



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105163724 A

(43) 申请公布日 2015. 12. 16

(21) 申请号 201480017087. 1

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2014. 02. 06

A61K 9/50(2006. 01)

(30) 优先权数据

13154463. 7 2013. 02. 07 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 09. 21

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2014/052370 2014. 02. 06

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/122232 EN 2014. 08. 14

(71) 申请人 葛兰素史密丝克莱恩生物有限公司

地址 比利时里克森萨特

申请人 埃克塞特航海股份公司

(72) 发明人 G. 格兰迪 A. 格兰迪

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司  
72001

代理人 杜艳玲 彭昶

权利要求书1页 说明书23页 附图8页

(54) 发明名称

包含囊泡的药物组合物

(57) 摘要

本发明涉及包含动物囊泡和细菌囊泡的药物组合物、用于制备所述组合物的方法及其用途。

1. 制备药物组合物的方法,其中所述方法包括混合:(a)动物囊泡与(b)细菌囊泡。
2. 免疫原性药物组合物,其包含:(a)动物囊泡和(b)细菌囊泡。
3. 任一前述权利要求所述的方法或组合物,其中所述动物囊泡包括至少一种疾病相关抗原。
4. 权利要求3所述的方法或组合物,其中所述疾病相关抗原选自肿瘤相关抗原(TAA)、病原体相关抗原或退行性病症相关抗原。
5. 权利要求4所述的方法或组合物,其中所述至少一种TAA选自黑色素A、Silv、癌胚抗原(CEA)和间皮素。
6. 任一前述权利要求所述的方法或组合物,其中所述动物囊泡是外来体或外来体样囊泡。
7. 任一前述权利要求所述的方法或组合物,其中所述细菌囊泡是外膜囊泡(OMV)、微泡(MV)或‘天然OMV’(‘NOMV’)。
8. 权利要求7所述的方法或组合物,其中所述细菌囊泡是外膜囊泡(OMV)。
9. 任一前述权利要求所述的方法或组合物,其中所述细菌囊泡是经修饰的,例如通过在亲本细胞中遗传重组。
10. 任一前述权利要求所述的方法或组合物,其中所述动物囊泡和细菌囊泡形成复合体。
11. 权利要求10所述的方法或组合物,其中所述复合体通过两个脂双层的融合或通过其表面连接形成。
12. 任一前述权利要求所述的方法或组合物,其中所述药物组合物是疫苗组合物。
13. 任一前述权利要求所述的方法或组合物,其用于治疗或预防疾病。
14. 权利要求13所述的方法或组合物,其中所述疾病是癌症、病原体感染或退行性病症。
15. 用于提高哺乳动物中免疫应答的方法,其包括对所述哺乳动物施用权利要求2至13中任一项所述的药物组合物。

## 包含囊泡的药物组合物

[0001] 该申请要求享有欧洲申请 EP13154463.7 (于 2013 年 2 月 7 日提交) 的权益, 其两者的完整内容在此为全部目的通过引用并入本文。

### 技术领域

[0002] 本发明涉及药物组合物, 其包含动物囊泡 (vesicle) 和细菌囊泡, 用于制备所述组合物的方法, 和其用途。

### 背景技术

[0003] 癌症是发病率和死亡率的主要全球原因, 其被预期在接下来的数十年变得越来越普遍。对癌症的常规治疗包括化学治疗药物、放射治疗和介入性手术。基于癌症细胞的分子表达概况, 也已经对不同的癌症类型开发了特异的激素和抗体治疗 (例如, 赫赛汀 (Herceptin), 用于 Her2 阳性乳腺癌的抗 -Her2 抗体)。

[0004] 因为它们的特异性、安全性和对控制复发关键的长期免疫记忆, 癌症疫苗已经作为对用于癌症的常规治疗的有吸引力的替代物在近期出现 (Dougan 等人, *Annu Rev Immunol.* 2009; 27:83-117, PMID:19007331)。卉妍康 (Cervarix) 和加德西 (Gardasil) 是预防性疫苗的成功实例, 其显示了对宫颈癌预防的功效。这些疫苗, 基于来自致癌的人乳头瘤病毒 (HPV) 变体的抗原的递送, 激活了强大的抗病毒免疫应答, 其因此防止了 HPV- 诱导的宫颈肿瘤的新生成。

[0005] 2010 年, 食品与药品管理局 (Food and Drug Administration) 批准了用于晚期前列腺癌治疗的疫苗 (普罗文奇 (Provenge)) 的使用。这是刺激免疫系统对抗自体抗原以促进癌细胞杀伤的治疗疫苗的第一个实例。该疫苗是基于使用前列腺特异蛋白质 (前列腺酸性磷酸酶 - 融合蛋白) (其引发免疫系统以识别并杀死前列腺癌细胞) 致敏 (pulsed) 的激活的树突状细胞的使用。然而, 对该疫苗最初的热情由于其中等的功效 (存活期增加 4.1 个月) 和过高的成本 (~\$93,000/ 剂量 / 患者) 而迅速减少。然而, 普罗文奇代表了癌症疫苗发展的里程碑并且已经开启了个人化癌症疫苗治疗领域的新途径。

[0006] 然而, 使用不同递送载体和 / 或与多种佐剂配制的基于肿瘤相关抗原 (TAA) 的递送的大多数疫苗由于四个主要原因已经导致了令人失望的结果: (i) 很多 TAA 是低免疫原性的, 因为它们是高表达的 (例如 Her2) 或携带体细胞突变的 (例如 RAS, p53) 或翻译修饰 (例如 MUC1) 的蛋白质; (ii) 一些 TAA 在胎儿发育期间频繁地高表达 (例如 CEA) 但是不在成人中高表达; (iii) TAA, 特别是胞内的那些, 具有低抗原性, 因为它们低效率地递送至抗原递呈细胞 (APC) 的; (iv) TAA 通常在免疫抑制环境中或在由有缺陷的抗原呈递过程 (例如缺少 MHC I)、不存在共刺激分子 (例如缺少 B7 分子) 和免疫抑制因子 (例如 IL-10 和 TFG) 的释放导致的 TAA 建立的免疫耐受情况下表达。

[0007] 对新的免疫调节剂逆转晚期癌症状态通常的免疫耐受性的能力和增加对癌症细胞免疫监督的能力进行评估。新型抗原递送系统和佐剂还以增加癌症疫苗的效能为目标进行发展。这些包括树突状细胞活化剂和生长因子、疫苗佐剂、T- 细胞刺激物和生长因子、

经遗传修饰的 T 细胞、细胞因子、中和或抑制抑制性细胞的试剂。佐剂,包括那些在临床中使用的,诸如明矾和 MPL (Romanowski 等人, Lancet 2009 Dec 12;374(9706):1975-85, PMID:19962185),和那些在临床发展的后期使用的,意在通过模式识别受体 (PRR) 诸如 TLR 靶向先天免疫系统用于激活。

[0008] 尽管在这些领域近期有所进步,但是来自癌症疫苗(例如,用于非霍奇金淋巴瘤 (non-Hodgkin's lymphoma) 治疗的 MyVax 和 FavId) 的临床研究结果还没有令人满意的,并且在此仍对能够克服在癌症患者中建立的耐受性并且在体内有效提升 T 细胞和 B 细胞水平并且使 T- 细胞数目维持延长的时期的有效的免疫刺激分子 / 疫苗递送平台有需求。还可期望增加的免疫应答用于治疗不同于癌症的疾病,特别地,其中的患者可以是免疫受损 (immune-compromised) 的,例如由于感染、退行性疾病或老龄。

[0009] 大多数抗原使用激活的 T 辅助(Th) 细胞主要是 Th1 和 Th2 细胞激活 B 细胞。Th1 细胞分泌 IFN- $\gamma$ , 其激活巨噬细胞并且诱导通过 B 细胞的调理的抗体 (opsonizing antibody) 的生产。Th1 应答主要导致细胞介导的免疫 (细胞应答), 其针对胞内病原体 (侵袭性细菌、原生动物和病毒) 进行保护。Th1 应答激活细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL), 其是 T 细胞的亚群, 其诱导由病毒和其它胞内病原体感染的细胞的死亡。天然杀伤 (NK) 细胞也通过 Th1 应答激活, 这些细胞在肿瘤细胞、通过病毒或胞内细菌感染的细胞的细胞凋亡 / 杀伤的诱导中起到主要作用。在另一方面, Th2 细胞通常诱导在对抗胞外病原体 (寄生虫、胞外微生物和毒素) 的防御中至关重要的体液 (抗体) 应答。

[0010] 对疫苗的 Th 应答的量级和类型可以极大地调节, 取决于抗原制剂使用的佐剂。例如, 明矾是在人疫苗接种 (包括对抗白喉 - 破伤风 - 百日咳、人乳头瘤病毒的疫苗和肝炎疫苗) 中最通常使用的佐剂 (Marrack P 等人, (2009). Nat Rev Immunol. 9(4):287-93), 其主要引起强大的 Th2 应答, 但是对于对抗需要的 Th1- 细胞介导的免疫的病原体是相当无效的。Freund 氏不完全佐剂 (IFA) 诱导主要偏向于 Th2 的应答与一些 Th1 细胞应答。对于 MF59®, 它是细胞 (Th1) 和体液 (Th2) 两者免疫应答的有效刺激物 (Ott G, (1995). Pharm Biotechnol 6: 277-96)。其它佐剂, 基本上模式识别受体 (PRR) 的配体, 通过诱导先天免疫进行作用, 主要靶向 APC 并且因此影响适应性免疫应答。PRR 家族几乎全部的成员是佐剂潜在的目标。这些包括 Toll- 样受体 (TLR)、NOD- 样受体 (NLR)、RIG-I- 样受体 (RLR) 和 C- 型凝集素受体 (CLR)。它们通过涉及不同衔接分子的途径信号传递, 导致不同转录因子的激活。这些转录因子 (NF- $\kappa$ B、IRF3) 诱导在免疫应答的引发、扩张和极化中起关键作用的细胞因子和趋化因子的生产。

[0011] 由于经典的佐剂诱导强大的 Th2 应答与较少或无 Th1 应答, 因此目前的挑战是开发诱导对疫苗, 诸如那些对抗癌症、肝炎、流感、疟疾和 HIV 的疫苗重要的强大 Th1 偏向 (bias) 的佐剂。正在被开发的新佐剂是 PRR 的天然配体或合成激动剂, 其是单独的或与多种制剂一同。PRR 活化作用刺激了促炎性细胞因子 / 趋化因子和 I 类 IFN 的生产, 其增加了宿主消灭病原体的能力。因此, 在疫苗制剂中掺入病原体相关分子模式 (PAMP) 可以改善和促进疫苗特异性应答的诱导。

[0012] 发明公开

本发明已开发了动物囊泡 - 细菌囊泡复合体, 其可以在药物组合物, 例如疫苗中使用。特别地, 本发明人已展示当外来体 (动物囊泡) 和 OMV (细菌囊泡) 一同混合 (见例如, 实施例

1) 时, 外来体 -OMV 复合体自发形成, 并且本发明人假设形成了稳定的融合复合体。因此本发明提供了用于基于动物囊泡和细菌囊泡的共同递送的高免疫原性疫苗的开发的新平台。动物囊泡与细菌囊泡的组合递送代表了通过利用两种组分的主要性能引起先天免疫应答的治疗性疫苗有前景的策略:

由细菌囊泡提供的强大佐剂性; 和

针对由动物囊泡呈递的和与靶向疾病相关的抗原的特异性的适应性免疫应答。

[0013] 此外, 本发明提供了囊泡(特别是外来体 -OMV 复合体), 其诱导对疫苗诸如那些针对癌症、肝炎、流感、疟疾和 HIV 的疫苗重要的强大 Th1 偏向。

[0014] 本发明可用于其中抗原组合至患者免疫系统的呈递可以是有利的任何治疗。例如, 动物囊泡可以呈递任何疾病相关抗原, 诸如用于癌症治疗的一种或多种 TAA, 用于感染治疗的一种或多种病原体抗原, 或与其它疾病相关的任何其它抗原或抗原的组合, 特别是对于免疫受损的状况和 / 或其中需要免疫的强力增强的(例如, 在老年人中)。与细菌囊泡的细菌抗原的强大佐剂特性组合, 这些通过动物囊泡呈递的疾病相关抗原可以对疫苗接种提供有效的方法。

[0015] 因此, 本发明提供药物组合物, 其包含:(a) 动物囊泡和(b) 细菌囊泡。在一些实施方案中, 动物囊泡和细菌囊泡是一同处于复合体中的, 例如通过脂双层的融合或通过表面分子附着。在一些实施方案中, 动物囊泡包含疾病相关抗原, 诸如一种或多种 TAA、一种或多种病原体相关抗原或一种或多种退行性病症相关抗原。在优选的实施方案中, 动物囊泡包含 TAA。例如, 在一些实施方案中, 动物囊泡是肿瘤来源的。在一些实施方案中, 动物囊泡是肿瘤来源的外来体。在一些实施方案中, 细菌囊泡是外膜囊泡(OMV)、微泡(MVs [1]) 或“天然 OMV”(“NOMV”)。因此, 在一个实施方案中, 本发明提供了包含肿瘤来源的外来体和 OMV 的药物组合物。

[0016] 本发明还提供了用于制备一种或多种复合体的方法, 其中方法包括混合(a) 动物囊泡和(b) 细菌囊泡的步骤。

[0017] 本发明还提供了包含(a)动物囊泡和(b)细菌囊泡的复合体。在一些实施方案中, 复合体是可获得的或通过本发明的方法获得。在一些实施方案中复合体是融合复合体。

[0018] 本发明还提供了用于制备药物组合物的方法, 其中方法包括混合(a) 动物囊泡和(b) 细菌囊泡的步骤。在优选的实施方案中, 药物组合物是免疫原性组合物。

[0019] 相似地, 本发明提供了用于制备药物组合物的方法, 其中方法包括混合第一组合物和第二组合物的步骤, 其中第一组合物包含动物囊泡并且第二组合物包含细菌囊泡。混合后, 方法可以包括允许来自第一和第二组合物的囊泡彼此相互作用的步骤, 从而产生本发明的药物组合物。

[0020] 本发明还提供了用于在药物中使用的组合物, 其中组合物包含(a) 动物囊泡和(b)细菌囊泡。该组合物可以在例如, 治疗或预防癌症中使用, 例如其中动物囊泡包括 TAA。

[0021] 本发明还提供了在哺乳动物中提高免疫应答的方法, 其包括对哺乳动物施用本发明的药物组合物。该免疫应答可以是抗肿瘤应答, 例如其中动物囊泡包括 TAA。

[0022] 本发明还提供了动物囊泡和细菌囊泡两者在药物生产中的用途, 例如, 用于在治疗或预防癌症中使用。

[0023] 本发明还提供了用于制备药物组合物的方法, 其包括步骤:(a) 从哺乳动物主体

提取肿瘤细胞；(b)从提取的肿瘤细胞获得囊泡；和(c)将获得的囊泡与细菌囊泡混合以提供药物组合物。可以随后将该组合物施用至在步骤(a)中提取的肿瘤细胞所来自的哺乳动物主体。

[0024] 本发明还提供了用于制备药物组合物的方法,其包括步骤:(a)从自哺乳动物主体获得的肿瘤细胞获得囊泡；和(b)将获得的囊泡与细菌囊泡混合以提供药物组合物。可以随后将该组合物施用至在步骤(a)之前已获得的肿瘤细胞所来自的哺乳动物主体。

#### [0025] 动物囊泡

可用于本发明的动物囊泡是从动物细胞释放的胞外囊泡。动物囊泡由包含生物分子的脂双层限制,并且通常具有 20 至 1000 nm 的直径。在本领域中已知动物囊泡的多种类型,其包括膜颗粒、膜囊泡、微泡、外来体样囊泡、外来体、核外粒体样囊泡、核外粒体或外囊泡(exovesicle)。Théry 等人 (F1000 Biol Rep. 2011; 3: 15) 提供了外来体和其它相似分泌囊泡的一般性综述。动物囊泡的不同类型基于直径、亚细胞来源、它们在蔗糖中的密度、形状、沉降速率、脂质组合物、蛋白质标记物和分泌模式(即根据信号(可诱导的)或自发地(组成型的))进行区分。四种常见动物囊泡和它们的区分特征在以下表 1 中描述。

表 1:

动物囊泡	直径 (nm)	形状	标记物	脂质	来源
微泡	100-1000	不规则	整联蛋白, 选择蛋白, CD40 配体	磷脂酰丝氨酸	质膜
外来体样囊泡	20-50	不规则	TNFR1	无脂筏	来自其它细胞器的 MVB
外来体	30-100	杯状	四跨膜蛋白 (Tetraspanin) (例如 CD63, CD9), Alix, TSG101, ESCRT	胆固醇、鞘磷脂、神经酰胺、脂筏、磷脂酰丝氨酸	多泡核内体
膜颗粒	50-80	圆形	CD133、无 CD63	未知	质膜

[0026] 动物囊泡被认为在胞内通讯中起作用,其通过直接和间接的机制在供体和受体细胞之间作为囊泡起作用。直接机制包括通过受体细胞对动物囊泡和其供体细胞来源组分(诸如蛋白质、脂质或核酸)的摄取,所述组分在受体细胞中具有生物学活性。间接机制包括微泡-受体细胞表面相互作用,和受体细胞的胞内信号导致的调节。因此,动物囊泡可以通过受体细胞介导一种或多种供体细胞来源特性的获得。

[0027] 在一些实施方案中,动物囊泡是哺乳动物囊泡,即其来自哺乳动物细胞。在一些实施方案中,动物囊泡是人囊泡,即其来自人细胞。在药物组合物是意在对人施用,人囊泡是优选的。相同的来源/意图匹配适用于其它动物。

[0028] 任何能够呈递疾病相关抗原至免疫系统(例如,由于具有肿瘤来源,来源于感染的或突变的细胞或其它方式)的动物囊泡可在本发明的背景下使用。因此,在一些实施方案中,本发明提供了包含细菌囊泡和动物囊泡的药物组合物,其中动物囊泡包括至少一种疾病相关抗原。在进一步的实施方案中,包括至少一种疾病相关抗原的动物囊泡是膜颗粒、膜囊泡、微泡、外来体样囊泡、外来体、核外粒体样囊泡、核外粒体或外囊泡。外来体和外来体

样囊泡是本发明优选的动物囊泡(因为它们的大小、组成和容易生产)。

[0029] 在一些实施方案中,动物囊泡所来源的动物细胞是肿瘤细胞。肿瘤细胞可以是初级肿瘤细胞,或者可以从肿瘤细胞产生,例如通过传代、培养、增殖、无限增殖化等。因此,肿瘤细胞可以来自癌症或癌前期患者中的肿瘤,或者可以来自肿瘤或癌症细胞系。肿瘤细胞可以提供展示 TAA 的动物囊泡。肿瘤细胞可以来自良性肿瘤或恶性肿瘤。

[0030] 在其它实施方案中,动物囊泡所来源的动物细胞是受感染细胞,即含有病原体的细胞。

[0031] 在其它实施方案中,动物囊泡所来源的动物细胞是突变细胞。例如,在一些实施方案中,突变细胞表达突变体或错误折叠的蛋白质。在一些实施方案中,突变细胞过表达一种或多种蛋白质。在一些实施方案中,突变体细胞涉及退行性疾病,诸如蛋白质构象病症(proteopathic disorder)。在一些实施方案中,动物细胞是中枢神经系统细胞。

[0032] 在一些实施方案中,动物细胞,诸如肿瘤细胞、受感染细胞或突变细胞,可以是自体的,即来自于药物组合物将施用的患者。

[0033] 通常地,作为对特定癌症类型的疫苗使用的药物组合物将包含来源于该特定癌症类型的肿瘤/癌细胞的动物囊泡。例如,在前列腺癌疫苗中使用的药物组合物通常地包含从前列腺肿瘤/癌细胞中纯化的动物囊泡。这样,动物囊泡包含刺激待治疗/保护以免于的肿瘤/癌细胞上呈递的抗原的适应性免疫应答的 TAA。相同的来源/意图匹配适用于其它疾病。

[0034] 如在表 1 中显示的,外来体是纳米级(30-100 nm)膜囊泡,其通过多泡体(MVB)的界膜的“向内/反转出芽(inward/reverse budding)”在晚期胞吞区室中形成并且在 MVB 与质膜融合后释放。外来体分泌在生理状况和病理状况两者下在大多数细胞类型被观察到,特别是肿瘤细胞和造血细胞。外来体容易制备并且甚至有为了该目的的可商购获得的试剂盒(例如来自 SBI 的 ExoQuick-TC 试剂盒)。

[0035] 外来体含有胞质蛋白和膜蛋白,以及来源于亲本细胞的核酸。蛋白质含量通常对某些分子富集,其包括靶向/黏着分子(例如四跨膜蛋白、乳凝集素和整联蛋白)、膜运输分子(例如膜联蛋白和 Rab 蛋白)、细胞骨架分子(例如肌动蛋白和微管蛋白)、涉及 MVB 形成的蛋白质(例如 Alix、Tsg101 和网格蛋白)、蛋白伴侣(例如, Hsp70 和 Hsp90)、信号转导蛋白(例如蛋白激酶、14-3-3 和异三聚体 G 蛋白)和细胞质酶(例如 GAPDH、过氧化物酶和丙酮酸激酶)(Yang C. & Robbins D.B. The role of tumor-derived exosomes in cancer pathogenesis. *Clinical and Developmental Immunology*, 2011, doi:10.1155/2011/842849)。其它动物囊泡还含有多种活性分子,诸如对外来体在上文描述的那些。例如,膜微泡和核外粒体已显示包含细胞因子、生长因子受体、RNA 并且还有金属蛋白酶。

[0036] 取决于它们的细胞来源,动物囊泡的蛋白质组成可以对特定蛋白质富集。例如,肿瘤来源的动物囊泡通常含有在亲本肿瘤细胞中表达的 TAA,诸如黑色素 A(melan-A)、Silv、癌胚抗原(CEA)和间皮素(mesothelin)。因此,癌症疫苗策略已使用肿瘤来源的外来体作为 TAA 的来源以致敏 DC,其导致肿瘤抗原对 DC 的转移,其能够在小鼠(Wolfers J, Lozier A, Raposo G, 等人 Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming. *Nature Medicine*. 2001;7(3):297-303)和人(Bu

N, Wu H, Sun B, 等人 Exosome-loaded dendritic cells elicit tumor-specific CD8(+) cytotoxic T cells in patients with glioma. *Journal of Neuro-Oncology*. 104(3):659 - 667) 中诱导肿瘤特异的 CD8+ CTL 应答。

[0037] 在一些实施方案中,动物囊泡可以经修饰以包含另外的蛋白质或增加或减少目的蛋白的水平。通常地,修饰将在从细胞获得囊泡前对囊泡来源的所述细胞实施。改变蛋白质表达的方法是本领域熟知的并且包括,例如,基因修饰、通过小分子抑制剂、酶或其它抑制/激活蛋白或肽和反义技术(或其它核酸技术)抑制。例如,动物囊泡可以经修饰以含有高水平的促炎因子(Yang C. & Robbins D.B. The role of tumor-derived exosomes in cancer pathogenesis. *Clinical and Developmental Immunology*, 2011, doi:10.1155/2011/842849),例如通过使囊泡所来源的细胞经历促炎因子和/或 Hsp70 水平增加所处于的应激状况(stress condition)。这可以导致可以刺激 Th1 极化的免疫应答的动物囊泡。可选地,亲本细胞可以经修饰以减少免疫抑制分子诸如 FasL、TRAIL 或 TGF- $\beta$  的表达。动物囊泡还可以通过另外的免疫原性蛋白的掺入进行修饰,例如与超抗原葡萄球菌肠毒素 A (SEA) 融合(Xiu F, Cai Z, Yang Y, Wang X, Wang J, Cao X. Surface anchorage of superantigen SEA promotes induction of specific antitumor immune response by tumor-derived exosomes. *Journal of Molecular Medicine*. 2007;85(5):511 - 521)。

[0038] 动物囊泡制备物的蛋白质含量可以通过本领域熟知的方法分析,其包括例如蛋白质印迹、共聚焦显微术、蛋白质组学等。

[0039] 取决于它们的细胞起源和合成机制,外来体的脂质组成也可以变化。这些不同可以通过本领域熟知的方法检测。也可以监控外来体特异的核酸(诸如 miRNA)。因此,外来体可以通过蛋白质、脂质和核酸组成表征。

#### [0040] 细菌囊泡

本发明有用的细菌囊泡可以是通过革兰氏阴性菌外膜的破坏或从其起泡(blebbing)以形成保留来自外膜抗原的囊泡获得的任何脂蛋白体囊泡。因此,术语包括,例如,OMV(有时称为“泡(bleb)”)、微泡(MV[1])和“天然 OMV”(“NOMV”[2])。

[0041] 细菌囊泡具有数种特性,使得它们对疫苗递送平台是吸引人的候选,所述特性包括:(i)强大的免疫原性、(ii)自身佐剂性、(iii)、与哺乳动物细胞相互作用并且通过膜融合或经黏着受体的细胞连接而吸收的能力,和(iv)通过重组工程将异源抗原表达掺入的可能性。

[0042] MV 和 NOMV 是天然出现的膜囊泡,其在细菌生长期间自发地形成并且被释放至培养基中。MV 可以通过在液体培养基中培养细菌,在液体培养基中将全细胞与较小的 MV 分离(例如通过过滤或通过低速离心只使得细胞并且没有较小的囊泡沉淀),并且随后从清除细胞的培养基中收集 MV(例如通过过滤、通过 MV 的示差沉淀或聚集、通过高速离心以使得 MV 沉淀)而获得。用于在 MV 生产中使用的菌株通常可以基于在培养中生产的 MV 的量进行选择,例如参考 3&4 描述的具有高 MV 生产的奈瑟氏菌(*Neisseria*)。

[0043] OMV 从细菌人工制备,并且可以使用去污剂处理(例如使用脱氧胆酸盐),或通过非去污剂方式(例如,见参考 5)进行制备。用于形成 OMV 的技术包括使用胆酸盐去污剂(例如,石胆酸、鹅脱氧胆酸、熊脱氧胆酸、脱氧胆酸、胆酸、熊胆酸等的盐)在足够高至不使去污

剂沉淀的 pH 处理细菌 [6]。其它技术可以在不存在去污剂下使用诸如超声处理、均化作用、微流化作用、空穴作用、渗透压休克、研磨、弗氏细胞压碎器(French press)、混合等技术基本执行 [5]。使用无或低去污剂的方法可以保留有用的抗原 [5]。因此,方法可以使用具有约 0.5% 或更低例如约 0.2%、约 0.1%、<0.05% 或 0 的脱氧胆酸盐的 OMV 提取缓冲液。

[0044] 细菌囊泡可以通过过滤例如通过 0.22 $\mu\text{m}$  过滤器从全细菌方便地分离。细菌滤液可以通过离心例如高速离心(例如 20,000  $\times g$  约 2 小时)澄清。另一个用于 OMV 制备的有用方法在参考 7 中描述并且涉及粗 OMV 的超滤,而不是高速离心。方法可以涉及在超滤发生后的超速离心步骤。用于纯化细菌囊泡的简单方法在参考 8 中描述,其包括:(i)第一过滤步骤,其中囊泡基于它们的不同大小从细菌分离,囊泡通过至滤液,例如使用 0.22 $\mu\text{m}$  微量过滤;和(ii)第二过滤步骤,其中囊泡保留在滞留物中,例如使用 0.1 $\mu\text{m}$  微量过滤。两个步骤均可以使用切向流过滤(tangential flow filtration)。

[0045] OMV 生产的另一个有用的方法是将细菌突变,从而其自发地将囊泡释放至培养基中。例如,对于脑膜炎球菌(meningococcus),如在参考 9 中公开的,可以将脑膜炎球菌中的 *mltA* 基因失活,并且这些突变体细菌自发地将囊泡释放至它们的培养基中。

[0046] OMV 是在生长期间通过革兰氏阴性菌自然地并且组成型地释放的脂双层纳米级球形颗粒(直径 10-300 nm)。OMV 通过细菌外膜的“出芽(budding out)”产生并且,与此一致,它们具有细菌外膜的相似的组成,其包括脂多糖(LPS)、甘油磷脂、外膜蛋白和周质组分(Mashburn-Warren 和 Whiteley, 2008; 2005)。已经提出 OMV 释放是细菌为快速适应外部环境的变化的重要步骤。另外,已将很多其它功能归因于 OMV,其包括递送至宿主细胞的毒素和毒力因子、种间和种内细胞对细胞交叉对话(cross-talk)、生物膜形成、基因转化和针对宿主免疫应答的防御。

[0047] 如它们的亲本细菌细胞,OMV 激活了人免疫系统:LPS 和外膜孔蛋白是作为病原体相关分子模式(PAMP)呈递至先天免疫系统的非均质复合体的部分。在宿主吞噬细胞表面呈现的模式识别受体(PRR)如 Toll-样受体(TLR)识别 LPS 和其它 PAMP,并且连同补体系统驱使炎症应答(Amano 等人, 2010; Beutler 等人, 2003; Blander 和 Medzhitov, 2006; Schnare 等人, 2001; Schnare 等人, 2006)。此外,PAMP 免疫增强剂通过在上文描述的 OMV 内在化处理与保护性抗原共同递送的事实解释了为何 OMV 在引起保护性免疫中如此有效。

[0048] OMV 内含物或完整的 OMV 可以通过膜融合或通过由黏着受体与囊泡的细胞连接(其使用与细菌相同的宿主受体)吸收入哺乳动物细胞(Ellis 和 Kuehn, 2010; Ellis 等人, 2010; Kuehn 和 Kesty, 2005; Parker 等人, 2010)。OMV 对宿主细胞的黏着在体内和体外两者均发生。OMV 还已经在受感染的人组织中被检测到(Brown 和 Hardwidge, 2007; Kulp 和 Kuehn, 2010; Lee 等人, 2008; Lindmark 等人, 2009)。由产肠毒素大肠杆菌(Enterotoxigenic *E. coli*) (ETEC)产生的热不稳定肠毒素(LT)是活性毒素的实例,其可以通过 OMV 递送至宿主细胞(Brown 和 Hardwidge, 2007)。

[0049] 如上文提及的,还可能将异源抗原掺入至细菌囊泡,诸如 OMV (Gorringe 等人, 2009; O' Dwyer 等人, 2004; Roy 等人, 2010)。例如,Schroeder 和 Aebischer (2009)制备了来自沙门氏菌(*Salmonella*)的重组 OMV,其携带了融合至自发整合至 OM 中的大肠杆菌自转运蛋白 C-末端域的利什曼原虫(*Leishmania*)抗原。研究者发现重组囊泡的皮下

注射将使用活沙门氏菌疫苗经口免疫的小鼠中的疫苗免疫应答加强高达 40 倍。研究还已经显示来自其它革兰氏阴性菌和近期的,来自革兰氏阳性微生物的异源蛋白可以通过与周质或外膜蛋白融合掺入初生 OMV (Ashraf 等人, 2011; Muralinath 等人, 2011)。

[0050] 虽然与基于囊泡的疫苗的大多临床经验是基于脑膜炎球菌,但是对其它革兰氏阴性菌的基于囊泡的疫苗也是已知的。

[0051] 因此,囊泡可以来自埃希氏菌属(*Escherichia*)、志贺菌属(*Shigella*)、奈瑟氏菌属、莫拉克斯氏菌属(*Moraxella*)、包特菌属(*Bordetella*)、疏螺旋体属(*Borrelia*)、布鲁氏菌属(*Brucella*)、衣原体、嗜血杆菌属(*Chlamydia Haemophilus*)、军团杆菌属(*Legionella*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、耶尔森氏菌属(*Yersinia*)、螺旋杆菌属(*Helicobacter*)、沙门氏菌属、弧菌属(*Vibrio*) 等的任何的物种。例如,囊泡可以来自百日咳杆菌(*Bordetella pertussis*)、伯氏疏螺旋体(*Borrelia burgdorferi*)、马耳他布鲁氏菌(*Brucella melitensis*)、羊布鲁氏菌(*Brucella ovis*)、鸚鵡热衣原体(*Chlamydia psittaci*)、沙眼衣原体(*Chlamydia trachomatis*)、黏膜炎莫拉氏菌(*Moraxella catarrhalis*)、大肠埃希氏菌(*Escherichia coli* (其包括肠道外病原体菌株))、流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae* (其包括非分型菌株))、嗜肺军团菌(*Legionella pneumophila*)、淋病奈瑟氏菌(*Neisseria gonorrhoeae*)、脑膜炎奈瑟氏菌(*Neisseria meningitidis*)、乳糖奈瑟氏菌(*Neisseria lactamica*)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、小肠结肠炎耶尔森氏菌(*Yersinia enterocolitica*)、幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*)、肠沙门氏菌(*Salmonella enterica* (其包括伤寒和鼠伤寒血清型))、霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)、痢疾志贺氏菌(*Shigella dysenteriae*)、弗氏志贺氏菌(*Shigella flexneri*)、鲍氏志贺氏菌(*Shigella boydii*) 或索氏志贺氏菌(*Shigella sonnei*) 等。

[0052] 脑膜炎奈瑟氏菌(*N. meningitidis*) OMV 具有在人中经验证的安全记录并且从而可以是优选的选择。另一个可用的选择是大肠杆菌囊泡,例如 BL21(DE3)菌株(参见方法)。

[0053] 囊泡可以从野生型细菌或从经修饰的细菌例如已经经修饰以将导致毒性表型的基因失活的菌株制备。例如,已知修饰细菌从而使它们不表达天然脂多糖(LPS),特别对大肠杆菌、脑膜炎球菌、志贺氏菌等。可以进行天然 LPS 的多种修饰,例如,这些可以破坏天然脂质 A 结构、寡糖核心或外部 O 抗原。LPS 中不存在 O 抗原是有用的,如不存在六酰化脂质 A。肠毒素的失活,例如对防止志贺毒素的表达也是已知的。如果脂寡糖(LOS)在囊泡中存在,可能将囊泡处理从而连接它的 LOS 和蛋白质组分(“泡内”缀合)。囊泡可以整体缺少 LOS,或者它们可以缺少六酰化 LOS,例如在囊泡中的 LOS 可以具有每 LOS 分子减少数量的二级酰基链 [10]。例如,囊泡可以来自具有 *lpxL1* 缺失或突变的菌株,其导致五酰基化 LOS 的产生。菌株中的 LOS 可以缺少乳糖-N-新四糖表位,例如,其可以是 *Ist* 和 / 或 *IgtB* 敲除的菌株。LOS 可以缺少至少一个野生型初级 O-连接脂肪酸 [11]。LOS 可以没有  $\alpha$  链。LOS 可以包含 GlcNAc-Hep<sub>2</sub>磷酸乙醇胺-KDO<sub>2</sub>-脂质 A [12]。细菌还可以经修饰以减少或敲除 Tol-Pal 的表达。Tol-Pal 复合体是革兰氏阴性菌中的超分子机构,其跨越周质并且由膜和可溶蛋白两者构成。装配是病原生物诸如霍乱弧菌、铜绿假单胞菌和鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)的毒力所需要的。因此,在优选的实施方案中,细菌囊泡不包含有功能的 Tol-Pal 系统。如上文提及的,细菌还可以通过 *mltA* 基因的失活进行修饰。

[0054] 细菌可以经修饰以具有上调的抗原或表达外来抗原(即对特别的细菌菌株不是天然的抗原)。作为该修饰的结果,从经修饰的细菌制备的囊泡含有更高水平的上调的/外来抗原。上调的抗原在囊泡中表达的增加(相对于对应的野生型菌株测量)按囊泡的每单位质量的相对抗原的质量测量至少 10% 是有效地,并且至少 20%、30%、40%、50%、75%、100% 或更多是更有效地。

[0055] 可以用于导致抗原上调的合适的重组修饰包括,但不限于:(i) 启动子置换;(ii) 基因添加;(iii) 基因置换;或(iv) 阻遏物敲除。在启动子置换中,将在细菌中控制抗原基因表达的启动子使用提供更高表达水平的启动子置换。例如,可以将基因置于来自看家代谢基因的启动子的控制下。在其它实施方案中,将抗原基因置于组成型启动子或可诱导启动子的控制下。相似地,基因可以经修饰以确保其表达不经历相变异。用于减少或消除在脑膜炎球菌中基因表达的相变异性的方法在参考 13 中公开。这些方法包括启动子置换或将负责基因相变异性的 DNA 基序的移除或置换。在基因添加中,已表达抗原的细菌受到了相关基因的第二个拷贝。可以将第二个拷贝整合至细菌染色体中或者可以在附加体元件诸如质粒上。第二个拷贝可以具有比已存在的拷贝更强大的启动子。基因可以位于组成型启动子或可诱导启动子的控制下。基因添加的效果是增加表达的抗原量。在基因置换中,发生了基因添加,不过是通过将基因已存在的拷贝缺失完成的(参见参考 14)。来自置换拷贝的表达比先前的拷贝更高,因此导致了上调。在阻遏物敲除中,将抑制目的抗原表达的蛋白质敲除。因此,没有抑制出现并且目的抗原可以以更高水平表达。用于上调基因的启动子可以有利地包括 CREN [15]。

[0056] 除了基因修饰,经修饰的菌株将通常与其亲本菌株是同基因的。作为修饰的结果,在经修饰的菌株中目的抗原的表达(在相同条件下)比亲本菌株更高。通常的修饰会将基因置于没有在自然中发现的启动子的控制下和/或敲除编码阻遏物的基因。

[0057] 在将抗原上调的实施方案中,可以使用多种方法,例如在 IPTG 可诱导启动子的控制下导入表达抗原性目的蛋白的基因。启动子可以包括 CREN。

[0058] 本发明可以使用来自不同菌株的囊泡的混合物(参见,例如,参考 16)。

[0059] 复合体

本发明人已经显示当在溶液,诸如 PBS 中混合时,上文描述的动物囊泡和细菌囊泡共定位(co-localise)。本发明人假设它们形成了稳定的复合体。

[0060] 因此,在一些实施方案中,本发明提供了包含动物囊泡和细菌囊泡的复合体。在一些实施方案中,复合体包含单一动物囊泡和单一细菌囊泡。在一些实施方案中,复合体包含两个或更多个动物囊泡(相同类型的)和/或两个或更多个细菌囊泡(相同类型的)。例如,在一些实施方案中,复合体按 1:1、1:2、1:3、1:4 或更多,或 2:1、3:1、4 或更多:1 的囊泡数量比例包含动物囊泡和细菌囊泡。

[0061] 相似地,在一些实施方案中,本发明的免疫原性组合物包含动物囊泡和细菌囊泡,其中动物囊泡和细菌囊泡在复合体中。

[0062] 在一些实施方案中,复合体通过两个脂双层的融合,即动物囊泡的脂双层和细菌囊泡的脂双层的融合形成。在一些实施方案中,融合导致单一闭合的脂双层。因此,在一些实施方案中,本发明提供了“融合复合体”,其包含:(i) 与佐剂性相关的细菌抗原,任选地包括 PAMP;和(ii) 疾病相关抗原,诸如 TAA。

[0063] 如在上文提及的,外来体可以通过蛋白质、脂质和核酸组成表征,取决于它们的细胞来源。这些不同可以被检测并且用于区分来自融合体中 OMV 的外来体。因此,在一些实施方案中,融合复合体包含动物糖形、动物脂质、动物核酸和 / 或动物外膜蛋白,例如来源于动物囊泡。融合复合体通常是具有脂双层,任选地单一闭合的脂双层(其可以代表两个或更多个脂双层的完全融合)的囊泡。

[0064] 在另一个实施方案中,复合体通过两个脂双层(即动物囊泡脂双层和细菌囊泡脂双层)上的蛋白质和 / 或碳水化合物部分的表面连接形成。例如,表面连接可以通过黏着受体。

[0065] 在一些实施方案中,复合体通过融合和表面连接的组合形成。

[0066] 在一些实施方案,没有复合体形成,即动物囊泡和细菌囊泡作为分离的组分存在于药物组合物中。

[0067] 在一些实施方案中,在掺入药物组合物前,动物囊泡和细菌囊泡是作为分离的组分贮存的。组分可以在施用至动物之前、之后或同时组合。因此,分离的组分可以通常同时或循序作为分离的组分施用至动物。可选地,分离的组分可以共施用至动物,例如施用双室注射器(dual-chambered syringe)或混合注射器。

[0068] 动物囊泡和细菌囊泡的共定位可以通过标记动物囊泡和细菌囊泡(例如,对各自使用不同的荧光标记),将动物囊泡和细菌囊泡一同混合(例如在 PBS 中)并且在显微镜(例如,激光扫描共聚焦显微镜)下观察囊泡来确定。

[0069] 疾病相关抗原

通常,动物囊泡包含疾病相关抗原,用于刺激对抗特定目的疾病的免疫应答。

[0070] 因此,在一些实施方案中,动物囊泡包含至少一种疾病相关抗原。在一些实施方案中,所述至少一种疾病相关抗原是 TAA、病原体相关抗原或退行性病症相关抗原。

[0071] 一些病原体已经显示在患者受感染的细胞表面表达了一些它们的抗原。因此,来源于这些受感染的细胞的动物囊泡,诸如外来体,将也含有病原体相关抗原。在一些实施方案中,病原体相关抗原可以与特定病毒、细菌、真菌、原生动物或寄生虫相关。在优选的实施方案中,病原体是胞内病原体,即能够在宿主细胞内生长和繁殖的病原体。细菌实例包括但不限于土拉热弗朗西斯氏菌(*Francisella tularensis*)、单核细胞增生利斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*)、沙门氏菌、布鲁氏菌、军团菌、分枝杆菌(*Mycobacterium*)、卡诺氏菌(*Nocardia*)、马红球菌(*Rhodococcus equi*)、耶尔森氏菌(*Yersinia*)、脑膜炎奈瑟氏菌、衣原体(*Chlamydia*)、立克次氏体(*Rickettsia*)、柯克斯氏体(*Coxiella*)、分枝杆菌(*Mycobacterium*)诸如麻风分枝杆菌(*Mycobacterium leprae*)和苍白密螺旋体(*Treponema pallidum*)。真菌实例包括但不限于荚膜组织胞浆菌(*Histoplasma capsulatum*)、新型隐球菌(*Cryptococcus neoformans*)和耶氏肺孢子虫(*Pneumocystis jirovecii*)。原生动物的实例包括但不限于顶复虫(Apicomplexans)(例如疟原虫(*Plasmodium* spp.))、刚地弓形虫(*Toxoplasma gondii*)和隐孢子虫(*Cryptosporidium parvum*)和锥虫(*Trypanosomatids*) (例如利什曼原虫(*Leishmania* spp.))和克氏锥虫(*Trypanosoma cruzi*)。

[0072] 退行性病症包括但不限于肌肉萎缩性侧索硬化症(ALS)(又名 Lou Gehrig 氏疾病)、阿尔茨海默病、帕金森氏疾病、多系统萎缩症、尼曼 - 匹克病、动脉粥样硬化、进行性核上性麻痹、癌症、特发性震颤、泰 - 萨克斯病、糖尿病、心脏病、圆锥形角膜、炎症性肠病

(IBD)、前列腺炎、骨关节炎、骨质疏松症、类风湿性关节炎、亨廷顿氏疾病、慢性创伤性脑病和慢性阻塞性肺病 (COPD)。在进一步的实施方案中,退行性病症是蛋白质构象疾病,其中某些蛋白质变得结构异常,并且从而破坏了身体的细胞、组织和器官的功能。蛋白质构象疾病包括但不限于阿尔茨海默病、帕金森氏疾病、朊病毒疾病、二型糖尿病、淀粉样变性。任何这些退行性病症可以具有与它们相关的落入术语“退行性病症相关抗原”之内的抗原。例如,聚集蛋白质构象疾病的蛋白质(参见表 2)或其片段是退行性病症相关抗原的实例。

[0073] 表 2:

蛋白质构象病	主要聚集蛋白 (疾病相关抗原)
阿尔茨海默病	淀粉状 $\beta$ 肽 (A $\beta$ ); Tau 蛋白 (参见 Tau 病)
大脑 $\beta$ - 淀粉样血管病	淀粉状 $\beta$ 肽 (A $\beta$ )
青光眼中视网膜神经节细胞退化	淀粉状 $\beta$ 肽 (A $\beta$ )
朊病毒疾病 (多种)	朊病毒蛋白
帕金森氏疾病和其它突触核蛋白病 (synucleinopathies) (多种)	$\alpha$ - 突触核蛋白
Tau 病 (Tauopathies) (多种)	微管 - 相关蛋白 tau (Tau 蛋白)
额颞叶退化 (FTLD) (Ubi+, Tau-)	TDP-43
FTLD - FUS	肉瘤融合 (FUS) 蛋白
肌肉萎缩性侧索硬化症 (ALS)	超氧化物歧化酶, TDP-43, FUS
亨廷顿氏疾病和其它三联重复病症 (多种)	具有串联谷氨酰胺扩增的蛋白质
家族性英国型痴呆	ABri
家族性丹麦型痴呆	ADan
遗传性脑出血伴淀粉样变性 (冰岛型) (HCHWA-I)	半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C
CADASIL	Notch 3
亚历山大病	胶质原纤维酸性蛋白 (GFAP)
Seipinopathies	Seipin
家族性淀粉样样神经病, 老年系统性淀粉样变性	运甲状腺素蛋白
Serpinopathies (多种)	丝氨酸蛋白酶抑制剂
AL (轻链) 淀粉样变性 (原发性全身性淀粉样变性)	单克隆免疫球蛋白轻链
AH (重链) 淀粉样变性	免疫球蛋白重链
AA (二级) 淀粉样变性	淀粉状 A 蛋白质
二型糖尿病	胰岛淀粉样多肽 (IAPP; 糊精)
主动脉内侧淀粉样变性 (Aortic medial amyloidosis)	Medin (乳凝集素)
ApoAI 淀粉样变性	载脂蛋白 AI
ApoAII 淀粉样变性	载脂蛋白 AII
ApoAIV 淀粉样变性	载脂蛋白 AIV
芬兰型家族性淀粉样变性 (FAF)	凝溶胶蛋白
溶菌酶淀粉样变性	溶菌酶
纤维蛋白原淀粉样变性	纤维蛋白原
透析淀粉样变性	$\beta$ -2 微球蛋白
包含体肌炎 / 肌病	淀粉状 $\beta$ 肽 (A $\beta$ )
白内障	晶体蛋白
具有视紫红质突变的色素性视网膜炎	视紫红质

甲状腺髓样癌	降血钙素
心脏心房淀粉样变性	心钠素
垂体泌乳素瘤	催乳素
遗传性格子状角膜营养不良	角膜上皮蛋白
皮肤苔癣状淀粉样变	角蛋白
马洛里小体	角蛋白中间丝蛋白
角膜乳铁蛋白淀粉样变性	乳铁蛋白
肺泡蛋白沉积症	表面活性剂蛋白 C (SP-C)
牙源 (Pindborg) 淀粉状肿瘤	牙源性成釉质细胞 - 相关蛋白
淀粉状精囊 (Seminol vesicle amyloid)	精囊蛋白 I
囊胞性纤维症	囊性纤维化跨膜电导调节 (CFTR) 蛋白
镰状细胞疾病	血红蛋白
危重病性肌病 (CIM)	肌浆球蛋白泛素化的蛋白过多状态

[0074] 动物囊泡可以含有疾病相关抗原的任何组合,其包括病原体相关抗原的任何组合,退行性病症相关抗原的任何组合(其包括如在表 2 中列举的蛋白质构象疾病抗原的任何组合),或 TAA 的任何组合。

#### [0075] 肿瘤相关抗原

TAA (其包括肿瘤特异性抗原-TSA)是在肿瘤细胞中生产的蛋白质,其具有异常结构和/或异常表达模式。

[0076] 癌胚抗原是肿瘤抗原的一类。实例是  $\alpha$  胎蛋白(AFP)和癌胚抗原(CEA)。这些蛋白质一般在胚胎发育的早期阶段产生并且在免疫系统完全发育时消失。因此,自体耐受没有发展对抗这些抗原。

[0077] 异常蛋白质还通过使用致癌病毒,例如 EBV 和 HPV 感染的细胞产生。由这些病毒感染的细胞含有被转录的潜伏病毒 DNA 并且获得的蛋白质产生免疫应答。

[0078] 除了蛋白质,其它物质如细胞表面糖脂和糖蛋白也可以在肿瘤细胞中具有异常结构并且因此可以是免疫系统的靶。

[0079] 在一些实施方案中本发明的动物囊泡包含一种或多种 TAA,其中一种或多种 TAA 选自:(a)癌-睾丸抗原诸如 NY-ESO-1、SSX2、SCP1 以及 RAGE、BAGE、GAGE 和 MAGE 家族多肽,例如,GAGE-1、GAGE-2、MAGE-1、MAGE-2、MAGE-3、MAGE-4、MAGE-5、MAGE-6 和 MAGE-12 (其可以被用于,例如,针对黑素瘤、肺肿瘤、头颈肿瘤、NSCLC、乳腺肿瘤、胃肠肿瘤和膀胱肿瘤);(b)突变抗原,例如,p53(与多种实体肿瘤,例如,结肠直肠癌、肺癌、头颈癌相关)、p21/Ras(与例如黑素瘤、胰腺癌和结肠直肠癌相关)、CDK4 (与例如,黑素瘤相关)、MUM1 (与例如,黑素瘤相关)、胱天蛋白酶-8 (与例如,头颈癌相关)、CIA 0205 (与例如,膀胱癌相关)、HLA-A2-R1701、 $\beta$ -联蛋白(与例如黑素瘤相关)、TCR (与例如,T-细胞非霍奇金淋巴瘤相关)、BCR-ab1 (与例如,慢性髓细胞性白血病相关)、磷酸丙糖异构酶、KIA 0205、CDC-27 和 LDLR-FUT;(c)过表达抗原,例如,半乳凝素 4 (与例如,结肠直肠癌相关)、半乳凝素 9 (与例如,霍奇金氏疾病相关)、蛋白酶 3 (与例如,慢性髓细胞性白血病相关)、WT 1 (与例如,多种白血病相关)、碳酸酐酶(与例如肾癌相关)、醛缩酶 A (与例如,肺癌相关)、PRAME (与例如,黑素瘤相关)、HER-2/neu (与例如,乳腺癌、结肠癌、肺癌和卵巢癌相关)、乳腺珠蛋白(mammaglobin)、甲胎蛋白(与例如,肝癌相关)、KSA (与例如,结肠直肠癌相关)、促胃液素(与例如,胰腺癌和胃癌相关)、端粒酶催化蛋白、MUC-1 (与例如,乳腺癌和卵巢癌相关)、G-250 (与例如,肾细胞癌相关)、p53(与例如,乳腺癌、结肠癌相关)和癌胚抗原(与例如,乳腺癌、肺癌和胃肠道癌症诸如结肠直肠癌相关);(d)共同抗原,例如,黑素瘤-黑素细胞分化抗原诸如 MART-1/Melan A、gp100、MC1R、黑素细胞刺激激素受体、酪氨酸酶、酪氨酸酶相关蛋白-1/TRP1 和酪氨酸酶相关蛋白-2/TRP2 (与例如,黑素瘤相关);(e)前列腺相关抗原诸如 PAP、PSA、PSMA、PSH-P1、PSM-P1、PSM-P2,与例如前列腺癌相关。(f)免疫球蛋白独特型(例如,与骨髓瘤和 B 细胞淋巴瘤相关)。在某些实施方案中,一种或多种 TAA 选自,但不限于 p15、Hom/Mel-40、H-Ras、E2A-PRL、H4-RET、IGH-IGK、MYL-RAR、EB 病毒(Epstein Barr virus)抗原、EBNA、人乳头瘤病毒(HPV)抗原,其包括 E6 和 E7、乙肝病毒和丙肝病毒抗原、人 T-细胞嗜淋巴细胞病毒抗原、TSP-180、p185erbB2、p180erbB-3、c-met、mn-23H1、TAG-72-4、CA 19-9、CA 72-4、CAM 17.1、NuMa、K-ras、p16、TAGE、PSCA、CT7、43-9F、5T4、791 Tgp72、 $\beta$ -HCG、BCA225、BTAA、CA 125、CA 15-3 (CA 27.29\BCAA)、CA 195、CA 242、CA-50、CAM43、CD68\KP1、CO-029、FGF-5、

Ga733 (EpCAM)、HTgp-175、M344、MA-50、MG7-Ag、MOV18、NB/70K、NY-CO-1、RCAS1、SDCCAG16、TA-90 (Mac-2 结合蛋白 / 亲环蛋白 C- 相关蛋白)、TAAL6、TAG72、TLP、TPS 等。在一些实施方案中,一种或多种 TAA 选自,但不限于:黑色素 A、Silv、癌胚抗原(CEA)和间皮素。

[0080] 应当理解的是动物囊泡包含选自上文列举的 TAA 的 1 种、2 种、3 种、4 种、5 种、6 种、7 种、8 种、9 种、10 种或更多种 TAA 的任何组合。

#### [0081] 药物组合物

药物组合物可以包括除动物囊泡和细菌囊泡以外的进一步的组分。这些进一步的组分可以包括进一步的免疫原性组分和 / 或非免疫原性组分。

[0082] 药物组合物将通常包括药学上可接受的载体,其可以是自身不诱导对接受组合物的患者有害的抗体的产生的任何物质,并且其可以在没有异常毒性下施用。药学上可接受的载体可以包括液体,诸如水、盐水、丙三醇和乙醇。辅助物质诸如润湿剂或乳化剂、pH 缓冲物质等也可以在这样的囊泡中出现。合适的载体的全面讨论在参考 17 中可以得到。

[0083] 药物组合物的 pH 通常在 6 和 8 之间,并且更优选地在 6.5 和 7.5 之间(例如约 7)。在一些实施方案中,本发明组合物中稳定的 pH 可以通过缓冲剂,例如 Tris 缓冲剂、柠檬酸缓冲剂、磷酸缓冲剂或组氨酸缓冲剂的使用维持。因此,本发明的药物组合物将通常包括缓冲剂。

[0084] 药物组合物可以是无菌的和 / 或无致热源的。药物组合物可以是对于人等渗的。

[0085] 本发明还提供了使用本发明的药物组合物预填充的容器(例如小瓶)或递送设备(例如注射器)。本发明还提供了用于提供这样的容器或设备的方法,其包括将本发明含囊泡的组合物导入容器或设备。

[0086] 用于施用至主体的本发明的药物组合物优选地是疫苗组合物。根据本发明的疫苗可以是预防性的(例如预防癌症)或治疗性的(例如治疗癌症)。作为疫苗使用的药物组合物包含免疫有效量的抗原,以及任何其它组分(按需要)。通过“免疫有效量”,这意指以单一剂量或作为系列的部分对个体施用的量对治疗或预防是有效的。该量的变化取决于待治疗个体的健康和身体状况、年龄、待治疗的个体的分类群(例如非人灵长动物、灵长动物等)、个体免疫系统合成抗体的能力、期望的保护程度、疫苗的配制、治疗医生对医疗状况的评估和其它相关因素。期望的是所述量将落入相对广的范围,其可以通过例行试验确定。本发明的组合物的抗原含量将通常以每剂量蛋白质的量进行表示。在本发明组合物中目的抗原的浓度可以通常在 10 和 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$  之间,优选地在 25 和 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$  之间,并且更优选地约 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$  或约 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$  (以组合物中总蛋白质表示)。

[0087] 在药物组合物中包括的动物囊泡和细菌囊泡的浓度将根据数个参数而变化,其包括例如囊泡来源的细胞类型。组合物中动物囊泡的浓度将通常为每 ml  $10^8$  至  $10^9$  个囊泡。通常地,动物囊泡和细菌囊泡将按摩尔以相同量混合。然而,在一些实施方案中,根据表面抗原的水平,在药物组合物中将存在较大比例的动物囊泡或较大比例的细菌囊泡。例如,在一些实施方案中,动物囊泡与细菌囊泡按 1:10 至 10:1、1:9 至 9:1、1:8 至 8:1、1:7 至 7:1、1:6 至 6:1、1:5 至 5:1、1:4 至 4:1、1:3 至 3:1、1:2 至 2:1 或 1:1 的摩尔量比例混合。

[0088] 药物组合物可以包括免疫佐剂。因此,例如,它们可以包括铝盐佐剂或水包油乳状液(例如,水包鲨烯乳状液)。合适的铝盐包括氢氧化物(例如羟基氧化物)、磷酸盐(例如羟基磷酸盐、正磷酸盐),(例如参见参考 18 的第 8&9 章),或其混合物。盐可以是任何合适的

形式(例如凝胶、结晶的、非晶形的等),具有抗原吸附的盐是优选的。用于施用至主体的组合物中的  $Al^{+++}$  的浓度优选地小于 5mg/ml,例如  $\leq 4$  mg/ml、 $\leq 3$  mg/ml、 $\leq 2$  mg/ml、 $\leq 1$  mg/ml 等。优选的范围在 0.3 和 1mg/ml 之间。0.85mg/剂量的最大值是优选的。

[0089] 本发明的组合物可以以多种液体形式制备。例如,组合物可以按可注射剂,按照溶液或悬液进行制备。可以将组合物制备以用于肺部施用,例如通过吸入器,使用细喷雾(fine spray)。可以制备组合物,用于经鼻、经耳或经眼施用,例如以喷雾或液滴,并且鼻内囊泡疫苗是本领域已知的。对肌肉施用可注射剂是常见的。注射可以通过针(例如皮下注射针),但是可以可选地使用无针注射。

[0090] 组合物可以包括抗微生物剂,特别地当以多剂量形式包装时。抗微生物剂诸如硫柳汞(thiomersal)和 2-苯氧乙醇一般在疫苗中被发现,但是优选使用无汞防腐剂或根本无防腐剂。

[0091] 组合物可以包含去污剂,例如 Tween (聚山梨醇酯),诸如 Tween 80。去污剂通常以低水平例如  $< 0.01\%$  存在。

[0092] 组合物可以包括例如来自 OMV 制备物的剩余去污剂(例如脱氧胆酸盐)。剩余去污剂的量优选地对每  $\mu\text{g}$  囊泡蛋白质小于  $0.4\mu\text{g}$  (更优选地小于  $0.2\mu\text{g}$ )。

[0093] 如果组合物包括 LOS,对每  $\mu\text{g}$  囊泡蛋白质 LOS 的量优选地小于  $0.12\mu\text{g}$  (更优选地小于  $0.05\mu\text{g}$ )。

[0094] 组合物可以包括钠盐(例如氯化钠)例如用于控制张力。NaCl 的浓度通常是  $10 \pm 2$  mg/ml,例如约 9 mg/ml。

[0095] 有效剂量体积可以按常规建立,取决于组合物的抗原性。典型组合物的人剂量可以是,例如对于肌肉注射(例如注射至大腿或上臂)约 0.5ml。可以对其它递送途径使用相似剂量,例如用于雾化的鼻内疫苗可以具有每喷雾约  $100\mu\text{l}$  或约  $130\mu\text{l}$  的体积,且四次喷雾施用以产生约 0.5ml 的总剂量。

[0096] 本发明的用途

本发明还提供了本发明的复合体或组合物,用于在药物中使用,例如在疾病治疗或预防中使用。

[0097] 本发明还提供了用于治疗或预防疾病的方法,其包括对哺乳动物,优选地人施用本发明的药物组合物。

[0098] 本发明还提供了在哺乳动物中提高免疫应答的方法,其包括对哺乳动物施用本发明的药物组合物,优选地免疫原性组合物。通常地,免疫应答是抗体应答。抗体应答优选地是保护性抗体应答。本发明还提供了用于在这样的方法中使用的本发明的组合物。

[0099] 本发明还提供用于保护哺乳动物对抗疾病,诸如癌症的方法,其包括对哺乳动物施用本发明的药物组合物。

[0100] 本发明提供了用于作为药物(例如,作为免疫原性组合物或作为疫苗)使用的本发明的药物组合物。其还提供了动物囊泡和细菌囊泡,任选地以复合体,在用于治疗或预防哺乳动物中疾病的药物的生产中的用途。

[0101] 疾病可以是,例如(但不限于)病原体感染(诸如在本申请其它地方列举的那些),肌肉萎缩性侧索硬化症(ALS)(又名 Lou Gehrig 氏疾病)、阿尔茨海默病、帕金森氏疾病、多系统萎缩症、尼曼-匹克病、动脉粥样硬化、进行性核上性麻痹、癌症、特发性震颤、泰-萨克

斯病、糖尿病、心脏病、圆锥形角膜、炎症性肠病 (IBD)、前列腺炎、骨关节炎、骨质疏松症、类风湿性关节炎、亨廷顿氏疾病、慢性创伤性脑病和慢性阻塞性肺病 (COPD)。在进一步的实施方案中,退行性病症是蛋白质构象疾病,其中某些蛋白质出现结构异常,并且从而破坏了身体中细胞、组织和器官的功能。蛋白质构象疾病包括但不限于阿尔茨海默氏病、帕金森氏病、朊病毒疾病、二型糖尿病、淀粉样变性。

[0102] 癌症可以是,例如(但不限于),支气管癌、鼻咽癌、喉癌、小细胞和非小细胞肺癌、肺腺癌、肝癌、胰腺癌、膀胱癌、结肠癌、乳腺癌、宫颈癌、卵巢癌或淋巴细胞性白血病。

[0103] 选择在本发明中使用的囊泡应当以含有用于提高对特别的疾病的免疫应答的合适抗原的囊泡作为选择。合适的囊泡可以由技术人员容易地选择。例如,为了制备用于在治疗癌症中使用的药物组合物或复合体,技术人员可以选择动物囊泡,诸如来源于肿瘤的外来体,并且将该动物囊泡与当施用至癌症患者时能够辅助免疫应答的细菌囊泡组合。相似地,囊泡应当含有对目的疾病的合适抗原。例如,对于在表 2 中列举的蛋白质构象病症,技术人员可以确保一种或多种对应列举的聚集蛋白的抗原包括在动物囊泡中。

[0104] 哺乳动物优选地是人。人可以是成年人或儿童。意图用于儿童的疫苗也可以对成年人施用,例如,为评估安全性、剂量、免疫原性等。

[0105] 治疗处理的功效可以通过在本发明的组合物施用后监测感染或肿瘤进展进行测试。预防性治疗的功效可以通过在组合物施用后监测对抗囊泡中的免疫原性蛋白或其它抗原(例如 TAA)的免疫应答进行测试。本发明的组合物的免疫原性可以通过将它们施用至测试主体并且随后确定标准血清参数进行确定。这些免疫应答将通常在组合物施用约 4 周后确定,并且与在组合物施用前测定的值进行比较。在施用多于一剂量的组合物下,可以进行多于一次的施用后测定。通常地,包含了包括 TAA 的动物囊泡的本发明的药物组合物在施用至主体后能够诱导血清抗 TAA 抗体应答。

[0106] 本发明的组合物将通常直接施用至患者。直接递送可以通过肠外注射(例如皮下地、腹腔内地、静脉地、肌内地或对组织细胞间隙),或通过经直肠、经口、经阴道、经皮、经鼻内、经眼、经耳、经肺或其它粘膜施用。对大腿和上臂的经肌肉施用是优选的。注射可以通过针(例如皮下注射针),但是可以可选地使用无针注射。通常的经肌肉剂量为约 0.5ml。

[0107] 本发明可以用于引起全身和 / 或粘膜免疫。

[0108] 剂量治疗可以是单剂量方案或多剂量方案。多剂量可以在初次免疫时间表和 / 或加强免疫时间表中使用。初次剂量时间表可以随后是加强剂量时间表。引发剂量(例如 4-16 周)之间和引发和加强之间的合适的时机可以按常规确定。

[0109] 综述

术语“包含”涵盖了“包括”以及“组成”,例如组合物“包含”X 可以唯一地由 X 组成或可以包括另外的一些,例如 X+Y。

[0110] 词语“基本地”不排除“完全地”,例如组合物“基本不含”Y 可以完全不含 Y。需要时,词语“基本地”可以从本发明的定义中忽略。

[0111] 关于数值的术语“约”是任选和平均的,例如  $x \pm 10\%$ 。

[0112] 除非特别声明,包括将两种或更多种组分混合的步骤的方法不需要任何特别的混合顺序。因此组分可以以任何顺序混合。在此有三种组分时,则两种组分可以相互组合,并且随后所述组合可以与第三种组分组合等。

### [0113] 附图简述

图 1. OMV- 外来体复合体。将从大肠杆菌  $\Delta$  To1R 纯化的 OMV 通过与 FM 4-64 染料孵育进行标记, 并且与从经 EGFP 转染的 HEK293T 细胞系分离的外来体孵育。通过具有 488nm/543nm 激光线的激光扫描共聚焦显微镜评估外来体 -OMV 共定位。上方小图 图 1A: 分别使用 488nm 和 542nm 激光线扫描纯化的 EGFP- 外来体和 OMV FM 4-64 染料。将外来体和 OMV 的原始荧光信号转换为白色和灰色比例(EGFP- 外来体, 深灰色斑点; OMV FM 4-64, 白色斑点); 两个图像的合并显示三个可见的 OMV 中的两个(斑点 1 和 3) 显示了 488nm 和 542 nm 两者的荧光信号, 表明这些囊泡与外来体共定位。下方小图 图 1B、1C 和 1D: 可见囊泡的共定位图表。图表代表 OMV 和外来体斑点每微米荧光强度, 并且显示了 EGFP- 外来体和 OMV FM 4-64 之间的重叠信号(如斑点 1 和斑点 3 标记的)(EGFP- 外来体, 实线; OMV FM 4-64, 虚线)。

[0114] 图 2. 用针对 IFITM3 (已知是外来体相关的蛋白质) 提高的抗体的蛋白质印迹。

[0115] 图 3. 由 OMV+ 外来体制剂引发的针对 5 种外来体相关人蛋白(CXCR4、ECCR、IFITM3、FOLH1、TFRC) 的总 IgG。收集来自使用 OMV+ 外来体和 OMV 单独免疫的小鼠的血清并且对每种重组蛋白通过 ELISA 进行分析, 如与免疫前血清比较。

[0116] 图 4. 由 OMV+ 外来体针对 5 种外来体相关人蛋白引发的 IgG1 和 IgG2a 抗体亚类。收集来自使用 OMV+ 外来体、外来体和 OMV 单独免疫的小鼠的血清并且对每种重组蛋白通过 ELISA 进行分析。

### [0117] 实施本发明的模式

#### 实施例 1

#### 方法

#### 外来体纯化和分析

Hek293-EGFP 稳定克隆通过在生产商的条件使用编码绿色荧光蛋白 EGFP 的质粒 (pcDNA-EGFP) 稳定转染 HEK293-FLPin 细胞 (Invitrogen) 进行开发。将 Hek293-EGFP 细胞以 5% CO<sub>2</sub> 在 37°C 下在 DMEM 10% FBS 中培养。当细胞在 80-90% 的汇合时, 将培养基使用新鲜的无血清培养基替换。在 24 小时后我们根据提供者的方案收集 10ml 细胞培养上清液并且使用 ExoQuick-TC 试剂盒 (SBI) 将外来体纯化。

[0118] 使用针对一组已知与外来体相关的蛋白质的抗体, 通过蛋白质印迹通过共聚焦显微术分析外来体制备物的质量。此外, 使用针对由不同细胞系表达的和在外来体中检测到的肿瘤相关抗原的抗体将外来体染色(例如, 参见图 2)。

[0119] 对于蛋白质印迹, 将外来体沉淀在 20ul Laemmli 上样液中重悬, 煮 10' 并且通过 SDS-PAGE 分离, 并且转移至 PVDF 膜。在 RT 下使用 PBS+10% 含脂奶粉将膜浸透 1 小时。所述膜在具有 1% 脱脂奶粉和 0.05 % Tween 的 PBS 中孵育, 首先使用 1:1000 稀释的多克隆在 4°C ON 进行探测。在使用具有 1% 脱脂奶粉和 0.05 % Tween 的 PBS 洗涤 3 次后, 在 RT 添加 1:500 稀释的二级抗体 1 小时。在使用 PBS+0.05 % Tween 另外洗涤 3 次后, 使用 ECL 将膜显色并且使用 ChemiDoc 探测。使用 Exoquick-Tc 将 Hek293-EGFP 外来体分离并且在具有 488nm 激光线的激光扫描共聚焦显微镜 (LeicaSP5) 下进行观察, 以用于共聚焦显微术分析。

### [0120] OMV 制备

BL21 (DE3)  $\Delta$  *tolR* 突变体菌株(其缺乏功能 TolR 基因)的培养基,将菌株通过 0.22- $\mu$ m 孔径过滤器(Millipore, Bedford, MA)过滤。滤液通过离心澄清并且经历高速离心(200,000 x g 2 小时),并且将含有 OMV 的沉淀使用 PBS 洗涤并且最后使用 PBS 重悬。使用标准方案程序将 OMV 使用 FM 4-64 染料(分子探针)标记,以用于共聚焦显微术。

[0121] 可选地,可以将 BL21 (DE3)  $\Delta$  *ompA* 大肠杆菌细胞从新鲜平板接种至 500ml LB (Luria Bertani 液体培养基)+Amp (100ug/ml) 并且在 37°C 震荡(200 r.p.m.) 下培养并生长,制备 OMV。在 37°C 将细菌培养生长至 O.D. =1。此时,通过 0.22- $\mu$ m 孔径过滤器(Millipore, Bedford, MA) 将培养基过滤。滤液经历高速离心(200,000x g 90 分钟),并且使用 PBS 洗涤含有 OMV 的沉淀并且最后使用 PBS 重悬(Berlanda 等人 (2008) Mol Cell Proteomics 2008 Mar; 7(3):473-85)。

#### [0122] OMV- 外来体复合体的产生

为证明 OMV 与外来体相互作用的能力,实施了共定位研究。使用 FM 4-64 染料将 OMV 标记,与等体积的 EGFP- 外来体制备物在 PBS 中以室温混合 30 分钟,稀释并放置于玻璃盖片上,并且使用甘油 plastine 封固。OMV- 外来体复合体在使用 488nm/543nm 激光线的激光扫描共聚焦显微镜(LeicaSP5) 下显现。

#### [0123] 结果和结论

EGFP- 外来体的分析显示它们含有 CD81,最丰富的外来体蛋白之一。此外,外来体显示了一组肿瘤相关抗原的存在,其可以被用于在疫苗中使用。使用 FM 4-64 染料将 OMV 标记并且与纯化的 EGFP- 外来体孵育。通过具有 488nm/543nm 激光线的激光扫描共聚焦显微镜证实外来体 -OMV 共定位。在该分析中,OMV- 外来体复合体的存在通过重叠 488nm 和 542nm 荧光信号展示,而不同的 OMV 和外来体则显示两种荧光信号之一。如在图 1 中显示的,当 EGFP- 外来体和 OMV FM 4-64 共同孵育时,一些 OMV 和外来体囊泡具有两种荧光信号,其表明细菌囊泡和哺乳动物囊泡共同定位(通过在图 1,小图 A 中标记为 1 和 3 的浅灰色斑点代表),并且形成复合体。

#### [0124] 实施例 2

##### 方法

##### OMV 制备

从新鲜平板接种至 500ml LB (Luria Bertani 液体培养基)+Amp (100ug/ml) 并且在 37°C 震荡(200 r.p.m.) 下培养并生长的 BL21 (DE3)  $\Delta$  *ompA* 大肠杆菌细胞制备 OMV。细菌培养生长至在 37°C O.D. =1。在该点,通过 0.22  $\mu$ m 孔径过滤器(Millipore, Bedford, MA) 过滤培养基。将滤液进行高速离心(200,000x g 90 分钟),并且使用 PBS 洗涤含有 OMV 的沉淀,并且最后使用 PBS 重悬(Berlanda 等人 (2008). Mol Cell Proteomics 2008 Mar; 7(3):473-85)。

#### [0125] 用于免疫研究的外来体的制备

对于免疫研究,如 Raposo 等人 (1996) Exp. Med. 183, 1161-1172 描述的通过差速离心将来自细胞培养上清液的外来体分离。CD81 简略地,将  $1 \times 10^8$  个 HCT15 细胞在 DMEM-10% FCS 中培养,直到在汇合前在 18 175cm<sup>2</sup> 烧瓶中汇合。对于外来体制备,使用无血清培养基(PFHM-II Gibco-Life Technologies) 将培养基替换,培养 24 小时并且随后以 200xg 离心 10 分钟(沉淀 P1)。将上清液收集并且两次以 500g 离心 10 分钟(沉淀 P2)。

将第二上清液顺序两次以 2,000xg 离心 15 分钟(沉淀 P3),一次以 10,000xg 离心 30 分钟(沉淀 P4),和一次以 70,000xg 离心 60 分钟(沉淀 P5),其使用了 SW28 转子(Beckman instruments, Inc.)。将细胞沉淀 P1 在 1 ml 的 C-RIPA 缓冲液(50 mM Tris-HCl pH7.5、150 mM NaCl、1% Nonidet P-40; 2mM EGTA、1 mM 原钒酸盐、0.1% SDS、0.5% 脱氧胆酸钠、1 mM 苯基-甲烷-磺酰氟化物、10  $\mu$ g/ml 亮抑肽酶、10  $\mu$ g/ml 抑肽酶)中溶解,而将来源于上清液各沉淀 P2-P5 在 0.5 ml 相同缓冲液中溶解。在澄清后,每个样品的蛋白质浓度通过 Bradford 法确定。

[0126] 作为外来体制备物的质量控制,将 20  $\mu$ g P1 提取物和 10  $\mu$ g P2-P5 提取物(分别对应约  $2 \times 10^5$  和  $2 \times 10^7$  个细胞)上样至 SDS-PAGE (4-12%) 并且通过用靶向外来体标记物 CD81 的抗体的蛋白质印迹进行分析。此外,在外来体中存在的五种蛋白质也通过蛋白质印迹评估。将 SDS-PAGE (4-12% 凝胶)在硝化纤维素膜上电印迹。将膜在室温下在由含有 10% 奶粉的 1x PBS-0.1% Tween 20 (PBST) 构成的封闭缓冲液中浸透 1 小时。随后,将膜与在含有 1% 奶粉的封闭缓冲液中稀释 1:1000 的抗原特异性抗体孵育,并且在 PBST-1% 中洗涤。将二级 HRP-缀合抗体(山羊抗-小鼠免疫球蛋白/HRP, Perkin Elmer)在封闭缓冲液中稀释 1:5000,并且使用 Chemidoc-IT UVP CCD 相机(UVP)和 Western Lightning™ Chemiluminescence Reagent Plus (Perkin Elmer) 根据生产商的方案实施化学发光检测。

#### [0127] 免疫

将 5/6 周大 CD1 远交繁殖雌性小鼠(每组 5 只小鼠)在第 1、14 和 28 天使用与终浓度为 3mg/ml 的作为佐剂的等体积的明矾氢氧化物(Alum Hydroxide)配制的 OMV (100 微升中 15 微克)或 OMV+ 外来体组合(100 微升中各 15 微克)或单独的外来体(100 微升中 15 微克)进行腹膜内免疫。最后免疫后两周将小鼠放血并且从各自小鼠收集血清。

#### [0128] ELISA 分析

由使用 OMV+ 外来体组合免疫的小鼠引起的总 IgG 滴度在一组外来体蛋白质上测试,其通过酶联免疫吸附测定(ELISA)测定。微-ELISA 平板(Nunc Maxisorp)的个别孔使用在 PBS (pH7.4)中的 1  $\mu$ g 各重组蛋白在 4°C 包被过夜。将平板洗涤,使用 PBS-1%BSA 在 37 °C 处理 1 小时,并且将对 OMV、外来体和 OMV+ 外来体的抗血清的 100  $\mu$ l 等分试样以在 PBS-0.1% Tween 中的不同系列稀释添加至孔中。在 37°C 孵育 2 小时后,将平板再次洗涤并且使用在 PBS-Tween 中以 1:2500 稀释的碱性磷酸酶缀合的山羊抗-小鼠 IgG (Sigma)在 37°C 孵育 1 小时。

[0129] 对于 IgG2a 和 IgG1 亚类的检测,将平板使用在 PBS-Tween 中以 1:4000 稀释的碱性磷酸酶缀合的山羊抗-小鼠 IgG2a 和 IgG1 (Sigma)孵育。此后向样品添加 100  $\mu$ l PNPP (Sigma)并且在室温孵育 30 分钟。在 405 nm 读取光密度,并且将血清-抗体滴度定义为在产生 0.5 OD 值的血清稀释度。

#### [0130] 结果和结论

##### *在 HCT15 来源的外来体中检测标记物*

HCT15 细胞中的一组外来体相关蛋白质的表达通过 HCT15 细胞的总提取物和 / 或外来体级分的蛋白质印迹进行证实。通过培养上清液连续的差速离心制备外来体,其获得 5 个离心沉淀,其中 P1 代表细胞沉淀, P2-P4 是中间上清液来源的沉淀,并且 P5 是最终的外来体富集沉淀。使用提高针对外来体标记物 CD81 的抗体和针对 5 种选择的蛋白质(在下文表

A 中列举)的多克隆抗体对沉淀 P1 (20  $\mu\text{g}$ /泳道,对应于约  $1 \times 10^5$ 个细胞)、P4 和最终外来体沉淀 P5 (10  $\mu\text{g}$ /泳道,对应于  $2 \times 10^7$ 个细胞)进行蛋白质印迹:

表 A	
蛋白质	描述 (GeneCards 概述在 <a href="http://www.genecards.org">http://www.genecards.org</a> 可以获得)
TFRC	TFRC (转铁蛋白受体)。与 TFRC 相关的疾病包括胃腺鳞癌和伯杰疾病 (berger disease), 并且在其中它涉及的超通路 (super-pathway) 是高尔基体相关小泡生物起源和胰岛素受体循环。
FOLH1	FOLH1 基因编码 II 型跨膜糖蛋白, 其属于 M28 肽酶家族。蛋白质在不同的可透底物 (其包括营养叶酸和神经肽 N-乙酰-L-天门冬氨酸-L-谷氨酸) 上作为谷氨酸羧肽酶起作用, 并且其在数种组织诸如前列腺、中枢和外周神经系统和肾中表达。在该基因中的突变可能与受损的膳食叶酸的肠内吸收有关, 其导致低血液叶酸水平和随后的高同型半胱氨酸血症。该蛋白质在脑中的表达可能涉及数种与谷氨酸兴奋性毒性相关的病理状况。在前列腺中, 所述蛋白质在癌细胞中上调并且作为前列腺癌的有效诊断和预后指示物使用。
EGFR	EGFR (表皮生长因子受体)。通过该基因编码的蛋白质是跨膜糖蛋白, 其是蛋白激酶超家族的成员。该蛋白质是表皮生长因子家族成员的受体。EGFR 是细胞表面蛋白, 其结合至表皮生长因子。蛋白质对配体的结合诱导了受体二聚化和酪氨酸自磷酸化并且导致了细胞增殖。该基因中的突变与肺癌相关。与 EGFR 相关的疾病包括肺癌和甲沟炎, 并且在其中它涉及的超通路是 ErbB 信号通路和神经胶质瘤。
CXCR4	CXCR4 (趋化因子 (C-X-C 基序) 受体 4)。该基因编码对基质细胞来源因子 1 具有特异性的 CXC 趋化因子受体。所述蛋白质具有 7 个跨膜区域并且位于细胞表面。其与 CD4 蛋白质作用以支持 HIV 进入细胞并且其也在乳腺癌细胞中高度表达。该基因中的突变已与 WHIM (疣、低丙球蛋白血症、传染病和先天性骨髓粒细胞缺乏症) 综合征有关。与 CXCR4 相关的疾病包括 WHIM 综合征和眼内淋巴瘤。
IFITM3	IFITM3 (干扰素诱导跨膜蛋白 3)。通过该基因编码的蛋白质是干扰素诱导的膜蛋白, 其帮助给予对抗甲型流感 H1N1 病毒、西尼罗病毒和登革热病毒的免疫力。与 IFITM3 相关的疾病包括西尼罗病毒和心包结核。

[0131] CD81 在外来体级分中高度富集, 其证明了制备物的质量。使用全部抗体检测到预期大小的条带, 其证明了蛋白质在这些细胞中的表达和与外来体级分相关。

**[0132] OMV-外来体制剂是高免疫原性的**

为证实 OMV- 外来体组合引起针对外来体蛋白的高抗体滴度的能力,CD1 小鼠是使用在明矾氢氧化物中配制的 OMV+ 外来体(15+15 微克)和 OMV (15 微克)免疫的小鼠。将在最后免疫后收集的血清合并并且在使用 5 种重组蛋白质(参见表 A)包被的平板上通过 ELISA 分析。选择的蛋白质是外来体相关的并且涉及多种人疾病(参见表 A)。如在图 3 中显示的,OMV+ 外来体组合诱导了针对 5/5 人蛋白质的高抗体滴度。当单独使用 OMV 免疫小鼠时几乎没有检测到抗体,表明了通过 OMV+ 外来体引起的针对各抗原的抗体应答是特异的,并且不是由于 OMV 蛋白的交叉反应。在整个实验期间小鼠没有显示任何明显的毒性或疼痛迹象。

**[0133]** 这段数据显示 OMV- 外来体制剂是安全的和高免疫原性的,其能够引起针对全部选择的人蛋白质的抗体。因为 5 种外来体蛋白已知涉及不同的人病理学,基于 OMV- 外来体制剂的疫苗能够在不同疾病的预防和治疗中具有广泛适用性。

**[0134] 来自免疫小鼠的血清中的抗原特异性 IgG 亚类分布**

可以使用佐剂组合疫苗以减少免疫剂量和注射数量,从而减少不期望的副作用(Dadan 等人 (1998). *Infect. Immun.* 66:2093-2098(1998)。佐剂通过产生贮存效果、靶向免疫细胞或增加某些细胞因子的生产来增强或调解特定抗原的免疫应答(Moingeon 等人, (2001). *Vaccine* 19:4363-4372 ; Gupta et al (1995). *Vaccine* 13:1263-1276)。佐剂可以诱导在 Th1-Th2 平衡和因此产生的抗体亚类中的变化。在小鼠中,免疫球蛋白 G1 (IgG1) 与 Th2 样应答相关,而 Th1 应答与 IgG2a、IgG2b 和 IgG3 抗体的诱导有关(Germann 等人, (1995). *Eur. J. Immunol.* 25:823-829)。

**[0135]** 为理解使用 OMV 与外来体的共同递送的免疫是否能够将免疫应答平衡向 Th1 概况转移,我们比较了在使用 OMV+ 外来体、单独的外来体或 OMV 免疫的小鼠中引起的针对 5 种选择的蛋白质的 IgG2a 和 IgG1 亚类的水平。抗原特异性 IgG1 和 IgG2a 滴度在来自使用不同制剂免疫的小鼠的血清中通过使用抗 -IgG1 和抗 -IgG2a 特异性抗体的 ELISA 测量。

**[0136]** 如在图 4 中显示的,使用 OMV+ 外来体和单独的外来体免疫引起了相似水平的 IgG。相反地,OMV+ 外来体能够引起比单独的外来体显著更高的抗原特异性 IgG2a 水平。该发现有力地表明了制剂 OMV+ 外来体对免疫应答向 Th1 方向偏移是非常有效的。

**[0137]** 应当理解本发明将只通过实施例的方式进行描述并且可以进行修改同时保留在本发明的范围和精神中。

**[0138] 参考**

- [1] W002/09643.
- [2] Katial 等人 (2002) *Infect. Immun.* 70:702-707.
- [3] 美国专利 6, 180, 111.
- [4] W001/34642.
- [5] W02004/019977.
- [6] W001/91788.
- [7] W02005/004908.
- [8] W02011/036562.
- [9] W02006/046143.
- [10] W000/26384.

- 
- [11] US-6531131
- [12] US-6645503
- [13] W02004/015099.
- [14] W02006/081259.
- [15] Deghmane 等人 (2003) *Infect Immun* 71:2897-901.
- [16] W02006/024946
- [17] Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy. 20th edition, ISBN: 0683306472
- [18] *Vaccine Design*... (1995) 编辑 Powell & Newman. ISBN: 030644867X. Plenum.
- [19] Berlanda 等人 (2008). *Mol Cell Proteomics* 2008 Mar; 7(3):473-85。

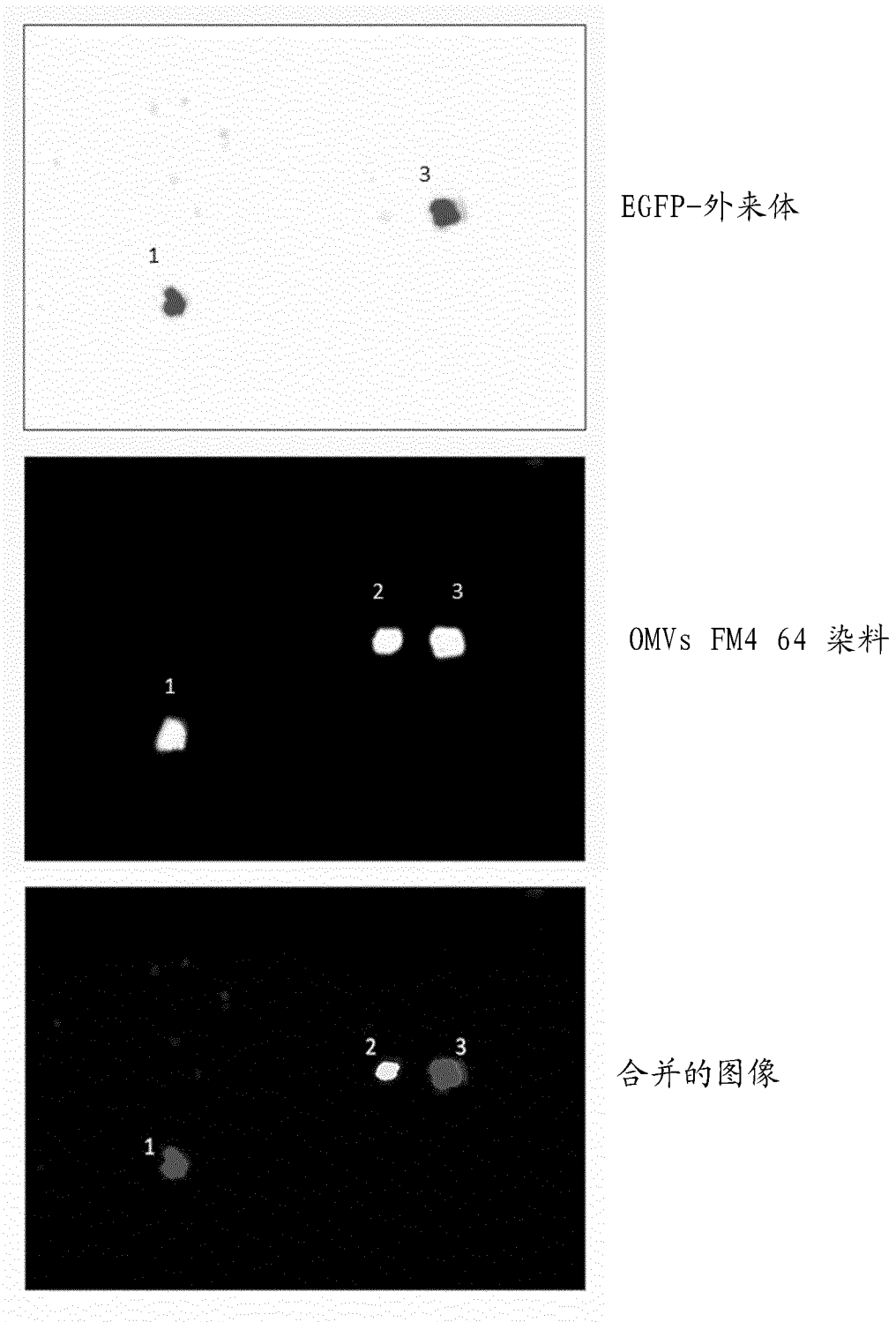


图 1A

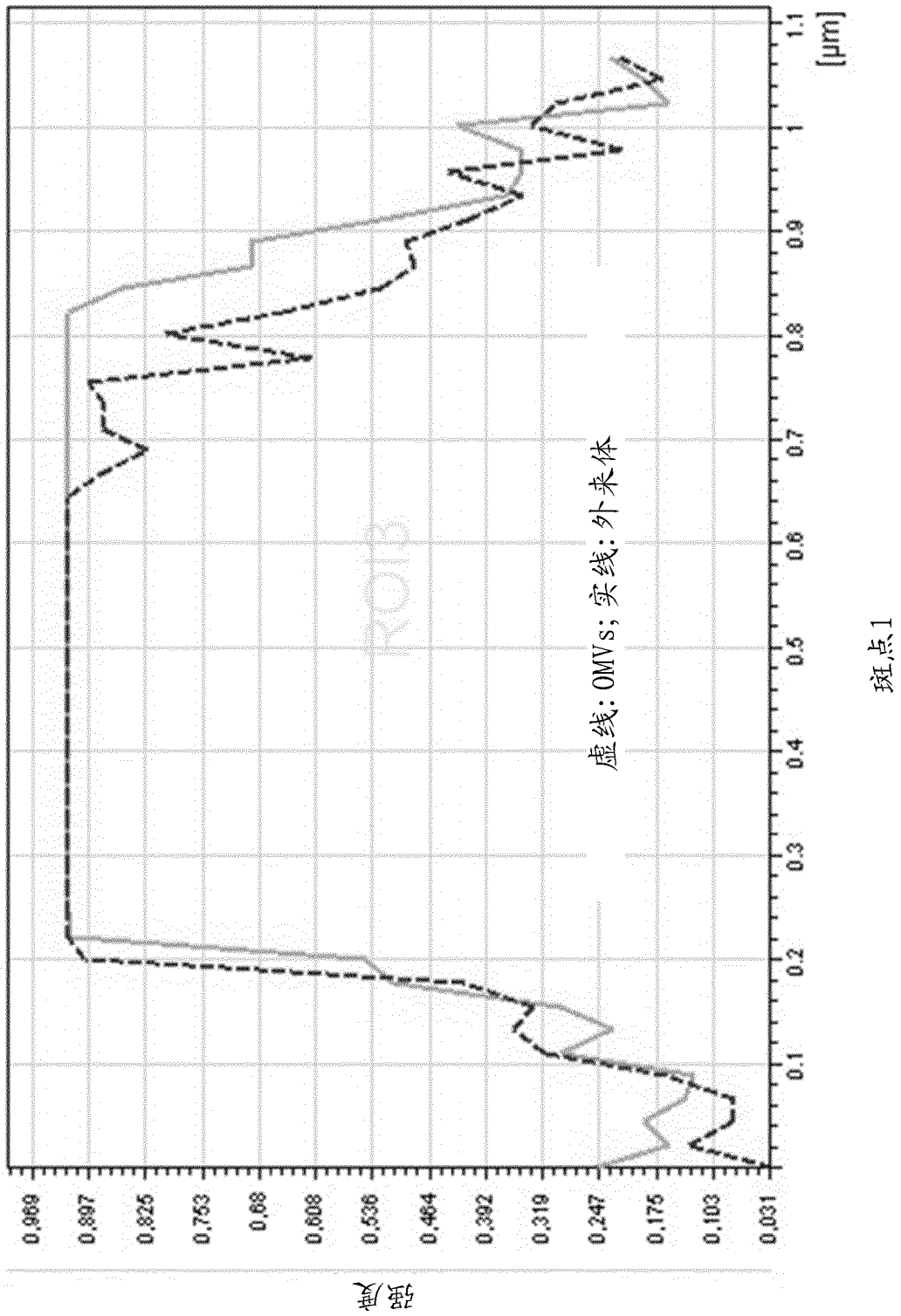


图 1B

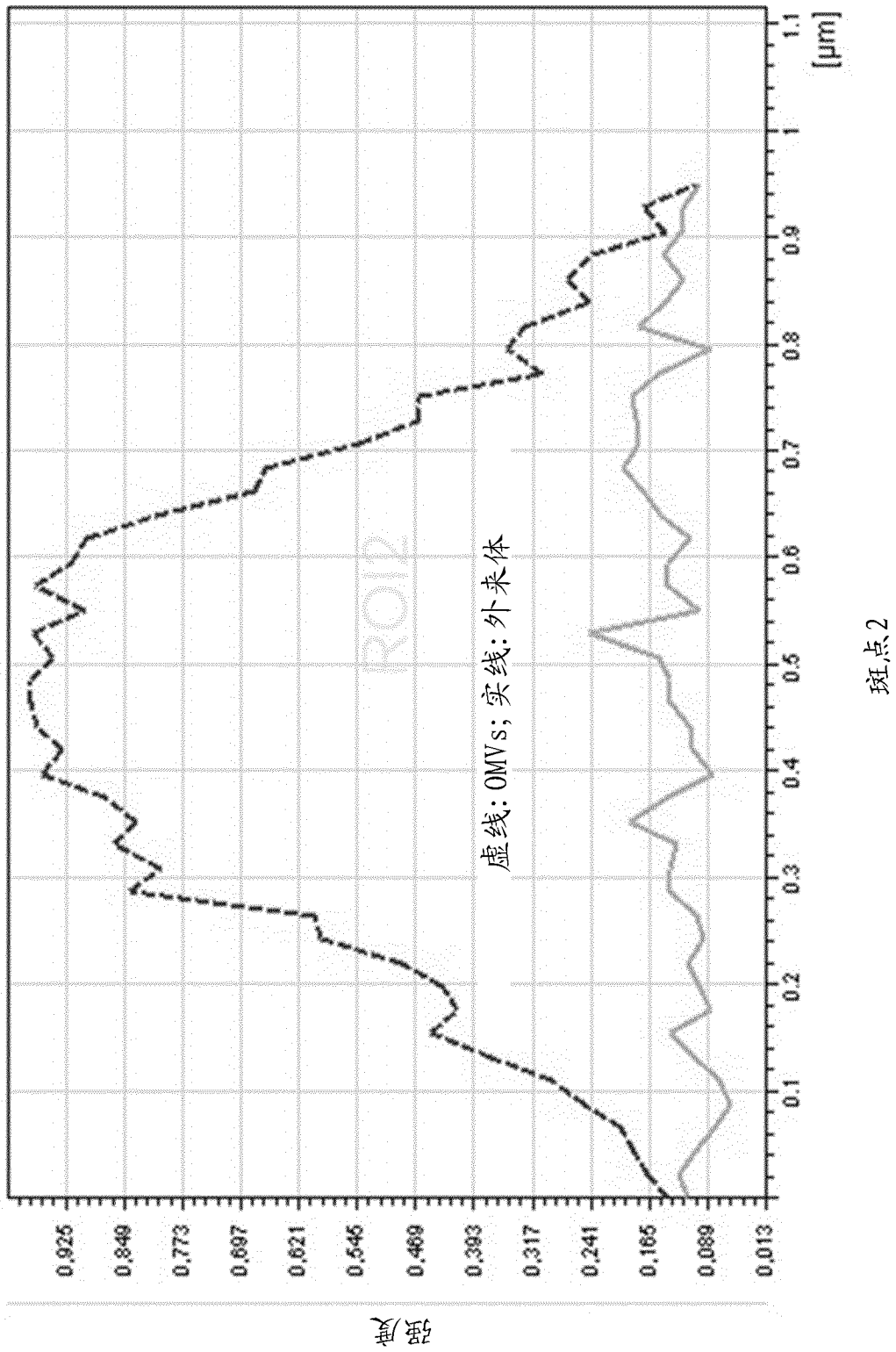


图 1C

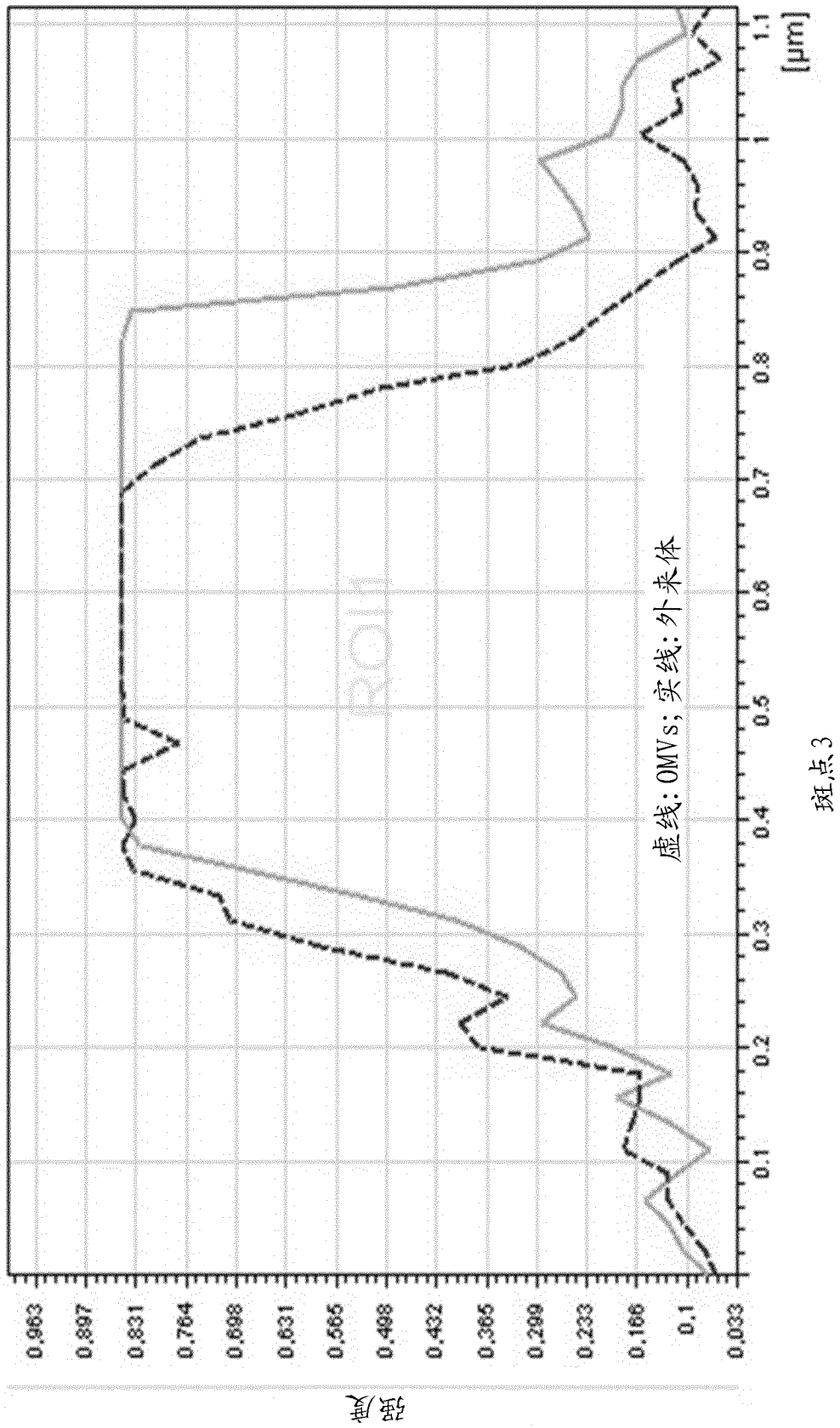


图 1D

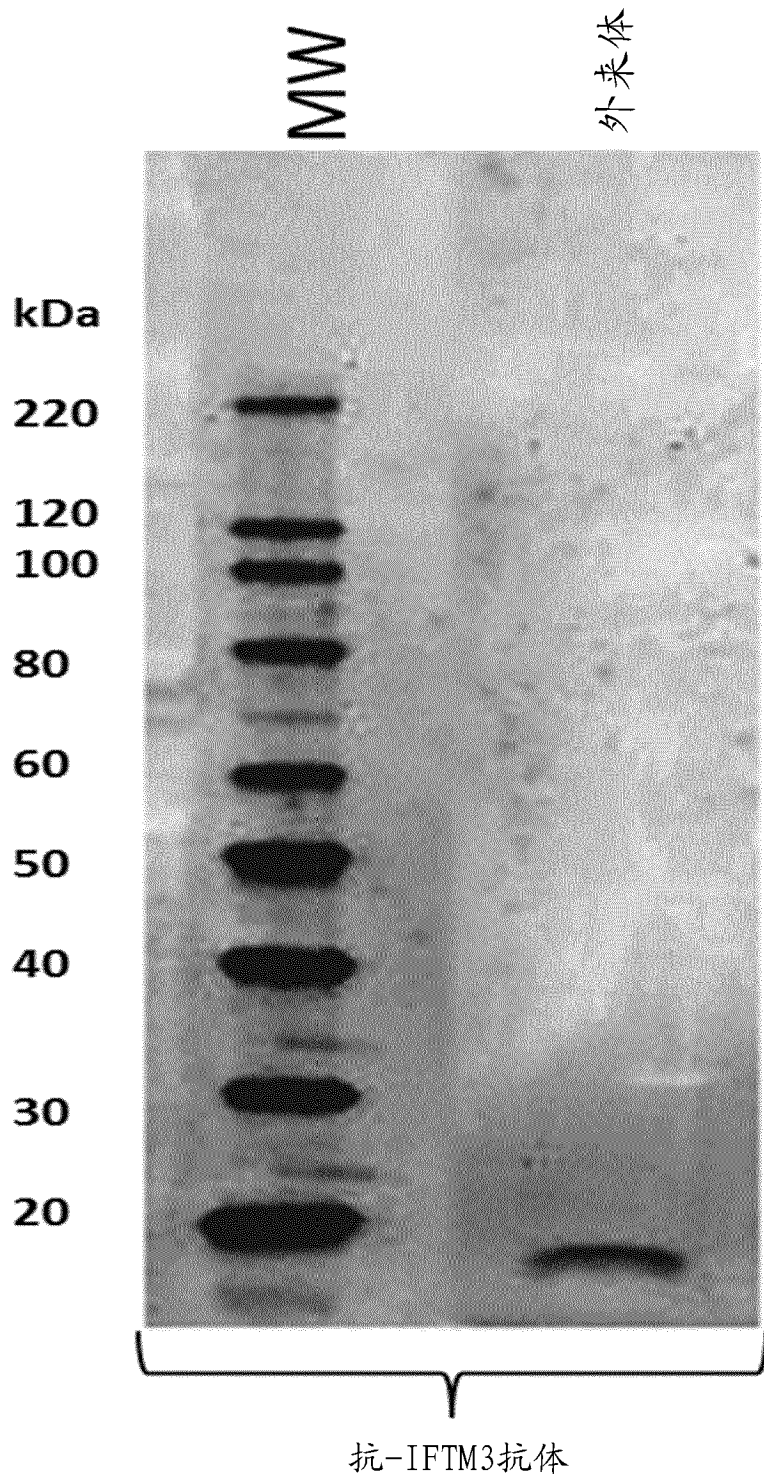


图 2

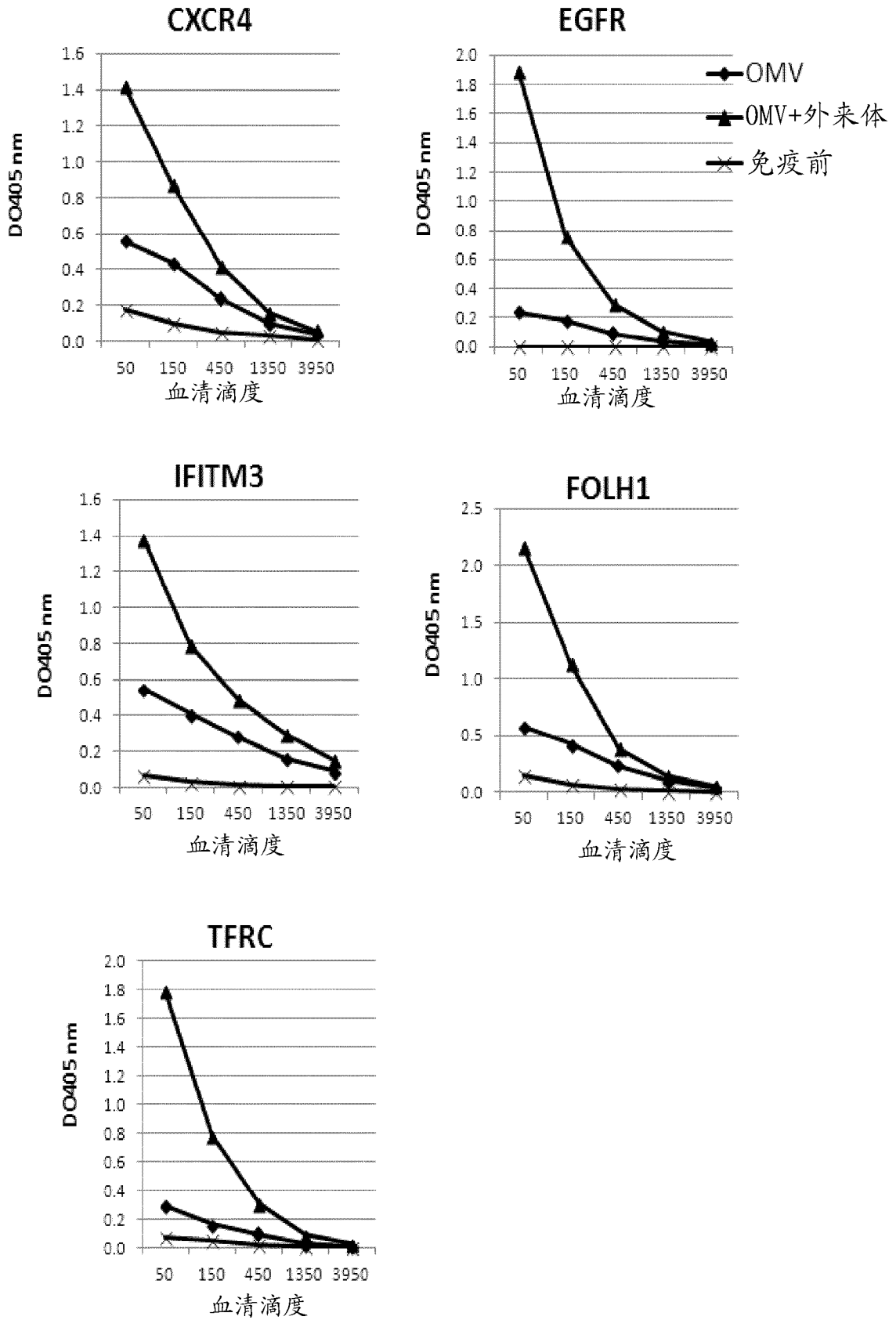


图 3

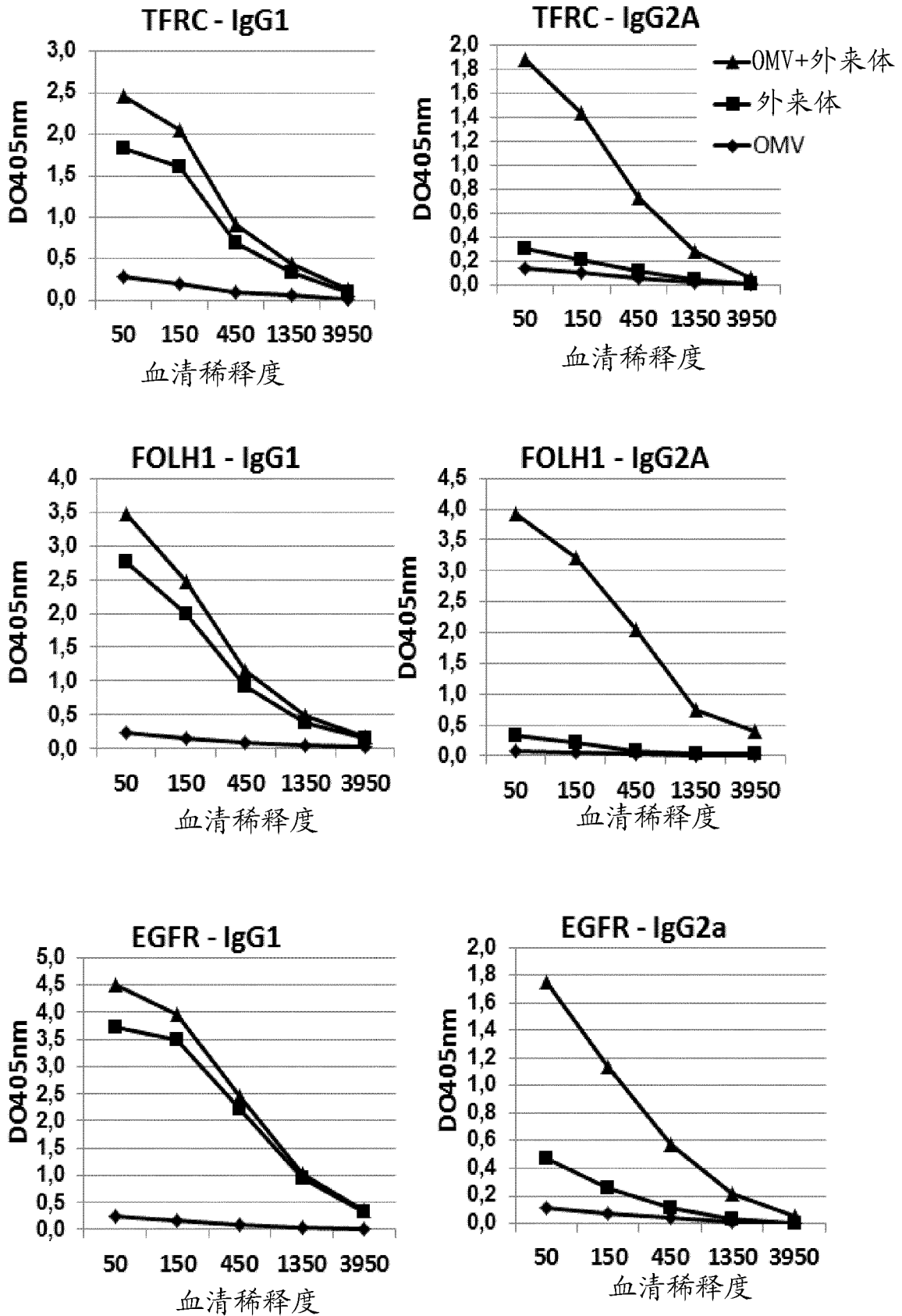


图 4A

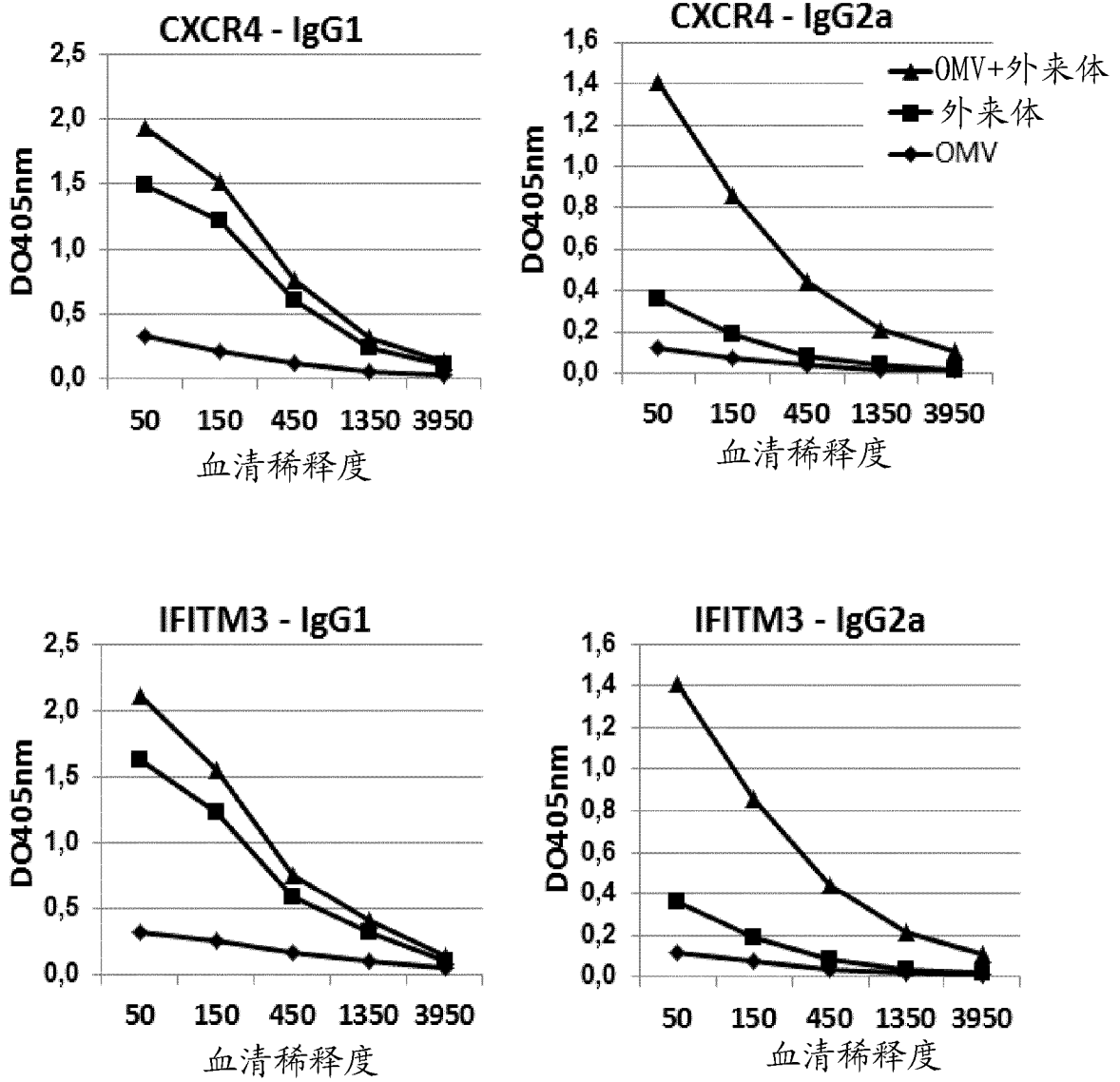


图 4B