



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 115813848 B

(45) 授权公告日 2023. 08. 08

(21) 申请号 202210897045.8

(22) 申请日 2022.07.28

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 115813848 A

(43) 申请公布日 2023.03.21

(66) 本国优先权数据
202111504624.3 2021.12.10 CN
202210661776.2 2022.06.13 CN

(73) 专利权人 上海臻上医药科技有限公司
地址 201203 上海市浦东新区中国(上海)
自由贸易试验区哈雷路1043号502室

(72) 发明人 王路凡 刘伟为 郭智峰 毛俊松
高晨阳 顾臻 刘晓曦

(74) 专利代理机构 杭州天昊专利代理事务所
(特殊普通合伙) 33283
专利代理师 向庆宁 曹小燕

(51) Int.Cl.

A61K 9/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 47/18 (2006.01)
A61K 47/24 (2006.01)
A61K 47/28 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 112843019 A, 2021.05.28
CN 113151312 A, 2021.07.23
WO 2018089846 A1, 2018.05.17
WO 2021159130 A2, 2021.08.12

审查员 杜正午

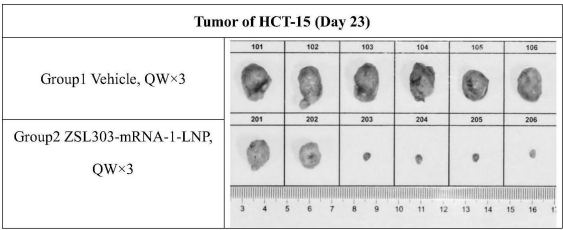
权利要求书1页 说明书29页
序列表(电子公布) 附图5页

(54) 发明名称

微针注射mRNA编码双特异性抗体药物的试剂、方法和应用

(57) 摘要

本发明提供了一种微针注射mRNA编码双特异性抗体药物的试剂,该试剂由包含双特异性抗体mRNA、氨基丁三醇、三(羟甲基)氨基甲烷盐酸盐等的水相溶液,以及包裹该水相溶液的脂质溶液组成;通过改进水相溶液和脂质溶液的配方、比例关系,并使水相溶液pH控制在5.5,脂质溶液中的脂质含量提高至8~12mg/mL,此配方可大幅提高载药量,从而在给药时可降低试剂辅料用量,这样用量减少之后在保证药效的同时可以潜在的大大降低毒副作用,真正实现双特异性抗体mRNA的微针经皮给药。通过该方法制备的微针皮内注射制剂非常稳定,能长期保存,经细胞水平检测具有良好的表达效果,经微针注射至免疫系统重建的免疫缺陷小鼠肿瘤模型,能发挥显著的抑瘤效果。



1. 一种微针皮内注射mRNA编码双特异性抗体的试剂,其特征在于,所述试剂的制备方法包括如下步骤:

(1) 双特异性抗体核酸的合成

所述双特异性抗体核酸具有如SEQ ID NO:1所示的序列,具体合成方法如下:使用BsaI限制性内切酶对质粒模板进行线性化,在37℃的条件下反应3小时,回收纯化质粒线性化的产物以保留线性化质粒为主,配置mRNA IVT反应的体系,将已经纯化的质粒线性化产物与mRNA IVT反应体系混合,在37℃的条件下反应3小时,反应结束后,加入DNaseI,在37℃的条件下反应20分钟,反应结束后,纯化转录产物以去除多余的酶和IVT反应的原料,对纯化后的转录产物进行酶法加帽,在37℃的条件下反应1小时,反应结束后,用LiCl法对加帽产物进行纯化,最终对纯化产物进行常规的定量检测和纯度检测;

(2) 水相溶液和脂质溶液的配制

配置水相溶液及脂质混合溶液,其中4X水相溶液配方为:氨基丁三醇99.20mg,三(羟甲基)氨基甲烷盐酸盐377.60mg,冰乙酸13.76mg,三水乙酸钠64.00mg,DEPC水40mL;脂质溶液母液的配方为:SM-102 141.36mg,无水乙醇加入量4mL,胆固醇59.26mg,无水乙醇加入量4mL,DSPC 31.44mg,无水乙醇加入量4mL,DMG-PEG₂₀₀₀ 14.97mg,无水乙醇加入量4mL;

配置方案如下:

a、水相溶液的配制:分别精密称取氨基丁三醇、三(羟甲基)氨基甲烷盐酸盐、三水乙酸钠及乙酸并用DEPC水溶解成储液后备用,使用时再通过DEPC水稀释至1X的溶液使用;取双特异性抗体核酸通过1X的水相溶液稀释成0.15mg/mL的水相mRNA溶液,配置3.8mL,用冰乙酸调节水相溶液pH为5.5;

b、脂质溶液的配制:精密称取四种脂质并分别加入无水乙醇溶解,按照1:1:1:1的比例吸取、混合均匀即可配置成最终的脂质混合溶液;

(3) 微流控纳米药物制备系统制备微针皮内注射mRNA编码双特异性抗体的试剂:

a、按照水相mRNA溶液:有机相脂质溶液=3:1的比例,12mL/min的流速,5mL的制备体积,初始废液0.3mL,终端废液0.05mL的参数,通过微流控纳米药物制备系统制备试剂;

b、制备得到的试剂立即用1X的水相溶液20倍稀释,通过超滤离心管进行离心浓缩,离心条件为2500g,4℃,10min,弃掉超滤离心管下部溶液,直至超滤管上部体积接近初始制备的试剂体积;此时再补加10倍体积的1X的水相溶液继续超滤离心,以期进一步降低乙醇浓度,最终超滤离心得到的样品即为最终微针皮内注射mRNA编码双特异性抗体的试剂样品,其体积应接近于初始制备的试剂体积,4℃保存备用。

微针注射mRNA编码双特异性抗体药物的试剂、方法和应用

[0001] 本申请主张中国在先申请,申请号:202111504624.3,申请日2021年12月10日的优先权;主张中国在先申请,申请号:202210661776.2,申请日2022年6月13日的优先权,其所有的内容作为本发明的一部分。

技术领域

[0002] 本发明属于生物技术领域,具体而言,涉及一种微针皮内注射试剂,尤其涉及微针注射mRNA编码双特异性抗体药物的试剂、方法和应用。

背景技术

[0003] 裸露的mRNA直接进入体内会被降解,如何把mRNA有效地递送到细胞内,实现高效的mRNA递送,从而完成蛋白的翻译制造,是mRNA药物药效的保证。脂质体是指将药物包封于内形成的微型泡囊体,常用作相应药物的递送载体,现在已经发展成为成熟的一类新型靶向制剂。

[0004] 复合脂质体是一种由不同脂质相间排列组成的类似生物膜结构的拥有不同相区域的脂质双分子层的球型药物载体,其特点主要是在制备过程中采用多种不同相变温度的脂质为膜材,不同比例的脂质材料在一定范围内的变化影响复合脂质体的刚性。此外,由于复合脂质体中形成了不同的相区域,所制得的脂质体能够使得某些难溶性药物的载药量大幅度上升。与传统脂质体相比,具有更好稳定性和生物利用度,但是现有的复合脂质体依然存在载药量偏低、饱和率低、体内表达量低等问题。

[0005] 现有的脂质体注射试剂通常是通过静脉注射,静脉注射存在一些难以克服的问题,比如:需要有一定的注射量才能产生作用;可能引起血管的损伤;注射药物可能会引起血管内膜的炎症或其他部位组织的炎症;给患者带来疼痛;需医护帮忙完成注射,使用不方便;核酸在体内表达量低等问题。

[0006] 微针给药是一种新型的局部经皮给药技术,结合了贴膏剂的便捷性和皮内注射给药的有效性,规避了其它给药方式的不足,具有不触及神经、安全、无痛、高效渗透等多种优点。微针制品通常包括多根长度一般不超过1mm的微针,所述微针能够在皮肤角质层形成微型通道,突破皮肤角质层的阻隔,促进药物的渗透,从而减少药物在角质层的蓄积量,增加到表皮、真皮及皮下组织的药物剂量。因此微针制品被广泛应用于促进小分子、大分子药物的透皮吸收,具有广泛的应用前景。另外,微针制品的使用极为方便,不需要专业培训,患者可以自行给药,意外针刺伤风险低,意外伤害可能小,且使用后易于处理。

[0007] 双特异性抗体是含有2种特异性抗原结合位点的人工抗体,能在靶细胞和功能分子(细胞)之间架起桥梁,激发具有导向性的免疫反应,是基因工程抗体的一种,现已成为抗体工程领域的热点,在肿瘤的免疫治疗中具有广阔的应用前景。T细胞介导的双特异性抗体作用原理是将具有杀伤性T细胞招募到肿瘤细胞处,诱导靶依赖的多克隆T细胞活化,释放细胞因子以及穿孔素和颗粒酶,最终导致肿瘤细胞裂解,是用于免疫治疗的一种药物。各种双特异性抗体(BsAb,bispecific antibody)的结构在不断的开发创新中,包括将两个不

同抗体的最小片段scFv(single chain Fv)串联。目前,最成功的此类双特异性抗体是blinatumomab,这是一种CD19XCD3 bi-(scFv)2,它能够激活并招募T细胞聚集到淋巴瘤细胞上,被批准用于治疗急性淋巴细胞白血病。但是目前大多数双特异性抗体都面临着表达生产上的挑战,包括产量低、在长期存储中稳定性差,随着时间的推移容易聚集,以及各种杂质的出现。因此,新的双特异性抗体药物的生产工艺开发、生产、测试和临床级材料的开发通常需要数年时间。此外,像这类疗效不错的双特异性抗体blinatumomab,其在患者血清中的半衰期小于2小时,需要输液泵持续给药,给药方式及其不方便,患者的依从性降低。另外,此类免疫治疗类双特异性抗体在治疗的时候,患者面临着免疫因子风暴的风险,以及其它毒副作用。

[0008] 因此,如果能通过以mRNA在患者体内编码双特异性抗体的方式来解决双特异性抗体本身在生产中的问题,并且搭配本身具有增强免疫效果的微针皮内给药方式,通过皮肤里大量的抗原递呈细胞来增强免疫疗效,从而达到降低用药剂量同时能够增强免疫效果的目的,进而降低免疫治疗药物带来的毒副作用。

[0009] 但是现有的双特异性抗体mRNA试剂载药量较低,而且通常采用静脉注射的给药方式,存在试剂用量大给患者带来潜在的毒副作用增加的危害。注射现有方法制备的大体积的双特异性抗体mRNA,在生物体内要达到治疗效果所需要的用量较大(每次注射剂量超过50 μ l),无法进行微针给药(微针给药对药物的量需要控制在mg内,以及给药体积不能超过50 μ l)。因此为了实现微针注射双特异性抗体mRNA,急需找到一种载药量更高、用量和毒副作用更低、治疗效果更好的双特异性抗体mRNA微针注射试剂来满足临床所需。

发明内容

[0010] 为解决上述问题,本发明提供了一种微针注射mRNA编码双特异性抗体药物的试剂,该试剂由包含双特异性抗体mRNA、氨基丁三醇、三(羟甲基)氨基甲烷盐酸盐等的水相溶液,以及包裹该水相溶液的脂质溶液组成;通过改进水相溶液和脂质溶液的配方、比例关系,并使水相溶液pH控制在5.5,脂质溶液中的脂质含量提高至8~12mg/mL,从而大幅提高载药量,降低试剂辅料用量,用量更少,毒副作用更小,治疗效果更好,真正实现双特异性抗体mRNA的微针经皮给药。通过该方法制备的微针皮内注射制剂非常稳定,能长期保存,经细胞水平检测具有非常好的免疫效果,经微针注射至免疫系统重建的免疫缺陷小鼠肿瘤模型,能发挥显著的抑瘤效果。

[0011] 一方面,本发明提供了一种微针皮内注射mRNA编码双特异性抗体的试剂,所述试剂包括水相溶液和脂质溶液,脂质溶液用于包裹水相溶液的物质;其中,水相溶液包括用于编码双特异性抗体的mRNA和缓冲液,缓冲液中包括氨基丁三醇和三(羟甲基)氨基甲烷盐酸盐;所述缓冲液的pH为4~6。

[0012] 研发小组经前期研究发现,与肌肉注射等其他注射方式相比,微针注射所到达的真皮中含有丰富的抗原呈递细胞,这种免疫细胞对于启动免疫反应至关重要,能够在免疫反应过程中发挥作用,故通过微针递送免疫类抗肿瘤药物具有增强疗效的潜力。

[0013] 微针可以真正实现无痛给药,但微针皮内注射的方式为小体积给药,因皮内组织结构的特定限制(图1),单次注射的试剂量非常小,对于提高有效药物浓度有客观需求,给药体积不能超过50 μ l,因为单次药物注射剂量偏高的试剂将无法经皮吸收。

[0014] 现有双特异性抗体mRNA试剂配方的载药量较低,导致同等剂量时所需的给药试剂体积偏大,单次注射剂量超过50 μ l,无法进行微针给药,同时由于载药量低,使较多的大分子辅料带入体内,副作用风险高。因此为了实现双特异性抗体mRNA的微针给药,必须提高双特异性抗体mRNA试剂的载药量。

[0015] 本发明所述载药量是指单位体积的药物试剂中双特异性抗体mRNA的含量。

[0016] 另外,微针给药试剂的载药量低将直接影响微针治疗效果,如能提高单位体积中的药物含量,即提高载药量,也将大幅提升微针给药的疗效。

[0017] 本发明通过改进编码双特异性抗体mRNA试剂的水相溶液配方和pH,使微针皮内注射试剂配方中的双特异性抗体mRNA载药量显著提升,同等辅料物质的量下,提高单位体积双特异性抗体mRNA载药量,可以有效减少同等剂量下的给药制剂体积,成功实现微针皮内给药,并获得显著的疾病治疗效果,同时相应地减少了进入体内的大分子辅料等的量,在一定程度上降低辅料可能带来的副反应,如有效减少PEG等大分子的免疫刺激。

[0018] 在一些方式中,本发明经研究证明,相比于现有的含有三甲胺、盐酸三乙胺等成分的水相溶液配方,采用本发明提供的含有氨基丁三醇和三(羟甲基)氨基甲烷盐酸盐的水相溶液配方能显著提升注射试剂的载药量,从而能真正实现微针给药,同时该试剂具有非常好的稳定性,可长期保存,其中的mRNA含量等药物成分含量稳定,有良好的临床应用条件。

[0019] 另外,本发明发现,维持水相溶液合适的pH值,也能显著提升用于微针皮内注射的编码双特异性抗体mRNA的载药量,若将pH调至4~6等偏酸性范围内,能使脂质体中负载的双特异性抗体mRNA含量显著提升,并在特定pH条件下,即pH5.5时达到最优。其原因可能是,在制备时,在偏酸环境可以使得可电离阳离子脂质带正电荷,同等条件下可以吸附更多核酸分子(如mRNA等,本身带负电荷),且这种最优是在水相制备溶液为pH5.5时体现,相比于pH7.4或pH4等条件下的缓冲液,pH5.5时可以更加紧密包裹核酸分子,达成相对稳定的可用制剂,因此载药量更高。

[0020] 进一步地,所述缓冲液中还包括冰乙酸、三水乙酸钠和DEPC水。

[0021] 进一步地,所述缓冲液中的氨基丁三醇:三(羟甲基)氨基甲烷盐酸盐:冰乙酸:三水乙酸钠:DEPC水的质量比为99.2:377.6:13.76:64:40。

[0022] 本发明提供的水相溶液配方必须严格按照特定比例配置,才能维持在较高的载药量。

[0023] 进一步地,所述缓冲液pH为5.5。

[0024] 进一步地,所述脂质溶液中的脂质含量为10~20mg/mL,所述脂质包括可电离阳离子脂质、胆固醇、磷脂和PEG化脂质。

[0025] 本发明经大量实验证明,通过调整缓冲液的pH,使其从原先的7.4调整到5.5,能最大限度提高脂质纳米颗粒中mRNA的载量,这是因为在制备过程中,偏酸环境可以使得可电离阳离子脂质带正电荷,同等条件下可以吸附更多核酸分子(如mRNA等,本身带负电荷);而在本体系中,制备水相为pH5.5时,可以使得在制备时,对应有机相中的可电离阳离子脂质带更多正电荷,同等条件下可以吸附更多核酸分子,且更加紧密包裹核酸分子,达成相对稳定的制剂。

[0026] 进一步地,所述脂质溶液中的脂质含量为8~12mg/mL;所述脂质包括可电离阳离子脂质、胆固醇、磷脂和PEG化脂质。

[0027] 本发明经大量研究证明,通过调控试剂中的脂质含量,也可显著提高脂质体的载药量。所述脂质包括胆固醇、可电离阳离子脂质、磷脂和PEG化脂质,是一种复合脂质体;提高脂质含量,是指同时提高胆固醇、可电离阳离子脂质、磷脂和PEG化脂质四种成分的含量,使脂质溶液中的脂质含量从最初的7.72mg/mL提高到10~20mg/mL,优选为8~12mg/mL,最优选为15.44mg/mL,可使脂质制剂体系的载药量由45μg/mL左右至少提高到100μg/mL左右。

[0028] 进一步地,所述可电离阳离子脂质选自以下的一种或几种:C12-200、MC3、DLinDMA、DLin-MC3-DMA、DLinkC2DMA、cKK-E12、ICE、HGT5000、HGT5001、OF-02、DODAC、DDAB、DMRIE、DOSPA、DOGS、DODAP、DODMA、DMDMA、DODAC、DLenDMA、DMRIE、CLinDMA、CpLinDMA、DMOBA、DOcarbDAP、DLinDAP、DLincarbDAP、DLinCDAP、KLin-K-DMA、DLin-K-XTC2-DMA、SM-102、ALC-0315、HGT4003;所述磷脂选自以下的一种或几种:神经酰胺、脑磷脂、脑苷脂、二酰基甘油、1,2-二棕榈酰基-sn-甘油基-3-磷酸基甘油钠盐(DPPG)、1,2-二硬脂酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DSPE)、1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DSPC)、1,2-二棕榈酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DPPC)、1,2-二油基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DOPE)、1,2-二油基-sn-甘油-3-磷脂酰胆碱(DOPC)、1,2-二棕榈酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DPPE)、1,2-二肉豆蔻酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DMPE)、和1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸-(1'-rac-甘油)(DOPG)、1-棕榈酰-2-油酰基-磷脂酰乙醇胺(POPE)、1-棕榈酰-2-油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(POPC)、1-硬脂酰基-2-油酰基-磷脂酰乙醇胺(SOPE)、鞘磷脂;所述PEG化脂质选自以下的一种或几种:DMG-PEG₁₀₀₀、DMG-PEG₁₃₀₀、DMG-PEG₁₅₀₀、DMG-PEG₁₈₀₀、DMG-PEG₂₀₀₀、DMG-PEG₂₂₀₀、DMG-PEG₂₅₀₀、DMG-PEG₂₇₀₀、DMG-PEG₃₀₀₀、DMG-PEG₃₂₀₀、DMG-PEG₃₅₀₀、DMG-PEG₃₇₀₀、DMG-PEG₄₀₀₀、DMG-PEG₄₂₀₀、DMG-PEG₄₅₀₀、DMG-PEG₄₇₀₀、DMG-PEG₅₀₀₀、ALC-0159、C8-PEG、DOGPEG、神经酰胺PEG和DSPE-PEG。

[0029] 进一步地,所述可电离阳离子脂质为SM-102(十七烷-9-基-8-((2-羟乙基)(6-氧代-6-((十一烷氧基)己基)氨基)辛酸酯));磷脂为DSPC(1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱);PEG化脂质为DMG-PEG(1,2-二肉豆蔻酰-rac-甘油-3-甲氧基聚乙二醇2000),其PEG分子量范围可为1000~5000Da;可电离阳离子脂质:胆固醇:磷脂:PEG化脂质的质量比为(9~10):(3~4):(2~3):1。

[0030] 进一步地,所述PEG化脂质为DMG-PEG₂₀₀₀;所述SM-102:胆固醇:DSPC:DMG-PEG₂₀₀₀的质量比为14.36:59.26:31.44:14.97。

[0031] 进一步地,所述用于编码双特异性抗体的mRNA具有如SEQ ID NO:1所示的序列(双特异性抗体CD3×EpCAM-mRNA)。

[0032] 另一方面,本发明提供了pH值在提高微针皮内注射mRNA编码双特异性抗体试剂的载药量的用途。

[0033] 本发明经研究证明,水相溶液的pH会直接影响微针皮内注射mRNA编码双特异性抗体试剂的载药量,通过调整到合适的pH值,能显著提升脂质体的载药量。

[0034] 进一步地,所述水相溶液pH为5.5。

[0035] 本发明经大量实验证明,通过调整缓冲液的pH,使其从原先的4.0或7.4调整到5.5,能进一步提高脂质体的载药量。

[0036] 再一方面,本发明提供了微针在用于制备皮内注射mRNA试剂编码双特异性抗体的注射用具中的用途,所述mRNA具有如SEQ ID NO:1所示的序列,用于编码双特异性抗体;所

述试剂为如上所述的试剂。

[0037] 本发明经大量研究证明,通过微针注射双特异性抗体,不仅用量低,而且在体内具有更高表达量和更好的抑瘤效果。

[0038] 进一步地,所述微针的注射方式为每周一次,至少注射三次。

[0039] 在一些方式中,针对小鼠的注射剂量为3.6微克,注射体积小于0.2毫升。

[0040] 在一些方式中,对于人体的注射剂量可以根据临床试验结果来进一步确认。

[0041] 本发明提供的微针注射mRNA编码双特异性抗体药物试剂通过微流控纳米药物制备系统制得。

[0042] 本发明自主合成双特异性抗体,制备成用于微针皮内注射的试剂,不仅具有高载药量,高稳定性,经细胞水平检测具有非常好的表达效果,通过微针注射免疫缺陷小鼠,还能发挥显著的抑瘤效果。

[0043] 这里所述的“微针”和普通注射器具有区别,可以表示针头很短,或者药物试剂很少,例如采用微流通道,例如1-999微米的通道,或者用量在采用微升或者微克作为剂量单位,例如1-10微克,或者0.1-200微升。或者当采用微针注射的时候,采用微升级别的量通过微流控通道逐渐注射到人体的浅表组织部位,比如皮下、皮内或者肌肉组织等等。

[0044] 本发明具有以下有益效果:

[0045] (1)成功实现双特异性抗体mRNA的微针皮内注射给药;

[0046] (2)采用含有氨基丁三醇和三(羟甲基)氨基甲烷盐酸盐等成分配制的缓冲液,显著提升微针皮内注射mRNA编码双特异性抗体药物试剂的载药量;

[0047] (3)通过提高微针皮内注射mRNA编码双特异性抗体药物试剂中的胆固醇、可电离阳离子脂质、磷脂和PEG化脂质的含量,使其载药量显著提升;

[0048] (4)通过改变微针皮内注射mRNA编码双特异性抗体药物试剂中的缓冲液pH至5.5,进一步提升载药量;

[0049] (5)使微针皮内注射mRNA编码双特异性抗体药物试剂的载药量由45 μ g/mL左右最高提高到102.9 μ g/mL;

[0050] (6)具有非常好的稳定性,长期存放两年以上,其中的mRNA含量不会发生降解;

[0051] (7)经细胞水平检测具有非常好的表达效果,通过微针注射免疫缺陷小鼠,能发挥显著的抑瘤效果。

[0052] 详细说明

[0053] 定义

[0054] 除非另有定义,否则本文中使用的所有技术和科学术语所具有的含义与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的相同。以下参考文献为本领域技术人员提供了本发明中使用的许多术语的一般定义:生物化学与分子生物学词典(Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology), (第2版)J.Stenesch(编著),Wiley-Interscience(1989);微生物学与分子生物学词典(Dictionary of Microbiology and Molecular Biology) (第3版), P.Singleton和D.Sainsbury(编著),Wiley-Interscience(2007);钱伯斯科技词典(Chambers Dictionary of Science and Technology) (第2版),P.Walker(编著), Chambers(2007);遗传学词汇(Glossary of Genetics) (第5版),R.Rieger等(编著), Springer-Verlag(1991);以及哈珀柯林斯生物学词典(The HarperCollins Dictionary

of Biology), W.G.Hale和J.P.Margham, (编著), HarperCollins(1991)。

[0055] 尽管与本文所描述的类似或等效的任何方法和组合物可用于本发明的实践或检验,但本文描述了优选的方法和组合物。出于本发明的目的,下面为了清楚和便于参考起见对以下术语加以定义:根据长期以来的专利法惯例,当在本申请包括权利要求书中使用不带数量指示的指称物时,表示“一或多”。术语“约”和“近似”用于本文中时是可互换的,并且一般应理解为是指一个给定数字周围的数字范围,以及所叙述的数字范围内的所有数字。此外,本文中的所有数值范围应理解为包括该范围内的各个整数。

[0056] 核酸

[0057] 术语“核酸”包括任何可以掺入寡核苷酸链中的化合物和/或物质。根据本申请使用的示例性核酸包括但不限于DNA, RNA包括信使RNA (mRNA)、其杂交体、RNAi诱导剂、RNAi剂、siRNA、shRNA、miRNA、反义RNA、核酶、催化DNA、诱导三螺旋形成的RNA、适体、载体等,在本申请中详细描述。

[0058] 术语“脱氧核糖核酸”、“DNA”或“DNA分子”是指由两条链(多核苷酸)组成的分子,每条链包含单体单元核苷酸。核苷酸通过一个核苷酸的糖与下一个核苷酸的磷酸基之间的共价键在链中彼此连接,产生交替的糖-磷酸基骨架。两条分开的多核苷酸链的含氮碱基与氢键结合在一起以制备双链DNA。

[0059] 术语“核糖核酸”、“RNA”或“RNA分子”是指至少2个碱基-糖基-磷酸基组合串成的链。在一个实施例中,术语包括由核苷酸组成的化合物,其中糖部分是核糖。在另一个实施例中,末端包括其中主链被改性的RNA和RNA衍生物。在一个实施例中, RNA可能是以tRNA(转移RNA)、snRNA(小核RNA)、rRNA(核糖体RNA)、mRNA(信使RNA)、反义RNA、小抑制RNA(siRNA)、微小RNA(miRNA)和核酶的形式存在。siRNA和miRNA的用途已有描述(Caudy A A et al, Genes&Devel 16:2491-96 and references cited therein)。另外,这些形式的RNA可以是单链、双链、三链或四链的绞合。在另一实施例中,术语也包括其他类型的主链但具有相同碱基的人造核酸。在另一实施例中,人造核酸为PNA(肽核酸)。PNA含有肽主链和核苷酸碱基,并且能够在另一实施例中与DNA和RNA分子结合。在另一实施例中,核苷酸为改性氧杂环丁烷。在另一实施例中,通过用硫代磷酸基键取代一个或以上磷酸二酯键来改性核苷酸。在另一实施例中,改性核酸包括本领域已知的天然核酸的磷酸基主链的任何其他变体。本领域普通技术人员熟悉硫代磷酸基核酸和PNA的用途,其描述,例如, Neilsen P E, Curr Opin Struct Biol 9:353-57; [0280] and Raz N Ket al Biochem Biophys Res Commun. 297:1075-84。核酸的生产和使用是本领域技术人员熟知的,其描述, Molecular Cloning, (2001), Sambrook and Russell, eds. And Methods in Enzymology: Methods for molecular cloning in eukaryotic cells (2003) Purchio and G.C. Fareed 每个核酸衍生物代表本发明的单独实施例。

[0060] 用于本文时,术语“核酸”包括以下的一种或多种类型:多脱氧核糖核苷酸(含有2-脱氧-D-核糖)、多核糖核苷酸(含有D-核糖)以及任何其他类型的多核苷酸,其是嘌呤或嘧啶碱基或者修饰的嘌呤或嘧啶碱基(包括无碱基位点)的N-糖苷。术语“核酸”,用于本文时,也包括核糖核苷或脱氧核糖核苷的共价键合的聚合物,所述共价键合通常通过亚基之间的磷酸二酯键,但在有些情况下通过硫代磷酸酯、甲基膦酸酯等键合。“核酸”包括单链和双链DNA以及单链和双链RNA。示例性核酸包括但不限于gDNA; hnRNA; mRNA; rRNA, tRNA, 微小RNA

(miRNA), 小干扰RNA (siRNA), 小核仁RNA (snoRNA), 小核RNA (snRNA) 和小时序RNA (stRNA) 等, 及其任何组合。

[0061] 经过修饰的核苷酸

[0062] 在一些方式中, 所述的所述的mRNA包括经过修饰的核苷酸, 其中修饰的核苷酸选择如下一种或者几种核苷酸: 2-氨基腺苷、2-硫代胸苷、肌苷、吡咯并嘧啶、3-甲基腺苷、5-甲基胞苷、C-5丙炔基-胞苷、C-5丙炔基-尿苷、2-氨基腺苷、C5-溴尿苷、C5-氟尿苷、C5-碘尿苷、C5-丙炔基-尿苷、C5-丙炔基-胞苷、C5-甲基胞苷、2-氨基腺苷、7-脱氮腺苷、7-脱氮鸟苷、8-氧代腺苷、8-氧代鸟苷、0(6)-甲基鸟嘌呤、假尿苷、N-1-甲基-假尿苷、2-硫代尿苷以及2-硫代胞苷; 甲基化碱基; 插入碱基; 2'-氟代核糖、核糖、2'-脱氧核糖、阿拉伯糖以及己糖; 硫代磷酸基和5'-N-亚磷酰胺键。以及PCT/CN2020/074825, PCT/CN2020/106696中所描述的改性核苷酸进行修饰。

[0063] mRNA

[0064] mRNA可以包括至少两种核苷酸。核苷酸可以是天然存在的核苷酸或修饰核苷酸。在一些实施例中, RNA分子包括约5种核苷酸至约5,000种核苷酸。在一些实施例中, RNA分子包括至少约5种核苷酸。在一些实施例中, RNA分子包括至多约5,000种核苷酸。在一些实施例中, RNA分子包括约5种核苷酸至约20种核苷酸、约5种核苷酸至约40种核苷酸、约5种核苷酸至约60种核苷酸、约5种核苷酸至约80种核苷酸、约5种核苷酸至约100种核苷酸、约5种核苷酸至约200种核苷酸、约5种核苷酸至约500种核苷酸、约5种核苷酸至约1,000种核苷酸核苷酸、约5种核苷酸至约2,000种核苷酸、约5种核苷酸至约5,000种核苷酸、约20种核苷酸至约40种核苷酸、约20种核苷酸至约60种核苷酸、约20种核苷酸至约80种核苷酸、约20种核苷酸至约100种核苷酸、约20种核苷酸至约200种核苷酸、约20种核苷酸至约500种核苷酸、约20种核苷酸至约1,000种核苷酸、约20种核苷酸至约2,000种核苷酸、约20种核苷酸至约5,000种核苷酸、约40种核苷酸至约60种核苷酸、约40种核苷酸至约80种核苷酸、约40种核苷酸至约100种核苷酸、约40种核苷酸至约200种核苷酸、约40种核苷酸至约500种核苷酸、约40种核苷酸至约1,000种核苷酸、约40种核苷酸至约2000种核苷酸、约40种核苷酸至约5,000种核苷酸、约60种核苷酸至约80种核苷酸、约60种核苷酸至约100种核苷酸、约60种核苷酸至约200种核苷酸、约60种核苷酸至约500种核苷酸、约60种核苷酸至约1,000种核苷酸、约60种核苷酸至约2,000种核苷酸、约60种核苷酸至约5,000种核苷酸、约80种核苷酸至约100种核苷酸、约80种核苷酸至约200种核苷酸、约80种核苷酸至约500种核苷酸、约80种核苷酸至约1,000种核苷酸、约80种核苷酸至约2,000种核苷酸、约80种核苷酸至约5,000种核苷酸、约100种核苷酸至约200种核苷酸、约100种核苷酸至约500种核苷酸、约100种核苷酸至约1,000种核苷酸、约100种核苷酸至约2000种核苷酸、约100种核苷酸至约5,000种核苷酸、约200种核苷酸至约500种核苷酸、约200种核苷酸至约1,000种核苷酸、约200种核苷酸至约2000种核苷酸、约200种核苷酸至约5000种核苷酸、约500种核苷酸至约1,000种核苷酸、约500种核苷酸至约2000种核苷酸、约500种核苷酸至约5,000种核苷酸、约1,000种核苷酸以约2000种核苷酸、约1,000种核苷酸至约5,000种核苷酸或约2000种核苷酸至约5,000种核苷酸。在一些实施例中, RNA分子包括约5种核苷酸、约20种核苷酸、约40种核苷酸、约60种核苷酸、约80种核苷酸、约100种核苷酸、约200种核苷酸、约500种核苷酸、约1,000种核苷酸、约2000种核苷酸或约5000种核苷酸。

[0065] mRNA可以包括至少一种本申请所述的修饰核苷酸。在一些实施例中, RNA分子包括约1种修饰核苷酸至约100种修饰核苷酸。在一些实施例中, RNA分子包括至少约1种修饰核苷酸。在一些实施例中, RNA分子包括至多约100种修饰核苷酸。在一些实施例中, RNA分子包括约1种修饰核苷酸至约2种修饰核苷酸、约1种修饰核苷酸至约3种修饰核苷酸、约1种修饰核苷酸至约4种修饰核苷酸、约1种修饰核苷酸至约5种修饰核苷酸、约1种修饰核苷酸至约10种修饰核苷酸、约1种修饰核苷酸至约20种修饰核苷酸、约1种修饰核苷酸至约100种修饰核苷酸、约2种修饰核苷酸至约3种修饰核苷酸、约2种修饰核苷酸至约4种修饰核苷酸、约2种修饰核苷酸至约5种修饰核苷酸、约2种修饰核苷酸至约10种修饰核苷酸、约2种修饰核苷酸至约20种修饰核苷酸、约2种修饰核苷酸至约100种修饰核苷酸、约3种修饰核苷酸至约4种修饰核苷酸、约3种修饰核苷酸至约5种修饰核苷酸、约3种修饰核苷酸至约10种修饰核苷酸、约3种修饰核苷酸至约20种修饰核苷酸、约3种修饰核苷酸至约100种修饰核苷酸、约4种修饰核苷酸至约5种修饰核苷酸、约4种修饰核苷酸至约10种修饰核苷酸、约4种修饰核苷酸至约20种修饰核苷酸、约4种修饰核苷酸至约100种修饰核苷酸、约5种修饰核苷酸至约10种修饰核苷酸、约5种修饰核苷酸至约20种修饰核苷酸、约5种修饰核苷酸至约100种修饰核苷酸或者约20种修饰核苷酸至约100种修饰核苷酸。在一些实施例中, RNA分子包括约1种修饰核苷酸、约2种修饰核苷酸、约3种修饰核苷酸、约4种修饰核苷酸、约5种修饰核苷酸、约10种修饰核苷酸、约20种修饰核苷酸或者约100种修饰核苷酸。

[0066] mRNA可以包括至少0.1%的修饰核苷酸。修饰核苷酸的分数可以计算为: 修饰核苷酸的数量/核苷酸的总数*100%。在一些实施例中, RNA分子包括约0.1%修饰核苷酸至约100%修饰核苷酸。在一些实施例中, RNA分子包括至少约0.1%的修饰核苷酸。在一些实施例中, RNA分子包括至多约100%修饰核苷酸。在一些实施例中, RNA分子包括约0.1%修饰核苷酸至约0.2%修饰核苷酸、约0.1%修饰核苷酸至约0.5%改性核苷酸、约0.1%修饰核苷酸至约1%修饰核苷酸、约0.1%修饰核苷酸至约2%修饰核苷酸、约0.1%修饰核苷酸至约5%修饰核苷酸、约0.1%修饰核苷酸至约10%修饰核苷酸、约0.1%修饰核苷酸至约20%修饰核苷酸、约0.1%修饰核苷酸至约50%修饰核苷酸、约0.1%修饰核苷酸至约100%修饰核苷酸、约0.2%修饰核苷酸至约0.5%修饰核苷酸、约0.2%修饰核苷酸至约1%修饰核苷酸、约0.2%修饰核苷酸至约2%修饰核苷酸、约0.2%修饰核苷酸至约5%修饰核苷酸、约0.2%修饰核苷酸至约10%修饰核苷酸、约0.2%修饰核苷酸至约20%修饰核苷酸、约0.2%修饰核苷酸至约50%修饰核苷酸、约0.2%修饰核苷酸至约100%修饰核苷酸、约0.5%修饰核苷酸至约1%修饰核苷酸、约0.5%修饰核苷酸至约2%修饰核苷酸、约0.5%修饰核苷酸至约5%修饰核苷酸、约0.5%修饰核苷酸至约10%修饰核苷酸、约0.5%修饰核苷酸至约20%修饰核苷酸、约0.5%修饰核苷酸至约50%修饰核苷酸、约0.5%修饰核苷酸至约100%修饰核苷酸、约1%修饰核苷酸至约2%修饰核苷酸、约1%修饰核苷酸至约5%修饰核苷酸、约1%修饰核苷酸至约10%修饰核苷酸、约1%修饰核苷酸至约20%修饰核苷酸、约1%修饰核苷酸至约50%修饰核苷酸、约1%修饰核苷酸至约100%修饰核苷酸、约2%修饰核苷酸至约5%修饰核苷酸、约2%修饰核苷酸至约10%修饰核苷酸、约2%修饰核苷酸至约20%修饰核苷酸、约2%修饰核苷酸至约50%修饰核苷酸、约2%修饰核苷酸至约100%修饰核苷酸、约5%修饰核苷酸至约10%修饰核苷酸、约5%修饰核苷酸至约20%修饰核苷酸、约5%修饰核

苷酸至约50%修饰核苷酸、约5%修饰核苷酸至约100%修饰核苷酸、约10%修饰核苷酸至约20%修饰核苷酸、约10%修饰核苷酸至约50%修饰核苷酸、约10%改性核苷酸至约100%修饰核苷酸、约20%修饰核苷酸至约50%修饰核苷酸、约20%修饰核苷酸至约100%修饰核苷酸或者约50%修饰核苷酸至约100%修饰核苷酸。在一些实施例中, RNA分子包括约0.1%修饰核苷酸、约0.2%修饰核苷酸、约0.5%修饰核苷酸、约1%修饰核苷酸、约2%修饰核苷酸、约5%修饰核苷酸、约10%修饰核苷酸、约20%修饰核苷酸、约50%修饰核苷酸、或约100%修饰核苷酸。

[0067] 在反应中使用的核苷酸, 例如核糖核苷酸(例如组合的ATP、GTP、CTP以及UTP)的总浓度在0.5mM至约500mM之间。在一些实施例中, 核苷酸的总浓度为约0.5mM至约500mM。在一些实施例中, 核苷酸的总浓度为至少约0.5mM。在一些实施例中, 核苷酸的总浓度为至多约500mM。在一些实施例中, 核苷酸的总浓度为约0.5mM至约1mM、约0.5mM至约5mM、约0.5mM至约10mM、约0.5mM至约50mM、约0.5mM至约100mM、约0.5mM至约200mM、约0.5mM至约300mM、约0.5mM至约500mM、约1mM至约5mM、约1mM至约10mM、约1mM至约50mM、约1mM至约100mM、约1mM至约200mM、约1mM至约300mM、约1mM至约500mM、约5mM至约10mM、约5mM至约50mM、约5mM至约100mM、约5mM至约200mM、约5mM至约300mM、约5mM至约500mM、约10mM至约50mM、约10mM至约100mM、约10mM至约200mM、约10mM至约300mM、约10mM至约500mM、约50mM至约100mM、约50mM至约200mM、约50mM至约300mM、约50mM至约500mM、约100mM至约200mM、约100mM至约300mM、约100mM至约500mM、约200mM至约300mM、约200mM至约500mM或者约300mM至约500mM。在一些实施例中, 核苷酸的总浓度为约0.5mM、约1mM、约5mM、约10mM、约50mM、约100mM、约200mM、约300mM或者约500mM。

[0068] 合成后处理

[0069] 合成后可加入5'帽和/或3'尾。帽的存在可以提供对大多数真核细胞中发现的核酸酶的抗性。“尾”的存在可以用于保护mRNA免于核酸外切酶降解和/或调节蛋白质表达水平。

[0070] 可以如下添加5'帽: 第一, RNA末端磷酸酶从5'核苷酸中去除一个末端磷酸基, 留下两个末端磷酸基; 然后通过鸟苷酰转移酶将鸟苷三磷酸(GTP)加入到末端磷酸基中, 产生5,5,5三磷酸键; 然后用甲基转移酶将鸟嘌呤的7-氮甲基化。帽结构的实例包括但不限于m7G(5') ppp(5' (A, G(5') ppp(5') A和G(5') ppp(5') G。更多帽结构在已公布的美国申请No.US 2016/0032356中进行了描述, 阿什奎尔海克(Ashiquil Haque)等, “化学修饰的hCFTR mRNA在囊性纤维化小鼠模型中恢复肺功能”(Chemically modified hCFTR mRNAs recuperate lung function in a mouse model of cystic fibrosis), 科学报告(Scientific Reports) (2018) 8:16776, 以及科尔(Kore)等, “5'-端帽类似物的最新进展: 合成和生物分支”(Recent Developments in 5'-Terminal Cap Analogs: Synthesis and Biological Ramifications)有机化学迷你读物(Mini-Reviews in Organic Chemistry) 2008, 5, 179-192, 其通过引用并入本申请。

[0071] 尾结构可以包括聚(A)和/或聚(C)尾。mRNA的3'末端(例如, 3'末端的10、20、30、40、50、60、70、80、90或100种核苷酸)上的聚-A尾可以包括至少50%、55%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的腺苷核苷酸。mRNA的3'末端(例如, 3'末端的10、20、30、40、50、60、70、80、90或100种核苷酸)上的聚-A尾可以包括

至少50%、55%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%或99%胞嘧啶核苷酸。

[0072] 如本申请所述,添加5'帽和/或3'尾可以有助于检测体外合成期间产生的无效转录物,因为没有加帽和/或加尾,那些过早中止的mRNA转录物的大小可能太小而无法被检测到。因此,在一些实施例中,在测试mRNA纯度(例如,mRNA中存在的无效转录物的水平)之前,将5'帽和/或3'尾加入合成的mRNA中。在一些实施例中,在如本申请所述纯化mRNA之前,将5'帽和/或3'尾加入到合成的mRNA中。在其他实施例中,在如本申请所述纯化mRNA后,将5'帽和/或3'尾加入到合成的mRNA中。

[0073] 除了以上方法外,加帽或者加尾的步骤是在从DNA体外转录为RNA的转录过程总完成的,这些方法都是本领域一般技术人员可以自由选择。

[0074] 根据本发明合成的mRNA可以不需进一步纯化而使用。特别地,可以使用根据本发明合成的mRNA而无需去除短聚物的步骤。在一些实施例中,根据本发明合成的mRNA进一步纯化。根据本发明可以使用各种方法纯化合成的mRNA。例如,可以使用离心、过滤和/或色谱方法进行mRNA的纯化。在一些实施例中,合成的mRNA通过乙醇沉淀或过滤或色谱法、或凝胶纯化或任何其它合适的方法纯化。在一些实施例中,通过HPLC纯化mRNA。在一些实施例中,在标准酚:氯仿:异戊醇溶液中提取mRNA,这是本领域技术人员所熟知的。在一些实施例中,使用切向流过滤纯化mRNA。合适的纯化方法包括在US 2016/0040154、US 2015/0376220、于2018年2月27日提交的PCT申请PCT/US18/19954,名称为“用于纯化信使RNA的方法”以及于2018年2月27日提交的题为“纯化信使RNA的方法”的PCT申请PCT/US18/19978中所描述的方法,所有这些都通过引用并入本申请并且可以用于实施本发明。

[0075] 在一些实施例中,mRNA在加帽和封尾之前被纯化。在一些实施例中,加帽和封尾之后纯化mRNA。在一些实施例中,加帽和封尾之前和之后均纯化mRNA。在一些实施例中,通过离心在加帽和封尾之前或之后或之前和之后均纯化mRNA。在一些实施例中,通过过滤在加帽和封尾之前或之后或之前和之后均纯化mRNA。在一些实施例中,通过切向流过滤(TFF)或通过色谱法在加帽和封尾之前或之后或之前和之后均纯化mRNA。

[0076] 在一些方式中,加尾是伴随转录同时完成的,因此,也可以在加尾和加帽步骤完成后对核酸进行纯化,纯化的方法如前述的方法。所以,在一些方式中,纯化步骤应该都是在封尾之后。当然,mRNA也可以在加帽之前被纯化。当然也可以在转录之后就进行纯化。可以使用本领域可用的任何方法来检测和定量mRNA的全长或无效转录物。在一些实施例中,使用印迹、毛细管电泳、色谱、荧光、凝胶电泳、HPLC、银染色、光谱、紫外(UV)或UPLC或其组合检测合成的mRNA分子。本领域已知的其他检测方法包括在本发明中。在一些实施例中,使用UV吸收光谱法通过毛细管电泳分离来检测合成的mRNA分子。在一些实施例中,在凝胶电泳之前,mRNA被乙二醛染料变性。在一些实施例中,合成的mRNA在加帽或封尾前表征。在一些实施例中,合成的mRNA在加帽和封尾后表征。

[0077] 在一些实施例中,根据本发明制备的mRNA基本上没有短聚物或无效转录物。特别地,通过毛细管电泳或乙二醛凝胶电泳,根据本发明制备的mRNA包括不可检测水平的短聚物或无效转录物。如本文所用,术语“短聚物”或“无效转录物”是指任何小于全长的转录物。在一些实施例中,“短聚物”或“无效转录物”的长度小于100核苷酸、小于90、小于80、小于70、小于60、小于50、小于40、小于30、小于20或者长度小于10核苷酸。在一些实施例中,添加

5'-帽和/或3'-聚A尾后检测或量化短聚物。

[0078] UTR序列

[0079] 3'-非翻译区(3'-UTR):通常,术语“3'-UTR”是指人工核酸分子的一部分,其位于可读框的3'(即“下游”),并且其不翻译为蛋白。通常,3'-UTR是mRNA的蛋白编码区(可读框(ORF)或编码序列(CDS))和聚腺苷酸序列之间的mRNA的一部分。在本发明的情况中,术语3'-UTR还可以包含这样的元件,其不在模板中编码,RNA由其转录,但在成熟过程中在转录后添加,例如聚腺苷酸序列。mRNA的3'-UTR不翻译为氨基酸序列。3'UTR序列通常由在基因表达过程中被转录为各自的mRNA的基因编码。基因组序列首先转录为包含任选内含子的成熟前mRNA。成熟前mRNA随后在成熟过程中进一步被加工为成熟mRNA。该成熟过程包含以下步骤:5'加帽、剪接成熟前mRNA以切除任选内含子和3'末端修饰(如成熟前mRNA3'末端的聚腺苷酸化和任选的核酸内切酶/或核酸外切酶切割等)。在本发明范围内,3'-UTR对应于位于蛋白编码区终止密码子,优选紧接蛋白编码区终止密码子的3'端和mRNA的聚腺苷酸序列之间。术语“对应于”意为3'-UTR序列可以是如用于限定3'-UTR序列的mRNA序列中的RNA序列,或对应于此RNA序列的DNA序列中。在本发明范围内,术语“基因的3'-UTR”,为对应于源自该基因的成熟mRNA的3'-UTR的序列,所述成熟mRNA即通过基因转录和成熟前mRNA的成熟获得的mRNA。术语“基因的3'-UTR”包括3'-UTR的DNA序列和RNA序列(正义和反义链二者以及成熟和未成熟的二者)。优选3'UTR具有多于20,30,40或50个核苷酸的长度。3'-非翻译区(3'UTR):3'UTR典型地是mRNA的一部分,其位于mRNA的蛋白编码区(即可读框)和多聚腺苷酸序列之间。mRNA的3'UTR不翻译为氨基酸序列。在本发明范围内,3'UTR对应于位于蛋白编码区终止密码子的3'端,优选紧接蛋白编码区终止密码子的3'端,并且向多聚腺苷酸序列的5'侧,优选向紧接多聚腺苷酸序列的5'侧的核苷酸延伸的成熟mRNA序列。术语“对应于”意为3'UTR序列可以是如用于限定3'UTR序列的mRNA序列中的RNA序列,或对应于此RNA序列的DNA序列中。在本发明范围内,术语“基因的3'UTR”,如“白蛋白基因的3'UTR”,为对应于源自该基因的成熟mRNA的3'UTR的序列,所述成熟mRNA即通过基因转录和成熟前mRNA的成熟获得的mRNA。术语“基因的3'UTR”包括3'UTR的DNA序列和RNA序列。

[0080] 5'-非翻译区(5'-UTR):通常,术语“5'-UTR”是指人工核酸分子的一部分,其位于可读框的5'(即“上游”),并且其不翻译为蛋白。5'-UTR通常理解为信使RNA(mRNA)的特定区段,所述信使RNA位于mRNA的可读框的5'。通常,5'-UTR在转录起始位点起始并且在可读框的起始密码子之前的一个核苷酸处终止。优选地,所述5'UTR具有多于20,30,40或50个核苷酸的长度。5'-UTR可以包含用于控制基因表达的元件,也称为调控元件。所述调控元件可以是例如核糖体结合位点。5'-UTR可以被转录后修饰,例如通过加入5'-帽修饰。mRNA的5'-UTR不翻译为氨基酸序列。5'-UTR序列通常由基因表达过程中转录为各个mRNA的基因编码。基因组序列首先转录为成熟前mRNA,其包含任选的内含子。成熟前mRNA然后在成熟过程中进一步加工为成熟mRNA。该成熟过程包括以下步骤:5'加帽、剪接成熟前mRNA以切除任选内含子和3'末端修饰(如成熟前mRNA3'末端的聚腺苷酸化和任选的核酸内切酶/或核酸外切酶切割等)。在本发明范围内,5'-UTR对应于位于起始密码子和例如5'-帽之间的成熟mRNA序列。优选地,5'-UTR对应于从位于5'帽的3'侧的核苷酸,更优选从紧邻5'帽的3'侧核苷酸,向位于蛋白编码区起始密码子5'侧的核苷酸,优选向紧接蛋白编码区起始密码子5'侧的核苷酸延伸的序列。紧接成熟mRNA 5'帽的3'侧的核苷酸典型地对应于转录起始位点。术

语“对应于”意为5'-UTR序列可以是如用于限定5'-UTR序列的mRNA序列中的RNA序列,或与此RNA序列对应的DNA序列。在本发明范围内,术语“基因的5'-UTR”,是对应于源自该基因的成熟mRNA的5'-UTR的序列,所述成熟mRNA即通过基因转录和成熟前mRNA的成熟获得的mRNA。术语“基因的5'-UTR”包括5'-UTR的DNA序列和RNA序列(正义和反义链以及成熟和未成熟的二者)。

[0081] 作为mRNA稳定化的备选方案,已经发现天然存在的真核mRNA分子含有特征稳定化元件。例如,它们可以包含在其5'末端(5'-UTR)和/或在其3'末端(3'-UTR)的所谓非翻译区(UTR)以及其它结构特征,如5'帽结构或3'-聚腺苷酸尾。5'-UTR和3'-UTR二者都典型地从基因组DNA转录并且因此是成熟前(premature)mRNA元件。在mRNA加工过程中,成熟mRNA的特有结构特征,如5'帽和3'-聚腺苷酸尾(也称为多聚腺苷酸尾或聚腺苷酸序列)通常被添加于转录的(成熟前)mRNA。

[0082] 3'-聚腺苷酸尾典型地是添加在转录的mRNA的3'末端的一段单调腺苷核苷酸序列。其可以包含至多约400个腺苷核苷酸。发现此种3'-聚腺苷酸尾的长度对于个体mRNA的稳定性是可能的关键要素。此外,已显示 α -球蛋白mRNA的3'UTR可能是对于公知的 α -球蛋白mRNA稳定性的重要因素(Rodgers等人,Regulated α -globin mRNA decay is a cytoplasmic event proceeding through 3'-to-5' exosome-dependent decapping, RNA, 8, 第1526-1537页, 2002)。 α -球蛋白mRNA的3'UTR明显参与特定核蛋白-复合物(α -复合物)的形成,其存在与mRNA体外稳定性相关(Wang等人, An mRNA stability complex functions with poly(A)-binding protein to stabilize mRNA in vitro, Molecular and Cellular biology, 第19卷, 第7期, 1999年7月, 第4552-4560页)。对于核糖体蛋白mRNA中的UTR已经进一步表明有趣的调节功能:在核糖体蛋白mRNA的5'-UTR控制生长相关的mRNA翻译的同时,该调节的严格性由核糖体蛋白mRNA中的各个3'-UTR赋予(Ledda等人, Effect of the 3'-UTR length on the translational regulation of 5'-terminal oligopyrimidine mRNAs, Gene, 第344卷, 2005, p.213-220)。该机制促进核糖体蛋白的特异表达,所述核糖体蛋白通常以恒定的方式转录从而一些核糖体蛋白mRNA如核糖体蛋白S9或核糖体蛋白L32称为看家基因(Janovick-Guretzky等人, Housekeeping Gene Expression in Bovine Liver is Affected by Physiological State, Feed Intake, and Dietary Treatment, J. Dairy Sci., Vol.90, 2007, p.2246-2252)。核糖体蛋白的生长相关的表达模式因此主要是由于对翻译水平的调节。

[0083] 术语“3'-UTR元件”是指包含源自3'-UTR或源自3'-UTR的变体或片段的核酸序列或由源自3'-UTR或源自3'-UTR的变体或片段的核酸序列组成的核酸序列。“3'-UTR元件”优选是指人工核酸序列,如人工mRNA的3'-UTR包含的核酸序列。因此,在本发明的意义中,优选地,3'-UTR元件可以由mRNA,优选人工mRNA的3'-UTR包含,或3'-UTR元件可以由各自的转录模板的3'-UTR包含。优选地,3'-UTR元件是对应于mRNA的3'-UTR,优选人工mRNA,如通过转录基因改造的载体构建体获得的mRNA的3'-UTR的核酸序列。优选地,本发明的意义中的3'-UTR元件作为3'-UTR行使功能或编码执行3'-UTR的功能的核苷酸序列。

[0084] 因此,术语“5'-UTR元件”是指包含源自5'-UTR或5'-UTR的变体或片段的核酸序列或由源自5'-UTR或5'-UTR的变体或片段的核酸序列组成的核酸序列。“5'-UTR元件”优选是指人工核酸序列,如人工mRNA的5'-UTR包含的核酸序列。因此,在本发明的意义中,优选地,

5' -UTR元件可以由mRNA, 优选人工mRNA的5' -UTR包含, 或5' -UTR元件可以由各自的转录模板的5' -UTR包含。优选地, 5' -UTR元件是对应于mRNA的5' -UTR, 优选人工mRNA, 如通过转录基因改造的载体构建体获得的mRNA的5' -UTR的核酸序列。优选地, 本发明的意义中的5' -UTR元件作为5' -UTR行使功能或编码执行5' -UTR的功能的核苷酸序列。

[0085] 根据本发明的人工核酸分子中的3' -UTR元件和/或5' -UTR元件延长和/或增加从所述人工核酸分子的蛋白生产。因此, 根据本发明的人工核酸分子可以尤其包含一下一种或者几种功能的3' -UTR元件和/或5' -UTR元件: 增加从所述人工核酸分子的蛋白生产的3' -UTR元件, 延长从所述人工核酸分子的蛋白生产的3' -UTR元件, 增加和延长从所述人工核酸分子的蛋白生产的3' -UTR元件, 增加从所述人工核酸分子的蛋白生产的5' -UTR元件, 延长从所述人工核酸分子的蛋白生产的5' -UTR元件, 增加和延长从所述人工核酸分子的蛋白生产的5' -UTR元件, 增加从所述人工核酸分子的蛋白生产的3' -UTR元件和增加从所述人工核酸分子的蛋白生产的5' -UTR元件, 增加从所述人工核酸分子的蛋白生产的3' -UTR元件和延长从所述人工核酸分子的蛋白生产的5' -UTR元件, 增加从所述人工核酸分子的蛋白生产的3' -UTR元件和增加和延长从所述人工核酸分子的蛋白生产的5' -UTR元件, 延长从所述人工核酸分子的蛋白生产的3' -UTR元件和增加从所述人工核酸分子的蛋白生产的5' -UTR元件, 延长从所述人工核酸分子的蛋白生产的3' -UTR元件和增加和延长从所述人工核酸分子的蛋白生产的5' -UTR元件, 延长从所述人工核酸分子的蛋白生产的3' -UTR元件和增加从所述人工核酸分子的蛋白生产的5' -UTR元件, 延长从所述人工核酸分子的蛋白生产的3' -UTR元件和增加和延长从所述人工核酸分子的蛋白生产的5' -UTR元件, 增加和延长从所述人工核酸分子的蛋白生产的3' -UTR元件和增加从所述人工核酸分子的蛋白生产的5' -UTR元件, 增加和延长从所述人工核酸分子的蛋白生产的3' -UTR元件和延长从所述人工核酸分子的蛋白生产的5' -UTR元件, 或增加和延长从所述人工核酸分子的蛋白生产的3' -UTR元件和增加和延长从所述人工核酸分子的蛋白生产的5' -UTR元件。优选地, 根据本发明的人工核酸分子包含延长从所述人工核酸分子的蛋白生产的3' -UTR元件和/或增加从所述人工核酸分子的蛋白生产的5' -UTR元件。优选地, 根据本发明的人工核酸分子包含至少一个3' -UTR元件和至少一个5' -UTR元件, 即延长和/或增加从所述人工核酸分子的蛋白生产并且源自稳定mRNA的至少一个3' -UTR元件和延长和/或增加从所述人工核酸分子的蛋白生产并且源自稳定mRNA的至少一个5' -UTR元件。“延长和/或增加从所述人工核酸分子的蛋白生产”通常是指与从缺少3' -UTR和/或5' -UTR或包含参比3' -UTR和/或参比5' -UTR (如天然与ORF组合存在的3' -UTR和/或5' -UTR) 的各个参比核酸产生的蛋白的量相比, 从具有各个3' -UTR元件和/或5' -UTR元件的根据本发明的人工核酸分子产生的蛋白的量。尤其是, 与缺少3' -UTR和/或5' -UTR或包含参比3' -UTR和/或5' -UTR, 如天然与ORF组合存在的3' -和/或5' -UTR的各个核酸相比, 根据本发明的人工核酸分子的至少一个3' -UTR元件和/或5' -UTR元件延长从根据本发明的人工核酸分子, 例如从根据本发明的mRNA的蛋白生产。尤其是, 与缺少3' -和/或5' -UTR或包含参比3' -和/或5' -UTR, 如天然与ORF组合存在的3' -和/或5' -UTR的各个核酸相比, 根据本发明的人工核酸分子的至少一个3' -UTR元件和/或5' -UTR元件增加从根据本发明的人工核酸分子, 例如从根据本发明的mRNA的蛋白生产, 尤其是蛋白表达和/或总蛋白生产。优选地, 与缺少3' -UTR和/或5' -UTR或包含参比3' -UTR和/或参比5' -UTR, 如天然与ORF组合存在的3' -UTR和/或5' -UTR的各个核酸的翻译效率相比, 根据本发明的人工核酸分子的所述至少一个3' -UTR元件和/或所述至少一个5' -UTR元件不消极影响核酸的翻译效率。甚至更优选地, 与

其天然情况下各个ORF编码的蛋白的翻译效率相比,翻译效率由3'-UTR和/或5'-UTR增强。本文中使用的术语“各个核酸分子”或“参比核酸分子”意为-除不同3'-UTR和/或5'-UTR之外-参比核酸分子是与包含3'-UTR元件和/或5'-UTR元件的本发明的人工核酸分子相当的,优选相同的。

[0086] 药物组合物

[0087] 本申请还披露了包括化合物、蛋白(抗体,抗体片段,融合蛋白、肽链,氨基酸序列等等)、改性核苷、改性核苷酸或本申请提供的改性核酸的药物组合物。

[0088] 在一些实施例中,本发明的药物组合物可以通过本领域技术人员已知的任何方法给予受试者,例如肠胃外、经口、经粘膜、经皮、肌肉内、静脉内、皮内、皮下、腹膜内、心室内、颅内、阴道内或肿瘤内。

[0089] 药物组合物可以通过静脉内、动脉内或肌肉内注射液体制剂来施用。合适的液体制剂包括溶液、悬浮液、分散液、乳液、油等。在一些实施例中,药物组合物是静脉内给药的,因此配制成适于静脉内给药的形式。在一些实施例中,药物组合物是动脉内给药的,因此配制成适于动脉内给药的形式。在一些实施例中,药物组合物是肌肉内给药的,因此配制成适于肌肉内给药的形式。药物组合物可以使用囊泡给药,例如,脂质体(see Langer, Science 249: 1527-1533 (1990); Treat et al., in Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss, New York, pp. 353-365 (1989); Lopez-Berestein, ibid., pp. 317-327; see generally ibid)。

[0090] 药物组合物可以口服给药,因此,可以配制成适于口服给药的形式,即固体或液体制剂。合适的固体口服制剂可以包括片剂、胶囊、颗粒剂、丸剂等。合适的液体口服制剂可以包括溶液、悬浮液、分散液、乳液、油。

[0091] 药物组合物可以局部给予体表,因此可以配制成适于局部给药的形式。合适的局部制剂可包括凝胶、软膏、乳膏、洗剂、滴剂等。对于局部给药,可以制备组合物或其生理学上可耐受的衍生物,并在有或没有药物载体的情况下作为溶液,悬浮液或乳液施用于生理学上可接受的稀释剂中。药物组合物可以作为栓剂给药,例如直肠栓剂或尿道栓剂。在一些实施例中,药物组合物通过皮下植入颗粒给药。在一些实施例中,颗粒在一段时间内提供药剂的受控释放。药物组合物可另外包括药学上可接受的赋形剂,如本申请所用,包括任何和所有溶剂、分散介质、稀释剂或其他液体载体、分散或悬浮助剂、表面活性剂、等渗剂、增稠剂或乳化剂、防腐剂、固体粘合剂、润滑剂等,适合于所需的特定剂型。雷明顿的《药学的科学与实践》,第21版, A.R. Gennaro (Lippincott, Williams & Wilkins, Baltimore, Md., 2006; incorporated herein by reference)披露了用于配制药组合物的各种赋形剂和用于其制备的已知技术。

[0092] 在一些实施例中,药学上可接受的赋形剂的纯度为至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%。在一些实施例中,赋形剂被批准用于人类和兽医用途。在一些实施例中,赋形剂经美国食品和药物管理局批准。在一些实施例中,赋形剂是药用级。在一些实施例中,赋形剂符合美国药典(USP)、欧洲药典(EP)、英国药典和/或国际药典的标准。

[0093] 用于液体制剂的药学上可接受的载体可以是水性或非水性溶液、悬浮液、乳液或油。非水溶剂的实例可以是丙二醇、聚乙二醇和可注射的有机酯,例如油酸乙酯。含水载体

可包括水、醇/水溶液、乳液或悬浮液、包括盐水和缓冲介质。油的实例可以是石油、动物、植物或合成来源的油,例如花生油、大豆油、矿物油、橄榄油、向日葵油和鱼肝油。

[0094] 非消化道给药的载体(用于皮下、静脉内、动脉内或肌内注射)可包括氯化钠溶液、林格氏葡萄糖、右旋糖和氯化钠、乳酸林格氏液和固定油。静脉内载体包括液体和营养补充剂、电解质补充剂,例如基于林格氏葡萄糖的电解质补充剂等。实例可以是无菌液体,例如水和油,添加或不添加表面活性剂和其他药学上可接受的佐剂。通常,水、盐水、葡萄糖水溶液和相关糖溶液、以及二醇如丙二醇或聚乙二醇是优选的液体载体,特别是对于可注射溶液。油的实例可以是石油、动物、植物或合成来源的油,例如花生油、大豆油、矿物油、橄榄油、向日葵油和鱼肝油。

[0095] 药物组合物可进一步包括粘合剂(例如阿拉伯胶、玉米淀粉、明胶、卡波姆、乙基纤维素、瓜尔胶、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、聚维酮)、崩解剂(例如玉米淀粉、马铃薯淀粉、海藻酸、二氧化硅、交联羧甲基纤维素钠、交聚维酮、瓜尔胶、羟基乙酸淀粉钠)、各种pH和离子强度的缓冲剂(例如Tris-HCl、乙酸盐、磷酸基)、白蛋白或明胶等添加剂、以防止吸收到表面、洗涤剂(例如吐温20、吐温80、普朗尼克F68、胆汁酸盐)、蛋白酶抑制剂、表面活性剂(例如十二烷基硫酸钠)、渗透增强剂、增溶剂(例如甘油、聚乙二醇甘油)、抗氧化剂(例如抗坏血酸、偏亚硫酸氢钠、丁基化羟基苯甲醚)、稳定剂(例如羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素)、增粘剂(例如卡波姆、胶体二氧化硅、乙基纤维素、瓜尔胶)、甜味剂(例如阿斯巴甜、柠檬酸)、防腐剂(如硫柳汞、苯甲醇、对羟基苯甲酸酯)、润滑剂(如硬脂酸、硬脂酸镁、聚乙二醇、十二烷基硫酸钠)、流动助剂(如胶体二氧化硅)、增塑剂(如邻苯二甲酸二乙酯、柠檬酸三乙酯)、乳化剂(例如卡波姆、羟丙基纤维素、十二烷基硫酸钠)、聚合物涂层(例如泊洛沙姆或泊洛沙胺)、涂料和成膜剂(例如乙基纤维素、丙烯酸酯、聚甲基丙烯酸酯)和/或佐剂。

[0096] 本申请提供的药物组合物可以是控释组合物,即组合物,其中化合物在给药后的一段时间内释放。控释或持续释放组合物可包括在亲脂性贮库(例如脂肪酸、蜡、油)中的制剂。在一些实施例中,药物组合物可以是立即释放组合物,即组合物,其中整个化合物在给药后立即释放。

[0097] 递送载体

[0098] 可使用任何方法配制和递送根据本发明合成的mRNA用于体内生产蛋白质,例如抗体,或者抗原,或者抗体片段或者抗原片段等。在一些实施例中,将mRNA封装到转移载体中,例如纳米颗粒。除此之外,这种包封的一个目的通常是保护核酸免受可能含有降解核酸和/或引起核酸快速排泄的系统或受体的酶或化学物质的环境的影响,并促进细胞摄取和相应序列的表达。因此在一些实施例中,合适的递送载体能增强其中包括mRNA的稳定性和/或促进mRNA递送至靶细胞或组织。在一些实施例中,纳米颗粒可以是基于脂质的纳米颗粒,例如包括脂质体或基于聚合物的纳米颗粒。在一些实施例中,用于递送载体的纳米颗粒可具有约1~1000nm之间的颗粒直径。纳米颗粒可包括至少0.001 μ g、0.01 μ g、0.1 μ g、1 μ g、10 μ g、100 μ g、1mg、10mg、100mg、1g或更多mRNA。

[0099] 当然,这种纳米粒子也可以是核壳类结构的颗粒,如果核酸与聚合物混合形成了核,然后再在核结构外包裹脂质体,也可以通过本发明的混合器来完成。可以先通过混合器让核酸和聚合物形成微粒结构,然后在通过混合器让微粒与脂质成分形成微粒结构。这种

所谓的核壳结构,例如专利申请号201880001680.5中所有核的材料以及壳的材料都可以用本发明的混合器来形成,该专利的所有组成核的材料和形成壳的材料都是本发明的一个具体实施方式。

[0100] 在一些实施例中,转运载体是脂质体囊泡、或促进核酸转移至靶细胞和组织的其他手段。合适的转运载体可以包括但不限于脂质体、纳米脂质体、含神经酰胺的纳米脂质体、蛋白脂质体、纳米颗粒、磷酸钙-硅酸盐纳米颗粒、磷酸钙纳米颗粒、二氧化硅纳米颗粒、纳米晶颗粒、半导体纳米颗粒、聚(D-精氨酸)、纳米树枝状聚合物、淀粉基递送系统、胶束、乳剂、囊泡、质粒、病毒、钙磷酸基核苷酸、适体、肽和其他载体标签。还考虑使用生物离子胶囊和其他病毒衣壳蛋白组装体作为合适的转移载体。(Hum.Gene Ther.2008September;19(9):887-95)。

[0101] 脂质体可以包括一种或以上阳离子脂质、一种或以上非阳离子脂质、一种或以上基于甾醇的脂质、和/或一种或以上PEG-改性脂质。脂质体可包括三种或更多种不同的脂质组分,脂质的一种不同组分是基于甾醇的阳离子脂质。在一些实施例中,基于甾醇的阳离子脂质是咪唑胆固醇酯或“ICE”脂质(参见W02011/068810,其通过引用并入本申请)。在一些实施例中,基于甾醇的阳离子脂质可构成脂质纳米颗粒(例如,脂质体)中总脂质的不超过70%(例如,不超过65%和60%)。合适的脂质的实例可包括,例如,磷脂酰化合物(例如,磷脂酰甘油、磷脂酰胆碱、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰乙醇胺、鞘脂、脑苷脂和神经节苷脂)。

[0102] 阳离子脂质的非限制性实例可包括C12-200、MC3、DLinDMA、DLin-MC3-DMA、DLinkC2DMA、cKK-E12、ICE(咪唑基)、HGT5000、HGT5001、OF-02、DODAC、DDAB、DMRIE、DOSPA、DOGS、DODAP、DODMA和DMDMA、DODAC、DLenDMA、DMRIE、CLinDMA、CpLinDMA、DMOBA、DOcarbDAP、DLinDAP、DLincarbDAP、DLinCDAP、KLin-K-DMA、DLin-K-XTC2-DMA、SM-102、ALC-0315和HGT4003、或其组合。

[0103] 非阳离子脂质的非限制性实例可以包括神经酰胺、脑磷脂、脑苷脂、二酰基甘油、1,2-二棕榈酰基-sn-甘油基-3-磷酸基甘油钠盐(DPPG)、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DSPE)、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(DSPC)、1,2-二棕榈酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(DPPC)、1,2-二油基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DOPE)、1,2-二油基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(DOPC)、1,2-二棕榈酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DPPE)、1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DMPE)、和1,2-二油酰基-sn-甘油基-3-磷酸-(1'-rac-甘油)(DOPG)、1-棕榈酰基-2-油酰基-磷脂酰乙醇胺(POPE)、1-棕榈酰基-2-油酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(POPC)、1-硬脂酰基-2-油酰基-磷脂酰乙醇胺(SOPE)、鞘磷脂、或其组合。

[0104] 在一些实施例中,PEG改性脂质可以是PEG长度可以是1000~5000Da的聚(乙烯)二醇链,其共价连接到具有C6-C20长度的烷基链的脂质上。PEG改性脂质的非限制性实例可包括DMG-PEG₁₀₀₀、DMG-PEG₁₃₀₀、DMG-PEG₁₅₀₀、DMG-PEG₁₈₀₀、DMG-PEG₂₀₀₀、DMG-PEG₂₂₀₀、DMG-PEG₂₅₀₀、DMG-PEG₂₇₀₀、DMG-PEG₃₀₀₀、DMG-PEG₃₂₀₀、DMG-PEG₃₅₀₀、DMG-PEG₃₇₀₀、DMG-PEG₄₀₀₀、DMG-PEG₄₂₀₀、DMG-PEG₄₅₀₀、DMG-PEG₄₇₀₀、DMG-PEG₅₀₀₀、ALC-0159、C8-PEG、DOGPEG、神经酰胺PEG和DSPE-PEG、或其组合。

[0105] 还考虑使用聚合物作为转移载体,无论是单独使用还是与其他转移载体组合使用。合适的聚合物可包括,例如,聚丙烯酸酯、聚烷基氰基丙烯酸酯、聚丙交酯、聚丙交酯-聚乙交酯共聚物、聚己内酯、葡聚糖、白蛋白、明胶、藻酸盐、胶原、壳聚糖、环糊精和聚乙烯亚

胺。基于聚合物的纳米颗粒可包括聚乙烯亚胺(PEI),例如支化的PEI。

[0106] 载体的核壳结构也是另外一种具体的实施方式。在一些方式中,所述的疫苗试剂包括前述的核酸,该核酸可以翻译,表达冠状病毒的抗原或者抗原片段,这样的核酸被包含在多个多聚复合物或蛋白质核粒子内,并且其中所述多个多聚复合物或蛋白质核粒子本身被囊封在第一生物相容性脂质双层壳中。在一些方式中,所述多聚复合物或蛋白质核粒子含有至少第一带正电荷的聚合物或蛋白质。其中所述第一生物相容性脂质双层壳促进一种或多种哺乳动物抗原呈递细胞对所述多个多聚复合物或蛋白质核粒子的巨胞饮作用。在一些方式中,该疫苗试剂还包含囊封在所述生物相容性脂质双层内的选自CpG、聚(I:C)、明矾及其任何组合的佐剂。在一些方式中,疫苗试剂还包括含囊封在所述生物相容性脂质双层之间的空间内的免疫调节化合物,例如IL-12p70蛋白质、FLT3配体、或吲哚胺2,3-双加氧酶(IDO-1)抑制剂。在一些方式中,其中所述吲哚胺2,3-双加氧酶(IDO-1)抑制剂是GDC-0919、INCB24360或其组合。在一些方式中,其中所述带正电荷的聚合物或蛋白质包含鱼精蛋白、聚乙烯亚胺、聚(β -氨基酯)或其任何组合。在一些方式中,所述生物相容性脂质双层包含以下的一种或多种:1,2-二油酰-sn-甘油-3-乙基磷酸胆碱(EDOPC);1,2-二油酰-sn-甘油-3-磷脂酰乙醇胺(DOPE);1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[氨基(聚乙二醇)-2000](DSPE-PEG);及其组合。在一些方式中,所述生物相容性脂质双层包含:(a)约30%至约70%的1,2-二油酰-sn-甘油-3-乙基磷酸胆碱(EDOPC);(b)约70%至约30%的1,2-二油酰-sn-甘油-3-磷脂酰乙醇胺(DOPE);或(c)约0.5%至约5%的1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[氨基(聚乙二醇)-2000](DSPE-PEG)。在一些方式中,所述生物相容性脂质双层包含:(a)约45%至约55%的1,2-二油酰-sn-甘油-3-乙基磷酸胆碱(EDOPC);(b)约55%至约45%的1,2-二油酰-sn-甘油-3-磷脂酰乙醇胺(DOPE);和(c)约1%至约2%的1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[氨基(聚乙二醇)-2000](DSPE-PEG)。

[0107] 双特异性抗体

[0108] 双特异性抗体(Bispecific Antibody, BsAb)能够同时靶向两个表位,在治疗效果和安全性上较单抗药物具备一定优势,被认为是颇具潜力的新一代免疫治疗药物。

[0109] BsAb在自然界并不存在,是一种人工构建的抗体,其形式可以按照Fc的存在与否分为IgG-like和非IgG-like两种。IgG-like形式分子量较大,具有Fc区域,可以执行Fc介导的效应功能,半衰期较非IgG-like形式的更长,纯化、溶解度和稳定性更高。非IgG-like形式的双抗主要发挥更多的抗原结合能力,由于没有Fc区域其循环动力学较低,但具有更好的组织穿透能力、较低的免疫原性和较低的先天免疫系统的非特异性激活。

[0110] BsAbs在肿瘤治疗的首次应用是将T细胞重新定向至肿瘤细胞上,通过识别肿瘤表面相关抗原(TAA)介导T细胞杀伤,也就是起到了免疫细胞衔接的作用。具有代表性的BiTE(Bispecific T-cell engagers)是2014年Amgen获批上市CD3 $\times$ CD19双抗-Blinatumomab,适应症为急性淋巴细胞白血病(ALL)。但由于没有Fc区域,其血清半衰期较短,需要持续静脉输注以达到治疗性血清水平。Blinatumomab的上市推动了一系列CD3双抗的研发,另一端的TAA靶点包括血液肿瘤相关的CD19、CD20、BCMA、CD33、CD123和CLEC12A等,与实体瘤相关的CLDN18.2, CEA, EpCAM, HER2, PSMA, pCadherin, GPC3, GPA33等。

[0111] 本发明提供的mRNA编码的双特异性抗体为CD3 $\times$ EpCAM-mRNA(即ZSL303-mRNA-1),制备微针注射试剂ZSL303-mRNA-1-LNP,经细胞水平检测具有非常好的表达效果,经微针注

射至免疫系统重建的免疫缺陷小鼠肿瘤模型,能发挥显著的抑瘤效果。

[0112] 微针

[0113] 微针是由硅、金属或其他材料通过微电子制造技术或微铸模等技术制成的长度为几百微米到几毫米不等的细小的针。它能有效刺穿皮肤的角质层,通过在皮肤表面形成微小通道,药物可到达皮肤指定深度,被吸收进入血液而发挥作用,是一种集透皮贴片与皮下注射双重释药特点于一体的微经皮给药系统。微针主要的给药方式有贴针、蘸针、包衣微针、包囊药物微针和微针注射等,具有生物利用度高,无损伤性、剂量可控、稳定、无痛感的优点。主要用于大分子物质如蛋白质、核酸、疫苗等的经皮吸收,此外,在美容界也有广泛的用途,微针产生的微小通道可以使皮下腺产生的汗液更好的排出体外,使缓解毛孔堵塞性及油性皮肤得到缓解;另外,可增加皮肤用品如乳剂、凝胶和洗液等的吸收量,提高有效成分的利用率。

[0114] 微针此前便凭借其无痛微创、方便使用、意外针刺风险低等优点和广阔的市场前景,受到了国际药企、学术机构的追捧。随着微加工技术的发展,我国医药研究投入比重的加大,微针给药系统的相关研究和应用也在不断增加,一定程度上推动了我国微针给药行业的发展。

[0115] 微针可以定义为高 $10\sim 2000\mu\text{m}$ 、宽 $10\sim 50\mu\text{m}$ 的针,具有给药意义的装置是微针阵列,即许多微针以阵列的方式排列在给药载体上。微针的长度在几百微米到几毫米不等,它可以恰好穿过皮肤角质层而又不触及痛觉神经,在皮肤表面形成给药通道,使药物到达皮肤指定深度,并进入皮下的毛细管网被吸收,在起到促进药物渗透的同时又不引起痛感和皮肤损伤。因此,微针有助于提高药物的给药效率和改善病人的依从性。

[0116] 虽然理论上微针的长度只需要 $15\sim 20\mu\text{m}$ 就可以刺穿人的皮肤角质层,但是由于皮肤具有良好的弹性及可伸缩性,而且不同年龄的人以及不同的皮肤部位的皮肤角质层厚度差异比较大,因此为了保证微针可以有效地刺穿不同类型的皮肤,实现有效的经皮给药,微针的长度要远长于 $20\mu\text{m}$ 但是一般要小于 1mm 。微针的材料也由最初的金属微针逐渐发展为由可溶性材料制作的可溶解微针。

[0117] 微针最重要的优势在于它可以使大分子穿透角质层,并且相对于注射给药,它几乎无损伤性、无痛感,相当于皮下给药,易被患者接受。另外,通过微针给药,药物的剂量比较稳定且可控制。使用微针贴剂的感受就好比在脸上贴了一片创可贴,患者没有任何不适感。所以,微针也被称为是一种革命性的新剂型和新的给药方式。外用药、化妆品、生物制剂、部分化药等都可以进行微针贴剂化改造,市场空间非常可观。

[0118] 微针透皮给药应用广泛,可用于小分子、生物制剂、疫苗、细胞内DNA/RNA等透皮递送,疫苗、糖尿病、皮肤病、医美是微针在现阶段的主要研究方向。

[0119] 随着20世纪90年代微纳米加工技术的发展,微针在药学领域的运用逐渐成为可能,并先后开发出了金属微针(主要材料有不锈钢、钛合金、镍、钯等)、硅及二氧化硅微针、玻璃微针、聚合物微针等类型。在实际运用中,可根据中心是否有微型通道将微针分为实心微针和空心微针。实心微针按给药方式不同又可分为可溶性载药微针、不可溶性药物涂层微针、组织预处理微针。此外,还可分为生物微针与人造微针、异面微针与同面微针等。

[0120] 空心微针是使用微加工技术制作的长度小于 1mm 的中空针头,用来将液体疫苗制剂通过针头注射入皮肤从而实现经皮给药。最早使用的空心微针是McAllister等人在二十

世纪八十年代使用硅制作的长度约150 μ m的微针。

[0121] 实心微针在疫苗的经皮给药应用中主要有两种方式：“poke and patch”和“coat and poke”。最初的实心微针是由钛、硅、不锈钢、玻璃等材料制作而成，但是在使用中由于存在微针折断残留在皮肤中的风险，而且这些材料都无法在皮肤中被降解成无毒物质。因此在随后的研究中，开始使用可降解但不易溶于水的高分子聚合物材料制作出可适用于经皮给药的实心微针，如PLGA、PGA、PLA等材料。实心微针的形状主要为金字塔形或是圆锥形，微针长度在150~1000微米之间。

[0122] poke and patch是实心微针最早应用于经皮给药时的使用方法，简单说就是将微针预处理皮肤后取走，然后将含有药物的凝胶贴片或者液体制剂敷到微针预处理区域，使制剂中药物通过皮肤上微针预处理后留下的针孔扩散渗透入皮肤中完成药物的经皮给药。缺点，不好精确控制给药剂量。

[0123] coat and poke是用含有疫苗的涂布液，将疫苗涂布在微针阵列针尖表面制作得到涂布针，当涂布针作用于皮肤后，针尖表面载有的药物将迅速溶解释放到皮肤内。与poke and patch方法相比，coat and poke方法可以相对精确地控制在经皮给药过程中的给药剂量，而且使用更简单，给药时间也缩短至几分钟。但是缺点是，针尖载药量容易受微针形状及微针阵列中微针数量的影响。

[0124] poke and release(自溶性微针)是指由水溶性材料为基质制作而成的仅在微针针体含有疫苗的微针贴片。既可以提高载药量，又可以根据材料将微针设计为快速给药或者缓释给药方式。现在常用的水溶性高分子材料主要有：CMC、PVP、PVA/PVP混合材料、蚕丝蛋白、硫酸软骨素、透明质酸钠以及多糖等材料。

[0125] 自溶性微针是指由实心微针的基底部与其前端的可溶性针状结构结合而成的一类微针，由可溶性或生物可降解基质构成，这类微针的基质在插入皮肤后能溶解，具有良好的生物相容性。通常，这类型的微针阵列由糖、碳水化合物或合成聚合物组成，可用于承载胰岛素、低分子量肝素、卵清蛋白、腺病毒载体、疫苗抗原、光敏剂和前体等物质。自溶性微针具有以下优点：只能一次性使用，可避免传播感染性疾病；可溶部分负载的药物不用经皮被动吸收；基底部作为实心微针使用可进一步给药， t_{max} 和持续时间均优于传统皮下注射法；自溶性微针还有药物缓释作用，可根据治疗需求制作不同降解速度的自溶性微针。

[0126] 水凝胶微针由溶胀材料和药物储集层组成。水凝胶微针阵列中的溶胀材料和药物储集层可通过肿胀的微投射吸收间隙液来解除药物的溶解，这一点与自溶性微针不同，因此将其单独分为一类。水凝胶微针有两种载药方式：一种是微针基底部承载药物，针体刺入皮肤后水凝胶吸收细胞间液膨胀，形成凝胶通道，基底部的药物通过凝胶通道渗入人体，渗入速度由水凝胶的交联密度决定；另一种是水凝胶微针基底部及针体均由药物与聚合物混合制备，刺入皮肤后体液渗入，针体溶胀，药物释出。水凝胶微针制备时其材料不存在降解物残留问题，因此可大量生产。

[0127] 本发明提供的微针注射试剂适用于任意一种微针。

[0128] 尽管与本文描述的那些类似或等同的方法和材料可用于本发明的实践或测试，但下文描述了合适的方法和材料。本文提及的所有出版物、专利申请、专利和其他参考文献都通过引用整体并入。本文引用的参考文献不被认为是要求保护的发明的现有技术。另外，材料、方法和实施例仅是说明性的，而不是限制性的。

附图说明

[0129] 图1为微针皮内给药的示意图；

[0130] 图2为实施例1中Ribogreen试剂盒进行包封率的测量过程中96孔黑板进行样品添加方式示意图；

[0131] 图3为实施例2中ZSL303-mRNA-1 (CD3×EPCAM-mRNA)经Lipo2k和LipoMAX两种转染试剂分别在24h和36h的表达结果示意图；

[0132] 图4为实施例3中小鼠血浆中的双特异性抗体CD3×EpCAM的浓度变化曲线图；

[0133] 图5为实施例6中ZSL303-mRNA-1-LNP给药动物实验方案示意图；

[0134] 图6为实施例6中两组方式给药后对PBMC人源化小鼠中HCT-15异种移植肿瘤体积变化曲线图；

[0135] 图7为实施例6中三次微针给药的抑瘤效果示意图；

[0136] 图8为实施例6中小鼠肿瘤实体成像结果图；

[0137] 图9为实施例6中两组方式给药后23天小鼠肿瘤重量对比图；

[0138] 图10为实施例6中给药三次之后小鼠血清中双特异性抗体的浓度检测结果示意图。

具体实施方式

[0139] 下面结合附图和实施例对本发明作进一步详细描述,需要指出的是,以下所述实施例旨在便于对本发明的理解,而对其不起任何限定作用。

[0140] 以下实施例中采用的实验试剂、耗材及实验仪器如下:

[0141] 实验试剂及耗材:无水乙醇(Sigma-Aldrich, Lot:SHBM7661)、胆固醇(Sigma-Aldrich, Lot:SLBW6939)、DSPC(Avanti, 850365P-1G-F-162)、可电离阳离子脂质SM-102(朗旭生物, Lot:20210401)、DMG-PEG₂₀₀₀(朗旭生物, Lot:20200601)、DEPC水(Invitrogen, Lot:2359688)、三水乙酸钠(Sigma-Aldrich, Lot:STBJ4139)、三(羟甲基)氨基甲烷盐酸盐(Roche, Lot:51792620)、氨基丁三醇(Sigma-Aldrich, Lot:WXBD2025U)、冰乙酸(MACKLIN, Lot:CH228067)、ZSL303-mRNA-1(Novoprotein, Lot:20211129)、超滤离心管15mL 10K(Millipore, Lot:P1852497)

[0142] 实验仪器:微流控纳米药物制备系统(迈安纳, 型号:INano L)、高速冷冻离心机(Thermo Scientific, 型号:Sorvall ST 16R)、超微量分光光度计(Thermo Scientific, 型号:Nanodrop One)、激光粒度仪(丹东百特仪器, 型号:BT-90+)、精密天平(Sartorius, 型号:SQP Quintix124-1CN)、pH计(METTLER TOLEDO, 型号:S210)

[0143] 实施例1微针注射mRNA编码双特异性抗体药物试剂的制备

[0144] 本实施例提供的微针注射mRNA编码双特异性抗体药物试剂ZSL303-mRNA-1-LNP的制备方法包括如下步骤:

[0145] 1、ZSL303-mRNA-1的合成

[0146] 本实施例采用的双特异性抗体ZSL303-mRNA-1-LNP(其中表达双特异性抗体的核酸CD3×EpCAM-mRNA具有如SEQ ID NO:1所示的序列)委托novoprotein公司进行合成,具体合成方法如下:使用BsaI限制性内切酶对质粒模板进行线性化,在37℃的条件下反应3小时,回收纯化质粒线性化的产物以保留线性化质粒为主,配置mRNA IVT反应的体系,将已经

纯化的质粒线性化产物与mRNA IVT反应体系混合,在37℃的条件下反应3小时,反应结束后,加入DNaseI,在37℃的条件下反应20分钟,反应结束后,纯化转录产物以去除多余的酶和IVT反应的原料,对纯化后的转录产物进行酶法加帽,在37℃的条件下反应1小时,反应结束后,用LiCl法对加帽产物进行纯化,最终对纯化产物进行常规的定量检测和纯度检测。

[0147] 2、水相溶液和脂质溶液的配制

[0148] 配置水相溶液及脂质混合溶液,其中4X水相溶液和脂质溶液母液的配制按照表1所述方式进行:

[0149] 表1、4X水相溶液和脂质溶液母液配方

[0150]	4X 的水相溶液		脂质溶液母液		
	样品名称	称样量	样品名称	称样量	无水乙醇加入量
	氨基丁三醇	99.20mg	SM-102	141.36mg	4mL
	三(羟甲基)氨基甲烷盐酸盐	377.60mg	胆固醇	59.26mg	4mL
	冰乙酸	13.76mg	DSPC	31.44mg	4mL
	三水乙酸钠	64.00mg	DMG-PEG ₂₀₀₀	14.97mg	4mL
	DEPC 水	40mL	NA	NA	NA

[0151] 配置方案如下:

[0152] (1) 水相溶液的配制:分别精密称取氨基丁三醇、三(羟甲基)氨基甲烷盐酸盐、三水乙酸钠及乙酸并用DEPC水溶解成储液后备用,使用时再通过DEPC水稀释至1X的溶液使用;取ZSL303-mRNA-1适量通过1X的水相溶液稀释成0.15mg/mL的水相mRNA溶液,配置3.8mL。用冰乙酸调节水相溶液pH为5.5。

[0153] (2) 脂质溶液的配制:精密称取四种脂质并分别加入如表1所示的无水乙醇溶解储存备用,制备LNP时按照1:1:1:1的比例吸取、混合均匀即可配置成最终的脂质混合溶液。

[0154] 3、微流控纳米药物制备系统制备ZSL303-mRNA-1-LNP

[0155] (1) 按照水相mRNA溶液:有机相脂质溶液=3:1的比例,12mL/min的流速,5mL的制备体积,初始废液0.3mL,终端废液0.05mL的参数,通过微流控纳米药物制备系统制备ZSL303-mRNA-1-LNP。

[0156] (2) 制备得到的LNP立即用1X的水相溶液20倍稀释,通过超滤离心管进行离心浓缩(离心条件2500g,4℃,10min),弃掉超滤离心管下部溶液,直至超滤管上部体积接近初始制备的LNP体积。此时再补加10倍体积的1X的水相溶液继续超滤离心,以期进一步降低乙醇浓度,最终超滤离心得到的样品即为最终ZSL303-mRNA-1-LNP样品,其体积应接近于初始制备的LNP体积,4℃保存备用。

[0157] 4、检测分析

[0158] 按照步骤1和2制备ZSL303-mRNA-1-LNP样品,一共进行三次制备实验,每隔一周进行一次制备,分别检测其粒度、PDI(分散性系数)、包封率和载药量。

[0159] (1) 检测粒度及PDI。

[0160] 将制得的ZSL303-mRNA-1-LNP样品进行粒度及PDI的检测,其中粒度的检测方法为

将1mL样品放入样品池,相应样品分散在样品池中,通过波长671nm激光照射到样品上,通过APD光电检测器在90°角检测样品颗粒布朗运动造成的散射光强随时间的波动,再通过相关器进行自相关运算得出样品的自相关曲线,结合数学方法就可以得到颗粒的扩散系数,进一步利用Stokes-Einstein方程得到样品的粒度分布结果,即流体力学直径 D_H 及其分布。颗粒分布信息经系统计算得为PDI;经检测,平均粒度为125.5nm,PDI为0.265。

[0161] (2)通过Ribogreen试剂盒进行包封率的测量,并计算载药量。

[0162] 包封率的检测方法为:

[0163] a.通过无菌无酶水将20X的TE buffer稀释制得适量1X TE buffer。例如:10mL 20X TE buffer加190mL无菌无酶水,充分混匀;

[0164] b.制备Triton buffer,例如向100mL的TE buffer中加入2mL的Triton X-100,磁力搅拌15min以混匀;

[0165] c.取96孔黑板,在第一排分别加入15μL样品,以及一孔PBS,并补加1X TE buffer至总体积250μL;

[0166] d.按照图2所示在96孔黑板进行样品添加,其中B、C排中为50μL 1X TE buffer加上50μL A排样品稀释液;D、E排为50μL Triton buffer加上50μL A排样品稀释液;

[0167] e.按照表2配置标曲溶液,并分别加入到96孔黑板中,其中RNA标准品采用ZSL303-mRNA-1母液稀释至20μg/mL作为标曲的RNA储液。

[0168] 表2、标曲溶液的配制

Final RNA μg/mL	RNA Stock Required μL	TE Buffer Required μL	Triton Buffer Required μL	Total Volume per Well μL
2.5	25	25	50	100
1	10	40	50	100
0.5	5	45	50	100
0.25	2.5	47.5	50	100
0.1	1	49	50	100

[0170] f.所有样品孔加入显色液后,于酶标仪上进行荧光检测。根据标曲计算得到包封率结果。

[0171] 随后按照包封率的计算公式(包载的药物与投入总药物的比值)进行计算得到包封率数据。而包载的mRNA量由于涉及到包封率测量时的稀释,所以要乘回相应的稀释倍数。

[0172] 再根据未包载药物(ZSL303-mRNA-1)量和药物(ZSL303-mRNA-1)总量,计算载药量,载药量=(总药物量-(未被有效包封)游离药物量)/体积。

[0173] 经检测和计算,本实施例制备的ZSL303-mRNA-1-LNP样品的平均包封率为95.5%,载药量为102.9μg/mL。

[0174] 三次ZSL303-mRNA-1-LNP制备实验结果比较稳定,粒度性状一致,包封率和载药量稳定。

[0175] 实施例2细胞水平双特异性抗体mRNA蛋白表达

[0176] 本实施例采用实施例1制备的高载药量的ZSL303-mRNA-1-LNP进行293T细胞的表达水平检验。使用EpCAM(Acro Biosystems#EPM-H5254)作为抗原,Anti-His-HRP(Genscript#A00612)作为二抗,使用QELISA方法检测293T表达上清中是否含有表达产物,

检测ZSL303-mRNA-1-LNP在 Lipofectamine®2000Reagent (invitrogen#11668-027;以下简称:Lipo2k) 和 Lipofectamine® MessengerMAX™ Reagent (invitrogen#LMRNA008;以下简称:LipoMAX) 两种转染试剂下的表达情况。实验流程如下:

- [0177] 1、使用HEK 293T(人胚肾细胞), Culture Medium: DMEM+10%FBS;
 [0178] 2、使用24well plate中培养, 细胞密度: 2×10^5 , 种板24小时转染使用;
 [0179] 3、分别采用如表3所示的转染条件进行转染, 转染后抗体表达结果如表3所示:
 [0180] 表3、转染条件

序号	转染试剂	ZSL303-mRNA-1量	mRNA: 转染试剂	转染试剂体积	抗体浓度 ($\mu\text{g/mL}$)		Max OD450 (1:40)	
					24h	36h	24h	36h
1	Lipo2k	2 μg	1:2	4 μl	1.802	2.556	2.151	2.250
2			1:3	6 μl	1.657	2.752	2.057	2.304
3			1:4	8 μl	1.549	1.915	1.980	2.018
4		3 μg	1:2	6 μl	1.583	2.087	2.005	2.090
5			1:3	9 μl	1.628	2.078	2.037	2.086
6			1:4	12 μl	1.467	1.773	1.918	1.952
7	LipoMAX	2 μg	1:2	4 μl	1.748	2.243	2.117	2.148
8			1:3	6 μl	1.612	2.027	2.026	2.066
9			1:4	8 μl	1.477	1.897	1.925	2.010
10		3 μg	1:2	6 μl	1.678	2.261	2.071	2.155
11			1:3	9 μl	1.577	1.968	2.000	2.041
12			1:4	12 μl	1.297	1.507	1.775	1.810
13	空白				0.000102	0.000171	0.0659	0.0558

[0182] 由表3可以看出, 所有转染条件下, ZSL303-mRNA-1均有表达。细胞水平验证了ZSL303-mRNA-1具有良好的表达效果, 且双特异性抗体可分泌至细胞上清。

[0183] 当采用ZSL303-mRNA-1含量为3 μg mRNA: 转染试剂体积为1:4的组别, 表达效果均较全局最低, 其原因应该是转染试剂比例较多, 对同数量下的细胞毒性更大。

[0184] 无论哪种转染试剂, 当采用ZSL303-mRNA-1含量为2 μg , mRNA: 转染试剂体积为1:2的组别, 表达效果均较全局最高, 推测4 μl 转染试剂已经能饱和2 μg 左右的mRNA, 所以转染效果较好, 效率较高。因此优选采用使用ZSL303-mRNA-1含量为2 μg , 且mRNA: 转染试剂的比值在1:2, 转染试剂体积为4 μl , 转染后能产生较高的表达量。

[0185] 比较Lipo2k和LipoMAX两种转染试剂分别在24h和36h的表达结果见图3和表4。

[0186] 表4 ELISA检测ZSL303-mRNA-1在细胞上清中的表达结果

条件	双特异性抗体 (ng/mL)	OD450
Lipo2k 24h	1805	2.151
Lipo2k 36h	2556	2.25
LipoMAX 24h	1748	2.117
LipoMAX 36h	2243	2.148

[0188] 由图3和表4可以看出, 使用不同的转染试剂并且在不同时间点收集上清, 经由ELISA对其上清定量后, 发现使用36h时表达的抗体浓度最高, 采用Lipo2K转染试剂来进行转染的样品, 其表达量最高。

[0189] 实施例3 ZSL303-mRNA-1-LNP在小鼠血浆中的表达

[0190] 本实施例采用QELISA法测定实施例1提供的ZSL303-mRNA-1-LNP在小鼠血浆中的表达水平。使用EpCAM作为抗原, Anti-His-HRP作为二抗, 检测在不同时间条件下提取的小鼠血浆中的药物的表达积累情况, 根据表达积累量来推测较好的组合条件。具体的实验过

程如下:

[0191] 1、样本收集:Day 15给药 (ZSL303-mRNA-1-LNP, 5 μ g/mouse) 后1h、6h、12h、24h、48h、72h时间点,动物经剪尾采血,采血量约40 μ L/mouse, EDTA-K₂抗凝,冰上放置。抗凝全血于2-8 $^{\circ}$ C, 8000rpm离心10min,收集上层血浆20 μ L, -80 $^{\circ}$ C保存;2、使用抗原包被试剂 (Sangon Biotech#BBI E661004-0100) 和96孔ThermoFisher NUNC ELISA检测板,以0.5 μ g/mL的浓度包被抗原EpCAM (Acro Biosystems#EPM-H5254), 于4 $^{\circ}$ C冰箱中放置12小时;3、取出上述包被完成的ELISA板,使用1xPBST (含0.5%Tween20) 溶液,洗板1次;4、封闭上述ELISA板,使用已经平衡至室温的封闭液 (含2%BSA (Vetec V900933-100G) 的PBS溶液), 每孔添加200 μ L,完成后使用封板膜 (Sangon Biotech#BBI F600418-0001) 将所有板孔覆盖,并置于室温中孵育1小时;5、使用上述封闭液稀释各个时间点取得的小鼠血浆,置于96孔稀释板中 (Beyotime#FPT021);6、使用上述封闭液稀释CD3xEpCAM双特异性抗体,置于上述96孔稀释板中;7、取出上述封闭完成的ELISA板,使用上述1xPBST溶液,洗板3次;8、加入上述步骤5和步骤6中已经稀释好的小鼠血浆和阳性参照物,每孔添加100 μ L,完成后使用上述封板膜将所有板孔覆盖,并置于室温中孵育2小时;9、使用上述封闭液,以1:2500的比例,稀释该实施例中的二抗 (THETM His Tag Antibody [HRP], mAb, Mouse, Genscript-A00612);10、取出上述孵育2小时后的ELISA板,使用上述1xPBST溶液,洗板3次;11、加入上述步骤8中已经稀释好的二抗溶液,每孔添加100 μ L,完成后使用上述封板膜将所有板孔覆盖,并置于室温中孵育1小时;12、取出上述孵育1小时后的ELISA板,使用上述1xPBST溶液,洗板6次;13、在上述ELISA板中,加入已经平衡至室温的TMB单组分显色液 (Solarbio#PR1200), 每孔添加100 μ L,完成后,在室温下置于黑暗环境中孵育8分钟;14、终止上述反应,使用ELISA反应终止液 (Sangon Biotech#BBI E661006-0200), 每孔添加100 μ L;15、立刻使用酶标仪 (Molecular Devices SpectraMax[®] iD3), 在软件 (Molecular Devices SoftMax Pro 7.1) 中读取其在波长450nm激发光下的OD值;16、使用软件 (GraphPad Software Prism 8) 记录并分析所得的OD值,并作图 (见图4)。

[0192] 由图4可以看出,在12小时,24小时,48小时时,小鼠血浆中的双特异性抗体CD3 $\times$ EpCAM的浓度逐渐达到或越过高峰,其中48小时达到最高峰约150ng/mL,并随时间延长再逐步降低。

[0193] 实施例4不同缓冲液pH对制备ZSL303-mRNA-1-LNP的影响

[0194] 按照实施例1提供的方法配制水相溶液及脂质混合溶液,其中的水相溶液配制中:分别精密称取氨基丁三醇、三(羟甲基)氨基甲烷盐酸盐、三水乙酸钠三种盐及冰乙酸并用DEPC水溶解后备用,使用时再通过DEPC水稀释至1X的溶液使用。稀释后的水相溶液经pH计检测pH为7.4,随后再通过冰乙酸调节pH配置出pH4.0和pH5.5的水相溶液。

[0195] 取ZSL303-mRNA-1母液5 μ L于超微量分光光度计Nanodrop进行浓度测量,结果为2186 μ g/mL,与购买时标量值基本无差。按此浓度进行后续mRNA的稀释配制。分别用不同pH的水相溶液稀释至200 μ g/mL的浓度。详细配置方案如表5所示。

[0196] 表5、不同缓冲液pH的配置方案

	pH 4	pH 5.5	pH 7.4
[0197]	0.07 mL mRNA 母液+0.7 mL pH4 水相 buffer	0.07 mL mRNA 母液+0.7mL pH5.5 水相 buffer	0.07mL mRNA 母液+0.7mL pH7.4 水相 buffer

[0198] 实验结果及分析：制备得到的ZSL303-mRNA-1-LNP相关粒度、PDI、包封率、载药量，结果汇总如表7所示。粒度、PDI、包封率、载药量按照实施例1提供的方法进行检测。检测结果如表6所示。

[0199] 表6、不同缓冲液pH对制备ZSL303-mRNA-1-LNP的影响

[0200]	缓冲液 pH	pH 4.0 buffer for mRNA-LNP	pH 5.5 buffer for mRNA-LNP	pH 7.4 buffer for mRNA-LNP
	粒度(nm)	97.27	125.5	133.4
	PDI	0.214	0.265	0.349
	包封率(%)	95.8	95.5	32.1
	载药量($\mu\text{g/mL}$)	85.5	102.9	36.1

[0201] 由表6可以看出，采用不同pH的mRNA水相溶液制备得到的ZSL303-mRNA-1-LNP粒度结果差别较大，包封率完全不同，pH为4.0时包封率和pH5.5时包封率差别不大，但是测得pH5.5下总mRNA载药量特别高($102.9\mu\text{g/mL}$)，稳定性更好，用量更少，毒副作用更小，治疗效果更好，更适于微针给药。

[0202] 可见维持水相溶液合适的pH值，也能显著提升用于微针皮内注射的编码双特异性抗体mRNA的载药量，若将pH调至4~6等偏酸性范围内，能使脂质体中负载的双特异性抗体mRNA含量显著提升，并在特定pH条件下，即pH5.5时达到最优。其原因可能是，在制备时，在偏酸环境可以使得可电离阳离子脂质带正电荷，同等条件下可以吸附更多核酸分子(如mRNA等，本身带负电荷)，且这种最优是在水相制备溶液为pH5.5时体现，相比于pH7.4或pH4等条件下的缓冲液，pH5.5时可以更加紧密包裹核酸分子，达成相对稳定的可用制剂，因此载药量更高。

[0203] 实施例5脂质溶液中的脂质含量对制备ZSL303-mRNA-1-LNP的影响

[0204] 本实施例按照实施例1提供的方法配制配置水相溶液及脂质混合溶液从而制备ZSL303-mRNA-1-LNP，其中此次脂质溶液母液的配制分别按照表7和表8两种方式进行：

[0205] 表7、低脂质含量的微针注射试剂配方

[0206]	4X 的水相溶液		脂质溶液母液		
	样品名称	称样量	样品名称	称样量	无水乙醇加入量
	氨基丁三醇	99.20 mg	SM-102	106.024 mg	6 mL
	三(羟甲基)氨基甲烷盐酸盐	377.60 mg	胆固醇	44.448 mg	6 mL
	冰乙酸	13.76 mg	DSPC	23.577 mg	6 mL
	三水乙酸钠	64.00 mg	DMG-PEG ₂₀₀₀	11.231 mg	6 mL
	DEPC 水	40 mL	NA	NA	NA

[0207] 表8、高脂质含量的微针注射试剂配方

[0208]	4X 的水相溶液		脂质溶液母液		
	样品名称	称样量	样品名称	称样量	无水乙醇加入量
	氨基丁三醇	99.20 mg	SM-102	141.36 mg	4 mL
	三(羟甲基)氨基甲烷盐酸盐	377.60 mg	胆固醇	59.26 mg	4 mL
	冰乙酸	13.76 mg	DSPC	31.44 mg	4 mL
	三水乙酸钠	64.00 mg	DMG-PEG ₂₀₀₀	14.97 mg	4 mL
	DEPC 水	40 mL	NA	NA	NA

[0209] 制备得到的不同脂质含量的ZSL303-mRNA-1-LNP的分别检测粒度、PDI、包封率、载药量,考察不同脂质含量对制备ZSL303-mRNA-1-LNP的影响。粒度、PDI、包封率、载药量按照实施例1提供的方法进行检测。检测结果如表9所示。

[0210] 表9、不同脂质含量对制备ZSL303-mRNA-1-LNP的影响

[0211]	脂质含量	低脂质组颗粒	高脂质组颗粒
	粒度 (nm)	162.4	139.7
	PDI	0.216	0.303
	包封率 %	91.8	88.0
	载药量 (μg/mL)	45.9	96.1

[0212] 由表9可见,当提高脂质溶液中的脂质含量时,能显著提升ZSL303-mRNA-1-LNP的载药量,用量更少,毒副作用更小,治疗效果更好,同时稳定性也非常好,更适于微针给药。

[0213] 实施例6免疫重建动物模型中的抑瘤效果

[0214] 本实施例使用人结肠癌HCT-15细胞PBMC人源化小鼠异种移植瘤模型,对受试物单独给药(实施例1制备的ZSL303-mRNA-1-LNP)的抗肿瘤活性进行评价。本实施例共接种16只动物,分组用12只,分组后立即给药,每周1次微针给药,连续给药3次,共分两组,其中第一组为三次微针注射PBS(空白对照),第二组为三次微针给药(MN,QW×3)。给药组最后一次给药后(Day 15)进行PK取样,Day23处死所有动物,取瘤称重并拍照记录后结束实验。

[0215] 实验动物:种属及品系:NOG小鼠;性别及周龄:雌性,8-10周龄;体重:18-20g,偏差约为体重均值的±20%;接种动物数:16只;入组动物数:12只;动物来源:北京维通利华实验动物技术有限公司,生产许可证号:SCXK(京)2021-0006,动物合格证:110011220100517757。

[0216] 细胞株:人结肠癌细胞株HCT-15购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。

[0217] 培养基:RPMI-1640培养基,DMEM培养基和胎牛血清(FBS)均购自GIBCO公司(Grand Island,NY,USA),基质胶(Matrigel)购自CORNING公司(Corning,NY,USA)。

[0218] hPBMC购自浙江迈顺生物科技有限公司,Source ID:DZ20976, Lot#:A10Z976076。

[0219] 模型建立:HCT-15细胞培养于含10%FBS的RPMI-1640培养基,维持在5%CO₂的37℃饱和湿度培养箱中。收集对数生长期HCT-15细胞,重悬于含50%Matrigel的RPMI-1640基础培养基中,调整细胞浓度至 2×10^7 /mL。在无菌条件下,接种0.1mL细胞悬液至小鼠右侧背部皮下,接种浓度为 2×10^6 /0.1mL/mouse。

[0220] 肿瘤细胞接种后2天,复苏液氮冻存的hPBMC,培养于含10%HIFBS(FBS,56℃×30min)的DMEM培养基中,在含5%CO₂的37℃培养箱中孵育6h。收集孵育后hPBMC,重悬于PBS

缓冲液中,调整细胞浓度至 $2.5 \times 10^7/\text{mL}$ 。在无菌条件下,腹腔注射0.2mL细胞悬液至小鼠体内,注射浓度为 $5 \times 10^6/0.2\text{mL/mouse}$ 。

[0221] 分组及给药:在平均肿瘤体积达到 $100\text{--}120\text{mm}^3$ 时,将动物按肿瘤体积随机分组,使各组肿瘤体积差异小于均值的10%。

[0222] 分组当日记为Day 0,并按照动物体重开始给药。给药期间,个别动物体重与Day 0相比下降超过15% ($\text{BWL} \geq 15\%$),将做停药处理,直至动物体重恢复后 ($\text{BWL} < 15\%$),恢复给药。

[0223] 称量及观察:实验期间每周2次测定动物体重和肿瘤体积。肿瘤长、宽通过数显卡尺进行测量,肿瘤体积通过长、宽测量值进行估算。

[0224] 实验期间每日1次观察记录动物临床症状,记录动物死亡时间。临床观察包括动物总体健康状况,体重异常,行为异常,以及其他给药相关不良反应。

[0225] 样本收集:Day 15给药后1h、6h、12h、24h、48h、72h时间点,动物经剪尾采血,采血量约为 $40\mu\text{L/mouse}$,EDTA- K_2 抗凝,冰上放置。抗凝全血于 $2\text{--}8^\circ\text{C}$,8000rpm离心10min,收集上层血浆 $20\mu\text{L}$, -80°C 保存。

[0226] 实验终点说明:根据动物福利相关规定,实验期间如果个别实验动物符合以下任一条件,该动物将从实验组中移除并施以安乐死:1、动物体重与Day 0相比下降超过20% ($\text{BWL} \geq 20\%$);2、动物出现严重不良反应,如失明、瘫痪等;3、肿瘤体积大于 2000mm^3 ;4、肿瘤表面形成开放式溃疡。

[0227] 个别动物到达动物福利终点,进行最后一次称量后施以 CO_2 安乐死。同组中的剩余动物继续给药观察,直至到达动物福利终点或实验终点。

[0228] 实验周期定为23天,实验终点最后一次称量结束后,用 CO_2 安乐死处死剩余动物,取瘤称重并拍照记录后结束实验。

[0229] 评价指标:肿瘤体积(Tumor Volume,TV)计算公式为: $1/2 \times a \times b^2$,其中a、b分别为肿瘤测量的长和宽;肿瘤生长抑制率($\% \text{TGI}_{\text{TV}}$)计算公式为: $(1 - \text{TV}_\text{T}/\text{TV}_\text{C}) \times 100\%$, TV_C 为阴性对照组平均肿瘤体积, TV_T 为治疗组平均肿瘤体积;相对肿瘤体积(Relative Tumor Volume,RTV)计算公式为: V_t/V_0 ,其中 V_0 为分组时的肿瘤体积, V_t 为每一次测量时的肿瘤体积;相对肿瘤增值率($\% \text{T}/\text{C}_{\text{RTV}}$)计算公式为: $\text{T}_{\text{RTV}}/\text{C}_{\text{RTV}} \times 100\%$,其中 T_{RTV} 为治疗组RTV, C_{RTV} 为阴性对照组RTV;抑瘤率($\% \text{TGI}_{\text{TW}}$)计算公式为: $\% \text{TGI}_{\text{TW}} = (1 - \text{TW}_\text{T}/\text{TW}_\text{C}) \times 100\%$, TW_C 为阴性对照组平均肿瘤重量, TW_T 为治疗组平均肿瘤重量;动物体重变化率($\% \text{BWC}$)计算公式为: $(\text{BW}_\text{t} - \text{BW}_0)/\text{BW}_0 \times 100\%$,其中 BW_t 为每次测量时动物体重, BW_0 为分组时动物体重。

[0230] 统计分析:本研究中,实验数据均以 $\text{Mean} \pm \text{SEM}$ 表示。以时间点为X轴,肿瘤体积(mm^3)为Y轴绘制肿瘤生长曲线;以时间点为X轴,动物体重(g)为Y轴绘制动物体重变化曲线。组间比较采用双尾t-检验, $P < 0.05$ 为显著性差异, $P < 0.01$ 为极显著差异(Microsoft Excel 2007,Redmond,WA,USA)。

[0231] 实验方案:ZSL303-mRNA-1-LNP给药动物实验方案如图5所示,先收集对数生长期HCT-15细胞,在小鼠右侧背部皮下接种肿瘤细胞,实际接种 $2 \times 10^6/0.1\text{mL/mouse}$ 。肿瘤细胞接种后2天,腹腔注射0.2mL hPBMC细胞悬液至小鼠体内,注射浓度为 $5 \times 10^6/0.2\text{mL/mouse}$ 。本实施例共接种16只动物,分组用12只,分组后立即给药,Test Article 1(即CD3×EpCAM-mRNA双特异性抗体组)为每周1次微针给药,连续给药3次(MN,QW×3)。Test Article 1给药

组最后一次给药后 (Day 15) 采血取样用来检测血浆中的双特异性抗体药物浓度, Day 23 处死所有动物, 取瘤称重并拍照记录后结束实验。

[0232] 抗肿瘤活性评价:

[0233] 本实施例利用免疫缺陷小鼠PBMC重建模型来检测CD3×EpCAM-mRNA-LNP在动物水平的抑瘤效果, 具体结果如图6~10, 其中, 两组方式给药后对PBMC人源化小鼠中HCT-15异种移植瘤肿瘤体积变化曲线如图6所示, 三次微针给药的抑瘤效果见图7; 小鼠肿瘤实体成像结果见图8; 两组方式给药后23天小鼠肿瘤重量对比见图9; 给药三次之后小鼠血清中双特异性抗体的浓度检测结果见图10。

[0234] 通过实验结果发现LNP结合微针注射的方式, 每周给药一次, 共三次给药, 在Day9前即给药一次时, 出现微弱的抑瘤效果, 但是在第二次给药之后明显的抑制肿瘤生长, 且肿瘤不再生长, 第三次给药之后抑瘤效显著, TGI (Tumor Growth Inhibition, 肿瘤生长抑制) 高达80%; 在实验终点Day23时取瘤拍照称重, 与图6的数据完全吻合。同时, 我们在Day15时开始收集小鼠血清, 检测双特异性抗体在小鼠血清中的浓度 (图10), 在给药两次后直至Day15, 小鼠血清中的双特异性抗体浓度约为50ng/mL, 在12h至48h之间, 抗体浓度平均维持在142ng/mL, 48h之后开始微降, 但也维持在大约100ng/mL, 这一结果表示我们制备的LNP结合微针的注射方式维持较长时间的血药浓度, 进而发挥显著的抑瘤效果。

[0235] 本实施例进一步验证了本发明提供的经皮注射试剂结合微针递送mRNA药物平台的有效性, 我们合成的双特异性抗体mRNA不仅在细胞水平证实了我们合成的mRNA具有良好的表达性能, 而且在动物水平也展现出显著的抑瘤效果。接下来, 我们将进一步验证我们项目的可行性, 是否优于体外表达纯化的双特异性抗体的药效, 如果这两点均可以得到证实验证, 那么我们将为体外表达纯化困难产量低但效果显著的双特异性抗体药物提供一种有效的解决方案。

[0236] 虽然本发明披露如上, 但本发明并非限定于此。任何本领域技术人员, 在不脱离本发明的精神和范围内, 均可作各种更动与修改, 因此本发明的保护范围应当以权利要求所限定的范围为准。

序列表

SEQ ID NO: 1

ZSL303-mRNA-1:

[0237] TCTCAACACAACATATACAAAACAAACGAATCTCAAGCAATCAAGCATTCTACTTCTATTGCAGCA
ATTTAAATCATTTCTTTTAAAGCAAAAGCAATTTCTGAAAATTTTCACCATTTACGAACGATAGCAT
GGGCTGGTCCTGCATCATCTTGTTCTTGGTGGCTACTGCCACTGGAGTACACAGCGAGATTGTCCTT
ACACAGTCACCAGGCACCCTTTCCTTGTCTCCTGGGGAACGAGCCACCCTCAGTTGTTCGGTCAAG
CAAGAATCTGCTGCATTCCAATGGGATCACATACCTGTATTGGTACCAGCAGAAGCCTGGACAGGC
ACCCAGACTGCTCATCTACCAGATGTCCAATCTGGCCTCAGGCATTCTGACAGGTTTTCCGGCAG
CGGTCTGGCACCGATTTACCCTGACCATATCCAGGCTCGAACCAGAGGATTTGCCGTGTATTA
CTGCGCACAGAATCTGGAGATTCCCCGCACTTTGGCCAAGGGACTAACTGGAGATCAAGCGGG
GAGGAGGCGGCTCTGGAGGTGGCGGCAGTGGTGGAGGCGGTCTGGCGGTGGCGGATCTGGAGG

[0238]

TGGTGGGAGCCAGGTCCAGCTTGTTTCAGTCAGGCGCAGAGGTGAAGAAACCCGGAGCTAGCGTG
AAAGTCTCCTGCAAAGCGTCAGGGTACACCTTCACCAACTATGGGATGAACTGGGTACGTCAAGC
CCCAGGGCAAAGACTCGAATGGATGGGTTGGATCAACACGTACACAGGGGAACCGACTTATGGCG
AGGACTTCAAGGGGAGAGTGACCATAACACTGGACACATCCGCTAGCACAGCGTATATGGAGCTG
AGCAGTCTGAGGAGCGAAGATACGGCTGTTTACTATTGTGCCCCGCTTTGGTAACTACGTGGACTAT
TGGGGTCAGGGAACTCTGGTGACGGTTTCTAGCAGTGGCGGCGGAGGATCCCAGGTGCAGCTGCA
GCAGTCTGGCGCTGAGCTGGCTAGACCTGGCGCCTCCGTGAAGATGTCTGCAAGACCTCCGGCT
ACACCTTCACCCGGTACACCATGCACTGGGTCAAGCAGAGGCCTGGACAGGGCCTGGAATGGATC
GGCTACATCAACCCCTCCCGGGGCTACACCAACTACAACCAGAAGTTCAAGGACAAGGCCACCCCT
GACAACCGACAAGTCCTCCTCCACCGCCTACATGCAGCTGTCTCCTGACCTCCGAGGACTCCG
CCGTGTACTACTGCGCCCGGTACTACGACGACCACTACTCCCTGGACTACTGGGGCCAGGGCACC
ACACTGACAGTGTCTAGCGGAGGCGGAGGATCTGGTGGTGGCGGATCTGGCGGCGGTGGAAGTG
GCGGAGGTGGTAGCCAGATCGTGCTGACCCAGTCTCCCGCCATCATGTCTGCTAGCCCTGGCGAG
AAAGTGACAATGACCTGCCGGGCCTCCTCCTCCGTGTCCTACATGAACTGGTATCAGCAGAAAGTCC
GGCACCTCCCCAAGCGGTGGATCTACGACACCTCCAAGGTGGCCTCTGGCGTGCCCTACAGATT
CTCCGGCTCTGGCTCTGGCACCTCCTACAGCCTGACCATCTCCAGCATGGAAGCCGAGGATGCCGC
CACCTACTACTGCCAGCAGTGGTCCTCCAACCCCTGACCTTTGGCGCTGGCACCAAGCTGGAAC
TGAAGGGCGGCTCTCACCACCACCATCACCACTGATGAGCTGCAGAATTCGTGACGGATCCGAT
CTGGTACTGCATGCACGCAATGCTAGCTGCCCCCTTTCCCGTCTCTGGGTACCCCGAGTCTCCCCCGA
CCTCGGGTCCCAGGTATGCTCCACCTCCACCTGCCCCACTCACCACTCTGCTAGTTCCAGACAC
CTCCCAAGCACGCAGCAATGCAGCTCAAAACGCTTAGCCTAGCCACACCCCCACGGGAAACAGC
AGTGATTAACCTTTAGCAATAAACGAAAGTTAACTAAGCTATACTAACCCAGGGTTGGTCAATTT
CGTGCCAGCCACACCTCGAGCTAGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCATATG
ACTAAA
AAAAAAAAAAAA

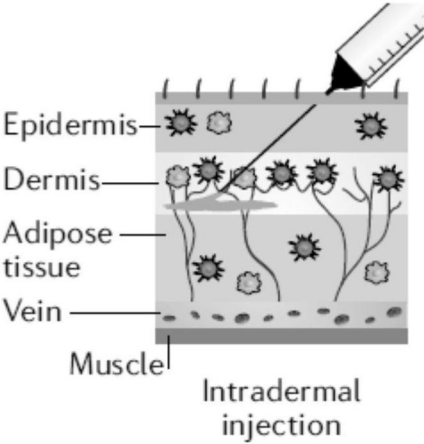


图1

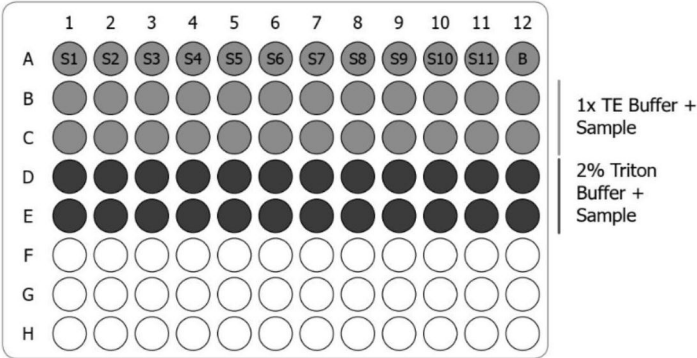


图2

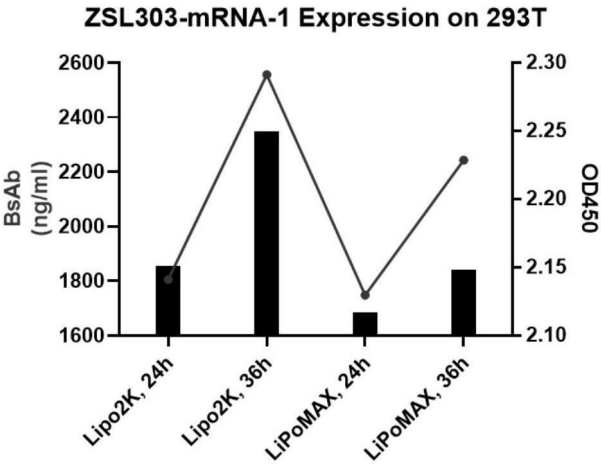


图3

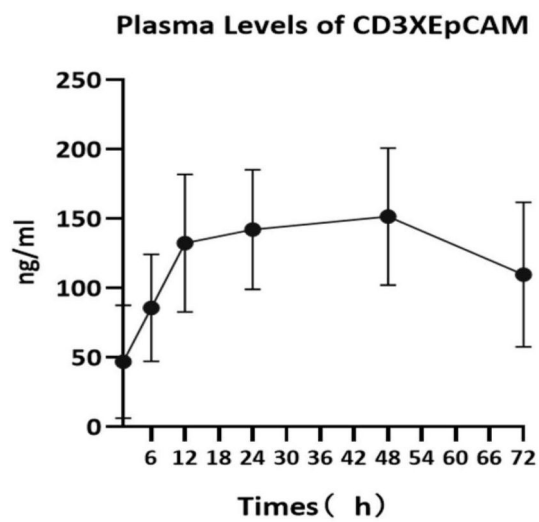


图4

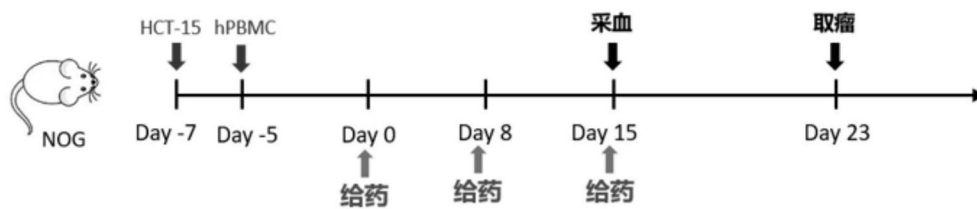


图5

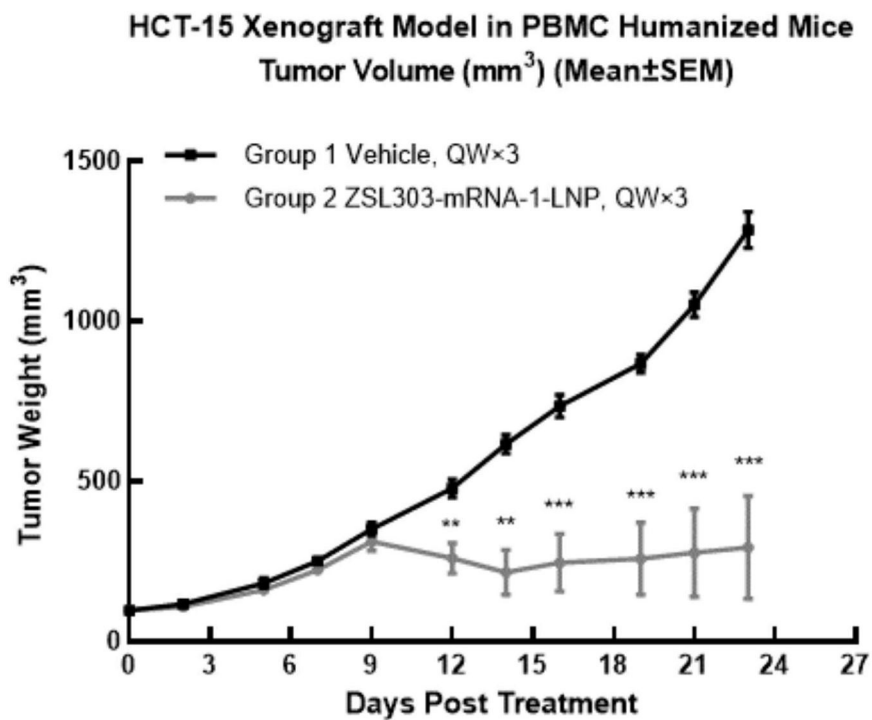


图6

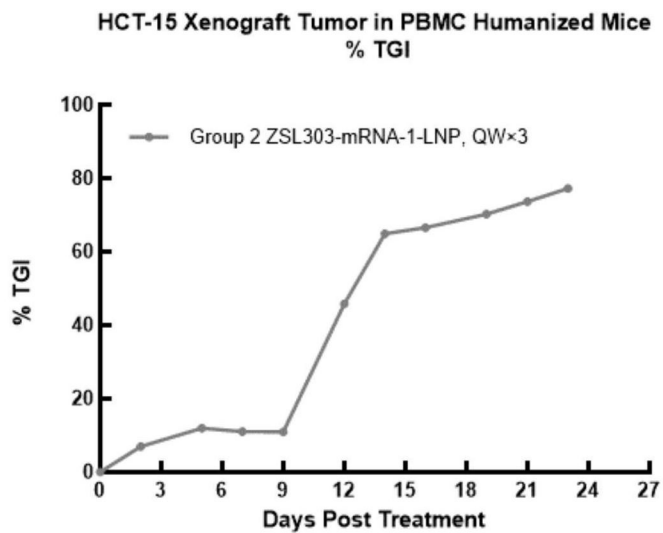


图7

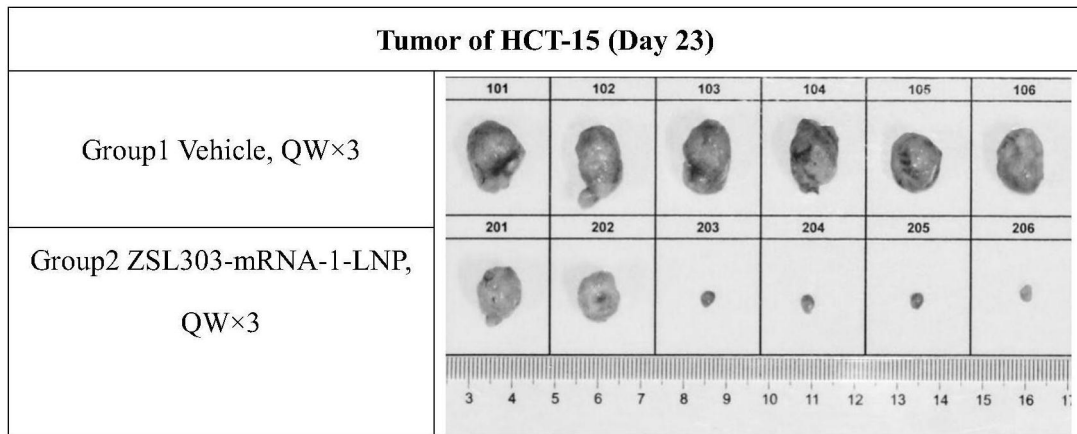


图8

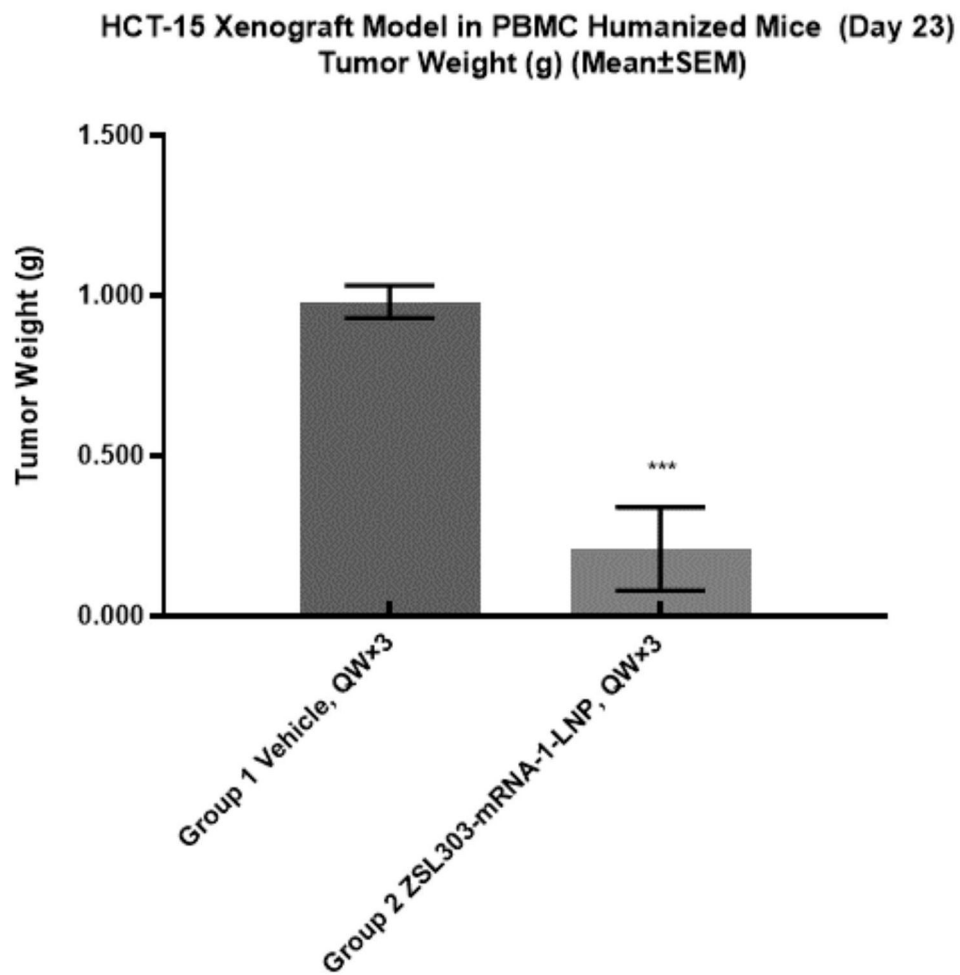


图9

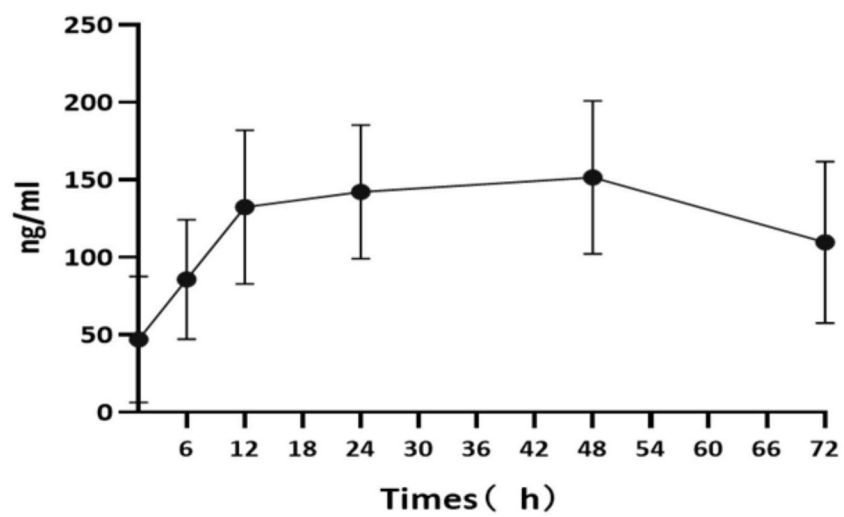


图10