



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109475640 A

(43)申请公布日 2019.03.15

(21)申请号 201780036069.1

(22)申请日 2017.06.09

(30)优先权数据

PCT/EP2016/063226 2016.06.09 EP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.12.10

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2017/064059 2017.06.09

(87)PCT国际申请的公布数据

WO2017/212009 EN 2017.12.14

(71)申请人 库瑞瓦格股份公司

地址 德国图宾根

(72)发明人 帕特里克·鲍姆霍夫

卡罗琳·蒂勒 乔安娜·雷杰曼

(74)专利代理机构 上海胜康律师事务所 31263

代理人 李献忠 邱晓敏

(51)Int.Cl.

A61K 47/64(2006.01)

G07C 215/14(2006.01)

A61P 43/00(2006.01)

A61K 48/00(2006.01)

权利要求书8页 说明书126页

序列表11页 附图13页

(54)发明名称

核酸被运载物的混合载体

(57)摘要

提供了用于递送核酸化合物的组合物,其包含阳离子肽或聚合物和类脂质化合物。核酸化合物可以是任何化学修饰的或未修饰的DNA或RNA。相对于阳离子肽或聚合物,组合物中的类脂质的量优选较低。

1. 一种组合物,其包括:

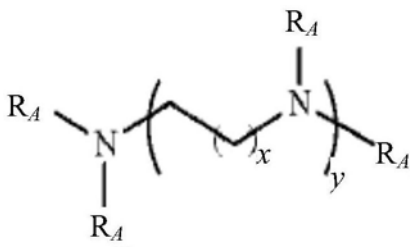
- (a) 阳离子肽或聚合物;
- (b) 阳离子类脂质化合物;和
- (c) 核酸化合物。

2. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述类脂质化合物包含两个或更多个阳离子氮原子和至少两个亲脂性尾部。

3. 根据权利要求1或2所述的组合物,其中所述类脂质化合物(a)包含可水解的连接基团,例如酯、酰胺或氨基甲酸酯基团;或(b)不含可水解的连接基团。

4. 根据权利要求2或3所述的组合物,其中所述类脂质化合物的所述阳离子氮原子中的至少一个是永久阳离子的。

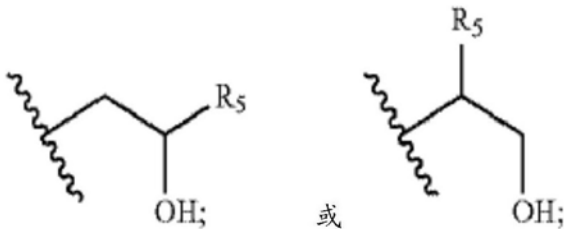
5. 根据权利要求1至3中任一项所述的组合物,其中所述类脂质化合物是根据式I的化合物



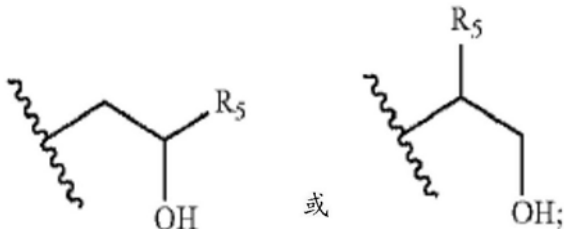
(式 I)

其中,

-R_A每次出现时独立地选自未经取代的、环状或非环状的、支链或非支链的C₁₋₂₀脂族基团;经取代或未经取代的、环状或非环状的、支链或非支链的C₁₋₂₀杂脂族基团;经取代或未经取代的芳基;经取代或未经取代的杂芳基;



其中至少一个R_A是



-R₅每次出现时独立地选自未经取代的、环状或非环状的、支链或非支链的C₈₋₁₆脂族基团;经取代或未经取代的芳基;或经取代或未经取代的杂芳基;

-每次出现的x是从1至10的整数;

-每次出现的y是从1至10的整数；
或其药学上可接受的盐。

6. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物，其中所述类脂质化合物包含两个或三个式IIa和/或式IIb部分：

-N(R₁)-CH₂-CH(R₅)-R₂ (式IIa)

-N⁺(R₃)(R₄)-CH₂-CH(R₅)-R₂ (式IIb)

其中，独立地对于每个单独的式IIa或式IIb部分，

-R₁选自氢或C₁-C₄-烷基；

-R₂选自直链或支链的、饱和或不饱和的C₆-C₁₆烃基链，

-R₃和R₄选自C₁-C₄-烷基，并且

-R₅是氢或羟基。

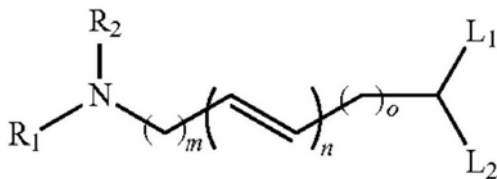
7. 根据权利要求6所述的组合物，其中类脂质化合物是包含三个相同的式IIa和/或式IIb部分的化合物，并且其中

-R₁是氢，

-R₂是直链或支链的C₆-C₁₆烷基链，并且

-R₃和R₄是甲基。

8. 根据权利要求1至3中任一项所述的组合物，其中所述类脂质化合物是根据式III的化合物，



(式 III)

其中，

-R₁和R₂各自独立地选自氢，任选经取代的、饱和或不饱和的C₁-C₂₀烃基，和任选经取代的、饱和或不饱和的C₆-C₂₀酰基；

-L₁和L₂各自独立地选自任选经取代的、饱和或不饱和的C₁-C₃₀烃基；

-m和o各自独立地选自自由零和任何正整数组成的组；并且

n是任何正整数。

9. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物，其中所述阳离子肽或聚合物是包含至少一个阳离子部分P的化合物，所述阳离子部分P具有能够形成二硫键或其二硫键连接的多聚体的至少一个-SH基团，其中部分P选自：

-分子量为约0.5kDa至约30kDa的聚合物部分，或

-包含3至100个氨基酸的肽部分，其中所述肽部分的氨基酸总数的至少10%代表选自Arg、Lys、His和/或Orn的碱性氨基酸。

10. 根据权利要求9所述的组合物，

其中部分P是

-包含7至30个氨基酸的肽部分，并且其中至少一个-SH基团由Cys残基提供；或者

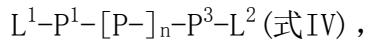
-选自任选经修饰的聚丙烯酸酯、壳聚糖、聚乙烯亚胺、多胺、聚氨基酯或聚酰胺胺或其任何共聚物的聚合物部分。

11. 根据权利要求10所述的组合物,其中所述肽部分具有两个末端,并且其中

-所述Cys残基位于所述末端中的一个处或其附近;或其中

-所述肽部分包含至少两个Cys残基,并且其中所述Cys残基中的至少一个位于所述末端中的每一个处或其附近。

12. 根据权利要求9-11中任一项所述的组合物,其中所述阳离子肽或聚合物是根据式IV的化合物,



其中,P定义如上;

P³是任选的;

P¹和P³被独立地选择,各自代表选自聚乙二醇(PEG)、聚-N-(2-羟丙基)甲基丙烯酰胺、聚-2-(甲基丙烯酰氧基)乙基磷酰胆碱、聚(羟烷基L-天冬酰胺)、聚(2-(甲基丙烯酰氧基)乙基磷酰胆碱)、羟乙基淀粉或聚(羟烷基L-谷氨酰胺)的直链或支链亲水聚合物链,其中所述聚合物链显示约1kDa至约100kDa的分子量,并且其中P¹和P³各自通过二硫键与P部分连接;

L¹和L²是任选的配体并且独立地选自RGD, RGD肽,转铁蛋白,叶酸,信号肽或信号序列,定位信号或序列,核定位信号或序列(NLS),抗体,细胞穿透肽,例如WEAKLAKALAKALAKHLAKALAKALACEA, TAT,受体的配体,细胞因子,激素,生长因子,小分子,碳水化合物,甘露糖,半乳糖,n-乙酰半乳糖胺,合成配体,小分子激动剂,受体的抑制剂或拮抗剂,或RGD肽模拟物类似物;

n是整数,选自1至约50,优选选自从2、3、4或5至约10,或从2、3或4至约9的范围,例如6或7;

并且其中,如果n大于1,则每个部分P通过二硫键与另一部分P连接。

13. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述阳离子肽或聚合物比所述核酸化合物的重量比为至少约1,并且其中所述类脂质化合物比所述核酸化合物的比例不高于约15nmol/μg。

14. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述类脂质化合物比所述阳离子肽或聚合物的重量比不高于约1:50,和/或其中所述类脂质化合物比所述阳离子肽或聚合物的比例不高于约2nmol/μg。

15. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其具有约0.1至约20,或约0.2至约15,或约2至约15,或约2至约12的N/P比,其中所述N/P比定义为所述阳离子肽或聚合物的碱性基团的氮原子比所述核酸化合物的磷酸酯基团的摩尔比。

16. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其基本上不含根据权利要求2至8中任一项所定义的一类脂质化合物以外的脂质。

17. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其包含两种或更多种不同类型的阳离子肽和/或聚合物。

18. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述核酸化合物选自

-经化学修饰的或未经化学修饰的DNA、单链或双链DNA、编码或非编码DNA,其任选地选

自质粒,寡脱氧核苷酸,基因组DNA,DNA引物,DNA探针,免疫刺激性DNA,适体或其任何组合,和/或

—经化学修饰的或未经化学修饰的RNA、单链或双链RNA、编码或非编码RNA,其任选地选自信使RNA(mRNA)、寡核糖核苷酸、病毒RNA、复制子RNA、转移RNA(tRNA)、核糖体RNA(rRNA)、免疫刺激性RNA(isRNA)、微小RNA、小干扰RNA(siRNA)、小核RNA(snRNA)、小发夹RNA(shRNA)或核糖开关、RNA适体、RNA诱饵、反义RNA、核酶、或其任何组合。

19. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其还包含独立地选自靶向剂、细胞穿透剂和隐形剂中的一种或多种化合物。

20. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述阳离子肽或聚合物、所述类脂质化合物和所述核酸化合物包含在纳米颗粒中。

21. 一种纳米颗粒,其包含根据权利要求1至20中任一项所述的组合物。

22. 根据权利要求21所述的纳米颗粒,其包含由所述核酸化合物和所述阳离子肽或聚合物和/或所述类脂质化合物形成的络合物。

23. 根据权利要求21或22所述的纳米颗粒,其相应地具有通过动态激光散射测定的约30nm至约800nm的流体动力学直径,优选约50nm至约300nm、或约60nm至约250nm、或者约60nm至约150nm、或约60nm至约120nm的流体动力学直径。

24. 根据权利要求21至23中任一项所述的纳米颗粒,其具有在约0mV至约-50mV,或约0mV至约-10mV的范围内的 ζ 电位。

25. 根据权利要求21至24中任一项所述的纳米颗粒,其基本上由以下项组成:

(a) 一种或多种阳离子肽和/或聚合物;

(b) 一种或多种类脂质化合物;

(c) 一种或多种核酸化合物;

以及任选地

(d) 独立地选自靶向剂、细胞穿透剂和隐形剂的一种或多种化合物。

26. 一种能通过包括以下步骤的方法获得的纳米颗粒:

在含水液体存在下,组合

(i) 一种或多种阳离子肽和/或聚合物;

(ii) 根据权利要求2至8中任一项所定义的一种或多种类脂质化合物;和

(iii) 一种或多种核酸化合物,

以使得能形成纳米颗粒。

27. 一种组合物,其包含多个根据权利要求21-26中任一项所述的纳米颗粒。

28. 根据权利要求27所述的组合物,其中所述纳米颗粒相应地具有通过动态激光散射测定的约30nm至约800nm的平均流体动力学直径,优选约50nm至约300nm、或约60nm至约250nm、或者约60nm至约150nm、或约60nm至约120nm的平均流体动力学直径。

29. 根据权利要求27或28所述的组合物,其被配制成无菌液体。

30. 根据权利要求27或28所述的组合物,其被配制成无菌固体组合物,例如粉末或冻干形式,以与含水液体载体重构。

31. 一种用于制备根据权利要求27-30中任一项所述的组合物的试剂盒,其包含:

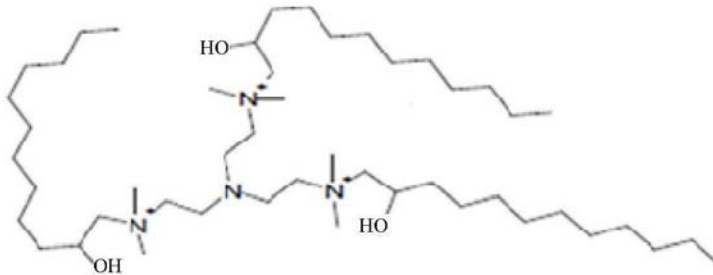
(a) 第一试剂盒组分,其包含所述阳离子肽或聚合物和/或所述类脂质化合物;和

(b) 第二试剂盒组分,其包含所述核酸化合物。

32. 根据权利要求21-26中任一项所述的纳米颗粒或根据权利要求27-30中任一项所述的组合物,其作为药物的用途。

33. 根据权利要求32所述的用于用途的纳米颗粒或组合物,其中所述用途包括预防、治疗和/或改善选自以下的疾病:癌症或肿瘤疾病,传染病,优选(病毒,细菌或原生动物)传染病,自身免疫疾病,过敏或过敏性疾病,单基因疾病,即(遗传性)疾病,或一般的遗传性疾病,具有遗传性的遗传背景并且通常由确定的基因缺陷引起且根据孟德尔定律遗传的疾病,心血管疾病,神经元疾病,呼吸系统疾病,消化系统疾病,皮肤疾病,肌肉骨骼疾病,结缔组织疾病,赘生物,免疫缺陷,内分泌、营养和代谢疾病,眼疾,耳疾和与肽或蛋白缺乏相关的疾病。

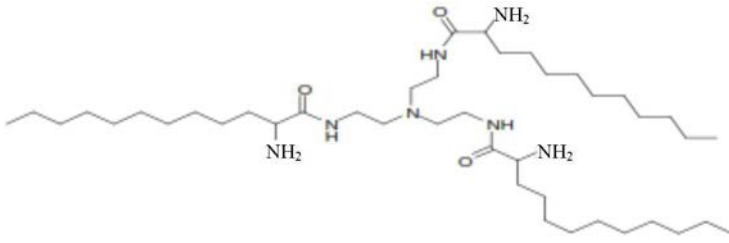
34. 一种包含式IX中所示的阳离子的类脂质化合物:



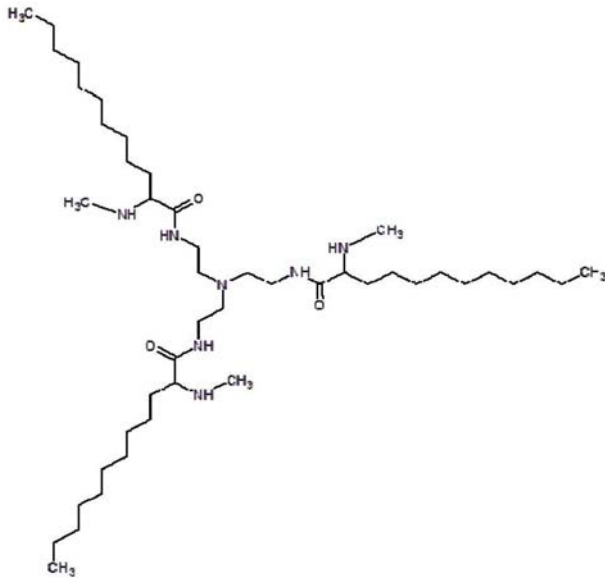
(式 IX),

其任选地还包含药学上可接受的阴离子。

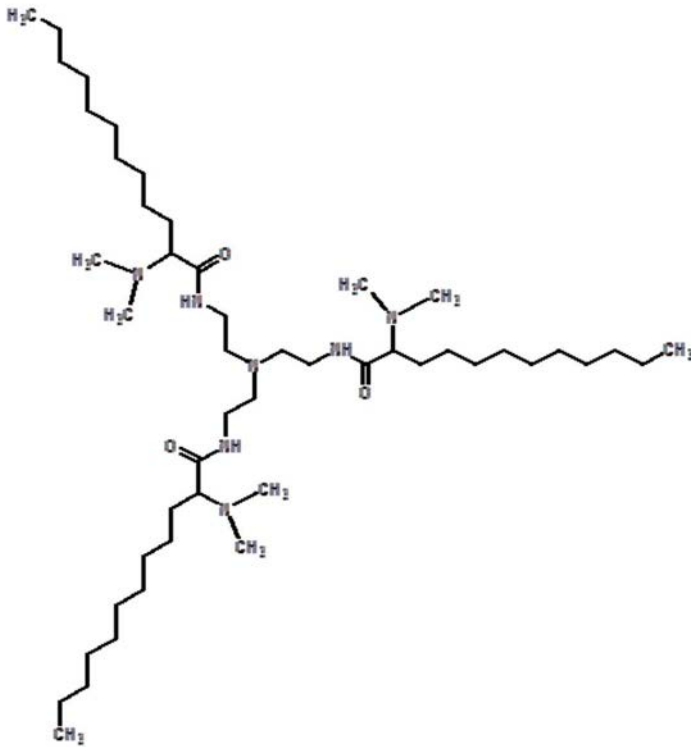
35. 一种包含式X、Xa或Xb的类脂质化合物:



(式 X);

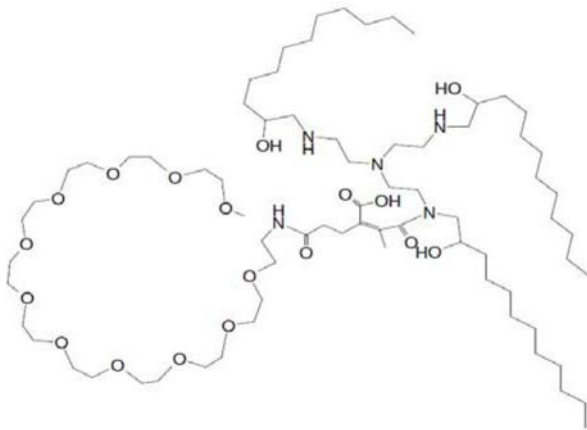


(式 Xa); 或



(式 Xb)。

36. 一种类脂质化合物,其包含式XI中所示的结构:



(式 XI)。

37. 一种类脂质化合物,其包含式XII中所示的结构:

核酸被运载物的混合载体

背景技术

[0001] 本发明属于药物治疗、疾病预防和药物递送领域。本发明尤其涉及可用于向需要的受试者递送某些类型的活性成分的载体。更具体地,本发明涉及这样的活性成分的递送,所述活性成分代表生物活性化合物,所述生物活性化合物难以跨越生物屏障递送至其在活体内的靶标,例如靶向器官、组织或细胞。具有很大治疗价值并且同时难以递送至其生物学靶标的此类生物活性化合物的示例包括基于核酸的疫苗和治疗剂。

[0002] 今天的各种疾病需要一种治疗,其涉及基于肽、蛋白和核酸的药物的施用,特别是涉及核酸转染到细胞或组织中。基于肽、蛋白和核酸的药物的全部治疗潜力经常受到它们由于其大小和电荷而穿过哺乳动物的细胞质膜的能力有限的影响,导致细胞通路不良和治疗效果不足。今天,这种障碍代表了许多生物制药的生物医学发展和商业成功的重大挑战(参见例如Foerg and Merkle, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, published online at www.interscience.wiley.com, 2008, 97 (1) :144-62)。

[0003] 对于某些疾病或病症,已经开发了基因治疗方法作为这种治疗的特定形式,其需要用基因转染细胞或组织并将它们插入细胞的DNA中,例如在遗传性疾病的情况下,其中缺陷型突变等位基因用功能性等位基因替代。然而,将核酸或基因转移或插入个体细胞仍然是当今的主要挑战,尽管它对于实现基因治疗的显著治疗效果是绝对必要的。

[0004] 为了成功地将核酸或基因转移到个体细胞中,必须通过许多不同的障碍。核酸的转运通常通过核酸与细胞膜缔合和随后由内体摄取而发生。在内体中,引入的核酸与细胞溶质分离。当细胞溶质中发生表达时,这些核酸必须离开内体。如果核酸在内体与溶酶体融合之前不离开内体,则它们将遭受内体的内容物的通常命运并且被降解。替代地,内体可以与细胞膜融合,导致其内容物返回到细胞外培养基中。为了有效转移核酸,内体逃逸因此似乎是除了转染效率本身之外最重要的步骤之一。到目前为止,有不同的方法来解决这些问题。但是,到目前为止,还没有任何方法在所有方面都取得了成功。

[0005] 目前本领域中使用的转染剂通常包括各种类型的肽、聚合物、脂质以及其他载体化合物,其可以组装成纳米颗粒或微米颗粒(参见例如Gao, X., K.S.Kim, et al. (2007), *AAPS J* 9 (1) :E92-104)。这些转染剂中的大多数已仅仅成功用于体外反应。当用核酸转染活体动物的细胞时,必须满足进一步的要求。例如,核酸和载体的络合物(complex)必须在生理盐溶液中在附聚方面是稳定的。此外,它不得与宿主的补体系统的部分相互作用。另外,该络合物必须通过普遍存在的核酸酶保护核酸免于早期细胞外降解。对于基因治疗应用,此外非常重要,载体不被适应性免疫系统识别(免疫原性)并且不刺激非特异性细胞因子风暴(急性免疫应答)(参见Kim et al., (2007, 同上); Martin, M.E. and K.G.Rice (2007), *AAPS J* 9 (1) :E18-29; 和Foerg and Merkle, (2008, 同上)。

[0006] Foerg和Merkle (2008, 同上) 讨论了基于肽、蛋白和核酸的药物的治疗潜力。根据他们的分析,这些药物的全部治疗潜力经常因其穿过哺乳动物的细胞质膜的能力有限而受到损害,导致细胞通路不良和治疗效果不足。今天,这种障碍代表了许多生物制药的生物医学发展和商业成功的重大挑战。

[0007] 在这种背景下,Gao等人(Gao et al.The AAPS Journal 2007;9(1)Article 9)看到了在开发一种方法中基因治疗的主要挑战,该方法将治疗基因递送给可以实现适当基因表达的选定细胞。然而,基因递送和特别成功地将核酸引入细胞或组织中并不简单并且通常取决于许多因素。为了成功递送,例如将核酸或基因成功递送到细胞或组织中,必须克服许多障碍。根据Gao et al. (2007)的说法,理想的基因递送方法需要满足3个主要标准:(1)它应该保护转基因不被细胞间基质中核酸酶降解,(2)它应该使转基因穿过质膜和(3)它应该没有任何不利影响。

[0008] 通常,用核酸转染细胞是使用病毒或非病毒载体或载体体进行的。为了成功递送,这些病毒或非病毒载体必须能够克服上述障碍。目前可用的最成功的基因治疗策略依赖于使用的病毒载体,例如腺病毒、腺相关病毒、逆转录病毒和疱疹病毒。病毒载体能够高效地介导基因转移和可能的长期基因表达,并满足3个标准中的2个。然而,在基因治疗临床试验中发现的急性免疫应答、免疫原性和插入诱变已引起关于一些常用病毒载体的严重安全性问题。

[0009] 可以在使用非病毒载体中找到该问题的解决方案。尽管非病毒载体不如病毒载体有效,但已开发出许多非病毒载体以在基因治疗中提供更安全的替代方案。已经使用物理(无载体体基因递送)和化学方法(基于合成载体的基因递送)研究了非病毒基因递送的方法。物理方法通常包括使用注射针、电穿孔、基因枪、超声波和流体动力学递送的简单注射。这些方法中的一些采用渗透细胞膜并促进细胞内基因转移的物理力。化学方法通常使用合成的或天然存在的化合物,例如,阳离子脂质或阳离子聚合物,作为将转基因递送到细胞中的载体体。虽然在各种非病毒基因递送系统的基础科学和应用方面取得了重大进展,但大多数非病毒方法仍然不如病毒载体有效,特别是对于体内基因递送(参见例如Gao et al.The AAPS Journal 2007;9(1)Article 9)。

[0010] 在过去的十年中,已经宣布了核酸的细胞递送中的实质性改善的有吸引力的前景,这些前景应该是由于它们物理组装或化学连接到所谓的细胞穿透肽(CPP),其也称为蛋白转导结构域(PTD)(参见Foerg and Merkle,(2008,同上))。CPP代表10至约30个氨基酸的短肽序列,其可穿过哺乳动物细胞的质膜,因此可为细胞药物递送提供前所未有的机会。几乎所有这些肽都包含一系列阳离子氨基酸与序列的组合,其在低pH下形成 α -螺旋。当通过质子泵在体内连续降低pH时,肽的构象变化通常迅速开始。该螺旋基序介导插入内体的膜,导致其内容物释放到细胞质中(参见Foerg and Merkle,(2008,同上);和Vives,E.,P.Brodin,et al.(1997);A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus.J Biol Chem 272(25):16010-7)。尽管具有这些优点,但CPP介导的药物递送的主要障碍被认为是在接触或通过上皮细胞和内皮细胞的酶促屏障时肽通常快速代谢清除。因此,CPP的代谢稳定性代表了其细胞生物利用度的重要生物药物因素。然而,在本技术领域中没有可用的CPP,其一方面足够稳定以在它们被代谢裂解之前将它们的被运载物(cargo)运送到靶标,并且另一方面可以在它们可以累积并达到毒性水平之前从组织中清除。

[0011] 本技术领域用于将被运载物分子输送到细胞中(例如,用于基因治疗)的另一种方法包括使用其他类型的肽配体(参见Martin and Rice(参见Martin and Rice,The AAPS Journal 2007;9(1)Article 3))。此类肽配体可以是取自较大蛋白的短序列,其代表受体

识别所需的必需氨基酸,例如用于靶向癌细胞的EGF肽。已经鉴定了其他肽配体,其包括用于靶向凝集素样氧化LDL受体(LOX-1)的配体。内皮细胞中LOX-1的上调与功能失调状态如高血压和动脉粥样硬化有关。然而,这种肽配体不适用于许多基因治疗方法,因为它们不能通过络合或粘附与其被运载物分子连接,而是需要共价键,例如,交联剂,其通常在细胞中表现出细胞毒性作用。

[0012] 合成载体也可用于将被运载物分子递送到细胞中,例如用于基因治疗的目的。然而,许多合成载体的一个主要缺点是与病毒载体相比它们的转染效率差,并且需要显著的改进以实现进一步的临床开发。已经鉴定了限制体外和体内核酸转移的若干障碍,并且包括在生理条件下载体的细胞内不良递送、毒性和不稳定性(参见例如Read, M.L., K.H.Bremner, et al. (2003): Vectors based on reducible polycations facilitate intracellular release of nucleic acids. *J Gene Med* 5(3):232-45)。

[0013] 基因治疗中的一种特定方法使用阳离子或可阳离子化的脂质。然而,尽管许多阳离子或可阳离子化的脂质在细胞培养物中显示出优异的转染活性,但大多数在血清存在下表现不佳,并且只有少数在体内具有活性。当脂质络合物暴露于占优势数量的带负电荷且通常是存在于血液、粘液上皮衬液或组织基质中的两性蛋白和多糖时,发生尺寸、表面电荷和脂质组成的显著变化。脂质络合物(lipoplexe)一旦在体内施用,就倾向于与带负电的血液成分相互作用并形成大的聚集体,这些聚集体会被吸收到循环的红细胞表面,被困在粘稠的粘液层中或栓塞在微血管中,从而阻止它们到达在远端位置的预期的靶细胞。此外,已观察到与脂质络合物有关的毒性。症状包括尤其是炎性细胞因子的诱导。在人类中,在接受脂质络合物的受试者中注意到不同程度的不良炎症反应,包括流感样症状。因此,关于脂质络合物是否可以安全地用于人体,特别是当需要重复施用时,这似乎是有疑问的。

[0014] 基因治疗中的另一种方法是使用阳离子或可阳离子化的聚合物。结果证明这些聚合物在核酸递送方面是有效的,因为它们可以紧密复合和浓缩带负电荷的核酸。因此,已经研究了许多阳离子或可阳离子化的聚合物作为体外和体内基因递送的载体。这些包括聚乙烯亚胺(PEI)、聚酰胺胺和聚丙烯胺树枝状大分子、聚烯丙胺、阳离子葡聚糖、壳聚糖,各种蛋白和肽。尽管大多数阳离子或可阳离子化的聚合物具有将DNA缩合成小颗粒并通过细胞表面上的阴离子位点的电荷-电荷相互作用经由胞吞作用促进细胞摄取的功能,但它们的转染活性和毒性显著不同。有趣的是,阳离子或可阳离子化的聚合物表现出更好的转染效率,并且由于带负电的核酸被运载物(cargo)的更强的复合作用而导致分子量增大。然而,分子量的增大也会导致聚合物的毒性增大。PEI可能是用于基因递送的最活跃且研究最多的聚合物,但其作为转染试剂的主要缺点涉及其不可生物降解的性质和毒性。此外,尽管由高分子量聚合物形成的多聚复合物(polyplexes)在生理条件下表现出改善的稳定性,但数据表明这种聚合物可能阻碍载体解包(unpacking)。例如,19和36个氨基酸残基的聚(L-赖氨酸)(PLL)显示出比180个残基的PLL更快地从DNA解离,导致短期基因表达显著增强。需要最少6到8个阳离子氨基酸来将DNA压实成在受体介导的基因递送中有活性的结构。然而,由短聚阳离子形成的多聚复合物在生理条件下是不稳定的,并且通常在生理盐溶液中快速聚集。为了克服这种负面影响,Read et al. (参见Read, M.L., K.H.Bremner, et al. (2003): Vectors based on reducible polycations facilitate intracellular release of nucleic acids. *J Gene Med* 5(3):232-45;和Read, M.L., S.Singh, et al. (2005):

A versatile reducible polycation-based system for efficient delivery of a broad range of nucleic acids. *Nucleic Acids Res* 33 (9) :e86) 基于通过肽 Cys-Lys₁₀-Cys 的氧化缩聚制备的线性可还原聚阳离子 (RPC) 开发了一种新型合成载体, 其可以通过细胞内环境切割以促进核酸的释放。他们可以证明经由 RPC 形成的多聚复合物由于减少能够有效释放 DNA 和 mRNA 的条件而不稳定。RPC 的裂解还将聚阳离子的毒性降低至与低分子量肽相当的水平。Read et al. (2003, 同上) 的这种方法的缺点是, 内体溶解剂氯喹或阳离子脂质 DOTAP 另外是将转染效率提高到适当水平所必需的。因此, Read et al. (2005, 同上) 包括 RPC 中的组氨酸残基, 其具有已知的内体缓冲能力。他们可以证明, 富含组氨酸的 RPC 可通过细胞内还原环境而裂解, 从而能够有效地细胞质递送多种核酸, 包括质粒 DNA、mRNA 和 siRNA 分子, 而不需要内体溶解剂氯喹。

[0015] Read et al. (2005, 同上) 没有评估富含组氨酸的 RPC 是否可以直接用于体内应用。在他们的研究中, 在不存在血清的情况下进行转染以避免掩蔽组氨酸残基增强基因转移的能力, 其可能源自血清蛋白与限制细胞摄取的多聚复合物的结合。初步实验表明, 富含组氨酸的 RPC 多聚复合物的转染特性可能受到存在的血清蛋白的影响, 其中在 10% FCS (胎牛血清) 中观察到 GFP 阳性细胞减少 50%。对于体内应用, 他们提出用亲水性聚合物聚-[N-(2-羟基-丙基) 甲基丙烯酰胺] 进行修饰。因此, Read et al. (2005, 同上) 没有实现预防多聚复合物的聚集和聚阳离子蛋白与血清蛋白的结合。此外, 由于大量过量的聚合物 (其特征在于高 N/P 比), 在复合核酸时形成强络合物, 由于它们强烈倾向于盐诱导的聚集和与血清内容物的相互作用 (调理作用), 因此它们在体内仅具有有限的用途。另外, 这些络合物当用于基因治疗时, 可以激发急性免疫应答。Read et al. (2003, 同上) 也没有提供了该出版物中所示的基于 RPC 的络合物的体内数据。事实证明, 这些强的基于 RPC 的络合物在局部施用至真皮后完全无活性。此外, Read et al. (2005, 同上) 使用严格的氧化条件 (30% DMSO) 以诱导产生具有尽可能长的链长 (“逐步增长聚合”) 的高分子聚合物以确保核酸被运载物的完全络合。

[0016] 在类似于 Read et al. 的方法中, McKenzie et al. (McKenzie, D.L., K.Y. Kwok, et al. (2000), *J Biol Chem* 275 (14) :9970-7., McKenzie, D.L., E. Smiley, et al. (2000), *Bioconjug Chem* 11 (6) :901-9, 和 US 6,770,740B1) 通过将多个半胱氨酸插入短的合成肽中来开发自交联肽作为基因递送剂, 以降低毒性, 如用高分子聚阳离子观察到的。对于 DNA 的络合, 它们将自交联肽与 DNA 混合以在 DNA 被运载物络合的同时诱导肽间二硫键。对于体内基因递送方法, 他们提出了自交联肽的衍生化, 其中隐形剂 (stealth) (例如聚乙二醇) 或靶向剂在远离每个末端的位点可操作地附接于肽。在另一种方法中, 同一作者为了掩蔽 DNA 肽缩合物并从而减少与血液成分的相互作用的目的, 开发了非交联肽 CWK₁₈ 通过可还原或不可还原键用聚乙二醇衍生化 (Kwok, K.Y., D.L. McKenzie, et al. (1999). "Formulation of highly soluble poly(ethylene glycol)-peptide DNA condensates." *J Pharm Sci* 88 (10) :996-1003.)。

[0017] 综上所述, 上面举例说明的现有技术存在各种缺点。如 Read et al. (2003, supra) 或 McKenzie et al. (2000 I and II, 同上和 US 6,770,740B1) 描述的自交联肽的一个特殊缺点涉及所形成的颗粒表面上的高正电荷。由于这种电荷, 当使这些颗粒在体内经受升高的盐浓度时, 颗粒对于聚集表现出高度的不稳定性。然而, 这种盐浓度通常在体内在细胞或

细胞外介质中发生。此外,具有高正电荷的络合物显示出强烈的调理作用倾向。这导致巨噬细胞的摄取增强以及由于降解导致的络合物的快速失活。特别地,免疫系统的细胞对这些络合物的摄取通常导致对不同细胞因子的下游刺激。然而,这种先天免疫系统的非特异性激活代表了这些系统的严重缺点,并且应该避免,特别是为了基因治疗的若干方面的目的,其中应严格避免急性免疫应答(细胞因子风暴)。另外,在生物系统中,带正电荷的络合物可以通过细胞外基质或血清的带负电的组分容易地结合或固定。而且,络合物中的核酸可能过早释放,导致络合物在体内的转移效率和半衰期降低。此外,有利于体内基因递送的利用隐形剂(例如聚乙二醇(PEG))的载体的可逆衍生化仅对于肽单体是可能的,但对于自交联肽而言不是可能的,或者对于具有确定的聚合物链长的聚合物载体是不可能的。特别是,在交联的阳离子肽载体的末端不可能进行这种可逆衍生化。另外,在现有技术中,仅描述了具有长聚合物链或具有不确定聚合物链长度的由自交联肽组成的高分子量聚合物,其不幸地将其被运载物压实到使得在细胞中被运载物释放受限的程度。极端不确定的聚合物链长度在基于RPC的药物的管理批准方面是进一步的问题。这种批准的一个前提条件是每种这样的药物制剂具有相同的组成、相同的结构和相同的性质。对于来自现有技术的基于RPC的络合物,这不能得到保证。此外,现有技术中提供的基于RPC的聚合物或络合物由于其不确定的结构或聚合物链长而难以表征。

[0018] 因此,直到今天还没有提出普遍适用的方法或载体,其允许压实和稳定用于基因治疗和其他治疗应用的目的的核酸,并且其显示良好的转染活性以及核酸被运载物的良好释放的组合,特别是体内和低毒性甚至无毒性,例如由于通过自交联聚合物进行的核酸的可逆隐形和可逆络合的组合而导致。因此,本技术领域仍然需要提供用于基因转移的改进的载体,其足够稳定以在它们被代谢裂解之前将其被运载物运送到靶标并且在它们可以积累并达到毒性水平之前从组织中清除。

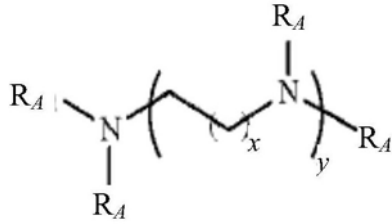
[0019] 因此,本发明的目的是提供一种载体,特别是用于递送核酸用于治疗或预防应用的载体,其能够压实核酸并且允许其在体外有效引入不同的细胞系中,而且能够体内转染。当细胞摄取通过内体途径发生时,这种载体或络合剂还应允许或使得核酸能从内体中有效释放。另一个目的是提供一种载体,其在与核酸络合时表现出对附聚的抗性。另一个目的是为核酸被运载物提供相对于含有血清的培养基的增强的稳定性。另一个目的是在没有强烈的急性免疫反应的情况下实现有效的体内活性。另一个目的是克服如上文所述的已知的用于核酸递送的载体的任何缺点或限制。基于以下描述、实施例和专利权利要求,本发明所解决的其他目的将变得清楚。

[0020] 通过如专利权利要求中所述的本发明的主题来实现这些目的。

发明内容

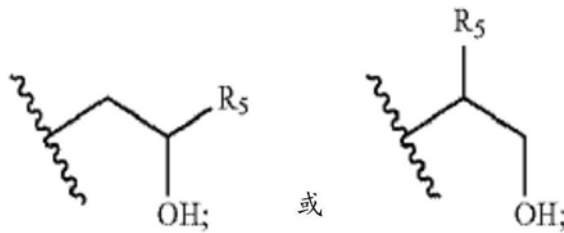
[0021] 在第一方面,本发明提供了包含阳离子肽或聚合物、阳离子类脂质化合物(a cationic lipidoid compound)和核酸化合物的组合物。类脂质化合物优选为包含两个或更多个阳离子氮原子和至少两个亲脂性尾部的化合物。与许多常规阳离子脂质相反,类脂质化合物可以不含可水解的连接基团,特别是包含可水解的酯、酰胺或氨基甲酸酯基团的连接基团。类脂质的阳离子氮原子可以是可阳离子化的或永久阳离子的,或者两种类型的阳离子氮可以存在于化合物中。

[0022] 在一实施方案中,类脂质化合物是根据式I的化合物

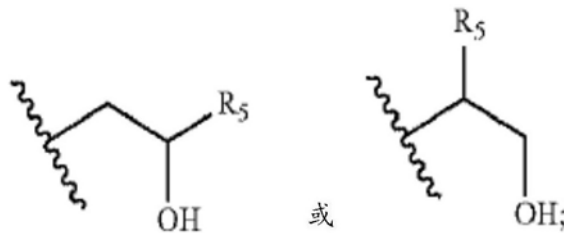


(式 I)

[0023] 其中每次出现的 R_A 独立地是未经取代的、环状或非环状的、支链或非支链的 C_{1-20} 脂族基;经取代或未经取代的、环状或非环状的、支链或非支链的 C_{1-20} 杂脂族基;经取代或未经取代的芳基;经取代或未经取代的杂芳基;

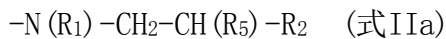


并且其中至少一个 R_A 是



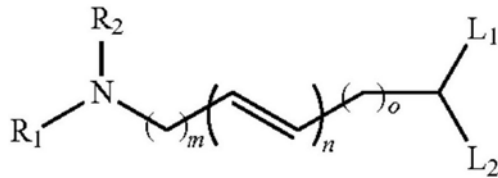
[0024] 此外,每次出现的 R_5 独立地是未经取代的,环状或非环状的,支链或非支链的 C_{8-16} 脂族基团;经取代或未经取代的芳基;或经取代或未经取代的杂芳基。每次出现的 x 都是介于1和10之间的整数,包括1和10;每次出现的 y 都是介于1和10之间的整数,包括1和10。此外,式I化合物的任何药学上可接受的盐都包括在类脂质化合物的范围内。在一些实施方案中,根据式I的类脂质化合物包含PEG部分。

[0025] 在另一实施方案中,类脂质是包含两个或三个式IIa和/或式IIb部分的化合物:



其中,独立地对于每个单独的式IIa或式IIb部分, R_1 选自氢或 C_1-C_4 烷基; R_2 选自直链或支链、饱和或不饱和的 C_6-C_{16} 烃基链, R_3 和 R_4 在每次出现时独立地选自 C_1-C_4 -烷基,并且 R_5 是氢或羟基,优选羟基。在一些实施方案中,根据式IIa和/或IIb的类脂质化合物包含PEG部分。

[0026] 在进一步的实施方案中,类脂质是根据式III的化合物



(式 III)

[0027] 其中 R_1 和 R_2 各自独立地选自氢,任选经取代的、饱和或不饱和的 C_1 - C_{20} 烷基,和任选经取代的饱和或不饱和的 C_6 - C_{20} 酰基; L_1 和 L_2 各自独立地选自任选经取代的、饱和或不饱和的 C_1 - C_{30} 烷基; m 和 o 各自独立地选自自由零和任何正整数组成的组;并且 n 是任何正整数。在本发明的一些实施方案中, R_1 、 R_2 、 L_1 和/或 L_2 各自独立地为PEG部分或被PEG部分取代。

[0028] 阳离子肽或聚合物可以是例如包含或基于选自Arg、Lys、His和/或Orn的碱性氨基酸的寡肽或多肽。替代地,其可以是基于不代表氨基酸的单体单元的聚合物,例如阳离子多糖、聚亚胺或聚丙烯酸酯。

[0029] 核酸化合物可以,例如,选自经化学修饰的或未经化学修饰的DNA,单链或双链DNA,编码或非编码DNA,其任选地选自质粒,(短)寡脱氧核苷酸(即(短)DNA寡核苷酸),基因组DNA,DNA引物,DNA探针,免疫刺激性DNA,适体或其任何组合。替代地或附加地,还可以例如从任何PNA(肽核酸)选择这样的核酸分子。进一步替代地或附加地,并且还根据特别优选的实施方案,核酸选自经化学修饰的或未经化学修饰的RNA,单链或双链RNA,编码或非编码RNA,其任选地自信使RNA(mRNA),(短)寡核糖核苷酸(即(短)RNA寡核苷酸),病毒RNA,复制子RNA,转移RNA(tRNA),核糖体RNA(rRNA),免疫刺激性RNA(isRNA),微小RNA,小干扰RNA(siRNA),小核RNA(snRNA),小发夹RNA(shRNA),或核糖开关,RNA适体,RNA诱饵,反义RNA,核酶或其任何组合。优选地,络合物的核酸分子是RNA。更优选地,络合物的核酸分子是(线性)单链RNA,甚至更优选mRNA或免疫刺激性RNA。

[0030] 该组合物的特征还可以在于其相对于阳离子肽或聚合物的量或者相对于核酸的量,其类脂质的含量相对较低。在一实施方案中,阳离子肽或聚合物比核酸化合物的重量比为至少约1,并且类脂质比核酸化合物的比例不高于约 $15\text{nmol}/\mu\text{g}$ 。在另一实施方案中,类脂质比阳离子肽或聚合物的重量比不高于约1:50,和/或类脂质比阳离子肽或聚合物的比例不高于约 $2\text{nmol}/\mu\text{g}$ 。

[0031] 在另一方面,本发明提供了包含阳离子肽或聚合物、类脂质和核酸化合物的纳米颗粒,例如络合物形式的纳米颗粒。

[0032] 在另一方面,本发明提供了包含这样的纳米颗粒或多种这样的纳米颗粒的组合物。该组合物可以配制成例如无菌液体分散体或无菌固体组合物,例如粉末或冻干形式,以用于与含水液体载体重构。

[0033] 在另一方面,本发明提供了用于制备如上定义的组合物的试剂盒。例如,试剂盒可包含:第一试剂盒组分,其包含阳离子肽或聚合物,和/或类脂质;和第二试剂盒组分,其包含核酸化合物。

[0034] 在又一方面,本发明涉及根据上述任一方面的组合物,纳米颗粒或试剂盒的医学用途。例如,医学用途可包括预防、治疗和/或改善选自以下的疾病:癌症或肿瘤疾病,传染

病,优选(病毒,细菌或原生动物)传染病,自身免疫疾病,过敏或过敏性疾病,单基因疾病,即(遗传性)疾病,或一般的遗传性疾病,具有遗传性的遗传背景并且通常由确定的基因缺陷引起且根据孟德尔定律遗传的疾病,心血管疾病,神经元疾病,呼吸系统疾病,消化系统疾病,皮肤疾病,肌肉骨骼疾病,结缔组织疾病,赘生物,免疫缺陷,内分泌、营养和代谢疾病,眼疾,耳疾和与肽或蛋白缺乏相关的疾病。

[0035] 本发明基于以下发现:通过使用结合阳离子肽或聚合物和类脂质的载体,可以显著改善生物活性被运载物材料(例如核酸)向某些组织或靶细胞的递送,其中被运载物材料是被细胞有效吸收,而通常与类脂质相关的毒性显著降低。

[0036] 基于下面的详细说明、实施方案和权利要求,本发明的其他目的、方面、有用的实施方案、应用、有益效果和优点将变得显而易见。

附图说明

[0037] 图1A至1C显示了本发明的聚合物-脂质或聚合物-类脂质制剂对体外So18肌肉细胞的转染效率的影响。使用GpLuc mRNA (SEQ ID NO:12) 作为被运载物,一式三份进行所有转染实验。此外,还包括阴性对照(缓冲,被动脉冲)。除了本发明的聚合物-脂质或聚合物-类脂质转染试剂之外,聚合物以及纯GpLuc mRNA仅用于比较,而不使用转染试剂(本文中也为标记为R2851)。

[0038] 类似地,图2A和2B显示了本发明的聚合物-类脂质制剂对体外HepG2细胞中mRNA的转染效率的影响。特别地,比较了可阳离子化的3-C12和3-C12-OH以及永久性阳离子3-C12-OH-cat。有关详细信息,请参阅示例3。

[0039] 图3显示了用不同的聚合物-脂质或类脂质络合的GpLuc mRNA处理后,人外周血单核细胞(PBMC)中细胞因子干扰素 α (INF α)的体外释放。有关详细信息,请参阅示例4。

[0040] 图4显示了视网膜下注射本发明的聚合物-脂质或聚合物-类脂质制剂后24小时,视网膜下注射PpLuc mRNA (SEQ ID NO:19) 到大鼠眼中的扫描激光检眼镜(SLO)分析结果,其表示为相对光单位(RLU)。关于注射方案和进一步的细节,参见示例5。

[0041] 图5显示了使用本发明的HA-mRNA的聚合物-类脂质制剂或单独的“裸”HA-mRNA,在用HA-mRNA (R2564, SEQ ID NO:17) 肌内接种Balb/c小鼠 (n=8) 后诱导针对HA蛋白(血凝素)的抗体的滴度。每个点代表一只动物,水平线代表中值。有关更多详细信息,参见示例6。

[0042] 图6显示了使用非CVCM/PB83聚合物用mRNA构建体R2851转染的A549细胞中的GpLuc蛋白表达。

[0043] 图7A和7B显示了使用非CVCM/PB83聚合物用mRNA构建体R2851转染的BHK和分化的So18细胞中的GpLuc蛋白表达。

[0044] 图7C显示了使用非CVCM/PB83聚合物用mRNA构建体R2244转染的HeLa细胞中的PpLuc蛋白表达。

[0045] 图8显示了用mRNA构建体R2851转染的Hep G2细胞中的GpLuc蛋白表达。

[0046] 图9显示了玻璃体内注射后的PpLuc蛋白表达。

[0047] 图10显示了用使用不同聚合物/脂质组合物配制的mRNA构建体R2851转染的A549细胞中的GpLuc蛋白表达。

[0048] 图11A和图11B显示用使用聚乙二醇化脂质配制的mRNA构建体R2851转染的A549细

胞中的GpLuc蛋白表达。

具体实施方式

[0049] 除非另外定义,或者除非特定上下文另有要求,否则本文使用的所有技术术语具有与相关技术领域技术人员通常理解的含义相同的含义。

[0050] 除非上下文指出或另有要求,否则在本说明书中和权利要求的词语“包括”、“包含”和“含有”以及类似表达应以开放和包含的含义解释为“包括但不限于”。

[0051] 表达,“一个实施方案”,“一实施方案”,“特定实施方案”等表示特定特征、性质或特性,或特征、性质或特性的特定组或组合,如结合相应的表达所提及的那样,存在于本发明的至少一个实施方案中。在整个说明书中各种地方出现的这些表达不一定是指同一实施方案。此外,特定特征、性质或特性可以在一个或多个实施方案中以任何合适的方式组合。

[0052] 除非上下文另有明确规定,否则单数形式“一”、“一个”和“该”应理解为包括复数指代。

[0053] 数字背景中的百分比应理解为相对于各个项目的总数。在其他情况下,并且除非上下文另有规定,否则百分比应理解为重量百分比(wt.-%)。

[0054] 在第一方面,本发明提供了包含阳离子肽或聚合物、阳离子类脂质化合物和核酸化合物的组合物。

[0055] 在本发明的上下文中,“组合物”是指可以(任选地与任何其他成分一起)掺入特定的成分的任何类型的组合物。因此,组合物可以是干燥组合物,例如粉末或颗粒,或固体单元,例如冻干形式或片剂。替代地,组合物可以是液体形式,并且每种组分可以独立地以溶解或分散(例如悬浮或乳化)形式掺入。在一优选的实施方案中,将组合物配制成无菌固体组合物,例如粉末或冻干形式,以与含水液体载体重构。对于包含如下面进一步详细描述核酸被运载物的那些组合物形式,这样的制剂也是优选的。

[0056] 如本文所使用的,“化合物”是指化学物质,其是由具有基本相同的化学结构和性质的分子组成的材料。对于小分子化合物,这些分子在其原子组成和结构构型方面通常是相同的。对于大分子或聚合化合物,化合物的分子高度相似,但并非所有化合物都必须相同。例如,指定由50个单体单元组成的聚合物片段也可含有单个分子,例如具有48或53个单体单元的单个分子。

[0057] 如本文所使用的,肽是包含通过肽或酰胺键连接的多个氨基酸单体的化合物。取决于肽的大小,其也可以称为寡肽或多肽。原则上,蛋白也是多肽。

[0058] 在本发明的上下文中,聚合物是其分子由多个重复亚单元组成的化合物。聚合物可以基于不同的亚单元,例如共聚物。

[0059] 类脂质化合物(也简称为类脂质)是脂质样化合物,即具有脂质样物理性质的两亲化合物。类脂质化合物优选为包含两个或更多个阳离子氮原子和至少两个亲脂性尾部的化合物。与许多常规阳离子脂质相反,类脂质化合物可以不含可水解的连接基团,特别是包含可水解的酯、酰胺或氨基甲酸酯基团的连接基团。类脂质的阳离子氮原子可以是可阳离子化的或永久阳离子的,或者两种类型的阳离子氮可以存在于化合物中。

[0060] 除非从特定的上下文中清楚地看出不同的含义,否则术语“阳离子”是指相应的结构永久地带有正电荷,或不永久地但是响应于某些条件(例如pH)带有正电荷。因此,术语

“阳离子”包括“永久阳离子”和“可阳离子化”。

[0061] 如本文所使用的，“永久阳离子”是指相应的化合物或基团或原子在其环境的任何pH值或氢离子活性下带正电荷。通常，正电荷是由季氮原子的存在引起的。当化合物携带多个这样的正电荷时，它可以被称为永久性聚阳离子，其是永久阳离子的子类别。

[0062] 在本文中，前缀“聚-”是指在化合物中具有各自性质的多个原子或基团。如果放在括号中，则多个的存在是可选的。例如，(聚)阳离子是指阳离子和/或聚阳离子。但是，不应将缺少前缀解释为排除多个。例如，聚阳离子化合物也是阳离子化合物，并且可以这样称呼。

[0063] “可阳离子化”是指化合物或基团或原子在较低pH下带正电荷并且在其环境的较高pH下不带电荷。同样在不能测定pH值的非水性环境中，可阳离子化的化合物、基团或原子在高氢离子浓度下带正电，在低浓度或活性的氢离子下不带电。它取决于可阳离子化或可聚阳离子化合物的各个性质，特别是相应的可阳离子化基团或原子的 pK_a ，在所述pH或氢离子浓度下，其是带电荷或不带电荷的。在稀释的水性环境中，可以使用本领域技术人员公知的所谓的Henderson-Hasselbalch方程来估计带有正电荷的可阳离子化的化合物、基团或原子的比例。

[0064] 例如，如果化合物或部分是可阳离子化的，则优选其在约1至9，优选4至9，5至8或甚至6至8的pH值下带正电荷，更优选9或者低于9，8或者低于8，7或者低于7的pH值下带正电荷，最优选在生理pH值，例如约7.3至7.4，即在生理条件下，特别是在体内细胞的生理盐条件下带正电荷。

[0065] 除非从特定的上下文中清楚地看出不同的含义，否则“阳离子化的”通常意味着可阳离子化的结构处于其例如在碱性氨基酸(例如精氨酸)在中性生理学环境中的情况下实际带有正电荷的状态。

[0066] 化合物的“多聚体”(如在包含至少一个阳离子部分P的阳离子化合物的二硫键连接的多聚体的情况下)应理解为包含至少两个第一化合物的单元的化合物，该化合物是所述第一化合物的多聚体。这与第一化合物是否已含有多个重复单元无关。

[0067] -SH基团表示巯基。

[0068] 本发明基于以下发现：类脂质与阳离子肽或聚合物的组合在以令人意想不到的耐受性程度络合核酸并将核酸递送到细胞中是非常有效的。更具体地，本发明人已经发现，这种组合显示出载体组分(即类脂质和聚合物或肽)在其将被运载物递送到细胞中的有效性方面的累加效应，而在毒性方面没有或者令人惊讶地几乎没有累加效应。

[0069] 有利地，阳离子肽或聚合物允许显著改变其肽或聚合物含量，从而非常容易地调节其生物物理/生物化学性质，例如，允许掺入各种类型的阳离子或可阳离子化的肽、蛋白或聚合物，并任选地加入其它组分，例如，其他氨基酸成分。

[0070] 同样非常令人惊讶的是观察到，即使少量的类脂质(相对于阳离子肽或聚合物的量和/或相对于核酸化合物)也能够增强核酸被运载物的细胞递送而基本上不增加不希望的效果，也不增加组合物的毒性。本发明可以用少至约0.1%至约10%的在脂质络合物或脂质纳米颗粒中使用的脂质的典型量来实施，所述脂质络合物或脂质纳米颗粒已被提出用于例如RNA的递送和细胞的转染。不希望受理论束缚，发明人认为这种低量的类脂质对于实现本发明的组合物的高耐受性是关键。

[0071] 阳离子肽或聚合物可以是基于单体单元的任何永久性阳离子或可阳离子化合物,所述单体单元可以代表或不代表氨基酸。阳离子肽或聚合物可以例如选自那些通常已知具有与核酸化合物形成络合物的能力的阳离子肽或聚合物。

[0072] 在一实施方案中,阳离子肽或聚合物选自鱼精蛋白,核仁素(nucleoline),寡聚赖氨酸或聚赖氨酸,寡聚精氨酸或聚精氨酸,细胞穿透肽,嵌合CPP,转运蛋白,MPG肽,HIV结合肽,Tat,HIV-1Tat,Tat衍生肽,穿透蛋白家族成员,穿透蛋白,触角足基因衍生肽(Antennapedia-derived peptides),pAntp,pIs1,抗微生物衍生CPP,buforin-2,Bac715-24,SynB,SynB(1),pVEC,hCT衍生肽,SAP,MAP,KALA,PpTG20,FGF,乳铁蛋白,组蛋白,VP22,VP22衍生肽,HSV,蛋白转导结构域,PpT620,富含脯氨酸的肽,富含精氨酸的肽,富含赖氨酸的肽,Pep-1,降钙素肽, β -氨基酸,反向聚酰胺,聚(N-乙基-4-乙烯基吡啶溴化物),聚(二甲基氨基乙基甲基丙烯酸酯),聚(酰氨基胺),聚 β 氨基酯,经二胺修饰的1,4-丁二醇二丙烯酸酯-共-5-氨基-1-戊醇聚合物,聚丙胺树枝状大分子,pAMAM基树枝状大分子,聚亚胺,聚(乙烯亚胺),聚(丙烯亚胺),聚烯丙胺,1,5-二甲基-1,5-二氮杂十一亚甲基聚甲溴化物,海美溴铵(hexadimethrine bromide),阳离子多糖,阳离子环糊精基聚合物,阳离子葡聚糖基聚合物,壳聚糖,硅烷主链基聚合物,PMOXA-PDMS共聚物,一种或多种阳离子嵌段和一种或多种中性嵌段的嵌段共聚物。

[0073] 在一实施方案中,阳离子肽或聚合物选自天然肽。天然意指肽是天然产生的,即由活生物体产生的。当然,天然肽也可以化学合成,但它是天然存在的肽。任选地,天然肽可以是经化学修饰的。

[0074] 选择用于本发明的组合物的天然阳离子肽可以是例如细胞穿透肽(CPP)的成员。许多CPP具有富含碱性氨基酸(例如赖氨酸或精氨酸)的氨基酸组合物。

[0075] 在一实施方案中,细胞穿透肽来自不含半胱氨酸形式的TAT衍生肽(TAT意指“转录反式激活因子”),例如TAT或HIV₁-TAT,Tat-AIE点,TAT₍₄₇₋₅₇₎,TAT₍₄₉₋₅₇₎,TAT₍₄₈₋₆₀₎,R9-TAT,Tat-GFP-Tat,Tat-GFP,6His-TAT-Ainp1,6His-TAT-GFP,6xHis-TAT-SOD,TAT-白树毒素(TAT-gelolin),pTat,EGFP-TAT,Tat-Dex,Tat-PCP,P42-TAT。

[0076] 在另一实施方案中,细胞穿透肽来自触角足基因衍生肽,也称为穿透蛋白家族或pAntp,例如pAntp₄₃₋₅₈。

[0077] 在进一步的实施方案中,细胞穿透肽选自hCT衍生的肽,例如hCT9-32、hCT12-32、hCT15-32、hCT18-32、hCT21-32。可能感兴趣的另一组细胞穿透肽是成组的组蛋白,例如H2A或H4。

[0078] 根据进一步的实施方案,细胞穿透肽是抗微生物衍生的阳离子CPP,例如buforin-2、滑爪蟾素II(magainin II)、天蚕素、果蝇抗菌肽(andropin)、家蚕抗菌肽(moricin)、ceratotoxin肽、蜂毒肽(melittin)、铃蟾抗菌肽(bombinin)、东北林蛙抗菌肽(brevinin-1)、蛙科皮肤抗菌肽(esculentins)、CAP18、LL37、Bac715-24/BAC715-24、Bac1-7、Bac1-15、Bac1-17、Bac1-24、Bac5-24、Bac7-24、Bac9-24、Bac11-24、Bac13-24、Bac15-24、SynB1、SynB3、SynB5、皮抑菌肽(dermaseptin)S4、蜜蜂抗菌肽(abaecin)、蜜蜂抗菌肽(apidaecin)、猪抗菌肽(prophenin)、或吲哚菌素(indolicidin)。

[0079] 任选地,CPP是转运蛋白家族的不含半胱氨酸的成员。

[0080] 任选地,CPP是嵌合或合成修饰的肽,例如MPG肽家族的成员,例如MPG-NLS、EGFP-

MPG、MPG α 、MPG β ；或生物素-穿透素、PAF26、PAF95、PAF96、CRGDK、P28、RALA肽、RTAT-ELPBC、GST-(HE)12EFG5-TAT、FabRev1-Tat、G3R6TAT、MAP、Pep-1、ppTG、ppTG1、ppTG20、EGFP-ppTG20；或MPG、KLA-TAT₍₄₇₋₅₇₎、或TatLK15。

[0081] 根据另一实施方案，阳离子肽或聚合物选自合成肽，或寡核苷酸或聚(氨基酸)，其已知不是在自然界中发生的。优选的合成肽是由2至约50个氨基酸残基，或更优选约5至约30个氨基酸残基组成的化合物，其富含碱性氨基酸，例如精氨酸、赖氨酸、组氨酸和/或鸟氨酸。优选地，阳离子肽的至少约50%的氨基酸残基由碱性氨基酸代表。

[0082] 任选地，阳离子肽完全或主要由一种特定的碱性氨基酸组成，例如约5至约30个Arg、Lys、His或Orn的片段，例如

Arg₅、Arg₆、Arg₇、Arg₈、Arg₉、Arg₁₀、Arg₁₁、Arg₁₂、Arg₁₃、Arg₁₄、Arg₁₅₋₃₀；Lys₅、Lys₆、Lys₇、Lys₈、Lys₉、Lys₁₀、Lys₁₁、Lys₁₂、Lys₁₃、Lys₁₄、Lys₁₅₋₃₀；His₅、His₆、His₇、His₈、His₉、His₁₀、His₁₁、His₁₂、His₁₃、His₁₄、His₁₅₋₃₀；或Orn₅、Orn₆、Orn₇、Orn₈、Orn₉、Orn₁₀、Orn₁₁、Orn₁₂、Orn₁₃、Orn₁₄、Orn₁₅₋₃₀。

[0083] 其他有用的肽由两种或更多种不同的碱性氨基酸组成，如以下示例中所述，其意指序列的组成，而没有指定氨基酸残基出现的特定顺序：

Arg₍₄₋₂₉₎Lys₁、Arg₍₄₋₂₉₎His₁、Arg₍₄₋₂₉₎Orn₁、Lys₍₄₋₂₉₎His₁、Lys₍₄₋₂₉₎Orn₁、His₍₄₋₂₉₎Orn₁、Arg₍₃₋₂₈₎Lys₂、Arg₍₃₋₂₈₎His₂、Arg₍₃₋₂₈₎Orn₂、Lys₍₃₋₂₈₎His₂、Lys₍₃₋₂₈₎Orn₂、His₍₃₋₂₈₎Orn₂、Arg₍₂₋₂₇₎Lys₃、Arg₍₂₋₂₇₎His₃、Arg₍₂₋₂₇₎Orn₃、Lys₍₂₋₂₇₎His₃、Lys₍₂₋₂₇₎Orn₃、His₍₂₋₂₇₎Orn₃、Arg₍₁₋₂₆₎Lys₄、Arg₍₁₋₂₆₎His₄、Arg₍₁₋₂₆₎Orn₄、Lys₍₁₋₂₆₎His₄、Lys₍₁₋₂₆₎Orn₄、His₍₁₋₂₆₎Orn₄、Arg₍₃₋₂₈₎Lys₁His₁、Arg₍₃₋₂₈₎Lys₁Orn₁、Arg₍₃₋₂₈₎His₁Orn₁、Arg₁Lys₍₃₋₂₈₎His₁、Arg₁Lys₍₃₋₂₈₎Orn₁、Lys₍₃₋₂₈₎His₁Orn₁、Arg₁Lys₁His₍₃₋₂₈₎、Arg₁His₍₃₋₂₈₎Orn₁、Lys₁His₍₃₋₂₈₎Orn₁；

Arg₍₂₋₂₇₎Lys₂His₁、Arg₍₂₋₂₇₎Lys₁His₂、Arg₍₂₋₂₇₎Lys₂Orn₁、Arg₍₂₋₂₇₎Lys₁Orn₂、Arg₍₂₋₂₇₎His₂Orn₁、Arg₍₂₋₂₇₎His₁Orn₂、Arg₂Lys₍₂₋₂₇₎His₁、Arg₁Lys₍₂₋₂₇₎His₂、Arg₂Lys₍₂₋₂₇₎Orn₁、Arg₁Lys₍₂₋₂₇₎Orn₂、Lys₍₂₋₂₇₎His₂Orn₁、Lys₍₂₋₂₇₎His₁Orn₂、Arg₂Lys₁His₍₂₋₂₇₎、Arg₁Lys₂His₍₂₋₂₇₎、Arg₂His₍₂₋₂₇₎Orn₁、Arg₁His₍₂₋₂₇₎Orn₂、Lys₂His₍₂₋₂₇₎Orn₁、Lys₁His₍₂₋₂₇₎Orn₂；

Arg₍₁₋₂₆₎Lys₃His₁、Arg₍₁₋₂₆₎Lys₂His₂、Arg₍₁₋₂₆₎Lys₁His₃、Arg₍₁₋₂₆₎Lys₃Orn₁、Arg₍₁₋₂₆₎Lys₂Orn₂、Arg₍₁₋₂₆₎Lys₁Orn₃、Arg₍₁₋₂₆₎His₃Orn₁、Arg₍₁₋₂₆₎His₂Orn₂、Arg₍₁₋₂₆₎His₁Orn₃、Arg₃Lys₍₁₋₂₆₎His₁、Arg₂Lys₍₁₋₂₆₎His₂、Arg₁Lys₍₁₋₂₆₎His₃、Arg₃Lys₍₁₋₂₆₎Orn₁、Arg₂Lys₍₁₋₂₆₎Orn₂、Arg₁Lys₍₁₋₂₆₎Orn₃、Lys₍₁₋₂₆₎His₃Orn₁、Lys₍₁₋₂₆₎His₂Orn₂、Lys₍₁₋₂₆₎His₁Orn₃、Arg₃Lys₁His₍₁₋₂₆₎、Arg₂Lys₂His₍₁₋₂₆₎、Arg₁Lys₃His₍₁₋₂₆₎、Arg₃His₍₁₋₂₆₎Orn₁、Arg₂His₍₁₋₂₆₎Orn₂、Arg₁His₍₁₋₂₆₎Orn₃、Lys₃His₍₁₋₂₆₎Orn₁、Lys₂His₍₁₋₂₆₎Orn₂、Lys₁His₍₁₋₂₆₎Orn₃；

Arg₍₂₋₂₇₎Lys₁His₁Orn₁、Arg₁Lys₍₂₋₂₇₎His₁Orn₁、Arg₁Lys₁His₍₂₋₂₇₎Orn₁、Arg₁Lys₁His₁Orn₍₂₋₂₇₎；

Arg₍₁₋₂₆₎Lys₂His₁Orn₁、Arg₍₁₋₂₆₎Lys₁His₂Orn₁、Arg₍₁₋₂₆₎Lys₁His₁Orn₂、Arg₂Lys₍₁₋₂₆₎His₁Orn₁、Arg₁Lys₍₁₋₂₆₎His₂Orn₁、Arg₁Lys₍₁₋₂₆₎His₁Orn₂、Arg₂Lys₁His₍₁₋₂₆₎Orn₁、Arg₁Lys₂His₍₁₋₂₆₎Orn₁、Arg₁Lys₁His₍₁₋₂₆₎Orn₂、Arg₂Lys₁His₁Orn₍₁₋₂₆₎、Arg₁Lys₂His₁Orn₍₁₋₂₆₎、Arg₁Lys₁His₂Orn₍₁₋₂₆₎。

[0084] 在阳离子肽内掺入一种或多种亲水性氨基酸残基和碱性氨基酸可能更有用。在可用于此目的的亲水性氨基酸中，优选具有不带电荷的极性侧链的那些，特别是Thr、Ser、Asn

和/或Gln。这些氨基酸或富含这些氨基酸的序列的掺入使得能够更灵活地结合核酸被运载物。这会导致核酸被运载物的更有效的压实,并因此更好地防止核酸酶和不希望有的减压实。其还使得能提供在整个载体上表现出降低的阳离子电荷的载体,并且在这种情况下,如果需要或必要,能更好地调节结合性能。

[0085] 掺入阳离子中的有用部分序列的示例包括以下:Ser-Thr、Thr-Ser、Ser-Ser、Thr-Thr、Ser-Thr-Ser、Thr-Ser-Thr、Ser-Ser-Ser、Thr-Thr-Thr、Ser-Thr-Ser-Thr、Thr-Ser-Thr-Ser、Ser-Ser-Ser-Ser、Thr-Thr-Thr-Thr、Gln-Asn、Asn-Gln、Gln-Gln、Asn-Asn、Gln-Asn-Gln、Asn-Gln-Asn、Gln-Gln-Gln、Asn-Asn-Asn、Gln-Asn-Gln-Asn、Asn-Gln-Asn-Gln、Gln-Gln-Gln-Gln、Asn-Asn-Asn-Asn、Ser-Asn、Asn-Ser、Ser-Ser、Asn-Asn、Ser-Asn-Ser、Asn-Ser-Asn、Ser-Ser-Ser、Asn-Asn-Asn、Ser-Asn-Ser-Asn、Asn-Ser-Asn-Ser、Ser-Ser-Ser-Ser、或Asn-Asn-Asn-Asn等。这样的序列可以重复,例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、13、14、15或甚至更多次,或者根据需要彼此组合。

[0086] 任选地,富含亲水性氨基酸的序列可含有至少一个脯氨酸,其可用作较长序列的Ser、Thr和Asn的结构破坏剂(structure breaker)。也可掺入两种、三种或更多种脯氨酸,特别是掺入在更长的序列中。

[0087] 在阳离子肽中掺入一种或多种亲脂性氨基酸(特别是Leu、Val、Ile、Ala和/或Met)可能更有用。这种亲脂性氨基酸可能能够参与阳离子肽与核酸被运载物组合时形成的络合物中。

[0088] 亲脂性氨基酸的使用使得核酸的更强的压实成为可能。这可能是由于亲脂性氨基酸和核酸被运载物的特定相互作用,这为载体和被运载物之间形成的络合物提供了额外稳定性。稳定化可以类似于聚合物链之间的非共价缔合或交联。特别是在水性环境中,这种类型的相互作用通常很强并且提供显著的效果。

[0089] 有用子序列的示例包括:Leu-Val、Val-Leu、Leu-Leu、Val-Val、Leu-Val-Leu、Val-Leu-Val、Leu-Leu-Leu、Val-Val-Val、Leu-Val-Leu-Val、Val-Leu-Val-Leu、Leu-Leu-Leu-Leu、Val-Val-Val-Val、Ile-Ala、Ala-Ile、Ile-Ile、Ala-Ala、Ile-Ala-Ile、Ala-Ile-Ala、Ile-Ile-Ile、Ala-Ala-Ala、Ile-Ala-Ile-Ala、Ala-Ile-Ala-Ile、Ile-Ile-Ile-Ile、Ala-Ala-Ala-Ala、Met-Ala、Ala-Met、Met-Met、Ala-Ala、Met-Ala-Met、Ala-Met-Ala、Met-Met-Met、Ala-Ala-Ala、Met-Ala-Met-Ala、Ala-Met-Ala-Met、或Met-Met-Met-Met等。例如,这些序列可以重复1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、13、14、15或更多次,或彼此组合。任选地,富含亲脂性氨基酸的序列可含有至少一个脯氨酸,其可用作Leu、Val、Ile、Ala和/或Met的较长序列的结构破坏剂。也可掺入两个、三个或更多个脯氨酸,特别是掺入更长的序列中。

[0090] 阳离子肽的性质可以通过在其序列中包括非天然氨基酸或通过该肽的化学修饰来进一步调节。例如,可以引入特定的化学基团。可以选择这样的基团,以使得能连接其他组分或配体,例如,通过酰胺形成(例如通过与羧酸、磺酸、胺等反应),通过Michael加成(例如使用马来酰亚胺部分, α 不饱和羰基, β 不饱和羰基等),通过点击化学(例如使用叠氮化物或炔烃),通过烯炔/炔炔易位(例如使用烯炔或炔炔)、亚胺或腓(hydrozone)形成(使用醛或酮、肼、羟基胺、胺)、络合反应(使用抗生物素蛋白、生物素、蛋白G等)或允许 S_N -类型取代反应的组分(例如用卤代烷烃、硫醇、醇、胺、肼、酰肼、磺酸酯、氧磷盐)或其它可用于连接其它组分的化学部分来连接其他组分或配体。

[0091] 在另一实施方案中,阳离子肽或聚合物选自天然、合成或半合成聚合物。优选地,聚合物的分子量分别为约0.5kDa至约20kDa,例如约0.5kDa至约11.5kDa,或约1kDa至约10kDa,或约0.1kDa至约8kDa,或约0.1kDa至约6kDa,或约0.1kDa至约5kDa,或约0.5kDa至约5kDa,或约0.3kDa至约20kDa,或约0.3kDa至约10kDa,或约0.4kDa至约10kDa,或约0.5kDa至约10kDa,或约0.5kDa至约7.5kDa,或约0.5kDa至约4kDa,或约0.5kDa至约3kDa,或约0.67kDa至约2.7kDa。

[0092] 在一实施方案中,阳离子聚合物是任选经修饰的聚丙烯酸酯、壳聚糖、聚乙烯亚胺、多胺、聚氨基酯或聚酰胺胺、或其任何共聚物。

[0093] 特别优选的阳离子聚合物包括例如经修饰的聚氨基酸,如 β -氨基酸聚合物或反向聚酰胺(reversed polyamide);经修饰的聚乙烯,如(聚(N-乙基-4-乙基溴化吡啶鎓))(PEVP)等;经修饰的丙烯酸酯,如(聚(二甲基氨基乙基甲基丙烯酸酯))(pDMAEMA)等;经修饰的酰氨基胺,如(聚(酰氨基胺))(pAMAM)等;经修饰的聚 β 氨基酯(PBAE),如经二胺末端修饰的1,4-丁二醇二丙烯酸酯-共-5-氨基-1-戊醇聚合物等;树枝状大分子,如聚丙胺树枝状大分子或基于pAMAM的树枝状大分子等;聚亚胺,如聚(乙烯亚胺)(PEI或pEI),聚(丙烯亚胺)等;聚烯丙基胺,1,5-二甲基-1,5-二氮杂十一亚甲基聚甲溴化物(1,5-dimethyl-1,5-diazaundecamethylene polymethobromide),海美溴铵(hexadimethrine bromide)。

[0094] 还优选阳离子多糖,即基于糖主链的聚合物,例如基于环糊精的聚合物,基于葡萄糖的聚合物,壳聚糖等;硅烷主链基聚合物,如PMOXA-PDMS共聚物等;以及由一种或多种阳离子嵌段(例如选自如上所述的阳离子聚合物)的和一种或多种亲水或疏水嵌段(例如聚乙二醇)的组合组成的嵌段聚合物。

[0095] 在一优选的实施方案中,阳离子肽或聚合物是阳离子化合物,其包含具有至少一个能够形成二硫键或其二硫键连接的多聚体的-SH基团的至少一个阳离子部分P,其中部分P是分子量为约0.5kDa至约30kDa的聚合物部分,或包含约3至约100个氨基酸的肽部分,其中肽部分的氨基酸总数的至少10%代表选自精氨酸(Arg)、赖氨酸(Lys)、组氨酸(His)和/或鸟氨酸(Orn)的碱性氨基酸。

[0096] 在一实施方案中,阳离子化合物的阳离子部分P是包含3至100个氨基酸的肽部分,其中肽部分的氨基酸总数的至少10%代表选自Arg、Lys、His和/或Orn的碱性氨基酸。例如在W02012/013326中公开了这种肽的示例,其公开内容以其整体并入本文。

[0097] 在这种情况下,“碱性氨基酸”是在生理环境中阳离子化的氨基酸,或者更确切地说,其大部分分子在相对中性的pH下具有净正电荷,例如在细胞外体液的生理pH值下具有净正电荷。这是Arg、Lys、His和Orn的情况。

[0098] 在P是肽部分的情况下,P的“二硫键连接的多聚体”是指由至少两个肽P分子之间形成至少一个二硫键而产生的肽或蛋白。例如,两个肽分子P可以通过一个二硫键连接,例如以形成更长的肽链;或者它们可以通过两个二硫键连接,例如,以形成环肽、更长的肽链或另一种结构,具体取决于参与二硫键形成的-SH基团的位置。来自两个以上肽P的二硫键连接的多聚体也可具有各种不同的形状,具体取决于P和已形成的二硫键的性质。如果组合物包含两种或更多种不同的肽P,则多聚体可以由相同或不同分子之间的二硫键产生。

[0099] 优选地,选择作为部分P的肽部分具有约3至约50个氨基酸的长度,更优选约7至约30个氨基酸,或约3至约25个氨基酸的长度。还优选长度为约3至约20个氨基酸,或约5至约

20个氨基酸,或约7至约30个氨基酸,或约6至约18个氨基酸,或约7个至约17个氨基酸,例如约5至约15个氨基酸。

[0100] 通常,选择作为部分P的肽部分具有约0.3kDa至约50kDa,特别是约0.5kDa至约30kDa,或约0.6kDa至约10kDa,或约0.8kDa至约5kDa的分子量,例如约1kDa至约3kDa的分子量。

[0101] 这种肽部分中的-SH基团可以通过对代表P的肽序列中的任何氨基酸残基进行化学修饰,通过引入不是氨基酸但包含巯基的结构单元,和/或通过包含这种-SH基团(例如半胱氨酸(Cys))的一个或多个氨基酸来提供。基团。在一优选的实施方案中,代表P的肽部分的-SH基团中的至少一个由Cys提供。在另一实施方案中,基本上P的所有-SH基团由Cys残基提供。例如,P可以包含由Cys提供的一个-SH基团,或者它可以提供两个-SH基团,两者都由Cys提供。

[0102] 在进一步优选的实施方案中,部分P是包含7至30个氨基酸的肽部分,并且其中至少一个-SH基团由Cys残基提供。在该实施方案中还优选的是包含一个或两个-SH基团的肽部分,其中每个-SH基团由Cys提供。此外,这种肽部分可以具有两个末端,例如在线性肽序列的情况下可以具有两个末端,并且Cys残基可以位于末端中的一个处或其附近。还优选的是具有两个末端和至少两个Cys残基的此类肽部分,其中至少一个Cys残基位于末端中的一个处或其附近。

[0103] 选择为P的肽部分中碱性氨基酸的含量相应地为肽序列的氨基酸总数的至少10%,并且优选更高,例如至少约20%,或至少约30%,或分别至少约40%,或至少约50%,或至少约60%,或至少约70%。考虑到以下因素,也可以根据肽的长度选择碱性氨基酸的含量:肽通常还需要掺入至少一个(更优选至少两个)具有能够形成二硫键的-SH基团的残基,例如半胱氨酸残基或其他被修饰以具有-SH基团的氨基酸。在一优选的实施方案中,肽中碱性氨基酸的数量比肽中氨基酸总数少2至5个,特别是比氨基酸总数少2至4个,例如比P中的氨基酸总数少2或3个。在一具体实施方案中,肽由2个Cys组成,或者说仅由碱性氨基酸组成。

[0104] 选择作为P的肽部分可包含核心序列,其源自富含碱性氨基酸的已知肽或蛋白。在本文中,“衍生的”是指P可以包含其它的不存在于已知肽中的氨基酸,该p衍生自该已知肽,其他氨基酸是例如需要具有形成二硫键的能力的那些氨基酸,例如,Cys。富含碱性氨基酸的此类已知肽的示例包括鱼精蛋白,核仁素(nucleoline),精胺或亚精胺,寡聚L-赖氨酸或聚L-赖氨酸(PLL),碱性多肽,寡聚精氨酸或聚精氨酸,细胞穿透肽(CPP),嵌合CPP,例如转运素(Transportan),或MPG肽,HIV结合肽,Tat,HIV-1Tat(HIV),Tat衍生肽,穿透素家族的成员,例如穿透素,触角足基因衍生肽(特别是来自果蝇(*Drosophila*)触角足基因的),pAntp,pIsl1等,抗微生物衍生的CPP,例如,Buforin-2,Bac715-24,SynB,SynB(1),pVEC,hCT-衍生的肽,SAP,PpTG20,FGF,乳铁蛋白,组蛋白,VP22衍生的或类似的肽,HSV,VP22(单纯疱疹),MAP,KALA或蛋白转导结构域(PTD,PpT620,富含脯氨酸的肽,富含精氨酸的肽,富含赖氨酸的肽,Pep-1,L-寡聚体,降钙素肽。

[0105] 在一些优选的实施方案中,选择作为P的肽部分包含完全或主要由一种特定碱性氨基酸组成的核心序列,例如约5至约30个Arg、Lys、His或Orn的片段,例如

Arg₅,Arg₆,Arg₇,Arg₈,Arg₉,Arg₁₀,Arg₁₁,Arg₁₂,Arg₁₃,Arg₁₄,Arg₁₅₋₃₀;Lys₅,Lys₆,Lys₇,

Lys₈, Lys₉, Lys₁₀, Lys₁₁, Lys₁₂, Lys₁₃, Lys₁₄, Lys₁₅₋₃₀; His₅, His₆, His₇, His₈, His₉, His₁₀, His₁₁, His₁₂, His₁₃, His₁₄, His₁₅₋₃₀; 或 Orn₅, Orn₆, Orn₇, Orn₈, Orn₉, Orn₁₀, Orn₁₁, Orn₁₂, Orn₁₃, Orn₁₄, Orn₁₅₋₃₀。

[0106] 表述“核心序列”是指一个或多个另外的氨基酸可以存在于相应核心序列之外的肽中,特别是具有-SH基团的氨基酸,例如半胱氨酸。其他有用的核心序列由两种或更多种不同的碱性氨基酸组成,如以下示例中所述,其意指序列的组成,而没有指定氨基酸出现的特定顺序:

Arg₍₄₋₂₉₎Lys₁, Arg₍₄₋₂₉₎His₁, Arg₍₄₋₂₉₎Orn₁, Lys₍₄₋₂₉₎His₁, Lys₍₄₋₂₉₎Orn₁, His₍₄₋₂₉₎Orn₁, Arg₍₃₋₂₈₎Lys₂, Arg₍₃₋₂₈₎His₂, Arg₍₃₋₂₈₎Orn₂, Lys₍₃₋₂₈₎His₂, Lys₍₃₋₂₈₎Orn₂, His₍₃₋₂₈₎Orn₂, Arg₍₂₋₂₇₎Lys₃, Arg₍₂₋₂₇₎His₃, Arg₍₂₋₂₇₎Orn₃, Lys₍₂₋₂₇₎His₃, Lys₍₂₋₂₇₎Orn₃, His₍₂₋₂₇₎Orn₃, Arg₍₁₋₂₆₎Lys₄, Arg₍₁₋₂₆₎His₄, Arg₍₁₋₂₆₎Orn₄, Lys₍₁₋₂₆₎His₄, Lys₍₁₋₂₆₎Orn₄, His₍₁₋₂₆₎Orn₄, Arg₍₃₋₂₈₎Lys₁His₁, Arg₍₃₋₂₈₎Lys₁Orn₁, Arg₍₃₋₂₈₎His₁Orn₁, Arg₁Lys₍₃₋₂₈₎His₁, Arg₁Lys₍₃₋₂₈₎Orn₁, Lys₍₃₋₂₈₎His₁Orn₁, Arg₁Lys₁His₍₃₋₂₈₎, Arg₁His₍₃₋₂₈₎Orn₁, Lys₁His₍₃₋₂₈₎Orn₁;

Arg₍₂₋₂₇₎Lys₂His₁, Arg₍₂₋₂₇₎Lys₁His₂, Arg₍₂₋₂₇₎Lys₂Orn₁, Arg₍₂₋₂₇₎Lys₁Orn₂, Arg₍₂₋₂₇₎His₂Orn₁, Arg₍₂₋₂₇₎His₁Orn₂, Arg₂Lys₍₂₋₂₇₎His₁, Arg₁Lys₍₂₋₂₇₎His₂, Arg₂Lys₍₂₋₂₇₎Orn₁, Arg₁Lys₍₂₋₂₇₎Orn₂, Lys₍₂₋₂₇₎His₂Orn₁, Lys₍₂₋₂₇₎His₁Orn₂, Arg₂Lys₁His₍₂₋₂₇₎, Arg₁Lys₂His₍₂₋₂₇₎, Arg₂His₍₂₋₂₇₎Orn₁, Arg₁His₍₂₋₂₇₎Orn₂, Lys₂His₍₂₋₂₇₎Orn₁, Lys₁His₍₂₋₂₇₎Orn₂;

Arg₍₁₋₂₆₎Lys₃His₁, Arg₍₁₋₂₆₎Lys₂His₂, Arg₍₁₋₂₆₎Lys₁His₃, Arg₍₁₋₂₆₎Lys₃Orn₁, Arg₍₁₋₂₆₎Lys₂Orn₂, Arg₍₁₋₂₆₎Lys₁Orn₃, Arg₍₁₋₂₆₎His₃Orn₁, Arg₍₁₋₂₆₎His₂Orn₂, Arg₍₁₋₂₆₎His₁Orn₃, Arg₃Lys₍₁₋₂₆₎His₁, Arg₂Lys₍₁₋₂₆₎His₂, Arg₁Lys₍₁₋₂₆₎His₃, Arg₃Lys₍₁₋₂₆₎Orn₁, Arg₂Lys₍₁₋₂₆₎Orn₂, Arg₁Lys₍₁₋₂₆₎Orn₃, Lys₍₁₋₂₆₎His₃Orn₁, Lys₍₁₋₂₆₎His₂Orn₂, Lys₍₁₋₂₆₎His₁Orn₃, Arg₃Lys₁His₍₁₋₂₆₎, Arg₂Lys₂His₍₁₋₂₆₎, Arg₁Lys₃His₍₁₋₂₆₎, Arg₃His₍₁₋₂₆₎Orn₁, Arg₂His₍₁₋₂₆₎Orn₂, Arg₁His₍₁₋₂₆₎Orn₃, Lys₃His₍₁₋₂₆₎Orn₁, Lys₂His₍₁₋₂₆₎Orn₂, Lys₁His₍₁₋₂₆₎Orn₃;

Arg₍₂₋₂₇₎Lys₁His₁Orn₁, Arg₁Lys₍₂₋₂₇₎His₁Orn₁, Arg₁Lys₁His₍₂₋₂₇₎Orn₁, Arg₁Lys₁His₁Orn₍₂₋₂₇₎;

Arg₍₁₋₂₆₎Lys₂His₁Orn₁, Arg₍₁₋₂₆₎Lys₁His₂Orn₁, Arg₍₁₋₂₆₎Lys₁His₁Orn₂, Arg₂Lys₍₁₋₂₆₎His₁Orn₁, Arg₁Lys₍₁₋₂₆₎His₂Orn₁, Arg₁Lys₍₁₋₂₆₎His₁Orn₂, Arg₂Lys₁His₍₁₋₂₆₎Orn₁, Arg₁Lys₂His₍₁₋₂₆₎Orn₁, Arg₁Lys₁His₍₁₋₂₆₎Orn₂, Arg₂Lys₁His₁Orn₍₁₋₂₆₎, Arg₁Lys₂His₁Orn₍₁₋₂₆₎, Arg₁Lys₁His₂Orn₍₁₋₂₆₎。

[0107] 如上所述,这些是核心序列,并且这种肽部分P的完整肽序列还包含能够形成二硫键的至少一个-SH基团。Cys是肽中的携带这种-SH基团优选的部分之一。因此,上面显示的核心序列优选是肽部分的部件,其进一步包含至少一个Cys,例如一个或两个Cys,其中一个或两个Cys残基分别位于肽的末端中的一个或每个末端处。选择作为部分P的这种特别优选的序列包括以下:

具有一个末端Cys残基的序列:CysArg₅, CysArg₆, CysArg₇, CysArg₈, CysArg₉, CysArg₁₀, CysArg₁₁, CysArg₁₂, CysArg₁₃, CysArg₁₄, CysArg₁₅, CysArg₁₆, CysArg₁₇, CysArg₁₈, CysArg₁₉, CysArg₂₀, CysArg₂₁₋₃₀; CysLys₅, CysLys₆, CysLys₇, CysLys₈, CysLys₉, CysLys₁₀, CysLys₁₁, CysLys₁₂, CysLys₁₃, CysLys₁₄, CysLys₁₅, CysLys₁₆, CysLys₁₇, CysLys₁₈, CysLys₁₉, CysLys₂₀, CysLys₂₁₋₃₀; CysHis₅, CysHis₆, CysHis₇, CysHis₈, CysHis₉, CysHis₁₀, CysHis₁₁, CysHis₁₂,

CysHis₁₃, CysHis₁₄, CysHis₁₅, CysHis₁₆, CysHis₁₇, CysHis₁₈, CysHis₁₉, CysHis₂₀, CysHis₂₁₋₃₀;
CysOrn₅, CysOrn₆, CysOrn₇, CysOrn₈, CysOrn₉, CysOrn₁₀, CysOrn₁₁, CysOrn₁₂, CysOrn₁₃,
CysOrn₁₄, CysOrn₁₅, CysOrn₁₆, CysOrn₁₇, CysOrn₁₈, CysOrn₁₉, CysOrn₂₀, CysOrn₂₁₋₃₀。

具有两个末端的Cys残基的序列:CysArg₅Cys, CysArg₆Cys, CysArg₇Cys, CysArg₈Cys,
CysArg₉Cys, CysArg₁₀Cys, CysArg₁₁Cys, CysArg₁₂Cys, CysArg₁₃Cys, CysArg₁₄Cys,
CysArg₁₅Cys, CysArg₁₆Cys, CysArg₁₇Cys, CysArg₁₈Cys, CysArg₁₉Cys, CysArg₂₀Cys, CysArg₂₁₋₃₀Cys;
CysLys₅Cys, CysLys₆Cys, CysLys₇Cys, CysLys₈Cys, CysLys₉Cys, CysLys₁₀Cys,
CysLys₁₁Cys, CysLys₁₂Cys, CysLys₁₃Cys, CysLys₁₄Cys, CysLys₁₅Cys, CysLys₁₆Cys,
CysLys₁₇Cys, CysLys₁₈Cys, CysLys₁₉Cys, CysLys₂₀Cys, CysLys₂₁₋₃₀Cys; CysHis₅Cys,
CysHis₆Cys, CysHis₇Cys, CysHis₈Cys, CysHis₉Cys, CysHis₁₀Cys, CysHis₁₁Cys, CysHis₁₂Cys,
CysHis₁₃Cys, CysHis₁₄Cys, CysHis₁₅Cys, CysHis₁₆Cys, CysHis₁₇Cys, CysHis₁₈Cys,
CysHis₁₉Cys, CysHis₂₀Cys, CysHis₂₁₋₃₀Cys; CysOrn₅Cys, CysOrn₆Cys, CysOrn₇Cys,
CysOrn₈Cys, CysOrn₉Cys, CysOrn₁₀Cys, CysOrn₁₁Cys, CysOrn₁₂Cys, CysOrn₁₃Cys,
CysOrn₁₄Cys, CysOrn₁₅Cys, CysOrn₁₆Cys, CysOrn₁₇Cys, CysOrn₁₈Cys, CysOrn₁₉Cys,
CysOrn₂₀Cys, CysOrn₂₁₋₃₀Cys。

[0108] 当然,包括两种或更多种具有如上所述的被选择作为在组合物中的P的不同肽部分的阳离子化合物,或者将肽部分P与如下所述的式I化合物组合,也在本发明的范围内。

[0109] 此外,该组合物可包含阳离子肽部分P与一种或多种其他肽的组合,所述其他肽不落入P的定义内,但其可用于调节载体系统或在本发明的组合物与被运载物材料(如核酸)结合时形成的络合物的物理、化学或生物学性质。不遵循P的定义的此类其他肽序列可以是包含部分P的阳离子化合物或其二硫键连接的多聚体的部件,或者它们可以作为单独的化合物掺入本发明的组合物中。优选这种单独的化合物还包含一个或多个-SH基团,以便能够与包含阳离子部分P的阳离子化合物形成二硫键。

[0110] 例如,掺入包含一种或多种芳族氨基酸(如Trp、Tyr或Phe)的肽可能是有用的。当然,芳族氨基酸也可以掺入部分P本身内。替代地,这些芳族氨基酸可以以其他肽的形式掺入组合物中,然而所述其他肽包含一个或多个-SH基团,以便能够与另一种组分形成二硫键,例如与包含阳离子部分P的阳离子化合物形成二硫键。以这种方式,芳族氨基酸也将参与载体组合物与核酸被运载物组合时形成的络合物中。

[0111] 由于氨基酸的芳族结构与核酸的碱基的相互作用,芳族氨基酸的掺入使得载体能够额外结合核酸被运载物,这可以有助于络合物更稳定。该结合不同于阳离子或阳离子化的基团与核酸的磷酸主链的相互作用。芳族氨基酸与核酸的碱基之间的相互作用可以例如通过嵌入或通过小的或大的沟槽结合发生。它不易于通过主要在体内细胞外基质中发现的阴离子络合配体(例如肝素、透明质酸)进行减压,并且它也不易受盐效应的影响。

[0112] 在一些具体实施方案中,所述组合物包含一种或多种肽,所述肽包含富含芳族氨基酸或基本上由芳族氨基酸组成的核心序列。

[0113] 这种肽中的芳族氨基酸可以彼此相同或不同。核心序列优选侧接一个或更多个优选两个包含-SH基团的部分,例如Cys,其赋予形成二硫键的能力。

[0114] 有用的核心序列的示例包括:Trp-Tyr, Tyr-Trp, Trp-Trp, Tyr-Tyr, Trp-Tyr-Trp, Tyr-Trp-Tyr, Trp-Trp-Trp, Tyr-Tyr-Tyr, Trp-Tyr-Trp-Tyr, Tyr-Trp-Tyr-Trp, Trp-Trp-

Trp-Trp, Phe-Tyr, Tyr-Phe, Phe-Phe, Phe-Tyr-Phe, Tyr-Phe-Tyr, Phe-Phe-Phe, Phe-Tyr-Phe-Tyr, Tyr-Phe-Tyr-Phe, Phe-Phe-Phe-Phe, Phe-Trp, Trp-Phe, Phe-Phe, Phe-Trp-Phe, Trp-Phe-Trp, Phe-Trp-Phe-Trp, Trp-Phe-Trp-Phe, 和 Tyr-Tyr-Tyr-Tyr 等。这些序列可以重复 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、13、14、15 或甚至更多次。它们也可以适当地相互组合。

[0115] 还包括末端 Cys 残基的完整肽序列的示例是, 例如:

Cys-Tyr, Cys-Trp, Cys-Trp-Tyr, Cys-Tyr-Trp, Cys-Trp-Trp, Cys-Tyr-Tyr, Cys-Trp-Tyr-Trp, Cys-Tyr-Trp-Tyr, Cys-Trp-Trp-Trp, Cys-Tyr-Tyr-Tyr, Cys-Trp-Tyr-Trp-Tyr, Cys-Tyr-Trp-Tyr-Trp, Cys-Trp-Trp-Trp-Trp, Cys-Tyr-Tyr-Tyr-Tyr, Cys-Phe, Cys-Phe-Tyr, Cys-Tyr-Phe, Cys-Phe-Phe, Cys-Tyr-Tyr, Cys-Phe-Tyr-Phe, Cys-Tyr-Phe-Tyr, Cys-Phe-Phe-Phe, Cys-Tyr-Tyr-Tyr, Cys-Phe-Tyr-Phe-Tyr, Cys-Tyr-Phe-Tyr-Phe, 或 Cys-Phe-Phe-Phe-Phe, Cys-Phe-Trp, Cys-Trp-Phe, Cys-Phe-Phe, Cys-Phe-Trp-Phe, Cys-Trp-Phe-Trp, Cys-Phe-Trp-Phe-Trp, Cys-Trp-Phe-Trp-Phe;

Cys-Tyr-Cys, Cys-Trp-Cys, Cys-Trp-Tyr-Cys, Cys-Tyr-Trp-Cys, Cys-Trp-Trp-Cys, Cys-Tyr-Tyr-Cys, Cys-Trp-Tyr-Trp-Cys, Cys-Tyr-Trp-Tyr-Cys, Cys-Trp-Trp-Trp-Cys, Cys-Tyr-Tyr-Tyr-Cys, Cys-Trp-Tyr-Trp-Tyr-Cys, Cys-Tyr-Trp-Tyr-Trp-Cys, Cys-Trp-Trp-Trp-Trp-Cys, Cys-Tyr-Tyr-Tyr-Tyr-Cys, Cys-Phe-Cys, Cys-Phe-Tyr-Cys, Cys-Tyr-Phe-Cys, Cys-Phe-Phe-Cys, Cys-Tyr-Tyr-Cys, Cys-Phe-Tyr-Phe-Cys, Cys-Tyr-Phe-Tyr-Cys, Cys-Phe-Phe-Phe-Cys, Cys-Tyr-Tyr-Tyr-Cys, Cys-Phe-Tyr-Phe-Tyr-Cys, Cys-Tyr-Phe-Tyr-Phe-Cys, 或 Cys-Phe-Phe-Phe-Phe-Cys, Cys-Phe-Trp-Cys, Cys-Trp-Phe-Cys, Cys-Phe-Phe-Cys, Cys-Phe-Trp-Phe-Cys, Cys-Trp-Phe-Trp-Cys, Cys-Phe-Trp-Phe-Trp-Cys, Cys-Trp-Phe-Trp-Phe-Cys 等。每个 Cys 也可以被经修饰的氨基酸或带有游离-SH 部分的化合物取代。也可以使用代表序列的组合或重复的肽, 特别是具有两个末端 Cys 残基的那些肽, 例如, 具有两个末端 Cys 残基的肽, 例如重复 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、13、14、15 或甚至更多次。

[0116] 另外, 这种富含芳族氨基酸的肽可含有至少一个脯氨酸, 其可用作 Trp、Tyr 和 Phe 的较长序列的结构破坏剂。根据芳族氨基酸序列的长度, 可优选掺入两个、三个或更多个脯氨酸。

[0117] 在本发明的组合物中掺入包含一种或多种亲水性氨基酸的肽以及包含肽部分 P 的阳离子化合物可能更有用。当然, 亲水性氨基酸也可以掺入肽部分 P 本身。替代地, 这些氨基酸可以以其他肽的形式掺入组合物中, 所述其他肽还包含一个或多个-SH 基团或二硫键, 并且可以参与到载体组合物与核酸被运载物组合时形成的络合物中, 以便修改络合物的性质。

[0118] 在可用于此目的的亲水性氨基酸中, 优选具有不带电荷的极性侧链的那些, 特别是 Thr、Ser、Asn 和/或 Gln。这些氨基酸或富含这些氨基酸的序列的掺入使得能够更灵活地结合核酸被运载物。这可以导致核酸被运载物的更有效的压实, 并因此更好地防止核酸酶和不希望有的减压实。它还使得能提供在整个载体上表现出降低的阳离子电荷的载体, 并且在这种情况下, 如果需要或必要, 能更好地调节结合性能。

[0119] 有用的核心序列的示例包括基于相同或不同亲水氨基酸的序列, 例如以下: Ser-Thr, Thr-Ser, Ser-Ser, Thr-Thr, Ser-Thr-Ser, Thr-Ser-Thr, Ser-Ser-Ser, Thr-Thr-Thr,

Ser-Thr-Ser-Thr, Thr-Ser-Thr-Ser, Ser-Ser-Ser-Ser, Thr-Thr-Thr-Thr, Gln-Asn, Asn-Gln, Gln-Gln, Asn-Asn, Gln-Asn-Gln, Asn-Gln-Asn, Gln-Gln-Gln, Asn-Asn-Asn, Gln-Asn-Gln-Asn, Asn-Gln-Asn-Gln, Gln-Gln-Gln-Gln, Asn-Asn-Asn-Asn, Ser-Asn, Asn-Ser, Ser-Ser, Asn-Asn, Ser-Asn-Ser, Asn-Ser-Asn, Ser-Ser-Ser, Asn-Asn-Asn, Ser-Asn-Ser-Asn, Asn-Ser-Asn-Ser, Ser-Ser-Ser-Ser, 或Asn-Asn-Asn-Asn等。同样, 这样的序列可以重复, 例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、13、14、15或甚至更多次, 或者根据需要彼此组合。此外, 核心序列优选侧接有一个或两个包含-SH基团或形成二硫键的残基, 例如Cys, 其赋予形成二硫键的能力。

[0120] 还包括此类末端Cys残基的完整肽序列的示例是: Cys-Thr-Cys, Cys-Ser-Cys, Cys-Ser-Thr-Cys, Cys-Thr-Ser-Cys, Cys-Ser-Ser-Cys, Cys-Thr-Thr-Cys, Cys-Ser-Thr-Ser-Cys, Cys-Thr-Ser-Thr-Cys, Cys-Ser-Ser-Ser-Cys, Cys-Thr-Thr-Thr-Cys, Cys-Ser-Thr-Ser-Thr-Cys, Cys-Thr-Ser-Thr-Ser-Cys, Cys-Ser-Ser-Ser-Ser-Cys, Cys-Thr-Thr-Thr-Thr-Cys, Cys-Asn-Cys, Cys-Gln-Cys, Cys-Gln-Asn-Cys, Cys-Asn-Gln-Cys, Cys-Gln-Gln-Cys, Cys-Asn-Asn-Cys, Cys-Gln-Asn-Gln-Cys, Cys-Asn-Gln-Asn-Cys, Cys-Gln-Gln-Gln-Cys, Cys-Asn-Asn-Asn-Cys, Cys-Gln-Asn-Gln-Asn-Cys, Cys-Asn-Gln-Asn-Gln-Cys, Cys-Gln-Gln-Gln-Gln-Cys, Cys-Asn-Asn-Asn-Asn-Cys, Cys-Asn-Cys, Cys-Ser-Cys, Cys-Ser-Asn-Cys, Cys-Asn-Ser-Cys, Cys-Ser-Ser-Cys, Cys-Asn-Asn-Cys, Cys-Ser-Asn-Ser-Cys, Cys-Asn-Ser-Asn-Cys, Cys-Ser-Ser-Ser-Cys, Cys-Asn-Asn-Asn-Cys, Cys-Ser-Asn-Ser-Asn-Cys, Cys-Asn-Ser-Asn-Ser-Cys, Cys-Ser-Ser-Ser-Ser-Cys, 或Cys-Asn-Asn-Asn-Asn-Cys等。每个Cys也可以被带有游离-SH部分或参与二硫键的硫原子的经修饰的氨基酸或化合物取代。所述序列可以重复, 例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、13、14、15或甚至更多次, 或彼此组合。

[0121] 任选地, 富含亲水性氨基酸的序列可含有至少一个脯氨酸, 其可用作Ser、Thr和Asn的较长序列的结构破坏剂。也可掺入两种, 三种或更多种脯氨酸, 特别是可掺入到更长的序列内。

[0122] 在本发明的组合物中掺入包含一种或多种亲脂性氨基酸(特别是Leu、Val、Ile、Ala和/或Met)的肽以及包含肽部分P的阳离子化合物可能更有用。这种亲脂性氨基酸也可以掺入肽部分P本身内。替代地, 它们可以以其他肽的形式掺入组合物中, 所述其他肽还包含一个或多个-SH基团或二硫键, 并且其可以参与到载体组合物与核酸被运载物组合时形成的络合物中。

[0123] 亲脂性氨基酸的使用使得能实现核酸的更强的压实。这可能是由于亲脂性氨基酸和核酸被运载物的特定相互作用, 这为载体和被运载物之间形成的络合物提供了额外稳定性。稳定化可以类似于聚合物链之间的非共价缔合或交联。特别是在含水环境中, 这种类型的相互作用通常很强并且提供显著的效果。

[0124] 有用的核心序列的示例包括基于相同或不同亲脂性氨基酸的序列, 例如Leu-Val, Val-Leu, Leu-Leu, Val-Val, Leu-Val-Leu, Val-Leu-Val, Leu-Leu-Leu, Val-Val-Val, Leu-Val-Leu-Val, Val-Leu-Val-Leu, Leu-Leu-Leu-Leu, Val-Val-Val-Val, Ile-Ala, Ala-Ile, Ile-Ile, Ala-Ala, Ile-Ala-Ile, Ala-Ile-Ala, Ile-Ile-Ile, Ala-Ala-Ala, Ile-Ala-Ile-Ala, Ala-Ile-Ala-Ile, Ile-Ile-Ile-Ile, Ala-Ala-Ala-Ala, Met-Ala, Ala-Met, Met-Met,

Ala-Ala, Met-Ala-Met, Ala-Met-Ala, Met-Met-Met, Ala-Ala-Ala, Met-Ala-Met-Ala, Ala-Met-Ala-Met, 或 Met-Met-Met-Met 等。这些序列可以重复, 例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、13、14、15 或更多次, 或彼此组合。此外, 核心序列优选侧接有一个或两个包含-SH 基团的残基, 或侧接有参与二硫键的硫原子, 例如 Cys。

[0125] 还包括此类末端 Cys 残基的完整肽序列的示例是 Cys-Val-Cys, Cys-Leu-Cys, Cys-Leu-Val-Cys, Cys-Val-Leu-Cys, Cys-Leu-Leu-Cys, Cys-Val-Val-Cys, Cys-Leu-Val-Leu-Cys, Cys-Val-Leu-Val-Cys, Cys-Leu-Leu-Leu-Cys, Cys-Val-Val-Val-Cys, Cys-Leu-Val-Leu-Val-Cys, Cys-Val-Leu-Val-Leu-Cys, Cys-Leu-Leu-Leu-Leu-Cys, Cys-Val-Val-Val-Val-Cys, Cys-Ala-Cys, Cys-Ile-Cys, Cys-Ile-Ala-Cys, Cys-Ala-Ile-Cys, Cys-Ile-Ile-Cys, Cys-Ala-Ala-Cys, Cys-Ile-Ala-Ile-Cys, Cys-Ala-Ile-Ala-Cys, Cys-Ile-Ile-Ile-Cys, Cys-Ala-Ala-Ala-Cys, Cys-Ile-Ala-Ile-Ala-Cys, Cys-Ala-Ile-Ala-Ile-Cys, Cys-Ile-Ile-Ile-Ile-Cys, or Cys-Ala-Ala-Ala-Ala-Cys, Cys-Met-Cys, Cys-Met-Ala-Cys, Cys-Ala-Met-Cys, Cys-Met-Met-Cys, Cys-Ala-Ala-Cys, Cys-Met-Ala-Met-Cys, Cys-Ala-Met-Ala-Cys, Cys-Met-Met-Met-Cys, Cys-Ala-Ala-Ala-Cys, Cys-Met-Ala-Met-Ala-Cys, Cys-Ala-Met-Ala-Met-Cys, Cys-Met-Met-Met-Met-Cys, 或 Cys-Ala-Ala-Ala-Ala-Cys 等。每个 Cys 也可以被带有游离-SH-部分或参与衍生自这种-SH 基团的二硫键的经修饰的氨基酸或化合物取代。这种序列可以重复, 例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、13、14、15 或甚至更多次, 或彼此组合。

[0126] 任选地, 富含亲脂性氨基酸的序列可含有至少一个脯氨酸, 其可用作 Leu、Val、Ile、Ala 和/或 Met 的较长序列的结构破坏剂。也可掺入两种, 三种或更多种脯氨酸, 特别是可掺入更长的序列内。

[0127] 任选地, 肽部分 P 可含有功能性肽序列。替代地或另外, 功能性肽 (任选地在经过修饰后) 可以与包含肽部分 P 的阳离子化合物一起掺入本发明的组合中, 以具有参与二硫键的一个或多个-SH 基团或硫原子。替代地, 这种功能性肽序列也可以通过酸不稳定键, 优选通过载体组分的侧链, 与另一种载体组分如肽 P 附接, 这使得能在较低的 pH 值下 (例如在生理 pH 值下) 分离或释放功能性肽序列。

[0128] 功能性肽或肽序列可以代表或衍生自信号肽或信号序列, 定位信号或序列, 核酸定位信号或序列 (NLS), 抗体, 细胞穿透肽 (例如 TAT), 等等。

[0129] 在这种情况下, 信号肽, 定位信号或序列或核定位信号或序列 (NLS) 可用于将载体-被运载物络合物引导至特定靶细胞 (例如肝细胞或抗原呈递细胞) 或亚细胞结构, 并且可以允许转位 (translocalisation) 到特定靶标, 例如进入细胞, 进入细胞核, 进入内体区室, 线粒体基质, 质膜, 高尔基体 (Golgi apparatus), 细胞核, 细胞质和细胞骨架 (cytoskeleton), 内质网等。信号序列或核定位信号可用于将本文定义的任何核酸 (特别是 RNA 或 DNA, 更优选 shRNA 或 pDNA) 转运例如进入细胞核。核定位序列可包括例如 KDEL, DEEL, QEDL, RDEL, GQNLSTSN, PKKKRKY, PQKKIKS, QPKKP, RKKR, RKKRRQRRRAHQ, RQARRNRWRERQR, MPLTRRRPAASQALAPPTP, GAALTILV, 或 GAALTLLG。内体区室的定位序列的示例是 MDDQRDLISNNEQLP。线粒体基质的示例性定位序列是 MLFNLRXXLNNAAFRHGHNFMRNFR CGQPLX。质膜的定位序列包括例如 GCVCSSNP, GQVTTPPL, GQELSQHE, GNSPSYNP, GVSGSKGQ, GQTITTPPL, GQTLTTPPL, GQIFSRSA, GQIHGLSP, GARASVLS, 和 GCTLSAEE。内质网和细胞核的定位

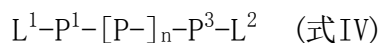
序列包括GAQVSSQK和GAQLSRNT。高尔基体、细胞核、细胞质和细胞骨架的定位序列包括GNAAAkk。细胞质和细胞骨架的定位序列包括GNEASYPL。质膜和细胞骨架的定位序列包括GSSKSKPK。分泌信号肽序列的示例包括经典或非经典MHC序列(例如MHC I和II分子的信号序列,例如MHC I类分子HLA-A*0201的信号序列)。有用的肽还可以掺入细胞因子或免疫球蛋白的信号序列,例如免疫球蛋白或抗体的恒定链的信号序列;Lamp1, tapasin, Erp57, 钙网蛋白, 钙联接蛋白, 其他膜相关蛋白, 或与内质网(ER)或内体-溶酶体区室相关的蛋白的信号序列。特别优选的是MHC I类分子HLA-A*0201的信号序列。

[0130] 肽部分P的性质可以通过在其序列中包括非天然氨基酸或通过该肽的化学修饰来进一步调节。例如,可以引入特定的化学基团。可以选择这样的基团,以使得能连接其他组分或配体,例如,通过酰胺形成(例如通过与羧酸、磺酸、胺等反应),通过Michael加成(例如使用马来酰亚胺部分, α 不饱和羰基, β 不饱和羰基等),通过点击化学(例如使用叠氮化物或炔烃),通过烯炔/炔炔易位(例如使用烯炔或炔炔)、亚胺或腙(hydrozone)形成(使用醛或酮、肼、羟基胺、胺)、络合反应(使用抗生物素蛋白、生物素、蛋白G等)或允许 S_n -类型取代反应的组分(例如用卤代烷烃、硫醇、醇、胺、肼、酰肼、磺酸酯、氧磷盐)或其它可用于连接其它组分的化学部分来连接其他组分或配体。

[0131] 包含具有肽部分P的阳离子化合物的本发明组合物的一个特别优点是这样的肽部分可以容易地设计并适应与特定治疗目的或应用相关的特定需要。例如,可以通过改变肽序列中碱性氨基酸的含量来优化与特定被运载物(例如核酸构建体)形成络合物所需的正电荷的量。同时,可以改变肽的长度以优化其生物降解性和耐受性。

[0132] 本发明人已发现肽分子在也允许与核酸被运载物形成络合物的条件下容易彼此形成二硫键。在某些体内条件下,例如在存在例如细胞溶质GSH的典型的细胞溶质环境中,二硫键减少,导致较小的肽单元,其容易被大多数细胞代谢,首先转化为小寡肽,最终转化为氨基酸。即使对于如上所述的较大的寡肽,也未发现显著的毒性。

[0133] 在另一个优选的实施方案中,包含部分P的阳离子化合物是根据式IV的化合物



[0134] 其中P如上所定义,即P是分子量为约0.5kDa至约30kDa的聚合物部分,或包含3至100个氨基酸的肽部分,其中肽部分的氨基酸的总数的至少10%代表选自Arg、Lys、His和/或Orn的碱性氨基酸。 P^3 是任选的。 P^1 和 P^3 (如果存在)被独立地选择,各自代表选自聚乙二醇(PEG)、聚-N-(2-羟丙基)甲基丙烯酰胺、聚-2-(甲基丙烯酰氧基)乙基磷酸胆碱、聚(羟烷基L-天冬酰胺)、聚(2-(甲基丙烯酰氧基)乙基磷酸胆碱)、羟乙基淀粉或聚(羟烷基L-谷氨酰胺)的直链或支链亲水聚合物链,其中所述聚合物链显示约1kDa至约100kDa的分子量,并且其中 P^1 和 P^3 各自通过二硫键与部分P连接。 L^1 和 L^2 是任选的配体并且独立地选自RGD, RGD肽,转铁蛋白,叶酸,信号肽或信号序列,定位信号或序列,核定位信号或序列(NLS),抗体,细胞穿透肽,例如WEAKLAKALAKALAKHLAKALAKALACEA, TAT,受体的配体,细胞因子,激素,生长因子,小分子,碳水化合物,甘露糖,半乳糖,n-乙酰半乳糖胺,合成配体,小分子激动剂,受体的抑制剂或拮抗剂,或RGD肽模拟物类似物。

[0135] 此外,式IV中的n是整数,选自1至约50,并且优选选自从2、3、4或5至约10,或从2、3或4至约9的范围,例如6或7;并且其中,如果n大于1,则每个部分P通过二硫键与另一部分P连接。还优选的是,n的选择范围为2至约20,或约4至约10,例如约4、5、6、7、8、9或10。

[0136] 对可选片段L₁、L₂或P₃的任何引用应被解释为适用于其中存在相应片段的可选实施方案。

[0137] 如从式IV显而易见的,相应的阳离子化合物分别包含至少在组分或部分P、P¹和P³之间的二硫键,并且任选地在部分P内和/或在P¹和L¹和/或P³和L³之间的其它二硫键。二硫键衍生自-SH基团,-SH基团可以衍生自诸如Cys之类的残基,或衍生自化学修饰的氨基酸,或衍生自还原形式带有-SH基团的其他残基。

[0138] 任选地,化合物中还可以存在一个或多个另外的-SH基团或二硫键,以连接其他组分,例如氨基酸组分,例如抗原表位,抗原,抗体,细胞穿透肽(如TAT),配体等。

[0139] 例如在W02011/026641中公开了根据式II的化合物及其制备方法的其他示例,其公开内容以其整体并入本文。

[0140] 使用根据式IV的化合物实施本发明具有高通用性的优点。此外,基于式II的实施方案允许限定聚合物链的长度并且将不同短聚合物的所需性质组合在一种聚合物中,以例如有效地压实核酸,用于为了基因治疗或其它治疗应用的目的而有效地转染核酸,而不丧失活性,特别是在体外将核酸有效转染到不同的细胞系中以及在体内转染。此外,载体分子对细胞无毒并且提供其核酸被运载物的有效释放。最后,由于亲水性聚合物链(例如PEG)的可逆添加,特别是朝向分子的末端的可逆添加,其显示出改善的抗团聚性,这进一步赋予核酸被运载物相对于含有血清的培养基增强的稳定性并且防止免疫系统识别聚合载体被运载物络合物或其他与血清内容物的不希望的作用。在细胞溶质中,由片段P¹和P³实现的“包被”在细胞的还原条件下容易除去。此效果也促进了细胞溶质中核酸被运载物的释放。

[0141] 如上所定义,配体L¹和L²可任选地包含在根据式IV的化合物中。它们可以用于例如将诸如络合核酸之类的被运载物引导到特定细胞中。它们可以彼此独立地选择。可能合适的配体的示例包括RGD、转铁蛋白、叶酸、信号肽或信号序列、定位信号或序列、核定位信号或序列(NLS)、抗体、细胞穿透肽(例如TAT)、受体的配体(例如细胞因子、激素、生长因子等)、小分子(例如碳水化合物,如甘露糖或半乳糖或合成配体)、小分子激动剂、受体的抑制剂或拮抗剂(例如RGD肽模拟物类似物)等。

[0142] 一些优选的配体包括WEAKLAKALAKALAKHLAKALAKALACEA(也称为KALA)和N-乙酰半乳糖胺(GalNac)。在该文中还优选甘露糖作为靶抗原呈递细胞的配体,所述细胞在其细胞膜上携带甘露糖受体。在进一步优选的实施方案中,作为任选配体的半乳糖可用于靶向肝细胞。

[0143] 这样的配体L¹和L²可以通过以下方式连接到组分P¹和/或P³上:通过可逆的二硫键或通过任何其他可能的化学连接,例如,通过结合3-硫代丙酸或2-亚氨基硫杂环戊烷(Traut试剂),通过酰胺形成(例如羧酸,磺酸,胺等),通过迈克尔(Michael)加成(例如马来酰亚胺部分,不饱和羰基等),通过点击化学(例如叠氮化物或炔烃),通过烯炔/炔炔(例如烯炔或炔炔),亚胺或腙(hydrozone)形成(醛或酮、肼、羟基胺、胺)、络合反应(抗生物素蛋白、生物素、蛋白G)或允许S_n-类型取代反应的组分(例如卤代烷烃、硫醇、醇、胺、肼、酰肼、磺酸酯、氧磷盐)或其它可用于连接其它组分的化学部分。

[0144] 如上所定义的,组分P¹和P³是独立选择的,并且各自代表含有至少一个硫原子的直链或支链亲水聚合物链,所述硫原子参与与组分P形成的二硫键。P¹和P³中的每一个的聚合

物链独立地选自聚乙二醇 (PEG)、聚-N-(2-羟丙基) 甲基丙烯酰胺、聚-2-(甲基丙烯酰氧基) 乙基磷酸胆碱、聚(羟烷基-L-天冬酰胺)、聚(2-(甲基丙烯酰氧基) 乙基磷酸胆碱)、羟乙基淀粉或聚(羟烷基-L-谷氨酰胺)。P¹和P³各自显示约1kDa至约100kDa的分子量。

[0145] P¹和/或P³的聚合物链的分子量优选为约1kDa至约75kDa, 或约5kDa至约50kDa, 甚至更优选约5kDa至约25kDa。根据另一个优选方案, P¹和/或P³是约5kDa至约25kDa的任选经修饰的聚乙二醇链。

[0146] 可以通过内部半胱氨酸或任何其它(经修饰的)氨基酸或部分为亲水性聚合物链P¹和P³中的每个提供能够形成二硫键的硫原子, 所述氨基酸或部分处于其还原形式并且在掺入式IV化合物之前带有-SH部分。

[0147] 替代地, 亲水性聚合物链P¹和/或P³可以衍生自用-SH部分修饰的聚合物, 优选通过与携带-SH部分的化合物的化学反应修饰的聚合物, 使得亲水性聚合物P¹和P³中的每一个携带至少一个这样的-SH部分, 该-SH部分随后掺入式IV化合物。这种携带-SH部分的化合物可以是例如(另外的)半胱氨酸或携带-SH部分的任何其他(修饰的)氨基酸。

[0148] 这种化合物也可以是任何非氨基化合物或部分, 其含有或允许将-SH部分引入亲水性聚合物链P¹和P³中。这些非氨基化合物可以通过化学反应或化合物的结合而连接到P¹和/或P³上, 例如通过以下方式连接到P¹和/或P³上: 例如, 通过结合3-硫代丙酸或2-亚氨基硫杂环戊烷(Traut试剂), 通过酰胺形成(例如羧酸, 磺酸, 胺等), 通过迈克尔(Michael)加成(例如马来酰亚胺部分, 不饱和羰基等), 通过点击化学(例如叠氮化物或炔烃), 通过烯炔/炔炔(例如烯炔或炔炔), 亚胺或脎(hydrozone)形成(醛或酮、肼、羟基胺、胺)、络合反应(抗生物素蛋白、生物素、蛋白G)或允许S_n-类型取代反应的组分(例如卤代烷烃、硫醇、醇、胺、肼、酰肼、磺酸酯、氧磷盐)或其它可用于连接其它组分的化学部分。在本文中, 特别优选的PEG衍生物是α-甲氧基-ω-巯基聚(乙二醇)。在每种情况下, 参与二硫键(例如, 半胱氨酸或任何其他(修饰的)氨基酸或化合物的二硫键)的硫原子可以存在于P¹和P³的末端或内部任何位置。在一个实施方案中, P¹和P³中的每一个显示在一个末端的至少一个二硫键和至少一个另外的-SH基团或二硫键, 其可以用于另外连接如本文所定义的其他组分, 例如, 配体, 氨基酸组分(AA)_x, 抗体, 细胞穿透肽(如TAT)等。

[0149] 根据进一步优选的实施方案, 亲水性聚合物链P¹和P³中的每一个还可以含有至少一个另外的官能团, 其允许通过以下方式连接如本文所定义的其他组分(例如, 配体, 氨基酸组分(AA)_x等): 例如,

通过酰胺形成(例如羧酸, 磺酸, 胺等), 通过迈克尔(Michael)加成(例如马来酰亚胺部分, 不饱和羰基等), 通过点击化学(例如叠氮化物或炔烃), 通过烯炔/炔炔(例如烯炔或炔炔), 亚胺或脎(hydrozone)形成(醛或酮、肼、羟基胺、胺)、络合反应(抗生物素蛋白、生物素、蛋白G)或允许S_n-类型取代反应的组分(例如卤代烷烃、硫醇、醇、胺、肼、酰肼、磺酸酯、氧磷盐)或通过其他可用于连接其他组分的化学基团。

[0150] 如上所定义的, 式IV化合物中的P是分子量为约0.5kDa至约30kDa的聚合物部分, 或包含3至100个氨基酸的肽部分, 其中肽部分的氨基酸的总数的至少10%代表选自Arg、Lys、His和/或Orn中的碱性氨基酸。如果P是肽部分, 则相同的优选方案适用于上文在P的上下文中已经描述的类似物; 与-SH基团有关的优选方案也应适用于衍生自这种-SH基团的式II化合物中的二硫键。

[0151] 例如,选择为在式IV化合物中的P的肽部分优选具有约3至约50个氨基酸的长度,更优选约7至约30个氨基酸,或约3至约25个氨基酸的长度。还优选长度范围为约3至约20个氨基酸,或约5至约20个氨基酸,或约7至约30个氨基酸,或约6至约18个氨基酸,或约7个至约17个氨基酸,例如约5至约15个氨基酸。进一步优选式II中的肽部分P具有约0.3kDa至约50kDa,特别是约0.5kDa至约30kDa,或约0.6kDa至约10kDa的分子量,或约0.8kDa至约5kDa,例如约1kDa至约3kDa的分子量。

[0152] 此外,选择作为在式IV中的P的肽部分中的碱性氨基酸的含量相应地是肽序列的氨基酸总数的至少10%,并且优选更高,例如至少约20%,分别为约30%,或至少约40%,或至少约50%,或至少约60%,或至少约70%。

[0153] 在一些优选的实施方案中,选择作为在式IV化合物中的P的肽部分包含完全或主要由一种特定碱性氨基酸组成的核心序列,例如约5至约30个Arg、Lys、His或Orn的片段,并且可以侧接有一个或两个末端Cys残基。式IV中肽部分P的这种优选形式的示例包括:

具有一个末端Cys残基的P序列:CysArg₅, CysArg₆, CysArg₇, CysArg₈, CysArg₉, CysArg₁₀, CysArg₁₁, CysArg₁₂, CysArg₁₃, CysArg₁₄, CysArg₁₅, CysArg₁₆, CysArg₁₇, CysArg₁₈, CysArg₁₉, CysArg₂₀, CysArg₂₁₋₃₀; CysLys₅, CysLys₆, CysLys₇, CysLys₈, CysLys₉, CysLys₁₀, CysLys₁₁, CysLys₁₂, CysLys₁₃, CysLys₁₄, CysLys₁₅, CysLys₁₆, CysLys₁₇, CysLys₁₈, CysLys₁₉, CysLys₂₀, CysLys₂₁₋₃₀; CysHis₅, CysHis₆, CysHis₇, CysHis₈, CysHis₉, CysHis₁₀, CysHis₁₁, CysHis₁₂, CysHis₁₃, CysHis₁₄, CysHis₁₅, CysHis₁₆, CysHis₁₇, CysHis₁₈, CysHis₁₉, CysHis₂₀, CysHis₂₁₋₃₀; CysOrn₅, CysOrn₆, CysOrn₇, CysOrn₈, CysOrn₉, CysOrn₁₀, CysOrn₁₁, CysOrn₁₂, CysOrn₁₃, CysOrn₁₄, CysOrn₁₅, CysOrn₁₆, CysOrn₁₇, CysOrn₁₈, CysOrn₁₉, CysOrn₂₀, CysOrn₂₁₋₃₀。

具有两个末端Cys残基的P序列:CysArg₅Cys, CysArg₆Cys, CysArg₇Cys, CysArg₈Cys, CysArg₉Cys, CysArg₁₀Cys, CysArg₁₁Cys, CysArg₁₂Cys, CysArg₁₃Cys, CysArg₁₄Cys, CysArg₁₅Cys, CysArg₁₆Cys, CysArg₁₇Cys, CysArg₁₈Cys, CysArg₁₉Cys, CysArg₂₀Cys, CysArg₂₁₋₃₀Cys; CysLys₅Cys, CysLys₆Cys, CysLys₇Cys, CysLys₈Cys, CysLys₉Cys, CysLys₁₀Cys, CysLys₁₁Cys, CysLys₁₂Cys, CysLys₁₃Cys, CysLys₁₄Cys, CysLys₁₅Cys, CysLys₁₆Cys, CysLys₁₇Cys, CysLys₁₈Cys, CysLys₁₉Cys, CysLys₂₀Cys, CysLys₂₁₋₃₀Cys; CysHis₅Cys, CysHis₆Cys, CysHis₇Cys, CysHis₈Cys, CysHis₉Cys, CysHis₁₀Cys, CysHis₁₁Cys, CysHis₁₂Cys, CysHis₁₃Cys, CysHis₁₄Cys, CysHis₁₅Cys, CysHis₁₆Cys, CysHis₁₇Cys, CysHis₁₈Cys, CysHis₁₉Cys, CysHis₂₀Cys, CysHis₂₁₋₃₀Cys; CysOrn₅Cys, CysOrn₆Cys, CysOrn₇Cys, CysOrn₈Cys, CysOrn₉Cys, CysOrn₁₀Cys, CysOrn₁₁Cys, CysOrn₁₂Cys, CysOrn₁₃Cys, CysOrn₁₄Cys, CysOrn₁₅Cys, CysOrn₁₆Cys, CysOrn₁₇Cys, CysOrn₁₈Cys, CysOrn₁₉Cys, CysOrn₂₀Cys, CysOrn₂₁₋₃₀Cys。

[0154] 替代地,用于式IV中的部分P的肽序列由两种或更多种不同的碱性氨基酸组成,如下示例中所述,其意指序列的组成,而没有指定碱性氨基酸发生的特定顺序,同时Cys残基处于末端位置:

CysArg₍₄₋₂₉₎Lys₁, CysArg₍₄₋₂₉₎His₁, CysArg₍₄₋₂₉₎Orn₁, CysLys₍₄₋₂₉₎His₁, CysLys₍₄₋₂₉₎Orn₁, CysHis₍₄₋₂₉₎Orn₁, CysArg₍₃₋₂₈₎Lys₂, CysArg₍₃₋₂₈₎His₂, CysArg₍₃₋₂₈₎Orn₂, CysLys₍₃₋₂₈₎His₂, CysLys₍₃₋₂₈₎Orn₂, CysHis₍₃₋₂₈₎Orn₂, CysArg₍₂₋₂₇₎Lys₃, CysArg₍₂₋₂₇₎His₃, CysArg₍₂₋₂₇₎Orn₃, CysLys₍₂₋₂₇₎His₃, CysLys₍₂₋₂₇₎Orn₃, CysHis₍₂₋₂₇₎Orn₃, CysArg₍₁₋₂₆₎Lys₄, CysArg₍₁₋₂₆₎

His₄, CysArg₍₁₋₂₆₎Orn₄, CysLys₍₁₋₂₆₎His₄, CysLys₍₁₋₂₆₎Orn₄, CysHis₍₁₋₂₆₎Orn₄, CysArg₍₃₋₂₈₎Lys₁His₁, CysArg₍₃₋₂₈₎Lys₁Orn₁, CysArg₍₃₋₂₈₎His₁Orn₁, CysArg₁Lys₍₃₋₂₈₎His₁, CysArg₁Lys₍₃₋₂₈₎Orn₁, CysLys₍₃₋₂₈₎His₁Orn₁, CysArg₁Lys₁His₍₃₋₂₈₎, CysArg₁His₍₃₋₂₈₎Orn₁, CysLys₁His₍₃₋₂₈₎Orn₁;

CysArg₍₂₋₂₇₎Lys₂His₁, CysArg₍₂₋₂₇₎Lys₁His₂, CysArg₍₂₋₂₇₎Lys₂Orn₁, CysArg₍₂₋₂₇₎Lys₁Orn₂, CysArg₍₂₋₂₇₎His₂Orn₁, CysArg₍₂₋₂₇₎His₁Orn₂, CysArg₂Lys₍₂₋₂₇₎His₁, CysArg₁Lys₍₂₋₂₇₎His₂, CysArg₂Lys₍₂₋₂₇₎Orn₁, CysArg₁Lys₍₂₋₂₇₎Orn₂, CysLys₍₂₋₂₇₎His₂Orn₁, CysLys₍₂₋₂₇₎His₁Orn₂, CysArg₂Lys₁His₍₂₋₂₇₎, CysArg₁Lys₂His₍₂₋₂₇₎, CysArg₂His₍₂₋₂₇₎Orn₁, CysArg₁His₍₂₋₂₇₎Orn₂, CysLys₂His₍₂₋₂₇₎Orn₁, CysLys₁His₍₂₋₂₇₎Orn₂;

CysArg₍₁₋₂₆₎Lys₃His₁, CysArg₍₁₋₂₆₎Lys₂His₂, CysArg₍₁₋₂₆₎Lys₁His₃, CysArg₍₁₋₂₆₎Lys₃Orn₁, CysArg₍₁₋₂₆₎Lys₂Orn₂, CysArg₍₁₋₂₆₎Lys₁Orn₃, CysArg₍₁₋₂₆₎His₃Orn₁, CysArg₍₁₋₂₆₎His₂Orn₂, CysArg₍₁₋₂₆₎His₁Orn₃, CysArg₃Lys₍₁₋₂₆₎His₁, CysArg₂Lys₍₁₋₂₆₎His₂, CysArg₁Lys₍₁₋₂₆₎His₃, CysArg₃Lys₍₁₋₂₆₎Orn₁, CysArg₂Lys₍₁₋₂₆₎Orn₂, CysArg₁Lys₍₁₋₂₆₎Orn₃, CysLys₍₁₋₂₆₎His₃Orn₁, CysLys₍₁₋₂₆₎His₂Orn₂, CysLys₍₁₋₂₆₎His₁Orn₃, CysArg₃Lys₁His₍₁₋₂₆₎, CysArg₂Lys₂His₍₁₋₂₆₎, CysArg₁Lys₃His₍₁₋₂₆₎, CysArg₃His₍₁₋₂₆₎Orn₁, CysArg₂His₍₁₋₂₆₎Orn₂, CysArg₁His₍₁₋₂₆₎Orn₃, CysLys₃His₍₁₋₂₆₎Orn₁, CysLys₂His₍₁₋₂₆₎Orn₂, CysLys₁His₍₁₋₂₆₎Orn₃;

CysArg₍₂₋₂₇₎Lys₁His₁Orn₁, CysArg₁Lys₍₂₋₂₇₎His₁Orn₁, CysArg₁Lys₁His₍₂₋₂₇₎Orn₁, CysArg₁Lys₁His₁Orn₍₂₋₂₇₎, CysArg₍₁₋₂₆₎Lys₂His₁Orn₁, CysArg₍₁₋₂₆₎Lys₁His₂Orn₁, CysArg₍₁₋₂₆₎Lys₁His₁Orn₂, CysArg₂Lys₍₁₋₂₆₎His₁Orn₁, CysArg₁Lys₍₁₋₂₆₎His₂Orn₁, CysArg₁Lys₍₁₋₂₆₎His₁Orn₂, CysArg₂Lys₁His₍₁₋₂₆₎Orn₁, CysArg₁Lys₂His₍₁₋₂₆₎Orn₁, CysArg₁Lys₁His₍₁₋₂₆₎Orn₂, CysArg₂Lys₁His₁Orn₍₁₋₂₆₎, CysArg₁Lys₂His₁Orn₍₁₋₂₆₎, CysArg₁Lys₁His₂Orn₍₁₋₂₆₎;

CysArg₍₄₋₂₉₎Lys₁Cys, CysArg₍₄₋₂₉₎His₁Cys, CysArg₍₄₋₂₉₎Orn₁Cys, CysLys₍₄₋₂₉₎His₁Cys, CysLys₍₄₋₂₉₎Orn₁Cys, CysHis₍₄₋₂₉₎Orn₁Cys, CysArg₍₃₋₂₈₎Lys₂Cys, CysArg₍₃₋₂₈₎His₂Cys, CysArg₍₃₋₂₈₎Orn₂Cys, CysLys₍₃₋₂₈₎His₂Cys, CysLys₍₃₋₂₈₎Orn₂Cys, CysHis₍₃₋₂₈₎Orn₂Cys, CysArg₍₂₋₂₇₎Lys₃Cys, CysArg₍₂₋₂₇₎His₃Cys, CysArg₍₂₋₂₇₎Orn₃Cys, CysLys₍₂₋₂₇₎His₃Cys, CysLys₍₂₋₂₇₎Orn₃Cys, CysHis₍₂₋₂₇₎Orn₃Cys, CysArg₍₁₋₂₆₎Lys₄Cys, CysArg₍₁₋₂₆₎His₄Cys, CysArg₍₁₋₂₆₎Orn₄Cys, CysLys₍₁₋₂₆₎His₄Cys, CysLys₍₁₋₂₆₎Orn₄Cys, CysHis₍₁₋₂₆₎Orn₄Cys, CysArg₍₃₋₂₈₎Lys₁His₁Cys, CysArg₍₃₋₂₈₎Lys₁Orn₁Cys, CysArg₍₃₋₂₈₎His₁Orn₁Cys, CysArg₁Lys₍₃₋₂₈₎His₁Cys, CysArg₁Lys₍₃₋₂₈₎Orn₁Cys, CysLys₍₃₋₂₈₎His₁Orn₁Cys, CysArg₁Lys₁His₍₃₋₂₈₎Cys, CysArg₁His₍₃₋₂₈₎Orn₁Cys, CysLys₁His₍₃₋₂₈₎Orn₁Cys;

CysArg₍₂₋₂₇₎Lys₂His₁Cys, CysArg₍₂₋₂₇₎Lys₁His₂Cys, CysArg₍₂₋₂₇₎Lys₂Orn₁Cys, CysArg₍₂₋₂₇₎Lys₁Orn₂Cys, CysArg₍₂₋₂₇₎His₂Orn₁Cys, CysArg₍₂₋₂₇₎His₁Orn₂Cys, CysArg₂Lys₍₂₋₂₇₎His₁Cys, CysArg₁Lys₍₂₋₂₇₎His₂Cys, CysArg₂Lys₍₂₋₂₇₎Orn₁Cys, CysArg₁Lys₍₂₋₂₇₎Orn₂Cys, CysLys₍₂₋₂₇₎His₂Orn₁Cys, CysLys₍₂₋₂₇₎His₁Orn₂Cys, CysArg₂Lys₁His₍₂₋₂₇₎Cys, CysArg₁Lys₂His₍₂₋₂₇₎Cys, CysArg₂His₍₂₋₂₇₎Orn₁Cys, CysArg₁His₍₂₋₂₇₎Orn₂Cys, CysLys₂His₍₂₋₂₇₎Orn₁Cys, CysLys₁His₍₂₋₂₇₎Orn₂Cys;

CysArg₍₁₋₂₆₎Lys₃His₁Cys, CysArg₍₁₋₂₆₎Lys₂His₂Cys, CysArg₍₁₋₂₆₎Lys₁His₃Cys, CysArg₍₁₋₂₆₎Lys₃Orn₁Cys, CysArg₍₁₋₂₆₎Lys₂Orn₂Cys, CysArg₍₁₋₂₆₎Lys₁Orn₃Cys, CysArg₍₁₋₂₆₎His₃Orn₁Cys, CysArg₍₁₋₂₆₎His₂Orn₂Cys, CysArg₍₁₋₂₆₎His₁Orn₃Cys, CysArg₃Lys₍₁₋₂₆₎His₁Cys,

CysArg₂Lys₍₁₋₂₆₎His₂Cys, CysArg₁Lys₍₁₋₂₆₎His₃Cys, CysArg₃Lys₍₁₋₂₆₎Orn₁Cys, CysArg₂Lys₍₁₋₂₆₎Orn₂Cys, CysArg₁Lys₍₁₋₂₆₎Orn₃Cys, CysLys₍₁₋₂₆₎His₃Orn₁Cys, CysLys₍₁₋₂₆₎His₂Orn₂Cys, CysLys₍₁₋₂₆₎His₁Orn₃Cys, CysArg₃Lys₁His₍₁₋₂₆₎Cys, CysArg₂Lys₂His₍₁₋₂₆₎Cys, CysArg₁Lys₃His₍₁₋₂₆₎Cys, CysArg₃His₍₁₋₂₆₎Orn₁Cys, CysArg₂His₍₁₋₂₆₎Orn₂Cys, CysArg₁His₍₁₋₂₆₎Orn₃Cys, CysLys₃His₍₁₋₂₆₎Orn₁Cys, CysLys₂His₍₁₋₂₆₎Orn₂Cys, CysLys₁His₍₁₋₂₆₎Orn₃Cys;

CysArg₍₂₋₂₇₎Lys₁His₁Orn₁Cys, CysArg₁Lys₍₂₋₂₇₎His₁Orn₁Cys, CysArg₁Lys₁His₍₂₋₂₇₎Orn₁Cys, CysArg₁Lys₁His₁Orn₍₂₋₂₇₎Cys, CysArg₍₁₋₂₆₎Lys₂His₁Orn₁Cys, CysArg₍₁₋₂₆₎Lys₁His₂Orn₁Cys, CysArg₍₁₋₂₆₎Lys₁His₁Orn₂Cys, CysArg₂Lys₍₁₋₂₆₎His₁Orn₁Cys, CysArg₁Lys₍₁₋₂₆₎His₂Orn₁Cys, CysArg₁Lys₍₁₋₂₆₎His₁Orn₂Cys, CysArg₂Lys₁His₍₁₋₂₆₎Orn₁Cys, CysArg₁Lys₂His₍₁₋₂₆₎Orn₁Cys, CysArg₁Lys₁His₍₁₋₂₆₎Orn₂Cys, CysArg₂Lys₁His₁Orn₍₁₋₂₆₎Cys, CysArg₁Lys₂His₁Orn₍₁₋₂₆₎Cys, CysArg₁Lys₁His₂Orn₍₁₋₂₆₎Cys。

[0155] 此外,式IV中的肽部分P可包含一个或多个芳族氨基酸,特别是Trp、Tyr或Phe,如上文更详细地描述的。任选地,富含芳族氨基酸的肽序列可以进一步含有至少一个脯氨酸,其可以作为Trp、Tyr和Phe的较长序列的结构破坏剂。根据芳族氨基酸序列的长度,可优选掺入两个、三个或更多个脯氨酸。

[0156] 任选地,式IV中的部分P,如果选择肽序列,则该序列可以进一步含有一个或多个亲水性氨基酸,特别是选自具有不带电荷的极性侧链的那些,例如Thr、Ser、Asn和/或Gln。参考上文关于通常将这样的氨基酸并入P中的更详细描述。这同样适用于在部分P中掺入亲脂性氨基酸,特别是Leu、Val、Ile、Ala和/或Met,以及适用于P的任何其他修饰。

[0157] 替代地,根据式IV的阳离子化合物可包含由分子量为约0.5kDa至约30kDa的聚合物部分表示的部分P。同样在这种情况下,对于上述聚合物部分P通常描述的选择和优选方案应该应用于这种特定情况,其中P是式IV化合物的部件。

[0158] 同样,由于P在这种情况下以多聚体形式出现,该多聚体包括若干P单元和/或与P¹和P³连接并通过衍生自-SH基团的二硫键连接,在这种情况下P可以不再包含如式IV所表示的氧化形式的-SH基团本身。

[0159] 如上所述,P可以是任选经修饰的聚丙烯酸酯、壳聚糖、聚乙烯亚胺、多胺、聚氨基酯或聚酰胺胺、或其任何共聚物。

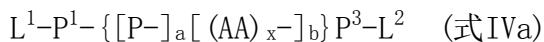
[0160] 优选地,选择用于P的聚合物部分的分子量分别显示为约0.5kDa至约20kDa,例如约0.5kDa至约11.5kDa,或约1kDa至约10kDa,或约0.1kDa至约8kDa,或约0.1kDa至约6kDa,或约0.1kDa至约5kDa,或约0.5kDa至约5kDa,或约0.3kDa至约20kDa,或约0.3kDa至约10kDa,或约0.4kDa至约10kDa,或约0.5kDa至约10kDa,或约0.5kDa至约7.5kDa,或约0.5kDa至约4kDa,或约0.5kDa至约3kDa,或约0.67kDa至约2.7kDa。

[0161] 选择用于P的优选聚合物部分包括:例如,经修饰的聚氨基酸,如β-氨基酸聚合物或反向聚酰胺;经修饰的聚乙烯,如(聚(N-乙基-4-乙烯基溴化吡啶鎓))(PEVP)等;经修饰的丙烯酸酯,如(聚(二甲基氨基乙基甲基丙烯酸酯))(pDMAEMA)等;经修饰的酰氨基胺,如(聚(酰氨基胺))(pAMAM)等;经修饰的聚β氨基酯(PBAE),如经二胺末端修饰的1,4-丁二醇二丙烯酸酯-共-5-氨基-1-戊醇聚合物等;树枝状大分子,如聚丙胺树枝状大分子或基于pAMAM的树枝状大分子等;聚亚胺,如聚(乙烯亚胺)(PEI或pEI),聚(丙烯亚胺)等;聚烯丙基

胺, 1,5-二甲基-1,5-二氮杂十一亚甲基聚甲溴化物(1,5-dimethyl-1,5-diazaundecamethylene polymethobromide), 海美溴铵(Polybrene®)。

[0162] 还优选阳离子多糖, 即基于糖主链的聚合物, 例如基于环糊精的聚合物, 基于葡聚糖的聚合物, 壳聚糖等; 硅烷主链基聚合物, 如PMOXA-PDMS共聚物等; 以及由一种或多种阳离子嵌段(例如选自如上所述的阳离子聚合物)的组合和一种或多种亲水或疏水嵌段(例如聚乙二醇)的组合组成的嵌段聚合物。

[0163] 在一实施方案中, 包含至少一个阳离子部分P的阳离子化合物是根据式IVa的化合物



其中,

P、P¹、P³、L¹和L²如上定义;

(AA)_x是氨基酸(AA)组分, 其中x是选自1至约100的整数;

a和b是独立地选自1至约49的整数, 使得a+b的总和在2至约50的范围内;

部分[P⁻]和[(AA)_x⁻]可以在子式{[P⁻]_a[(AA)_x⁻]_b}内以任何顺序排列; 并且其中

P、P¹、P³和(AA)_x中的每一个通过二硫键与每个相邻的P、P¹、P³和(AA)_x连接。

[0164] 同样, 先前在式IV的情况下针对P、P¹、P³、L¹和L²描述的选项和优选方案也通过类推适用于该实施方案。式IVa与式IV的不同之处在于它还包含一个或多个肽序列(AA)_x与在化合物核心区中的一个或多个部分P的组合。

[0165] 可以独立地选择(AA)_x的每个单独单元, 以及单元内的每个氨基酸。一个或多个(AA)_x单元可用于引入特定的非碱性氨基酸, 例如一种或多种芳族氨基酸, 特别是Trp、Tyr和/或Phe; 或一种或多种亲水性氨基酸, 特别是Thr、Ser、Asn和/或Gln; 或亲脂性氨基酸, 特别是Leu、Val、Ile、Ala和/或Met。因此, 并且如上所述, 通过(AA)_x单元的掺入是在肽序列P自身内引入相应氨基酸的替代方案。当根据式IVa单独掺入(AA)_x单元时, 这些(AA)_x单元中的每一个通过二硫键连接到每个相邻的P、P¹、P³和(AA)_x部分, 在一优选实施方案中, 如上所述, 其涉及末端Cys残基。

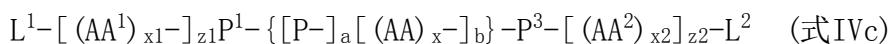
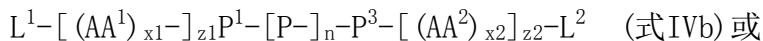
[0166] 优选地, 每个(AA)_x部分的氨基酸数为约2至约50, 或约3至约50, 更优选约7至约30, 或约3至约25。长度范围优选为约3至约20个氨基酸, 或约5至约20个氨基酸, 或约7至约30个氨基酸, 或约6至约18个氨基酸, 或约7至约17个氨基酸, 例如约5至约15个氨基酸。

[0167] 在式IVa中的P是肽部分的情况下, 优选组分{[P⁻]_a[(AA)_x⁻]_b}中阳离子氨基酸的含量为至少10%、20%或30%, 优选至少40%, 更优选至少50%或60%。任选地, 其为约50±10%, 60±10%, 70±10%或80±10%。在这种情况下, 整个组分{[P⁻]_a[(AA)_x⁻]_b}中所有氨基酸的含量(即数量)定义为100%。

[0168] 在式IVa中的部分P是聚合物链的情况下, 在本文定义的(生理)pH下组分{[P⁻]_a[(AA)_x⁻]_b}中的阳离子电荷含量优选大于50%, 例如至少60%, 70%, 80%, 90%, 或甚至95%, 96%, 97%, 98%, 99%或100%, 或可以在高于约50%至100%的范围内, 或在约60%至约100%的范围内, 或在由前述任何两个值形成的范围内, 前提是在整个组分{[P⁻]_a[(AA)_x⁻]_b}中, 所有电荷(例如本文所定义的(生理)pH下的正电荷和负电荷)的含量是100%。

[0169] 在进一步的实施方案中, 包含至少一个阳离子部分P的阳离子化合物是根据下式

IVb或IVc中的一者的化合物:



其中P、P¹、P³、(AA)_x、L¹和L²如上定义;

(AA¹)_{x1}和(AA²)_{x2}是氨基酸(AA)组分,其中氨基酸AA¹和AA²可以与AA相同或不同和/或彼此相同或不同,并且其中x1和x2是独立地选自1至约100的整数;

z1和z2是独立地选自1至约30的整数;

部分[P-]和[(AA)_{x-}]可以在子式{[P-]_a[(AA)_{x-}]_b}内以任何顺序排列;并且其中

P、P¹、P³、(AA)_x、(AA¹)_{x1}或(AA²)_{x2}中的任何一个可以通过二硫键连接到相邻的P、P¹、P³、(AA)_x、(AA¹)_{x1}、(AA²)_{x2}、L¹和/或L²。

[0170] 同样,先前针对P、P¹、P³、L¹、L²和(AA)_x以及式IV和式IVa的情况中的a和b所述的选项和优选方案也可以类推适用于具有根据式IVb和IVc的阳离子化合物的这些实施方案。先前针对x描述的优选方案也适用于x1和x2。式IVb与式VIa的不同之处在于氨基酸组分(AA)_x已被氨基酸组分(AA¹)_{x1}和(AA²)_{x2}取代,其也被定义为独立选择的氨基酸重复单元,每单元具有1至约100个氨基酸,每分子具有1至约30个单元;代替位于分子的核心部分处或附近,(AA¹)_{x1}和(AA²)_{x2}分别位于核心外部以及在P¹和可选组分L¹之间以及在P³和任选组分L²之间,从而使得能调节分子构建体的物理和生物学性质。在根据式IVc的化合物中,氨基酸组分既如式IVa中一样存在于分子的核心区域中,也如式IVb中一样朝向两个末端存在。

[0171] 整数z1和z2分别选自1至约30,更优选约1至约20,或1至约15,或1至约10的范围内。

[0172] 在一实施方案中,组合物包含两种或更多种不同种类的阳离子肽和/或聚合物。在该实施方案中,每种阳离子肽和/或聚合物可以单独选择,其中上述所有选项和优选方案适用于每种选择。

[0173] 如上所述,阳离子类脂质化合物,也简称为类脂质,是脂质样化合物,即具有脂质样物理性质的两亲化合物。

[0174] 在一实施方案中,类脂质是包含至少两个阳离子氮原子和至少两个亲脂性尾部的化合物。如本文所使用的,“尾部”是表示链或链状结构的分子的亚结构,例如具有至少四个,更优选至少六个碳原子的任选经取代的烃基、酰基或酰氧基烷基链。代表亲脂性尾部的任选经取代的烃基、酰基或酰氧基烷基链可以直接与阳离子氮原子连接。

[0175] 在一具体实施方案中,类脂质是包含两个相同亲脂性尾部的化合物,每个尾部与阳离子氮原子直接连接。在另一具体实施方案中,类脂质是包含三个相同亲脂性尾部的化合物,每个尾部与阳离子氮原子直接连接。在另一具体实施方案中,类脂质是包含四个或更多个相同亲脂性尾部的化合物,每个尾部与阳离子氮原子直接连接。在这些实施方案的每一个中,类脂质可任选地包含没有连接亲脂性尾部的另外的氮原子。这种类脂质也可以理解为具有衍生自寡聚胺的阳离子主链的化合物,其中亲脂性尾部连接到寡聚胺的阳离子氮或一些阳离子氮上。

[0176] 如果亲脂性尾部是经取代的烃基(例如烷基)链,则取代基可以是例如甲基或羟基。

[0177] 任选经取代的烃基链可以是饱和的,以便类似于烷基,或者它可以是不饱和的,即

链烯基或炔基,各自任选地具有一个、两个、三个或更多个碳-碳双键和/或三键。在尾部结构代表或包括酰基或酰氧基烷基的情况下,这些尾部结构还可以在尾部的烃链段中包含一个、两个或更多个碳-碳双键和/或三键。

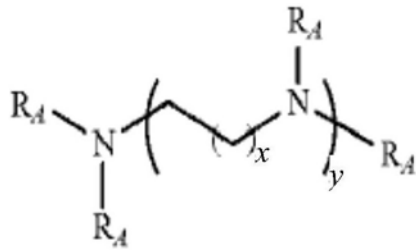
[0178] 在一实施方案中,类脂质化合物不含可水解的连接基团,例如酯、酰胺或氨基甲酸酯基团。如本文所使用的,连接基团是将类脂质分子的亲脂性尾部连接至包含阳离子氮原子的亲水性区域的基团。已经提出的作为载体或试剂以将核酸递送至细胞并增强转染的常规阳离子脂质通常(如果不是典型的话)显示出这样的最通常是可水解的和/或可酶促裂解的接头或连接基团。特别地,已经提出了具有酯基的接头,而且也提出了具有酰胺基团或氨基甲酸酯基团的接头,所有这些接头都易于在体内水解和/或可酶促裂解。

[0179] 如本文所使用的,可水解是指在体内条件下在数秒、数分钟、数小时或数天内在生理流体(例如组织间液)中发生明显程度的水解。优选地,相应的化合物或基团在不超过7天后,或甚至在不超过2天后水解至至少50%。

[0180] 在本发明的一些实施方案中,类脂质化合物包含PEG部分。

[0181] 如所述的,类脂质化合物是阳离子的,这意味着它是可阳离子化的或永久性阳离子的。在一实施方案中,类脂质是可阳离子化的,即它包含一个或多个可阳离子化的氮原子,但不含永久性阳离子氮原子。在另一实施方案中,类脂质的阳离子氮原子中的至少一个是永久阳离子的。任选地,类脂质包含两个永久阳离子氮原子、三个永久阳离子氮原子或甚至四个或更多个永久阳离子氮原子。

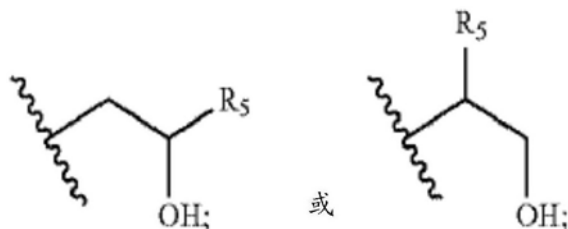
[0182] 在进一步的实施方案中,类脂质化合物是根据式I的化合物



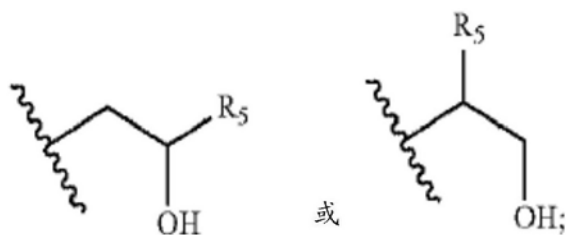
(式 I)

或其药学上可接受的盐。

[0183] 在式I中,每次出现的R_A独立地是未经取代的、环状或非环状的、支链或非支链的C₁₋₂₀脂族的;经取代或未经取代的、环状或非环状的、支链或非支链的C₁₋₂₀杂脂族的;经取代或未经取代的芳基;经取代或未经取代的杂芳基;



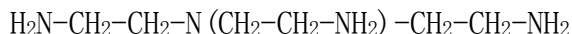
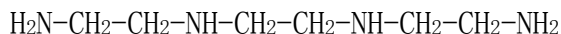
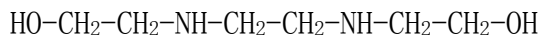
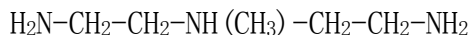
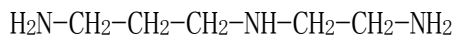
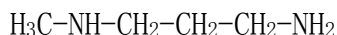
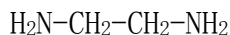
其中至少一个R_A是



此外,每次出现的 R_5 独立地是未经取代的、环状或非环状的、支链或非支链的 C_8-16 脂族基团;经取代或未经取代的芳基;或经取代或未经取代的杂芳基。此外,每次出现的 x 是1至10的整数,并且每次出现的 y 是1至10的整数。在本发明的一些实施方案中, R_A 或 R_5 是PEG部分或被PEG部分取代。

[0184] 任选地, R_5 至少一次出现时是 C_8-C_{16} 烷基,或甚至在每次出现时是 C_8-C_{16} 烷基。根据优选的实施方案中的一个,至少一个 x 选自1或2,并且任选地所有出现的 x 是1或2。此外,至少一个 y 选自1或2,并且任选地所有出现的 y 是1或2。在另一实施方案中,所有出现的 R_5 是 C_8-C_{16} 烷基,所有出现的 x 都是1或2,并且所有出现的 y 都是1或2。

[0185] 在一些实施方案中,这种类脂质可以通过使寡聚胺和环氧化物封端的脂族化合物在升高的温度下,例如在80至95 $^{\circ}C$,在不存在溶剂的情况下反应来制备。这种类脂质化合物包括由胺和疏水脂族尾部打开环氧化物而产生的亲水部分。优选地,寡聚胺包含2至5个氮原子。优选的寡聚胺包括但不限于:

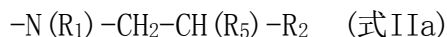


[0186] 在本发明的一些实施方案中,基于寡聚胺的类脂质任选地被PEG部分取代。

[0187] 优选的环氧化物封端的脂族化合物是但不限于2-烷基环氧乙烷,其中烷基是丁基、己基、辛基、癸基、十二烷基、十四烷基或十八烷基。任选地,烷基可进一步表现出烷基侧链,例如甲基、乙基、丙基或异丙基侧链。此外,2-烷基环氧乙烷的烷基还可包含一个或多个杂原子,例如氧。此外,环氧化物封端的脂族化合物可包含一个或多个碳-碳双键或三键。

[0188] 关于制备这种类脂质化合物的进一步指导,参考US 8969353,其公开内容以其整体并入本文。

[0189] 根据进一步的实施方案,其中类脂质化合物包含两个或三个式IIa和/或式IIb部分:

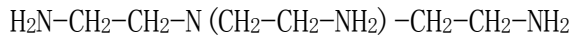




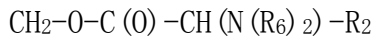
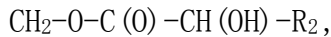
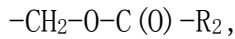
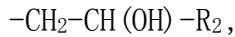
其中,独立地,对于式IIa或式IIb的每个单独的部分, R_1 选自氢或 C_1-C_4 -烷基; R_2 选自直链或支链的、饱和或不饱和的 C_6-C_{16} 烃基链, R_3 和 R_4 选自 C_1-C_4 -烷基,并且 R_5 是氢或羟基。任选地,在一些实施方案中,式IIa和/或IIb的每个部分单独地可以被PEG部分取代或可以不被PEG部分取代。

[0190] 每次出现的 R_1 可以相同或不同。在一实施方案中,其对于每次出现都是相同的,特别是当 R_1 是氢或甲基时。 R_3 和 R_4 也可以在每次出现时相同;例如, R_3 和 R_4 的所有示例可以是甲基。

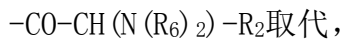
[0191] 在又一实施方案中,类脂质化合物是包含三个相同的式IIa和/或式IIb部分的化合物,其中 R_1 是氢, R_2 是直链或支链的 C_6-C_{16} 烷基链, R_3 和 R_4 是甲基,并且 R_5 是羟基。例如,根据式IIa的化合物可以基于寡聚胺主链



[0192] 其中对于三个伯氨基中的每一个,氢原子中的一个被



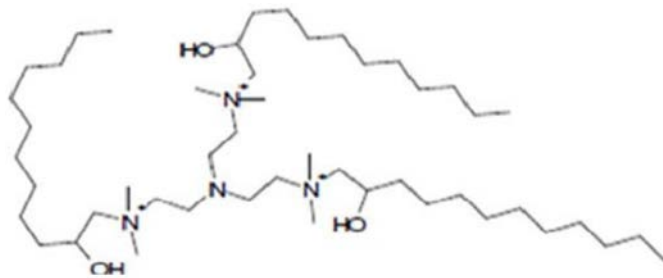
和/或



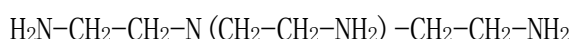
[0193] 其中 R_2 是直链或支链 C_6-C_{16} 烷基,特别是直链 C_6 、 C_8 、 C_{10} 或 C_{12} 烷基,并且每个 R_6 可以独立地是H或 CH_3 。式IIb化合物可以基于相同的寡聚胺主链和相同的取代基 $-CH_2-CH(OH)-R_2$,但另外在还连接取代基 $-CH_2-CH(OH)-R_2$ 的每个氮原子处具有两个甲基。同样, R_2 是直链或支链的 C_6-C_{16} 烷基,特别是直链的 C_6 、 C_8 、 C_{10} 或 C_{12} 烷基。

[0194] 任选地,其中对于三个伯氨基中的每一个,氢原子中的一个被PEG部分取代或被聚乙二醇化。

[0195] 在一具体实施方案中,永久性阳离子类脂质是式IX中所示的包含阳离子的化合物:

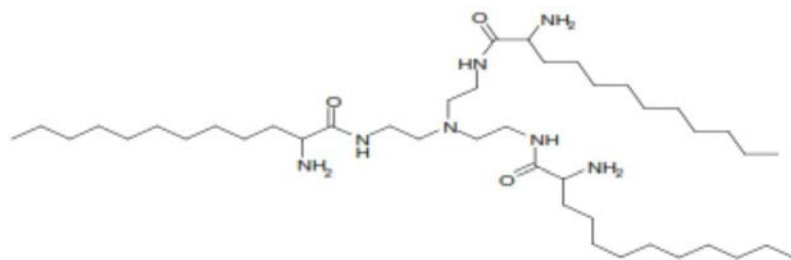


并且进一步任选地包含阴离子,优选如上所述的阴离子。该化合物可以通过首先使下式的寡聚胺:

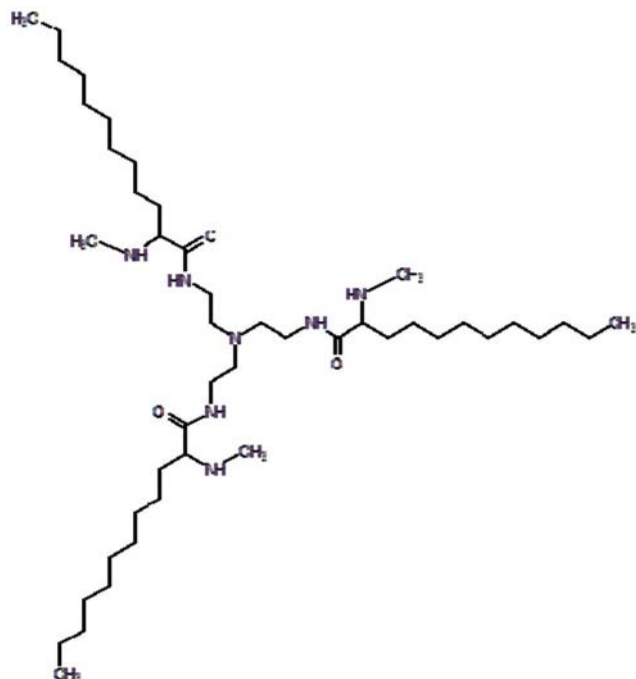


与非支链的、饱和的末端 C_{12} 烷基环氧化物反应,然后用活化的甲基(如甲基碘)进行季铵化。本发明的一个方面涉及这种化合物本身,包括其任何盐。

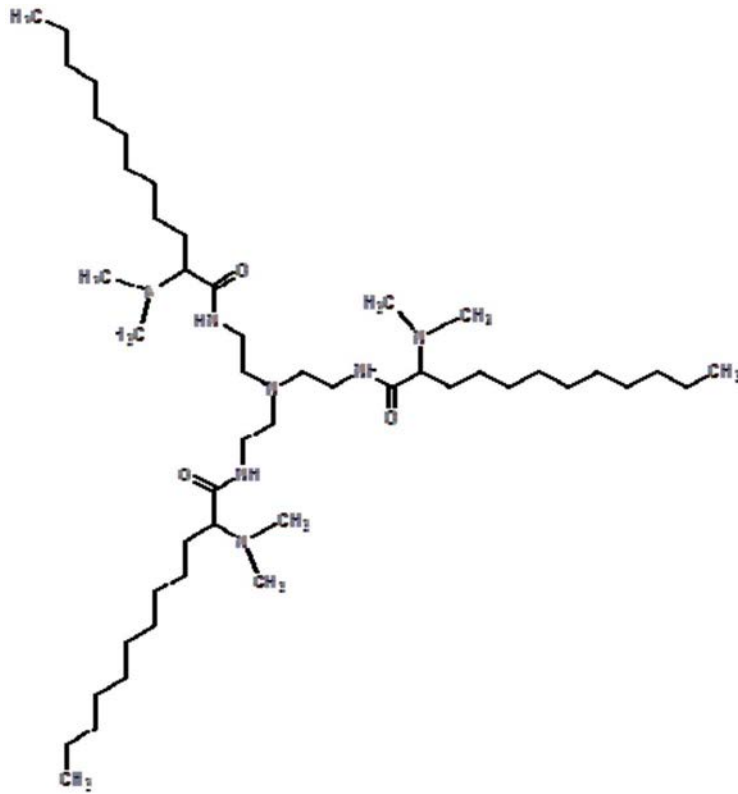
[0196] 在本发明的另一具体实施方案中,类脂质是根据式X的化合物:



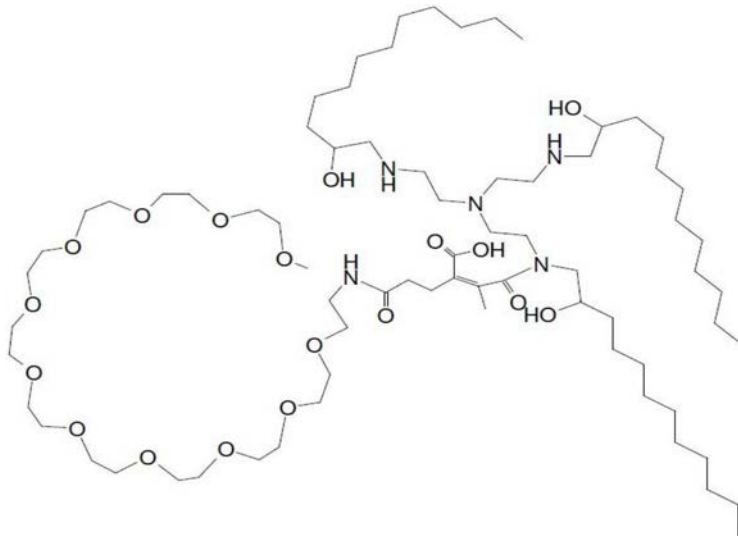
[0197] 任选地,类脂质化合物是根据式X的类脂质化合物,其中伯胺各自独立地被甲基取代一次或两次。在一特别优选的实施方案中,类脂质化合物是根据式Xa的化合物:



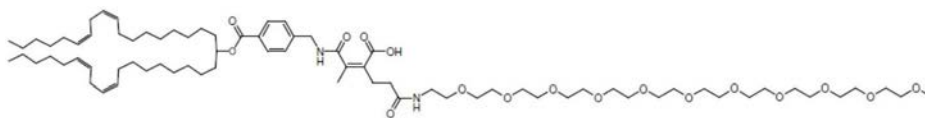
[0198] 在本发明的另一特别优选的实施方案中,类脂质化合物是根据式Xb的化合物:



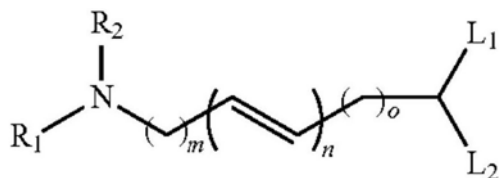
[0199] 在一特别优选的实施方案中,类脂质化合物是包含以下结构的化合物:



[0200] 在本发明的另一优选实施方案中,类脂质化合物是包含以下结构的化合物:



[0201] 在进一步的实施方案中,类脂质化合物是根据式III的化合物:



(式 III)

其中 R_1 和 R_2 各自独立地选自氢, 任选经取代的、饱和或不饱和的 C_1 - C_{20} 烃基, 和任选经取代的、饱和或不饱和的 C_6 - C_{20} 酰基。此外, L_1 和 L_2 各自独立地选自任选经取代的、饱和或不饱和的 C_1 - C_{30} 烃基; m 和 o 各自独立地选自自由零和任何正整数组成的组;并且 n 是任何正整数。在一些实施方案中,根据式I或II的类脂质被聚乙二醇化。在其他实施方案中,根据式III的类脂质被聚乙二醇化。在其他实施方案中,通常的阳离子或可离子化的脂质是聚乙二醇化的。在一些实施方案中,PEG中乙二醇部分的数目为5至9、10至20、21-30、31-40、41至50或更多,或PEG部分选自PEG200至PEG10000。优选地,PEG部分选自PEG500至PEG2000。在其他实施方案中,使用支化、Y形或梳形的PEG聚合物。

[0202] 在一优选的实施方案中,式III的类脂质的 R_1 和 R_2 都是 C_1 - C_{20} 烷基,更优选 C_1 - C_6 烷基,特别是甲基、乙基、丙基或异丙基。例如, R_1 和 R_2 都可以是甲基。此外, n 优选不大于约5,特别是不大于约2,例如1。此外, o 优选选自0或1, m 优选选自1至6,例如1、2、3、4、5或6。

[0203] 在进一步的实施方案中, L_1 和 L_2 各自独立地选自不饱和的 C_6 - C_{22} 烃基,特别是选自 C_{10} - C_{22} 烃基。具有14、16、18、20或22个碳原子的直链 ω -6和 ω -9不饱和烃链是优选的烃基。

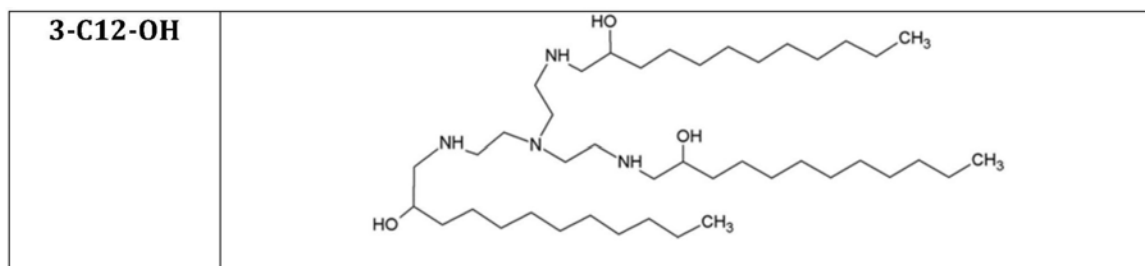
[0204] 还优选的是式III的类脂质,其中 R_1 和 R_2 均为甲基, m 为3或4, n 为1, o 为0或1,且 L_1 和 L_2 为具有16或18个碳原子的相同的线性 ω -6和 ω -9不饱和烃链。在一些实施方案中, R_1 、 R_2 、 L_1 或 L_2 中的至少一个可以是PEG部分或被PEG部分取代。

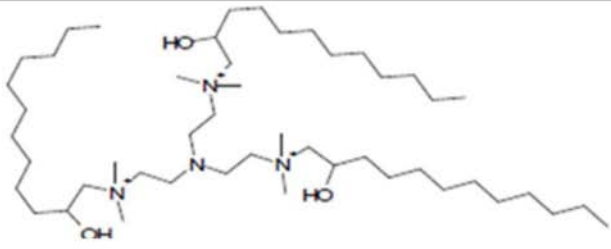
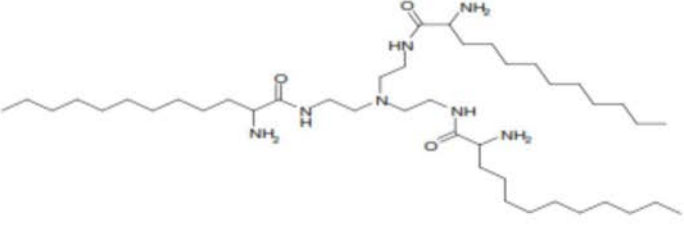
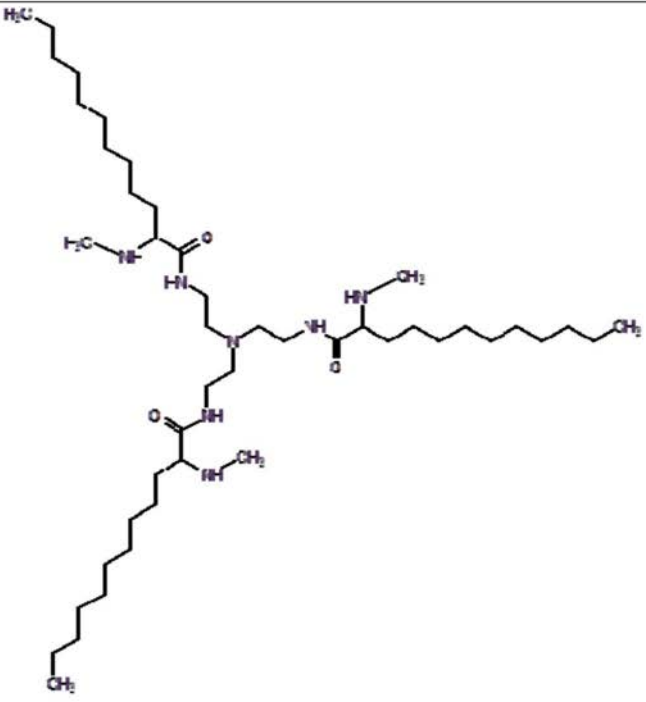
[0205] 在进一步的实施方案中,类脂质是如上定义的式III化合物,不同之处在于 n 为0。

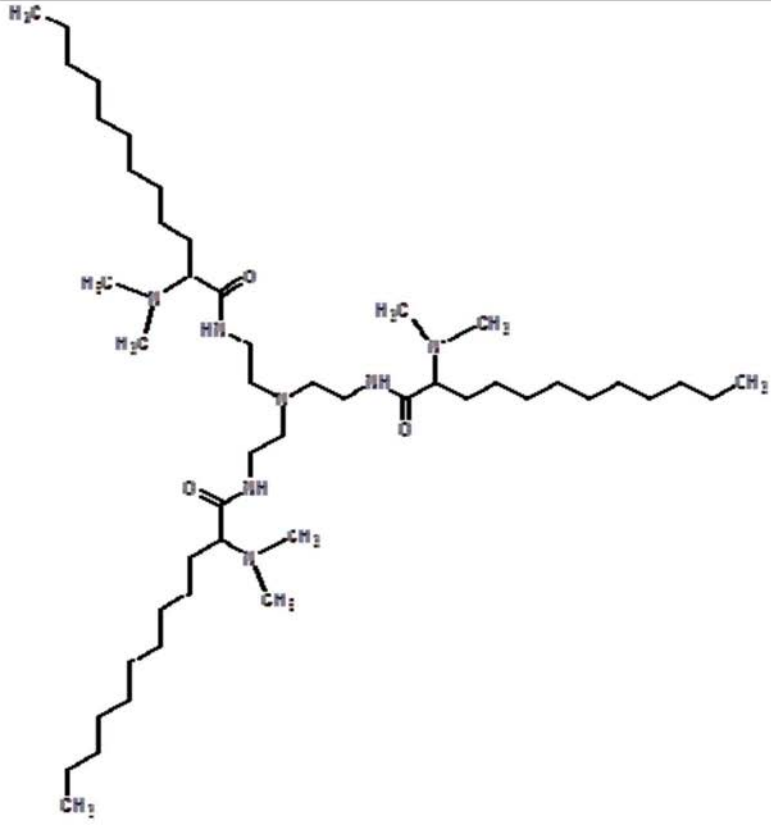
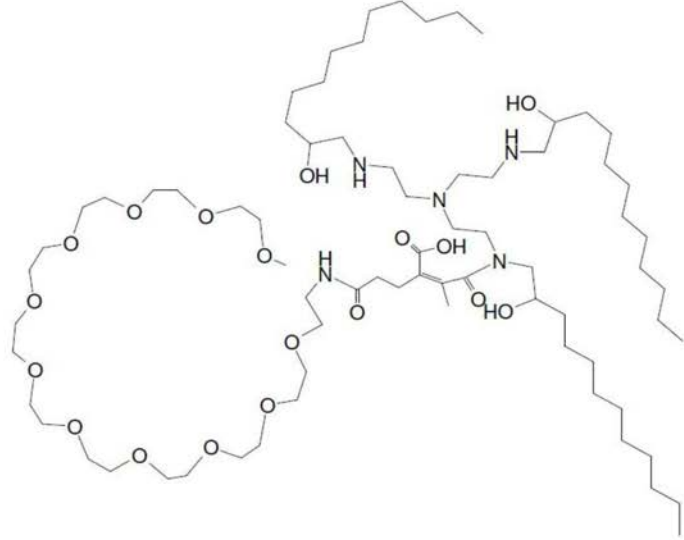
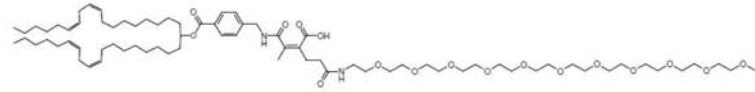
[0206] 任选地,该组合物包含两种或更多种类脂质,各自如上所述独立地选择;或者它可以包含类脂质与另一种阳离子脂质的组合。

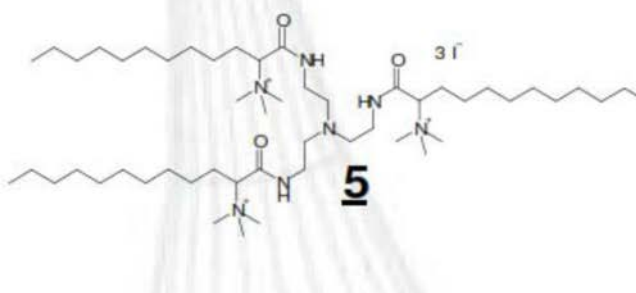
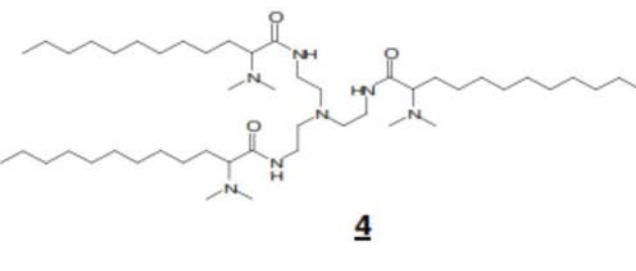
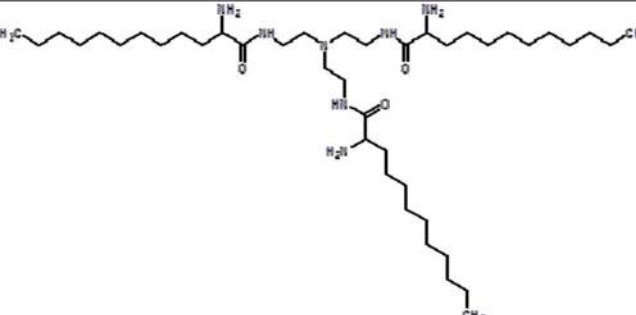
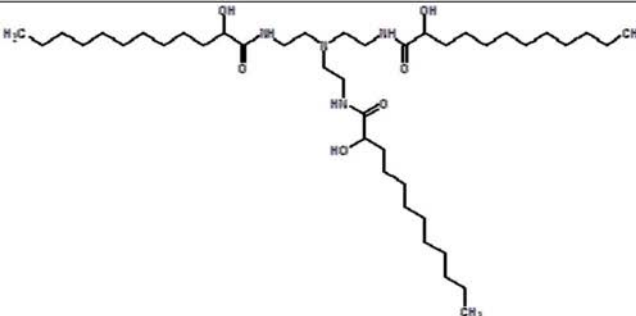
[0207] 在一实施方案中,组合物基本上不含除上文定义的种类脂质之外的脂质;或者基本上不含权利要求之一中定义的脂质以外的脂质。事实上,本发明的一个特别的优点是它确实受益于类脂质在有效递送核酸方面的性质和有利效果,但不需要存在那些如上所定义的非阳离子的并且通常用于制备脂质络合物或脂质纳米颗粒的其它脂质,例如两性离子磷脂或类固醇,如胆固醇,其有时被称为辅助脂质。因此,本发明的优选实施方案之一是该组合物不含中性或两性离子脂质;或者它不含类固醇,如不含胆固醇。

[0208] 不限于此,以下类脂质结构已用于本发明:

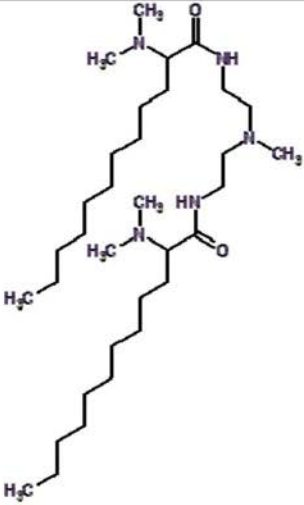
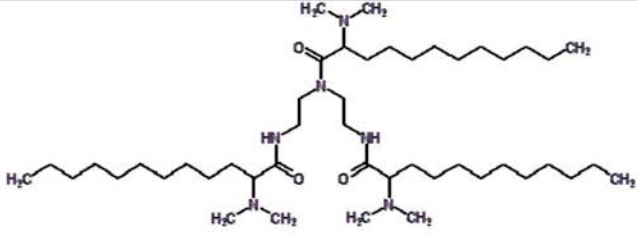
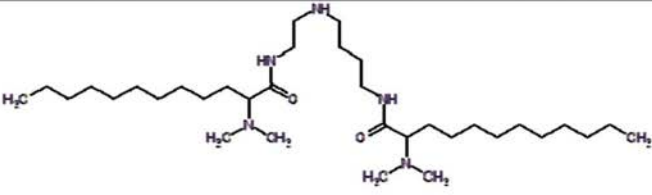
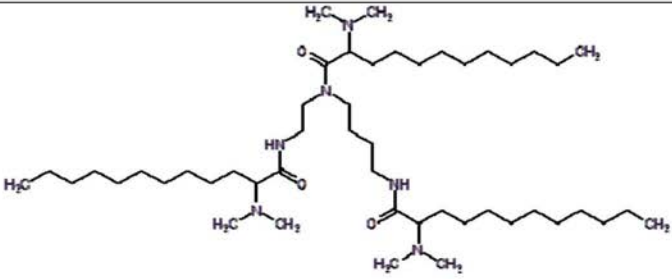


3-C12-OH-cat	
3-C12-酰胺	
3-C12-酰胺单 甲基	

<p>3-C12-酰胺二 甲基</p>	 <p>The structure shows a central nitrogen atom bonded to two methyl groups (H₂C) and a long dodecyl chain (CH₂). This nitrogen is part of an amide group (-NH-CO-) that is linked to another nitrogen atom. This second nitrogen is also bonded to two methyl groups and another long dodecyl chain. The two amide groups are connected via their nitrogen atoms, forming a tertiary amine-like structure with two long hydrophobic tails.</p>
<p>RevPEG(10)- 3-C12-OH</p>	 <p>The structure features a large, circular polyethylene glycol (PEG) chain with ten repeating units. Attached to this PEG chain is a complex molecule containing a central carbon atom bonded to a hydroxyl group (-OH) and a long dodecyl chain. This central carbon is also bonded to two nitrogen atoms, each of which is further substituted with a long dodecyl chain and a hydroxyl group, creating a multi-functionalized lipid-PEG conjugate.</p>
<p>RevPEG(10)- DLin- pAbenzoic</p>	 <p>The structure shows a long, linear polyethylene glycol (PEG) chain with ten repeating units. At one end of the PEG chain, there is a complex molecule consisting of a long dodecyl chain, a benzene ring, and a carboxylic acid group (-COOH), representing a lipid-PEG conjugate with a specific functional group.</p>

<p>3C12 酰胺- TMA cat.</p>	
<p>3C12 酰胺- DMA</p>	
<p>3C12 酰胺- NH2</p>	
<p>3C12 酰胺- OH</p>	

<p>3C12 酯-OH</p>	
<p>3C12 酯-amin</p>	
<p>3C12 酯-DMA</p>	

<p>2C12Amid-DMA</p>	
<p>3C12-lin-amid-DMA</p>	
<p>2C12-sperm-amid-DMA</p>	
<p>3C12-sperm-amid-DMA</p>	

[0209] 包含在本发明组合中或如下所述的本发明纳米颗粒中的生物活性被运载物材料优选是核酸化合物或络合物。组合中包含的核酸化合物可以是任何类型的核酸或核酸衍生物。在一些优选的实施方案中，核酸化合物选自化学修饰的或未修饰的DNA，单链或双链DNA，编码或非编码DNA，其任选地选自质粒，(短)寡脱氧核苷酸(即(短)DNA寡核苷酸)，基因组DNA，DNA引物，DNA探针，免疫刺激性DNA，适体或其任何组合。替代地或附加地，还可以例如从任何PNA(肽核酸)选择这样的核酸分子。进一步替代地或附加地，并且还根据特别优选的实施方案，核酸选自化学修饰的或未修饰的RNA，单链或双链RNA，编码或非编码RNA，其任选地自信使RNA(mRNA)，(短)寡核糖核苷酸(即(短)RNA寡核苷酸)，病毒RNA，复制子RNA，转移RNA(tRNA)，核糖体RNA(rRNA)，免疫刺激性RNA(isRNA)，微小RNA(microRNA)，小干扰RNA(siRNA)，小核RNA(snRNA)，小发夹RNA(shRNA)，或核糖开关，RNA适体，RNA诱饵，反义

RNA,核酶或其任何组合。优选地,络合物的核酸分子是RNA。更优选地,络合物的核酸分子是(线性)单链RNA,甚至更优选mRNA或免疫刺激性RNA。

[0210] 任选地,生物活性被运载物材料是一种以上核酸化合物的组合。

[0211] 从不同角度描述,核酸可以是单链或双链核酸化合物或络合物。严格地说,双链核酸也可以被认为是两种核酸化合物(即两条反平行链)的组合,所述两种核酸化合物由于它们通过非共价键结合而形成核酸络合物。然而,与通常的技术语言一样,双链核酸也可以描述为一种化合物或分子。核酸也可以是部分双链或部分单链核酸,其包含至少部分自身互补的两条链。这种部分双链或部分单链核酸分子通常由更长和更短的单链核酸分子或两个长度大致相等的单链核酸分子形成,其中一个单链核酸分子与另一个单链核酸分子部分互补,因此两者在该区域形成双链核酸分子,即部分双链或部分单链核酸(分子)。优选地,核酸化合物是单链核酸。此外,核酸化合物可以是环状或线性核酸,优选线性核酸。

[0212] 任选地,核酸可以是人工核酸。“人工核酸分子”或“人工核酸”通常可以理解为不是天然存在的核酸分子,例如DNA或RNA。换句话说,人工核酸分子可以理解为非天然核酸分子。这种核酸分子会由于其单个序列(其不是天然存在的)和/或由于其他修饰(例如不是天然存在的核苷酸的结构修饰)而是非天然的。人工核酸分子可以是DNA分子、RNA分子或包含DNA和RNA部分的杂合分子。通常,可以通过基因工程方法设计和/或产生人工核酸分子,以对应于期望的人工核苷酸序列(异源序列)。在本文中,人工序列通常是非天然存在的序列,即它与野生型序列有至少一个核苷酸不同。术语“野生型”可以理解为天然存在的序列。此外,术语“人工核酸分子”不限于“一个单一分子”,而是通常理解为包含相同分子的整体。因此,它可以涉及等分试样中包含的多个相同分子。

[0213] 在另一实施方案中,本发明中定义的序列(蛋白或核酸)包含与所述序列(蛋白或核酸)具有至少为5%,10%,20%,30%,40%,50%,60%,70%,80%,85%,86%,87%,88%,89%,90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%的序列同一性的序列(蛋白或核酸)或由其组成。

[0214] 两种或更多种不同核酸的组合会是有用的,例如,在包含编码抗体重链的核酸(例如RNA)的组合物以及编码相同抗体的轻链的核酸的组合物的情况下。另一示例是两种或更多种核酸的组合,以影响被称为CRISPR/Cas系统(CRISPR:聚集的规则间隔短回文重复序列;Cas:CRISPR相关蛋白)的生物免疫系统的部分。

[0215] 又一个示例是指导RNA(gRNA)与本发明的组合物或纳米颗粒内的编码核酸的组合。

编码核酸

[0216] 核酸可以编码蛋白或肽,蛋白或肽可以例如但不限于,选自治疗活性蛋白或肽,例如选自抗原,例如肿瘤抗原,致病抗原(例如,选自动物抗原,选自病毒抗原,选自原生动物抗原,选自细菌抗原),过敏原抗原,自身免疫抗原或其他抗原,选自过敏原,选自抗体,选自免疫刺激性蛋白或肽,选自抗原-特异性T细胞受体,或选自适用于特定(治疗)应用的其他蛋白或肽,其中编码核酸可以转运到细胞、组织或生物体中,并且蛋白可以随后在该细胞、组织或生物中表达。

[0217] 双顺反子核酸或RNA和多顺反子核酸或RNA:双顺反子或多顺反子核酸或RNA通常是核酸或RNA,优选mRNA,其通常可具有两个(双顺反子)或更多(多顺反子)编码区。在该背

景下的编码区是可翻译成肽或蛋白的密码子序列。

[0218] 根据本发明的某些实施方案,核酸是单-、双-或多顺反子的,优选如本文所定义。双-或多顺反子核酸分子中的编码序列优选编码如本文所定义的不同蛋白或肽或其片段或变体。优选地,编码两种或更多种蛋白或肽的编码序列可以在双-或多顺反子核酸中通过至少一种IRES(内部核糖体进入位点)序列分离,如下文所定义。因此,术语“编码两种或更多种蛋白或肽”可以意指,但不限于,双-或甚至多顺反子核酸可以编码例如本文提供的定义中的至少两种、三种、四种、五种、六种或更多种(优选不同的)蛋白或肽和/或蛋白或肽或其片段或变体。更优选地,但不限于,双-或甚至多顺反子核酸可以编码例如如本文所定义的至少两种、三种、五种、六种或更多种(优选不同的)蛋白或肽或者如本文所定义的其片段变体。在这种情况下,如上定义的所谓的IRES(内部核糖体进入位点)序列可以作为唯一的核糖体结合位点起作用,但是它也可以用于提供:如上定义的双或甚至多顺反子核酸,其编码将由核糖体彼此独立地翻译的若干蛋白或肽。可根据本发明使用的IRES序列的示例是来自小核糖核酸病毒(例如FMDV),瘟病毒(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),小鼠白血病病毒(MLV),猿猴免疫缺陷病毒(SIV)或蟋蟀麻痹病毒(CrPV)的那些序列。

[0219] 根据进一步的实施方案,根据本发明的核酸序列的至少一个编码序列可以编码与或不与氨基酸接头序列连接的至少两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种和更多种如本文所定义的蛋白或肽(或其片段和衍生物),其中所述接头序列可包含刚性接头、柔性接头、可切割接头(例如,自裂解肽)或其组合。其中,蛋白或肽可以相同或不同或其组合。特定蛋白或肽组合可以由编码至少两种如本文所解释的蛋白或肽的核酸(在本文中也称为“多抗原构建体/核酸”)编码。

[0220] 必须指出的是,在本发明的背景下,编码序列的某些组合(例如,包含至少两种不同的蛋白)可以通过单-、双-和多顺反子核酸和/或多-抗原构建体/核酸的任何组合以获得多聚或甚至多价核酸混合物产生。

[0221] 在特别优选的方面,编码的肽或蛋白选自人、病毒、细菌、原生动植物蛋白或肽。

[0222] a) 治疗活性蛋白

[0223] 在本发明的上下文中,治疗活性蛋白或肽可以由包含在本发明的纳米颗粒中的核酸编码。治疗活性蛋白在本文中定义为对愈合有影响,预防性预防疾病或治疗性治疗疾病的蛋白,优选如本文所定义的,或者是个体需要的蛋白,例如个体的生物体不会产生或仅以不足量产生的天然的或经过修饰的天然蛋白。这些可选自任何天然存在的或合成设计的重组或分离的蛋白,这对于本领域技术人员是已知的。治疗活性蛋白可以包含能够刺激或抑制细胞中信号转导的蛋白,例如细胞因子,淋巴因子,单核因子,生长因子,受体,信号转导分子,转录因子等;抗凝血剂;抗凝血酶;抗过敏蛋白;细胞凋亡因子或凋亡相关蛋白,治疗活性酶和任何与任何获得性疾病或任何遗传性疾病相关的蛋白,但不受限于此。

[0224] b) 抗原

[0225] 替代地,核酸可以编码抗原。根据本发明,术语“抗原”是指被免疫系统识别并且能够(例如通过形成作为适应性免疫应答的一部分的抗体或抗原特异性T细胞来)触发抗原特异性免疫应答的物质。在本文中,蛋白的抗原表位、片段或肽特别是指B细胞和T细胞表位,它们可分别被B细胞、抗体或T细胞识别。

[0226] 在本发明的上下文中,由核酸编码的抗原通常代表属于上述定义的任何抗原、抗原表位或抗原肽,并且优选是蛋白和肽抗原,例如肿瘤抗原,过敏原抗原,自身免疫自身抗原,致病性抗原等。特别地,抗原可以是来自宿主生物(例如人受试者)本身的另一生物的抗原,例如病毒抗原,细菌抗原,真菌抗原,原生动物抗原,动物抗原,过敏原抗原等。过敏原抗原(也称为过敏抗原或过敏原)通常是可在人类受试者中引起过敏的抗原。

[0227] 替代地,由核酸编码的抗原可以源自宿主自身。此类抗原的示例包括肿瘤抗原、自体抗原或自身抗原,例如自身免疫自体抗原,以及如本文所定义的(非自身)抗原,其最初源自宿主生物体外的细胞,但是已经在宿主生物体、组织或细胞内例如通过蛋白酶降解或其他类型的代谢被片段化或降解。

[0228] 在本发明的上下文中也优选的一类抗原是肿瘤抗原。位于肿瘤细胞表面的肿瘤抗原是优选的肿瘤抗原。肿瘤抗原还可以代表与正常细胞相比在肿瘤细胞中过表达的蛋白。此外,肿瘤抗原还包括在不是或者最初不是肿瘤细胞但与肿瘤相关的细胞中表达的抗原。例如,与肿瘤供血血管的形成或重构相关的抗原,特别是与新血管形成(如VEGF或bFGF等生长因子)有关的抗原也是令人感兴趣的。与肿瘤相关的抗原还包括来自通常包埋肿瘤的细胞或组织的抗原。此外,某些其他蛋白或肽可以(过度)表达并且在已经发展成肿瘤的患者体液中以增加的浓度出现。这些物质也被称为肿瘤抗原或肿瘤相关抗原,尽管它们严格来说不是抗原,因为它们不会诱导免疫应答。

[0229] 肿瘤抗原可进一步分为肿瘤特异性抗原(TSA)和肿瘤相关抗原(TAA)。TSA只能由肿瘤细胞而非健康细胞呈递。它们通常由肿瘤特异性突变引起。更常见的TAA通常由肿瘤和健康细胞产生。这些抗原被免疫系统识别,抗原呈递细胞可被细胞毒性T细胞破坏。另外,肿瘤抗原也可以以例如突变受体的形式存在于肿瘤表面。在这种情况下,它们也可以被抗体识别。

[0230] 如果编码的抗原是过敏原,则这种抗原可以选自任何来源的抗原,例如来自动物、植物、霉菌、真菌、细菌等的抗原。植物来源的过敏原可以是例如来自花粉的过敏原。同样,掺入纳米颗粒中的核酸可编码天然抗原或其片段或表位。

[0231] c) 抗体

[0232] 根据进一步的实施方案,核酸化合物编码抗体或抗体片段。抗体或其片段选自(i)单链抗体,(ii)单链抗体片段,(iii)多链抗体,和(iv)多链抗体片段。

[0233] 通常,抗体由轻链和重链组成,两者都具有可变结构域和恒定结构域。轻链由N-末端可变结构域 V_L 和C-末端恒定结构域 C_L 组成。相反,IgG抗体的重链例如由N-末端可变结构域 V_H 和三个恒定结构域 C_{H1} 、 C_{H2} 和 C_{H3} 组成。

[0234] 在一优选的实施方案中,抗体选自全长抗体。这种抗体可以是任何重组产生的或天然存在的抗体,特别是适用于治疗、诊断或科学目的的抗体,或与疾病(例如免疫疾病或癌症)相关的抗体。术语“抗体”以其最广泛的含义使用,并且具体涵盖单克隆和多克隆抗体(包括激动剂、拮抗剂和阻断或中和抗体)和具有多表位特异性的抗体种类。抗体可以属于任何类别的抗体,例如IgM、IgD、IgG、IgA和IgE抗体。此外,抗体可以类似于在宿主生物中通过免疫产生的抗体,或其重组工程化版本,嵌合抗体,人抗体,人源化抗体,双特异性抗体,胞内抗体。

[0235] 此外,核酸化合物还可以编码抗体片段,抗体的变体,加合物或衍生物,例如单链

可变片段,双抗体或三抗体。抗体片段优选选自上述类型抗体的Fab,Fab',F(ab')₂,Fc,Facb,pFc',Fd和Fv片段。通常,抗体片段是本技术领域已知的。例如,Fab(“片段,抗原结合”)片段由重链和轻链中的每一个的一个恒定结构域和一个可变结构域组成。两个可变结构域结合特定抗原上的表位。两条链通过二硫键连接。例如,scFv(“单链可变片段”)片段通常由轻链和重链的可变结构域组成。结构域通过人工连接连接,通常通过多肽连接,例如通过由15-25个甘氨酸、脯氨酸和/或丝氨酸残基组成的肽连接。

[0236] 在一实施方案中,生物活性被运载物材料包含至少两种不同RNA的组合,其中一种RNA编码抗体或其片段的重链,另一种RNA编码抗体或其片段的相应轻链。

[0237] 在另一实施方案中,生物活性被运载物材料包含至少两种不同RNA的组合,其中一种RNA编码抗体或其片段的重链可变区,另一种RNA编码抗体或其片段的相应轻链可变区。

[0238] 此外,优选抗体或抗体片段的不同链由多顺反子核酸(也称为多顺反子核酸)编码。替代地,抗体或抗体片段的不同链由几种单顺反子核酸编码。

[0239] 根据进一步的实施方案,本发明包括至少一种核酸分子用于制备生物活性被运载物材料的用途。如果使用多于一种核酸分子,则络合的核酸分子可以是不同的,即由此形成至少两种不同(络合的)核酸分子的混合物。

[0240] 在一个实施方案中,生物活性被运载物材料包括:

- (i) 编码CRISPR相关蛋白的核酸分子;和/或
- (ii) 一种或多种指导RNA序列。

[0241] 术语“CRISPR相关蛋白”包括但不限于CAS9(CRISPR-相关蛋白9),CSY4,dCAS9和dCAS9-效应物结构域(激活因子和/或抑制因子结构域)融合蛋白。CRISPR相关蛋白可以来自任何数量的物种,包括但不限于来自化脓性链球菌(*Streptococcus pyogenes*),无害李斯特菌(*Listeria innocua*)和嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*)。

[0242] 术语“指导RNA(gRNA)”,也称为“人工指导RNA”,“单指导RNA”,“小指导RNA”或“sgRNA”,描述了包括通常20-25个核苷酸长序列的RNA,其与转录起始位点上游的感兴趣的基因的5'UTR的一条链互补。sgRNA设计的描述可以在例如Mali et al.,2013,Science 339:823-826中找到。人工sgRNA靶向感兴趣的基因,其指导由人工多核苷酸编码的CRISPR相关蛋白与感兴趣的基因相互作用,例如需要调节转录的基因。根据应用选择感兴趣的基因。

[0243] 在一实施方案中,包含在本发明的组合物或纳米颗粒中的本发明的单个核酸分子包含编码所述CRISPR相关蛋白和同时所述指导RNA的单个核酸分子。

[0244] 在进一步的实施方案中,生物活性被运载物材料包含一种以上核酸分子的组合。在另一实施方案中,本发明的一种以上核酸分子包含编码CRISPR相关蛋白的所述核酸分子和所述指导RNA。在这种情况下,生物活性被运载物材料包含两种不同的RNA,其表达Cas9蛋白和靶特异性gRNA。

[0245] siRNA

[0246] 在进一步优选的实施方案中,掺入本发明纳米颗粒中的核酸化合物是dsRNA形式,优选siRNA。特别是与RNA干扰现象有关的dsRNA或siRNA是令人感兴趣的。RNA干扰(RNAi)的体外技术基于双链RNA分子(dsRNA),其触发基因表达的序列特异性抑制(Zamore(2001) Nat. Struct. Biol. 9:746-750; Sharp(2001) Genes Dev. 5:485-490; Hannon(2002) Nature

41:244-251)。在用长dsRNA转染哺乳动物细胞时,蛋白激酶R和RnaseL的活化带来非特异性作用,诸如例如干扰素应答(Stark et al. (1998) Annu.Rev.Biochem.67:227-264;He and Katze (2002) Viral Immunol.15:95-119)。当使用较短的(例如21至23聚体的(23-mer))所谓的siRNA(小干扰RNA)时,避免了这些非特异性作用,因为短于30bp的siRNA不会触发非特异性作用(Elbashir et al. (2001) Nature 411:494-498)。

[0247] 例如,核酸可以是双链RNA(dsRNA),其长度为约17至约29个碱基对,优选约19至约25个碱基对。dsRNA优选为至少90%,更优选至少95%,例如100%(关于dsRNA的核苷酸)与如上所述的治疗相关蛋白或抗原的核酸序列的区段互补,其为编码区段或非编码区段,优选编码区段。90%互补意指在例如20个核苷酸的dsRNA长度下,其含有的与编码相应蛋白的mRNA的相应区段不互补的核苷酸不超过2个。还优选的是双链RNA,其序列与上文所述的治疗相关蛋白或抗原的核酸的区段完全互补。

[0248] 在一实施方案中,dsRNA相应地具有通式结构5'-(N₁₇₋₂₉)-3',并且优选通式结构5'-(N₁₉₋₂₅)-3',或5'-(N₁₉₋₂₄)-3',或5'-(N₂₁₋₂₃)-3',其中每个N是核苷酸,并且其中核苷酸序列与对应于上文所述的治疗相关蛋白或抗原的mRNA的区段互补。原则上,在mRNA的编码区中出现的长度为17至29个碱基对,优选19至25个碱基对的所有区段可以用作本文dsRNA的靶序列。同样地,用作核酸的dsRNA也可以针对上文描述(作为活性成分)的(治疗相关的)蛋白或抗原的核苷酸序列,其不位于编码区,特别是不位于mRNA的5'非编码区中,例如,因此,可以针对具有调节功能的mRNA的非编码区。因此,用作核酸的dsRNA的靶序列可位于mRNA的翻译和非翻译区和/或上文所述的蛋白或抗原的对照元件的区域中。用作核酸的dsRNA的靶序列也可位于非翻译和翻译序列的重叠区域中;特别地,靶序列可以包含mRNA编码区的起始三联体上游的至少一个核苷酸。

免疫刺激性核酸

[0249] a) 免疫刺激性CpG核酸

[0250] 根据另一实施方案,掺入本发明的纳米颗粒中的核酸是免疫刺激性CpG核酸,特别是CpG-RNA或CpG-DNA,其优选诱导先天免疫应答。可能合适的免疫刺激性CpG核酸的示例包括但不限于单链CpG-DNA(ss CpG-DNA),双链CpG-DNA(dsDNA),单链CpG-RNA(ss CpG-RNA)和双链CpG-RNA(ds CpG-RNA)。优选地,CpG核酸是CpG-RNA,特别是单链CpG-RNA(ss CpG-RNA)。如上所述,就核苷酸或碱基对而言,CpG核酸的优选长度类似于siRNA优选的长度。优选地,CpG基序是未甲基化的。

[0251] b) 免疫刺激性RNA(isRNA)

[0252] 根据另一替代方案,在本发明的纳米颗粒中作为生物活性被运载物材料掺入的核酸可以是免疫刺激性RNA(isRNA)的形式,其优选引发先天免疫应答。

[0253] 这种isRNA可以是双链RNA,单链RNA,或部分双链RNA,或短RNA寡核苷酸。在一个优选的实施方案中,它是单链RNA。

[0254] 此外,isRNA可以是环状或线性的。在一优选的实施方案中,使用线性isRNA,例如线性单链RNA,或长单链RNA。

[0255] 此外,isRNA可以是编码或非编码RNA。根据一优选的实施方案,非编码RNA用作isRNA,例如非编码单链RNA,非编码线性RNA,非编码线性单链RNA或非编码长线性单链RNA。

[0256] 根据一进一步优选的实施方案,isRNA在其5'末端携带三磷酸酯,如体外转录的

RNA的情况。该优选适用于所有上述类型的线性isRNA。

[0257] 同样,根据本发明用作生物活性被运载物材料的isRNA可选自任何类型或类别的RNA,无论是天然存在的还是合成的,其能够诱导先天免疫应答,和/或能够增强或支持由抗原诱导的适应性免疫应答。

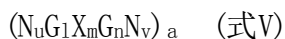
[0258] 在这种情况下,免疫应答可以以各种方式发生。合适的适应性免疫应答的实质因素是某些T细胞亚群的刺激。T淋巴细胞通常分为两个亚群,即T辅助细胞1(Th1)细胞和T辅助细胞2(Th2)细胞,免疫系统能够利用其破坏细胞内(Th1)和细胞外(Th2)病原体,如抗原。两种Th细胞群在它们产生的效应物蛋白(细胞因子)的模式上不同。因此,Th1细胞通过激活巨噬细胞和细胞毒性T细胞来辅助细胞免疫应答。另一方面,Th2细胞通过刺激B细胞转化为浆细胞并通过形成抗体(例如抗抗原)来促进体液免疫应答。因此,Th1/Th2比率在诱导和维持适应性免疫应答中非常重要。

[0259] 在本发明的上下文中,优选适应性免疫应答的Th1/Th2比率向细胞应答(Th1应答)转移,即诱导或增强细胞免疫应答。例如,可以支持适应性免疫应答的先天免疫系统可以被Toll样受体(TLR)的配体激活。TLR是高度保守的模式识别受体(PRR)多肽家族,其识别病原体相关分子模式(PAMP)并在哺乳动物的先天免疫中起关键作用。目前,已经鉴定了至少13个家族成员并将其指定为toll样受体TLR1,TLR2,TLR3,TLR4,TLR5,TLR6,TLR7,TLR8,TLR9,TLR10,TLR11,TLR12和TLR13。此外,已经鉴定了许多特异性TLR配体。发现未甲基化的细菌DNA及其合成类似物(CpG DNA)是TLR9的配体(Hemmi H et al. (2000) Nature 408:740-5; Bauer S et al. (2001) Proc Natl Acad Sci USA 98,9237-42)。此外,据报道,某些TLR的配体包括某些核酸分子,并且某些类型的RNA是以序列非依赖性方式免疫刺激的,其中这些不同的免疫刺激性RNA可刺激TLR3,TLR7或TLR8,或细胞内受体,如RIG-I,MDA-5等。Lipford et al.确定某些含G、U的寡核糖核苷酸通过TLR7和TLR8起作用作为免疫刺激的(参见WO03/086280)。Lipford et al.描述的免疫刺激性含G、U的寡核糖核苷酸被认为可以从RNA源衍生,RNA源包括核糖体RNA,转移RNA,信使RNA和病毒RNA。

[0260] 因此,在本发明的上下文中使用的isRNA可以包含任何已知为免疫刺激性的RNA序列,包括但不限于代表和/或编码TLR配体的RNA序列,例如鼠家族成员TLR1至TLR13,或更多优选选自人家族成员TLR1至TLR10,特别是TLR7或TLR8;或者用于RNA的细胞内受体的配体,例如RIG-1或MDA-5(参见例如Meylan,E.,Tschopp,J. (2006):Toll-like receptors and RNA helicases:Two parallel ways to trigger antiviral responses.Mol.Cell 22, 561-569)。

[0261] isRNA可包括核糖体RNA(rRNA),转移RNA(tRNA),信使RNA(mRNA)和病毒RNA(vRNA),但不受限于此。它可分别包含多达约5000个的核苷酸,例如约5至约5000个核苷酸,或约5至约1000个,或约500至约5000个,或约5至约500个,或约5至约250个,约5至约100个,或约5至约50个或约5至约30个核苷酸。

[0262] 根据该实施方案的另一个优选方面,isRNA包含式V或VI的核酸或由其组成:



其中:G是鸟苷(鸟嘌呤),尿苷(尿嘧啶)或鸟苷(鸟嘌呤)或尿苷(尿嘧啶)的类似物,优选鸟苷(鸟嘌呤)或其类似物;

X是鸟苷(鸟嘌呤),尿苷(尿嘧啶),腺苷(腺嘌呤),胸苷(胸腺嘧啶),胞苷(胞嘧啶),或

这些核苷酸(核苷)的类似物,优选尿苷(尿嘧啶)或其类似物;

N是长度为约4至50,优选约4至40,更优选约4至30或4至20个核酸的核酸序列,每个N独立地选自鸟苷(鸟嘌呤),尿苷(尿嘧啶),腺苷(腺嘌呤),胸苷(胸腺嘧啶),胞苷(胞嘧啶)或这些核苷酸(核苷)的类似物;

a为1至20,优选1至15,最优选1至10的整数;

l是1到40的整数,

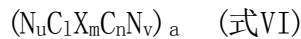
其中如果 $l=1$,则G是鸟苷(鸟嘌呤)或其类似物,并且如果 $l>1$,则这些核苷酸(核苷)中至少50%是鸟苷(鸟嘌呤)或其类似物;

m是整数,至少为3;其中如果 $m=3$,则X是尿苷(尿嘧啶)或其类似物,并且如果 $m>3$,则出现至少3个连续的尿嘧啶(尿嘧啶)或尿苷(尿嘧啶)的类似物;

n是1至40的整数,其中如果 $n=1$,则G是鸟苷(鸟嘌呤)或其类似物,并且如果 $n>1$,则这些核苷酸(核苷)中的至少50%是鸟苷(鸟嘌呤)或类似物;

u,v彼此独立地为0至50的整数,其中优选地,如果 $u=0$, $v\geq 1$,或者如果 $v=0$,则 $u\geq 1$;

其中式V的核酸分子具有至少50个核苷酸,优选至少100个核苷酸,更优选至少150个核苷酸,甚至更优选至少200个核苷酸,最优选至少250个核苷酸的长度;



其中:

C是胞苷(胞嘧啶),尿苷(尿嘧啶),或胞苷(胞嘧啶)或尿苷(尿嘧啶)的类似物,优选胞苷(胞嘧啶)或其类似物;

X是鸟苷(鸟嘌呤),尿苷(尿嘧啶),腺苷(腺嘌呤),胸苷(胸腺嘧啶),胞苷(胞嘧啶),或上述核苷酸(核苷)的类似物,优选尿苷(尿嘧啶)或其类似物;

N是长度各自为约4至50,优选约4至40,更优选约4至30或4至20个核酸的核酸序列,每个N独立地选自鸟苷(鸟嘌呤),尿苷(尿嘧啶),腺苷(腺嘌呤),胸苷(胸腺嘧啶),胞苷(胞嘧啶)或这些核苷酸(核苷)的类似物;

a为1至20,优选1至15,最优选1至10的整数;

l是1到40的整数,其中如果 $l=1$,则C是胞苷(胞嘧啶)或其类似物,并且如果 $l>1$,则这些核苷酸(核苷)中至少50%是胞苷(胞嘧啶)或其类似物;

m是整数,至少为3;其中如果 $m=3$,则X是尿苷(尿嘧啶)或其类似物,并且如果 $m>3$,则出现至少3个连续的尿嘧啶(尿嘧啶)或尿苷(尿嘧啶)的类似物;

n是1至40的整数,其中如果 $n=1$,则C是胞苷(胞嘧啶)或其类似物,并且如果 $n>1$,则这些核苷酸(核苷)中的至少50%是胞苷(胞嘧啶)或类似物;

u,v彼此独立地为0至50的整数,其中优选地,如果 $u=0$, $v\geq 1$,或者如果 $v=0$,则 $u\geq 1$;

其中式VI的核酸分子具有至少50个核苷酸,优选至少100个核苷酸,更优选至少150个核苷酸,甚至更优选至少200个核苷酸,最优选至少250个核苷酸的长度。

[0263] 对于式VI,上面给出的元素N(即 N_u 和 N_v)和X(X_m),特别是如上定义的核心结构,以及整数a,l,m,n,u和v的任何定义类似地相应地应用于式V的元素,其中在式VI中,核心结构由 $C_l X_m C_n$ 定义。边界元素 N_u 和 N_v 的定义与上面给出的 N_u 和 N_v 的定义相同。

[0264] 根据该实施方案的一个非常特别优选的方面,根据式V的核酸分子可以选自例如以下任何序列:

(CH₂CH₂O)_nCH₂CH₂OR; “锁定的”核酸(LNA),其中2'-羟基例如通过亚甲基桥连接到相同核糖的4'-碳上;和氨基(-O-氨基,其中氨基,例如NRR,可以是烷基氨基,二烷基氨基,杂环基,芳基氨基,二芳基氨基,杂芳基氨基或二杂芳基氨基,乙二胺,多氨基)或氨基烷氧基。

[0272] “脱氧”修饰包括氢,氨基(例如NH₂;烷基氨基,二烷基氨基,杂环基,芳基氨基,二芳基氨基,杂芳基氨基,二杂芳基氨基或氨基酸);或者氨基可以通过接头与糖连接,其中接头包含原子C,N和O中的一个或多个。

[0273] 糖基团还可含有一个或多个碳,其具有与核糖中相应碳的立体化学构型相反的立体化学构型。因此,人工核酸,优选mRNA,可包括含有例如阿拉伯糖作为糖的核苷酸。

[0274] 主链修饰

[0275] 可以通过用不同的取代基取代一个或多个氧原子来修饰核酸化合物主链的磷酸基团。此外,修饰的核苷和核苷酸可包括用本文所述的修饰的磷酸酯完全取代未修饰的磷酸酯部分。修饰的磷酸酯基团的示例包括但不限于硫代磷酸酯,硒代磷酸酯(phosphoroselenate),硼代磷酸酯(borano phosphate),硼代磷酸酯(borano phosphate ester),氢膦酸酯,氨基磷酸酯(phosphoramidate),烷基或芳基膦酸酯和磷酸三酯。二硫代磷酸酯具有被硫取代的非连接氧。连接氧也可以通过用氮(桥连的氨基磷酸酯),硫(桥连的硫代磷酸酯)和碳(桥连的亚甲基-膦酸酯)取代来修饰磷酸酯接头。

[0276] 碱基修饰:

[0277] 任选地,修饰可以涉及核酸化合物的核碱基部分。在诸如RNA之类的核酸中发现的核碱基的示例包括但不限于腺嘌呤,鸟嘌呤,胞嘧啶和尿嘧啶。例如,本文所述的核苷和核苷酸可在主沟槽面上进行化学修饰。在一些实施方案中,主要沟槽化学修饰可包括氨基,硫醇基,烷基或卤素基团。

[0278] 在本发明特别优选的实施方案中,碱基修饰物选自2-氨基-6-氯嘌呤核苷-5'-三磷酸酯,2-氨基嘌呤-核苷-5'-三磷酸酯;2-氨基腺苷-5'-三磷酸酯,2'-氨基-2'-脱氧胞苷-三磷酸酯,2-硫代胞苷-5'-三磷酸酯,2-硫代尿苷-5'-三磷酸酯,2'-氟胸苷-5'-三磷酸酯,2'-O-甲基肌苷-5'-三磷酸酯,4-硫代尿苷-5'-三磷酸酯,5-氨基烯丙基胞苷-5'-三磷酸酯,5-氨基烯丙基尿苷-5'-三磷酸酯,5-溴胞苷-5'-三磷酸酯,5-溴尿苷-5'-三磷酸酯,5-溴-2'-脱氧胞苷-5'-三磷酸酯,5-溴-2'-脱氧尿苷-5'-三磷酸酯,5-碘胞苷-5'-三磷酸酯,5-碘-2'-脱氧胞苷-5'-三磷酸酯,5-碘尿苷-5'-三磷酸酯,5-碘-2'-脱氧尿苷-5'-三磷酸酯,5-甲基胞苷-5'-三磷酸酯,5-甲基尿苷-5'-三磷酸酯,5-丙炔基-2'-脱氧胞苷-5'-三磷酸酯,5-丙炔基-2'-脱氧尿苷-5'-三磷酸酯,6-氮杂胞苷-5'-三磷酸酯,6-氮杂尿苷-5'-三磷酸酯,6-氯嘌呤核苷-5'-三磷酸酯,7-脱氮腺苷-5'-三磷酸酯,7-脱氮鸟苷-5'-三磷酸酯,8-氮杂腺苷-5'-三磷酸酯,8-叠氮基腺苷-5'-三磷酸酯,苯并咪唑-核苷-5'-三磷酸酯,N1-甲基腺苷-5'-三磷酸酯,N1-甲基鸟苷-5'-三磷酸酯,N6-甲基腺苷-5'-三磷酸酯,O6-甲基鸟苷-5'-三磷酸酯,假尿苷-5'-三磷酸酯,或嘌呤霉素-5'-三磷酸酯,黄嘌呤核苷-5'-三磷酸酯。特别优选用于碱基修饰的核苷酸,其选自由5-甲基胞苷-5'-三磷酸酯,7-脱氮鸟苷-5'-三磷酸酯,5-溴胞苷-5'-三磷酸酯和假尿苷-5'-三磷酸酯组成的碱基修饰的核苷酸。

[0279] 在一些实施方案中,修饰的核苷包括吡啶-4-酮核糖核苷,5-氮杂-尿苷,2-硫代-5-氮杂-尿苷,2-硫代尿苷,4-硫代-假尿苷,2-硫代-假尿苷,5-羟基尿苷,3-甲基尿苷,5-羧

甲基-尿苷,1-羧基甲基-假尿苷,5-丙炔基-尿苷,1-丙炔基-假尿苷,5-牛磺酰甲基尿苷,1-牛磺酰甲基-假尿苷,5-牛磺酰甲基-2-硫代尿苷,1-牛磺酰甲基-4-硫代尿苷,5-甲基-尿苷,1-甲基-假尿苷,4-硫代-1-甲基-假尿苷,2-硫代-1-甲基-假尿苷,1-甲基-1-脱氮-假尿苷,2-硫代-1-甲基-1-脱氮-假尿苷,二氢尿苷,二氢假尿苷,2-硫代二氢尿苷,2-硫代-二氢假尿苷,2-甲氧基尿苷,2-甲氧基-4-硫代尿苷,4-甲氧基-假尿苷,和4-甲氧基-2-硫代-假尿苷。

[0280] 在一些实施方案中,修饰的核苷包括5-氮杂-胞苷,假异胞苷,3-甲基-胞苷,N4-乙酰基胞苷,5-甲酰基胞苷,N4-甲基胞苷,5-羟甲基胞苷,1-甲基-假异胞苷,吡咯-胞苷,吡咯-假异胞苷,2-硫代-胞苷,2-硫代-5-甲基-胞苷,4-硫代-假异胞苷,4-硫代-1-甲基-假异胞苷,4-硫代-1-甲基-1-脱氮-假异胞苷,1-甲基-1-脱氮-假异胞苷,泽布拉林(zebularine),5-氮杂-泽布拉林,5-甲基-泽布拉林,5-氮杂-2-硫代-泽布拉林,2-硫代-泽布拉林,2-甲氧基-胞苷,2-甲氧基-5-甲基-胞苷,4-甲氧基-假异胞苷和4-甲氧基-1-甲基-假异胞苷。

[0281] 在其他实施方案中,修饰的核苷包括2-氨基嘌呤,2,6-二氨基嘌呤,7-脱氮-腺嘌呤,7-脱氮-8-氮杂-腺嘌呤,7-脱氮-2-氨基嘌呤,7-脱氮-8-氮杂-2-氨基嘌呤,7-脱氮-2,6-二氨基嘌呤,7-脱氮-8-氮杂-2,6-二氨基嘌呤,1-甲基腺苷,N6-甲基腺苷,N6-异戊烯基腺苷,N6-(顺-羟基异戊烯基)腺苷,2-甲硫基-N6-(顺式-羟基异戊烯基)腺苷,N6-甘氨酸基氨基甲酰基腺苷,N6-苏氨酸基氨基甲酰基腺苷,2-甲硫基-N6-苏氨酸基氨基甲酰基腺苷,N6,N6-二甲基腺苷,7-甲基腺嘌呤,2-甲硫基腺嘌呤和2-甲氧基-腺嘌呤。

[0282] 在其他实施方案中,修饰的核苷包括肌苷,1-甲基-肌苷,γ苷(wyosine),怀丁苷(wybutosine),7-脱氮-鸟苷,7-脱氮-8-氮杂-鸟苷,6-硫代鸟苷,6-硫代-7-脱氮-鸟苷,6-硫代-7-脱氮-8-氮杂-鸟苷,7-甲基-鸟苷,6-硫代-7-甲基-鸟苷,7-甲基-鸟苷,6-甲氧基-鸟苷,1-甲基鸟苷,N2-甲基鸟苷,N2,N2-二甲基鸟苷,8-氧代-鸟苷,7-甲基-8-氧代-鸟苷,1-甲基-6-硫代-鸟苷,N2-甲基-6-硫代-鸟苷,和N2,N2-二甲基-6-硫代-鸟苷。

[0283] 在一些实施方案中,核苷酸可以在主沟槽面上修饰,并且可以包括用甲基或卤素基团取代尿嘧啶的C-5上的氢。

[0284] 在具体的实施方案中,修饰的核苷是5'-0-(1-硫代磷酸酯)-腺苷,5'-0-(1-硫代磷酸酯)-胞苷,5'-0-(1-硫代磷酸酯)-鸟苷,5'-0-(1-硫代磷酸酯)-尿苷或5'-0-(1-硫代磷酸酯)-假尿苷。

[0285] 在进一步的具体实施方案中,修饰的核酸化合物,优选mRNA,可以包含选自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,5-甲基-尿苷,吡咯-胞苷,肌苷,α-硫代-鸟苷,6-甲基-鸟苷,5-甲基-胞苷,8-氧代-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,假-异-胞苷,6-氯-嘌呤,N6-甲基-腺苷,α-硫代-腺苷,8-叠氮基-腺苷,7-脱氮-腺苷中的核苷修饰物。

[0286] 在一个实施方案中,核酸表现出脂质修饰。如本文所定义的这种脂质修饰的核酸或RNA通常还包含与该核酸或RNA共价连接的至少一个接头,和与相应接头共价连接的至少一个脂质。替代地,脂质修饰的核酸包含至少一种如本文所定义的核酸和与该核酸共价连接(没有接头)的至少一种(双功能)脂质。根据第三替代方案,脂质修饰的核酸包含如本文

所定义的核酸分子,与该RNA共价连接的至少一个接头,和与相应的接头共价连接的至少一个脂质,以及还有与该核酸共价连接(没有接头)的至少一个(双功能的)脂质。在这种情况下,特别优选脂质修饰存在于线性核酸序列的末端。

[0287] 根据本发明的另一个优选实施方案,如本文所定义的修饰的核酸序列,特别是如本文所定义的修饰的RNA,可以通过添加所谓的“5'帽”结构来修饰,“5'帽”结构优选使如本文所定义的核酸稳定。5'-帽是实体,通常是修饰的核苷酸实体,其通常“封闭”成熟RNA的5'-末端。5'-帽通常可以由修饰的核苷酸形成,特别是由鸟嘌呤核苷酸的衍生物形成。优选地,5'-帽通过5'-5'-三磷酸酯键连接到5'-末端。5'-帽可以是甲基化的,例如m7GpppN,其中N是携带5'-帽的核酸的末端5'核苷酸,通常是RNA的5'-末端。m7GpppN是5'-帽结构,其天然存在于由聚合酶II转录的RNA中,因此在本文中优选不被认为是包含在修饰的RNA中的修饰。因此,本发明的经修饰的RNA序列可包含m7GpppN作为5'-帽,但另外,经修饰的RNA序列通常包含至少一种如本文所定义的进一步修饰。

[0288] 5'帽结构的其他示例包括甘油基、反向的脱氧脱碱基残基(部分),4',5'亚甲基核苷酸,1-(β-D-赤式呋喃糖基)核苷酸,4'-硫代核苷酸,碳环核苷酸,1,5-脱水己糖醇核苷酸,L-核苷酸,α-核苷酸,修饰的碱基核苷酸,苏式-戊呋喃糖基核苷酸,非环状3',4'-断键核苷酸(acyclic 3',4'-seco nucleotide),非环状3,4-二羟基丁基核苷酸,非环状3,5二羟基戊基核苷酸,3'-3'-反向核苷酸部分,3'-3'-反向无碱基部分,3'-2'-反向核苷酸部分,3'-2'-反向无碱基部分,1,4-丁二醇磷酸酯,3'-氨基磷酸酯,己基磷酸酯,氨基己基磷酸酯,3'-磷酸酯,3'-硫代磷酸酯,二硫代磷酸酯,或桥接或非桥接甲基磷酸酯部分。在这种情况下,这些修饰的5'-帽结构被认为是至少一种修饰。

[0289] 特别优选的修饰的5'-帽结构是帽1(m7G的相邻核苷酸的核糖的甲基化),帽2(m7G下游的第二个核苷酸的核糖的额外甲基化),帽3(m7G下游的第3个核苷酸的核糖的额外甲基化),帽4(m7G下游的第4个核苷酸的核糖甲基化),ARCA(抗反转帽类似物,修饰的ARCA(例如硫代磷酸酯修饰的ARCA),肌苷,N1-甲基-鸟苷,2'-氟-鸟苷,7-脱氮杂-鸟苷,8-氧代-鸟苷,2-氨基-鸟嘌呤,LNA-鸟苷和2-叠氨基鸟苷。因此,根据本发明的RNA优选包含5'-帽结构。

[0290] 在一优选的实施方案中,使用如本文所定义的帽类似物在如本文所定义的RNA体外转录反应中共转录地添加5'-帽结构。在另一实施方案中,使用加帽酶(例如痘苗病毒加帽酶)通过酶促加帽添加5'-帽结构。

[0291] 任选地,可以选择核酸,其代表对外切核酸酶或内切核酸酶导致的体内降解具有基本抗性的mRNA。这种稳定化可以通过例如化学修改主链的磷酸酯来实现。可另外使用糖或碱修饰。mRNA也可以通过添加所谓的“5'帽”结构而保持稳定以防止通过RNA酶导致的降解。在这方面特别优选G(5')ppp(5')G或m7G(5')ppp(5')N作为5'帽结构(N为A,G,C或U)。根据另一示例,mRNA可以在3'末端显示通常约10至约200个腺苷核苷酸,优选约10至约100个腺苷核苷酸,或约20至约100个腺苷核苷酸或甚至约40至约80个腺苷核苷酸的聚-A尾。根据另一个示例,mRNA可以在3'末端具有通常约10至约200个胞嘧啶核苷酸,优选约10至约100个胞嘧啶核苷酸,或约20至约70个胞嘧啶核苷酸,或约20至约60或甚至约10至约40个胞嘧啶核苷酸。

[0292] 根据另一实施方案,可以通过修饰核酸序列的鸟苷/胞嘧啶(G/C)含量来修饰并因

此稳定本发明的核酸序列。

[0293] 在本发明特别优选的实施方案中,与相应野生型核酸序列(即未修饰的核酸)的编码序列的G/C含量相比,本发明的核酸序列的编码序列的G/C含量被修饰,特别是增加。与由相应的野生型核酸编码的氨基酸序列相比,优选不修饰由核酸编码的氨基酸序列。本发明的核酸序列的这种修饰基于以下事实:任何核酸区域的序列,特别是待翻译的任何RNA区域的序列对于该核酸,特别是该RNA的有效翻译是重要的。因此,核酸的组成和各种核苷酸的序列是重要的。特别地,在RNA的情况下,具有增加的G(鸟苷)/C(胞嘧啶)含量的序列比具有增加的A(腺苷)/U(尿嘧啶)含量的序列更稳定。因此,根据本发明,核酸的密码子相比于各自的野生型核酸发生变化,同时保留翻译的氨基酸序列,使得它们包括增加量的G/C核苷酸。关于若干密码子编码同一个氨基酸(所谓的遗传密码变性)的事实而言,可以确定稳定性的最有利密码子(所谓的替代密码子使用)。根据待由核酸编码的氨基酸,与其野生型序列相比,存在修饰核酸序列的各种可能性。

[0294] 以下修饰可适用于RNA分子,但也可转移至DNA分子:在由仅含有G或C核苷酸的密码子编码的氨基酸的情况下,不需要修饰密码子。因此,用于Pro(CCC或CCG),Arg(CGC或CGG),Ala(GCC或GCG)和Gly(GGC或GGG)的密码子不需要修饰,因为不存在A或U。相反,含有A和/或U核苷酸的密码子可以通过替换编码相同氨基酸但不含A和/或U的其他密码子进行修饰。这些密码子的示例是:用于Pro的密码子可以从CCU或CCA被修饰为CCC或CCG;用于Arg的密码子可以从CGU或CGA或AGA或AGG被修饰为CGC或CGG;用于Ala的密码子可以从GCU或GCA被修饰为GCC或GCG;用于Gly的密码子可以从GGU或GGA被修饰为GGC或GGG。在其他情况下,尽管不能从密码子中除去A或U核苷酸,但是可以通过使用含有较低含量的A和/或U核苷酸的密码子来降低A和U含量。这些的示例是:用于Phe的密码子可以从UUU被修饰为UUC;用于Leu的密码子可以从UUA,UUG,CUU或CUA被修饰为CUC或CUG;用于Ser的密码子可以从UCU或UCA或AGU被修饰为UCC,UCG或AGC;用于Tyr的密码子可以从UAU被修饰为UAC;用于Cys的密码子可以从UGU被修饰为UGC;用于His的密码子可以从CAU被修饰为CAC;用于Gln的密码子可以从CAA被修饰为CAG;用于Ile的密码子可以从AUU或AUA被修饰为AUC;用于Thr的密码子可以从ACU或ACA被修饰为ACC或ACG;用于Asn的密码子可以从AAU被修饰为AAC;用于Lys的密码子可以从AAA被修饰为AAG;用于Val的密码子可以从GUU或GUA被修饰为GUC或GUG;用于Asp的密码子可以从GAU被修饰为GAC;用于Glu的密码子可以从GAA被修饰为GAG;终止密码子UAA可以被修饰为UAG或UGA。另一方面,在用于Met(AUG)和Trp(UGG)的密码子的情况下,不存在序列修饰的可能性。上面列出的取代可以单独使用或以所有可能的组合使用,以与其特定的野生型RNA(即原始序列)相比增加本发明的RNA序列的G/C含量。因此,例如,野生型序列中出现的用于Thr的所有密码子可以修饰为ACC(或ACG)。然而,优选地,例如,使用上述替换可能性的组合:

- 将编码原始序列中Thr的所有密码子(野生型RNA)替换为ACC(或ACG),以及
- 将最初编码Ser的所有密码子替换为UCC(或UCG或AGC);将编码原始序列中的Ile的所有密码子替换为AUC,以及
- 将最初编码Lys的所有密码子替换为AAG,以及
- 将最初编码Tyr的所有密码子替换为UAC;将原始序列中编码Val的

- 所有密码子替换为GUC (或GUG), 以及
- 将最初编码Glu的所有密码子替换为GAG, 以及
 - 将最初编码Ala的所有密码子替换为GCC (或GCG), 以及
 - 将最初编码Arg的所有密码子替换为CGC (或CGG); 将原始序列中编码Val的所有密码子替换为GUC (或GUG), 以及
 - 将最初编码Glu的所有密码子替换为GAG, 以及
 - 将最初编码Ala的所有密码子替换为GCC (或GCG), 以及
 - 将最初编码Gly的所有密码子替换为GGC (或GGG), 以及
 - 将最初编码Asn的所有密码子替换为AAC; 将原始序列中编码Val的所有密码子替换为GUC (或GUG), 以及
 - 将最初编码Phe的所有密码子替换为UUC, 以及
 - 将最初编码Cys的所有密码子替换为UGC, 以及
 - 将最初编码Leu的所有密码子替换为CUG (或CUC), 以及
 - 将最初编码Gln的所有密码子替换为CAG, 以及
 - 将最初编码Pro的所有密码子替换为CCC (或CCG); 等等。

[0295] 根据一具体实施方案, 所述区域中的编码本文定义的肽或蛋白或其片段或变体的可取代密码子或野生型RNA序列的完整序列的至少5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 更优选至少70%, 甚至更优选至少80%, 最优选至少90%, 95%或甚至100%被取代, 从而增加所述序列中的G/C含量。在这种情况下, 与野生型序列相比, 特别优选将本发明的RNA序列 (优选根据本发明的RNA序列的至少一个编码序列) 的G/C含量增加至最大值 (即可取代的密码子的100%)。根据本发明, 本发明的RNA序列的进一步优选的修饰是基于以下发现: 翻译效率也由细胞中tRNA出现的不同频率决定。因此, 如果所谓的“稀少密码子”在本发明的RNA序列中以更大的程度存在, 则相应的修饰的RNA序列被以比在存在编码相对“频繁出现”的tRNA的密码子的情况下显著更差的程度翻译。根据本发明, 在本发明的修饰的RNA序列中, 与野生型RNA序列的相应区域相比, 编码如本文所定义的肽或蛋白或其片段或变体的区域被修饰, 使得编码在细胞中相对稀少的tRNA的野生型序列的至少一个密码子被交换为编码在细胞中相对频繁出现且携带与相对稀少的tRNA携带的氨基酸相同的氨基酸的tRNA的密码子。通过该修饰, 修饰本发明的RNA的序列, 使得插入可获得频繁出现的tRNA的密码子。换句话说, 根据本发明, 通过该修饰, 编码在细胞中相对稀少的tRNA的野生型序列的所有密码子可以在每种情况下交换编码在细胞中相对频繁出现并且在每种情况下携带与相对稀少的tRNA携带的氨基酸相同的氨基酸的tRNA的密码子。哪些tRNA在细胞中相对频繁地出现以及哪些tRNA相比而言相对稀少地出现, 这是本领域技术人员已知的; 参见例如Akashi, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2001, 11 (6): 660-666。对于特定氨基酸使用最频繁出现的tRNA的密码子, 例如, 使用在(人)细胞中最频繁出现的tRNA的Gly密码子, 是特别优选的, 根据本发明, 特别优选利用“频繁出现”密码子将在本发明的修饰的RNA序列中含量增加 (特别是最大化) 的连续G/C连接而不修饰由RNA序列的编码序列编码的蛋白的氨基酸序列。该优选的实施方案使得能够提供本发明的特别有效翻译和稳定 (修饰) 的RNA序列。如上所述测定本发明的修饰的RNA序列 (增加的G/C含量; tRNA的交换) 可以使用W002/098443 (其公开内容包括在本发明的全部范围内) 中解释的计算机程序进行。使用该计算机程序, 可以借助遗传密码

或其变性性质修饰任何所需RNA序列的核苷酸序列,使得结合使用编码在细胞中尽可能频繁地出现的tRNA的密码子产生最大的G/C含量,与未修饰的序列相比,由修饰的RNA序列编码的氨基酸序列优选不被修饰。替代地,与原始序列相比,也可以仅修改G/C含量或仅修改密码子的使用。在Visual Basic 6.0中的源代码(使用的开发环境:带有Servicepack 3的Microsoft Visual Studio Enterprise 6.0)也在W002/098443中描述。在本发明的另一优选实施方案中,本发明的RNA序列的核糖体结合位点环境中的A/U含量与其各自的野生型RNA的核糖体结合位点环境中的A/U含量相比增加。这种修饰(核糖体结合位点周围的A/U含量增加)增加了核糖体与RNA结合的效率。核糖体与核糖体结合位点(例如Kozak序列)的有效结合又具有RNA的有效翻译的作用。根据本发明的另一实施方案,本发明的RNA序列可以针对潜在的去稳定序列元件修饰。特别地,与相应的野生型RNA相比,可以修饰该RNA序列的编码序列和/或5'和/或3'非翻译区,使得其不包含去稳定序列元件,与其各自的野生型RNA相比,修饰的RNA序列的编码氨基酸序列优选不被修饰。已知例如在真核RNA序列中,出现去稳定序列元件(DSE),信号蛋白在体内与其结合并调节RNA的酶促降解。因此,为了进一步稳定修饰的RNA序列,任选地在编码至少一种如本文所定义的肽或蛋白或其片段或变体的区域中,可以与野生型RNA的相应区域相比执行一个或多个这样的修饰,使得其中不包含或基本上不包含去稳定序列元件。根据本发明,通过这些修饰,也可以从本发明的RNA序列中除去存在于非翻译区(3'-和/或5'-UTR)中的DSE。这种去稳定序列例如是富含AU的序列(AURES),其存在于许多不稳定RNA的3'-UTR区段中(Caput et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 1986,83:1670to 1674)。因此,与相应的野生型RNA相比,优选修饰本发明的RNA序列,使得本发明的RNA序列不包含这种去稳定序列。这也适用于那些被可能的内切核酸酶识别的序列基序,例如,序列GAACAAG,其包含在编码转铁蛋白受体的基因的3'-UTR区段中(Binder et al.,EMBO J.1994,13:1969-1980)。这些序列基序也优选在本发明的RNA序列中除去。

[0296] 根据另一个优选的实施方案,在本发明的上下文中使用的mRNA具有修改的G/C含量,优选在其编码区中,这意味着与其相应的野生型mRNA的编码区的G/C含量相比,G/C含量被修改,特别是增加,优选不改变编码的氨基酸序列。例如,所述编码区的G/C含量与编码如本文所述的抗原、抗原蛋白或抗原肽、或其片段或变体的野生型mRNA的G/C含量相比,可以增加至少7%,或至少15%,或至少20%。根据一具体实施方案,在编码区或整个序列中可取代密码子的至少5%,10%,20%,30%,40%,50%,60%,70%或80%,例如90%或更多,95%或更多,或甚至100%被取代以增加G/C含量。在这种情况下,100%取代意味着编码区的基本上所有可取代的密码子都被取代,这是本发明的优选实施方案之一。在另一个优选的实施方案中,使用mRNA,其中编码区被修饰,使得编码细胞中相对稀少的tRNA的野生型序列的至少一个密码子被交换为编码在细胞中相对频繁出现但编码与相对稀少的tRNA携带的氨基酸相同的氨基酸tRNA的密码子。在细胞中相对稀少或频繁出现的tRNA是本领域技术人员已知的;参见例如Akashi,Curr.Opin.Genet.Dev.2001,11(6):660-666。特别优选用于特定氨基酸的最常出现的tRNA。

[0297] 根据另一个实施方案,通过使序列适应人密码子使用,可以修饰并因此稳定本发明的核酸序列。

[0298] 根据本发明,本发明核酸序列的进一步优选的修饰基于以下发现:编码相同氨基

酸的密码子通常以不同频率出现。根据本发明,在本发明的经修饰的核酸序列中,与相应的野生型核酸的相应编码序列相比,优选修饰如本文所定义的编码序列,使得编码相同氨基酸的密码子的频率对应于根据人密码子使用的该密码子的天然存在的频率,如例如表B所示。

[0299] 例如,在由根据本发明的核酸序列的至少一个编码序列编码的氨基酸序列中存在氨基酸丙氨酸(Ala)的情况下,野生型编码序列优选以某种方式修改,使得密码子“GCC”的使用频率为0.40,密码子“GCT”的使用频率为0.28,密码子“GCA”的使用频率为0.22,密码子“GCG”的使用频率为0.10等(见表B)。

[0300] 表:人类密码子使用表

氨基酸	密码子	比值	/1000
Ala	GCG	0.10	7.4
Ala	GCA	0.22	15.8
Ala	GCT	0.28	18.5
Ala	GCC*	0.40	27.7
Cys	TGT	0.42	10.6
Cys	TGC*	0.58	12.6
Asp	GAT	0.44	21.8

氨基酸	密码子	比值	/1000
Asp	GAC*	0.56	25.1
Glu	GAG*	0.59	39.6
Glu	GAA	0.41	29.0
Phe	TTT	0.43	17.6
Phe	TTC*	0.57	20.3
Gly	GGG	0.23	16.5
Gly	GGA	0.26	16.5
Gly	GGT	0.18	10.8
Gly	GGC*	0.33	22.2
His	CAT	0.41	10.9
His	CAC*	0.59	15.1
Ile	ATA	0.14	7.5
Ile	ATT	0.35	16.0
Ile	ATC*	0.52	20.8
Lys	AAG*	0.60	31.9
Lys	AAA	0.40	24.4
Leu	TTG	0.12	12.9
Leu	TTA	0.06	7.7
Leu	CTG*	0.43	39.6
Leu	CTA	0.07	7.2
Leu	CTT	0.12	13.2
Leu	CTC	0.20	19.6
Met	ATG*	1	22.0
Asn	AAT	0.44	17.0
Asn	AAC*	0.56	19.1
Pro	CCG	0.11	6.9
Pro	CCA	0.27	16.9
Pro	CCT	0.29	17.5
Pro	CCC*	0.33	19.8
Gln	CAG*	0.73	34.2
Gln	CAA	0.27	12.3
Arg	AGG	0.22	12.0
Arg	AGA*	0.21	12.1

氨基酸	密码子	比值	/1000
Arg	CGG	0.19	11.4
Arg	CGA	0.10	6.2
Arg	CGT	0.09	4.5
Arg	CGC	0.19	10.4
Ser	AGT	0.14	12.1
Ser	AGC*	0.25	19.5
Ser	TCG	0.06	4.4
Ser	TCA	0.15	12.2
Ser	TCT	0.18	15.2
Ser	TCC	0.23	17.7
Thr	ACG	0.12	6.1
Thr	ACA	0.27	15.1
Thr	ACT	0.23	13.1
Thr	ACC*	0.38	18.9
Val	GTG*	0.48	28.1
Val	GTA	0.10	7.1
Val	GTT	0.17	11.0
Val	GTC	0.25	14.5
Trp	TGG*	1	13.2
Tyr	TAT	0.42	12.2
Tyr	TAC*	0.58	15.3
Stop	TGA*	0.61	1.6
Stop	TAG	0.17	0.8
Stop	TAA	0.22	1.0

*:最频繁出现的密码子。

[0301] 如上所述,根据本发明优选的是,编码在细胞中相对稀少的tRNA的野生型序列的所有密码子可以交换编码在细胞中相对频繁出现并且在每种情况下携带与相对稀少的tRNA携带的氨基酸相同的氨基酸的tRNA的密码子。因此,特别优选将最频繁出现的密码子用于每种编码的氨基酸(参见表B,最频繁出现的密码子用星号标记)。这种优化程序增加了密码子适应指数(CAI)并最终使CAI最大化。在本发明的上下文中,具有增加的或最大化的CAI的序列通常被称为“密码子优化的”序列和/或CAI增加的和/或最大化的序列。根据优选的实施方案,本发明的核酸序列包含至少一种编码序列,其中编码序列/序列如本文所述进行密码子优化。更优选地,至少一个编码序列的密码子适应指数(CAI)为至少0.5,至少0.8,至少0.9或至少0.95。最优选地,至少一个编码序列的密码子适应指数(CAI)是1。

[0302] 例如,在氨基酸丙氨酸(Ala)存在由根据本发明的核酸序列的至少一个编码序列编码的氨基酸序列中的情况下,野生型编码序列以使得最频繁出现的人密码子“GCC”总是

用于所述氨基酸的方式调整,或者对于氨基酸半胱氨酸(Cys),野生型序列以使得最常见的人密码子“TGC”总是用于所述氨基酸的方式调整等等。

[0303] 根据另一实施方案,本发明的核酸序列可以通过修改,优选增加核酸序列的胞嘧啶(C)含量,优选核酸序列的编码序列的胞嘧啶(C)含量,更优选RNA序列的编码序列的胞嘧啶(C)含量来修饰。

[0304] 在本发明的特别优选的实施方案中,与相应的野生型核酸(即未修饰的核酸)的编码序列的C含量相比,本发明的核酸序列的编码序列的C含量被修改,优选增加。与由相应的野生型核酸编码的氨基酸序列相比,优选不修饰由本发明的核酸序列的至少一个编码序列编码的氨基酸序列。

[0305] 在本发明的一优选实施方案中,修饰的核酸,特别是修饰的RNA序列被修饰,使得实现理论上可能的最大胞嘧啶含量或甚至最大胞嘧啶含量的至少10%,20%,30%,40%,50%,60%,70%或80%,或至少90%。

[0306] 在进一步优选的实施方案中,属于“胞嘧啶含量可优化”的靶核酸(特别是修饰的RNA野生型序列)的密码子的至少10%,20%,30%,40%,50%,60%,70%,80%,90%或甚至100%被具有比野生型序列中存在的胞嘧啶含量高的胞嘧啶含量的密码子取代。

[0307] 在进一步优选的实施方案中,可以另外修饰野生型编码序列的密码子中的一些,使得细胞中相对稀少的tRNA的密码子被用于细胞中相对频繁出现的tRNA的密码子交换,条件是取代的相对频繁出现的tRNA的密码子携带与原始野生型密码子的相对稀少的tRNA携带的氨基酸相同的氨基酸。优选地,用于相对稀少的tRNA的所有密码子被细胞中相对频繁出现的tRNA的密码子替换,除了编码仅由不含任何胞嘧啶的密码子编码的氨基酸的密码子,或者由各自含有相同数量的胞嘧啶的两个密码子编码的谷氨酰胺(Gln)除外。

[0308] 在本发明的另一优选实施方案中,修饰的靶核酸,优选RNA被修饰,使得通过编码细胞中相对频繁出现的tRNA的密码子达到理论上可能的最大胞嘧啶含量的至少80%,或至少90%,或甚至达到最大胞嘧啶含量,其中氨基酸序列保持不变。

[0309] 由于遗传密码的天然存在的简并性,一个以上的密码子可编码特定的氨基酸。因此,20个天然存在的氨基酸中的18个由多于一个的密码子(Tryp和Met为例外)编码,例如,由2个密码子(例如Cys,Asp,Glu),3个密码子(例如Ile),4个密码子(例如Al,Gly,Pro)或6个密码子(例如Leu,Arg,Ser)编码。然而,并非所有编码相同氨基酸的密码子在体内条件下以相同的频率使用。根据每个单一生物,建立典型的密码子使用概况。

[0310] 在本发明的上下文中使用的术语“胞嘧啶含量可优化的密码子”是指表现出比编码相同氨基酸的其他密码子更低的胞嘧啶含量的密码子。因此,任何野生型密码子(其可被另一个编码相同氨基酸替换并显示更高数量的在该密码子内的胞嘧啶的密码子)被认为是胞嘧啶可优化的(C-可优化的)。通过野生型编码序列内的特定C-优化的密码子对C-可优化的野生型密码子的任何此类取代增加了其总C-含量并反映了富含C的修饰核酸序列。根据优选的实施方案,核酸序列,特别是本发明的RNA序列,优选本发明的核酸序列的至少一个编码序列包含含有用于所有可能的C-可优化的密码子的C-优化的密码子的C-最大化的RNA序列或由其组成。因此,100%或全部理论上可替换的C-可优化的密码子优选在编码序列的整个长度上被C-优化的密码子替换。

[0311] 在这种情况下,胞嘧啶含量可优化的密码子是含有的胞嘧啶的数量比编码相同氨

氨酸的其他密码子的胞嘧啶的数量少的密码子。

[0312] 任何密码子GCG,GCA,GCU编码氨基酸Ala,其可以由编码相同氨基酸的密码子GCC交换,和/或

[0313] 编码Cys的密码子UGU可以由编码相同氨基酸的密码子UGC交换,和/或

[0314] 编码Asp的密码子GAU可以由编码相同氨基酸的密码子GAC交换,和/或

[0315] 编码Phe的密码子UUU可以与编码相同氨基酸的密码子UUC交换,和/或

[0316] 编码Gly的密码子GGG,GGA,GGU中的任何一种可以由编码相同氨基酸的密码子GGC交换,和/或

[0317] 编码His的密码子CAU可以由编码相同氨基酸的密码子CAC交换,和/或

[0318] 编码Ile的密码子AUA,AUU中的任何一种可以由密码子AUC交换,和/或

[0319] 编码Leu的密码子UUG,UUA,CUG,CUA,CUU中的任何一种可以由编码相同氨基酸的密码子CUC交换,和/或

[0320] 编码Asn的密码子AAU可以由编码相同氨基酸的密码子AAC交换,和/或

[0321] 编码Pro的密码子CCG,CCA,CCU中的任何一种可以由编码相同氨基酸的密码子CCC交换,和/或

[0322] 编码Arg的密码子AGG,AGA,CGG,CGA,CGU中的任何一种可以由编码相同氨基酸的密码子CGC交换,和/或

[0323] 编码Ser的密码子AGU,AGC,UCG,UCA,UCU中的任何一种可以由编码相同氨基酸的密码子UCC交换,和/或

[0324] 编码Thr的密码子ACG,ACA,ACU中的任何一种可以由编码相同氨基酸的密码子ACC交换,和/或

[0325] 编码Val的任何密码子GUG,GUA,GUU可以由编码相同氨基酸的密码子GUC交换,和/或

[0326] 编码Tyr的密码子UAU可以由编码相同氨基酸的密码子UAC交换。

[0327] 在任何上述情况中,胞嘧啶的数量按每交换密码子增加1个地增加。交换编码序列的所有非C-优化的密码子(对应于C-优化的密码子)导致C-最大化的编码序列。在本发明的上下文中,根据本发明的RNA序列的至少一个编码序列中的非C-优化的密码子的至少70%,优选至少80%,更优选至少90%被替换为C优化密码子。

[0328] 可能优选的是,对于一些氨基酸,被C-优化的密码子替换的C-可优化的密码子的百分比小于70%,而对于其他氨基酸,被替换的密码子的百分比高于70%以满足编码序列的所有可C-可优化的野生型密码子的至少70%的C-优化的总百分比。

[0329] 优选地,在本发明的C-优化的RNA序列中,对于任何给定的氨基酸,至少50%的C-可优化的野生型密码子被C-优化的密码子替换,例如,任何修饰的富含C的RNA序列优选在C-可优化的野生型密码子位置含有至少50%(优选至少60%)的C-优化的密码子,所述C-优化的密码子编码上述氨基酸Ala,Cys,Asp,Phe,Gly,His,Ile,Leu,Asn,Pro,Arg,Ser,Thr,Val和Tyr中的任一种。

[0330] 在该上下文中,在无需任何进一步的选择过程的情况下,可以使用编码氨基酸的密码子,其不是胞嘧啶含量可优化的,并且然而其由至少两个密码子编码。然而,编码细胞(例如,人细胞)中相对稀少的tRNA的野生型序列的密码子可以被交换为编码细胞中相对频

繁出现的tRNA的密码子,其中两者都编码相同的氨基酸。因此,编码Glu的相对稀少的密码子GAA可以通过编码相同氨基酸的相对频繁出现的密码子GAG交换,和/或编码Lys的相对稀少的密码子AAA可以通过编码相同氨基酸的相对频繁出现的密码子AAG交换,和/或编码Gln的相对稀少的密码子CAA可以被交换为编码相同氨基酸的相对频繁出现的密码子CAG。

[0331] 在这种情况下,仅由一个密码子编码的氨基酸Met (AUG) 和Trp (UGG) 各自保持不变。终止密码子不是胞嘧啶含量优化的,然而,相对稀少的终止密码子琥珀、赭石 (UAA, UAG) 可以通过相对频繁出现的终止密码子蛋白石 (UGA) 进行交换。

[0332] 上面列出的单个取代可以单独使用以及以所有可能的组合使用,以优化与野生型核酸序列相比的经修饰的核酸序列的胞嘧啶含量。

[0333] 因此,本文所定义的至少一种编码序列可以与相应的野生型核酸的编码序列相比进行改变,使得氨基酸由至少两个或更多个密码子编码,所述至少两个或更多个密码子中的一个包含一个额外的胞嘧啶,这种密码子可以通过包含一个额外胞嘧啶的C-优化密码子进行交换,其中与野生型序列相比,氨基酸优选不改变。

[0334] 根据进一步优选的实施方案,本发明的核酸序列,特别是RNA序列可以在3'末端含有poly-A尾,poly-A尾通常具有约10至200个腺苷核苷酸,优选约10至100个腺苷核苷酸,更多优选约40至80个腺苷核苷酸或甚至更优选约50至70个腺苷核苷酸。

[0335] 优选地,本发明的RNA序列中的聚(A)序列通过RNA体外转录从DNA模板衍生。替代地,聚(A)序列也可以通过常规的化学合成方法在体外获得,而不必从DNA-祖细胞转录。此外,聚(A)序列或聚(A)尾可以通过使用市售的聚腺苷酸化试剂盒和本领域已知的相应方案,根据本发明的RNA的酶促多聚腺苷酸化产生。

[0336] 替代地,如本文所述的RNA任选地包含多腺苷酸化信号,其在本文中定义为信号,其通过特定蛋白因子(例如切割和多腺苷酸化特异性因子(CPSF),裂解刺激因子(CstF),裂解因子I和II(CF I和CF II),聚(A)聚合酶(PAP))将聚腺苷酸化传递至(转录的)RNA。在该情况下,优选包含NN(U/T)ANA共有序列(consensus sequence)的共有多腺苷酸化信号。在一特别优选的方面,多腺苷酸化信号包括以下序列之一:AA(U/T)AAA或A(U/T)(U/T)AAA(其中尿苷通常存在于RNA中,胸苷通常存在于DNA中)。

[0337] 根据进一步优选的实施方案,本发明的核酸序列,特别是RNA序列可以含有在3'末端的通常约10至200个胞嘧啶核苷酸,优选约10至100个胞嘧啶核苷酸,更优选约20至70个胞嘧啶核苷酸或甚至更优选约20至60个或甚至10至40个胞嘧啶核苷酸的聚(C)尾。优选地,本发明的RNA序列中的聚(C)序列通过RNA体外转录从DNA模板衍生。

[0338] 在优选的实施方案中,根据本发明的核酸序列,特别是RNA序列包含至少一个5'-或3'-UTR元件。在这种情况下,UTR元件包含核酸序列或其组成,所述核酸序列衍生自任何天然存在的基因的5'-或3'-UTR或衍生自基因的5'-或3'-UTR的片段、同源物或变体。优选地,根据本发明使用的5'-或3'-UTR元件与本发明的RNA序列的至少一种编码序列是异源的。即使衍生自天然存在的基因的5'-或3'-UTR元件是优选的,也可以在本发明的上下文中使用合成工程化的UTR元件。

[0339] 术语“3'UTR元件”通常是指核酸序列,其包含衍生自3'UTR或3'UTR的变体的核酸

序列或由其组成。在本发明意义上的3'UTR元件可以代表核酸分子的3'UTR,特别是RNA或DNA的3'UTR,优选mRNA的3'UTR。因此,在本发明的意义上,优选地,3'UTR元件可以是RNA的3'UTR,优选是mRNA的3'UTR,或者它可以是RNA的3'UTR的转录模板。因此,3'UTR元件优选是核酸序列,该核酸序列对应于RNA的3'UTR,优选对应于mRNA的3'UTR,该mRNA是例如通过遗传工程改造的载体构建体的转录获得的mRNA。优选地,3'UTR元件实现3'UTR的功能或编码实现3'UTR功能的序列。

[0340] 优选地,所述至少一个3'UTR元件包含衍生自脊索动物基因,优选脊椎动物基因,更优选哺乳动物基因,最优选人基因的3'UTR的核酸序列或由其组成,或包含衍生自脊索动物基因,优选脊椎动物基因,更优选哺乳动物基因,最优选人基因的3'UTR的变体的核酸序列或由其组成。

[0341] 优选地,本发明的核酸序列,特别是RNA序列包含3'UTR元件,其可以是可衍生自与具有增强的半衰期(提供稳定的RNA)的RNA相关的基因,例如如下定义和描述的3'UTR元件。优选地,3'UTR元件是衍生自基因的3'UTR的核酸序列,其优选编码稳定的RNA,或衍生自所述基因的同源物、片段或变体。

[0342] 在一特别优选的实施方案中,3'UTR元件包含核酸序列或由其组成,所述核酸序列衍生自根据专利申请W02013/143700(其公开内容通过引用并入本文)的SEQ ID NO:1369-1390所述的选自以下基因中的基因的3'UTR:白蛋白基因, α -珠蛋白基因, β -珠蛋白基因,酪氨酸羟化酶基因,脂氧合酶基因和胶原 α 基因,例如胶原 $\alpha 1$ (I)基因,或衍生自选自以下基因中的基因的3'UTR的变体:白蛋白基因, α -珠蛋白基因, β -珠蛋白基因,酪氨酸羟化酶基因,脂氧合酶基因和胶原 α 基因,例如胶原 $\alpha 1$ (I)基因,或者衍生自其同源物、片段或变体。在一特别优选的实施方案中,3'UTR元件包含核酸序列或由其组成,所述核酸序列衍生自白蛋白基因的3'UTR,优选脊椎动物白蛋白基因,更优选哺乳动物白蛋白基因,最优选人白蛋白基因的3'UTR。

[0343] 在该上下文中,特别优选的是,根据本发明的RNA序列包含3'-UTR元件,其包含衍生自根据专利申请W02013/143700的SEQ ID NO:1369-1390的核酸的相应RNA序列或片段、同源物或其变体。

[0344] 在另一个特别优选的实施方案中,3'UTR元件包含核酸序列或由其组成,所述核酸序列衍生自 α 或 β -珠蛋白基因的3'UTR,优选脊椎动物 α -或 β -珠蛋白基因,更优选哺乳动物 α -或 β -珠蛋白基因,最优选人 α -或 β -珠蛋白基因的3'UTR。

[0345] 术语'衍生自[...]基因的3'UTR的核酸序列'优选是指基于[...]基因的3'UTR序列或其部分的核酸序列,例如基于白蛋白基因, α -珠蛋白基因, β -珠蛋白基因,酪氨酸羟化酶基因,脂氧合酶基因或胶原 α 基因,如胶原 $\alpha 1$ (I)基因,优选白蛋白基因的3'UTR或基于其一部分。该术语包括对应于整个3'UTR序列的序列,即基因的全长3'UTR序列,和对应于基因的3'UTR序列片段的序列,所述基因例如白蛋白基因, α -珠蛋白基因, β -珠蛋白基因,酪氨酸羟化酶基因,脂氧合酶基因或胶原 α 基因,例如胶原 $\alpha 1$ (I)基因,优选白蛋白基因。

[0346] 术语'衍生自[...]基因的3'UTR的变体的核酸序列'优选是指核酸序列,其基于基因的3'UTR序列的变体,例如基于白蛋白基因, α -珠蛋白基因, β -珠蛋白基因,酪氨酸羟化酶基因,脂氧合酶基因或胶原 α 基因,如胶原 $\alpha 1$ (I)基因的3'UTR的变体,或基于其一部分,如上所述的。该术语包括对应于基因的3'UTR的变体的整个序列的序列,即基因的全长变体3'

UTR序列,和对应于基因的变体3'UTR序列的片段的序列。在该情况下的片段优选由对应于全长变体3'UTR中的连续核苷酸段的连续核苷酸段组成,其代表全长变体3'UTR的至少20%,优选至少30%,更优选至少40%,更优选至少50%,甚至更优选至少60%,甚至更优选至少70%,甚至更优选至少80%,最优选至少90%。在本发明的意义上,变体的这种片段优选是如本文所述的变体的功能片段。

[0347] 根据优选的实施方案,根据本发明的核酸序列,特别是RNA序列包含5'-帽结构和/或至少一个3'-非翻译区元件(3'-UTR元件),优选如本文所定义的。更优选地,RNA还包含如本文所定义的5'-UTR元件。

[0348] 在特别优选的实施方案中,RNA序列包含,优选在5'至3'方向包含:

- a.) 5'-帽结构,优选m7GpppN;
- b.) 至少一种编码序列,其编码至少一种衍生自目标蛋白或目的肽或其片段或变体的抗原性肽或蛋白,或其片段或变体,
- c.) 3'-UTR元件,其包含衍生自 α 珠蛋白基因,其同源物,片段或变体的核酸序列或由其组成;
- d.) 任选地,聚(A)序列,其优选包含64个腺苷;
- e.) 任选地,聚(C)序列,优选包含30个胞嘧啶;和

[0349] 在特别优选的实施方案中,至少一种核酸序列,特别是RNA序列包含至少一个5'-非翻译区域元件(5'-UTR元件)。优选地,所述至少一个5'-UTR元件包含核酸序列或由其组成,所述核酸序列衍生自TOP基因的5'-UTR或衍生自TOP基因的5'-UTR的片段、同源物或变体。

[0350] 特别优选5'-UTR元件不包含如上定义的TOP-基序或5'-TOP。

[0351] 在一些实施方案中,5'-UTR元件的核酸序列,其衍生自TOP基因的5'-UTR,在其3'末端以位于所述基因或其来源的RNA的起始密码子(例如A(U/T)G)的上游的1、2、3、4、5、6、7、8、9或10位的核苷酸封端。因此,5'-UTR元件不包含蛋白编码序列的任何部分。因此,优选地,至少一种核酸序列的,特别是RNA序列的唯一蛋白编码部分通过编码序列提供。

[0352] 衍生自TOP基因的5'-UTR的核酸序列优选衍生自真核TOP基因,优选植物或动物TOP基因,更优选脊索动物TOP基因,甚至更优选脊椎动物TOP基因,最优选哺乳动物TOP基因,如人TOP基因。

[0353] 例如,5'-UTR元件优选选自包含核酸序列或由其组成的5'-UTR元件,所述核酸序列衍生自选自以下项组成的群组的核酸序列:专利申请W02013/143700的SEQ ID NO:1-1363,SEQ ID NO:1395,SEQ ID NO:1421和SEQ ID NO:1422,该专利申请其公开内容通过引用并入本文,专利申请W02013/143700的SEQ ID NO:1-1363,SEQ ID NO:1395,SEQ ID NO:1421和SEQ ID NO:1422的同源物,其变体,或优选相应的RNA序列。术语“专利申请W02013/143700的SEQ ID NO:1-1363,SEQ ID NO:1395,SEQ ID NO:1421和SEQ ID NO:1422的同源物”是指除了智人之外的其他物种的与根据专利申请W02013/143700的SEQ ID NO:1-1363,SEQ ID NO:1395,SEQ ID NO:1421和SEQ ID NO:1422的序列同源的序列。

[0354] 在一优选的实施方案中,根据本发明的核酸序列的5'-UTR元件,特别是RNA序列的5'-UTR元件包含选自以下的核酸序列或由其组成:从核苷酸位置5(即位于序列中第5位的核苷酸)延伸至紧邻(位于序列的3'末端)的起始密码子的核苷酸位置5'(例如紧邻ATG序列

的核苷酸位置5')的核酸序列衍生的核酸序列;选自专利申请W02013/143700的SEQ ID NO:1-1363,SEQ ID NO:1395,SEQ ID NO:1421和SEQ ID NO:1422,专利申请W02013/143700的SEQ ID NO:1-1363,SEQ ID NO:1395,SEQ ID NO:1421和SEQ ID NO:1422的同源物,其变体,或相应的RNA序列的核酸序列。特别优选5'UTR元件衍生自以下核酸序列:从紧邻3'至5'-TOP的核苷酸位置延伸至紧邻(位于序列的3'末端)的起始密码子的核苷酸位置5'(例如紧邻ATG序列的核苷酸位置5')的核酸序列;选自专利申请W02013/143700的SEQ ID NO:1-1363,SEQ ID NO:1395,SEQ ID NO:1421和SEQ ID NO:1422,专利申请W02013/143700的SEQ ID NO:1-1363,SEQ ID NO:1395,SEQ ID NO:1421和SEQ ID NO:1422的同源物,其变体,或相应的RNA序列的核酸序列。

[0355] 在一特别优选的实施方案中,5'-UTR元件包含核酸序列或由其组成,所述核酸序列衍生自编码核糖体蛋白的TOP基因的5'-UTR或衍生自编码核糖体蛋白的TOP基因的5'-UTR的变体。例如,5'-UTR元件包含核酸序列或由其组成,所述核酸序列衍生自根据如本文所述的专利申请W02013/143700的SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:170、SEQ ID NO:193、SEQ ID NO:244、SEQ ID NO:259、SEQ ID NO:554、SEQ ID NO:650、SEQ ID NO:675、SEQ ID NO:700、SEQ ID NO:721、SEQ ID NO:913、SEQ ID NO:1016、SEQ ID NO:1063、SEQ ID NO:1120、SEQ ID NO:1138、以及SEQ ID NO:1284-1360中任一项的核酸序列,相应RNA序列,其同源物或其变体的5'-UTR,优选缺乏5'-TOP基序。如上所述,从位置5延伸至紧邻ATG(其位于序列的3'末端)的5'的核苷酸的序列对应于所述序列的5'-UTR。

[0356] 优选地,5'-UTR元件包含核酸序列或由其组成,所述核酸序列衍生自编码核糖体大蛋白(RPL)的TOP基因的5'-UTR或衍生自编码核糖体大蛋白(RPL)的TOP基因的5'-UTR的同源物或变体。例如,5'-UTR元件包含核酸序列或由其组成,所述核酸序列衍生自根据如本文所述的专利申请W02013/143700的SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:259、SEQ ID NO:1284-1318、SEQ ID NO:1344、SEQ ID NO:1346、SEQ ID NO:1348-1354、SEQ ID NO:1357、SEQ ID NO:1358、SEQ ID NO:1421以及SEQ ID NO:1422中任一项的核酸序列,相应的RNA序列,其同源物或其变体的5'-UTR,优选缺乏5'-TOP基序。

[0357] 在一特别优选的实施方案中,5'-UTR元件包含核酸序列或由其组成,所述核酸序列衍生自核糖体蛋白大32基因的5'-UTR,其优选来自脊椎动物核糖体蛋白大32(L32)基因,更优选来自哺乳动物核糖体蛋白大32(L32)基因,最优选来自人核糖体蛋白大32(L32)基因,或衍生自核糖体蛋白大32基因的5'-UTR的变体,其优选来自脊椎动物核糖体蛋白大32(L32)基因,更优选来自哺乳动物核糖体蛋白大32(L32)基因,最优选来自人核糖体蛋白大32(L32)基因,其中优选5'-UTR元件不包含所述基因的5'-TOP。

[0358] 因此,在特别优选的实施方案中,5'-UTR元件包含核酸序列或由其组成,所述核酸序列与根据SEQ ID NO:13的核酸序列(缺乏5'末端寡嘧啶束的人核糖体蛋白大32的5'-UTR:GGCGCTGCCTACGGAGGTGGCAGCCATCTCCTTCTCGGCATC;其对应于专利申请W02013/143700的SEQ ID No.1368)或优选与相应的RNA序列具有至少约40%,优选至少约50%,优选至少约60%,优选至少约70%,更优选至少约80%,更优选至少约90%,甚至更优选至少约95%,甚至更优选至少约99%的同一性,或其中所述至少一个5'UTR元件包含核酸序列的片段或由其组成,所述核酸序列的片段与上述序列的所述核酸序列具有至少约40%,优选至少约50%,优选至少约60%,优选至少为约70%,更优选至少约80%,更优选至少约90%,甚至更

优选至少约95%，甚至更优选至少约99%的同一性，其中，优选地，片段如上所述，即是代表全长5'UTR的至少20%等的连续核苷酸段。优选地，片段的长度为至少约20个核苷酸或更多，优选至少约30个核苷酸或更多，更优选至少约40个核苷酸或更多。优选地，片段是如本文所述的功能片段。

[0359] 在一些实施方案中，根据本发明的RNA序列包含5'-UTR元件，其包含核酸序列或由其组成，所述核酸序列衍生自脊椎动物TOP基因（例如哺乳动物，例如人TOP基因）的5'-UTR，选自RPSA, RPS2, RPS3, RPS3A, RPS4, RPS5, RPS6, RPS7, RPS8, RPS9, RPS10, RPS11, RPS12, RPS13, RPS14, RPS15, RPS15A, RPS16, RPS17, RPS18, RPS19, RPS20, RPS21, RPS23, RPS24, RPS25, RPS26, RPS27, RPS27A, RPS28, RPS29, RPS30, RPL3, RPL4, RPL5, RPL6, RPL7, RPL7A, RPL8, RPL9, RPL10, RPL10A, RPL11, RPL12, RPL13, RPL13A, RPL14, RPL15, RPL17, RPL18, RPL18A, RPL19, RPL21, RPL22, RPL23, RPL23A, RPL24, RPL26, RPL27, RPL27A, RPL28, RPL29, RPL30, RPL31, RPL32, RPL34, RPL35, RPL35A, RPL36, RPL36A, RPL37, RPL37A, RPL38, RPL39, RPL40, RPL41, RPLP0, RPLP1, RPLP2, RPLP3, RPLP0, RPLP1, RPLP2, EEF1A1, EEF1B2, EEF1D, EEF1G, EEF2, EIF3E, EIF3F, EIF3H, EIF2S3, EIF3C, EIF3K, EIF3EIP, EIF4A2, PABPC1, HNRNPA1, TPT1, TUBB1, UBA52, NPM1, ATP5G2, GNB2L1, NME2, UQCRB, 或其同源物或变体，其中优选5'-UTR元件不包含TOP-基序或所述基因的5'-TOP, 并且其中任选地，5'-UTR元件开始于在其5'末端处在5'-末端寡嘧啶束(TOP)下游的位置1、2、3、4、5、6、7、8、9或10的核苷酸，并且其中进一步任选地，衍生自TOP基因的5'-UTR的5'UTR元件终止于在其3'末端处在其来源的基因的起始密码子(A(U/T)G)上游的位置1、2、3、4、5、6、7、8、9或10的核苷酸。

[0360] 在进一步特别优选的实施方案中，5'-UTR元件包含核酸序列或由其组成，所述核酸序列衍生自核糖体蛋白大32基因(RPL32)，核糖体蛋白大35基因(RPL35)，核糖体蛋白大21基因(RPL21)，ATP合成酶，H⁺转运，线粒体F1络合物， α 亚基1，心肌(ATP5A1)基因，羟基类固醇(17- β)脱氢酶4基因(HSD17B4)，雄激素-诱导1基因(AIG1)，细胞色素c氧化酶亚基VIc基因(COX6C)或N-乙酰基鞘氨醇酰胺水解酶(酸性神经酰胺酶)1基因(ASAH1)的5'-UTR或其变体，优选衍生自脊椎动物核糖体蛋白大32基因(RPL32)，脊椎动物核糖体蛋白大35基因(RPL35)，脊椎动物核糖体蛋白大21基因(RPL21)，脊椎动物ATP合成酶，H⁺转运，线粒体F1络合物， α 亚基1，心肌(ATP5A1)基因，脊椎动物羟基类固醇(17- β)脱氢酶4基因(HSD17B4)，脊椎动物雄激素诱导的1基因(AIG1)，脊椎动物细胞色素c氧化酶亚基VIc基因(COX6C)，或脊椎动物N-乙酰基鞘氨醇酰胺水解酶(酸性神经酰胺酶)1基因(ASAH1)或其变体，更优选衍生自哺乳动物核糖体蛋白大32基因(RPL32)，核糖体蛋白大35基因(RPL35)，核糖体蛋白大21基因(RPL21)，哺乳动物ATP合成酶，H⁺转运，线粒体F1络合物， α 亚基1，心肌(ATP5A1)基因，哺乳动物羟基类固醇(17- β)脱氢酶4基因(HSD17B4)，哺乳动物雄激素诱导的1基因(AIG1)，哺乳动物细胞色素c氧化酶亚基VIc基因(COX6C)，或哺乳动物N-乙酰基鞘氨醇氨基-水解酶(酸性神经酰胺酶)1基因(ASAH1)或其变体，最优选衍生自人核糖体蛋白大32基因(RPL32)，人核糖体蛋白大35基因(RPL35)，人核糖体蛋白大21基因(RPL21)，人ATP合成酶，H⁺转运，线粒体F1络合物， α 亚基1，心肌(ATP5A1)基因，人羟基类固醇(17- β)脱氢酶4基因(HSD17B4)，人雄激素诱导的1基因(AIG1)，人细胞色素c氧化酶亚基VIc基因(COX6C)，或者人N-乙酰基鞘氨醇酰胺水解酶(酸性神经酰胺酶)1基因(ASAH1)或其变体，其中优选5'UTR元件不包含所述基因的5'TOP。

[0361] 因此,在特别优选的实施方案中,5'-UTR元件包含核酸序列或由其组成,所述核酸序列与根据专利申请W02013/143700的SEQ ID NO:1412-1420的核酸序列或相应的RNA序列具有至少约40%,优选至少约50%,优选至少约60%,优选至少约70%,更优选至少约80%,更优选至少约90%,甚至更优选至少约95%,甚至更优选至少约99%的同一性,或其中至少一个5'-UTR元件包含核酸序列的片段或由其组成,所述核酸序列的片段与根据专利申请W02013/143700的SEQ ID NO:1412-1420的核酸序列具有至少约40%,优选至少约50%,优选至少约60%,优选至少约70%,更优选至少约80%,更优选至少约90%,甚至更优选至少约95%,甚至更优选至少约99%的同一性,其中,优选地,该片段如上所述,即是代表全长5'-UTR的至少20%等的连续核苷酸段。优选地,片段的长度为至少约20个核苷酸或更多,优选至少约30个核苷酸或更多,更优选至少约40个核苷酸或更多。优选地,片段是如本文所述的功能片段。

[0362] 因此,在特别优选的实施方案中,5'-UTR元件包含核酸序列或由其组成,所述核酸序列与根据SEQ ID NO:14的核酸序列(缺乏5'末端寡嘧啶束的ATP5A1的5'-UTR:GCGGCTCGGCCATTTTGTCCCAGTCAGTCCGGAGGCTGCGGCTGCAGAAGTACCGCCTGCGGAGTAACTGCAAAG;其对应于专利申请W02013/143700的SEQ ID No.1414)或优选与相应的RNA序列具有至少约40%,优选至少约50%,优选至少约60%,优选至少约70%,更优选至少约80%,更优选至少约90%,甚至更优选至少约95%,甚至更优选至少约99%的同一性,或其中所述至少一个5'-UTR元件包含核酸序列的片段或由其组成,所述核酸序列的片段与上述的所述核酸序列具有至少约40%,优选至少约50%,优选至少约60%,优选至少为约70%,更优选至少约80%,更优选至少约90%,甚至更优选至少约95%,甚至更优选至少约99%的同一性,其中,优选地,片段如上所述,即是代表全长5'-UTR的至少20%等的连续核苷酸段。优选地,片段的长度为至少约20个核苷酸或更多,优选至少约30个核苷酸或更多,更优选至少约40个核苷酸或更多。优选地,片段是如本文所述的功能片段。

[0363] 优选地,至少一个5'-UTR元件和至少一个3'-UTR元件协同作用以增加从如上所述的至少一种RNA序列生产的蛋白。

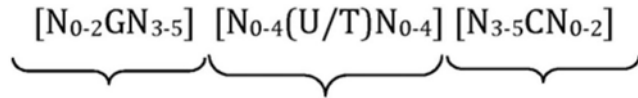
[0364] 根据特别优选的实施方案,根据本发明的RNA序列包含,优选在5'至3'方向包含:

- a.) 5'-帽结构,优选m7GpppN;
- b.) 5'-UTR元件,其包含核酸序列或由其组成,所述核酸序列衍生自TOP基因,其同源物、片段或变体的5'-UTR;
- c.) 至少一种编码序列,其编码至少一种衍生自目标蛋白或目的肽或其片段或变体的抗原性肽或蛋白,
- d.) 3'-UTR元件,其包含衍生自提供稳定RNA的基因,其同源物、片段或变体的核酸序列或由其组成;
- e.) 任选地,聚(A)序列,其优选包含64个腺苷;以及
- f.) 任选地,聚(C)序列,优选包含30个胞嘧啶。

[0365] 在特别优选的实施方案中,根据本发明使用的核酸序列,特别是RNA序列包含组蛋白茎-环序列/结构。此类组蛋白茎-环序列优选地选自如W02012/019780中所公开的组蛋白茎-环序列,其公开内容通过引用并入本文。

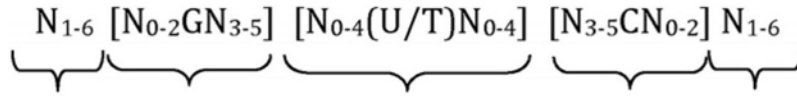
[0366] 适用于本发明的组蛋白茎环序列优选选自下列式VII或VIII中的至少一个:

式VII (无茎边界元件的茎环序列) :



茎 1 环 茎 2

式VIII (带有茎边界元素的茎环序列) :



茎 1 茎 1 环 茎 2 茎 2

边界元件

边界元件

其中:

茎1或茎2的边界元件 N_{1-6} 是1至6个N,优选2至6个N,更优选2至5个N,甚至更优选3至5个N,最优选4至5或5个N的连续序列,其中每个N彼此独立地选自选自A,U,T,G和C的核苷酸或其核苷酸类似物;

茎1 $[N_{0-2}GN_{3-5}]$ 与元件茎2反向互补或部分反向互补,并且是5至7个核苷酸之间的连续序列;

其中 N_{0-2} 是0至2个N,优选0至1个N,更优选1个N的连续序列,其中每个N彼此独立地选自选自A,U,T,G和C的核苷酸或其核苷酸类似物;

其中 N_{3-5} 是3至5个N,优选4至5个N,更优选4个N的连续序列,其中每个N彼此独立地选自选自A,U,T,G和C的核苷酸或其核苷酸类似物,并且

其中G是鸟苷或其类似物,并且可以任选地被胞苷或其类似物取代,条件是其茎2中的互补核苷酸胞苷被鸟苷取代;

环序列 $[N_{0-4}(U/T)N_{0-4}]$ 位于元件茎1和茎2之间,并且是3至5个核苷酸的连续序列,更优选4个核苷酸的连续序列;

其中每个 N_{0-4} 彼此独立地是0至4个N,优选1至3个N,更优选1至2个N的连续序列,其中每个N独立地选自选自A,U,T G和C的核苷酸,或其核苷酸类似物;并且

其中U/T代表尿苷或任选的胸苷;

茎2 $[N_{3-5}CN_{0-2}]$ 与元件茎1反向互补或部分反向互补,并且是5至7个核苷酸之间的连续序列;

其中 N_{3-5} 是3至5个N,优选4至5个N,更优选4个N的连续序列,其中每个N独立地选自选自A,U,T,G和C的核苷酸或其核苷酸类似物;

其中 N_{0-2} 是0至2个N,优选0至1个N,更优选1个N的连续序列,其中每个N独立地选自选自A,U,T,G或C的核苷酸或其核苷酸类似物;以及

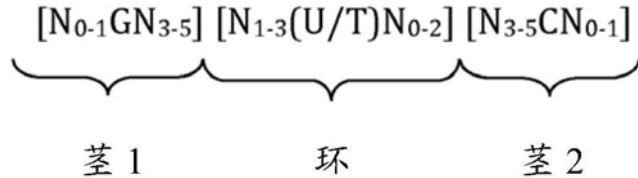
其中C是胞苷或其类似物,并且可任选地被鸟苷或其类似物取代,条件是其茎1中的互补核苷鸟苷被胞苷取代;

其中茎1和茎2能够彼此碱基配对,从而形成反向互补序列,其中碱基配对可以在茎1和茎2之间发生,例如,通过Watson-Crick碱基配对核苷酸A和U/T或G和C,或通过非Watson-

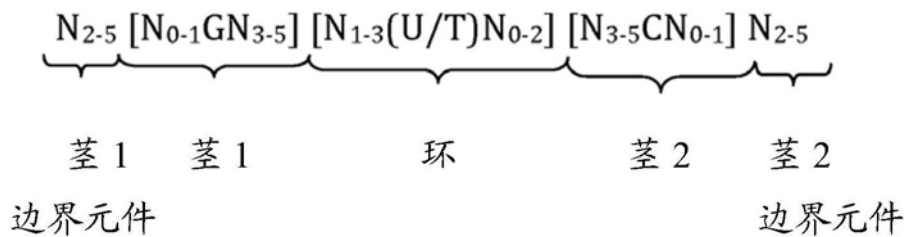
Crick碱基配对,例如摇摆碱基配对,反向Watson-Crick碱基配对,Hoogsteen碱基配对,反向Hoogsteen碱基配对发生,或能够彼此碱基配对,以形成部分反向互补序列,其中在茎1和茎2之间可能发生不完全碱基配对,基于一个茎中的一个或多个碱基在另一个茎的反向互补序列中不具有互补碱基。

[0367] 根据进一步优选的实施方案,核酸序列,特别是RNA序列可以包含根据以下特定式VIIa或VIIIa中的至少一者的至少一个组蛋白茎-环序列:

式VIIa (茎环序列没有茎边界元件):



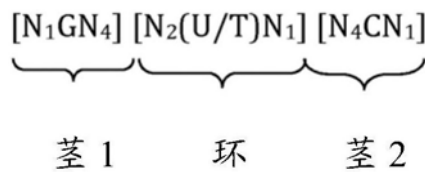
式VIIIa (具有茎边界元件的茎环序列):



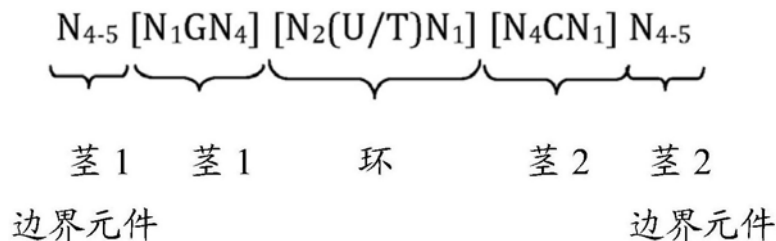
其中N,C,G,T和U如上所定义。

[0368] 根据进一步更特别优选的实施方案,所述至少一种核酸,优选至少一种RNA可以包含根据以下特定式VIIb或VIIIb中的至少一者的至少一个组蛋白茎环序列:

式VIIb (无茎边界元件的茎环序列):



式VIIIb (具有茎边界元件的茎环序列):



其中N,C,G,T和U如上所定义。

[0369] 特别优选的组蛋白茎-环序列是序列CAAAGGCTCTTTTCAGAGCCACCA (根据SEQ ID NO:15) 或更优选相应的RNA序列CAAAGGCUCUUUCAGAGCCACCA (根据SEQ ID NO:16)。

[0370] 任何上述修饰可以应用于本发明的核酸序列,特别是DNA和/或RNA序列,并且还可以应用于本发明上下文中使用的任何DNA或RNA,并且如果合适或必需的话,可以是以任何组合形式相互组合,条件是,这些修饰组合在相应的核酸序列中不会相互干扰。本领域技术人员将能够相应地做出他的选择。

[0371] 根据本发明的核酸序列,特别是根据本发明的包含如本文所定义的至少一个编码

序列的RNA序列可优选包含5'UTR和/或3'UTR,所述5'UTR和/或3'UTR优选含有至少一个组蛋白茎-环。根据本发明的RNA序列的3'UTR优选还包含如本文所定义的聚(A)和/或聚(C)序列。3'UTR的单个元件可以沿着本发明的RNA序列的序列以5'至3'的任何顺序出现在其中。此外,还可以包含如本文所述的其他元件,例如本文定义的稳定序列(例如衍生自珠蛋白基因的UTR),IRES序列等。每种元件也可以根据本发明在RNA序列中重复至少一次(特别是在二-或多顺反子构建体中),优选两次或更多次。例如,单个元件可以根据本发明以下列顺序存在于核酸序列中,特别是在RNA序列中:

- 5'-编码序列-组蛋白茎-环-聚(A)/(C)序列-3';或
- 5'-编码序列-聚(A)/(C)序列-组蛋白茎-环-3';或
- 5'-编码序列-组蛋白茎-环-多腺苷酸化信号-3';或
- 5'-编码序列-多腺苷酸化信号-组蛋白茎-环-3';或
- 5'-编码序列-组蛋白茎-环-组蛋白茎-环-聚(A)/(C)序列-3';或
- 5'-编码序列-组蛋白茎-环-组蛋白茎-环-多腺苷酸化信号-3';或
- 5'-编码序列-稳定序列-聚(A)/(C)序列-组蛋白茎-环-3';或
- 5'-编码序列-稳定序列-聚(A)/(C)序列-聚(A)/(C)序列-组蛋白-茎-环-3';等等。

[0372] 根据进一步的实施方案,用于本发明的核酸序列,特别是RNA序列,优选包含下列结构元件中的至少一种:5'-和/或3'-非翻译区域元件(UTR元件),特别是5'-UTR元件,其优选包含核酸序列或由其组成,所述核酸序列衍生自TOP基因的5'-UTR或其片段,同源物或变体,或5'-和/或3'-UTR元件,其可优选衍生自提供稳定RNA的基因或其同源物,片段或变体;组蛋白-茎-环结构,优选在其3'非翻译区中的组蛋白-茎-环;5'-帽结构;聚-A尾巴;或聚(C)序列。

[0373] 在特别优选的实施方案中,核酸序列,特别是RNA序列,优选在5'至3'方向包含:

- a.) 5'-帽结构,优选m7GpppN;
- b.) 至少一种编码序列,其编码至少一种目标抗原性肽或目标蛋白或其片段或变体,
- c.) 3'-UTR元件,其包含衍生自 α 珠蛋白基因,其同源物、片段或变体的核酸序列或由其组成;
- d.) 任选地,聚(A)序列,其优选包含64个腺苷;
- e.) 任选地,聚(C)序列,其优选包含30个胞嘧啶;以及
- f.) 任选地,组蛋白茎-环,其优选包含根据SEQ ID NO:16的RNA序列。

[0374] 根据另一特别优选的实施方案,核酸序列,特别是根据本发明使用的RNA序列,优选在5'至3'方向包含:

- a.) 5'-帽结构,优选m7GpppN;
- b.) 5'-UTR元件,其包含核酸序列或由其组成,所述核酸序列衍生自TOP基因的5'-UTR,其同源物、片段或变体;
- c.) 至少一种编码序列,其编码至少一种目标抗原性肽或目标蛋白或其片段或变体,
- d.) 3'-UTR元件,其包含衍生自提供稳定的RNA的基因的核酸序列或由其组成;
- e.) 任选地,聚(A)序列,其优选包含64个腺苷;
- f.) 任选地,聚(C)序列,其优选包含30个胞嘧啶;以及
- 任选地,组蛋白茎-环,其优选包含根据SEQ ID NO:16的RNA序列。

[0375] 根据本发明使用的核酸可以通过本领域已知的任何方法制备,所述方法包括合成方法,诸如,例如固相合成,以及体外方法,例如体外转录反应或体内反应,例如DNA质粒在细菌中的体内增殖。

[0376] 根据另一优选的实施方案,核酸是编码核酸,优选mRNA的形式,其另外或替代地编码分泌信号肽。此类信号肽通常表现出约15至30个氨基酸的长度,并且优选位于编码肽的N末端,但不受限于此。如本文所定义的信号肽优选地使得能将编码的蛋白或肽转运至特定细胞区域或特定细胞区室,例如细胞表面,内质网(ER)或内体-溶酶体区室。

[0377] 由核酸编码的蛋白或肽可以代表天然存在的蛋白的片段或变体。针对整个野生型序列,在核酸水平或氨基酸水平上,此类片段或变体通常可包含与上述蛋白或肽或其编码核酸序列的序列中的一者具有至少5%,10%,20%,30%,40%,50%,60%,优选至少70%,更优选至少80%,同样更优选至少85%,甚至更优选至少90%,最优选至少95%或甚至97%的序列同一性的序列。

[0378] 在本发明的上下文中,蛋白或肽的“片段”可以包含如本文所定义的蛋白或肽的序列,该序列就其氨基酸序列或其编码的核酸序列而言,与天然蛋白的氨基酸序列或其编码的核酸序列相比,是N末端,C-末端和/或序列间截短的。这种截短可以在氨基酸水平上或在核酸水平上发生。因此,关于这种片段的序列同一性可以涉及整个蛋白或肽或整个编码核酸序列。这同样适用于核酸。

[0379] 这些蛋白或肽的片段可包含约6至约20或更多个氨基酸的序列,其包括:由MHC I类分子加工和呈递的片段,其优选具有约8至约10个氨基酸的长度,例如8、9或10个氨基酸(或甚至6、7、11或12个氨基酸)的长度,以及由MHC II类分子加工和呈递的片段,其优选具有约13个或更多个氨基酸的长度,例如13、14、15、16、17、18、19、20或甚至更多个氨基酸的长度,其中这些片段可选自氨基酸序列的任何部分。这些片段通常由T细胞以由肽片段和MHC分子组成的络合物的形式识别,即这些片段通常不以其天然形式识别。

[0380] 这些蛋白或肽的片段也可包含那些蛋白或肽的表位。在本发明的上下文中,表位(也称为“抗原决定簇”)通常是位于天然蛋白或肽的外表面上的片段,优选具有5至15个氨基酸,更优选具有5至12个氨基酸,6至9个氨基酸,其可以以天然形式被抗体或B细胞受体识别。此类表位可以进一步选自这些蛋白或肽的任何本文提及的变体。在这种情况下,抗原决定簇可以由蛋白或肽的片段组成的构象或不连续的表位,这些片段在蛋白或肽的氨基酸序列中是不连续的,但是以三维结构组合在一起,或者可以由单一多肽链组成的连续或线性的表位。

[0381] 如本文所定义的蛋白或肽的“变体”可以由核酸编码,其中编码蛋白或肽的核苷酸被替换,使得编码的氨基酸序列被改变。由此产生具有一个或多个突变的蛋白或肽,例如用一个或多个取代的、插入的和/或缺失的氨基酸。优选地,与全长天然蛋白(例如其特异性抗原特性)相比,这些片段和/或变体具有相同的生物学功能或比活性。

[0382] 在一实施方案中,阳离子肽或聚合物比核酸化合物的重量比为至少约1。例如,其可以是在约1至约20,或约1至约15的范围内,例如约 2 ± 1 、 3 ± 1 、 4 ± 1 、 5 ± 1 、 6 ± 1 、 7 ± 1 、 8 ± 1 、 9 ± 1 、 10 ± 1 、 11 ± 1 、 12 ± 1 、 13 ± 1 、 14 ± 1 。

[0383] 以每 μg 核酸化合物的 nmol 阳离子类脂质表示,该量优选不高于约 $40\text{nmol}/\mu\text{g}$ 。在另一实施方案中,该比例不大于约 $15\text{nmol}/\mu\text{g}$,特别是不大于 $10\text{nmol}/\mu\text{g}$ 。在一些具体实施方案

中,该量甚至更低,例如分别为约2nmol/ μg 或更低,或约1.5nmol/ μg 或更低,或甚至约1nmol/ μg 或更低,例如在约0.05nmol/ μg 至约2nmol/ μg ,或约0.1至约1.5nmol/ μg ,或约0.25至约1.0nmol/ μg ,或约0.3至约0.8nmol/ μg ,例如约0.4nmol/ μg 的范围内。

[0384] 在一实施方案中,阳离子肽或聚合物比核酸化合物的重量比为至少约1,和/或类脂质比核酸化合物的比例不高于约15nmol/ μg 。

[0385] 不仅相对于核酸被运载物,类脂质的量相对较低,而且相对于阳离子肽或聚合物,类脂质的量也相对较低。通常优选类脂质比阳离子肽或聚合物的重量比相应地不高于约1:10,或不高于约1:20,或1:30,或1:40。在另一个优选的实施方案中,各自的比例不高于约1:50,和/或类脂质比核酸的比率不高于约2nmol/ μg 。

[0386] 该组合物还可以通过N/P比表征,其根据本发明定义为阳离子肽或聚合物的碱性基团的氮原子(“N”)比用作被运载物的核酸化合物的磷酸基团(“P”)的摩尔比;除非从上下文中清楚地表明具有不同的N/P比率。在一实施方案中,N/P比为约0.1至约20,或约0.2至约15,或约2至约15,或约2至约12。

[0387] N/P比可以基于例如1 μg RNA通常含有约3nmol磷酸残基来计算,条件是RNA表现出碱基的统计分布。肽或聚合物的“N”值可以基于其分子量,或基于在肽或聚合物具有分子量分布的情况下其平均分子量,以及阳离子或可阳离子化基团的相对含量来计算。在另一优选的实施方案中,N/P比相应地在约0.2至约15的范围内,或在约0.2至约13,或约0.3至约12,或约0.5至约10,或从约0.6到约8的范围内。

[0388] 在一实施方案中,N/P比选自约2至约15,或约2至约12的范围。根据本发明的具有这种N/P比的组合物特别适用于包含静脉内施用该组合物的用途。

[0389] 如上所述,本发明组合物以及纳米颗粒中类脂质的量通常远低于作为被运载物的核酸的常规脂质载体中的类脂质的量。

[0390] 理论上,类脂质的量也可以用N/P比表示。在这种情况下,“N”代表类脂质的碱性基团的摩尔数,而“P”代表用作被运载物的核酸的磷酸酯基团。在本发明的组合物中,并且因此在本发明的纳米颗粒中,该类脂质相关的N/P比优选不高于约3,特别是不高于约2。还优选与类脂质相关的N/P比分别是在1或更小的范围内,例如为约0.01至约1,或约0.02至约0.8,或约0.05至约0.6,或约0.1至约0.5。

[0391] 本发明的组合物可包含其他组分,例如一种或多种非活性成分,辅助剂或赋形剂。在一实施方案中,组合物包含一种或多种独立地选自靶向剂、细胞穿透剂和隐形剂的化合物。

[0392] 如本文所使用的,靶向剂是对靶标具有亲和力的化合物,所述靶标是例如位于靶细胞表面上或靶细胞表面处的靶标,或细胞内靶标。例如,靶向剂可以代表对目标靶标具有亲和力的抗体、抗体片段或小分子试剂。任选地,这种试剂可以掺入阳离子肽或聚合物中。在其他情况下,这种试剂可以作为另外的组分掺入组合物中,而不与任何载体化合物共价连接。

[0393] 这同样适用于任选的细胞穿透剂和/或隐形剂。如本文所使用的,细胞穿透剂包括细胞穿透肽(CPP),以及具有类似生物或仿生功能的任何其他化合物,即促进被运载物被摄入细胞。在本发明的上下文中,隐形剂是指一种化合物或材料,该化合物或材料在与被运载物分子或颗粒附接时,导致在例如通过静脉注射或输注而注射了该被运载物分子或颗粒的

受试者的血流中更长的循环时间。隐形剂的示例是聚乙二醇化脂质,其脂质结构域能够通过例如与类脂质的疏水基团相互作用而起到纳米颗粒的锚定作用,而其聚乙二醇(PEG)结构域可赋予“隐形”特性,这意味着被运载物材料在血液中循环时与受试者的免疫系统的相互作用减少,这通常与血液中的延长的消除半衰期以及降低的免疫原性和抗原性相关。

[0394] 有用的聚乙二醇化脂质的示例包括1-(单甲氧基-聚乙二醇)-2,3-二肉豆蔻酰基甘油(PEG-DMG),N-[(甲氧基聚(乙二醇)₂₀₀₀)氨基甲酰基]-1,2-二肉豆蔻酰氧基丙基-3-胺(PEG-C-DMA),或1,2-二酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)](1,2-diacyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy(polyethylene glycol)]);在后者的情况下,酰基可以表示例如肉豆蔻酰基,棕榈酰基,硬脂酰基或油酰基,并且聚乙二醇通常为聚乙二醇-350至聚乙二醇-5000,特别是聚乙二醇-750,聚乙二醇-1000,聚乙二醇-2000和聚乙二醇-3000。

[0395] 在本发明的组合物中,组分,即阳离子肽或聚合物,类脂质和核酸化合物,可以掺入一种或多种纳米颗粒中。换句话说,组合物可包含一种或多种纳米颗粒,其包含阳离子肽或聚合物、类脂质和核酸化合物。替代地,组合物可包含一种或多种纳米颗粒,所述纳米颗粒至少包含阳离子肽或聚合物和核酸化合物。在这些实施方案中,可以如上所述选择组分中的每一种,包括关于这些特征的所有选项和偏好。

[0396] 通常,这样的纳米颗粒当阳离子肽或聚合物以及任选还有类脂质与核酸化合物组合时形成,所述核酸化合物可以一起形成载体-被运载物络合物,如下文进一步详细描述。然而,两种组分(即聚合物或肽和核酸化合物)也可以相互作用以形成类似纳米颗粒的胶体结构,而类脂质不能或不完全掺入这种络合物或纳米颗粒中。

[0397] 如本文所使用的,“纳米颗粒”是具有任何结构或形态的亚微米颗粒。亚微米颗粒也可称为胶体或胶体状物。关于纳米颗粒所基于的材料,以及结构或形态,纳米颗粒可以被分类为例如纳米胶囊、囊泡、脂质体、脂质纳米颗粒、胶束、交联胶束、脂质络合物(lipoplex)、多聚物(polyplex)、混合或杂合络合物,以仅提及特定类型纳米颗粒的一些可能的名称。

[0398] 根据该方面,本发明还涉及上述定义的纳米颗粒本身,以及多个这样的纳米颗粒,特别是多个优选的纳米颗粒,如下面更详细描述的。

[0399] 在一优选的实施方案中,纳米颗粒包含由核酸化合物和阳离子肽或聚合物和/或类脂质形成的络合物。在另一具体实施方案中,纳米颗粒基本上由这些组分(a)、(b)和(c)组成。在另一具体实施方案中,纳米颗粒基本上由(a)一种或多种阳离子肽和/或聚合物组成;(b)一种或多种类脂质;(c)一种或多种核酸化合物;和任选地(d)一种或多种独立地选自靶向剂、细胞穿透剂和隐形剂的化合物组成。同样,对于这些实施方案,以上关于各个组分描述的选项和优选方案也是完全适用的。

[0400] 在一优选的实施方案中,本发明的纳米颗粒包含阳离子肽或聚合物与阳离子类脂质的络合物;或阳离子肽或聚合物和/或阳离子类脂质与核酸化合物的络合物。换句话说,纳米颗粒可包含络合物,或甚至基本上代表络合物,该络合物可由以下任何两个成员或全部三个成员组成:

- (a) 阳离子肽或聚合物;
- (b) 阳离子类脂质;和/或

(c) 核酸化合物。

[0401] 如本文所用,“络合物”是分子形成通过弱于共价化学键的力保持在一起的较大单元的缔合物。这种络合物也可称为缔合络合物。将络合物保持在一起的力通常是氢键,也称氢桥,伦敦力和/或偶极吸引力。涉及脂质或类脂质和核酸的络合物通常被称为脂质络合物,并且聚合物和核酸之间的络合物被称为多聚物。

[0402] 在根据本发明提供的阳离子肽或聚合物和类脂质两者的存在下,核酸可以同时形成具有脂质络合物和多聚物的特征的杂合络合物。不希望受理论束缚,发明人假设如果在本发明的组合物或纳米颗粒中形成,这种杂化络合物可能特别稳定,因为它们结合了被运载物 and 不同类型载体之间的各种类型的相互作用,这涉及被运载物分子的不同结构域或区域。另一方面,还认为可能的是,当进行本发明时,核酸化合物的络合主要通过阳离子肽或蛋白实现,特别是在仅使用相对少量的类脂质的情况下,类脂质的存在主要影响络合物在其被活细胞吸收的情况下的最终结果。在任何情况下,本发明不受任何理论的限制,并且由本文定义的两种或更多种成分形成的任何络合物应理解为根据本发明所述的络合物。

[0403] 在一优选的实施方案中,本发明的纳米颗粒基本上由如上定义的被运载物载体络合物组成。在该具体情况下,表述“基本上由.....组成”不应理解为排除在纳米颗粒中存在的少量辅助材料,例如溶剂,助溶剂,表面活性剂,等渗剂等。

[0404] 替代地,在本发明的组合物中的纳米颗粒的至少约50重量%由阳离子肽或聚合物、类脂质和生物活性被运载物材料组成,或至少60重量%,至少70重量%,至少80重量%,至少85重量%,至少90重量%,或至少95重量%由阳离子肽或聚合物、类脂质和生物活性被运载物材料组成。

[0405] 在本发明的上下文中,“生物活性被运载物材料”通常是指化合物或化合物的混合物或组合,其用于借助于制剂、载体、载体或媒介物递送至受试者,或受试者的器官,组织或细胞,以获得所需的生物学效应,例如药理学作用,包括任何类型的预防、治疗、诊断或改善作用。生物活性被运载物材料的递送是用于施用包含这种材料的目的,而在某些情况下也可被认为具有生物活性的制剂、或载体、载体或媒介物主要是用于递送被运载物材料的工具。除非从上下文中有明显不同的含义,否则同义地使用表述“生物活性被运载物材料”,“生物活性化合物”,“被运载物材料”,“被运载物”等。本发明的组合物以及本发明的纳米颗粒包含至少一种核酸化合物或基于核酸的材料作为生物活性被运载物材料。任选地,一种或多种可以代表或不代表核酸化合物的其他活性成分可以存在,并且还可以形成被运载物的一部分。

[0406] 如本文所使用的,“载体”或“载体”一般意指作为制剂的一部分的任何化合物、构建体或材料,其有助于、促成或改善生物活性化合物或材料的递送。它可以是生物学上基本上惰性的,或者它可以是生物学活性的,因为它基本上与受试者的组织、细胞或亚细胞组分相互作用,并且例如增强生物活性被运载物材料的摄取。在本发明的上下文中,该术语也可以应用于类脂质、阳离子肽或聚合物,或两者的组合或混合物。

[0407] “制剂”(就掺入其中并通过该制剂施用的生物活性化合物而言)是在其组成和制备方法方面在药学上可接受的任何产品,其包含至少一种生物活性化合物和一种赋形剂、载体、载体或其他辅助材料。

[0408] 如上所述,本发明的组合物可包含其他组分,例如独立地选自如上所述的靶向剂、

细胞穿透剂和隐形剂的一种或多种化合物。这些另外的组分中的任何一种可任选地掺入纳米颗粒中。

[0409] 如本文所使用的,靶向剂是对靶标具有亲和力的化合物,所述靶标是例如位于靶细胞表面上或靶细胞表面处的靶标,或细胞内靶标。例如,靶向剂可以代表对目标靶标具有亲和力的抗体、抗体片段或小分子试剂。如在具有部分P或其二硫键连接的多聚体的化合物的背景中所讨论的,这种试剂可任选地掺入这种化合物中。在其他情况下,这种试剂可以作为另外的组分掺入纳米颗粒中,而不与任何载体化合物共价连接。

[0410] 这同样适用于任选的细胞穿透剂和/或隐形剂。如本文所使用的,细胞穿透剂包括如上文定义的细胞穿透肽(CPP),以及具有类似生物或仿生功能的任何其他化合物,即促进被运载物被摄入细胞。在本发明的上下文中,隐形剂是指一种化合物或材料,该化合物或材料在掺入在包含阳离子类脂质,包含部分P或其二硫键连接的多聚体的化合物和核酸被运载物的纳米颗粒时,导致所述纳米颗粒在例如通过静脉注射或输注而注射了所述纳米颗粒的受试者的血流中更长的循环时间。隐形剂的示例是聚乙二醇化脂质,其脂质结构域能够通过例如与类脂质的疏水基团相互作用而起到纳米颗粒的锚定作用,而其聚乙二醇(PEG)结构域可赋予所述纳米颗粒“隐形”特性,这意味着所述纳米颗粒在血液中循环时与受试者的免疫系统的相互作用减少,这通常与血液中的纳米颗粒的延长的消除半衰期以及降低的免疫原性和抗原性相关。

[0411] 有用的聚乙二醇化脂质的示例包括1-(单甲氧基-聚乙二醇)-2,3-二肉豆蔻酰基甘油(PEG-DMG),N-[(甲氧基聚(乙二醇)₂₀₀₀)氨基甲酰基]-1,2-二肉豆蔻酰氧基丙基-3-胺(PEG-C-DMA),或1,2-二酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)](1,2-diacyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy(polyethylene glycol)]);在后者的情况下,酰基可以表示例如肉豆蔻酰基,棕榈酰基,硬脂酰基或油酰基,并且聚乙二醇通常为聚乙二醇-350至聚乙二醇-5000,特别是聚乙二醇-750,聚乙二醇-1000,聚乙二醇-2000和聚乙二醇-3000。

[0412] 其他中性脂质通常不必掺入本发明的组合物或纳米颗粒中。这是本发明的另一个优点,并且与大多数已知的确实需要加入(通常甚至是大量的)所谓的辅助脂质的适用于核酸被运载物的络合和递送的脂质载体系统形成对比。如本文所使用的,辅助脂质是非阳离子或可阳离子化的(除非是两性离子的)磷脂或类固醇,其可有助于脂质纳米颗粒与核酸组合的稳定性。因此,本发明的优选实施方案之一是纳米颗粒以及本发明的组合物不含这种辅助脂质。

[0413] 纳米颗粒具有通过动态激光散射测定的不大于约1,000nm的流体动力学直径。更优选地,它们的流体动力学直径不大于约800nm,例如在约30nm至约800nm范围内。在其他优选的实施方案中,流体动力学直径相应地在约50nm至约300nm的范围内,或在约60nm至约250nm,约60nm至约150nm,或约60nm至约120nm的范围内。虽然这些是单个纳米颗粒的优选直径,但这并不排除在本发明的组合物中存在其他直径的纳米颗粒。然而,本发明优选其中许多(或甚至大多数)纳米颗粒具有这种直径的组合物来实施。

[0414] 此外,根据本发明的包含多个这样的纳米颗粒的组合物还可以通过动态激光散射测定的平均流体动力学直径来表征,该直径也优选不大于800nm,例如在约30nm至约800nm的范围内。在流体动力学直径的背景下,“平均”应理解为Z-平均,也称为累积量平均。显然,

通过动态激光散射进行的测量也必须按照所用分析设备制造商的建议,用适当的分散剂和适当的稀释度进行。特别优选的是,平均流体动力学直径相应地在约50nm至约300nm的范围内,或在约60nm至约250nm,约60nm至约150nm,或约60nm至约120nm的范围内。

[0415] 纳米颗粒还可以通过它们的电动势来表征,电动势可以通过 ζ 电位表示。在优选的实施方案中, ζ 电位相应地在约0mV至约50mV,或在约0mV至约10mV的范围内。在其他优选的实施方案中, ζ 电位是正的,即相应地高于0mV,但不高于50mV,或40mV,或30mV,或20mV,或10mV。

[0416] 在进一步的实施方案中, ζ 电位是在约0mV至约-50mV,或约0mV至约-10mV的范围内。在另一实施方案中, ζ 电位是负的,即相应地低于0mV,但不低于-50mV,或-40mV,或-30mV,或-20mV,或-10mV。

[0417] 在另一实施方案中,对于N/P比率低于1的颗粒(特别适合局部施用), ζ 电位在0mV至-50mV的范围内。在另一实施方案中,对于N/P比率超过1的颗粒(特别适用于静脉内或其他血管内应用), ζ 电位在0mV至+50mV的范围内。

[0418] 包含阳离子部分P或其二硫键连接的多聚体的阳离子化合物的量应当考虑核酸被运载物的量来选择。在一优选的实施方案中,选择这些量使得N/P比在约0.1至约20的范围内。在此背景下,N/P比被定义为含有部分P或其二硫键连接的多聚体的化合物的碱性含氮基团的氮原子(“N”)与用作被运载物的核酸的磷酸酯基团(“P”)的摩尔比。N/P比可以基于例如1 μ g RNA通常含有约3nmol磷酸酯残基来计算,条件是RNA表现出碱基的统计分布。肽或聚合物的“N”值可以基于其分子量,或在肽或聚合物具有分子量分布的情况下其平均分子量,以及阳离子或可阳离子化基团的相对含量来计算。在另一优选的实施方案中,N/P比相应地在约0.2至约15的范围内,或在约0.2至约13,或约0.3至约12,或约0.5至约10,或约0.6到约8的范围内。

[0419] 在一实施方案中,N/P比选自约2至约15,或约2至约12的范围。根据本发明的具有这种N/P比的组合物特别适用于包含静脉内施用该组合物的用途。

[0420] 如上所述,本发明组合物以及纳米颗粒中阳离子类脂质的量通常远低于在用于作为被运载物的核酸的常规基于类脂质的载体中阳离子类脂质的量。本发明可以用少至约0.1%至约10%的在脂质络合物或类脂质纳米颗粒中使用的类脂质的典型量来实施,所述脂质络合物或类脂质纳米颗粒已被提出用于例如RNA的递送和细胞的转染。不希望受理论束缚,发明人认为这种低量的类脂质对于实现本发明的组合物的高耐受性是关键。

[0421] 类脂质的量也可以以N/P比表示。在这种情况下,“N”表示阳离子类脂质的碱性基团的摩尔数,而“P”表示用作被运载物的核酸的磷酸酯基团。在本发明的组合物中,并且因此在本发明的纳米颗粒中,该类脂质相关的N/P比优选不高于约3,特别是不高于约2。还优选与类脂质相关的N/P比相应地在约0.016至约0.650,或约0.032至约0.484,或约0.080至约0.323,或约0.968至约0.258的范围内,例如约0.129。

[0422] 阳离子类脂质的量不仅相对于被运载物相对较低,而且相对于肽或聚合物载体相对较低,即相对于包含部分P或其多聚体的化合物的量相对较低。通常优选阳离子类脂质比包含部分P或其二硫键连接的多聚体的化合物的重量比相应地不高于约1:10,或不高于约1:20,或1:30,或1:40。在另一优选的实施方案中,相应的比率不高于约1:50。

[0423] 纳米颗粒可通过包括以下步骤的方法制备:将(i)一种或多种阳离子肽和/或聚合

物；(ii)如上所定义的一种或多种类脂质，其任选溶于适当的溶剂（例如乙醇，DMSO）中；和（iii）一种或多种核酸化合物组合，所述组合在水性液体存在下进行，以使得能形成纳米颗粒或多个纳米颗粒。为了能够良好地混合不同的试剂，可以在与核酸混合之前将类脂质与阳离子络合配偶体混合。混合可以通过合适的混合装置进行（例如利用T形或Y形阀的层流组合；微流体装置或简单加入搅拌溶液）。

[0424] 优选配制和加工本发明的组合物、纳米颗粒或包含纳米颗粒的组合物，其包含阳离子肽或聚合物，类脂质，作为被运载物的核酸化合物和/或一种或多种非活性成分，特别是包含如上所述的纳米颗粒的组合物，以便适合给予受试者，特别是动物或人受试者。优选地，该组合物是无菌的。

[0425] 在这方面，该组合物也可称为药物组合物。这是一般性优选方案，其可以应用于本文所描述的关于组合物或纳米颗粒的组分和其他特征的任何选择和优选方案。换句话说，本发明还涉及例如本文定义的药物组合物，其中核酸化合物是编码至少一种肽或蛋白的编码核酸。例如，编码核酸可以编码治疗活性蛋白或抗原。本发明还涉及包含这种药物组合物的疫苗，其中编码核酸编码至少一种抗原。在这种情况下，疫苗可以由药物组合物组成，或者它可以包含药物组合物和其他组分。

[0426] 本发明的药物组合物，纳米颗粒或包含纳米颗粒的组合物可以经口，胃肠外，通过吸入喷雾，局部，直肠，鼻腔，口腔，阴道或通过植入的储库施用。本文所用的术语肠胃外包括皮下，静脉内，肌肉内，关节内，滑膜内，胸骨内，鞘内，肝内，病灶内，颅内，透皮，皮内，肺内，腹膜内，心内，动脉内和舌下注射或输注技术。在一些实施方案中，本发明的药物组合物，纳米颗粒或包含纳米颗粒的组合物可通过眼部递送施用。在一具体实施方案中，本发明的药物组合物，纳米颗粒或包含纳米颗粒的组合物通过视网膜下或玻璃体内注射施用。在优选的实施方案中，本发明的药物组合物，纳米颗粒或包含纳米颗粒的组合物通过玻璃体内注射施用。在另一优选的实施方案中，本发明的药物组合物，纳米颗粒或包含纳米颗粒的组合物通过视网膜下注射施用。

[0427] 本发明还可用于治疗患有或易患眼部疾病、病症或病况的受试者。如本文所使用的，“眼部疾病，病症或病况”是指影响眼睛和/或视力的疾病、病症或病况。在一些实施方案中，眼部疾病、病症或病况可由眼睛中的蛋白缺乏或功能障碍或与视力相关的解剖结构的部分引起。示例性眼部疾病、病症或病况包括但不限于年龄相关性黄斑变性（AMD），色素性葡萄膜炎（PU），视网膜分支静脉阻塞（BRVO），视网膜中央静脉阻塞（CRVO），糖尿病性黄斑水肿（DME），黄斑囊样水肿（CME），葡萄膜黄斑水肿（UME），巨细胞病毒（CMV）视网膜炎，眼内炎，炎症，青光眼，黄斑变性，巩膜炎，脉络膜炎和葡萄膜炎。

[0428] 在多种实施方案中，本发明可用于递送本文所述的编码在眼部疾病，病症或病症中的任何一种中缺乏的蛋白的mRNA。

[0429] 优选地，本发明的药物组合物，纳米颗粒或包含纳米颗粒的组合物可以通过肠胃外注射施用，更优选通过皮下，静脉内，肌肉内，关节内，滑膜内，胸骨内，鞘内，肝内，病灶内，颅内，透皮施用，皮内，肺内，腹膜内，心内，动脉内，玻璃体内，视网膜下，前房内，结膜下，眼球筋膜下（subtenon），眼球后，局部和/或后巩膜旁施用，施用到睫状肌内和舌下注射或通过输注技术施用。特别优选的是皮内和肌内注射。本发明的药物组合物的无菌可注射形式可以是水性或油性的悬浮液。可以根据本领域已知的技术使用合适的分散剂或润湿剂

和悬浮剂配制这些悬浮液。

[0430] 如本文所定义的本发明的药物组合物, 纳米颗粒或包含纳米颗粒的组合物还可以以任何口服可接受的剂型口服施用, 包括但不限于胶囊, 片剂, 水悬浮液或溶液。

[0431] 本发明的药物组合物, 纳米颗粒或包含纳米颗粒的组合物也可以局部施用, 特别是当治疗目标包括局部施用易于接近的区域或器官时, 例如, 局部施用, 例如包括皮肤疾病或任何其他可接近的上皮组织疾病。对于这些区域或器官中的每一个, 容易制备合适的局部制剂。对于局部应用, 本发明的药物组合物可以配制成合适的软膏, 其含有悬浮或溶解在一种或多种载体中的如本文所定义的核酸。

[0432] 本发明的药物组合物、纳米颗粒或包含纳米颗粒的组合物通常包含“安全有效量”的本发明的药物组合物的组分, 特别是本文定义的核酸序列。如本文所使用的, “安全有效量”是指足以显著诱导如本文所定义的疾病或病症的阳性修饰的如本文所定义的核酸序列的量。然而, 与此同时, “安全有效量”足够小, 以避免严重的副作用, 并且能在优势和风险之间建立合理的关系。确定这些限制通常属于合理的医学判断范围。

[0433] 因此, 根据本发明的疫苗基于与本文所述的(药物)组合物的组分相同的组分。就此而言, 可以参考本文提供的(药物)组合物的描述。优选地, 根据本发明的疫苗包含至少一种核酸, 其包含至少一种如本文所定义的核酸序列和药学上可接受的载体。在疫苗包含多于一种的核酸, 特别是多于一种的mRNA序列(例如根据本发明的多种RNA序列, 其中每种优选编码不同的抗原肽或蛋白)的实施方案中, 疫苗可以以物理上分离的形式提供, 并且可以通过单独的施用步骤施用。根据本发明的疫苗可以对应于如本文所述的(药物)组合物, 尤其是其中mRNA序列由单一组合物提供的情况。然而, 本发明的疫苗也可以物理分离提供。例如, 在其中疫苗包含一种以上的mRNA序列/种类的实施方案中, 可以提供这些RNA种类, 使得可以含有至少一种mRNA种类/序列各自(例如三种不同的mRNA种类/序列)(每种编码不同的抗原肽或蛋白)的例如两种, 三种, 四种, 五种或六种单独的组合物被提供, 其可以组合或不组合。而且, 本发明的疫苗可以是至少两种不同组合物的组合, 每种组合物包含编码本文定义的至少一种抗原肽或蛋白的至少一种mRNA。替代地, 疫苗可以作为至少一种mRNA, 优选至少两种, 三种, 四种, 五种, 六种或更多种mRNA的组合提供, 每种mRNA编码本文定义的抗原肽或蛋白中的一种。疫苗可以在其使用之前组合以提供单一组合物, 或者可以使用它使得需要不止一次施用来施用编码如本文定义的任何抗原肽或蛋白的不同mRNA序列/种类。如果疫苗含有编码本文定义的抗原组合的至少一种mRNA序列, 通常至少两种mRNA序列, 它可以是例如通过一次施用(组合所有mRNA种类/序列)来施用, 通过至少两次单独的施用来施用。因此, 作为单独的实体(含有一种mRNA种类)或作为组合的实体(含有多于一种的mRNA种类)提供的、编码至少一种抗原肽或蛋白或本文定义的任何抗原组合(和任选的其他抗原)的单、双或多顺反子mRNA的任何组合被理解为根据本发明的疫苗。

[0434] 与根据本发明的(药物)组合物一样, 疫苗的实体可以以液体和/或干燥(例如冻干)形式提供。它们可以含有其他组分, 特别是允许其药物用途的其他组分。疫苗或(药物)组合物可以例如另外含有药学上可接受的载体和/或其他辅助物质和添加剂。

[0435] 疫苗或(药物)组合物通常包含安全有效量的如本文所定义的核酸, 特别是根据本发明的mRNA, 其编码如本文所定义的抗原肽或蛋白或优选如本文所定义的其片段或变体或抗原的组合。如本文所使用的, “安全有效量”是指足以显著诱导癌症或与癌症相关的疾

病或病症的阳性修改的mRNA的量。然而,与此同时,“安全有效量”足够小,以避免严重的副作用,也就是说,使得能在优势和风险之间建立合理的关系。确定这些限制通常属于合理的医学判断范围。关于本发明的疫苗或(药物)组合物,表述“安全有效量”优选是指适合于以使得没有发生过度或破坏性免疫反应、而且优选地没有低于可测量水平的这种免疫反应的这样的方式刺激这种适应性免疫系统的mRNA(因此编码抗原)的量。此外,如本文所定义的(药物)组合物或疫苗的mRNA的“安全有效量”可以根据mRNA的类型,例如单顺反子,双顺反子或甚至多顺反子mRNA来选择,因为与使用等量的单顺反子mRNA相比,双-或甚至多顺反子mRNA可导致编码的抗原的显著更高的表达。如上所定义的(药物)组合物或疫苗的mRNA的“安全有效量”将在所附医生的知识和经验范围内进一步根据待治疗的具体病症以及待治疗患者的年龄和身体状况,病症的严重程度,治疗持续时间,伴随治疗的性质,所用的特定药学上可接受的载体和类似因素。根据本发明的疫苗或组合物可以根据本发明用于人类和兽医医学目的,作为药物组合物或作为疫苗使用。

[0436] 在优选的实施方案中,核酸,特别是根据本发明的(药物)组合物、疫苗或部件的试剂盒的mRNA以冻干形式提供。优选地,冻干的mRNA在合适的缓冲液中重构,有利地基于含水载体,在施用前重构,所述缓冲液如,林格氏-乳酸盐(Ringer-Lactate)溶液,优选林格氏(Ringer)溶液,其是磷酸盐缓冲溶液。在一优选的实施方案中,根据本发明的(药物)组合物、疫苗或部件的试剂盒包含至少一种,两种,三种,四种,五种,六种或更多种mRNA,优选mRNA以冻干形式(任选地与至少一种其他添加剂一起)单独提供并且优选在其使用前分别在合适的缓冲液(例如Ringer-Lactate溶液)中重构,以使得能单独施用每种(单顺反子)mRNA。

[0437] 根据本发明的疫苗或(药物)组合物通常可含有药学上可接受的载体。本文使用的表述“药学上可接受的载体”优选包括本发明的疫苗的液体或非液体基质。如果本发明的疫苗以液体形式提供,则载体将是水,通常是无热原的水;等渗盐水或缓冲(含水)溶液,例如磷酸盐,柠檬酸盐缓冲溶液等。特别是对于注射本发明的疫苗,可以使用水或优选缓冲液,更优选含水缓冲液,其含有钠盐,优选至少50mM的钠盐,钙盐,优选至少0.01mM的钙盐和任选的钾盐,优选至少3mM的钾盐。根据一优选的实施方案,钠,钙和任选的钾盐可以以其卤化物(例如,氯化物,碘化物或溴化物)的形式存在,以其氢氧化物,碳酸盐,碳酸氢盐或硫酸盐等形式存在。钠盐的示例包括例如NaCl, NaI, NaBr, Na₂CO₃, NaHCO₃, Na₂SO₄, 任选的钾盐的示例包括例如:KCl, KI, KBr, K₂CO₃, KHCO₃, K₂SO₄, 以及钙盐的示例包括例如CaCl₂, CaI₂, CaBr₂, CaCO₃, CaSO₄, Ca(OH)₂, 但不受限于此。此外,上述阳离子的有机阴离子可以包含在缓冲剂中。根据更优选的实施方案,如上定义的适用于注射目的的缓冲剂可以含有选自氯化钠(NaCl), 氯化钙(CaCl₂)和任选的氯化钾(KCl)的盐,其中除了氯化物外还可以存在另外的阴离子。CaCl₂也可以用另一种盐(如KCl)代替。通常,注射缓冲液中的盐以至少50mM的氯化钠(NaCl), 至少3mM的氯化钾(KCl)和至少0.01mM的氯化钙(CaCl₂)的浓度存在。相对于特定参考培养基,注射缓冲液可以是高渗的,等渗的或低渗的,即缓冲液相对于特定参考培养基可以具有更高,相同或更低的盐含量,其中优选地,可以使用前述盐的那样的浓度时,其由于渗透性或其他浓度效应而不会导致细胞损伤。参考培养基例如在“体内”方法中是存在的液体,例如血液,淋巴液,细胞溶液或其他体液,或者例如可用作“体外”方法中的参考培养基的液体,例如普通缓冲液或液体。这种常规的缓冲液或液体是本领域技术人

员已知的。特别优选Ringer-Lactate溶液作为液体基质。

[0438] 然而,也可以使用一种或多种相容的固体或液体填充剂或稀释剂或包封化合物,其适合于对人施用。本文所用的术语“相容的”是指本发明的疫苗的组分能够与如本文所定义的本发明的核酸,特别是mRNA以使得不发生相互作用的方式混合,这将大大降低本发明的疫苗在典型使用条件下的药效。当然,药学上可接受的载体、填充剂和稀释剂必须具有足够高的纯度和足够低的毒性,以使它们适合于对待治疗的人施用。可用作药学上可接受的载体、填充剂或其成分的化合物的一些示例是糖,例如乳糖,葡萄糖,海藻糖和蔗糖;淀粉,例如玉米淀粉或马铃薯淀粉;葡萄糖;纤维素及其衍生物,例如羧甲基纤维素钠,乙基纤维素,乙酸纤维素;粉末黄耆胶;麦芽;明胶;脂;固体助流剂,例如硬脂酸,硬脂酸镁;硫酸钙;植物油,例如花生油,棉籽油,芝麻油,橄榄油,玉米油和可可油;多元醇,例如聚丙二醇,甘油,山梨糖醇,甘露醇和聚乙二醇;海藻酸。

[0439] 原则上,通过施用本发明的药物组合物或疫苗的方式确定药学上可接受的载体的选择。组合物或疫苗可以例如全身或局部施用。全身施用的途径通常包括,例如,透皮,口服,肠胃外途径,包括皮下,静脉内,肌肉内,动脉内,皮内和腹膜内注射,眼内,玻璃体内,视网膜下,前房下,结膜下,眼球筋膜下,眼球后,局部和/或后巩膜旁施用,施用至睫状肌内和/或鼻内施用途径。用于局部施用的途径通常包括例如局部施用途径,而且包括皮内,透皮,皮下或肌内注射或病灶内,经颅内,肺内,心内和舌下注射。更优选地,根据本发明的组合物或疫苗可以通过皮内,皮下或肌肉内途径施用,优选通过注射施用,其可以是无针和/或针头注射。因此,组合物/疫苗优选配制成液体或固体形式。待施用的根据本发明的疫苗或组合物的合适量可通过常规实验确定,例如,通过常规实验确定,通过使用动物模型确定。这些模型包括但不限于兔,绵羊,小鼠,大鼠,狗和非人灵长类动物模型。用于注射的优选单位剂型包括水、生理盐水或其混合物的无菌溶液。应将这些溶液的pH调节至约7.4。合适的注射用载体包括水凝胶,用于控制或延迟释放的装置,聚乳酸和胶原基质。用于局部施用的合适的药学上可接受的载体包括适用于洗剂,乳膏,凝胶等的那些。如果本发明的组合物或疫苗是口服施用的,则片剂、胶囊等是优选的单位剂量形式。用于制备可用于口服施用的单位剂型的药学上可接受的载体在现有技术中是众所周知的。其选择将取决于次要考虑因素,例如味道、成本和可储存性,这对于本发明的目的而言并不重要,并且本领域技术人员可以毫无困难地进行。

[0440] 本发明的疫苗或组合物可另外含有一种或多种辅助物质,以进一步提高免疫原性。从而可以优选地实现本发明组合物中包含的核酸和辅助物质的协同作用,所述辅助物质可以任选地与如上所述的本发明的疫苗或组合物共同配制(或单独配制)。根据各种类型的辅助物质,各种机理可在这方面发挥作用。

[0441] 可以包括在本发明的疫苗或组合物中的其他添加剂是乳化剂,例如吐温(Tween);润湿剂,例如十二烷基硫酸钠;着色剂;味道赋予剂,药物载体;片剂形成剂;稳定剂;抗氧化剂;防腐剂。

[0442] 本发明的疫苗或组合物还可另外含有任何其他化合物,其已知由于与人Toll样受体TLR1,TLR2,TLR3,TLR4,TLR5,TLR6,TLR7,TLR8,TLR9,TLR10的结合亲和力(作为配体),或由于与鼠类Toll样受体TLR1,TLR2,TLR3,TLR4,TLR5,TLR6,TLR7,TLR8,TLR9,TLR10,TLR11,TLR12或TLR13的结合亲和力(作为配体)而具有免疫刺激作用。

[0443] 在本文中添加到本发明的疫苗或组合物中的另一类化合物可以是CpG核酸,特别是CpG-RNA或CpG-DNA。CpG-RNA或CpG-DNA可以是单链CpG-DNA(ss CpG-DNA),双链CpG-DNA(dsDNA),单链CpG-RNA(ss CpG-RNA)或双链CpG-RNA(ds CpG-RNA)。CpG核酸优选为CpG-RNA形式,更优选为单链CpG-RNA(ss CpG-RNA)形式。CpG核酸优选含有至少一种或多种(促有丝分裂原)胞嘧啶/鸟嘌呤二核苷酸序列(CpG基序)。根据第一优选的替代方案,这些序列中包含的至少一个CpG基序,即CpG基序的C(胞嘧啶)和G(鸟嘌呤)是未甲基化的。这些序列中任选包含的所有其他胞嘧啶或鸟嘌呤可以是甲基化的或未甲基化的。然而,根据进一步优选的替代方案,CpG基序的C(胞嘧啶)和G(鸟嘌呤)也可以甲基化形式存在。

[0444] 如本文所使用的,术语“本发明组合物”可以指包含至少一种人工核酸的本发明的组合物。同样,在本文中使用的术语“本发明的疫苗”可以指本发明的疫苗,该疫苗基于人工核酸,即包含至少一种人工核酸或包含本发明的包含所述人工核酸的组合物。

[0445] 该组合物可以设计为即用型可注射制剂。例如,它可以配制成适合注射的无菌液体。在这种情况下,它可以作为纳米颗粒的无菌水溶液或无菌水悬浮液提供,优选pH在约4至约9的范围内,或更优选在约4.5至约8.5的范围内。这种液体组合物的渗透压浓度优选为约150至约500mOsmol/kg,更优选为约200至约400mOsmol/kg。如果要静脉内注射组合物,则pH也可以为约4.5至约8,或约5至约7.5;在这种情况下,渗透压浓度优选分别选自约220至约350mOsmol/kg,或约250至约330mOsmol/kg。

[0446] 替代地,可将组合物配制成浓缩形式,其在使用前需要稀释或甚至重构。例如,它可以是液体浓缩物的形式,该液体浓缩物可以是需要用含水溶剂或稀释剂稀释的水性和/或有机液体制剂。如果液体浓缩物包含有机溶剂,则这种溶剂优选选自具有相对低毒性的水混溶性有机溶剂,例如乙醇或丙二醇。

[0447] 在一优选的实施方案中,本发明的组合物作为干制剂提供,以用于与液体载体重构,以便产生适于注射的液体制剂。特别地,干燥制剂可以是无菌粉末或冻干形式,以用于与含水液体载体重构。

[0448] 为了优化其性能、稳定性或耐受性,组合物可任选地包含所需或有用的药物赋形剂。潜在有用的赋形剂包括酸,碱,渗透剂,抗氧化剂,稳定剂,表面活性剂,增效剂,着色剂,增稠剂,填充剂,和(如果需要的)防腐剂。

[0449] 本发明还涉及试剂盒,特别是部件的试剂盒,其包含如本文定义的本发明组合物的成分。换句话说,本发明提供了用于制备任何此类组合物的试剂盒。本发明的药物组合物可以例如在试剂盒的一个或不同部件中,试剂盒包含含有阳离子肽或聚合物和/或类脂质化合物的第一试剂盒组分,和含有该核酸化合物的第二试剂盒组分。

[0450] 例如,第一试剂盒组分可以作为无菌固体组合物,例如冻干形式或粉末提供,或作为无菌液体组合物提供。除阳离子肽或聚合物和/或类脂质外,第一试剂盒组分可包含一种或多种如上所述的非活性成分。类似地,第二试剂盒组分可以配制成例如无菌固体或液体组合物,并且除核酸化合物外还含有一种或多种另外的非活性成分。通过组合和任选地混合两种组分的含量来获得本发明的组合物。任选地,类脂质可以与阳离子肽或聚合物一起容纳在第三试剂盒组分中,而不是第一试剂盒组分中。

[0451] 替代地,但也在本发明的范围内,提供了试剂盒,其包含第一试剂盒组分,第一试剂盒组分包含至少一种阳离子肽或聚合物,至少一种类脂质,和至少一种核酸化合物或至

少一种核酸序列或包含核酸序列的疫苗,配制为例如无菌固体或液体制剂,所述第一试剂盒组分任选地包含至少一种如本文所定义的其他组分,例如药物载体或载体;和第二试剂盒组分,其包含用于溶解或分散第一试剂盒组分的内容物的液体载体,以获得如上所述的本发明的组合物。同样,试剂盒组分优选以无菌形式提供,无论是固体还是液体,并且它们中的每一种可以包含一种或多种另外的赋形剂或非活性成分。

[0452] 在试剂盒或部件的试剂盒包含多个核酸序列的情况下,试剂盒的一种组分可以仅包含在试剂盒中包含的一个、几个或所有核酸序列。在一个替代实施方案中,每一个/每个核酸序列可以包含在试剂盒的不同/单独的组分中,使得每个组分形成试剂盒的部件。此外,可以在作为试剂盒的一部分的第一组分中包含一种以上的核酸,而一种或多种其他(第二种、第三种等)组分(提供试剂盒的一种或多种其他部件)可以包含一种或多种核酸,所述核酸可以与第一种组分的核酸相同或部分相同或不同。

[0453] 任选地,上述任何试剂盒组分被配制代表浓缩物,该浓缩物是固体形式或者液体形式,并且可以设计成由生物相容的或生理学上可耐受的液体载体稀释,所述液体载体可以任选地不是试剂盒的部件,例如无菌盐水溶液,无菌缓冲液或其他常用作注射药物的液体稀释剂的溶液。

[0454] 在可注射制剂的情形中,表述“液体载体”通常是指具有生理学上可接受的组成、pH和渗透压浓度的良好耐受的水性可注射液体组合物。

[0455] 所述试剂盒或部件的试剂盒可以进一步包含技术说明书,其具有关于核酸序列,本发明的药物组合物或其组分或部件中的任何一种的施用和剂量的信息,例如,如果试剂盒是作为部件的试剂盒制备的话。

[0456] 如上所述的纳米颗粒、试剂盒和组合物特别适用于将核酸被运载物递送至活细胞,例如用核酸转染细胞。这可以用于科学研究目的,诊断应用或治疗。在一个优选的实施方案中,纳米颗粒或组合物用作药物。

[0457] 如本文所使用的,“药物”是指可用于预防,防止,治疗,治愈,姑息治疗,改善,控制,改善,延迟,稳定疾病或病症,或防止或延迟疾病或病症的复发或传播(包括防止,治疗或改善疾病或病症的任何症状)的任何化合物,材料,组合物或制剂。

[0458] 为了适合用作诊断剂或体内药物,本发明的组合物可以以液体形式提供,其中每种组分可以以溶解或分散(例如悬浮或乳化)形式独立地掺入。例如,组合物可以是无菌水溶液的形式,其适于通过注射施用给受试者。在另一优选的实施方案中,将组合物配制成无菌固体组合物,例如无菌粉末或冻干形式,以用于与含水液体载体重构。

[0459] 在进一步优选的实施方案中,如本文所述的纳米颗粒和/或组合物用于预防、治疗和/或改善与肽或蛋白缺乏相关的疾病。因此,本发明还涉及纳米颗粒和/或组合物在制备用于预防、治疗和/或改善与肽或蛋白缺乏相关的疾病的药物中的用途。此外,本发明提供了治疗处于与肽或蛋白缺乏相关的疾病或病症的风险中或受与肽或蛋白缺乏相关的疾病或病症影响的受试者的方法,该方法包括将纳米颗粒和/或组合物施用给受试者。

[0460] 本发明还提供了人工核酸、包含至少一种人工核酸的本发明的组合物、本文所述的本发明的多肽、包含至少一种本发明的多肽或本发明的疫苗的本发明的组合物或包含它们的试剂盒的若干应用和用途。特别地,本发明的(药物)组合物或本发明的疫苗可以用于人类和兽医医学目的,优选用于人类医学目的,通常用作药物组合物或用作疫苗。

[0461] 在另一方面,本发明提供了人工核酸,包含至少一种人工核酸的本发明的组合物,如本文所述的本发明的多肽,包含至少一种本发明的多肽的本发明的组合物,本发明的疫苗或本发明的试剂盒或部件的试剂盒在用于预防(暴露前预防或暴露后预防)和/或治疗例如病毒感染的方法中的用途。因此,在另一方面,本发明涉及人工核酸,包含至少一种本文公开的人工核酸的本发明的组合物,如本文所述的本发明的多肽,包含至少一种本发明的多肽的本发明的组合物,如本文所定义的本发明的疫苗或本发明的试剂盒或部件的试剂盒作为药物的第一医学用途。特别地,本发明提供了如本文所定义的包含至少一个编码区的人工核酸或如本文所述的其片段或变体在用于制备药物中的用途,所述编码区编码包含至少一种例如病毒蛋白或肽的至少一种多肽。

[0462] 根据另一方面,本发明涉及如本文所公开的人工核酸,包含至少一种本文公开的人工核酸的本发明的组合物,如本文所述的本发明的多肽,包含至少一种本发明的多肽的本发明的组合物,本发明的疫苗或本发明的试剂盒或部件的试剂盒用于治疗例如病毒感染或与感染有关的疾病或病症的第二医学用途。

[0463] 本发明的组合物或本发明的疫苗,特别是包含至少一种本文公开的人工核酸的本发明的组合物,本文所述的本发明的多肽或包含至少一种本发明的多肽的本发明的组合物可以例如全身或者局部施用。用于全身施用的途径通常包括例如透皮,口服,肠胃外途径,包括皮下,静脉内,肌肉内,动脉内,皮内和腹膜内注射,前房内,结膜下,眼球筋膜下,眼球后,局部和/或后部巩膜内施用,施用到睫状肌内和/或鼻内施途径。用于局部施用的途径通常包括例如局部施途径,而且包括皮内,透皮,皮下或肌内注射或病灶内,经颅内,肺内,心内和舌下注射。更优选地,疫苗可以通过皮内,皮下或肌肉内途径施用。因此,本发明的疫苗优选配制成液体(或有时是固体)形式。优选地,本发明的疫苗可以通过常规针注射或无针喷射注射施用。在一优选的实施方案中,本发明的疫苗或组合物可以通过本文定义的喷射注射施用,优选肌肉内或皮内,更优选皮内施用。

[0464] 在优选的实施方案中,单剂量的人工核酸、组合物或疫苗包含特定量的本文公开的人工核酸。优选地,人工核酸以每剂量至少40 μ g的量提供,优选以每剂量40至700 μ g的量提供,更优选以每剂量80至400 μ g的量提供。更具体地,在优选通过使用常规针进行皮内注射的情况下,包含在单剂量中的本发明的人工核酸的量通常为至少200 μ g,优选200 μ g至1000 μ g,更多优选300 μ g至850 μ g,甚至更优选300 μ g至700 μ g。在优选通过喷射注射(例如使用Tropis装置)进行皮内注射的情况下,单剂量中包含的人工核酸的量通常为至少80 μ g,优选80 μ g至700 μ g,更优选80 μ g至400 μ g。此外,在优选通过使用常规针或通过喷射注射进行肌内注射的情况下,单剂量中包含的人工核酸的量通常为至少80 μ g,优选80 μ g至1000 μ g,更优选80 μ g至850 μ g,甚至更优选80 μ g至700 μ g。

[0465] 用于治疗或预防例如病毒感染免疫的免疫方案,即受试者针对例如病毒的免疫接种通常包含一系列单剂量或配量的本发明的组合物或本发明的疫苗。如本文所使用的,单一剂量分别指初始/第一剂量,第二剂量或任何其他剂量,其优选施用以“增强”免疫反应。

[0466] 根据优选的实施方案,本文公开的人工核酸,包含本文公开的至少一种人工核酸的本发明的组合物,如本文所述的本发明的多肽,包含本发明的至少一种多肽的本发明的组合物,本发明的疫苗或本发明的试剂盒或部件的试剂盒提供了用于治疗或预防,优选治疗或预防例如治疗或预防病毒感染或相关病症或疾病,其中治疗或预防包括施用另外的活

性药物成分。更优选地,在基于本发明的人工核酸的本发明的疫苗或组合物的情况下,多肽可以作为另外的活性药物成分共同施用。例如,可以共同施用至少一种例如如本文所述的病毒蛋白或肽,或其片段或变体,以诱导或增强免疫应答。同样地,在基于本文所述的本发明多肽的本发明的疫苗或组合物的情况下,如本文所述的人工核酸可以作为另外的活性药物成分共同施用。例如,可以共同施用如本文所述的编码如本文所述的至少一种多肽的人工核酸,以诱导或增强免疫应答。

[0467] 本发明的疫苗或组合物的另一组分可以是免疫治疗剂,其可以选自免疫球蛋白,优选IgG,单克隆或多克隆抗体,一种或者多种多克隆血清等,最优选免疫球蛋白,例如针对例如病毒的免疫球蛋白。优选地,这种另外的免疫治疗剂可以作为肽/蛋白提供,或者可以由核酸编码,优选由DNA或RNA编码,更优选由mRNA编码。除了由本发明的人工核酸或本发明的多肽触发的主动疫苗接种之外,这种免疫治疗剂还允许提供被动疫苗接种。

[0468] 在另一方面,本发明提供治疗或预防病症的方法,其中所述病症优选为感染例如病毒与感染例如病毒有关的病症,其中所述方法包括向有需要的受试者施用本文公开的人工核酸,包含本文公开的至少一种人工核酸的本发明的组合物,如本文所述的本发明的多肽,包含至少一种发明的多肽的本发明的组合物,本发明的疫苗或本发明的试剂盒或部件的试剂盒。

[0469] 特别地,这种方法可以优选地包括以下步骤:

a) 提供如本文公开的人工核酸,包含本文公开的至少一种人工核酸的本发明的组合物,如本文所述的本发明的多肽,包含至少一种发明的多肽的本发明的组合物,本发明的疫苗或本发明的试剂盒或部件的试剂盒;

b) 向组织或生物体应用或施用如本文公开的人工核酸,包含本文公开的至少一种人工核酸的本发明的组合物,如本文所述的本发明的多肽,包含至少一种发明的多肽的本发明的组合物,本发明的疫苗或本发明的试剂盒或部件的试剂盒;

c) 任选地针对例如病毒施用免疫球蛋白(IgG)。

[0470] 根据另一方面,本发明还提供了用于表达至少一种多肽或其片段或变体的方法,所述多肽包含例如至少一种病毒,其中该方法优选包括以下步骤:

a) 提供包含至少一个编码区的本发明的人工核酸,所述至少一个编码区编码包括例如至少一种病毒的至少一种多肽或其片段或变体,优选如本文所定义的,或提供包含所述人工核酸的组合物;以及

b) 将本发明的人工核酸或包含所述人工核酸的本发明组合物应用或施用于表达系统,例如,无细胞表达系统,细胞(例如表达宿主细胞或体细胞),组织或生物体。

[0471] 该方法可以应用于实验室,用于研究,用于诊断,用于商业生产肽或蛋白和/或用于治疗目的。在这种情况下,通常在制备如本文定义的本发明的人工核酸或本文定义的本发明的组合物或疫苗后,通常将其应用或施用于无细胞表达系统,细胞(例如表达宿主细胞或体细胞),组织或生物体,例如以裸露或复合形式或作为本文所述的(药物)组合物或疫苗,优选通过转染或通过使用本文所述的任何施用方式进行。该方法可以在体外、体内或离体(ex vivo)进行。该方法还可以在治疗特定疾病的背景下进行,特别是在治疗感染性疾病或相关病症中进行。

[0472] 在本文中,体外定义为将本文定义的本发明的人工核酸或本文定义的本发明的组

合物或疫苗转染或转导到生物体外的培养基中的细胞中；本文将体内定义为通过将本发明的mRNA或本发明的组合物或疫苗应用于整个生物体或个体而将本发明的人工核酸或本发明的组合物或疫苗转染或转导到细胞中，并且离体在本文中定义为将本发明的人工核酸或本发明的组合物或疫苗转染或转导到生物体或个体外的细胞中，随后将转染的细胞应用于生物体或个体。

[0473] 同样地，根据另一方面，本发明还提供如本文所定义的本发明的人工核酸或如本文所定义的本发明的组合物或疫苗，优选用于诊断或治疗目的，用于表达例如编码的病毒抗原肽或蛋白中的用途，例如，通过将本文定义的本发明的人工核酸或本文定义的本发明的组合物或疫苗应用或施用于例如，无细胞表达系统，细胞（例如表达宿主细胞或体细胞），组织或生物体实现。该用途可以应用于（诊断）实验室，用于研究，诊断，用于肽或蛋白的商业生产和/或用于治疗目的。在这种情况下，通常在制备如本文定义的本发明的人工核酸或本文定义的本发明的组合物或疫苗后，通常将其应用或施用于无细胞表达系统，细胞（例如表达宿主细胞或体细胞），组织或生物体，优选以裸露形式或复合形式，或作为本文所述的（药物）组合物或疫苗进行，优选通过转染或通过使用本文所述的任何施用模式进行。该用途可以在体外、体内或离体进行。此外，该用途可以在治疗特定疾病的背景下进行，特别是在治疗例如病毒感染或相关疾病时进行。

[0474] 在一特别优选的实施方案中，本发明提供了如本文所定义的人工核酸，本发明的组合物或本发明的疫苗用于如本文所定义的用途，优选用于用作药物的用途，用于治疗或预防中的用途，优选治疗或预防例如病毒感染或相关疾病中的用途，或用于用作疫苗的用途。

[0475] 组合物或疫苗可以通过常规针头注射或无针头喷射注射施用例如进入肿瘤组织中，邻近和/或紧密接近肿瘤组织。在优选的实施方案中，本发明的组合物或本发明的药物组合物通过喷射注射施用。喷射注射是指无针注射方法，其中包含本发明的组合物和任选的其他合适赋形剂的流体被迫通过孔口，从而产生能够穿透哺乳动物皮肤的超细液体高压液体流。原则上，液体流在皮肤中形成孔，液体流通过该孔被推入目标组织，例如，肿瘤组织中。因此，可以使用喷射注射，例如用于肿瘤内应用本发明的组合物。

[0476] 在其他实施方案中，本发明的组合物或本发明的药物组合物可以口服，胃肠外，通过吸入喷雾，局部，直肠，鼻腔，口腔，阴道或通过植入的储库施用。本文所用的术语肠胃外包括皮下，静脉内，肌肉内，关节内，结内，滑膜内，胸骨内，鞘内，肝内，病灶内，颅内，透皮，皮内，肺内，腹膜内，心内，动脉内，前房内，结膜下，眼球筋膜下，眼球后，局部，和/或后巩膜旁施用，施用到睫状肌内以及舌下注射或输注技术。

[0477] 进一步特别优选的施用途径是皮内和肌内注射。

[0478] 尽管如此，本发明的药物组合物可以包含其他组分，以用于促进药物组合物的组分的施用和摄取。这些其他组分可以是合适的载体或载体，抗菌剂和/或抗病毒剂。

[0479] 本发明的药物组合物的其他组分可以是免疫治疗剂，该免疫治疗剂可以选自免疫球蛋白，优选IgG，单克隆或多克隆抗体，一种或多种多克隆血清等。优选地，这种其他免疫治疗剂可以作为肽/蛋白提供，或者可以由核酸编码，优选由DNA或RNA编码，更优选由mRNA编码。

[0480] 本发明的药物组合物通常包含“安全有效量”的本发明药物组合物的组分，特别是

“安全有效量”的如本文所定义的RNA分子。如本文所使用的，“安全有效量”是指如本文所定义的RNA分子的足以显著诱导对例如肿瘤或癌症的阳性修改的量。然而，与此同时，“安全有效量”足够小，可以避免严重的副作用，并且能在优势和风险之间建立合理的关系。确定这些限制通常属于合理的医学判断范围。

[0481] 本发明的药物组合物通常可作为药物组合物用于人类医学目的以及还用于兽医医学目的，优选用于人类医学目的。

[0482] 本发明还提供了如本文所定义的核酸序列，包含本文所定义的多个核酸序列的本发明的组合物，包含本文定义的核酸序列的药物组合物或包含它们的试剂盒的若干应用和用途。

[0483] 根据一个具体的方面，本发明涉及如本文所定义的核酸序列或包含如本文所定义的多种核酸序列的本发明的组合物作为药物的第一医学用途，特别是在基因治疗中，优选用于治疗本文定义的疾病中的第一医学用途。

[0484] 根据另一方面，本发明涉及如本文所定义的核酸序列或包含如本文所定义的多个核酸序列的本发明的组合物用于治疗本文所定义的疾病的第二医学用途，优选涉及本文所定义的核酸序列，包含多个如本文所定义的核酸序列的本发明的组合物，包含它们的药物组合物或包含它们的试剂盒在制备用于预防，治疗和/或改善本文定义的疾病的药物中的用途。优选地，为此目的，将药物组合物用于或施用于有需要的患者。

[0485] 优选地，本文提及的疾病优选选自感染性疾病，肿瘤（例如癌症或肿瘤疾病），血液和血液形成器官的疾病，内分泌，营养和代谢疾病，神经系统疾病，循环系统疾病，呼吸系统疾病，消化系统疾病，皮肤和皮下组织疾病，肌肉骨骼系统和结缔组织疾病，以及泌尿生殖系统疾病。

[0486] 在这种情况下，特别优选的是遗传性疾病，所述遗传性疾病选自：1p36缺失综合征；18p缺失综合征；21-羟化酶缺乏症；45,X（特纳综合征）；47,XX,+21（唐氏综合征）；47,XXX（三倍X综合征）；47,XXY（克莱恩费尔特（Klinefelter）综合征）；47,XY,+21（唐氏综合征）；47,XYY综合征；5-ALA脱水酶缺陷性卟啉症（ALA脱水酶缺乏症）；5-氨基乙酰丙酸脱水酶缺乏性卟啉症（ALA脱水酶缺乏症）；5p缺失综合征（猫叫综合征（Cri du chat））5p-综合征（猫叫综合征）；A-T（共济失调-毛细血管扩张症）；AAT（ α -1抗胰蛋白酶缺乏症）；没有输精管（先天性双侧输精管缺如）；缺乏脉管（先天性双侧输精管缺如）；无铜蓝蛋白血症；ACG2（软骨发生II型）；ACH（软骨发育不全）；软骨发生II型；软骨发育不全；酸性 β -葡萄糖苷酶缺乏症（戈谢病1型）；尖头并指（Apert）（Apert综合征）；尖头并指，V型（Pfeiffer综合征）；头畸形（Apert综合征）；急性脑戈谢病（戈谢病2型）；急性间歇性卟啉症；ACY2缺乏症（海绵状脑白质营养不良病）；AD（阿尔茨海默病）；阿德莱德型颅缝早闭症（Muenke综合征）；腺瘤性结肠息肉病（家族性腺瘤性息肉病）；结肠腺瘤性息肉病（家族性腺瘤性息肉病）；ADP（ALA脱水酶缺乏症）；腺苷酸琥珀酸裂解酶缺乏；肾上腺疾病（21-羟化酶缺乏症）；肾上腺素综合征（21-羟化酶缺乏症）；肾上腺脑白质营养不良；AIP（急性间歇性卟啉症）；AIS（雄激素不敏感综合征）；AKU（尿黑酸尿）；ALA脱水酶卟啉症（ALA脱水酶缺乏症）；ALA-D卟啉症（ALA脱水酶缺乏症）；ALA脱水酶缺乏症；尿黑尿症（alkaptonuria）；亚历山大病；尿黑酸尿；尿黑酸黄褐病（alkaptonuria）； α -1抗胰蛋白酶缺乏症； α -1蛋白酶抑制剂（ α -1抗胰蛋白酶缺乏症）； α -1相关肺气肿（ α -1抗胰蛋白酶缺乏症）； α -半乳糖苷酶A缺乏症（法布里氏病）；ALS（肌萎缩侧

索硬化症);阿耳斯特雷姆(氏)综合征;ALX(亚历山大病);阿尔茨海默病;釉质生长不全;氨基乙酰丙酸脱水酶缺乏症(ALA脱水酶缺乏症);氨酰化酶2缺乏症(Canavan病);肌萎缩侧索硬化症;安德森-法布里氏病(法布里氏病);雄激素不敏感综合征;贫血;贫血,遗传性铁粒细胞(X-连锁的铁粒细胞性贫血);贫血,性连锁的低色素副成纤维细胞(X连锁的铁粒细胞性贫血);贫血,脾脏,家族性(戈谢病);安格曼综合征;弥漫性躯体性血管角化瘤(法布里氏病);弥漫性血管角化瘤(法布里氏病);视网膜血管瘤病(希佩尔·林道(von Hippel-Lindau)病);ANH1(X连锁的铁粒细胞性贫血);APC耐药,莱顿突变(Leiden)型(莱顿第五因子血栓形成倾向);阿佩尔氏综合征(Apert Syndrome);AR缺乏症(雄激素不敏感综合征);AR-CMT2ee(2型腓骨肌萎缩症(Charcot-Mare-Toot));蜘蛛样指综合征(Arachnodactyly)(马凡氏综合征);ARNSHL(非综合征性耳聋常染色体隐性遗传);关节病-眼病(Arthroophthalmopathy),遗传性进展(Stickler综合征COL2A1);先天性关节松弛症(Arthrochhalasis multiplex congenita)(埃勒斯-多洛斯综合征型(Ehlers-Danlos syndrome arthrochhalasia type));AS(安格尔曼(Angelman)综合征);Aspa缺乏症(海绵状脑白质营养不良(Canavan)病);Aspa缺乏症(海绵状脑白质营养不良病);天冬氨酸酶缺乏症(海绵状脑白质营养不良病);共济失调-毛细血管扩张;自闭症-痴呆-共济失调-有目的手部使用综合征(雷特(Rett)综合征);常染色体显性遗传性幼年ALS(4型肌萎缩侧索硬化症);常染色体显性遗传的opitz G/BBB综合征(22q11.2缺失综合征);常染色体隐性遗传形式的幼年ALS 3型(肌萎缩侧索硬化2型);常染色体隐性遗传性非综合征性听力损失(非综合征性耳聋常染色体隐性遗传);常染色体隐性遗传性感觉神经性听力损伤和甲状腺肿(彭德莱综合征(Pendred syndrome));AxD(亚历山大病);艾尔扎(Ayerza)综合征(原发性肺动脉高压);己糖胺酶GM2神经节苷脂病的B变体(Sandhoff病);BANF(神经纤维瘤病2);脓疱性皮肤忍受-史蒂文森(Beare-Stevenson cutis gyrate)综合征;良性阵发性腹膜炎(地中海热,家族性);本杰明综合征;B地中海贫血;BH4缺乏症(四氢生物蝶呤缺乏症);双侧声学神经纤维瘤病(神经纤维瘤(Neurofibromatosis)2);生物素酶缺乏;膀胱癌;出血性疾病(莱顿第五因子血栓形成倾向);布洛赫苏尔茨伯格(Bloch-Sulzberger)综合征(色素失禁症(incontinentia pigmenti));布卢姆综合征;骨病;骨髓疾病(X连锁的铁粒细胞性贫血);博尼维乌尔里奇(Bonnevie-Ullrich)综合征(特纳综合征);伯恩维尔病(结节性硬化症);结节性硬化症(Bourneville phakomatosis)(结节性脑硬化(tuberous sclerosis));脑疾病(朊病毒病);乳腺癌;Birt-Hogg-Dubé综合征;脆性骨病(成骨不全);广泛拇指-拇趾综合征(阔拇指巨趾综合征(Rubinstein-Taybi)综合征);青铜糖尿病(血色素沉着症);青铜色肝硬化(血色素沉着症);球脊髓的(Bulbospinal)肌肉萎缩,X连锁(肯尼迪病);急腹症-高脂血症(Burger-Grutz)综合征(脂蛋白脂肪酶缺乏症,家族性);遗传性多发梗死痴呆病(CADASIL);CGD慢性肉芽肿病;发生异常的发育不良;海绵状脑白质营养不良病;癌症;癌症家族综合征(遗传性非息肉病性结直肠癌);乳腺的癌(乳腺癌);膀胱的癌(膀胱癌);羧化酶缺乏症,多发性、晚发性症(生物素酶缺乏症);心肌病翼状颈(努南(noonan)综合征);猫叫综合征(Cri du chat);CAVD(先天性双侧输精管缺如);凯勒(Caylor)贲门综合征(22q11.2缺失综合征);CBAVD(先天性双侧输精管缺如);乳糜泻;CEP(先天性红细胞生成性卟啉症);神经酰胺三己糖苷酶缺乏症(法布里氏病);小脑视网膜血管瘤病,家族性(希佩尔·林道综合征(von Hippel-Lindau disease));伴有皮层下梗死和脑白质病的脑动脉病(CADASIL);

伴有皮质下梗死和脑白质病的脑常染色体显性遗传病(遗传性多发梗死痴呆病(CADASIL));脑硬化(结节性硬化症);脑血管性高血氨症(雷特(Rett)综合征);脑苷脂质病综合征(戈谢病);CF(囊性纤维化);CH(先天性甲状腺功能减退症);夏科氏(Charcot)病(肌萎缩侧索硬化症);腓骨肌萎缩症(Charcot-marie-tooth disease);软骨发育不良(软骨发育不全);软骨营养不良综合征(软骨发育不全);具有感觉神经性耳聋的软骨营养不良(耳脊椎骨骺发育不良(otospondylomegaepiphyseal dysplasia));软骨发育不全(软骨发生,II型);舞蹈手足徐动症自残高尿酸血症综合征(莱施-尼汉(Lesch-Nyhan)综合征);经典半乳糖血症(半乳糖血症);经典埃勒斯-当洛斯综合征(典型Ehlers-Danlos综合征);典型苯丙酮尿症(苯丙酮尿症);唇腭裂(斯蒂克勒(Stickler)综合征);具有致死性侏儒症的首蓓叶状颅骨(Cloverleaf skull with thanatophoric dwarfism)(致死性发育不良2型(Thanatophoric dysplasia type 2));CLS(科-勒二氏(Coffin-Lowry)综合征);CMT(腓骨肌萎缩症(Charcot-marie-tooth disease));柯凯因氏综合征(Cockayne Syndrome);科-勒二氏综合征;胶原病,II型和XI型;结肠癌,家族性非息肉病(遗传性非息肉病性结直肠癌);结肠癌,家族性(家族性腺瘤性息肉病);结直肠癌;完全HPRT缺乏症(莱施-尼汉(Lesch-Nyhan)综合征);完全次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶缺乏症(莱施-尼汉(Lesch-Nyhan)综合征);压迫性神经病变(遗传性压迫易感性麻痹神经病);先天性肾上腺皮质增生(21-羟化酶缺乏症);先天性双侧输精管缺如(先天性输精管缺如);先天性红细胞生成性卟啉症;先天性心脏病;先天性髓鞘形成(腓骨肌萎缩症(Charcot-marie-tooth disease)1型/腓骨肌萎缩症(Charcot-marie-tooth disease)4型);先天性甲状腺功能减退症;先天性高铁血红蛋白血症(高铁血红蛋白血症先天性高铁血红蛋白血症);先天性骨硬化(软骨发育不全);先天性铁粒细胞性贫血(X连锁性铁粒细胞性贫血);结缔组织病;锥体动脉异常面综合征(22q11.2缺失综合征);库利氏(Cooley)贫血症(重型B地中海贫血症);铜贮存病(威尔逊(Wilson)病);铜转运病(门克斯病);粪卟啉症(Coproporphria),遗传性(遗传性粪便);粪卟啉原氧化酶缺乏症(遗传性粪便);考登综合征;CPO缺乏症(遗传性粪便);CPO缺乏症(遗传性粪便);CPX缺乏症(遗传性粪便);颅面关节病(颅面狭窄症(Crouzon)综合征);颅面部发育不良(颅面狭窄症(Crouzon)综合征);克汀病(先天性甲状腺功能减退症);克雅氏(Creutzfeldt-Jakob)病(朊病毒病);猫叫综合征(Cri du chat)(克罗恩病,纤维化);颅面狭窄症(Crouzon)综合征;颅面狭窄症(Crouzon)综合征伴发黑棘皮病(柯鲁松氏征伴黑棘皮症(Crouzonodermoskeletal syndrome));柯鲁松氏征伴黑棘皮症(Crouzonodermoskeletal)综合征;CS(Cockayne综合征)(Cowden综合征);库施曼-巴滕-施泰纳特(Curschmann-Batten-Steinert)综合征(肌强直性营养不良);比耶-史蒂文森的回状皮肤综合征(cutis gyrata syndrome of Beare-Stevenson)(比耶-史蒂文森回状皮肤综合征);紊乱突变染色体;D-甘油酸脱氢酶缺乏症(原发性高草酸尿症);斑点干骺端综合征(脊椎干骺端发育不良(spondyloepimetaphyseal dysplasia),Strudwick型);DAT-痴呆症阿尔茨海默氏症(阿尔茨海默病);遗传性高钙尿症(登特病(Dent's disease));DBMD(肌营养不良症,杜兴型(Duchenne)和贝克尔(Becker)型);患有甲状腺肿的耳聋(彭德莱综合征(Pendred综合征));耳聋-视网膜色素变性综合征(亚瑟(Usher)综合征);缺乏症,苯丙氨酸羟化酶(苯丙酮尿症);退行性神经疾病;德-格鲁希(de Grouchy)综合征1(德-格鲁希综合征);德热里纳-索塔斯(Dejerine-Sottas综合征)(腓骨肌萎缩症(Charcot-Marie-Tooth

disease); δ -氨基乙酰丙酸(Delta-aminolevulinate)脱水酶缺乏性卟啉症(ALA脱水酶缺乏症);老年痴呆症(遗传性多发梗死痴呆病(CADASIL));脱髓鞘性脑白质营养不良(亚历山大病);皮肤挛缩型埃勒斯-当洛斯(Ehlers-Danlos)综合征(埃勒斯-当洛斯综合征皮肤挛缩型);皮肤脆裂症(Dermatosparaxis)(埃勒斯-当洛斯综合征皮肤挛缩型);发育障碍;dHMN(肌萎缩侧索硬化症4型);DHMN-V(远端脊髓性肌萎缩,V型);DHTR缺乏症(雄激素不敏感综合征);弥漫性球囊硬化症(克拉伯病);迪乔治综合征;二氢睾酮受体缺乏症(雄激素不敏感综合征);远端脊髓性肌萎缩,V型;DM1(肌强直性营养不良1型);DM2(肌强直性营养不良2型);唐氏综合征;DSMAV(远端脊髓性肌萎缩,V型);DSN(腓骨肌萎缩症(Charcot-marie-tooth disease)4型);DSS(腓骨肌萎缩症病,4型);杜兴型/贝克尔型肌营养不良症(肌营养不良症,杜兴型和贝克尔型类型);矮小,软骨发育不全(软骨发育不全);矮小,比非嗜性(比发育不良);侏儒症;侏儒症-视网膜萎缩-耳聋综合征(科凯恩氏(Cockayne)综合征);脱髓鞘遗传性脑白质营养不良(dysmyelinogenic leukodystrophy)(亚历山大病);紧张性肌营养不良(Dystrophia myotonica)(肌强直性营养不良);视网膜色素变性视网膜色素沉着综合征(亚瑟(Usher)综合征);早发性家族性阿尔茨海默病(EOFAD)(阿尔茨海默病);EDS(埃勒斯-当洛斯综合征);埃勒斯-当洛斯综合征;埃克曼-洛普斯坦(Ekman-Lobstein病)(成骨不全);诱捕神经病变(遗传性压迫易感性麻痹神经病(hereditary neuropathy with liability to pressure palsies));结节硬化病(Epilepsia)(结节性硬化症);EPP(红细胞生成性原卟啉);成红细胞性贫血(β 地中海贫血);红细胞原卟啉症(红细胞生成性原卟啉);红细胞5-氨基乙酰丙酸合成酶缺乏症(X-连锁性铁粒细胞性贫血);红细胞生成性卟啉症(先天性红细胞生成性卟啉症);红细胞生成性原卟啉;红细胞生成性尿路结石(先天性红细胞生成性卟啉症);眼癌(视网膜母细胞瘤FA-共济失调(FA-Friedreich ataxia));法布里氏病;面部损伤和紊乱;莱顿第五因子血栓形成倾向;FALS(肌萎缩侧索硬化症);家族性听神经瘤(II型神经纤维瘤病);家族性腺瘤性息肉病;家族性阿尔茨海默病(FAD)(阿尔茨海默病);家族性肌萎缩侧索硬化症(肌萎缩侧索硬化症);家族性自主神经功能障碍;家族性脂肪诱导的高甘油三酯血症(脂蛋白脂肪酶缺乏症,家族性);家族性血色素沉着症(血色素沉着症);家族性LPL缺乏症(脂蛋白脂肪酶缺乏症,家族性);家族性非息肉病性结肠癌(遗传性非息肉病性结直肠癌);家族性阵发性多浆膜炎(地中海热,家族性);家族性PCT(迟发性皮肤卟啉症(porphyrria cutanea tarda));家族性压力敏感性神经病变(遗传性压迫易感性麻痹神经病);家族性原发性肺动脉高压(FPPH)(原发性肺动脉高压);家族性特纳综合征(努南综合征);家族性血管性脑白质病(CADASIL);FAP(家族性腺瘤性息肉病);FD(家族性自主神经);女性伪特纳综合征(努南综合征);亚铁螯合酶(ferrochelatase)缺乏症(红细胞生成原卟啉症);铁转运蛋白病(4型血色素沉着症);发烧(地中海热,家族性);FG综合征;FGFR3相关性冠状动脉综合征(明克(Muenke)综合征);星形胶质细胞的纤维蛋白样变性(亚历山大病);胰腺纤维囊性病(囊性纤维化);FMF(地中海热,家族性);佛伦(Folling)疾病(苯丙酮尿症);脆性(X)染色体综合征(脆性X综合征);脆性X综合征;骨脆症(Fragilitas ossium)(成骨不全);FRAXA综合征(脆性X综合征);FRDA(弗里德赖希共济失调);弗里德赖希共济失调(弗里德赖希的共济失调);弗里德赖希共济失调;FXS(脆性X综合征);G6PD缺乏症;半乳糖激酶缺乏症(半乳糖血症);半乳糖-1-磷酸尿苷酶-转移酶缺乏症(半乳糖血症);半乳糖血症;半乳糖苷酶缺乏症(克拉伯病);半乳糖神经酰胺脂质沉积症(克拉伯病);半乳

糖脑苷脂酶缺乏症(克拉伯病);半乳糖鞘脂沉积症(克拉伯病);GALC缺乏症(克拉伯病);GALT缺乏症(半乳糖血症);戈谢病;戈谢样病(伪戈谢病);GBA缺乏症(戈谢病1型);GD(戈谢病);遗传性肺部疾病;遗传性肺气肿(α -1抗胰蛋白酶缺乏症);遗传性血色素沉着症(血色素沉着症);巨细胞肝炎,新生儿(新生儿血色素沉着症);GLA缺乏症(法布里氏病);胶质母细胞瘤,视网膜(视网膜母细胞瘤);胶质瘤,视网膜(视网膜母细胞瘤);球形细胞脑白质营养不良(GCL,GLD)(克拉伯病);球形细胞脑白质病(克拉伯病);葡萄糖脑苷脂酶缺乏症(戈谢病);葡糖脑苷沉积病(Glucoocerebrosidosis)(戈谢病);葡萄糖脑苷脂病(戈谢病);葡萄糖神经酰胺酶缺乏症(戈谢病);葡萄糖神经酰胺 β -葡萄糖苷酶缺乏症(戈谢病);葡萄糖神经酰胺脂质沉积症(戈谢病);甘油酸尿症(原发性高草酸尿症);甘氨酸脑病(非酮症高甘氨酸血症);乙醇酸尿症(原发性高草酸尿症);GM2神经节苷脂病,1型(家族黑蒙性白痴(Tay-Sachs)病);甲状腺肿-耳聋综合征(彭德莱综合征(Pendred)综合征);遗传性耳聋-色素性视网膜炎(Graefe-Usher)综合征(Usher综合征);格-斯(Gronblad-Strandberg)综合征(弹力纤维性假黄瘤(pseudoxanthoma elasticum));冈特卟啉症(Guenther porphyria)(先天性红细胞生成性卟啉症);冈瑟病(先天性红细胞生成性卟啉症);血色病(血色素沉着症);哈尔格林(Hallgren)综合征(Usher综合征);丑角鱼鳞病;Hb S病(镰状细胞性贫血);HCH(软骨发育不全);HCP(遗传性粪便);头部和大脑畸形;听力障碍和耳聋;儿童听力问题;HEF2A(2型血色病);HEF2B(2型血色病);血卟啉症(卟啉症);血红素合成酶缺乏症(红细胞生成性原卟啉);血色素沉着症(血色病);血色病;血红蛋白M病(高铁血红蛋白血症 β -珠蛋白型);血红蛋白S病(镰状细胞性贫血);血友病;HEP(肝细胞生成性卟啉症);肝AGT缺乏症(高草酸尿症,原发性);肝细胞生成性卟啉症;肝豆状核变性综合征(威尔逊(Wilson)病);遗传性关节镜眼病(斯蒂克勒(Stickler)综合征);遗传性粪便;遗传性异位性脂肪变性(法布里氏病);遗传性血色素沉着症(HHC)(血色病);遗传性包涵体肌病(骨骼肌再生);遗传性铁负荷性贫血(X连锁性铁粒细胞性贫血);遗传性运动和感觉神经病(腓骨肌萎缩症(Charcot-marie-tooth disease));遗传性运动神经元病(脊髓性肌萎缩);遗传性运动神经元病,V型(远端脊髓性肌萎缩,V型);遗传性多发性外生骨疣;遗传性非息肉病性结直肠癌;遗传性周期性发热综合征(地中海热,家族性);遗传性结肠息肉病(Polyposis Coli)(家族性腺瘤性息肉病);遗传性肺气肿(α -1抗胰蛋白酶缺乏症);对活化蛋白C的遗传抗性(莱顿第五因子血栓形成倾向);遗传性感觉和自主神经病变III型(家族性自主神经功能障碍);遗传性痉挛性截瘫(婴儿期发作性上行遗传性痉挛性麻痹);遗传性脊柱共济失调(弗里德赖希(Friedreich)共济失调);遗传性脊髓硬化症(弗里德赖希共济失调);赫里克(Herrick)贫血症(镰状细胞性贫血);杂合子OSMED(韦-兹(Weissenbacher-Zweymüller)综合征);杂合性异孔孔虫(耳脊椎骨骺发育不良(otospondylomegapiphyseal dysplasia)(韦-兹综合征);HexA缺乏症(家族黑蒙性白痴(Tay-Sachs)病);己糖胺酶A缺乏症(家族黑蒙性白痴病);己糖胺酶 α -亚基缺乏症(变体B)(家族黑蒙性白痴病);HFE相关血色素沉着症(血色素沉着症);HGPS(儿童的早衰症(Progeria));希佩尔林道(Hippel-Lindau)病(冯·希佩尔林道病);HLAH(血色素沉着症);HMN V(远端脊髓性肌萎缩,V型);HMSN(腓骨肌萎缩症病);HNPP(遗传性压迫易感性麻痹神经病);高胱氨酸尿症;黑质酸氧化酶缺乏症(Homogentisic acid oxidase deficiency)(尿黑素尿症(alkaptonuria));均质酸根(Homogentisic aciduria)(尿黑素尿症);纯合的迟发性卟啉病

(porphyria cutanea tarda) (肝红细胞生成性卟啉症 (hepatoerythropoietic porphyria)); HP1 (原发性高草酸尿症); HP2 (原发性高草酸尿症); HPA (高苯丙氨酸血症); HPRT-次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶缺乏症 (莱斯奇-尼汉 (Lesch-Nyhan) 综合征); HSN III型 (家族性自主神经功能障碍); HSN3 (家族性自主神经功能障碍); HSN-III (家族性自主神经功能障碍); 人类皮肤病 (埃勒斯-达洛斯综合征皮肤病型); 亨廷顿氏病; 哈钦森吉尔福德 (Hutchinson-Gilford) 早衰综合征 (早衰); 高雄激素血症, 非经典型, 由于21-羟化酶缺乏症 (21-羟化酶缺乏症); 高乳糜微粒血症, 家族性 (脂蛋白脂肪酶缺乏症, 家族性); 高胆碱血症伴酮症酸中毒和白细胞减少症 (丙酸血症); I型高脂蛋白血症 (脂蛋白脂肪酶缺乏症, 家族性); 高尿酸血症, 原发性; 高苯丙氨酸血症 (高苯丙氨酸血症); 高苯丙氨酸血症; 软骨发育不良 (Hypochondrodysplasia) (软骨发育不全 (hypochondroplasia)); 软骨形成不足 (hypochondrogenesis); 软骨发育不良; 低色素性贫血 (X连锁性铁粒细胞性贫血); 先天性低血症; 门克斯综合征); 次黄嘌呤磷酰基转移酶 (HPRT) 缺乏症 (莱斯奇-尼汉 (Lesch-Nyhan) 综合征); IAHS (婴儿期发作性上行遗传性痉挛性麻痹); 特发性色素沉着症 (色素沉着症, 3型); 特发性新生儿色素沉着症 (色素沉着症, 新生儿); 特发性肺动脉高压 (原发性肺动脉高压); 免疫系统疾病 (X连锁性严重联合免疫缺陷); 色素失调症 (Incontinentia Pigmenti); 婴儿脑戈谢病 (戈谢病2型); 婴儿戈谢病 (戈谢病2型); 婴儿期发病的上行遗传性痉挛性麻痹; 不孕不育; 遗传性肺气肿 (α -1抗胰蛋白酶缺乏症); 遗传性人传染性海绵状脑病 (朊病毒病); 继承受力性麻痹倾向 (遗传性压迫易感性麻痹神经病); Insley-Astley综合征 (耳脊椎骨骺发育不良 (otospondylomegapiphyseal dysplasia)); 间歇性急性卟啉症综合征 (急性间歇性卟啉症); 肠息肉-皮肤色素沉着综合征 (黑斑息肉综合征 (Peutz-Jeghers综合征)); IP (色素失禁症 (incontinentia pigmenti)); 铁贮存障碍 (色素沉着症); 等臂双着丝粒 (Isodicentric) 15 (idic15); 孤立性耳聋 (非综合征性耳聋); 杰克逊-韦斯综合征; JH (血色病2型); 朱伯特 (Joubert) 综合征; JPLS (青少年原发性侧索硬化症); 幼年肌萎缩侧索硬化 (肌萎缩侧索硬化2型); 青少年痛风, 舞蹈手足徐动症, 智力障碍综合征 (莱斯奇-尼汉 (Lesch-Nyhan) 综合征); 青少年高尿酸血症综合征 (莱斯奇-尼汉综合征); JWS (杰克逊-威斯综合征); KD (X连锁脊髓延髓肌肉萎缩); 肯尼迪病 (X连锁脊髓延髓肌肉萎缩); 肯尼迪脊髓和延髓肌肉萎缩 (X连锁脊髓延髓肌肉萎缩); 角苷脂组织细胞增多症 (Kerasin histiocytosis) (戈谢病); 角苷脂沉积症 (戈谢病); 角苷脂贮积病 (Kerasin thesaurismosis) (戈谢病); 酮症性甘氨酸血症 (丙酸血症); 酮症高甘氨酸血症 (丙酸血症); 肾脏疾病 (原发性高草酸尿症); 克莱恩费尔特 (Klinefelter) 综合征; 克莱恩费尔特氏综合征; 克尼斯克综合征 (Kniest syndrome); 克拉伯 (Krabbe) 病; 腔隙性痴呆 (CADASIL); 兰格萨尔迪诺 (Langer-Saldino) 软骨成长不全 (软骨成长不全, II型); 兰格萨尔迪诺发育不良 (软骨成长不全, II型); 迟发性阿尔茨海默病 (阿尔茨海默病2型); 迟发性家族性阿尔茨海默病 (AD2) (阿尔茨海默病2型); 迟发性克拉伯病 (LOKD) (克拉伯病); 学习障碍 (学习障碍); 着色斑病 (Lentiginosis), 口周皮炎 (黑色素斑-胃肠多发息肉 (Peutz-Jeghers) 综合征); 莱斯奇-尼汉 (Lesch-Nyhan) 综合征; 脑白质营养不良; 罗森塔尔纤维引起的脑白质营养不良 (亚历山大病); 脑白质营养不良, 海绵状 (海绵状脑白质营养不良病); LFS (李-法美尼 (Li-Fraumeni) 综合征); 李-法美尼综合征; 脂肪酶D缺乏症 (脂蛋白脂肪酶缺乏症, 家族性); LIPD缺乏症 (脂蛋白脂肪酶缺乏症, 家族性); 脂质沉积症, 脑苷脂 (戈谢

病);脂质沉积症,神经节苷脂,婴儿(家族黑蒙性白痴(Tay-Sachs)病);脂质组织细胞增生症(角苷脂型)(戈谢病);脂蛋白脂酶缺乏症,家族性;肝病(半乳糖血症);卢伽雷氏症(Lou Gehrig)病(肌萎缩侧索硬化症);路易斯-巴综合征(共济失调-毛细血管扩张症);林奇(Lynch)综合征(遗传性非息肉病性结直肠癌);赖氨酰羟化酶缺乏症(埃勒斯-多洛斯(Ehlers-Danlos)综合征脊柱后凸畸形型);马查多约瑟夫(Machado-Joseph)病(脊髓小脑性共济失调3型);男性乳腺癌(乳腺癌);男性生殖器紊乱;男性特纳综合征(努南综合征);乳腺恶性赘瘤(乳腺癌);乳腺恶性肿瘤(乳腺癌);膀胱恶性肿瘤(膀胱癌);乳房癌(乳腺癌);马凡综合征15;马克(Marker)X综合(脆性X综合征);马丁-贝尔综合征(脆性X综合征);麦康纳奥尔布赖特(McCune-Albright)综合征;麦克劳德综合征;MEDNIK;地中海贫血(β 地中海贫血);地中海热,家族性;巨型骨骺侏儒症(耳脊椎骨骺发育不良(otospondylomegaepiphyseal dysplasia));门克亚(Menkea)综合征(门克斯Menkes综合征);门克斯综合征;伴有骨软骨异常的精神发育迟滞(科-勒二氏(Coffin-Lowry)综合征));代谢紊乱;间向性(Metatropic)侏儒症,II型(克尼斯克发育不良(Kniest dysplasia));间向性发育不良(Metatropic dysplasia)II型(克尼斯克发育不良);高铁血红蛋白血症 β -珠蛋白型;甲基丙二酸血症;MFS(马凡氏综合征);MHAM(考登综合征);MK(门克斯综合征);微综合征;头小畸形(Microcephaly);MMA(甲基丙二酸血症);MNK(门克斯综合征);单体性1p36综合征(1p36缺失综合征);单体性X(特纳综合征);运动神经元病,肌萎缩侧索硬化症(肌萎缩侧索硬化症);运动障碍;莫厄特-威尔逊(Mowat-Wilson)综合征;粘多糖贮积症(MPS I);粘膜纤维瘤病(囊性纤维化);Muenke综合征;多发梗塞性(Multi-Infarct)痴呆(CADASIL);多种羧化酶缺乏症,迟发性(生物素酶缺乏症);多发性错构瘤综合征(考登(Cowden)综合征);多发性神经纤维瘤病(神经纤维瘤病);肌营养不良症;肌营养不良症,杜兴型(Duchenne)和贝克尔型(Becker型);肌强直性萎缩症(肌强直性营养不良);肌强直性肌营养不良症(肌强直性营养不良);肌强直性营养不良;粘液性水肿(Myxedema),先天性(先天性甲状腺功能减退症);南斯恩斯利(Nance-Insley)综合征(耳脊椎骨骺发育不良(otospondylomegaepiphyseal dysplasia));南斯斯威尼(Nance-Sweeney)软骨发育不良(耳脊椎骨骺发育不良);NBIA1(泛酸激酶相关神经变性);尼尔-丁沃尔(Neill-Dingwall)综合征(科凯恩(Cockayne)综合征);神经母细胞瘤,视网膜(视网膜母细胞瘤);脑铁积累1型的神经变性(泛酸激酶相关神经变性);神经纤维瘤病I型;神经纤维瘤病II型;神经系统疾病;神经肌肉疾病;神经元病变,远端遗传性运动,V型(远端脊髓性肌萎缩V型);神经元病变,远端遗传性运动,具有锥体特征(肌萎缩侧索硬化症4型);NF(神经纤维瘤病);尼曼-皮克(Niemann-Pick)(尼曼-皮克)病;诺亚克(Noack)综合征(菲佛(Pfeiffer)综合征);非酮症高甘氨酸血症(甘氨酸脑病(Glycine encephalopathy));非神经病理性戈谢病(戈谢病1型);非苯丙酮尿酸高苯丙氨酸血症(四氢生物蝶呤缺乏症);非综合征性耳聋;努南综合征;诺尔伯特尼亚戈谢(Norrbottnian Gaucher)病(戈谢病3型);褐黄痛(Ochronosis)(尿黑素尿症(alkaptonuria));褐黄病性关节炎(Ochronotic arthritis)(尿黑酸尿(alkaptonuria));OI(成骨不全);OSMED(耳脊椎骨骺发育不良(otospondylomegaepiphyseal dysplasia));成骨不全;骨质疏松症(成骨不全);先天性骨硬化(软骨发育不全);耳鼻息痛(Oto-spondylo-megaepipepseal dysplasia)(耳脊椎骨骺发育不良(otospondylomegaepiphyseal dysplasia));耳脊椎骨骺发育不良;坏血病

(Oxalosis) (原发性高草酸尿症); 草酸尿 (Oxaluria), 原发性 (高氧尿症, 原发性); 泛酸激酶相关神经变性; 帕套 (Patau) 综合征 (13三体综合征); PBGD缺乏症 (急性间歇性卟啉症); PCC缺乏症 (丙酸血症); PCT (迟发性卟啉病 (porphyria cutanea tarda)); PDM (2型肌强直性营养不良); 甲状腺肿-耳聋综合征 (pendred syndrome); 周期性疾病 (地中海热, 家族性); 周期性腹膜炎 (地中海热, 家族性); 口周着色斑病综合征 (Periorificial lentiginosis syndrome) (黑斑息肉 (Peutz-Jeghers) 综合征); 周围神经疾病 (家族性自主神经功能障碍); 周围神经纤维瘤病 (神经纤维瘤病1型 (neurofibromatosis 1)); 腓骨肌萎缩症 (Charcot-Marie-Tooth disease); 过氧化物酶体丙氨酸:乙醛酸氨基转移酶缺乏症 (高草酸尿症, 原发性); 佩茨-杰格尔斯 (Peutz-Jeghers) 综合征; 菲佛 (Pfeiffer) 综合征; 苯丙氨酸羟化酶缺乏症 (苯丙酮尿症); 苯丙酮尿症; 嗜铬细胞瘤 (冯·希佩尔-林道 (von Hippel-Lindau) 病); 皮埃尔罗宾综合征与胎儿软骨发育不良 (韦-兹 (Weissenbacher-Zweymüller) 综合征); 色素性肝硬化 (血色素沉着症); PJS (佩茨-杰格尔斯 (Peutz-Jeghers) 综合征); PKAN (泛酸激酶相关神经变性); PKU (苯丙酮尿症); 铅卟啉 (Plumboporphyria) (ALA缺乏性卟啉症); PMA (腓骨肌萎缩症 (Charcot-Marie-tooth disease)); 多发性纤维异常增生症 (麦-奥尔布赖特 (McCune-Albright) 综合征); 结肠息肉病 (polyposis coli) (家族性腺瘤性息肉病); 息肉病, 错构的 (hamartomatous) 肠道 (黑斑息肉 (Peutz-Jeghers) 综合征); 息肉, 肠道, II (黑斑息肉 (Peutz-Jeghers) 综合征); 息肉综合征 (黑斑息肉 (Peutz-Jeghers) 综合征); 卟吩胆色素原 (Porphobilinogen) 合酶缺乏症 (ALA缺乏性卟啉症); 卟啉; 卟啉症 (卟啉症); PPH (原发性肺动脉高压); PPOX缺乏症 (混合型卟啉病 (variegate porphyria)); 普拉德拉巴特威利 (Prader-Labhart-Willi) 综合征 (普拉德威利 (Prader-Willi) 综合征); 普拉德威利综合征; 老年前期和老年性痴呆症 (阿尔茨海默病); 原发性血色素沉着症 (血色素沉着症); 原发性高尿酸血症综合征 (莱斯奇-尼汉 (Lesch-Nyhan) 综合征); 原发性肺动脉高压; 原发性老年退行性痴呆 (阿尔茨海默病); 朊病毒病; 前胶原类型EDS VII, 突变体 (埃勒斯-多洛斯 (Ehlers-Danlos) 综合征关节紊乱型); 早衰 (哈金森吉尔福德早衰综合征); 类似早衰综合征 (科凯恩 (Cockayne) 综合征); 类早老性侏儒症 (科凯恩 (Cockayne) 综合征); 进行性舞蹈病, 慢性遗传性 (亨廷顿病) (亨廷顿舞蹈病); 进行性肌萎缩 (脊髓性肌萎缩); 用正常巩膜逐渐变形成骨不全 (成骨不全III型); PROMM (2型肌强直性营养不良); 丙酸血症 (propionic academia); 丙酰辅酶A羧化酶缺乏症 (丙酸血症); 蛋白C缺乏症; 蛋白S缺乏; 原卟啉症 (红细胞生成性原卟啉); 原卟啉原氧化酶缺乏症 (混合型卟啉病 (variegate porphyria)); 近端肌强直性营养不良 (2型肌强直性营养不良); 近端肌强直性肌病 (2型肌强直性肌营养不良); 伪戈谢病; 伪乌尔里希-特纳综合征 (Ullrich-Turner综合征) (努南综合征); 弹性假黄色瘤 (pseudoxanthoma elasticum); 心肌脂质沉积症 (克拉伯病); 肺动脉高压 (原发性肺动脉高压); 肺动脉高压 (原发性肺动脉高压); PWS (普拉德威利 (Prader-Willi) 综合征); PXE-弹性假黄色瘤 (PXE-pseudoxanthoma elasticum) (弹性假黄色瘤 (pseudoxanthoma elasticum)); Rb (视网膜母细胞瘤); 雷克林豪森病, 神经 (神经纤维瘤病1); 复发性多浆膜炎 (地中海热, 家族性); 视网膜疾病; 视网膜色素变性耳聋综合征 (亚瑟 (Usher) 综合征); 视网膜母细胞瘤; 雷特 (Rett) 综合征; RFALS 3型 (肌萎缩侧索硬化2型); 雷克 (Ricker) 综合征 (2型肌强直性营养不良); 赖利-戴 (Riley-Day) 综合征 (家族性植物神经功能障碍症 (familial dysautonomia)); 鲁西-列维 (Roussy-

Levy) 综合征(腓骨肌萎缩症(Charcot-Marie-Tooth disease);RSTS(鲁宾斯坦-泰比(Rubinstein-Taybi)综合征);RTS(雷特(Rett)综合征)(鲁宾斯坦-泰比(Rubinstein-Taybi)综合征);RTT(雷特(Rett)综合征);鲁宾斯坦-泰比综合征;萨克巴拉巴斯(Sack-Barabas)综合征(埃勒斯-多洛斯(Ehlers-Danlos)综合征,血管型);SADDAN;李-法美尼(Li-Fraumeni)肉瘤家族综合征(李-佛美尼综合征);肉瘤,乳腺癌,白血病和肾上腺(SBLA)综合征(李-佛美尼综合征);SBLA综合征(李-佛美尼综合征);SBMA(X连锁脊髓延髓肌肉萎缩);SCD(镰状细胞性贫血);双侧听神经鞘瘤(Schwannoma,acoustic,bilateral)(神经纤维瘤病2);SCIDX1(X连锁严重联合免疫缺陷);结节性溃疡(scerrosis tuberosa)(结节性硬化症);SDAT(阿尔茨海默病);先天性SED(先天性脊椎骨骺发育不良(spondyloepiphyseal dysplasia congenita));SED斯特劳威克(Strudwick)(脊椎干骺端发育不良(spondyloepimetaphyseal dysplasia),斯特劳威克型);SEDC(先天性脊椎骨骺发育不良);SEMD,斯特劳威克型(脊椎干骺端发育不良,斯特劳威克型);老年痴呆症(阿尔茨海默病2型);严重软骨发育不全伴发育迟缓和黑棘皮病(SADDAN);什普林茨恩(Shprintzen)综合征(22q11.2缺失综合征);镰状细胞性贫血;骨骼-皮肤-脑综合征(SADDAN);皮肤色素沉着症;SMA(脊髓性肌萎缩);SMED,斯特劳威克(Strudwick)型(脊椎干骺端发育不良(spondyloepimetaphyseal dysplasia),斯特劳威克型);SMED,I型(脊椎干骺端发育不良(spondyloepimetaphyseal dysplasia),斯特劳威克型);小头-小颌-并趾综合征(Smith Lemli Opitz Syndrome);南非遗传性卟啉症(混合型卟啉病(variegate porphyria));痉挛性麻痹,婴儿期发作上升(婴儿期发作性上行遗传性痉挛性麻痹);言语和交流障碍;鞘脂病,泰-萨克斯病(Tay-Sachs病);脊髓延髓肌肉萎缩;脊髓性肌萎缩;脊髓性肌萎缩,远端V型(远端脊髓性肌萎缩V型);远端脊髓性肌萎缩,具有上肢优势(远端脊髓性肌萎缩V型);脊髓小脑性共济失调;脊椎干骺端发育不良,斯特劳威克型;先天性脊椎干骺端发育不良;先天性脊椎骨骺发育不良(spondyloepiphyseal dysplasia)(胶原病,II型和XI型);短肢-手型脊椎骨骺干骺端发育不良(spondylometapiphyseal dysplasia),斯特劳威克型(脊椎干骺端发育不良(spondyloepimetaphyseal dysplasia),斯特劳威克型);脊椎干骺端结构不良(spondylometaphyseal dysplasia)(SMD)(脊椎干骺端发育不良(spondyloepimetaphyseal dysplasia),斯特劳威克型);脊椎干骺端结构不良(spondylometaphyseal dysplasia),斯特劳威克型(脊椎干骺端发育不良(spondyloepimetaphyseal dysplasia),斯特劳威克型);中枢神经系统的海绵状变性(海绵状脑白质营养不良病);脑海绵状变性(海绵状脑白质营养不良病);婴儿期白质的海绵状变性(海绵状脑白质营养不良病);散发性原发性肺动脉高压(原发性肺动脉高压);SSB综合征(SADDAN);钢铁头发综合征(门克斯(Menkes)综合征);斯泰诺特(Steinert)病(肌强直性营养不良);斯泰诺特(Steinert)肌强直性营养不良综合征(肌强直性营养不良);斯蒂克勒(Stickler)综合征;中风(CADASIL);斯特劳威克综合征(脊椎干骺端发育不良(spondyloepimetaphyseal dysplasia),斯特劳威克型);亚急性神经病理性戈谢病(3型戈谢病);瑞典遗传性卟啉症(急性间歇性卟啉症);瑞典卟啉症(急性间歇性卟啉症);瑞士奶酪软骨发育不良(克尼斯克发育不良(Kniest dysplasia));泰-萨克斯(Tay-Sachs)病;TD-致死性发育不良侏儒症(TD-thanatophoric dwarfism)(致死性骨发育不良(thanatophoric dysplasia));有直股骨和苜蓿叶状头骨的TD(2型致死性骨发育不良);毛

细血管扩张(Telangiectasia),小脑-眼皮肤(共济失调-毛细血管扩张);睾丸女性化综合征(雄激素不敏感综合征);四氢生物蝶呤缺乏;TFM-睾丸女性化综合征(雄激素不敏感综合征);中间型地中海贫血(thalassemia)(β 地中海贫血);重型地中海贫血(β 地中海贫血);致死性骨发育不全(thanatophoric dysplasia);硫胺素反应性巨幼红细胞性贫血伴糖尿病和感音神经性耳聋;血栓形成倾向由于辅助因子缺乏辅助激活蛋白C,莱顿突变(Leiden)型(莱顿第五因子血栓形成倾向);甲状腺疾病;常染色体显性型神经病变(Tomaculous neuropathy)(遗传性压迫易感性麻痹神经病);总HPRT缺乏症(莱斯奇-尼汉(Lesch-Nyhan综合征));总次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶缺乏症(莱斯奇-尼汉(Lesch-Nyhan综合征));图雷特综合征;传染性痴呆(朊病毒病);传染性海绵状脑病(朊病毒病);特雷彻-柯林斯(Treacher Collins)综合征;骨脆裂(Trias fragilitis ossium)(成骨不全症I型);三倍X综合征;三体(Triplo)X综合征(三倍X综合征);21三体性(Trisomy)综合征(唐氏综合征);三体性X(三倍X综合征);特鲁瓦西耶-阿诺特-乔福地(Troisier-Hanot-Chauffard)综合征(血色素沉着症);TS(特纳综合征);TSD(泰-萨克斯(Tay-Sachs)病);TSE(朊病毒病);晚期结节性硬化症(结节性硬化症);结节性硬化症;特纳综合征;女性X染色体特纳综合征(努南综合征);特纳氏表型,正常核型(karyotype normal)(努南综合征);特纳氏综合征(特纳综合征);特纳样综合征(努南综合征);2型戈谢病(戈谢病2型);3型戈谢病(戈谢病3型);UDP-半乳糖-4-差向异构酶缺乏症(半乳糖血症);UDP葡萄糖4-差向异构酶缺乏症(半乳糖血症);UDP葡萄糖己糖-1-磷酸尿苷酰转移酶缺乏症(半乳糖血症);乌尔里希-努南(Ullrich-Noonan)综合征(努南综合征);乌尔里希-努南综合征(特纳综合征);未分化性耳聋(非综合征性耳聋);UPS缺乏症(急性间歇性卟啉症);膀胱癌(Urinary bladder cancer)(膀胱癌(bladder cancer));UROD缺乏症(迟发性皮肤卟啉症);尿卟啉原脱羧酶缺乏症(迟发性皮肤卟啉症(porphyrria cutanea tarda));尿卟啉原合成酶缺乏症(急性间歇性卟啉症);UROS缺乏症(先天性红细胞生成性卟啉症);亚瑟(Usher)综合征;UTP己糖-1-磷酸尿苷酰转移酶缺乏症(半乳糖血症);范博加特-伯特兰(Van Bogaert-Bertrand)综合征(海绵状脑白质营养不良病);范德霍夫(Van der Hoeve)综合征(成骨不全I型);混合型卟啉病(variegate porphyria);心电图综合征(22q11.2缺失综合征);VHL综合征(冯·希佩尔-林道(von Hippel-Lindau)病);视力障碍和失明(阿尔斯特罗姆(Alstrom)综合征);范博加特-伯特兰(Von Bogaert-Bertrand)病(海绵状脑白质营养不良病);冯·希佩尔-林道(von Hippel-Lindau)病;冯·雷奇伦豪森-阿普尔鲍姆(Von Recklenhausen-Applebaum)病(血色素沉着症);冯·克雷克林豪森(von Recklinghausen)病(神经纤维瘤病1);VP(混合型卟啉病(variegate porphyria));弗罗利克(Vrolik)病(成骨不全);瓦登伯革氏症候群(Waardenburg)综合征;华氏跳蚤(Warburg Sjo Fledelius)综合征(微综合征);WD(威尔森病);韦-兹(Weissenbacher-Zweymüller)综合征;威尔逊病;威尔逊氏病(威尔逊病);沃尔夫-赫塞豪恩(Wolf-Hirschhorn)综合征;沃尔夫周期性疾病(Wolff Periodic disease)(地中海热,家族性);WZS(韦-兹综合征);着色性干皮病(xeroderma pigmentosum);X连锁精神发育迟滞和大疱性(脆性X综合征);X连锁原发性高尿酸血症(莱斯奇-尼汉(Lesch-Nyhan)综合征);X连锁严重联合免疫缺陷;X连锁铁粒细胞性贫血;X连锁脊髓延髓肌肉萎缩(肯尼迪病);X连锁尿酸尿症酶缺陷(莱斯奇-尼汉(Lesch-Nyhan)综合征);X-SCID(X连锁严重联合免疫缺陷);XLSA(X连锁的铁粒细胞性贫血);XSCID(X连锁严重联合免疫缺陷);XXX

综合征(三倍X综合征);XXXX综合征(48,XXXX);XXXXX综合征(49,XXXXX);XXY综合征(克兰费尔特综合征(Klinefelter)综合征);XXY三体性(克兰费尔特(Klinefelter)综合征);XYY核型(47,XYY综合征);XYY综合征(47,XYY综合征);和YY综合征(47,YY综合征)。

[0487] 在进一步优选的方面,如本文所定义的核酸序列或包含如本文所定义的多个核酸序列的本发明组合物可用于制备药物组合物,特别是用于本文所定义的目的,优选用于基因疗法治疗本文定义的疾病。

[0488] 本发明的药物组合物还可以用于基因治疗,特别是用于治疗疾病或病症,优选如本文所定义的疾病或病症。

[0489] 本发明还提供了如本文所定义的本发明的含RNA组合物,或药物组合物,或疫苗,或试剂盒或部件的试剂盒的若干应用和用途。在一个实施方案中,组合物或药物组合物或试剂盒或部件的试剂盒可用作药物,即用于治疗肿瘤或癌症疾病。在这种情况下,治疗优选通过肿瘤内施用,特别是通过注射到肿瘤组织中进行。根据另一方面,本发明涉及如上所述的含RNA组合物或药物组合物,或疫苗,或试剂盒或部件的试剂盒的第二医学用途,其中这些主题用于制备特别是用于肿瘤内应用(施用)以治疗肿瘤或癌症疾病的药物。

[0490] 优选地,本文提及的疾病选自肿瘤或癌症疾病,其优选包括例如急性淋巴细胞白血病,急性髓性白血病,肾上腺皮质癌,艾滋病相关癌症,艾滋病相关淋巴瘤,肛门癌,阑尾癌,星形细胞瘤,基底细胞癌,胆管癌,膀胱癌,骨癌,骨肉瘤/恶性纤维组织细胞瘤,脑干胶质瘤,脑肿瘤,小脑星形细胞瘤,脑星形细胞瘤/恶性胶质瘤,室管膜瘤,成神经管细胞瘤,幕上原始神经外胚层肿瘤,视觉通路和下丘脑神经胶质瘤,乳腺癌,支气管腺瘤/类癌,伯基特淋巴瘤,儿童类癌,胃肠道类癌,未知的原发性癌,原发性中枢神经系统淋巴瘤,儿童期小脑星形细胞瘤,儿童期脑星形细胞瘤/恶性胶质瘤,宫颈癌,儿童癌症,慢性淋巴细胞白血病,慢性粒细胞白血病,慢性骨髓增生性疾病,结肠癌,皮肤T细胞淋巴瘤,增生性小圆形细胞瘤,子宫内膜癌,室管膜瘤,食道癌,尤文氏肿瘤族中的尤文氏肉瘤,儿童颅外生殖细胞肿瘤,外生殖细胞肿瘤,肝外胆管癌,眼内黑色素瘤,视网膜母细胞瘤,胆囊癌,胃(腹部)癌,胃肠道类肿瘤,胃肠道间质瘤(GIST),颅外、性腺外或卵巢生殖细胞肿瘤,妊娠滋养细胞肿瘤,脑干胶质瘤,儿童脑星形细胞瘤,儿童视觉通路和下丘脑神经胶质瘤,胃类癌,毛细胞白血病,头颈癌,心脏癌,肝细胞(肝)癌,霍奇金淋巴瘤,下咽癌,儿童下丘脑和视觉通路胶质瘤,眼内黑色素瘤,胰岛细胞癌(内分泌胰腺),卡波西肉瘤,肾癌(肾细胞癌),喉癌,白血病,急性淋巴细胞白血病,急性髓性白血病,慢性淋巴细胞白血病,慢性粒细胞白血病,毛细胞白血病,唇和口腔癌,脂肪肉瘤,肝癌,非小细胞肺癌,小细胞肺癌,淋巴瘤,AIDS相关淋巴瘤,Burkitt淋巴瘤,皮肤T细胞淋巴瘤,霍奇金淋巴瘤,非霍奇金淋巴瘤,原发性中枢神经系统淋巴瘤,瓦尔登斯特伦(Waldenström)巨球蛋白血症,骨/骨肉瘤恶性纤维组织细胞瘤,儿童成神经管细胞瘤,黑色素瘤,眼内(眼)黑色素瘤,Merkel细胞癌,成人恶性间皮瘤,儿童间皮瘤,隐匿性原发性转移性鳞状颈癌,口腔癌,儿童多发性内分泌肿瘤综合征,多发性骨髓瘤/浆细胞肿瘤,蕈样真菌病,骨髓增生异常综合征,骨髓增生异常/骨髓增生性疾病,慢性粒细胞白血病,成人急性髓性白血病,儿童急性髓性白血病,多发性骨髓瘤(骨髓癌),慢性骨髓增生性疾病,鼻腔和鼻窦癌,鼻咽癌,神经母细胞瘤,口腔癌,口咽癌,骨肉瘤/骨恶性纤维组织细胞瘤,卵巢癌,卵巢上皮癌(表面上皮-基质肿瘤),卵巢生殖细胞肿瘤,卵巢低恶性潜能肿瘤,胰腺癌,胰岛细胞胰腺癌,鼻窦和鼻腔癌,甲状旁腺癌,阴茎癌,咽癌,嗜铬细胞

瘤,松果体星形细胞瘤,松果体生殖细胞瘤,儿童松果体细胞瘤和幕上原始神经外胚层肿瘤,垂体腺瘤,浆细胞瘤/多发性骨髓瘤,胸膜肺母细胞瘤,原发性中枢神经系统淋巴瘤,前列腺癌,直肠癌,肾细胞癌(肾癌),肾盂和输尿管癌,视网膜母细胞瘤,儿童横纹肌肉瘤,唾液腺癌,尤因肿瘤家族的肉瘤,Kaposi肉瘤,软组织肉瘤,子宫肉瘤,Sézary综合征,皮肤癌(非黑色素瘤),皮肤癌(黑色素瘤),Merkel细胞皮肤癌,小肠癌,鳞状细胞癌,隐匿性原发性鳞状细胞癌,儿童幕上原始神经外胚层肿瘤,睾丸癌,咽喉癌,儿童胸腺瘤,胸腺瘤和胸腺癌,甲状腺癌,儿童甲状腺癌,肾盂和输尿管移行细胞癌,妊娠滋养细胞肿瘤,尿道癌,子宫内异位症,子宫肉瘤,阴道癌,儿童视觉通路和下丘脑神经胶质瘤,外阴癌,瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症和儿童期肾母细胞瘤(肾癌)。

[0491] 特别优选的适用于肿瘤内施用的肿瘤或癌症的示例是前列腺癌,肺癌,乳腺癌,脑癌,头颈癌,甲状腺癌,结肠癌,胃癌,肝癌,胰腺癌,卵巢癌,皮肤癌,膀胱,子宫和子宫颈。

[0492] 根据一具体实施方案,药物可以作为单剂量或多剂量施用给患者。在某些实施方案中,药物可以作为单剂量施用给患者,然后是第二剂量,并且任选地甚至是其后的第三,第四(或更多)剂量等施用给患者。

[0493] 优选地,本发明的组合物以每剂量至少40 μ gRNA的量提供。更具体地,单剂量中包含的mRNA的量通常为至少200 μ g,优选为200 μ g至1000 μ g,更优选为300 μ g至850 μ g,甚至更优选为300 μ g至700 μ g。

[0494] 在另一实施方案中,本发明的组合物的核苷酸分子,优选mRNA分子,编码至少一种抗原的至少一个表位。在本发明的优选实施方案中,至少一种抗原选自:来自与传染病相关的病原体的抗原,与过敏相关的抗原,与自身免疫疾病相关的抗原,和与癌症或肿瘤疾病相关的抗原,或所述抗原的片段、变体和/或衍生物。

[0495] 优选地,所述至少一种抗原来源于病原体,优选病毒,细菌,真菌或原生动物病原体,优选选自:狂犬病毒,埃博拉病毒,马尔堡病毒,乙型肝炎病毒,人乳头瘤病毒(hPV),炭疽杆菌,呼吸道合胞病毒(RSV),单纯疱疹病毒(HSV),登革热病毒,轮状病毒,流感病毒,人类免疫缺陷病毒(HIV),黄热病病毒,结核分枝杆菌,疟原虫,金黄色葡萄球菌,沙眼衣原体,巨细胞病毒(CMV)和乙型肝炎病毒(HBV)。

[0496] 在本文中,本发明的组合物的mRNA可以编码蛋白或肽,其包含致病抗原的至少一个表位或其片段、变体或衍生物。这些致病性抗原来自病原生物,特别是细菌,病毒或原生动物(多细胞)病原生物,其引起受试者,特别是哺乳动物受试者,更特别是人的免疫反应。更具体地,致病性抗原优选是表面抗原,例如位于病毒或细菌或原生动物的表面的蛋白(或蛋白片段,例如表面抗原的外部部分)。

[0497] 致病性抗原是优选衍生自与感染性疾病相关的病原体的肽或蛋白抗原,其优选选自衍生自以下病原体的抗原:鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*),无形体属(*Anaplasma* genus),无形体嗜吞噬细胞(*Anaplasma phagocytophilum*),巴西钩口线虫(*Ancylostoma braziliense*),十二指肠钩虫(*Ancylostoma duodenale*),溶血性杆菌(*Arcanobacterium haemolyticum*),蛔虫(*Ascaris lumbricoides*),曲霉属(*Aspergillus* genus),星状病毒科(*Astroviridae*),巴贝斯虫属(*Babesia* genus),炭疽芽孢杆菌(*Bacillus anthracis*),蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*),汉赛巴尔通体(*Bartonella henselae*),BK病毒,人芽囊原虫(*Blastocystis hominis*),芽孢杆菌(*Blastomyces*

dermatitidis),百日咳博德特氏菌(*Bordetella pertussis*),伯氏疏螺旋体属(*Borrelia burgdorferi*),疏螺旋体属(*Borrelia* genus),疏螺旋体属(*Borrelia* spp),布鲁氏菌属(*Brucella* genus),马来丝虫(*Brugia malayi*),布尼亚病毒科(*Bunyaviridae* family),洋葱伯克霍尔德菌(*Burkholderia cepacia*)和其他伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia* species),鼻疽伯克霍尔德菌(*Burkholderia mallei*),类鼻疽伯克氏菌(*Burkholderia pseudomallei*),杯状病毒科(*Caliciviridae* family),弯曲杆菌属(*Campylobacter* genus),白色念珠菌(*Candida albicans*),念珠菌属(*Candida* spp),沙眼衣原体(*Chlamydia trachomatis*),肺炎衣原体(*Chlamydophila pneumoniae*),鹦鹉热衣原体(*Chlamydophila psittaci*),CJD朊病毒(CJD prion),华支睾吸虫(*Clonorchis sinensis*),肉毒梭菌(*Clostridium botulinum*),艰难梭菌(*Clostridium difficile*),产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*),产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*),梭菌属(*Clostridium* spp),破伤风梭菌(*Clostridium tetani*),球孢子菌属spp(*Coccidioides* spp),冠状病毒(coronaviruses),白喉杆菌(*Corynebacterium diphtheriae*),伯纳特氏立克次氏体(*Coxiella burnetii*),克里米亚-刚果出血热(Crimean-Congo hemorrhagic fever virus),新型隐球菌(*Cryptococcus neoformans*),隐孢子虫属(*Cryptosporidium* genus),巨细胞病毒(CMV)(*Cytomegalovirus* (CMV)),登革热病毒(DEN-1,DEN-2,DEN-3和DEN-4),脆双核阿米巴(*Dientamoeba fragilis*),埃博拉病毒(*Ebola virus* (EBOV)),棘球蚴属(*Echinococcus* genus),查菲埃立克体(*Ehrlichia chaffeensis*),伊氏埃立克体(*Ehrlichia ewingii*),埃立克体属(*Ehrlichia* genus),溶组织内阿米巴(*Entamoeba histolytica*),肠球菌属(*Enterococcus* genus),肠道病毒属(*Enterovirus* genus),肠病毒(Enteroviruses),主要是柯萨奇病毒A(Coxsackie A viruses)和肠道病毒71(EV71),表皮癣菌属(*Epidermophyton* spp),爱泼斯坦-巴尔病毒(Epstein-Barr Virus:EBV),大肠杆菌(*Escherichia coli*)0157:H7,0111和0104:H4,肝片吸虫(*Fasciola hepatica*)和大片吸虫(*Fasciola gigantica*),FFI朊病毒(FFI prion),丝虫属超家族(*Filarioidea* superfamily),黄病毒(Flaviviruses),土拉弗朗西斯菌(*Francisella tularensis*),梭杆菌属(*Fusobacterium* genus),白地霉(*Geotrichum candidum*),贾第虫(*Giardia intestinalis*),顎口线虫属(*Gnathostoma* spp),GSS朊病毒(Prion),瓜纳瑞托病毒(*Guanarito virus*),杜克雷嗜血杆菌(*Haemophilus ducreyi*),流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*),幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*),亨尼病毒属(Henipavirus)亨德拉病毒(*Hendra virus*)和尼帕病毒(*Nipah virus*),甲型肝炎病毒(Hepatitis A Virus),乙型肝炎病毒(HBV),丙型肝炎病毒(HCV),丁型肝炎病毒,戊型肝炎病毒,单纯疱疹病毒1和2(HSV-1和HSV-2),组织胞浆荚膜炎(*Histoplasma capsulatum*),HIV(人类免疫缺陷病毒),威尼克外瓶霉(*Hortaea werneckii*),人类博卡病毒(Human bocavirus) (HBoV),人类疱疹病毒(Human herpesvirus)6 (HHV-6)和人类疱疹病毒7 (HHV-7),人间质肺病毒(hMPV),人乳头瘤病毒(HPV),人副流感病毒(HPIV),流行性乙型脑炎病毒(Japanese encephalitis virus),JC病毒,胡宁病毒(*Junin virus*),金格杆菌(*Kingella kingae*),肉芽肿克雷白氏杆菌(*Klebsiella granulomatis*),库鲁病朊病毒(Kuru prion),拉沙病毒(*Lassa virus*),嗜肺军团菌(*Legionella pneumophila*),利什曼属(*Leishmania* genus),钩端螺旋体属(*Leptospira* genus),单核细胞增生李斯特菌(*Listeria*

monocytogenes), 淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒 (Lymphocytic choriomeningitis virus: LCMV), 马塞堡病毒 (Machupo virus), 马拉色菌 (*Malassezia* spp), 马尔堡病毒 (Marburg virus), 麻疹病毒 (Measles virus), 横川后殖吸虫 (*Metagonimus yokagawai*), 微孢子虫门 (*Microsporidia* phylum), 传染性软疣病毒 (MCV), 腮腺炎病毒 (Mumps virus), 麻风分枝杆菌 (*Mycobacterium leprae*) 和麻风杆菌新种 (*Mycobacterium lepromatosis*), 结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*), 溃疡分枝杆菌 (*Mycobacterium ulcerans*), 肺炎支原体 (*Mycoplasma pneumoniae*), 福氏耐格里变形虫 (*Naegleria fowleri*), 美洲板口线虫 (*Necator americanus*), 淋病奈瑟菌 (*Neisseria gonorrhoeae*), 脑膜炎奈瑟菌 (*Neisseria meningitidis*), 星状诺卡氏菌 (*Nocardia asteroides*), 诺卡氏菌属 (*Nocardia* spp), 盘尾丝虫 (*Onchocerca volvulus*), 恙虫病东方体 (*Orientia tsutsugamushi*), 正粘病毒科 (流感) (*Orthomyxoviridae* family (Influenza)), 巴西副球孢子菌 (*Paracoccidioides brasiliensis*), 并殖器吸虫属 (*Paragonimus* spp), 卫氏肺吸虫 (*Paragonimus westermani*), 细小病毒B19 (Parvovirus B19), 巴斯德氏菌属 (*Pasteurella* genus), 疟原虫属 (*Plasmodium* genus), 耶氏肺孢子虫 (*Pneumocystis jirovecii*), 脊髓灰质炎病毒 (Poliovirus), 狂犬病病毒 (*Rabies virus*), 呼吸道合胞病毒 (RSV) (*Respiratory syncytial virus* (RSV)), 鼻病毒 (*Rhinovirus*), 鼻病毒 (*rhinoviruses*), 小蛛立克次氏体 (*Rickettsia akari*), 立克次氏体属 (*Rickettsia* genus), 普氏立克次氏体 (*Rickettsia prowazekii*), 立克次氏立克次氏体 (*Rickettsia rickettsii*), 伤寒立克次氏体 (*Rickettsia typhi*), 裂谷热病毒 (Rift Valley fever virus), 轮状病毒 (Rotavirus), 风疹病毒 (*Rubella virus*), 沙巴病毒 (*Sabia virus*), 沙门氏菌属 (*Salmonella* genus), 人疥螨 (*Sarcoptes scabiei*), 非典型肺炎 (SARS) 冠状病毒, 血吸虫属 (*Schistosoma* genus), 志贺氏菌属 (*Shigella* genus), 辛诺柏病毒 (*Sin Nombre virus*), 汉坦病毒 (Hantavirus), 申克氏孢子丝菌 (*Sporothrix schenckii*), 葡萄球菌属 (*Staphylococcus* genus), 葡萄球菌属 (*Staphylococcus* genus), 无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*), 肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*), 酿脓链球菌 (*Streptococcus pyogenes*), 粪类圆线虫 (*Strongyloides stercoralis*), 绦虫属 (*Taenia* genus), 猪带绦虫 (*Taenia solium*), 蜱传脑炎病毒 (TBEV) (*Tick-borne encephalitis virus* (TBEV)), 犬弓首线虫 (*Toxocara canis*) 或猫弓首线虫 (*Toxocara cati*), 弓形虫 (*Toxoplasma gondii*), 梅毒螺旋体 (*Treponema pallidum*), 旋毛虫 (*Trichinella spiralis*), 阴道毛滴虫 (*Trichomonas vaginalis*), 毛癣菌 (*Trichophyton* spp), 毛首鞭形线虫 (*Trichuris trichiura*), 布氏锥虫 (*Trypanosoma brucei*), 克氏锥虫 (*Trypanosoma cruzi*), 解脲支原体 (*Ureaplasma urealyticum*), 水痘带状疱疹病毒 (VZV) (*Varicella zoster virus* (VZV)), 水痘带状疱疹病毒 (VZV) (*Varicella zoster virus* (VZV)), 重型天花 (*Variola major*) 或类天花 (*Variola minor*), vCJD朊病毒, 委内瑞拉马脑炎病毒 (Venezuelan equine encephalitis virus), 霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*), 西尼罗河病毒 (West Nile virus), 西部马脑炎病毒 (Western equine encephalitis virus), 斑氏丝虫 (*Wuchereria bancrofti*), 黄热病病毒 (Yellow fever virus), 小肠结肠炎耶尔森氏菌 (*Yersinia enterocolitica*), 鼠疫耶尔森氏菌 (*Yersinia pestis*) 和假结核耶尔森氏菌 (*Yersinia pseudotuberculosis*)。

[0498] 此外,致病性抗原(来源于与感染性疾病相关的病原体的抗原)可以优选地选自以

下抗原:外膜蛋白A OmpA,生物膜相关蛋白Bap,转运蛋白MucK(鲍曼不动杆菌,不动杆菌感染);可变表面糖蛋白VSG,微管相关蛋白MAP15,反式唾液酸酶TSA(布氏锥虫,非洲昏睡病(非洲锥虫病));HIV p24抗原,HIV包膜蛋白(Gp120,Gp41,Gp160),多蛋白GAG,负因子蛋白Nef,转录反式激活因子Tat(HIV(人类免疫缺陷病毒),AIDS(获得性免疫缺陷综合征));半乳糖可抑制的粘附蛋白GIAP,29kDa抗原Eh29,Gal/GalNAc凝集素,蛋白CRT,125kDa免疫显性抗原,蛋白M17,粘附素ADH112,蛋白STIRP(溶组织内阿米巴,阿米巴病);主要表面蛋白1-5(MSP1a,MSP1b,MSP2,MSP3,MSP4,MSP5),IV型分泌系统蛋白(VirB2,VirB7,VirB11,VirD4)(无形体属,无形体病);保护性抗原PA,水肿因子EF,致死性因子LF,S层同源蛋白SLH(炭疽杆菌,炭疽病);acranolysin,磷脂酶D,胶原结合蛋白CbpA(溶血隐蔽杆菌(溶血隐秘杆菌),溶血隐蔽杆菌感染);核衣壳蛋白NP,糖蛋白前体GPC,糖蛋白GP1,糖蛋白GP2(Junin病毒,阿根廷出血热);几丁质-蛋白层蛋白,14kDa表面抗原A14,主要精子蛋白MSP,MSP聚合组织蛋白MPOP,MSP纤维蛋白2MFP2,MSP聚合激活激酶MPAK,ABA-1样蛋白ALB,蛋白ABA-1,皮菌素CUT-1(人蛔虫,蛔虫病);41kDa过敏原Asp v13,过敏原Asp f3,主要分生孢子表面蛋白小棒A,蛋白酶Pep 1p,GPI锚定蛋白Gel1p,GPI锚定蛋白Crf1p(曲霉菌属,曲霉菌病);家族VP26蛋白,VP29蛋白(星状病毒科,星状病毒感染);棒状体相关蛋白1RAP-1,裂殖子表面抗原MSA-1,MSA-2(a1,a2,b,c),12D3,11C5,21B4,P29,变异红细胞表面抗原VESA1,顶端膜抗原1AMA-1(巴贝虫属,巴贝虫病);溶血素,肠毒素C,PX01-51,乙醇酸氧化酶,ABC转运蛋白,青霉素-宾格蛋白,锌转运蛋白家族蛋白,假尿苷合成酶Rsu,质粒复制蛋白RepX,寡肽酶F,原噬菌体膜蛋白,蛋白HemK,鞭毛抗原H,28.5-kDa细胞表面抗原(蜡状芽孢杆菌,蜡状芽孢杆菌感染);大T抗原LT,小T抗原,衣壳蛋白VP1,衣壳蛋白VP2(BK病毒,BK病毒感染);29kDa蛋白,半胱天冬酶-3-样抗原,糖蛋白(人芽囊原虫,人芽囊原虫感染);酵母表面粘附素WI-1(皮炎芽生菌,芽生菌病);核蛋白N,聚合酶L,基质蛋白Z,糖蛋白GP(马秋波病毒,玻利维亚出血热);外表面蛋白A OspA,外表面蛋白OspB,外表面蛋白OspC,核心蛋白聚糖结合蛋白A DbpA,核心蛋白聚糖结合蛋白B DbpB,鞭毛丝41kDa核心蛋白Fla,碱性膜蛋白A前体BmpA(免疫显性抗原P39),外表面22kDa脂蛋白前体(抗原IPLA7),可变表面脂蛋白vlsE(疏螺旋体属,疏螺旋体感染);肉毒菌神经毒素BoNT/A1,BoNT/A2,BoNT/A3,BoNT/B,BoNT/C,BoNT/D,BoNT/E,BoNT/F,BoNT/G,重组肉毒杆菌毒素F Hc结构域FHc(肉毒梭菌,肉毒杆菌中毒(和婴儿肉毒杆菌中毒));核衣壳,糖蛋白前体(萨比亚病毒,巴西出血热);铜/锌超氧化物歧化酶SodC,细菌铁蛋白Bfr,50S核糖体蛋白RplL,OmpA样跨膜结构域蛋白Omp31,免疫原性39-kDa蛋白M5P39,锌ABC转运蛋白周质锌结合蛋白znuA,周质免疫原性蛋白Bp26,30S核糖体蛋白S12RpsL,甘油醛-3-磷酸脱氢酶Gap,25kDa外膜免疫原性蛋白前体Omp25,侵袭蛋白B 1a1B,触发因子Tig,分子伴侣DnaK,推定的肽基-脯氨酰顺反异构酶SurA,脂蛋白Omp19,外膜蛋白MotY Omp16,保守外膜蛋白D15,苹果酸脱氢酶Mdh,IV型分泌系统(T4SS)VirJ的成分,功能未知的脂蛋白BAB1_0187(布鲁氏菌属,布鲁氏菌病);ABC转运蛋白家族成员(LolC,OppA和PotF),推定的脂蛋白释放系统跨膜蛋白LolC/E,鞭毛蛋白FlaC,伯克霍尔德氏菌细胞内运动A BimA,细菌伸长因子-Tu EF-Tu,17kDa OmpA样蛋白,boaA编码蛋白,boaB编码蛋白(洋葱伯克霍尔德菌和其他伯克霍尔德氏菌物种,伯克霍尔德氏菌感染);分枝菌酸转移酶Ag85A,热休克蛋白Hsp65,蛋白TB10.4,19kDa抗原,蛋白PstS3,热休克蛋白Hsp70(溃疡分枝杆菌,布鲁里溃疡);诺罗病毒主要和次要病毒衣壳蛋白VP1和VP2,基因组多蛋白,札如病毒

(Sapovirus) 衣壳蛋白VP1, 蛋白Vp3, 几何多蛋白(杯状病毒科, 杯状病毒感染(诺如病毒和沙波病毒)); 主要外膜蛋白PorA, 鞭毛蛋白FlaA, 表面抗原CjaA, 纤连蛋白结合蛋白CadF, 天冬氨酸/谷氨酸结合ABC转运蛋白Peb1A, 蛋白FspA1, 蛋白FspA2(弯曲杆菌属, 弯曲杆菌病); 糖酵解酶烯醇酶, 分泌天冬氨酰蛋白酶SAP1-10, 糖磷脂酰肌醇(GPI)-连接细胞壁蛋白, 蛋白Hyr1, 补体受体3相关蛋白CR3-RP, 粘附素Als3p, 热休克蛋白90kDa hsp90, 细胞表面疏水性蛋白CSH(通常为白色念珠菌和其他念珠菌属, 念珠菌病); 17-kDa抗原, 蛋白P26, 三聚体自转运粘附素TAAs, 巴尔通体粘附素A BadA, 可变表达的外膜蛋白Vomps, 蛋白Pap3, 蛋白HbpA, 包膜相关蛋白酶HtrA, 蛋白OMP89, 蛋白GroEL, 蛋白LalB, 蛋白OMP43, 二氢硫辛酰胺琥珀酰转移酶SucB(韩瑟勒巴通氏菌(*Bartonella henselae*), 猫抓病); 无鞭毛体表面蛋白-2, 无鞭毛蛋白特异性表面蛋白SSP4, 克努兹盼(cruzipain), 反式唾液酸酶TS, 锥鞭毛体(trypomastigote)表面糖蛋白TSA-1, 补体调节蛋白CRP-10, 蛋白G4, 蛋白G2, 中国雨蛙精子尾部致密纤维(paraxonemal rod)蛋白PAR2, 副鞭节杆组分Par1, 粘蛋白相关表面蛋白MPSP(克氏锥虫, 南美锥虫病(美洲锥虫病)); 包膜糖蛋白(gB, gC, gE, gH, gI, gK, gL)(水痘带状疱疹病毒(VZV), 水痘); 主要外膜蛋白MOMP, 可能的的外膜蛋白PMPC, 外膜复合蛋白B OmcB, 热休克蛋白Hsp60HSP10, 蛋白IncA, 来自III型分泌系统的蛋白, 核糖核苷酸还原酶小链蛋白NrdB, 质粒蛋白Pgp3, 衣原体外蛋白N CopN, 抗原CT521, 抗原CT425, 抗原CT043, 抗原TC0052, 抗原TC0189, 抗原TC0582, 抗原TC0660, 抗原TC0726, 抗原TC0816, 抗原TC0828(沙眼衣原体, 衣原体); 低钙反应蛋白E LCrE, 衣原体外蛋白N CopN, 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶PknD, 酰基载体蛋白S-丙二酰转移酶FabD, 单链DNA结合蛋白Ssb, 主要外膜蛋白MOMP, 外膜蛋白2Omp2, 多态膜蛋白家族(Pmp1, Pmp2, Pmp3, Pmp4, Pmp5, Pmp6, Pmp7, Pmp8, Pmp9, Pmp10, Pmp11, Pmp12, Pmp13, Pmp14, Pmp15, Pmp16, Pmp17, Pmp18, Pmp19, Pmp20, Pmp21)(肺炎衣原体(*Chlamydia pneumoniae*), 肺炎衣原体感染); 霍乱毒素B CTB, 毒素调节菌毛蛋白A TcpA, 毒素共调节菌毛蛋白TcpF, 毒素共调节菌毛生物合成蛋白F TcpF, 霍乱肠毒素亚基A, 霍乱肠毒素亚单位B, 热稳定肠毒素ST, 甘露糖敏感血凝素MSHA, 外膜蛋白U孔蛋白(porin) ompU, 波林(Poring) B蛋白, 多态膜蛋白-D(霍乱弧菌, 霍乱); 丙酰辅酶A羧化酶PCC, 14-3-3蛋白, 抑制素, 半胱氨酸蛋白酶, 谷胱甘肽转移酶, 凝溶胶蛋白, 组织蛋白酶L蛋白酶CatL, 外皮蛋白(Tegumental Protein) 20.8kDa TP20.8, 外皮蛋白31.8kDa TP31.8, 溶血磷脂酸磷酸酶LPAP, (华支睾吸虫(*Clonorchis sinensis*), 华支睾吸虫病); 表面层蛋白SLP, 谷氨酸脱氢酶抗原GDH, 毒素A, 毒素B, 半胱氨酸蛋白酶Cwp84, 半胱氨酸蛋白酶Cwp13, 半胱氨酸蛋白酶Cwp19, 细胞壁蛋白CwpV, 鞭毛蛋白FliC, 鞭毛蛋白FliD(艰难梭菌, 艰难梭菌感染); 鼻病毒: 衣壳蛋白VP1, VP2, VP3, VP4; 冠状病毒: spike蛋白S, 包膜蛋白E, 膜蛋白M, 核衣壳蛋白N(通常是鼻病毒和冠状病毒, 普通感冒(急性病毒性鼻咽炎; 急性鼻炎)); 朊病毒蛋白Prp(CJD朊病毒, 克罗伊茨费尔特-雅各布病(CJD)); 包膜蛋白Gc, 包膜蛋白Gn, 核衣壳蛋白(克里米亚-刚果出血热病毒, 克里米亚-刚果出血热(CCHF)); 毒力相关的DEAD-box RNA解旋酶VAD1, 加拉克曼蛋白(galactoxylomannan-protein) GalXM, 葡萄糖醛酸木糖甘露聚糖(glucuronoxylomannan) GXM, 甘露糖蛋白MP(新型隐球菌, 隐球菌病); 酸性核糖体蛋白P2Cp2, 粘蛋白抗原Muc1, Muc2, Muc3Muc4, Muc5, Muc6, Muc7, 表面粘附蛋白CP20, 表面粘附蛋白CP23, 表面蛋白CP12, 表面蛋白CP21, 表面蛋白CP40, 表面蛋白CP60, 表面蛋白CP15, 表面相关的糖肽gp40, 表面相关的糖肽gp15, 卵囊壁蛋白AB, 前抑制蛋白(profilin) PRF, 腺苷

三磷酸双磷酸酶(隐孢子虫属,隐孢子虫病);脂肪酸和视黄醇结合蛋白-1FAR-1,金属蛋白酶组织抑制剂TIMP(TMP),半胱氨酸蛋白酶ACEY-1,半胱氨酸蛋白酶ACCP-1,表面抗原Ac-16,分泌蛋白2ASP-2,金属蛋白酶1MTP-1,天冬氨酰蛋白酶抑制剂API-1,表面相关抗原SAA-1,成人特异性分泌因子Xa丝氨酸蛋白酶抑制剂抗凝血剂AP,组织蛋白酶D样天冬氨酸蛋白酶ARR-1(通常为巴西钩虫属;多种其他寄生虫,皮肤幼虫迁移(CLM));组织蛋白酶L样蛋白酶,53/25-kDa抗原,8kDa家族成员,具有边缘胰蛋白酶样活性的囊尾蚴蛋白TsAg5,六钩蚴蛋白TSOL18,六钩蚴蛋白TSOL45-1A,乳酸脱氢酶A LDHA,乳酸脱氢酶B LDHB(猪带绦虫,囊尾蚴病);pp65抗原,膜蛋白pp15,衣壳近端外皮蛋白pp150,蛋白M45,DNA聚合酶UL54,解旋酶UL105,糖蛋白gM,糖蛋白gN,糖蛋白H,糖蛋白B gB,蛋白UL83,蛋白UL94,蛋白UL99(巨细胞病毒(CMV),巨细胞病毒感染);衣壳蛋白C,膜前蛋白prM,膜蛋白M,包膜蛋白E(结构域I,结构域II,结构域II),蛋白NS1,蛋白NS2A,蛋白NS2B,蛋白NS3,蛋白NS4A,蛋白2K,蛋白NS4B,蛋白NS5(登革热病毒(DEN-1,DEN-2,DEN-3和DEN-4)-虫媒病毒,登革热);39kDa蛋白(脆双核阿米巴(*Dientamoeba fragilis*),双核阿米巴病);白喉毒素前体Tox,白喉毒素DT,菌毛蛋白特异性分选酶SrtA,轴菌毛蛋白SpaA,尖端菌毛蛋白SpaC,次要菌毛蛋白SpaB,表面相关蛋白DIP1281(白喉棒状杆菌,白喉);糖蛋白GP,核蛋白NP,次要基质蛋白VP24,主要基质蛋白VP40,转录激活因子VP30,聚合酶辅助因子VP35,RNA聚合酶L(埃博拉病毒(EBOV),埃博拉出血热);朊病毒蛋白(vCJD朊病毒,变体克雅二氏病(vCJD,nvCJD));UvrABC系统蛋白B,蛋白Flp1,蛋白Flp2,蛋白Flp3,蛋白TadA,血红蛋白受体HgbA,外膜蛋白TdhA,蛋白CpsRA,调节因子CpxR,蛋白SapA,18kDa抗原,外膜蛋白NcaA,蛋白LspA,蛋白LspA1,蛋白LspA2,蛋白LspB,外膜成分DsrA,凝集素DltA,脂蛋白Hlp,主要外膜蛋白OMP,外膜蛋白OmpA2(杜克雷氏嗜血杆菌,软下疳(Chancroid));天冬氨酰蛋白酶1Pep1,磷脂酶B PLB, α -甘露糖苷酶1AMN1,葡聚糖基转移酶GEL1,脲酶URE,过氧化物酶体基质蛋白Pmp1,富含脯氨酸的抗原Pra,humal T细胞复原蛋白TcrP(粗球孢子菌(*Coccidioides immitis*)和波萨达斯球孢子菌(*Coccidioides posadasii*),球孢子菌病(*Coccidioidomycosis*));过敏原Tri R2,热休克蛋白60Hsp60,真菌肌动蛋白法,抗原Tri r2,抗原Tri r4,抗原Tri t1,蛋白IV,甘油-3-磷酸脱氢酶Gpd1,渗透感应器(osmosensor)HwSho1A,渗透感应器(osmosensor)HwSho1B,组氨酸激酶HwHhk7B,过敏原Mala s 1,过敏原Mala s 11,硫氧还蛋白(thioredoxin)Trx Mala s 13,过敏原Mala f,过敏原Mala s(通常是毛癣菌属,表皮癣菌属(*Epidermophyton* spp.),马拉色菌属(*Malassezia* spp.),威尼克外瓶霉(*Hortaea werneckii*),脚气(Dermatophytosis));蛋白EG95,蛋白EG10,蛋白EG18,蛋白EgA31,蛋白EM18,抗原EPC1,抗原B,抗原5,蛋白P29,蛋白14-3-3,8-kDa蛋白,亲肌肉抗原(myophilin),热休克蛋白20HSP20,糖蛋白GP-89,脂肪酸结合蛋白FAPB(棘球绦虫属,棘球蚴病);主要表面蛋白2MSP2,主要表面蛋白4MSP4,MSP变体SGV1,MSP变体SGV2,外膜蛋白OMP,外膜蛋白19OMP-19,主要抗原蛋白MAP1,主要抗原蛋白MAP1-2,主要抗原蛋白MAP1B,主要抗原蛋白MAP1-3,Erum2510编码蛋白,蛋白GroEL,蛋白GroES,30-kDa主要外膜蛋白,GE 100-kDa蛋白,GE 130-kDa蛋白,GE160-kDa蛋白(埃立克体属(*Ehrlichia* genus),埃立克体病(*Ehrlichiosis*));分泌抗原SagA,sagA样蛋白SalA和SalB,胶原粘附素Scm,表面蛋白Fms1(EbpA(fm),Fms5(EbpB(fm),Fms9(EpbC(fm)和Fms10,蛋白EbpC(fm),96kDa免疫保护糖蛋白G1(肠球菌属,肠球菌感染);基因组多蛋白,聚合酶3D,病毒衣壳蛋白VP1,病毒衣壳蛋白

VP2,病毒衣壳蛋白VP3,病毒衣壳蛋白VP4,蛋白酶2A,蛋白酶3C(肠病毒属,肠道病毒感染);外膜蛋白OM,60kDa外膜蛋白,细胞表面抗原OmpA,细胞表面抗原OmpB(sca5),134kDa外膜蛋白,31kDa外膜蛋白,29.5kDa外膜蛋白,细胞表面蛋白SCA4,细胞表面蛋白Adr1(RP827),细胞表面蛋白Adr2(RP828),细胞表面蛋白SCA1,侵袭蛋白invA,细胞分裂蛋白fts,分泌蛋白sec 0家族,毒力蛋白virB,tlyA,tlyC,细小蛋白(parvulin)样蛋白Plp,蛋白前转位酶(preprotein translocase)SecA,120kDa表面蛋白抗原SPA,138kD复合抗原,主要100kD蛋白(蛋白I),胞质内蛋白D,保护性表面蛋白抗原SPA(普氏立克次氏体(*Rickettsia prowazekii*),流行性斑疹伤寒(Epidemic typhus));埃-巴二氏(Epstein-Barr)核抗原(EBNA-1,EBNA-2,EBNA-3A,EBNA-3B,EBNA-3C,EBNA-前导蛋白(EBNA-LP)),潜伏膜蛋白(LMP-1,LMP-2A,LMP-2B),早期抗原EBV-EA,膜抗原EBV-MA,病毒衣壳抗原EBV-VCA,碱性核酸酶EBV-AN,糖蛋白H,糖蛋白gp350,糖蛋白gp110,糖蛋白gp42,糖蛋白gHgL,糖蛋白gB(埃-巴二氏)病毒(EBV),埃-巴二氏病毒感染性单核细胞增多症);衣壳蛋白VP2,衣壳蛋白VP1,主要蛋白NS1(细小病毒B19,传染性红斑(第五病));pp65抗原,糖蛋白105,主要衣壳蛋白,包膜糖蛋白H,蛋白U51(人疱疹病毒6(HHV-6)和人疱疹病毒7(HHV-7),幼儿急疹);硫氧还蛋白-谷胱甘肽还原酶TGR,组织蛋白酶L1和L2,Kunitz型蛋白KTM,亮氨酸氨肽酶LAP,半胱氨酸蛋白酶Fas2,鞘脂激素样蛋白-2SAP-2,硫氧还蛋白过氧化物酶TPx,Prx-1,Prx-2,组织蛋白酶L-半胱氨酸蛋白酶CL3,蛋白酶组织蛋白酶L CL1,磷酸甘油酸激酶PGK,27-kDa分泌蛋白,60kDa蛋白HSP35 α ,谷胱甘肽转移酶GST,28.5kDa外皮抗原28.5kDa TA,组织蛋白酶B3蛋白酶CatB3,I型胱抑素stefin-1,组织蛋白酶L5,组织蛋白酶L1g和组织蛋白酶B,脂肪酸结合蛋白FABP,亮氨酸氨肽酶LAP(肝片吸虫和大片吸虫,肝片吸虫病);朊蛋白(FFI朊病毒,致命性家族性失眠症(FFI));毒液过敏原同源样蛋白VAL-1,丰富的幼虫转录物ALT-1,丰富的幼虫转录物ALT-2,硫氧还蛋白过氧化物酶TPX,胡蜂过敏原同源物VAH,硫氧还蛋白过氧化物酶2TPX-2,抗原蛋白SXP(肽N,N1,N2,和N3),活化相关蛋白-1ASP-1,硫氧还蛋白TRX,转谷氨酰胺酶BmTGA,谷胱甘肽-S-转移酶GST,肌球蛋白,胡蜂过敏原同源物VAH,175kDa胶原酶,甘油醛-3-磷酸脱氢酶GAPDH,角质层胶原蛋白Col-4,分泌的幼虫酸性蛋白SLAPs,几丁质酶CHI-1,麦芽糖结合蛋白MBP,糖酵解酶果糖-1,6-二磷酸醛缩酶Fba,原肌球蛋白TMY-1,线虫特异性基因产物OvB20,半胱氨酸蛋白酶抑制剂(onchocystatin)CPI-2,Cox-2(丝虫超家族(*Filarioidea* superfamily),丝虫病(Filariasis));磷脂酶C PLC,热不稳定肠毒素B,Iota毒素成分Ib,蛋白CPE1281,丙酮酸铁氧还蛋白氧化还原酶,延伸因子G EF-G,裂解素(perfringolysin)O Pfo,甘油醛-3-磷酸脱氢酶GapC,果糖二磷酸醛缩酶Alf2,产气荚膜梭菌肠毒素CPE, α 毒素AT, α 类毒素ATd, ϵ -类毒素ETd,蛋白HP,大细胞毒素TpeL,内切- β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶Naglu,磷酸甘油半胱氨酸酶Pgm(产气荚膜梭菌,产气荚膜梭菌引起的食物中毒);白细胞毒素lktA,粘附FadA,外膜蛋白RadD,高分子量精氨酸结合蛋白(梭杆菌属,梭杆菌属感染);磷脂酶C PLC,热不稳定肠毒素B,Iota毒素成分Ib,蛋白CPE1281,丙酮酸铁氧还蛋白氧化还原酶,延伸因子G EF-G,裂解素(perfringolysin)O Pfo,甘油醛-3-磷酸脱氢酶GapC,果糖二磷酸醛缩酶Alf2,产气荚膜梭菌肠毒素CPE, α 毒素AT, α 类毒素ATd, ϵ -类毒素ETd,蛋白HP,大细胞毒素TpeL,内切- β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶Naglu,磷酸甘油半胱氨酸酶Pgm(通常产气荚膜梭菌;其他梭菌属物种,气性坏疽(梭菌肌坏死));脂肪酶A,脂肪酶B,过氧化物酶Dec1(念珠地丝菌(*Geotrichum candidum*),地丝菌病(Geotrichosis));朊蛋白

(GSS)朊病毒,格-施-沙(Gerstmann-Sträussler-Scheinker)综合征(GSS);囊壁蛋白CWP1, CWP2, CWP3, 变体表面蛋白VSP, VSP1, VSP2, VSP3, VSP4, VSP5, VSP6, 56kDa抗原, 丙酮酸铁氧还蛋白氧化还原酶PFOR, 醇脱氢酶E ADHE, α -贾第素(alpha-giardin), α 8-贾第素, α 1-贾第素, β -贾第素, 半胱氨酸蛋白酶, 谷胱甘肽-S-转移酶GST, 精氨酸脱亚胺酶ADI, 果糖-1,6-双磷酸醛缩酶FBA, 贾第虫滋养体抗原GTA (GTA1, GTA2), 鸟氨酸羧基转移酶OCT, 条纹纤维-阿塞布林样蛋白(striated fiber-asseblin-like protein)SALP, 尿苷磷酸基样蛋白UPL, α -微管蛋白, β -微管蛋白(贾第虫, 贾第虫病); ABC转运蛋白家族成员(LolC, OppA和PotF), 推定的脂蛋白释放系统跨膜蛋白LolC/E, 鞭毛蛋白FliC, 伯克霍尔德氏菌细胞内运动A BimA, 细菌伸长因子-Tu EF-Tu, 17kDa OmpA样蛋白, boaA编码蛋白(鼻疽伯克霍尔德菌, 鼻疽); 亲环蛋白CyP, 24kDa第三阶段幼虫蛋白GS24, 排泄分泌产物ESPs (40、80、120和208kDa) (棘颚口线虫(Gnathostoma spinigerum)和刚棘颚口线虫(Gnathostoma hispidum), 腭口线虫病(Gnathostomiasis)); 菌毛蛋白, 次要菌毛蛋白相关亚基pilC, 主要菌毛蛋白亚基和变体pilE, pilS, 相变蛋白porA, 孔蛋白(porin) B PorB, 蛋白TraD, 奈瑟球菌外膜抗原H.8, 70kDa抗原, 主要外膜蛋白PI, 外膜蛋白P1A和P1B, W抗原, 表面蛋白A NspA, 转铁蛋白结合蛋白TbpA, 转铁蛋白结合蛋白TbpB, PBP2, mtrR编码蛋白, ponA编码蛋白, 膜通透酶FbpBC, FbpABC蛋白系统, LbpAB蛋白, 外膜蛋白Opa, 外膜转运蛋白FetA, 铁抑制调节因子MpeR(淋病奈瑟氏球菌, 淋病); 外膜蛋白A OmpA, 外膜蛋白C OmpC, 外膜蛋白K17 OmpK17(肉芽肿克雷伯菌(Klebsiella granulomatis), 腹股沟肉芽肿(Granuloma inguinale)(杜诺凡病(Donovanosis))); 纤连蛋白-结合蛋白Sfb, 纤连蛋白/纤维蛋白原结合蛋白FBP54, 纤连蛋白-结合蛋白FbaA, M蛋白1型Emm1, M蛋白6型Emm6, 免疫球蛋白-结合蛋白35 Sib35, 表面蛋白R28 Spr28, 超氧化物歧化酶SOD, C5a肽酶ScpA, 抗原I/II AgI/II, 粘附素AspA, G-相关的 α 2-巨球蛋白结合蛋白GRAB, 表面纤维状蛋白M5(化脓性链球菌, A组链球菌感染); C蛋白 β 抗原, 精氨酸脱亚胺酶蛋白, 粘附素BibA, 105 kDa蛋白BPS, 表面抗原c, 表面抗原R, 表面抗原X, 胰蛋白酶抗性蛋白R1, 胰蛋白酶抗性蛋白R3, 胰蛋白酶抗性蛋白R4, 表面免疫原性蛋白Sip, 表面蛋白Rib, 富含亮氨酸的重复蛋白LrrG, 富含丝氨酸的重复蛋白Srr-2, C蛋白 α 抗原Bca, β 抗原Bag, 表面抗原 ϵ , α 样蛋白ALP1, α 样蛋白ALP5表面抗原 δ , α 样蛋白ALP2, α 样蛋白ALP3, α 样蛋白ALP4, C β 蛋白Bac(无乳链球菌, B组链球菌感染); 转铁蛋白结合蛋白2 Tbp2, 磷酸酶P4, 外膜蛋白P6, 肽聚糖相关脂蛋白Pal, 蛋白D, 蛋白E, 粘附和渗透蛋白Hap, 外膜蛋白26 Omp26, 外膜蛋白P5(Fimbrin), 外膜蛋白D15, 外膜蛋白OmpP2, 5'-核苷酸酶NucA, 外膜蛋白P1, 外膜蛋白P2, 外膜脂蛋白Pcp, 脂蛋白E, 外膜蛋白P4, 墨角藻激酶(fuculokinase FucK), [Cu, Zn]-超氧化物歧化酶SodC, 蛋白酶HtrA, 蛋白O145, α -半乳糖苷神经酰胺(流感嗜血杆菌, 流感嗜血杆菌感染); 聚合酶3D, 病毒衣壳蛋白VP1, 病毒衣壳蛋白VP2, 病毒衣壳蛋白VP3, 病毒衣壳蛋白VP4, 蛋白酶2A, 蛋白酶3C(肠道病毒, 主要是柯萨奇A病毒和肠道病毒71(EV71), 手足口病(HFMD)); RNA聚合酶L, 蛋白L, 糖蛋白Gn, 糖蛋白Gc, 核衣壳蛋白S, 包膜糖蛋白G1, 核蛋白NP, 蛋白N, 多蛋白M(辛农布雷(Sin Nombre)病毒, 汉坦病毒, 汉坦病毒肺综合征(HPS)); 热休克蛋白HspA, 热休克蛋白HspB, 柠檬酸合成酶GltA, 蛋白UreB, 热休克蛋白Hsp60, 中性粒细胞活化蛋白NAP, 过氧化氢酶KatA, 空泡细胞毒素VacA, 尿素酶 α UreA, 尿素酶 β UreB, 蛋白Cpn10, 蛋白groEs, 热休克蛋白Hsp10, 蛋白MopB, 细胞毒性相关的10kDa蛋白CAG, 36kDa抗原, β -内酰胺酶HcpA, β -内酰胺酶HcpB(幽门螺杆菌, 幽门螺杆菌

菌感染);整合膜蛋白,易聚集蛋白,0-抗原,毒素-抗原Stx2B,毒素-抗原Stx1B,粘附抗原片段Int28,蛋白EspA,蛋白EspB,紧密黏附素(Intimin),蛋白Tir,蛋白IntC300,蛋白Eae(大肠杆菌O157:H7,0111和O104:H4,溶血性尿毒症综合征(HUS));RNA聚合酶L,蛋白L,糖蛋白Gn,糖蛋白Gc,核衣壳蛋白S,包膜糖蛋白G1,核蛋白NP,蛋白N,多蛋白M(布尼维病毒科,肾综合征出血热(HFRS));糖蛋白G,基质蛋白M,核蛋白N,融合蛋白F,聚合酶L,蛋白W,蛋白C,磷酸蛋白p,非结构蛋白V(亨尼帕病毒(Hendra virus Nipah病毒),亨尼帕病毒感染);多蛋白,糖蛋白Gp2,甲型肝炎表面抗原HBsAg,蛋白2A,病毒蛋白VP1,病毒蛋白VP2,病毒蛋白VP3,病毒蛋白VP4,蛋白P1B,蛋白P2A,蛋白P3AB,蛋白P3D(甲型肝炎病毒,甲型肝炎);乙型肝炎表面抗原HBsAg,乙型肝炎核心抗原HbcAg,聚合酶,蛋白Hbx,preS2中表面蛋白,表面蛋白L,大S蛋白,病毒蛋白VP1,病毒蛋白VP2,病毒蛋白VP3,病毒蛋白VP4(乙型肝炎病毒(HBV),乙型肝炎);包膜糖蛋白E1 gp32 gp35,包膜糖蛋白E2 NS1 gp68 gp70,衣壳蛋白C,核心蛋白核心,多蛋白,病毒蛋白VP1,病毒蛋白VP2,病毒蛋白VP3,病毒蛋白VP4,抗原G,蛋白NS3,蛋白NS5A,(丙型肝炎病毒,丙型肝炎);病毒蛋白VP1,病毒蛋白VP2,病毒蛋白VP3,病毒蛋白VP4,大型肝炎 δ 抗原,小型肝炎 δ 抗原(丁型肝炎病毒,丁型肝炎);病毒蛋白VP1,病毒蛋白VP2,病毒蛋白VP3,病毒蛋白VP4,衣壳蛋白E2(戊型肝炎病毒,戊型肝炎);糖蛋白L UL1,尿嘧啶-DNA糖基化酶UL2,蛋白UL3,蛋白UL4,DNA复制蛋白UL5,门静脉蛋白UL6,病毒粒子成熟蛋白UL7,DNA解旋酶UL8,复制起始结合蛋白UL9,糖蛋白M UL10,蛋白UL11,碱性外切核酸酶UL12,丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶UL13,外皮蛋白UL14,终止酶UL15,外皮蛋白UL16,蛋白UL17,衣壳蛋白VP23UL18,主要衣壳蛋白VP5UL19,膜蛋白UL20,外皮蛋白UL21,糖蛋白H(UL22),胸苷激酶UL23,蛋白UL24,蛋白UL25,衣壳蛋白P40(UL26,VP24,VP22A),糖蛋白B(UL27),ICP18.5蛋白(UL28),主要DNA结合蛋白ICP8(UL29),DNA聚合酶UL30,核基质蛋白UL31,包膜糖蛋白UL32,蛋白UL33,内核膜蛋白UL34,衣壳蛋白VP26(UL35),大外皮蛋白UL36,衣壳装配蛋白UL37,VP19C蛋白(UL38),核糖核苷酸还原酶(大亚基)UL39,核糖核苷酸还原酶(小亚基)UL40,外皮蛋白/病毒体宿主关闭VHS蛋白(UL41),DNA聚合酶持续合成因子UL42,膜蛋白UL43,糖蛋白C(UL44),膜蛋白UL45,外皮蛋白VP11/12(UL46),外皮蛋白VP13/14(UL47),病毒粒子成熟蛋白VP16(UL48, α -TIF),包膜蛋白UL49,dUTP二磷酸酶UL50,外皮蛋白UL51,DNA解旋酶/引物酶络合物蛋白UL52,糖蛋白K(UL53),转录调节蛋白IE63(ICP27,UL54),蛋白UL55,蛋白UL56,病毒复制蛋白ICP22(IE68,US1),蛋白US2,丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶US3,糖蛋白G(US4),糖蛋白J(US5),糖蛋白D(US6),糖蛋白I(US7),糖蛋白E(US8),外皮蛋白US9,衣壳/外皮蛋白US10,Vmw21蛋白(US11),ICP47蛋白(IE12,US12),主要转录激活剂ICP4(IE175,RS1),E3泛素连接酶ICP0(IE110),潜伏相关蛋白1LRP1,潜伏相关蛋白2 LRP2,神经毒力因子RL1(ICP34.5),潜伏相关转录物LAT(单纯疱疹病毒1和2(HSV-1和HSV-2),单纯疱疹);热休克蛋白Hsp60,细胞表面蛋白H1C,二肽基肽酶IV型DppIV,M抗原,70kDa蛋白,17kDa组蛋白样蛋白(夹膜组织胞浆菌,组织胞浆菌病);脂肪酸和视黄醇结合蛋白-1FAR-1,金属蛋白酶组织抑制剂TIMP(TMP),半胱氨酸蛋白酶ACEY-1,半胱氨酸蛋白酶ACCP-1,表面抗原Ac-16,分泌蛋白2ASP-2,金属蛋白酶1MTP-1,天冬氨酰蛋白酶抑制剂API-1,表面相关抗原SAA-1,表面相关抗原SAA-2,成人特异性分泌因子Xa,丝氨酸蛋白酶抑制剂抗凝血剂AP,组织蛋白酶D样天冬氨酰蛋白酶ARR-1,谷胱甘肽S-转移酶GST,天冬氨酰蛋白酶APR-1,乙酰胆碱酯酶AChE(十二指肠钩虫(*Ancylostoma duodenale*)和美洲板口线虫(*Necator*

americanus), 钩虫感染); 蛋白NS1, 蛋白NP1, 蛋白VP1, 蛋白VP2, 蛋白VP3 (人博卡病毒(HBoV), 人博卡病毒感染); 主要表面蛋白2MSP2, 主要表面蛋白4MSP4, MSP变体SGV1, MSP变异体SGV2, 外膜蛋白OMP, 外膜蛋白19OMP-19, 主要抗原蛋白MAP1, 主要抗原蛋白MAP1-2, 主要抗原蛋白MAP1B, 主要抗原蛋白MAP1-3, Erum2510编码蛋白, 蛋白GroEL, 蛋白GroES, 30-kDa主要外膜蛋白, GE 100-kDa蛋白, GE 130-kDa蛋白, GE 160-kDa蛋白 (伊氏埃立克体(*Ehrlichia ewingii*), 人伊氏埃立克体病(human ewingii ehrlichiosis)); 主要表面蛋白1-5 (MSP1a, MSP1b, MSP2, MSP3, MSP4, MSP5), IV型分泌系统蛋白VirB2, VirB7, VirB11, VirD4 (嗜吞噬细胞无形体(*Anaplasma phagocytophilum*), 人粒细胞无形体病(HGA)); 蛋白NS1, 小疏水蛋白NS2, SH蛋白, 融合蛋白F, 糖蛋白G, 基质蛋白M, 基质蛋白M2-1, 基质蛋白M2-2, 磷蛋白P, 核蛋白N, 聚合酶L (人偏肺病毒(hMPV), 人变性肺病毒感染); 主要表面蛋白2MSP2, 主要表面蛋白4MSP4, MSP变体SGV1, MSP变异体SGV2, 外膜蛋白OMP, 外膜蛋白19OMP-19, 主要抗原蛋白MAP1, 主要抗原蛋白MAP1-2, 主要抗原蛋白MAP1B, 主要抗原蛋白MAP1-3, Erum2510编码蛋白, 蛋白GroEL, 蛋白GroES, 30-kDa主要外膜蛋白, GE 100-kDa蛋白, GE 130-kDa蛋白, GE 160-kDa蛋白 (查菲埃里希体病, 人单核细胞埃里希体病); 复制蛋白E1, 调节蛋白E2, 蛋白E3, 蛋白E4, 蛋白E5, 蛋白E6, 蛋白E7, 蛋白E8, 主要衣壳蛋白L1, 次要衣壳蛋白L2 (人乳头瘤病毒(HPV), 人乳头瘤病毒(HPV)感染); 融合蛋白F, 血凝素-神经氨酸酶HN, 糖蛋白G, 基质蛋白M, 磷蛋白P, 核蛋白N, 聚合酶L (人副流感病毒(HPIV), 人副流感病毒感染); 血凝素(HA), 神经氨酸酶(NA), 核蛋白(NP), M1蛋白, M2蛋白, NS1蛋白, NS2蛋白 (NEP蛋白: 核输出蛋白), PA蛋白, PB1蛋白 (聚合酶碱基1蛋白), PB1-F2蛋白和PB2蛋白 (正粘病毒科, 流感病毒(流感)); 基因组多蛋白, 蛋白E, 蛋白M, 衣壳蛋白C (日本脑炎病毒, 日本脑炎); RTX毒素, IV型菌毛, 主要菌毛亚基PilA, 调节转录因子PilS和PilR, 蛋白 σ 54 (sigma54), 外膜蛋白 (金氏金氏菌, 金氏金氏菌感染); 朊蛋白 (库鲁病朊病毒(Kuru prion), 库鲁病); 核蛋白N, 聚合酶L, 基质蛋白Z, 糖蛋白GP (拉沙病毒, 拉沙热); 肽聚糖相关脂蛋白PAL, 60kDa伴侣蛋白Cpn60 (groEL, HspB), IV型菌毛蛋白PilE, 外膜蛋白MIP, 主要外膜蛋白MompS, 锌金属蛋白酶MSP (嗜肺军团菌(*Legionella pneumophila*), 嗜肺军团病(Legionellosis) (军团病, 庞提阿克热(Pontiac fever))); P4核酸酶, 蛋白WD, 核糖核苷酸还原酶M2, 表面膜糖蛋白Pg46, 半胱氨酸蛋白酶CP, 葡萄糖调节蛋白78 GRP-78, 阶段特异性S抗原样蛋白A2, ATP酶F1, β -微管蛋白, 热休克蛋白70 Hsp70, KMP-11, 糖蛋白GP63, 蛋白BT1, 核苷水解酶NH, 细胞表面蛋白B1, 核糖体蛋白P1样蛋白P1, 甾醇24-c-甲基转移酶SMT, LACK蛋白, 组蛋白H1, SPB1蛋白, 硫醇特异性抗氧化剂TSA, 蛋白抗原ST11, 信号肽酶SP, 组蛋白H2B, 表面抗原PSA-2, 半胱氨酸蛋白酶b Cpb (利什曼原虫属, 利什曼病); 主要膜蛋白I, 富含丝氨酸的抗原-45kDa, 10kDa伴侣蛋白GroES, HSP kDa抗原, 氨基氧壬酸合成酶AONS, 蛋白重组酶A RecA, 乙酰基/丙酰辅酶A羧化酶 α , 丙氨酸消旋酶, 60kDa伴侣蛋白2, ESAT-6样蛋白EcxB (L-ESAT-6), 蛋白Lsr2, 蛋白ML0276, 肝素结合血凝素HBHA, 热休克蛋白65Hsp65, mycP1或ML0041编码蛋白, htrA2或ML0176编码蛋白, htrA4或ML2659编码蛋白, gcp或ML0379编码蛋白, clpC或ML0235编码蛋白 (麻风分枝杆菌和麻风分枝杆菌病, 麻风病); 外膜蛋白LipL32, 膜蛋白LIC10258, 膜蛋白LP30, 膜蛋白LIC12238, Ompa样蛋白Lsa66, 表面蛋白LigA, 表面蛋白LigB, 主要外膜蛋白OmpL1, 外膜蛋白LipL41, 蛋白LigAni, 表面蛋白LcpA, 粘附蛋白LipL53, 外膜蛋白UpL32, 表面蛋白Lsa63, 鞭毛蛋白FlaB1, 膜脂蛋白LipL21, 膜蛋白pL40, 钩端螺旋体表面粘

附素Lsa27,外膜蛋白OmpL36,外膜蛋白OmpL37,外膜蛋白OmpL47,外膜蛋白OmpL54,酰基转移酶LpxA(钩端螺旋体属,钩端螺旋体病);李斯特菌溶血素O前体Hly(LL0),侵袭相关蛋白Iap(P60),李斯特菌溶血素调节蛋白PrfA,锌金属蛋白酶Mpl,磷脂酰肌醇特异性磷脂酶C PLC(PlcA,PlcB),0-乙酰转移酶燕麦,ABC转运蛋白通透酶Im.G_1771,粘附蛋白LAP,LAP受体Hsp60,粘附素LapB,溶血素,李斯特菌溶血素O LL0,蛋白ActA,内化素(Intestinalin)A In1A,蛋白In1B(单核细胞增生李斯特氏菌,李斯特菌病);外表面蛋白A OspA,外表面蛋白OspB,外表面蛋白OspC,核心蛋白聚糖结合蛋白A DbpA,核心蛋白聚糖结合蛋白B DbpB,鞭毛丝41kDa核心蛋白Fla,碱性膜蛋白A BmpA(免疫显性抗原P39),外表面22kDa脂蛋白前体(抗原IPLA7),可变表面脂蛋白vlsE(通常为博氏疏螺旋体和其他疏螺旋体属,莱姆病(莱姆疏螺旋体病));毒液过敏原同源样蛋白VAL-1,丰富的幼虫转录物ALT-1,丰富的幼虫转录物ALT-2,硫氧还蛋白过氧化物酶TPX,胡蜂过敏原同源物VAH,硫氧还蛋白过氧化物酶2TPX-2,抗原蛋白SXP(肽N,N1,N2,和N3),激活相关蛋白-1ASP-1,硫氧还蛋白TRX,转谷氨酰胺酶BmTGA,谷胱甘肽-S-转移酶GST,肌球蛋白,胡蜂(vespid)过敏原同源物VAH,175kDa胶原酶,甘油醛-3-磷酸脱氢酶GAPDH,角质层胶原蛋白Col-4,分泌的幼虫酸性蛋白SLAPs,几丁质酶CHI-1,麦芽糖结合蛋白MBP,糖酵解酶果糖-1,6-二磷酸醛缩酶Fba,原肌球蛋白TMY-1,线虫特异性基因产物OvB20,半胱氨酸蛋白酶抑制剂(onchocystatin)CPI-2,蛋白Cox-2(班氏血丝虫和马来丝虫,淋巴丝虫病(象皮病));糖蛋白GP,基质蛋白Z,聚合酶L,核蛋白N(淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒(LCMV),淋巴细胞脉络丛脑膜炎);血小板反应蛋白相关的匿名蛋白TRAP,SSP2孢子表面蛋白2,顶膜抗原1AMA1,棒状体膜抗原RMA1,酸性碱性重复抗原ABRA,细胞穿越蛋白PF,蛋白Pvs25,裂殖子表面蛋白1MSP-1,裂殖子表面蛋白2MSP-2,环感染的红细胞表面抗原RESALiver阶段抗原3LSA-3,蛋白Eba-175,丝氨酸重复抗原5SERA-5,环孢子蛋白CS,裂殖子表面蛋白3MSP3,裂殖子表面蛋白8MSP8,烯醇化酶PF10,肝细胞红细胞蛋白17kDa HEP17,红细胞膜蛋白1EMP1,蛋白克伯氏(Kbetamezoite)表面蛋白4/5MSP 4/5,热休克蛋白Hsp90,谷氨酸富集蛋白GLURP,裂殖子表面蛋白4MSP-4,蛋白STARP,环孢子蛋白相关抗原前体CRA(疟原虫属,疟疾);核蛋白N,膜相关蛋白VP24,次要核蛋白VP30,聚合酶辅助因子VP35,聚合酶L,基质蛋白VP40,包膜糖蛋白GP(马尔堡病毒,马尔堡出血热(MHF));蛋白C,基质蛋白M,磷蛋白P,非结构蛋白V,血凝素糖蛋白H,聚合酶L,核蛋白N,融合蛋白F(麻疹病毒,麻疹);ABC转运蛋白家族成员(LolC,OppA和PotF),推定的脂蛋白释放系统跨膜蛋白LolC/E,鞭毛蛋白FliC,伯克霍尔德氏菌细胞内运动A BimA,细菌伸长因子-Tu EF-Tu,17kDa OmpA样蛋白,boaA编码蛋白,boaB编码蛋白(类鼻疽伯克霍尔德菌,类鼻疽(莫尔氏病));菌毛蛋白,次要菌毛蛋白相关亚基pilC,主要菌毛蛋白亚基和变体pilE,pilS,相变蛋白porA,孔蛋白B PorB,蛋白TraD,奈瑟球菌外膜抗原H.8,70kDa抗原,主要外膜蛋白PI,外膜蛋白P1A和P1B,W抗原,表面蛋白A NspA,转铁蛋白结合蛋白TbpA,转铁蛋白结合蛋白TbpB,PBP2,mtrR编码蛋白,ponA编码蛋白,膜渗透酶FbpBC,FbpABC蛋白系统,LbpAB蛋白,外膜蛋白Opa,外膜转运蛋白FetA,铁抑制调节因子MpeR,因子H结合蛋白fHbp,粘附素NadA,蛋白NhbA,阻遏物FarR(脑膜炎奈瑟球菌,脑膜炎球菌病);66kDa蛋白,22kDa蛋白(通常为横川后殖吸虫,后殖吸虫病);极性管蛋白(格留虫属(Glugea)中的34、75和170kDa,脑胞内原虫属(Encephalitozoon)中的35、55和150kDa),驱动蛋白相关蛋白,RNA聚合酶II最大亚基,类似于完整膜蛋白YIPA,抗沉默蛋白1,热休克转录因子HSF,蛋白激酶,胸苷激酶,NOP-2样核

仁蛋白(微孢子虫门(Microsporidia phylum),微孢子虫病);CASP8和FADD样凋亡调节因子,谷胱甘肽过氧化物酶GPX1,RNA解旋酶NPH-II NPH2,聚(A)聚合酶催化亚基PAPL,主要包膜蛋白P43K,早期转录因子70kDa亚基VETFS,早期转录因子82kDa亚基VETFL,金属内肽酶G1型,核苷三磷酸酶I NPH1,复制蛋白A28样MC134L,RNA聚合酶7kDa亚基RP07(传染性软疣病毒(MCV),传染性软疣(MC));基质蛋白M,磷蛋白P/V,小疏水蛋白SH,核蛋白N,蛋白V,融合糖蛋白F,血凝素-神经氨酸酶HN,RNA聚合酶L(腮腺炎病毒,腮腺炎);外膜蛋白OM,细胞表面抗原OmpA,细胞表面抗原OmpB(sca5),细胞表面蛋白SCA4,细胞表面蛋白SCA1,胞质内蛋白D,结晶表层蛋白SLP,保护性表面蛋白抗原SPA(伤寒立克次体,鼠伤寒杆菌(地方性斑疹伤寒));粘附素P1,粘附蛋白P30,蛋白p116,蛋白P40,细胞骨架蛋白HMW1,细胞骨架蛋白HMW2,细胞骨架蛋白HMW3,MPN152编码蛋白,MPN426编码蛋白,MPN456编码蛋白,MPN-500编码蛋白(肺炎支原体,支原体肺炎);NocA,铁依赖性调节蛋白,VapA,VapD,VapF,VapG,酪蛋白分解蛋白酶,细丝尖端相关43-kDa蛋白,蛋白P24,蛋白P61,15-kDa蛋白,56-kDa蛋白(通常为星形诺卡氏菌和其他诺卡氏菌种,诺卡氏菌病);毒液过敏原同源蛋白VAL-1,丰富的幼虫转录物ALT-1,丰富的幼虫转录物ALT-2,硫氧还蛋白过氧化物酶TPX,胡蜂过敏原同源物VAH,硫氧还蛋白过氧化物酶2 TPX-2,抗原蛋白SXP(肽N,N1,N2,和N3),活化相关蛋白-1ASP-1,硫氧还蛋白TRX,转谷氨酰胺酶BmTGA,谷胱甘肽-S-转移酶GST,肌球蛋白,胡蜂过敏原同源物VAH,175 kDa胶原酶,甘油醛-3-磷酸脱氢酶GAPDH,角质层胶原蛋白Col-4,分泌的幼虫酸性蛋白SLAPs,几丁质酶CHI-1,麦芽糖结合蛋白MBP,糖酵解酶果糖-1,6-二磷酸醛缩酶Fba,原肌球蛋白TMY-1,线虫特异性基因产物OvB20,半胱氨酸蛋白酶抑制剂(onchocystatin)CPI-2,Cox-2(旋盘尾丝虫,旋盘尾丝虫病(河盲症));43kDa分泌糖蛋白,糖蛋白gp0,糖蛋白gp75,抗原Pb27,抗原Pb40,热休克蛋白Hsp65,热休克蛋白Hsp70,热休克蛋白Hsp90,蛋白P10,磷酸丙糖异构酶TPI,N-乙酰葡萄糖胺结合凝集素副球孢子(Paracoccin),28 kDa蛋白Pb28(巴西副球孢子菌,副球孢子菌病(南美芽生菌病));28-kDa克努兹盼样(cruzipain-like)半胱氨酸蛋白酶Pw28CCP(通常为卫氏肺吸虫和其他肺吸虫种,肺吸虫病);外膜蛋白OmpH,外膜蛋白Omp28,蛋白PM1539,蛋白PM0355,蛋白PM1417,修复蛋白MutL,蛋白BcbC,蛋白PM0305,甲酸脱氢酶-N,蛋白PM0698,蛋白PM1422,DNA促旋酶,脂蛋白PlpE,粘附蛋白Cp39,血红素采集系统受体HasR,39kDa荚膜蛋白,铁调节OMP IROMP,外膜蛋白OmpA87,菌毛蛋白Ptf,菌毛亚基蛋白PtfA,转铁蛋白结合蛋白Tbpl,酯酶MesA,多杀巴斯德氏菌毒素PMT,粘附蛋白Cp39(巴斯德氏菌属,巴斯德菌病);“丝状血凝素FhaB,腺苷酸环化酶CyaA,百日咳毒素亚基4前体PtxD,百日咳杆菌前体Prn,毒素亚基1 PtxA,蛋白Cpn60,蛋白brkA,百日咳毒素亚基2前体PtxB,百日咳毒素亚基3前体PtxC,百日咳毒素亚基5前体PtxE,百日咳杆菌粘附素Prn,蛋白Fim2,蛋白Fim3;“(百日咳博德特氏菌,百日咳(百日咳病));“F1荚膜抗原,毒力相关V抗原,分泌效应蛋白LcrV,V抗原,外膜蛋白酶PlpA,分泌效应蛋白YopD,推定分泌蛋白酪氨酸磷酸酶YopH,针络合物主要亚基YscF,蛋白激酶YopO,推定的自转运蛋白YapF,内膜ABC转运蛋白YbtQ(Irp7),推定的糖结合蛋白YP00612,热休克蛋白90HtpG,推定的硫酸酯酶蛋白YdeN,外膜脂蛋白载体蛋白Lo1A,分泌伴侣YerA,推定的脂蛋白YP00420,溶血素激活蛋白HpmB,农药/耶尔森杆菌素膜受体Psn,分泌效应蛋白YopE,分泌效应蛋白YopF,分泌效应蛋白YopK,外膜蛋白YopN,外膜蛋白YopM,凝固酶/纤维蛋白溶酶前体PlpA;“(鼠疫耶尔森氏菌,鼠疫);蛋白PhpA,表面粘附素PsaA,肺炎球菌溶血素Ply,ATP依赖性蛋

白酶Clp, 脂肪酸-蛋白连接酶LplA, 细胞壁表面锚定蛋白psrP, 分选酶SrtA, 谷氨酰tRNA合成酶GltX, 胆碱结合蛋白A CbpA, 肺炎球菌表面蛋白A PspA, 肺炎球菌表面蛋白C PspC, 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶Gnd, 铁结合蛋白PiaA, 专一水解酶 (Murein hydrolase) 水解酶LytB, 蛋白LytC, 蛋白酶A1 (肺炎链球菌, 肺炎球菌感染); 主要表面蛋白B, kexin样蛋白酶KEX1, 蛋白A12, 55kDa抗原P55, 主要表面糖蛋白Msg (耶氏肺孢子虫, 肺孢子虫性肺炎 (PCP)); 基因组多蛋白, 聚合酶3D, 病毒衣壳蛋白VP1, 病毒衣壳蛋白VP2, 病毒衣壳蛋白VP3, 病毒衣壳蛋白VP4, 蛋白酶2A, 蛋白酶3C (脊髓灰质炎病毒, 脊髓灰质炎); 蛋白Nfa1, 肠促胰岛素类似物-3, 分泌型脂肪酶, 组织蛋白酶B样蛋白酶, 半胱氨酸蛋白酶, 组织蛋白酶, 过氧化还原酶, 蛋白Cry1Ac (通常为福氏耐格里阿米巴原虫, 原发性阿米巴脑膜脑炎 (PAM)); 未知蛋白 (agnoprotein), 大T抗原, 小T抗原, 主要衣壳蛋白VP1, 小衣壳蛋白Vp2 (JC病毒, 进行性多灶性脑白质病); 低钙反应蛋白E LCrE, 衣原体外蛋白N CopN, 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶PknD, 酰基载体蛋白S-丙二酰转移酶FabD, 单链DNA结合蛋白Ssb, 主要外膜蛋白MOMP, 外膜蛋白20mp2, 多态膜蛋白家族 (Pmp1, Pmp2, Pmp3, Pmp4, Pmp5, Pmp6, Pmp7, Pmp8, Pmp9, Pmp10, Pmp11, Pmp12, Pmp13, Pmp14, Pmp15, Pmp16, Pmp17, Pmp18, Pmp19, Pmp20, Pmp21) (鹦鹉热衣原体 (*Chlamydophila psittaci*), 鹦鹉热病); 外膜蛋白P1, 热休克蛋白B HspB, 肽ABC转运蛋白, GTP结合蛋白, 蛋白IcmB, 核糖核酸酶R, 磷酸酶SixA, 蛋白DsbD, 外膜蛋白To1C, DNA结合蛋白PhoB, ATP酶DotB, 热休克蛋白B HspB, 膜蛋白Com1, 28kDa蛋白, DNA-3-甲基腺嘌呤糖苷酶I, 外膜蛋白OmpH, 外膜蛋白AdaA, 甘氨酸裂解系统T蛋白 (贝纳特氏立克次体, Q热病); 核蛋白N, 大结构蛋白L, 磷蛋白P, 基质蛋白M, 糖蛋白G (狂犬病病毒, 狂犬病); 融合蛋白F, 核蛋白N, 基质蛋白M, 基质蛋白M2-1, 基质蛋白M2-2, 磷蛋白P, 小疏水蛋白SH, 主要表面糖蛋白G, 聚合酶L, 非结构蛋白1NS1, 非结构蛋白2NS2 (呼吸道合胞病毒 (RSV), 呼吸道合胞病毒感染); 基因组多蛋白, 聚合酶3D, 病毒衣壳蛋白VP1, 病毒衣壳蛋白VP2, 病毒衣壳蛋白VP3, 病毒衣壳蛋白VP4, 蛋白酶2A, 蛋白酶3C (鼻病毒, 鼻病毒感染); 外膜蛋白OM, 细胞表面抗原OmpA, 细胞表面抗原OmpB (sca5), 细胞表面蛋白SCA4, 细胞表面蛋白SCA1, 蛋白PS120, 胞质内蛋白D, 保护性表面蛋白抗原SPA (立克次氏体属, 立克次体感染); 外膜蛋白OM, 细胞表面抗原OmpA, 细胞表面抗原OmpB (sca5), 细胞表面蛋白SCA4, 细胞表面蛋白SCA1, 胞质内蛋白D (小蛛立克次氏体, 立克次氏体痘); 包膜糖蛋白GP, 聚合酶L, 核蛋白N, 非结构蛋白NSS (裂谷热病毒, 裂谷热 (RVF)); 外膜蛋白OM, 细胞表面抗原OmpA, 细胞表面抗原OmpB (sca5), 细胞表面蛋白SCA4, 细胞表面蛋白SCA1, 胞质内蛋白D (立克次体立克次氏体, 落基山斑疹热 (RMSF)); “非结构蛋白6NS6, 非结构蛋白2NS2, 中间衣壳蛋白VP6, 内衣壳蛋白VP2, 非结构蛋白3NS3, RNA指导的RNA聚合酶L, 蛋白VP3, 非结构蛋白1NS1, 非-结构蛋白5NS5, 外衣壳糖蛋白VP7, 非结构糖蛋白4NS4, 外衣壳蛋白VP4” (轮状病毒, 轮状病毒感染); 多蛋白P200, 糖蛋白E1, 糖蛋白E2, 蛋白NS2, 衣壳蛋白C (风疹病毒, 风疹); 伴侣蛋白GroEL (MopA), 肌醇磷酸酶SopB, 热休克蛋白Hs1U, 伴侣蛋白DnaJ, 蛋白TviB, 蛋白IroN, 鞭毛蛋白FliC, 侵袭蛋白SipC, 糖蛋白gp43, 外膜蛋白LamB, 外膜蛋白PagC, 外膜蛋白To1C, 外膜蛋白NmpC, 外膜蛋白FadL, 转运蛋白SadA, 转移酶WgaP, 效应蛋白SifA, SteC, SseL, SseJ和SseF (沙门氏菌属, 沙门氏菌病), 蛋白14, 非结构蛋白NS7b, 非结构蛋白NS8a, 蛋白9b, 蛋白3a, 核蛋白N, 非结构蛋白NS3b, 非结构蛋白NS6, 蛋白7a, 非结构蛋白NS8b, 膜蛋白M, 包膜小膜蛋白EsM, 复制酶多蛋白1a, 加标糖蛋白S, 复制酶多蛋白1ab; (SARS冠状病毒, SARS (严重急性呼吸系统综合征));

丝氨酸蛋白酶,非典型疥螨抗原1ASA1,谷胱甘肽S-转移酶GST,半胱氨酸蛋白酶,丝氨酸蛋白酶,载脂蛋白(疥螨,疥疮);谷胱甘肽S-转移酶GST,副肌球蛋白,血红蛋白SM32,主要卵抗原,14kDa脂肪酸结合蛋白Sm14,主要幼虫表面抗原P37,22,6kDa表皮抗原,钙蛋白酶CANP,三磷酸异构酶Tim,表面蛋白9B,外衣壳蛋白VP2,23kDa整合膜蛋白Sm23,Cu/Zn-超氧化物歧化酶,糖蛋白Gp,肌球蛋白(血吸虫属,血吸虫病(裂体吸虫病));60kDa伴侣蛋白,56kDa型特异性抗原,丙酮酸磷酸二激酶,4-羟基苯甲酸八戊烯基转移酶(恙虫病东方体,恙虫病);脱氢酶GuaB,侵袭蛋白Spa32,侵袭素IpaA,侵袭素IpaB,侵袭素IpaC,侵袭素IpaD,侵袭素IpaH,侵袭素IpaJ(志贺氏菌属,志贺氏菌病(细菌性痢疾));蛋白P53,病毒粒子蛋白US10同源物,转录调节因子IE63,转录反式激活因子IE62,蛋白酶P33, α 反式诱导因子74kDa蛋白,脱氧尿苷5'-三磷酸核苷酸水解酶,转录反式激活因子IE4,膜蛋白UL43同源物,核磷蛋白UL3同系物,核蛋白UL4同源物,复制起始结合蛋白,膜蛋白2,磷蛋白32,蛋白57,DNA聚合酶持续合成因子,门蛋白54,DNA引物酶,外皮蛋白UL14同源物,外皮蛋白UL21同源物,外皮蛋白UL55同源物,三联终止酶亚基UL33同源物,三联终止酶亚基UL15同源物,衣壳结合蛋白44,病毒粒子包装蛋白43(水痘带状疱疹病毒(VZV),带状疱疹(带状疱疹));截短的3- β 羟基-5-烯类固醇脱氢酶同源物,病毒粒子膜蛋白A13,蛋白A19,蛋白A31,截短蛋白A35同源物,蛋白A37.5同源物,蛋白A47,蛋白A49,蛋白A51,信号素样蛋白A43,丝氨酸蛋白酶抑制剂1,丝氨酸蛋白酶抑制剂2,丝氨酸蛋白酶抑制剂3,蛋白A6,蛋白B15,蛋白C1,蛋白C5,蛋白C6,蛋白F7,蛋白F8,蛋白F9,蛋白F11,蛋白F14,蛋白F15,蛋白F16(重型天花或轻型天花,天花(痘疮));粘附素/糖蛋白gp70,蛋白酶(申克孢子丝菌,孢子丝菌病);血红素铁结合蛋白IsdB,胶原粘附素Cna,凝集因子A ClfA,蛋白MecA,纤连蛋白结合蛋白A FnbA,肠毒素A型EntA,肠毒素B型EntB,肠毒素C型EntC1,肠毒素C型EntC2,肠毒素D型EntD,肠毒素E型EntE,毒性休克综合征毒素-1TSST-1,葡萄球菌激酶,青霉素结合蛋白2a PBP2a (MecA),分泌抗原SssA(葡萄球菌属,葡萄球菌食物中毒);血红素铁结合蛋白IsdB,胶原粘附素Cna,凝集因子A ClfA,蛋白MecA,纤连蛋白结合蛋白A FnbA,肠毒素A型EntA,肠毒素B型EntB,肠毒素C型EntC1,肠毒素C型EntC2,肠毒素D型EntD,肠毒素E型EntE,毒性休克综合征毒素-1TSST-1,葡萄球菌激酶,青霉素结合蛋白2a PBP2a (MecA),分泌抗原SssA(金黄色葡萄球菌属,如金黄色葡萄球菌,金黄色葡萄球菌感染);抗原Ss-IR,抗原NIE,强力弹性蛋白,Na⁺-K⁺ATP酶Sseat-6,原肌球蛋白SsTmy-1,蛋白LEC-5,41kDa抗原P5,41-kDa幼虫蛋白,31kDa幼虫蛋白,28kDa幼虫蛋白(肠类圆线虫,类圆线虫病);甘油磷酸二酯磷酸二酯酶GlpQ(Gpd),外膜蛋白TnpB,蛋白Tp92,抗原TpF1,重复蛋白Tpr,重复蛋白F TprF,重复蛋白G TprG,重复蛋白I TprI,重复蛋白J TprJ,重复蛋白K TprK,密螺旋体膜蛋白TnpA,脂蛋白,15kDa Tpp15,47kDa膜抗原,微铁蛋白(miniferritin)TpF1,粘附素Tp0751,脂蛋白TP0136,蛋白TpN17,蛋白TpN47,外膜蛋白TP0136,外膜蛋白TP0155,外膜蛋白TP0326,外膜蛋白TP0483,外膜膜蛋白TP0956(梅毒螺旋体,梅毒);组织蛋白酶L样蛋白酶,53/25-kDa抗原,8kDa家族成员,具有边缘胰蛋白酶样活性的囊尾蚴蛋白TsAg5,六钩蚴蛋白TSOL18,六钩蚴蛋白TSOL45-1A,乳酸脱氢酶A LDHA,乳酸脱氢酶B LDHB(牛带绦虫属,绦虫病);破伤风毒素TetX,破伤风毒素C TTC,140kDa S层蛋白,黄素蛋白 β 亚基CT3,磷脂酶(卵磷脂酶),磷酸载体蛋白HPr(破伤风梭菌,破伤风(牙关紧闭症));基因组多蛋白,蛋白E,蛋白M,衣壳蛋白C(蜱传脑炎病毒(TBEV),蜱传脑炎);58-kDa抗原,68-kDa抗原,弓蛔虫幼虫排泄分泌抗原TES,32-kDa糖蛋白,糖蛋白

TES-70,糖蛋白GP31,排泄分泌抗原TcES-57,肠周液抗原Pe,可溶性提取物抗原Ex,排泄物/分泌幼虫抗原ES,抗原TES-120,多蛋白过敏原TBA-1,组织蛋白酶L样半胱氨酸蛋白酶c-cpl-1,26-kDa蛋白(犬弓蛔虫或猫弓蛔线虫,弓蛔虫病(眼幼虫移行症(OLM)和内脏幼虫移行症(VLM)));微线蛋白(MIC1,MIC2,MIC3,MIC4,MIC5,MIC6,MIC7,MIC8),棒状体蛋白Rop2,棒状体蛋白(Rop1,Rop2,Rop3,Rop4,Rop5,Rop6,Rop7,Rop16,Rjop17),蛋白SR1,表面抗原P22,主要抗原p24,主要表面抗原p30,致密颗粒蛋白(GRA1,GRA2,GRA3,GRA4,GRA5,GRA6,GRA7,GRA8,GRA9,GRA10),28kDa抗原,表面抗原SAG1,SAG2相关抗原,核苷-三磷酸酶1,核苷-三磷酸酶2,蛋白Stt3,含有HesB样结构域的蛋白,菱形蛋白酶5,毒蛋白酶1(弓形虫,弓形虫病);43kDa分泌糖蛋白,53kDa分泌糖蛋白,副肌球蛋白,抗原Ts21,抗原Ts87,抗原p46000,TSL-1抗原,小窝蛋白-1 CAV-1,49 kDa新生幼虫抗原,鞘脂激活蛋白原同源物,丝氨酸蛋白酶,丝氨酸蛋白酶抑制剂,45-kDa糖蛋白Gp45(旋毛虫,旋毛虫病);Myb样转录因子(Myb1,Myb2,Myb3),粘附蛋白AP23,粘附蛋白AP33,粘附素蛋白AP33-3,粘附素AP51,粘附素AP65,粘附蛋白AP65-1, α -辅肌动蛋白,驱动蛋白相关蛋白,特尼拿蛋白(tenascin),62kDa蛋白酶,枯草杆菌蛋白酶样丝氨酸蛋白酶SUB1,半胱氨酸蛋白酶基因3CP3, α -烯醇酶Eno1,半胱氨酸蛋白酶CP30,热休克蛋白(Hsp70,Hsp60),免疫原性蛋白P270,(阴道毛滴虫,毛滴虫病); β -微管蛋白,47-kDa蛋白,分泌性白细胞样蛋白酶-1SLP-1,50-kDa蛋白TT50,17kDa抗原,43/47kDa蛋白(毛首鞭形线虫,鞭虫病(鞭虫感染));蛋白ESAT-6(EsxA),10kDa滤液抗原EsxB,分泌抗原85-B FBPB,纤连蛋白结合蛋白A FbpA(Ag85A),丝氨酸蛋白酶PepA,PPE家族蛋白PPE18,纤连蛋白结合蛋白D FbpD,免疫原性蛋白MPT64,分泌蛋白MPT51,过氧化氢酶-过氧化物酶-过氧亚硝酸酶TATAT,周质磷酸结合脂蛋白PSTS3(PBP-3,Phos-1),铁调节肝素结合血凝素Hbha,PPE家族蛋白PPE14,PPE家族蛋白PPE68,蛋白Mtb72F,蛋白Apa,免疫原性蛋白MPT63,周质磷酸结合脂蛋白PSTS1(PBP-1),分子伴侣DnaK,细胞表面脂蛋白Mpt83,脂蛋白P23,磷酸转运系统渗透酶蛋白pstA,14kDa抗原,纤连蛋白结合蛋白C FbpC1,丙氨酸脱氢酶TB43,谷氨酰胺合成酶1,ESX-1蛋白,蛋白CFP10,TB10.4蛋白,蛋白MPT83,蛋白MTB12,蛋白MTB8,Rpf样蛋白,蛋白MTB32,蛋白MTB39,晶状体蛋白,热休克蛋白HSP65,蛋白PST-S(通常为结核分枝杆菌,结核病);外膜蛋白FobA,外膜蛋白FobB,细胞内生长基因座IglC1,细胞内生长基因座IglC2,氨基转移酶Wbt1,伴侣蛋白GroEL,17kDa主要膜蛋白TUL4,脂蛋白LpnA,几丁质酶家族18蛋白,异柠檬酸脱氢酶,Nif3家族蛋白,IV型菌毛糖基化蛋白,外膜蛋白tolC,FAD结合家族蛋白,IV型菌毛蛋白多聚体外膜蛋白,双组分传感蛋白KdpD,伴侣蛋白DnaK,蛋白TolQ(土拉弗朗西斯菌,野兔病(Tularemia));“MB抗原,脲酶,蛋白GyrA,蛋白GyrB,蛋白ParC,蛋白ParE,脂质相关膜蛋白LAMP,胸苷激酶TK,磷脂酶PL-A1,磷脂酶PL-A2,磷脂酶PL-C,表面表达96kDa抗原;“(解脲支原体,解脲支原体感染);非结构性多蛋白,结构多蛋白,衣壳蛋白CP,蛋白E1,蛋白E2,蛋白E3,蛋白酶P1,蛋白酶P2,蛋白酶P3(委内瑞拉马脑炎病毒,委内瑞拉马脑炎);糖蛋白GP,基质蛋白Z,聚合酶L,核蛋白N(瓜纳瑞托病毒,委内瑞拉出血热);多蛋白,蛋白E,蛋白M,衣壳蛋白C,蛋白酶NS3,蛋白NS1,蛋白NS2A,蛋白AS2B,蛋白NS4A,蛋白NS4B,蛋白NS5(西尼罗河病毒,西尼罗河热);衣壳蛋白CP,蛋白E1,蛋白E2,蛋白E3,蛋白酶P2(西部马脑炎病毒,西部马脑炎);基因组多蛋白,蛋白E,蛋白M,衣壳蛋白C,蛋白酶NS3,蛋白NS1,蛋白NS2A,蛋白AS2B,蛋白NS4A,蛋白NS4B,蛋白NS5(黄热病病毒,黄热病);推定的Yop靶向蛋白YobB,效应蛋白YopD,效应蛋白YopE,蛋白YopH,效应蛋

白YopJ,蛋白易位蛋白YopK,效应蛋白YopT,蛋白YpkA,鞭毛生物合成蛋白FlhA,肽酶M48,钾外排系统KefA,转录调节因子RovA,粘附素Ifp,转运蛋白LcrV,蛋白PcrV,侵袭素Inv,外膜蛋白OmpF样孔蛋白,粘附素YadA,蛋白激酶C,磷脂酶C1,蛋白PsaA,甘露糖基转移酶样蛋白WbyK,蛋白YscU,抗原YPMa(伪结核耶尔赞氏菌,伪结核耶尔赞氏菌感染);效应蛋白YopB,60kDa伴侣蛋白,蛋白WbcP,酪氨酸蛋白磷酸酶YopH,蛋白YopQ,肠毒素,半乳糖苷渗透酶,还原酶NrdE,蛋白YasN,侵袭素Inv,粘附素YadA,外膜孔蛋白F OmpF,蛋白UspA1,蛋白EibA,蛋白Hia,细胞表面蛋白Ail,伴侣SycD,蛋白LcrD,蛋白LcrG,蛋白LcrV,蛋白SycE,蛋白YopE,调节蛋白TyeA,蛋白YopM,蛋白YopN,蛋白YopO,蛋白YopT,蛋白YopD,蛋白酶ClpP,蛋白MyfA,蛋白FilA和蛋白PsaA(小肠结肠炎耶尔森菌,耶尔森菌病)(括号内是特定病原体或病原体家族(抗原衍生自所述病原体)以及与病原体相关的感染性疾病)。

[0499] 在特别优选的实施方案中,致病抗原选自:

a) HIV p24抗原,HIV包膜蛋白(Gp120,Gp41,Gp160),多蛋白GAG,阴性因子蛋白Nef,转录Tat激活因子,前提是,传染病是HIV,优选人类免疫缺陷病毒感染,

b) 主要外膜蛋白MOMP,可能的的外膜蛋白PMPC,外膜复合蛋白B0mcB,热休克蛋白Hsp60HSP10,蛋白IncA,来自III型分泌系统的蛋白,核糖核苷酸还原酶小链蛋白NrdB,质粒蛋白Pgp3,衣原体外源蛋白N CopN,抗原CT521,抗原CT425,抗原CT043,抗原TC0052,抗原TC0189,抗原TC0582,抗原TC0660,抗原TC0726,抗原TC0816,抗原TC0828,前提是,传染病是沙眼衣原体感染,

c) pp65抗原,膜蛋白pp15,衣壳近端蛋白pp150,蛋白M45,DNA聚合酶UL54,解旋酶UL105,糖蛋白gM,糖蛋白gN,糖蛋白H,糖蛋白B gB,蛋白UL83,蛋白UL94,蛋白UL99,前提是,感染疾病是巨细胞病毒感染,优选是巨细胞病毒(CMV)感染;

d) 衣壳蛋白C,膜前蛋白prM,膜蛋白M,包膜蛋白E(结构域I,结构域II,结构域II),蛋白NS1,蛋白NS2A,蛋白NS2B,蛋白NS3,蛋白NS4A,蛋白2K,蛋白NS4B,蛋白NS5,前提是,感染性疾病是登革热,最好是感染登革热病毒(DEN-1,DEN-2,DEN-3和DEN-4)-虫媒病毒;

e) 乙型肝炎表面抗原HBsAg,乙型肝炎核心抗原HbcAg,聚合酶,蛋白Hbx,preS2中表面蛋白,表面蛋白L,大S蛋白,病毒蛋白VP1,病毒蛋白VP2,病毒蛋白VP3,病毒蛋白VP4,前提是,感染疾病是乙型肝炎,优选是乙型肝炎病毒(HBV)感染;

f) 复制蛋白E1,调节蛋白E2,蛋白E3,蛋白E4,蛋白E5,蛋白E6,蛋白E7,蛋白E8,主要衣壳蛋白L1,次要衣壳蛋白L2,前提是,感染性疾病是人乳头瘤病毒(HPV)感染,优选人乳头瘤病毒(HPV)感染;

g) 融合蛋白F,血凝素-神经氨酸酶HN,糖蛋白G,基质蛋白M,磷蛋白P,核蛋白N,聚合酶L,前提是,感染性疾病是人副流感病毒感染,优选人副流感病毒(HPIV)感染;

h) 血凝素(HA),神经氨酸酶(NA),核蛋白(NP),M1蛋白,M2蛋白,NS1蛋白,NS2蛋白(NEP蛋白:核输出蛋白),PA蛋白,PB1蛋白(聚合酶碱性1蛋白),PB1-F2蛋白和PB2蛋白(正粘病毒科,流感病毒(流感));

i) 核蛋白N,大结构蛋白L,磷蛋白P,基质蛋白M,糖蛋白G,前提是,传染病是狂犬病,优选是狂犬病病毒感染;

j) 融合蛋白F,核蛋白N,基质蛋白M,基质蛋白M2-1,基质蛋白M2-2,磷蛋白P,小疏水蛋白SH,主要表面糖蛋白G,聚合酶L,非结构蛋白1 NS1,非结构蛋白2NS2,前提是,传染病是呼

吸道合胞病毒感染,优选是呼吸道合胞病毒(RSV)感染;

k) 分泌抗原SssA(葡萄球菌属,葡萄球菌食物中毒);分泌抗原SssA(金黄色葡萄球菌属,例如金黄色葡萄球菌,葡萄球菌感染);分子伴侣DnaK,细胞表面脂蛋白Mpt83,脂蛋白P23,磷酸转运系统渗透酶蛋白pstA,14kDa抗原,纤连蛋白结合蛋白C FbpC1,丙氨酸脱氢酶TB43,谷氨酰胺合成酶1,ESX-1蛋白,蛋白CFP10,TB10.4蛋白,蛋白MPT83,蛋白MTB12,蛋白MTB8,Rpf样蛋白,蛋白MTB32,蛋白MTB39,晶体蛋白,热休克蛋白HSP65,蛋白PST-S,前提是,传染病是结核病,优选是结核分枝杆菌感染;

或基因组多蛋白,蛋白E,蛋白M,衣壳蛋白C,蛋白酶NS3,蛋白NS1,蛋白NS2A,蛋白AS2B,蛋白NS4A,蛋白NS4B,蛋白NS5,前提是,传染病是黄热病,优选为黄热病病毒感染。

实施例

[0500] 以下实施例旨在进一步说明本发明。它们仅仅是说明性的,并非旨在限制本发明主题的范围。

[0501] 实施例1:根据本发明的组合物的制备

[0502] 对于以下实施例,制备编码高斯普鲁士斯(*Gaussia princeps*)荧光素酶(GpLuc)的DNA序列并用于随后的RNA体外转录反应。获得的mRNA构建体用于进一步的体外和体内实验。下面提供GpLuc和PpLuc的相应的氨基酸序列和mRNA序列以及制备步骤细节。

[0503] GpLuc,氨基酸序列(SEQ ID NO:11):

MGVKVLFA L I C I A V A E A K P T E N N E D F N I V A V A S N F A T T D L D A D R G K L P G K K L P L E V L K E M E A N A R K A G C T R G C
L I C L S H I K C T P K M K K F I P G R C H T Y E G D K E S A Q G G I G E A I V D I P E I P G F K D L E P M E Q F I A Q V D L C V D C T T G C L K G L A N
V Q C S D L L K K W L P Q R C A T F A S K I Q G Q V D K I K G A G G D

[0504] GpLuc,mRNA序列(SEQ ID NO:12),在本文中也标记为R2851:

GGGGCGCUGCCUACGGAGGUGGCAGCCAUCUCCUUCUCGGCAUCAAGCUUACCAUGGGCGUGAAGGUCCUGUU
CGCCCUCAUCUGCAUCGCCGUGGGCGGAGGCCAAGCCCACCGAGAACAACGAGGACUUAACAUCGUGGCCCGUCGCCA
GCAACUUCGCCACCACGGACCUGGACGCGGACCGGGGAAGCUGCCGGGCAAGAAGCUCCCCUGGAGGUGCUGAAG
GAGAUGGAGGCCAACGCCCGCAAGGCCGGGUGCACCCGGGGCUGCCUCAUCUGCCUGUCCACAUCAAGUGCACCCC
CAAGAUGAAGAAGUUCAUCCCCGGGCGCUGCCACACCUACGAGGGCGACAAGGAGAGCGCGCAGGGCGGGAUCGGCG
AGGCCAUCGUGGACAUCCCCGAGAUCCCCGGGUUCAAGGACCUGGAGCCCAUGGAGCAGUUAUCGCCAGGUCGAC
CUCUGCGUGGACUGCACGACCGGUGCCUGAAGGGGCGGCCAACGUGCAGUGCUCCGACCUCUGAAGAAGUGGCU
GCCCCAGCGGUGCGCCACCUUCGCGAGCAAGAUCAGGGCCAGGUCGACAAGAUAAGGGCGCCGGGGGCGACUGAG
GACUAGUGCAUCACAUUUAAAAGCAUCUCAGCCUACCAUGAGAAUAAGAGAAAGAAAUGAAGAUAUAUAGCUUAUU
CAUCUCUUUUUCUUUUUCGUUGGUGUAAAAGCCAACACCCUGUCUAAAAACAUAUUUUUCUUUAUCAUUUUGCCUC
UUUUCUCUGUCUCAAUUAAAUAUUUUUUUGGAAAGAACCUAGAUCUAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAA
UUUCAGAGCCACCAGAAUU

[0505] PpLuc,氨基酸序列(SEQ ID NO:18):

MEDAKNIKKGPAPFYPLEDGTAGEQLHKAMKRYALVPGTIAFTDAHIEVDITYAEYFEMSVRLAEAMKRYGLN
TNHRIVVCSENSLQFFMPVLGALFIGVAVAPANDIYNERELLSMGISQPTVVVFVSKKGLQKILNVQKKLPIIQKII
IMDSKTDYQGFQSMYTFVTSHLPPGFNEYDFVPESFDRDKTIALIMSSGSTGLPKGVALPHRTACVRFSHARDPIF
GNQIIPDTAILSVPVPHHGFHGMFTTLGYLICGFRVVLMYRFEEELFLRSLQDYKIQSALLVPTLFSFFAKSTLIDKY

DLSNLHEIASGGAPLSKEVGEAVAKRFHLPGIRQGYGLTETTSAILITPEGDDKPGAVGKVVPFPEAKVVDLDTGKT
 LGVNQRGELCVRGPMIMSGYVNNPEATNALIDKDGWLHSGDIAYWDEDEHFFIVDRLKSLIKYKGYQVAPAELESIL
 LQHPNIFDAGVAGLPDDDAGELPAAVVVLEHGKTMTEKEIVDYVASQVTTAKKLRGGVVFVDEVPKGLTGKLDARKI
 REILIKAKKGGKIAV

[0506] PpLuc, mRNA序列 (SEQ ID NO:19):

GGGGCGCUGCCUACGGAGGUGGCAGCCAUUCUCCUUCUCGGCAUCAAGCUUGAGGAUGGAGGACGCCAAGAACA
 UCAAGAAGGGCCCCGGCGCCUUCUACCCGUCUGGAGGACGGGACCGCCGGCGAGCAGCUCCACAAGGCCAUGAAGCGG
 UACGCCUUGGUGCCGGGCACGAUCGCCUUCACCGACGCCACAUCGAGGUCGACAUCACCUACGCGGAGUACUUCGA
 GAUGAGCGUGCGCCUGGCGGAGGCCAUGAAGCGGUACGGCCUGAACACCAACCACCGGAUCGUGGUGUGCUCGGAGA
 ACAGCCUGCAGUUCUUAUGCCGGUGCUGGGCGCCUUCUUAUCGGCGUGGCCGUCGCCCCGGCGAACGACAUCUAC
 AACGAGCGGGAGCUGCUGAACAGCAUGGGGAUCAGCCAGCCGACCGUGGUGUUCGUGAGCAAGAAGGGCCUGCAGAA
 GAUCCUGAACGUGCAGAAGAAGCUGCCCAUCAUCCAGAAGAUAUCAUCAUGGACAGCAAGACCGACUACCAGGGCU
 UCCAGUCGAUGUACACGUUCGUGACCAGCCACCUCCCGCCGGGCUUCAACGAGUACGACUUCGUCCCGGAGAGCUUC
 GACCGGGACAAGACCAUCGCCUGAUAUGAACAGCAGCGGCAGCACCAGCCUGCCGAAGGGGGUGGCCUGCCGCA
 CCGGACCGCCUGCGUGCGCUUCUCGCACGCCGGGACCCCAUCUUCGGCAACCAGAUAUCCCGGACACCGCCAUC
 UGAGCGUGGUGCCGUUCCACCACGGCUUCGGCAUGUUCACGACCCUGGGCUACCUCAUCUGCGGCUUCCGGGUGGUC
 CUGAUGUACCGGUUCGAGGAGGAGCUGUUCUGCGGAGCCUGCAGGACUACAAGAUCAGAGCGCGCUGCUCGUGCC
 GACCCUGUUCAGCUUCUUCGCAAGAGCACCCUGAUCGACAAGUACGACCUUCGAACCGUCACGAGAUCGCCAGCG
 GGGCGCCCCCGUGAGCAAGGAGGUGGGCGAGGCCGUGGCAAGCGGUUCCACCUCCGGGAUCCGCCAGGGCUAC
 GGCCUGACCGAGACCACGAGCGGAUCCUGAUCACCCCGAGGGGACGACAAGCCGGGCGCCGUGGGCAAGGUGGU
 CCCGUUCUUCGAGGCCAAGGUGGUGGACCUGGACACCGGCAAGACCCUGGGCGUGAACCAGCGGGGCGAGCUGUGCG
 UGCGGGGGCCGAUGAUAUGAGCGGCUACGUGAACACCCCGAGGCCACCAACGCCUCAUCGACAAGGACGGCUGG
 CUGCACAGCGGCGACAUCGCCUACUGGGACGAGGACGAGCACUUCUUAUCGUCGACCGGCUGAAGUCGCUGAUCAA
 GUACAAGGGCUACCAGGUGGCGCCGGCCGAGCUGGAGAGCAUCCUGCUCCAGCACCCCAACAUCUUCGACGCCGGCG
 UGGCCGGGCGUGCCGGACGACGACCGGGCGAGCUGCCGGCCGCGGUGGUGGUGCUGGAGCACGGCAAGACCAUGACG
 GAGAAGGAGAUUCGUCACUACGUGGCCAGCCAGGUGACCACCGCCAAGAAGCUGCGGGGCGGCGUGGUGUUCGUGGA
 CGAGGUCCCGAAGGGCCUGACCGGGAAGCUCGACGCCCCGGAAGAUCCGCGAGAUCUGAUAAGGCCAAGAAGGGCG
 GCAAGAUCGCCGUGUAAGACUAGUGCAUCACAUUUAAAAGCAUCUCAGCCUACCAUGAGAAUAAGAGAAAGAAAUG
 AAGAUCAAUAGCUUAUUCUUCUUCUUCUUCUUCUUCGUUGGUGUAAAGCCAACACCCUGUCUAAAAACAUAUUUUC
 UUUAAUCAUUUUGCCUCUUUCUCUGUCUUAUUAAUAAAAAUGGAAAGAACCUAGAUCUAAAAAAAAAAAAAAAA
 AAUGCAUCCCCCCCCCCCCCCCCCCC
 CCCCCCCCCAAAGGCUCUUUCAGAGCCACCAGAAUU

[0507] DNA和mRNA构建体的制备:

[0508] 编码高斯普鲁士斯 (*Gaussia princeps*) 荧光素酶的DNA序列通过引入GC优化的稳定序列修饰野生型编码DNA序列来制备。将序列引入衍生的pUC19载体中并修饰以包含源自32L4-5'-UTR核糖体5' TOP UTR (32L4) 和源自白蛋白7的3' UTR的稳定UTR序列, 组蛋白茎环序列, 在编码序列的3'处引入3'末端的一段64x腺苷 (聚-A-尾) 和3'-末端的一段30x胞嘧啶 (聚-C-尾)。该序列含有以下序列元件: 编码高斯荧光素酶 (*Gaussia luciferase*) 的编码序列; 来源于32L4-5'-UTR核糖体5' TOP UTR的稳定序列 (32L4); 在3'末端的64x腺苷 (聚-A-

尾);5个核苷酸,在3'末端的30×胞嘧啶(聚-C-尾)和5个额外的核苷酸。

[0509] 本文中提到的R2851类似于富含GC的mRNA序列,其编码高斯普鲁士斯(*Gaussia princeps*)荧光素酶,具有聚(A)序列(聚(A)序列具有64个腺苷酸),后接5个核苷酸,后接具有30个胞苷酸的聚(C)-序列和组蛋白茎环序列,后接5个额外的核苷酸。

[0510] RNA体外转录:

[0511] 在相应的缓冲条件下,在核苷酸混合物存在下,使用DNA依赖性T7RNA聚合酶在体外酶促线性化和转录相应的DNA质粒。通过向核苷酸混合物中加入帽类似物(m7GpppG)共转录加帽GpLuc mRNA。

[0512] mRNA构建体的纯化:

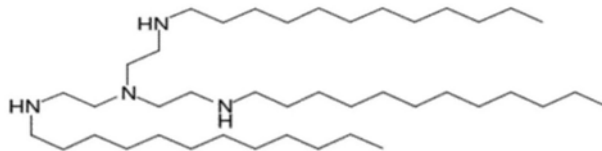
[0513] 使用PureMessenger® (CureVac, Tübingen, 德国; WO 2008/077592A1) 纯化获得的mRNA构建体,并用于进一步的实验。

[0514] 阳离子肽/聚合物的制备

[0515] 如下制备PB83,二硫键连接的聚乙二醇/肽缀合物。将20mg肽(CHHHHHHRRRRHHHHHC-NH₂) TFA盐溶于2mL pH8.5的硼酸盐缓冲液中,并在室温下搅拌约18小时。然后,将溶解在N-甲基吡咯烷酮中的12.6mg PEG-SH 5000 (Sunbright) 加入到肽溶液中,并用pH8.5的硼酸盐缓冲液填充至3mL。在室温下温育18小时后,将反应混合物纯化并通过离心超滤(Centricon)程序(MWCO 10kDa)浓缩,用水洗涤并冻干。冷冻干燥后,将冻干物溶于ELGA水中,并将浓度调节至10mg/mL。将所获得的聚乙二醇/肽聚合物(HO-PEG 5000-S-(S-CHHHHHHRRRRHHHHHC-S)-)₇-S-PEG 5000-OH)用于进一步的配制实验,并且在下文称为PB83。

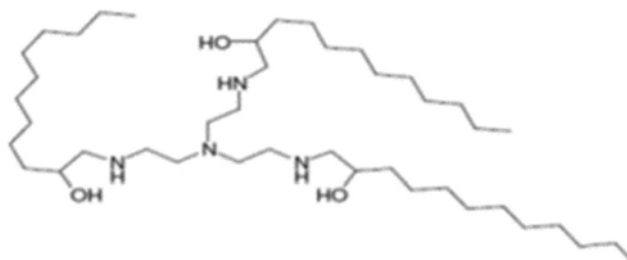
[0516] 类脂质的制备

[0517] 制备类脂质



3-C12

和

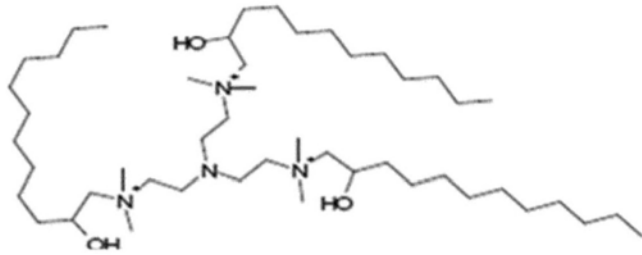


3-C12-OH

脂质体3-C12可以通过用活化的月桂酸(C12)酸衍生物酰化三(2-氨基乙基)胺,然后还原酰胺来获得。替代地,它可以通过用相应的醛还原胺化来制备。根据Love et al.,

pp.1864-1869,PNAS,vol.107(2010),no.5(参见compound C12-110),通过加入末端C₁₂烷基环氧化物与相同的寡聚胺制备类脂质3-C12-OH。

[0518] 根据式IX的包含阳离子的类脂质3-C12-OH-cat:



(式 IX)

通过由3-C12-OH与活化的甲基如甲基碘发生反应来制备。

[0519] 具有聚合物-类脂质复合的mRNA的纳米颗粒的组合物的制备:

[0520] 首先,将林格氏(ringer)乳酸缓冲液(RiLa;替代地,可以使用例如盐水(NaCl)或PBS缓冲液),相应量的类脂质和各自量的聚合物(PB83)混合以制备包含类脂质和肽或聚合物的组合物。然后,通过以下使用载体组合物组装具有mRNA的纳米颗粒:将mRNA与相应量的聚合物-类脂质载体混合,并允许在室温下孵育10分钟,以便能够在类脂质、聚合物和mRNA之间形成络合物。然后将纳米颗粒用于进一步的体外和体内实验。该背景下的相关参数是类脂质的量和种类、聚合物的量和种类以及N/P比。

[0521] 为了表征所获得的聚合物-类脂质复合的mRNA颗粒的完整性,进行RNA琼脂糖凝胶移位测定。另外,进行尺寸测量以评估所获得的纳米颗粒是否具有均匀的尺寸分布。

[0522] 对于RNA凝胶移位测定,制备常规RNA琼脂糖凝胶并装载相应的聚合物-类脂质复合的mRNA颗粒。使用生物成像仪使凝胶条带可视化。对所有测试的聚合物-类脂质复合的mRNA进行分析并确定在相应的条件下是稳定的(数据未显示)。

[0523] 为了确定粒径,将包含聚合物-类脂质复合的mRNA的样品在林格氏乳酸液(或盐水)中稀释至最终体积为50 μ L。使用Zetasizer®装置进行尺寸测量。

[0524] 凝胶移位测定和粒度分析的结果表明,所获得的聚合物-类脂质-mRNA络合物在宽范围的聚合物-类脂质比率下是稳定和均匀的。

[0525] 实施例2:不同聚合物-类脂质制剂对So18肌细胞体外转染效率的影响。

[0526] 该实施例显示了与分化的So18细胞中的阳性和阴性对照相比,包含GpLuc mRNA (SEQ ID NO:12)的根据本发明的各种组合物的转染效率。发现在阳离子聚合物-肽缀合物(PB83)中加入至少量的类脂质(即3-C12和3-C12-OH)导致转染效率的显著提高,如图1A至图1C所示。

[0527] So18细胞的转染:

[0528] So18是Daubas等人从正常C3H小鼠腿部的比目鱼肌原代培养物分离的肌原细胞系。在第1天,将体积为0.2mL的So18细胞(20000个细胞)接种在96孔玻璃底板(Softwell水凝胶涂有胶原,弹性E=12kPa)中。从每个孔中取出培养基后,加入100 μ L DMEM培养基(含有每孔加入2%马血清)。然后,在第2天,用根据实施例1)制备的聚合物-类脂质络合物和各对照(一式三份)的100 μ L转染混合物(一式三份)转染So18细胞,并将细胞在37 $^{\circ}$ C和5%CO₂下

温育,持续120分钟。孵育后,将150 μ L培养基更换为补充有10%胎牛血清的150 μ L新鲜DMEM培养基。转染后24小时,即第3天,提取每孔的10 μ L上清液并将其用于进一步的发光分析,其如下所述进行。用被运载物成功转染导致荧光素酶蛋白的翻译和Gp荧光素酶蛋白分泌到细胞培养上清液中。

[0529] 对于发光分析,将体积为10 μ L的上清液转移至96孔板用于GpLuc测量。然后,制备腔肠素工作溶液(100 μ M)(1mL腔肠素原液(在EtOH中4.72mM)在49mL磷酸盐缓冲盐水中,补充有5mM NaCl,pH7.2)。将体积为100 μ L的腔肠素工作溶液用作GpLuc的底物,并在5秒后在市售的酶标仪中测量。

[0530] 实施例3:不同聚合物-类脂质制剂对HepG2细胞体外转染效率的影响。

[0531] 该实施例显示了与HepG2细胞中的阳性和阴性对照相比,包含GpLuc mRNA的根据本发明的各种组合物的转染效率。发现向阳离子聚合物-肽缀合物(PB83)中添加至少少量的类脂质(3-C12;3-C12-OH或3-C12-OH-cat)导致转染效率的显著提高,如图2A和2B所示。

[0532] 除了转染HepG2细胞而不是So18细胞外,该实验如前述实施例中所述进行。将体积为0.2mL的HepG2细胞(10000个细胞)接种在96孔组织培养板中。从每个孔中取出培养基后,向每个孔中加入100 μ LRPMI 1640培养基(含有1%青霉素和1%链霉素,1%L-谷氨酰胺)。然后,用聚合物-类脂质mRNA络合物和各自的对照(一式三份)的100 μ L转染混合物(一式三份)转染HepG2细胞,并将细胞在37 $^{\circ}$ C和5%CO₂下孵育90分钟。孵育后,将150 μ L培养基更换为补充有10%胎牛血清的150 μ L新鲜RPMI 1640培养基。转染后二十四小时,提取每孔的10 μ L上清液并将其用于进一步的发光分析。

[0533] 实施例4:人PBMC中的体外细胞因子刺激

[0534] 在该实施例中,评估了由本发明的纳米颗粒诱发的免疫系统的内在刺激。为了评估本发明的制剂对免疫刺激的影响,测量了用不同聚合物-脂质复合的GpLuc mRNA处理后人外周血单核细胞(PBMC)中细胞因子干扰素 α (INF α)和肿瘤坏死因子 α (TNF α)的释放。

[0535] 使用Ficoll梯度分离来自健康供体外周血的人外周血单核细胞(PBMC),随后用1 \times PBS(磷酸盐缓冲盐水)洗涤。将分离的细胞接种在96孔微量滴定板(2 \times 10⁵个细胞/孔)上。将PBMC用10 μ L相应的聚合物-类脂质复合的mRNA颗粒(根据实施例1制备)或某些对照(例如,裸RNA,林格氏乳酸盐缓冲液,CpG2216, RNAdjuvant[®])在X-VIVO 15培养基(Lonza)中孵育24小时(一式三份)。通过使用检测人INF α 的特异性抗体检测细胞因子的产生来测量对PBMC刺激的免疫刺激作用。

[0536] 将ELISA微量滴定板(Nunc Maxisorb)与结合缓冲液(0.02%NaN₃,15mM Na₂CO₃,15mM NaHCO₃,pH 9.7)一起温育过夜(o/n),其另外含有特异性细胞因子抗体。然后用含有1%的BSA(牛血清白蛋白)的1 \times PBS封闭细胞。加入细胞上清液并在37 $^{\circ}$ C下温育4小时。随后,用含有0.05%Tween-20的1 \times PBS洗涤微量滴定板,然后用生物素标记的二抗(BD Pharmingen,Heidelberg,德国)孵育。将链霉抗生物素蛋白偶联的辣根过氧化物酶加入板中。然后,再次用含有0.05%Tween-20的1 \times PBS洗涤板,并加入ABTS(2,2'-连氨基-双(3-乙基-苯并噻唑啉-6-磺酸)作为底物。通过使用标准曲线,利用来自Tecan(Crailsheim,德国)的Sunrise ELISA-Reader测量重组细胞因子(BD Pharmingen,Heidelberg,德国)的在405nm处的吸光度(OD 405)来确定细胞因子的量。同时,还测定了在细胞培养物上清液中的GpLuc浓度。

[0537] 结果,测试的组合物不刺激人PBMC中细胞因子的分泌,如图3所能看到的,这表明本发明的纳米颗粒在没有强效阳性对照(如CpG寡脱氧核苷酸)的情况下仅具有非常小的内在潜能来刺激免疫系统。

[0538] 实施例5:视网膜下注射荧光素酶-mRNA后24小时对大鼠眼睛的扫描激光检眼镜(SLO)分析。

[0539] 通过以不同电荷比混合PpLuc mRNA (SEQ ID NO:19) 和阳离子聚合物-脂质或类脂质溶液(例如MC3-cat或3-C12-OH)来制备mRNA络合物。用经林格氏缓冲液处理的动物作为对照。用林格氏缓冲液将冻干制剂再水化。最终mRNA浓度为2.5 μ g/ μ l。每只眼睛注射2剂2 μ l。每组治疗4只眼(2只大鼠)。在治疗后二十四小时,使用非侵入性扫描激光检眼镜(SLO)对视网膜成像(数据未显示)。将荧光素溶液注射到大鼠的尾静脉中,并在2分钟的温育时间后持续至少10分钟分析眼睛。在此期间,大鼠另外接受荧光素溶液以嗅闻。为了进行详细分析,然后处死动物,取出它们的眼睛并冷冻。随后,分析眼睛样品的转染水平。为此,将眼睛在TissueLyser中机械破碎并裂解。在发光计中测定每种样品的荧光素酶活性。

[0540] 视网膜下注射荧光素酶-mRNA (PpLuc mRNA) 的结果显示在图4中,表示为相对光单位(RLU)。

[0541] 实施例6:对小鼠进行肌肉内接种后诱导体液和细胞免疫应答。

[0542] DNA和mRNA构建体的制备

[0543] 对于本实施例,制备编码甲型流感病毒的血凝素(HA)蛋白的DNA序列(A/Netherlands/602/2009(H1N1))并将其用于随后的体外转录反应。以下提供各自的mRNA序列以及疫苗接种方案的进一步的细节。

[0544] 编码甲型流感病毒血凝素(HA)蛋白的富含G/C的mRNA序列R2564(A/Netherlands/602/2009(H1N1))(SEQ ID NO 17):

```
GGGGCGCUGCCUACGGAGGUGGCAGCCAUCUCCUUCUCGGCAUCAAGCUUACCAUGAAGGCCAUCCUGGUGGU
CCUCCUGUACACCUUCGCCACCGCGAACGCCGACACGUCUGUGCAUCGGCUACCACGCCAACACAGCACCCGACACCG
UGGACACCGUGCUCGAGAAGAAGCUCACGGUGACCCACUCCGUGAACCGUCUGGAGGACAAGCACAACGGGAAGCUC
UGCAAGCUCGGGGCGUCGCCCCGUCACCUCGGGAAGUGCAACAUCGCCGGCUGGAUCCUGGGGAACCCGGAGUG
CGAGAGCCUGUCCACCGGAGCUCUCCUGGAGCUACAUCGUGGAGACCUCAGCUCCGACAACGGCACGUGCUACCCCG
GCGACUUAUCGACUACGAGGAGCUCGCGGAGCAGCUGAGCUCGUGAGCUCCUUCGAGCGGUUCGAGAUCUCCCC
AAGACCAGCUCUCCUGGCCAACCACGACAGCAACAAGGGGGUACCCGCCCGCCUGCCCGCACGCCGGCGGAAGUCCU
CUACAAGAACCUGAUCUGGCUCGUGAAGAAGGGGAACAGCUACCCCAAGCUGUCCAAGAGCUACAUAACGACAAGG
GCAAGGAGGUGCUGGUCCUCUGGGGAUCCACCACCCAGCACCUCGCCGACCAGCAGAGCCUGUACCAGAACGCC
GACGCCUACGUGUUCGUGGGCUCACGCCGCUACUCCAAGAAGUUAAGCCCGAGAUCGCCAUCCGGCCGAAGGUCCG
CGACCAGGAGGGCCGGAUGAACUACUACUGGACGUCUGGUGGAGCCCGGGGACAAGAUCACCUUCGAGGCGACCCGCA
ACCUCGUGGUCCCCCGCUACGCCUUCGCAUUGGAGCGGAACGCCGGGAGCGGCAUCAUCAUCUCCGACACCCCGUG
CACGACUGCAACACGACCUGCCAGACCCCGAAGGGCGCAUCAACACCAGCCUGCCUUCAGAACAUCCACCCCAU
CACGAUCGGGAAGUGCCCCAAGUACGUGAAGUCCACCAAGCUGCGCCUCGCGACCGGCCUGCGGAACGUCCCGAGCA
UCCAGUCCCGCGGGCUGUUCGCGCCAUCGCCGGGUUCAUCGAGGGCGGCUUGACCGGGAUGGUGGACGGCUGGUAC
GGGUACCACCACGAGAACGAGCAGGGCAGCGGUACGCCCGACCUCAAGUCCACGCAGAACGCGAUCGACGAGAU
CACCAACAAGGUGAACAGCGUCAUCGAGAAGAUGAACACCCAGUUCACCGCCGUGGGCAAGGAGUUAACCACCUGG
```

AGAAGCGGAUCGAGAACCUGAACCAAGAAGGUCGACGACGGCUUCCUCGACAUCUGGACGUACAACGCCGAGCUGCUG
 GUGCUCCUGGAGAACGAGCGCACCCUGGACUACCACGACUCCAACGUGAAGAACCUCUACGAGAAGGUCCGGAGCCA
 GCUGAAGAACAACGCCAAGGAGAUCCGGGAACGGCUGCUUCGAGUUCUACCACAAGUGCGACAACACCUGCAUGGAGU
 CCGUGAAGAACGGGACCUACGACUACCCCAAGUACAGCGAGGAGGCCAAGCUGAACC GCGAGGAGAUCGACGGCGUG
 AAGCUCGAGUCCACGCGGAUCUACCAGAUCUGGCGAUCUACAGCACCGUCGCCAGCUCUCCUGGUGCUCGUGGUCAG
 CCUGGGGGCCAUCUCCUUCUGGAUGUGCAGCAACGGCUCUCCUGCAGUGCCGCAUCUGCAUCUGACCACUAGUGCAUC
 ACAUUUAAAAGCAUCUCAGCCUACCAUGAGAAUUAAGAGAAAAGAAAUGAAGAUCAAUAGCUUAUUAUCUCUUUUUC
 UUUUUCGUUGGUGUAAAAGCCAACACCCUGUCUAAAAAACAUAUUUUUCUUUAUUAUUAUUUUGCCUCUUUUUCUCUGUGC
 UUCAUUUAAUAAAAAUGGAAAGAACCUAGAUCUAA
 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAUGCAUCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCAAGGCUCUUUCAGAGCCA
 CCAGAAUU

[0545] 根据第一种制备方法,制备编码上述mRNA的DNA序列。构建体R2564 (SEQ ID NO: 17) 通过以下方式制备:引入衍生自核糖体蛋白32L的5'-TOP-UTR,通过引入GC优化的稳定序列修饰野生型编码序列,然后衍生自白蛋白-3'-UTR的稳定序列,一段64个腺苷(聚(A)-序列) (a stretch of 64adenosines),一段30个胞嘧啶(聚(C)-序列)和组蛋白茎环。

[0546] 制备疫苗

[0547] “裸”mRNA R2564在林格氏乳酸盐溶液(RiLa)中施用。在施用前通过直接混合所有组分来产生裸mRNA R2564与PB83和3-C12-OH的共同制剂。

[0548] 免疫接种

[0549] 使用单独的10 μ g HA-mRNA (R2564, SEQ ID NO:17, '裸' HA-mRNA) 或使用与PB83N/P 0.7, 0.4 3-C12-OH共同配制的10 μ gHA-mRNA,对Balb/c小鼠(每组n=8)在第0天肌肉内接种(左侧M.胫骨肌)并在第25天加强免疫(boosted);见下表1。其中,指示的以 μ g表示的量是指核酸分子本身的质量。

[0550] 表1:实验设置

组	处理	RNA 剂量	途径(体积)	小鼠#
1	RiLa 缓冲液	10 μ g	i.m. (25 μ L)	8
2	裸 HA-mRNA	10 μ g	i.m. (25 μ L)	8
4	R2564 PB83 N/P 0.7, 0.4 3-C12-OH	10 μ g	i.m. (25 μ L)	8

[0551] 所有动物在第25天接受加强注射。在第40天通过收集血液样品并测定血清血凝抑制(HI)抗体滴度(参见下表2)来分析功能性体液应答的诱导,所述滴度通常用作免疫保护以免受流感病毒感染的替代标记物。通常认为1:40或更高的HI滴度赋予保护作用。林格氏乳酸盐缓冲液(RiLa)处理的小鼠作为阴性对照。

[0552] 表2:疫苗接种时间表

天	处理	采样
第0天	初步(Prime)	
第25天	加强	
第40天	终止	血液+脾脏收集

[0553] 血细胞凝集抑制测定

[0554] 对于血细胞凝集抑制(HI)测定,将小鼠血清热灭活(56°C,30分钟),与高岭土一起孵育,并预吸附于鸡红细胞(CRBC)(Merck&Kollegen,Ochsenhausen,德国)。对于HI测定,将50μL的2倍稀释的预处理血清与4个血细胞凝集单位(HAU)的灭活A/California/57/2009(NIBSC,Potters Bar,UK)孵育45分钟,并加入50μL 0.5%CRBC。

[0555] 结果:从图5中可以看出,用PB83N/P 0.7,0.4 3-C12-0H-制剂接种的所有小鼠均产生 $\geq 1:40$ 的HI-滴度。图5进一步显示,与单独用HA-mRNA接种相比,用包含HA-mRNA(R2564)的制剂和基于PB83和3-C12-0H的聚合物-类脂质载运体的肌肉接种诱导针对HA蛋白的更高抗体滴度(R2564)。

[0556] 实施例7:其他聚合物与不同脂质组合对A549细胞的转染效率。

[0557] 该实施例描述了评估除PB83以外的聚合物与不同脂质组合对A549细胞(人肺癌细胞系)的转染效率的影响。为此,聚阳离子嵌段聚合物Sunbright AS50-DT-A(NOF Corporation,东京)用于有效递送mRNA。作为转染效率的读数,高斯普鲁士斯(Gaussia princeps)荧光素酶GpLuc mRNA用作被运载物。用被运载物成功转染导致荧光素酶蛋白的翻译和荧光素酶蛋白分泌到细胞培养上清液中。

[0558] 因此,将A549细胞以每孔75000个细胞的密度接种在24孔板中的细胞培养基(Gibco(ThermoFisher)Ham's F-12K(Kaighn's)培养基,10%胎牛血清(FBS),1%L-谷氨酰胺,1%青霉素/链霉素)。如下所述用不同的载体-脂质制剂和用编码GpLuc的mRNA(SEQ ID NO:12;R2851)一式两份转染A549细胞。作为阴性对照,使用编码不含PB83载运体的GpLuc的mRNA。24小时后定量荧光素酶表达。#

[0559] 表3:转染条件

#	聚合物	脂质	mRNA	
1	在 40 μ l HEPES [10 mM] 中的 10 μ l Sunbright [10 g/l]	无	2.5 μ l mRNA (1 μ g/ μ l) 47.5 μ l HEPES [10 mM]	与不含血清的培养基达 1ml 每孔加入 200 μ l
2	在 42 μ l NaCl [0,9%]中的 8 μ l Sunbright [10 g/l]	无	2.5 μ l mRNA (1 μ g/ μ l) 47.5 μ l NaCl [0,9%]	
3	在 42 μ l NaCl [0,9%]中的 8 μ l Sunbright [10 g/l]	1 μ l 3-C12-OH [100 μ mol/ml]	2.5 μ l mRNA (1 μ g/ μ l) 47.5 μ l NaCl [0,9%]	
6	在 40 μ l HEPES [10 mM] 中的 10 μ l Sunbright [10 g/l]	1 μ l DDAB [100 μ mol/ml]	2.5 μ l mRNA (1 μ g/ μ l) 47.5 μ l HEPES [10 mM]	

[0560] 结果:

[0561] 图6显示了GpLuc蛋白在使用非PB83聚合物用mRNA构建体R2851转染的A549细胞中表达,并且与不(w/o)添加脂质的Sunbright聚合物对照相比,具有添加的脂质的测试制剂更有效。这表明当使用阳离子聚合物系统时,mRNA与非常少量脂质的组合能够提高转染效率。

[0562] 实施例7:其他聚合物与不同脂质组合对BHK细胞的转染效率。

[0563] 该实施例描述评估PB83以外的聚合物与不同脂质组合对婴儿仓鼠肾(BHK)细胞和Sol8(小家鼠骨骼肌)细胞的转染效率的影响。为此,分子

-GH5R4H5GC-S-S-CGH5R4H5G('镶嵌二聚体(Inlay-Dimer)';S-S表示单元通过半胱氨酸S-S键共价连接;Intavis Bioanalytical Instruments AG,德国/科隆);

-K(EEEKK)₃SGGGGH5R4H5GC-S-S-CGH5R4H5GGGS(KKEE E)₃K('KKEEE)3K-二聚体';S-S表示单元通过半胱氨酸S-S键共价连接;Intavis Bioanalytical Instruments AG,德国/科隆);

-聚阳离子线性多糖壳聚糖95/50('壳聚糖(Chitosan)',CAS 9012-76-4;Intavis Bioanalytical Instruments AG,德国/科隆);

-(R₁₂C)-(CR₁₂C)-(R₁₂C)('三聚体(Trimer)';R₁₂C和CR₁₂C单元通过半胱氨酸S-S键共价连接;Intavis Bioanalytical Instruments AG,德国/科隆);

-R₁₂C-PEG5000('R₁₂C-PEG');和

-(R₁₂CW)₂(两个R₁₂CW-单元通过半胱氨酸S-S键共价连接),它们用于递送mRNA。作为转染效率的读数,高斯普鲁士斯(Gaussia princeps)荧光素酶GpLuc mRNA用作被运载物。用

被运载物成功转染导致荧光素酶蛋白的翻译和荧光素酶蛋白分泌到细胞培养上清液中。

[0564] 因此,对于BHK细胞,将细胞以每孔10000个细胞的密度接种在96孔板中的细胞培养基(RPMI,10%FCS,1%L-谷氨酰胺,1%青霉素/链霉素)中。如下所述用不同的载体-脂质制剂和编码GpLuc的mRNA(SEQ ID NO:12;R2851)一式两份转染BHK细胞。作为阴性对照,使用编码不含PB83载体的GpLuc的mRNA。转染后24小时定量荧光素酶表达。

[0565] 因此,对于So18(分化的)细胞,在转染前,在细胞培养基(DMEM,1%青霉素/链霉素,1%L-谷氨酰胺,1%FCS)中,在96孔板中以每孔10000个细胞的密度接种细胞7天。接种后一天,除去培养基,将含有1%FCS的DMEM加入细胞中。接种后3天,更换细胞的培养基(DMEM,1%FCS)。在第8天,如下所述用不同的载体-脂质制剂和编码GpLuc的mRNA(SEQ ID NO:12;R2851)转染So18细胞,一式三份。作为阴性对照,使用编码不含CVCM/PB83载体的GpLuc的mRNA。转染后24小时定量荧光素酶表达。

[0566] 因此,对于HeLa细胞,将细胞以每孔10000个细胞的密度接种在96孔板中的细胞培养基(RPMI,10%FCS,1%L-谷氨酰胺,1%青霉素/链霉素)中。如下所述,用不同的载体-脂质制剂和2 μ g编码PpLuc的mRNA(SEQ ID NO:19;R2244;参见下表)转染HeLa细胞,一式两份。作为阴性对照,使用编码不含PB83载体的PpLuc的mRNA。转染后24小时定量荧光素酶表达。

[0567] 表4:转染条件

CVCM 型	水	(R ₁₂ CW) ₂ (4 g/l)	MC3		20% 海藻糖
			1:100 1 μ mol/ml	1:10 10 μ mol/ml	
CR12 0.8; 0.1 MC3	158.8 μ l	3.2 μ l	3 μ l		75 μ l
CR12 0.8; 0.3 MC3	152.8 μ l	3.2 μ l	9 μ l		75 μ l
CR12 0.8; 1.0 MC3	158.8 μ l	3.2 μ l		3 μ l	75 μ l

[0568] 结果:

[0569] 图7A和7B显示了GpLuc蛋白在BHK中表达,并且使用非PB83聚合物用mRNA构建体R2851转染分化的So18细胞,并且与不添加脂质的相应聚合物对照相比,具有添加的脂质的测试制剂更有效。图7C显示了PpLuc蛋白在HeLa细胞中表达。这表明当使用阳离子聚合物系统时,mRNA与非常少量脂质的组合能够提高转染效率。

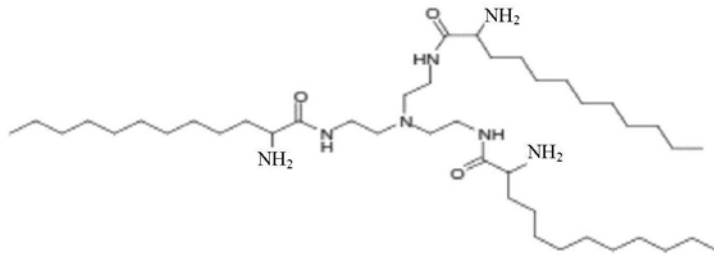
[0570] 实施例8:其他聚合物与3-C12-酰胺脂质组合的转染效率

[0571] 该实施例描述了评估不同聚合物-脂质制剂对不含FCS的HepG2细胞的转染效率的影响。作为转染效率的读数,高斯普鲁士斯(Gaussia princeps)荧光素酶GpLuc mRNA用作被运载物。用被运载物成功转染导致荧光素酶蛋白的翻译和荧光素酶蛋白分泌到细胞培养上清液中。

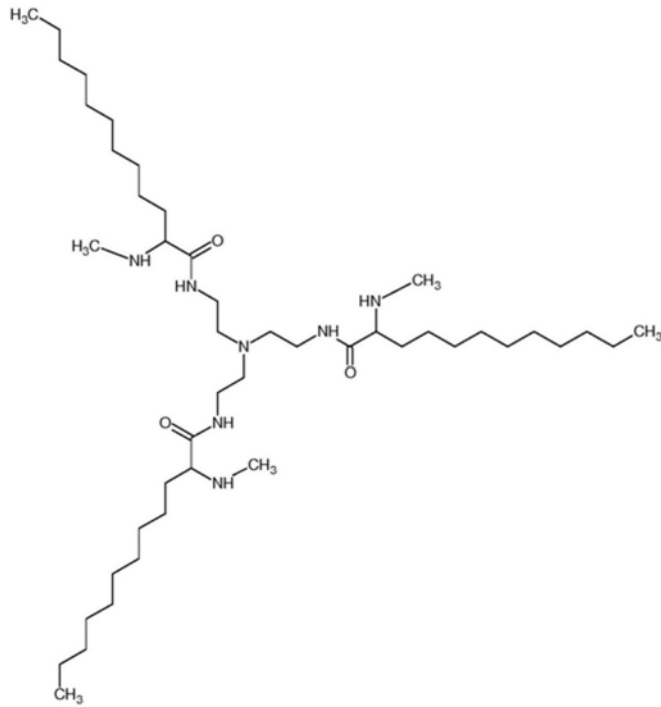
[0572] 因此,将HepG2细胞以每孔10000个细胞的密度接种于24孔板中的细胞培养基(RPMI 1640w/25mM HEPES 500ml,10%FCS,1%L-谷氨酰胺,1%青霉素/链霉素;Lonza Group AG BE12-115F/6MB205;巴塞尔/瑞士)。HepG2细胞如下所述用不同的载体-脂质制剂和编码GpLuc(SEQ ID NO:12;R2851)的mRNA进行转染,一式两份,其N/P比为0.7。作为阴

性对照,使用编码不含CVCM/PB83载运体的GpLuc的mRNA。24小时后定量荧光素酶表达。

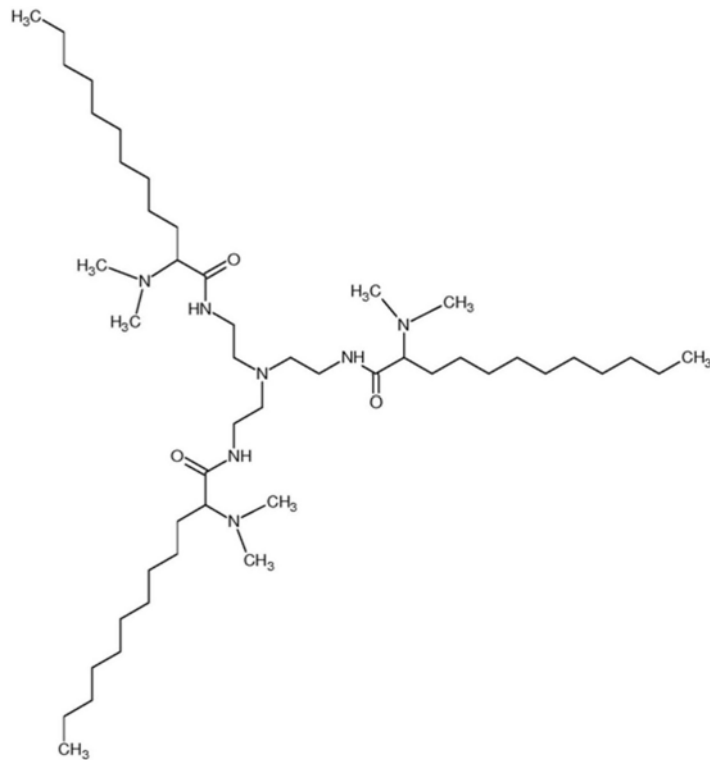
[0573] 3-C12-酰胺(式X)



[0574] 3-C12-酰胺单甲基衍生物(式Xa)



[0575] 3-C12-酰胺二甲基衍生物(式Xb)



[0576] 表5:转染条件:

	载体	脂质	N/P
条件1	CVCM/PB83	w/o	0.7
条件2	CVCM/PB83	3-C12-OH	0.7
条件3	CVCM/PB83	3-C12-酰胺	0.7

[0577] 结果:

[0578] 图8显示GpLuc蛋白在用mRNA构建体R2851转染的Hep G2细胞中表达,并且与不添加脂质的对照相比,具有添加的脂质的测试制剂是高效的。这表明mRNA与极少量脂质的组合能够提高转染效率。

[0579] 实施例9:玻璃体内递送期间其他聚合物与不同脂质组合的转染效率

[0580] 该实施例描述了评估不同聚合物-脂质制剂在进行眼部递送时对转染效率的影响。作为转染效率的读数,萤火虫 (*Photinus pyralis*) 荧光素酶Ppluc mRNA用作被运载物。用所述被运载物成功转染导致荧光素酶蛋白的翻译和荧光素酶蛋白分泌到细胞培养上清液中。

[0581] 通过以相同的电荷比混合PpLuc mRNA (SEQ ID NO:19R2244) 和阳离子聚合物-脂质溶液来制备mRNA络合物。根据以下方案在林格氏缓冲液中制备制剂,导致最终mRNA浓度为 $2\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。

[0582] 制剂配方1 (PpLuc mRNA R2244)

[0583] 20ml mRNA (5g/l) +25ml水+5ml $10\times\text{RiLa}$

[0584] 得到100毫克的mRNA在50毫升中,相当于2毫克/毫升

[0585] 制剂配方2 (PpLuc mRNA R2244在PB83中N/P 0.7,0.43-C12-OH)

[0586] 20ml CVCM (PB83, 10g/l) +0.4ml 3-C12-OH ($100\mu\text{mol}/\text{ml}$) +4.5ml水+5ml $10\times\text{RiLa}$,加入20毫升mRNA (R2244-荧光素酶;5克/升)

[0587] 得到100毫克的mRNA在50毫升中,相当于2毫克/毫升

[0588] 每只眼睛(玻璃体内)注射5 μ l。每组治疗4只眼。用在林格氏缓冲液中制备的非按配方配制的mRNA处理的动物作为对照。处理后24小时,处死动物,取出眼睛并冷冻。随后,分析眼睛样品的转染水平。为此,将眼睛在TissueLyser中机械破碎并裂解。在发光计中测定每种样品的荧光素酶活性。荧光素酶活性的结果表示为相对光单位(RLU)。

[0589] 结果:

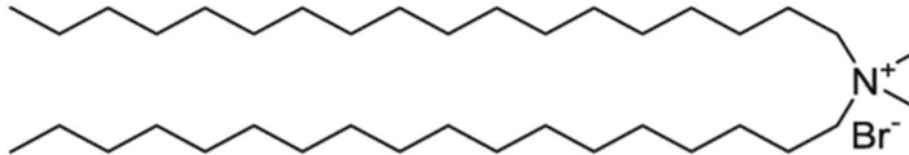
[0590] 图9显示PpLuc蛋白经在玻璃体内注射表达,并且与不添加脂质的对照相比,具有添加的脂质的测试制剂是高效的。这表明mRNA与极少量脂质的组合能够增加玻璃体内的转染效率。

[0591] 实施例10:不同聚合物-脂质组合对A549细胞的转染效率

[0592] 该实施例描述了评估不同聚合物-脂质制剂对A549细胞(人肺癌细胞系)的转染效率的影响。作为转染效率的读数,高斯普鲁士斯(*Gaussia princeps*)荧光素酶GpLuc mRNA用作被运载物。用所述被运载物成功转染导致荧光素酶蛋白的翻译和荧光素酶蛋白分泌到细胞培养上清液中。

[0593] 因此,将A549细胞以每孔75000个细胞的密度接种在24孔板中的细胞培养基(Gibco(ThermoFisher)Ham's F-12K(Kaighn's)培养基,10%胎牛血清(FBS),1%L-谷氨酰胺,1%青霉素/链霉素)中。如下所述用不同的载体-脂质制剂和编码GpLuc的mRNA(SEQ ID NO:12;R2851)转染A549细胞,一式两份。作为阴性对照,使用编码不含CVCM/PB83载体的GpLuc的mRNA。24小时后定量荧光素酶表达。

[0594] 在该工作实施例中,使用阳离子脂质DDAB(二甲基双十八烷基铵;CAS号3700-67-2;Avanti Polar Lipids,Alabaster,美国):



[0595] 表6:转染条件:

	步骤 1 (添加在水中制备的 CVCM/PB83)	步骤 2 (添加缓冲液或者 mRNA)	步骤 3 (添加缓冲液或者 mRNA)	步骤 4 (填充并分配)
条件 1 (没有脂质)	30 μ l CVCM [1 μ g/ μ l, 在水中稀释]	20 μ l RiLa	2.5 μ l mRNA (1 μ g/ μ l)	与不含血清的培养基达到 1ml
条件 2	30 μ l CVCM [1 μ g/ μ l, 在水中稀释] + 1 μ l DDAB	20 μ l RiLa	2.5 μ l mRNA (1 μ g/ μ l)	

	(1 μ mol/ml)			每孔添加 200 μ l
条件 3	30 μ l CVCM [1 μ g/ μ l, 在水中稀释] + 1 μ l DDAB (1 μ mol/ml)	2.5 μ l mRNA (1 μ g/ μ l)	20 μ l RiLa	
条件 4	30 μ l CVCM [1 μ g/ μ l, 在水中稀释] + 1 μ l DDAB (1 μ mol/ml)	10 μ l RiLa	2.5 μ l mRNA (1 μ g/ μ l) in 10 μ l RiLa	
条件 5	30 μ l CVCM [1 μ g/ μ l, 在水中稀释] + 1 μ l 3-C12-OH (1:100)	20 μ l RiLa	2.5 μ l mRNA (1 μ g/ μ l)	

[0596] 结果:

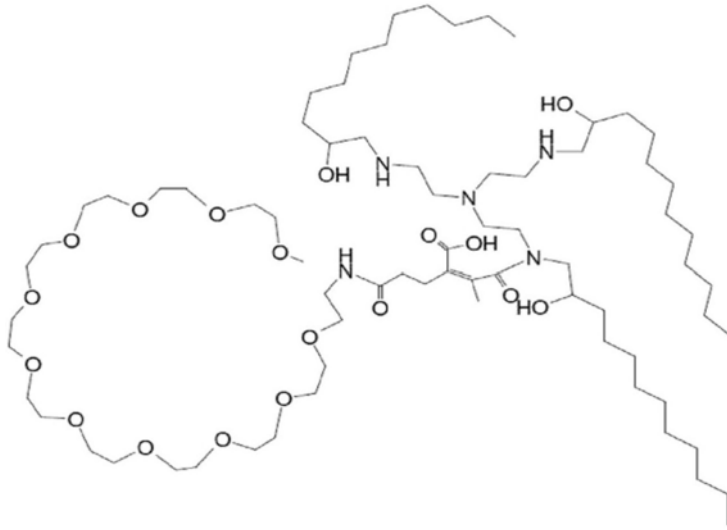
[0597] 图10显示GpLuc蛋白在用mRNA构建体R2851转染的A549细胞中表达,并且与不添加脂质的对照相比,具有添加的脂质的测试制剂是高效的。这表明mRNA与极少量脂质的组合能够提高转染效率。

[0598] 实施例11:不同聚合物-PEG-脂质组合对A549细胞的转染效率

[0599] 该实施例描述了评估不同聚合物-脂质制剂对A549细胞(人肺癌细胞系)的转染效率的影响。作为转染效率的读数,高斯普鲁士斯(Gaussia princeps)荧光素酶GpLuc mRNA用作被运载物。用所述被运载物成功转染导致荧光素酶蛋白的翻译和荧光素酶蛋白分泌到细胞培养上清液中。

[0600] 因此,将A549细胞以每孔75000个细胞的密度接种在24孔板中的细胞培养基(Gibco (ThermoFisher) Ham's F-12K (Kaighn's) 培养基,10%胎牛血清(FBS),1%L-谷氨酰胺,1%青霉素/链霉素)中。如下所述用不同的载体-脂质制剂和用编码GpLuc的mRNA (SEQ ID NO:12;R2851) 转染A549细胞,一式两份。作为阴性对照,使用编码不含CVCM/PB83载体的GpLuc的mRNA。24小时后定量荧光素酶表达。

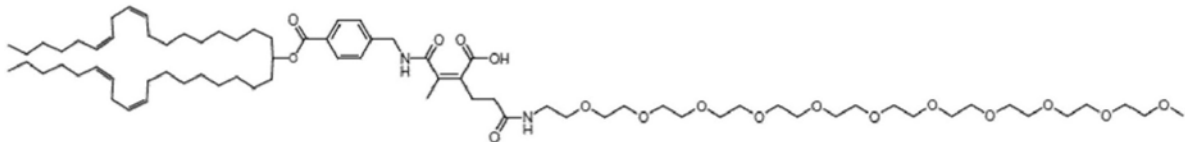
[0601] 在该工作实施例中,使用(R₁₂CW)₂作为载体聚合物(通过半胱氨酸S-S键共价结合的两个R₁₂CW-单元)和聚乙二醇化的3-C12-OH脂质(ChiroBlock,Bitterfeld-Wolfen,德国):



[0602] 表7:转染条件

	载体	脂质	mRNA	N/P	
条件 1	15 μ l (R ₁₂ CW) ₂ [0.25 g/l]	无	2.5 μ l Gpluc mRNA [5 g/l]	0.7	+ 20 μ l RiLa 用不含血清 的培养基填 充直至 1ml 每孔添加 200 μ l
条件 2	无	5 μ l 聚乙二 醇化 3-C12- OH [100 μ mol/ml]	2.5 μ l Gpluc mRNA [5 g/l]	0.7	
条件 3	15 μ l (R ₁₂ CW) ₂ [0.25 g/l]	5 μ l 聚乙二 醇化 3-C12- OH [100 μ mol/ml]	2.5 μ l Gpluc mRNA [5 g/l]	0.7	

[0603] 在第二部分中, (R₁₂CW)₂用作载体聚合物(两个R₁₂CW-单元通过半胱氨酸S-S键共价结合)并且使用



(ChiroBlock, Bitterfeld-Wolfen, 德国)。

[0604] 表8:转染条件:

	载体	脂质	mRNA	N/P	
条件 4	45 μ l (R ₁₂ CW) ₂ [0.25 g/l]	无	2.5 μ l Gpluc mRNA [5 g/l]	0.7	+ 20 μ l RiLa
条件 5	无	5 μ l 聚乙二 醇化脂质 [100 μ mol/ml]	2.5 μ l Gpluc mRNA [5 g/l]	0.7	用不含血清 的培养基填 充直至 1ml
条件 6	45 μ l (R ₁₂ CW) ₂ [0.25 g/l]	5 μ l 聚乙二 醇化脂质 [100 μ mol/ml]	2.5 μ l Gpluc mRNA [5 g/l]	0.7	每孔添加 200 μ l

[0605] 结果:

[0606] 图11A和11B显示了GpLuc蛋白在用mRNA构建体R2851转染的A549细胞中表达,并且与没有添加脂质的对照相比,具有添加的聚乙二醇化脂质的测试制剂是高效的。这表明mRNA与极少量聚乙二醇化脂质的组合能够提高转染效率。

序列表 (SEQUENCE LISTING)

<110> 库瑞瓦格股份公司 (CureVac AG)

<120> 核酸被运载物的混合载体 (HYBRID CARRIERS FOR NUCLEIC ACID CARGO)

<130> CRV16P02PC2 - CV146 - P231

<160> 19

<170> PatentIn版 3.5 (PatentIn version 3.5)

<210> 1

<211> 60

<212> RNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 式V (formula_V)

<400> 1

uagcgaagcu cuuggaccua gguuuuuuuuuuuuuuuuggg ugCGUuccua gaaguacacg 60

<210> 2

<211> 120

<212> RNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 式V (formula_V)

<400> 2

uagcgaagcu cuuggaccua gguuuuuuuuuuuuuuuuggg ugCGUuccua gaaguacacg 60

aucgcuucga gaaccuggau ccaaaaaaaaaaaaaaaccc acgcaaggau cuucaugugc 120

<210> 3

<211> 229

<212> RNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 式V (formula_V)

<400> 3

gggagaaaagc ucaagcuugg agcaaugccc gcacauugag gaaaccgagu ugcauauucuc 60

agaguauugg cccccgugua gguuauucuu gacagacagu ggagcuuauu cacucccagg 120

auccgagucg cauacuacgg uacuggugac agaccuaggu cgucaguuga ccaguccgcc 180

acuagacgug aguccgucaa agcaguuaga uguuacacuc uuuuagauc 229

<210> 4

<211> 547

<212> RNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 式V(formula_V)

<400> 4

gggagaaagc ucaagcuugg agcaaugccc gcacauugag gaaaccgagu ugcauauuc 60
 agaguauugg cccccgugua gguuauucuu gacagacagu ggagcuuauu cacucccagg 120
 auccgagucg cauacuacgg uacuggugac agaccuaggu cgucaguuga ccaguccgcc 180
 acuagacgug aguccgucaa agcaguuaga uguuacacuc uauuagaucu cggauuacag 240
 cuggaaggag caggaguagu guucuugcuc uaaguaccga gugugcccaa uaccggauga 300
 gcuuauuac gaacggcucc uccucuuga cugcagcgu agucggauu cuggggauca 360
 aauuacugac ugccuggauu acccucggac auauaaccuu guagcacgcu guugcuguau 420
 aggugaccaa cgcccacucg aguagaccag cucucuuguu cggacaauu auaggaggcg 480
 cggucaauuc acuuucuggcu aguuuagaau aggucgacc gaccucuaua aguagcgugu 540
 ccucuag 547

<210> 5

<211> 1083

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 式V(formula_V)

<400> 5

gggagaaagc ucaagcuugg agcaaugccc gcacauugag gaaaccgagu ugcauauuc 60
 agaguauugg cccccgugua gguuauucuu gacagacagu ggagcuuauu cacucccagg 120
 auccgagucg cauacuacgg uacuggugac agaccuaggu cgucaguuga ccaguccgcc 180
 acuagacgug aguccgucaa agcaguuaga uguuacacuc uauuagaucu cggauuacag 240
 cuggaaggag caggaguagu guucuugcuc uaaguaccga gugugcccaa uaccggauga 300
 gcuuauuac gaacggcucc uccucuuga cugcagcgu agucggauu cuggggauca 360
 aauuacugac ugccuggauu acccucggac auauaaccuu guagcacgcu guugcuguau 420
 aggugaccaa cgcccacucg aguagaccag cucucuuguu cggacaauu auaggaggcg 480
 cggucaauuc acuuucuggcu aguuuagaau aggucgacc gaccucuaua aguagcgugu 540
 ccucuagagc uacgcagguu cgcauuuuuu gcguugauua gugugcauag aacagaccuc 600
 uuauucggug aaacgccaga augcuuuuuu ccauuuacuc uucccaaac gcguacggcc 660
 gaagacgcgc gcuuauucuu uguuacguucu cgcacaugga agaaucagcg ggcauggugg 720
 uagggcaaua ggggagcugg guagcagcga aaaagggcc cugcgcacgu agcuucgcug 780
 uucgucugaa acaaccggc auccguugua gcgauccgu uaucaguguu auucuuguc 840
 gcacuaagau ucauggugua gucgacaaua acagcgucuu ggcagauucu ggucacgugc 900
 ccuauccccg ggcuugugcc ucucaggugc acagcgauac uuuuagccuu caagguacuc 960
 gacgugggua ccgauucgug acacuuccua agauuuuucc acuguguuag ccccgaccg 1020
 ccgaccuaaa cugguccaau guauacgcau ucgcugagcg gaucgaaau aaaagcuuga 1080
 auu 1083

gugcauauag uagucaucga gggucgccuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uggcccaguu 300
 cugagacuuc gcuagagacu acaguuacag cugcaguagu aaccacugcg gcuauugcag 360
 gaaaucccg uacaguuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuccgc ucacuaugau uaagaaccag 420
 guggaguguc acugcucucg aggucucacg agagcgcucg auacaguccu uggaagaauc 480
 uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uugugcgacg aucacagaga acuucuauuc augcaggucu 540
 gcucuagaac gaacugaccu gacgccugaa cuuaugagcg ugcguauuuu uuuuuuuuuu 600
 uuuuuuuuuu cucccaacaa augucgauca auagcugggc uguuggagac gcgucagcaa 660
 augccguggc uccauaggac guguagacuu cuauuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuccggg 720
 accacaaaua auauucuuugc uugguugggc gcaagggccc cguaucaggu cauaaacggg 780
 uacauguugc acaggcuccu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uucgcugagu uauuccgguc 840
 ucaaaaagacg gcagacguca gucgacaaca cggucuaaag cagugcuaca aucugccgug 900
 uucguguuuu uuuuuuuuuu uuuuuuguga accuacacgg cgugcacugu aguucgcau 960
 ucuaugggua ccggcucaga guuaugccuu gguugaaaac ugcccagcau acuuuuuuuu 1020
 uuuuuuuuuu uucauauucc caugcuaagc aagggaugcc gcgagucaug uuaagcuuga 1080
 auu 1083

<210> 9

<211> 59

<212> RNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 式V (formula_V) I

<400> 9

uagcgaagcu cuuggaccua ccuuuuuuuu uuuuuucccu gcguuccuag aaguacacg 59

<210> 10

<211> 120

<212> RNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 式V (formula_V) I

<400> 10

uagcgaagcu cuuggaccua ccuuuuuuuu uuuuuuuccc ugcuuccua gaaguacacg 60
 aucgcuuuga gaaccuggau ggaaaaaaa aaaaaaggg acgcaaggau cuucauguc 120

<210> 11

<211> 185

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> GpLuc 氨基酸序列 (amino acid sequence)

<400> 11

Met Gly Val Lys Val Leu Phe Ala Leu Ile Cys Ile Ala Val Ala Glu
 1 5 10 15
 Ala Lys Pro Thr Glu Asn Asn Glu Asp Phe Asn Ile Val Ala Val Ala
 20 25 30
 Ser Asn Phe Ala Thr Thr Asp Leu Asp Ala Asp Arg Gly Lys Leu Pro
 35 40 45
 Gly Lys Lys Leu Pro Leu Glu Val Leu Lys Glu Met Glu Ala Asn Ala
 50 55 60
 Arg Lys Ala Gly Cys Thr Arg Gly Cys Leu Ile Cys Leu Ser His Ile
 65 70 75 80
 Lys Cys Thr Pro Lys Met Lys Lys Phe Ile Pro Gly Arg Cys His Thr
 85 90 95
 Tyr Glu Gly Asp Lys Glu Ser Ala Gln Gly Gly Ile Gly Glu Ala Ile
 100 105 110
 Val Asp Ile Pro Glu Ile Pro Gly Phe Lys Asp Leu Glu Pro Met Glu
 115 120 125
 Gln Phe Ile Ala Gln Val Asp Leu Cys Val Asp Cys Thr Thr Gly Cys
 130 135 140
 Leu Lys Gly Leu Ala Asn Val Gln Cys Ser Asp Leu Leu Lys Lys Trp
 145 150 155 160
 Leu Pro Gln Arg Cys Ala Thr Phe Ala Ser Lys Ile Gln Gly Gln Val
 165 170 175
 Asp Lys Ile Lys Gly Ala Gly Gly Asp
 180 185

<210> 12

<211> 940

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> GpLuc mRNA

<400> 12

ggggcgcugc cuacggaggu ggcagccauc uccuucucgg caucaagcuu accaugggcg 60
 ugaagguccu guucgcccuc aucugcaucg ccguggcgga ggccaagccc accgagaaca 120
 acgaggacuu caacaucgug gccgucgcca gcaacuucgc caccacggac cuggacgcgg 180
 accgggggaa gcugccgggc aagaagcucc ccucggaggu gcugaaggag auggaggcca 240
 acgcccgcaa ggccgggugc acccgggggc gccucaucug ccuguccac aucaagugca 300
 cccccaagau gaagaaguuc auccccgggc gcugccacac cuacgagggc gacaaggaga 360
 gcgcgcaggg cgggaucggc gaggccaucg uggacaucce ggagaucccc ggguucaagg 420
 accuggagcc cauggagcag uucaucgccc aggucgaccu cugcguggac ugcacgaccg 480

gcugccugaa ggggcuggcc aacgugcagu gcuccgaccu ccugaagaag uggcugcccc 540
 agcggugcgc caccuucgcg agcaagauc agggccaggu cgacaagauc aaggcgccg 600
 ggggcgacug aggacuagug caucacauuu aaaagcaucu cagccuacca ugagaauaag 660
 agaaagaaaa ugaagaucua uagcuuauuc aucucuuuuu cuuuuucguu gguguaaagc 720
 caacaccug ucuaaaaaac auaaaauucu uuaaucauuu ugccucuuuu cucugugcuu 780
 cauuuaauaa aaaauggaaa gaaccuagau cuaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 840
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaugca ucccccccc ccccccccc 900
 ccccccccc ccaaaggcuc uuuucagagc caccagaau 940

<210> 13

<211> 42

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 缺乏5'末端寡嘧啶束的人核糖体蛋白大32的5'-UTR (5'-UTR of human ribosomal protein Large 32 lacking the 5' terminal oligopyrimidine tract)

<400> 13

ggcgtgcct acggaggtgg cagccatctc cttctcgca tc 42

<210> 14

<211> 75

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 缺乏5'末端寡嘧啶束的ATP5A1的5'-UTR (5'-UTR of ATP5A1 lacking the 5' terminal oligopyrimidine tract)

<400> 14

gcggtcggc cattttgtcc cagtcagtcc ggaggctgcg gctgcagaag taccgcctgc 60
 ggagtaactg caaag 75

<210> 15

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 组蛋白茎-环序列 (histone stem-loop sequence)

<400> 15

caaaggctct tttcagagcc acca 24

<210> 16

<211> 24

<212> RNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 组蛋白茎-环序列(histone stem-loop sequence)

<400> 16

caaaggcucu uuucagagcc acca 24

<210> 17

<211> 2083

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> HA-R2564 mRNA

<400> 17

ggggcgcugc cuacggaggu ggcagccauc uccuucucgg caucaagcuu accaugaag 60
ccaucucggu gguccuccug uacaccuucg ccaccgcaa cgccgacacg cugugcaucg 120
gcuaccacgc caacaacagc accgacaccg uggacaccgu gcucgagaag aacgucacgg 180
ugaccacacuc cgugaaccug cuggaggaca agcacaacgg gaagcucugc aagcugcggg 240
gcgucgcccc gcugcaccuc gggaagugca acaucgccgg cuggaucug gggaacccgg 300
agugcgagag ccuguccacc gcgagcuccu ggagcuacau cguggagacc uccagcuccg 360
acaacggcac gugcuacccc ggcgacuuca ucgacuacga ggagcuccgc gagcagcuga 420
gcuccgugag cuccuucgag cgguucgaga ucuucccaa gaccagcucc uggcccaacc 480
acgacagcaa caaggggguc accgccgcu gcccgcacgc cggcgcaag uccuucuaca 540
agaaccugau cuggcucgug aagaagggga acagcuacce caagcugucc aagagcuaca 600
ucaacgacaa gggcaaggag gugcuggucc ucugggggau ccaccacccc agcaccuccg 660
ccgaccagca gagccuguac cagaacgccg acgccuacgu guucgugggc uccagccgcu 720
acuccaagaa guucaagccc gagaucgcca uccggccgaa gguccgac caggagggcc 780
ggaugaacua cuacuggacg cugguggagc ccggggacaa gaucaccuuc gaggcgaccg 840
gcaaccucgu ggucggcguc uacgccuucg ccauggagcg gaacgccggg agcggcauca 900
ucaucuccga caccggcug cacgacugca acacgaccug ccagacccc aagggcgcca 960
ucaacaccag ccugcccuuc cagaacaucc acccaucac gaucgggaag ugcccaagu 1020
acgugaaguc caccaagcug cgccucgca ccggccugcg gaacgucgg agcauccagu 1080
cccgcgggcu guucggcgcc aucgccgggu ucaucgaggg cggcuggacc gggauuggg 1140
acggcuggua cggguaccac caccagaacg agcagggcag cggguacgcc gccgaccuca 1200
aguccacgca gaacgcgauc gacgagauc ccaacaaggu gaacagcug aucgagaaga 1260
ugaacaccca guucaccgcc gugggcaagg aguucaacca ccuggagaag cggaucgaga 1320
accugaacaa gaagcugac gacggcuuc ucgacaucug gacguacaac gccgagcugc 1380
uggugcuccu ggagaacgag cgcaccucgg acuaccacga cuccaacgug aagaaccucu 1440
acgagaaggu ccggagccag cugaagaaca acgccaagga gaucgggaac ggcugcuucg 1500
aguucuacca caagucgac aacaccugca uggaguccgu gaagaacggg accuacgacu 1560
acccaagua cagcgaggag gccaaagcuga accgcgagga gaucgacggc gugaagcugc 1620
aguccacgcg gaucuccag auccuggcga ucuacagcac cgucgccagc uccugugc 1680

ucguggucag ccugggggcc aucuccuucu ggaugugcag caacggcucc cugcagugcc 1740
gcaucugcau cugaccacua gugcaucaca uuuaaaagca ucucagccua ccaugagaau 1800
aagagaaaga aaaugaagau caauagcuua uucaucucuu uuucuuuuuc guugguguaa 1860
agccaacacc cugucuaaaa aacauaaaau ucuuuauca uuugccucu uuucucugug 1920
cuucaauuaa uaaaaaaaaugg aaagaaccua gaucuaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1980
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa gcaucccccc ccccccccc 2040
cccccccccc cccccaaagg cucuuucag agccaccaga auu 2083

<210> 18

<211> 550

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> Ppluc 氨基酸序列(amino acid sequence)

<400> 18

Met	Glu	Asp	Ala	Lys	Asn	Ile	Lys	Lys	Gly	Pro	Ala	Pro	Phe	Tyr	Pro
1				5					10					15	
Leu	Glu	Asp	Gly	Thr	Ala	Gly	Glu	Gln	Leu	His	Lys	Ala	Met	Lys	Arg
			20					25					30		
Tyr	Ala	Leu	Val	Pro	Gly	Thr	Ile	Ala	Phe	Thr	Asp	Ala	His	Ile	Glu
		35					40					45			
Val	Asp	Ile	Thr	Tyr	Ala	Glu	Tyr	Phe	Glu	Met	Ser	Val	Arg	Leu	Ala
		50				55					60				
Glu	Ala	Met	Lys	Arg	Tyr	Gly	Leu	Asn	Thr	Asn	His	Arg	Ile	Val	Val
65				70						75				80	
Cys	Ser	Glu	Asn	Ser	Leu	Gln	Phe	Phe	Met	Pro	Val	Leu	Gly	Ala	Leu
				85					90					95	
Phe	Ile	Gly	Val	Ala	Val	Ala	Pro	Ala	Asn	Asp	Ile	Tyr	Asn	Glu	Arg
			100					105					110		
Glu	Leu	Leu	Asn	Ser	Met	Gly	Ile	Ser	Gln	Pro	Thr	Val	Val	Phe	Val
			115				120					125			
Ser	Lys	Lys	Gly	Leu	Gln	Lys	Ile	Leu	Asn	Val	Gln	Lys	Lys	Leu	Pro
			130				135					140			
Ile	Ile	Gln	Lys	Ile	Ile	Ile	Met	Asp	Ser	Lys	Thr	Asp	Tyr	Gln	Gly
145				150						155				160	
Phe	Gln	Ser	Met	Tyr	Thr	Phe	Val	Thr	Ser	His	Leu	Pro	Pro	Gly	Phe
				165						170				175	
Asn	Glu	Tyr	Asp	Phe	Val	Pro	Glu	Ser	Phe	Asp	Arg	Asp	Lys	Thr	Ile
				180						185				190	
Ala	Leu	Ile	Met	Asn	Ser	Ser	Gly	Ser	Thr	Gly	Leu	Pro	Lys	Gly	Val

195	200	205
Ala Leu Pro His Arg Thr	Ala Cys Val Arg Phe	Ser His Ala Arg Asp
210	215	220
Pro Ile Phe Gly Asn Gln Ile Ile	Pro Asp Thr Ala Ile Leu Ser Val	
225	230	235
Val Pro Phe His His Gly Phe Gly	Met Phe Thr Thr Leu Gly Tyr Leu	
245	250	255
Ile Cys Gly Phe Arg Val Val Leu	Met Tyr Arg Phe Glu Glu Glu Leu	
260	265	270
Phe Leu Arg Ser Leu Gln Asp Tyr	Lys Ile Gln Ser Ala Leu Leu Val	
275	280	285
Pro Thr Leu Phe Ser Phe Phe Ala	Lys Ser Thr Leu Ile Asp Lys Tyr	
290	295	300
Asp Leu Ser Asn Leu His Glu Ile	Ala Ser Gly Gly Ala Pro Leu Ser	
305	310	315
Lys Glu Val Gly Glu Ala Val Ala	Lys Arg Phe His Leu Pro Gly Ile	
325	330	335
Arg Gln Gly Tyr Gly Leu Thr Glu	Thr Thr Ser Ala Ile Leu Ile Thr	
340	345	350
Pro Glu Gly Asp Asp Lys Pro Gly	Ala Val Gly Lys Val Val Pro Phe	
355	360	365
Phe Glu Ala Lys Val Val Asp Leu	Asp Thr Gly Lys Thr Leu Gly Val	
370	375	380
Asn Gln Arg Gly Glu Leu Cys Val	Arg Gly Pro Met Ile Met Ser Gly	
385	390	395
Tyr Val Asn Asn Pro Glu Ala Thr	Asn Ala Leu Ile Asp Lys Asp Gly	
405	410	415
Trp Leu His Ser Gly Asp Ile Ala	Tyr Trp Asp Glu Asp Glu His Phe	
420	425	430
Phe Ile Val Asp Arg Leu Lys Ser	Leu Ile Lys Tyr Lys Gly Tyr Gln	
435	440	445
Val Ala Pro Ala Glu Leu Glu Ser	Ile Leu Leu Gln His Pro Asn Ile	
450	455	460
Phe Asp Ala Gly Val Ala Gly Leu	Pro Asp Asp Ala Gly Glu Leu	
465	470	475
Pro Ala Ala Val Val Val Leu Glu	His Gly Lys Thr Met Thr Glu Lys	
485	490	495
Glu Ile Val Asp Tyr Val Ala Ser	Gln Val Thr Thr Ala Lys Lys Leu	
500	505	510

Arg Gly Gly Val Val Phe Val Asp Glu Val Pro Lys Gly Leu Thr Gly
 515 520 525
 Lys Leu Asp Ala Arg Lys Ile Arg Glu Ile Leu Ile Lys Ala Lys Lys
 530 535 540
 Gly Gly Lys Ile Ala Val
 545 550

<210> 19

<211> 2035

<212> RNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

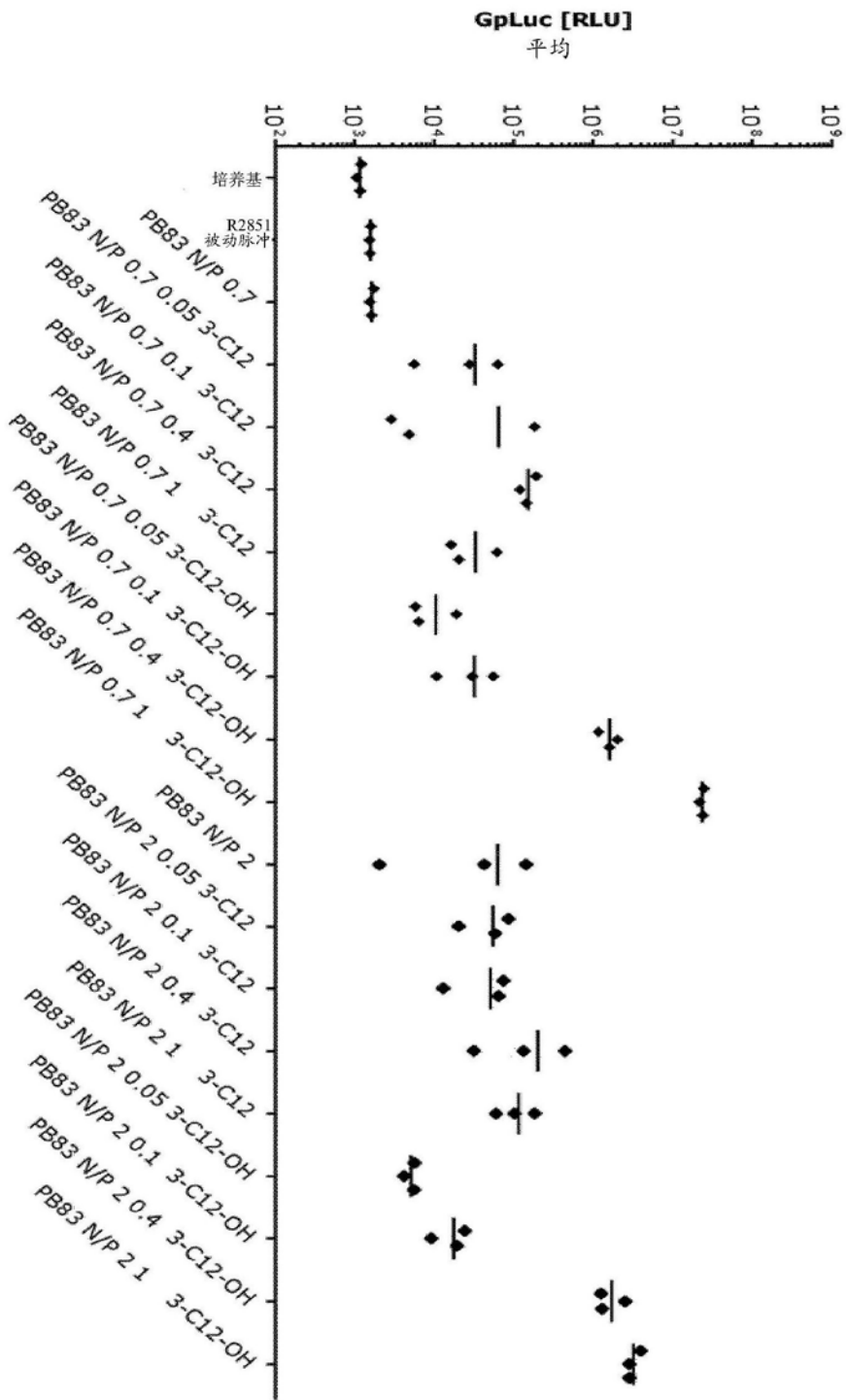
<220>

<223> Ppluc mRNA

<400> 19

ggggcgcugc cuacggaggu ggcagccauc uccuucucgg caucaagcuu gaggauggag 60
 gacgccaaga acaucaagaa gggcccggcg cccuucuaacc cgcuggagga cgggaccgcc 120
 ggcgagcagc uccacaaggc caugaagcgg uacgcccugg ugccgggcac gaucgccuuc 180
 accgacgcc acaucgaggu cgacaucacc uacgcggagu acuucgagau gagcgugcgc 240
 cuggccgagg ccaugaagcg guacggccug aacaccaacc accggaucgu ggugugcucg 300
 gagaacagcc ugcaguucuu caugccggug cugggcgccc ucuucaucgg cguggccguc 360
 gccccggcga acgacaucua caacgagcgg gagcugcuga acagcauggg gaucagccag 420
 ccgaccgugg uguucgugag caagaagggc cugcagaaga uccugaacgu gcagaagaag 480
 cugcccauca uccagaagau caucaucaug gacagcaaga ccgacuacca gggcuuccag 540
 ucgauguaca cguucgugac cagccaccuc ccgccgggcu ucaacgagua cgacuucguc 600
 ccggagagcu ucgaccggga caagaccauc gcccugauca ugaacagcag cggcagcacc 660
 ggccugccga aggggguggc ccugccgcac cggaccgccu gcgugcgcuu cucgcacgcc 720
 cgggacccca ucuucggcaa ccagaucauc ccggacaccg ccauccugag cguggugccg 780
 uuccaccacg gcuucggcau guucacgacc cugggcuacc ucaucugcgg cuuccgggug 840
 guccugaugu accgguucga ggaggagcug uuccugcggg gccugcagga cuacaagauc 900
 cagagcgcgc ugcucgugcc gaccuguuc agcuucuucg ccaagagcac ccugaucgac 960
 aaguacgacc ugucgaaccu gcacgagauc gccagcgggg gcgccccgcu gagcaaggag 1020
 gugggcgagg ccguggccaa gcgguuccac cucccgggca uccgccaggg cuacggccug 1080
 accgagacca cgagcgcgau ccugaucacc cccgaggggg acgacaagcc gggcgccgug 1140
 ggcaaggugg ucccguucuu cgaggccaag gugguggacc uggacaccgg caagaccug 1200
 ggcgugaacc agcggggcga gcugugcgug cgggggcccga ugaucaugag cggcuacgug 1260
 aacaaccgg aggccaccaa cgcuccauc gacaaggacg gcuggcugca cagcggcgac 1320
 aucgccuacu gggacgagga cgagcacuuc uucaucgucg accggcugaa gucgcugauc 1380
 aaguacaagg gcuaccaggu ggcgccggcc gagcuggaga gcauccugcu ccagcacc 1440
 aacaucucg acgccggcgu ggccgggcug ccggacgacg acgccggcga gcugccggcc 1500
 gcgguggugg ugcuggagca cggcaagacc augacggaga aggagaucgu cgacuacgug 1560

gccagccagg ugaccaccgc caagaagcug cggggcggcg ugguguucgu ggacgagguc 1620
ccgaagggcc ugaccgggaa gcucgacgcc cggaagaucc gcgagauccu gaucaaggcc 1680
aagaagggcg gcaagaucgc cguguaagac uagugcauca cauuuaaaag caucucagcc 1740
uaccaugaga auaagagaaa gaaaaugaag aucaauagcu uauucaucuc uuuuucuuuu 1800
ucguuggugu aaagccaaca ccugucuaa aaaacauaaa uuucuuuuuu cauuuugccu 1860
cuuuucucug ugcuucaauu aauaaaaaau ggaaagaacc uagaucuaaa aaaaaaaaaa 1920
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa augcaucucc 1980
cccccccccc ccccccccc ccccccaaaa ggcucuuuuc agagccacca gaauu 2035



在 24 小时后，在(不同)S018 中的 GpLuc 表达

图1A

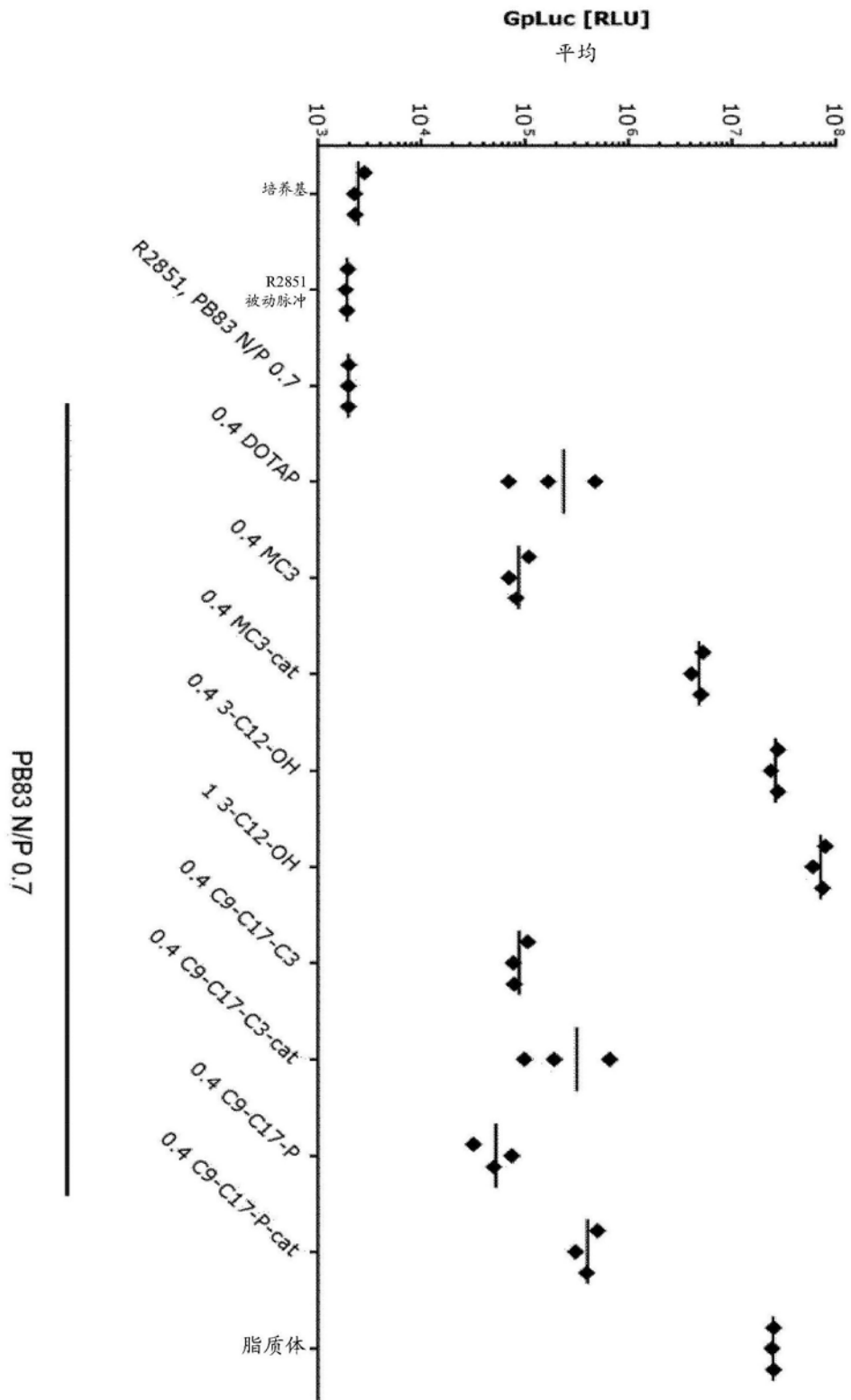


图1B

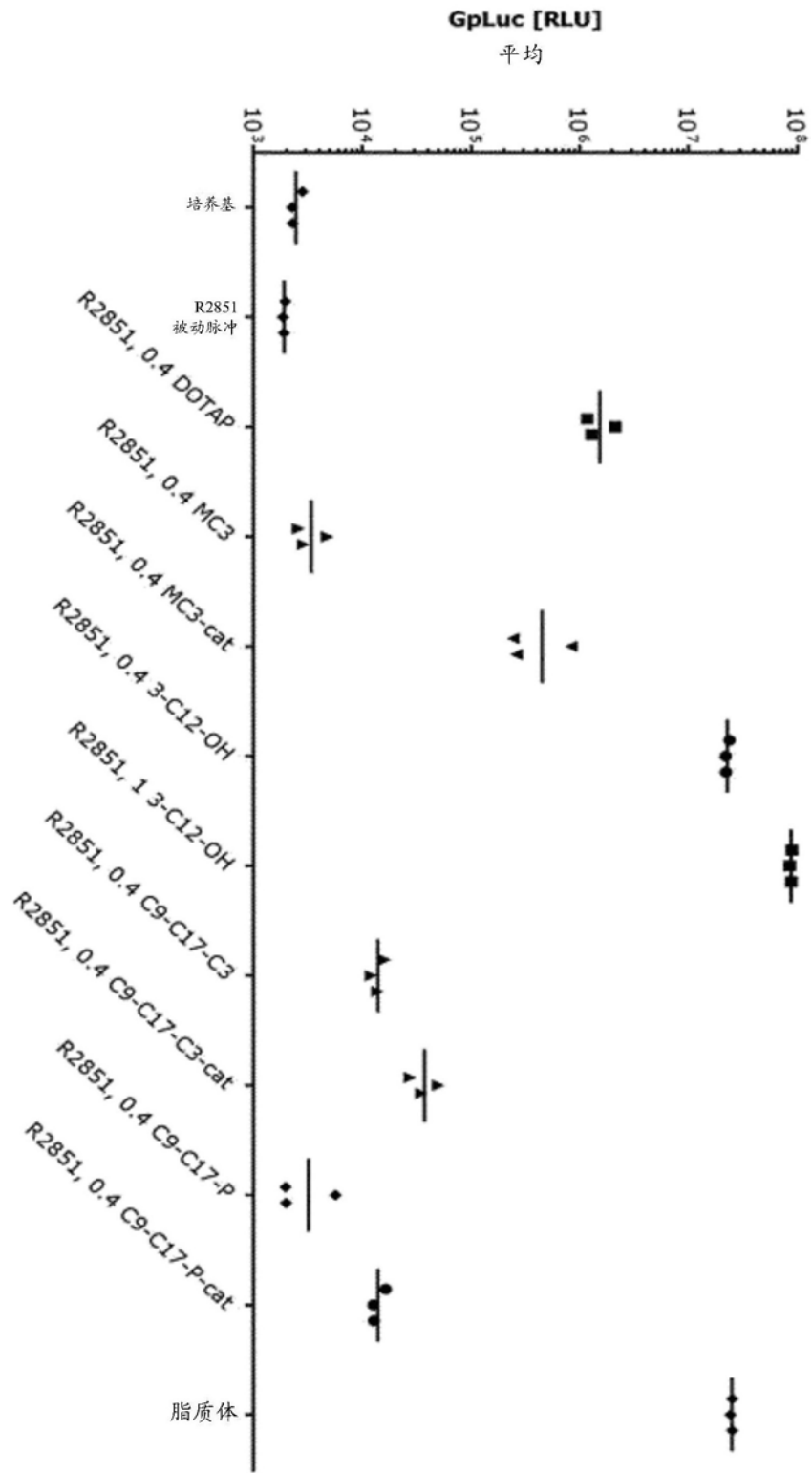


图1C

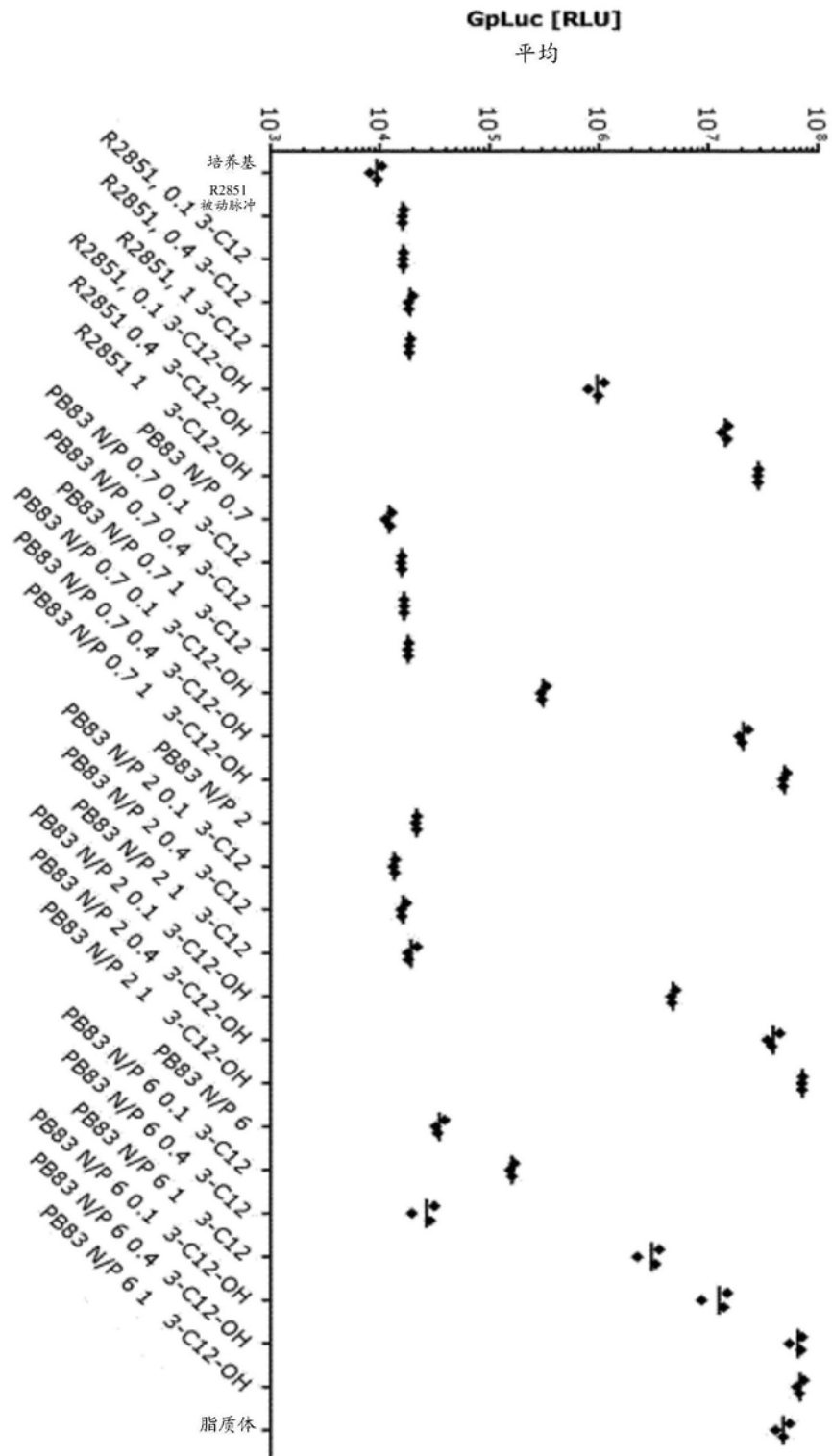


图2A

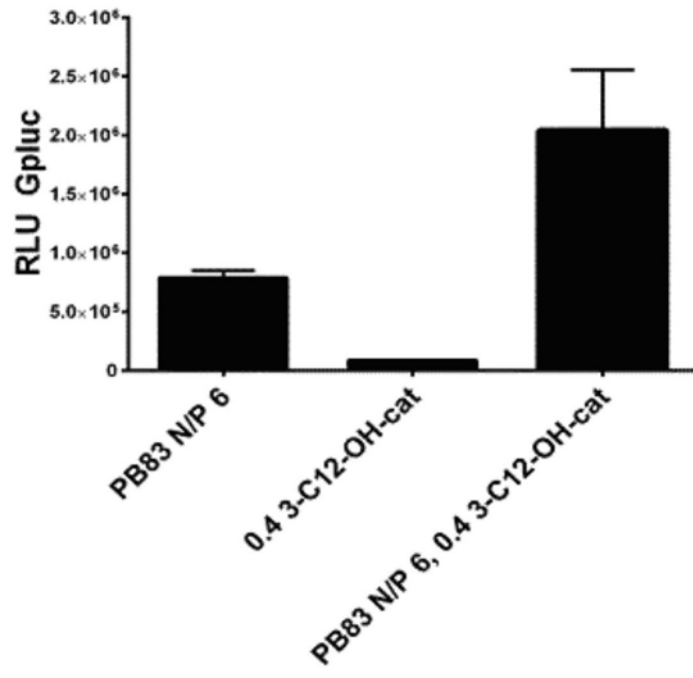


图2B

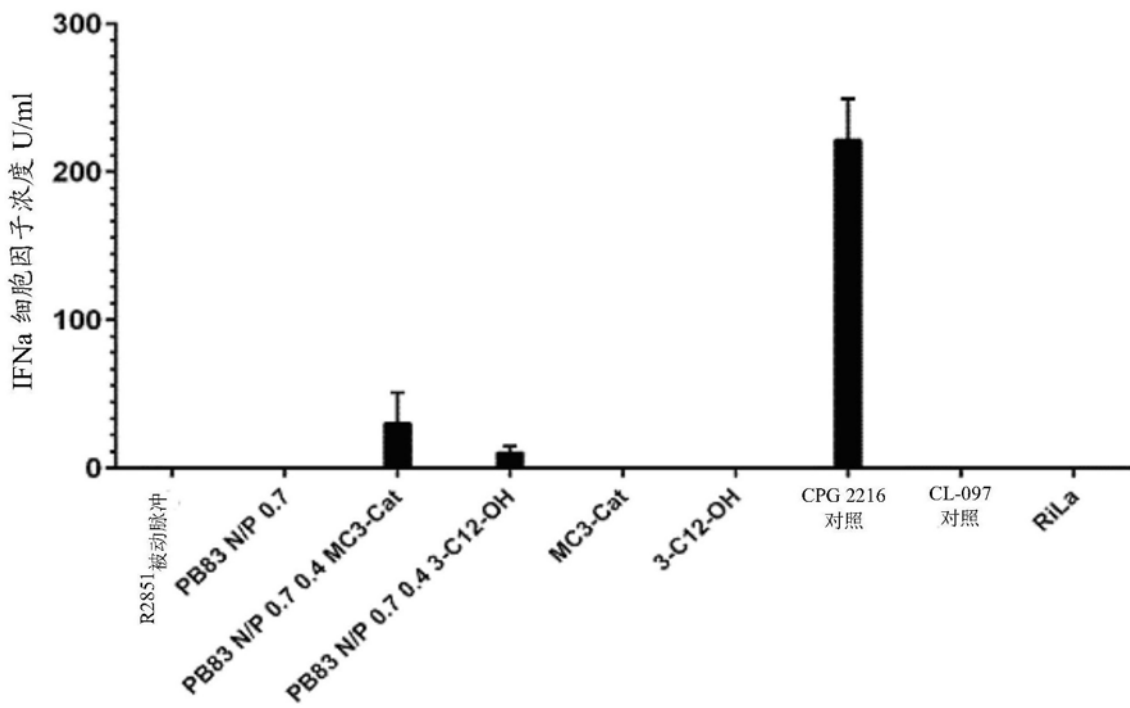


图3

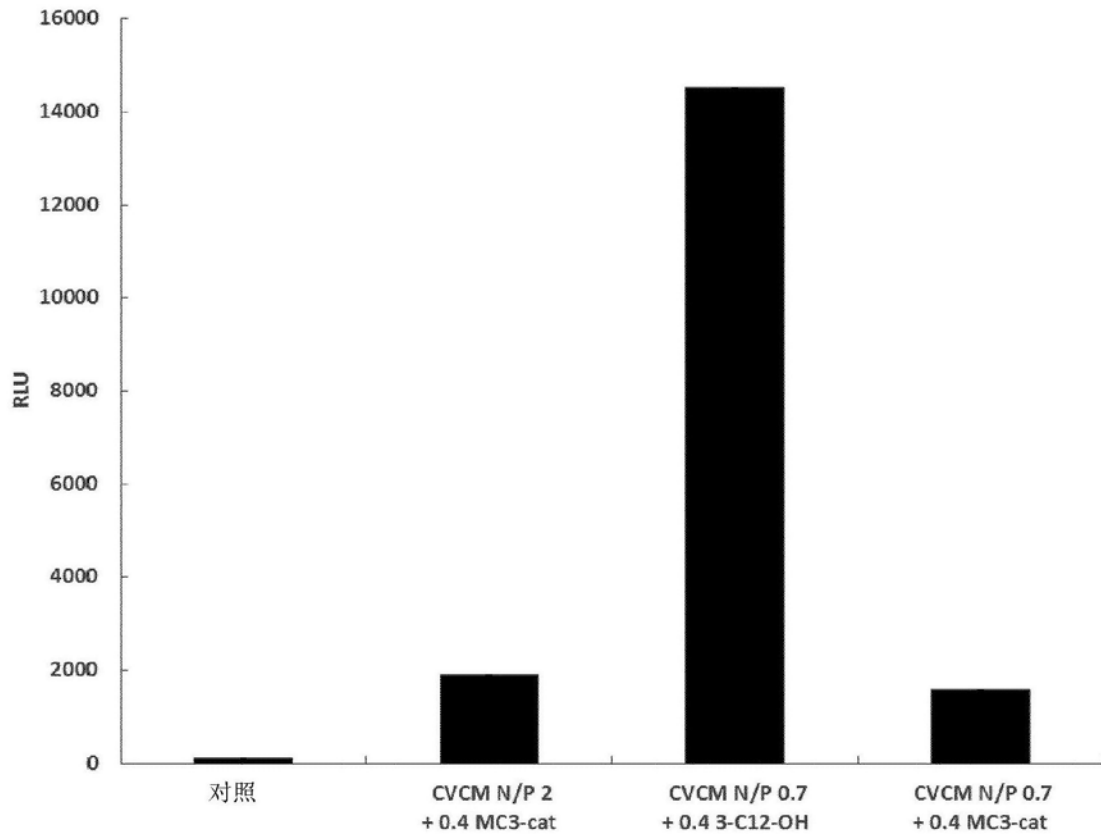


图4

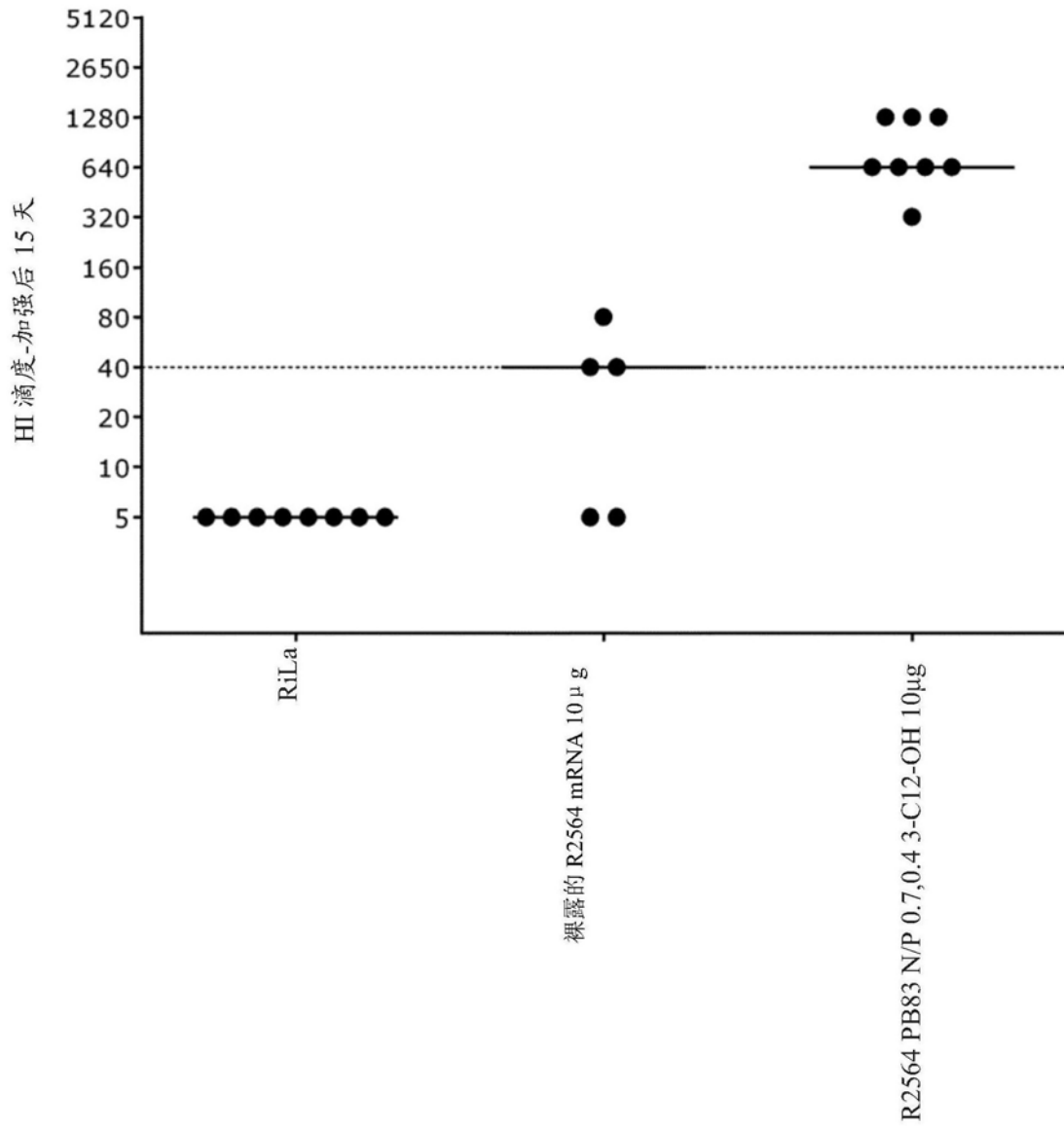


图5

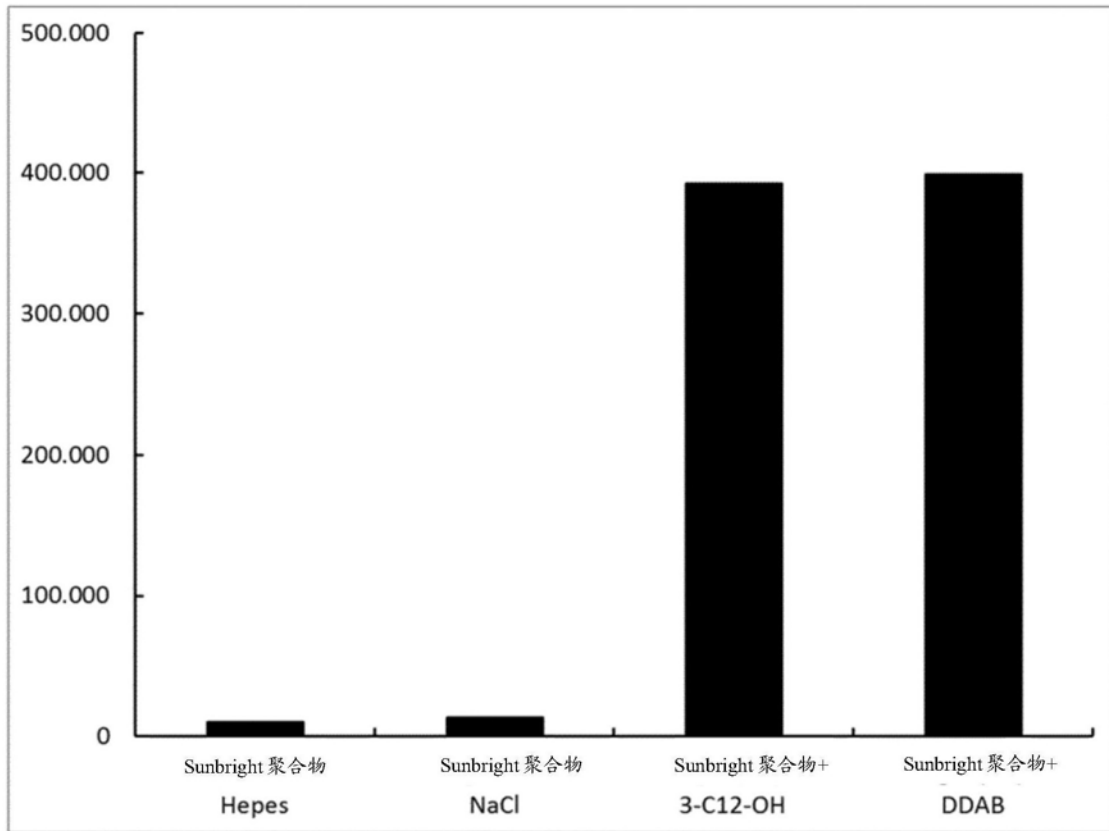


图6

在 FCS 存在下，24 小时后，BHK 中的 GpLuc 表达

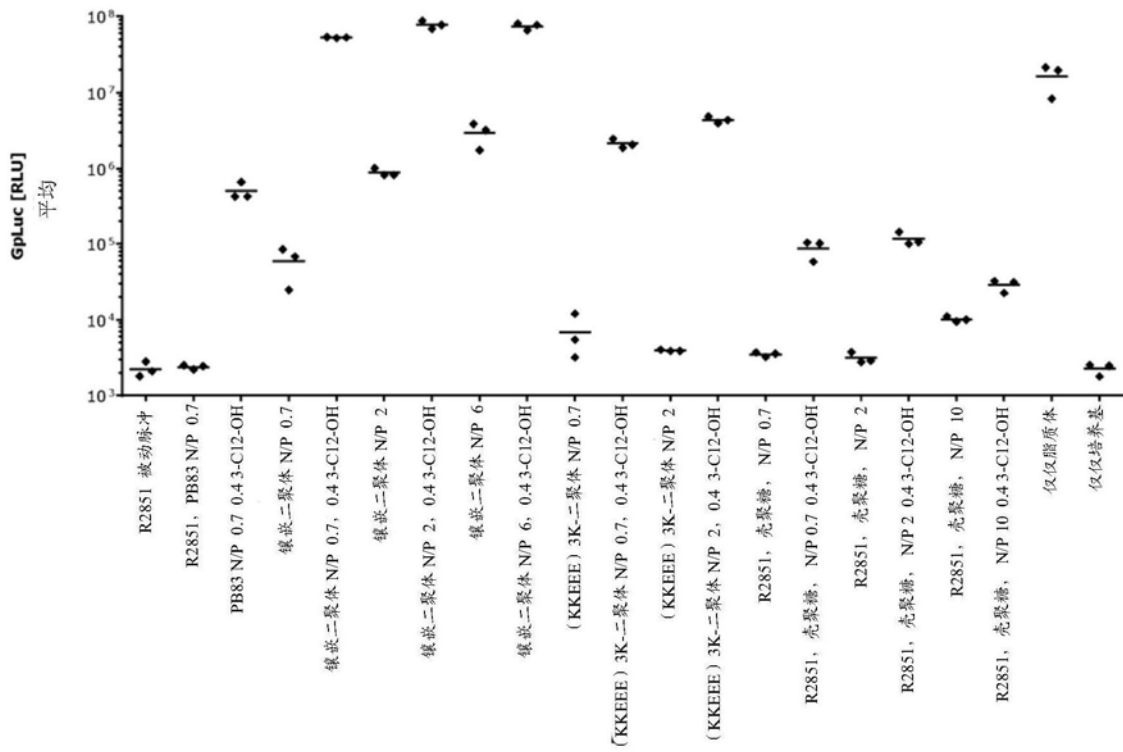


图7A

在 24 小时后，在不同 Sol8 中的 GpLuc 表达

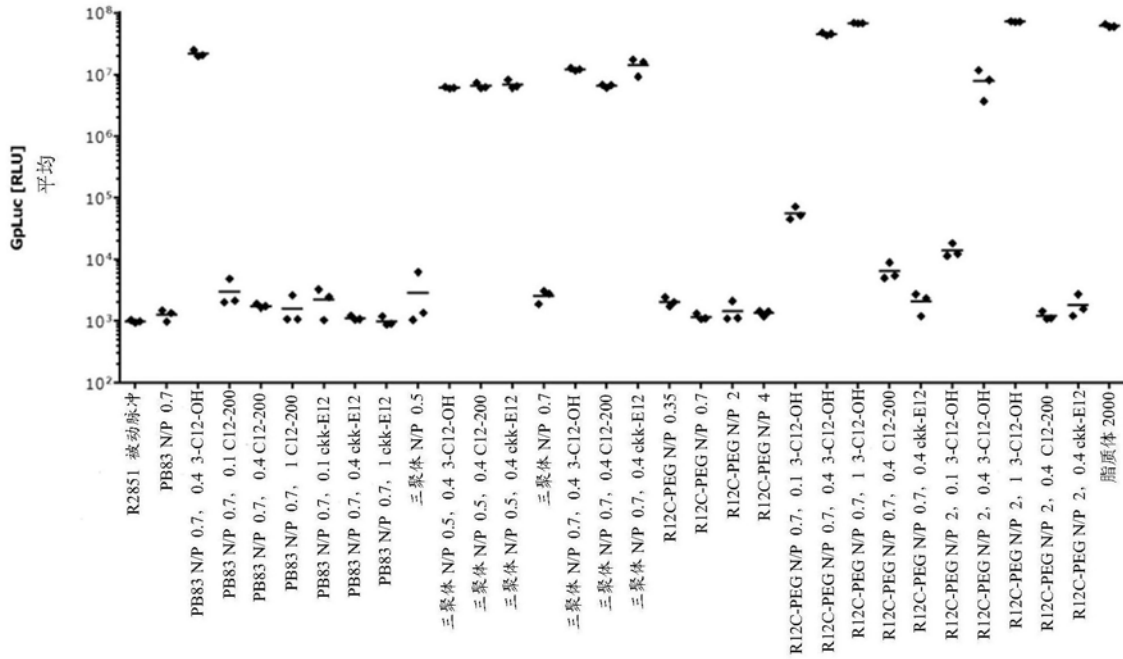


图7B

在 24 小时后，在 HeLa 细胞中的 PpLuc 表达

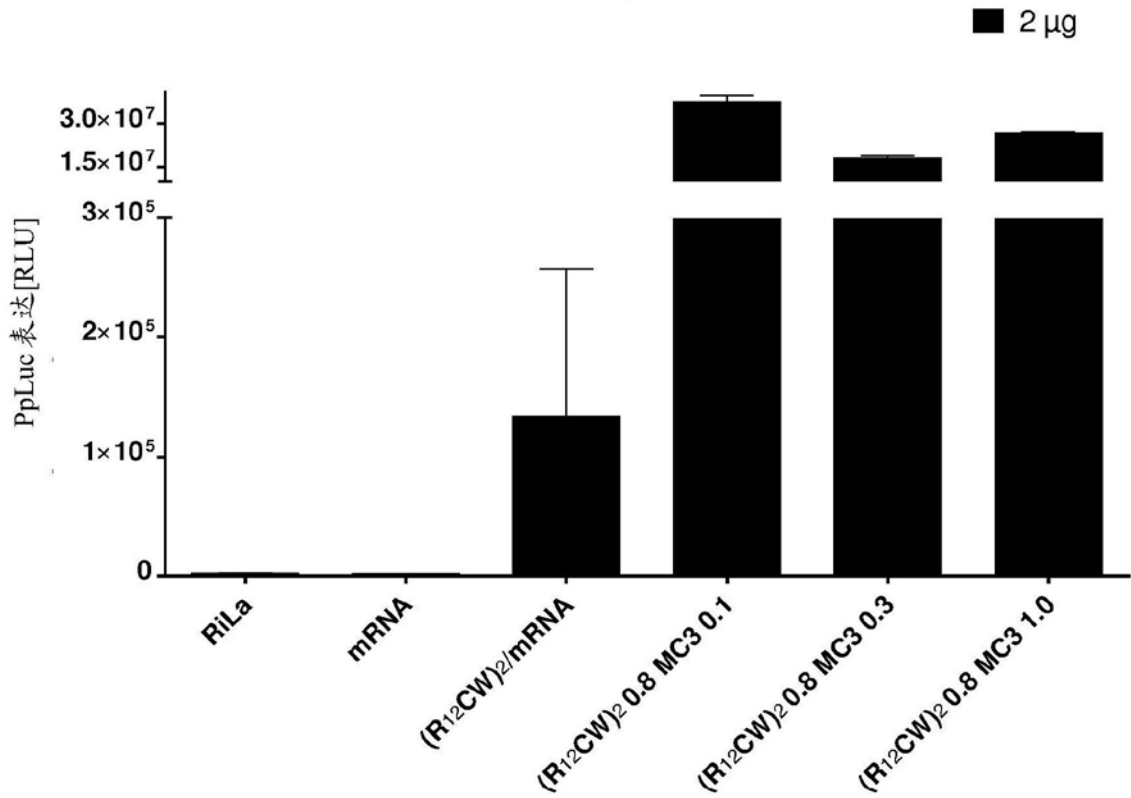


图7C

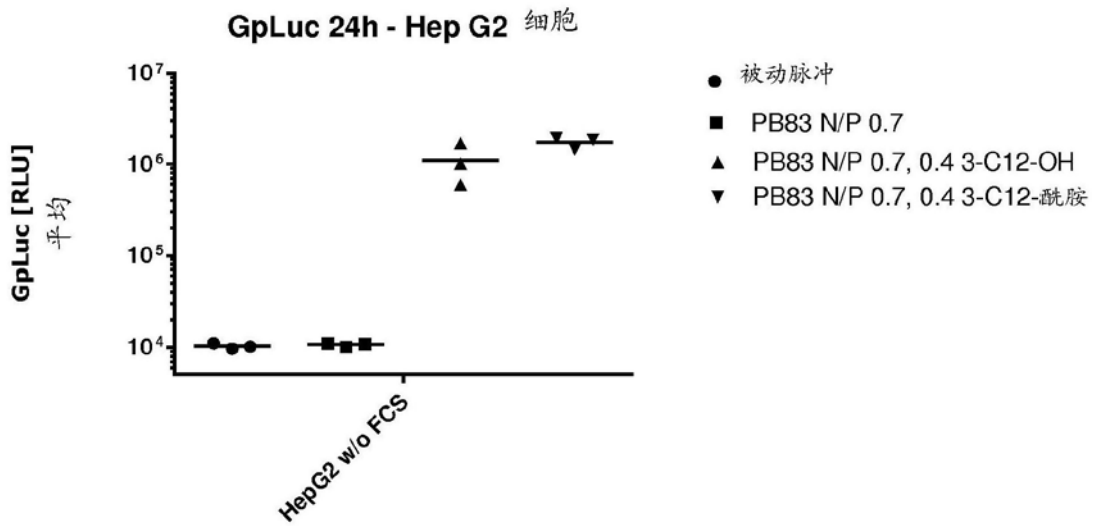


图8

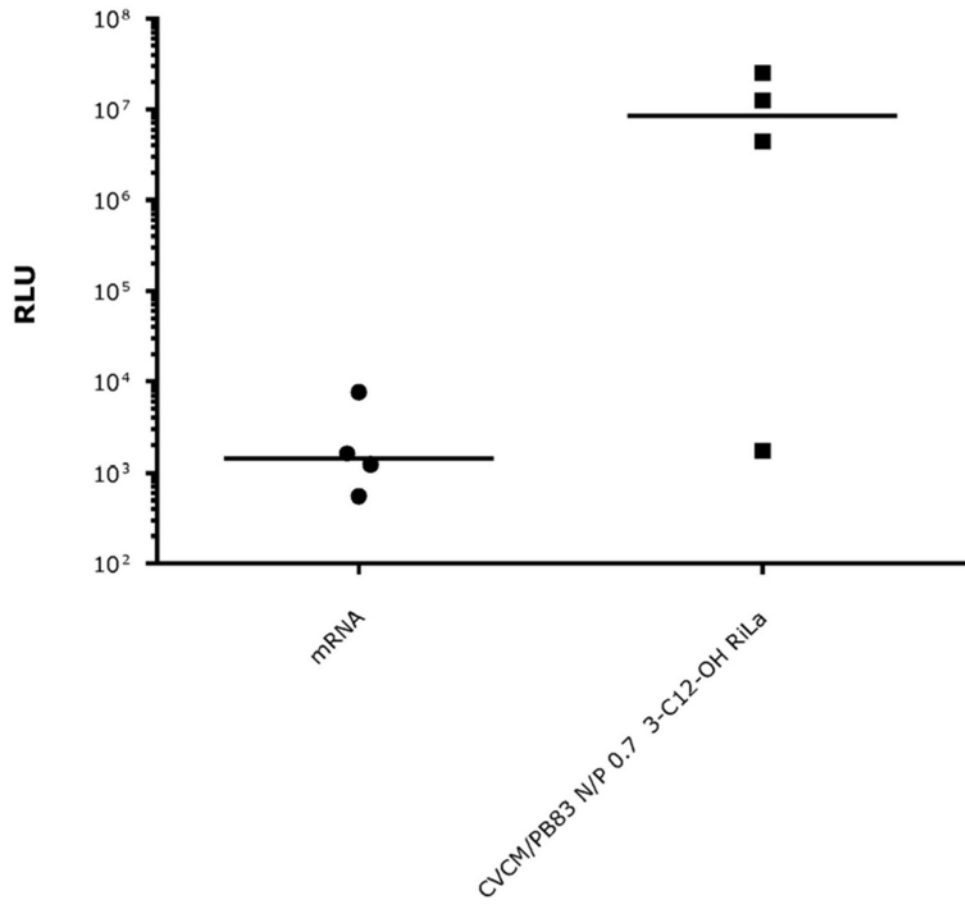


图9

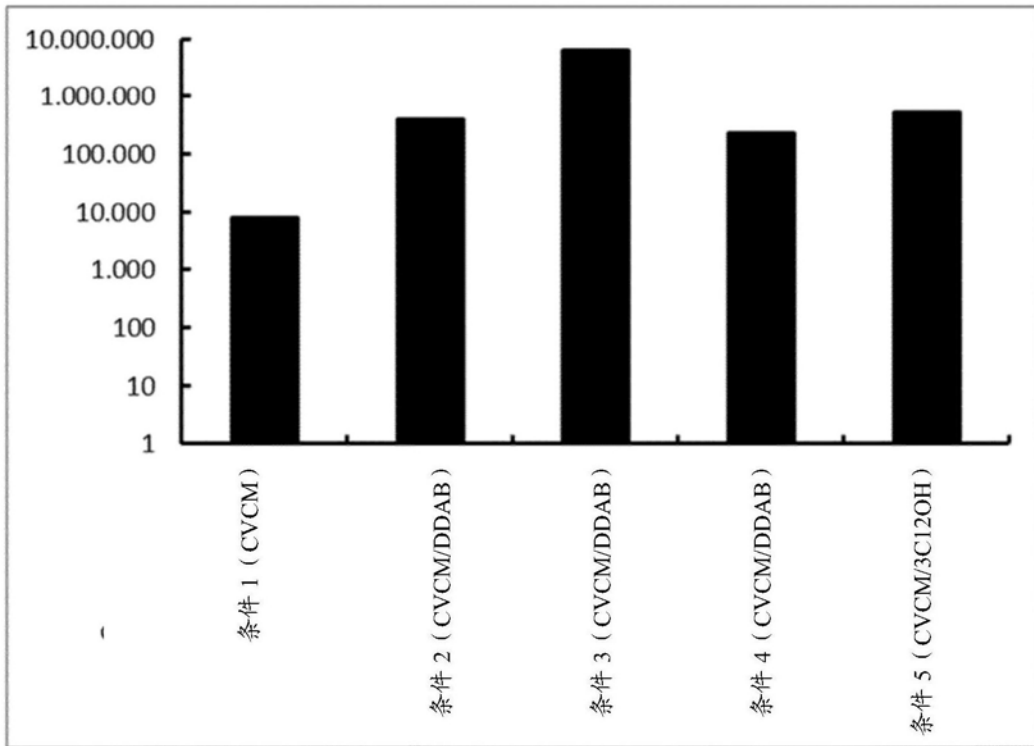


图10

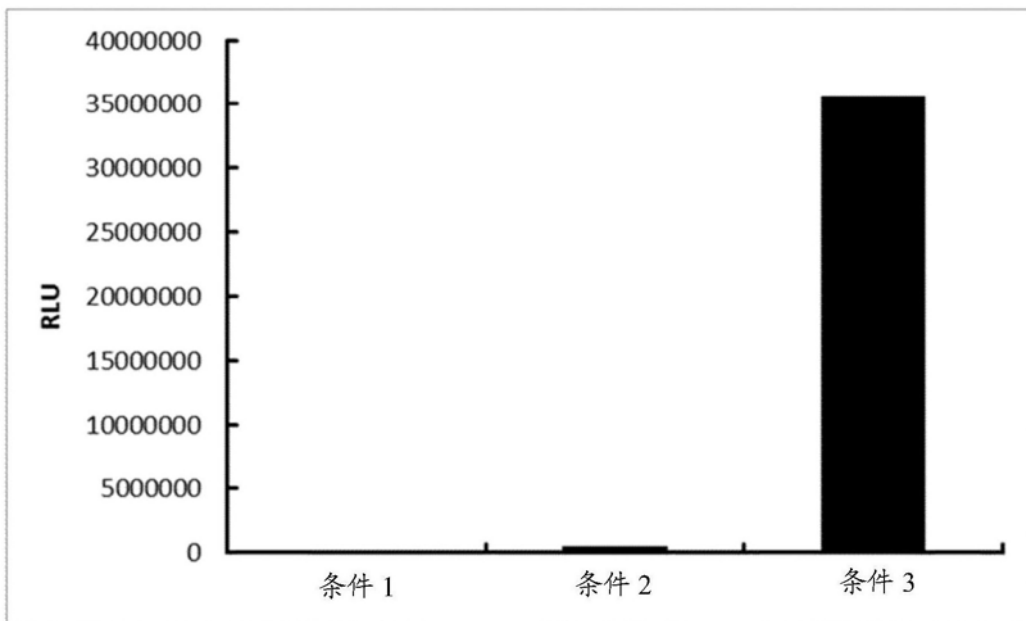


图11A

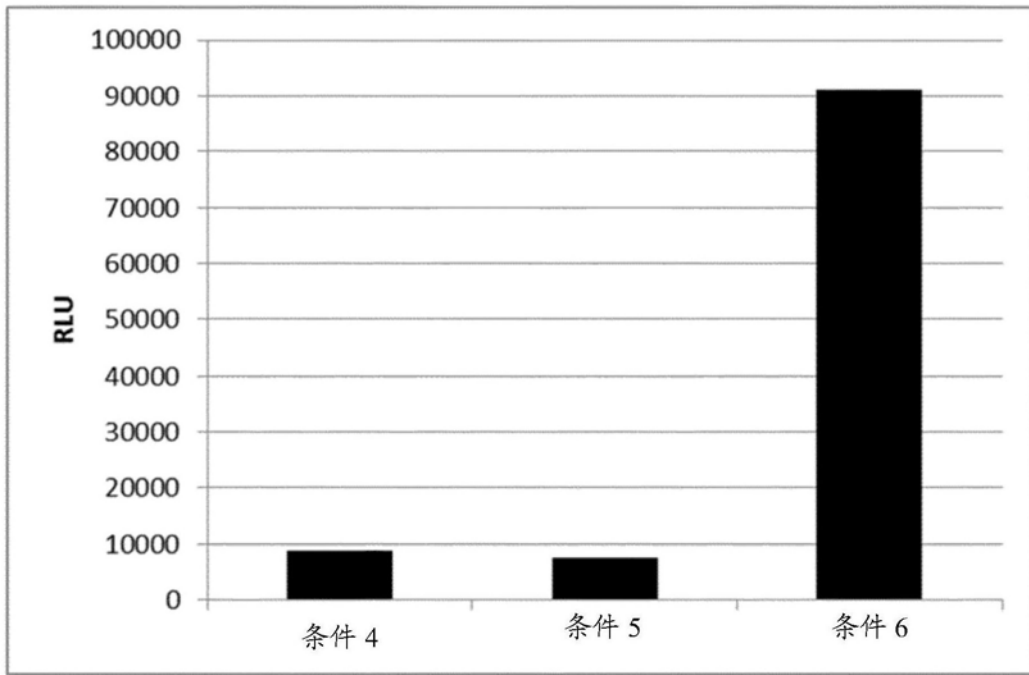


图11B