(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119317430 A
(43)申请公布日 2025.01.14

(21)申请号 202380044939.5
(22)申请日 2023.04.26
(30)优先权数据
63/335,092 2022.04.26 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.12.04
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2023/066266 2023.04.26
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/212618 EN 2023.11.02
(71)申请人 斯特兰德生物科技公司
地址 美国马萨诸塞州
(72)发明人 R·索威尔 R·布瑟罗
W·亚伯拉罕 赵炜煜 N·梅农
A·沙赫 P·南比亚 T·基塔达
(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494
专利代理师 封新琴
(51)Int.Cl.
A61K 9/51(2006.01)
A61K 31/00(2006.01)
A61K 31/70(2006.01)

权利要求书5页 说明书69页
序列表（电子公布） 附图7页

(54)发明名称

包含委内瑞拉马脑炎(VEE)复制子的脂质纳米颗粒及其用途

(57)摘要

本公开涉及包含VEE复制子的脂质纳米颗粒(LNP),其中所述LNP可用于选择性地减少和/或避免有效载荷在肝脏内的表达。本公开还涉及此类LNP用于治疗各种疾病和病症的用途。

CN 119317430 A

1.一种减少或避免异源蛋白在有需要的受试者的肝脏中表达的方法,所述方法包括向所述受试者施用脂质纳米颗粒,所述脂质纳米颗粒包含(i)一种或多种类型的脂质,和(ii)源自委内瑞拉马脑炎(VEE)病毒的复制子(“VEE复制子”),其中所述VEE复制子包含编码所述异源蛋白的核酸序列。

2.如权利要求1所述的方法,其中减少所述表达包括与参考受试者(例如,接受对应的脂质纳米颗粒但其中所述复制子不是VEE复制子的受试者)相比,(i)减少在所述肝脏中表达的异源蛋白的量,(ii)缩短所述异源蛋白在所述肝脏中表达的持续时间,或(iii)(i)和(ii)两者。

3.如权利要求2所述的方法,其中在所述施用后,与所述参考受试者相比,在所述肝脏中表达的异源蛋白的量减少至少约5%、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%。

4.如权利要求3所述的方法,其中在所述施用后,所述肝脏不表达所述异源蛋白。

5.如权利要求2或3所述的方法,其中在所述施用后,与所述参考受试者相比,所述异源蛋白在所述肝脏中表达的持续时间缩短至少约5%、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%。

6.如权利要求1至5中任一项所述的方法,其中在所述施用后,所述异源蛋白在所述受试者的非肝组织中表达,其中所述非肝组织选自脾、肺、肿瘤或它们的组合。

7.如权利要求6所述的方法,其中在所述施用后,与在所述参考受试者的所述非肝组织中观察到的量相比,在所述非肝组织中表达的异源蛋白的量为至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或至少约100%或更多。

8.如权利要求6或7所述的方法,其中在所述施用后,与在所述参考受试者的所述非肝组织中观察到的持续时间相比,所述异源蛋白在所述非肝组织中表达的持续时间为至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或至少约100%。

9.一种在有需要的受试者的非肝组织中选择性地表达异源蛋白的方法,所述方法包括向所述受试者施用脂质纳米颗粒,所述脂质纳米颗粒包含(i)一种或多种类型的脂质,和(ii)源自委内瑞拉马脑炎(VEE)病毒的复制子(“VEE复制子”),其中所述VEE复制子包含编码所述异源蛋白的核酸序列。

10.如权利要求9所述的方法,其中在所述施用后,在所述非肝组织中表达的异源蛋白的量为在所述受试者的肝脏中观察到的对应量的至少约2倍、至少约3倍、至少约4倍、至少约5倍、至少约6倍、至少约7倍、至少约8倍、至少约9倍、至少约10倍、至少约15倍、至少约20倍、至少约25倍、至少约30倍、至少约35倍、至少约40倍、至少约45倍或至少约50倍。

11.如权利要求9或10所述的方法,其中在所述施用后,所述异源蛋白在所述非肝组织中表达的持续时间为在所述受试者的所述肝脏中观察到的对应持续时间的至少约2倍、至少约3倍、至少约4倍、至少约5倍、至少约6倍、至少约7倍、至少约8倍、至少约9倍、至少约10倍、至少约15倍、至少约20倍、至少约25倍、至少约30倍、至少约35倍、至少约40倍、至少约45倍或至少约50倍或更长。

12.如权利要求9至11中任一项所述的方法,其中所述非肝组织包括脾、肺或两者。

13.一种治疗有需要的受试者的疾病或病症的方法,所述方法包括向所述受试者施用脂质纳米颗粒,所述脂质纳米颗粒包含(i)一种或多种类型的脂质,和(ii)源自委内瑞拉马脑炎(VEE)病毒的复制子(“VEE复制子”),其中所述VEE复制子包含编码异源蛋白的核酸序列,并且其中在所述施用后,所述异源蛋白优先在所述受试者的非肝组织中表达。

14.如权利要求13所述的方法,其中在所述施用后,在所述非肝组织中表达的异源蛋白的量为在所述受试者的肝脏中观察到的对应量的至少约2倍、至少约3倍、至少约4倍、至少约5倍、至少约6倍、至少约7倍、至少约8倍、至少约9倍、至少约10倍、至少约15倍、至少约20倍、至少约25倍、至少约30倍、至少约35倍、至少约40倍、至少约45倍或至少约50倍或更多。

15.如权利要求13或14所述的方法,其中在所述施用后,所述异源蛋白在所述非肝组织中表达的持续时间为在所述受试者的所述肝脏中观察到的对应持续时间的至少约2倍、至少约3倍、至少约4倍、至少约5倍、至少约6倍、至少约7倍、至少约8倍、至少约9倍、至少约10倍、至少约15倍、至少约20倍、至少约25倍、至少约30倍、至少约35倍、至少约40倍、至少约45倍或至少约50倍或更长。

16.如权利要求13至15中任一项所述的方法,其中所述非肝组织包括脾、肺或两者。

17.如权利要求13至16中任一项所述的方法,其中所述疾病或病症包括癌症、炎性病症、单基因病症、神经病症、精神病症或它们的组合。

18.如权利要求17中任一项所述的方法,其中所述癌症包括黑色素瘤、鳞状细胞癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌、肺鳞状细胞癌、腹膜癌、肝细胞癌、胃肠癌、胰腺癌、胶质母细胞瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、肝细胞瘤、乳腺癌、结肠癌、结直肠癌、子宫内膜癌或子宫癌、唾液腺癌、肾癌、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、肝肿瘤、胃癌、头颈癌或它们的组合。

19.一种在有需要的受试者中增加基于脂质纳米颗粒的疗法的耐受性的方法,所述方法包括向所述受试者施用脂质纳米颗粒,所述脂质纳米颗粒包含(i)一种或多种类型的脂质,和(ii)源自委内瑞拉马脑炎(VEE)病毒的复制子(“VEE复制子”),其中所述VEE复制子包含编码异源蛋白的核酸序列。

20.如权利要求19所述的方法,其中与在参考受试者(例如,接受对应的脂质纳米颗粒但其中所述复制子不是VEE复制子的受试者)中观察到的对应耐受性相比,所述基于脂质纳米颗粒的疗法的耐受性在所述受试者中增加至少约2倍、至少约3倍、至少约4倍、至少约5倍、至少约6倍、至少约7倍、至少约8倍、至少约9倍、至少约10倍、至少约15倍、至少约20倍、至少约25倍、至少约30倍、至少约35倍、至少约40倍、至少约45倍、或至少约50倍或更多。

21.如权利要求20所述的方法,其中所述基于脂质纳米颗粒的疗法的耐受性增加与肝毒性降低相关联。

22.如权利要求21所述的方法,其中在所述施用后,与在所述参考受试者中观察到的对应肝毒性相比,所述受试者表现出肝毒性降低。

23.如权利要求22所述的方法,其中与所述参考受试者的肝毒性相比,所述受试者中的肝毒性降低至少约5%、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%。

24.如权利要求19至23中任一项所述的方法,其中在所述施用后,与在所述参考受试者的所述肝脏中观察到的对应表达相比,所述受试者表现出所述异源蛋白在所述肝脏中的表

达降低。

25.如权利要求24所述的方法,其中在所述施用后,与在所述参考受试者的所述肝脏中观察到的量相比,在所述受试者的所述肝脏中表达的异源蛋白的量减少至少约5%、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%。

26.如权利要求24或25所述的方法,其中在所述施用后,与在所述参考受试者的所述肝脏中观察到的持续时间相比,所述异源蛋白在所述受试者的所述肝脏中表达的持续时间缩短至少约5%、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%。

27.如权利要求19至26中任一项所述的方法,其中与在所述参考受试者的所述非肝组织中观察到的量相比,在所述受试者的所述非肝组织中表达的异源蛋白的量为至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或至少约100%或更多。

28.如权利要求19至27中任一项所述的方法,其中与所述参考受试者相比,所述异源蛋白在所述受试者的所述非肝组织中表达的持续时间为至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或至少约100%。

29.一种产生与肝毒性降低相关联的基于脂质纳米颗粒的疗法的方法,所述方法包括组合(i)包含一种或多种类型的脂质的脂质纳米颗粒和(ii)源自委内瑞拉马脑炎(VEE)病毒的复制子(“VEE复制子”),其中所述VEE复制子包含编码异源蛋白的核酸序列。

30.如权利要求1至29中任一项所述的方法,其中所述VEE复制子具有如SEQ ID NO:187中所示的核苷酸序列。

31.如权利要求1至30中任一项所述的方法,其中所述异源蛋白包括细胞因子、抗体或其抗原结合片段、嵌合抗原受体或它们的组合。

32.如权利要求31所述的方法,其中所述细胞因子包含白介素(IL)-12蛋白。

33.如权利要求32所述的方法,其中所述VEE复制子的所述核酸序列包含:(i)编码IL-12β亚基并且与SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:58、SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:71、SEQ ID NO:72、SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:74或SEQ ID NO:75中所示的序列具有至少约75%、至少约76%、至少约77%、至少约78%、至少约79%、至少约80%、至少约81%、至少约82%、至少约83%、至少约84%、至少约85%、至少约86%、至少约87%、至少约88%、至少约89%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%序列同一性的核苷酸序列;(ii)编码IL-12α亚基并且与SEQ ID NO:101、SEQ ID NO:102、SEQ ID NO:103、SEQ ID NO:104、SEQ ID NO:105、SEQ ID NO:106、SEQ ID NO:107、SEQ ID NO:108、SEQ ID NO:109、SEQ ID NO:110、SEQ ID NO:111、SEQ ID NO:112、SEQ ID NO:113、SEQ ID NO:114、SEQ ID NO:115、SEQ ID NO:116、SEQ ID NO:117、SEQ ID NO:118、SEQ ID NO:119、SEQ ID NO:120、SEQ ID NO:121、SEQ ID NO:122、SEQ ID

NO:123、SEQ ID NO:124或SEQ ID NO:125中所示的序列具有至少约77％、至少约78％、至少约79％、至少约80％、至少约81％、至少约82％、至少约83％、至少约84％、至少约85％、至少约86％、至少约87％、至少约88％、至少约89％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％、至少约99％或约100％同一性的核苷酸序列;或(iii)(i)和(ii)两者。

34.如权利要求33所述的方法,其中所述细胞因子不包含IL-12蛋白。

35.如权利要求1至34中任一项所述的方法,其中所述一种或多种类型的脂质包括可电离脂质、阳离子脂质、类脂、磷脂、甾醇或它们的组合。

36.如权利要求35所述的方法,其中所述一种或多种类型的脂质包括TT3、1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DOPE)、胆固醇、C14-PEG2000或它们的组合。

37.如权利要求36所述的方法,其中所述一种或多种类型的脂质是TT3。

38.如权利要求36或37所述的方法,其中所述C14-PEG2000包括1,2-二肉豆蔻酰基-rac-甘油-3-甲氧基聚乙二醇-2000(DMG-PEG2000)、1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-2000](DMPE-PEG2000)或两者。

39.如权利要求36至38中任一项所述的方法,其中所述C14-PEG2000嵌入所述脂质纳米颗粒中。

40.如权利要求36至38中任一项所述的方法,其中在分离的多核苷酸已被包封在所述脂质纳米颗粒中之后添加所述C14-PEG2000。

41.如权利要求1至40中任一项所述的方法,其中所述脂质纳米颗粒具有约30-500nm的直径。

42.如权利要求1至41中任一项所述的方法,其中所述脂质纳米颗粒具有约50-400nm的直径。

43.如权利要求1至42中任一项所述的方法,其中所述脂质纳米颗粒具有约70-300nm的直径。

44.如权利要求1至43中任一项所述的方法,其中所述脂质纳米颗粒具有约100-200nm的直径。

45.如权利要求1至44中任一项所述的方法,其中所述脂质纳米颗粒具有约100-175nm的直径。

46.如权利要求1至45中任一项所述的方法,其中所述脂质纳米颗粒具有约100-160nm的直径。

47.如权利要求1至46中任一项所述的方法,其中所述一种或多种类型的脂质与所述VEE复制子具有约1:2至约15:1的质量比。

48.如权利要求47所述的方法,其中所述一种或多种类型的脂质与所述VEE复制子具有1:2、1:1.5、1:1.2、1:1.1、1:1、1.1:1、1.2:1、1.5:1、2:1、2.5:1、3:1、3.5:1、4:1、4.5:1、5:1、5.5:1、6:1、6.5:1、7:1、7.5:1、8:1、8.5:1、9:1、9.5:1、10:1、10.5:1、11:1、11.5:1、12:1、12.5:1、13:1、13.5:1、14:1、14.5:1或15:1的质量比。

49.如权利要求1至48中任一项所述的方法,其中所述VEE复制子包含5'-帽。

50.如权利要求1至49中任一项所述的方法,其中所述VEE复制子还包含调节元件。

51.如权利要求50所述的方法,其中所述调节元件选自由以下组成的组:至少一个翻译

增强子元件(TEE)、翻译起始序列、至少一个微RNA结合位点或其种子、连接核苷的3'加尾区、富AU元件(ARE)、转录后控制调节子、5'UTR、3'UTR以及它们的组合。

52.如权利要求51所述的方法,其中所述连接核苷的3'加尾区包含poly-A尾、polyA-G四联体或茎环序列。

53.如权利要求1至52中任一项所述的方法,其中所述VEE复制子包含至少一个经修饰的核苷。

54.如权利要求53所述的方法,其中所述至少一个经修饰的核苷选自由以下组成的组:6-氮杂-胞苷、2-硫代-胞苷、α-硫代-胞苷、假-异-胞苷、5-氨基烯丙基-尿苷、5-碘-尿苷、N1-甲基-假尿苷、5,6-二氢尿苷、α-硫代-尿苷、4-硫代-尿苷、6-氮杂-尿苷、5-羟基-尿苷、脱氧-胸苷、假-尿苷、肌苷、α-硫代-鸟苷、8-氧代-鸟苷、O6-甲基-鸟苷、7-脱氮-鸟苷、N1-甲基-腺苷、2-氨基-6-氯-嘌呤、N6-甲基-2-氨基-嘌呤、6-氯-嘌呤、N6-甲基-腺苷、α-硫代-腺苷、8-叠氮-腺苷、7-脱氮-腺苷、吡咯-胞苷、5-甲基-胞苷、N4-乙酰基-胞苷、5-甲基-尿苷、5-碘-胞苷以及它们的组合。

55.如权利要求1至54中任一项所述的方法,其中所述一种或多种类型的脂质与所述VEE复制子具有约10:1的质量比。

56.如权利要求1至55中任一项所述的方法,其中所述脂质纳米颗粒经由肿瘤内、鞘内、肌肉内、静脉内、皮下、吸入、皮内、淋巴内、眼内、腹膜内、胸膜内、脊柱内、血管内、鼻内、经皮、舌下、粘膜下、透皮或透粘膜施用而施用至所述受试者。

57.如权利要求1至56中任一项所述的方法,所述方法还包括向所述受试者施用至少一种额外的治疗剂。

58.如权利要求57所述的方法,其中所述至少一种额外的治疗剂包括化疗药物、靶向抗癌疗法、溶瘤药物、细胞毒性剂、基于免疫的疗法、细胞因子、手术程序、放射程序、共刺激分子的活化剂、免疫检查点抑制剂、疫苗、细胞免疫疗法或它们的任何组合。

59.如权利要求58所述的方法,其中所述免疫检查点抑制剂包括抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、抗LAG-3抗体、抗CTLA-4抗体、抗GITR抗体、抗TIM3抗体或它们的任何组合。

包含委内瑞拉马脑炎(VEE)复制子的脂质纳米颗粒及其用途

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本PCT申请要求2022年4月26日提交的美国临时申请号63/335,092的优先权权益,该临时申请通过引用以其整体并入本文。

[0003] 对经由EFS-WEB以电子方式提交的序列表的引用

[0004] 以电子方式提交(名称:4597_016PC01_SequenceListing_ST26.XM L;大小:410,263字节;创建日期:2023年4月24日)并与申请一起提出的序列表的内容通过引用以其整体并入本文。

背景技术

[0005] 基于核酸的治疗(例如,mRNA疫苗)正在成为治疗各种疾病的越来越重要的方法。在施用时,可产生所编码的蛋白质,以诱导免疫应答(例如,肿瘤抗原诱导抗肿瘤免疫应答)或提供维持健康状态的重要功能。然而,用于递送核酸分子的当前递送平台是无效的或与不期望的副作用相关联,从而限制了基于核酸的疗法的全部潜力。例如,在涉及mRNA的情况下,脂质纳米颗粒(LNP)通常用于包封mRNA。并且,为了改善LNP递送,许多努力集中于鉴定可影响细胞内递送和/或mRNA表达的新颖脂质或特定脂质组合物,例如在各种类型的哺乳动物组织、器官和/或细胞(例如,哺乳动物肝细胞)中。然而,这些现有的方法成本高、耗时且不可预测。另外,当体内施用时,LNP也与肝毒性相关联。因此,本领域需要改进的LNP,其可以提供将核酸递送至受试者的更安全和更有效的手段。

发明内容

[0006] 本文提供了一种减少或避免异源蛋白在有需要的受试者的肝脏中表达的方法,所述方法包括向所述受试者施用脂质纳米颗粒,所述脂质纳米颗粒包含(i)一种或多种类型的脂质,和(ii)源自委内瑞拉马脑炎(VEE)病毒的复制子(“VEE复制子”),其中所述VEE复制子包含编码所述异源蛋白的核酸序列。在一些方面,减少表达包括与参考受试者(例如,接受对应的脂质纳米颗粒但其中复制子不是VEE复制子的受试者)相比,(i)减少在肝脏中表达的异源蛋白的量,(ii)缩短异源蛋白在肝脏中表达的持续时间,或(iii)(i)和(ii)两者。

[0007] 在一些方面,在施用后,与参考受试者相比,在肝脏中表达的异源蛋白的量减少至少约5%、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%。在一些方面,在施用后,肝脏不表达异源蛋白。

[0008] 在一些方面,在施用后,与参考受试者相比,异源蛋白在肝脏中表达的持续时间缩短至少约5%、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%。

[0009] 在一些方面,在施用后,异源蛋白在受试者的非肝组织中表达,其中所述非肝组织选自脾、肺、肿瘤或它们的组合。在一些方面,在施用后,与在参考受试者的非肝组织中观察到的量相比,在非肝组织中表达的异源蛋白的量为至少约90%、至少约91%、至少约92%、

至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％、至少约99％或至少约100％或更多。在一些方面，与在参考受试者的非肝组织中观察到的持续时间相比，异源蛋白在非肝组织中表达的持续时间为至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％、至少约99％或至少约100％。

[0010] 本文还提供了一种在有需要的受试者的非肝组织中选择性地表达异源蛋白的方法，所述方法包括向所述受试者施用脂质纳米颗粒，所述脂质纳米颗粒包含(i)一种或多种类型的脂质，和(ii)源自委内瑞拉马脑炎(VEE)病毒的复制子(“VEE复制子”)，其中所述VEE复制子包含编码所述异源蛋白的核酸序列。

[0011] 在一些方面，在施用后，在非肝组织中表达的异源蛋白的量为在受试者的肝脏中观察到的对应量的至少约2倍、至少约3倍、至少约4倍、至少约5倍、至少约6倍、至少约7倍、至少约8倍、至少约9倍、至少约10倍、至少约15倍、至少约20倍、至少约25倍、至少约30倍、至少约35倍、至少约40倍、至少约45倍或至少约50倍。在一些方面，在施用后，异源蛋白在非肝组织中表达的持续时间为在受试者的肝脏中观察到的对应持续时间的至少约2倍、至少约3倍、至少约4倍、至少约5倍、至少约6倍、至少约7倍、至少约8倍、至少约9倍、至少约10倍、至少约15倍、至少约20倍、至少约25倍、至少约30倍、至少约35倍、至少约40倍、至少约45倍或至少约50倍或更长。在一些方面，非肝组织包括脾、肺或两者。

[0012] 本文公开了一种治疗有需要的受试者的疾病或病症的方法，所述方法包括向所述受试者施用脂质纳米颗粒，所述脂质纳米颗粒包含(i)一种或多种类型的脂质，和(ii)源自委内瑞拉马脑炎(VEE)病毒的复制子(“VEE复制子”)，其中所述VEE复制子包含编码所述异源蛋白的核酸序列，并且其中在施用后，所述异源蛋白优先在所述受试者的非肝组织中表达。

[0013] 在一些方面，在施用后，在非肝组织中表达的异源蛋白的量为在受试者的肝脏中观察到的对应量的至少约2倍、至少约3倍、至少约4倍、至少约5倍、至少约6倍、至少约7倍、至少约8倍、至少约9倍、至少约10倍、至少约15倍、至少约20倍、至少约25倍、至少约30倍、至少约35倍、至少约40倍、至少约45倍或至少约50倍或更多。在一些方面，在施用后，异源蛋白在非肝组织中表达的持续时间为在受试者的肝脏中观察到的对应持续时间的至少约2倍、至少约3倍、至少约4倍、至少约5倍、至少约6倍、至少约7倍、至少约8倍、至少约9倍、至少约10倍、至少约15倍、至少约20倍、至少约25倍、至少约30倍、至少约35倍、至少约40倍、至少约45倍或至少约50倍或更长。在一些方面，非肝组织包括脾、肺或两者。

[0014] 在一些方面，可用本公开治疗的疾病或病症包括癌症、炎性病症、单基因病症、神经病症、精神病症或它们的组合。在一些方面，癌症包括黑色素瘤、鳞状细胞癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌、肺鳞状细胞癌、腹膜癌、肝细胞癌、胃肠癌、胰腺癌、胶质母细胞瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、肝细胞瘤、乳腺癌、结肠癌、结直肠癌、子宫内膜癌或子宫癌、唾液腺癌、肾癌、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、肝肿瘤、胃癌、头颈癌或它们的组合。

[0015] 本公开进一步提供了一种在有需要的受试者中增加基于脂质纳米颗粒的疗法的耐受性的方法，所述方法包括向所述受试者施用脂质纳米颗粒，所述脂质纳米颗粒包含(i)一种或多种类型的脂质，和(ii)源自委内瑞拉马脑炎(VEE)病毒的复制子(“VEE复制子”)，其中所述VEE复制子包含编码异源蛋白的核酸序列。

[0016] 在一些方面,与在参考受试者(例如,接受对应的脂质纳米颗粒但其中复制子不是VEE复制子的受试者)中观察到的对应耐受性相比,基于脂质纳米颗粒的疗法的耐受性在受试者中增加至少约2倍、至少约3倍、至少约4倍、至少约5倍、至少约6倍、至少约7倍、至少约8倍、至少约9倍、至少约10倍、至少约15倍、至少约20倍、至少约25倍、至少约30倍、至少约35倍、至少约40倍、至少约45倍、或至少约50倍或更多。

[0017] 在一些方面,基于脂质纳米颗粒的疗法的耐受性增加与肝毒性降低相关联。在一些方面,在施用后,与在参考受试者中观察到的对应肝毒性相比,受试者表现出肝毒性降低。在一些方面,与参考受试者的肝毒性相比,受试者中的肝毒性降低至少约5%、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%。

[0018] 在一些方面,在施用后,与在参考受试者的肝脏中观察到的对应表达相比,受试者表现出异源蛋白在肝脏中的表达降低。

[0019] 在一些方面,在施用后,与在参考受试者的肝脏中观察到的量相比,在受试者的肝脏中表达的异源蛋白的量减少至少约5%、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%。在一些方面,在施用后,与在参考受试者的肝脏中观察到的持续时间相比,异源蛋白在受试者的肝脏中表达的持续时间缩短至少约5%、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%。在一些方面,与在参考受试者的非肝组织中观察到的量相比,在受试者的非肝组织中表达的异源蛋白的量为至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或至少约100%或更多。在一些方面,与参考受试者相比,异源蛋白在受试者的非肝组织中表达的持续时间为至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或至少约100%。

[0020] 本文提供了一种产生与肝毒性降低相关联的基于脂质纳米颗粒的疗法的方法,所述方法包括组合(i)包含一种或多种类型的脂质的脂质纳米颗粒和(ii)源自委内瑞拉马脑炎(VEE)病毒的复制子(“VEE复制子”),其中所述VEE复制子包含编码异源蛋白的核酸序列。

[0021] 在本文提供的任何方法中,在一些方面,VEE复制子具有如SEQ ID NO:187所示的核苷酸序列。在一些方面,异源蛋白包括细胞因子、抗体或其抗原结合片段、嵌合抗原受体或它们的组合。在一些方面,细胞因子包含白介素(IL)-12蛋白。

[0022] 在一些方面,VEE复制子的核酸序列包含:(i)编码IL-12β亚基并且与SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:58、SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:71、SEQ ID NO:72、SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:74或SEQ ID NO:75中所示的序列具有至少约75%、至少约76%、至少约77%、至少约78%、至少约79%、至少约80%、至少约81%、至少约82%、至少约83%、至少约84%、至少约85%、至少约86%、至少约87%、至少约88%、至少约89%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约

100％序列同一性的核苷酸序列;(ii)编码IL-12α亚基并且与SEQ ID NO:101、SEQ ID NO:102、SEQ ID NO:103、SEQ ID NO:104、SEQ ID NO:105、SEQ ID NO:106、SEQ ID NO:107、SEQ ID NO:108、SEQ ID NO:109、SEQ ID NO:110、SEQ ID NO:111、SEQ ID NO:112、SEQ ID NO:113、SEQ ID NO:114、SEQ ID NO:115、SEQ ID NO:116、SEQ ID NO:117、SEQ ID NO:118、SEQ ID NO:119、SEQ ID NO:120、SEQ ID NO:121、SEQ ID NO:122、SEQ ID NO:123、SEQ ID NO:124或SEQ ID NO:125中所示的序列具有至少约77％、至少约78％、至少约79％、至少约80％、至少约81％、至少约82％、至少约83％、至少约84％、至少约85％、至少约86％、至少约87％、至少约88％、至少约89％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％、至少约99％或约100％同一性的核苷酸序列;或(iii)(i)和(ii)两者。

[0023] 在一些方面,细胞因子不包含IL-12蛋白。

[0024] 在一些方面,一种或多种类型的脂质包括可电离脂质、阳离子脂质、类脂、磷脂、甾醇或它们的组合。在一些方面,一种或多种类型的脂质包括TT3、1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DOPE)、胆固醇、C14-PEG2000或它们的组合。在一些方面,一种或多种类型的脂质是TT3。在一些方面,C14-PEG2000包括1,2-二肉豆蔻酰基-rac-甘油-3-甲氧基聚乙二醇-2000(DMG-PEG2000)、1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-2000](DMPE-PEG2000)或两者。在一些方面,C14-PEG2000嵌入脂质纳米颗粒中。在一些方面,在分离的多核苷酸已被包封在脂质纳米颗粒中之后添加C14-PEG2000。

[0025] 在一些方面,脂质纳米颗粒具有约30-500nm的直径。在一些方面,脂质纳米颗粒具有约50-400nm的直径。在一些方面,脂质纳米颗粒具有约70-300nm的直径。在一些方面,脂质纳米颗粒具有约100-200nm的直径。在一些方面,脂质纳米颗粒具有约100-175nm的直径。在一些方面,脂质纳米颗粒具有约100-160nm的直径。

[0026] 在一些方面,一种或多种类型的脂质与VEE复制子具有约1:2至约15:1的质量比。在一些方面,一种或多种类型的脂质与VEE复制子具有1:2、1:1.5、1:1.2、1:1.1、1:1、1.1:1、1.2:1、1.5:1、2:1、2.5:1、3:1、3.5:1、4:1、4.5:1、5:1、5.5:1、6:1、6.5:1、7:1、7.5:1、8:1、8.5:1、9:1、9.5:1、10:1、10.5:1、11:1、11.5:1、12:1、12.5:1、13:1、13.5:1、14:1、14.5:1或15:1的质量比。

[0027] 在一些方面,VEE复制子包含5'帽。

[0028] 在一些方面,VEE复制子进一步包含调节元件。在一些方面,调节元件选自由以下组成的组:至少一个翻译增强子元件(TEE)、翻译起始序列、至少一个微RNA结合位点或其种子、连接核苷的3'加尾区、富AU元件(ARE)、转录后控制调节子、5'UTR、3'UTR以及它们的组合。在一些方面,连接核苷的3'加尾区包含poly-A尾、polyA-G四联体或茎环序列。

[0029] 在一些方面,VEE复制子包含至少一个经修饰的核苷。在一些方面,至少一个经修饰的核苷选自由以下组成的组:6-氮杂-胞苷、2-硫代-胞苷、α-硫代-胞苷、假-异-胞苷、5-氨基烯丙基-尿苷、5-碘-尿苷、N1-甲基-假尿苷、5,6-二氢尿苷、α-硫代-尿苷、4-硫代-尿苷、6-氮杂-尿苷、5-羟基-尿苷、脱氧-胸苷、假-尿苷、肌苷、α-硫代-鸟苷、8-氧代-鸟苷、06-甲基-鸟苷、7-脱氮-鸟苷、N1-甲基-腺苷、2-氨基-6-氯-嘌呤、N6-甲基-2-氨基-嘌呤、6-氯-嘌呤、N6-甲基-腺苷、α-硫代-腺苷、8-叠氮-腺苷、7-脱氮-腺苷、吡咯-胞苷、5-甲基-胞苷、N4-乙酰基-胞苷、5-甲基-尿苷、5-碘-胞苷以及它们的组合。

[0030] 在一些方面,一种或多种类型的脂质与VEE复制子具有约10:1的质量比。

[0031] 在一些方面,脂质纳米颗粒经由肿瘤内、鞘内、肌肉内、静脉内、皮下、吸入、皮内、淋巴内、眼内、腹膜内、胸膜内、脊柱内、血管内、鼻内、经皮、舌下、粘膜下、透皮或透粘膜施用而施用至受试者。

[0032] 在本文提供的任何方法中,在一些方面,该方法还包括向受试者施用至少一种额外的治疗剂。在一些方面,至少一种额外的治疗剂包括化疗药物、靶向抗癌疗法、溶瘤药物、细胞毒性剂、基于免疫的疗法、细胞因子、手术程序、辐射程序、共刺激分子活化剂、免疫检查点抑制剂、疫苗、细胞免疫疗法或它们的任何组合。在一些方面,免疫检查点抑制剂包括抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、抗LAG-3抗体、抗CTLA-4抗体、抗GITR抗体、抗TIM3抗体或它们的任何组合。

附图说明

[0033] 图1提供了静脉内施用以下之一后小鼠肝脏中发光表达的比较:(1)不具有任何VEE复制子的RNA(RNA-无VEE),(2)具有VEE复制子的RNA(RNA-VEE),和(3)PBS。为了比较,还提供了肾、脾和肺中的发光表达。

[0034] 图2A和2B提供了单次静脉内施用LNP1或LNP2后小鼠肝脏中td-Tomato蛋白荧光表达的比较。LNP1和LNP2均负载有mRNA,所述mRNA具有VEE复制子并编码与核定位信号融合的Cre重组酶(Cre-NLS)。对照动物接受PBS的施用。在图2A中,荧光表达显示为辐射效率百分比(相对于对照归一化)。在图2B中,荧光表达显示为平均辐射效率。在这两个图中,每个符号代表一个测量的器官,并且误差条代表平均值的标准误差。使用双尾非配对学生t检验对LNP组与对照组之间的荧光强度差异进行统计分析(N=3)。

[0035] 图3A和3B提供了单次静脉内施用LNP3、LNP4、LNP5或LNP6后小鼠肝脏中td-Tomato蛋白荧光表达的比较。LNP3-LNP6中的每一者负载有mRNA,所述mRNA不具有任何VEE复制子(RNA-无VEE)并编码与核定位信号融合的Cre重组酶(Cre-NLS)。对照动物接受PBS的施用。在图3A中,荧光表达显示为平均辐射效率百分比(相对于对照归一化)。在图3B中,荧光表达显示为平均辐射效率。

[0036] 图4A和4B提供了单次静脉内施用LNP7或LNP3后小鼠肝脏中td-Tomato蛋白荧光表达的比较。LNP3和LNP7两者负载有mRNA,所述mRNA不具有任何VEE复制子(RNA-无VEE)并编码与核定位信号融合的Cre重组酶(Cre-NLS)。对照动物接受PBS的施用。在图4A中,荧光表达显示为辐射效率百分比(相对于对照归一化)。在图4B中,荧光表达显示为平均辐射效率。

[0037] 图5A和5B提供了在单次施用LNP8、LNP9或LNP2后小鼠肝脏中萤火虫荧光素酶表达的比较,所述LNP8、LNP9或LNP2均负载有具有VEE复制子并编码萤火虫荧光素酶的mRNA。向动物静脉内(IV)或肿瘤内(IT)施用LNP8。向动物静脉内施用LNP9和LNP2。对照动物接受PBS的施用。在图5A中,荧光素酶表达显示为辐射度百分比(相对于对照归一化)。在图5B中,荧光素酶表达显示为平均辐射度。在这两个图中,每个符号代表一个测量的器官,并且误差条代表平均值的标准误差。

[0038] 图6A和6B提供了在单次静脉内施用LNP8、LNP9或LNP2(均负载有mRNA,所述mRNA不具有任何VEE复制子(RNA-无VEE)并编码萤火虫荧光素酶)后小鼠肝脏中萤火虫荧光素酶表达的比较。对照动物接受PBS的施用。在图6A中,荧光素酶表达显示为辐射度百分比(相对于

对照归一化)。在图6B中,荧光素酶表达显示为平均辐射度。在这两个图中,每个符号代表一个测量的器官,并且误差条代表平均值的标准误差。使用双尾非配对学生t检验对LNP组与对照组之间的生物发光强度差异进行统计分析(N=5)。

[0039] 图7A和7B提供了在单次施用(a)负载有不具有任何VEE复制子(RNA-无VEE)并编码萤火虫荧光素酶的mRNA的LNP8或(b)负载有具有VEE复制子并编码萤火虫荧光素酶的mRNA的LNP8后小鼠肝脏中萤火虫荧光素酶表达的比较。在图7A中,荧光素酶表达显示为辐射度百分比(相对于对照归一化)。在图7B中,荧光素酶表达显示为平均辐射度。在这两个图中,每个符号代表一个测量的器官,并且误差条代表平均值的标准误差。使用双尾非配对学生t检验对LNP组与对照组之间的生物发光强度差异进行统计分析。

具体实施方式

[0040] 本公开涉及脂质纳米颗粒(LNP)和此类LNP在受试者中选择性地递送有效载荷(例如,异源蛋白)的用途。更具体地,本公开的LNP包含(i)一种或多种类型的脂质,和(ii)源自委内瑞拉马脑炎(VEE)病毒的复制子("VEE复制子"),其中所述VEE复制子包含编码有效载荷的核酸序列。如本文所证明的,在一些方面,当施用至受试者时,本文所述的LNP能够选择性地避免和/或防止所编码的有效载荷在受试者的肝脏内的表达。因此,在一些方面,与本领域可用的其他递送平台相比,本公开的LNP与肝毒性降低相关联。贯穿本申请提供了本公开的额外的方面。

[0041] 在更详细地描述本公开之前,应当理解,本公开不限于所描述的特定组合物或方法步骤,因此此类组合物或方法步骤当然可变化。本领域技术人员在阅读本公开时将显而易见的是,本文所描述且说明的各个单独方面具有离散的组分和特征,所述组分和特征可容易地与任何另外的若干方面的特征分离或组合而不偏离本公开的范围或精神。任何列举的方法可以列举的事件的顺序或以逻辑上可能的任何其他顺序来执行。

[0042] 本文提供的标题不是本公开的各个方面的限制,其可通过参考作为整体的说明书来定义。还应理解,本文使用的术语仅出于描述特定方面的目的,并且并不意图是限制性的,因为本公开的范围将仅受所附权利要求限制。

[0043] I.定义

[0044] 除非另外定义,否则本文所用的所有技术术语和科学术语具有与本公开所属领域的普通技术人员通常所理解的含义相同的含义。在发生冲突的情况下,以本申请(包括定义)为准。除非上下文另有要求,否则单数术语应包括复数且复数术语应包括单数。

[0045] 在整个本公开中,术语"一个"或"一种"实体是指一个(种)或多个(种)所述实体;例如,"一种多核苷酸"应理解为表示一种或多种多核苷酸。因此,术语"一个"或("一种")、"一个(种)或多个(种)"和"至少一个(种)"在本文中可互换使用。

[0046] 此外,在本文中使用时将"和/或"视为对两个指定特征或组分中的每一个具有或不具有另一个的具体公开。因此,如本文在短语诸如"A和/或B"中使用的术语"和/或"旨在包括"A和B"、"A或B"、"A"(单独)和"B"(单独)。同样,如在短语诸如"A、B和/或C"中使用的术语"和/或"旨在涵盖以下方面中的每一个:A、B和C;A、B或C;A或C;A或B;B或C;A和C;A和B;B和C;A(单独);B(单独);以及C(单独)。

[0047] 应当理解,本文无论在何处用措辞"包含(comprising)"来描述方面,都还提供了

以“由……组成”和/或“基本上由……组成”描述的其他类似方面。

[0048] 术语“约”在本文中用于意指近似、大致、约或在……左右。当所述术语与数值范围结合使用时,其通过使边界延伸高于和低于阐述的数值来修饰那个范围。一般来说,除非另有说明,否则术语“约”在本文中用于以高于和低于值10%上下(升高或降低)的变化来修饰数值。

[0049] 在数字或一系列数字之前的术语“至少”应理解为包括与术语“至少”相邻的数字,以及逻辑上可以包括的所有后续数字或整数,从上下文可以清楚地看出。例如,核酸分子中核苷酸的数目必须是整数。例如,“21个核苷酸的核酸分子的至少18个核苷酸”意味着18、19、20或21个核苷酸具有指定的性质。当至少出现在一系列数字或范围之前时,应理解,“至少”可以修饰所述系列或范围中的每一个数字。“至少”也不限于整数(例如,“至少5%”包括5.0%、5.1%、5.18%,而不考虑有效数字的数目)。

[0050] 如本文所用,术语“源自”是指从特定分子或生物体中分离或使用特定分子或生物体制备的组分,或来自特定分子或生物体的信息(例如,氨基酸或核酸序列)。例如,源自第二核酸序列的核酸序列可包括与第二核酸序列的核苷酸序列同一或基本相似的核苷酸序列。在核苷酸或多肽的情况下,来源物种可通过例如天然存在的诱变、人工定向诱变或人工随机诱变获得。用于获得核苷酸或多肽的诱变可以是有意定向的或有意随机的,或两者的混合。核苷酸或多肽的诱变以产生源自第一核苷酸或多肽的不同核苷酸或多肽可以是随机事件(例如,由聚合酶失真引起)并且可通过适当的筛选方法(例如,如本文所述)来鉴定来源核苷酸或多肽。在一些方面,源自第二核苷酸或氨基酸序列的核苷酸或氨基酸序列分别与第二核苷酸或氨基酸序列具有至少约50%、至少约51%、至少约52%、至少约53%、至少约54%、至少约55%、至少约56%、至少约57%、至少约58%、至少约59%、至少约60%、至少约61%、至少约62%、至少约63%、至少约64%、至少约65%、至少约66%、至少约67%、至少约68%、至少约69%、至少约70%、至少约71%、至少约72%、至少约73%、至少约74%、至少约75%、至少约76%、至少约77%、至少约78%、至少约79%、至少约80%、至少约81%、至少约82%、至少约83%、至少约84%、至少约85%、至少约86%、至少约87%、至少约88%、至少约89%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%的序列同一性,其中第一核苷酸或氨基酸序列保留第二核苷酸或氨基酸序列的生物活性。

[0051] “核酸”、“核酸分子”、“核苷酸序列”、“核酸序列”、“多核苷酸”及其语法变化形式可互换使用并且是指呈单链形式或双链螺旋形式的核糖核苷(腺苷、鸟苷、尿苷或胞苷;“RNA分子”)或脱氧核糖核苷(脱氧腺苷、脱氧鸟苷、脱氧胸苷或脱氧胞苷;“DNA分子”)的磷酸酯聚合形式或其任何磷酸酯类似物,诸如硫代磷酸酯和硫酯。单链核酸序列是指单链DNA(ssDNA)或单链RNA(ssRNA)。双链DNA-DNA、DNA-RNA和RNA-RNA螺旋是可能的。术语核酸分子,特别是DNA或RNA分子,仅指分子的一级和二级结构,并且不将其限制于任何特定的三级形式。因此,这一术语包括尤其见于线性或环状DNA分子(例如,限制片段)、质粒、超螺旋DNA和染色体中的双链DNA。在讨论特定双链DNA分子的结构时,在本文中可根据仅沿非转录DNA链(即,具有与mRNA同源的序列的链)以5’至3’方向给出序列的正常惯例来描述序列。“重组DNA分子”是经过分子生物学操作的DNA分子。DNA包括但不限于cDNA、基因组DNA、质粒DNA、合成DNA和半合成DNA。本公开的“核酸组合物”包含一种或多种如本文所述的核酸。如本文

所述,本公开的多核苷酸包含DNA、RNA或两者。在一些方面,术语“多核苷酸”包括聚脱氧核糖核苷酸(含有2-脱氧-D-核糖)、聚核糖核苷酸(含有D-核糖),包括tRNA、rRNA、shRNA、siRNA、miRNA和mRNA,无论是剪接的还是未剪接的;为嘌呤或嘧啶碱基的N-或C-糖苷的任何其他类型的多核苷酸;以及含有正核苷酸主链的其他聚合物,例如聚酰胺(例如,肽核酸“PNA”)和聚吗啉代聚合物;以及其他合成的序列特异性核酸聚合物,条件是所述聚合物含有呈允许碱基配对和碱基堆积,如在DNA和RNA中发现的构型的核碱基。

[0052] 如本文所用,术语“复制子”是指包含允许多核苷酸在所关注的细胞中复制的复制起点的多核苷酸。如本文进一步所述,在一些方面,复制子是自我复制mRNA(即,能够指导其自身在靶细胞内的扩增或复制)(本文也称为“repRNA”或“RNA-VEE”)。为了指导其自身的扩增,RNA分子应编码催化RNA扩增所必需的酶(例如,甲病毒非结构蛋白nsP1、nsP2、nsP3、nsP4),并且还含有复制所需的顺式RNA序列,这些序列被所编码的酶识别和利用。甲病毒RNA载体复制子应包含以下有序元件:非结构蛋白介导的扩增所需的5’病毒或细胞序列(也可称为5’CSE,或5’顺式复制序列,或复制所需的顺式5’病毒序列,或能够启动甲病毒转录的5’序列);当表达时编码生物活性甲病毒非结构蛋白(例如,nsP1、nsP2、nsP3、nsP4)的序列;以及非结构蛋白介导的扩增所需的3’病毒或细胞序列(也可称为3’CSE,或复制所需的顺式3’病毒序列,或甲病毒RNA聚合酶识别序列)。甲病毒RNA载体复制子可以含有表达一个或多个异源序列的手段,诸如例如IRES或病毒(例如,甲病毒)亚基因组启动子(例如,连接区启动子),在某些方面,可对其进行修饰,以增加或减少亚基因组片段的病毒转录,或降低与有缺陷的辅助蛋白或结构蛋白表达盒的同源性,以及待表达的一个或多个异源序列。复制子还可以含有额外的序列,例如,编码一种或多种多肽(例如,蛋白质编码基因或3’近端基因)和/或聚腺苷酸束的一个或多个异源序列。复制子不应含有编码所有甲病毒结构蛋白(衣壳、E1、E2)的序列。可由复制子载体表达的异源序列的非限制性示例描述于例如美国专利号6,015,686(通过引用以其整体并入本文)中,并且包括例如抗原、淋巴因子、细胞因子等。如从本公开内容显而易见的,本文提供的VEE复制子是repRNA。因此,“VEE复制子”、“RNA-VEE”和“repRNA”在本申请中可互换使用。另外,术语“不具有任何VEE复制子的mRNA”、“不具有任何VEE复制子的RNA”和“RNA-无VEE”在本文中可与术语“modRNA”互换使用。

[0053] 术语“药学上可接受的载剂”、“药学上可接受的赋形剂”及其语法变化形式涵盖美国联邦政府的监管机构批准的或美国药典中列出的用于包括人类在内的动物的任何剂,以及不会导致产生以至于禁止向受试者施用所述组合物的程度的不希望的生理效应并且不会消除所施用的化合物的生物活性和性质的任何载剂或稀释剂。包括可用于制备药物组合物并且通常是安全、无毒且合乎需要的赋形剂和载剂。

[0054] 如本文所用,术语“药物组合物”是指本文所述的一种或多种化合物,诸如例如与一种或多种其他化学组分(诸如药学上可接受的载剂和赋形剂)混合或掺混或悬浮在其中的本公开的多核苷酸。

[0055] 术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用以指例如由本文所述的多核苷酸编码的任何长度的氨基酸的聚合物。聚合物可以包含经修饰的氨基酸。所述术语还涵盖已天然或通过干预修饰的氨基酸聚合物;例如,二硫键形成、糖基化、脂化、乙酰化、磷酸化或任何其他操作或修饰,如与标记组分缀合。定义中还包括例如含有一种或多种氨基酸类似物(包括,例如非天然氨基酸,诸如高半胱氨酸、鸟氨酸、对乙酰基苯丙氨酸、D-氨基酸和

肌酸)以及本领域已知的其他修饰的多肽。如本文所用,术语“多肽”是指具有任何大小、结构或功能的蛋白质、多肽和肽。

[0056] 多肽包括基因产物、天然存在的多肽、合成多肽、同源物、直向同源物、横向同源物、前述的片段和其他等效物、变体和类似物。

[0057] 多肽可以是单个多肽或者可以是多分子复合物,诸如二聚体、三聚体或四聚体。它们还可以包含单链或多链多肽。最常见地,二硫键存在于多链多肽中。术语多肽还可应用于氨基酸聚合物,其中一个或多个氨基酸残基是相应的天然存在的氨基酸的人工化学类似物。在一些方面,“肽”可以为小于或等于约50个氨基酸长,例如,约5、约10、约15、约20、约25、约30、约35、约40、约45或约50个氨基酸长。

[0058] 术语“编码序列”或序列“编码”在本文中用于意指“编码”特定蛋白质(例如诸如IL-12)的DNA或RNA区域(转录区)。当置于合适的调节区(诸如启动子)的控制下时,编码序列在体外或体内被转录(DNA)和翻译(RNA)到多肽中。编码序列的边界由5’(氨基)末端处的起始密码子和3’(羧基)末端处的翻译终止密码子决定。编码序列可以包括但不限于来自原核生物或真核生物的cDNA、来自原核生物或真核生物的基因组DNA和合成DNA序列。转录终止序列可以位于编码序列的3’。

[0059] Kozak共有序列,Kozak共有或Kozak序列,被称为出现在真核mRNA上并且具有共有(gcc)gccRccAUGG(SEQ ID NO:174)的序列,其中R是起始密码子(AUG)上游三个碱基的嘌呤(腺嘌呤或鸟嘌呤),其后面是另一个“G”。在一些方面,多核苷酸包含与Kozak共有序列具有至少约95%或更高,例如至少99%序列同一性的核酸序列。在一些方面,多核苷酸包含Kozak共有序列。

[0060] 术语“RNA”在本文中用于意指包含至少一个核糖核苷酸残基的分子。“核糖核苷酸”涉及在β-D-呋喃核糖基的2’-位具有羟基的核苷酸。该术语包括双链RNA、单链RNA、分离的RNA诸如部分或完全纯化的RNA、基本上纯的RNA、合成的RNA、重组生成的RNA(其通过添加、缺失、取代和/或改变一个或多个核苷酸而与天然存在的RNA不同)。术语“mRNA”意指“信使-RNA”,并且涉及通过使用DNA模板生成并编码肽或蛋白质的“转录物”。通常,mRNA包含5’-UTR、蛋白质编码区和3’-UTR。mRNA在细胞和体外仅具有有限的半衰期。在本公开的上下文中,可以通过从DNA模板体外转录生成mRNA。体外转录方法是技术人员已知的。例如,存在各种可商购获得的体外转录试剂盒。在本公开的一些方面,RNA,优选mRNA,用5’-帽结构修饰。

[0061] 如本文所用,术语“同一性”(例如,序列同一性)是指聚合物分子之间,例如多核苷酸分子之间的总体单体保守性。没有任何额外限定符的术语“同一的”,例如,多核苷酸A与多核苷酸B相同,意味着多核苷酸序列是100%相同的(100%序列同一性)。将两个序列描述为例如“70%相同”等同于将它们描述为具有例如“70%序列同一性”。

[0062] 两个多肽或多核苷酸序列之间的百分比同一性的计算,例如,可以通过为了最佳比较目的而比对所述两个序列来进行(例如,为了最佳比对可在第一多肽或多核苷酸序列和第二多肽或多核苷酸序列中的一者或两者中引入空位并且为了比较的目的可忽视不相同的序列)。在一些方面,出于比较目的比对的序列的长度是参考序列的长度的至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%或100%。然后比对相应氨基酸位置的氨基酸,或在多核苷酸的情况下碱基进行比较。

[0063] 当第一序列中的位置在第二序列中被与对应位置相同的氨基酸或核苷酸占据时，则分子在该位置上相同。两个序列之间的同一性百分比随将为了两个序列的最优比对而需要引入的空位的数目和每个空位的长度考虑在内，由所述序列共有的相同位置的数目而变化。两个序列之间的序列的比较和同一性百分比的确定可使用数学算法来完成。

[0064] 可用于比对不同序列(例如多核苷酸序列)的合适软件程序可获自各种来源。确定百分比序列同一性的一种合适的程序是bl2seq，其为可从美国政府国立生物技术信息中心(U.S.government's National Center for Biotechnology Information)BLAST网站(blast.ncbi.nlm.nih.gov)获得的BLAST程序组(suite of program)的一部分。Bl2seq使用BLASTN或BLASTP算法在两个序列之间进行比较。BLASTN用于比较核酸序列，而BLASTP用于比较氨基酸序列。其他合适的程序是例如Needle、Stretcher、Water或Matcher、生物信息学程序的EMB OSS套件的一部分，并且也可从worldwideweb.ebi.ac.uk/Tools/psa的欧洲生物信息学研究所(EBI)获得。

[0065] 序列比对可使用本领域已知的方法进行，诸如MAFFT、Clustal(ClustalW、Clustal X或Clustal Omega)、MUSCLE等。

[0066] 与多核苷酸或多肽参考序列比对的单个多核苷酸或多肽靶序列内的不同区域可各自具有它们自己的百分比序列同一性。应注意，序列同一性百分比值四舍五入至最接近的十分位。例如，80.11、80.12、80.13和80.14向下舍入到80.1，而80.15、80.16、80.17、80.18和80.19向上舍入到80.2。还应注意，长度值将始终是整数。

[0067] 在一些方面，第一氨基酸序列(或核酸序列)与第二氨基酸序列(或核酸序列)的百分比同一性(％ID)计算为％ID＝100x(Y/Z)，其中Y是在第一序列和第二序列的比对(如通过目视检查或特定序列比对程序比对)中评分为相同匹配的氨基酸残基(或核碱基)的数目，并且Z是第二序列中残基的总数。如果第一序列的长度长于第二序列，则第一序列与第二序列的百分比同一性将高于第二序列与第一序列的百分比同一性。

[0068] 本领域技术人员将理解，用于计算序列同一性百分比的序列比对的生成不限于仅由一级序列数据驱动的二进制序列-序列比较。还应理解，序列比对可通过将序列数据与来自异构源的数据如结构数据(例如，晶体学蛋白质结构)、功能数据(例如，突变的位置)或系统发育数据整合而产生。整合异构数据以生成多重序列比对的合适程序是可在www.tcoffee.org获得且可替代地可例如从EBI获得的T-Coffee。还应理解，用于计算百分比序列同一性的最终比对可自动地或人工地加以验证。

[0069] 如本文所用，术语“分离的”、“纯化的”、“提取的”及其语法变体可互换地使用并且是指已进行一个或多个纯化过程的本公开的期望组合物，例如本公开的多核苷酸的制备状态。在一些方面，如本文所用，分离或纯化是从含有污染物的样品中去除、部分去除(例如，一部分)本公开的组合物的工艺。

[0070] 如本文所用，术语“表达”是指多核苷酸产生基因产物，例如RNA或多肽(例如治疗性蛋白质，例如冠状病毒蛋白)的过程。它包括但不限于将多核苷酸转录成微RNA结合位点、小发夹RNA(shRNA)、小干扰RNA(siRNA)或任何其他RNA产物。它包括但不限于将多核苷酸转录成信使RNA(mRNA)和将mRNA翻译成多肽。表达产生“基因产物”。如本文所用，基因产物可以是例如核酸，诸如通过基因的转录产生的RNA。如本文所用，基因产物可以是由基因的转录产生的核酸、RNA或miRNA，或从转录物翻译的多肽。本文所述的基因产物还包括具有转录

后修饰的核酸,所述修饰例如为聚腺苷酸化或剪接;或具有翻译后修饰的多肽,所述修饰例如为磷酸化、甲基化、糖基化、添加脂质、与其他蛋白质亚基缔合或蛋白水解裂解。

[0071] 关于分别作为较大多肽或多核苷酸的一部分的多肽部分或多核苷酸部分的“异源”描述了源于与多肽或多核苷酸分子的剩余部分不同的多肽或多核苷酸的多肽或多核苷酸。多肽或多核苷酸的额外的异源组分可以分别来源于与本文所述的剩余多肽或多核苷酸相同的生物体,或者额外的组分可以来自不同的生物体。例如,异源多肽可以是合成的,或源自不同物种、个体的不同细胞类型或不同个体的相同或不同类型的细胞。如本文所述,由本文所述的多核苷酸的ORF编码的蛋白质(或多肽)对所述多核苷酸来说是异源的。

[0072] 术语“半衰期”涉及消除分子的一半活性、量或数目所需的时间段。在本公开的上下文中,RNA的半衰期指示所述RNA的稳定性。疾病的“出现”或“进展”意指疾病的初始表现和/或随后的进展。疾病的出现可以是可检测到的并且可以使用如本领域所熟知的标准临床技术进行评估。然而,出现还指可能无法检测到的进展。如本文所用,出现或进展是指症状的生物学过程。出现包括发生、复发和发作。如本文所用,靶疾病或病症的发作或发生包括初始发作和/或复发。

[0073] II.本公开的方法

[0074] II.A.选择性表达的方法

[0075] 本公开总体上涉及使用脂质纳米颗粒(LNP)将有效载荷(在本文中也称为“生物活性分子”)递送至细胞。可用于本公开的LNP已经被修饰或工程化,使得LNP表现出组织特异性向性。如本文所用,“组织特异性向性”是指LNP靶向特定组织而不靶向其他组织的能力。例如,如本文所证明的,本文所述的LNP能够在非肝组织(例如,脾和肺)中诱导有效载荷的表达,但不能在肝中诱导有效载荷的表达。不受任何一种理论的束缚,申请人已经鉴定,对LNP进行修饰或工程化以包含源自委内瑞拉马脑炎(VEE)病毒的复制子(“VEE复制子”)允许选择性地递送有效载荷,使得有效载荷在肝脏中的表达被避免或减少。

[0076] 因此,在一些方面,本文提供了一种减少或避免有效载荷(例如,异源蛋白)在有需要的受试者的肝脏中表达的方法,所述方法包括向所述受试者施用脂质纳米颗粒,所述脂质纳米颗粒包含(i)一种或多种类型的脂质,和(ii)源自委内瑞拉马脑炎(VEE)病毒的复制子(“VEE复制子”),其中所述VEE复制子包含编码所述有效载荷的核酸序列。

[0077] 在一些实施方案中,有效载荷的表达被完全避免(即,在施用后有效载荷不在肝脏中表达)。在一些方面,与受试者内的非肝组织(例如,脾和肺)相比,肝脏中有效载荷的表达减少。例如,在一些方面,在施用后,与非肝组织中的对应表达相比,肝脏中有效载荷的表达减少至少约5%、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%。在一些方面,与参考受试者(例如,接受不包含VEE复制子的对应脂质纳米颗粒的受试者)的肝脏中有效载荷的表达相比,肝脏中有效载荷的表达减少。在一些方面,在施用后,与参考受试者的肝脏中的对应表达相比,肝脏中有效载荷的表达减少至少约5%、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%。

[0078] 如本文所用,“减少表达”是指(i)在组织(例如,肝)中表达的有效载荷的总量降低;(ii)有效载荷在组织(例如,肝)中表达的时间(即,持续时间)缩短;或(iii)(i)和(ii)两者。

[0079] 因此,在一些方面,在施用本文所述的LNP(例如,包含编码有效载荷的VEE复制子)之后,与非肝组织(例如,脾和肺)相比,在肝中表达的有效载荷的总量减少。在一些方面,与非肝组织中的对应量相比,在肝脏中表达的有效载荷的总量减少至少约5%、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%。在一些方面,与在参考受试者(例如,接受不包含VEE复制子的对应脂质纳米颗粒的受试者)的肝脏中表达的有效载荷的总量相比,在肝脏中表达的有效载荷的总量减少。在一些方面,在施用本文所述的LNP(例如,包含含有编码有效载荷的核酸序列的VEE复制子)之后,与参考受试者的肝脏中的对应量相比,在肝脏中表达的有效载荷的总量减少至少约5%、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%。

[0080] 如本文所述,在一些方面,在施用本文所述的LNP(例如,包含含有编码有效载荷的核酸序列的VEE复制子)之后,有效载荷在肝脏中仅瞬时表达,例如,与非肝组织中的对应表达相比和/或与参考受试者(例如,接受不包含VEE复制子的对应脂质纳米颗粒的受试者)的肝脏中的对应表达相比。因此,在一些方面,施用本公开的LNP导致与非肝组织(例如,脾和肺)相比,肝脏中有效载荷表达的持续时间缩短。在一些方面,与非肝组织中的对应持续时间相比,肝脏中有效载荷表达的持续时间缩短至少约5%、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%。在一些方面,在向有需要的受试者施用本文所述的LNP(例如,包含含有编码有效载荷的核酸序列的VEE复制子)之后,与参考受试者(例如,接受不包含VEE复制子的对应脂质纳米颗粒的受试者)的肝脏中有效载荷表达的持续时间相比,受试者的肝脏中有效载荷表达的持续时间缩短。在一些方面,与参考受试者的肝脏中的对应持续时间相比,受试者的肝脏中有效载荷表达的持续时间缩短至少约5%、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%。

[0081] 在一些方面,在施用本文所述的LNP(例如,包含含有编码有效载荷的核酸序列的VEE复制子)之后,与非肝组织(例如,脾和肺)相比,肝脏中(i)所表达的有效载荷的总量和(ii)有效载荷表达的持续时间均减少。在一些方面,与非肝组织中的对应值相比,(i)所表达的有效载荷的总量和(ii)有效载荷表达的持续时间均减少至少约5%、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%。在一些方面,在施用本文所述的LNP(例如,包含含有编码有效载荷的核酸序列的VEE复制子)之后,与参考受试者(例如,接受不包含VEE复制子的对应脂质纳米颗粒的受试者)的肝脏中的对应值相比,肝脏中(i)所表达的有效载荷的总量和(ii)有效载荷表达的持续时间均减少。在一些方面,与参考受试者的肝脏中的对应值相比,(i)所表达的有效载荷的总量和(ii)有效载荷表达的持续时间均减少至少约5%、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%。

[0082] 如从本公开内容显而易见的,在一些方面,与参考受试者(例如,接受不包含VEE复制子的对应脂质纳米颗粒的受试者)中的对应表达相比,本文所述的LNP对非淋巴组织中有效载荷的表达具有最小的影响。因此,在一些方面,在施用后,与在参考受试者的非肝组织中观察到的总量相比,在受试者的非肝组织中表达的有效载荷的总量为至少约90%、至少

约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％、至少约99％或至少约100％或更多。在一些方面，在施用本文所述的LNP(例如，接受不包含VEE复制子的对应脂质纳米颗粒的受试者)之后，与在参考受试者的非肝组织中观察到的持续时间相比，非肝组织中有效载荷表达的持续时间为至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％、至少约99％或至少约100％。

[0083] 如至少从以上公开内容显而易见的，本公开的一些方面涉及在有需要的受试者的非肝组织中选择性地表达有效载荷(例如，异源蛋白)的方法。在一些方面，此类方法包括向有需要的受试者施用脂质纳米颗粒，所述脂质纳米颗粒包含(i)一种或多种类型的脂质，和(ii)源自委内瑞拉马脑炎(VEE)病毒的复制子(“VEE复制子”)，其中所述VEE复制子包含编码有效载荷的核酸序列，并且其中在施用后，与非肝组织中的对应表达相比，肝脏中的有效载荷表达减少。如本文进一步所述，非肝组织可以包括受试者内除肝以外的任何合适的组织。此类非肝组织的非限制性示例包括脾、肺或两者。如本文所用，“选择性表达”或“优先表达”或其语法变体是指与第二组织(例如，肝)相比，第一组织(例如，非肝组织)中(例如，有效载荷)的表达增加。在一些方面，有效载荷选择性地或优先地在非肝组织中表达，其中与肝脏中的对应表达相比，非肝组织中的表达(例如，有效载荷的总量和/或有效载荷表达的持续时间)增加。在一些实施方案中，有效载荷在非肝组织中的表达与在受试者的其他非肝组织中的对应表达相同。在一些方面，与受试者的其他非肝组织中的对应表达相比，有效载荷在非肝组织中的表达增加。在一些方面，有效载荷在非肝组织中的表达与受试者中的其他非肝组织相比降低，但与肝脏中的对应表达相比增加。

[0084] 如本文所证明的，在一些方面，与肝脏相比，本公开的LNP可用于诱导有效载荷在脾脏中的选择性(或优先)表达。因此，在一些方面，与在肝脏中观察到的对应量相比，在脾脏中表达的有效载荷的总量增加至少约1倍、至少约2倍、至少约3倍、至少约4倍、至少约5倍、至少约6倍、至少约7倍、至少约8倍、至少约9倍、至少约10倍、至少约15倍、至少约20倍、至少约25倍、至少约30倍、至少约35倍、至少约40倍、至少约45倍、至少约50倍、至少约75倍、或至少约100倍或更多。在一些方面，与在肝脏中观察到的对应持续时间相比，脾脏中有效载荷表达的持续时间增加至少约1倍、至少约2倍、至少约3倍、至少约4倍、至少约5倍、至少约6倍、至少约7倍、至少约8倍、至少约9倍、至少约10倍、至少约15倍、至少约20倍、至少约25倍、至少约30倍、至少约35倍、至少约40倍、至少约45倍、至少约50倍、至少约75倍、或至少约100倍或更多。

[0085] 还如本文所证明的，在一些方面，与肝脏相比，本公开的LNP可用于诱导有效载荷在肺中的选择性表达。因此，在一些方面，与在肝脏中观察到的对应量相比，在肺中表达的有效载荷的总量增加至少约1倍、至少约2倍、至少约3倍、至少约4倍、至少约5倍、至少约6倍、至少约7倍、至少约8倍、至少约9倍、至少约10倍、至少约15倍、至少约20倍、至少约25倍、至少约30倍、至少约35倍、至少约40倍、至少约45倍、至少约50倍、至少约75倍、或至少约100倍或更多。在一些方面，与在肝脏中观察到的对应持续时间相比，肺中有效载荷表达的持续时间增加至少约1倍、至少约2倍、至少约3倍、至少约4倍、至少约5倍、至少约6倍、至少约7倍、至少约8倍、至少约9倍、至少约10倍、至少约15倍、至少约20倍、至少约25倍、至少约30倍、至少约35倍、至少约40倍、至少约45倍、至少约50倍、至少约75倍、或至少约100倍或更

多。

[0086] II.B.治疗方法

[0087] 如从本公开内容显而易见的,本文所述的LNP(例如,包含VEE复制子,所述VEE复制子包含编码有效载荷的核酸序列)可用于治疗多种疾病或病症。因此,在一些方面,本文提供了一种治疗有需要的受试者的疾病或病症的方法,所述方法包括向所述受试者施用脂质纳米颗粒,所述脂质纳米颗粒包含(i)一种或多种类型的脂质,和(ii)源自委内瑞拉马脑炎(VEE)病毒的复制子("VEE复制子"),其中所述VEE复制子包含编码所述有效载荷的核酸序列,并且其中在施用后,所述有效载荷优先在所述受试者的非肝组织中表达。在一些方面,在施用LNP后,在非肝组织中表达的有效载荷的量为在受试者的肝脏中观察到的对应量的至少约1倍、至少约2倍、至少约3倍、至少约4倍、至少约5倍、至少约6倍、至少约7倍、至少约8倍、至少约9倍、至少约10倍、至少约15倍、至少约20倍、至少约25倍、至少约30倍、至少约35倍、至少约40倍、至少约45倍、至少约50倍、至少约75倍、或至少约100倍或更多。在一些方面,在施用LNP之后,非肝组织中有效载荷表达的持续时间为在受试者的肝脏中观察到的对应持续时间的至少约1倍、至少约2倍、至少约3倍、至少约4倍、至少约5倍、至少约6倍、至少约7倍、至少约8倍、至少约9倍、至少约10倍、至少约15倍、至少约20倍、至少约25倍、至少约30倍、至少约35倍、至少约40倍、至少约45倍、至少约50倍、至少约75倍、或至少约100倍或更长。

[0088] 本文所述的LNP(例如,包含VEE复制子,所述VEE复制子包含编码有效载荷的核酸序列)可用于治疗本领域已知的任何合适的疾病或病症。可治疗的疾病和病症的非限制性示例包括癌症、炎性病症、单基因病症、神经病症、精神病症或它们的组合。如从本公开内容显而易见的,在一些方面,本文所述的LNP可用于调节(例如,增加或减少)免疫应答。在一些方面,本文所述的LNP可用作疫苗。在一些方面,疾病或病症包括癌症。癌症的非限制性示例包括:黑色素瘤、鳞状细胞癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌、肺鳞状细胞癌、腹膜癌、肝细胞癌、胃肠癌、胰腺癌、胶质母细胞瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、肝细胞瘤、乳腺癌、结肠癌、结直肠癌、子宫内膜癌或子宫癌、唾液腺癌、肾癌、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、肝肿瘤、胃癌、头颈癌或它们的组合。

[0089] 如本公开其他地方进一步所述,在一些方面,与本领域可用的其他递送平台相比,本文所述的LNP允许增加安全性,同时减少不期望的副作用。例如,对于许多过去基于LNP的肿瘤内治疗方法,肝毒性一直是一个重大问题(例如,由于LNP在肝内的积累)。参见,例如,Jain等人,Nucleic Acid Ther 28(5):285-296(Oct.2018),其通过引用以其整体并入本文。不受任何一种理论的束缚,在一些方面,通过避免或减少有效载荷在肝脏内的表达,本文所述的LNP(例如,包含VEE复制子,所述VEE复制子包含编码有效载荷的核酸序列)与肝毒性降低相关联。例如,在一些方面,在施用本文提供的LNP之后,与参考受试者(例如,接受对应的LNP但没有VEE复制子的受试者)相比,受试者中的肝毒性降低。在一些方面,与参考受试者的肝毒性相比,受试者中的肝毒性降低至少约5%、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%。肝毒性可以使用本领域可用的任何合适的方法来测量。在一些方面,可以通过对受试者进行一般毒性评估(例如,临床耐受性和一般健康状况)来评估肝毒性。可用于进行此类评估的非限制性标准包括:受试者的活动、食物消耗、身体评分指数、水合状态以及它们

的组合。在一些方面,可以从受试者获得生物样品(例如,血液或血清),并且可以进行血液学和/或临床化学。例如,在一些方面,可以测量肝转氨酶(ALT/AST)、总胆红素、血清白蛋白或它们的组合的水平。可以将此类测量值与参考值(例如,健康受试者中的对应量)进行比较以评估肝毒性。在一些方面,还可以使用更具侵入性的方法(例如,肝脏的显微镜评估)。

[0090] 如对本领域技术人员显而易见的,在一些方面,降低的肝毒性可以允许施用的LNP的更大耐受性。因此,在一些方面,本文提供了一种在有需要的受试者中增加基于LNP的疗法的耐受性的方法,所述方法包括向所述受试者施用脂质纳米颗粒,所述脂质纳米颗粒包含(i)一种或多种类型的脂质,和(ii)源自委内瑞拉马脑炎(VEE)病毒的复制子("VEE复制子"),其中所述VEE复制子包含编码有效载荷(例如,异源蛋白)的核酸序列。在一些方面,与在参考受试者(例如,接受对应的脂质纳米颗粒但其中复制子不是VEE复制子的受试者)中观察到的对应耐受性相比,基于脂质纳米颗粒的疗法的耐受性在受试者中增加至少约2倍、至少约3倍、至少约4倍、至少约5倍、至少约6倍、至少约7倍、至少约8倍、至少约9倍、至少约10倍、至少约15倍、至少约20倍、至少约25倍、至少约30倍、至少约35倍、至少约40倍、至少约45倍、或至少约50倍或更多。

[0091] 在本公开的一些方面,本文所述的多核苷酸、载体、脂质纳米颗粒和/或药物组合物(本文也统称为"组合物")用于治疗疾病或病症。在一些方面,疾病或病症包括癌症。可治疗的癌症的非限制性示例在本公开的其他地方提供。

[0092] 在一些方面,将有效量的本文所述的任何LNP或包含此类LNP的组合物(本文也统称为"组合物")经由合适的途径(诸如肿瘤内施用、静脉内施用(例如,作为团注或通过一段时间内的连续输注)、通过肌肉内、腹膜内、脑脊液内、皮下、关节内、滑膜内、鞘内、口服、吸入或局部途径)施用至有需要的受试者。包括喷射雾化器和超声雾化器的用于液体调配物的可商购获得的雾化器可用于施用。液体调配物可以雾化,并且冻干粉可以在重构之后雾化。在一些方面,本文所述的药物组合物使用碳氟化合物调配物和计量剂量吸入器来雾化,或者作为冻干和研磨的粉末吸入。在一些方面,本文所述的药物组合物被配制用于肿瘤内注射。在一些方面,本文所述的药物组合物经由局部途径施用至受试者,例如注射到局部部位,诸如肿瘤部位或感染部位。在一些方面,受试者是人。

[0093] 如从本公开将显而易见的,在一些方面,将本文所述的组合物以有效量单独或与一种或多种其他活性剂组合施用至受试者,以赋予治疗效果。在一些方面,将组合物施用至患有癌症的受试者,并且治疗效果包括肿瘤负荷降低、癌细胞减少、免疫活性增加或它们的组合。可以使用本领域已知的任何合适的方法(例如,测量肿瘤体积和/或T细胞活性)来确定施用的组合物(例如,脂质纳米颗粒)是否实现治疗效果。如本领域的技术人员所认识到的,有效量有所不同,这取决于正在治疗的特定病状、病状的严重程度、包括年龄、身体状况、大小、性别和体重在内的个体患者参数、治疗持续时间、同时疗法的性质(如果有的话)、具体施用途径和在健康从业者的专业技能知识内的相似因素。

[0094] 半衰期等经验性考虑通常将有助于确定剂量。施用频率可以在治疗过程中确定并进行调整,并且通常但不一定是基于靶疾病/病症的治疗和/或抑制和/或改善和/或延迟。可替代地,本文所述的组合物(例如,脂质纳米颗粒)的持续释放调配物可能是适当的。用于实现持续释放的各种调配物和装置是本领域已知的。

[0095] 在本公开的一些方面,治疗是本文公开的组合物的单次注射。在一些方面,将单次

注射肿瘤内施用至有需要的受试者。

[0096] 在本公开的一些方面,本文所述的组合物的剂量可以在已被给予组合物(例如,本文所述的脂质纳米颗粒)的一次或多次施用的个体中凭经验确定。在一些方面,给予个体递增剂量的本文所述的组合物。为了评估本文组合物的功效,可以跟踪疾病/病症的指标。对于在若干天或更长时间内的重复施用,取决于病状,在一些方面,持续治疗,直至出现期望的症状抑制或直至达到足以减轻靶疾病或病症或其症状的治疗水平。

[0097] 在本公开的一些方面,给药频率为约每周一次、约每2周一次、约每3周一次、约每4周一次、约每5周一次、约每6周一次、约每7周一次、约每8周一次、约每9周一次或约每10周一次;或约每月一次、约每2个月一次、或约每3个月一次或更长时间。使用的本文所述的组合物(例如,脂质纳米颗粒)的给药方案(例如,剂量和/或给药频率)可以随时间变化。

[0098] 在本公开的一些方面,所述方法包括向有需要的受试者施用一个或多个剂量的本文所述的组合物。

[0099] 组合物(例如,本文所述的脂质纳米颗粒)的适当剂量将取决于特定组合物(例如,脂质纳米颗粒)、疾病/病症(例如,癌症)的类型和严重程度、组合物(例如,脂质纳米颗粒)是出于预防还是治疗目的施用、先前的疗法、受试者的临床病史和对组合物(例如,脂质纳米颗粒)的应答以及主治医生的判断。在一些方面,临床医生可以施用本文公开的组合物,直至达到实现期望结果的剂量。在一些方面,期望的结果是肿瘤负荷降低、癌细胞减少或免疫活性增加。本文所述的一种或多种组合物的施用可以是连续的或间歇的,这取决于例如接受者的生理状况、施用的目的是治疗性的还是预防性的,以及熟练从业者已知的其他因素。本文所述的组合物的施用可以在预选的时间段内基本上是连续的,或者可以例如在出现靶疾病或病症之前、期间或之后采用一系列间隔剂量。

[0100] 如本文所用,减轻靶疾病/病症包括延迟疾病的出现或进展或者降低疾病严重程度。减轻疾病并不一定需要治愈结果。如本文所用,“延迟”靶疾病或病症的出现意指推迟、阻碍、减缓、放缓、稳定和/或延缓疾病的进展。这种延迟可以具有不同的时间长度,这取决于疾病和/或被治疗的受试者的病史。延迟或减轻疾病的出现或者延迟疾病的发作的方法是降低在给定时间帧内出现疾病的一种或多种症状的可能性和/或与不使用所述方法相比在给定时间帧内降低症状的程度的方法。这种比较通常基于临床研究,使用足以给出统计上显著的结果的许多受试者。

[0101] 在一些方面,将本文所述的组合物以足以使体内肿瘤负荷或癌细胞生长减少至少约5%、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%或更多的量施用至有需要的受试者。在一些方面,将本文所述的组合物以使免疫活性增加至少约5%、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%或更高的有效量施用。

[0102] 在一些方面,向受试者施用组合物会增强受试者的免疫活性,诸如T细胞活性。在一些方面,与参考受试者(例如,施用组合物之前的受试者或对施用组合物没有反应性的对应受试者)的免疫活性相比,免疫活性增强或增加至少约0.5倍、至少约1倍、至少约2倍、至少约3倍、至少约4倍、至少约5倍、至少约6倍、至少约7倍、至少约8倍、至少约9倍、至少约10倍、至少约15倍、至少约20倍、至少约25倍、至少约50倍或更多。

[0103] 在一些方面,受试者是患有癌症、疑似患有癌症或处于癌症风险中的人。在一些方面,癌症选自由以下组成的组:黑色素瘤、鳞状细胞癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌、肺鳞状细胞癌、腹膜癌、肝细胞癌、胃肠癌、胰腺癌、胶质母细胞瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、肝细胞瘤、乳腺癌、结肠癌、结直肠癌、子宫内膜癌或子宫癌、唾液腺癌、肾癌、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、肝癌、胃癌和各种类型的头颈癌,包括鳞状细胞头颈癌。在一些方面,癌症可以是黑色素瘤、肺癌、结直肠癌、肾细胞癌、尿路上皮癌或霍奇金淋巴瘤。

[0104] 可以通过常规医学检查(例如,实验室测试、器官功能测试、CT扫描或超声)来鉴定患有靶疾病或病症的受试者。疑似患有靶疾病或病症的受试者可能显示出所述疾病或病症的一种或多种症状。处于疾病或病症风险中的受试者可以是具有与所述疾病或病症相关联的一种或多种风险因素的受试者。还可以通过常规医疗实践来鉴定处于疾病或病症风险中的受试者。

[0105] 在一些方面,将本文所述的组合物与至少一种额外的合适的治疗剂共同施用。在一些方面,至少一种额外的合适的治疗剂包括抗癌剂、抗病毒剂、抗菌剂或其他用于增强和/或补充本文所述的组合物(例如,脂质纳米颗粒)的免疫刺激作用的药剂。可与本文所述的组合物组合使用的额外治疗剂的另外的示例包括:化疗药物、靶向抗癌疗法、溶瘤药物、细胞毒性剂、基于免疫的疗法、细胞因子、手术程序、放射程序、共刺激分子的活化剂、免疫检查点抑制剂、疫苗、细胞免疫疗法或它们的任何组合。在一些方面,将本文所述的组合物和至少一种额外的治疗剂以顺序方式施用至受试者,即,每种治疗剂在不同时间施用。在一些方面,将本文所述的组合物和至少一种额外的治疗剂以基本上同时的方式施用至受试者。

[0106] 本领域技术人员将理解,本文所述的组合物和另一种抗癌剂(例如,化疗剂)的任何组合可以以任何顺序用于治疗癌症。可以基于许多因素选择本文所述的组合,这些因素包括但不限于减少肿瘤形成或肿瘤生长、减少癌细胞、增加免疫活性和/或减轻与癌症相关联的至少一种症状的有效性,或减轻组合中另一种药剂的副作用的有效性。例如,本文所述的组合疗法可以减少与组合的每个个体成员相关联的任何副作用,例如,与抗癌剂相关联的副作用。

[0107] 在一些方面,其他抗癌治疗剂是化学疗法、放射疗法、手术疗法、免疫疗法或它们的组合。在一些方面,化疗剂是卡铂(carboplatin)、顺铂(cisplatin)、多西他赛(docetaxel)、吉西他滨(gemcitabine)、白蛋白结合型紫杉醇(nab-paclitaxel)、培美曲塞(pemetrexed)、长春瑞滨(vinorelbine)或它们的组合。在一些方面,放射疗法是电离辐射、γ辐射、中子束放射疗法、电子束放射疗法、质子疗法、近距离放射疗法、全身放射性同位素、放射增敏剂或它们的组合。在一些方面,手术疗法是治愈性手术(例如,肿瘤去除手术)、预防性手术、腹腔镜手术、激光手术或它们的组合。在一些方面,免疫疗法是过继性细胞转移、治疗性癌症疫苗或它们的组合。

[0108] 在一些方面,化疗剂是铂化剂,诸如卡铂、奥沙利铂(Oxaliplatin)、顺铂、奈达铂(Nedaplatin)、赛特铂(Satraplatin)、洛铂(Lobaplatin)、三铂(Triplatin)、四硝酸酯(Tetranitrate)、吡铂(Picoplatin)、Prolindac、阿罗铂(Aroplatin)和其他衍生物;拓扑异构酶I抑制剂,诸如喜树碱(Camptothecin)、拓扑替康(Topotecan)、伊立替康(irinotecan)/SN38、鲁比替康(rubitecan)、贝洛替康(Belotecan)和其他衍生物;拓扑异

构酶II抑制剂,诸如依托泊苷(Etoposide,VP-16)、柔红霉素(Daunorubicin)、多柔比星(doxorubicin)药剂(例如,脂质体中的多柔比星、多柔比星HCl、多柔比星类似物或多柔比星及其盐或类似物)、米托蒽醌(Mitoxantrone)、阿柔比星(Aclarubicin)、表柔比星(Epirubicin)、伊达比星(Idarubicin)、氨柔比星(Amrubicin)、安吖啶(Amsacrine)、吡柔比星(Pirarubicin)、戊柔比星(Valrubicin)、佐柔比星(Zorubicin)、替尼泊苷(Teniposide)和其他衍生物;抗代谢药,诸如叶酸家族(甲氨蝶呤(Methotrexate)、培美曲塞、雷替曲塞(Raltitrexed)、氨基蝶呤(Aminopterin)和亲属);嘌呤拮抗剂(硫鸟嘌呤(Thioguanine)、氟达拉滨(Fludarabine)、克拉屈滨(Cladribine)、6-巯基嘌呤、喷司他丁(Pentostatin)、氯法拉滨(clofarabine)和亲属)和嘧啶拮抗剂(阿糖胞苷(Cytarabine)、氟尿苷(Floxuridine)、阿扎胞苷(Azacitidine)、替加氟(Tegafur)、卡莫氟(Carmofur)、卡培他滨(Capacitabine)、吉西他滨、羟基脲(hydroxyurea)、5-氟尿嘧啶(5FU)和亲属);烷基化剂,诸如氮芥(例如,环磷酰胺(Cyclophosphamide)、美法仑(Melphalan)、苯丁酸氮芥(Chlorambucil)、氮芥(mechlorethamine)、异环磷酰胺(Ifosfamide)、曲磷胺(Trofosfamide)、泼尼莫司汀(Prednimustine)、苯达莫司汀(Bendamustine)、乌莫司汀(Uramustine)、雌莫司汀(Estramustine)和亲属);亚硝基脲类(例如,卡莫司汀(Carmustine)、洛莫司汀(Lomustine)、司莫司汀(Semustine)、福莫司汀(Fotemustine)、尼莫司汀(Nimustine)、雷莫司汀(Ranimustine)、链脲佐菌素(Streptozocin)和亲属);三氮烯类(例如,达卡巴嗪(Dacarbazine)、阿曲他明(Altretamine)、替莫唑胺(Temozolomide)和亲属);烷基磺酸盐(例如,白消安(Busulfan)、甘露舒凡(Mannosulfan)、曲奥舒凡(Treosulfan)和亲属);丙卡巴肼(Procarbazine);二溴甘露醇(Mitobronitol)和氮丙啶类(例如,卡波醌(Carboquone)、三亚胺醌(Triaziquone)、噻替派(ThioTEPA)、三亚乙基蜜胺(triethylenemalamine)和亲属);抗生素,诸如羟基脲(Hydroxyurea)、蒽环类(例如,多柔比星药剂、柔红霉素、表柔比星和其他衍生物);蒽二酮类(例如,米托蒽醌和亲属);链霉菌家族(例如,博来霉素(Bleomycin)、丝裂霉素C(Mitomycin C)、放线菌素(Actinomycin)、普卡霉素(Plicamycin));紫外光;以及它们的组合。

[0109] 在一些方面,其他抗癌治疗剂是抗体。抗体(优选单克隆抗体)通过各种机制实现其针对癌细胞的治疗效果。它们可以在产生细胞凋亡或程序性细胞死亡方面具有直接作用。它们可以阻断信号转导途径的组分,诸如例如生长因子受体,从而有效地阻止肿瘤细胞的增殖。在表达单克隆抗体的细胞中,它们可以导致抗独特型抗体的形成。间接作用包括募集具有细胞毒性的细胞,诸如单核细胞和巨噬细胞。这种类型的抗体介导的细胞杀伤被称为抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)。抗体还结合补体,从而导致直接细胞毒性,其被称为补体依赖性细胞毒性(CDC)。将手术方法与免疫治疗药物或方法组合是一种成功的方法,如例如Gadri等人2009:Synergistic effect of dendritic cell vaccination and anti-CD20 antibody treatment in the therapy of murine lymphoma.J Immunother.32(4):333-40中所证明的。以下列表提供了可与本公开组合使用的抗癌抗体和潜在抗体靶标(在括号中)的一些非限制性示例:阿巴伏单抗(Abagovomab)(CA-125)、阿昔单抗(Abciximab)(CD41)、阿德木单抗(Adecatumumab)(EpCAM)、阿托珠单抗(Afutuzumab)(CD20)、培戈-阿拉赛珠单抗(Alacizumab pegol)(VEGFR2)、阿妥莫单抗(Altumo mab pentetate)(CEA)、阿麦妥单抗(Amatuximab)(MORAb-009)、马安那莫单抗

(Anatumomab mafenatox)(TAG-72)、阿泊珠单抗(Apolizumab)(HLA-DR)、阿西莫单抗(Arcitumomab)(CEA)、巴维昔单抗(Bavituximab)(磷脂酰丝氨酸)、贝妥莫单抗(Bectumomab)(CD22)、贝利尤单抗(Belimu mab)(BAFF)、贝伐珠单抗(Bevacizumab)(VEGF-A)、比伐珠单抗美登新(Bivatuzumab mertansine)(CD44 v6)、博纳吐单抗(Blinatumomab)(CD19)、维布妥昔单抗(Brentuximab vedotin)(CD30 TNFRSF8)、莫坎妥珠单抗(Cantuzumab mertansin)(mucin CanAg)、雷坎妥组单抗(Cantuzumab ravtansine)(MUC1)、卡普罗单抗喷地肽(Capromab pendetide)(前列腺癌细胞)、卡芦单抗(Carlumab)(CNT0888)、卡妥索单抗(Catumaxomab)(Ep CAM)(CD3)、西妥昔单抗(Cetuximab)(EGFR)、泊西他组单抗(Citatuzu mab bogatox)(EpCAM)、西妥木单抗(Cixutumumab)(IGF-1受体)、克劳昔单抗(Claudiximab)(Claudin)、泰坦-克利妥珠单抗(Clivatuzumab tetraxe tan)(MUC1)、可那木单抗(Conatumumab)(TRAIL-R2)、达西组单抗(Da cetuzumab)(CD40)、达罗托组单抗(Dalotuzumab)(胰岛素样生长因子I受体)、地诺单抗(Denosumab)(RANKL)、地莫单抗(Detumomab)(B淋巴瘤细胞)、曲齐妥单抗(Drozitumab)(DR5)、依美昔单抗(Ecromeximab)(GD3神经节苷脂)、依决洛单抗(Edrecolomab)(EpCAM)、埃罗妥珠单抗(Elotuzumab)(SLAMF7)、依那妥组单抗(Enavatuzumab)(PDL192)、恩妥昔单抗(Ensituximab)(NPC-1C)、依帕珠单抗(Epratuzumab)(CD22)、厄妥索单抗(Ertumaxomab)(HER2/neu)(CD3)、埃达组单抗(Etaracizumab)(整合蛋白αvβ3)、法妥组单抗(Farletuzumab)(叶酸受体1)、FBTA05(CD20)、非拉妥组单抗(Ficlatuzumab)(SCH 900105)、芬妥木单抗(Figitumumab)(IGF-1受体)、法兰妥单抗(Flanvotumab)(糖蛋白75)、非苏木单抗(Fresol imumab)(TGF-β)、加利昔单抗(Galiximab)(CD80)、加尼妥单抗(Ganitu mab)(IGF-I)、吉妥珠单抗奥唑米星(Gemtuzumab ozogamicin)(CD33)、吉伏组单抗(Gevokizumab)(IL-1β)、吉妥昔单抗(Girentuximab)(碳酸酐酶9(CA-IX))、维汀-格巴妥木单抗(Glembatumumab vedotin)(GPNMB)、替伊莫单抗(Ibritumomab tiuxetan)(CD20)、艾芦库单抗(Icrucumab)(VE GFR-1)、伊戈伏单抗(Igovoma)(CA-125)、雷英妥昔单抗(Indatuximab ra vtansine)(SDC1)、英妥木单抗(Intetumumab)(CD51)、奥加伊妥珠单抗(Inotuzumab ozogamicin)(CD22)、伊匹单抗(Ipilimumab)(CD152)、伊妥木单抗(Iratumumab)(CD30)、拉贝珠单抗(Labetuzumab)(CEA)、来沙木单抗(Lexatumumab)(TRAIL-R2)、利韦单抗(Libivirumab)(乙型肝炎表面抗原)、林妥珠单抗(Lintuzumab)(CD33)、莫星-洛沃妥珠单抗(Lorvotuzumab mertansine)(CD56)、卢卡木单抗(Lucatumumab)(CD40)、鲁昔单抗(Lumiliximab)(CD23)、马帕木单抗(Mapatumumab)(TRAIL-R1)、马妥珠单抗(Matuzumab)(EGFR)、美泊利单抗(Mepol izumab)(IL-5)、米拉珠单抗(Milatuzumab)(CD74)、米妥莫单抗(Mit umomab)(GD3神经节苷脂)、莫格利珠单抗(Mogamulizumab)(CCR 4)、莫赛妥莫单抗(Moxetumomab pasudotox)(CD22)、他那可单抗(Nacolomab tafenatox)(C242 antigen)、他那莫单抗(Naptumomab estafe natox)(5T4)、那呐妥单抗(Narnatumab)(RON)、耐昔妥珠单抗(Necit umumab)(EGFR)、尼妥珠单抗(Nimotuzumab)(EGFR)、纳武单抗(Nivolumab)(IgG4)、奥法木单抗(Ofatumumab)(CD20)、奥拉单抗(Ola ratumab)(PDGF-Rα)、奥那妥组单抗(Onartuzumab)(人散射因子受体激酶)、莫妥组单抗(Oportuzumab monatox)(EpCAM)、奥戈伏单抗(Oregovomab)(CA-125)、奥塞芦单抗(Oxelumab)(OX-40)、帕尼单抗(Panitumumab)(EGFR)、帕曲妥单抗(Patritumab)(HER3)、

Pemtumo ma(MUC1)、帕妥珠单抗(Pertuzuma)(HER2/neu)、平妥莫单抗(Pint umomab)(腺癌抗原)、普立木单抗(Pritumumab)(波形蛋白)、雷妥莫单抗(Racotumomab)(N-羟乙酰神经氨酸)、雷曲妥单抗(Radretumab)(纤连蛋白额外结构域-B)、雷韦单抗(Rafivirumab)(狂犬病毒糖蛋白)、雷莫芦单抗(Ramucirumab)(VEGFR2)、利妥木单抗(Rilotumumab)(HGF)、利妥昔单抗(Rituximab)(CD20)、罗妥木单抗(Robatumumab)(IGF-1受体)、沙马组单抗(Samalizumab)(CD200)、西罗珠单抗(Sibrot uzumab)(FAP)、司妥昔单抗(Siltuximab)(IL-6)、他贝芦单抗(Tabalu mab)(BAFF)、泰坦-替组单抗(Tacatuzumab tetraxetan)(甲胎蛋白)、帕他普莫单抗(Taplitumomab paptox)(CD19)、替妥莫单抗(Tenatumo mab)(肌腱蛋白-C)、替妥木单抗(Teprotumumab)(CD221)、曲美木单抗(Ticilimumab)(CTLA-4)、替加组单抗(Tigatuzumab)(TRAIL-R2)、TNX-650(IL-13)、托西莫单抗(Tositumomab)(CD20)、曲妥珠单抗(Trastuzumab)(HER2/neu)、TRBS07(GD2)、替西木单抗(Tremelimuma b)(CTLA-4)、西莫白介素单抗(Tucotuzumab celmoleukin)(EpCAM)、乌妥昔单抗(Ublituximab)(MS4A1)、乌瑞芦单抗(Urelumab)(4-1BB)、伏洛昔单抗(Volociximab)(整联蛋白α5β1)、伏妥莫单抗(Votumumab)(肿瘤抗原CTAA16.88)、扎芦木单抗(Zalutumumab)(EGFR)、扎木单抗(Zanolimumab)(CD4)。

[0110] 在一些方面,其他抗癌治疗剂是细胞因子、趋化因子、共刺激分子、融合蛋白或它们的组合。趋化因子的示例包括但不限于CCR7及其配体CCL19和CCL21,此外还有CCL2、CCL3、CCL5和CCL16。其他示例是CXCR4、CXCR7和CXCL12。此外,共刺激或调节分子诸如例如B7配体(B7.1和B7.2)是有用的。其他细胞因子也是有用的,诸如例如白介素,尤其是(例如,IL-1至IL17)、干扰素(例如,IFNalpha1至IFNalpha8、IFNalpha10、IFNalpha13、IFNalpha14、IFNalpha16、IFNalpha17、IFNalpha21、IFNbeta1、IFNW、IFNE1和IFNK)、造血因子、TGF(例如,TGF-α、TGF-β和TGF家族的其他成员),最后是肿瘤坏死因子受体家族的成员及其配体以及其他刺激分子,包括但不限于41BB、41BB-L、CD137、CD137L、CTLA-4GITR、GITRL、Fas、Fas-L、TNFR1、TRAIL-R1、TRAIL-R2、p75NGF-R、DR6、LT.beta.R、RANK、EDAR1、XEDAR、Fn114、Troy/Trade、TAJ、TNFRII、HVEM、CD27、CD30、CD40、4-1BB、OX40、GITR、GITRL、TACI、BAFF-R、BCMA、RELT、和CD95(Fas/APO-1)、糖皮质激素诱导的TNFR相关蛋白、TNF受体相关凋亡介导蛋白(TRAMP)和死亡受体-6(DR6)。尤其地,CD40/CD40L和OX40/OX40L由于其对T细胞存活和增殖的直接影响而成为组合免疫疗法的重要靶标。综述参见Lechner等人2011:Chemokines,costimulatory molecules and fusion proteins for the immunotherapy of solid tumors.Immunotherapy 3(11),1317-1340。

[0111] 在一些方面,其他抗癌治疗剂是细菌治疗。研究人员一直在使用厌氧细菌,诸如诺维氏梭菌(Clostridium novyi),来消耗缺氧肿瘤的内部。当这些细菌与肿瘤的含氧侧接触时,它们应该会死亡,这意味着它们对身体的其他部分无害。另一种策略是使用经过酶转化的厌氧细菌,所述酶可以将无毒前药转化为有毒药物。随着肿瘤坏死和缺氧区中细菌的增殖,所述酶仅在肿瘤中表达。因此,全身应用的前药仅在肿瘤中代谢为毒性药物。这已被证明对非致病性厌氧菌生孢梭菌(Clostridium sporogenes)有效。

[0112] 在一些方面,其他抗癌治疗剂是激酶抑制剂。癌细胞的生长和存活与激酶活性的失调密切相关。为了恢复正常激酶活性并因此减少肿瘤生长,使用了广泛的抑制剂。靶向激酶组包括受体酪氨酸激酶(例如,BCR-ABL、B-Raf、EGFR、HER-2/ErbB2、IGF-IR、PDGFR-α、

PDGFR-β、c-Kit、Flt-4、Flt3、FGFR1、FGFR3、FGFR4、CSF1R、c-Met、RON、c-Ret、ALK)、细胞质酪氨酸激酶(例如,c-SRC、c-YES、Abl、JAK-2)、丝氨酸/苏氨酸激酶(例如,ATM、Aurora A&B、CDKs、mTOR、PKCi、PLKs、b-Raf、S6K、STK11/LKB1)和脂质激酶(例如,PI3K、SK1)。小分子激酶抑制剂是例如PHA-739358、尼洛替尼(Nilotinib)、达沙替尼(Dasatinib)和PD166326、NSC 743411、拉帕替尼(Lapatinib)(GW-572016)、卡奈替尼(Canertinib)(CI-1033)、司马沙尼(Semaxinib)(SU5416)、瓦他拉尼(Vatalanib)(PTK787/ZK222584)、舒尼替尼(Sutent)(SU11248)、索拉非尼(Sorafenib)(BAY 43-9006)和来氟米特(Leflunomide)(SU101)。更多信息参见例如,Zhang等人2009:Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors.Nature Reviews Cancer 9,28-39。

[0113] 在一些方面,其他抗癌治疗剂是toll样受体。Toll样受体(TLR)家族的成员是先天性免疫和适应性免疫之间的重要联系,许多佐剂的作用依赖于TLR的活化。大量已建立的抗癌疫苗掺入TLR配体以增强疫苗应答。除了TLR2之外,TLR3、TLR4,尤其是TLR7和TLR8已经被用于被动免疫疗法方法中的癌症疗法。密切相关的TLR7和TLR8通过影响免疫细胞、肿瘤细胞和肿瘤微环境而有助于抗肿瘤应答,并且可以被核苷类似物结构活化。所有TLR都已用作独立的免疫治疗剂或癌症疫苗佐剂,并且可以与本公开的调配物和方法协同地组合。更多信息参见van Duin等人2005:Triggering TLR signaling in vaccination.Trends in Immunology,27(1):49-55。

[0114] 在一些方面,其他抗癌治疗剂是血管生成抑制剂。血管生成抑制剂阻止肿瘤存活所需的血管的广泛生长(血管生成)。例如,可以通过靶向不同的分子来阻断肿瘤细胞为满足其日益增长的营养和氧气需求而促进的血管生成。可与本公开组合的血管生成介导分子或血管生成抑制剂的非限制性示例是可溶性VEGF(VEGF同种型VEGF121和VEGF165、受体VEGFR1、VEGFR2和共受体神经纤毛蛋白-1和神经纤毛蛋白-2)1和NRP-1、血管生成素2、TSP-1和TSP-2、血管抑素和相关分子、内皮抑素、血管抑制因子(vasostatin)、钙网蛋白、血小板因子-4、TIMP和CDAI、Meth-1和Meth-2、IFN-α、-β和-γ、CXCL10、IL-4、-12和-18、凝血酶原(kringle结构域-2)、抗凝血酶III片段、催乳素、VEGI、SPARC、骨桥蛋白、乳腺丝抑蛋白(maspin)、血管能抑素(canstatin)、增殖蛋白相关蛋白、休眠蛋白(restin)和药物例如贝伐珠单抗(bevacizumab)、伊曲康唑(itraconazole)、羧酰胺三唑(carboxyamidotriazole)、TNP-470、CM101、IFN-α、血小板因子-4、舒拉明(suramin)、SU5416、凝血栓蛋白(thrombospondin)、VEGFR拮抗剂、血管静止类固醇+肝素、软骨源性血管生成抑制因子、基质金属蛋白酶抑制剂、2-甲氧基雌二醇、替考加兰(tecogalan)、四硫钼酸盐(tetrathiomolybdate)、沙利度胺(thalidomide)、凝血栓蛋白、催乳素Vβ3抑制剂、利诺安(linomide)、他喹莫德(tasquinimod)。综述参见Schoenfeld和Dranoff 2011:Anti-angiogenesis immunotherapy.Hum Vaccin.(9):976-81。

[0115] 在一些方面,其他抗癌治疗剂是基于病毒的疫苗。存在许多可用的或正在开发的基于病毒的癌症疫苗,其可以与本公开的调配物一起用于组合治疗方法中。使用此类病毒载体的一个优点是其固有的引发免疫应答的能力,其中由于病毒感染而发生炎性反应,从而产生免疫活化所需的危险信号。理想的病毒载体应该是安全的,并且不应该引入抗载体免疫应答以允许增强抗肿瘤特异性应答。重组病毒(诸如疫苗病毒、单纯疱疹病毒、腺病毒、腺相关病毒、逆转录病毒和禽痘病毒)已被用于动物肿瘤模型,并且基于其令人鼓舞的结

果,人类临床试验已经启动。特别重要的基于病毒的疫苗是病毒样颗粒(VLP),即含有来自病毒外壳的某些蛋白质的小颗粒。病毒样颗粒不含病毒的任何遗传物质,并且不能引起感染,但它们可以被构建成在其外壳上呈递肿瘤抗原。VLP可以源自各种病毒,诸如例如乙型肝炎病毒或其他病毒家族,包括细小病毒科(例如,腺相关病毒)、逆转录病毒科(例如,HIV)和黄病毒科(例如,丙型肝炎病毒)。一般综述参见Sorensen和Thompsen 2007:"Virus-based immunotherapy of cancer:what do we know and where are we going?" APMIS115(11):1177-93;对抗癌症的病毒样颗粒在以下文献中进行了综述:Buonaguro等人2011:Developments in virus-like particle-based vaccines for infectious diseases and cancer.Expert Rev Vaccines 10(11):1569-83;以及Guillén等人2010:Virus-like particles as vaccine antigens and adjuvants:application to chronic disease,cancer immunotherapy and infectious disease preventive strategies.Procedia in Vaccinology 2(2),128-133。

[0116] 在一些方面,其他抗癌治疗剂是基于肽的靶向疗法。肽可以结合至细胞表面受体或肿瘤周围受影响的细胞外基质。如果核素在细胞附近衰变,则附接到这些肽(例如,RGD)的放射性核素最终会杀死癌细胞。这些结合基序的寡聚体或多聚体尤其令人感兴趣,因为这可导致增强的肿瘤特异性和亲合力。对于非限制性示例,参见Yamada 2011:Peptide-based cancer vaccine therapy for prostate cancer,bladder cancer,and malignant glioma.Nihon Rinsho 69(9):1657-61。

[0117] III.脂质纳米颗粒

[0118] 如本文所述,本公开的LNP表现出组织特异性向性,使得LNP可以允许将有效载荷(例如,异源蛋白)选择性地递送至细胞(例如,非肝组织内的细胞)。在一些方面,递送可以在体内(例如,通过向受试者施用本文所述的LNP)或离体(例如,通过将本文所述的LNP与细胞一起体外培养)发生。如本文所用,"脂质纳米颗粒"(LNP)是指具有连续脂质双层的囊泡,诸如球形囊泡。脂质纳米颗粒可用于将药物疗法递送至靶向位置的方法中。LNP的非限制性示例包括脂质体、双头基两亲分子(bolaamphihiles)、固体脂质纳米颗粒(SLN)、纳米结构脂质载体(NLC)、单层膜结构(例如,古细菌脂质体(archaeosomes)和胶束)、类脂质纳米颗粒(LLN)、聚合物纳米颗粒(PNP)、脂质聚合物杂化纳米颗粒(LPN)或它们的组合。

[0119] 在一些方面,脂质纳米颗粒包含一种或多种类型的脂质。如本文所用,"脂质"是指一组有机化合物,其包括但不限于脂肪酸的酯,并且在一些方面,其特征在于不溶于水,但可溶于许多有机溶剂。因此,除非另有说明,否则脂质包括天然脂质和类脂质材料(例如,类脂)。它们通常分为至少三类:(1)"单纯脂质",其包括脂肪和油以及蜡;(2)"复合脂质",其包括磷脂和糖脂;和(3)"衍生脂质",诸如类固醇。脂质的非限制性示例包括甘油三酯(例如,三硬脂酸甘油酯)、甘油二酯(例如,山嵛酸甘油酯)、甘油单酯(例如,单硬脂酸甘油酯)、脂肪酸(例如,硬脂酸)、类固醇(例如,胆固醇)和蜡(例如,棕榈酸鲸蜡酯)。在一些方面,可用于本公开的脂质包括可电离脂质、阳离子脂质、类脂、磷脂、甾醇或它们的组合。

[0120] 在一些方面,LNP中的一种或多种类型的脂质包含可电离脂质。因此,在一些方面,可用于本公开的LNP包含(i)可电离脂质和(ii)VEE复制子,所述VEE复制子包含编码有效载荷的核酸序列。

[0121] 可电离脂质的非限制性示例包括:((4-羟基丁基)氮烷二基)双(已烷-6,1-二基)

双(2-己基癸酸酯)(ALC-0315)、8-((2-羟基乙基)(6-氧代-6-(十一烷氧)己基)氨基)辛酸十七烷-9-基酯(SM-102)、8-((2-羟基乙基)(8-(壬氧基)-8-氧代辛基)氨基)辛酸十七烷-9-基酯(脂质5)、二((Z)-壬-2-烯-1-基)9-((4-(二甲基氨基)丁酰基)氧基)十七烷二酸酯(L319)、3-(二十二烷基氨基)-N1,N1,4三十二烷基-1-哌嗪乙胺(KL10)、N1-[2(二十二烷基氨基)乙基]-N1,N4,N4-三十二烷基1,4-哌嗪二乙胺(KL22)、14,25-二十三烷基-15,18,21,24-四氮杂-三十八烷(KL25)、1,2-二亚油酰基氧基-N,N--二甲基氨基丙烷(DLin-DMA)、2,2-二亚油酰基-4-二甲基氨基甲基-[1,3]-二噁戊烷(DLin-K-DMA)、七碳六烯酸-6,9,28,31-四烯-19-基-4-(二甲基氨基)丁酸酯(DLin-MC3-DMA)、2,2-二亚油酰基-4-(2二甲基氨基乙基)-[1,3]-二噁戊烷(DLin-KC2-DMA)、1,2-二油酰基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DODMA)、2-({8-[(3β)-胆甾-5-烯-3-基氧基]辛基}氧基)-N,N-二甲基-3-[(9Z,12Z)-十八烷-9,12-二烯-1-基氧基]丙-1-胺(Octyl-CLinDMA)、(2R)-2-({8-[(3β)-胆甾-5-烯-3-基氧基]辛基}氧基)-N,N-二甲基-3-[(9Z,12Z)-十八-9,12-二烯-1-基氧基]丙-1-胺(Octyl-CLinDMA(2R))和(2S)-2-({8-[(3β)-胆甾-5-烯-3-基氧基]辛基}氧基)-N,N-二甲基-3-[(9Z,12Z)-十八-9,12-二烯-1-基氧基]丙-1-胺(Octyl-CLinDMA(2S))或它们的任何组合。

[0122] 在一些方面,LNP中的一种或多种类型的脂质包含阳离子脂质。在一些方面,可用于本公开的LNP包含(i)阳离子脂质和(ii)VEE复制子,所述VEE复制子包含编码有效载荷的核酸序列。在一些方面,LNP(即,包含阳离子脂质和VEE复制子)进一步包含可电离脂质。

[0123] 如本文所用,“阳离子脂质”是指在选定pH诸如生理pH下具有净正电荷的许多脂质种类中的任何一种。阳离子脂质的非限制性示例包括:1,2-二油酰基-3-三甲基铵-丙烷(DOTAP)、lipofectamine、N-[1-(2,3-二油酰基氧基)丙基]-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTMA)、1-[2-(油酰基氧基)乙基]-2-油酰基-3-(2-羟乙基)氯化咪唑鎓(DOTEVI)、2,3-二油酰基氧基-N-[2(精胺甲酰氨基)ethyl]-N,N-二甲基-1-三氟乙酸丙胺(DOSPA)、N,N-二硬脂酰基-N,N-二甲基溴化铵(DDAB)、N-(1,2-二肉豆蔻基氧基-3-基)-N,N-二甲基-N-羟乙基溴化铵(DMRIE)、N-(1,2-二油酰基氧基丙-3-基)-N,N-二甲基-N-羟乙基溴化铵(DORIE)、N,N-二油酰基-N,N-二甲基氯化铵(DODAC)、1,2-二月桂酰基-sn-甘油-3-乙基磷酸胆碱(DLePC)、1,2-二硬脂酰基-3-三甲基铵-丙烷(DSTAP)、1,2-二棕榈酰基-3-三甲基铵-丙烷(DPTAP)、1,2-二亚油酰基-3-三甲基铵-丙烷(DLTAP)、1,2-二肉豆蔻酰基-3-三甲基铵-丙烷(DMTAP)、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-乙基磷酸胆碱(DSePC)、1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-乙基磷酸胆碱(DPePC)、1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油-3-乙基磷酸胆碱(DMePC)、1,2-二油酰基sn-甘油-3-乙基磷酸胆碱(DOePC)、1,2-二-(9Z-十四碳烯酰基)-sn-甘油-3-乙基磷酸胆碱(14:1EPC)、1-棕榈酰基-2-油酰基-sn-甘油-3-乙基磷酸胆碱(16:0-18:1EPC)或它们的任何组合。贯穿本公开提供了额外的示例。

[0124] 在一些方面,LNP中的一种或多种类型的脂质包含类脂。因此,在一些方面,本文所述的LNP包含:(i)类脂和(ii)VEE复制子,所述VEE复制子包含编码有效载荷的核酸序列。在一些方面,LNP(即,包含类脂和VEE复制子)进一步包含可电离脂质、阳离子脂质或两者。

[0125] 如本文所用,术语“类脂”是指具有脂质(例如,合成阳离子脂质)的一种或多种特性的分子。在一些方面,类脂可以具有一系列仲胺和叔胺,这会增加LNP的净正电荷。类脂质材料和/或类脂的非限制性示例包括:1,1’-((2-(4-(2-((2-(双(2-羟基十二烷基)氨基)乙基)(2-羟基十二烷基)氨基)乙基)哌嗪-1-基)乙基)氮烷二基)双(十二烷-2-醇)(C12-

200)、3,6-双(4-(双(2-羟基十二烷基)氨基)丁基)哌嗪2,5-二酮(cKK-E12)、四(8-甲基壬基)3,3',3″,3‴-(((甲基氮烷二基)双(丙烷-3,1二基))双(氮烷三基))四丙酸酯(3060i10)、G0-C14、5A2-SC8、3,6-双(4-(双((9Z,12Z)-2-羟基十八碳9,12-二烯-1-基)氨基)丁基)哌嗪-2,5-二酮(OF-02)、(((3,6-二氧代哌嗪-2,5-二基)双(丁烷-4,1-二基))双(氮烷三基))四(乙烷-2,1-二基)(9Z,9'Z,9″Z,9‴Z,12Z,12'Z,12″Z,12‴Z)-四(十八碳-9,12-二烯酸酯)(OF-Deg-Lin)、(((3,6-二氧代哌嗪-2,5-二基)双(丁烷-4,1-二基))四(氮烷三基))四(丁烷-4,1-二基)(9Z,9'Z,9″Z,9‴Z,12Z,12'Z,12″Z,12‴Z)-四(十八碳-9,12-二烯酸酯)(OF-C4-Deg-Lin)、N1,N3,N5-三(3-(二十二烷基氨基)丙基)苯1,3,5-三甲酰胺(TT3)、六(辛-3-基)9,9',9″,9‴,9⁗,9⁗'-((((苯-1,3,5-三羰基)三(氮烷二基))三(丙烷-3,1-二基))三(氮烷三基))壬酸己酯(FTT5)、PL-1[公开于Nature Communications,12-7264(2021),其特此通过引用并入]、98N12-5[公开于Molecular Therapy第17卷第5期2009年5月,其特此通过引用并入]、ethyl 5,5-二((Z)-十七碳-8-烯-1-基)-1-(3-(吡咯烷-1-基)丙基)-2,5-二氢-1H-咪唑-2-羧酸乙酯(A2-Iso5-2DC18(A2))和A12-Iso5-2DC18(A12),或它们的任何组合。

[0126] 在一些方面,脂质包含甾醇。在一些方面,可用于本公开的LNP包含(i)甾醇和(ii)VEE复制子,所述VEE复制子包含编码有效载荷的核酸序列。在一些方面,LNP(即,包含甾醇和VEE复制子)进一步包含可电离脂质、阳离子脂质、类脂或它们的任何组合。

[0127] 如本文所用,"甾醇"是指可用于填充脂质膜堆积缺陷并提供结构完整性的胆固醇或胆固醇类似物。甾醇的非限制性示例包括:胆固醇、粪甾醇、谷甾醇、麦角甾醇、菜油甾醇、豆甾醇、菜籽甾醇、番茄碱、番茄苷、熊果酸、α-生育酚以及它们的组合。在一些方面,甾醇是胆固醇。

[0128] 在一些方面,脂质包含磷脂。在一些方面,可用于本公开的LNP包含(i)磷脂和(ii)VEE复制子,所述VEE复制子包含编码有效载荷的核酸序列。在一些方面,LNP(即,包含磷脂和VEE复制子)进一步包含可电离脂质、阳离子脂质、类脂、甾醇或它们的任何组合。

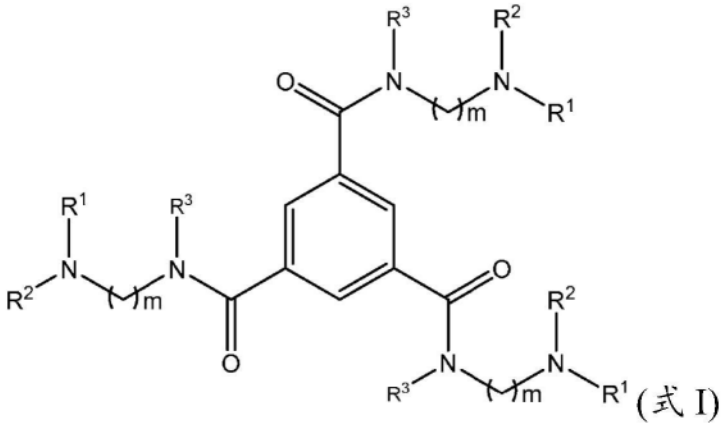
[0129] 磷脂的非限制性示例包括:1,2-二亚油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DLPC)、1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油-磷酸胆碱(DMPC)、1,2-二油酰基-sn甘油-3-磷酸胆碱(DOPC)、1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DPPC)、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DSPC)、1,2-二十一烷酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DUPC)、1-棕榈酰基-2-油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(POPC)、1,2-二-O-十八烯基-sn-甘油-磷酸胆碱(18:0二醚PC)、1-油酰基-2-胆固醇基半琥珀酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(OChemsPC)、1-十六烷基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(C16 Lyso PC)、1,2-二亚麻酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1,2-二花生四烯酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1,2-二二十二碳六烯酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DOPE)、1,2-二植烷酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(ME 16.0PE)、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二亚油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二亚麻酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二花生四烯酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二二十二碳六烯酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷脂酰-rac-(1-甘油)钠盐(DOPG)、鞘磷脂及它们的任何组合。在一些方面,磷脂选自由以下组成的组:1-肉豆蔻酰基-2-棕榈酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(14:0-16:0PC,MPPC)、1-肉豆蔻酰基-2硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(14:0-18:0PC,MSPC)、1-棕榈酰基2-乙酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(16:0-02:0PC)、1-棕榈

酰基-2-肉豆蔻酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(16:0-14:0PC,PMPC)、1-棕榈酰基-2-硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(16:0-18:0PC,PSPC)、1-棕榈酰基-2-油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(16:0-18:1PC,POPC)、1-棕榈酰基-2-亚油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(16:0-18:2PC,PLPC)、1-棕榈酰基-2-花生四烯酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(16:0-20:4PC)、1-棕榈酰基-2-二十二碳六烯酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(14:0-22:6PC)、1-硬脂酰基-2-肉豆蔻酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(18:0-14:0PC,SMPC)、1-硬脂酰基-2-棕榈酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(18:0-16:0PC,SPPC)、1-硬脂酰基-2-油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(18:0-18:1PC,SOPC)、1-硬脂酰基-2-亚油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(18:0-18:2PC)、1-硬脂酰基-2-花生四烯酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(18:0-20:4PC)、1-硬脂酰基-2-二十二碳六烯酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(18:0-22:6PC)、1-油酰基-2-肉豆蔻酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(18:1-14:0PC,OMPC)、1-油酰基-2-棕榈酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(18:1-16:0PC,OPPC)、1-油酰基-2-硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(18:1-18:0PC,OSPC)、1-棕榈酰基-2-油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(16:0-18:1PE,POPE)、1-棕榈酰基-2-亚油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(16:0-18:2PE)、1-棕榈酰基-2-花生四烯酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(16:0-20:4PE)、1-棕榈酰基-2-二十二碳六烯酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(16:0-22:6PE)、1-硬脂酰基-2-油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(18:0-18:1PE)、1-硬脂酰基-2-亚油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(18:0-18:2-PE)、1-硬脂酰基-2-花生四烯酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(18:0-20:4-PE)、1-硬脂酰基-2-二十二碳六烯酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(18:0-22:6PE)、1-油酰基-2-胆固醇基半琥珀酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(OChemsPC)及它们的任何组合。

[0130] 因此,在一些方面,可用于本公开的LNP包含(i)一种或多种天然脂质(例如,天然阳离子脂质)和(ii)VEE复制子,所述VEE复制子包含编码有效载荷的核酸序列。在一些方面,可用于本公开的LNP包含(i)一种或多种合成脂质(例如,类脂)和(ii)VEE复制子,所述VEE复制子包含编码有效载荷的核酸序列。在一些方面,用于本公开的LNP包含(i)天然脂质(例如,阳离子脂质)和合成脂质(例如,类脂)两者,和(ii)VEE复制子,所述VEE复制子包含编码有效载荷的核酸序列。

[0131] 可与本公开的LNP一起使用的脂质的示例包括但不限于N1,N3,N5-三(3-(二十二烷基氨基)丙基)苯-1,3,5-三甲酰胺(TT3)、N-(2,3-二油酰基氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTAP);lipofectamine;1,2-二亚油酰基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DLinDMA)、1,2-二亚油酰基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DLenDMA);二十八烷基二甲基铵(DODMA)、二硬脂酰基二甲基铵(DSDMA)、N,N-二油酰基-N,N,-二甲基氯化铵(DODAC);N-(2,3-二油酰基氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTMA);N-N-二硬脂酰基-N,N-二甲基溴化铵(DDAB);3-(N—(N',N'-二甲基氨基乙烷)-氨基甲酰基)胆固醇(DC-Chol)和N-(1,2-二肉豆蔻基氧基丙-3-基)-N,N-二甲基-N-羟乙基溴化铵(DMRIE)。

[0132] 在一些方面,脂质由式I表示:

[0133] 
(式 I)

[0134] 及其盐;其中每个R^1独立地为未取代的烷基;每个R^2独立地为未取代的烷基;每个R^3独立地为氢或取代或未取代的烷基;并且每个m独立地为3、4、5、6、7或8。在一些方面,每个R^1独立地为未取代的烷基;每个R^2独立地为未取代的烷基;R^3为氢;并且每个m为3。在一些方面,至少一个R^1为未取代的C1-24烷基。在一些方面,至少一个R^1为未取代的C_{1-18}烷基。在一些方面,至少一个R^1为未取代的C_{1-12}烷基。在一些方面,至少一个R^1为未取代的C_{6-18}烷基。在一些方面,至少一个R^1为未取代的C_{6-12}烷基。在一些方面,至少一个R^1为未取代的C_{8-12}烷基。在一些方面,至少一个R^1为未取代的C_{10-12}烷基。在一些方面,至少一个R^1为未取代的C_{11}烷基。

[0135] 在一些方面,至少一个R^2为未取代的C_{1-24}烷基。在一些方面,至少一个R^2为未取代的C_{1-18}烷基。在一些方面,至少一个R^2为未取代的C_{1-12}烷基。在一些方面,至少一个R^2为未取代的C_{6-18}烷基。在一些方面,至少一个R^2为未取代的C_{6-12}烷基。在一些方面,至少一个R^2为未取代的C_{8-12}烷基。在一些方面,至少一个R^2为未取代的C_{10-12}烷基。在一些方面,至少一个R^2为未取代的C_{11}烷基。

[0136] 在一些方面,至少两个R^1为未取代的C_{1-24}烷基。在一些方面,至少两个R^1为未取代的C_{1-18}烷基。在一些方面,至少两个R^1为未取代的C_{1-12}烷基。在一些方面,至少两个R^1为未取代的C_{6-18}烷基。在一些方面,至少两个R^1为未取代的C_{6-12}烷基。在一些方面,至少两个R^1为未取代的C_{8-12}烷基。在一些方面,至少两个R^1为未取代的C_{10-12}烷基。在一些方面,至少两个R^1为未取代的C_{11}烷基。

[0137] 在一些方面,至少两个R^2为未取代的C_{1-24}烷基。在一些方面,至少两个R^2为未取代的C_{1-18}烷基。在一些方面,至少两个R^2为未取代的C_{1-12}烷基。在一些方面,至少两个R^2为未取代的C_{6-18}烷基。在一些方面,至少两个R^2为未取代的C_{6-12}烷基。在一些方面,至少两个R^2为未取代的C_{8-12}烷基。在一些方面,至少两个R^2为未取代的C_{10-12}烷基。在一些方面,至少两个R^2为未取代的C_{11}烷基。

[0138] 在一些方面,R^1的所有实例均为未取代的C_{1-24}烷基。在一些方面,R^1的所有实例均为未取代的C_{1-18}烷基。在一些方面,R^1的所有实例均为未取代的C_{1-12}烷基。在一些方面,R^1的所有实例均为未取代的C_{6-18}烷基。在一些方面,R^1的所有实例均为未取代的C_{6-12}烷基。在一些方面,R^1的所有实例均为未取代的C_{8-12}烷基。在一些方面,R^1的所有实例均为未取代的C_{10-12}烷基。在一些方面,R^1的所有实例均为未取代的C_{11}烷基。

[0139] 在一些方面,R^2的所有实例均为未取代的C_{1-24}烷基。在一些方面,R^2的所有实例均为未取代的C_{1-18}烷基。在一些方面,R^2的所有实例均为未取代的C_{1-12}烷基。在一些方面,R^2的

所有实例均为未取代的C_{6-18}烷基。在一些方面，R^2的所有实例均为未取代的C_{6-12}烷基。在一些方面，R^2的所有实例均为未取代的C_{8-12}烷基。在一些方面，R^2的所有实例均为未取代的C_{10-12}烷基。在一些方面，R^2的所有实例均为未取代的C_{11}烷基。

[0140] 在一些方面，至少一个R^3为氢。在一些方面，至少一个R^3为取代或未取代的烷基。在一些方面，至少一个R^3为取代或未取代的C_{1-18}烷基。在一些方面，至少一个R^3为取代或未取代的C_{1-12}烷基。在一些方面，至少一个R^3为取代或未取代的C_{1-6}烷基。在一些方面，至少一个R^3为取代或未取代的C_{1-4}烷基。在一些方面，至少一个R^3为取代或未取代的C_{2-4}烷基。在一些方面，至少一个R^3为取代或未取代的甲基。

[0141] 在一些方面，至少一个R^3为取代的烷基，其中所述取代的烷基被卤素取代。在一些方面，至少一个R^3为取代的烷基，其中所述取代的烷基被氟取代。在一些方面，至少一个R^3为取代的烷基，其中所述取代的烷基被卤代烷基取代。

[0142] 在一些方面，至少两个R^3为氢。在一些方面，至少两个R^3为取代或未取代的烷基。在一些方面，至少两个R^3为取代或未取代的C_{1-18}烷基。在一些方面，至少两个R^3为取代或未取代的C_{1-12}烷基。在一些方面，至少两个R^3为取代或未取代的C_{1-6}烷基。在一些方面，至少两个R^3为取代或未取代的C_{1-4}烷基。在一些方面，至少两个R^3为取代或未取代的C_{2-4}烷基。在一些方面，至少两个R^3为取代或未取代的甲基。

[0143] 在一些方面，至少两个R3为取代的烷基，其中所述取代的烷基被卤素取代。在一些方面，至少两个R3为取代的烷基，其中所述取代的烷基被氟取代。在一些方面，至少两个R3为取代的烷基，其中所述取代的烷基被卤代烷基取代。

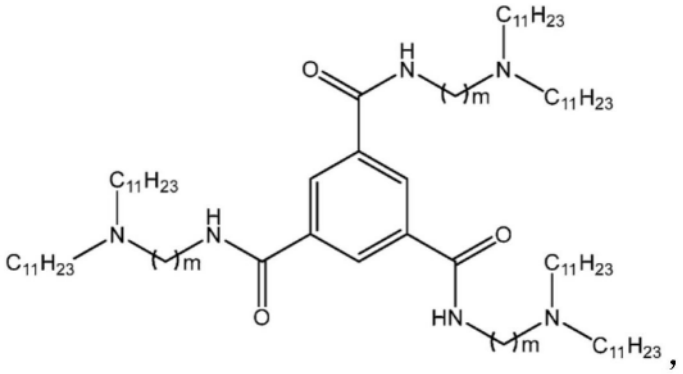
[0144] 在一些方面，R^3的所有实例均为氢。在一些方面，R^3的所有实例均为取代或未取代的烷基。在一些方面，R^3的所有实例均为取代或未取代的C_{1-18}烷基。在一些方面，R^3的所有实例均为取代或未取代的C_{1-12}烷基。在一些方面，R^3的所有实例均为取代或未取代的C_{1-6}烷基。在一些方面，R^3的所有实例均为取代或未取代的C_{1-4}烷基。在一些方面，R^3的所有实例均为取代或未取代的C_{2-4}烷基。在一些方面，R^3的所有实例均为取代或未取代的甲基。

[0145] 在一些方面，R^3的所有实例均为取代的烷基，其中所述取代的烷基被卤素取代。在一些方面，R^3的所有实例均为取代的烷基，其中所述取代的烷基被氟取代。在一些方面，R^3的所有实例均为取代的烷基，其中所述取代的烷基被卤代烷基取代。

[0146] 在一些方面，至少一个m为3。在一些方面，至少一个m为4。在一些方面，至少一个m为5。在一些方面，至少一个m为6。在一些方面，至少一个m为7。在一些方面，至少一个m为8。在一些方面，至少两个m为3。在一些方面，至少两个m为4。在一些方面，至少两个m为5。在一些方面，至少两个m为6。在一些方面，至少两个m为7。在一些方面，至少两个m为8。

[0147] 在一些方面，m的所有实例均为3。在一些方面，m的所有实例均为4。在一些方面，m的所有实例均为5。在一些方面，m的所有实例均为6。在一些方面，m的所有实例均为7。在一些方面，m的所有实例均为8。

[0148] 在本公开的一些方面，脂质是TT3，其由下式表示：

[0149] 

[0150] 其中m的所有实例均＝3。式I和TT3的组合物、合成和用途描述于WO2016187531A1中,其通过引用以其整体并入本文。

[0151] 因此,在一些方面,本文所述的LNP包含(i)TT3和(ii)VEE复制子,所述VEE复制包含编码有效载荷的核酸序列。如本文所用,“TT3”能够形成脂质纳米颗粒,用于将各种生物活性剂(例如,本文所述的有效载荷)递送到细胞中。此外,本公开还证明了未负载的TT3-LNP可以在体内和体外诱导癌细胞中的免疫原性细胞死亡(ICD)。如本文所述,免疫原性细胞死亡是指可以通过活化树突细胞(DC)和随后活化特异性T细胞应答来诱导有效免疫应答的细胞死亡形式。在一些方面,经历免疫原性细胞死亡的细胞是肿瘤细胞。

[0152] 在一些方面,脂质是DOTAP。因此,在一些方面,本公开的LNP包含(i)DOTAP和(ii)VEE复制子,所述VEE复制子包含编码有效载荷的核酸序列。如本文所用,“DOTAP”也能够形成脂质纳米颗粒。DOTAP可用于将包括酵母人工染色体(YAC)的DNA高效转染到真核细胞中以进行瞬时或稳定的基因表达,并且也适用于将其他带负电荷的分子(诸如RNA、寡核苷酸、核苷酸、核糖核蛋白(RNP)复合物和蛋白质)有效转移到哺乳动物细胞的研究样品中。

[0153] 在本公开的一些方面,脂质是lipofectamine。在一些方面,本文所述的LNP包含(i)lipofectamine和(ii)VEE复制子,所述VEE复制子包含编码有效载荷的核酸序列。如本文所用,“脂质体转染胺”是由Invitrogen生产和销售的用于分子和细胞生物学的常见转染试剂。它用于通过脂质转染提高RNA(包括mRNA和siRNA)或质粒DNA到体外细胞培养物中的转染效率。lipofectamine含有脂质亚基,所述脂质亚基可在水性环境中形成脂质体或脂质纳米颗粒,所述脂质体或脂质纳米颗粒夹带转染有效载荷。由于中性辅脂介导脂质体与细胞膜的融合,因此含RNA的脂质体(在其表面上带正电荷)可以与带负电荷的活细胞质膜融合,从而允许核酸货物分子穿过细胞质进行复制或表达。

[0154] 在一些方面,本文所述的LNP包含单一类型的脂质(例如,所有类脂,例如,所有TT3)。在一些方面,本公开的LNP包含多种类型的脂质。例如,在一些方面,LNP包含类脂(例如,TT3)以及其他脂质成分。这些通常包括属于但不限于磷脂酰胆碱(PC)(例如,1,s-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DSPC)和1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DOPE)、甾醇(例如,胆固醇)和聚乙二醇(PEG)-脂质缀合物(例如,1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[叶酸(聚乙二醇)-2000(DSPE-PEG2000)和1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-2000(C14-PEG2000))的其他脂质分子。表1示出了示例性LNP、TT3-LNP和DOTAP-LNP的调配物。

[0155] 表1.

[0156]

DOTAP-LNP 摩尔比	DOTAP 40	DSPC 10	胆固醇 48	DSPE-PEG2000 2
TT3-LNP 摩尔比	TT3 20	DOPE 30	胆固醇 40	C14-PEG2000 0.75

[0157] 在一些方面,LNP包含C14-PEG2000。因此,在一些方面,可用于本公开的LNP包含(i)C14-PEG2000和(ii)VEE复制子,所述VE E复制子包含编码有效载荷的核酸序列。在一些方面,C14-PEG2000包括1,2-二肉豆蔻酰基-rac-甘油-3-甲氧基聚乙二醇-2000(DMG-PEG 2000)、1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-2000](DMPE-PEG2000)或两者。在一些方面,可以在包封VEE复制子之前将C14-PEG2000(或本文公开的其他脂质成分)嵌入LNP中。在一些方面,可以在包封VEE复制子之后将C14-PEG2000(或本文公开的其他脂质成分)添加到LNP中。例如,在一些方面,将VEE复制子包封在LNP中,然后使用例如胶束将C14-PEG2000(本文公开的其他脂质成分)附接到LNP。

[0158] 在一些方面,可用于本公开的LNP包含聚合物材料。因此,在一些方面,本文提供的LNP包含(i)聚合物材料和(ii)VEE复制子,所述VEE复制子包含编码有效载荷的核酸序列。在一些方面,LNP包含(i)一种或多种类型的脂质,(ii)聚合物材料,和(iii)VEE复制子,所述VEE复制子包含编码有效载荷的核酸序列。在一些方面,一种或多种类型的脂质包括可电离脂质、阳离子脂质、类脂、磷脂、甾醇或它们的组合。

[0159] 在一些方面,聚合物材料包括阳离子聚合物或非阳离子聚合物,诸如本文所述的那些。聚合物材料的非限制性示例公开于Jiang等人Reference Module in Materials Science and Materials Engineering.(2021)和Byun等人BioChip J(2022),二者特此通过引用并入。聚合物材料的非限制性示例包括:聚乙烯亚胺(PEI)、聚(酰胺基胺)(PAMAM)、聚(β-氨基酯)(PBAE)、聚(甲基丙烯酸2-N,N-二甲基氨基乙酯)(PDMAEMA)、聚(氨基酸)(PAA)、壳聚糖葡聚糖(Raemdonck等人,2009)、环糊精(Singh等人,2019)、纤维素(Kim等人,2020)、透明质酸、聚乳酸(PLA)、聚(乳酸-共-乙醇酸)(PLGA)和聚己内酯(PCL)。

[0160] 至少从以上公开内容显而易见,在一些方面,可用于本公开的LNP包含VEE复制子,所述VEE复制子包含编码有效载荷的核酸序列,以及以下组分中的一者或多者:(i)可电离脂质;(ii)阳离子脂质;(iii)类脂质材料(例如,类脂);(iv)磷脂;(v)甾醇;(vi)聚乙二醇化脂质;和(vii)聚合物材料。在一些方面,本文所述的LNP包含VEE复制子,所述VEE复制子包含编码有效载荷的核酸序列,以及以下中的一者或多者:(i)可电离脂质;(ii)阳离子脂质;(iii)磷脂;(iv)甾醇;和(v)聚乙二醇化脂质。在一些方面,本文所述的LNP包含VEE复制子,所述VEE复制子包含编码有效载荷的核酸序列,以及以下中的一者或多者:(i)类脂质材料(例如,类脂);(ii)磷脂;(iii)甾醇;和(iv)聚乙二醇化脂质。在一些方面,本文所述的LNP包含VEE复制子,所述VEE复制子包含编码有效载荷的核酸序列,以及以下中的一者或多者:(i)聚合物材料;(ii)磷脂;(iii)甾醇;和(iv)聚乙二醇化脂质。在一些方面,本文所述的LNP包含VEE复制子,所述VEE复制子包含编码有效载荷的核酸序列,以及以下中的一者或多者:(i)聚合物材料;(ii)脂质;(iii)磷脂;(iv)甾醇;和(v)聚乙二醇化脂质。

[0161] 脂质纳米颗粒的粒度可影响药物释放速率、生物分布、粘膜粘附、细胞对水的摄取和纳米颗粒内部的缓冲液交换以及蛋白质扩散。在本公开的一些方面,LNP的直径范围为约

30至约500nm。在本公开的一些方面,LNP的直径范围为约30至约500nm、约50至约400nm、约70至约300nm、约100至约200nm、约100至约175nm或约100至约160nm。在本公开的一些方面,LNP的直径范围为100-160nm。在本公开的一些方面,LNP的直径可以为约30nm、约40nm、约50nm、约60nm、约70nm、约80nm、约90nm、约100nm、约101nm、约102nm、约103nm、约104nm、约105nm、约106nm、约107nm、约108nm、约109nm、约110nm、约111nm、约112nm、约113nm、约114nm、约115nm、约116nm、约117nm、约118nm、约119nm、约120nm、约130nm、约140nm、约150nm或约160nm。在一些方面,脂质纳米颗粒具有约140nm的直径。

[0162] ζ电位是脂质纳米颗粒表面上的有效电荷的量度。ζ电位的大小提供了关于颗粒稳定性的信息。在一些方面,本文所述的纳米颗粒的ζ电位范围为约-20至约20mv。在本公开的一些方面,LNP的ζ电位范围为约3至约6mv。在本公开的一些方面,LNP的ζ电位可以为约3mv、约3.1mv、约3.2mv、约3.3mv、约3.4mv、约3.5mv、约3.6mv、约3.7mv、约3.8mv、约3.9mv、约4mv、约4.1mv、约4.2mv、约4.3mv、约4.4mv、约4.5mv、约4.6mv、约4.7mv、约4.8mv、约4.9mv、约5mv、约5.1mv、约5.2mv、约5.3mv、约5.4mv、约5.5mv、约5.6mv、约5.7mv、约5.8mv、约5.9mv或约6mv。在一些方面,本文所述的纳米颗粒的ζ电位可以为约-6.0mv、约-5.9mv、约-5.8mv、约-5.7mv、约-5.6mv、约-5.5mv、约-5.4mv、约-5.3mv、约-5.2mv、约-5.1mv、约-5.0mv、约-4.9mv、约-4.8mv、约-4.7mv、约-4.6mv、约-4.5mv、约-4.4mv、约-4.3mv、约-4.2mv、约-4.1mv、约-4.0mv、约-3.9mv、约-3.8mv、约-3.7mv、约-3.6mv、约-3.5mv、约-3.4mv、约-3.3mv、约-3.2mv、约-3.1mv、约-3.0mv、约-2.9mv、约-2.8mv、约-2.7mv、约-2.6mv、约-2.5mv、约-2.4mv、约-2.3mv、约-2.2mv、约-2.1mv、约-2.0mv、约-1.9mv、约-1.8mv、约-1.7mv、约-1.6mv、约-1.5mv、约-1.4mv、约-1.3mv、约-1.2mv、约-1.1mv、约-1.0mv、约-0.9mv、约-0.8mv、约-0.7mv、约-0.6mv、约-0.5mv、约-0.4mv、约-0.3mv、约-0.2mv、约-0.1mv、约0.0mv,0.1ab out mv、约0.2mv、约0.3mv、约0.4mv、约0.5mv、约0.6mv、约0.7mv、约0.8mv、约0.9mv、约1.0mv、约1.1mv、约1.2mv、约1.3mv、约1.4mv、约1.5mv、约1.6mv、约1.7mv、约1.8mv、约1.9mv、约2.0mv、约2.1mv、约2.2mv、约2.3mv、约2.4mv、约2.5mv、约2.6mv、约2.7mv、约2.8mv、约2.9mv、约3.0mv、约3.1mv、约3.2mv、约3.3mv、约3.4mv、约3.5mv、约3.6mv、约3.7mv、约3.8mv、约3.9mv、约4.0mv、约4.1mv、约4.2mv、约4.3mv、约4.4mv、约4.5mv、约4.6mv、约4.7mv、约4.8mv、约4.9mv、约5.0mv、约5.1mv、约5.2mv、约5.3mv、约5.4mv、约5.5mv、约5.6mv、约5.7mv、约5.8mv、约5.9mv或约6.0mv

[0163] 在一些方面,本公开涉及用脂质纳米颗粒(LNP)包封的多核苷酸(例如,VEE复制子mRNA)。在本公开的一些方面,LNP的脂质与多核苷酸(例如,VEE复制子mRNA)之间的质量比范围为约1:2至约15:1。在一些方面,脂质与多核苷酸(例如,VEE复制子mRNA)之间的质量比可以为约1:2、约1:1.9、约1:1.8、约1:1.7、约1:1.6、约1:1.5、约1:1.4、约1:1.3、约1:1.2、约1:1.1、约1:1、约1.1:1、约1.2:1、约1.3:1、约1.4:1、约1.5:1、约1.6:1、约1.7:1、约1.8:1、约1.9:1、约2:1、约2.5:1、约3:1、约3.5:1、约4:1、约4.5:1、约5:1、约5.5:1、约6:1、约6.5:1、约7:1、约7.5:1、约8:1、约8.5:1、约9:1、约9.5:1、约10:1、约10.5:1、约11:1、约11.5:1、约12:1、约12.5:1、约13:1、约13.5:1、约14:1、约14.5:1或约15:1。在本公开的一些方面,脂质与多核苷酸(例如,VEE复制子mRNA)之间的质量比为约10:1。

[0164] IV.VEE复制子

[0165] 除了一种或多种类型的脂质(例如,上述那些)之外,本公开的LNP包含VEE复制子,

所述VEE复制子包含编码有效载荷的核酸序列。如本公开其他地方进一步所述,申请人已经鉴定与非肝组织(例如,脾和肺)相比,VEE复制子与一种或多种脂质(例如,类脂,例如,TT3)之间的相互作用为本文所述的LNP提供了某些改进的性质,诸如组织特异性向性,其允许LNP避开肝脏和/或减少肝脏内有效载荷的表达。

[0166] VEE病毒是通常由蚊子携带的病毒病原体,其主要在马物种中引起VEE或脑脊髓炎。然而,人类也可能感染VEE,并且免疫系统较弱的人(如果感染VEE)尤其具有发生严重并发症的风险。VEE的病毒体是球形的,并且具有脂质膜,其中糖蛋白表面蛋白散布在外表面周围。VEE的基因组为约11.45kb,不包括5'-末端帽和3'-末端poly(A)束,并且包含四种非结构蛋白(nsP)和五种结构蛋白。非结构蛋白包括nsP1、nsP2、nsP3和nsP4,而结构区编码蛋白C、E3、E2、6K和E1。在一些方面,自扩增复制子RNA是源自VEE的WT复制子RNA。野生型VEE病毒复制子RNA的序列如SEQ ID NO:186所示(参见表4)。

[0167] 在一些方面,可用于本公开的VEE复制子包含与SEQ ID NO:186中所示的序列或其片段具有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%序列同一性的核苷酸序列。在一些方面,可用于本公开的VEE复制子包含与SEQ ID NO:187中所示的序列具有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%序列同一性的核苷酸序列。在一些方面,VEE复制子包含SEQ ID NO:187中所示的核酸序列。在一些方面,VEE复制子由SEQ ID NO:187中所示的核酸序列组成。在一些方面,VEE复制子基本上由SEQ ID NO:187中所示的核酸序列组成。

[0168] 在一些方面,可用于本公开的VEE复制子包括本领域已知的任何VEE复制子。在一些方面,VEE复制子包含一个或多个突变。例如,在一些方面,VEE复制子包含具有非结构蛋白nsP2和nsP3的突变,其中所述突变促进人细胞中的亚基因组表达。在一些方面,与野生型VEE复制子(SEQ ID NO:186)相比,VEE复制子包含允许所编码的有效载荷的更高表达的突变。在一些方面,自扩增复制子RNA在SEQ ID NO:186的WT复制子的核酸位置3936和/或4758处包含至少一个点突变。在一些方面,自扩增复制子RNA包含以下点突变中的至少一者:SEQ ID NO:186的WT复制子序列的位置3936处的鸟嘌呤变为胞嘧啶(G3936C)和位置4758处的腺嘌呤变为鸟嘌呤(A4758G)。G3936C突变将导致氨基酸残基1309处的甘氨酸变为精氨酸(G1309R)。A4758G突变将导致氨基酸残基1583处的丝氨酸变为甘氨酸(51583G)。关于此类VEE复制子的额外的公开内容在例如US20200281994A1中提供,其通过引用以其整体并入本文。

[0169] 不受任何一种理论的束缚,在一些方面,VEE复制子与一种或多种脂质(例如,类脂,例如,TT3)之间的相互作用导致LNP不靶向肝脏。并且,由于LNP不靶向肝脏,所以在一些方面,有效载荷不在肝脏中表达。在一些方面,本文所述的LNP(例如,包含VEE复制子,所述VEE复制子包含编码有效载荷的核酸序列)能够靶向肝脏,但是与非肝组织中的对应表达相比,有效载荷的表达减少。

[0170] 在一些方面,VEE复制子能够诱导toll样受体(TLR)的活化。TLR的子集TLR3、TLR7/8和TLR9通过触发抗病毒细胞因子诸如I型干扰素(IFN)的产生而参与抗病毒应答。TLR3对双链RNA做出反应,所述双链RNA是许多病毒的复制中间体。TLR7/8识别病毒单链RNA,而

TLR9识别病毒DNA内未甲基化的CpG基序。参与病毒识别的TLR在内体膜上表达,并且可以根据它们对衔接蛋白MyD88的需求进行分离:TLR3活性不依赖于MyD88,而TLRs7/8/9依赖于MyD88。TLR3的活化导致I型干扰素(IFN)的产生。持续的Rip3活化和坏死性凋亡需要通过ISGF3(STAT1/STAT2/IRF9)复合物的I型干扰素信号传导。不受任何一种理论的束缚,在一些方面,I型干扰素的诱导可以减少和/或抑制有效载荷在肝脏内的表达。

[0171] IV.A.有效载荷

[0172] 如本文所述,可用于本公开的VEE复制子包含有效载荷。如本文所用,术语"有效载荷"是指能够作用于与本文所述的LNP接触的靶标(例如,靶细胞)的任何药剂。在一些方面,除非另有说明否则术语有效载荷可以与术语"生物活性分子"互换使用。可用于本公开的有效载荷的非限制性示例包括:核苷酸(例如,包含可检测部分或毒素或破坏转录的核苷酸)、核酸(例如,编码多肽(诸如酶)的DNA或mRNA分子,或具有调节功能的RNA分子,诸如miRNA、dsDNA、lncRNA、siRNA、反义寡核苷酸、磷酸二胺吗啉代寡核苷酸(PMO)、肽缀合的磷酸二胺吗啉代寡核苷酸(PPMO)或它们的组合)、氨基酸(例如,包含可检测部分或毒素或破坏翻译的氨基酸)、多肽(例如,酶)、脂质、碳水化合物和小分子(例如,小分子药物和毒素)。

[0173] 在一些方面,有效载荷包含编码蛋白质(例如,异源蛋白质)的核酸序列。如对本领域技术人员显而易见的,任何合适的蛋白质都可以编码在有效载荷中。在一些方面,蛋白质包含可检测的蛋白质(例如,荧光蛋白)。此类可检测的蛋白质的非限制性示例包括:荧光素酶、wt-GFP、绿色荧光蛋白(例如,EGFP、Emerald、Superfolder GFP、Azami Green、mWasabi、TagGFP、TurboGFP、AcGFP、ZsGreen、T-Sapphire等)、蓝色荧光蛋白(例如,EBFP、EBFP2、Azurite、mTagBFP等)、青色荧光蛋白(例如,ECFP、mECFP、Cerulean、mTurquoise、CyPet、AmCyan1、Midori-Ishi Cyan、TagCFP、mTFP1(Teal)等)、黄色荧光蛋白(例如,EYFP、Topaz、Venus、mCitrine、YPet、TagYFP、PhiYFP、ZsYellow1、mBanana等)、橙色荧光蛋白(例如,Kusabira Orange、Kusabira Orange2、mOrange、mOrange2、dTomato、dTomato-Tandem、TagRFP、TagRFP-T、DsRed、DsRed2、DsRed-Express(T1)、DsRed-Monomer、mTangerine等)或红色荧光蛋白(例如,mRuby、mApple、mStrawberry、AsRed2、mRFP1、JRed、mCherry、HcRed1、mRaspberry、dKeima-Tandem、HcRed-Tandem、mPlum、AQ143等)。

[0174] 在一些方面,有效载荷包含编码治疗性蛋白质的核酸序列。此类治疗性蛋白质的非限制性示例包括细胞因子。在一些方面,细胞因子包含白介素(IL)-12分子。在一些方面,IL-12分子包含IL-12、IL-12亚基(例如,IL-12β亚基或IL-12α亚基)或保留免疫调节功能的突变体IL-12分子。在一些方面,细胞因子不是IL-12。在一些方面,细胞因子选自(i)细胞因子的共同γ链家族;(ii)细胞因子的IL-1家族;(iii)造血细胞因子;(iv)干扰素(例如,I型、II型或III型);(v)细胞因子的TNF家族;(vi)细胞因子IL-17家族;(vii)损伤相关分子模式(DAMP);(viii)致耐受细胞因子;或(ix)它们的组合。在一些方面,细胞因子包含IL-2、IL-4、IL-7、IL-10、IL-15、IL-21、IFN-γ、IL-1α、IL-1β、IL-1ra、IL-18、IL-33、IL-36α、IL-36β、IL-36γ、IL-36ra、IL-37、IL-38、IL-3、IL-5、IL-6、IL-11、IL-13、IL-23、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、粒细胞-集落刺激因子(G-CSF)、白血病抑制因子(LIF)、干细胞因子(SCF)、血小板生成素(TPO)、巨噬细胞-集落刺激因子(M-CSF)、促红细胞生成素(EPO)、Flt-3、IFN-α、IFN-β、IFN-γ、IL-19、IL-20、IL-22、IL-24、TNF-α、TNF-β、BAFF、APRIL、淋巴毒素β(TNF-γ)、IL-17A、IL-17B、IL-17C、IL-17D、IL-17E、IL-17F、IL-25、TSLP、

IL-35、IL-27、TGF-β或它们的组合。下文进一步提供了可编码的其他蛋白质的额外示例。

[0175] 在有效载荷包含编码IL-12蛋白的核酸序列的情况下,在一些方面,IL-12蛋白(例如,由本文所述的核酸分子编码)包含与SEQ ID NO:182至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%相同的氨基酸序列。

[0176] 在一些方面,IL-12分子包含IL-12α和/或IL-12β亚基。在一些方面,IL-12α亚基包含与SEQ ID NO:183至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%相同的氨基酸序列。

[0177] 在一些方面,IL-12β亚基包含与SEQ ID NO:184至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%相同的氨基酸序列。

[0178] 在一些方面,本文所述的VEE复制子包含已进行密码子优化的核酸序列。因此,在一些方面,本文公开的编码IL-12蛋白(例如,IL-12p35亚基、IL-12p40亚基或异源二聚体IL-12p70)的核苷酸序列不同于野生型核苷酸序列(例如,SEQ ID NO:185)的核苷酸序列。

[0179] 在一些方面,VEE复制子包含编码IL-12β亚基的核酸序列,其中所述核酸序列与SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:58、SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:71、SEQ ID NO:72、SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:74或SEQ ID NO:75中任一项所示的序列具有至少约75%、至少约76%、至少约77%、至少约78%、至少约79%、至少约80%、至少约81%、至少约82%、至少约83%、至少约84%、至少约85%、至少约86%、至少约87%、至少约88%、至少约89%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%的序列同一性。

[0180] 在一些方面,可用于本公开的VEE复制子包含编码IL-12β亚基的核酸序列,其中所述核酸序列(i)与SEQ ID NO:51中所示的序列具有至少76%、至少77%、至少78%、至少79%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性;(ii)与SEQ ID NO:52中所示的序列具有至少78%、至少79%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性;(iii)与SEQ ID NO:53中所示的序列具有至少77%、至少78%、至少79%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性;(iv)与SEQ ID NO:54中所示的序列具有至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性;(v)与SEQ ID NO:55中所示的序列具有至

少88％、至少89％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％的序列同一性；(vi)与SEQ ID NO:56中所示的序列具有至少87％、至少88％、至少89％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％的序列同一性；(vii)与SEQ ID NO:57中所示的序列具有至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％的序列同一性；(viii)与SEQ ID NO:58中所示的序列具有至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％的序列同一性；(ix)与SEQ ID NO:59中所示的序列具有至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％的序列同一性；(x)与SEQ ID NO:65、69或74中所示的序列具有至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％的序列同一性；(xi)与SEQ ID NO:66、70或75中所示的序列具有至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％的序列同一性；(xii)与SEQ ID NO:62中所示的序列具有至少97％、至少98％、至少99％或100％的序列同一性；(xiii)与SEQ ID NO:63中所示的序列具有至少99％或100％的序列同一性；或(xiv)与SEQ ID NO:64中所示的序列具有至少98％、至少99％或100％的序列同一性。

[0181] 在一些方面，编码IL-12β亚基的核酸分子包含SEQ ID NO:51中所示的序列。在一些方面，编码IL-12β亚基的核酸分子包含SEQ ID NO:52中所示的序列。在一些方面，编码IL-12β亚基的核酸分子包含SEQ ID NO:53中所示的序列。在一些方面，编码IL-12β亚基的核酸分子包含SEQ ID NO:54中所示的序列。在一些方面，编码IL-12β亚基的核酸分子包含SEQ ID NO:55中所示的序列。在一些方面，编码IL-12β亚基的核酸分子包含SEQ ID NO:56中所示的序列。在一些方面，编码IL-12β亚基的核酸分子包含SEQ ID NO:57中所示的序列。在一些方面，编码IL-12β亚基的核酸分子包含SEQ ID NO:58中所示的序列。在一些方面，编码IL-12β亚基的核酸分子包含SEQ ID NO:59中所示的序列。在一些方面，编码IL-12β亚基的核酸分子包含SEQ ID NO:65中所示的序列。在一些方面，编码IL-12β亚基的核酸分子包含SEQ ID NO:66中所示的序列。在一些方面，编码IL-12β亚基的核酸分子包含SEQ ID NO:67中所示的序列。在一些方面，编码IL-12β亚基的核酸分子包含SEQ ID NO:68中所示的序列。在一些方面，编码IL-12β亚基的核酸分子包含SEQ ID NO:69中所示的序列。在一些方面，编码IL-12β亚基的核酸分子包含SEQ ID NO:70中所示的序列。在一些方面，编码IL-12β亚基的核酸分子包含SEQ ID NO:71中所示的序列。在一些方面，编码IL-12β亚基的核酸分子包含SEQ ID NO:72中所示的序列。在一些方面，编码IL-12β亚基的核酸分子包含SEQ ID NO:73中所示的序列。在一些方面，编码IL-12β亚基的核酸分子包含SEQ ID NO:74中所示的序列。在一些方面，编码IL-12β亚基的核酸分子包含SEQ ID NO:75中所示的序列。在一些方面，编码IL-12β亚基的核酸分子包含SEQ ID NO:62中所示的序列。在一些方面，编码IL-12β亚基的核酸分子包含SEQ ID NO:63中所示的序列。在一些方面，编码IL-12β亚基的核酸分子包含SEQ ID NO:64中所示的序列。在一些方面，编码IL-12β亚基的核酸分子包含SEQ ID NO:60中所示的序列。在一些方面，编码IL-12β亚基的核酸分子包含SEQ ID NO:61中所示的序列。

[0182] 在一些方面，VEE复制子包含编码IL-12 p35亚基(在本文中也称为IL-12α亚基)的

核酸序列,其中所述核酸序列与SEQ ID NO:101、SEQ ID NO:102、SEQ ID NO:103、SEQ ID NO:104、SEQ ID NO:105、SEQ ID NO:106、SEQ ID NO:107、SEQ ID NO:108、SEQ ID NO:109、SEQ ID NO:110、SEQ ID NO:111、SEQ ID NO:112、SEQ ID NO:113、SEQ ID NO:114、SEQ ID NO:115、SEQ ID NO:116、SEQ ID NO:117、SEQ ID NO:118、SEQ ID NO:119、SEQ ID NO:120、SEQ ID NO:121、SEQ ID NO:122、SEQ ID NO:123、SEQ ID NO:124或SEQ ID NO:125中任一项所示的序列具有至少约77%、至少约78%、至少约79%、至少约80%、至少约81%、至少约82%、至少约83%、至少约84%、至少约85%、至少约86%、至少约87%、至少约88%、至少约89%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%的序列同一性。

[0183] 在一些方面,可用于本公开的VEE复制子包含编码IL-12p35亚基的核酸序列,其中所述核酸序列(i)与SEQ ID NO:101中所示的序列具有至少79%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性;(ii)与SEQ ID NO:102中所示的序列具有至少78%、至少79%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性;(iii)与SEQ ID NO:103中所示的序列具有至少77%、至少78%、至少79%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性;(iv)与SEQ ID NO:104中所示的序列具有至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性;(v)与SEQ ID NO:105中所示的序列具有至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性;(vi)与SEQ ID NO:106中所示的序列具有至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性;(vii)与SEQ ID NO:107中所示的序列具有至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性;(viii)与SEQ ID NO:108中所示的序列具有至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性;(ix)与SEQ ID NO:109中所示的序列具有至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性;(x)与SEQ ID NO:115、119或124中所示的序列具有至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性;(xi)与SEQ ID NO:116、120或125中所示的序列具有至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性;(xii)与SEQ ID NO:112中所示的序列具有至少98%、至少99%或100%的序列同一性;(xiii)与SEQ ID NO:113中所示的序列具有至少98%、至少99%或100%的序列同一性;或(xiv)与SEQ ID NO:114中所示的序列具有至少98%、至少99%或100%的序列同一性。

[0184] 在一些方面,编码IL-12α亚基的核酸分子包含SEQ ID NO:101中所示的序列。在一些方面,编码IL-12α亚基的核酸分子包含SEQ ID NO:102中所示的序列。在一些方面,编码IL-12α亚基的核酸分子包含SEQ ID NO:103中所示的序列。在一些方面,编码IL-12α亚基的核酸分子包含SEQ ID NO:104中所示的序列。在一些方面,编码IL-12α亚基的核酸分子包含SEQ ID NO:105中所示的序列。在一些方面,编码IL-12α亚基的核酸分子包含SEQ ID NO:106中所示的序列。在一些方面,编码IL-12α亚基的核酸分子包含SEQ ID NO:107中所示的序列。在一些方面,编码IL-12α亚基的核酸分子包含SEQ ID NO:108中所示的序列。在一些方面,编码IL-12α亚基的核酸分子包含SEQ ID NO:109中所示的序列。在一些方面,编码IL-12α亚基的核酸分子包含SEQ ID NO:115中所示的序列。在一些方面,编码IL-12α亚基的核酸分子包含SEQ ID NO:116中所示的序列。在一些方面,编码IL-12β亚基的核酸分子包含SEQ ID NO:117中所示的序列。在一些方面,编码IL-12β亚基的核酸分子包含SEQ ID NO:118中所示的序列。在一些方面,编码IL-12β亚基的核酸分子包含SEQ ID NO:119]中所示的序列。在一些方面,编码IL-12β亚基的核酸分子包含SEQ ID NO:120中所示的序列。在一些方面,编码IL-12β亚基的核酸分子包含SEQ ID NO:121中所示的序列。在一些方面,编码IL-12β亚基的核酸分子包含SEQ ID NO:122中所示的序列。在一些方面,编码IL-12β亚基的核酸分子包含SEQ ID NO:123中所示的序列。在一些方面,编码IL-12β亚基的核酸分子包含SEQ ID NO:124中所示的序列。在一些方面,编码IL-12β亚基的核酸分子包含SEQ ID NO:125中所示的序列。在一些方面,编码IL-12α亚基的核酸分子包含SEQ ID NO:112中所示的序列。在一些方面,编码IL-12α亚基的核酸分子包含SEQ ID NO:113中所示的序列。在一些方面,编码IL-12α亚基的核酸分子包含SEQ ID NO:114中所示的序列。在一些方面,编码IL-12β亚基的核酸分子包含SEQ ID NO:110中所示的序列。在一些方面,编码IL-12β亚基的核酸分子包含SEQ ID NO:111中所示的序列。

[0185] 在一些方面,编码IL-12p40亚基的核酸分子和编码IL-12p35亚基的核酸分子可以彼此缀合。例如,在一些方面,本公开提供了一种分离的多核苷酸,其包含第一核酸和第二核酸,其中第一核酸编码IL-12p40亚基并且第二核酸编码IL-12p35亚基。在一些方面,IL-12α亚基和IL-12β亚基通过接头连接。在一些方面,接头包含至少约2、至少约5、至少约6、至少约7、至少约8、至少约9、至少约10、至少约11、至少约12、至少约13、至少约14、至少约15、至少约16、至少约17、至少约18、至少约19或至少约20个氨基酸的氨基酸接头。在一些方面,接头包含(GS)接头。在一些方面,GS接头具有式(Gly3Ser)n或S(Gly3Ser)n,其中n为选自由以下组成的组的正整数:1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50、60、70、80或100。在一些方面,(Gly3Ser)n接头是(Gly3Ser)3或(Gly3Ser)4。

[0186] 在一些方面,VEE复制子包含编码趋化因子的核酸序列。趋化因子的非限制性示例包括CCL14、CCL19、CCL20、CCL21、CCL25、CCL27、CXCL12、CXCL13、CXCL-8、CCL2、CCL3、CCL4、CCL5、CCL11和CXCL10。在一些方面,VEE复制子包含编码生长因子的核酸序列。如本文所用,术语“生长因子”是指能够在细胞之间进行信号传导并刺激细胞生长的天然存在的物质。虽然细胞因子可以是生长因子,但某些类型的细胞因子也可以对细胞生长具有抑制作用,因此区分了这两个术语。生长因子的非限制性示例包括肾上腺髓质素(AM)、血管生成素(Ang)、自分泌运动因子、骨形态发生蛋白(BMP)、睫状神经营养因子(CNTF)、白血病抑制因子(LIF)、白介素6(IL-6)、巨噬细胞集落刺激因子(m-CSF)、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、

粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、表皮生长因子(EGF)、肝配蛋白A1、肝配蛋白A2、肝配蛋白A3、肝配蛋白A4、肝配蛋白A5、肝配蛋白B1、肝配蛋白B2、肝配蛋白B3、促红细胞生成素(EPO)、成纤维细胞生长因子1(FGF1)、成纤维细胞生长因子2(FGF2)、成纤维细胞生长因子3(FGF3)、成纤维细胞生长因子4(FGF4)、成纤维细胞生长因子5(FGF5)、成纤维细胞生长因子6(FGF6)、成纤维细胞生长因子7(FGF7)、成纤维细胞生长因子8(FGF8)、成纤维细胞生长因子9(FGF9)、成纤维细胞生长因子10(FGF10)、成纤维细胞生长因子11(FGF11)、成纤维细胞生长因子12(FGF12)、成纤维细胞生长因子13(FGF13)、成纤维细胞生长因子14(FGF14)、成纤维细胞生长因子15(FGF15)、成纤维细胞生长因子16(FGF16)、成纤维细胞生长因子17(FGF17)、成纤维细胞生长因子18(FGF18)、成纤维细胞生长因子19(FGF19)、成纤维细胞生长因子20(FGF20)、成纤维细胞生长因子21(FGF21)、成纤维细胞生长因子22(FGF22)、成纤维细胞生长因子23(FGF23)、胎牛生长激素(FBS)、胶质细胞源性神经营养因子(GDNF)、神经营养素、Persephin、Artemin、生长分化因子9(GDF9)、肝细胞生长因子(HGF)、肝细胞瘤衍生生长因子(HDGF)、胰岛素、胰岛素样生长因子1(IGF-1)、胰岛素样生长因子2(IGF-2)、白介素1(IL-1)、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、角质形成细胞生长因子(KGF)、迁移刺激因子(MSF)、巨噬细胞刺激蛋白(MSP)、肌生长抑制素(GDF-8)、神经调节蛋白1(NRG1)、神经调节蛋白2(NRG2)、神经调节蛋白3(NRG3)、神经调节蛋白4(NRG4)、脑源性神经营养因子(BDNF)、神经生长因子(NGF)、神经营养蛋白3(NT-3)、神经营养蛋白4(NT-4)、胎盘生长因子(PGF)、血小板源性生长因子(PDGF)、肾素酶(RNLS)、T细胞生长因子(TCGF)、血小板生成素(TPO)、转化生长因子α(TGF-α)、转化生长因子β(TGF-β)、肿瘤坏死因子α(TNF-α)和血管内皮生长因子(VEGF)。

[0187] 在一些方面,可用于本公开的VEE复制子包含编码配体结合蛋白的核酸序列。配体结合蛋白的非限制性示例包括嵌合抗原受体(CAR)、T细胞受体(TCR)、嵌合抗体-T细胞受体(caTCR)、嵌合信号传导受体(CSR)、T细胞受体模拟物(TCR模拟物)以及它们的组合。

[0188] 在一些方面,VEE复制子包含编码CAR的核酸序列。在一些方面,CAR被设计为标准CAR。在“标准CAR”中,不同的组分(例如,细胞外靶向结构域、跨膜结构域和细胞内信号传导/活化结构域)被线性构建为单个融合蛋白。在一些方面,CAR被设计为第一代CAR。“第一代”CAR由细胞外结合结构域、铰链区、跨膜结构域和一个或多个细胞内信号传导结构域组成。所有第一代CAR都包含CD3ζ链结构域作为细胞内信号传导结构域。在一些方面,CAR被设计为第二代CAR。“第二代”CAR另外含有共刺激结构域(例如,CD28或4-1BB)。在一些方面,CAR被设计为第三代CAR。“第三代”CAR与第二代CAR相似,不同之处在于它们包含多个共刺激结构域(例如,CD28-4-1BB或CD28-OX40)。在一些方面,CAR被设计为第四代CAR。“第四代”CAR(也称为TRUCK或装甲CAR)另外含有可以进一步改善功能的额外的因子。例如,在一些方面,第四代CAR另外含有CAR在靶向肿瘤组织中信号传导时可以释放的细胞因子。在一些方面,第四代CAR包含一个或多个额外的元件,诸如归巢基因和自杀基因,其可以帮助进一步调节CAR的活性。在一些方面,CAR被设计为分体式CAR。在“分体式CAR”系统中,CAR的一个或多个组分(例如,细胞外靶向结构域、跨膜结构域和细胞内信号传导/活化结构域)被分成两个或多个部分,使得它依赖于促进完整功能受体组装的多个输入。在一些方面,CAR被设计为可切换的CAR。利用“可切换的CAR”,CAR可以在存在刺激的情况下被切换(例如,瞬时地)打开(开启开关CAR)或关闭(关闭开关CAR)。可以与本公开一起使用的CAR的额外的示例描

述于例如US 2020/0172879A1和US2019/0183932 A1中,每一篇均通过引用以其整体并入本文。

[0189] 在一些方面,本文所述的VEE复制子包含编码抗体或其抗原结合片段(本文统称为“抗体”)的核酸序列。抗体可以源自天然来源,或部分或全部合成产生。在一些方面,抗体是单克隆抗体。在一些方面,单克隆抗体是IgG抗体。在一些方面,单克隆抗体是IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。在一些方面,抗体是多克隆抗体。在一些方面,抗原结合片段选自Fab、Fab'和F(ab')2、F(ab1)2、Fv、dAb和Fd片段。在一些方面,抗原结合片段是scFv或(scFv)2片段。在一些方面,抗体或抗原结合片段是NANOBODY®(单结构域抗体)。在一些方面,抗体或抗原结合片段是双特异性或多特异性抗体。

[0190] IV B.额外的组分

[0191] 在一些方面,可用于本公开的VEE复制子包含具有以下额外组分中的一者或多者的核酸序列。

[0192] 终端架构修改:UTR

[0193] 基因的非翻译区(UTR)被转录但不被翻译。5'UTR在转录起始位点开始并延续至起始密码子,但不包括起始密码子;而3'UTR在终止密码子后立即开始并延续直至转录终止信号。越来越多的证据表明UTR在核酸分子的稳定性和翻译方面所起的调节作用。可以将UTR的调节特征掺入本公开的RNA中,以增强分子的稳定性。还可以掺入特定特征以确保转录物的受控下调,以防它们被错误地导向不期望的器官位点。

[0194] 5'UTR和翻译起始

[0195] 天然5'UTR具有在翻译起始中起作用的特征。它们含有像Kozak序列这样的特征,众所周知,Kozak序列参与了核糖体启动许多基因翻译的过程。Kozak序列具有共有CCR(A/G)CCAUGG,其中R是起始密码子(AUG)上游三个碱基处的嘌呤(腺嘌呤或鸟嘌呤),所述起始密码子后跟另一个“G”。还已知5'UTR形成参与延伸因子结合的二级结构。

[0196] 参与延伸因子结合的5'UTR二级结构可以与5'UTR或3'UTR中的其他RNA结合分子相互作用,以调节基因表达。例如,延伸因子EIF4A2与5'UTR中的二级结构元件的结合对于微RNA介导的阻遏是必需的(Meijer H A等人,Science,2013,340,82-85,其通过引用以其整体并入本文)。可以将5'UTR中的不同二级结构掺入侧翼区,以稳定特定组织或细胞中的mRNA或选择性地使其不稳定。

[0197] 通过对通常在特定靶器官的丰富表达的基因中发现的特征进行工程化,可以增强本公开的核酸或mRNA的稳定性和蛋白质产量。例如,引入肝脏表达的mRNA(诸如白蛋白、血清淀粉样蛋白A、载脂蛋白A/B/E、转铁蛋白、甲胎蛋白、促红细胞生成素或因子VIII)的5'UTR可用于增强核酸分子(诸如mmRNA)在肝细胞系或肝脏中的表达。同样,使用来自其他组织特异性mRNA的5'UTR来改善在该组织中的表达是可能的—对于肌肉(MyoD、肌球蛋白、肌红蛋白、肌细胞生成素、Herculin)、对于内皮细胞(Tie-1、CD36)、对于髓样细胞(C/EBP、AML1、G-CSF、GM-CSF、CD11b、MSR、Fr-1、i-NOS)、对于白细胞(CD45、CD18)、对于脂肪组织(CD36、GLUT4、ACRP30、脂联素)和对于肺上皮细胞(SP-A/B/C/D)。

[0198] 可以将其他非UTR序列掺入5'(或3'UTR)UTR中。例如,可以将内含子或内含子序列的部分掺入本公开的核酸或mRNA的侧翼区中。内含子序列的掺入可以增加蛋白质产量以及mRNA水平。

[0199] 在本公开的一些方面,来自GTX基因的IRES序列的至少一个片段可以包括在5'UTR中。作为非限制性示例,片段可以是来自GTX基因的IRES的18个核苷酸序列。作为另一个非限制性示例,来自GTX基因的IRES序列的18个核苷酸序列片段可以在本文所述的多核苷酸的5'UTR中串联重复。18个核苷酸序列可以在5'UTR中重复至少一次、至少两次、至少三次、至少四次、至少五次、至少六次、至少七次、至少八次、至少九次或超过十次。

[0200] 核苷酸可以从5'(或3')UTR中突变、替换和/或去除。例如,可将起始密码子上游的一个或多个核苷酸替换为另一个核苷酸。待替换的一个或多个核苷酸可以是起始密码子上游的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、35、40、45、50、55、60或超过60个核苷酸。作为另一个示例,可以从UTR中去除起始密码子上游的一个或多个核苷酸。

[0201] 5'UTR、3'UTR和翻译增强子元件(TEE)

[0202] 在一些方面,编码IL-12的核苷酸序列的5'UTR包含至少一个翻译增强子多核苷酸、翻译增强子元件、翻译增强子元件(统称为"TEE")。在一些方面,TEE位于转录启动子和起始密码子之间。在一些方面,在5'UTR中具有至少一个TEE的RNA在5'UTR处包含帽。在一些方面,至少一个TEE可以位于编码经历帽依赖性或帽非依赖性翻译的IL-12的核苷酸序列的5'UTR中。

[0203] 术语"翻译增强子元件(translation enhancer element)"或"翻译增强子元件(translation enhancer element)"(本文统称为"TEE")是指增加由mRNA产生的多肽或蛋白质的量的序列。

[0204] 在一个方面,TEE是UTR中的保守元件,其可以促进核酸的翻译活性,诸如但不限于帽依赖性或帽非依赖性翻译。这些序列的保守性先前已经由Panek等人(Nucleic Acids Research,2013,1-10;通过引用以其整体并入本文)在包括人类在内的14个物种中显示。

[0205] 在一些方面,编码IL-12的核苷酸序列具有至少一个TEE,所述至少一个TEE与美国申请号2014/0147454中公开的具有至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%或至少约99%的同一性,所述申请通过引用以其整体并入本文。在一些方面,RNA包括与美国专利公开号US20090226470、US20070048776、US20130177581和US20110124100、国际专利公开号WO1999024595、WO2012009644、WO2009075886和WO2007025008、欧洲专利公开号EP2610341A1和EP2610340A1、美国专利号6,310,197、美国专利号6,849,405、美国专利号7,456,273、美国专利号7,183,395中描述的TEE具有至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%或至少约99%同一性的至少一个TEE,所述专利中的每一个通过引用以其整体并入本文。

[0206] 在一些方面,编码IL-12的核苷酸序列的5'UTR可以包括至少1、至少2、至少3、至少4、至少5、至少6、至少7、至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少16、至少17、至少18、至少19、至少20、至少21、至少22、至少23、至少24、至少25、至少30、至少35、至少40、至少45、至少50、至少55或超过60个TEE序列。在一些方面,RNA的5'UTR中的TEE序列是相同或不同的TEE序列。在一些方面,TEE序列处于重复一次、两次或超过三次的模式,诸如ABABAB或AABBAABBAABB或ABCABCABC或其变体。在这些模式中,每个字母A、B或C代表核苷酸水平上的不同TEE序列。

[0207] 在一些方面,分隔两个TEE序列的间隔子包括本领域已知的调节RNA的翻译的其他序列,诸如但不限于本文所述的miR序列(例如,miR结合位点和miR种子)。在一些方面,用于分隔两个TEE序列的每个间隔子包括不同的miR序列或miR序列的组分(例如,miR种子序列)。

[0208] 在一些方面,在本公开的编码IL-12的核苷酸序列的5'UTR中使用的TEE是IRES序列,诸如但不限于描述于美国专利号7,468,275和国际专利公开号WO2001055369中的那些,所述专利中的每一个通过引用以其整体并入本文。

[0209] 在一些方面,本文所述的TEE位于编码IL-12的核苷酸序列的5'UTR和/或3'UTR中。在一些方面,位于3'UTR中的TEE与位于5'UTR中和/或被描述用于掺入5'UTR中的TEE相同和/或不同。

[0210] 在一些方面,编码IL-12的核苷酸序列的3'UTR可以包括至少1、至少2、至少3、至少4、至少5、至少6、至少7、至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少16、至少17、至少18、至少19、至少20、至少21、至少22、至少23、至少24、至少25、至少30、至少35、至少40、至少45、至少50、至少55或超过60个TEE序列。在一些方面,本公开的编码IL-12的核苷酸序列的3'UTR中的TEE序列是相同或不同的TEE序列。TEE序列处于重复一次、两次或超过三次的模式,诸如ABABAB或AABBAABBAABB或ABCABCABC或其变体。在这些模式中,每个字母A、B或C代表核苷酸水平上的不同TEE序列。

[0211] 在一些方面,3'UTR包括分隔两个TEE序列的间隔子。在一些方面,间隔子是15个核苷酸的间隔子和/或本领域已知的其他间隔子。在一些方面,3'UTR可以包括在3'UTR中重复至少一次、至少两次、至少3次、至少4次、至少5次、至少6次、至少7次、至少8次和至少9次或超过9次的TEE序列-间隔子模块。

[0212] 在一些方面,分隔两个TEE序列的间隔子包括本领域已知的调节编码IL-12的核苷酸序列的翻译的其他序列,诸如但不限于本文所述的miR序列(例如,miR结合位点和miR种子)。在一些方面,用于分隔两个TEE序列的每个间隔子包括不同的miR序列或miR序列的组分(例如,miR种子序列)。

[0213] 掺入微RNA结合位点

[0214] 在一些方面,编码IL-12的核苷酸序列进一步包含传感器序列。传感器序列包括例如微RNA结合位点、转录因子结合位点、结构化mRNA序列和/或基序、经工程化以充当用于内源性核酸结合分子的假受体的人工结合位点。包含至少一个传感器序列的多核苷酸的非限制性示例描述于美国申请号2014/0147454中,所述申请特此通过引用以其整体并入。

[0215] 在一些方面,进行靶细胞或组织的微RNA(miRNA)谱分析,以确定细胞或组织中miRNA的存在或不存在。

[0216] 微RNA(或miRNA)是19-25个核苷酸长的非编码RNA,其结合至核酸分子的3'UTR并通过降低核酸分子稳定性或通过抑制翻译来下调基因表达。在一些方面,RNA包含一个或多个微RNA靶序列、微RNA序列或微RNA种子。此类序列可对应于任何已知的微RNA,诸如美国公开US2005/0261218和美国公开US2005/0059005中教导的那些,所述美国公开的内容通过引用以其整体并入本文。作为非限制性示例,已知的微RNA、其序列和人类基因组中的种子序列描述于美国申请号2014/0147454中,所述申请通过引用以其整体并入本文。

[0217] 微RNA序列包含"种子"区,即成熟微RNA的2-8位区域中的序列,所述序列与miRNA

靶序列具有完美的沃森-克里克互补性。微RNA种子包含成熟微RNA的2-8位或2-7位。在一些方面,微RNA种子包含7个核苷酸(例如,成熟微RNA的核苷酸2-8),其中对应的miRNA靶标中的种子互补位点两侧是与微RNA位置1相对的腺嘌呤(A)。在一些方面,微RNA种子包含6个核苷酸(例如,成熟微RNA的核苷酸2-7),其中对应的miRNA靶标中的种子互补位点两侧是by与微RNA位置1相对的腺嘌呤(A)。参见例如Grimson A,Farh K,Johnston W K,Garrett-Engele P,Lim L P,Bartel D P;Mol Cell.2007年7月6日;27(1):91-105。微RNA种子的碱基与靶序列具有完全互补性。通过将微RNA靶序列工程化到本公开的核酸或mRNA的3'UTR中,可以靶向分子以进行降解或减少翻译,前提条件是所讨论的微RNA是可用的。这一过程将降低核酸分子递送时脱靶效应的危险。关于微RNA、微RNA靶区域及其表达模式和在生物学中的作用的鉴定已经报道(Bonauer等人,Curr Drug Targets 2010 11:943-949;Anand和Cheresh Curr Opin Hematol 2011 18:171-176;Contreras和Rao Leukemia 201226:404-413(2011年12月20日.doi:10.1038/leu.2011.356);Bartel Cell2009 136:215-233;Landgraf等人,Cell,2007 129:1401-1414;Gentner和Naldini,Tissue Antigens.2012 80:393-403及其中的所有参考文献;所述参考文献中的每一个通过引用以其整体并入本文)。

[0218] 例如,如果mRNA不旨在被递送到肝脏而是在肝脏那里结束,则在miR-122(一种肝脏中丰富的微RNA)的一个或多个靶位点被工程化到经修饰的核酸、增强的经修饰的RNA或核糖核酸的3'UTR中时,miR-122可以抑制所关注基因的表达。可以对不同微RNA的一个或多个结合位点的引入进行工程化,以进一步降低经修饰的核酸、增强的经修饰的RNA或核糖核酸的寿命、稳定性和蛋白质翻译。如本文所用,术语"微RNA位点"是指微RNA靶位点或微RNA识别位点或者微RNA结合或缔合的任何核苷酸序列。应当理解,"结合"可以遵循传统的沃森-克里克杂交规则,或者可以反映微RNA与靶序列在微RNA位点处或附近的任何稳定缔合。

[0219] 相反,出于本公开的编码IL-12的核苷酸序列的目的,微RNA结合位点可以从其天然存在的序列中工程化出来(即从其中去除),以便增加特异性组织中的蛋白质表达。例如,可以去除miR-122结合位点以改善肝脏中的蛋白质表达。

[0220] 在一些方面,编码IL-12的核苷酸序列在3'UTR中包含至少一个miRNA结合位点,以将细胞毒性或细胞保护性mRNA治疗剂导向特定细胞,诸如但不限于正常和/或癌细胞(例如,HEP3B或SNU449)。

[0221] 已知微RNA调节mRNA并由此调节蛋白质表达的组织的示例包括但不限于肝脏(miR-122)、肌肉(miR-133、miR-206、miR-208)、内皮细胞(miR-17-92、miR-126)、髓样细胞(miR-142-3p、miR-142-5p、miR-16、miR-21、miR-223、miR-24、miR-27)、脂肪组织(let-7、miR-30c)、心脏(miR-1d、miR-149)、肾脏(miR-192、miR-194、miR-204)、和肺上皮细胞(let-7、miR-133、miR-126)

[0222] 具体地,已知微RNA在免疫细胞(也称为造血细胞)中差异表达,所述免疫细胞诸如为抗原呈递细胞(APC)(例如,树突细胞和巨噬细胞)、巨噬细胞、单核细胞、B淋巴细胞、T淋巴细胞、粒细胞、自然杀伤细胞等。免疫细胞特异性微RNA参与免疫原性、自身免疫、对感染的免疫应答、炎症以及在基因治疗和组织/器官移植之后不需要的免疫应答。免疫细胞特异性微RNA还调节造血细胞(免疫细胞)的发育、增殖、分化和凋亡的许多方面。例如,miR-142和miR-146仅表达在免疫细胞中,特别富含在骨髓树突细胞中。在本领域中证明,通过将

miR-142结合位点添加到所递送的基因构建体的3'UTR中来关闭对外源核酸分子的免疫应答,从而使得能够在组织和细胞中更稳定地转移基因。miR-142有效降解抗原呈递细胞中的外源mRNA并抑制转导细胞的细胞毒性消除(Annoni A等人,blood,2009,114,5152-5161;Brown B D等人,Nat med.2006,12(5),585-591;Brown B D等人,blood,2007,110(13):4144-4152,所述参考文献中的每一个通过引用以其整体并入本文)。

[0223] 本领域进行了许多微RNA表达研究,以分析微RNA在各种癌细胞/组织和其他疾病中的差异表达。一些微RNA在某些癌细胞中异常过表达,而其他微RNA则表达不足。例如,微RNA在以下中差异表达:癌细胞(WO2008/154098、US2013/0059015、US2013/0042333、WO2011/157294);癌症干细胞(US2012/0053224);胰腺癌和疾病(US2009/0131348、US2011/0171646、US2010/0286232、美国专利号8,389,210);哮喘和炎症(美国专利号8,415,096);前列腺癌(US2013/0053264);肝细胞癌(WO2012/151212、US2012/0329672、WO2008/054828、美国专利号8,252,538);肺癌细胞(WO2011/076143、WO2013/033640、WO2009/070653、US2010/0323357);皮肤T细胞淋巴瘤(WO2013/011378);结直肠癌细胞(WO2011/0281756、WO2011/076142);癌症阳性淋巴结(WO2009/100430、US2009/0263803);鼻咽癌(EP2112235);慢性阻塞性肺病(US 2012/0264626、US2013/0053263);甲状腺癌(WO2013/066678);卵巢癌细胞(US2012/0309645、WO2011/095623);乳腺癌细胞(WO2008/154098、WO2007/081740、US2012/0214699)、白血病和淋巴瘤(WO2008/073915、US2009/0092974、US2012/0316081、US2012/0283310、WO2010/018563,所述参考文献中的每一个的内容通过引用以其整体并入本文。)

[0224] 可以将至少一个微RNA位点工程化到编码IL-12的核苷酸序列的3'UTR中。在一些方面,可以将至少两个、至少三个、至少四个、至少五个、至少六个、至少七个、至少八个、至少九个、至少十个或更多个微RNA位点工程化到编码IL-12的核苷酸序列的3'UTR中。在一些方面,掺入编码IL-12的核苷酸序列中的微RNA位点是相同或不同的微RNA位点。在一些方面,掺入编码IL-12的核苷酸序列中的微RNA位点靶向体内的相同或不同组织。作为非限制性示例,通过在mRNA的3'UTR中引入组织特异性、细胞类型特异性或疾病特异性微RNA结合位点,可以降低特定细胞类型(例如,肝细胞、骨髓细胞、内皮细胞、癌细胞等)中的表达程度。

[0225] 在一些方面,微RNA位点在3'UTR的5'末端附近、3'UTR的5'末端和3'末端之间的约一半处和/或3'UTR的3'末端附近被工程化。在一些方面,微RNA位点在3'UTR的5'末端附近以及3'UTR的5'末端和3'末端之间的约一半处被工程化。在一些方面,微RNA位点在3'UTR的3'末端附近以及3'UTR的5'末端和3'末端之间的约一半处被工程化。在一些方面,微RNA位点在3'UTR的5'末端附近和3'UTR的3'末端附近被工程化。

[0226] 在一些方面,mRNA包含与已知的种子序列具有100%同一性或与种子序列具有小于100%同一性的微RNA结合区位点。可以对种子序列进行部分突变,以降低微RNA结合亲和力,从而减少对该mRNA转录物的下调。本质上,靶mRNA和微RNA种子之间的匹配或错配程度可以充当变阻器,以更精细地调整微RNA调节蛋白质表达的能力。此外,微RNA结合位点的非种子区的突变也可影响微RNA调节蛋白质表达的能力。

[0227] RNA结合蛋白(RBP)的RNA基序

[0228] RNA结合蛋白(RBP)可以调节共转录和转录后基因表达的许多方面,诸如但不限于

RNA剪接、定位、翻译、周转、聚腺苷酸化、加帽、修饰、输出和定位。RNA结合结构域(RBD),诸如但不限于RNA识别基序(RR)和hnRNP K-同源性(KH)结构域,通常调节RBP与其RNA靶标之间的序列关联(Ray等人Nature 2013.499:172-177;通过引用以其整体并入本文)。在一些方面,典型RBD结合短RNA序列。在一些方面,典型RBD识别RNA结构。

[0229] RNA结合蛋白以及相关核酸和蛋白序列的非限制性示例描述于美国申请号2014/0147454中,所述申请通过引用以其整体并入本文。

[0230] 在一些方面,为了增加所关注mRNA的稳定性,将编码HuR的mRNA与所关注mRNA共转染或共注射到细胞或组织中。这些蛋白质也可以在体外拴系至所关注mRNA,然后一起施用至细胞。Poly A尾结合蛋白PABP与真核翻译起始因子eIF4G相互作用,以刺激翻译起始。将编码这些RBP的mRNA与mRNA药物共同施用和/或将这些蛋白质在体外拴系至mRNA药物并将蛋白质结合的mRNA施用到细胞中可以增加mRNA的翻译效率。相同的概念可以扩展到将mRNA与编码各种翻译因子和促进子的mRNA以及与蛋白质本身共同施用,以影响RNA稳定性和/或翻译效率。

[0231] 在一些方面,编码IL-12的核苷酸序列包含至少一个RNA结合基序,诸如但不限于RNA结合结构域(RBD)。

[0232] 在一些方面,连接核苷的第一区和/或至少一个侧翼区包含至少一个RBD。在一些方面,连接核苷的第一区包含与剪接因子相关的RBD,并且至少一个侧翼区包含用于稳定性和/或翻译因子的RBD。

[0233] 3'UTR中的其他调节元件

[0234] 除了微RNA结合位点之外,天然mRNA的3'-UTR中调节不同组织和细胞中的mRNA稳定性和翻译的其他调节序列可以被去除或引入RNA中。此类顺式调节元件可以包括但不限于顺式RNP(核糖核蛋白)/RBP(RNA结合蛋白)调节元件、富AU元件(AUE)、结构化茎环、组成型衰变元件(CDE)、GC丰富度和其他结构化mRNA基序(Parker B J等人,Genome Research,2011,21,1929-1943,其通过引用以其整体并入本文)。例如,CDE是一类调节基序,其通过与Roquin蛋白的相互作用介导mRNA降解。特别地,CDE存在于许多编码发育和炎症调节因子以限制巨噬细胞中的细胞因子产生的mRNA中(Leppek K等人,2013,Cell,153,869-881,其通过引用以其整体并入本文)。

[0235] 在一些方面,RNA是营养缺陷型的。如本文所用,术语"营养缺陷型"是指包含响应于空间或时间线索触发、促进或诱导mRNA的降解或失活从而使得蛋白质表达基本上被阻止或降低的至少一个特征的mRNA。此类空间或时间线索包括待翻译的mRNA的位置,诸如特定的组织或器官或细胞环境。还考虑了涉及温度、pH、离子强度、水分含量等的线索。

[0236] 3'UTR和富AU元件

[0237] 已知3'UTR具有嵌入其中的一段腺苷和尿苷。这些富AU特征在具有高周转率的基因中特别普遍。基于它们的序列特征和功能性质,富AU元件(ARE)可分为三类(Chen等人,1995):I类ARE在富U区内含有AUUUA基序的若干个分散拷贝。C-Myc和MyoD含有I类ARE。II类ARE具有两个或更多个重叠的UUAUUUA(U/A)(U/A)九聚体。含有这类ARE的分子包括GM-CSF和TNF-a。III类ARE的定义不太明确。这些富U区不含AUUUA基序。c-Jun和肌细胞生成素是这一类中两个被充分研究的示例。已知与ARE结合的大多数蛋白质会使信使不稳定,而ELAV家族的成员,最著名的是HuR,已被证明增加mRNA的稳定性。HuR结合至所有三个类别的ARE。将

HuR特异性结合位点工程化到核酸分子的3'UTR中将导致HuR结合,从而导致体内信息的稳定化。

[0238] 3'UTR富AU元件(ARE)的引入、去除或修饰可用于调节本公开的核酸或mRNA的稳定性。在对特异性核酸或mRNA进行工程化时,可以引入ARE的一个或多个拷贝,以使本公开的核酸或mRNA不太稳定,从而限制翻译并减少所得蛋白质的产生。同样,可以对ARE进行鉴定和去除或突变,以增加细胞内稳定性,从而增加翻译和所得蛋白质的产生。可以使用本公开的核酸或mRNA在相关细胞系中进行转染实验,并且可以在转染后的各个时间点测定蛋白质产量。例如,可以用不同的ARE工程化分子转染细胞,并通过使用ELISA试剂盒检测相关蛋白并测定在转染后约6小时、约12小时、约24小时、约48小时和/或约7天产生的蛋白。

[0239] 3'UTR和三螺旋

[0240] 在一些方面,编码IL-12的核苷酸序列在核酸、编码IL-12的增强核苷酸序列或核糖核酸的3'端包含三螺旋。在一些方面,编码IL-12的核苷酸序列的3'端包括单独的三螺旋或与Poly-A尾组合的三螺旋。

[0241] 在一些方面,编码IL-12的核苷酸序列包含至少第一和第二富U区、第一区和第二区之间的保守茎环区和富A区。在一些方面,第一和第二富U区与富A区缔合,以在核酸的3'端上形成三螺旋。此三螺旋可以稳定核酸,增强核酸的翻译效率和/或保护3'端免于降解。示例性三螺旋包括但不限于转移相关肺腺癌转录物1(MALAT1)、MEN-β和聚腺苷酸化核(PAN)RNA的三螺旋序列(参见Wilusz等人,Genes&Development 2012 26:2392-2407;其通过引用以其整体并入本文)。

[0242] 茎环

[0243] 在一些方面,编码IL-12的核苷酸序列包含茎环,诸如但不限于组蛋白茎环。在一些方面,茎环是长度为约25或约26个核苷酸的核苷酸序列,诸如但不限于如国际专利公开号WO2013103659中所述的SEQ ID NO:7-17,所述国际专利通过引用以其整体并入本文。组蛋白茎环可以相对于编码区位于3'(例如,在编码区的3'末端)。作为非限制性示例,茎环可以位于本文所述核酸的3'端。

[0244] 在一些方面,包含组蛋白茎环的编码IL-12的核苷酸序列可以通过添加至少一个链终止核苷来稳定。不希望受理论的束缚,添加至少一个链终止核苷可以减缓核酸的降解,并且因此可以增加核酸的半衰期。

[0245] 在一些方面,链终止核苷是国际专利公开号WO2013103659中描述的那些,所述国际专利通过引用以其整体并入本文。在一些方面,链终止核苷是3'-脱氧腺苷(虫草素)、3'-脱氧尿苷、3'-脱氧胞嘧啶、3'-脱氧鸟苷、3'-脱氧胸腺嘧啶、2',3'-双脱氧核苷(诸如2',3'-双脱氧腺苷、2',3'-双脱氧尿苷、2',3'-双脱氧胞嘧啶、2',3'-双脱氧鸟苷、2',3'-双脱氧胸腺嘧啶)、2'-脱氧核苷或-O-甲基核苷。

[0246] 在一些方面,编码IL-12的核苷酸序列包含组蛋白茎环、polyA尾序列和/或5'帽结构。在一些方面,组蛋白茎环在polyA尾序列之前和/或之后。包含组蛋白茎环和polyA尾序列的核酸可以包括本文所述的链终止核苷。

[0247] 在一些方面,编码IL-12的核苷酸序列包含组蛋白茎环和5'帽结构。5'帽结构可以包括但不限于本文所述和/或本领域已知的那些。

[0248] 5'加帽

[0249] mRNA的5'帽结构参与核输出,从而增加mRNA稳定性并结合mRNA帽结合蛋白(CBP),通过CBP与poly(A)结合蛋白缔合形成成熟的环状mRNA种类,所述CBP负责细胞中的mRNA稳定性和翻译能力。帽进一步有助于在mRNA剪接期间去除5'近端内含子。

[0250] 可以对内源性mRNA分子进行5'-端加帽,从而在mRNA的末端鸟苷帽残基与5'-末端转录的有义核苷酸之间生成5'-ppp-5'-三磷酸连接。然后可以将此5'-鸟苷酸帽甲基化,以生成N7-甲基-鸟苷酸残基。还可以任选地对mRNA的5'端的末端和/或前末端转录的核苷酸的核糖进行2'-O-甲基化。通过鸟苷酸帽结构的水解和切割进行5'-脱帽可以靶向核酸分子,诸如mRNA分子,以进行降解。

[0251] 对本公开的RNA的修饰可以生成不可水解的帽结构,从而防止脱帽,并因此增加mRNA半衰期。由于帽结构水解需要切割5'-ppp-5'磷酸二酯连接,因此可以在加帽反应期间使用经修饰的核苷酸。例如,来自New England Biolabs(Ipswich,Mass.)的疫苗加帽酶可根据制造商的说明书与α-硫代-鸟苷核苷酸一起使用,以在5'-ppp-5'帽中产生硫代磷酸酯连接。可以使用额外的经修饰的鸟苷核苷酸,诸如α-甲基-膦酸和硒代-磷酸核苷酸。

[0252] 额外的修饰包括但不限于在糖环的2'-羟基上对mRNA的5'-末端和/或5'-前末端核苷酸的核糖(如上所述)进行2'-O-甲基化。可以使用多个不同的5'-帽结构以生成核酸分子(诸如mRNA分子)的5'-帽。

[0253] 帽类似物(在本文中也称为合成帽类似物、化学帽、化学帽类似物或结构或功能帽类似物)在其化学结构上不同于天然(即内源性、野生型或生理)5'-帽,同时保留帽功能。帽类似物可以经化学(即非酶促)或酶促合成和/或连接至核酸分子。

[0254] 例如,抗反向帽类似物(ARCA)帽含有通过5'-5'-三磷酸基团连接的两个鸟嘌呤,其中一个鸟嘌呤含有N7甲基以及3'-O-甲基(即,N7,3'-O-二甲基-鸟苷-5'-三磷酸-5'-鸟苷(m7G-3'mppp-G;其可以等同地命名为3'O-Me-m7G(5')ppp(5')G)。另一个未修饰的鸟嘌呤的3'-O原子连接至加帽的核酸分子(例如,mRNA或mmRNA)的5'-末端核苷酸。N7-和3'-O-甲基化鸟嘌呤提供加帽的核酸分子(例如,mRNA或mmRNA)的末端部分。

[0255] 另一个示例性帽是mCAP,其类似于ARCA但在鸟苷上具有2'-β-甲基(即,N7,2'-O-二甲基-鸟苷-5'-三磷酸-5'-鸟苷,m7Gm-ppp-G)。

[0256] 在一些方面,帽是二核苷酸帽类似物。在一些方面,将二核苷酸帽类似物在不同的磷酸位置用硼烷磷酸基团或硒代磷酸基团进行修饰,诸如美国专利号8,519,110中描述的二核苷酸帽类似物,所述美国专利的内容通过引用以其整体并入本文。

[0257] 在一些方面,帽是帽类似物,是本领域已知和/或本文所述的帽类似物的N7-(4-氯苯氧基乙基)取代的二核苷酸形式。帽类似物的N7-(4-氯苯氧基乙基)取代的二核苷酸形式的非限制性示例包括N7-(4-氯苯氧基乙基)-G(5')ppp(5')G和N7-(4-氯苯氧基乙基)-m3'-OG(5')ppp(5')G帽类似物(参见例如,the various cap analogs and the methods of synthesizing cap analogs,描述于Kor等人Bioorganic&Medicinal Chemistry 201321:4570-4574中;所述参考文献的内容通过引用以其整体并入本文)。在一些方面,本公开的帽类似物是4-氯/溴苯氧基乙基类似物。

[0258] 虽然帽类似物允许在体外转录反应中伴随的核酸分子加帽,但高达约20%的转录物保持未加帽。这,以及帽类似物,与由内源性细胞转录机制产生的核酸的内源性5'-帽结构的结构差异可导致翻译能力降低和细胞稳定性降低。因此,在一些方面,本文提供的方法

(参见例如,实施例1-3)能够增加所产生的本文所述的表达IL-12的核苷酸的加帽效率。在一些方面,利用本文提供的方法,对至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、约100%的多核苷酸进行加帽。在一些方面,利用本文提供的方法,对至少约50%的多核苷酸进行加帽。在一些方面,对至少约60%的多核苷酸进行加帽。在一些方面,对至少约70%的多核苷酸进行加帽。在一些方面,对至少约80%的多核苷酸进行加帽。在一些方面,对至少约85%的多核苷酸进行加帽。在一些方面,对至少约90%的多核苷酸进行加帽。在一些方面,对至少约95%的多核苷酸进行加帽。在一些方面,对约100%的多核苷酸进行加帽。在一些方面,对至少约80%至约100%的多核苷酸进行加帽。

[0259] 在一些方面,提供具有5'-帽或5'-帽类似物的RNA是通过在所述5'-帽或5'-帽类似物存在下体外转录DNA模板来实现的,其中所述5'-帽被共转录地掺入所产生的RNA链中,

[0260] 在一些方面,RNA可以例如通过体外转录生成,并且可以使用加帽酶(例如,疫苗病毒的加帽酶)在转录后将5'-帽附接到RNA。在一些方面,使用酶对编码IL-12的核苷酸序列进行转录后加帽,以生成更真实的5'帽结构。如本文所用,短语"更真实的"是指在结构上或功能上紧密地反映或模拟内源性或野生型特征的特征。也就是说,与现有技术的合成特征或类似物等相比,"更真实的"特征更好地代表内源性、野生型、天然或生理细胞功能和/或结构,或者在一个或多个方面优于对应的内源性、野生型、天然或生理特征。本公开的更真实的5'帽结构的非限制性示例是,除其他外,与本领域已知的合成5'帽结构(或野生型、天然或生理5'帽结构)相比,帽结合蛋白的结合增强、半衰期增加、对5'核酸内切酶的敏感性降低和/或5'脱帽减少的那些。例如,重组疫苗病毒加帽酶和重组2'-O-甲基转移酶可以在mRNA的5'-末端核苷酸和鸟嘌呤帽核苷酸之间产生典型的5'-5'-三磷酸连接,其中帽鸟嘌呤含有N7甲基化,并且mRNA的5'-末端核苷酸含有2'-O-甲基。与例如本领域已知的其他5'帽类似物结构相比,这种帽导致更高的翻译能力和细胞稳定性以及减少的细胞促炎细胞因子的活化。帽结构包括7mG(5')ppp(5')N,pN2p、7mG(5')ppp(5')NlmpNp、7mG(5')-ppp(5')NlmpN2mp和m(7)Gpppm(3)(6,6,2')Apm(2')Apm(2')Cpm(2)(3,2')Up。

[0261] 在一些方面,5'末端帽包括内源性帽或帽类似物。在一些方面,5'末端帽包含鸟嘌呤类似物。有用的鸟嘌呤类似物包括肌苷、N1-甲基-鸟苷、2'氟-鸟苷、7-脱氮-鸟苷、8-氧代-鸟苷、2-氨基-鸟苷、LNA-鸟苷和2-叠氮基-鸟苷。

[0262] 在一些方面,5'帽包含5'至5'三磷酸连接。在一些方面,5'帽包含5'至5'三磷酸连接,包括硫代磷酸酯修饰。在一些方面,5'帽包含2'-O或3'-O-核糖甲基化核苷酸。在一些方面,5'帽包含经修饰的鸟苷核苷酸或经修饰的腺苷核苷酸。在一些方面,5'帽包含7-甲基鸟苷酸。示例性帽结构包括m7G(5')ppp(5')G、m7,2`O-mG(5')ppSp(5')G、m7G(5')ppp(5')2`O-mG和m7,3`O-mG(5')ppp(5')2`O-mA。

[0263] 在一些方面,编码IL-12的核苷酸序列包含经修饰的5'帽。5'帽上的修饰可以增加mRNA的稳定性,增加mRNA的半衰期,并且可以增加mRNA翻译效率。在一些方面,经修饰的5'帽包含以下修饰中的一者或多者:在加帽的鸟苷三磷酸(GTP)的2'和/或3'位处的修饰、用亚甲基部分(CH2)替换糖环氧(其产生碳环)、在帽结构的三磷酸桥部分处的修饰或在核碱基(G)部分处的修饰。

[0264] 可修饰的5'帽结构包括但不限于美国申请号2014/0147454和WO2018/160540中描述的帽,所述美国申请通过引用以其整体并入本文。

[0265] IRES序列

[0266] 在一些方面,编码IL-12的核苷酸序列包含内部核糖体进入位点(IRES)。IRES最初被鉴定为特征小RNA病毒RNA,在不存在5'帽结构的情况下在启动蛋白质合成方面发挥着重要作用。IRES可以充当唯一的核糖体结合位点,或者可以充当mRNA的多个核糖体结合位点之一。含有多于一个功能性核糖体结合位点的核酸或mRNA可编码由核糖体独立翻译的若干个肽或多肽("多顺反子核酸分子")。当向核酸或mRNA提供IRES时,进一步任选地提供第二可翻译区。可根据本公开使用的IRES序列的示例包括但不限于来自小核糖核酸病毒(例如,FMDV)、害虫病毒(CFFV)、脊髓灰质炎病毒(PV)、脑心肌炎病毒(ECMV)、口蹄疫病毒(FMDV)、丙型肝炎病毒(HCV)、经典猪瘟病毒(CSFV)、鼠白血病病毒(MLV)、猿猴免疫缺陷病毒(SIV)或蟋蟀麻痹病毒(CrPV)的那些。

[0267] 末端架构修饰:Poly-A尾

[0268] 在RNA加工期间,通常将腺嘌呤核苷酸长链(poly-A尾)添加到信使RNA(mRNA)分子中以增加分子的稳定性。转录后,转录物的3'端立即被切割,以释放3'羟基。然后poly-A聚合酶将腺嘌呤核苷酸链添加到RNA中。所述过程(被称为聚腺苷酸化)添加100至250个残基长的poly-A尾。

[0269] 在一些方面,3'尾的长度大于约30个核苷酸。在一些方面,poly-A尾的长度大于约35个核苷酸。在一些方面,长度为至少约40个核苷酸。在一些方面,长度为至少约45个核苷酸。在一些方面,长度为至少约55个核苷酸。在一些方面,长度为至少约60个核苷酸。在一些方面,长度为至少70个核苷酸。在一些方面,长度为至少约80个核苷酸。在一些方面,长度为至少约90个核苷酸。在一些方面,长度为至少约100个核苷酸。在一些方面,长度为至少约120个核苷酸。在一些方面,长度为至少约140个核苷酸。在一些方面,长度为至少约160个核苷酸。在一些方面,长度为至少约180个核苷酸。在一些方面,长度为至少约200个核苷酸。在一些方面,长度为至少约250个核苷酸。在一些方面,长度为至少约300个核苷酸。在一些方面,长度为至少约350个核苷酸。在一些方面,长度为至少约400个核苷酸。在一些方面,长度为至少约450个核苷酸。在一些方面,长度为至少约500个核苷酸。在一些方面,长度为至少约600个核苷酸。在一些方面,长度为至少约700个核苷酸。在一些方面,长度为至少约800个核苷酸。在一些方面,长度为至少约900个核苷酸。在一些方面,长度为至少约1000个核苷酸。在一些方面,长度为至少约1100个核苷酸。在一些方面,长度为至少约1200个核苷酸。在一些方面,长度为至少约1300个核苷酸。在一些方面,长度为至少约1400个核苷酸。在一些方面,长度为至少约1500个核苷酸。在一些方面,长度为至少约1600个核苷酸。在一些方面,长度为至少约1700个核苷酸。在一些方面,长度为至少约1800个核苷酸。在一些方面,长度为至少约1900个核苷酸。在一些方面,长度为至少约2000个核苷酸。在一些方面,长度为至少约2500个核苷酸。在一些方面,长度为至少约3000个核苷酸。

[0270] 在一些方面,编码IL-12的核苷酸序列被设计成包括polyA-G四联体。G-四联体是四个鸟嘌呤核苷酸的环状氢键阵列,其可以由DNA和RNA中的富G序列形成。在此方面,G-四联体掺入在poly-A尾的端部。可在不同的时间点测定所得核酸或mRNA的稳定性、蛋白质产量和其他参数,包括半衰期。已经发现,polyA-G四联体导致的蛋白质产量相当于单独使用

120个核苷酸的poly-A尾所见的蛋白质产量的至少75％。

[0271] 在一些方面,编码IL-12的核苷酸序列包含polyA尾并且通过添加链终止核苷而稳定。在一些方面,具有polyA尾的编码IL-12的核苷酸序列进一步包含5'帽结构。

[0272] 在一些方面,编码IL-12的核苷酸序列包含polyA-G四联体。在一些方面,具有polyA-G四联体的编码IL-12的核苷酸序列进一步包含5'帽结构。

[0273] 在一些方面,通过添加终止于3'-脱氧核苷、2',3'-双脱氧核苷、3'-O-甲基核苷、3'-O-乙基核苷、3'-阿拉伯糖苷以及本领域已知和/或本文所述的其他经修饰核苷的寡核苷酸来稳定包含polyA尾或polyA-G四联体的编码IL-12的核苷酸序列。

[0274] 经修饰的核苷

[0275] 在一些方面,编码IL-12的核苷酸序列包含一个或多个经修饰的核苷。在一些方面,所述一个或多个经修饰的核苷包括6-氮杂-胞苷、2-硫代-胞苷、α-硫代-胞苷、假-异-胞苷、5-氨基烯丙基-尿苷、5-碘-尿苷、N1-甲基-假尿苷、5,6-二氢尿苷、α-硫代-尿苷、4-硫代-尿苷、6-氮杂-尿苷、5-羟基-尿苷、脱氧-胸苷、假-尿苷、肌苷、α-硫代-鸟苷、8-氧代-鸟苷、O6-甲基-鸟苷、7-脱氮-鸟苷、N1-甲基-腺苷、2-氨基-6-氯-嘌呤、N6-甲基-2-氨基-嘌呤、6-氯-嘌呤、N6-甲基-腺苷、α-硫代-腺苷、8-叠氮-腺苷、7-脱氮-腺苷、吡咯-胞苷、5-甲基-胞苷、N4-乙酰基-胞苷、5-甲基-尿苷、5-碘-胞苷以及它们的组合。

[0276] 在一些方面,编码IL-12的核苷酸序列中的一个或多个尿苷被经修饰的核苷替换。在一些方面,替换尿苷的经修饰的核苷是假尿苷(ψ)、N1-甲基-假尿苷(m1ψ)或5-甲基-尿苷(m5U)。

[0277] 在一些方面,编码IL-12的核苷酸序列包含如美国申请号2014/0147454、国际申请WO2018160540、国际申请WO2015/196118或国际申请WO2015/089511中所述的编码IL-12的核苷酸序列,所述申请通过引用以其整体并入本文。

[0278] 细胞毒性核苷

[0279] 在一些方面,编码IL-12的核苷酸序列包含一个或多个细胞毒性核苷。例如,可以将细胞毒性核苷掺入多核苷酸(诸如编码IL-12s或mRNA的双功能核苷酸序列)中。细胞毒性核苷抗癌剂包括但不限于阿糖腺苷、阿糖胞苷、胞嘧啶阿拉伯糖苷(cytosine arabinoside)、5-氟尿嘧啶、氟达拉滨、氟尿苷、FTORAFUR®(替加氟和尿嘧啶的组合)、替加氟((RS)-5-氟-1-(四氢呋喃-2-基)嘧啶-2,4(1H,3H)-二酮)和6-巯基嘌呤。

[0280] 许多细胞毒性核苷类似物作为抗癌剂在临床上使用或已经作为临床试验的对象。此类类似物的示例包括但不限于阿糖胞苷、吉西他滨、曲沙他滨(troxacitabine)、地西他滨(decitabine)、替扎他滨(tezacitabine)、2'-脱氧-2'-亚甲基胞苷(DMDC)、克拉屈滨、氯法拉滨、5-氮杂胞苷、4'-硫代-阿糖胞苷、环戊烯基胞嘧啶和1-(2-C-氰基-2-脱氧-β-D-阿拉伯-呋喃戊糖基)-胞嘧啶。此类化合物的另一个示例是磷酸氟达拉滨。这些化合物可以全身施用,并且可能具有细胞毒性剂的典型副作用,诸如但不限于,相对于增殖的正常细胞,对肿瘤细胞的特异性很小或没有特异性。

[0281] 本领域还报道了许多细胞毒性核苷类似物的前药。示例包括但不限于N4-山嵛酰基-1-β-D-阿拉伯呋喃糖基胞嘧啶、N4-十八烷基-1-β-D-阿拉伯呋喃糖基胞嘧啶、N4-棕榈酰基-1-(2-C-氰基-2-脱氧-β-D-阿拉伯-呋喃戊糖基)胞嘧啶和P-4055(阿糖胞苷5'-反油酸酯)。一般来说,这些前药可以主要在肝脏和体循环中转化为活性药物,并且在肿瘤组织

中很少或没有活性药物的选择性释放。例如,卡培他滨(一种5'-脱氧-5-氟胞苷(以及最终的5-氟尿嘧啶)的前药)在肝脏和肿瘤组织中均代谢。Fujiu等人(美国专利号4,966,891)要求保护了一系列含有"在生理条件下容易水解的基团"的卡培他滨类似物,并通过引用并入本文。Fujiu描述的系列包括5'-脱氧-5-氟胞苷的N4烷基和芳烷基氨基甲酸酯,并暗示这些化合物将在正常生理条件下通过水解活化,以提供5'-脱氧-5-氟胞苷。

[0282] Fadl等人(Pharmazie.1995,50,382-7,通过引用以其整体并入本文)报道了一系列阿糖胞苷N4-氨基甲酸酯,其中化合物被设计成在肝脏和血浆中转化为阿糖胞苷。WO 2004/041203(通过引用以其整体并入本文)公开了吉西他滨的前药,其中一些前药是N4-氨基甲酸酯。这些化合物旨在克服吉西他滨的胃肠道毒性,并旨在通过从胃肠道吸收完整的前药后在肝脏和血浆中水解释放来提供吉西他滨。Nomura等人(Bioorg Med.Chem.2003,11,2453-61,通过引用以其整体并入本文)描述了1-(3-C-乙炔基-β-D-核糖-戊并呋喃糖基)胞嘧啶的缩醛衍生物,其在生物还原时产生中间体,所述中间体需要在酸性条件下进一步水解以产生细胞毒性核苷化合物。

[0283] 可具有化疗性的细胞毒性核苷酸还包括但不限于吡唑并[3,4-D]-嘧啶、别嘌呤醇(allopurinol)、硫唑嘌呤、卡培他滨、胞嘧啶阿拉伯糖苷、氟尿嘧啶、巯基嘌呤、6-硫代鸟嘌呤、阿昔洛韦、阿糖腺苷、利巴韦林(ribavirin)、7-脱氮-腺苷、7-脱氮-鸟苷、6-氮杂-尿嘧啶、6-氮杂-胞苷、胸苷核糖核苷酸、5-溴脱氧尿苷、2-氯-嘌呤和肌苷或它们的组合。

[0284] V.药物组合物

[0285] 在一些方面,本公开涉及一种药物组合物,其包含本文所述的多核苷酸、载体和/或脂质纳米颗粒。在本公开的一些方面,药物组合物进一步包含药学上可接受的载剂(赋形剂)。如本文所用,"可接受的"意指载剂必须与组合物的活性成分相容并且对待治疗的受试者无害。在一些方面,载剂能够稳定活性成分。药学上可接受的赋形剂(载剂)包括本领域熟知的缓冲液。参见例如,Remington:The Science and Practice of Pharmacy第20版(2000)Lippincott Williams and Wilkoins,编者:K.E.Hoover。

[0286] 用于体内施用的药物组合物必须是无菌的。这很容易通过例如通过无菌过滤膜过滤来实现。脂质纳米颗粒可以放置在具有无菌接入端口的容器(例如,具有可被皮下注射针刺穿的塞子的静脉内溶液袋或小瓶)中。

[0287] 在本公开的一些方面,药物组合物可以被配制用于肿瘤内、鞘内、肌肉内、静脉内、皮下、吸入、皮内、淋巴内、眼内、腹膜内、胸膜内、脊柱内、血管内、鼻内、经皮、舌下、粘膜下、透皮或透粘膜施用。在本公开的一些方面,药物组合物可以被配制用于肿瘤内注射。如本文所用,肿瘤内注射是指直接注射到肿瘤中。可以原位获得高浓度的组合物,同时使用少量药物。免疫疗法的局部递送允许多种组合疗法,同时防止显著的全身暴露和脱靶毒性。

[0288] 在本公开的一些方面,药物组合物可以被配制用于肌肉内注射、静脉内注射或皮下注射。

[0289] 在本公开的一些方面,药物组合物包含冻干调配物或水溶液形式的药学上可接受的载剂、缓冲剂、赋形剂、盐或稳定剂。参见例如,Remington:The Science and Practice of Pharmacy第20版(2000)Lippincott Williams and Wilkins,编者:K.E.Hoover。可接受的载剂和赋形剂或稳定剂在所使用的剂量和浓度下对接受者无毒,并且包括:缓冲液,诸如磷酸盐、柠檬酸盐和其他有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(诸如十八烷

基二甲基苄基氯化铵;氯化六烃季铵;苯扎氯铵、苄索氯铵;苯酚、丁醇或苯甲醇;对羟基苯甲酸烷基酯,诸如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯;儿茶酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;和间甲酚);低分子量(小于约10个残基)多肽;蛋白质,诸如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水聚合物,诸如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其他碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,诸如EDTA;糖类,诸如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇;成盐抗衡离子,诸如钠;金属络合物(例如,Zn-蛋白质络合物);和/或非离子表面活性剂,诸如TWEEN™、PLURONICS™或聚乙二醇(PEG)。

[0290] 在一些方面,本文所述的药物组合物包含脂质纳米颗粒,其可以通过本领域已知的方法制备,诸如以下文献中所描述的方法:Epstein等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 82:3688(1985);Hwang等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77:4030(1980);以及美国专利号4,485,045和4,544,545,所述文献通过引用以其整体并入本文。具有增强的循环时间的脂质体公开于美国专利号5,013,556中,所述美国专利通过引用以其整体并入本文。在一些方面,可以用包含磷脂酰胆碱、胆固醇和PEG衍生化磷脂酰乙醇胺(PEG-PE)的脂质组合物来通过反相蒸发法生成脂质体。通过具有限定孔径的过滤器将脂质体挤出以产生具有期望直径的脂质体。

[0291] 在本公开的一些方面,药物组合物以持续释放形式配制。持续释放调配物的合适的示例包括含有脂质纳米颗粒的固体疏水性聚合物的半透性基质,所述基质呈成形制品的形式,例如,膜或微胶囊。持续释放基质的示例包括但不限于聚酯、水凝胶(例如,聚(2-羟乙基-甲基丙烯酸酯)或聚(乙烯醇))、聚丙交酯(美国专利号3,773,919)、L-谷氨酸和7-乙基-L-谷氨酸酯的共聚物、不可降解的乙烯-乙酸乙烯酯、可降解的乳酸-乙醇酸共聚物诸如LUPROM DEPOT™(由乳酸-乙醇酸共聚物和乙酸亮丙瑞林构成的可注射微球)、乙酸异丁酸蔗糖和聚-D-(-)-3-羟基丁酸。

[0292] 在一些方面,合适的表面活性剂包括但不限于非离子剂,诸如聚氧乙烯脱水山梨醇(例如,TWEEN™ 20、40、60、80或85)和其他脱水山梨醇(例如,SPAN™ 20、30、60、80或85)。在一些方面,具有表面活性剂的组合物包含0.05%至5%的表面活性剂。在一些方面,组合物包含0.1%和2.5%。应当理解,如果需要,可以添加其他成分,例如甘露醇或其他药学上可接受的媒介物。

[0293] 在一些方面,药物组合物呈单位剂型,诸如片剂、丸剂、胶囊剂、粉剂、颗粒剂、溶液剂或混悬剂或栓剂,以用于口服、肠胃外或直肠施用或者通过吸入或吹入施用。

[0294] 为了制备固体组合物诸如片剂,可以将主要活性成分与药物载剂(例如,常规压片成分,诸如玉米淀粉、乳糖、蔗糖、山梨糖醇、滑石、硬脂酸、硬脂酸镁、磷酸二钙或树胶)和其他药物稀释剂(例如,水)混合,以形成含有本公开的化合物或其无毒的药学上可接受的盐的均匀混合物的固体预配制组合物。当提及作为均匀的这些预配制混合物时,意指所述活性成分被均匀地分散于整个组合物以使得可以容易地将所述组合物细分成同样有效的单位剂型诸如片剂、丸剂和胶囊。然后将这个固体预配制组合物细分为含有约0.1至约500mg本公开的活性成分的上述类型的单位剂型。可以包覆或以其他方式配混新颖组合物的片剂或丸剂以提供给出延长作用的优点的剂型。例如,片剂或丸剂可以包含内剂量组分和外剂量组分,后者为在前者上的包膜形式。这两种组分可以通过肠溶层分开,所述肠溶层用于抵

抗胃中的崩解并且允许内组分完整地传递进入十二指肠或被延迟释放。多种材料可用于此类肠溶层或包衣,此类材料包括许多聚合酸以及聚合酸与虫胶、十六醇和乙酸纤维素等材料的混合物。

[0295] 可使用可商购获得的脂肪乳剂制备合适的乳剂,诸如INTRALI PID™、LIPOSYN™、INFONUTROL™、LIPOFUNDIN™、和LIPI PHYSAN™。活性成分可以溶解在预混合的乳剂组合物中,或者可替代地,活性成分可以溶解在油(例如,大豆油、红花油、棉籽油、芝麻油、玉米油或杏仁油)以及与磷脂(例如,卵磷脂、大豆磷脂或大豆卵磷脂)和水混合后形成的乳剂中。应当理解,可以添加其他成分,例如甘油或葡萄糖,以调节乳剂的张力。合适的乳剂通常将含有至多约20%的油,例如,约5%和约20%之间。脂肪乳剂可以包含具有合适尺寸的脂肪液滴,并且可以具有在约5.5至约8.0范围内的pH。

[0296] 用于吸入或吹入的药物组合物包括药学上可接受的水性或有机溶剂、或其混合物中的溶液和混悬剂、以及粉末。液体或固体组合物可含有如上所述合适的药学上可接受的赋形剂。在一些方面,通过口服或鼻腔呼吸途径施用组合物,以产生局部或全身作用。

[0297] 在药学上可接受的溶剂中的组合物可以通过使用气体进行雾化。可以直接从雾化装置中吸入雾化溶液,或者雾化装置可以附接到面罩塞条或间歇正压呼吸机。可以从以适当方式递送调配物的装置施用溶液、悬浮液或粉剂组合物。

[0298] VI.用于疗法中的试剂盒

[0299] 本公开还提供了用于针对疾病或病症(诸如癌症(例如,黑色素瘤、肺癌、结直肠癌或肾细胞癌))的免疫疗法和/或治疗或降低疾病或病症(例如,癌症)的风险的试剂盒。在一些方面,试剂盒包括一个或多个包含本文所述组合物的容器。

[0300] 在一些方面,试剂盒包含根据本文所述的任何方法使用的说明书。例如,所包含的说明书可以包括施用本文所述的药物组合物以治疗、延迟发作或减轻目标疾病的描述。在一些方面,说明书包括向处于目标疾病/病症(例如,癌症)风险的受试者施用本文所述的组合物的描述。

[0301] 在一些方面,说明书包括剂量信息、给药时间表和施用途径。在一些方面,容器是单位剂量、散装包装(例如,多剂量包装)或亚单位剂量。在一些方面,说明书是标签或包装插页(例如,试剂盒中包含的纸片)上的书面说明书。在一些方面,说明书是机器可读说明书(例如,磁性或光学存储盘上携带的说明书)。

[0302] 在一些方面,标签或包装插页表明本文公开的组合物用于治疗、延迟发作和/或减轻与癌症相关的疾病或病症,诸如本文所述的那些。可以提供用于实践本文所述的任何方法的说明书。

[0303] 在一些方面,本文所述的试剂盒采用合适的包装。在一些方面,合适的包装包括小瓶、瓶子、罐子、软包装(例如,密封Mylar或塑料袋)或它们的组合。在一些方面,包装包括与特定装置例如吸入器、鼻施用装置(例如,雾化器)或输注装置例如微型泵组合使用的包装。在一些方面,试剂盒包括无菌进入端口(例如,容器可以是具有通过皮下注射针可刺穿的塞子的静脉内溶液袋或小瓶)。在一些方面,容器还可以具有无菌进入端口(例如,容器可以是具有通过皮下注射针可刺穿的塞子的静脉内溶液袋或小瓶)。在一些方面,至少一种活性剂是如本文所述的组合物。

[0304] 在一些方面,试剂盒进一步包含额外的组分,诸如缓冲液和解释性信息。在一些方

面,试剂盒包含容器和在所述容器上或与所述容器相关联的标签或包装插页。在一些方面,本公开提供了包含本文所述的试剂盒的内容物的制品。

[0305] 一般技术

[0306] 除非另有说明,否则本公开的实践将采用分子生物学(包括重组技术)、微生物学、细胞生物学、生物化学和免疫学的常规技术,这些技术在本领域的技术范围内。Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第二版(Sambrook等人,1989)Cold Spring Harbor Press;Oligonucleotide Synthesis(M.J.Gait编辑,1984);Methods in Molecular Biology,Humana Press;Cell Biology:A Laboratory Notebook(J.E.Cellis编辑,1998)Academic Press;Animal Cell Culture(R.I.Freshney编辑,1987);Introduction to Cell and Tissue Culture(J.P.Mather和P.E.Roberts,1998)Plenum Press;Cell and Tissue Culture:Laboratory Procedures(A.Doyle,J.B.Giffiths和D.G.Newell编辑,1993-8)J.Wiley and Sons;Method of Enzymology(Academic Press,Inc.);Handbook of Experimental Immunology(D.M.Weir和C.C.Blackwell编辑);Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells(J.M.Miller和M.P.Calos编辑,1987);Current Protocols in Molecular Biology(F.M.Ausubel等人编辑,1987):PCR:The Polymerase Chain Reaction,(Mullis等人编辑,1994);Current Protocols in Immunology(J.E.Coligan等人编辑,1991);Short Protocols in Molecular Biology(Wiley and Sons,1999);Immunobiology(C.A.Janeway和P.Travers,1997);Antibodies(P.Finch,1997);Antibodies:a practical approach(D.Catty编辑,IRL Press,1988-1989);Monoclonal antibodies:a practical approach(P.Shepherd和C.Dean编辑,Oxford University Press,2000);Using antibodies:a laboratory manual(E.Harlow和D.Lane,Cold Spring Harbor Laboratory Press,1999);The Antibodies(M.Zanette和J.D.Capra编辑,Harwood Academic Publishers,1995)。无需进一步阐述,据信,基于以上描述,本领域技术人员可以最大程度地利用本公开。本文引用的所有出版物(包括上文和本公开中别处列出的那些)通过引用以其整体并入。

[0307] 实施例

[0308] 实施例1:包含VEE复制子的LNP的构建

[0309] 为了构建本文所述的LNP,使用以下材料和方法:

[0310] 模板制备

[0311] 使用BspQI限制酶将模板DNA线性化。线性化后,将DNA在过滤器上缓冲液交换6个透析体积(diavolumes)。然后使用T7 RNA聚合酶和NTP对此DNA进行IVT。IVT后,使用DNaseI对剩余的DNA进行消化。然后在液相色谱法之前对mRNA进行缓冲液交换。随后,再次对mRNA进行缓冲液交换,然后出于质量控制目的进行测定。

[0312] 具有T-连接的常规BL-1LNP调配物的制备

[0313] 将脂质材料各自称重并溶解在乙醇中。通过将所有脂质材料按照以下形式的组成比混合来制备乙醇相。通过用20mM柠檬酸盐缓冲液(pH 4.0)、300mM NaCl和水稀释RNA分子(例如,具有VEE复制子的mRNA或不具有任何VEE的对照mRNA)来制备水相。通过以3:1(水相:乙醇相)的流速比通过T-连接混合LNP的乙醇相和水相,然后以1:1(LNP相:PEG相)的流速比经由T-连接混合立即用TBS缓冲液(pH 4.0)进行在线稀释来提供LNP。下表2提供了包含在

LNP组合物中的每种组分的相对量。

[0314] 表2.BL-1LNP组合物

[0315]

组分	示例性量	重量比
mRNA	1.0 mg	1.0
BL-1	12.7 mg	12.7
DSPC	2.8 mg	2.8

[0316]

胆固醇	2.8 mg	2.8
β-谷甾醇	2.8 mg	2.8
DMG-PEG-2k	1.5 mg	1.5

[0317] 具有T-连接的PEG后胶束TT3 LNP调配物的制备

[0318] 将脂质材料各自称重并溶解在乙醇中。通过将除DMG-PEG-2K以外的所有脂质材料按照以下形式的组成比混合来制备乙醇相。通过用20mM柠檬酸盐缓冲液(pH 4.0)、300mM NaCl和水稀释RNA分子(例如,具有VEE复制子的mRNA或不具有任何VEE复制子的对照mRNA)来制备水相。通过将对应量的DMG-PEG-2K添加到TBS缓冲液中并经由涡旋充分混合来制备PEG胶束相。最后,通过首先以3:1(水相:乙醇相)的流速比通过T-连接混合LNP的乙醇相和水相,然后以1:1(LNP相:PEG相)的流速比经由T-连接混合立即用PEG胶束相进行在线稀释来提供PEG后胶束TT3 LNP。下表3提供了包含在LNP组合物中的每种组分的相对量(作为示例性量和重量比)。

[0319] 表3.TT3 LNP组合物

[0320]

组分	示例性量	重量比
mRNA	1.0mg	1.0
TT3	10mg	10.0
DOPE	8.0mg	8.0
胆固醇	5.6mg	5.6
DMG-PEG-2k	4.1mg	4.1

[0321] 表3A.

[0322]

TT3 LNP 组合物组分	重量比
mRNA	1.0
TT3	10.0
DOPE	8.0
胆固醇	5.6

[0323]

PEG-DMG-2k 胶束	重量比
DMG-PEG-2k	4.1 (相对于上述不属于胶束的一部分的 mRNA)

[0324] BL-1/TT3 LNP的缓冲液交换和冻融

[0325] 将得到的BL-1/TT3 LNP进行缓冲液交换并经由切向流过滤进行浓缩。随后,将TBS储备溶液中的40％蔗糖(W/V)添加到所有制备好的BL-1/TT3 LNP中,以制备LNP在10％蔗糖中的最终溶液。通过用2％TE+Triton解离LNP来测量LNP的最终RNA浓度,并用Quant-it RiboGreen测定进一步检测。将LNP等分成50μg/管的等分试样,并在-80℃下冷冻。在用LNP给药之前,将LNP在室温下解冻。

[0326] 实施例2:肝脏表达的分析

[0327] 为了评估实施例1中构建的LNP靶向肝脏的能力,在小鼠中进行生物分布分析。简言之,动物接受了以下施用,并使用生物发光测定评估了蛋白质表达:(1)PBS(阴性对照);(2)负载有不具有任何VEE复制子的对照mRNA的LNP(RNA-无VEE);或(3)负载有具有VEE复制子的mRNA的LNP(RNA-VEE)。

[0328] 如图1所示,在接受RNA-无VEE的动物中,肝脏内存在显著的蛋白质表达。相反,在接受RNA-VEE的动物中,在肝脏中几乎没有观察到可检测的蛋白质表达。在来自RNA-无VEE组和RNA-VEE组的动物中,其他组织(例如,脾和肺)中的蛋白质表达相当,从而证明了在肝脏中观察到的效应的特异性。

[0329] 以上结果证明,本文所述的LNP可以选择性地避免和/或减少在肝脏中的表达,这表明LNP可以允许更大的耐受性(例如,降低的肝毒性)。

[0330] 实施例3:肝毒性的评估

[0331] 为了进一步评估体内效应,将如实施例2中所述将本公开的LNP施用至动物(例如,小鼠)。然后,将经由各种方法在动物中评估肝毒性。例如,在一些方面,将测量例如动物血液中的肝酶(ALT/AST)水平。在一些方面,将评估动物的一般毒性(例如,活性、食物消耗量、身体评分指数、水合状态,或它们的组合)。在一些方面,将进行肝脏的显微镜评估,以检测对肝脏的任何LNP相关影响。

[0332] 实施例4:额外的脂质纳米颗粒的构建

[0333] 为了进一步评估本文所述的VEE复制子,如实施例1中所述构建了额外的LNP以包含本文所述的不同脂质(例如,可电离脂质、阳离子脂质或类脂质材料,例如,类脂)。总共构建了九种不同的LNP(本文称为LNP1-LNP9),并将它们用于包封具有VEE复制子(本文所述)的mRNA或不具有任何VEE复制子的对照mRNA。如后续实施例中所述评估这些LNP诱导有效载荷表达的能力。

[0334] 实施例5:用负载有具有VEE复制子的RNA的脂质纳米颗粒分析肝脏表达

[0335] 为了进一步评估本文所述的VEE复制子选择性地避免和/或减少肝脏中表达的能力,B6.Cg Gt(ROSA)26Sortm14(CAG-tdTomato)Hze/J(Ai报告基因)小鼠接受了LNP1或LNP2的单次静脉内施用。LNP1和LNP2均负载有20μg包含编码核定位信号(NLS)-Cre的核酸序列的VEE复制子。对照动物接受了磷酸盐缓冲盐水溶液(PBS)的施用。Cre基因编码Cre蛋白,所述Cre蛋白是位点特异性DNA重组酶,其可催化DNA分子中特定位点之间的DNA重组。这些位点被称为loxP序列,并且含有围绕可发生重组的定向核心序列的Cre的特异性结合位点。Cre诱导tdTomato荧光,其指示肝组织中Cre介导的重组。在LNP施用后约72小时(hrs),使用荧光IVIS成像测量小鼠肝脏内的tdTomato荧光表达。

[0336] 如图2A和2B所示,在接受LNP1和LNP2的小鼠的肝脏中观察到的荧光信号与在对照

动物中观察到的荧光信号没有显著差异。另外,在接受LNP1和LNP2的动物之间,肝脏中的荧光表达也没有明显差异。这些结果突出了本文所述的VEE复制子选择性地避免和/或减少肝脏中表达的能力。结果进一步表明,VEE复制子的肝脏回避性质至少与LNP1和LNP2之间的任何差异无关。

[0337] 实施例6:用负载有不具有VEE复制子的RNA的脂质纳米颗粒分析肝脏表达

[0338] 为了证实本文所述的LNP确实可以靶向肝脏,B6.Cg Gt(ROSA)26Sortm14(CAG-tdTomato)Hze/J(Ai报告基因)小鼠接受了LNP3、LNP4、LNP5或LNP6的单次静脉内施用。所述LNP中的每一个负载有20μg不具有任何VEE复制子并编码核定位信号(NLS)-Cre的mRNA(RNA-无VEE)。对照动物接受PBS的施用。在LNP施用后约72小时,使用荧光IVIS成像再次测量小鼠肝脏内的tdTomato荧光表达。如实施例4中所述,预期肝脏内的td-Tomato荧光表达将指示组织中Cre介导的重组。

[0339] 如图3A和3B所示,在对照动物中,在来自对照组的小鼠的肝脏中没有观察到可检测的荧光信号。相反,在接受施用一种测试的LNP(每种均负载有RNA-无VEE)的小鼠的肝脏中观察到强荧光信号。

[0340] 为了进一步分析,将LNP7(也负载有不具有任何VEE复制子的mRNA,其中所述mRNA编码NLS-Cre;RNA-VEE)静脉内施用至tdTomato报告基因小鼠。为了比较,一些动物接受了上面使用的LNP3(即,负载有不具有任何VEE复制子并编码NLS-Cre的mRNA)。将对照小鼠用单独的PBS治疗。同样,在LNP施用后约72小时,使用荧光IVIS成像定量td-Tomato荧光。

[0341] 如图4A和4B所示,与对照动物相比,在接受LNP7的动物的肝脏中观察到显著的荧光信号。所述荧光信号与在用LNP3治疗的小鼠中观察到的荧光信号相当。

[0342] 此实施例中提供的结果共同证明,本文所述的LNP确实可以靶向肝脏,这表明在较早实施例中观察到的肝脏回避和/或肝脏表达减少对VEE复制子本身是特异性的。

[0343] 实施例7:施用负载有具有VEE复制子的RNA或不具有任何VEE复制子的RNA的脂质纳米颗粒后肝脏中萤火虫荧光素酶表达的分析

[0344] 为了在不同的荧光模型中证实上述结果,C57BL/6J小鼠接受了以下LNP之一的单次施用:LNP8、LNP9和LNP2。向动物静脉内施用LNP9和LNP2。向动物静脉内或肿瘤内施用LNP8。所述LNP中的每一个(即,LNP8、LNP9和LNP2)均负载有40μg包括VEE复制子并编码FLuc的mRNA,所述FLuc是一种萤火虫荧光素酶基因,其编码催化d-荧光素氧合为氧荧光素的酶,所述反应产生可见光(530nm-640nm)。对照动物接受PBS的施用。施用后约24小时,使用生物发光IVIS成像测量肝脏中的荧光素酶表达。

[0345] 如前面用td-Tomato报告基因小鼠观察到的,与对照动物相比,接受LNP2施用的C57BL/6J小鼠的肝脏中的荧光素酶表达没有显著差异。在接受LNP8或LNP9的C57BL/6J小鼠中观察到类似的结果。另外,施用途径(至少在静脉内施用和肿瘤内施用之间)似乎没有任何影响,因为在静脉内或肿瘤内接受LNP8的动物中没有观察到荧光素酶表达的显著差异。

[0346] 再次,为了证实脂质纳米颗粒本身确实可以靶向肝脏,LNP2、LNP8和LNP9这次负载了10μg不具有任何VEE复制子并编码萤火虫荧光素酶的mRNA。然后,向C57BL/6J小鼠静脉内施用单剂量的LNP,并且约24小时后,使用生物发光IVIS成像测量肝脏中的荧光素酶表达。

[0347] 如图6A和6B所示,与对照相比,LNP组(包括LNP8、LNP9和LNP2)在肝脏中的生物发光信号显著更高,这表明对于每个测试的LNP,FLuc-mod RNA在肝脏中特异性表达。

[0348] 以上结果证实,本文所述的LNP能够靶向肝脏。上述结果还有助于证实本文所述的VEE复制子的肝脏回避性质。

[0349] 实施例8:负载有具有VEE复制子的RNA或不具有任何VEE复制子的RNA的脂质纳米颗粒的肝特异性递送的比较

[0350] 为了提供不具有任何VEE复制子的mRNA(RNA-无VEE)与具有VEE复制子的mRNA(RNA-VEE)之间肝脏特异性的直接比较,C57BL/6J小鼠接受了LNP8的单次静脉内施用,所述LNP8负载有2mg/kg(1)编码萤火虫荧光素酶的RNA-无VEE或(2)编码萤火虫荧光素酶的RNA-VEE。然后,施用后约48小时,使用生物发光IVIS成像测量动物肝脏中的荧光素酶表达。

[0351] 如图7A和7B所示,与RNA-VEE复制子组相比,RNA-无VEE组的肝脏中的生物发光信号显著更高。此结果进一步证实,RNA-无VEE允许在肝脏中表达,而RNA-VEE阻止在肝脏中表达。另外,结果还进一步证明,本文所述的VEE复制子的肝脏回避性质与所使用的脂质纳米颗粒无关。

[0352] 实施例9:包含具有VEE复制子的RNA和可电离脂质的脂质纳米颗粒

[0353] 为了评估本文所述的VEE复制子的肝脏回避性质,将构建包含可电离脂质的脂质纳米颗粒以制备脂质纳米颗粒,然后将其用于包封具有VEE复制子并编码有效载荷的mRNA(RNA-VEE)。可电离脂质将选自以下:((4-羟基丁基)氮烷二基)双(己烷-6,1-二基)双(2-己基癸酸酯)(ALC-0315)、8-((2-羟基乙基)(6-氧代-6-(十一烷氧)己基)氨基)辛酸十七烷-9-基酯(SM-102)、8-((2-羟基乙基)(8-(壬氧基)-8-氧代辛基)氨基)辛酸十七烷-9-基酯(脂质5)、二((Z)-壬-2-烯-1-基)9-((4-(二甲基氨基)丁酰基)氧基)十七烷二酸酯(L319)、3-(二十二烷基氨基)-N1,N1,4三十二烷基-1-哌嗪乙胺(KL10)、N1-[2(二十二烷基氨基)乙基]-N1,N4,N4-三十二烷基1,4-哌嗪二乙胺(KL22)、14,25-二十三烷基-15,18,21,24-四氮杂-三十八烷(KL25)、1,2-二亚油酰基氧基-N,N--二甲基氨基丙烷(DLin-DMA)、2,2-二亚油酰基-4-二甲基氨基甲基-[1,3]-二噁戊烷(DLin-K-DMA)、七碳六烯酸-6,9,28,31-四烯-19-基-4-(二甲基氨基)丁酸酯(DLin-MC3-DMA)、2,2-二亚油酰基-4-(2二甲基氨基乙基)-[1,3]-二噁戊烷(DLin-KC2-DMA)、1,2-二油酰基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DODMA)、2-({8-[(3β)-胆甾-5-烯-3-基氧基]辛基}氧基)-N,N-二甲基-3-[(9Z,12Z)-十八烷-9,12-二烯-1-基氧基]丙-1-胺(Octyl-CLinDMA)、(2R)-2-({8-[(3β)-胆甾-5-烯-3-基氧基]辛基}氧基)-N,N-二甲基-3-[(9Z,12Z)-十八-9,12-二烯-1-基氧基]丙-1-胺(Octyl-CLinDMA(2R))和(2S)-2-({8-[(3β)-胆甾-5-烯-3-基氧基]辛基}氧基)-N,N-二甲基-3-[(9Z,12Z)-十八-9,12-二烯-1-基氧基]丙-1-胺(Octyl-CLinDMA(2S))或它们的任何组合。

[0354] 将在体内施用上述LNP(即,包含可电离脂质和RNA-VEE),然后将在肝脏中评估所编码的有效载荷的表达(例如,如实施例4-7中所述)。在一些方面,还将在动物中评估肝毒性(例如,如实施例3中所述)。

[0355] 实施例10:包含具有VEE复制子的RNA和阳离子脂质的脂质纳米颗粒

[0356] 为了评估本文所述的VEE复制子的肝脏回避性质,将构建包含阳离子脂质的脂质纳米颗粒以制备脂质纳米颗粒,然后将其用于包封具有VEE复制子并编码有效载荷的mRNA(RNA-VEE)。阳离子脂质将选自以下:1,2-二油酰基-3-三甲基铵-丙烷(DOTAP)、lipofectamine、N-[1-(2,3-二油酰基氧基)丙基]-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTMA)、1-[2-(油酰基氧基)乙基]-2-油酰基-3-(2-羟乙基)氯化咪唑鎓(DOTEVI)、2,3-二油酰基氧基-N-[2

(精胺甲酰氨基)ethyl]-N,N-二甲基-1-三氟乙酸丙胺(DOSPA)、N,N-二硬脂酰基-N,N-二甲基溴化铵(DDAB)、N-(1,2-二肉豆蔻基氧基-3-基)-N,N-二甲基-N-羟乙基溴化铵(DMRIE)、N-(1,2-二油酰基氧基丙-3-基)-N,N-二甲基-N-羟乙基溴化铵(DORIE)、N,N-二油酰基-N,N-二甲基氯化铵(DODAC)、1,2-二月桂酰基-sn-甘油-3-乙基磷酸胆碱(DLePC)、1,2-二硬脂酰基-3-三甲基铵-丙烷(DSTAP)、1,2-二棕榈酰基-3-三甲基铵-丙烷(DPTAP)、1,2-二亚油酰基-3-三甲基铵-丙烷(DLTAP)、1,2-二肉豆蔻酰基-3-三甲基铵-丙烷(DMTAP)、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-乙基磷酸胆碱(DSePC)、1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-乙基磷酸胆碱(DPePC)、1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油-3-乙基磷酸胆碱(DMePC)、1,2-二油酰基sn-甘油-3-乙基磷酸胆碱(DOePC)、1,2-二-(9Z-十四碳烯酰基)-sn-甘油-3-乙基磷酸胆碱(14:1EPC)、1-棕榈酰基-2-油酰基-sn-甘油-3-乙基磷酸胆碱(16:0-18:1EPC)或它们的任何组合。

[0357] 将在体内施用上述LNP(即,包含阳离子脂质和RNA-VEE),然后将在肝脏中评估所编码的有效载荷的表达(例如,如实施例4-7中所述)。在一些方面,还将在动物中评估肝毒性(例如,如实施例3中所述)。

[0358] 实施例10:包含具有VEE复制子的RNA和类脂质材料的脂质纳米颗粒

[0359] 为了评估本文所述的VEE复制子的肝脏回避性质,将构建包含类脂质材料的脂质纳米颗粒以制备类脂质纳米颗粒(LLN),然后将其用于包封具有VEE复制子并编码有效载荷的mRNA(RNA-VEE)。类脂质材料将选自以下:1,1'-((2-(4-(2-((2-(双(2-羟基十二烷基)氨基)乙基)(2-羟基十二烷基)氨基)乙基)哌嗪-1-基)乙基)氮烷二基)双(十二烷-2-醇)(C12-200)、3,6-双(4-(双(2-羟基十二烷基)氨基)丁基)哌嗪2,5-二酮(cKK-E12)、四(8-甲基壬基)3,3',3″,3″'-(((甲基氮烷二基)双(丙烷-3,1二基))双(氮烷三基))四丙酸酯(3060i10)、G0-C14、5A2-SC8、3,6-双(4-(双((9Z,12Z)-2-羟基十八碳9,12-二烯-1-基)氨基)丁基)哌嗪-2,5-二酮(OF-02)、(((3,6-二氧代哌嗪-2,5-二基)双(丁烷-4,1-二基))双(氮烷三基))四(乙烷-2,1-二基)(9Z,9'Z,9″Z,9″'Z,12Z,12'Z,12″Z,12″'Z)-四(十八碳-9,12-二烯酸酯)(OF-Deg-Lin)、(((3,6-二氧代哌嗪-2,5-二基)双(丁烷-4,1-二基))四(氮烷三基))四(丁烷-4,1-二基)(9Z,9'Z,9″Z,9″'Z,12Z,12'Z,12″Z,12″'Z)-四(十八碳-9,12-二烯酸酯)(OF-C4-Deg-Lin)、N1,N3,N5-三(3-(二十二烷基氨基)丙基)苯1,3,5-三甲酰胺(TT3)、六(辛-3-基)9,9',9″,9″',9‴,9⁗'-((((苯-1,3,5-三羰基)三(氮烷二基))三(丙烷-3,1-二基))三(氮烷三基))壬酸己酯(FTT5)、PL-1[公开于Nature Communications,12-7264(2021),其特此通过引用并入]、98N12-5[公开于Molecular Therapy第17卷第5期2009年5月,其特此通过引用并入]、ethyl 5,5-二((Z)-十七碳-8-烯-1-基)-1-(3-(吡咯烷-1-基)丙基)-2,5-二氢-1H-咪唑-2-羧酸乙酯(A2-Iso5-2DC18(A2))和A12-Iso5-2DC18(A12),或它们的任何组合。

[0360] 将在体内施用上述LLP(即,包含类脂质材料和RNA-VEE),然后将在肝脏中评估所编码的有效载荷的表达(例如,如实施例4-7中所述)。在一些方面,还将在动物中评估肝毒性(例如,如实施例3中所述)。

[0361] 实施例12:包含具有VEE复制子的RNA和聚合物材料的脂质纳米颗粒

[0362] 为了评估本文所述的VEE复制子的肝脏回避性质,将构建包含聚合物材料的脂质纳米颗粒以制备聚合物纳米颗粒(PNP),然后将其用于包封具有VEE复制子并编码有效载荷的mRNA(RNA-VEE)。聚合物材料将选自以下:聚乙烯亚胺(PEI)、聚(酰胺基胺)(PAMAM)、聚

(β-氨基酯)(PBAE)、聚(甲基丙烯酸2-N,N-二甲基氨基乙酯)(PDMAEMA)、聚(氨基酸)(PAA)、壳聚糖葡聚糖、环糊精、纤维素、透明质酸、聚乳酸(PLA)、聚(乳酸-共-乙醇酸)(PLGA)和聚己内酯(PCL)。

[0363] 将在体内施用上述PNP(即,包含聚合物材料和RNA-VEE),然后将在肝脏中评估所编码的有效载荷的表达(例如,如实施例4-7中所述)。在一些方面,还将在动物中评估肝毒性(例如,如实施例3中所述)。

[0364] 表4.示例性VEE复制子序列

[0365]

野生型 VEE 复制	ATGGGCGGCGCATGAGAGAAGCCCAGACCAATTACCTACC CAAAATGGAGAAAGTTCACGTTGACATCGAGGAAGACAGC

[0366]

子序列 (SEQ ID NO: 186)	CCATTCCTCAGAGCTTTGCAGCGGAGCTTCCCGCAGTTTGA GGTAGAAGCCAAGCAGGTCACTGATAATGACCATGCTAAT GCCAGAGCGTTTTCGCATCTGGCTTCAAAACTGATCGAAAC GGAGGTGGACCCATCCGACACGATCCTTGACATTGGAAGT GCGCCCGCCCGCAGAATGTATTCTAAGCACAAGTATCATT GTATCTGTCCGATGAGATGTGCGGAAGATCCGGACAGATT GTATAAGTATGCAACTAAGCTGAAGAAAAACTGTAAGGAA ATAACTGATAAGGAATTGGACAAGAAAATGAAGGAGCTG GCCGCCGTCATGAGCGACCCTGACCTGGAAACTGAGACTA TGTGCCTCCACGACGACGAGTCGTGTCGCTACGAAGGGCA AGTCGCTGTTTACCAGGATGTATACGCGGTTGACGGACCG ACAAGTCTCTATCACCAAGCCAATAAGGGAGTTAGAGTCG CCTACTGGATAGGCTTTGACACCACCCCTTTTATGTTTAAG AACTTGGCTGGAGCATATCCATCATACTCTACCAACTGGGC CGACGAAACCGTGTTAACGGCTCGTAACATAGGCCTATGC AGCTCTGACGTTATGGAGCGGTCACGTAGAGGGATGTCCA TTCTTAGAAAGAAGTATTTGAAACCATCCAACAATGTTCTA TTCTCTGTTGGCTCGACCATCTACCACGAGAAGAGGGACTT ACTGAGGAGCTGGCACCTGCCGTCTGTATTTCACTTACGTG GCAAGCAAAATTACACATGTCGGTGTGAGACTATAGTTAG TTGCGACGGGTACGTCGTTAAAAGAATAGCTATCAGTCCA GGCCTGTATGGGAAGCCTTCAGGCTATGCTGCTACGATGC ACCGCGAGGGATTCTTGTGCTGCAAAGTGACAGACACATT GAACGGGGAGAGGGTCTCTTTTCCCGTGTGCACGTATGTGC CAGCTACATTGTGTGACCAAATGACTGGCATACTGGCAAC AGATGTCAGTGCGGACGACGCGCAAAAACTGCTGGTTGGG CTCAACCAGCGTATAGTCGTCAACGGTCGCACCCAGAGAA ACACCAATACCATGAAAAATTACCTTTTGCCCGTAGTGGCC CAGGCATTTGCTAGGTGGGCAAAGGAATATAAGGAAGATC AAGAAGATGAAAGGCCACTAGGACTACGAGATAGACAGTT AGTCATGGGGTGTTGTTGGGCTTTTAGAAGGCACAAGATA ACATCTATTTATAAGCGCCCGGATACCCAAACCATCATCAA AGTGAACAGCGATTTCCACTCATTCGTGCTGCCCAGGATAG GCAGTAACACATTGGAGATCGGGCTGAGAACAAGAATCAG GAAAATGTTAGAGGAGCACAAGGAGCCGTCACCTCTCATT ACCGCCGAGGACGTACAAGAAGCTAAGTGCGCAGCCGATG AGGCTAAGGAGGTGCGTGAAGCCGAGGAGTTGCGCGCAGC TCTACCACCTTTGGCAGCTGATGTTGAGGAGCCCACTCTGG AGGCAGACGTCGACTTGATGTTACAAGAGGCTGGGGCCGG CTCAGTGGAGACACCTCGTGGCTTGATAAAGGTTACCAGC TACGATGGCGAGGACAAGATCGGCTCTTACGCTGTGCTTTC TCCGCAGGCTGTACTCAAGAGTGAAAAATTATCTTGCATCC ACCCTCTCGCTGAACAAGTCATAGTGATAACACACTCTGGC CGAAAAGGGCGTTATGCCGTGGAACCATACCATGGTAAAG TAGTGGTGCCAGAGGGACATGCAATACCCGTCCAGGACTT TCAAGCTCTGAGTGAAAGTGCCACCATTGTGTACAACGAA CGTGAGTTCGTAAACAGGTACCTGCACCATATTGCCACAC ATGGAGGAGCGCTGAACACTGATGAAGAATATTACAAAAC TGTCAAGCCCAGCGAGCACGACGGCGAATACCTGTACGAC ATCGACAGGAAACAGTGCGTCAAGAAAGAACTAGTCACTG

[0367]

GGCTAGGGCTCACAGGCGAGCTGGTGGATCCTCCCTTCCAT
GAATTCGCCTACGAGAGTCTGAGAACACGACCAGCCGCTC
CTTACCAAGTACCAACCATAGGGGTGTATGGCGTGCCAGG
ATCAGGCAAGTCTGGCATCATTAAAAGCGCAGTCACCAAA
AAAGATCTAGTGGTGAGCGCCAAGAAAGAAAACTGTGCAG
AAATTATAAGGGACGTCAAGAAAATGAAAGGGCTGGACGT
CAATGCCAGAACTGTGGACTCAGTGCTCTTGAATGGATGC
AAACACCCCGTAGAGACCCTGTATATTGACGAAGCTTTTGC
TTGTCATGCAGGTACTCTCAGAGCGCTCATAGCCATTATAA
GACCTAAAAAGGCAGTGCTCTGCGGGGATCCCAAACAGTG
CGGTTTTTTTAACATGATGTGCCTGAAAGTGCATTTTAACC
ACGAGATTTGCACACAAGTCTTCCACAAAAGCATCTCTCGC
CGTTGCACTAAATCTGTGACTTCGGTCGTCTCAACCTTGTT
TTACGACAAAAAAATGAGAACGACGAATCCGAAAGAGAC
TAAGATTGTGATTGACACTACCGGCAGTACCAAACCTAAG
CAGGACGATCTCATTCTCACTTGTTTCAGAGGGTGGGTGAA
GCAGTTGCAAATAGATTACAAAGGCAACGAAATAATGACG
GCAGCTGCCTCTCAAGGGCTGACCCGTAAAGGTGTGTATG
CCGTTCGGTACAAGGTGAATGAAAATCCTCTGTACGCACC
CACCTCAGAACATGTGAACGTCCTACTGACCCGCACGGAG
GACCGCATCGTGTGGAAAACACTAGCCGGCGACCCATGGA
TAAAAACACTGACTGCCAAGTACCCTGGGAATTTCACTGC
CACGATAGAGGAGTGGCAAGCAGAGCATGATGCCATCATG
AGGCACATCTTGGAGAGACCGGACCCTACCGACGTCTTCC
AGAATAAGGCAAACGTGTGTTGGGCCAAGGCTTTAGTGCC
GGTGCTGAAGACCGCTGGCATAGACATGACCACTGAACAA
TGGAACACTGTGGATTATTTTGAAACGGACAAAGCTCACT
CAGCAGAGATAGTATTGAACCAACTATGCGTGAGGTTCTTT
GGACTCGATCTGGACTCCGGTCTATTTTCTGCACCCACTGT
TCCGTTATCCATTAGGAATAATCACTGGGATAACTCCCCGT
CGCCTAACATGTACGGGCTGAATAAAGAAGTGGTCCGTCA
GCTCTCTCGCAGGTACCCACAACTGCCTCGGGCAGTTGCCA
CTGGAAGAGTCTATGACATGAACACTGGTACACTGCGCAA
TTATGATCCGCGCATAAACCTAGTACCTGTAAACAGAAGA
CTGCCTCATGCTTTAGTCCTCCACCATAATGAACACCCACA
GAGTGACTTTTCTTCATTCGTCAGCAAATTGAAGGGCAGAA
CTGTCCTGGTGGTCGGGGAAAAGTTGTCCGTCCCAGGCAA
AATGGTTGACTGGTTGTCAGACCGGCCTGAGGCTACCTTCA
GAGCTCGGCTGGATTTAGGCATCCCAGGTGATGTGCCCAA
ATATGACATAATATTTGTTAATGTGAGGACCCCATATAAAT
ACCATCACTATCAGCAGTGTGAAGACCATGCCATTAAGCTT
AGCATGTTGACCAAGAAAGCTTGTCTGCATCTGAATCCCG
GCGGAACCTGTGTCAGCATAGGTTATGGTTACGCTGACAG
GGCCAGCGAAAGCATCATTGGTGCTATAGCGCGGCAGTTC
AAGTTTTCCCGGGTATGCAAACCGAAATCCTCACTTGAAG
AGACGGAAGTTCTGTTTGTATTCATTGGGTACGATCGCAAG
GCCCGTACGCACAATTCTTACAAGCTTTCATCAACCTTGAC
CAACATTTATACAGGTTCCAGACTCCACGAAGCCGGATGT
GCACCCTCATATCATGTGGTGCGAGGGGATATTGCCACGG
CCACCGAAGGAGTGATTATAAATGCTGCTAACAGCAAAGG

[0368]

	ACAACCTGGCGGAGGGGTGTGCGGAGCGCTGTATAAGAAA TTCCCGGAAAGCTTCGATTTACAGCCGATCGAAGTAGGAA AAGCGCGACTGGTCAAAGGTGCAGCTAAACATATCATTCA TGCCGTAGGACCAAACTTCAACAAAGTTTCGGAGGTTGAA GGTGACAAACAGTTGGCAGAGGCTTATGAGTCCATCGCTA AGATTGTCAACGATAACAATTACAAGTCAGTAGCGATTCC ACTGTTGTCCACCGGCATCTTTTCCGGGAACAAAGATCGAC TAACCCAATCATTGAACCATTTGCTGACAGCTTTAGACACC ACTGATGCAGATGTAGCCATATACTGCAGGGACAAGAAAT GGGAAATGACTCTCAAGGAAGCAGTGGCTAGGAGAGAAG CAGTGGAGGAGATATGCATATCCGACGACTCTTCAGTGAC AGAACCTGATGCAGAGCTGGTGAGGGTGCATCCGAAGAGT TCTTTGGCTGGAAGGAAGGGCTACAGCACAAGCGATGGCA AAACTTTCTCATATTTGGAAGGGACCAAGTTTCACCAGGCG GCCAAGGATATAGCAGAAATTAATGCCATGTGGCCCGTTG CAACGGAGGCCAATGAGCAGGTATGCATGTATATCCTCGG AGAAAGCATGAGCAGTATTAGGTCGAAATGCCCCGTCGAA GAGTCGGAAGCCTCCACACCACCTAGCACGCTGCCTTGCTT GTGCATCCATGCCATGACTCCAGAAAGAGTACAGCGCCTA AAAGCCTCACGTCCAGAACAAATTACTGTGTGCTCATCCTT TCCATTGCCGAAGTATAGAATCACTGGTGTGCAGAAGATC CAATGCTCCCAGCCTATATTGTTCTCACCGAAAGTGCCTGC GTATATTCATCCAAGGAAGTATCTCGTGGAAACACCACCG GTAGACGAGACTCCGGAGCCATCGGCAGAGAACCAATCCA CAGAGGGGACACCTGAACAACCACCACTTATAACCGAGGA TGAGACCAGGACTAGAACGCCTGAGCCGATCATCATCGAA GAGGAAGAAGAGGATAGCATAAGTTTGCTGTCAGATGGCC CGACCCACCAGGTGCTGCAAGTCGAGGCAGACATTCACGG GCCGCCCTCTGTATCTAGCTCATCCTGGTCCATTCCTCATG CATCCGACTTTGATGTGGACAGTTTATCCATACTTGACACC CTGGAGGGAGCTAGCGTGACCAGCGGGGCAACGTCAGCCG AGACTAACTCTTACTTCGCAAAGAGTATGGAGTTTCTGGCG CGACCGGTGCCTGCGCCTCGAACAGTATTCAGGAACCCTC CACATCCCGCTCCGCGCACAAGAACACCGTCACTTGCACC CAGCAGGGCCTGCTCGAGAACCAGCCTAGTTTCCACCCCG CCAGGCGTGAATAGGGTGATCACTAGAGAGGAGCTCGAGG CGCTTACCCCGTCACGCACTCCTAGCAGGTCGGTCTCGAGA ACCAGCCTGGTCTCCAACCCGCCAGGCGTAAATAGGGTGA TTACAAGAGAGGAGTTTGAGGCGTTCGTAGCACAACAACA ATGACGGTTTGATGCGGGTGCATACATCTTTTCCTCCGACA CCGGTCAAGGGCATTTACAACAAAAATCAGTAAGGCAAAC GGTGCTATCCGAAGTGGTGTTGGAGAGGACCGAATTGGAG ATTTCGTATGCCCCGCGCCTCGACCAAGAAAAAGAAGAAT TACTACGCAAGAAATTACAGTTAAATCCCACACCTGCTAA CAGAAGCAGATACCAGTCCAGGAAGGTGGAGAACATGAA AGCCATAACAGCTAGACGTATTCTGCAAGGCCTAGGGCAT TATTTGAAGGCAGAAGGAAAAGTGGAGTGCTACCGAACCC TGCATCCTGTTCCTTTGTATTCATCTAGTGTGAACCGTGCCT TTTCAAGCCCCAAGGTCGCAGTGGAAGCCTGTAACGCCAT GTTGAAAGAGAACTTTCCGACTGTGGCTTCTTACTGTATTA

[0369]

	TTCCAGAGTACGATGCCTATTTGGACATGGTTGACGGAGCT TCATGCTGCTTAGACACTGCCAGTTTTTGCCCTGCAAAGCT GCGCAGCTTTCCAAAGAAACACTCCTATTTGGAACCCACA ATACGATCGGCAGTGCCTTCAGCGATCCAGAACACGCTCC AGAACGTCCTGGCAGCTGCCACAAAAAGAAATTGCAATGT CACGCAAATGAGAGAATTGCCCGTATTGGATTCGGCGGCC TTTAATGTGGAATGCTTCAAGAAATATGCGTGTAATAATGA ATATTGGGAAACGTTTAAAGAAAACCCCATCAGGCTTACT GAAGAAAACGTGGTAAATTACATTACCAAATTAAAAGGAC CAAAAGCTGCTGCTCTTTTTGCGAAGACACATAATTTGAAT ATGTTGCAGGACATACCAATGGACAGGTTTGTAATGGACT TAAAGAGAGACGTGAAAGTGACTCCAGGAACAAAACATA CTGAAGAACGGCCCAAGGTACAGGTGATCCAGGCTGCCGA TCCGCTAGCAACAGCGTATCTGTGCGGAATCCACCGAGAG CTGGTTAGGAGATTAAATGCGGTCCTGCTTCCGAACATTCA TACACTGTTTGATATGTCGGCTGAAGACTTTGACGCTATTA TAGCCGAGCACTTCCAGCCTGGGGATTGTGTTCTGGAAACT GACATCGCGTCGTTTGATAAAAGTGAGGACGACGCCATGG CTCTGACCGCGTTAATGATTCTGGAAGACTTAGGTGTGGAC GCAGAGCTGTTGACGCTGATTGAGGCGGCTTTCGGCGAAA TTTCATCAATACATTTGCCCACTAAAACTAAATTTAAATTC GGAGCCATGATGAAATCTGGAATGTTCCTCACACTGTTTGT GAACACAGTCATTAACATTGTAATCGCAAGCAGAGTGTTG AGAGAACGGCTAACCGGATCACCATGTGCAGCATTCATTG GAGATGACAATATCGTGAAAGGAGTCAAATCGGACAAATT AATGGCAGACAGGTGCGCCACCTGGTTGAATATGGAAGTC AAGATTATAGATGCTGTGGTGGGCGAGAAAGCGCCTTATT TCTGTGGAGGGTTTATTTTGTGTGACTCCGTGACCGGCACA GCGTGCCGTGTGGCAGACCCCCTAAAAAGGCTGTTTAAGC TTGGCAAACCTCTGGCAGCAGACGATGAACATGATGATGA CAGGAGAAGGGCATTGCATGAAGAGTCAACACGCTGGAAC CGAGTGGGTATTCTTTCAGAGCTGTGCAAGGCAGTAGAAT CAAGGTATGAAACCGTAGGAACTTCCATCATAGTTATGGC CATGACTACTCTAGCTAGCAGTGTTAAATCATTCAGCTACC TGAGAGGGGCCCCTATAACTCTCTACGGCTAACCTGAATG GACTACGACATAGTCTAGTCCGCCAAGTCTAGCATATGGG CGCGCCCTCAGCATCGATTGAATTGGCCACCATGGTGAGC AAGGGCGAGGAGGATAACATGGCCATCATCAAGGAGTTCA TGCGCTTCAAGGTGCACATGGAGGGCTCCGTGAACGGCCA CGAGTTCGAGATCGAGGGCGAGGGCGAGGGCCGCCCCTAC GAGGGCACCCAGACCGCCAAGCTGAAGGTGACCAAGGGT GGCCCCCTGCCCTTCGCCTGGGACATCCTGTCCCCTCAGTT CATGTACGGCTCCAAGGCCTACGTGAAGCACCCCGCCGAC ATCCCCGACTACTTGAAGCTGTCCTTCCCCGAGGGCTTCAA GTGGGAGCGCGTGATGAACTTCGAGGACGGCGGCGTGGTG ACCGTGACCCAGGACTCCTCCCTGCAGGACGGCGAGTTCA TCTACAAGGTGAAGCTGCGCGGCACCAACTTCCCCTCCGA CGGCCCCGTAATGCAGAAGAAGACCATGGGCTGGGAGGCC TCCTCCGAGCGGATGTACCCCGAGGACGGCGCCCTGAAGG GCGAGATCAAGCAGAGGCTGAAGCTGAAGGACGGCGGCC

[0370]

	ACTACGACGCTGAGGTCAAGACCACCTACAAGGCCAAGAA GCCCGTGCAGCTGCCCGGCGCCTACAACGTCAACATCAAG TTGGACATCACCTCCCACAACGAGGACTACACCATCGTGG AACAGTACGAACGCGCCGAGGGCCGCCACTCCACCGGCGG CATGGACGAGCTGTACAAGTAGGAATTGGCAAGCTGCTTA CATAGAACTCGCGGCGATTGGCATGCCGCCTTAAAATTTTT ATTTTATTTTTCTTTTCTTTTCCGAATCGGATTTTGTTTTTAA TATTTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACGCGTCG AGGGGAATTAATTCTTGAAGACGAAAGGGCCAGGTGGCAC TTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTT TCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAA CCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTA TGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTG CGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTG GTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAG TGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTT GAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCA CTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTGTT GACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATT CTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAA GCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGT GCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTAC TTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTT TTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACTCGCCTTGATCGTT GGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGC GTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCG CAAACTATTAACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGC AACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGG ACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTG CTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTAT CATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATC GTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATG AACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGAT TAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATAC TTTAGATTGATTTAAAACTTCATTTTTAATTTAAAAGGATC TAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCC TTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAG AAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGC GTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAACCACCGCTACCAG CGGTGGTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTT CCGAAGGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATA CTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAG AACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCT GTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTA CCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCA GCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGC TTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGC GTGAGCATTGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAA GGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGG AGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTAT

[0371]

	CTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCG TCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGA AAAACGCCAGCAACGCGAGCTCTAATACGACTCACTATAG
VEE 复制子序列 (SEQ ID NO: 187)	gctcttctaagTAATACGACTCACTATAATGGGCGGCGCATGAGAG AAGCCCAGACCAATTACCTACCCAAAATGGAGAAAGTTCAC GTTGACATCGAGGAAGACAGCCCATTCCTCAGAGCTTTGCA GCGGAGCTTCCCGCAGTTTGAGGTAGAAGCCAAGCAGGTC ACTGATAATGACCATGCTAATGCCAGAGCGTTTTCGCATCTG GCTTCAAAACTGATCGAAACGGAGGTGGACCCATCCGACA CGATCCTTGACATTGGAAGTGCGCCCGCCCGCAGAATGTAT TCTAAGCACAAGTATCATTGTATCTGTCCGATGAGATGTGCG GAAGATCCGGACAGATTGTATAAGTATGCAACTAAGCTGAA GAAAAACTGTAAGGAAATAACTGATAAGGAATTGGACAAG AAAATGAAGGAGCTCGCCGCCGTCATGAGCGACCCTGACC TGGAAACTGAGACTATGTGCCTCCACGACGACGAGTCGTGT CGCTACGAAGGGCAAGTCGCTGTTTACCAGGATGTATACGC GGTTGACGGACCGACAAGTCTCTATCACCAAGCCAATAAGG GAGTTAGAGTCGCCTACTGGATAGGCTTTGACACCACCCCT TTTATGTTTAAGAACTTGGCTGGAGCATATCCATCATACTCTA CCAACTGGGCCGACGAAACCGTGTTAACGGCTCGTAACATA GGCCTATGCAGCTCTGACGTTATGGAGCGGTCACGTAGAGG GATGTCCATTCTTAGAAAGAAGTATTTGAAACCATCCAACA ATGTTCTATTCTCTGTTGGCTCGACCATCTACCACGAGAAGA GGGACTTACTGAGGAGCTGGCACCTGCCGTCTGTATTTCAC TTACGTGGCAAGCAAAATTACACATGTCGGTGTGAGACTAT AGTTAGTTGCGACGGGTACGTCGTTAAAAGAATAGCTATCA GTCCAGGCCTGTATGGGAAGCCTTCAGGCTATGCTGCTACG ATGCACCGCGAGGGATTCTTGTGCTGCAAAGTGACAGACA CATTGAACGGGGAGAGGGTCTCTTTTCCCGTGTGCACGTAT GTGCCAGCTACATTGTGTGACCAAATGACTGGCATACTGGC AACAGATGTCAGTGCGGACGACGCGCAAAAACTGCTGGTT GGGCTCAACCAGCGTATAGTCGTCAACGGTCGCACCCAGA GAAACACCAATACCATGAAAAATTACCTTTTGCCCGTAGTG GCCCAGGCATTTGCTAGGTGGGCAAAGGAATATAAGGAAGA TCAAGAAGATGAAAGGCCACTAGGACTACGAGATAGACAG TTAGTCATGGGGTGTTGTTGGGCTTTTAGAAGGCACAAGAT AACATCTATTTATAAGCGCCCGGATACCCAAACCATCATCAA AGTGAACAGCGATTTCCACTCATTCGTGCTGCCCAGGATAG GCAGTAACACATTGGAGATCGGGCTGAGAACAAGAATCAG GAAAATGTTAGAGGAGCACAAGGAGCCGTCACCTCTCATTA CCGCCGAGGACGTACAAGAAGCTAAGTGCGCAGCCGATGA GGCTAAGGAGGTGCGTGAAGCCGAGGAGTTGCGCGCAGCT CTACCACCTTTGGCAGCTGATGTTGAGGAGCCCACTCTGGA AGCCGATGTCGACTTGATGTTACAAGAGGCTGGGGCCGGCT CAGTGGAGACACCTCGTGGCTTGATAAAGGTTACCAGCTAC GATGGCGAGGACAAGATCGGCTCTTACGCTGTGCTTTCTCC GCAGGCTGTACTCAAGAGTGAAAAATTATCTTGCATCCACC CTCTCGCTGAACAAGTCATAGTGATAACACACTCTGGCCGA AAAGGGCGTTATGCCGTGGAACCATACCATGGTAAAGTAGT GGTGCCAGAGGGACATGCAATACCCGTCCAGGACTTTCAA

[0372]

	GCTCTGAGTGAAAGTGCCACCATTGTGTACAACGAACGTGA GTTCGTAAACAGGTACCTGCACCATATTGCCACACATGGAG GAGCGCTGAACACTGATGAAGAATATTACAAAACTGTCAAG CCCAGCGAGCACGACGGCGAATACCTGTACGACATCGACA GGAAACAGTGCGTCAAGAAAGAACTAGTCACTGGGCTAGG GCTCACAGGCGAGCTGGTGGATCCTCCCTTCCATGAATTCG CCTACGAGAGTCTGAGAACACGACCAGCCGCTCCTTACCA AGTACCAACCATAGGGGTGTATGGCGTGCCAGGATCAGGCA AGTCTGGCATCATTAAAAGCGCAGTCACCAAAAAAGATCTA GTGGTGAGCGCCAAGAAAGAAAACTGTGCAGAAATTATAA GGGACGTCAAGAAAATGAAAGGGCTGGACGTCAATGCCAG AACTGTGGACTCAGTGCTCTTGAATGGATGCAAACACCCCG TAGAGACCCTGTATATTGACGAAGCTTTTGCTTGTCATGCAG GTACTCTCAGAGCGCTCATAGCCATTATAAGACCTAAAAAG GCAGTGCTCTGCGGGGATCCCAAACAGTGCGGTTTTTTTAA CATGATGTGCCTGAAAGTGCATTTTAACCACGAGATTTGCA CACAAGTCTTCCACAAAAGCATCTCTCGCCGTTGCACTAAA TCTGTGACTTCGGTCGTCTCAACCTTGTTTTACGACAAAAA AATGAGAACGACGAATCCGAAAGAGACTAAGATTGTGATTG ACACTACCGGCAGTACCAAACCTAAGCAGGACGATCTCATT CTCACTTGTTTCAGAGGGTGGGTGAAGCAGTTGCAAATAGA TTACAAAGGCAACGAAATAATGACGGCAGCTGCCTCTCAAG GGCTGACCCGTAAAGGTGTGTATGCCGTTCGGTACAAGGTG AATGAAAATCCTCTGTACGCACCCACCTCAGAACATGTGAA CGTCCTACTGACCCGCACGGAGGACCGCATCGTGTGGAAA ACACTAGCCGGCGACCCATGGATAAAAACACTGACTGCCA AGTACCCTGGGAATTTCACTGCCACGATAGAGGAGTGGCAA GCAGAGCATGATGCCATCATGAGGCACATCTTGGAGAGACC GGACCCTACCGACGTCTTCCAGAATAAGGCAAACGTGTGTT GGGCCAAGGCTTTAGTGCCGGTGCTGAAGACCGCTGGCATA GACATGACCACTGAACAATGGAACACTGTGGATTATTTTGA AACGGACAAAGCTCACTCAGCAGAGATAGTATTGAACCAA CTATGCGTGAGGTTCTTTGGACTCGATCTGGACTCCGGTCTA TTTTCTGCACCCACTGTTCCGTTATCCATTAGGAATAATCAC TGGGATAACTCCCCGTCGCCTAACATGTACGGGCTGAATAA AGAAGTGGTCCGTCAGCTCTCTCGCAGGTACCCACAACTGC CTCGGGCAGTTGCCACTGGAAGAGTCTATGACATGAACACT GGTACACTGCGCAATTATGATCCGCGCATAAACCTAGTACCT GTAAACAGAAGACTGCCTCATGCTTTAGTCCTCCACCATAAT GAACACCCACAGAGTGACTTTTCTTCATTCGTCAGCAAATT GAAGGGCAGAACTGTCCTGGTGGTCGGGGAAAAGTTGTCC GTCCCAGGCAAAATGGTTGACTGGTTGTCAGACCGGCCTG AGGCTACCTTCAGAGCTCGGCTGGATTTAGGCATCCCAGGT GATGTGCCCAAATATGACATAATATTTGTTAATGTGAGGACC CCATATAAATACCATCACTATCAGCAGTGTGAAGACCATGCC ATTAAGCTTAGCATGTTGACCAAGAAAGCTTGTCTGCATCT GAATCCCGGCGGAACCTGTGTCAGCATAGGTTATGGTTACG CTGACAGGGCCAGCGAAAGCATCATTGGTGCTATAGCGCGG CAGTTCAAGTTTTCCCGGGTATGCAAACCGAAATCCTCACT TGAAGAGACGGAAGTTCTGTTTGTATTCATTGGGTACGATC

[0373]

GCAAGGCCCGTACGCACAATCCTTACAAGCTTTCATCAACC
TTGACCAACATTTATACAGGTTCCAGACTCCACGAAGCCGG
ATGTGCACCCTCATATCATGTGGTGCGAGGGGATATTGCCAC
GGCCACCGAAGGAGTGATTATAAATGCTGCTAACAGCAAAG
GACAACCTGGCGGAGGGGTGTGCGGAGCGCTGTATAAGAA
ATTCCCGGAAAGCTTCGATTTACAGCCGATCGAAGTAGGAA
AAGCGCGACTGGTCAAAGGTGCAGCTAAACATATCATTCAT
GCCGTAGGACCAAACTTCAACAAAGTTTCGGAGGTTGAAG
GTGACAAACAGTTGGCAGAGGCTTATGAGTCCATCGCTAAG
ATTGTCAACGATAACAATTACAAGTCAGTAGCGATTCCACT
GTTGTCCACCGGCATCTTTTCCGGGAACAAAGATCGACTAA
CCCAATCATTGAACCATTTGCTGACAGCTTTAGACACCACT
GATGCAGATGTAGCCATATACTGCAGGGACAAGAAATGGGA
AATGACTCTCAAGGAAGCAGTGGCTAGGAGAGAAGCAGTG
GAGGAGATATGCATATCCGACGACTCTTCAGTGACAGAACC
TGATGCAGAGCTGGTGAGGGTGCATCCGAAGAGTTCTTTGG
CTGGAAGGAAGGGCTACAGCACAAGCGATGGCAAAACTTT
CTCATATTTGGAAGGGACCAAGTTTCACCAGGCGGCCAAGG
ATATAGCAGAAATTAATGCCATGTGGCCCGTTGCAACGGAG
GCCAATGAGCAGGTATGCATGTATATCCTCGGAGAAAGCAT
GAGCAGTATTAGGTCGAAATGCCCCGTCGAAGAGTCGGAA
GCCTCCACACCACCTAGCACGCTGCCTTGCTTGTGCATCCA
TGCCATGACTCCAGAAAGAGTACAGCGCCTAAAAGCCTCA
CGTCCAGAACAAATTACTGTGTGCTCATCCTTTCCATTGCCG
AAGTATAGAATCACTGGTGTGCAGAAGATCCAATGCTCCCA
GCCTATATTGTTCTCACCGAAAGTGCCTGCGTATATTCATCC
AAGGAAGTATCTCGTGGAAACACCACCGGTAGACGAGACT
CCGGAGCCATCGGCAGAGAACCAATCCACAGAGGGGACAC
CTGAACAACCACCACTTATAACCGAGGATGAGACCAGGACT
AGAACGCCTGAGCCGATCATCATCGAAGAGGAAGAAGAGG
ATAGCATAAGTTTGCTGTCAGATGGCCCGACCCACCAGGTG
CTGCAAGTCGAGGCAGACATTCACGGGCCGCCCTCTGTATC
TAGCTCATCCTGGTCCATTCCTCATGCATCCGACTTTGATGT
GGACAGTTTATCCATACTTGACACCCTGGAGGGAGCTAGCG
TGACCAGCGGGGCAACGTCAGCCGAGACTAACTCTTACTTC
GCAAAGAGTATGGAGTTTCTGGCGCGACCGGTGCCTGCGCC
TCGAACAGTATTCAGGAACCCTCCACATCCCGCTCCGCGCA
CAAGAACACCGTCACTTGCACCCAGCAGGGCCTGCTCGAG
AACCAGCCTAGTTTCCACCCCGCCAGGCGTGAATAGGGTGA
TCACTAGAGAGGAGCTCGAGGCGCTTACCCCGTCACGCACT
CCTAGCAGGTCGGTCTCGAGAACCAGCCTGGTCTCCAACCC
GCCAGGCGTAAATAGGGTGATTACAAGAGAGGAGTTTGAG
GCGTTCGTAGCACAACAACAATGACGGTTTGATGCGGGTGC
ATACATCTTTTCCTCCGACACCGGTCAAGGGCATTTACAACA
AAAATCAGTAAGGCAAACGGTGCTATCCGAAGTGGTGTTGG
AGAGGACCGAATTGGAGATTTCGTATGCCCCGCGCCTCGAC
CAAGAAAAAGAAGAATTACTACGCAAGAAATTACAGTTAAA
TCCCACACCTGCTAACAGAAGCAGATACCAGTCCAGGAAG
GTGGAGAACATGAAAGCCATAACAGCTAGACGTATTCTGCA
AGGCCTAGGGCATTATTTGAAGGCAGAAGGAAAAGTGGAG

[0374]

TGCTACCGAACCCTGCATCCTGTTCCTTTGTATTCATCTAGT
GTGAACCGTGCCTTTTCAAGCCCCAAGGTCGCAGTGGAAG
CCTGTAACGCCATGTTGAAAGAGAACTTTCCGACTGTGGCT
TCTTACTGTATTATTCCAGAGTACGATGCCTATTTGGACATGG
TTGACGGAGCTTCATGCTGCTTAGACACTGCCAGTTTTTGC
CCTGCAAAGCTGCGCAGCTTTCCAAAGAAACACTCCTATTT
GGAACCCACAATACGATCGGCAGTGCCTTCAGCGATCCAGA
ACACGCTCCAGAACGTCCTGGCAGCTGCCACAAAAAGAAA
TTGCAATGTCACGCAAATGAGAGAATTGCCCGTATTGGATTC
GGCGGCCTTTAATGTGGAATGCTTCAAGAAATATGCGTGTAA
TAATGAATATTGGGAAACGTTTAAAGAAAACCCCATCAGGC
TTACTGAAGAAAACGTGGTAAATTACATTACCAAATTAAAA
GGACCAAAAGCTGCTGCTCTTTTTGCGAAGACACATAATTT
GAATATGTTGCAGGACATACCAATGGACAGGTTTGTAATGG
ACTTAAAGAGAGACGTGAAAGTGACTCCAGGAACAAAACA
TACTGAAGAACGGCCCAAGGTACAGGTGATCCAGGCTGCC
GATCCGCTAGCAACAGCGTATCTGTGCGGAATCCACCGAGA
GCTGGTTAGGAGATTAAATGCGGTCCTGCTTCCGAACATTCA
TACACTGTTTGATATGTCGGCTGAAGACTTTGACGCTATTAT
AGCCGAGCACTTCCAGCCTGGGGATTGTGTTCTGGAAACTG
ACATCGCGTCGTTTGATAAAAGTGAGGACGACGCCATGGCT
CTGACCGCGTTAATGATTCTGGAAGACTTAGGTGTGGACGC
AGAGCTGTTGACGCTGATTGAGGCGGCTTTCGGCGAAATTT
CATCAATACATTTGCCCACTAAAACTAAATTTAAATTCGGAG
CCATGATGAAATCTGGAATGTTCCTCACACTGTTTGTGAAC
ACAGTCATTAACATTGTAATCGCAAGCAGAGTGTTGAGAGA
ACGGCTAACCGGATCACCATGTGCAGCATTCATTGGAGATG
ACAATATCGTGAAAGGAGTCAAATCGGACAAATTAATGGCA
GACAGGTGCGCCACCTGGTTGAATATGGAAGTCAAGATTAT
AGATGCTGTGGTGGGCGAGAAAGCGCCTTATTTCTGTGGAG
GGTTTATTTTGTGTGACTCCGTGACCGGCACAGCGTGCCGT
GTGGCAGACCCCCTAAAAAGGCTGTTTAAGCTTGGCAAAC
CTCTGGCAGCAGACGATGAACATGATGATGACAGGAGAAG
GGCATTGCATGAAGAGTCAACACGCTGGAACCGAGTGGGT
ATTCTTTCAGAGCTGTGCAAGGCAGTAGAATCAAGGTATGA
AACCGTAGGAACTTCCATCATAGTTATGGCCATGACTACTCT
AGCTAGCAGTGTTAAATCATTCAGCTACCTGAGAGGGGCCC
CTATAACTCTCTACGGCTAACCTGAATGGACTACGACATAGT
CTAGTCCGCCAAGGCCACCGATATCTATGTTACGTGCAAAG
GTGATTGTCACCCCCCGAAAGACCATATTGTGACACACCCT
CAGTATCACGCCCAAACATTTACAGCCGCGGTGTCAAAAAC
CGCGTGGACGTGGTTAACATCCCTGCTGGGAGGATCAGCCG
TAATTATTATAATTGGCTTGGTGCTGGCTACTATTGTGGCCAT
GTACGTGCTGACCAACCAGAAACATAATTGAATACAGCAGC
AATTGGCAAGCTGCTTACATAGAACTCGCGGCGATTGGCAT
GCCGCCTTAAAATTTTTATTTTATTTTTCTTTTCTTTTCCGAAT
CGGATTTTGTTTTTAATATTTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAaaagaagagcGCAGCTCTGG
CCCGTGTCTCAAAATCTCTGATGTTACATTGCACAAGATAAA
AATATATCATCATGAACAATAAAACTGTCTGCTTACATAAAC

[0375]

	AGTAATACAAGGGGTGTTATGAGCCATATTCAACGGGAAAC GTCGAGGCCGCGATTAAATTCCAACATGGATGCTGATTTATA TGGGTATAAATGGGCTCGCGATAATGTCGGGCAATCAGGTG CGACAATCTATCGCTTGTATGGGAAGCCCGATGCGCCAGAG TTGTTTCTGAAACATGGCAAAGGTAGCGTTGCCAATGATGT TACAGATGAGATGGTCAGACTAAACTGGCTGACGGAATTTA TGCCTCTTCCGACCATCAAGCATTTTATCCGTACTCCTGATG ATGCATGGTTACTCACCACTGCGATCCCCGGAAAAACAGCA TTCCAGGTATTAGAAGAATATCCTGATTCAGGTGAAAATATT GTTGATGCGCTGGCAGTGTTCCTGCGCCGGTTGCATTCGATT CCTGTTTGTAATTGTCCTTTTAACAGCGATCGCGTATTTCGT CTCGCTCAGGCGCAATCACGAATGAATAACGGTTTGGTTGA TGCGAGTGATTTTGATGACGAGCGTAATGGCTGGCCTGTTG AACAAGTCTGGAAAGAAATGCATAAACTTTTGCCATTCTCA CCGGATTCAGTCGTCACTCATGGTGATTTCTCACTTGATAAC CTTATTTTTGACGAGGGGAAATTAATAGGTTGTATTGATGTT GGACGAGTCGGAATCGCAGACCGATACCAGGATCTTGCCAT CCTATGGAACTGCCTCGGTGAGTTTTCTCCTTCATTACAGAA ACGGCTTTTTCAAAAATATGGTATTGATAATCCTGATATGAAT AAATTGCAGTTTCATTTGATGCTCGATGAGTTTTTCTAATCA GAATTGGTTAATTGGTTGTAACACTGGCAGAGCATTACGCT GACTTGACGGGACGGCGCAAGCTCATGACCAAAATCCCTTA ACGTGAGTTACGCGTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTA GAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGC GTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAACCACCGCTACCAGC GGTGGTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCC GAAGGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTG TTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAAC TCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTA CCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGG GTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGT CGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGA GCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAG CTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGG ACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCG CACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATA GTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTT TGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGC CAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGC CTTTTGCTCACAT

[0376] 应了解,意图使用具体实施方式部分而非发明内容和摘要部分来解释权利要求书。发明内容和摘要部分可阐明如发明人所构想的本公开的一个或多个但非所有的示例性方面,并且因此,并不意图通过任何方式对本公开和所附权利要求进行限制。

[0377] 上文已借助说明实施所指定功能和其关系的功能构建块来阐述本公开。为了方便描述,本文已对这些功能构建块的边界进行任意界定。也可限定替代边界,只要指定功能及其相互关系被适当地执行。

[0378] 具体方面的前述描述将充分地揭示本公开的一般性质,以使得其他人通过应用本

领域中的知识,在无过度实验且不背离本公开的一般概念的情况下,可容易地针对各种应用对此类具体方面进行修改和/或改变。因此,基于本文呈现的教义和指导,此类改变和修改意图在所公开方面的等效物的含义和范围内。应理解,本文的短语或术语是出于描述而非限制的目的,使得本说明书的术语或短语将由所属领域的技术人员根据教示和指导来解释。

[0379] 本公开的广度和范围不应受任何上述示例性方面的限制,而应仅根据以下权利要求及其等同物来限定。

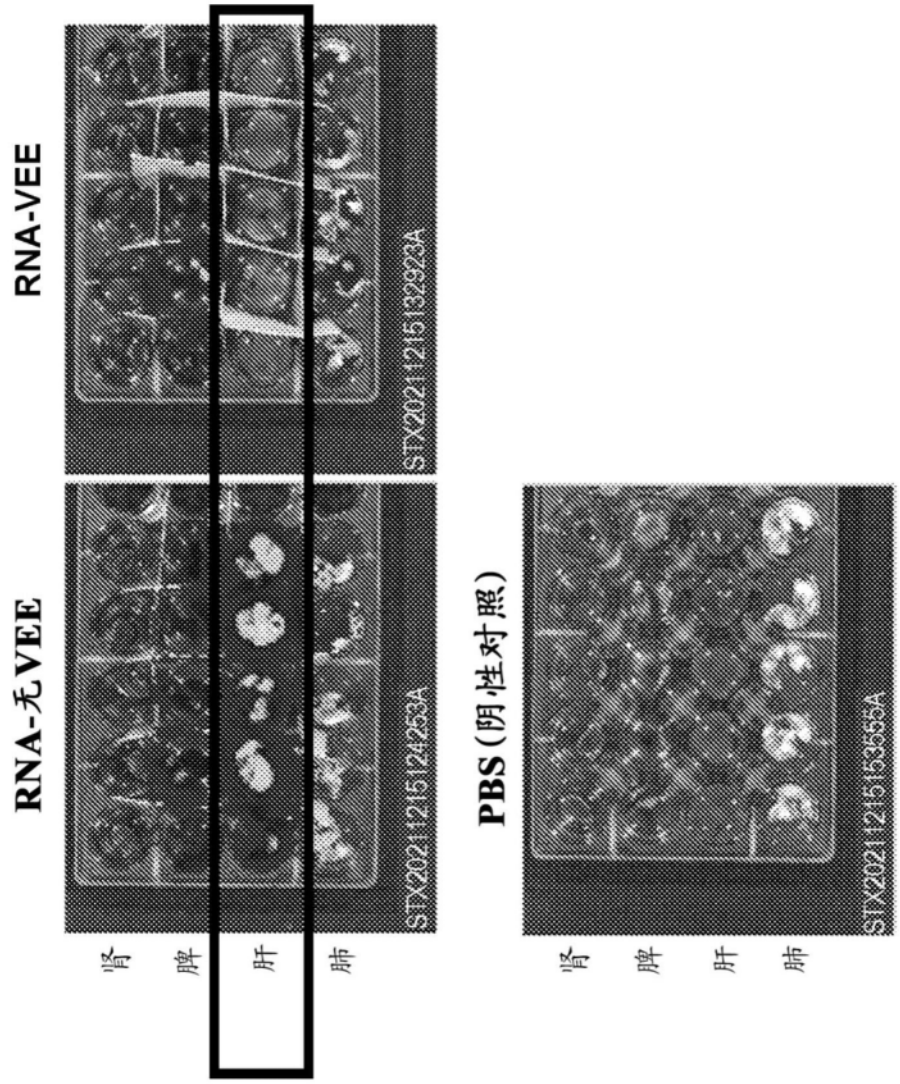

RNA-VEE
RNA-无VEE
PBS(阴性对照)
肾
脾
肝
肺
STX20211215132923A
STX20211215124253A
STX20211215153555A

图1

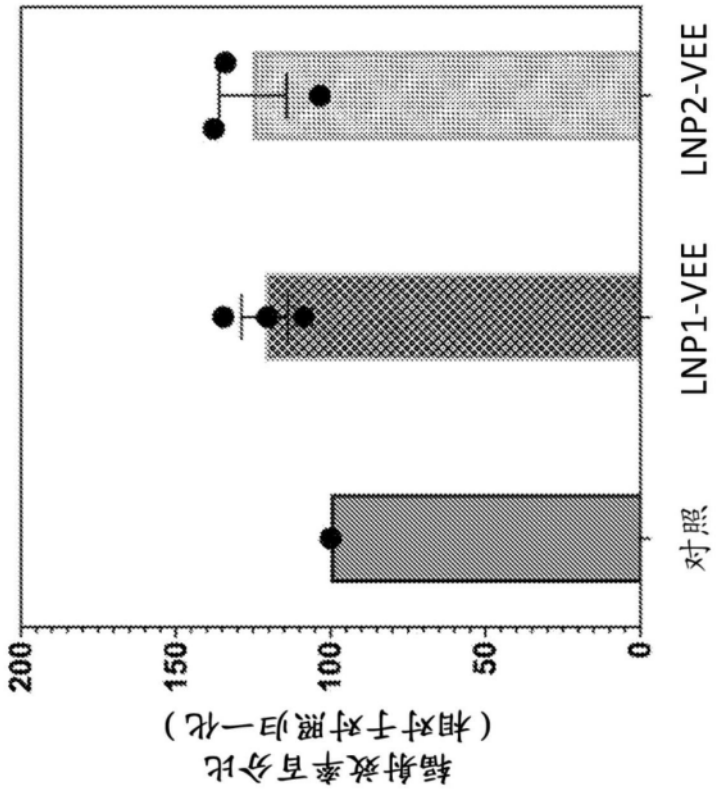

辐射效率百分比
（相对于对照归一化）
200
150
100
50
0
对照
LNP1-VEE
LNP2-VEE

图2A

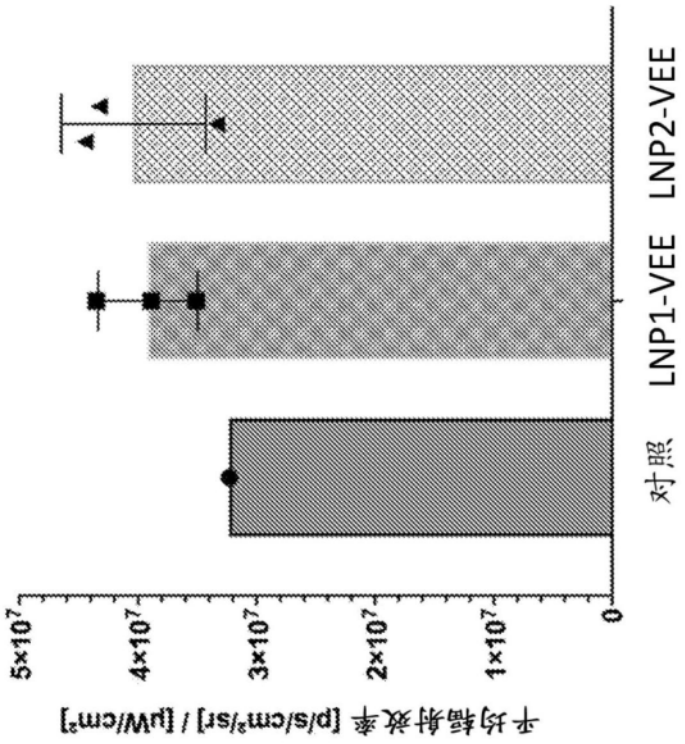

平均辐射效率 [p/s/cm²/sr] / [μW/cm²]
5×10⁷
4×10⁷
3×10⁷
2×10⁷
1×10⁷
0
对照
LNP1-VEE
LNP2-VEE

图2B

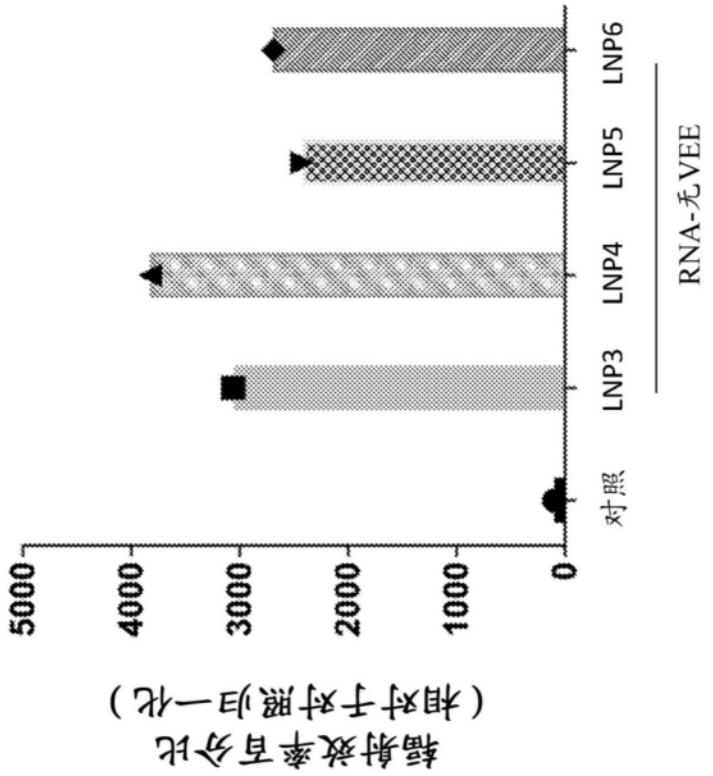

辐射效率百分比
（相对于对照归一化）
5000
4000
3000
2000
1000
0
对照
LNP3
LNP4
LNP5
LNP6
RNA-无VEE

图3A

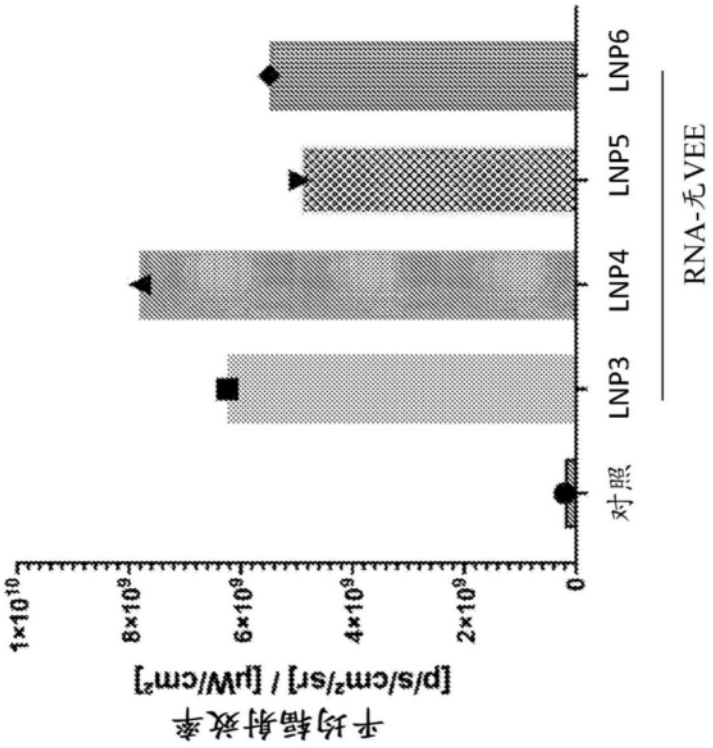

平均辐射效率
[p/s/cm²/sr] / [μW/cm²]
1×10¹⁰
8×10⁹
6×10⁹
4×10⁹
2×10⁹
0
对照
LNP3
LNP4
LNP5
LNP6
RNA-无VEE

图3B

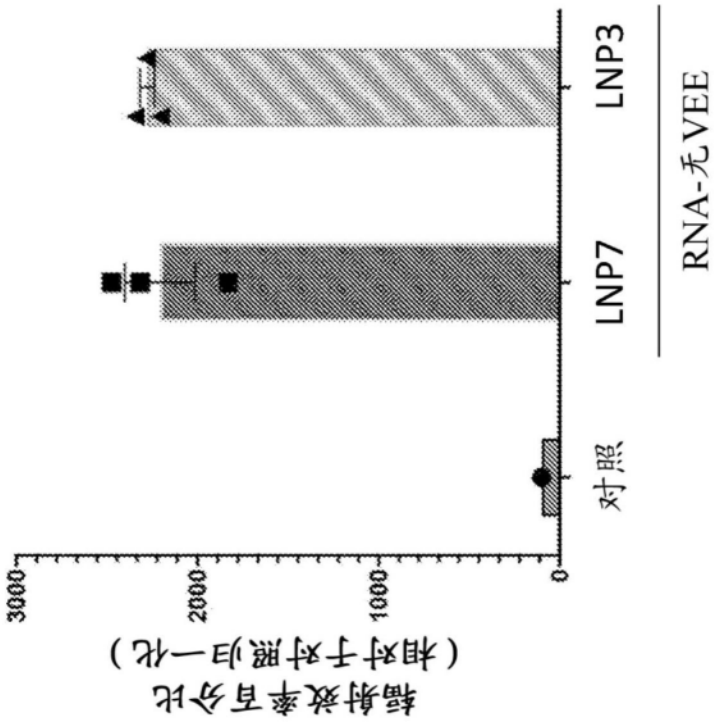

辐射效率百分比
（相对于对照归一化）
3000
2000
1000
0
对照
LNP7
LNP3
RNA-无VEE

图4A

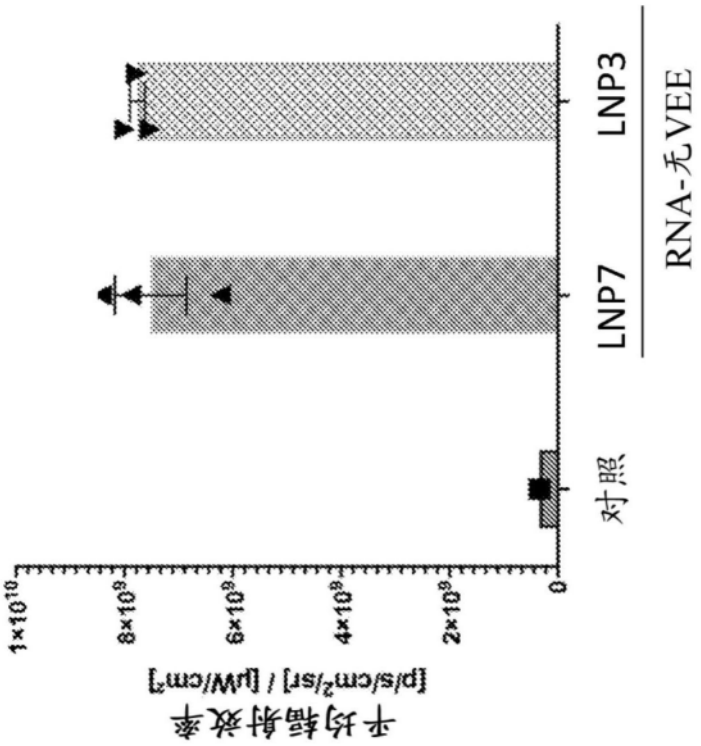

平均辐射效率
[p/s/cm²/sr] / [μW/cm²]
1×10¹⁰
8×10⁹
6×10⁹
4×10⁹
2×10⁹
0
对照
LNP7
LNP3
RNA-无VEE

图4B

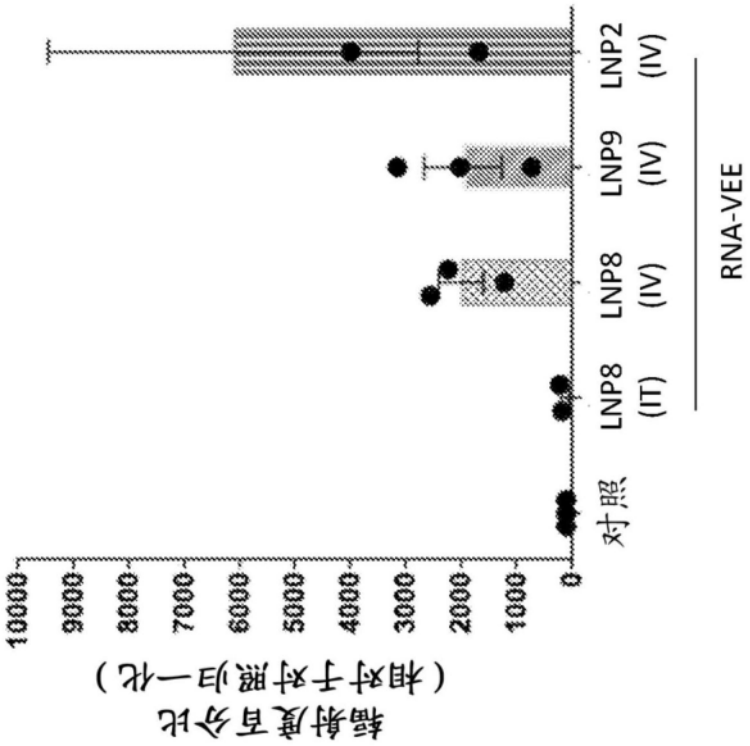

辐射度百分比
（相对于对照归一化）
10000
9000
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
对照
LNP8 (IT)
LNP8 (IV)
LNP9 (IV)
LNP2 (IV)
RNA-VEE

图5A

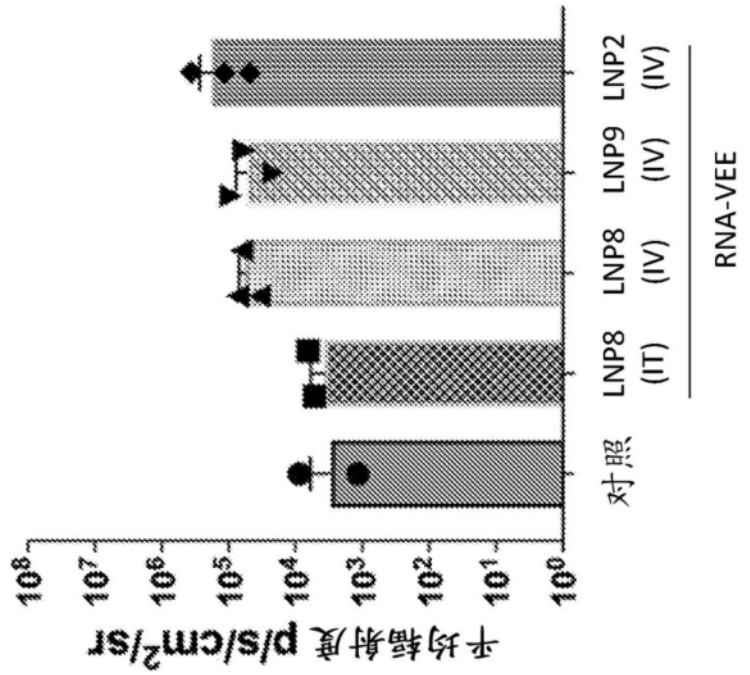

平均辐射度 p/s/cm²/sr
10⁸
10⁷
10⁶
10⁵
10⁴
10³
10²
10¹
10⁰
对照
LNP8 (IT)
LNP8 (IV)
LNP9 (IV)
LNP2 (IV)
RNA-VEE

图5B

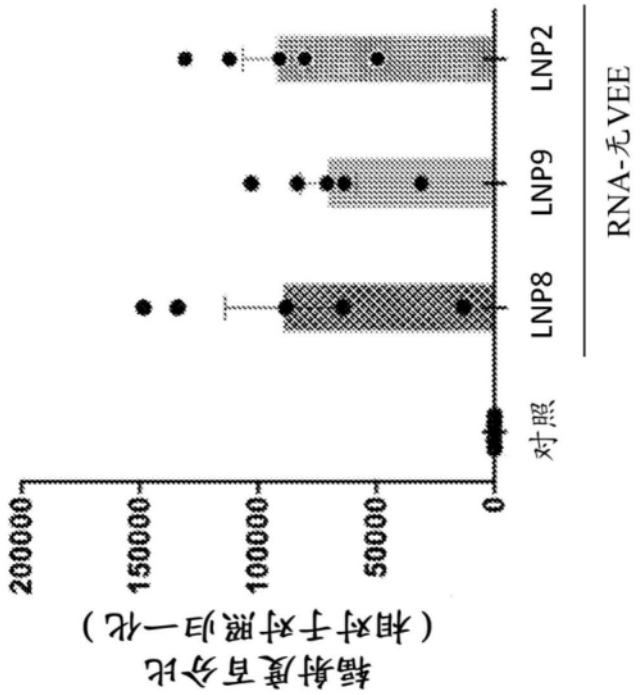

辐射度百分比
（相对于对照归一化）
200000
150000
100000
50000
0
对照
LNP8
LNP9
LNP2
RNA-无VEE

图6A

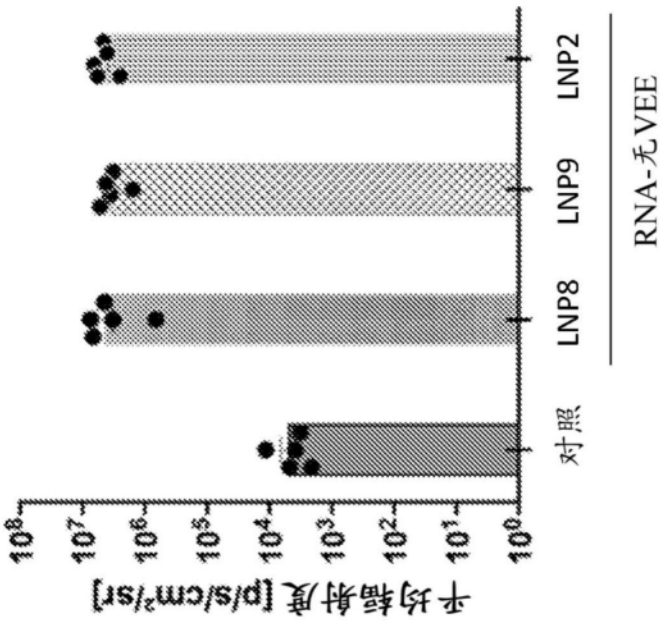

平均辐射度 [p/s/cm²/sr]
10⁸
10⁷
10⁶
10⁵
10⁴
10³
10²
10¹
10⁰
对照
LNP8
LNP9
LNP2
RNA-无VEE

图6B

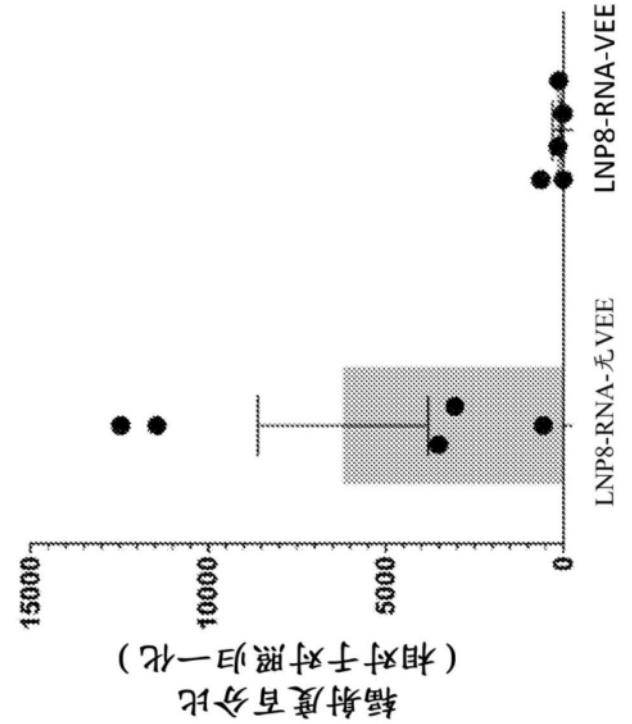

辐射度百分比
（相对于对照归一化）
15000
10000
5000
0
LNP8-RNA-无VEE
LNP8-RNA-VEE

图7A

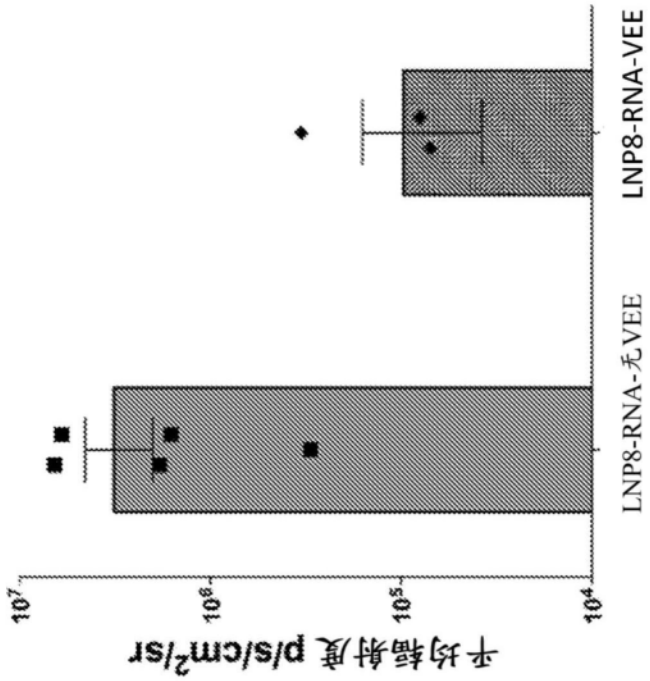

平均辐射度 p/s/cm²/sr
10⁷
10⁶
10⁵
10⁴
LNP8-RNA-无VEE
LNP8-RNA-VEE

图7B