



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 102482666 B

(45)授权公告日 2017.02.08

(21)申请号 201080039405.6

(22)申请日 2010.07.06

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 102482666 A

(43)申请公布日 2012.05.30

(30)优先权数据
61/223,196 2009.07.06 US
61/256,912 2009.10.30 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2012.03.05

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2010/041078 2010.07.06

(87)PCT国际申请的公布数据
W02011/005769 EN 2011.01.13

(73)专利权人 变异生物技术公司
地址 加拿大魁北克

(72)发明人 大卫·E·安德森
安德烈·奥格雷尔

(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227
代理人 顾晋伟 田旻

(51)Int.Cl.
G12N 15/09(2006.01)

(56)对比文件
US 5910306 A, 1999.06.08, 说明书第3栏17行-第7栏第55行.
US 5910306 A, 1999.06.08, 说明书第3栏17行-第7栏第55行.
US 5876721 A, 1999.03.02, 说明书第3栏第2行-第4栏第65行.
CN 1237102 A, 1999.12.01, 全文.

审查员 马骞

权利要求书2页 说明书28页 附图4页

(54)发明名称

制备囊泡的方法和由其产生的制剂

(57)摘要

本公开内容提供了制备囊泡的方法。在一些实施方案中,所述方法包括提供形成囊泡之脂质的熔融混合物,以及随后将所述熔融混合物加入包含抗原的水性溶液中,从而形成含有抗原的囊泡。在另一些实施方案中,所述方法包括提供冻干的脂质制品,以及用包含抗原的水性溶液使所述冻干的脂质制品再水合,从而形成含有抗原的囊泡。所述冻干的脂质制品通过使形成囊泡之脂质熔化以产生熔融脂质混合物以及随后将该熔融脂质混合物冻干而制备。本公开内容还提供了利用这些方法制备的含有抗原的囊泡制剂。本公开内容还提供了试剂盒,其包含第一容器中的冻干的脂质制品和第二容器中的包含抗原的水性溶液。

1. 一种方法,其包括:
提供形成囊泡之脂质的熔融混合物;以及
将所述熔融混合物加入包含抗原的水性溶液中以形成含有抗原的囊泡,
在所述含有抗原的囊泡的形成期间,将所述包含抗原的水性溶液保持在低于40℃的温度。
2. 权利要求1的方法,其包括在所述含有抗原的囊泡的形成期间,将所述包含抗原的水性溶液保持在低于30℃的温度。
3. 权利要求1或2的方法,其还包括将所述含有抗原的囊泡冻干。
4. 权利要求3的方法,其中将所述含有抗原的囊泡冻干包括:
将包含含有抗原之囊泡的溶液置于容器中;
通过将所述容器中的温度降低至所述囊泡的低共熔点以下而使所述含有抗原之囊泡的溶液冷冻;以及
通过降低所述容器内的压力使经冷冻的含有抗原之囊泡的溶液干燥。
5. 权利要求3的方法,其还包括将所述冻干的含有抗原的囊泡用水性溶液再水合从而形成再水合的含有抗原的囊泡。
6. 权利要求1或2的方法,其还包括在所述含有抗原的囊泡形成后加入佐剂。
7. 权利要求6的方法,其中所述佐剂是TLR-3激动剂。
8. 权利要求7的方法,其中所述TLR-3激动剂是多聚次黄嘌呤核苷酸:多聚胞嘧啶核苷酸,其任选地用聚L-赖氨酸羧甲基纤维素稳定。
9. 权利要求7或8的方法,其中所述TLR-3激动剂与冻干保护剂一起加入。
10. 权利要求9的方法,其中所述冻干保护剂是蔗糖、海藻糖、聚乙二醇(PEG)、二甲基琥珀酸缓冲液(DMS)、牛血清白蛋白(BSA)、甘露醇或葡聚糖。
11. 权利要求1或2的方法,其中提供形成囊泡之脂质的熔融混合物包括:
提供形成囊泡之脂质和佐剂的熔融混合物。
12. 权利要求11的方法,其中所述佐剂是TLR-4激动剂。
13. 权利要求12的方法,其中所述TLR-4激动剂是减毒的脂质A衍生物。
14. 权利要求13的方法,其中所述TLR-4激动剂是脂质A的单磷酸衍生物。
15. 权利要求13的方法,其中所述TLR-4激动剂是脂质A的3-脱酰基单磷酸衍生物。
16. 权利要求1或2的方法,其中所述抗原是病毒。
17. 权利要求16的方法,其中所述病毒是减毒病毒或灭活病毒。
18. 权利要求16的方法,其中所述病毒是甲型肝炎病毒或流感病毒。
19. 权利要求1或2的方法,其中所述抗原是多肽。
20. 权利要求19的方法,其中所述多肽是病毒多肽。
21. 权利要求20的方法,其中所述病毒多肽是乙型肝炎病毒多肽、丙型肝炎病毒多肽、HIV多肽或流感病毒多肽。
22. 权利要求21的方法,其中所述丙型肝炎病毒多肽是HBsAG。
23. 权利要求16的方法,其中所述抗原是不耐热的。
24. 包含根据权利要求1至23中任一项制备之含有抗原的囊泡的制剂。
25. 一种试剂盒,其包含:

第一容器,其含有根据权利要求3或4制备的冻干的含有抗原之囊泡,用于再水化所述含有抗原的囊泡的说明;以及任选的第二容器,其含有用于再水化所述冻干的含有抗原之囊泡的水性溶液。

26. 权利要求25的试剂盒,其中所述冻干的含有抗原之囊泡通过以下制备:提供形成囊泡之脂质和TLR-4激动剂的熔融混合物;以及将所述熔融混合物加入包含抗原的水性溶液中以形成含有抗原的囊泡。

27. 免疫原性制剂,其包含:

根据权利要求1至23中任一项形成的含有抗原的囊泡,其包含非离子型表面活性剂,并且所述制剂不具有非层状结构。

28. 治疗有效量的根据权利要求27的免疫原性制剂在制备用于向有此需要的患者施用的药物中的用途。

制备囊泡的方法和由其产生的制剂

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 依据35U.S.C. §119(e), 本申请要求享有2009年7月6日提交的美国临时专利申请系列号61/223,196和2009年10月30日提交的美国临时专利申请系列号61/256,912的优先权, 其每篇均通过引用整体并入本文。

背景技术

[0003] 囊泡, 作为细胞膜的模型, 首次描述于二十世纪六十年代(参见Bangham等人, *J. Mol. Biol.* 13:238-252, 1965)。已发现囊泡在递送小分子药物、疫苗辅佐(vaccine adjuvancy)、基因转移和诊断成像方面具有诸多应用(例如参见Liposome Technology, 第3版, Gregory Gregoriadis编, Informa HealthCare, 2006以及Liposomes: A Practical Approach(The Practical Approach Series, 264), 第2版, Vladimir Torchilin和Volkmar Weissig编, Oxford University Press, USA, 2003)。

[0004] 已描述了制备囊泡的多种方法(例如参见上文引用的参考文献以及Walde和Ichikawa, *Biomol. Eng.*, 18:143-177, 2001)。但是, 本领域中仍需要可用于将物质包封在囊泡内的方法。

[0005] 本领域已描述的一种方法是所谓的“3步融化法”。首先将形成囊泡的脂质在高温(例如120°C)下融化。第二步中, 通过将水性缓冲液(例如碳酸氢盐缓冲液)加入熔融脂质中以产生乳剂。最后, 在降低的温度(例如50°C)下使待包封的物质与乳剂组分均质化, 继而冻干。或者, 将由乳剂得到的囊泡冻干, 随后在待包封物质存在下使其重溶。

[0006] 尽管例如上述的方法可非常适于包封可经受高温的物质和/或能够快速扩散到空囊泡中的小分子, 但我们已发现其不适于包封疫苗中常常涉及的抗原类型(例如多肽、病毒等)。特别地, 我们已发现这些方法产生低包封效率, 并且可显著降低相关抗原的活性(例如通过免疫应答所测定地)。因此, 本领域中需要能够包封抗原同时对抗原活性的影响尽可能小的制备囊泡的方法。

发明概要

[0007] 在一个方面中, 本公开内容提供了制备囊泡的方法, 其包括提供形成囊泡之脂质的熔融混合物以及随后将所述熔融混合物加入包含抗原的水性溶液中以形成含有抗原的囊泡的步骤。

[0008] 在另一方面中, 本公开内容提供了制备囊泡的方法, 其包括提供冻干的脂质制品以及用包含抗原的水性溶液使所述冻干的脂质制品再水合以形成含有抗原的囊泡的步骤。所述冻干的脂质制品通过使形成囊泡的脂质融化以产生熔融脂质混合物以及随后将所述熔融脂质混合物冻干而制备。

[0009] 在另一方面中, 本公开内容提供了利用这些方法制备的含有抗原的囊泡制剂。在一些实施方案中, 所述含有抗原的囊泡制剂相比于利用现有技术方法可获得的那些显示出更高的抗原包封水平。在一些实施方案中, 所述含有抗原的囊泡制剂相比于利用现有技术

方法可获得的那些显示出更高的抗原活性水平。

[0010] 在又一方面中,本公开内容提供了试剂盒,其包含第一容器中的冻干脂质制品和第二容器中的包含抗原的水性溶液。在一些实施方案中,所述试剂盒还包含用于将所述两个容器中的内容物相混合以产生含有抗原的囊泡制剂的说明。

[0011] 附图简述

[0012] 图1比较了利用实施例1的3步融化法和实施例2的反向2步融化法制备之两种囊泡制剂的平均粒径。将制剂冻干,然后在含有2 μ g灭活甲型肝炎抗原的缓冲液存在下进行再水合。水合后立即以及在其后2、4和6小时利用mastersizer粒度仪测定粒径(其为稳定性的良好标志)。

[0013] 图2显示由含有甲型肝炎抗原的囊泡引起的免疫应答。利用实施例1的3步融化法和实施例2的反向2步融化法制备空囊泡。将制剂冻干,然后在含有2 μ g灭活甲型肝炎抗原的缓冲液存在下进行再水合。在第0、14和28天,对小鼠进行3次口服免疫,并在末次免疫后14天测试血清反应性。每种符号表示各只动物的血清终点效价。

[0014] 图3显示,如流式细胞术所证明地,囊泡中的胆盐含量影响未成熟树突状细胞的成熟。利用抗MHC-II和抗CD86抗体通过流式细胞术对未成熟树突状细胞的成熟情况进行测定。成熟的树突状细胞定义为对于所述两种抗体呈双阳性。利用如实施例2的步骤1和步骤2所制备的非离子型表面活性剂脂质囊泡(non-ionic surfactant lipid vesicle, NISV)处理未成熟的树突状细胞,并且NISV具有或不具有胆汁酸对总脂质的两种不同摩尔比率(0.1和0.5)。作为阳性对照,单独用TNF- α 对未成熟树突状细胞进行处理。

[0015] 图4比较了在不加入任何抗原的情况下利用实施例1和2的方法所制备之示例性囊泡的³¹P NMR谱。所有谱均于25 $^{\circ}$ C收集。

[0016] 定义

[0017] 在本公开内容中,使用了如下段落所定义的若干术语。

[0018] 本文所使用的术语“抗原”是指含有能被抗体识别的一个或多个表位(线性表位、构象表位、或二者皆有)的物质。在某些实施方案中,抗原可以是病毒、多肽、多核苷酸、多糖等。术语“抗原”既指亚单位抗原(即与完整生物体分开和分离的抗原,其中所述抗原与所述生物体天然相关联)也指死的、减毒的或灭活的细菌、病毒、真菌、寄生物或其它微生物。在某些实施方案中,抗原可以是“免疫原”。

[0019] 本文所使用的术语“包封(entrapping)”是指物质和囊泡之间任何类型的物理联系,例如利用或不利用对物质的挤压而将其包囊(encapsulation)、粘附(至囊泡的内壁或外壁)或包埋入壁中。该术语与术语“加载/loading)”和“含有”互换使用。

[0020] 本文所使用的术语“免疫应答”是指在动物中激发的应答。免疫应答可以指细胞免疫、体液免疫或者可同时包括两者。免疫应答还可以限于免疫系统的一部分。例如,在某些实施方案中,免疫原性制剂可以诱导增强的IFN γ 应答。在某些实施方案中,免疫原性制剂可以诱导粘膜IgA应答(例如,对鼻和/或直肠冲洗液所测定地)。在某些实施方案中,免疫原性制剂可以诱导全身性IgG应答(例如,在血清中所测定地)。

[0021] 本文所使用的术语“免疫原性”是指能够在宿主动物中针对非宿主实体(例如甲型肝炎病毒或乙型肝炎病毒)产生免疫应答。在某些实施方案中,这种免疫应答构成由针对特定感染性生物体(例如甲型肝炎病毒或乙型肝炎病毒)的疫苗激发之保护性免疫的基础。

“免疫原”是免疫原性物质(例如分子)。

[0022] 本文所使用的术语“治疗有效量”是指在接受治疗的患者中足以显示有意义之益处的量。免疫原性制剂的治疗有效量可根据如下因素变化,例如期望的生物学终点(biological endpoint)、制剂性质、施用途径、接受治疗的患者健康情况、体型和/或年龄等。

[0023] 本文所使用的术语“多肽”是指蛋白质(即通过肽键相互连接的至少两个氨基酸的串)。在一些实施方案中,多肽可包含除氨基酸之外的部分(例如可以是糖蛋白、蛋白聚糖、脂蛋白等)和/或可以进行另外的加工或修饰。本领域普通技术人员将理解,“蛋白质”可以是如细胞所产生的完整多肽链(具有或不具有信号序列),或者可以是其一部分。本领域普通技术人员将理解,蛋白质有时可包含多于一条多肽链,例如通过一个或更多个二硫键连接或者通过其它方式相关联的多肽链。多肽可以含有L-氨基酸、D-氨基酸或者二者皆有,并且可以含有任何本领域已知的多种氨基酸修饰或类似物。可用的修饰包括例如末端乙酰化、酰胺化等。在一些实施方案中,多肽可以包含天然氨基酸、非天然氨基酸、合成氨基酸及其组合。

[0024] 本文所使用的术语“多糖”是指糖的多聚物。所述多聚物可包括天然糖类(例如阿拉伯糖、来苏糖、核糖、木糖、核酮糖、木酮糖、阿洛糖、阿卓糖、半乳糖、葡萄糖、古洛糖、艾杜糖、甘露糖、塔洛糖、果糖、阿洛酮糖、山梨糖、塔格糖、甘露庚酮糖、景天庚酮糖、辛酮糖(octulose)和sialose)和/或经修饰的糖类(例如2'-氟代核糖、2'-脱氧核糖和己糖)。示例性多糖包括淀粉、糖原、葡聚糖、纤维素等。

[0025] 本文所使用的术语“多核苷酸”是指核苷酸的多聚物。所述多聚物可以包括天然核苷(即腺苷、胸苷、鸟苷、胞苷、尿苷、脱氧腺苷、脱氧胸苷、脱氧鸟苷和脱氧胞苷)、核苷类似物(例如2-氨基腺苷、2-硫代胸苷、肌苷、吡咯并嘧啶、3-甲基腺苷、5-甲基胞苷、C5-溴尿苷、C5-氟尿苷、C5-碘尿苷、C5-丙炔基尿苷、C5-丙炔基胞苷、C5-甲基胞苷、7-氮杂腺苷、7-氮杂鸟苷、8-酮基腺苷、8-酮基鸟苷、0(6)-甲基鸟苷、4-乙酰基胞苷、5-(羧基羟甲基)尿苷、二氢尿苷、甲基假尿苷、1-甲基腺苷、1-甲基鸟苷、N6-甲基腺苷和2-硫代胞苷)、经化学修饰的碱基、经生物学修饰的碱基(例如甲基化的碱基)、经嵌入的碱基、经修饰的糖类(例如2'-氟代核糖、核糖、2'-脱氧核糖、2'-O-甲基胞苷、阿拉伯糖和己糖)或者经修饰的磷酸基团(例如硫代磷酸酯和5'-N-亚磷酰胺连接)。

[0026] 本文所使用的术语“小分子治疗物”是指非多聚的治疗性分子,其可以包含若干个碳-碳键,并且具有小于约1500Da(例如小于约1000Da、小于约500Da或者小于约200Da)的分子量。小分子治疗物可以在实验室中合成(例如通过组合合成,利用工程化微生物等)或者可以在自然界中找到(例如天然产品)。一般来说,小分子治疗物可以改变、抑制、活化或以其它方式影响生物学事件。例如,小分子治疗物可以包括但不限于抗AIDS物质,抗癌物质,抗生素,抗糖尿病物质,免疫抑制剂,抗病毒物质,酶抑制剂,神经毒素,阿片样物质,安眠剂,抗组胺物质,润滑剂、镇定剂,抗惊厥剂,肌肉松弛剂以及抗帕金森物质,抗痉挛剂和肌肉收缩剂(包括通道阻断剂、缩瞳剂和抗胆碱能剂),抗青光眼化合物,抗寄生物和/或抗原生动物化合物,细胞-细胞外基质相互作用的调节剂(包括细胞生长抑制剂和抗粘附分子),血管舒张剂、DNA、RNA或蛋白质合成抑制剂,抗高血压剂,镇痛剂,抗发热剂,甾体和非甾体的抗炎剂,抗血管生成因子剂,抗分泌因子剂,抗凝血剂和/或抗血栓形成剂,局部麻醉

剂,眼科制剂,前列腺素,抗抑郁剂,抗精神病物质,止吐剂和成像剂。适用于本公开内容方法中的示例性小分子的更完整列表可以在Pharmaceutical Substances:Syntheses, Patents,Applications,Axel Kleemann和Jurgen Engel编,Thieme Medical Publishing, 1999;Merck Index:An Encyclopedia of Chemicals,Drugs,and Biologicals,Susan Budavari等人编,CRC Press,1996以及the United States Pharmacopeia-25/Nationalformulary-20,the United States Pharmacopeial Convention,Inc.出版,2001中找到。尽管不是必需的,但是优选所述小分子是有关政府部门或机构已认定的安全和有效使用的小分子。例如,FDA根据21C.E.R. §§330.5331至361和440至460列出的人用药物以及FDA根据21C.F.R. §§500至589列出的兽用药物均被认为是本公开内容方法可使用的药物。

[0027] 本文所使用的术语“治疗”是指向患有疾病、具有疾病症状或患病倾向的患者施用制剂,用以减轻、缓解、改变、改善、改进或影响疾病、疾病的一种或更多种症状或者患病倾向。在某些实施方案中,术语“治疗”是指对患者进行免疫接种。

[0028] 一些实施方案的详述

[0029] 1. 制备囊泡的方法

[0030] 本公开内容提供了制备囊泡的方法。囊泡一般具有由一个或更多个包含脂质(任选地,包含其它分子)的双分子层所包封的水性区室(aqueous compartment)。例如,如下文更详细讨论地,在一些实施方案中,本公开内容的囊泡包含有助于将脂质运送穿过粘膜的运送增强分子(例如胆盐)。

[0031] 在一个方面中,本公开内容提供了制备囊泡的方法,其包括提供形成囊泡之脂质的熔融混合物以及随后将熔融混合物加入包含抗原的水性溶液中以形成含有抗原的囊泡的步骤。在一些实施方案中,包含抗原的水性溶液是受温度控制的。在一些实施方案中,包含抗原的水性溶液在加入步骤过程中保持在低于约50℃的温度(例如低于约40℃、低于约30℃等)。在一些实施方案中,包含抗原的水性溶液保持在约25℃至约50℃之间的温度范围。在一些实施方案中,包含抗原的水性溶液保持在室温。

[0032] 应理解,可以任何方式获得形成囊泡之脂质的熔融混合物,例如使脂质熔化以形成熔融混合物。在一些实施方案中,在120℃至150℃的温度范围使脂质熔化(例如120℃至125℃、120℃至130℃、120℃至140℃、130℃至140℃、135℃至145℃或者140℃至145℃)。在一些实施方案中,在约120℃使脂质熔化。在一些实施方案中,在约125℃使脂质熔化。在一些实施方案中,在约130℃使脂质熔化。在一些实施方案中,在约135℃使脂质熔化。在一些实施方案中,在约140℃使脂质熔化。在一些实施方案中,在约145℃使脂质熔化。在一些实施方案中,在约150℃使脂质熔化。

[0033] 在另一方面中,本公开内容提供了制备囊泡的方法,其包括提供冻干的脂质制品以及用包含抗原的水性溶液使冻干的脂质制品再水合以形成含有抗原的囊泡的步骤。所述冻干的脂质制品通过使形成囊泡的脂质熔化以产生熔融脂质混合物以及随后将熔融脂质混合物冻干而制备。

[0034] 不希望受任何理论的束缚,认为通过将抗原的水性溶液加入冻干的脂质制品中,在抗原存在下形成囊泡。这可以解释所观察到的高包封效率。此外,本公开内容的方法避免了使抗原暴露于有机溶剂和高温。不希望受任何理论的束缚,这可以解释所得制剂中被包

封抗原的高活性(即抗原性和/或免疫原性)。

[0035] 形成囊泡的脂质

[0036] 脂质是有机分子,其一般不溶于水但是可溶于非极性有机溶剂(例如乙醚、氯仿、丙酮、苯等)中。脂肪酸是一类脂质,其包含与饱和或不饱和烃链连接的酸部分。具体实例包括月桂酸、棕榈酸、硬脂酸、花生酸、棕榈油酸、油酸、亚油酸、亚麻酸、花生四烯酸等。脂肪酸的碱金属盐一般比酸本身更易溶于水。包含具有8个或更多个碳之烃链的脂肪酸及其盐常常表现出两亲性性质,这是由于在同一分子中同时存在亲水性(头部)和疏水性(尾部)区域。包含极性头部基团的非离子型脂质也能够表现出两亲性(即表面活性剂的)性质。脂肪酸与甘油(1,2,3-三羟基丙烷)的三酯构成另一类脂质,称为“甘油三酯”,其常见于动物脂肪和植物油中。脂肪酸与长链单羟基醇的酯形成发现于蜡中的另一类脂质。磷脂是又一类脂质。其是甘油或神经鞘氨醇与脂肪酸和磷酸的酯或酰胺衍生物,这一点与甘油三酯类似。可以用磷脂本身的乙醇胺、胆碱或丝氨酸使所得磷脂酸的磷酸基团进一步酯化。应理解,所述方法可以利用能够形成囊泡的任何脂质(包括现有技术中描述的任何脂质,例如 Liposome Technology, 第3版, Gregory Gregoriadis 编, Informa HealthCare, 2006 以及 Liposomes: A Practical Approach (The Practical Approach Series, 264), 第2版, Vladimir Torchilin 和 Volkmar Weissig 编, Oxford University Press, USA, 2003)。

[0037] 在一些实施方案中,所述形成囊泡的脂质是磷脂。可以使用任何天然或合成的磷脂。不限于此地,具体磷脂的实例有L- α -(二硬脂酰基)卵磷脂、L- α -(二棕榈酰基)卵磷脂、L- α -磷脂酸、L- α -(二月桂酰基)-磷脂酸、L- α -(二肉豆蔻酰基)磷脂酸、L- α -(二油酰基)磷脂酸、DL- α -(二棕榈酰基)磷脂酸、L- α -(二硬脂酰基)磷脂酸以及由脑、肝、卵黄、心、大豆等制备的或合成制备的多种类型的L- α -磷脂酰胆碱,及其盐。

[0038] 在一些实施方案中,所述形成囊泡的脂质是非离子型表面活性剂。在本文中,非离子型表面活性剂囊泡称为“NISV”。不限于此地,合适的非离子型表面活性剂的实例包括基于甘油的酯型表面活性剂(ester-linked surfactant)。这种甘油酯可以包含两种高级脂肪族酰基基团的一种,例如每个酰基部分中含有至少十个碳原子。基于这种甘油酯的表面活性剂可以包含多于一个甘油单位,例如多至5个甘油单位。可以使用甘油单酯,例如含有C₁₂-C₂₀烷酰基或烯酰基部分(例如己酰基、月桂酰基、肉豆蔻酰基、棕榈酰基、油酰基或硬脂酰基)的那些。示例性的非离子型表面活性剂是1-单棕榈酰基甘油。

[0039] 在一些实施方案中,还可以使用醚型表面活性剂(ether-linked surfactant)作为非离子型表面活性剂。例如,基于甘油或具有多至4个碳原子的低级脂肪族二醇的二醇(如,乙二醇)的醚型表面活性剂是合适的。基于这种二醇的表面活性剂可以包含多于一个二醇单位,例如多至5个二醇单位(例如二甘醇鲸蜡醇醚和/或聚氧乙烯-3-月桂酸醚)。可以使用二醇或甘油的单醚,包括含有C₁₂-C₂₀烷基或烯基部分(例如己酰基、月桂酰基、肉豆蔻酰基、鲸蜡基、油酰基或硬脂酰基)的那些。可以使用的环氧乙烷缩合产物包括PCT公开No. WO 88/06882中公开的那些(例如聚氧乙烯高级脂肪族醚和胺表面活性剂)。示例性的醚型表面活性剂包括1-单鲸蜡醇甘油醚和二甘醇鲸蜡醇醚。

[0040] 其它组分

[0041] 在一些实施方案中,所述囊泡可以包含其它脂质和非脂质组分,只要其不妨碍囊泡形成即可。应理解,这些组分可以与形成囊泡的脂质共混合和/或可以与抗原共混合。在

一些实施方案中,我们已发现将这些组分与形成囊泡的脂质共混合是有利的。

[0042] 在一些实施方案中,所述囊泡可以包含有助于运送脂质穿过粘膜的运送增强分子。如美国专利No. 5,876,721中所述,多种分子可以用作运送增强剂。例如,侧链C₂₃碳原子携带羧酸的胆固醇衍生物和/或其衍生物可以用作运送增强剂。此类衍生物包括但不限于“胆汁酸”胆酸和鹅脱氧胆酸、其与甘氨酸或牛磺酸的缀合产物(例如甘胆酸(glycocholic acid)和牛磺胆酸)、衍生物(包括脱氧胆酸和熊脱氧胆酸)以及这些酸中每一种的盐。还包含胆汁酸或盐的NISV在本文中称为“胆汁酸体(bilosome)”。在一些实施方案中,运送增强剂包括酰氧化的氨基酸,例如酰肉碱及其盐。例如,含有C₆₋₂₀烷酰基或烯酰基部分的酰肉碱(例如棕榈酰肉碱)可以用作运送增强剂。本文所使用的术语“酰氧化的氨基酸”旨在涵盖伯、仲和叔氨基酸以及 α 、 β 和 γ 氨基酸。酰肉碱是酰氧化的 γ 氨基酸的实例。应理解,囊泡可以包含多于一种类型的运送增强剂,例如一种或更多种不同的胆汁盐以及一种或更多种酰肉碱。运送增强剂(如果存在的话)通常包含形成囊泡之脂质的40~400%(重量)(例如60~100%(重量)或者70~90%(重量))。在一些实施方案中,运送增强剂(如果存在的话)包含形成囊泡之脂质的1~40%(重量)(例如1~20%(重量)、1~25%(重量)、1~30%(重量)、1~35%(重量)、2~25%(重量)、2~30%(重量)或者2~35%(重量))。

[0043] 在某些实施方案中,所述囊泡可以不含运送增强分子。在一些实施方案中,所述囊泡可以不含“胆汁酸”(例如胆酸和鹅脱氧胆酸)、其与甘氨酸或牛磺酸的缀合产物(例如甘胆酸和牛磺胆酸)、衍生物(包括脱氧胆酸和熊脱氧胆酸)以及这些酸中每一种的盐。在一些实施方案中,所述囊泡可以不含酰氧化的氨基酸,例如酰肉碱及其盐以及棕榈酰肉碱。

[0044] 在一些实施方案中,所述囊泡可以包含离子型表面活性剂,例如用以使囊泡带负电荷。例如,这可以帮助稳定囊泡以及提供有效的分散。不限于此地,酸性物质(例如高级烷酸和烯酸(例如棕榈酸、油酸)或者含有酸性基团(包括磷酸)的其它化合物(例如二烷基磷酸酯(例如二鲸蜡醇磷酸酯或磷脂酸或磷脂酰丝氨酸))以及硫酸单酯(例如高级烷基硫酸酯(例如鲸蜡醇硫酸酯))均可用于此目的。离子型表面活性剂(如果存在的话)通常包含形成囊泡之脂质的1~30%(重量),例如2~20%(重量)或者5~15%(重量)。在一些实施方案中,离子型表面活性剂(如果存在的话)将包含形成囊泡之脂质的1~50%(重量)(例如,1~35%(重量)、5~40%(重量)、10~40%(重量)、15~40%(重量)、20~40%(重量)或者20~35%(重量))。

[0045] 在一些实施方案中,所述囊泡可以包含分子量较高的、有助于形成双分子层的合适的疏水性物质(例如类固醇,如固醇(例如胆固醇))。在一些实施方案中,类固醇的存在可以辅助形成双分子层,而所述囊泡的物理性质即取决于所述双分子层。类固醇(如果存在的话)通常包含形成囊泡之脂质的20~120%(重量),例如25~90%(重量)或者35~75%(重量)。在一些实施方案中,类固醇(如果存在的话)将包含形成囊泡之脂质的25~95%(重量)、25~105%(重量)、35~95%(重量)或者35~105%(重量)。

[0046] 在一些实施方案中,冻干前,任何溶液或混合物中可包含冻干保护剂。示例性的冻干保护剂包括蔗糖、海藻糖、聚乙二醇(PEG)、二甲基琥珀酸缓冲液(DMS)、牛血清白蛋白(BSA)、甘露醇和葡聚糖。

[0047] 在一些实施方案中,本公开内容的囊泡是还包含离子型表面活性剂或类固醇的“胆汁酸体”。在一些实施方案中,所述胆汁酸体可以同时包含离子型表面活性剂和类固醇。

[0048] 在一些实施方案中,本公开内容的囊泡是不含运送增强分子并且还包含离子型表面活性剂或类固醇的非离子型表面活性剂囊泡(NISV)。在一些实施方案中,所述囊泡可以不含“胆汁酸”(例如胆酸和鹅脱氧胆酸)、其与甘氨酸或牛磺酸的缀合产物(例如甘胆酸和牛磺胆酸)、衍生物(包括脱氧胆酸和熊脱氧胆酸)以及这些酸中每一种的盐。在一些实施方案中,所述囊泡可以不含酰氧化的氨基酸,例如酰肉碱及其盐以及棕榈酰肉碱。在一些实施方案中,NISV可以不含运送增强分子(例如任何前述分子)并且同时包含离子型表面活性剂和类固醇。

[0049] 冻干

[0050] 如上文和下文所讨论地,在一些实施方案中,本公开内容的方法包括冻干步骤(对熔融脂质混合物的冻干或者对含有抗原之囊泡制剂的冻干)。冻干是用于提高制品的长期稳定性的成熟方法。据信,提高物理和化学稳定性通过阻止降解和水解来实现。冻干包括将目标制备物冷冻,然后降低环境压力(以及任选地,对制备物进行加热)以使经冷冻的溶剂直接从固相升华为气体(即干燥阶段)。在某些实施方案中,所述干燥阶段分为初级和次级干燥阶段。

[0051] 可以通过将制备物置于容器(例如烧瓶、离心管等)中(任选地使容器旋转)同时在通过机械制冷(例如利用干冰和甲醇、液氮等)冷却的浸浴中完成冷冻阶段。在一些实施方案中,冷冻步骤包括使制备物冷却至制备物的低共熔点以下。由于低共熔点出现在制备物的固相和液相能共存的最低温度,因此使所述物质保持于该点以下的温度确保了在随后步骤中将发生升华而非蒸发。

[0052] 干燥阶段(或者,当使用两个干燥阶段时的初级干燥阶段)包括降低压力以及任选地使制备物加热至溶剂能够升华的点。干燥阶段通常将大部分溶剂从制备物中除去。应理解,冷冻和干燥阶段不必是分开的阶段,而是可以以任何方式联合。例如,在某些实施方案中,冷冻和干燥阶段可以重叠。

[0053] 次级干燥阶段可以任选地用于除去冷冻阶段期间吸收的残留溶剂。不希望受任何理论的束缚,该阶段涉及升高温度以破坏溶剂分子与经冷冻制备物之间形成的任何物理-化学相互作用。干燥阶段一经完成,在任选地将冻干制品密封之前可以用惰性气体(例如氮气或氦气)打破真空状态。

[0054] 再水合

[0055] 如上文所讨论地,在一些实施方案中,本公开内容的方法包括使冻干的脂质制品再水合以形成含有抗原的囊泡的步骤。这通过将冻干的脂质制品与包含抗原的水性溶液混合来实现。在一些实施方案中,这涉及将水性溶液加入冻干的脂质制品中。

[0056] 在一些实施方案中,所述含有抗原的囊泡包含在再水合步骤中加入的至少约10%的抗原。在一些实施方案中,所述含有抗原的囊泡包含在再水合步骤中加入的至少约20%的抗原。在一些实施方案中,所述含有抗原的囊泡包含在再水合步骤中加入的至少约30%的抗原。在一些实施方案中,所述含有抗原的囊泡包含在再水合步骤中加入的至少约40%的抗原。在一些实施方案中,所述含有抗原的囊泡包含在再水合步骤中加入的至少约50%的抗原。在一些实施方案中,所述含有抗原的囊泡包含在再水合步骤中加入的至少约60%的抗原。在一些实施方案中,所述含有抗原的囊泡包含在再水合步骤中加入的至少约70%的抗原。在一些实施方案中,所述含有抗原的囊泡包含在再水合步骤中加入的至少约80%

的抗原。在一些实施方案中,所述含有抗原的囊泡包含在再水合步骤中加入的至少约90%的抗原。

[0057] 在一些实施方案中,所述水性溶液包括缓冲液。所使用的缓冲液通常取决于水性溶液中抗原的性质。例如,不限于此,可以使用PCB缓冲液、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液、PBS缓冲液、N,N-二羟乙基甘氨酸缓冲液(bicine buffer)、Tris缓冲液、HEPES缓冲液、MOPS缓冲液等。PCB缓冲液通过将丙酸钠、二甲砷酸钠和双Tris丙烷以2:1:2的摩尔比混合而制备。改变所加入的HCl量可使pH在4~9的范围内缓冲。在一些实施方案中,可以使用碳酸盐缓冲液。

[0058] 在一些实施方案中,可以使通过上述任意方法制备的含有抗原的囊泡制剂冻干备用,并随后在使用前进行再水合(例如使用无菌水或水性缓冲液)。在一些实施方案中,可以在该再水合步骤中加入佐剂(例如通过将其掺入无菌水或水性缓冲液中来实现)。在一些实施方案中,含有抗原的囊泡制剂在冻干前可储存于 -80°C 。在一些实施方案中,冻干制剂可储存于 $-20^\circ\text{C}\sim 10^\circ\text{C}$ 的温度范围中(例如 $-5^\circ\text{C}\sim 10^\circ\text{C}$ 、 $0^\circ\text{C}\sim 5^\circ\text{C}$ 或 $2^\circ\text{C}\sim 8^\circ\text{C}$)。

[0059] 囊泡大小和加工

[0060] 应理解,囊泡制剂通常包含具有一定大小的囊泡混合物。应当理解,以下所列的直径数值对应于混合物中最常见的直径。在一些实施方案中,制剂中超过90%的囊泡具有最常见数值的上下50%范围内的直径(例如 $1000\pm 500\text{nm}$)。在一些实施方案中,该分布可以更窄,例如,制剂中超过90%的囊泡具有最常见数值的上下40、30、20、10或5%范围内的直径。在一些实施方案中,可以利用声波作用或超声作用促进囊泡形成和/或改变囊泡粒径。在一些实施方案中,可以利用过滤、透析和/或离心来调整囊泡大小分布。

[0061] 一般地,根据本公开内容的方法得到的囊泡可具有任意大小。在一些实施方案中,所述制剂可包含直径范围约150nm至约15 μm 的囊泡,例如约800nm至约1.5 μm 。在某些实施方案中,所述囊泡可具有大于10 μm (例如约15 μm 至约25 μm)的直径。在某些实施方案中,所述囊泡可具有约2 μm 至约10 μm (例如约1 μm 至约4 μm)的直径。在某些实施方案中,所述囊泡可具有小于150nm(例如约50nm至约100nm)的直径。

[0062] 抗原

[0063] 一般地,应理解,可以利用本公开内容的方法包封任何抗原。如前文所讨论地,抗原可以以任何方式与囊泡相关联。在一些实施方案中,抗原可以存在于囊泡的水性核中。然而,根据其疏水性,抗原还可以部分地或完全地与双分子层相关联。一般地,还应理解,在一些实施方案中,囊泡制剂可包含不与囊泡相关联的一种或更多种抗原量。

[0064] 在一些实施方案中,可使用本公开内容的方法包封疫苗中包含的一种或更多种抗原。表1是合适疫苗的非限制性列表。

[0065] 表1

[0066]

疫苗	疾病
BioThrax [®]	炭疽
DTaP (Daptacel [®] , Infanrix [®] , Tripedia [®])	白喉
Td (Decavac [®])	白喉
DT, TT	白喉
Tdap (Boostrix [®] , Adacel [®])	白喉
DTaP/IPV/HepB (Pediatrix [®])	白喉
DTaP/Hib (TriHIBit [®])	白喉
HepA (Havrix [®] , Vagta [®])	甲型肝炎
HepA/HepB (Twinrix [®])	甲型肝炎
HepB (Engerix-B [®] , Recombivax HB [®])	乙型肝炎
HepB/Hib (Comvax)	乙型肝炎
DTaP/IPV/HepB (Pediatrix),	乙型肝炎
HepA/HepB (Twinrix [®])	乙型肝炎
Hib (ActHIB [®] , HibTITER [®] , PedvaxHIB [®])	HIB
HepB/Hib (Comvax [®])	HIB
DTaP/Hib (TriHIBit [®])	HIB
HPV (Gardasil [®])	HPV
流感 (Fluarix [®] , Fluvirin [®] , Fluzone [®] , Flulaval [®] , FluMist [®])	季节性流感
流感 (Afluria [®])	季节性流感

[0067]

疫苗	疾病
流感 (Agriflu [®])	季节性流感
流感 (Begrivac [®])	季节性流感
流感 (Enzira [®])	季节性流感
流感 (Fluad [®])	季节性流感
流感 (Fluvax [®])	季节性流感
流感 (Fluviral, Fluviral S/F [®])	季节性流感
流感 (Grippol [®])	季节性流感
流感 (Inflexal, Inflexal S, Inflexal V [®])	季节性流感
流感 (Influvac [®])	季节性流感
流感 (Mastaflu [®])	季节性流感
流感 (Mutagrip [®])	季节性流感
流感 (Optaflu [®])	季节性流感
流感 (Vaxigrip [®])	季节性流感
H1N1 大流行性流感 (Arepanrix [®])	H1N1 大流行性流感
H1N1 大流行性流感 (Calvapan [®])	H1N1 大流行性流感
H1N1 大流行性流感 (Focetria [®])	H1N1 大流行性流感
H1N1 大流行性流感 (流感病毒A (H1N1) 2009单价疫苗 [®])	H1N1 大流行性流感
H1N1 大流行性流感 (Pandemrix [®])	H1N1 大流行性流感
JE (JE-Vax [®])	日本脑炎
莱姆病 (LYMERix [®])	莱姆病
麻疹 (Attenuvax [®])	麻疹
MMR (M-M-R II [®])	麻疹
MMRV (ProQuad [®])	麻疹
脑膜炎球菌病, 缀合物 (Menactra [®])	脑膜炎球菌病 (Meningococcal)
脑膜炎球菌病, 多糖 (Menomune [®])	脑膜炎球菌病
流行性腮腺炎 (Mumpsvax [®])	流行性腮腺炎
MMR (M-M-R II [®])	流行性腮腺炎
MMRV (ProQuad [®])	流行性腮腺炎
DTaP (Daptacel [®] , Infanrix [®] , Tripedia [®])	百日咳
Tdap (Boostrix [®])	百日咳
DTaP/IPV/HepB (Pedarix [®])	百日咳
DTaP/Hib (TriHIBit [®])	百日咳
肺炎球菌病, 缀合物 (Prevnar [®])	肺炎球菌病 (Pneumococcal)
肺炎球菌病, 多糖 (Pneumovax 23 [®])	肺炎球菌病
脊髓灰质炎 (Ipol [®])	脊髓灰质炎
DTaP/IPV/HepB (Pedarix [®])	脊髓灰质炎
狂犬病 (BioRab [®] , Imovax Rabies [®] , RabAvert [®])	狂犬病
轮状病毒病 (RotaTeq [®])	轮状病毒病 (Rotavirus)
风疹 (Meruvax II [®])	风疹
MMR (M-M-R II [®])	风疹
MMRV (ProQuad [®])	风疹
带状疱疹 (Zostavax [®])	带状疱疹
牛痘 (Dryvax [®])	小痘和猴痘
DTaP (Daptacel [®] , Infanrix [®] , Tripedia [®])	破伤风
Td (Dccavac [®])	破伤风
DT, TT	破伤风

[0068]

疫苗	疾病
Tdap (Boostrix [®])	破伤风
DTaP/IPV/HepB (Pediarix [®])	破伤风
DTaP/Hib (TriHIBit [®])	破伤风
BCG	结核病
伤寒 (Typhim Vi [®])	伤寒
伤寒, 口服 (Vivotif Berna [®])	伤寒
水痘 (Varivax [®])	水痘
MMRV (ProQuad [®])	水痘
黄热病 (YF-Vax [®])	黄热病

[0069] 在以下部分中,我们讨论一些可使用的示例性抗原。

[0070] 甲型肝炎

[0071] 甲型肝炎是由甲型肝炎病毒(HAV)引起的严重的肝脏疾病。该病毒在甲型肝炎患者的粪便中发现。如表1所示,目前已批准了几种灭活型甲型肝炎疫苗。例如,**Havrix[®]**由GlaxoSmithKline Biologicals生产。美国专利No.6,180,110描述了**Havrix[®]**中使用的减毒HAV株(HAV 4380),其最初源自HAV的HM175株(美国专利No.4,894,228)。**Havrix[®]**包含经福尔马林灭活之HAV的无菌混悬液。将病毒抗原活性与使用ELISA的一个标准进行参照,并表示为“ELISA单位”(U)。每1ml成人剂量的疫苗包含1440U的病毒抗原,其吸附于采用氢氧化铝(明矾)形式的0.5mg铝上。**Havrix[®]**(与获批的所有其它甲型肝炎疫苗一样)以用于肌内(IM)施用的无菌混悬液形式提供。尽管一剂量的**Havrix[®]**提供至少短期保护,然而目前推荐在6~12个月后进行再次加强给药,以确保长期保护。

[0072] 灭活型甲型肝炎疫苗的另一实例——**AIMMUGEN[®]**——已在日本获得批准并从1994年起由Kaketsuken上市。**AIMMUGEN[®]**包含经甲醛灭活之HAV的无菌混悬液。所推荐的成人剂量是第0、1和6个月时0.5 μ g(肌内)。

[0073] 本文所使用的表述“HAV抗原”是指能够激活人体内针对HAV之中和抗体的任何抗原。HAV抗原可包含活的减毒病毒颗粒或灭活的减毒病毒颗粒,或者可以是例如HAV衣壳或可容易地通过重组DNA技术获得的HAV病毒蛋白。

[0074] 在一个方面中,本公开内容提供了制备包含灭活或减毒的甲型肝炎病毒(本文中亦称为“甲型肝炎病毒抗原”或“病毒抗原”)的免疫原性制剂的方法。应理解,所述方法可用于制备灭活的甲型肝炎病毒。一般地,这些方法涉及在宿主细胞中使甲型肝炎病毒增殖,裂解宿主细胞以释放病毒,分离以及随后灭活病毒抗原。移去细胞培养基后,使细胞裂解以形成悬液。通过超滤和凝胶渗透色谱方法对所述悬液进行纯化。然后,用福尔马林对经纯化的裂解物进行处理,以确保病毒灭活(例如,参见Andre等人,Prog.Med.Virol.37:72-95,1990)。

[0075] 在制备**AIMMUGEN[®]**中,使甲型肝炎病毒株KRM0003(由野生型HAV构建,所述野生型HAV从甲型肝炎患者的粪便中分离得到)在GL37细胞(由非洲绿猴肾亲本细胞株构建的细胞株,用于疫苗生产)中增殖。用HAV株KRM0003接种GL37细胞,收集病毒抗原,充分纯化并用甲醛使其灭活。

[0076] 灭活型甲型肝炎病毒的另一实例是Meridian Life Sciences的甲型肝炎病毒抗

原(HAV-ag)(可购得但未获批准)。与Havrix[®]一样,Meridian HAV-ag也来源于甲型肝炎病毒株HM175,但是在FRhK-4(恒河猴胎肾)细胞中增殖。移去细胞培养基后,使细胞裂解以形成悬液,通过梯度离心使该悬液部分纯化,并通过福尔马林处理使其灭活。

[0077] 应理解,可使用任何甲型肝炎病毒株,例如但不限于本领域中已有描述的下列病毒株中的任一种(以及其它非人类变体):

[0078] • 人甲型肝炎病毒Hu/亚利桑那州/HAS-15/1979

[0079] • 人甲型肝炎病毒Hu/澳大利亚/HM175/1976

[0080] • 人甲型肝炎病毒Hu/中国/H2/1982

[0081] • 人甲型肝炎病毒Hu/哥斯达黎加/CR326/1960

[0082] • 人甲型肝炎病毒Hu/法国/CF-53/1979

[0083] • 人甲型肝炎病毒Hu/格鲁吉亚/GA76/1976

[0084] • 人甲型肝炎病毒Hu/德国/GBM/1976

[0085] • 人甲型肝炎病毒Hu/日本/HAJ85-1/1985

[0086] • 人甲型肝炎病毒Hu/洛杉矶/LA/1975

[0087] • 人甲型肝炎病毒Hu/北非/MBB/1978

[0088] • 人甲型肝炎病毒Hu/挪威/NOR-21/1998

[0089] • 人甲型肝炎病毒Hu/塞拉利昂/SLF88/1988

[0090] • 人甲型肝炎病毒MSM1

[0091] • 人甲型肝炎病毒上海/LCDC-1/1984

[0092] 此外,虽然常常使用福尔马林和甲醛对获批的甲型肝炎病毒进行灭活,然而应当理解,可以使用其它技术,例如用氯处理、暴露于高温(病毒抗原在85°C/185°F以上失活)等。

[0093] 在某些实施方案中,可证明在用于制备灭活型甲型肝炎病毒的传统方法中增加额外步骤是有利的。例如,美国专利No.6,991,929描述了在病毒增殖后包括蛋白酶(例如胰蛋白酶)处理步骤。发现该步骤可以改善宿主细胞物质的去除以及产生更纯的病毒制备物。

[0094] 虽然目前所有已获批的甲型肝炎疫苗均包含灭活的病毒抗原,然而文献中还已经描述了包含减毒病毒抗原的替代性疫苗。在某些实施方案中,免疫原性制剂可包含这种减毒病毒抗原。如本领域所公知地,减毒疫苗的优势在于能够产生更强的免疫原性,这是由于其能够在体内复制而不导致完整感染所致。

[0095] 本领域中已使用的一种制备减毒甲型肝炎病毒的方法是病毒适应,其涉及使病毒株在多种细胞培养物中连续传代。病毒株随时间发生突变,然后可以鉴定减毒株。在某些实施方案中,可以使病毒在不同细胞培养物中传代。例如,研究人员已通过使病毒株CR326在人二倍体肺(MRCS)细胞培养物中传代16次得到了减毒的甲型肝炎病毒(参见Provost等人, J. Med. Virol. 20:165-175, 2005)。通过使相同病毒株在恒河猴胎肾(FRhK6)细胞培养物中传代15次并且又在MRCS细胞培养物中传代8次,获得毒力稍强的病毒株。还已描述了以这种方式由H2病毒株制备的另一种减毒甲型肝炎疫苗(参见欧洲专利No.0413637以及Mao等人, Vaccine 15:944-947, 1997)。

[0096] 在某些实施方案中,可证明在降低的温度下进行一个或更多个细胞培养步骤是有利的。例如,欧洲专利No.0413637描述了包括在降低的温度下(例如降至32~34°C,而非35

~36℃)进行一个或多个接种步骤。

[0097] 美国专利No.6,180,110描述了一种培养在MRC-5细胞中的减毒甲型肝炎病毒(HAV 4380)。研究人员通过将其基因组与毒力较强的病毒株基因组相比较,鉴定出HAV 4380中似乎与减毒相关的突变。这使他们可以设计出具有对于减毒甲型肝炎候选疫苗来说最佳之特征的HAV突变株。应理解,这种方法可应用于任何已知的减毒甲型肝炎病毒,并且可用于遗传改造变体而无需进行病毒适应。

[0098] 乙型肝炎

[0099] 乙型肝炎病毒(HBV)导致急性和慢性感染。HBV感染的广义临床范围涉及从亚临床至急性症状的肝炎;从不活跃的乙型肝炎表面抗原(HbsAg)的携带状态至肝硬化及其慢性期中的并发症(Fattovich, J. Hepatol. 39: s50-58, 2003)。HBV依靠肠胃外或粘液暴露于一般来自HBV感染者的HbsAg阳性体液而传播(Hilleman, Vaccine 21: 4626-4649, 2003)。

[0100] 目前,有两种市售疫苗用于预防HBV感染,其两者均利用重组技术制备。例如, Engerix-B™是由Glaxo SmithKline Biologicals开发的非感染性重组DNA乙型肝炎疫苗。其含有经纯化的HBV表面抗原,该抗原通过培养经遗传改造的、携带HBV表面抗原基因的酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)细胞而获得。

[0101] 本文所使用的表述“乙型肝炎表面抗原”或“HbsAG”是指在人中展示HBV表面抗原之抗原性的任何HbsAG或其片段。

[0102] Engerix-B™和其它已获批的肠胃外施用乙型肝炎疫苗已成功地诱导针对HBV的全身性免疫应答。但是,作为全身性免疫应答之一部分产生的抗体不能在粘膜水平上提供保护,而粘膜是大多数感染性病原体(包括HBV)的主要进入部位。因此,本领域中仍需要口服递送的乙型肝炎疫苗。

[0103] 在一个方面中,本公开内容提供了制备包含乙型肝炎病毒表面抗原或其展示HbsAG之抗原性的片段的免疫原性制剂的方法。所有已知的乙型肝炎疫苗均包含重组HbsAG。应理解,这些已获批的乙型肝炎疫苗中的任一种均可以用作本公开内容方法中的抗原来源,用以制备免疫原性制剂。

[0104] 一般地,可使用任何方法制备乙型肝炎表面抗原。有关HbsAG的制备已有详细记载(例如,参见Harford等人, Develop. Biol. Standard 54: 125, 1983以及Gregg等人, Biotechnology 5: 479, 1987等)。一般地,可使用重组DNA技术方法,其涉及培养携带HBV表面抗原基因的经遗传改造的细胞。然后,对所表达的表面抗原进行纯化,并且通常制备成吸附于氢氧化铝上的表面抗原混悬液(例如,参见Valenzuela等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 1-5, 1983以及McAleer等人, Nature 307: 178-180, 1984)。

[0105] 流感

[0106] 流感是一种常见的呼吸系统感染性疾病,其与正粘病毒科(Orthomyxoviridae)病毒家族相关。A和B型流感是导致人类流行性疾病的两种流感病毒类型。基于两种表面抗原——血凝素(HA)和神经氨酸酶(N),可将A型流感病毒进一步分类为多种亚型。未对B型流感病毒进行亚型分类。对于处于由流感感染引起的严重疾病和相关并发症的高风险中的对象来说,免疫接种被认为是预防或减轻流感的一种最有效方式。接种由灭活的流感病毒制备的抗原刺激产生特异性抗体。一般来说,保护作用仅仅针对制备疫苗所来源的病毒株或者密切相关的病毒株。

[0107] 所有种类的流感疫苗通常都是三价疫苗。它们一般包含来源于两种A型流感病毒株和一种B型流感病毒株的抗原。每个季节待掺入流感疫苗中的流感病毒株由世界卫生组织(WHO)以及国家卫生机构和疫苗生产商共同确定。应理解,根据本公开内容,可使用任何流感病毒株,并且,基于WHO的建议,每年的流感病毒株将有所差异。

[0108] 还涉及可用于例如大流行性情形中的单价疫苗。单价的大流行性流感疫苗最有可能包含来自单一A病毒株的流感抗原。在一些实施方案中,流感抗原来源于大流行性流感病毒株。例如,在一些实施方案中,流感抗原是A型流感(猪来源H1N1)病毒抗原。

[0109] 全球范围内主要使用3类灭活疫苗来抵御流感:全病毒疫苗、含有病毒之外部和内部组分的裂解病毒疫苗以及仅由病毒之外部组分(血凝素和神经氨酸酶)组成的亚单位疫苗。不希望受任何理论的束缚,认为亚单位疫苗的较高纯度应当使其致反应性较低(less reactogenic)而耐受性较好。相反,认为全病毒和裂解病毒疫苗包含更多表位并因此具有更高的免疫原性。

[0110] 在一些实施方案中,流感抗原基于亚单位疫苗。一般地,亚单位疫苗仅包含流感病毒中对于有效免疫接种(例如激发保护性免疫应答)来说所需的部分。在一些实施方案中,由病毒颗粒制备亚单位流感抗原(例如纯化病毒的特定组分)。在一些实施方案中,通过重组方法制备亚单位流感抗原(例如在细胞培养物中表达)。例如,美国专利No.5,858,368描述了利用重组DNA技术制备重组流感疫苗的方法。所得三价流感疫苗是基于从具有流行可能性的流感病毒克隆的重组血凝素抗原的混合物。重组血凝素抗原是全长的、未经切割的糖蛋白,其由杆状病毒表达载体在所培养的昆虫细胞中产生并在非变性条件下纯化。在一些实施方案中,亚单位流感抗原通过合成方法(例如肽合成)产生。亚单位疫苗可包含从由WHO确定的所选病毒株中制备的经纯化的表面抗原、血凝素抗原和神经氨酸酶抗原。不希望受任何理论的束缚,认为表面抗原、血凝素抗原和神经氨酸酶抗原在免疫接种后激发产生病毒中和抗体中发挥重要作用。

[0111] 在一些实施方案中,流感抗原是裂解病毒抗原。利用裂解病毒抗原制备的疫苗通常含有较高浓度的病毒中免疫原性最强的部分(例如血凝素和神经氨酸酶),而减低免疫原性较弱的病毒蛋白以及蛋(用于产生病毒)中存在的非病毒蛋白或无关病原体(例如禽白血性增生(avian leukosis)病毒、其它微生物和细胞碎片)的浓度降低。一般地,通过物理方法制备裂解病毒抗原,其中包括破坏病毒颗粒(一般利用有机溶剂或去污剂(例如Triton X-100))以及分离或纯化病毒蛋白至不同程度(例如通过蔗糖梯度离心或使尿囊液穿过色谱柱)。在一些实施方案中,病毒颗粒被破坏并分离后进行透析或超滤。裂解病毒抗原通常含有大部分或所有的病毒结构蛋白,但是与它们在全病毒中的比例未必一致。病毒裂解的方法以及合适的裂解试剂是本领域已知的(参见,例如美国专利公开No.20090155309)。在一些实施方案中,利用本领域已知的方法(例如ELISA)对裂解病毒抗原的最终抗原浓度(例如血凝素和/或神经氨酸酶抗原的浓度)进行标准化。

[0112] 在一些实施方案中,流感抗原是全病毒抗原。认为在未接触过抗原的个体中,利用全病毒抗原制备的疫苗的免疫原性更强并能够以低于其它制剂(例如亚单位或裂解病毒抗原)的抗原剂量诱导更强的保护性抗体应答。但是,包含全病毒抗原的流感疫苗比起其它制剂可产生更多的副作用。

[0113] 本文所述的免疫原性制剂中存在的流感病毒抗原可以是感染性的、灭活的或减毒

的。

[0114] 在某些实施方案中,免疫原性制剂可以包含灭活的病毒抗原。应理解,可以使用任何方法来制备灭活的流感病毒抗原。WO 09/029695描述了用于生产灭活型全病毒疫苗的示例性方法。一般地,这些方法涉及在宿主细胞中使流感病毒增殖,任选地使宿主细胞裂解以释放病毒,分离病毒抗原,然后使其灭活。常常通过对病毒进行化学处理(例如福尔马林、甲醛等)来灭活用于疫苗制剂的病毒。但是,应理解,可以使用其它技术,例如用氯处理、暴露于高温等。在这些处理中,通常使病毒颗粒的外壳保持完整,而使其复制功能受损。优选地,非复制型病毒疫苗包含多于能够在宿主中复制之活疫苗的抗原。

[0115] 在某些实施方案中,免疫原性制剂可以包含减毒的病毒抗原。如本领域所公知地,用减毒的病毒抗原制备的疫苗的一个优势在于具有较强免疫原性的潜力,这是由于其能够在体内复制而不会导致完整感染的能力所致。优选地,由减毒的病毒株制备的活病毒疫苗不具有致病性,但是仍能在宿主中复制。本领域中已使用的一种制备减毒流感病毒抗原的方法是病毒适应,其包括使病毒株在多种细胞培养物中连续传代。病毒株随时间发生突变,随后可对减毒株进行鉴定。在某些实施方案中,可以使病毒在不同细胞培养物中传代。在某些实施方案中,可证明在降低的温度下进行一个或更多个细胞培养步骤是有利的。

[0116] 目前几种流感疫苗已获得批准(见表1)。例如,**Fluzone[®]**,一种裂解细胞灭活型流感疫苗,其由Sanofi Pasteur, Inc.开发和生产并且可以根据本公开内容使用。**Fluzone[®]**包含由在有胚的鸡蛋中增殖的流感病毒制备的无菌混悬液。收集含有病毒的流体,并用甲醛灭活。使流感病毒浓缩,并利用连续流动离心机在线性蔗糖密度梯度溶液中进行纯化。然后利用非离子型表面活性剂辛苯聚糖-9(octoxinol-9)(**Triton[®]X-100**)对病毒进行化学破坏,产生裂解病毒抗原。然后通过化学方法对裂解病毒进行进一步纯化,并重悬于磷酸钠盐缓冲的等渗氯化钠溶液中。继而根据流感季节的需要对**Fluzone[®]**疫苗进行标准化,并制备成每0.5mL剂量含有45μg血凝素(HA),建议比例是针对三种原型病毒株中的每一种的HA为15μg(例如,由A/所罗门群岛/3/2006(H1N1)、A/威斯康辛/67/2005(H3N2)和B/马来西亚/2506/2004病毒株制备的2007-2008疫苗)。**Fluzone[®]**疫苗制备用于肌肉注射。

[0117] 可根据本公开内容使用的已获批流感疫苗的另一实例是**Vaxigrip[®]**,其是裂解细胞灭活型流感疫苗,并且也是由Sanofi Pasteur, Inc.开发和生产的。**Vaxigrip[®]**以与上述针对**Fluzone[®]**类似的方式制备,并且类似地制备用于肌肉注射。

[0118] 可根据本公开内容使用的已获批流感疫苗的另一实例是**Flumist[®]**。**Flumist[®]**是一种活的减毒三价疫苗,其通过鼻内喷雾施用。**Flumist[®]**中的流感病毒株具有3处导致温度限制性生长和减毒表型的遗传突变。抗原性特性和经遗传修饰之流感病毒的累积效果是其能够在鼻咽中复制并诱导保护性免疫。为了生产**Flumist[®]**,用每种合适的病毒株接种无特定病原体(specific pathogen-free, SPF)的蛋并孵育以使得疫苗病毒复制。收集这些蛋的尿囊液,合并在一起,然后通过过滤进行澄清化。通过超速离心使病毒浓缩,并用稳定缓冲液稀释,以获得最终的蔗糖和磷酸钾盐浓度。然后,对病毒收集物进行无菌过滤,以产生单价半成品。继而将来自三种病毒株的单价半成品混合并用稳定缓冲液进行获得期望效力所需的稀释,以产生三价半成品疫苗。然后,将半成品疫苗直接注入用于经鼻施用的单个喷

雾器中。每个经预注入的冷冻**Flumist**[®]喷雾器含有0.2mL单次剂量。每0.2mL剂量含有 $10^{6.5-7.5}$ FFU的3种合适病毒株中每株之减毒活流感病毒重配株(reassortant)。

[0119] 如上文所述,目前已有几种流感疫苗获得批准。应理解,这些已获批流感疫苗中的任一种或其组合可以与本文所述的囊泡相组合,以产生免疫原性制剂。例如,市售的**Fluzone**[®]和/或**Vaxigrip**[®]可以以这种方式进行组合,以产生活性免疫原性制剂。在一些

实施方案中,首先对已获批的流感疫苗进行纯化(例如,用以除去疫苗中的明矾佐剂或其它试剂)。在一些实施方案中,在用本文所述的囊泡制备之前,不对已获批流感疫苗进行纯化。

[0120] PCT专利申请No.PCT/US09/47911描述了可用于本公开内容方法和制剂中的另一些示例性流感抗原。示例性流感抗原还描述于美国专利No.7,527,800、7,537,768、,514,086、7,510,719、7,494,659、7,468,259、7,399,840、7,361,352、7,316,813、7,262,045、7,244,435、7,192,595、7,052,701、6,861,244、6,743,900、6,740,325、6,635,246、6,605,457、6,534,065、6,372,223、6,344,354、6,287,570、6,136,606、5,962,298、5,948,410和5,919,480中。

[0121] 其它病毒

[0122] 目前将丙型肝炎病毒(HCV)认定为是与输血相关的非甲、非乙型(non-A,non-B,NANB)肝炎的主要原因。HCV是单链有义链RNA病毒,其与黄病毒和瘟病毒类似(Miller等人,Proc.Natl.Acad.Sci.87:2057,1991以及Weiner等人,Virology 180:842,1990)。美国专利No.7,348,011、6,831,169、6,538,123和6,235,888均描述了疫苗中可以使用的示例性HCV抗原。

[0123] 人免疫缺陷逆转录病毒(HIV)是导致AIDS(获得性免疫缺陷综合症)的原因,AIDS是一种使机体的免疫系统瓦解导致其易受机会性感染的疾病。美国专利No.7,067,134、7,063,849、6,787,351、6,706,859、6,692,955、6,653,130、6,649,410、6,541,003、6,503,753、6,500,623、6,383,806、6,090,392、5,861,243、5,817,318和4,983,387均描述了疫苗中可以使用的示例性HIV抗原。多种HIV抗原还公开于美国专利申请公开No.20090117141和20090081254中。

[0124] 在某些实施方案中,根据本公开内容方法制备的免疫原性制剂可以包含不耐热的抗原。本文所使用的术语“不耐热的抗原”是指当暴露于某些升高的温度时丧失抗原性完整性的抗原。在一些实施方案中,如抗原性完整性测定(例如ELISA)中所测得地,与未经操作的抗原相比,不耐热的抗原暴露于升高的温度时破坏抗原之抗原性完整性的超过20%(例如,超过30%、超过40%、超过50%或更多)。在某些实施方案中,不耐热的抗原在30℃以上(例如,35℃以上、40℃以上、45℃以上或50℃以上)的温度下丧失抗原性完整性。在一些实施方案中,如抗原性完整性测定(例如ELISA)中所测得地,与未经操作的抗原相比,不耐热的抗原在这些升高的温度之一中保存超过3分钟(例如,5分钟、10分钟、15分钟或更长)破坏抗原之抗原性完整性的超过20%(例如,超过30%、超过40%、超过50%或更多)。如上文所讨论地,本公开内容的方法尤其对不耐热的抗原有益,这是因为其可以利用较低温度的抗原溶液,使得可以更好地保留抗原性完整性。

[0125] 应理解,本公开内容不限于抗原,并且一般来讲,所述方法可用于包封任何抗原性或非抗原性的物质。因此,在一些实施方案中,本公开内容的方法可用于包封可具有或不具

有抗原性的一种或更多种多肽、多核苷酸或多糖。特定类型的物质包括但不限于佐剂、酶、受体、神经递质、激素、细胞因子、细胞应答调节剂(例如生长因子和趋化因子)、抗体、半抗原、毒素、干扰素、核酶、反义试剂、质粒、DNA和RNA。在一些实施方案中,多肽可以是抗体或抗体片段,例如人源化抗体。在一些实施方案中,这些物质是不耐热的,因为其在上述参考文献中涉及抗原的条件下转化成为降解物。

[0126] 佐剂

[0127] 在某些实施方案中,本公开内容的方法还可包括将一种或更多种佐剂加入囊泡制剂中的步骤。如本领域所公知地,佐剂是增强免疫应答的试剂。佐剂是本领域公知的(例如,参见“Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach”, Pharmaceutical Biotechnology, 卷6, Powell和Newman编, Plenum Press, New York and London, 1995)。在一些实施方案中,可在囊泡制剂(包封有抗原)制备后加入佐剂。在一些实施方案中,可在制备囊泡制剂的过程期间加入佐剂(例如,与形成囊泡的脂质或其它囊泡组分一起,与抗原一起,或者在单独的步骤中)。

[0128] 在某些实施方案中,在加入抗原前加入佐剂。在一些实施方案中,将佐剂与形成囊泡的脂质共熔化。在一些实施方案中,将TLR-4佐剂(下文有描述)与形成囊泡的脂质共熔化。在某些实施方案中,在加入抗原后加入佐剂。在一些实施方案中,在加入抗原后,佐剂与冻干保护剂一起加入。在一些实施方案中,在加入抗原后,将TLR-3佐剂(下文有描述)与冻干保护剂一起加入。在一些实施方案中,所述冻干保护剂是蔗糖。

[0129] 示例性佐剂包括弗式(Freund's)完全佐剂(CFA)、弗式不完全佐剂(IFA)、角鲨烯、角鲨烷和明矾(氢氧化铝),这些是本领域公知的材料并且可以从多种来源购得。在某些实施方案中,铝或钙盐(例如氢氧化物或磷酸盐)可以用作佐剂。明矾(氢氧化铝)已用于多种现有疫苗中。当肌肉给药时,每份剂量通常包含约40至约700 μ g的铝。例如,每份剂量的**Havrix[®]**包含500 μ g铝。

[0130] 在多个实施方案中,水包油型乳剂或油包水型乳剂也可以用作佐剂。例如,油相可以包含角鲨烯或角鲨烷以及表面活性剂。在多个实施方案中,可以使用非离子型表面活性剂,例如山梨聚糖和二缩甘露醇的单-和二-C₁₂-C₂₄-脂肪酸酯。优选地,油相包含约0.2至约15%(重量)(例如约0.2至1%)的免疫原性制剂。PCT公开No. WO 95/17210描述了示例性乳剂。

[0131] 命名为QS21的佐剂是免疫活性的皂苷级分,其具有佐剂活性,来源于南美树种石碱木(*Quillaja Saponaria Molina*)的树皮,其生产方法公开于美国专利No. 5,057,540中。石碱木皂苷的半合成和合成衍生物也是可用的,例如描述于美国专利No. 5,977,081和6,080,725中的那些。

[0132] TLR是与果蝇(*Drosophila*)Toll受体同源的蛋白家族,其识别病原体相关分子模式,因而帮助机体区分自身和非自身分子。病毒病原体中共有的物质作为病原体相关分子模式被TLR识别。例如,TLR-3识别双链RNA中的模式,TLR-4识别脂多糖中的模式,而TLR-7/8识别病毒和细菌RNA和DNA中含有腺苷的模式。当TLR被这种模式识别激活时,发生一系列信号传导事件,导致炎症以及先天性和获得性免疫应答的活化。含有被不同TLR识别之分子模式的多种合成配体已被开发用作佐剂,其可以包含于本文所述的免疫原性制剂中。

[0133] 例如,多聚次黄嘌呤核苷酸:多聚胞嘧啶核苷酸或poly(I:C)(可从InvivoGen of

San Diego, CA获得)是双链RNA(病毒感染的一种相关分子模式)的合成类似物和TLR-3激动剂的示例性佐剂(例如,参见Field等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 58:1004(1967)以及Levy等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 62:357(1969))。在一些实施方案中, poly(I:C)可以与其它试剂相组合以提高稳定性(例如,通过作用于RNA酶活性而减少降解来实现)。例如,美国专利No. 3,952,097、4,024,241和4,349,538描述了poly(I:C)与聚L-赖氨酸的复合物。还显示,向poly(I:C)中加入聚精氨酸会通过作用于RNA酶活性而减少降解。poly(IC:LC)是用聚L-赖氨酸羧甲基纤维素稳定的合成双链poly(I:C)。美国专利公开No. 20090041809描述了具有一个或多个锁核酸(locked nucleic acid, LNA)核苷的双链核酸,其可用作TLR-3激动剂。本领域技术人员将能够鉴定其它合适的TLR-3激动剂佐剂。

[0134] TLR-4激动剂的示例性佐剂是减毒的脂质A衍生物(attenuated lipid A derivative, ALD), 例如单磷酸脂质A(MPL)和3-脱酰基单磷酸脂质A(3D-MPL)。ALD是脂质A样分子,其已被改变或构建从而使该分子表现出少于或不同于脂质A的不良作用。这些不良作用包括致热性、局部Shwarzman反应以及在鸡胚50%致死剂量测定(CELD₅₀)中评估的毒性。MPL和3D-MPL分别描述于美国专利No. 4,436,727和4,912,094中。MPL最初来源于肠细菌脂多糖(LPS)的组分——脂质A,其是一种强效但具有高毒性的免疫系统调节剂。3D-MPL与MPL的不同在于,与还原末端的葡萄糖胺在第3位以酯键连接的酰基残基已被选择性地去除。应理解,MPL和3D-MPL可包括多种脂肪酸取代形式(即具有不同脂肪酸链长度的七酰基、六酰基、五酰基等)的混合物。因此,本公开内容涵盖了多种形式的MPL和3D-MPL,包括其混合物。

[0135] 在一些实施方案中,这些ALD可以与海藻糖二霉菌酸酯(TDM)和细胞壁骨架(CWS)相组合,例如在2%角鲨烯/Tween™ 80乳剂中(例如参见英国专利No. 2122204)。MPL可以作为PHAD(磷酸化六酰基二糖)从Alabaster, AL的Avanti Polar Lipids, Inc.获得。本领域技术人员将能够鉴定其它合适的TLR-4激动剂佐剂。例如,另一些脂多糖已描述于PCT公开No. WO 98/01139、美国专利No. 6,005,099和EP专利No. 729473中。

[0136] II. 囊泡制剂

[0137] 在另一方面中,本公开内容提供了利用这些方法制备的含有抗原的囊泡制剂。在一些实施方案中,所述含有抗原的囊泡制剂显示出高于利用现有技术方法可获得之水平的抗原包封水平。在一些实施方案中,所述含有抗原的囊泡制剂显示出高于利用现有技术方法可获得之水平的抗原活性(即抗原性和/或免疫原性)水平。

[0138] 免疫原性囊泡制剂可用于治疗人类(包括成人和儿童)的许多疾病。然而,一般而言,其可用于任何动物。在某些实施方案中,本文中的方法可用于兽医应用中,例如犬科动物和猫科动物应用中。如需要,本文中的方法还可用于畜牧动物中,例如绵羊、牛、猪和马。

[0139] 一般地,本文所述的免疫原性囊泡制剂以诱导免疫应答所必需或足够的量和时间加以施用。给药方案可包括单次给药或者一段时间内的多次给药。所施用抗原的确切量可以依患者而变化,并且可取决于若干因素。因此,应理解,一般来讲,所使用的精确剂量由处方医师来确定,其将不仅取决于患者的体重和施用途径,还取决于给药频率、患者年龄以及症状的严重程度和/或感染风险。在某些实施方案中,免疫原性制剂中抗原剂量的范围可以为约5μg至约5mg,例如约100μg至约750μg。当使用舌下或含服施用时或者在佐剂存在下,较低剂量的抗原可以是足够的。当口服给药时(尤其是无佐剂时),较高剂量可以更有用。

[0140] 一般地,可以通过任何途径向患者施用所述制剂。特别地,实施例中的结果表明本文所述的免疫原性制剂即使当口服施用时亦可诱导保护性应答。应理解,鉴于口服递送与任何注射形式相比的优势(即依从性、物质分布(mass distribution)等),口服途径是特别期望的。还应理解,鉴于至今大多数疫苗(包括所有已知的甲型肝炎疫苗)经肠胃外施用的事实,所述结果是出乎意料的。

[0141] 因此,在某些实施方案中,所述免疫原性制剂可以口服(包括含服、舌下以及通过洗胃或其它人工喂食方法)施用。这种口服递送可以利用固体或液体制剂实现,例如以片剂、胶囊剂、微粒剂(multi-particulate)、凝胶剂、薄膜剂、卵状剂(ovule)、酞剂、溶液、混悬液等形式。在某些实施方案中,当使用液体制剂时,所述制剂可以与碱性制剂(例如碳酸氢盐溶液)联合施用,以中和胃pH。在某些实施方案中,所述碱性制剂可以在免疫原性制剂施用之前和/或之后施用。在某些实施方案中,可以在施用前将所述碱性制剂与免疫原性制剂相组合,或者将所述碱性制剂与免疫原性制剂同时施用。

[0142] 尽管对于口服递送特别感兴趣,然而应理解,在某些实施方案中,免疫原性制剂还可以制备用于肠胃外递送,例如通过注射。在这些实施方案中,施用可以是例如静脉内、肌肉内、皮内或皮下施用,或者通过输注或无针注射技术。对于这样的肠胃外施用,所述免疫原性制剂可以制备并保存为常规冻干制剂,并在施用前使用可药用的盐溶液(例如0.9%的盐溶液)重溶。如本领域已知,可以使用可药用的酸(例如甲磺酸)调整注射用制剂的pH值。可使用的其它可接受的载剂和溶剂包括林格氏(Ringer's)液和U.S.P.。此外,常规使用无菌不挥发性油作为溶剂或悬浮介质。为此,可以使用任何无刺激性的不挥发性油,包括合成的单-或二甘油酯。此外,使用脂肪酸(例如油酸)制备注射剂。可以例如通过过滤穿过滞留细菌的过滤器或通过掺入无菌固体制剂形式的除菌试剂(使用前可以将其溶解或分散于无菌水或其它无菌注射用介质中)对注射用制剂除菌。

[0143] 所述免疫原性制剂还可通过鼻内或通过吸入方式施用,即以干粉吸入剂或气溶胶喷雾形式(其由加压容器、泵、喷洒器、雾化器或喷雾器在使用或不使用合适抛射剂(例如,二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷、氢氟烷烃、二氧化碳或者其它合适的气体)的情形下提供)便利地递送。在加压气溶胶的情形下,可以通过提供阀来确定剂量单位,以递送计数的量。所述加压容器、泵、喷洒器、雾化器或喷雾器可以含有抗体溶液或悬液,例如使用乙醇和抛射剂的混合物作为溶剂,所述溶剂还可额外地含有润滑剂(例如山梨坦三油酸酯)。用于吸入器或吹药器中的胶囊和药筒(例如由明胶制成)可以制备成含有免疫原性制剂和合适粉末基料(例如乳糖或淀粉)的粉末混合物。

[0144] 优选地,用于直肠施用的制剂是栓剂,其可以通过将所述免疫原性制剂与合适的无刺激性赋形剂或载体(例如可可脂、聚乙二醇或栓剂蜡,其在环境温度下呈固态,在体温下呈液态,因而在直肠道中熔化并释放抗体)混合而制备。还可以使用本领域已知的保留灌肠和直肠导管。增强粘稠度的载体(例如羟丙基纤维素)也是本公开内容用于直肠施用的某种载体,因为其有助于使制剂滞留在直肠内。一般地,选择向制剂中加入的载体体积以最大程度地使制剂滞留。特别地,所述体积不应大到损害所施用制剂在直肠道中的滞留。

[0145] 示例性制剂

[0146] 在一些实施方案中,本公开内容提供了包含抗原、TLR-3激动剂佐剂和囊泡的免疫原性制剂,所述囊泡包含非离子型表面活性剂和有助于脂质样分子运送穿过粘膜的运送增

强剂。在一些实施方案中,这些制剂可以口服施用。在一些实施方案中,所述TLR-3激动剂佐剂包含poly(I:C)。在一些实施方案中,所述TLR-3激动剂佐剂包含poly(IC:LC)。在一些实施方案中,所述运送增强剂是胆汁酸、其衍生物或者这些中任一种的盐(例如脱氧胆酸钠)。在一些实施方案中,所述非离子型表面活性剂是甘油酯(例如1-单棕榈酰基甘油)。在一些实施方案中,所述囊泡还包含离子型两亲性分子(例如二鲸蜡醇磷酸酯)。在一些实施方案中,所述囊泡还包含类固醇(例如胆固醇)。在一些实施方案中,所述囊泡包含1-单棕榈酰基甘油、二鲸蜡醇磷酸酯、胆固醇和脱氧胆酸钠。

[0147] 在一些实施方案中,本公开内容提供了包含抗原、TLR-3激动剂佐剂和囊泡的免疫原性制剂,所述囊泡包含非离子型表面活性剂。在一些实施方案中,这些制剂可以肠胃外施用(例如通过肌肉注射)。在一些实施方案中,所述TLR-3激动剂佐剂包含poly(I:C)。在一些实施方案中,所述TLR-3激动剂佐剂包含poly(IC:LC)。在一些实施方案中,非离子型表面活性剂是甘油酯(例如1-单棕榈酰基甘油)。在一些实施方案中,所述囊泡还包含离子型两亲性分子(例如二鲸蜡醇磷酸酯)。在一些实施方案中,所述囊泡还包含类固醇(例如胆固醇)。在一些实施方案中,所述囊泡包含1-单棕榈酰基甘油、二鲸蜡醇磷酸酯和胆固醇。在一些实施方案中,所述囊泡可以不含运送增强分子。在一些实施方案中,所述囊泡可以不含“胆汁酸”(例如胆酸和鹅脱氧胆酸)、其与甘氨酸或牛磺酸的缀合产物(例如甘胆酸和牛磺胆酸)、衍生物(包括脱氧胆酸和熊脱氧胆酸)以及这些酸中每一种的盐。在一些实施方案中,所述囊泡可以不含酰氧化的氨基酸,例如酰肉碱及其盐以及棕榈酰肉碱。

[0148] 在一些实施方案中,本公开内容提供了包含抗原、TLR-4激动剂佐剂和囊泡的免疫原性制剂,所述囊泡包含非离子型表面活性剂和有助于脂质样分子运送穿过粘膜的运送增强剂。在一些实施方案中,这些制剂可以口服施用。在一些实施方案中,所述TLR-4激动剂佐剂包含单磷酸脂质A或者3-脱酰基单磷酸脂质A。在一些实施方案中,所述运送增强剂是胆汁酸、其衍生物或者这些中任一种的盐(例如脱氧胆酸钠)。在一些实施方案中,所述非离子型表面活性剂是甘油酯(例如1-单棕榈酰基甘油)。在一些实施方案中,所述囊泡还包含离子型两亲性分子(例如二鲸蜡醇磷酸酯)。在一些实施方案中,所述囊泡还包含类固醇(例如胆固醇)。在一些实施方案中,所述囊泡包含1-单棕榈酰基甘油、二鲸蜡醇磷酸酯、胆固醇和脱氧胆酸钠。

[0149] 在一些实施方案中,本公开内容提供了包含抗原、TLR-4激动剂佐剂和囊泡的免疫原性制剂,所述囊泡包含非离子型表面活性剂。在一些实施方案中,这些制剂可以肠胃外施用(例如通过肌肉注射)。在一些实施方案中,所述TLR-4激动剂佐剂包含单磷酸脂质A或3-脱酰基单磷酸脂质A。在一些实施方案中,所述非离子型表面活性剂是甘油酯(例如1-单棕榈酰基甘油)。在一些实施方案中,所述囊泡还包含离子型两亲性分子(例如二鲸蜡醇磷酸酯)。在一些实施方案中,所述囊泡还包含类固醇(例如胆固醇)。在一些实施方案中,所述囊泡包含1-单棕榈酰基甘油、二鲸蜡醇磷酸酯和胆固醇。在一些实施方案中,所述囊泡可以不含运送增强分子。在一些实施方案中,所述囊泡可以不含“胆汁酸”(例如胆酸和鹅脱氧胆酸)、其与甘氨酸或牛磺酸的缀合产物(例如甘胆酸和牛磺胆酸)、衍生物(包括脱氧胆酸和熊脱氧胆酸)以及这些酸中每一种的盐。在一些实施方案中,所述囊泡可以不含酰氧化的氨基酸,例如酰肉碱及其盐以及棕榈酰肉碱。

[0150] 在某些实施方案中,本公开内容的制剂包含呈现层状结构(例如双分子层结构)的

囊泡。在一些实施方案中,本公开内容的制剂基本不具有非层状结构(例如胶束)。

[0151] 应理解,可通过任何已知方法测量本文所述之制剂中存在的囊泡的物理性质(例如层状结构)。例如,在一些实施方案中,可以在25℃通过³¹P NMR测定囊泡的物理性质。在一些实施方案中,-2.5ppm附近具有强场最大值的各向异性峰以及约15至20ppm化学位移各向异性的表示存在层状结构。在一些实施方案中,³¹P NMR谱中观察到的集中于2.5ppm附近的各向异性峰表示存在非层状结构。在一些实施方案中,本公开内容之制剂的³¹P NMR谱基本不具有2.5ppm附近的各向异性峰。在一些实施方案中,如果存在2.5ppm附近的各向异性峰,其强度(峰高)低于约15至20ppm化学位移各向异性以及-2.5ppm附近强场最大值之各向异性峰的强度(峰高)。在一些实施方案中,如果存在2.5ppm附近的各向异性峰,其强度(峰高)低于约15至20ppm化学位移各向异性以及-2.5ppm附近强场最大值之各向异性峰的强度(峰高)的50%(例如低于40%、低于30%、低于20%、低于10%、低于50%、低于2%或低于1%)。

[0152] 在一些实施方案中,本公开内容提供了冻干形式的上述任一种制剂。

[0153] III. 试剂盒

[0154] 在又一方面中,本公开内容提供了试剂盒,其包含第一容器中冻干的脂质制品和第二容器中包含抗原(以及任选地佐剂)的水性溶液。在一些实施方案中,所述试剂盒还包含将所述两个容器中的内含物混合以产生含有抗原之囊泡制剂的说明。

[0155] 如上文所讨论地,冻干的脂质制品是通过使形成囊泡的脂质熔化以产生熔融脂质混合物以及随后将熔融脂质混合物冻干以得到冻干的脂质制品而预先制备的。

[0156] 在又一方面中,本公开内容提供了试剂盒,其包含第一容器中本公开内容之任何冻干的、含有抗原的囊泡制剂和第二容器中的水性溶液(任选地含有佐剂)。在一些实施方案中,所述试剂盒还包含将所述两个容器中的内含物混合以使含有抗原的囊泡制剂再水合的说明。

[0157] 在一些实施方案中,所述试剂盒可包含额外的组分,例如用于将含有抗原的囊泡制剂注射入患者中的注射器。

实施例

[0158] 下列实施例描述了制备和实施本文所述之某些制剂的一些示例性方式。应当理解,这些实施例仅用于举例说明,而不意在限制本文所述之制剂和方法的范围。

[0159] 实施例1:制备囊泡的3步熔化法

[0160] 本实施例描述了3步熔化法,其用于制备后面实施例中所述的一些囊泡。

[0161] 在步骤1中,将5:4:1摩尔比的下列脂质:1-单棕榈酰基甘油(MPG,270mg)、胆固醇(CHO,255mg)和二鲸蜡醇磷酸酯(DCP,90mg)置于50ml平底玻璃烧杯中,确保没有粉末沾到玻璃烧杯侧壁上。然后在加热的油浴中使脂质混合物于120℃熔化10分钟,并不时搅动用铝箔覆盖的玻璃烧杯。

[0162] 使熔融脂质混合物保持于120℃的同时,通过加入10.9ml 25mM的碳酸氢盐缓冲液(pH 7.6,预热至50℃)在步骤2中产生乳剂。立即将乳剂于50℃均质化2分钟(在50℃水浴中以8000rpm均质化)。在均质化的同时,加入25mM碳酸氢盐缓冲液(pH 9.7)中的1.1ml 100mM脱氧胆酸钠(“胆汁盐”)溶液,并于50℃继续均质化8分钟。

[0163] 在步骤3中,将PBS溶液(约pH 7.2)中的抗原(例如HAV抗原或HBV表面抗原)加入含

有胆汁盐的经加热的熔融脂质混合物中。

[0164] 在该3步法的变化形式中,将步骤2中用胆汁盐制备的熔融脂质混合物冷却至30℃,在孵育器/摇床(220rpm)中孵育2小时,于-80℃冷冻,冻干,然后在使用前用100mM磷酸盐缓冲液(pH 8.5)中的抗原溶液使其重溶。

[0165] 实施例2:制备囊泡的反向2步熔化法(inverted two-step melt method)

[0166] 本实施例描述了一种反向2步熔化法,其用于制备后面实施例中描述的一些囊泡。

[0167] 在步骤1中,使用同样的5:4:1摩尔比的脂质(MPG:CHO:DCP);然而,在该方法中,还包含0.1~0.5摩尔比的脱氧胆酸(“胆汁酸”),其与脂质在加热的油浴中于135℃共熔化10分钟。在实施例1的方法中,水性胆汁盐溶液仅在步骤2中使熔融脂质转化成乳剂后加入。

[0168] 在该阶段,抗原储液(例如,用6ml PBS缓冲液(pH 7.11)稀释的4ml 25μg/ml的HAV抗原溶液,或者用8.75ml PBS缓冲液(pH 7.2)稀释的1.25ml 1.0mg/ml的HBV表面抗原溶液)在加热的水浴(25℃至50℃)中预孵育5分钟。在步骤2中,将所得到的抗原储液均质化(以8,000rpm),加入熔融脂质混合物,并继续均质化另外的10分钟。所得均质物于30℃以220rpm振摇2小时。将PBS缓冲液中的10ml 400mM蔗糖溶液加入经振摇的均质物中,再进一步使均质物涡旋30秒。将该混合物于-80℃冷冻,冻干,并继而在使用前用100mM磷酸盐缓冲液(pH 8.5)中使其重溶。

[0169] 在该2步法的变化形式中,将步骤1中制备的共熔化的脂质/胆汁酸溶液冷却至30℃,在孵育器/摇床(220rpm)中孵育2小时,于-80℃冷冻,冻干,并继而在使用前用100mM磷酸盐缓冲液(pH 8.5)中的抗原溶液使其重溶。

[0170] 实施例3:乙型肝炎抗原完整性分析

[0171] HBV表面抗原溶液于4℃、25℃和50℃的温度下以8,000rpm均质化。下面表2比较了通过ELISA测定的所得抗原相对于直接通过ELISA测定之未经操作抗原的百分比。如所示,实施例1的3步熔化法中涉及的使HbsAg暴露于50℃破坏了抗原之抗原性完整性的超过50%。利用本公开内容的反向2步熔化法使得含有抗原之缓冲液的温度显著降低(例如至25℃)。该反向2步熔化法由于能够利用较低温度的抗原溶液而使得可以更好地保留抗原性完整性。

[0172] 表2

抗原	抗原溶液的温度		
	4℃	25℃	50℃
HBsAg	67%	71%	38%

[0174] 实施例4:乙型肝炎抗原包封的分析

[0175] 本实施例描述了为了测定乙型肝炎表面抗原包封水平而进行的实验。利用水合茚三酮测定对包封水平进行测定。所述水合茚三酮测定是确定样品中多肽浓度的显色法。含有氨基基团的物质与水合茚三酮试剂反应,产生蓝紫色复合物。

[0176] 利用实施例1和2的方法将乙型肝炎表面抗原包封入囊泡中。利用实施例2的方法对两种不同比率的胆汁酸(0.10和0.50)进行测试。使包经封的乙型肝炎表面抗原从囊泡水解、中和、与水合茚三酮试剂混合并随后于110℃孵育。然后使溶液冷却,并在595nm处测定其吸光值。在该波长下的吸光值与原始样品中存在的多肽量之间具有线性关系。表3显示使用实施例2的反向2步法实现了高水平的抗原(此时为HBV表面抗原)包封。表3还表明胆汁酸

含量可以影响包封效率。

[0177] 表3

[0178]

抗原	囊泡制备方法		
	三步融化	反向两步融化	
胆汁盐/酸	胆汁盐比率0.17	胆汁酸比率0.50	胆汁酸比率0.10
HbsAg	42%	56%	40%

[0179] 实施例5:水合后囊泡稳定性的生理化学表征

[0180] 本实施例描述了为了利用动态光散射测定囊泡稳定性而进行的实验。我们使用 Malvern Instrument Zetasizer Nano ZS(ZEN3600)利用三次读数和2分钟平衡时间确定颗粒大小和大小分布。将20 μ l囊泡样品加入980 μ l碳酸氢盐缓冲液(pH 7.6)中,涡旋,并随后加入聚苯乙烯试管(Sarstedt 67.754)中。利用Minitab v14,通过两样品t检验在95%置信水平上进行统计学分析。由纳米级大小分析获得的结果显示于图1中。在含有2 μ l HAV抗原的缓冲液存在下进行再水合后立即以及再水合后2、4和6小时,利用mastersizer对如实施例1和2中所述制备的囊泡进行测定。如图1中所示,随着时间推移,通过实施例2的反向2步融化法制备的囊泡比通过实施例1的3步融化法制备的囊泡更加稳定(如通过大小稳定性评估)。再水合后囊泡的稳定性对于待施用于患者的囊泡制剂来说是潜在重要的因素。

[0181] 实施例6:小鼠免疫中对甲型肝炎抗原的抗体应答

[0182] 本实施例描述了在小鼠中对某些免疫原性制剂的体内测试。如实施例1和2中所述地制备囊泡,并随后在含有2 μ g HAV抗原的缓冲液存在下进行再水合。通过在第0、14和28天用这些含有抗原的囊泡经口强饲,对雌性BALB/c小鼠(n=4)进行3次免疫接种(相当于2 μ g HAV抗原/给药)。

[0183] 随后收集血清样品,以评估由口服免疫接种诱导的甲型肝炎特异性IgG效价。利用ELISA针对灭活的HAV抗原对末次免疫后14天收集的血清样品进行测试。如图2所示,用通过实施例2的反向2步融化法制备的囊泡对小鼠进行的口服免疫接种比通过实施例1的3步融化法制备的囊泡诱导显著较高的对甲型肝炎抗原的全身性(血清)IgG应答。每个符号代表个体动物的血清终点效价。该数据显示与利用3步融化法制备之囊泡的水合相比,利用2步融化法用HAV抗原制备之空囊泡的水合产生更好的免疫原性。

[0184] 一些研究人员已表明目前已获批的通过肌内(IM)注射给药的甲型肝炎疫苗和乙型肝炎疫苗诱导产生中和IgG抗体。我们已发现口服施用的免疫原性甲型肝炎制剂能够诱导全身产生IgG抗体(血清样品)以及粘膜产生IgA抗体(鼻冲洗液样品)。由于甲型肝炎和乙型肝炎感染通过粘膜表面发生,IgA应答(粘膜性免疫应答的标志)可比全身性IgG应答更有效。如果免疫原性甲型肝炎或乙型肝炎制剂通过标准肠胃外途径(例如通过IM注射)施用,我们将仅预期产生全身性IgG应答。

[0185] 实施例7:囊泡的胆汁盐含量影响未成熟树突状细胞的成熟

[0186] 目前普遍接受的是,树突状细胞(DC)是重要的抗原呈递细胞,其在建立抗原(例如HAV抗原)诱导耐受性或小肠中的保护性免疫应答方面起作用(Alpan等人,J.Immunol.166(8):4843-4852,2001)。树突状细胞的活化(通常由免疫刺激物引起)促进共刺激分子的表达以及以使得T细胞增殖性活化(productive priming)的方式呈递抗原。

[0187] 简单地讲,从初次接受实验的(**naïve**)BALB/c小鼠中分离来源于骨髓的树突状细

胞祖细胞,并在白介素4(IL-4)和粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)存在下进行培养,使得分化成未成熟树突状细胞表型(5天)。随后用肿瘤坏死因子 α (TNF- α)进行处理,这进一步使未成熟树突状细胞分化成成熟的树突状细胞。使未成熟树突状细胞与实施例2步骤1和2(没有随后的添加抗原的步骤)中制备的非离子型表面活性剂脂质囊泡(NISV)孵育,所述NISV具有或不具有胆汁酸对总脂质的两种不同摩尔比率(0.1和0.5)。作为阳性对照,单独用TNF- α 对未成熟树突状细胞进行处理。利用抗MHC II和抗CD86抗体,通过流式细胞术对树突状细胞的成熟情况进行测定。如图3所示,不含胆汁酸的NISV不显著影响未成熟树突状细胞的成熟,而含有胆汁酸的NISV使树突状细胞的成熟提高。该结果还表明这种提高的成熟可能受胆汁酸含量的影响。

[0188] 实施例8:通过 ^{31}P NMR表征囊泡

[0189] 本实施例描述了通过 ^{31}P NMR对根据本公开内容方法制备的某些示例性囊泡进行表征。

[0190] 在不加入任何抗原的情况下如实施例1和2所描述制备囊泡。用碳酸氢钠(NaHCO_3)缓冲液使冻干的囊泡重溶。脂质终浓度是50mg/ml。将4ml悬浮囊泡转移至10mm NMR管中,并加入几滴 D_2O 。

[0191] 利用反向2步融化法制备之囊泡的 ^{31}P NMR谱显示于图4A中。具有弱场肩部(low-field shoulder)和强场峰以及约20ppm的化学位移各向异性的非对称线形对应于以典型层状结构组织的DCP。

[0192] 利用3步融化法制备之囊泡的 ^{31}P NMR谱显示于图4B中。在通过该方法制备的样品中观察到了各向同性峰,其叠加于宽线上并且集中于2.5ppm附近。各向同性峰很可能归因于非层状结构(例如胶束、六角相或非常小(纳米级大小)的囊泡)的存在。

[0193] 实施例9:用于制备囊泡的反向两步融化法

[0194] 本实施例描述了可以用于制备囊泡的示例性反向两步融化法。将5:4:1摩尔比率的脂质(5.575g MPG、5.218g CHO和1.845g DCP)置于250ml平底玻璃烧杯中,确保无粉末沾到玻璃烧杯侧壁上。在某些实施方案中,当制备胆汁酸体时,胆汁酸(例如0.5摩尔比率的脱氧胆酸钠(0.662g的脱氧胆酸钠))在该步骤中加入。

[0195] 利用夹钳抓住含有脂质和胆汁酸的烧杯,用铝箔覆盖烧杯,并使脂质在加热的油浴中于140 $^{\circ}\text{C}$ 至145 $^{\circ}\text{C}$ 熔化,其间在烧杯中不时搅动。

[0196] 在该阶段,通过将抗原与浓缩的磷酸盐缓冲液(15ml WFI无菌水中的5.174g Na_2HPO_4 和1.179g NaH_2PO_4)混合,从而制备抗原储液。抗原储液在无菌的1L SS器皿中以8000rpm均质化。通过无菌玻璃漏斗将熔化的脂质(含有或不含胆汁酸)快速转移至SS器皿中,同时继续使溶液均质化。该混合物以8000rpm均质化10分钟。将所得悬液转移至1L的无菌瓶中,并于30 $^{\circ}\text{C}$ 至35 $^{\circ}\text{C}$ 以220rpm振摇1~2小时。

[0197] 在某些实施方案中,将所得悬液分成两份等体积(每份225ml),并如下所述加入佐剂poly(IC:LC)。

[0198] 对于第一组,通过将22.5mL Poly(IC:LC)悬液(45mg Poly(IC:LC),2mg/ml)与100mM磷酸盐缓冲液中的202.5ml 400mM蔗糖溶液混合,从而制备400mM蔗糖溶液中的Poly(IC:LC)。将所得悬液加入第一225ml体积的抗原/囊泡悬液中,并于30 $^{\circ}\text{C}$ 至35 $^{\circ}\text{C}$ 以220rpm振摇5分钟。

[0199] 对于第二组,通过将7.5mL Poly(IC:LC)悬液(15mg Poly(IC:LC),2mg/ml)与100mM磷酸盐缓冲液中的217.5ml 400mM蔗糖溶液混合,从而制备400mM蔗糖溶液中的Poly(IC:LC)。将所得悬液加入第二225ml体积的抗原/囊泡悬液中,并于30°C至35°C以220rpm振摇5分钟。

[0200] 接着将样品于-80°C冷冻过夜。在某些实施方案中,随后将样品冻干并储存于4°C。

[0201] 实施例10:用于制备囊泡的反向两步融化法

[0202] 本实施例描述了可以用于制备囊泡的示例性反向两步融化法。将5:4:1摩尔比率的脂质(496g 1-单棕榈酰基甘油(MPG)、496g胆固醇(CHO)和164g二鲸蜡醇磷酸酯(DCP))置于平底玻璃烧杯中,确保无粉末沾到玻璃烧杯侧壁上。使TLR-4激动剂与脂质(例如12mgPHAD™(Avanti Polar Lipids的磷酸化六酰基二糖))共融化。夹住烧杯并用铝箔覆盖,并使脂质在加热的油浴中于120~125°C融化,其间在烧杯中不时搅动。

[0203] 在该阶段,通过将抗原与浓缩的磷酸盐缓冲液(20ml无菌水中的5.980g Na₂HPO₄和1.363g NaH₂PO₄)混合,从而制备抗原储液。抗原储液于30~35°C以8,000rpm均质化,并将熔化的脂质和TLR-4激动剂快速转移至烧杯中,同时使溶液均质化。该混合物以8000rpm继续均质化10分钟。所得悬液于30~35°C以220±10rpm振摇1~2小时。

[0204] 在一些实施方案中,可以将水中的蔗糖溶液加入囊泡/抗原溶液中,并于30~35°C以220±10rpm振摇5分钟。

[0205] 接着将样品于-80°C冷冻过夜。在某些实施方案中,随后将样品冻干并储存于4°C。

[0206] 通过引用并入

[0207] 本文中提及之任何参考文献的内容均通过引用整体并入本文。

[0208] 其它实施方案

[0209] 本说明书和实施例旨在仅用于举例说明。考虑到本文公开的说明书或所述方法的实施、制剂和试剂盒,其它实施方案对于本领域技术人员来说将是显而易见的。

[0210] 特别地,虽然前述讨论关注于抗原的包封,然而应理解,一般来讲,所述方法可以用于包封任何抗原性或非抗原性物质。因此,在一些实施方案中,本公开内容的方法可用于包封抗原性或非抗原性的一种或更多种多肽、多核苷酸或多糖。特定类型的物质包括但不限于佐剂、酶、受体、神经递质、激素、细胞因子、细胞应答调节剂(例如生长因子和趋化因子)、抗体、半抗原、毒素、干扰素、核酶、反义试剂、质粒、DNA和RNA。在一些实施方案中,所述多肽可以是抗体或抗体片段,例如人源化抗体。表4提供了能够利用本公开内容方法包封之示例性物质的非限制性列表。

[0211] 表4

[0212]

物质	参考药物
干扰素 γ -1b	Actimmune [®]
艾特普酶 (alteplase)	Activase [®] /Cathflo [®]
抗血友病因子	Advate
人白蛋白	Albutein [®]
α -L-艾杜糖醛酸酶 (laronidase)	Aldurazyme [®]
干扰素 α -n3	Alferon N [®]
人抗血友病因子	Alphanate [®]
病毒经过滤的人凝血因子IX	AlphaNine [®] SD
阿法赛特 (alefacept)	Amevive [®]
比伐卢定 (bivalirudin)	Angiomax [®]
阿法达贝汀 (darbepoetin alfa)	Aranesp [™]
贝伐单抗 (bevacizumab)	Avastin [™]
干扰素 β -1a	Avonex [®]
凝血因子IX	BeneFix [™]
干扰素 β -1b	Betaseron [®]
托西莫单抗 (tositumomab)	Bexxar [®]
抗血友病因子	Bioclote [™]
人生长激素	BioTropin [™]
A型肉毒杆菌毒素	Botox [®]
阿来组单抗 (alemtuzumab)	Campath [®]
阿克雷托单抗 (acritumomab); 经镓-99标记	CEA-Scan [®]
糖脑苷酶	Ceredase [®]
葡糖苷脂酰鞘氨醇酶类似物	Cerezyme [®]
响尾蛇科多价免疫Fab	CroFab [™]
地高辛免疫Fab	DigiFab [™]
拉布立酶 (rasburicase)	Elitek [®]
益赛普 (etanercept)	Enbrcl [®]
α 促红细胞生成素 (epoietin alfa)	Epogen [®]
西妥昔单抗 (cetuximab)	Erbix [™]
半乳糖苷酶 β (algalidase beta)	Fabrazyme [®]
尿促卵泡激素 (urofollitropin)	Fertinex [™]
促滤泡素 β (follitropin beta)	Follistim [™]
特立帕肽 (teriparatide)	Forteo [®]
人促生长素	GenoTropin [®]
胰高血糖素	GlucaGen [®]
促滤泡素 α (follitropin alfa)	Gonal-F [®]
抗血友病因子	Helixate [®]
因子 XIII	Hemofil [®]
胰岛素	Humalog [®]
抗血友病因子/冯·维勒布兰德因子复合物-人	Humate-P [®]
促生长素 (somatotropin)	Humatrope [®]
阿达木单抗 (adalimumab)	Humira [™]
人胰岛素	Humulin [®]
重组人透明质酸酶	Hylenex [™]
干扰素 α 1facon-1	Infergen [®]

[0213]

物质	参考药物
依替巴肽 (eptifibatide)	Integrilin TM
α 干扰素	Intron A [®]
帕利夫明 (palifermin)	Kepivance
阿那白滞素 (anakinra)	Kineret TM
抗血友病因子	Kogenate [®] FS
苜精胰岛素 (insulin glargine)	Lantus [®]
粒细胞巨噬细胞集落刺激因子	Leukine [®]
促黄体素 α , 注射用	Luveris
雷珠单抗 (ranibizumab)	Lucentis [®]
奥吉妥单抗 (gemtuzumab ozogamicin)	Mylotarg TM
加硫酶 (galsulfase)	Naglazyme TM
奈西利肽 (nesiritide)	Natrecor [®]
聚乙二醇非格司亭 (pegfilgrastim)	Neulasta TM
奥普瑞白介素 (oprelvekin)	Neumega [®]
非格司亭 (filgrastim)	Neupogen [®]
法索单抗 (fanolesomab)	NeuroSpec TM
促生长激素 (somatropin)	Norditropin [®] /Norditropin Nordiflex [®]
胰岛素; 锌混悬液	Novolin L [®]
胰岛素; 低精蛋白混悬液	Novolin N [®]
胰岛素, 常规	Novolin R [®]
胰岛素	Novolin [®]
凝血因子VIIa	NovoSeven [®]
促生长激素	Nutropin [®]
免疫球蛋白, 静脉内	Octagam [®]
聚乙二醇化L-天冬酰胺酶	Oncaspar [®]
阿巴西普 (abatacept)	Orencia TM
莫罗单抗-CD3 (muromomab-CD3)	Orthoclone OKT3 [®]
人绒毛膜促性腺激素	Ovidrel [®]
聚乙二醇化干扰素 α -2a	Pegasys [®]
聚乙二醇化干扰素 α -2b	PEG-Intron TM
阿巴瑞克 (abarelix)	Plenaxis TM
α 促红细胞生成素 (epoietin alfa)	Procrit [®]
阿地白介素 (aldesleukin)	Proleukin, IL-2 [®]
人蛋氨酸生长素 (somatrem)	Protropin [®]
阿法链道酶 (dornase alfa)	Pulmozyme [®]
依法利珠单抗 (efalizumab)	Raptiva TM
干扰素 β -1a	Rebif [®]
抗血友病因子	Recombinate [®]
rAHF/抗血友病因子	ReFacto [®]
来匹卢定 (lepirudin)	Refludan [®]
英夫利西单抗 (infliximab)	Remicade [®]
阿昔单抗 (abciximab)	ReoPro TM
瑞替普酶 (reteplase)	Retavase TM
利妥昔单抗 (rituximab)	Rituxan TM
干扰素 α -2a	Roferon-A [®]
促生长激素	Saizen [®]

[0214]

物质	参考药物
合成猪分泌素	SecreFlo™
巴利昔单抗 (basiliximab)	Simulect®
艾库组单抗 (eculizumab)	Soliris®
培维索孟 (pegvisomant)	Somavert®
帕利珠单抗 (palivizumab)	Synagis™
促甲状腺素 α	Thyrogen®
替奈普酶 (tencetplase)	TNKase™
那他珠单抗 (natalizumab)	Tysabri®
干扰素 α -n1	Wellferon®
奇格瑞 α (drotrecogin alfa)	Xigris™
奥马珠单抗 (omalizumab)	Xolair®
达克珠单抗 (daclizumab)	Zenapax®
替伊莫单抗 (ibritumomab tiuxetan)	Zevalin™
促生长素	Zorbtive™ (Serostim®)

[0215] 此外,尽管认为本公开内容的方法特别适用于对其化学和/或物理环境敏感的不耐热物质(例如生物物质,例如微生物、多肽、多核苷酸、多糖等),然而应理解,在一些实施方案中,所述方法还可用于包封较稳定的物质,包括传统的小分子治疗剂。

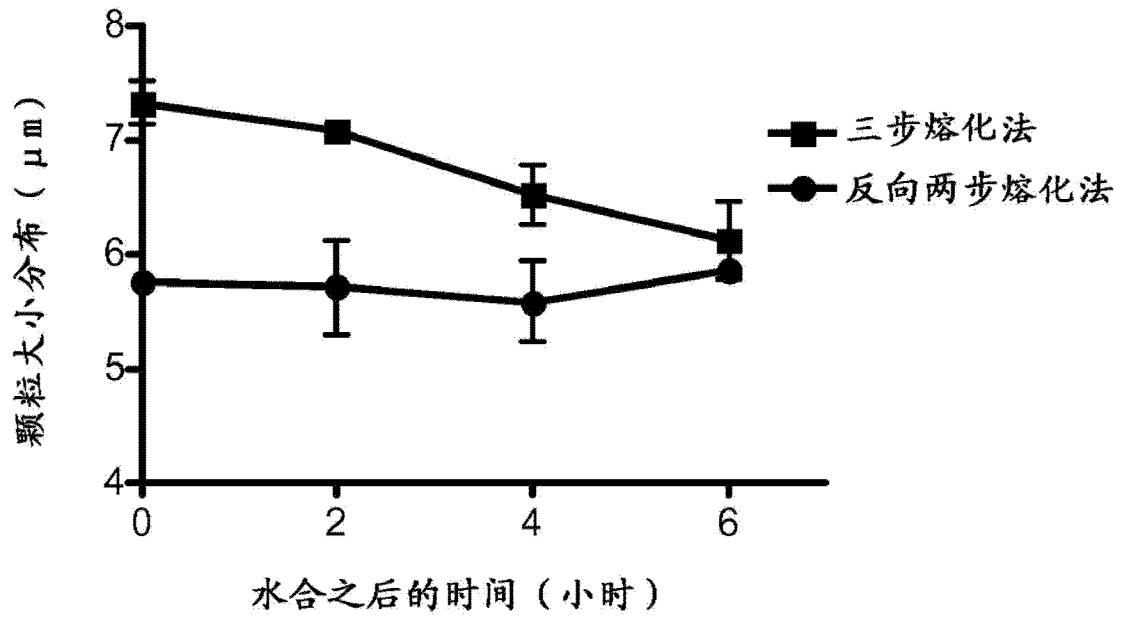


图1

针对甲型肝炎病毒抗原的抗体应答

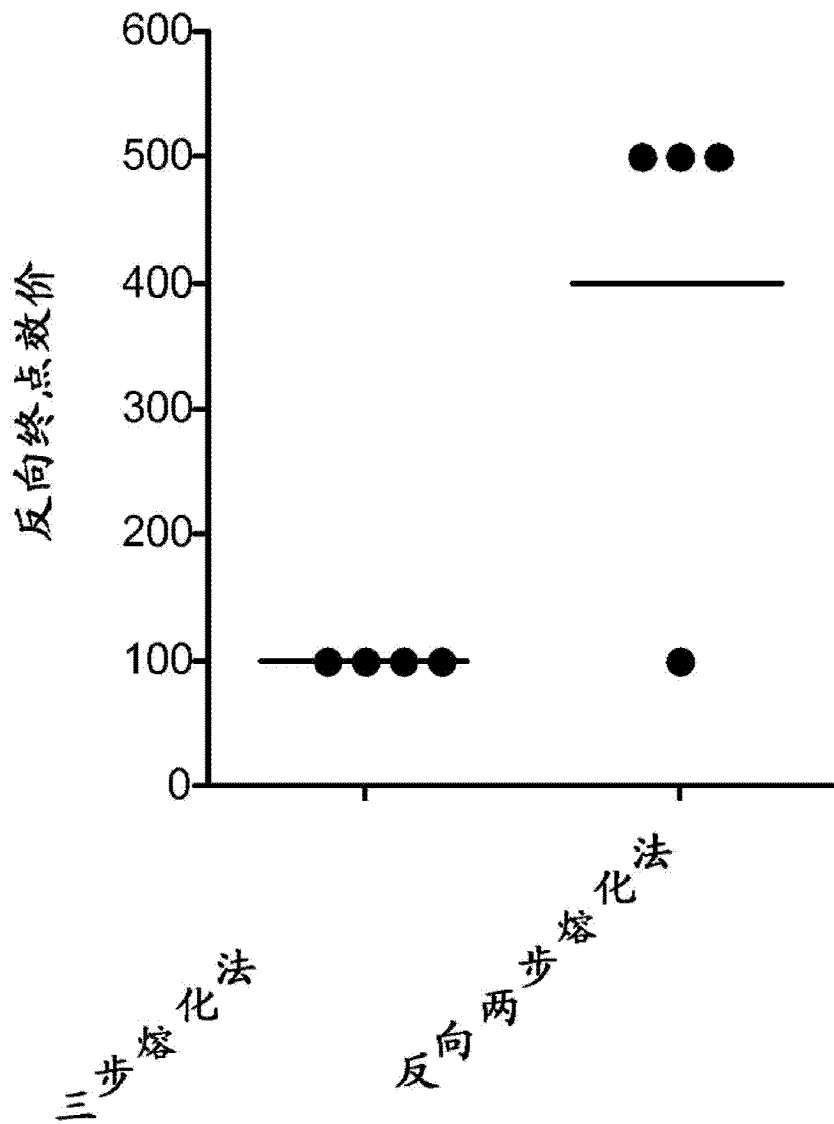


图2

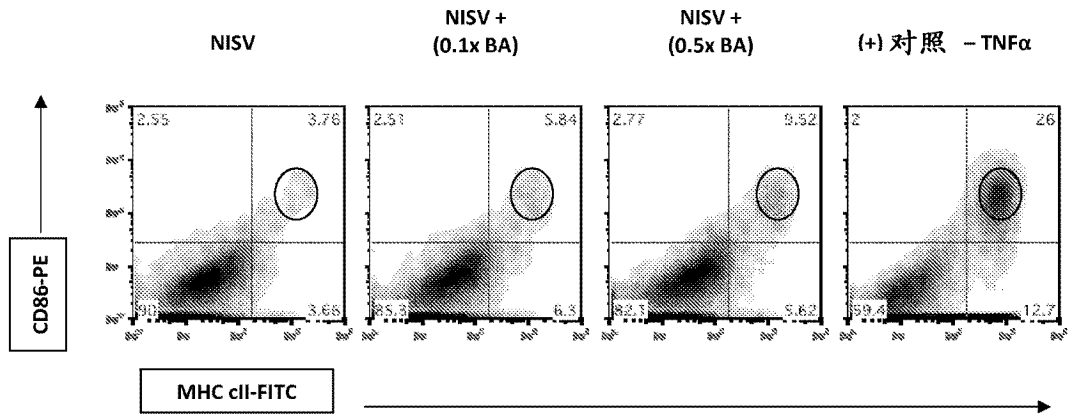


图3

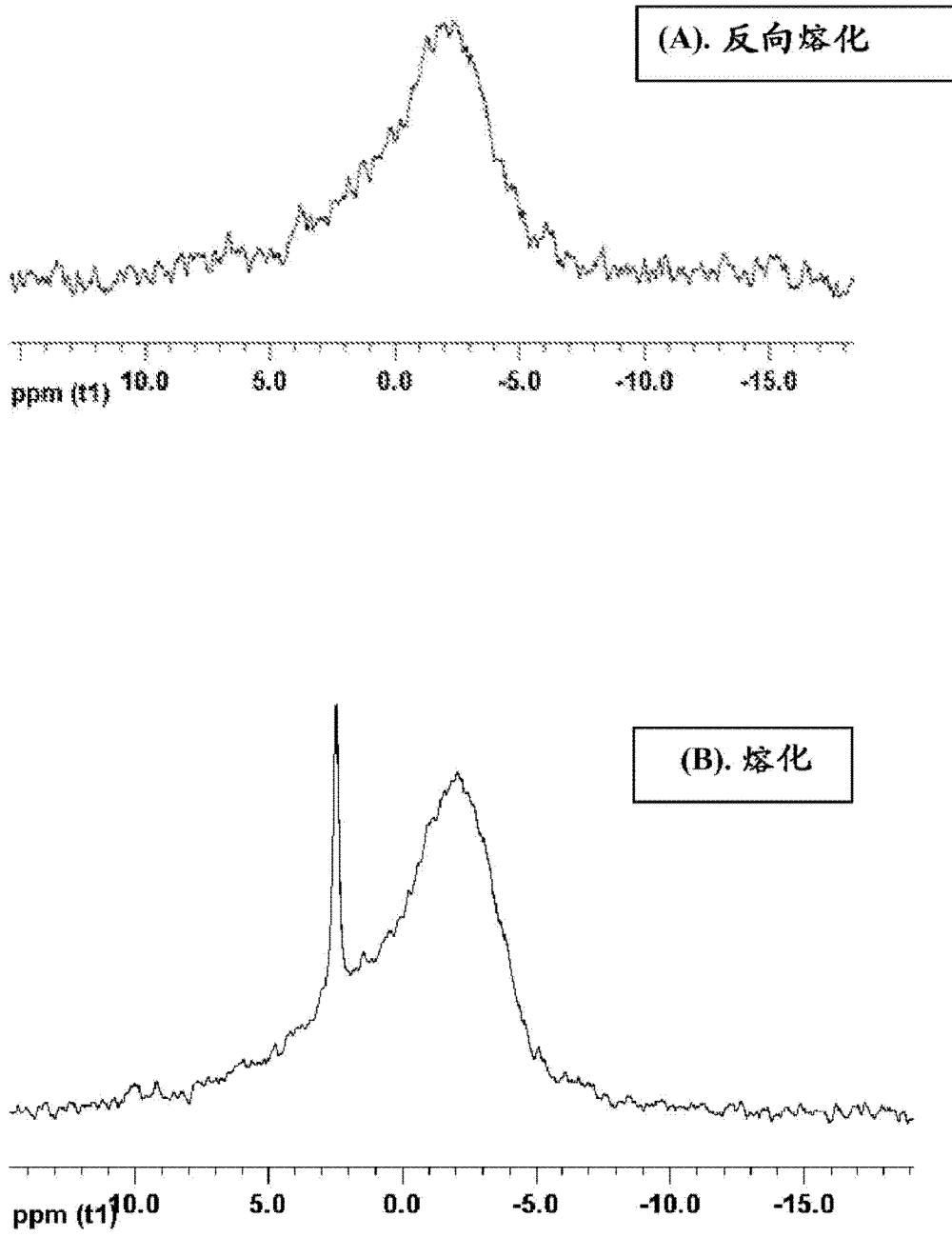


图4