



(21) 申请号 201880024391.7

A61P 37/00 (2006.01)

(22) 申请日 2018.04.10

(56) 对比文件

(65) 同一申请的已公布的文献号

WO 2016176330 A1, 2016.11.03

申请公布号 CN 110719787 A

US 2015044244 A1, 2015.02.12

(43) 申请公布日 2020.01.21

CN 1703505 A, 2005.11.30

(30) 优先权数据

US 2017036889 A1, 2017.02.09

PCT/EP2017/058651 2017.04.11 EP

WO 2013102203 A1, 2013.07.04

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

WO 2017182524 A1, 2017.10.26

2019.10.10

WO 2014160243 A1, 2014.10.02

(86) PCT国际申请的申请数据

CN 102947450 A, 2013.02.27

PCT/EP2018/059188 2018.04.10

WO 2007024708 A2, 2007.03.01

(87) PCT国际申请的公布数据

US 2011143397 A1, 2011.06.16

WO2018/189193 EN 2018.10.18

Katalin Kariko等. Generating the

(73) 专利权人 生物技术公司

optimal mRNA for therapy: HPLC

地址 德国美因兹

purification eliminates immune activation

专利权人 约翰·古腾堡大学美因兹医学大
学转化肿瘤学公司

and improves translation of nucleoside-

modified, protein-encoding mRNA. Nucleic

Acids Research. 2011, 第39卷 (第21期), 第e142

页摘要、“mRNA synthesis”和“HPLC

purification of RNA”部分以及图3-5.

(72) 发明人 乌尔·沙欣

Antonio Castillo等. Rapid isolation of

塞巴斯蒂安·克赖特尔

mycoviral double-stranded RNA from

克里斯蒂纳·克林克

Botrytis cinerea and Saccharomyces

尤塔·佩茨申卡

cerevisiae. Virology Journal . 2011, 第38卷

莱娜·马伦·克兰斯

第38页.

穆斯塔法·迪肯

王欢等. 用于肿瘤治疗的小分子干扰RNA非

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限
公司 11227

病毒载体研究进展. 药学实践杂志. 2015, (第8

期), 第498-501页.

专利代理师 顾晋伟 刘振佳

审查员 蒋超

(51) Int. Cl.

A61K 39/00 (2006.01)

权利要求书1页 说明书42页

A61K 48/00 (2006.01)

序列表3页 附图21页

(54) 发明名称

用于治疗自身免疫病的RNA

(57) 摘要

本发明涉及非免疫原性RNA。该RNA形成了用

于开发用于诱导针对自身抗原之耐受并因此用

于治疗自身免疫病的治疗剂的基础。

1. 药物组合物,其包含编码包含自身抗原的肽的非免疫原性RNA,其中所述非免疫原性RNA通过并入包含1-甲基假尿苷的核苷酸来替代包含尿嘧啶的核苷酸并去除dsRNA而成为非免疫原性的,其中所述非免疫原性RNA配制在F12脂质体中。

2. 权利要求1所述的药物组合物,其中所述非免疫原性RNA在施用时不导致树突细胞的活化、T细胞的活化和/或IFN- α 的分泌。

3. 权利要求1或2所述的药物组合物,其中所述非免疫原性RNA是体外转录的RNA。

4. 权利要求1或2所述的药物组合物,其中所述自身抗原与自身免疫病相关。

5. 权利要求1或2所述的药物组合物,其中所述自身抗原是T细胞抗原。

6. 权利要求1或2所述的药物组合物,其中所述自身抗原是CNS来源的。

7. 权利要求1或2所述的药物组合物,其中所述自身抗原是髓鞘抗原。

8. 权利要求1或2所述的药物组合物,其中所述自身抗原是髓鞘少突胶质细胞糖蛋白(MOG)。

9. 权利要求1或2所述的药物组合物,其中所述肽包含自身抗原,所述自身抗原包含髓鞘少突胶质细胞糖蛋白(MOG)的第35至55位氨基酸。

10. 权利要求1或2所述的药物组合物,其还包含免疫抑制化合物或编码所述免疫抑制化合物的非免疫原性RNA,其中所述免疫抑制化合物选自转化生长因子 β (TGF- β)、白介素10(IL-10)、白介素1受体拮抗剂(IL-1RA)、白介素4(IL-4)、白介素27(IL-27)、白介素35(IL-35)、程序性死亡-配体1(PD-L1)、诱导型T细胞共刺激分子配体(ICOSL)、B7-H4、CD39、CD73、FAS、FAS-IL、吡啶胺2,3-双加氧酶1(IDO1)、吡啶胺2,3-双加氧酶2(IDO2)、乙醛脱氢酶1(ALDH1)/视黄醛脱氢酶(RALDH)、精氨酸酶1(ARG1)、精氨酸酶2(ARG2)、氧化亚氮合酶(NOS2)、半乳凝素-1、半乳凝素-9、脑信号蛋白4A。

11. 权利要求1至10中任一项所述的药物组合物用于制备用于治疗或预防自身免疫病的药物的用途。

12. 权利要求11所述的用途,其中所述治疗包括诱导针对自身反应性T细胞的耐受。

13. 权利要求11所述的用途,其中所述自身免疫病是T细胞介导的自身免疫病。

14. 权利要求11所述的用途,其中所述自身免疫病是CNS的自身免疫病。

15. 权利要求11所述的用途,其中所述自身免疫病是多发性硬化。

16. 权利要求11至15中任一项所述的用途,其中所述非免疫原性RNA在施用时不导致树突细胞的活化、T细胞的活化和/或IFN- α 的分泌。

17. 权利要求11或12所述的用途,其中所述治疗或预防包括提供免疫抑制化合物或编码所述免疫抑制化合物的非免疫原性RNA,其中所述RNA通过并入1-甲基假尿苷并去除dsRNA而成为非免疫原性的。

18. 权利要求17所述的用途,其中所述免疫抑制化合物选自转化生长因子 β (TGF- β)、白介素10(IL-10)、白介素1受体拮抗剂(IL-1RA)、白介素4(IL-4)、白介素27(IL-27)、白介素35(IL-35)、程序性死亡-配体1(PD-L1)、诱导型T细胞共刺激分子配体(ICOSL)、B7-H4、CD39、CD73、FAS、FAS-IL、吡啶胺2,3-双加氧酶1(IDO1)、吡啶胺2,3-双加氧酶2(IDO2)、乙醛脱氢酶1(ALDH1)/视黄醛脱氢酶(RALDH)、精氨酸酶1(ARG1)、精氨酸酶2(ARG2)、氧化亚氮合酶(NOS2)、半乳凝素-1、半乳凝素-9、脑信号蛋白4A。

用于治疗自身免疫病的RNA

[0001] 本发明描述了非免疫原性RNA。该RNA形成了用于开发用于诱导针对自身抗原之耐受并因此用于治疗自身免疫病的治疗剂的基础。

背景技术

[0002] 免疫系统的进化在脊椎动物中产生基于两种防御类型(固有免疫和适应性免疫)的高度有效的网络。与依赖于识别与病原体相关的常见分子模式的不变受体的进化上古老的固有免疫系统相反,过继免疫基于B细胞(B淋巴细胞)和T细胞(T淋巴细胞)上的高度特异性抗原受体和克隆选择。B细胞通过分泌抗体来引起体液免疫应答,而T细胞介导导致所识别细胞破坏的细胞免疫应答,并在人和动物的细胞介导的免疫中发挥中心作用。

[0003] 成熟T细胞通过其抗原特异性受体(TCR)识别抗原并对其作出应答,所述受体与和主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex,MHC)分子结合并呈递在靶细胞表面上的免疫原性肽(表位)相互作用。例如,细胞毒性T细胞对与MHC-I蛋白缔合呈递的抗原作出应答。辅助T细胞识别MHC-II蛋白上呈递的抗原。TCR活化的最直接后果是信号传导途径的启动,导致T细胞的克隆扩增,细胞表面上活化标志物的上调,分化成效应细胞,诱导细胞毒性或细胞因子分泌和诱导凋亡。TCR是复杂信号传导机构的一部分,其包含TCR α 链和 β 链的异二聚体复合物,这是共受体CD4或CD8和CD3信号转导模块。虽然CD3链在细胞内转移活化信号,但TCR α/β 异二聚体仅负责抗原识别。

[0004] 除T细胞在免疫应答中发挥的关键作用之外,树突细胞(DC)同样重要。DC是专职抗原呈递细胞,其在维持针对自身抗原的耐受和活化针对外来抗原的固有和适应性免疫中具有关键调节作用。

[0005] 免疫系统也可产生不期望的作用。例如,自身免疫性病症的特征在于针对自身抗原(自身抗原)的耐受丧失,针对自身抗原具有反应性的淋巴细胞的活化以及靶器官中的病理损伤。

[0006] 目前对于自身免疫性病症的治疗主要集中在症状响应和缓和整个免疫系统上。抗原特异性治疗最近已成为自身免疫性病症的潜在治疗,但已证明引发适当的免疫应答是困难的,而且这些治疗取得的成功有限。

[0007] 因此需要自身免疫病的有效治疗。

[0008] 本发明的目的是提供用于自身免疫病治疗的药剂。该目的根据本发明通过权利要求书的主题来实现。

[0009] 本发明涵盖用于诱导针对自身抗原之耐受的组合物、方法和用途。根据本发明,免疫应答是自身免疫病特征的自身抗原以非免疫原性RNA的形式施用,所述非免疫原性RNA编码包含自身抗原或其片段或者自身抗原或片段之变体的肽或多肽。在一个优选实施方案中待施用的RNA通过并入到抑制RNA介导的固有免疫受体活化的经RNA修饰核苷酸中并去除双链RNA(dsRNA)而成为非免疫原性的。根据本发明示出,用非免疫原性RNA对小鼠进行免疫接种完全阻断了自身免疫病的任何体征。还示出施用单疾病驱动表位可以是足够的。

[0010] 本发明的一个方面涉及在对象中治疗自身免疫病的方法,其包括向对象施用编码

包含自身抗原或其片段或者自身抗原或片段之变体的肽或多肽的非免疫原性RNA。

[0011] 在一个实施方案中,自身免疫病是T细胞介导的自身免疫病。

[0012] 本发明的一个方面涉及在对象中诱导针对自身反应性T细胞之耐受的方法,其包括向对象施用编码包含自身抗原或其片段或者自身抗原或片段之变体的肽或多肽的非免疫原性RNA。

[0013] 在一个实施方案中,对象患有自身免疫病。在一个实施方案中,自身免疫病是T细胞介导的自身免疫病。在一个实施方案中,T细胞与自身抗原或表达并优选呈递自身抗原的细胞发生自身反应。

[0014] 在本发明方法的一个实施方案中,自身免疫病是CNS的自身免疫病。在本发明方法的一个实施方案中,自身免疫病是多发性硬化。

[0015] 在本发明方法的一个实施方案中,非免疫原性RNA在施用时不导致树突细胞的活化、T细胞的活化和/或IFN- α 的分泌。

[0016] 在本发明方法的一个实施方案中,非免疫原性RNA通过并入经修饰核苷酸并去除dsRNA而成为非免疫原性的。在一个实施方案中,经修饰核苷酸抑制RNA介导的固有免疫受体活化。在一个实施方案中,经修饰核苷酸包含用包含经修饰核碱基的核苷对一个或多个尿苷的替换。在一个实施方案中,经修饰核碱基是经修饰尿嘧啶。在一个实施方案中,包含经修饰核碱基的核苷选自:3-甲基尿苷(m3U)、5-甲氧基尿苷(mo5U)、5-氮杂尿苷、6-氮杂尿苷、2-硫代-5-氮杂尿苷、2-硫代尿苷(s2U)、4-硫代尿苷(s4U)、4-硫代假尿苷、2-硫代假尿苷、5-羟基尿苷(ho5U)、5-氨基烯丙基尿苷、5-卤代尿苷(例如,5-碘代尿苷或5-溴代尿苷)、尿苷5-羟乙酸(cmo5U)、尿苷5-羟乙酸甲酯(mcmo5U)、5-羧甲基尿苷(cm5U)、1-羧甲基假尿苷、5-羧基羟甲基尿苷(chm5U)、5-羧基羟甲基尿苷甲酯(mchm5U)、5-甲氧基羰基甲基尿苷(mcm5U)、5-甲氧基羰基甲基-2-硫代尿苷(mcm5s2U)、5-氮甲基-2-硫代尿苷(nm5s2U)、5-甲基氮甲基尿苷(mnm5U)、1-乙基假尿苷、5-甲基氮甲基-2-硫代尿苷(mnm5s2U)、5-甲基氮甲基-2-硒尿苷(mnm5se2U)、5-氮甲酰甲基尿苷(ncm5U)、5-羧甲基氮甲基尿苷(cmm5U)、5-羧甲基氮甲基-2-硫代尿苷(cmm5s2U)、5-丙炔基尿苷、1-丙炔基假尿苷、5-牛磺酸甲基尿苷(τ m5U)、1-牛磺酸甲基假尿苷、5-牛磺酸甲基-2-硫代尿苷(τ m5s2U)、1-牛磺酸甲基-4-硫代假尿苷、5-甲基-2-硫代尿苷(m5s2U)、1-甲基-4-硫代假尿苷(m1s4 ψ)、4-硫代-1-甲基假尿苷、3-甲基假尿苷(m3 ψ)、2-硫代-1-甲基假尿苷、1-甲基-1-脱氮假尿苷、2-硫代-1-甲基-1-脱氮假尿苷、二氢尿苷(D)、二氢假尿苷、5,6-二氢尿苷、5-甲基二氢尿苷(m5D)、2-硫代二氢尿苷、2-硫代二氢假尿苷、2-甲氧基尿苷、2-甲氧基-4-硫代尿苷、4-甲氧基假尿苷、4-甲氧基-2-硫代假尿苷、N1-甲基假尿苷、3-(3-氨基-3-羧基丙基)尿苷(acp3U)、1-甲基-3-(3-氨基-3-羧基丙基)假尿苷(acp3 ψ)、5-(异戊烯基氨基)尿苷(inm5U)、5-(异戊烯基氨基)-2-硫代尿苷(inm5s2U)、 α -硫代尿苷、2'-O-甲基尿苷(Um)、5,2'-O-二甲基尿苷(m5Um)、2'-O-甲基假尿苷(ψ m)、2-硫代-2'-O-甲基尿苷(s2Um)、5-甲氧基羰基甲基-2'-O-甲基尿苷(mcm5Um)、5-氮甲酰甲基-2'-O-甲基尿苷(ncm5Um)、5-羧甲基氮甲基-2'-O-甲基尿苷(cmm5Um)、3,2'-O-二甲基尿苷(m3Um)、5-(异戊烯基氨基)-2'-O-甲基尿苷(inm5Um)、1-硫代尿苷、脱氧胸苷、2'-F-阿糖尿苷、'-F-尿苷、2'-OH-阿糖尿苷、5-(2-甲酯基乙烯基)尿苷和5-[3-(1-E-丙烯基氨基)尿苷。在一个实施方案中,包含经修饰核碱基的核苷是假尿苷(ψ)、N1-甲基假尿苷(m¹ ψ)或5-甲基尿苷(m⁵U)。在一个实施方案中,包含经修

饰核碱基的核苷是1-甲基假尿苷。

[0017] 在本发明方法的一个实施方案中,非免疫原性RNA是mRNA。在本发明方法的一个实施方案中,非免疫原性RNA是体外转录的RNA。

[0018] 在本发明方法的一个实施方案中,自身抗原与自身免疫病相关。在本发明方法的一个实施方案中,自身抗原是T细胞抗原。在本发明方法的一个实施方案中,自身抗原是CNS来源的。在本发明方法的一个实施方案中,自身抗原是髓鞘抗原(myelin antigen)。在本发明方法的一个实施方案中,自身抗原是髓鞘少突胶质细胞糖蛋白(Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein,MOG)。在本发明方法的一个实施方案中,包含自身抗原或其片段或者自身抗原或片段之变体的肽或多肽包含髓鞘少突胶质细胞糖蛋白(MOG)的第35至55位氨基酸。

[0019] 在本发明方法的一个实施方案中,非免疫原性RNA在对象的细胞中瞬时表达。

[0020] 在本发明方法的一个实施方案中,非免疫原性RNA被递送至树突细胞。在一个实施方案中,树突细胞是未成熟的树突细胞。

[0021] 在本发明方法的一个实施方案中,非免疫原性RNA配制在递送载剂中。在一个实施方案中,递送载剂包含颗粒。在一个实施方案中,递送载剂包含脂质。在一个实施方案中,脂质包含阳离子脂质。在一个实施方案中,脂质与非免疫原性RNA形成复合物和/或包封非免疫原性RNA。在本发明方法的一个实施方案中,非免疫原性RNA配制在脂质体中。

[0022] 本发明的一个方面涉及药物组合物,其包含编码包含自身抗原或其片段或者自身抗原或片段之变体的肽或多肽的非免疫原性RNA。

[0023] 在一个实施方案中,非免疫原性RNA在施用时不导致树突细胞的活化、T细胞的活化和/或IFN- α 的分泌。

[0024] 在一个实施方案中,非免疫原性RNA通过并入经修饰核苷酸并去除dsRNA而成为非免疫原性的。在一个实施方案中,经修饰核苷酸抑制RNA介导的固有免疫受体活化。在一个实施方案中,经修饰核苷酸包含用包含经修饰核碱基的核苷对一个或多个尿苷的替换。在一个实施方案中,经修饰核碱基是经修饰尿嘧啶。在一个实施方案中,包含经修饰核碱基的核苷选自:3-甲基尿苷(m3U)、5-甲氧基尿苷(mo5U)、5-氮杂尿苷、6-氮杂尿苷、2-硫代-5-氮杂尿苷、2-硫代尿苷(s2U)、4-硫代尿苷(s4U)、4-硫代假尿苷、2-硫代假尿苷、5-羟基尿苷(ho5U)、5-氨基烯丙基尿苷、5-卤代尿苷(例如,5-碘代尿苷或5-溴代尿苷)、尿苷5-羟乙酸(cmo5U)、尿苷5-羟乙酸甲酯(mcmo5U)、5-羧甲基尿苷(cm5U)、1-羧甲基假尿苷、5-羧基羟甲基尿苷(chm5U)、5-羧基羟甲基尿苷甲酯(mchm5U)、5-甲氧基羰基甲基尿苷(mcm5U)、5-甲氧基羰基甲基-2-硫代尿苷(mcm5s2U)、5-氨基甲基-2-硫代尿苷(nm5s2U)、5-氨基甲基尿苷(mnm5U)、1-乙基假尿苷、5-氨基甲基-2-硫代尿苷(mnm5s2U)、5-氨基甲基-2-硒尿苷(mnm5se2U)、5-氨基酰甲基尿苷(ncm5U)、5-羧甲基氨基甲基尿苷(cmm5U)、5-羧甲基氨基-2-硫代尿苷(cmm5s2U)、5-丙炔基尿苷、1-丙炔基假尿苷、5-牛磺酸甲基尿苷(τ m5U)、1-牛磺酸甲基假尿苷、5-牛磺酸甲基-2-硫代尿苷(τ m5s2U)、1-牛磺酸甲基-4-硫代假尿苷、5-甲基-2-硫代尿苷(m5s2U)、1-甲基-4-硫代假尿苷(m1s4 ψ)、4-硫代-1-甲基假尿苷、3-甲基假尿苷(m3 ψ)、2-硫代-1-甲基假尿苷、1-甲基-1-脱氮假尿苷、2-硫代-1-甲基-1-脱氮假尿苷、二氢尿苷(D)、二氢假尿苷、5,6-二氢尿苷、5-甲基二氢尿苷(m5D)、2-硫代二氢尿苷、2-硫代二氢假尿苷、2-甲氧基尿苷、2-甲氧基-4-硫代尿苷、4-甲氧基假尿苷、4-甲氧基-2-硫代假

尿苷、N1-甲基假尿苷、3-(3-氨基-3-羧基丙基)尿苷(acp3U)、1-甲基-3-(3-氨基-3-羧基丙基)假尿苷(acp3 ψ)、5-(异戊烯基氨基甲基)尿苷(inm5U)、5-(异戊烯基氨基甲基)-2-硫代尿苷(inm5s2U)、 α -硫代尿苷、2'-O-甲基尿苷(Um)、5,2'-O-二甲基尿苷(m5Um)、2'-O-甲基假尿苷(ψ m)、2-硫代-2'-O-甲基尿苷(s2Um)、5-甲氧基羰基甲基-2'-O-甲基尿苷(mcm5Um)、5-氨甲酰甲基-2'-O-甲基尿苷(ncm5Um)、5-羧甲基氨基甲基-2'-O-甲基尿苷(cmm5Um)、3,2'-O-二甲基尿苷(m3Um)、5-(异戊烯基氨基甲基)-2'-O-甲基尿苷(inm5Um)、1-硫代尿苷、脱氧胸苷、2'-F-阿糖尿苷、2'-F-尿苷、2'-OH-阿糖尿苷、5-(2-甲酯基乙烯基)尿苷和5-[3-(1-E-丙烯基氨基)尿苷。在一个实施方案中,包含经修饰核碱基的核苷是假尿苷(ψ)、N1-甲基假尿苷($m^1\psi$)或5-甲基尿苷(m^5U)。在一个实施方案中,包含经修饰核碱基的核苷是1-甲基假尿苷。

[0025] 在本发明药物组合物的一个实施方案中,非免疫原性RNA是mRNA。在本发明药物组合物的一个实施方案中,非免疫原性RNA是体外转录的RNA。

[0026] 在本发明药物组合物的一个实施方案中,自身抗原与自身免疫病相关。在本发明药物组合物的一个实施方案中,自身抗原是T细胞抗原。在本发明药物组合物的一个实施方案中,自身抗原是CNS来源的。在本发明药物组合物的一个实施方案中,自身抗原是髓鞘抗原。在本发明药物组合物的一个实施方案中,自身抗原是髓鞘少突胶质细胞糖蛋白(MOG)。在本发明药物组合物的一个实施方案中,包含自身抗原或其片段或者自身抗原或片段之变体的肽或多肽包含髓鞘少突胶质细胞糖蛋白(MOG)的第35至55位氨基酸。

[0027] 在本发明药物组合物的一个实施方案中,非免疫原性RNA在被施用药物组合物的对象的细胞中瞬时表达。

[0028] 在本发明药物组合物的一个实施方案中,非免疫原性RNA被递送至被施用药物组合物的对象的树突细胞。在一个实施方案中,树突细胞是未成熟的树突细胞。

[0029] 在本发明药物组合物的一个实施方案中,非免疫原性RNA配制在递送载剂中。在一个实施方案中,递送载剂包含颗粒。在一个实施方案中,递送载剂包含脂质。在一个实施方案中,脂质包含阳离子脂质。在一个实施方案中,脂质与非免疫原性RNA形成复合物和/或包封非免疫原性RNA。在本发明药物组合物的一个实施方案中,非免疫原性RNA配制在脂质体中。

[0030] 本发明的一个方面涉及本发明的药物组合物,其用于本发明的方法。

[0031] 根据以下发明详述和所附权利要求书,本发明的其他特征和优点将变得明显。

[0032] 发明详述

[0033] 尽管下面详细描述了本发明,但应当理解,本发明不限于本文中所述的特定方法、方案和试剂,因为这些可变化。还应当理解,本文中使用的术语仅用于描述特定实施方案的目的,并不旨在限制本发明的范围,本发明的范围仅由所附权利要求书限制。除非另外限定,否则本文中使用的所有技术和科学术语具有本领域普通技术人员通常理解的含义。

[0034] 在下文中,将描述本发明的要素。这些要素随具体实施方案列出,然而,应当理解,其可以以任何方式且以任意数量组合以产生另外的实施方案。各个描述的实例和优选实施方案不应被解释为将本发明仅限于明确描述的实施方案。本说明书应当理解为支持并涵盖将明确描述的实施方案与任何数量的所公开和/或优选要素组合的实施方案。此外,除非上

下文另有指明,否则本申请中所有描述的要素的任意排列和组合应当被认为通过本申请的说明书公开。

[0035] 优选地,本文中使用的术语如“A multilingual glossary of biotechnological terms: (IUPAC Recommendations)”, H.G.W. Leuenberger, B. Nagel, 和 H. *Kölbl*, Eds., (1995) Helvetica Chimica Acta, CH-4010 Basel, Switzerland 中所述进行定义。

[0036] 除非另有说明,否则本发明的实施将采用生物化学、细胞生物学、免疫学和重组 DNA 技术中的常规方法,其在本领域的文献中进行了说明(参见,例如 Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版, J. Sambrook 等编辑, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor 1989)。

[0037] 在本说明书和所附权利要求书通篇,除非上下文另外要求,否则词语“包括/包含”及其变化形式将被理解为意指包括所述成员、整数或步骤或者成员、整数或步骤的组,但是不排除任何其他成员、整数或步骤或者成员、整数或步骤的组,尽管在一些实施方案中可排除这样的其他成员、整数或步骤或者成员、整数或步骤的组,即主题在于包括所述成员、整数或步骤或者成员、整数或步骤的组。除非本文中另外指出或与上下文明显矛盾,否则在描述本发明的上下文中(尤其是在权利要求书的上下文中)使用的没有数量词修饰的名词应被解释为涵盖一个/种或更多个/种。本文中数值范围的记载仅意在用作单独提及落入该范围内的每个单独值的简写方法。除非本文中另外指出,否则每个单独的值均被并入本说明书中,如同其在本文中被单独记载一样。

[0038] 除非本文中另有说明或另外与上下文明显矛盾,否则本文中描述的所有方法都可以以任何合适的顺序进行。本文中提供的任何和所有实例或示例性语言(例如,“例如”)的使用仅旨在更好地举例说明本发明,而不对以其他方式要求保护的本发明范围构成限制。说明书中的语言都不应被解释为指示实施本发明所必需的任何未要求保护的要素。

[0039] 在本说明书的正文通篇引用了数篇文件。本文中不管是在上文还是下文引用的每篇文件(包括所有专利、专利申请、科学出版物、制造商的说明书、指南等)均在此通过引用整体并入。本文中没有内容应被解释为承认本发明无权由于在先发明而早于这些公开内容。

[0040] 本发明考虑通过诱导免疫系统对与自身免疫病相关的自身抗原的耐受来治疗或预防自身免疫病。通过施用非免疫原性 RNA 诱导针对自身抗原的耐受。非免疫原性 RNA 包含编码包含自身抗原或其片段或者自身抗原或片段之变体的肽或多肽的序列,其当施用于对象时抑制对所述自身抗原的免疫应答。

[0041] 在多个实施方案中,本文中所述的非免疫原性 RNA 的长度为 200 至 20000 个核苷酸、500 至 5000 个核苷酸、500 至 2500 个核苷酸,特别是 600 至 2500 个核苷酸或 800 至 2000 个核苷酸。

[0042] 根据本发明,优选施用本文中所述的配制在载体或递送载剂中(例如在纳米颗粒制剂、特别是脂质复合物(lipoplex)制剂中)的非免疫原性 RNA。因此,如本文中所述,本文中所述的非免疫原性 RNA 分子可配制在载体或递送载剂中(例如在纳米颗粒或纳米颗粒制剂、特别是脂质复合物制剂中)存在。

[0043] 在一个实施方案中,可使用递送载剂,其在全身性施用之后将非免疫原性 RNA 分子递送至脾中的抗原呈递细胞,例如树突细胞(DC)。例如,具有确定颗粒大小的纳米颗粒 RNA

制剂在全身性施用之后导致RNA向脾DC的大量递送,在所述制剂中颗粒的净电荷接近零或为负,例如RNA与脂质体的电中性或带负电荷的脂质复合物,例如包含DOTMA和DOPE或DOTMA和胆固醇的脂质复合物。根据本发明特别优选的是纳米颗粒RNA制剂,其中纳米颗粒中正电荷与负电荷的电荷比例为1.4:1或更小和/或纳米颗粒的 ζ 电位为0或更小。在一个实施方案中,纳米颗粒中正电荷与负电荷的电荷比例为1.4:1至1:8,优选1.2:1至1:4,例如1:1至1:3,例如1:1.2至1:2、1:1.2至1:1.8、1:1.3至1:1.7,特别是1:1.4至1:1.6,例如大约1:1.5。在一个实施方案中,纳米颗粒的 ζ 电位为-5或更小、-10或更小、-15或更小、-20或更小或者-25或更小。在多个实施方案中,纳米颗粒的 ζ 电位为-35或更高、-30或更高或者-25或更高。在一个实施方案中,纳米颗粒具有0mV至-50mV,优选0mV至-40mV或-10mV至-30mV的 ζ 电位。在一个实施方案中,正电荷由纳米颗粒中存在的至少一种阳离子脂质贡献,并且负电荷由RNA贡献。在一个实施方案中,纳米颗粒包含至少一种辅助脂质。辅助脂质可以是中性或阴离子脂质。

[0044] 在一个实施方案中,纳米颗粒是包含DOTMA和DOPE的脂质复合物,DOTMA与DOPE的摩尔比为10:0至1:9,优选8:2至3:7,并且更优选地为7:3至5:5,并且其中DOTMA中的正电荷与RNA中的负电荷的电荷比例为1.8:2至0.8:2,更优选1.6:2至1:2,甚至更优选1.4:2至1.1:2,并且甚至更优选约1.2:2。

[0045] 在一个实施方案中,纳米颗粒是包含DOTMA和胆固醇的脂质复合物,DOTMA与胆固醇的摩尔比为10:0至1:9,优选8:2至3:7,并且更优选地为7:3至5:5,并且其中DOTMA中的正电荷与RNA中的负电荷的电荷比例为1.8:2至0.8:2,更优选1.6:2至1:2,甚至更优选1.4:2至1.1:2,并且甚至更优选约1.2:2。

[0046] 在一个实施方案中,纳米颗粒是包含DOTAP和DOPE的脂质复合物,DOTAP与DOPE的摩尔比为10:0至1:9,优选8:2至3:7,并且更优选地为7:3至5:5,并且其中DOTMA中的正电荷与RNA中的负电荷的电荷比例为1.8:2至0.8:2,更优选1.6:2至1:2,甚至更优选1.4:2至1.1:2,并且甚至更优选约1.2:2。

[0047] 在一个实施方案中,纳米颗粒是包含DOTMA和DOPE的脂质复合物,DOTMA与DOPE的摩尔比为2:1至1:2,优选2:1至1:1,并且其中DOTMA中的正电荷与RNA中的负电荷的电荷比例为1.4:1或更小。

[0048] 在一个实施方案中,纳米颗粒是包含DOTMA和胆固醇的脂质复合物,DOTMA与胆固醇的摩尔比为2:1至1:2,优选2:1至1:1,并且其中DOTMA中的正电荷与RNA中的负电荷的电荷比例为1.4:1或更小。

[0049] 在一个实施方案中,纳米颗粒是包含DOTAP和DOPE的脂质复合物,DOTAP与DOPE的摩尔比为2:1至1:2,优选2:1至1:1,并且其中DOTAP中的正电荷与RNA中的负电荷的电荷比例为1.4:1或更小。

[0050] 在一个实施方案中,根据本发明的非免疫原性RNA配制在F12或F5脂质体(优选F12脂质体)中。

[0051] 根据本发明,术语“F12”表示包含摩尔比为2:1的DOTMA和DOPE的脂质体和使用这样的脂质体形成的具有RNA的脂质复合物。

[0052] 根据本发明,术语“F5”表示包含摩尔比为1:1的DOTMA和胆固醇的脂质体和使用这样的脂质体形成的具有RNA的脂质复合物。

[0053] 本文中使用的术语“纳米颗粒”是指具有使颗粒适合于全身性施用、特别是肠胃外施用的直径(通常小于1000纳米(nm)的直径)的任何颗粒,特别是核酸的颗粒。在一些实施方案中,纳米颗粒的直径为小于600nm。在一些实施方案中,纳米颗粒的直径为小于400nm。在一些实施方案中,纳米颗粒的平均直径为约50nm至约1000nm,优选约50nm至约400nm,优选约100nm至约300nm,例如约150nm至约200nm。在一些实施方案中,纳米颗粒的直径为约200至约700nm,约200至约600nm,优选约250至约550nm,特别是约300至约500nm或约200至约400nm。

[0054] 本文中使用的术语“纳米颗粒制剂”或类似术语是指包含至少一种纳米颗粒的任何物质。在一些实施方案中,纳米颗粒制剂是纳米颗粒的均质集合。在一些实施方案中,纳米颗粒制剂是分散体或乳剂。通常来说,当组合至少两种不混溶性物质时,形成分散体或乳剂。

[0055] 术语“脂质复合物”或“核酸脂质复合物”(特别是“RNA脂质复合物”)是指脂质与核酸(特别是RNA)的复合物。当将通常还包含中性“辅助性”脂质的阳离子脂质体与核酸混合时,脂质复合物自发地形成。

[0056] 如果本发明涉及电荷(例如正电荷、负电荷或中性电荷)或者阳离子化合物、负性化合物或中性化合物,这通常意指提到的电荷存在于选定的pH(例如生理pH)下。例如,术语“阳离子脂质”意指在选定pH(例如生理pH)下带有净正电荷的脂质。术语“中性脂质”意指在选定pH(例如生理pH)下无净正电荷或负电荷的脂质并且可以以不带电荷或中性两性离子的形式存在。本文中的“生理pH”意指约7.5的pH。

[0057] 本发明中考虑使用的纳米颗粒载体(例如脂质载体)包括可与核酸(例如RNA)缔合的任何物质或载剂,例如通过与核酸形成复合物或形成核酸被封闭或封装在其中的囊泡来缔合。与裸核酸相比,这可使得提高核酸的稳定性。特别地,可提高血液中核酸的稳定性。

[0058] 阳离子脂质、阳离子聚合物和其他带正电荷的物质可与带负电荷的核酸形成复合物。这些阳离子分子各自可用于与核酸复合,从而形成例如所谓的脂质复合物或多聚复合物(polyplex),并且这些复合物已被表明将核酸递送到细胞内。

[0059] 用于本发明的纳米颗粒核酸制剂可通过多种方案并且由多种核酸复合化合物获得。脂质、聚合物、寡聚物或两亲物是典型的复合剂。在一个实施方案中,复合化合物包含选自以下的至少一种试剂:鱼精蛋白、聚乙烯亚胺、多聚-L-赖氨酸、多聚-L-精氨酸或组蛋白。

[0060] 根据本发明,鱼精蛋白可用作阳离子载体剂。术语“鱼精蛋白”是指具有相对低分子量的多种强碱性蛋白中的任一种,其富含精氨酸并且被发现在不同动物(例如鱼)的精子细胞中替代体细胞组蛋白尤其与DNA缔合。特别地,术语“鱼精蛋白”是指在鱼精中存在的蛋白质,其是强列碱性的,可溶于水,加热不凝固,并且在水解后主要产生精氨酸。以纯化的形式,其用于胰岛素的长效制剂并且用于中和肝素的抗凝作用。根据本发明,本文中使用的术语“鱼精蛋白”意指包含获得自或来源于天然或生物来源的任何鱼精蛋白氨基酸序列(包括其片段)和所述氨基酸序列或其片段的多聚体形式。此外,该术语涵盖这样的(合成的)多肽,其是人工的且专为特定目的而设计,并且不能从天然或生物来源中分离。根据本发明使用的鱼精蛋白可以是硫酸化鱼精蛋白或盐酸鱼精蛋白。在一个优选实施方案中,用于产生本文中所述纳米颗粒的鱼精蛋白来源是鱼精蛋白5000,其在等张盐溶液中包含多于10mg/ml的鱼精蛋白(每毫升5000个肝素中和单位)。

[0061] 脂质体是微观的脂质囊泡,其通常具有一个或更多个囊泡形成脂质(vesicle-forming lipid)(例如磷脂)双层,并且能够封装药物。在本发明的情况中可使用不同类型的脂质体,包括但不限于多层囊泡(multilamellar vesicle,MLV)、小单层囊泡(small unilamellar vesicle,SUV)、大单层囊泡(large unilamellar vesicle,LUV)、空间稳定脂质体(sterically stabilized liposome,SSL)、多泡囊泡(multivesicular vesicle,MV)和大多泡囊泡(large multivesicular vesicle,LMV)以及本领域中已知的其他双层形式。脂质体的大小和层数(lamellarity)取决于制备方式,并且所使用囊泡类型的选择取决于优选施用模式。存在数种其他其中脂质可存在于水性介质中的超分子组织形式,包含由单层构成的层状相、六角相和反六角相、立方相、胶束、反胶束。这些相也可与DNA或RNA组合获得,并且与RNA和DNA的相互作用可显著影响相态。所述相可存在于本发明的纳米颗粒核酸制剂中。

[0062] 对于由核酸和脂质体形成核酸脂质复合物,可使用形成脂质体的任何合适方法,只要其提供所考虑的核酸脂质复合物即可。脂质体可使用标准方法形成,例如反蒸发法(reverse evaporation method,REV)、乙醇注入法、脱水-再水合法(dehydration-rehydration method,DRV)、超声处理或其他合适的方法。

[0063] 脂质体形成后,可对脂质体进行尺寸调节以获得具有基本上均匀的尺寸范围的脂质体群。

[0064] 双层形成脂质(bilayer-forming lipid)通常具有两条烃链(特别是酰基链)和极性或非极性的头基。双层形成脂质由天然存在脂质构成或是合成来源的,包括磷脂,例如磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酸、磷脂酰肌醇和鞘磷脂,其中两条烃链的长度通常为约14至22个碳原子,并且具有不同的不饱和度。在本发明的组合物中使用的另一些合适脂质包括糖脂和固醇,例如胆固醇及其也可用于脂质体中的多种类似物。

[0065] 阳离子脂质通常具有亲脂性部分,例如固醇、酰基或二酰基链,并且具有总净正电荷。脂质的头基通常携带正电荷。阳离子脂质优选具有1至10价的正电荷,更优选1至3价的正电荷,并且更优选1价的正电荷。阳离子脂质的实例包括但不限于1,2-二-0-十八碳烯基-3-三甲基铵丙烷(DOTMA)、二甲基双十八烷基铵(DDAB)、1,2-二油酰基-3-三甲基铵丙烷(DOTAP)、1,2-二油酰基-3-二甲基铵丙烷(DODAP)、1,2-二酰氧基-3-二甲基铵丙烷、1,2-二烷氧基-3-二甲基铵丙烷、双十八烷基二甲基氯化铵(DODAC)、1,2-二豆蔻酰氧基丙基-1,3-二甲基羟乙基铵(DMRIE)和2,3-二油酰氧基-N-[2(精胺甲酰胺)乙基]-N,N-二甲基-1-三氟乙酸丙铵(DOSPA)。优选的是DOTMA、DOTAP、DODAC和DOSPA。最优选的是DOTMA。

[0066] 此外,考虑到结构稳定性等,本文中所述的纳米颗粒优选地还包含中性脂质。中性脂质可适当地考虑核酸-脂质复合物的递送效率而选择。中性脂质的实例包括但不限于1,2-二-(9Z-十八碳烯酰基)-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DOPE)、1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DOPC)、二酰基磷脂酰胆碱、二酰基磷脂酰乙醇胺、神经酰胺、鞘磷脂、脑磷脂、固醇和脑苷脂。优选的是DOPE和/或DOPC。最优选的是DOPE。在其中阳离子脂质体包含阳离子脂质和中性脂质二者的情况下,可适当地考虑脂质体的稳定性等来确定阳离子脂质与中性脂质的摩尔比。

[0067] 根据一个实施方案,本文中所述的纳米颗粒可包含磷脂。磷脂可以是甘油磷脂。甘油磷脂的实例包括但不限于三种脂质类型:(i)两性离子磷脂,其包括例如磷脂酰胆碱

(PC)、卵黄磷脂酰胆碱、天然部分氢化或完全氢化形式的大豆来源PC、二豆蔻酰基磷脂酰胆碱(DMPC)、鞘磷脂(SM);(ii)带负电荷的磷脂,其包括例如磷脂酰丝氨酸(PS)、磷脂酰肌醇(PI)、磷脂酸(PA)、磷脂酰甘油(PG)、二棕榈酰基PG、二豆蔻酰基磷脂酰甘油(DMPG),其中缀合物使得两性离子磷脂带负电荷的合成衍生物,例如甲氧基-聚乙二醇-二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺(mPEG-DSPE)的情况;以及(iii)阳离子磷脂,其包括例如其中磷酸单酯被O-甲基化以形成阳离子脂质的磷脂酰胆碱或鞘磷脂。

[0068] 核酸与脂质载体的缔合可例如通过核酸填充载体的空隙空间使得载体物理捕获核酸,或者通过共价键合、离子键合或氢键键合,或者通过经由非特异性键的吸附来发生。

[0069] 术语“免疫应答”涉及优选针对抗原的免疫系统反应,并且优选地是指细胞免疫应答、体液免疫应答或这两者。根据本发明,对于靶标(例如抗原、细胞或组织),术语“对.....的免疫应答”或“针对.....的免疫应答”涉及针对所述靶标导向的免疫应答。

[0070] 免疫系统分为两部分,固有系统和适应性系统。适应性免疫应答取决于对特定抗原具有特异性的B淋巴细胞和T淋巴细胞。固有免疫系统对绝大多数威胁共有的共同结构作出应答。这些共同结构称为病原体相关分子模式或PAMP,并且被toll样受体或TLR识别。除细胞TLR之外,固有免疫系统的重要部分是体液补体系统,其通过PAMP识别机制调理和杀伤病原体。这些高度保守的可溶性和膜结合蛋白统称为模式识别受体(Pattern-Recognition Receptor,PRR),并且其是触发固有免疫系统的PAMP/PRR相互作用。

[0071] TLR是由固有免疫系统的细胞表达的跨膜蛋白,其识别侵入的微生物并活化发起免疫和炎症反应以破坏侵入物的信号传导途径。不同的TLR用作多种配体的受体,包括细菌细胞壁组分、病毒双链RNA和小分子抗病毒或免疫调节化合物。在人中,TLR3、7、8和9主要对来自病毒和细菌的基于核酸的PAMP作出应答。

[0072] 术语“细胞免疫应答”、“细胞应答”、“细胞介导的免疫”或类似术语意在包括针对以表达抗原和/或用MHC I类或II类呈递抗原为特征之细胞的细胞应答。细胞应答涉及称为T细胞或T淋巴细胞的细胞,其充当“助手”或“杀手”。辅助T细胞(也称为CD4⁺ T细胞)通过调节免疫应答来发挥中心作用,并且杀伤细胞(也称为细胞毒性T细胞、细胞裂解性T细胞、CD8⁺ T细胞或CTL)对细胞(例如病变细胞)进行杀伤。

[0073] 术语“体液免疫应答”是指活生物体中的过程,其中抗体是应答于它们最终中和和/或消除的试剂和生物体而产生的。抗体应答的特异性由T细胞和/或B细胞通过结合单一特异性抗原的膜相关受体介导。在结合适当的抗原并接收多种其他活化信号后,B淋巴细胞分裂,这产生记忆B细胞以及分泌抗体的浆细胞克隆,每个克隆都产生识别与其抗原受体识别的相同抗原表位的抗体。记忆B淋巴细胞保持休眠直至它们随后被其特异性抗原活化。这些淋巴细胞提供记忆的细胞基础,并且当再次暴露于特异性抗原时导致抗体应答的升高。

[0074] 本文中使用的术语“抗体”是指免疫球蛋白分子,其能够与抗原上的表位特异性结合。特别地,术语“抗体”是指包含通过二硫键相互连接的至少两条重(H)链和两条轻(L)链的糖蛋白。术语“抗体”包括单克隆抗体、重组抗体、人抗体、人源化抗体、嵌合抗体和任何前述物质的组合。每条重链由重链可变区(VH)和重链恒定区(CH)构成。每条轻链由轻链可变区(VL)和轻链恒定区(CL)构成。可变区和恒定区在本文中也分别称为可变结构域和恒定结构域。VH和VL区可进一步细分为被称为互补决定区(complementarity determining region,CDR)的高变区,其散布有被称为框架区(framework region,FR)的更保守的区域。

每个VH和VL由从氨基端至羧基端按以下顺序排列的三个CDR和四个FR构成:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。VH的CDR被称为HCDR1、HCDR2和HCDR3,VL的CDR被称为LCDR1、LCDR2和LCDR3。重链和轻链的可变区包含与抗原相互作用的结合结构域。抗体的恒定区包含重链恒定区(CH)和轻链恒定区(CL),其中CH可进一步细分为恒定结构域CH1、铰链区以及恒定结构域CH2和CH3(从氨基端至羧基端按以下顺序排列:CH1、CH2、CH3)。抗体的恒定区可介导免疫球蛋白与宿主组织或因子的结合,所述宿主组织或因子包括免疫系统的多种细胞(例如,效应细胞)和经典补系统的第一组分(C1q)。抗体可以是来源于天然来源或来自重组来源的完整免疫球蛋白,并且可以是完整免疫球蛋白的免疫活性部分。抗体通常是免疫球蛋白分子的四聚体。抗体可以以多种形式(包括例如多克隆抗体、单克隆抗体、Fv、Fab和F(ab)₂,以及单链抗体和人源化抗体)存在。

[0075] 本文中所述的抗体包括IgA,例如IgA1或IgA2、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgE、IgM和IgD抗体。在多个实施方案中,抗体是IgG1抗体,更特别是IgG1, κ 或IgG1, λ 同种型(即IgG1, κ ; λ);IgG2a抗体(例如IgG2a, κ ; λ);IgG2b抗体(例如IgG2b, κ ; λ);IgG3抗体(例如IgG3, κ ; λ)或IgG4抗体(例如IgG4, κ ; λ)。

[0076] 术语“免疫球蛋白”涉及免疫球蛋白超家族的蛋白质,优选涉及抗原受体(例如抗体)或B细胞受体(BCR)。免疫球蛋白的特征在于具有特征性免疫球蛋白(Ig)折叠的结构域,即免疫球蛋白结构域。该术语涵盖膜结合免疫球蛋白以及可溶性免疫球蛋白。膜结合免疫球蛋白也称为表面免疫球蛋白或膜免疫球蛋白,其通常是BCR的一部分。可溶性免疫球蛋白通常被称为抗体。免疫球蛋白通常包含数条链,通常是通过二硫键连接的两条相同的重链和两条相同的轻链。这些链主要由免疫球蛋白结构域(例如V_L, (可变轻链)结构域,C_L (恒定轻链)结构域,V_H (可变重链)结构域以及C_H (恒定重链)结构域C_H1、C_H2、C_H3和C_H4)构成。存在五种类型的哺乳动物免疫球蛋白重链,即 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ ,其是不同种类的抗体(即,IgA、IgD、IgE、IgG和IgM)的原因。与可溶性免疫球蛋白的重链相对,膜或表面免疫球蛋白的重链在其羧基端包含跨膜结构域和短的胞质结构域。在哺乳动物中存在两种类型的轻链,即 λ 和 κ 。免疫球蛋白链包含可变区和恒定区。恒定区在免疫球蛋白的不同同种型内基本上是保守的,其中可变部分是高度多样的并且负责抗原识别。

[0077] 根据本发明,术语“抗原”或“免疫原”涵盖任何物质,优选肽或蛋白质,其是免疫应答的靶标和/或其将引发免疫应答。特别地,“抗原”涉及与抗体或T淋巴细胞(T细胞)特异性反应的任何物质。根据本发明,术语“抗原”包括任何包含至少一个表位(例如B细胞或T细胞表位)的分子。优选地,在本发明上下文中,抗原是任选地在加工之后诱导免疫反应的分子,所述免疫反应优选地对该抗原或表达该抗原的细胞具有特异性。抗原可包括或可来源于变应原、病毒、细菌、真菌、寄生虫以及其他感染原和病原体,或者抗原也可以是肿瘤抗原。

[0078] “自体抗原”或“自身抗原”是来源于生物体的抗原,其在正常情况下不被该生物体的免疫系统识别,但其可成为免疫攻击的靶标,导致自身免疫病。

[0079] 在一个优选实施方案中,自身抗原与自身免疫病相关。术语“与自身免疫病相关的自身抗原”是指对自身免疫病具有病理学意义的自身抗原。在一个实施方案中,与自身免疫病相关的自身抗原是包含至少一个这样的表位的分子,针对该表位在患有自身免疫病的患者中引导免疫反应。

[0080] 通过施用编码包含自身抗原或其片段或者自身抗原或片段之变体的肽或多肽的

非免疫原性RNA而根据本发明向对象提供的所述肽或多肽应导致对自身抗原的免疫应答降低。因此,根据本发明提供的包含自身抗原或其片段或者自身抗原或片段之变体的肽或多肽可对应于或包含与自身免疫病相关的自身抗原或其变体(包括自身抗原的片段及其变体)。在一个实施方案中,这样的片段或变体在免疫学上等同于与自身免疫病相关的自身抗原(类似于自身抗原),因为它们的提供导致对靶向自身抗原或表达该自身抗原的细胞并且任选地在MHC分子的情况下呈递自身抗原的自身反应性T细胞的耐受。因此,根据本发明提供的包含自身抗原或其片段或者自身抗原或片段之变体的肽或多肽可与和自身免疫病相关的自身抗原相同,可包含与自身免疫病相关的自身抗原或其一部分或片段,或者可包含与和自身免疫病相关的自身抗原或其一部分或片段同源的抗原。如果根据本发明提供的包含自身抗原或其片段或者自身抗原或片段之变体的肽或多肽包含与自身免疫病相关的自身抗原的一部分或片段,或者与和自身免疫病相关的自身抗原同源的抗原的一部分或片段,则所述一部分或片段可包含与自身免疫病相关的自身抗原的表位,特别是与自身反应性T细胞所靶向的自身免疫病相关的自身抗原的表位。因此,根据本发明,包含自身抗原或其片段或者自身抗原或片段之变体的肽或多肽可包含与自身免疫病相关的自身抗原的免疫原性片段,例如与自身免疫病相关的自身抗原的肽片段。根据本发明的“自身抗原的免疫原性片段”优选涉及能够刺激T细胞应答的自身抗原的一部分或片段。当根据本发明提供时,所述一部分或片段还能够诱导针对自身反应性T细胞的耐受。根据本发明提供的包含自身抗原或其片段或者自身抗原或片段之变体的肽或多肽可以是重组肽或多肽和/或根据本发明对其进行编码的非免疫原性RNA可以是重组RNA。

[0081] 术语“免疫学上等同的”意指例如关于免疫效应类型表现出相同或基本上相同的免疫学特性和/或发挥相同或基本上相同的免疫学效应的免疫学上等同的分子,例如免疫学上等同的氨基酸序列。在本发明的上下文中,术语“免疫学上等同的”优选地关于抗原或抗原变体的免疫学效应或特性使用。

[0082] 在本发明的一个实施方案中,通过施用非免疫原性RNA而根据本发明提供的肽或多肽包含来自自身抗原的至少一个表位,所述自身抗原优选地是在自身免疫病病症(例如本文中所述的自身免疫病病症)中识别的自身抗原。在一个实施方案中,根据本发明提供的肽或多肽包含对象对其具有自身反应性的表位。

[0083] 术语“表位”是指分子(例如抗原)中的抗原决定簇,即被免疫系统识别(即结合),例如被抗体或T细胞受体识别的分子中的一部分或片段。例如,表位是被免疫系统识别的抗原上离散的三维位点。表位通常由分子(例如氨基酸或糖侧链)的化学活性表面组群组成,并且通常具有特定的三维结构特征以及特定的电荷特征。构象和非构象表位的区别在于,在存在变性溶剂的情况下,与前者的结合丧失而与后者的结合不丧失。优选地,该术语涉及包含表位的抗原的免疫原性部分。蛋白质的表位优选地包含所述蛋白质的连续或不连续部分,并且长度优选为5至100,优选5至50,更优选8至30,最优选10至25个氨基酸,例如,表位的长度可优选为9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个氨基酸。优选的是,在本发明上下文中的表位是T细胞表位。

[0084] 本文中使用的术语“T细胞表位”是指以被T细胞受体识别的构型与MHC分子结合的肽。通常来说,T细胞表位呈递在抗原呈递细胞的表面上。优选地,T细胞表位是MHC I类和/或II类呈递的肽。优选地,T细胞表位包含基本上对应于抗原片段的氨基酸序列的氨基酸序

列。优选地,所述抗原片段是MHC I类和/或II类呈递的肽。适合与MHC分子(特别是I类MHC分子)结合的肽优选长度为7至20个氨基酸,更优选长度为7至12个氨基酸,更优选长度为8至11个氨基酸,特别是长度为9或10个氨基酸。在一个实施方案中,当在MHC(例如抗原呈递细胞的MHC)的情况下呈递时,T细胞表位被T细胞受体识别。如果被T细胞受体识别,则T细胞表位可以能够在存在合适的共刺激信号的情况下诱导携带特异性识别T细胞表位的T细胞受体的T细胞的克隆扩增。

[0085] 根据本发明,表位(例如自身抗原的T细胞表位)可存在于通过施用作为较大实体的一部分的非免疫原性RNA而根据本发明提供的肽或多肽中,所述较大实体例如包含更多自身抗原而不仅是表位的序列和/或包含一种或多种自身抗原的多于一个表位的多肽。呈递的肽或T细胞表位在适当地加工之后产生。而且,T细胞表位可在对于TCR识别或对于与MHC结合非必需的一个或更多个残基处被修饰。这样的经修饰T细胞表位可被认为是免疫学上等同的。

[0086] 本文中所述的非免疫原性RNA可针对需要免疫耐受的多种疾病(例如自身免疫病)定制,并且还可针对个体患者定制。存在多种免疫测定以确定在给定患者的血液中循环的免疫细胞是否对所测试的特定肽发生免疫应答。或者,所选抗原或表位可基于一类患者中看到的最常见的反应性。

[0087] “细胞表面”根据其在领域中的通常含义使用,并因此包括易于被蛋白质和其他分子结合的细胞外部。如果抗原位于细胞的表面并且易于被例如添加至所述细胞的抗原特异性抗体结合,则所述抗原在所述细胞的表面上表达。在一个实施方案中,在细胞表面上表达的抗原是具有胞外部分的完整膜蛋白。

[0088] 在本发明的上下文中,术语“胞外部分”或“外结构域”是指朝向细胞的胞外空间并且优选地被位于细胞外部的结合分子(例如抗体)从所述细胞的外部接近的分子(例如,蛋白质)的部分。优选地,该术语是指一个或更多个细胞外环或结构域或者其片段。

[0089] 术语“一部分”或“部分”在本文中可互换使用,并且是指结构(例如氨基酸序列)的连续或不连续的元件。术语“片段”是指结构(例如氨基酸序列)的连续元件。结构的一部分、部分或片段优选地包含所述结构的一个或更多个功能特性,例如,抗原性、免疫性和/或结合性。蛋白质序列的一部分或部分优选包含蛋白质序列的至少6个、特别是至少8个、至少12个、至少15个、至少20个、至少30个、至少50个或至少100个连续和/或非连续氨基酸。蛋白质序列的片段优选包含蛋白质序列的至少6个、特别是至少8个、至少12个、至少15个、至少20个、至少30个、至少50个或至少100个连续氨基酸。

[0090] 术语“免疫原性”涉及抗原诱导免疫反应的相对有效性。

[0091] 术语“免疫刺激”在本文中用于指提高的总体免疫应答。

[0092] “免疫耐受”、“免疫学耐受”或简称“耐受”描述了免疫系统对具有引发免疫应答之能力的物质或组织的无反应状态。在自我识别之后防止免疫原性应答发生的免疫耐受由数种机制介导,主要涉及将“自身”肽呈递给CD4⁺或CD8⁺ T细胞,其方式是导致自身反应性T细胞的消除、抑制或转化,否则其将潜在地攻击作为自身抗原来源的细胞和组织和/或支持B细胞产生与这些自身抗原反应的抗体。建立耐受的机制是不同的,但产生的作用是相似的。对来自特定组织的自身抗原的耐受诱导不足是组织特异性自身免疫病的主要原因。在正常条件下,组织特异性自身抗原由耐受诱导的(致耐受性的)细胞呈递,所述细胞使任何反应

性T细胞经历细胞死亡、无反应性或转化为Treg类型。在自身免疫病中,这些相同的自身抗原或者没有充分呈递,这限制了自身反应性T细胞与指令的接合,或者不适当地呈递,指示特异性T细胞产生免疫应答而不是将抗原作为自身而发生耐受。全身性地或通过黏膜将这些自身抗原递送至强效致耐受性细胞的抗原特异性治疗部分地能够部分地通过产生能够抵消不适当活化的致病性T细胞的抑制性T细胞而恢复耐受。

[0093] 术语“靶标”应意指作为免疫应答之靶标的物质(例如细胞)。靶标包括呈递抗原或抗原表位(即通过抗原加工来源于抗原的肽片段)的细胞。

[0094] “抗原加工”是指抗原降解成为所述抗原之片段的加工产物(例如,将蛋白质降解成肽)并使这些片段中的一种或更多种与MHC分子缔合(例如,通过结合)以用于被细胞(优选抗原呈递细胞)呈递给特定T细胞。

[0095] 抗原呈递细胞(APC)是在其表面上的主要组织相容性复合物(MHC)的情况下展示抗原的细胞。T细胞可使用其T细胞受体(TCR)识别该复合物。抗原呈递细胞加工抗原并将其呈递给T细胞。抗原呈递细胞包括但不限于单核细胞/巨噬细胞、B细胞和树突细胞(DC)。根据本发明,术语“抗原呈递细胞”包括专职抗原呈递细胞和非专职抗原呈递细胞。

[0096] 专职抗原呈递细胞在通过吞噬或通过受体介导的胞吞内化抗原并随后在其膜上展示与II类MHC分子结合的抗原片段方面非常高效。T细胞识别抗原呈递细胞膜上的抗原-II类MHC分子复合物并与其相互作用。然后,抗原呈递细胞产生另外的共刺激信号,从而导致活化T细胞。共刺激分子的表达是专职抗原呈递细胞的限定特征。

[0097] 专职抗原呈递细胞的主要类型是树突细胞,其具有最宽范围的抗原呈递,并且可能是最重要的抗原呈递细胞;巨噬细胞;B细胞以及某些活化的上皮细胞。

[0098] 非专职抗原呈递细胞不组成型地表达与天然T细胞相互作用所需的MHC II类蛋白质;这些仅在非专职抗原呈递细胞被某些细胞因子(例如IFN γ)刺激之后表达。

[0099] 树突细胞(DC)是白细胞群体,其通过MHC II类和I类两种抗原呈递途径将外周组织中捕获的抗原呈递给T细胞。众所周知,树突细胞是免疫应答的强效诱导物,并且这些细胞的活化是诱导免疫的关键步骤。

[0100] 树突细胞常规被分类为“未成熟细胞”和“成熟细胞”,其可用作区分两种充分表征的表型的简单方式。然而,这种命名不应被解释为排除所有可能的中间分化阶段。

[0101] 未成熟树突细胞被表征为具有高抗原摄取和加工能力(这与Fc γ 受体和甘露糖受体的高表达相关)的抗原呈递细胞。成熟表型通常以这些标志物的较低表达但是导致T细胞活化的细胞表面分子的高表达为特征,所述细胞表面分子例如I类和II类MHC、黏附分子(例如,CD54和CD11)和共刺激分子(例如,CD40、CD80、CD86和4-1BB)。

[0102] 树突细胞成熟指这样的抗原呈递树突细胞导致T细胞致敏(priming)的树突细胞活化状态,而通过未成熟树突细胞的呈递导致耐受。树突细胞成熟主要由以下引起:具有被固有受体检测的微生物特征的生物分子(细菌DNA、病毒RNA、内毒素等)、促炎细胞因子(TNF、IL-1、IFN)、树突细胞表面上的CD40被CD40L连接以及从正经受应激细胞死亡的细胞中释放的物质。树突细胞可通过在体外用细胞因子培养骨髓细胞来获得,所述细胞因子例如粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)和肿瘤坏死因子 α 。

[0103] “以呈递抗原为特征的细胞”或“呈递抗原的细胞”或类似表述意指在MHC分子(特别是MHC I类分子)的情况下呈递抗原或者例如通过加工抗原而呈递来源于所述抗原的片

段的细胞,例如抗原呈递细胞。类似地,术语“以呈递抗原为特征的疾病”表示涉及以呈递抗原(特别地以I类MHC呈递抗原)为特征之细胞的疾病。

[0104] 在本发明的上下文中,术语“免疫反应性细胞”或“效应细胞”涉及在免疫反应期间发挥效应功能的细胞。“免疫反应性细胞”优选地能够结合抗原或者以表达和/或呈递抗原或表位为特征的细胞,并且介导免疫应答。例如,这样的细胞分泌细胞因子和/或趋化因子,杀伤微生物,分泌抗体,识别受感细胞染或癌细胞并任选地消除这些细胞。例如,免疫反应性细胞包括T细胞(细胞毒性T细胞、辅助T细胞、肿瘤浸润性T细胞)、B细胞、自然杀伤细胞、中性粒细胞、巨噬细胞和树突细胞。

[0105] 优选地,“免疫反应性细胞”以一定程度的特异性识别抗原或表位,特别是如果在MHC分子的情况下(例如在抗原呈递细胞的表面上)呈递。优选地,所述识别使得识别抗原或表位的细胞能够具有应答性或反应性。如果细胞是携带在MHC II类分子的情况下识别抗原或表位之受体的辅助T细胞($CD4^+$ T细胞),则这样的应答性或反应性可涉及释放细胞因子和/或活化 $CD8^+$ 淋巴细胞(CTL)和/或B细胞。如果细胞是CTL,则这样的应答性或反应性可涉及例如通过凋亡或穿孔素介导的细胞裂解来消除在MHC I类分子的情况下呈递的细胞,即以用I类MHC呈递抗原为特征的细胞。根据本发明,CTL应答性可包括持续的钙通量、细胞分裂、细胞因子(例如 $IFN-\gamma$ 和 $TNF-\alpha$)产生、活化标志物(例如CD44和CD69)上调、以及抗原表达靶细胞的特异性细胞裂解性杀伤。CTL应答性还可使用准确地指示CTL应答性的人工报道子来确定。这样的识别抗原或表位并且具有应答性或反应性的CTL在本文中还称为“抗原应答性CTL”。如果细胞是B细胞,则这样的应答性可涉及释放免疫球蛋白。

[0106] 术语“T细胞”或“T淋巴细胞”涉及参与多种细胞介导的免疫反应的胸腺来源细胞,并且包括T辅助细胞($CD4^+$ T细胞)和细胞毒性T细胞(CTL, $CD8^+$ T细胞),后者包括细胞裂解性T细胞。

[0107] T细胞属于已知为淋巴细胞的白细胞组,并且在细胞介导的免疫中发挥核心作用。其与其他淋巴细胞类型(例如B细胞和自然杀伤细胞)的区别之处可在于在其细胞表面上存在称为T细胞受体(TCR)的特殊受体。胸腺是负责T细胞成熟的主要器官。已发现T细胞的数个不同亚群,其各自均具有独特的功能。

[0108] T辅助细胞在免疫过程中辅助其他白细胞,除其他功能之外还包括使B细胞成熟为浆细胞以及活化细胞毒性T细胞和巨噬细胞。这些细胞由于其在表面上表达CD4蛋白而还被称为 $CD4^+$ T细胞。辅助T细胞当抗原呈递细胞(APC)表面上表达的MHC II类分子向其呈递肽抗原时变得活化。一旦活化,其迅速分裂并分泌在活性免疫应答中起调节或辅助作用的称为细胞因子的小蛋白质。

[0109] 细胞毒性T细胞破坏病毒感染的细胞和肿瘤细胞,并且还参与移植物排斥。这些细胞由于其在表面上表达CD8糖蛋白而还被称为 $CD8^+$ T细胞。这些细胞通过结合与MHC I类缔合的原来识别其靶标,所述MHC I类存在于身体的几乎每个细胞的表面上。

[0110] 大多数T细胞具有作为数种蛋白质的复合体而存在的T细胞受体(TCR)。实际的T细胞受体由两条独立的肽链构成,所述肽链由独立的T细胞受体 α 和 β ($TCR\alpha$ 和 $TCR\beta$)基因产生,并且称为 α -和 β -TCR链。 $\gamma\delta$ T细胞($\gamma\delta$ T cell)代表在其表面上具有独特T细胞受体(TCR)的一小部分T细胞。然而,在 $\gamma\delta$ T细胞中,TCR由一条 γ 链和一条 δ 链构成。与 $\alpha\beta$ T细胞相比,该T细胞组群较不常见(总T细胞的2%)。

[0111] T细胞受体的结构与免疫球蛋白Fab片段非常相似,所述免疫球蛋白Fab片段是定义为抗体臂的组合轻链和重链的区域。TCR的每条链是免疫球蛋白超家族的成员,并且具有一个N端免疫球蛋白(Ig)-可变(V)结构域,一个Ig-恒定(C)结构域,跨膜/跨细胞膜区域和C端处的短细胞质尾部。TCR α 链和 β 链的可变结构域具有三个高变或互补决定区(CDR),而 β 链的可变区具有通常不接触抗原并因此不被视为CDR的另外的高变区(HV4)。CDR3是负责识别经加工抗原的主要CDR,尽管 α 链的CDR1已显示与抗原肽的N端部分相互作用,而 β 链的CDR1与肽的C端部分相互作用。CDR2被认为识别MHC。 β 链的CDR4不被认为参与抗原识别,但已显示其与超级抗原相互作用。TCR结构域的恒定结构域由短连接序列组成,其中半胱氨酸残基形成二硫键,其形成两条链之间的连接。

[0112] 术语“B细胞”或“B淋巴细胞”涉及淋巴细胞亚型的白细胞类型,其通过分泌抗体在体液免疫中发挥作用。另外,B细胞呈递抗原并被分类为专职抗原呈递细胞(APC)并分泌细胞因子。B细胞在其细胞膜上表达B细胞受体(BCR)。BCR允许B细胞结合特异性抗原,针对该抗原,B细胞将引起抗体应答。B细胞受体由两部分构成,一种同种型的膜结合免疫球蛋白分子(IgD、IgM、IgA、IgG或IgE)(其除存在完整膜结构域之外与其分泌形式相同)和信号转导部分:通过二硫桥结合在一起的称为Ig- α /Ig- β 的异二聚体(CD79)。二聚体的每个成员跨越质膜并具有带有基于免疫受体酪氨酸的活化基序(immunoreceptor tyrosine-based activation motif, ITAM)的胞质尾部。

[0113] B细胞活化发生在次级淋巴器官(例如脾和淋巴结)中。在B细胞在骨髓中成熟后,它们通过血液迁移至次级淋巴器官,其通过循环淋巴接受恒定的抗原供应。当B细胞通过其BCR与抗原结合时,B细胞活化开始。不同的B细胞亚群经历T细胞依赖性活化或T细胞非依赖性活化。

[0114] 术语“主要组织相容性复合物”和缩写“MHC”包括MHC I类和MHC II类分子,并且涉及在所有脊椎动物中存在的基因复合体。MHC蛋白或分子在免疫反应中对淋巴细胞与抗原呈递细胞或病变细胞之间的信号传导的重要的,其中MHC蛋白或分子与肽结合并将其呈递用于被T细胞受体识别。由MHC编码的蛋白质在细胞表面上表达,并向T细胞展示自身抗原(来自细胞本身的肽片段)和非自身抗原(例如,侵入微生物的片段)二者。

[0115] MHC区域分为三个亚组,I类,II类和III类。MHC I类蛋白包含 α 链和 β 2微球蛋白(由15号染色体编码的非MHC部分)。其将抗原片段呈递给细胞毒性T细胞。在大多数免疫系统细胞上,特别是在抗原呈递细胞上,MHC II类蛋白包含 α 链和 β 链,并且其将抗原片段呈递给T辅助细胞。MHC III类区域编码其他免疫组分,例如补体组分和编码细胞因子的一些组分。

[0116] 在人中,MHC区域中编码细胞表面上的抗原呈递蛋白的基因被称为人白细胞抗原(HLA)基因。然而,缩写MHC通常用于指HLA基因产物。HLA基因包括九种所谓的经典MHC基因:HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DPA1、HLA-DPB1、HLA-DQA1、HLA-DQB1、HLA-DRA和HLA-DRB1。

[0117] 在本发明所有方面的一个优选实施方案中,MHC分子是HLA分子。

[0118] 在本发明的上下文中,术语“免疫效应功能”或“效应功能”包括由免疫系统的组分介导的任何功能,其导致例如杀伤细胞。优选地,在本发明的上下文中,免疫效应功能是T细胞介导的效应功能。在辅助T细胞(CD4⁺ T细胞)的情况下,这样的功能包括抗原或来源于抗原的抗原肽在MHC II类分子的情况下被T细胞受体识别、释放细胞因子和/或活化CD8⁺淋巴细胞(CTL)和/或B细胞,并且在CTL的情况下包括抗原或来源于抗原的抗原肽在MHC I类分

子情况下被T细胞受体识别、例如通过凋亡或穿孔素介导的细胞裂解消除在MHC I类分子情况下呈递的细胞(即,以用I类MHC呈递抗原为特征的细胞)、产生细胞因子(例如IFN- γ 和TNF- α)以及表达抗原的靶细胞的特异性细胞裂解性杀伤。

[0119] 术语“tol1样受体”或“TLR”涉及在固有免疫系统中发挥关键作用的一类蛋白质。它们是通常在前哨细胞(例如巨噬细胞和树突细胞)中表达的单一跨膜非催化性受体,其识别来源于微生物的结构上保守的分子。一旦这些微生物突破了物理屏障(例如皮肤或肠道黏膜),它们就会被TLR识别,其活化免疫细胞应答。

[0120] 在本发明的一个实施方案中,向对象施用编码包含自身抗原或其片段或者自身抗原或片段之变体的肽或多肽的非免疫原性RNA。RNA的翻译产物可在对象的细胞中形成,并且产物可展示给免疫系统用于诱导针对靶向自身抗原的自身反应性T细胞的耐受。

[0121] 或者,本发明考虑了这样的实施方案,其中表达包含自身抗原或其片段或者自身抗原或片段之变体的肽或多肽的非免疫原性RNA被引入到细胞例如离体抗原呈递细胞(例如取自患者的抗原呈递细胞)中,并将任选地离体克隆繁殖的细胞移植回同一患者体内。可使用本领域中已知的任何方法,优选地通过静脉内、腔内或腹膜内施用以无菌形式将经转染的细胞重新引入到患者中。合适的细胞包括抗原呈递细胞。抗原呈递细胞优选地为树突细胞、巨噬细胞、B细胞、间充质基质细胞、上皮细胞、内皮细胞和成纤维细胞,并且最优选地为树突细胞。因此,本发明还包括用于治疗自身免疫病的方法,其包括向需要的对象施用表达本文中所述的非免疫原性RNA的分离的抗原呈递细胞。细胞可以是与对象自体的、同种异体的、同基因或异源的。

[0122] 本文中使用的术语“核酸”旨在包括脱氧核糖核酸(DNA)或核糖核酸(RNA),例如cDNA、mRNA、重组产生的和化学合成的分子。核酸可以是单链或双链的。根据本发明,RNA包括体外转录的RNA(IVT RNA)或合成的RNA。根据本发明,核酸优选是分离的核酸。此外,本文中所述的核酸可以是重组分子。

[0123] 根据本发明,术语“分离的核酸”意指核酸(i)在体外扩增,例如通过聚合酶链反应(PCR)体外扩增;(ii)通过克隆重组产生;(iii)是纯化的,例如通过切割并通过凝胶电泳分离而纯化的;或(iv)是合成的,例如通过化学合成而合成的。核酸可用于引入到细胞中,即转染细胞,例如以RNA的形式,其可通过体外转录由DNA模板制备。此外,可在应用之前通过稳定化序列、加帽和多聚腺苷酸化对RNA进行修饰。

[0124] 在本发明的上下文中,术语“DNA”涉及包含脱氧核糖核苷酸残基并且优选完全或基本上由脱氧核糖核苷酸残基构成的分子。“脱氧核糖核苷酸”涉及在 β -D-呋喃核糖基的2'位处缺乏羟基的核苷酸。术语“DNA”包括分离的DNA,例如部分或完全纯化的DNA、基本上纯的DNA、合成的DNA和重组产生的DNA,并且包括通过一个或更多个核苷酸的添加、缺失、替换和/或改变而不同于天然存在DNA的经修饰DNA。这样的改变可包括将非核苷酸物质添加至例如DNA的末端或内部,例如DNA的一个或更多个核苷酸处。DNA分子中的核苷酸还可包括非标准核苷酸,例如非天然存在的核苷酸或化学合成的核苷酸。这些改变的DNA可称为类似物或天然存在DNA的类似物。

[0125] 在本发明的上下文中,术语“RNA”涉及包含核糖核苷酸残基并且优选完全或基本上由核糖核苷酸残基构成的分子。“核糖核苷酸”涉及在 β -D-呋喃核糖基的2'位处具有羟基的核苷酸。该术语包括双链RNA、单链RNA、分离的RNA,例如部分或完全纯化的RNA、基本上纯

的RNA、合成RNA、重组产生的RNA以及通过添加、缺失、替换和/或改变一个或更多个核苷酸而不同于天然存在RNA的经修饰RNA。这样的改变可包括将非核苷酸物质添加至例如RNA的末端或内部,例如RNA的一个或更多个核苷酸处。RNA分子中的核苷酸还可包括非标准核苷酸,例如非天然存在的核苷酸或化学合成的核苷酸或脱氧核苷酸。这些改变的RNA可称为类似物或天然存在RNA的类似物。根据本发明,术语“RNA”包括并优选地涉及“mRNA”,其意指“信使RNA”并且涉及可使用DNA作为模板产生且编码肽或蛋白质的转录物。mRNA通常包含5'非翻译区(5'-UTR)、蛋白质或肽编码区和3'非翻译区(3'-UTR)。mRNA在细胞中和在体外具有有限的半衰期。优选地,mRNA使用DNA模板通过体外转录产生。在本发明的一个实施方案中,RNA通过体外转录或化学合成获得。体外转录方法是技术人员已知的。例如,有多种体外转录试剂盒可商购获得。

[0126] 根据本发明,可根据需要改变RNA的稳定性和翻译效率。例如,可通过具有稳定化作用和/或提高RNA翻译效率的一种或更多种修饰来使RNA稳定化并提高其翻译。为了提高根据本发明使用的RNA的表达,可在编码区(即编码所表达的肽或蛋白质的序列)内,优选地在不改变所表达肽或蛋白质的序列的情况下对其进行修饰以提高GC含量从而提高mRNA稳定性并进行密码子优化,并因此增强在细胞中的翻译。

[0127] 在本发明中使用的RNA的上下文中,术语“修饰”包括对RNA的非天然存在于所述RNA中的任何修饰。

[0128] 在本发明的一个实施方案中,根据本发明使用的RNA不具有未加帽的5'-三磷酸。去除这样的未加帽的5'-三磷酸可通过用磷酸酶处理RNA来实现。

[0129] 根据本发明的RNA可具有经修饰的核糖核苷酸以提高其稳定性和/或降低细胞毒性。例如,在一个实施方案中,在根据本发明使用的RNA中,5-甲基胞苷被部分或完全(优选完全)替换为胞苷。作为替代或补充,在一个实施方案中,在根据本发明使用的RNA中,假尿苷被部分或完全(优选完全)替换为尿苷。

[0130] 在一个实施方案中,术语“修饰”涉及向RNA提供5'-帽或5'-帽类似物。术语“5'-帽”是指见于mRNA分子的5'-端上的帽结构,并且通常由通过不寻常的5'至5'三磷酸酯键与mRNA连接的鸟苷核苷酸组成。在一个实施方案中,该鸟苷在7-位甲基化。术语“常规5'-帽”是指天然存在的RNA 5'-帽,优选7-甲基鸟苷帽(m⁷G)。在本发明的上下文中,术语“5'-帽”包括类似于RNA帽结构并且被修饰以具有稳定化RNA和/或增强RNA翻译(如果连接于RNA的话,优选在体内和/或在细胞中)之能力的5'-帽类似物。

[0131] RNA可包含另外的修饰。例如,本发明中使用的RNA的另外修饰可以是延伸或截短天然存在的poly(A)尾或者改变5'-或3'-非翻译区(UTR),例如引入与所述RNA的编码区不相关的UTR,例如用来源于珠蛋白基因的3'-UTR交换已有的3'-UTR或者插入来源于球蛋白基因的3'-UTR的一个或更多个(优选两个)拷贝,所述球蛋白基因例如 $\alpha 2$ -珠蛋白、 $\alpha 1$ -珠蛋白、 β -珠蛋白,优选 β -珠蛋白,更优选人 β -珠蛋白。

[0132] 与具有经掩蔽poly-A序列的RNA相比,具有未掩蔽poly-A序列的RNA更高效地翻译。术语“poly(A)尾”或“poly-A序列”涉及通常位于RNA分子的3'端的腺嘌呤基(A)残基的序列,并且“未掩蔽poly-A序列”意指RNA分子3'端的poly-A序列以poly-A序列的A结束,并且除位于poly-A序列3'端(即下游)的A之外,在此之后没有核苷酸。此外,约120个碱基对的长poly-A序列产生最佳的转录物稳定性和RNA翻译效率。

[0133] 因此,为了提高根据本发明使用的RNA的稳定性和/或表达,可对其进行修饰以使其与poly-A序列联合存在,所述poly-A序列的长度优选为10至500,更优选30至300,甚至更优选65至200,并且尤其是100至150个腺苷残基。在一个尤其优选的实施方案中,poly-A序列的长度为约120个腺苷残基。为了进一步提高根据本发明使用的RNA的稳定性和/或表达,poly-A序列可以是未掩蔽的。

[0134] 术语RNA的“稳定性”涉及RNA的“半衰期”。“半衰期”涉及消除分子的一半活性、量或数目所需的时间。在本发明的上下文中,RNA的半衰期指示所述RNA的稳定性。RNA的半衰期可能影响RNA的“表达持续时间”。可预期具有长半衰期的RNA将长时间表达。

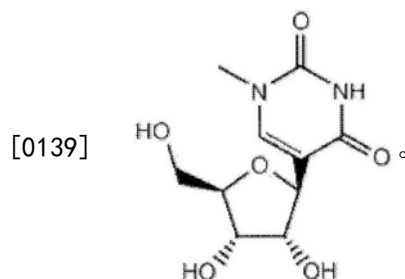
[0135] 当然,如果根据本发明期望降低RNA的稳定性和/或翻译效率,则可对RNA进行修饰以干扰如上所述提高RNA的稳定性和/或翻译效率的元件的功能。

[0136] 根据本发明施用的RNA是非免疫原性的。本文中使用的术语“非免疫原性RNA”是指在(例如向哺乳动物)施用之后不诱导免疫系统应答的RNA,或者诱导比由相同RNA所诱导的应答更弱的RNA,所述相同RNA的不同之处仅在于其未进行使得非免疫原性RNA成为非免疫原性的修饰和处理。在一个优选实施方案中,通过将抑制RNA介导的固有免疫受体活化的经修饰核苷酸并入到RNA中并去除双链RNA(dsRNA)使得非免疫原性RNA成为非免疫原性的。

[0137] 为了通过并入经修饰核苷酸而使得非免疫原性RNA成为非免疫原性的,可使用任何经修饰核苷酸,只要其降低或抑制RNA的免疫原性即可。特别优选的是抑制RNA介导的固有免疫受体活化的经修饰核苷酸。在一个实施方案中,经修饰核苷酸包含用包含经修饰核碱基的核苷对一个或多个尿苷的替换。在一个实施方案中,经修饰核碱基是经修饰尿嘧啶。在一个实施方案中,包含经修饰核碱基的核苷选自:3-甲基尿苷(m3U)、5-甲氧基尿苷(mo5U)、5-氮杂尿苷、6-氮杂尿苷、2-硫代-5-氮杂尿苷、2-硫代尿苷(s2U)、4-硫代尿苷(s4U)、4-硫代假尿苷、2-硫代假尿苷、5-羟基尿苷(ho5U)、5-氨基烯丙基尿苷、5-卤代尿苷(例如,5-碘代尿苷或5-溴代尿苷)、尿苷5-羧乙酸(cmo5U)、尿苷5-羧乙酸甲酯(mcmo5U)、5-羧甲基尿苷(cm5U)、1-羧甲基假尿苷、5-羧基羧甲基尿苷(chm5U)、5-羧基羧甲基尿苷甲酯(mchm5U)、5-甲氧基羧基甲基尿苷(mcm5U)、5-甲氧基羧基甲基-2-硫代尿苷(mcm5s2U)、5-氨基甲基-2-硫代尿苷(nm5s2U)、5-氨基甲基尿苷(mnm5U)、1-乙基假尿苷、5-氨基甲基-2-硫代尿苷(mnm5s2U)、5-氨基甲基-2-硒尿苷(mnm5se2U)、5-氨基酰甲基尿苷(ncm5U)、5-羧甲基氨基甲基尿苷(cmm5U)、5-羧甲基氨基甲基-2-硫代尿苷(cmm5s2U)、5-丙炔基尿苷、1-丙炔基假尿苷、5-牛磺酸甲基尿苷(τ m5U)、1-牛磺酸甲基假尿苷、5-牛磺酸甲基-2-硫代尿苷(τ m5s2U)、1-牛磺酸甲基-4-硫代假尿苷、5-甲基-2-硫代尿苷(m5s2U)、1-甲基-4-硫代假尿苷(m1s4 ψ)、4-硫代-1-甲基假尿苷、3-甲基假尿苷(m3 ψ)、2-硫代-1-甲基假尿苷、1-甲基-1-脱氮假尿苷、2-硫代-1-甲基-1-脱氮假尿苷、二氢尿苷(D)、二氢假尿苷、5,6-二氢尿苷、5-甲基二氢尿苷(m5D)、2-硫代二氢尿苷、2-硫代二氢假尿苷、2-甲氧基尿苷、2-甲氧基-4-硫代尿苷、4-甲氧基假尿苷、4-甲氧基-2-硫代假尿苷、N1-甲基假尿苷、3-(3-氨基-3-羧基丙基)尿苷(acp3U)、1-甲基-3-(3-氨基-3-羧基丙基)假尿苷(acp3 ψ)、5-(异戊烯基氨基)尿苷(inm5U)、5-(异戊烯基氨基)-2-硫代尿苷(inm5s2U)、 α -硫代尿苷、2'-O-甲基尿苷(Um)、5,2'-O-二甲基尿苷(m5Um)、2'-O-甲基假尿苷(ψ m)、2-硫代-2'-O-甲基尿苷(s2Um)、5-甲氧基羧基甲基-2'-O-甲基尿苷(mcm5Um)、5-氨基酰甲基-2'-O-甲基尿苷(ncm5Um)、5-羧甲基氨基甲基-2'-O-甲基尿苷(cmm5Um)、3,2'-O-二甲基尿苷(m3Um)、5-(异

戊烯基氨基甲基)-2'-O-甲基尿苷(inm5Um)、1-硫代尿苷、脱氧胸苷、2'-F-阿糖尿苷、2'-F-尿苷、2'-OH-阿糖尿苷、5-(2-甲酯基乙烯基)尿苷和5-[3-(1-E-丙烯基氨基)尿苷。在一个特别优选的实施方案中,包含经修饰核碱基的核苷是假尿苷(ψ)、N1-甲基假尿苷($m^1\psi$)或5-甲基尿苷(m^5U),特别是1-甲基假尿苷。

[0138] 包含经修饰核碱基的示例性核苷的结构是1-甲基假尿苷 $m^1\psi$:



[0140] 在一个实施方案中,用包含经修饰核碱基的核苷替换一个或更多个尿苷包括替换至少1%、至少2%、至少3%、至少4%、至少5%、至少10%、至少25%、至少50%、至少75%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的尿苷。

[0141] 在使用T7 RNA聚合酶通过体外转录(IVT)合成mRNA期间,由于酶的非常规活性,产生了大量的异常产物,包括双链RNA(dsRNA)。dsRNA诱导炎性细胞因子并活化效应酶,导致蛋白质合成抑制。dsRNA可例如通过使用无孔或多孔C-18聚苯乙烯-二乙烯基苯(PS-DVB)基质的离子对反相HPLC从RNA(例如IVT RNA)中去除。或者,可使用基于酶的方法,其使用特异性水解dsRNA而非ssRNA的大肠杆菌(E.coli)RNA酶III(RNase III),从而从IVT RNA制备物中消除dsRNA污染物。此外,可通过使用纤维素材料将dsRNA与ssRNA分离。在一个实施方案中,使RNA制备物与纤维素材料接触,并且在允许dsRNA与纤维素材料结合并且不允许ssRNA与纤维素材料结合的条件下将ssRNA与纤维素材料分离。

[0142] 本文中使用的术语“去除”是指将第一物质群体(例如非免疫原性RNA)的特征与第二物质群体(例如dsRNA)的邻近性区分开,其中第一物质群体不一定缺少第二物质,并且第二物质群体不一定缺少第一物质。然而,与第一物质和第二物质的未分离混合物相比,以去除第二物质群体为特征的第一物质群体具有可测量的较低的第二物质含量。

[0143] 可通过物理、化学或生物学手段将核酸转移到宿主细胞中。

[0144] 用于将核酸引入到宿主细胞中的物理方法包括磷酸钙沉淀、脂质体转染(lipofection)、粒子轰击、显微注射、电穿孔等。

[0145] 用于将目的核酸引入到宿主细胞中的生物学方法包括使用DNA和RNA载体。病毒载体并且尤其是反转录病毒载体已成为用于将基因插入到哺乳动物(例如人)细胞中的最广泛使用的方法。另一些病毒载体可来源于慢病毒、痘病毒、单纯疱疹病毒I、腺病毒和腺相关病毒等。

[0146] 用于将核酸引入到宿主细胞中的化学手段包括胶体分散体系,例如大分子复合物、纳米囊、微球、珠;以及基于脂质的体系,包括水包油乳剂、胶束、混合胶束和脂质体。用作在体外和体内递送载剂的优选胶体体系是脂质体(即,人工膜性小泡(membrane vesicle))。这样的体系的制备和使用是本领域中公知的。

[0147] “编码”是指在具有确定的核苷酸序列或确定的氨基酸序列的生物过程中,核酸中特定核苷酸序列用作用于合成另一些聚合物和大分子之模板的固有特性。因此,如果在细

胞或其他生物体系中核酸的表达(翻译和任选地转录)产生蛋白质,则核酸编码蛋白质。

[0148] 根据本发明,术语“表达”以其最一般含义使用并且包括产生RNA和/或肽或多肽,例如通过转录和/或翻译。关于RNA,术语“表达”或“翻译”特别地涉及产生肽或多肽。其还包括核酸的部分表达。此外,表达可以是瞬时的或稳定的。

[0149] 在本发明的上下文中,术语“转录”涉及其中将DNA序列中的遗传密码转录成RNA的过程。随后,可将RNA翻译成蛋白质。根据本发明,术语“转录”包括“体外转录”,其中术语“体外转录”涉及其中优选使用合适的细胞提取物在无细胞系统中体外合成RNA(特别是mRNA)的过程。优选地,克隆载体被应用于产生转录物。这些克隆载体通常被指定为转录载体并且根据本发明被术语“载体”所涵盖。根据本发明,本发明中使用的RNA优选为体外转录的RNA(IVT-RNA)并且可通过合适DNA模板的体外转录获得。用于控制转录的启动子可以是任何RNA聚合酶的任何启动子。RNA聚合酶的具体实例是T7、T3和SP6 RNA聚合酶。优选地,根据本发明的体外转录由T7或SP6启动子控制。用于体外转录的DNA模板可通过克隆核酸(特别是cDNA),并将其引入到用于体外转录的合适载体中来获得。cDNA可通过RNA的逆转录来获得。

[0150] 根据本发明的术语“翻译”涉及细胞核糖体中的过程,通过该过程,信使RNA的链指导氨基酸序列组装以产生肽或多肽。

[0151] 根据本发明,优选的是编码肽或蛋白质的核酸(例如RNA)一旦被细胞摄取或者引入(即转染或转导)到细胞中,则导致所述肽或蛋白质的表达,所述细胞可存在于体外或对象中。细胞可在细胞内(例如在胞质中和/或在胞核中)表达编码的肽或蛋白质,可分泌编码的肽或蛋白质,或者可将其在表面上表达。

[0152] 根据本发明,术语例如“核酸表达”和“核酸编码”或类似术语在本文中可互换使用,并且对于特定的肽或多肽意味着核酸(如果存在于适当的环境中的话,优选在细胞中)可被表达以产生所述肽或多肽。

[0153] 术语例如“转移”、“引入”、“转染”或“转导”在本文中可互换使用,并且涉及将核酸(特别是外源或异源核酸(例如RNA))引入到细胞中。根据本发明,细胞可存在于体外或体内,例如,细胞可形成器官、组织和/或生物体的一部分。根据本发明,转染可以是瞬时的或稳定的。对于转染的一些应用,如果转染的遗传物质仅是瞬时表达的就足够了。由于在转染过程中引入的核酸通常不整合到核基因组中,因此外来核酸将通过有丝分裂被稀释或降解。允许核酸附加型(episomal)扩增的细胞系大幅降低了稀释的速率。如果希望经转染的核酸实际上保留在细胞及其子细胞的基因组中,则必须发生稳定的转染。可将RNA转染到细胞中以瞬时表达其编码的蛋白质。

[0154] 根据本发明,术语“肽”是指这样的物质,其包含两个或更多个,优选3个或更多个,优选4个或更多个,优选6个或更多个,优选8个或更多个,优选10个或更多个,优选13个或更多个,优选16个或更多个,优选21个或更多个并且多至优选8、10、20、30、40或50个,特别是100个通过肽键共价连接的氨基酸。

[0155] 术语“蛋白质”是指大的肽,即多肽,优选是指具有多于100个氨基酸残基的肽,但通常术语“肽”、“多肽”和“蛋白质”是同义词并且在本文中可互换使用。

[0156] 本发明还包括肽、蛋白质或氨基酸序列(例如本文中所述的自身抗原)的“变体”。

[0157] 出于本发明的目的,氨基酸序列的“变体”包括氨基酸插入变体、氨基酸添加变体、氨基酸缺失变体和/或氨基酸替换变体。

[0158] 氨基酸插入变体包括在特定氨基酸序列中插入单个或两个或更多个氨基酸。在具有插入的氨基酸序列变体的情况下,将一个或更多个氨基酸残基插入到氨基酸序列中的特定位点中,但是也可随机插入并适当筛选所得产物。

[0159] 氨基酸添加变体包含一个或更多个氨基酸(例如1、2、3、5、10、20、30、50或更多个氨基酸)的氨基-和/或羧基-末端融合体。

[0160] 氨基酸缺失变体的特征在于从序列中去除一个或更多个氨基酸,例如去除1、2、3、5、10、20、30、50或更多个氨基酸。缺失可在蛋白质的任何位置。在蛋白质的N端和/或C端包含缺失的氨基酸缺失变体也称为N端和/或C端截短变体。

[0161] 氨基酸替换变体的特征在于序列中的至少一个残基被去除并且另一个残基被插入其位置。优选的是在氨基酸序列中在同源蛋白质或肽之间非保守的位置处进行修饰和/或将氨基酸用具有类似特性的其他氨基酸替换。优选地,蛋白质变体中的氨基酸变化是保守氨基酸变化,即类似地带电荷或不带电荷的氨基酸的替换。保守氨基酸变化涉及其侧链相关的氨基酸的家族中一种的替换。天然存在的氨基酸通常分为四个家族:酸性氨基酸(天冬氨酸、谷氨酸)、碱性氨基酸(赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、非极性氨基酸(丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸)和不带电荷的极性氨基酸(甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、半胱氨酸、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸)。有时,苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸被共同分类为芳香族氨基酸。

[0162] 优选地,给定氨基酸序列与作为所述给定氨基酸序列之变体的氨基酸序列之间的相似性(优选同一性)程度将为至少约60%、65%、70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%。优选地对于这样的氨基酸区域给出相似性或同一性程度,所述氨基酸区域为参考氨基酸序列整个长度的至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%或约100%。例如,如果参考氨基酸序列由200个氨基酸组成,则优选对于至少约20、至少约40、至少约60、至少约80、至少约100、至少约120、至少约140、至少约160、至少约180或约200个氨基酸(优选连续氨基酸)给出相似性或同一性程度。优选地对于至少80、至少100、至少120、至少150、至少180、至少200或至少250个氨基酸的片段给出相似性或同一性程度。在一些优选实施方案中,对于参考氨基酸序列的整个长度给出相似性或同一性程度。可用本领域已知的工具进行用于确定序列相似性(优选序列同一性)的比对,优选使用最佳序列比对,例如使用Align,使用标准设置,优选EMBOSS::needle, Matrix:Blosum62,Gap Open 10.0,Gap Extend 0.5。

[0163] “序列相似性”表示相同或代表保守氨基酸替换的氨基酸的百分比。两个氨基酸序列之间的“序列同一性”表示序列之间相同的氨基酸的百分比。

[0164] 术语“%同一性”旨在特别地是指在待比较的两个序列之间的最佳比对中相同的氨基酸残基的百分比,其中所述百分比是纯统计学的,并且所述两个序列之间的差异可在序列的整个长度上随机分布,并且与参考序列相比,待比较序列可以包含添加或缺失以获得两个序列之间的最佳比对。两个序列的比较通常通过针对区段或“比较窗”在最佳比对之后比较所述序列来进行以鉴定对应序列的局部区域。用于比较的最佳比对可人工进行,或者借助于Smith和Waterman,1981,Ads App.Math.2,482的局部同源性算法、借助于Neddleman和Wunsch,1970,J.Mol.Biol.48,443的局部同源性算法和借助于Pearson和

Lipman, 1988, Proc. Natl Acad. Sci. USA 85, 2444 的相似性检索算法, 或者借助于使用所述算法的计算机程序 (Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis. 中的 GAP、BESTFIT、FASTA、BLAST P、BLAST N 和 TFASTA) 来进行。

[0165] 百分比同一性如下获得: 确定待比较序列对应的相同位置的数目, 将该数目除以所比较的位置的数目, 并将该结果乘以 100。

[0166] 根据本发明, 同源氨基酸序列表现出至少 40%, 特别是至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80%、至少 90% 并且优选至少 95%、至少 98% 或至少 99% 的氨基酸残基同一性。

[0167] 根据本发明, 氨基酸序列、肽或蛋白质的变体、片段、部分或一部分优选分别具有其所来源于的氨基酸序列、肽或蛋白质的功能特性, 即它是功能上等同的。在一个实施方案中, 氨基酸序列、肽或蛋白质的变体、片段、部分或一部分分别与其所来源于的氨基酸序列、肽或蛋白质在免疫学上等同。在一个实施方案中, 功能特性是免疫学特性。

[0168] 本发明包括本文中所述的肽或蛋白质的衍生物, 其由术语“肽”和“蛋白质”构成。根据本发明, 蛋白质和肽的“衍生物”是蛋白质和肽的经修饰形式。这样的修饰包括任何化学修饰, 并且包括与蛋白质或肽缔合的任何分子 (例如碳水化合物、脂质和/或蛋白质或肽) 的单个或多个替换、缺失和/或添加。在一个实施方案中, 蛋白质或肽的“衍生物”包括由糖基化、乙酰化、磷酸化、酰胺化、棕榈酰化、豆蔻酰化、异戊二烯化、脂化、烷基化、衍生化、引入保护/封闭基团、蛋白水解切割或者与抗体或与另外的细胞配体结合得到的那些经修饰类似物。术语“衍生物”还延伸至所述蛋白质和肽的所有功能性化学等同物。优选地, 经修饰肽具有提高的稳定性和/或提高的免疫原性。

[0169] 根据本发明, 术语“来源于”意指特定实体, 特别是特定序列存在于其所来源于的对象 (特别是生物体或分子) 中。在氨基酸或核酸序列 (尤其是特定序列区域) 的情况下, “来源于”特别地意指相关氨基酸序列或核酸序列来源于其所在的氨基酸序列或核酸序列。

[0170] 术语“细胞”或“宿主细胞”优选是完整细胞, 即未释放其正常细胞内组分 (例如酶、细胞器或遗传物质) 的具有完整膜的细胞。完整细胞优选地是有生存力的细胞 (viable cell), 即能够执行其正常代谢功能的活细胞。优选地, 根据本发明, 所述术语涉及可用外源核酸转化或转染的任何细胞。根据本发明, 术语“细胞”包括原核细胞 (例如, 大肠杆菌) 或真核细胞 (例如, 树突细胞、B 细胞、CHO 细胞、COS 细胞、K562 细胞、HEK293 细胞、HELA 细胞、酵母细胞和昆虫细胞)。外源核酸在细胞内可如下存在: (i) 本身自由分散、(ii) 并入到重组载体中或 (iii) 整合到宿主细胞基因组或线粒体 DNA 中。特别优选哺乳动物细胞, 例如来自人、小鼠、仓鼠、猪、山羊和灵长类的细胞。细胞可来源于大量组织类型并且包括原代细胞和细胞系。

[0171] 包含核酸 (例如已用核酸转染的) 的细胞优选表达由所述核酸编码的肽或蛋白质。

[0172] 术语“扩增”是指其中特定实体倍增的过程。在本发明的一个实施方案中, 该术语在免疫应答的情况下使用, 在所述免疫应答中淋巴细胞被抗原刺激, 增殖, 并且识别所述抗原的特异性淋巴细胞扩增。优选地, 克隆扩增导致淋巴细胞分化。

[0173] 本文中使用的“分离的”旨在是指基本上不含其他分子 (例如其他细胞物质) 的分子。

[0174] 在本发明的上下文中的术语“重组”意指“通过遗传改造制造”。优选地, 在本发明

的上下文中的“重组对象”(例如重组细胞或核酸)不是天然存在的。

[0175] 本文中使用的术语“天然存在的”是指对象可见于自然界中的事实。例如,存在于生物体(包括病毒)中和可从自然界来源中分离的并且未在实验中人工有意修饰的肽或核酸是天然存在的。

[0176] 术语例如“减小”、“抑制”或“降低”涉及引起在水平上优选地为5%或更大、10%或更大、20%或更大,更优选地为50%或更大,并且最优选地为75%或更大的总体降低的能力。这些术语包括完全或基本上完全抑制,即降低至零或基本上降低至零。

[0177] 术语例如“提高”、“增强”、“促进”、“刺激”或“诱导”涉及引起在水平上优选地为5%或更大、10%或更大、20%或更大,50%或更大、75%或更大、100%或更大、200%或更大或者500%或更大的总体提高的能力。这些术语可涉及从零或者不可测量或不可检测的水平提高、增强、促进、刺激或诱导至大于零的水平或者可测量或可检测的水平。或者,这些术语还可意味着在提高、增强、促进、刺激或诱导之前存在一定水平,并且在提高、增强、促进、刺激或诱导之后水平更高。

[0178] 本文中所述的药剂和组合物可用于抑制哺乳动物中的免疫应答以治疗或预防自身免疫病的方法。特别地,本文中所述的药剂和组合物可用于治疗患有自身免疫病的对象,所述自身免疫病的特征在于存在针对自身抗原的免疫应答。根据本发明,向对象施用编码包含自身抗原或其片段或者自身抗原或片段之变体的肽或多肽的非免疫原性RNA。

[0179] 术语“疾病”是指影响个体身体的异常情况。疾病通常被解释为与特定症状和体征相关的医学病症。疾病可由起初来自于外部来源的因素引起,例如感染性疾病,或者其可由内部功能障碍引起,例如自身免疫病。对于人,“疾病”通常更广泛地用于指引起患病个体的疼痛、功能障碍、痛苦、社会问题或死亡或者与该个体接触的那些的类似问题的任何状况。在此更广泛的意义上,疾病有时包括损伤、失能、障碍、综合征、感染、孤立症状、不正常行为以及结构和功能的非典型变化,而在另一些情况下和出于另一些目的,这些可被认为是可区分的类别。疾病通常不仅在身体上而且还在情感上影响个体,因为对许多疾病的感染和经历可改变个体对生命的看法和个体性格。根据本发明,术语“疾病”包括自身免疫病。

[0180] 根据本发明待治疗的疾病优选是涉及自身抗原或与自身抗原相关的疾病。

[0181] 术语“自身免疫病”或“自身免疫性病症”是指身体对其自身组织的某些成分产生免疫原性(即免疫系统)应答的任何疾病/病症。换句话说,免疫系统失去了其将身体内的某组织或系统识别为自身的能力并且如同其为外来的那样对其靶向和攻击。自身免疫病可分为主要影响一个器官的那些疾病(例如溶血性贫血和抗免疫性甲状腺炎)以及其中自身免疫病过程通过许多组织扩散的那些疾病(例如,系统性红斑狼疮)。例如,认为多发性硬化由T细胞攻击围绕脑和脊髓的神经纤维的鞘引起。这导致协调丧失、虚弱和视力模糊。自身免疫病的实例包括但不限于艾迪生病(Addison's disease)、斑秃、强直性脊柱炎、自身免疫性肝炎、自身免疫性腮腺炎、克罗恩病(Crohn's disease)、糖尿病(I型)、营养不良性大疱性表皮松解症(epidermolysis bullosa)、附睾炎、肾小球肾炎、格雷夫斯病(Graves' disease)、吉兰-巴雷综合征(Guillain-Barré syndrome)、桥本病(Hashimoto's disease)、溶血性贫血、系统性红斑狼疮、多发性硬化、重症肌无力、寻常型天疱疮、银屑病、风湿热、类风湿性关节炎、结节病、硬皮病、干燥综合征(Sjögren's syndrome)、脊柱关节病(spondyloarthropathies)、甲状腺炎、血管炎、白癜风、黏液水肿、恶性贫血、溃疡性结肠炎

和I型糖尿病等。

[0182] 以下是已知与某些自身免疫病相关的抗原的列表。来自这些抗原的表位可包括在根据本发明的包含自身抗原或其片段或者自身抗原或片段之变体的肽或多肽中。

[0183] 多发性硬化 (MS) / (+动物模型EAE (实验性自身免疫性脑脊髓炎 (experimental autoimmune encephalomyelitis)))

[0184] MS中可能的候选自身抗原包括髓鞘抗原、神经元抗原和星形胶质细胞来源的抗原。髓鞘蛋白的蛋白质组分,例如髓鞘碱性蛋白 (myelin basic protein, MBP) (例如, MBP84-102、MBP83-99、MBP13-32、MBP144-163、MBP143-168、MBP151-170)、蛋白脂质蛋白 (PLP) (例如PLP139-151)、髓鞘少突胶质细胞糖蛋白 (MOG)、髓鞘相关糖蛋白 (MAG)、髓鞘相关少突胶质细胞碱性蛋白 (MOBP)、CNPase (2', 3'-环核苷酸3'-磷酸二酯酶)、S100 β 蛋白和转醛醇酶H,对于根据本发明的应用特别有利。

[0185] 类风湿性关节炎 (RA)

[0186] RA中可能的候选自身抗原包括II型胶原、人软骨糖蛋白-39和聚集蛋白聚糖 (aggrecan) G1。

[0187] 1型糖尿病

[0188] 1型糖尿病中可能的候选自身抗原包括胰岛素、胰岛素原、谷氨酸脱羧酶65 (GAD65)、胰岛素瘤相关蛋白2 (IA-2)、胰岛素瘤相关蛋白2 β (IA-2 β)、胰岛细胞自身抗原 (HSP)、glima 38、胰岛细胞自身抗原 (ICA69)、p52、锌转运体8 (ZnT8)、胰岛特异性葡萄糖-6-磷酸酶催化亚基相关蛋白 (islet-specific glucose-6-phosphatase catalytic subunit-related protein, IGRP) 和嗜铬粒蛋白 (chromogranin) A。

[0189] 重症肌无力

[0190] 重症肌无力中可能的候选自身抗原包括nAChR、MuSK和LRP4。

[0191] 本发明考虑使用疾病例如MS、RA、1型糖尿病、重症肌无力、IBD和银屑病中的其他自身抗原 (其中一些在本文中列出) 以及本领域中已知的其他自身抗原。已知的自身抗原和自身免疫表位的数量正在增长。本发明还考虑使用将来变得已知的任何这样的抗原和表位。

[0192] 术语“与自身抗原相关的疾病”或“涉及自身抗原的疾病”是指涉及自身抗原的任何疾病,例如以针对自身抗原或表达自身抗原之细胞的免疫反应之存在为特征性疾病。

[0193] 术语“治疗”或“治疗性治疗”涉及改善个体的健康状况和/或延长 (提高) 个体寿命的任何治疗。所述治疗可消除个体中的疾病,阻止或减慢个体中疾病的发生,抑制或减慢个体中疾病的发生,降低个体中症状的频率或严重程度,和/或降低目前患有或以前患有疾病的个体中的复发。

[0194] 术语“预防性治疗”或“预防治疗”涉及旨在个体 (特别是处于该疾病的风险之中的个体) 中防止疾病发生的任何治疗。术语“预防性治疗”或“预防治疗”在本文中可互换使用。

[0195] “处于风险之中”意指与一般群体相比,被鉴定为具有较正常患病几率更高的几率的对象 (即患者)。另外,曾患有或目前患有疾病的对象是发生疾病风险提高的对象,因为这样的对象可继续发生疾病。

[0196] 术语“体内”涉及对象中的情况。

[0197] 术语“个体”或“对象”涉及脊椎动物,特别是哺乳动物。例如,在本发明上下文中的哺乳动物是人;非人灵长类;家养哺乳动物,例如狗、猫、绵羊、牛、山羊、猪、马等;实验室动物,例如小鼠、大鼠、兔、豚鼠等;以及圈养动物,例如动物园的动物。术语“对象”还涉及非哺乳动物脊椎动物,例如鸟类(特别是家禽,例如鸡、鸭、鹅、火鸡),并且涉及鱼类(特别是养殖鱼,例如鲑鱼或鲈鱼)。本文中使用的术语“动物”还包括人。优选地,术语“患者”涉及患病个体。

[0198] 术语“自体”用于描述来源于同一对象的任何事物。例如,“自体移植”是指来源于同一对象的组织或器官的移植。这样的过程是有利的,因为它们克服了免疫屏障,否则其导致排斥。

[0199] 术语“同种异体”用于描述来源于相同物种的不同个体的任何事物。当在一个或更多个基因座处的基因不不同时,将两个或更多个个体称为彼此是同种异体的。

[0200] 术语“同基因”用于描述来源于具有相同基因型的个体或组织(即同卵双胞胎或相同近交品系的动物或其组织)的任何事物。

[0201] 术语“异源”用于描述由多个不同元件组成的事物。例如,将一个个体的骨髓转移到不同个体中构成异源移植。异源基因是来源于除所述对象之外的来源的基因。

[0202] 本文中所述的药剂可以以任何合适的药物组合物的形式施用。术语“药物组合物”涉及包含治疗有效药剂或其盐的制剂,优选与药物赋形剂(例如缓冲剂、防腐剂和张力调节剂)一起。所述药物组合物可用于通过将所述药物组合物施用于个体来治疗或预防疾病或病症。药物组合物在本领域中也称为药物制剂。药物组合物可局部或全身性施用。

[0203] 术语“全身性施用”是指施用治疗有效的药剂以使得药剂以显著量广泛地分布于个体的体内并且产生生物学作用。根据本发明,优选地施用通过肠胃外施用进行。

[0204] 术语“肠胃外施用”是指施用治疗有效的药剂以使得药剂不通过肠。术语“肠胃外施用”包括静脉内施用、皮下施用、皮内施用或动脉内施用,但不限于此。

[0205] 本发明的方法还优选地包括进一步向对象提供免疫抑制化合物。如果免疫抑制化合物是肽或多肽,则可通过施用免疫抑制化合物或编码免疫抑制化合物的核酸(例如RNA)、特别是非免疫原性RNA(例如本文中所述的RNA)而将其提供给对象。免疫抑制化合物可选自转化生长因子 β (TGF- β)、白介素10 (IL 10)、白介素1受体拮抗剂 (IL-1RA)、白介素4 (IL-4)、白介素27 (IL-27)、白介素35 (IL-35)、程序性死亡-配体1 (PD L1)、诱导型T细胞共刺激分子配体 (ICOSL)、B7-H4、CD39、CD73、FAS、FAS-IL、吡啶胺2,3-双加氧酶1 (ID01)、吡啶胺2,3-双加氧酶2 (ID02)、乙醛脱氢酶1 (ALDH1)/视黄醛脱氢酶 (RALDH)、精氨酸酶1 (ARG1)、精氨酸酶2 (ARG2)、氧化亚氮合酶 (NOS2)、半乳凝素 (galectin) -1、半乳凝素-9、脑信号蛋白 (semaphorin) 4A及其任何组合。此外,本文中所述的组合物可包含这样的免疫抑制化合物或者编码这样的免疫抑制化合物的核酸(例如RNA)。

[0206] 根据本发明的药物组合物通常以“药用有效量”和“可药用制剂”施用。

[0207] 术语“药用有效量”是指单独或与另外的剂量一起实现期望反应或期望效果的量。在治疗特定疾病的情况下,期望的反应优选地涉及抑制疾病进程。这包括减慢疾病的进展,并且特别是中断或逆转疾病的进展。治疗疾病的期望反应也可以是延迟所述疾病或所述病症的发生或者预防其发生。本文中所述组合物的有效量将取决于待治疗的病症;疾病的严重程度;患者的个体参数,包括年龄、生理状况、身材大小和体重;治疗持续时间;伴随治疗

(如果存在的话)的类型;具体施用途径;以及类似因素。因此,本文中所述组合物的施用剂量可取决于多种这样的参数。在采用初始剂量患者的反应不足的情况下,可使用更高的剂量(或通过不同的更局部化的施用途径实现有效地更高的剂量)。

[0208] 术语“可药用”是指不与药物组合物的活性组分的作用相互作用的物质的无毒性。

[0209] 本发明的药物组合物可包含盐、缓冲剂、防腐剂、载体和任选地其他治疗剂。优选地,本发明的药物组合物包含一种或更多种可药用载体、稀释剂和/或赋形剂。

[0210] 术语“赋形剂”旨在表示药物组合物中不是活性成分的所有物质,例如黏合剂、润滑剂、增稠剂、表面活性剂、防腐剂、乳化剂、缓冲剂、矫味剂或着色剂。

[0211] 术语“稀释剂”涉及稀释剂和/或稀化剂。此外,术语“稀释剂”包括流体、液体或固体悬浮物(solid suspension)和/或混合介质中的任意一种或更多种。

[0212] 术语“载体”涉及适用于向人施用的一种或更多种相容性固体或液体填充剂或稀释剂。术语“载体”涉及天然或合成的有机或无机组分,其与活性组分组合以促进活性组分的应用。优选地,载体组分是无菌液体,例如水或油,包括来源于矿物油、动物或植物的那些,例如花生油、大豆油、芝麻油、向日葵油等。盐溶液和葡萄糖水溶液以及甘油溶液也可用作水性载体化合物。

[0213] 用于治疗用途的可药用载体或稀释剂在制药领域中是公知的,并且描述于例如 Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A.R Gennaro edit.1985) 中。合适的载体的实例包括例如碳酸镁、硬脂酸镁、滑石、糖、乳糖、果胶、糊精、淀粉、明胶、西黄蓍胶、甲基纤维素、羧甲基纤维素钠、低熔点蜡、可可豆脂等。合适的稀释剂的实例包括乙醇、甘油和水。

[0214] 可针对预期的施用途径和标准药学实践来选择药用载体、赋形剂或稀释剂。本发明的药物组合物可包含以下作为载体、赋形剂或稀释剂或者除载体、赋形剂或稀释剂之外还可以包含以下:任何合适的黏合剂、润滑剂、助悬剂、包衣剂和/或增溶剂。合适的黏合剂的实例包括淀粉、明胶、天然糖例如葡萄糖、无水乳糖、自由流动乳糖(free-flow lactose)、 β -乳糖、玉米甜味剂、天然和合成胶例如阿拉伯胶、西黄蓍胶或藻酸钠、羧甲基纤维素和聚乙二醇。合适的润滑剂的实例包括油酸钠、硬脂酸钠、硬脂酸镁、苯甲酸钠、乙酸钠、氯化钠等。可在药物组合物中提供防腐剂、稳定剂、染料以及甚至矫味剂。防腐剂的实例包括苯甲酸钠、山梨酸和对羟基苯甲酸酯。也可使用抗氧化剂和助悬剂。

[0215] 在一个实施方案中,该组合物是水性组合物。水性组合物可任选地包含溶质,例如盐。在一个实施方案中,所述组合物为冻干组合物的形式。冻干组合物可通过冷冻干燥相应的水性组合物来获得。

[0216] 通过以下附图和实施例对本发明进行进一步举例说明,所述附图和实施例不应被解释为限制本发明的范围。

[0217] 附图

[0218] 图1:施用与F12脂质体络合的萤光素酶-RNA之后脾免疫细胞的活化、细胞因子释放和蛋白质的表达。对BALB/c小鼠($n=7$)用10 μ g非免疫原性LUC mRNA-LPX静脉内注射到眶后丛中,并在24小时之后研究(A)树突细胞($n=3$) (通过CD86的上调揭示)、T细胞、B细胞和NK细胞(通过CD69的上调揭示)的成熟状态。在mRNA-LPX注射到BALB/c小鼠中之后6小时(B)评估血清IFN α 浓度。(C)通过体内生物发光成像,将mRNA-LPX注射到萤光素酶-RNA的BALB/c

小鼠 ($n=4$) 中之后6、24、48和72小时的体内萤光素酶活性确定。数据描述为来自 $n=3$ 只小鼠/组的平均值 $\pm$ SD。LLOD=检测下限。

[0219] 图2:通过纤维素处理或HPLC纯化纯化的非免疫原性MOG35-55mRNA的斑点杂交(Dotblot)分析。曝光时间20秒。

[0220] 图3:通过DC的MOG35-55抗原呈递诱导对EAE的耐受。通过在C57BL/6小鼠中用MOG35-55-CFA(第0天)和百日咳毒素(第0天和第2天)进行免疫接种主动诱导EAE。在EAE诱导之后第7天和第10天,将通过纤维素或HPLC法纯化的编码非免疫原性MOG35-55的mRNA静脉内注射到眶后丛中。对照小鼠接受150mM NaCl。数据描述为平均值。 $n=6$ 只小鼠/组。

[0221] 图4:通过APC的MOG35-55抗原呈递诱导抗原特异性T细胞增殖。将初始、cell-trace-violet(CTV)标记的Thy1.1⁺ 2D2⁺ CD4⁺ T细胞过继转移至Thy1.2⁺ C57BL/6对照小鼠。第二天,用10、20或40 μ g编码非免疫原性MOG35-55的mRNA对小鼠进行免疫接种。用20 μ g非免疫原性无关对照mRNA处理对照小鼠。第二对照组另外接受150mM NaCl。4天之后,处死小鼠并分析脾的Thy1.1⁺细胞增殖。数据描述为来自 $n=3$ 只小鼠/组的平均值 $\pm$ SD。

[0222] 图5:通过诱导的抗原特异性Treg细胞的MOG35-55 T细胞增殖的体外抑制。(A,B)用编码非免疫原性MOG35-55的mRNA对2D2 Foxp3-eGFP小鼠进行免疫接种4次(d0,d3,d6,d9)。用编码免疫原性MOG35-55的mRNA或非免疫原性无关对照mRNA处理对照小鼠。第三对照组另外接受150mM NaCl。在最后一次mRNA处理之后4天,处死小鼠并分析MOG35-55特异性CD4⁺细胞的Foxp3-eGFP表达(C)。将每个处理组的细胞(抑制)与未经处理初始小鼠的CTV标记的2D2 CD4⁺ T细胞(应答细胞)共培养,并用MOG35-55肽负载的BMDC在体外再刺激72小时。通过FACS通过CTV稀释来确定应答细胞的增殖(对CTV⁺细胞设门)。以4种不同的比例测量抑制细胞对应答细胞的抑制能力。数据描述为来自 $n=4$ 只小鼠/组的平均值 $\pm$ SD。通过单因素ANOVA和Tukey多重比较检验评估CD4⁺ Foxp3⁺细胞频率的统计分析,*** $p\leq 0.001$ 。

[0223] 图6:通过DC的MOG35-55抗原呈递诱导对EAE的耐受。通过在C57BL/6小鼠中用MOG35-55-CFA(第0天)和百日咳毒素(第0天和第2天)进行免疫接种主动诱导EAE。在EAE诱导之后第7天和第10天,将编码非免疫原性MOG35-55的mRNA以及非免疫原性无关mRNA静脉内注射到眶后丛中。对照小鼠接受150mM NaCl。数据描述为平均值。 $n=6$ 至8只小鼠/组。通过单因素ANOVA和Tukey多重比较检验确定每组每只小鼠的最大EAE评分的统计分析。使用曲线下面积(AUC),通过不同EAE疾病发生曲线的单因素ANOVA和Tukey多重比较检验确定统计学显著性。

[0224] 图7:在真实治疗环境中通过DC的MOG35-55抗原呈递诱导对EAE的耐受。通过在C57BL/6小鼠中用MOG35-55-CFA(第0天)和百日咳毒素(第0天和第2天)进行免疫接种主动诱导EAE。在小鼠达到1至2的EAE评分之后,将编码非免疫原性MOG35-55的mRNA以及非免疫原性无关mRNA静脉内注射到眶后丛中。对照小鼠接受150mM NaCl。数据描述为平均值。 $n=6$ 至9只小鼠/组。通过单因素ANOVA和Tukey多重比较检验评估每组每只小鼠的最大EAE评分的统计分析。使用曲线下面积(AUC),通过不同EAE疾病发生曲线的单因素ANOVA和Tukey多重比较检验确定统计学显著性。

[0225] 图8:通过DC的抗原呈递诱导对EAE的耐受。通过在C57BL/6小鼠中用MOG35-55-CFA免疫接种主动诱导EAE,并且在EAE诱导之后第7天和第10天,将小鼠用20 μ g编码非免疫原性MOG35-55的mRNA或150mM NaCl进行处理。在疾病诱导之后第16天,从经受EAE折磨并经mRNA

处理的小鼠获取器官,并将其在布雷菲德菌素A存在下,在MOG35-55肽存在下培养6小时。通过CD4⁺ CD44⁺ T细胞的细胞内细胞因子染色对CD40L的表达进行检测。数据描述为来自n=4只小鼠/组的平均值±SD。通过单因素ANOVA和Tukey多重比较检验评估CD4⁺ T_H17细胞的统计分析,*p≤0.05。

[0226] 图9:在经治疗处理的小鼠中MOG35-55肽特异性Th1和Th17细胞显著降低(第7天/第10天)。通过在C57BL/6小鼠中用MOG35-55-CFA进行免疫接种主动诱导EAE,并且在EAE诱导之后第7天和第10天,将小鼠用20μg编码非免疫原性MOG35-55的mRNA或150mM NaCl进行处理。在EAE诱导之后第16天收获脑和脊髓,并将细胞在布雷菲德菌素A存在下,在MOG35-55肽存在下在体外再刺激6小时。然后通过细胞内细胞因子染色分析CD4⁺ T细胞的IFN γ 和IL-17A表达,并计算IFN γ⁺和IL-17A⁺ CD4⁺ T细胞的百分比。数据描述为来自n=4只小鼠/组的平均值±SD。通过单因素ANOVA和Tukey多重比较检验评估统计分析,*p≤0.05。

[0227] 图10:施用与F12脂质体复合的非免疫原性(m1Y)和免疫原性(U) mRNA的不同MOG35-55-mRNA混合物之后,脾免疫细胞的活化和细胞因子释放。对C57BL/6小鼠用20μg总MOG35-55 mRNA-LPX静脉内注射到眶后丛中,并在24小时之后研究树突细胞(通过CD86的上调揭示)、T细胞和NK细胞(通过CD69的上调揭示)的成熟状态。将mRNA-LPX注射到C57BL/6小鼠中之后6小时,评估血清IFNα浓度。数据描述为来自n=3只小鼠/组的平均值±SD。

[0228] 图11:非免疫原性mRNA与免疫原性mRNA的不同MOG35-55-mRNA混合物的斑点杂交分析。曝光时间20秒。虚线设定为320pg dsRNA的100%的斑点强度。

[0229] 图12:非免疫原性MOG35-55 mRNA诱导对EAE的完全耐受。通过在C57BL/6小鼠中用MOG35-55-CFA(第0天)和百日咳毒素(第0天和第2天)进行免疫接种主动诱导EAE。在EAE诱导之后第7天和第10天,将编码非免疫原性(m1Y)和免疫原性(U) MOG35-55的mRNA的不同混合物静脉内注射到眶后丛中。对照小鼠接受150mM NaCl。数据描述为平均值。n=6至8只小鼠/组。通过单因素ANOVA和Tukey多重比较检验评估每组每只小鼠的最大EAE评分的统计分析,**p≤0.01。

[0230] 图13:单独的核苷修饰不诱导识别丧失。施用与F12脂质体复合的不同核苷修饰的mRNA之后脾免疫细胞的活化和细胞因子释放。对C57BL/6小鼠用10μg总mRNA-LPX静脉内注射到眶后丛中,并在24小时之后研究树突细胞(通过CD86的上调揭示)、T细胞和NK细胞(通过CD69的上调揭示)的成熟状态。在mRNA-LPX注射到C57BL/6小鼠之后6小时评估血清IFNα浓度。数据描述为来自n=3只小鼠/组的平均值±SD。

[0231] 图14:编码非免疫原性MOG35-55的mRNA-LPX处理不导致抗原特异性CD4⁺效应细胞的扩增。在第0、3、7和10天用20μg编码非免疫原性MOG35-55的mRNA处理初始C57BL/6小鼠。用20μg非免疫原性无关对照mRNA处理对照小鼠。第二对照组接受150mM NaCl。在第一次mRNA处理之后第13天,处死小鼠并通过IFN γ ELISpot分析脾细胞的促炎细胞因子和抗炎细胞因子的分泌(A),以及通过多重ELISA检测MOG35-55-肽再刺激细胞的上清液中的细胞因子(B和C)。数据描述为来自n=4至5只小鼠/组的平均值±SD。

[0232] 图15:用编码非免疫原性MOG35-55的mRNA-LPX处理之后,共抑制性分子上调。在第0、3、7和10天用20μg编码非免疫原性MOG35-55的mRNA处理初始C57BL/6小鼠。用20μg非免疫原性无关对照mRNA处理对照小鼠。此外,第二对照组接受150mM NaCl。在第一次mRNA处理之后第13天,处死小鼠并通过流式细胞术分析来自脾的MOG35-55CD4⁺ T细胞的共抑制性分子

上调。数据描述为来自 $n=4$ 至5只小鼠/组的平均值 $\pm$ SD。通过单因素ANOVA和Tukey多重比较检验评估统计分析。

[0233] 图16:用编码非免疫原性MOG35-55的mRNA-LPX的治疗性疫苗接种降低了淋巴细胞向CNS中的浸润。在d-1将初始Thy1.1⁺ 2D2 CD4⁺ T细胞过继转移到Thy1.2⁺ C57BL/6小鼠中。在通过用MOG35-55-CFA(第0天)和百日咳毒素(第0天和第2天)进行免疫接种之后的第二天主动诱导EAE,并在EAE诱导之后第7天和第10天,将小鼠用20 μ g编码非免疫原性MOG35-55的mRNA、20 μ g非免疫原性无关mRNA或150mM NaCl进行处理。在疾病诱导之后第16天,从经不同处理的小鼠获取器官。检测Thy1.1⁺ CD4⁺ MOG35-55特异性细胞的浸润,并使用Trucount™管通过流式细胞术确定浸润细胞的总数。数据描述为来自 $n=4$ 只小鼠/组的平均值 $\pm$ SD。通过单因素ANOVA和Tukey多重比较检验评估浸润的CD4⁺ T细胞的分析。

[0234] 图17:在经治疗处理的小鼠中MOG35-55特异性Th1和Th17细胞显著降低(第7天/第10天)。通过在C57BL/6小鼠中用MOG35-55-CFA(第0天)和百日咳毒素(第0天和第2天)进行免疫接种主动诱导EAE,并且在EAE诱导之后第7天和第10天,将小鼠用20 μ g编码非免疫原性MOG35-55的mRNA、20 μ g非免疫原性无关mRNA或150mM NaCl进行处理。在EAE诱导之后第16天收获脑和脊髓,并且将细胞在布雷菲德菌素A存在下,在MOG35-55肽存在下在体外再刺激6小时。然后通过细胞内细胞因子染色通过流式细胞术分析CD4⁺ T细胞的IFN γ 和IL-17A表达,并计算CD4⁺ T细胞的IFN γ ⁺和IL-17A⁺的百分比。数据描述为来自 $n=4$ 只小鼠/组的平均值 $\pm$ SD。通过单因素ANOVA和Tukey多重比较检验评估统计分析。

[0235] 图18:在成功的非免疫原性MOG35-55特异性mRNA-LPX处理之后,在MOG35-55特异性CD4⁺ T细胞上共抑制性分子上调。通过在C57BL/6小鼠中用MOG35-55-CFA(第0天)和百日咳毒素(第0天和第2天)进行免疫接种主动诱导EAE,并且在EAE诱导之后第7天和第10天,将小鼠用20 μ g编码非免疫原性MOG35-55的mRNA、20 μ g非免疫原性无关mRNA或150mM NaCl进行处理。在疾病诱导之后第16天,从经不同处理的组解剖脾。通过四聚体特异性MACS分离MOG35-55特异性CD4⁺ T细胞,并通过四聚体染色通过流式细胞术进行表型分析。数据描述为来自 $n=4$ 只小鼠/组的平均值 $\pm$ SD。通过单因素ANOVA和Tukey多重比较检验评估统计分析。

[0236] 图19:PD-1和CTLA-4是维持非免疫原性mRNA诱导的抗原特异性耐受所需要的。通过在C57BL/6小鼠中用MOG35-55-CFA(第0天)和百日咳毒素(第0天和第2天)进行免疫接种主动诱导EAE,并且在EAE诱导之后第7天和第10天,将小鼠用20 μ g编码非免疫原性MOG35-55的mRNA或20 μ g非免疫原性无关mRNA($n=8$ 只小鼠/组)进行处理。用抗PD-1或抗CTLA-4阻断抗体或相应的IgG对照同时处理经mRNA处理的小鼠。通过日常健康监测评估EAE发生。使用EAE曲线下面积(AUC),通过不同疾病发生曲线的单因素ANOVA和Tukey多重比较检验确定统计学显著性。

[0237] 图20:通过用非免疫原性抗原特异性mRNA处理的抗原特异性耐受诱导独立于EAE疾病模型。(A)用编码非免疫原性PLP139-151的mRNA-LPX的治疗性疫苗接种诱导对复发缓解型EAE的耐受。通过在SJL小鼠中用PLP139-151-CFA(第0天)和百日咳毒素(第0天和第2天)进行免疫接种主动诱导EAE。从EAE诱导之后第7天和第10天开始,每周2 $\times$ 将20 μ g编码非免疫原性PLP139-151的mRNA以及非免疫原性无关mRNA i.v.注射到眶后丛中。(B)用编码非免疫原性多表位的mRNA-LPX的治疗性疫苗接种诱导复杂EAE中的耐受。通过在来自C57BL/6

和SJL/JRj的F1杂交小鼠中用MOG35-55、PLP139-151、PLP178-191、MBP84-104和MOBP15-36-CFA(第0天)和百日咳毒素(第0天和第2天)进行免疫接种主动诱导EAE。从EAE诱导之后第7天和第10天开始,每周2×将40μg编码非免疫原性多表位的mRNA、20μg非免疫原性MOG35-55 mRNA和20μg非免疫原性无关mRNA i.v.注射到眶后丛中。通过日常健康监测评估EAE发生。数据描述为平均值。n=6至8只小鼠/组。使用EAE曲线下面积(AUC),通过不同疾病发生曲线的单因素ANOVA和Tukey多重比较检验确定统计学显著性。

[0238] 图21:通过非免疫原性mRNA的细胞因子共递送改善了EAE模型中非免疫原性抗原特异性mRNA-LPX处理的致耐受性效力。通过在C57BL/6小鼠中用MOG35-55-CFA(第0天)和百日咳毒素(第0天和第2天)进行免疫接种主动诱导EAE,并且在EAE诱导之后第7天和第10天,将小鼠用5μg非免疫原性MOG35-55 mRNA分别连同15μg非免疫原性mIL-10(A)或mIL-27(B)mRNA进行处理。对照小鼠接受5μg非免疫原性MOG35-55 mRNA连同15μg非免疫原性无关mRNA、15μg编码非免疫原性细胞因子的mRNA或20μg非免疫原性无关mRNA。通过日常健康监测评估EAE发生。数据描述为平均值。n=6至8只小鼠/组。使用EAE曲线下面积(AUC),通过不同疾病发生曲线的单因素ANOVA和Tukey多重比较检验确定统计学显著性。

实施例

[0239] 实施例1:材料和方法

[0240] 动物

[0241] C57BL/6、BALB/c、SJL/JR_j野生型小鼠和来自C57BL/6和SJL/JRj的F1杂交小鼠分别购自荷兰的ENVIGO RMS gmbH和法国的Janvier Laboratories。表达在MHC II类(I-A^b)的情况下识别MOG35-55的T细胞受体的Thy1.1⁺ 2D2 TCR MOG转基因C57BL/6小鼠,以及另外包括敲入Foxp3-eGFP的Thy1.1⁺ 2D2 Foxp3-eGFP TCR MOG转基因C57BL/6小鼠由Ari Waisman博士教授的实验室友情提供。在整个实验中使用年龄和性别匹配的动物,并且在无特定病原体(specific pathogen-free,SPF)条件下,将小鼠维持在BioNTech AG Mainz的动物设施中。

[0242] RNA构建体和体外转录

[0243] LUC-mRNA的体外转录基于pST1-hAg-CDS-FI-A30LA70质粒-骨架,其包含5'人α球蛋白UTR(hAg)、3'FI元件和100个核苷酸的poly(A)尾,在30个核苷酸之后有接头。LUC构建体包含萤火虫荧光素酶基因。MOG35-55、PLP139-151、PLP178-191和MBP84-104构建体基于相同的质粒-骨架(pST1-hAg-CDS-FI-A30LA70)设计,并在MOG35-55、PLP139-151、PLP178-191和MBP84-104编码序列之前和之后分别另外包含mmsec(opt)和mmMITD(opt)序列(pST1-hAg-mmsec(opt)-CDS-mmMITD(opt)-A30LA70)。前导肽和MHC运输信号(MITD)的添加强烈地改善了通过APC的抗原呈递(Kreiter,S.等,2007,J.Immunol.180,309-318)。所有抗原序列在疾病相关表位之前和之后另外包含7个侧翼氨基酸以促进抗原呈递。抗原序列髓鞘少突胶质细胞糖蛋白(MOG)具有以下肽序列:MOG27-63:SPGKNATGMEVGWYRSPFSRVVHLYRNGKDQDA EAQP。对于小鼠髓鞘蛋白脂质蛋白PLP139-151,还添加了7个侧翼氨基酸用于更好的肽呈递(PLP131-159:AHSLERVCHCLGKWLGHDPDKFVGITYALT)。蛋白脂质蛋白PLP178-191包含氨基酸PLP170-199:AVPVYIYFNTWTTCQSIAFPSKTSASIGSL,并且髓鞘碱性蛋白(MBP)84-104包含氨基酸MBP76-112:RTQDENPVVHFFKNIIVTPRTPPPSQGKGRGLSLSRFS。对于用mRNA进行免疫接种的对

照,使用空载体,其编码无特异性抗原序列(pST2 hAg-mmsec(opt)-空-mmMITD(opt)-2hBg-A30LA70)。还基于质粒-骨架pST1-hAg-CDS-FI-A30LA70合成了编码鼠白介素10(mIL-10)和鼠白介素27(mIL-27)的细胞因子的mRNA。如由Kreiter等,2007(Cancer Immunol.Immunother.56,1577-87)所述,通过体外转录产生RNA。将经纯化mRNA在H₂O中洗脱并在-80℃下储存直至进一步使用。所有描述的mRNA构建体的体外转录由BioNTech RNA Pharmaceuticals GmbH进行。

[0244] 产生非免疫原性mRNA

[0245] 为了产生所用的非免疫原性mRNA,在体外转录期间使用1-甲基假尿苷代替正常核苷尿苷,并通过HPLC或纤维素处理进一步纯化mRNA。对于HPLC纯化,改编了Weissman等,2013(Methods Mol Bio.969,43-43)的方案,并且用梯度38%至70%的缓冲液B进行mRNA的洗脱。从所有产生的mRNA进行质量控制(生物分析仪和斑点杂交分析)以确保mRNA的纯度和完整性。

[0246] 为了产生所用的免疫原性mRNA,将正常核苷尿苷用于体外转录,并且mRNA不通过HPLC或纤维素处理进一步纯化。

[0247] 为了研究HPLC-纯化或纤维素处理对脾细胞活化的影响,使用经假尿苷修饰的mRNA(pU-mRNA),其接受或不接受另外的HPLC纯化(pU-HPLC mRNA)。如已经描述的那样产生相应的mRNA。

[0248] 用于IVT mRNA质量控制的斑点杂交分析

[0249] 通过斑点杂交分析体外转录的、经修饰的和经HPLC纯化的mRNA的双链mRNA(dsRNA)。将1μg不同的mRNA构建体加载到NYTRAN SPC膜(GE Healthcare)上,封闭,并随后与J2抗体(SCICONS English and Scientific Consulting)一起孵育用于dsRNA的检测。使用二抗抗小鼠HRP抗体(Jackson ImmunoResearch)并用BioRad ChemiDoc对膜进行分析。

[0250] RNA-脂质复合物的制备和注射

[0251] 在无菌和无RNA酶的条件下制备RNA-脂质复合物(RNA-LPX)。使用HEPES(10mM)/EDTA(0.1mM)将RNA稀释至1mg/ml的浓度。将1.5M NaCl(5M NaCl储液;Ambion)添加至特定体积的RNA以获得150mM NaCl的终浓度。短暂涡旋之后,添加指定体积的F12脂质体,并再次短暂涡旋RNA-脂质体混合物(RNA-LPX),并最后在RT下孵育10分钟以使得能够形成RNA-LPX(Kranz等2016,Nature.16,396-401)。对每只小鼠将200μl RNA-LPX溶液静脉内注射到小鼠的眶后丛。

[0252] 流式细胞术分析

[0253] 荧光激活细胞分选(Fluorescence-activated cell sorting,FACS)表面和细胞内抗体购自eBioscience或BD Pharmingen,并根据制造商的方案使用。所用的抗体如下:CD11b、CD11c、CD19、CD25、CD4、CD44、CD40L、CD49b、CD69、CD8、CD86、CD90.1、Foxp3、ICOS、IFN γ、IL-17A、Lag-3、PD-1、TIGIT和Tim-3。

[0254] 将来自不同器官的单细胞悬液在4℃下针对细胞外标记染色30分钟。对于IFN γ、IL-17A和CD40L的细胞内细胞因子染色,将细胞如所述进行分离并另外在37℃,5%CO₂下在包含MOG35-55肽(浓度15μg/ml)、莫能菌素(Monensin)(GolgiStop,BD-Bioscience)和布雷菲德菌素A的培养基中进行刺激持续6小时。在进行活-死染色(生存力染料eFluor®506,eBioscience)和细胞表面标志物染色之后,使用来自BD Biosciences的Cytofix/Cytoperm

和Perm/Wash缓冲液,根据制造商的方案将细胞固定并透化。将细胞与细胞内抗体在4℃下孵育30分钟,并在FACS分析之前在Perm/Wash中洗涤两次。在BD LSR Fortessa或BD FACS Canto II上获得样品,并使用FlowJo 7.6.5或FlowJo 10.4(Tree Star)软件进行分析。

[0255] 对于细胞内Foxp3染色,使用Foxp3转录因子染色缓冲液组(Thermo Fisher Scientific)进行固定和透化。在细胞外染色之后,根据制造商的建议进行所有步骤。

[0256] 通过四聚体染色检测MOG35-55特异性CD4⁺ T细胞。MOG35-55特异性APC-缀合的pMHC II类四聚体获自国立卫生研究院四聚体核心设施(National Institutes of Health Tetramer Core Facility)。将小鼠脾细胞的单细胞悬液与MOG35-55 APC-缀合的四聚体在室温下在完全DC培养基(对于培养基组成,参见“骨髓来源的DC(BMDC)的产生”)中孵育1小时。洗涤细胞并进行抗APC染色和随后的MACS。如上所述将细胞与细胞外或细胞内抗体一起孵育。

[0257] 为了确定脾、脑和脊髓中的绝对CD4⁺ MOG35-55特异性细胞计数(Thy1.1⁺ 2D2 CD4⁺ T细胞),使用Trucount™管(BD Biosciences)。如上所述对单细胞悬液进行染色,随后转移到Trucount™管中,并通过流式细胞术确定绝对细胞计数。

[0258] 体内生物发光成像(BLI)

[0259] 使用Xenogen IVIS Spectrum体内成像系统(Caliper Life Sciences)研究脾细胞中非免疫原性mRNA的翻译效率。在非免疫原性LUC-mRNA的RNA-LPX免疫接种之后6小时、24小时、48小时和72小时,用D-萤光素的水溶液(250μl,1.6mg于PBS中)(BD Biosciences)对小鼠进行i.p.注射。5分钟之后,使用IVIS Living Image 4.0软件对来自脾的信号强度进行限定,并通过目的区域(region of interest,ROI)中的体内生物发光进行测量,并量化为总通量(光子/秒)。在分组(bin)4中采集时间为1分钟。在活小鼠的生物发光成像期间,用2.5%异氟烷/氧混合物的剂量麻醉小鼠。将活动物的发射光子的LUC信号强度描绘为灰度图像,其中黑色是最不强烈的而白色是最强烈的生物发光信号。使用IVIS Living Image软件分析小鼠的图像。

[0260] 磁活化细胞分选(Magnetic activated cell sorting,MACS)

[0261] 通过使用MACS(Miltenyi Biotec)根据制造商的说明书进行阳性选择从脾和淋巴结分离Thy1.1⁺ 2D2 TCR MOG转基因C57BL/6小鼠或Thy1.1⁺ 2D2 Foxp3-eGFP TCR MOG转基因C57BL/6小鼠的Thy1.1⁺ 2D2CD4⁺ T细胞。使用CD4(L3T4)微珠纯化CD4⁺ T细胞。

[0262] 在使用抗APC微珠进行MOG35-55特异性APC-缀合的pMHC II类四聚体染色之后,CD4⁺ MOG35-55特异性T细胞是MACS富集的。根据制造商的方案进行富集。

[0263] 骨髓来源的DC(BMDC)的产生

[0264] 从C57BL/6小鼠的股骨和胫骨中提取骨髓(bone marrow,BM)细胞,并在37℃下在组织培养瓶中在RPMI 1640+GlutaMAX-I培养基(Gibco)中培养,所述培养基补充有10%FBS(Biochrom)、1%丙酮酸钠100x(Gibco)、1%MEM NEAA 100x(Gibco)、0.5%青霉素-链霉素(Gibco)、50μM 2-巯基乙醇(Life Technologies)和1000U/ml树突细胞(DC)分化因子粒细胞-巨噬细胞集落-刺激因子(granulocyte-macrophage colony-stimulation factor,GM-CSF)(Peprotech)。在第6天,在37℃下将2×10⁶DC/ml与MOG35-55肽(15μg/ml)预孵育3小时并随后与T细胞共培养,总体积为96孔板中的200μl培养基。

[0265] 体外Treg抑制测定

[0266] 对于体外Treg抑制研究,将CTV标记的(CellTrace Violet细胞增殖试剂盒,Thermo Fisher Scientific)初始CD4⁺ 2D2转基因(Thy1.1⁺) T细胞(每孔 3×10^4 个细胞)与重复mRNA免疫接种的小鼠的分离的和CFSE标记(5 μ M) CD4⁺ 2D2-Foxp3-eGFP转基因细胞以不同的抑制和应答2D2T细胞的比例(1:1、2:1、4:1、8:1)进行共培养。在第0天、第3天、第6天和第9天,对2D2-Foxp3-eGFP小鼠用非免疫原性和免疫原性MOG35-55 mRNA以及非免疫原性无关mRNA和盐水静脉内注射到眶后丛中。在用MOG35-55肽负载的BMDC(终浓度15 μ g/ml MOG35-55肽)再刺激之后72小时,通过流式细胞术分析CTV标记的应答2D2 T细胞的增殖。

[0267] 过继性T细胞转移和体内增殖测定

[0268] 对于增殖研究,根据制造商的说明书,对富集的CD4⁺ 2D2转基因(Thy1.1⁺) T细胞进行CTV标记(CellTrace Violet细胞增殖试剂盒,Thermo Fisher Scientific),计数并在麻醉下将200 μ l PBS中的 7×10^6 个细胞i.v.注射到初始C57BL/6(Thy1.2⁺)接受体小鼠中的眶后丛中。在第二天,用10、20或40 μ g编码MOG35-55表位的非免疫原性mRNA对C57BL/6小鼠进行免疫接种。对照小鼠接受20 μ g非免疫原性无关mRNA或盐水。T细胞转移之后4天,处死小鼠并通过流式细胞术分析细胞的增殖。

[0269] 为了确定在EAE小鼠第7天和第10天成功进行mRNA处理之后脾、脑和脊髓中CD4⁺ MOG35-55特异性T细胞的绝对细胞计数以及这些细胞的表型分析,从Thy1.1⁺ 2D2 TCR MOG转基因C57BL/6小鼠分离CD4⁺ 2D2转基因(Thy1.1⁺) T细胞,通过MACS富集CD4细胞,并使用氧-异氟烷蒸发器(2.5%异氟烷/氧)的麻醉下将200 μ l PBS中的7至 10×10^6 个细胞i.v.注射到初始C57BL/6(Thy1.2⁺)接受体小鼠中的眶后丛中。在第二天,在C57BL/6小鼠中主动诱导EAE。

[0270] ELISA

[0271] 使用标准ELISA测定根据制造商的说明书在小鼠血清中RNA免疫接种之后6小时通过ELISA(PBL)进行小鼠IFN- α 的检测。

[0272] 使用17-重小鼠ELISA测定试剂盒(Thermo Fisher Scientific)定量重复地mRNA处理的小鼠的再刺激脾细胞的细胞培养上清液中存在的Th1/Th2/Th9/Th17/Th22和Treg细胞因子。用0、5、10、20或100 μ g/ml的MOG35-55肽刺激从小鼠分离的脾细胞(5×10^5 个细胞)的单细胞悬液72小时,并分析上清液的细胞因子含量。

[0273] IFN γ 酶联免疫斑点测定(enzyme-linked immune spot assay,ELISpot)

[0274] 通过干扰素 γ (IFN γ) ELISpot检测MOG35-55应答T细胞的频率。在第0、3、7和10天,将小鼠用非免疫原性MOG35-55 mRNA、非免疫原性无关mRNA或盐水进行处理。在第一次处理之后第13天,分离不同处理组的脾并制备单细胞悬液。使用CD4(L3T4)微珠通过MACS纯化CD4⁺ T细胞。使用ELISpot试剂盒用MOG35-55肽再刺激之后进行IFN γ 应答抗原特异性T细胞的量化。用IFN γ 特异性捕获抗体(抗小鼠IFN γ 抗体,Mabtech)将96孔ELISpot板(MultiScreenHTS IP滤板,Merck Millipore)包被过夜。用完全培养基封闭之后,洗涤板并将 5×10^5 个CD4⁺ T细胞与 1×10^5 个MOG35-55肽负载的BMDC(肽浓度15 μ g/ml)一起平板接种。作为对照,将CD4⁺ T细胞与无关肽负载的BMDC一起孵育。将所有细胞在37 $^{\circ}$ C下,5%CO₂湿润的培养箱中培养16小时。将细胞洗涤并在37 $^{\circ}$ C和5%CO₂下用生物素化的抗-IFN γ 检测抗体(抗小鼠IFN γ 生物素化抗体,Mabtech)孵育2小时。通过添加ExtrAvidin-碱性磷酸酶(Sigma)使该二抗可视化,并在孵育1小时之后,添加BCIP/NBT液体底物(Sigma)并在1至3分

钟之后通过在流动的自来水下清洗该板而使反应停止。在ELISpot阅读仪(S6 Macro分析仪;CTL)上进行斑点的量化。

[0275] EAE的诱导和用mRNA对小鼠的处理

[0276] 在8至10周龄雌性C57BL/6小鼠中用在补充有10mg/ml热灭活的结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)H37RA(Difco Laboratories)的CFA(Difco实验室)中乳化的50 μ g MOG35-55肽(氨基酸序列:MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK)在尾根部皮下(s.c.)主动诱导EAE。在免疫接种当天和2天之后,小鼠腹膜内(i.p.)接受150ng百日咳毒素(List Biological Laboratories, INC., Campbell, CA)。根据以下标准,在免疫接种之后第10天开始每天对小鼠进行称重和评分:0,无疾病;1,尾张力(tone)降低;2,翻正反射受损;3,部分后肢瘫痪;4,完全后肢麻痹;5,后肢瘫痪伴部分前肢瘫痪;以及6,垂死或死亡。

[0277] 此外,在雌性SJL/JRj小鼠(8至10周)中用在补充有10mg/ml热灭活的结核分枝杆菌H37RA的CFA中乳化的200 μ g PLP139-151肽(氨基酸序列:HSLGKWLGHDPKF)在尾根部s.c.主动诱导EAE。在免疫接种当天和2天之后,小鼠i.p.接受200ng PTX。根据已经描述的评分标准,在免疫接种之后第8天开始每天对小鼠进行称重和评分。

[0278] 在来自C57BL/6和SJL/JRj(8至10周)的雌性F1杂交小鼠中用250 μ g肽混合物(MOG35-55、PLP139-151、PLP178-191(氨基酸序列:NTWTTCQSIAPFSK)、MBP84-104(氨基酸序列:VHFFKNIVTPRTPPPSQGKGR)、MOBP15-36(氨基酸序列:QKFSEHFSIHCCPPFTFLNSKR))主动诱导复杂EAE。每种肽使用50 μ g。将肽混合物在补充有10mg/ml热灭活的结核分枝杆菌H37RA的CFA中乳化并在尾根部s.c.注射。在免疫接种当天和2天之后,小鼠i.p.接受200ng PTX。根据已经描述的评分标准,在免疫接种之后第8天开始每天对小鼠进行称重和评分。

[0279] 为了确定C57BL/6小鼠的保护性免疫力,在疾病诱导之后第7天和第10天时或在EAE评分为1至2时,将小鼠用20 μ g非免疫原性MOG35-55编码、20 μ g非免疫原性无关对照mRNA或盐水进行处理。

[0280] 从EAE诱导之后第7天和第10天开始,每周2 $\times$ 用20 μ g非免疫原性PLP139-151 mRNA进行SJL小鼠中复发缓解型EAE的治疗性治疗。对照小鼠接受20 μ g非免疫原性无关对照mRNA。

[0281] 在比较非免疫原性单表位mRNA处理与非免疫原性多表位处理的实验中,用40 μ g编码非免疫原性多表位的mRNA(使用10 μ g的每种编码非免疫原性表位的mRNA(MOG35-55、PLP139-151、PLP178-191、MBP84-104))、20 μ g非免疫原性MOG35-55 mRNA或20 μ g非免疫原性无关对照mRNA处理复杂EAE小鼠。从EAE诱导之后第7天和第10天开始,每周2 $\times$ 注射mRNA。

[0282] 为了测试编码细胞因子的mRNA和抗原特异性mRNA处理的组合作用,在EAE诱导之后第7天和第10天时将5 μ g编码非免疫原性MOG35-55的mRNA连同15 μ g编码非免疫原性mIL-10或mIL-27的mRNA一起注射。对照小鼠接受5 μ g非免疫原性MOG35-55 mRNA连同15 μ g非免疫原性无关mRNA、15 μ g编码非免疫原性细胞因子的mRNA或20 μ g非免疫原性无关mRNA。

[0283] 对于所有实验,在使用氧-异氟烷蒸发器(2.5%异氟烷/氧)的麻醉下将mRNA i.v.注射到眶后丛中。

[0284] 抗体处理

[0285] 在EAE诱导之后第7、10、14和17天时,用PD-1(500 μ g第一次处理,250 μ g后续处理,克隆RMP1-14, BioXcell)或CTLA-4(500 μ g第一次处理,250 μ g后续处理,克隆9H10,

BioXcell) 阻断抗体或同种型匹配的对照抗体 (大鼠 IgG2a 和叙利亚仓鼠 IgG, BioXCell) 处理 C57BL/6 小鼠。将抗体在 PBS 中稀释并 i.p. 施用。

[0286] 脾、LN 和 CNS 浸润物的分离

[0287] 所有基于细胞的分析均在脾、淋巴结和 CNS 器官的单细胞悬液上进行。简单地说, 将脾和 LN 用 1mg/ml 胶原酶 D 和 0.1mg/ml DNA 酶 I (DNase I) 孵育 15 分钟, 并随后在用 PBS 清洗的同时通过 70 μ m 细胞过滤器捣碎。在脾细胞的单细胞悬液上进行红细胞裂解 (低张裂解缓冲液: 1g KHCO₃ 和 8.25g NH₄Cl 溶解在 11H₂O 和 200 μ l 0.5M EDTA 中)。在用 PBS 进行另外的洗涤步骤之后, 用 Vi-Cell 细胞计数器 (Beckman Coulter) 对细胞进行计数。

[0288] 为了从脑和脊髓中分离 CNS 浸润物, 将小鼠用氯胺酮-Rompun 麻醉并使用 0.9% NaCl 通过左心室灌注。将脑和脊髓手动移出, 切成小块, 并在 37 $^{\circ}$ C 下用包含胶原酶 D (1mg/ml) 和 DNA 酶 I (0.1mg/ml) 的 PBS++ (含有钙和镁的 PBS, Gibco) 消化 20 分钟。然后通过将组织块吸入到注射器中并再次紧靠 15ml falcon 管的壁压出而手动均化经消化的组织。将此过程进行多至 10 次, 直至看不到任何块。将单细胞悬液重悬于 70% Percoll 中并在 30:37Percoll 梯度下分层。最终的 Percoll 梯度为 30:37:70%, 并在室温下以 300g 离心 40 分钟。用 2% FCS/PBS 洗涤位于 70% 与 37% Percoll 之间的间期的单个核细胞层, 然后进行进一步分析。

[0289] 统计分析

[0290] 使用 GraphPad Prism 7 软件 (Graphpad Software, Inc.) 评价统计学显著性, 当比较多于两个组时, 该软件采用 Tukey 比较检验因子校正的单因素 ANOVA。通过计算单个小鼠的疾病发生曲线下的面积 (AUC) 对 EAE 发生曲线进行比较。 $p \leq 0.05$ 的值被认为具有统计学显著性; * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$ 。所采用的测试在相应的图例中提及。

[0291] 实施例 2: 相关脾细胞活化的非免疫原性 mRNA 的检测

[0292] 为了分析脾细胞的活化和所用非免疫原性 mRNA 的翻译效率, 对 BALB/c 小鼠用与 F12 脂质体复合的萤光素酶-mRNA (10 μ g) 静脉内注射到眶后丛中。在 RNA-LPX 注射之后 6、24、48 和 72 小时通过体内成像评估萤光素酶活性, 并将代表性小鼠示于图 1C 中。用非免疫原性 mRNA 对小鼠进行免疫接种导致 LUC-mRNA 的持续高翻译。因此, 在 mRNA 免疫接种之后 72 小时内可检测到 LUC 蛋白表达。

[0293] 此外, 如图 1A 中所示, 用非免疫原性 mRNA 对小鼠进行免疫接种导致活化标志物 DC 上的 CD86 和淋巴细胞上的 CD69 没有像未经处理的对照小鼠那样上调。在用非免疫原性 LUC-mRNA 免疫接种的小鼠中, 在 mRNA 免疫接种之后 6 小时也未在血液中检测到 IFN α (图 1B)。

[0294] 实施例 3: 非免疫原性 mRNA 的表征

[0295] 使用非免疫原性 mRNA 将特定疾病相关抗原递送至树突细胞以确保在治疗应用中抗原呈递而没有免疫活化。已表明, 将 1-甲基假尿苷并入到 mRNA 中可增强细胞中的蛋白质表达并降低哺乳动物细胞系中以及小鼠体内的 mRNA 的免疫原性 (Andries 等, 2015, J Control Release. 217, 337-344)。这种效应最可能依赖于 mRNA 逃避内体 Toll 样受体和下游固有免疫信号传导之活化的能力提高 (Andries 等, 2015)。另外, 在体外转录期间使用 1-甲基假尿苷代替核苷尿苷并入到 mRNA 中, 合成 mRNA 的 HPLC 纯化进一步消除了免疫活化并改善了经核苷修饰的编码蛋白质的 mRNA 的翻译 (Kariko 等, 2011, Nucleic Acids Res. 39,

e142)。通过HPLC纯化,在mRNA体外转录之后去除剩余的双链mRNA污染物,得到不诱导干扰素信号传导和炎症细胞因子的mRNA(Kariko等,2011)。用于纯化经核苷纯化的mRNA的替代方法是纤维素纯化(PCT/EP2016/059056)。

[0296] 为了研究用于治疗应用的mRNA是否真的是非免疫原性的,进行生物分析仪和斑点杂交分析以确保mRNA的完整性和纯度。图2示出了通过纤维素处理或HPLC纯化而纯化的非免疫原性MOG35-55 mRNA的斑点杂交分析。对dsRNA具有特异性的J2抗体在所分析的MOG35-55 mRNA的纤维素或HPLC纯化之后未显示信号,所用mRNA范围为40ng直至1 μ g。这种质量控制确保了这两种mRNA批次的非免疫原性mRNA特征,在EAE处理中可实现积极的治疗作用。在C57BL/6小鼠中主动诱导EAE,并且在疾病诱导之后第7天和第10天时,将小鼠用通过纤维素或HPLC法纯化的编码抗原特异性MOG35-55的非免疫原性mRNA进行处理。这两组均完全地对EAE诱导具有抗性(图3)。关于用非免疫原性抗原特异性mRNA进行治疗性疫苗接种的更详细描述将在以下实施例中说明。

[0297] 实施例4:非免疫原性MOG35-55 mRNA的免疫接种对抗原特异性T细胞增殖的作用

[0298] 为了研究非免疫原性MOG35-55 mRNA-LPX的免疫接种是否导致通过DC的MOG35-55抗原呈递给T细胞,研究了携带髓鞘少突胶质细胞糖蛋白(MOG)特异性T细胞受体的抗原特异性CD4⁺ T细胞(CD4⁺ 2D2 T细胞)的增殖。将Cell-Trace-Violet(CTV)-标记的Thy1.1⁺ MOG35-55特异性CD4⁺ 2D2 T细胞转移到Thy1.2+C57BL/6小鼠中。24小时之后,用不同浓度(10、20或40 μ g的mRNA)的编码MOG35-55表位的非免疫原性mRNA对接受体小鼠进行免疫接种,并且另外4天之后分析MOG35-55特异性CD4⁺ 2D2 T细胞的增殖。对照小鼠接受20 μ g的非免疫原性无关mRNA或盐水。与对照小鼠相比,当将小鼠用非免疫原性MOG35-55 mRNA进行处理时,2D2 T细胞增殖(图4),表明抗原呈递细胞(APC)以正确的方式翻译和加工编码抗原的非免疫原性mRNA并呈递MOG35-55肽。此外,用非免疫原性MOG35-55 mRNA(剂量从10至40 μ g递增)对小鼠进行免疫接种也显示抗原特异性T细胞群增多。

[0299] 实施例5:用抗原特异性非免疫原性mRNA进行的免疫接种在初始小鼠中诱导调节性T细胞的形成

[0300] Treg是控制多种免疫应答的基础,并且其对耐受诱导和维持是重要的。动物模型中的临床前研究显示,Treg的过继转移可通过恢复对自身抗原的免疫耐受来预防或治愈数种T细胞介导的疾病,包括自身免疫病。已描述了数种CD4⁺调节性T细胞(Shevach,E.M.,2006,Immunity 25,195-201)并将其分为两个主要亚群:天然和诱导型Treg,其在不同致耐受性条件下在外周产生。Treg细胞通过限制自身反应性T细胞的扩增和分化来调节它们的致敏(Sakaguchi,S.等,2008,Cell 133,775-87)。

[0301] 为了进一步研究用抗原特异性非免疫原性mRNA进行的免疫接种对相应T细胞表型的作用,已将2D2-Foxp3-eGFP融合蛋白转染到Th1.1阳性小鼠的T细胞中。用非免疫原性和免疫原性MOG35-55 mRNA以及非免疫原性无关mRNA或盐水对这些小鼠进行重复免疫接种(d0、d3、d6和d9)。在最后一次mRNA处理之后4天(d13)进行分析,用非免疫原性MOG35-55 mRNA对小鼠进行的免疫接种导致小鼠中Foxp3⁺细胞的形成。用免疫原性抗原特异性mRNA或无关非免疫原性mRNA处理的小鼠显示Foxp3细胞群没有增多,并且具有如经盐水处理的对照小鼠一样的Foxp3阳性细胞的频率(图5A和B)。

[0302] 通过体外抑制测定评估诱导的Foxp3⁺细胞是否发挥抑制作用(图5C)。因此,将经

免疫接种小鼠的总CD4⁺细胞用CFSE标记并与用CTV另外标记的初始MOG35-55特异性CD4⁺2D2T细胞以不同的抑制/应答比例共培养72小时。重要的是,来自用非免疫原性MOG35-55 mRNA免疫接种的小鼠的诱导调节细胞在存在MOG35-55肽负载的BMDC的情况下介导2D2效应T细胞增殖的剂量依赖性抑制。相反,所有其他群都没有发挥抑制活性。

[0303] 总之,这些结果表明在非炎性条件下APC特异性抗原呈递介导功能性调节性T细胞的形成。

[0304] 实施例6:在疾病模型EAE中用非免疫原性MOG35-55 mRNA进行治疗性疫苗接种的影响

[0305] 为了阐明在疾病模型中用抗原特异性非免疫原性mRNA进行的mRNA免疫接种的耐受性作用,在C57BL/6小鼠中主动诱导EAE,并且在疾病诱导之后第7天和第10天时,将小鼠用编码抗原特异性MOG35-55的非免疫原性mRNA、以及非免疫原性无关mRNA进行处理。在已发生强DC活化和成熟信号以及第一次T细胞致敏的时间点开始处理。用非免疫原性抗原特异性mRNA进行的RNA免疫接种完全阻断了任何的EAE体征(图6),并且6只经mRNA免疫接种的小鼠中没有单只小鼠发生该疾病。

[0306] 同时,用编码无关表位的非免疫原性mRNA对小鼠进行的处理未保护小鼠免于疾病,并且5/6小鼠发生EAE(图6)。这些结果表明通过未成熟DC的MOG呈递可使EAE下调,并且只有用非免疫原性抗原特异性mRNA处理的动物才完全地对EAE诱导具有抗性。

[0307] 此外,研究了当疾病的症状可见并且小鼠达到1至2的疾病评分时,EAE是否可在疾病进展的后期时间点进行处理。值得注意的是,可显示,在用编码非免疫原性MOG35-55的mRNA进行RNA免疫接种之后,EAE小鼠没有发生严重的EAE,并且当在评分1处理时症状可减轻(图7)。即使在2的评分时处理小鼠,也可使快速的疾病进展停止。小鼠仅显示最大疾病评分为2至3,而几乎所有未经处理的对照小鼠均发生完全EAE,最大评分为4。与用编码非免疫原性MOG35-55的mRNA处理的EAE小鼠相比,用非免疫原性无关mRNA的治疗性处理对疾病进展没有积极作用,并且发生EAE的动物与未经处理的对照小鼠类似。

[0308] 为了研究mRNA处理诱导之耐受的分子机理,并且为了观察用非免疫原性抗原特异性mRNA进行mRNA免疫接种并由此通过DC的MOG35-55呈递是否直接影响效应T细胞(Teff),在C57BL/6小鼠中再次诱导EAE,在疾病诱导之后第7天和第10天用编码非免疫原性MOG35-55的mRNA处理动物,并且在最后一次mRNA处理之后6天,分离脾、LN、脑和脊髓。将来自不同器官的细胞在体外用MOG35-55肽再活化6小时,并随后对CD40配体(CD40L)Teff细胞设门。CD40L在活化之后在T细胞上迅速表达,并因此用作MOG特异性Teff细胞的标志物。如图8中所示,施用非免疫原性MOG35-55 mRNA导致脑和脊髓中用非免疫原性抗原特异性mRNA处理的组中抗原特异性CD4⁺ T细胞的频率显著降低。在功能水平上可显示,与未经处理的对照小鼠相比,在用编码非免疫原性MOG35-55的mRNA处理的小鼠中,CD4⁺ T细胞在脑中分泌显著更少的干扰素- γ (IFN γ)并在脊髓中分泌显著更少的白介素17A(IL-17A)(图9)。这些数据表明用非免疫原性MOG35-55 mRNA进行的mRNA处理可使记忆T细胞和Teff细胞失活,导致这些细胞降低。

[0309] 实施例7:mRNA纯度对EAE处理效率的影响

[0310] 用包含尿苷(U)的免疫原性mRNA与包含1-甲基假尿苷的非免疫原性mRNA的组合并通过纤维素纯化(m1Y)纯化的实验揭示,脾细胞的活化(通过活化标志物DC上的CD86和淋巴

细胞上的CD69的上调来检测)以及IFN α 分泌与所用的免疫原性mRNA的量相关。用非免疫原性mRNA (20 μ g m1Y MOG35-55 mRNA)几乎没有实现活化,并且通过添加免疫原性mRNA (U MOG35-55 mRNA)活化稳定地提高(图10)。5 μ g U mRNA+15 μ g m1 Y mRNA仅显示比20 μ g U mRNA略微更低地活化,而20 μ g m1Y mRNA再次完全没有活化免疫系统。不同mRNA混合物的相应斑点杂交分析还揭示,仅100%的非免疫原性(m1Y)mRNA未显示dsRNA的信号(图11)。

[0311] 为了进一步研究所用mRNA的纯度对EAE处理效力的影响,使用相同的mRNA混合物以处理持续的EAE。再次,在C57BL/6小鼠中主动诱导EAE,并在诱导疾病之后第7天和第10天时将小鼠用抗原特异性mRNA进行处理。在该实验中,使用与先前“活化”实验中相同的非免疫原性与免疫原性MOG35-55 mRNA的mRNA混合物。与100%非免疫原性(m1Y)mRNA不同,非免疫原性与免疫原性mRNA的混合物(2.5 μ g U+17.5 μ g m1Y MOG35-55 mRNA以及5 μ g U+15 μ g m1Y MOG35-55 mRNA)不能完全阻止疾病的发生并且一些小鼠开始发生类似于用100%免疫原性mRNA处理的小鼠的疾病(图12)。这些结果表明,为了有效处理EAE,纯的非免疫原性(m1Y)mRNA是必需的。

[0312] 对未经修饰和经修饰的mRNA的脾活化进行另外的比较,所述mRNA是通过HPLC纯化的或不是通过HPLC纯化的。如图13中所示,核苷修饰(例如单独的假尿苷(pU))不诱导免疫系统对mRNA之识别的丧失,但纯化过程造成不同。未经纯化的pU-mRNA仍具有免疫原性,并且就脾活化(DC上的CD86强烈上调,B细胞、T细胞和NK细胞上的CD69上调)和IFN α 分泌而言,其作用与常规mRNA(U-mRNA)相似。相反,通过HPLC另外纯化pU mRNA以去除dsRNA(pU HPLC mRNA)阻止DC、B细胞、T细胞和NK细胞活化并因此阻止IFN α 分泌,如未经处理的对照小鼠中一样。这些结果强调,如在初始小鼠中观察到的,仅尿苷修饰与另外的IVT mRNA纯化的组合使mRNA的免疫原性最小化为零,其为可诱导耐受的水平。因此,非免疫原性mRNA(经尿苷修饰与mRNA纯化组合)是用于耐受诱导目的的最佳mRNA。

[0313] 实施例8:用非免疫原性MOG35-55特异性mRNA的处理不诱导抗原特异性CD4⁺ T细胞的从头致敏,但导致初始小鼠中无能T细胞(anergic T cell)的扩增

[0314] 外周耐受的维持和诱导取决于通过在其表面上表达低水平的共刺激分子(如CD86或CD40)的APC的自身抗原呈递。在实施例2,图1中示出了在用非免疫原性mRNA处理之后不存在通过APC的共刺激分子表达和细胞因子产生。因此,在mRNA处理之后,在不存在活化刺激的情况下APC加工并呈递由非免疫原性mRNA编码的表位。在不存在共刺激信号情况下的TCR参与不导致效应T细胞的扩增,而是导致凋亡或T细胞无能(Mueller, D.L., 2010, Nat. Immunol. 11, 21-7)。相反,在效应T细胞致敏期间,DC释放特异性细胞因子,其与抗原呈递和共刺激分子的表达一起通过驱动CD4⁺ T细胞分化成Th1、Th2或Th17细胞来使效应免疫应答极化。事实上,在非免疫原性抗原特异性mRNA处理之后效应T细胞的产生并非意在自身免疫病,因为更多的效应T细胞甚至可能导致更严重的疾病过程而不是治愈性处理。

[0315] 为了研究抗原定向T细胞应答的产生,用20 μ g编码非免疫原性MOG35-55的mRNA、20 μ g非免疫原性无关mRNA或盐水重复处理(第0、3、7和10天)初始C57BL/6小鼠。在四次mRNA免疫接种之后,在第13天从脾分离CD4⁺ T细胞,并进行IFN γ ELISpot。图14A示出了用编码非免疫原性MOG35-55的mRNA处理的小鼠在抗原特异性mRNA处理之后不形成对抗原识别作出应答的IFN γ ⁺ CD4⁺效应T细胞。

[0316] 根据这些结果,用不同浓度的MOG35-55肽(0、5、10、20和100 μ g)再刺激脾CD4⁺ T细

胞48小时也不导致其他炎性细胞因子(例如TNF α 和GM-CSF)的分泌,如通过ELISA在上清液中测量的(图14B)。仅在用非免疫原性抗原特异性mRNA处理的小鼠中检测到抗炎细胞因子IL-10的分泌,但在用非免疫原性无关mRNA处理的小鼠中没有检测到(图14C)。此外,仅在该组中,可检测到Th2细胞因子(如IL4和IL-5)的分泌(数据未示出)。应答于非免疫原性抗原特异性mRNA的IL-10的产生提供了抗原特异性调节性T细胞(Treg)应答于处理而被活化的证据。Treg是控制多种免疫应答的基础。已报道了诱导型Treg的许多不同亚群,并且尤其是CD25⁺Foxp3⁺和Tr1细胞的特征在于产生高水平的IL-10。这些调节性T细胞通过限制自身反应性T细胞的扩增和分化来调节它们的致敏。

[0317] 为了研究非免疫原性抗原特异性mRNA处理之后的CD4表型,在第0、3、7和10天,用20 μ g非免疫原性抗原特异性MOG35-55 mRNA、20 μ g非免疫原性无关mRNA或盐水对C57BL/6小鼠进行重复免疫接种。将来自用编码非免疫原性MOG35-55的mRNA处理的小鼠的CD4⁺MOG35-55四聚体⁺细胞上的TIGIT、Tim-3、PD-1和Lag-3的表达与非免疫原性无关和未经处理的对照小鼠的总CD4⁺细胞上的进行比较。与用非免疫原性无关mRNA处理的小鼠相比,用非免疫原性抗原特异性mRNA进行重复免疫接种导致TIGIT、Tim-3、PD-1和Lag-3的上调(图15)。

[0318] 这些标志物的上调与无能T细胞表型相关。无能(anergy)是功能性无应答性的获得状态,并且是T细胞受体(TCR)参与而没有通过CD28进行共刺激的结果(Jenkins,M.K.等,1987,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.84,5409-13;Quill,H.&Schwartz,R.H.,1987,J.Immunol.138,3704-3712;Jenkins,M.K.等,1990,J.Immunol.144,16-22)。另外,它构成了施加外周耐受的一种手段。无能T细胞在功能上无活性,并且即使在存在完全共刺激的情况下遇到抗原时也不能引起有效的(productive)免疫应答。具有不同表型和基因表达程序的无能CD4⁺T细胞甚至可转化为调节性T细胞,进而可促进致病性CD4⁺T细胞的无能并抑制自身免疫(Kalekar,L.A.等,2016,Nat.Immunol.17,304-14)。Lag-3、Tim-3、ICOS以及TIGIT介导效应T细胞上的共抑制功能,并且这些分子的过表达与T细胞耗竭相关(Anderson,A.C.等,2016,Immunity 44,989-1004)。T细胞表面上多种共抑制性受体的积聚甚至与功能障碍提高相关(Blackburn,S.D.等,2009,Nat.Immunol.10,29-37)。TIGIT本身通过直接下调T细胞的增殖,但也通过阻止DC成熟、降低IL-12分泌和诱导免疫抑制细胞因子IL-10的产生而用作共抑制性分子(Yu,X.等,2009,Nat.Immunol.10,48-57;Joller,N.等,2011,J.Immunol.186,1338-1342)。Lag-3在调节T细胞稳态和效应T细胞应答中发挥作用(Workman,C.J.等,2002,J.Immunol.169,5392-5395;Workman,C.J.&Vignali,D.A.A.,2003,Eur.J.Immunol.33,970-979;Workman,C.J.&Vignali,D.A.A.,2005,J.Immunol.174,688-695)。

[0319] 此外,免疫检查点分子如程序性死亡1受体(programmed death 1 receptor,PD-1)和细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4(cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4,CTLA-4)是共抑制性分子,其参与免疫应答的负调节并因此维持外周自身耐受。共抑制性分子通常在T细胞活化时上调,并通过反馈抑制约束效应物应答。PD1及其配体(PD-L1和PD-L2)例如递送调节T细胞活化与耐受之间平衡的抑制信号(Keir,M.E.等,2008,Annu.Rev.Immunol.26,677-704)。针对自身抗原的免疫应答需要特异性和平衡的应答以维持耐受,其是由不同的共抑制性受体及其配体介导的。通过PD-1的上调,效应T细胞应答将

关闭,并进而保护组织免受免疫细胞介导的损伤。

[0320] 所有这些共抑制性受体在调节自身免疫病中发挥中心作用,并且这些分子中一些缺乏甚至导致自身免疫。

[0321] 实施例9:在疾病模型EAE中非免疫原性抗原特异性mRNA处理之后MOG35-55特异性CD4⁺ T细胞的更详细表征

[0322] 与实施例6中所示的结果一致,图8和9的MOG35-55特异性CD4⁺ T细胞的过继细胞转移实验也显示了相同的结果。将2D2 TCR转基因小鼠的MOG35-55特异性Thy1.1⁺ CD4⁺ T细胞转移到Thy1.2⁺ C57BL/6小鼠中,并且在24小时之后在接受体小鼠中诱导EAE。在疾病诱导之后第7天和第10天时,将小鼠用20μg编码非免疫原性MOG35-55的mRNA、20μg非免疫原性无关mRNA或盐水进行处理。在最后一次mRNA处理之后六天,分离脑和脊髓。将来自这些组织的细胞在体外用MOG35-55肽再活化6小时,并随后对Thy1.1⁺ CD4⁺ T细胞设门。如图16中所示,施用编码非免疫原性MOG35-55的mRNA导致脑和脊髓中MOG35-55特异性CD4⁺ T细胞的频率显著降低。在功能水平上,与对照小鼠相比,在用编码非免疫原性MOG35-55的mRNA处理的小鼠的脑和脊髓中CD4⁺ T细胞分泌显著更少的IFN γ 和白介素17A (IL-17A) (图17)。这些数据再次表明,用非免疫原性MOG35-55 mRNA处理mRNA可使Teff细胞失活,导致这些细胞向脑和脊髓中的浸润降低。

[0323] 为了研究成功处理之后的抗原特异性CD4 T细胞表型,主动诱导EAE,并且在疾病诱导之后第7天和第10天时,用20μg编码非免疫原性MOG35-55的mRNA、20μg非免疫原性无关mRNA或盐水处理动物。在疾病的峰期(疾病诱导之后第16天),通过MOG35-55四聚体染色研究脾中的CD4 T细胞表型。根据实施例5和8中所示的实验,同样在EAE疾病环境中,由非免疫原性抗原特异性mRNA诱导的抗原特异性耐受是由脾中的MOG35-55特异性CD4⁺ T细胞上的共抑制性分子Lag-3、ICOS、TIGIT和Tim-3的上调介导的(图18A)。除介导免疫耐受的细胞内在机制如无能和负性共刺激之外,细胞外源性(Treg细胞介导的耐受)机制也可介导非免疫原性抗原特异性mRNA处理作用。如已讨论的,Treg在抗原特异性耐受中发挥关键作用(Sakaguchi, S.等,1985, J. Exp. Med. 161, 72-87)。MOG35-55特异性CD4⁺ T细胞的FACS分析还显示Treg群的显著扩增(图18B)。另外,用抗原特异性非免疫原性mRNA处理的小鼠脾中的Treg表达高水平的CD69,表明它们是高度活化的。

[0324] 为了确定负性共刺激分子的表达是否是耐受诱导和维持所需要的,在EAE的mRNA处理期间阻断PD-1或CTLA-4。与用IgG对照组合的编码非免疫原性MOG35-55的mRNA处理的小鼠相比,疾病诱导之后第7天和第10天时用与抗PD-1或抗CTLA-4抗体组合的编码非免疫原性MOG35-55的mRNA的EAE处理导致对EAE的保护逆转(图19)。这表明PD-1和CTLA-4对于长期维持由非免疫原性抗原特异性mRNA诱导的抗原特异性耐受至关重要,因为PD1和CTLA-4的抗体阻断与mRNA处理平行导致由非免疫原性抗原特异性mRNA处理介导的耐受诱导的效力显著降低。

[0325] 总之,所描述的实验研究了通过用抗原特异性非免疫原性mRNA处理的抗原特异性耐受诱导的这种新治疗方法的作用模式。结果表明,抗原特异性非免疫原性mRNA处理是改变自身免疫中的有害免疫应答以提供保护的有效方法。在初始以及受疾病折磨的小鼠中显示的实验示出,用非免疫原性抗原特异性mRNA处理导致介导外周耐受的无能和调节性T细胞的诱导,导致成功处理持续的自身免疫病。已显示,治疗作用依赖于已充分描述的耐受诱

导的机制,如在每个实施例中所讨论的文献中所述的。这些机制对于耐受诱导是重要的和基础的,不依赖于自身免疫病的类型。因此,由非免疫原性抗原特异性mRNA处理介导的耐受机制可转移至任何其他类型的自身免疫病。

[0326] 实施例10:通过用非免疫原性抗原特异性mRNA处理的抗原特异性耐受诱导不依赖于EAE疾病模型

[0327] 所有先前所述的EAE实验均在用MOG35-55肽诱导的C57BL/6小鼠中进行,导致单相疾病进展。另一个EAE模型的特征在于由于导致SJL小鼠中的复发缓解型疾病过程的不同相关表位(PLP139-151)而导致的复发性疾病。该模型用于示出在更多临床相关疾病环境中的耐受诱导。图20A示出了在复发缓解型疾病模型中,在EAE诱导之后第7天和第10天开始每周2×用编码非免疫原性PLP139-151的mRNA的mRNA处理对EAE发生具有积极作用,因为这些小鼠显示出比用非免疫原性无关对照mRNA处理的小鼠弱得多的疾病进展。

[0328] 为了更好地模拟MS中的情况,使用与多种致病性自身反应性T细胞克隆相关的复杂EAE。由于基于明确诊断为MS,该疾病可能已经与复杂的抗髓鞘自身反应性相关,因此由于“表位扩散”而研究了多表位处理方法的效力。如图20B中所示,通过编码MOG35-55、PLP139-151、PLP178-191和MBP84-104的四种不同的编码非免疫原性疾病-表位的mRNA的混合物成功地处理复杂的EAE。每种编码非免疫原性疾病-表位的mRNA均使用10μg,得到40μg用于高效处理。如针对20μg编码非免疫原性MOG35-55的mRNA所示,单一表位处理中没有一种能够赋予类似的处理结果。

[0329] 这些结果显示,在不同实验中观察到的抗原特异性耐受诱导不依赖于特定表位并且可用不同的疾病相关表位来介导。此外,数据强调,即使是具有复杂致病性自身免疫过程的复杂的持续疾病也可通过施用多种非免疫原性髓鞘特异性mRNA构建体来成功地处理。

[0330] 实施例11:免疫调节细胞因子的共递送改善非免疫原性抗原特异性mRNA-LPX处理的致耐受性作用

[0331] 数种免疫调节分子(例如IL-10)可支持Treg功能。此外,已知抗炎细胞因子IL-10诱导致耐受性DC(Torres-Aguilar, H.等,2010,Autoimmun.Rev.10,8-17;Torres-Aguilar, H.等,2010,J.Immunol.184,1765-1775;Steinbrink K.等,1997,J.Immunol.159,4772-4780)并抑制T细胞增殖和细胞因子应答(Gu, Y.等,2008,Eur.J.Immunol.38,1807-1813;Guo, B.,2016,J.Clin.Cell Immunol.7,1-16)。已知IL-27也是具有抗炎特性的细胞因子,并且在EAE研究中,已显示该细胞因子抑制疾病的严重程度(Mascanfroni, I. D.等,2013,Nat.Immunol.14,1054-63;Thom, R.等,2017,Front.Immunol.8,1-14)。在一组EAE实验中,在调节免疫应答并改善耐受诱导的效率方面,应研究非免疫原性抗原特异性mRNA与由非免疫原性mRNA编码的免疫调节细胞因子(如IL-10和IL27)的共递送。

[0332] 使用EAE小鼠的“亚治疗性”处理评价免疫调节细胞因子共递送以增强单抗原特异性mRNA-LPX处理的致耐受性的能力。在先前的实验中非免疫原性抗原特异性mRNA-LPX处理已示出了稳健的耐受诱导,因此在EAE模型中以亚治疗剂量研究了另外的编码非免疫原性细胞因子的mRNA处理的组合方法以确定治疗贡献。

[0333] 为了研究编码非免疫原性细胞因子的mRNA处理对疾病模型中非免疫原性抗原特异性mRNA的有益作用,在C57BL/6小鼠中主动诱导EAE,并且在疾病诱导之后第7天和第10天,将小鼠用编码非免疫原性抗原特异性MOG35-55的mRNA、与编码非免疫原性mIL-10(图

21A) 或mIL-27 (图21B) 的mRNA组合的编码非免疫原性MOG35-55的mRNA、单独的编码非免疫原性细胞因子的mRNA、以及非免疫原性无关mRNA进行处理。

[0334] 图21中描绘的结果表明,由非免疫原性mRNA编码的免疫调节细胞因子的共递送增强了抗原特异性环境中的耐受。此外,它没有广泛地抑制免疫应答,因为与对照小鼠相比,编码单细胞因子的mRNA处理显示EAE进展没有变化。

[0001]	序列表																
[0002]	<110>	生物技术RNA制药有限公司等															
[0003]	<120>	用于治疗自身免疫病的RNA															
[0004]	<130>	674-192PCT2															
[0005]	<150>	PCT/EP2017/058651															
[0006]	<151>	2017年4月11日															
[0007]	<160>	9															
[0008]	<170>	PatentIn version 3.5															
[0009]	<210>	1															
[0010]	<211>	37															
[0011]	<212>	PRT															
[0012]	<213>	人工序列															
[0013]	<220>																
[0014]	<223>	表位															
[0015]	<400>	1															
[0016]		Ser	Pro	Gly	Lys	Asn	Ala	Thr	Gly	Met	Glu	Val	Gly	Trp	Tyr	Arg	Ser
[0017]		1				5					10					15	
[0018]		Pro	Phe	Ser	Arg	Val	Val	His	Leu	Tyr	Arg	Asn	Gly	Lys	Asp	Gln	Asp
[0019]					20					25					30		
[0020]		Ala	Glu	Ala	Gln	Pro											
[0021]				35													
[0022]	<210>	2															
[0023]	<211>	21															
[0024]	<212>	PRT															
[0025]	<213>	人工序列															
[0026]	<220>																
[0027]	<223>	表位															
[0028]	<400>	2															
[0029]		Met	Glu	Val	Gly	Trp	Tyr	Arg	Ser	Pro	Phe	Ser	Arg	Val	Val	His	Leu
[0030]		1				5					10					15	
[0031]		Tyr	Arg	Asn	Gly	Lys											
[0032]					20												
[0033]	<210>	3															
[0034]	<211>	29															
[0035]	<212>	PRT															
[0036]	<213>	人工序列															
[0037]	<220>																
[0038]	<223>	表位															

[0039]	<400>	3															
[0040]	Ala	His	Ser	Leu	Glu	Arg	Val	Cys	His	Cys	Leu	Gly	Lys	Trp	Leu	Gly	
[0041]	1				5					10						15	
[0042]	His	Pro	Asp	Lys	Phe	Val	Gly	Ile	Thr	Tyr	Ala	Leu	Thr				
[0043]				20					25								
[0044]	<210>	4															
[0045]	<211>	30															
[0046]	<212>	PRT															
[0047]	<213>	人工序列															
[0048]	<220>																
[0049]	<223>	表位															
[0050]	<400>	4															
[0051]	Ala	Val	Pro	Val	Tyr	Ile	Tyr	Phe	Asn	Thr	Trp	Thr	Thr	Cys	Gln	Ser	
[0052]	1				5					10						15	
[0053]	Ile	Ala	Phe	Pro	Ser	Lys	Thr	Ser	Ala	Ser	Ile	Gly	Ser	Leu			
[0054]				20					25					30			
[0055]	<210>	5															
[0056]	<211>	37															
[0057]	<212>	PRT															
[0058]	<213>	人工序列															
[0059]	<220>																
[0060]	<223>	表位															
[0061]	<400>	5															
[0062]	Arg	Thr	Gln	Asp	Glu	Asn	Pro	Val	Val	His	Phe	Phe	Lys	Asn	Ile	Val	
[0063]	1				5					10						15	
[0064]	Thr	Pro	Arg	Thr	Pro	Pro	Pro	Ser	Gln	Gly	Lys	Gly	Arg	Gly	Leu	Ser	
[0065]				20					25					30			
[0066]	Leu	Ser	Arg	Phe	Ser												
[0067]			35														
[0068]	<210>	6															
[0069]	<211>	13															
[0070]	<212>	PRT															
[0071]	<213>	人工序列															
[0072]	<220>																
[0073]	<223>	表位															
[0074]	<400>	6															
[0075]	His	Ser	Leu	Gly	Lys	Trp	Leu	Gly	His	Pro	Asp	Lys	Phe				
[0076]	1				5					10							
[0077]	<210>	7															

[0078]	<211>	14
[0079]	<212>	PRT
[0080]	<213>	人工序列
[0081]	<220>	
[0082]	<223>	表位
[0083]	<400>	7
[0084]	Asn Thr Trp Thr Thr Cys Gln Ser Ile Ala Phe Pro Ser Lys	
[0085]	1	5 10
[0086]	<210>	8
[0087]	<211>	21
[0088]	<212>	PRT
[0089]	<213>	人工序列
[0090]	<220>	
[0091]	<223>	表位
[0092]	<400>	8
[0093]	Val His Phe Phe Lys Asn Ile Val Thr Pro Arg Thr Pro Pro Pro Ser	
[0094]	1	5 10 15
[0095]	Gln Gly Lys Gly Arg	
[0096]		20
[0097]	<210>	9
[0098]	<211>	22
[0099]	<212>	PRT
[0100]	<213>	人工序列
[0101]	<220>	
[0102]	<223>	表位
[0103]	<400>	9
[0104]	Gln Lys Phe Ser Glu His Phe Ser Ile His Cys Cys Pro Pro Phe Thr	
[0105]	1	5 10 15
[0106]	Phe Leu Asn Ser Lys Arg	
[0107]		20

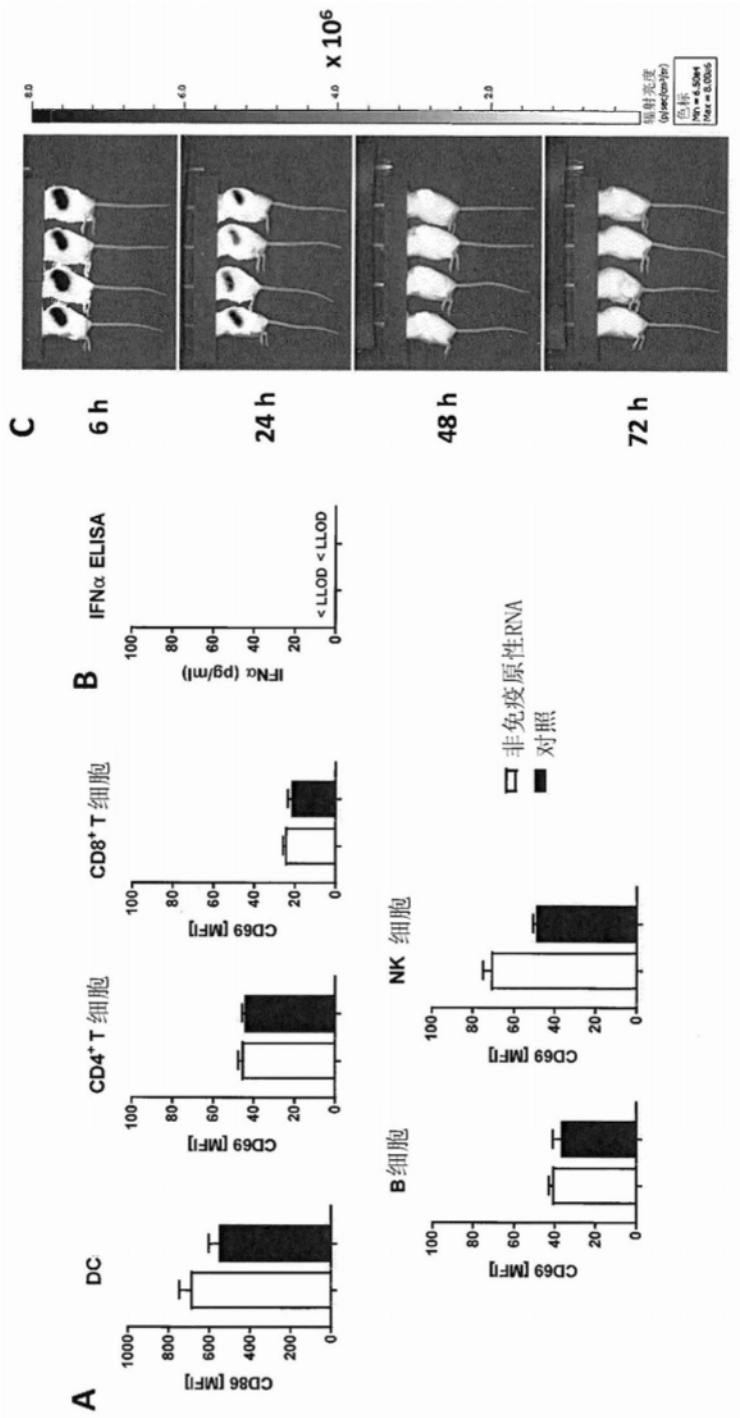


图1

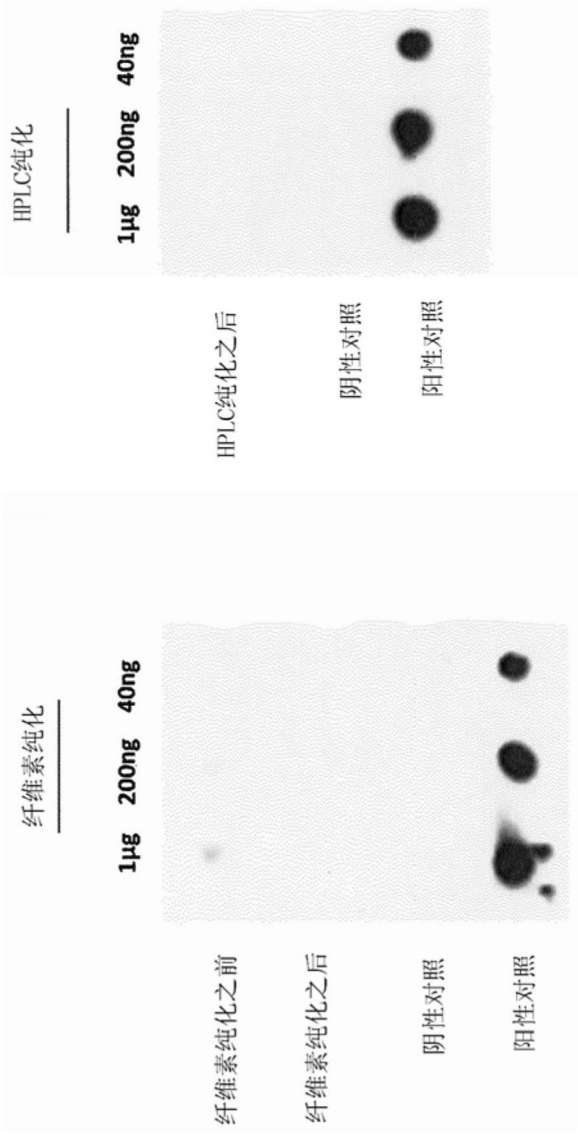


图2

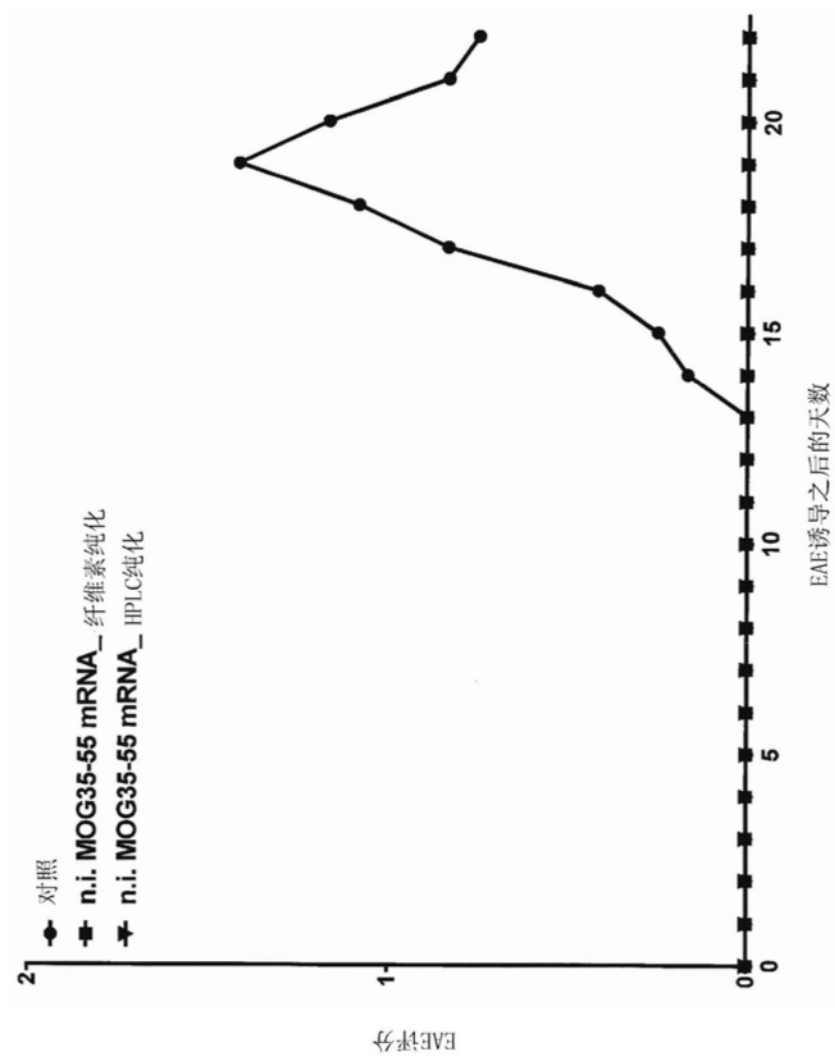


图3

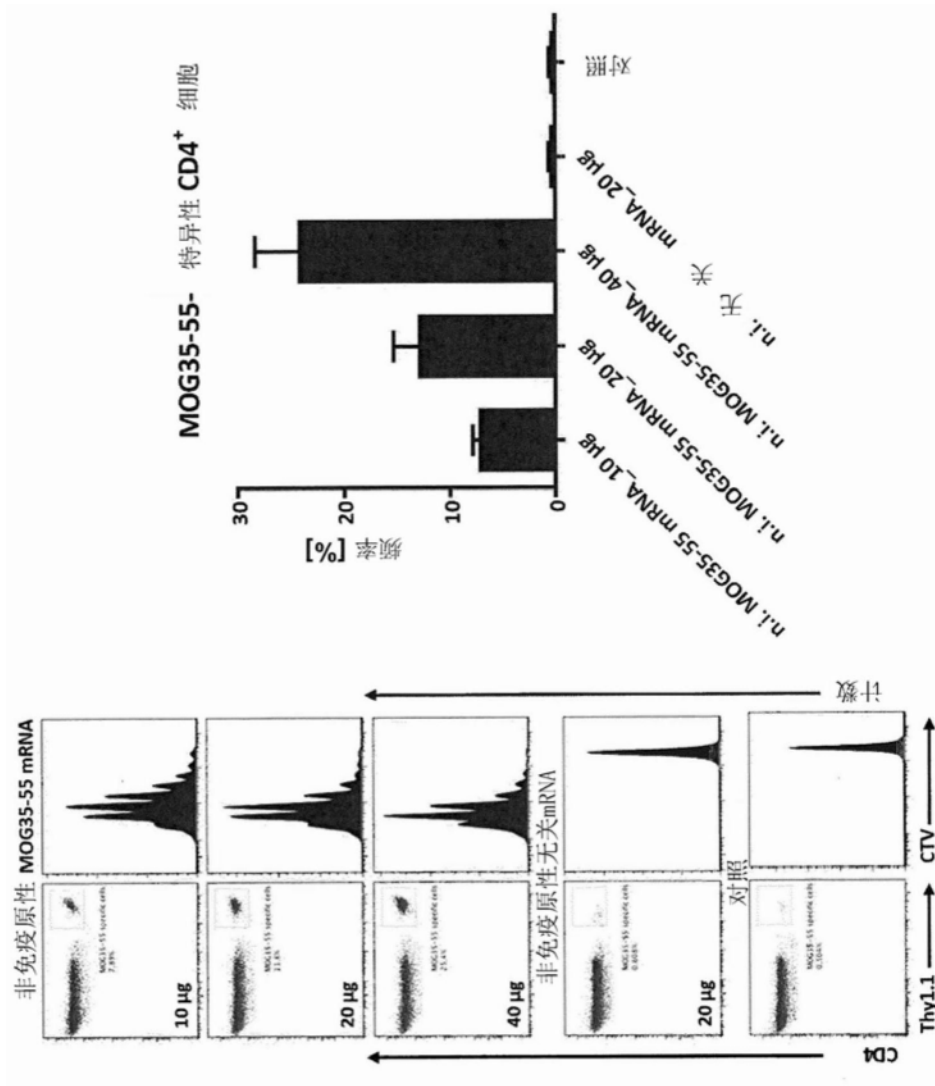


图4

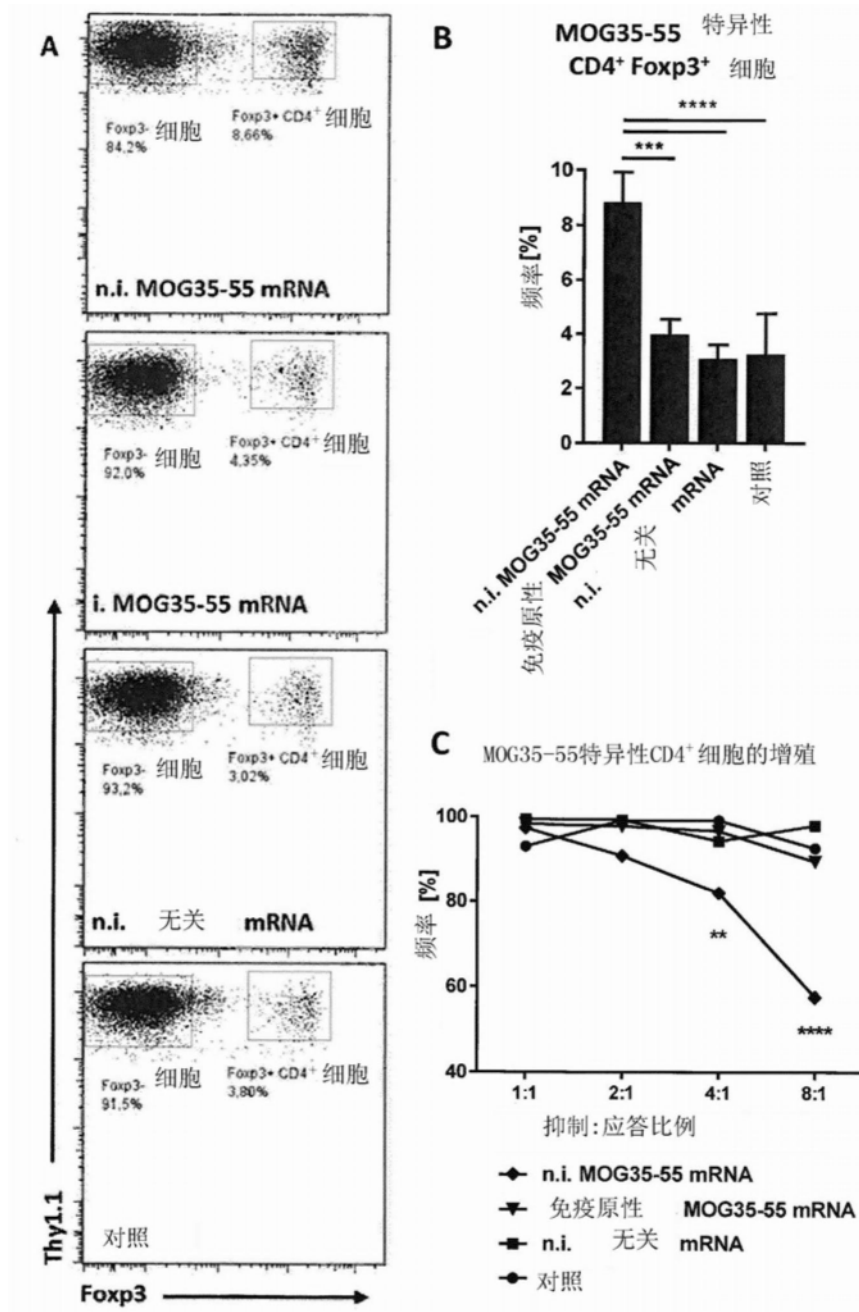


图5

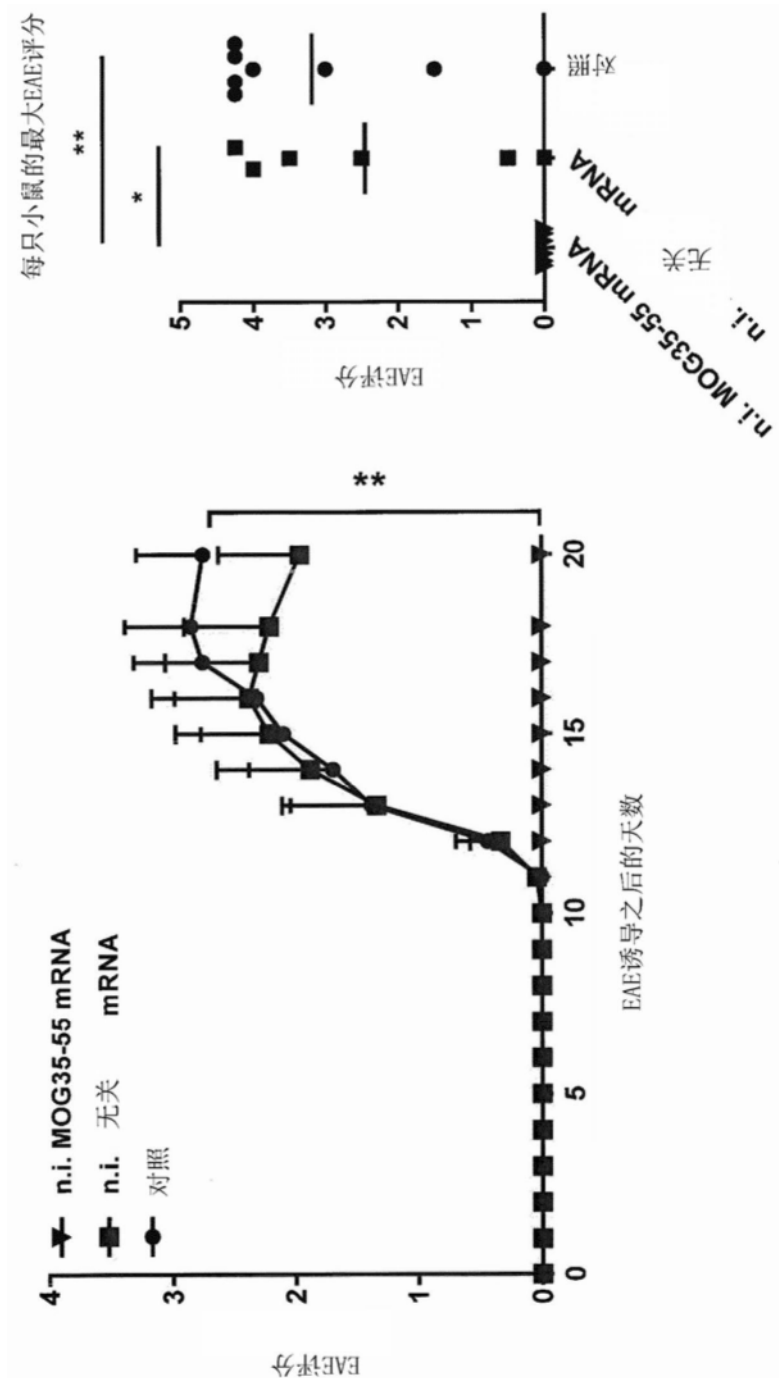


图6

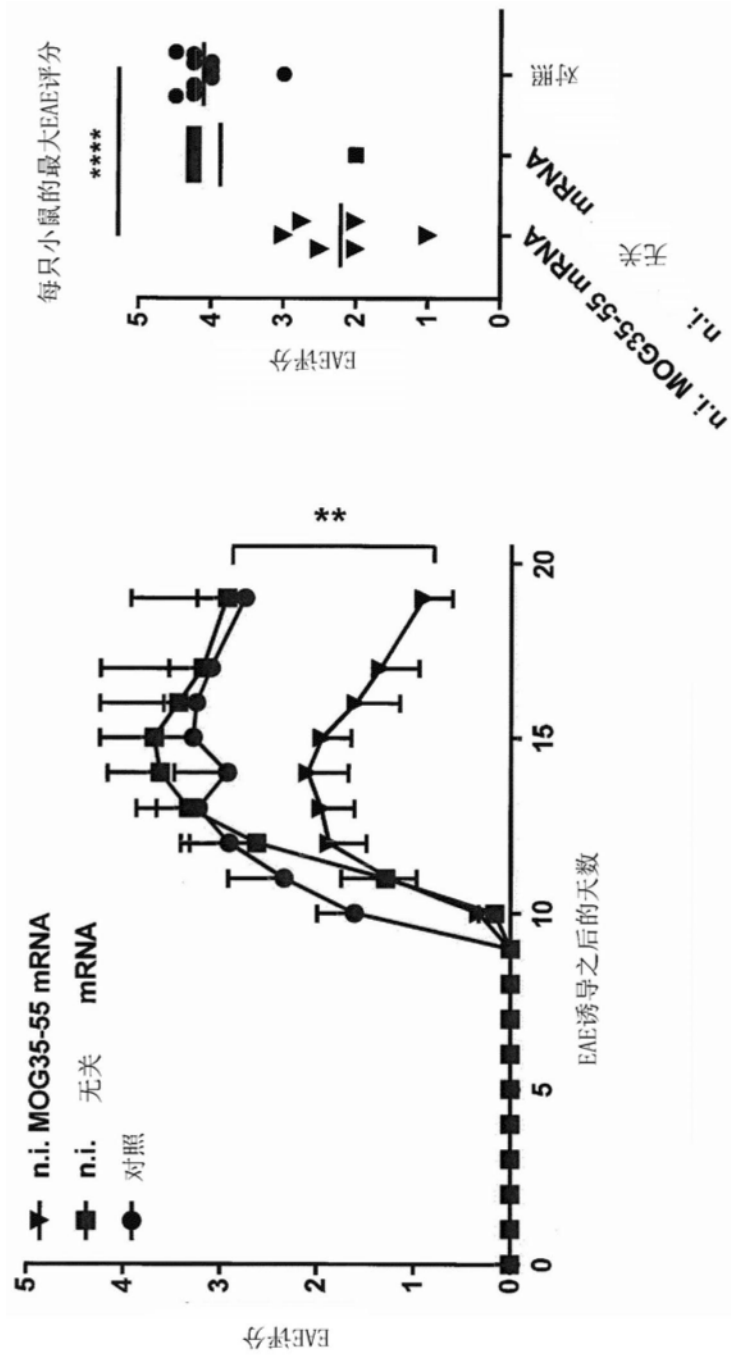


图7

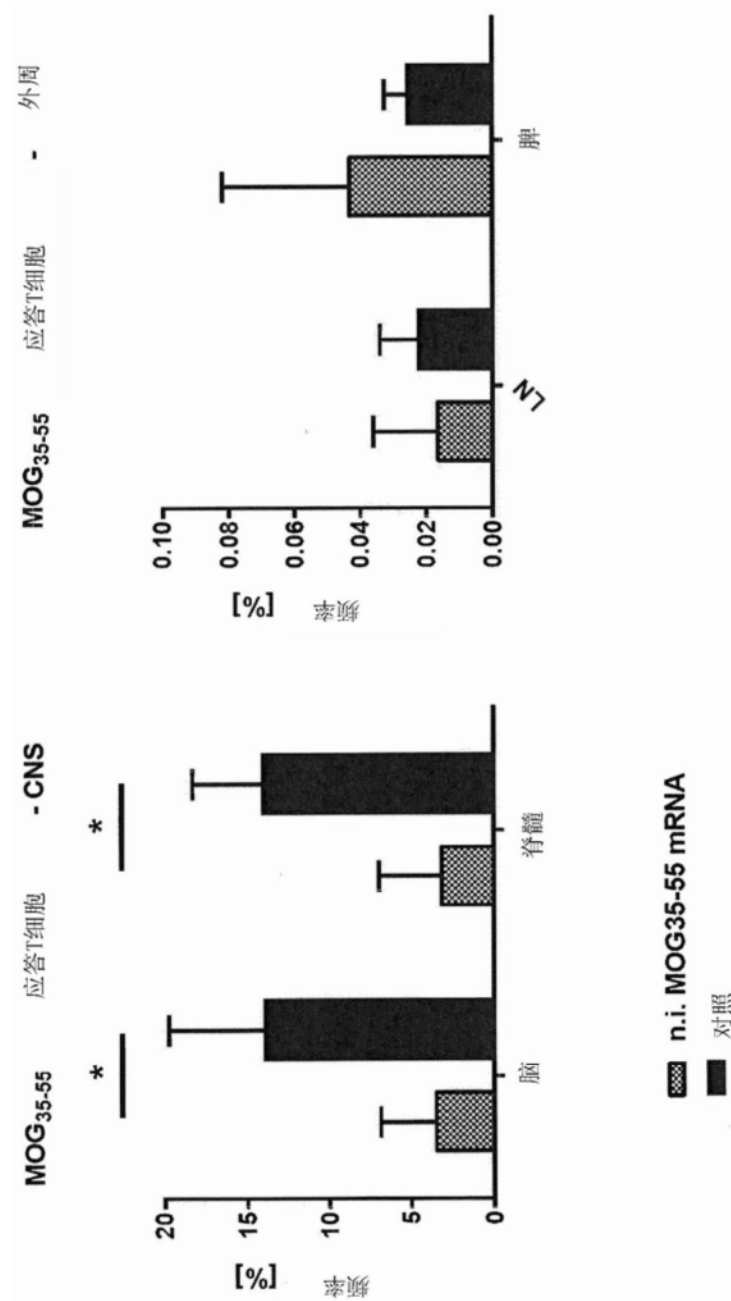


图8

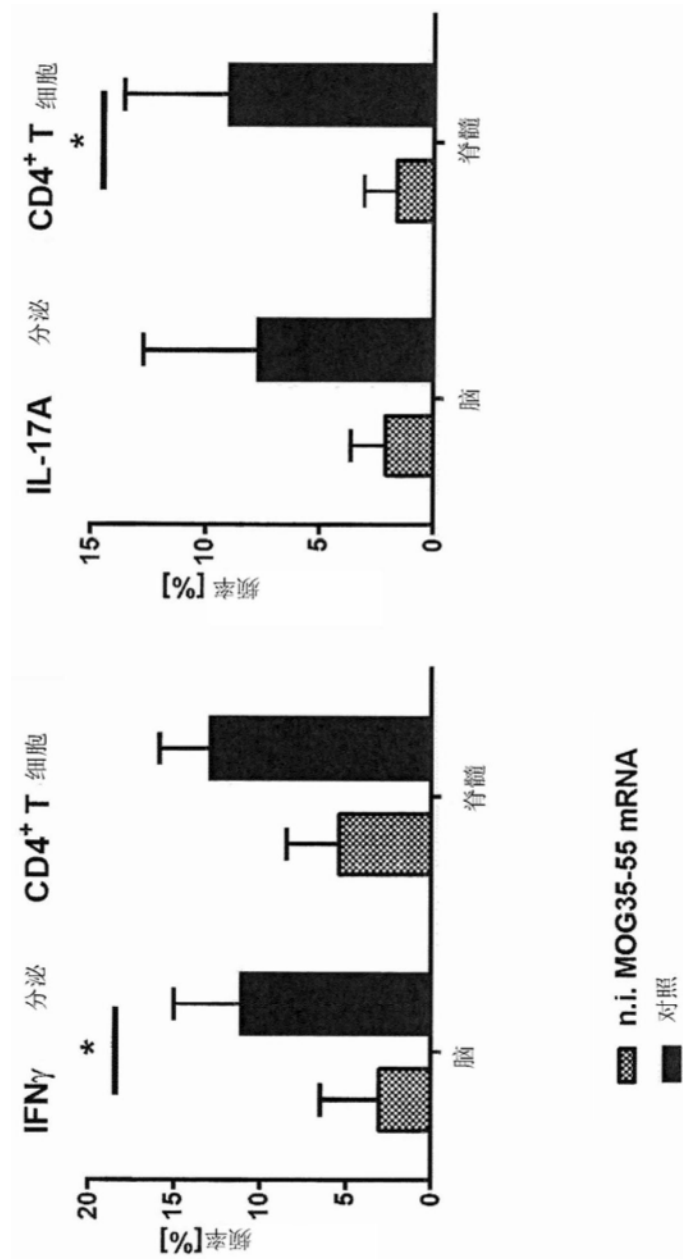


图9

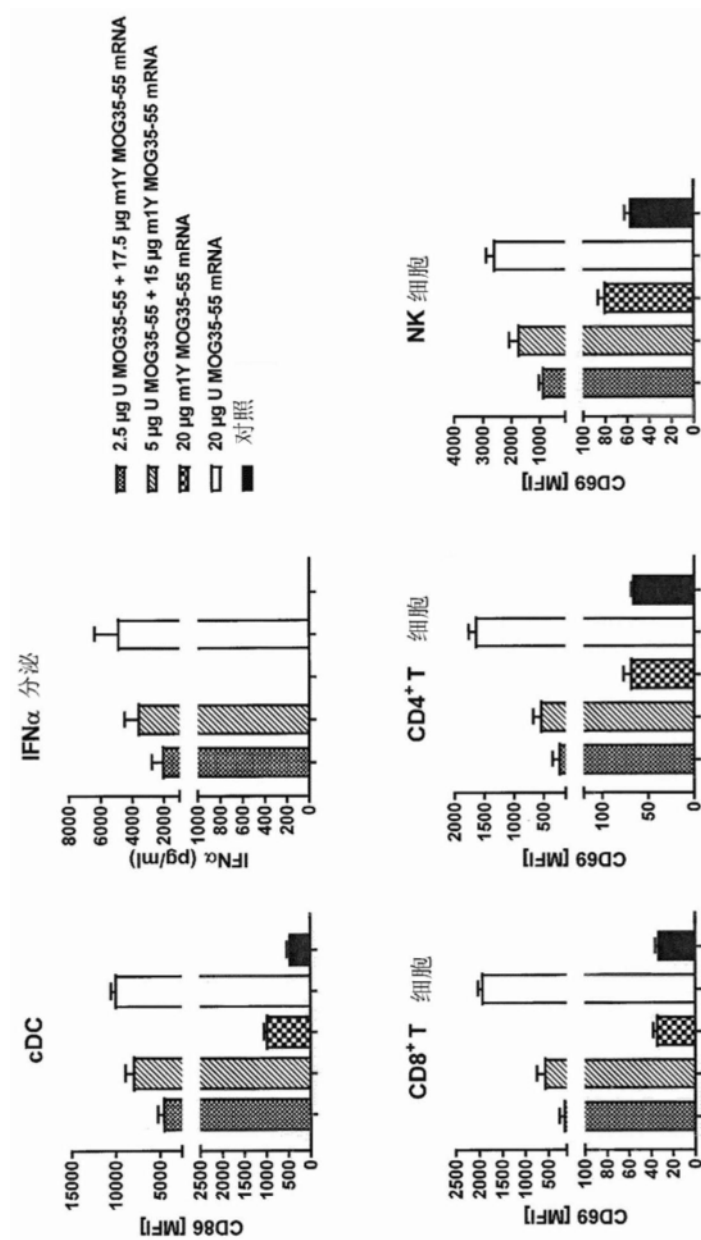


图10

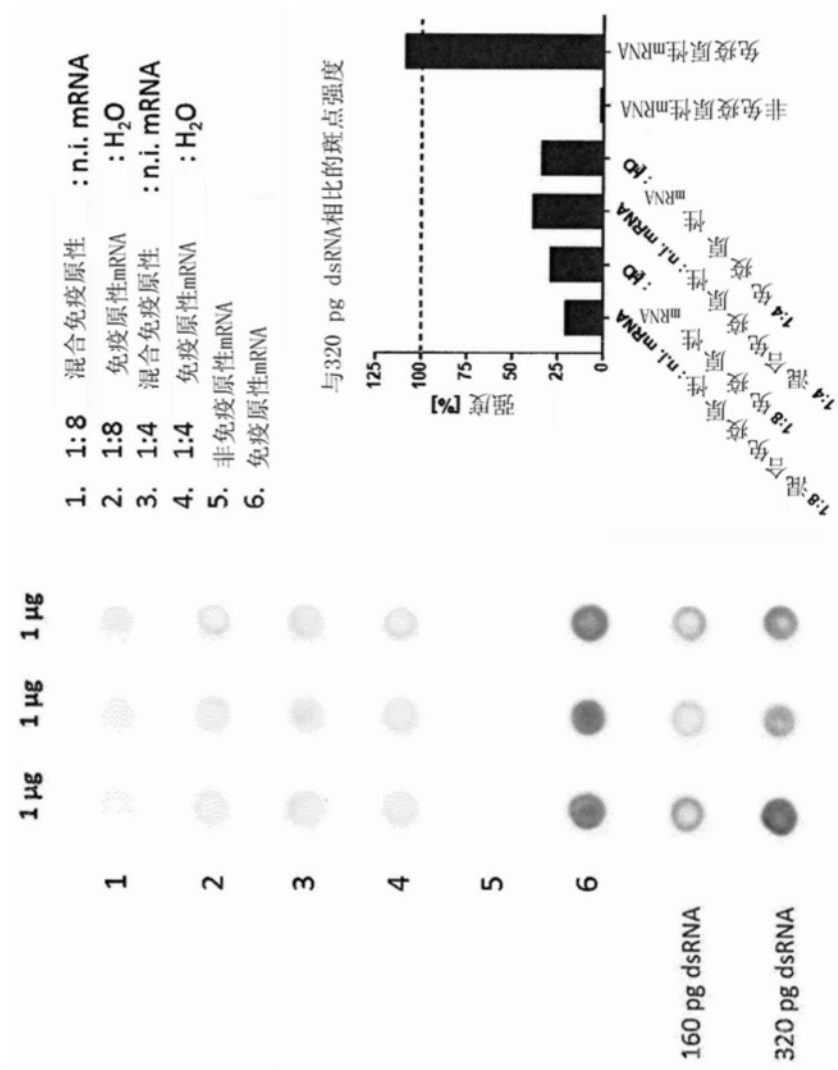


图11

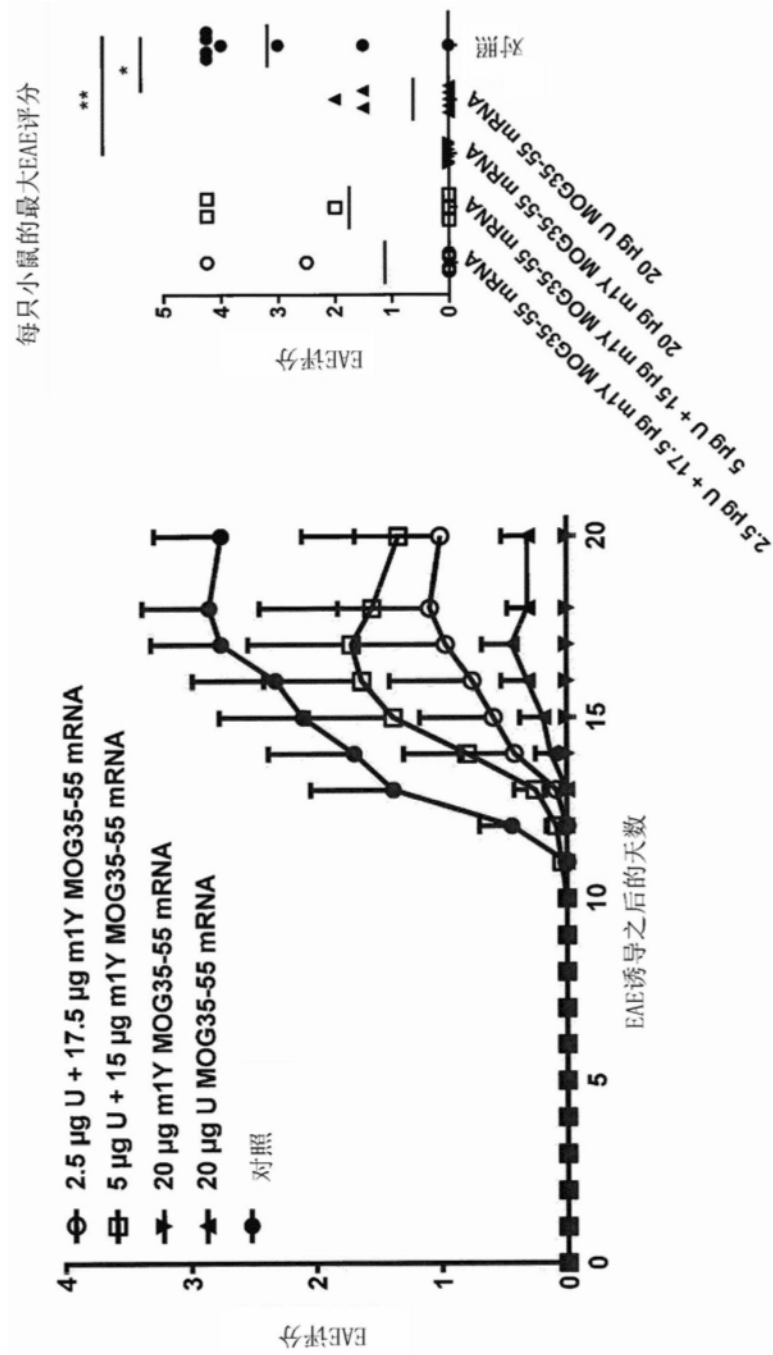


图12

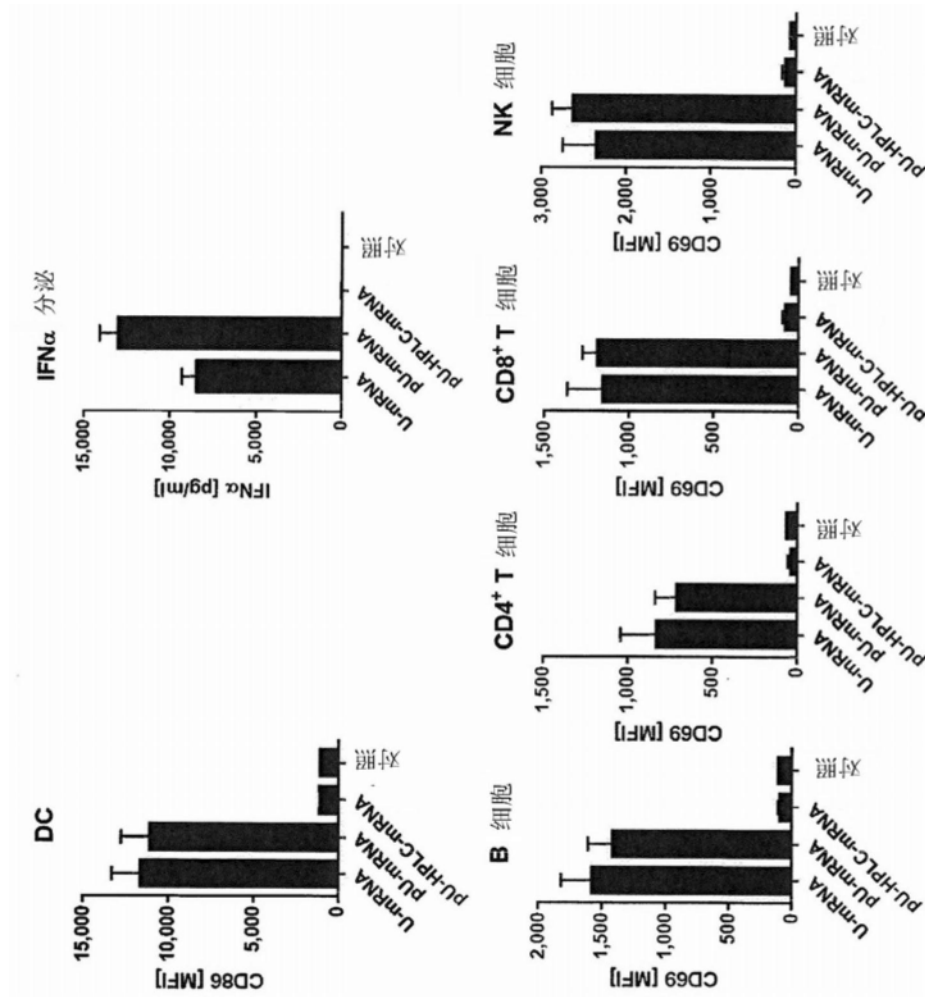


图13

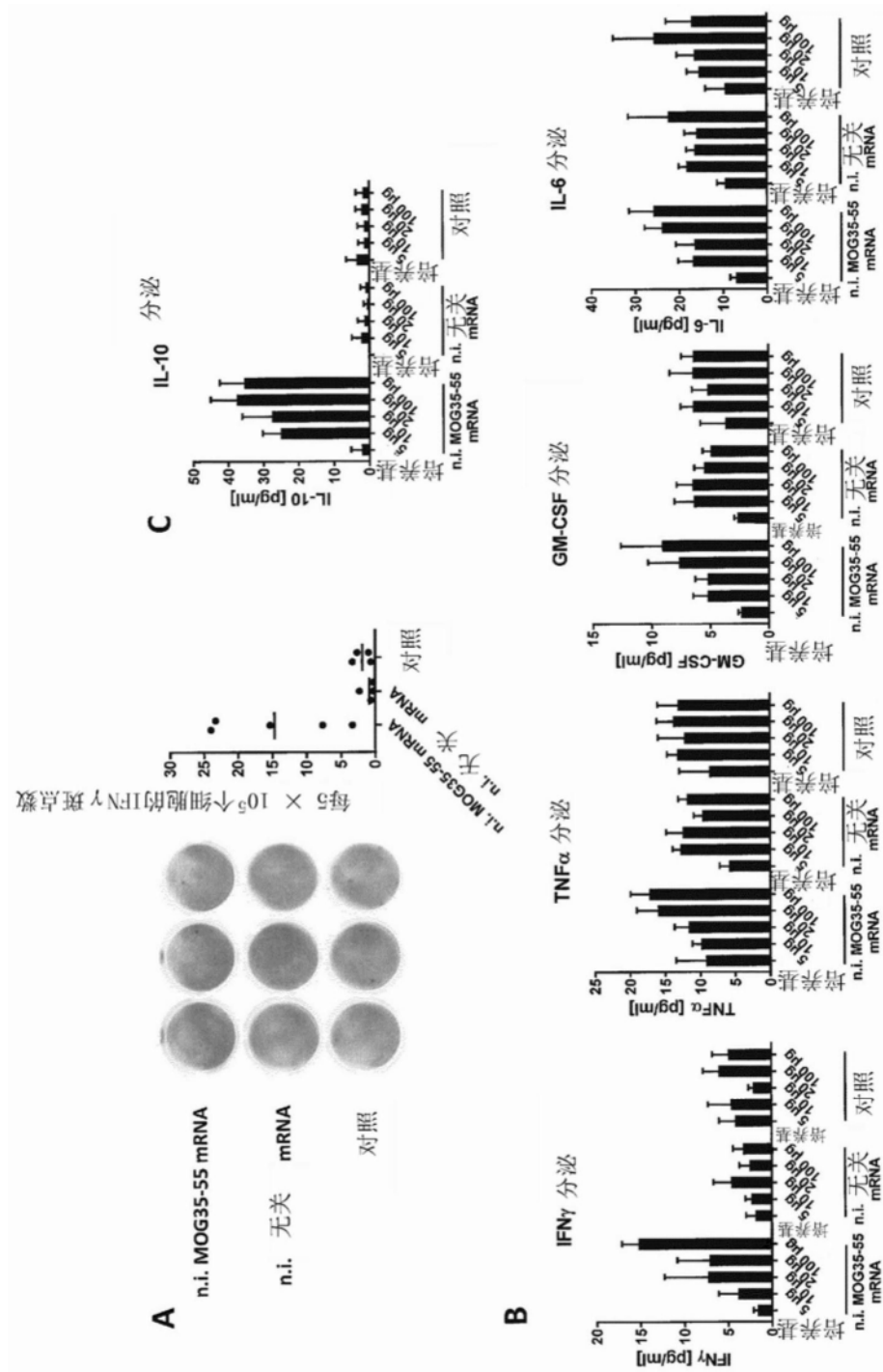


图14

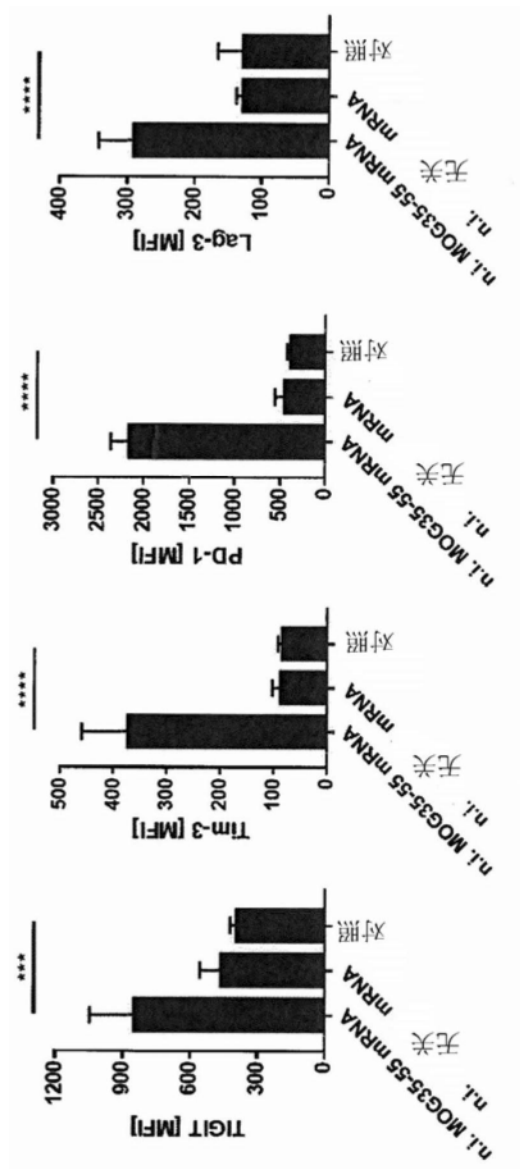


图15

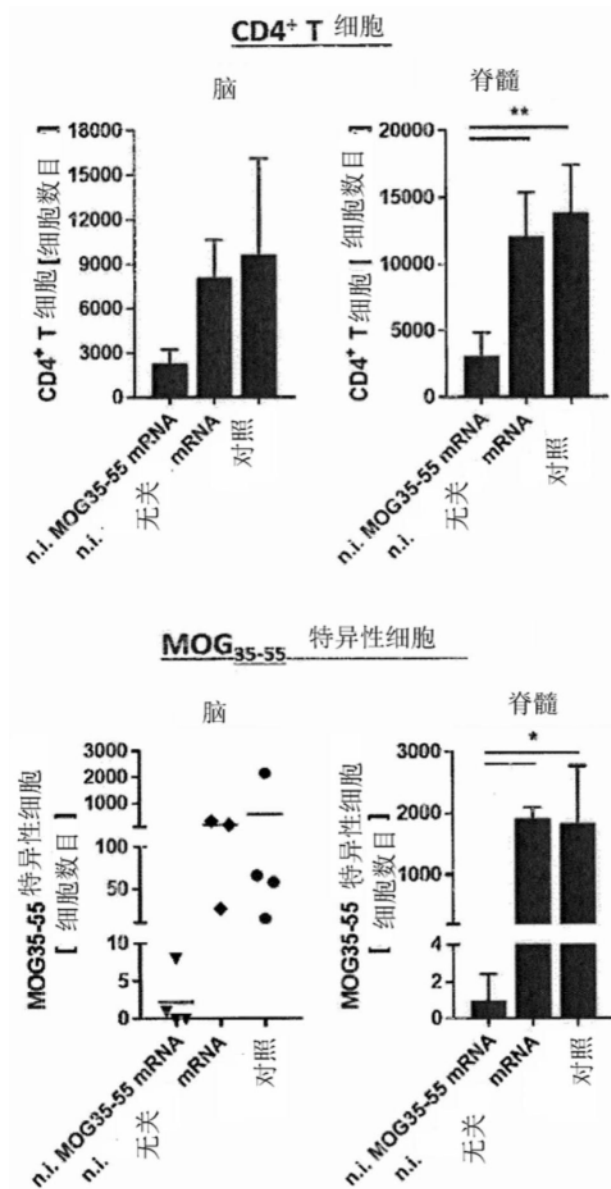


图16

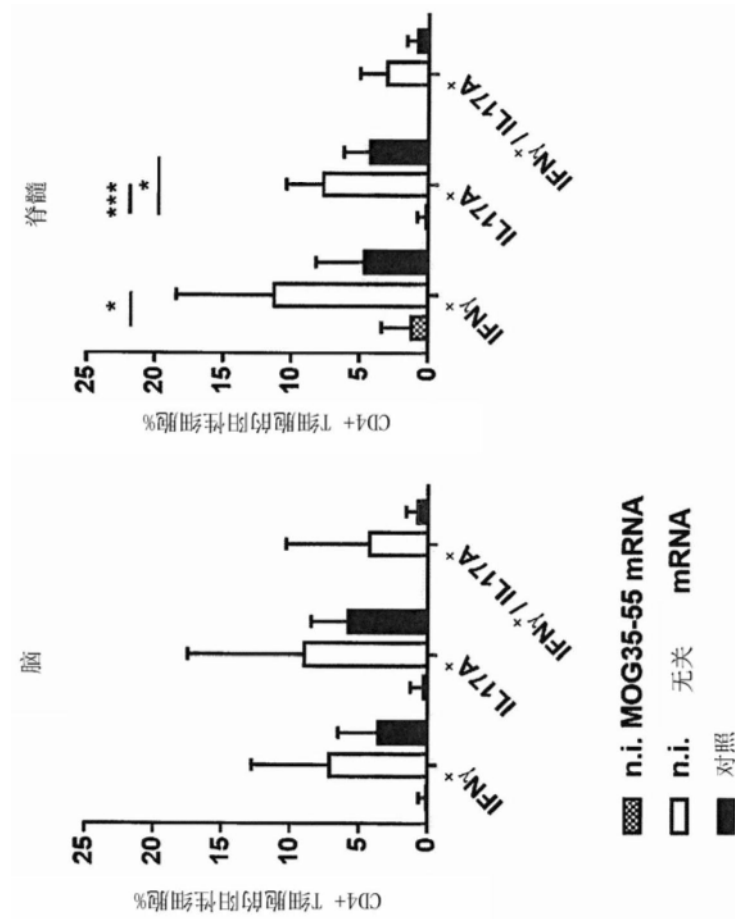


图17

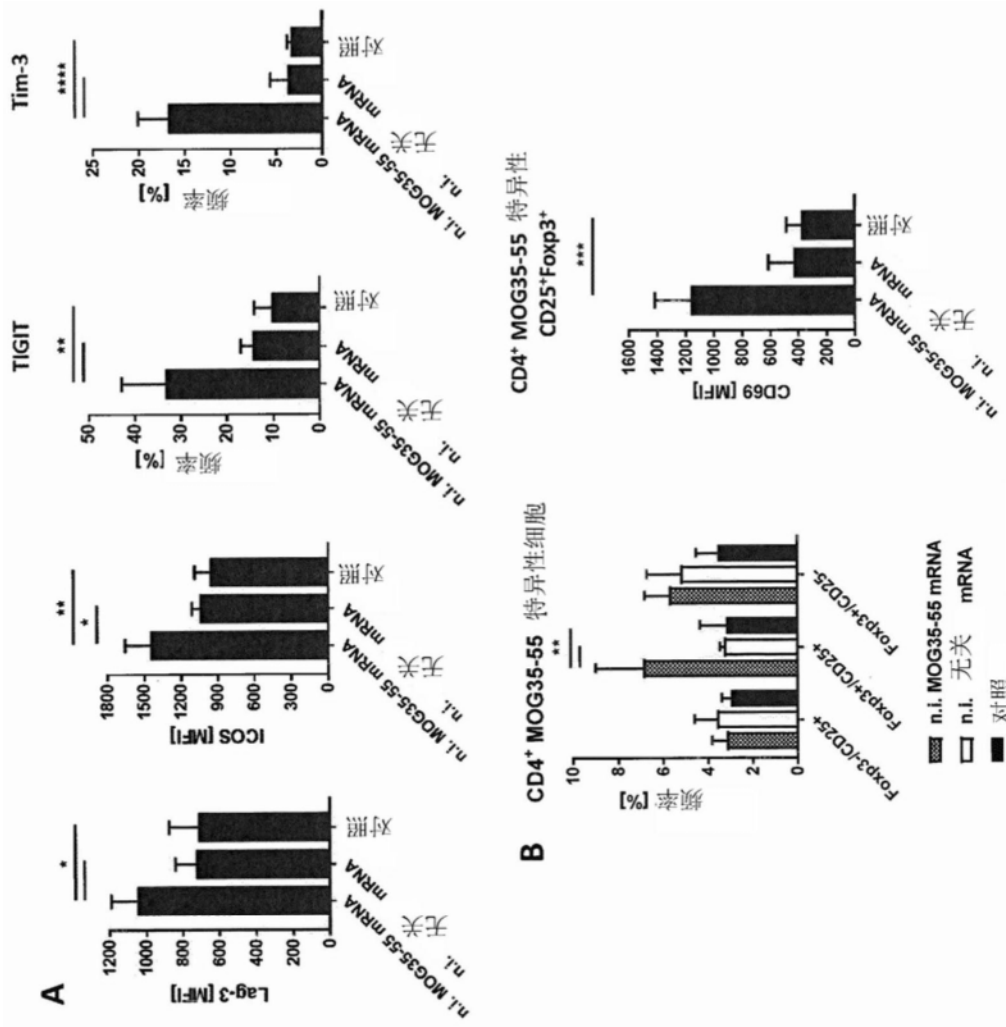


图18

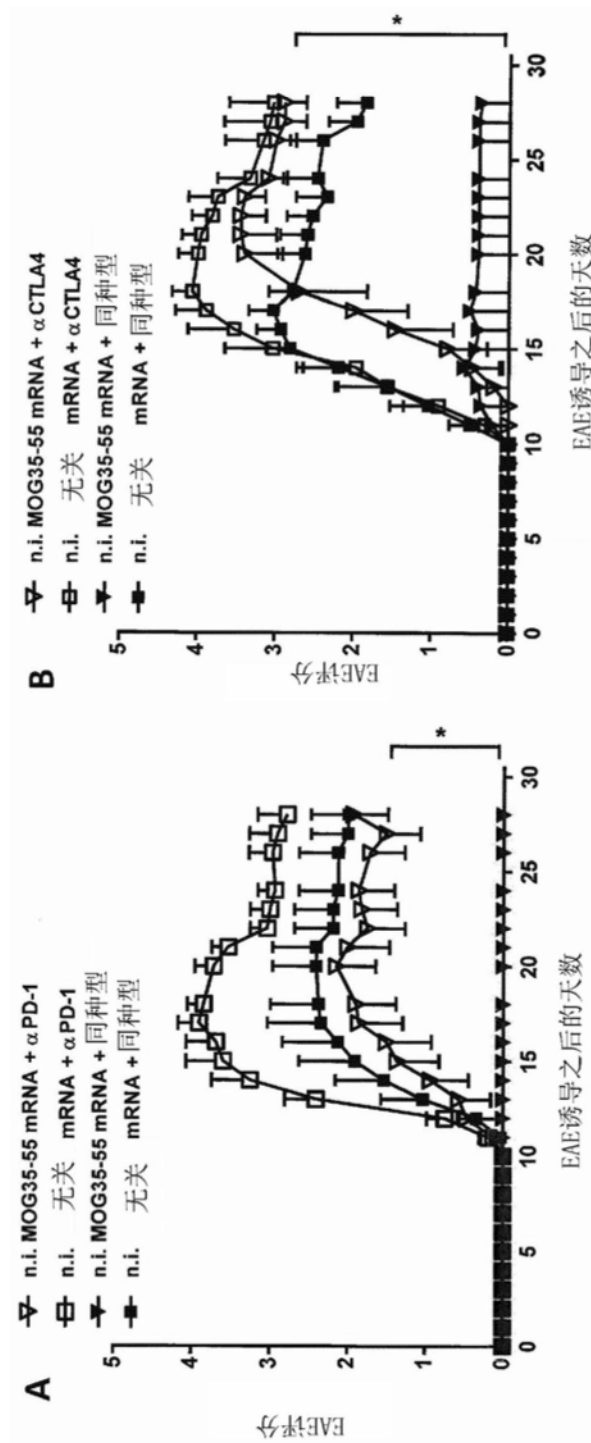


图19

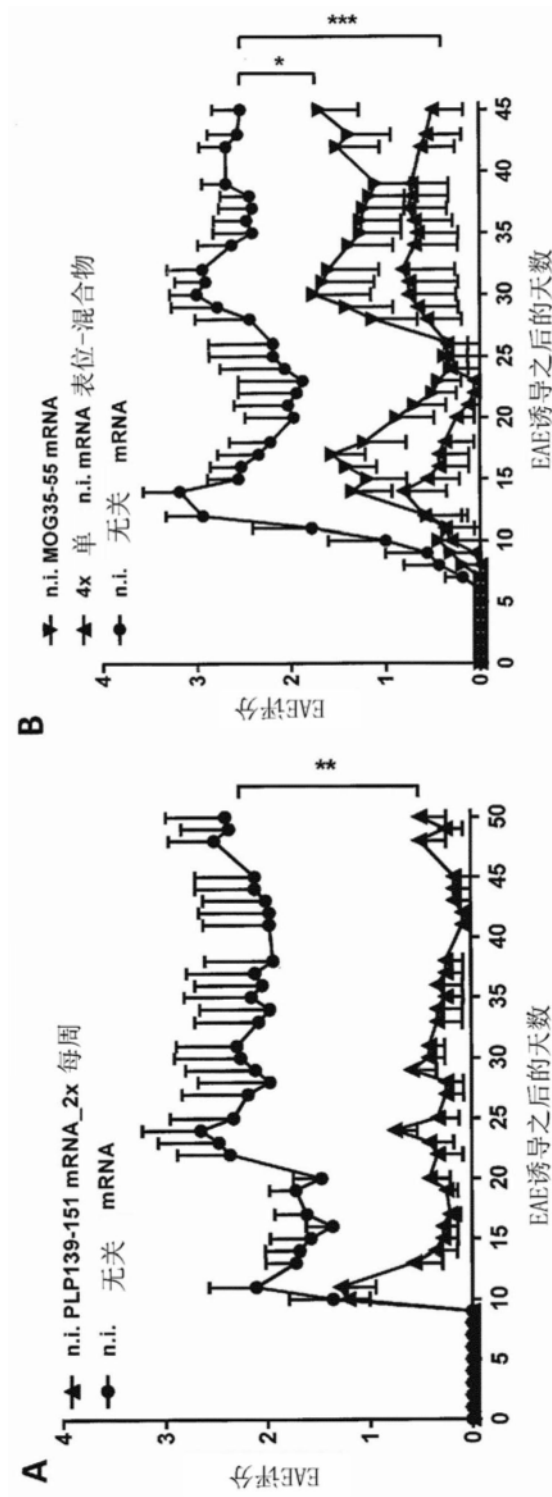


图20

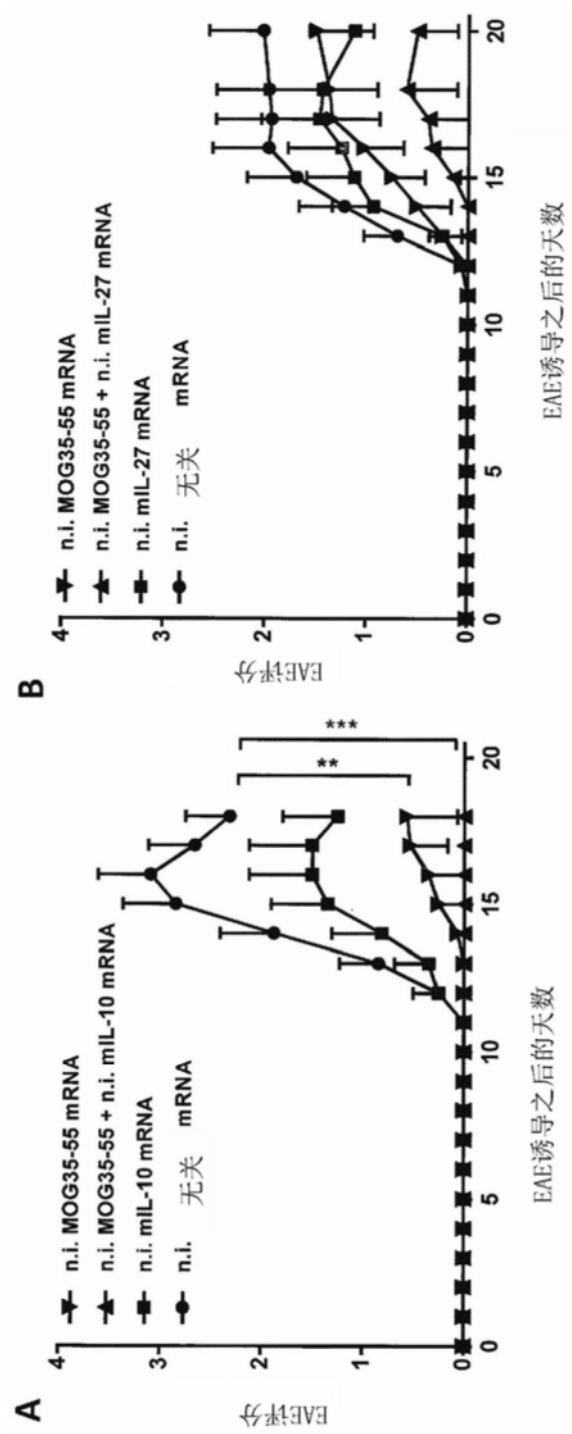


图21