可以与合成3'UTR与异源3'UTR一起使用。

[0250] 非UTR序列也可以用作核酸内的区或亚区。例如, 内含子或内含子序列的部分可并入本公开的核酸的区中。并入内含子序列可增加蛋白质产生以及核酸水平。

[0251] 特征的组合可包括于侧翼区中并且可包含于其他特征内。例如, ORF可由可包含强Kozak翻译起始信号的5'UTR和/或可包括用于模板化添加聚-A尾的寡(dT)序列的3'UTR侧接。5'UTR可包含来自相同和/或不同基因的第一多核苷酸片段和第二多核苷酸片段, 如美国专利申请公开号20100293625和PCT/US 2014/069155中所描述的5'UTR, 所述专利申请通过引用以其整体并入本文。

[0252] 应了解来自任何基因的任何UTR可被并入核酸的区域中。此外, 可以利用任何已知基因的多个野生型UTR。提供不为野生型区的变体的人工UTR也在本公开的范围内。这些UTR或其部分可置于与它们所选自的转录物中的相同的取向或可在取向或位置上有所改变。因此, 5'UTR或3'UTR可被反转、缩短、延长、与一个或多个其他5'UTR或3'UTR组合。如本文所用, 术语“改变的”在其涉及UTR序列时意指所述UTR已相对于参考序列以一些方式改变。例如, 3'UTR或5'UTR可通过如上所传授的取向或位置的变化而相对于野生型或天然UTR改变或可通过额外核苷酸的包含、核苷酸的缺失、核苷酸的交换或转位来改变。产生“改变的”UTR (无论是3'还是5') 的任何这些变化包含变体UTR。

[0253] 在一些实施方案中, 可以使用双重、三重或四重UTR, 如5'UTR或3'UTR。如本文所用, “双重”UTR是其中同一UTR的两个拷贝串联或大体上串联编码的一种UTR。例如, 可如美国专利公开20100129877中所描述使用双重 β -球蛋白3'UTR, 所述专利的内容通过引用以其整体并入本文。

[0254] 具有图案化的UTR也在本公开的范围内。如本文所用, “图案化的UTR”是反映重复或交替图案诸如重复一次、两次或多于3次的ABABAB或AABBAABBAABB或ABCABCABC或其变体的那些UTR。在这些图案中, 每个字母A、B或C表示在核苷酸水平上的不同UTR。

[0255] 在一个实施方案中, 侧翼区选自其蛋白质共享共同功能、结构、特征或特性的转录物家族。例如, 目的多肽可属于在特定细胞、组织中或在发育过程中的某一时间表达的蛋白质的家族。来自任何这些基因的UTR可交换相同或不同蛋白质家族的任何其他UTR以便形成

新的多核苷酸。如本文所用,“蛋白质家族”在广义上用于指共享至少一种功能、结构、特征、定位、起源或表达模式的两个或更多个目的多肽的群。

[0256] 非翻译区还可包括翻译增强子元件(TEE)。作为非限制性例子,TEE可包括美国申请号20090226470(通过引用以其整体并入本文)中所描述的那些和本领域已知的那些。

[0257] RNA(例如,mRNA)的体外转录

[0258] 本公开的流感病毒疫苗包含至少一种RNA多核苷酸,如mRNA(例如经修饰的mRNA)。mRNA例如在体外从被称为“体外转录模板”的模板DNA转录。在一些实施方案中,体外转录模板编码5'非翻译(UTR)区,含有开放阅读框,并且编码3'UTR和聚A尾。体外转录模板的特定核酸序列组成和长度将取决于由模板编码的mRNA。

[0259] “5'非翻译区”(UTR)是指mRNA的直接在起始密码子(即mRNA转录物的由核糖体翻译的第一个密码子)的上游(即5')的区域,其不编码多肽。

[0260] “3'非翻译区”(UTR)是指mRNA的直接在终止密码子(即mRNA转录物的发出翻译终止信号的密码子)的下游(即3')的区域,其不编码多肽。

[0261] “开放阅读框”是以起始密码子(例如甲硫氨酸(ATG))开始,并且以终止密码子(例如TAA、TAG或TGA)结束的一段连续DNA,并且编码多肽。

[0262] “聚A尾”是mRNA的在3'UTR的下游例如直接在其下游(即3')的区域,其含有多个连续单磷酸腺苷。聚A尾可含有10至300个单磷酸腺苷。例如,聚A尾可含有10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290或300个单磷酸腺苷。在一些实施方案中,聚A尾含有50至250个单磷酸腺苷。在相关生物环境中(例如在细胞中,在体内),聚(A)尾起保护mRNA免遭例如在细胞质中的酶促降解的作用,并且有助于转录终止,mRNA从核输出以及翻译。

[0263] 在一些实施方案中,多核苷酸包含200至3,000个核苷酸。例如,多核苷酸可包括200至500、200至1000、200至1500、200至3000、500至1000、500至1500、500至2000、500至3000、1000至1500、1000至2000、1000至3000、1500至3000、或2000至3000个核苷酸。

[0264] 化学合成

[0265] 固相化学合成。本公开的核酸可以使用固相技术全部或部分制造。核酸的固相化学合成是一种自动化方法,其中分子被固定在固体支持物上并且在反应物溶液中逐步合成。固相合成适用于核酸序列中的化学修饰的位点特异性引入。

[0266] 液相化学合成。通过连续添加单体结构单元合成本公开的核酸可在液相中进行。

[0267] 合成方法的组合。上文论述的合成方法各自具有其自身的优点和限制。已经进行尝试来组合这些方法以克服限制。此类方法组合在本公开的范围内。使用固相或液相化学合成与酶连接组合提供用于产生长链核酸(其不能通过单独的化学合成获得)的有效方式。

[0268] 核酸区或亚区的连接

[0269] 也可以使用通过连接酶组装核酸。DNA或RNA连接酶通过磷酸二酯键的形成促进多核苷酸链的5'末端和3'末端的分子间连接。核酸如嵌合多核苷酸和/或环形核酸可通过连接一个或多个区或亚区来制备。DNA片段可通过连接酶催化的反应连接以产生具有不同功能的重组DNA。两个寡脱氧核苷酸(一个具有5'磷酸基,且另一个具有游离3'羟基)用作DNA连接酶的底物。

[0270] 纯化

[0271] 本文描述的核酸的纯化可包括但不限于核酸净化、质量保证和质量控制。净化可通过本领域已知的方法诸如但不限于 **AGENCOURT®** 珠粒 (Beckman Coulter Genomics, Danvers, MA)、多-T珠粒、LNATM寡-T捕获探针 (**EXIQON®** Inc, Vedbaek, Denmark), 或基于HPLC的纯化方法诸如但不限于强阴离子交换HPLC、弱阴离子交换HPLC、反相HPLC (RP-HPLC) 以及疏水相互作用HPLC (HIC-HPLC) 来进行。术语“纯化的”当关于核酸使用时, 如“纯化的核酸”, 是指与至少一种污染物分离的核酸。“污染物”是使另一种物质不适当、不纯或低品质的任何物质。因此, 纯化的核酸 (例如DNA和RNA) 以不同于在自然中发现它的形式或设定或不同于在使它经受处理或纯化方法之前存在的形式或设定的形式或设定存在。

[0272] 质量保证和/或质量控制检查可使用诸如但不限于凝胶电泳、UV吸光度或分析型HPLC的方法来进行。

[0273] 在一些实施方案中, 核酸可以通过包括但不限于逆转录酶-PCR的方法进行测序。

[0274] 定量

[0275] 在一个实施方案中, 本发明的核酸可在外来体中或当来源于一种或多种体液时量化。“体液”包括外周血、血清、血浆、腹水、尿液、脑脊髓液 (CSF)、痰、唾液、骨髓、滑液、房水、羊水、耳垢、母乳、支气管肺泡灌洗液、精液、前列腺液、考珀液或射精前液体、汗液、粪便物、毛发、泪液、囊液、胸膜和腹膜液、心包液、淋巴液、食糜、乳糜、胆汁、间质液、经血、脓液、皮脂、呕吐物、阴道分泌物、粘膜分泌物、水样粪便、胰液、来自鼻窦腔的洗出液、支气管肺吸出物、胚胎腔液以及脐带血。可选地, 可从选自下组的器官摄取外来体, 该组由以下组成: 肺、心脏、胰脏、胃、肠、膀胱、肾、卵巢、精巢、皮肤、结肠、乳房、前列腺、脑、食道、肝以及胎盘。

[0276] 测定可使用构建体特异性探针、细胞计数、qRT-PCR、实时PCR、PCR、流式细胞术、电泳、质谱法或其组合进行, 同时可使用免疫组织化学方法如酶联免疫吸附测定 (ELISA) 方法分离外来体。还可通过尺寸排阻色谱法、密度梯度离心、差速离心、纳米膜超滤、免疫吸附剂捕获、亲和纯化、微流体分离或其组合来分离外来体。

[0277] 这些方法给予研究者实时监测剩余的或所递送的核酸的水平的能力。这是可能的, 因为本公开的核酸由于结构修饰或化学修饰而不同于内源形式。

[0278] 在一个实施方案中, 核酸可使用诸如但不限于紫外可见光谱 (UV/Vis) 的方法来量化。UV/Vis光谱仪的非限制性例子是 **NANODROP®** 光谱仪 (ThermoFisher, Waltham, MA)。可对量化的核酸进行分析以便确定所述核酸是否具有适当大小, 检查没有发生所述核酸的降解。核酸的降解可通过以下方法来检查, 诸如但不限于琼脂糖凝胶电泳, 基于HPLC的纯化方法诸如但不限于强阴离子交换HPLC、弱阴离子交换HPLC、反相HPLC (RP-HPLC) 以及疏水相互作用HPLC (HIC-HPLC), 液相层析-质谱法 (LCMS), 毛细管电泳 (CE) 以及毛细管凝胶电泳 (CGE)。

[0279] 治疗方法

[0280] 本文提供了用于预防 and/或治疗人和其他哺乳动物的流感的组合物 (例如药物组合物)、方法、试剂盒和试剂。流感病毒RNA疫苗可用作治疗剂或预防剂。它们可在医学中用于预防 and/或治疗感染性疾病。

[0281] 广谱疫苗

[0282] 流感RNA (例如, mRNA) 疫苗可用作治疗剂或预防剂。设想可能存在这样的情况, 即人有感染多于一种 β 冠状病毒 (betacoronavirus) 的风险, 例如, 有感染流感的风险。归因于包括但不限于制造速度、能够快速调适疫苗以适应所感知的地理威胁等的许多因素, 所以RNA (例如, mRNA) 治疗性疫苗特别可经受组合疫苗接种方法。此外, 因为疫苗利用人体来产生抗原性蛋白质, 所以疫苗可经受对较大更复杂抗原性蛋白质的产生, 从而允许在人类受试者中达成适当折叠、表面表达、抗原递呈等。为了防止多于一种流感病毒株, 可以施用组合疫苗, 其包括编码第一种流感病毒的至少一种抗原性多肽的RNA, 并且还包括编码第二种流感病毒的至少一种抗原性多肽的RNA。RNA (mRNA) 可以共同配制, 例如, 在单个LNP中, 或者可以配制在用于共同给药的单独的LNP中。

[0283] 在本发明的各个方面, 提供了一种在受试者中引发针对流感的免疫应答的方法。所述方法涉及向受试者施用包含至少一种RNA多核苷酸的流感病毒RNA疫苗, 所述RNA多核苷酸具有编码至少一种流感病毒抗原性多肽或其免疫原性片段的开放阅读框, 由此在受试者中诱导对流感病毒抗原性多肽或其免疫原性片段具有特异性的免疫应答, 其中在疫苗接种之后, 相对于用预防有效剂量的针对流感病毒的传统疫苗接种的受试者中的抗抗原性多肽抗体滴度, 受试者中的抗抗原性多肽抗体滴度增加。“抗抗原性多肽抗体”是特异性结合至抗原性多肽的血清抗体。

[0284] 预防有效剂量是在临床可接受水平下预防病毒感染的治疗有效剂量。在一些实施方案中, 治疗有效剂量是疫苗的包装说明书中所列的剂量。如本文所用的传统疫苗是指除本发明的mRNA疫苗以外的疫苗。例如, 传统疫苗包括但不限于活体微生物疫苗、杀灭微生物疫苗、亚单位疫苗、蛋白抗原疫苗、DNA疫苗等。在示例性实施方案中, 传统疫苗是已获得监管批准和/或由国立药物监管机构例如美国食品与药物管理局 (FDA) 或欧洲药品管理局 (EMA) 登记的疫苗。

[0285] 在一些实施方案中, 相对于用预防有效剂量的针对流感的传统疫苗接种的受试者中的抗抗原性多肽抗体滴度, 所述受试者中的抗抗原性多肽抗体滴度在接种疫苗后增加1log至10log。

[0286] 在一些实施方案中, 相对于用预防有效剂量的针对流感的传统疫苗接种的受试者中的抗抗原性多肽抗体滴度, 所述受试者中的抗抗原性多肽抗体滴度在接种疫苗后增加1log。

[0287] 在一些实施方案中, 相对于用预防有效剂量的针对流感的传统疫苗接种的受试者中的抗抗原性多肽抗体滴度, 所述受试者中的抗抗原性多肽抗体滴度在接种疫苗后增加2log。

[0288] 在一些实施方案中, 相对于用预防有效剂量的针对流感的传统疫苗接种的受试者中的抗抗原性多肽抗体滴度, 所述受试者中的抗抗原性多肽抗体滴度在接种疫苗后增加3log。

[0289] 在一些实施方案中, 相对于用预防有效剂量的针对流感的传统疫苗接种的受试者中的抗抗原性多肽抗体滴度, 所述受试者中的抗抗原性多肽抗体滴度在接种疫苗后增加5log。

[0290] 在一些实施方案中, 相对于用预防有效剂量的针对流感的传统疫苗接种的受试者中的抗抗原性多肽抗体滴度, 所述受试者中的抗抗原性多肽抗体滴度在接种疫苗后增加

10log。

[0291] 在本发明的其他方面,提供一种在受试者中引发针对流感的免疫应答的方法。所述方法涉及向受试者施用包含至少一种RNA多核苷酸的流感病毒RNA疫苗,所述RNA多核苷酸具有编码至少一种流感病毒抗原性多肽或其免疫原性片段的开放阅读框,由此在受试者中诱导对流感病毒抗原性多肽或其免疫原性片段具有特异性的免疫应答,其中受试者中的所述免疫应答相当于用针对流感病毒的传统疫苗在相对于所述RNA疫苗的2倍至100倍剂量水平下接种的受试者中的免疫应答。

[0292] 在一些实施方案中,受试者中的免疫应答相当于用传统疫苗在相对于所述流感RNA疫苗的两倍剂量水平下接种的受试者中的免疫应答。

[0293] 在一些实施方案中,受试者中的免疫应答相当于用传统疫苗在相对于所述流感RNA疫苗的三倍剂量水平下接种的受试者中的免疫应答。

[0294] 在一些实施方案中,受试者中的免疫应答相当于用传统疫苗在相对于所述流感RNA疫苗的4倍剂量水平下接种的受试者中的免疫应答。

[0295] 在一些实施方案中,受试者中的免疫应答相当于用传统疫苗在相对于所述流感RNA疫苗的5倍剂量水平下接种的受试者中的免疫应答。

[0296] 在一些实施方案中,受试者中的免疫应答相当于用传统疫苗在相对于所述流感RNA疫苗的10倍剂量水平下接种的受试者中的免疫应答。

[0297] 在一些实施方案中,受试者中的免疫应答相当于用传统疫苗在相对于所述流感RNA疫苗的50倍剂量水平下接种的受试者中的免疫应答。

[0298] 在一些实施方案中,受试者中的免疫应答相当于用传统疫苗在相对于所述流感RNA疫苗的100倍剂量水平下接种的受试者中的免疫应答。

[0299] 在一些实施方案中,受试者中的免疫应答相当于用传统疫苗在相对于所述流感RNA疫苗的10倍至1000倍剂量水平下接种的受试者中的免疫应答。

[0300] 在一些实施方案中,受试者中的免疫应答相当于用传统疫苗在相对于所述流感RNA疫苗的100倍至1000倍剂量水平下接种的受试者中的免疫应答。

[0301] 在其他方面,本发明是一种对受试者接种疫苗的组合物或方法,其包括向受试者施用包含一种或多种RNA多核苷酸的核酸疫苗,所述RNA多核苷酸具有编码第一抗原性多肽的开放阅读框,其中向所述受试者施用的所述核酸疫苗的剂量在10 μ g/kg至400 μ g/kg之间。在一些实施方案中,RNA多核苷酸的剂量是1-5 μ g、5-10 μ g、10-15 μ g、15-20 μ g、10-25 μ g、20-25 μ g、20-50 μ g、30-50 μ g、40-50 μ g、40-60 μ g、60-80 μ g、60-100 μ g、50-100 μ g、80-120 μ g、40-120 μ g、40-150 μ g、50-150 μ g、50-200 μ g、80-200 μ g、100-200 μ g、120-250 μ g、150-250 μ g、180-280 μ g、200-300 μ g、50-300 μ g、80-300 μ g、100-300 μ g、40-300 μ g、50-350 μ g、100-350 μ g、200-350 μ g、300-350 μ g、320-400 μ g、40-380 μ g、40-100 μ g、100-400 μ g、200-400 μ g、或300-400 μ g/剂。在一些实施方案中,通过皮内或肌肉注射向受试者施用核酸疫苗。在一些实施方案中,在第0天向受试者施用核酸疫苗。在一些实施方案中,在第21天向受试者施用第二剂量的核酸疫苗。

[0302] 在其他实施方案中,通过测定受试者中的抗抗原性多肽抗体滴度来评估免疫应答。

[0303] 在其他方面,本发明是一种在受试者中引发针对流感的免疫应答的方法,该方法

是通过向所述受试者施用包含至少一种RNA多核苷酸的流感RNA疫苗,该RNA多核苷酸具有编码至少一种流感病毒抗原性多肽或其免疫原性片段的开放阅读框,由此在所述受试者中诱导对所述抗原性多肽或其免疫原性片段具有特异性的免疫应答,其中相对于在用预防有效剂量的针对流感的传统疫苗接种的受试者中诱导的免疫应答,所述受试者中的免疫应答早2天至10周被诱导。在一些实施方案中,在以相对于所述RNA疫苗的2倍至100倍剂量水平接种预防有效剂量的传统疫苗的受试者中诱导了受试者中的免疫应答。

[0304] 在一些实施方案中,相对于在用预防有效剂量的传统疫苗接种的受试者中诱导的免疫应答,所述受试者中的免疫应答被提早2天诱导。

[0305] 在一些实施方案中,相对于在用预防有效剂量的传统疫苗接种的受试者中诱导的免疫应答,所述受试者中的免疫应答被提早3天诱导。

[0306] 在一些实施方案中,相对于在用预防有效剂量的传统疫苗接种的受试者中诱导的免疫应答,所述受试者中的免疫应答被提早1周诱导。

[0307] 在一些实施方案中,相对于在用预防有效剂量的传统疫苗接种的受试者中诱导的免疫应答,所述受试者中的免疫应答被提早2周诱导。

[0308] 在一些实施方案中,相对于在用预防有效剂量的传统疫苗接种的受试者中诱导的免疫应答,所述受试者中的免疫应答被提早3周诱导。

[0309] 在一些实施方案中,相对于在用预防有效剂量的传统疫苗接种的受试者中诱导的免疫应答,所述受试者中的免疫应答被提早5周诱导。

[0310] 在一些实施方案中,相对于在用预防有效剂量的传统疫苗接种的受试者中诱导的免疫应答,所述受试者中的免疫应答被提早10周诱导。

[0311] 本文另外提供了一种通过向受试者施用具有编码第一抗原性多肽的开放阅读框的流感RNA疫苗来在受试者中引发针对流感的免疫应答的方法,其中所述RNA多核苷酸不包含稳定元件,并且其中佐剂并不与所述疫苗共同配制或共同给药。

[0312] 治疗性和预防性组合物

[0313] 本文提供用于预防、治疗或诊断人的流感的组合物(例如药物组合物)、方法、试剂盒和试剂。流感RNA疫苗可用作治疗剂或预防剂。它们可在医学中用于预防和/或治疗感染性疾病。在一些实施方案中,可以设想将本发明的流感疫苗用于对免疫效应细胞进行初免,例如以离体使外周血单核细胞(PBMC)活化,然后将其输注(再输注)至受试者体内。

[0314] 在一些实施方案中,可向受试者(例如哺乳动物受试者,如人类受试者)施用如本文所述的含有RNA多核苷酸的流感疫苗,并且所述RNA多核苷酸在体内被翻译以产生抗原性多肽。在一些实施方案中,受试者是育龄妇女。在一些实施方案中,本文所述的疫苗减少或预防从母亲到儿童的先天性流感传播。(Pass等人(2014) J Ped Infect Dis 3(增刊1):S2-S6.)

[0315] 可诱导流感RNA疫苗在细胞、组织或生物体中翻译多肽(例如抗原或免疫原)。在示例性实施方案中,此类翻译在体内发生,尽管可以设想此类翻译离体、在培养中或在体外发生的实施方案。在示例性实施方案中,使细胞、组织或生物体与有效量的含有流感RNA疫苗的组合物接触,所述疫苗含有具有至少一个编码抗原性多肽的可翻译区域的多核苷酸。

[0316] 流感RNA疫苗的“有效量”至少部分地基于靶标组织、靶标细胞类型、施用手段、多核苷酸的物理特征(例如经修饰的核苷的大小和程度)和流感RNA疫苗的其他组分以及其他

决定因素而提供。一般来说,流感RNA疫苗组合物的有效量提供作为细胞中的抗原产生的函数的诱导或加强免疫应答,优选比含有编码相同抗原或肽抗原的相应未经修饰的多核苷酸的组合物更高效。抗原产生增加可通过以下来证明:细胞转染增加(用RNA疫苗转染的细胞的百分比)、从多核苷酸进行的蛋白质翻译增加、核酸降解降低(如例如由从经修饰的多核苷酸进行的蛋白质翻译的持续时间增加所证明)或宿主细胞的抗原特异性免疫应答改变。

[0317] 在一些实施方案中,本公开的RNA疫苗(包括编码其多肽的多核苷酸)可用于治疗流感。

[0318] 流感RNA疫苗可作为主动免疫方案的一部分向健康个体或在潜伏期期间在感染早期或在症状发作之后的活动性感染期间预防性或治疗性施用。在一些实施方案中,对细胞、组织或受试者提供的本公开的RNA疫苗的量可为有效于免疫预防的量。

[0319] 流感RNA疫苗可与其他预防性或治疗性化合物一起施用。作为一个非限制性例子,预防性或治疗性化合物可为佐剂或加强剂。如本文所用,当涉及预防性组合物如疫苗时,术语“加强”是指额外施用预防性(疫苗)组合物。加强剂(或加强疫苗)可在较早施用预防性组合物之后给予。初次施用预防性组合物与加强之间的给药时间可以是但是不限于1分钟、2分钟、3分钟、4分钟、5分钟、6分钟、7分钟、8分钟、9分钟、10分钟、15分钟、20分钟、35分钟、40分钟、45分钟、50分钟、55分钟、1小时、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7小时、8小时、9小时、10小时、11小时、12小时、13小时、14小时、15小时、16小时、17小时、18小时、19小时、20小时、21小时、22小时、23小时、1天、36小时、2天、3天、4天、5天、6天、1周、10天、2周、3周、1个月、2月、3月、4月、5月、6月、7月、8月、9月、10月、11月、1年、18月、2年、3年、4年、5年、6年、7年、8年、9年、10年、11年、12年、13年、14年、15年、16年、17年、18年、19年、20年、25年、30年、35年、40年、45年、50年、55年、60年、65年、70年、75年、80年、85年、90年、95年或超过99年。在示例性实施方案中,在初次施用预防性组合物与加强剂之间的施用时间可为但不限于1周、2周、3周、1个月、2个月、3个月、6个月或1年。

[0320] 在一些实施方案中,类似于本领域中已知的失活疫苗的施用,可肌肉或皮内施用流感RNA疫苗。

[0321] 视感染的盛行性或未满足医学需求的程度或水平而定,流感RNA疫苗可用于多种环境中。作为一个非限制性例子,RNA疫苗可用于治疗和/或预防多种感染性疾病。RNA疫苗具有优越特性,因为相比于可商购的抗病毒物,它们产生大得多的抗体滴度,并且更早产生应答。

[0322] 本文提供药物组合物,其包括流感RNA疫苗和RNA疫苗组合物和/或复合物,任选与一种或多种药学上可接受的赋形剂组合。

[0323] 流感RNA疫苗可单独或与一种或多种其他组分结合配制或施用。例如,流感RNA疫苗(疫苗组合物)可包含包括但不限于佐剂的其他组分。在一些实施方案中,流感RNA疫苗不包含佐剂(它们不含佐剂)。

[0324] 流感RNA疫苗可以与一种或多种药学上可接受的赋形剂组合配制或施用。在一些实施方案中,疫苗组合物包含至少一种另外的活性物质,如例如治疗活性物质、预防活性物质或两者的组合。疫苗组合物可为无菌的、无热原的或无菌且无热原。在配制和/或制造药物制品如疫苗组合物时的一般考虑可见于例如Remington:The Science and Practice of Pharmacy第21版,Lippincott Williams & Wilkins,2005(通过引用以其整体并入本

文)中。

[0325] 在一些实施方案中,向人、人患者或受试者施用流感RNA疫苗。出于本公开的目的,短语“活性成分”通常是指RNA疫苗或其中含有的多核苷酸,例如编码抗原性多肽的RNA多核苷酸(例如,mRNA多核苷酸)。

[0326] 可通过药理学领域中已知或之后开发的任何方法制备本文所述的流感疫苗组合物的配制品。一般来说,此类制备方法包括以下步骤:使活性成分(例如,mRNA多核苷酸)与赋形剂和/或一种或多种其他辅助成分缔合,然后如果必要和/或合乎需要,将产品划分、成形和/或包装成所需单剂量单位或多剂量单位产品。

[0327] 本公开的药物组合物中的活性成分、药学上可接受的赋形剂和/或任何额外成分的相对量将视治疗的受试者的身份、大小和/或状况而变化,并且进一步视将采用的施用组合物的途径而变化。举例来说,组合物可包含在0.1%与100%之间,例如在0.5与50%之间,在1%-30%之间,在5%-80%之间,至少80% (w/w) 的活性成分。

[0328] 可使用一种或多种赋形剂配制流感RNA疫苗以:(1)使稳定性增加;(2)使细胞转染增加;(3)容许持续或延迟释放(例如从储库配制品释放);(4)改变生物分布(例如靶向具体组织或细胞类型);(5)使所编码蛋白质在体内的翻译增加;和/或(6)改变所编码蛋白质(抗原)在体内的释放概况。除传统赋形剂如任何和所有溶剂、分散介质、稀释剂或其他液体媒介物、分散或混悬助剂、表面活性剂、等张剂、增稠剂或乳化剂、防腐剂之外,赋形剂还可包括但不限于类脂质、脂质体、脂质纳米粒子、聚合物、脂质复合物、核壳纳米粒子、肽、蛋白质、用流感RNA疫苗转染的细胞(例如用于向受试者中移植)、透明质酸酶、纳米粒子模拟物及其组合。

[0329] 稳定元件

[0330] 已发现天然存在的真核mRNA分子含有稳定元件,除其他结构特征如5'-帽结构或3'-聚(A)尾之外,还包括但不限于在它们的5'端的非翻译区(UTR)(5'UTR)和/或在它们的3'端的非翻译区(3'UTR)。5'UTR与3'UTR两者均典型地从基因组DNA转录,并且是成熟前mRNA的元件。成熟mRNA的特征性结构特征,如5'-帽和3'-聚(A)尾,通常在mRNA加工期间被添加至转录的(成熟前)mRNA中。3'-聚(A)尾典型地是一段被添加至转录的mRNA的3'端的腺嘌呤核苷酸。它可包含多达约400个腺嘌呤核苷酸。在一些实施方案中,3'-聚(A)尾的长度可为对于个体mRNA的稳定性来说所必需的要素。

[0331] 在一些实施方案中,RNA疫苗可包括一种或多种稳定元件。稳定元件可包括例如组蛋白茎环。已鉴定作为32kDa蛋白质的茎环结合蛋白(SLBP)。它在核与细胞质两者中在组蛋白信使的3'端与组蛋白茎环缔合。它的表达水平由细胞周期调控;它在S期期间达到峰值,此时组蛋白mRNA水平也升高。已显示所述蛋白质为由U7snRNP对组蛋白前mRNA进行高效3'端加工所必需。在加工之后,SLBP继续与茎环缔合,然后在细胞质中刺激成熟组蛋白mRNA翻译成组蛋白。SLBP的RNA结合结构域遍及后生动物和原生动物是保守的;它与组蛋白茎环的结合取决于环的结构。最小结合位点包括相对于茎环在5'的至少三个核苷酸和在3'的两个核苷酸。

[0332] 在一些实施方案中,RNA疫苗包括编码区、至少一个组蛋白茎环,以及任选地,聚(A)序列或聚腺苷酸化信号。所述聚(A)序列或多腺苷酸化信号通常应使所编码蛋白质的表达水平增加。在一些实施方案中,所编码蛋白质不是组蛋白、报告蛋白(例如荧光素酶、GFP、

EGFP、 β -半乳糖苷酶、EGFP) 或标志物或选择蛋白 (例如 α -球蛋白、半乳糖激酶和黄嘌呤:鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶 (GPT))。

[0333] 在一些实施方案中, 尽管两者均代表自然界中的可选机理, 但聚 (A) 序列或聚腺苷酸化信号和至少一个组蛋白茎环的组合以协同方式作用以增加蛋白质表达, 超过个体元件各自观察到的水平。已经发现, 聚 (A) 和至少一个组蛋白茎环的组合的协同作用不取决于元件的顺序或聚 (A) 序列的长度。

[0334] 在一些实施方案中, RNA疫苗不包含组蛋白下游元件 (HDE)。“组蛋白下游元件” (HDE) 包括在天然存在的茎环的3'的一段具有约15至20个核苷酸的富含嘌呤的多核苷酸, 其代表参与将组蛋白前mRNA加工成成熟组蛋白mRNA中的U7snRNA的结合位点。理想地, 本发明核酸不包括内含子。

[0335] 在一些实施方案中, RNA疫苗可含有或可不含有增强子和/或启动子序列, 其可以是经修饰的或未经修饰的, 或其可以是活化的或未活化的。在一些实施方案中, 组蛋白茎环通常源于组蛋白基因, 并且包括被由短序列组成的间隔子分隔的两个相邻的、部分或完全反向互补序列的分子内碱基配对, 其形成结构的环。未配对的环区域典型地不能与茎环元件中的任一者进行碱基配对。它更经常存在于RNA中, 因为许多RNA二级结构的关键组分, 但也可存在于单链DNA中。茎环结构的稳定性通常取决于配对区域的长度、错配或凸起数目和碱基组成。在一些实施方案中, 可产生摆动碱基配对 (非沃森-克里克 (non-Watson-Crick) 碱基配对)。在一些实施方案中, 至少一个组蛋白茎环序列包含15至45个核苷酸的长度。

[0336] 在其他实施方案中, RNA疫苗可已被移除一个或多个富含AU的序列。有时被称为AURES的这些序列是见于3'UTR中的去稳定序列。AURES可以从RNA疫苗中移除。可选地, AURES可以保留在RNA疫苗中。

[0337] 纳米粒子配制品

[0338] 在一些实施方案中, 在纳米粒子中配制流感RNA疫苗。在一些实施方案中, 在脂质纳米粒子中配制流感RNA疫苗。在一些实施方案中, 在被称为阳离子脂质纳米粒子的脂质-聚阳离子复合物中配制流感RNA疫苗。脂质纳米粒子的形成可以通过本领域已知的方法和/或如美国公开号20120178702 (其通过引用以其整体并入本文) 所述的方法来实现。作为一非限制性例子, 聚阳离子可包括阳离子肽或多肽, 诸如但不限于聚赖氨酸、聚鸟氨酸和/或聚精氨酸以及国际公开号WO 2012013326或美国专利公开号US 20130142818 (其各自通过引用以其整体并入本文) 中描述的阳离子肽。在一些实施方案中, 在包括非阳离子脂质诸如但不限于胆固醇或二油酰基磷脂酰乙醇胺 (DOPE) 的脂质纳米粒子中配制流感RNA疫苗。

[0339] 脂质纳米粒子配制品可受以下但不限于以下的影响: 对阳离子脂质组分的选择、阳离子脂质饱和度、PEG化的性质、所有组分的比率和诸如尺寸等的生物物理学参数。在Semple等人 (Nature Biotech. 201028:172-176; 通过引用以其整体并入本文) 的一个例子中, 脂质纳米粒子配制品由57.1%阳离子脂质、7.1%二棕榈酰基磷脂酰胆碱、34.3%胆固醇和1.4%PEG-c-DMA组成。作为另一例子, 改变阳离子脂质的组成可将siRNA更有效递送至各种抗原递呈细胞 (Basha等人Mol Ther. 2011 19:2186-2200; 通过引用以其整体并入本文)。

[0340] 在一些实施方案中, 脂质纳米粒子配制品可包含35%至45%阳离子脂质、40%至

50%阳离子脂质、50%至60%阳离子脂质和/或55%至65%阳离子脂质。在一些实施方案中,在脂质纳米粒子中脂质与RNA(例如,mRNA)的比率可为5:1至20:1、10:1至25:1、15:1至30:1和/或至少30:1。

[0341] 在一些实施方案中,可使脂质纳米粒子配制品中的PEG的比率增加或降低,和/或可将PEG脂质的碳链长度从C14修饰为C18以改变脂质纳米粒子配制品的药物动力学和/或生物分布。作为非限制性例子,脂质纳米粒子配制品可含有相较于阳离子脂质、DSPC和胆固醇的0.5%至3.0%、1.0%至3.5%、1.5%至4.0%、2.0%至4.5%、2.5%至5.0%和/或3.0%至6.0%的脂质摩尔比的PEG-c-DOMG(R-3-[(ω -甲氧基-聚(乙二醇)2000)氨基甲酰基])-1,2-二肉豆蔻基氧基丙基-3-胺)(在本文中也称为PEG-DOMG)。在一些实施方案中,PEG-c-DOMG可用PEG脂质诸如但不限于PEG-DSG(1,2-二硬脂酰基-sn-甘油,甲氧基聚乙二醇)、PEG-DMG(1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油)和/或PEG-DPG(1,2-二棕榈酰基-sn-甘油,甲氧基聚乙二醇)替代。阳离子脂质可选自本领域中已知的任何脂质,诸如但不限于DLin-MC3-DMA、DLin-DMA、C12-200和DLin-KC2-DMA。

[0342] 在一些实施方案中,流感RNA疫苗配制品是包含至少一种脂质的纳米粒子。脂质可选自但不限于DLin-DMA、DLin-K-DMA、98N12-5、C12-200、DLin-MC3-DMA、DLin-KC2-DMA、DODMA、PLGA、PEG、PEG-DMG、PEG化脂质以及氨基醇脂质。在一些实施方案中,脂质可以是阳离子脂质,诸如但不限于DLin-DMA、DLin-D-DMA、DLin-MC3-DMA、DLin-KC2-DMA、DODMA以及氨基醇脂质。氨基醇阳离子脂质可为美国专利公开号US 20130150625中所述和/或通过其中所述的方法制备的脂质,所述专利通过引用以其整体并入本文。作为非限制性例子,阳离子脂质可以是2-氨基-3-[(9Z,12Z)-十八烷-9,12-二烯-1-基氧基]-2-[(9Z,2Z)-十八烷-9,12-二烯-1-基氧基]甲基}丙-1-醇(US 20130150625中的化合物1);2-氨基-3-[(9Z)-十八烷-9-烯-1-基氧基]-2-[(9Z)-十八烷-9-烯-1-基氧基]甲基}丙-1-醇(US 20130150625中的化合物2);2-氨基-3-[(9Z,12Z)-十八烷-9,12-二烯-1-基氧基]-2-[(辛基氧基)甲基]丙-1-醇(US 20130150625中的化合物3);以及2-(二甲基氨基)-3-[(9Z,12Z)-十八烷-9,12-二烯-1-基氧基]-2-[(9Z,12Z)-十八烷-9,12-二烯-1-基氧基]甲基}丙-1-醇(US 20130150625中的化合物4);或其任何药学上可接受的盐或立体异构体。

[0343] 脂质纳米粒子配制品典型地包含脂质,特别是可电离阳离子脂质,例如,2,2-二亚油醇基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧杂环戊烷(DLin-KC2-DMA)、二亚油醇基-甲基-4-二甲基氨基丁酸酯(DLin-MC3-DMA)、或二((Z)-壬-2-烯-1-基)9-((4-(二甲基氨基)丁酰基)氧基)十七烷二酸酯(L319),并且进一步包含中性脂质、固醇以及能够减少粒子聚集的分子,例如PEG或经PEG修饰的脂质。

[0344] 在一些实施方案中,脂质纳米粒子配制品基本上由以下组成:(i)至少一种选自由以下组成的组的脂质:2,2-二亚油醇基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧杂环戊烷(DLin-KC2-DMA)、二亚油醇基-甲基-4-二甲基氨基丁酸酯(DLin-MC3-DMA)和二((Z)-壬-2-烯-1-基)9-((4-(二甲基氨基)丁酰基)氧基)十七烷二酸酯(L319);(ii)中性脂质,其选自DSPC、DPPC、POPC、DOPE和SM;(iii)固醇,例如胆固醇;和(iv)PEG-脂质,例如PEG-DMG或PEG-cDMA,按摩尔比计20%-60%阳离子脂质:5%-25%中性脂质:25%-55%固醇:0.5%-15%PEG-脂质。

[0345] 在一些实施方案中,脂质纳米粒子配制品包括基于摩尔数25%至75%的选自2,2-

二亚油醇基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧杂环戊烷 (DLin-KC2-DMA)、二亚油醇基-甲基-4-二甲基氨基丁酸酯 (DLin-MC3-DMA) 和二((Z)-壬-2-烯-1-基) 9-((4-(二甲基氨基) 丁酰基) 氧基) 十七烷二酸酯 (L319) 的阳离子脂质, 例如基于摩尔数35%至65%、45%至65%、60%、57.5%、50%或40%。

[0346] 在一些实施方案中, 脂质纳米粒子配制品包括基于摩尔数0.5%至15%的中性脂质, 例如基于摩尔数3%至12%、5%至10%或15%、10%或7.5%。中性脂质的例子包括但不限于DSPC、POPC、DPPC、DOPE和SM。在一些实施方案中, 配制品包括基于摩尔数, 5%至50%的固醇(例如基于摩尔数15%至45%、20%至40%、40%、38.5%、35%或31%)。固醇的一个非限制性例子是胆固醇。在一些实施方案中, 脂质纳米粒子配制品包括基于摩尔数0.5%至20%的PEG或经PEG修饰的脂质(例如基于摩尔数0.5%至10%、0.5%至5%、1.5%、0.5%、1.5%、3.5%或5%)。在一些实施方案中, PEG或经PEG修饰的脂质包含平均分子量为2,000Da的PEG分子。在一些实施方案中, PEG或经PEG修饰的脂质包含平均分子量小于2,000例如约1,500Da、约1,000Da或约500Da的PEG分子。经PEG修饰的脂质的非限制性例子包括PEG-二硬脂酰基甘油(PEG-DMG)(在本文中也称为PEG-C14或C14-PEG)、PEG-cDMA(进一步讨论于Reyes等人, J. Controlled Release, 107, 276-287 (2005) 中, 所述文献的内容通过引用以其整体并入本文)。

[0347] 在一些实施方案中, 脂质纳米粒子配制品包括基于摩尔数25%-75%的选自2,2-二亚油醇基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧杂环戊烷 (DLin-KC2-DMA)、二亚油醇基-甲基-4-二甲基氨基丁酸酯 (DLin-MC3-DMA) 和二((Z)-壬-2-烯-1-基) 9-((4-(二甲基氨基) 丁酰基) 氧基) 十七烷二酸酯 (L319) 的阳离子脂质, 0.5%-15%的中性脂质, 5%-50%的固醇, 和0.5%-20%的PEG或经PEG修饰的脂质。

[0348] 在一些实施方案中, 脂质纳米粒子配制品包括基于摩尔数35%-65%的选自2,2-二亚油醇基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧杂环戊烷 (DLin-KC2-DMA)、二亚油醇基-甲基-4-二甲基氨基丁酸酯 (DLin-MC3-DMA) 和二((Z)-壬-2-烯-1-基) 9-((4-(二甲基氨基) 丁酰基) 氧基) 十七烷二酸酯 (L319) 的阳离子脂质, 3%-12%的中性脂质, 15%-45%的固醇, 和0.5%-10%的PEG或经PEG修饰的脂质。

[0349] 在一些实施方案中, 脂质纳米粒子配制品包括基于摩尔数45%-65%的选自2,2-二亚油醇基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧杂环戊烷 (DLin-KC2-DMA)、二亚油醇基-甲基-4-二甲基氨基丁酸酯 (DLin-MC3-DMA) 和二((Z)-壬-2-烯-1-基) 9-((4-(二甲基氨基) 丁酰基) 氧基) 十七烷二酸酯 (L319) 的阳离子脂质, 5%-10%的中性脂质, 25%-40%的固醇, 和0.5%-10%的PEG或经PEG修饰的脂质。

[0350] 在一些实施方案中, 脂质纳米粒子配制品包括基于摩尔数60%的选自2,2-二亚油醇基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧杂环戊烷 (DLin-KC2-DMA)、二亚油醇基-甲基-4-二甲基氨基丁酸酯 (DLin-MC3-DMA) 和二((Z)-壬-2-烯-1-基) 9-((4-(二甲基氨基) 丁酰基) 氧基) 十七烷二酸酯 (L319) 的阳离子脂质, 7.5%的中性脂质, 31%的固醇, 和1.5%的PEG或经PEG修饰的脂质。

[0351] 在一些实施方案中, 脂质纳米粒子配制品包括基于摩尔数50%的选自2,2-二亚油醇基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧杂环戊烷 (DLin-KC2-DMA)、二亚油醇基-甲基-4-二甲基氨基丁酸酯 (DLin-MC3-DMA) 和二((Z)-壬-2-烯-1-基) 9-((4-(二甲基氨基) 丁酰基) 氧

基)十七烷二酸酯(L319)的阳离子脂质,10%的中性脂质,38.5%的固醇,和1.5%的PEG或经PEG修饰的脂质。

[0352] 在一些实施方案中,脂质纳米粒子配制品包括基于摩尔数50%的选自2,2-二亚油醇基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧杂环戊烷(DLin-KC2-DMA)、二亚油醇基-甲基-4-二甲基氨基丁酸酯(DLin-MC3-DMA)和二((Z)-壬-2-烯-1-基)9-((4-(二甲基氨基)丁酰基)氧基)十七烷二酸酯(L319)的阳离子脂质,10%的中性脂质,35%的固醇,和4.5%或5%的PEG或经PEG修饰的脂质,和0.5%的靶向性脂质。

[0353] 在一些实施方案中,脂质纳米粒子配制品包括基于摩尔数40%的选自2,2-二亚油醇基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧杂环戊烷(DLin-KC2-DMA)、二亚油醇基-甲基-4-二甲基氨基丁酸酯(DLin-MC3-DMA)和二((Z)-壬-2-烯-1-基)9-((4-(二甲基氨基)丁酰基)氧基)十七烷二酸酯(L319)的阳离子脂质,15%的中性脂质,40%的固醇,和5%的PEG或经PEG修饰的脂质。

[0354] 在一些实施方案中,脂质纳米粒子配制品包括基于摩尔数57.2%的选自2,2-二亚油醇基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧杂环戊烷(DLin-KC2-DMA)、二亚油醇基-甲基-4-二甲基氨基丁酸酯(DLin-MC3-DMA)和二((Z)-壬-2-烯-1-基)9-((4-(二甲基氨基)丁酰基)氧基)十七烷二酸酯(L319)的阳离子脂质,7.1%的中性脂质,34.3%的固醇,和1.4%的PEG或经PEG修饰的脂质。

[0355] 在一些实施方案中,脂质纳米粒子配制品包括基于摩尔数57.5%的选自作为PEG-cDMA (PEG-cDMA进一步讨论于Reyes等人J.Controlled Release,107,276-287 (2005)中,所述文献的内容通过引用以其整体并入本文)的PEG脂质的阳离子脂质,7.5%的中性脂质、31.5%的固醇、和3.5%的PEG或经PEG修饰的脂质。

[0356] 在一些实施方案中,脂质纳米粒子配制品基本上由按摩尔比计20%-70%阳离子脂质:5%-45%中性脂质:20%-55%胆固醇:0.5%-15%经PEG修饰的脂质的脂质混合物组成。在一些实施方案中,脂质纳米粒子配制品基本上由按摩尔比计20%-60%阳离子脂质:5%-25%中性脂质:25%-55%胆固醇:0.5%-15%经PEG修饰的脂质的脂质混合物组成。

[0357] 在一些实施方案中,摩尔脂质比是50/10/38.5/1.5 (mol%阳离子脂质/中性脂质,例如DSPC/胆固醇/经PEG修饰的脂质,例如PEG-DMG、PEG-DSG或PEG-DPG)、57.2/7.1134.3/1.4 (mol%阳离子脂质/中性脂质,例如DPPC/胆固醇/经PEG修饰的脂质,例如PEG-cDMA)、40/15/40/5 (mol%阳离子脂质/中性脂质,例如DSPC/胆固醇/经PEG修饰的脂质,例如PEG-DMG)、50/10/35/4.5/0.5 (mol%阳离子脂质/中性脂质,例如DSPC/胆固醇/经PEG修饰的脂质,例如PEG-DSG)、50/10/35/5 (阳离子脂质/中性脂质,例如DSPC/胆固醇/经PEG修饰的脂质,例如PEG-DMG)、40/10/40/10 (mol%阳离子脂质/中性脂质,例如DSPC/胆固醇/经PEG修饰的脂质,例如PEG-DMG或PEG-cDMA)、35/15/40/10 (mol%阳离子脂质/中性脂质,例如DSPC/胆固醇/经PEG修饰的脂质,例如PEG-DMG或PEG-cDMA)或52/13/30/5 (mol%阳离子脂质/中性脂质,例如DSPC/胆固醇/经PEG修饰的脂质,例如PEG-DMG或PEG-cDMA)。

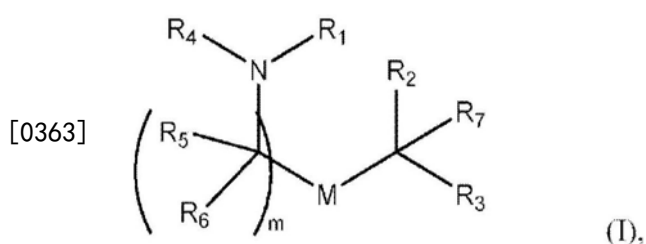
[0358] 脂质纳米粒子组合和制备它们的方法的非限制性例子描述于例如Semple等人(2010)Nat.Biotechnol.28:172-176;Jayarama等人(2012),Angew.Chem.Int.Ed.,51:8529-8533;以及Maier等人(2013)Molecular Therapy 21,1570-1578(其各自的内容通过引用以其整体并入本文)中。

[0359] 在一些实施方案中,脂质纳米粒子配制品可包含阳离子脂质、PEG脂质和结构性脂质,并且任选包含非阳离子脂质。作为一个非限制性例子,脂质纳米粒子可包含40%-60%的阳离子脂质,5%-15%的非阳离子脂质,1%-2%的PEG脂质和30%-50%的结构性脂质。作为另一个非限制性例子,脂质纳米粒子可包含50%阳离子脂质,10%非阳离子脂质,1.5%PEG脂质和38.5%结构性脂质。作为又一个非限制性例子,脂质纳米粒子可包含55%阳离子脂质,10%非阳离子脂质,2.5%PEG脂质和32.5%结构性脂质。在一些实施方案中,阳离子脂质可以是本文描述的任何阳离子脂质,诸如但不限于DLin-KC2-DMA、DLin-MC3-DMA以及L319。

[0360] 在一些实施方案中,本文所述的脂质纳米粒子配制品可为4组分脂质纳米粒子。脂质纳米粒子可包含阳离子脂质、非阳离子脂质、PEG脂质和结构性脂质。作为一个非限制性例子,脂质纳米粒子可包含40%-60%的阳离子脂质,5%-15%的非阳离子脂质,1%-2%的PEG脂质和30%-50%的结构性脂质。作为另一个非限制性例子,脂质纳米粒子可包含50%阳离子脂质,10%非阳离子脂质,1.5%PEG脂质和38.5%结构性脂质。作为又一个非限制性例子,脂质纳米粒子可包含55%阳离子脂质,10%非阳离子脂质,2.5%PEG脂质和32.5%结构性脂质。在一些实施方案中,阳离子脂质可以是本文描述的任何阳离子脂质,诸如但不限于DLin-KC2-DMA、DLin-MC3-DMA以及L319。

[0361] 在一些实施方案中,本文描述的脂质纳米粒子配制品可包含阳离子脂质、非阳离子脂质、PEG脂质以及结构脂质。作为非限制性例子,脂质纳米粒子包含50%的阳离子脂质DLin-KC2-DMA、10%的非阳离子脂质DSPC、1.5%的PEG脂质PEG-DOMG以及38.5%的结构脂质胆固醇。作为非限制性例子,脂质纳米粒子包含50%的阳离子脂质DLin-MC3-DMA、10%的非阳离子脂质DSPC、1.5%的PEG脂质PEG-DOMG以及38.5%的结构脂质胆固醇。作为非限制性例子,脂质纳米粒子包含50%的阳离子脂质DLin-MC3-DMA、10%的非阳离子脂质DSPC、1.5%的PEG脂质PEG-DMG以及38.5%的结构脂质胆固醇。作为又一个非限制性例子,脂质纳米粒子包含55%的阳离子脂质L319、10%的非阳离子脂质DSPC、2.5%的PEG脂质PEG-DMG以及32.5%的结构脂质胆固醇。

[0362] 在一些实施方案中,纳米粒子包含具有化学式(I)的化合物:



[0364] 或其盐或异构体,其中:

[0365] R₁选自下组,该组由以下组成:C₅₋₃₀烷基、C₅₋₂₀烯基、-R*YR''、-YR''、和-R''M'R' ;

[0366] R₂和R₃独立地选自下组,该组由以下组成:H、C₁₋₁₄烷基、C₂₋₁₄烯基、-R*YR''、-YR''、和-R*OR'',或R₂和R₃连同它们所附接的原子一起形成杂环或碳环;

[0367] R₄选自下组,该组由以下组成:C₃₋₆碳环、-(CH₂)_nQ、-(CH₂)_nCHQR、-CHQR、-CQ(R)₂、和未取代的C₁₋₆烷基,其中Q选自碳环、杂环、-OR、-O(CH₂)_nN(R)₂、-C(O)OR、-OC(O)R、-CX₃、-CX₂H、-CXH₂、-CN、-N(R)₂、-C(O)N(R)₂、-N(R)C(O)R、-N(R)S(O)₂R、-N(R)C(O)N(R)₂、-N(R)C(S)N(R)₂、-N(R)R₈、-O(CH₂)_nOR、-N(R)C(=NR₉)N(R)₂、-N(R)C(=CHR₉)N(R)₂、-OC(O)N(R)₂、-

$N(R)C(O)OR$ 、 $-N(OR)C(O)R$ 、 $-N(OR)S(O)_2R$ 、 $-N(OR)C(O)OR$ 、 $-N(OR)C(O)N(R)_2$ 、 $-N(OR)C(S)N(R)_2$ 、 $-N(OR)C(=NR_9)N(R)_2$ 、 $-N(OR)C(=CHR_9)N(R)_2$ 、 $-C(=NR_9)N(R)_2$ 、 $-C(=NR_9)R$ 、 $-C(O)N(R)OR$ 、和 $-C(R)N(R)_2C(O)OR$ ，并且每个 n 独立地选自1、2、3、4、和5；

[0368] 每个 R_5 独立地选自下组，该组由以下组成： C_{1-3} 烷基、 C_{2-3} 烯基、和H；

[0369] 每个 R_6 独立地选自下组，该组由以下组成： C_{1-3} 烷基、 C_{2-3} 烯基、和H；

[0370] M 和 M' 独立地选自 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-C(O)N(R')-$ 、

[0371] $-N(R')C(O)-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-C(S)S-$ 、 $-SC(S)-$ 、 $-CH(OH)-$ 、 $-P(O)(OR')O-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S-S-$ 、芳基基团、和杂芳基基团；

[0372] R_7 选自下组，该组由以下组成： C_{1-3} 烷基、 C_{2-3} 烯基、和H；

[0373] R_8 选自下组，该组由以下组成： C_{3-6} 碳环和杂环；

[0374] R_9 选自下组，该组由以下组成：H、CN、 NO_2 、 C_{1-6} 烷基、 $-OR$ 、 $-S(O)_2R$ 、 $-S(O)_2N(R)_2$ 、 C_{2-6} 烯基、 C_{3-6} 碳环和杂环；

[0375] 每个 R 独立地选自下组，该组由以下组成： C_{1-3} 烷基、 C_{2-3} 烯基、和H；

[0376] 每个 R' 独立地选自下组，该组由以下组成： C_{1-18} 烷基、 C_{2-18} 烯基、 $-R*YR''$ 、 $-YR''$ 、和H；

[0377] 每个 R'' 独立地选自下组，该组由以下组成： C_{3-14} 烷基和 C_{3-14} 烯基；

[0378] 每个 $R*$ 独立地选自下组，该组由以下组成： C_{1-12} 烷基和 C_{2-12} 烯基；

[0379] 每个 Y 独立地是 C_{3-6} 碳环；

[0380] 每个 X 独立地选自下组，该组由以下组成：F、Cl、Br、和I；并且

[0381] m 选自5、6、7、8、9、10、11、12、和13。

[0382] 在一些实施方案中，具有化学式(I)的化合物的子集包括以下那些，其中当 R_4 是 $-(CH_2)_nQ$ 、 $-(CH_2)_nCHQR$ 、 $-CHQR$ 、或 $-CQ(R)_2$ 时，则(i) Q 不是 $-N(R)_2$ ，此时 n 是1、2、3、4或5，或(ii) Q 不是5元、6元、或7元杂环烷基，此时 n 是1或2。

[0383] 在一些实施方案中，具有化学式(I)的化合物的另一个子集包括以下那些，其中

[0384] R_1 选自下组，该组由以下组成： C_{5-30} 烷基、 C_{5-20} 烯基、 $-R*YR''$ 、 $-YR''$ 、和 $-R''M'R'$ ；

[0385] R_2 和 R_3 独立地选自下组，该组由以下组成：H、 C_{1-14} 烷基、 C_{2-14} 烯基、 $-R*YR''$ 、 $-YR''$ 、和 $-R*OR''$ ，或 R_2 和 R_3 连同它们所附接的原子一起形成杂环或碳环；

[0386] R_4 选自下组，该组由以下组成： C_{3-6} 碳环、 $-(CH_2)_nQ$ 、 $-(CH_2)_nCHQR$ 、 $-CHQR$ 、 $-CQ(R)_2$ 、和未取代的 C_{1-6} 烷基，其中 Q 选自 C_{3-6} 碳环、具有一个或多个选自N、O、和S的杂原子的5元至14元杂芳基、 $-OR$ 、 $-O(CH_2)_nN(R)_2$ 、 $-C(O)OR$ 、 $-OC(O)R$ 、 $-CX_3$ 、 $-CX_2H$ 、 $-CXH_2$ 、 $-CN$ 、 $-C(O)N(R)_2$ 、 $-N(R)C(O)R$ 、 $-N(R)S(O)_2R$ 、 $-N(R)C(O)N(R)_2$ 、 $-N(R)C(S)N(R)_2$ 、 $-CRN(R)_2C(O)OR$ 、 $-N(R)R_8$ 、 $-O(CH_2)_nOR$ 、 $-N(R)C(=NR_9)N(R)_2$ 、 $-N(R)C(=CHR_9)N(R)_2$ 、 $-OC(O)N(R)_2$ 、 $-N(R)C(O)OR$ 、 $-N(OR)C(O)R$ 、 $-N(OR)S(O)_2R$ 、 $-N(OR)C(O)OR$ 、 $-N(OR)C(O)N(R)_2$ 、 $-N(OR)C(S)N(R)_2$ 、 $-N(OR)C(=NR_9)N(R)_2$ 、 $-N(OR)C(=CHR_9)N(R)_2$ 、 $-C(=NR_9)N(R)_2$ 、 $-C(=NR_9)R$ 、 $-C(O)N(R)OR$ 、和具有一个或多个选自N、O、和S的杂原子的5元至14元杂环烷基，所述5元至14元杂环烷基被选自以下的一个或多个取代基取代：氧代($=O$)、OH、氨基、单-或二-烷基氨基、和 C_{1-3} 烷基，并且每个 n 独立地选自1、2、3、4、和5；

[0387] 每个 R_5 独立地选自下组，该组由以下组成： C_{1-3} 烷基、 C_{2-3} 烯基、和H；

[0388] 每个 R_6 独立地选自下组，该组由以下组成： C_{1-3} 烷基、 C_{2-3} 烯基、和H；

[0389] M 和 M' 独立地选自 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-C(O)N(R')-$ 、 $-N(R')C(O)-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C$

(S)-、-C(S)S-、-SC(S)-、-CH(OH)-、-P(O)(OR')O-、-S(O)₂-、-S-S-、芳基基团、和杂芳基基团；

[0390] R₇选自下组，该组由以下组成：C₁₋₃烷基、C₂₋₃烯基、和H；

[0391] R₈选自下组，该组由以下组成：C₃₋₆碳环和杂环；

[0392] R₉选自下组，该组由以下组成：H、CN、NO₂、C₁₋₆烷基、-OR、-S(O)₂R、-S(O)₂N(R)₂、C₂₋₆烯基、C₃₋₆碳环和杂环；

[0393] 每个R独立地选自下组，该组由以下组成：C₁₋₃烷基、C₂₋₃烯基、和H；

[0394] 每个R'独立地选自下组，该组由以下组成：C₁₋₁₈烷基、C₂₋₁₈烯基、-R*YR''、-YR''、和H；

[0395] 每个R''独立地选自下组，该组由以下组成：C₃₋₁₄烷基和C₃₋₁₄烯基；

[0396] 每个R*独立地选自下组，该组由以下组成：C₁₋₁₂烷基和C₂₋₁₂烯基；

[0397] 每个Y独立地是C₃₋₆碳环；

[0398] 每个X独立地选自下组，该组由以下组成：F、Cl、Br、和I；并且

[0399] m选自5、6、7、8、9、10、11、12、和13，

[0400] 或其盐或异构体。

[0401] 在一些实施方案中，具有化学式(I)的化合物的另一个子集包括以下那些，其中

[0402] R₁选自下组，该组由以下组成：C₅₋₃₀烷基、C₅₋₂₀烯基、-R*YR''、-YR''、和-R''M'R'；

[0403] R₂和R₃独立地选自下组，该组由以下组成：H、C₁₋₁₄烷基、C₂₋₁₄烯基、-R*YR''、-YR''、和-R*OR''，或R₂和R₃连同它们所附接的原子一起形成杂环或碳环；

[0404] R₄选自下组，该组由以下组成：C₃₋₆碳环、-(CH₂)_nQ、-(CH₂)_nCHQR、-CHQR、-CQ(R)₂、和未取代的C₁₋₆烷基，其中Q选自C₃₋₆碳环、具有一个或多个选自N、O、和S的杂原子的5元至14元杂环、-OR、-O(CH₂)_nN(R)₂、-C(O)OR、-OC(O)R、-CX₃、-CX₂H、-CXH₂、-CN、-C(O)N(R)₂、-N(R)C(O)R、-N(R)S(O)₂R、-N(R)C(O)N(R)₂、-N(R)C(S)N(R)₂、-CRN(R)₂C(O)OR、-N(R)R₈、-O(CH₂)_nOR、-N(R)C(=NR₉)N(R)₂、-N(R)C(=CHR₉)N(R)₂、-OC(O)N(R)₂、-N(R)C(O)OR、-N(OR)C(O)R、-N(OR)S(O)₂R、-N(OR)C(O)OR、-N(OR)C(O)N(R)₂、-N(OR)C(S)N(R)₂、-N(OR)C(=NR₉)N(R)₂、-N(OR)C(=CHR₉)N(R)₂、-C(=NR₉)R、-C(O)N(R)OR、和-C(=NR₉)N(R)₂，并且每个n独立地选自1、2、3、4、和5；并且当Q是5元至14元杂环并且(i) R₄是-(CH₂)_nQ，其中n是1或2，或(ii) R₄是-(CH₂)_nCHQR，其中n是1，或(iii) R₄是-CHQR和-CQ(R)₂时，则Q是5元至14元杂芳基或8元至14元杂环烷基；

[0405] 每个R₅独立地选自下组，该组由以下组成：C₁₋₃烷基、C₂₋₃烯基、和H；

[0406] 每个R₆独立地选自下组，该组由以下组成：C₁₋₃烷基、C₂₋₃烯基、和H；

[0407] M和M'独立地选自-C(O)O-、-OC(O)-、-C(O)N(R')-、-N(R')C(O)-、-C(O)-、-C(S)-、-C(S)S-、-SC(S)-、-CH(OH)-、-P(O)(OR')O-、-S(O)₂-、-S-S-、芳基基团、和杂芳基基团；

[0408] R₇选自下组，该组由以下组成：C₁₋₃烷基、C₂₋₃烯基、和H；

[0409] R₈选自下组，该组由以下组成：C₃₋₆碳环和杂环；

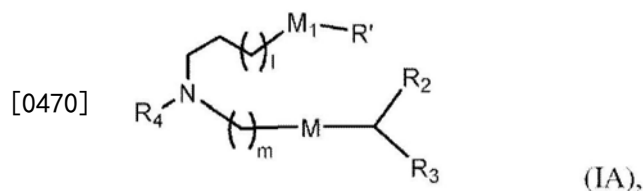
[0410] R₉选自下组，该组由以下组成：H、CN、NO₂、C₁₋₆烷基、-OR、-S(O)₂R、-S(O)₂N(R)₂、C₂₋₆烯基、C₃₋₆碳环和杂环；

[0411] 每个R独立地选自下组，该组由以下组成：C₁₋₃烷基、C₂₋₃烯基、和H；

[0412] 每个R'独立地选自下组，该组由以下组成：C₁₋₁₈烷基、C₂₋₁₈烯基、-R*YR''、-YR''、和H；

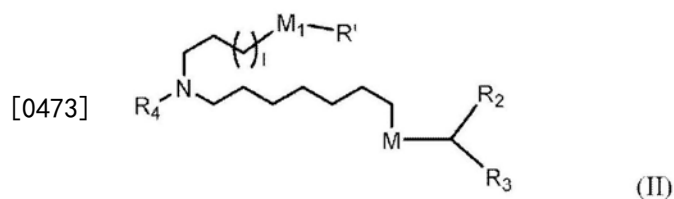
- [0413] 每个R''独立地选自下组,该组由以下组成:C₃₋₁₄烷基和C₃₋₁₄烯基;
- [0414] 每个R*独立地选自下组,该组由以下组成:C₁₋₁₂烷基和C₂₋₁₂烯基;
- [0415] 每个Y独立地是C₃₋₆碳环;
- [0416] 每个X独立地选自下组,该组由以下组成:F、Cl、Br、和I;并且
- [0417] m选自5、6、7、8、9、10、11、12、和13,
- [0418] 或其盐或异构体。
- [0419] 在一些实施方案中,具有化学式(I)的化合物的另一个子集包括以下那些,其中
- [0420] R₁选自下组,该组由以下组成:C₅₋₃₀烷基、C₅₋₂₀烯基、-R*YR''、-YR''、和-R''M'R';
- [0421] R₂和R₃独立地选自下组,该组由以下组成:H、C₁₋₁₄烷基、C₂₋₁₄烯基、-R*YR''、-YR''、和-R*OR'',或R₂和R₃连同它们所附接的原子一起形成杂环或碳环;
- [0422] R₄选自下组,该组由以下组成:C₃₋₆碳环、-(CH₂)_nQ、-(CH₂)_nCHQR、-CHQR、-CQ(R)₂、和未取代的C₁₋₆烷基,其中Q选自C₃₋₆碳环、具有一个或多个选自N、O、和S的杂原子的5元至14元杂芳基、-OR、-O(CH₂)_nN(R)₂、-C(O)OR、-OC(O)R、-CX₃、-CX₂H、-CXH₂、-CN、-C(O)N(R)₂、-N(R)C(O)R、-N(R)S(O)₂R、-N(R)C(O)N(R)₂、-N(R)C(S)N(R)₂、-CRN(R)₂C(O)OR、-N(R)R₈、-O(CH₂)_nOR、-N(R)C(=NR₉)N(R)₂、-N(R)C(=CHR₉)N(R)₂、-OC(O)N(R)₂、-N(R)C(O)OR、-N(OR)C(O)R、-N(OR)S(O)₂R、-N(OR)C(O)OR、-N(OR)C(O)N(R)₂、-N(OR)C(S)N(R)₂、-N(OR)C(=NR₉)N(R)₂、-N(OR)C(=CHR₉)N(R)₂、-C(=NR₉)R、-C(O)N(R)OR、和-C(=NR₉)N(R)₂,并且每个n独立地选自1、2、3、4、和5;
- [0423] 每个R₅独立地选自下组,该组由以下组成:C₁₋₃烷基、C₂₋₃烯基、和H;
- [0424] 每个R₆独立地选自下组,该组由以下组成:C₁₋₃烷基、C₂₋₃烯基、和H;
- [0425] M和M'独立地选自-C(O)O-、-OC(O)-、-C(O)N(R')-、-N(R')C(O)-、-C(O)-、-C(S)-、-C(S)S-、-SC(S)-、-CH(OH)-、-P(O)(OR')O-、-S(O)₂-、-S-S-、芳基基团、和杂芳基基团;
- [0426] R₇选自下组,该组由以下组成:C₁₋₃烷基、C₂₋₃烯基、和H;
- [0427] R₈选自下组,该组由以下组成:C₃₋₆碳环和杂环;
- [0428] R₉选自下组,该组由以下组成:H、CN、NO₂、C₁₋₆烷基、-OR、-S(O)₂R、-S(O)₂N(R)₂、C₂₋₆烯基、C₃₋₆碳环和杂环;
- [0429] 每个R独立地选自下组,该组由以下组成:C₁₋₃烷基、C₂₋₃烯基、和H;
- [0430] 每个R'独立地选自下组,该组由以下组成:C₁₋₁₈烷基、C₂₋₁₈烯基、-R*YR''、-YR''、和H;
- [0431] 每个R''独立地选自下组,该组由以下组成:C₃₋₁₄烷基和C₃₋₁₄烯基;
- [0432] 每个R*独立地选自下组,该组由以下组成:C₁₋₁₂烷基和C₂₋₁₂烯基;
- [0433] 每个Y独立地是C₃₋₆碳环;
- [0434] 每个X独立地选自下组,该组由以下组成:F、Cl、Br、和I;并且
- [0435] m选自5、6、7、8、9、10、11、12、和13,
- [0436] 或其盐或异构体。
- [0437] 在一些实施方案中,具有化学式(I)的化合物的另一个子集包括以下那些,其中
- [0438] R₁选自下组,该组由以下组成:C₅₋₃₀烷基、C₅₋₂₀烯基、-R*YR''、-YR''、和-R''M'R';
- [0439] R₂和R₃独立地选自下组,该组由以下组成:H、C₂₋₁₄烷基、C₂₋₁₄烯基、-R*YR''、-YR''、和-R*OR'',或R₂和R₃连同它们所附接的原子一起形成杂环或碳环;

- [0440] R_4 是 $-(CH_2)_nQ$ 或 $-(CH_2)_nCHQR$,其中 Q 是 $-N(R)_2$,并且 n 选自3、4、和5;
- [0441] 每个 R_5 独立地选自下组,该组由以下组成: C_{1-3} 烷基、 C_{2-3} 烯基、和H;
- [0442] 每个 R_6 独立地选自下组,该组由以下组成: C_{1-3} 烷基、 C_{2-3} 烯基、和H;
- [0443] M 和 M' 独立地选自 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-C(O)N(R')$ 、 $-N(R')C(O)-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-C(S)S-$ 、 $-SC(S)-$ 、 $-CH(OH)-$ 、 $-P(O)(OR')O-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S-S-$ 、芳基基团、和杂芳基基团;
- [0444] R_7 选自下组,该组由以下组成: C_{1-3} 烷基、 C_{2-3} 烯基、和H;
- [0445] 每个 R 独立地选自下组,该组由以下组成: C_{1-3} 烷基、 C_{2-3} 烯基、和H;
- [0446] 每个 R' 独立地选自下组,该组由以下组成: C_{1-18} 烷基、 C_{2-18} 烯基、 $-R^*YR''$ 、 $-YR''$ 、和H;
- [0447] 每个 R'' 独立地选自下组,该组由以下组成: C_{3-14} 烷基和 C_{3-14} 烯基;
- [0448] 每个 R^* 独立地选自下组,该组由以下组成: C_{1-12} 烷基和 C_{1-12} 烯基;
- [0449] 每个 Y 独立地是 C_{3-6} 碳环;
- [0450] 每个 X 独立地选自下组,该组由以下组成:F、Cl、Br、和I;并且
- [0451] m 选自5、6、7、8、9、10、11、12、和13,
- [0452] 或其盐或异构体。
- [0453] 在一些实施方案中,具有化学式(I)的化合物的另一个子集包括以下那些,其中
- [0454] R_1 选自下组,该组由以下组成: C_{5-30} 烷基、 C_{5-20} 烯基、 $-R^*YR''$ 、 $-YR''$ 、和 $-R''M'R'$;
- [0455] R_2 和 R_3 独立地选自下组,该组由以下组成: C_{1-14} 烷基、 C_{2-14} 烯基、 $-R^*YR''$ 、 $-YR''$ 、和 $-R^*OR''$,或 R_2 和 R_3 连同它们所附接的原子一起形成杂环或碳环;
- [0456] R_4 选自下组,该组由以下组成: $-(CH_2)_nQ$ 、 $-(CH_2)_nCHQR$ 、 $-CHQR$ 、和 $-CQ(R)_2$,其中 Q 是 $-N(R)_2$,并且 n 选自1、2、3、4、和5;
- [0457] 每个 R_5 独立地选自下组,该组由以下组成: C_{1-3} 烷基、 C_{2-3} 烯基、和H;
- [0458] 每个 R_6 独立地选自下组,该组由以下组成: C_{1-3} 烷基、 C_{2-3} 烯基、和H;
- [0459] M 和 M' 独立地选自 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-C(O)N(R')$ 、 $-N(R')C(O)-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-C(S)S-$ 、 $-SC(S)-$ 、 $-CH(OH)-$ 、 $-P(O)(OR')O-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S-S-$ 、芳基基团、和杂芳基基团;
- [0460] R_7 选自下组,该组由以下组成: C_{1-3} 烷基、 C_{2-3} 烯基、和H;
- [0461] 每个 R 独立地选自下组,该组由以下组成: C_{1-3} 烷基、 C_{2-3} 烯基、和H;
- [0462] 每个 R' 独立地选自下组,该组由以下组成: C_{1-18} 烷基、 C_{2-18} 烯基、 $-R^*YR''$ 、 $-YR''$ 、和H;
- [0463] 每个 R'' 独立地选自下组,该组由以下组成: C_{3-14} 烷基和 C_{3-14} 烯基;
- [0464] 每个 R^* 独立地选自下组,该组由以下组成: C_{1-12} 烷基和 C_{1-12} 烯基;
- [0465] 每个 Y 独立地是 C_{3-6} 碳环;
- [0466] 每个 X 独立地选自下组,该组由以下组成:F、Cl、Br、和I;并且
- [0467] m 选自5、6、7、8、9、10、11、12、和13,
- [0468] 或其盐或异构体。
- [0469] 在一些实施方案中,具有化学式(I)的化合物的子集包括具有化学式(IA)的那些:



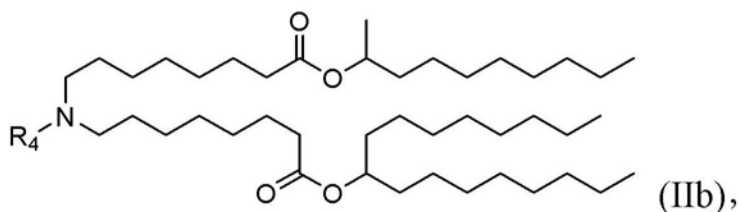
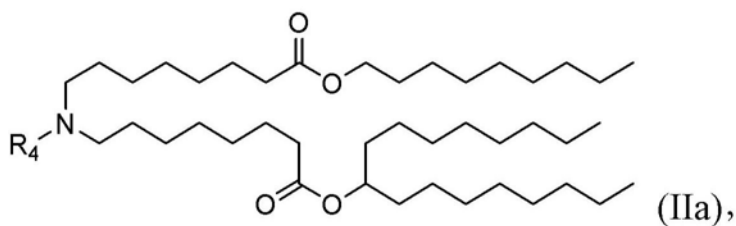
[0471] 或其盐或异构体,其中1是选自1、2、3、4、和5;m是选自5、6、7、8、和9;M₁是一个键或M';R₄是未取代的C₁₋₃烷基或-(CH₂)_nQ,其中Q是OH、-NHC(S)N(R)₂、-NHC(O)N(R)₂、-N(R)C(O)R、-N(R)S(O)₂R、-N(R)R₈、-NHC(=NR₉)N(R)₂、-NHC(=CHR₉)N(R)₂、-OC(O)N(R)₂、-N(R)C(O)OR、杂芳基或杂环烷基;M和M'独立地选自-C(O)O-、-OC(O)-、-C(O)N(R')-、-P(O)(OR')O-、-S-S-、芳基基团、和杂芳基基团;并且R₂和R₃独立地选自下组,该组由以下组成:H、C₁₋₁₄烷基、和C₂₋₁₄烯基。

[0472] 在一些实施方案中,具有化学式(I)的化合物的子集包括具有化学式(II)的那些:

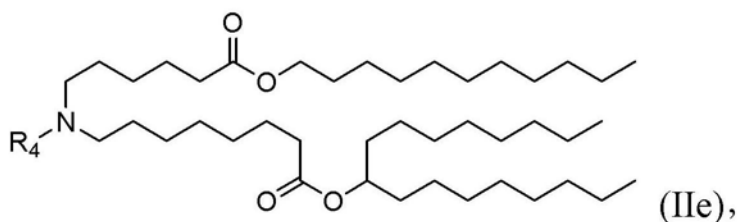
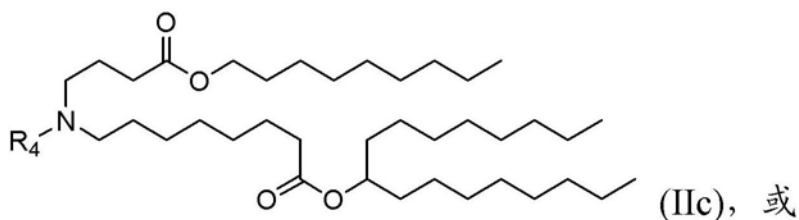


[0474] 或其盐或异构体,其中1是选自1、2、3、4、和5;M₁是一个键或M';R₄是未取代的C₁₋₃烷基或-(CH₂)_nQ,其中n是2、3、或4,并且Q是OH、-NHC(S)N(R)₂、-NHC(O)N(R)₂、-N(R)C(O)R、-N(R)S(O)₂R、-N(R)R₈、-NHC(=NR₉)N(R)₂、-NHC(=CHR₉)N(R)₂、-OC(O)N(R)₂、-N(R)C(O)OR、杂芳基或杂环烷基;M和M'独立地选自-C(O)O-、-OC(O)-、-C(O)N(R')-、-P(O)(OR')O-、-S-S-、芳基基团、和杂芳基基团;并且R₂和R₃独立地选自下组,该组由以下组成:H、C₁₋₁₄烷基、和C₂₋₁₄烯基。

[0475] 在一些实施方案中,具有化学式(I)的化合物的子集包括具有化学式(IIa)、(IIb)、(IIc)、或(IIe)的那些:

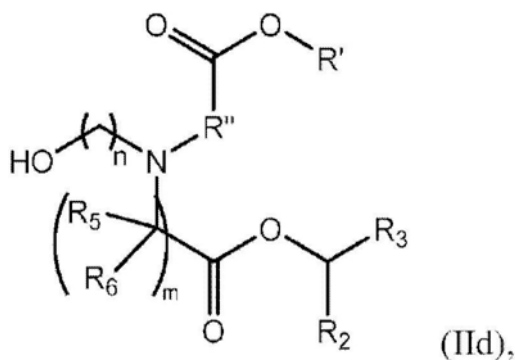


[0476]

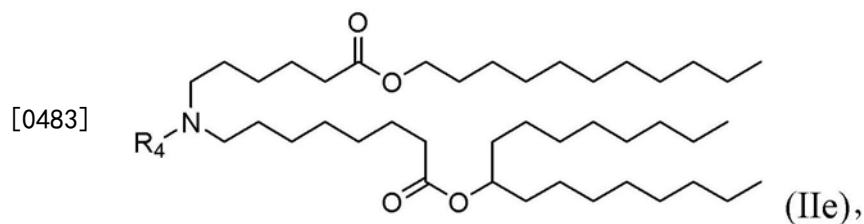
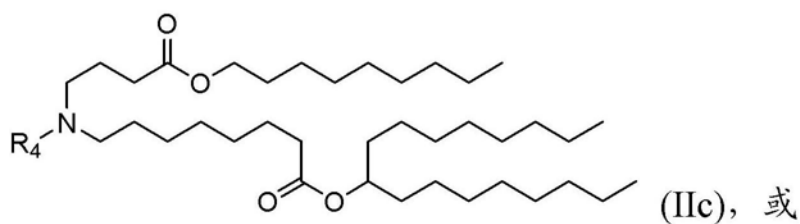
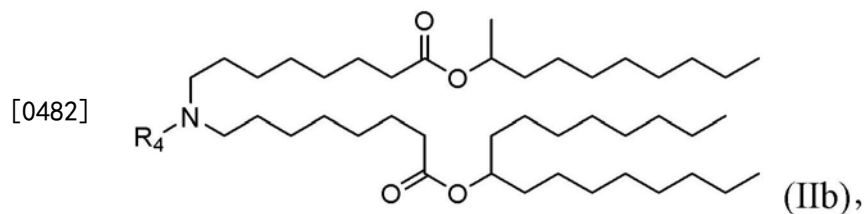
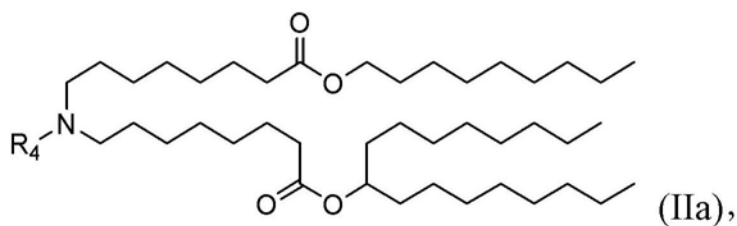
[0477] 或其盐或异构体,其中R₄是如本文所述的。

[0478] 在一些实施方案中,具有化学式 (I) 的化合物的子集包括具有化学式 (IIId) 的那些:

[0479]

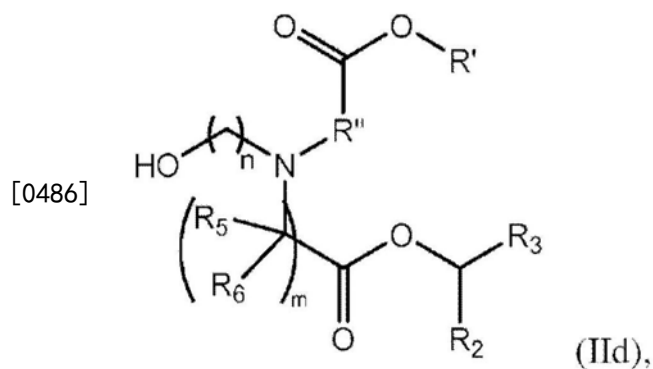
[0480] 或其盐或异构体,其中n是2、3、或4;并且m、R'、R''、和R₂至R₆是如本文所述的。例如,R₂和R₃各自可独立地选自下组,该组由以下组成:C₅₋₁₄烷基和C₅₋₁₄烯基。

[0481] 在一些实施方案中,具有化学式 (I) 的化合物的子集包括具有化学式 (IIa)、(IIb)、(IIc)、或 (IIe) 的那些:



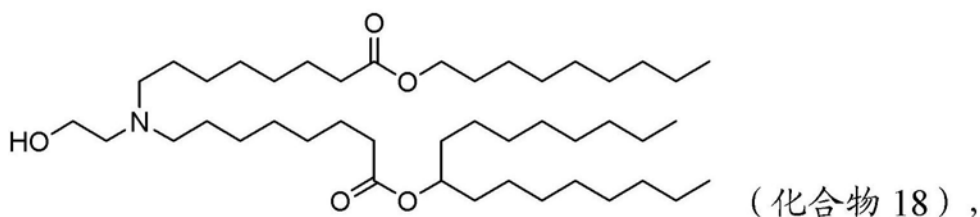
[0484] 或其盐或异构体,其中R₄是如本文所述的。

[0485] 在一些实施方案中,具有化学式 (I) 的化合物的子集包括具有化学式 (IIId) 的那些:

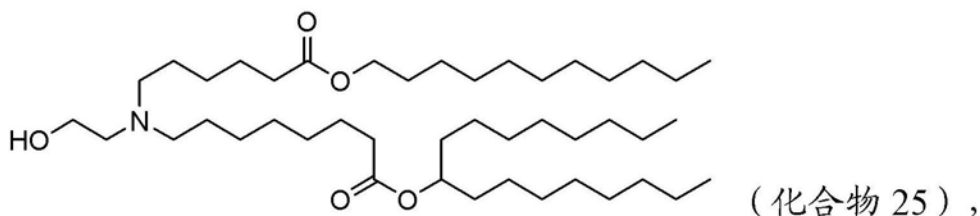


[0487] 或其盐或异构体,其中n是2、3、或4;并且m、R'、R''、和R₂至R₆是如本文所述的。例如, R₂和R₃各自可独立地选自下组,该组由以下组成:C₅₋₁₄烷基和C₅₋₁₄烯基。

[0488] 在一些实施方案中,具有化学式 (I) 的化合物是化合物18或25:



[0489]



[0490] 或其盐和异构体。

[0491] 在一些实施方案中,本公开的特征在于包括包含如本文所述的化合物(例如,根据化学式(I)、(IA)、(II)、(IIa)、(IIb)、(IIc)、(IId)或(IIe)的化合物)的脂质部分的纳米粒子组合物。

[0492] 本文披露的药物组合物的脂质组合物可以包含一种或多种聚乙二醇(PEG)脂质。

[0493] 如本文所用,术语“PEG脂质”是指经聚乙二醇(PEG)修饰的脂质。PEG-脂质的非限制性例子包括经PEG修饰的磷脂酰乙醇胺和磷脂酸、PEG-神经酰胺缀合物(例如,PEG-CerC14或PEG-CerC20)、经PEG修饰的二烷基胺和经PEG修饰的1,2-二酰氧基丙-3-胺。此类脂质也称为PEG化脂质。例如,PEG脂质可以是PEG-c-DMG、PEG-DMG、PEG-DLPE、PEG-DMPE、PEG-DPPC、或PEG-DSPE脂质。

[0494] 在一些实施方案中,PEG-脂质包括但不限于1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油甲氧基聚乙二醇(PEG-DMG)、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-[氨基(聚乙二醇)](PEG-DSPE)、PEG-二甾基甘油(PEG-DSG)、PEG-二棕榈酰基、PEG-二油烯基、PEG-二硬脂酰、PEG-二酰基甘酰胺(PEG-DAG)、PEG-二棕榈酰基磷脂酰乙醇胺(PEG-DPPE)、或PEG-1,2-二肉豆蔻酰氧丙基-3-胺(PEG-c-DMA)。

[0495] 在一个实施方案中,PEG-脂质选自下组,该组由以下组成:经PEG修饰的磷脂酰乙醇胺、经PEG修饰的磷脂酸、经PEG修饰的神经酰胺、经PEG修饰的二烷基胺、经PEG修饰的二酰基甘油、经PEG修饰的二烷基甘油及其混合物。

[0496] 在一些实施方案中,PEG-脂质的脂质部分包括长度为从约C₁₄至约C₂₂(优选地从约C₁₄至约C₁₆)的那些。在一些实施方案中,PEG部分(例如mPEG-NH₂)尺寸为约1000、2000、5000、10,000、15,000或20,000。在一个实施方案中,PEG-脂质是PEG_{2k}-DMG。

[0497] 在一个实施方案中,本文所述的脂质纳米粒子可以包含PEG脂质,所述脂质是一种非扩散PEG。非扩散PEG的非限制性例子包括PEG-DSG以及PEG-DSPE。

[0498] 在某些实施方案中,本发明中使用的PEG脂质是一种PEG化脂肪酸。在某些实施方案中,本发明中使用的PEG脂质是一种具有化学式(VIII)的化合物。本文提供的是具有化学式(VIII)的化合物:



[0500] 或其盐,其中:

[0501] R^3 是 $-OR^O$;

[0502] R^O 是氢、任选取代的烷基或氧保护基团;

[0503] r 是1和100之间的整数,并在一些实施方案中是45;

[0504] R^5 是任选取代的 C_{10-40} 烷基、任选取代的 C_{10-40} 烯基、或任选取代的 C_{10-40} 炔基;并且任选地 R^5 的一个或多个亚甲基基团被任选取代的亚碳环基、任选取代的亚杂环基、任选取代的亚芳基、任选取代的亚杂芳基、 $N(R^N)$ 、 O 、 S 、 $C(O)$ 、 $-C(O)N(R^N)$ 、 $NR^NC(O)$ 、 $NR^NC(O)N(R^N)$ 、 $C(O)O$ 、 $OC(O)$ 、 $OC(O)O$ 、 $OC(O)N(R^N)$ 、 $-NR^NC(O)O$ 、 $C(O)S$ 、 $SC(O)$ 、 $C(=NR^N)$ 、 $C(=NR^N)N(R^N)$ 、 $NR^NC(=NR^N)$ 、 $NR^NC(=NR^N)N(R^N)$ 、 $-C(S)$ 、 $C(S)N(R^N)$ 、 $NR^NC(S)$ 、 $NR^NC(S)N(R^N)$ 、 $S(O)$ 、 $OS(O)$ 、 $S(O)O$ 、 $OS(O)O$ 、 $OS(O)_2$ 、 $-S(O)_2O$ 、 $OS(O)_2O$ 、 $N(R^N)S(O)$ 、 $S(O)N(R^N)$ 、 $N(R^N)S(O)N(R^N)$ 、 $OS(O)N(R^N)$ 、 $-N(R^N)S(O)O$ 、 $S(O)_2N(R^N)$ 、 $S(O)_2N(R^N)$ 、 $N(R^N)S(O)_2N(R^N)$ 、 $OS(O)_2N(R^N)$ 、或 $N(R^N)S(O)_2O$ 替代;并且

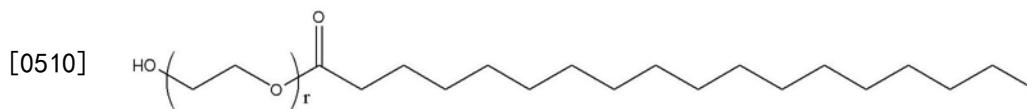
[0505] R^N 的每个情况独立地是氢、任选取代的烷基、或氮保护基团。

[0506] 在某些实施方案中,式(VIII)的化合物具有化学式(VIII-OH):

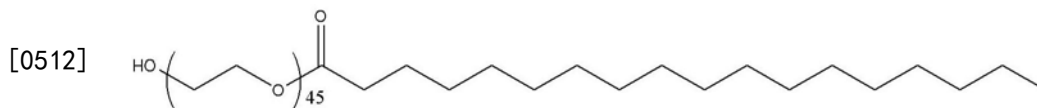


[0508] 或其盐。在一些实施方案中, r 是45。

[0509] 在某些实施方案中,所述PEG脂质是以下化学式中的一个:



[0511] (CMPD 427) 或



[0513] (CMPD 428) 或其盐。

[0514] 在一个实施方案中,本文披露的药物组合物的脂质组合物中的PEG-脂质的量范围是从约0.1mol%至约5mol%、从约0.5mol%至约5mol%、从约1mol%至约5mol%、从约1.5mol%至约5mol%、从约2mol%至约5mol%、从约0.1mol%至约4mol%、从约0.5mol%至约4mol%、从约1mol%至约4mol%、从约1.5mol%至约4mol%、从约2mol%至约4mol%、从约0.1mol%至约3mol%、从约0.5mol%至约3mol%、从约1mol%至约3mol%、从约1.5mol%至约3mol%、从约2mol%至约3mol%、从约0.1mol%至约2mol%、从约0.5mol%至约2mol%、从约1mol%至约2mol%、从约1.5mol%至约2mol%、从约0.1mol%至约1.5mol%、从约0.5mol%至约1.5mol%、或从约1mol%至约1.5mol%。

[0515] 在一个实施方案中,本文披露的脂质组合物中的PEG-脂质的量是约2mol%。在一个实施方案中,本文披露的脂质组合物中的PEG-脂质的量是约1.5mol%。

[0516] 在一个实施方案中,本文披露的脂质组合物中的PEG-脂质的量是至少约0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4、4.1、4.2、

4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、或5mol%。

[0517] 在一些方面,本文披露的药物组合物的脂质组合物不包含PEG-脂质。

[0518] 在一些实施方案中,LNP由化合物18和428构成。

[0519] 在一些实施方案中,LNP具有按摩尔比计50:38.5:10:1.5的化合物18:磷脂:胆固醇:化合物428。在一些实施方案中,LNP具有按摩尔比计50:38.5:10:1.5的化合物18:DSPC:胆固醇:化合物428。

[0520] 在一些实施方案中,LNP具有按摩尔比计40:38.5:20:1.5的化合物18:磷脂:胆固醇:化合物428。在一些实施方案中,LNP具有按摩尔比计40:38.5:20:1.5的化合物18:DSPC:胆固醇:化合物428。

[0521] 在一些实施方案中,纳米粒子组合物可具有50:10:38.5:1.5的摩尔比的化合物18:磷脂:胆固醇:化合物428的配方。在一些实施方案中,纳米粒子组合物可具有50:10:38.5:1.5的摩尔比的化合物18:DSPC:胆固醇:化合物428的配方。

[0522] 在一些实施方案中,LNP由化合物25构成。

[0523] 疫苗组合物中的活性成分、药学上可接受的赋形剂和/或任何其他成分的相对量可根据所治疗受试者的身份、大小和/或状况而变化,并且进一步根据组合物的施用途径而变化。例如,组合物可包含在0.1%与99% (w/w) 之间的活性成分。举例来说,组合物可包含在0.1%与100%之间例如在.5与50%之间、在1%-30%之间、在5%-80%之间、至少80% (w/w) 的活性成分。

[0524] 在一些实施方案中,流感RNA疫苗组合物可包含在包含MC3、胆固醇、DSPC和PEG2000-DMG的脂质纳米粒子、缓冲剂柠檬酸钠、蔗糖和注射用水中配制的本文所述的多核苷酸。作为一个非限制性例子,组合物包含:2.0mg/mL的药物物质(例如,编码H10N8流感病毒的多核苷酸),21.8mg/mL的MC3,10.1mg/mL的胆固醇,5.4mg/mL的DSPC,2.7mg/mL的PEG2000-DMG,5.16mg/mL的柠檬酸钠,71mg/mL的蔗糖和1.0mL的注射用水。

[0525] 在一些实施方案中,纳米粒子(例如,脂质纳米粒子)具有10-500nm、20-400nm、30-300nm、40-200nm的平均直径。在一些实施方案中,纳米粒子(例如,脂质纳米粒子)具有50-150nm、50-200nm、80-100nm或80-200nm的平均直径。

[0526] 在一些实施方案中,包含多核苷酸的RNA疫苗配制品是可包含至少一种脂质的纳米粒子。脂质可选自但不限于DLin-DMA、DLin-K-DMA、98N12-5、C12-200、DLin-MC3-DMA、DLin-KC2-DMA、DODMA、PLGA、PEG、PEG-DMG、PEG化脂质以及氨基醇脂质。在另一个方面,脂质可以是阳离子脂质,诸如但不限于DLin-DMA、DLin-D-DMA、DLin-MC3-DMA、DLin-KC2-DMA、DODMA以及氨基醇脂质。氨基醇阳离子脂质可为美国专利公开号US 20130150625中所述和/或通过其中所述的方法制备的脂质,所述专利通过引用以其整体并入本文。作为非限制性例子,阳离子脂质可以是2-氨基-3-[(9Z,12Z)-十八烷-9,12-二烯-1-基氧基]-2-{[(9Z,2Z)-十八烷-9,12-二烯-1-基氧基]甲基}丙-1-醇(US 20130150625中的化合物1);2-氨基-3-[(9Z)-十八烷-9-烯-1-基氧基]-2-{[(9Z)-十八烷-9-烯-1-基氧基]甲基}丙-1-醇(US 20130150625中的化合物2);2-氨基-3-[(9Z,12Z)-十八烷-9,12-二烯-1-基氧基]-2-[(辛基氧基)甲基]丙-1-醇(US 20130150625中的化合物3);以及2-(二甲基氨基)-3-[(9Z,12Z)-十八烷-9,12-二烯-1-基氧基]-2-{[(9Z,12Z)-十八烷-9,12-二烯-1-基氧基]甲基}丙-1-醇(US 20130150625中的化合物4);或其任何药学上可接受的盐或立体异构体。

[0527] 脂质纳米粒子配制品典型地包含脂质,特别是可电离阳离子脂质,例如,2,2-二亚油醇基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧杂环戊烷(DLin-KC2-DMA)、二亚油醇基-甲基-4-二甲基氨基丁酸酯(DLin-MC3-DMA)、或二((Z)-壬-2-烯-1-基)9-((4-(二甲基氨基)丁酰基)氧基)十七烷二酸酯(L319),并且进一步包含中性脂质、固醇以及能够减少粒子聚集的分子,例如PEG或经PEG修饰的脂质。

[0528] 在一些实施方案中,脂质纳米粒子配制品基本上由以下组成:(i)至少一种选自由以下组成的组的脂质:2,2-二亚油醇基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧杂环戊烷(DLin-KC2-DMA)、二亚油醇基-甲基-4-二甲基氨基丁酸酯(DLin-MC3-DMA)和二((Z)-壬-2-烯-1-基)9-((4-(二甲基氨基)丁酰基)氧基)十七烷二酸酯(L319);(ii)中性脂质,其选自DSPC、DPPC、POPC、DOPE和SM;(iii)固醇,例如胆固醇;和(iv)PEG-脂质,例如PEG-DMG或PEG-cDMA,按摩尔比计约20%-60%阳离子脂质:5%-25%中性脂质:25%-55%固醇:0.5%-15%PEG-脂质。

[0529] 在一些实施方案中,配制品包括基于摩尔数从约25%至约75%的选自2,2-二亚油醇基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧杂环戊烷(DLin-KC2-DMA)、二亚油醇基-甲基-4-二甲基氨基丁酸酯(DLin-MC3-DMA)和二((Z)-壬-2-烯-1-基)9-((4-(二甲基氨基)丁酰基)氧基)十七烷二酸酯(L319)的阳离子脂质,例如基于摩尔数,从约35至约65%、从约45至约65%、约60%、约57.5%、约50%或约40%。

[0530] 在一些实施方案中,配制品包括基于摩尔数从约0.5%至约15%的中性脂质(例如基于摩尔数从约3至约12%、从约5至约10%或约15%、约10%或约7.5%)。示例性中性脂质的实施例包括但不限于DSPC、POPC、DPPC、DOPE和SM。在一些实施方案中,配制品包括基于摩尔数从约5%至约50%的固醇(例如基于摩尔数,约15至约45%、约20至约40%、约40%、约38.5%、约35%或约31%)。一示例性固醇是胆固醇。在一些实施方案中,配制品包括基于摩尔数从约0.5%至约20%的PEG或经PEG修饰的脂质(例如基于摩尔数约0.5至约10%、约0.5至约5%、约1.5%、约0.5%、约1.5%、约3.5%或约5%)。在一些实施方案中,PEG或经PEG修饰的脂质包含平均分子量2,000Da的PEG分子。在其他实施方案中,PEG或经PEG修饰的脂质包含平均分子量小于2,000例如约1,500Da、约1,000Da或约500Da的PEG分子。示例性经PEG修饰的脂质包括但不限于PEG-二硬脂酰基甘油(PEG-DMG)(在本文中也称为PEG-C14或C14-PEG)、PEG-cDMA(进一步讨论于Reyes等人J.Controlled Release,107,276-287(2005)中,所述文献的内容通过引用以其整体并入本文)。

[0531] 在一些实施方案中,本发明配制品包括基于摩尔数25%-75%的选自2,2-二亚油醇基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧杂环戊烷(DLin-KC2-DMA)、二亚油醇基-甲基-4-二甲基氨基丁酸酯(DLin-MC3-DMA)和二((Z)-壬-2-烯-1-基)9-((4-(二甲基氨基)丁酰基)氧基)十七烷二酸酯(L319)的阳离子脂质,0.5%-15%的中性脂质,5%-50%的固醇,和0.5%-20%的PEG或经PEG修饰的脂质。

[0532] 在一些实施方案中,本发明配制品包括基于摩尔数35%-65%的选自2,2-二亚油醇基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧杂环戊烷(DLin-KC2-DMA)、二亚油醇基-甲基-4-二甲基氨基丁酸酯(DLin-MC3-DMA)和二((Z)-壬-2-烯-1-基)9-((4-(二甲基氨基)丁酰基)氧基)十七烷二酸酯(L319)的阳离子脂质,3%-12%的中性脂质,15%-45%的固醇,和0.5%-10%的PEG或经PEG修饰的脂质。

[0533] 在一些实施方案中,本发明配制品包括基于摩尔数45%-65%的选自2,2-二亚油醇基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧杂环戊烷(DLin-KC2-DMA)、二亚油醇基-甲基-4-二甲基氨基丁酸酯(DLin-MC3-DMA)和二((Z)-壬-2-烯-1-基)9-((4-(二甲基氨基)丁酰基)氧基)十七烷二酸酯(L319)的阳离子脂质,5%-10%的中性脂质,25%-40%的固醇,和0.5%-10%的PEG或经PEG修饰的脂质。

[0534] 在一些实施方案中,本发明配制品包括基于摩尔数约60%的选自2,2-二亚油醇基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧杂环戊烷(DLin-KC2-DMA)、二亚油醇基-甲基-4-二甲基氨基丁酸酯(DLin-MC3-DMA)和二((Z)-壬-2-烯-1-基)9-((4-(二甲基氨基)丁酰基)氧基)十七烷二酸酯(L319)的阳离子脂质,7.5%的中性脂质,31%的固醇,和约1.5%的PEG或经PEG修饰的脂质。

[0535] 在一些实施方案中,本发明配制品包括基于摩尔数约50%的选自2,2-二亚油醇基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧杂环戊烷(DLin-KC2-DMA)、二亚油醇基-甲基-4-二甲基氨基丁酸酯(DLin-MC3-DMA)和二((Z)-壬-2-烯-1-基)9-((4-(二甲基氨基)丁酰基)氧基)十七烷二酸酯(L319)的阳离子脂质,10%的中性脂质,38.5%的固醇,和约1.5%的PEG或经PEG修饰的脂质。

[0536] 在一些实施方案中,本发明配制品包括基于摩尔数约50%的选自2,2-二亚油醇基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧杂环戊烷(DLin-KC2-DMA)、二亚油醇基-甲基-4-二甲基氨基丁酸酯(DLin-MC3-DMA)和二((Z)-壬-2-烯-1-基)9-((4-(二甲基氨基)丁酰基)氧基)十七烷二酸酯(L319)的阳离子脂质,约10%的中性脂质,约35%的固醇,和约4.5%或约5%的PEG或经PEG修饰的脂质,和约0.5%的靶向性脂质。

[0537] 在一些实施方案中,本发明配制品包括基于摩尔数约40%的选自2,2-二亚油醇基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧杂环戊烷(DLin-KC2-DMA)、二亚油醇基-甲基-4-二甲基氨基丁酸酯(DLin-MC3-DMA)和二((Z)-壬-2-烯-1-基)9-((4-(二甲基氨基)丁酰基)氧基)十七烷二酸酯(L319)的阳离子脂质,约15%的中性脂质,约40%的固醇,和约5%的PEG或经PEG修饰的脂质。

[0538] 在一些实施方案中,本发明配制品包括基于摩尔数约57.2%的选自2,2-二亚油醇基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧杂环戊烷(DLin-KC2-DMA)、二亚油醇基-甲基-4-二甲基氨基丁酸酯(DLin-MC3-DMA)和二((Z)-壬-2-烯-1-基)9-((4-(二甲基氨基)丁酰基)氧基)十七烷二酸酯(L319)的阳离子脂质,约7.1%的中性脂质,约34.3%的固醇,和约1.4%的PEG或经PEG修饰的脂质。

[0539] 在一些实施方案中,本发明配制品包括基于摩尔数约57.5%的选自作为PEG-cDMA(PEG-cDMA进一步讨论于Reyes等人(J. Controlled Release, 107, 276-287 (2005)中,所述文献的内容通过引用以其整体并入本文)的PEG脂质的阳离子脂质,约7.5%的中性脂质、约31.5%的固醇、和约3.5%的PEG或经PEG修饰的脂质。

[0540] 在优选实施方案中,脂质纳米粒子配制品基本上由按摩尔比计约20%-70%阳离子脂质:5%-45%中性脂质:20%-55%胆固醇:0.5%-15%经PEG修饰的脂质的摩尔比;更优选按摩尔比计约20%-60%阳离子脂质:5%-25%中性脂质:25%-55%胆固醇:0.5%-15%经PEG修饰的脂质的脂质混合物组成。

[0541] 在特别的实施方案中,摩尔脂质比是约50/10/38.5/1.5(mol%阳离子脂质/中性

脂质,例如DSPC/胆固醇/经PEG修饰的脂质,例如PEG-DMG、PEG-DSG或PEG-DPG)、57.2/7.1134.3/1.4(mol%阳离子脂质/中性脂质,例如DPPC/胆固醇/经PEG修饰的脂质,例如PEG-cDMA)、40/15/40/5(mol%阳离子脂质/中性脂质,例如DSPC/胆固醇/经PEG修饰的脂质,例如PEG-DMG)、50/10/35/4.5/0.5(mol%阳离子脂质/中性脂质,例如DSPC/胆固醇/经PEG修饰的脂质,例如PEG-DSG)、50/10/35/5(阳离子脂质/中性脂质,例如DSPC/胆固醇/经PEG修饰的脂质,例如PEG-DMG)、40/10/40/10(mol%阳离子脂质/中性脂质,例如DSPC/胆固醇/经PEG修饰的脂质,例如PEG-DMG或PEG-cDMA)、35/15/40/10(mol%阳离子脂质/中性脂质,例如DSPC/胆固醇/经PEG修饰的脂质,例如PEG-DMG或PEG-cDMA)或52/13/30/5(mol%阳离子脂质/中性脂质,例如DSPC/胆固醇/经PEG修饰的脂质,例如PEG-DMG或PEG-cDMA)。

[0542] 在一些实施方案中,本文所述的脂质纳米粒子配制品可包含阳离子脂质、PEG脂质和结构性脂质,并且任选包含非阳离子脂质。作为一个非限制性例子,脂质纳米粒子可包含约40%-60%的阳离子脂质、约5%-15%的非阳离子脂质、约1%-2%的PEG脂质和约30%-50%的结构性脂质。作为另一个非限制性例子,脂质纳米粒子可包含约50%阳离子脂质、约10%非阳离子脂质、约1.5%PEG脂质和约38.5%结构性脂质。作为又另一个非限制性例子,脂质纳米粒子可包含约55%阳离子脂质、约10%非阳离子脂质、约2.5%PEG脂质和约32.5%结构性脂质。在一些实施方案中,阳离子脂质可以是本文描述的任何阳离子脂质,诸如但不限于DLin-KC2-DMA、DLin-MC3-DMA以及L319。

[0543] 在一些实施方案中,本文所述的脂质纳米粒子配制品可为4组分脂质纳米粒子。脂质纳米粒子可包含阳离子脂质、非阳离子脂质、PEG脂质和结构性脂质。作为一个非限制性例子,脂质纳米粒子可包含约40%-60%的阳离子脂质、约5%-15%的非阳离子脂质、约1%-2%的PEG脂质和约30%-50%的结构性脂质。作为另一个非限制性例子,脂质纳米粒子可包含约50%阳离子脂质、约10%非阳离子脂质、约1.5%PEG脂质和约38.5%结构性脂质。作为又另一个非限制性例子,脂质纳米粒子可包含约55%阳离子脂质、约10%非阳离子脂质、约2.5%PEG脂质和约32.5%结构性脂质。在一些实施方案中,阳离子脂质可以是本文描述的任何阳离子脂质,诸如但不限于DLin-KC2-DMA、DLin-MC3-DMA以及L319。

[0544] 在一些实施方案中,本文描述的脂质纳米粒子配制品可包含阳离子脂质、非阳离子脂质、PEG脂质以及结构脂质。作为一个非限制性例子,脂质纳米粒子包含约50%的阳离子脂质DLin-KC2-DMA、约10%的非阳离子脂质DSPC、约1.5%的PEG脂质PEG-DMG以及约38.5%的结构脂质胆固醇。作为一个非限制性例子,脂质纳米粒子包含约50%的阳离子脂质DLin-MC3-DMA、约10%的非阳离子脂质DSPC、约1.5%的PEG脂质PEG-DMG以及约38.5%的结构脂质胆固醇。作为非限制性例子,脂质纳米粒子包含约50%的阳离子脂质DLin-MC3-DMA、约10%的非阳离子脂质DSPC、约1.5%的PEG脂质PEG-DMG以及约38.5%的结构脂质胆固醇。作为又另一个非限制性例子,脂质纳米粒子包含约55%的阳离子脂质L319、约10%的非阳离子脂质DSPC、约2.5%的PEG脂质PEG-DMG以及约32.5%的结构脂质胆固醇。

[0545] 在一些实施方案中,RNA疫苗可以使用较小LNP递送。此类粒子可包括从低于0.1 μ m直至100nm的直径,诸如但不限于少于0.1 μ m、少于1.0 μ m、少于5 μ m、少于10 μ m、少于15 μ m、少于20 μ m、少于25 μ m、少于30 μ m、少于35 μ m、少于40 μ m、少于50 μ m、少于55 μ m、少于60 μ m、少于65 μ m、少于70 μ m、少于75 μ m、少于80 μ m、少于85 μ m、少于90 μ m、少于95 μ m、少于100 μ m、少于125 μ m、少于150 μ m、少于175 μ m、少于200 μ m、少于225 μ m、少于250 μ m、少于275 μ m、少于300 μ m、

少于325um、少于350um、少于375um、少于400um、少于425um、少于450um、少于475um、少于500um、少于525um、少于550um、少于575um、少于600um、少于625um、少于650um、少于675um、少于700um、少于725um、少于750um、少于775um、少于800um、少于825um、少于850um、少于875um、少于900um、少于925um、少于950um、和少于975um。

[0546] 在另一个实施方案中,可使用较小的LNP递送RNA疫苗,所述LNP可包括以下直径:从约1nm至约100nm、从约1nm至约10nm、约1nm至约20nm、从约1nm至约30nm、从约1nm至约40nm、从约1nm至约50nm、从约1nm至约60nm、从约1nm至约70nm、从约1nm至约80nm、从约1nm至约90nm、从约5nm至约100nm、从约5nm至约10nm、约5nm至约20nm、从约5nm至约30nm、从约5nm至约40nm、从约5nm至约50nm、从约5nm至约60nm、从约5nm至约70nm、从约5nm至约80nm、从约5nm至约90nm、约10至约50nm、从约20至约50nm、从约30至约50nm、从约40至约50nm、从约20至约60nm、从约30至约60nm、从约40至约60nm、从约20至约70nm、从约30至约70nm、从约40至约70nm、从约50至约70nm、从约60至约70nm、从约20至约80nm、从约30至约80nm、从约40至约80nm、从约50至约80nm、从约60至约80nm、从约20至约90nm、从约30至约90nm、从约40至约90nm、从约50至约90nm、从约60至约90nm和/或从约70至约90nm。

[0547] 在一些实施方案中,本公开的LNP包含约2:1至约30:1的N:P比。

[0548] 在一些实施方案中,本公开的LNP包含约6:1的N:P比。

[0549] 在一些实施方案中,本公开的LNP包含约3:1的N:P比。

[0550] 在一些实施方案中,本公开的LNP包含约10:1至约100:1的wt/wt比的可电离的阳离子脂质组分与RNA。

[0551] 在一些实施方案中,本公开的LNP包含约20:1的wt/wt比的可电离的阳离子脂质组分与RNA。

[0552] 在一些实施方案中,本公开的LNP包含约10:1的wt/wt比的可电离的阳离子脂质组分与RNA。

[0553] 在一些实施方案中,本公开的LNP具有约50nm至约150nm的平均直径。

[0554] 在一些实施方案中,本公开的LNP具有约70nm至约120nm的平均直径。

[0555] 疫苗施用模式

[0556] 可通过产生治疗有效结果的任何途径来施用流感RNA疫苗。这些包括但不限于皮内、肌内和/或皮下施用。本公开提供包括向有需要的受试者施用RNA疫苗的方法。视受试者的物种、年龄和一般状况、疾病的严重性、特定组合物、它的给药模式、它的活性模式等而定,所需精确量将在受试者与受试者之间不同。流感RNA疫苗组合物典型地以剂量单位形式配制以易于达成剂量的施用和均一性。然而,应了解RNA疫苗组合物的总每日用量将由主治医师在合理医学判断的范围内决定。用于任何特定患者的具体治疗有效、预防有效或适当成像剂量水平都将取决于多种因素,包括所治疗的障碍和所述障碍的严重性;所用具体化合物的活性;所用具体组合物;患者的年龄、体重、一般健康状况、性别和膳食;所用具体化合物的施用时间、施用途径和排泄速率;治疗的持续时间;与所用具体化合物组合或同时使用的药物;以及医学领域中熟知的类似因素。

[0557] 在一些实施方案中,流感RNA疫苗组合物可在足以递送0.0001mg/kg至100mg/kg、0.001mg/kg至0.05mg/kg、0.005mg/kg至0.05mg/kg、0.001mg/kg至0.005mg/kg、0.05mg/kg至0.5mg/kg、0.01mg/kg至50mg/kg、0.1mg/kg至40mg/kg、0.5mg/kg至30mg/kg、0.01mg/kg至

10mg/kg、0.1mg/kg至10mg/kg或1mg/kg至25mg/kg受试者体重的剂量水平下每天、一天一次或多次、每周、每月等施用以获得所需治疗、诊断、预防或成像效果(参见例如国际公开号W02013078199中所述的单位剂量的范围,该国际公开通过引用以其整体并入本文)。所需剂量可一天三次、一天两次、一天一次、每隔一天、每三天、每周、每两周、每三周、每四周、每2个月、每3个月、每6个月等加以递送。在一些实施方案中,可使用多次施用(例如两次、三次、四次、五次、六次、七次、八次、九次、十次、十一次、十二次、十三次、十四次或更多次施用)来递送所需剂量。当采用多次施用时,可使用分次给药方案,如本文所述的那些。在示例性实施方案中,流感RNA疫苗组合物可按足以递送0.0005mg/kg至0.01mg/kg,例如约0.0005mg/kg至约0.0075mg/kg,例如约0.0005mg/kg、约0.001mg/kg、约0.002mg/kg、约0.003mg/kg、约0.004mg/kg或约0.005mg/kg的剂量水平施用。

[0558] 在一些实施方案中,流感RNA疫苗组合物可按足以递送0.025mg/kg至0.250mg/kg、0.025mg/kg至0.500mg/kg、0.025mg/kg至0.750mg/kg、或0.025mg/kg至1.0mg/kg的剂量水平施用一次或两次(或更多次)。

[0559] 在一些实施方案中,流感RNA疫苗组合物可按0.0100mg、0.025mg、0.050mg、0.075mg、0.100mg、0.125mg、0.150mg、0.175mg、0.200mg、0.225mg、0.250mg、0.275mg、0.300mg、0.325mg、0.350mg、0.375mg、0.400mg、0.425mg、0.450mg、0.475mg、0.500mg、0.525mg、0.550mg、0.575mg、0.600mg、0.625mg、0.650mg、0.675mg、0.700mg、0.725mg、0.750mg、0.775mg、0.800mg、0.825mg、0.850mg、0.875mg、0.900mg、0.925mg、0.950mg、0.975mg、或1.0mg的总剂量或按足以递送所述总剂量的剂量水平施用两次(例如,第0天和第7天、第0天和第14天、第0天和第21天、第0天和第28天、第0天和第60天、第0天和第90天、第0天和第120天、第0天和第150天、第0天和第180天、第0天和3个月以后、第0天和6个月以后、第0天和9个月以后、第0天和12个月以后、第0天和18个月以后、第0天和2年以后、第0天和5年以后、或第0天和10年以后)。本公开涵盖更高和更低施用剂量和频率。例如,流感RNA疫苗组合物可以施用三次或四次。

[0560] 在一些实施方案中,流感RNA疫苗组合物可按0.010mg、0.025mg、0.100mg、或0.400mg的总剂量或按足以递送所述总剂量的剂量水平施用两次(例如,第0天和第7天、第0天和第14天、第0天和第21天、第0天和第28天、第0天和第60天、第0天和第90天、第0天和第120天、第0天和第150天、第0天和第180天、第0天和3个月以后、第0天和6个月以后、第0天和9个月以后、第0天和12个月以后、第0天和18个月以后、第0天和2年以后、第0天和5年以后、或第0天和10年以后)。

[0561] 在一些实施方案中,用于对受试者接种疫苗的方法中的RNA疫苗以在10 μ g/kg与400 μ g/kg之间的单剂量的核酸疫苗(以用以对所述受试者接种疫苗的有效量)向所述受试者施用。在一些实施方案中,用于对受试者接种疫苗的方法中的RNA疫苗以在10 μ g与400 μ g之间的单剂量的核酸疫苗(以用以对所述受试者接种疫苗的有效量)向所述受试者施用。在一些实施方案中,用于对受试者接种疫苗的方法中的流感RNA(例如,mRNA)疫苗以10 μ g的单剂量向受试者施用。在一些实施方案中,用于对受试者接种疫苗的方法中的流感RNA疫苗以2 μ g的单剂量向受试者施用。在一些实施方案中,用于对受试者接种疫苗的方法中的流感RNA疫苗以两次10 μ g的剂量向受试者施用。在一些实施方案中,用于对受试者接种疫苗的方法中的流感RNA疫苗以两次2 μ g的剂量向受试者施用。

[0562] 可将本文所述的流感RNA疫苗药物组合物配制成本文所述的剂型,如鼻内、气管内或可注射(例如静脉内、眼内、玻璃体内、肌内、皮内、心内、腹膜内、鼻内和皮下)剂型。

[0563] 流感RNA疫苗配制品和使用方法

[0564] 本公开的一些方面提供流感RNA(例如,mRNA)疫苗的配制品,其中所述RNA疫苗以在受试者中有效于产生抗原特异性免疫应答(例如产生对流感抗原性多肽具有特异性的抗体)的量配制。“有效量”是RNA(例如,mRNA)疫苗的有效于产生抗原特异性免疫应答的剂量。本文也提供诱导受试者中的抗原特异性免疫应答的方法。

[0565] 在一些实施方案中,抗原特异性免疫应答通过测量在被施用如本文提供的流感RNA(例如,mRNA)疫苗的受试者中产生的抗流感抗原性多肽抗体滴度来表征。抗体滴度是受试者内抗体(例如,对特定抗原(例如流感抗原性多肽)或抗原的表位具有特异性的抗体)的量的测量。典型地将抗体滴度表示为提供阳性结果的最大稀释度的倒数。酶联免疫吸附测定(ELISA)是一种用于例如测定抗体滴度的常见测定。

[0566] 在一些实施方案中,抗体滴度用于评估受试者是否已患有感染,或确定是否需要免疫。在一些实施方案中,抗体滴度用于确定自体免疫应答的强度,确定是否需要加强免疫,确定先前疫苗是否有效,以及鉴定任何当前或先前感染。根据本公开,抗体滴度可用于确定由流感RNA疫苗在受试者中诱导的免疫应答的强度。

[0567] 在一些实施方案中,受试者中产生的抗流感抗原性多肽抗体滴度相对于对照增加至少1log。例如,受试者中产生的抗流感抗原性多肽抗体滴度相对于对照增加至少1.5、至少2、至少2.5、或至少3log。在一些实施方案中,受试者中产生的抗流感抗原性多肽抗体滴度相对于对照增加1、1.5、2、2.5或3log。在一些实施方案中,受试者中产生的抗流感抗原性多肽抗体滴度相对于对照增加1-3log。例如,受试者中产生的抗流感抗原性多肽抗体滴度相对于对照增加1-1.5、1-2、1-2.5、1-3、1.5-2、1.5-2.5、1.5-3、2-2.5、2-3、或2.5-3log。

[0568] 在一些实施方案中,受试者中产生的抗流感抗原性多肽抗体滴度相对于对照增加至少2倍。例如,受试者中产生的抗流感抗原性多肽抗体滴度相对于对照增加至少3倍、至少4倍、至少5倍、至少6倍、至少7倍、至少8倍、至少9倍、或至少10倍。在一些实施方案中,受试者中产生的抗流感抗原性多肽抗体滴度相对于对照增加2、3、4、5、6、7、8、9、或10倍。在一些实施方案中,受试者中产生的抗流感抗原性多肽抗体滴度相对于对照增加2-10倍。例如,相对于对照,受试者产生的抗流感抗原性多肽抗体滴度可增加2-10、2-9、2-8、2-7、2-6、2-5、2-4、2-3、3-10、3-9、3-8、3-7、3-6、3-5、3-4、4-10、4-9、4-8、4-7、4-6、4-5、5-10、5-9、5-8、5-7、5-6、6-10、6-9、6-8、6-7、7-10、7-9、7-8、8-10、8-9、或9-10倍。

[0569] 在一些实施方案中,所述对照是在尚未被施用流感RNA(例如,mRNA)疫苗的受试者中产生的抗流感抗原性多肽抗体滴度。在一些实施方案中,对照是在已被施用减毒活疫苗或灭活流感疫苗的受试者中产生的抗流感抗原性多肽抗体滴度。减毒疫苗是通过使有活力的(活体)病毒的毒性降低来产生的疫苗。减毒病毒以致使它相对于活体未修饰病毒无害或毒性更小的方式被改变。在一些实施方案中,对照是在被施用失活流感疫苗的受试者中产生的抗流感抗原性多肽抗体滴度。在一些实施方案中,对照是在被施用重组或纯化流感蛋白疫苗的受试者中产生的抗流感抗原性多肽抗体滴度。重组蛋白疫苗典型地包括已在异源性表达系统(例如细菌或酵母)中产生或从大量病原性生物体纯化的蛋白抗原。

[0570] 在一些实施方案中,流感RNA(例如,mRNA)疫苗的有效量是相较于重组流感蛋白疫

苗的护理标准剂量降低的剂量。如本文提供的“护理标准”是指医学或心理学治疗指导方针,并且可为通用的或特异性的。“护理标准”指定基于科学证据和对给定病况的治疗中涉及的医学专业人员之间的协作的适当治疗。它是医师/临床医师应遵循的针对某一类型的患者、疾患或临床情况的诊断和治疗过程。如本文提供的“护理标准剂量”是指重组或纯化流感蛋白疫苗或活体减毒或失活流感疫苗的由医师/临床医师或其他医学专业人员将在遵循用于治疗或预防流感或相关病况的护理标准指导方针下向受试者施用以治疗或预防流感或相关病况的剂量。

[0571] 在一些实施方案中,在被施用有效量的流感RNA疫苗的受试者中产生的抗流感抗原性多肽抗体滴度相当于在被施用护理标准剂量的重组或纯化流感蛋白疫苗或活体减毒或失活流感疫苗的对照受试者中产生的抗流感抗原性多肽抗体滴度。

[0572] 在一些实施方案中,流感RNA(例如,mRNA)疫苗的有效量是相当于重组或纯化流感蛋白疫苗的护理标准剂量降低至少2倍的剂量。例如,流感RNA疫苗的有效量可以是相当于重组或纯化流感蛋白疫苗的护理标准剂量降低至少3倍、至少4倍、至少5倍、至少6倍、至少7倍、减少8倍、至少9倍或至少10倍的剂量。在一些实施方案中,流感RNA疫苗的有效量是相当于重组或纯化流感蛋白疫苗的护理标准剂量降低至少100倍、至少500倍或至少1000倍的剂量。在一些实施方案中,流感RNA疫苗的有效量是相当于重组或纯化流感蛋白疫苗的护理标准剂量降低2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、50倍、100倍、250倍、500倍、或1000倍的剂量。在一些实施方案中,在被施用有效量的流感RNA疫苗的受试者中产生的抗流感抗原性多肽抗体滴度相当于在被施用护理标准剂量的重组或纯化流感蛋白疫苗或减毒活流感疫苗或灭活流感疫苗的对照受试者中产生的抗流感抗原性多肽抗体滴度。在一些实施方案中,流感RNA(例如,mRNA)疫苗的有效量是相当于重组或纯化疫苗的护理标准剂量降低2倍至1000倍(例如2倍至100倍、10倍至1000倍)的剂量,其中在受试者中产生的抗流感抗原性多肽抗体滴度相当于在被施用护理标准剂量的重组或纯化流感蛋白疫苗、活体减毒流感疫苗或失活流感疫苗的对照受试者中产生的抗流感抗原性多肽抗体滴度。

[0573] 在一些实施方案中,流感RNA(例如,mRNA)疫苗的有效量是相当于重组流感蛋白疫苗的标准照护剂量降低2至1000倍、2至900倍、2至800倍、2至700倍、2至600倍、2至500倍、2至400倍、2至300倍、2至200倍、2至100倍、2至90倍、2至80倍、2至70倍、2至60倍、2至50倍、2至40倍、2至30倍、2至20倍、2至10倍、2至9倍、2至8倍、2至7倍、2至6倍、2至5倍、2至4倍、2至3倍、3至1000倍、3至900倍、3至800倍、3至700倍、3至600倍、3至500倍、3至400倍、3至300倍、3至200倍、3至100倍、3至90倍、3至80倍、3至70倍、3至60倍、3至50倍、3至40倍、3至30倍、3至20倍、3至10倍、3至9倍、3至8倍、3至7倍、3至6倍、3至5倍、3至4倍、4至1000倍、4至900倍、4至800倍、4至700倍、4至600倍、4至500倍、4至400倍、4至300倍、4至200倍、4至100倍、4至90倍、4至80倍、4至70倍、4至60倍、4至50倍、4至40倍、4至30倍、4至20倍、4至10倍、4至9倍、4至8倍、4至7倍、4至6倍、4至5倍、4至4倍、5至1000倍、5至900倍、5至800倍、5至700倍、5至600倍、5至500倍、5至400倍、5至300倍、5至200倍、5至100倍、5至90倍、5至80倍、5至70倍、5至60倍、5至50倍、5至40倍、5至30倍、5至20倍、5至10倍、5至9倍、5至8倍、5至7倍、5至6倍、6至1000倍、6至900倍、6至800倍、6至700倍、6至600倍、6至500倍、6至400倍、6至300倍、6至200倍、6至100倍、6至90倍、6至80倍、6至70倍、6至60倍、6至50倍、6至40倍、6至30倍、6至20倍、6至10倍、6至9倍、6至8倍、6至7倍、7至1000倍、7至900倍、7至800倍、7至700倍、7至600倍、7至

500倍、7至400倍、7至300倍、7至200倍、7至100倍、7至90倍、7至80倍、7至70倍、7至60倍、7至50倍、7至40倍、7至30倍、7至20倍、7至10倍、7至9倍、7至8倍、8至1000倍、8至900倍、8至800倍、8至700倍、8至600倍、8至500倍、8至400倍、8至300倍、8至200倍、8至100倍、8至90倍、8至80倍、8至70倍、8至60倍、8至50倍、8至40倍、8至30倍、8至20倍、8至10倍、8至9倍、9至1000倍、9至900倍、9至800倍、9至700倍、9至600倍、9至500倍、9至400倍、9至300倍、9至200倍、9至100倍、9至90倍、9至80倍、9至70倍、9至60倍、9至50倍、9至40倍、9至30倍、9至20倍、9至10倍、10至1000倍、10至900倍、10至800倍、10至700倍、10至600倍、10至500倍、10至400倍、10至300倍、10至200倍、10至100倍、10至90倍、10至80倍、10至70倍、10至60倍、10至50倍、10至40倍、10至30倍、10至20倍、20至1000倍、20至900倍、20至800倍、20至700倍、20至600倍、20至500倍、20至400倍、20至300倍、20至200倍、20至100倍、20至90倍、20至80倍、20至70倍、20至60倍、20至50倍、20至40倍、20至30倍、30至1000倍、30至900倍、30至800倍、30至700倍、30至600倍、30至500倍、30至400倍、30至300倍、30至200倍、30至100倍、30至90倍、30至80倍、30至70倍、30至60倍、30至50倍、30至40倍、40至1000倍、40至900倍、40至800倍、40至700倍、40至600倍、40至500倍、40至400倍、40至300倍、40至200倍、40至100倍、40至90倍、40至80倍、40至70倍、40至60倍、40至50倍、50至1000倍、50至900倍、50至800倍、50至700倍、50至600倍、50至500倍、50至400倍、50至300倍、50至200倍、50至100倍、50至90倍、50至80倍、50至70倍、50至60倍、60至1000倍、60至900倍、60至800倍、60至700倍、60至600倍、60至500倍、60至400倍、60至300倍、60至200倍、60至100倍、60至90倍、60至80倍、60至70倍、70至1000倍、70至900倍、70至800倍、70至700倍、70至600倍、70至500倍、70至400倍、70至300倍、70至200倍、70至100倍、70至90倍、70至80倍、80至1000倍、80至900倍、80至800倍、80至700倍、80至600倍、80至500倍、80至400倍、80至300倍、80至200倍、80至100倍、80至90倍、90至1000倍、90至900倍、90至800倍、90至700倍、90至600倍、90至500倍、90至400倍、90至300倍、90至200倍、90至100倍、100至1000倍、100至900倍、100至800倍、100至700倍、100至600倍、100至500倍、100至400倍、100至300倍、100至200倍、200至1000倍、200至900倍、200至800倍、200至700倍、200至600倍、200至500倍、200至400倍、200至300倍、300至1000倍、300至900倍、300至800倍、300至700倍、300至600倍、300至500倍、300至400倍、400至1000倍、400至900倍、400至800倍、400至700倍、400至600倍、400至500倍、500至1000倍、500至900倍、500至800倍、500至700倍、500至600倍、600至1000倍、600至900倍、600至800倍、600至700倍、700至1000倍、700至900倍、700至800倍、800至1000倍、800至900倍、或900至1000倍的剂量。在一些实施方案中,如前所述,在受试者中产生的抗流感抗原性多肽抗体滴度相当于在被施用护理标准剂量的重组或纯化流感蛋白疫苗、活体减毒流感疫苗或失活流感疫苗的对照受试者中产生的抗流感抗原性多肽抗体滴度。在一些实施方案中,有效量是相当于(或相当于至少)重组流感蛋白疫苗的标准照护剂量降低2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍、110倍、120倍、130倍、140倍、150倍、160倍、170倍、1280倍、190倍、200倍、210倍、220倍、230倍、240倍、250倍、260倍、270倍、280倍、290倍、300倍、310倍、320倍、330倍、340倍、350倍、360倍、370倍、380倍、390倍、400倍、410倍、420倍、430倍、440倍、450倍、4360倍、470倍、480倍、490倍、500倍、510倍、520倍、530倍、540倍、550倍、560倍、5760倍、580倍、590倍、600倍、610倍、620倍、630倍、640倍、650倍、660倍、670倍、680倍、690倍、700倍、710倍、720倍、730倍、740倍、750倍、760倍、770倍、780

倍、790倍、800倍、810倍、820倍、830倍、840倍、850倍、860倍、870倍、880倍、890倍、900倍、910倍、920倍、930倍、940倍、950倍、960倍、970倍、980倍、990倍、或1000倍的剂量。在一些实施方案中,如前所述,在受试者中产生的抗流感抗原性多肽抗体滴度相当于在被施用护理标准剂量的重组或纯化流感蛋白疫苗或减毒活流感疫苗或灭活流感疫苗的对照受试者中产生的抗流感抗原性多肽抗体滴度。

[0574] 在一些实施方案中,流感RNA(例如,mRNA)疫苗的有效量是50-1000 μ g的总剂量。在一些实施方案中,流感RNA(例如,mRNA)疫苗的有效量是50-1000、50-900、50-800、50-700、50-600、50-500、50-400、50-300、50-200、50-100、50-90、50-80、50-70、50-60、60-1000、60-900、60-800、60-700、60-600、60-500、60-400、60-300、60-200、60-100、60-90、60-80、60-70、70-1000、70-900、70-800、70-700、70-600、70-500、70-400、70-300、70-200、70-100、70-90、70-80、80-1000、80-900、80-800、80-700、80-600、80-500、80-400、80-300、80-200、80-100、80-90、90-1000、90-900、90-800、90-700、90-600、90-500、90-400、90-300、90-200、90-100、100-1000、100-900、100-800、100-700、100-600、100-500、100-400、100-300、100-200、200-1000、200-900、200-800、200-700、200-600、200-500、200-400、200-300、300-1000、300-900、300-800、300-700、300-600、300-500、300-400、400-1000、400-900、400-800、400-700、400-600、400-500、500-1000、500-900、500-800、500-700、500-600、600-1000、600-900、600-800、600-700、700-1000、700-900、700-800、800-1000、800-900、或900-1000 μ g的总剂量。在一些实施方案中,流感RNA(例如,mRNA)疫苗的有效量是50、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950或1000 μ g的总剂量。在一些实施方案中,有效量是总计两次向受试者施用的25-500 μ g的剂量。在一些实施方案中,流感RNA(例如,mRNA)疫苗的有效量是总计两次向受试者施用的25-500、25-400、25-300、25-200、25-100、25-50、50-500、50-400、50-300、50-200、50-100、100-500、100-400、100-300、100-200、150-500、150-400、150-300、150-200、200-500、200-400、200-300、250-500、250-400、250-300、300-500、300-400、350-500、350-400、400-500或450-500 μ g的剂量。在一些实施方案中,流感RNA(例如,mRNA)疫苗的有效量是总计两次向受试者施用的25、50、100、150、200、250、300、350、400、450、或500 μ g的总剂量。

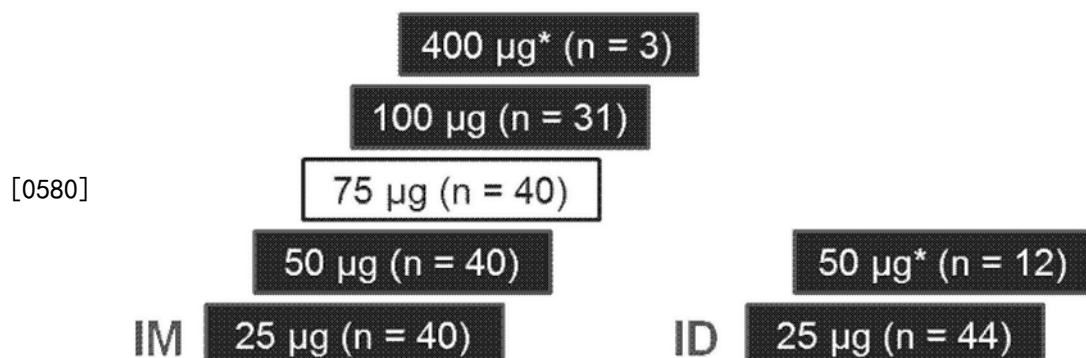
[0575] 在一些实施方案中,在受试者中由流感RNA疫苗诱导的抗原特异性免疫应答是产生对抗流感抗原性多肽具有特异性的抗体。在一些实施方案中,此类抗体能够中和受感染宿主中的流感。在一些实施方案中,在受试者中由流感RNA疫苗诱导的抗原特异性免疫应答是抗原特异性T细胞应答。此类T细胞应答可以为免疫动物(例如小鼠或人)提供针对融合流感感染的免疫力。

[0576] 无需进一步详细阐述,相信本领域技术人员可基于以上描述最大限度地利用本发明。因此,以下具体实施方案应仅被解释为说明性的,并且不以任何方式限制本公开的其余部分。出于本文引用的目的或主题,本文引用的所有出版物均通过引用并入。

[0577] 实施例

[0578] 实施例1.H10N8流感的mRNA

[0579] 进行了一项I期临床试验以测试H10N8流感的mRNA疫苗。如下示意图示出了在第1阶段试验期间依据给药类型的剂量递增。黑框指示已完成或已结束的同时组群。白框指示持续招募的同时组群。星号用于描述仅接受初免剂量并随后中止的同时组群。

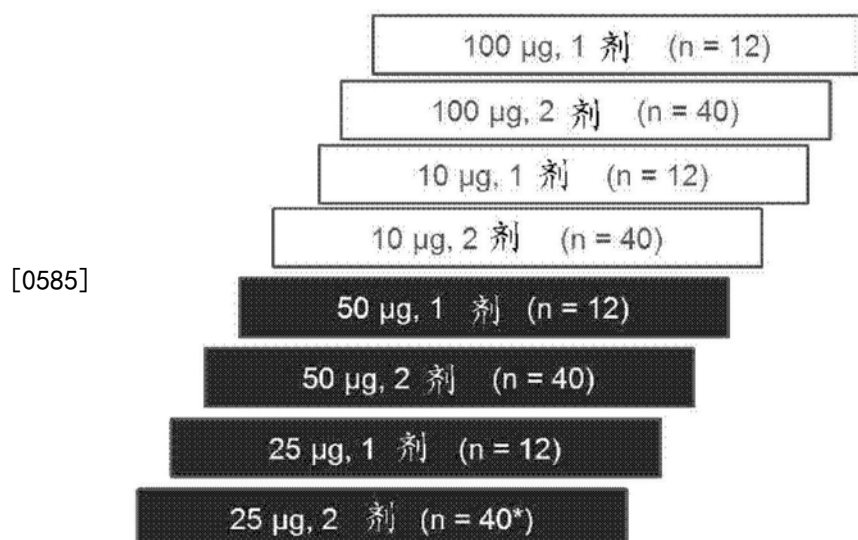


[0581] 产生了编码全长膜结合血凝素的mRNA,并在1期试验中用于人类受试者。依照给药类型,肌肉(IM)和皮内(ID)同期组群以3:1的安慰剂对照比率进行剂量递增。受试者在第1天和第22天接受2剂。IM组给予400µg,而出于安全考虑,ID组接受50µg。在第43天测量HAI滴度和微量中和(MN)。所述方案随后被修改以包括用于老年人同期组群的75µg。

[0582] 预计1:40的HAI滴度或HAI从基线增加4倍将更具保护性。来自1期试验的非盲数据报道,高达100%的IM 100µg同期组群达到1:40的滴度,而该同期组群中的78%从基线增加4倍(图1)。还认为1:20的微量中和或MN从基线增加2倍将具有保护性。来自1期试验的非盲数据报道,IM 100µg同期组群的87%实现了1:20或MN从基线增加2倍(图2)。

[0583] 实施例2.H7N9流感的mRNA

[0584] 进行一项I期临床试验以测试H7N9流感的mRNA疫苗。示意图示出在1期试验期间肌肉(IM)同期组群的剂量递增。黑框指示已完成或已结束同期组群。白框指示持续招募的同期组群。星号用于描述3名参与者错过剂量的同期组群。



[0586] 在1期试验中测试了编码全长膜结合血凝素的mRNA。以3:1的安慰剂对照比率对肌肉(IM)同期组群进行剂量递增。受试者在第1天接受初免剂量,在第22天接受加强剂。最后,在第43天测量HAI滴度和微量中和(MN)水平。所述方案随后被修改以包括10µg同期组群并去除200µg同期组群。

[0587] 预计1:40的HAI滴度或HAI从基线增加4倍将更具保护性。来自1期试验的非盲数据报道,IM 25µg第2剂量同期组群中高达96%(26/27)受试者显示基于HAI的保护增加。单剂量同期组群中九名受试者中的三名也实现了该相同结果(图3)。同样理论上来说,1:20的微量

量中和或MN从基线增加2倍将具有保护性。来自1期试验的非盲数据报道,高达100%的IM 25 μ g第2剂量同期组群实现了1:20或MN从基线增加2倍。单剂量同期组群中九名受试者中的七名也实现了该相同结果(图4)。

[0588] 表1显示了在第二剂量后第21天(Novarax为第14天)HAI或MN大于40的个体的百分比的竞争对手比较数据。

[0589] 表1:与竞争对手数据的比较

[0590]	公司	佐剂	HAI	MN
	Novartis	MF59	52	78
	Novavax	Iscomatrix	81	N/T
	GSK	AS03	96	96
	本发明的构建体		96	100

[0591] 实施例3.H10N8流感的长期mRNA疫苗

[0592] 在本研究中,为小鼠接种mRNA H10N8流感疫苗并观察超过一年。每月收集血液以研究HAI应答的持续时间。结果如图5所示。HAI滴度保持相对恒定超过九个月。在11个月左右可以看到有一些下降。然而,这些小鼠在这一时间点开始因自然原因死亡。小鼠的寿命为约12-16个月。结果非常出乎意料地证明了mRNA疫苗的在整个小鼠寿命期间维持了保护性效果。

[0593] 尽管本文已经描述和示出了若干个发明实施方案,但本领域普通技术人员将容易地想到用于执行功能和/或获得结果和/或本文描述的优点中的一个或多个的多种其他装置和/或结构,并且每个此类变型和/或修改都应当被认为在本文描述的发明实施方案的范围内。更一般地,本领域普通技术人员将容易地认识到,本文描述的所有参数、尺寸、材料和配置都意在为示例性的,并且实际的参数、尺寸、材料和/或配置将取决于使用本发明传授内容的一个或多个具体应用。本领域普通技术人员将认识到或仅仅使用常规实验就能够确定本文描述的具体发明实施方案的许多等同形式。因此,应当理解的是,前面的实施方案仅仅通过举例的方式提出,并且在所附权利要求书及其等同形式的范围内,可以实践除具体描述和要求保护的以外的其他发明实施方案。本公开的发明实施方案涉及本文描述的每个单独的特征、系统、物品、材料、试剂盒和/或方法。此外,此类特征、系统、物品、材料、试剂盒和/或方法中两个或更多个的任意组合-如果这些特征、系统、物品、材料、试剂盒和/或方法不会相互不一致-都包括在本公开的发明范围内。

[0594] 如本文所定义和使用的所有定义都应理解为优先于辞典定义、通过引用并入的文件中的定义和/或所定义术语的普通含义。

[0595] 本文中公开的所有参考文献、专利和专利申请均就各自所引用的主题(在某些情况下可涵盖整个文件)而言通过引用并入。

[0596] 除非明确指示相反含义,否则如本文在说明书和权利要求书中所用的不定冠词“一个/种(a)”和“一个/种(an)”应理解为意指“至少一个/种”。

[0597] 如本文在说明书和权利要求书中所用的词组“和/或”应理解为意指如此联合的要素中的“任一者或二者”,即要素在一些情况下连结存在,并且在其他情况下分开存在。用“和/或”列示的多个/种要素应以相同方式解释,即如此联合的要素中的“一个/种或多个/种”。除了通过“和/或”条款明确标识的要素以外,其他要素可任选地存在,不论与那些明确

标识的要素是否相关。因此,作为非限制性例子,在结合诸如“包含 (comprising)”等开放式语言使用时,提到“A和/或B”在一个实施方案中可仅指A(任选地,包括除了B以外的要素);在另一个实施方案中,仅指B(任选地,包括除了A以外的要素);在又一个实施方案中,是指A和B二者(任选地,包括其他要素);等等。如在本文的说明书和权利要求书中使用的,“或/或者”应当理解为具有与前面定义的“和/或”相同的含义。例如,在分离列表中的项目时,“或”或者“和/或”应解释为包括性的,即包括多个/种要素或要素列表中的至少一个/种要素,但也包括多于一个/种要素,以及任选地其他未列示项目。只有明确指示相反含义的术语,如“.....中的仅一个/种 (only one of)”或“.....中确切的一个/种 (exactly one of)”,或在权利要求书中使用时“由.....组成 (consisting of)”将是指包括多个/种要素或要素列表中确切的一个/种要素。通常,当跟在排他性术语(如“任一 (either)”、“.....中的一个/种 (one of)”、“.....中的仅一个/种 (only one of)”或“.....中确切的一个/种 (exactly one of)”、“基本上由.....组成 (Consisting essentially of)”)后时,如本文所用的术语“或”应仅解释为指示排他性备选方案(即,“一个/种或另一个/种,但并非二者 (one or the other but not both)”),在用于权利要求书中时,其应具有如在专利法领域中使用的普通含义。

[0598] 如本文在说明书和权利要求书中使用的,在提及一个/种或多个/种要素的列表时,短语“至少一个/种”应理解为意指选自所述要素列表中的任何一个/种或多个/种要素的至少一个/种要素,但是并不一定包括在所述要素列表中具体列出的每个/种要素的至少一个/种,也不排除所述要素列表中的要素的任意组合。这个定义还容许除了词组“至少一个/种”所涉及的要素列表内明确标识的要素以外的要素可任选地存在,不论与那些明确标识的要素是否相关。因此,作为非限制性例子,“A和B中的至少一个/种”(或等效地,“A或B中的至少一个/种”,或等效地“A和/或B中的至少一个/种”)在一个实施方案中可是指至少一个/种(任选地包括多于一个/种)A,不存在B(并且任选地包括除了B以外的要素);在又一个实施方案中,是指至少一个/种(任选地包括多于一个/种)B,不存在A(并且任选地包括除了A以外的要素);在又一个实施方案中,是指至少一个/种(任选地包括多于一个/种)A、以及至少一个/种(任选地包括多于一个/种)B(并且任选地包括其他要素);等等。每种可能性代表本发明的单独实施方案。

[0599] 还应理解,除非明确指示相反含义,否则在本文要求保护的包括多于一个步骤或动作的任何方法中,所述方法的步骤或动作的顺序并不一定限于列举所述方法的步骤或动作的顺序。

[0600] 在权利要求书以及上述说明书中,所有过渡性词组(例如“包含 (comprising)”、“包括 (including)”、“携带 (carrying)”、“具有 (having)”、“含有 (containing)”、“涉及 (involving)”、“保持 (holding)”、“由.....构成 (composed of)”等)应理解为开放式的,即意指包括但不限于。只有过渡性词组“由.....组成 (consisting of)”和“基本上由.....组成 (consisting essentially of)”应分别为封闭式或半封闭式过渡性词组,如美国专利局专利审查程序手册 (United States Patent Office Manual of Patent Examining Procedures) 2111.03部分中所阐述。

序列表

<110> ModernaTX, Inc.
 <120> 流感疫苗
 <130> M1378.70059W000
 <140> 尚未分配
 <141> 2017-11-10
 <150> US 62/421,160
 <151> 2016-11-11
 <160> 23
 <170> PatentIn 3.5版
 <210> 1
 <211> 560
 <212> PRT
 <213> 甲型流感病毒 (Influenza A virus)
 <400> 1
 Met Asn Thr Gln Ile Leu Val Phe Ala Leu Ile Ala Ile Ile Pro Thr
 1 5 10 15
 Asn Ala Asp Lys Ile Cys Leu Gly His His Ala Val Ser Asn Gly Thr
 20 25 30
 Lys Val Asn Thr Leu Thr Glu Arg Gly Val Glu Val Val Asn Ala Thr
 35 40 45
 Glu Thr Val Glu Arg Thr Asn Ile Pro Arg Ile Cys Ser Lys Gly Lys
 50 55 60
 Lys Thr Val Asp Leu Gly Gln Cys Gly Leu Leu Gly Thr Ile Thr Gly
 65 70 75 80
 Pro Pro Gln Cys Asp Gln Phe Leu Glu Phe Ser Ala Asp Leu Ile Ile
 85 90 95
 Glu Arg Arg Glu Gly Ser Asp Val Cys Tyr Pro Gly Lys Phe Val Asn
 100 105 110
 Glu Glu Ala Leu Arg Gln Ile Leu Arg Glu Ser Gly Gly Ile Asp Lys
 115 120 125
 Glu Ala Met Gly Phe Thr Tyr Ser Gly Ile Arg Thr Asn Gly Ala Thr
 130 135 140
 Ser Ala Cys Arg Arg Ser Gly Ser Ser Phe Tyr Ala Glu Met Lys Trp
 145 150 155 160
 Leu Leu Ser Asn Thr Asp Asn Ala Ala Phe Pro Gln Met Thr Lys Ser
 165 170 175
 Tyr Lys Asn Thr Arg Lys Ser Pro Ala Leu Ile Val Trp Gly Ile His

			180				185				190				
His	Ser	Val	Ser	Thr	Ala	Glu	Gln	Thr	Lys	Leu	Tyr	Gly	Ser	Gly	Asn
			195				200				205				
Lys	Leu	Val	Thr	Val	Gly	Ser	Ser	Asn	Tyr	Gln	Gln	Ser	Phe	Val	Pro
			210				215				220				
Ser	Pro	Gly	Ala	Arg	Pro	Gln	Val	Asn	Gly	Gln	Ser	Gly	Arg	Ile	Asp
225			230				235				240				
Phe	His	Trp	Leu	Met	Leu	Asn	Pro	Asn	Asp	Thr	Val	Thr	Phe	Ser	Phe
			245				250				255				
Asn	Gly	Ala	Phe	Ile	Ala	Pro	Asp	Arg	Ala	Ser	Phe	Leu	Arg	Gly	Lys
			260				265				270				
Ser	Met	Gly	Ile	Gln	Ser	Gly	Val	Gln	Val	Asp	Ala	Asn	Cys	Glu	Gly
			275				280				285				
Asp	Cys	Tyr	His	Ser	Gly	Gly	Thr	Ile	Ile	Ser	Asn	Leu	Pro	Phe	Gln
290			295				300								
Asn	Ile	Asp	Ser	Arg	Ala	Val	Gly	Lys	Cys	Pro	Arg	Tyr	Val	Lys	Gln
305			310				315				320				
Arg	Ser	Leu	Leu	Leu	Ala	Thr	Gly	Met	Lys	Asn	Val	Pro	Glu	Ile	Pro
			325				330				335				
Lys	Gly	Arg	Gly	Leu	Phe	Gly	Ala	Ile	Ala	Gly	Phe	Ile	Glu	Asn	Gly
			340				345				350				
Trp	Glu	Gly	Leu	Ile	Asp	Gly	Trp	Tyr	Gly	Phe	Arg	His	Gln	Asn	Ala
			355				360				365				
Gln	Gly	Glu	Gly	Thr	Ala	Ala	Asp	Tyr	Lys	Ser	Thr	Gln	Ser	Ala	Ile
370			375				380								
Asp	Gln	Ile	Thr	Gly	Lys	Leu	Asn	Arg	Leu	Ile	Glu	Lys	Thr	Asn	Gln
385			390				395				400				
Gln	Phe	Glu	Leu	Ile	Asp	Asn	Glu	Phe	Asn	Glu	Val	Glu	Lys	Gln	Ile
			405				410				415				
Gly	Asn	Val	Ile	Asn	Trp	Thr	Arg	Asp	Ser	Ile	Thr	Glu	Val	Trp	Ser
			420				425				430				
Tyr	Asn	Ala	Glu	Leu	Leu	Val	Ala	Met	Glu	Asn	Gln	His	Thr	Ile	Asp
			435				440				445				
Leu	Ala	Asp	Ser	Glu	Met	Asp	Lys	Leu	Tyr	Glu	Arg	Val	Lys	Arg	Gln
450			455				460								
Leu	Arg	Glu	Asn	Ala	Glu	Glu	Asp	Gly	Thr	Gly	Cys	Phe	Glu	Ile	Phe
465			470				475				480				
His	Lys	Cys	Asp	Asp	Asp	Cys	Met	Ala	Ser	Ile	Arg	Asn	Asn	Thr	Tyr
			485				490				495				

Asp His Ser Lys Tyr Arg Glu Glu Ala Met Gln Asn Arg Ile Gln Ile		
500	505	510
Asp Pro Val Lys Leu Ser Ser Gly Tyr Lys Asp Val Ile Leu Trp Phe		
515	520	525
Ser Phe Gly Ala Ser Cys Phe Ile Leu Leu Ala Ile Val Met Gly Leu		
530	535	540
Val Phe Ile Cys Val Lys Asn Gly Asn Met Arg Cys Thr Ile Cys Ile		
545	550	555
		560

<210> 2

<211> 1953

<212> RNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多核苷酸

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (1) .. (1)

<223> 被7MeGpppG2'OMe修饰

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (1953) .. (1953)

<223> 被OH修饰

<400> 2

ggaaaauaaga gagaaaagaa gaguaagaag aaauauaaga gccaccaugu acaaaaucgu	60
cgucauuuau gcauugcugg gcgcugucuaa gggacucgac aagaucuguc ucggacacca	120
cgcgguuggc aacggaacca ucgucaagac ccugacuaac gagcaggaag aagugaccaa	180
cgccaccgaa acuguggaau ccaccgggau caacagauug ugcaugaagg gucggagca	240
caaggauucg ggaaacugcc acccgauugg aaugcucauc ggcaccccg caugcgauuc	300
gcaucugacu gggauuggg auaccuuuau cgagcgggaa aacgcgaucg cauacuguua	360
ccccggugcc accgugaacg uggaggcgcu cagacagaag auuauggagu caggcggcau	420
caacaagauu uccacgggcu ucaccuacgg guccuccauu aacuccgccg guaccacucg	480
ggccugcaug cggaacggag ggaacuccuu uuacgccgag cucaaguggc uuugucaaaa	540
auccaaggga cagaauuucc cccaaaccac caacaccuau aggaacaccg acaccgccga	600
acaucucauu auguggggca uccaucaccc uucgagcaca caggagaaga augaccucua	660
cggcacccag ucgcugagca ucuccguggg cucaucgacc uaucgcaaca acuucgugcc	720
uguggucggc gcccgaccuc aagucaacgg acaguccgga cgcauugacu uccauggac	780
ucuggugcaa ccgggagaca acaucacuuu cuccacacac ggccgacuga uuccccaaag	840
ccgcguguca aagcugaucg guagagggcu ggguauucag ucggaugcuc ccaucgauaa	900
caacugcgaa uccaagugcu uuuggagagg cggcucauc aauacucggc ugccguuua	960

gaaccugagc	ccgaggaccg	uggggcagug	cccaaaaauac	gugaaucgcc	ggucacugau	1020
gcuggcgacc	ggaaugagga	acgugccuga	acucauccag	ggacgggggc	uguucggcgc	1080
caucgccggc	uuccuggaaa	acggauggga	gggaauuggug	gacgguuggu	acggcuuccg	1140
ccacaaaaac	gcccagggaa	cuggacaggc	cgccgacuac	aaguccacac	aggccgcaau	1200
agaccagauc	acugggaagc	ucaaccgccu	uguggaaaag	acuaacacug	aaucgaguc	1260
gaucgagucu	gaguucuccg	agaucgaaca	ccagauuggg	aacgugauca	acuggacgaa	1320
ggacuccauu	accgacaucu	ggaccuacca	ggcggaacug	cucguggcga	uggagaacca	1380
gcacacuauc	gacauggccg	acuccgagau	gcugaauucg	uacgaacgcg	ugcggaagca	1440
acugagacaa	aacgcugaag	aagauggaaa	ggguuguuuu	gagaucuacc	acgccugcga	1500
cgacagcugc	auggaaaagca	uuaggaacaa	uaccuacgac	cacucgcagu	accgggagga	1560
ggcccuucug	aaccggcuga	acauuaaccc	cgugaccuug	agcuccggcu	acaaggacau	1620
cauccugugg	uucucguuug	gagccagcug	cuucgugcug	cuggccgucg	ugaugggauu	1680
guucuuucuu	ugccugaaaa	acggaaacau	gcgcugcacc	aucuguauuu	gauaaauaggc	1740
uggagccucg	guggccaugc	uucuuugccc	uugggccucc	ccccagcccc	uccuccccuu	1800
ccugcacccg	uacccccgug	gucuuugaau	aaagucugag	ugggcggcaa	aaaaaaaaaa	1860
aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	1920
aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaa	uag			1953

<210> 3

<211> 1683

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多核苷酸

<400> 3

atgtacaaaa	tcgtcgtcat	tatcgcatgt	ctgggcgctg	tcaaggact	cgacaagatc	60
tgtctcggac	accacgcggt	ggctaacgga	accatcgtca	agaccctgac	taacgagcag	120
gaagaagtga	ccaacgccac	cgaaactgtg	gaatccaccg	ggatcaacag	attgtgcatg	180
aagggtcgga	agcacaagga	tctgggaaac	tgccaccgga	ttggaatgct	catcggcacc	240
ccggcatgcg	atctgcatct	gactgggatg	tgggataccc	ttatcgagcg	ggaaaacgcg	300
atcgcatact	gttaccgccg	tgccaccgtg	aacgtggagg	cgctcagaca	gaagattatg	360
gagtcaggcg	gcatcaacaa	gatttccacg	ggcttcacct	acgggtcctc	cattaactcc	420
gccggtacca	ctcgggcctg	catgcggaac	ggagggaact	ccttttacgc	cgagctcaag	480
tggtttgtgt	caaaatccaa	gggacagaat	ttccccaaa	ccaccaacac	ctataggaac	540
accgacaccg	ccgaacatct	cattatgtgg	ggcatccatc	acccttcgag	cacacaggag	600
aagaatgacc	tctacggcac	ccagtcgctg	agcatctccg	tgggctcatc	gacctatcgc	660
aacaacttcg	tgctgtgtgt	cggcgcccga	cctcaagtca	acggacagtc	cggacgcatt	720
gacttccatt	ggactcttgt	gcaaccggga	gacaacatca	ctttctccca	caacggcgga	780
ctgattgccc	caagccgcgt	gtcaaagctg	atcggtagag	ggctgggtat	tcagtcggat	840
gctcccatcg	ataacaactg	cgaatccaag	tgcttttgga	gaggcggctc	catcaatact	900

```

cggctgccgt ttcagaacct gagcccgagg accgtggggc agtgcccaaa atacgtgaat    960
cgccgggtcac tgatgctggc gaccggaatg aggaacgtgc ctgaactcat ccagggacgg    1020
gggctgttcg gcgccatcgc cggcttcctg gaaaacggat gggagggaat ggtggacggt    1080
tggtacggct tccgccacca aaacgcccag ggaactggac aggccgccga ctacaagtcc    1140
acacaggccg caatagacca gatcactggg aagctcaacc gccttggtga aaagactaac    1200
actgaattcg agtcgatcga gtctgagttc tccgagatcg aacaccagat tgggaacgtg    1260
atcaactgga cgaaggactc cattaccgac atctggacct accaggcgga actgctcgtg    1320
gcgatggaga accagcacac tatcgacatg gccgactccg agatgctgaa tctgtacgaa    1380
cgcggtgcgga agcaactgag acaaaacgct gaagaagatg gaaagggttg tttcgagatc    1440
taccacgcct gcgacgacag ctgcatggaa agcattagga acaataccta cgaccactcg    1500
cagtaccggg aggaggccct tctgaaccgg ctgaacatta accccgtgac cttgagctcc    1560
ggctacaagg acatcatcct gtggttctcg tttggagcca gctgcttcgt gctgctggcc    1620
gtcgtgatgg gattgttctt cttctgcctg aaaaacggaa acatgcgctg caccatctgt    1680
att                                                                    1683

```

<210> 4

<211> 561

<212> PRT

<213> 甲型流感病毒 (Influenza A virus)

<400> 4

```

Met Tyr Lys Ile Val Val Ile Ile Ala Leu Leu Gly Ala Val Lys Gly
1           5           10           15
Leu Asp Lys Ile Cys Leu Gly His His Ala Val Ala Asn Gly Thr Ile
          20           25           30
Val Lys Thr Leu Thr Asn Glu Gln Glu Glu Val Thr Asn Ala Thr Glu
          35           40           45
Thr Val Glu Ser Thr Gly Ile Asn Arg Leu Cys Met Lys Gly Arg Lys
          50           55           60
His Lys Asp Leu Gly Asn Cys His Pro Ile Gly Met Leu Ile Gly Thr
65           70           75           80
Pro Ala Cys Asp Leu His Leu Thr Gly Met Trp Asp Thr Leu Ile Glu
          85           90           95
Arg Glu Asn Ala Ile Ala Tyr Cys Tyr Pro Gly Ala Thr Val Asn Val
          100          105          110
Glu Ala Leu Arg Gln Lys Ile Met Glu Ser Gly Gly Ile Asn Lys Ile
          115          120          125
Ser Thr Gly Phe Thr Tyr Gly Ser Ser Ile Asn Ser Ala Gly Thr Thr
          130          135          140
Arg Ala Cys Met Arg Asn Gly Gly Asn Ser Phe Tyr Ala Glu Leu Lys
145          150          155          160

```

Trp	Leu	Val	Ser	Lys	Ser	Lys	Gly	Gln	Asn	Phe	Pro	Gln	Thr	Thr	Asn
				165			170				175				
Thr	Tyr	Arg	Asn	Thr	Asp	Thr	Ala	Glu	His	Leu	Ile	Met	Trp	Gly	Ile
				180			185				190				
His	His	Pro	Ser	Ser	Thr	Gln	Glu	Lys	Asn	Asp	Leu	Tyr	Gly	Thr	Gln
				195			200				205				
Ser	Leu	Ser	Ile	Ser	Val	Gly	Ser	Ser	Thr	Tyr	Arg	Asn	Asn	Phe	Val
				210			215				220				
Pro	Val	Val	Gly	Ala	Arg	Pro	Gln	Val	Asn	Gly	Gln	Ser	Gly	Arg	Ile
225				230			235				240				
Asp	Phe	His	Trp	Thr	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Asp	Asn	Ile	Thr	Phe	Ser
				245			250				255				
His	Asn	Gly	Gly	Leu	Ile	Ala	Pro	Ser	Arg	Val	Ser	Lys	Leu	Ile	Gly
				260			265				270				
Arg	Gly	Leu	Gly	Ile	Gln	Ser	Asp	Ala	Pro	Ile	Asp	Asn	Asn	Cys	Glu
				275			280				285				
Ser	Lys	Cys	Phe	Trp	Arg	Gly	Gly	Ser	Ile	Asn	Thr	Arg	Leu	Pro	Phe
				290			295				300				
Gln	Asn	Leu	Ser	Pro	Arg	Thr	Val	Gly	Gln	Cys	Pro	Lys	Tyr	Val	Asn
305				310			315				320				
Arg	Arg	Ser	Leu	Met	Leu	Ala	Thr	Gly	Met	Arg	Asn	Val	Pro	Glu	Leu
				325			330				335				
Ile	Gln	Gly	Arg	Gly	Leu	Phe	Gly	Ala	Ile	Ala	Gly	Phe	Leu	Glu	Asn
				340			345				350				
Gly	Trp	Glu	Gly	Met	Val	Asp	Gly	Trp	Tyr	Gly	Phe	Arg	His	Gln	Asn
				355			360				365				
Ala	Gln	Gly	Thr	Gly	Gln	Ala	Ala	Asp	Tyr	Lys	Ser	Thr	Gln	Ala	Ala
				370			375				380				
Ile	Asp	Gln	Ile	Thr	Gly	Lys	Leu	Asn	Arg	Leu	Val	Glu	Lys	Thr	Asn
385				390			395				400				
Thr	Glu	Phe	Glu	Ser	Ile	Glu	Ser	Glu	Phe	Ser	Glu	Ile	Glu	His	Gln
				405			410				415				
Ile	Gly	Asn	Val	Ile	Asn	Trp	Thr	Lys	Asp	Ser	Ile	Thr	Asp	Ile	Trp
				420			425				430				
Thr	Tyr	Gln	Ala	Glu	Leu	Leu	Val	Ala	Met	Glu	Asn	Gln	His	Thr	Ile
				435			440				445				
Asp	Met	Ala	Asp	Ser	Glu	Met	Leu	Asn	Leu	Tyr	Glu	Arg	Val	Arg	Lys
				450			455				460				
Gln	Leu	Arg	Gln	Asn	Ala	Glu	Glu	Asp	Gly	Lys	Gly	Cys	Phe	Glu	Ile

465	470	475	480
Tyr His Ala Cys Asp Asp Ser Cys Met Glu Ser Ile Arg Asn Asn Thr			
	485	490	495
Tyr Asp His Ser Gln Tyr Arg Glu Glu Ala Leu Leu Asn Arg Leu Asn			
	500	505	510
Ile Asn Pro Val Thr Leu Ser Ser Gly Tyr Lys Asp Ile Ile Leu Trp			
	515	520	525
Phe Ser Phe Gly Ala Ser Cys Phe Val Leu Leu Ala Val Val Met Gly			
	530	535	540
Leu Phe Phe Phe Cys Leu Lys Asn Gly Asn Met Arg Cys Thr Ile Cys			
545	550	555	560
Ile			

<210> 5

<211> 1891

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多核苷酸

<400> 5

tcaagctttt ggaccctcgt acagaagcta atacgactca ctataggga	ataagagaga	60
aaagaagagt aagaagaaat ataagagcca ccatgaatac ccagattctc	gtgttcgccc	120
tcatcgctat catcccaacc aatgccgaca agatctgctt gggcatcat	gcggtgtcga	180
acggaaccaa ggtcaacacc ctgaccgagc ggggagtgga agtgggtcaac	gctactgaaa	240
cgggtggaaag gactaataatc ccacgcatct gctcaaaggg aaagaaaact	gtggatctcg	300
gacagtgtgg acttctgggg accatcacgg gtccaccgca atgcgatcag	tttctggagt	360
tcagcgcaga tctgatcatc gagcgcagag aagggtccga cgtttgttac	cctggaaagt	420
tcgtgaacga agaggcactg cgccaaatct tgcgggagag cggcggcatt	gacaaagagg	480
ccatgggatt cacctactcg ggtattcgca ctaacggtgc cacttctgcg	tgccggcggt	540
ccgggtcctc cttctatgcc gagatgaagt ggctcctgtc gaacaccgac	aacgcagctt	600
ttccgcaaata gactaagtcc tacaataaaca ctagaaagtc gccggcactg	atcgtctggg	660
gaatccatca ctccgtgtct actgcggagc aaactaagct gtacggcagc	ggaaacaagc	720
tcgtgaccgt cggttcatcg aactaccagc agagctttgt gccaagcccc	ggagcgaggc	780
cccaggtcaa cgggcagagc ggacgcatcg acttccactg gctgatgctc	aatccgaatg	840
acaccgtgac cttctcgttc aatggcgctt tcatcgcacc tgaccgcgcc	agcttcttga	900
gaggaaagtc aatgggcata cagtcgggcg tccaagtgga tgccaactgc	gaggagact	960
gctatcactc cggcggaacc atcatctcca atttgccgtt tcaaacatc	gactcgcgcg	1020
cagtgggaaa gtgtccgcga tacgtgaagc agagatcact gctgctggcc	actgggatga	1080
agaacgtgcc tgaaatcccg aaaggaaggg ggttgcttcg cgctattgcg	ggcttcatcg	1140
aaaacggatg ggaggggctc atcgatggtt ggtacggatt caggcaccag	aacgcgcagg	1200

gggaaggaac	ggccgctgat	tacaagtcaa	ctcaatcggc	cattgaccaa	atcactggca	1260
aactgaatcg	cctgatcgaa	aagaccaatc	agcagtttga	gttgatcgac	aacgaattca	1320
acgaagtgga	gaaacagatt	ggcaatgtca	tcaattggac	cagagatagc	atcacggaag	1380
tctggtcgta	caacgccgaa	ctcctggttg	cgatggaaaa	tcaacacacc	atcgacctgg	1440
ccgactccga	aatggacaaa	ctctacgagc	gggtcaaacg	ccagctgcg	gaaaacgcag	1500
aagaagatgg	aaccggatgc	ttcgagatct	ttcataagt	cgacgacgat	tgcatggcca	1560
gcattccgga	caatacctac	gatcactcca	agtaccggga	ggaagcgatg	caaaatcgga	1620
tccagattga	cccgggtcaaa	ctgtcgtcag	gctacaagga	tgtgatcctt	tggtttctcat	1680
tccgagcgtc	ctgtttttatc	cttctggcta	ttgtgatggg	cctgggtgttc	atctgcgtga	1740
agaacggaaa	catgcgctgc	actatctgca	tctgataata	ggctggagcc	tcgggtggcca	1800
tgctttcttg	cccttggggc	tccccccagc	ccctctctcc	cttctctgcac	ccgtaccccc	1860
gtggtctttg	aataaaagtct	gagtgggcgg	c			1891

<210> 6

<211> 1891

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多核苷酸

<400> 6

ucaagcuuuu	ggaccucgu	acagaagcua	auacgacuca	cuauaggga	auaagagaga	60
aaagaagagu	aagaagaaau	auaagagcca	ccaugaauac	ccagauucuc	guguucgccc	120
ucaucgcua	caucccaacc	aaugccgaca	agaucugcuu	gggucaucau	gcggugucga	180
acggaaccaa	ggucaacacc	cugaccgagc	ggggagugga	aguggucaac	gcuacugaaa	240
cgguggaaa	gacuaauauc	ccacgcaucu	gcucaaaggg	aaagaaaacu	guggaucucg	300
gacagugugg	acuucugggg	accaucacgg	guccaccgca	augcgauacg	uuucuggagu	360
ucagcgcaga	ucugaucauc	gagcgcagag	aaggguccga	cguuuguuac	ccuggaaagu	420
ucgugaacga	agaggcacug	cgccaaauuc	ugcgggagag	cggcggcauu	gacaaagagg	480
ccaugggauu	caccuacucg	gguaauucgca	cuaacggugc	cacuucugcg	ugccggcguu	540
ccggguccuc	cuucuaugcc	gagaugaagu	ggcuccuguc	gaacaccgac	aacgcagcuu	600
uuccgcaaa	gacuaagucc	uacaaaaaca	cuagaaaguc	gccggcacug	aucgucuggg	660
gaauccauca	cuccgugucu	acugcggagc	aaacuaagcu	guacggcagc	ggaaacaagc	720
ucgugaccgu	cgguucaucg	aacuaccagc	agagcuuugu	gccaagcccc	ggagcgaggc	780
cccaggucua	cgggcagagc	ggacgcaucg	acuuccacug	gcugaugcuc	aauccgaaug	840
acaccgugac	cuucucguuc	aauggcgccu	ucaucgcacc	ugaccgcgcc	agcuuccuga	900
gaggaaaguc	aaugggcuaa	cagucgggcg	uccaagugga	ugccaacugc	gaggagacu	960
gcuaucauc	cggcggaacc	aucaucucca	auuugccguu	uacaaacauc	gacucgcgcg	1020
cagugggaaa	guguccgcga	uacgugaagc	agagaucacu	gcugcuggcc	acugggauga	1080
agaacgugcc	ugaaaucccg	aaaggaaggg	gguuguucgg	cgcuaauugc	ggcuucaucg	1140
aaaacggaug	ggaggggcuc	aucgaugguu	gguacggauu	caggcaccag	aacgcgcagg	1200

gggaaggaac	ggccgcugau	uacaagucac	cucaaucggc	cauugaccaa	aucacuggca	1260
aacugaauucg	ccugaucgaa	aagaccaauc	agcaguuuuga	guugaucgac	aacgaauuca	1320
acgaagugga	gaaacagauu	ggcaauguca	ucaauuggac	cagagauagc	aucacggaag	1380
ucuggucgua	caacgccgaa	cuccugguug	cgauggaaaa	ucaacacacc	aucgaccugg	1440
ccgacuccga	aauggacaaa	cucuacgagc	gggucaaacg	ccagcugcgc	gaaaacgcag	1500
aagaagaugg	aaccggauuc	uucgagauuc	uucuaaagug	cgacgacgau	ugcauggcca	1560
gcauccggaa	caauaccuac	gaucacucca	aguaccggga	ggaagcgaug	caaaaucgga	1620
uccagauuga	cccggucaaa	cugucgucag	gcuacaagga	ugugaucuuu	ugguucucuu	1680
ucggagcguc	cuguuuuauu	cuucuggcua	uugugauggg	ccugguguuu	aucugcguga	1740
agaacggaaa	caugcgucgc	acuaucugca	ucugauaaua	ggcuggagcc	ucgguggcca	1800
ugcuucuuug	cccuuggggc	ucuuuuuagc	ccuuccuucc	cuuccugcac	ccguaccccc	1860
guggucuuug	aauaaagucu	gaguggggcg	c			1891

<210> 7

<211> 1680

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多核苷酸

<400> 7

augaaauacc	agaauucucg	guucgcccuc	aucgcuauc	ucccaaccaa	ugccgacaag	60
aucugcuugg	gucaucaugc	ggugucgaac	ggaaccaagg	ucaacacccu	gaccgagcgg	120
ggaguggaag	uggucaacgc	uacugaaacg	guggaaagga	cuaauauccc	acgcaucugc	180
ucaaaaggga	agaaaacugu	ggaucucgga	caguguggac	uucuggggac	caucacgggu	240
ccaccgcaau	gcgaucaguu	ucuggaguuc	agcgcagauc	ugaucaucga	gcgcagagaa	300
ggguccgacg	uuuguuacc	uggaaaguuc	gugaacgaag	aggcacugcg	ccaaaucuuu	360
cgggagagcg	gcggcauuga	caaagaggcc	augggauuca	ccuacucggg	uauucgcacu	420
aacggugcca	cuucugcgug	ccggcguucc	ggguccuccu	ucuaugccga	gaugaagugg	480
cuccugucga	acaccgacaa	cgcagcuuuu	ccgcaaauga	cuaaguccua	caaaaacacu	540
agaaagucgc	cggcacugau	cgucugggga	auccaucacu	ccgugucuac	ugcggagcaa	600
acuaagcugu	acggcagcgg	aaacaagcuc	gugaccgucg	guucaucgaa	cuaccagcag	660
agcuuugugc	caagccccgg	agcgaaggcc	caggucaacg	ggcagagcgg	acgcaucgac	720
uuccacuggc	ugaugcucaa	uccgaaugac	accgugaccu	ucucguucaa	uggcgccuuc	780
aucgcaccug	accgcgccag	cuuccugaga	ggaaagucac	ugggcacuaa	gucgggcguc	840
caaguggaug	ccaacugcga	gggagacugc	uaucaucucc	gcggaaccuu	caucuccaau	900
uugccguuuc	aaaacaucga	cucgcgcgca	gugggaaagu	guccgcgaua	cgugaagcag	960
agaucacugc	ugcuggccac	ugggaugaag	aacgugccug	aaaucccgaa	aggaaggggg	1020
uuguucggcg	cuauugcggg	cuucaucgaa	aacggauggg	aggggcucuu	cgaugguugg	1080
uacggauuca	ggcaccagaa	cgcgcagggg	gaaggaacgg	ccgcugauua	caagucaacu	1140
caaucggcca	uugaccaaau	cacuggcaaa	cugaauccgc	ugaucgaaaa	gaccaaucag	1200

caguuugagu	ugaucgacaa	cgaauucaac	gaaguggaga	aacagauugg	caaugucauc	1260
aaugggacca	gagauagcau	cacggaaguc	uggucguaca	acgccgaacu	ccugguugcg	1320
auggaaaauc	aacacaccau	cgaccuggcc	gacuccgaaa	uggacaaacu	cuacgagcgg	1380
gucaaacgcc	agcugcgcga	aaacgcagaa	gaagauggaa	ccggaugcuu	cgagaucuuu	1440
cauaagugcg	acgacgauug	cauggccagc	auccggaaca	auaccuacga	ucacuccaag	1500
uaccgggagg	aagcgauuca	aaaucggau	cagauugacc	cggucuaacu	gucgucaggc	1560
uacaaggau	ugaucuuuug	guucucauuc	ggagcguccu	guuuuauccu	ucuggcuauu	1620
gugauggggcc	ugguguucau	cugcgugaag	aacggaaaca	ugcgugcac	uauugcauc	1680
<210>	8					
<211>	1683					
<212>	RNA					
<213>	人工序列 (Artificial Sequence)					
<220>						
<223>	合成多核苷酸					
<400>	8					
auguacaaaa	ucgucgucau	uauugcauug	cugggcgcug	ucaagggacu	cgacaagauc	60
ugucucggac	accacgcggu	ggcuacgga	accaucguca	agaccugac	uaacgagcag	120
gaagaaguga	ccaacgccac	cgaacugug	gaauccaccg	ggaucacag	auugugcaug	180
aagggucgga	agcacaagga	ucugggaaac	ugccaccgga	uuggaauugu	caucggcacc	240
ccggcaugcg	aucugcaucu	gacugggaug	ugggauaccc	uuauugagcg	ggaaaacgcg	300
aucgcauacu	guuaccccg	ugccaccgug	aacguggagg	cgcucagaca	gaagauuau	360
gagucaggcg	gcaucaacaa	gaauuccacg	ggcuucaccu	acggguccuc	cauuacucc	420
gccgguacca	cucgggccug	caugcggaac	ggagggaacu	ccuuuacgc	cgagcucaag	480
uggcuugugu	caaaauccaa	gggacagaau	uuccccaaa	ccaccaacac	cuauaggaac	540
accgacaccg	ccgaacauuc	cauuauugug	ggcauccauc	acccuucgag	cacacaggag	600
aagaauagacc	ucuaaggcac	ccagucgcug	agcauucucc	ugggcucauc	gaccuauccg	660
aacaacuucg	ugccuguggu	cggcgcccga	ccucaaguca	acggacaguc	cggacgcauu	720
gacuuccauu	ggacucuggu	gcaaccggga	gacaacauca	cuuucuccca	caacggcgga	780
cugauugccc	caagccgcgu	gucaaagcug	aucgguaag	ggcuggguau	ucagucggau	840
gcucccaucg	auaacaacug	cgaauccaag	ugcuuuugga	gaggcggcuc	caucauacu	900
cggcugccgu	uucagaaccu	gagcccagg	accguggggc	agugcccaa	auacgugaau	960
cgccggucac	ugaugcuggc	gaccggaaug	aggaauguc	cugaacucau	ccaggacagg	1020
gggcuguuucg	gcgccaucgc	cggcuuccug	gaaaacggau	gggagggaau	gguggacggg	1080
ugguacggcu	uccgccacca	aaacgcccag	ggaacuggac	aggccgccga	cuacaagucc	1140
acacaggccg	caauagacca	gaucacuggg	aagcucaacc	gccuugugga	aaagacuaac	1200
acugaauucg	agucgaucga	gucugaguuc	uccgagaucg	aacaccagau	ugggaacgug	1260
aucaacugga	cgaaggacuc	cauuaccgac	aucuggaccu	accaggcgga	acugcucgug	1320
gcgauggaga	accagcacac	uaucgacaug	gccgacuccg	agaugcugaa	ucuguacgaa	1380
cgcgugcgga	agcaacugag	acaaaacgcu	gaagaagaug	gaaagguug	uuucgagauc	1440

uaccacgccu gcgacgacag cugcauggaa agcauuagga acaauaccua cgaccacucg	1500
caguaccggg aggaggcccu ucugaaccgg cugaacauua accccgugac cuugagcucc	1560
ggcuacaagg acaucauccu gugguucucg uuuggagcca gcugcuucgu gcugcuggcc	1620
gucgugaugg gauuguucuu cuucugccug aaaaacggaa acaugcgcug caccaucugu	1680
auu	1683
<210> 9	
<211> 1997	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成多核苷酸	
<400> 9	
ucaagcuuuu ggaccucgu acagaagcua auacgacuca cuauaggga auaagagaga	60
aaagaagagu aagaagaaau auaagagcca ccaugaauac ccagauucuc guguucgccc	120
ucaucgcua uaucccaacc aaugccgaca agaucugcuu gggucaucau gcggugucga	180
acggaaccaa ggucaacacc cugaccgagc ggggagugga aguggucaac gcuacugaaa	240
cgguggaaag gacuaauauc ccacgcaucu gcucaaaggg aaagaaaacu guggaucucg	300
gacagugugg acuuucgggg accaucacgg guccaccgca augcgaucag uuucuggagu	360
ucagcgcaga ucugaucauc gagcgcagag aaggguccga cguuuguuac ccuggaaagu	420
ucgugaacga agaggcacug cgccaaaucu ugcgggagag cggcggcauu gacaaagagg	480
ccaugggauu caccuacucg gguauucgca cuaacggugc cacuucugcg ugccggcguu	540
ccggguccuc cuucuaugcc gagaugaagu ggcuccuguc gaacaccgac aacgcagcuu	600
uuccgcaau gacuaagucc uacaaaaaca cuagaaaguc gccggcacug aucgucuggg	660
gaauccauca cuccgugucu acugcggagc aaacuaagcu guacggcagc ggaaacaagc	720
ucgugaccgu cgguucaucg aacuaccagc agagcuuugu gccaagcccc ggagcgaggc	780
cccaggucua cgggcagagc ggacgcaucg acuuccacug gcugaugcuc aauccgaaug	840
acaccgugac cuucucguuc aauggcgccu ucaucgcacc ugaccgcgcc agcuuccuga	900
gaggaaaguc aaugggcaua cagucgggcg uccaagugga ugccaacugc gagggagacu	960
gcuaucacuc cggcggaacc aucaucucca auuugccguu ucaaaacauc gacucgcgcg	1020
cagugggaaa guguccgca uacgugaagc agagaucacu gcugcuggcc acugggauga	1080
agaacgugcc ugaaaucccg aaaggaaggg gguuguucgg cgcuaauugc ggcuucaucg	1140
aaaacggaug ggaggggcuc aucgaugguu gguacggauu caggcaccag aacgcgcagg	1200
gggaaggaac ggccgcugau uacaagucua cucaaucggc cauugacca aucacuggca	1260
aacugaauuc ccugaucgaa aagaccaauc agcaguuga guugaucgac aacgaauuca	1320
acgaagugga gaaacagauu ggcaauguca ucaauuggac cagagauagc aucacggaag	1380
ucuggucgua caacgccgaa cuccugguug cgauggaaaa ucaacacacc aucgaccugg	1440
ccgacuccga aauggacaaa cucuacgagc gggucacacg ccagcugcgc gaaaacgcag	1500
aagaagaugg aaccggaugc uucgagauci uucauagug cgacgacgau ugcauggcca	1560
gcauccggaa caauaccuac gaucacucca aguaccggga ggaagcgaug caaaucgga	1620

uccagauuga cccggucaaa cugucgucag gcuacaagga ugugauccuu ugguucucau	1680
ucggagcguc cuguuuuauuc cuucuggcua uugugauggg ccugguguuc aucugcguga	1740
agaacggaaa caugcgcugc acuaucugca ucugauaaua ggcuggagcc ucgguggcca	1800
ugcuucuuugc cccuuggggcc uccccccagc cccuccuccc cuuccugcac ccguaccccc	1860
guggucuuug aaauaaagucu gaguggggcg caaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	1920
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	1980
aaaaaaaaaa aucuaga	1997
<210> 10	
<211> 47	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成多核苷酸	
<400> 10	
gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaauauaag agccacc	47
<210> 11	
<211> 47	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成多核苷酸	
<400> 11	
gggaaataag agagaaaaga agagtaagaa gaaatataag agccacc	47
<210> 12	
<211> 119	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成多核苷酸	
<400> 12	
ugauaaauagg cuggagccuc gguggccaug cuucuugccc cuugggccuc cccccagccc	60
cuccuccccu uccugcacc cguacccccgu ggucuuugaa uaaagucuga gugggcggc	119
<210> 13	
<211> 119	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成多核苷酸	
<400> 13	

tgataatagg ctggagcctc ggtggccatg cttcttgccc cttgggcctc cccccagccc	60
ctcctccctt tcctgcaccc gtacccccgt ggtctttgaa taaagtctga gtgggcggc	119
<210> 14	
<211> 47	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成多核苷酸	
<400> 14	
gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaauauaag agccacc	47
<210> 15	
<211> 47	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成多核苷酸	
<400> 15	
gggaaataag agagaaaaga agagtaagaa gaaatataag agccacc	47
<210> 16	
<211> 119	
<212> RNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成多核苷酸	
<400> 16	
ugauaauagg cuggagccuc gguggccaug cuucuugccc cuugggccuc cccccagccc	60
cuccuccccu uccugcaccc guacccccgu ggucuuugaa uaaagucuga gugggcggc	119
<210> 17	
<211> 119	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成多核苷酸	
<400> 17	
tgataatagg ctggagcctc ggtggccatg cttcttgccc cttgggcctc cccccagccc	60
ctcctccctt tcctgcaccc gtacccccgt ggtctttgaa taaagtctga gtgggcggc	119
<210> 18	
<211> 18	
<212> PRT	

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多肽

<400> 18

Met Asp Trp Thr Trp Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Arg Val

1 5 10 15

His Ser

<210> 19

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多肽

<400> 19

Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro

1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly

20

<210> 20

<211> 9

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多核苷酸

<400> 20

ccrccaugg

9

<210> 21

<211> 11

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多核苷酸

<400> 21

gggauccuac c

11

<210> 22

<211> 9

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多核苷酸

<400> 22

uuauuuuaww

9

<210> 23

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多肽

<400> 23

Gly Gly Gly Ser

1

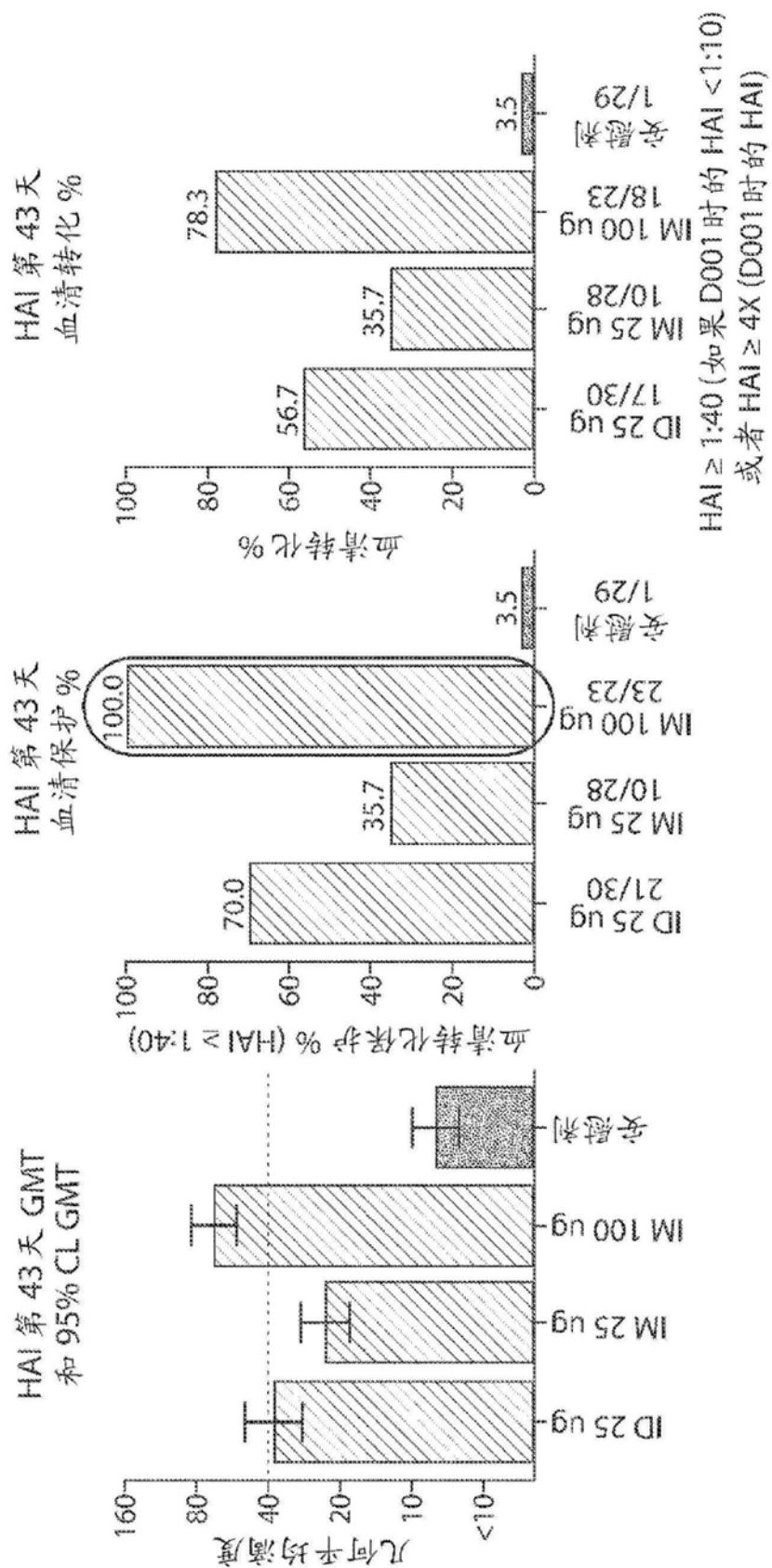


图1

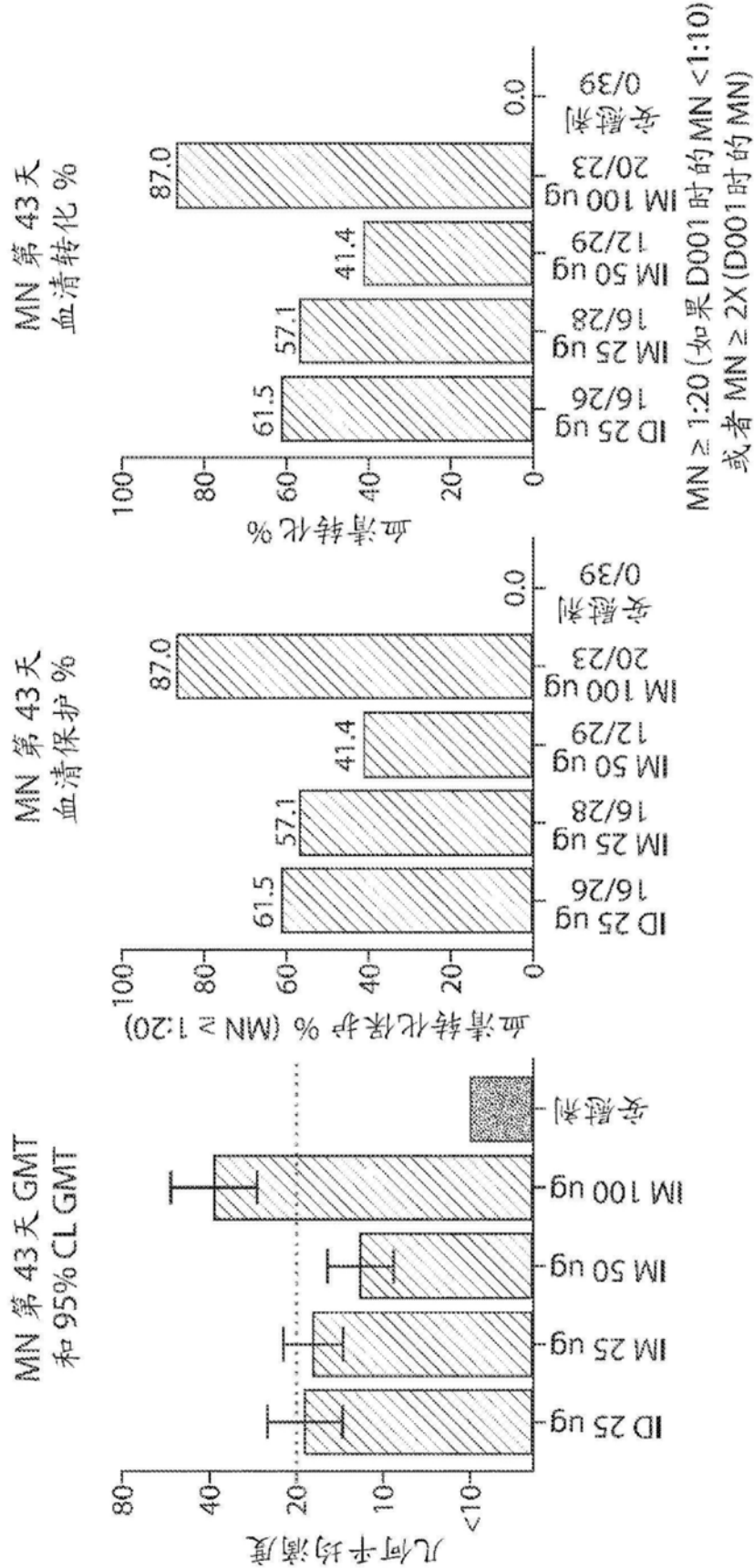


图2

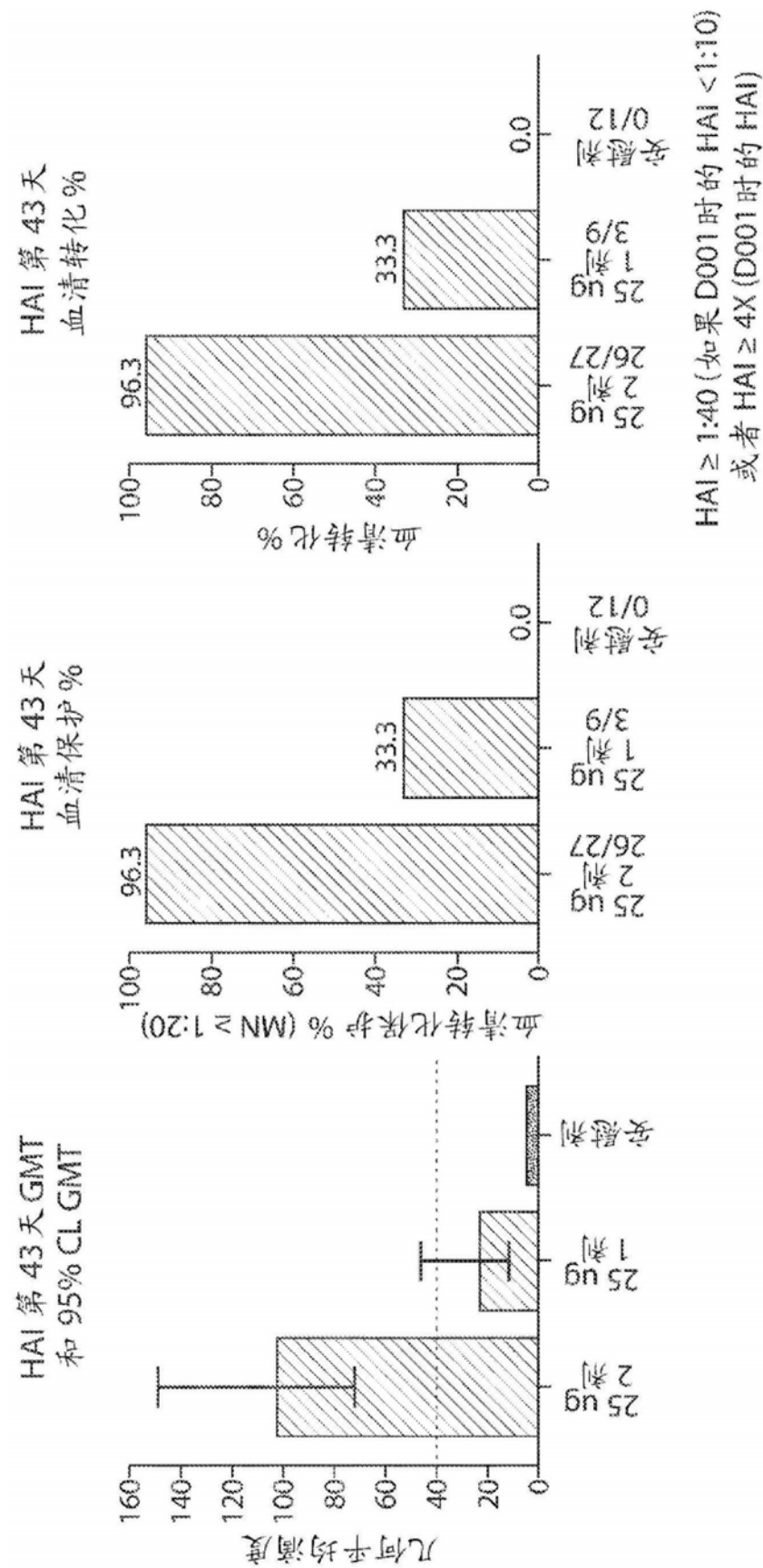


图3

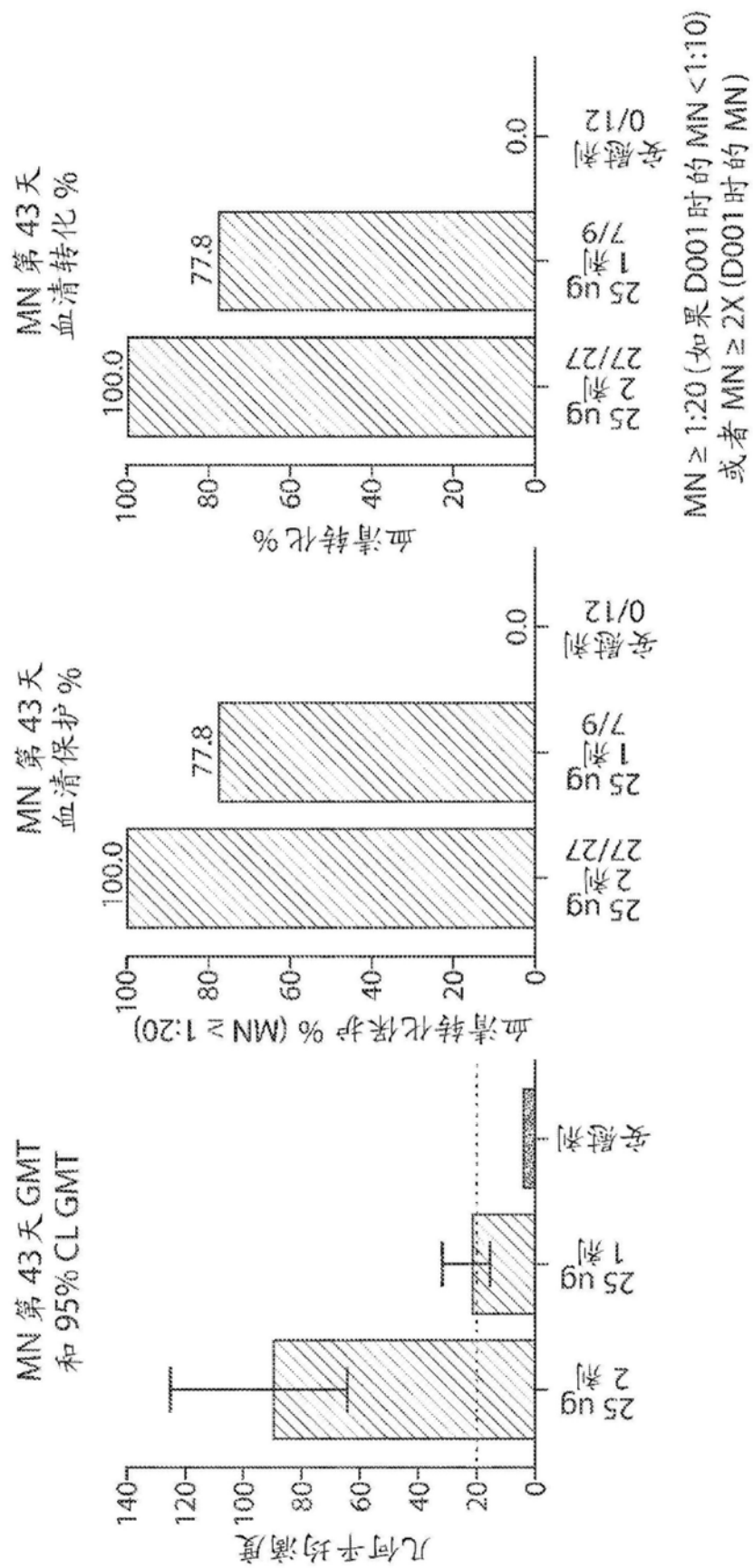


图4

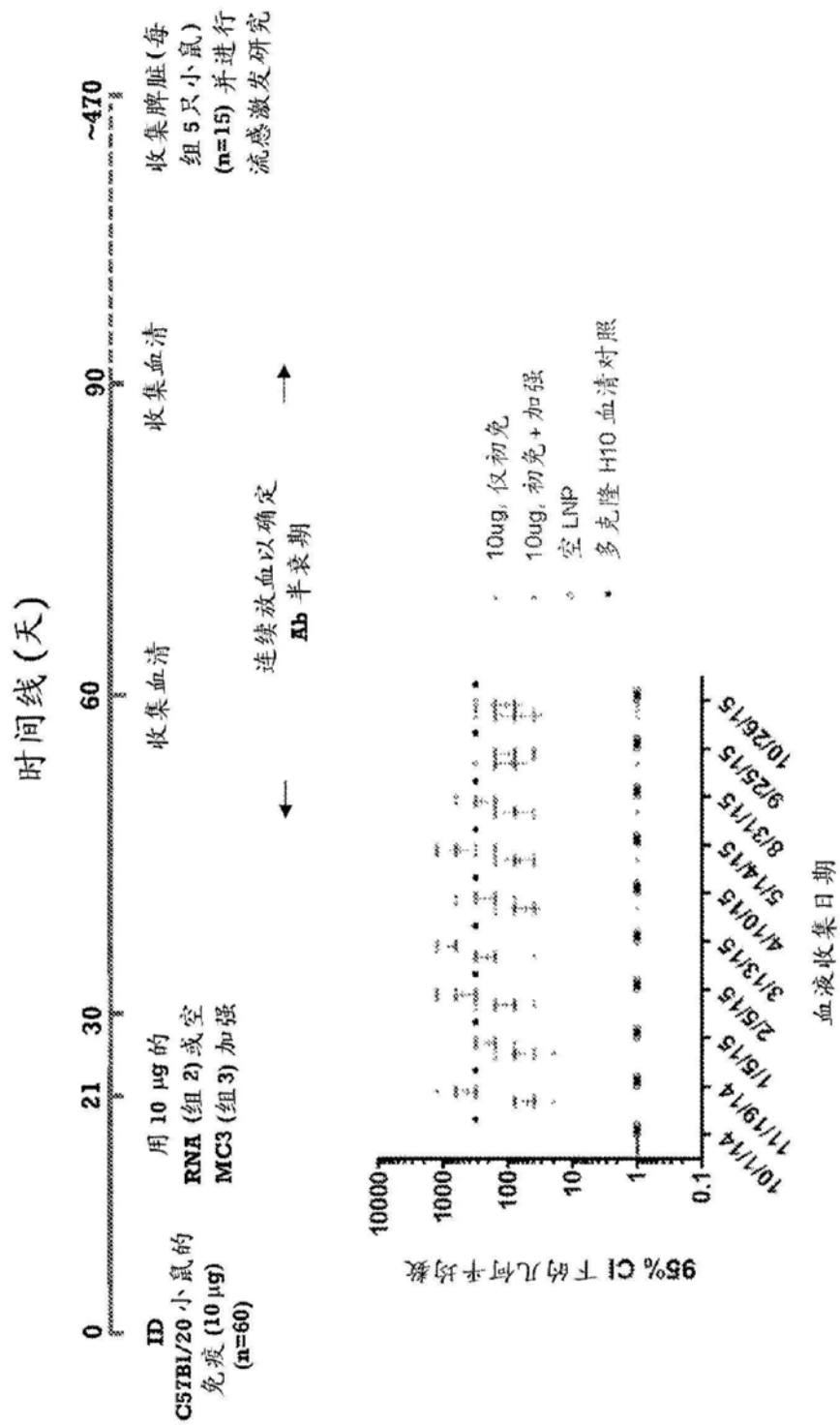


图5