



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103781469 B

(45) 授权公告日 2015. 09. 16

(21) 申请号 201280010464. X

A61K 39/00(2006. 01)

(22) 申请日 2012. 02. 23

A61P 35/00(2006. 01)

(30) 优先权数据

A61P 37/04(2006. 01)

61/446, 332 2011. 02. 24 US

A61P 35/02(2006. 01)

61/470, 449 2011. 03. 31 US

A61K 39/395(2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

(56) 对比文件

2013. 08. 26

US 20060069238 A1, 2006. 03. 30, 摘要, 实施例, 权利要求, 说明书附图 1、2.

(86) PCT国际申请的申请数据

US 7820627 B2, 2010. 10. 26, 摘要, 权利要求, 实施例.

PCT/US2012/026385 2012. 02. 23

(87) PCT国际申请的公布数据

审查员 丁伟

W02012/116225 EN 2012. 08. 30

(73) 专利权人 肿瘤防护公司

地址 美国华盛顿州

(72) 发明人 斯科特·彼得森 杰弗里·米勒德

桑迪·科佩诺尔 琳达·佩斯塔诺

戴安娜·F·豪斯曼

罗伯特·L·科克曼

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理

有限公司 11262

代理人 高瑜 杨淑媛

(51) Int. Cl.

A61K 9/127(2006. 01)

权利要求书3页 说明书75页

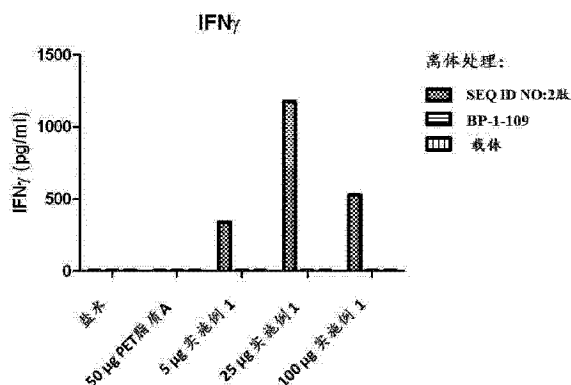
序列表9页 附图8页

(54) 发明名称

含有佐剂的以 MUC1 为基础的糖脂肽疫苗

(57) 摘要

本文提供用于免疫疗法和 / 或癌症治疗的脂质体糖脂肽疫苗制剂, 其包含佐剂和免疫原。



1. 一种脂质体疫苗制剂,其包含:

(a) 以下结构的糖脂肽:

$\text{H}_2\text{N-TSAPDT (Tn) RPAPGS (Tn) T (Tn) APPAHGVTSAPDT (Tn) RPAPGS (Tn) T (Tn)}$
 APPAHGVS*S*L-OH

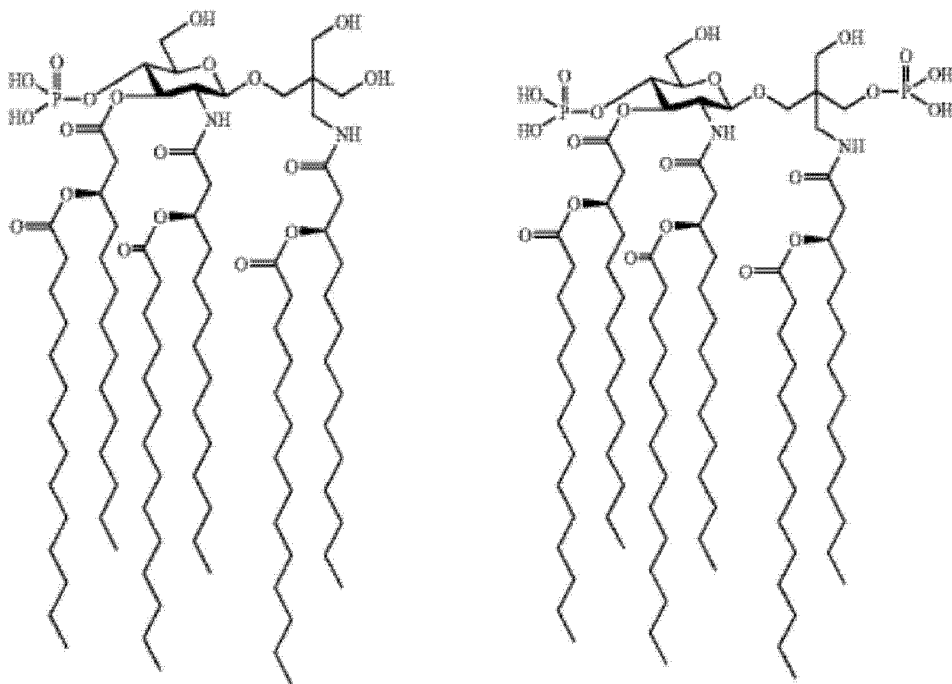
SEQ ID NO:2

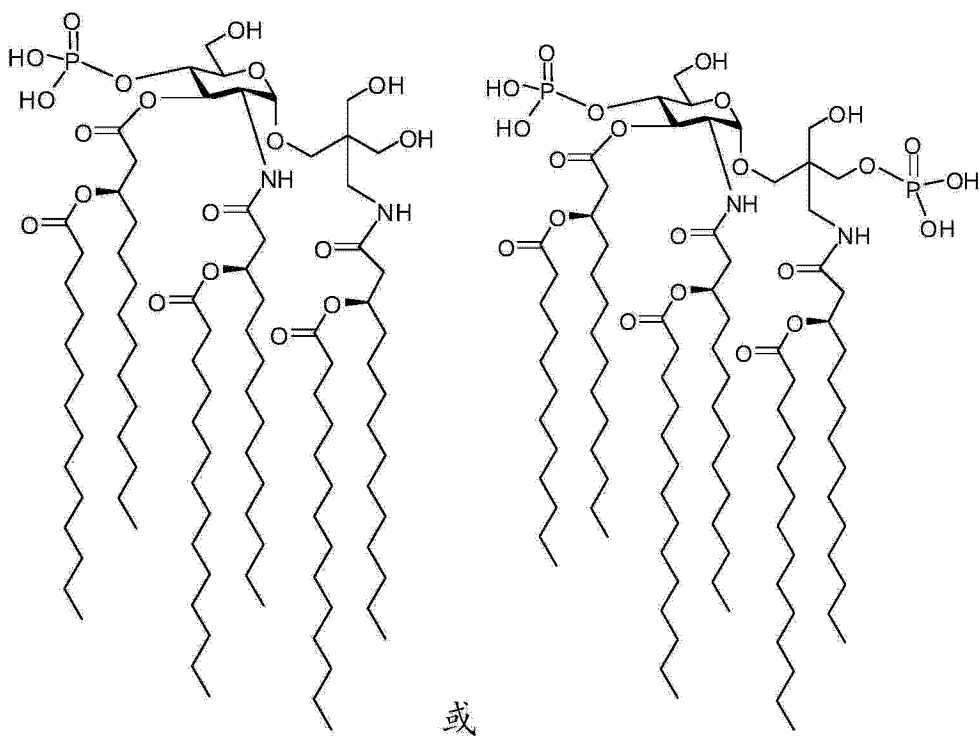
其中

Tn 在每次出现时独立地表示共价连接到丝氨酸或苏氨酸残基的 α -N-乙酰半乳糖胺 (GalNAc α 1);且

* 在每次出现时独立地表示共价连接到丝氨酸残基的 C14 脂质;

(b) 以下结构的佐剂:





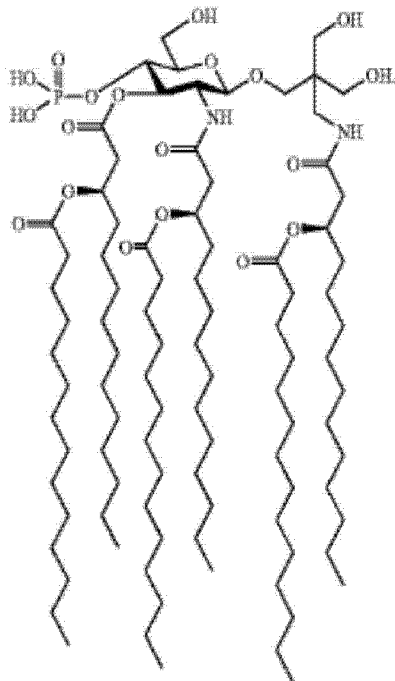
或其药学上可接受的盐；和

(c) 载体脂质；

其中 (a) 与 (b) 的重量 / 重量比为 10:1 至 1:10。

2. 如权利要求 1 所述的制剂, 其中所述 C14 脂质为肉豆蔻酰基链。

3. 如权利要求 1 所述的制剂, 其中所述佐剂是



或其药学上可接受的盐。

4. 如权利要求 3 所述的制剂, 其中所述佐剂是药学上可接受的三乙胺盐。

5. 如权利要求 1 所述的制剂, 其中所述载体脂质选自 DMPG、DPPC 或其药学上可接受的盐或其组合。

6. 如权利要求 1 所述的制剂,其进一步包含胆固醇。
7. 如权利要求 1 所述的制剂,其中所述制剂被冻干。
8. 如权利要求 1 所述的制剂,其中所述制剂被冻干并被进一步重建。

含有佐剂的以 MUC1 为基础的糖脂肽疫苗

[0001] 交叉参考

[0002] 本申请要求于 2011 年 2 月 24 日提交的美国临时申请第 61/446,332 号以及于 2011 年 3 月 31 日提交的美国临时申请第 61/470,449 号的权益,各申请以全文引入本文中作为参考。

[0003] 序列表

[0004] [0001.1] 本申请含有经 EFS-Web 提交的 ASCII 格式的序列表,该序列表由此以引用方式完整并入。所述 ASCII 副本创建于 2012 年 2 月 23 日,命名为 34395PCT.txt,大小为 7,683 字节。

背景技术

[0005] 癌症的免疫疗法会指引免疫系统识别肿瘤相关抗原并攻击癌细胞。

发明内容

[0006] 本文提供免疫原性疫苗制剂,其利用免疫系统来治疗恶性肿瘤。在一些实施方案中,本文所述的免疫治疗性制剂会引起抗原特异性 B- 细胞和 / 或 T- 细胞应答。在一些实施方案中,本文所述的疫苗制剂包含合成抗原,该合成抗原会引起识别肿瘤相关抗原并攻击癌细胞的免疫应答。本文所述的免疫原性疫苗制剂加强了现有癌症治疗方案的效力。

[0007] 本文提供脂质体疫苗制剂,其包含:

[0008] (a) 肽,其包含至少两个拷贝的核心串联重复:

[0009] TSAPDTRPAPGSTAPPAHGV, (SEQ ID NO:1)

[0010] 或与 SEQ ID NO:1 至少 85% 相同的序列,或其线性排列;

[0011] 其中

[0012] S 和 T 在每次出现时都独立地任选地被癌症相关的糖表位 Te 取代;

[0013] (b) 共价连接到 (a) 的脂肽,其具有通式:

[0014] $H_2N-(aa_1)*(aa_2)*(aa_3)-OH$

[0015] 其中

[0016] aa_1 在每次出现时独立地选自 S、T、K、R 或 C;

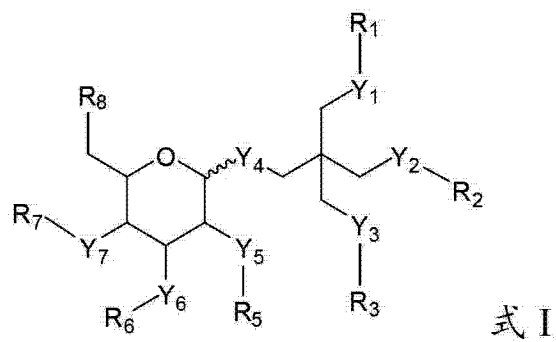
[0017] aa_2 在每次出现时独立地选自 S、T、K、R 或 C;

[0018] aa_3 在每次出现时独立地选自 L 或 G;

[0019] * 在每次出现时独立地表示共价连接到氨基酸残基的脂质;

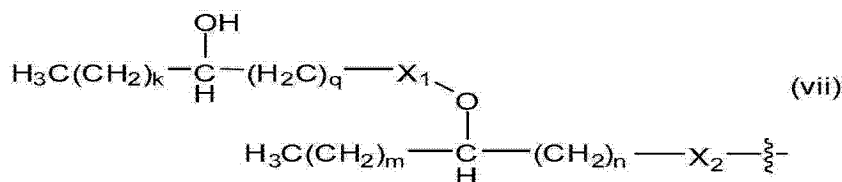
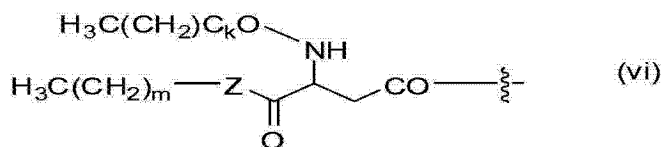
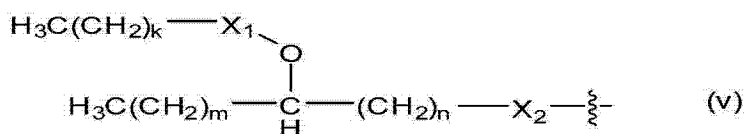
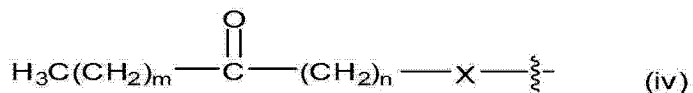
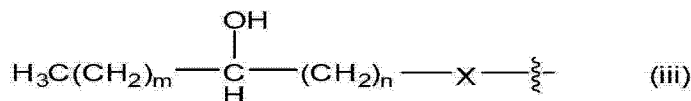
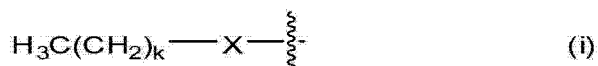
[0020] (c) 式 I 的佐剂或其药学上可接受的盐;

[0021]

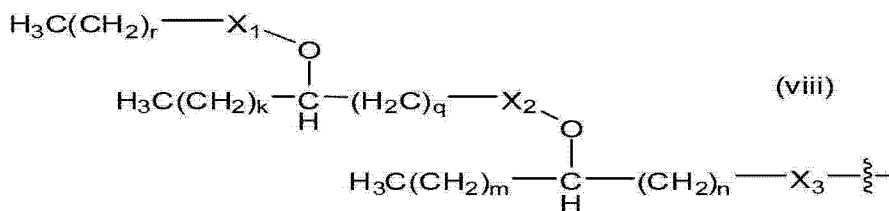


[0022] 其中 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的至少一个为选自下组的强亲脂性基团：

[0023]



和



[0024] 其中 X、X₁、X₂和 X₃独立地为 -CO- 或 -CH₂-；

[0025] Z 为 -NH- 或 -O-；

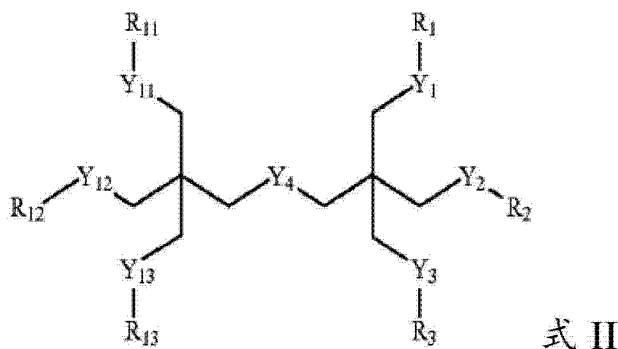
[0026] k、m 和 r 独立地为 0 至 30 的整数(包含 0 和 30)，

[0027] n 和 q 独立地为 0 至 6 的整数(包含 0 和 6)；

[0028] 其中 Y₄为选自 -O-、-S- 和 -NH- 的间隔基，其中 Y₁R₁、Y₂R₂、Y₃R₃、Y₅R₅、Y₆R₆和 Y₇R₇中的至少一个为单价磷酸等效物(MPE)，

[0029] 其中每个单价磷酸等效物独立地为

- [0030] (a) $-R' -C(O)OH$, 其中 R' 是取代或未取代的 1-4 个碳的烷基, 或
- [0031] (b) 独立地选自 $-OB(OH)OR$ 、 $-OP(O)(OH)OR$ 、 $-OS(O)(O)(OH)OR$ 和 $-OP(=O)(OH)-O-P(=O)(OH)OR$,
- [0032] 其中 R 是氢或取代或未取代的 1-4 个碳的烷基, 并且如
- [0033] 果 R 是取代的烷基, 则该取代基是 $-OH$ 或 $-NH_2$,
- [0034] 其中 R_8 选自 H 、 OH 、 OR_9 、与 Y_8 组合形成如先前所定义的单价磷酸等效物的部分, 及如上所定义的基团 (i)-(viii); 其中 R_9 为 1 至 10 个碳长度的烷基或酰基; 且
- [0035] 其中该糖苷键是 α 或 β ;
- [0036] 或者
- [0037] 式 II 的佐剂或其药学上的盐;
- [0038]



- [0039] 其中 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_{11} 、 R_{12} 和 R_{13} 中的至少一个为选自上述 (i)-(viii) 的强亲脂性基团;
- [0040] 其中 Y_4 为选自 $-O-$ 、 $-S-$ 和 $-NH-$ 的间隔基, 并且
- [0041] 其中 Y_1R_1 、 Y_2R_2 、 Y_3R_3 、 $Y_{11}R_{11}$ 、 $Y_{12}R_{12}$ 和 $Y_{13}R_{13}$ 中的至少一个独立地为如先前所定义的单价磷酸等效物;
- [0042] 其中下列限制适用于上述的 (I) 以及 (II):
- [0043] Y_1 、 Y_2 、 Y_3 、 Y_5 、 Y_6 、 Y_7 、 Y_{11} 、 Y_{12} 和 Y_{13} 为独立地选自 $-O-$ 、 $-S-$ 和 $-NH-$ 的间隔基;
- [0044] R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_{11} 、 R_{12} 和 R_{13} 独立地为氢、与共同编号的 Y 基团形成如先前所定义的单价磷酸等效物的部分, 或
- [0045] 选自上述 (i)-(viii) 的强亲脂性基团;
- [0046] 所述化合物的强亲脂性基团共同提供至少两个主要碳链, 且
- [0047] 所述强亲脂性基团的主要碳链共同提供至少 30 个碳原子; 和
- [0048] (d) 一种或多种载体脂质。
- [0049] 在一些实施方案中, 该制剂为冻干的粉剂、干燥的薄膜或干燥的粉剂。在一些实施方案中, 该制剂为冻干的粉剂。在一些实施方案中, 该疫苗制剂为水中的悬浮液、乳液或油中的悬浮液。在一些实施方案中, 该制剂为水中的悬浮液。在一些实施方案中, 该制剂进一步包含叔丁醇。
- [0050] 在一些实施方案中, 该核心串联重复序列与 (a) 中的序列具有至少 90% 的同源性。在一些实施方案中, 该核心串联重复序列与 (a) 中的序列具有至少 95% 的同源性。
- [0051] 在一些实施方案中, 该载体脂质选自双肉豆蔻酰磷脂酰甘油 (DMPG)、双棕榈酰磷

脂酰胆碱(DPPC)、磷脂酰胆碱(PC;卵磷脂)、磷脂酸(PA)、磷脂酰甘油(PG)、磷脂酰乙醇胺(PE)、磷脂酰丝氨酸(PS)。其他适合的磷脂进一步包括双硬脂酰基磷脂酰胆碱(DSPC)、双肉豆蔻酰磷脂酰胆碱(DMPC)、双棕榈酰磷脂酰甘油(DPPG)、双硬脂酰基磷脂酰甘油(DSPG)、双棕榈酰磷脂酸(DPPA)、双肉豆蔻酰磷脂酸(DMPA)、双硬脂酰基磷脂酸(DSPA)、双棕榈酰磷脂酰丝氨酸(DPPS)、双肉豆蔻酰磷脂酰丝氨酸(DMPS)、双硬脂酰基磷脂酰丝氨酸(DSPS)、双棕榈酰磷脂酰乙醇胺(DPPE)、双肉豆蔻酰磷脂酰乙醇胺(DMPE)、双硬脂酰基磷脂酰乙醇胺(DSPE)或其药学上可接受的盐或其组合。

[0052] 在一些实施方案中,该载体脂质选自双肉豆蔻酰磷脂酰甘油(DMPG)、双棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)或其药学上可接受的盐或其组合。

[0053] 在一些实施方案中,该制剂还包含胆固醇。

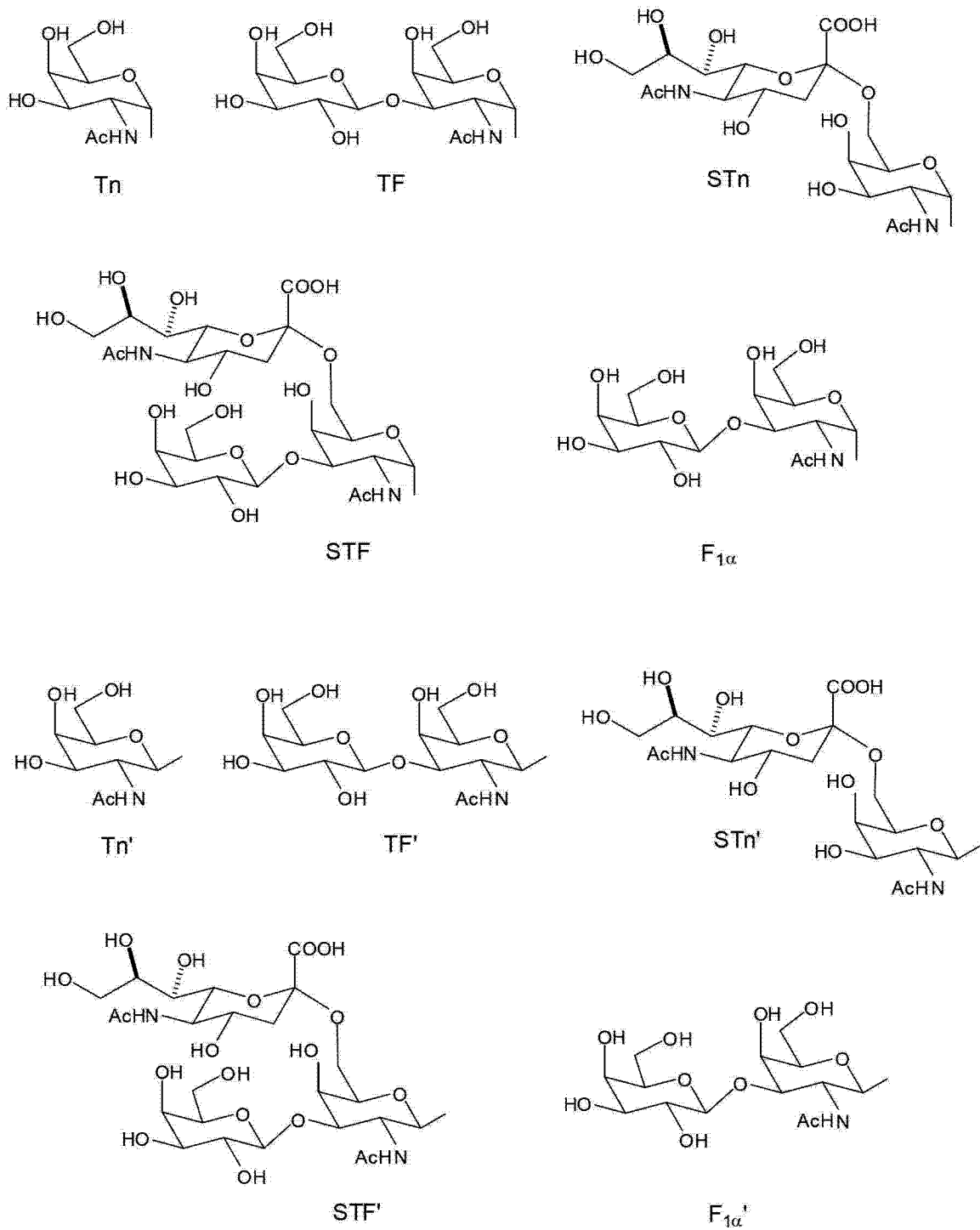
[0054] 在一些实施方案中,该共价连接到氨基酸残基的脂质在每次出现时独立地选自肉豆蔻酰基、棕榈酰基、月桂基、硬脂酰基、癸酰基和辛酰基链或其组合。在一些实施方案中,共价连接到氨基酸残基的脂质在每次出现时独立地为肉豆蔻酰基链。

[0055] 在一些实施方案中,(b) 连接到 (a) 的羧基末端。在一些实施方案中,(b) 连接到 (a) 的氨基末端。

[0056] 在一些实施方案中,(a)+(b) 和 (c) 的重量 (a)+(b): 重量 (c) 比例为约 1:10 至约 10:1。在一些实施方案中,(a)+(b) 和 (c) 的重量 (a)+(b): 重量 (c) 比例为约 1:5 至约 5:1。在一些实施方案中,(a)+(b) 和 (c) 的重量 (a)+(b): 重量 (c) 比例为约 1:2 至约 2:1。

[0057] 在一些实施方案中,Te 在每次出现时独立地选自

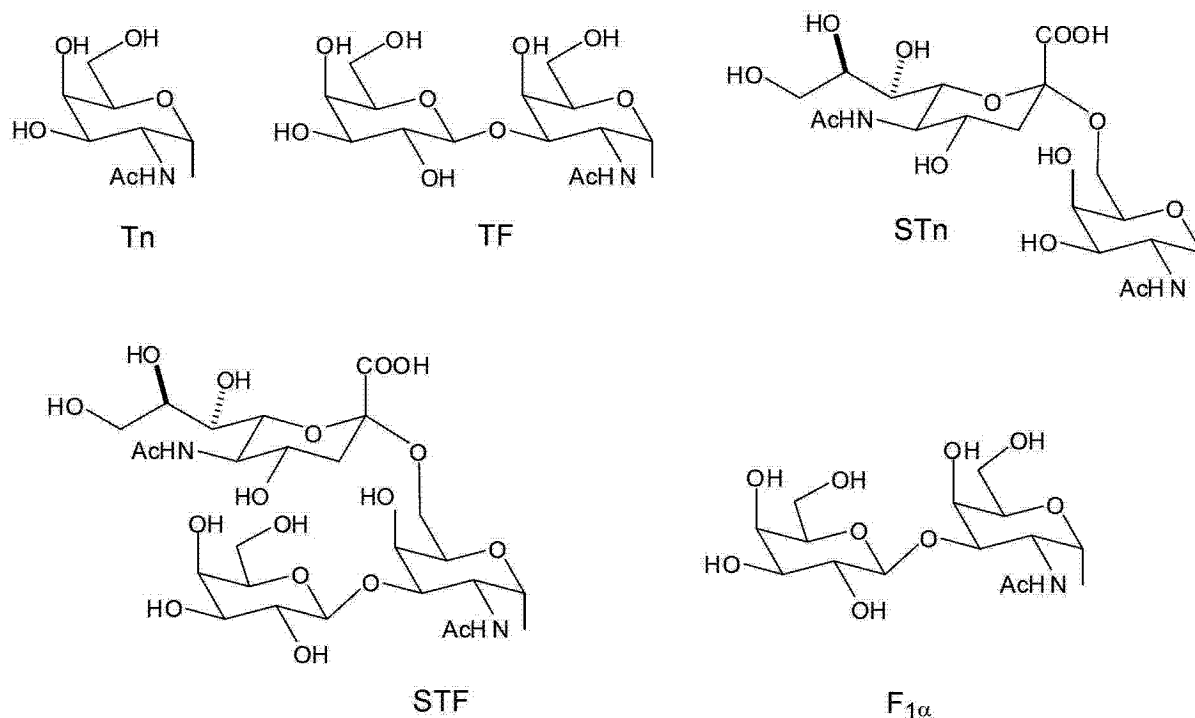
[0058]



[0059] 和 T- 半抗原。

[0060] 在一些实施方案中，Te 在每次出现时独立地选自

[0061]



[0062] 和 T- 半抗原。

[0063] 在一些实施方案中,肽被至少一个癌症相关的糖 Te 所取代。在一些实施方案中,该肽被至少两个 Te 所取代。在一些实施方案中,该肽被至少三个 Te 所取代。在一些实施方案中,该肽被至少四个 Te 所取代。在一些实施方案中,该肽被至少五个 Te 所取代。在一些实施方案中,该肽被至少六个 Te 所取代。在一些实施方案中,该肽被至少七个 Te 所取代。在一些实施方案中,该肽被至少八个 Te 所取代。在一些实施方案中,该肽被至少九个 Te 所取代。在一些实施方案中,该肽被至少十个 Te 所取代。

[0064] 在一些实施方案中,佐剂为式 I 化合物或其药学上可接受的盐。在一些实施方案中,该佐剂为式 II 化合物或其药学上可接受的盐。

[0065] 在一些实施方案中, Y₄ 是 -S-。在一些实施方案中, Y₄ 是 -NH-。在一些实施方案中, Y₄ 是 -O-。

[0066] 在一些实施方案中,至少一个强亲脂性基团符合 (i),并且对于至少一个这样的基团, k 为 4-30 的整数。在一些实施方案中,至少一个强亲脂性基团符合 (ii),并且对于至少一个这样的基团, 2k+3n 为 4-30 的整数。在一些实施方案中,至少一个强亲脂性基团符合 (iii),并且对于至少一个这样的基团, m+n+1 是 4-30。在一些实施方案中,至少一个强亲脂性基团符合 (iv),并且对于至少一个这样的基团, m+n+1 是 4-30。在一些实施方案中,至少一个强亲脂性基团符合 (v),并且对于至少一个这样的基团, m+n+k+1 是 4-30。在一些实施方案中,至少一个强亲脂性基团符合 (vi),并且对于至少一个这样的基团, k+m+2 是 4-30。在一些实施方案中,至少一个强亲脂性基团符合 (vii),并且对于至少一个这样的基团, k+q+m+n 是 4-30。在一些实施方案中,至少一个强亲脂性基团符合 (viii),并且对于至少一个这样的基团, r+k+q+m+n 是 5-30。

[0067] 在一些实施方案中, Y₁、Y₂、Y₃、Y₄、Y₅、Y₆、Y₇、Y₁₁、Y₁₂ 和 Y₁₃ 独立地为 -O- 或 -NH-。在一些实施方案中, Y₁、Y₂、Y₃、Y₄、Y₅、Y₆ 和 Y₇ 独立地为 -O- 或 -NH-。在一些实施方案中, Y₁、

Y_2 、 Y_3 、 Y_4 、 Y_{11} 、 Y_{12} 、 Y_{13} 独立地为 $-O-$ 或 $-NH-$ 。

[0068] 在一些实施方案中, Y_4 是 $-O-$ 。在一些实施方案中, 每个单磷酸等效物是 $-OP(O)(OH)(OH)$ 。

[0069] 在一些实施方案中, 式 I 的佐剂为一种化合物, 其中

[0070] Y_4 为 $-O-$;

[0071] Y_1 、 Y_2 和 Y_7 为 $-O-$;

[0072] Y_3 、 Y_5 和 Y_6 独立地为 $-O-$ 或 $-NH-$;

[0073] R_1 、 R_3 、 R_5 和 R_6 独立地为氢或选自 (i)-(viii) 的强亲脂性基团;

[0074] R_1 、 R_3 、 R_5 和 R_6 中的至少一个不是氢;

[0075] R_2 和 R_7 独立地选自 H 、 $-P(O)(OH)_2$ 、 $-SO_3H$ 、 $-P(O)(OH)(OCH_2CH_2NH_2)$ 和 $-CH_2COOH$; 且

[0076] R_8 选自 H 、 OH 、 OSO_3H 和 OR_9 , 其中 R_9 是 1 至 10 个碳长度的烷基或酰基。

[0077] 在一些实施方案中, 式 I 的佐剂为一种化合物, 其中

[0078] Y_4 为 $-O-$;

[0079] Y_2 和 Y_{12} 为 $-O-p$;

[0080] Y_1 、 Y_3 、 Y_{11} 和 Y_{13} 独立地选自 $-O-$ 、 $-NH-$ 和 $-S-$;

[0081] R_1 、 R_3 、 R_{11} 和 R_{13} 独立地为氢或选自 (i)-(viii) 的强亲脂性基团;

[0082] R_1 、 R_3 、 R_5 和 R_6 中的至少一个不是氢; 且

[0083] R_2 和 R_{12} 独立地选自 H 、 $-P(O)(OH)_2$ 、 $-P(O)(OH)(OCH_2CH_2NH_2)$ 和 $-CH_2COOH$ 。

[0084] 在一些实施方案中, R_1 、 R_3 、 R_5 和 R_6 独立地为氢或选自 (i)-(viii) 的强亲脂性基团, R_1 、 R_3 、 R_5 和 R_6 中的至少一个不是氢, 且 R_2 和 R_7 独立地选自 H 、 $-P(O)(OH)_2$ 、 $-SO_3H$ 、 $-P(O)(OH)(OCH_2CH_2NH_2)$ 和 $-CH_2COOH$; 且 R_8 选自 H 、 OH 、 OSO_3H 和 OR_9 , 其中 R_9 是 1 至 10 个碳长度的烷基或酰基。

[0085] 在一些实施方案中, R_1 、 R_3 、 R_{11} 和 R_{13} 独立地为氢或选自 (i)-(viii) 的强亲脂性基团; R_1 、 R_3 、 R_5 和 R_6 中的至少一个不是氢; 且 R_2 和 R_{12} 独立地选自 H 、 $-P(O)(OH)_2$ 、 $-P(O)(OH)(OCH_2CH_2NH_2)$ 和 $-CH_2COOH$ 。

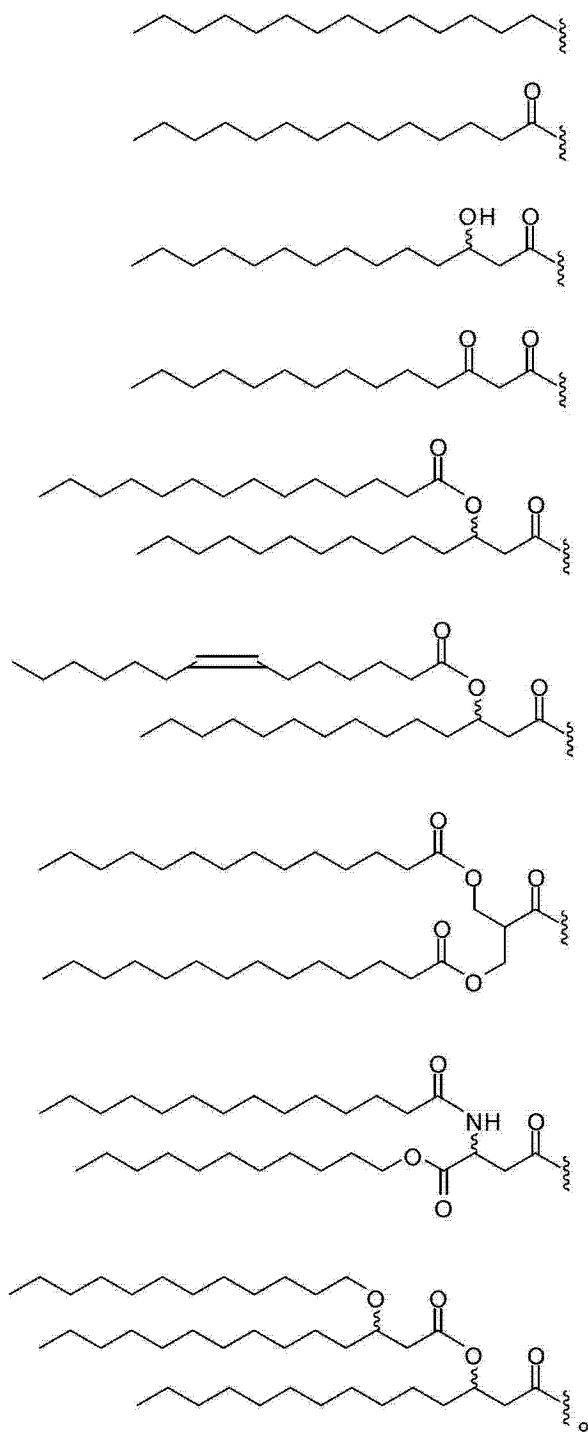
[0086] 在一些式 I 的实施方案中, 每个单磷酸等效物为

[0087] $-OP(O)(OH)(OH)$ 。在一些式 II 的实施方案中, 每个单磷酸等效物为 $-OP(O)(OH)(OH)$ 。

[0088] 在一些实施方案中, 所述化合物的强亲脂性基团共同提供至少三个主要碳链, 且其中所述强亲脂性基团的主要碳链共同提供至少 40 个碳原子, 所述佐剂具有免疫刺激活性。在一些实施方案中, 所述化合物的强亲脂性基团共同提供至少四个主要碳链, 且其中该主要碳链共同提供至少 50 个碳原子, 所述佐剂具有免疫刺激活性。在一些实施方案中, 该强亲脂性基团共同提供六个主要碳链。在一些实施方案中, 每个主要碳链的特征在于所述链中有 10、12、14、16、18 或 20 个碳原子。

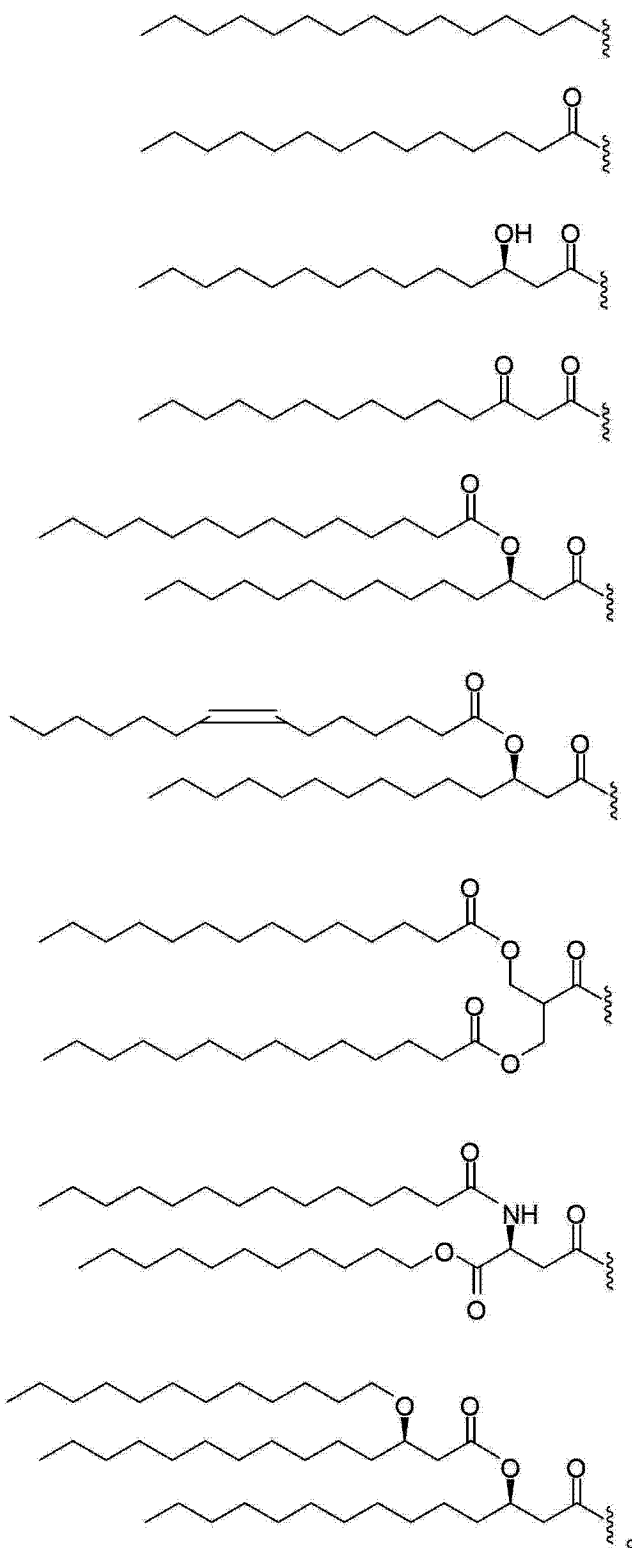
[0089] 在一些实施方案中, 至少一个强亲脂性基团为以下所列结构中的一种:

[0090]



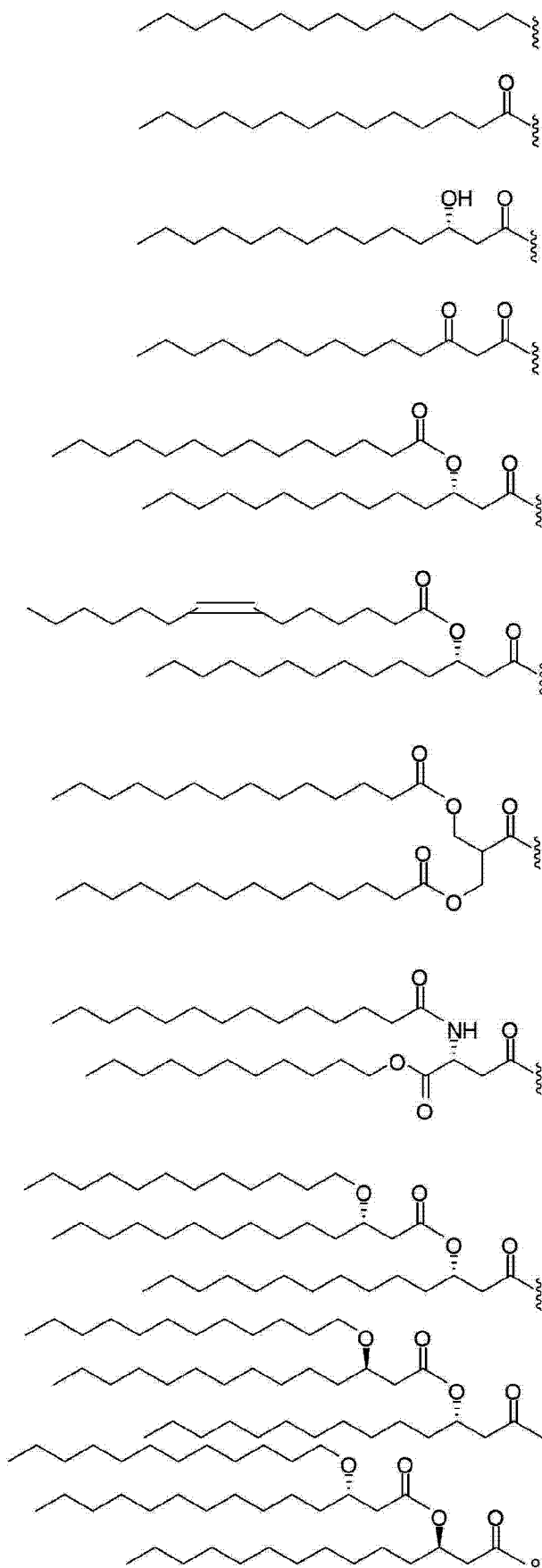
[0091] 在一些实施方案中,该至少一个强亲脂性基团包含 R 对映异构体。在一些实施方案中,该至少一个强亲脂性基团包含 S 对映异构体。在一些实施方案中,该至少一个强亲脂性基团是外消旋物。在一些实施方案中,该至少一个强亲脂性基团包含 RR、RS、SR 或 SS 非对映异构体。所有外消旋物、对映异构体或非对映异构体均被涵盖在本文所提出的实施方案的范围内。在一些实施方案中,该至少一个强亲脂性基团为以下所列结构中的一种:

[0092]



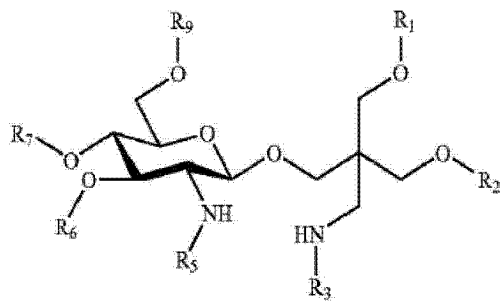
[0093] 在一些实施方案中,该至少一个强亲脂性基团为以下所列结构中的一种:

[0094]



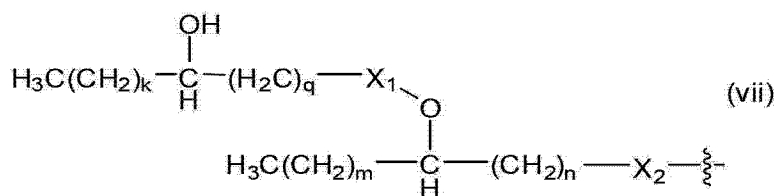
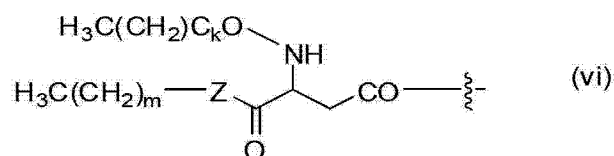
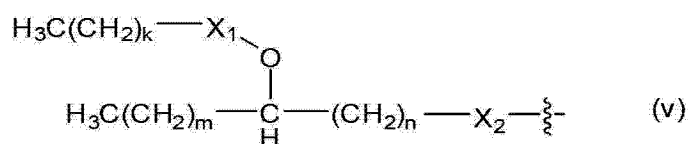
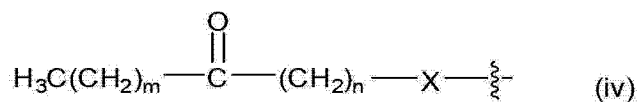
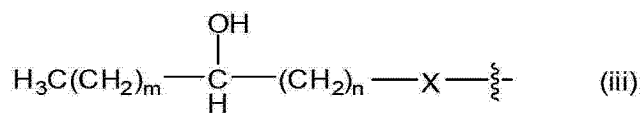
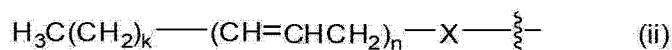
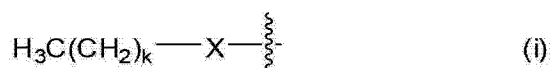
[0095] 在一些实施方案中,式 I 的佐剂是 PET 脂质 A 的类似物。在一些实施方案中,式 I 的佐剂具有以下结构:

[0096]

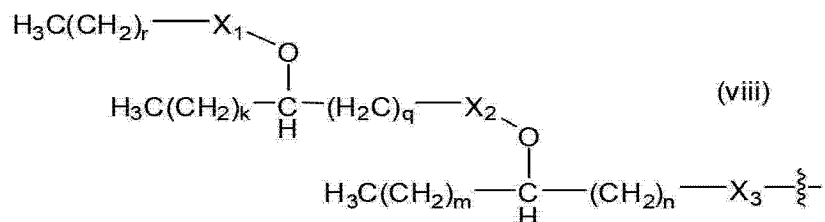


[0097] 其中 R₁、R₃、R₅和 R₆独立地为氢或选自下组的亲脂性基团：

[0098]



和



[0099] 其中 X、X₁、X₂和 X₃独立地为 -CO- 或 -CH₂-；

[0100] Z 为 -NH- 或 -O-；

[0101] k、m 和 r 独立地为 0 至 30 的整数(包含 0 和 30)，

[0102] n 和 q 独立地为 0 至 6 的整数(包含 0 和 6)；

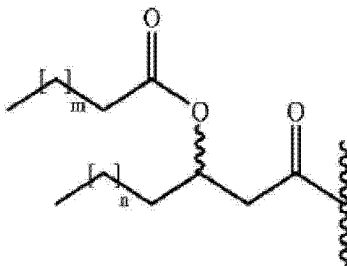
[0103] R₁、R₃、R₅和 R₆中的至少一个不是氢；

[0104] R_2 和 R_7 独立地选自 H 、 $-P(O)(OH)_2$ 、 $-SO_3H$ 、 $-P(O)(OH)(OCH_2CH_2NH_2)$ 和 $-CH_2COOH$ ；且

[0105] R_9 是 H 或1至10个碳长度的烷基或酰基。

[0106] 在一些实施方案中， R_1 和 R_9 为氢； R_2 为氢或膦酰基 $-P(O)(OH)_2$ ； R_7 是膦酰基 $-P(O)(OH)_2$ ；且 R_3 、 R_5 和 R_6 为相同或不同的具有下列结构的酰基

[0107]

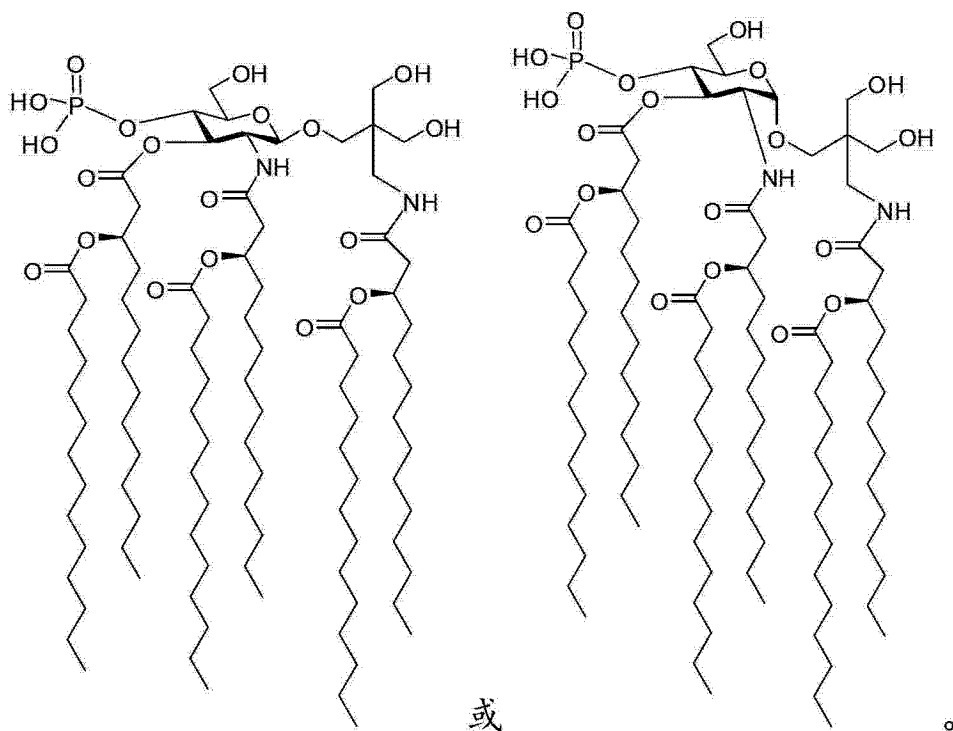


[0108] 其中 m 和 n 独立地选自6至10之间的整数(包含6和10)。

[0109] 在一些实施方案中， R_3 、 R_5 和 R_6 是相同的。

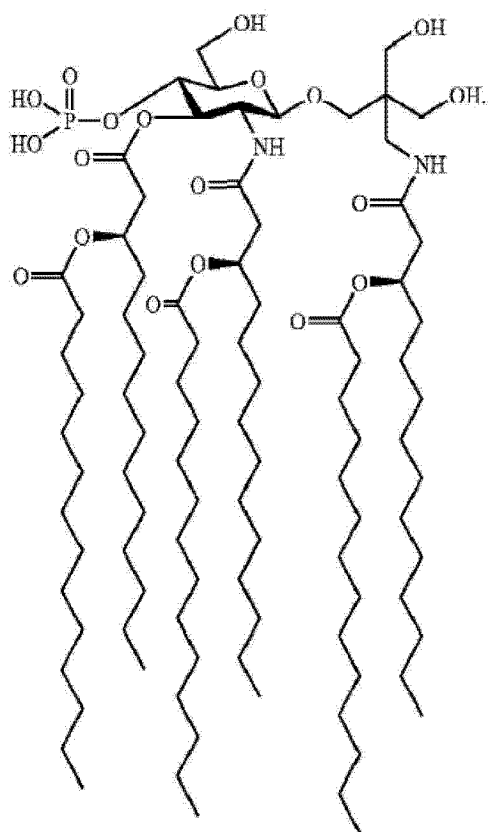
[0110] 在一些实施方案中，佐剂具有以下所列结构中的一种：

[0111]



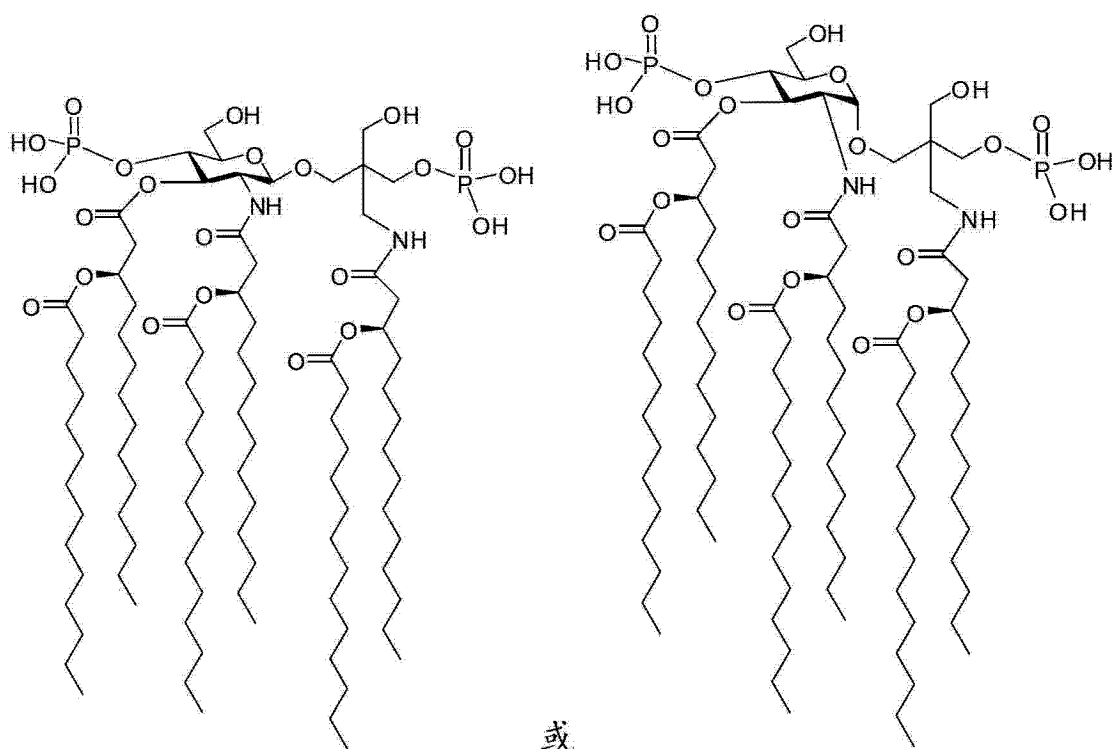
[0112] 在一些实施方案中，佐剂具有下列结构

[0113]



[0114] 在一些实施方案中,佐剂具有以下所列结构中的一种:

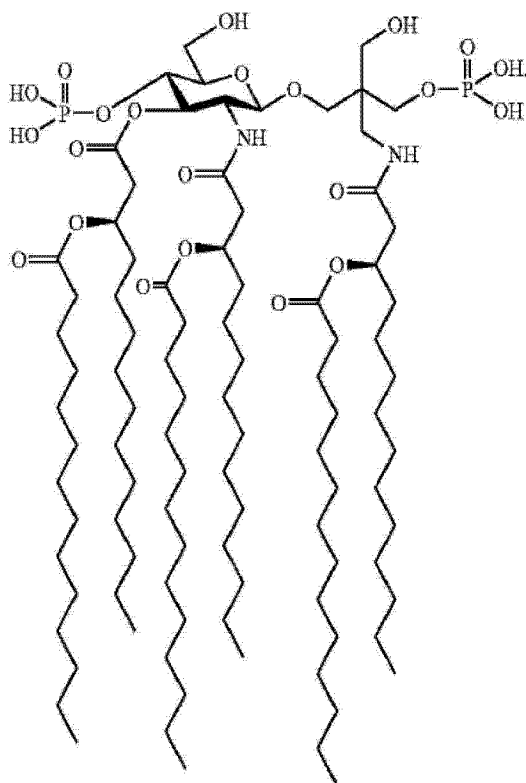
[0115]



或

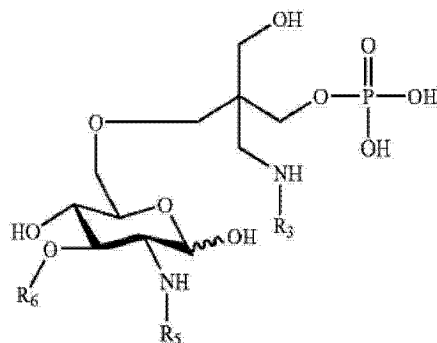
[0116] 在一些实施方案中,佐剂具有下列结构

[0117]



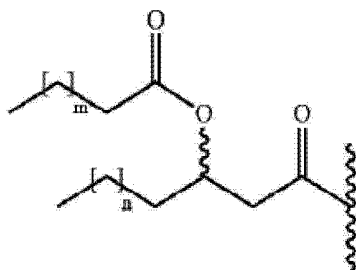
[0118] 在一些实施方案中,佐剂具有下列结构:

[0119]



[0120] 其中 R_3 、 R_5 和 R_6 为相同或不同的具有下列结构的取代基

[0121]



[0122] 其中 m 和 n 独立地选自 6 至 10 之间的整数(包含 6 和 10)。

[0123] 在一些上述的实施方案中,佐剂是三乙胺盐、三乙醇胺盐或铵盐。在一些上述的实施方案中,佐剂是三乙胺盐。在一些上述的实施方案中,佐剂是 PET 脂质 A 类似物的三乙胺盐。

[0124] 在一些上述的实施方案中, a 包含

[0125] $H_2N-TSAPDT(Tn)RPAPGS(Tn)T(Tn)APPAHGVTSAPDT(Tn)RPAPGS(Tn)T(Tn)APPAHGVSS*L-OH$ (SEQ ID NO:2), 其中 Tn 表示 GalNAc α 1。

[0126] 在一些上述的实施方案中, 脂质体疫苗制剂包含:

[0127] (a) 肽, 其包含至少两个拷贝的核心串联重复:

[0128] $T(Te)S(Te)APDT(Te)RPAPGS(Te)T(Te)APPAHGV$, SEQ ID NO:18 或与 SEQ ID NO:18 至少 85% 相同的序列, 或其线性排列;

[0129] 其中

[0130] Te 表示癌症相关的糖表位;

[0131] (b) 共价连接到 (a) 的脂肽, 其具有通式:

[0132] $H_2N-S*S*L-OH$

[0133] 其中

[0134] * 在每次出现时独立地表示共价连接到丝氨酸残基的脂质。

[0135] 在一些上述的实施方案中, 疫苗制剂包含:

[0136] (a) 肽, 其包含至少两个拷贝的核心串联重复:

[0137] $TSAPDT(Te)RPAPGS(Te)T(Te)APPAHGV$, SEQ ID NO:19 或与 SEQ ID NO:19 至少 85% 相同的序列, 或其线性排列;

[0138] 其中

[0139] Te 表示癌症相关的糖表位;

[0140] (b) 共价连接到 (a) 的脂肽, 其具有通式:

[0141] $H_2N-S*S*L-OH$

[0142] 其中

[0143] * 在每次出现时独立地表示共价连接到丝氨酸残基的脂质。

[0144] 在一些实施方案中, 该制剂包含 SEQ ID NO:18 或 SEQ ID NO:19 的核心串联重复序列的 2-10 个串联重复。在一些实施方案中, 该制剂包含 SEQ ID NO:18 或 SEQ ID NO:19 的核心串联重复序列的 2-5 个串联重复。在一些实施方案中, 该制剂包含 SEQ ID NO:18 或 SEQ ID NO:19 的核心串联重复序列的 2 个串联重复。

[0145] 在一些这样的实施方案中, 该制剂是冻干的粉剂、干燥的薄膜或干燥的粉剂。在一些这样的实施方案中, 该制剂是冻干的粉剂。在一些这样的实施方案中, 该疫苗制剂是水中的悬浮液、乳液或油中的悬浮液。在一些实施方案中, 该制剂是水中的悬浮液。在一些这样的实施方案中, 该制剂进一步包含叔丁醇。

[0146] 在一些这样的实施方案中, 核心串联重复序列与如上述或本文的任何实施方案中所述的 (a) 中序列有至少 90% 的同源性。在一些这样的实施方案中, 核心串联重复序列与如上述或本文的任何实施方案中所述的 (a) 中序列有至少 95% 的同源性。

[0147] 在一些这样的实施方案中, 载体脂质选自双肉豆蔻酰磷脂酰甘油 (DMPG)、双棕榈酰磷脂酰胆碱 (DPPC)、磷脂酰胆碱 (PC; 卵磷脂)、磷脂酸 (PA)、磷脂酰甘油 (PG)、磷脂酰乙醇胺 (PE)、磷脂酰丝氨酸 (PS)。其他适合的磷脂进一步包括双硬脂酰基磷脂酰胆碱 (DSPC)、双肉豆蔻酰磷脂酰胆碱 (DMPC)、双棕榈酰磷脂酰甘油 (DPPG)、双硬脂酰基磷脂酰甘油 (DSPG)、双棕榈酰磷脂酸 (DPPA)、双肉豆蔻酰磷脂酸 (DMPA)、双硬脂酰基磷脂酸

(DSPA)、双棕榈酰磷脂酰丝氨酸(DPPS)、双肉豆蔻酰磷脂酰丝氨酸(DMPS)、双硬脂酰基磷脂酰丝氨酸(DSPS)、双棕榈酰磷脂酰乙醇胺(DPPE)、双肉豆蔻酰磷脂酰乙醇胺(DMPE)、双硬脂酰基磷脂酰乙醇胺(DSPE),或其药学上可接受的盐,或其组合。

[0148] 在一些这样的实施方案中,载体脂质选自双肉豆蔻酰磷脂酰甘油(DMPG)、双棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)或其药学上可接受的盐或其组合。

[0149] 在一些这样的实施方案中,共价连接到氨基酸残基的脂质在每次出现时独立地选自肉豆蔻酰基、棕榈酰基、月桂基、硬脂酰基、癸酰基和辛酰基链或其组合。

[0150] 在一些这样的实施方案中,该制剂进一步包含胆固醇。

[0151] 在一些这样的实施方案中,共价连接到丝氨酸残基的脂质在每次出现时独立地为肉豆蔻酰基链。

[0152] 在一些这样的实施方案中,(b) 连接到 (a) 的羧基末端。在一些这样的实施方案中,(b) 连接到 (a) 的氨基末端。

[0153] 在一些这样的实施方案中,(a)+(b) 和 (c) 的重量 (a)+(b): 重量 (c) 比例为约 1:10 至约 10:1。在一些这样的实施方案中,(a)+(b) 和 (c) 的重量 (a)+(b): 重量 (c) 比例为约 1:5 至约 5:1。在一些这样的实施方案中,(a)+(b) 和 (c) 的重量 (a)+(b): 重量 (c) 比例为约 1:2 至约 2:1。

[0154] 在一些实施方案中,Te 是 Tn,其中 Tn 表示 GalNAc α 1。

[0155] 在一些实施方案中,本文提供脂质体疫苗制剂,其包含:

[0156] (a) 以下结构的糖脂肽:

[0157] $\text{H}_2\text{N-TSAPDT (Tn) RPAPGS (Tn) T (Tn) APPAHGVTSAPDT (Tn) RPAPGS (Tn) T (Tn) APPAHGVS*S*L-OH}$

[0158] SEQ ID NO:2

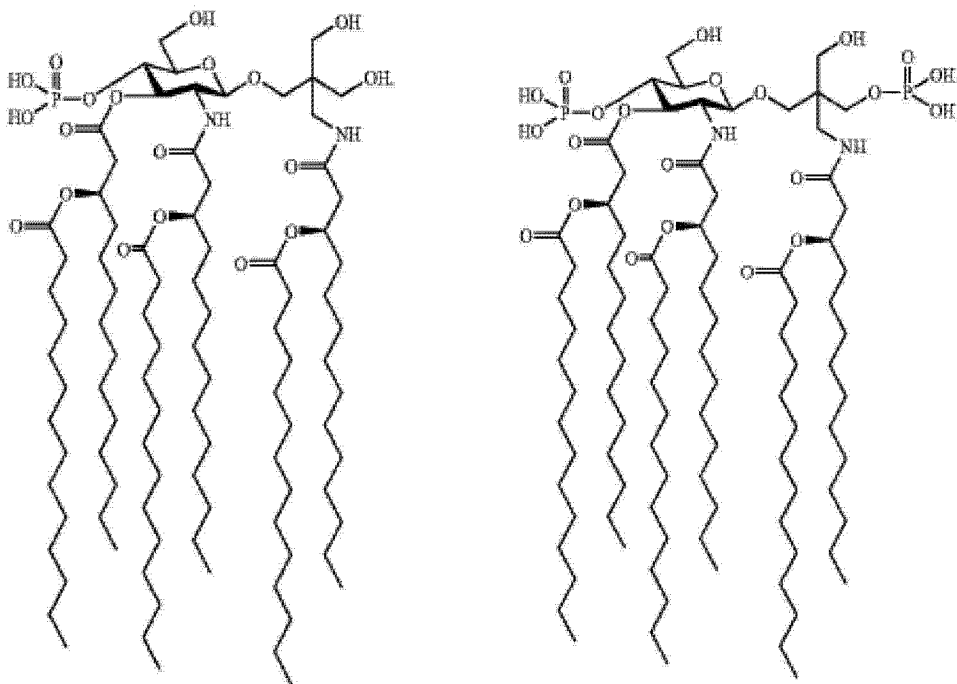
[0159] 其中

[0160] Tn 表示 GalNAc α 1 ;且

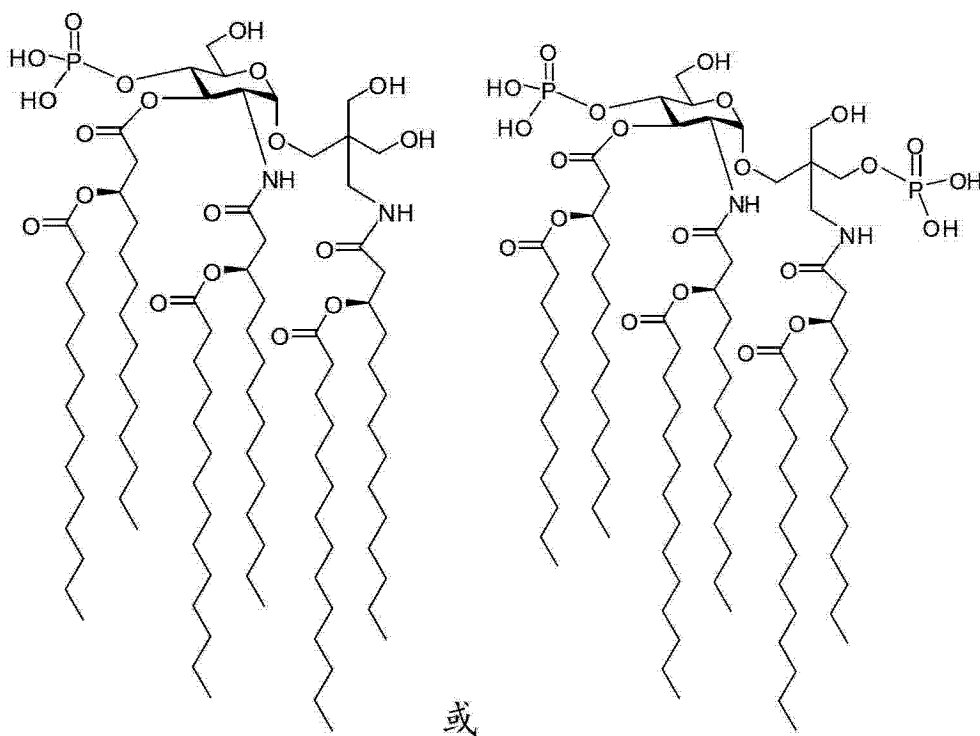
[0161] * 在每次出现时独立地表示共价连接到丝氨酸残基的 C14 脂质;

[0162] (b) 以下结构的佐剂:

[0163]



[0164]

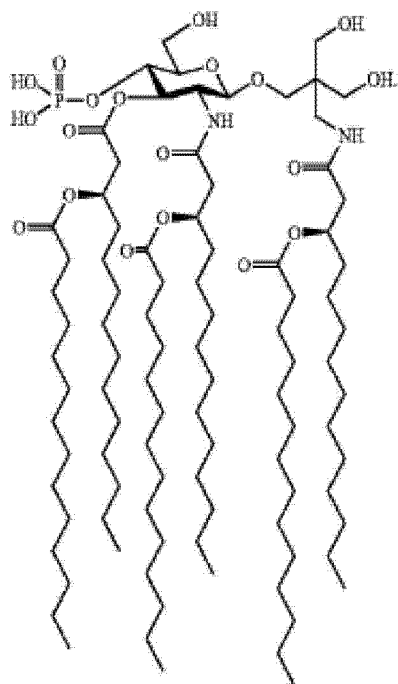


[0165] 或其药学上可接受的盐 ;和

[0166] (c) 载体脂质。

[0167] 在一些实施方案中, C14 脂质是肉豆蔻酰基链。

[0168] 在一些实施方案中, 佐剂为



[0169]

或其药学上可接受的盐。

[0170] 在一些实施方案中,药学上可接受的盐为三乙胺盐。

[0171] 在一些实施方案中,载体脂质选自 DMPG、DPPC 或其药学上可接受的盐或其组合。在一些实施方案中,脂质体疫苗制剂进一步包含胆固醇。

[0172] 在任何上述的实施方案中,该制剂包含一个或多个 MUC1 表位。在任何上述的实施方案中,脂质体具有 90% (d90) ≤ 约 0.25 μm 的直径总体分布(diameter population distribution)。在任何上述的实施方案中,脂质体具有 90% (d90) ≤ 约 0.22 μm 的直径总体分布。在任何上述的实施方案中,脂质体具有 90% (d90) ≤ 约 0.20 μm 的直径总体分布。

[0173] 在另一方面,本文提供脂质体疫苗制剂,其包含:

[0174] (a) 肽,其包含至少两个拷贝的核心串联重复:

[0175] TSAPDTRPAPGSTAPPAHGV, (SEQ ID NO:1)

[0176] 或与 SEQ ID NO:1 至少 85% 相同的序列,或其线性排列;

[0177] 其中

[0178] S 和 T 在每次出现时独立地任选地被癌症相关的糖表位 Te 取代;

[0179] (b) 共价连接到 (a) 的脂肽,其具有通式:

[0180] $H_2N-(aa_1)*(aa_2)*(aa_3)-OH$

[0181] 其中

[0182] aa_1 在每次出现时独立地选自 S、T、K、R 或 C;

[0183] aa_2 在每次出现时独立地选自 S、T、K、R 或 C;

[0184] aa_3 在每次出现时独立地选自 L 或 G;

[0185] * 在每次出现时独立地表示共价连接到氨基酸残基的脂质;

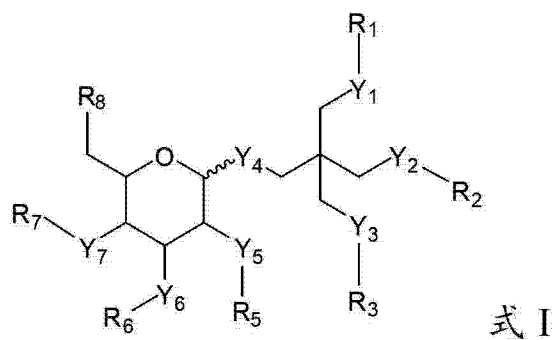
[0186] (c) 佐剂;和

[0187] (d) 一种或多种载体脂质。

[0188] 在一些实施方案中,佐剂选自 CpG 寡脱氧核苷酸(ODN)、皂苷、TLR-9 激动剂或脂质 A 类似物或其药学上可接受的盐或其组合。

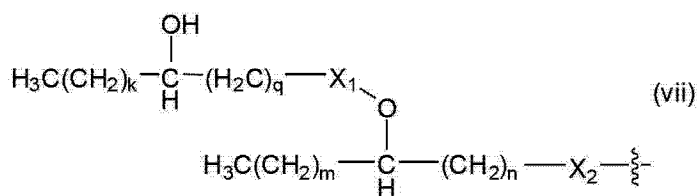
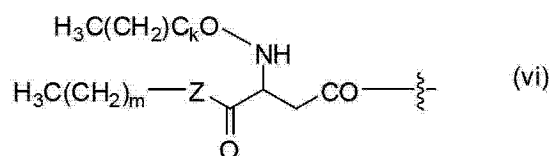
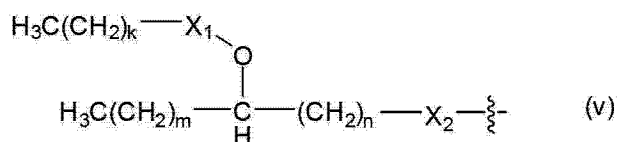
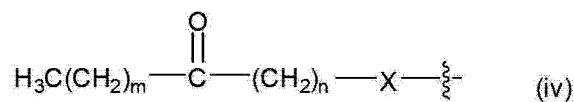
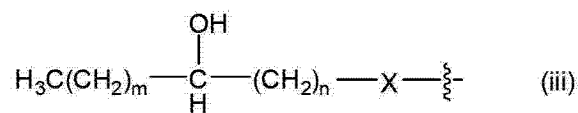
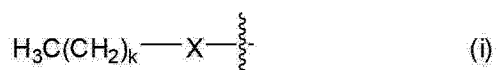
[0189] 在一些实施方案中,脂质 A 类似物是式 I 的佐剂或其药学上可接受的盐:

[0190]

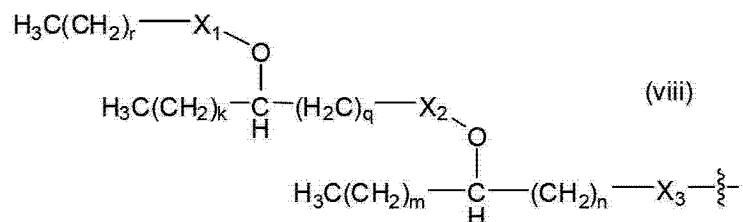


[0191] 其中 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的至少一个为选自下组的强亲脂性基团

[0192]



和



[0193] 其中 X、X₁、X₂和 X₃独立地为 -CO- 或 -CH₂-；

[0194] Z 为 -NH- 或 -O；

[0195] k、m 和 r 独立地为 0 至 30 的整数(包含 0 和 30)，

[0196] n 和 q 独立地为 0 至 6 的整数(包含 0 和 6)；

[0197] 其中 Y₄是选自 -O-、-S- 和 -NH- 的间隔基，

[0198] 其中 Y_1R_1 、 Y_2R_2 、 Y_3R_3 、 Y_5R_5 、 Y_6R_6 和 Y_7R_7 中的至少一个为单价磷酸等效物 (MPE)，

[0199] 其中每个单价磷酸等效物独立地为

[0200] (a) $-R' -C(O)OH$ ，其中 R' 是取代或未取代的 1-4 个碳的烷基，或

[0201] (b) 独立地选自 $-OB(OH)OR$ 、 $-OP(O)(OH)OR$ 、 $-OS(O)(O)(OH)OR$ 和 $-OP(=O)(OH)-O-P(=O)(OH)OR$ ，

[0202] 其中 R 是氢或是取代或未取代的 1-4 个碳的烷基，并且如果 R 是取代的烷基，则该取代基是 $-OH$ 或 $-NH_2$ ，

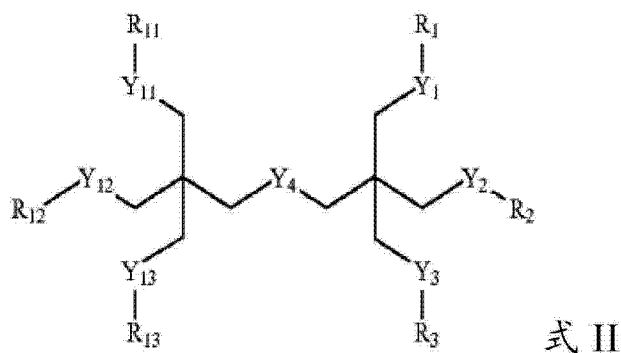
[0203] 其中 R_8 选自 H 、 OH 、 OR_9 ，与 Y_8 组合形成如先前所定义的单价磷酸等效物的部分，以及如上所定义的基团 (i)-(viii)；其中 R_9 为 1 至 10 个碳长度的烷基或酰基；且

[0204] 其中该糖苷键是 α 或 β ；

[0205] 或者

[0206] 式 II 的佐剂或其药学上的盐；

[0207]



[0208] 其中 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_{11} 、 R_{12} 和 R_{13} 中的至少一个为选自以上 (i)-(viii) 的强亲脂性基团；

[0209] 其中 Y_4 为选自 $-O-$ 、 $-S-$ 和 $-NH-$ 的间隔基，并且

[0210] 其中 Y_1R_1 、 Y_2R_2 、 Y_3R_3 、 $Y_{11}R_{11}$ 、 $Y_{12}R_{12}$ 和 $Y_{13}R_{13}$ 中的至少一个独立地为如先前所定义的单价磷酸等效物；

[0211] 其中下列限制适用于上述的 (I) 以及 (II)：

[0212] Y_1 、 Y_2 、 Y_3 、 Y_5 、 Y_6 、 Y_7 、 Y_{11} 、 Y_{12} 和 Y_{13} 为独立地选自 $-O-$ 、 $-S-$ 和 $-NH-$ 的间隔基；

[0213] R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_{11} 、 R_{12} 和 R_{13} 独立地为氢，

[0214] 与共同编号的 Y 基团形成如先前所定义的单价磷酸等效物的部分，或

[0215] 选自上述 (i)-(viii) 的强亲脂性基团；

[0216] 所述化合物的强亲脂性基团共同提供至少两个主要碳链，并且

[0217] 所述强亲脂性基团的主要碳链共同提供至少 30 个碳原子。

[0218] 在一些这样的实施方案中，该制剂是冻干的粉剂、干燥的薄膜或干燥的粉剂。在一些实施方案中，该制剂是冻干的粉剂。在一些这样的实施方案中，该疫苗制剂是水中的悬浮液、乳液或油中的悬浮液。在一些实施方案中，该制剂是水中的悬浮液。在一些这样的实施方案中，该制剂进一步包含叔丁醇。

[0219] 在一些这样的实施方案中，核心串联重复序列与如上述或本文的任何实施方案中所述的 (a) 中序列有至少 90% 的同源性。在一些这样的实施方案中，核心串联重复序列与

如上述或本文的任何实施方案中所述的 (a) 中序列有至少 95% 的同源性。

[0220] 在一些这样的实施方案中,载体脂质选自双肉豆蔻酰磷脂酰甘油(DMPG)、双棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)、磷脂酰胆碱(PC;卵磷脂)、磷脂酸(PA)、磷脂酰甘油(PG)、磷脂酰乙醇胺(PE)、磷脂酰丝氨酸(PS)。其他适合的磷脂进一步包括双硬脂酰基磷脂酰胆碱(DSPC)、双肉豆蔻酰磷脂酰胆碱(DMPC)、双棕榈酰磷脂酰甘油(DPPG)、双硬脂酰基磷脂酰甘油(DSPG)、双棕榈酰磷脂酸(DPPA)、双肉豆蔻酰磷脂酸(DMPA)、双硬脂酰基磷脂酸(DSPA)、双棕榈酰磷脂酰丝氨酸(DPPS)、双肉豆蔻酰磷脂酰丝氨酸(DMPS)、双硬脂酰基磷脂酰丝氨酸(DSPS)、双棕榈酰磷脂酰乙醇胺(DPPE)、双肉豆蔻酰磷脂酰乙醇胺(DMPE)、双硬脂酰基磷脂酰乙醇胺(DSPE),或其药学上可接受的盐或其组合。

[0221] 在一些这样的实施方案中,载体脂质选自双肉豆蔻酰磷脂酰甘油(DMPG)、双棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)或其药学上可接受的盐或其组合。

[0222] 在一些这样的实施方案中,该制剂进一步包含胆固醇。

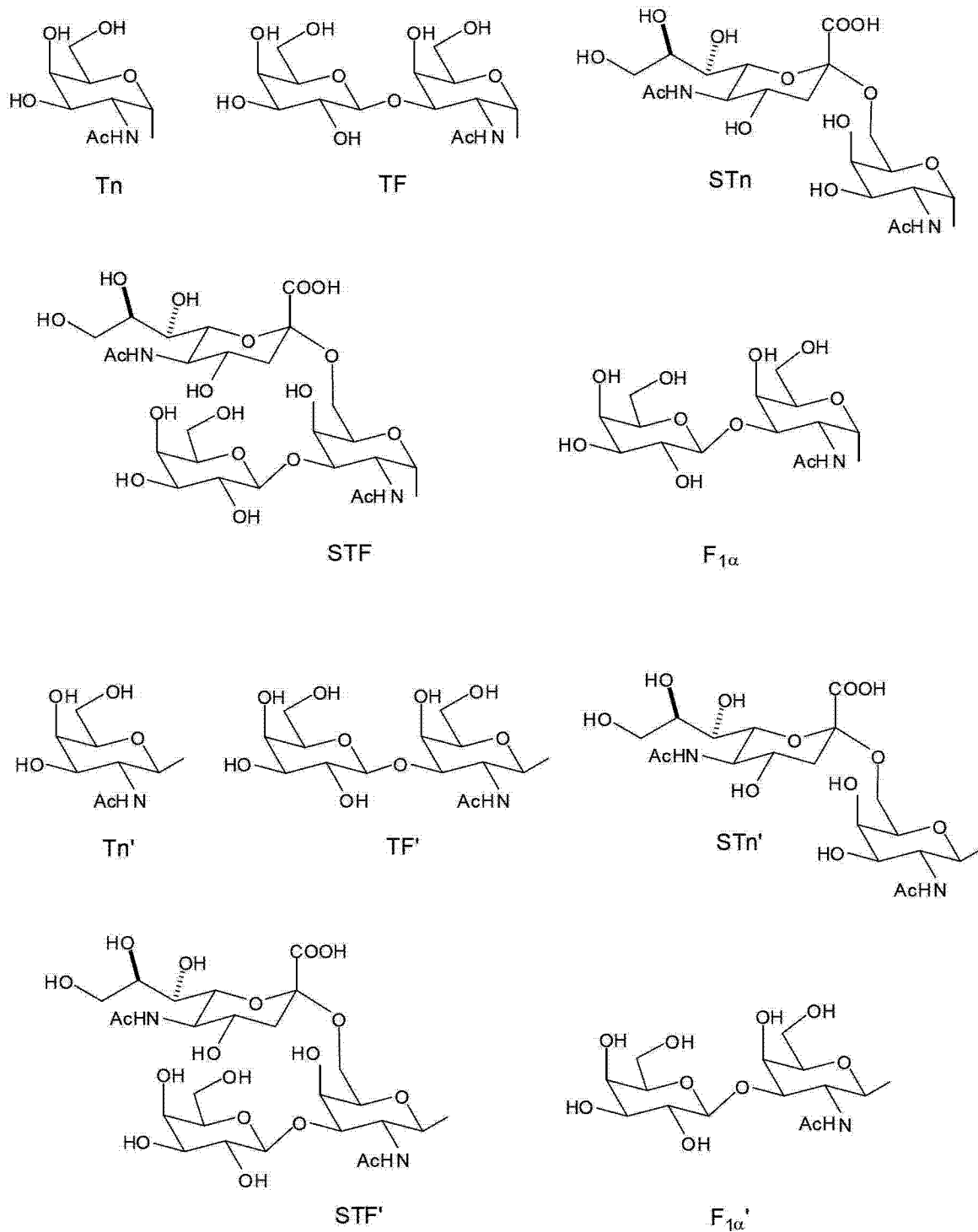
[0223] 在一些这样的实施方案中,共价连接到氨基酸残基的脂质在每次出现时独立地选自肉豆蔻酰基、棕榈酰基、月桂基、硬脂酰基、癸酰基和辛酰基链或其组合。在一些这样的实施方案中,共价连接到氨基酸残基的脂质在每次出现时独立地为肉豆蔻酰基链。

[0224] 在一些这样的实施方案中,(b) 连接到 (a) 的羧基末端。在一些这样的实施方案中,(b) 连接到 (a) 的氨基末端。

[0225] 在一些这样的实施方案中,(a)+(b) 和 (c) 的重量 (a)+(b): 重量 (c) 比例为约 1:10 至约 10:1。在一些这样的实施方案中,(a)+(b) 和 (c) 的重量 (a)+(b): 重量 (c) 比例为约 1:5 至约 5:1。在一些这样的实施方案中,(a)+(b) 和 (c) 的重量 (a)+(b): 重量 (c) 比例为约 1:2 至约 2:1。

[0226] 在一些这样的实施方案中,Te 在每次出现时独立地选自

[0227]



[0228] 和 T- 半抗原。

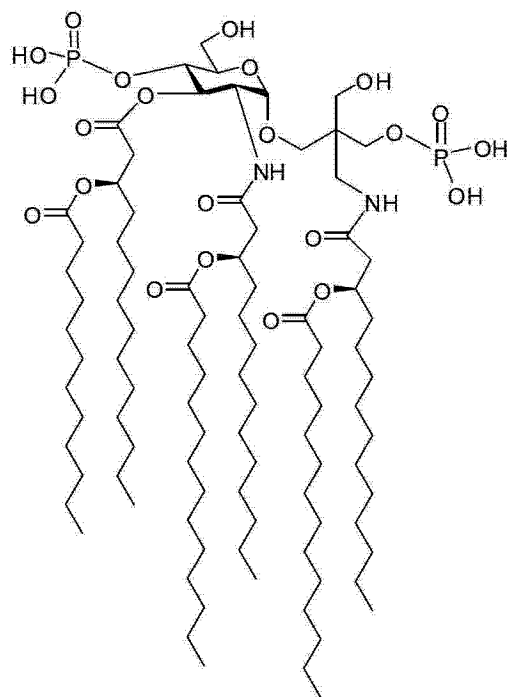
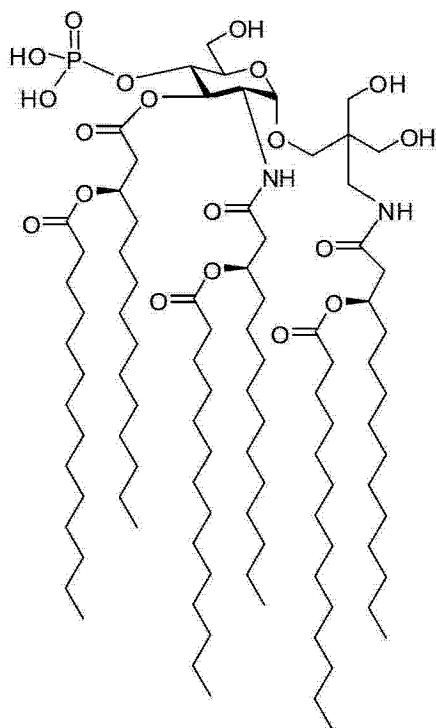
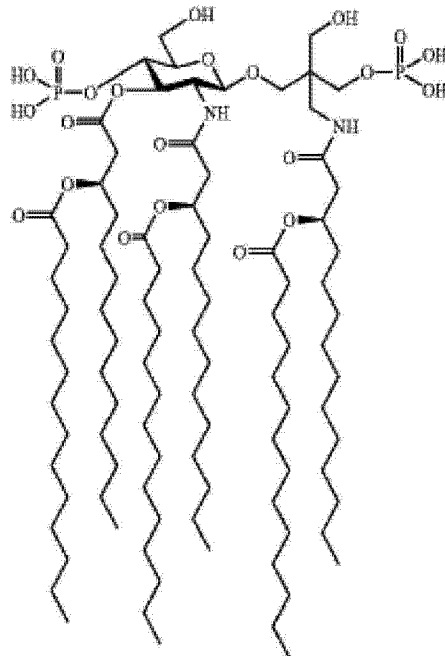
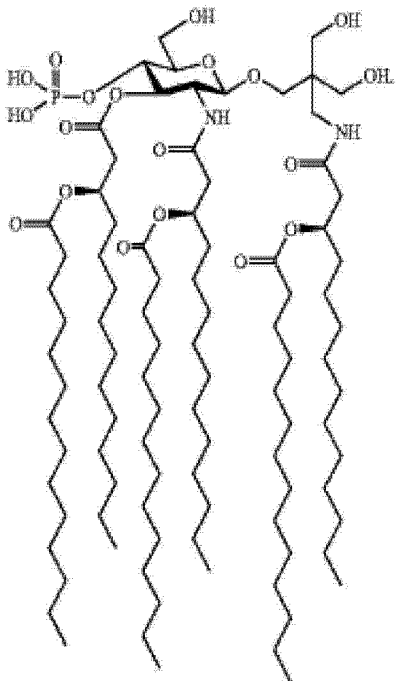
[0229] 在一些这样的实施方案中, Te 是 Tn。在一些这样的实施方案中, Te 是 Tn'。在一些这样的实施方案中, Te 是 STn。在一些这样的实施方案中, Te 是 STn'。在一些这样的实施方案中, Te 是 TF。在一些这样的实施方案中, Te 是 TF'。在一些这样的实施方案中, Te 是 STF。在一些这样的实施方案中, Te 是 STF'。在一些这样的实施方案中, Te 是 F_{1α}。在一些这样的实施方案中, Te 是 F_{1α}'。在一些这样的实施方案中, Te 是 T- 半抗原。在一些这样的实施方案中, Te 是 T- 半抗原'。在一些这样的实施方案中, Te 在每次出现时独立地选自 Tn、Tn'、STn 和 STn'。在一些这样的实施方案中, Te 在每次出现时独立地选自 Tn 和

STn。

[0230] 在一些这样的实施方案中,佐剂选自式 I 化合物、皂苷、CpGODN 和 TLR-9 激动剂或其药学上可接受的盐或其组合。

[0231] 在一些这样的实施方案中,佐剂选自

[0232]



[0233]

皂苷、

CpG ODN 和 TLR-9 激动剂或其药学上可接受的盐或其组合。

[0234] 在一些这样的实施方案中,疫苗制剂包含

[0235] (a) 肽,其包含至少两个拷贝的核心串联重复:

[0236] T(Te)S(Te)APDT(Te)RPAPGS(Te)T(Te)APPAHGV, SEQ ID NO:18 或与 SEQ ID NO:18 至少 85% 相同的序列,或其线性排列;

[0237] 其中

[0238] Te 表示癌症相关的糖表位;

[0239] (b) 共价连接到 (a) 的脂肽,其具有通式:

[0240] $H_2N-S^*S^*L-OH$

[0241] 其中

[0242] * 在每次出现时独立地表示共价连接到丝氨酸残基的脂质。

[0243] 在一些这样的实施方案中,疫苗制剂包含:

[0244] (a) 肽,其包含至少两个拷贝的核心串联重复:

[0245] TSAPDT(Te)RPAPGS(Te)T(Te)APPAHGV, SEQ ID NO:19 或与 SEQ ID NO:19 至少 85% 相同的序列,或其线性排列;

[0246] 其中

[0247] Te 表示癌症相关的糖表位;

[0248] (b) 共价连接到 (a) 的脂肽,其具有通式:

[0249] $H_2N-S^*S^*L-OH$

[0250] 其中

[0251] * 在每次出现时独立地表示共价连接到丝氨酸残基的脂质。

[0252] 在一些这样的实施方案中,脂质体疫苗制剂包含:

[0253] (a) 以下结构的糖脂肽:

[0254] $H_2N-TSAPDT(Tn)RPAPGS(Tn)T(Tn)APPAHGVTSAPDT(Tn)RPAPGS(Tn)T(Tn)APPAHGVS^*S^*L-OH$

[0255] SEQ ID NO:2

[0256] 其中

[0257] Tn 表示 GalNAc α 1;且

[0258] * 在每次出现时独立地表示共价连接到丝氨酸残基的 C14 脂质。

[0259] 本文提供用于治疗罹患或疑似罹患表达 MUC1 肿瘤相关抗原的癌症的个体的方法,其包括向所需个体施用如上所述的脂质体疫苗制剂一段时间。

[0260] 在一些实施方案中,该癌症为乳腺癌、腮腺癌、胃癌、食道癌、头颈癌、胆囊癌、肝细胞癌、甲状腺癌、子宫内膜癌、多发性骨髓瘤、急性骨髓性白血病、急性/慢性淋巴细胞白血病、毛细胞白血病、滤泡性淋巴瘤、多发性骨髓瘤、浆细胞瘤、弥漫型大 B 细胞淋巴瘤、胰腺癌、结肠癌、前列腺癌、卵巢癌、肺腺癌、鳞状细胞肺癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肾癌、膀胱癌或泌尿道癌。

[0261] 在一些实施方案中,上述方法进一步包括测定该个体中的免疫应答。在一些实施方案中,测定该治疗个体中的免疫应答包括测定该个体中的 T 细胞增殖。

[0262] 在一些实施方案中,该一段时间选自至少约 5 天、至少约 1 周、至少约 2 周、至少约 4 周、至少约 8 周、至少约 16 周、至少约 20 周、至少约 24 周、至少约 28 周、至少约 32 周、至少约 36 周、至少约 40 周、至少约 44 周、至少约 48 周、至少约 52 周、至少约 60 周、至少约 68 周、至少约 72 周、至少约 80 周、至少约 88 周、至少约 96 周和至少约 104 周。

[0263] 在一些实施方案中,经由肌肉内、静脉内、皮下、节内、肿瘤内、腹腔内或真皮内注射来施用疫苗组合物。在一些实施方案中,经由皮下注射来施用疫苗组合物。在一些实施方案中,经由泵施用疫苗组合物。在一些实施方案中,经由植入泵(例如经由 Alzet® 渗透泵)施用疫苗组合物。

[0264] 在一些实施方案中,在用上述疫苗制剂治疗之前用环磷酰胺、达克珠单抗(daclizumab)或伊马替尼(imatinib)治疗该个体。

[0265] 本文还提供用于诱发和/或维持个体中的细胞和体液免疫应答的方法,其包括向个体施用上述的脂质体疫苗制剂一段时间。在一些实施方案中,上述方法还包括测定个体中的 T 细胞增殖。在其他实施方案中,上述方法包括测定个体中的抗体产生。

[0266] 本文还提供治疗个体中与低糖基化(hypoglycosylated)MUC1 有关的疾病、病症或病况的方法,其包括向具有低糖基化 MUC1 的个体施用上述的脂质体疫苗制剂一段时间。在一些实施方案中,个体中的低糖基化 MUC1 与癌症有关。在其他实施方案中,上述的脂质体疫苗制剂诱发和/或维持个体中对于低糖基化 MUC1 特异性的免疫应答。在一些情况下,该免疫应答是细胞免疫应答。在其他情况下,该免疫应答是体液免疫应答。

[0267] 援引并入

[0268] 在本说明书中提到的所有出版物、专利和专利申请均在此引入本文中作为参考,该引入参考的程度就如同特定和个别地将各个单独的出版物、专利或专利申请引入作为参考一般。

附图说明

[0269] 本发明的新颖特征在随附的权利要求中详细阐明。通过参考以下对在其中利用本发明原理的说明性实施方案加以阐述的详细描述和附图,将会获得对本发明的特征和优点的更好的理解,在附图中:

[0270] 图 1 说明合成脂质体疫苗制剂的过程。

[0271] 图 2 说明通过透射电子显微镜检查获得的玻璃化、配制的脂质体的图像(图 2A),和通过光学显微镜检查获得的重建(reconstituted)的脂质体疫苗的图像(图 2B),以及对本文所述的脂质体疫苗制剂的冷冻断裂电子显微镜检查(图 2C)。

[0272] 图 3 说明在用本文所述疫苗制剂免疫的 C57BL/6J 小鼠的 CD8+(图 3A)和 CD4+(图 3B) T 淋巴细胞中 IFN γ 的离体诱导。

[0273] 图 4 说明 IgG 与来自用本文所述疫苗制剂免疫的小鼠血清的 MUC1 抗原相结合的剂量反应。

[0274] 图 5 说明本文所述的包含 SEQ ID NO:2 的脂质体疫苗制剂与疫苗制剂 BLP25 (疫苗 A 或 Vac A) 在 IgG 与糖基化 MUC1 抗原(上部)和非糖基化 MUC1 抗原(下部)相结合方面的比较。

[0275] 图 6 说明在用本文所述疫苗制剂免疫的人类 MUC1 转基因小鼠中脾细胞的 IFN γ 的离体诱导(图 6A) 和 IgG 抗体的诱导(图 6B 和 6C)。

[0276] 图 7 说明用来自接种了本文所述疫苗制剂的小鼠的血清对 B16-MUC1 和 B16 细胞(图 7A) 或乳房上皮和乳腺癌细胞(图 7B) 的 FACS 分析。

具体实施方式

[0277] 目前存在很多临床上有用的治疗癌症的疗法。在一些情况下,常规癌症治疗的缺点在于该治疗是非特异性的,会同时影响健康细胞以及癌细胞,从而造成毒性副作用。

[0278] MUC1 黏蛋白是一种在正常细胞以及癌细胞中表达的高分子量糖蛋白。然而,与肿瘤相关的黏蛋白通常携带改变的糖基化模式。在很多癌症中,MUC1 为过度表达和 / 或低糖基化或异常糖基化。癌组织中的 MUC1 的异常糖基化会导致核心肽表位暴露在免疫系统下。这些特性使得与肿瘤相关的黏蛋白在抗原性上不同于正常细胞的对应黏蛋白。因此,本文提供免疫原性疫苗制剂,其可诱发靶向在肿瘤和 / 或癌组织中表达的 MUC1 抗原的细胞和 / 或体液免疫应答。

[0279] 在一些实施方案中,本文所述的免疫原性制剂引起抗原特异性的 B 细胞和 / 或 T 细胞应答,该应答可识别肿瘤相关抗原并攻击癌细胞。在一些这样的实施方案中,选择性地攻击癌细胞,从而减少了毒性副作用的可能性。在其他实施方案中,本文所述的免疫原性制剂诱导 B 细胞产生抗癌抗原的抗体。因此,一种包含使用本文所述的脂质体疫苗制剂的免疫治疗方法具有加强现有癌症疗法的效力的可能性。在一些实施方案中,施用本文提供的脂质体疫苗制剂可延长正在接受本文所述的疫苗治疗的个体的寿命和 / 或改善其生活质量。

[0280] MUC1 黏蛋白

[0281] 黏蛋白是特征为高分子量 (>1,000,000 道尔顿) 及广泛糖基化 (经常超过 80%) 的糖蛋白。人类 MUC1 的基因产物在很多人类癌细胞上强烈表达,包括但不限于乳腺癌、胰腺癌和某些卵巢癌细胞。虽然在各种癌症上表达的由 MUC1 编码的黏蛋白含有相同的串联重复核心肽序列,但仍存在糖基化作用差异。由于在癌细胞中低糖基化,癌细胞上的 MUC1 分子会表达在正常上皮细胞上不会表达的表位。MUC1 黏蛋白由具有细胞外、跨膜和细胞质结构域的膜内在蛋白质构成。MUC1 的抗原成分存在于 MUC1 的胞外域中,其包含由如下所述 SEQ ID NO:1 的 20-mer 氨基酸单元的串联重复所构成的糖蛋白。

[0282] 人类 MUC1 的氨基酸序列可从 SWISS-PROT 数据库中以 P15941 获得。重复的数目是高度多态性的。在北欧人群中为 21 到 125 不等。最常见的等位基因含有 41 和 85 个重复。关于小鼠 MUC1,请参见 SWISS-PROT Q02496。

[0283] MUC1 为多态性抗原,其特征在于数量可变的下列 20-mer 核心序列的完全和不完全重复:

[0284] 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20

[0285] T S A P D T R P A P G S T A P P A H G V

[0286] (SEQ ID NO:1)

[0287] 串联重复的二十肽(icosapeptide)在三个位置发生多态性,如方括号所显示: TSAP[D/E][T/S]RPAPGSTAP[P/A/Q/T]AHGV (SEQ ID NO:3)。常见的多态性为搭配的双突变 DT→ES 和单一置换 P→A、P→Q 和 P→T。最常见的置换 DT→ES 发生在至多 50% 的重复中。

[0288] 含糖脂肽的疫苗涵盖在本文所示的实施方案的范围中,该糖脂肽包含至少一个 MUC1 的天然 B 和 / 或 T 细胞表位,或至少一个基本上与这一天然表位相同的突变表位。在一些实施方案中,糖肽任选地包含不是表位一部分的额外 MUC1 序列。

[0289] 在一些实施方案中,适用于本文所述的脂质体疫苗制剂的糖肽包含 MUC1 的 B 细胞

表位或 T 细胞表位(在每一情况下该表位可为天然的表位或其允许的突变体)或其组合。在一些实施方案中,这些表位是相同的、重叠的或不同的。在一些实施方案中,抗原的 T 和 B 细胞表位重叠。例如在 MUC1 的情况下, SAPDTRP, SEQ ID NO:4(即 SEQ ID NO:1 的氨基酸 2-8) 是 T 细胞表位,而 PDTRP, SEQ ID NO:5(即 SEQ ID NO:1 的氨基酸 4-8) 是 B 细胞表位。

[0290] 在本文所述疫苗制剂中存在的免疫原上的糖基化位点任选地为以下一个或多个:

(1) 在 MUC1 衍生的肿瘤糖蛋白中实际糖基化的位点, (2) 可糖基化但实际不在该肿瘤糖蛋白中糖基化的位点, 和 / 或 (3) 与肿瘤糖蛋白无关的位点。在本文提供的疫苗制剂中存在的免疫原中, 没有、有一个、有一些或所有在 MUC1 衍生的肿瘤糖蛋白中会正常糖基化的糖基化位点是糖基化的。

[0291] 适用于本文所述的疫苗制剂的免疫原包含两个或多个拷贝的前述完整重复序列或其线性排列。

[0292] 每个所述的 MUC1 表位任选地对应于可变串联重复区域的一个或多个表位, 或是对应于该区域外的表位。串联重复区域中的表位包括, 例如 RPAPGS, SEQ ID NO:6(即 SEQ ID NO:1 的氨基酸 7-12), PPAHGV, SEQ ID NO:7(即 SEQ ID NO:1 的氨基酸 15-20 和 1), 和 PDTRP, SEQ ID NO:8(即 SEQ ID NO:1 的氨基酸 4-8)。序列 PDTRPAPGS, SEQ ID NO:9(即 SEQ ID NO:1 的氨基酸 4-12) 包括两个重叠的表位。PDTRP 序列 SEQ ID NO:10 形成凸出球形物的顶端, 其暴露于溶剂中, 并形成稳定的 II 型 β -转角(β -turn)。

[0293] 糖脂肽也涵盖在本文所示的实施方案的范围中, 该糖脂肽包含至少一个 20 个氨基酸的序列(核心串联重复), 该序列与 MUC1 的串联重复的不同之处仅仅在于一个或多个保守性取代和 / 或单一非保守性取代, 并包含 MUC1 的各种可变串联重复区域的表位(完全相同或是可被允许的突变体)。

[0294] 在这些实施方案的一个子集中, 糖脂肽包含数个非重叠的核心串联重复, 比如两个(总共 40 个氨基酸)、三个(总共 60 个氨基酸)、四个、五个、六个、七个或八个。这些核心串联重复可以是(但不必是)彼此相同的。相比之下, 天然的人类 MUC1 黏蛋白的重复数目一般为 21-125。

[0295] 疫苗制剂也涵盖在本文所示的实施方案的范围中, 其中糖脂肽的肽部分任选地包含额外的氨基酸子序列。此子序列包含额外的表位, 包括 MUC1 可变串联重复区域的表位(比核心串联重复短)、该区域外的 MUC1 表位或其他癌抗原的表位。

[0296] 据此, 本文提供包含 MUC1 糖脂肽的疫苗制剂。在一些实施方案中, 这样的合成 MUC1 糖脂肽包含一个或多个拷贝的 SEQ ID NO:1 的核心串联重复肽, 该肽模拟存在于癌细胞上的 MUC1 肽表位。在一些实施方案中, 本文提供包含肽的 MUC1 糖脂肽, 该肽包含至少两个拷贝的核心串联重复:

[0297] TSAPDTRPAPGSTAPPAHGV (SEQ ID NO:1)

[0298] 或与 SEQ ID NO:1 基本上相同的序列, 或其线性排列;

[0299] 其中

[0300] S 和 T 在每次出现时独立地任选地被癌症相关的糖表位 Te 所取代。

[0301] 由于存在该序列的多个重复, 所显示的起始点是任意的, 且该串联重复的“线性排列”不同。例如在一个实施方案中, 串联重复单元从 SEQ ID NO:1 的氨基酸 19 开始, 并顺着整个 SEQ ID NO:1 的肽序列循环, 以提供序列 GVTSAPDTRPAPGSTAPPAH (SEQ ID NO:11)

的核心串联重复。在另一示例性实施方案中,串联重复单元仅从 SEQ ID NO:1 的氨基酸 6 开始,并顺着整个 SEQ ID NO:1 的肽序列循环,以提供序列 TRPAPGSTAPPAHGVTSAPD (SEQ ID NO:12) 的核心串联重复。其他类似的“线性排列”也被涵盖在本文所示的实施方案的范围中。

[0302] 在一些实施方案中,本文所述的脂质体制剂包含 1 至 30 个拷贝的 SEQ ID NO:1 的核心串联重复,或与 SEQ ID NO:1 基本上相同的序列或其线性排列。在一些实施方案中,本文所述的脂质体制剂包含 1 至 20 个拷贝的 SEQ ID NO:1 的核心串联重复、与 SEQ ID NO:1 基本上相同的序列或其线性排列。在一些实施方案中,本文所述的脂质体制剂包含 1 至 10 个拷贝的 SEQ ID NO:1 的核心串联重复、与 SEQ ID NO:1 基本上相同的序列或其线性排列。在一些实施方案中,本文所述的脂质体制剂包含 1 至 5 个拷贝的 SEQ ID NO:1 的核心串联重复、与 SEQ ID NO:1 基本上相同的序列或其线性排列。在一些实施方案中,本文所述的脂质体制剂包含 2 个拷贝的 SEQ ID NO:1 的核心串联重复、与 SEQ ID NO:1 基本上相同的序列或其线性排列。在一些实施方案中,本文所述的脂质体制剂包含 3 个拷贝的 SEQ ID NO:1 的核心串联重复、与 SEQ ID NO:1 基本上相同的序列或其线性排列。在一些实施方案中,本文所述的脂质体制剂包含 4 个拷贝的 SEQ ID NO:1 的核心串联重复、与 SEQ ID NO:1 基本上相同的序列或其线性排列。在一些实施方案中,本文所述的脂质体制剂包含 5 个拷贝的 SEQ ID NO:1 的核心串联重复、与 SEQ ID NO:1 基本上相同的序列或其线性排列。在一些实施方案中,本文所述的脂质体制剂包含 6 个拷贝的 SEQ ID NO:1 的核心串联重复、与 SEQ ID NO:1 基本上相同的序列或其线性排列。在一些实施方案中,本文所述的脂质体制剂包含 7 个拷贝的 SEQ ID NO:1 的核心串联重复、与 SEQ ID NO:1 基本上相同的序列或其线性排列。在一些实施方案中,本文所述的脂质体制剂包含 8 个拷贝的 SEQ ID NO:1 的核心串联重复、与 SEQ ID NO:1 基本上相同的序列或其线性排列。在一些实施方案中,本文所述的脂质体制剂包含 9 个拷贝的 SEQ ID NO:1 的核心串联重复、与 SEQ ID NO:1 基本上相同的序列或其线性排列。在一些实施方案中,本文所述的脂质体制剂包含 10 个拷贝的 SEQ ID NO:1 的核心串联重复、与 SEQ ID NO:1 基本上相同的序列或其线性排列。在上述的任何实施方案中,该一个或多个拷贝的 SEQ ID NO:1 的核心串联重复如本文所述糖基化。

[0303] 如本文所用的“与 SEQ ID NO:1 基本上相同的序列”指,在一个实施方案中,序列与 SEQ ID NO:1 至少 80% 相同。在其他实施方案中,“与 SEQ ID NO:1 基本上相同的序列”指序列与 SEQ ID NO:1 至少 85% 相同。在其他实施方案中,“与 SEQ ID NO:1 基本上相同的序列”指序列与 SEQ ID NO:1 至少 90% 相同。在其他实施方案中,“与 SEQ ID NO:1 基本上相同的序列”指序列与 SEQ ID NO:1 至少 95% 相同。

[0304] MUC1 核心重复变异体

[0305] 在一些实施方案中,本文所述的疫苗制剂中纳入 MUC1 核心重复的免疫活性同系物或变异体(例如 SEQ ID NO:1 的变异体)。因此,本文所示的实施方案涵盖 MUC1 核心重复肽的使用,该肽具有与 SEQ ID NO:1 中所示的氨基酸序列相似但不相同的序列。因此,本文提供的实施方案的范围中也涵盖 MUC1 核心重复的使用,其与 SEQ ID NO:1 序列相比具有 99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、84%、83%、82%、81% 或 80% 的序列同一性,且具有免疫活性。

[0306] 在一些实施方案中,MUC1 核心重复蛋白任选地被修饰以含有保守性变异,

以便改变非关键的残基或位于非关键区域的残基。可利用本领域中已知的方法辨别非关键的氨基酸,比如定点诱变(site-directed mutagenesis)、结晶化、核磁共振、光亲和标记(photoaffinity labeling)或丙氨酸扫描诱变(alanine-scanning mutagenesis)(Cunningham 等人, Science, 244:1081-1085(1989); Smith 等人, J. Mol. Biol., 224:899-904(1992); de Vos 等人, Science, 255:306-312(1992))。经由比如蛋白酶结合底物、裂解(cleavage)、体外活性或体内活性等方法来检测经修饰的蛋白质的活性或诱导免疫应答的能力。

[0307] 在一些实施方案中, MUC1 核心重复变异体中纳入 1、2、3、4 或 5 个氨基酸取代, 这些取代可改善 MUC1 核心重复的稳定性, 或是带有可改善 MUC1 核心重复抗氧化的稳定性的不同疏水性氨基酸, 或是带有可改善 MUC1 核心重复抗蛋白酶的稳定性的不同氨基酸。因此, “变异” MUC1 核心重复多肽在氨基酸序列上与 SEQ ID NO:1 所示序列的不同在于一个或多个取代、删除、插入、倒位、截短、修饰或其组合。此变异体任选地含有以另一相似特性的氨基酸取代特定氨基酸的氨基酸取代。保守性取代包括, 丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸等脂肪族氨基酸间的互换; 羟基残基丝氨酸和苏氨酸间的互换, 酸性残基天冬氨酸和谷氨酸的交换, 酰胺残基天冬酰胺和谷氨酰胺间的取代, 碱性残基赖氨酸和精氨酸的交换, 以及芳香族残基苯丙氨酸和酪氨酸间的置换。参见 Bowie 等人, Science, 247:1306-1310(1990)。

[0308] 如下文所详述, 核心串联重复区域任选地以使其变异体仍保留 T 细胞活化特性的方式被修饰。

[0309] 在一些实施方案中, MUC1 变异体是 MUC1 蛋白质的片段。在一些实施方案中, MUC1 变异体包括抗蛋白水解切割的 MUC1 片段或含有一个或多个非天然氨基酸如 D-氨基酸的 MUC1 片段。此类衍生物具有循环半衰期延长的优点, 同时保留有利的 T-细胞特异性。

[0310] 在另一实施方案中, MUC1 变异体包括 MUC1 细胞外串联重复区域的一部分, 该部分具有氨基酸序列 DTR, SEQ ID NO:13, (Asp-Thr-Arg); DTRP, SEQ ID NO:14, (Asp-Thr-Arg-Pro); SAPDTRP, SEQ ID NO:15, (Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro) 或 TSAPDTRPA, SEQ ID NO:16。其他 MUC1 衍生物基本上由 MUC1 黏蛋白的一个截短肽核心重复(例如 GVTSAPDTRPAPGSTA, SEQ ID NO:17)所组成。当然, 这个截短的核心序列可被重新排列和/或如上文所述以其他方式予以改变。

[0311] MUC1 核心重复的修饰

[0312] MUC1 核心重复变异体涵盖衍生物或类似物, 其中 (i) 氨基酸被不是由遗传密码所编码的氨基酸残基所取代, (ii) 成熟的多肽与另一化合物(比如聚乙二醇)融合, 或 (iii) 将额外氨基酸融合到 MUC1 多肽, 比如前导或分泌性序列或用于纯化多肽的序列。

[0313] 典型的修饰包括(但不限于)乙酰化、酰化、ADP-核糖基化、酰胺化、黄素的共价连接、血红素部分的共价连接、核苷酸或核苷酸衍生物的共价连接、脂质或脂质衍生物的共价连接、磷脂酰肌醇的共价连接、交联、环化、二硫键形成、去甲基化、共价交联的形成、胱氨酸的形成、焦谷氨酸的形成、甲酰化、 γ 羧基化、糖基化、GPI 锚的形成、羟基化、碘化、甲基化、肉豆蔻酰化、氧化、蛋白酶解加工、磷酸化、异戊二烯化、外消旋化、硒磺化(selenoylation)、硫化、转运 RNA 介导的蛋白质的氨基酸添加, 比如精氨酸化和泛素化(ubiquitination)。

[0314] 可以在 MUC1 核心重复多肽中的任何位置进行修饰, 包括肽的主干、氨基酸侧链和

氨基或羧基末端。某些常用于修饰 MUC1 核心重复的肽修饰包括糖基化、脂质连接、硫化、谷氨酸残基的 γ 羧基化、羟基化、利用共价修饰阻断多肽的氨基或羧基或以上两者,以及 ADP-核糖基化。

[0315] 此外,以保守方式改变核心序列的一个或多个氨基酸,以便维持必需的活化 T 细胞的活性。典型的取代在下列氨基酸群组之间进行:(a)G、A、V、L 和 I;(b)G 和 P;(c)S、C、T、M;(d)F、Y 和 W;(e)H、K 和 R;以及 (f)D、E、N 和 Q。其他的取代包括下列群组:(i)S 和 T;(ii)P 和 G;以及 (iii)A、V、L 和 I。

[0316] 本文提供的实施方案的范围中也涵盖核心重复多肽的修饰,其中多肽与另一在正常情况下与之没有关联的多肽接合(例如谷胱甘肽 S-转移酶 (GST)-融合蛋白、 β -半乳糖苷酶融合物、酵母双杂合 GAL 融合物、聚-His 融合物、Ig 融合物等等)。因此,MUC1 核心重复肽在其 N 末端或 C 末端任选地可操作地连接至异源性多肽,该异源性多肽具有与该 MUC1 核心重复并非基本上同源的氨基酸序列。“可操作地连接”表示 MUC1 核心重复肽和异源性多肽符合读框(in-frame)。此融合蛋白改变(例如增强、抑制)MUC1 核心重复或其功能性变异体诱发宿主系统的免疫反应的能力。

[0317] 糖表位

[0318] 人类癌症呈现数种糖表位。这些包括乳糖系列(lacto series)1型和2型链、与癌症有关的神经节链(ganglio chains)和中性糖鞘脂(glycosphingolipids)。乳糖系列1型和2型链的实例包括(但不限于):路易斯 a (Lewis a)、路易斯 a 二聚体、路易斯 b、路易斯 b/ 路易斯 a、路易斯 x、路易斯 y、路易斯 a/ 路易斯 x、路易斯 x 二聚体、路易斯 y/ 路易斯 x、路易斯 y 三岩藻糖、路易斯 b 三岩藻糖、路易斯 x 唾液酸、路易斯 y 唾液酸、路易斯 x 唾液酸二聚体、Tn、唾液酸 Tn、唾液酸 TF、TF 等等。癌症相关的神经节链的实例包括(但不限于)GM3、GD3、GM2、GM4、GD2、GM1、GD-1a、GD-1b 等等。中性鞘脂包括红细胞三糖(globotriose)、红细胞四糖(globotetraose)、红细胞戊糖(globopentaose)、异红细胞三糖(isoglobotriose)、异红细胞四糖(isoglobotetraose)、粘三糖(mucotriose)、粘四糖(mucotetraose)、乳三糖(lactotriose)、乳四糖(lactotetraose)、新乳四糖(neolactotetraose)、神经节三糖(gangliotriose)、神经节四糖(gangliotetraose)、半乳二糖(galabiose)、9-0-乙酰基-GD3 等等。

[0319] 此抗原的另一群组包含与肿瘤有关的糖基化黏蛋白。黏蛋白通常是发现于唾液、胃液等中的糖蛋白,其形成黏性溶液且在身体的外表面和内表面上作为润滑剂或保护剂。癌组织会产生异常黏蛋白,它们比其正常的对应物有相对较少的糖基化和/或过度表达。由于癌细胞中蛋白质的糖基化机制发生功能性改变,与肿瘤有关的黏蛋白一般含有短的、不完整的聚糖。因此,举例来说,与人奶脂肪球相关的正常黏蛋白主要由四糖聚糖 gal β 1-4 glcNAc β 1-6 (gal β 1-3) gal NAc- α 和其唾液酸化(sialylated)的类似物所组成。但是,与肿瘤有关的 Tn 半抗原仅由单糖残基 α -2-乙酰氨基-3-脱氧-D-吡喃半乳糖基所组成,而 T-半抗原仅由双糖 β -D-吡喃半乳糖基-(1-3)- α -乙酰氨基-2-脱氧-D-吡喃半乳糖基所组成。其他与肿瘤有关的黏蛋白的半抗原(比如唾液酸-Tn (sialyl-Tn) 和唾液酸-(2-6) T 半抗原)包括末端唾液酸残基连接到短 Tn 和 T 聚糖上而形成的半抗原。

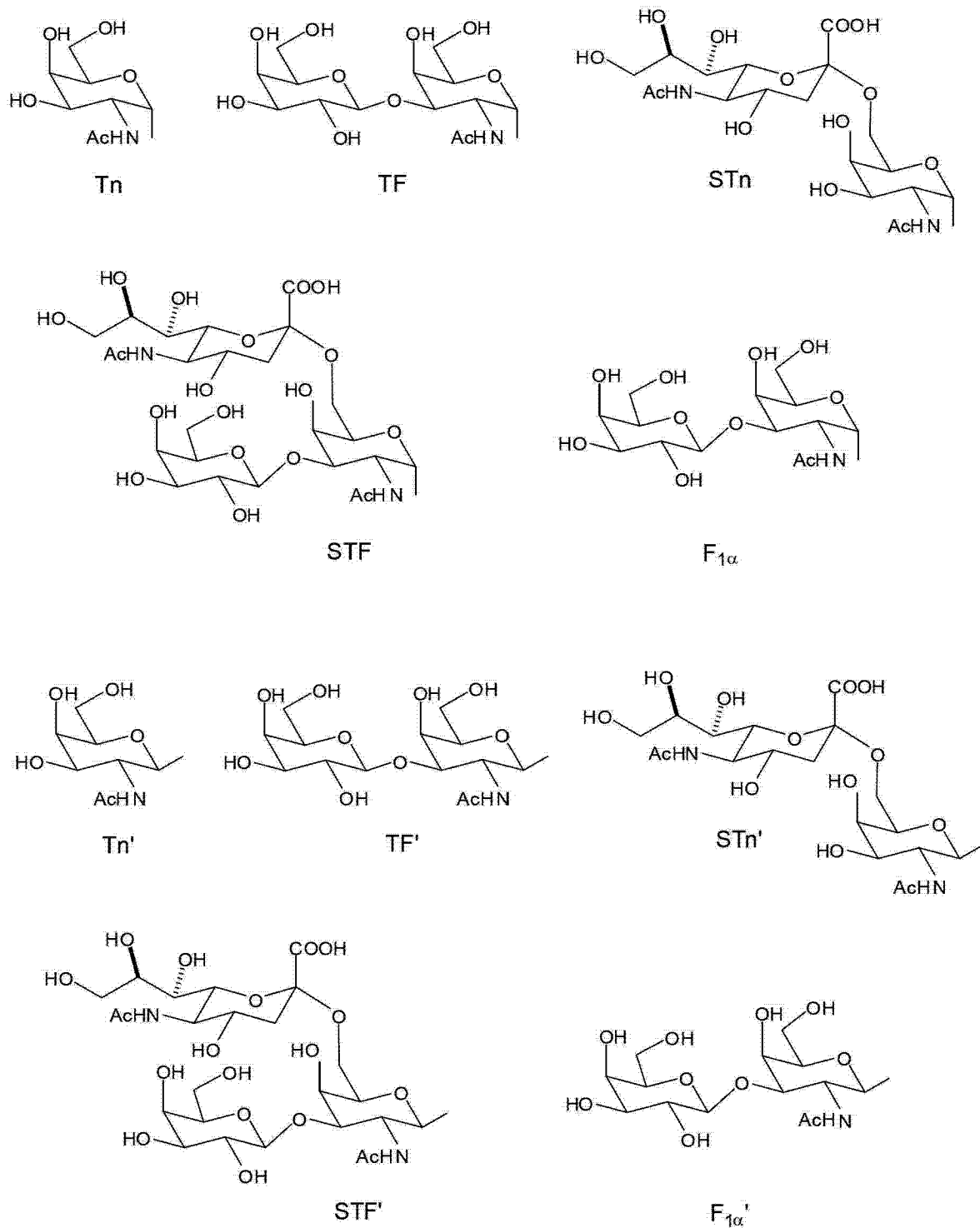
[0320] 在大部分原发性癌细胞和它们的转移(所有人类癌的 >90%) 的外表面细胞膜上可发现呈免疫活性形式的 T 和 Tn 抗原。作为癌症标志物,T 和 Tn 使得早期免疫组织化学检

测和某些癌症侵袭性的预知成为可能。T 和 Tn 的表达程度通常与癌症(包括某些癌)的分化程度有关联。

[0321] 多种糖类适合被纳入本文所述脂质体疫苗制剂中存在的合成糖脂肽免疫原中。Wong (美国专利第 6, 013, 779 号)中描述了各种糖表位,该专利的公开内容引入本文中作为参考。Tn、T、TF、唾液酸 Tn 和唾液酸 (2→6)T 半抗原为与肿瘤有关的糖表位的实例,其在常见的人类癌症中高度表达;使用适合的方法将这类糖表位偶联到胺化的化合物和 / 或氨基酸上。

[0322] 在一些实施方案中,适用于 SEQ ID NO:1 核心串联重复的糖基化的糖表位包括(且不限于):

[0323]



[0324] T 半抗原等。

[0325] 在天然的人类 20-mer MUC1 黏蛋白中，每个重复有五个典型的 O-连接的糖基化位点。在正常的 MUC1 中，这 5 个位点中平均有 2.65 个被占据。本文所示的实施方案的范围内涵盖包含 MUC1 糖蛋白的疫苗制剂，其中每个重复的糖基化氨基酸的平均数目少于、等于或大于“天然”值。在一些这样的实施方案中，SEQ ID NO:1 的丝氨酸或苏氨酸残基中的一个或多个是 O-糖基化的。

[0326] 如本文所用，糖基化氨基酸或肽是其侧链包含至少一个糖单体单元的氨基酸或肽。任选地，糖基化氨基酸或肽中可纳入脂族和 / 或芳族部分。简单地糖基化的氨基酸或

肽是其侧链由选自 -O-、-S- 和 -NH- 的连接体和一个或多个糖单元所组成的氨基酸或肽。糖基化氨基酸或肽包含选自半乳糖、甘露糖、葡萄糖、N- 乙酰葡萄糖胺、N- 乙酰半乳糖胺、唾液酸、岩藻糖、木糖等的单体单元。糖单元的数目从约 1 至 20 ;或 1 至 10 或 1 至 5 或 1-3 或 1-2 不等。如果寡糖链(即两个或两个以上糖单元的链)连接,则该链为直链或支链。

[0327] 在一个实施方案中,糖基化氨基酸或肽包含 -O- 糖基化的和 -N- 糖基化的残基。O- 糖基化是例如含有羟基的氨基酸如丝氨酸或苏氨酸的 O- 糖基化。酪氨酸、羟基赖氨酸和羟基脯氨酸也任选地被 O- 糖基化。在其他实施方案中,糖基化的氨基酸或肽包含 N- 糖基化的残基。N- 糖基化是例如含有酰胺的氨基酸侧链如 Asn 或蛋白质的氨基末端的 N- 糖基化。在 N- 糖基化连接中,氮任选地不被取代(-NH-)或被取代(-NZ-)。在其他实施方案中,糖基化的氨基酸或肽包含 S- 糖基化的残基。S- 糖基化是例如半胱氨酸的硫醇基的 S- 糖基化。

[0328] 因此,在一些实施方案中,本文所述的疫苗制剂包含免疫原,其中 SEQ ID NO:1 的丝氨酸或苏氨酸残基中的一个被糖基化。在一些实施方案中,本文所述的疫苗制剂包含免疫原,其中 SEQ ID NO:1 的丝氨酸或苏氨酸残基中的两个被糖基化。在一些实施方案中,本文所述的疫苗制剂包含免疫原,其中 SEQ ID NO:1 的丝氨酸或苏氨酸残基中的三个被糖基化。在一些实施方案中,本文所述的疫苗制剂包含免疫原,其中 SEQ ID NO:1 的丝氨酸或苏氨酸残基中的四个被糖基化。在一些实施方案中,本文所述的疫苗制剂包含免疫原,其中 SEQ ID NO:1 的丝氨酸或苏氨酸残基中的五个被糖基化。

[0329] 在一些实施方案中,本文所述的疫苗制剂包含两个或更多拷贝的 SEQ ID NO:1 核心串联重复序列。在一些这样的实施方案中,本文所述的疫苗制剂包含具有两个或多个拷贝的 SEQ ID NO:1 核心串联重复序列的免疫原,其中 SEQ ID NO:1 的丝氨酸或苏氨酸残基中的一个被糖基化。在一些实施方案中,本文所述的疫苗制剂包含具有两个或多个拷贝的 SEQ ID NO:1 核心串联重复序列的免疫原,其中 SEQ ID NO:1 的丝氨酸或苏氨酸残基中的两个被糖基化。在一些实施方案中,本文所述的疫苗制剂包含具有两个或多个拷贝的 SEQ ID NO:1 核心串联重复序列的免疫原,其中 SEQ ID NO:1 的丝氨酸或苏氨酸残基中的三个被糖基化。在一些实施方案中,本文所述的疫苗制剂包含具有两个或多个拷贝的 SEQ ID NO:1 核心串联重复序列的免疫原,其中 SEQ ID NO:1 的丝氨酸或苏氨酸残基中的四个被糖基化。在一些实施方案中,本文所述的疫苗制剂包含具有两个或多个拷贝的 SEQ ID NO:1 核心串联重复序列的免疫原,其中 SEQ ID NO:1 的丝氨酸或苏氨酸残基中的五个被糖基化。在一些实施方案中,本文所述的疫苗制剂包含具有两个或多个拷贝的 SEQ ID NO:1 核心串联重复序列的免疫原,其中 SEQ ID NO:1 的丝氨酸或苏氨酸残基中的六个被糖基化。在一些实施方案中,本文所述的疫苗制剂包含具有两个或多个拷贝的 SEQ ID NO:1 核心串联重复序列的免疫原,其中 SEQ ID NO:1 的丝氨酸或苏氨酸残基中的七个被糖基化。在一些实施方案中,本文所述的疫苗制剂包含具有两个或多个拷贝的 SEQ ID NO:1 核心串联重复序列的免疫原,其中 SEQ ID NO:1 的丝氨酸或苏氨酸残基中的八个被糖基化。在一些实施方案中,本文所述的疫苗制剂包含具有两个或多个拷贝的 SEQ ID NO:1 核心串联重复序列的免疫原,其中 SEQ ID NO:1 的丝氨酸或苏氨酸残基中的九个被糖基化。在一些实施方案中,本文所述的疫苗制剂包含具有两个或多个拷贝的 SEQ ID NO:1 核心串联重复序列的免疫原,其中 SEQ ID NO:1 的丝氨酸或苏氨酸残基中的十个被糖基化。取决于 SEQ ID NO:1 核心串联重

复序列的拷贝数,额外的丝氨酸或苏氨酸残基任选地被糖基化,且被涵盖在本文所示的实施方案的范围内。

[0330] 在具有两个或多个拷贝的 SEQ ID NO:1 核心串联重复序列的免疫原的一些实施方案中,就每个残基而言,特定的 SEQ ID NO:1 核心串联重复序列中的糖基化模式与另一核心串联重复中的糖基化模式相同。例如在具有两个苏氨酸残基和一个丝氨酸残基上有糖基化的核心串联重复的免疫原中,另一个核心串联重复会在相对应的残基即两个苏氨酸残基和一个丝氨酸残基上有相同的糖基化。

[0331] 在具有两个或多个拷贝的 SEQ ID NO:1 核心串联重复序列的免疫原的一些实施方案中,就每个残基而言,SEQ ID NO:1 核心串联重复序列的糖基化模式与其他核心串联重复中的糖基化模式不同。换言之,在一些实施方案中,核心串联重复与其他核心串联重复不同地被糖基化。预期这些不同包括出现不同的糖基化(例如在第一核心串联重复上 4 个糖基化而在第二核心串联重复上 2 个糖基化)、不同的用于糖基化的氨基酸残基,和核心串联重复之间不同的糖基。

[0332] 在任何上述的实施方案中,存在于 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:18 或 SEQ ID NO:19 的核心串联重复序列或任何其他本文所述的肽序列上的每个糖基残基在每次出现时独立地进行选择。因此,本文所述的疫苗制剂中的糖基化肽包含一个或多个糖表位(例如本文所述的糖基残基,比如癌症相关的 Te 糖表位),所述糖表位为全部相同或不同的或各种糖基残基(例如 Te 残基)的任何组合。

[0333] 在一些实施方案中,本文所述的疫苗制剂包含具有两个或多个拷贝的 SEQ ID NO:1 核心串联重复序列的免疫原,其中每个核心串联重复的苏氨酸-6、丝氨酸-12 和苏氨酸-13 被糖基化。在一些实施方案中,本文所述的疫苗制剂包含具有两个或多个拷贝的 SEQ ID NO:1 核心串联重复序列的免疫原,其在第一核心串联重复上丝氨酸-12 和苏氨酸-13 未被糖基化,而在第二或额外的核心串联重复上苏氨酸-6 被糖基化。

[0334] 脂质

[0335] 在一些实施方案中,SEQ ID NO:1 的核心串联重复共价连接到一个或多个脂化的氨基酸上。如本文所用,“脂质”是棕榈酰基、月桂基、肉豆蔻酰基、硬脂酰基或癸酰基,或者更常见地,任何连接到具有氧、氮或硫官能团的氨基酸上的 C₂-C₃₀饱和、单不饱和或多不饱和、支链或直链的脂肪酰基。此类氨基酸包括(但不限于)苏氨酸、丝氨酸、赖氨酸、精氨酸和半胱氨酸。

[0336] “单脂肽(monolipopeptide)”是仅有一个脂质连接于其上的肽。相似地,“双脂肽(dilipopeptide)”是有两个脂质连接到一个或两个氨基酸上的肽。如果两个脂质连接到两个氨基酸残基上,则这些残基被任何数目的氨基酸分隔开。在多于一个脂质被连接的情况中,脂质为相同的脂质或不同的脂质。相似地,如果多于两个脂质被连接,两个或多个脂质为相同的,或是所有的脂质为不同的。

[0337] 因此,由于肽的脂质部分会自发地整合到脂质体的脂双层中,本文提供的脂化肽被纳入到脂质体中。因此,在一个实施方案中,脂肽呈现在脂质体的“表面”。在替代的实施方案中,肽被包封在脂质体中。

[0338] 糖脂肽包含一个或多个糖基化氨基酸,其中至少一个糖基化氨基酸包含与疾病有关的糖表位,比如与肿瘤有关的糖表位,和一个或多个脂化氨基酸。

[0339] 在一些实施方案中,本文所述的脂质体疫苗制剂中存在的糖脂肽是糖基化双脂肽。在一些这样的实施方案中,连接到 SEQ ID NO:1 的糖基化核心串联重复的双脂肽包含序列

[0340] $H_2N-(aa_1)*(aa_2)*(aa_3)-OH$

[0341] 其中

[0342] aa_1 在每次出现时独立地选自 S、T、K、R 或 C;

[0343] aa_2 在每次出现时独立地选自 S、T、K、R 或 C;

[0344] aa_3 在每次出现时独立地选自 L 或 G;

[0345] * 在每次出现时独立地表示共价连接到氨基酸残基的脂质。

[0346] 如本文所用,以“*”表示的脂质共价连接到在“*”之前的氨基酸上。因此, $K*C*L$ 表示双脂化序列,其中 K 和 C 残基共价连接到脂质。双脂化序列的实例包括(且不限于) $S*S*L$ 、 $S*S*G$ 、 $S*K*L$ 、 $T*S*L$ 、 $R*S*L$ 、 $C*T*G$ 等。其他的类似排列也被涵盖在本文所示实施方案的范围内。

[0347] 在一些这样的实施方案中,双脂化序列连接到 SEQ ID NO:1 核心串联重复的 N 末端。在一些其他的此类实施方案中,双脂化序列连接到 SEQ ID NO:1 核心串联重复的 C 末端。

[0348] 在一些实施方案中,本文所述的脂质体疫苗制剂中存在的糖脂肽,在其 C 末端区域包含序列 SSL,其中两个丝氨酸均被脂化。

[0349] 因此,本文提供包含 MUC1 糖脂肽的疫苗制剂。在一些实施方案中,此类合成的 MUC1 糖脂肽包含一个或多个拷贝的 SEQ ID NO:1 核心串联重复肽,该肽模拟存在于癌细胞上的 MUC1 肽表位。

[0350] 在一些实施方案中,本文提供包含肽的 MUC1 糖脂肽,该肽包含至少两个拷贝的核心串联重复:

[0351] TSAPDTRPAPGSTAPPAHGV (SEQ ID NO:1)

[0352] 或与 SEQ ID NO:1 至少 85% 相同的序列,或其线性排列;

[0353] 其中

[0354] S 和 T 在每次出现时独立地任选地被癌症相关的糖表位 Te 所取代;和

[0355] 共价连接到 (a) 的脂肽,其具有通式:

[0356] $H_2N-(aa_1)*(aa_2)*(aa_3)-OH$

[0357] 其中

[0358] aa_1 在每次出现时独立地选自 S、T、K、R 或 C;

[0359] aa_2 在每次出现时独立地选自 S、T、K、R 或 C;

[0360] aa_3 在每次出现时独立地选自 L 或 G;

[0361] * 在每次出现时独立地表示共价连接到氨基酸残基的脂质。

[0362] 在一些实施方案中,本文提供 MUC1 糖脂肽,其包含:

[0363] (a) 肽,其包含至少两个拷贝的核心串联重复:

[0364] T(Te)S(Te)APDT(Te)RPAPGS(Te)T(Te)APPAHGV, SEQ ID NO:18 或与 SEQ ID NO:18 至少 85% 相同的序列,或其线性排列;

[0365] 其中

[0366] Te 表示癌症相关的糖表位；

[0367] (b) 共价连接到 (a) 的脂肽, 其具有通式：

[0368] $H_2N-S^*S^*L-OH$

[0369] 其中

[0370] * 在每次出现时独立地表示共价连接到丝氨酸残基的脂质。

[0371] 在一些实施方案中, 本文提供包含肽的 MUC1 糖脂肽, 该肽包含至少两个拷贝的核心串联重复：

[0372] TSAPDT (Te) RPAPGS (Te) T (Te) APPAHGV (SEQ ID NO:19) 或与 SEQ ID NO:19 至少 85% 相同的序列, 或其线性排列；

[0373] 其中

[0374] Te 是癌症相关的糖表位；和

[0375] 共价连接到 (a) 的脂肽, 其具有通式：

[0376] $H_2N-(aa_1)*(aa_2)*(aa_3)-OH$

[0377] 其中

[0378] aa_1 在每次出现时独立地选自 S、T、K、R 或 C；

[0379] aa_2 在每次出现时独立地选自 S、T、K、R 或 C；

[0380] aa_3 在每次出现时独立地选自 L 或 G；

[0381] * 在每次出现时独立地表示共价连接到氨基酸残基的脂质；

[0382] 在特定的实施方案中, 本文所述的脂质体疫苗制剂是含有 43 个氨基酸的合成糖脂肽, 其具有两个拷贝的 SEQ ID NO:1, 以及连接到 C 末端的双脂化的三肽序列, 如下所示：

[0383] TSAPDT (Tn) RPAPGS (Tn) T (Tn) APPAHGVTSAPDT (Tn) RPAPGS (Tn) T (Tn) APPAHGVS*S*L-OH (SEQ ID NO:2)

[0384] 其中

[0385] Tn 是 GalNAc α 1。

[0386] 有六个用 (Tn) 名称所表示的 α -糖基化的丝氨酸和苏氨酸部分。Tn 是经由 α 糖苷键连接的 (GalNAc α 1)N-乙酰半乳糖胺 (GalNAc) 的缩写。存在两个被指定为 S* 的 C 末端肉豆蔻基丝氨酸残基, 其用来将该肽锚定在药物产品的脂质体中, 并增强免疫识别。所有的氨基酸为天然的 L 异构体, 且 O-连接的、GalNAc 修饰的丝氨酸和苏氨酸均由 α 糖苷键连接。在序列中不存在半胱氨酸, 因此在该肽中不可能有二硫键三级结构或在肽之间的交联。

[0387] 在一些实施方案中, 本文提供的疫苗制剂包含 SEQ ID NO:2 的盐。此类盐的实例包括(且不限于)乙酸盐、柠檬酸盐、酒石酸盐、甲磺酸盐、苯磺酸盐、甲苯磺酸盐、顺丁烯二酸盐、反丁烯二酸盐、草酸盐、三氟甲磺酸盐、三乙胺盐、二异丙基乙胺盐等。此类盐的进一步实例包括(且不限于)盐酸盐、氢溴酸盐、磷酸盐、硫酸盐等。在其他实施方案中, SEQ ID NO:2 的盐是三氟乙酸盐。在特定实施方案中, SEQ ID NO:2 的盐是具有下式的乙酸盐： $C_{248}H_{407}N_{59}O_{90} \cdot XC_2H_3O_2$ 。

[0388] 佐剂

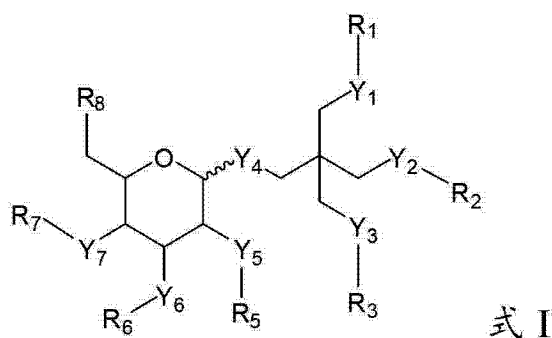
[0389] 包含 SEQ ID NO:1 核心串联重复的糖脂肽任选地连同佐剂一起施用, 以增强对于抗原的特定应答。在一个实施方案中, 以脂质为基础的佐剂(比如脂质 A 及其衍生物)适用

于本文所述的糖脂肽疫苗制剂。例如单磷酸脂质 A (MPLA) 是一种可引起脂质体抗原对特定 T 淋巴细胞的呈递增加的佐剂。在另一实施方案中,胞壁酰二肽(MDP)也是适合与本文所述的疫苗制剂共同使用的佐剂。

[0390] 在进一步的实施方案中,适合与本文提供的脂质体疫苗制剂一起使用的佐剂包括刺激性细胞因子,比如白细胞介素-2(IL-2)。在一些实施方案中,IL-2 有益地与脂质体一起配制。在一些实施方案中,佐剂是 toll 样受体(toll-like receptor)的调节物。toll 样受体调节物的实例包括 TLR-9 激动剂,且不限于 toll 样受体的小分子调节物,比如咪喹莫特(Imiquimod)。与式 I 或式 II 的佐剂组合使用的佐剂的其他实例包括(且不限于)皂苷、CpG ODN 等。

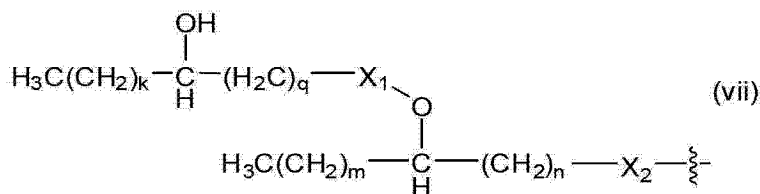
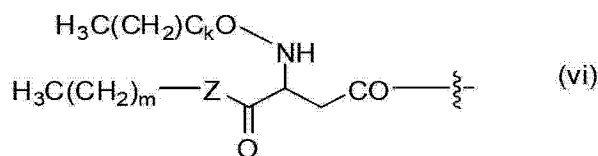
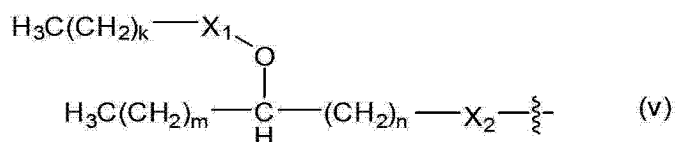
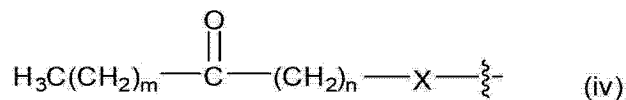
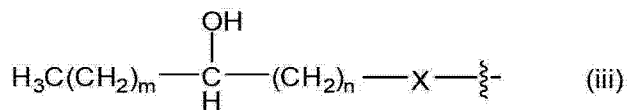
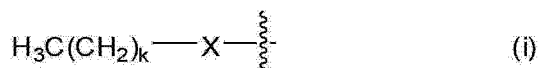
[0391] 脂质 A 的合成模拟物也被期望与本文所述的疫苗制剂一起使用。在一些这样的实施方案中,佐剂是式 I 的化合物:

[0392]

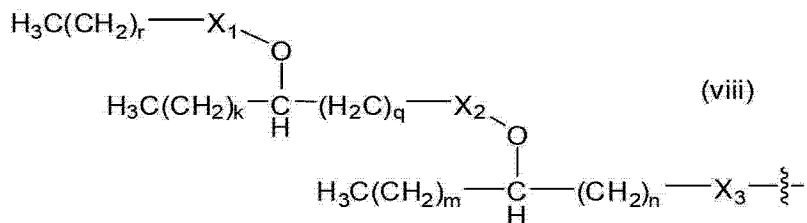


[0393] 其中 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的至少一个为选自下组的强亲脂性基团:

[0394]



和



[0395] 其中 X、X₁、X₂和 X₃独立地为 -CO- 或 -CH₂-；

[0396] Z 为 -NH- 或 -O；

[0397] k、m 和 r 独立地为 0 至 30 的整数(包含 0 和 30)，n 和 q 独立地为 0 至 6 的整数(包含 0 和 6)；

[0398] 其中 Y₄为选自 -O-、-S- 和 -NH- 的间隔基，其中 Y₁R₁、Y₂R₂、Y₃R₃、Y₅R₅、Y₆R₆和 Y₇R₇中

的至少一个为单价磷酸等效物(MPE),

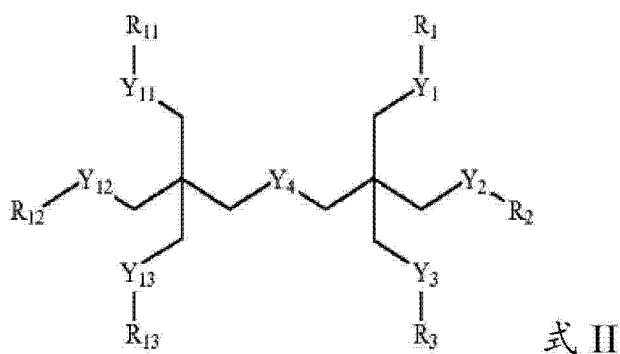
[0399] 其中每个单价磷酸等效物独立地为 (a) $-R' -C(O)OH$, 其中 R' 是取代或未取代的 1-4 个碳的烷基, 或 (b) 独立地选自 $-OB(OH)OR$ 、 $-OP(O)(OH)OR$ 、 $-OS(O)(O)(OH)OR$ 和 $-OP(=O)(OH)-O-P(=O)(OH)OR$, 其中 R 是氢或取代或未取代的 1-4 个碳的烷基, 并且如果 R 是取代的烷基, 则该取代基是 $-OH$ 或 $-NH_2$,

[0400] 其中 R_8 选自 H 、 OH 、 OR_9 、与 Y_8 组合形成如先前所定义的单价磷酸等效物的部分, 和如上所定义的基团 (i)-(viii); 其中 R_9 为 1 至 10 个碳长度的烷基或酰基; 且

[0401] 其中糖苷键是 α 或 β ;

[0402] 或为式 II 化合物的化合物

[0403]



[0404] 其中 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_{11} 、 R_{12} 和 R_{13} 中的至少一个为选自上述 (i)-(viii) 的强亲脂性基团;

[0405] 其中 Y_4 为选自 $-O-$ 、 $-S-$ 和 $-NH-$ 的间隔基, 且

[0406] 其中 Y_1R_1 、 Y_2R_2 、 Y_3R_3 、 $Y_{11}R_{11}$ 、 $Y_{12}R_{12}$ 和 $Y_{13}R_{13}$ 中的至少一个独立地为如先前所定义的单价磷酸等效物;

[0407] 其中下列限制适用于上述的 (I) 以及 (II):

[0408] Y_1 、 Y_2 、 Y_3 、 Y_5 、 Y_6 、 Y_7 、 Y_{11} 、 Y_{12} 和 Y_{13} 为独立地选自 $-O-$ 、 $-S-$ 和 $-NH-$ 的间隔基;

[0409] R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_{11} 、 R_{12} 和 R_{13} 独立地为氢,

[0410] 与共同编号的 Y 基团形成如先前所定义的单价磷酸等效物的部分, 或

[0411] 选自上述 (i)-(viii) 的强亲脂性基团。

[0412] 所述化合物的强亲脂性基团共同提供至少两个主要碳链, 且

[0413] 所述强亲脂性基团的主要碳链共同提供至少 30 个碳原子;

[0414] 或该化合物为 I 或 II 的药学上可接受的盐。

[0415] 在一些实施方案中, 适合本文所述的脂质体疫苗制剂的佐剂为式 I 的化合物或其药学上可接受的盐。

[0416] 在一些实施方案中, 适合本文所述的脂质体疫苗制剂的佐剂是式 II 的化合物或其药学上可接受的盐。

[0417] 在一些实施方案中, Y_4 是 $-O-$ 。在一些实施方案中, 至少一个强亲脂性基团符合 (i), 且对于至少一个这样的基团, k 是 4-30 的整数。在一些实施方案中, 至少一个强亲脂性基团符合 (ii), 且对于至少一个这样的基团, $2k+3n$ 是 4-30 的整数。在一些实施方案中, 至少一个强亲脂性基团符合 (iii), 且对于至少一个这样的基团, $m+n+1$ 是 4-30。在一

些实施方案中,至少一个强亲脂性基团符合 (iv),并且对于至少一个这样的基团, $m+n+1$ 是 4-30。在一些实施方案中,至少一个强亲脂性基团符合 (v),并且对于至少一个这样的基团, $m+n+k+1$ 是 4-30。在一些实施方案中,至少一个强亲脂性基团符合 (vi),并且对于至少一个这样的基团, $k+m+2$ 是 4-30。在一些实施方案中,至少一个强亲脂性基团符合 (vii),并且对于至少一个这样的基团, $k+q+m+n$ 是 4-30。在一些实施方案中,至少一个强亲脂性基团符合 (viii),并且对于至少一个这样的基团, $r+k+q+m+n$ 是 5-30。

[0418] 在一些实施方案中, Y_1 、 Y_2 、 Y_3 、 Y_4 、 Y_5 、 Y_6 、 Y_7 、 Y_{11} 、 Y_{12} 和 Y_{13} 独立地为 $-O-$ 或 $-NH-$ 。在一些实施方案中, Y_1 、 Y_2 、 Y_3 、 Y_4 、 Y_5 、 Y_6 和 Y_7 独立地由 $-O-$ 或 $-NH-$ 所组成。在一些实施方案中, Y_1 、 Y_2 、 Y_3 、 Y_4 、 Y_{11} 、 Y_{12} 、 Y_{13} 独立地为 $-O-$ 或 $-NH-$ 。

[0419] 在一些实施方案中,每个单磷酸等效物是 $-OP(O)(OH)(OH)$ 。

[0420] 在一些实施方案中,式 I 的佐剂是一种化合物,其中

[0421] Y_4 是 $-O-$;

[0422] Y_1 、 Y_2 和 Y_7 是 $-O-$;

[0423] Y_3 、 Y_5 和 Y_6 独立地为 $-O-$ 或 $-NH-$;

[0424] R_1 、 R_3 、 R_5 和 R_6 独立地为氢或选自 (i)-(viii) 的强亲脂性基团;

[0425] R_1 、 R_3 、 R_5 和 R_6 中的至少一个不是氢;

[0426] R_2 和 R_7 独立地选自 H 、 $-P(O)(OH)_2$ 、 $-SO_3H$ 、 $-P(O)(OH)(OCH_2CH_2NH_2)$ 和 $-CH_2COOH$;且

[0427] R_8 选自 H 、 OH 、 OSO_3H 和 OR_9 , 其中 R_9 是 1 至 10 个碳长度的烷基或酰基。

[0428] 在一些式 I 的实施方案中,

[0429] Y_4 是 $-O-$;

[0430] Y_2 和 Y_{12} 是 $-O-$;

[0431] Y_1 、 Y_3 、 Y_{11} 和 Y_{13} 独立地选自 $-O-$ 、 $-NH-$ 和 $-S-$;

[0432] R_1 、 R_3 、 R_{11} 和 R_{13} 独立地为氢或选自 (i)-(viii) 的强亲脂性基团;

[0433] R_1 、 R_3 、 R_5 和 R_6 中的至少一个不是氢;且

[0434] R_2 和 R_{12} 独立地选自 H 、 $-P(O)(OH)_2$ 、 $-P(O)(OH)(OCH_2CH_2NH_2)$ 和 $-CH_2COOH$ 。

[0435] 在一些实施方案中, R_1 、 R_3 、 R_5 和 R_6 独立地为氢或选自 (i)-(viii) 的强亲脂性基团, R_1 、 R_3 、 R_5 和 R_6 中的至少一个不是氢,且 R_2 和 R_7 独立地选自 H 、 $-P(O)(OH)_2$ 、 $-SO_3H$ 、 $-P(O)(OH)(OCH_2CH_2NH_2)$ 和 $-CH_2COOH$;且 R_8 选自 H 、 OH 、 OSO_3H 和 OR_9 , 其中 R_9 是 1 至 10 个碳长度的烷基或酰基。

[0436] 在一些实施方案中, R_1 、 R_3 、 R_{11} 和 R_{13} 独立地为氢或选自 (i)-(viii) 的强亲脂性基团; R_1 、 R_3 、 R_5 和 R_6 中的至少一个不是氢;且 R_2 和 R_{12} 独立地选自 H 、 $-P(O)(OH)_2$ 、 $-P(O)(OH)(OCH_2CH_2NH_2)$ 和 $-CH_2COOH$ 。

[0437] 在一些实施方案中,每个单磷酸等效物是 $-OP(O)(OH)(OH)$ 。

[0438] 在一些实施方案中,上述化合物的强亲脂性基团共同提供至少三个主要碳链,且其中所述强亲脂性基团的主要碳链共同提供至少 40 个碳原子,所述化合物具有免疫刺激活性。在一些实施方案中,上述化合物的强亲脂性基团共同提供至少四个主要碳链,且其中该主要碳链共同提供至少 50 个碳原子,所述化合物具有免疫刺激活性。

[0439] 在一些实施方案中,该强亲脂性基团共同提供六个主要碳链。在一些实施方案中,每个主要碳链的特征在于所述链中有 10、12、14、16、18 或 20 个碳原子。

[0440] 在一些实施方案中, Y_3 和 Y_5 是 $-NH-$, 且 Y_6 是 $-O-$ 。在一些实施方案中, R_3 、 R_5 和 R_6 是根据 (v) 的强亲脂性基团, 且 k 、 X_1 、 m 、 n 和 X_2 为独立选择值。在一些实施方案中, R_3 、 R_5 和 R_6 的 k 和 m 独立地为 8-18。在一些实施方案中, X_1 是 $-CO-$ 、 X_2 是 $-CO-$ 且 $n=1$ 。在一些实施方案中, k 和 m 独立地为 8、10、12、14、16 或 18。在一些实施方案中, k 和 m 为 12。在一些实施方案中, R_8 是 OH 。在一些实施方案中, Y_7 是 $-O-$ 且 R_7 是 $-P(=O)(OH)(OH)$ 。在一些实施方案中, Y_2 是 $-O-$ 且 R_2 是 H 。在一些实施方案中, Y_2 是 $-O-$ 且 R_2 是 $-P(=O)(OH)(OH)$ 。在一些实施方案中, R_1-R_3 是氢。在一些实施方案中, Y_1-Y_3 是 $-O-$ 且 R_1-R_3 是氢。在一些实施方案中, R_1-R_3 是氢, 且 Y_1-Y_3 中的两个是 $-O-$ 且另一个是 $-NH-$ 。在一些实施方案中, R_1-R_3 中的两个是氢。在一些实施方案中, $-Y_1R_1$ 、 $-Y_2R_2$ 和 $-Y_3R_3$ 中的两个是 $-OH$ 。在一些实施方案中, $-Y_1R_1$ 、 $-Y_2R_2$ 和 Y_3R_3 中的一个是 $-OH$ 且 $-Y_1R_1$ 、 $-Y_2R_2$ 和 Y_3R_3 中的一个为 $-NH_2$ 。

[0441] 在一些实施方案中, R_1-R_4 中的一个为氢。在一些实施方案中, R_1-R_3 中没有一个是氢。在一些实施方案中, R_1-R_3 中的一个为强亲脂性基团。在一些实施方案中, R_1-R_3 中的至少两个包含强亲脂性基团。在一些实施方案中, R_1-R_3 中的两个为强亲脂性基团。在一些实施方案中, R_1-R_4 中的三个为强亲脂性基团。

[0442] 在一些实施方案中, 间隔基 Y_1-Y_4 和 $Y_{11}-Y_{13}$ 中的每一个是 $-O-$ 。在一些实施方案中, 间隔基 Y_1-Y_4 中的三个是 $-O-$ 且剩余的间隔基是 $-NH-$ 。

[0443] 在一些实施方案中, 式 I 或式 II 化合物提供一个磷酸等效物。在一些实施方案中, 式 I 或式 II 化合物提供两个磷酸等效物。

[0444] 在一些实施方案中, (b) 适用且 R 为羟基。在一些实施方案中, (b) 适用, 且所述磷酸等效物包含 $-OP(=O)(OH)O-$ 。在一些实施方案中, (b) 适用且 R 是取代或未取代的 1-4 个碳的烷基。

[0445] 在一些实施方案中, R 是 $CH_2CH_2NH_2$ 。在一些实施方案中, (a) 适用。在一些实施方案中, R' 是 $-CH_2-$ 。在一些实施方案中, 糖是氨基糖。在一些实施方案中, 糖是葡糖胺。

[0446] 在一些实施方案中, 至少一个磷酸等效物是 Y_5R_5 、 Y_6R_6 、 Y_7R_7 或 Y_8R_8 。在一些实施方案中, 至少一个磷酸等效物连接到所述糖单元。在一些实施方案中, 至少一个磷酸等效物是 Y_1R_1 、 Y_2R_2 或 Y_3R_3 。在一些实施方案中, R_5-R_8 中的至少一个包含强亲脂性基团。在一些实施方案中, R_5-R_7 中的两个或多个包含强亲脂性基团。

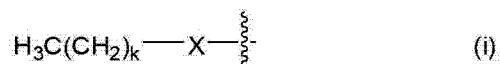
[0447] 在一些实施方案中, 至少一个强亲脂性基团只包含一个主要碳链。在一些实施方案中, 至少一个强亲脂性基团只包含两个主要碳链。在一些实施方案中, 至少一个强亲脂性基团只包含三个主要碳链。在一些实施方案中, 强亲脂性基团共同提供三个主要碳链。在一些实施方案中, 强亲脂性基团共同提供四个主要碳链。在一些实施方案中, 强亲脂性基团共同提供五个主要碳链。在一些实施方案中, 强亲脂性基团共同提供六个主要碳链。在一些实施方案中, 强亲脂性基团共同提供七个主要碳链。在一些实施方案中, 强亲脂性基团共同提供八个主要碳链。

[0448] 在一些实施方案中, 每个主要碳链为 10-20 个碳。在一些实施方案中, 每个主要碳链为 12-16 个碳。在一些实施方案中, 强亲脂性基团的主要碳链共同提供至少 40 个碳原子。在一些实施方案中, 强亲脂性基团的主要碳链共同提供至少 50 个碳原子。在一些实施方案中, 强亲脂性基团的主要碳链共同提供至少 60 个碳原子。在一些实施方案中, 强亲脂性基团的主要碳链共同提供至少 70 个碳原子。在一些实施方案中, 强亲脂性基团的主要碳

链共同提供至少 80 个碳原子。在一些实施方案中,强亲脂性基团的主要碳链共同提供至少 90 个碳原子。在一些实施方案中,强亲脂性基团的主要碳链共同提供不超过 90 个碳原子。在一些实施方案中,强亲脂性基团的主要碳链共同提供不超过 80 个碳原子。在一些实施方案中,强亲脂性基团的主要碳链共同提供不超过 70 个碳原子。在一些实施方案中,强亲脂性基团的主要碳链共同提供不超过 60 个碳原子。

[0449] 在一些实施方案中,至少一个强亲脂性基团选自:

[0450]



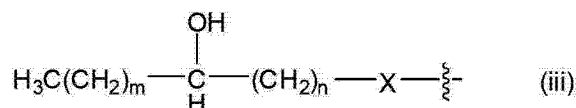
[0451] 其中 X 是 $-\text{CO}-$ 或 $-\text{CH}_2-$, k 是 4-30 的整数;

[0452]



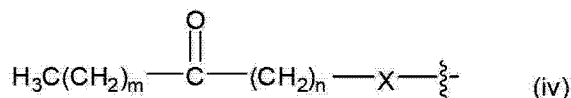
[0453] 其中 n 是 0-6 的整数, k 是 0-30 的整数, 且 $2k+3n$ 是 4-30 的整数;

[0454]



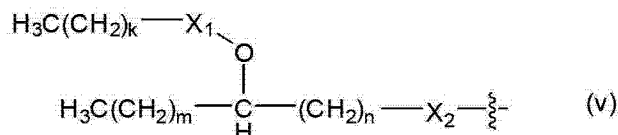
[0455] 其中 m 和 n 是整数 (n 为 0-6, 而 m 为 0-30), 且 $m+n+1$ 是 4-30;

[0456]



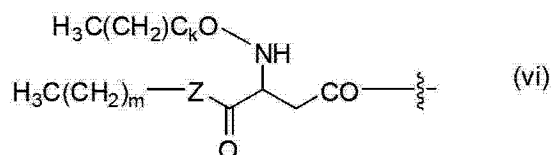
[0457] 其中 $m+n+1$ 是 4-30;

[0458]



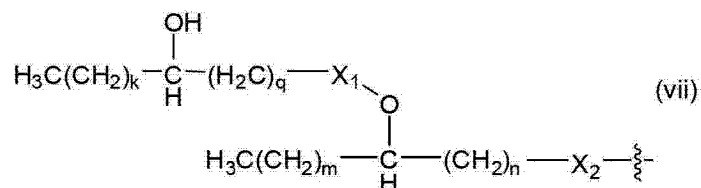
[0459] 其中 X_1 和 X_2 独立地为 $-\text{CO}-$ 或 $-\text{CH}_2-$, 且 $m+n+k+1$ 是 4-30;

[0460]



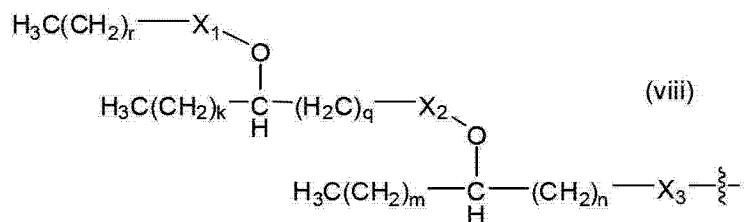
[0461] 其中 Z 是 $-\text{NH}-$ 或 $-\text{O}-$, 且 $k+m+2$ 是 4-30;

[0462]



[0463] 其中 q 是 0-6 的整数, 且 $k+q+m+n$ 是 4-30; 及

[0464]

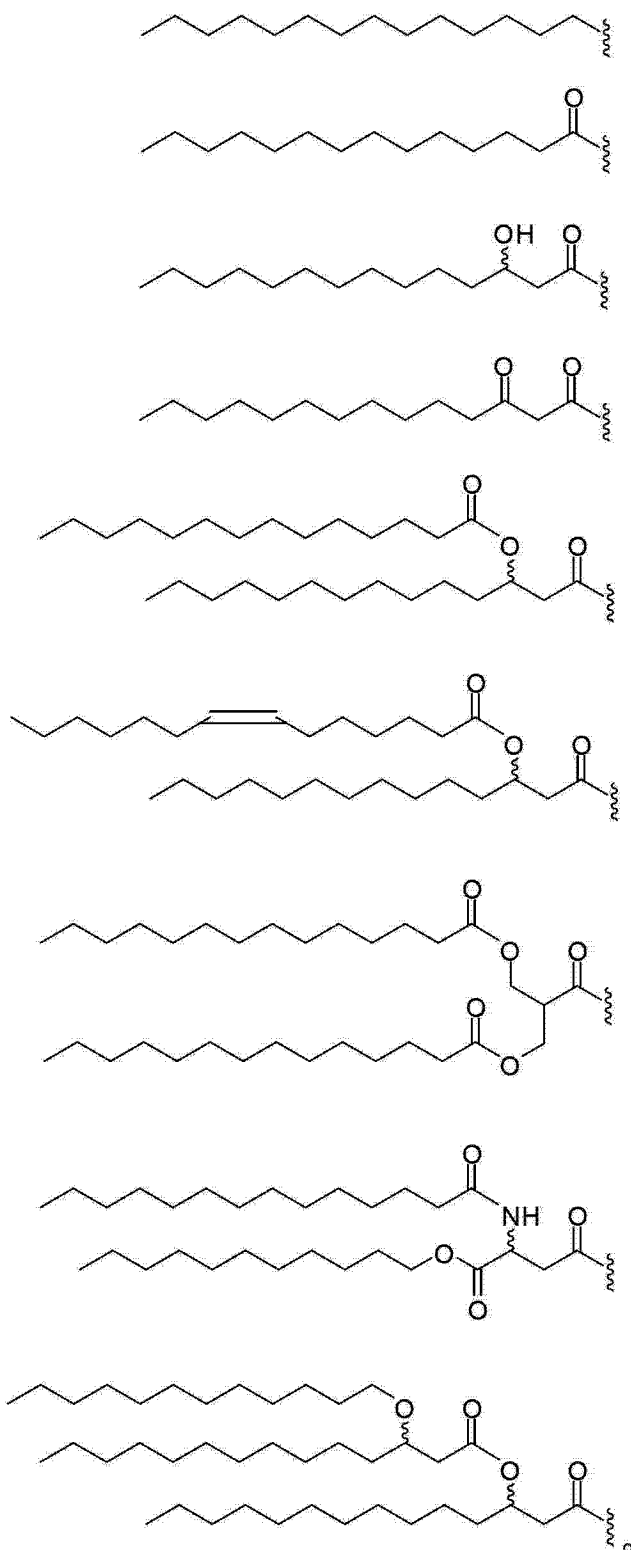


[0465] 其中 X_1 、 X_2 和 X_3 独立地为 $-\text{CO}-$ 或 $-\text{CH}_2-\text{CO}_2-$, r 是 0-6 的整数, 且 $r+k+q+m+n$ 是 5-30。

[0466] 在一些实施方案中, 所有的强亲脂性基团选自结构 (i)-(viii)。在一些实施方案中, 至少一个强亲脂性基团是结构 (i)。在一些实施方案中, 至少一个强亲脂性基团是结构 (ii)。在一些实施方案中, 至少一个强亲脂性基团是结构 (iii)。在一些实施方案中, 至少一个强亲脂性基团是结构 (iv)。在一些实施方案中, 至少一个强亲脂性基团是结构 (v)。在一些实施方案中, 至少一个强亲脂性基团是结构 (vi)。在一些实施方案中, 至少一个强亲脂性基团是结构 (vii)。在一些实施方案中, 至少一个强亲脂性基团是结构 (viii)。

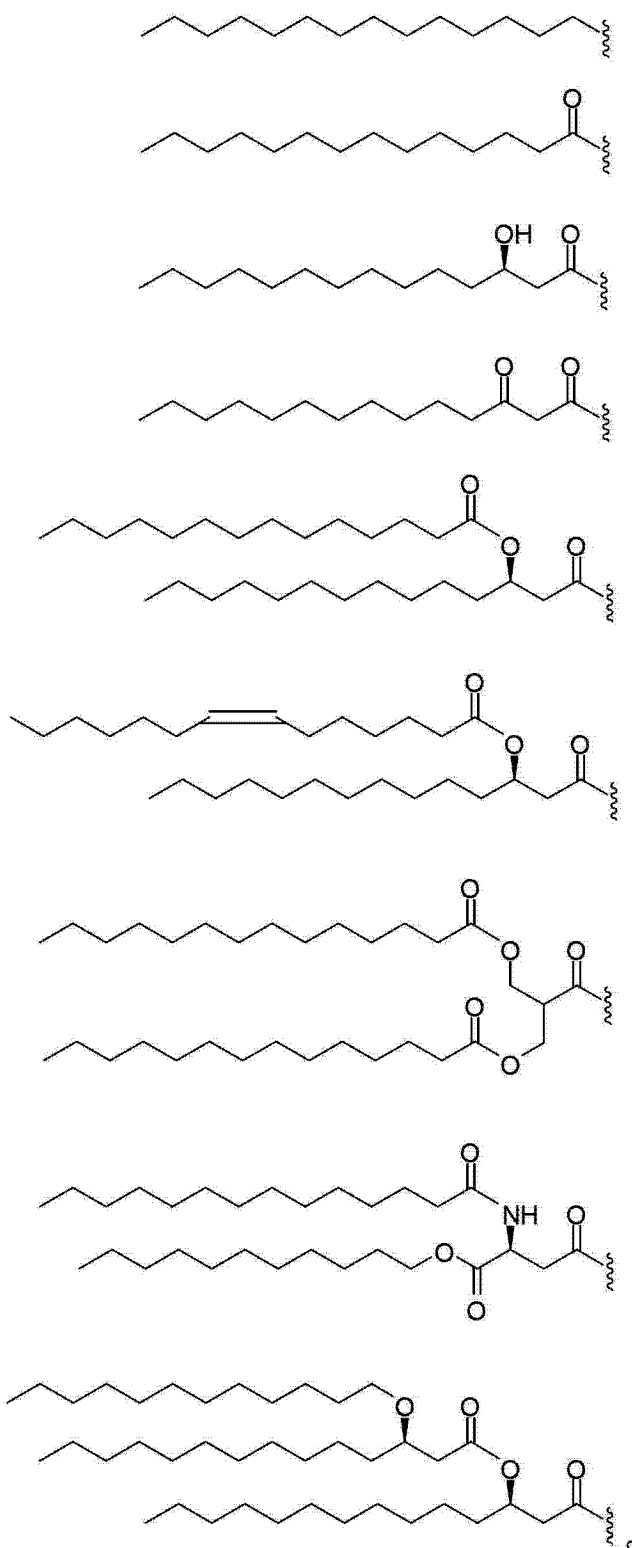
[0467] 在一些实施方案中, 至少一个强亲脂性基团为以下所列结构中的一种:

[0468]



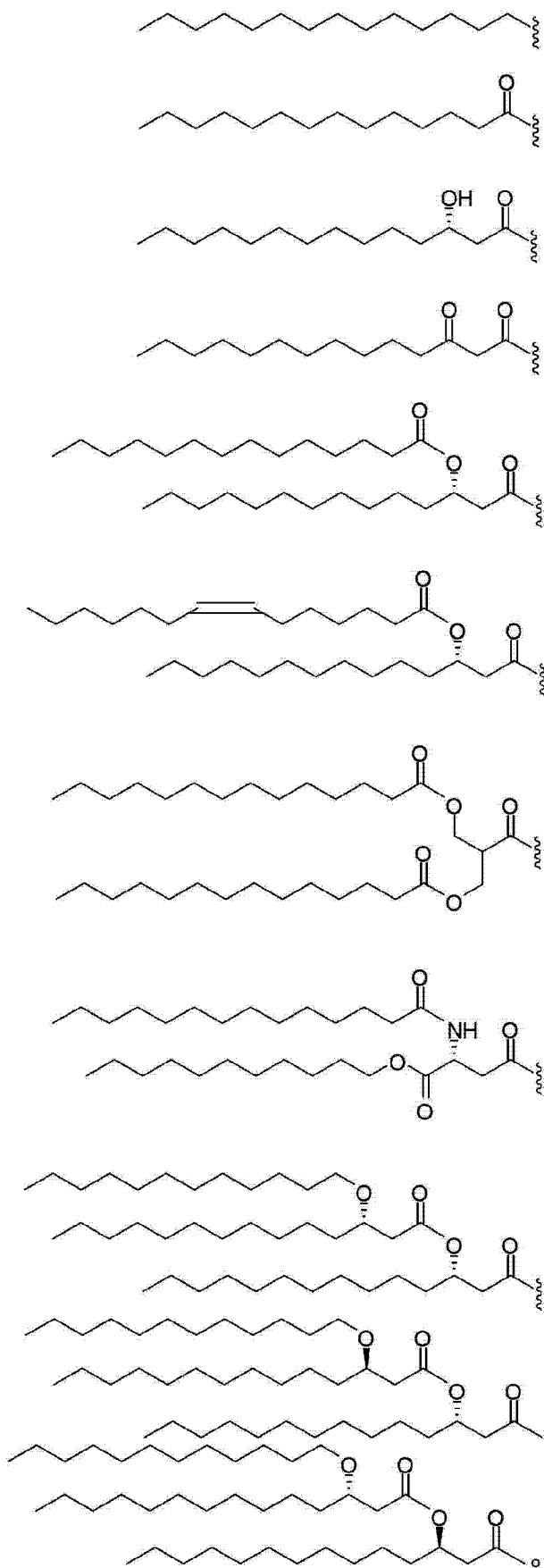
[0469] 在一些实施方案中,该至少一个强亲脂性基团包含 R 对映异构体。在一些实施方案中,该至少一个强亲脂性基团包含 S 对映异构体。在一些实施方案中,该至少一个强亲脂性基团是外消旋物。在一些实施方案中,该至少一个强亲脂性基团包含 RR、RS 和 SR 或 SS 非对映异构体。所有外消旋物、对映异构体或非对映异构体均被涵盖在本文所示的实施方案的范围中。在一些实施方案中,至少一个强亲脂性基团为以下所列结构中的一种:

[0470]



[0471] 在一些实施方案中,该至少一个强亲脂性基团为以下所列结构中的一种:

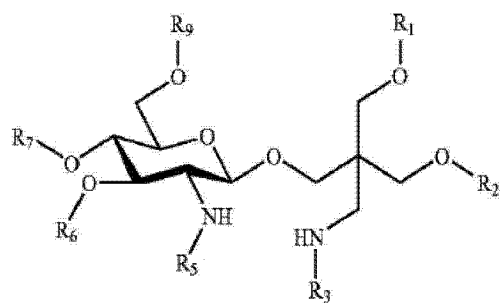
[0472]



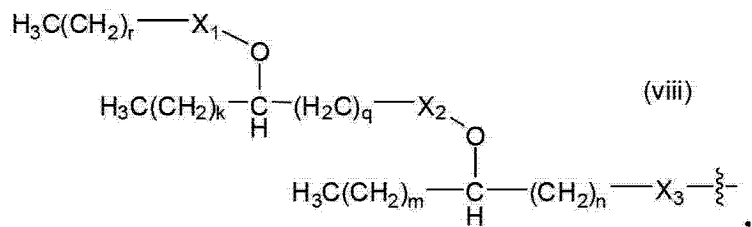
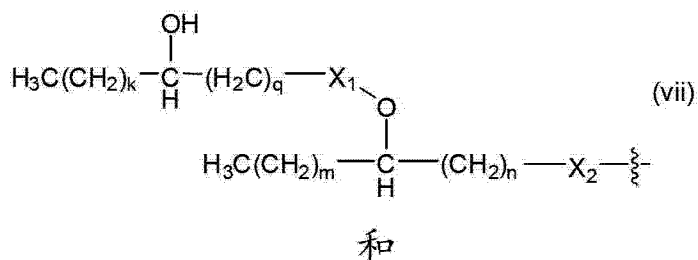
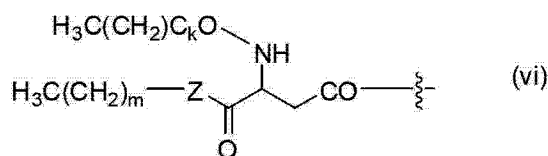
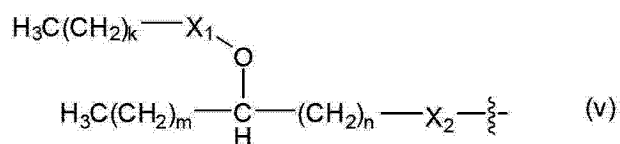
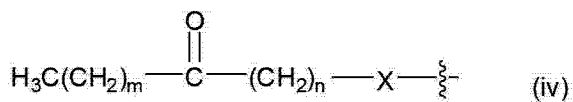
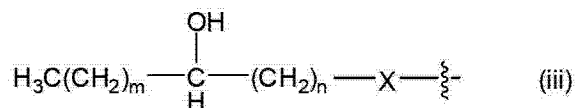
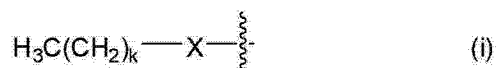
[0473] 在一些实施方案中,每个强亲脂性基团独立地为以上所列结构中的一种。

[0474] 在一些实施方案中,佐剂为如下定义的化合物:

[0475]

[0476] 其中 R_1 、 R_3 、 R_5 和 R_6 独立地为氢或选自下组的亲脂性基团：

[0477]



[0478] 其中 X、X₁、X₂和 X₃独立地为 -CO- 或 -CH₂-；

[0479] Z 是 -NH- 或 -O-；

[0480] k、m 和 r 独立地为 0 至 30 的整数(包含 0 和 30)，

[0481] n 和 q 独立地为 0 至 6 的整数(包含 0 和 6)；

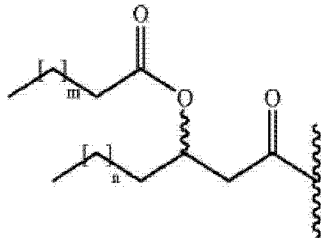
[0482] R₁、R₃、R₅和 R₆中的至少一个不是氢；

[0483] R_2 和 R_7 独立地选自 H 、 $-P(O)(OH)_2$ 、 $-SO_3H$ 、 $-P(O)(OH)(OCH_2CH_2NH_2)$ 和 $-CH_2COOH$; 且

[0484] R_9 是 H 或 1 至 10 个碳长度的烷基或酰基。

[0485] 在一些实施方案中, R_1 和 R_9 是氢; R_2 是氢或膦酰基 $-P(O)(OH)_2$; R_7 是膦酰基 $-P(O)(OH)_2$; 且 R_3 、 R_5 和 R_6 是相同或不同的下列结构的酰基

[0486]

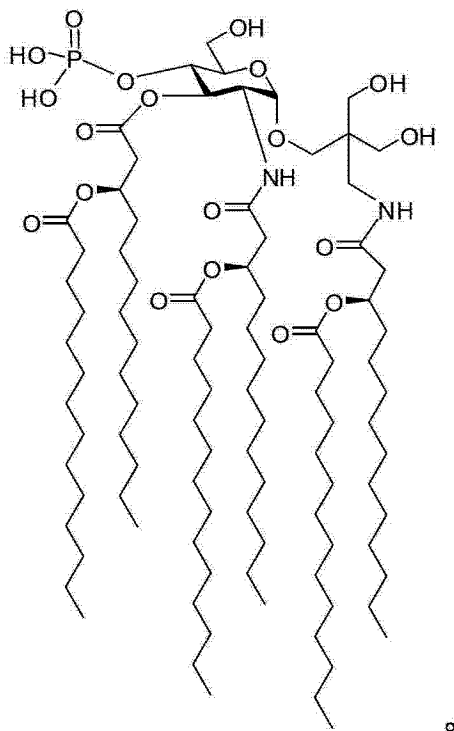


[0487] 其中 m 和 n 独立地选自 6 至 10 之间的整数(包含 6 和 10)。

[0488] 在一些实施方案中, R_3 、 R_5 是 R_6 是相同的。

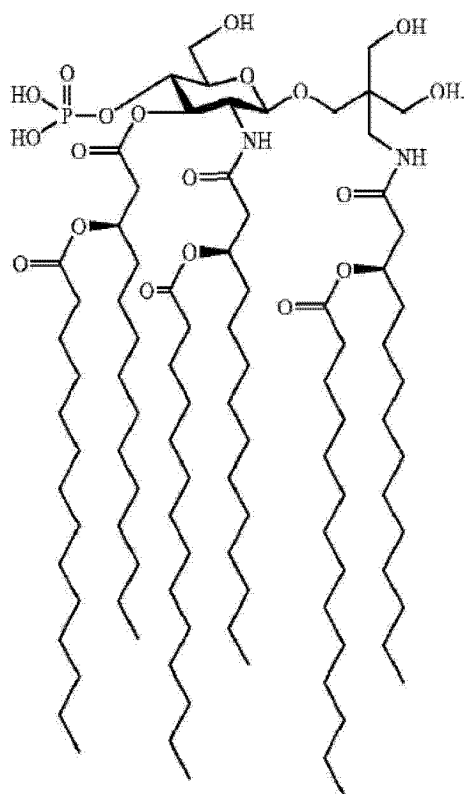
[0489] 在一些实施方案中, 佐剂是

[0490]



[0491] 在一些实施方案中, 佐剂具有下列结构

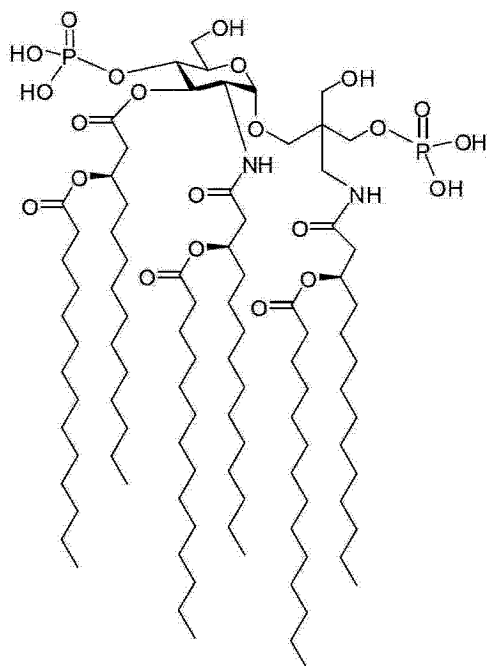
[0492]



(PET 脂质 A)

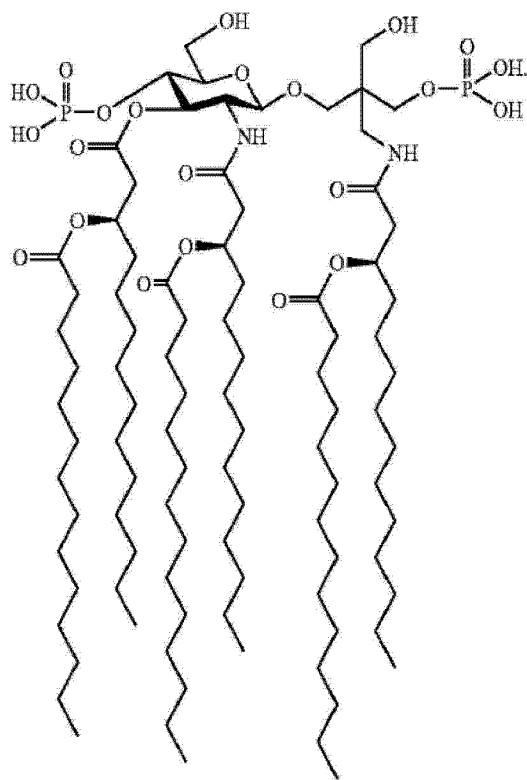
[0493] 在一些实施方案中,佐剂是:

[0494]

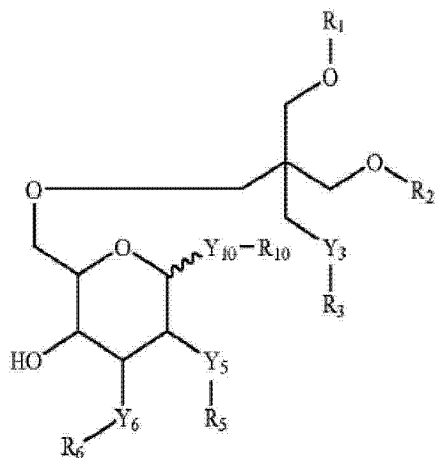


[0495] 在一些实施方案中,佐剂具有下列结构

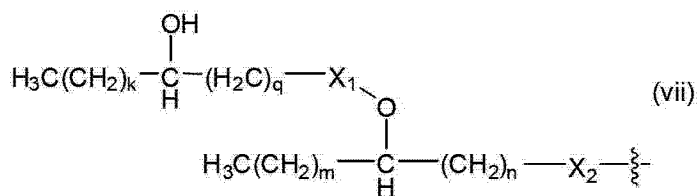
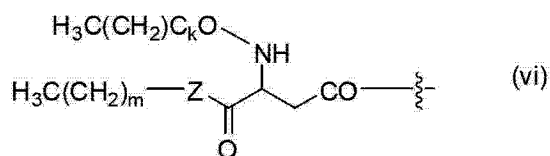
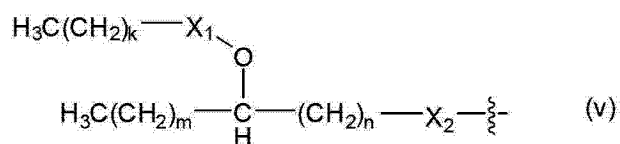
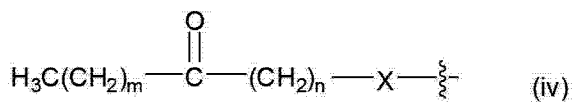
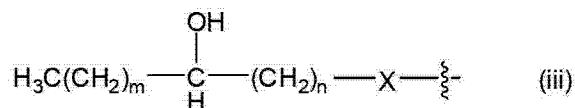
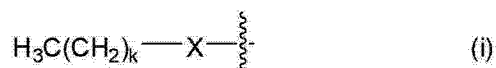
[0496]



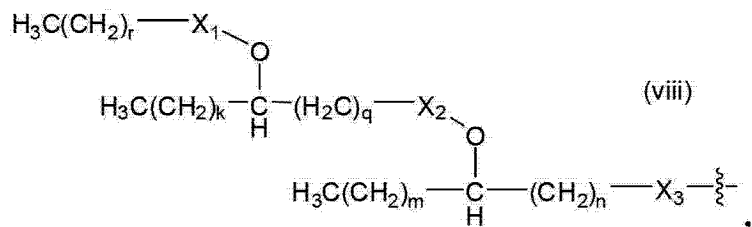
[0497] 在一些实施方案中,佐剂是由下列结构所定义的化合物或其药学上可接受的盐:
[0498]



[0499] 其中 Y₃、Y₅和 Y₆独立地为 -O- 或 -NH- ;
[0500] Y₁₀选自 -O-、-NH- 和 -S- ;
[0501] R₁、R₃、R₅和 R₆独立地为氢或选自下组的亲脂性基团
[0502]



和



[0503] 其中 X、X₁、X₂和 X₃独立地为 CO 或 CH₂;

[0504] Z 为 NH 或 O;

[0505] k、m 和 r 独立地为 0 至 30 的整数(包含 0 和 30),

[0506] n 和 q 独立地为 0 至 6 的整数(包含 0 和 6);

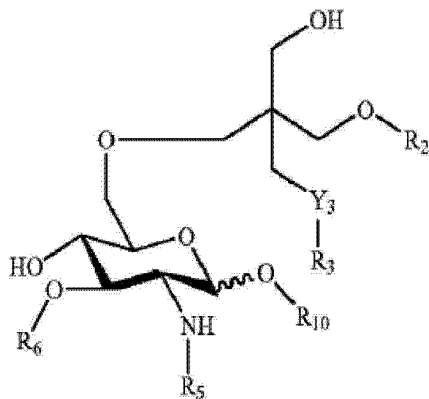
[0507] 且 R₁、R₃、R₅和 R₆中的至少一个不是氢原子;

[0508] R_2 选自 H 、 $-P(O)(OH)_2$ 、 $-SO_3H$ 、 $-P(O)(OH)(OCH_2CH_2NH_2)$ 和 $-CH_2COOH$ ；且

[0509] R_{10} 选自 H 、 $-P(O)(OH)_2$ 、 $-SO_3H$ 、 $-P(O)(OH)(OCH_2CH_2NH_2)-CH_2COOH$ 和 1 至 10 个碳长度的烷基。

[0510] 在一些实施方案中,佐剂具有下列结构

[0511]

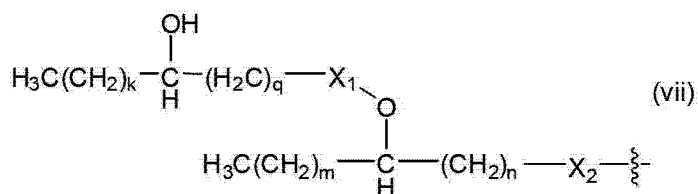
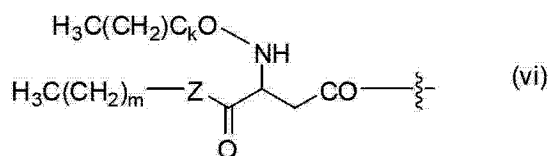
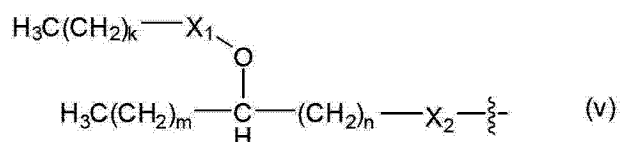
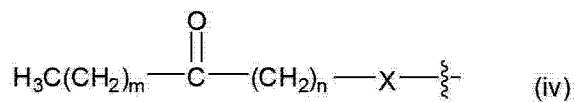
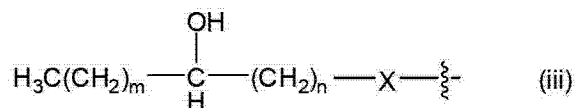
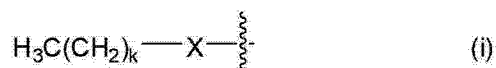


[0512] 其中 R_2 和 R_{10} 独立地为氢或膦酰基 ($-P(O)(OH)_2$), 且它们中的至少一个是膦酰基；

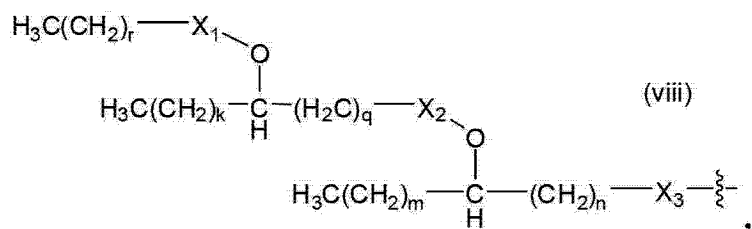
[0513] Y_3 是 $-O-$ 或 $-NH-$,

[0514] R_3 、 R_5 和 R_6 独立地为氢或选自下组的亲脂性基团

[0515]



和



[0516] 其中 X、X₁、X₂和 X₃独立地为 CO 或 CH₂;

[0517] Z 是 NH 或 O;

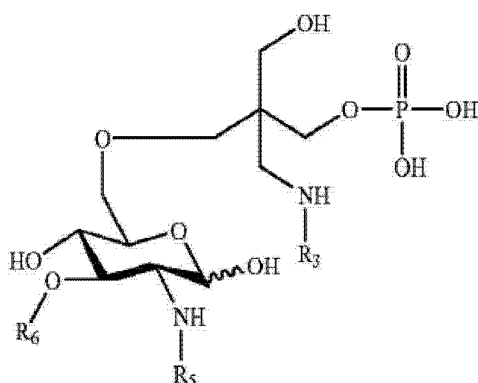
[0518] k、m 和 r 独立地为 0 至 30 的整数(包含 0 和 30),

[0519] n 和 q 独立地为 0 至 6 的整数(包含 0 和 6);

[0520] 且 R₃、R₅和 R₆中的至少一个不是氢。

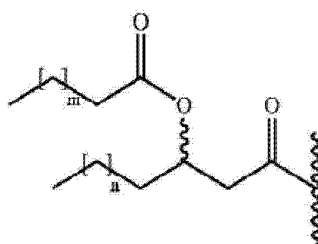
[0521] 在一些实施方案中,佐剂具有下列结构

[0522]



[0523] 其中 R₃、R₅和 R₆为相同或不同的下列结构的取代基

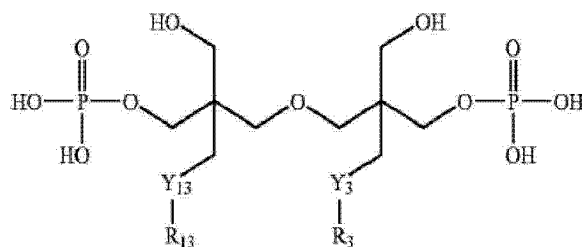
[0524]



[0525] 其中 m 和 n 独立地选自 6 至 10 之间的整数(包含 6 和 10)。

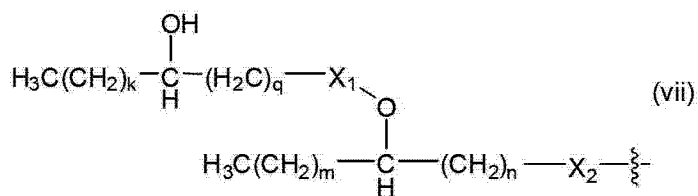
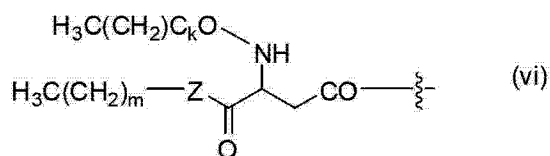
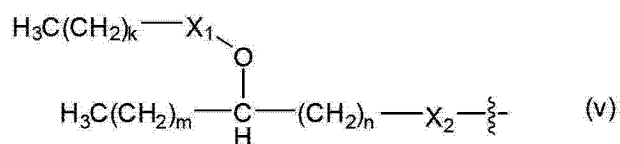
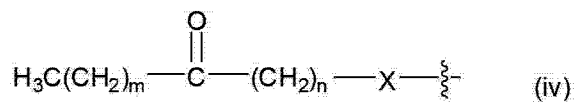
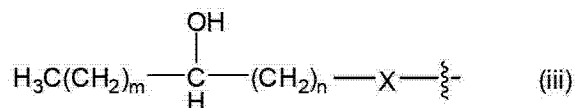
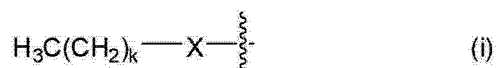
[0526] 在一些实施方案中,佐剂具有下列结构

[0527]

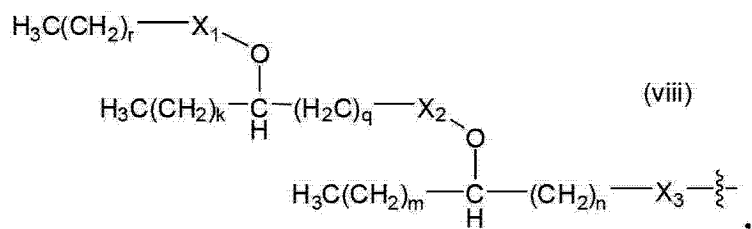


[0528] 其中 Y₃和 Y₁₃独立地为 -O- 或 -NH- ;R₃和 R₁₃为相同的取代基且为选自下组的强亲脂性基团 :

[0529]



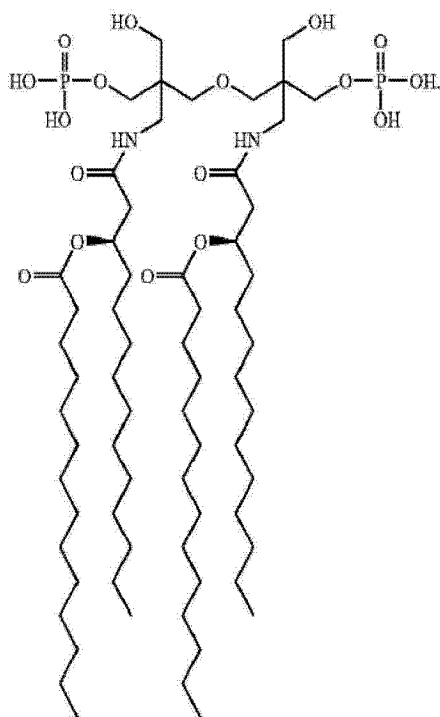
和



[0530] 其中 X、X₁、X₂和 X 独立地为 CO 或 CH₂;Z 是 NH 和 O;k、m 和 r 独立地为 0 至 30 的整数(包含 0 和 30),n 和 q 独立地为 0 至 6 的整数(包含 0 和 6)。

[0531] 在一些实施方案中,佐剂具有下列结构

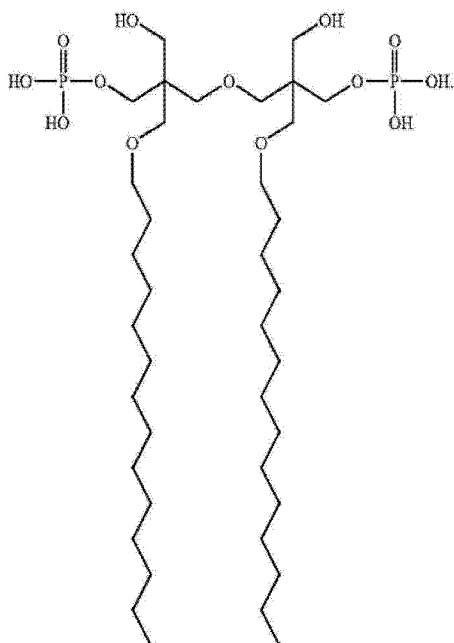
[0532]



。

[0533] 在一些实施方案中,佐剂具有下列结构

[0534]

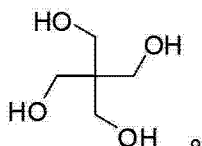


。

[0535] 在一些实施方案中,所述化合物的强亲脂性基团共同提供至少三个主要碳链,且其中所述强亲脂性基团的主要碳链共同提供至少 40 个碳原子。在一些实施方案中,所述化合物的强亲脂性基团共同提供至少四个主要碳链,且其中该主要碳链共同提供至少 50 个碳原子。在一些实施方案中,所述化合物的强亲脂性基团共同提供至少四个主要碳链,且其中该主要碳链共同提供至少 50 个碳原子。

[0536] 在一些实施方案中,式 I 或式 II 化合物包含季戊四醇(PET)单元或 PET 单元的衍生物。在一些这样的实施方案中,PET 单元具有以下结构:

[0537]



[0538] 在一些实施方案中,通过糖单元的开环修饰脂质 A,以提供 PET 基团;任选地修饰该 PET 基团(例如以产生醚衍生物、酰胺衍生物、酯衍生物等)。

[0539] 在一些式 II 的实施方案中,至少两个主要碳链在没有任何中间 PET 单元的情况下连接到第一 PET 单元,且至少两个主要碳链在没有任何中间 PET 单元的情况下连接到第二 PET 单元。在一些实施方案中,至少两个主要碳链在没有任何中间 PET 单元的情况下连接到糖单元,且至少两个主要碳链在没有任何中间糖单元的情况下连接到该 PET 单元。在一些实施方案中,强亲脂性基团共同提供六个主要碳链。在一些实施方案中,强亲脂性基团共同提供六个主要碳链。

[0540] 在一些实施方案中,每个主要碳链的特征在于所述链中有 10、12、14、16、18 或 20 个碳原子。在一些实施方案中,每个主要碳链的特征在于所述链中有 10、12、14、16、18 或 20 个碳原子。在一些实施方案中,每个主要碳链为 10、12、14、16、18 或 20 个碳。在一些实施方案中,每个主要碳链为 10、12、14、16、18 或 20 个碳。在一些实施方案中,每个主要碳链为 10、12、14、16、18 或 20 个碳。

[0541] 在一些实施方案中,任何上述的佐剂具有脂质 A 拮抗剂活性。

[0542] 在一些实施方案中,上述的佐剂在本文提供的脂质体疫苗制剂中以盐的形式存在。此类盐的实例包括(且不限于)三乙胺盐或二异丙基乙胺盐、其他铵盐、三乙醇胺盐、乙酸盐、柠檬酸盐、酒石酸盐、甲磺酸盐、苯磺酸盐、甲苯磺酸盐、顺丁烯二酸盐、反丁烯二酸盐、草酸盐、三氟甲磺酸盐、盐酸盐、氢溴酸盐、磷酸盐、硫酸盐等。其他的此类盐包括(且不限于)NaOH、KOH、MgOH、CaOH、ZnOH、乙二胺、乙醇胺(2-氨基乙醇)、1H-咪唑、二乙胺、哌嗪、二甲基乙醇胺(deanol)、胆碱盐等。

[0543] 在特定实施方案中,本文所述的脂质体疫苗制剂包含 PET 脂质 A,即磷酸糖脂佐剂季戊四醇-6-链-C14-葡糖胺-单-磷酸盐。在特定实施方案中,本文所述的脂质体疫苗制剂包含 PET 脂质 A 的三乙胺盐。PET 脂质 A 的 TEA 盐的 IUPAC 名称是 (2R, 3S, 4R, 5R, 6R)-6-(3-羟基-2-(羟基甲基)-2-(((R)-3-(十四酰氧基)十四酰氨基)甲基)丙氧基)-2-(羟基甲基)-5-((R)-3-(十四酰氧基)十四酰氨基)-4-((R)-3-(十四酰氧基)十四酰氧基)四氢-2H-吡喃-3-基磷酸氢三乙铵盐。PET 脂质 A 的某些物理特性如下所示:

[0544]

参数	特性
分子量(游离酸)	1686.43g/mol
分子量(TEA 盐)	1787.62g/mol
分子式(游离酸)	C ₉₅ H ₁₈₁ N ₂ O ₁₉ P

分子式 (TEA 盐)

 $C_{95}H_{180}N_2O_{19}P \cdot C_6H_{16}N$ **[0545] 脂质体**

[0546] 本文所述的疫苗制剂是脂质体疫苗制剂。适合纳入该制剂中的示例性脂质体包括(且不限于)多层囊泡(MLV)、寡层囊泡(OLV)、单层囊泡(UV)、小单层囊泡(SUV)、中单层囊泡(MUV)、大单层囊泡(LUV)、巨大单层囊泡(GUV)、多囊性囊泡(MVV)、由逆相蒸发法制得的单或寡层囊泡(REV)、由逆相蒸发法制得的多层囊泡(MLV-REV)、稳定的多层囊泡(SPLV)、冷冻及解冻的 MLV (FATMLV)、由挤出法制成的囊泡(VET)、由弗氏压碎(French press)制成的囊泡(FPV)、由融合法制成的囊泡(FUV)、脱水-再水合囊泡(DRV)和泡沫体(BSV)。用于制备脂质体的技术描述于例如 COLLOIDAL DRUG DELIVERY SYSTEMS, vol. 66 (J. Kreuter ed., Marcel Dekker, Inc. (1994)) 之中。

[0547] 取决于制备方法,脂质体为单层或多层,且大小不同,直径范围为约 0.02 μm 到大于约 10 μm 。

[0548] 脂质体吸附到很多类型的细胞上,且随后释放所纳入的药剂(例如包含一个或多个拷贝的 SEQ ID NO:1 核心串联重复的糖脂肽)。在一些情况下,脂质体与目标细胞融合,由此使该脂质体的内容物流入该目标细胞中。或者,脂质体被吞噬性细胞内吞。内吞之后是脂质体脂质的溶酶体内降解作用,并释放出所包封的药剂。Scherphof 等人, Ann. N. Y. Acad. Sci., 446:368(1985)。

[0549] 本文提供的脂质体也包含载体脂质。在一些实施方案中,载体脂质为磷脂。能够形成脂质体的载体脂质包括(但不限于)双棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)、磷脂酰胆碱(PC;卵磷脂)、磷脂酸(PA)、磷脂酰甘油(PG)、磷脂酰乙醇胺(PE)、磷脂酰丝氨酸(PS)。其他适合的磷脂进一步包括双硬脂酰基磷脂酰胆碱(DSPC)、双肉豆蔻酰磷脂酰胆碱(DMPC)、双棕榈酰磷脂酰甘油(DPPG)、双硬脂酰基磷脂酰甘油(DSPG)、双肉豆蔻酰磷脂酰甘油(DMPG)、双棕榈酰磷脂酸(DPPA)、双肉豆蔻酰磷脂酸(DMPA)、双硬脂酰基磷脂酸(DSPA)、双棕榈酰磷脂酰丝氨酸(DPPS)、双肉豆蔻酰磷脂酰丝氨酸(DMPS)、双硬脂酰基磷脂酰丝氨酸(DSPS)、双棕榈酰磷脂酰乙醇胺(DPPE)、双肉豆蔻酰磷脂酰乙醇胺(DMPE)、双硬脂酰基磷脂酰乙醇胺(DSPE)等或其组合。在一些实施方案中,该脂质体进一步包含可调节脂质体形成的固醇(例如胆固醇)。在一些实施方案中,该载体脂质为任何已知的非磷酸极性脂质。

[0550] 在一些实施方案中,本文所述的脂质体包含连接到双脂化氨基酸序列上的一个或多个拷贝的 SEQ ID NO:1 糖基化核心串联重复。在一些其他的实施方案中,本文所述的脂质体包含连接到双脂化氨基酸序列上的一个或多个拷贝的 SEQ ID NO:1 糖基化核心串联重复以及佐剂。在更进一步的实施方案中,本文所述的脂质体包含连接到双脂化氨基酸序列上的一个或多个拷贝的 SEQ ID NO:1 糖基化核心串联重复、佐剂以及载体脂质。在任何前述的实施方案中,本文所述的脂质体包含佐剂的混合物(例如式 I 佐剂和 CpG ODN、合成 TLR-9 激动剂、皂苷等)。

[0551] 在特定实施方案中,使用同时混合步骤来生产本文所述的疫苗制剂,该步骤中有有机相和水相的受控混合。在一些实施方案中,有机相包含有机溶剂。在一些实施方案中,有机相包含有机溶剂和至多约 20%v/v 的水。在一些实施方案中,有机相包含有机溶剂和至多约 15%v/v 的水。在一些实施方案中,有机相包含有机溶剂和至多约 10%v/v 的水。在一

些实施方案中,有机相包含有机溶剂和至多约 5%v/v 的水。在一些实施方案中,有机相包含有机溶剂和少于约 5%v/v 的水。在一些这样的实施方案中,水在该有机相中的存在允许改善溶质(例如糖脂肽)的溶解作用。在一些这样的实施方案中,有机相包含可与水混溶的有机溶剂。

[0552] 在一些实施方案中,水相任选地包含至多约 20%v/v 的有机溶剂。在一些实施方案中,水相任选地包含至多约 15%v/v 的有机溶剂。在一些实施方案中,水相任选地包含至多约 10%v/v 的有机溶剂。在一些实施方案中,水相任选地包含至多约 5%v/v 的有机溶剂。

[0553] 举例来说,载体脂质和糖脂肽(例如 SEQ ID NO:2 的糖脂肽)和佐剂(例如 PET 脂质 A、PET 脂质 A 三乙胺盐)完全溶解于有机相中,该有机相任选地含有至多 5%v/v 的水(例如含有至多 5%v/v 水的 t-BuOH)。通过使用受控的流速比来同时混合两相,从而控制脂质体的大小。水相与有机相的流速比保持恒定在约 3:1,以产生总体分布为约 90% (d90) $\leq$ 0.22 μm 的脂质体,从而允许通过无菌过滤器过滤。在一些实施方案中,脂质体具有约 90% (d90) $\leq$ 0.4 μm 的总体分布。在一些实施方案中,脂质体具有约 90% (d90) $\leq$ 0.30 μm 的总体分布。在一些实施方案中,脂质体具有约 90% (d90) $\leq$ 0.25 μm 的总体分布。在一些实施方案中,脂质体具有约 90% (d90) $\leq$ 0.20 μm 的总体分布。

[0554] 在脂质体制备中任选地改变的某些参数包括水相 / 有机相混合比、温度以及冷却速率,以得到适合纳入本文所述的疫苗制剂中的脂质体。图 1 说明用于制造本文所述的脂质体疫苗制剂的示例性程序。脂质溶液和水之间的流速比

[0555] 假若水相和有机相流动的开始和停止为同步的,则水与有机溶液的流速比可决定溶剂浓度以及脂质体大小。溶剂浓度愈高,形成的脂质体愈大。因此,在一些实施方案中,水流速与有机溶液流速的比例为至少 2:1 (产生不高于约 33 1/3% 的有机溶剂浓度)、至少 3:1 (产生不高于约 25% 的有机溶剂浓度)。在一些实施方案中,水流速与有机溶液流速的比例为至少 5.67:1 (产生不高于约 15% 的有机溶剂浓度)。水流速与有机溶液流速的比例一般不高于 19:1。在一些实施方案中,水流速与有机溶液流速的比例为约 19:1 (达到约 5% 的有机溶剂浓度)至 31/3:1 (达到有机溶剂浓度约 30%)、约 9:1 (达到约 10% 的有机溶剂浓度)至 5:1 (达到约 20% 的有机溶剂浓度)或约 9:1 至 4:1 (达到约 25% 的有机溶剂浓度)。举例来说,通过使 85mL/min 的水流到 15mL/min 的有机相获得于水中 15%v/v 浓度的叔丁醇,以提供基本上均匀 d90 的脂质体粒子大小。在任何上述的实施方案中,有机相是本文所述的任何有机相。

[0556] 因此,只要比例保持恒定,对于指定的所需脂质体大小,可根据实际情况调整流速。因此,例如,如果想要产生其中超过约 99% 的脂质体的大小小于约 200nm 且有机溶液浓度为约 20% 的脂质体制剂,则根据实际考虑,比如实际的混合时间和欲使用的溶液体积,调整流速,同时保持水流速与脂质溶液流速的比例为约 4:1。

[0557] 液体的温度

[0558] 液体任选地在它们各自的储存器中同时加热,该储存器可用夹套隔热,以减少热损失。将任一液体的温度保持在约 40°C -45°C、约 45°C -50°C、约 50°C -55°C 或约 55°C -60°C。在一些实施方案中,将任一液体的温度保持在约 42°C $\pm$ 2°C、44°C $\pm$ 2°C、47°C $\pm$ 2°C、50°C $\pm$ 2°C、53°C $\pm$ 2°C、55°C $\pm$ 2°C、57°C $\pm$ 2°C 或 60°C $\pm$ 2°C。在一些实施方案中,将任一液体的温度保持在约 53°C $\pm$ 2°C。

[0559] 冷却

[0560] 在一些实施方案中,快速冷却(可通过在脂质体形成之后立即使用热交换器来达成)可控制脂质体大小,并且消除批量大小的独立性及脂质体大小的变异性的障碍。为了维持脂质体大小,冷却温度和时间应在 5 小时内不超过约 20℃,例如在不到 5 小时内从约 55℃冷却到约 35℃,或是在不到 2 小时内从约 55℃冷却到约 30℃,或是在不到 30 分钟内从约 55℃冷却到约 30℃。若需要,任选地将混合物冷却到更低的温度;然而使主体溶液保持在冷冻温度之上。

[0561] 一种使用上述程序制造脂质体的装置在美国申请序号第 13/140,786 号(以美国专利申请第 2012/0034294 号公开)中描述,该申请的公开内容引入本文中作为参考。

[0562] 在一个实施方案中,将从上述控制混合步骤获得的亲液胶体(即包含脂质体的悬浮液)无菌过滤、转移到小瓶中,并经过冷冻干燥以提供冻干的包含脂质体的块状物或粉剂。在施用至有需要的个体之前将此块状物或粉剂在盐水中(例如 0.9%w/v 无菌盐水)中重建。在另一实施方案中,将从上述控制混合步骤获得的亲液胶体(即包含脂质体的悬浮液)无菌过滤并直接施用至有需要的个体。在其他的实施方案中,将从上述控制混合步骤获得的亲液胶体(即包含脂质体的悬浮液)无菌过滤、置于小瓶中,并蒸发和/或浓缩(例如在减压之下),以提供干燥的薄膜或粉剂,随后在施用至有需要的个体之前将该薄膜或粉剂重建。

[0563] 在一些实施方案中,用于重建上述脂质体薄膜或粉剂或冻干块状物或固体的液体是盐水(例如 0.9%w/v 盐水)。在一些实施方案中,用于重建上述脂质体薄膜或粉剂或冻干块状物或固体的液体是任何其他肠胃外可接受的稀释剂(例如 D5W、乳酸林格氏液(lactated Ringers solution)、右旋糖溶液等)。在一些实施方案中,用于重建上述脂质体薄膜或粉剂或冻干块状物或固体的液体是油。在一些这样的实施方案中,本文所示的实施方案的范围中涵盖使用药学上可接受的油作为稀释剂以制备持续释放性疫苗制剂。在一些这样的实施方案中,作为油中的悬浮液的疫苗制剂允许在施用后形成持续释放库(sustained release depot)(例如油中悬浮液的皮下或肌内袋),从而允许长期释放。用于配制本文所述包含脂质体的油中悬浮液的此类稀释剂的实例包括(且不限于)大豆油、油酸及其甘油酯衍生物、橄榄油、蓖麻油等。在一些这样的实施方案中,本文提供的脂质体疫苗制剂为乳液。在一些这样的实施方案中,本文提供的脂质体疫苗制剂是油中的悬浮液。

[0564] 在一些实施方案中,本文所述的脂质体疫苗制剂包含的糖双脂化肽(例如 SEQ ID NO:2)与佐剂(例如 PET 脂质 A, TEA 盐)的重量/重量比为约 10:1 至约 1:10。在一些实施方案中,本文所述的脂质体疫苗制剂包含的糖双脂化肽(例如 SEQ ID NO:2)与佐剂(例如 PET 脂质 A, TEA 盐)的重量/重量比为约 8:1 至约 1:8。在一些实施方案中,本文所述的脂质体疫苗制剂包含的糖双脂化肽(例如 SEQ ID NO:2)与佐剂(例如 PET 脂质 A, TEA 盐)的重量/重量比为约 5:1 至约 1:5。在一些实施方案中,本文所述的脂质体疫苗制剂包含的糖双脂化肽(例如 SEQ ID NO:2)与佐剂(例如 PET 脂质 A, TEA 盐)的重量/重量比为约 2:1 至约 1:2。在一些实施方案中,本文所述的脂质体疫苗制剂包含的糖双脂化肽(例如 SEQ ID NO:2)与佐剂(例如 PET 脂质 A, TEA 盐)的重量/重量比为 1:1。在一些特定的实施方案中,本文所述的脂质体疫苗制剂包含约 300 μg 糖双脂化肽(例如 SEQ ID NO:2)和约 150 μg 的佐剂(例如 PET 脂质 A, TEA 盐)。在一些实施方案中,本文所述的脂质体疫苗制剂包含约 600 μg 糖

双脂化肽(例如 SEQ ID NO:2)和约 300 μ g 的佐剂(例如 PET 脂质 A, TEA 盐)。在一些实施方案中,本文所述的脂质体疫苗制剂包含约 900 μ g 糖双脂化肽(例如 SEQ ID NO:2)和约 450 μ g 的佐剂(例如 PET 脂质 A, TEA 盐)。在一些实施方案中,本文所述的脂质体疫苗制剂包含约 1200 μ g 糖双脂化肽(例如 SEQ ID NO:2)和约 600 μ g 的佐剂(例如 PET 脂质 A, TEA 盐)。在一些这样的实施方案中,脂质体制剂是冻干的固体粉剂或块状物,其在盐水(例如 0.9%w/v 无菌盐水)中重建以提供该疫苗制剂。

[0565] 本文涵盖以上对于各种变化所述的一个或多个拷贝的糖基化核心串联重复(SEQ ID NO:1)、双脂化氨基酸序列和一种或多种佐剂的任何组合。在整份说明书中,提供了糖脂肽和其组合物及使用方法,并进行选择以对有需要的个体提供合适的治疗。

[0566] 治疗方法

[0567] 在一些实施方案中,本文提供用于刺激有需要的个体的免疫系统的方法,其包括施用本文所述的脂质体疫苗制剂,例如糖脂肽制剂,其包含一个或多个拷贝的 SEQ ID NO:1 和佐剂(例如 PET 脂质 A)。在一些情况下,施用本文所述的脂质体疫苗制剂诱发和/或维持细胞应答。在其他情况下,施用本文所述的脂质体疫苗制剂诱发和/或维持体液应答。在进一步的情况下,施用本文所述的脂质体疫苗制剂诱发和/或维持体液以及细胞应答。

[0568] 本文还提供了用于治疗有需要的个体的癌症的方法,其包括施用本文所述的脂质体疫苗制剂。在一些这样的实施方案中,该个体正罹患癌症。在其他实施方案中,该个体疑似罹患癌症。在其他实施方案中,该个体容易罹患癌症(例如容易罹患乳腺癌的个体)。在某些实施方案中,癌症选自乳腺癌、肺癌、肺腺癌、鳞状细胞肺癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、头颈癌、脑癌、腹部癌症、结肠癌、结肠直肠癌、食道癌、咽旁间隙癌、胃肠癌、神经胶质瘤、肝癌、口腔癌、舌癌、神经母细胞瘤、骨肉瘤、卵巢癌、肾癌、膀胱癌、泌尿道癌、胰腺癌、视网膜母细胞瘤、子宫颈癌、子宫癌、维尔姆斯肿瘤(Wilm's tumor)、多发性骨髓瘤、皮肤癌、淋巴瘤、白血病、血癌、甲状腺癌、骨癌、腺样囊性肿瘤、软骨肉瘤、胰岛细胞肿瘤、神经内分泌肿瘤、前列腺癌、卵巢癌、胶质母细胞瘤、子宫内膜肿瘤、子宫内膜癌、平滑肌肉瘤、胆囊癌、肝细胞癌、血液癌、多发性骨髓瘤、急性骨髓性白血病、急性/慢性淋巴细胞白血病、毛细胞白血病、滤泡性淋巴瘤、多发性骨髓瘤、浆细胞瘤、弥漫型大 B 细胞淋巴瘤。在某些实施方案中,该癌症是头颈癌、肺癌、结肠癌或前列腺癌。在某些实施方案中,该癌症是非小细胞肺癌。在一些实施方案中,该癌症是血液癌。

[0569] 在一些实施方案中,该癌症与 MUC1 抗原的表达有关,包括(但不限于)乳腺癌、非小细胞肺癌、卵巢癌、结肠直肠癌、胃癌、前列腺癌、胰腺癌和肾细胞癌。在一些实施方案中,该癌症与实体瘤有关。在某些情况下,实体瘤是晚期的,例如第 3 期或第 4 期。在一些情况下,肿瘤为乳腺肿瘤、非小细胞肺肿瘤、卵巢肿瘤、结肠直肠肿瘤、胃肿瘤、前列腺肿瘤、胰腺肿瘤和肾细胞癌肿瘤。在某些情况下,实体瘤在组织学上与 MUC1 抗原的表达相关。

[0570] 如本文所用,在一些实施方案中,“治疗”或“正治疗”或“经治疗”指治疗性处理,其中目的是为了减缓(减轻)不希望的生理性病况、病症或疾病,或是为了得到有益或所需的临床结果。就本文所述的目的而言,有益或所需的临床结果包括(但不限于)缓和症状;降低病况、病症或疾病的程度;稳定(即不恶化)病况、病症或疾病的状态;延迟发作或减缓病况、病症或疾病的进展;改善病况、病症或疾病的状态;及无论是可检测到或无法检测到的缓解(无论是部分或完全),或是改善或改进病况、病症或疾病。治疗包括在没有造成过多

副作用之下引发临床上显著的应答。治疗也包括与未接受治疗的情况下预期的存活期相比延长存活期。在其他实施方案中,“治疗”或“正治疗”或“经治疗”指防治性措施,其中目的是要延迟非所需的生理病况、病症或疾病的发作或降低严重性,例如容易罹患疾病的人(例如携带疾病(比如乳腺癌)遗传标记的个体)。

[0571] 本文所述的治疗方法可治疗各种分期的癌症,包括局部晚期、转移期和 / 或复发期。在癌症的分期中,局部晚期一般定义为从局部区域扩散到附近组织和 / 或淋巴结的癌症。在罗马数字分期系统中,局部晚期通常被分类在第 II 期或第 III 期。转移性癌症为癌症扩散到整个身体的远端组织和器官的分期(第 IV 期)。被称作复发性的癌症一般被定义为已经复发的癌症,通常在一段时间之后、在缓解之后或在肿瘤经可见地移除之后。复发可为局部的(即出现在与原来相同的位置)或是远端的(即出现在身体的不同部位)。在某些情形下,可通过本文所述的联合疗法治疗的癌症是无法切除的或是不能够通过手术移除的。

[0572] 在一些这样的实施方案中,本文所述的治疗方法(例如免疫疗法)为对个体所开出的任何其他癌症疗法提供辅助疗法。因此,在一些实施方案中,本文所述的脂质体疫苗制剂与采用任何其他抗癌剂的治疗联合施用,包括(且不限于)氨甲蝶呤(RHEUMATREX®)、氨甲喋呤、环磷酰胺(CYTOXAN®)、沙利度胺(THALIDOMID®)、吡啶甲酰胺、actimid®、放线菌素、17-N-烯丙基氨基-17-去甲氧基格尔德霉素(17-N-allylamino-17-demethoxygeldanamycin)、氨基喋呤、安吡啶(amsacrine)、蒽环霉素(anthracycline)、抗肿瘤药、抗瘤酮(antineoplaston)、5-氮杂胞苷(5-azacytidine)、硫唑嘌呤、BL22、苯达莫司汀(bendamustine)、比立考达(biricodar)、博来霉素(bleomycin)、硼替佐米(bortezomib)、苔藓虫素(bryostatin)、白消安(busulfan)、花萼海绵诱癌素(calyculin)、喜树碱(camptothecin)、卡培他滨(capecitabine)、卡铂(carboplatin)、西妥昔单抗(cetuximab)、苯丁酸氮芥(chlorambucil)、顺铂、克拉屈滨(cladribine)、氯法拉滨(clofarabine)、阿糖胞苷(cytarabine)、达卡巴嗪(dacarbazine)、达沙替尼(dasatinib)、道诺霉素(daunorubicin)、地西他滨(decitabine)、二氯乙酸、圆皮海绵内酯(discodermolide)、多西紫杉醇(docetaxel)、多柔比星(doxorubicin)、表柔比星(epirubicin)、埃博霉素(epothilone)、艾立布林(eribulin)、雌氮芥(estramustine)、依托泊苷(etoposide)、依喜替康(exatecan)、依昔舒林(exisulind)、铁锈醇(ferruginol)、氟尿苷(floxuridine)、氟达拉滨(fludarabine)、氟尿嘧啶、磷雌酚(fosfestrol)、福莫司汀(fotemustine)、更昔洛韦(ganciclovir)、吉西他滨(gemcitabine)、羟基脲、IT-101、伊达比星(idarubicin)、异环磷酰胺(ifosfamide)、咪喹莫特(imiquimod)、伊立替康(irinotecan)、伊洛福芬(irofulven)、伊沙匹隆(ixabepilone)、拉尼喹达(laniquidar)、拉帕替尼(lapatinib)、来那度胺(lenalidomide)、洛莫司汀(lomustine)、勒托替康(lurtotecan)、马磷酰胺(mafosfamide)、马索罗酚(masoprocol)、氮芥、美法仑(melphalan)、巯基嘌呤(mercaptopurine)、丝裂霉素、米托坦(mitotane)、米托蒽醌(mitoxantrone)、奈拉滨(nelarabine)、尼罗替尼(nilotinib)、奥利美生(oblimersen)、奥沙利铂(oxaliplatin)、PAC-1、紫杉醇(paclitaxel)、培美曲塞(pemetrexed)、喷司他丁(pentostatin)、哌泊溴烷(pipobroman)、匹克生琼(pixantrone)、普卡霉素(plicamycin)、丙卡巴肼(procarbazine)、蛋白酶体抑制剂(例如硼替佐米(bortezomib))、雷替曲塞(Raltitrexed)、蝴蝶霉素(Rebeccamycin)、Revlimid®、

鲁比特康(rubitecan)、SN-38、salinosporamide A、沙铂(satraplatin)、链脲霉素(streptozotocin)、苦马豆素(swainsonine)、他立喹达(tariquidar)、紫杉烷、替加氟-尿嘧啶(tegafur-uracil)、替莫唑胺(temozolomide)、睾内酯(testolactone)、噻替派(thioTEPA)、硫鸟嘌呤(tioguanine)、拓扑替康(topotecan)、曲贝替定(trabectedin)、维甲酸(tretinoin)、四硝酸三铂(triplatin tetranitrate)、三(2-氯乙基)胺、曲沙他滨(troxacitabine)、尿嘧啶氮芥(uracil mustard)、戊柔比星(valrubicin)、长春花碱、长春新碱、长春瑞宾(vinorelbine)、伏立诺他(vorinostat)、佐舒喹达(zosuquidar)等。

[0573] 在另外的实施方案中,本文所述的治疗方法(例如免疫疗法),即本文所述的脂质体疫苗制剂,与放射线疗法(例如 γ 射线、X 射线和 / 或直接将放射性同位素递送到肿瘤细胞、微波、UV 辐射等)联合施用。在另外的实施方案中,本文所述的治疗方法(例如免疫疗法),即本文所述的脂质体疫苗制剂,与基因疗法联合施用。治疗性基因包括细胞增殖的诱导物(致癌基因)的反义形式、细胞增殖的抑制剂(肿瘤抑制基因)或程序性细胞死亡的诱导物(促细胞凋亡基因)。在一些实施方案中,本文所述的联合疗法伴随手术(例如切除术)来施用。

[0574] 在另外的实施方案中,本文所述的治疗方法(例如免疫疗法),即本文所述的脂质体疫苗制剂,与止泻剂、止吐剂、止痛剂、阿片类药物和 / 或非甾体抗炎药联合施用。

[0575] 在进一步的实施方案中,将本文所述的脂质体疫苗制剂(例如包含 SEQ ID NO: 2 和 PET 脂质 A TEA 盐的制剂)施用至已用环磷酰胺或伊马替尼(imitanib)或达克珠单抗和 / 或任何其他抗癌剂预先治疗的个体。在其他实施方案中,将本文所述的脂质体疫苗制剂施用至尚未用环磷酰胺和 / 或任何其他抗癌剂预先治疗的个体。

[0576] 在一些上述的实施方案中,采用本文所述的脂质体疫苗制剂(例如包含 SEQ ID NO:2 的制剂)的治疗可延长罹患癌症的个体的寿命和 / 或增高其存活率。在一些上述的实施方案中,采用本文所述的脂质体疫苗制剂(例如包含 SEQ ID NO:2 的制剂)的治疗可改善罹患癌症的个体的生活质量(例如,当用本文所述的疫苗制剂免疫个体时,该个体需要较低剂量的引起副作用的抗癌药)。

[0577] 在一些上述的实施方案中,采用本文所述的脂质体疫苗制剂(例如包含 SEQ ID NO:2 的制剂)的治疗可诱发和 / 或维持个体的免疫应答。免疫应答包括体液应答(即抗体的产生)、细胞应答(即 T- 淋巴细胞的增殖和刺激)或此两者。细胞应答的活化和持续时间的测定可通过任何已知的方法来进行,包括例如细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)分析。体液应答也通过已知方法来测定,包括对脂质体疫苗(比如 IgG 或 IgM 抗体部分)特异性抗体效价的分离和定量。

[0578] 本文还提供用于治疗个体中与异常糖基化 MUC1 有关的疾病、病症或病况的方法,其包括向具有异常糖基化 MUC1 的个体施用本文所述的脂质体疫苗制剂。在一些本文所述的方法的实施方案中,所述方法包括处理具有改变的糖基化模式的 MUC1,包括相对于正常 MUC1 对应物的不足或低糖基化。在一些实施方案中,改变的模式来自于相对于正常 MUC1 对应物不同的糖基单元(即不同的糖类)。在本文所述的方法的其他实施方案中,该方法包括处理由于过度或高糖基化引起的异常糖基化的 MUC1。

[0579] 表现出 MUC1 的低糖基化形式的疾病、病况和病症包括(但不限于)癌症,比如本文所述的癌症、癌前病变和癌症的肿瘤形成,例如前列腺的或上皮的增生;胰腺炎;炎症肠

病；在表达 MUC1 的组织中诱发炎症的事件，例如泌乳和 / 或乳腺炎、盆腔手术、腮腺炎病毒和吸烟；以及其他发炎组织表型，如肠和结肠中的炎症。MUC1 的高糖基化形式见于某些癌症中，包括(但不限于)鳞状细胞癌、鲍文氏病(Bowen's Disease)和一些乳腺癌。

[0580] 剂量

[0581] 当将本文所述的脂质体疫苗制剂(例如含糖脂肽的制剂，该糖脂肽具有一个或多个拷贝的 SEQ ID NO:1 核心串联重复肽)给予个体时，本领域技术人员会了解剂量将取决于数个因素，包括(但不限于)该个体的体重、肿瘤大小或肿瘤进展。如本文所用，通常接受本文所述的疫苗制剂(例如包含 SEQ ID NO:2 和 PET 脂质 A 佐剂的制剂)的个体是单一有机体。在某些实施方案中，个体是哺乳动物。特定地，个体是人类，包括男性或女性。在很多实施方案中，该个体是患者或是正等待或正进行医疗照护和治疗的个体。

[0582] 任选地以单一的或累积的应用给予个体剂量为约 50 μ g、约 100 μ g、约 200 μ g、约 300 μ g、约 400 μ g、约 500 μ g、约 600 μ g、约 700 μ g、约 800 μ g、约 900 μ g、约 1,000 μ g、约 1,010 μ g、约 1,020 μ g、约 1,030 μ g、约 1,040 μ g、约 1,050 μ g、约 1,060 μ g、约 1,070 μ g、约 1,080 μ g、约 1,090 μ g、约 1,100 μ g、1,200 μ g、1,300 μ g、1,400 μ g、1,500 μ g、1,600 μ g、1,700 μ g、1,800 μ g、1,900 μ g 或约 2,000 μ g 的本文所述的以 MUC1 为基础的糖脂多肽脂质体疫苗制剂(例如包含 SEQ ID NO:2 和 PET 脂质 A 佐剂的制剂)。在特定实施方案中，给予该个体的剂量是每周约 1,000 μ g 的疫苗制剂。

[0583] 个体任选地接受本文所述的以 MUC1 为基础的糖脂多肽脂质体疫苗制剂(例如包含 SEQ ID NO:2 和 PET 脂质 A 佐剂的制剂)剂量，例如每天多次、每天、每隔一天、每周一次或是任何其他合适的给药方案。在一个实施方案中，例行给药包括在一段时间内每周一次施用本文所述的脂质体疫苗的剂量。当然，该给药方案任选地包含 MUC1 肽递送的其他组合。即，在医生的判断之下，一周一次、两次、三次、四次、五次、六次或更多次施用该疫苗。在一些实施方案中，会在一段时间内给予个体至少 5 份剂量。在其他实施方案中，会给予个体多于或少于 5 份剂量。因此，在一个实施方案中，个体每周会接受约 1,000 μ g 的 MUC1 糖脂化多肽的剂量。或者，该个体每周两次接受两份 500 μ g 的剂量，或是在五天内接受每天 100 μ g 的剂量。

[0584] 这些剂量的实例并不具限制性，仅用来示范施用约 1,000 μ g 的 MUC1 糖脂化多肽的特定给药方案。例如，若对于指定状况的适当剂量为每周 1,000 μ g，则该剂量任选地被分为任何数目的组合，例如每周注射四次 250 μ g。如果用于特定状况的适当剂量大于或小于 1,000 μ g，也同样适用。

[0585] 施用以 MUC1 为基础的糖脂多肽脂质体疫苗制剂(例如包含 SEQ ID NO:2 和 PET 脂质 A 佐剂的制剂)至个体的时间长度为任何合适的时间长度，其取决于癌症分期、患者病史及主治医师的判断。此合适的时间段的实例包括(但不限于)至少约 3 个月、至少约 4 个月、至少约 5 个月、至少约 6 个月、至少约 7 个月、至少约 8 个月、至少约 9 个月、至少约 10 个月、至少约 11 个月、至少约 12 个月、至少约 13 个月、至少约 14 个月、至少约 15 个月、至少约 16 个月、至少约 17 个月、至少约 18 个月、至少约 19 个月、至少约 20 个月、至少约 21 个月、至少约 22 个月、至少约 23 个月或至少约 24 个月或更长。如果需要的话，治疗时间任选地持续超过 24 个月，比如 30 个月、31 个月、32 个月、33 个月、34 个月、35 个月、36 个月或超过 36 个月。

[0586] 在另一实施方案中,任何本文所述的方法的给药时间长度为至少约 2 周、至少约 4 周、至少约 8 周、至少约 16 周、至少约 17 周、至少约 18 周、至少约 19 周、至少约 20 周、至少约 24 周、至少约 28 周、至少约 32 周、至少约 36 周、至少约 40 周、至少约 44 周、至少约 48 周、至少约 52 周、至少约 60 周、至少约 68 周、至少约 72 周、至少约 80 周、至少约 88 周、至少约 96 周或至少约 104 周。

[0587] 任选地在不同的治疗阶段施用任何本文所述的脂质体疫苗制剂(例如包含 SEQ ID NO:2 和 PET 脂质 A 佐剂的制剂)。例如在治疗期和维持期施用以 MUC1 为基础的糖脂多肽脂质体疫苗制剂。在一些实施方案中,治疗期会包含以每周剂量施用脂质体疫苗制剂,而维持期为一段较长的时间,比如约每 6 周、约每 7 周、约每 8 周、约每 9 周、约每 10 周、约每 11 周、约每 12 周或更长。在一些情况下,在治疗期给予的剂量会大于在维持期所给予的剂量。然而,治疗期和维持期针对特定个体而设计,所以治疗期和维持期之间的时间和剂量会随上述的实例而不同。通常,维持期开始于任何被认为适当的时间。例如在一些实施方案中,治疗期为八周,而维持期会持续整个个体的生命期。在其他实施方案中,只会进行治疗期或维持期。

[0588] 在进一步的实施方案中,预防性地给予本文所述的脂质体疫苗(例如包含 SEQ ID NO: 2 和 PET 脂质 A 佐剂的制剂)。在这些实施方案中,施用脂质体疫苗制剂可预防个体(例如遗传上倾向于发展癌症如乳腺癌的个体)中癌症的发作。

[0589] 个体应保持本文所述的疫苗制剂的时间长度由主治医师决定。在一些情况下,在个体余下的生命中施用该疫苗制剂是有利的。在一些这样的实施方案中,在身体的四个四分象限(quadrants)处施用疫苗制剂,例如淋巴结附近(例如在每个腋窝)、在每个臀部(例如皮下)等。在一些这样的实施方案中,经由泵施用疫苗制剂。在一些实施方案中,将泵和/或递送装置植入到个体内,以允许长期给药。可植入泵的实例包括(且不限于)Alzet[®]渗透泵。

[0590] 药盒(kit)

[0591] 本文提供用于分配本文所述的脂质体疫苗制剂的药盒。此类药盒包含第一药品小瓶,其包含含有一个或多个拷贝的 SEQ ID NO:1 核心串联重复的糖脂肽和佐剂(PET 脂质 A, 三乙胺盐),及第二小瓶,其含有本文所述的用于重建的合适的无菌液体。在一些实施方案中

[0592] 例如,在一个实施方案中,此类药盒包含第一小瓶,即含有 300 μ g 的糖脂肽(其包含一个或多个拷贝的 SEQ ID NO:1 的核心串联重复)和 150 μ g 的佐剂(PET 脂质 A, 三乙胺盐)的药品小瓶,其代表 120% 的装填量。这种过量旨在使特定剂量的取出和施用更加方便。该药盒进一步包含第二小瓶,其含有至多 1mL 的 0.9% 的注射用氯化钠溶液。以 0.6mL 的注射用氯化钠溶液(0.9%w/v)重建药品后,药品小瓶产生 0.5mL,用于递送相当于 250 μ g 的包含一个或多个拷贝的 SEQ ID NO:1 核心串联重复的糖脂肽。举例来说,如果剂量总共是 1mg,则每剂量需要 4 小瓶。

[0593] 某些定义

[0594] 本文所用的“主要碳链”指长度为至少六个碳的碳链。碳链的碳原子可结合 3、2、1 或 0 个氢。在主要碳链中,--CH< 和 >C< 碳通常为用以连接到另一碳链的分支点(带有或不带有连接体)。在一些实施方案中,它们可被侧基如氨基或羟基取代。任何主要碳链的碳

原子可包括一个或多个羰基或硫代羰基的碳,即 $-\text{C}(=\text{O})-$ 或 $-\text{C}(=\text{S})-$ 。

[0595] “强亲脂性基团”指包含至少五个非氢的原子的亲脂性基团,如由 Meylan 算法所预测,该亲脂性基团的 $\log P$ 大于 3。基团的亲脂性可通过测量 STP 处非极性溶剂(例如乙醇、二氧杂环己烷、丙酮、苯、正辛醇)和水之间的分子 HZ (其中 Z 是上述的侧链)的分配系数来确定。亲脂性可被定义为这个分配系数的对数($\log P$);那么对于倾向于非极性溶剂的分子而言该值是正值。因此,亲脂性基团是 $\log P$ 大于零的基团。

[0596] 分配系数(P)被定义为溶解的物质在由两种基本不混溶的溶剂所组成的两相系统中的平衡浓度比。一种这样的系统是正辛醇:水;辛醇相含有约 20% 的水,而水相有约 0.008% 的辛醇。因此,相关分配系数(P_{ow})是用水饱和的辛醇中溶质摩尔浓度与用辛醇饱和的水中溶质摩尔浓度的比例。正辛醇是生物膜的有用替代物,因为像很多膜组分一样,正辛醇是两亲性的。(除非另外说明,否则此后提到 $\log P$ 时将指 $\log P_{ow}$ 。)

[0597] 更多测定 P_{ow} 的方法的资料参见 Sangster, J., Octanol-Water Partition Coefficients: Fundamentals and Physical Chemistry (1997 年 4 月) (ISBN0-471-9739)。辛醇-水分配系数的列表参见 EPA “Chemicals in the Environment: OPPT Chemicals Fact Sheets” the USDA Pesticide Properties Databases, Sangster, J., “Octanol-Water Partition Coefficients of Simple Organic Compounds”, J. Phys. Chem. Ref. Data, 18:1111-1230 (1989); Verbruggen, E. M. J. 等人, “Physicochemical Properties of Higher Nonaromatic Hydrocarbons: Literature Study”, J. Phys. Chem. Ref. Data, 29:1435-46 (2000)。应注意的是,对不同化合物收集的 P_{ow} 值可能是通过不同的方法测定的。

[0598] 在 Meylan 法中,通过将每个片段的加权系数(原始系数乘上该片段的拷贝数)加上常数 0.2290,以获得预测的 $\log P_{ow}$ 。涵盖的片段包括脂肪族连接的 $-\text{CH}_3$ (0.5473)、 $-\text{CH}_2-$ (0.4911)、 $-\text{CH}$ (0.3614)、 $-\text{OH}$ (-1.4086)、 $-\text{NH}_2$ (-1.4148)、 $-\text{C}(=\text{O})\text{N}$ (-0.5236)、 $-\text{SH}$ (-0.0001)、 $-\text{NH}-$ (-1.4962)、 $\text{N}=\text{C}$ (-0.0010)、 $-\text{O}-$ (-1.2566)、 $-\text{CHO}$ (-0.9422)、-叔 C 因而 3+C 连接的 (0.2676)、C 无 H 且非叔 (0.9723)、 $-\text{C}(=\text{O})\text{O}-$ (-0.9505)、 $-\text{C}(=\text{O})-$ (-1.5586)、 $=\text{CH}$ 或 $\text{C}<$ (0.3836)、 $\# \text{C}$ (0.1334)、 $-\text{C}(=\text{O})\text{N}$ (-0.5236)、 $-\text{O}-\text{CO}-\text{C}-\text{N}-\text{CO}$ (-0.5)、 $-\text{SO}-\text{O}$ (-9)、 $-\text{O}-\text{P}$ (-0.0162); $\text{O}=\text{P}$ (-2.4239)、磷酸连接的 $-\text{OH}$ (0.475); 芳族 C (0.2940)、芳族 N (5 元环) (-0.5262) 和芳族连接的 $-\text{OH}$ (-0.4802)。

[0599] 对于强亲脂性基团,经 Meylan 算法预测的 $\log P$ 至少为 3。在进一步的实施方案中,对于强亲脂性基团, $\log P$ 为至少 4、至少 4、至少 5、至少 6、至少 7、至少 8、至少 9、至少 10 或超过 10。

[0600] 强亲脂性基团包含一个或多个碳链,并且在一些实施方案中,包含一个或多个主要碳链。强亲脂性基团包括简单(无分支、无环)的脂质或复杂(分支和/或环状,包括部分芳族)的脂质。

[0601] 在一些实施方案中,强亲脂性基团包含不超过 100 个非氢原子、不超过 80 个非氢原子、不超过 60 个非氢原子或不超过 40 个非氢原子。

[0602] 如先前提到的,强亲脂性基团必须包含至少五个非氢原子。在一些实施方案中,它包含至少六个,更优选至少 8 个,更优选至少 9 个,甚至更优选地,它包含至少 11 个非氢原子,更优选至少 13 个非氢原子,更优选至少 21 个非氢原子。

[0603] 在一些实施方案中,强亲脂性基团具有限于元素碳、硅、氢、氧、氮、硫和磷的元素构成。在一些实施方案中,不含氢的侧链内的大多数键为碳-碳键。

[0604] 因为氧、氮、硫和磷的存在易于降低亲脂性,在一些实施方案中,在强亲脂性基团中超过 50% 或超过 75% 的非氢原子为碳原子。

[0605] 基于相同的原因,在一些实施方案中,强亲脂性基团包含至少 5 个、至少 6 个、至少 7 个、至少 8 个、至少 9 个或至少 10 个碳原子。

[0606] 强亲脂性基团的额外参考可在美国专利第 7,820,627 号中找到,该文献中关于亲脂性和强亲脂性基团的讨论及应用在此引入作为参考。

[0607] 实施例

[0608] 实施例 1:脂质体疫苗制剂的合成

[0609] 将 SEQ ID NO:2 的糖脂肽 (159mg)、PET 脂质 A (96mg)、DPPC (4.36g)、DMPG Na (0.54g) 和胆固醇 (2.60g) 溶解于含有 5mL 无菌水的 117 克叔丁醇中,用于灌注。

[0610] 将加热的叔丁醇溶液和加热的无菌水在设定为所需流速的分离马达下进行泵送,从而使水相与有机相的流速比保持恒定在 5.9:1,以产生总体分布为 90% ($d_{90} \leq 0.22 \mu m$) 的脂质体,允许经过至少一个无菌过滤器过滤。使用描述于图 1 中的程序,准备含有冻干固体的小瓶。将下列批次的制剂用于 1L 规模的批次,其相当于 500 个小瓶。

[0611] 将该制剂以所述批量大小分次或多次使用。

[0612]

组分	量/小瓶	功能
SEQ ID NO: 2 的糖脂肽	0.30mg	抗原
PET 脂质 A TEA 盐	0.15mg	佐剂
双棕榈酰磷脂酰胆碱 (DPPC)	8.72mg	脂质体的结构性脂质
双肉豆蔻酰磷脂酰甘油, 钠盐 (DMPG)	1.09mg	脂质体的结构性脂质
胆固醇	5.20mg	脂质体的结构性脂质

[0613]

t-BuOH, 试剂级 [#]	适量	溶剂
用于冲洗的无菌水 [#]	适量	溶剂

[0614] [#]未包含在最终制剂中。在冻干过程中移除水和醇。

[0615] 将脂质体混合物无菌过滤并冻干。冻干的药品为无菌粉剂,其在重建后产生不含

可见颗粒的乳状悬浮液。该容器封闭系统包含带有 13mmFlurotec® 塞和 13mm 铝封的 5mL 的 1 型玻璃小瓶。在替代的实施方案中,该容器封闭系统包含 3mL 的 1 型玻璃小瓶。

[0616] 以注射用氯化钠溶液(0.9%w/v)重建后,每一小瓶提供拟用

[0617] 于皮下给药的冻干脂质体制剂。

[0618] 也将上述脂质体疫苗制剂按比例放大到 9L 规模的批次。批次制剂如下:

[0619]

组分	量
SEQ ID NO: 2 糖脂肽	1.3508 g
PET 脂质 A	0.6754 g
1,2-双棕榈酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱 (DPPC)	39.2008 g
1,2-双肉豆蔻酰基-sn-甘油-3-磷酸甘油, 钠 盐 (DMPG-Na)	4.9089
胆固醇, NF	23.3969
叔丁醇#	1052.4 g
用于灌洗的无菌水#	7649.4 g

[0620] #未包含在最终制剂中。在冻干过程中移除水和醇。

[0621] 图 2 显示从上述过程中所获得的脂质体疫苗的示例性图像。图 2A 显示从批样本中所获得的玻璃化的、配制的脂质体的透射电子显微镜照片。图 2B 显示在光学显微镜检查下于盐水中重建的脂质体疫苗的图像。图 2C 显示在电子显微镜检查下重建的脂质体疫苗的冷冻断裂图像。

[0622] 实施例 2: 实施例 1 的脂质体疫苗制剂对 CD4⁺ 和 CD8⁺T 淋巴细胞中 IFN γ 的诱导

[0623] 将实施例 1 的脂质体疫苗制剂以 5 μ g/ 小鼠、25 μ g/ 小鼠或 100 μ g/ 小鼠的浓度注射到 C57B1/6J 雌性小鼠中。对照包括 50 μ g/ 小鼠的盐水处理和单独 PET 脂质 A 处理。免疫之后,从 C57B1/6 小鼠中分离出脾细胞,并用具有 SEQ ID NO:2 的 MUC1 肽、具有序列 CT RPNNNTRKSIRIQRGPGRAFVTIGKIGNMRQAS*S*L (SEQ ID NO:20, S* 为脂化丝氨酸)的阴性对照肽 BP-1-109、盐水载体离体刺激 48 个小时,或不予处理。

[0624] 图 3 显示用各种抗原离体刺激的 CD4⁻/CD8⁺ (图 3A)或 CD4⁺/CD8⁻ (图 3B)T 淋巴细胞中的细胞内 IFN γ 浓度。数据表示为相对于总 CD4⁺ 或 CD8⁺ 细胞群的阳性 IFN γ 细胞的 %。以各种浓度的实施例 1 的脂质体疫苗制剂进行体内处理的小鼠的 T 细胞,当以 MUC1 肽离体激发时,相对于盐水处理,具有统计上显著($p < 0.05$)的 IFN γ 诱导。

[0625] 实施例 3: 用于测试实施例 1 的脂质体疫苗制剂的体液应答的体内动物模型

[0626] 将实施例 1 的脂质体疫苗制剂以三种不同疫苗浓度(5、25 和 100 μ g)注射到 C57B1/6J 小鼠。使用 50 μ g 剂量的 PET 脂质 A 和盐水作为阴性对照。分离取自小鼠的血清,并随后进行连续稀释,且在用具有 SEQ ID NO:2 的 MUC1 抗原包被的板上温育。与血清温育

之后,洗涤该板,并加入标记的抗小鼠 IgG 特异性抗体。将该抗体洗掉,并经由 ELISA 测读仪测量小鼠 IgG。图 4 中的 ELISA 分析显示在所有的三个剂量组中(即 5 μ g/ 小鼠、25 μ g/ 小鼠、100 μ g/ 小鼠)抗体量为相似的。相反地,以盐水和 PET 脂质 A 处理的动物显示无抗体应答。

[0627] 在相似的实验中,以实施例 1 脂质体疫苗制剂或非糖基化 MUC1 疫苗(疫苗 A)注射小鼠。使用未经处理的组(naive group)作为阴性对照组。分离、稀释血清,并将其与具有 SEQ ID NO:2 的糖基化 MUC1 肽或非糖基化 MUC1 肽(STAPPAHGVTSPDTRPAPGSTAPPAKG, SEQ ID NO:21)一起温育。图 5 显示在以实施例 1 脂质体疫苗处理的小鼠或以疫苗 A 处理的小鼠中 IgG 与糖基化肽的结合(上部)相对于以实施例 1 脂质体疫苗处理的小鼠或以疫苗 A 处理的小鼠中 IgG 与非糖基化肽的结合(下部)的比较。

[0628] 实施例 4:转基因人类 MUC1 动物模型中实施例 1 的脂质体疫苗制剂对于 IFN γ 和抗体的诱导

[0629] 表达人类 MUC1 的转基因(Tg)小鼠系根据 Peat 等人, Cancer Res., 52:1954-1960, 1992 获得。MUC1Tg 小鼠以与人类内源性 MUC1 表达相似的模式或水平来表达人类 MUC1 转基因。

[0630] 在下列实验中, MUC1 Tg 小鼠(N=5/ 组)以下列方式中的一种进行处理:(1) 以环磷酸胺(第 -3 天)预处理,并每周以 5、25 或 100 μ g 的实施例 1 脂质体疫苗制剂处理八周,(2) 以盐水对照处理,或 (3) 单独 50 μ g PET 脂质 A 佐剂。在处理期结束时,根据 IFN γ 诱导评估小鼠的 T 细胞应答并通过 ELISA 评估小鼠的抗体应答。

[0631] IFN γ 诱导:收集的脾细胞各分离自盐水处理的、PET 脂质 A 处理的和脂质体疫苗制剂处理的 MUC1Tg 小鼠组,并以具有 SEQ ID NO:2 的 MUC1 肽、具有序列 CTRPNNTRKSIRIQ RGPGRFVTIGKIGNMRQAS*S*L (SEQ ID NO:20, S* 是脂化丝氨酸)的阴性对照肽 BP-1-109 或载体离体刺激 48 个小时。使用 Luminex 技术测量细胞培养上清液中离体处理后的 IFN γ 表达或诱导(图 6A)。用实施例 1 脂质体疫苗制剂在所有三种浓度下免疫的转基因动物在以具有 SEQ ID NO:2 的 MUC1 肽离体刺激下显示出 IFN γ 应答。

[0632] 抗体诱导:从上述处理的动物中收集血清,并使用与先前实施例相似的具有 SEQ ID NO:2 的 MUC1 肽进行 ELISA 分析。图 6B 显示出以 5、25 或 100 μ g 的实施例 1 脂质体疫苗制剂接种或用 50 μ g 的脂质体 PET 脂质 A 或盐水处理的小鼠中的总 IgG 含量。图 6C 显示来自以 25 μ g 的实施例 1 脂质体疫苗制剂接种的小鼠的 IgG 同种型。图 6B 和 6C 中的绘制数据表示从 5 只个别小鼠中所得的平均血清 IgG 含量。

[0633] 实施例 5:实施例 1 的脂质体疫苗制剂和对于人类肿瘤 MUC1 的抗体特异性

[0634] C57B1/6J 小鼠以 100 μ g 的实施例 1 脂质体疫苗制剂进行接种。使用从经处理的小鼠或未经处理的动物(naive animals)取得的血清进行 B16 或 B16-MUC1 小鼠黑色素瘤细胞系的 FACS 分析。使用抗 MUC1 抗体 SM3 (SCBT SC-53381)作为低糖基化 MUC1 的阳性对照。图 7A 显示来自用实施例 1 脂质体疫苗制剂免疫的小鼠的 IgG 会选择性结合到细胞 MUC1。

[0635] 在相似的实验中,使用以 100 μ g 的实施例 1 脂质体疫苗制剂或 50 μ g 的 PET 脂质 A 接种的人类 MUC1 转基因小鼠中获得的血清对人类乳腺上皮细胞和 T47D 乳腺癌细胞进行染色。通过流式细胞术使用荧光偶联的抗小鼠第二抗体检测细胞染色。图 7B 显示来自

用实施例 1 脂质体疫苗制剂免疫的小鼠的 IgG 可以区分正常和肿瘤 MUC1。再度使用 SM3 作为低糖基化 MUC1 的阳性对照,且使用 MUC1 单克隆抗体 B27.29 和 Stemcell (StemCell Technologies) 作为完全糖基化正常 MUC1 的阳性对照。

[0636] 实施例 6: 实施例 1 的脂质体疫苗制剂对于肿瘤生长的影响

[0637] 从第 -42 天开始,使用每两周的程序,以盐水载体、50 μ g 脂质体 PET 脂质 A 或 5 μ g 的实施例 1 脂质体疫苗制剂处理 C57B1/6 小鼠。在第 0 天,以 2×10^6 B16-MUC1、 0.5×10^6 B16 或 2×10^6 MC38-MUC1 肿瘤细胞激发小鼠,随后在第 +3 天和第 +17 天进行两次额外的接种。每周两次记录肿瘤生长。

[0638] 在 B16-MUC1 模型中,以实施例 1 疫苗制剂处理的动物在第 44 天仍没有肿瘤。在研究结束时,在实施例 1 疫苗制剂组中 9/12 的动物没有肿瘤。相反地,盐水和 PET 脂质 A 组显示出相似的肿瘤生长曲线。到第 10 天时,这两个组的平均肿瘤体积为约 200mm³。到第 24 天,盐水和 PET 脂质 A 组的平均肿瘤体积为约 1200mm³。

[0639] 在 MC38-MUC1 模型中,在研究结束时,在实施例 1 疫苗制剂组中 3/12 的动物没有肿瘤。相比于盐水和 PET 脂质 A 组,肿瘤生长也减缓。到第 32 天,相比于 PET 脂质 A 组的约 1200mm³和盐水组的约 1700mm³,实施例 1 疫苗制剂组的平均肿瘤体积为约 120mm³。

[0640] 在肿瘤不会显示出 MUC1 的 B16 模型中,在所有三组中肿瘤生长均相似。

[0641] 实施例 7: 用于测试脂质体疫苗制剂对非小细胞肺癌的免疫疗法的效果的临床试验

[0642] 这是一个前瞻性的开放标签的、设有对照的、随机化的研究,以测试实施例 1 脂质体疫苗用于治疗第 IIIB 期或第 IV 期非小细胞肺癌 (NSCLC) 患者的主动特异性免疫疗法的安全性和效力。为了能够符合资格,进入该试验的患者将需要显示出在一线治疗(单独的化学疗法,或化学疗法和放射疗法)之后疾病稳定或是有临床反应,并且 ECOG 表现状态 (performance status) 为 0、1 或 2。经过 3 周的药物洗脱期 (washout period) 之后,患者依疾病状态(第 IIIB 期局部区域性疾病或第 IIIB 期伴恶性胸腔积液和第 IV 期)进行分级,并随机分至最佳支持性医护 (BSC) 加上疫苗免疫疗法或是单独的 BSC。

[0643] 在第 0、1、2、3、4、5、6 和 7 周进行八次 1,000 μ g 的实施例 1 脂质体疫苗的每周皮下接种。

[0644] 主要结果评价是实施例 1 脂质体疫苗的安全性谱的文件,以及两个试验小组中患者存活率的比较。次要结果评价是测定实施例 1 脂质体疫苗引发的免疫应答并评估进行免疫疗法的患者的生活质量。

[0645] 实施例 8: 用于测试脂质体疫苗制剂在晚期实体瘤患者中的最大耐受剂量和 / 或推荐剂量的临床试验

[0646] 这是一个开放标签的、第 I 期剂量递增研究,以评估实施例 1 脂质体疫苗在先前治疗的第 3 期或第 4 期实体瘤患者中重复剂量接种的安全性和免疫原性,其组织学与 MUC1 抗原的表达有关,该实体瘤包括(但不限于):乳腺癌、非小细胞肺癌、卵巢癌、结肠直肠癌、胃癌、前列腺癌、胰腺癌和肾细胞癌。

[0647] 第 1 部分评估每隔一周一次 (Q2W) 皮下施用实施例 1 脂质体疫苗历经 8 周(总共 4 份剂量)或每周一次 (QW) 历经 8 周(总共 8 份剂量)的递增剂量水平,并使用 3+3 剂量递增设计,来确定每个给药方案的最大耐受剂量 (MTD) 和 / 或推荐剂量 (RD),以供在该研究的

第 2 部分中进一步评价。第 2 部分评价在各有 15 位患者的每组中在 8 周期间以 Q2W 和 QW MTD/RD 施用的实施例 1 脂质体疫苗的安全性、免疫原性和潜在的抗肿瘤活性。在 8 周的给药期之后,评价患者的安全性、免疫应答和肿瘤反应至第 20 周。

[0648] 研究群体包括先前治疗的第 3 或 4 期实体瘤(其组织学与 MUC1 表达相关)患者。

[0649] 入选标准:

[0650] • 在同意时为 18-70 岁

[0651] • 根据研究者的判断至少 6 个月的预期寿命

[0652] • 组织学上确定患有乳腺癌、非小细胞肺癌、卵巢癌、结肠直肠癌、胃癌、前列腺癌、胰腺癌或肾细胞癌或其他肿瘤类型

[0653] • 至少一个对于局部晚期或转移性疾病的全身性疗程(包括化学疗法、靶向疗法或免疫疗法)之后,仍证明有持续性、复发性或进行性疾病

[0654] • 临床第 3 或 4 期疾病

[0655] • ECOG 为 0 或 1

[0656] • 适当的血液、肾和肝功能参数

[0657] 排除批准:

[0658] • 在 4 周的研究药物给药内曾接受任何全身性化学疗法、放射或实验药剂的治疗

[0659] • 有已知的自身免疫病、动脉炎或血管炎或经诊断的免疫缺陷疾病(例如细胞免疫缺陷、低丙球蛋白血症或异常丙种球蛋白血症)的病史

[0660] • 有任何先前存在的需要长期类固醇或免疫抑制疗法的医疗状况

[0661] • HIV、乙型肝炎或丙型肝炎阳性

[0662] • 在入选研究之前 $\leq$ 4 周曾接受过任何其他疫苗

[0663] 给药模式:在第 -3 天所有受试者接受环磷酰胺 250mg/m²的初始静脉内注射。按照组别分配,从第 1 天开始皮下施用实施例 1 的脂质体疫苗。所有患者在四个单独的注射部位接受作为四次单独注射施用的实施例 1 脂质体疫苗(在右上臂或大腿、左上臂或大腿及右和左下腹部各进行一次注射)。开始剂量是 250 μ g 的脂质体疫苗和 125 μ g 的 PET 脂质 A 佐剂(2:1 的比例)。额外的剂量水平包括 2:1 比例的 500 和 1000 μ g 脂质体疫苗与佐剂。使用剂量加倍设计(dose-doubling design)来选择剂量水平。当 MTD 小于 1000 μ g 时,考虑中间剂量水平,750 μ g。

[0664] 在第 2 部分八周给药的评价和分析中,免疫应答测量包括使用对于实施例 1 脂质体疫苗特异性的 ELISA 测定 MUC-1 特异性抗体的血清效价及对于 IFN- γ 的 MUC-1 特异性 ELISPOT 分析。免疫应答量度还包括(但不限于):循环 CD4 和 CD8T 细胞的比例、循环骨髓抑制细胞群的比例、T 细胞细胞因子的含量、抗实施例 1 脂质体疫苗的 IgG 和 IgM 抗体的相对比例和循环细胞因子的含量。如 RECIST1.1 所定义的来评估肿瘤反应。

[0665] 虽然本文已经显示并描述了本发明的优选实施方案,但对于本领域技术人员很明显的是,这些实施方案仅通过举例而提供。本领域技术人员现在将想到不偏离本发明的各种变化、改变和取代。应了解的是,可使用本文所述发明的实施方案的多种替代方案来实施本发明。以下权利要求旨在限定本发明的范围并由此覆盖这些权利要求范围内的方法和结构及其等效物。

[0001]

序 列 表

<110> 肿瘤防护公司

<120> 含有佐剂的以 MUC1 为基础的糖脂肽疫苗

<130> 34395-826.601

<140>

<141>

<150> 61/470,449

<151> 2011-03-31

<150> 61/446,332

<151> 2011-02-24

<160> 21

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明：合成肽

<400> 1

Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro

1

5

10

15

Ala His Gly Val

20

<210> 2

<211> 43

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明：合成多肽

<220>

<221> MOD_RES

<222> (6)..(6)

<223> Thr-GalNAc-alpha-1

[0002]

<220>
<221> MOD_RES
<222> (12)..(12)
<223> Ser-GalNAc-alpha-1

<220>
<221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> Thr-GalNAc-alpha-1

<220>
<221> MOD_RES
<222> (26)..(26)
<223> Thr-GalNAc-alpha-1

<220>
<221> MOD_RES
<222> (32)..(32)
<223> Ser-GalNAc-alpha-1

<220>
<221> MOD_RES
<222> (33)..(33)
<223> Thr-GalNAc-alpha-1

<220>
<221> MOD_RES
<222> (41)..(42)
<223> 共价连接到 Ser 残基的 C14 脂质

<400> 2
Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro
1 5 10 15

Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser
20 25 30

Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Ser Ser Leu
35 40

<210> 3
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的说明：合成肽

[0003]

<220>

<221> MOD_RES

<222> (5).. (5)

<223> Asp 或 Gln

<220>

<221> MOD_RES

<222> (6).. (6)

<223> Thr 或 Ser

<220>

<221> MOD_RES

<222> (16).. (16)

<223> Pro、Ala、Gln 或 Thr

<400> 3

Thr	Ser	Ala	Pro	Xaa	Xaa	Arg	Pro	Ala	Pro	Gly	Ser	Thr	Ala	Pro	Xaa
1				5						10					15

Ala His Gly Val
20

<210> 4

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明：合成肽

<400> 4

Ser	Ala	Pro	Asp	Thr	Arg	Pro
1				5		

<210> 5

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明：合成肽

<400> 5

Pro	Asp	Thr	Arg	Pro
1				5

<210> 6

[0004]

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明：合成肽

<400> 6

Arg Pro Ala Pro Gly Ser

1 5

<210> 7

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明：合成肽

<400> 7

Pro Pro Ala His Gly Val Thr

1 5

<210> 8

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明：合成肽

<400> 8

Pro Asp Thr Arg Pro

1 5

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明：合成肽

<400> 9

Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser

1 5

<210> 10

[0005]

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明：合成肽

<400> 10

Pro Asp Thr Arg Pro

1 5

<210> 11

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明：合成肽

<400> 11

Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala

1 5 10 15

Pro Pro Ala His

20

<210> 12

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明：合成肽

<400> 12

Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr

1 5 10 15

Ser Ala Pro Asp

20

<210> 13

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

[0006]

<223> 人工序列的说明：合成肽

<400> 13

Asp Thr Arg

1

<210> 14

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明：合成肽

<400> 14

Asp Thr Arg Pro

1

<210> 15

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明：合成肽

<400> 15

Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro

1

5

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明：合成肽

<400> 16

Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala

1

5

<210> 17

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

[0007]

<223> 人工序列的说明：合成肽

<400> 17

Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala
1 5 10 15

<210> 18

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明：合成肽

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> 癌症相关的糖表位修饰的 Thr

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> 癌症相关的糖表位修饰的 Ser

<220>

<221> MOD_RES

<222> (6)..(6)

<223> 癌症相关的糖表位修饰的 Thr

<220>

<221> MOD_RES

<222> (12)..(12)

<223> 癌症相关的糖表位修饰的 Ser

<220>

<221> MOD_RES

<222> (13)..(13)

<223> 癌症相关的糖表位修饰的 Thr

<400> 18

Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro
1 5 10 15

Ala His Gly Val
20

<210> 19

<211> 20

[0008]

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明：合成肽

<220>

<221> MOD_RES

<222> (6)..(6)

<223> 癌症相关的糖表位修饰的 Thr

<220>

<221> MOD_RES

<222> (12)..(12)

<223> 癌症相关的糖表位修饰的 Ser

<220>

<221> MOD_RES

<222> (13)..(13)

<223> 癌症相关的糖表位修饰的 Thr

<400> 19

Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro
1 5 10 15

Ala His Gly Val
 20

<210> 20

<211> 37

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明：合成多肽

<220>

<221> MOD_RES

<222> (35)..(36)

<223> 脂化的 Ser

<400> 20

Cys Thr Arg Pro Asn Asn Asn Thr Arg Lys Ser Ile Arg Ile Gln Arg
1 5 10 15

Gly Pro Gly Arg Ala Phe Val Thr Ile Gly Lys Ile Gly Asn Met Arg
 20 25 30

[0009]

Gln Ala Ser Ser Leu
35

<210> 21

<211> 28

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明：合成肽

<400> 21

Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg
1 5 10 15

Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala Lys Gly
20 25

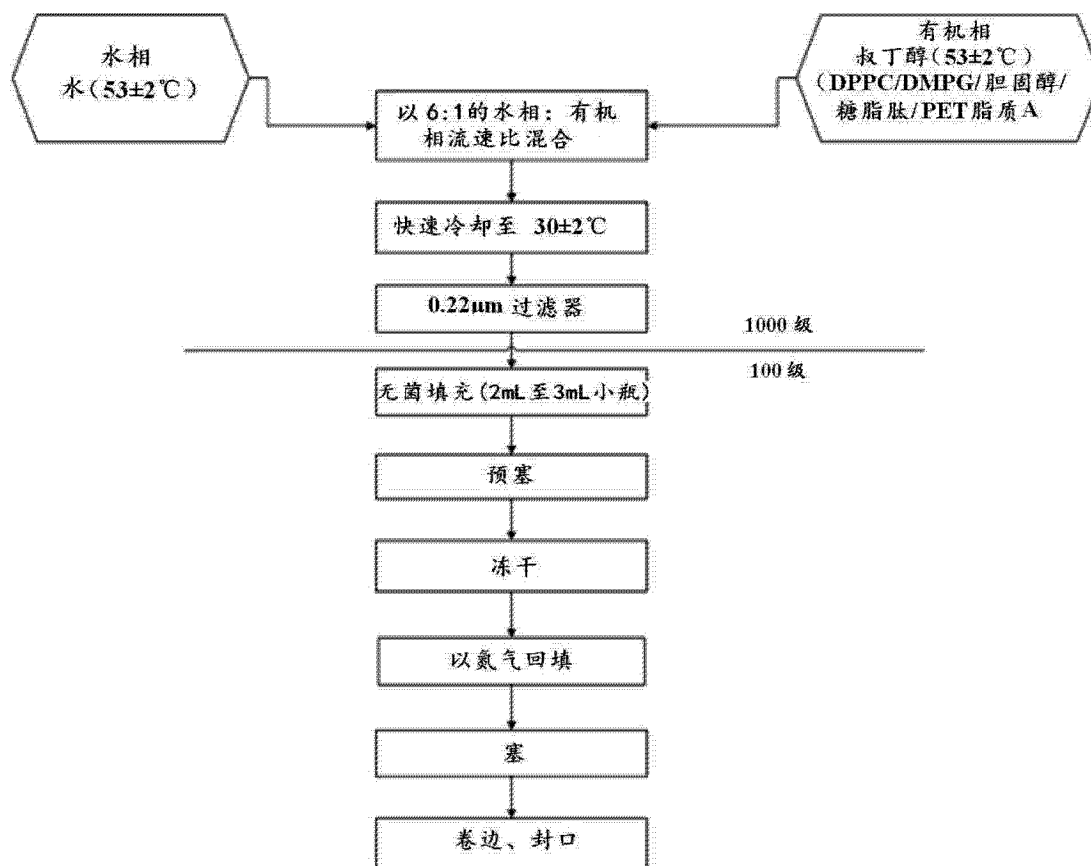


图 1

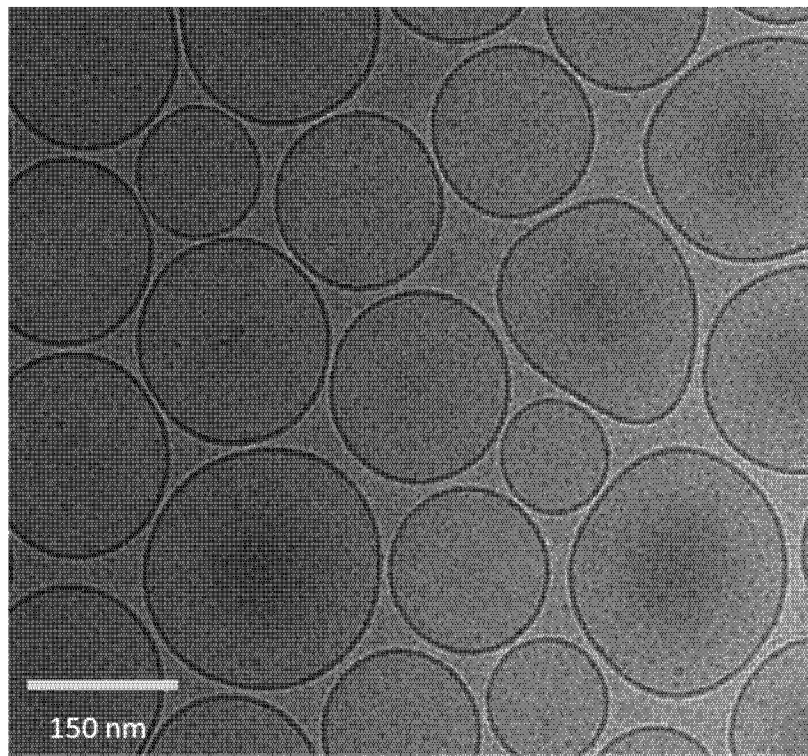


图 2A

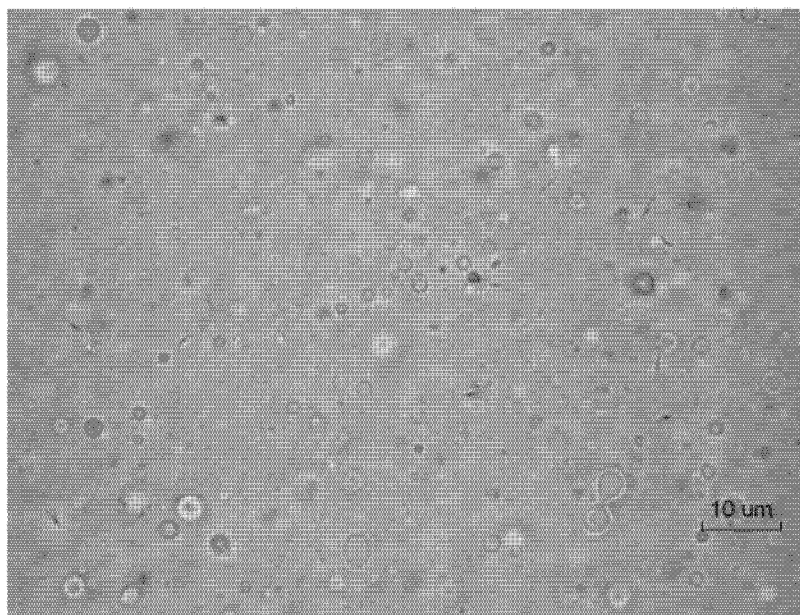


图 2B

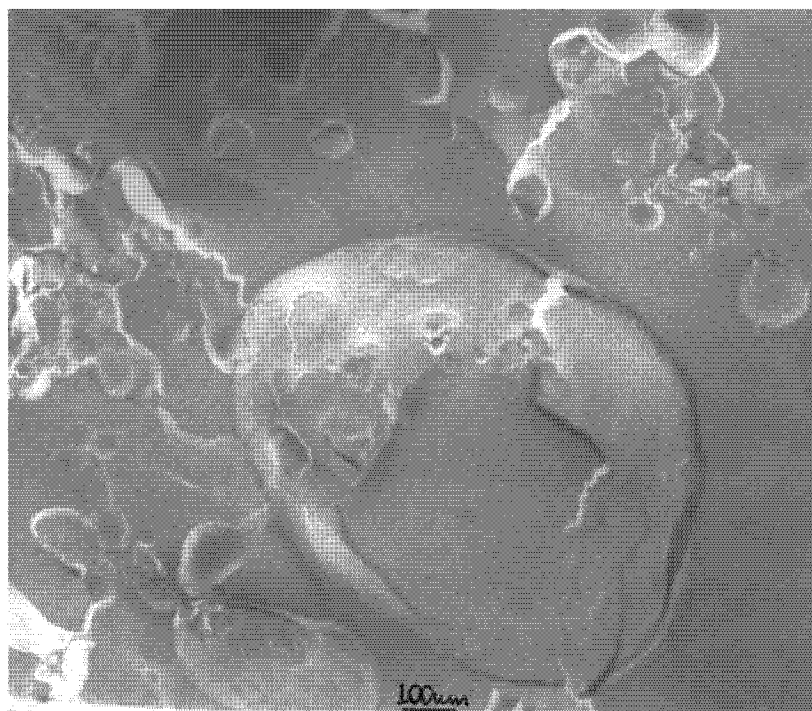


图 2C

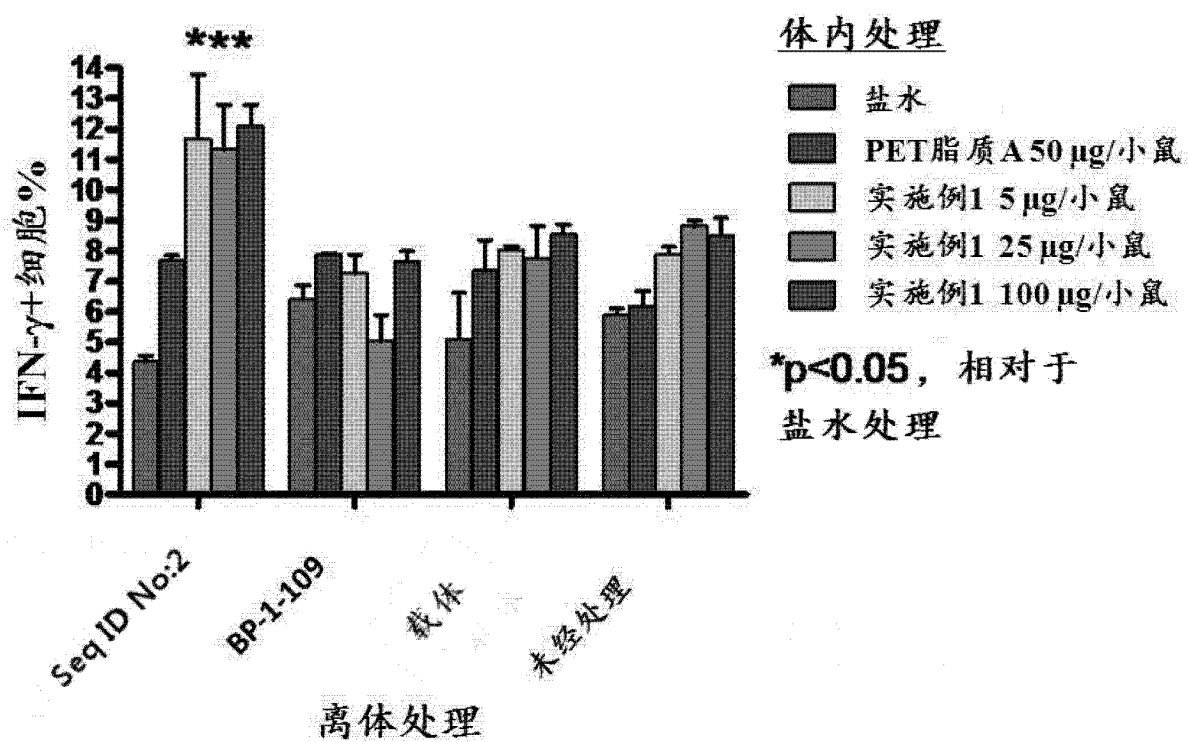


图 3A

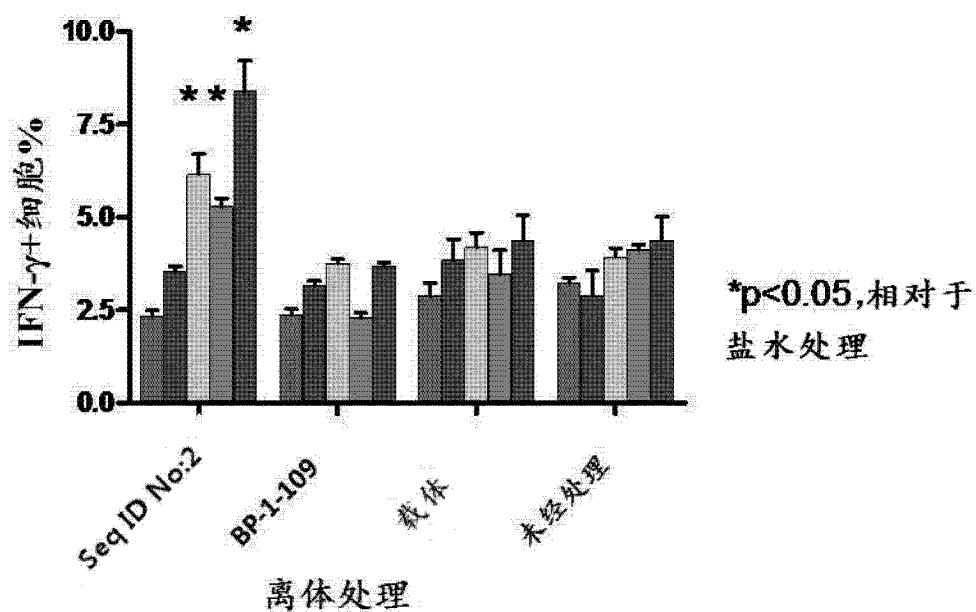


图 3B

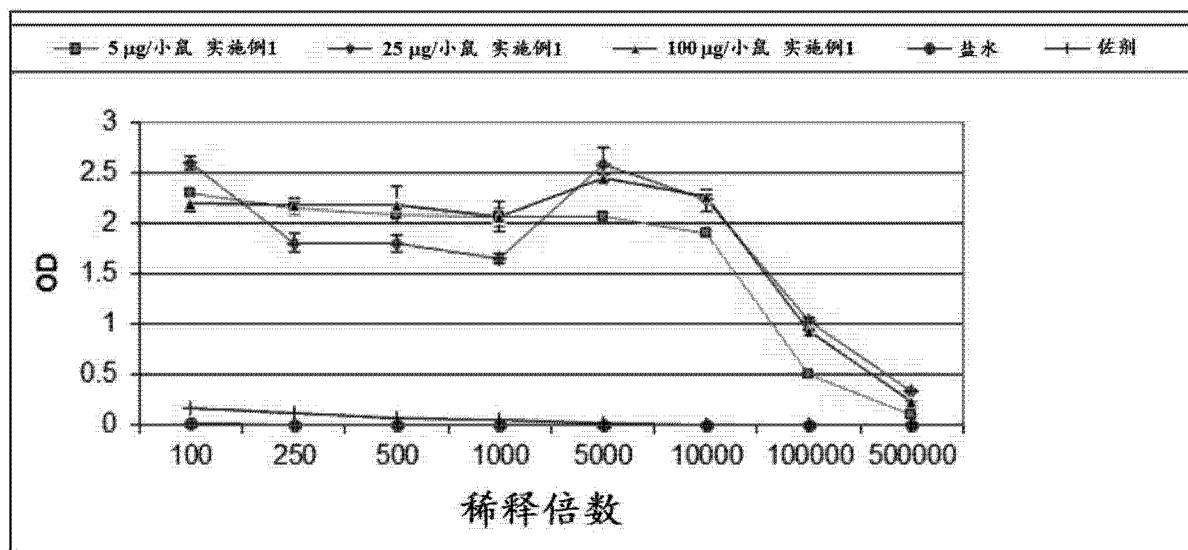


图 4

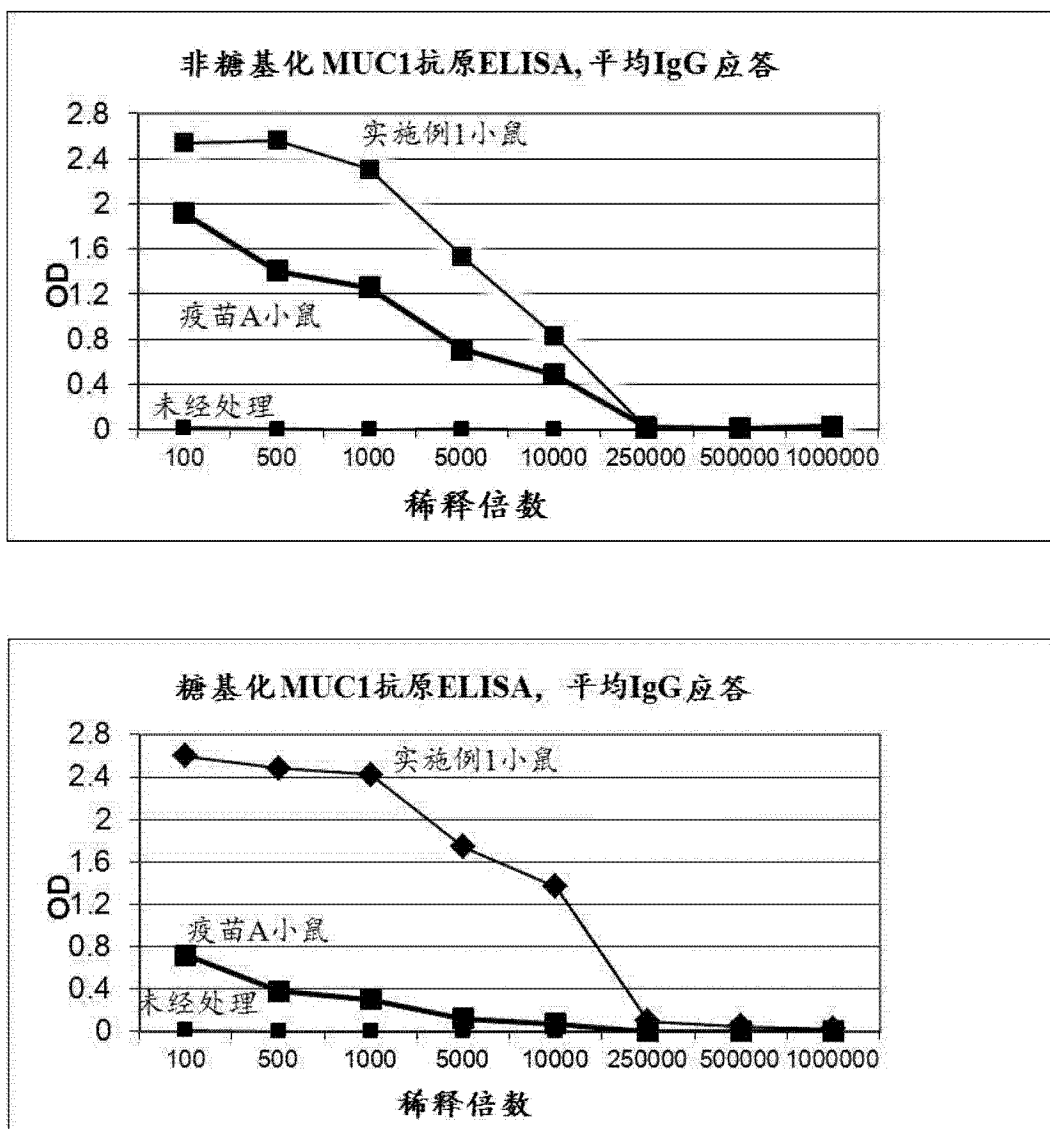


图 5

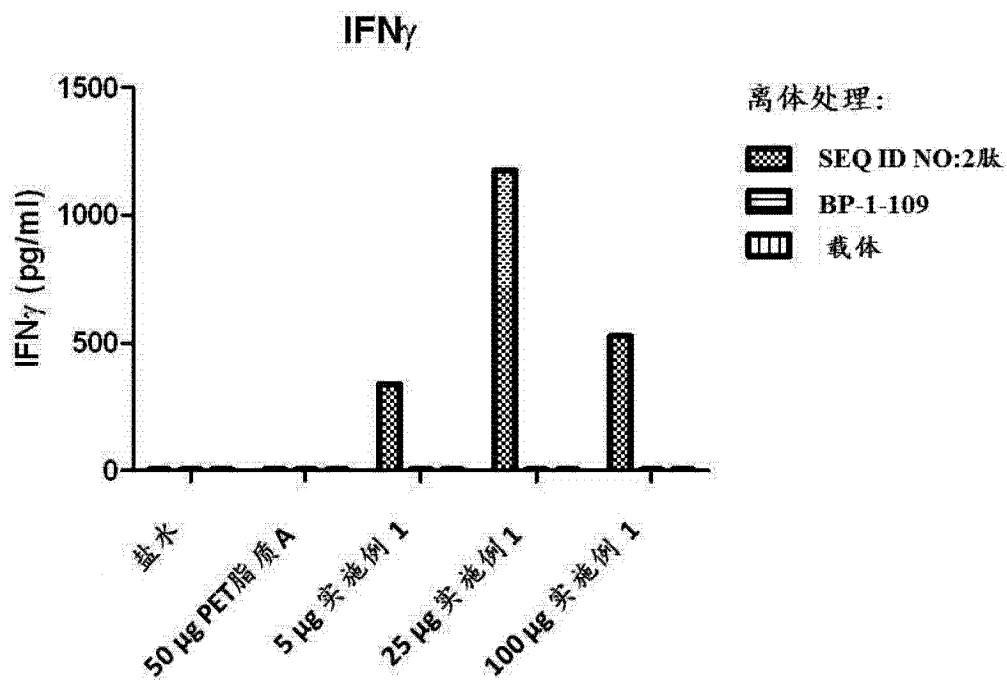


图 6A

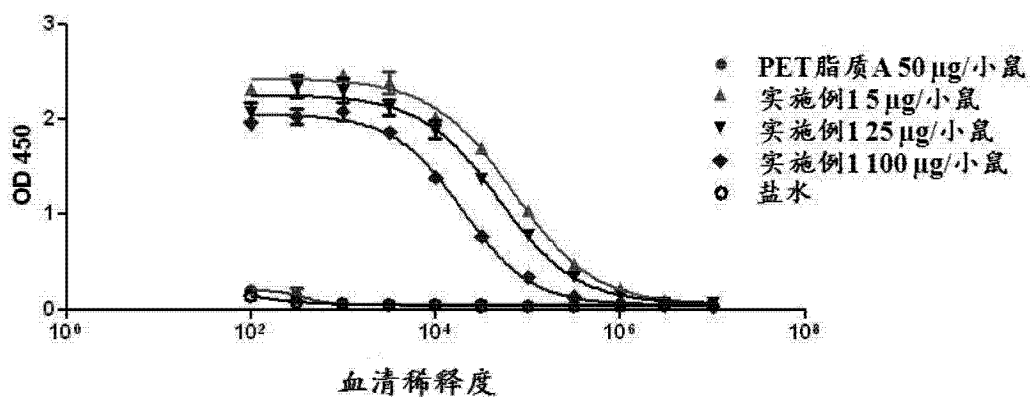


图 6B

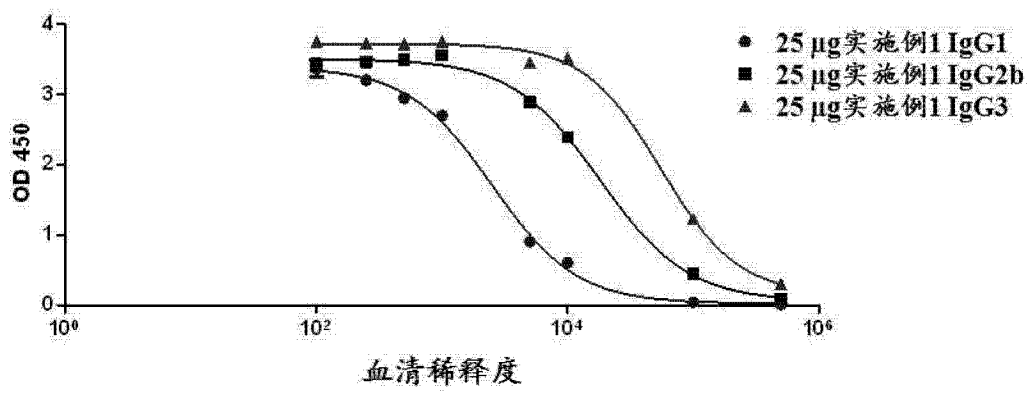


图 6C

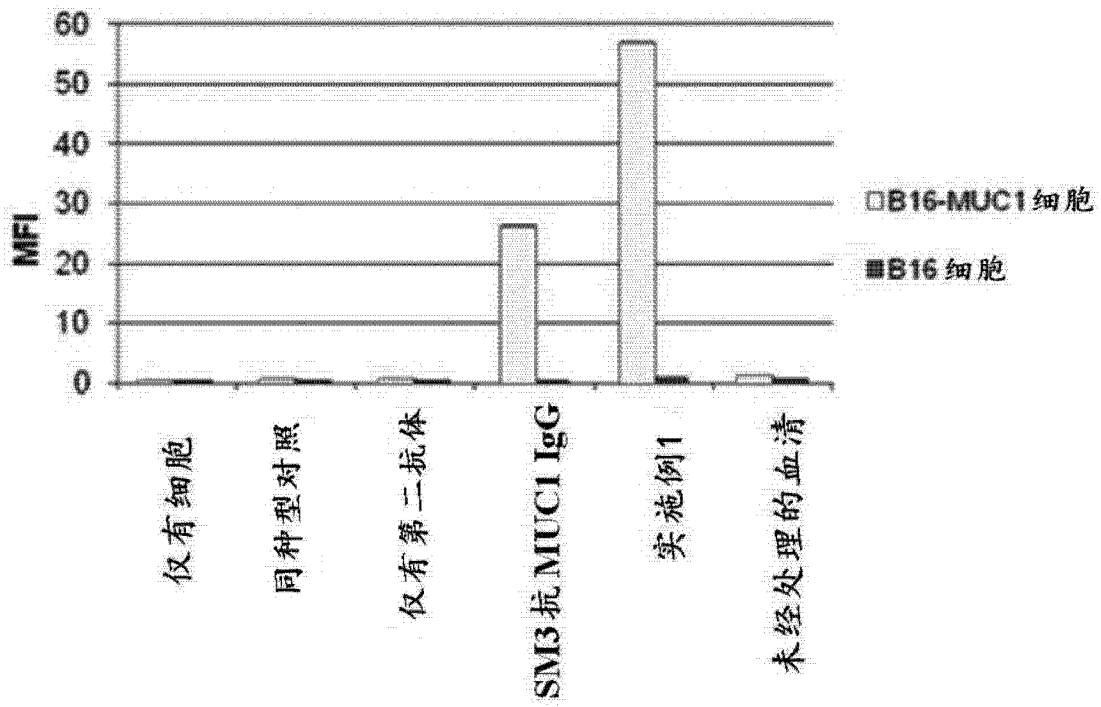


图 7A

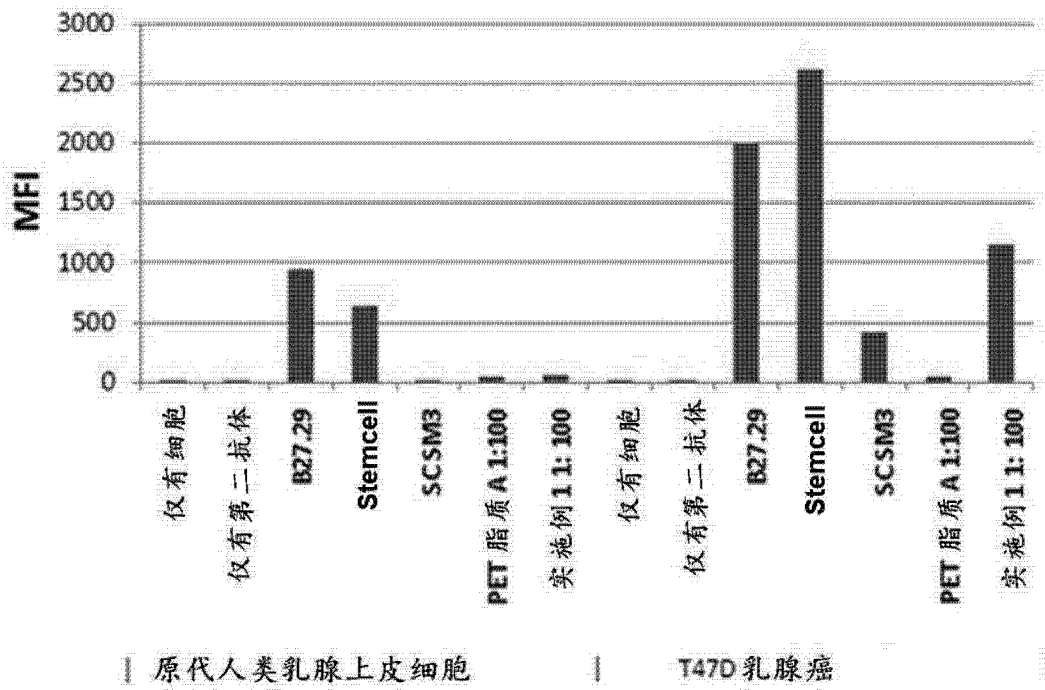


图 7B