



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103179989 A

(43) 申请公布日 2013. 06. 26

(21) 申请号 201180051161. 8

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2011. 08. 31

A61K 48/00 (2006. 01)

(30) 优先权数据

A61K 9/127 (2006. 01)

61/378, 831 2010. 08. 31 US

A61K 39/00 (2006. 01)

A61K 9/00 (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2013. 04. 23

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2011/049873 2011. 08. 31

(87) PCT申请的公布数据

W02012/030901 EN 2012. 03. 08

(71) 申请人 诺华有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72) 发明人 A · 吉尔 A · 维尔玛

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公

司 31100

代理人 韦东

权利要求书1页 说明书43页 附图19页

(54) 发明名称

用于递送编码免疫原的 RNA 的小脂质体

(57) 摘要

通过递送包封于脂质体内的 RNA 来实现核酸免疫。所述 RNA 编码感兴趣的免疫原, 并且所述脂质体的直径在 60 ~ 180nm 范围内, 理想上在 80 ~ 160nm 范围内。因此, 本发明提供具有包封水性核心的脂双层的脂质体, 其中: (i) 所述脂双层的直径在 60 ~ 180nm 范围内; 和 (ii) 所述水性核心包含编码免疫原的 RNA。这些脂质体适用于在体内递送 RNA 至脊椎动物细胞, 从而所述脂质体可用作药物组合物中的成分以免疫对象抵抗各种疾病。

1. 一种内部包封编码感兴趣免疫原的 RNA 的脂质体,其中,所述脂质体的直径在 60 ~ 180nm 范围内。
2. 如权利要求 1 所述的脂质体,其特征在于,所述脂质体的直径在 80 ~ 160nm 范围内。
3. 如前述权利要求中任一项所述的脂质体,其特征在于,所述脂质体包含具有阳离子头部基团的脂质。
4. 如前述权利要求中任一项所述的脂质体,其特征在于,所述脂质体包含具有两性离子头部基团的脂质。
5. 如前述权利要求中任一项所述的脂质体,其特征在于,所述 RNA 是自复制 RNA。
6. 如权利要求 5 所述的脂质体,其特征在于,所述自复制 RNA 分子编码 (i) RNA 依赖性 RNA 聚合酶,所述 RNA 聚合酶能从所述自复制 RNA 分子转录 RNA,和 (ii) 免疫原。
7. 如权利要求 6 所述的脂质体,其特征在于,所述 RNA 分子具有两个开放阅读框,第一个所述开放阅读框编码 α 病毒复制酶并且第二个所述开放阅读框编码所述免疫原。
8. 如前述权利要求中任一项所述的脂质体,其特征在于,所述 RNA 分子长度为 9000 ~ 12000 个核苷酸。
9. 如前述权利要求中任一项所述的脂质体,其特征在于,所述免疫原能在体内引起针对细菌、病毒、真菌或寄生虫的免疫反应。
10. 一种药物组合物,所述组合物包含前述权利要求中任一项所述的脂质体。
11. 一种包含脂质体群的药物组合物,其中,所述群中脂质体的平均直径为 60nm-180nm (含)。
12. 一种在脊椎动物体内引起保护性免疫反应的方法,所述方法包括向脊椎动物给予有效量的权利要求 1-9 所述脂质体或者权利要求 10 或权利要求 11 所述药物组合物的步骤。

用于递送编码免疫原的 RNA 的小脂质体

[0001] 本申请要求 2010 年 8 月 31 日提交的美国临时申请号 61/378,831 的权益,其全部内容通过引用纳入本文以用于所有目的。

技术领域

[0002] 本发明涉及用于免疫的 RNA 非病毒性递送领域。

技术背景

[0003] 用于免疫动物的核酸递送是多年来的目标。已经测试了许多方法,包括使用 DNA 或 RNA,使用病毒或非病毒递送载剂(或者甚至无递送载剂,以“裸”疫苗形式),使用复制型或非复制型载体,或者使用病毒或非病毒载体。

[0004] 仍需要进一步和改善的核酸疫苗,特别是需要改善的核酸疫苗递送方法。

发明内容

[0005] 根据本发明,通过递送包封在脂质体内的 RNA 来实现核酸免疫。所述 RNA 编码感兴趣的免疫原,并且所述脂质体的直径在 60 ~ 180nm 范围内,理想地在 80-160nm 范围内。将该尺寸与例如未包封 α 病毒等长蛋白衣壳的约 40nm 直径作比较。RNA(特别是自复制 RNA)在小脂质体中有效包封的组合允许有效递送以引起强免疫反应。

[0006] 因此,本发明提供其内包封编码感兴趣免疫原的 RNA 的脂质体,其中,所述脂质体的直径在 60 ~ 180nm 范围内。这些脂质体适于体内递送所述 RNA 至脊椎动物细胞,从而其可用作药物组合物中的组分以免疫对象抵抗病毒性疾病。

[0007] 本发明还提供用于制备包含 RNA 的脂质体的方法,所述方法包括以下步骤,使 RNA 和一种或多种脂质混合,所述条件使所述脂质形成直径范围为 60-180nm 并且包封所述 RNA 的脂质体。

[0008] 脂质体

[0009] 本发明使用其内包封编码免疫原的 RNA 的脂质体。因此所述 RNA(如在天然病毒中)分离自任何外部介质。已发现包埋在所述脂质体中可保护 RNA 不受 RNA 酶消化。所述脂质体可包括一些外部的 RNA(例如在其表面上),但在所述脂质体核心中至少包封一半的 RNA(理想上为全部)。在脂质体内包封不同于,例如参考文献 1 中公开的脂质/RNA 复合物,其中 RNA 与预先形成的脂质体混合。

[0010] 水环境下各种两亲性脂质能形成双分子层以包封含 RNA 的水性核心形成脂质体。这些脂质可具有阴离子、阳离子或两性离子亲水头基。从阴离子磷脂形成脂质体可追溯到二十世纪六十年代,而形成阳离子脂质体的脂质从二十世纪九十年代已开始研究。一些磷脂是阴离子型而其他一些是两性离子型且其它的是阳离子型。合适磷脂种类包括但不限于:磷脂酰乙醇胺、磷脂酰胆碱、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰甘油和表 1 所列的一些有用的磷脂。有用的阳离子脂质包括但不限于:二油酰-三甲基铵丙烷(DOTAP)、1,2-二硬脂基氧基-N,N-二甲基-3-氨基丙烷(DSDMA)、1,2-二油氧基-N,N-二甲基-3-氨基丙烷(DODMA)、

1,2-双氧十八烯-3-三甲胺丙烷(DOTMA)、1,2-二亚油氧基-N,N-二甲基-3-氨基丙烷(DLinDMA)、1,2-二亚麻氧基-N,N-二甲基-3-氨基丙烷(DLenDMA)。两性脂质包括但不限于酰基两性脂质和醚基两性脂质。有用的两性脂质示例是DPPC、DOPC、DSPC、十二烷基磷酸胆碱、1,2-二油酰-sn-甘油-3-磷酸酰乙醇胺(DOPE)、和1,2-二植烷酰-sn-甘油-3-磷酸酰乙醇胺(DPyPE)。所述脂质可为饱和或不饱和。优选使用至少一种非饱和脂质来制备脂质体。如果非饱和脂质有两个尾部,所述两个尾部可均为非饱和的,或其可以有一个饱和尾部和一个非饱和尾部。脂质的一个尾部中可包含类固醇基团,例如RV05中(也参见图16A和C-K)。

[0011] 因此,在一些实施方式中,本发明提供具有脂双层的脂质体,所述脂质体包封水性核心,其中(i)所述脂质体的直径在60-180nm范围内;并且(ii)所述水性核心包含编码免疫原的RNA。

[0012] 本发明的脂质体可由单一脂质或脂质混合物形成。混合物可包括(i)阴离子脂质混合物(ii)阳离子脂质混合物(iii)两性脂质混合物(iv)阴离子脂质和阳离子脂质的混合物(v)阴离子脂质和两性脂质的混合物(vi)两性脂质和阳离子脂质的混合物或(vii)阴离子脂质、阳离子脂质和两性脂质的混合物。相似地,混合物可包括饱和以及不饱和脂质。例如,混合物可包括DSPC(两性、饱和)、DLinDMA(阳离子型、不饱和)和/或DMPG(阴离子型、饱和)。使用脂质混合物时,不是混合物中的所有组成脂质需要为两亲性,例如可将一种或多种两亲性脂质与胆固醇混合。

[0013] 当发明的脂质体由脂质混合物形成时,优选那些阳离子脂质的比例应为脂质总量的20-80%,例如30-70%、或40-60%。其余部分可以由例如胆固醇(例如35-50%胆固醇)和/或DMG(任选PEG化)和/或DSPC制备。该混合物在下文使用。这些百分比值是摩尔百分比。

[0014] 脂质体可包含两亲性脂质,其亲水部分经PEG化(即通过共价结合聚乙二醇来修饰)。此修饰可增加稳定性并防止所述脂质体的非特异性吸收。例如,可使用诸如参考文献2和3公开的那些技术将脂质与PEG偶联。PEG为脂质体提供包衣,该包衣可赋予有利的药代动力学特性。可使用各种长度的PEG,例如0.5-8kDa。

[0015] 因此,脂质体可以由阳离子型脂质(例如,DLinDMA、RV05)、两性离子脂质(例如DSPC、DPyPE)、胆固醇和PEG化脂质形成。示例中使用DSPC、DLinDMA、PEG-DMPG和胆固醇的混合物,以及数种其它混合物。

[0016] 脂质体通常分为3组:多室囊泡(MLV);小单室囊泡(SUV);和大单室囊泡(LUV)。MLV的各囊泡中具有多种双层,形成数个分开的水性隔室。SUV和LUV具有包封水性核心的单一双层;SUV通常直径 $\leq 50\text{nm}$,LUV直径 $>50\text{nm}$ 。本发明的脂质体理想地是直径范围为60-180nm并优选范围80-160nm的LUV。所述脂质体优选基本是球形。若它们不是球形,则术语“直径”指脂质体的最大截面直径。

[0017] 本发明的脂质体可以是组合物的一部分,该组合物包含多种脂质体并且该多种脂质体中的脂质体能具有一定范围的直径。对于含不同直径的脂质体群的组合物:(i)至少80%数量的脂质体应具有60-180nm范围的直径,且优选范围80-160nm,以及/或(ii)所述群的平均直径(通过强度,例如Z均)理想上范围是60-180nm,且优选范围80-160nm。

[0018] 理想上,脂质体尺寸分布(通过强度)只有一个最大值而不是两个最大值,即,围

绕平均值（模式）分布有单一脂质体群。脂质体群内的直径应理想地具有 <0.2 的多分散性指数，有时 <0.1。参考文献 1 的脂质体 /RNA 复合物预期具有 600–800nm 范围的直径，并且具有更高的分散性。

[0019] 用于在脂质体悬液中测定平均粒径和尺寸分布的设备市售可得。这些设备通常使用动态光散射和 / 或单颗粒光学感应的技术如获自 PSS 公司 (ParticleSizing Systems) (美国圣巴巴拉) 的 Accusizer™ 和 Nicomp™ 系列仪器，或马文仪器公司 (Malvern Instruments) (英国) 的 Zetasizer™ 仪器，或厚利巴公司 (Horiba) (日本京都) 的粒度分布分析仪 (Particle Size Distribution Analyzer instruments)。动态光散射是测定脂质体直径的优选方法。对脂质体群而言，用于确定本发明组合中脂质体平均直径的优选方法是 Z 均值，即，通过动态光散射 (DLS) 测量脂质体总集合的强度加权平均水动力尺寸。所述 Z 均值获自所测相关曲线的累积量分析，其中，假定单一粒径（脂质体直径）并对自相关函数应用单指数拟合。所述累积量分析算法不生成分布情况，但是除强度加权 Z 均值之外，其还给出多分散指数。

[0020] 制备合适脂质体的技术为本领域技术人员所熟知，例如见参考文献 4–6。参考文献 7 中描述了一种有用的方法，该方法包括混合 (i) 脂质的乙醇溶液 (ii) 核酸的水溶液和 (iii) 缓冲液，然后混合、平衡、稀释并纯化。本发明优选的脂质体可通过该混合方法得到。为获得具有所需直径的脂质体，可使用以下方法进行混合：将两股 RNA 水溶液进料流与一股乙醇脂质溶液流在单一的混合区中合并，其中所有的流速相同，例如在下文所述的微流体通道中。

[0021] RNA

[0022] 本发明的脂质体包括编码免疫原的 RNA 分子（不同于 siRNA）。体内给予该颗粒后，RNA 从所述颗粒中释放出来并在细胞内翻译以原位提供免疫原。

[0023] 该 RNA 为 +– 链，并且不需要任何干预复制步骤例如逆转录通过细胞进行翻译。其还能与免疫细胞表达的 TLR7 受体结合，从而启动佐剂效应。

[0024] 优选的 +– 链 RNA 是自复制 RNA。自复制 RNA 分子（复制子）在甚至无任何蛋白下递送到脊椎动物细胞时，能通过其自身（经自身产生的反义拷贝）转录引起多种子 RNA 生成。因此自复制 RNA 分子通常是 +– 链分子，其递送到细胞后能直接翻译，且该翻译提供 RNA 依赖性 RNA 聚合酶，该酶然后从该递送 RNA 中生成反义和正义转录本。因此所递送 RNA 引起多种子 RNA 生成。这些子 RNA 以及共线亚基因组转录物可以自身翻译以提供编码免疫原的原位表达，或可转录提供与该递送 RNA 同义的其他转录物，其经翻译提供所述免疫原的原位表达。该转录序列的总体结果是所引入复制子 RNA 在数量上大幅扩增，因此编码的免疫原成为细胞的主要多肽产物。

[0025] 实现自复制的一种合适系统为使用基于 α 病毒的 RNA 复制子。这些 +– 链复制子在递送到细胞后翻译以得到复制酶（或复制酶 – 转录酶）。这些复制酶翻译为自切割产生复制复合物的多聚蛋白，该复合物形成该 +– 链递送 RNA 的基因组 – – 链拷贝。这些 – – 链转录本可自我转录以产生该 +– 链亲本 RNA 的其他拷贝，还产生编码所述免疫原的亚基因组转录物。因此所述亚基因组转录物的翻译引起所述感染细胞原位表达所述免疫原。合适的 α 病毒复制子可使用来自辛德毕斯病毒、西门利克森林病毒、东部马脑炎病毒、委内瑞拉马脑炎病毒等的复制酶。可使用突变或野生型病毒序列，例如已用于复制子的 VEEV 减毒 TC83

突变体 [8]。

[0026] 因此优选的自复制 RNA 分子编码 (i) 可从所述自复制 RNA 分子转录 RNA 的 RNA 依赖性 RNA 聚合酶和 (ii) 免疫原。所述聚合酶可以是 α 病毒复制酶,例如包括一种或多种 α 病毒蛋白 nsP1、nsP2、nsP3 和 nsP4。尽管除了非结构复制酶多聚蛋白以外,天然 α 病毒基因组还编码结构病毒粒蛋白,但本发明的自复制 RNA 分子优选不编码 α 病毒结构蛋白。因此优选的自复制 RNA 可引起细胞中自身基因组 RNA 拷贝生成,但不引起含 RNA 的病毒颗粒生成。不能生成这些病毒粒说明自复制 RNA 分子不像野生型 α 病毒,其自身不能以感染形式永存。野生型病毒永存必需的 α 病毒结构蛋白在本发明的自复制 RNA 中缺失,且其位置被编码感兴趣免疫原的一个或多个基因占据,从而亚基因组转录物编码所述免疫原而不是结构 α 病毒的病毒粒蛋白。

[0027] 因此本发明有用的自复制 RNA 分子可具有两个开放阅读框。第一 (5') 开放阅读框编码复制酶;第二 (3') 开放阅读框编码免疫原。在一些实施方式中,所述 RNA 可具有额外的(例如,下游)开放阅读框以例如编码其他免疫原(见下文)或编码辅助多肽。

[0028] 自复制 RNA 分子可具有与所编码复制酶相容的 5' 序列。

[0029] 自复制 RNA 分子可具有各种长度,但其通常为 5000-25000 核苷酸长度,如 8000-15000 核苷酸或 9000-12000 核苷酸。因此,该 RNA 比 siRNA 递送中所见更长。

[0030] 用于本发明的一种 RNA 分子可具有 5' 帽(例如 7-甲基鸟甘)。该帽可增强该 RNA 的体内翻译。

[0031] 用于本发明的 RNA 分子 5' 核苷酸可具有 5' 三磷酸基团。在加帽的 RNA 中其可通过 5'-至-5' 桥与 7-甲基鸟苷连接。5' 三磷酸可增强 RIG-I 结合并因此促进佐剂效应。

[0032] RNA 分子可具有 3' 聚 A 尾。其还可在 3' 末端附近包括聚 A 聚合酶识别序列(如 AAUAAA)。

[0033] 用于本发明的 RNA 分子通常为单链。单链 RNA 通常能通过结合 TLR7、TLR8、RNA 解旋酶和/或 PKR 而引起佐剂效应。以双链形式递送的 RNA(dsRNA)可与 TLR3 结合,并且该受体还会被单链 RNA 复制中或单链 RNA 二级结构内形成的 dsRNA 触发。

[0034] 用于本发明的 RNA 分子可通过体外转录 (IVT) 方便制备。IVT 可使用细菌中质粒形式产生和增殖或合成产生(例如通过基因合成和/或聚合酶链式反应工程改造方法)的(cDNA)模板。例如,DNA 依赖性 RNA 聚合酶(例如噬菌体 T7、T3 或 SP6RNA 聚合酶)可用于从 DNA 模板转录 RNA。合适的加帽和聚 A 加成反应可按需使用(尽管所述复制子的聚 A 通常在 DNA 模板内编码)。这些 RNA 聚合酶可对转录的 5' 核苷酸有严格的要求,且在一些实施方式中这些要求必须与所编码复制酶的要求匹配,以确保 IVT-转录 RNA 能有效作为其自身编码复制酶的底物发挥作用。

[0035] 如参考文献 9 中所讨论,所述自复制 RNA 可包括(除了任何 5' 帽结构以外)一个或多个具有经修饰核碱基的核苷酸。因此该 RNA 可包括:m5C(5-甲基胞苷)、m5U(5-甲基尿苷)、m6A(N6-甲基腺苷)、s2U(2 硫尿苷)、Um(2'-O-甲基尿苷)、m1A(1-甲基腺苷)、m2A(2-甲基腺苷)、Am(2'-O-甲基腺苷)、ms2m6A(2-甲硫基-N6-甲基腺苷)、i6A(N6-异戊烯基腺苷)、ms2i6A(2-甲硫基-N6-异戊烯基腺苷)、io6A(N6-(顺式-羟基异戊烯基)腺苷)、ms2io6A(2-甲硫基-N6-(顺式-羟基异戊烯基)腺苷)、g6A(N6-甘氨酸氨甲酰基腺苷)(N6-glycinyllcarbamoyladenine)、t6A(N6-苏氨酸氨甲酰基腺苷)、ms2t6A(2-甲基

硫-N6- 苏氨酰氨甲酰基腺苷)、m6t6A(N6- 甲基-N6- 苏氨酰氨甲酰基腺苷)、hn6A(N6- 羟基正缬氨酰氨甲酰基腺苷)(N6-hydroxynorvalylcarbamoyladenine)、ms2hn6A(2- 甲基硫基-N6- 羟基正缬氨酰氨甲酰基腺苷)、Ar(p)(2'-O- 核糖基腺苷(磷酸))、I(肌苷)、m11(1- 甲基肌苷)、m'Im(1, 2'-O- 二甲基肌苷)、m3C(3- 甲基胞苷)、Cm(2T-O- 甲基胞苷)、s2C(2- 巯基胞苷)、ac4C(N4- 乙酰胞苷)、f5C(5- 甲酰化胞苷)(5-formylcytidine)、m5Cm(5, 2-O- 二甲基胞苷)、ac4Cm(N4 乙酰基 2T-O 甲基胞苷)、k2C(赖西丁)(lysidine)、m1G(1- 甲基鸟苷)、m2G(N2- 甲基鸟苷)、m7G(7- 甲基鸟苷)、Gm(2'-O- 甲基鸟苷)、m22G(N2, N2- 二甲基鸟苷)、m2Gm(N2, 2'-O- 二甲基鸟苷)、m22Gm(N2, N2, 2'-O- 三甲基鸟苷)、Gr(p)(2'-O- 核糖基鸟苷(磷酸))、yW(怀丁苷)(wybutosine)、o2yW(过氧怀丁苷)(peroxywybutosine)、OHyW(羟基怀丁苷)(hydroxywybutosine)、OHyW*(改性不足的羟基怀丁苷)(undermodified hydroxywybutosine)、imG(怀俄苷)、mimG(甲基鸟苷)、Q(q 苷)、oQ(环氧 q 苷)、galQ(半乳糖-q 苷)、manQ(甘露糖-q 苷)、preQo(7- 氰基-7- 脱氮鸟苷)、preQi(7- 氨基-7- 脱氮鸟苷)、G*(古嘌呤)(archaeosine)、D(二氢尿苷)、m5Um(5, 2'-O- 二甲基尿苷)、s4U(4- 硫脲苷)、m5s2U(5- 甲基-2- 硫脲苷)、s2Um(2- 硫-2'-O- 甲基尿苷)、acp3U(3-(3- 氨基-3- 羧基丙基)尿苷)、ho5U(5- 羟基尿苷)、mo5U(5- 甲氧基尿苷)、cmo5U(尿苷 5- 氧乙酸)、mcmo5U(尿苷 5- 氧乙酸甲酯)、chm5U(5-(羧基羟基甲基)尿苷)、mchm5U(5-(羧基羟基甲基)尿苷甲酯)、mcm5U(5- 甲氧羰基甲基尿苷)、mcm5Um(S- 甲氧羰基甲基-2-O- 甲基尿苷)、mcm5s2U(5- 甲氧羰基甲基-2- 硫脲苷)、nm5s2U(5- 氨基甲基-2- 硫脲苷)、mnm5U(5- 甲氨基甲基尿苷)、mnm5s2U(5- 甲氨基甲基-2- 硫脲苷)、mnm5se2U(5- 甲氨基甲基-2- 硒基尿苷)、ncm5U(5- 氨基甲酰基甲基尿苷)、ncm5Um(5- 氨基甲酰基甲基-2'-O- 甲基尿苷)、cmnm5U(5- 羧甲基氨基甲基鸟苷)、cnmm5Um(5- 羧甲基氨基甲基-2-L-O 甲基尿苷)、cmnm5s2U(5- 羧甲基氨基甲基-2- 硫脲苷)、m62A(N6, N6- 二甲基腺苷)、Tm(2'-O- 甲基肌苷)、m4C(N4- 甲基胞苷)、m4Cm(N4, 2-O- 二甲基胞苷)、hm5C(5- 羟甲基胞苷)、m3U(3- 甲基尿苷)、cm5U(5- 羧甲基尿苷)、m6Am(N6, T-O- 二甲基腺苷)、rn62Am(N6, N6, O-2- 三甲基腺苷)、m2' 7G(N2, 7- 二甲基鸟苷)、m2' 2' 7G(N2, N2, 7- 三甲基鸟苷)、m3Um(3, 2T-O- 二甲基尿苷)、m5D(5- 甲基二氢尿苷)、f5Cm(5- 甲酰基-2'-O- 甲基胞苷)、m1Gm(1, 2'-O- 二甲基鸟苷)、m'Am(1, 2-O- 二甲基腺苷)虹膜甲基尿苷(irinomethyluridine)、tm5s2U(S- 牛磺酸甲基-2- 硫脲苷)、imG-14(4- 去甲基鸟苷)、imG2(异鸟苷), 或 ac6A(N6- 乙酰腺苷)、次黄嘌呤、肌苷、8- 氧代- 腺嘌呤、其 7- 取代衍生物、二氢尿嘧啶、假尿嘧啶、2- 硫尿嘧啶、4- 硫尿嘧啶、5- 氨基尿嘧啶、5-(C1-C6)- 烷基尿嘧啶、5- 甲基尿嘧啶、5-(C2-C6)- 烯基尿嘧啶、5-(C2-C6)- 炔基尿嘧啶、5-(羟甲基)嘧啶、5- 氯尿嘧啶、5- 氟尿嘧啶、5- 溴尿嘧啶、5- 羟基胞嘧啶、5-(C1-C6)- 烷基胞嘧啶、5- 甲基胞嘧啶、5-(C2-C6)- 烯基胞嘧啶、5-(C2-C6)- 炔基胞嘧啶、5- 氯胞嘧啶、5- 氟胞嘧啶、5- 溴胞嘧啶、N2- 二甲基鸟嘌呤、7- 脱氮鸟嘌呤、8- 氮鸟嘌呤、7- 脱氮-7- 取代鸟嘌呤、7- 脱氮-7-(C2-C6) 炔基鸟嘌呤、7- 脱氮-8- 取代鸟嘌呤、8- 羟基鸟嘌呤、6- 硫鸟嘌呤、8- 氧桥鸟嘌呤(8-oxoguanine)、2- 氨基嘌呤、2- 氨基-6- 氯嘌呤、2, 4- 二氨基嘌呤、2, 6- 二氨基嘌呤、8- 氮嘌呤、取代的 7- 脱氮嘌呤、7- 脱氮-7- 取代嘌呤、7- 脱氮-8- 取代嘌呤、或脱碱基核苷酸。例如, 自复制 RNA 可包括一种或多种经修饰的嘧啶核碱基, 例如假尿苷和 / 或 5- 甲基胞苷残基。然而在一些实施方式中, 该 RNA 不包含经

修饰的核碱基,并可不包含经修饰的核苷酸,即,RNA 中所有核苷酸是标准的 A、C、G 和 U 核糖核苷酸(除了任何的 5' 帽子结构,其可包含 7'-甲基鸟苷)。在其他实施方式中,该 RNA 可包括含 7-甲基鸟苷的 5' 帽,且第 1、2 或 3 个 5' 核糖核苷酸可在核糖的 2' 位置被甲基化。

[0036] 本发明所用的 RNA 理想上仅包括核苷之间的磷酸二酯连接,但在一些实施方式中其可含氨基磷酸酯、硫代磷酸酯和 / 或甲基磷酸酯连接。

[0037] 理想上,脂质体包含少于 10 种不同种类的 RNA,例如 5、4、3 或 2 种不同种类,最优选脂质体包含单一的 RNA 种类,即脂质体中所有 RNA 分子具有相同的序列和相同的长度。

[0038] 可改变每个脂质体的 RNA 量。每个脂质体的单独自复制 RNA 分子数目通常 <50,例如 <20、<10、<5 或 1-4/ 每个脂质体。

[0039] 免疫原

[0040] 本发明所用的 RNA 分子编码多肽免疫原。给予脂质体后,该 RNA 体内翻译并且该免疫原可引起受体的免疫应答。该免疫原可引起抗细菌、病毒、真菌或寄生虫(或者在一些实施方式中针对变应原,并在其它实施方式中针对肿瘤抗原)的免疫应答。该免疫应答可包含抗体应答(通常包括 IgG)和 / 或细胞介导的免疫应答。该多肽免疫原通常会引起免疫应答,该免疫应答识别相应的细菌、病毒、真菌或寄生虫(或变应原或肿瘤)多肽,但在一些实施方式中,该多肽可用作模拟表位来引起识别细菌、病毒、真菌或寄生虫糖的免疫应答。该免疫原通常是表面多肽,例如粘附素、血凝素、包膜糖蛋白、刺突糖蛋白等。

[0041] 所述 RNA 分子可编码单一多肽免疫原或多个多肽。多个免疫原可以单一多肽免疫原(融合蛋白)或分开的多肽形式存在。如果免疫原作为来自复制子的分开多肽表达,那么这些多肽中的一种或多种可与上游 IRES 或额外的病毒启动子元件一起提供。或者,多个免疫原可从多聚蛋白表达或作为内含肽表达,所述多聚蛋白编码与小自催化蛋白酶融合的单免疫原(例如口蹄疫病毒 2A 蛋白)。

[0042] 与参考文献 1 和 10 不同,所述 RNA 编码免疫原。为避免疑义,本发明不包括编码以下的 RNA:萤火虫荧光素酶或大肠杆菌(*E. coli*) β -半乳糖苷酶的融合蛋白或绿色荧光蛋白(GFP)。所述多肽可用作标志物,或甚至在基因治疗背景下使用,但是本发明涉及引起免疫反应系统的 RNA 的递送。用于基因治疗的脂质体的最优直径可与用于免疫目的的脂质体不同,因为这两种方法的靶标细胞和组织不同。因此,所述免疫原也不是递送用于增补或替代缺陷宿主蛋白(如在基因治疗中)的自身蛋白。并且,该 RNA 不是全小鼠胸腺 RNA。

[0043] 在一些实施方式中,该免疫原引起抵御这些细菌之一的免疫应答:

[0044] 脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*):有用的免疫原包括但不限于膜蛋白,例如粘附素、自转运蛋白(*autotransporter*)、毒素、摄铁蛋白(*iron acquisition protein*)和 H 因子结合蛋白。三种有用多肽的组合公开在参考文献 11 中。

[0045] 肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*):有用的多肽免疫原公开在参考文献 12 中。其包括但不限于 RrgB 菌毛亚基、 β -N-乙酰-己糖胺酶前体(*spr0057*)、*spr0096*、一般应激蛋白 GSP-781(*spr2021*、*SP2216*)、丝氨酸 / 苏氨酸激酶 *StkP* (*SP1732*) 和肺炎球菌表面粘附素 *PsaA*。

[0046] 酿脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*):有用的免疫原包括但不限于参考文献 13 和 14 中公开的多肽。

- [0047] 粘膜炎莫拉菌 (*Moraxella catarrhalis*)。
- [0048] 百日咳博德特菌 (*Bordetella pertussis*) :有用的百日咳免疫原包括但不限于 :百日咳毒素或类毒素 (PT)、丝状血细胞凝集素 (FHA)、百日咳菌粘附素以及凝集原 2 和 3。
- [0049] 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) :有用的免疫原包括但不限于 :参考文献 15 中公开的多肽,例如溶血素、*esxA*、*esxB*、铁色素结合蛋白 (*sta006*) 和 / 或 *sta011* 脂蛋白。
- [0050] 破伤风梭菌 (*Clostridium tetani*) :典型的免疫原是破伤风类毒素。
- [0051] 白喉杆菌 (*Corynebacterium diphtheriae*) :典型的免疫原是白喉类毒素。
- [0052] 流感嗜血杆菌 (*Haemophilus influenzae*) :有用的免疫原包括但不限于参考文献 16 和 17 中公开的多肽。
- [0053] 铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)
- [0054] 无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*) :有用的免疫原包括但不限于参考文献 13 中公开的多肽。
- [0055] 沙眼衣原体 (*Chlamydia trachomatis*) :有用的免疫原包括但不限于 :PepA、LcrE、ArtJ、DnaK、CT398、OmpH- 样、L7/L12、OmcA、AtoS、CT547、Eno、HtrA 和 MurG。(例如参考文献 18 中公开的那些)。LcrE[19] 和 HtrA[20] 是两种优选的免疫原。
- [0056] 肺炎衣原体 (*Chlamydia pneumoniae*) :有用的免疫原包括但不限于参考文献 21 中公开的多肽。
- [0057] 幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*) :有用的免疫原包括但不限于 CagA、VacA、NAP 和 / 或脲酶 [22]。
- [0058] 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) :有用的免疫原包括但不限于 :衍生自肠产毒性大肠杆菌 (ETEC)、肠聚集性大肠杆菌 (EAggEC)、弥散粘附性大肠杆菌 (DAEC)、肠致病性大肠杆菌 (EPEC)、肠外致病性大肠杆菌 (ExPEC) 和 / 或肠出血性大肠杆菌 (EHEC) 的免疫原。ExPEC 株包括尿致病性大肠杆菌 (UPEC) 和脑膜炎 / 败血症相关的大肠杆菌 (MNEC)。有用的 UPEC 多肽免疫原公开在参考文献 23 和 24 中。有用的 MNEC 免疫原公开在参考文献 25 中。数种大肠杆菌类型的有用免疫原是 AcdF[26]。
- [0059] 炭疽杆菌 (*Bacillus anthracis*)。
- [0060] 鼠疫耶尔森菌 (*Yersinia pestis*) :有用的免疫原包括但不限于参考文献 27 和 28 中公开的那些。
- [0061] 表皮葡萄球菌 (*Staphylococcus epidermis*)。
- [0062] 产气荚膜梭菌 (*Clostridium perfringens*) 或肉毒梭菌 (*Clostridium botulinums*)。
- [0063] 嗜肺军团菌 (*Legionella pneumophila*)。
- [0064] 伯内特科克斯立克次体 (*Coxiella burnetti*)。
- [0065] 布鲁氏菌 (*Brucella*), 例如, 流产布鲁氏菌 (*B. abortus*)、犬种布鲁氏菌 (*B. canis*)、羊种布鲁氏菌 (*B. melitensis*)、沙林鼠布鲁氏菌 (*B. neotomae*)、绵羊布鲁氏菌 (*B. ovis*)、猪布鲁氏菌 (*B. suis*)、鳍足类布鲁氏菌 (*B. pinnipediae*)。
- [0066] 弗朗西斯氏菌 (*Francisella*), 例如, 新凶手弗朗西斯氏菌 (*F. novicida*)、蜃楼弗朗西斯氏菌 (*F. philomiragia*)、土拉热弗朗西斯氏菌 (*F. tularensis*)。

- [0067] 淋病奈瑟球菌 (*Neisseria gonorrhoeae*)
- [0068] 苍白密螺旋体 (*Treponema pallidum*)
- [0069] 杜氏嗜血菌 (*Haemophilus ducreyi*)
- [0070] 粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis*) 或屎肠球菌 (*Enterococcus faecium*)
- [0071] 腐生葡萄球菌 (*Staphylococcus saprophyticus*)
- [0072] 小肠结肠炎耶尔森菌 (*Yersinia enterocolitica*)
- [0073] 结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*)
- [0074] 立克次体 (*Rickettsia*)
- [0075] 单核细胞增生利斯特菌 (*Listeria monocytogenes*)
- [0076] 霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*)
- [0077] 伤寒沙门菌 (*Salmonella typhi*)
- [0078] 布氏疏螺旋体 (*Borrelia burgdorferi*)
- [0079] 牙龈卟啉单胞菌 (*Porphyromonas gingivalis*)
- [0080] 克雷伯菌 (*Klebsiella*)
- [0081] 在一些实施方式中,该免疫原引起抵御这些病毒之一的免疫应答:
- [0082] 正粘病毒 (*Orthomyxovirus*):有用的免疫原可来自甲型、乙型或丙型流感病毒,例如血凝素、神经氨酸酶或基质 M2 蛋白。所述免疫原是甲型流感病毒血凝素时,其可来自任何亚型例如 H1、H2、H3、H4、H5、H6、H7、H8、H9、H10、H11、H12、H13、H14、H15 或 H16。
- [0083] 副粘病毒科 (*Paramyxoviridae*) 病毒:病毒免疫原包括但不限于衍生自以下病毒的那些免疫原:肺炎病毒(例如,呼吸道合胞病毒 (*respiratory syncytial virus*, RSV)、腮腺炎病毒属(例如,腮腺炎病毒)、副粘病毒(例如,副流感病毒)、偏肺病毒和麻疹病毒(例如,麻疹病毒)。
- [0084] 痘病毒 (*Poxviridae*):病毒免疫原包括但不限于衍生自正痘病毒 (*Orthopoxvirus*) 如天花 (*Variola vera*) 的免疫原,包括但不限于重型天花 (*Variola major*) 和轻型天花 (*Variola minor*)。
- [0085] 小核糖核酸病毒 (*Picornavirus*):病毒免疫原包括但不限于衍生自以下病毒的那些免疫原:小核糖核酸病毒,如肠道病毒、鼻病毒、嗜肝 RNA 病毒、心脏病毒和口蹄疫病毒。在一个实施方式中,所述肠道病毒是脊髓灰质炎病毒,例如 1 型、2 型和 / 或 3 型脊髓灰质炎病毒。在另一个实施方式中,所述肠道病毒是 EV71 肠道病毒。在另一个实施方式中,所述肠道病毒是 A 型或 B 型柯萨奇 (*coxsackie*) 病毒。
- [0086] 布尼亚病毒 (*Bunyavirus*):病毒免疫原包括但不限于衍生自以下病毒的那些免疫原:正布尼亚病毒 (*Orthobunyavirus*) 如加利福尼亚脑炎病毒、白蛉病毒 (*Phlebovirus*) 如裂谷热病毒或内罗病毒 (*Nairovirus*) 如克里米亚 - 刚果出血热病毒。
- [0087] 嗜肝 RNA 病毒 (*Heparnavirus*):病毒免疫原包括但不限于衍生自嗜肝 RNA 病毒如甲型肝炎病毒 (HAV) 的免疫原。
- [0088] 线状病毒 (*Filovirus*):病毒免疫原包括但不限于衍生自线状病毒的那些免疫原,例如埃博拉病毒属 (*Ebola virus*) (包括扎伊尔 (*Zaire*) 埃博拉病毒、象牙海岸 (*Ivory Coast*) 埃博拉病毒、雷斯顿 (*Reston*) 或苏丹 (*Sudan*) 埃博拉病毒) 或者马尔堡病毒 (*Marburg virus*)。

[0089] 披膜病毒 (Togavirus) :病毒免疫原包括但不限于衍生自以下病毒的那些免疫原 :披膜病毒 (Togavirus),如风疹病毒 (Rubivirus)、 α 病毒 (Alphavirus) 或动脉炎病毒属 (Arterivirus)。该病毒包括风疹病毒 (rubella virus)。

[0090] 黄病毒 (Flavivirus) :病毒免疫原包括但不限于衍生自以下病毒的那些免疫原 :黄病毒,如蜱传脑炎 (TBE) 病毒、登革热 (1、2、3 或 4 型) 病毒、黄热病毒、日本脑炎病毒、开萨诺森林病毒、西尼罗河脑炎病毒、圣路易斯脑炎病毒、俄国春夏脑炎病毒、波瓦生脑炎病毒。

[0091] 瘟病毒 (Pestivirus) :病毒免疫原包括但不限于衍生自瘟病毒,如牛病毒性腹泻 (BVDV)、经典猪瘟 (CSFV) 或边界病 (BDV) 的那些免疫原。

[0092] 嗜肝 DNA 病毒 (Hepadnavirus) :病毒免疫原包括但不限于衍生自嗜肝 DNA 病毒如乙型肝炎病毒的那些免疫原。组合物可包括乙型肝炎病毒表面抗原 (HBsAg)。

[0093] 其它肝炎病毒 :组合物可包括来自丙型肝炎病毒、丁型肝炎病毒、戊型肝炎病毒或庚型肝炎病毒的免疫原。

[0094] 棒状病毒 (Rhabdovirus) :病毒免疫原包括但不限于衍生自棒状病毒如狂犬病病毒属 (例如狂犬病毒) 和水泡病毒 (VSV) 的那些免疫原。

[0095] 杯状病毒 (Caliciviridae) :病毒免疫原包括但不限于衍生自杯状病毒,如诺沃克病毒 (Norwalk virus) (诺如病毒 (Norovirus)) 和诺沃克样病毒,如夏威夷病毒 (Hawaii Virus) 和雪山病毒 (Snow Mountain Virus) 的那些免疫原。

[0096] 冠状病毒 (Coronavirus) :病毒免疫原包括但不限于衍生自 SARS 冠状病毒、禽传染性支气管炎 (IBV)、小鼠肝炎病毒 (MHV) 和猪传染性肠胃炎病毒 (TGEV) 的那些免疫原。所述冠状病毒免疫原可以是刺突多肽。

[0097] 逆转录病毒 (Retrovirus) :病毒免疫原包括但不限于衍生自肿瘤病毒 (Oncovirus)、慢病毒 (Lentivirus) (例如 HIV-1 或 HIV-2) 或者泡沫病毒 (Spumavirus) 的那些免疫原。

[0098] 呼肠病毒 (Reovirus) :病毒免疫原包括但不限于衍生自正呼肠孤病毒属 (Orthoreovirus)、轮状病毒 (rotavirus)、环状病毒 (Orbivirus)、或科罗拉多壁虱热病毒 (Coltivirus) 的那些免疫原。

[0099] 细小病毒 (Parvovirus) :病毒免疫原包括但不限于衍生自细小病毒 B19 的那些免疫原。

[0100] 疱疹病毒 (Herpesvirus) :病毒免疫原包括但不限于衍生自人疱疹病毒的那些免疫原,例如单纯疱疹病毒 (HSV) (例如 HSV1 型和 2 型)、水痘 - 带状疱疹病毒 (VZV)、艾伯斯坦 - 巴尔病毒 (EBV)、巨细胞病毒 (CMV)、人疱疹病毒 6 (HHV6)、人疱疹病毒 7 (HHV7) 和人疱疹病毒 8 (HHV8)

[0101] 乳头状多瘤空泡病毒 (Papovaviruses) :病毒免疫原包括但不限于衍生自乳头状瘤病毒 (Papillomaviruses) 和多瘤病毒 (Polyomaviruses) 的那些免疫原。(人) 乳头状瘤病毒可以是血清型 1、2、4、5、6、8、11、13、16、18、31、33、35、39、41、42、47、51、57、58、63 或 65,例如来自血清型 6、11、16 和 / 或 18 中的一种或多种。

[0102] 腺病毒 (Adenovirus) :病毒免疫原包括衍生自腺病毒血清型 36 (Ad-36) 的那些免疫原。

[0103] 在一些实施方式中,所述免疫原引起针对感染鱼的的病毒的免疫应答,例如:传染性鲑鱼贫血病毒 (ISAV)、鲑鱼胰腺病病毒 (SPDV)、传染性胰脏坏死病毒 (IPNV)、水道猫鱼病毒 (CCV)、鱼类淋巴囊肿病病毒 (FLDV)、传染性造血组织坏死病毒 (IHNV)、锦鲤疱疹病毒、鲑鱼小核糖核酸样病毒 (也称作大西洋鲑鱼的小核糖核酸样病毒)、陆封鲑病毒 (landlocked salmon virus, LSV)、大西洋鲑鱼轮状病毒 (ASR)、鳟鱼草莓病病毒 (TSD)、银鲑鱼肿瘤病毒 (CSTV) 或病毒性出血性败血症病毒 (VHSV)。

[0104] 真菌免疫原可衍生自皮肤真菌 (Dermatophytes), 包括: 絮状表皮癣菌 (*Epidermophyton floccusum*)、奥杜安氏小孢子菌 (*Microsporum audouini*)、犬小孢子菌 (*Microsporum canis*)、扭曲小孢子菌 (*Microsporum distortum*)、马类小孢子菌 (*Microsporum equinum*)、石膏样小孢子菌 (*Microsporum gypsum*)、矮小小孢子菌 (*Microsporum nanum*)、同心性毛癣菌 (*Trichophyton concentricum*)、马发癣菌 (*Trichophyton equinum*)、鸡毛癣菌 (*Trichophyton gallinae*)、石膏状毛癣菌 (*Trichophyton gypseum*)、麦格氏毛癣菌 (*Trichophyton megnini*)、须癣毛癣菌 (*Trichophyton mentagrophytes*)、昆克努发癣菌 (*Trichophyton quinckeanum*)、红色毛癣菌 (*Trichophyton rubrum*)、许兰毛癣菌 (*Trichophyton schoenleini*)、断发毛癣菌 (*Trichophyton tonsurans*)、疣状毛癣菌 (*Trichophyton verrucosum*)、疣状毛癣菌的白变种 (var. album)、盘状变种 (var. discoides)、赭色变种 (var. ochraceum)、紫色毛癣菌 (*Trichophyton violaceum*) 和/或蜜块状发癣菌 (*Trichophyton faviforme*); 或者衍生自烟曲霉 (*Aspergillus fumigatus*)、黄曲霉 (*Aspergillus flavus*)、黑曲霉 (*Aspergillus niger*)、构巢曲霉 (*Aspergillus nidulans*)、土曲霉 (*Aspergillus terreus*)、聚多曲霉 (*Aspergillus sydowi*)、黄曲霉 (*Aspergillus flavatus*)、灰绿曲霉 (*Aspergillus glaucus*)、头状芽裂殖菌 (*Blastoschizomyces capitatus*)、白假丝酵母 (*Candida albicans*)、烯醇酶假丝酵母 (*Candida enolase*)、热带假丝酵母 (*Candida tropicalis*)、光滑假丝酵母 (*Candida glabrata*)、克鲁斯假丝酵母 (*Candida krusei*)、近平滑假丝酵母 (*Candida parapsilosis*)、类星形假丝酵母 (*Candida stellatoidea*)、克鲁斯假丝酵母 (*Candida kusei*)、帕拉克斯假丝酵母 (*Candida parakwsei*)、葡萄牙假丝酵母 (*Candida lusitaniae*)、伪热带假丝酵母 (*Candida pseudotropicalis*)、季也蒙假丝酵母 (*Candida guilliermondii*)、卡氏枝孢霉 (*Cladosporium carrionii*)、粗球孢子菌 (*Coccidioides immitis*)、皮炎芽生菌 (*Blastomyces dermatidis*)、新型隐球菌 (*Cryptococcus neoformans*)、棒地霉 (*Geotrichum clavatum*)、荚膜组织胞浆菌 (*Histoplasma capsulatum*)、肺炎克雷伯菌 (*Klebsiella pneumoniae*)、微孢子虫 (Microsporidia)、脑炎微孢子虫属 (*Encephalitozoon* spp.)、表层角结膜炎微孢子虫 (*Septata intestinalis*) 和肠微孢子虫 (*Enterocytozoon bieneusi*); 较不常见的是: 短粒虫属 (*Brachiola* spp.)、微孢子虫属 (*Microsporidium* spp.)、孢子虫属 (*Nosema* spp.)、皮里虫属 (*Pleistophora* spp.)、气管普孢虫属 (*Trachipleistophora* spp.)、条孢虫属 (*Vittaforma* spp.)、巴西芽生菌 (*Paracoccidioides brasiliensis*)、卡氏肺孢子虫 (*Pneumocystis carinii*)、苜蓿腐霉 (*Pythium insidiosum*)、卵状糠疹癣菌 (*Pityrosporum ovale*)、酿酒酵母 (*Sacharomyces cerevisiae*)、布拉酵母 (*Saccharomyces boulardii*)、粟酒酵母 (*Saccharomyces pombe*)、尖端赛多孢子菌 (*Scedosporium apiospermum*)、申克孢子丝菌 (*Sporothrix schenckii*)、白

吉利丝孢酵母 (*Trichosporon beigelii*)、弓形虫 (*Toxoplasma gondii*)、马尔尼菲青霉菌 (*Penicillium marneffei*)、马拉色菌 (*Malassezia* spp.)、着色真菌属 (*Fonsecaea* spp.)、王氏霉菌属 (*Wangiella* spp.)、孢子丝菌属 (*Sporothrix* spp.)、蛙粪霉属 (*Basidiobolus* spp.)、耳霉属 (*Conidiobolus* spp.)、根霉属 (*Rhizopus* spp.)、毛霉属 (*Mucor* spp.)、犁头霉属 (*Absidia* spp.)、被孢霉属 (*Mortierella* spp.)、小克银汉霉属 (*Cunninghamella* spp.)、瓶霉属 (*Saksenaea* spp.)、链格孢菌属 (*Alternaria* spp.)、弯孢菌属 (*Curvularia* spp.)、长蠕孢菌属 (*Helminthosporium* spp.)、镰孢菌属 (*Fusarium* spp.)、曲霉属 (*Aspergillus* spp.)、青霉属 (*Penicillium* spp.)、链核霉菌属 (*Monolinia* spp.)、丝核菌属 (*Rhizoctonia* spp.)、拟青霉属 (*Paecilomyces* spp.)、皮司霉属 (*Pithomyces* spp.) 和枝孢霉属 (*Cladosporium* spp.)。

[0105] 在一些实施方式中,所述免疫原引起针对疟原虫 (*Plasmodium*) 属的寄生虫的免疫应答,例如恶性疟原虫 (*P. falciparum*)、间日疟原虫 (*P. vivax*)、三日疟原虫 (*P. malariae*) 或卵形疟原虫 (*P. ovale*)。因此,本发明可用于针对疟疾免疫。在一些实施方式中,所述免疫原引起的免疫应答针对源自鱼虱科 (*Caligidae*) 的寄生虫,尤其是那些来自疮痂鱼虱属 (*Lepeophtheirus*) 和鱼虱属 (*Caligus*) 例如海虱如鲑疮痂鱼虱 (*Lepeophtheirus salmonis*) 或智利鱼虱 (*Caligus rogercresseyi*) 的寄生虫。

[0106] 在一些实施方式中,所述免疫原引起针对以下的免疫应答:花粉过敏原(树、草本和草花粉过敏原)、昆虫或蜘蛛类动物过敏原(吸入式、唾液和毒液过敏原,例如螨虫过敏原、蟑螂和蠨过敏原、膜翅类毒液过敏原)、动物毛发和皮屑过敏原(来自例如狗、猫、马、大鼠、小鼠等);以及食物过敏原(例如麦醇溶蛋白)。来自树、草和草本植物的重要花粉过敏原源于例如以下分类学的目:壳斗目 (*Fagales*)、木樨目 (*Oleales*)、松柏目 (*Pinales*) 以及悬铃木科 (*platanaceae*),包括但不限于桦木(桦属 (*Betula*))、赤杨(桤木属 (*Alnus*))、榛木(榛属 (*Corylus*))、鹅耳枥木(鹅耳枥属 (*Carpinus*)) 和橄榄(齐墩果属 (*Olea*))、雪松(柳杉属 (*Cryptomeria*) 和桧属 (*Juniperus*))、悬铃木(悬铃木属 (*Platanus*)),禾本目包括以下属的草:黑麦草属 (*Lolium*)、猫尾草属 (*Phleum*)、早熟禾 (*Poa*)、狗牙根属 (*Cynodon*)、鸭茅属 (*Dactylis*)、绒毛草属 (*Holcus*)、藨草属 (*Phalaris*)、黑麦属 (*Secale*) 和蜀黍属 (*Sorghum*),菊目 (*Asterales*) 和荨麻目 (*Urticales*) 包括以下属的草本植物:豚草属 (*Ambrosia*)、艾属 (*Artemisia*) 和墙草属 (*Parietaria*)。其它重要的吸入式过敏原是来自于以下那些过敏原:表皮螨属 (*Dermatophagoides*) 和嗜霉螨属 (*Euroglyphus*) 的屋尘螨、储粮尘螨例如害嗜鳞螨 (*Lepidoglyphus*)、食甜螨属 (*Glycyphagus*) 和食酪螨属 (*Tyrophagus*),来自蟑螂、蠨和跳蚤例如小蠨属 (*Blatella*)、大蠨属 (*Periplaneta*)、摇蚊属 (*Chironomus*) 和栉头蚤属 (*Ctenocephalides*),来自哺乳动物如猫、狗和马,毒液过敏原包括例如源自针虫或咬虫的过敏原,例如来自分类学的膜翅目的那些昆虫,包括蜜蜂(蜜蜂科, *Apidae*)、黄蜂(胡蜂科, *Vespidea*) 和蚂蚁(蚁科, *Formicidae*)。

[0107] 在一些实施方式中,所述免疫原是选自以下的肿瘤抗原:(a) 癌症-睾丸抗原,如 NY-ESO-1、SSX2、SCP1 以及 RAGE、BAGE、GAGE 和 MAGE 家族多肽,如 GAGE-1、GAGE-2、MAGE-1、MAGE-2、MAGE-3、MAGE-4、MAGE-5、MAGE-6 和 MAGE-12(例如,可用于针对黑色素瘤、肺肿瘤、头颈部肿瘤、NSCLC 瘤、乳腺肿瘤、胃肠道肿瘤和膀胱肿瘤);(b) 突变的抗原,例如 p53(与各种实体瘤如结直肠癌、肺癌、头颈癌有关)、p21/Ras(与例如黑色素瘤、胰腺癌和结直肠

癌有关)、CDK4(与例如黑色素瘤有关)、MUM1(与例如黑色素瘤有关)、半胱天冬酶-8(与例如头颈癌有关)、CIA0205(与例如膀胱癌有关)、HLA-A2-R1701、 β 联蛋白(与例如黑色素瘤有关)、TCR(与例如 T- 细胞非霍奇金淋巴瘤有关)、BCR-ab1(与例如慢性髓细胞性白血病有关)、磷酸丙糖异构酶、KIA0205、CDC-27 和 LDLR-FUT;(c) 过表达的抗原,例如半乳糖凝集素 4(与例如结直肠癌有关)、半乳糖凝集素 9(与例如霍奇金病有关)、蛋白酶 3(与例如慢性髓细胞性白血病有关)、WT1(与例如各种白血病有关)、碳酸酐酶(与例如肾癌有关)、醛缩酶 A(与例如肺癌有关)、PRAME(与例如黑色素瘤有关)、HER-2/neu(与例如乳腺癌、结肠癌、肺癌和卵巢癌有关)、乳腺球蛋白、甲胎蛋白(与例如肝细胞癌有关)、KSA(与例如结直肠癌有关)、胃泌素(与例如胰腺癌和胃癌有关)、端粒酶催化蛋白、MUC-1(与例如乳腺癌和卵巢癌有关)、G-250(与例如肾细胞癌有关)、p53(与例如乳腺癌和结肠癌有关)和癌胚抗原(与例如乳腺癌、肺癌和胃肠道癌如结直肠癌有关);(d) 共有的抗原,例如黑色素瘤-黑素细胞分化抗原如 MART-1/Melan A、gp100、MC1R、黑素细胞-刺激激素受体、酪氨酸酶、酪氨酸酶相关蛋白-1/TRP1 和酪氨酸酶相关蛋白-2/TRP2(与例如黑色素瘤有关);(e) 前列腺相关抗原,如 PAP、PSA、PSMA、PSH-P1、PSM-P1、PSM-P2,与例如前列腺癌有关;(f) 免疫球蛋白独特型(与例如骨髓瘤和 B 细胞淋巴瘤有关)。在某些实施方式中,肿瘤抗原包括但不限于:p15、Hom/Mel-40、H-Ras、E2A-PRL、H4-RET、IGH-IGK、MYL-RAR、艾伯斯坦-巴尔病毒抗原、EBNA、人乳头瘤病毒(HPV) 抗原,包括 E6 和 E7、乙肝和丙肝病毒抗原、人 T 细胞嗜淋巴病毒抗原、TSP-180、p185erbB2、p180erbB-3、c-met、mn-23H1、TAG-72-4、CA19-9、CA72-4、CAM17.1、NuMa、K-ras、p16、TAGE、PSCA、CT7、43-9F、5T4、791Tgp72、 β -HCG、BCA225、BTAA、CA125、CA15-3(CA27.29\BCAA)、CA195、CA242、CA-50、CAM43、CD68\KP1、C0-029、FGF-5、Ga733(EpCAM)、HTgp-175、M344、MA-50、MG7-Ag、MOV18、NB/70K、NY-CO-1、RCAS1、SDCCAG16、TA-90(Mac-2 结合蛋白/亲环蛋白 C 相关蛋白)、TAAL6、TAG72、TLP、TPS 等。

[0108] 药物组合物

[0109] 本发明的脂质体可用作药物组合物中的组分来免疫对象抵御各种疾病。除脂质体之外,这些组合物通常还包括药学上可接受的运载体。关于药学上可接受运载体的全面讨论参见参考文献 29。

[0110] 本发明的药物组合物可包括一种或多种小分子免疫增强剂。例如,所述组合物可包括 TLR2 激动剂(例如 Pam3CSK4)、TLR4 激动剂(例如氨烷基氨基葡萄糖苷磷酸,如 E6020)、TLR7 激动剂(例如咪喹莫特(imiquimod))、TLR8 激动剂(例如瑞喹莫德(resiquimod))和/或 TLR9 激动剂(例如 IC31)。任何所述的激动剂理想上具有<2000Da 的分子量。在一些实施方式中,所述激动剂也与 RNA 一同在脂质体内包封,但在其它实施方式中,不包封所述激动剂。

[0111] 本发明的药物组合物可包括溶于淡水(例如 w. f. i)或缓冲液的脂质体,所述缓冲液为例如磷酸盐缓冲液、Tris 缓冲液、硼酸盐缓冲液、琥珀酸盐缓冲液、组氨酸缓冲液或柠檬酸盐缓冲液。缓冲盐浓度一般在 5-20mM 范围内。

[0112] 本发明的药物组合物的 pH 可为 5.0-9.5,如 6.0-8.0。

[0113] 本发明的组合物可含有钠盐(如氯化钠)以产生张力。NaCl 的浓度通常是 10+2mg/mL,例如约 9mg/mL。

[0114] 本发明的组合物可包含金属离子螯合剂。这些金属离子螯合剂可通过移除能加速

磷酸二酯水解的离子来延长 RNA 稳定性。因此,组合物可包含 EDTA、EGTA、BAPTA、喷替酸等中的一种或多种。所述螯合剂的浓度通常为 10–500 μ M,例如 0.1mM。柠檬酸盐例如柠檬酸钠,既可作为螯合剂,又有利地提供缓冲活性。

[0115] 本发明药物组合物的摩尔渗透压浓度可为 200mOsm/kg–400mOsm/kg,如 240–360mOsm/kg 或 290–310mOsm/kg。

[0116] 本发明的药物组合物可包含一种或多种防腐剂,例如硫柳汞或 2- 苯氧乙醇。优选不含汞的组合物,且可制备不含防腐剂的疫苗。

[0117] 本发明的药物组合物优选无菌。

[0118] 本发明的药物组合物优选无热源,如含有 <1EU (内毒素单位,标准量度)/ 剂量,并优选 <0.1EU/ 剂量。

[0119] 本发明的药物组合物优选不含谷蛋白。

[0120] 本发明的药物组合物可以单位剂量形式制备。在一些实施方式中,单位剂量的体积可为 0.1–1.0mL,例如约 0.5mL。

[0121] 可将所述组合物制备为溶液或悬浮液形式的注射剂。所述组合物可制备用于肺部给药,例如用细雾通过吸入器给药。所述组合物可制备用于鼻部、耳部或眼部给药,例如作为喷雾或滴剂。一般是用于肌肉内给药的注射剂。

[0122] 组合物包含免疫有效量的脂质体,以及任何其它所需的组分。“免疫有效量”是指在一次剂量或一系列剂量的一部分中给予个体的量对治疗或预防有效。该量的变化取决于如下因素:待治疗个体的健康和身体状况、年龄、待治疗个体的分类群(例如,非人的灵长动物、灵长动物等)、个体免疫系统合成抗体的能力、所需的保护程度、疫苗配方、治疗医生对医学情况的评估和其它相关因素。预计所述量将落入可通过常规试验测定的相对较宽范围内。本发明组合物的脂质体和 RNA 含量一般按每剂量 RNA 的量来表示。优选剂量具有 $\leq 100 \mu$ g 的 RNA (例如 10–100 μ g, 如约 10 μ g、25 μ g、50 μ g、75 μ g 或 100 μ g),但可见表达的水平低很多,例如 $\leq 1 \mu$ g/ 剂量、 ≤ 100 ng/ 剂量、 ≤ 10 ng/ 剂量、 ≤ 1 ng/ 剂量等。

[0123] 本发明还提供一种递送装置(例如注射器、雾化器、喷雾器、吸入器、透皮贴片等),所述递送装置包含本发明的药物组合物。该装置可用于将所述组合物给予脊椎动物对象。

[0124] 本发明的脂质体不包括核糖体。

[0125] 治疗及医学应用方法

[0126] 与参考文献 10 中公开的颗粒相反,本发明的脂质体和药物组合物用于体内应用以引起针对感兴趣免疫原的免疫应答。

[0127] 本发明提供了用于在脊椎动物体内产生免疫应答的方法,所述方法包括给予有效量的本发明脂质体或药物组合物的步骤。所述免疫应答优选为保护性免疫应答,并优选涉及抗体和/或细胞介导的免疫。所述方法可产生加强应答。

[0128] 本发明还提供了本发明的脂质体或药物组合物在产生脊椎动物体内免疫应答的方法中的应用。

[0129] 本发明还提供了本发明脂质体在制造用于引起脊椎动物体内免疫应答的药物中的应用。

[0130] 通过这些应用和方法在脊椎动物体内产生免疫应答,可保护所述脊椎动物抵御各

种疾病和 / 或感染,例如,针对如上讨论的细菌和 / 或病毒性疾病。所述脂质体和组合物是免疫原性的,更优选为疫苗组合物。本发明所述的疫苗可以是预防性(即,用来预防感染)或治疗性(即,用来治疗感染)疫苗,但一般是预防性疫苗。

[0131] 所述脊椎动物优选哺乳动物,如人或大型兽类哺乳动物(例如,马、牛、鹿、山羊、猪)。当所述疫苗用于预防性用途时,人优选是儿童(如幼童或婴儿)或青少年;当所述疫苗用于治疗用途时,人优选是青少年或成人。用于儿童的疫苗也可给予成年人,例如,用以评估其安全性、剂量、免疫原性等。

[0132] 按本发明所述制备的疫苗可用于治疗儿童和成年人。因此,人患者可小于 1 岁、小于 5 岁、1 ~ 5 岁、5 ~ 15 岁、15 ~ 55 岁或至少 55 岁。接受疫苗的患者优选老年人(如 ≥ 50 岁, ≥ 60 岁并优选 ≥ 65 岁)、年轻人(如 ≤ 5 岁)、住院病人、保健护理人员、武装人员和军人、孕妇、慢性病人或免疫缺陷病人。然而,所述疫苗不仅适用于这些人群,还可用于更广泛的群体。

[0133] 通常将本发明的组合物直接给予患者。可通过肠胃外注射实现直接递送(例如皮下、腹膜内、静脉内、肌肉内、皮内或注入组织间隙;不同于参考文献 1,本发明一般不使用舌内注射)。替代的递送途径包括直肠、口服(例如片剂、喷雾)、颊部、舌下、阴道、局部、透皮或经皮、鼻内、眼部、耳部、肺部或其它粘膜给药。皮内和肌内给药是两种优选的途径。注射可以通过针头(例如皮下针头)进行,但也可替代使用无针注射。肌内剂量一般为 0.5mL。

[0134] 本发明可用于引起全身和 / 或粘膜免疫,优选引起增强的全身和 / 或黏膜免疫。

[0135] 可以通过单剂量方案或多剂量方案给药。多剂量可以用于初次免疫方案和 / 或加强免疫方案。在多剂量方案中,可通过相同或不同的途径如胃肠道外初始和粘膜加强,粘膜初次和胃肠道外加强等给予多个剂量。一般间隔至少 1 周(例如约 2 周、约 3 周、约 4 周、约 6 周、约 8 周、约 10 周、约 12 周、约 16 周等)给予多剂量。在一个实施方式中,可在出生后约 6 周、10 周和 14 周给予多剂量,例如按世界卫生组织的扩大免疫规划(Expanded Program on Immunisation,“EPI”)中常用的 6 周龄、10 周龄和 14 周龄时给药。在一个替代实施方式中,间隔约两个月(例如间隔约 7、8 或 9 周)给予两个主要剂量,然后在第二次主要剂量后约 6 个月 ~ 1 年(例如在第二次主要剂量后约 6、8、10 或 12 个月)给予一个或多个加强剂量。在另一个实施方式中,间隔约两个月(例如间隔约 7、8 或 9 周)给予三个主要剂量,然后在第三次主要剂量后约 6 个月 ~ 1 年(例如,在第三次主要剂量后约 6、8、10 或 12 个月)给予一个或多个加强剂量。

[0136] 概述

[0137] 除非另有说明,本发明的实施将采用化学、生物化学、分子生物学、免疫学和药理学的常规方法,这些常规方法在本领域技术范围内。这些技术在文献中已有充分描述。参见例如,参考文献 30-36 等。

[0138] 术语“包含”涵盖“包括”以及“由...组成”,例如,“包含”X 的组合物可以仅由 X 组成或可包括其它物质,例如 X+Y。

[0139] 与数值 x 相关的术语“约”是可选的并表示,例如, $x \pm 10\%$ 。

[0140] 术语“基本上”不排除“完全”,如“基本上不含”Y 的组合物可完全不含 Y。如有需要,“基本上”一词可以从本发明的定义中省略。

[0141] 提及电荷、阳离子、阴离子、两性离子等时都是指 pH7 情况下。

[0142] TLR3 是 Tol1 样受体 3。它是在先天免疫系统中起重要作用的单次跨膜受体,其。已知的 TLR3 激动剂包括聚 (I:C)。“TLR3”是该受体编码基因的批准 HGNC 名称,并且其专有 HGNC ID 是 HGNC :11849。人 TLR3 基因的 RefSeq 序列是 GI :2459625。

[0143] TLR7 是 Tol1 样受体 7。它是在先天免疫系统中起重要作用的单次跨膜受体。已知的 TLR7 激动剂包括例如咪喹莫特。“TLR7”是该受体编码基因的批准 HGNC 名称,并且其专有 HGNC ID 是 HGNC :15631。人 TLR7 基因的 RefSeq 序列是 GI :67944638。

[0144] TLR8 是 Tol1 样受体 8。它是在先天免疫系统中起重要作用的单次跨膜受体。已知的 TLR8 激动剂包括例如瑞喹莫德 (resiquimod)。“TLR8”是该受体编码基因的批准 HGNC 名称,并且其专有 HGNC ID 是 HGNC :15632。人 TLR8 基因的 RefSeq 序列是 GI :20302165。

[0145] RIG-I 样受体 (“RLR”) 家族包括多种 RNA 解旋酶,其在先天免疫系统中起重要作用 [37]。RLR-1 (也称作 RIG-I 或维甲酸诱导基因 1) 在其 N- 末端附近有两个半胱天冬酶募集结构域。该 RLR-1 解旋酶编码基因的批准 HGNC 名称是 “DDX58” (用于 DEAD(Asp-Glu-Ala-Asp) 盒多肽 58), 并且其专有 HGNC ID 是 HGNC :19102。人 RLR-1 基因的 RefSeq 序列是 GI :77732514。RLR2 (也称作 MDA5 或黑色素瘤分化相关基因 5) 在其 N- 末端附近也具有两个半胱天冬酶募集结构域。该 RLR-2 解旋酶编码基因的批准 HGNC 名称是 “IFIH1” (用于由解旋酶 C 结构域 1 诱导的干扰素 (interferon induced with helicase C domain1)), 并且其专有 HGNC ID 是 HGNC :18873。人 RLR-2 基因的 RefSeq 序列是 GI :27886567。RLR-3 (也称作 LGP2 或遗传学和生理学实验室蛋白 2 (laboratory of genetics and physiology 2)) 没有半胱天冬酶募集结构域。该 RLR-3 解旋酶编码基因的批准 HGNC 名称是 “DHX58” (用于 DEXH(Asp-Glu-X-His) 盒多肽 58), 并且其专有 HGNC ID 是 HGNC :29517。人 RLR-3 基因的 RefSeq 序列是 GI :149408121。

[0146] PKR 是双链 RNA 依赖性蛋白激酶。其在先天免疫系统中起重要作用。“EIF2AK2” (用于真核生物翻译起始因子 2- α 激酶 2) 是该酶编码基因的批准 HGNC 名称,并且其专有 HGNC ID 是 HGNC :9437。人 PKR 基因的 RefSeq 序列是 GI :208431825。

附图说明

[0147] 图 1 显示 RNA 染色凝胶。泳道显示 : (1) 标记物 (2) 裸复制子 (3) RNA 酶处理后的复制子 (4) 包封在脂质体内的复制子 (5) RNA 酶处理后的脂质体 (6) 经 RNA 酶处理后又经苯酚 / 氯仿提取的脂质体。

[0148] 图 2 是脂质体的电子显微照片。

[0149] 图 3 显示在大 (下方线) 或小 (上方线) 脂质体中递送 RNA 后第 1 天、第 3 天和第 6 天的蛋白表达 (以相对光单位 (RLU) 形式)。

[0150] 图 4 显示 RNA 染色凝胶。泳道显示 : (1) 标记物 (2) 裸复制子 (3) 包封在脂质体内的复制子 (4) 经 RNA 酶处理后又经苯酚 / 氯仿提取的脂质体。

[0151] 图 5 显示 RNA 递送后第 1、3 和 6 天的蛋白质表达,其中, RNA 以病毒例包装的复制子形式递送 (方形)、以裸露 RNA 形式递送 (菱形) 或在脂质体内递送 (+ = 0.1 μ g, $\times$ = 1 μ g)。

[0152] 图 6 显示四种不同剂量的脂质体包封 RNA 递送后第 1、3 和 6 天的蛋白质表达。

[0153] 图 7 显示接受病毒粒包装的复制子 (VRP 或 VSRP)、1 μ g 裸露 RNA 和 1 μ g 脂质体包封 RNA 的动物中抗 F IgG 效价。

[0154] 图 8 显示接受 VRP、1 μ g 裸露 RNA 和 0.1g 或 1 μ g 脂质体包封 RNA 的动物中抗 F IgG 效价。

[0155] 图 9 显示接受 VRP、0.1g 或 1 μ g 脂质体包封 RNA 的动物内中和抗体效价。

[0156] 图 10 显示复制子以裸露 RNA (圆形)、脂质体包封的 RNA (三角形和方形) 或脂质体-DNA 复合物 (lipoplex) (倒三角形) 形式递送后的表达水平。

[0157] 图 11 显示复制子以裸露 RNA (0.01 ~ 1 μ g)、脂质体包封的 RNA (0.01 ~ 10 μ g) 或包装成病毒粒 (VRP, 106 感染单位或 IU) 形式递送后的 F 特异性 IgG 效价 (第二剂量后 2 周)。

[0158] 图 12 显示复制子以裸露 RNA (1 μ g)、脂质体包封的 RNA (0.1 或 1 μ g) 或包装成病毒粒 (VRP, 106IU) 的形式递送后的 F 特异性 IgG 效价 (圆形) 和 PRNT 效价 (方形)。也显示了未处理 (naïve) 小鼠的效价。实线表示几何平均数。

[0159] 图 13 显示在第二剂量后 4 周, 用代表 F 蛋白内主要抗原表位的合成肽再刺激后的胞内细胞因子生成。y 轴表示 CD8+CD4- 的细胞因子 +%。

[0160] 图 14 显示小牛免疫后 210 天内 F 特异性 IgG 效价 (平均 $\log_{10}$ 效价 $\pm$ 标准偏差)。在第 63 天时, 三条线可由底至顶部轻易区分: PBS 阴性对照、脂质体递送的 RNA 以及所述“三角 4 (Triangle4)”产物。

[0161] 图 15 显示在编码 F 蛋白的复制子第一剂量后两周的抗 F 效价表达 (相对)。所述效价对脂质体 Z 均直径 (nm) 作图。

[0162] 图 16A ~ 16M 显示替代阳离子型脂质的结构: (A) RV05; (B) RV02; (C) RV04; (D) RV07; (E) RV03; (F) RV08; (G) RV09; (H) RV14; (I) RV10; (J) RV11; (K) RV15; (L) RV16; (M) RV17。

[0163] 图 17 显示有用的“分裂”PEG 偶联脂质的结构。在测试的脂质体中, 框内 PEG 的总分子量是 2000。

[0164] 图 18A ~ 18E 显示多种 PEG 偶联脂质的结构, 其中 R 是具有所需长度的 PEG。

具体实施方式

[0165] RNA 复制子

[0166] 下文使用多种复制子。一般而言, 这些复制子基于杂交 α 病毒基因组, 其具有来自委内瑞拉马脑炎病毒 (VEEV) 的非结构蛋白, 来自 VEEV 的包装信号, 以及来自辛德毕斯病毒或 VEEV 突变体的 3' UTR。该复制子长约 10kb, 且具有聚腺苷酸尾。

[0167] 将编码 α 病毒复制子的质粒 DNA (名为: pT7-mVEEV-FL.RSVF 或 A317、pT7-mVEEV-SEAP 或 A306、pSP6-VCR-GFP 或 A50) 作为用于体外合成 RNA 的模板。所述复制子含有 RNA 复制所需的 α 病毒遗传元件, 但缺乏编码颗粒组装所必需基因产物的那些遗传元件; 所述结构蛋白由感兴趣的蛋白质 (报告子 (如 SEAP 或 GFP) 或者免疫原 (如全长 RSVF 蛋白)) 取代, 因此所述复制子不能诱导传染性颗粒产生。所述 α 病毒 cDNA 上游的噬菌体 (T7 或 SP6) 启动子促进所述复制子 RNA 的体外合成, 并且紧邻聚 (A) 尾下游的丁型肝炎病毒 (HDV) 核酶通过其自切割活性产生正确的 3' 末端。

[0168] 用合适的限制性内切核酸酶线性化所述 HDV 核酶下游的质粒 DNA 后, 用 T7 或 SP6 噬菌体衍生的 DNA 依赖性 RNA 聚合酶体外合成失控转录物 (run-off transcript)。按照生产

商（安碧公司（Ambion））提供的说明，在 7.5mM(T7RNA 聚合酶) 或 5mM(SP6RNA 聚合酶) 各三磷酸核苷 (ATP、CTP、GTP 和 UTP) 存在下 37℃ 转录 2 小时。转录后，用 TURBO DNA 酶（安碧公司（Ambion））消化模板 DNA。用 LiCl 沉淀复制子 RNA，并将其复溶于无核酸酶的水中。通过 ScriptCap m7G 加帽系统（埃皮森特生物技术公司（Epicentre Biotechnologies））按照使用手册所述，用牛痘加帽酶（VCE）对未加帽的 RNA 进行转录后加帽；以该方式加帽的复制子标有前缀“v”，例如，vA317 是通过 VCE 加帽的 A317 复制子。用 LiCl 沉淀转录后加帽的 RNA，并将其复溶于无核酸酶的水中。RNA 样品的浓度通过检测 OD260nm 测定。体外转录物的完整性通过变性琼脂糖凝胶电泳证实。

[0169] 脂质体包封

[0170] 将 RNA 包封在基本按参考文献 7 和 38 所述方法制备的脂质体内。所述脂质体由 10%DSPC（两性离子型）、40%DLinDMA（阳离子型）、48%胆固醇和 2%PEG 偶联 DMG（2kDa PEG）制成。这些比例指占整个脂质体中的摩尔 %。

[0171] 用参考文献 2 的方法合成 DLinDMA（1, 2- 二亚油氧基 -N, N- 二甲基 -3- 氨基丙烷）。DSPC（1, 2- 二硬脂酰基 -sn- 甘油 -3- 磷酸胆碱）购自健赞公司（Genzyme）。胆固醇获自西格玛 - 奥德里奇公司（Sigma-Aldrich）。PEG 偶联 DMG（1, 2- 二肉豆蔻酰基 -sn- 丙三基 -3- 磷酸乙醇胺 -N-[甲氧基（聚乙二醇），铵盐）、DOTAP（1, 2- 二油酰基 -3- 三甲基铵基丙烷，氯盐）和 DC-chol（3β-[N-(N', N'- 二甲氨基乙烷)- 氨基甲酰基] 盐酸胆固醇），来自阿凡提极性脂公司（Avanti Polar Lipids）。

[0172] 简单来说，将脂质溶解于乙醇（2mL）中，将 RNA 复制子溶解于缓冲液（2mL, 100mM 柠檬酸钠, pH6）中，用 2mL 缓冲液混合这些物质，然后平衡 1 小时。用 6mL 缓冲液稀释所述混合物，然后过滤。所得产物包含脂质体，具有约 95% 的包封率。

[0173] 例如，在一个具体方法中，在乙醇中制备新鲜的脂质储液。称量 37mg DLinDMA、11.8mg DSPC、27.8mg 胆固醇和 8.07mg PEG-DMG，并在 7.55mL 乙醇中溶解。在 37° C 温和摇动新鲜制备的脂质储液约 15 分钟以形成均质混合物。然后，将 755 μL 所述储液加入 1.245mL 乙醇中形成 2mL 工作脂质储液。将这个量的脂质用于形成含有 250 μg RNA 的脂质体。还以 100mM 柠檬酸盐缓冲液（pH6）中约 1 μg/μL 储液制备 2mL RNA 工作溶液。三个 20mL 的玻璃瓶（有搅拌棒）用 RNA 酶清除液（分子生物产品公司（Molecular BioProducts））冲洗并用足量 MilliQ 水清洗，然后用于去除瓶子的 RNA 酶污染。将所述玻璃瓶中的一个用于所述 RNA 工作溶液，其它的瓶用于收集所述脂质和 RNA 混合物（如后文所述）。在 37° C 加热所述工作脂质和 RNA 溶液 10min，然后将其装入 3cc 鲁尔锁（luer-lok）注射器。将 2mL 柠檬酸盐缓冲液（pH6）加载入另一个 3cc 注射器中。使用 FEP 管（氟化乙烯 - 丙烯；所有使用的 FEP 管都具有 2mm 内直径和 3mm 外直径，获自艺达思健康科学公司（Idex Health Science））将含有 RNA 和所述脂质的注射器连接至 T 型混流器（PEEK™500 μm ID 连接，艺达思健康科学公司（Idex Health Science））。所述 T 型混流器的出口也装有 FEP 管。将含有柠檬酸盐缓冲液的第三注射器连接至一段单独的管。然后，用注射泵以 7mL/min 的流速驱动所有注射器。放置所述管的出口以使所述混合物收集到 20mL 玻璃瓶中（同时搅拌）。取出所述搅拌棒，使所述乙醇 / 水性溶液平衡至室温 1h。将 4mL 所述混合物加载入连有一段 FEP 管的 5cc 注射器，将等量的 100mM 柠檬酸盐缓冲液（pH6）加载入另一个连有一段等长 FEP 管的 5cc 注射器。用注射泵以 7mL/ 分钟的流速驱动所述两个注射器，并将最终的

混合物收集到 20mL 玻璃瓶中（同时搅拌）。其次，使收集自第二混合步骤的混合物（脂质体）通过 Mustang Q 膜（结合并移除阴离子分子的阴离子交换支持物，获自波尔公司（Pall Corporation））。在该膜用于脂质体之前，4mL 1M NaOH、4mL 1M NaCl 和 10mL 100mM 柠檬酸盐缓冲液（pH6）依次通过该膜。将脂质体在 37° C 加温 10min 后通过所述膜。接着，将脂质体浓缩到 2mL，使用切向流过滤（TFF）相对 10 ~ 15 体积 1×PBS 透析，然后回收终产物。所述 TFF 系统和中空纤维过滤膜购自斯派实验室（Spectrum Labs）（多明格斯牧场（Rancho Dominguez）），并按照生产商指南使用。使用具有 100kD 孔径截止值、8cm² 表面积 of 聚砜中空纤维过滤膜。对于体外和体内实验，制剂用 1×PBS 稀释到所需的 RNA 浓度。

[0174] 图 2 显示通过这些方法制备的脂质体的示例性电子显微照片。这些脂质体包含编码全长 RSV F 抗原的包封 RNA。一个批次的动态光散射显示其平均直径是 141nm（根据密度）或 78nm（根据数量）。

[0175] 包封 RNA 的百分比和 RNA 浓度利用 Quant-iT RiboGreen RNA 试剂盒（英杰公司（Invitrogen））按照生产商说明来测定。利用所述试剂盒提供的核糖体 RNA 标准品生成标准曲线。在添加染料前，在 1×TE 缓冲液（来自试剂盒）中 10× 或 100× 稀释所述脂质体。单独地，在添加染料（用于破坏脂质体并由此检测总 RNA）前，在含有 0.5% 曲通（Triton）X 的 1×TE 缓冲液中 10× 或 100× 稀释脂质体。之后，向各溶液添加等量染料，然后，将约 180 μL 添加染料后的各溶液一式两份加入 96 孔组织培养板。在酶标仪上读取荧光（激发波长 485nm，发射波长 528nm）。所有脂质体制剂的体内给药都基于 RNA 的包封量。

[0176] 脂质体内包封显示保护 RNA 免于 RNA 酶消化。实验使用 3.8mAU RNA 酶 A/ 微克 RNA，在室温孵育 30 分钟。RNA 酶用蛋白酶 K 在 55° C 灭活 10 分钟。然后添加 1:1v/v 的样品混合物到 25:24:1v/v/v 的苯酚：氯仿：异戊醇以从所述脂质提取所述 RNA 进入水相。涡旋数秒混匀样品，然后将样品置于离心机上以 12,000RPM 离心 15 分钟。移出并使用所述水相（含有所述 RNA）来分析所述 RNA。在上样之前（每孔 400ng RNA），将所有样品和甲醛上样染料一起孵育，在 65° C 变性 10 分钟，并冷却至室温。使用安碧公司（Ambion）的 Millennium 标记物来估计 RNA 构建物的分子量。在 90V 跑胶。按照生产商指南，在水中使用时使用 0.1%SYBR 金通过室温摇晃 1 小时对所述凝胶染色。图 1 显示在无包封情况下，RNA 被 RNA 酶完全消化（第 3 泳道）。包封后无法检测到 RNA（第 4 泳道），即便这些脂质体经 RNA 酶处理也未见变化（第 4 泳道）。脂质体经 RNA 酶处理后又经苯酚提取，发现未被消化的 RNA（第 6 泳道）。甚至在 4° C 经过 1 周后，仍能观察到 RNA 而没有任何片段化（图 4，箭头）。在 4° C 持续 6 周和一个冻融循环后，体内蛋白表达不变。因此，脂质体包封的 RNA 是稳定的。

[0177] 为评估所述 RNA 的体内表达，在所述复制子内编码了报告酶（SEAP；分泌型碱性磷酸酶）而不是免疫原。以 1:4 在 1×Phospha-Light 稀释缓冲液中稀释血清，在该稀释液中使用化学发光碱性磷酸盐底物来检测表达水平。在第 0 天，以 0.1 μg 或 1 μg RNA 剂量对 8 ~ 10 周龄 BALB/c 小鼠（5 只 / 组）进行肌肉注射（50 μL / 腿）。不含所述脂质体的相同载体（溶于无 RNA 酶的 1×PBS）也以 1 μg 给药。还测试了病毒粒包装的复制子。本文所用的病毒粒包装的复制子（称为“VRP”）按参考文献 39 的方法获得，其中，所述 α 病毒复制子衍生自突变 VEEV 或者 VEEV 基因组衍生嵌合体，所述 VEEV 经工程改造成含有辛德毕斯病毒 3'UTR 和辛德毕斯病毒包装信号（PS），通过共电穿孔使其与编码辛德毕斯病毒衣壳和

糖蛋白基因的缺陷型辅助 RNA 包装入 BHK 细胞。

[0178] 如图 5 所示,就 $1\mu\text{g}$ 剂量而言,包封使 SEAP 水平增加约 $1/2\log$,在第 6 天, $0.1\mu\text{g}$ 包封剂量的表达符合 $1\mu\text{g}$ 未包封剂量所见的水平。到第 3 天时,表达水平超过了那些使用 VRP(方形)所达到的水平。因此, RNA 在脂质体中配制时表达相对裸露 RNA 对照增加,甚至在 $10\times$ 更低剂量也如此。表达与 VRP 对照相比也更高,但表达动力学非常不同(参见图 5)。由电穿孔递送所述 RNA 使得表达相对于裸露 RNA 增加,但这些水平都低于用脂质体递送。

[0179] 为评估所述脂质体组所见效果是仅仅归因于脂质体组分还是与包封相关,所述复制子以包封形式(用两种不同的纯化方法, $0.1\mu\text{g}$ RNA)给药,或在脂质体形成后与其混合(非包封的“脂质体-DNA 复合物”, $0.1\mu\text{g}$ RNA)给药,或者以裸露 RNA($1\mu\text{g}$)给药。图 10 显示所述脂质体-DNA 复合物产生最低表达水平,显示包封对蛋白表达是必要的。

[0180] 进一步的 SEAP 实验显示清晰的体内剂量应答,少至 1ng 的 RNA 递送后即可观察到表达(图 6)。比较包封和裸露复制子表达的进一步实验表明 $0.01\mu\text{g}$ 包封的 RNA 相当于 $1\mu\text{g}$ 裸露 RNA。就 $0.5\mu\text{g}$ 剂量的 RNA 而言,在第 6 天,包封的材料显示高 12 倍的表达;就 $0.1\mu\text{g}$ 剂量而言,在第 6 天,表达水平高 24 倍。

[0181] 也研究了动物个体,而不是观察组的平均水平。数种动物对裸露复制子无应答,包封消除了这些无应答情况。

[0182] 进一步的实验用 DOTAP 替代 DLinDMA。尽管相比于裸露复制子,DOTAP 脂质体显示了较好表达,但其仍然低于 DLinDMA 脂质体(在第 1 天有 2-3 倍差异)。

[0183] 为评估体内免疫原性,构建复制子来表达源自呼吸道合胞病毒(RSV)的全长 F 蛋白。该复制子以裸露($1\mu\text{g}$)形式、脂质体中包封(0.1 或 $1\mu\text{g}$)形式或病毒粒中包封(10^6IU ;“VRP”)形式,在第 0 天和第 21 天递送。图 7 显示在第二剂量后两周的抗 F IgG 效价,所述脂质体明显增强了免疫原性。图 8 显示两周后的效价,在此点处 $0.1\mu\text{g}$ 的包封 RNA 组、 $1\mu\text{g}$ 的包封 RNA 组或 VRP 组之间没有统计学上差异。在第二剂量后两周,这三组的中和效价(以噬菌斑减少 60% 测量,“PRNT60”)无显著差异(图 9)。图 12 显示第二剂量后 4 周的 IgG 和 PRNT 效价。

[0184] 图 13 证实所述 RNA 引起强 CD8T 细胞应答。

[0185] 进一步实验比较接受 VRP、 $0.1\mu\text{g}$ 脂质体包封 RNA 或者 $1\mu\text{g}$ 脂质体包封 RNA 的小鼠中 F 特异性 IgG 效价。第二剂量后不同时间的效价比(VRP:脂质体)如下:

[0186]

	2 周	4 周	8 周
$0.1\mu\text{g}$	2.9	1.0	1.1
$1\mu\text{g}$	2.3	0.9	0.9

[0187] 因此,脂质体包封的 RNA 诱导与病毒粒递送所见基本相同量级的免疫应答。

[0188] 进一步实验显示用 $10\mu\text{g}$ 剂量的较高 F-特异性 IgG 应答,就 $1\mu\text{g}$ 和 $0.1\mu\text{g}$ 剂量而言的等同应答,用 $0.01\mu\text{g}$ 剂量的较低应答。图 11 显示,接受 3 种不同剂量裸露形式复制子、4 种不同剂量的脂质体形式复制子、或 VRP(10^6IU)形式复制子的小鼠中的 IgG 滴度。

用 $1\mu\text{g}$ 脂质体包封 RNA 显示的应答与 VRP 相比在统计学上差异不显著 (ANOVA), 但 $10\mu\text{g}$ 脂质体包封 RNA 显示的结果与这两组相比在统计学上差异显著 ($p<0.05$)。

[0189] 进一步研究证实 $0.1\mu\text{g}$ 脂质体包封的 RNA 产生比 $0.1\mu\text{g}$ 递送的 DNA 高很多的抗 F IgG 应答 (第二剂量后 15 天), 甚至比通过电穿孔 (Elgen™DNA 递送系统, 伊诺瓦欧公司 (Inovio)) 递送的 $20\mu\text{g}$ 编码该 F 抗原的质粒 DNA 具有更强免疫原性。

[0190] 棉鼠

[0191] 用棉鼠 (*Sigmodon hispidus*) 取代小鼠进行研究。与裸露 RNA 相比, $1\mu\text{g}$ 剂量的脂质体包封使 F 特异性 IgG 效价增加了 8.3 倍, 使 PRNT 效价增加了 9.5 倍。其抗体应答量级与由 $5\times 10^6\text{IU}$ VRP 引起的相当。裸露 RNA 和脂质体包封的 RNA 都能保护棉鼠免于 RSV 攻击 (1×10^5 噬菌斑形成单位), 使肺病毒负荷减少了至少 3.5log。包封使该减少增加了约 2 倍。

[0192] 棉鼠中的进一步研究使用四种不同复制子: vA317 表达全长 RSV-F; vA318 表达截短 (去除跨膜和胞质尾) RSV-F; vA142 表达去除融合肽的 RSV-F; vA140 表达截短并且没有其肽的 RSV-F。每组 4~8 只的棉鼠采用四种不同复制子以脂质体中配制的两种剂量 (1.0 和 $0.1\mu\text{g}$) 在第 0 天和第 21 天给予肌肉内疫苗接种 ($100\mu\text{L}$ /腿), 所述脂质体使用 2kDa PEG 偶联 DMG 由方法 (D) 制成, 但用 $150\mu\text{g}$ RNA 批量大小。对照组接受以明矾作为佐剂的 RSV-F 亚基蛋白疫苗 ($5\mu\text{g}$) (8 只动物/组)、表达全长 RSV-F 的 VRP ($1\times 10^6\text{IU}$, 8 只动物/组) 或未处理对照 (4 只动物/组)。在第 0 天、第 21 天和第 34 天收集血清用于抗体分析。

[0193] 在第 21 天和第 34 天的 F 特异性血清 IgG 效价和 RSV 血清中和抗体效价是:

[0194]

组	第 21 天, IgG	第 34 天, IgG	第 21 天, NT	第 34 天, NT
$1\mu\text{g}$ vA317	915	2249	115	459
$0.1\mu\text{g}$ vA317	343	734	87	95
$1\mu\text{g}$ vA318	335	1861	50	277
$0.1\mu\text{g}$ vA318	129	926	66	239
$1\mu\text{g}$ vA142	778	4819	92	211
$0.1\mu\text{g}$ vA142	554	2549	78	141
$1\mu\text{g}$ vA140	182	919	96	194
$0.1\mu\text{g}$ vA140	61	332	29	72
$5\mu\text{g}$ F 三聚体亚基 / 明矾	13765	86506	930	4744
$1\times 10^6\text{IU}$ VRP-F 全长	1877	19179	104	4528

未处理	5	5	10	15
-----	---	---	----	----

[0195] 虽然血清中和效价比那些由带佐剂蛋白疫苗或 VRP 所诱导的低至少十倍,但本研究中评价的所有四种复制子 (vA317、vA318、vA142、vA140) 由脂质体递送时在棉鼠体内都具有免疫原性。在第一次疫苗接种后,所述脂质体 /RNA 疫苗引起血清 F 特异性 IgG 和 RSV 中和抗体,而第二次疫苗接种有效加强所述反应。与使用 0.1 μ g 复制子的第二次疫苗接种相比,使用 1 μ g 复制子的第二次疫苗接种之后的 F 特异性 IgG 滴度高 2 ~ 3 倍。所述四种复制子引起的抗体效价相当,提示全长和截短 RSV-F (各有或没有融合肽) 在棉鼠中有相似的免疫原性。

[0196] 进一步的棉鼠研究使用 vA317、vA318 和 vA142 复制子。每组 2-8 只棉鼠在第 0 天和第 21 天用包封在 RV01 脂质体 (用 PEG 2000) 中的复制子 (0.1 或 1 μ g) 给予肌肉内疫苗接种 (100 μ L/腿),所述 RV01 脂质体通过方法 (D) 制备,但用 150 μ g RNA 批量大小。对照组接受以明矾作为佐剂的 RSV-F 亚基蛋白疫苗 (5 μ g) 或表达全长 RSV-F 的 VRP (1×10^6 IU, 8 只动物/组)。所有这些动物接受第三次疫苗接种 (在第 56 天),所述疫苗接种用以明矾作为佐剂的 RSV-F 亚基蛋白疫苗 (5 μ g)。此外,还有未处理对照组 (4 只动物/组)。此外,在第 0 天和第 56 天用脂质体中 1 μ g vA317RNA 对附加组给予双侧肌肉内疫苗接种 (50 μ L/腿),但不接受使用所述亚基蛋白疫苗的第三次疫苗接种。

[0197] 在第 0、21、35、56、70 天收集血清用于抗体分析,对于所述附加组另加第 14、28 和 42 天。F 特异性血清 IgG 效价 (GMT) 如下所示:

[0198]

	第21天	第35天	第56天	第70天
1 μ g vA318	260	1027	332	14263
0.1 μ g vA318	95	274	144	2017
1 μ g vA142	483	1847	1124	11168
0.1 μ g vA142	314	871	418	11023
1 μ g vA317	841	4032	1452	13852
1×10^6 VRP (F全长)	2075	3938	1596	14574
5 μ g F三聚体亚基/明矾	12685	54526	25846	48864
未处理	5	5	5	5

[0199] 血清中和效价如下所示 (60% RSV 中和效价,3-4 只动物的两个库/组,这两个库/组的 GMT):

[0200]

	第21天	第35天	第56天	第70天
1 μg vA318	58	134	111	6344
0.1 μg vA318	41	102	63	6647
1 μg vA142	77	340	202	5427
0.1 μg vA142	35	65	56	2223
1 μg vA317	19	290	200	4189
1×10^6 VRP (F-全长)	104	1539	558	2876
5 μg F三聚体亚基/明矾	448	4457	1630	3631
未处理	10	10	10	

[0201] 附加组的血清效价和中和效价如下所示：

[0202]

天数	14	21	28	35	42	56	70
IgG	397	561	535	501	405	295	3589
NT	52	82	90	106	80	101	1348

[0203] 因此，确定所述复制子在棉鼠中是免疫原性的，其在第一次疫苗接种后引起血清 F 特异性 IgG 和 RSV 中和抗体。第二次疫苗接种有效加强所述反应。用 1.0 μg 复制子进行第二次疫苗接种之后的 F 特异性 IgG 效价比用 0.1 μg 复制子的第二次疫苗接种高 1.5 ~ 4 倍。

[0204] 第三次疫苗接种（蛋白，第 56 天）没有在先前接种 F 三聚体亚基 + 明矾的棉鼠中提高效价，但其在先前接种复制子的棉鼠中确实提供大量提高的效价。在大多数情况下，在接种两次复制子然后蛋白加强后的 RSV 血清中和效价等于或大于由两次或三次连续蛋白接种所引起的效价。

[0205] 该研究还评估了对 1.0 μg vA317 的抗体反应的动力学。由单次接种引起的 F 特异性血清 IgG 和 RSV 中和效价在约第 21 天达到其峰值，并且保持直到至少第 56 天（F 特异性 IgG 效价下降 50-70%，RSV 中和效价变化很小）。在第 56 天对这些动物给予同源第二接种，使抗体效价加强到至少等于第 21 天给予第二次接种所达到的抗体效价。

[0206] 进一步的实验涉及病毒攻击。vA368 复制子编码去除融合肽的全长野生型表面融合糖蛋白 RSV，其由 EV71 IRES 驱动表达。每组 7 只的棉鼠在第 0 天和第 21 天给予肌肉内疫苗接种（100 μL /腿），用方法（H）所制备脂质体中的 vA368，175 μg RNA 批量大小，或用具有相同复制子的 VRP。所述脂质体包含 2kDa 与 DMG 偶联的 PEG。对照组接受以明矾作为佐剂的 5 μg 蛋白，还包括首次接受试验的对照组。

[0207] 所有组在最终免疫之后四周接受使用 1×10^6 PFU RSV 的鼻内攻击（i. n.）。在第 0、

21、35 天收集血清用于抗体分析。在攻击后 5 天检测病毒肺效价。结果如下所示：

[0208]

	脂质体	VRP	蛋白质	首次接受试验
<i>F</i> 特异性血清 IgG 效价(GMT)				
第21天	370	1017	28988	5
第35天	2636	2002	113843	5
中和效价 (GMT)				
第21天	47	65	336	10
第35天	308	271	5188	10
肺病毒负荷(pfu/克肺)				
第54天	422	225	124	694110

[0209] 因此,所述 RNA 疫苗使所述肺病毒负荷减少超过三个 log,从首次接受试验的对照棉鼠中大约 10^6 PFU/g 降低至接种棉鼠中少于 10^3 PFU/g。

[0210] 大型哺乳动物研究

[0211] 在牛中实行大型动物研究。在第 0、21、86 和 146 天用 $66 \mu\text{g}$ 编码全长 RSV F 蛋白的复制子 vA317 免疫牛 (4 ~ 6 周龄,约 60-80kg,5 只 / 组)。所述复制子在通过方法 (E) 制备的脂质体内配制的,但使用 1.5mg RNA 批量大小;所述脂质体具有 40%DlinDMA、10%DSPC、48%胆固醇和 2% 与 DMG 偶联的 PEG-2000。用单独 PBS 作为阴性对照,用许可疫苗作为阳性对照 (来自富道 (Fort Dodge) 的“三角 4”,包含已灭活病毒)。在第 146 天,所有牛接受以 MF59 乳剂作为佐剂的 $15 \mu\text{g}$ F 蛋白。

[0212] 所述 RNA 疫苗编码人 RSV F,而所述“三角 4”疫苗包含牛 RSV F,但所述 RSV F 蛋白在 BRSV 和 HRSV 之间高度保守。

[0213] 牛通过肌肉内给药在颈部每侧以 $2 \times 1\text{mL}$ 接受 2ml 各实验疫苗。相反,“三角 4”疫苗以单一 2mL 剂量给入颈部。

[0214] 在第 0、14、21、35、42、56、63、86、100、107、114、121、128、135、146、160、167、174、181、188、195 和 202 天收集血清用于抗体分析。若个体动物的效价低于检测极限,则指定其效价为 5。

[0215] 图 14 显示 210 天内 F 特异性 IgG 效价。前 63 天内,所述 RNA 复制子通过脂质体在所述牛中具有免疫原性,尽管其相比所述许可疫苗产生更低效价。在第二次剂量之后,所有接种的牛显示 F 特异性抗体,并且效价在第二次剂量后 2 ~ 6 周时间段内十分稳定 (且就所述 RNA 疫苗而言尤其稳定)。直至第 202 天的效价如下：

[0216]

	第0天	3wp1 第21天	2wp2 第35天	5wp2 第56天	~9wp2 第86天	2wp3 第100天	5wp3 第121天	8wp3 第146天	2wp4 第160天	5wp4 第181天	8wp4 第202天
PBS	5	5	5	5	5	5	5	5	46	98	150
脂质体	5	5	12	11	20	768	428	74	20774	7022	2353
三角4	5	5	1784	721	514	3406	2786	336	13376	4775	2133

[0217] RSV 血清中和抗体效价如下：

	第0天	2wp2 第35天	5wp2 第56天	2wp3 第100天	3wp3 第107天	4wp3 第114天	8wp3 第146天	2wp4 第160天	3wp4 第167天	4wp4 第174天
PBS	12	10	10	14	18	20	14	10	10	10
脂质体	13	10	10	20	13	17	13	47	26	21
三角4	12	15	13	39	38	41	13	24	26	15

[0219] 用于第二次脂质体剂量的材料不是新鲜制备的，而在小鼠免疫原性研究中，同批 RNA 显示效能下降。因此，如果在所有接种中使用新鲜材料，所述疫苗可能会具有更强的免疫原性。

[0220] 用补体分析时，检测所有经接种牛内的中和抗体。在该分析中，所有经接种的牛在第二次 RNA 疫苗接种后具有良好中和抗体效价。此外，在第二次疫苗接种后的少数牛中，以及在第三次疫苗接种后的所有牛中检测到所述 RNA 疫苗引起 F 特异性血清 IgG 滴度。

[0221] MF59 作为佐剂的 RSV-F 能够提高所有预先接种牛中的 IgG，并且提高 RNA 预先接种牛的补体依赖性中和效价。

[0222] 大型动物体内 RNA 疫苗的概念验证在由小型动物模型移至较大动物模型和人时，对先前用基于 DNA 的疫苗观察到的效力损失方面特别重要。牛 DNA 疫苗的剂量通常为 0.5-1mg [40, 41]，因此仅由 66 μ g RNA 引起免疫应答是非常鼓舞人心的。

[0223] 脂质体直径的作用

[0224] 为得到较小的脂质体，用在微流芯片上通道内混合脂质和 RNA 溶液的方法替代注射器/管方法。

[0225] 在乙醇中配制新鲜的脂质储液。称量 37mg DlinDMA、11.8mg DSPC、27.8mg 胆固醇和 8.07mg PEG-DMG，并在 7.55mL 乙醇中溶解。在 37 $^{\circ}$ C 温和摇晃新鲜配制的脂质储液约 15 分钟以形成均质混合物。然后，将 226.7 μ L 所述储液加入 1.773mL 乙醇中形成 2mL 工作脂质储液。还由 100mM 柠檬酸盐缓冲液 (pH6) 中约 1 μ g/ μ L 储液配制 4mL RNA 工作溶液。四个 20mL 玻璃小瓶（带搅拌棒）用 RNA 酶清除液冲洗并用足量的 MilliQ 水清洗，然

后用于去除瓶子的 RNA 酶污染。将所述玻璃小瓶中的两个用于所述 RNA 工作溶液（每瓶中 2mL），而其它的小瓶用于收集所述脂质和 RNA 混合物。在 37° C 加热所述工作脂质和 RNA 溶液 10min，然后将其加载入 3cc 鲁尔锁（luer-lok）注射器。用 0.03 英寸 ID×1/16 英寸 OD 的 PTFE 管（希瑞司公司（Syrris）），采用 4 轨边缘连接器，将含有 RNA 和所述脂质的注射器连接至 Mitos 液滴连接芯片（Mitos Droplet junction Chip）（获自希瑞司公司（Syrris）的玻璃微流体装置，部件编号 3000158）。由注射泵驱动两股 RNA 流和一股脂质流，并在所述芯片的 X 连接处（100 μm×105 μm）完成乙醇和水相的混合。所有三股流的流速保持在 1.5mL/min，从而总体水与乙醇流速比是 2:1。设置所述管出口以收集所述混合物于 20mL 玻璃小瓶中（同时搅拌）。取出搅拌棒并使乙醇 / 水溶液室温平衡 1 小时。然后，将所述混合物加载入 5cc 注射器，所述注射器与一段 0.03 英寸 ID×1/16 英寸 OD 的 PTFE 管拟合，而在另一个有等长 PTFE 管的 5cc 注射器中加载入等体积的 100mM 柠檬酸盐缓冲液（pH6）。用注射泵以 3mL/min 的流速驱动所述两个注射器，并收集最终混合物至 20mL 玻璃小瓶（同时搅拌）内。其次，将脂质体浓缩至 2mL，并在回收终产物之前用 TFF 系统相对 10 ~ 15 体积的 1×PBS 透析。使用具有 100kDa 孔径截止值和 20cm² 表面积的中空纤维过滤膜。对于体外和体内实验，用 1×PBS 将制剂稀释到所需的 RNA 浓度。

[0226] 用所述注射器 / 管方法通过 75 μg RNA 制备的脂质体的 Z 均直径是 148nm，其多分散指数是 0.122，而由所述芯片混合方法所得的脂质体的 Z 均直径是 97nm，其多分散指数是 0.086。包封 RNA 的比例由 90% 略微降至 87%。使用 ZetasizerNano ZS（马文仪器公司（Malvern Instruments），英国伍斯特郡），根据生产商说明书测量所述直径和多分散指数。测量前，脂质体在 1×PBS 中稀释。

[0227] 在第 0 天，通过肌肉内注射（50 μl / 腿）将所述脂质体给予 8-10 周龄的 BALB/c 小鼠。在第 1 天和第 3 天实施眼眶窦抽血，在第 6 天实施终末抽血。由化学发光分析检测血清 SEAP 水平。如图 3 所示，所述较小脂质体在第 1 天使 SEAP 水平增加约两倍，在第 6 天增加约五倍。

[0228] 还就递送编码全长 RSV-F 蛋白的复制子评估了由两种不同方法制备的脂质体。检测第 0 和 21 天肌肉内免疫接种后每组 8 只小鼠的 F 特异性血清 IgG 效价。在第 14 天（2wp1）和 35 天（2wp2）收集血清用于抗体分析。若个体动物效价 <25（检测界限），则指定其效价为 5。数据以每组的几何平均效价显示如下：

[0229]

制剂	裸露	注射器 / 管脂质体	芯片脂质体
2wp1 GMT	35	2421	4695
2wp2 GMT	457	10757	19773

[0230] 因此，较小的芯片混合脂质体在 2wp1 和 2wp2 产生高约 2 倍的 GMT。

[0231] 还使用各种具有不同直径的不同脂质体来递送编码全长 RSV F 蛋白的复制子。在图 15 中，第一剂量后两周针对 F 蛋白的总 IgG 效价相对脂质体直径作图。

[0232] 脂质体制造方法

[0233] 总的来说，根据本发明用 8 种不同方法制备脂质体。这些在本文中称作方法 (A) ~

(H) 而它们主要在过滤和 TFF 步骤方面有所不同。细节如下：

[0234] (A) 在乙醇中制备新鲜的脂质储液。称量 37mg DlinDMA、11.8mg DSPC、27.8mg 胆固醇和 8.07mg PEG DMG 2000 并溶于 7.55mL 乙醇中。在 37° C 温和摇晃新鲜制备的脂质储液约 15 分钟以形成均质混合物。然后将 755 μ L 所述储液加入 1.245mL 乙醇中形成 2mL 工作脂质储液。使用这个量的脂质和 250 μ g RNA 来形成脂质体。还从 100mM 柠檬酸盐缓冲液 (pH6) 中约 1 μ g/ μ L 储液制备 2mL RNA 工作液。3 个 20mL 的玻璃小瓶 (带搅拌棒) 用 RNA 酶清除液 (MBP 公司 (Molecular BioProducts), 加利福尼亚州圣地亚哥) 冲洗并用大量 MilliQ 水清洗, 然后用于去除瓶的 RNA 酶污染。所述瓶之一用于所述 RNA 工作液, 其他的用于收集所述脂质和 RNA 混合物 (如下所述)。在加载入 3cc 鲁尔锁注射器之前, 使所述工作脂质和 RNA 溶液在 37° C 加热 10 分钟。2mL 柠檬酸盐缓冲液 (pH6) 加入另一 3cc 注射器中。使用 FEP 管 ([氟化乙烯-丙烯]; FEP 管具有 2mm ID $\times$ 3mm OD, 由艺达思健康科学公司 (Idex Health Science) 供应) 将含有 RNA 和所述脂质的注射器连接至 T 型混合器 (PEEK™500 μ m ID 接头, 华盛顿州奥克港的艺达思健康科学公司 (Idex Health Science))。所述 T 型混合器的出口也装有 FEP 管。使含有所述柠檬酸盐缓冲液的第三个注射器连接至一段分离的 FEP 管。然后, 用注射泵以 7mL/min 的流速驱动所有注射器。所述管出口放置成将所述混合物收集到 20mL 玻璃瓶 (同时搅拌) 中。取出搅拌棒并使乙醇/水溶液室温平衡 1 小时。将 4mL 所述混合物加载入连接至一段 FEP 管的 5cc 注射器, 将等量的 100mM 柠檬酸盐缓冲液 (pH6) 加载入连接等长 FEP 管的另一个 5cc 注射器。用注射泵以 7mL/分钟的流速驱动所述两个注射器, 并将最终混合物收集到 20mL 玻璃瓶中 (同时搅拌)。其次, 第二混合步骤 (脂质体) 收集的混合物穿过 Mustang Q 膜 (结合并移除阴离子分子的阴离子交换支持物, 获自美国密歇根州安娜堡的波乐公司 (Pall Corporation))。穿过所述脂质体前, 4mL 的 1M NaOH、4mL 的 1M NaCl 和 10mL 的 100mM 柠檬酸盐缓冲液 (pH6) 依次通过所述 Mustang 膜。在通过所述膜之前, 脂质体在 37° C 加温 10 分钟。接着, 将脂质体浓缩至 2mL, 并在回收终产物之前用 10 ~ 15 体积的 1 $\times$ PBS 通过 TFF 透析。所述 TFF 系统和中空纤维过滤膜购自斯派实验室 (Spectrum Labs) 并按照生产商指导使用。使用具有 100kD 孔径截止值和 8cm² 表面积的聚砜中空纤维过滤膜 (部件编号 P/N:X1AB-100-20P)。对于体外和体内实验, 制剂用 1 $\times$ PBS 稀释到所需的 RNA 浓度。

[0235] (B) 同方法 (A), 除了在摇晃后, 向 1.773mL 乙醇添加 226.7 μ L 所述储液以制备 2mL 工作脂质储液, 因而改变了所述脂质:RNA 比例。

[0236] (C) 同方法 (B), 除了省去所述 Mustang 过滤, 因此脂质体从 20mL 玻璃小瓶进入 TFF 透析。

[0237] (D) 同方法 (C), 除了 TFF 使用具有 100kD 孔径截止值和 20cm² 表面积的聚醚砜 (PES) 中空纤维膜 (部件编号 P-C1-100E-100-01N)。

[0238] (E) 同方法 (D), 除了使用 Mustang 膜, 如方法 (A) 中所用。

[0239] (F) 同方法 (A), 除了省去所述 Mustang 过滤, 因此脂质体从 20mL 玻璃小瓶进入 TFF 透析。

[0240] (G) 同方法 (D), 除了从 100mM 柠檬酸盐缓冲液 (pH6) 中约 11 μ g/ μ L 储液制备 4mL RNA 工作溶液。然后, 以同样方式准备 4 个 20mL 玻璃小瓶。其中两个用于 RNA 工作溶液 (每瓶 2mL), 其它的用于收集所述脂质和 RNA 混合物, 如方法 (C)。将含有 RNA 和所述脂

质的注射器用 PTFE 管 (0.03 英寸内径 $\times$ 1/16 英寸外径) 通过 4 通道边缘连接器 (希瑞司公司 (Syrris)) 连接至 Mitos 液滴连接芯片 (获自希瑞司公司 (Syrris) 的玻璃微流体装置, 部件编号 3000158), 而不是使用 T 型混合器。由注射泵驱动两股 RNA 流和一股脂质流, 在所述芯片的 X 连接 ($100\ \mu\text{m} \times 105\ \mu\text{m}$) 处完成所述乙醇和水相的混合。所有三股流的流速保持在 $1.5\text{mL}/\text{min}$, 从而总体水和乙醇的流速比是 2:1。设置所述管出口以将所述混合物收集至 20mL 玻璃小瓶 (同时搅拌) 内。取出所述搅拌棒, 使所述乙醇 / 水溶液平衡至室温 1 小时。然后, 将所述混合物加载入拟合另一段 PTFE 管的 5cc 注射器, 在带有等长 PTFE 管的另一个 5cc 注射器中加载入等体积的 100mM 柠檬酸盐缓冲液 (pH6)。用注射泵以 $3\text{mL}/\text{min}$ 的流速驱动所述两个注射器, 并将最终混合物收集到 20mL 玻璃小瓶 (同时搅拌) 内。其次, 将脂质体浓缩至 2mL, 并如方法 (D) 中所述, 用 10 ~ 15 体积的 $1\times\text{PBS}$ 通过 TFF 透析。

[0241] (H) 同方法 (A), 除了由混合 $120.9\ \mu\text{L}$ 的所述脂质储液和 1.879mL 乙醇来制备 2mL 工作脂质储液。并且, 在 T 型混合器中混合后, 将来自 20mL 小瓶的脂质体加载入 Pierce Slide-A-Lyzer 透析盒 (赛默飞科技公司 (Thermo Scientific), 加强型, $0.5 \sim 3\text{mL}$ 容量), 并在回收终产物之前, 用 $400 \sim 500\text{mL}$ $1\times\text{PBS}$ 在塑料高压处理容器中 4°C 过夜透析。

[0242] RSV 免疫原性

[0243] 在第 0 天和第 21 天, 以单独复制子 ($1\ \mu\text{g}$) 或制成脂质体的形式对每组 4 或 8 只 BALB/c 小鼠通过双侧肌肉疫苗接种 ($50\ \mu\text{L}/\text{腿}$) 给予所述编码 RSV F 蛋白的 vA317 自复制型复制子, 所述脂质体有 DlinDMA (“RV01”) 或 DOTAP (“RV13”) 或图 16A ~ 16M 所示脂质 (“RV05”)。所述 RV01 脂质体有 40%DlinDMA、10%DSPC、48%胆固醇和 2%PEG-DMG, 但 RNA 量不同。所述 RV05 脂质体有 40%RV05、10%DSPC、48%胆固醇和 2%PEG-DMG, 或 60%RV05、38%胆固醇和 2%PEG-DMG。所述 RV13 脂质体有 40%DOTAP、10%DOPE、48%胆固醇和 2%PEG-DMG。出于比较, 用电穿孔或用 RV01 (10) 脂质体 ($0.1\ \mu\text{g}$ DNA) 递送表达相同 RSV-F 抗原的裸露质粒 DNA ($20\ \mu\text{g}$)。使用四只小鼠作为未处理对照组。

[0244] 由方法 (A) 或方法 (B) 制备脂质体。对于由方法 (A) 制备的一些脂质体, RNA 用量增倍或减半。Z 均直径和多分散指数是:

[0245]

RV	Zav (nm)	pdI	制备方法
RV01 (10)	158.6	0.088	(A)
RV01 (08)	156.8	0.144	(A)
RV01 (05)	136.5	0.136	(B)
RV01 (09)	153.2	0.067	(A)
RV01 (10)	134.7	0.147	(A)
RV05 (01)	148	0.127	(A)
RV05 (02)	177.2	0.136	(A)
RV13 (02)	128.3	0.179	(A)

[0246] 在第 14、36 和 49 天收集血清用于抗体分析。在第 49 天收集小鼠的脾用于 T 细胞分析。

[0247] F 特异性血清 IgG 效价 (GMT) 如下：

[0248]

RV	第 14 天	第 36 天
裸露 DNA 质粒	439	6712
裸露 A317 RNA	78	2291
RV01(10)	3020	26170
RV01(08)	2326	9720
RV01(05)	5352	54907
RV01(09)	4428	51316
RV05(01)	1356	5346
RV05(02)	961	6915
RV01(10)DNA	5	13
RV13(02)	644	3616

[0249] 细胞因子呈阳性且对 RSV F51-66 肽特异的 T 细胞比例如下,仅显示统计上显著大于 0 的数字：

[0250]

RV	CD4+CD8-				CD4-CD8+			
	IFN γ	IL2	IL5	TNF α	IFN γ	IL2	IL5	TNF α
裸露DNA质粒	0.04	0.07		0.10	0.57	0.29		0.66
裸露A317 RNA	0.04	0.05		0.08	0.57	0.23		0.67
RV01 (10)	0.07	0.10		0.13	1.30	0.59		1.32
RV01 (08)	0.02	0.04		0.06	0.46	0.30		0.51
RV01 (05)	0.08	0.12		0.15	1.90	0.68		1.94
RV01 (09)	0.06	0.08		0.09	1.62	0.67		1.71
RV01 (10) DNA				0.03				0.08
RV13 (02)	0.03	0.04		0.06	1.15	0.41		1.18

[0251] 因此,如增加的F特异性IgG效价和T细胞频率所确定,所述脂质体制剂相对裸露的RNA对照显著增强了免疫原性。用脂质体制剂、或用电穿孔以裸露形式递送的质粒DNA的免疫原性显著少于脂质体制剂的自复制RNA。

[0252] 通过方法(H)制备其他RV01脂质体,使用偶联DMG的短(2kDa)或长(5kDa)PEG,包封150 μ g RNA(编码RSV表面融合糖蛋白的vA375复制子)或仅包封缓冲液。因此,这些脂质体有40% DlinDMA、10% DSPC、48%胆固醇和2%PEG-DMG。尺寸和包封如下:

[0253]

RV	PEG	Zav (nm)	pDI	RNA	包封 ⁿ
RV01 (36)	2kDa	152.1	0.053	+	92.5%
RV01 (36)	2kDa	144	0.13	-	-
RV01 (43)	5kDa	134	0.136	+	71.6%
RV01 (43)	5kDa	130.3	0.178	-	-

[0254] 在第0和21天通过双侧肌肉注射(50 μ l/腿)将所述脂质体给予BALB/c小鼠(每组10只)。剂量是0.01、0.03、0.1、0.3或1 μ g。第一次或第二次注射之后两周的F特异性血清IgG和PRNT60效价(GMT)如下:

[0255]

RV	RNA (μg)	2wp1	2wp2	PRNT60 (2wp2)
缓冲液对照	0	—	—	10
RV01 (36)	0	—	—	10
RV01 (36)	0.01	3399	50691	37
RV01 (36)	0.03	3446	53463	83
RV01 (36)	0.1	8262	76808	238
RV01 (36)	0.3	5913	82599	512
RV01 (36)	1	8213	85138	441
RV01 (43)	0	—	—	10
RV01 (43)	0.01	3959	37025	51
RV01 (43)	0.03	5842	50763	180
RV01 (43)	0.1	7559	122555	314
RV01 (43)	0.3	5712	126619	689
RV01 (43)	1	9434	199991	1055

[0256] 脂质体—包封要求

[0257] 如上所述,参考图 10,包封对有效表达是必要的。进一步实验使用三种不同的 RNA:(i) 表达 RSV-F(即,RSV 的表面融合糖蛋白)的“vA317”复制子;(ii) 表达 GFP 的“vA17”复制子;和(iii) 复制缺陷型且编码 GFP 的“vA336”。以裸露形式或由方法(D)制备的脂质体形式递送 RNA。由方法(D)制备空脂质体,但没有任何 RNA。脂质体制剂有以下这些特点:

[0258]

RNA	粒径 Zav(nm)	多分散性	RNA 包封
vA317	155.7	0.113	86.6%
vA17	148.4	0.139	92%
vA336	145.1	0.143	92.9%
空	147.9	0.147	—

[0259] 在第 0 和 21 天对每组 5 只 BALB/c 小鼠给予双侧肌肉内疫苗接种 (50 μL/腿),使用

以下制剂：

[0260] 第 1 组 裸露的自复制 RSV-FRNA (vA317, 0.1 μ g)

[0261] 第 2 组 包封在脂质体中的自复制 RSV-FRNA (vA317, 0.1 μ g)

[0262] 第 3 组 添加至空脂质体的自复制 RSV-FRNA (vA317, 0.1 μ g)

[0263] 第 4 组 F 亚基蛋白 (5 μ g)

[0264] 在第 14、35 和 51 天收集血清用于抗体分析。检测 F 特异性的特定血清 IgG 效价 (GMT)；若个体动物的效价 <25 (检测极限)，则指定效价为 5。此外，在第 51 天从小鼠收集脾用于 T 细胞分析，以测定哪些细胞是细胞因子阳性且对 RSVF51-66 肽 (CD4+) 或 RSV F 肽 F85-93 和 F249-258 (CD8+) 特异。

[0265] 在所述 10 组小鼠和未免疫对照小鼠中的 IgG 效价如下：

[0266]

天数	1	2	3	4	-
14	22	1819	5	5	5
35	290	32533	9	19877	5
51	463	30511	18	20853	5

[0267] 第 51 天的 RSV 血清中和效价如下：

[0268]

天数	1	2	3	4
51	35	50	24	38

[0269] 在第 51 天，显示 RSV F 特异性 CD4+ 脾 T 细胞的动物如下，其中，仅当所述受刺激反应在统计上显著大于 0 时给出数字 (% 阳性细胞)：

[0270]

细胞因子	1	2	3	4
IFN- γ		0.04		
IL2	0.02	0.06		0.02
IL5				
TNF α	0.03	0.05		

[0271] 在第 51 天，显示 RSV F 特异性 CD8+ 脾 T 细胞的动物如下，其中仅当所述受刺激反应在统计上显著大于 0 时给出数字：

[0272]

细胞因子	1	2	3	4
IFN- γ	0.37	0.87		
IL2	0.11	0.40		0.04
IL5				
TNF α	0.29	0.79		0.06

[0273] 由于 RNA 和所述脂质体的简单混合（第 3 组）不具免疫原性（实际上，免疫原性低于裸露 RNA），因而所述脂质体内的 RNA 包封对高免疫原性而言是必要的。

[0274] 有 ν A317 RSV 复制子的不同阳离子脂质

[0275] 进一步实验比较四种不同阳离子脂质（DlinDMA、RV02、RV04 和 RV07）。所有脂质体包含 2%PEG-DMG 2000，但剩余的脂质成分不同。所述成分和物理特点如下：

[0276]

名称	脂质1	其它脂质	Zav 直径(nm)	pdI	%包封n
A	DlinDMA , 40%	10% DSPC、48% 胆固醇	158.6	0.088	90.7
B	RV02, 40%	10% DSPC、48% 胆固醇	146.8	0.084	97.5
C	RV04, 40%	10% DSPC、48% 胆固醇	136.7	0.165	67.3
D	RV04, 60%	38% 胆固醇	176.3	0.157	55.2
E	RV07, 40%	10% DSPC、48% 胆固醇	144.9	0.204	82
F	RV07, 60%	38% 胆固醇	124.1	0.195	80

[0277] 在第 0 和 21 天将裸露复制子 ($1 \mu\text{g}$) 或 $0.1 \mu\text{g}$ 包封的 RNA 由双侧肌内疫苗接种 ($50 \mu\text{L}/\text{腿}$) 给予每组 8 只 BALB/c 小鼠。这两种注射后两周的 F 特异性血清 IgG 效价 (GMT) 如下：

[0278]

脂质体	第 14 天	第 35 天
裸露的 A317 RNA	111	469
A	1834	30519
B	1050	5681

C	430	4127
D	779	4693
E	586	6424
F	121	2568

[0279] 对于 RV07, 缺失 DSPC 引起免疫原性大幅降低。

[0280] 以相同方式测试更多脂质 (RV03, RV08, RV09, RV14[42]) :

[0281]

名称	脂质 1	其它脂质	Zav 直径 (nm)	pDI	% 包封 ⁿ
G	DlinDMA, 40%	10%DSPC、48% 胆固醇	158. 6	0. 088	90. 7
H	RV03, 40%	10%DSPC、48% 胆固醇	150. 3	0. 188	83. 1
I	RV03, 60%	38% 胆固醇	161. 1	0. 239	68. 4
J	RV08, 40%	10%DSPC、48% 胆固醇	191. 1	0. 227	51. 7
K	RV09, 40%	10%DSPC、48% 胆固醇	161. 6	0. 209	64. 5
L	RV09, 60%	38% 胆固醇	170. 7	0. 121	82. 4
M	RV14, 60%	30%DSPC	155. 5	0. 238	63. 3
N	RV01, 40%	10%DSPC、48% 胆固醇	96. 14	0. 087	92

[0282]

脂质体	第 14 天	第 35 天
裸露的 A317 RNA	35	457
G	2421	10757
H	15	52
I	16	85
J	991	1921
K	1082	1421
L	146	286

M	27	212
N	4695	19773

[0283] 脂质体 M(有 DC-胆固醇)表现不佳,甚至低于裸露的 RNA 对照。相反,剩余阳离子脂质给出有用结果。通过不同的混合方法(用微流体芯片的方法(G))从脂质体 G(方法(D))制备脂质体 N,而该较小脂质体用大致相同包封产生良好结果。

[0284] 以相同方式测试更多脂质(RV01、RV10、RV11、RV15):

[0285]

名称	脂质 1	其它脂质	Zav 直径 (nm)	pDI	% 包封 ⁿ
P	DLinDMA, 40%	10%DSPC、48% 胆固醇	158.6	0.088	90.7
Q	RV10, 40%	10%DSPC、48% 胆固醇	123.6	0.14	80.3
R	RV11, 40%	10%DSPC、48% 胆固醇	137.1	0.155	81
S	RV11, 60%	38% 胆固醇	135.4	0.175	79.7
T	RV15, 40%	38% 胆固醇	111	0.167	76.4

[0286]

脂质体	第 14 天	第 35 天
裸露的 A317 RNA	185	982
P	2787	27416
Q	24	161
R	633	1715
S	405	2733
T	761	2459

[0287] 除脂质体 Q 以外,这些脂质体中每一种都性能优于对照。脂质体 Q 中 RV10 脂质的 pKa 是 7.86,该数值看来对体内使用而言过高。然而即使落在 5.0 ~ 7.6 的有用 pKa 范围内,尽管结果良好,但没有具有一个烷基尾部和一个含类固醇头部的脂质给出与 RV01 一样的结果。

[0288] 采用 RV05 制备更多脂质体。所述脂质体都有 40%RV05 和 2%PEG 化脂质,但剩余成分不同(尽管总是包含胆固醇)。物理特征如下:

[0289]

名称	PEG化脂质	其它组分	Zav (nm)	pdl	%包封 ⁿ
U	DMG	10% DSPC、48%	102.2	0.12	76.81
V	胆固醇	10% DSPC、46%胆固醇、2% α GC	103.7	0.107	72.58
W	DMG	10% DPyPE、48%胆固醇	99.6	0.115	78.34
X	DMG	10% 18:3 PC、48%胆固醇	130	0.14	87.92
Y	DMG	10% 18:2 PC、48%胆固醇	101.1	0.133	76.64
Z	DMG	30% 18:2 PC、28%胆固醇	134.3	0.158	57.76

[0290] α GC = α - 半乳糖苷神经酰胺

[0291] 如前所述测试 BALB/c 小鼠：

[0292]

注射	第 14 天	第 35 天
裸露 RNA	321	915
U	551	955
V	342	2531
W	1127	3881
X	364	1741
Y	567	5679
Z	1251	5303

[0293] 对于具有不对称脂质尾部（烷基 + 胆固醇）的阳离子脂质而言，将中性脂质从 DSPC（饱和 C18 脂质尾部）改变至 18:2 或 18:3PC（每个尾部有 2 和 3 个不饱和双键）可增加总 IgG 效价。通过用 DPyPE 替代 DSPC，观察到相当的结果。

[0294] 有 vA317 RSV 复制子的更多不同阳离子脂质

[0295] 也使用参考文献 43 中公开的阳离子脂质来制备 vA317 复制子的脂质体。这些阳离子脂质的 pKa 为 5.8–6.1。为了比较，也测试 DODMA、DlinDMA 和 DOTMA。阳离子脂质始终以 40% 存在。所有脂质体包含胆固醇和 2%PEG 化 DMG (PEG2000, 除了含有 PEG5000 的脂质体 E) 并由方法 (H) 制备。物理特征如下：

[0296]

	阳离子脂质	其它脂质	Zav (nm)	pdl	%包封 ^a
A	DlinDMA	10% DSPC、48%胆固醇	122.3	0.068	95.23
B	RV16	10% DSPC、48%胆固醇	148.5	0.088	69.34
C	RV17	10% DSPC、48%胆固醇	138	0.098	67.99
D	DODMA	10% DSPC、48%胆固醇	107.4	0.151	96.61
E	DlinDMA	10% DSPC、48%胆固醇	106.1	0.136	61.61
F	DOTMA	10% DSPC、48%胆固醇	89.32	0.164	98.87
G	DlinDMA	10% 18:2 PC、48% 胆固醇	115.8	0.111	95.67
H	DlinDMA	10% LPC、48%胆固醇	116.7	0.143	94.84
I	DlinDMA	10% DPyPE、48% 胆固醇	134	0.163	96.33
J	RV05	10% 18:2 PC、8%胆固醇、40% DPyPE	124.7	0.17	61.51

[0297] 如前所述用这些脂质体接种 BALB/c 小鼠。F 特异性血清 IgG 效价 (GMT) 如下：

[0298]

组	第 14 天	第 35 天
裸露 RNA	28	721
A	2237	12407
B	1107	13981
C	2109	22147
D	2175	24881
E	5654	39927
F	285	6362
G	1058	3467
H	1475	10211
I	557	1363
J	703	1732

[0299] 因此,所述 RV05 脂质体比裸露 RNA 更具免疫原性,但其免疫原性低于 RV01 脂质

体。

[0300] 在第 49 天收集脾用于 T 细胞分析。所有脂质体给出统计上显著大于 0 的 F 特异性细胞因子阳性 T 细胞频率 (CD4⁺ 和 CD8⁺)。

[0301] 不同脂质和 PEG 长度

[0302] vA317 复制子在脂质体中给予,所述脂质体具有不同 PEG 长度的各种不同脂质。所述脂质体都具有 40%DlinDMA、10%DSPC 和 48%胆固醇,但剩余的 2% 不同,其具有不同 PEG 化脂质 (例如,图 18A ~ 18E) 和不同 PEG 长度。

[0303] 通过方法 (H) 制备的脂质体的物理特征如下:

[0304]

名称	PEG 修饰的脂质	PEG 长度	Zav (nm)	pDI	% 包封 ⁿ
A	DMG	2000	136.3	0.087	85.35
B	DMG	3000	120.9	0.087	72.06
C	DMG	1000	175.9	0.111	92.52
D	图 18A	2000	157.9	0.094	97.44
E	图 18D	2000	122.2	0.122	77.84
F	图 18E	2000	129.8	0.125	82.57
G	胆固醇	2000	122.9	0.087	87.1
H	图 18C	2000	138	0.137	78.48
I	图 18B	2000	113.4	0.091	89.12

[0305] 在第 0 和 21 天用裸露 (1 μg) 或包封形式 (0.1 μg) 的所述复制子由双侧肌内疫苗接种 (50 μL/腿) 给予每组 8 只 BALB/c 小鼠。在第 14 和 35 天收集血清用于抗体分析。

[0306] 二次注射后两周 (2wp1) 的 F 特异性血清 IgG 效价 (GMT) 如下:

[0307]

RV	2wp1	2wp2
裸露 RNA	216	1356
A	3271	15659
B	3860	22378
C	1691	7412
D	1025	1767

E	1618	9536
F	2684	11221
G	3514	10566
H	4142	22810
I	952	10410

[0308] 结果显示的趋势表明,PEG 头部基团的分子量越大,其免疫原性越高。由于 DMG 偶联 PEG 的长度由 1000Da 增加至 3000Da,2wp2 F 特异性 IgG 效价由 7412 增加至 15659 到 22378。

[0309] 改变酯与酯的连接区域基本不影响所述效价。并且,对于相同的头部基团 (2000) 分子量而言,其趋势为所述脂质尾部的长度增加使所述效价降低 (有 C14 二烷基的 H 相比有 C18 二烷基的 I)。用胆固醇替代 PEG 二烷基脂质尾部对免疫原性几乎没有影响 (有 DMG 的 A 相比有胆固醇的 G)。

[0310] 采用不同脂质进行相似实验,其中所述 2kDa PEG 分裂成 2×1 kDa 基团 (图 17)。在第 0 和 21 天,再次使用所述 vA317 复制子以 $1 \mu\text{g}$ 裸露 RNA 形式或 $0.1 \mu\text{g}$ 脂质体包封的 RNA 形式由双侧肌内疫苗接种 ($50 \mu\text{L}$ /腿) 给予每组 8 只 BALB/c 小鼠。所述脂质体都具有 40% 阳离子脂质 (DlinDMA)、10%DSPC 和 48% 胆固醇,但剩余的 2% 不同,有不同 PEG 化脂质 (但都具有 2kDa PEG)。所述脂质体由方法 (H) 制备。

[0311] 所述脂质体的物理特征如下:

[0312]

名称	PEG 化脂质	Zav (nm)	pdI	% 包封 ⁿ
A	DMG	121	0.101	84.84
B	分裂 ;R=C14 饱和	141.3	0.049	95.41
C	分裂 ;R=C16 饱和	114.6	0.101	96.79
D	分裂 ;R=C18 饱和	116.5	0.088	98.63
E	分裂 ;R=C18、1 不饱和	129.4	0.149	93.37

[0313] 采用 RV05 制备其它脂质体。所述脂质体都具有 40% 阳离子脂质 (RV05) 和 2%PEG 化脂质 (2kDa PEG),但剩余成分不同 (尽管总是包括胆固醇)。脂质体由方法 (H) 制备,但 pH 为 5。物理特征如下:

[0314]

名称	PEG化脂质	其它组分	Zav (nm)	pdl	%包封 ^a
F	DMG	10% DSPC、48% 胆固醇	102.2	0.12	76.81
G	胆固醇	10% DSPC、46% 胆固醇、2% α GC	103.7	0.107	72.58
H	DMG	10% DPyPE、48% 胆固醇	99.6	0.115	78.34
I	DMG	10% 18:3 PC、48% 胆固醇	130	0.14	87.92
J	DMG	10% 18:2 PC、48% 胆固醇	101.1	0.133	76.64
K	DMG	30% 18:2 PC、28% 胆固醇	134.3	0.158	57.76

[0315] α GC = α - 半乳糖苷神经酰胺

[0316] 在第 0 和 21 天用所述复制子以裸露 (1 μ g) 或包封形式 (0.1 μ g) 由双侧肌内疫苗接种 (50 μ L/腿) 给予每组 8 只 BALB/c 小鼠。在第 14 和 35 天收集血清用于抗体分析。二次注射后两周 (2wp1) 的 F 特异性血清 IgG 效价 (GMT) 如下：

[0317]

RV	2wp1	2wp2
裸露 RNA	321	915
A	2761	17040
B	866	3657
C	1734	5209
D	426	2079
E	2696	15794
F	551	955
G	342	2531
H	1127	3881
I	364	1741
J	567	5679
K	1251	5303

[0318] 裂解 PEG 头部基团从而降低体内效价。在所述 PEG 脂质尾部内包含双键 (1 个不饱和度 / 烷基尾部) 使 IgG 效价在第 14 天增加 6 倍, 在第 35 天增加 7 倍。对于具有不对

称脂质尾部（烷基+胆固醇）的阳离子脂质而言，将中性脂质从 DSPC（饱和 C18 脂质尾部）改变至 18:2 或 18:3PC（每条尾部具有 2 和 3 个不饱和双键）使总 IgG 效价增高。用 DPyPE 替代 DSPC 观察到相当的结果。

[0319] CMV 免疫原性

[0320] 使用以 DlinDMA 作为阳离子脂质的 RV01 脂质体递送编码巨细胞病毒（CMV）糖蛋白的 RNA 复制子。“vA160”复制子编码全长糖蛋白 H 和 L（gH/gL），而“vA322”复制子编码可溶形式（gHsol/gL）。所述两种蛋白质受控于单一复制子内的分离亚基因组启动子；同时给予两个分开的载体没有产生良好结果，其中一个载体编码 gH 且一个编码 gL。

[0321] 在第 0 天、第 21 天和第 42 天为 BALB/c 小鼠（10 只/组）双侧肌内免疫接种（50 μ L/腿）表达 gH/gL 的 VRP（ 1×10^6 IU）、表达 gHsol/gL 的 VRP（ 1×10^6 IU）和作为对照的 PBS。两个测试组接受脂质体（40%DlinDMA、10%DSPC、48%胆固醇、2%PEG-DMG；用方法（D）制备，但用 150 μ g RNA 批量大小）中配制的 1 μ g vA160 或 vA322 复制子。

[0322] 所述 vA160 脂质体具有 168nm 的 Z_{av} 直径，0.144 的 pdI，87.4% 包封。所述 vA322 脂质体具有 162nm 的 Z_{av} 直径，0.131 的 pdI，90% 包封。

[0323] 所述复制子能从单一载体表达两种蛋白质。

[0324] 在第 63 天（3wp3）收集血清用于免疫学分析。CMV 中和效价（使每孔阳性病毒灶数量减少 50% 的血清稀释度的倒数，相对于对照组）如下所示：

[0325]

gH/gL VRP	gHsol/gL VRP	gH/gL 脂质体	gHsol/gL 脂质体
4576	2393	4240	10062

[0326] RNA 表达全长或可溶形式的 CMV gH/gL 复合体，从而引起高效价的中和抗体，如上皮细胞所测。由脂质体包封 RNA 引起的平均效价至少与相应的 VRP 一样高。

[0327] 重复实验证实，所述复制子能表达来自单一载体的两种蛋白。所述 RNA 复制子给出的 3wp3 效价是 11457，相比之下 VRP 为 5516。

[0328] 应理解，仅以举例的方式描述了本发明，在本发明的范围和构思内可对之进行修改。

[0329] 表 1：有用的磷脂

[0330] DDPC 1,2-二癸酰-sn-甘油-3-磷脂酰胆碱

[0331] DEPA 1,2-二芥酰-sn-甘油-3-磷酸酯

[0332] DEPC 1,2-芥酰-sn-甘油-3-磷脂酰胆碱

[0333] DEPE 1,2-二芥酰-sn-甘油-3-磷脂酰乙醇胺

[0334] DEPG 1,2-二芥酰-sn-甘油-3-[磷脂酰-外消旋-(1-甘油...)]

[0335] DLOPC 1,2-亚麻酰-sn-甘油-3-磷脂酰胆碱

[0336] DLPA 1,2-二月桂酰-sn-甘油-3-磷酸酯

[0337] DLPC 1,2-二月桂酰-sn-甘油-3-磷脂酰胆碱

[0338] DLPE 1,2-二月桂酰-sn-甘油-3-磷脂酰乙醇胺

[0339] DLPG 1,2-二月桂酰-sn-甘油-3-[磷脂酰-外消旋-(1-甘油...)]

[0340] DLPS 1,2-二月桂酰-sn-甘油-3-磷脂酰丝氨酸

- [0341] DMG 1, 2- 二肉豆蔻酰 -sn- 甘油 -3- 磷酸乙醇胺
- [0342] DMPA 1, 2- 二肉豆蔻酰 -sn- 甘油 -3- 磷酸酯
- [0343] DMPC 1, 2- 二肉豆蔻酰 -sn- 甘油 -3- 磷脂酰胆碱
- [0344] DMPE 1, 2- 二肉豆蔻酰 -sn- 甘油 -3- 磷脂酰乙醇胺
- [0345] DMPG 1, 2- 肉豆蔻酰 -sn- 甘油 -3-[磷脂酰 - 外消旋 -(1- 甘油...)
- [0346] DMPS 1, 2- 二肉豆蔻酰 -sn- 甘油 -3- 磷脂酰丝氨酸
- [0347] DOPA 1, 2- 二油酰 -sn- 甘油 -3- 磷酸酯
- [0348] DOPC 1, 2- 二油酰 -sn- 甘油 -3- 磷脂酰胆碱
- [0349] DOPE 1, 2- 二油酰 -sn- 甘油 -3- 磷脂酰乙醇胺
- [0350] DOPG 1, 2- 二油酰 -sn- 甘油 -3-[磷脂酰 - 外消旋 -(1- 甘油...)
- [0351] DOPS 1, 2- 二油酰 -sn- 甘油 -3- 磷脂酰丝氨酸
- [0352] DPPA 1, 2- 二棕榈酰 -sn- 甘油 -3- 磷酸酯
- [0353] DPPC 1, 2- 二棕榈酰 -sn- 甘油 -3- 磷脂酰胆碱
- [0354] DPPE 1, 2- 二棕榈酰 -sn- 甘油 -3- 磷脂酰乙醇胺
- [0355] DPPG 1, 2- 二棕榈酰 -sn- 甘油 -3-[磷脂酰 - 外消旋 -(1- 甘油...)
- [0356] DPPS 1, 2- 二棕榈酰 -sn- 甘油 -3- 磷脂酰丝氨酸
- [0357] DPyPE 1, 2- 二植烷酰 -sn- 甘油 -3- 磷脂酰乙醇胺
- [0358] DSPA 1, 2- 二硬脂酰 -sn- 甘油 -3- 磷酸酯
- [0359] DSPC 1, 2- 二硬脂酰 -sn- 甘油 -3- 磷脂酰胆碱
- [0360] DSPE 1, 2- 二硬脂酰 (Diostearpyl)-sn- 甘油 -3- 磷脂酰乙醇胺
- [0361] DSPG 1, 2- 二硬脂酰 -sn- 甘油 -3-[磷脂酰 - 外消旋 -(1- 甘油...)
- [0362] DSPS 1, 2- 二硬脂酰 -sn- 甘油 -3- 磷脂酰丝氨酸
- [0363] EPC 蛋 -PC
- [0364] HEPC 氢化蛋 PC
- [0365] HSPC 高纯度氢化大豆 PC
- [0366] HSPC 氢化大豆 PC
- [0367] LYSOPC MYRISTIC 1- 肉豆蔻酰 -sn- 甘油 -3- 磷脂酰胆碱
- [0368] LYSOPC PALMITIC 1- 棕榈酰 -sn- 甘油 -3- 磷脂酰胆碱
- [0369] LYSOPC STEARIC 1- 硬脂酰 -sn- 甘油 -3- 磷脂酰胆碱
- [0370] 乳鞘磷脂 MPPC 1- 肉豆蔻酰, 2- 棕榈酰 -sn- 甘油 3- 磷脂酰胆碱
- [0371] MSPC 1- 肉豆蔻酰, 2- 硬脂酰 -sn- 甘油 -3- 磷脂酰胆碱
- [0372] PMPC 1- 棕榈酰, 2- 肉豆蔻酰 -sn- 甘油 -3- 磷脂酰胆碱
- [0373] POPC 1- 棕榈酰, 2- 油酰 -sn- 甘油 -3- 磷脂酰胆碱
- [0374] POPE 1- 棕榈酰, 2- 油酰 -sn- 甘油 -3- 磷脂酰乙醇胺
- [0375] POPG 1, 2- 二油酰 -sn- 甘油 -3-[磷脂酰 - 外消旋 -(1- 甘油)...]
- [0376] PSPC 1- 棕榈酰, 2- 硬脂酰 -sn- 甘油 -3- 磷脂酰胆碱
- [0377] SMPC 1- 硬脂酰, 2- 肉豆蔻酰 -sn- 甘油 -3- 磷脂酰胆碱
- [0378] SOPC 1- 硬脂酰, 2- 油酰 -sn- 甘油 -3- 磷脂酰胆碱
- [0379] SPPC 1- 硬脂酰, 2- 棕榈酰 -sn- 甘油 -3- 磷脂酰胆碱

[0380] 参考文献

[0381] [1]Johanning 等 (1995)Nucleic Acids Res. 23:1495-1501.

[0382] [2]Heyes 等 (2005)J Controlled Release107:276-87.

[0383] [3]W02005/121348.

[0384] [4]Liposomes:Methods and Protocols.Volumel:Pharmaceutical Nanocarriers:Methods and Protocols.(《脂质体:方法与实验方案》),卷1:“药物纳米载体:方法与实验方案”.(Weissig 编). 胡马纳出版社 (Humana Press),2009. ISBN160327359X.

[0385] [5]Liposome Technology(《脂质体技术》),卷 I、II 和 III. (Gregoriadis 编). 英富曼医疗保健出版社 (Informa Healthcare),2006.

[0386] [6]Functional Polymer Colloids and Microparticles volume4(Microsphere, microcapsules&liposomes)(《功能性聚合物胶体与微粒》,卷4(微球、微囊和脂质体)). (Arshady 和 Guyot 编). 西特斯书籍出版社 (Citrus Books),2002.

[0387] [7]Jeffer 等. (2005)Pharmaceutical Research(《药物研究》)22(3):362-372.

[0388] [8]W02005/113782.

[0389] [9]W02011/005799.

[0390] [10]El Ouahabi 等. (1996)FEBS Letts380:108-12.

[0391] [11]Giuliani 等. (2006)Proc Natl Acad Sci U S A103(29):10834-9.

[0392] [12]W02009/016515.

[0393] [13]W002/34771.

[0394] [14]W02005/032582.

[0395] [15]W02010/119343.

[0396] [16]W02006/110413.

[0397] [17]W02005/111066.

[0398] [18]W02005/002619.

[0399] [19]W02006/138004.

[0400] [20]W02009/109860.

[0401] [21]W002/02606.

[0402] [22]W003/018054.

[0403] [23]W02006/091517.

[0404] [24]W02008/020330.

[0405] [25]W02006/089264.

[0406] [26]W02009/104092.

[0407] [27]W02009/031043.

[0408] [28]W02007/049155.

[0409] [29]Gennaro(2000)Remington:The Science and Practice of Pharmacy(《雷明顿:药物科学与实践》). 第20版, ISBN:0683306472.

[0410] [30]Methods In Enzymology(《酶学方法》)(S.Colowick 和 N.Kaplan 编., 学术出版社公司 (Academic Press, Inc.)).

- [0411] [31]Handbook of Experimental Immunology(《实验免疫学手册》),卷 I ~ IV(D. M. Weir 和 C. C. Blackwell 编,1986,布莱克威尔科学出版社 (Blackwell Scientific Publications 英国)).
- [0412] [32]Sambrook 等. (2001)Molecular Cloning:A Laboratory Manual(《分子克隆 : 实验手册》),第 3 版 (冷泉港实验室出版社 (Cold Spring Harbor Laboratory Press)).
- [0413] [33]Handbook of Surface and Colloidal Chemistry(《表面和胶体化学手册》) (Birdi, K. S. 编, CRC 出版社 (CRC Press), 1997)
- [0414] [34]Ausubel 等 (编) (2002)Short protocols in molecular biology(《精编分子生物学实验指南》) 第五版 (实验室指南).
- [0415] [35]Molecular Biology Techniques:An Intensive Laboratory Course(《分子生物学技术 : 详细实验室课程》), (Ream 等编., 1998, 学术出版社 (Academic Press)).
- [0416] [36]PCR(Introduction to Biotechniques Series)(《PCR(生物技术入门系列)》) 第二版 (Newton 和 Graham 编, 1997, 施普林格出版社 (Springer Verlag)).
- [0417] [37]Yoneyama 和 Fujita(2007)Cytokine&Growth Factor Reviews(《细胞因子和生长因子综述》) 18:545-51.
- [0418] [38]Maurer 等. (2001)Biophysical Journal, 80:2310-2326.
- [0419] [39]Perri 等. (2003)J Virol 77:10394-10403.
- [0420] [40]Boxus 等. (2007)J Virol 81:6879-89.
- [0421] [41]Taylor 等. (2005)Vaccine 23:1242-50.
- [0422] [42]W02011/076807.
- [0423] [43]W02011/057020.

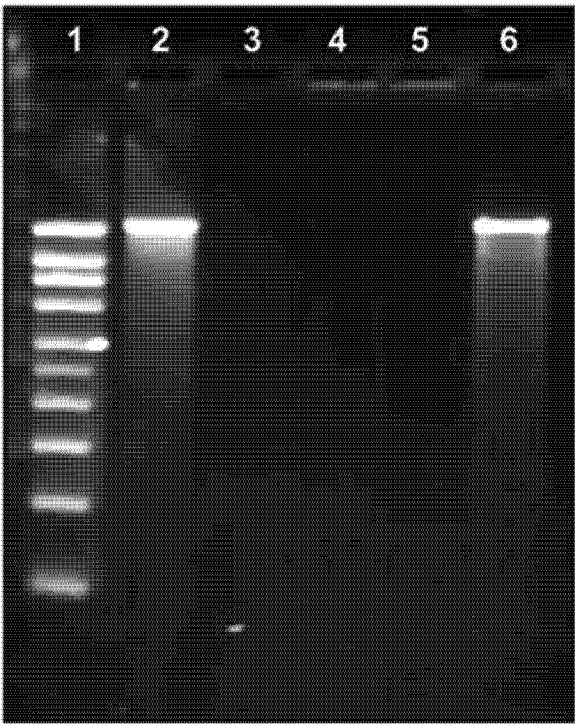


图 1

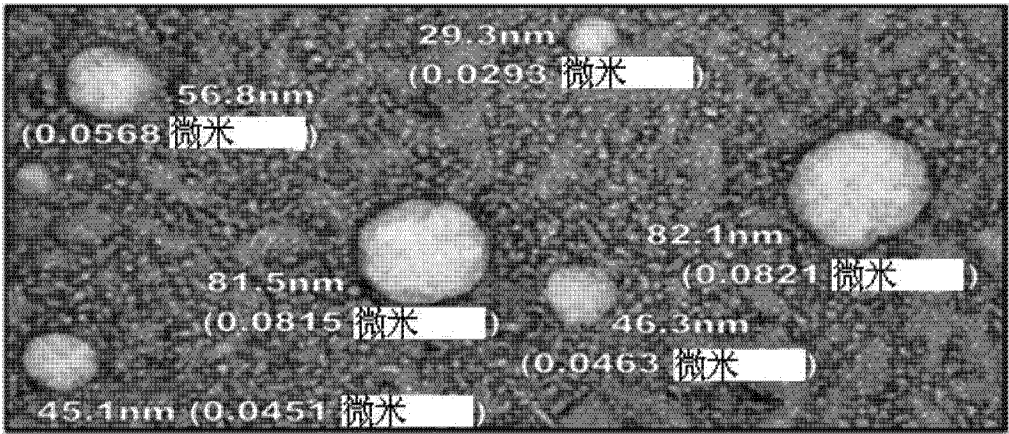


图 2

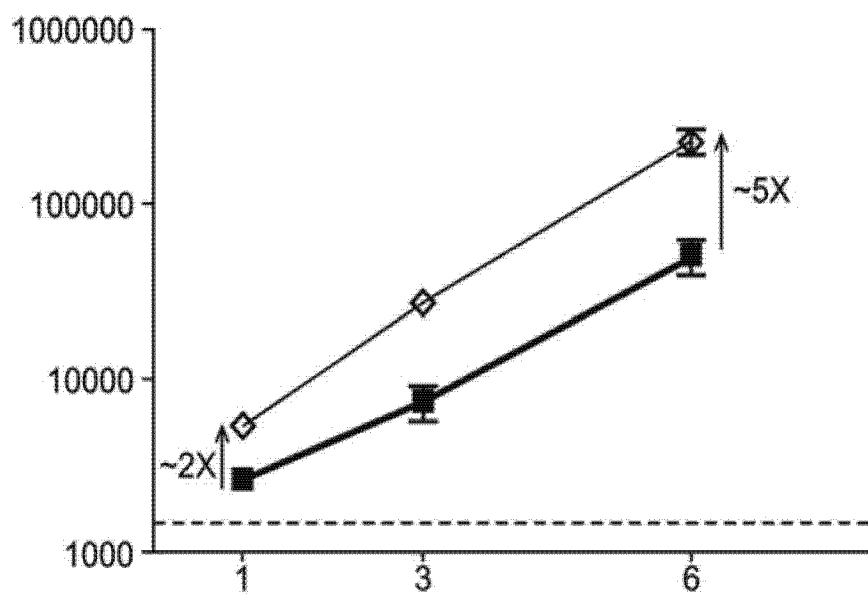


图 3

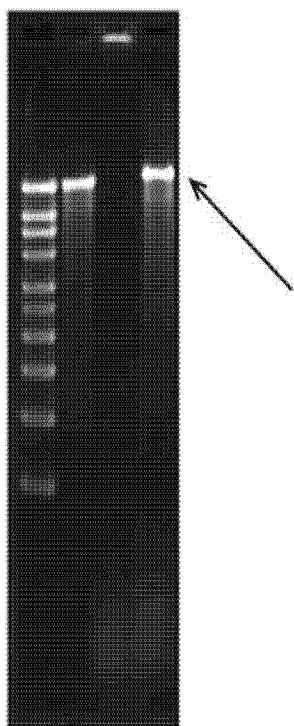


图 4

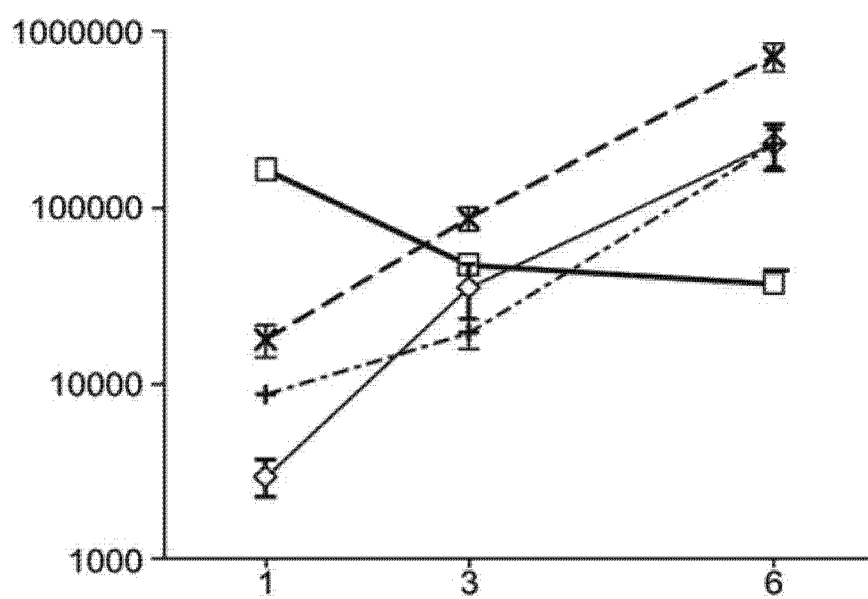


图 5

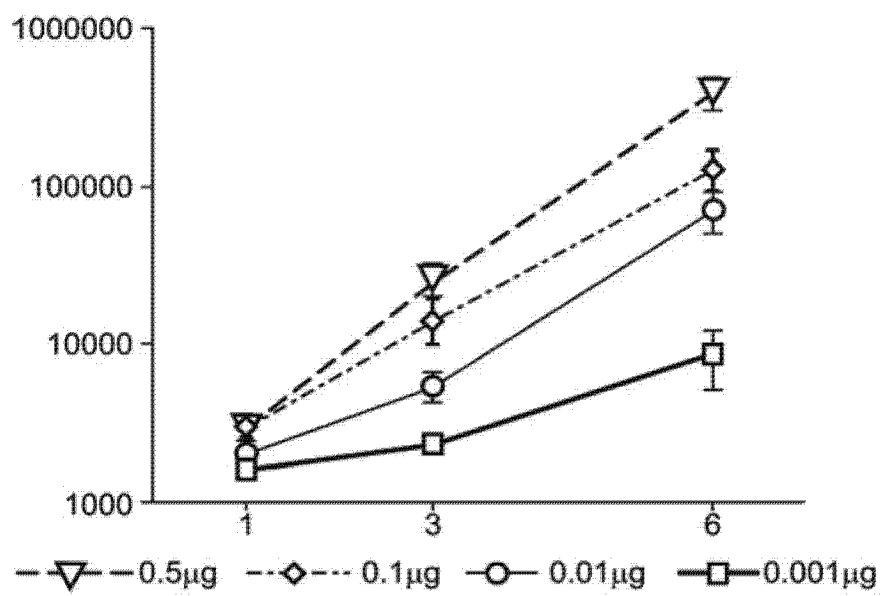


图 6

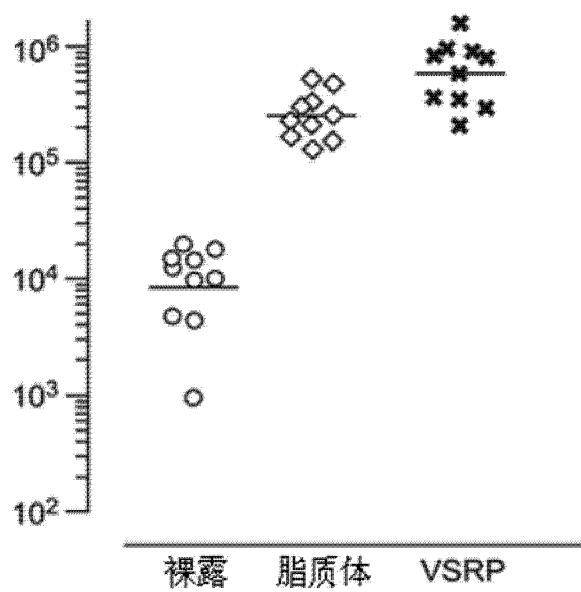


图 7

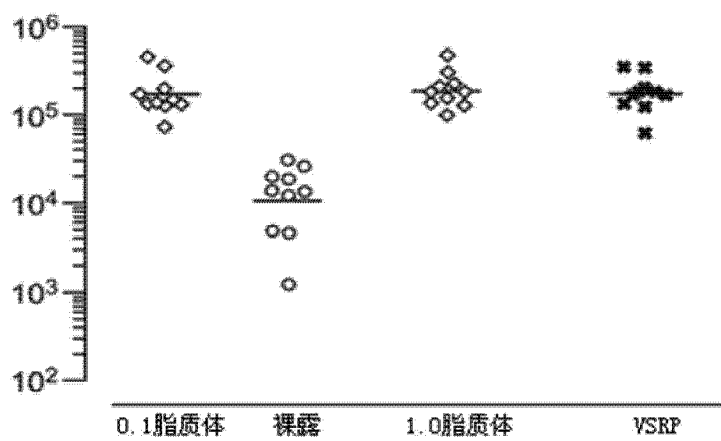


图 8

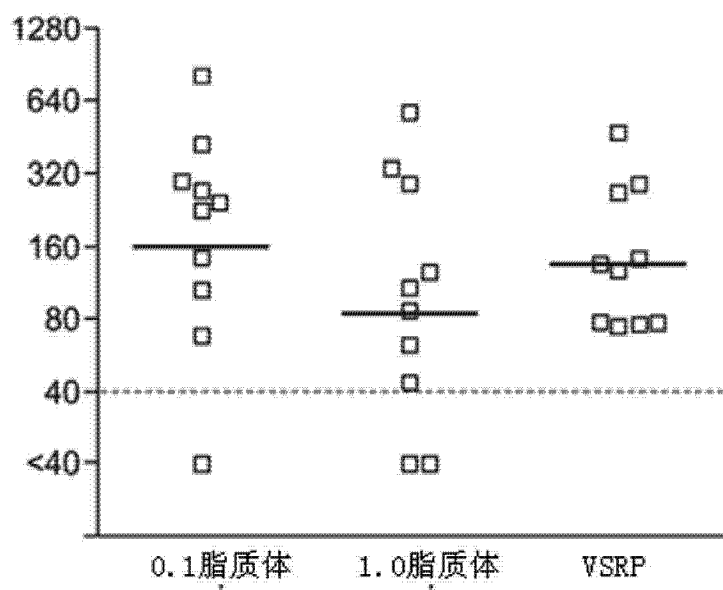


图 9

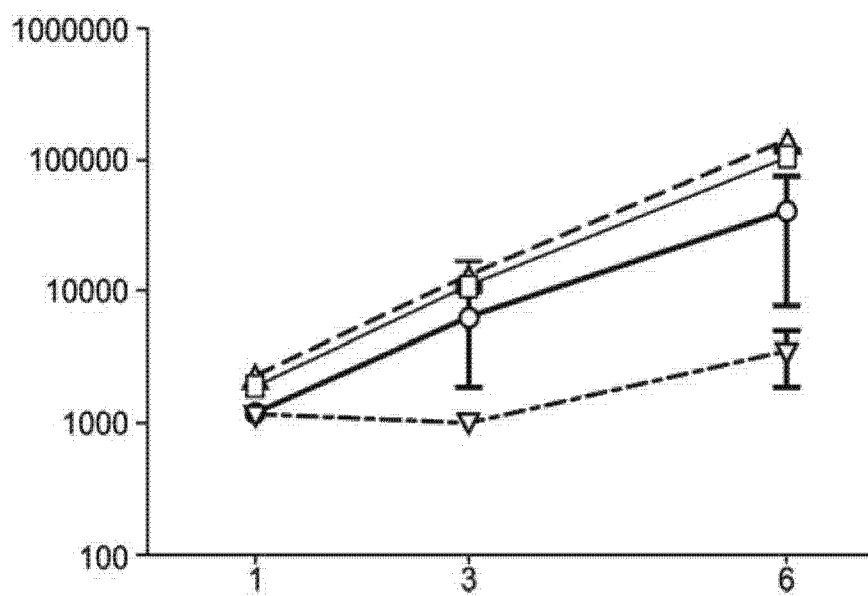


图 10

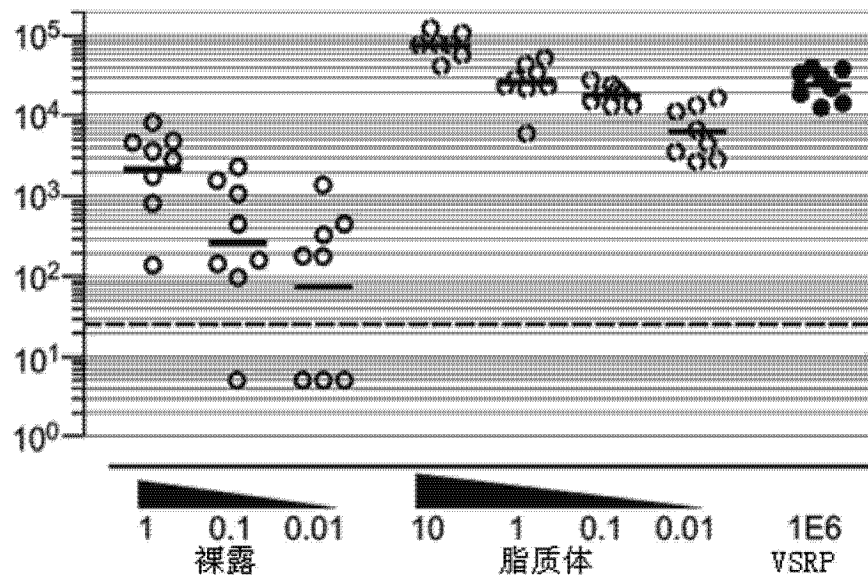


图 11

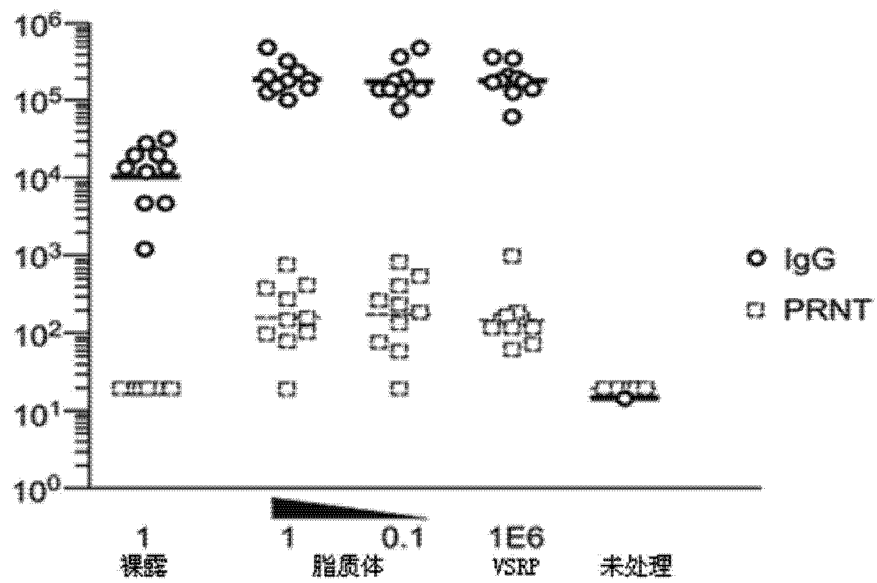


图 12

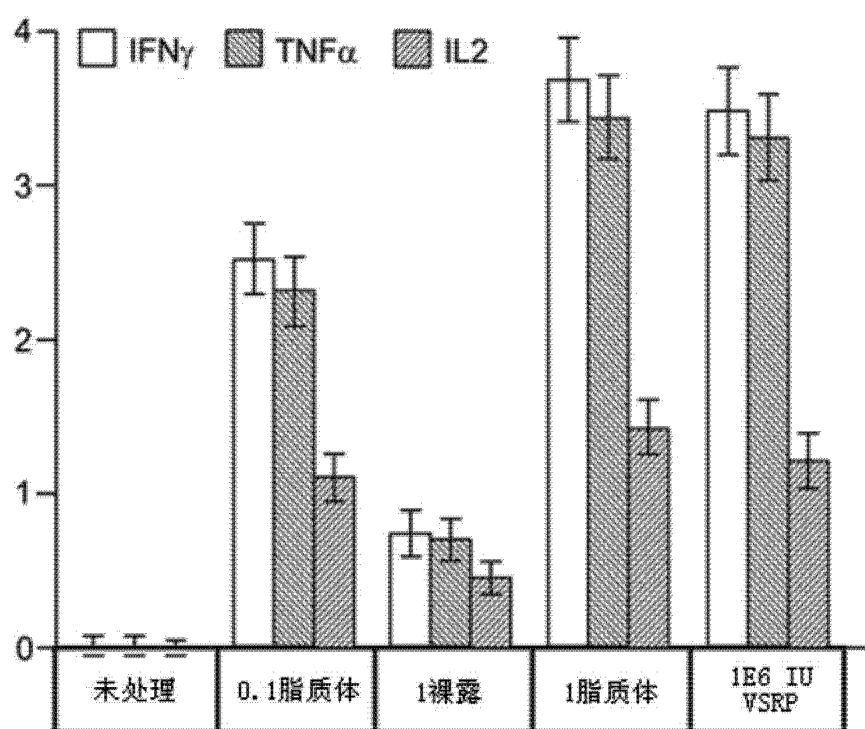


图 13

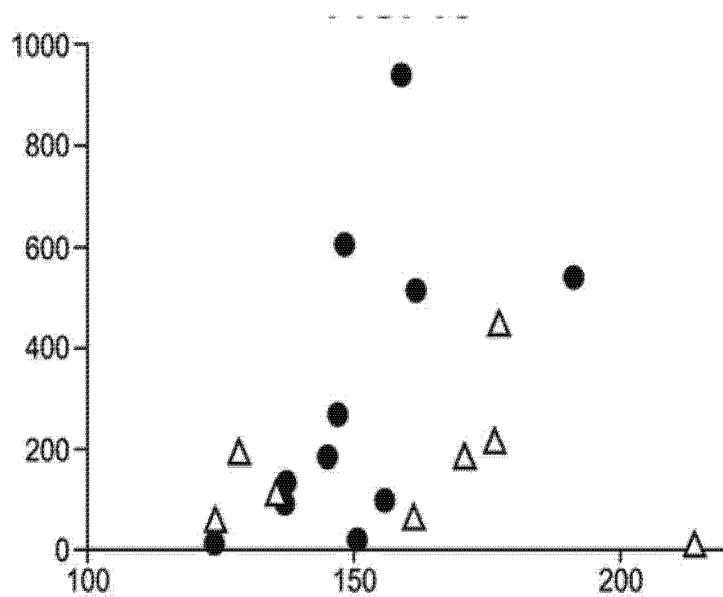


图 15

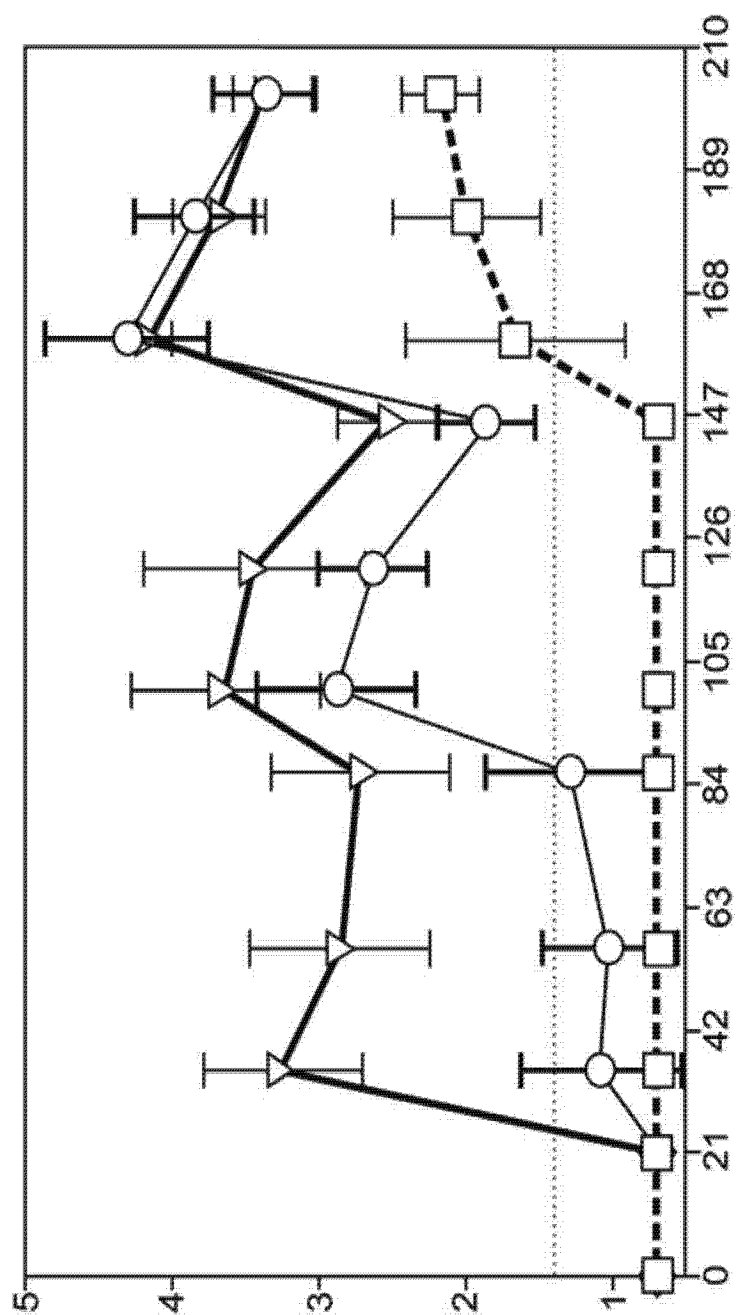


图 14

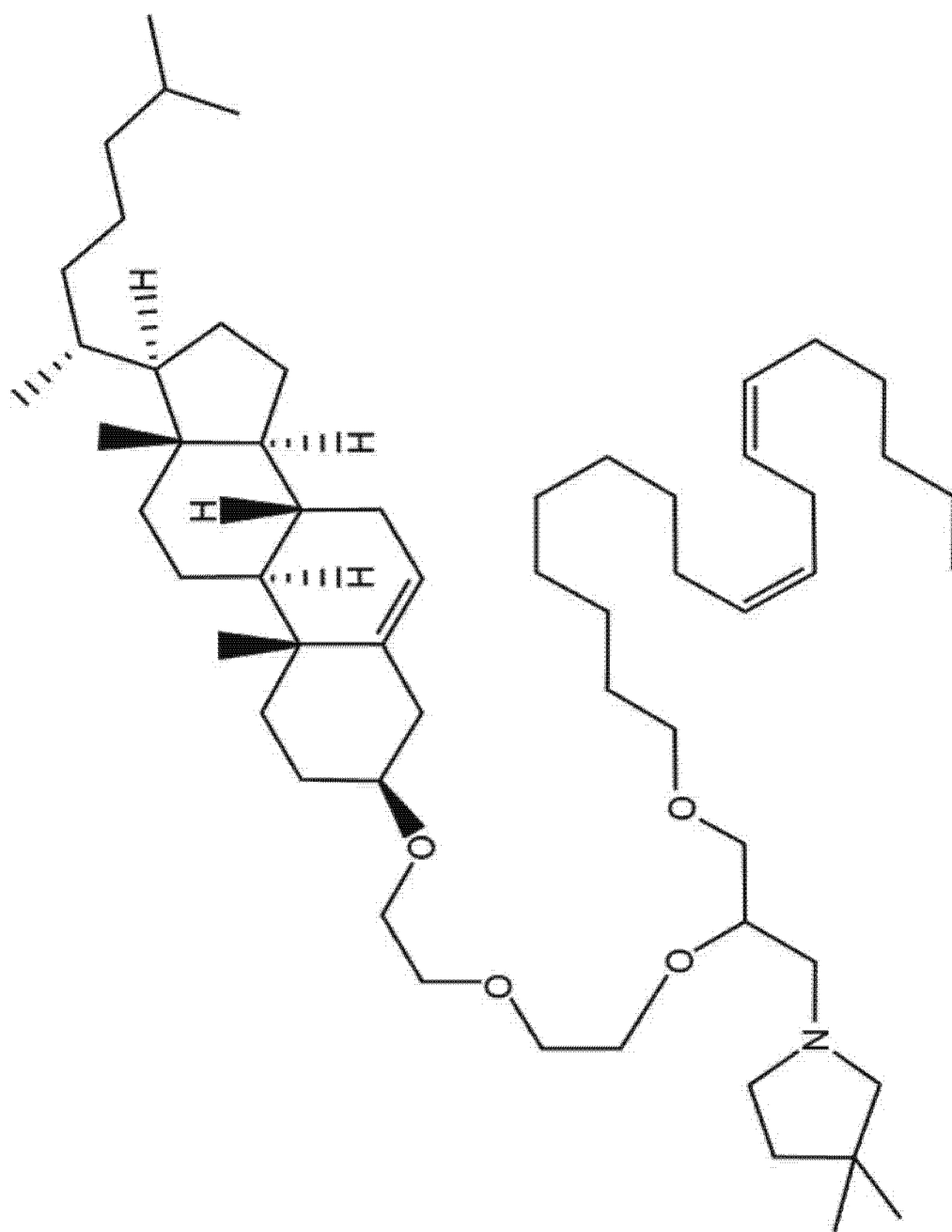


图 16A

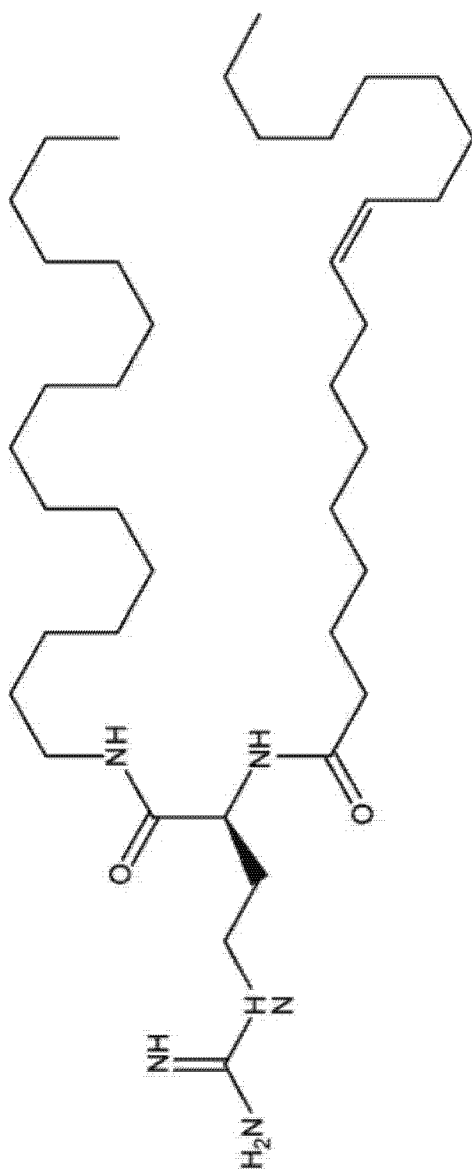


图 16B

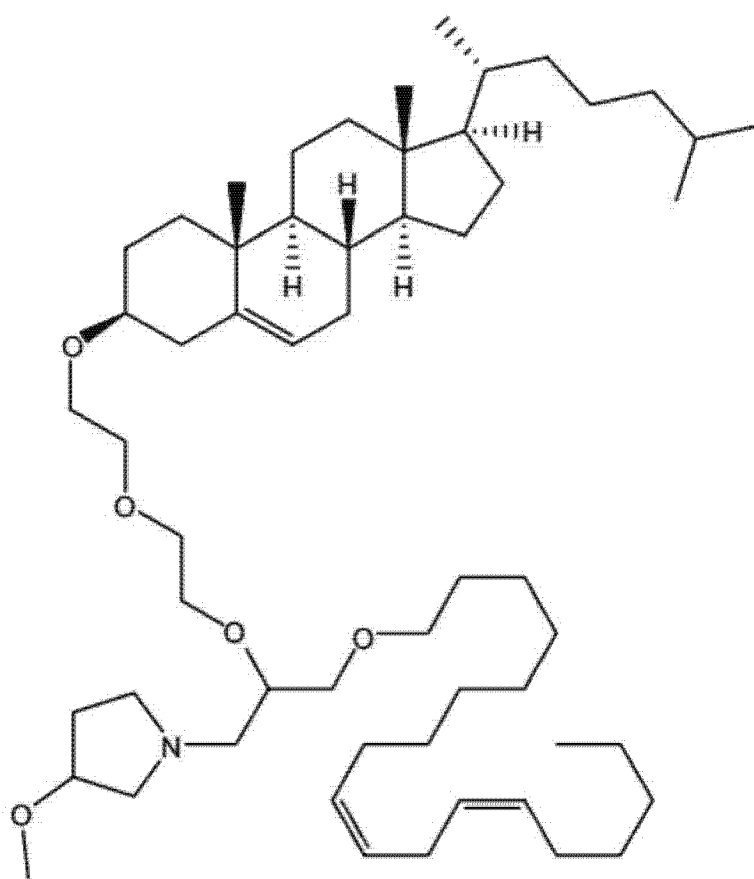


图 16C

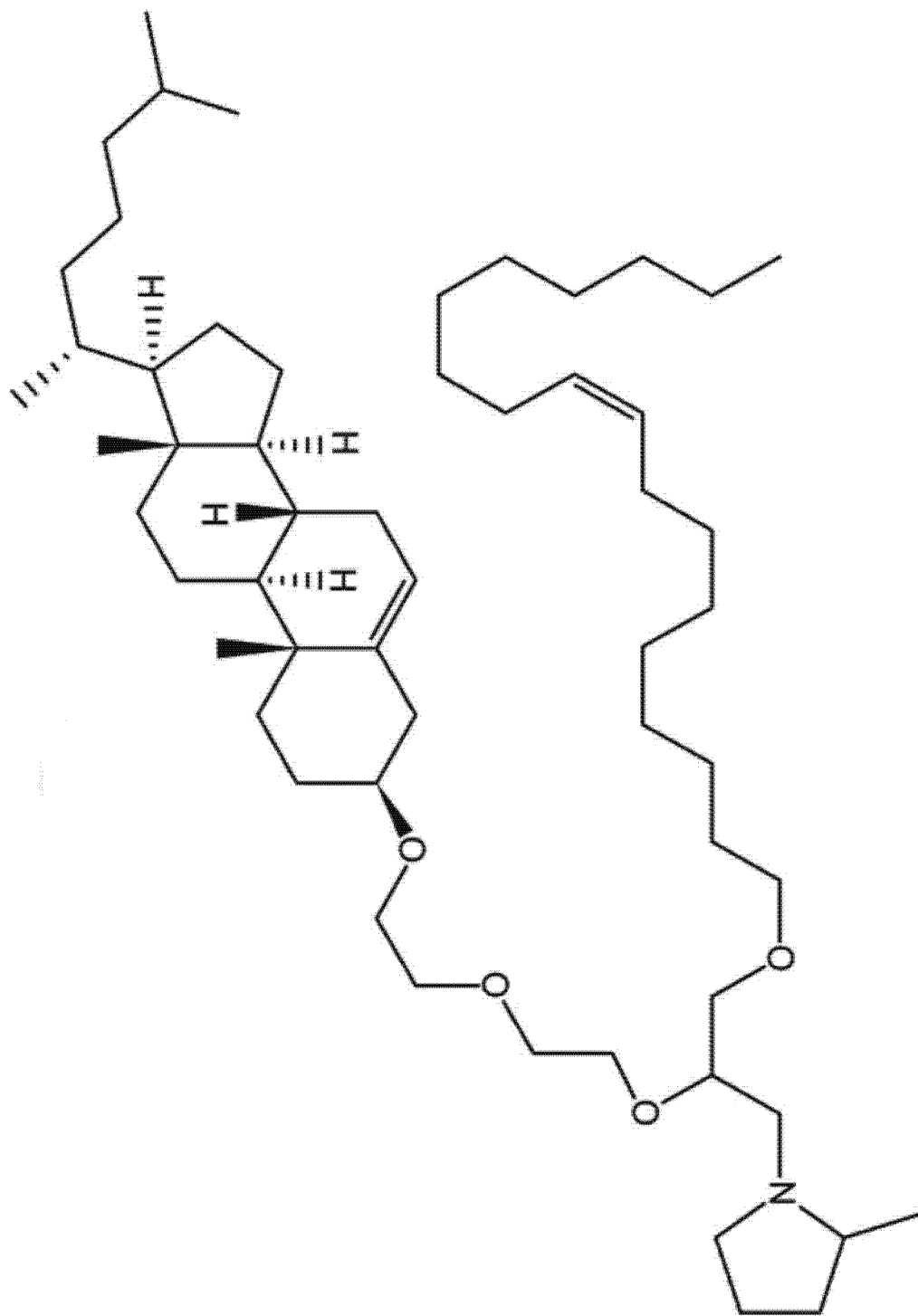


图 16D

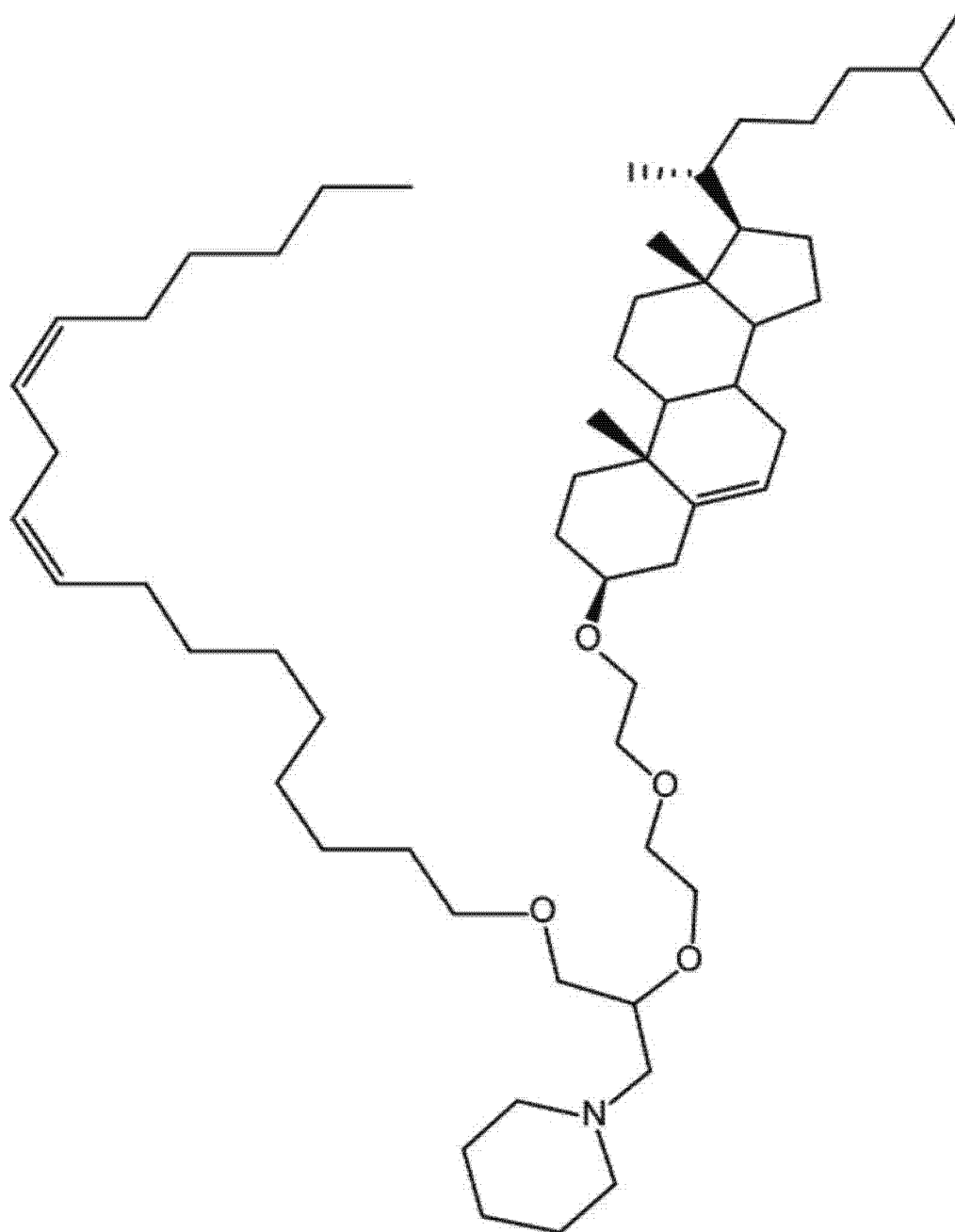


图 16E

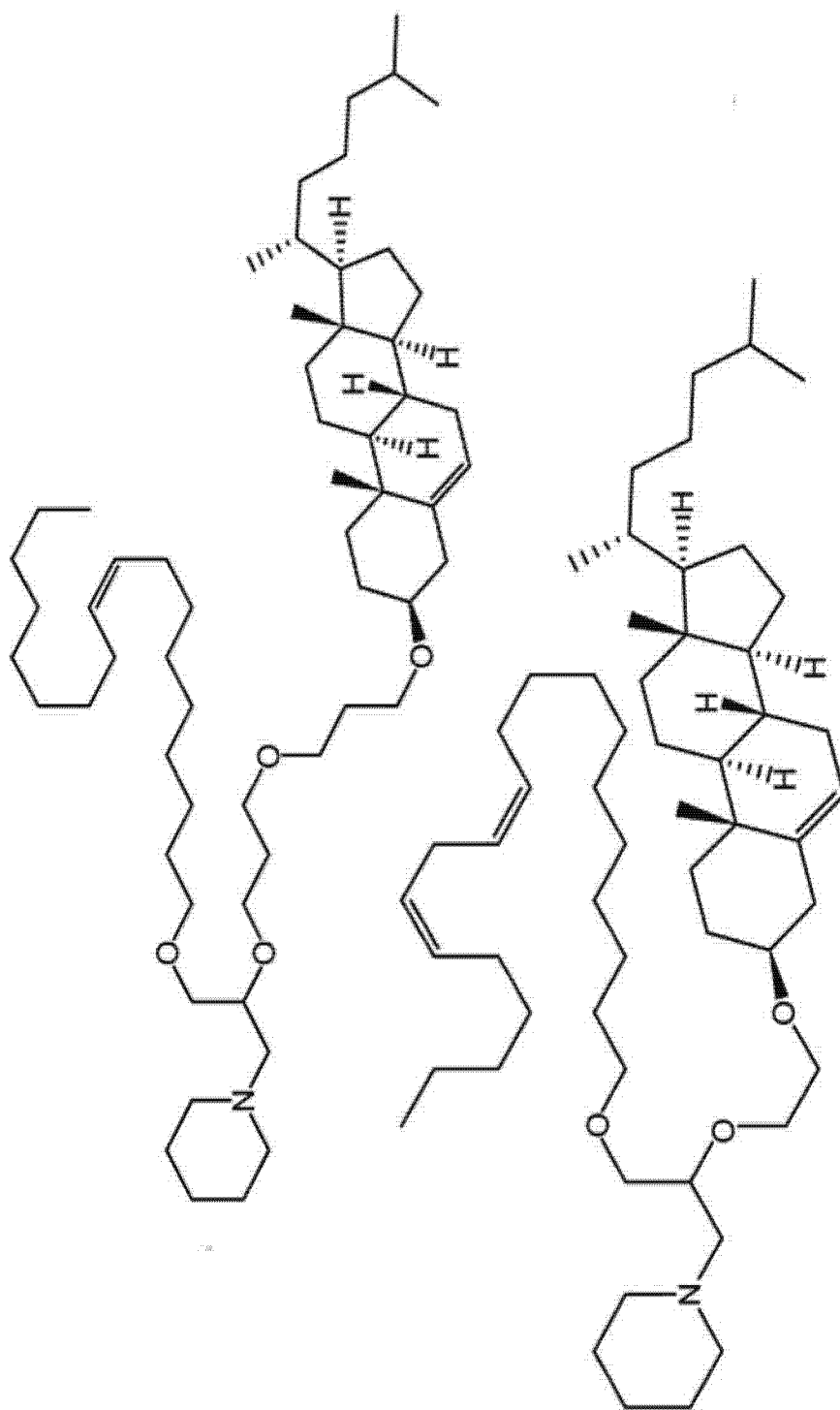


图 16F

图 16G

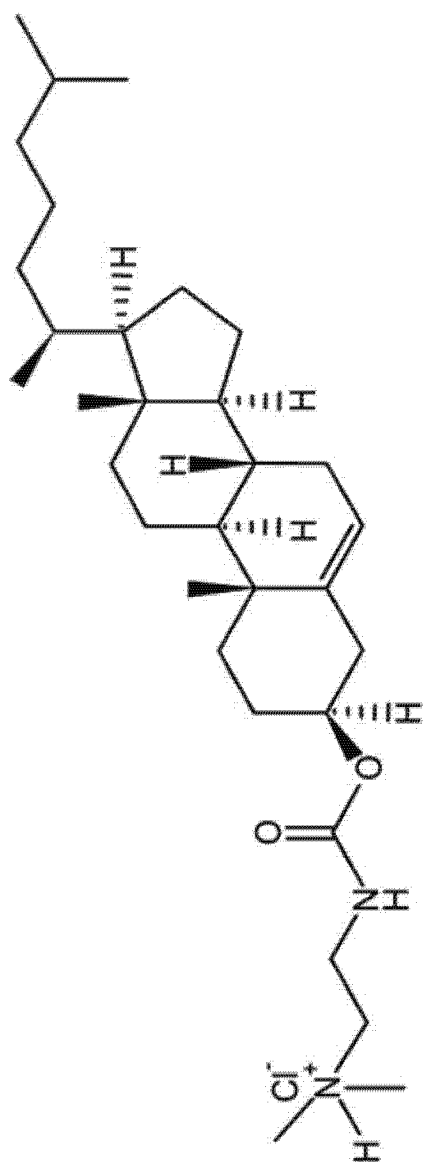


图 16H

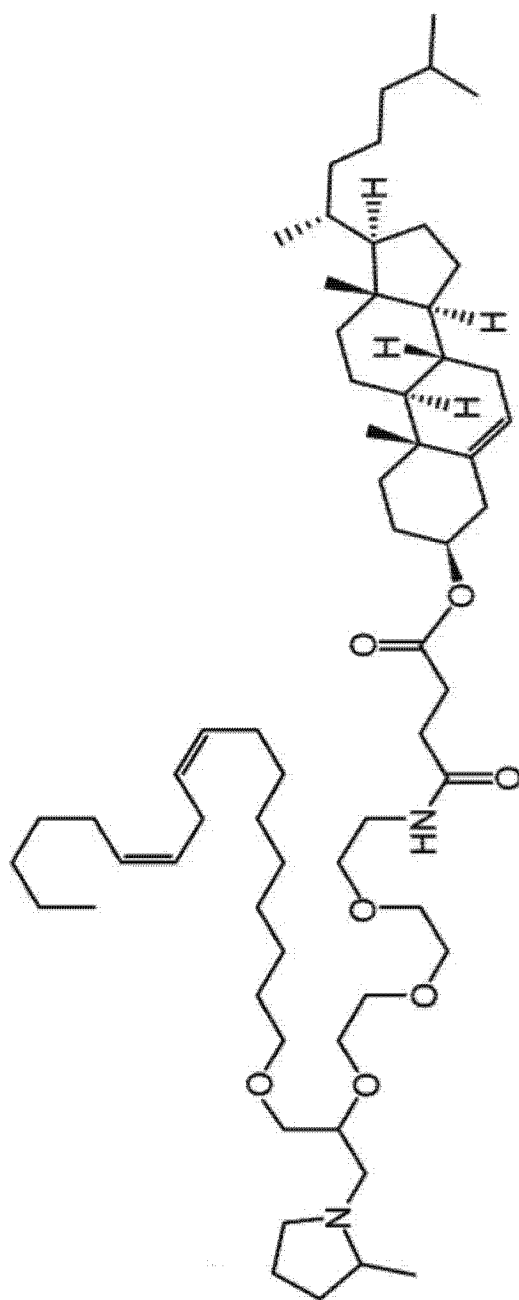


图 16I

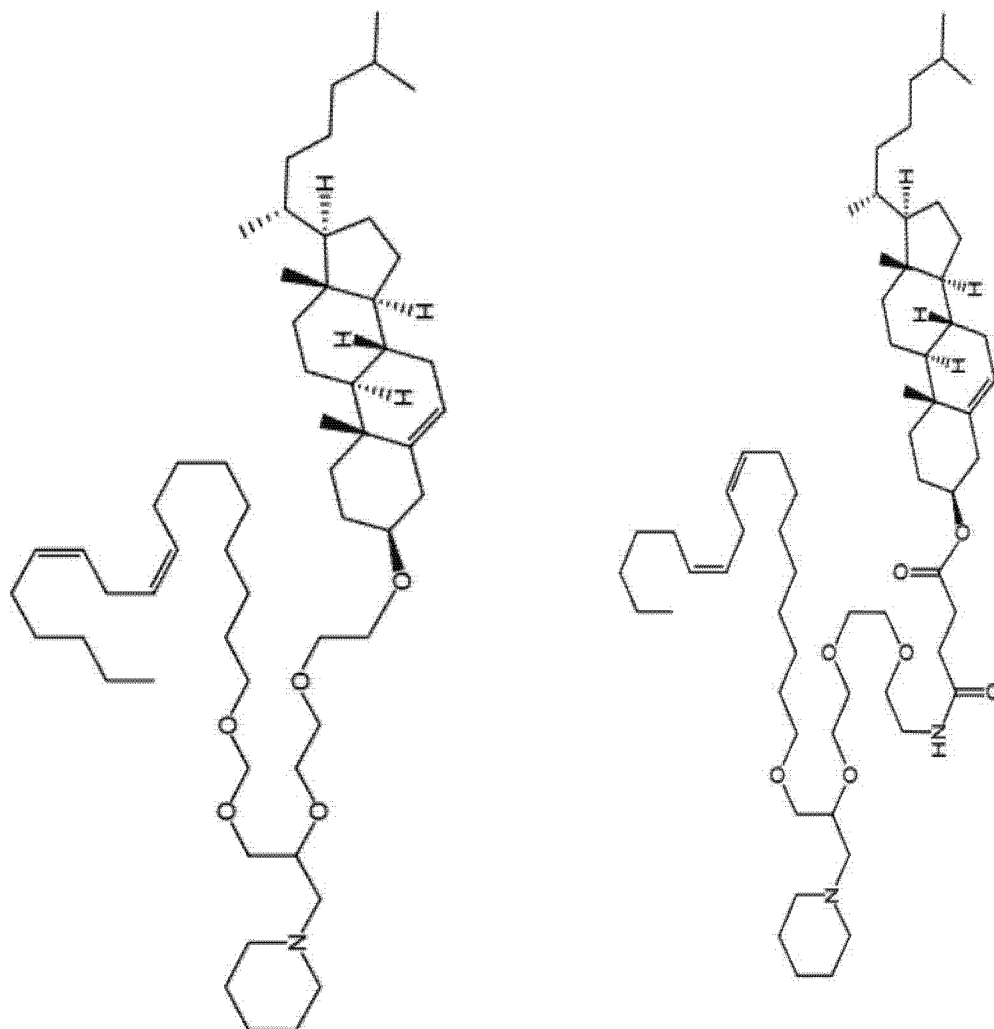


图 16J

图 16K

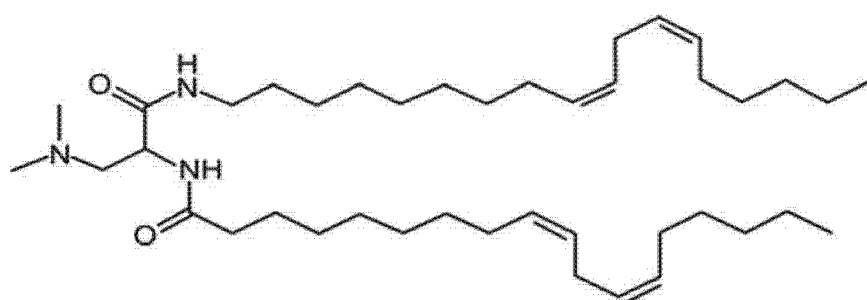


图 16L

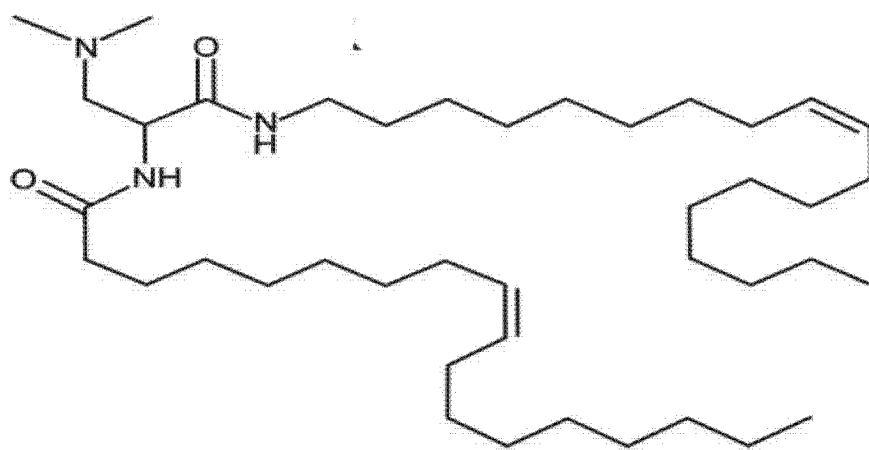


图 16M

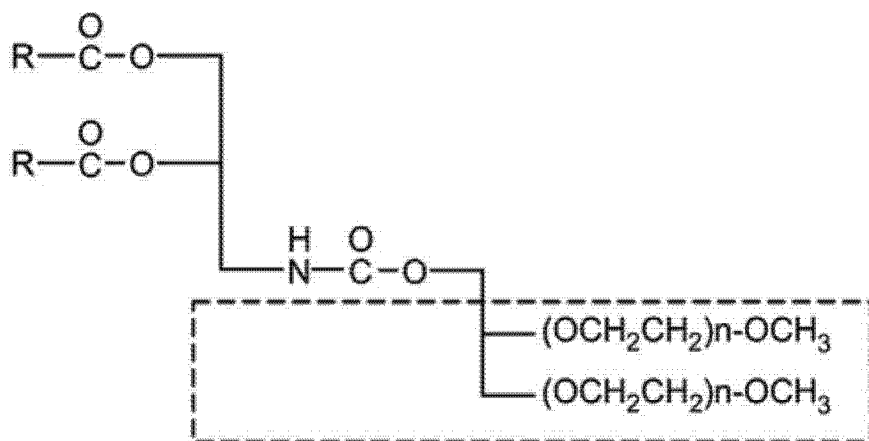


图 17

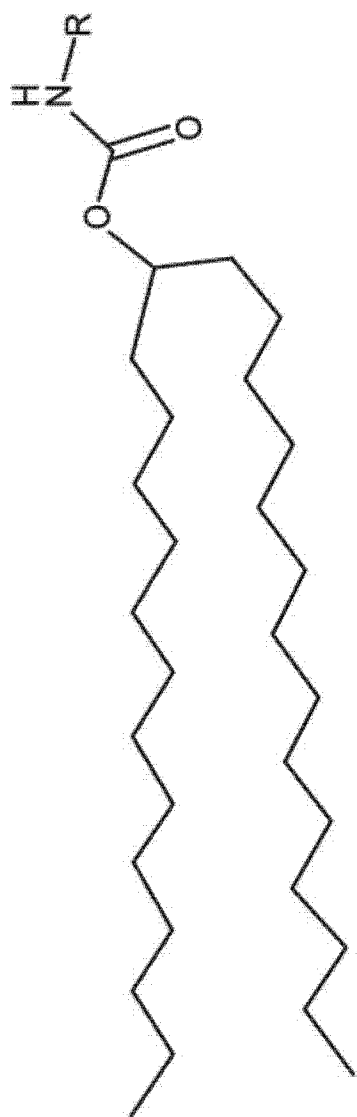


图 18A

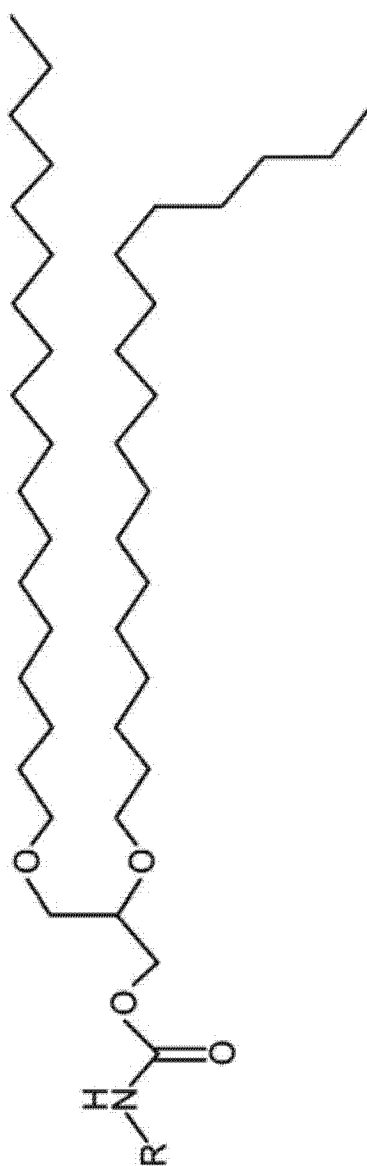


图 18B

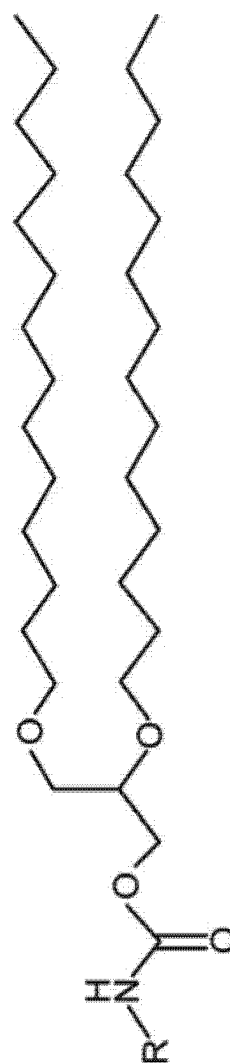


图 18C

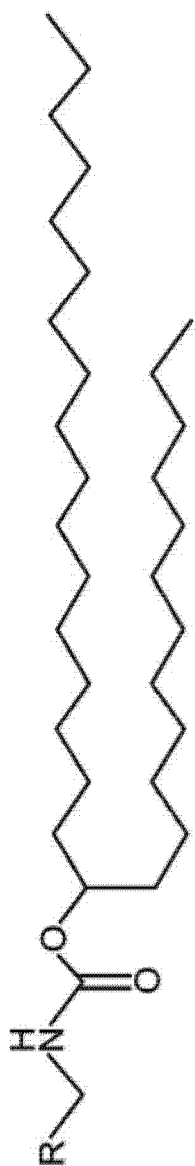


图 18D

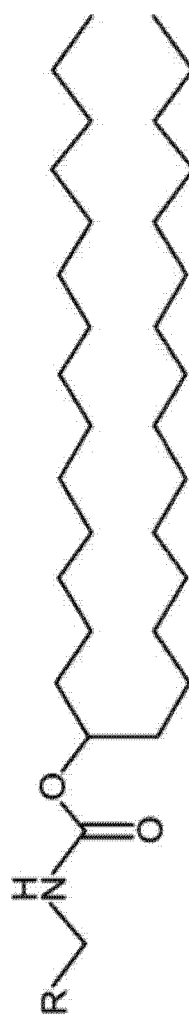


图 18E