



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101702882 A

(43) 申请公布日 2010.05.05

(21) 申请号 200880017151.0

代理人 梁谋 黄可峻

(22) 申请日 2008.03.20

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

A61K 38/385(2006.01)

60/896,412 2007.03.22 US

60/911,549 2007.04.13 US

60/948,512 2007.07.09 US

60/983,799 2007.10.30 US

12/049,957 2008.03.17 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2009.11.23

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2008/057678 2008.03.20

(87) PCT申请的公布数据

W02008/116078 EN 2008.09.25

(71) 申请人 PDS 生物科技公司

地址 美国印地安那州

(72) 发明人 陈薇旭 晏为力 黄力夫 G·康

F·贝杜-阿多 K·托尼

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

权利要求书 3 页 说明书 35 页 附图 29 页

(54) 发明名称

利用阳离子脂质刺激免疫应答

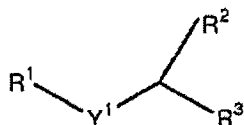
(57) 摘要

本发明提供单独使用阳离子脂质或与抗原组合使用阳离子脂质以刺激免疫应答的组合物和方法。

1. 一种组合物,所述组合物包含一定剂量的至少一种阳离子脂质,所述剂量足以活化患者免疫系统细胞中的丝裂原活化蛋白(“MAP”)激酶信号转导途径并在患者中诱导免疫应答。

2. 权利要求 1 的组合物,其中所述阳离子脂质通过刺激胞外信号调节激酶(“ERK”)1、ERK 2 和 p38 中的至少一种活化 MAP 激酶信号转导途径。

3. 权利要求 1 的组合物,其中所述阳离子脂质包括具有由下式代表的结构的非甾族阳离子脂质:



其中 R¹ 为季铵基团, Y¹ 为选自烃链、酯、酮和肽的间隔基, R² 和 R³ 独立选自饱和脂肪酸、不饱和脂肪酸、酯连接的烃、磷 - 二酯及其组合。

4. 权利要求 3 的组合物,其中所述阳离子脂质选自 DOTAP、DOTMA、DOEPC 及其组合。

5. 权利要求 1 的组合物,所述组合物进一步包含至少一种抗原,以形成阳离子脂质 / 抗原复合物,其中所述阳离子脂质 / 抗原复合物刺激抗原特异性免疫应答。

6. 权利要求 5 的组合物,其中所述阳离子脂质通过刺激 ERK 1、ERK 2 和 p38 中的至少一种活化 MAP 激酶信号转导途径。

7. 权利要求 5 的组合物,其中至少一种抗原选自肿瘤相关抗原、病毒抗原、微生物抗原及其组合。

8. 权利要求 5 的组合物,其中所述至少一种抗原包括脂化抗原或被修饰以增加其疏水性的抗原,所述被修饰的抗原可以在抗原和连接的疏水基团之间包含接头序列。

9. 权利要求 8 的组合物,其中所述至少一种抗原选自脂蛋白、脂肽、用疏水性增强的氨基酸序列修饰的蛋白或肽及其组合。

10. 权利要求 5 的组合物,所述组合物进一步包含结合所述至少一种抗原的氨基酸序列,其中所产生的抗原氨基酸序列在得到所述抗原的亲本蛋白中不存在。

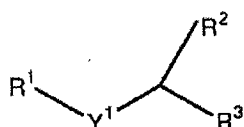
11. 权利要求 5 的组合物,所述组合物进一步包含结合至少一种抗原的氨基酸序列,其中所述氨基酸序列为共价结合的赖氨酸 - 丝氨酸 - 丝氨酸。

12. 权利要求 5 的组合物,其中所述至少一种抗原包括被操作以增加抗原上的负电荷的抗原。

13. 一种诱导患者免疫应答的方法,所述方法包括给予患者一定剂量的至少一种阳离子脂质,所述剂量足以诱导患者免疫系统细胞中的 MAP 激酶信号转导途径活化。

14. 权利要求 13 的方法,其中所述阳离子脂质通过刺激 ERK 1、ERK 2 和 p38 中的至少一种活化 MAP 激酶信号转导途径。

15. 权利要求 13 的方法,其中所述阳离子脂质包括具有由下式代表的结构的非甾族阳离子脂质:



其中 R¹ 为季铵基团, Y¹ 选自烃链、酯、酮和肽, R² 和 R³ 独立选自饱和脂肪酸、不饱和脂

肪酸、酯连接的烃、磷 - 二酯及其组合。

16. 权利要求 15 的方法,其中所述阳离子脂质选自 DOTAP、DOTMA、DOEPC 及其组合。

17. 权利要求 13 的方法,所述方法进一步包括使至少一种抗原与阳离子脂质复合,以形成阳离子脂质 / 抗原复合物,其中所述阳离子脂质 / 抗原复合物刺激抗原特异性免疫应答。

18. 权利要求 17 的方法,其中所述阳离子脂质通过刺激 ERK 1、ERK 2 和 p38 中的至少一种活化 MAP 激酶信号转导途径。

19. 权利要求 17 的方法,其中所述至少一种抗原选自肿瘤相关抗原、病毒抗原、微生物抗原及其组合。

20. 权利要求 17 的方法,其中所述至少一种抗原包括脂化抗原或被修饰以增加其疏水性的抗原,所述被修饰的抗原可以在抗原和连接的疏水基团之间包含接头序列。

21. 权利要求 20 的方法,其中所述至少一种抗原选自脂蛋白、脂肽、用疏水性增强的氨基酸序列修饰的蛋白或肽及其组合。

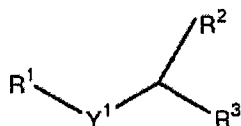
22. 权利要求 17 的方法,所述方法进一步包括使一种氨基酸序列结合所述至少一种抗原,其中所产生的抗原氨基酸序列在得到所述抗原的亲本蛋白中不存在。

23. 权利要求 17 的方法,所述方法进一步包括使一种氨基酸序列结合所述至少一种抗原,其中所述氨基酸序列为共价结合的赖氨酸 - 丝氨酸 - 丝氨酸。

24. 权利要求 17 的方法,所述方法进一步包括操作所述至少一种抗原,以增加所述至少一种抗原上的负电荷。

25. 一种组合物,其包含一定剂量的至少一种阳离子脂质,所述剂量足以诱导患者的免疫系统的细胞产生活性氧物质 (“ROS”),其中所诱导的 ROS 水平足以提高免疫应答水平,超过没有所述至少一种阳离子脂质时的免疫应答水平。

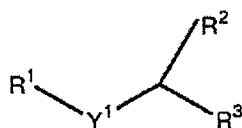
26. 权利要求 25 的组合物,其中所述至少一种阳离子脂质包括具有由下式代表的结构的非甾族阳离子脂质:



其中 R^1 为季铵基团, Y^1 选自烃链、酯、酮和肽, R^2 和 R^3 独立选自饱和脂肪酸、不饱和脂肪酸、酯连接的烃、磷 - 二酯及其组合。

27. 一种在患者中诱导足以刺激免疫应答的 ROS 的方法,所述方法包括给予患者一定剂量的至少一种阳离子脂质,所述剂量足以诱导患者的免疫系统的细胞产生活性氧物质 (“ROS”),其中所诱导的 ROS 水平足以提高免疫应答水平,超过没有所述至少一种阳离子脂质时的免疫应答水平。

28. 权利要求 27 的方法,其中所述至少一种阳离子脂质包括具有由下式代表的结构的非甾族阳离子脂质:



其中 R^1 为季铵基团, Y^1 选自烃链、酯、酮和肽, R^2 和 R^3 独立选自饱和脂肪酸、不饱和脂

肪酸、酯连接的烃、磷 - 二酯及其组合。

利用阳离子脂质刺激免疫应答

发明领域

[0001] 一般地讲,本发明涉及刺激免疫应答,更具体地说,涉及脂质在免疫应答中的作用。

相关申请的交叉参考

[0002] 本申请要求保护由 Weishu Chen、Weili Yan、KenyaToney、Gregory Conn、Frank Bedu-Addo 和 Leaf Huang 于 2008 年 3 月 17 日申请的题为“Stimulation of an Immune Response by Cationic Lipids(利用阳离子脂质刺激免疫应答)”的美国申请号 12/049,957 的权益,所述申请要求保护以下每一个的权益:由 Leaf Huang 于 2007 年 3 月 22 日申请的题为“Cationic-Lipid Based Immune Stimulant for Treatment of Disease(用于治疗疾病的基于阳离子脂质的免疫刺激剂)”的美国临时申请号 60/896,412;由 Leaf Huang 和 Weishu Chen 于 2007 年 4 月 13 日申请的题为“Cationic-Lipid Based Dual Function Delivery System and Immune Stimulant for Treatment of Disease(用于治疗疾病的基于阳离子脂质的双功能传递系统和免疫刺激剂)”的美国临时申请号 60/911,549;由 Leaf Huang、Weishu Chen 和 Weili Yan 于 2007 年 7 月 9 日申请的题为“Cationic-Lipid Based Dual Function Delivery System and Immune Stimulant for Treatment of Disease(用于治疗疾病的基于阳离子脂质的双功能传递系统和免疫刺激剂)”的美国临时申请号 60/948,512;以及由 Weishu Chen 和 Leaf Huang 于 2007 年 10 月 30 日申请的题为“Induction of Immune Responses by a Liposomal Peptide Formulation(利用脂质体肽制剂诱导免疫应答)”的美国临时申请号 60/983,799,这些临时申请的公开内容整体通过引用结合到本文中。

发明背景

[0003] 本章节意在给读者介绍本领域的多个方面,这些方面可能涉及在下文描述和/或要求保护的本发明的多个方面。相信本部分论述有助于给读者提供背景信息,以利于更好地理解本发明的多个方面。因此,应当理解,在本指引下理解这些陈述,而不作为对先有技术的承认。

[0004] 开发安全有效的人用免疫疗法对全世界的患者仍是一项迫切的医学需要。为了激发合适的免疫应答,可以在疫苗设计或免疫疗法中使用增强、引导或促进免疫应答的免疫调节剂 [Gregoriadis, G., Immunological adjuvants :a role for liposomes. Immunol Today 11 :89(1990)]。例如,疫苗可以包括抗原,以刺激免疫应答。然而,某些潜在的包含抗原的疫苗是免疫应答的弱刺激剂,因为所述疫苗不能有效地将该抗原递送至免疫系统的抗原提呈细胞 (“APC”) 和/或该抗原是弱免疫原性的。因此,需要将抗原有效递送至 APC 且还刺激免疫系统应答抗原的免疫疗法。免疫调节剂有潜力用作这样的免疫疗法。这样的免疫疗法可以具有这些和其它益处。例如,当免疫调节剂作为治疗性疫苗的组成部分时,其应当至少 (1) 改善 APC 中的抗原递送和/或加工 [Wang, R. F. 和 Wang, H. Y. Enhancement

of antitumor immunity byprolonging antigen presentation on dendritic cells. *Nat Biotechnol* 20 :149(2002)], (2) 诱导产生免疫调节性细胞因子,其有利于发展针对疫苗抗原的免疫应答,由此促进细胞介导的免疫性,包括细胞毒性 T- 淋巴细胞 (“CTL”), (3) 减少免疫次数或有效疫苗所需的抗原量 [Vogel, F. R. Improving vaccine performance with adjuvants. *Clin Infect Dis* 30 增刊 3 :S266(2000)], (4) 增加疫苗抗原的生物学或免疫学半衰期,和 (5) 通过抑制免疫抑制因子克服对抗原的免疫耐受 [Baecher-Allan, C. 和 Anderson, D. E. Immune regulation in tumor-bearing hosts. *Curr Opin Immunol* 18 :214(2006)]。

[0005] 目前,用于增强抗原(例如肽抗原或蛋白抗原)激发免疫应答的效力的主要物质类别是佐剂,例如油包水乳剂、铝和其它增强抗原反应的化学品;然而,这些佐剂不是如上所述的免疫调节剂,因为它们自身不具有直接的免疫调节作用 [Vogel, F. R. 和 Powell, M. F. Acompendium of vaccine adjuvants and excipients, *Pharm Biotechnol* 6 :141(1995)]。几种这样的佐剂可用于动物,它们中的一些已在临床实验中进行了测试。除了传统的佐剂如铝盐之外,诸如流感病毒体 [Gluck, R. 和 Walti, E. 2000. Biophysical validation of Epaxal Berna, a hepatitis Avaccine adjuvanted with immunopotentiating reconstituted influenzaviruses(IRIV). *Dev Biol(Basel)* 103 :189(2000)] 和 Chiron 的 MF59 [Kahn, J. O. 等人, Clinical and immunologic responses to human immunodeficiency virus(HIV) type ISF2 gp 120 subunit vaccine combined with MF59 adjuvant with or without muramyl tripeptide dipalmitoylphosphatidylethanolamine in non-HIV-infected human volunteers. *J Infect Dis* 170 :1288(1994)] 的产品也具有固有的免疫作用,它们即将上市。例如, MF59 是基于亚微米乳剂的佐剂,被树突细胞内化 [Dupuis, M. 等人, Dendritic cells internalize vaccine adjuvant after intramuscular injection. *Cell Immunol* 186 :18(1998)]。然而,按照关于 HSV 和流感疫苗的临床实验报告 [Jones, C. A. 和 Cunningham, A. L. Vaccination strategies to prevent genital herpes and neonatal herpes simplex virus(HSV) disease. *Herpes* 11 :12(2004); Minutello, M. 等人, Safety and immunogenicity of an inactivated subunit influenza virus vaccine combined with MF59 adjuvant emulsion in elderly subjects, immunized for three consecutive influenza seasons. *Vaccine* 17 :99(1999)], 得自动物模型的证据提示, MF59 佐剂增强中和抗体的产生,而不是增强 T 细胞应答。因此,需要刺激细胞介导的免疫应答的新方法。

[0006] 此外,如上所述,某些抗原是免疫应答的弱刺激剂。因此,除了将抗原与如上所述的刺激免疫应答的物质共给予之外,还可以修饰弱免疫原性的抗原,以增强其免疫原性。例如,弱免疫原性的抗原可以偶联免疫原性肽、多糖或脂质以增强其免疫原性。然而,简单地将弱免疫原性抗原与这些类型的化合物偶联可能不足以激发免疫应答。例如,所产生的免疫应答可能针对偶联化合物上而不是弱抗原上的免疫原性表位,或者偶联抗原不能被有效递送至免疫系统的 APC。因此,需要其它方法来刺激针对弱免疫原性的抗原的免疫应答。

发明概述

[0007] 本发明的某些示例性方面在下文陈述。应当理解的是,提供这些方面仅仅是为了

给读者提供本发明可能采取的某些形式的简要概述,且这些方面无意限制本发明的范围。实际上,本发明可包括下文可能未明确陈述的许多方面。

[0008] 本发明涉及在某些剂量和组成条件下用作新的免疫刺激剂类型的阳离子脂质的以下应用:(1) 将抗原有效提呈或传递给免疫系统,和(2) 刺激免疫系统对抗原做出响应。

[0009] 脂质体已广泛用于传递小分子量药物、质粒DNA、寡核苷酸、蛋白和肽。使用脂质体介质作为非病毒性抗原载体的疫苗相比于使用活减毒疫苗或病毒载体(例如牛痘苗或流感病毒)的传统免疫是优选的。美国专利号7,303,881描述了一种简单但有效的脂质型免疫治疗剂-阳离子脂质/抗原复合物,其由阳离子脂质和抗原这两种分子组成,并可向其加入另外的组分,例如稳定剂、佐剂和表面调节剂[参见美国专利号7,303,881]。由阳离子脂质和抗原[例如E7、人乳头瘤病毒(“HPV”)]组成的制剂在小鼠模型中诱导针对HPV阳性TC-1肿瘤的预防性和治疗性抗肿瘤免疫应答。结果表明,与抗原复合的阳离子脂质体用于刺激免疫应答,并启动树突细胞(APC)与T细胞的相互作用。

[0010] 在本发明中,进行了另外的研究,以进一步了解阳离子脂质/抗原复合物诱导有效的免疫应答的能力,所述研究已导致发现阳离子脂质可在低剂量条件下通过活化所有哺乳类动物都存在的丝裂原活化蛋白(“MAP”)激酶信号转导途径的组分独立地用作有效的免疫活化剂。与抗原组合的阳离子脂质/抗原复合物在低剂量条件下诱导对在复合物中配制的抗原特异性的强免疫应答。于较高的阳离子脂质剂量,活性氧物质(ROS)在免疫细胞中过量产生,并抑制所观测的免疫应答。

[0011] 因此,本发明的一个方面提供至少一种阳离子脂质的组合物,所述阳离子脂质的剂量足以通过活化患者免疫系统细胞的MAP激酶信号转导从而诱导患者免疫应答。

[0012] 本发明的又一方面提供诱导患者免疫应答的方法,所述方法通过给予患者阳离子脂质活化MAP激酶信号转导途径。

[0013] 本发明的又一方面提供至少一种阳离子脂质的组合物,所述阳离子脂质的剂量足以通过在患者的免疫系统细胞中诱导活性氧物质(“ROS”)的产生从而诱导免疫应答。所述阳离子脂质复合物刺激ROS产生至一定水平,该水平足以提高免疫应答水平,超过没有所述至少一种阳离子脂质时的免疫应答水平。

[0014] 本发明的又一方面提供诱导免疫应答的方法,所述方法通过给予患者阳离子脂质复合物,以诱导患者免疫系统细胞产生活性氧物质(“ROS”)。所述阳离子脂质复合物刺激ROS产生至一定水平,该水平足以提高免疫应答水平,超过没有所述至少一种阳离子脂质时的免疫应答水平。[0014] 本发明的其它方面涉及添加至少一种抗原以形成阳离子脂质/抗原复合物,在此情况下免疫应答是抗原特异性的。

附图简述

[0015] 在参考附图阅读以下的详述时,本发明的各种特征、方面和优势将变得更好理解,在附图中,相同的字符在全部图中都代表相同的部分,其中:

[0016] 图1图示了在用1,2-二油酰-3-三甲铵丙烷(“DOTAP”)刺激树突细胞后的体外细胞因子产生。

[0017] 图2,通过流式细胞仪分析CTL介导的细胞毒性。制备并扩展E7特异性细胞毒性T淋巴细胞(“CTL”)克隆。在用E7肽进行5天的体外再刺激后,将效应细胞与PKH-67标

记的 TC-1 靶细胞以所示的效应细胞：靶细胞比率于 37°C 温育 4 小时。BL-6 用作非特异性靶细胞对照。通过在流式细胞仪中 PKH-67 阳性靶细胞门控中的 PI 阳性细胞百分率确定 E7 特异性杀伤的百分率。通过与 100 : 1 E : T 比率的对照组比较计算统计学分析 (* $p < 0.01$, ** $p < 0.001$, $n = 5$)。

[0018] 图 3, 在接受最佳脂质剂量的 DOTAP/E7 的小鼠中观察肿瘤浸润 T- 淋巴细胞。如所述建立 TC-1 肿瘤, 并使其未治疗或于第 6 天单次注射治疗。在第 14 天解剖实体肿瘤, 并检验浸润淋巴细胞。使用缀合 FITC 的抗 CD8 (A、B、C) 和抗 CD4 (D、E、F) 抗体测定肿瘤浸润 T 细胞, 之后用 DAPI 复染色。如所述检查 3 只小鼠组别的代表性肿瘤切片, 并用共聚焦显微镜成像。进行 TUNEL 测定, 以检测肿瘤切片中的凋亡 (G、H、I)。

[0019] 图 4 图示了用阳离子脂质疗法治疗诱导体液活性。

[0020] 图 5 图示了使用流式细胞仪在接受 DOTAP 和 E7 肽之后小鼠的 T 调节细胞群的减少。

[0021] 图 6, 用 DOTAP/E7 制剂治疗的小鼠的 TC-1 肿瘤生长的动力学。在 TC-1 接种后第 6 天, 小鼠接受以各种脂质浓度在 DOTAP 脂质中配制的 10 μ g E7 肽的治疗。在第 23 天时将各组的 TC-1 肿瘤尺寸与未治疗的对照组比较, 并进行统计学分析 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)。

[0022] 图 7, 皮下注射 DOTAP 诱导树突细胞活化并迁移入引流淋巴结中。用 PBS 对照 (A、C 和 E) 或含有 100nmol 总脂质和 0.5% NBD-DOTAP 的 DOTAP/E7 (B、D 和 F) 注射裸小鼠 ($n = 4-6$)。于注射后 4 小时, 制备引流淋巴结细胞, 并用针对表面标记的适宜抗体染色。分析总淋巴结细胞中 NBD 和 CD11c (A 和 B) 或 CD86 (C 和 D) 的共表达, 而 CD3⁺ 群中的 NBD 和 CD8 (E 和 F) 的共表达被门控并分析。数字代表象限中的细胞的百分率。

[0023] 图 8 表明, 用在最佳 DOTAP 佐剂中配制的 E7 肽免疫激发功能性 CD8⁺T 细胞。CD8⁺IFN- γ ⁺ 细胞的数量 / 10⁵ 个 CD8⁺T 细胞表示为平均值 \pm SD, 并与未治疗的对照相比较 ($n = 4$, ** $p < 0.01$)。

[0024] 图 9 图示了由多种阳离子脂质组成的阳离子脂质 / E7 复合物与已知激发 T- 细胞应答的有效佐剂相比的抗肿瘤免疫应答。

[0025] 图 10 图示了小鼠引流淋巴结中的 ROS 产生, 其与抗肿瘤免疫应答相关。A, 在注射后 2 小时由接受 DOTAP/E7 (含有 0、15、100 或 600nmol 脂质) 注射的小鼠分离引流淋巴结 (“DLN”)。列出了具有阳性 ROS 信号的细胞的相对百分率。B, 在 DOTAP/E7 注射后 10 小时以流式细胞仪收集细胞检测 DLN 中的细胞毒性。显示了 DC (空心方块) 中死亡细胞 (PI 阳性) 的相对百分率和活 DC 数 / 10⁵ 个 LN 细胞 (条形), 并通过配对 Student *t* 检验与未治疗对照的相比较 (** $P < 0.01$)。C, 通过惰性中性脂质、二油酰磷脂酰胆碱 (“DOPC”) 和 DOTAP/E7 (DOPC/DOTAP 的摩尔比率 = 5) 的共配制减少 DLN 中的活性氧物质 (“ROS”) 产生, 导致复合物的抗肿瘤活性降低。

[0026] 图 11 图示了改善的囊化效率对由于阳离子脂质 / 抗原复合物而产生的免疫应答的作用。通过在阳离子脂质体制剂中掺入 E7- 脂肽增强抗 TC-1 肿瘤活性。带有 TC-1 肿瘤的小鼠 (8-12 只小鼠 / 组) 在第 6 天接受 DOTAP/E7 (含 5 或 10nmol 的 E7 肽) 或 DOTAP/E7- 脂肽 (含 5nmol 肽) 或单独的 DOTAP 脂质的单次治疗。用葡萄糖 (5%) 治疗的小鼠用作阴性对照。第 24 天时将每组的肿瘤大小的平均值与接受 DOTAP/E7 (5nmol) 的组别相比

较,并通过 Student t 检验分析 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)。

[0027] 图 12 证实,用 DOTAP/E7- 脂肽免疫小鼠在 CD8⁺T 细胞中诱导增加的 IFN- γ 分泌。

[0028] 图 13 图示了连接到短的不相关氨基酸序列的肽抗原的增加的免疫原性。

[0029] 图 14A 图示了在用不同的阳离子脂质体刺激后共刺激分子 CD80 和 CD86 在 DC2.4 细胞上的表达。

[0030] 图 14B 图示了阳离子脂质对 DC 2.4 细胞上的共刺激分子 (CD 80) 表达的烃链长度依赖性表达。

[0031] 图 15,趋化因子和 CD11c 的转录被上调,而 IL-1 被阳离子脂质体下调。(A) Affymetrix 微阵列分析显示了 DC2 之后 mRNA 水平的增加倍数。用 50 μ M DOTAP 脂质体处理 4 种细胞 24 小时。(B) RT-PCR 表明,通过将 DOTAP 和 1,2-二油酰-sn-甘油-3-乙基磷酸胆碱 (“DOEPC”) 的 BMDC 溶液与 50 μ M DOEPC 或 DOTAP 脂质体温育 16 小时,接着进行总 RNA 提取和用特异性引物扩增 (100ng/mL LPS 作为阳性对照),上调 CCL2 和 CCL4。

[0032] 图 16,仅阳离子脂质体诱导来自 BMDC 的 CCL2 释放。

[0033] 图 17, DOTAP 以剂量依赖性方式诱导 CCL2 释放。

[0034] 图 18,MAP 激酶抑制剂用于研究涉及 DOTAP 诱导的来自 BMDC 的 CCL2 释放的信号转导途径。在第 6 天,将 BMDC 与抑制剂预温育 20 分钟,接着进行 24 小时的 75 μ M DOTAP 脂质体处理。用于该实验的浓度为:PD (PD-98059),20 μ M;SB (SB-203580),10 μ M;U (U-0126),10 μ M;PTx (Pertussis Toxin (百日咳毒素)),200ng/mL;PP2,10 μ M;Wort (Wortmannin (渥曼青霉素)),200nM;GF (GF 109203X),200nM。通过 ELISA 分析上清液。100ng/ml LPS 用作阳性对照。

[0035] 图 19, DOTAP 诱导 ERK 和 p38 在 BMDC 中的活化。(A) 时程研究。在第 6 天,将 BMDC 以 106/mL/ 孔的密度接种在 12 孔板中。它们与 75 μ M DOTAP 脂质体温育所示的时间。收获细胞,并使用图中所示抗体进行蛋白质印迹分析。用 ERK2 抗体探测相同的膜,以用作载荷对照。(B) DOTAP- 诱导的 ERK 活化被 p38 负调节。(C) DOTAP- 诱导的 ERK 活化主要通过 PI-3 激酶,并被 p38 负调节。

[0036] 图 20,通过 siRNA 方法下调 ERK 基因表达减弱 DOTAP 诱导的来自 BMDC 的 CCL2 释放。(A) 在 BMDC 处理 24 小时后被 siRNA 阻断的 ERK1 基因表达。(B) siRNA 对 ERK1 的阻断特异性减弱 DOTAP- 诱导的来自 BMDC 的 CCL2 释放。DOTAP :75M, LPS :100ng/mL。与对照 siRNA 相比 * $p < 0.05$, $n = 3$ 。

[0037] 图 21, DOTAP/E7 制剂诱导 CCL2 在小鼠引流淋巴结中的累积。在第 0 天,对小鼠 ($n = 3$) 注射 DOTAP/E7 制剂 (100nmol DOTAP 和 10 μ g E7 肽)。在所日期,处死小鼠,并收集引流淋巴结。将引流淋巴结在 100 μ L ELISA 缓冲液 (10% FBS 的 PBS 溶液) 中匀化,然后通过在上文中提及的 ELISA (A) 或以 CCL2 抗体免疫化学染色 (B) 分析。原始放大倍数 : $\times 400$ 。

[0038] 图 22,抑制 ERK 既减弱引流淋巴结中的 CCL2 累积,又阻断 DOTAP/E7 制剂的抗肿瘤活性。(A) 引流淋巴结中的 CCL2 累积被 ERK 和 p38 途径相反地调节。(B) 接受有或没有抑制剂共配制的 DOTAP/E7 的小鼠的 TC-1 肿瘤生长动力学。小鼠 ($n = 5$) 在第 0 天注射 TC-1 细胞 (1×10^5 个 / 小鼠)。在第 6 天,用 DOTAP/E7、DOTAP/E7/U-0126、DOTAP/E7/SB 或 PBS 治疗它们。此后检测肿瘤大小。与 DOTAP/E7 相比 * $p < 0.05$ 。

[0039] 图 23, 阳离子脂质 / 抗原复合物有效活化人树突细胞。图 20A-E 分别图示了 DOTAP/E7 对 CD 80 的刺激、DOTAP/E7 对 CD83 的刺激、DOTAP/E7 对 CD 86 的刺激、DOEPC/E7 和 DOTAP/ 胆固醇 /E7 对 CD 80 的刺激以及 DOEPC/E7 和 DOTAP/ 胆固醇 /E7 对 CD 83 的刺激。

[0040] 图 24 图示了 DOTAP/E7 复合物诱导人树突细胞的细胞因子和趋化因子产生的能力。图 23A-F 分别图示了 TNF- α 、IL-12、CCL3、CCL4、CC15 和 CCL-19 的产生。

[0041] 图 25 图示了阳离子脂质 / 抗原复合物粒径对人树突细胞活化的作用。

发明详述

[0042] 将在下文描述本发明的一个或多个具体实施方案。目的在于提供这些实施方案的简要描述,不可能在说明书中描述实际执行的所有特征。应当意识到,在任何这样的实际执行的开发中,必需实施众多执行特有的决定,以实现开发者在不同执行方案中可能不同的具体目标。而且,应当意识到,这样的开发工作可能是复杂且耗时的,但对由本文公开内容获益的一般技术人员将仍然应是常规任务。

[0043] 在介绍本发明的要素(例如其示例性实施方案)时,冠词“一个”、“一种”、“该”和“所述”意在表示有一个或多个要素。术语“包含”、“包括”和“具有”意思是包含性的,并指除了所列要素之外可能存在其它要素。

[0044] 本发明的一个方面提供阳离子脂质,以在哺乳动物中产生免疫应答,从而预防或治疗疾病。阳离子脂质可以以剂量依赖性方式独立地用作免疫调节剂,例如通过活化 MAP 激酶信号转导途径的多种组分,以产生趋化因子和 / 或细胞因子。观察到的最佳剂量范围在不同的哺乳动物物种中是不同的。例如在啮齿类动物中,最佳的阳离子脂质剂量可以在 50-300nmol 的范围内。本文描述的具体剂量和组成仅仅是示例性的,本领域技术人员可以确定适用于给定患者的剂量。另一方面,低剂量范围的阳离子脂质可以与抗原或药物结合,以提呈至免疫系统的细胞,同时刺激强抗原特异性免疫应答。在本发明的某些方面,所述抗原是脂肽。

[0045] 美国专利号 7, 303, 881 公开了多种与疾病相关抗原复合的阳离子脂质,已表明其刺激预防特定疾病(例如 HPV- 阳性癌症)的预防性免疫应答以及治疗性免疫应答,所述治疗性免疫应答杀死表达特定抗原的细胞,并对疾病产生有效治疗。目前,已进行了研究来进一步了解使用 DOTAP、DOEPC 和丙基 -N,N,N- 三甲基氯化铵(“DOTMA”)的阳离子脂质的免疫刺激能力,所述 3 种阳离子脂质属于广泛的脂质类别,在以上援引的专利中被证实用作免疫刺激剂。这些研究已导致发现阳离子脂质可以独立地用作免疫调节剂,在某些低剂量范围或组成内,在有(或没有)抗原的情况下刺激免疫应答。当阳离子脂质与抗原复合时,产生抗原特异性免疫应答。

[0046] 又一方面,在目前所述的某些剂量条件下给予的本发明的阳离子脂质组合物刺激 MAP 激酶信号转导途径的多种组分的诱导,并活化机体对抗疾病的免疫应答,同时传递抗原至免疫系统的细胞。如在以下的实施例中所示,阳离子脂质以剂量依赖性方式诱导活性氧物质(“ROS”)的产生。然而,超过最佳的阳离子脂质剂量,高 ROS 产生诱导免疫系统细胞凋亡,抑制脂质产生强免疫应答的能力。特定范围的 ROS 的产生又导致产生细胞因子和趋化因子,以调节免疫应答。因此,阳离子脂质的最佳剂量是有效刺激 ROS 生产水平的量,该

量足以刺激免疫应答以提高水平,超过没有阳离子脂质时的免疫应答水平(同时不刺激过量的 ROS 产生,其足以诱导显著量的免疫系统细胞凋亡,即足以抑制免疫应答的凋亡),并活化 MAP 激酶信号转导途径。如上所述,最佳剂量在不同物种可以不同,并易于由本领域一般技术人员确定。

[0047] 又一方面,最佳剂量的阳离子脂质与一种或多种抗原组合给予。在此情况下,阳离子脂质/抗原组合能够产生与阳离子脂质组合传递的抗原特异性的免疫应答。产生的应答可以包括产生特异性细胞毒性 T 细胞、记忆 T 细胞或 B 细胞,导致对与抗原相关的特定疾病的预防性或治疗性响应。

[0048] 本发明的阳离子脂质可以为阳离子脂质复合物的形式。阳离子脂质复合物可以采取多种囊泡形式,例如脂质体、胶束或乳剂。阳离子脂质复合物可以为单层或多层。当包含抗原时,抗原可被囊化在阳离子脂质复合物中,或者可为非囊化的。囊化的被理解为抗原可被包含在复合物的内部空间中或/或掺入复合物的脂质壁中。

[0049] 本发明进一步涉及产生这些复合物的方法,其中所述方法可以任选地包括由过量的各个组分中纯化这些制品的步骤。为了生产本发明的抗原复合物,包括纯化步骤是有利的实施方案。

[0050] 在某些实施方案中,阳离子脂质复合物于 pH 6.0-8.0 具有净正电荷和/或正电荷表面。

[0051] 可纳入本发明的阳离子脂质复合物的任选“抗原”可以为核酸、肽、脂肽、蛋白、脂蛋白、多糖和其它大分子,它们可以与阳离子脂质直接复合。然而,阳离子药物(例如大阳离子蛋白)可以与阴离子脂质直接复合,或者序贯地首先与阴离子脂质或聚合物复合,之后与阳离子脂质复合。该方法的应用允许利用本发明的复合物将正电荷或中性电荷的药物传递给细胞。

[0052] 本发明的一个方面涉及阳离子脂质复合物刺激趋化因子和细胞因子产生的用途。趋化因子和细胞因子是免疫应答的重要调节物。趋化因子最初被鉴定为炎性细胞的有效化学引诱物,所述炎性细胞包括嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞和单核细胞/巨噬细胞。随后的研究揭示,趋化因子通过调节树突细胞和其它淋巴细胞向淋巴器官的运输对免疫反应起显著作用。树突细胞是迁移细胞,其在组织中采样抗原,迁移至引流淋巴结并成熟,以刺激 T 细胞应答。CCL2 是 CC 趋化因子的一员,最初被鉴定为单核细胞/巨噬细胞的趋化因子和活化因子。随后的研究表明,其还可以影响 T 细胞、天然杀伤细胞和嗜中性粒细胞的功能。进一步的研究发现,在存在 Th1 细胞因子、白介素-12 (“IL-12”) 和干扰素- γ (“IFN- γ ”) 时,CCL2 是 CD8+ 细胞毒性 T 淋巴细胞 (“CTL”) 活性的最有效的活化剂。这可以由 CCL2 和 IFN- γ 系统之间的正双向相互作用解释。不存在有细胞因子或趋化因子可以干扰 Th1 极化和随后的特异性肿瘤免疫性产生。还已经表明另一种 CC 趋化因子 CCL-4 在体内募集和扩增树突细胞,并加强质粒 DNA 疫苗的免疫原性。最近已经表明,趋化因子通过将原初 CD8+T 细胞引导至 CD4+T 细胞-树突细胞相互作用的部位增强免疫性,并促进记忆 CD8+T 细胞产生。可由本发明的阳离子脂质复合物刺激的一些趋化因子的实例为 CCL-2、CCL-3 和 CCL-4。可被本发明的阳离子脂质复合物刺激的细胞因子的实例为 IL-12 和 IFN- γ 。本发明人设想本发明的阳离子脂质复合物还可以刺激除本说明书中所公开的趋化因子和细胞因子以外的趋化因子和细胞因子。

[0053] 又一方面,本发明的阳离子脂质复合物通过活化细胞激酶途径刺激免疫应答,所述途径例如胞外信号调节的激酶 (ERK) 途径 (也称为丝裂原活化的 (MAP) 激酶途径)、p38 途径或磷脂酰肌醇-3 (PI-3) 途径。这些途径又可以调节免疫应答的刺激以及细胞因子和趋化因子的产生。这些途径是本领域技术人员众所周知的。

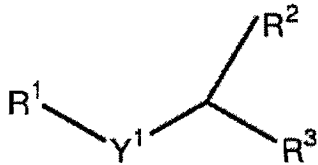
[0054] 本发明的阳离子脂质复合物可以调节 T 细胞活性,以刺激免疫应答。有 3 类 T 细胞:辅助 T 细胞、杀伤 T 细胞和调节 T 细胞。这 3 类 T 细胞一起工作,以协调细胞免疫应答。细胞毒性 T-淋巴细胞 (“CTL”) 也称为杀伤 T 细胞或 CD8+T-细胞,负责攻击表达外源抗原或肿瘤抗原的细胞。尽管未充分了解调节性 T 细胞作用的确切机制,据信调节 T 细胞负责抑制 CTL 介导的免疫性。已知降低调节 T 细胞活性可以产生增加的 CTL 活性,导致更强的细胞免疫反应。如在以下的实施例中所示,于最佳脂质剂量组成的本发明的阳离子脂质复合物也可以通过降低调节 T 细胞群刺激有效的免疫应答。

[0055] 脂质

[0056] 本发明的阳离子脂质复合物可以形成脂质体,所述脂质体任选地与抗原混合,并可以包含单独的阳离子脂质或与中性脂质组合的阳离子脂质。合适的阳离子脂质物质包括但不限于:3-β [4N-(1N,8-双胍基亚精胺)-氨基甲酰基]胆固醇 (BGSC);3-β [N,N-双胍基乙基-氨基乙烷)-氨基甲酰基]胆固醇 (BGTC);N,N¹N²N³四-甲基四棕榈酰基精胺 (cellfectin);N-叔丁基-N'-十四烷基-3-十四烷基-氨基丙脒 (CLONfectin);二甲基双十八烷基溴化铵 (DDAB);1,2-二肉豆蔻基氧基丙基-3-二甲基-羟基乙基溴化铵 (DMRIE);2,3-二油酰基氧基-N-[2(精胺甲酰胺基)乙基]-N,N-二甲基-1-三氟乙酸丙铵 (DOSPA);1,3-二油酰基氧基-2-(6-羧基精胺基)-丙酰胺 (DOSPER);4-(2,3-双-棕榈酰基氧基-丙基)-1-甲基-1H-咪唑 (DPIM);N,N,N',N'-四甲基-N,N'-双(2-羟乙基)-2,3-二油酰基氧基-1,4-丁烷二碘化铵 (Tfx-50);N-1-(2,3-二油酰基氧基)丙基-N,N,N-三甲基氯化铵 (DOTMA) 或其它 N-(N,N-1-二烷氧基)-烷基-N,N,N-三取代的铵表面活性剂;1,2-二油酰基-3-(4'-三甲基铵)丁醇-sn-甘油 (DOBT) 或胆甾醇基(4'-三甲铵)丁酸酯 (ChOTB),其中三甲铵基经丁醇间隔臂连接至双链(对于 DOTB)或胆甾醇基(对于 ChOTB);DORI (DL-1,2-二油酰基-3-二甲基氨基丙基-β-羟乙基铵)或 DORIE (DL-1,2-0-二油酰基-3-二甲基氨基丙基-β-羟乙基铵) (DORIE) 或如在 WO 93/03709 中公开的其类似物;1,2-二油酰基-3-琥珀酰基-sn-甘油胆碱酯 (DOSC);胆甾醇基半琥珀酸酯 (ChOSC);脂聚胺,例如双十八烷基酰氨基甘氨酸精胺 (DOGS) 和二棕榈酰基磷脂酰乙醇戊基精胺 (DPPES) 或在美国专利号 5,283,185 中公开的阳离子脂质、胆甾醇基-3β-羧基-酰氨基-乙烯基三甲基碘化铵、1-二甲基氨基-3-三甲胺-DL-2-丙基-胆甾醇基碘化甲酸酯、胆甾醇基-3-0-羧酰氨基乙烯胺、胆甾醇基-3-β-氧基琥珀酰氨基-乙烯三甲基碘化铵、1-二甲基氨基-3-三甲胺-DL-2-丙基-胆甾醇基-3-β-氧基碘化琥珀酸酯、2-(2-三甲胺)-乙基甲基氨基乙基-胆甾醇基-3-β-氧基碘化琥珀酸酯、3-β-N-(N',N'-二甲基氨基乙烷)氨基甲酰基胆固醇 (DC-cho1) 和 3-β-N-(聚乙烯亚胺)-氨基甲酰基胆固醇;0,0'-二肉豆蔻基-N-赖氨酸天冬氨酸盐 (DMKE);0,0'-二肉豆蔻基-N-赖氨酸-谷氨酸盐 (DMKD);1,2-二肉豆蔻基氧基丙基-3-二甲基-羟基乙基溴化铵 (DMRIE);1,2-二月桂酰-sn-甘油-3-乙基磷酸胆碱 (DLEPC);1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油-3-乙基磷酸胆碱 (DMEPC);1,2-二油酰基-sn-甘油-3-乙基磷酸胆

碱 (DOEPC) ;1,2- 二棕榈酰 -sn- 甘油 -3- 乙基磷酸胆碱 (DPEPC) ;1,2- 二硬脂酰 -sn- 甘油 -3- 乙基磷酸胆碱 (DSEPC) ;1,2- 二油酰基 -3- 三甲铵丙烷 (DOTAP) ;二油酰基二甲基氨基丙烷 (DODAP) ;1,2- 棕榈酰基 -3- 三甲铵丙烷 (DPTAP) ;1,2- 二硬脂酰 -3- 三甲铵丙烷 (DSTAP)、1,2- 肉豆蔻酰 -3- 三甲铵丙烷 (DMTAP) ;和十二烷基硫酸钠 (SDS)。本发明设想了在本申请中公开的阳离子脂质的结构变体和衍生物的运用。

[0057] 本发明的某些方面包括非甾族阳离子脂质,其具有以下代表性结构:



其中 R¹ 为季铵基团, Y¹ 选自烃链、酯、酮和肽, R² 和 R³ 独立选自饱和脂

肪酸、不饱和脂肪酸、酯连接的烃、磷 - 二酯及其组合。DOTAP、DMTAP、DSTAP、DPTAP、DPEPC、DSEPC、DMEPC、DLEPC、DOEPC、DMKE、DMKD、DOSPA、DOTMA 是具有该通用结构的脂质的实例。

[0058] 在一个实施方案中,本发明的阳离子脂质为其中亲脂基团和氨基之间的键在水溶液中稳定的脂质。因此,本发明的复合物的特征是在其储存过程中的稳定性(即它们在形成后随着时间推移保持小直径和保留生物活性的能力)。在阳离子脂质中使用的这类键包括酰胺键、酯键、醚键和氨甲酰基键。本领域技术人员容易理解,含有一种以上的阳离子脂质物质的脂质体可用于生产本发明的复合物。例如,已公开了含有两种阳离子脂质物质(赖氨酰-磷脂酰乙醇胺和 β-丙氨酰胆固醇酯)的脂质体用于某些药物递送用途[Brunette, E. 等, Nucl. Acids Res., 20:1151(1992)]。

[0059] 要进一步理解的是,在考虑适用于本发明并任选地与抗原混合的阳离子脂质体时,本发明的方法不是仅限于使用以上提及的阳离子脂质,而是可以使用任何脂质组合物,只要产生阳离子脂质体,且产生的阳离子电荷密度足以活化和诱导免疫应答。

[0060] 因此,除了阳离子脂质之外,本发明的复合物还可以包含其它脂质。这些脂质包括但不限于以溶血磷脂酰胆碱(1-油酰溶血磷脂酰胆碱)为实例的溶血磷脂、胆固醇或中性磷脂,包括二油酰基磷脂酰乙醇胺(DOPE)或二油酰基磷脂酰胆碱(DOPC),以及多种亲脂质的表面活性剂,其含有聚乙二醇部分,以 Tween-80 和 PEG-PE 为实例。

[0061] 本发明的阳离子脂质复合物还可以包含带负电荷的脂质以及阳离子脂质,只要所形成的复合物的净电荷是正的,和/或复合物的表面带正电荷。本发明的负电荷脂质是含有至少一种脂质物质的那些,所述脂质物质于生理 pH 或生理 pH 附近具有净负电荷,或者这些的组合。适宜的带负电荷的脂质物质包括但不限于 CHEMS(胆甾醇基半琥珀酸酯)、NGPE(N-戊二酰基磷脂酰乙醇胺)、磷脂酰甘油和磷脂酸或相似的磷脂类似物。

[0062] 生产在生产本发明的包含脂质的药物递送复合物中使用的脂质体的方法是本领域一般技术人员已知的。脂质体制备方法的综述可见于 Liposome Technology (CFC Press New York 1984); Liposomes by Ostro (Marcel Dekker, 1987); Methods Biochem Anal. 33: 337-462(1988) 和美国专利号 5,283,185。这样的方法包括冻融挤压和超声。单层脂质体(平均直径小于约 200nm) 和多层脂质体(平均直径大于约 300nm) 均可以用作起始组分,以产生本发明的复合物。

[0063] 在用于生产本发明的阳离子脂质复合物的阳离子脂质体中,阳离子脂质以约 10mol% 至约 100mol% 总脂质体脂质或约 20mol% 至约 80mol% 总脂质体脂质存在于脂质

体中。当在脂质体中包含中性脂质时,中性脂质可以约 0mol% 至约 90mol% 总脂质体脂质或约 20mol% 至约 80mol% 总脂质体脂质或约 40mol% 至约 80mol% 总脂质体脂质的浓度存在。当在脂质体中包含带负电荷的脂质时,带负电荷的脂质可以约 0mol% 至约 49mol% 总脂质体脂质或约 0mol% 至约 40mol% 总脂质体脂质的浓度存在。在一个实施方案中,脂质体包含阳离子脂质和中性脂质,其比率在约 2 : 8 至约 6 : 4 之间。要进一步理解的是,本发明的复合物可以包含修饰的脂质、蛋白、聚阳离子或受体配体,它们用作引导复合物至特定组织或细胞类型的靶向因子。靶向因子的实例包括但不限于去唾液酸糖蛋白、胰岛素、低密度脂蛋白 (LDL)、叶酸以及针对细胞表面分子的单克隆抗体和多克隆抗体。而且,为改变复合物的循环半衰期,可通过掺入含有聚乙二醇部分的亲脂表面活性剂空间隔离表面正电荷。

[0064] 阳离子脂质复合物可以在由蔗糖梯度收集后储存在等渗蔗糖或葡萄糖溶液中,或者它们可以被冻干,然后在使用前以等渗溶液重配。在一个实施方案中,阳离子脂质复合物储存在溶液中。通过特定的测定检测本发明的阳离子脂质复合物的稳定性,以确定阳离子脂质复合物在储存时随时间推移的物理稳定性和生物活性。通过本领域一般技术人员已知的方法测定阳离子脂质复合物的直径和电荷,检测阳离子脂质复合物的物理稳定性,所述方法包括例如电子显微镜、凝胶过滤层析或利用准弹性光散射,所述准弹性光散射使用例如在实施例中描述的 Coulter N4SD 粒径分析仪进行。依据纯化阳离子脂质复合物时的测定,当储存的阳离子脂质复合物的直径相对于阳离子脂质复合物的直径增加不超过 100% 或不超过 50% 或不超过 30% 时,阳离子脂质复合物的物理稳定性在储存过程中是“基本(上)不变的”。

[0065] 尽管有可能以纯的或基本纯的形式给予阳离子脂质,但优选将其作为药物组合物、制剂或制备物提供。使用本发明的阳离子脂质复合物的药物制剂可以包含在生理学相适的无菌缓冲液中的阳离子脂质复合物,所述缓冲液例如磷酸缓冲盐水、等渗盐水或低离子强度缓冲液,例如乙酸盐或 Hepes (示例性的 pH 在约 5.0 至约 8.0 的范围内)。阳离子脂质复合物可作为气雾剂或液体溶液剂进行肿瘤内、动脉内、静脉内、气管内、腹膜内、皮下和肌肉内给予。

[0066] 本发明的制剂可以掺入本领域已知的任何稳定剂。示例性的稳定剂是胆固醇和其它固醇,它们可能有助于固定脂质体双层,并防止脂质双层分解或去稳定。还可以将诸如聚乙二醇、多糖和单糖等物质掺入脂质体中,以修饰脂质体表面,防止其由于与血液组分相互作用而去稳定。其它示例性的稳定剂是蛋白、糖、无机酸或有机酸,它们可独立地使用或作为混合物使用。

[0067] 可使用许多药学上的方法控制、改变或延长免疫刺激的时程。可通过使用聚合复合物(例如聚酯、聚氨基酸、甲基纤维素、聚乙烯、聚(乳酸)和水凝胶)囊化或捕获阳离子脂质并缓慢释放它们,实现控释制剂。还可以使用相似的聚合物吸附脂质体。脂质体可以包含在乳化制剂中,以便改变刺激剂的释放模式。或者,可以通过用诸如聚乙二醇或其它聚合物的化合物和其它物质(如能够增强脂质体和乳化剂的循环时间或半衰期的糖)包衣脂质体表面,提高刺激剂在血液循环中存在的时间。

[0068] 当需要口服制剂时,阳离子脂质可以与本领域已知的典型的药物载体组合,所述载体例如蔗糖、乳糖、甲基纤维素、羧甲基纤维素或阿拉伯胶等。阳离子脂质还可以囊化为

胶囊剂或片剂用于系统性给予。

[0069] 本发明的阳离子脂质的给药可用于预防目的或治疗目的。当预防性提供时,在任何疾病迹象或症状之前提供阳离子脂质。当治疗性提供时,在疾病发生时或发生后提供阳离子脂质。免疫刺激剂的治疗性给药用于减弱或治愈疾病。对于这两种目的,阳离子脂质可以与其它的治疗剂或抗原一起给予。当阳离子脂质与其它的治疗剂或抗原一起给予时,可以产生针对特定疾病的预防性或治疗性作用。

[0070] 既兽用又人用的本发明制剂包含如上所述的单独的阳离子脂质,还任选地含有一种或多种治疗性成分,例如抗原或药物分子。所述制剂可便利地以单位剂型存在,可以通过药学领域已知的任何方法制备。

[0071] 抗原

[0072] 在一个实施方案中,在没有任何其它药物的情况下给予阳离子脂质,以便提高或降低不同免疫应答,包括产生其它免疫调节剂,并增强免疫应答来对抗疾病。在另一个实施方案中,阳离子脂质与一种或多种抗原组合给予。在此情况下,目标是产生免疫应答,该免疫应答对与阳离子脂质组合传递的抗原是特异性的。产生的应答可以包括产生特异性细胞毒性 T- 细胞、记忆 T- 细胞或 B- 细胞,对与这些抗原相关的特定疾病产生预防性或治疗性反应。抗原可以为任何肿瘤相关抗原或微生物抗原或本领域技术人员已知的任何其它抗原。

[0073] 本文使用的“肿瘤相关抗原”是与肿瘤细胞或癌细胞相关的分子或化合物(例如蛋白、肽、多肽、脂蛋白、脂肽、糖蛋白、糖肽、脂质、糖脂、碳水化合物、RNA 和 / 或 DNA),且其能够在 MHC 分子背景中的抗原提呈细胞表面上表达时激发免疫应答(体液的和 / 或细胞的)。肿瘤相关抗原包括自身抗原以及可能与癌症非特异性相关但在给予动物时仍然增强免疫应答和 / 或降低肿瘤或癌症细胞生长的其它抗原。本文提供更具体的实施方案。

[0074] 本文使用的“微生物抗原”是微生物的抗原,包括但不限于传染性病毒、传染性细菌、传染性寄生物和传染性真菌。微生物抗原可以为完整微生物及其天然分离株、片段或衍生物、与天然微生物抗原相同或相似的合成化合物,并优选地诱导对相应微生物(由其产生天然微生物抗原)特异性的免疫应答。在优选的实施方案中,如果化合物诱导类似于天然微生物抗原的免疫应答(体液的和 / 或细胞的),则该化合物类似于天然微生物抗原。类似于天然微生物抗原的化合物或抗原是本领域一般技术人员众所周知的,例如蛋白、肽、多肽、脂蛋白、脂肽、糖蛋白、糖肽、脂质、糖脂、碳水化合物、RNA 和 / 或 DNA。类似于天然微生物抗原的化合物的又一个非限制性实例是多糖抗原的肽模拟物。本文提供更具体的实施方案。

[0075] 术语“抗原”进一步指包括已知的或野生型抗原的肽或蛋白类似物,例如本说明书中描述的那些。所述类似物可以比野生型抗原更可溶或更稳定,并且还可以包含使抗原更具免疫活性的突变或修饰。可以任何方式修饰抗原,例如添加脂质或糖部分、突变肽或蛋白氨基酸序列、突变 DNA 或 RNA 序列或本领域技术人员已知的任何其它修饰。可以使用本领域技术人员已知的标准方法修饰抗原。

[0076] 具有与所需抗原的氨基酸序列同源的氨基酸序列的肽或蛋白在本发明的组合物和方法中也是有用的,其中同源抗原诱导针对相应肿瘤、微生物或感染细胞的免疫应答。

[0077] 在一个实施方案中,在阳离子脂质复合物中的抗原包含与肿瘤或癌症相关的抗

原,即肿瘤相关抗原,以制备预防或治疗肿瘤的疫苗。因此,在一个实施方案中,本发明的肿瘤疫苗或癌症疫苗进一步包括至少一种肿瘤相关抗原的至少一个表位。在又一个优选的实施方案中,本发明的肿瘤疫苗或癌症疫苗进一步包括来自一种或多种肿瘤相关抗原的多个表位。发现用于本发明的阳离子脂质复合物和方法的肿瘤相关抗原可为固有的免疫原性的或非免疫原性的,或者稍微具有免疫原性的。如本文所示,即便肿瘤相关的自身抗原也可以在本发明的疫苗中有利地用于治疗作用,因为本发明的组合物能够打破对这类抗原的免疫耐受。示例性的抗原包括但不限于合成抗原、重组抗原、外源抗原或同源抗原,抗原性物质可以包括但不限于蛋白、肽、多肽、脂蛋白、脂肽、脂质、糖肽、碳水化合物、RNA 和 DNA。这类疫苗的实例包括但不限于使用与肿瘤相关抗原复合的阳离子脂质治疗或预防乳癌、头颈癌、黑素瘤、宫颈癌、肺癌、前列腺癌、消化道癌 (gut carcinoma) 或本领域已知对免疫疗法敏感的任何其它癌症。还有可能将抗原与阳离子脂质一起配制,而不囊化在脂质体中。

[0078] 本发明的阳离子脂质复合物可用于治疗或预防癌症的方法中。在此情况下,对要免疫的哺乳动物注射含有脂质体和囊化抗原的药物制剂。可以用肿瘤疫苗治疗的癌症的实例包括但不限于使用阳离子脂质和与癌症相关的抗原或多种肽抗原预防或治疗乳癌、头颈癌、黑素瘤、宫颈癌、肺癌、前列腺癌、消化道癌或本领域已知的任何其它癌症。还有可能将抗原与阳离子脂质一起配制,而没有将抗原囊化在脂质体中。

[0079] 适用于本发明的肿瘤相关抗原包括天然的分子和修饰的分子,其可以指示单个肿瘤类型、由几种类型的肿瘤共有和 / 或相比于正常细胞在肿瘤细胞中独有地表达或过表达。除了蛋白、糖蛋白、脂蛋白、肽和脂肽之外,还已经以文件记录了碳水化合物、神经节苷脂、糖脂和粘液素的肿瘤特异性表达模式。用于癌症疫苗的示例性肿瘤相关抗原包括癌基因的蛋白产物、肿瘤抑制基因和具有肿瘤细胞独有的突变或重排的任何其它基因、再激活的胚胎基因产物、癌胚抗原、组织特异性的 (但不是肿瘤特异性的) 分化抗原、生长因子受体、细胞表面碳水化合物残基、外源病毒蛋白和许多其它自身蛋白。

[0080] 肿瘤相关抗原的具体实施方案包括例如突变的或修饰的抗原,例如 Ras p21 原癌基因、肿瘤抑制物 p53 以及 HER-2/neu 和 BCR-ab1 癌基因的蛋白产物,以及 CDK4、MUM1、半胱天冬酶 8 和 β 联蛋白;过表达的抗原,例如半乳糖凝集素 4、半乳糖凝集素 9、碳酸酐酶、醛缩酶 A、PRAME、Her2/neu、ErbB-2 和 KSA、癌胚抗原如甲胎蛋白 (AFP)、人绒毛膜促性腺素 (hCG);自体抗原,例如癌胚抗原 (CEA) 和黑素细胞分化抗原,例如 Mart 1/Melan A、gp100、gp75、酪氨酸酶、TRP1 和 TRP2;前列腺相关抗原,例如 PSA、PAP、PSMA、PSM-P1 和 PSM-P2;再激活的胚胎基因产物,例如 MAGE 1、MAGE3、MAGE 4、GAGE 1、GAGE 2、BAGE、RAGE 和其它睾丸癌抗原,例如 NY-ES01、SSX2 和 SCP1;粘液素,例如 Muc-1 和 Muc-2;神经节苷脂,例如 GM2、GD2 和 GD3、中性糖脂和糖蛋白,例如 Lewis (y) 和 globo-H;以及糖蛋白,例如 Tn、Thompson-Freidenreich 抗原 (TF) 和 sTn。还包括在本文中作为肿瘤相关抗原的完整细胞和肿瘤细胞裂解物,以及其免疫原性部分,以及在单克隆增殖的 B 淋巴细胞上表达的免疫球蛋白独特型,其针对 B 细胞淋巴瘤使用。

[0081] 肿瘤相关抗原及其对应的肿瘤细胞靶包括例如细胞角蛋白,尤其是细胞角蛋白 8、18 和 19,作为癌症抗原。上皮膜抗原 (EMA)、人胚胎抗原 (HEA-125)、人乳脂小球、MBr1、MBr8、Ber-EP4、17-1A、C26 和 T16 也是已知的癌抗原。肌间线蛋白和肌肉特异性肌动蛋白是肌源性肉瘤抗原。胎盘碱性磷酸酶、 β -人绒毛膜促性腺素和甲胎蛋白是滋养层和种系

细胞肿瘤的抗原。前列腺特异性抗原是前列腺癌抗原、结肠腺癌的癌胚抗原。HMB-45 是黑素瘤抗原。在宫颈癌中,有用的抗原可以由人乳头瘤病毒编码。嗜铬蛋白 -A 和突触素是神经内分泌和神经外胚层肿瘤的抗原。特别令人感兴趣的是形成具有坏死区域的实体瘤实质的渐进性肿瘤。这些坏死细胞的裂解是抗原提呈细胞的丰富抗原来源,因此本发明的治疗可有利地与常规化疗和 / 或放疗联合使用。

[0082] 在一个实施方案中,使用人乳头瘤病毒 HPV 抗原。用作肿瘤相关抗原的特异性 HPV 抗原是 HPV 亚型 16E7。HPV E7 抗原 - 阳离子脂质复合物有效预防和治疗宫颈癌。另外,遗传工程的 E7 蛋白,即 E7m 蛋白,具有抗原活性,但没有致肿瘤活性,是有效的肿瘤相关抗原。E7m- 阳离子脂质复合物诱导细胞免疫性,使既有肿瘤完全消退,并由此可用作有效的抗宫颈癌疫苗。

[0083] 肿瘤相关抗原可以通过本领域众所周知的方法制备。例如,这些抗原可通过制备癌细胞的粗提物由癌细胞制备(例如在 Cohen 等人, *Cancer Res.*, 54:1055 (1994) 中所述),通过部分纯化抗原、重组技术或从头合成已知抗原来制备。抗原还可以为编码抗原性肽的核酸形式,所述抗原性肽为适于在对象中表达并提呈至免疫对象的免疫系统的形式。此外,所述抗原可以为完整抗原,或者其可以为包含至少一个表位的完整抗原的片段。

[0084] 来源于已知易于引起某些癌症的病原体的抗原也可以有利地包括在本发明的癌症疫苗中。估计全世界的癌症发病率接近 16% 可归因于感染性病原体;许多常见的恶性肿瘤的特征在于表达特定的病毒基因产物。因此,包含涉及引起癌症的病原体的一种或多种抗原可有助于放宽宿主免疫应答,并增强癌症疫苗的预防性或治疗性作用。用于本文提供的癌症疫苗的特异性目标病原体包括乙肝病毒(肝细胞癌)、丙肝病毒(肝癌)、EB 病毒(EBV)(伯基特淋巴瘤、鼻咽癌、免疫抑制个体的 PTLD)、HTLV (成年 T 细胞白血病)、致癌人乳头瘤病毒 16、18、33、45 型(成年宫颈癌)和细菌幽门螺杆菌(B 细胞胃淋巴瘤)。其它可在哺乳动物(更具体地说为人)中用作抗原的医学相关的微生物描述于文献,例如 C. G. A Thomas, *Medical Microbiology*, Bailliere Tindall, Great Britain 1983,所述文献的完整内容通过引用结合到本文中。

[0085] 在又一个实施方案中,在阳离子脂质复合物中的抗原包含来源于病原体或与病原体相关的抗原,即微生物抗原。因此,在一个实施方案中,本发明的病原体疫苗进一步包含至少一种微生物抗原的至少一个表位。可以被本发明的疫苗作为目标的病原体包括但不限于病毒、细菌、寄生物和真菌。在又一个实施方案中,本发明的病原体疫苗进一步包含来自一种或多种微生物抗原的多个表位。

[0086] 用于阳离子脂质复合物和方法的微生物抗原可以为固有的免疫原性的或非免疫原性的,或者稍具免疫原性的。示例性的抗原包括但不限于合成抗原、重组抗原、外源抗原或同源抗原,抗原性物质可以包括但不限于蛋白质、肽、多肽、脂蛋白、脂肽、脂质、糖脂、碳水化合物、RNA 和 DNA。

[0087] 示例性的病毒病原体包括但不限于感染哺乳动物(更具体地说是人)的病毒。病毒的实例包括但不限于:逆转录病毒科,例如人免疫缺陷病毒,例如 HIV-1(也称为 HTLV-III、LAV 或 HTLV-III/LAV 或 HIV-III);和其它分离株,例如 HIV-LP;小核糖核酸病毒科(例如脊髓灰质炎病毒、甲肝病毒;肠病毒、人柯萨奇病毒、鼻病毒、艾柯病毒);卡利西病毒科((*Calciviridae*) 例如引起胃肠炎的毒株);披膜病毒科(例如马脑炎病毒、风

疹病毒)；黄病毒科(例如登革热病毒、脑炎病毒、黄热病病毒)；冠状病毒科(例如冠状病毒)；棒状病毒科(例如疱疹性口炎病毒、狂犬病病毒)；冠状病毒科(例如冠状病毒)；弹状病毒科(例如疱疹性口炎病毒、狂犬病病毒)；丝状病毒科(例如埃博拉病毒)；副粘病毒科(例如副流感病毒、腮腺炎病毒、麻疹病毒、呼吸道合胞病毒)；正粘病毒科(例如流感病毒)；环蛇病毒科((Bungaviridae)例如汉滩病毒、环蛇病毒(bunga viruses)、白蛉热病毒(phleboviruses)和内罗毕病毒(Nairo viruses))；沙粒病毒科(出血热病毒)；呼肠孤病毒科(例如呼肠孤病毒、环状病毒(orbiviruses)以及轮状病毒)；双RNA病毒科、肝病病毒科(乙型肝炎病毒)；细小病毒科(细小病毒)；乳多空病毒科(乳头瘤病毒、多瘤病毒)；腺病毒科(大多数腺病毒)；疱疹病毒科,单纯疱疹病毒(HSV)1型和2型、水痘带状疱疹病毒、巨细胞病毒(CMV)、疱疹病毒；痘病毒科(天花病毒、牛痘病毒、痘病毒)；和虹彩病毒科(例如非洲猪瘟病毒)；以及未分类型病毒(例如海绵状脑病的病原因子、 δ 型肝炎因子(认为是乙型肝炎病毒的缺损卫星)、非甲非乙型肝炎因子(1类=内部传递；2类=肠外传递(即丙型肝炎)；诺沃克和有关病毒,以及星形病毒)。

[0088] 另外,在脊椎动物中,革兰氏阴性细菌和革兰氏阳性细菌可为本发明的组合物和方法的目标。这样的革兰氏阳性细菌包括但不限于巴斯德氏菌属(*Pasteurella*)、葡萄球菌(*Staphylococci*)和链球菌属(*Streptococcus*)。革兰氏阴性细菌包括但不限于大肠杆菌(*Escherichiacoli*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)和沙门氏菌属(*Salmonella*)。传染性细菌的具体实例包括但不限于:幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*)、伯氏疏螺旋体(*Borrelia burgdorferi*)、嗜肺军团菌(*Legionella pneumophila*)、分枝杆菌属(*Mycobacteria*) (例如结核分枝杆菌(*M. tuberculosis*)、鸟分枝杆菌(*M. avium*)、胞内分枝杆菌(*M. intracellular*)、堪萨斯分枝杆菌(*M. kansasii*)、戈氏分枝杆菌(*M. goodii*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、淋病奈瑟菌(*Neisseria gonorrhoeae*)、脑膜炎奈瑟菌(*Neisseriameningitidis*)、单核细胞增多性李氏菌(*Listeria monocytogenes*)、化脓性链球菌(*Streptococcus pyogenes*) (A群链球菌)、无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*) (B群链球菌)、链球菌(*Streptococcus*) (草绿色群)、粪链球菌(*Streptococcus faecalis*)、牛链球菌(*Streptococcus bovis*)、链球菌(*Streptococcus*) (厌氧性菌属)、肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)、致病性弯曲菌属(*Campylobacter*)、肠球菌属(*Enterococcus*)、流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*)、炭疽杆菌(*Bacillus anthracis*)、白喉杆菌(*Corynebacterium diphtheriae*)、棒状杆菌属(*Corynebacterium*)、红斑丹毒丝菌(*Erysipelothrix rhusiopathiae*)、产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*)、破伤风杆菌(*Clostridium tetani*)、产气肠杆菌(*Enterobacter aerogenes*)、肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)、多杀性巴氏杆菌(*Pasteurella multocida*)、拟杆菌属(*Bacteroides*)、具核梭杆菌(*Fusobacterium nucleatum*)、念珠状链杆菌(*Streptobacillus moniliformis*)、苍白密螺旋体(*Treponema pallidum*)、细弱密螺旋体(*Treponema pertense*)、细螺旋体(*Leptospira*)、立克次氏体(*Rickettsia*)和以色列放线菌(*Actinomyces israelii*)。

[0089] 可以在本发明的组合物中用作微生物抗原来源的细菌病原体的多肽包括但不限于铁调节的外膜蛋白(“IROMP”)、外膜蛋白(“OMP”)和引起疝病的气单胞菌(*Aeromonis salmonicida*)的A-蛋白、引起细菌性肾病(“BKD”)的鲑鱼肾杆菌的p57蛋

白 (*Renibacterium salmoninarum*)、主要表面结合抗原 (“msa”)、表面表达的细胞毒素 (“mpr”)、表面表达的溶血素 (“ish”) 和耶尔森氏鼠疫杆菌肠道病 (*Yersinia*) 的鞭毛抗原;胞外蛋白 (“ECP”), 铁调节的外膜蛋白 (“IROMP”) 和巴斯德杆菌病 (*Pasteurellosis*) 的结构蛋白;鳃弧菌病 (*Vibriosis anguillarum*) 和奥德弧菌病 (*V. ordalii*) 的 OMP 和鞭毛蛋白;叉尾鲷爱德华菌病 (*Edwardsiellosis ictaluri*) 和迟缓爱德华菌病 (*E. tarda*) 的鞭毛蛋白、OMP 蛋白、aroA 和 purA;以及小瓜虫 (*Ichthyophthirius*) 的表面抗原;和噬纤维菌 (*Cytophaga columnari*) 的结构蛋白和调节蛋白;以及立克次氏体 (*Rickettsia*) 的结构蛋白和调节蛋白。这样的抗原可以通过重组方法或者本领域已知的任何其它方法分离或制备。

[0090] 病原体的实例进一步包括但不限于感染哺乳动物(更具体地说为人)的真菌。真菌的实例包括但不限于:新型隐球菌 (*Cryptococcus neoformans*)、荚膜组织胞浆菌 (*Histoplasma capsulatum*)、粗球孢子菌 (*Coccidioides immitis*)、皮炎芽生菌 (*Blastomyces dermatitidis*)、沙眼衣原体 (*Chlamydia trachomatis*)、白色念珠菌 (*Candida albicans*)。传染性寄生虫的实例包括疟原虫 (*Plasmodium*), 诸如恶性疟原虫 (*Plasmodium falciparum*)、三日疟原虫 (*Plasmodium malariae*)、卵形疟原虫 (*Plasmodium ovale*) 和间日疟原虫 (*Plasmodium vivax*)。其它传染性生物(即原生生物)包括鼠弓形体虫 (*Toxoplasma gondii*)。寄生性病原体的多肽包括但不限于鱼虱属 (*Ichthyophthirius*) 的表面抗原。

[0091] 在哺乳动物中和更具体地在人中用作抗原的其它医学相关的微生物详尽描述于文献,例如参见 C. G. A. Thomas, *Medical Microbiology*, Bailliere Tindall, Great Britain 1983, 该文献的完整内容通过引用结合到本文中。除了治疗传染性人类疾病和人类病原体之外,本发明的组合物和方法可用于治疗非人哺乳动物的感染。许多治疗非人哺乳动物的疫苗公开于 Bennett, K. *Compendium of Veterinary Products*, 第 3 版, North American Compendiums, Inc., 1995;还参见 WO 02/069369, 其公开内容通过引用明确地结合到本文中。

[0092] 示例性的非人病原体包括但不限于小鼠乳腺肿瘤病毒 (“MMTV”)、劳氏肉瘤病毒 (“RSV”)、鸟白血病病毒 (“ALV”)、禽类成髓细胞瘤病毒 (“AMV”)、鼠白血病病毒 (“MLV”)、猫白血病病毒 (“FeLV”)、小鼠肉瘤病毒 (“MSV”)、长臂猿白血病病毒 (“GALV”)、脾坏死病毒 (“SNV”)、网状内皮组织增生病毒 (“RV”)、猿猴肉瘤病毒 (“SSV”)、Mason-Pfizer 猴病毒 (“MPMV”)、猿猴逆转录病毒 1 型 (“SRV-1”)、慢病毒如 HIV-1、HIV-2、SIV、绵羊髓鞘脱落病毒、猫免疫缺陷病毒 (“FIV”) 和马传染性贫血病毒 (“EIAV”)、T- 细胞白血病病毒如 HTLV-I、HTLV-II、猿猴 T- 细胞白血病病毒 (“STLV”) 以及牛白血病病毒 (“BLV”), 和泡沫病毒如人泡沫病毒 (“HFV”)、猿猴泡沫病毒 (“SFV”) 和牛泡沫病毒 (“BFV”)。

[0093] 在某些实施方案中,本文针对传染性病原体使用的“治疗”是指提高患者对病原体传染的抗性 or 降低患者被病原体感染的可能性的预防性治疗;和/或在患者已被感染后的治疗,以便对抗感染,例如减弱或消除感染或防止其恶化。

[0094] 可以通过本领域众所周知的方法制备微生物抗原。例如,可以通过制备粗提物、部分纯化抗原或通过重组技术或通过从头合成已知抗原直接由病毒和细菌细胞制备这些抗原。所述抗原还可以为编码抗原性肽的核酸形式,所述抗原性肽为适于在对象中表达并提

呈至免疫对象的免疫系统的形式。此外,所述抗原可以为完整抗原,或者其可以为包含至少一个表位的完整抗原的片段。

[0095] 为了改善抗原向阳离子脂质囊泡的掺入以及还改善细胞向免疫系统的传递,可以修饰抗原,以增加其疏水性或抗原上的负电荷。可以增加抗原的疏水性,例如通过缀合至脂质链或疏水氨基酸,以便改善其在阳离子脂质的疏水酰基链中的抗原溶解性,同时保持所述分子的抗原特性。修饰的抗原可为脂蛋白、脂肽、用疏水性增加的氨基酸序列修饰的蛋白或肽及其组合。修饰的抗原可以具有缀合在脂质和抗原之间的接头,例如 N-末端 α 或 ϵ -棕榈酰赖氨酸可以经由二肽丝氨酸-丝氨酸接头连接至抗原。如在下文更详细的论述,相比于 DOTAP/E7 制剂, DOTAP/E7-脂肽复合物表现出增强的体内功能性抗原特异性 CD8⁺T 淋巴细胞响应。此外,可通过改变其中抗原被囊化入阳离子脂质复合物中的制剂缓冲液,或通过共价连接阴离子部分如阴离子氨基酸至抗原来操作抗原,以增加其负电荷。

[0096] 如在实施例 1(下文)中所证实的,通过共价修饰抗原增加 E7 抗原的免疫原性。有可能将氨基酸序列共价连接至抗原,使得获得的抗原氨基酸序列在由其获得抗原的亲代蛋白中不存在。进行了研究以证实修饰的抗原提供比天然抗原优良的 MHC I 类结合亲和力。这种已证实的优良的结合亲和力转变为产生针对 HPV-阳性 TC-1 肿瘤的优良的体内抗肿瘤免疫应答。依据以下实施例将进一步理解本发明。

[0097] 实施例

[0098] 实施例 1

[0099] 利用特定剂量的阳离子脂质组合物有效刺激免疫系统和抗原传递至抗原提呈细胞导致预防和治疗疾病的有效免疫应答。

[0100] 1. 用作免疫系统刺激剂的脂质体制备物包括单独的阳离子脂质(例如 DOTAP),或掺入抗原(例如 HPV 蛋白 E7 肽抗原)的阳离子脂质体。

[0101] 在所有的脂质体制备步骤中使用细胞培养级水(可由 Cambrex, Walkersville, MD 商购)或磷酸缓冲盐水。E7 抗原是来源于 HPV 16 E7 蛋白(由匹兹堡大学分子医学研究所, Pittsburgh, PA(University of Pittsburgh, Molecular Medicine Institute, Pittsburgh, PA)合成)的 H-2D^b 限制性 CTL 表位(氨基酸 49-57, RAHYNIVTF[SEQ. ID. NO. 1])。

[0102] 使用脂质膜制备这些研究使用的脂质体。通过(1)将脂质溶解在氯仿中,和(2)在稳定的干燥氮气流下蒸发氯仿溶液,在玻璃瓶中制备脂质膜。将所述膜在真空下保持过夜从而除去痕量的有机溶剂。然后加入所需量的水或缓冲液,以得到 10mg/mL 的终浓度,使脂质膜水合 12 小时。然后将悬浮液在水浴型超声器中超声 10 分钟,之后通过 400、200 和 100nm 膜过滤器(可由 Hamilton Co., Reno, NV 商购)挤压,并于 4°C 储存。为了制备 DOTAP/E7,通过 E7 肽水溶液再水合脂质膜。还可以使用本领域技术人员众所周知的在通用脂质体制备中使用的其它方法。

[0103] 2. 在用阳离子脂质治疗后刺激淋巴结细胞和树突细胞的 IL-12 和 TNF- α 生产

[0104] 为了阐明阳离子脂质 DOTAP 的免疫刺激机制和进一步表征其免疫刺激活性,重要的是评价 DOTAP 是否可以诱导正确的 Th1 细胞因子产生,以进一步增强免疫应答。因此,我们在 DOTAP 刺激后通过骨髓源树突细胞("BMDC")检验细胞因子产生。在重组 mGM-CSF 和 mIL-4 存在下在体外培养 6 天后,用培养基对照、DOTAP 脂质体、LPD(阳离子脂质复合的 DNA

和精蛋白)或脂多糖(LPS)以 $0.1\mu\text{g}/\text{mL}$ 于 37°C 刺激BMDc(每孔 2mL , 10^6 个细胞)20小时。通过BDELISA Set分析上清液中的IL-12和TNF- α 产量。LPD和LPS用作阳性对照。LPD中的细菌DNA包含已知经toll样受体活化免疫系统并刺激TNF- α 的CpG基序。收获培养上清液,并通过ELISA评价IL-12和TNF- α 细胞因子水平。在图1中,IL-12而不是TNF- α 的产量响应于DOTAP浓度而增加。这表明,除了树突细胞以外,其它细胞类型,例如T细胞,也可能涉及在体内观察到的由DOTAP脂质体刺激的Th1细胞因子产生。此外,阳离子脂质不诱导显著水平的促炎细胞因子TNF- α 的事实提示,免疫刺激性机制可独立于toll样受体途径。

[0105] 3. 通过阳离子脂质/抗原复合物以脂质剂量依赖性方式诱导抗原特异性CTL免疫应答。

[0106] 用DOTAP/E7制剂于第0天和第7天免疫C57BL/6雌性小鼠。使用多种浓度的DOTAP,然而,HPV-16 E7抗原的浓度保持在 $10\mu\text{g}$ 剂量。E7抗原是来源于HPV 16 E7蛋白的H-2D^b限制性CTL表位(氨基酸49-57,RAHYNIVTF(SEQ. ID. NO. 1))。在最后1次免疫后7天,处死小鼠,并收获和分离脾细胞。在除去RBC后,在 $40\text{U}/\text{mL}$ 重组IL-2(可由R&D systems, Minneapolis, MN商购)存在下用E7肽($10\mu\text{g}/\text{mL}$)刺激在完全RPMI-1640培养基中的总脾细胞群(响应细胞)5天。在体外CTL扩增后,响应细胞准备用作CTL效应细胞。TC-1细胞系在该测定中用作靶细胞。TC-1细胞是用HPV 16 E6和E7癌基因和活化的H-ras转化的C57BL/6小鼠肺上皮细胞。为了区分效应细胞和靶细胞,用PKH-67(可由Sigma, St. Louis, MO购买)按照生产商的说明标记TC-1细胞。将效应细胞和标记的靶细胞以多种效应细胞:靶细胞(E:T)比率接种入96-孔板中,于 37°C 进行4小时的裂解反应。然后收获细胞,并用碘化丙啶(PI)染色,以在BD FACSCanto数字流式细胞仪(可由BD Biosciences, San Diego, CA商购)上分析。E7-特异性裂解的百分率通过FL1(PKH-67)阳性区域中的PI阳性细胞百分率确定。

[0107] 现在转至图2,观察到接受 100nmol DOTAP的DOTAP/E7的小鼠表现出显著的CTL活性,导致特异性的TC-1细胞杀伤,而接受 600nmol DOTAP的DOTAP/E7的小鼠显示出显著降低的杀伤作用,表明了阳离子脂质的剂量反应作用。接受 15nmol DOTAP的DOTAP/E7的小鼠未导致CTL活性与用PBS治疗的对照小鼠显著不同。通过将来自接受最佳剂量的DOTAP的组别的效应细胞与作为靶细胞的HPV E7-阴性BL6细胞温育,我们证实该杀伤作用是E7-特异性的,且产生的细胞杀伤作用可忽略。除了CTL介导的杀伤作用之外,我们还研究了天然杀伤("NK")细胞介导的细胞毒性。NK细胞能够破坏肿瘤细胞,而没有有意的免疫或活化,且它们还在固有免疫应答中起重要作用[Wu, J和Lanier, L L, Natural killer cells and cancer. *Adv Cancer Res* 90:127(2003);和Lodoen, MB,和Lanier, LL, Natural killer cells as an initial defense against pathogens. *Curr Opin Immunol* 18:391(2006)]。接受多种剂量的DOTAP的DOTAP/E7复合物的小鼠对NK易感靶细胞—YAC-1细胞表现出显著的杀伤作用。

[0108] 4. 给予阳离子脂质/抗原复合物以脂质剂量依赖性方式诱导体内CD8+和CD4+T-细胞产生以及向E-7阳性肿瘤微环境的迁移

[0109] 为了理解最佳的DOTAP/E7制剂是否诱导T-淋巴细胞(T-细胞)的产生,以及T-淋巴细胞是否能有效迁移至表达E7抗原的细胞部位,对肿瘤浸润T淋巴细胞

进行免疫组织化学检查(图3)。6-7周龄的C57BL/6雌性小鼠购自Charles River Laboratories(Wilmington, MA),并用于所有动物研究。将TC-1细胞(10^5 个细胞)于第0天注射入小鼠的已剪毛侧面建立皮下HPV-阳性肿瘤。在第6天,对小鼠($n = 6-12$)皮下注射150 μ L选定的DOTAP/E7制剂(15、100、600nmol),每种制剂均含10 μ g E7肽。

[0110] 切除小鼠的实体HPV-阳性肿瘤,并于第14天解剖,嵌入Tissue-Tek® OCT化合物(可由Sakura Finetek, Torrance, CA商购)中(在冷冻切片制备之后)。利用低温保持器(可由H/I Hacker Instruments & Industries Inc. 商购)将样品切成8 μ m薄切片。使用FITC-缀合的抗-CD8和抗-CD4抗体(可由Miltenyi Biotec Inc., Auburn, CA商购)测定肿瘤浸润T细胞,之后用DAPI复染色核。用Leica SP2共聚焦显微镜进行切片成像。

[0111] 使用TACS™ TdT试剂盒(可由R&D Systems, Minneapolis, MN商购)进行TUNEL测定,并按照生产商的说明用DAB显色。样品用Nikon Microphot SA显微镜成像。

[0112] 如在图3中所示,相比于未治疗的小鼠(图3A)和接受高剂量的DOTAP组合物(600nmol,图3C)的小鼠,在接受100nmol的DOTAP/E7的小鼠(图3B)中发现高比例的CD8+T淋巴细胞(约5%)。对CD4+T细胞发现相似的结果(图3E-F)。还在某些肿瘤冷冻切片中进行了测定凋亡的TUNEL测定。在图3H中,相比于表现出正常和有生命的肿瘤细胞的未治疗小鼠(图3G)和高脂质剂量组(图3I),在用DOTAP/E7复合物中100nmol剂量的脂质治疗小鼠后,在这些小鼠的肿瘤细胞的缩合并裂解的核中观察到TUNEL-阳性反应。观察到与以上题为“阳离子脂质/抗原复合物以脂质剂量依赖性方式诱导抗原特异性CTL免疫应答”的第3章中描述的对抗原特异性CTL反应的剂量反应作用相似的阳离子脂质剂量对T-淋巴细胞生产的剂量反应作用。

[0113] 5. 给予阳离子脂质/抗原复合物诱导体液免疫性。

[0114] 图4显示了用含DOTAP和蛋白抗原、卵清蛋白的阳离子脂质/抗原复合物注射小鼠的结果。评价小鼠复合物刺激B-细胞活性和诱导抗体产生的能力,也称为体液免疫应答。通过监测IgG抗体形成评价体液应答。如图4所示,DOTAP/卵清蛋白复合物以剂量依赖性方式激发体液应答。这些数据提示,DOTAP制剂可用于刺激细胞免疫应答和体液免疫应答这二者。

[0115] 6. 以脂质剂量依赖性方式给予阳离子脂质/抗原复合物降低T-调节性细胞群。

[0116] 调节性T细胞被认为抑制针对肿瘤相关抗原的T-细胞免疫性,并被认为是阻碍(tempering)成功的免疫疗法和活性免疫接种的主要障碍。因此,我们研究了DOTAP/E7在治疗性疫苗制剂中以其最佳剂量对荷载肿瘤的小鼠破坏由T调节细胞保持的免疫耐受的能力,由此增强对肿瘤相关抗原的T-细胞免疫性。用于流式细胞仪分析的所有抗小鼠抗体都由BD Pharmingen(San Diego, CA)或eBioscience, Inc. (San Diego, CA)购买和商购。收获脾细胞,并使用1mg/ml胶原酶和70 μ m细胞捕获器解离。在除去红细胞(RBC)后,用荧光标记的单克隆抗CD4抗体(RM4-5)、抗CD8a抗体(53-6.7)、抗CD3e抗体(145-2c11)、抗NK1.1(pk136)和抗CD25抗体(pc61.5)于4°C对单细胞悬浮液染色30分钟。在使用Cytotfix/Cytoperm™试剂盒(BDPharmingen)按照生产商的说明固定和浸透后,用抗Foxp3(FJK-16s)的50 μ l Perm/Wash™缓冲液于4°C染色细胞30分钟。用Perm/Wash™缓冲液再洗涤细胞2次,然后最终重悬浮在300 μ l染色缓冲液中,并用BD FACSCanto数字流式细胞仪(可由BD Biosciences, San Diego, CA商购)分析。如在图5中所示,相比

于未治疗的荷瘤小鼠,由接受 DOTAP/E7 复合物 (100nmol DOTAP) 的小鼠而不是由高剂量 (600nmol DOTAP) 动物收获的脾细胞显示出较低量的 T-reg 细胞亚群 (Foxp3+、CD25+ 和 CD25+/Foxp3+)。

[0117] 在表 1 中,概述了用于 T-reg 分析的 10 个代表性实验。在小鼠接受最佳的 DOTAP/E7 治疗后,脾细胞中的 CD4+T 细胞群显著增加,还发现 CD8+T 细胞的相似增加(未显示数据)。另外,在该治疗组中发现 T-reg 群 (CD4+/Foxp3+ 和 CD4+/CD25+/Foxp3+) 显著减少。尤其明显的是, DOTAP/E7 于高 DOTAP 剂量降低的抗肿瘤活性与 T-reg 细胞群增加相关。再次观察到阳离子脂质的剂量反应作用。该结果表明,以最佳脂质剂量用于免疫疗法的阳离子脂质组合物通过破坏荷瘤小鼠的耐受,并刺激功能性 CD4+ 和 CD8+ 抗原-特异性 T 淋巴细胞的增殖,同时抑制 T-reg 细胞群,有可能能够增强所观测到的针对特定癌症的免疫应答。

[0118] 表 1:用 DOTAP/E7 复合物治疗后在荷瘤小鼠脾细胞中的 Treg 亚群的百分率

	CD4+	CD4+/Foxp3+	CD4+/CD25+/Foxp3+
PBS 处理的	18.8±2.9%	13.1±0.1%	9.5±0.5%
DOTAP/E7 15 nmole	21.7±1.3%	12.0±1.0%	8.4±0.2%
DOTAP/E7 100 nmole	25.1±2.4%	11.4±0.2%	7.2±0.2%
DOTAP/E7 600 nmole	22.1±2.1%	14.3±2.3%	9.5±0.9%
LPD/E7 100 nmole	26.8±2.2%	11.0±0.1%	7.4±0.1%

< 0.01, ***p < 0.001 (n = 10 个 / 组)

[0119] 10. 在用 DOTAP 剂量可变的 DOTAP/E7 组合物治疗的小鼠中 TC-1HPV- 阳性肿瘤生长的动力学。

[0120] 在图 6 中,在第 0 天对小鼠皮下注射 TC-1 细胞,以便诱导 HPV- 阳性肿瘤的生长。小鼠在第 6 天于腹侧皮下接受含有 10 μg E7 肽的 DOTAP/E7 组合物。复合物中的 DOTAP 脂质浓度由 3nmol 至 600nmol 变化 (3、15、30、75、150、300 和 600nmol)。在第 23 天,相比于未治疗的对照,低剂量的 DOTAP (15nmol) 显示出部分肿瘤抑制作用 (P < 0.05),而 30、150 或 300nmol 的 DOTAP 表现出增强的效力 (P < 0.01)。75nmol 的 DOTAP 显示出最显著的肿瘤退化作用 (P < 0.001)。再者,给予高剂量 DOTAP (600nmol) 的小鼠没有显示出抗肿瘤活性,证实高剂量的 DOTAP 脂质体可能会诱导出对免疫应答的负调节。另外,100nmol 剂量但无 E7 肽的 DOTAP 脂质体没有显示出显著的肿瘤生长抑制,表明所述抗肿瘤作用是抗原特异性的。

[0121] 11. DOTAP/E7 复合物在注射后主要由树突细胞摄取,并诱导树突细胞活化和向引流淋巴结的迁移。

[0122] 对裸小鼠 ($n = 4-6$) 注射 PBS 对照 (图 7A、C 和 E) 或含有 100nmol 总脂质和 0.5% 1-油酰-2-[6-[(7-硝基-2-1,3-苯并噁二唑-4-基)氨基]己酰基]-3-三甲铵丙烷] (“NBD-DOTAP”) 的 DOTAP/E7 (图 7B、D 和 F)。在注射后 4 小时,制备引流淋巴结细胞,并用针对表面标记的适宜抗体染色。分析总淋巴结细胞中 NBD 和 CD11c (图 7A 和 B) 或 CD86 (图 7C 和 D) 的共表达,而 CD3⁺ 群中的 NBD 和 CD8 (图 7E 和 F) 的共表达被门控并分析。数字代表象限中的细胞百分率。收获引流淋巴结细胞,并通过流式细胞仪于注射后的不同时间点分析。在 NBD-DOTAP/E7 注射后 4 小时,总淋巴结细胞中的 CD11c⁺ 细胞的数量相比于未治疗小鼠增加 2.5 倍以上 (图 7A 和 B)。研究了共刺激分子 CD86 在 NBD⁺ 细胞上的表达,NBD⁺ 细胞表现出高水平的 CD86 (图 7C 和 D),表明皮下注射 DOTAP 诱导树突细胞活化。还通过用抗 CD3、CD4 和 CD8 抗体共染色,研究了由其它细胞类型如 T 淋巴细胞的 NBD 摄取。在 (图 7E 和 F) 中门控并分析 CD3⁺ 细胞,表明在 NBD-DOTAP 注射后没有 NBD 摄取。该结果清楚地表明,在免疫后不久 NBD-DOTAP 主要由树突细胞 (约 80%) 摄取,而 DOTAP 诱导活化的树突细胞向引流淋巴结迁移,导致树突细胞-T 细胞相互作用,并激发强 T-细胞应答。

[0123] 12. 用一种特别有利剂量的 DOTAP 配制的 DOTAP/E7 复合物免疫激发功能性 CD8⁺T 细胞。

[0124] 已知由活化 T 细胞或 NK 细胞分泌的 IFN- γ 对 Th1 型免疫应答以及诱导 CTL 应答起重要作用。为评价由 DOTAP/E7 接种诱导的功能性 CD8⁺T 淋巴细胞是否能够产生必需的细胞因子,在最后 1 次免疫后 1 周由对照小鼠或免疫小鼠分离脾细胞,并与 5 μ g/ml E7 肽或没有肽温育 6 小时,之后进行 IFN- γ 的胞内染色。如在图 8 中所示,在接受以最佳脂质剂量的 DOTAP 配制的 E7 的小鼠中和 LPD 阳性对照中生产 IFN- γ 的 CD8⁺ 细胞数显著高于阴性对照组。CD8⁺ 细胞的 IFN- γ 生产以 E7-特异性方式发生。这些结果表明,最佳剂量的 DOTAP 是在系统淋巴器官中诱导 CTL 以及产生生产 IFN- γ 的 CD8⁺T 淋巴细胞的有效疫苗佐剂。

[0125] 13. 比较阳离子脂质 /E7 复合物的抗肿瘤作用和已知诱导抗原特异性 CTL 活性的先导佐剂中配制的 E7 的抗肿瘤活性。

[0126] 为比较阳离子脂质 /E7 制剂与其它佐剂诱导对肿瘤的免疫应答的效力,在建立肿瘤后 6 天,用 E7 肽配制的脂质体治疗每种制剂 6-12 只荷瘤小鼠,所述脂质体包含 (1) 阳离子脂质 (DOTAP、DOEPC 和 DOTMA),为 100nmol 剂量的阳离子脂质组成,(2) 阴离子脂质 (DOPG),或 (3) 佐剂 (完全弗氏佐剂 (“CFA”) 或 CpG ODN1826)。在图 9 中,接受两种佐剂以及阳离子脂质制剂的小鼠相比于对照组在第 26 天显示出有效的肿瘤生长抑制。接受阴离子脂质 DOPG/E7 的小鼠未显示出肿瘤退化。相比于接受 CpG/E7 或 CFA/E7 制剂的那些小鼠,接受最佳的 DOTAP/E7 和 DOEPC 制剂的小鼠表现出较好的抗癌活性 ($p < 0.01$)。接受最佳的 DOTMA/E7 的小鼠相比于接受 CpG/E7 或 CFA/E7 制剂的那些也表现出较好的抗癌活性。

[0127] 14. 阳离子脂质以剂量依赖性方式诱导 ROS 产生,于高剂量导致树突细胞死亡和降低免疫刺激作用。

[0128] 在注射后 2 小时由接受 DOTAP/E7 (含 0、15、100 或 600nmol 脂质) 皮下注射的小鼠 (每种情况的 $n = 4$) 分离引流淋巴结。将总淋巴结细胞与 DCFH-DA 化合物于 37°C 温育 30 分钟,之后进行流式细胞仪分析。门控大的粒细胞,并分析其 ROS 表达,其中荧光产物 DCF

在 ROS 存在下产生。具有阳性 ROS 信号的细胞的相对百分率列于图 10A。如下实施引流淋巴结中的细胞毒性：在 DOTAP/E7 注射后 10 小时收集细胞，并用适宜的抗体染色。在图 10B 中，树突细胞 (DC) 中死亡细胞的相对百分率以线图 (□) 显示，条形图代表每 10^5 个 LN 细胞的活 DC 数。数值对未治疗的对照标准化，并进行统计分析 (**p < 0.01)。由接受 DOTAP 15nmol 的小鼠获得的细胞表现出基础水平的 ROS 生产 (< 5%)，而由注射 DOTAP 100nmol 剂量的小鼠获得的细胞产生相对较高水平的 ROS (约 20%)。引人注目的是，得自 DOTAP 600nmol 组的大部分大粒细胞 (约 80%) 显示出阳性 ROS 信号。在皮下注射后 10 小时，收获总淋巴结细胞，并通过流式细胞仪分析细胞死亡 (图 10B)。CD11c⁺ (树突细胞) 群中的细胞死亡百分率 (碘化丙锭阳性) 随脂质剂量增加，并与在图 10A 中显示的 ROS 产量正相关。与未治疗的对照组相比，注射高剂量 DOTAP 的组别的 DC 群中的细胞死亡百分率为约 2 倍高。还在图 10B 中显示了随 DOTAP 脂质剂量变化的每 10^5 个淋巴结细胞的活 CD11c⁺ 细胞数。接受 100nmol 脂质的 DOTAP/E7 的小鼠在其它治疗组中表现出最高量 (**p < 0.01) 的活树突细胞。在小鼠接受最佳制剂后 2 天以后称重引流淋巴结。总之，结果表明，由高剂量 DOTAP 诱导的 ROS 产量可引起树突细胞死亡。

[0129] 此外，如在图 10C 中所示，阳离子电荷的密度对免疫刺激作用和产生的抗癌症活性是重要的。通过共配制高比率的惰性、中性脂质 DOPC 和阳离子脂质 /E7 复合物，导致阳离子电荷密度降低，减弱 ROS 产生和抗癌症活性这二者。

[0130] 15. 肽抗原的脂化导致在阳离子脂质 / 抗原复合物中的囊化改善

[0131] 如上所述制备阳离子脂质 / 抗原复合物。使用 LavaPep™ 肽定量试剂盒 (可由 Fluorotechnics, Sydney, Australia 商购) 依据脂质体结合肽的百分率确定肽囊化效率。因为未掺入的脂肽聚集且不能通过排阻滤器，所以以在 1% SDS 存在下与挤压出的脂质体相关的量量度掺入的脂肽，并以平均值 ±SD (n = 3) 报告。对于水溶性肽如天然 E7 和 KSS-E7，通过 Microcon® 离心过滤装置 (可由 Millipore, Bedford, MA 商购) 将未结合的肽与复合物分离。使用 LavaPep™ 按照生产商的说明检测未结合肽的浓度。以 (1-% 未结合的肽) 测定囊化效率，并在表 2 中以平均值 ±SD (n = 3) 报告。

[0132] 表 2: 合成脂肽的组成以及在脂肽：DOTAP = 1 : 40 的摩尔比率的 DOTAP 脂质体中的肽抗原捕获效率的比较

肽名称	肽组成			捕获效率 (%)
	脂质	间隔序列	CTL 表位	
天然 E7	-	-	RAHYNIVTF [SEQ. ID. NO. 1]	27.1 ± 5.8 %
KSS-E7	-	KSS	RAHYNIVTF [SEQ. ID. NO. 1]	26.4 ± 6.1 %
PA-E7	棕榈酸	-	RAHYNIVTF [SEQ. ID. NO. 1]	84.5 ± 6.4 %
α-PA-KSS-E7	棕榈酸	KSS	RAHYNIVTF [SEQ. ID. NO. 1]	92.8 ± 4.2 %
ε-PA-KSS-E7	棕榈酸	KSS	RAHYNIVTF [SEQ. ID. NO. 1]	94.1 ± 4.6 %

[0133] 16. 阳离子脂质 / 抗原复合物的抗肿瘤效率改善抗原囊化效率

[0134] 在第 6 天（肿瘤建立后）用 DOTAP/E7（含 10nmol 或 5nmol 肽）或 DOTAP/E7 脂肽制剂（含 5nmol 肽抗原）给予带有 TC-1 肿瘤的小鼠（每组 8-12 只）单剂量治疗。在每种情况下均使用 100nmol 阳离子脂质的组合物。含 5nmol 肽的 DOTAP/E7 未显示出显著的抗肿瘤活性。相反，两种为 5nmol 抗原的 E7- 脂肽（ α 或 ϵ 位）在 DOTAP 脂质体中配制时，相比于含 5nmol 天然 E7 抗原的 DOTAP 显示出显著增强的疗效（** $p < 0.01$ ）（图 11）。由脂肽激发的抗肿瘤活性类似于 10nmol 的 DOTAP/E7 的该活性。PA-E7 为棕榈酰化 E7 肽（无 KSS 间隔基），其在 DOTAP 脂质体中配制时，不能显示出增强的抗肿瘤活性，如在其它脂肽制剂中所观察到的，这可能归因于通过将脂肪酸直接连接至所述肽而被隐藏的表位。抗肿瘤活性被 DOTAP/E7 脂肽增强，这至少部分归因于抗原的囊化效率增加。这证实，通过增加抗原的疏水性，向复合物中的掺入增加，导致抗原特异性免疫应答增加。用葡萄糖（5%）治疗的小鼠用作阴性对照。

[0135] 17. 阳离子脂质 / 脂化抗原复合物增加抗原特异性 CTL 应答。

[0136] 用 DOTAP/E7- 脂肽免疫增加分泌 IFN- γ 的 CD8⁺T 细胞的生产。用多种制剂注射小鼠，在最后 1 次免疫后的 7 天，由免疫过的小鼠分离脾细胞。用或不用 E7 肽（5 μ g/ml）体外刺激细胞 6 小时，并用表面 CD8 标记和胞内 IFN- γ 细胞因子染色，然后进行 FACS 分析。各个治疗组的每 10⁴ 个总 CD8⁺ 的 CD8⁺IFN- γ ⁺ 双阳性细胞的百分率以平均值 \pm SD 示于图 12，并通过成对 t 检验进行统计学分析（** $p < 0.01$, $n = 4$ ）。

[0137] 为评价由 DOTAP/E7- 脂肽接种诱导的表位特异性免疫应答，分析生产 IFN- γ 的 CD8⁺T 细胞。在最后 1 次免疫后 1 周由对照小鼠或免疫小鼠分离脾细胞，并用 5 μ g/ml E7 肽或不用肽刺激，之后对 IFN- γ 进行胞内染色。如在表 2（上文）中所述和在图 12 中所示，就脂肽抗原而言，复合物中的抗原掺入被显著改善，因此，在接受于 DOTAP 脂质体中配制的 5nmol ϵ -PA-KSS-E7 的小鼠中生产 IFN- γ 的 CD8⁺ 细胞数显著高于 10nmol 和 5nmol 天然 E7 的那些（** $p < 0.01$ ）。再者，KSS-E7 以相等的抗原量显示出优于天然 E7 的结果。CD8⁺ 细胞的 IFN- γ 生产为 E7- 特异性的，因为未脉冲的细胞仅显示出细胞因子的背景水平。这些结果表明，将疏水性和复合效率增加的 E7- 脂肽掺入 DOTAP 脂质体中明确增强阳离子脂质 / 抗原复合物的效力，并增加淋巴器官中生产 IFN- γ 的 CD8⁺T 淋巴细胞的量。

[0138] 18. 通过连接与亲代肽序列中存在的序列不相关的短氨基酸序列改善肽抗原的抗原性，导致改善由 DOTAP 和 KSS-E7 肽组成的脂质 / 抗原复合物的抗肿瘤效力

[0139] 没有连接脂质链的 KSS（赖氨酸 - 丝氨酸 - 丝氨酸）-E7 肽在 DOTAP 阳离子脂质中配制时，提供的免疫应答远比在 DOTAP 复合物中配制的天然 E7 肽强（图 11 和 12），尽管囊化效率与天然 E7 的囊化效率相当（表 2）。已知肽结合并稳定 MHC I 类分子的能力可与其诱导特异性 CTL 应答的能力直接相关 [Feltkamp, M. C. 等, Vaccination with cytotoxic T lymphocyte epitope-containing peptide protects against tumor induced by human papillomavirus type 16-transformed cells. Eur J Immunol, 23, (9), 2242-2249 (1993)]。我们评价了天然 E7 肽和 KSS 延长的 E7 肽的 MHC I 类结合亲和力。将小鼠淋巴瘤细胞系 RMA-S 细胞以 5 \times 10⁵ 个细胞 /ml 的浓度于 27 $^{\circ}$ C 与天然 E7 或 KSS-E7 肽（10 μ M）温育过夜。与培养基温育的细胞用作对照。然后将细胞于 37 $^{\circ}$ C 温育 2 小时。在洗涤后，用针对细胞表面上的 H-2D^b 或 H-2K^b 分子的荧光缀合的单克隆抗体染色细胞，之后进行流式细胞仪分析。E7 肽（氨基酸 49-57）是已知限于 H-2D^b 的表位，其使 RMA-S 细胞上的 H-2D^b 分子相比于对

照上调 4 倍 (图 13)。对 KSS-E7 肽观察到平均荧光增加 8 倍。在与 E7 肽或 KSS-E7 肽温育后,没有检测到 RMA-S 细胞上的 H-2K^b 分子上调。结果证实,KSS-E7 对 H-2D^b 分子的结合亲和力比天然 E7 肽改善,这导致在 DOTAP/ 抗原复合物中配制时较优的抗肿瘤活性。

[0140] 研究证实,免疫原性肽的免疫原性可通过连接与得到免疫原性肽的天然亲代蛋白序列不相关的短氨基酸序列而被改善或改变。

[0141] 19. 阳离子脂质和抗原之间的离子相互作用对掺入阳离子脂质 / 抗原复合物中的抗原效力的作用。

[0142] 对于这些研究,将 DOTAP 溶解在氯仿中,并在 16×100mm 玻璃管中由 7mg DOTAP 制备干膜。在真空干燥后,在 (1) 高离子强度环境 (15mM 磷酸钠,150mM NaCl,pH 7.0) 或 (2) 低离子强度环境 (0.5ml 抗原的 15mM 磷酸钠溶液,50mM NaCl pH 7.0) 中,用 0.5ml 抗原 (HPV-16E7,氨基酸 11-20, YMLDLQPETT (SEQ. ID. NO. 2)) 水合脂质体。粒径为 100nm。

[0143] 将颗粒经 100K Nanosep 微过滤器 (可由 Pall Corp., AnnArbor, MI 商购) 过滤、以 5000rpm 在小型离心机中离心 20 分钟,分析抗原囊化效率。通过反相层析分析起始缓冲液和 Nanosep 过滤器流通液 (未结合的肽) 中的抗原浓度,以确定囊化百分率。以 (1- 未掺入的肽%) 计算囊化效率,如在表 3 中所见。

[0144] 表 3 :通过增加抗原上的负电荷增强抗原向阳离子脂质 / 抗原复合物的囊化。

制剂缓冲液	囊化百分率
高离子强度环境 20mM 磷酸钠 150mMNaCl, pH7.0	22%
低离子强度环境 20mM 磷酸钠 50mMNaCl, pH7.0	53%

[0145] 离子相互作用在高离子强度环境中被最小化。较高强度的离子环境有效降低负电荷。通过增加制剂缓冲液 (150mM NaCl) 的离子强度,带负电荷的抗原和带正电荷的脂质之间的离子相互作用被最小化,导致囊化降低。通过降低离子强度,脂质和抗原之间的离子相互作用被增强,导致抗原向复合物的掺入更大。因此,可通过改变制剂缓冲液或通过带阴离子或聚阴离子化合物连接至抗原而增加负电荷来操作抗原,增强向阳离子脂质 / 抗原复合物的掺入效率。

[0146] 讨论

[0147] 如在美国专利号 7,303,881 中所述,广泛类型的阳离子脂质可以与抗原一起用作有效的免疫刺激剂,以在疾病治疗中产生抗原特异性免疫应答。例如,美国专利 7,303,881 公开,包含阳离子脂质的脂质体活化树突细胞,以阳离子脂质刺激 DC2.4 树突细胞上的共刺激分子 CD80/CD86 的表达证实 (图 14A 和 14B)。如在图 14A 中所示,不同的阳离子脂质体刺激 DC2.4 细胞上的 CD80/CD86 表达的能力变化极大。脂转染胺试剂[™]是聚阳离子脂质 2,3-二油酰氧基-N-[2(精胺羧酰胺)乙基]-N,N-二甲基-1-三氟乙酸丙铵 (DOSPA) 和中性脂质二油酰磷脂酰乙醇胺 (DOPE) 的 3 : 1 (重量 / 重量) 的脂质体制剂,是由 0,0' - 二

豆蔻酰-N-赖氨酰天冬氨酸 (DMKE) 和 O,O'-二豆蔻酰-N-赖氨酰-谷氨酸 (DMKD) 制备的脂质体, 强刺激 CD2.4 细胞的 CD80/CD86 表达。

[0148] 不同的阳离子脂质刺激 DC2.4 细胞上的 CD 80 表达的能力是可变的。脂质的亲水头和亲脂尾对该能力具有显著作用。例如, 带有乙基磷酸胆碱 (EPC) 头基的 DXEPC 脂质一般似乎比具有三甲铵丙烷 (TAP) 头基的 DXTAP 脂质更有效。在具有一种特定头基结构的脂质中, 具有较短的 (1,2-二月桂酰-sn-甘油-3-乙基磷酸胆碱 (DLEPC-12:0)、1,2-二豆蔻酰-sn-甘油-3-乙基磷酸胆碱 (DMEPC-14:0)) 或不饱和的 (1,2-二油酰基-sn-甘油-3-乙基磷酸胆碱 (DOEPC-18:1)) 酰基链的脂质似乎比具有较长的 (1,2-二棕榈酰-sn-甘油-3-乙基磷酸胆碱 (DPEPC-16:0)) 或饱和的 (1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-乙基磷酸胆碱 (DSEPC-16:0)) 酰基链的那些脂质更有效 (图 14B)。这些数据证实, 多种阳离子脂质能够刺激树突细胞的活化。因此选择 3 种代表性的阳离子脂质 DOTAP、DOTMA 和 DOEPC 进行额外的研究, 以确定阳离子脂质用作免疫刺激剂的机制。本文以代表性阳离子脂质提供的数据可以外推至刺激免疫应答的其它阳离子脂质。

[0149] 得自本研究的数据已导致以下观察结果: 阳离子脂质不仅有效靶向和传递抗原载体至免疫系统的 APC, 而且在低剂量组合物范围内用作有效佐剂, 以用所获的免疫系统调节分子 (包括细胞因子和趋化因子) 的产生通过活化 MAP 激酶依赖性信号转导途径直接影响免疫系统功能。阳离子脂质对制剂的免疫刺激能力的明确剂量反应作用已被证实。为此, 我们已证实, 当诸如 HPV 16 型的 E7 蛋白的肽表位的抗原被囊化在 DOTAP、DOTMA 或 DOEPC (DOTAP/E7、DOTMA/E7 或 DOEPC/E7) 的阳离子脂质体中且抗原/脂质复合物以约 100nmol 剂量组合物通过单次皮下注射给予时, 其在小鼠中诱导 HPV16E7-阳性肿瘤 TC-1 的退化。在接受脂质/抗原复合物时, 颗粒主要由树突细胞摄取, 树突细胞是主要的专职抗原提呈细胞。启动树突细胞活化和迁移至引流淋巴结有利于针对如所示的抗原特异性 TC-1 肿瘤的免疫应答。小鼠在接受 DOTAP/E7 注射时产生功能性 CD8⁺T 淋巴细胞, 肿瘤尺寸减小, 并表现出增强的凋亡, 这归因于肿瘤微环境中的浸润 T 细胞数增加。产生的钟形 (活性降低至最佳剂量之上和之下) 阳离子脂质剂量反应曲线于非常低的剂量时显示出活性, 表明阳离子脂质作为佐剂或免疫刺激剂的活性是如此有效, 以至于 EC₅₀ 低至每次注射约 15nmol。高剂量的阳离子脂质消除免疫刺激活性。我们还已证实, 当诸如卵清蛋白的抗原掺入阳离子脂质体中并以单次皮下注射给予时, 产生针对所述抗原的有效抗体。显然, 最佳剂量组成的阳离子脂质和阳离子脂质/抗原复合物提供简单、安全且非常有效的免疫疗法, 可用于预防和治疗疾病。

[0150] T 调节细胞最初由 Gershon 等人 [Eardley, D D 等人, Immunoregulatory circuits among T-cell sets. I. T-helper cells induce other T-cell sets to exert feedback inhibition. J Exp Med 147:1106; 和 Cantor, H 等人, Immunoregulatory circuits among T-cell sets. II. Physiologic role of feedback inhibition in vivo: absence in NZB mice. J Exp Med 147:1116 (1978)] 于 20 世纪 70 年代描述, 并被称为抑制性 T 细胞。最近的研究已探索了 CD4⁺CD25⁺ 调节性 T 细胞 (T-reg) 在几种鼠模型以及癌症患者中的肿瘤免疫性抑制方面的作用 [Comes, A 等人, CD25+regulatory T cell depletion augments immunotherapy of micrometastases by an IL-21-secreting cellular vaccine. J Immunol 176:1750 (2006)]。T-reg 细胞群的频率在癌症患者的外周血中增加 [Sasada, T 等

人, CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with gastrointestinal malignancies: possible involvement of regulatory T cells in disease progression. *Cancer* 98: 1089 (2003)]. 它们还在肿瘤浸润淋巴细胞和引流淋巴结中富集 [Baecher-Allan, C 和 Hafler, DA, Suppressor T cells in human diseases. *J Exp Med* 200: 273 (2004)]. 另外, T-reg 在肿瘤相关组织中的累积预示较差的预后或存活 [Baecher-Allan, C 和 Anderson, DE Immune regulation in tumor-bearing hosts. *Curr Opin Immunol* 18: 214 (2006)]. 尽管尚未完全理解 T-reg 如何抑制正常 T-细胞免疫性的详细机制, 但最近已报道, 通过使用抗 CD25 抗体封闭 T-reg 细胞增强抗肿瘤活性 [Attia, P 等人, Inability of a fusion protein of IL-2 and diphtheria toxin (Denileukin Diftitox, DAB389IL-2, ONTAK) to eliminate regulatory T lymphocytes in patients with melanoma. *J Immunother* 28: 582 (2005)]. 实际上, 已变得显而易见的是, 必须监测和表征接受候选人肿瘤疫苗的患者中的效应细胞和 T-reg 反应 [Baecher-Allan, C 和 Anderson, DE Immune regulation in tumor-bearing hosts. *Curr Opin Immunol* 18: 214 (2006)]. 在本研究中, 我们发现 DOTAP/E7 的抗肿瘤活性与 T-reg 细胞减少明确相关。

[0151] 因此, 阳离子脂质构成了一类新的免疫刺激剂, 其以特定剂量可以有效应用于调节机体免疫应答以及开发治疗剂和预防和治疗用途的疫苗。

[0152] 几年来已知晓, 蛋白质和肽对用于开发免疫疗法和疫苗具有显著的潜力。成功开发这些疗法的主要缺陷是无法将抗原有效递送至免疫系统。另外, 已投入大量的精力来开发安全有效的免疫刺激剂, 用于传染性疾病和用作癌症疗法。已在针对人的传染性疾病和癌症的疫苗中测试了涉及佐剂的当前技术, 所述佐剂例如得自 SEPPIC, Inc. 的 Montanide ISA™ 51 和 720, 其是来自二缩甘露醇单油酸酯家族的表面活性剂分别和矿物油或非矿物油的混合物 [Aucouturier, J 等人, Montanide ISA 720 and 51: a new generation of water in oil emulsions as adjuvants for human vaccines. *Expert Rev Vaccines* 1: 111 (2002)]. 多种研究证实了 Montanide ISA™ 51 和 720 增强抗体效价还有特异性 CTL 应答的能力 [Yamshchikov, GV 等人, Evaluation of peptide vaccine immunogenicity in draining lymph nodes and peripheral blood of melanoma patients. *Int J Cancer* 92: 703 (2001)]. 然而, 该类型的油包水佐剂在生产过程中需要关键的乳化步骤, 该步骤一直不易控制。更重要的是, 多个表位的多肽 TAB9 与 Montanide ISA 720 联合的 I 期临床实验表明, 较低剂量组的 8 名志愿者中的 7 名显示出中度或严重的局部炎症, 而较高剂量组的 8 名志愿者中的 4 名发生肉芽瘤和无菌性脓疡 [Toledo, H 等人, A phase I clinical trial of a multi-epitope polypeptide TAB9 combined with Montanide ISA 720 adjuvant in non-HIV-1 infected human volunteers. *Vaccine* 19: 4328 (2001)]. ISA 720 由可代谢油组成, 并认为其对人类几乎没有反应原性。然而, 和大部分其它佐剂一样, 乳液中的表面活性剂可以触发树突细胞和巨噬细胞上的 toll 样受体 (TLR), 因此诱导 NF- κ B 和炎症反应的产生 [Aucouturier, J 等人, Montanide ISA 720 and 51: a new generation of water in oil emulsions as adjuvants for human vaccines. *Expert Rev Vaccines* 1: 111 (2002)].

[0153] 我们已证实, 阳离子脂质不增强 NF- κ B 的表达, 提示阳离子脂质刺激树突细胞是通过非 NF- κ B 依赖性机制发信号 [Cui, Z. 等人 (2005). Immunostimulation mechanism of LPD nanoparticle as a vaccine carrier. *Mol Pharm* 2: 22-28)]. 因此, 阳离子脂质体可

能属于安全性改善的一类独特的佐剂。

[0154] 我们还已经证实,通过脂化抗原,例如连接单棕榈酸至 KSS 延长的 E7 肽(在 α 或 ϵ 位),可将阳离子脂质体/抗原复合物中的肽囊化效率改善至超过水溶性抗原的该效率。DOTAP/E7-脂肽复合物仅由 2 个分子组成,诱导产生根除 HPV 阳性 TC-1 细胞的抗原特异性 CTL 的整体增强。阳离子脂质组成保持在 100nm。当抗原以降低的剂量(5nmol 或以下)给予荷瘤小鼠时,DOTAP/E7-脂肽复合物相比于全剂量(10nmol)的原始 DOTAP/E7 制剂显示出优良的抗肿瘤活性。脂肽的增强的抗原性和抗肿瘤活性与脂质体中增强的脂肽囊化相关。如在表 2 中所示,于 2.5mol% 总脂质的肽荷载的脂肽捕获效率为 90%,而仅约 25%的天然水溶性 E7 肽掺入到复合物中。还已经报道了脂肽的相似增强的脂质体囊化 [Yagi, N. 等人, Preparation of functionalliposomes with peptide ligands and their binding to cell membranes. *Lipids*, 35, 673-680 (2000); 和 Liang, M. T. 等人, Encapsulation of lipopeptides within liposomes: effect of number of lipid chains, chain length and method of liposome preparation. *Int J Pharm*, 301, 247-254 (2005)]。为了使肽由 MHC I 类途径提呈,肽必须进入 APC 的胞质。阳离子脂质体传递囊化的而不是游离的肽至细胞中。因此,可以预期肽的囊化越高,传递和抗原性就越好。另外,在如所示的给药条件下,阳离子脂质还用作有效的免疫刺激剂,导致强抗原特异性免疫应答,产生所观测到的肿瘤细胞死亡。

[0155] 已暗示了 ROS 对先天免疫应答和 T 细胞活化的重要性 [Kantengwa 等人, Superoxide an ions induce the maturation of humandendritic cells. *Am J Respir Crit Care Med* 167:431-437 (2003)], 高 ROS 生产导致细胞死亡 [Tobieme K 等人, ASK1 is required for sustained activations of JNK/p38 MAP kinases and apoptosis. *EMBO Rep* 2:222-228 (2001)], [Aramaki Y 等人, Induction of apoptosis in WEHI 231 cells by cationic liposomes. *Pharm Res* 17:515-520 (2000)]。我们证实, ROS 由引流淋巴结细胞中的阳离子脂质诱导,高剂量的 DOTAP 脂质导致杀伤树突细胞。实际上, Iwaoka 等人已表明,阳离子脂质体可以在体外诱导巨噬细胞中的 ROS [Iwaoka S 等人, cationic liposomes induce apoptosis through p38 MAP kinase caspase-8-Bid pathway in macrophage-like RAW264.7 Cells. *J Leukoc Biol* 79:184-191 (2006)]。在图 10A 中显示的数据清楚地表明,阳离子脂质能够在皮下注射 DOTAP/E7 复合物之后在引流淋巴结中体内产生 ROS。相同的数据还提示,高剂量的阳离子脂质产生的过量的 ROS 导致增强的树突细胞死亡。这些数据支持给予患者一定剂量的阳离子脂质,所述剂量足以在患者免疫系统细胞中诱导 ROS 产生,其中所诱导的 ROS 水平足以将免疫应答增加至没有阳离子脂质时的免疫应答之上。可能有其它可能的原因涉及失去免疫刺激,产生的抗癌活性归因于 DOTAP/E7 复合物的高 DOTAP 剂量。然而, DLN 中活化 APC 的量降低应明确地对以下几项起重要作用:所观测到的淋巴细胞浸润(图 3)、抗原特异性 CTL 活性和 IFN- γ 生产(图 2 和 8)的降低,以及最重要的是于高疫苗剂量的抗肿瘤活性(图 6)。另一方面,需要理想的 ROS 生产水平,因为 DOTAP 诱导的 ROS 可能是介导随后的信号转导的初始信号,所述信号转导例如 ERK 和 p38 MAP 激酶,是疫苗活性所必需的,如下文实施例 2 中所述。此外,我们在图 10C 中已证实了阳离子电荷密度对免疫刺激作用和产生的抗癌活性的的重要性。在此证实,可以共同配制高比率的情性、中性脂质 DOPC 和阳离子脂质/E7 复合物,导致阳离子电荷密度降低,

从而减少 ROS 产生和抗癌活性。

[0156] 实施例 1 证实了阳离子脂质剂量对免疫刺激作用的重要性,还突显了阳离子脂质 / 抗原复合物在开发简单且安全的免疫疗法以产生用于治疗癌症和多种疾病 (例如细菌和病毒感染) 的强抗原特异性免疫应答方面的作用。

[0157] 实施例 2

[0158] 阳离子脂质的免疫刺激活性的机制:MAP 激酶、ERK 的磷酸化和趋化因子的诱导

[0159] A. 材料和方法

[0160] 1. 细胞系和肽

[0161] TC-1 细胞由 TC Wu (Johns Hopkins University, Baltimore, MD) 提供。这些细胞是已用 HPV16 E6 和 E7 癌基因和活化的 H-ras 转化的 C57BL/6 小鼠肺内皮细胞。细胞在补加 10% 胎牛血清和 100U/ml 青霉素和 100mg/ml 链霉素的 RPMI 培养基 (可由 Invitrogen, Carlsbad, CA 商购) 中生长。得自 HPV 16 E7 蛋白的 MHC I 类限制性肽 (氨基酸 49-57, RAHYNIVTF [SEQ. ID. NO. 1]) 由匹兹堡大学肽合成室 (University of Pittsburgh Peptide Synthesis Facility) 使用 AdvancedChemTech 200 型肽合成仪通过固相合成来合成,并通过 HPLC 纯化。[如在 Feltkamp 等人, Eur J Immunol 23, 2242-2249 (1993) 中所述]。对 pERK 和 ERK2 特异性的小鼠单克隆抗体和 siRNA 购自 Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA。对磷酸化的 p38 (p-p38) 特异性的小鼠单克隆抗体得自 Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA。GeneChip 小鼠基因组 4302.0 阵列得自 Affymetrix, Inc. PD-98059、U-0126、PP2、渥曼青霉素和 GF109203X 得自 Calbiochem。百日咳毒素和其它试剂得自 Sigma。

[0162] 2. 脂质 / 抗原复合物的制备和物理特性的测定

[0163] 所有的脂质都购自 Avanti Polar Lipids (Alabaster AL)。小单层 DOTAP、DOEPC 和 DOTMA 脂质体通过薄膜水合后挤压制备。将有或没有药物的、在氯仿中的脂质在氮气流下于玻璃管中干燥为薄层。薄膜真空干燥 2-3 小时,然后用细胞培养级水 (可由 Cambrex, Walkersville, MD 商购) 或含有 E7 肽的缓冲液再水合至 0.7mg 脂质 / mL 和 0.1mg E7 / mL 的终浓度 (摩尔比率 = 11 : 1)。顺序地通过 0.4、0.2 和 0.1 μ m 孔径的聚碳酸酯膜挤压脂质分散液。未捕获的肽未被除去。将脂质体储存在 4°C, 直至使用。通过检测脂质体结合肽的百分率确定 E7 肽与脂质体的结合。简而言之,通过 Microcon[®] 离心过滤装置 (Millipore, Bedford, MA) 将 DOTAP/E7 或 DOTAP/E7 / 药物 (MAP 激酶抑制剂) 复合物与未结合的 E7 肽分离,未结合肽的浓度通过 MicroBCA[™] 蛋白测定试剂盒 (Pierce, Rockford, IL) 检测。以未结合肽的百分率确定肽结合的效力。约 30% 的 E7 肽与脂质体结合。

[0164] 3. 统计分析

[0165] 数据以至少 3 次独立实验的平均值 \pm SD 表示。使用双尾 Student t 检验评价平均值差异的统计学显著性。显著性被设定于 $p < 0.05$ 。

[0166] 4. RNA 提取和微阵列

[0167] 通过 Qiagen, Germantown, MD 的 RNeasy 小型试剂盒按照生产商的说明提取 RNA。使用 7 μ g 总 RNA 合成 cDNA。对该反应使用得自 Life Technologies, Gaithersburg, MD 的定制 cDNA 试剂盒和 T7-(dT)₂₄ 引物。然后使用 BioArray High Yield RNA 转录试剂盒由 cDNA 反应产生生物素化 cRNA。然后在片段化缓冲液 (5X 片段化缓冲液:200mM Tris- 乙酸

盐, pH 8.1, 500mM KOAc, 150mM MgOAc) 中于 94°C 片段化 cRNA 35 分钟, 然后进行芯片杂交。然后将 15 μ g 片段化的 cRNA 加至杂交混合物 (0.05 μ g/ μ l 片段化的 cRNA, 50pM 对照寡核苷酸 B2、BioB、BioC、BioD, 以及 cre 杂交对照, 0.1mg/ml 鲑鱼精 DNA, 0.5mg/ml 乙酰化 BSA, 100mM MES, 1M NaCl, 20mMEDTA, 0.01% Tween 20)。10 μ g cRNA 用于杂交。在 GeneChip 杂交烘箱 640 中使阵列于 45°C 杂交 16 小时。洗涤阵列, 并用 R-藻红蛋白链霉抗生物素蛋白在 GeneChip Fluidics Station 400 中染色。此后, 用 Hewlett Packard GeneArray 扫描仪扫描阵列。Affymetrix GeneChip 微阵列 5.0 套装软件用于洗涤、扫描和基础分析。样品质量通过检验某些基因的 3' -5' 强度比率评价。

[0168] 5. 骨髓源树突细胞 (BMDC)

[0169] 使用由 Inaba K. 等人, Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* 176:1693-702, (1992) 所述修改的程序产生 BMDC。简而言之, 由 C57BL/6 雌性小鼠的股骨和胫骨收获骨髓。在裂解红细胞后, 塑料粘附使得树突细胞前体与淋巴细胞分离。余下的骨髓细胞在补加 10% FBS、非必需氨基酸、抗生素/抗真菌素以及各 1,000U/ml 的 GM-CSF 和 IL-4 (R&D systems) 的 RPMI 1640 培养基中培养 6 天。每隔一天更换培养基。细胞在第 6 天用于测定。通过流式细胞仪验证 CD11c 表达, 发现这些细胞中 > 90% 为树突细胞。

[0170] 6. RT-PCR

[0171] 通过 Qiagen 的 Rneasy 小型试剂盒按照生产商的说明由 BMDC 分离总 RNA。在用 DNA 酶于 37°C 消化 30 分钟后, 通过分光光度计测定总 RNA 浓度。由 IDT 技术合成小鼠 CCL2、CCL3、CCL4 和 β -肌动蛋白的引物对 (CCL2 的正向引物 5' -AAGCCAGCTCTCTCTCCTC-3' [SEQ. ID. NO. 3] 和反向引物 5' -CCTCTCTCTTTGAGCTTGGTG-3' [SEQ. ID. NO. 4]; CCL3 的正向引物 5' -ATCATGAAGGTCTCCACCAC-3' [SEQ. ID. NO. 5] 和反向引物 5' -TCTCAGGCATTTCAGTTCCAG-3' [SEQ. ID. NO. 6]; β -肌动蛋白的正向引物 5' -GCTCTGTGCAAACCTAACCC-3' [SEQ. ID. NO. 7] 和反向引物 5' -TGTGATGGTGGGAATGGGTCA G-3' [SEQ. ID. NO. 8] 和反向引物 5' -TTTGATGTCACGCACGATTTCC-3' [SEQ. ID. NO. 9] [Wang H. 等人, Potential involvement of monocyte chemoattractant protein (MCP)-1/CCL2 in IL-4-mediated tumor immunity through inducing dendritic cell migration into the draining lymph nodes, *Int Immunopharmacol* 3:627-42, (2003)]。使用一步 RT-PCR 试剂盒 (可由 Invitrogen, Carlsbad, CA 商购) 进行 RT-PCR, 其中逆转录和 DNA 扩增发生在同一反应中。简而言之, 将 1 μ g 总 RNA 用作反应模板, 所述反应在逆转录酶和 Taq 聚合酶这二者存在下包含适宜的引物。混合物于 45°C 温育 30 分钟, 并如下循环 25 次: 94°C, 30 秒; 55°C, 30 秒; 和 72°C, 2 分钟。扩增的适宜阴性对照包括没有逆转录酶的反应。PCR 产物通过 UV 透视用溴化乙锭染色的 1.5% 琼脂糖凝胶显现。

[0172] 7. 淋巴结细胞的 CCL2 生产和 DOTAP 刺激后的 BMDC

[0173] 在 C57BL/6 雌性小鼠 (n = 5) 接受 PBS、DOTAP/E7 或 DOTAP/E7/MAP 激酶抑制剂皮下注射后 2 天, 通过 CCL2 ELISA 试剂盒 (由 BD Biosciences 市售可得) 分析在引流淋巴结中的 CCL2 产量。在如所述的重组 mGM-CSF 和 mIL-4 存在下将得自 C57BL/6 小鼠的 BMDC

培养 6 天。在第 6 天时,用培养基对照或脂质体于 37°C 刺激 BMDC(在 1mL 中的 10^6 个细胞/孔)1 小时、24 小时或 48 小时。对于抑制剂治疗,将抑制剂与 BMDC 预温育 20 分钟,之后进行脂质体刺激。通过 CCL2ELISA 试剂盒分析上清液中的 CCL2 产量。

[0174] 8. CCL2 免疫组织化学染色

[0175] 在第 2 天除去小鼠的引流淋巴结,包埋入 OCT 化合物中,在液氮中速冻,并储存于 -80°C ,直至用于免疫组织化学分析。按照生产商的方案使用山羊 ABC 染色系统(可由 Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA 商购)。简而言之,切下 $8\mu\text{m}$ 厚的引流淋巴结的冷冻 (cryostat) 切片,并在冷丙酮中固定 10 分钟,用 PBS 洗涤 3 次,每次洗涤 5 分钟。然后将切片顺序地在 1%过氧化氢 (H_2O_2 溶液) 中温育 10 分钟,以封闭内源过氧化物酶,在 1.5%封闭血清(驴血清)的 PBS 溶液中温育 60 分钟,然后与一抗(1 : 100 稀释度;可由 Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA 商购)于 4°C 温育过夜。然后将载玻片与生物素化二抗(1 : 150 稀释度;可由 Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA 商购)和 AB 酶试剂温育 30 分钟,并与 3 滴过氧化物酶底物温育 10 分钟或更长时间。

[0176] 9. 蛋白质印迹分析

[0177] 在不同的处理后收集 BMDC 细胞裂解物,将总细胞蛋白在聚丙烯酰胺 /SDS 凝胶上解析,然后转移至聚偏二氟乙烯膜上。用 5%脱脂乳的 Tris 缓冲盐水溶液封闭膜 1 小时,然后与一抗温育 1 小时至过夜。在用 Tris 缓冲盐水洗涤膜 3 次之后,将膜与缀合二抗的辣根过氧化物酶温育 1 小时。使用 ECL plus (Amersham International) 继之以放射自显影通过增强的化学发光检测与蛋白带相关的过氧化物酶活性。

[0178] 10. siRNA 处理

[0179] 用针对 ERK1 的 siRNA 和对照 siRNA(可由 Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA 商购),使用脂转染胺 2000 试剂(可由 Invitrogen, Carlsbad, CA 商购),按照生产商的说明进行 RNA 干扰实验。简而言之,在第 5 天,将 BMDC 以 5×10^5 个/孔接种在 12 孔板中,并立即使用 $4\mu\text{l}$ 转染试剂用 80nM siRNA 转染。将细胞与 DOTAP 或 LPS 再温育 16 小时。通过 ELISA 分析上清液的 CCL2。

[0180] B. 结果

[0181] 转化树突细胞系 DC2.4 已被表明是 APC 的良好模型 [Mendoza L. 等人, Prophylactic, therapeutic and anti-metastatic effects of BMDC and DC lines in mice carrying HPV 16-associated tumours, Int J Oncol 23:243-7, (2003); Okada N. 等人, Effects of lipofectin-antigen complexes on major histocompatibility complex class I-restricted antigen presentation pathway in murine dendritic cells and on dendritic cell maturation, Biochim Biophys Acta 1527:97-101, (2001)], 使用其通过使用 Affymetrix 微阵列分析研究由 DOTAP 诱导的整体基因调节(图 15A)。数据表明, DOTAP 诱导几种趋化因子的过表达,所述趋化因子包括单核细胞趋化蛋白-1 (“MCP-1”) /CC 趋化因子-2 (“CCL2”)、巨噬细胞炎性蛋白-1 α (“MIP-1 α ”) /CC 趋化因子-3 (“CCL3”)、巨噬细胞炎性蛋白-1 β (MIP-1 β) /CC 趋化因子-4 (“CCL4”)。除了 CC 趋化因子诱导以外, IL-1 信号被下调,因为 IL-1 β 降低,且 IL-1 受体拮抗剂 (“IL1RA”) 在 $50\mu\text{M}$ DOTAP 处理 16 小时时增加。令人感兴趣的是,树突细胞标记 CD11c 由 DOTAP 脂质

体诱导,提示阳离子脂质在树突细胞成熟中起作用。通过用鼠 BMDc 进行的 RT-PCR 证实趋化因子 mRNA 的诱导 (图 15B)。

[0182] 如前所述,趋化因子涉及淋巴细胞迁移,并在免疫应答中起重要作用。趋化因子诱导可以解释如前所述的阳离子脂质体的主要佐剂活性。该假说提示我们进一步研究作为该过程基础的详细机制。使用由不同脂质制备的脂质体确定趋化因子的诱导是否是由脂质体引起的一般现象。使用 BMDc 的结果表明,仅季阳离子脂质体 (DOTAP 和 DOEPC) 诱导来自 BMDc 的 MCP-1/CCL2 释放。中性电荷的 (DOPC 和 DOG) 和负电荷的 (DOPS 和 DOPG) 脂质体不诱导 (图 165)。DOTAP、DODAP 中任一种的叔胺类似物也不诱导活性,提示所述活性需要脂质中的季氨基头基。在实验中还包括作为阳性对照的 LPS。图 16 还表明,阳离子脂质体的 CCL2 诱导在 24 小时时达到最大量,因为 48 小时温育没有导致更高水平的趋化因子产生。我们的数据还表明, DOTAP- 诱导的 CCL2 表达是剂量依赖性的 (图 17)。5 μ M DOTAP 诱导来自 BMDc 的显著量的 CCL2,并于 45-75 μ M 达到最大诱导。为了鉴别哪种途径涉及 BMDc 中由 DOTAP 引起的 CCL2 诱导,使用几种对不同的信号转导途径特异性的抑制剂。ERK 途径的特异性抑制剂 PD98059 (“PD”) 和 U-0126 (“U”) 几乎完全消除 CCL2 生产,但令人惊奇的是, p38 途径抑制剂 SB203586 (“SB”) 协同增加由 DOTAP 诱导的 CCL2 生产 (图 18)。我们的数据还清楚表明, PKC 途径和 Src 激酶不涉及由 DOTAP 诱导的 CCL2 生产,因为 PKC 抑制剂 GF109203X (“GF”) 和 Src 激酶抑制剂 PP2 不具有抑制作用。图 18 还表明, PI-3 激酶和 Gi- 依赖性 G- 蛋白偶联受体 (GPCR) 可能涉及 DOTAP 处理时的 CCL2 释放,因为渥曼青霉素 (“Wort”) 和百日咳毒素 (“PTx”) 具有某些抑制作用。

[0183] 已知某些趋化因子由 ERK 途径调节 [Yoo J.K. 等人, IL-18 induces monocyte chemotactic protein-1 production in macrophages through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and MEK/ERK1/2 pathways, J Immunol 175: 8280-6, (2005)], 并在我们的系统中被验证。使用 BMDc 研究 ERK 途径的活化,我们的数据表明, DOTAP 在接触的 10 分钟之内诱导 ERK 磷酸化,磷酸化 -ERK (pERK) 保持高水平至少 40 分钟 (图 19A)。另外, p38 也被 DOTAP 稍微活化。然而,在 DOTAP 温育后没有检测到 I κ B 磷酸化和随后的降解 (未显示数据),提示 NF- κ B 不涉及由 DOTAP 启动的信号转导,与我们先前的发现相一致 [Cui Z. 等入, Immunostimulation mechanism of LPD nanoparticle as a vaccine carrier, Mol Pharm 2:22-8, (2005)]。蛋白质印迹表明, p38 抑制也可以协同增加由 DOTAP 触发的 ERK 磷酸化,提示 ERK 途径和 p38 被相反调节 (图 19B)。换句话说, p38 的活化可以抑制 ERK 的活化。与图 18 中的 ELISA 数据相一致,我们的数据还表明, DOTAP 诱导的 ERK 活化由 PI-3 激酶介导,因为渥曼青霉素抑制 DOTAP 诱导的 ERK 磷酸化。但是, Gi 抑制剂 PTx 对 DOTAP 诱导的 ERK 磷酸化仅显示出轻微的抑制作用 (图 19C)。另一方面, PKC 途径和 Src 激酶不涉及该过程,因为 GF 和 PP2 对由 DOTAP 诱导的 ERK 磷酸化没有作用。

[0184] 为了进一步验证 ERK 途径涉及由 DOTAP 启动的 CCL2 释放,使用 RNA 干扰方法封闭 BMDc 中的 ERK 基因表达。图 20A 表明,在 24 小时处理后 ERK1 被特异性 siRNA 下调。DOTAP 诱导的 CCL2 释放在用阻断 ERK1 基因表达的 siRNA 处理的细胞中也被减弱 (图 20B)。然而,即便 ERK1 被下调, LPS 也继续诱导 CCL2 释放 (图 20B)。数据还证实, ERK1 siRNA 处理不影响其它信号转导途径。

[0185] 迄今为止,数据表明了在外体的 DOTAP- 诱导的 ERK 活化和 CCL2 下游诱导。我们

已研究了以上的信号转导机制是否在体外对 DOTAP/E7 佐剂活性起作用。DOTAP/E7 脂质体疫苗制剂用于皮下免疫小鼠,收集引流淋巴结,并通过 ELISA 测定 CCL2。数据表明了免疫后在引流淋巴结中累积的 CCL2,最大累积为注射后 2 天(图 21A)。这些数据由免疫组织化学染色证实(图 21B)。相同的数据还证实,更多的淋巴细胞在 DOTAP/E7 处理时迁移至引流淋巴结,导致淋巴结增大。

[0186] 还在 DOTAP/E7 脂质体复合物中配制 ERK 和 p38 途径的抑制剂。DOTAP/E7/U-0126 和 DOTAP/E7/SB203580 形成澄清的悬浮液,但 PD98059 难以在 DOTAP/E7 复合物中配制。稳定的 DOTAP/E7/ 药物制剂具有与 DOTAP/E7 制剂相似的 ζ 电位、粒径和抗原载荷能力,表明药物掺入不显著改变疫苗的物理特征。用 DOTAP/E7/U-0126 和 DOTAP/E7/SB203580 皮下注射小鼠。与体外数据相一致, DOTAP/E7 制剂诱导引流淋巴结的 CCL2 累积,而 U-0126 和 SB-203580 相反地调节 CCL2 诱导(图 22A)。为了确定 ERK 和 p38 途径是否涉及 DOTAP/E7 的抗肿瘤活性,我们已检验了 DOTAP/E7/ 药物制剂的抗肿瘤活性。如图 22B 所示,用 100nmol 脂质剂量的 DOTAP/E7 处理的荷瘤小鼠对 TC-1 肿瘤生长表现出强生长抑制作用。ERK 抑制剂 U-0126 在与 DOTAP/E7 共配制时,以相似的脂质剂量完全消除 DOTAP/E7 的抗肿瘤活性。类似地,在小鼠接受与 SB203580 共配制的 DOTAP/E7 治疗时,显示出抗肿瘤活性的部分抑制,表明两种 p38ERK 途径对 DOTAP/E7 复合物的抗肿瘤活性起重要作用。

[0187] C. 讨论

[0188] 脂质体为闭合的囊泡结构,由水合两性脂质双层组成 [Small D.M., Surface and bulk interactions of lipids and water with a classification of biologically active lipids based on these interactions, Federation Proc. 29:1320-1326, (1970)]。自从它们在 1974 年被鉴定为佐剂 [Allison A.G. 和 Gregoriadis G., Liposomes as immunological adjuvants, Nature 252:252, (1974)] 以来,脂质体已作为蛋白和 DNA 疫苗的传递系统被广泛研究 [Chen W.C. 和 Huang L, Non-viral vector as vaccine carrier, Adv Genet 54:315-37, (2005); Gregoriadis G. 等人, Vaccine entrapment in liposomes, Methods 19:156-62, (1999); Perrie Y. 等人, Liposome-mediated DNA immunization via the subcutaneous route, J Drug Target 11:555-63, (2003)]。脂质体显示出抗原传递的几种独特优势。首先,在脂质组成、大小、成层性 (lamellarity)、电荷和制备方法方面存在显著的多样性,可根据特定用途选择它们。而且,考虑到载体对抗原的比率,脂质体囊泡系统以囊化或稳定结合的形式具有高抗原载荷效率。由安全性观点看,脂质体是生物可降解的、生物相容的,并具有低免疫原性 [Copland M.J. 等人, Lipid based particulate formulations for the delivery of antigen, Immunol Cell Biol 83:97-105, (2005); Hagan D.T. 和 Singh M., Microparticles as vaccine adjuvants and delivery systems, Expert Rev Vaccines 2:269-83, (2003)]。此外,脂质体还已经被用于将蛋白质抗原导入胞质 MHC I 类途径中,以产生 CD8+T 细胞应答 [Chikh G. 和 Schutze-Redelmeier M.P., Liposomal delivery of CTL epitopes to dendritic cells, Biosci Rep 22:339-53, (2002)]。

[0189] 因为阳离子脂质体可以与带负电荷的细胞膜相互作用,所以它们被广泛用于基因疗法和疫苗传递 [Anderson P., Effective vaccination of mice against Mycobacterium tuberculosis infection with a soluble mixture of secreted mycobacterial

proteins, *Infect Immun* 62:2536-44, (1994); Hasegawa A. 等人, Nasal immunization with diphtheria toxoid conjugated-CD52 core peptide induced specific antibody production in genital tract of female mice, *Am J Reprod Immunol* 34:305-11, (2002)]. 然而, 依据阳离子脂质体能够活化先天免疫应答, 已将其自身视为惰性的 [Moinegeon P. 等人, Towards the rational design of TH1 adjuvants, *Vaccine* 19:4363-72, (2001)]. 然而, 阳离子脂质体还可以诱导共刺激分子 CD80 和 CD83 的表达, 并活化人树突细胞 (图 23A-E 和 25A-B)。它们还诱导人树突细胞, 以产生涉及产生对疾病的有效免疫应答的关键趋化因子和细胞因子 (图 24A-F)。所有这些发现提示, 阳离子脂质体除了有效传递至树突细胞以外, 还是免疫系统的有效活化剂。

[0190] 与目前使用的佐剂如 Alum、CpG 和 CFA 不同, 阳离子脂质免疫调节剂不增强 NF- κ B 的表达, 证实阳离子脂质引起的免疫系统刺激通过 NF- κ B 非依赖性机制发信号, 消除了我们的阳离子脂质型疗法的 LPS-样炎症反应的可能性。这些研究表明, 阳离子脂质体除了为有效传递系统之外, 还属于安全性改善的一类独特的免疫刺激物。

[0191] 在本说明书中, 研究了阳离子脂质体的佐剂活性的可能的分子机制。研究了 MAP 激酶信号转导途径的多种组分对阳离子脂质的免疫刺激活性的作用。研究了脂质作为树突细胞的活性刺激剂。已证实趋化因子的产生由阳离子脂质诱导, 该诱导主要由 ERK 途径介导。而且, 数据清楚表明, p38 途径负调节该过程。最近的报告证实, p38 对 IL-2 生产起负作用, 该负作用主要通过其调节 ERK 的活性的能力介导。p38 特异性抑制剂诱导 ERK 活化, 最终导致 IL-2 基因活化增加 [Kogkopoulou O. 等人, Conditional up-regulation of IL-2 production by p38 MAPK inactivation is mediated by increased Erk1/2 activity, *J Leukoc Biol* 79:1052-60, (2006)]. p38 的磷酸化和活化增强其与 ERK1/2 的相互作用, 并与 ERK1/2 磷酸转移酶活性的抑制相关, 提示活化的 p38 可能整合 ERK1/2, 并通过 MEK1 立体阻断其磷酸化 [Zhang H. 等人, Stress-reduced inhibition of ERK1 and ERK2 by direct interaction with p38 MAP kinase, *J Biol Chem* 276:6905-8, (2001)]. 最近的工作提示, 强烈持续的 ERK 磷酸化导致树突细胞的 AP-1 转录因子 c-Fos 磷酸化, 这又抑制 T_H1-限定性细胞因子 IL-12 的表达, 因此有利于 T_H2 偏倚。然而, 我们的结果表明了与这些报告的两个显著差异。首先, 用于这些研究的 Pam-3-cys (TLR-2 配体) 相比于 LPS 显示出增强 ERK 活化 (Dillon 等人, 2004), 但阳离子脂质诱导的 ERK 活化低于利用 LPS 所观察到的。我们还检验了 T_H2 细胞因子 IL-10, 结果表明 DOTAP 不诱导 IL-10 (未显示数据)。因此, 由 DOTAP 诱导的 ERK 信号不足以触发 T_H2 反应。其次, DOTAP 诱导的 IL-1 信号下调也可以抑制 T_H2 反应。似乎 DOTAP 诱导的 ERK 活化被正确控制。

[0192] 我们的结果提示, DOTAP 诱导的 ERK 活化和 CCL2 诱导需要 PI-3 激酶。需要进一步的研究来鉴别 PI-3 激酶和 ERK 之间的精确关联。尽管 ELISA 数据表明, PTx 抑制由 DOTAP 诱导的 CCL2 释放, 但 DOTAP 诱导的 ERK 磷酸化仅被 PTx 稍微抑制, 如蛋白质印迹数据所示。因此, G 蛋白偶联受体可以涉及或者可以不涉及由 DOTAP 启动的信号转导。令人感兴趣的是, 溶血磷脂酰胆碱 (LPC) 诱导 G2A 受体依赖性 ERK 活化和 T 细胞迁移 [Radu C.G. 等人, T cell chemotaxis to lysophosphatidylcholine through the G2A receptor, *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:245-50, (2004)]. 作者最初报道, LPC 是 G2A 受体的配体 [Kabarowski J.H. 等人, Lysophosphatidylcholine as a

ligand for the immunoregulatory receptor G2A, *Science* 293:702-5, (2001)], 但随后, 通过调节胞内整合和 G2A 受体表面表达的机制证实 LPC 诱导的 ERK 活化 [Wang L 等人, *Lysophosphatidylcholine-induced surfacereistribution regulates signaling of the murine G protein-coupled receptor G2A*, *Mol Biol Cell* 16:2234-47, (2005)]. 活性阳离子脂质包含大的极性头基和两个长酰基链。这样的结构特征可能有利于它们插入到脂质膜中, 导致脂质单层的自发弯曲的可能改变, 以及膜蛋白的构象和功能改变。

[0193] 因为 p38 负调节 CCL2 诱导的 ERK 活化, 所以我们预期, 在 DOTAP/E7 疫苗中配制的 p38 抑制剂 SB203580 可能增强抗肿瘤活性。然而, 发现相反的结果, 暗示 p38 在 DOTAP/E7 诱导的肿瘤退化中也可能起正面作用。因为阳离子脂质体可以诱导活性氧物质 (ROS) 的产生, 活性氧物质可以导致 p38 活化, 所以有可能 DOTAP 诱导的 p38 活化是经由 ROS (Iwaoka 等人, 2006)。累积的证据表明, p38 活化诱导来自树突细胞的 T_H1 细胞因子释放 [DeSilva D. R. 等人, *The p38 mitogen-activated protein kinase pathway in activated and Anergic Th1 cells*, *Cell Immunol* 180:116-23, (1997); Yu J. J. 等人, *Regulation and phenotype of an innate Th1 cell: role of cytokines and the p38 kinase pathway*, *J Immunol* 171:6112-8, (2003)]. 在哺乳动物物种中, MAP 激酶 (ERK、p38 和 JNK) 涉及免疫应答的所有方面, 从先天免疫的启动期至适应性免疫的活化, 并至免疫功能终结时的细胞死亡 [Dong C 等人, *MAP kinases in the immune response*, *Annu Rev Immunol* 20:55-72, (2002)]。

[0194] 实验性佐剂的巨大变异性可应用于动物, 它们中的一些已在临床实验中测试。它们包括几种油包水乳剂、脂质体和其它化学佐剂 [Vogel, F. R. 和 Powell, M. F. *A compendium of vaccine adjuvants and excipients*. *Pharm Biotechnol* 6:141 (1995)]. 然而, 除了铝盐以外, 仅流感病毒体 [Gluck, R. 和 Walti, E., *Biophysical validation of Epaxal* Berna, a hepatitis A vaccine adjuvanted with immunopotentiating reconstituted influenza virosomes (IRIV). *Dev Biol (Basel)* 103:189 (2000)] 和 Chiron 的 MF59 [Kahn, J. O. 等人, *Clinical and immunologic responses to human immunodeficiency virus (HIV) type 1 gp120 subunit vaccine combined with MF59 adjuvant with or without muramyl tripeptide dipalmitoyl phosphatidylethanolamine in non-HTV-infected human volunteers*. *J Infect Dis* 170:1288 (1994)] 已经投放市场。和阳离子脂质体 (未公开的数据) 类似, 基于亚微米乳液的佐剂 MF59 被树突细胞内化 [Dupuis, M. 等人, *Dendritic cells internalize vaccine adjuvant after intramuscular injection*. *Cell Immunol* 186:18 (1998)]. 其刺激多种免疫活性, 所述活性导致针对共传递的抗原的高抗体和 T- 细胞反应。然而, 按照对 HSV 和流感疫苗的临床实验报告 [Jones, C. A. 和 Cunningham, A. L., *Vaccination strategies to prevent genital herpes and neonatal herpes simplex virus (HSV) disease*. *Herpes* 11:12 (2004); 和 Minutello, M. 等人, *Safety and immunogenicity of an inactivated subunit influenza virus vaccine combined with MF59 adjuvant emulsion in elderly subjects, immunized for three consecutive influenza seasons*. *Vaccine* 17:99 (1999)], 动物模型的证据提示, MF59 佐剂增强中和抗体, 而不是 T- 细胞应答。因此, 作为疫苗佐剂的阳离子脂质体不同于 MF59, 因为其产生强烈的细胞介导的免疫应答, 如我们的数据所示。

[0195] 阳离子脂质 / 抗原复合物似乎是曾经报道过的最简单的癌症疫苗制剂。其仅含有两种分子,即抗原和载体。除了E7肽向抗原提呈细胞如树突细胞的胞质传递以外,DOTAP还必须活化DC。实际上,由单独的DOTAP组成的脂质体诱导树突细胞中CD80/CD86共刺激分子的表达。

[0196] 总之,我们的发现首次提示阳离子脂质体为有效的免疫系统刺激剂。本文报告的结果阐明了如DOTAP的阳离子脂质的佐剂活性的分子机制。

[0197] DOTAP介导几种其表达由ERK途径介导的趋化因子和细胞因子的诱导。我们的研究还鉴定出ERK途径为评价阳离子脂质体的佐剂活性的新分子标记。这些标记可用于有效的脂质型佐剂和疫苗传递系统的高通量筛选或设计。

[0198] 实施例3 阳离子脂质 / 抗原复合物在人免疫系统细胞中的免疫刺激能力的证实

[0199] 1. 阳离子脂质 /E7 复合物以脂质剂量依赖性方式活化人树突细胞

[0200] 如上所述制备阳离子脂质体。制剂中使用的E7抗原是由HLA-A*0201限制的已鉴定的人E7肽(HPV-16E7,氨基酸11-20,YMLDLQPETT(SEQ. ID. NO. 2))。所述肽由匹兹堡大学分子医学研究所,Pittsburgh,PA合成。人HLA-A2人树突细胞得自Lonza,Walkersville,MD。融化冷冻的冷冻小管,在补加50 μ g/ml IL-4和GM-CSF的LGM-3培养基(可由Lonza,Walkersville,MD商购)中于37°C和5% CO₂下培养树突细胞,初始铺板密度为在12孔组织培养皿中2ml培养基中的125,000个细胞/cm²。细胞在培养物中培养3天,并通过显微镜检查表现为粘附细胞和圆形细胞的混合物。

[0201] 在第3天用新鲜的50 μ g/ml剂量的IL-4和GM-CSF处理细胞(所有孔),并用10ng/ml的白介素1- β (“IL- β ”)、白介素6(“IL-6”)和TNF- α 的混合物、10 μ g/ml前列腺素E2(“PGE-2”) (阳性活化对照)、未处理(阴性活化对照)和2.5、10和40 μ mol脂质终浓度的DOTAP/E7、2.5、10和40 μ mol脂质终浓度的DOEPC以及2.5、10和40 μ mol脂质和胆固醇终浓度的DOTAP/胆固醇/E7处理测试孔。以25mol%加入脂质双层的稳定剂胆固醇。将处理的树突细胞保持在培养物中达24小时,并收获,用于细胞表面标记染色和流式细胞仪分析。收获的细胞通过血细胞计数器计数,随后向每个样品顺序加入10 μ l的以下抗体缀合物以标记表面标记:CD80-FITC、CD83-APC和CD86-PE(BDBiosciences)。随后使用BD FACscaliber流式细胞仪通过流式细胞术分析表面标记的细胞,并监测在活化时产生的共刺激树突细胞标记分子CD80、CD83和CD86。如在图23A、B和C中所见,用多种脂质剂量的阳离子脂质/E7复合物处理的原初人树突细胞上调树突细胞活化的全部3种共刺激标记的表达,为了抗原成功提呈至T-细胞评价并需要所述表达。如在图23D和E中所见,在药物组合物中还可以包括其它的组分,如稳定剂,而没有负面影响复合物的免疫刺激能力。

[0202] 2. 阳离子脂质 /E7 复合物活化人树突细胞,并诱导趋化因子和细胞因子产生

[0203] 如上所述在培养物中处理和培养人HLA-A2树突细胞(Lonza,Walkersville,MD)。在第3天时,用40 μ mol DOTAP/E7复合物或50 μ mol浓度的有效的免疫刺激剂脂多糖(LPS)(阳性对照)处理细胞。除去测定孔的培养基,并以1300rpm在微离心机中离心5分钟,以沉淀未附着的树突细胞。除去上清液,并用10 μ l/ml Calbiochem(LaJolla,CA)蛋白酶抑制剂混合物第I组(目录号539131)处理,在分析前冷冻储存。由Pierce Biotechnology(Woburn,MA)使用它们的Searchlight蛋白阵列多重ELISA测定分析样品的细胞因子表达。

[0204] 评价 TNF- α 和 IL-12 的产生,已知对细胞免疫应答、CCL3、CCL4、CCL5 和 CCL19 必需的选定趋化因子的产生都进行了评价(图 24A-F)。图 24 图示说明,DOTAP/E7 复合物诱导人树突细胞产生细胞因子和趋化因子。图 24A-F 图示说明,DOTAP/E7 分别诱导产生 TNF- α 、IL-12、CCL3、CCL4、CCL5 和 CCL-19。

[0205] 与用鼠树突细胞获得的观察结果(实施例 1)类似,和 LPS 不同,DOTAP/E7 复合物不诱导促炎细胞因子 TNF- α 的显著产生,证实在人系统中 NF- κ B 介导的信号转导也不由阳离子脂质活化。DOTAP/E7 刺激多种趋化因子的有效产生,证实阳离子脂质用作有效的免疫刺激剂,并提供鼠和人免疫细胞中有效活化的相似关联。

[0206] 3. DOTAP/E7 粒径对人树突细胞活化的作用

[0207] 人 HLA-A2 树突细胞(Lonza, Walkersville, MD)如上所述被处理和和培养物中生长。在第 3 天,用 10ng/ml 的 IL- β 、IL-6 和 TNF- α 的混合物、10 μ g/ml 的 PGE-2(阳性活化对照)、未处理(阴性活化对照)、50 μ mol 浓度的有效的免疫刺激剂脂多糖(LPS)(第二个阳性对照)或 100nm、200nm 和 400nm 粒径的 10 μ mol DOTAP/E7 复合物处理测试孔。在图 25 中所示的结果表明,在免疫疗法的开发中阳离子脂质/抗原复合物可以在广泛粒径范围内使用,以诱导免疫应答。

[0208] 讨论

[0209] 在实施例 1 和 2 中所描述的研究导致开发出免疫治疗制剂,其由阳离子脂质/抗原复合物组成。在用阳离子脂质如 DOTAP 和 DOEPC 刺激时,鼠骨髓源的树突细胞(BMDC)被活化,以表达共刺激分子 CD80 和 CD86[Vangesseri 等人, *Immuno stimulation of dendritic cells by cationic liposomes. Mol Membr Biol* 23:385-395(2006)]。还在 DOTAP 活化的 BMDC 中观察到 MAP 激酶信号转导途径的多种组分和几种趋化因子如 CCL2 的活化。动物研究提示,在特定剂量范围内的 DOTAP 脂质体既用作抗原载体,又用作有效的佐剂,以诱导活化的树突细胞向引流淋巴结迁移,由此导致产生针对携带抗原的细胞如肿瘤细胞的体内抗原特异性 CD8⁺T 淋巴细胞。活化原初人树突细胞的体外测试表明,阳离子脂质是有效的免疫刺激剂,针对 T-细胞识别和抗原提呈所需的共刺激分子的表达促进树突细胞活化。我们还已经证实,在被 DOTAP/E7 脂质体活化时人树突细胞在体外促进人 T-细胞的显著增殖。

[0210] 以上报告的研究鉴定出阳离子脂质体的特别独特的组成和应用,它们可被用于开发简单的、成本有效的和几种衰弱性疾病更为需要的免疫疗法。

[0211] 在不偏离本发明范围的情况下,可以对上述方面和示例性实施方案实施多种改变,预期在以上说明书中包含的所有内容都应被视为阐述性的,而没有限制意义。为此,尽管所述实施例主要论述阳离子脂质 DOTAP、DOEPC 和 DOTMA,但本领域技术人员会认识到,这些阳离子脂质仅仅是示例性的,所述方法适用于其它阳离子脂质。

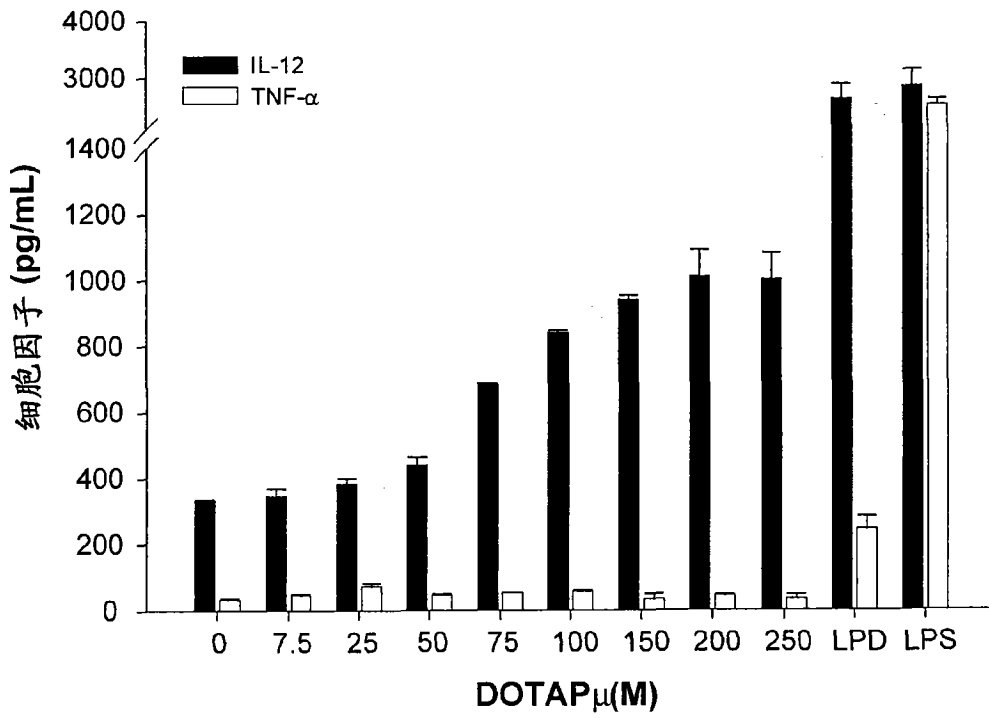


图 1

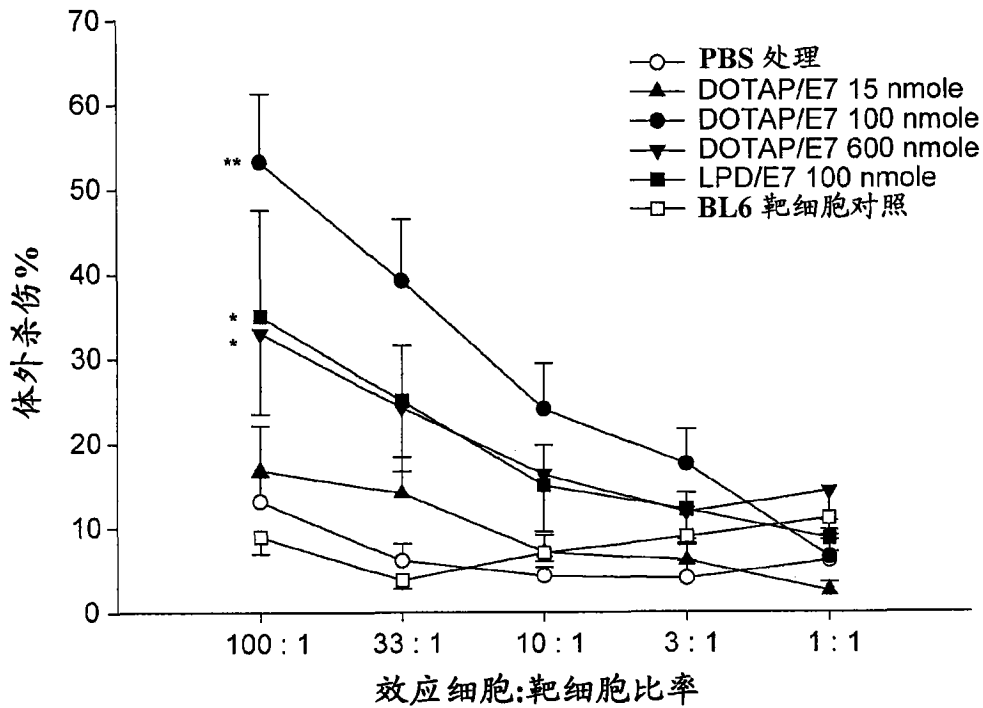


图 2

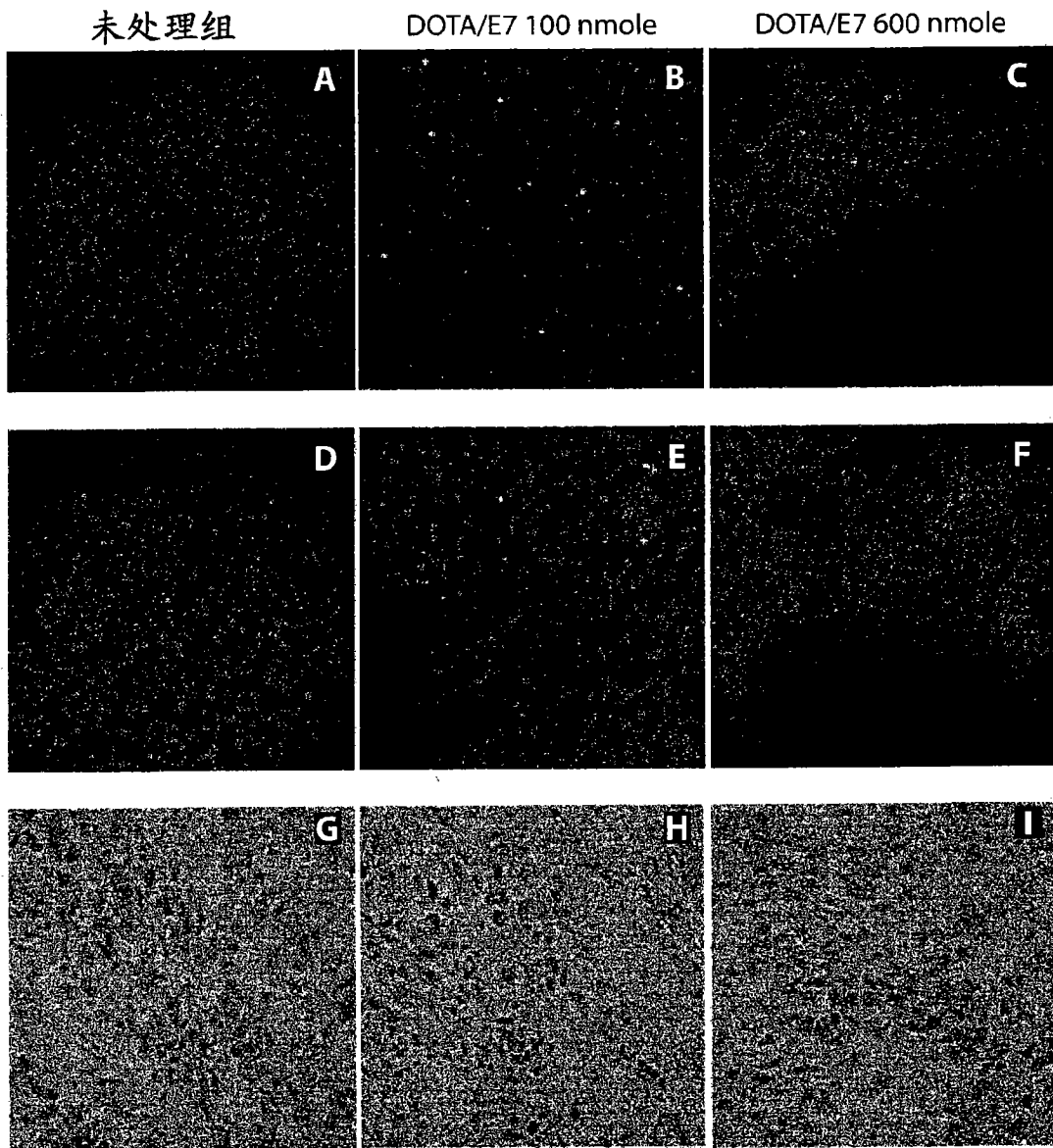


图 3

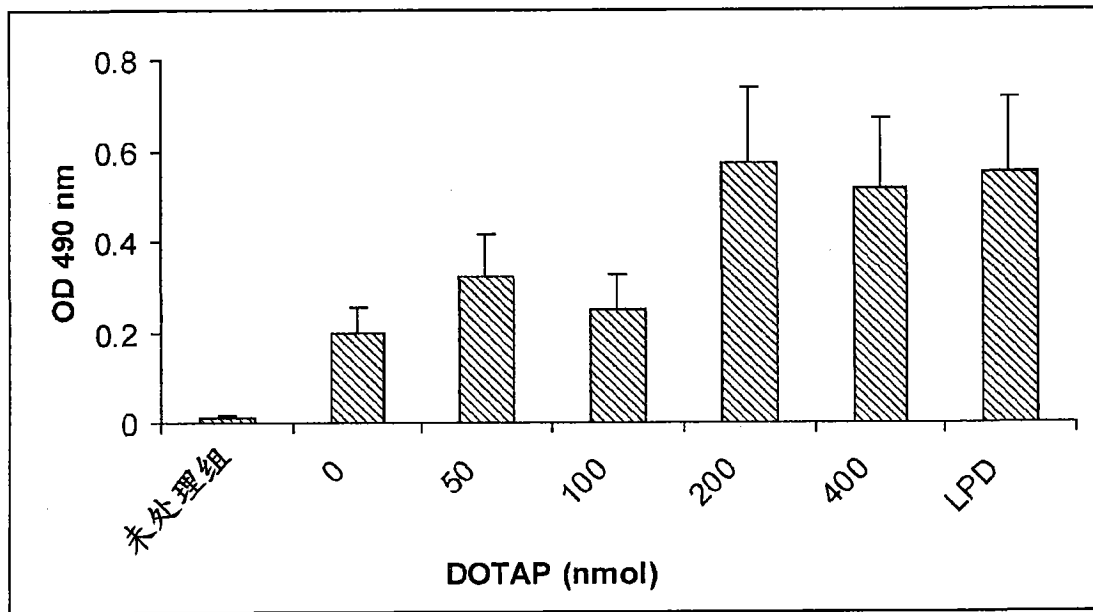


图 4

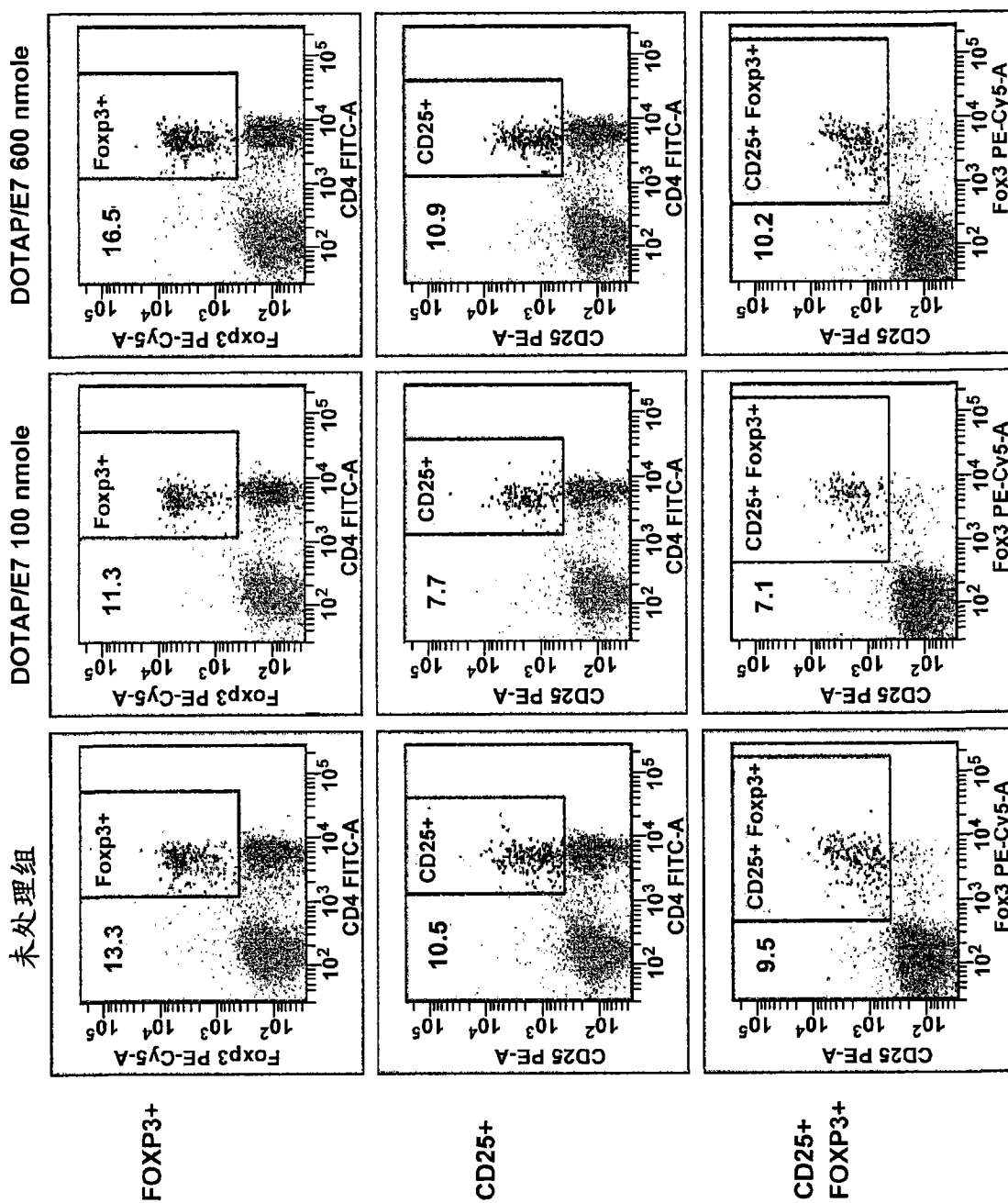


图 5

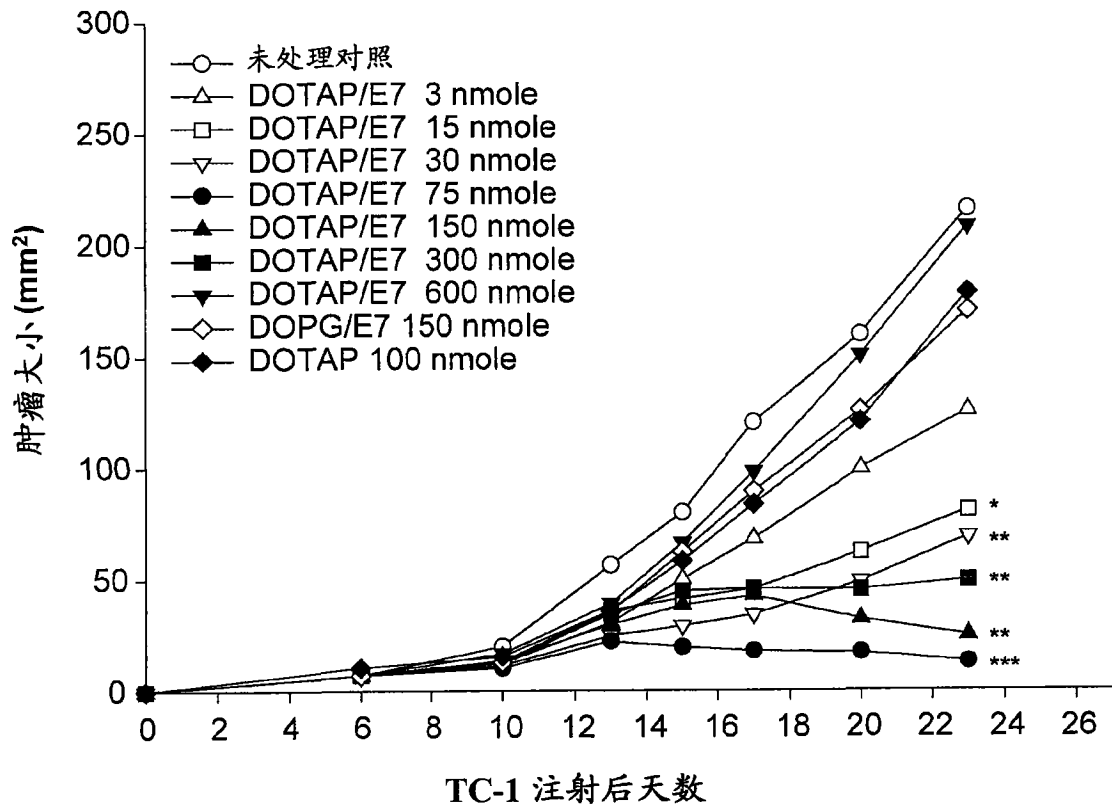


图 6

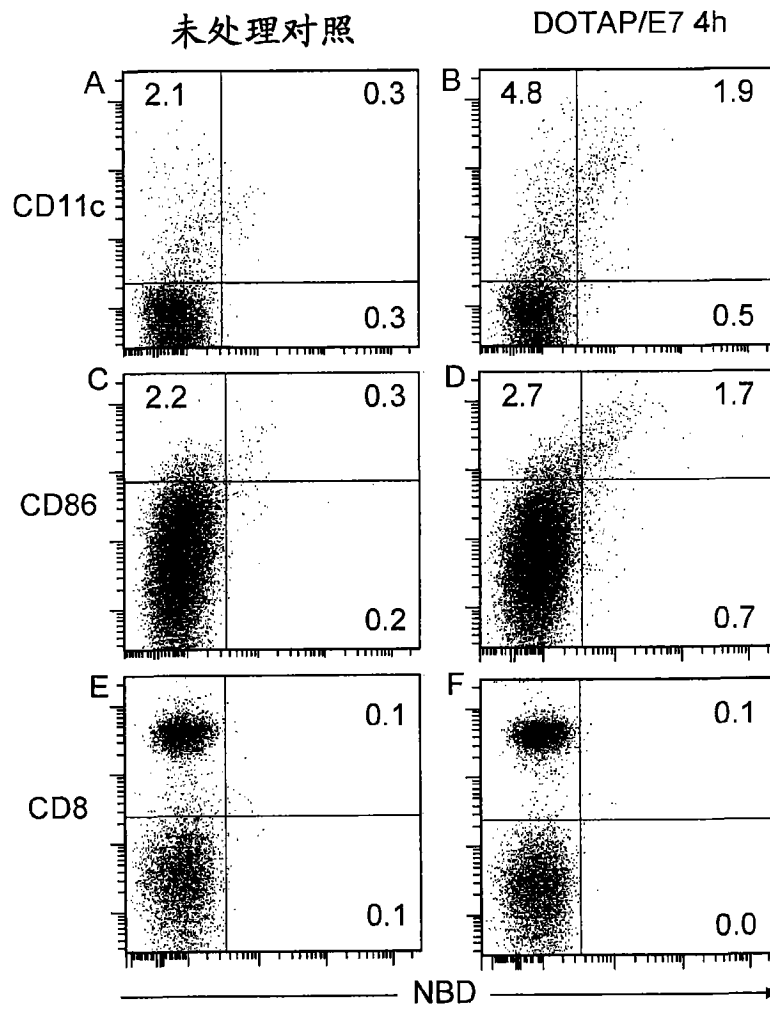


图 7

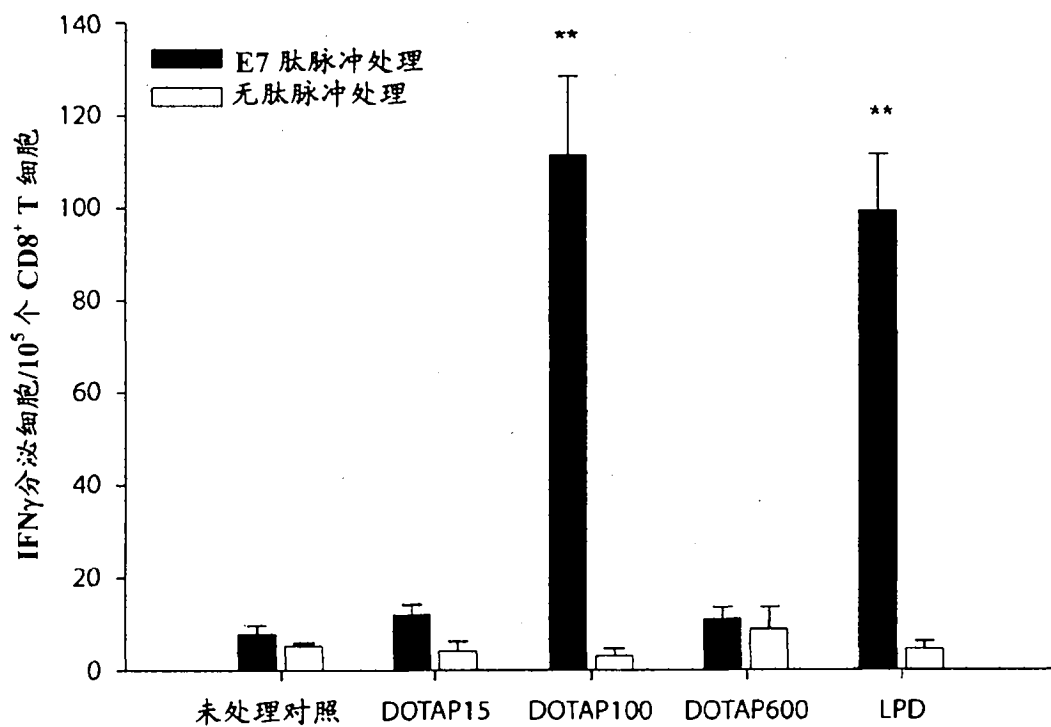


图 8

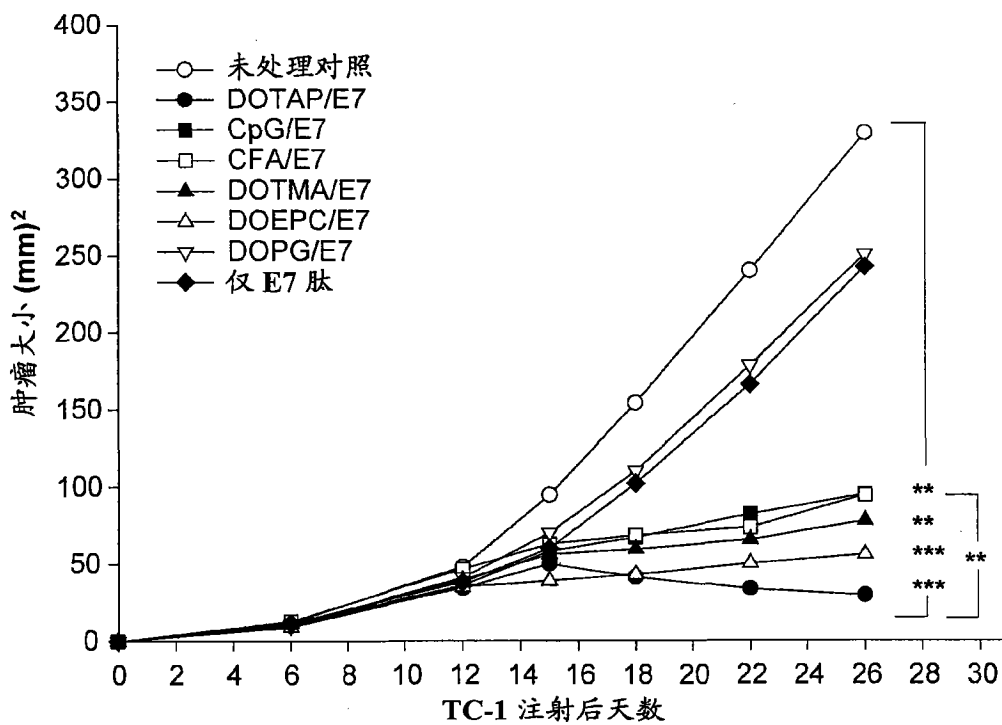


图 9

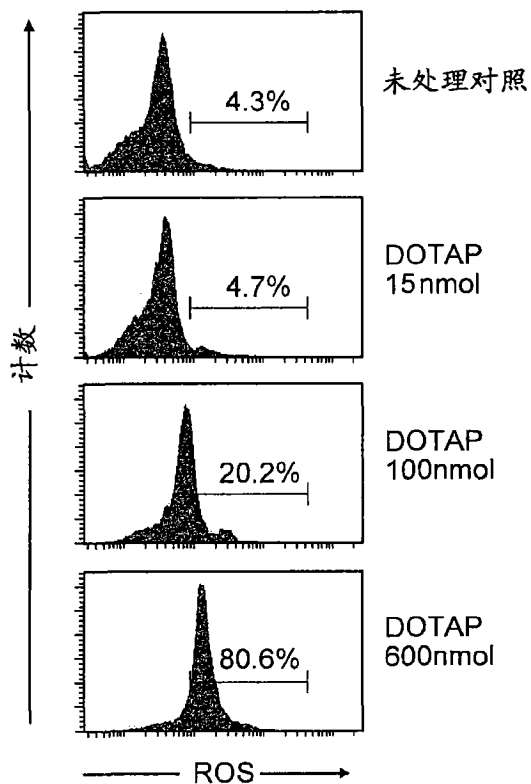


图 10A

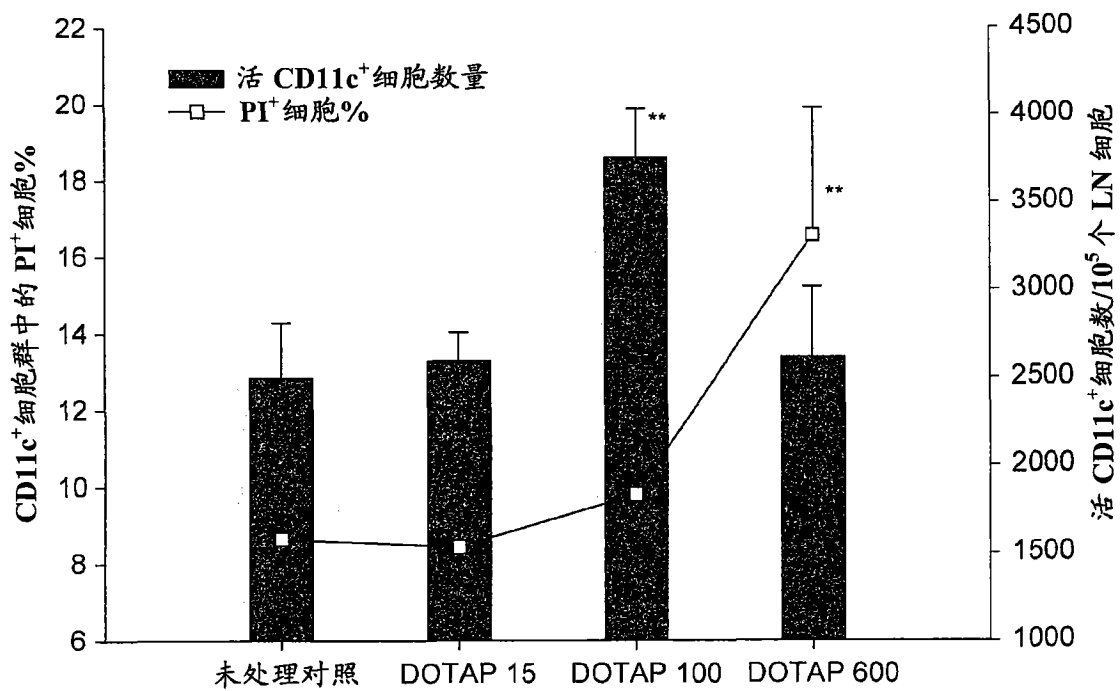


图 10B

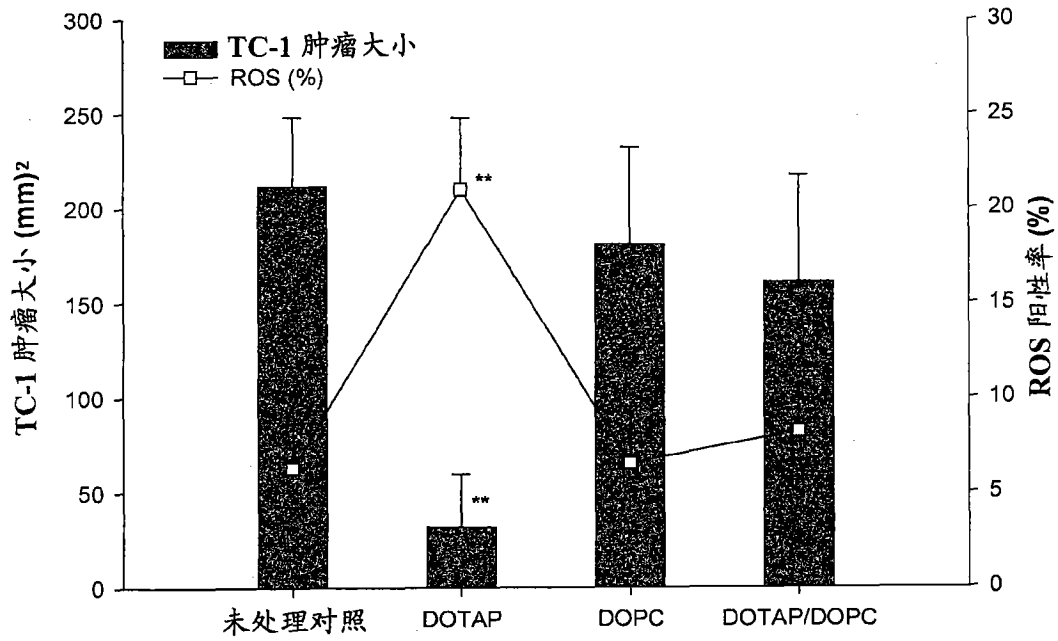


图 10C

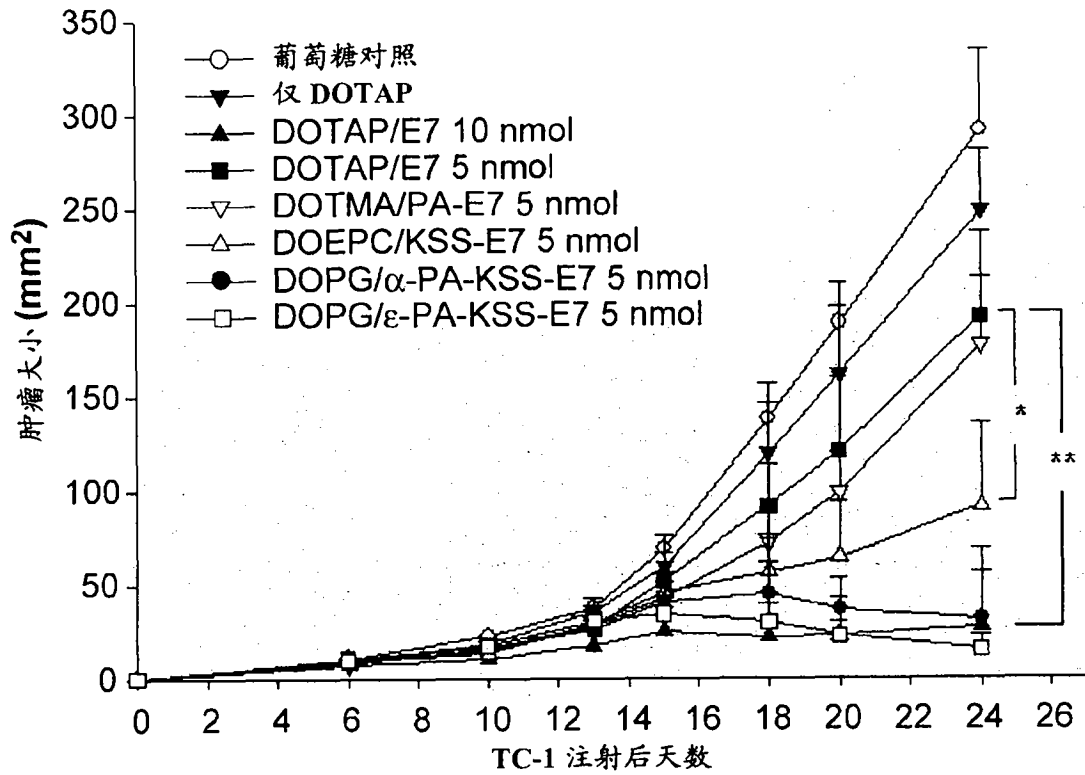


图 11

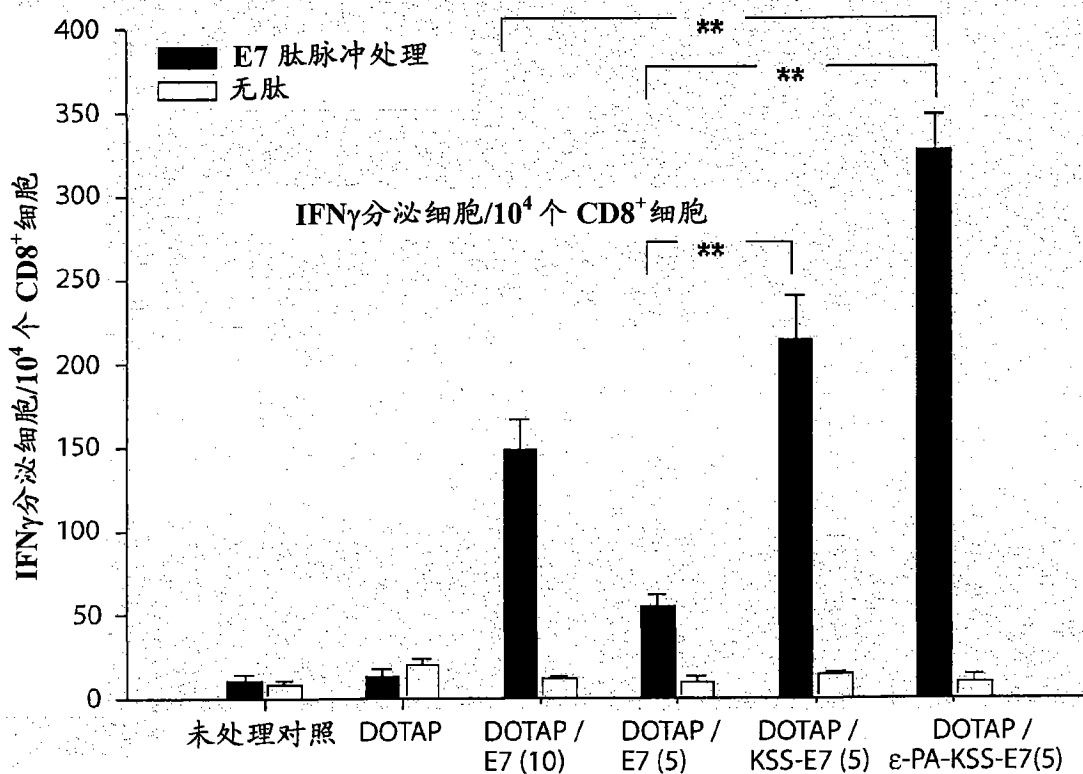


图 12

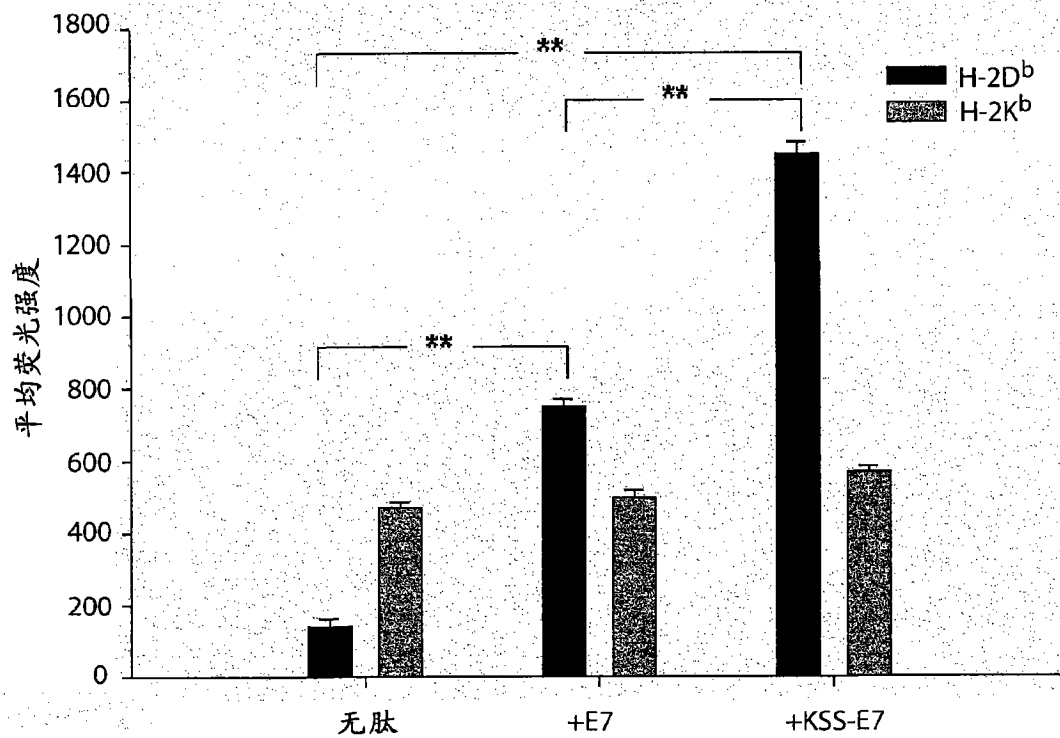


图 13

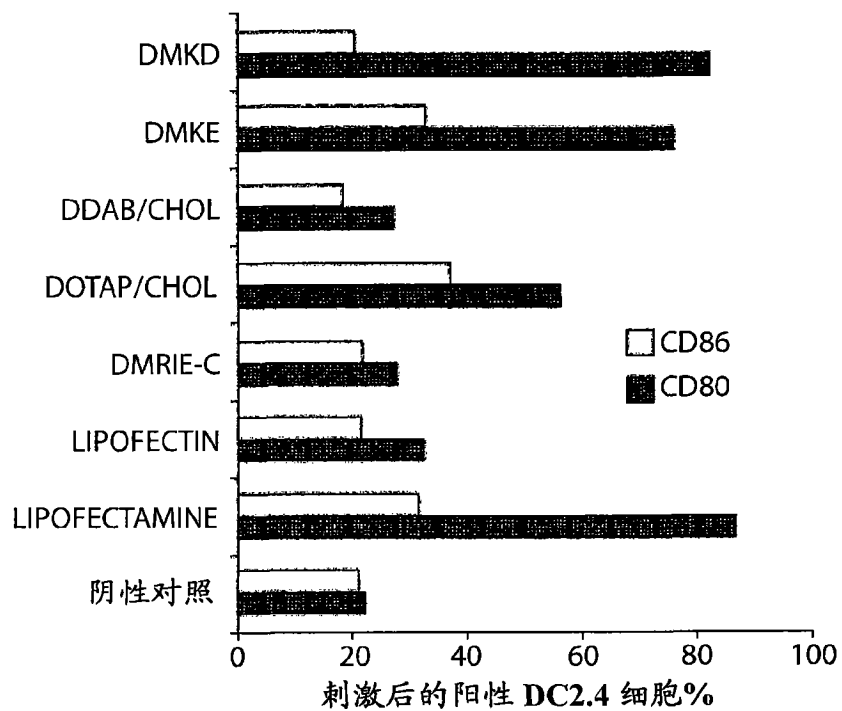


图 14A

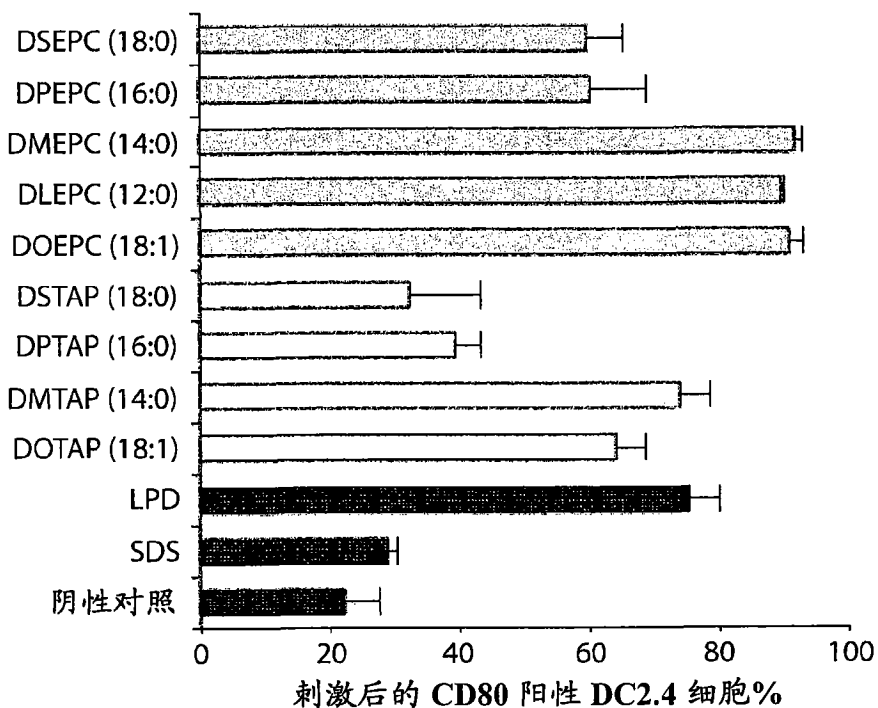


图 14B

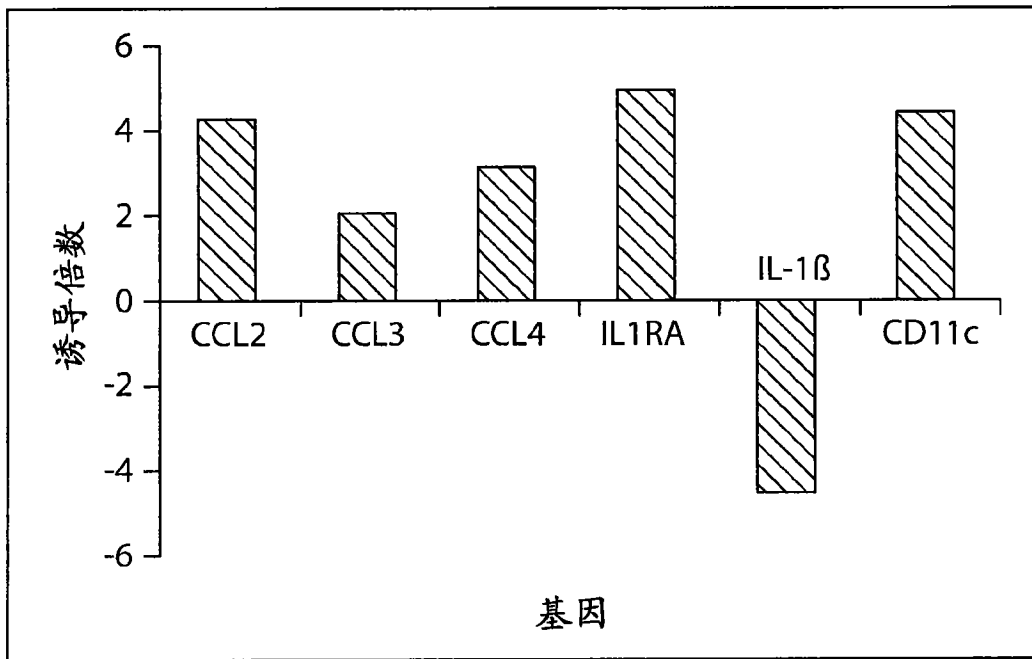


图 15A

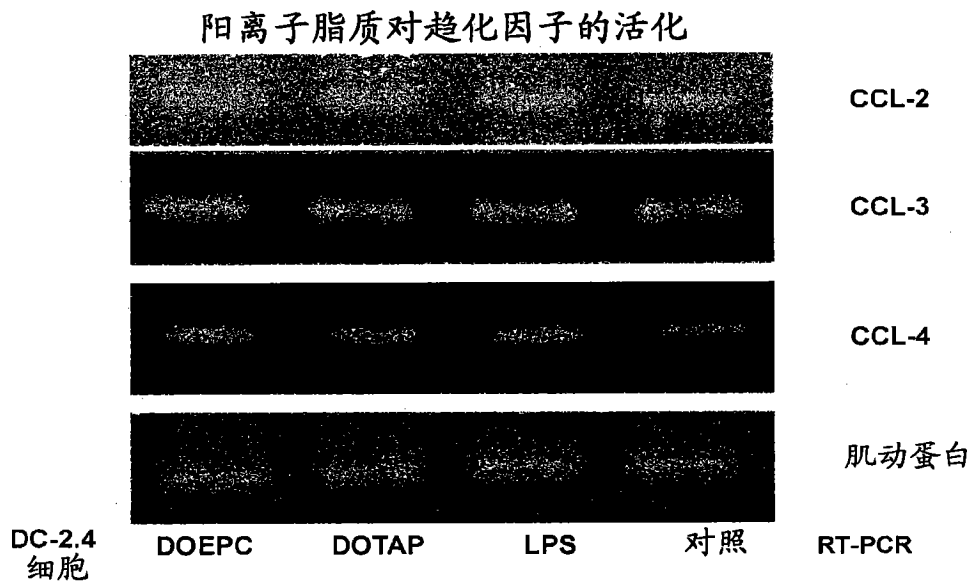


图 15B

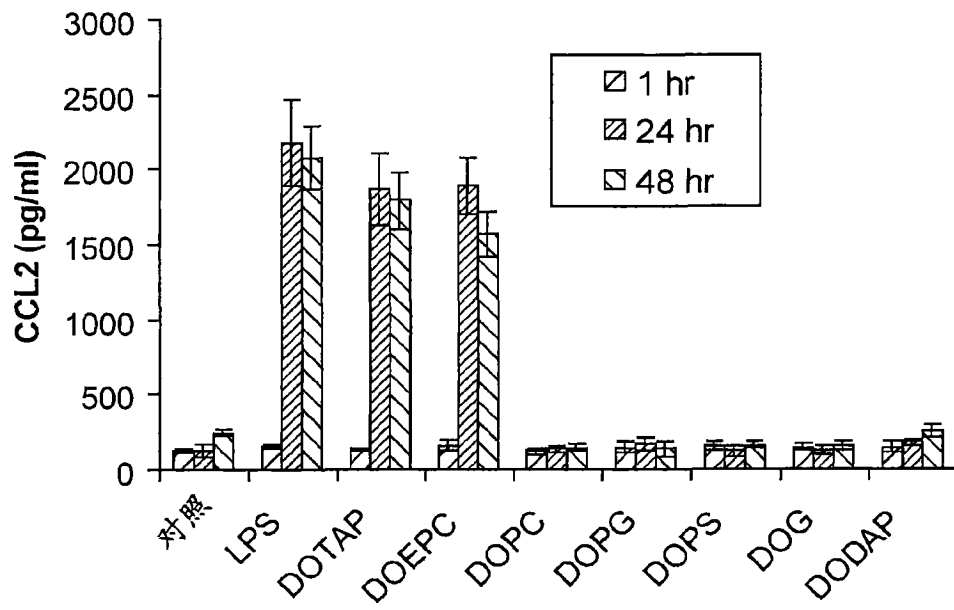


图 16

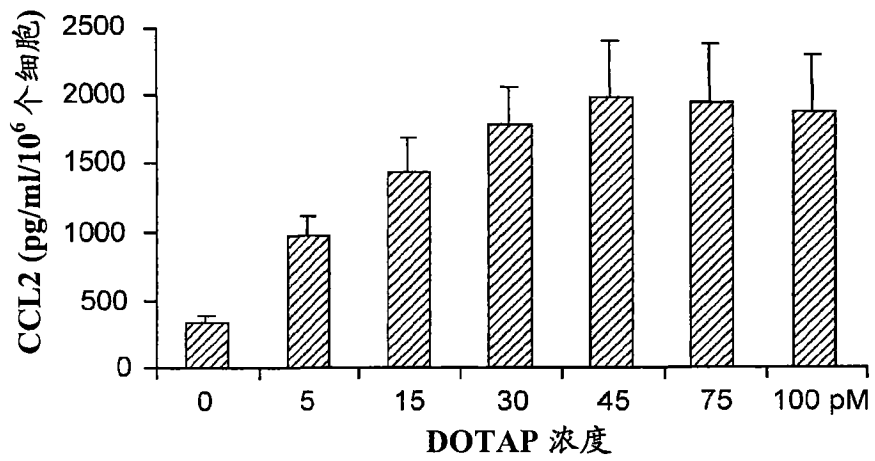


图 17

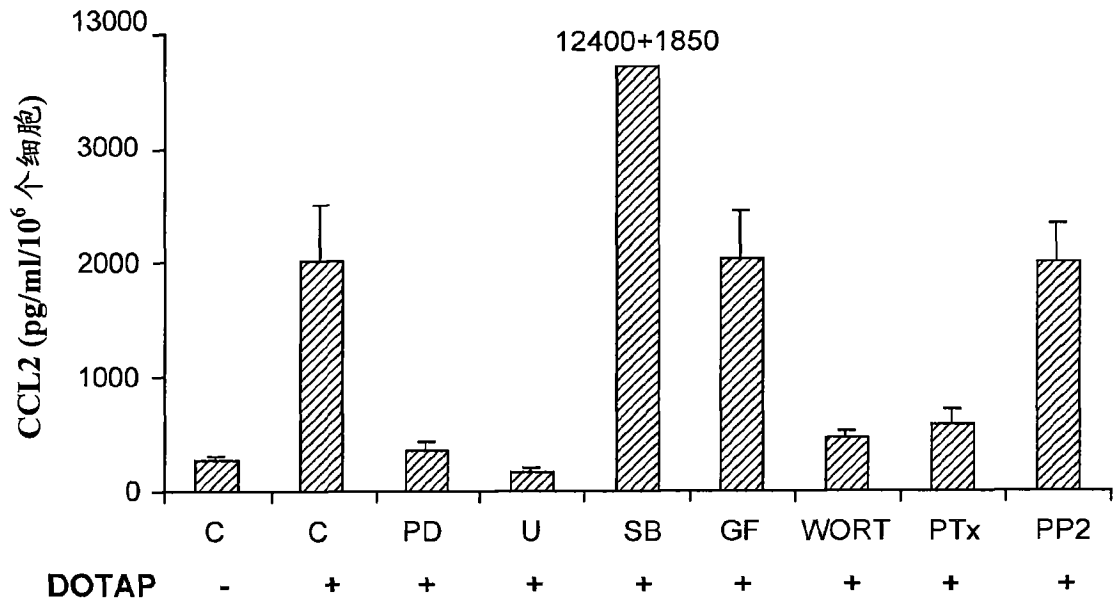


图 18

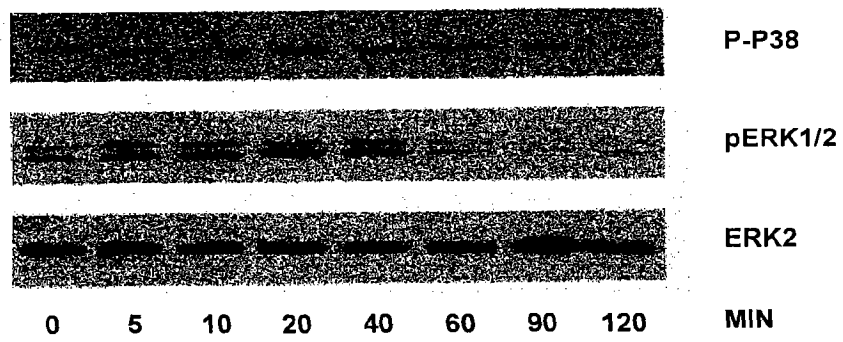


图 19A

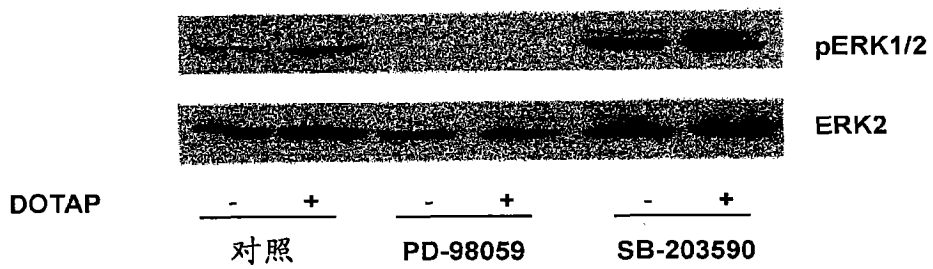


图 19B

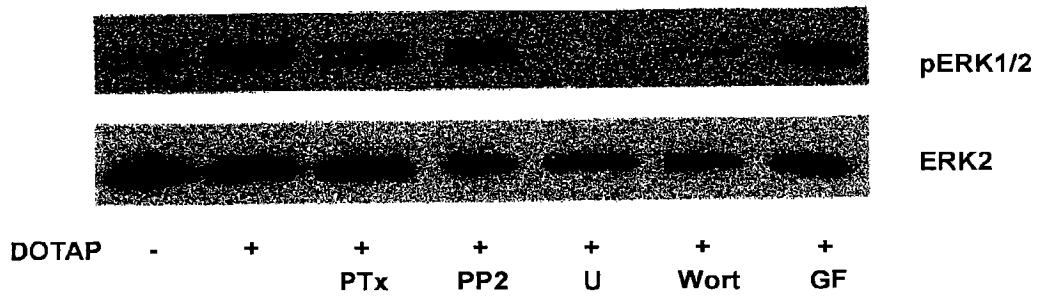


图 19C



图 20A

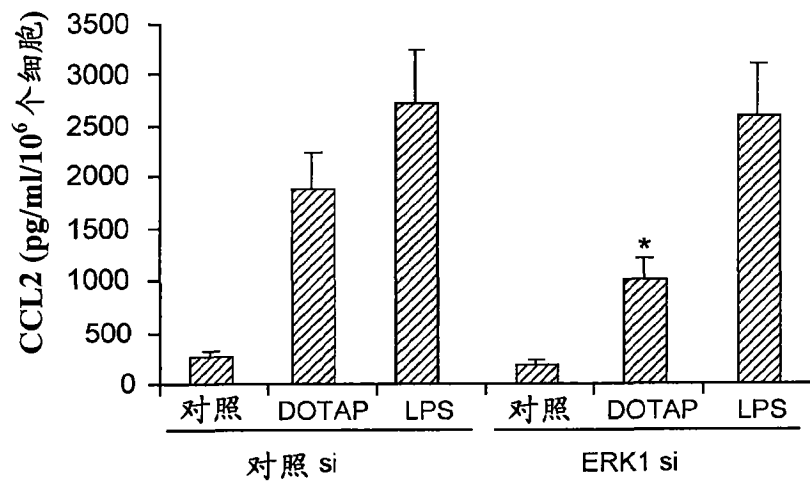


图 20B

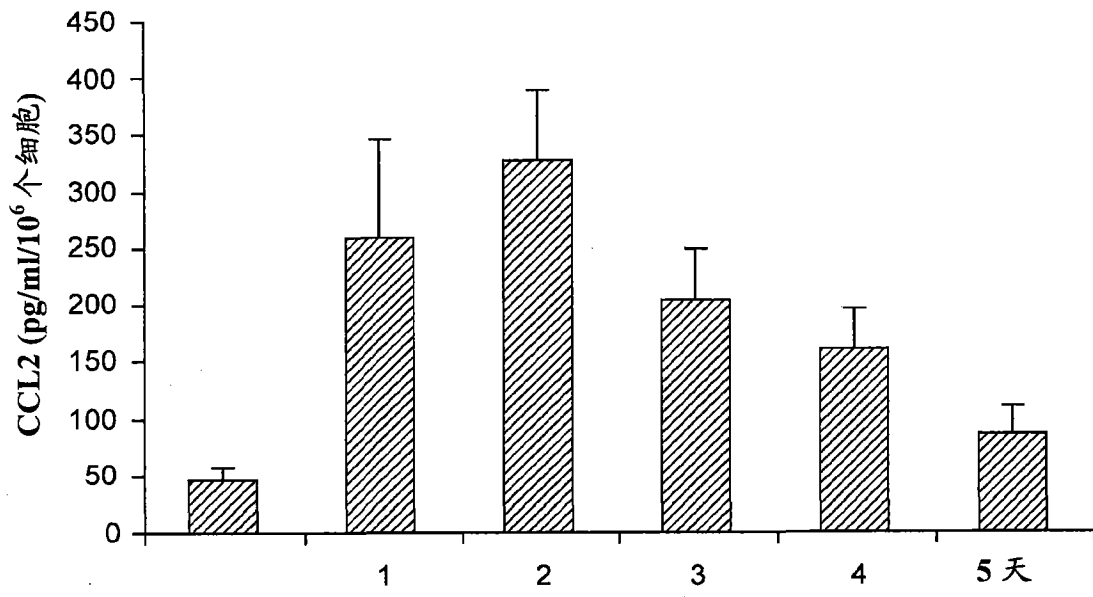


图 21A

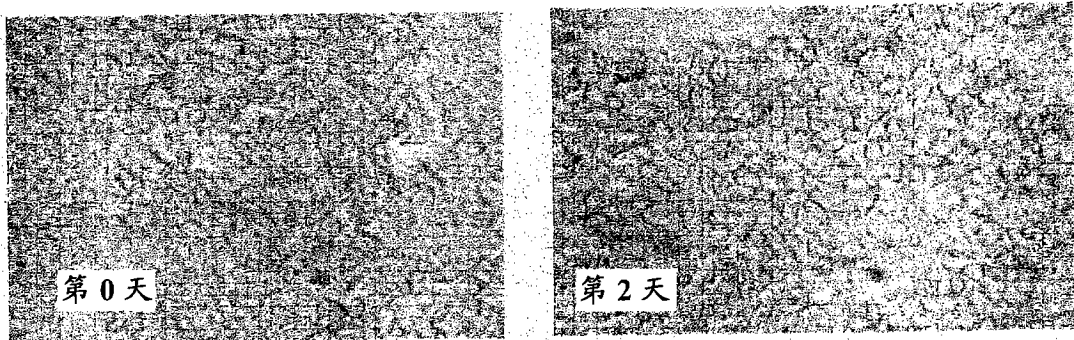


图 21B

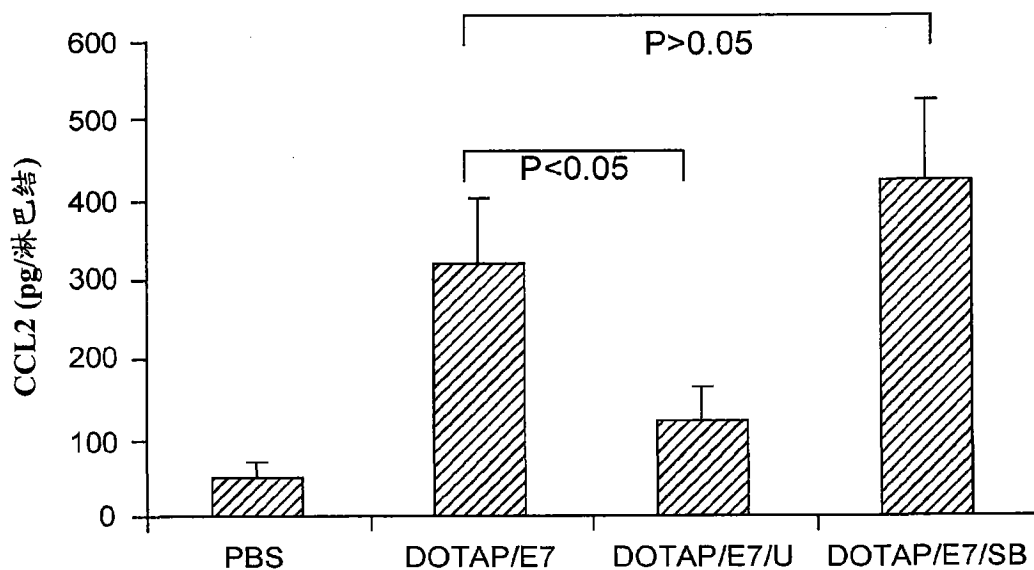


图 22A

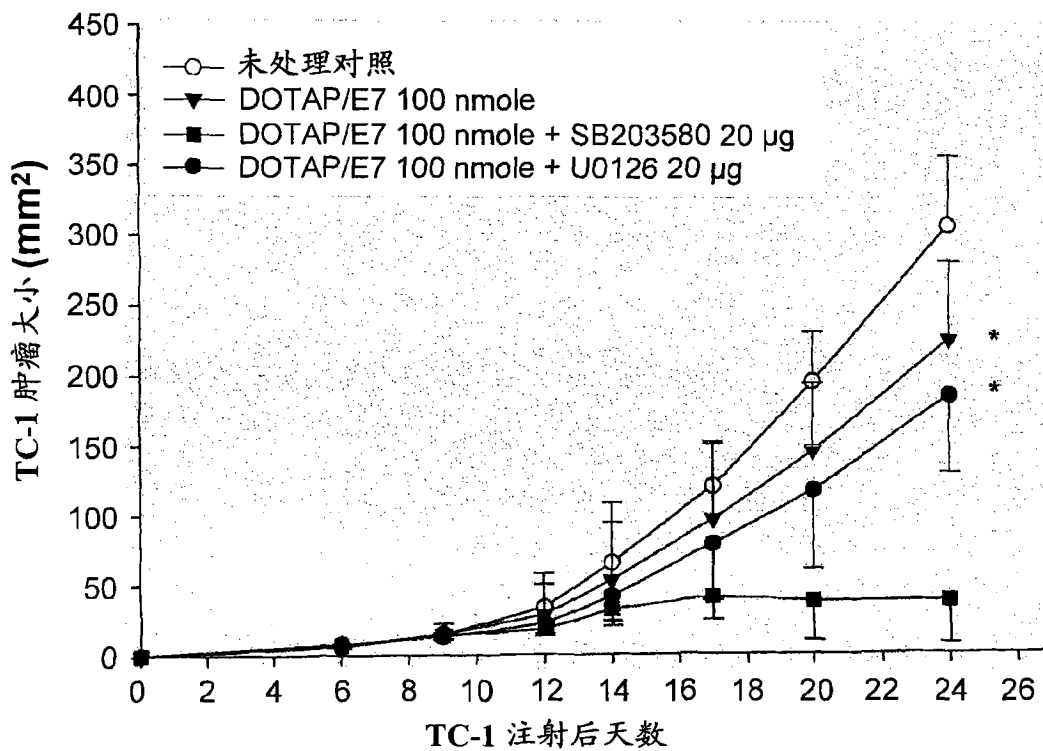


图 22B

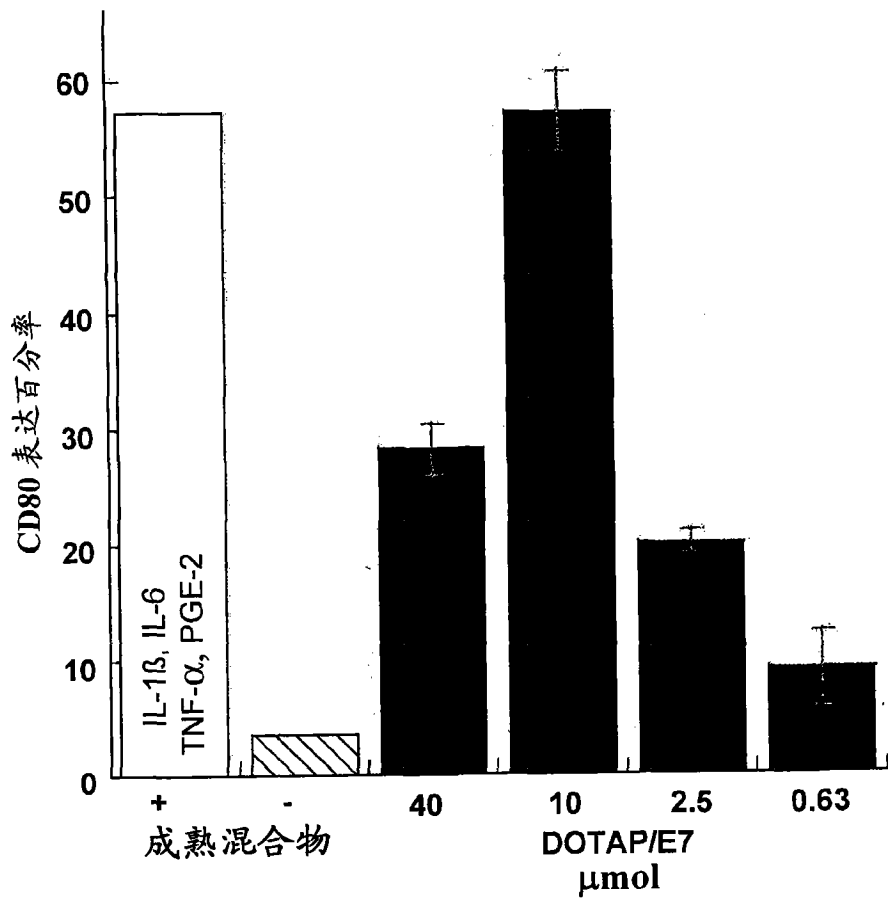


图 23A

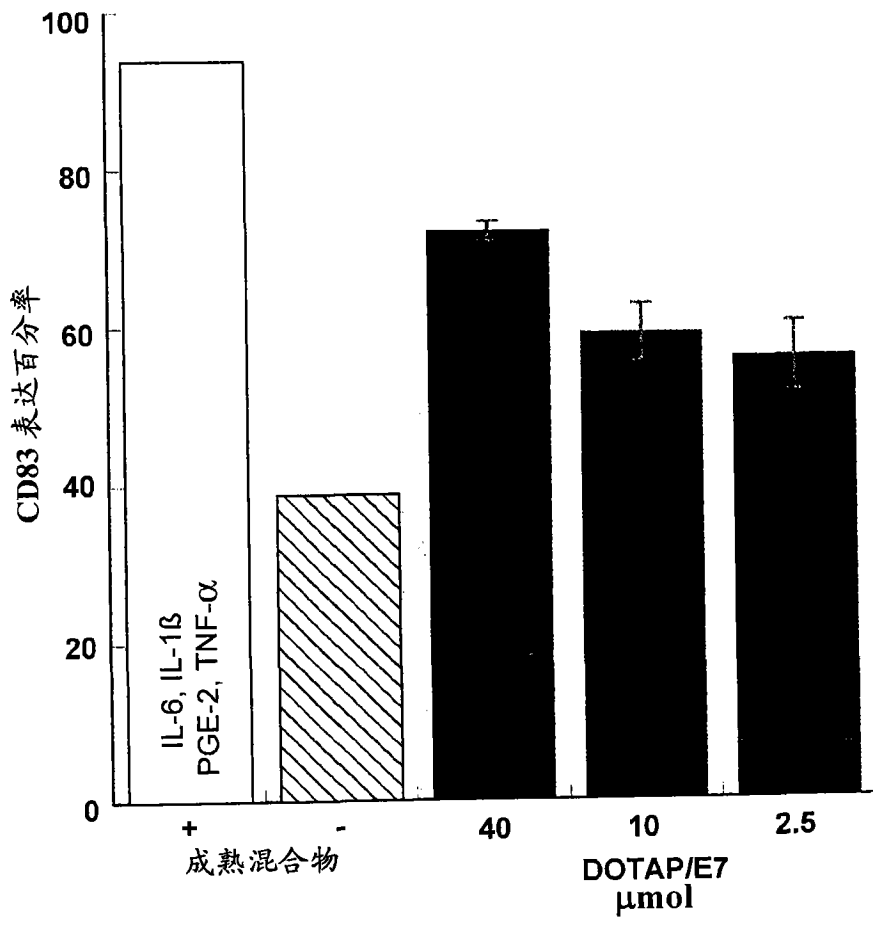


图 23B

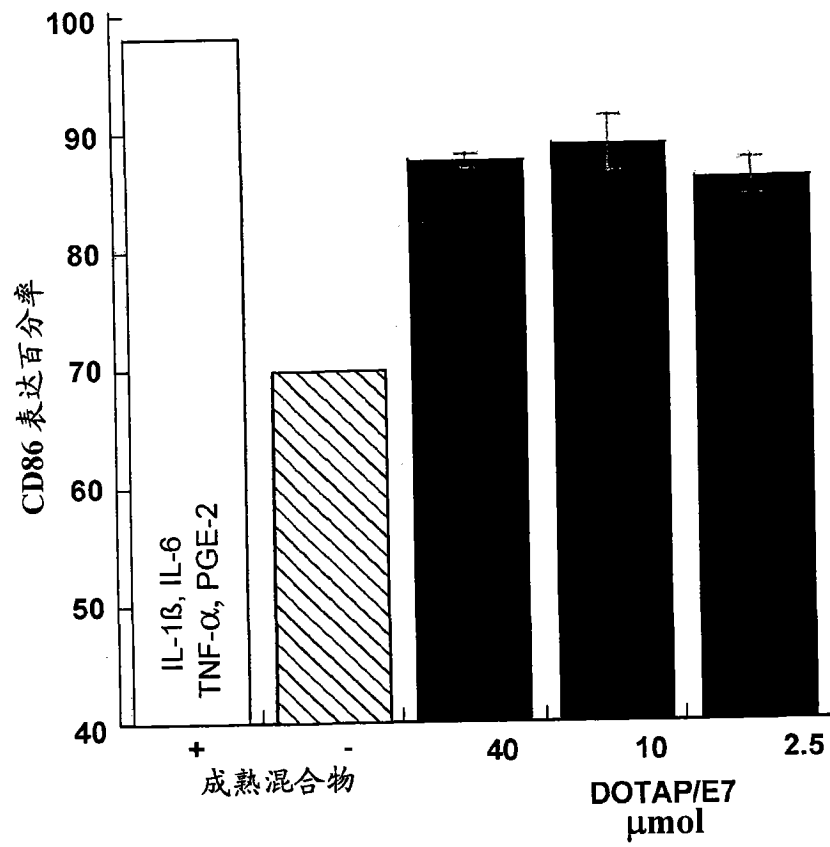


图 23C

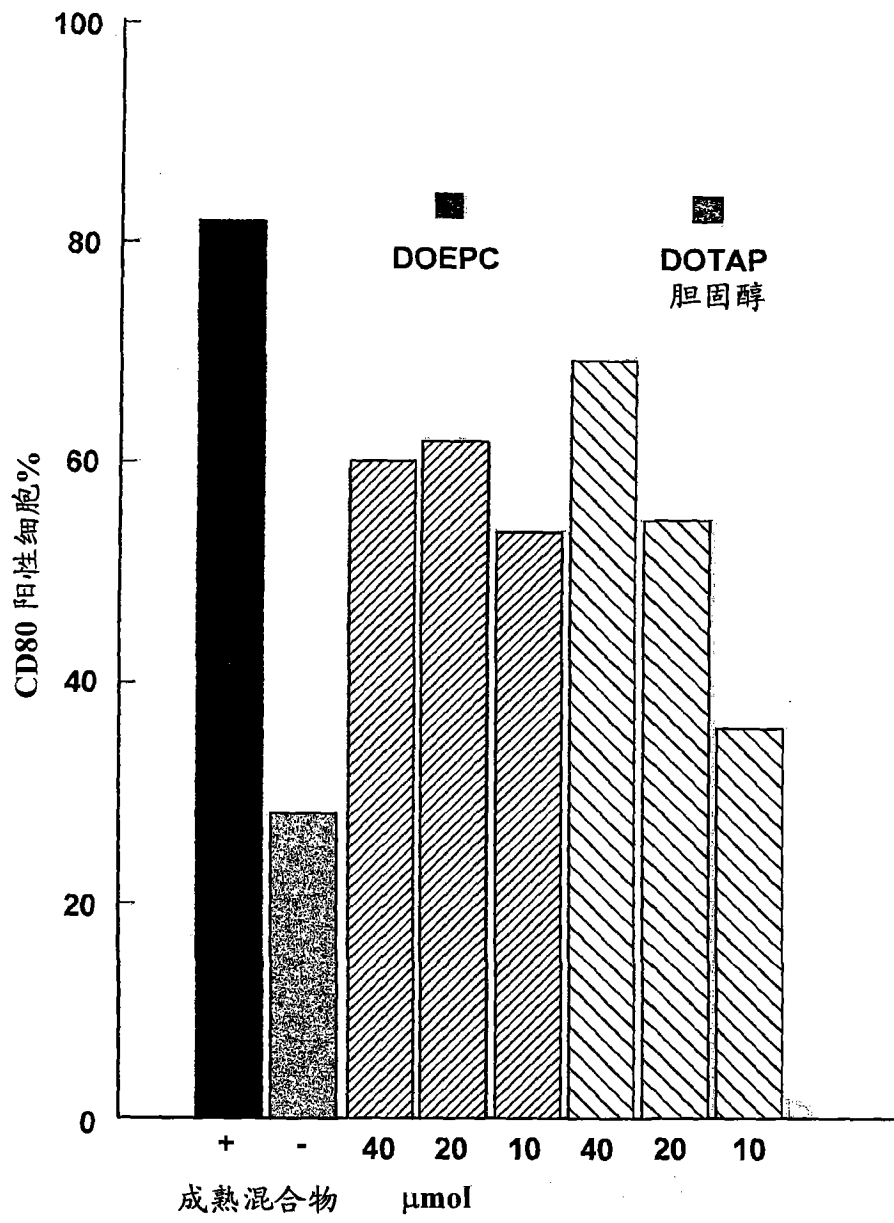


图 23D

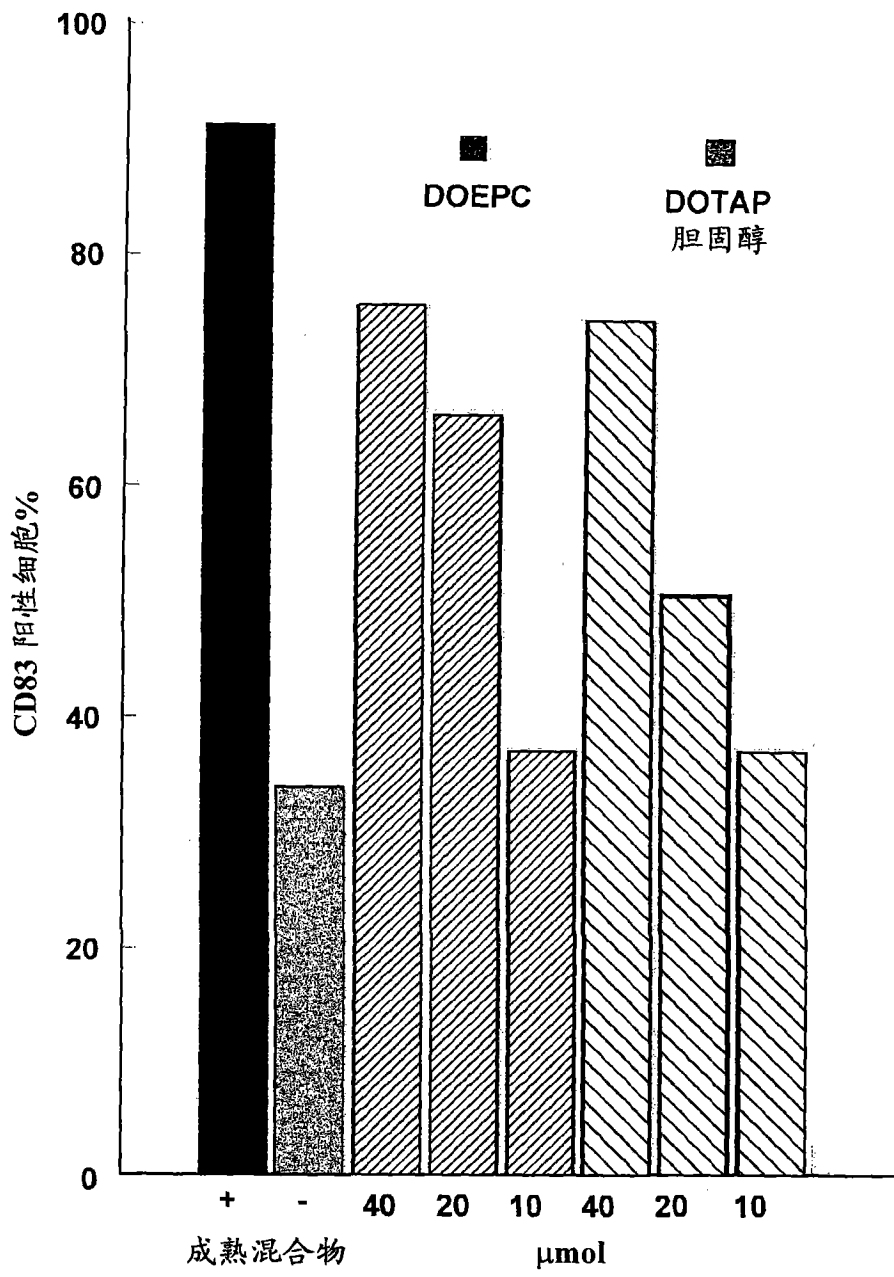


图 23E

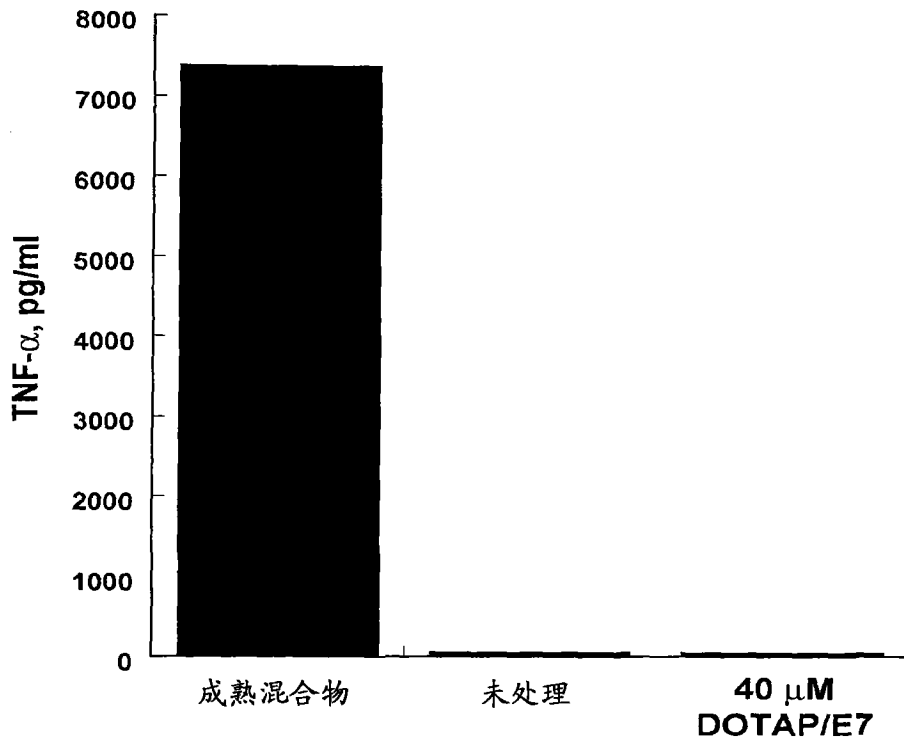


图 24A

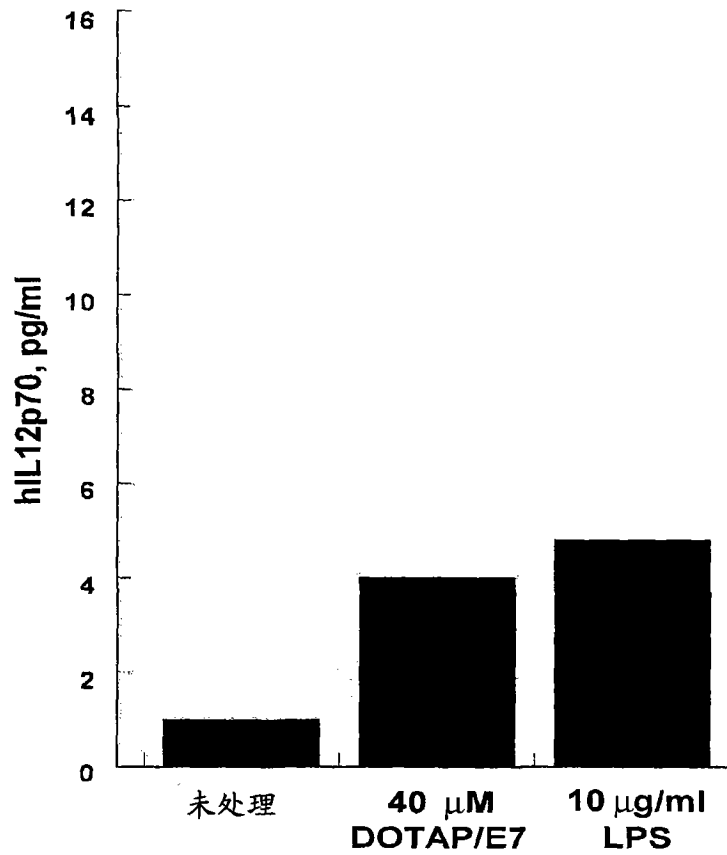


图 24B

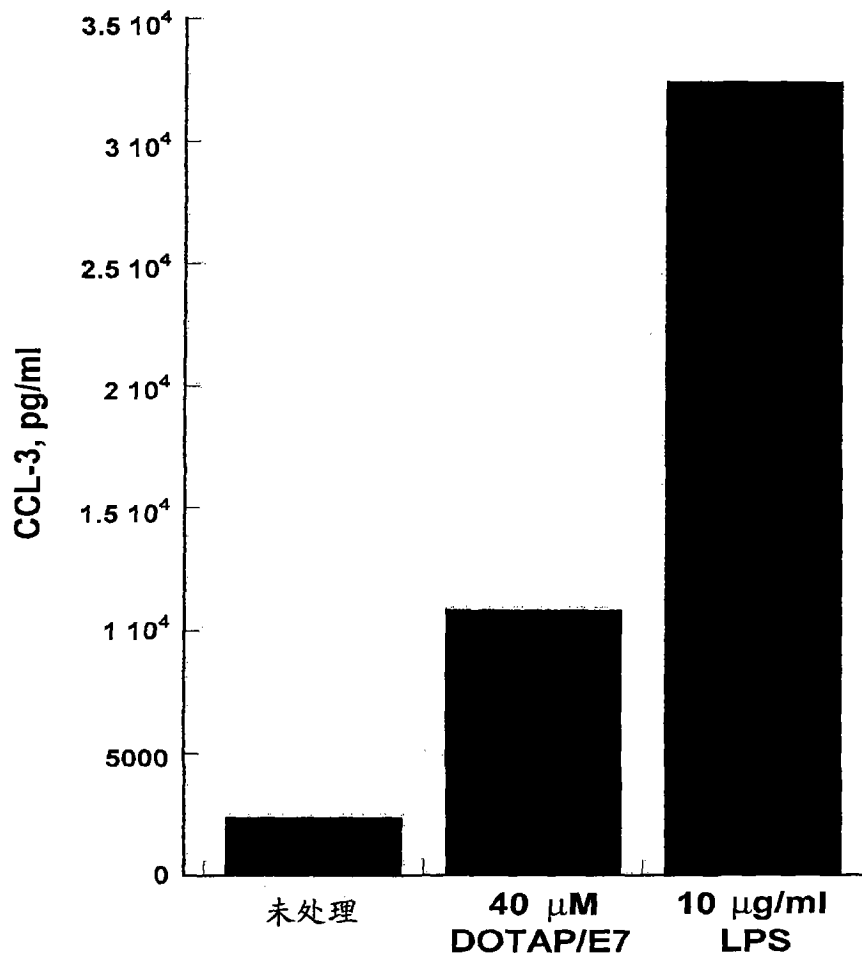


图 24C

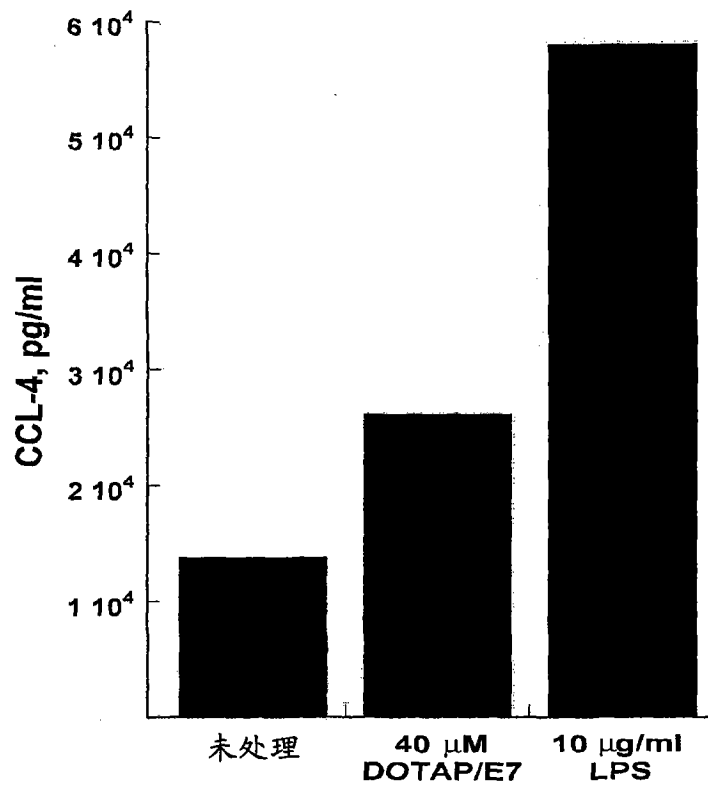


图 24D

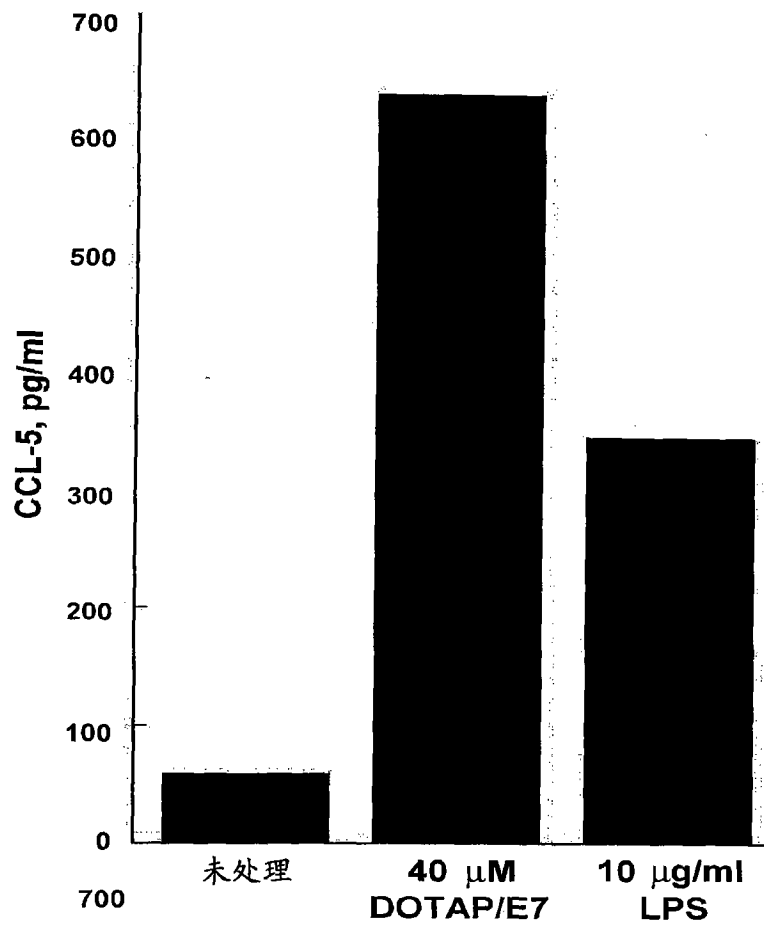


图 24E

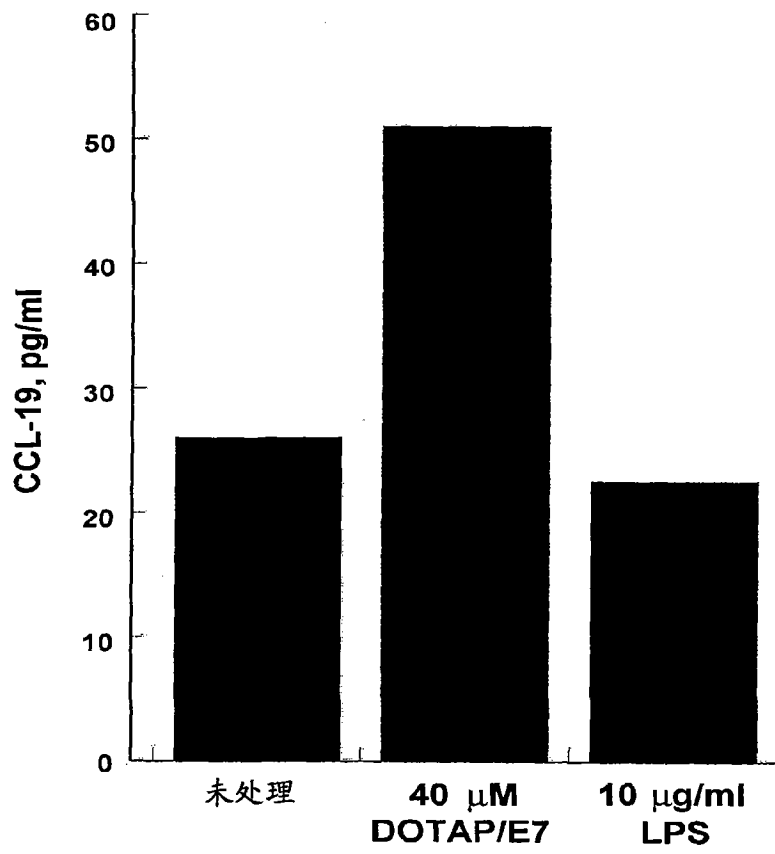


图 24F

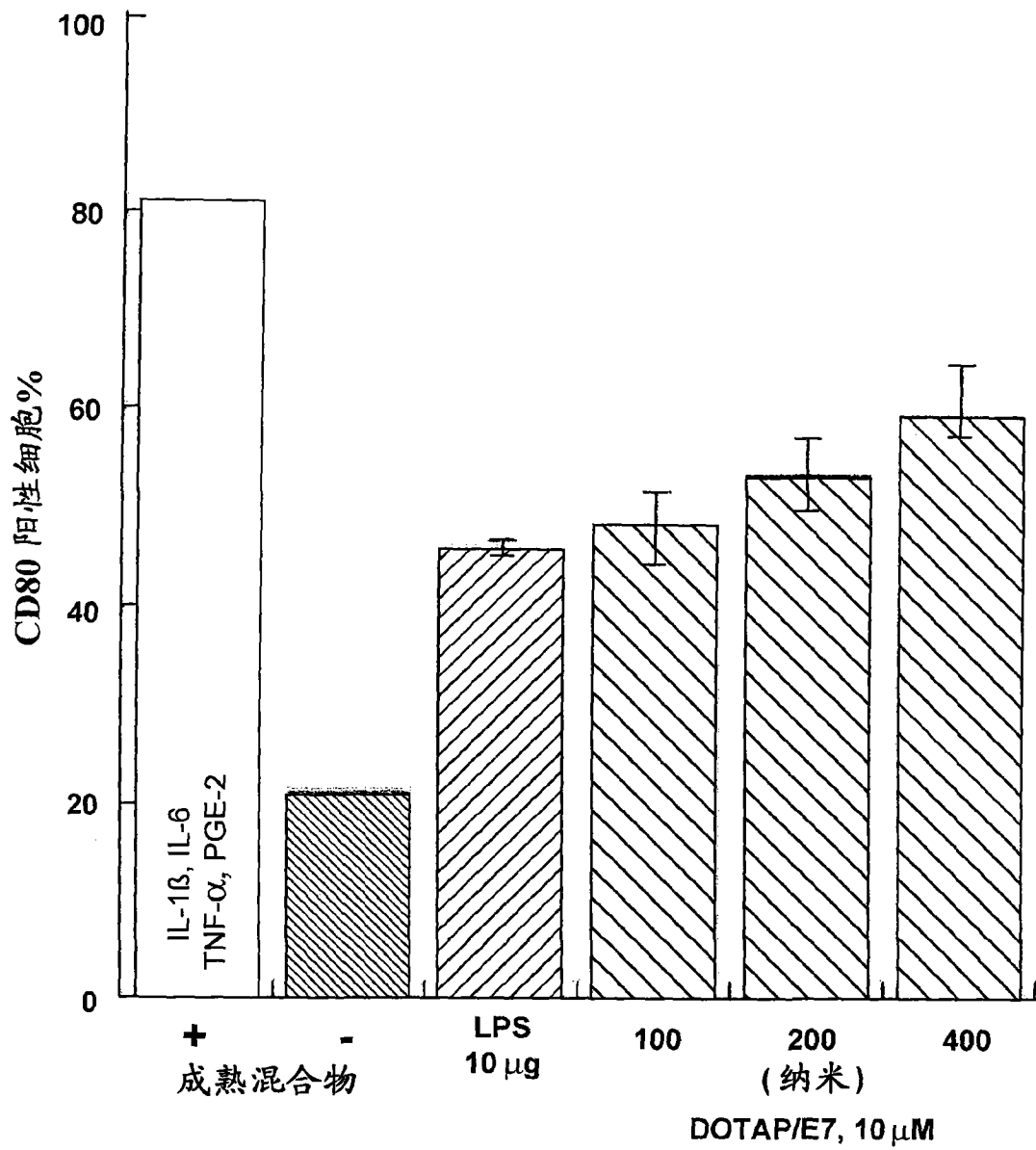


图 25A

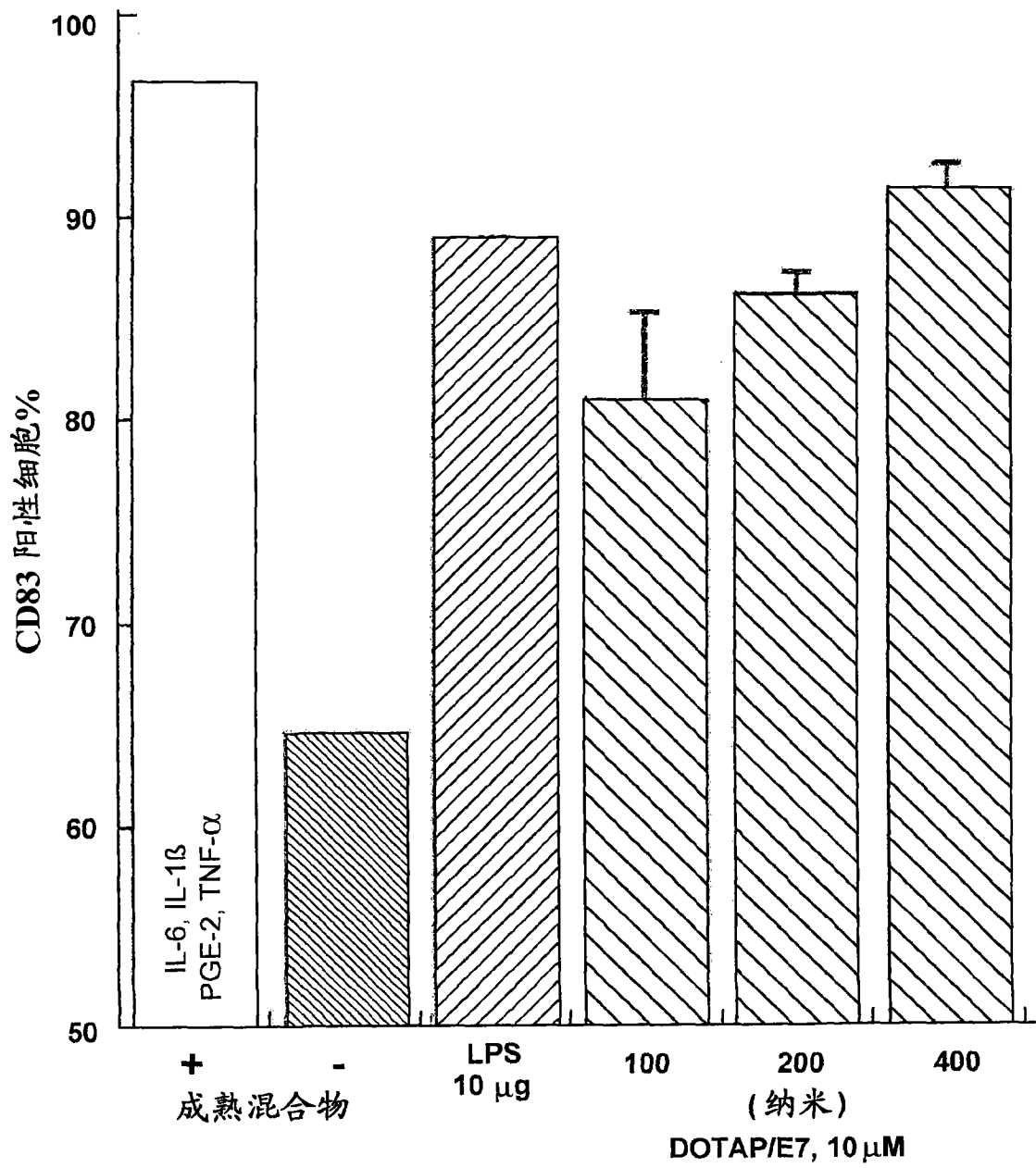


图 25B

1. 一种组合物,其包含:

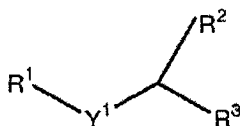
一定剂量的至少一种阳离子脂质,所述剂量足以活化患者免疫系统细胞中的丝裂原活化蛋白 (“MAP”) 激酶信号转导途径,由此诱导患者免疫应答,所述免疫应答包括 T 细胞或抗体或者它们的组合;

其中所诱导的免疫应答为超过没有所述至少一种阳离子脂质时的免疫应答水平的增强的免疫应答;和

其中所述剂量不诱导显著水平的凋亡,所述显著水平凋亡为抵消所述增强的免疫应答的免疫系统细胞凋亡量。

2. 权利要求 1 的组合物,其中所述阳离子脂质通过刺激胞外信号调节激酶 (“ERK”) 1、ERK 2 和 p38 中的至少一种活化 MAP 激酶信号转导途径。

3. 权利要求 1 的组合物,其中所述阳离子脂质包括具有由下式代表的结构的非甾族阳离子脂质:



其中 R¹ 为季铵基团, Y¹ 为选自烃链、酯、酮和肽的间隔基, R² 和 R³ 独立选自饱和脂肪酸、不饱和脂肪酸、酯连接的烃、磷 - 二酯及其组合。

4. 权利要求 3 的组合物,其中所述阳离子脂质选自 DOTAP、DOTMA、DOEPC 及其组合。

5. 权利要求 1 的组合物,所述组合物进一步包含至少一种抗原,以形成阳离子脂质 / 抗原复合物,其中所述阳离子脂质 / 抗原复合物或混合物刺激抗原特异性免疫应答。

6. 权利要求 5 的组合物,其中所述阳离子脂质通过刺激 ERK 1、ERK 2 和 p38 中的至少一种活化 MAP 激酶信号转导途径。

7. 权利要求 5 的组合物,其中至少一种抗原选自肿瘤相关抗原、病毒抗原、微生物抗原及其组合。

8. 权利要求 5 的组合物,其中所述至少一种抗原包括脂化抗原或被修饰以增加其疏水性的抗原,所述修饰增强抗原与所述阳离子脂质的复合作用,由此增强由所述阳离子脂质诱导的抗原特异性免疫应答,并且所述被修饰的抗原可以在抗原和连接的疏水基团之间包含接头序列。

9. 权利要求 8 的组合物,其中所述至少一种抗原选自脂蛋白、脂肽、用疏水性增强的氨基酸序列修饰的蛋白或肽及其组合。

10. 权利要求 5 的组合物,所述组合物进一步包含结合所述至少一种抗原的氨基酸序列,其中所产生的抗原氨基酸序列在得到所述抗原的亲本蛋白中不存在。

11. 权利要求 5 的组合物,所述组合物进一步包含结合至少一种抗原的氨基酸序列,其中所述氨基酸序列为共价结合的赖氨酸 - 丝氨酸 - 丝氨酸。

12. 权利要求 5 的组合物,其中所述至少一种抗原包括被操作以增加抗原上的负电荷的抗原。

13. 一种诱导患者免疫应答的方法,所述方法包括:

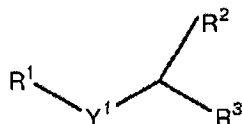
给予患者一定剂量的至少一种阳离子脂质,所述剂量足以诱导患者免疫系统细胞中的 MAP 激酶信号转导途径活化,所述免疫应答包括 T 细胞或抗体或者它们的组合;

其中所诱导的免疫应答为超过没有所述至少一种阳离子脂质时的免疫应答水平的增强的免疫应答；和

其中所述剂量不诱导显著水平的凋亡，所述显著水平凋亡为抵消所述增强的免疫应答的免疫系统细胞凋亡量。

14. 权利要求 13 的方法，其中所述阳离子脂质通过刺激 ERK 1、ERK 2 和 p38 中的至少一种活化 MAP 激酶信号转导途径。

15. 权利要求 13 的方法，其中所述阳离子脂质包括具有由下式代表的结构的非甾族阳离子脂质：



其中 R¹ 为季铵基团，Y¹ 选自烃链、酯、酮和肽，R² 和 R³ 独立选自饱和脂肪酸、不饱和脂肪酸、酯连接的烃、磷 - 二酯及其组合。

16. 权利要求 15 的方法，其中所述阳离子脂质选自 DOTAP、DOTMA、DOEPC 及其组合。

17. 权利要求 13 的方法，所述方法进一步包括使至少一种抗原与阳离子脂质复合，以形成阳离子脂质 / 抗原复合物或混合物，其中所述阳离子脂质 / 抗原复合物刺激抗原特异性免疫应答。

18. 权利要求 17 的方法，其中所述阳离子脂质通过刺激 ERK 1、ERK 2 和 p38 中的至少一种活化 MAP 激酶信号转导途径。

19. 权利要求 17 的方法，其中所述至少一种抗原选自肿瘤相关抗原、病毒抗原、微生物抗原及其组合。

20. 权利要求 17 的方法，其中所述至少一种抗原包括脂化抗原或被修饰以增加其疏水性的抗原，所述修饰增强抗原与所述阳离子脂质的复合作用，由此增强由所述阳离子脂质诱导的抗原特异性免疫应答，并且所述被修饰的抗原可以在抗原和连接的疏水基团之间包含接头序列。

21. 权利要求 20 的方法，其中所述至少一种抗原选自脂蛋白、脂肽、用疏水性增强的氨基酸序列修饰的蛋白或肽及其组合。

22. 权利要求 17 的方法，所述方法进一步包括使一种氨基酸序列结合所述至少一种抗原，其中所产生的抗原氨基酸序列在得到所述抗原的亲本蛋白中不存在。

23. 权利要求 17 的方法，所述方法进一步包括使一种氨基酸序列结合所述至少一种抗原，其中所述氨基酸序列为共价结合的赖氨酸 - 丝氨酸 - 丝氨酸。

24. 权利要求 17 的方法，所述方法进一步包括操作所述至少一种抗原，以增加所述至少一种抗原上的负电荷。

25. 一种组合物，其包含：

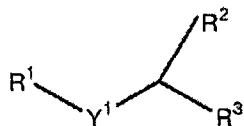
一定剂量的至少一种阳离子脂质，所述剂量足以诱导患者的免疫系统细胞产生活性氧物质（“ROS”）；

其中所诱导的 ROS 水平足以激活免疫应答超过没有所述至少一种阳离子脂质时的免疫应答水平；

其中所述 ROS 水平不足以诱导显著水平的凋亡，所述显著水平凋亡为抵消所述增强的

免疫应答的免疫系统细胞凋亡量。

26. 权利要求 25 的组合物,其中所述至少一种阳离子脂质包括具有由下式代表的结构的非甾族阳离子脂质:



其中 R¹ 为季铵基团, Y¹ 选自烃链、酯、酮和肽, R² 和 R³ 独立选自饱和脂肪酸、不饱和脂肪酸、酯连接的烃、磷 - 二酯及其组合。

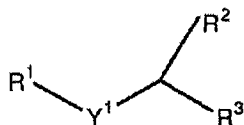
27. 一种在患者中诱导足以刺激免疫应答的 ROS 的方法,所述方法包括:

给予患者一定剂量的至少一种阳离子脂质,所述剂量足以诱导患者的免疫系统的细胞产生活性氧物质 (“ROS”);

其中所诱导的 ROS 水平足以激活免疫应答超过没有所述至少一种阳离子脂质时的免疫应答;和

其中所述 ROS 水平不足以诱导显著水平的凋亡,所述显著水平凋亡为抵消所述增强的免疫应答的免疫系统细胞凋亡量。

28. 权利要求 27 的方法,其中所述至少一种阳离子脂质包括具有由下式代表的结构的非甾族阳离子脂质:



其中 R¹ 为季铵基团, Y¹ 选自烃链、酯、酮和肽, R² 和 R³ 独立选自饱和脂肪酸、不饱和脂肪酸、酯连接的烃、磷 - 二酯及其组合。

29. 权利要求 25 的组合物,其中所述 ROS 水平不诱导免疫系统细胞凋亡。

30. 权利要求 25 的组合物,其中所述至少一种阳离子脂质的剂量足以在患者的 60% 或更少的免疫系统细胞中诱导产生 ROS。

31. 权利要求 27 的方法,其中所述 ROS 水平不诱导免疫系统细胞凋亡。

32. 权利要求 27 的方法,其中给予的所述至少一种阳离子脂质的剂量足以在患者的 60% 或更少的免疫系统细胞中诱导产生 ROS。

33. 一种组合物,其包含:

一定剂量的至少一种阳离子脂质,所述剂量足以活化患者免疫系统细胞中的 MAP 激酶信号转导途径,由此诱导患者免疫应答,所述免疫应答包括 T 细胞或抗体或者它们的组合;

其中所诱导的免疫应答为超过没有所述至少一种阳离子脂质时的免疫应答水平的增强的免疫应答;和

其中所述 MAP 激酶信号转导途径不诱导免疫系统细胞凋亡。

34. 一种在患者中诱导免疫应答的方法,所述方法包括:

给予患者一定剂量的至少一种阳离子脂质,所述剂量足以诱导激活患者免疫系统细胞的 MAP 激酶信号转导途径,所述免疫应答包括 T 细胞或抗体或者它们的组合;

其中所诱导的免疫应答为超过没有所述至少一种阳离子脂质时的免疫应答水平的增强的免疫应答;和

其中所述 MAP 激酶信号转导途径不诱导免疫系统细胞凋亡。