(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 113874049 A
(43)申请公布日 2021.12.31

(21)申请号 202080036433.6

(22)申请日 2020.03.13

(30)优先权数据
62/818,425 2019.03.14 US
62/923,403 2019.10.18 US
62/924,131 2019.10.21 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2021.11.12

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/IB2020/000178 2020.03.13

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2020/183239 EN 2020.09.17

(71)申请人 恩根尼公司
地址 加拿大魁北克

(72)发明人 R·K·G·帕尼克 D·维劳克斯 P·L·马 N·C·M·塔姆 C·福勒特 A·成 S·多菲尼 X·陈 J·罗拉

(74)专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所有限公司 11038
代理人 李程达

(51)Int.Cl.
A61K 48/00(2006.01)
A61K 38/20(2006.01)
A61K 45/06(2006.01)
A61K 31/7036(2006.01)
A61K 39/395(2006.01)
A61K 9/14(2006.01)
A61K 47/36(2006.01)
A61K 47/34(2017.01)
A61K 47/32(2006.01)
A61K 9/02(2006.01)
A61K 9/52(2006.01)
A61P 13/10(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)

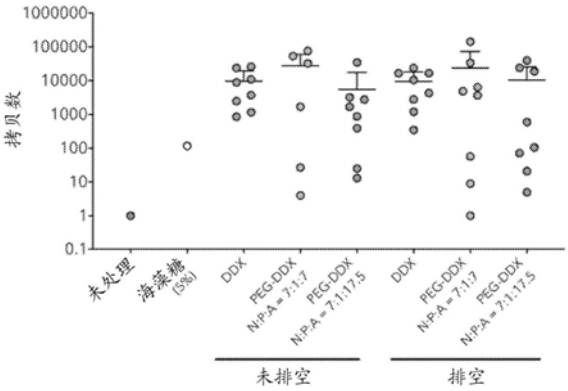
权利要求书2页 说明书50页 附图25页

(54)发明名称

用于治疗粘膜癌的单独或与I型IFN诱导剂组合的基于壳聚糖多聚复合物的IL-12的局部表达

(57)摘要

本公开涉及用于使IL-12在粘膜组织中局部表达的方法和组合物，优选地与IFN-1活化剂/诱导剂组合，用于癌症免疫疗法中，所述组合物包含用含聚阴离子的嵌段共聚物可逆包衣的衍生化壳聚糖多聚复合物。



CN 113874049 A

1.一种组合物,所述组合物包含衍生化壳聚糖核酸多聚复合物,所述衍生化壳聚糖核酸多聚复合物包含氨基官能化的壳聚糖和至少一种编码白细胞介素-12(IL-12)的治疗性核酸构建体,其中所述衍生化壳聚糖核酸多聚复合物还包含可逆包衣,所述可逆包衣包含一种或多种含聚阴离子的嵌段共聚物,所述含聚阴离子的嵌段共聚物具有至少一个聚阴离子锚定区和至少一个亲水性尾区。

2.根据权利要求1所述的组合物,其中所述氨基官能化的壳聚糖还包含亲水性多元醇或用亲水性多元醇官能化。

3.根据权利要求1所述的组合物,其中所述氨基官能化的壳聚糖包含精氨酸。

4.根据权利要求2所述的组合物,其中所述亲水性多元醇是葡萄糖或葡糖酸。

5.根据权利要求1所述的组合物,其中所述含聚阴离子的嵌段共聚物是线性二嵌段或三嵌段共聚物。

6.根据权利要求1-5中任一项所述的组合物,其中所述多聚复合物还包含编码额外免疫刺激分子的核酸,所述额外免疫刺激分子选自由IFN-1活化剂和免疫检查点抑制剂组成的组。

7.根据权利要求1-5中任一项所述的组合物,其中所述治疗性核酸构建体还包含编码额外免疫刺激分子的核酸,所述额外免疫刺激分子选自由IFN-1活化剂和免疫检查点抑制剂组成的组。

8.根据权利要求6或7所述的组合物,其中所述IFN-1活化剂选自由RIG-I激动剂、STING激动剂和TLR 7/9激动剂组成的组。

9.根据权利要求8所述的组合物,其中所述RIG-I激动剂选自由eRNA11a、VA RNA1、eRNA41H、MK4621、SLR10、SLR14和SLR20组成的组,并且更优选地选自由eRNA41H或eRNA11a组成的组。

10.根据权利要求1所述的组合物,其中所述治疗性核酸构建体包含在选自由以下组成的组的质粒内:gWIZ、pVAX、NTC8685或NTC9385R,任选地其中所述治疗性核酸构建体还包含选自由CMV、EF1a、CMV/EF1a、CAG和CMV/EF1a/HTLV启动子组成的组的表达控制元件。

11.根据权利要求1所述的组合物,其中所述治疗性核酸构建体还包含合成的基于β-球蛋白的内含子,任选地其中所述治疗性核酸构建体还包含HTLV-IR。

12.根据权利要求1所述的组合物,其中所述治疗性核酸构建体还包含卡那霉素选择或基于蔗糖的选择元件,任选地其中所述治疗性核酸构建体还包含pUC或R6K复制起点。

13.根据权利要求1-12中任一项所述的组合物,其中所述编码IL-12的治疗性核酸构建体包含SEQ ID NO:7。

14.一种用于使IL-12在有需要的患者中的粘膜组织中局部表达的方法,所述方法包括向所述患者施用治疗有效量的根据权利要求1-13中任一项所述的药物组合物。

15.一种用于抑制有需要的患者中的粘膜癌细胞生长的方法,所述方法包括向所述患者施用治疗有效量的根据权利要求1-13中任一项所述的药物组合物。

16.一种治疗有需要的患者的膀胱癌的方法,所述方法包括向所述患者施用治疗有效量的根据权利要求1-13中任一项所述的药物组合物。

17.根据权利要求14-16中任一项所述的方法,所述方法还包括同时或依序施用额外免疫刺激分子,所述额外免疫刺激分子选自由IFN-1活化剂和免疫检查点抑制剂组成的组。

18.根据权利要求17所述的方法，其中所述IFN-1活化剂选自由RIG-I激动剂、STING激动剂和TLR7/9激动剂组成的组。

19.根据权利要求17或18所述的方法，其中所述IFN-1激动剂和/或所述免疫检查点抑制剂由相同或不同的治疗性核酸构建体编码。

20.根据权利要求17或18所述的方法，其中所述IFN-1激动剂和/或所述免疫检查点抑制剂分开施用。

21.根据权利要求18所述的方法，其中所述IFN-1激动剂是RIG-I激动剂；优选地，其中所述RIG-I激动剂选自由eRNA11a、VA RNA1、eRNA41H、MK4621、SLR10、SLR14和SLR20组成的组，并且更优选地选自由eRNA41H或eRNA11a组成的组。

22.根据权利要求20所述的方法，其中所述免疫检查点抑制剂选自由伊匹单抗、曲美木单抗、纳武单抗、阿特珠单抗和/或派姆单抗组成的组。

23.一种组合物，所述组合物包含核酸多聚复合物，所述核酸多聚复合物包含阳离子聚合物和/或脂质、编码白细胞介素-12(IL-12)的治疗性核酸构建体和包含编码至少一种RIG-I激动剂的核酸的治疗性核酸构建体，其中所述编码IL-12和RIG-I的治疗性核酸构建体是相同或不同的核酸构建体。

24.根据权利要求23所述的组合物，其中所述RIG-I激动剂选自由eRNA11a、VA RNA1、eRNA41H、MK4621、SLR10、SLR14和SLR20组成的组，并且更优选地选自由eRNA41H、eRNA11a组成的组。

25.根据权利要求23所述的组合物，其中所述阳离子聚合物选自由聚乙烯亚胺(PEI)、PAMAM、聚赖氨酸(PLL)、聚精氨酸、壳聚糖和它们的衍生物组成的组。

26.根据权利要求25所述的组合物，其中所述阳离子聚合物包含衍生化壳聚糖，优选地，氨基官能化的壳聚糖。

27.根据权利要求26所述的组合物，其中所述氨基官能化的壳聚糖包含精氨酸并且还包含亲水性多元醇，例如葡糖酸或葡萄糖，或用亲水性多元醇，例如葡糖酸或葡萄糖官能化。

28.根据权利要求25-27中任一项所述的组合物，其中所述核酸多聚复合物还包含可逆包衣，所示可逆包衣包含一种或多种含聚阴离子的嵌段共聚物，所述含聚阴离子的嵌段共聚物具有至少一个聚阴离子锚定区和至少一个亲水性尾区，优选地，其中所述含聚阴离子的嵌段共聚物是线性二嵌段和/或三嵌段共聚物。

29.根据权利要求23-28中任一项所述的组合物，其中所述编码IL-12的治疗性核酸构建体包含SEQ ID NO:X。

30.一种用于使IL-12在有需要的患者中的粘膜组织中局部表达的方法，所述方法包括向所述患者施用治疗有效量的根据权利要求23-29中任一项所述的组合物。

31.一种用于抑制有需要的患者中的粘膜癌细胞生长的方法，所述方法包括向所述患者施用治疗有效量的根据权利要求23-29中任一项所述的组合物。

32.一种用于治疗有需要的患者的膀胱癌的方法，所述方法包括向所述患者施用治疗有效量的根据权利要求23-29中任一项所述的组合物。

用于治疗粘膜癌的单独或与I型IFN诱导剂组合的基于壳聚糖多聚复合物的IL-12的局部表达

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2019年3月14日提交的美国临时申请No.62/818,425、2019年10月18日提交的美国临时申请No.62/923,403和2019年10月21日提交的美国临时申请No.62/924,131的优先权,这些临时申请的内容以引用的方式整体并入本文中并用于达成所有目的。

发明领域

[0003] 本公开涉及用于使IL-12在粘膜组织中局部表达的方法和组合物,优选地与I型IFN(IFN-1)活化剂/诱导剂组合,用于癌症免疫疗法中。

背景技术

[0004] 传统上Th1 T细胞是通过其细胞因子IFN-γ、GM-CSF、IL-2和淋巴毒素(LT、TNF-β)的产生定义的。决定产生Th1细胞最关键取决于对细胞内细菌、真菌和病毒感染的固有免疫应答。感染这些病原体会导致TLR信号传导的活化和随后树突状细胞和NK细胞产生对Th1发育来说关键的细胞因子。Th1极化和分化由IL-12、IL-18、IFN-γ和1型干扰素促进,同时受IL-4、IL-10和TGF-β抑制。

[0005] 由成熟树突状细胞产生的IL-12被认为是与Th1定型相关的关键因子。T细胞活化和STAT1信号引起IL-12Rβ的表达,在结合IL-12后,通过Jak-2和Tyk-2传导信号,以活化STAT 4。STAT4进入核中,在核中其引起Th1谱系特异性转录因子如Tbet的表达。Tbet用来通过促进IFN-γ和IL-12Rβ2表达来加强Th1表型。IFN-γ又通过IFN-γ受体下游的STAT1信号传导增强Th1分化,刺激Tbet的产生。多种细胞如NK细胞和先前定型Th1细胞是IFN-γ的重要早期来源。相比之下,通过促进Th1定型并引导完全分化的Th1细胞产生IFN-γ,IL-18在Th1功能中起双重作用。

[0006] 考虑到IL-12通过活化NK细胞和使幼稚CD4+细胞分化成Th1细胞并且充当IFN-γ的有效刺激因子而在固有和适应性免疫应答中具有不可缺少的作用,长期以来认为它是肿瘤免疫疗法的潜在候选物。显示IL-12在体外表现出抗肿瘤活性(Kobayashi等人,J.Exp.Med.170:827-845(1989)和Stern等人,PNAS 87:6808-6812(1990),并且早期动物研究似乎是有希望的,显示IL-12在鼠类肿瘤模型中诱导肿瘤消退和减小。全身性IL-12施用的研究包括Brunda等人(J.Exp.Med.,178:1223-1230(1993)),其显示在小鼠中腹膜内施用IL-12显示显著减少B16F10黑色素瘤的实验性肺转移或皮下生长。对IL-12施用的反应依赖于剂量,并且引起存活时间增加。在实验性肝转移和建立的皮下M5076网状细胞肉瘤和Renca肾细胞腺癌肿瘤下证明类似的活性。类似地,Teicher等人(Int.J.Cancer,65(1):80-84(1996)报告,IL-12是一种在三种实体鼠类组织中有效的抗肿瘤剂:B16黑色素瘤、路易斯肺癌(Lewis lung carcinoma)和肾细胞癌,而Kozar等人(Clin.Can.Res.,9(8):3124-3133(2003)显示,用L1210白血病细胞或用B16F10黑色素瘤细胞接种的小鼠用每日注射IL-12或日剂量IL-12处理,显示肿瘤适度减小。

[0007] 在这些动物中，几乎没有报告表面毒性，这使得IL-12成为一种用于进一步临床发展的有吸引力的分子。然而，不幸地，在早期人类临床试验中看到功效降低并且毒性增加。在第一个1期剂量递增研究中，IL-12经静脉内施用于具有晚期实体肿瘤(包括黑色素瘤、肾癌和结肠癌)的四十名患者，只在具有黑色素瘤的患者中产生一个完全反应，以及在肾癌患者中产生部分反应(Atkins等人，Clin.Cancer Res.，3:409-17(1997))。在这项研究中看到显著的全身毒性，其中用最高剂量IL-12(1000ng/kg)治疗的四名患者中的三名经历口腔炎和/或肝功能失常。Bajetta等人(Clin.Cancer Res.，4:75-85(1998)在具有转移性黑色素瘤的十名患者中皮下注射0.5ug/kg IL-12的初步研究中，显示100％患者中有流感样综合征，90％患者中有发烧，60％患者中有短暂的高转氨酶血症，并且80％患者中有高甘油三酯血症。在10-20％研究患者中看到另外类型的毒性。未观测到部分或完全反应，不过在十名参与者中的三名中看到肿瘤消退。最值得注意地，在Genetics Institute进行的II期试验中，连续数日静脉内施用IL-12引起招收的17名患者中的12名住院治疗，并且两名患者死亡(Leonard等人，Blood，90(7):2541-2548(1995))。

[0008] 为了避免在全身施用下所见到的毒性，使用IL-12的局部递送进行研究。虽然这些研究显示与施用IL-12相关的毒性小于全身研究，但局部递送基本上对消除肿瘤无效。Lenzi等人(Clin.Cancer Res.，8:3686-3695，(2002))在1期试验中经由腹膜导管向罹患可归因于卵巢和多种腹部癌症的腹膜癌的29名患者施用IL-12，剂量在3ng/kg至多达600ng/kg的范围内。虽然在试验中没有看到危急生命的毒性，但是招收的29名患者中只有2名经历完全反应，8名具有稳定的疾病并且剩余19名具有进展性疾病。类似地，Weiss等人(J.Immunother.，26(4):343-348(2003)显示膀胱内施用IL-12于膀胱浅表性移行细胞癌患者不会引起中度、重度或危急生命的毒性，但患者也未显示抗肿瘤或免疫学作用的临床相关证据。

[0009] 已经报告了壳聚糖作为IL-12的佐剂用于治疗癌症的用途。壳聚糖用作与IL-12的共同制剂的一部分，用于治疗膀胱癌的膀胱内免疫疗法(Zaharoff等人，Cancer Res.69(15):6192-6199(2009)，以及小鼠中结肠直肠和胰腺肿瘤(Zaharoff等人，J.immunotherapy，33(7):697-705(2010)和乳腺癌(Vo等人，Oncoimmunology，3912):e968001(2015)的肿瘤内注射。为了减少IL-12从治疗部位散播，并且避免系统中因IL-12散播而引起的可能毒性，还涵盖与壳聚糖共价连接的IL-12分子作为治疗剂的用途(Zaharoff等人，U.S.20170106092)。然而，不幸地，基于IL-12的疗法的临床应用仍然是有问题的，因为可能会快速发展致命的炎性综合征，并且仍然需要改良的克服IL-12介导的毒性的策略。Wang等人，Nature Communications 8，Article 1395(2017)。

[0010] 因此，还需要用于有效地使IL-12局部表达但毒性减少并且功效提高的新的组合物和方法。理想地，这些可以结合额外免疫刺激策略使用以在肿瘤微环境中增强癌症免疫疗法。当前关于IL-12组合疗法的知识基础是相当有限的，并且主要集中在IL-12与例如IL-2、IL-7、IL-15、IL-18和IL-21的额外免疫调节细胞因子的共同施用和/或共表达上。参见例如Weiss等人，Expert Opin Biol Ther.7:1705-1721(2007)。值得注意地，IL-12与替代固有和/或适应性免疫刺激策略之间的潜在协同相互作用基本上尚未探索过。

[0011] 模式识别受体(PRR)包含固有免疫系统的另一个要素，其识别保守病原体相关核酸(NA)序列。核苷酸配体对PRR的活化诱导I型干扰素(IFN)和促炎性细胞因子的产生，这充

当病毒和微生物感染的第一道防线。Iwasaki和Medzhitov,Science 327:291-95(2010)。这些感测NA的PRR包括核内体toll样受体(TLR)家族(Majer等人,Curr.Opin.Immunol.44:26-33(2017));细胞溶质DNA传感器AIM 2和环状GMP-AMP合成酶(cGAS),它是cGAS-干扰素刺激因子(STING)通路的一部分(Chen等人,Nat.Immunol.17:1142-49(2016));以及细胞溶质RNA传感器视黄酸诱导性基因I(RIG-I)样受体家族(Schlee,Immunobiology,218:1322-35(2013))。有趣地,鲜有参考文献评估IL-12和RIG-I,并且这些参考文献未证明这两者之间有意义的相互作用。Jiang等人(J.Exp.Med.216:2854-68(2019))显示借助于中和抗体在体内消除内源IL-12对诱导的RIG-I反应无作用,而Kong等人(Cell Host&Microbe 6:150-61(2009))较早期的研究在基于细胞的测定中显示改变RIG-I的水平对IL-12的表达无作用。因而,IL-12与RIG-I的组合尤其似乎无用。

发明内容

[0012] 本发明解决了本领域中仍未满足的对IL-12的有效局部表达的需求,其采用用含聚阴离子的嵌段共聚物可逆包衣的衍生化壳聚糖多聚复合物,以加强肿瘤中存在或接近肿瘤的粘膜组织的转染。此外,如本文中第一次所呈现,用主题组合物和方法实现的IL-12的有效局部表达宜与一种或多种额外固有和/或适应性免疫刺激策略组合以进一步增强针对肿瘤的细胞毒性免疫应答。在优选的实施方案中,根据本发明的IL-12表达与I型干扰素(IFN-1)活化剂/诱导剂,例如RIG-I激动剂、STING激动剂和/或TLR 7/9激动剂的同时或依序施用和/或表达组合。在一些实施方案中,主题方法和组合物包含IL-12与至少一种RIG-I激动剂的共表达。

[0013] 在一方面,本发明提供了一种组合物,所述组合物包含衍生化壳聚糖核酸多聚复合物,所述衍生化壳聚糖核酸多聚复合物包含氨基官能化的壳聚糖和编码IL-12的治疗性核酸构建体,其中所述衍生化壳聚糖核酸多聚复合物还包含可逆包衣,所述可逆包衣包含一种或多种含聚阴离子的嵌段共聚物,所述含聚阴离子的嵌段共聚物具有至少一个聚阴离子锚定区和至少一个亲水性尾区。

[0014] 在优选的实施方案中,含聚阴离子的嵌段共聚物是线性二嵌段和/或三嵌段共聚物。在优选的实施方案中,氨基官能化的壳聚糖还包含亲水性多元醇。在一些实施方案中,氨基官能化的壳聚糖包含精氨酸。在一些实施方案中,亲水性多元醇是葡萄糖或葡糖酸。

[0015] 在一些实施方案中,治疗性核酸构建体包含在选自由以下组成的组的质粒内:gWIZ、pVAX、NTC8685或NTC9385R。在一些实施方案中,治疗性核酸构建体还包含选自由CMV、EF1a、CMV/EF1a、和CAG、和CMV/EF1α/HTLV组成的组的表达控制元件。在一些实施方案中,治疗性核酸构建体包含合成的基于β-球蛋白的内含子。在一些实施方案中,治疗性核酸构建体包含HTLV-IR。在一些实施方案中,治疗性核酸构建体包含基于卡那霉素(kanamycin)或蔗糖的选择元件。在一些实施方案中,治疗性核酸构建体包含pUC或R6K复制起点。

[0016] 在一些实施方案中,主题治疗性核酸构建体还包含编码至少一种额外固有和/或适应性免疫刺激分子的核酸。在一些实施方案中,免疫刺激分子包含I型干扰素(IFN-1)活化剂/诱导剂,例如RIG-I激动剂、STING激动剂和/或TLR 7/9激动剂。在优选的实施方案中,治疗性核酸构建体还包含编码至少一种RIG-I激动剂的核酸,所述RIG-I激动剂例如eRNA11a、腺病毒VA RNA1、eRNA41H、MK4621、SLR10、SLR14和/或SLR20,并且更优选地,

eRNA11a或eRNA41H。在一些实施方案中,免疫刺激分子是免疫检查点抑制剂的调节剂。

[0017] 在另一方面,提供了使IL-12在有需要的患者中的粘膜组织中局部表达的方法,所述方法包括向所述患者施用治疗有效量的包含衍生化壳聚糖核酸多聚复合物的药物组合物,所述衍生化壳聚糖核酸多聚复合物包含氨基官能化的壳聚糖和编码IL-12的治疗性核酸构建体,其中所述衍生化壳聚糖核酸多聚复合物还包含可逆包衣,所述可逆包衣包含一种或多种含聚阴离子的嵌段共聚物,所述含聚阴离子的嵌段共聚物至少一个聚阴离子锚定区和至少一个亲水性尾区。

[0018] 在一些实施方案中,所述方法还包括IFN-1活化剂/诱导剂和/或免疫检查点抑制剂的共表达。在一些实施方案中,IFN-1活化剂/诱导剂和/或免疫检查点抑制剂与IL-12从相同或不同的治疗性核酸构建体共表达。在优选的实施方案中,治疗性核酸构建体包含编码单链hIL-12和至少一种RIG-I激动剂的核酸,所述RIG-I激动剂例如eRNA11a、VA RNA1、eRNA41H、MK4621、SLR10、SLR14和SLR20,并且更优选地,eRNA11a或eRNA41H。在示例性实施方案中,编码单链hIL-12的核酸包含SEQ ID NO:7。

[0019] 在一些实施方案中,IFN-1活化剂/诱导剂和/或免疫检查点抑制剂分开施用。在优选的实施方案中,免疫检查点抑制剂选自由伊匹单抗(ipilimumab)、曲美木单抗(tremelimumab)、纳武单抗(nivolumab)、阿特珠单抗(atezolizumab)和/或派姆单抗(pembrolizumabco)组成的组。在一些实施方案中,IFN-1活化剂/诱导剂是MK 4621/JetPEI。

[0020] 在另一方面,提供了用于治疗有需要的患者的粘膜癌的方法,所述方法包括向所述患者施用治疗有效量的包含衍生化壳聚糖核酸多聚复合物的药物组合物,所述衍生化壳聚糖核酸多聚复合物包含氨基官能化的壳聚糖和编码IL-12的治疗性核酸,其中所述衍生化壳聚糖核酸多聚复合物还包含可逆包衣,所述可逆包衣包含一种或多种含聚阴离子的嵌段共聚物,所述含聚阴离子的嵌段共聚物具有至少一个聚阴离子锚定区和至少一个亲水性尾区。

[0021] 在一些实施方案中,所述方法还包括IFN-1活化剂/诱导剂和/或免疫检查点抑制剂的共表达。在一些实施方案中,IFN-1活化剂/诱导剂和/或免疫检查点抑制剂与IL-12从相同或不同的治疗性核酸构建体共表达。在优选的实施方案中,治疗性核酸构建体包含编码单链hIL-12和至少一种RIG-I激动剂的核酸,所述RIG-I激动剂例如eRNA11a、VA RNA1、eRNA41H、MK4621、SLR10、SLR14和SLR20,并且更优选地,eRNA11a或eRNA41H。在示例性实施方案中,编码单链hIL-12的核酸包含SEQ ID NO:7。

[0022] 在一些实施方案中,IFN-1活化剂/诱导剂和/或免疫检查点抑制剂分开施用。在优选的实施方案中,免疫检查点抑制剂选自由伊匹单抗、曲美木单抗、纳武单抗、阿特珠单抗和/或派姆单抗组成的组。在一些实施方案中,IFN-1活化剂/诱导剂是MK 4621/JetPEI。

[0023] 在优选的实施方案中,含聚阴离子的嵌段共聚物是线性二嵌段和/或三嵌段共聚物。在优选的实施方案中,氨基官能化的壳聚糖还包含亲水性多元醇。在一些实施方案中,氨基官能化的壳聚糖包含精氨酸。在一些实施方案中,亲水性多元醇是葡萄糖或葡糖酸。

[0024] 在另一方面,本发明提供了一种包含核酸多聚复合物的药物组合物,所述核酸多聚复合物包含阳离子聚合物和编码IL-12和至少一种RIG-I激动剂的治疗性核酸构建体。在优选的实施方案中,治疗性核酸构建体编码单链hIL-12分子和至少一种RIG-I激动剂,所述

RIG-I激动剂选自由eRNA11a、VA RNA1、eRNA41H、MK4621、SLR10、SLR14和SLR20组成的组，并且更优选地选自由eRNA11a或eRNA41H组成的组。在示例性实施方案中，编码单链hIL-12的核酸包含SEQ ID NO:7。

[0025] 在一些实施方案中，阳离子聚合物选自包含以下的组：多胺；聚合有机胺、聚(酰胺-胺)；聚氨基酸聚乙烯亚胺纤维素、多糖、壳聚糖和它们的衍生物。在一些实施方案中，阳离子聚合物选自由聚乙烯亚胺(PEI)、PAMAM、聚赖氨酸(PLL)、聚精氨酸、壳聚糖和它们的衍生物组成的组。

[0026] 在优选的实施方案中，阳离子聚合物包含衍生化壳聚糖。在本文示例的特定优选的实施方案中，衍生化壳聚糖是氨基官能化的壳聚糖，并且更优选地是包含精氨酸和亲水性多元醇，例如葡糖酸或葡萄糖的双重衍生化壳聚糖。在一些实施方案中，核酸多聚复合物还包含可逆包衣，所述可逆包衣包含一种或多种含聚阴离子的嵌段共聚物，所述含聚阴离子的嵌段共聚物具有至少一个聚阴离子锚定区和至少一个亲水性尾区。在优选的实施方案中，含聚阴离子的嵌段共聚物是线性二嵌段和/或三嵌段共聚物。

[0027] 在一些实施方案中，治疗性核酸构建体包含在选自由以下组成的组的质粒内：gWIZ、pVAX、NTC8685或NTC9385R。在一些实施方案中，治疗性核酸构建体还包含选自由CMV、EF1a、CMV/EF1a、和CAG、和CMV/EF1α/HTLV组成的组的表达控制元件。在一些实施方案中，治疗性核酸构建体包含合成的基于β-球蛋白的内含子。在一些实施方案中，治疗性核酸构建体包含HTLV-IR。在一些实施方案中，治疗性核酸构建体包含基于卡那霉素或蔗糖的选择元件。在一些实施方案中，治疗性核酸构建体包含pUC或R6K复制起点。

[0028] 在另一方面，提供使IL-12在有需要的患者中的粘膜组织中局部表达的方法，所述方法包括向所述患者施用治疗有效量的包含核酸多聚复合物的药物组合物，所述核酸多聚复合物包含阳离子聚合物和编码IL-12和至少一种RIG-I激动剂的治疗性核酸构建体。在优选的实施方案中，治疗性核酸构建体编码单链hIL-12分子和至少一种RIG-I激动剂，所述RIG-I激动剂选自由eRNA11a、VA RNA1、eRNA41H、MK4621、SLR10、SLR14和SLR20组成的组，并且更优选地选自由eRNA11a或eRNA41H组成的组。在示例性实施方案中，编码单链hIL-12的核酸包含SEQ ID NO:7。

[0029] 在另一方面，提供了用于治疗有需要的患者的粘膜癌的方法，所述方法包括向所述患者施用治疗有效量的包含核酸多聚复合物的药物组合物，所述核酸多聚复合物包含阳离子聚合物和编码IL-12和至少一种RIG-I激动剂的治疗性核酸。在优选的实施方案中，治疗性核酸构建体编码单链hIL-12分子和至少一种RIG-I激动剂，所述RIG-I激动剂选自由eRNA11a、VA RNA1、eRNA41H、MK4621、SLR10、SLR14和SLR20组成的组，并且更优选地选自由eRNA11a或eRNA41H组成的组。在示例性实施方案中，编码单链hIL-12的核酸包含SEQ ID NO:7。

[0030] 在一些实施方案中，阳离子聚合物选自包含以下的组：多胺；聚合有机胺、聚(酰胺-胺)；聚氨基酸聚乙烯亚胺纤维素、多糖、壳聚糖和它们的衍生物。在一些实施方案中，阳离子聚合物选自由聚乙烯亚胺(PEI)、PAMAM、聚赖氨酸(PLL)、聚精氨酸、壳聚糖和它们的衍生物组成的组。

[0031] 在优选的实施方案中，阳离子聚合物包含衍生化壳聚糖。在本文示例的特定优选的实施方案中，衍生化壳聚糖是氨基官能化的壳聚糖，并且更优选地是包含精氨酸和亲水

性多元醇，例如葡糖酸或葡萄糖的双重衍生化壳聚糖。在一些实施方案中，核酸多聚复合物还包含可逆包衣，所述可逆包衣包含一种或多种含聚阴离子的嵌段共聚物，所述含聚阴离子的嵌段共聚物具有至少一个聚阴离子锚定区和至少一个亲水性尾区。在优选的实施方案中，含聚阴离子的嵌段共聚物是线性二嵌段和/或三嵌段共聚物。

[0032] 定义

[0033] 除非另有定义，否则本文所用的所有领域术语、表示法和其它科学术语旨在具有本发明所属领域的技术人员通常所理解的含义。在一些情况下，为清楚和/或便于参考起见，本文定义了具有通常理解的含义的术语，并且本文中这类定义的包括不应被解释为表示与本领域通常所理解的相比有所不同。本文所描述或参考的技术和程序通常是很好理解的，并且是本领域技术人员使用常规方法通常采用的，例如Sambrook等人，Molecular Cloning:A Laboratory Manual第2版(1989)Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,NY中所述的广泛使用的分子克隆技术。除非另外说明，否则适当时，通常根据制造商规定的方案和/或参数来实施包括使用市售试剂盒和试剂的程序。

[0034] 除非上下文另外明确指出，否则如在本文中所用，单数形式“一个(种)”和“所述”包括多个指示物。

[0035] 术语“约”指示并涵盖指定值和高于和低于该值的范围。在某些实施方案中，术语“约”指示指定的值±10％、±5％或±1％。在某些实施方案中，在指示的情况下，术语“约”指示指定的值±该值的一个标准偏差。

[0036] 术语“它们的组合”包括该术语所指的要素的每一种可能的组合。

[0037] 在某些实施方案中，任何疾病或病症的“治疗(treating/treatment)”是指改善受试者中存在的疾病或病症。在另一个实施方案中，“治疗”包括改善受试者可能无法辨别的至少一个身体参数。在又一个实施方案中，“治疗”包括身体上(例如，可辨别症状的稳定)或生理上(例如，身体参数的稳定)或两方面调节疾病或病症。在又一个实施方案中，“治疗”包括延迟或预防疾病或病症的发作。举例来说，在一示例性实施方案中，短语“治疗癌症”是指抑制癌细胞增殖、抑制癌症扩散(转移)、抑制肿瘤生长、减少癌细胞数目或肿瘤生长、癌症恶性级别下降(例如分化增加)或改善癌症相关症状。

[0038] 如本文所用，术语“治疗有效量”或“有效量”是指主题组合物在施用于受试者时有效治疗疾病或病症的量。举例来说，在一示例性实施方案中，短语“有效量”可与“治疗有效量”或“治疗有效剂量”等互换使用，并且意指治疗剂有效治疗癌症的量。本文提供的组合物的有效量可以根据例如疾病状况、动物年龄、性别、体重的因素变化。

[0039] 如本文所用，术语“受试者”或“个体”是指哺乳动物受试者。示例性受试者包括但不限于人、猴、狗、猫、小鼠、大鼠、牛、马、骆驼、禽类、山羊和绵羊。在某些实施方案中，受试者是人。在一些实施方案中，受试者患有癌症、自身免疫性疾病或病症和/或可以用本文提供的抗体治疗的感染。在一些实施方案中，受试者是怀疑患有癌症、自身免疫性疾病或病症和/或感染的人。

[0040] “壳聚糖”是几丁质的部分或完全脱乙酰形式，是N-乙酰基葡萄糖胺的聚合物。在本发明中使用具有大于50％的任何脱乙酰度的壳聚糖。

[0041] 壳聚糖可以通过在脱乙酰位点将游离氨基官能化而衍生化。本文所述的衍生化壳聚糖具有许多有利于核酸递送媒介物的特性，包括：它们有效地结合带负电荷的核酸并与

之复合，它们可以形成大小可控的纳米颗粒，它们可以被细胞吸收，并且它们可以在细胞内的适当时间释放核酸。壳聚糖具有介于1％与50％之间的任何官能化程度。(官能化百分比是相对于在官能化之前或不存在官能化时壳聚糖聚合物上游离氨基部分的数量确定的。)脱乙酰度和官能化程度赋予官能化壳聚糖衍生物特定的电荷密度。

[0042] 根据本发明的多元醇可以具有3个、4个、5个、6个或7个碳的主链并且可以具有至少2个羟基。这类多元醇或它们的组合可用于缀合至壳聚糖主链，例如已用阳离子部分(例如，包含氨基的分子，如赖氨酸、鸟氨酸、包含胍盐基团的分子、精氨酸或它们的组合)官能化的壳聚糖。

[0043] 如本文所用的术语“C_2-C_6亚烷基”是指任选地含有一个或多个碳-碳多键的直链或支链二价烃基。为免生疑问，如本文所用的术语“C_2-C_6亚烷基”涵盖烷烃、烯烃和炔烃的二价基团。

[0044] 如本文所用，除非另有指示，否则术语“肽”和“多肽”可互换使用。

[0045] 术语“多肽”以其最广泛的含义使用，指的是常规多肽(即含有L或D-氨基酸的短多肽)，以及保留所需功能活性的肽同等物、肽类似物和肽模拟物。肽同等物可因用相关有机酸、氨基酸等替换一个或多个氨基酸或者侧链或官能团的取代或修饰而不同于常规肽。

[0046] 如本领域已知的，肽模拟物可以具有一个或多个被替代键替代的肽键。如本领域已知的，部分或全部肽主链也可以被构象受限的环状烷基或芳基取代基替代，以限制功能性氨基酸侧链的移动性。

[0047] 本发明的多肽可以通过公认的方法，例如本领域众所周知的重组和合成方法产生。合成肽的技术是众所周知的，并且包括以下中所述的技术：Merrifield，J.Amer.Chem.Soc.85:2149-2456(1963)；Atherton等人，Solid Phase Peptide Synthesis:A Practical Approach,IRL Press(1989)；和Merrifield,Science 232:341-347(1986)。

[0048] 如本文所用，“线性多肽”是指缺乏与其组成氨基酸侧链共价连接的分支基团的多肽。如本文所用，“分支多肽”是指包含与其组成氨基酸侧链共价连接的分支基团的多肽。

[0049] 如本文所用，阳离子或多元醇的“最终官能化程度”分别是指壳聚糖主链上用阳离子(例如氨基)或多元醇官能化的阳离子(例如氨基)基团的百分比。因此，“α:β比率”、“最终官能化程度比率”(例如，精氨酸最终官能化程度:多元醇最终官能化程度比率)等可以与术语“摩尔比”或“数量比”互换使用。

[0050] 分散系统由被称为分散相的颗粒物质组成，这些颗粒物质分布在整个连续介质中。壳聚糖核酸多聚复合物的“分散液”是包含水合壳聚糖核酸多聚复合物的组合物，其中多聚复合物分布在整个介质中。

[0051] 如本文所用，“浓缩前”分散液是未经过浓缩过程以形成浓缩分散液的分散液。

[0052] 如本文所用，“基本上不含”多聚复合物沉淀意指组合物基本上没有可在目视检查中观察到的颗粒。

[0053] 如本文所用，生理pH值是指在6至8之间的pH值。

[0054] “壳聚糖核酸多聚复合物”或其语法同等物意指包含多个壳聚糖分子和多个核酸分子的复合物。在一个优选的实施方案中，(例如双重)衍生的壳聚糖与所述核酸复合。

[0055] 如本文所用的术语“聚乙二醇”(“PEG”)旨在意指具有-(CH2CH2-O)-和通式HO-

(CH2CH2-O)n-H的重复单元的环氧乙烷的聚合物。

[0056] 如本文所用的术语“单甲氧基聚乙二醇”(“mPEG”)旨在意指具有-(CH2CH2-O)-和通式CH3O-(CH2CH2-O)n-H的重复单元的环氧乙烷的聚合物,例如在一端用甲氧基封端的PEG。

附图说明

[0057] 本公开参考附图公开,其中:

[0058] 图1展示了在所关注质粒在体外转染至MB49细胞中之后荧光素酶报告基因(Luc2)的剂量依赖性酶活性。

[0059] 图2A示出了基于体内转染效率(报告基因的mRNA拷贝数)对所关注的载体骨架的排序。

[0060] 图2B示出了基于体内转染效率(报告基因的酶活性)对所关注的载体骨架的排序。

[0061] 图2C示出了基于转染组织中的mRNA拷贝数对所关注的载体骨架的排序。

[0062] 图2D示出了基于体内表达的蛋白质水平对所关注的载体骨架的排序。

[0063] 图3A展示了使用经包含所关注的启动子/增强子序列的质粒转染的MB49细胞的体外GFP表达水平。

[0064] 图3B示出了基于MB49细胞中的GFP的体外表达对启动子/增强子序列的排序。

[0065] 图4A展示了经含有所关注的启动子/增强子序列的质粒转染的人原代膀胱上皮细胞的体外GFP荧光结果。

[0066] 图4B示出了基于体外人原代膀胱上皮细胞中的活性对启动子-增强子序列的排序。

[0067] 图5A示出了在用被改型成去除细菌组分的所关注的质粒体外转染人原代膀胱上皮细胞后GFP表达的剂量-反应。

[0068] 图5B示出了基于体外人原代膀胱上皮细胞中的活性对改型质粒的排序。

[0069] 图6示出了聚乙二醇化对体内膀胱转染的作用。

[0070] 图7A和7B示出了在两种不同的浓度下进行聚乙二醇化/未聚乙二醇化的人PD-L1-Fc在体内的mRNA表达。

[0071] 图8示出了体内通过用PEG-DDX转染介导的蛋白质表达的水平。

[0072] 图9A比较聚乙二醇化对多聚复合物稳定性的作用;在膀胱中孵育1小时之后排空的聚乙二醇化和未聚乙二醇化多聚复合物的外观。

[0073] 图9B展示了在膀胱中孵育1小时之后排空后,聚乙二醇化和未聚乙二醇化多聚复合物的动力学光散射测定结果。

[0074] 图10展示了DDX-1(DDX)和DDX-II(RXG)对体内hPD-L1-Fc产生的作用。

[0075] 图11展示了在向小鼠膀胱施用RXG(DDX-II,聚乙二醇化和未聚乙二醇化)制剂后人PD-L1-Fc蛋白表达的水平。

[0076] 图12A和12B示出了在无和有RIG-I激动剂盒下具有小鼠IL-12的质粒DNA构建体。图12A进一步展示了在单个开放阅读框架中包含由短的弹性蛋白接头接合的p40和p35基因的mIL-12转基因。图12B描绘了根据本发明的药物组合物的一临床实施方案的示意图。

[0077] 图13A描绘了用产生质粒的mIL-12刺激的脾细胞的IFNγ产生。

[0078] 图13B描绘了从NTC9385R质粒骨架表达的人IL-12p40p35的功能活性。

[0079] 图13C展示了小鼠介导的IL-12反应性报告细胞系(HEKBlue)的SEAP产生。

[0080] 图14A和14B比较来自在经空质粒(图14A)对比有和没有RIG-I激动剂盒下负载IL-12基因的质粒(图14B)转染后培养的膀胱癌上皮细胞的IFNβ水平。

[0081] 图15展示了在体内转染后4小时、24小时、48小时、72小时和96小时的IL-12mRNA的水平。

[0082] 图16A和16B示出了用于合成本发明的DDX/DNA纳米粒子的双重衍生化壳聚糖RXG(DDX II)结构和方法。图16C提供了PEG-b-PLE的化学结构。

[0083] 图17展示了关于DDX-DNA制剂的生理化学表征的数据。

[0084] 图18A、18B和18C提供了体外聚合物筛选测定结果。

[0085] 图19展示了在小鼠中膀胱内施用后的体内蛋白质表达,比较基于DDX对比RXG(DDX-II)的多聚复合物。

[0086] 图20A和20B比较非人类灵长类动物中在膀胱内施用包含人IL-12的多聚复合物之后的IL-12mRNA(图20A)和蛋白质(图20B)。

[0087] 图21展示了暴露于以下的NHP膀胱中的eRNA11a表达:0.0625mg/mL(c62.5)、0.25mg/mL(c250)和1mg/mL(c1000)的包含hIL-12和RIG-I激动剂(EG-70)的多聚复合物;和1mg/mL(c1000)的非编码对照物(RXG-PEG-N9)。

[0088] 图22展示了暴露于以下的NHP膀胱中的VA1表达:0.0625mg/mL(c62.5)、0.25mg/mL(c250)和1mg/mL(c1000)的包含hIL-12和RIG-I激动剂(EG-70)的多聚复合物;和1mg/mL(c1000)的非编码对照物(RXG-PEG-N9)。

[0089] 图23示出了在单次施用mEG-70-原型纳米粒子后小鼠膀胱中I112p40p35的进行密码子优化的mRNA表达的动力学。

[0090] 图24展示了在单次施用mEG-70原型纳米粒子后小鼠膀胱中的小鼠IL12p70蛋白表达。

[0091] 图25展示了在单次施用mEG-70原型纳米粒子后小鼠膀胱中的小鼠IL-12p70蛋白表达的剂量反应。

[0092] 图26比较聚乙二醇化纳米粒子对比未聚乙二醇化纳米粒子下的小鼠IL-12p70蛋白表达。

[0093] 图27A提供了用于在小鼠模型中评定mEG-70(mIL-12和RIG-I激动剂)治疗膀胱癌的功效的测定方案。图27B展示了在研究终点对照物和处理的动物的膀胱重量。

具体实施方式

[0094] 本发明涵盖粘膜组织中IL-12的局部表达,优选地与额外固有和/或适应性免疫刺激组合。蛋白质疗法的肠胃外和静脉内途径缺乏在粘膜组织处的充分生物利用率并且具有全身毒性。在粘膜组织处的局部基因疗法,例如膀胱内施用于膀胱和施用于胃肠道(GIT)的口服剂型,呈现了一种促进蛋白质的局部表达,同时将不必要的全身副作用减到最少的有吸引力的方法。然而,不幸地,病毒递送载体的临床使用受到以下限制:病毒免疫原性,其在重复给药后可能降低功效;粘液屏障的渗透效率低;载体生产成本;以及与临床执行(例如生物安全防护和冷链存储)相关的后勤复杂情况。本发明提供了一种用于粘膜组织,例如膀

胱的安全有效的非病毒载体平台，克服了这些限制。

[0095] 不受理论束缚，通过本发明，粘膜组织中的IL-12通路的活化作用于效应子CD4+和CD8+效应细胞，引起有效的抗肿瘤以及抗血管生成功能，而同时或依序刺激RIG-I通路诱导I型干扰素和IFN刺激的基因，从而提高了肿瘤抗原交叉呈递至CD8+细胞毒性T细胞。在本文中所示和例示的优选实施方案中，这些配合的生物机制将RIG-I激动剂对固有免疫系统的刺激与IL12介导的对适应性免疫应答的刺激联合起来，组合产生有效的炎性反应，驱动稳固且持久的抗肿瘤免疫应答。

[0096] 组合物

[0097] 本文提供了壳聚糖组合物，所述壳聚糖组合物包含与含聚阴离子的嵌段共聚物，例如二嵌段和/或三嵌段共聚物包衣复合的壳聚糖衍生物核酸纳米颗粒(多聚复合物)，其中单个的聚合物分子包含带负电荷的锚定区和一个或多个不带电的亲水性尾区。可用于本发明的方法和组合物中的示例性聚合物分子是包含聚乙二醇(PEG)部分和聚阴离子(PA)部分的“PEG-PA”聚合物分子。

[0098] 1.1.壳聚糖

[0099] 壳聚糖衍生物核酸纳米颗粒的壳聚糖组分可以用阳离子官能团和/或亲水部分进行官能化。用两个不同的官能团进行官能化的壳聚糖被称为双重衍生化壳聚糖(DD-壳聚糖)。示例性的DD-壳聚糖用亲水部分(例如多元醇)和阳离子官能团(例如氨基)官能化。示例性的壳聚糖衍生物还描述于例如各以引用的方式并入本文中的U.S.2007/0281904和U.S.2016/0235863中。

[0100] 在一个实施方案中，本文所述的双重衍生化壳聚糖包含脱乙酰度至少为50％的壳聚糖。在一个实施方案中，脱乙酰度至少为60％，更优选至少70％，更优选至少80％，更优选至少90％，并且最优选至少95％。在一个优选的实施方案中，本文所述的双重衍生化壳聚糖包含脱乙酰度至少为98％的壳聚糖。

[0101] 本文所述的壳聚糖衍生物具有在中性和生理pH值下可溶的平均分子量范围，并且出于本发明的目的，包括3-110kDa范围内的分子量。本文所述的实施方案的特征在于衍生化壳聚糖的平均分子量较低(<25kDa，例如约5kDa至约25kDa)，其可具有理想的递送和转染特性，并且尺寸小且具有良好的溶解性。平均分子量较低的衍生壳聚糖通常比分子量较高的衍生壳聚糖更易溶解，前者因此产生更容易释放核酸并增加细胞转染的核酸/壳聚糖复合物。许多文献致力于优化基于壳聚糖的递送系统的所有这些参数。

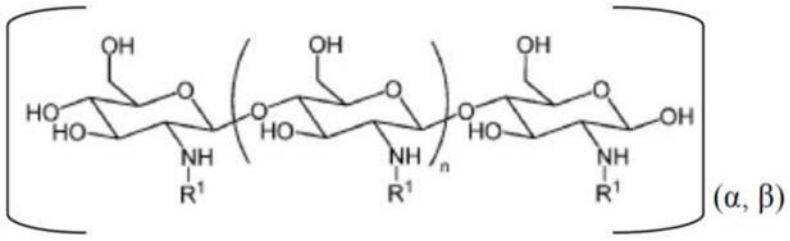
[0102] 普通技术人员会认识到，壳聚糖是指具有式I结构的多个分子，其中n为任意整数，并且每个R1独立地选自乙酰基或氢，其中R1选自氢的程度在50％至100％之间。此外，被称为具有例如3kD至110kD的平均分子量的壳聚糖通常是指分别具有例如3kD至110kD的重量平均分子量的多个壳聚糖分子，其中每个壳聚糖分子可以具有不同的链长(n+2)。同样广为人知的是，被称为“n聚体壳聚糖”的壳聚糖不一定包含式I的壳聚糖分子，其中每个壳聚糖分子的链长为n+2。相反，本文所用的“n聚体壳聚糖”是指多个壳聚糖分子，每个分子可具有不同的链长，其中所述多个壳聚糖分子的平均分子量基本上类似于或等于链长为n的壳聚糖分子。例如，24聚体壳聚糖可包含多个壳聚糖分子，每个分子具有在例如7-50范围内的不同的链长，但其重量平均分子量基本上类似于或等于具有链长24的壳聚糖分子。

[0103] 本发明的双重衍生化壳聚糖也可以用多元醇或亲水性官能团如多元醇官能化。不

希望受理论束缚，假设用亲水性基团如多元醇官能化可能有助于增加壳聚糖(包括精氨酸壳聚糖)的亲水性和/或可能提供羟基。在一些实施方案中，壳聚糖衍生物纳米颗粒的亲水性官能团是或包含葡萄糖酸。参见例如WO 2013/138930。在一些实施方案中，壳聚糖衍生物纳米颗粒的亲水性官能团是或包含葡萄糖。另外或可替代地，亲水性官能团可以包含多元醇。参见例如U.S.2016/0235863。下面进一步描述了示例性的用于壳聚糖官能化的多元醇。

[0104] 本文所述的官能化壳聚糖衍生物包括双重衍生化壳聚糖化合物，例如阳离子-壳聚糖-多元醇化合物。通常，阳离子-壳聚糖-多元醇化合物用含氨基的部分如精氨酸、赖氨酸、鸟氨酸或包含胍盐的分子或它们的组合官能化。在某些实施方案中，阳离子-壳聚糖-多元醇化合物具有以下式I结构：

[0105]



(I)

[0106] 其中n是1至650的整数，

[0107] α是阳离子部分(例如包含氨基的分子，例如赖氨酸、鸟氨酸、包含胍盐基团的分子、精氨酸或它们的组合)的最终官能化程度，

[0108] β是多元醇的最终官能化程度；并且

[0109] 每个R^1独立地选自氢、乙酰基、阳离子(例如精氨酸)和多元醇。

[0110] 优选地，本发明的双重衍生化壳聚糖可以用阳离子氨基酸精氨酸官能化。

[0111] 在一个实施方案中，壳聚糖衍生物纳米颗粒包含与最终官能化程度为1％、2％、4％、7％、8％、10％、15％、20％、25％、30％或更大的葡萄糖酸偶联的壳聚糖。在一个实施方案中，壳聚糖衍生物纳米颗粒包含与最终官能化程度为1％、2％、4％、7％、8％、10％、15％、20％、25％、30％或更大的葡萄糖偶联的壳聚糖。在一个实施方案中，壳聚糖衍生物纳米颗粒包含与最终官能化程度为约1％至约25％的阳离子部分(例如精氨酸)偶联的壳聚糖。在一个实施方案中，壳聚糖衍生物纳米颗粒包含与最终官能化程度为约10％至约40％的阳离子部分(例如精氨酸)偶联的壳聚糖。

[0112] 在一个实施方案中，壳聚糖衍生物纳米颗粒包含与最终官能化程度为约10％至约35％的阳离子部分(例如精氨酸)偶联的壳聚糖。在一个实施方案中，壳聚糖衍生物纳米颗粒包含与最终官能化程度为约20％至约35％的阳离子部分(例如精氨酸)偶联的壳聚糖。在一个实施方案中，壳聚糖衍生物纳米颗粒包含与最终官能化程度为约25％至约35％的阳离子部分(例如精氨酸)偶联的壳聚糖。在一个实施方案中，壳聚糖衍生物纳米颗粒包含与最终官能化程度为约25％至约30％的阳离子部分(例如精氨酸)偶联的壳聚糖。

[0113] 在一个实施方案中，壳聚糖衍生物纳米颗粒包含与最终官能化程度为约15％至约40％的阳离子部分(例如精氨酸)偶联的壳聚糖。在一个实施方案中，壳聚糖衍生物纳米颗粒包含与最终官能化程度为约15％至约35％的阳离子部分(例如精氨酸)偶联的壳聚糖。在

一个实施方案中，壳聚糖衍生物纳米颗粒包含与最终官能化程度为约15％至约30％的阳离子部分(例如精氨酸)偶联的壳聚糖。在一个实施方案中，壳聚糖衍生物纳米颗粒包含与最终官能化程度为约15％至约28％的阳离子部分(例如精氨酸)偶联的壳聚糖。

[0114] 在一个实施方案中，壳聚糖衍生物纳米颗粒包含与最终官能化程度为约10％至约35％的阳离子部分(例如精氨酸)偶联的壳聚糖。在一个实施方案中，壳聚糖衍生物纳米颗粒包含与最终官能化程度为约10％至约30％的阳离子部分(例如精氨酸)偶联的壳聚糖。在一个实施方案中，壳聚糖衍生物纳米颗粒包含与最终官能化程度为约10％至约28％的阳离子部分(例如精氨酸)偶联的壳聚糖。在一个实施方案中，壳聚糖衍生物纳米颗粒包含与最终官能化程度为约28％的阳离子部分(例如精氨酸)偶联的壳聚糖。

[0115] 在一个实施方案中，壳聚糖衍生物纳米颗粒包含与最终官能化程度为约2％至约30％、约5％至约30％、约7.5％至约30％、约5％至约25％、约5％至约22％、约5％至约20％、约5％至约15％或约5％至约10％的葡萄糖酸偶联的壳聚糖。在一个实施方案中，壳聚糖衍生物纳米颗粒包含与最终官能化程度为约7.5％至约25％、约7.5％至约20％、约7.5％至约15％或约7.5％至约12％的葡萄糖酸偶联的壳聚糖。在一个实施方案中，壳聚糖衍生物纳米颗粒包含与最终官能化程度为约10％的葡萄糖酸偶联的壳聚糖。

[0116] 在一个实施方案中，壳聚糖衍生物纳米颗粒包含与最终官能化程度为约2％至约30％、约5％至约30％、约7.5％至约30％、约5％至约25％、约5％至约22％、约5％至约20％、约5％至约15％或约5％至约10％的亲水性多元醇偶联的壳聚糖。在一个实施方案中，壳聚糖衍生物纳米颗粒包含与最终官能化程度为约7.5％至约25％、约7.5％至约20％、约7.5％至约15％或约7.5％至约12％的亲水性多元醇偶联的壳聚糖。在一个实施方案中，壳聚糖衍生物纳米颗粒包含与最终官能化程度为约10％的亲水性多元醇偶联的壳聚糖。

[0117] 在一个实施方案中，壳聚糖衍生物纳米颗粒包含与最终官能化程度为约2％至约30％、约5％至约30％、约7.5％至约30％、约5％至约25％、约5％至约22％、约5％至约20％、约5％至约15％或约5％至约10％的葡萄糖偶联的壳聚糖。在一个实施方案中，壳聚糖衍生物纳米颗粒包含与最终官能化程度为约7.5％至约25％、约7.5％至约20％、约7.5％至约15％或约7.5％至约12％的葡萄糖偶联的壳聚糖。在一个实施方案中，壳聚糖衍生物纳米颗粒包含与最终官能化程度为约10％的葡萄糖偶联的壳聚糖。

[0118] 在一个实施方案中，壳聚糖衍生物纳米颗粒包含与最终官能化程度为约2％至约40％的阳离子(例如精氨酸)和最终官能化程度为约2％至约30％的亲水性多元醇(例如葡萄糖或葡萄糖酸)偶联的壳聚糖。在一个实施方案中，壳聚糖衍生物纳米颗粒包含与最终官能化程度为约5％至约40％的阳离子(例如精氨酸)和最终官能化程度为约5％至约25％的亲水性多元醇(例如葡萄糖或葡萄糖酸)偶联的壳聚糖。在一个实施方案中，壳聚糖衍生物纳米颗粒包含与最终官能化程度为约7.5％至约40％的阳离子(例如精氨酸)和最终官能化程度为约7.5％至约20％的亲水性多元醇(例如葡萄糖或葡萄糖酸)偶联的壳聚糖。在一个实施方案中，壳聚糖衍生物纳米颗粒包含与最终官能化程度为约10％至约40％的阳离子(例如精氨酸)和最终官能化程度为约7.5％至约15％或约10％的亲水性多元醇(例如葡萄糖或葡萄糖酸)偶联的壳聚糖。

[0119] 在一个实施方案中，壳聚糖衍生物纳米颗粒包含与最终官能化程度为约2％至约35％的阳离子(例如精氨酸)和最终官能化程度为约2％至约30％的亲水性多元醇(例如葡

葡糖或葡萄糖酸)偶联的壳聚糖。在一个实施方案中,壳聚糖衍生物纳米颗粒包含与最终官能化程度为约5%至约35%的阳离子(例如精氨酸)和最终官能化程度为约5%至约25%的亲水性多元醇(例如葡萄糖或葡萄糖酸)偶联的壳聚糖。在一个实施方案中,壳聚糖衍生物纳米颗粒包含与最终官能化程度为约7.5%至约35%的阳离子(例如精氨酸)和最终官能化程度为约7.5%至约20%的亲水性多元醇(例如葡萄糖或葡萄糖酸)偶联的壳聚糖。在一个实施方案中,壳聚糖衍生物纳米颗粒包含与最终官能化程度为约10%至约35%的阳离子(例如精氨酸)和最终官能化程度为约7.5%至约15%或约10%的亲水性多元醇(例如葡萄糖或葡萄糖酸)偶联的壳聚糖。

[0120] 在一个实施方案中,壳聚糖衍生物纳米颗粒包含与最终官能化程度为约10%至约30%的阳离子(例如精氨酸)和最终官能化程度为约2%至约30%的亲水性多元醇(例如葡萄糖或葡萄糖酸)偶联的壳聚糖。在一个实施方案中,壳聚糖衍生物纳米颗粒包含与最终官能化程度为约12%至约30%的阳离子(例如精氨酸)和最终官能化程度为约5%至约25%的亲水性多元醇(例如葡萄糖或葡萄糖酸)偶联的壳聚糖。在一个实施方案中,壳聚糖衍生物纳米颗粒包含与最终官能化程度为约14%至约30%的阳离子(例如精氨酸)和最终官能化程度为约7.5%至约20%的亲水性多元醇(例如葡萄糖或葡萄糖酸)偶联的壳聚糖。在一个实施方案中,壳聚糖衍生物纳米颗粒包含与最终官能化程度为约15%至约30%的阳离子(例如精氨酸)和最终官能化程度为约7.5%至约15%或约10%的亲水性多元醇(例如葡萄糖或葡萄糖酸)偶联的壳聚糖。

[0121] 在一个实施方案中,壳聚糖衍生物纳米颗粒包含与最终官能化程度为约25%的阳离子(例如精氨酸)和最终官能化程度为约7.5%至约15%的亲水性多元醇(例如葡萄糖或葡萄糖酸)偶联的壳聚糖。在一个实施方案中,壳聚糖衍生物纳米颗粒包含与最终官能化程度为约28%的阳离子(例如精氨酸)和最终官能化程度为约7.5%至约15%的亲水性多元醇(例如葡萄糖或葡萄糖酸)偶联的壳聚糖。在一个实施方案中,壳聚糖衍生物纳米颗粒包含与最终官能化程度为约25%的阳离子(例如精氨酸)和最终官能化程度为约5%至约20%的亲水性多元醇(例如葡萄糖或葡萄糖酸)偶联的壳聚糖。在一个实施方案中,壳聚糖衍生物纳米颗粒包含与最终官能化程度为约28%的阳离子(例如精氨酸)和最终官能化程度为约5%至约20%的亲水性多元醇(例如葡萄糖或葡萄糖酸)偶联的壳聚糖。

[0122] 在一个优选的实施方案中,壳聚糖衍生物纳米颗粒包含与最终官能化程度为约14%的阳离子(例如精氨酸)和最终官能化程度为约10%的亲水性多元醇(例如葡萄糖或葡萄糖酸)偶联的壳聚糖。在一个优选的实施方案中,壳聚糖衍生物纳米颗粒包含与最终官能化程度为约15%的阳离子(例如精氨酸)和最终官能化程度为约12%的亲水性多元醇(例如葡萄糖或葡萄糖酸)偶联的壳聚糖。在另一个优选的实施方案中,壳聚糖衍生物纳米颗粒包含与最终官能化程度为约14%的精氨酸和最终官能化程度为约10%的葡萄糖偶联的壳聚糖。在另一个优选的实施方案中,壳聚糖衍生物纳米颗粒包含与最终官能化程度为约15%的精氨酸和最终官能化程度为约12%的葡萄糖偶联的壳聚糖。

[0123] 在一个优选的实施方案中,壳聚糖衍生物纳米颗粒包含与最终官能化程度为约28%的阳离子(例如精氨酸)和最终官能化程度为约10%的亲水性多元醇(例如葡萄糖或葡萄糖酸)偶联的壳聚糖。在另一个优选的实施方案中,壳聚糖衍生物纳米颗粒包含与最终官能化程度为约28%的精氨酸和最终官能化程度为约10%的葡萄糖偶联的壳聚糖。

[0124] 在一些实施方案中，适当时，DD-壳聚糖包括DD-壳聚糖衍生物，例如，掺入额外官能化的DD-壳聚糖，例如连接配体的DD-壳聚糖。将了解“衍生物”包括广泛类别的基于壳聚糖的聚合物，其包含共价修饰的N-乙酰基-D-葡萄糖胺和/或D-葡萄糖胺单元，以及掺入其它单元或连接到其它部分的基于壳聚糖的聚合物。衍生物通常基于葡萄糖胺的羟基或胺基的修饰，例如精氨酸官能化的壳聚糖下的修饰。壳聚糖衍生物的实例包括但不限于三甲基化壳聚糖、硫醇化壳聚糖、半乳糖基化壳聚糖、烷基化壳聚糖、掺入PEI的壳聚糖、糖醛酸修饰的壳聚糖、乙二醇壳聚糖等。关于壳聚糖衍生物的进一步教导，参见例如“Non-viral Gene Therapy”第63-74页，K.Taira,K.Kataoka,T.Niidome(编辑)，Springer-Verlag Tokyo,2005,ISBN 4-431-25122-7;Zhu等人，Chinese Science Bulletin,December 2007,第52卷(23)，第3207-3215页;以及Varma等人，Carbohydrate Polymers 55(2004)77-93。

[0125] 1.2.壳聚糖核酸多聚复合物

[0126] 壳聚糖衍生物纳米颗粒组合物一般含有至少一种核酸分子，和优选地多种这样的核酸分子。典型的核酸分子包含磷作为核酸主链的组分，例如呈多种磷酸二酯或其衍生物(例如硫代磷酸酯)形式。阳离子官能化的壳聚糖衍生物与核酸的比例可通过阳离子(+)与磷(P)摩尔比率表征，其中(+)是指阳离子官能化的壳聚糖衍生物的阳离子并且(P)是指核酸主链的磷。典型地，选择(+):(P)摩尔比率，以使得壳聚糖衍生物-核酸复合物在缺乏含聚阴离子的嵌段共聚物可逆包衣的情况下具有正电荷。因此，(+):(P)摩尔比率一般大于1。在优选的实施方案中，(+):(P)摩尔比率大于1.5，至少2，或大于2。在某些优选的实施方案中，(+):(P)摩尔比率大于2。

[0127] 在一些情况下，(+):(P)摩尔比率为或为约3:1。在一些情况下，(+):(P)摩尔比率为或为约4:1。在一些情况下，(+):(P)摩尔比率为或为约5:1。在一些情况下，(+):(P)摩尔比率为或为约6:1。在一些情况下，(+):(P)摩尔比率为或为约7:1。在一些情况下，(+):(P)摩尔比率为或为约8:1。在一些情况下，(+):(P)摩尔比率为或为约9:1。在一些情况下，(+):(P)摩尔比率为或为约10:1。

[0128] 在一些情况下，(+):(P)摩尔比率为大于1到至多约20:1，约2到至多约20:1，或约2到至多约10:1。在一些情况下，(+):(P)摩尔比率为大于约2到至多约20:1，或大于约2到至多约10:1。在一些情况下，(+):(P)摩尔比率为约3到至多约20:1，约3到至多约10:1，约3到至多约8:1，或约3到至多约7:1。在一些情况下，(+):(P)摩尔比率为约3到至多20:1，约3到至多10:1，约3到至多8:1，或约3到至多7:1。

[0129] 在某些实施方案中，(+):(P)摩尔比率为100:1，优选地小于100:1。举例来说，在某些实施方案中，(+):(P)摩尔比率可以为大于1至小于或等于100:1。在一些情况下，(+):(P)摩尔比率可以为大于2至小于或等于100:1。在一些情况下，(+):(P)摩尔比率可以为大于或等于3至小于或等于100:1。在一些情况下，(+):(P)摩尔比率可以为大于或等于5至小于或等于100:1。在一些情况下，(+):(P)摩尔比率可以为大于或等于7至小于或等于100:1。在一些情况下，(+):(P)摩尔比率可以为大于2至小于或等于50:1。在一些情况下，(+):(P)摩尔比率可以为大于或等于3至小于或等于50:1。在一些情况下，(+):(P)摩尔比率可以为大于或等于5至小于或等于50:1。在一些情况下，(+):(P)摩尔比率可以为大于或等于7至小于或等于50:1。在一些情况下，(+):(P)摩尔比率可以为大于2至小于或等于25:1。在一些情况下，(+):(P)摩尔比率可以为大于或等于3至小于或等于25:1。在一些情况下，(+):(P)摩尔

比率可以为大于或等于5至小于或等于25:1。在一些情况下,(+):(P)摩尔比率可以为大于或等于7至小于或等于25:1。

[0130] 在一些实施方案中,壳聚糖衍生物纳米颗粒的阳离子官能团是或包含氨基。这样的氨基官能化的壳聚糖衍生物纳米颗粒的实例包括(但不限于)含有经以下官能化的壳聚糖的纳米颗粒:胍盐或包含胍盐基团的分子、赖氨酸、鸟氨酸、精氨酸或它们的组合。在优选的实施方案中,阳离子官能团是精氨酸。氨基官能化的壳聚糖衍生物与核酸的比例可通过氨基(N)与磷(P)摩尔比率表征,其中(N)是指氨基官能化的壳聚糖衍生物中的氨基的氮原子并且(P)是指核酸主链的磷。典型地,选择N:P摩尔比率,以使得壳聚糖衍生物-核酸复合物在缺乏PEG-PA聚合物分子的情况下在生理相关pH值下具有正电荷。因此,N:P摩尔比率一般大于1。在优选的实施方案中,N:P摩尔比率大于1.5,至少2,或大于2。在某些优选的实施方案中,N:P摩尔比率大于2。

[0131] 在一些情况下,N:P摩尔比率为或为约3:1。在一些情况下,N:P摩尔比率为或为约4:1。在一些情况下,N:P摩尔比率为或为约5:1。在一些情况下,N:P摩尔比率为或为约6:1。在一些情况下,N:P摩尔比率为或为约7:1。在一些情况下,N:P摩尔比率为或为约8:1。在一些情况下,N:P摩尔比率为或为约9:1。在一些情况下,N:P摩尔比率为或为约10:1。

[0132] 在一些情况下,N:P摩尔比率为大于1到至多约20:1,约2到至多约20:1,或约2到至多约10:1。在一些情况下,N:P摩尔比率为大于约2到至多约20:1,或大于约2到至多约10:1。在一些情况下,N:P摩尔比率为约3到至多约20:1,约3到至多约10:1,约3到至多约8:1,或约3到至多约7:1。在一些情况下,N:P摩尔比率为约3到至多20:1,约3到至多10:1,约3到至多8:1,或约3到至多7:1。

[0133] 在某些实施方案中,N:P摩尔比率为100:1,优选地少于100:1。举例来说,在某些实施方案中,N:P摩尔比率可以为大于1至小于或等于100:1。在一些情况下,N:P摩尔比率可以为大于2至小于或等于100:1。在一些情况下,N:P摩尔比率可以为大于或等于3至小于或等于100:1。在一些情况下,N:P摩尔比率可以为大于或等于5至小于或等于100:1。在一些情况下,N:P摩尔比率可以为大于或等于7至小于或等于100:1。在一些情况下,N:P摩尔比率可以为大于2至小于或等于50:1。在一些情况下,N:P摩尔比率可以为大于或等于3至小于或等于50:1。在一些情况下,N:P摩尔比率可以为大于或等于5至小于或等于50:1。在一些情况下,N:P摩尔比率可以为大于或等于7至小于或等于50:1。在一些情况下,N:P摩尔比率可以为大于2至小于或等于25:1。在一些情况下,N:P摩尔比率可以为大于或等于3至小于或等于25:1。在一些情况下,N:P摩尔比率可以为大于或等于5至小于或等于25:1。在一些情况下,N:P摩尔比率可以为大于或等于7至小于或等于25:1。

[0134] 在一个优选的实施方案中,主题多聚复合物的胺与磷酸酯(N/P)比率为2至100,例如2至50,例如2至40,例如2至30,例如2至20,例如2至5。优选地,N/P比率与壳聚糖分子量成反比,即分子量较低的(例如双重)衍生化壳聚糖需要较高的N/P比率,反之亦然。

[0135] 本发明的核酸一般含有磷酸二酯键,不过在一些情况下包括可具有为了多种目的中的任一种,例如为了稳定性和保护而掺入的替换主链或其它修饰或部分的核酸类似物。涵盖的其它核酸类似物包括具有非核糖主链的核酸。另外,可制成天然存在的核酸、类似物和两者的混合物。核酸可以是单链或双链的,或含有双链或单链序列的部分。核酸包括但不限于DNA、RNA和杂交体,其中核酸包含脱氧核糖核苷酸和核糖核苷酸的任何组合,以及碱基

的任何组合，包括尿嘧啶、腺嘌呤、胸腺嘧啶、胞嘧啶、鸟嘌呤、肌苷、黄嘌呤、次黄嘌呤、异胞嘧啶、异鸟嘌呤等。核酸包括任何形式的DNA、任何形式的RNA，包括三链体、双链体或单链、反义、siRNA、核酶、脱氧核酶、多核苷酸、寡核苷酸、嵌合体、微小RNA和它们的衍生物。核酸包括人工核酸，包括但不限于肽核酸(PNA)、磷酰二胺吗啉代寡核苷酸(PMO)、锁核酸(LNA)、乙二醇核酸(GNA)和苏糖核酸(TNA)。应当理解，对于不包含磷的人工核酸，(+):P或N:P比率的同等量度可以通过核苷酸(或核苷酸类似物)碱基的数目来估计。

[0136] 在一个优选的实施方案中，组合物的多聚复合物包含在官能化之前平均分子量小于110kDa，更优选小于65kDa，更优选小于50kDa，更优选小于40kDa，最优选小于30kDa的壳聚糖分子。在一些实施方案中，组合物的多聚复合物包含在官能化之前平均分子量小于15kDa、小于10kDa、小于7kDa或小于5kDa的壳聚糖。

[0137] 在一个优选的实施方案中，多聚复合物包含具有平均小于680个葡萄糖胺单体单元，更优选小于400个葡萄糖胺单体单元，更优选小于310个葡萄糖胺单体单元，更优选小于250个葡萄糖胺单体单元，最优选小于190个葡萄糖胺单体单元的壳聚糖分子。在一些实施方案中，多聚复合物包含具有平均少于95个葡萄糖胺单体单元、少于65个葡萄糖胺单体单元、少于45个葡萄糖胺单体单元或少于35个葡萄糖胺单体单元的壳聚糖分子。

[0138] 壳聚糖和(例如双重)衍生化壳聚糖核酸多聚复合物可以通过本领域已知的任何方法，包括但不限于本文所述的那些方法制备。

[0139] 1.2.1.核酸

[0140] 如上所述，壳聚糖多聚复合物可含有多种核酸。在一个实施方案中，核酸组分包含治疗性核酸。主题(例如双重)衍生化壳聚糖核酸多聚复合物适合使用本领域已知的任何治疗性核酸，包括例如编码例如以下的治疗性蛋白质的核酸：激素、酶、细胞因子、趋化因子、抗体、促有丝分裂因子、生长因子、分化因子、影响细胞凋亡的因子、影响炎症的因子、影响免疫应答的因子(免疫刺激剂)等。

[0141] 治疗性核酸可以用于通过用作缺陷基因的替代或增强实现基因疗法，或通过编码治疗性产物来补偿特定基因产物的缺乏。治疗性核酸还可以抑制内源基因的表达。治疗性核酸可以编码全部或部分翻译产物，并且可以通过与细胞中已经存在的DNA重组来发挥作用，从而替换基因的缺陷部分。它还可以编码蛋白质的一部分并通过基因产物的共抑制发挥其作用。

[0142] 在一些实施方案中，核酸组分包含治疗性核酸构建体。治疗性核酸构建体是能够发挥治疗作用的核酸构建体。治疗性核酸构建体可包含编码治疗性蛋白质的核酸，以及产生作为治疗性RNA的转录物的核酸。

[0143] 在本文中所述和例示的优选实施方案中，治疗性核酸构建体包含编码IL-12的核酸，单独或与额外免疫刺激分子结合。IL-12是具有四个α-螺旋束结构的异二聚体1型细胞因子。活性异二聚体又名IL-12p70，其包含由两种单独基因IL-12A(编码p35)和IL-12B(编码p40)编码的2个亚基。IL-12A存在至少6种剪接变异转录产物(ENST00000305579.6、ENST00000466512.1、ENST00000480787.5、ENST00000468862.5、ENST00000496308.1和ENST00000480088.1)。人IL-12A同种型1前体的核酸和肽序列分别是例如NM_000882.4、NM_001354582.2、NM_001354583.2和NP_000873.2、NP_001341511.1和NP_001341512.1。小鼠IL12a核酸和肽序列分别是例如NM_001159424.2和NP_001152896.1。人IL-12B基因组序列、

转录产物和肽序列分别是例如NG_009618.1、NM_002187.3和NP_002178.2。小鼠IL-12B核酸和肽序列是例如NM_001303244和NP_001290173.1。

[0144] 在一些实施方案中，单链IL-12蛋白可以通过将p40亚基与p35亚基用短的氨基酸接头序列融合来产生。该两种亚基可以呈p40-接头-p35或p35-接头-p40取向连接。该蛋白质可以由于包括信号肽而从接头5'的亚基分泌，同时从接头序列下游的亚基去除信号肽。在优选的实施方案中，接头序列包含10氨基酸序列，其源自于牛弹性蛋白并且由缬氨酸(V)、脯氨酸(P)和甘氨酸(G)残基(VPGVGVPGVG)构成。在一些实施方案中，接头序列可以含有G和/或丝氨酸(S)残基，例如(GGGGS)n。在其它实施方案中，接头序列可能含有G、S和额外氨基酸，包括但不限于P、精氨酸(R)、赖氨酸(K)、苏氨酸(T)和谷氨酸(E)。在示例性实施方案中，接头选自由GSGSSRGGSGSGGSGGGGSK、GSTSG(A/S)GKSSEGKG(SEQ ID NO:1)、GSTSGSGKPGSGEGSTKG(SEQ ID NO:2)、GGGGGGS(SEQ ID NO:3)或GGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:4)组成的组。

[0145] 在一示例性实施方案中，编码hIL-12p40p35的核酸序列包含：

[0146] atgtgccatcagcaacttgtcatctcctggttctccctcgtgttcctggcctcccctcttgtcgcgatttgggagctgaagaaagatgtgtacgtcgtggaactcgactggtacccggacgccccggggaaatggtggtgctcacttgtgatactcccgaagaggatggaattacctggaccctcgatcagtcctccgaggtcttgggatccggcaaaactctgaccatccaagtcaaggaattcggcgacgcggggcagtacacctgtcacaagggcggagaagtgctgtcgcactcactcctgctccttcacaaaaaggaggacggcatctggtcgaccgacatcctgaaggaccagaaggaacccaagaacaagacctttctgcgctgcgaggccaagaactattcgggaaggttcacctgttggtggctgactaccatctccaccgacctgactttctccgtgaagtcctctcggggttcgagcgacccgcagggtgttacgtgcggtgctgcaaccctgtccgcggagagagtgcgggggacaacaaggaatacgagtactcagtggaatgccaggaagatagcgcctgccctgccgccgaagagtccctgccgattgaagtcatggtggacgcagtgcataagttgaaatatgagaactacacctcgtcgttcttcatccgggacatcatcaagcctgacccccctaagaatctgcagctcaagcccctcaagaactccagacaggtcgaagtgtcctgggagtacccagatacgtggagcacaccgcactcgtacttctccttgaccttctgcgtccaagtgcagggaaagtccaaacgggagaagaaggaccgcgtgttcactgataagacttccgctactgtgatctgccgcaaaaacgccagcatcagcgtgcgcgcgcaagatagatactactcaagctcttggtccgaatgggcgtccgtgccatgctcggtgcccggcgtgggcgtgcctggagtgggagcccggaacttgccggtggccacccctgaccccggaatgttccttgcctgcaccactcccaaaaccttctgagggctgtgtccaacatgctgcagaaggctcggcagaccctggaattctacccctgcacctccgaggagatcgaccacgaagatattaccaaggacaagacctcaaccgtggaagcctgcctgcccctggaactgaccaagaacgaatcgtgcctgaatagccgggaaacctccttcatcaccaacggctcctgcctggcctcacgaaagaccagctttatgatggccctgtgcctgagctcgatctacgaggacctgaagatgtaccaggtcgagttcaagactatgaacgccaagctgctgatggatccgaagcggcagatcttcttggaccagaatatgctggcagtgatcgacgagctgatgcaggccctcaacttcaactccgagactgtgccgcaaaagtcgagcctggaggaaccggacttctacaagaccaagatcaagttatgtattctcctgcacgcgtttaggattcgcgccgtgaccattgatagagtgatgtcctacctgaacgccagctga(SEQ ID NO:5)。

[0147] 在一示例性实施方案中，hIL-12p40p35氨基酸序列包含：

[0148] M C H Q Q L V I S W F S L V F L A S P L V A I W E L K K D V Y V V E L D W Y P D A P G E M V V L T C D T P E E D G I T W T L D Q S S E V L G S G K T L T I Q V K E F G D A G Q Y T C H K G G E V L S H S L L L L H K K E D G I W S

T D I L K D Q K E P K N K T F L R C E A K N Y S G R F T C W W L T T I S T D L T F S V K S S R G S S D P Q G V T C G A A T L S A E R V R G D N K E Y E Y S V E C Q E D S A C P A A E E S L P I E V M V D A V H K L K Y E N Y T S S F F I R D I I K P D P P K N L Q L K P L K N S R Q V E V S W E Y P D T W S T P H S Y F S L T F C V Q V Q G K S K RE K K D R V F T D K T S A T V I C R K N A S I S V R A Q D R Y Y S S S W S E W A S V P C S V P G V G V P G V G A RN L P V A T P D P G M F P C L H H S Q N L L R A V S N M L Q K A R Q T L E F Y P C T S E E I D H E D I T K D K T S T V E A C L P L E L T K N E S C L N S R E T S F I T N G S C L A S R K T S F M M A L C L S S I Y E D L K M Y Q V E F K T M N A K L L M D P K R Q I F L D Q N M L A V I D E L M Q A L N F N S E T V P Q K S S L E E P D F Y K T K I K L C I L L H A F R I R A V T I D R V M S Y L N A S终止(SEQ ID NO:6)。

[0149] 治疗性核酸还包括呈环状双链DNA质粒、微型环状DNA(Science Report 6:2315,2016)或封闭末端线性双链DNA(Li等人,PLoS One 8(8):e69879,2013)的治疗性DNA。

[0150] 治疗性核酸还包括治疗性RNA,它们是能够在哺乳动物细胞中发挥治疗作用的RNA分子。治疗性RNA包括但不限于信使RNA、反义RNA、siRNA、短发夹RNA、微小RNA和酶催化RNA。治疗性核酸包括但不限于旨在形成三链体分子的核酸、蛋白质结合核酸、核酶、脱氧核酶和小核苷酸分子。许多类型的治疗性RNA是本领域已知的。例如参见Meng等人,A new developing class of gene delivery:messenger RNA-based therapeutics,Biomater.Sci.,5,2381-2392,2017;Grimm等人,Therapeutic application of RNAi is mRNA targeting finally ready for prime time?J.Clin.Invest.,117:3633-3641,2007;Aagaard等人,RNAi therapeutics:Principles,prospects and challenges,Adv.Drug Deliv.Rev.,59:75-86,2007;Dorsett等人,siRNAs:Applications in functional genomics and potential as therapeutics,Nat.Rev.Drug Discov.,3:318-329,2004。这些包括双链短干扰RNA(siRNA)。

[0151] 1.2.1.1.表达控制区

[0152] 在一个优选的实施方案中,本发明的多聚复合物包含治疗性核酸,它是治疗性构建体,包含与编码区可操作连接的表达控制区。治疗性构建体产生治疗性核酸,其本身可以是治疗性的,或者可以编码治疗性蛋白质。

[0153] 在一些实施方案中,治疗性构建体的表达控制区具有组成型活性。在许多优选的实施方案中,治疗性构建体的表达控制区不具有组成型活性。这提供了治疗性核酸的动态表达。“动态”表达是指随时间变化的表达。动态表达可以包括由可检测表达期分隔的几个这样的低表达期或无表达期。在许多优选的实施方案中,治疗性核酸与可调控的启动子可操作地连接。这提供了治疗性核酸的可调节表达。

[0154] 表达控制区包含调控多核苷酸(本文有时称为元件),例如启动子和增强子,其影响可操作连接的治疗性核酸的表达。

[0155] 本文包括的表达控制元件可以来自细菌、酵母、植物或动物(哺乳动物或非哺乳动物)。表达控制区包括全长启动子序列,例如天然启动子和增强子元件,以及保留全部或部分全长或非变异功能(例如,保留一定量的营养调控或细胞/组织特异性表达)的子序列或

多核苷酸。如本文所用，术语“功能”和其语法变体，当用于指核酸序列、子序列或片段时，意指该序列具有天然核酸序列的一种或多种功能(例如，非变异或未修饰的序列)。如本文所用，术语“变体”意指序列取代、缺失或添加，或其它修饰(例如，化学衍生物，例如对核酸酶具有抗性的修饰形式)。

[0156] 如本文所用，术语“可操作的连接”是指如此描述的组件的物理并置，以允许它们以它们预期的方式起作用。在与核酸可操作连接的表达控制元件的实例中，该关系使得控制元件调节核酸的表达。典型地，调节转录的表达控制区并置在转录核酸的5’末端附近(即，“上游”)。表达控制区也可以位于转录序列的3’末端(即“下游”)或转录物内(例如内含子中)。表达控制元件可以位于距转录序列一定距离处(例如，距核酸100至500个、500至1000个、2000至5000个或更多个核苷酸)。表达控制元件的一个特定实例是启动子，它通常位于转录序列的5’。表达控制元件的另一个实例是增强子，它可以位于转录序列的5’或3’，或位于转录序列内。

[0157] 一些表达控制区赋予可操作连接的治疗性核酸可调控的表达。信号(有时称为刺激)可以增加或减少与这样的表达控制区可操作地连接的治疗性核酸的表达。这种响应信号而增加表达的表达控制区通常被称为诱导型的。这种响应信号而减少表达的表达控制区通常被称为抑制型的。典型地，这些元件赋予的增加或减少的量与存在的信号量成正比；信号量越大，表达的增加或减少就越大。

[0158] 许多可调控的启动子是本领域已知的。优选的诱导型表达控制区包括包含用小分子化合物刺激的诱导型启动子的那些表达控制区。在一个实施方案中，表达控制区对可口服递送但通常不存在于食物中的化学物质有反应。特定的实例可以在例如美国专利No.5,989,910、5,935,934、6,015,709和6,004,941中找到。

[0159] 尤其关注的启动子/增强子序列包括：

[0160]

启动子/增强子序列	描述
CMV	巨细胞病毒即刻早期增强子和启动子
EF1α	人延伸因子(EF)-1α 启动子
CMV/EF1α	CMV 增强子+核心 EF1α 启动子
2 x CMV/ EF1α	2 x CMV 增强子+核心 EF1α 启动子
CAG	CMV 增强子+启动子、鸡 β-肌动蛋白基因的第一外显子和第一内含子+兔 β 球蛋白基因剪接受体
CMV/EF1α/HTLV	CMV 增强子+人延伸因子(EF)-1α 启动子+人 T 细胞白血病病毒 1 型长末端重复序列的 R 区段和 U5 序列部分(R’-U5)

[0161] 在本发明的一些实施方案中，治疗性构建体包含在包含起点、多克隆位点和选择标记的质粒内。在一些实施方案中，小于10kb的质粒是理想的。在一些实施方案中，所用质粒适合于人类患者中的基因疗法和/或被工程化以在哺乳动物组织中进行高水平的短暂基因表达。在优选的实施方案中，质粒选自由以下组成的组：Nanoplasmid™(例如NTC9385质粒、NTC9385R、NTC9385R-RIG-I、NTC9385R(3CpG)、NTC9385R-eRNA41H-CpG、NTC8685质粒

(Nature Technology)、gWIZ质粒(Genlantis)或pVAX1质粒(Thermofisher Scientific)。参见例如美国专利No.US 6,027,722、US 6,287,863、US 6,410,220、US 6,573,091、US 9,012,226、US 9,017,966、US 9,018,012、US 9,109,012、US 9,487,788、US 9,487,789、US 9,506,082、US 9,550,998、US 9,725,725、US 9,737,620、US 9,950,081、US 10,047,365、US 10,144,935和US 10,167,478.在一些实施方案中,质粒已经被"改型"成去除抗生素选择剂和/或增加表达水平。

[0162] 关于进一步讲授,参见WO 2008/020318,其全部内容以引用的方式明确并入本文中。在一个实施方案中,(例如双重)衍生化壳聚糖核酸多聚复合物的核酸是人工核酸。

[0163] 在一个实施方案中,DD-壳聚糖核酸多聚复合物的核酸是治疗性核酸。在一个实施方案中,治疗性核酸是治疗性RNA。优选的治疗性RNA包括但不限于反义RNA、siRNA、短发夹RNA、微小RNA和酶催化RNA。

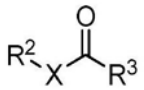
[0164] 在一些实施方案中,治疗性核酸为DNA。

[0165] 在一个实施方案中,治疗性核酸包含编码治疗性蛋白质的核酸序列。

[0166] 1.3.多元醇

[0167] 壳聚糖衍生物纳米颗粒可以用多元醇官能化。可用于本发明的多元醇通常是亲水的。在一些情况下,壳聚糖衍生物纳米颗粒用如氨基的阳离子组分和用多元醇官能化。这种用如氨基的阳离子部分和多元醇官能化的壳聚糖衍生物纳米颗粒被称为"双重衍生化壳聚糖纳米颗粒"。

[0168] 在一些实施方案中,壳聚糖衍生物纳米颗粒包含式II的多元醇:

[0169] 

II

[0170] 其中:

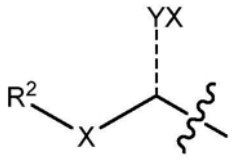
[0171] R^2选自:H和羟基;

[0172] R^3选自:H和羟基;并且

[0173] X选自:任选地经一个或多个羟基取代基取代的C_2-C_6亚烷基。

[0174] 在一些实施方案中,壳聚糖衍生物纳米颗粒用式II的多元醇官能化,其中R^2选自:H和羟基;R^3选自:H和羟基;并且X选自:任选地经一个或多个羟基取代基取代的C_2-C_6亚烷基。

[0175] 在一些实施方案中,壳聚糖衍生物纳米颗粒包含式III的多元醇:

[0176] 

III

[0177] 其中:

[0178] -----Y为=O或-H_2;

[0179] R^2选自:H和羟基;

[0180] R^3选自:H和羟基;

[0181] X选自:任选地经一个或多个羟基取代基取代的C_2-C_6亚烷基;并且

[0182]  表示多元醇与衍生化壳聚糖之间的键。

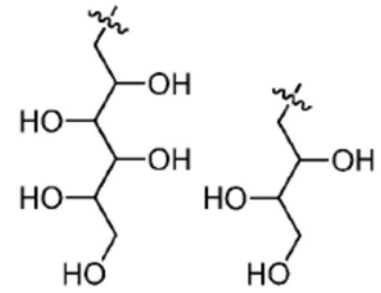
[0183] 在一个实施方案中,根据本发明的具有3至7个碳的多元醇可以具有一个或多个碳-碳多重键。在一个优选的实施方案中,根据本发明的多元醇包含羧基。在进一步优选的实施方案中,根据本发明的多元醇包含醛基。熟练技术人员将认识到,当根据本发明的多元醇包含醛基时,这种多元醇涵盖开链构象(醛)和环状构象(半缩醛)。

[0184] 多元醇的非限制性实例包括葡糖酸、苏糖酸、葡萄糖和苏糖。可能具有羧基和/或醛基或可以是其糖或酸形式的其它这类多元醇的实例在美国专利No.10,046,066中更详细地描述,其公开内容以引用的方式明确并入本文中。熟练技术人员将认识到多元醇不限于特定的立体化学。

[0185] 在一个优选的实施方案中,多元醇可以选自由以下组成的组:2,3-二羟基丙酸;2,3,4,5,6,7-六羟基庚醛;2,3,4,5,6-五羟基己醛;2,3,4,5-四羟基己醛;以及2,3-二羟基丙醛。

[0186] 在一个优选的实施方案中,多元醇可以选自由以下组成的组:D-甘油酸、L-甘油酸、L-甘油基-D-甘露庚糖、D-甘油基-L-甘露庚糖、D-葡萄糖、L-葡萄糖、D-岩藻糖、L-岩藻糖、D-甘油醛和L-甘油醛。

[0187] 在一些实施方案中,多元醇可以是式IV或式V的化合物:

[0188] 

(IV) (V)

[0189] 在一个优选的实施方案中,多元醇是式IV的化合物。在一些情况下,式IV的多元醇已通过还原胺化与壳聚糖偶联。

[0190] 具有羧基的亲水性多元醇可以与壳聚糖或阳离子官能化的壳聚糖,如胺官能化的壳聚糖(例如,Arg偶联的壳聚糖(Arg-壳聚糖))偶联。在一些实施方案中,多元醇在6.0±0.3的反应pH值下偶联。在此pH值下,亲水性多元醇的羧酸基团可能会根据亲核取代反应机制受到壳聚糖骨架上未偶联的胺的攻击。

[0191] 本领域的技术人员将认识到,当这类亲水性多元醇与Arg-壳聚糖偶联时,少量亲水性多元醇还可能与Arg的胺基通过相同的机制形成共价键,不过很可能将主要在壳聚糖骨架的胺基发生亲核取代反应。

[0192] 作为天然糖类的亲水性多元醇可以使用还原胺化,随后用$NaCBH_3$或NaBH还原而与壳聚糖,阳离子官能化的壳聚糖,如胺官能化的壳聚糖(例如,Arg偶联的壳聚糖(Arg-壳聚

糖))偶联。

[0193] 1.4.聚合物:多聚复合物组合物

[0194] 壳聚糖多聚复合物可以与多种聚合物混合,所述聚合物包含亲水性不带电部分和带负电荷的(阴离子)部分。如上所述,壳聚糖多聚复合物被配制成在没有含阴离子部分的聚合物下或与含阴离子部分的聚合物复合之前具有正电荷。因此在合适的条件下,聚合物组分将与壳聚糖衍生物核酸多聚复合物形成可逆的电荷:电荷复合物。在一些实施方案中,聚合物组分的聚合物是未支化的。在一些实施方案中,聚合物是支化的。在一些情况下,聚合物组分包含支化和未支化聚合物的混合物。

[0195] 在一些实施方案中,聚合物组分在施用后、在进入细胞后和/或在内吞后从壳聚糖多聚复合物释放。不希望受理论束缚,假设通过将多聚复合物和含有阴离子部分的聚合物复合而形成的多聚复合物:聚合物组合物可以提供提高的体外、溶液和/或体内稳定性,而不会显著影响转染效率。在一些实施方案中,与例如没有聚合物组分的其它方面相同的多聚复合物相比,由此形成的多聚复合物:聚合物组合物可提供降低的粘膜粘附特性。

[0196] 在一个优选的实施方案中,多聚复合物:聚合物组合物在生理pH值下具有低的净正ζ电位、中性ζ电位或净负ζ电位(约+10mV至约-20mV)。这类组合物在生理条件下可减少聚集,并减少与体内普遍存在的阴离子组分的非特异性结合。所述特性可增强这类组合物的迁移(例如,增强的粘液扩散)以接触细胞并且使核酸的细胞内释放增强。

[0197] 在一个优选的实施方案中,多聚复合物:聚合物颗粒组合物的平均流体动力学直径小于1000nm,更优选小于500nm并且最优选小于200nm。在某些实施方案中,多聚复合物:聚合物颗粒组合物的平均流体动力学直径为50nm到至多1000nm,优选50nm到至多500nm并且最优选50nm到至多200nm。在某些实施方案中,多聚复合物:聚合物颗粒组合物的平均流体动力学直径为50nm到至多175nm,优选50nm到至多150nm。在某些实施方案中,多聚复合物:聚合物颗粒组合物的平均流体动力学直径为75nm到至多1000nm,优选75nm到至多500nm并且最优选75nm到至多200nm。在某些实施方案中,多聚复合物:聚合物颗粒组合物的平均流体动力学直径为75nm到至多175nm,优选75nm到至多150nm。在某些实施方案中,多聚复合物:聚合物颗粒组合物的平均流体动力学直径大于100nm并且小于175nm。

[0198] 在一个实施方案中,多聚复合物:聚合物组合物具有80%、至少80%或优选90%,更优选至少90%的超螺旋DNA含量%。

[0199] 在一个实施方案中,多聚复合物:聚合物组合物在生理pH值下的平均ζ电位介于+10mV至-10mV之间,在生理pH值下最优选介于+5mV至-5mV之间。

[0200] 就粒度而言,多聚复合物:聚合物组合物优选是均质的。因此,在一个优选的实施方案中,组合物具有低平均多分散性指数(“PDI”)。在一个特别优选的实施方案中,多聚复合物:聚合物组合物的分散液的PDI小于0.5,更优选小于0.4,更优选小于0.3,还更优选小于0.25,并且最优选小于0.2。

[0201] 在一些情况下,多聚复合物:聚合物组合物的分散液在一个或多个冻融循环后表现出上述PDI、平均ζ电位、超螺旋DNA%或平均粒度(nm)或尺寸范围中的一种或多种。在一些情况下,多聚复合物:聚合物组合物的分散液在4℃下在溶液中存储至少48小时后表现出上述PDI、平均ζ电位、超螺旋DNA%或平均粒度(nm)或尺寸范围中的一种或多种。在一些情况下,多聚复合物:聚合物组合物的分散液在4℃下在溶液中存储至少1周或2周后表现出上

述PDI、平均ζ电位、超螺旋DNA％或平均粒度(nm)或尺寸范围中的一种或多种。

[0202] 在一些情况下，多聚复合物:聚合物组合物的分散液在冻干和再水合后表现出上述PDI、平均ζ电位、超螺旋DNA％或平均粒度(nm)或尺寸范围中的一种或多种。在一些情况下，多聚复合物:聚合物组合物的分散液在喷雾干燥和再水合后表现出上述PDI、平均ζ电位、超螺旋DNA％或平均粒度(nm)或尺寸范围中的一种或多种。在一些情况下，多聚复合物:聚合物组合物的分散液当浓缩(例如通过超滤，如切向流过滤)到至少250μg/mL的核酸浓度时表现出上述PDI、平均ζ电位、超螺旋DNA％或平均粒度(nm)或尺寸范围中的一种或多种。在一些情况下，多聚复合物:聚合物组合物的分散液当浓缩至125μg/mL至约1,000μg/mL的核酸浓度时表现出上述PDI、平均ζ电位、超螺旋DNA％或平均粒度(nm)或尺寸范围中的一种或多种。在一些情况下，多聚复合物:聚合物组合物的分散液当浓缩至125μg/mL至约25,000μg/mL的核酸浓度时表现出上述PDI、平均ζ电位、超螺旋DNA％或平均粒度(nm)或尺寸范围中的一种或多种。在一些情况下，多聚复合物:聚合物组合物的分散液当浓缩至125μg/mL至约2,000μg/mL的核酸浓度时表现出上述PDI、平均ζ电位、超螺旋DNA％或平均粒度(nm)或尺寸范围中的一种或多种。在一些情况下，多聚复合物:聚合物组合物的分散液当浓缩至125μg/mL至约5,000μg/mL的核酸浓度时表现出上述PDI、平均ζ电位、超螺旋DNA％或平均粒度(nm)或尺寸范围中的一种或多种。在一些情况下，多聚复合物:聚合物组合物的分散液当浓缩至125μg/mL至约10,000μg/mL的核酸浓度时表现出上述PDI、平均ζ电位、超螺旋DNA％或平均粒度(nm)或尺寸范围中的一种或多种。

[0203] 一般来说，如通过PDI或平均粒度所测量，即使在没有如冻干保护剂、冷冻保护剂、表面活性剂、再水合剂或润湿剂等赋形剂的情况下，本文所述的多聚复合物:聚合物组合物也表现出有利的溶液行为(例如，稳定性和/或无聚集)。在一些情况下，如通过PDI或平均粒度所测量，在生理液体或模拟生理液体中，本文所述的多聚复合物:聚合物组合物表现出有利的溶液行为(例如，稳定性和/或无聚集)。例如，在一些实施方案中，本文所述的多聚复合物:聚合物组合物在模拟肠液中、在哺乳动物尿液中及/或当在哺乳动物膀胱中存储(例如，并且与尿液接触)时是稳定的。

[0204] 如上所述，本文所述的多聚复合物:聚合物组合物优选在组合物中基本上尺寸稳定。在一个优选的实施方案中，本发明的组合物包含在室温下6小时，更优选12小时，更优选24小时，并且最优选48小时平均直径增加小于100％，更优选小于50％，并且最优选小于25％的多聚复合物:聚合物颗粒。在一个特别优选的实施方案中，本发明的组合物包含在室温下至少24小时或至少48小时平均直径增加小于25％的多聚复合物:聚合物颗粒。

[0205] 主题组合物的多聚复合物:聚合物颗粒优选在冷却条件下基本上尺寸稳定。在一个优选的实施方案中，本发明的组合物包含在2-8℃下6小时，更优选12小时，更优选24小时，并且最优选48小时平均直径增加小于100％，更优选小于50％，并且最优选小于25％的多聚复合物:聚合物颗粒。

[0206] 主题组合物的多聚复合物:聚合物颗粒优选在冻融条件下基本上尺寸稳定。在一个优选的实施方案中，本发明的组合物包含在-20至-80℃下6小时，更优选12小时，更优选24小时，并且最优选48小时平均直径增加小于100％，更优选小于50％，并且最优选小于25％的多聚复合物。

[0207] 在一个优选的实施方案中，组合物具有大于0.5mg/ml的核酸浓度，并且基本上不

含沉淀的多聚复合物。更优选地，组合物具有至少0.6mg/ml，更优选至少0.75mg/ml，更优选至少1.0mg/ml，更优选至少1.2mg/ml，并且最优选至少1.5mg/ml的核酸浓度，并且基本上不含沉淀的多聚复合物。在另一个优选的实施方案中，组合物具有大于2mg/ml的核酸浓度，并且基本上不含沉淀的多聚复合物。更优选地，组合物具有至少2.5mg/ml，更优选至少5mg/ml，更优选至少10mg/ml，更优选至少15mg/ml，并且最优选约25mg/ml的核酸浓度，并且基本上不含沉淀的多聚复合物。在一些实施方案中，组合物具有0.5mg/mL至约25mg/mL的核酸浓度，并且基本上不含沉淀的多聚复合物。在一些实施方案中，组合物具有≤约25mg/mL的核酸浓度，并且基本上不含沉淀的多聚复合物。组合物可以水合。在一个优选的实施方案中，组合物基本上不含未复合的核酸。

[0208] 在一个优选的实施方案中，多聚复合物:聚合物粒子组合物是等渗的。在配制药物组合物时非常希望在保持多聚复合物稳定性的同时实现等渗性，并且这些优选的组合物非常适合药物配制和治疗应用。

[0209] 在某些实施方案中，多聚复合物:聚合物颗粒组合物可以未包衣以通过降低pH值来释放全部或部分例如PEG聚合物包衣。在某些实施方案中，通过在低于聚合物的聚阴离子锚定区的pKa的pH条件下孵育颗粒来释放聚合物包衣。例如，在聚合物包衣是聚谷氨酸的情况下，可以通过在低于聚谷氨酸的pKa的pH值(例如小于约4.25的pH值)下孵育颗粒来释放聚合物包衣。在某些实施方案中，可以通过在比聚合物包衣的聚阴离子锚定区的pKa低至少0.25个pH单位或至少0.5个pH单位的pH条件下孵育颗粒来释放聚合物包衣。

[0210] 在某些实施方案中，多聚复合物:聚合物颗粒组合物可以未包衣以通过使颗粒经受高离子强度来释放全部或部分例如PEG聚合物包衣。

[0211] 不希望受理论束缚，假设某些生理条件可以促进本文所述的可逆聚乙二醇化壳聚糖DNA多聚复合物的部分(例如>5％)、大部分(>50％)、广泛(例如>90％)或完全(100％)未包衣。例如，某些亚细胞区室(例如，内体、早期内体、晚期内体或溶酶体)中的低pH条件可以促进聚合物包衣的释放。作为另一个实例，某些细胞外条件可以促进本文所述的可逆聚乙二醇化壳聚糖DNA多聚复合物的部分(例如>5％)、大部分(>50％)、广泛(>90％)或完全(100％)未包衣。在一些情况下，高离子强度和/或消化道中某些位置典型遇到的酸性pH条件可以促进本文所述的可逆聚乙二醇化壳聚糖DNA多聚复合物的部分(例如>5％)、大部分(>50％)、广泛(>90％)或完全(100％)未包衣。

[0212] 在某些实施方案中，本文所述的聚乙二醇化多聚复合物被配制用于递送至细胞、组织或身体区室(例如肠、小肠、大肠、结肠、肺或膀胱)，使得多聚复合物保持聚乙二醇化，从而促进转染靶细胞。在一些实施方案中，本文所述的聚乙二醇化多聚复合物在进入细胞内环境之后或期间部分(例如>5％)、大部分(>50％)、广泛(例如>90％)或完全(100％)释放聚合物包衣。在某些实施方案中，本文所述的聚乙二醇化多聚复合物被配制用于递送至细胞、组织或身体区室(例如肠、小肠、大肠、结肠、肺或膀胱)，使得本文所述的聚乙二醇化多聚复合物在递送至细胞、组织或身体区室(例如肠、小肠、大肠、结肠、肺或膀胱)之后部分(例如>5％)、大部分(>50％)、广泛(例如>90％)或完全(100％)释放聚合物包衣。

[0213] 应理解，可以调节聚合物的阴离子锚定区的阴离子电荷密度和/或pKa以在预期条件下促进或抑制释放。类似地，应理解，可以调节制剂的pH值、体积和离子强度以及其它条件以促进或抑制在预期条件下的释放。例如，为了通过低pH值的胃环境递送至肠道，聚乙二

醇化多聚复合物制剂可以包肠衣和/或在缓冲剂中递送以增加胃环境的pH值。优化的可逆聚乙二醇化颗粒组合物可以通过使用本文描述的测定法测定稳定性和转染效率来鉴定。

[0214] 包含与含阴离子部分的聚合物复合的壳聚糖多聚复合物的组合物可以通过(例如双重)衍生化壳聚糖多聚复合物的阳离子官能团(+)与聚合物的阴离子部分(-)的比率(称为“(+):(-)摩尔比率”)来表征。该(+):(-)摩尔比率可以在大于约1:100至小于约10:1之间变化。

[0215] 在某些实施方案中,(+):(-)摩尔比率可以为大于约1:75至小于约8:1。在一些情况下,(+):(-)摩尔比率可以为大于1:10至小于10:1。在一些情况下,(+):(-)摩尔比率可以为或为约1:10至或至约10:1。在一些情况下,(+):(-)摩尔比率可以为或为约1:8至或至约8:1。在某些实施方案中,(+):(-)摩尔比率可以为大于1:50至小于约10:1。在一些情况下,(+):(-)摩尔比率可以为大于1:25至小于约10:1。在一些情况下,(+):(-)摩尔比率可以为大于1:10至小于约7:1。在一些情况下,(+):(-)摩尔比率可以为大于1:8至小于约7:1。在一些情况下,(+):(-)摩尔比率可以为大于1:8至小于约6:1。

[0216] 在某些实施方案中,在(例如双重)衍生化壳聚糖多聚复合物的阳离子官能团是氨基部分的情况下,包含与含阴离子部分的聚合物复合的壳聚糖多聚复合物的组合物可以通过(例如双重)衍生化壳聚糖多聚复合物的氨基(N)与聚合物的阴离子(A)部分的比率(称为“N:A摩尔比率”)来表征。该N:A摩尔比率可以在大于约1:100至小于约10:1之间变化。

[0217] 在某些实施方案中,N:A摩尔比率可以为大于约1:75至小于约8:1。在一些情况下,N:A摩尔比率可以为大于1:10至小于10:1。在一些情况下,N:A摩尔比率可以为或为约1:10至或至约10:1。在一些情况下,N:A摩尔比率可以为或为约1:8至或至约8:1。在某些实施方案中,N:A摩尔比率可以为大于1:50至小于约10:1。在一些情况下,N:A摩尔比率可以为大于1:25至小于约10:1。在一些情况下,N:A摩尔比率可以为大于1:10至小于约7:1。在一些情况下,N:A摩尔比率可以为大于1:8至小于约7:1。在一些情况下,N:A摩尔比率可以为大于1:8至小于约6:1。

[0218] 另外或可替代地,包含与含阴离子部分的聚合物复合的壳聚糖多聚复合物的组合物可以通过(例如双重)衍生化壳聚糖多聚复合物的阳离子官能团(+)与核酸的磷原子(P)与聚合物的阴离子部分(-)的三组分比率(称为“(+):P:(-)摩尔比率”)来表征。

[0219] 在某些实施方案中,在(+):P为至少2:1到至多20:1的情况下,(+):(-)的摩尔比率可以在至少1:40至约40:1之间变化。在某些实施方案中,在(+):P为至少2:1到至多20:1的情况下,(+):(-)的摩尔比率可以在至少1:40至约1:10之间变化。在一些实施方案中,在(+):P为至少2:1到至多20:1的情况下,(+):(-)的摩尔比率可以在至少1:25至约25:1之间变化。在一些实施方案中,在(+):P为至少2:1到至多20:1的情况下,(+):(-)的摩尔比率可以在至少1:25至约1:10之间变化。在一些情况下,在(+):P为至少2:1到至多20:1的情况下,(+):(-)的摩尔比率可以在至少1:20至约20:1之间变化。在一些情况下,在(+):P为至少2:1到至多20:1的情况下,(+):(-)的摩尔比率可以在至少1:20至约1:10之间变化。在一些情况下,在(+):P为至少2:1到至多20:1的情况下,(+):(-)的摩尔比率可以在至少1:10至约10:1之间变化。在一些情况下,在(+):P为至少2:1到至多20:1的情况下,(+):(-)的摩尔比率可以在至少1:25至约2:1之间变化。在一些情况下,在(+):P为至少2:1到至多20:1的情况下,(+):(-)的摩尔比率可以在至少1:20至约1:1之间变化。

[0220] 在某些优选的实施方案中，(+):P:(-)为3:1:3.5至3:1:17.5。在某些优选的实施方案中，(+):P:(-)为5:1:3.5至5:1:17.5。在某些优选的实施方案中，(+):P:(-)为7:1:3.5至7:1:17.5。在某些优选的实施方案中，(+):P:(-)为约3:1:3.5、3:1:7、3:1:10、3:1:15、3:1:17.5或3:1:20。在某些优选的实施方案中，(+):P:(-)为约5:1:3.5、5:1:7、5:1:10、5:1:15、5:1:17.5或5:1:20。在某些优选的实施方案中，(+):P:(-)为约7:1:3.5、7:1:7、7:1:10、7:1:15、7:1:17.5或7:1:20。在某些优选的实施方案中，(+):P:(-)为约10:1:10、10:1:15、10:1:20、10:1:25、10:1:30或10:1:40。

[0221] 本领域技术人员将理解，与含阴离子部分的聚合物复合的氨基官能化的壳聚糖多聚复合物颗粒可以通过(例如双重)衍生化壳聚糖多聚复合物的氨基官能团(N)与核酸的磷原子(P)与聚合物的阴离子部分(A)的三组分比率(称为“N:P:A摩尔比率”)来表征。在某些实施方案中，在N:P为至少2:1到至多20:1的情况下，P:A的摩尔比率可以在至少1:40至约40:1之间变化。

[0222] 在某些实施方案中，在N:P为至少2:1到至多20:1的情况下，P:A的摩尔比率可以在至少1:40至约1:10之间变化。在某些实施方案中，在N:P为至少2:1到至多20:1的情况下，P:A的摩尔比率可以在至少1:25至约25:1之间变化。在某些实施方案中，在N:P为至少2:1到至多20:1的情况下，P:A的摩尔比率可以在至少1:25至约1:10之间变化。在一些情况下，在N:P为至少2:1到至多20:1的情况下，P:A的摩尔比率可以在至少1:20至约20:1之间变化。在一些情况下，在N:P为至少2:1到至多20:1的情况下，P:A的摩尔比率可以在至少1:20至约1:10之间变化。在一些情况下，在N:P为至少2:1到至多20:1的情况下，P:A的摩尔比率可以在至少1:10至约10:1之间变化。在一些情况下，在N:P为至少2:1到至多20:1的情况下，P:A的摩尔比率可以在至少1:25至约2:1之间变化。在一些情况下，在N:P为至少2:1到至多20:1的情况下，P:A的摩尔比率可以在至少1:20至约1:1之间变化。

[0223] 在某些优选的实施方案中，N:P:A为3:1:3.5至3:1:17.5。在某些优选的实施方案中，N:P:A为5:1:3.5至5:1:17.5。在某些优选的实施方案中，N:P:A为7:1:3.5至7:1:17.5。在某些优选的实施方案中，N:P:A为10:1:10至10:1:40。在某些优选的实施方案中，N:P:A为约3:1:3.5、3:1:7、3:1:10、3:1:15、3:1:17.5或3:1:20。在某些优选的实施方案中，N:P:A为约5:1:3.5、5:1:7、5:1:10、5:1:15、5:1:17.5或5:1:20。在某些优选的实施方案中，N:P:A为约7:1:3.5、7:1:7、7:1:10、7:1:15、7:1:17.5或7:1:20。在某些实施方案中，N:P:A为约10:1:10、10:1:15、10:1:20、10:1:25、10:1:30或10:1:40。

[0224] 1.4.1.亲水性不带电部分

[0225] 聚合物的亲水性不带电部分可以是或包含聚亚烷基多元醇或聚亚烷基氧基多元醇部分或它们的组合。聚合物的亲水性不带电部分可以是或包含聚亚烷基二醇或聚亚烷基氧基二醇部分。在某些实施方案中，聚亚烷基二醇部分是或包含聚乙二醇部分和/或单甲氧基聚乙二醇部分。在某些优选的实施方案中，聚合物的不带电部分是或包含聚乙二醇。聚合物的亲水性不带电部分可以是或包含其它生物相容性聚合物，例如聚乳酸。

[0226] 除了PEG之外，本领域已知几种亲水性不带电实体。例如参见：Lowe等人，Antibiofouling polymer interfaces:poly(ethyleneglycol)and other promising candidates,Polym.Chem.,6,198-212,2015；和Knop等人,Poly(ethylene glycol)in Drug Delivery:Pros and Cons as Well as Potential Alternatives.Angewandte Chemie国

际版,49(36),6288-6308,2010。聚合物的亲水性不带电部分的实例为但不限于:聚(丙三醇)、聚(2-甲基丙烯酰氧基乙基磷酰胆碱)、聚(磺基甜菜碱甲基丙烯酸酯)和聚(羧基甜菜碱甲基丙烯酸酯)、聚(2-甲基-2-恶唑啉)、聚(2-乙基-2-恶唑啉)和聚(乙烯基吡咯烷酮)。

[0227] 亲水性部分可具有约500Da至约50,000Da的重量平均分子量。在一些实施方案中,亲水性部分具有约1,000Da至约10,000Da的重量平均分子量。在某些实施方案中,亲水性部分具有约1,500Da至约7,500Da的重量平均分子量。在某些实施方案中,亲水性部分具有约3,000Da至约5,000Da的重量平均分子量。在一些情况下,亲水性部分具有5,000Da或约5,000Da的重量平均分子量。

[0228] 1.4.2.阴离子聚合物部分

[0229] 聚合物的阴离子聚合物部分可以包含多个在生理pH下带负电荷的官能团。多种阴离子聚合物适用于本文所述的方法和组合物,条件是这类阴离子聚合物可以作为具有亲水性不带电聚合物部分的聚合物的组分提供并且能够与带正电荷的(例如双重)衍生化壳聚糖-核酸纳米颗粒形成(例如,可逆)电荷:电荷复合物。

[0230] 示例性阴离子聚合物包括但不限于在生理pH下具有净负电荷的多肽。在一些情况下,多肽或其一部分由在生理pH下具有带负电荷的侧链的氨基酸组成。例如,聚合物的阴离子聚合物部分可以是聚谷氨酸多肽、聚天冬氨酸多肽或它们的混合物。额外的氨基酸或其模拟物可以掺入聚阴离子多肽中。例如,可以掺入甘氨酸和/或丝氨酸以增加灵活性或减少二级结构。

[0231] 在一些情况下,阴离子聚合物可以是或包含阴离子碳水化合物聚合物。示例性阴离子碳水化合物聚合物包括但不限于在生理pH下带负电荷的糖胺聚糖。示例性阴离子糖胺聚糖包括但不限于硫酸软骨素、硫酸皮肤素、硫酸角蛋白、肝素、硫酸肝素、透明质酸或它们的组合。在某些实施方案中,聚合物的阴离子聚合物部分是或包含透明质酸。

[0232] 另外的或替代的阴离子碳水化合物聚合物可以包括包含硫酸葡聚糖的聚合物。

[0233] 在一些情况下,聚阴离子部分是或包含选自由以下组成的组的聚阴离子:聚甲基丙烯酸和其盐、聚丙烯酸和其盐、甲基丙烯酸和其盐的共聚物以及丙烯酸和/或甲基丙烯酸和其盐的共聚物,例如聚氧化烯、聚丙烯酸共聚物。

[0234] 在一些情况下,聚阴离子部分是或包含选自由以下组成的组的聚阴离子:海藻酸盐、角叉菜胶、红藻胶、果胶、黄原胶、透明质酸、肝素、硫酸乙酰肝素、硫酸软骨素、纤维素、氧化纤维素、羧甲基纤维素、交联羧甲纤维素、含有侧羧基、磷酸基或硫酸基的合成聚合物和共聚物、主要带负电荷的聚氨基酸和生物相容性多酚材料。

[0235] 聚合物的阴离子部分可以具有约500Da至约5,000Da的重量平均分子量。在一些实施方案中,阴离子部分具有约500Da至约3,000Da的重量平均分子量。在某些实施方案中,阴离子部分具有约500Da至约2,500Da的重量平均分子量。在某些实施方案中,阴离子部分具有约500Da至约2,000Da的重量平均分子量。在某些实施方案中,阴离子部分具有约500Da至约1,500Da的重量平均分子量。在一些实施方案中,阴离子部分具有约1,000Da至约5,000Da的重量平均分子量。在一些实施方案中,阴离子部分具有约1,000Da至约3,000Da的重量平均分子量。在某些实施方案中,阴离子部分具有约1,000Da至约2,500Da的重量平均分子量。在某些实施方案中,阴离子部分具有约1,000Da至约2,000Da的重量平均分子量。在一些情况下,阴离子部分的重量平均分子量为或为约1,500Da。

[0236] 如本文所用，“嵌段共聚物(block copolymer)”、“嵌段共聚物(block copolymer)”等是指含有不同均聚物区域的共聚物。二嵌段共聚物含有两个不同的均聚物区域。三嵌段共聚物含有三个不同的均聚物区域。三个不同的区域可以各自不同(例如，AAAA-BBBB-CCCC)，或者两个区域可以相同(例如，AAAA-BBBB-AAAA)，相似(例如，AAAA-BBBB-AAA)，其中“A”、“B”和“C”代表形成所构成的共聚物的不同单体亚基。例如，“A”可以代表聚乙二醇均聚物的乙二醇单体亚基，而B可以代表聚谷氨酸均聚物的谷氨酸亚基。嵌段共聚物可以是线性(例如，二或三)嵌段共聚物。用于本发明的线性二嵌段和三嵌段共聚物的示例性实施方案包括以下非穷尽性列表中所列的那些：

PEG-聚谷氨酸 **甲氧基-聚(乙二醇)-嵌段-聚(L-谷氨酸)** **mPEG*K-b-PLE##**
mPEG1K-b-PLE10
mPEG1K-b-PLE50
mPEG1K-b-PLE100
mPEG1K-b-PLE200
mPEG5K-b-PLE10
mPEG5K-b-PLE50
mPEG5K-b-PLE100
mPEG5K-b-PLE200
mPEG10K-b-PLE10
mPEG10K-b-PLE50
mPEG10K-b-PLE100
mPEG10K-b-PLE200
mPEG20K-b-PLE10
mPEG20K-b-PLE50
mPEG20K-b-PLE100
mPEG20K-b-PLE200
PEG-聚天冬氨酸 **甲氧基-聚(乙二醇)-嵌段-聚(L-天冬氨酸)** **mPEG*K-b-PLD##**
mPEG1K-b-PLD10
mPEG1K-b-PLD50
mPEG1K-b-PLD100
mPEG1K-b-PLD200
mPEG5K-b-PLD10
mPEG5K-b-PLD50
mPEG5K-b-PLD100
mPEG5K-b-PLD200
mPEG20K-b-PLD10
mPEG20K-b-PLD50
mPEG20K-b-PLD100
mPEG20K-b-PLD200
PGA-PEG-PGA **聚(L-谷氨酸)-嵌段-聚(乙二醇)-嵌段-聚(L-谷氨酸)** **PLE##-b-PEG*K-b-PLE##**
PLE10-b-PEG1K-b-PLE10
PLE50-b-PEG1K-b-PLE50
PLE100-b-PEG1K-b-PLE100
PLE10-b-PEG5K-b-PLE10

[0237]

PLE50-b-PEG5K-b-PLE50
PLE100-b-PEG5K-b-PLE100
聚天冬氨酸-PEG-聚天冬氨酸 **聚(L-天冬氨酸)-嵌段-聚(乙二醇)-嵌段-聚(L-天冬氨酸)** **PLD##-b-PEG*K-b-PLD##**
PLD10-b-PEG1K-b-PLD10
PLD50-b-PEG1K-b-PLD50
PLD100-b-PEG1K-b-PLD100
PLD10-b-PEG5K-b-PLD10
PLD50-b-PEG5K-b-PLD50
PLD100-b-PEG5K-b-PLD100
PEG-聚谷氨酸-PEG **甲氧基-聚(乙二醇)-嵌段-聚(L-谷氨酸)-嵌段-聚(乙二醇)** **PEG*K-b-PGA##-b-PEG*K**
PEG1K-b-PGA10-b-PEG1K
PEG1K-b-PGA50-b-PEG1K
PEG1K-b-PGA100-b-PEG1K
PEG5K-b-PGA10-b-PEG5K
PEG5K-b-PGA50-b-PEG5K
PEG5K-b-PGA100-b-PEG5K
PEG-聚天冬氨酸-PEG **甲氧基-聚(乙二醇)-嵌段-聚(L-天冬氨酸)-嵌段-聚(乙二醇)** **PEG*K-b-PLD##-b-PEG*K**
PEG1K-b-PLD10-b-PEG1K
PEG1K-b-PLD50-b-PEG1K
PEG1K-b-PLD100-b-PEG1K
PEG5K-b-PLD10-b-PEG5K
PEG5K-b-PLD50-b-PEG5K
PEG5K-b-PLD100-b-PEG5K

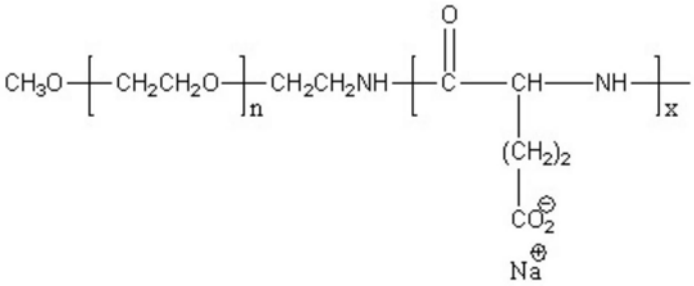
[0238]

[0239] *K:PEG的分子量(kDa)

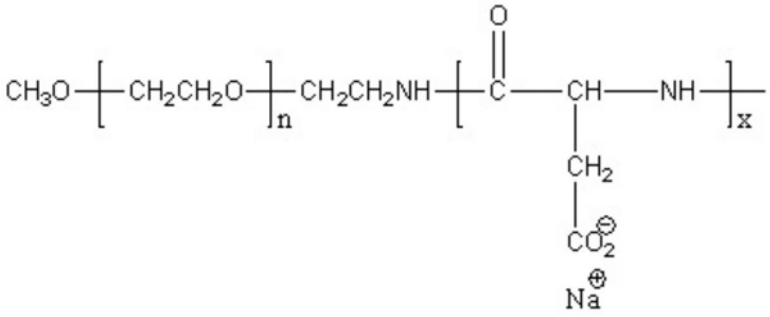
[0240] ##亚基数目

[0241] 在一个实施方案中,嵌段共聚物是或包含具有以下结构的PEG-聚谷氨酸聚合物:

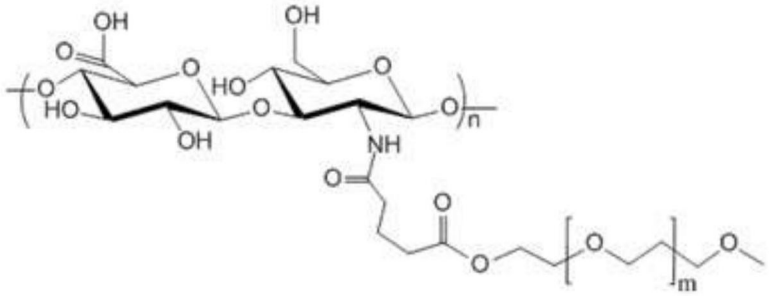
[0242]



[0243] 在一个实施方案中,嵌段共聚物是或包含具有以下结构的PEG-聚天冬氨酸聚合物:

[0244] 

[0245] 在一个实施方案中,嵌段共聚物是或包含具有以下结构的PEG-透明质酸聚合物:

[0246] 

[0247] 1.5.替代阳离子聚合物和脂质

[0248] 本发明的核酸多聚复合物用以加强和保护核苷酸避免酶促降解。除壳聚糖和其衍生物以外,也适宜用于达成这个目的的替代材料包括其它带正电荷(即阳离子)聚合物和/或脂质。

[0249] 可用于与本公开的治疗性核酸构建体形成多聚复合物的阳离子聚合物的实例包括多胺;聚合有机胺(例如聚乙烯亚胺(PEI)、聚乙烯亚胺纤维素和它们的衍生物);聚(酰胺-胺)(PAMAM和其衍生物);聚氨基酸(例如聚赖氨酸(PLL)、聚精氨酸和它们的衍生物);多糖(例如纤维素、葡聚糖、DEAE葡聚糖、淀粉);精胺、亚精胺、聚(乙烯基苄基三烷基铵)、聚(4-乙烯基-N-烷基-吡啶鎓)、聚(丙烯酰基-三烷基铵)和Tat蛋白质。参见例如Samal等人,Cationic polymers and their therapeutic potential,Chem Soc Rev.41:7147-94(2012)

[0250] 带正电荷的脂质的实例包括磷脂酸与氨基醇的酯,例如二棕榈酰基磷脂酸或二硬脂酰基磷脂酸与羟基乙二胺的酯。带正电的脂质的更具体实例包括3β-[N--(N',N'-二甲基氨基乙基)氨甲酰基)胆固醇(DC-chol);N,N'-二甲基-N,N'-二辛酰基溴化铵(DDAB);N,N'-二甲基-N,N'-二辛酰基氯化铵(DDAC);1,2-二油氧基丙基-3-二甲基-羟基乙基氯化铵(DORI);1,2-二油氧基-3-[三甲基铵基]-丙烷(DOTAP);N-(1-(2,3-二油氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTMA);二棕榈酰基磷脂酰胆碱(DPPC);1,2-双十八烷酰氧基-3-[三甲基铵基]-丙烷(DSTAP);以及例如Martin等人,Current Pharmaceutical Design 2005,11,375-394中所述的阳离子脂质。

[0251] 还可以使用呈任何浓度和任何比率的脂质与聚合物的掺合物。使用各种级别以不同比率掺合不同聚合物类型可产生从每一种构成聚合物引入的特征。也可以采用各种末端基团。

[0252] 1.6.制备方法

[0253] 如上所述,本领域技术人员将理解,本发明的多聚复合物:聚合物颗粒可以通过多

种方法产生。例如,可以生成多聚复合物颗粒,然后与聚合物接触。在一个示例性非限制性实施方案中,通过提供官能化壳聚糖和核苷酸原料并进行组合来制备多聚复合物颗粒。可以调整原料浓度以适应各种氨基与磷酸酯的比率(N/P)、混合比率和目标核苷酸浓度。在一些实施方案中,特别是小批量,例如2mL以下的批量,官能化壳聚糖和核苷酸原料可以通过在涡旋容器的同时将核苷酸原料缓慢滴入官能化壳聚糖原料中来混合。在其它实施方案中,可以通过管线中混合两种流体流来混合官能化壳聚糖和核苷酸原料。在其它实施方案中,所得到的多聚复合物分散液可以通过本领域已知的方式,例如超滤(例如,切向流过滤(TFF))或溶剂蒸发(例如,冻干或喷雾干燥)浓缩。以引用的方式整体明确地并入本文的WO 2009/039657中公开了一种优选的形成多聚复合物的方法。

[0254] 类似地,可以提供(例如,从上述反应混合物中分离)多聚复合物颗粒原料(例如,包含多聚复合物组合物的水溶液)并与聚合物原料(例如,包含聚合物的水溶液)组合。可以调整原料浓度以适应各种氨基与阴离子的比率(N/A)、氨基与磷(N:P)比率、N:P:A比率、混合比率和目标核苷酸浓度。在一些实施方案中,特别是小批量,例如2mL以下的批量,原料可以通过在涡旋容器的同时将第一原料(例如多聚复合物)缓慢滴入第二原料(例如聚合物)中来混合。在其它实施方案中,可以通过管线中混合两种流体流来混合原料。在其它实施方案中,所得到的多聚复合物:聚合物分散液可以通过本领域已知的方式,例如超滤(例如,切向流过滤(TFF))或溶剂蒸发(例如,冻干或喷雾干燥)浓缩。

[0255] 2.粉状制剂

[0256] 本发明的多聚复合物:聚合物组合物包括粉末。在一个优选的实施方案中,本发明提供了一种干粉多聚复合物:聚合物组合物。在一个优选的实施方案中,干粉多聚复合物:聚合物组合物是通过本发明的壳聚糖-核酸多聚复合物分散液脱水(例如,喷雾干燥或冻干)制备的。

[0257] 3.药物制剂

[0258] 本发明还提供了“药学上可接受的”或“生理学上可接受的”制剂,其包含本发明的多聚复合物:聚合物组合物。这类制剂可以在体内施用于受试者以实施治疗方法。

[0259] 如本文所用,术语“药学上可接受的”和“生理学上可接受的”是指可以施用于受试者的载体、稀释剂、赋形剂等,优选地不会产生过度的不良副作用(例如,恶心、腹痛、头痛等)。这类施用制剂包括无菌水溶液或非水溶液、悬浮液和乳液。液体制剂包括悬浮液、溶液、糖浆和酏剂。液体制剂可以通过固体重组来制备。

[0260] 药物制剂可以由与施用于受试者相容的载体、稀释剂、赋形剂、溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等制成。这类制剂可以含在片剂(包衣或未包衣)、胶囊(硬或软)、微珠、乳液、粉末、颗粒、晶体、悬浮液、糖浆或酏剂中。补充活性化合物和防腐剂以及其它添加剂也可以存在,例如抗微生物剂、抗氧化剂、螯合剂和惰性气体等。

[0261] 赋形剂可以包括盐、等渗剂、血清蛋白、缓冲剂或其它pH控制剂、抗氧化剂、增稠剂、不带电的聚合物、防腐剂或冷冻保护剂。本发明组合物中使用的赋形剂还可包括等渗剂和缓冲剂或其它pH控制剂。可以添加这些赋形剂以获得优选的pH值范围(约6.0-8.0)和渗透压(约50-400mmol/L)。合适的缓冲剂的实例是醋酸盐、硼酸盐、碳酸盐、柠檬酸盐、磷酸盐和磺化有机分子缓冲剂。这类缓冲剂可以呈0.01%至1.0%(w/v)的浓度存在于组合物中。等渗剂可选自本领域已知的那些等渗剂中的任一种,例如甘露糖醇、右旋糖、葡萄糖和氯化

钠,或其它电解质。优选地,等渗剂是葡萄糖或氯化钠。等渗剂可以呈赋予组合物与引入它的生物环境相同或相似的渗透压的量使用。组合物中等渗剂的浓度将取决于所用的特定等渗剂的性质,并且可以在约0.1%至10%范围内。当使用葡萄糖时,其优选地以1至5%w/v、更特别是5%w/v的浓度使用。当等渗剂是氯化钠时,其用量优选高达1%w/v,特别是0.9%w/v。本发明的组合物还可含有防腐剂。防腐剂的实例是聚六亚甲基-双胍、苯扎氯铵(benzalkonium chloride)、稳定的氧氯复合物(例如那些称为Purite®的)、乙酸苯汞、氯丁醇、山梨酸、氯己定(chlorhexidine)、苯甲醇、对羟基苯甲酸酯和硫柳汞(thimerosal)。典型地,这类防腐剂以约0.001至1.0%的浓度存在。此外,本发明的组合物还可含有冷冻保存剂。优选的冷冻保存剂是葡萄糖、蔗糖、甘露糖醇、乳糖、海藻糖、山梨糖醇、胶体二氧化硅、分子量优选低于100,000g/mol的葡聚糖、丙三醇和分子量低于100,000g/mol的聚乙二醇或它们的混合物。最优选的是葡萄糖、海藻糖和聚乙二醇。典型地,这类冷冻保存剂以约0.01至10%的浓度存在。

[0262] 药物制剂可以配制成与其预期的施用途径相容。例如,对于口服来说,组合物可以与赋形剂合并且以片剂、锭剂、胶囊剂(例如明胶胶囊)或包衣(例如肠溶衣(Eudragit®或Sureteric®))的形式使用。药学上相容的粘合剂和/或佐剂材料可以包括在口服制剂中。片剂、丸剂、胶囊剂、锭剂等可以含有任何以下成分或类似性质的化合物:粘合剂,例如微晶纤维素、黄蓍胶或明胶;赋形剂,例如淀粉或乳糖;崩解剂,例如海藻酸、Primogel或玉米淀粉;润滑剂,例如硬脂酸镁或其它硬脂酸盐;助流剂,例如胶体二氧化硅;甜味剂,例如蔗糖或糖精;或调味剂,例如薄荷、水杨酸甲酯或调味料。

[0263] 制剂还可以包括载体以保护组合物免于从体内快速降解或消除,例如控释制剂,包括植入物和微囊化递送系统。例如,可以采用延时材料,例如单独单硬脂酸甘油酯或硬脂酸甘油酯,或与蜡组合。

[0264] 还考虑栓剂和其它可直肠施用的制剂(例如,可通过灌肠施用的那些制剂)。进一步关于直肠递送,参见例如Song等人,Mucosal drug delivery:membranes,methodologies,and applications,Crit.Rev.Ther.Drug.Carrier Syst.,21:195-256,2004;Wearley,Recent progress in protein and peptide delivery by noninvasive routes,Crit.Rev.Ther.Drug.Carrier Syst.,8:331-394,1991。

[0265] 适用于施用的另外的药物制剂是本领域已知的并且适用于本发明的方法和组合物(参见例如Remington's Pharmaceutical Sciences(1990)第18版,Mack Publishing Co.,Easton,Pa.;The Merck Index(1996)第12版,Merck Publishing Group,Whitehouse,N.J.;以及Pharmaceutical Principles of Solid Dosage Forms,Technonic Publishing公司,Lancaster,Pa.,(1993))。

[0266] 4.施用

[0267] 在一个实施方案中,使用多聚复合物:聚合物组合物使多聚复合物在生理pH下具有延长的稳定性。这提供了有效的粘膜施用。

[0268] 接触粘膜细胞或组织的多种施用途径中的任何一种都是可能的,并且特定途径的选择将部分取决于靶粘膜细胞或组织。注射器、内窥镜、套管、插管、导管、雾化器、吸入器和其它物品可用于施用。

[0269] 膀胱内施用化学治疗剂是一些膀胱癌的标准护理。简单地说,膀胱内疗法涉及经

由插入导尿管直接滴注治疗剂至膀胱。在一些实施方案中，主题组合物提供增强的在尿中的稳定性，从而提高了局部表达。

[0270] 用于治疗受试者的剂量或“有效量”优选足以使疾患的一种、几种或全部症状得到可测量或可检测的程度的改善，但防止或抑制病症或疾患的进展或恶化、或症状是一个令人满意的结果。因此，在可通过在目标组织中表达治疗性核酸来治疗的疾患或病症的情况下，为改善可通过本发明的方法治疗的疾患而产生的治疗性RNA或治疗性蛋白质的量将取决于疾患和所需结果并且可以由技术人员容易地确定。合适的量将取决于所治疗的疾患、所需的治疗效果以及个别受试者(例如，受试者体内的生物利用度、性别、年龄等)。有效量可以通过测量相关生理效应来确定。

[0271] 本发明还考虑了兽医应用。因此，在一个实施方案中，本发明提供了治疗非人类哺乳动物的方法，其包括向需要治疗的非人哺乳动物施用本发明的多聚复合物:聚合物组合物。本发明的组合物也可以施用于粘膜。例如，组合物可以施用于胃肠道的粘膜细胞或组织，包括但不限于小肠和/或大肠的粘膜细胞或组织。其它靶粘膜细胞或组织包括但不限于眼、气道上皮、肺、阴道和膀胱细胞或组织。

[0272] 用于此目的的典型制剂包括液体、凝胶、水凝胶、溶液、乳膏、泡沫、薄膜、植入物、海绵、纤维、粉末和微乳液。

[0273] 本发明的化合物可以典型地以干粉形式(单独，作为混合物，例如与乳糖干混，或作为混合组分颗粒)从干粉吸入器或作为气溶胶喷雾从加压容器、泵、喷雾器、喷雾机或雾化器经鼻内或通过吸入施用于粘膜，使用或不使用合适的推进剂。

[0274] 用于吸入器或吹入器的胶囊、泡罩和药筒可以配制成含有本发明化合物、合适的粉末基质(例如乳糖或淀粉)和性能调节剂(例如I-亮氨酸、甘露糖醇或硬脂酸镁)的粉末混合物。

[0275] 用于吸入/鼻内施用的制剂可以配制成立即和/或调节释放。调节释放制剂包括延迟释放、持续释放、脉冲释放、控制释放、靶向释放和程序释放。

[0276] 本发明的化合物可以例如以栓剂、子宫托或灌肠剂的形式经直肠或阴道施用。可可脂是一种传统的栓剂基质，但可以酌情使用各种替代品。

[0277] 用于直肠/阴道施用的制剂可以配制成立即和/或调节释放。调节释放制剂包括延迟释放、持续释放、脉冲释放、控制释放、靶向释放和程序释放。

[0278] 本发明的化合物也可以典型地以滴剂的形式直接施用于眼睛或耳朵。适用于眼部和耳部施用的其它制剂包括软膏、可生物降解的(例如可吸收凝胶海绵、胶原蛋白)和不可生物降解的(例如硅树脂)植入物、晶片、镜片和微粒系统。还可以通过离子电渗疗法递送制剂。

[0279] 用于眼部/耳部施用的制剂可以配制成立即和/或调节释放。调节释放制剂包括延迟释放、持续释放、脉冲释放、控制释放、靶向释放或程序释放。

[0280] 粘膜施用

[0281] 在优选实施方案中，本发明的组合物施用于粘膜。例如，组合物可以施用于膀胱和胃肠道的粘膜细胞或组织，包括但不限于小肠和/或大肠和/或结肠的粘膜细胞或组织。其它靶粘膜细胞或组织包括但不限于眼、气道上皮、肺、阴道和膀胱细胞或组织。

[0282] 用于此目的的典型制剂包括液体、凝胶、水凝胶、溶液、乳膏、泡沫、薄膜、植入物、

海绵、纤维、粉末和微乳液。

[0283] 在膀胱粘膜的一示例性实施方案中，本文所述的化合物可以使用膀胱内疗法施用。膀胱内疗法涉及经由插入导尿管将治疗剂直接滴注至膀胱中。允许剂在膀胱中静置一段时间，介于0.5小时与6小时之间。它是膀胱癌化学疗法的标准施用途径。其利用可供药物直接递送至膀胱中的疾病部位的外部解剖入口，从而避免了滴注的药物不必要地暴露于身体内其它地方的健康组织。

[0284] 用于膀胱施用的制剂可以配制成立即和/或调节释放。调节释放制剂包括延迟释放、持续释放、脉冲释放、控制释放、靶向释放或程序释放。

[0285] 本发明的化合物还可以典型地以干粉形式(单独，作为混合物，例如与乳糖干混，或作为混合组分颗粒)从干粉吸入器或作为气溶胶喷雾从加压容器、泵、喷雾器、喷雾机或雾化器经鼻内或通过吸入施用于粘膜，使用或不使用合适的推进剂。

[0286] 用于吸入器或吹入器的胶囊、泡罩和药筒可以配制成含有本发明化合物、合适的粉末基质(例如乳糖或淀粉)和性能调节剂(例如I-亮氨酸、甘露糖醇或硬脂酸镁)的粉末混合物。

[0287] 用于吸入/鼻内施用的制剂可以配制成立即和/或调节释放。调节释放制剂包括延迟释放、持续释放、脉冲释放、控制释放、靶向释放和程序释放。

[0288] 本发明的化合物可以例如以栓剂、子宫托或灌肠剂的形式经直肠或阴道施用。可可脂是一种传统的栓剂基质，但可以酌情使用各种替代品。

[0289] 用于直肠或阴道施用的制剂可以配制成立即和/或调节释放。调节释放制剂包括延迟释放、持续释放、脉冲释放、控制释放、靶向释放或程序释放。

[0290] 本发明的化合物也可以典型地以滴剂的形式直接施用于眼睛或耳朵。适用于眼部和耳部施用的其它制剂包括软膏、可生物降解的(例如可吸收凝胶海绵、胶原蛋白)和不可生物降解的(例如硅树脂)植入物、晶片、镜片和微粒系统。还可以通过离子电渗疗法递送制剂。

[0291] 用于眼部/耳部施用的制剂可以配制成立即和/或调节释放。调节释放制剂包括延迟释放、持续释放、脉冲释放、控制释放、靶向释放或程序释放。

[0292] 治疗应用

[0293] 考虑用于本发明的治疗性蛋白质具有多种活性并且可用于治疗多种疾病。以下对治疗性蛋白质活性和可用本发明治疗性蛋白质治疗的适应症的描述是示例性的而不打算是详尽的。术语“受试者”是指动物，优选哺乳动物，尤其优选人。下面描述了治疗实施方案的具体非限制性实例。在一些情况下，治疗实施方案旨在作用于非粘膜目标组织、细胞或器官。如果治疗作用是非粘膜的，则应理解为与本文所述的多聚复合物:聚合物组合物接触的细胞或组织是粘膜的并且治疗作用接近粘膜目标。例如，可以转染粘膜细胞以产生和分泌IL-12和/或另一免疫刺激分子。

[0294] 在一个实施方案中，本发明的多聚复合物:聚合物组合物可以用于治疗性治疗。此类组合物在本文中有时称为治疗性组合物。如上所提出，主题组合物和方法主要采用编码IL-12的治疗性核酸，单独或与额外的固有和/或适应性免疫刺激分子结合。在一些实施方案中，治疗性核酸还编码IFN-1活化剂/诱导剂，如例如RIG-I激动剂、STING激动剂、TLR 7/9激动剂和/或其它模式识别受体激动剂。参见例如Vasou等人，Viruses 9:186(2017)。在一

些实施方案中，治疗性核酸还编码选自由以下组成的组的免疫检查点分子的调节剂：CTLA-4、PD-1、PD-L1、PD-L2、TIM3、B7-H3、B7-H4、LAG-3、KIR和它们的配体。

[0295] 合适的IFN-1活化剂/诱导剂包括RIG-I激动剂(例如eRNA11a、腺病毒VA RNA1、eRNA41H、MK4621(Merck)、SLR10、SLR14和SLR20)、STING(即，干扰素基因刺激因子)激动剂(例如CDN，即环状二核苷酸)、PRRago(例如CpG、咪喹莫特(Imiquimod)或聚I:C)和TLR激动剂(例如CPG-1826、GS-9620、AED-1419、CYT-003-QbG10、AVE-0675或PF-7909)，包括TRL7和TLR9，和RLR刺激剂(例如RIG-I、Mda5或LGP2刺激剂)。在一些实施方案中，IFN-1活化剂/诱导剂包括树突状细胞、T细胞、B细胞和/或T滤泡辅助性细胞。

[0296] 在优选的实施方案中，IFN-1活化剂/诱导剂是RIG-I激动剂。RIG-I(视黄酸诱导型基因I，由Ddx58编码)是一种细胞溶质抗病毒解旋酶，它充当RNA传感器，检测细胞质中的病毒RNA并在识别病毒RNA后被活化。作为一种模式识别受体，RIG-I含有RNA解旋酶结构域和两个N端胱天蛋白酶募集结构域(CARD)，所述结构域将信号传达至下游信号传导接头分子MAVS(线粒体抗病毒信号传导蛋白)。RIG-1经由MAVS进行信号传导引起了多种反应，包括经由TBK1和IRF7/8诱导I型IFN反应，包括IFNα和IFNβ，以及活化胱天蛋白酶-8依赖性细胞凋亡。在包括癌细胞的大部分的组织中都发现它们(Kato等人，Immunol.Rev.243(1):91-98(2011))。

[0297] RIG-I诱导的反应在细胞之间有所不同。虽然例如黑色素细胞和成纤维细胞的正常健康的细胞对RIG-I诱导的细胞凋亡非常有抗性，但肿瘤细胞高度容易发生RIG-I诱导的细胞死亡(Besch等人，2009；Kubler等人，2010)。RIG-I天然配体是含有5'三磷酸或二磷酸(5'ppp或5'pp)的双链体RNA的病毒短平端。当前正研发RIG-I特异性配体用于癌症免疫疗法(Duewell等人，2014，2015；Ellermeier等人，2013；Schnurr及Duewell，Oncoimmunology，2(5):e24170(2013)及，2014)。RIG-I配体的有效抗肿瘤活性的一部分是促进抗原交叉呈递至$CD8^+$T细胞和诱导细胞毒活性的下游能力(Hochheiser等人，2016)。RIG-I配体还展示了在例如流感的病毒感染模型中的强大治疗活性(Weber-Gerlach及Weber，2016)。

[0298] 从RNA聚合酶III启动子表达RIG-I配体的质粒载体骨架已经被用于鉴定有效的合成RIG-I配体(Luke等人，J.Virol.85(3):1370-1383)。用三磷酸修饰的茎环RNA尤其适用作本发明中的激动剂。这些包括(但不限于)：eRNA41H，它将(i)eRNA11a(一种通过收敛转录(convergent transcription)表达的免疫刺激dsRNA)与(ii)腺病毒VA RNAI进行组合；SLR20，一种双股三磷酸化20碱基对茎环RNA，用5'三磷酸序列修饰(Elion等人，Cancer Res.78(21):6183-6195(2018))；以及SLR10和SLR14，它们是在一端具有稳定四环的替代聚磷酸化RNA(Jiang等人，J.Exp.Med.216:2854-68(2019))。

[0299] 宜用于本文所述的组合物和方法中的额外RIG-I激动剂包括SB-9200，一种广谱抗病毒固有传感器激动剂，它经由活化RIG-I和结合核苷酸的寡聚结构域2通路起作用(Jones等人J.Med.Virol.89:1620-1628(2017)；MK 4621(RGT100，Merck)；CBS-13-BPS，一种模拟流感病毒锅柄启动子的结构的合成RIG-I特异性激动剂(Lee等人Nucleic Acids Res.46:10553(2018)；IVT-B2 RNA(Lien等人Molecular Therapy 24:135-45(2016)；SeV DVGs(Xu等人，mBio 65:e01265-15(2015))；具有含99核苷酸发夹的富尿苷序列的5'ppp RNA(M8)(Chiang等人J.Virol.89:8011-25(2015)；以及3pRNA。

[0300] 根据前述实施方案，在主题组合物和方法中适合与IL-12共表达的RIG-I激动剂包

括但不限于:RIG-I DNA疫苗、质粒编码的表达RNA聚合酶III的基于RNA的RIG-I激动剂,如例如eRNA11a、腺病毒VA RNA1、eRNA41H(Nature Technology Corp)、GFP2、Lamin A/C和Lamin VSV、三-GFP、SAD Δ PLp、三-G-AC-U、Flu vRNA、RNaseL片段、pppRVL、pppVSVL、ppp-shRNA-luc3VA1、5'ppp-dsRNA、3p-hpRNA、MK4621(Merck)、SLR10、SLR14、SLR20、CBS-13-BPS、IVT-B2 RNA、SeV CVG、SB-9200和如Ellermeier等人,Cancer Research(2013)73(6)中公开的siRNA。类似地,适合与IL-12共表达的STING激动剂包括但不限于:DExD/H解旋酶,包括DDX41,并且TLR激动剂包括但不限于CpG二核苷酸,如例如CpG-1826(ODN1826,Invivogen)。

[0301] 根据前述实施方案,在主题组合物和方法中适合与IL-12共表达的免疫检查点分子的调节剂包括例如针对以下一种或多种的单域抗体(sdAb):CTLA-4、PD-1、PD-L1、PD-L2、TIM3、B7-H3、B7-H4、LAG-3和KIR(如例如KN035(Ablynx/Sanofi);Inhibrix 105)(又见Wan等人,Oncol.Rep.(2018);Hosseinzadeh等人,Rep.Biochem&Mol.Bio.,(2017);Dougan等人,Can.Imm.Res.(2016);Ingram等人,PNAS(2018);以及WO2017198212);显性阴性PD-1分子(例如Atara Therapeutics)、对PD-L1具有高亲合力的PD-1变异体(例如竞争性拮抗剂)(Maute,PNAS(2015));以及与CD28的结合增加的CD80变异体(例如WO2017/181152)。

[0302] 在一些情况下,所述IFN-1激动剂和/或所述免疫检查点抑制剂由以下编码:

[0303] -所述衍生化壳聚糖核酸多聚复合物中的所述治疗性核酸构建体;

[0304] -所述衍生化壳聚糖核酸多聚复合物中的不同治疗性核酸构建体;

[0305] -不同衍生化壳聚糖核酸多聚复合物(例如不包含编码IL-12的构建体)中的治疗性核酸构建体;

[0306] -治疗性核酸构建体(例如在替代核酸递送制剂中配制,例如PEI或阳离子脂质制剂)。

[0307] 编码所述IFN-1激动剂和/或所述免疫检查点抑制剂的所述编码IL-12的治疗性核酸构建体和所述治疗性核酸构建体可以同时或依序施用。在一些情况下,编码所述IFN-1激动剂和/或所述免疫检查点抑制剂的所述治疗性核酸构建体在单一制剂中共同施用,或在单一,例如混合,两种不同制剂的组合下共同施用。在一些情况下,编码所述IFN-1激动剂和/或所述免疫检查点抑制剂的所述编码IL-12的治疗性核酸构建体和所述治疗性核酸构建体依序施用。

[0308] 本发明的免疫刺激分子还可以编码shRNA(短发夹RNA)分子,所述shRNA分子被设计成能抑制与肿瘤细胞或其它过度增生性细胞的生长或维持相关的蛋白质。质粒DNA可以同时编码治疗性蛋白质和一种或多种shRNA。此外,所述组合物的核酸还可以是质粒DNA与合成RNA的混合物,所述合成RNA包括正义RNA、反义RNA或核糖酶。

[0309] 治疗方法

[0310] 过度增生性病症

[0311] 主题组合物和方法宜用于治疗过度增生性病症。尤其关注用于治疗粘膜组织或接近粘膜组织的组织中的过度增生性病症的组合物和方法。本发明的方法和组合物可以用于治疗胃肠癌症,包括(但不限于)口腔癌、食道癌、胃癌、胰腺癌、肝癌、结肠直肠癌和直肠癌。可以通过本发明的方法和组合物治疗的鼻癌和肺癌包括(但不限于)鼻窦癌、口咽癌、气管癌症和肺癌。可以通过本发明的方法和组合物治疗的生殖泌尿系统癌症包括(但不限于)膀

胱癌、尿路上皮癌、尿道癌、睾丸癌、肾癌、前列腺癌、阴茎癌、肾上腺癌、子宫癌、宫颈癌和卵巢癌。

[0312] 在根据以上提供的任一种方法的一些实施方案中，所述方法还包括施用(例如全身性或局部施用于肿瘤部位)非基于核酸的免疫刺激分子。

[0313] 在一些实施方案中，免疫刺激分子是选自由以下组成的组的免疫检查点分子的调节剂：CTLA-4、PD-1、PD-L1、PD-L2、TIM3、B7-H3、B7-H4、LAG-3、KIR和它们的配体。在一些实施方案中，免疫调节剂是PD-L1或PD-L1的抑制剂。在一些实施方案中，PD-1的抑制剂是抗PD-1抗体，例如派姆单抗或纳武单抗。在一些实施方案中，免疫调节剂是CTLA-4的抑制剂。在一些实施方案中，CTLA-4的抑制剂是抗CTLA-4抗体，例如伊匹单抗或曲美木单抗。在一些实施方案中，PD-L1的抑制剂是抗PD-L1抗体，例如阿特珠单抗。

[0314] 在一些实施方案中，免疫调节剂是IFN-1激动剂，例如RIG-I激动剂、STING激动剂或TLR 7/9激动剂。适合共同施用的RIG-I激动剂包括但不限于短聚I:C和聚AU组合物(例如聚(I:C)/LyoVec复合物(Invivogen))；RGT100(MK4621，Merck)；SLR20(Elion等人；SLR10和SLR14(Jiang等人)；以及如US 8871799、US 8895608、US 8927561、US 9,073,946、US 9458492、US 9555106、US 9884876、US 9956285、US 9775894、US 9861574、US 9937247、US 10167476、US 10350158、US 10434064、US10273484、US9381208B2、US9738680B2、US 9790509、US10059943、US9109012B2、US9937247B2、US9816091B2、US9133456B2、US9409941B2、US9340789B2、US9040234B2、US 20200071316、US20200063141A1、US20200061097A1、US20200055871A1、US20200016253A1、US20190076463A1、US20180195063A1、US20160287623A1中公开的激动剂。

[0315] 适合与IL-12结合共同施用的STING激动剂包括但不限于c-二AMP钠盐、c-二GMP钠盐、2',3'-cGAMP钠盐、3',3'-cGAMP钠盐、10-羧基甲基-9-吖啶酮(CMA)、DMXAA(Tocris Bioscience、InvivoGen、Nimbus Therapeutics)、G10、α-Mangostin、CRD100(Curadev)、cAIMP、2'2'-c-GAMP、2'3'-cGAM(PS)2(Rp/Sp)、2'3'-c-二-AMP、c-二-IMP、c-二-UMP、5,6-二甲基咕吨酮-4-乙酸(DMXAA)、MK-1454(Merck)ML RR-S2 CDG、ML RR-S2 CDA(ADU-S100)、SB11285(Springbank Pharmaceuticals)、MAVU(AbbVie)、DiABZI、二硫代-(Rp1Rp)-[环[A(2'5')pA(3'5')p]][Rp,Rp]-环9腺苷-(2'5')-单硫代磷酸酯-腺苷-(3'5')-单硫代磷酸酯)二钠、二钠(RR-S2 CDA、ADU-S100、MIW815)(Corrales等人，2016)以及U.S.10,176,292、U.S.9,724,408、U.S.10,011,630、U.S.10,435,469、U.S.10,414,747、U.S.10,413,612、U.S.10,131,686、U.S.10,106,574、U.S.10,047,115、U.S.10,045,961、U.S.10,011,630、U.S.,9,994,607、U.S.9,937,247、U.S.9,840,533、U.S.9,770,467、U.S.9,724,408、U.S.9,718,848和U.S.9,642,830中公开的组合物。

[0316] 适合与IL-12共同施用的TLR7和TLR9激动剂包括但不限于：咪唑并喹啉和它们的类似物，包括雷西莫特(Resiquimod)和咪喹莫特(Aldara)、羟基氯喹(hydroxycholoroquine)、氯喹(chloroquire)、溴匹立明(bropirimine)、洛索立宾(Loxoribine)、艾托立宾(Isatoribine)、CpG寡核苷酸、稳定化的免疫调节性RNA(SIMRA)AST-008(Exicure)、MEDI9197以及U.S.434,064、U.S.10,413,612、U.S.10,407,431、U.S.10,370,342、U.S.10,364,266、U.S.10、208,037、U.S.10,202,386、U.S.9,944,649、U.S.9,902,730、U.S.9,868,955、U.S.9,359,360、U.S.9,295,732、U.S.9,243,050、U.S.9,

228,184、U.S.9,216,192、U.S.9,2206,430、U.S.8,735,421、U.S.8,728,486、U.S.8,399,423和U.S.8,242,106中公开的组合物。

[0317] 在一些实施方案中,非基于核酸的免疫调节剂和主题组合物同时,例如在相同组合物中施用。在一些实施方案中,非基于核酸的免疫调节剂和主题组合物依序施用。

[0318] 在一些实施方案中,本文提供的用于治疗膀胱癌的方法还包括向受试者施用至少一种额外治疗剂。在其它实施方案中,额外治疗剂是化学治疗药物或放射治疗药物。在一些实施方案中,化学治疗药物包括(但不限于)顺铂(cisplatin)、卡铂(carboplatin)、太平洋紫杉醇(paclitaxel)、多西紫杉醇(docetaxel)、5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil)、博来霉素(bleomycin)、甲氨蝶呤(methotrexate)、异环磷酰胺(ifosamide)、奥沙利铂(oxaliplatin)、环磷酰胺(cyclophosphamide)、达卡巴嗪(dacarbazine)、替莫唑胺(temozolomide)、吉西他滨(gemcitabine)、卡培他滨(capecitabine)、克拉屈滨(cladribine)、氯法拉滨(clofarabine)、阿糖胞苷(cytarabine)、氟尿苷(floxuridine)、氟达拉滨(fludarabine)、羟基脲(hydroxyurea)、培美曲塞(pemetrexed)、喷司他丁(pentostatin)、(thioguanadine)、柔红霉素(daunorubicin)、多柔比星(doxurubicin)、表柔比星(epirubicin)、伊达比星(idarubicin)、拓扑替康(topotecan)、伊立替康(irinotecan)、依托泊苷(etoposide)、替尼泊苷(eniposide)、秋水仙碱(colchicine)、长春新碱(vincristine)、长春花碱(vinblastine)和长春瑞滨(vinorelbine)。示例性癌症特异性剂和抗体包括(但不限于)阿法替尼(Afatinib)、阿地白介素(Aldesleukin)、阿仑单抗(Alemtuzumab)、阿西替尼(Axitinib)、贝利单抗(Belimumab)、贝伐单抗(Bevacizumab)、硼替佐米(Bortezomib)、博舒替尼(Bosutinib)、本妥昔单抗(Brentuximab vedotin)、卡博替尼(Cabozantinib)、卡那津单抗(Canakinumab)、卡非佐米(Carfilzomib)、西妥昔单抗(Cetuximab)、克唑替尼(Crizotinib)、达拉非尼(Dabrafenib)、达沙替尼(Dasatinib)、地诺单抗(Denosumab)、埃罗替尼(Erlotinib)、依维莫司(Everolimus)、吉非替尼(Gefitinib)、替伊莫单抗(lbritumomab tiuxetan)、依鲁替尼(lbrutinib)、伊马替尼(Imatinib)、伊匹单抗(Ipilimumab)、拉帕替尼(Lapatinib)、尼罗替尼(Nilotinib)、阿托珠单抗(Obinutuzumab)、奥法木单抗(Ofatumumab)、帕尼单抗(Panitumumab)、帕唑帕尼(Pazopanib)、帕妥珠单抗(Pertuzumab)、帕纳替尼(Ponatinib)、瑞戈非尼(Regorafenib)、利妥昔单抗(Rituximab)、罗米地辛(Romidepsin)、鲁索替尼(Ruxolitinib)、Sipuleucel-T、索拉非尼(Sorafenib)、坦罗莫司(Temsirolimus)、托珠单抗(Tocilizumab)、托法替尼(Tofacitinib)、托西莫单抗(Tositumomab)、曲美替尼(Trametinib)、曲妥珠单抗(Trastuzumab)、凡德他尼(Vandetanib)、威罗菲尼(Vemurafenib)、维莫德吉(Vismodegib)、伏瑞斯特(Vorinostat)、Ziv-阿柏西普(Ziv-aflibercept)以及它们的任何组合。在一些实施方案中,额外治疗剂在施用免疫缀合物之前、与其同时或在其之后施用于受试者。在一些实施方案中,额外治疗剂全身施用。例如,在一些实施方案中,额外治疗剂通过静脉内注射施用。

[0319] 另外,当前美国批准的常规的膀胱癌治疗是尿道内卡介苗(Bacillus Calmette-Guerin vaccine)。认为这种抗原性疫苗刺激膀胱细胞表达干扰素,干扰素又募集到患者的固有免疫系统以更好地识别癌细胞表面抗原和攻击癌细胞。然而,在超过三分之一病例中,疫苗无效。类似地,还测试了外源制造的干扰素多肽的膀胱内滴注,但还是无效。主题组合

物和方法也宜与这些更常规的方法结合使用,以加强和提高免疫应答。

[0320] 本文中陈述的实施例说明本公开的几个实施方案,但不应该将其看作是以任何方式限制本公开的范围。

[0321] 实施例1

[0322] 体外质粒转染功效的测量

[0323] 将MB49细胞接种至96孔板(35,000个细胞/孔)中,然后用NTC9385-Luc2、gWiz-Luc2或pVax-Luc2质粒转染。使用Lipofectamine2000(Thermofisher)和递增剂量的质粒DNA(20-300ng)进行转染。在转染后24小时,将细胞用荧光素酶细胞培养物溶解试剂(IX,Promega)溶解。在添加荧光素酶底物至细胞溶解产物之后立即在Envision板式读数器(Perkin-Elmer)上测量生物发光。如图1中所见,NTC9358R转染细胞显示体外最高效率。

[0324] 实施例2

[0325] 体内质粒转染功效的测量

[0326] 通过将JetPEI和20μg包含优化Luc2的候选质粒以6的胺与磷酸酯(NP)比率混合来制备JetPEI-质粒DNA多聚复合物。将多聚复合物在室温下孵育物最少15分钟并在4小时内使用。在历时60分钟暴露时间用异氟烷麻醉下,通过膀胱内滴注向雌性小鼠(12-16周)施用80μl Jet PEI-DNA制剂。在施用后24小时,收获膀胱组织并使用mRNA表达和荧光素酶酶活性测定法评定转染功效。在溶解缓冲液(Qiagen RNeasy)中均质化后从收获的膀胱组织提取RNA。使用1μg输入RNA和识别Luc2的TaqMan引物/探针进行RT-qPCR。使用Luc2 RNA的标准曲线进行绝对定量。如图2A中所见,RNA测定结果与体外荧光素酶活性测定结果一致,其中基于绝对拷贝数,NTC9385Luc2展示转染后最高的mRNA水平。对于荧光素酶测定,通过在荧光素酶细胞培养物溶解试剂(IX,Promega)存在下均质化,使收获的膀胱组织溶解。将酶底物荧光素添加到组织溶解产物并且立即在Envision板式读数器(Perkin-Elmer)上测量生物发光。如图2B中所见,gWIZ-Luc2和NTC9385Luc2-质粒均展示比pVAX-Luc2质粒显著更高的荧光素酶酶活性。

[0327] 为了评定候选质粒体内递送所关注基因的功效,用负载hPD-L1-Fc的质粒进行转染和转染后mRNA和蛋白质表达测定。对于RT-qPCR测定,在施用后24小时,收获膀胱组织,在溶解缓冲液中均质化并提取RNA(Qiagen RNeasy试剂盒)。使用1μg输入RNA和识别进行密码子优化的人PD-L1-Fc的TaqMan引物/探针进行RT-qPCR。使用人PD-L1-Fc RNA的标准曲线进行绝对定量。在施用后24小时使用三种不同的载体未观测到hPD-L1-Fc mRNA表达的统计上显著差异(图2C)。对于hPD-L1-Fc蛋白表达,在施用后24小时收获膀胱组织并通过在具有蛋白酶抑制剂的溶解缓冲液中均质化使组织溶解。使用专门设计的免疫测定(Mesoscale Discovery)定量人PD-L1-Fc蛋白。数据表示为溶解产物中pg/mL蛋白质。如图2D中所见,在所有测试小鼠中NTC9385R展现最小变化表达,并且是产生可定量hPDL1-Fc的唯一质粒。

[0328] 实施例3

[0329] 体外小鼠膀胱上皮细胞系中的启动子/增强子筛选

[0330] 通过在用含有多种启动子/增强子序列的一组质粒对鼠类尿路上皮细胞系进行体外转染后测量绿色荧光报告基因(GFP)的剂量依赖性表达,评定启动子/增强子组合的功效。所述测定中所用的启动子/增强子序列是CAG、EF1a、CMV/EF1a/HTLV、CMV/UbC、EF1a/HTLV、2xCMV/EF1a、CMV、UbC、CMV/EF1a、CMV/UbB、PGK、UbB和CBA。将MB49细胞(小鼠膀胱细

胞)接种至96孔板(35000个细胞/孔)中,24小时后,在SnapFast骨架(pSF)上用所指示的质粒转染。

[0331] 使用Lipofectamine2000(ThermoFisher)和递增剂量的质粒DNA进行转染。在转染后48小时,在Envision板式读数器上测量荧光。使用AlamarBlue细胞活力试剂(Invitrogen)测量细胞活力。数据表示为相对于细胞活力归一化的GFP相对荧光单位(RFU)(图3A)。跨越4个独立实验,将每一种质粒的总荧光强度排序(图3B)。在具有基于CAG、EF1a和CMV的启动子/增强子的质粒中看到高水平表达。

[0332] 实施例4

[0333] 体外原代人细胞(HBIEpC)中的启动子/增强子筛选

[0334] 通过在人原代膀胱上皮细胞的体外转染后测量绿色荧光报告基因(GFP)的剂量依赖性表达,评定启动子/增强子组合的功效。将人原代膀胱上皮细胞(ATCC)接种至96孔板(25,000个细胞/孔)中,24小时后,在SnapFast骨架(pSF)上用含有替代启动子/增强子组合的质粒转染。所研究的启动子/增强子组合包括CAG、UbB、EF1a、CMV-EF1a-HTLV、2XCEF、PGK、CBA、CMV-Ubb、EF1a-HTLV、CMV、CEF和UBC。使用Avalanche转染试剂(EZ Biosystems)和递增剂量的质粒DNA进行转染。在转染后24小时,在Envision板式读数器上测量荧光。使用AlamarBlue细胞活力试剂(Invitrogen)测量细胞活力。数据表示为相对于细胞活力归一化的GFP相对荧光单位(RFU)。如图4A中所见,在MB49细胞系中表现良好的启动子/增强子组合在人原代细胞中也具有高水平的表达。同样地,在MB49细胞系中低表达,在原代细胞中也展示低表达。跨越两个独立测定,将每一种质粒的总荧光强度排序(图4B)。在人膀胱细胞中具有EF1a/HTLV、CAG和2×CMV/EF1a的质粒展示最高水平的表达并且具有UBB和PGK启动子/增强子的质粒展示最低表达。

[0335] 实施例5

[0336] 原代人膀胱上皮细胞中改型质粒的测量

[0337] 使用基于荧光的测定评定被修饰(“改型”)成去除细菌组分的质粒的转染功效。简单地说,在用被改型成去除细菌组分的一组质粒体外转染人原代膀胱上皮细胞后测量绿色荧光报告基因(GFP)的剂量依赖性表达。将人原代膀胱上皮细胞(Cell Applications)接种至96孔板(25000个细胞/孔)中,24小时后,用所指示的质粒(Nature Technology公司)转染。使用Avalanche转染试剂(EZ Biosystems)和递增剂量的质粒DNA进行转染。在转染后24小时,在Envision板式读数器上测量荧光。使用AlamarBlue细胞活力试剂(Invitrogen)测量细胞活力。数据表示为相对于细胞活力归一化的GFP相对荧光单位(RFU)(图5A)。跨越2个独立实验,将每一种质粒的总荧光强度排序(图5B)。NP质粒是在人原代膀胱上皮细胞中最高表达的质粒,而pVAX和gWIZ(未修饰)是最低表达的质粒。NTC9385R质粒展示所测定质粒的最高表达水平。

[0338] 实施例6

[0339] 在孵育期之后有和没有排空多聚复合物下的聚乙二醇化对体内膀胱转染效率的作用

[0340] 在向小鼠膀胱施用DDX和聚乙二醇化DDX制剂后测定人PD-L1-Fc的mRNA表达。以7:1:17.5(PEG-DDX)或7:1:7(PEG-DDX)或7:1:0(DDX对照物)的NPA比率制备多聚复合物。在用异氟烷麻醉(暴露时间=60分钟)下通过膀胱内滴注向雌性小鼠(12-16周)施用80μL多聚复

合物(20μg[质粒DNA)。在暴露于多聚复合物之后并在从麻醉中醒来之前,将膀胱排空(使用注射器和导管通过尿道)或不排空。在施用后24小时,收获膀胱组织,并在溶解缓冲液中使组织均质化后提取RNA(Qiagen RNeasy试剂盒)。使用1μg输入RNA和识别进行密码子优化的人PD-L1-Fc的TaqMan引物/探针进行RT-qPCR。使用人PD-L1-Fc RNA的标准曲线进行绝对定量。数据表示为RNA拷贝数(图6)。

[0341] 实施例7

[0342] 使用PEG对比未PEG在不同的质粒浓度下对体内mRNA表达的评定

[0343] 以7:1:9(PEG-DDX)或7:1:0(DDX)的NPA比率制备包含人PD-L1-Fc的DDX和PEG-DDX多聚复合物。在用异氟烷麻醉(暴露时间＝60分钟)下通过膀胱内滴注向雌性小鼠(12-16周)施用80μL多聚复合物(0.25mg DNA/mL＝20μg质粒DNA;1.0mg DNA/mL＝80μg质粒DNA)。在施用后24小时,收获膀胱组织,并在溶解缓冲液中使组织均质化后提取RNA(Qiagen RNeasy试剂盒)。使用1μg输入RNA和识别进行密码子优化的人PD-L1-Fc的TaqMan引物/探针进行RT-qPCR。使用人PD-L1-Fc RNA的标准曲线进行绝对定量。数据表示为RNA拷贝数(图7A)。在第二个实验中,以7:1:3.5(PEG-DDX)或7:1:0(DDX对照物)的NPA比率制备所指示的多聚复合物。雌性小鼠(12-16周)经受相同方案,在用异氟烷麻醉(暴露时间＝60分钟)下通过膀胱内滴注施用80μL多聚复合物(0.25mg DNA/mL＝20μg质粒DNA;1.0mg DNA/mL＝80μg质粒DNA)。在施用后24小时,收获膀胱组织,并在溶解缓冲液中使组织均质化后提取RNA(Qiagen RNeasy试剂盒)。使用1μg输入RNA和识别进行密码子优化的PD-L1-Fc的TaqMan引物/探针进行RT-qPCR。使用人PD-L1-Fc RNA的标准曲线进行绝对定量。数据表示为RNA拷贝数(图7B)。在给与1.0mg/DNA/ml的动物中看到比施用0.25mg DNA/ml的动物高的表达。与未聚乙二醇化制剂相比,在施用后24小时,聚乙二醇化未削弱膀胱中的mRNA表达。

[0344] 实施例8

[0345] 在小鼠膀胱中施用聚乙二醇化DDX制剂后人PD-L1-Fc的表达

[0346] 以7:1:3.5的NPA比率制备PEG-DDX多聚复合物。在用异氟烷麻醉(暴露时间＝60分钟)下通过膀胱内滴注向雌性小鼠(12-16周)施用80μL多聚复合物(0.125mg DNA/mL＝10μg质粒DNA)。在施用后48小时,收获膀胱组织,并通过在蛋白质溶解缓冲液和蛋白酶抑制剂存在下均质化使组织溶解。使用专门设计的免疫测定(Mesoscale Discovery)定量人PD-L1-Fc蛋白。数据表示为溶解产物中pg/mL蛋白质(图8)。PEG-DDX™多聚复合物的膀胱内滴注在膀胱中产生稳固的可定量的蛋白质表达。

[0347] 实施例9

[0348] 聚乙二醇化对小鼠膀胱中尿中的多聚复合物稳定性的作用

[0349] 以0.25mg DNA/mL向小鼠膀胱(n＝4)施用80μL未聚乙二醇化(NPA 7:1:0)和聚乙二醇化(NPA 7:1:7和7:1:17.5)DDX/DNA多聚复合物制剂。在膀胱中孵育制剂1小时,然后排空膀胱(以收集膀胱内含物),用于分析。检查样品外观(图9A)并且通过动力学光散射对纳米粒子测定尺寸(图9B)。在排空后未聚乙二醇化多聚复合物严重聚集,与未展示聚集的聚乙二醇化多聚复合物相比可见白色凝块。

[0350] 实施例10

[0351] DDX-I对比DDX-II对体内hPD-L1-Fc产生的作用

[0352] 在用异氟烷麻醉(暴露时间＝60分钟)下通过膀胱内滴注向雌性小鼠(12-16周)施

用80μL多聚复合物(1.0mg DNA/mL＝80μg质粒DNA)。在施用后48小时,收获膀胱组织,并通过在含有蛋白酶抑制剂的蛋白质溶解缓冲液存在下均质化使组织溶解。使用专门设计的免疫测定(Mesoscale Discovery)定量人PD-L1-Fc蛋白。数据表示为溶解产物中pg/mL蛋白质。数据是平均值+/-SD;*p<0.05;**p<0.005-单因素ANOVA与克鲁斯凯-沃利斯检验(Kruskal-Wallis test)。以10:1或30:1的NP比率(如所指示)和1.0mg/mL的DNA浓度制备多聚复合物。DDX-I组成是14％R和3％GA。DDX-II(RXG)组成是13％R/13％G或28％R/9％G(如所指示)。如图10中所见,DDX-II(RXG)在体内引起比DDX-I显著高的蛋白质表达。

[0353] 实施例11

[0354] RXG制剂施用于小鼠膀胱后的蛋白质表达的动力学

[0355] 以10:1:5(聚乙二醇化)或20:1:0(未聚乙二醇化)的NPA比率制备多聚复合物。聚乙二醇化制剂在5％海藻糖+5％甘露醇中进行。未聚乙二醇化制剂在5％海藻糖中进行。指示％R和％G的RXG(DDX-II)组成。在用异氟烷麻醉(暴露时间＝60分钟)下通过膀胱内滴注向雌性小鼠(12-16周)施用80μL多聚复合物(1.0mg DNA/mL＝80μg质粒DNA)。在施用后24、48、72和96小时,收获膀胱组织,并通过在含有蛋白酶抑制剂的蛋白质溶解缓冲液存在下均质化使组织溶解。使用专门设计的免疫测定(Mesoscale Discovery)定量人PD-L1-Fc蛋白。数据表示为溶解产物中pg/mL蛋白质(图11)。蛋白质表达是高的(在ng/ml范围内)并且持续直至施用后96小时。

[0356] 实施例12

[0357] 在无和有RIG-I激动剂盒下具有小鼠IL-12的质粒DNA构建体

[0358] 无(图12A)和有RIG-I激动剂盒(图12B)下具有小鼠IL-12的质粒构建体。小鼠IL-12转基因包含IL-12p40和p35亚基的基因与短弹性蛋白接头的单个开放阅读框架(图12A)。将HEK293T细胞用含有mIL-12转基因的质粒转染并且在转染后48小时收获上清液。在细胞上清液中通过免疫测定来定量小鼠IL-12p40p35。构建体产生生物活性IL-12(图13A)。将脾细胞接种至96孔板中并且用抗CD3和抗CD28以及递增剂量的含有mIL-12的上清液刺激。在刺激后48小时在脾细胞培养上清液中通过ELISA测量IFNγ(图13A)。将HEKBlue细胞接种至96孔板中并用递增剂量的含有mIL-12的上清液刺激。相对于重组SEAP的标准曲线,在HEKBlue上清液中定量IL-12介导的SEAP产生,并且数据相对于细胞数目归一化。

[0359] 实施例13

[0360] 体外在用具有RIG-I激动剂的质粒转染的膀胱癌上皮细胞中的IFNβ产生(图14A和14B)

[0361] 将MB49细胞接种至96孔板(35,000个细胞/孔)中,然后用质粒(有或无RIG-I激动剂的NTC9385R-mIL12转染。使用Lipofectamine2000(Thermofisher)和递增剂量的质粒DNA进行转染。在转染后48小时,收集细胞培养物上清液并通过ELISA测量IFNβ产生。数据相对于总细胞蛋白质归一化并且表示为pg IFNβ/mg总蛋白质。

[0362] 实施例14

[0363] 体内在RXG制剂施用于小鼠膀胱后的mRNA表达

[0364] 将具有进行密码子优化的序列的单链小鼠IL-12p40p35开放阅读框架克隆至NTC9385R或NTC9385R-eRNA41H载体骨架中并在MB49细胞中体外确认表达(数据未示)。用RXG聚合物(NP20、未聚乙二醇化;25％R、10％G、5％海藻糖作为赋形剂)制备多聚复合物。

[0365] 在用异氟烷麻醉(暴露时间＝60分钟)下通过膀胱内滴注向雌性小鼠(12-16周)施用80μL多聚复合物(1.0mg DNA/mL＝80μg质粒DNA)。在施用后4、24、48、72和96小时，收获膀胱组织，并通过组织在溶解缓冲液中均质化来提取RNA(Qiagen RNeasy试剂盒)。使用500ng输入RNA和识别进行密码子优化的小鼠IL-12p40p35的TaqMan引物/探针进行RT-qPCR。使用通过体外转录生成的小鼠IL-12p40p35RNA的标准曲线进行绝对定量。数据表示为RNA拷贝数。如图15中所见，IL-12mRNA表达是高的并且持续到96小时。RIG-I激动剂的包括不降低IL-12mRNA表达。

[0366] 实施例15

[0367] 聚合物结构和多聚复合物形成

[0368] 通过在多种稳定剂中将DDX与pDNA以3至30的胺与磷酸酯(N:P)比率复合来形成多聚复合物，用于后续切向流过滤(TFF)浓缩、冷冻或冻干。双重衍生化壳聚糖(DDX)的结构：Σ(q+p+n)＝1，q＝0.03-0.35，p＝0.12-0.28。(图16)

[0369] 实施例16

[0370] DDX-DNA制剂的生理化学表征

[0371] 使用与12％至28％精氨酸和3％至35％多元醇缀合的DDX，以3至30范围内的N:P比率制备多聚复合物。通过动力学光散射(DLS)，在10mM NaCl中测量多聚复合物流体动力学直径(Z-平均)和多分散指数(PDI)。通过在0.8％琼脂糖凝胶中在pH 8(0.5X TBE)下经受100V 1小时，目测评定DNA从多聚复合物的释放，确定DNA捕获。在DNA从多聚复合物释放后，通过与过量竞争性聚阴离子(聚-(α,β)-DL-天冬氨酸)一起孵育，通过琼脂糖凝胶电泳(Quantity One v4.6.7，Bio-Rad Laboratories)定量DNA超螺旋。还通过多普勒激光测速法(laser Doppler velocimetry)测量多聚复合物ζ电位。(图17)

[0372] 实施例17

[0373] 体外筛选聚合物

[0374] 使用体外筛选，转染功效相对于DDX提高的一种新颖聚合物(3％多元醇、14％精氨酸(R)。将小鼠尿路上皮癌细胞(MB49)接种至96孔板(35000个细胞/孔)中，24小时后，用所指示的制剂转染。如所指示，用递增剂量的质粒DNA进行转染。在转染后48小时，在Envision板式读数器上测量荧光。使用AlamarBlue细胞活力试剂测量细胞活力。数据表示为相对于细胞活力归一化的GFP相对荧光单位(图18A)。B.热图表示相对于DDX(3％多元醇，14％R)的最大表达的变化倍数(图18B)。通过针对DDX进行高容量成像，确定GFP阳性细胞的百分比，并且在最大功效下进行比较(图18C)。

[0375] 实施例18

[0376] 在IVI施用DDX后的体内蛋白质表达

[0377] 在用异氟烷麻醉(暴露时间＝60分钟)下通过膀胱内滴注向雌性小鼠(12-16周)施用80μL多聚复合物(c1000＝80μg质粒DNA)。在施用后48小时，收获膀胱组织，并通过在含有蛋白酶抑制剂的蛋白质溶解缓冲液存在下均质化使组织溶解。使用专门设计的免疫测定(Mesoscale Discovery)定量人PD-L1-Fc蛋白。数据表示为溶解产物中pg/mL蛋白质。在小鼠中在经由IVI施用将DDX(12％多元醇、15％R)施用于小鼠膀胱后看到提高的蛋白质表达(图19)。

[0378] 实施例19

[0379] 非人类灵长类动物中人EG-70的膀胱内施用

[0380] 在麻醉下(暴露时间＝60分钟)通过膀胱内滴注向非人类灵长类动物施用0.25mg/ml包含IL-12p40p35的EG-70。动物接受10mL或20mL EG-70或20mL含有空载体对照物的多聚复合物(n＝1只/组,雌性(EG-70)或雄性(具有空载体DNA的多聚复合物)。在施用后48小时,收获膀胱组织,并通过在用于提取RNA的缓冲液(图20A)或含有蛋白酶抑制剂的蛋白质溶解缓冲液(图20B)存在下均质化使组织溶解。使用1μg输入RNA和识别进行密码子优化的人IL-12p40p35的TaqMan引物/探针进行RT-qPCR。使用通过体外转录生成的人IL-12p40p35 RNA的标准曲线进行绝对定量(图20A)。使用市售的人IL-12p70免疫测定(Mesoscale Discovery)定量人IL-12蛋白。数据表示为溶解产物中pg/mL蛋白质(图20B)。在膀胱内施用10ml和20ml治疗(分别与2.5mg或5mg质粒DNA对应)下均看到可检测的水平的mRNA和蛋白质。单独的数据点指示单独的动物内的膀胱组织部分。

[0381] 实施例20

[0382] 非人类灵长类动物中eRNA11a和VA1的表达

[0383] 在麻醉下(暴露时间＝60分钟)通过膀胱内滴注向非人类灵长类动物施用20ml包含IL-12/eRNA11a/VA1的C250 EG-70多聚复合物或含有空载体对照DNA的多聚复合物。动物接受0.0625mg/mL、0.25mg/mL或1mg/mL(分别c62.5、c250或c1000)剂量的EG-70或1mg/mL(c1000)对照纳米粒子(RXG-PEG-N9;n＝1只/组,雌性(EG-70,低和中间剂量)或雄性(EG-70,高剂量或具有空载体DNA的多聚复合物)。在施用后48小时,收获膀胱组织,并通过在RNA提取缓冲液存在下均质化使组织溶解。使用1μg输入RNA和识别eRNA11a或VA1的TaqMan引物/探针进行RT-qPCR。使用通过体外转录生成的人eRNA11a RNA(图21)和人VA1 RNA(图22)的标准曲线进行绝对定量(单独的数据点指示单独的动物内的膀胱组织部分)。

[0384] 实施例21

[0385] 鼠类膀胱癌模型中的抗肿瘤活性的评定

[0386] 为了评估mEG-70-原型纳米粒子的抗肿瘤活性,使用原位鼠类膀胱癌模型。简单地说,通过用聚-L-赖氨酸预处理鼠类膀胱以促进浅表尿路上皮层的剥离并且便于癌细胞植入来建立疾病。随后将稳定地过表达荧光素酶基因(MB49-Luc)的尿路上皮癌细胞滴注至鼠类膀胱(每只小鼠100,000个细胞)中并在滴注后第12天使用体内成像系统(IVIS)证实荧光素酶表达。生物发光信号的强度用于将动物随机化至处理组中。另外,从研究中排除无阳性生物发光信号的动物。在滴注后第13天和第20天小鼠接受每周一次的纳米粒子膀胱内施用两次。基于蛋白质表达动力学的评定选择这个给药方案。额外一组动物接受施用纳米粒子媒剂海藻糖(5%)的假程序。在第29天终止实验以测量膀胱重量,其随膀胱中的肿瘤负荷而变。

[0387] 如图27A和27B所示,假处理的负载肿瘤的动物表现出约75mg的平均膀胱重量,而用剂量为20μg质粒DNA的mEG-70-原型处理的动物具有几乎与未处理动物无法区分的膀胱重量(约20mg)。

[0388] 实施例22

[0389] 鼠类膀胱中小鼠IL-12mRNA表达的动力学

[0390] 为了评估鼠类膀胱中进行密码子优化的小鼠I112p40p35基因表达的动力学,在麻醉下(暴露时间＝60分钟),通过膀胱内滴注,健康雌性C57B1/6J小鼠(12-16周)接受包含

IL-12/eRNA11a/VA1的RXG纳米粒子或含有空载体对照DNA的多聚复合物的单次膀胱内滴注(IVI)。动物接受0.25mg/mL、c250剂量的mEG-70原型或对照纳米粒子(RXG-PEG-N9)。在施用后指示的时间,收获膀胱组织,并通过在RNA提取缓冲液存在下均质化使组织溶解。使用1μg输入RNA和具有进行密码子优化的mIL-12p40p35的TaqMan引物/探针进行RT-qPCR。使用通过体外转录生成的小鼠Il12p40p35 RNA的标准曲线进行绝对定量(图23)。

[0391] 如图23所示,早在施用后4小时,就可检测膀胱组织中的小鼠Il12p40p35 mRNA水平,并且在接受mEG-70-原型纳米粒子的小鼠中表达持续至给药之后96小时。正如所料,接受含有无IL-12转基因的质粒(N9,阴性对照物)的纳米粒子的小鼠不具有任何可检测的Il12p40p35 mRNA(<2个拷贝)。

[0392] 实施例23

[0393] 小鼠膀胱中小鼠IL-12p70蛋白质表达的动力学

[0394] 为了评估鼠类膀胱中小鼠IL12p70蛋白质表达的动力学,健康雌性C57Bl/6J小鼠(12-16周)接受20μg mEG-70-原型纳米粒子的单次IVI。在指示的时间收获膀胱组织并且制备组织溶解产物,用于在Mesoscale Discovery(MSD)平台上进行小鼠IL12p70免疫测定。

[0395] 如图24所示,早在施用后24小时,接受mEG-70-原型纳米粒子的一次IVI的小鼠展示可检测水平的IL-12p70蛋白。在给药之后48小时蛋白质表达最高,并且迟至96小时都检测到。在接受含有N9质粒DNA(阴性对照物)的纳米粒子的施用的小鼠的膀胱组织中未检测到IL-12p70。

[0396] 实施例24

[0397] 小鼠膀胱中小鼠IL-12p40p35蛋白质表达的剂量反应

[0398] 为了评估鼠类膀胱中小鼠IL12p70蛋白表达是否存在剂量依赖性表达,健康雌性C57Bl/6J小鼠(12-16周)接受剂量在0.1-80μg质粒DNA之间的mEG 70原型纳米粒子的单次IVI。给与阴性对照物直至20μg。在施用后48小时收获膀胱组织并且制备组织溶解产物,用于在MSD平台上进行小鼠IL12p70免疫测定。

[0399] 如图25所示,在最低剂量的N9-m12-R(0.1μg)下接受mEG-70-原型纳米粒子的一次IVI的小鼠展示低水平和频率(25%小鼠)的IL-12p70蛋白质。对于1-80μg范围内的所有剂量,检测到可比较水平的蛋白质表达。在接受含有N9质粒DNA(阴性对照物)的纳米粒子的施用的小鼠的膀胱组织中未检测到IL-12p70。

[0400] 实施例25

[0401] 体内聚乙二醇化纳米粒子表达

[0402] 进行评定聚乙二醇化对小鼠IL-12p70蛋白表达的任何潜在影响的研究。简单地说,雌性C57Bl/6J小鼠(12-16周)接受含有20μg质粒DNA的纳米粒子的单次施用。小鼠接受mEG-70或mEG-70-原型纳米粒子的单次IVI。在施用后24小时至7天收获膀胱组织,并且产生组织蛋白溶解产物,以通过免疫测定来定量IL 12p70蛋白。

[0403] 如图26所示,接受mEG-70原型或mEG-70的单次IVI的小鼠展示小鼠IL-12p70蛋白表达的可比较的水平和动力学。

[0404] 实施例26

[0405] NMIBC中的人类临床研究

[0406] 膀胱癌是美国(US)男性与女性中分别第四种和第十种最常见的恶性病(American

Cancer Society 2019)。非肌层浸润性膀胱癌(NIMBC)一般通过手术切除(TURBT)来管理，然后常常在24小时内施用单剂量膀胱内化学疗法(吉西他滨或丝裂霉素(mitomycin)，使复发率降低35％(Sylvester等人,2016)。

[0407] 在从病理学证实存在膀胱癌之后，医师研发出持续治疗计划，常常涉及BCG疗法。尽管有显著的副作用和30％至40％的失败率，利用BCG的膀胱内免疫疗法是用于预防患有高级别(Ta和上述)NMIBC的患者中复发和/或进展的主要治疗。即使患有对BCG无反应的NMIBC的患者极不可能得益于BCG的进一步疗法，因此，代表了新疗法研究的独特群体，也常常在第二维持过程中给与BCG以实现无病状态(Jarow等人,2015)。

[0408] 在缺乏药理学介入或膀胱切除术的情况下，有或者没有切除疾病的对BCG无反应的NMIBC将持续和进展。迄今为止，BCG失败的患者未获得有效的疗法，因为常常在TURBT后给与的吉西他滨和丝裂霉素不是有效的补救剂。因此，对BGC无反应的疾病(不管是BCG难治的还是复发)的治疗是根治性膀胱切除术，以通过外科手术去除所有肿瘤并确保无病生存率。NMIBC存在很少的可利用的治疗选择以及患者针对早期疾病仍继续进行根治性器官去除的事实描述了事实上巨大的未满足的医学需要。在难治的患者中起作用的更有效的治疗是NMIBC中极度需要的。

[0409] 在本发明的一示例性实施方案中，治疗性核酸包含4156bp质粒DNA(pDNA)，所述pDNA由称为opt-hIL-12的密码子优化的人白细胞介素-12基因(SEQ ID NO:7构成，连接于组成性活化巨细胞病毒(CMV)启动子，在NTC9385R骨架上，利用基于蔗糖的无抗生素的选择标记(RNA-OUT)，如下表中所阐述：

[0410] 表1

[0411]

```
CCGCCTAATG AGCGGGCTTT TTTTTGGCTT GTTGTCCACA ACCGTTAAAC  50
CTTAAAAGCT TTAAAAGCCT TATATATTCT TTTTTTTCTT ATAAAACTTA 100
AAACCTTAGA GGCTATTTAA GTTGCTGATT TATATTAATT TTATTGTTCA 150
AACATGAGAG CTTAGTACGT GAAACATGAG AGCTTAGTAC GTTAGCCATG 200
AGAGCTTAGT ACGTTAGCCA TGAGGGTTTA GTTCGTTAAA CATGAGAGCT 250
TAGTACGTTA AACATGAGAG CTTAGTACGT ACTATCAACA GGTTGAACTG 300
CTGATCCACG TTGTGGTAGA ATTGGTAAAG AGAGTCGTGT AAAATATCGA 350
GTTCGCACAT CTTGTTGTCT GATTATTGAT TTTTGGCGAA ACCATTTGAT 400
CATATGACAA GATGTGTATC TACCTTAACT TAATGATTTT GATAAAAATC 450
ATTAGGTACC CCGGCTCTAG TTATTAATAG TAATCAATTA CGGGGTCATT 500
AGTTCATAGC CCATATATGG AGTTCCGCGT TACATAACTT ACGGTAAATG 550
GCCCGCCTGG CTGACCGCCC AACGACCCCC GCCCATTGAC GTCAATAATG 600
ACGTATGTTC CCATAGTAAC GCCAATAGGG ACTTTCCATT GACGTCAATG 650
GGTGGAGTAT TTACGGTAAA CTGCCCACTT GGCAGTACAT CAAGTGTATC 700
ATATGCCAAG TACGCCCCCT ATTGACGTCA ATGACGGTAA ATGGCCCGCC 750
TGGCATTATG CCCAGTACAT GACCTTATGG GACTTTCCTA CTTGGCAGTA 800
CATCTACGTA TTAGTCATCG CTATTACCAT GGTGATGCGG TTTTGGCAGT 850
ACATCAATGG GCGTGGATAG CGGTTTGACT CACGGGGATT TCCAAGTCTC 900
CACCCCATTG ACGTCAATGG GAGTTTGTTT TGGCACCAAA ATCAACGGGA 950
CTTTCCAAAA TGTCGTAACA ACTCCGCCCC ATTGACGCAA ATGGGCGGTA 1000
GGCGTGTACG GTGGGAGGTC TATATAAGCA GAGCTCGTTT AGTGAACCGT 1050
CAGATCGCCT GGAGACGCCA TCCACGCTGT TTTGACCTCC ATAGAAGACA 1100
CCGGGACCGA TCCAGCCTCC GCGGCTCGCA TCTCTCCTTC ACGCGCCCGC 1150
CGCCCTACCT GAGGCCGCCA TCCACGCCGG TTGAGTCGCG TTCTGCCGCC 1200
TCCCGCCTGT GGTGCCTCCT GAACTGCGTC CGCCGTCTAG GTAAGTTTAA 1250
AGCTCAGGTC GAGACCGGGC CTTTGTCCGG CGCTCCCTTG GAGCCTACCT 1300
AGACTCAGCC GGCTCTCCAC GCTTTGCCTG ACCCTGCTTG CTCAACTCTA 1350
GTTCTCTCGT TAACTTAATG AGACAGATAG AAACTGGTCT TGTAGAAACA 1400
GAGTAGTCGC CTGCTTTTCT GCCAGGTGCT GACTTCTCTC CCCTGGGCTT 1450
TTTTCTTTTT CTCAGGTTGA AAAGAAGAAG ACGAAGAAGA CGAAGAAGAC 1500
AAACCGTCGT CGACGCCGCC ACCATGTGCC ATCAGCAACT TGTCATCTCC 1550
TGGTTCTCCC TCGTGTTCCT GGCCTCCCCT CTTGTCGCGA TTTGGGAGCT 1600
GAAGAAAGAT GTGTACGTCG TGGAACTCGA CTGGTACCCG GACGCCCCCG 1650
GGGAAATGGT GGTGCTCACT TGTGATACTC CCGAAGAGGA TGGAATTACC 1700
TGGACCCTCG ATCAGTCCTC CGAGGTCTTG GGATCCGGCA AAACTCTGAC 1750
CATCCAAGTC AAGGAATTCG GCGACGCGGG GCAGTACACC TGTCACAAGG 1800
GCGGAGAAGT GCTGTCGCAC TCACTCCTGC TCCTTCACAA AAAGGAGGAC 1850
GGCATCTGGT CGACCGACAT CCTGAAGGAC CAGAAGGAAC CCAAGAACAA 1900
GACCTTTCTG CGCTGCGAGG CCAAGAACTA TTCGGGAAGG TTCACCTGTT 1950
GGTGGCTGAC TACCATCTCC ACCGACCTGA CTTTCTCCGT GAAGTCCTCT 2000
CGGGGTTCGA GCGACCCGCA GGGTGTTACG TGCGGTGCTG CAACCCTGTC 2050
```

[0412]

```
CGCGGAGAGA GTGCGGGGGG ACAACAAGGA ATACGAGTAC TCAGTGGAAT  2100
GCCAGGAAGA TAGCGCCTGC CCTGCCGCCG AAGAGTCCCT GCCGATTGAA  2150
GTCATGGTGG ACGCAGTGCA TAAGTTGAAA TATGAGAACT ACACCTCGTC  2200
GTTCTTCATC CGGGACATCA TCAAGCCTGA CCCCCCTAAG AATCTGCAGC  2250
TCAAGCCCCT CAAGAACTCC AGACAGGTCG AAGTGTCCTG GGAGTACCCA  2300
GATACGTGGA GCACACCGCA CTCGTACTTC TCCTTGACCT TCTGCGTCCA  2350
AGTGCAGGGA AAGTCCAAAC GGGAGAAGAA GGACCGCGTG TTCACTGATA  2400
AGACTTCCGC TACTGTGATC TGCCGCAAAA ACGCCAGCAT CAGCGTGCGC  2450
GCGCAAGATA GATACTACTC AAGCTCTTGG TCCGAATGGG CGTCCGTGCC  2500
ATGCTCGGTG CCCGGCGTGG GCGTGCCTGG AGTGGGAGCC CGGAACTTGC  2550
CGGTGGCCAC CCCTGACCCC GGAATGTTCC CTTGCCTGCA CCACTCCCAA  2600
AACCTTCTGA GGGCTGTGTC CAACATGCTG CAGAAGGCTC GGCAGACCCT  2650
GGAATTCTAC CCCTGCACCT CCGAGGAGAT CGACCACGAA GATATTACCA  2700
AGGACAAGAC CTCAACCGTG GAAGCCTGCC TGCCCCTGGA ACTGACCAAG  2750
AACGAATCGT GCCTGAATAG CCGGGAAACC TCCTTCATCA CCAACGGCTC  2800
CTGCCTGGCC TCACGAAAGA CCAGCTTTAT GATGGCCCTG TGCCTGAGCT  2850
CGATCTACGA GGACCTGAAG ATGTACCAGG TCGAGTTCAA GACTATGAAC  2900
GCCAAGCTGC TGATGGATCC GAAGCGGCAG ATCTTCTTGG ACCAGAATAT  2950
GCTGGCAGTG ATCGACGAGC TGATGCAGGC CCTCAACTTC AACTCCGAGA  3000
CTGTGCCGCA AAAGTCGAGC CTGGAGGAAC CGGACTTCTA CAAGACCAAG  3050
ATCAAGTTAT GTATTCTCCT GCACGCGTTT AGGATTCGCG CCGTGACCAT  3100
TGATAGAGTG ATGTCCTACC TGAACGCCAG CTGAGAATTC CTGTGCCTTC  3150
TAGTTGCCAG CCATCTGTTG TTTGCCCCTC CCCCGTGCCT TCCTTGACCC  3200
TGGAAGGTGC CACTCCCACT GTCCTTTCCT AATAAAATGA GGAAATTGCA  3250
TCGCATTGTC TGAGTAGGTG TCATTCTATT CTGGGGGGTG GGGTGGGGCA  3300
GGACAGCAAG GGGGAGGATT GGGAAGACAA TAGCAGGCAT GCTGGGGATG  3350
CGGTGGGCTC TATGGCCCGG GACGGCCGCT AGCACCGTTG GTTTCCGTAG  3400
TGTAGTGGTT ATCACGTTCG CCTAACACGC GAAAGGTCCC CGGTTCGAAA  3450
CCGGGCACTA CAAACCAACA ACGTTAAAAA ACAGGTCCTC CCCATACTCT  3500
TTCATTGTAC ACACCGCAAG CTCGACAATC ATCGGATTGA AGCATTGTCG  3550
CACACATCTT CCACACAGGA TCAGTACCTG CTTTCGCTTT TAACCAAGGC  3600
TTTTCTCCAA GGGATATTTA TAGTCTCAAA ACACACAATT ACTTTACAGT  3650
TAGGGTGAGT TTCCTTTTGT GCTGTTTTTT AAAATAATAA TTTAGTATTT  3700
GTATCTCTTA TAGAAATCCA AGCCTATCAT GTAAAATGTA GCTAGTATTA  3750
AAAAGAACAG ATTATCTGTC TTTTATCGCA CATTAAGCCT CTATAGTTAC  3800
TAGGAAATAT TATATGCAAA TTAACCGGGG CAGGGGAGTA GCCGAGCTTC  3850
TCCCACAAGT CTGTGCGAGG GGGCCGGCGC GGGCCTAGAG ATGGCGGCGT  3900
CGGATCGGCC AGCCCGCCTA ATGAGCGGGC TTTTTTTTCT TAGGGTGCAA  3950
AAGGAGAGCC TGTAAGCGGG CACTCTTCCG TGGTCTGGTG GATAAATTCG  4000
CAAGGGTATC ATGGCGGACG ACCGGGGTTC GAGCCCCGTA TCCGGCCGTC  4050
CGCCGTGATC CATGCGGTTA CCGCCCGCGT GTCGAACCCA GGTGTGCGAC  4100
GTCAGACAAC GGGGGAGTGC TCCTTTTGGC TTCCTTCCCC TACCGGGGCC  4150
GCTAGC  4156
```

[0413] R6K复制起点将质粒复制限制于大肠杆菌(Escherichia coli)(大肠杆菌(E.coli))的特定菌株。opt-hIL12基因编码细胞因子蛋白IL-12的两个亚基(p40和p35)。为了确保所述亚基1:1的化学计量,EG-70质粒被设计成含有单个开放阅读框架(ORF)以通过添加短的重复弹性蛋白接头序列使p40与p35形成单体。质粒还由eRNA11a(免疫刺激双股核糖核酸[dsRNA])和腺病毒VA RNA1的基因构成。这些基因的两种RNA产物刺激RIG-I通路,将更多的免疫细胞募集至局部组织。在另一实施方案中,这种治疗性核酸包装在经精氨酸和葡萄糖官能化的双重衍生化壳聚糖聚合物中并且用可分离的PEG-b-PLE赋形剂包衣,以形成药物组合物EG-70。组合物被配制成1%w/w甘露醇溶液中的纳米粒子水性分散液,过滤法消毒,冻干成干粉,并存储在4℃下。纳米粒子分散液的平均粒度在75-175纳米范围内。

[0414] 本研究将评估膀胱内施用EG-70的安全性和其对BCG疗法失败并且等待根治性膀

胱切除术的NMIBC患者中的膀胱肿瘤的作用。该研究将是经典的剂量递增试验，其中每个队列中治疗3名患者。EG-70的初始剂量将基于非临床毒物学数据以及非临床功效数据，并且将是至少在GLP-毒物学研究中所见到的最小毒性剂量的1/5。对于无剂量限制性毒性(DLT)下治疗的连续队列，设计的I期剂量递增将处于多达半对数的增量中。

[0415] ****

[0416] 等效方案

[0417] 本说明书中提及的所有出版物、专利和专利申请都以引用的方式整体并入本文中并用于达成所有目的，其引用程度如同每个单独的出版物、专利或专利申请具体和单独地指出以引用的方式并入一般。上述公开内容可以涵盖具有独立效用的多个不同发明。尽管这些发明中的每一个都以其优选形式公开，但在此公开和说明的其特定实施方案不应被视为限制性的，因为许多变化是可能的。本发明的主题包括本文公开的各种要素、特征、功能和/或性质的所有新颖和非显而易见的组合和子组合。以下权利要求书特别指出被认为是新颖和非显而易见的某些组合和子组合。可以在本申请、要求本申请优先权的申请或相关申请中要求体现在特征、功能、要素和/或性质的其它组合和子组合中的发明。这样的权利要求，无论是针对不同的发明还是针对相同的发明，以及与原始权利要求书相比范围更宽、更窄、相等或不同，也都被认为包括在本公开的发明的主题之内。

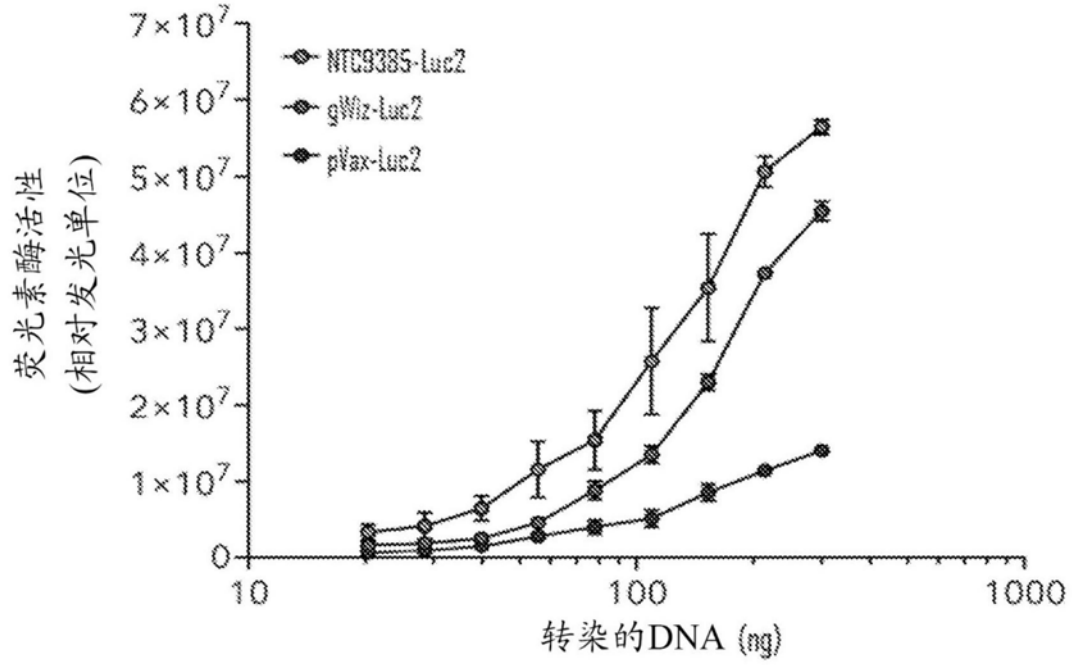

NTC9385-Luc2
gWiz-Luc2
pVax-Luc2
荧光素酶活性
(相对发光单位)
转染的DNA (ng)

图1

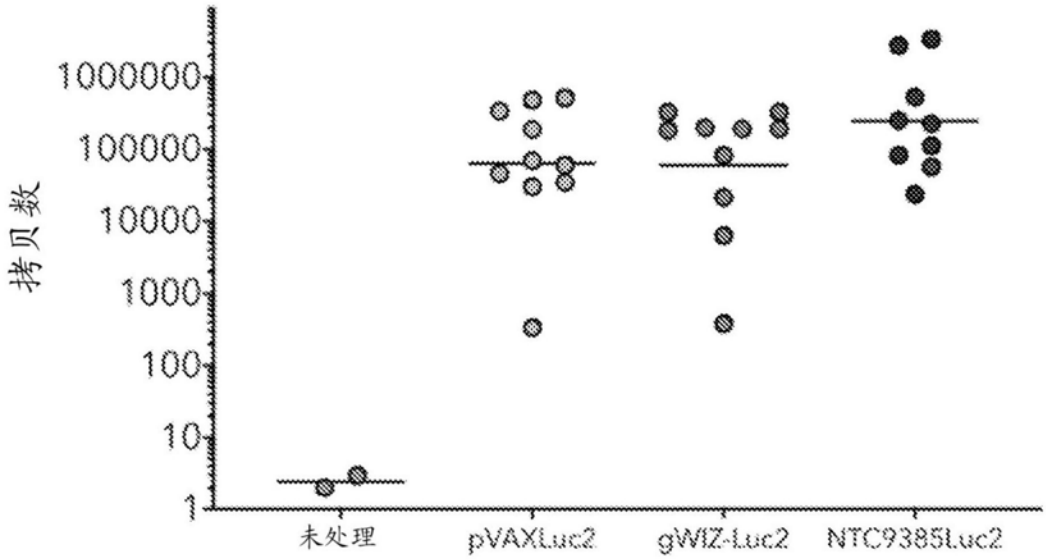

拷贝数
未处理
pVAXLuc2
gWIZ-Luc2
NTC9385Luc2

图2A

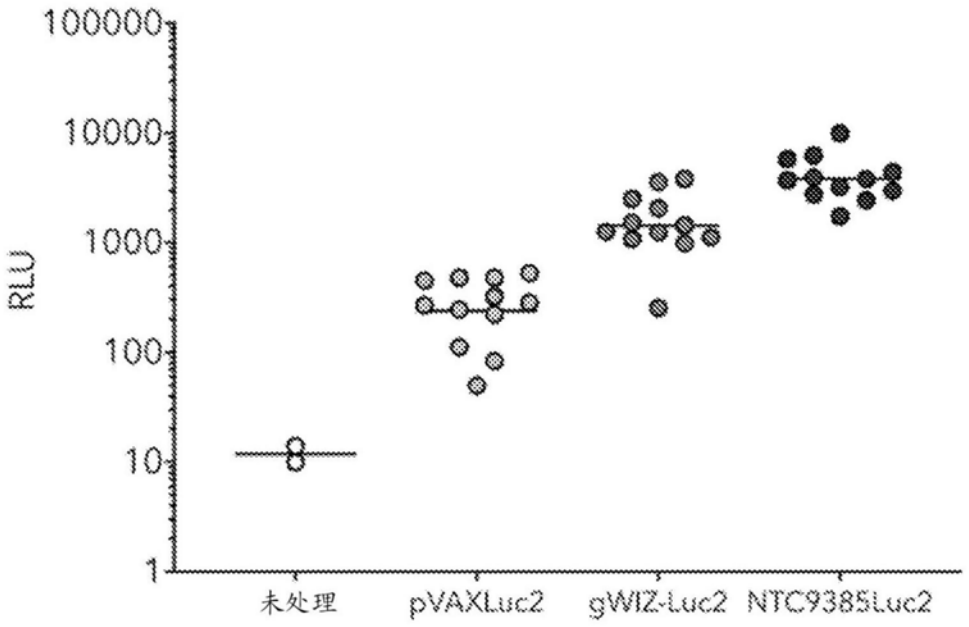

100000
10000
1000
100
10
1
RLU
未处理
pVAXLuc2
gWIZ-Luc2
NTC9385Luc2

图2B

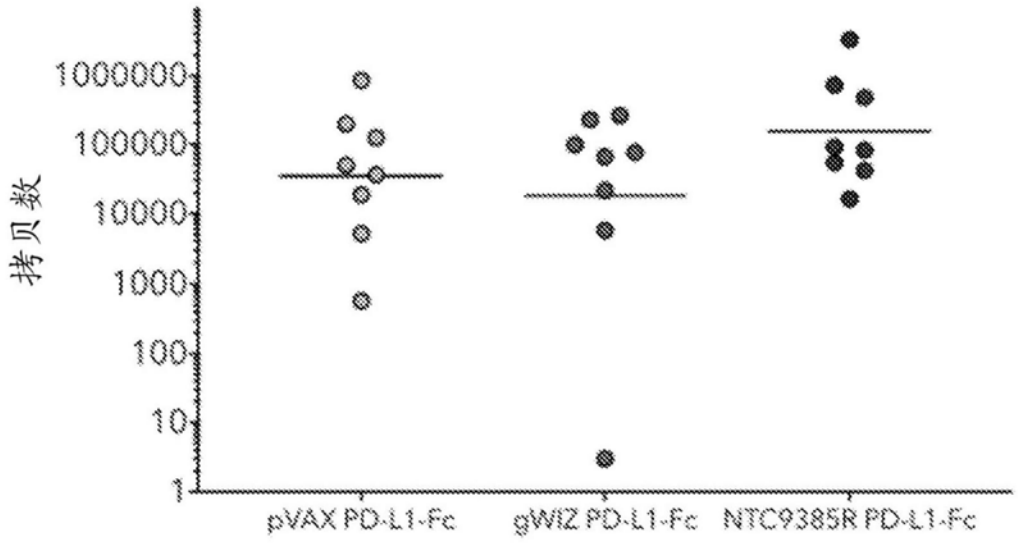

1000000
100000
10000
1000
100
10
1
拷贝数
pVAX PD-L1-Fc
gWIZ PD-L1-Fc
NTC9385R PD-L1-Fc

图2C

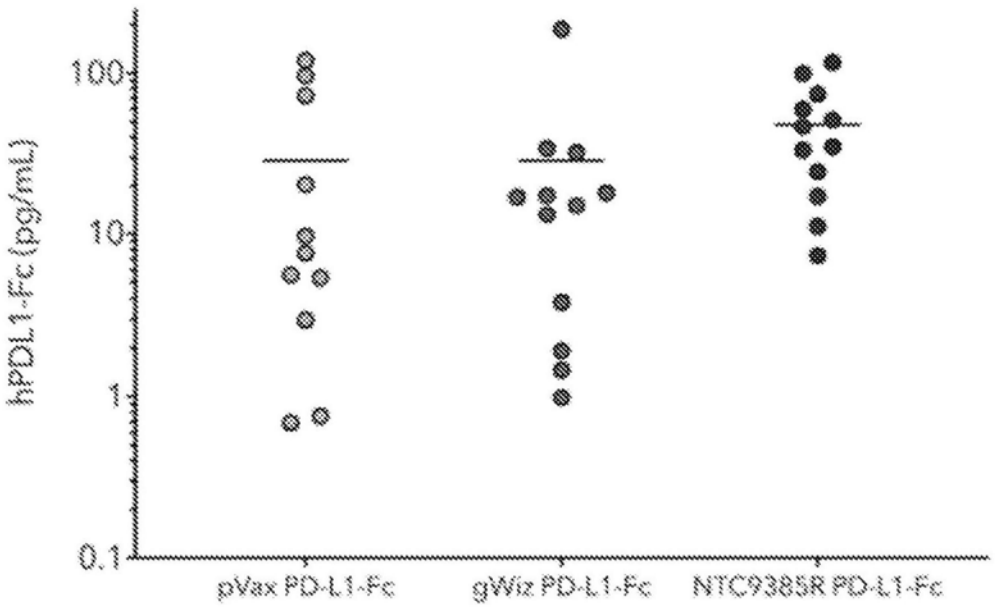

hPDL1-Fc (pg/mL)
100
10
1
0.1
pVax PD-L1-Fc
gWiz PD-L1-Fc
NTC9385R PD-L1-Fc

图2D

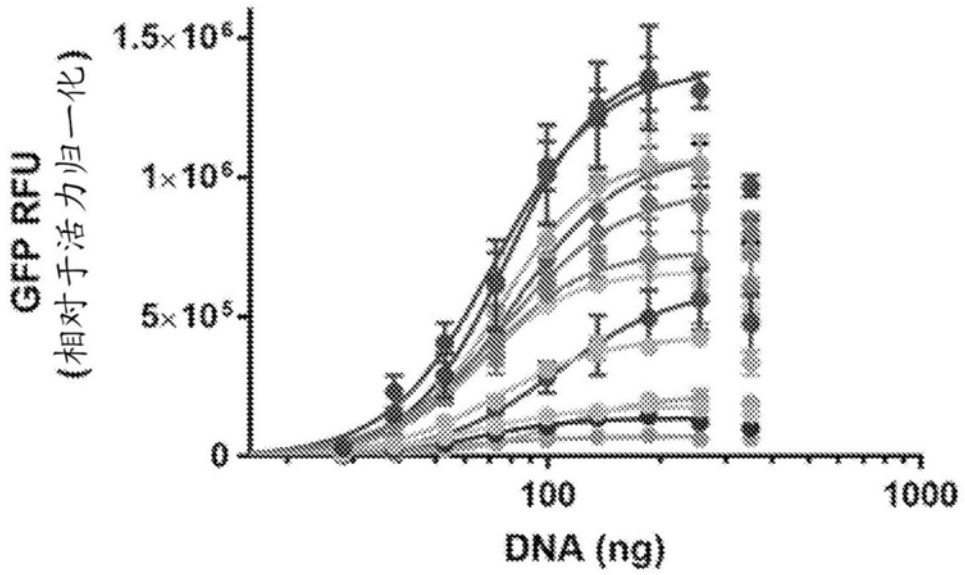

GFP RFU
(相对于活力归一化)
1.5×10⁶
1×10⁶
5×10⁵
0
100
1000
DNA (ng)

图3A

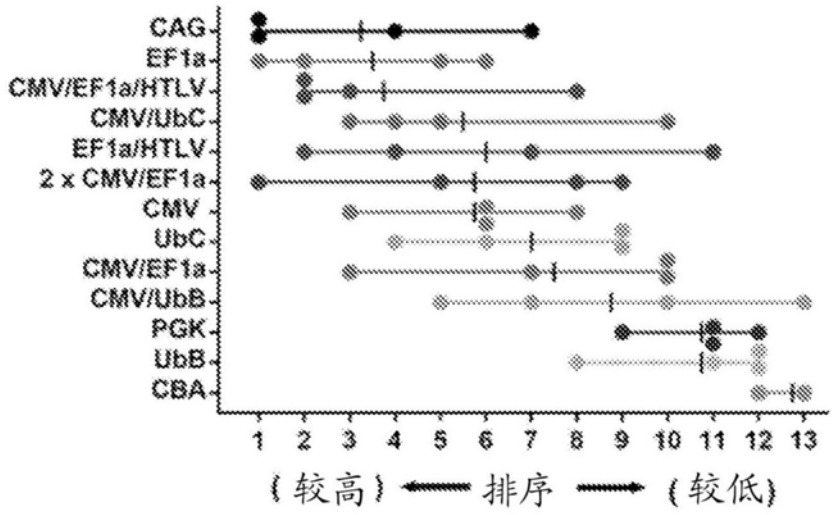

CAG
EF1a
CMV/EF1a/HTLV
CMV/UbC
EF1a/HTLV
2 x CMV/EF1a
CMV
UbC
CMV/EF1a
CMV/UbB
PGK
UbB
CBA
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13
(较高) 排序 (较低)

图3B

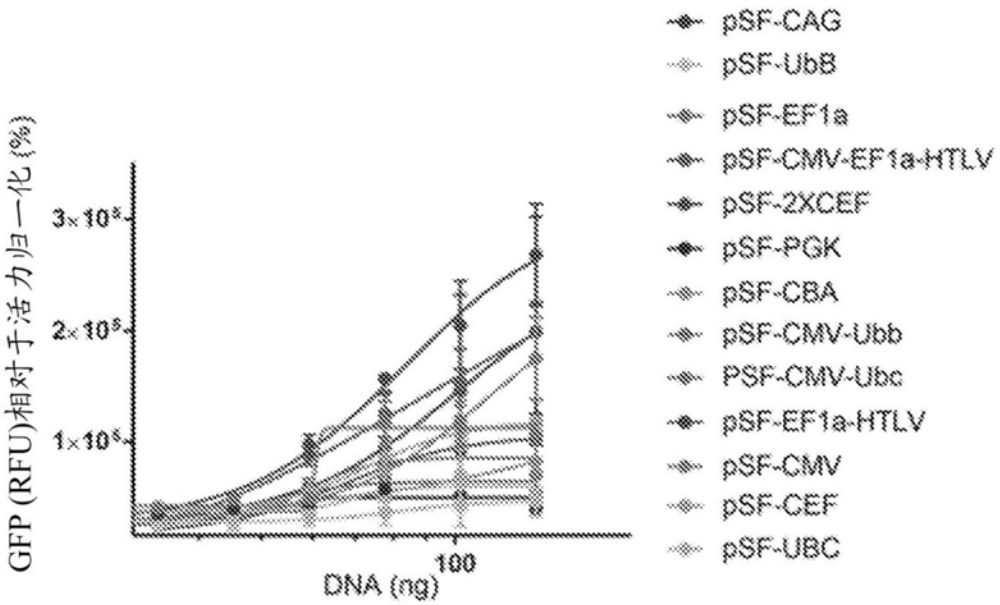

GFP (RFU)相对于活力归一化 (%)
3×10⁸
2×10⁸
1×10⁸
100
DNA (ng)
pSF-CAG
pSF-UbB
pSF-EF1a
pSF-CMV-EF1a-HTLV
pSF-2XCEF
pSF-PGK
pSF-CBA
pSF-CMV-Ubb
PSF-CMV-Ubc
pSF-EF1a-HTLV
pSF-CMV
pSF-CEF
pSF-UBC

图4A

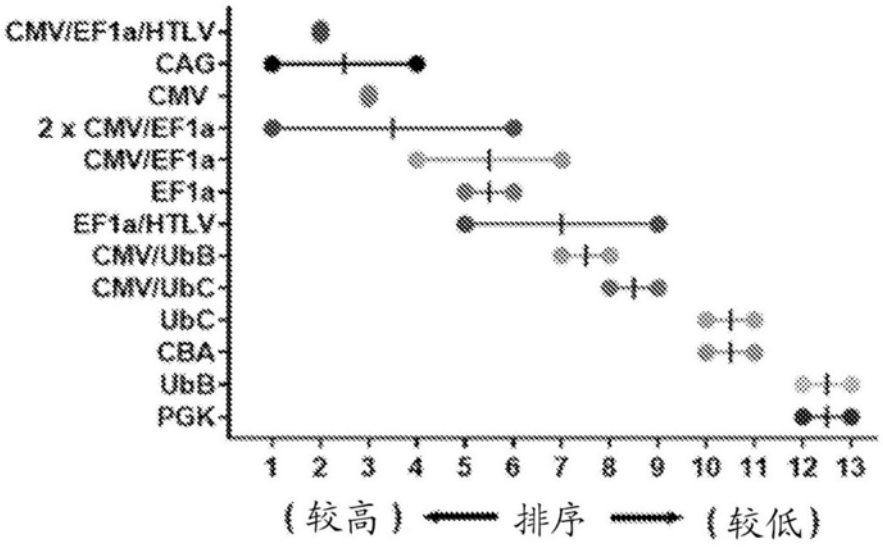

CMV/EF1a/HTLV
CAG
CMV
2 x CMV/EF1a
CMV/EF1a
EF1a
EF1a/HTLV
CMV/UbB
CMV/UbC
UbC
CBA
UbB
PGK
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13
（较高）排序（较低）

图4B

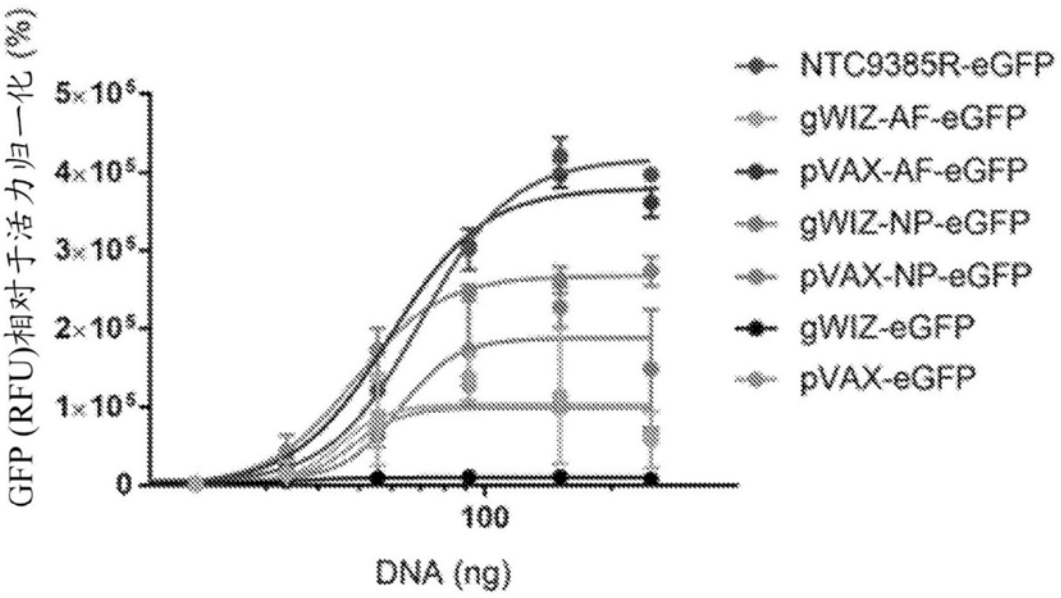

GFP (RFU)相对于活力归一化 (%)
5×10⁵
4×10⁵
3×10⁵
2×10⁵
1×10⁵
0
100
DNA (ng)
NTC9385R-eGFP
gWIZ-AF-eGFP
pVAX-AF-eGFP
gWIZ-NP-eGFP
pVAX-NP-eGFP
gWIZ-eGFP
pVAX-eGFP

图5A

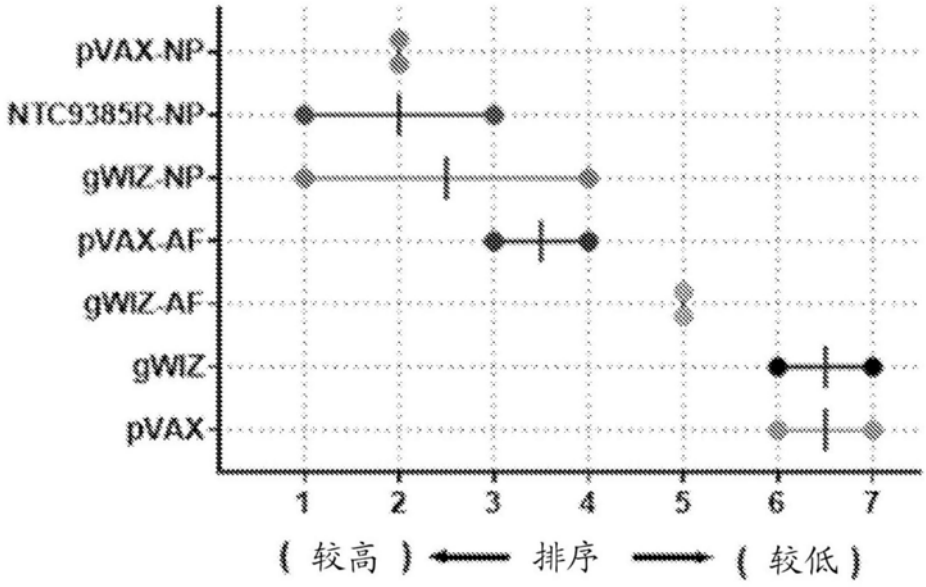

pVAX.NP
NTC9385R.NP
gWIZ.NP
pVAX.AF
gWIZ.AF
gWIZ
pVAX
1
2
3
4
5
6
7
(较高)
排序
(较低)

图5B

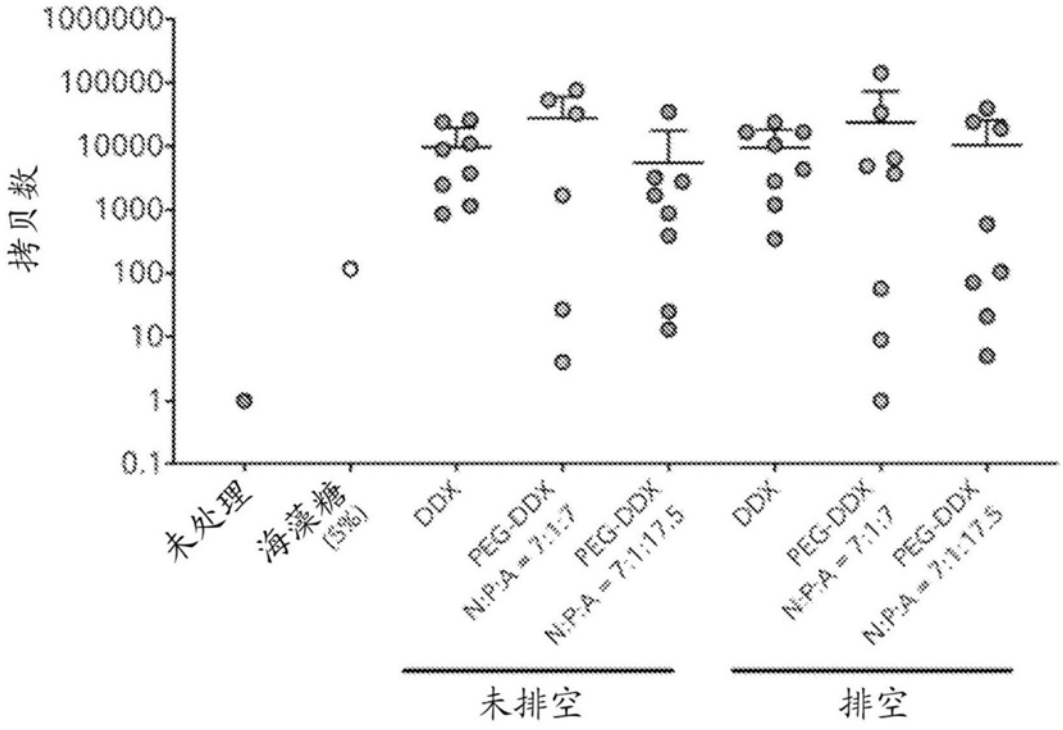

拷贝数
1000000
100000
10000
1000
100
10
1
0.1
未处理
海藻糖 (5%)
DDX
PEG-DDX N:P:A = 7:1:7
PEG-DDX N:P:A = 7:1:17.5
DDX
PEG-DDX N:P:A = 7:1:7
PEG-DDX N:P:A = 7:1:17.5
未排空
排空

图6

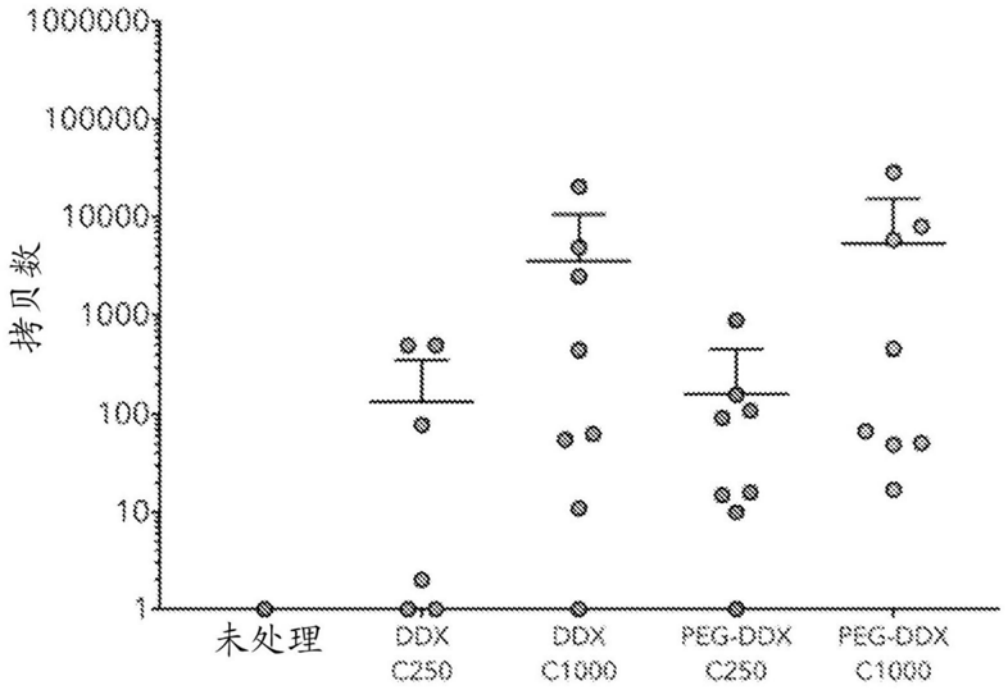

1000000
100000
10000
1000
100
10
1
拷贝数
未处理
DDX C250
DDX C1000
PEG-DDX C250
PEG-DDX C1000

图7A

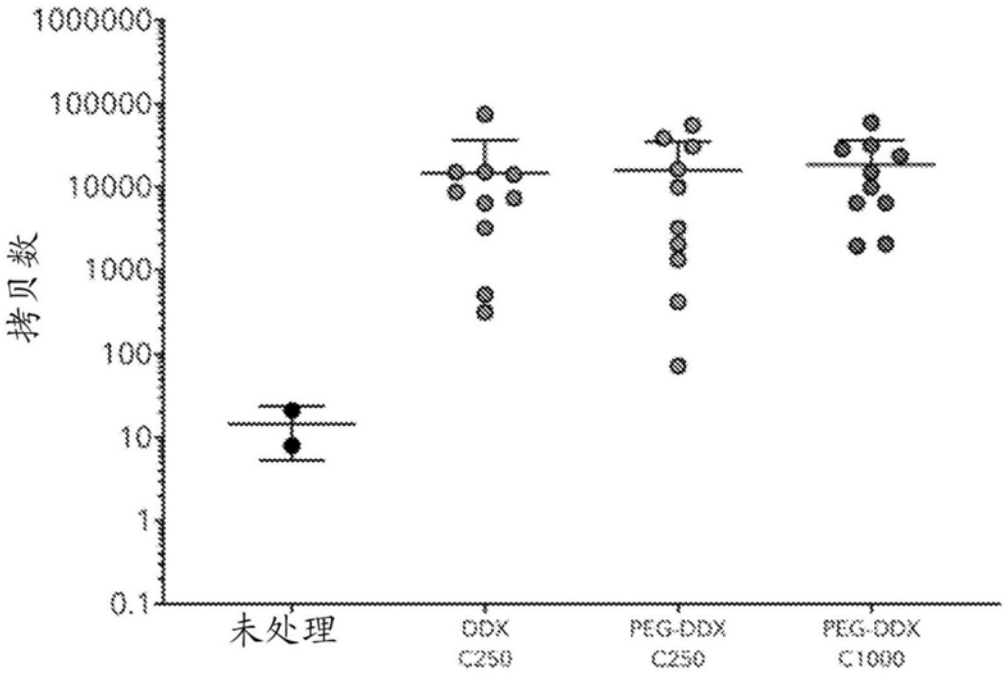

1000000
100000
10000
1000
100
10
1
0.1
拷贝数
未处理
DDX C250
PEG-DDX C250
PEG-DDX C1000

图7B

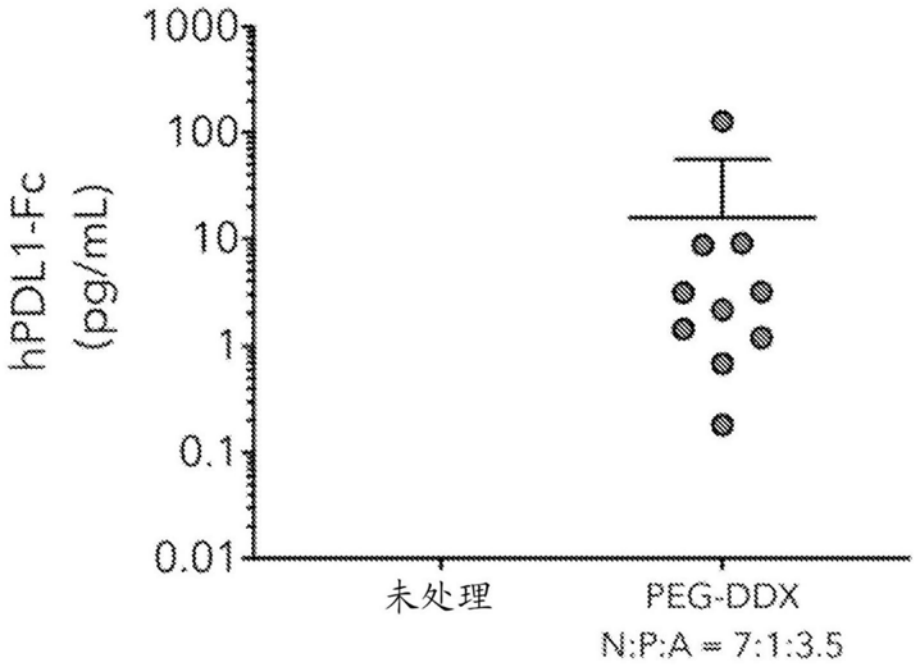

1000
100
10
1
0.1
0.01
hPDL1-Fc
(pg/mL)
未处理
PEG-DDX
N:P:A = 7:1:3.5

图8

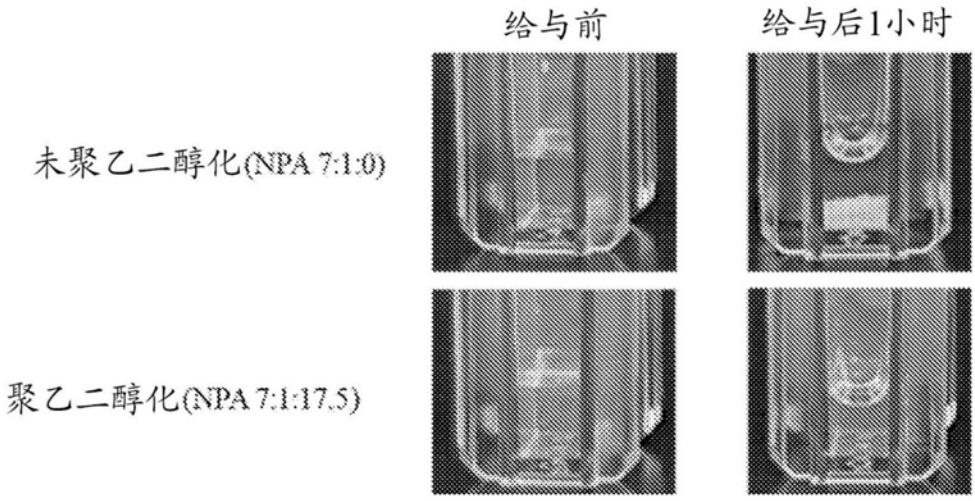

给与前
给与后1小时
未聚乙二醇化(NPA 7:1:0)
聚乙二醇化(NPA 7:1:17.5)

图9A

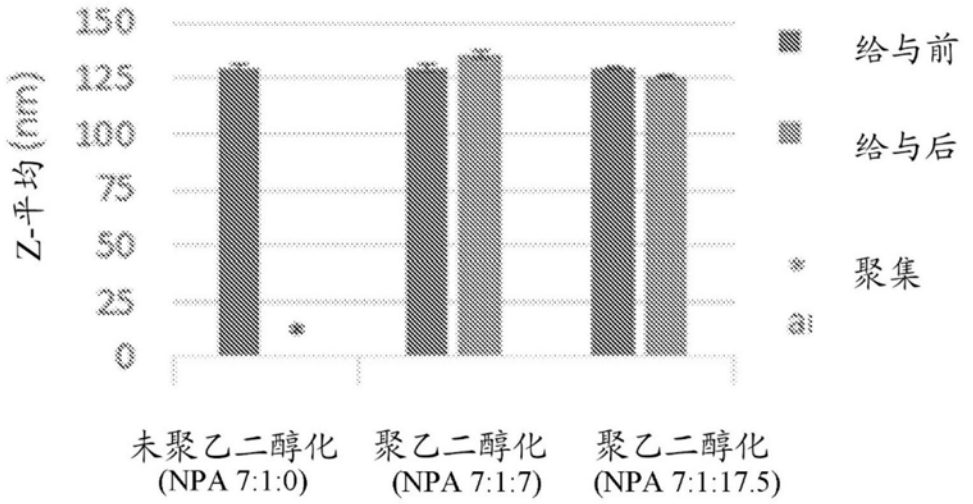
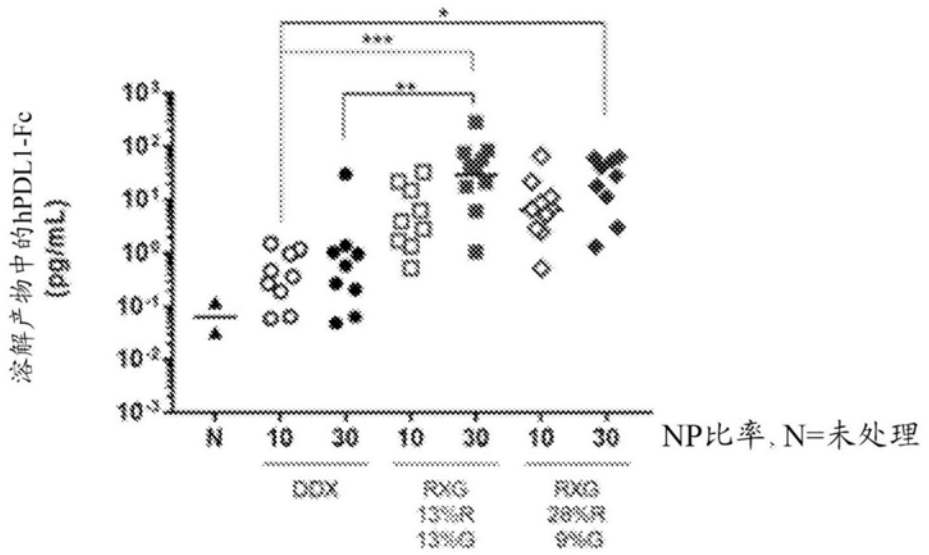


图9B

在IVI后48小时小鼠膀胱中的hPDL1-Fc蛋白表达



*=p<0.05, **=p<0.01, ***=p<0.001, 单因素ANOVA (克鲁斯凯-沃利斯检验)

图10

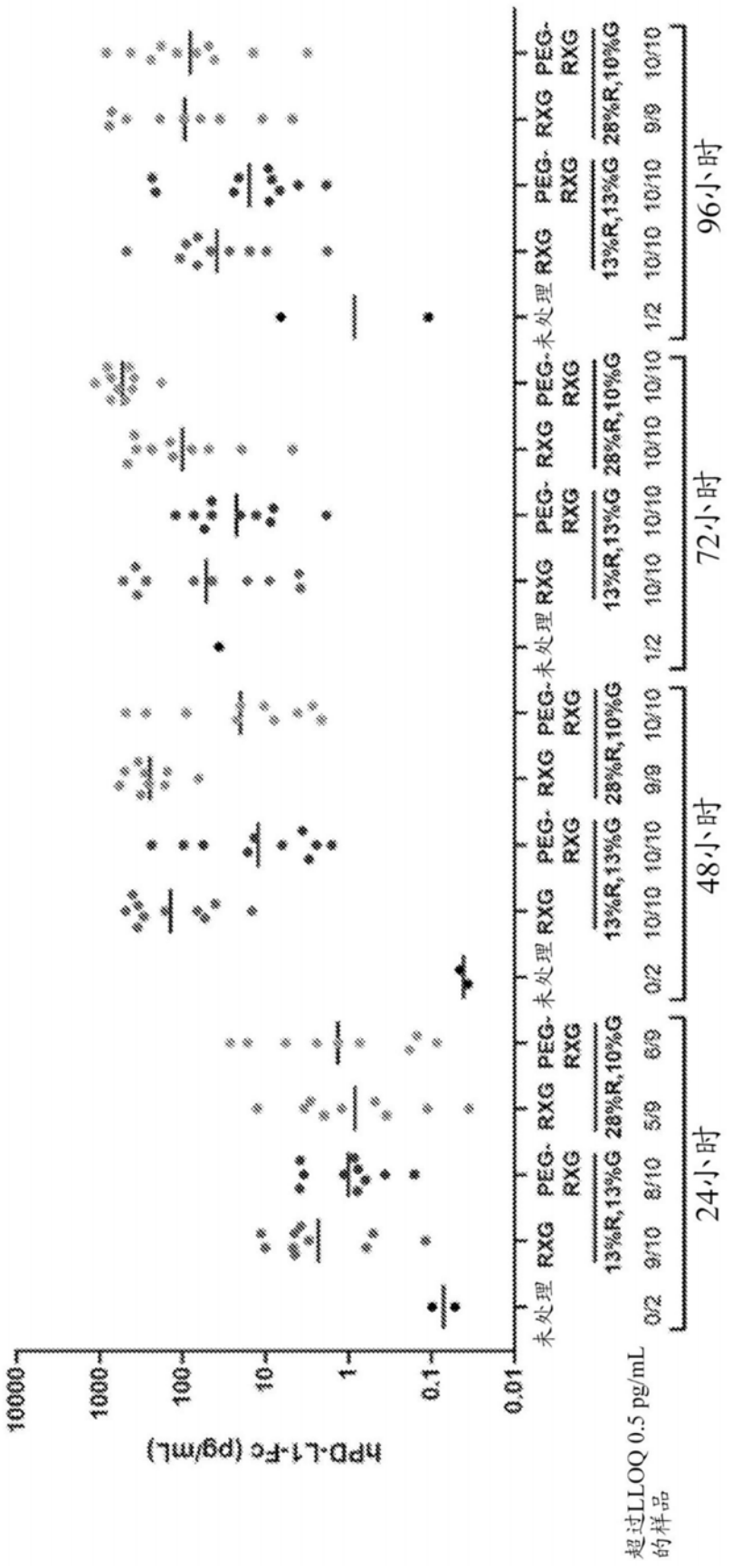
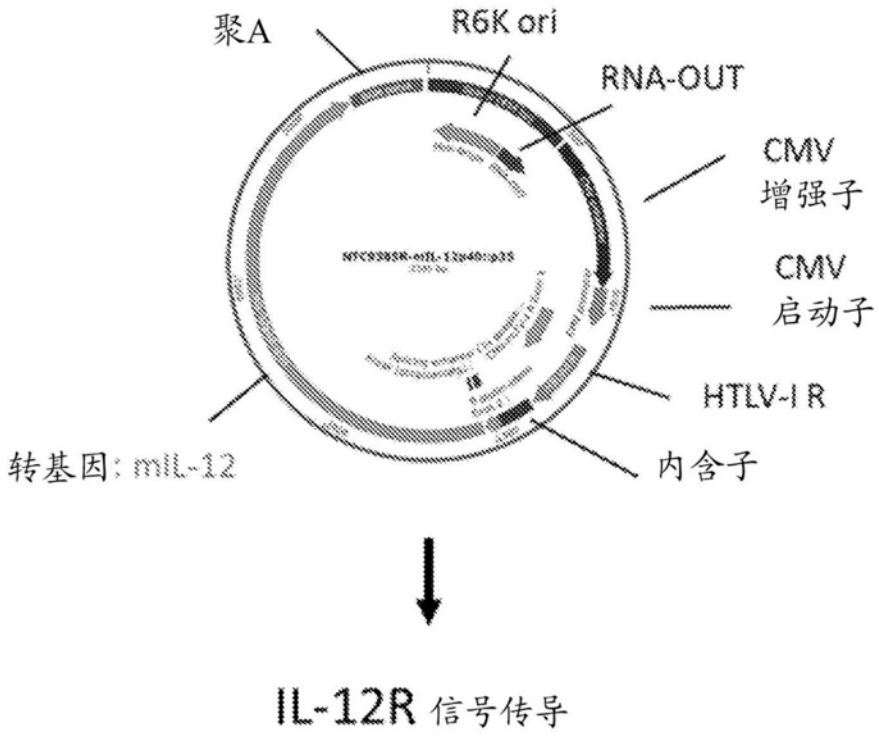

hPD-L1-Fc (pg/mL)
10000
1000
100
10
1
0.1
0.01
未处理 RXG PEG-RXG 13%R,13%G 28%R,10%G PEG-RXG 未处理 RXG PEG-RXG 13%R,13%G 28%R,10%G PEG-RXG 未处理 RXG PEG-RXG 13%R,13%G 28%R,10%G PEG-RXG 未处理 RXG PEG-RXG 13%R,13%G 28%R,10%G PEG-RXG
0/2 9/10 8/10 5/9 8/9 0/2 10/10 10/10 9/9 10/10 1/2 10/10 10/10 10/10 10/10 1/2 10/10 10/10 9/9 10/10
超过LLOQ 0.5 pg/mL的样品
24小时
48小时
72小时
96小时

图11


聚A
R6K ori
RNA-OUT
CMV
增强子
CMV
启动子
HTLV-I R
内含子
转基因: mIL-12
IL-12R 信号传导

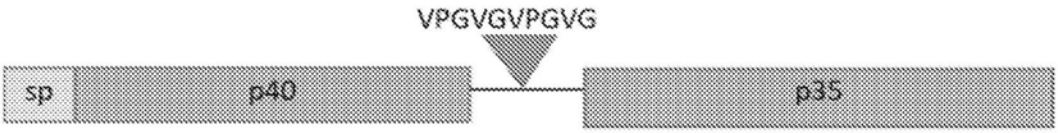

VPGVGVPGVG
sp
p40
p35

图12A

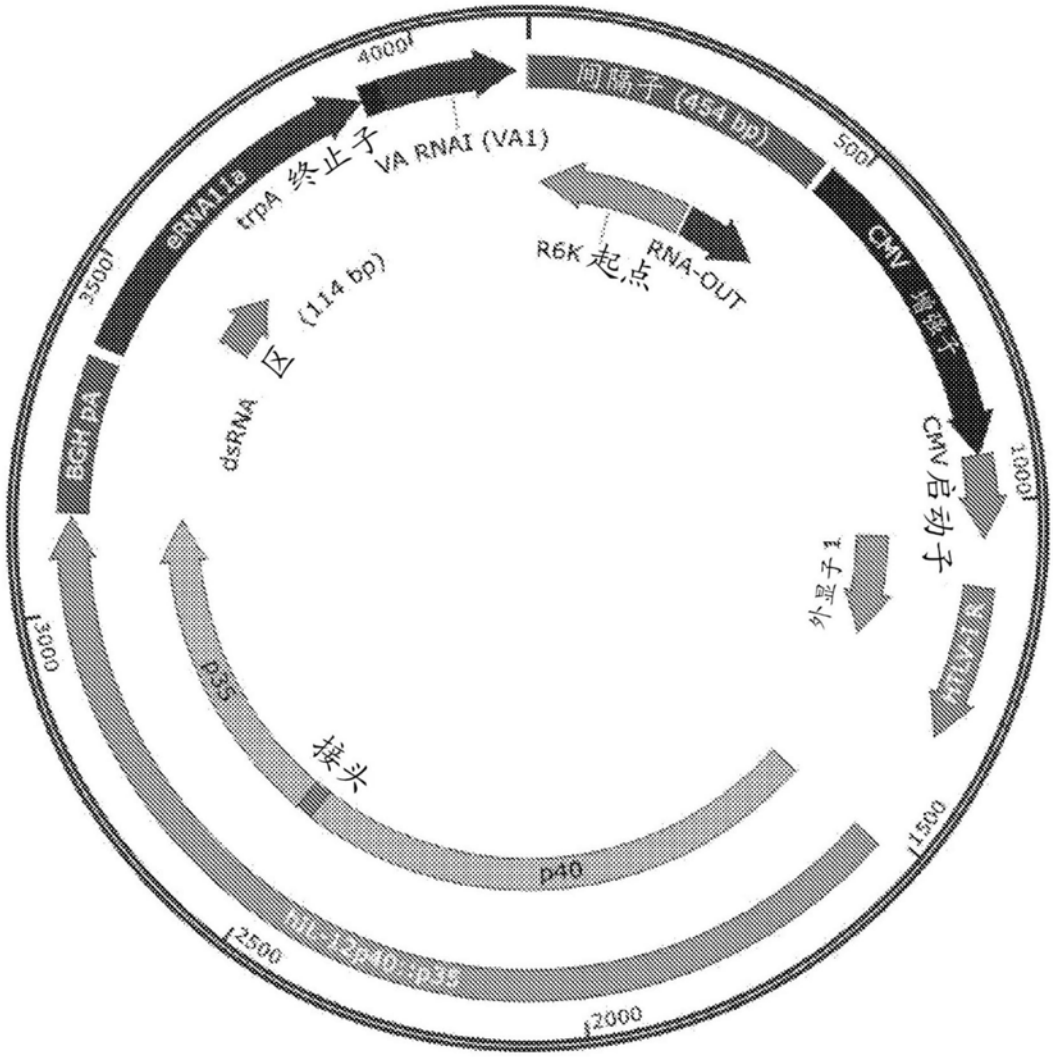

4000
间隔子 (454 bp)
500
CMV 增强子
1000
CMV启动子
外显子1
HTLV-R
1500
2000
hIL-12p40::p35
2500
p40
接头
p35
3000
BGH pA
3500
eRNA11a
trpA 终止子
VA RNAI (VA1)
R6K 起点
RNA-OUT
dsRNA 区 (114 bp)

图12B

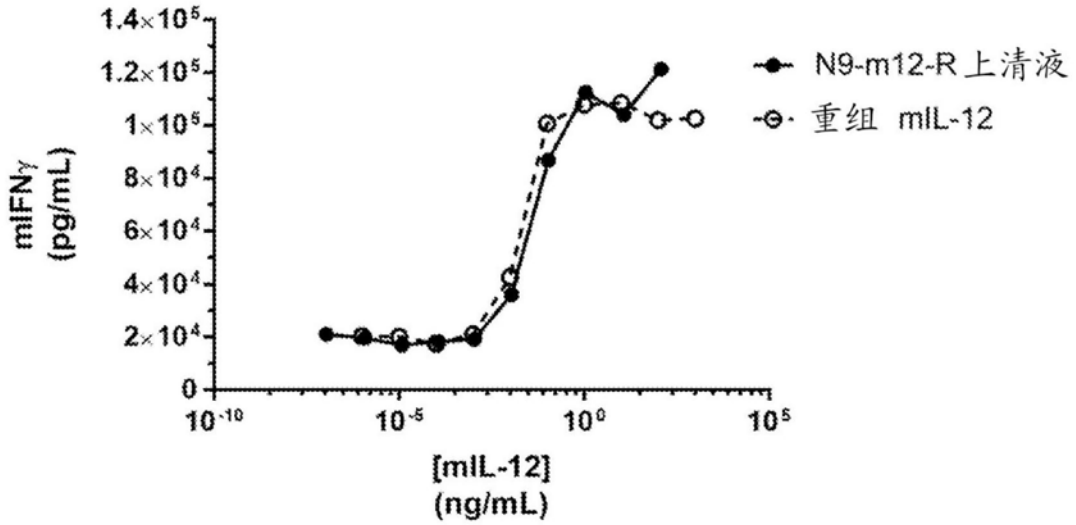

1.4×10⁵
1.2×10⁵
1×10⁵
8×10⁴
6×10⁴
4×10⁴
2×10⁴
0
mIFNγ (pg/mL)
10⁻¹⁰
10⁻⁵
10⁰
10⁵
[mIL-12] (ng/mL)
N9-m12-R 上清液
重组 mIL-12

图13A

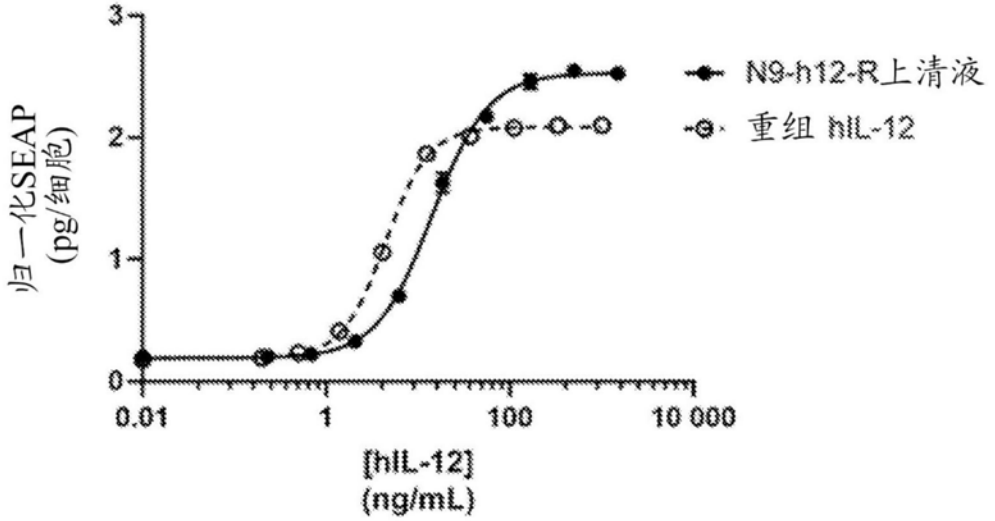

归一化SEAP
(pg/细胞)
3
2
1
0
0.01
1
100
10 000
[hIL-12]
(ng/mL)
N9-h12-R上清液
重组 hIL-12

图13B

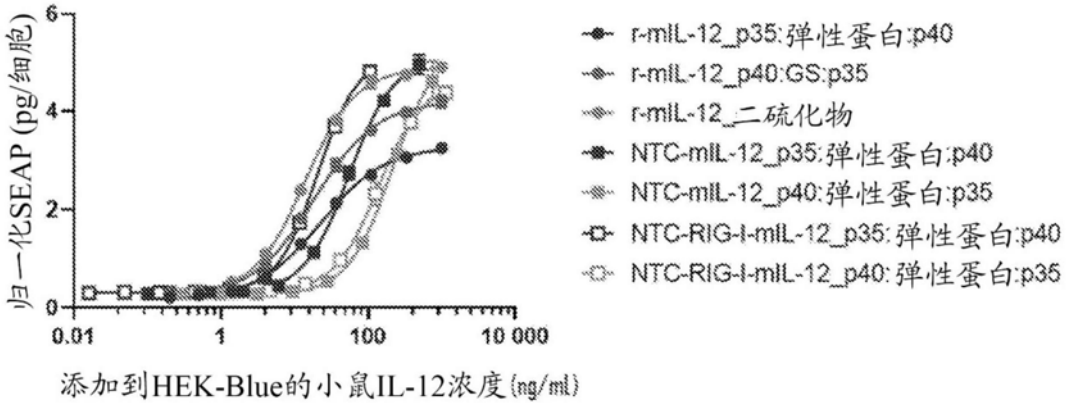

归一化SEAP (pg/细胞)
6
4
2
0
0.01
1
100
10 000
添加到HEK-Blue的小鼠IL-12浓度(ng/ml)
r-mIL-12_p35:弹性蛋白:p40
r-mIL-12_p40:GS:p35
r-mIL-12_二硫化物
NTC-mIL-12_p35:弹性蛋白:p40
NTC-mIL-12_p40:弹性蛋白:p35
NTC-RIG-I-mIL-12_p35:弹性蛋白:p40
NTC-RIG-I-mIL-12_p40:弹性蛋白:p35

图13C

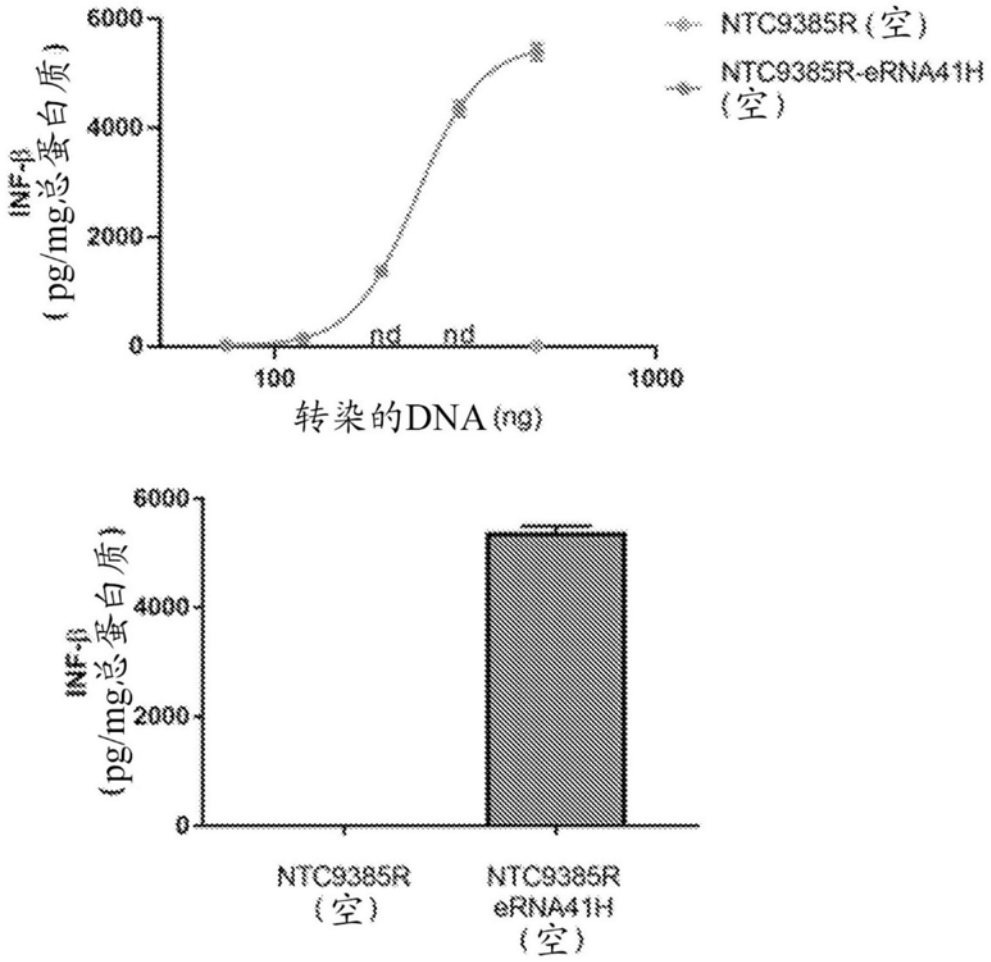

NTC9385R(空)
NTC9385R-eRNA41H
(空)
INF-β
(pg/mg总蛋白质)
6000
4000
2000
0
nd
nd
100
1000
转染的DNA(ng)
INF-β
(pg/mg总蛋白质)
6000
4000
2000
0
NTC9385R
(空)
NTC9385R
eRNA41H
(空)

图14A

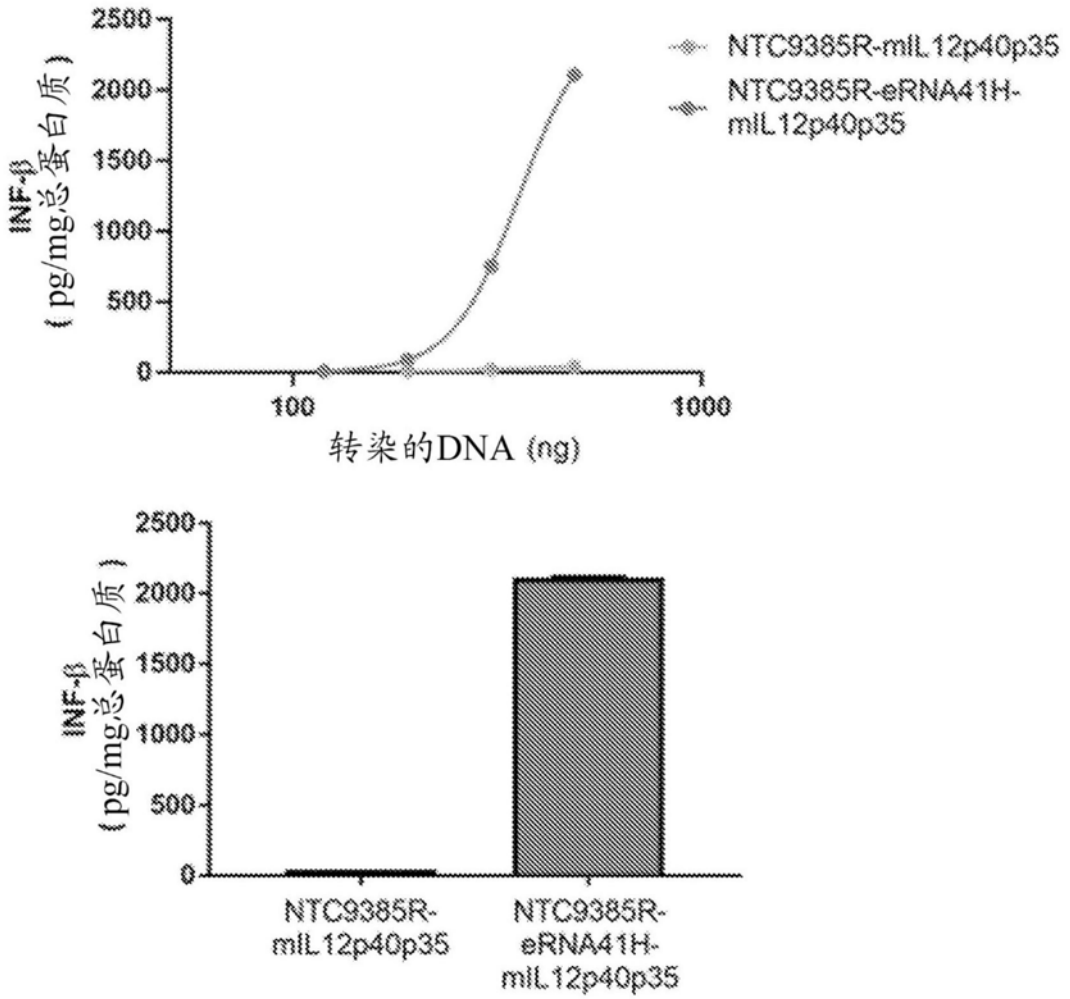

2500
2000
1500
1000
500
0
INF-β (pg/mg总蛋白质)
100
1000
转染的DNA (ng)
NTC9385R-mIL12p40p35
NTC9385R-eRNA41H-mIL12p40p35
2500
2000
1500
1000
500
0
INF-β (pg/mg总蛋白质)
NTC9385R-mIL12p40p35
NTC9385R-eRNA41H-mIL12p40p35

图14B

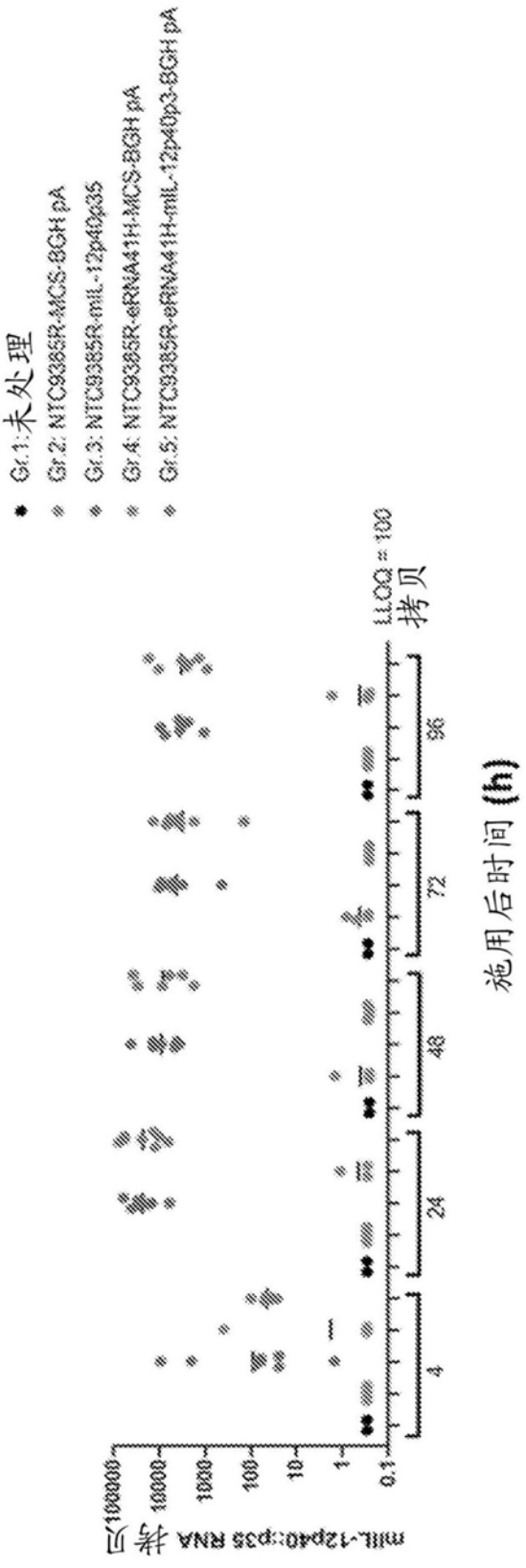
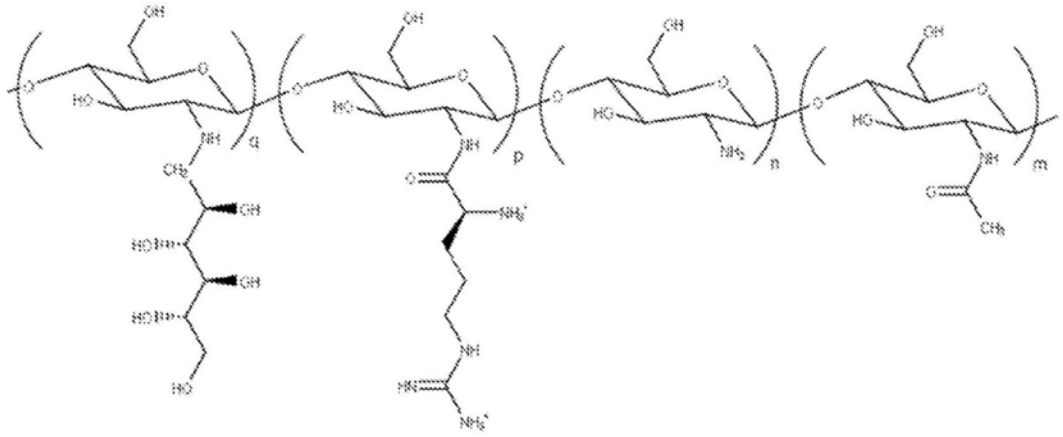

Gr.1:未处理
Gr.2: NTC9385R-MCS-BGH pA
Gr.3: NTC9385R-mIL-12p40p35
Gr.4: NTC9385R-eRNA41H-MCS-BGH pA
Gr.5: NTC9385R-eRNA41H-mIL-12p40p3-BGH pA
LLOQ = 100
拷贝
施用后时间 (h)
mIL-12p40::p35 RNA 拷贝
100000
10000
1000
100
10
1
0.1
4
24
48
72
96

图15



亚基：q ~ 0.10, p ~ 0.28, n ~ 0.61, m ~ 0.01

图16A

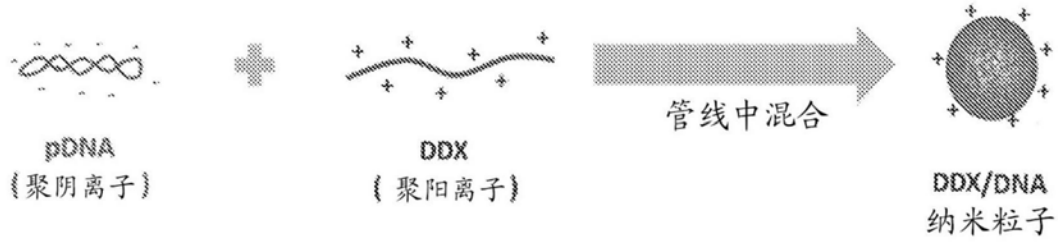


图16B

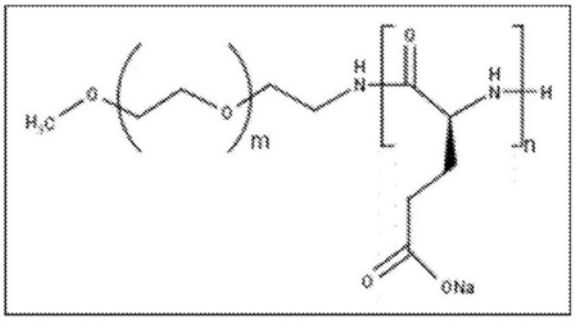


图16C

Z-平均直径	90 -135 nm
多分散指数 (PDI)	0.11 - 0.23
DNA捕获	对于所有DDX，N:P ≥ 10无DNA拖影
超螺旋DNA	> 80%

图17A

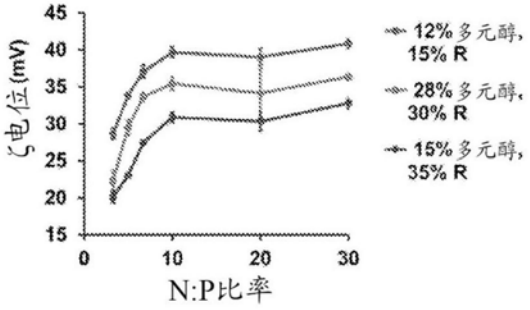


图17B

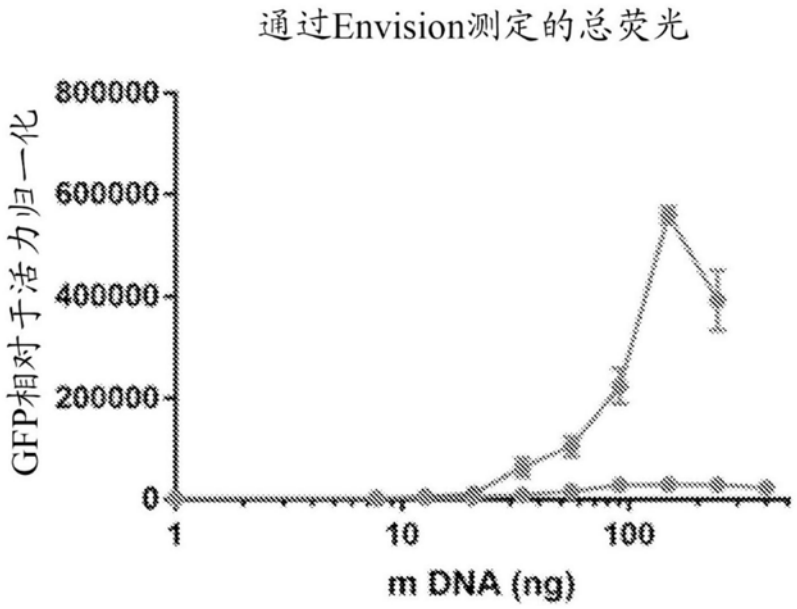


图18A

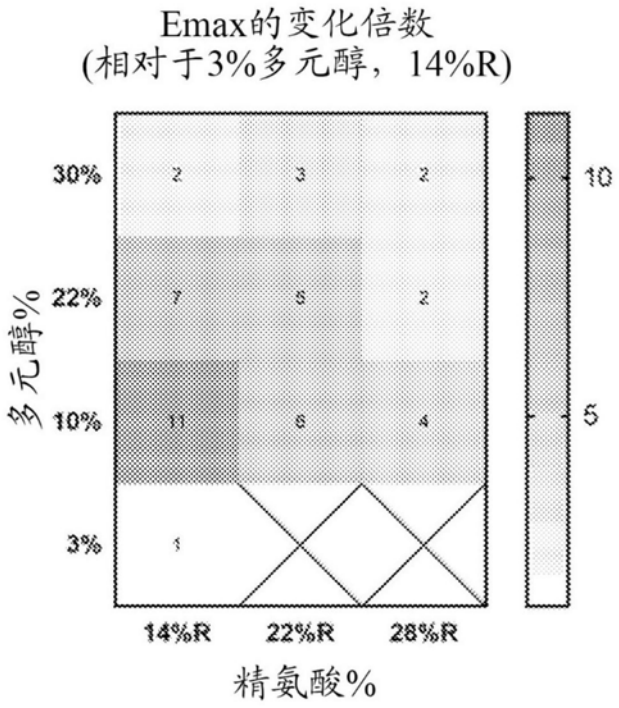

Emax的变化倍数
(相对于3%多元醇，14%R)
30%
22%
10%
3%
多元醇%
2
3
2
7
5
2
11
6
4
1
10
5
14%R
22%R
28%R
精氨酸%

图18B

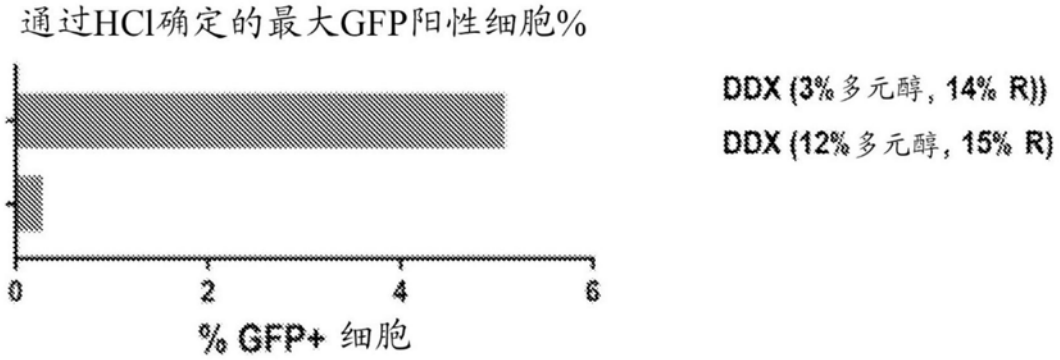

通过HCl确定的最大GFP阳性细胞%
DDX (3%多元醇, 14% R))
DDX (12%多元醇, 15% R)
0
2
4
6
% GFP+ 细胞

图18C

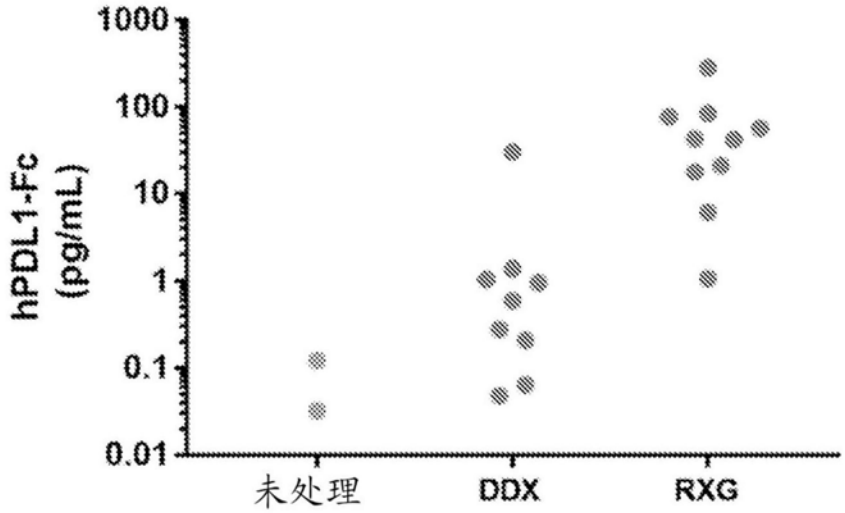

1000
100
10
1
0.1
0.01
hPDL1-Fc
(pg/mL)
未处理
DDX
RXG

图19

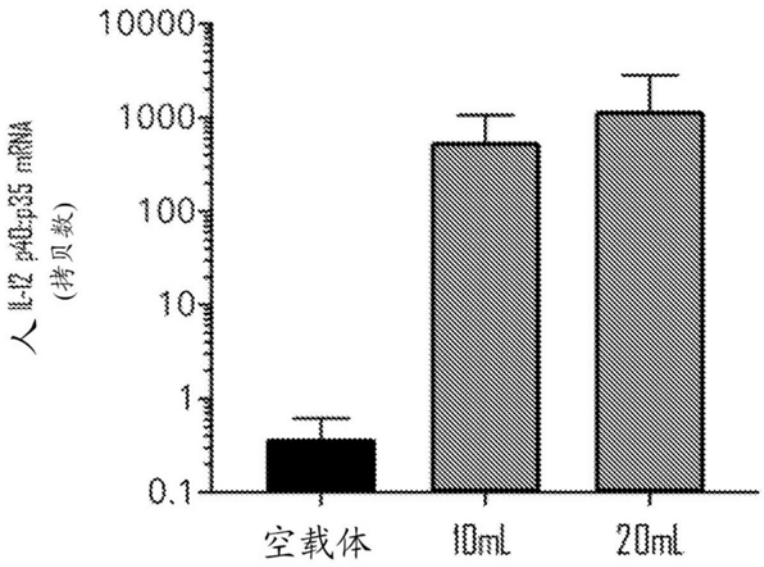

10000
1000
100
10
1
0.1
人 IL-12 p40-p35 mRNA
(拷贝数)
空载体
10mL
20mL

图20A

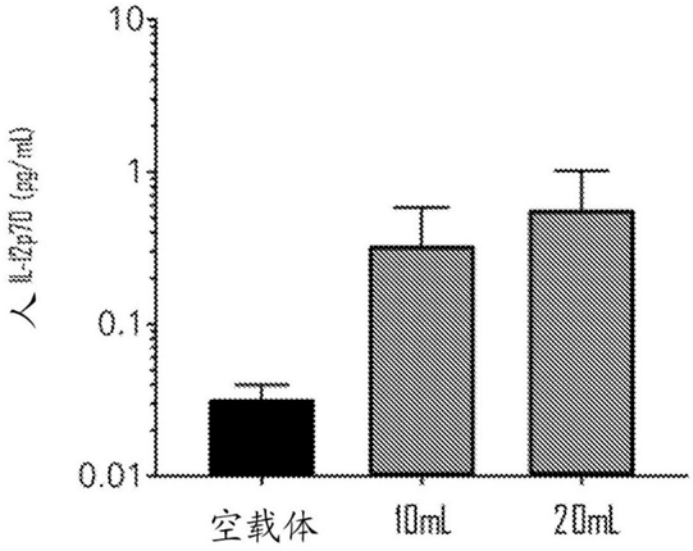

10
1
0.1
0.01
人 IL-12p70 (pg/mL)
空载体
10mL
20mL

图20B

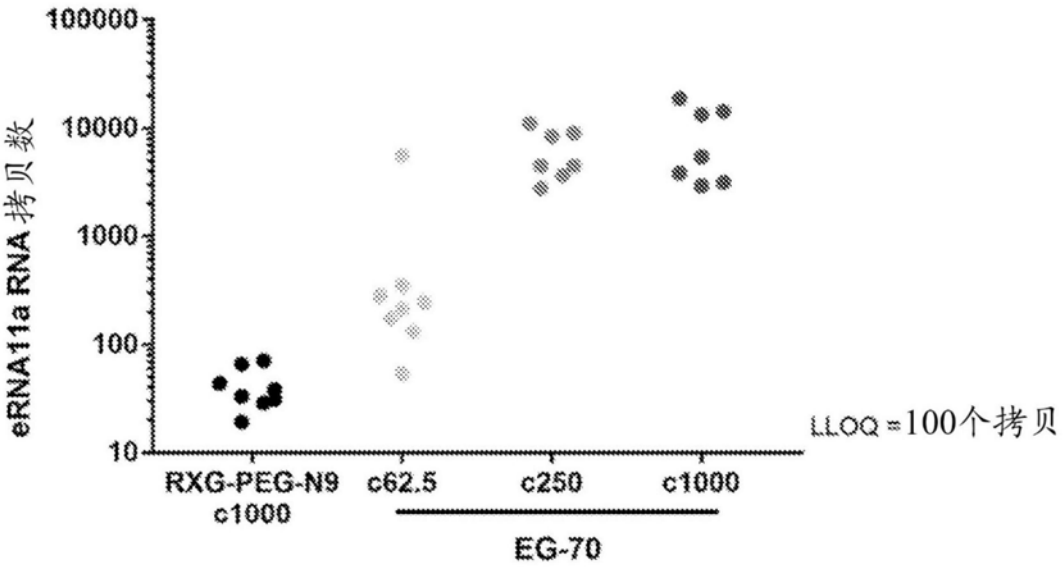

100000
10000
1000
100
10
eRNA11a RNA 拷贝数
LLOQ=100个拷贝
RXG-PEG-N9 c1000
c62.5
c250
c1000
EG-70

图21

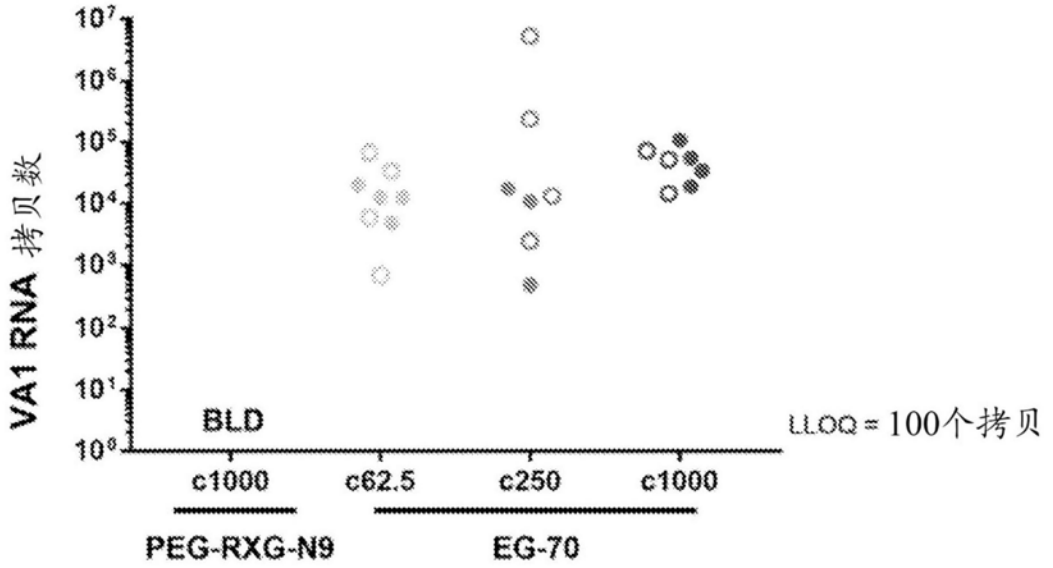

VA1 RNA 拷贝数
BLD
LLOQ = 100个拷贝
c1000
c62.5
c250
c1000
PEG-RXG-N9
EG-70

图22

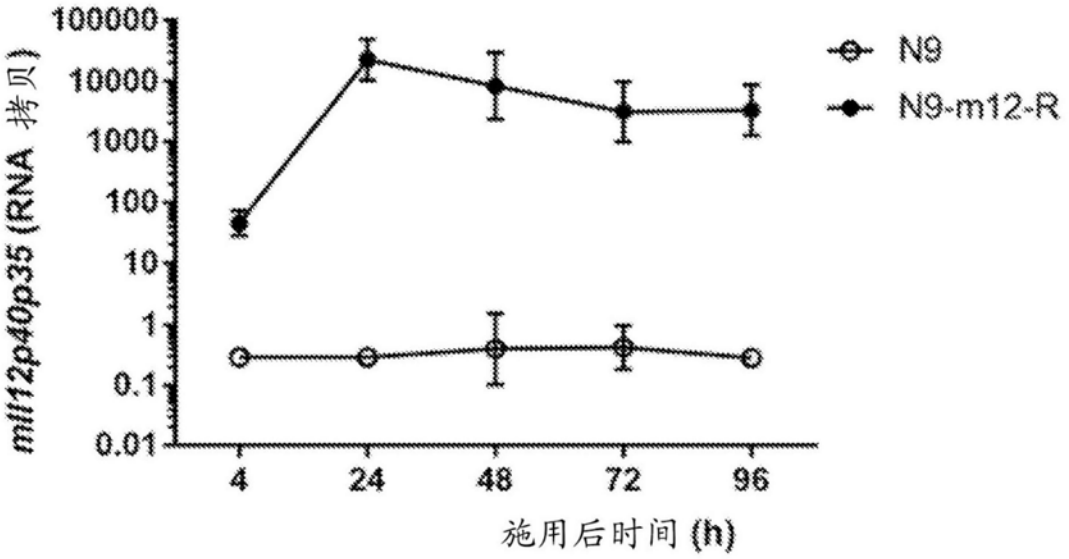

mll12p40p35 (RNA 拷贝)
N9
N9-m12-R
施用后时间 (h)

图23

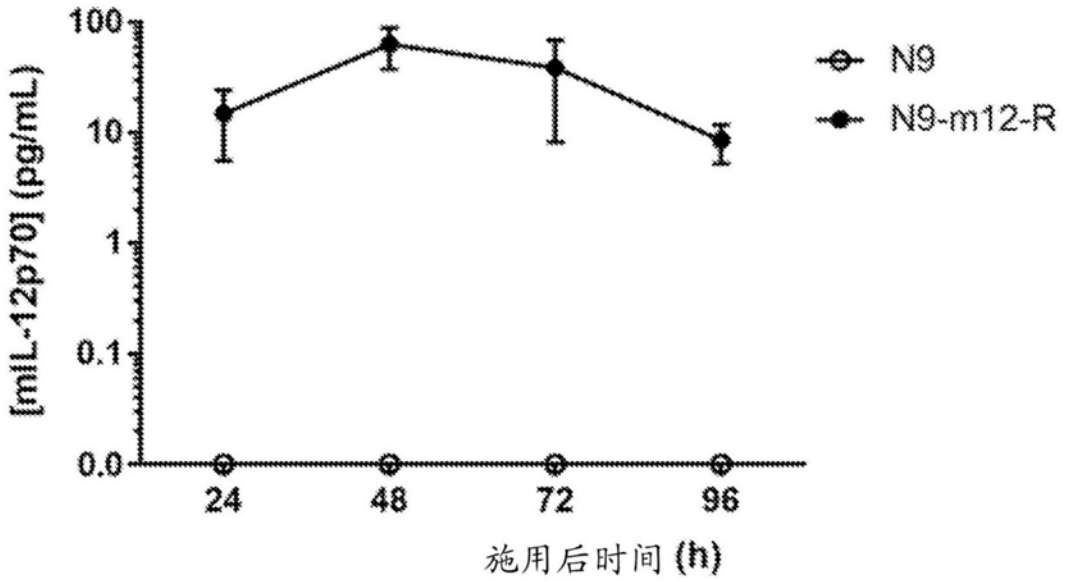

100
10
1
0.1
0.0
[mIL-12p70] (pg/mL)
24
48
72
96
施用后时间 (h)
N9
N9-m12-R

图24

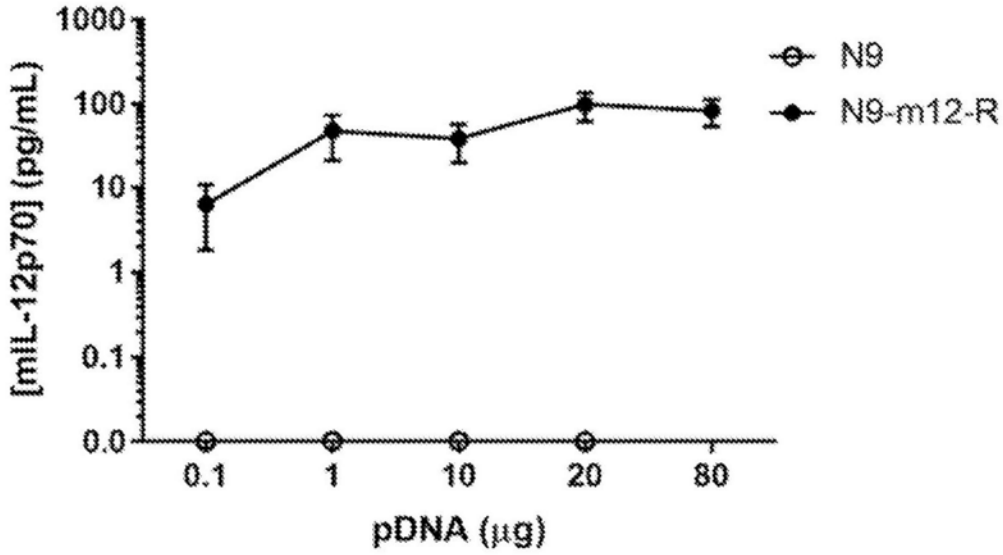

1000
100
10
1
0.1
0.0
[mIL-12p70] (pg/mL)
0.1
1
10
20
80
pDNA (μg)
N9
N9-m12-R

图25

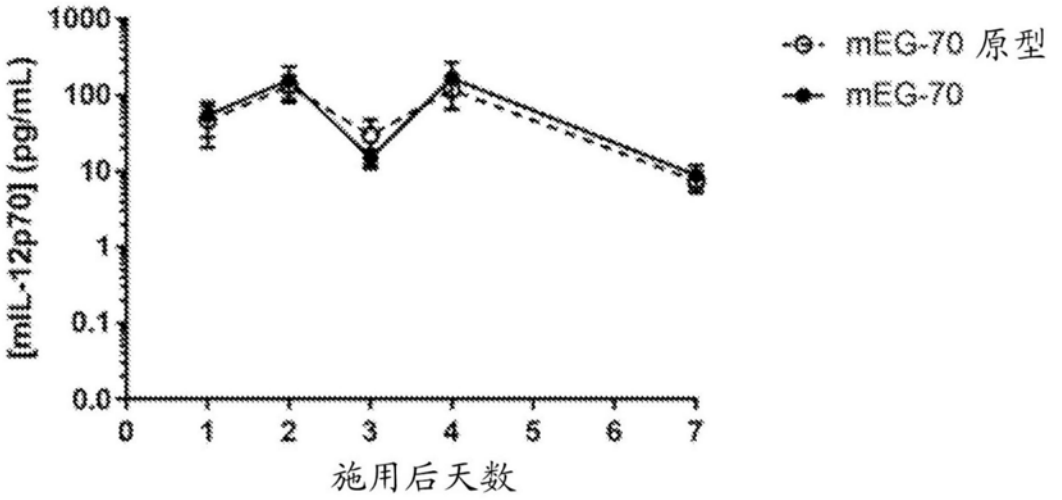

[mIL-12p70] (pg/mL)
1000
100
10
1
0.1
0.0
0
1
2
3
4
5
6
7
施用后天数
mEG-70 原型
mEG-70

图26

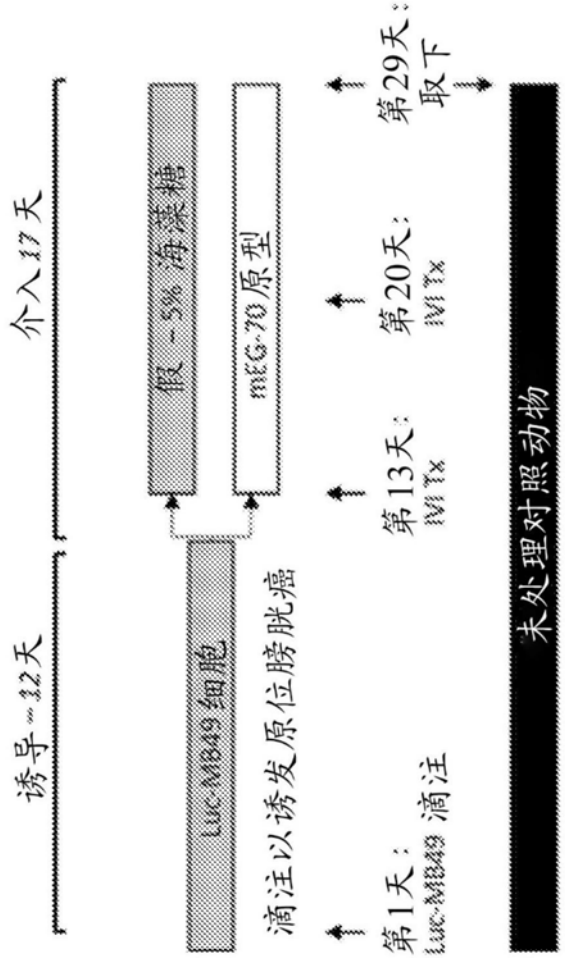

诱导~12天
介入17天
Luc-MB49细胞
假 -5% 海藻糖
mEG-70原型
滴注以诱发原位膀胱癌
第1天：
Luc-MB49 滴注
第13天：
IVI Tx
第20天：
IVI Tx
第29天：
取下
未处理对照动物

图27A

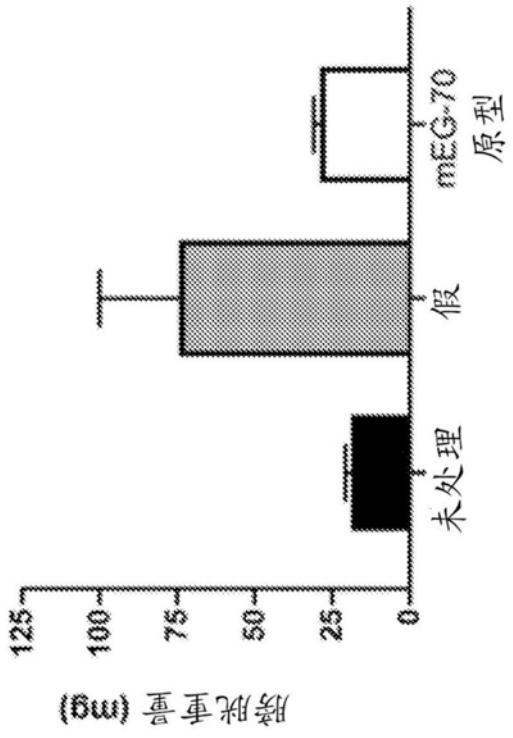


图27B