

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A61K 39/00

A61K 47/00

A61K 47/30

A61P 37/04



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01815645.2

[43] 公开日 2005 年 6 月 22 日

[11] 公开号 CN 1630531A

[22] 申请日 2001.9.14 [21] 申请号 01815645.2

[30] 优先权

[32] 2000. 9. 14 [33] AU [31] PR0117

[32] 2001. 5. 10 [33] AU [31] PR4888

[32] 2001. 5. 14 [33] AU [31] PR4962

[86] 国际申请 PCT/AU2001/001160 2001.9.14

[87] 国际公布 WO2002/022164 英 2002.3.21

[85] 进入国家阶段日期 2003.3.14

[71] 申请人 奥斯汀研究院

地址 澳大利亚维多利亚

[72] 发明人 玛格达莱娜·普莱班斯基

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司
代理人 林晓红

权利要求书 3 页 说明书 38 页 附图 21 页

[54] 发明名称 包含免疫原性微颗粒的组合物

[57] 摘要

本发明提供了一种免疫原性的组合物，其包含至少一种结合于微颗粒 (microparticle) 的抗原，其中所述微颗粒有着和病毒一样的大小范围。另外，本发明也提供了疫苗组合物和在研究对象上引发免疫应答的方法。

1. 一种免疫原性组合物，其包含至少一种结合于微颗粒的抗原，其中所述微颗粒具有和病毒一样的大小范围。
2. 一种疫苗组合物，其包含至少一种结合于微颗粒的抗原，其中所述微颗粒具有和病毒一样的大小范围。
3. 权利要求 1 或 2 的组合物，其中所述微颗粒的大小基本上是均一的。
4. 权利要求 1 到 3 中任一项的组合物，其中所述微颗粒包含一实心的核心。
5. 权利要求 1 到 4 中任一项的组合物，其中所述微颗粒直径是大约 $0.03\text{-}0.05 \mu\text{m}$ 。
6. 权利要求 1 到 5 中任一项的组合物，其中所述微颗粒由乳胶、亚铁分子、金、玻璃、磷酸钙、聚苯乙烯、聚赖氨酸 G 或其他可生物降解的和生物相容性的聚合物构成。
7. 权利要求 1 到 6 中任一项的组合物，其中所述抗原被吸附于、结合于、或共价偶联于所述微颗粒。
8. 权利要求 1 到 7 中任一项的组合物，其中所述抗原可以是一种肽、蛋白质、重组的肽或蛋白质、脂质、碳水化合物、核酸或其他类型的分子或这些物质的任意组合。
9. 权利要求 1 到 8 中任一项的组合物，其中所述抗原来源于病原体、组织、细胞器或分子并选自：
花粉、丙型肝炎病毒、(HIV) 核心、E1、E2 和 NS2 蛋白、来自疟原虫属如间日疟原虫和其他疟原虫属的抗原，包括恶性疟原虫的环孢子蛋白 (CS) 和人恶性疟原虫、间日疟原虫、卵形疟原虫和三日疟原虫的 TRAP、MSP-1、MSP-2、MSP-3、MSP-4、MSP-5、AMA-1、RESA、SALSA、STARP、LSA1 和 LSA3、

HIV-gp120/160 包膜糖蛋白、链球菌表面蛋白抗原、流感核蛋白、血凝素-神经酰胺酶表面感染、 TcpA 菌毛蛋白亚基、VP1 蛋白、LMCV 核蛋白、硕大利什曼原虫表面糖化蛋白 (gp63)、百日咳博德特氏菌表面蛋白、狂犬病病毒 G 蛋白、链球菌 M 蛋白、葡萄球菌蛋白或幽门螺旋杆菌蛋白、合胞体病毒 (RSV) F 或 G 蛋白、Epstein Barr virus (EBV) gp340 或核抗原 3A、血凝素、博氏疏螺旋体外表面蛋白 (Osp) A、结核分支杆菌 38kD 脂蛋白或 30kD 蛋白 (Ag85)、10kD 或 65kD 蛋白、脑膜炎奈瑟菌 1 型外蛋白、水痘带状疱疹 IE62 和 gpl、风疹病毒壳体蛋白、乙型肝炎病毒前-S1 抗原、单纯疱疹病毒 I 型糖化蛋白 G 或 gp D 或 CP27、墨累灰牛流域脑炎病毒 E 糖蛋白、甲型肝炎病毒 VP1、脊髓灰质炎病毒壳体蛋白 VP1、VP2、和 VP3、沙眼衣原体表面蛋白、乙型肝炎病毒包膜前-S2 抗原、人鼻病毒(HRV) 壳体、人乳头状瘤病毒来自癌基因 E6 和 E7 的多肽、李斯特杆菌表面蛋白、水痘病毒壳体蛋白、牛痘病毒包膜蛋白、布氏杆菌表面蛋白、轮状病毒、VP-3、VP-4、VP-5、VP-7 和 VP-8、所述一种或多种抗原的组合、所述抗原的长度上包含 5 个或更多氨基酸的氨基酸亚基或一个或多个所述亚基的组合。

10. 权利要求 1 到 8 中任一项的组合物，其中所述抗原来源于肿瘤如乳腺癌、肺癌、胰腺癌、结肠癌或黑色素瘤。

11. 权利要求 10 的组合物，其中所述抗原是重组的肽或蛋白。

12. 一种在研究对象上引发免疫应答的方法，所述方法包含给研究对象施用免疫有效量的、包含至少一种结合于微颗粒的抗原的组合物，其中所述微颗粒具有和病毒一样的大小范围。

13. 权利要求 11 的方法，其中所述免疫应答选自 CD8 细胞应答和抗体应答，其中所述抗体是 IgG、IgM 或 IgA。

14. 权利要求 11 的方法，其中所述免疫应答是树突状细胞的增殖和/或扩增。

15. 一种通过单剂量引发针对一种抗原的保护性免疫应答的方法，所述方法包含单次给研究对象施用免疫有效量的、包含至少一种结合于微颗粒的抗原的组合物，其中所述微颗粒具有和病毒一样的大小范围，并且所述免疫应答包含树突状细胞的刺激和/或增殖。

16. 一种为了引发免疫应答而在体内将抗原转运至树突状细胞的方法，所述方法包含给研究对象施用免疫有效量的、包含至少一种结合于微颗粒的抗原的组合物，其中所述微颗粒具有和病毒一样的大小范围。

17. 权利要求 15 或 16 的方法，其中所述免疫应答包含引发机制为 MHC I 型的抗原呈递，其中所述抗原被内凹或网格蛋白小凹摄取用于通过 Rab4 非依赖性和 TAP 依赖性的过程进行进一步加工。

18. 一种产生免疫原性微颗粒/抗原组合物的方法，其包含将和病毒一样大小范围的微颗粒与一种或多种抗原进行接触以使得所述微颗粒和抗原相结合。

包含免疫原性微颗粒的组合物

本发明涉及一种免疫原性组合物，疫苗组合物，在研究对象中引发免疫应答的方法和生产这些组合物的方法。

发明背景

调控人和动物的免疫系统是一种得到广泛认可的避免或治疗某些疾病或情况的手段。

免疫系统控制疾病的机理包括诱导中和抗体（一种体液免疫应答）和产生细胞或 T 细胞免疫应答。后者包括 T 辅助细胞 (T_H) 和细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL)。在病毒感染例如脊髓灰质炎或肝炎，抗体通过阻止病毒感染细胞而提供保护。通过利用杀菌机制和中和细菌毒素，抗体也能抵抗细菌如肺炎链球菌和葡萄球菌。

当抗原的肽片段结合到称为 MHC I 或 MHC II 的分子（主要组织相容性复合物，I 型或 II 型）并被呈递在专门的 APC（抗原呈递细胞 (antigen presenting cells)）如 DC（树突状细胞 (dendritic cells)）或巨噬细胞表面时，T 细胞能被激活。T 细胞含有的抗原受体能用于监视细胞表面的抗原肽片段的出现。 T_H 细胞的抗原受体识别结合于 MHC II 分子的抗原肽。相反的，CTL 的受体和呈现在 I 型分子的抗原反应。

激活的 T 细胞放大免疫应答，这是因为当 T 细胞识别被病原体感染或包含它能识别的抗原决定簇的目标细胞时，链式事件被触发，这些最终导致感染的细胞的死亡。另外，一些 T 细胞能刺激分泌细胞因子或淋巴因子，这些反过来可最终导致病原体的失活或消除。

尽管市场上有很多疫苗，但是对于大量的疾病或情况仍然需要生

产更有效和广谱的疫苗。也仍然需要保护性对抗那些尚未获得疫苗或疫苗效果不佳的感染体或病原体。另外，需要一种有效的单剂量的疫苗，就经济、运输和患者或研究对象的顺从性等原因而言，它显得尤其需要。

大多数疫苗的缺点为不能诱导最佳的、不同类型的体液和细胞应答的组合，以达到免疫学有效性。例如，当抗体和细胞应答两者同时存在会更有效时，一些疫苗只能刺激抗体应答。其他例子中，需要多剂的疫苗注射如追加注射才能抵抗相关的感染体。

在一些其他的例子中，与所需要的免疫球蛋白如 IgA、IgG 和 IgM 一起被诱导产生的还有 IgE。诱导 IgE 的疫苗是不利的，因该免疫球蛋白出现在过敏反应中。

刺激 IgA 的生成对于经黏膜位置或表面进入感染的病原体是“第一线”防御。因此，能产生高 IgA 分泌的免疫应答而不增加 IgE 生成的疫苗也将是有用的。

然而在其他例子中，尽管疫苗能刺激 APC，免疫刺激的程度是不乐观的。例如，树突状细胞或 DC 被一系列的细胞亚群所特征化，它们能通过表面分子彼此区别开来，一些表面分子是能结合于 T 细胞受体的特异配体。因此，需要去生产一种疫苗能选择性地定向于 DC 的一类亚群，例如一类能有效地启动 CD8 T 细胞的亚群，因为这些 T 细胞在对抗许多细胞内病原体和肿瘤的保护性免疫中发挥重要作用，但其难于诱导是众所周知的。

进一步，对于疫苗，就大多数细胞而言，细胞外的抗原传统地不进入 MHC I 处理途径。通常，利用死疫苗产生 CTL 免疫是不太可能的，尽管有人认为存在 APC 通过摄取凋亡细胞、免疫复合物和颗粒 [1] 来进行处理和呈递的 I 型的选择性途径。乙型肝炎的表面蛋白或酵母逆转录蛋白颗粒构成的非感染性病毒样颗粒（VLP）已经显示能被巨噬细胞用于有效地加工以呈递 MHC I 来在体内和体外诱导 CD8

CTL 细胞应答 [2, 3]。VLP 是多亚基、包含脂质的蛋白颗粒，其中脂质成分构成超过干重的 50%。

然而，因为乙型肝炎核心蛋白颗粒不具有免疫原性，并具有较低的脂质成分，推测 VLP 的免疫原性不是因为其大小而是在于其生物化学成分。这与关于当抗原表现为包含脂质或去污剂的形式时，它们可能通过损坏细胞膜而与 APC 融合，然后进入细胞浆的假说一致。

应用载有抗原的微球已经被试验作为一种可能的疫苗组合物。微球由可生物降解的乳酸和羟乙酸多酯（PLA 和 PLGA）构成。微球被构建成使得它们的大小和聚合物组合物能够控制其自身的降解速度。当微球降解后，其载有的抗原从中被释放，并提供了抗原的控释来刺激免疫应答。这些分子通过与蛋白颗粒一样的方式与免疫细胞接触和反应是不太可能的，蛋白颗粒的构造与细胞膜具有生物相容性。

然而，这种形式的疫苗组合物的难点还包括抗原稳定性、微球大小和抗原释放的动力学，所有的这些仍需要去解决以生产出具有好的抗原性和永久免疫原性的疫苗，以生产出能经济地生产和施用的疫苗 [4]。

在美国专利 No. 4,225,581 中，一种包含不同大小的异源性颗粒混合物的组合物被描述为对于将吸附于聚合物颗粒表面的抗原运输到体内是有用的。然而，这种疫苗的成功转运、抗原性和免疫原性没有被阐述或展示。特别的，没有证据显示诱导了 CD8 T 细胞应答，或甚至参与了 MHC I 型呈递途径。颗粒的聚合物材料认为和上面讨论的 PLA 或 PLGA 微颗粒具有相似的特性。

因此，在本发明之前还不清楚，作为疫苗的一部分而被施用的颗粒，其本身的大小是否能诱导免疫原性应答。

在形成本发明的工作中，发明者惊奇地发现结合于抗原的、与病毒大约一样大小的微颗粒能在研究对象上引起强烈的细胞和体液抗体应答。

发明概述

在本发明的第一部分提供了一种免疫原性组合物，其包含结合于微颗粒的至少一种抗原，其中微颗粒有着和病毒一样的大小范围。

涉及免疫原性组合物使用的术语“包含”意思是组合物中包括抗原和微颗粒。也可以包括其他成分。

术语“抗原”指的是任何能引起免疫应答的分子、成分或实体。免疫应答包括细胞和/或体液免疫应答。依赖于组合物设定的功能可以包含一种或多种抗原。

抗原可以是一种肽、蛋白质、脂质、碳水化合物、核酸或其他类型的分子或任何的这些分子的组合。

抗原可以来自病原体、组织、细胞、器官或分子，这依赖于组合物设定的功能。可以是纯化的抗原，或是重组来源的，生产于合适的载体如细菌、酵母菌或细胞培养。病原体例如可以是任何病原体、细胞内或细胞外的、抗原成分或它们的部分、病毒、细菌或原虫来源、如 HIV、流感病毒、肝炎病毒、疟疾。特别的，本发明中采用的抗原例子如下：花粉、丙型肝炎病毒、(HIV)核心、E1、E2 和 NS2 蛋白、来自疟原虫属的抗原、如间日疟原虫和其他疟原虫属包括恶性疟原虫的环孢子蛋白 (CS) 和人恶性疟原虫、间日疟原虫、卵形疟原虫和三日疟原虫、TRAP、MSP-1、MSP-2、MSP-3、MSP-4、MSP-5、AMA-1、RESA、SALSA、STARP、LSA1 和 LSA3、HIV-gp120/160 包膜糖蛋白、链球菌表面蛋白抗原、流感核蛋白、血凝素-神经酰胺酶表面感染、 TcpA 菌毛蛋白亚基、VP1 蛋白、LMCV 核蛋白、硕大利什曼原虫表面糖化蛋白 (gp63)、百日咳博德特氏菌表面蛋白、狂犬病病毒 G 蛋白、链球菌 M 蛋白、葡萄球菌蛋白或幽门螺旋杆菌蛋白、合胞体病毒 (RSV) F 或 G 蛋白、Epstein Barr virus (EBV) gp340 或核抗原 3A、血凝素、博氏疏螺旋体外表面蛋白 (Osp) A、结核分支杆菌 38kD 脂蛋白或 30kD 蛋白 (Ag85)、10kD 或 65kD 蛋白、

脑膜炎奈瑟菌 I 型外蛋白、水痘带状疱疹 IE62 和 gpl、风疹病毒壳体蛋白、乙型肝炎病毒前 S1 抗原、疱疹单纯病 I 型糖化蛋白 G 或 gp D 或 CP27、墨累灰牛流域脑炎病毒 E 糖蛋白、甲型肝炎病毒 VP1、脊髓灰质炎病毒壳体蛋白 VP1、VP2、VP3 和 VP6、沙眼衣原体表面蛋白、乙型肝炎病毒包膜前 S2 抗原、人鼻病毒(HRV)壳体、人乳头状瘤病毒来自癌基因 E6 和 E7 的肽、李斯特杆菌表面蛋白、水痘病毒壳体蛋白、牛痘病毒包膜蛋白、布氏杆菌表面蛋白、轮状病毒 VP-3、VP-4、VP-5、VP-7 和 VP-8、上述一种或多种抗原的组合、上述抗原的长度上包含 5 个或更多氨基酸的氨基酸亚基或一个或多个上述亚基的组合。

上述例举的病原体的裂解物或培养的过滤物也可以作为抗原。这些片段可以是纯化的、浓缩的或稀释的形式、同样他们提供了抗原性和或免疫原性。因此，根据本发明，这使得为患者特制免疫原性组合物成为可能，通过将患者肿瘤裂解物或肿瘤蛋白的某一特定成分结合到微颗粒上。

抗原也可以来自任何肿瘤类型或恶性物。可以生成抗原的肿瘤类型的例子是乳腺癌、肺癌、胰腺癌和结肠癌和黑色素瘤。一些进一步来源于肿瘤的特异性抗原的例子是黑色素瘤特异抗原（例如，MAGE 系列抗原），来自结肠的癌胚胎抗原（CEA），nm23 癌抗原和其他癌抗原或任何肿瘤中提取的真抗原，如粘蛋白如 MUC-1 到 MUC-7 抗原。单独或组合的重组肽或蛋白也可以被利用。

抗原也可以是合成的抗原决定簇，如基于上述提及的一种或多种抗原的模拟物或肽样模拟物。

术语“结合于”指的是微颗粒和抗原之间的连接。这可以是通过吸附、或通过结合或共价偶联。优选的抗原共价连接于微颗粒。甚至更优选的，抗原结合于微颗粒的表面。

术语微颗粒指的是小颗粒。它可以是珠样或球样或其他任何合适

的形式。

术语“病毒大小颗粒”(VSP)在本文中用于描述本发明的免疫原性组合物的某个实施方案。应该明白术语 VSP 被采用仅仅是因为便利，并不将本发明限制在已知的病毒大小。例如，和未知病毒一样大小的颗粒也在本发明的预期之中。

优选的，微颗粒具有实心的核心，给结合的或相连的抗原提供了稳定性，区别于以往是空心或胶囊工艺的微球。方便起见，这里指的病毒大小实心颗粒(VSSP)，其抗原出现在颗粒外面。用于制造 VSSP 的颗粒可以从制造商得到且基本上是统一规格(也就是，在预定大小的 10%以内)。

术语“实心的核心”指的是基本上实心(也就是颗粒不是空心的)。微颗粒可以由任何合适材料构成只要它不减弱免疫原性组合物的功能。因此微颗粒可以由乳胶、亚铁分子、金(如金的纳米颗粒)、玻璃、磷酸钙、聚苯乙烯或可生物降解的和生物相容性的聚合物如 PLG(聚赖氨酸 g)构成。优选的，微颗粒由聚苯乙烯、PLG 或金构成。最优选的，微颗粒由聚苯乙烯构成。

微颗粒有着和已知的病毒相同的大小范围。这意味着微颗粒是优选的小于大约 $0.50 \mu m$ 。优选的如此大小的微颗粒适合于引起免疫应答。尤其它适合于被人体研究对象或动物中的抗原呈递细胞所摄取。更优选的，微颗粒在大约 0.03 和 $0.5 \mu m$ 之间，优选的在大约 0.03 和 $0.15 \mu m$ 之间，仍更优选的在 0.03 和 $0.10 \mu m$ 之间。甚至更优选的微颗粒在约 0.03 到 $0.05 \mu m$ 之间，更优选的，微颗粒在约 $0.03 \mu m$ 和 $0.049 \mu m$ 之间。仍更优选的微颗粒在约 0.03 和约 $0.04 \mu m$ 之间或约 0.04 和 $0.049 \mu m$ 之间。

在优选的实施方案中，根据本发明应用的微颗粒群体，如用于单次剂量免疫接种的微颗粒群体，是统一大小的。这意味着在约定群体中的绝大多数颗粒是所指定的大小。

优选的微颗粒/抗原组合物是特别适合于引起细胞和/或体液免疫应答。细胞应答优选的选自 T_H 细胞尤其是生成 IFN 和 IL-4 的 T 细胞、CTL 尤其是 CD8 CTL 和 B 细胞的活化、成熟或增殖。

优选的微颗粒/抗原组合物引发了 MHC I 型抗原呈递机制，抗原通过包括内凹 (caveole) 和/或网格蛋白凹(pit)的迄今未知的机制被摄取以通过 Rab 4 非依赖性和 TAP 依赖性过程来进一步处理，如在这里的实施例 4 和 7 中解释的一样。体液应答优选地选自 IgA、IgD、IgG、IgM 和它们的亚组。

这种组合物也可以刺激那些有助于增强或放大免疫应答的细胞。这些包括但不限于 APC 如髓样或淋巴样两者来源的 DC, 和巨噬细胞。这些细胞的成熟、活化或增殖是预期之中的，这些细胞上和 T 细胞作用的共刺激配体或分子，如 CD40、CD80 和 CD86 也是如此。

本发明的免疫原性组合物可以用于治疗、预防或防治抗原引起的或与抗原接触相关的疾病或情况。例如，这种组合物可以用于特定的癌症的治疗或预防。

在本发明的另一部分提供了一种疫苗组合物，包括结合于微颗粒的至少一种抗原，其中所述微颗粒具有和病毒一样的大小范围。本发明的组合物尤其有用和有优点的是它是一种有效的单剂量疫苗，但是也可以用于多剂量方案。

因此，在一个实施方案中，本发明提供了一种单剂量的疫苗组合物，包括结合于微颗粒的至少一种抗原，其中所述微颗粒具有和病毒一样的大小范围。

“单剂量”是指在一次给予该组合物或疫苗后，体液和/或细胞免疫应答被刺激或增强到最大水平（“最大”是指这种水平不能被重复接种进一步增强），或提供给这种组合物的受者以保护。施用可以通过任何合适的方式，如通过经肌肉、经腹腔、经静脉注射、口服、吸入、或通过黏膜表面或位置施用。

优选的，抗原结合于微颗粒的表面。微颗粒的大小直径在约 0.03 和 0.5 μ m 之间，优选的在约 0.03 到 0.15 μ m，更优选的在约 0.03 到 0.1 μ m，甚至更优选的约 0.03 到 0.05 μ m，甚至更优选的约在 0.03 到 0.049 μ m。仍更优选的 0.03 到 0.04 μ m 或 0.04 到 0.049 μ m。微颗粒最优选的由聚苯乙烯、PLG、玻璃、磷酸钙或金构成。在优选的实施方案中，本发明应用的每种抗原都结合于固定大小的微颗粒上。

在另一个实施方案，本发明提供了一种单剂量疫苗组合物，它能增强体液和细胞免疫应答，组合物包括结合于微颗粒的至少一种抗原，其中所述微颗粒具有和病毒一样的大小范围。

细胞应答优选的选自 T_H 细胞、CTL 和 B 细胞的刺激、成熟或增殖。体液应答是优选的选自 IgA、IgG、IgM 和它们的亚组。优选的，IgG、IgA 和/或 IgM 应答被刺激。

这种组合物也可以刺激那些有助于增强或扩增免疫应答的细胞。这些包括但不限于 APC 如髓样或淋巴样两者来源的 DC、和巨噬细胞。这些细胞的成熟、活化或增殖是预期之中的。

术语“包含”有着和上面提及的相同的含义。

术语微颗粒有着和上面提及的含义。优选的微颗粒适合于被动物的抗原呈递细胞所摄取。优选的微颗粒在 0.03 和 0.5 μ m 之间，优选的在 0.03 和 0.15 μ m 之间。更优选的微颗粒在约 0.03 和 0.10 μ m 之间，更优选的微颗粒在约 0.03 μ m 和约 0.05 μ m 之间。仍更优选的微颗粒在约 0.03 到 0.049 或 0.04 和 0.049 μ m。

术语“抗原”和“结合”有着上面提及的含义。可根据意欲进行预防接种的情况/疾病应用任何合适的抗原。

给予患者的本发明的疫苗组合物的量是非关键性的或非限制性的。疫苗组合物的有效量是能刺激对抗抗原成分的免疫应答，优选的在单剂量或给药后将引起强烈的细胞和体液应答。根据患者的免疫状态（依赖于患者是否是免疫抑制或免疫刺激），主治医师或兽医的判

断，是否该组合物被用作疫苗防治或治疗疾病状态，或作为防治肿瘤形成的疫苗，或是否疫苗被用做治疗已经存在的肿瘤，给予的组合物的量可以不同。例如，患者可以接受 1 μ g 到 10,000 μ g 的本发明的组合物，更优选的 50 μ g 到 5,000 μ g，仍更优选的 100 μ g 到 1,000 μ g 和甚至更优选的 100 μ g 到 500 μ g 的本发明的组合物。佐剂通常是不需要的，然而，佐剂可以用于接种。合适的佐剂包括明矾，和任何其他佐剂或在应用于人的疫苗工艺中已经熟知的佐剂。

本发明的疫苗可以通过注射施用，通过口服给药，或通过黏膜表面或位置给药。在一个实施方案中，疫苗通过基因枪方式施用。根据本发明如果应用亚铁微颗粒和金微颗粒是特别适合于通过基因枪施用。然而，其他类型的抗原微颗粒可以按此方式给药。例如，来源于疟疾基因库的抗原，根据 Smooker PM 等(《疫苗》18(22): 2522-2540 “表达基因库免疫保护小鼠对付毒性疟疾的挑战”) 描述的方法，DNA 或质粒已经显示是能被基因枪有效地施用。在此将其全文并入作为参考。接种可以通过单或多剂量施用或通过接触抗原一加强而进行。

在本发明的另一实施方案提供了一个在研究对象上引发免疫应答的方法，上述方法包括给予研究对象施用免疫有效量的包含至少一种结合于微颗粒的抗原的组合物，其中所述微颗粒具有和病毒一样的大小范围。

研究对象可以是任何被要求去引发免疫应答的人或动物。这包括家养动物、家畜（如牛、羊、马、母牛、猪、山羊、美洲驼羊、家禽、鸵鸟、鸸鹋）和本土和外来动物，野生动物和凶猛动物。

术语“包含”有着和上面提及的相同的含义。

免疫有效量指的是能在研究对象中产生免疫应答的有效剂量，优选的在单次给予后产生免疫应答。免疫有效量的不同依赖于很多因素包括上面讨论的，和可能依赖于研究对象是否是人或动物，它们的年

龄，体重等。

术语“抗原”和“结合”有着和上面提及的相同的含义。

术语“免疫应答”指的是上面描述的细胞和体液应答，也是上面描述的辅助增强或扩增免疫应答的细胞的应答。特别的，免疫应答可以被树突状细胞的增殖和/或扩增来提供，尤其是 DEC205⁺, CD40⁺ 和 CD86⁺细胞，

术语微颗粒有着和上面提及的相同的含义。

优选的微颗粒在 0.03 和 0.5 μm 之间，更优选的在 0.03 和 0.1 μm 之间。仍更优选的在 0.03 和 0.1 μm 之间，甚至更优选的微颗粒在约 0.03 μm 和约 0.05 μm 之间。甚至更优选的在约 0.03 和 0.04 或 0.19 和 0.049 μm。仍更优选的抗原/微颗粒组合物特别适合于引发强烈的细胞和或体液免疫应答。

在一个优选的实施方案中，本发明提供了一个在研究对象上引发免疫应答的方法，上述方法包括给予研究对象一个免疫有效量的包含至少一种结合于微颗粒的抗原的组合物，其中所述微颗粒具有和病毒一样的大小范围，并且免疫应答包括刺激和/或扩增树突状细胞。优选的微颗粒是约 40 到 50nm，最优选的是 40 到 49nm 大小。

在另一个实施方案中，本发明提供了一个通过单剂量引发对抗原的保护性免疫应答的方法，上述方法包括施用，仅是单次给予研究对象，免疫有效量的、包括至少一种结合于微颗粒的抗原的组合物，其中所述微颗粒具有和病毒一样的大小范围，并且免疫应答包括刺激和/或扩增树突状细胞。优选的所述微颗粒是约 40 到 50nm，最优选的是 40 到 49nm 大小。

在另一部分本发明提供了一种为了引发免疫应答在体内将抗原转运入树突状细胞的方法，上述方法包括给予研究对象施用免疫有效量的、包括至少一种结合于微颗粒的抗原的组合物，其中所述微颗粒具有和病毒一样的大小范围，并且免疫应答包括刺激和/或扩增树突

状细胞。优选的微颗粒是约 40 到 50nm，最优先的是 40 到 49nm 大小。

本发明也扩展到一种制造免疫原性微颗粒/抗原组合物的方法，其包含将具有和病毒一样的大小范围的微颗粒与一种或多种抗原接触，以使得微颗粒和抗原相结合。本领域技术人员应熟知用于制造这种组合物的技术。

发明的详细阐述

本发明现在将参考下面的非限制性的实施例和图表来描述。

图 1：组 A-巨噬细胞与树突状细胞比较对不同大小微颗粒的不同摄取。每细胞 1000 个 0.02, 0.1 或 1 微米的荧光珠与培养的、来自 C57BL/B6 小鼠的腹膜渗出液的巨噬细胞或骨髓来源的树突状细胞一起孵育过夜，FACScan 检测荧光细胞百分比。三个相似实验之一被显示。用 10 倍的珠浓度，与珠或 Balb/c 来源的抗原呈递细胞作用 3 小时，得到在摄取不同大小的珠上的类似的差异。组 B-病毒大小的颗粒在体内淋巴结的细胞中被优先发现。左边在脚趾处用 50 微升的 0.1% 的不同大小（0.02、0.04、0.1、0.2、0.5、1 和 2 微米）的荧光珠溶液皮内接种于 C57BL/B6 小鼠，10 天后取走引流的腘淋巴结，用 FACScan 检测已摄取珠的细胞的百分比。数据用三次重复样本的平均荧光细胞百分比+/-标准误 (SE) 表示。0.04 和 0.1 微米大小的颗粒有着比其他任何大小的显著更高的摄取 ($p > 0.001$)。在仅用 0.1 或 1 微米珠的类似的实验中，0.1 微米珠在接种后 3, 6, 9 天收集的淋巴结中比 1 微米珠有着显著更高的摄取。组 C 和 D-病毒大小颗粒被淋巴结 NLDC145+ (也称为 DEC205+) (组 C) 和 F4/80+ (组 D) 细胞优先摄取。用 FACScan 分析已摄取荧光颗粒的淋巴结细胞的树突状细胞标记 NLDC145/DEC205 或巨噬细胞/单核细胞标记 F4/80 的共表达。数据显示归结于珠摄取而发出荧光的 NLDC145+或 F4/80+细胞

百分比。

图 2: 组 A-用结合于不同大小珠的 OVA 通过接种诱导产生干扰素 γ 的 CD8 和 CD4 T 细胞。用 100 μ g 结合于 0.02, 0.04, 0.1, 0.2, 0.5, 1 或 2 微米大小珠的 OVA 皮内接种 C57BL/B6 小鼠两次（间隔 10 天），用 IFN γ ELISPOT 检测追加接种 10 天后的脾 T 细胞活性。测定对 H-2K b 限制的 CD8 T 细胞抗原决定簇 SIINFEKL 或整个 OVA 的应答。对于检测对 OVA 的反应性，在检测前用磁珠（Dynabeads）先消除脾细胞中的 CD8 T 细胞再定量 OVA 反应性的 CD4 T 细胞。应用的 SIINFEKL 为 2.5 μ g/ml 和 OVA 为 25 μ g/ml。三个相似实验之一被显示。对于每种大小的珠每组中接种 2 只小鼠。ELISPOT 培养被重复两次，用每 100 万个被测定的细胞中的斑点形成单位（SFU）的平均值表示。标准差（SD）一直小于平均值的 20%。组 B-反应于 SIINFEKL 的通过 ELISPOT 检测的细胞毒活性的 T 细胞和分泌 γ 干扰素的 T 细胞之间的相关性。用不同大小的 OVA 珠接种 C57BL/B6 小鼠，用上面描述的 IFN γ ELISPOT 检测对 SIINFEKL 的活性。此外，通过有限稀释分析平行检测 SIINFEKL 特异的细胞毒活性的 T 细胞数目。带铬的 EL4 细胞本身或用 2.5 μ g/ml 的 SIINFEKL 预处理的 EL4 细胞被用做靶细胞。显示的数据说明了两个检测之间的强相关性 ($R^2=0.9254$)。两个相似实验之一被显示。组 C-用结合于不同大小的珠的 OVA 接种诱导抗体产生。从组 A 中描述的小鼠中收集血清，用 ELISA 检测稀释血清的 OVA 特异性 IgG 应答性。接受 0.02, 0.04, 0.1, 0.2, 0.5, 1 或 2 微米大小的 OVA 珠接种的个体小鼠被标记。两个相似实验之一被显示。

图 3: 抗原共价结合于珠对于诱导理想的 T 细胞应答是必要的。组 A-珠结合的 OVA 本身说明 I 型 MHC 限制性 T 细胞应答。用 OVA 共价结合的先前未透析的（对照）或用 PBS 通过 300Kd 分离膜透析的（透析）0.04 微米珠接种 C57BL/B6 小鼠，用 ELISPOT 检测一次

皮内接种 10 天后对生成干扰素 γ 的脾 SIIFEKL 特异性 CD8 T 细胞的诱导。用在两次重复实验中 ELISPOT 检测的每组 4 只小鼠的平均值 +/- 标准误表示。组 B- 合用珠和可溶性 OVA 不能诱导理想的 MHC I 型限制性的 T 细胞应答。用共价结合于 0.1 微米珠的 OVA (珠结合的 OVA) 或注射前与 OVA 混合的珠 (珠/OVA 混合) 接种 C57BL/B6 小鼠。用 ELISPOT 检测一次皮内接种 10 天后对生成干扰素 γ 的脾 SIIFEKL 特异性 CD8 T 细胞的诱导。两次重复实验中 ELISPOT 检测每组中两只小鼠的平均 T 细胞前体频率被显示。

图 4: 用病毒大小的珠-OVA 的单次接种能有效地诱导持久的高水平的 I 型 MHC 限制性的 T 细胞。组 A- 用珠-OVA (0.1 微米) 皮内接种 C57BL/B6 小鼠 1 次, 2 次或 3 次, 每次 14 天间隔, 用 ELISPOT 检测每组最后一次接种 10 天后它们的干扰素 γ 对 SIINEKL 的应答。每组中有 3 只小鼠被接种, 数据显示每个小鼠两次实验的平均值。两个相似实验之一被显示。组 B- 用珠-OVA (0.1 微米) 接种一次小鼠, 并在 12 天或 82 天后通过 ELISPOT 测定干扰素 γ 对 SIINFEKL 或 OVA 的应答。如图 2 显示测定对 OVA 的抗体水平保持到第 82 天。

图 5: 检测皮内接种后引流淋巴结内摄取珠的细胞的 CD40 的表达。来自纯种 C57BL/6 小鼠 (左) 或用荧光 0.04 μ m 荧光珠皮内接种于脚趾的小鼠的腘淋巴结在注射后 48 小时被分离, 用 PE 结合的对这些标记物特异的抗体的染色来分析 CD40 的表达。FL-1=FITC 阳性细胞 (珠阳性) 和 FL-2=PE 阳性细胞 (标记物阳性)。背景染色可以忽略 (小于 1%)。左边组表示来自非接种动物的腘淋巴结细胞, 右边组表示来自 VAP-OVA 接种动物的相同类型细胞。

图 6: 0.1 μ m OVA- 珠诱导成熟和不成熟小鼠 DC 的增殖。DC 培养来自从 C57BL/6 小鼠后腿的胫骨和股骨提取的骨髓细胞, 加有 GM-CSF 和 IL-4。培养 5 天后, 细胞按 1.25×10^6 细胞/1.25ml 被分成实验条件和与每细胞 1000 珠的结合有 OVA 的珠 (0.1 μ m) 处理。4

小时处理后，在培养物中加入 LPS 和 a 干扰素。细胞继续培养过夜，胸腺嘧啶核苷增殖分析设定在第二天，孵育过夜。每个数值代表三次的平均值+/-标准误（未处理的 DC 和实验组之间的 $*p < 0.00001$ ，非配对 t 检验）。

图 7: 在脚趾处注射有 $50 \mu 10.04$ 或 $1 \mu m$ 荧光珠-OVA 的 C57BL/6 小鼠体内摄取 $0.04 \mu m$ 和 $1 \mu m$ 颗粒的 APC 表型特征的比较。48 小时后分析引流的腘淋巴结的珠阳性细胞的活性与抗原呈递细胞系的细胞标记物的共染色。用 3-14 只小鼠/标记物的平均值+/-标准差表示。 0.04 和 $1 \mu m$ 荧光珠阳性细胞有着显著不同的 DEC205、F4/80、CD40、CD80 和 CD86 ($p < 0.05$) 的表达。

图 8A: DC 摄取病毒大小的颗粒的机制。骨髓来源培养的 DC 与 0 (黑色)、5 (白色)、 $10 \mu M$ (灰色) 的十四酸佛波酯乙酸盐(PMA); 0 (黑色)、1 (白色)、 $3mM$ (灰色) 的阿米洛利 (amiloride, AML) 或 0(黑色)、 0.25 (白色)或 $0.5 \mu g/ml$ (灰色)的松胞菌素 D(cytocalasin D, CCD) 孵育 30 分钟，然后加入 $0.04 \mu m$ 的 OVA 荧光颗粒继续 3 小时。选择性抑制内凹、网格蛋白包被的小凹形成或吞噬已经在 $10 \mu M$ PMA、 $3mM$ 阿米洛利和 $0.5 \mu g/ml$ CCD 中被报道，相应的 14, 15。当同时使用时，PMA 恒定在 $10 \mu M$ ，而加入 AML 1 (白色) 或 $3 mM$ (灰色)。用 FACScan 检测荧光细胞数目。数据用三次培养的平均值+/-标准误表示。

图 8B: 确认摄取的机制。DC 在有或无 $1 \mu g/ml$ CDD、 $1 \mu g/ml$ 非律平 (FIL) 或 $40mM$ 氯化铵 (AC) 条件下孵育 30 分钟，加入 $0.04 \mu m$ 或 $1 \mu m$ 的荧光珠继续 3 小时。选择性抑制内凹或网格蛋白有被小凹形成在 $1 \mu g/ml$ 非律平和 $40mM$ 氯化铵中被报道，相应的 14-17, 29。用 FACScan 检测荧光细胞数目。数据用三次培养的平均值+/-标准误表示。

图 9: 可溶性 OVA 和 $1 \mu m$ OVA 珠不能诱导与 $0.05 \mu m$ OVA-珠

能相比较的保护。C57/B6 小鼠用结合于 $0.05 \mu m$ 或 $1 \mu m$ 珠的 OVA、可溶性 OVA 接种或不处理，然后如上比较。数据用每组 8 个动物在第 10 天时个体肿瘤大小来表示。两次相似实验之一被显示。 $0.05 \mu m$ OVA-珠组和其他任何一组的肿瘤频率的差异是显著的：P=0.0001 对未处理组；P=0.0007 对可溶性组和 P=0.0035 对 $1 \mu m$ OVA-珠组。

图 10：病毒大小的颗粒不能和早期内体共存（左侧）。骨髓来源的 DC 和 0.1 微米珠-OVA（500 珠/细胞）孵育过夜，轻轻洗涤以洗去游离珠，涂在玻璃载片上用于共聚焦显微镜。细胞然后用多聚甲醛固定，用 triton 增加通透性，用生物素结合的早期内体标记物 Rab4 的单克隆抗体染色，再加入抗生蛋白链霉素-Alexa。在未结合的 0.04 和 0.1 微米的珠中观察到了相似的结果，显示了三个实验之一。用 DC 和珠孵育 30 分钟或 3 小时，0.1 微米珠同样不能和 Rab4 染色共存（右侧）。将 0.1 微米的珠-OVA 皮内注射在小鼠的后脚趾，48 小时后切除引流的腘淋巴结如上用于共聚焦分析。Rab4 标记物和 OVA 结合或未结合的 0.1 微米或 0.04 微米珠没有发现有共存。显示了三个实验之一。相反的，在用 1 微米大小的荧光珠接种的阳性对照小鼠中确定有共存。

图 11：保护性对抗肿瘤。组 A 用 OVA-VSSP（接种）单次皮内接种或未处理（纯种）的 C57/B6 小鼠 30 天后用 5×10^6 EG7（肿瘤细胞）挑战。用测径器测定肿瘤大小。显示了每组 10 只动物个体的肿瘤生长曲线。组 B 肿瘤如上诱导，在第 8 天的肿瘤生长（第 0 天接种），6 只动物未处理（纯种）和 6 只用 OVA-VSSP 皮内接种（接种）显示了接种后 3-13 天个体的生长曲线。

图 12：VSSP 接种后小鼠经受致命疟疾挑战的生存率。用 $100 \mu g$ VSSP-OVA、VSSP-裂解物或裂解物本身皮内接种 C57/B6 小鼠，再将之用 500,000 致命性约氏疟原虫 17XL 感染的 C57/B6 红细胞挑战。每天监测生存率。每组感染 5 只动物，六个代表性实验之一被显示。

在相似实验中，纯种小鼠在 2 周后有 40% 生存率 (8/20)。将约氏疟原虫 17XL 感染的红细胞反复冻融得到裂解物，超速离心，用标准方法结合到 VSP 上。

图 13：按上面对抗原 OVA 描述的将抗原 nm23 被结合到 0.05 μ m 珠 (VSP)，100 μ g/小鼠皮内注射到小鼠，10 天后用 ELISPOT 检测接种动物脾中干扰素 γ 应答性。应答于 nm23 的前体细胞频率的数据用每 100 万脾细胞的斑点形成单位来表示，平均值的标准误。三只小鼠 (m1-m3) 的个体应答被显示。

图 14：每方案中肿瘤抗原 nm23 或 OVA 被结合到 VSP，100 μ g/小鼠皮内注射。10 天后用 ELISPOT 检测白介素 4 分泌细胞的诱导。数据用每种免疫原接种的三只独立小鼠的斑点形成单位/百万细胞+/- 标准误表示。

图 15A：用结合有 OVA 的 0.05 μ m 珠 (VSP-OVA) 单次皮内接种小鼠血浆对 OVA 的抗体反应性，90 天后用 ELISA (B 组) 检测与未接种对照 (A 组) 的比较。

图 15B：用 ELISA 检测来自图 15A 中小鼠的相同血浆中的 OVA 特异 IgE 抗体，在两个纯种小鼠 (A2 和 A3) 和三个 VSP-OVA 小鼠 (B2, 3 和 5)。

图 16：组 A 单次接种诱导持久的抗体应答。C57/B6 小鼠用 OVA 结合的 0.04 μ m 珠单次接种，在不同的时间点收集血浆。显示了 OVA 特异的 IgG 的 ELISA 里，每组 4 个动物在 405nm 的平均光密度+/- 平均差。未经免疫的血浆作为阴性对照。两次相似实验之一被显示。相似的 ELISA 结果在总 Ig 中得到，没有 IgM 或 IgA 被检测到 (未显示)。OVA 单独不能诱导 PBS 接种的动物的 IgG 应答，在完全 Freund 佐剂 (CFA) 中的 OVA 诱导的 IgG 应答比单剂量 0.05 μ m 珠-OVA 对数级更高 (未显示)。组 B 用 0.04 μ m 珠-OVA 单次接种对持久的高水平的生成干扰素 γ 的 T 细胞的诱导。用结合于 0.04 μ m 珠的 OVA

(黑色或格子柱), PBS 中的可溶性 OVA (白色柱) 或用混合于 0.04 μ m 珠的 OVA (灰色柱) 皮内接种 C57/B6 小鼠。用 IFN γ ELISPOT 检测 10 天后 (黑、白和灰色柱) 或 12 月后 (格子柱) 的 SIINFEKL 活性脾 T 细胞的前体细胞频率。每组中有四只小鼠被测定, 两次相似实验之一被显示。每组的每 100 万细胞的斑点形成单位 (SFU) 的平均值+/-标准差被显示。在相似实验中, 用降低 10 倍的抗原 (10 μ g VSP-OVA) 单次接种诱导出每 100 万的 102+/-56SIINFEKL 特异性脾细胞 ($n=4$)。单次接种的 10 天后在标准的铬释放检测中也观察到了细胞毒 T 细胞应答 (对于 3/3 动物大于 50% 特异性裂解在 E: T=20:1, 没有显示)。

图 17: 初始/追加接种 C57/B6 动物分成未处理组或最初用 100 μ g 来自 MUC1 的肽 cp13-32, 其在完全 Freunds 佐剂 (cp13) 中结合到 700 μ g 的 KLH, 或用结合到重组 MUC1-GST 融合蛋白 (MFP) 的甘露聚糖, 或用 0.1 μ m 结合到 MUC1-GST 融合蛋白的 VSP(VSP), 进行皮内注射。10 天后动物被用 100 万有传染性的表达 MUC1 蛋白的痘病毒再次加强接种, 10 天后用 IFN γ ELISPOT 检测对 Cp13-32 抗原簇的反应性。数据用每组 2-3 动物平均的每 100 万脾细胞中产生 IFN- γ 细胞的平均数目+/-平均差来表示。

图 18: 比较聚苯乙烯和玻璃的 0.05 μ mVSP-OVA 颗粒。聚苯乙烯 0.05 μ m 珠如上所述被结合到 OVA (PS) 并与以同样方式结合到玻璃珠的 OVA (G1) 作比较。另外, 一种不同的化学操作比较于玻璃珠。简言之, 玻璃珠被称量, 悬浮在 PBS 中形成 2.5% 固体, 洗涤 2 遍。在微量离心机中离心 5 分钟去除 PBS。珠被重悬在 8% 戊二醛的 pH 值 7.4 的 PBS 溶液中, 在室温下轻轻混合过夜。珠用 PBS 再洗涤 3 遍, 重悬在 PBS 中。加入每毫升 500ug 的蛋白, 轻轻混合 5 小时。珠被沉淀, 将沉淀物重悬在 0.5M 的氨基乙醇中混合 30 分钟而终止反应。用 PBS 洗涤珠并用于接种 (G2)。将聚苯乙烯 (PS) 或

玻璃 (G1 或 G2) 的 VSP-OVA 按 $100 \mu\text{g}$ /小鼠的量皮内接种, 10 天后 ELISPOT 定量化来源于脾的 SIINFEKL 特异性分泌干扰素 γ T 细胞。数据用每组三只动物的个体平均值+/-标准差表示。

图 19: 珠结合形式和免疫原性。50mM MES 缓冲液 (pH 6.0) 中的 2mg/ml 卵白蛋白与聚苯乙烯羟基修饰的 $0.05 \mu\text{m}$ 的珠(2%固体)混合 15 分钟。在每份制备物中加入 1-乙基-3- (3-二甲基胺丙基) - 碳二亚胺到 4mg/ml (pH 6.5), 在室温下孵育 2 小时。标准 (甘氨酸) 用 7mg/ml 甘氨酸或 $20 \mu\text{l } 1\text{M}$ pH 7.4 的氨基乙醇 (胺), 或 $20 \mu\text{l } 1\text{M}$ pH 8.0 的胺乙醛二甲基乙缩醛 (醛), 或 $20 \mu\text{l } 1\text{M}$ pH 7.4 的乙二胺 (醇) 泼火。制备物在室温下孵育近 16 小时。所有的制备物在 4°C 下 PBS 中透析过夜。醛的制备物进一步用 $20 \mu\text{l } 1\text{M}$ HCL 泼火并孵育 4 小时, 在 4°C 下 PBS 中透析过夜。用 $100 \mu\text{g}$ 每种 VSSP-OVA 颗粒皮内接种 2-3 只 C57/B6 小鼠, 用干扰素 γ ELISPOT 检测脾中针对 CD8 T 细胞抗原决定簇 SIINFEKL 的免疫原性。结果用每只动物中每 100 万脾细胞中斑点形成单位的平均值+/-标准差来表示。

实施例 1: 使用的材料和方法

小鼠和接种: 6-8 周大小的 C57BL/6 和 BALB/c 小鼠都购自 Walter 和 Eliza Hall。小鼠以 100ul 的抗原结合珠皮内 (ID) 接种在后脚趾。

试剂: 所有试剂包括抗原卵白蛋白 (OVA, III 级) 和 1-乙基-3- (3-二甲基胺丙基) 碳二亚胺 (EDAC), 除非另外说明都购自 Sigma 公司。用于 FACScan 和共聚焦研究的单克隆抗体来自在蛋白 G 柱 (Pharmacia) 上自杂交瘤系自制 (in house) 纯化或购自 Pharmigen。FITC 结合的和羧化的 $0.02\text{-}2 \mu\text{m}$ 荧光球都购自 Molecular Probes, 非荧光的羧化微球购自 Polysciences。使用了以下标记物的抗体: MHC

II、 MHC I、 CD11c、 CD11b、 F4/80、 NLD-145、 CD8 alpha、 CD40、 CD80 和 CD86。共聚焦研究中使用的抗 Rab4 单克隆抗体是 Dr. Russel (Peter McCallum Research Institute)的惠赠品。

抗原呈递细胞: 树突状细胞制备于骨髓单核细胞按以前发表的方法稍加改动[5]。简要的，通过用培养基将细胞从后肢的胫骨和长骨的骨腔中冲洗出来，收集后接着裂解红细胞。细胞按 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 种植在 RPMI(CSL、 AUST)中，其中含有 10%热灭活的胎牛血清 (FCS)， 4mM L-谷酰胺、 100 U/ml 青霉素、 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 硫酸链霉素、 100 μM 疏基乙醇 、 1000 U/ml GM-CSF 和 0.2 ng/ml 的白细胞介素-4。在直径 100mm 的 petri-dishes 中的 10ml 培养基在潮湿的 CO₂ 孵箱中 37 °C下生长 5-6 天。在腹膜内注射硫胶质 3 天后从小鼠的腹膜腔内获得巨噬细胞，如所述方法培养 3 天来富集粘附细胞组分。

珠-抗体结合按生产商说明进行。简要的，OVA 在 0.05M MES 缓冲液 pH6.0 中稀释为 2.0mg/ml，和 2%固体/体积的珠按体积比 1: 1 混合。轻轻摇动混合液 15 分钟，然后加入 4mg/ml EDTA。用稀释的 NaOH 将混合液 pH 值调整为 6.5。轻轻摇动混合液 2 到 3 小时。加入甘氨酸使得其终浓度为 100mM 以终止反应。混合 30 分钟后，制备物在冷 PBS 中透析过夜。制备物可以马上使用或与 0.01%叠氮化物储存在 4°C备用。

细胞毒检测: 按[3]描述的方法进行。简要的，用于细胞毒检测的效应细胞为脾细胞，在 2ml 培养皿按 $2.5 \times 10^6/\text{ml}$ 在 37°C、潮湿的 CO₂ 孵箱，和含 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 肽抗原的 RPMI(CSL、 AUST)培养基中培养 7 天，其中含有 10%热灭活的胎牛血清 (FCS)， 4mM L-谷氨酰胺、 100 U/ml 青霉素、 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 硫酸链霉素和 100 μM β -疏基乙醇。白介素 2 (10U/ml, 重组人白介素 2, Lymphocult HT、 Biotest、 UK) 在第三天加入。靶细胞是 ⁵¹Cr 标记的 EL4 细胞，单独 (背景) 或在 37°C 下和 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ SIINFEKL 肽预处理 1 小时，或 EG7，一种卵白蛋白转

化的 EL4 细胞株。除非另外说明，检测在效应细胞：靶细胞比为 20:1 下重复 2 次。在四次重复实验中对所有靶细胞都设定了自发裂解(仅有培养基) 和最大裂解 (有 5% triton)。4 小时后收集上清。裂解%计算为 $100 \times (\text{实验释放}-\text{自发释放}) / (\text{最大释放}-\text{自发释放})$ 。特异裂解% (SL%) 为肽裂解%-无肽裂解%。

细胞毒 T 细胞前体 (CTLp) 检测: CTLp 检测按以前描述的[7]进行。对于至少 6 个效应细胞数目 (1×10^3 - 1.28×10^5)，要至少 32 次重复以得到 CTLp 频率。 5×10^5 丝裂霉素 C 处理过的同源脾细胞被培养在 U 底的微量滴定盘上的含有 10% 胎牛血清、 $5 \mu M$ SIINFEKL 或 OVA 和 10 U/ml 重组人白介素 2 的 DMEM 中。7 天后，用以含有 10^4 ^{51}Cr 标记的 EL4 或 EG7 细胞为靶细胞的 $100 \mu l$ 靶细胞悬液取代 100ml 的培养基来检测每个微培养的细胞毒性。如果发现每个盘中 Cr 的释放在仅和刺激物共培养的 10^4 个效应细胞或仅和肽或仅和重组人白介素 2 的刺激细胞中的平均同位素释放值的 3 个标准误之上，那么认为存在细胞毒活性。在应答细胞数目之间存在着线性关系 ($0.987 \leq r^2 \leq 1$)，表现为线性曲线，阴性细胞频率为对数曲线。CTLp 频率用达到产生 37% 阴性孔的应答细胞剂量的倒数表示。CTLp 频率检测进行 3 次，每次频率差异不超过平均值的 20%。

ELISPOT IFN γ 检测: 按[3]描述的进行。简要的， $100 \mu l$ 的 $5 \times 10^6 / ml$ 新近分离的脾细胞和设定的刺激物在预包被抗小鼠 IFN γ 单克隆抗体 (R4) 的乙酸板 (MAHA Millipore) 上培养 18 小时 (EACC)。每个条件都设置复孔。应用的培养基为 RPMI1640 (CSL)，附加物同上描述。过夜培养后，细胞被洗涤，板和第二种生物素结合的抗小鼠 IFNγ 单克隆抗体 (XMG 21-生物素、Pharmigen、CA、USA) 孵育，之后结合 $1 \mu g/ml$ 的 extravidin 碱性磷酸酶 (A-AP) (Sigma)。用比色法 AP 检测试剂盒 ((Biorad、Hercules、CA、USA) 检测碱性磷酸酶活性斑点，利用解剖显微镜计数。数据用每百万细胞的斑点形

成单位表示。使用的 SIINFEKL 肽为 $2.5 \mu \text{g/ml}$ 。

统计分析: 在保护性研究中，每组受保护的小鼠数目的比较用 EpilInfo Version 5.0 的 STAT 程序的卡方检验。在免疫原性研究中，组间的 ELISPOT 和 Cr 释放应答的比较用 Microsof Excel Version 5.0a 中的 Student's t 检验。线性回归用于检测免疫原性和保护性之间的相关性用 SPSS for Windows 统计软件包，

树突状细胞和巨噬细胞摄取珠: 在显微镜玻片上的生长 3 天的巨噬细胞培养物和 5 天的树突状细胞培养物用不同大小的荧光微珠孵育 5 分钟到 24 小时。培养物被洗涤以去除游离的珠和准备用于 FACScan 或共聚焦分析。

体内摄取珠的细胞分析: 从珠接种的小鼠中从接种后 12 小时直到 12 天间隔不同时间收集其引流的淋巴结和脾。收集细胞，裂解红细胞后洗涤，准备用于 FACScan 或共聚焦分析。

细胞表面标记物染色和流式细胞分析: 对于表面染色， 5×10^5 细胞与 PE 标记的抗表面标记物 F4/80 和 NLD-145、CD 的单克隆抗体孵育。对于那些不能被直接标记的抗体，两步洗涤后，细胞和对第一种抗体特异的第二种 PE 标记的抗体孵育。在和第二种抗体孵育之前的封闭步骤中使用生产第二种抗体的物种的天然血清。两次洗涤后，细胞用 PBS/0.2% 多聚甲醛洗涤，用 FACScan 流式细胞仪 (Becton-Dickinson) 和 CellQuest 软件分析。设定光栅门以去除死细胞和非淋系细胞。来自珠接种的未经任何表面标记染色的细胞和来自天然小鼠经对表面标记的 PE 标记抗体染色的细胞用于确定 FITC 和 PE 发射谱之间重叠的校正。

吞噬 FITC 标记的珠的共聚焦显微镜检测: 使用 Olympus 镜头的共聚焦显微镜，带有 Krypton-Argon 激光光源，装备有双重的荧光和发射检测来确定是否不同大小的荧光珠被巨噬细胞或树突状细胞吞噬。将标本制成 0.5-1.0 微米尺寸的系列切片以确定吞噬作用和用

Optiscan 分析仪分析。细胞在 488nm 和 568nm 被激活相应荧光素和 Alexa594，相应的通过 530nm 和 610nm 区带滤过片来检测。所有的采集中，激光能保持在饱和水平以下，增益和补偿参数在单一实验中固定。

*ELISA 检测：*用 ELISA 测定反应于 OVA 的抗体。聚氯乙烯板用 OVA (10 $\mu\text{g/ml}$ 在 0.2 M NaHC03 缓冲液、 pH 9.6) 4°C 包埋过夜。板用 PBS/0.05% Tween20 洗涤 4 遍和 PBS 洗涤 4 遍，利用 2% 小牛血清白蛋白非特异性结合在室温下封闭 1 小时。如上洗涤后，加入小鼠血清的系列稀释液，室温下孵育 1 小时。非免疫小鼠的血清作为阴性对照。板被洗涤，用辣根过氧化物酶结合的羊抗小鼠 Ig (Selinus、AUS) 和显色底物 2,2'-连氮-双-(3-乙基苯并噻唑啉)磺酸(Amersham、UK)检测结合的抗体。用 EL 312e 微量反应板读取器记录在 405nm 的吸光度。

实施例 2：体内和体外抗原呈递细胞对 VSSP 的优先摄取。

大量利用来自巨噬细胞/单核细胞系的研究已经显示颗粒大小依赖性的吞噬作用，理想的摄取是 1 微米直径[10, 11]。在树突状细胞中也观察到了摄取，然而，颗粒大小的综合范围还没有被测定。发明者尤其感兴趣于是否病毒大小的蛋白包被的颗粒 (0.03-0.1 μm) 也能被树突状细胞或巨噬细胞有效地摄取。图 1a 显示硫胶质引发的腹膜渗出液的巨噬细胞内吞了 1 μm 和 0.1 μm 的荧光素标记的颗粒 (荧光素珠)。相反的，发现未成熟的骨髓来源的树突状细胞优先摄取 0.1 μm 大小的荧光素珠。共聚焦显微镜用于确认颗粒在细胞内 (未显示)。这体内数据提示病毒大小的实心颗粒 (VSSP) 在体内也能被抗原呈递细胞优先摄取。一组不同大小 (0.02、0.04、0.1、0.2、0.5、1 和 2 μm) 的荧光素聚苯乙烯蛋白结合的颗粒被皮内注射到 C57/B6 小鼠的脚趾中。10 天后收集引流淋巴结的细胞用于 FACSscan 分析。

0.04-0.1 μ m 大小的颗粒被淋巴结细胞优先摄取(图 1b)。分析颗粒注射后的第 1、3、6 和 10 天的淋巴结细胞和未结合的颗粒取得了相同的结果。VSSP 被同时表达巨噬细胞和树突状细胞表面标记物的抗原呈递细胞有效摄取(图 1b)。骨髓来源的树突状细胞体外也摄取 VSSP。和预想的一样，这些细胞主要是髓系表型的[12]。

实施例 3：VSSP 诱导高的细胞毒和 IFN γ 分泌 T 细胞的前体频率和抗体

体内树突状细胞对 VSSP 的有效摄取提示它们可以用作靶抗原的转运和新疫苗的潜能。用卵白蛋白(OVA)包被的 0.02、0.04、0.1、0.2、0.5、1 或 2 μ m 颗粒接种 C57/B6 小鼠，15 天后追加接种，10 天后收集血清或脾细胞。图 2a 显示用 0.04 μ m 大小的颗粒获得了对 MHC I 型限制性 SIINFEKL 抗原决定簇诱导的 IFN γ 分泌 CD8⁺ T 细胞的满意诱导。应答于 OVA 的 CD4 T 细胞发现有若干于 OVA 结合的范围在 0.04-1 微米的颗粒相似的前体频率。VSSP 诱导的对 SIINFEKL 的细胞毒 T 细胞和 IFN γ 分泌 T 细胞的前体频率相关($R^2=0.92$) (图 2b)。OVA 特异 IgG 在用 0.04 μ m 接种的小鼠具有最高的前体频率，其次为用 1 μ m 颗粒接种的小鼠中。用无荧光素的 VSSP 也发现了相似的结果。因此，与许多免疫原和佐剂优先地启动细胞或体液应答不同，VSSP 对两者都能诱导出高水平的应答。

图 2 显示的结果是基于注射相同总量的结合抗原，但未消除残留的可溶性抗原。图 3a 显示在可溶性抗原被透析或超速离心去除后，用 0.04 微米 VSSP 获得了相似的 T 细胞应答。因此，可溶性抗原对于观察到的 T 细胞应答没有显著的作用。这也被结合和未结合 OVA 和 VSSP 混合物的比较所支持。图 3b 显示只有共价结合的 VSSP 能诱导高水平的 SIINFEKL 特异性 T 细胞。因此，共价结合到 VSSP 对于在体内将 OVA 导入 I 型呈递途径和诱导 I 型限制性的 T 细胞是必

要的。能推测更大量的结合蛋白在更小的颗粒比在更大的颗粒能产生更高的 VSSP 免疫原性。然而，不是这样，因为：1) $0.04 \mu m$ 为免疫原性高峰，而 $0.02 \mu m$ 大小的珠诱导出的反应性极低（图 2）；2) $0.04\text{-}0.1$ 微米的 VSSP 比 $1 \mu m$ 颗粒一直具有更高的免疫原性，而不论结合抗原的水平；3) 将 $1 \mu m$ 颗粒的接种浓度增加到所用 VSSP 的浓度的 100 倍（到 $1mg/\text{小鼠}$ ）也不能将免疫原性增强到在结合于 VSSP 的一定浓度范围的抗原上看到的水平；4) 用等效价量的不同大小的珠上的结合蛋白，或用相同数目的不同大小的珠接种，一直显示 VSSP 比浓度范围广泛($0.5\text{-}1000 \mu g$ 总 OVA、 $0.5\text{-}50 \mu g$ 结合的 OVA and $10^3\text{-}10^8$ 珠/动物)的更大的颗粒有着更高的免疫原性。

实施例 4：颗粒摄取和加工的新途径

已经显示：通过 II 型 MHC 加工途径消化形成的肽能被返流并最终结合到细胞表面空置的 I 型 MHC 分子[1, 10]。I 型呈递的不同机制是独立于 TAP（抗原加工相关转运子）介导的进入内质网（ER）的转运。乙型肝炎病毒表面蛋白 VLP 在巨噬细胞内通过非 TAP 依赖性机制被加工成 I 型呈递[2]。发明者用 OVA-结合的 VSSP 接种敲除 TAP 的 C57/B6 小鼠，在 TAP 敲除动物中没有检测到对 SIINFEKL 或 OVA 的上述背景水平的 T 细胞应答，这提示对 VSSP 的 I 型呈递相反的是 TAP 依赖的。对于吸收进 $1 \mu m$ 颗粒的蛋白，外源性抗原的 I 型呈递的 TAP 依赖性机制已经被描述成基于内饮囊泡的“渗漏”和抗原偶然地释放到细胞浆内[1, 10]。被吞噬作用摄取的如此大的颗粒的加工包括了与表达 Rab4 衔接子蛋白的溶酶体早期结合的步骤[13]。本发明者用共聚焦显微镜确定是否 VSSP 将按这个途径进行。图 4 显示 Rab4 和含 VSSP 荧光珠的囊泡在骨髓来源的培养的树突状细胞和皮内注射 VSSP 24 小时后体内的淋巴结细胞中都没有共存。因此，VSSP 可能利用一种不同于 VLP 和更大颗粒的加工途径，它是 Rab4

非依赖性和 TAP 依赖性的。机制在实施例 7 中进一步研究。

实施例 5：VSSP 在体内和体外诱导抗原呈递细胞扩增。

C57/B6 或不处理或用荧光素 0.1 μm 荧光珠在脚趾皮内接种。在注射 48 小时后切除腘淋巴结 (LN)，通过用 PE 结合的 CD40 特异性抗体染色分析该标记物的表达。

结果 (图 5) 显示：0.04, 0.05, 0.1 μm 聚苯乙烯珠单独或结合到 OVA 能增加皮内接种后来自引流淋巴结的细胞总数达 4 倍。此外，它们能引起 NLDC145+ (树突状细胞标记物) 细胞的比例增加 1.5 倍，但对 F4/80+ (单核细胞/巨噬细胞标记物) 细胞则不能。它们也增加表达活性分子 CD40 和 CD86 的淋巴结细胞的比例大于 1.5 倍。图 5 显示用 FACScan 观察到接种后增加 CD40+ 细胞的例子 (33% 到 66%)。也显示这些细胞中的许多已经摄取 0.04 μm 珠，在这里我们使用的绿色荧光素核心的 0.04 μm 珠。

0.04, 0.05 和 0.1 μm 的聚苯乙烯珠本身或结合到 OVA 能诱导纯化于小鼠骨髓的树突状细胞在体外的扩增。不成熟的，而非成熟 (LPS 和 alpha 肿瘤坏死因子活化后) 的树突状细胞对于 VSSP 的激活效应是敏感的 (图 6)。

这些数据综合提示，0.04-0.1 μm 大小的颗粒 (VSSP) 有着不可质疑的、前所未知的刺激抗原呈递细胞的能力，包括树突状细胞，和表达象 CD40 和 CD86 的有效共刺激分子的特殊细胞的增殖和扩增。另外，这提示 VSSP 对于免疫应答可能有佐剂效应的机制，甚至是对于那些非化学性地与其结合的抗原所引起的应答。

实施例 6：注射后快速摄取 VSSP 的细胞的扩展表型

为了进一步评价哪类细胞在皮内脚趾注射后快速地摄取 VSSP (因此可能有关于随后的免疫激活)，切除了引流的腘引流淋巴结。

FACScan 分析摄取了带有荧光素核心的 $0.04 \mu m$ VSSP-OVA 的细胞表型，并与相同的但为 $1 \mu m$ 大小的颗粒比较。图 7 显示表达每种表型标记物的 $0.04 \mu m$ 珠阳性或 $1 \mu m$ 珠阳性细胞比例。摄取 $0.04 \mu m$ 珠的细胞最大多数是 NLDC145+, CD40+和 CD86+。另外，更多的 CD11c+、CD4+和 CD8+细胞是 $0.04 \mu m$ 珠阳性多于 $1 \mu m$ 珠阳性。这种已经摄取了 $0.04 \mu m$ 珠的细胞的高度激活的 DC 表型可能进一步解释我们观察到的免疫应答是如此有效的原因，尤其是 CD8 T 细胞应答。

实施例 7：微颗粒的摄取和加工

为了明确树突状细胞摄取 $0.04 \mu m$ 珠-OVA 的机制，将骨髓来源的 DC 和吞噬作用的抑制物（松胞菌素 D, CCD），网格蛋白小凹的抑制物（阿米洛利，AML）或内凹介导的内饮作用的抑制物（十四酸佛波酯乙酸盐，PMA）一起孵育。将 DC 分别和设定浓度的 PMA、AML、CDD、非律平 (FIL) 或氯化铵(AM) (都来自 Sigma)在三个复孔中培养 30 分钟。加入 OVA-荧光素 $0.04 \mu m$ 珠继续 3 小时，用 FACScan 检测摄取。

PMA 和 AML 都减少了 DC 对 $0.04 \mu m$ 珠-OVA 的摄取，但是 CCD 不能造成任何的抑制（图 8a）。PMA 和 AML 的抑制具有相加作用（图 8a）。这提示网格蛋白小凹和内凹都参与了 VSSP 的摄取。

阿米洛利作用是抑制对于受体介导的内饮所必要的 Na+-H+交换 [14]。本发明者另外试验了通过干扰细胞浆酸化作用而抑制网格蛋白小凹装配的氯化铵，氯化铵抑制了 $0.04 \mu m$ 而不是 $1 \mu m$ 大小的珠的摄取（图 8b），确认了网格蛋白小凹在 VSSP 摄取上的作用。内凹也被提示是介导了 DC 摄取病毒颗粒的新的机制[15]。本发明者用 PMA 的结果提示内凹参与了 DC 摄取 VSSP（图 8a）。为了确认这点，本发明者使用了另一种内凹的抑制物，非律平。非律平通过降解胆固醇起作用，PMA 影响了磷酸化作用而调节内凹内饮作用[14, 15, 16]

17]。与 PMA 类似，非律平阻断了 0.04 μ m 而不是 1 μ m 珠的摄取，确认了本发明者的假设（图 8b）。

内凹和网格蛋白小凹能将分子转送到内体和溶酶体的区域[14, 16]。或者，内凹可以将抗原直接转运到细胞浆[17]导致细胞浆的加工和 ATP 依赖的转运进内质网以用于 I 型 MHC 的呈递。

这些结果，和实施例 4 中显示的结果一起，说明了根据本发明所表现的一种新的加工抗原的途径。本发明的免疫原性组合物表现为被抗原呈递细胞通过内凹和或网格蛋白小凹摄取，之后抗原被 Rab4 非依赖性和 TAP 依赖性的途径加工用于 I 型 MHC 的呈递。本发明关于内凹诱导 TAP 依赖性的抗原呈递途径和 CD8 细胞的能力是新颖的，以前没有报道过。

实施例 8 保护效应的比较

将 50nm（也就是 0.05 μ m）（VSSP）的 OVA 结合颗粒与 OVA 单独或 1000nm（也就是 1 μ m）OVA 结合颗粒进行对照，以直接比较其在小鼠保护性对抗随后皮下注射 100,000 表达 OVA 的肿瘤细胞（EL4）挑战的能力。所有的小鼠用 100 μ g 上述的一种（或没有=未处理）皮内接种一次，然后在 30 天后用肿瘤挑战。图 9a 显示 VSSP-OVA 完全阻止了表达 OVA 的肿瘤的生长，OVA 单独或 1000nm 珠的保护效应不显著。

实施例 9：单次 VSSP 免疫诱导了高水平的免疫力和对保护性对抗肿瘤的挑战

用 OVA 结合的 VSSP 皮内接种诱导了产生 IFN γ 干扰素的细胞毒性 SIINFEKL 特异性 T 细胞（图 10a 和 1a 和 b）。在接种 82 天后 T 细胞能保持高的前体频率（图 10d）。抗体应答同样被保持着（图 16）。单次 VSSP 接种获得的 CD8 T 细胞前体频率比单次甚至多次 VLP 颗

粒接种观察到的更高，唯与高效异源的初始/追加方案相当[1, 2, 3, 19, 20]。高的产生 IFN γ 和细胞毒 T 细胞前体频率与保护性对抗许多细胞内病原体和肿瘤相关[21, 22, 23]。本发明者用单一皮内剂量的 OVA 结合的 VSSP 接种 C57/B6 小鼠，然后用 EG7 肿瘤细胞株挑战它们，EG7 细胞株表达细胞浆内的 OVA 并是细胞毒 SIINFEKL 特异性 T 细胞的体外靶细胞。结果显示 VSSP 接种的小鼠完全保护性对抗了肿瘤的挑战，而所有的未处理对照组都出现了肿瘤。另外，随着抗原结合 VSSP 的单次注射，抗体水平也增加，和在图 2c 中观察到的相似。

关于 VSSP 疫苗进一步的工作。

下面描述的实施例 10 到 13 正式示范了 VSSP 能和不同的抗原一起使用并诱导广泛的免疫力，包括生成干扰素和白介素 4 的 T 细胞。单次剂量后被诱导的是高水平的 IgG，而不是有潜在的过敏性的 IgE。

VSSP 对于治疗的有效性还表现在另外两个模式上。1) 100% 清除存在的肿瘤（见实施例 10）和 2) 在单次疫苗注射后对致命性疟疾的保护性对抗（见实施例 11）。这进一步确定了 VSSP 做为一种具有不同寻常的效果和可变通的免疫接种方案，可以发展为对抗不同疾病的单剂量疫苗。此外，基于这些发现，本发明者相信 VSSP 可以被用于肿瘤的治疗和预防。

实施例 10：清除已存在的肿瘤

本发明者已经观察到用珠-OVA 单次接种完全保护性对抗了随后表达 OVA 的肿瘤的挑战。

C57/B6 小鼠用 100 μ g 珠 (0.05 μ m) -OVA (皮内注射) 单次接种或不处理。30 天后，用 5×10^6 EG7 肿瘤细胞株挑战小鼠。在接种的 3-13 天后用测径器测定肿瘤大小。为回顾性研究，用 EG7 细胞种植

小鼠，8天后分为相同肿瘤大小分布的组。一组不处理，另一组3天后（也就是在注射肿瘤细胞株11天后）用珠-OVA接种。

本发明者现在表明对存在肿瘤负荷的小鼠进行单次接种能治愈已经存在的肿瘤。在单次注射的2周后，肿瘤已被从接种的小鼠上清除。这个治疗能力对于任何肿瘤疫苗都是极其不寻常的，这使得这个疫苗载体对于发展治疗性疫苗是很有希望的（图11B）。

粘蛋白-1或Muc1是乳腺癌相关抗原。用VSSP-Muc1蛋白单次接种能抑制用表达乳腺癌抗原的肿瘤细胞株挑战的小鼠的肿瘤形成（见图11A）。

实施例11：保护性对抗疟疾

本发明者证明直径 $0.05\text{ }\mu\text{m}$ 的聚苯乙烯珠可以用做载体在小鼠中诱导对疟疾的保护性对抗。来自约氏疟原虫感染的红细胞的裂解物被结合到珠上，用于接种小鼠，然后用致死剂量的寄生虫挑战小鼠。

在50%寄生虫血症时收集感染了约氏疟原虫17XL的C57BL/6小鼠的血液。离心 800g 15分钟获得的红细胞被冻融3次和超声裂解。裂解物如上所述被结合到 $0.05\text{ }\mu\text{m}$ 颗粒上。珠-裂解物，珠-OVA或裂解物本身被皮内注射。在两周后用1,000,000个约氏疟原虫感染的红细胞腹腔内注射，挑战接种的或未处理的C57BL/6小鼠。

所有经上述处理的动物均在挑战中存活下来，而60%的仅用裂解物（没有珠结合）接种的动物不能控制感染而死亡（图12）。这是单剂量疫苗能用于实现对血液阶段疟疾的保护性对抗的第一个证明。单剂量疫苗对于在第三世界广泛存在的疟疾和其他疾病是特别有吸引力的，因为它简化了疫苗的注射和分发，可以保证覆盖广泛的人群。

实施例12：细胞免疫

- 1) 直径 $0.05\text{ }\mu\text{m}$ 的聚苯乙烯珠结合了不同于OVA的抗原，如

肿瘤抗原 nm23，也能诱导强烈的细胞免疫，如对分泌干扰素 γ 的 T 细胞的高水平的诱导（图 13）。

2) 和诱导细胞免疫一样，珠-OVA 或珠-nm23 诱导了高水平的 IL4（图 14）。这个淋巴因子启动了抗体的生成，这可以解释为什么我们观察到了良好的抗体诱导以及细胞免疫（需要干扰素 γ）。

实施例 13：抗体免疫

1) 直径 $0.05 \mu m$ 的聚苯乙烯珠结合到 OVA 在单次皮内 (ID) 注射后诱导了高滴度的 IgG 抗体（图 15A）。

2) 除了高 IgG 水平，没有出现可测定的 IgE 水平。因此，这个疫苗形式上证明没有诱导潜在的有害的 IgE 应答（因为它们参与过敏）的危险。

实施例 14：通过不同途径施用并诱导 IgG 与 IgA 抗体

为了确定将疫苗施用于人的有用途径，如上面描述的皮内给药、小鼠被通过腹膜内、皮下、鼻内和直肠内给予 VSSP 结合的 OVA (100ug/小鼠)。在单次接种 30 天后测定每组中的 3-4 只小鼠。与皮内相似，ELISPOT 检测到了所有途径均诱导了对于 SIINFEKL 或 OVA 的分泌 γ 干扰素的 T 细胞 (1/50,000 到 1/2,000 脾细胞)。令人惊讶的是，与用皮内注射的最初观察到的诱导了高水平的 IgG 但是很少或没有 IgA 相反，这些途径给予的 VSSP-OVA 诱导了血清 IgA 应答，直肠内和鼻内途径没有诱导可检测的 IgG (滴度小于 1/100) (表 1)。因此，通过直肠内、腹膜内、鼻内和皮下途径，VSSP 能用于诱导对疾病的保护性免疫，其中 IgA 扮演着保护作用，如粘膜感染（如肺内，宫颈或肠道）。

表 1

途径	血清 IgG 滴度	血清 IgA 滴度
直肠内	<1/100、<1/100、<1/100	1/1280、1/640、1/1280
腹膜内	1/1640、1/100、1/400	>1/5120、>1/5120、>1/5120
鼻内	<1/100、<1/100、<1/100、<1/100、<1/100、<1/100	1/160、1/320、1/320、1/640
皮下	1/800、1/200、1/6560	>1/5120、>1/5120、>1/5120

在两次剂量后的不同寻常的高 IgG 应答：

用 VSSP-OVA (100 μg/小鼠, 14 天间隔) 接种两次, 引起了如 ELISA 所检测到的令人惊异的滴度超过 1/500, 000 的高水平血清 Ig 和 IgG 抗体生成。用乳腺癌抗原 nm23 和疟疾抗原 MSP4/5 结合到 VSSP 接种后, 所得到的特异性 IgG 抗体的结果与此相似。

实施例 15：持久的免疫应答

VSSP-OVA 引起的应答出乎意料的长久。图 16 显示在单次皮内接种(100 μg/小鼠)1 年后仍存在 ELISA 可测定的强 OVA 特异性 IgG 抗体(组 A)和干扰素 γ ELISPOT 可测定的应答于 SIINFEKL 的 CD8 T 细胞(组 B)。组 B 还表明为了得到理想的免疫原性, 抗原必须是共价结合在实心颗粒上。

实施例 16：异源性初始/追加接种

在未用, 或用来自完全 Freund 佐剂的 MUC1 的肽 cp13-32 (cp13), 结合有 MUC1 的甘露聚糖 (重组 MUC1-GST 融合蛋白) (M-FP) 或

0.1 μ mVSSP-MUC1（重组 MUC1-GST 融合蛋白）（VSSP）初始接种的动物上追加接种牛痘-MUC1。图 17 显示比较于那些单独接受牛痘-MUC1 的动物（未处理/V 比较 VSSP/V），对于 MUC1 的肽 13-32 区段的应答在 VSSP-MUC1 初始，牛痘-MUC1 追加组中增强。因此 VSSP 抗原对于用于异源性初始-追加免疫方案是适合使用的。

实施例 17：VSSP 实心核心的材料构成

本发明者的假设是：0.04-0.05 μ m 大小的实心核心是 VSSP 免疫原性的首要决定因素，推测在这个大小范围内由除聚苯乙烯外的其他材料构成的颗粒也将是高度免疫原性的。因此，她比较了给小鼠单次皮内接种由聚苯乙烯（PS）或玻璃（G1 或 G2）构成的 0.05 μ m 的颗粒的免疫原性，所述颗粒用相同的化学操作（G1）结合到 OVA 或用戊二醛（G2）结合。图 18 表明聚苯乙烯和玻璃构成的 VSSP 都有相似的高的免疫原性，包括 ELISPOT 检测到的、对 SIINFEKL 产生干扰素 γ 的 T 细胞的高前体频率。因此，对于蛋白结合的 VSSP 的实心核心能用玻璃和聚苯乙烯提供，预测其他用于实心核心的材料也是有功能的，例如 PLG。

实施例 18：抗原和 VSSP 的结合

结果显示将抗原和 0.05 μ m 的颗粒混合使之比抗原本身具有更多的免疫原性，但是共价结合对于理想的免疫原性是必要的。因此用于将抗原结合到 VSSP 的化学操作理论上是免疫原性的决定因素。特别的，颗粒的整体电荷将促进与特异血清或其他内源蛋白的反应。这些反过来理论上能促进树突状细胞的摄取和引起高免疫原性。为了对此进行测定，小鼠用具有不同表面电荷的 50nm（也就是 0.05 μ m）的颗粒接种。OVA-VSSP 有整体负电荷归结于使用了羧化修饰的纳米颗粒和在 OVA 与甘氨酸结合后对活性羧酸基团的猝灭（甘氨酸，图

19）。通过与氨基乙醇猝灭反应，除结合后的 OVA 的净电荷以外的电荷能被中和（乙醇，图 19）。通过乙二胺的猝灭引进了阳性电荷（胺，图 19）。通过氨基乙醛二甲基乙缩醛（醛，图 19）的猝灭引入潜在有用的醛基团。所有对结合方案的三种修饰形成高免疫原性的颗粒，与甘氨酸和醛比较，胺和乙醇修饰是稍小的免疫原性。由于在颗粒中引入相反的电荷仍产生相同的免疫原性，因此不大可能由非特异性吸附血清蛋白产生免疫原性。另外，可以采用一些对于结合过程作出的选择性修饰和改变电荷，且不改变免疫原性。

讨论

考虑到上面的结果，本发明的组合物提供了一种进一步提高或改良用于不同的感染，癌或其他疾病的疫苗或接种策略的方法。

VSSP 的理想大小和大多数已知病毒相同（30-150nm）。使用 VSSP 具有生物学的重要意义是具有吸引力的设想。从上述观察，本发明者相信免疫系统可以被启动去完全应答于 VSSP 大小范围内的颗粒。在本发明之前，不知道或不了解免疫应答的刺激很大程度上依赖于那些在病毒范围内的免疫刺激物的大小，尤其当来自其他病原体如细菌，真菌的抗原决定簇是非常的大。的确，通过这途径的靶抗原不可思议地引发了广泛的（包括免疫系统的体液和细胞两方面）和强烈的应答（诱导快速持久的高效应 T 细胞前体频率），提示免疫系统可以被启动完全应答于病毒大小的颗粒。以往利用 VLP（也就是没有连接于颗粒的纯抗原）包括 HepB 表面蛋白或酵母菌逆转录蛋白（Ty）的研究也已经显示单次接种剂量诱导了广泛和持久的免疫，尽管应答是比用 VSSP 低 10-100 倍[1, 2, 3, 19, 20]。然而已经假设除了大小外的其他的特性，如其脂质或甘露聚糖成分，或膜结合蛋白形成了 VLP 诱导 I 型限制性 T 细胞应答的能力[1]。不希望被理论所限制，本发明者认为在体内通过 VSSP 将有效的靶抗原合并于抗原呈递细胞

如树突状细胞，之后通过 VSSP 上的蛋白裂解造成的抗原缓慢潜在的释放可能形成特别有力的免疫原。

在 OVA 模型中单次接种剂量保护性对抗了随后的肿瘤细胞的挑战的能力证实了利用 VSSP 做为新疫苗。本发明者也已经观察到对乳腺癌表达抗原，粘蛋白 1 (MUC1) 的广泛和强烈的免疫原性和保护。在它们的动物研究中利用的注射的皮内途径在人类中可以容易实现。VSSP 因此可以提供了一种特别具有吸引力并简单的人类疫苗发展的策略，尤其对那些体液和细胞免疫参与产生保护的疾病，如疟疾、癌和病毒疾病，特别的，AIDS 和肝炎[10, 12, 21, 25-28]。靶向于 I 型呈递途径的重组抗原也提供了诱导针对多种抗原决定簇的 T 细胞应答的可能性，因此将扩展这些疫苗在 MHC 多变的靶向人群中的使用。

目前，有效的 CTL 刺激物激活 DC 是通过离体处理 DC，但是这是昂贵的和相当困难的。本发明提供了一种在体内将抗原有效地传递给 DC 的不同方法，导致随后的高数目的抗原特异性 CD8T 细胞和免疫保护的诱导。在 0.04-0.05 μm 狹窄大小范围内的 VSSP 可诱导不可思議的高水平的 CD8 T 细胞的能力是抗原呈递细胞或有效亚群的有效摄取的结果，靶向于 I 型加工途径和/或直接的刺激 APC 功能。在淋巴结中发现比较于其他大小，VSSP 的摄取被增强了。这种增强归功于增加的颗粒阳性的 DEC205+ 细胞（一种 DC 的标记物）的频率。树突状细胞是一种强有力的抗原呈递细胞，且 CD60 与 CD80 的表达进一步确定可能有效的启动 CD8 T 细胞的亚群。这些标记物在高比例的 VSSP 阳性细胞被发现。因此，在体内在这个潜在的 DC 亚群摄取和选择性定位 VSSP 可以解释根据本发明的微颗粒的免疫原性。

本发明的 VSSP 的其他优点包括诱导免疫应答，包括通过多种途径注射后 IgA 的生成的能力，和它们对于初始/追加免疫策略的合适性。

进一步的研究将包括利用 VSSP 确定使得它们引发获得的独特免疫应答的生理机制。

需要理解的是，本领域技术人员在不脱离于本发明的核心概念下，可以获得这里描述的本发明的其他不同的实施方案。

参考文献：

1. Reimann J, Shirmbeck R. 加工能生成用于 MHCI 型限制性呈递的肽的外源性和内源性抗原的旁路途径。 Immunol. Rev. 1999 ; 172: 131-152.

2. Schirmbeck R, Melber K, Reimann J. 乙型肝炎病毒小表面抗原颗粒通过新的内体途径被加工为了主要组织相容性复合物 I 型限制性抗原决定簇的呈递。 Eur. J. Immunol. 1995; 25: 1063-1070.

3. Plebanski M, Gilbert SC, Schneider J, Hannan CM, Layton G, Blanchard T, Becker M, Smith G, Butcher G, Sinden RE, Hill AV. 通过用适合于人类使用的重组载体的单一 I 型限制性抗原决定簇初始和追加激活 T 细胞保护 berghei 疟原虫的感染。 Eur J Immunol 1998 ; 28: 4345-55.

4. P. Johansen, B. Gander, HP Merkle and D Sesardic, 微颗粒疫苗临床前期质量评价的不定性。 TIBTECH 2000,18: 203.

5. Lu L, McCaslin D, Starzl TE, Thomson AW. 骨髓来源的 DC 前体细胞(NLDC 145+、 MHC II +型、 B7-1 dim、 B7-2-)诱导了小鼠 T 淋巴细胞的异型抗原特异性的低应答性。 Transplantation 1995 ; 60: 1539-45.

6. Plebanski. 淋巴细胞制备和淋巴细胞中淋巴亚群的确定：1999年实践探讨；Edited by Rowland-Jones, SL and McMichael, AJ: 1-26.
7. Pietersz GA, Li W, Popovski V, Caruana J-A, Apostolopoulos V, McKenzie IFC. 利用甘露聚糖-MUC1 融合蛋白诱导细胞免疫的参数。Cancer Immunol Immunother 1998 ; 45: 321-326.
8. Fazekas de St. Groth S. 有限稀释检测的评价。J immunol Methods 1982; 49: R11.
9. Lefkovits I, Waldmann H. 免疫系统细胞的有限稀释分析。1. 免疫反应的克隆基础。immunol Today 1984 ; 5: 265.
10. York IA, Rock KL. 通过I型主要组织相容性复合物的抗原加工和呈递。Annu Rev Immunol 1996 ; 14: 369-96.
11. Falo LD, Jr., Kovacsics-Bankowski M, Thompson K, Rock KL. 体内进入吞噬系统的靶抗原诱导保护性的肿瘤免疫。Nat Med 1995; 1: 649-53.
12. Robinson SP, Saraya K, Reid CD. 树突状细胞体内和体外的发育部分。Leuk Lymphoma 1998 ; 29: 477-90.
13. Mosleh IM, Hubers LA, Steinlein P, Pasquali C, Gunther D, Meyer TF. 淋病奈瑟球菌孔蛋白介导了吞噬体的成熟。J. Biol. Chem. 1998; 273: 35332-35338.

14. Lamaze, Ch. & Schmid, S. L. 不依赖于网格蛋白的小凹吞噬途径的出现。Curr. Opin. Cell Biol. 7,573-80 (1995).
15. Werling, D. et al. 内凹参与于树突状细胞对呼吸道合胞病毒抗原的摄取。J. Leukoc Biol 66,50-8 (1999).
16. Schnitzer, J. E., Oh, P., Pinney, E. & Allard, J. 非律平敏感的内凹介导的内皮转运：减少的胞吞转运作用，清除剂胞饮作用，和选择性大分子的毛细血管通透性。J Cell Biol 127,1217-32 (1994).
17. Anderson, R. G. 内凹：进出信号集合的地方。Proc Natl Acad Sci USA 90,10909-13 (1993).
18. Reimann, J. & Kaufmann, S. H. 在抗感染免疫中的选择性抗原呈递途径[见评论]。Curr Opin Immunol 9,462-9 (1997).
19. Gilbert SC, Plebanski M, Harris SJ, Allsopp CE, Thomas R, Layton GT, Hill AV. 一种包含多个疟疾抗原决定簇的蛋白颗粒疫苗。Nat Biotechnol 1997 ; 15: 1280-4.
20. Gilbert SC, Schneider J, Plebanski M, Hannan CM, Blanchard TJ, Smith GL, Hill AV. Ty 病毒样颗粒，DNA 疫苗和修饰的 Ankara 病毒疫苗；比较和结合。Biol Chem 1999 ; 380: 299-303.
21. Plebanski M, Hill AVS. 疟疾感染的免疫学。Curr. Opin. Immunol. 2000 ; 12: 437-441.

22. Apostolopoulos V, McKenzie IF, Pietersz GA. 乳腺癌免疫治疗：目前状况和未来展望。Immunol Cell Biol 1996 ; 74: 457-64.
23. Cook G, Campbell JD. 多发性骨髓瘤的免疫调节：宿主-肿瘤冲突。Blood Rev 1999 ; 13: 151-62.
24. Gupta RK, Singh M, OHagan DT. 用于发展单剂量控释疫苗的多（丙交酯-co-乙交酯）微颗粒。Adv. Drug Deliv. Rev. 1998 ; 32: 225-246.
25. Chisari FV, Ferrari C. 乙型肝炎病毒的免疫发病机理。Annu. Rev. Immunol. 1995 ; 13: 29-60.
26. Pierson T, McArthur J, Sicilian RF. HIV 的储存器：在抗病毒免疫应答和抗逆转录治疗下病毒持续存在的机制。Annu. Rev. Immunol. 2000 ; 18: 665-708.
27. Harty JT, Tvinneim AR, White DW. 对感染抵抗力的 CD8+ T 细胞效应物机制。Annu. Rev. Immunol. 2000 ; 18:
28. Boehm U., Klamp T., Groot M., Howard J. C. 对 gamma 干扰素的细胞应答。Annu Rev Immunol 1997; 15: 749-95.
29. Arnold-Schild, D. et al. 切缘：专业抗原呈递细胞对热休克蛋白的受体介导的胞饮作用。J. Immunol 162,3757-60 (1999).

图 1

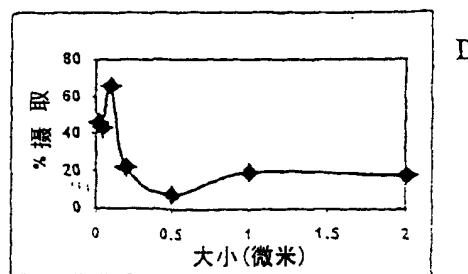
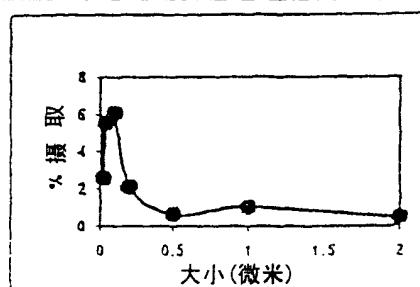
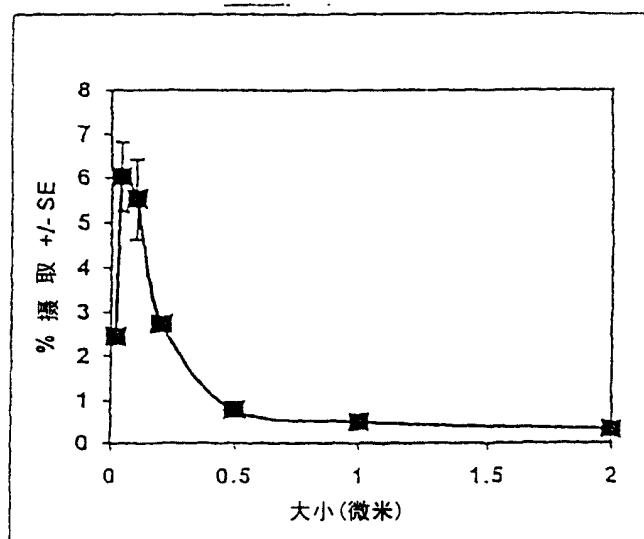
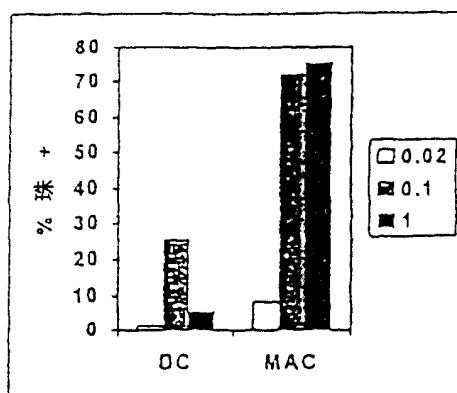


图2

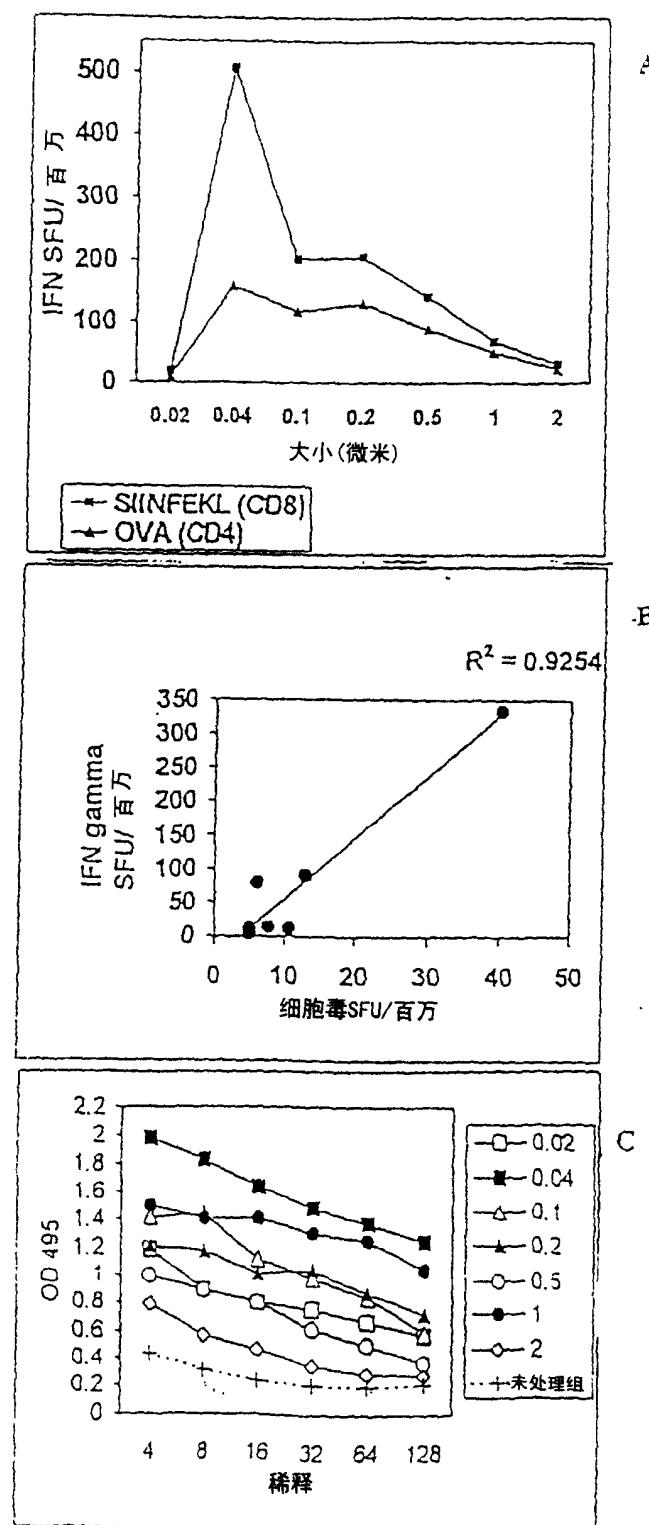


图3

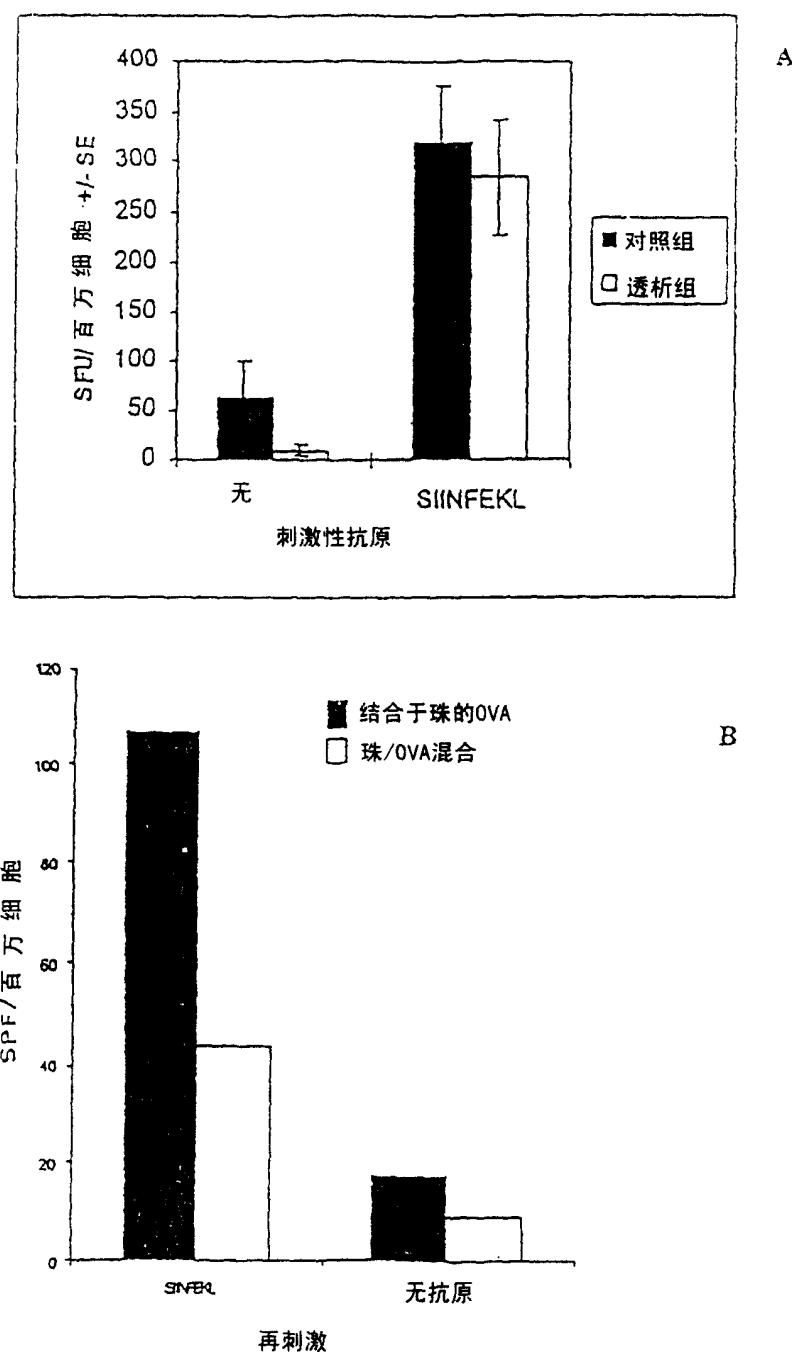


图 4

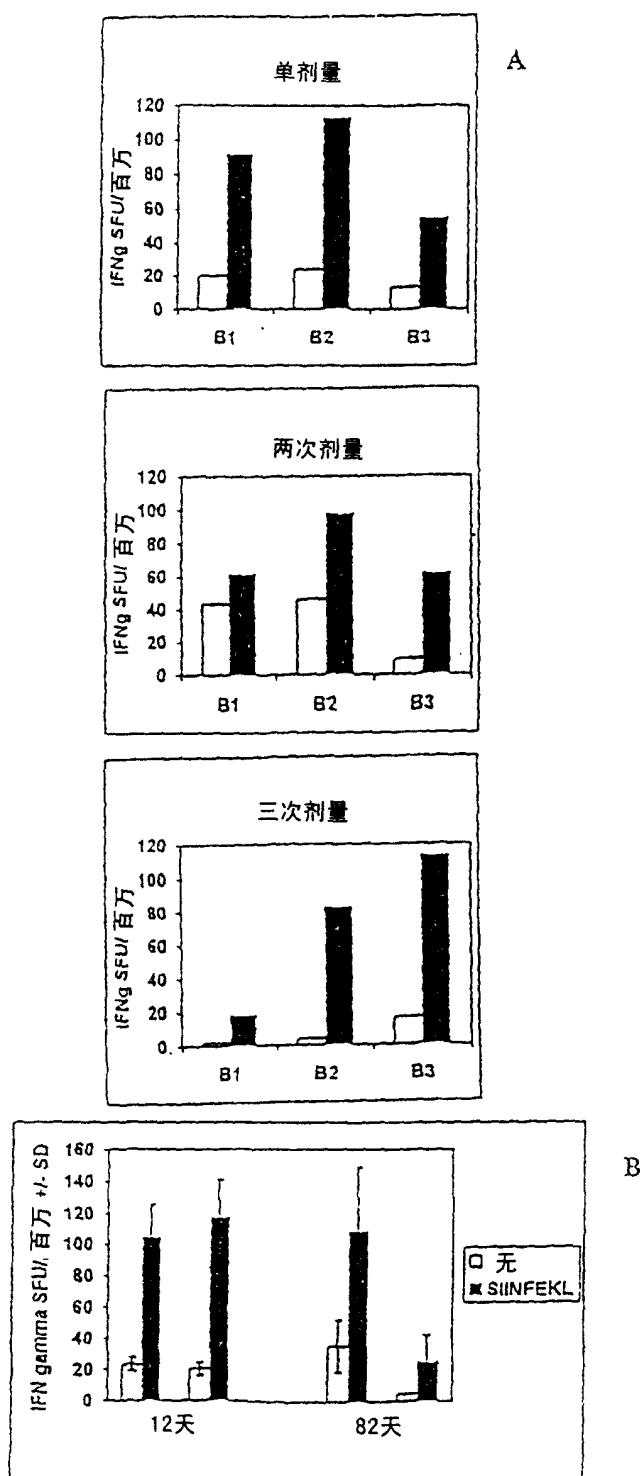


图5

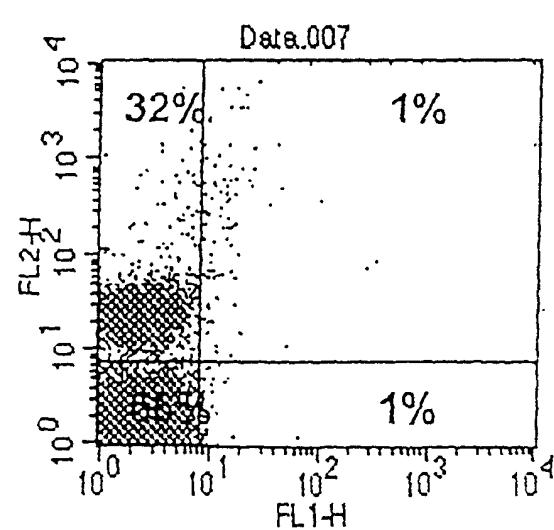
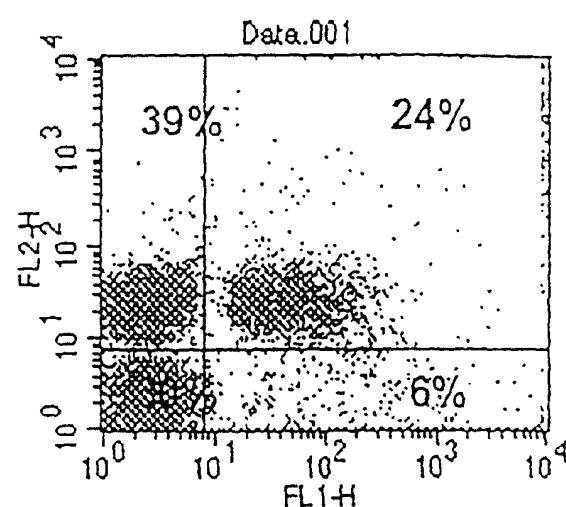


图6

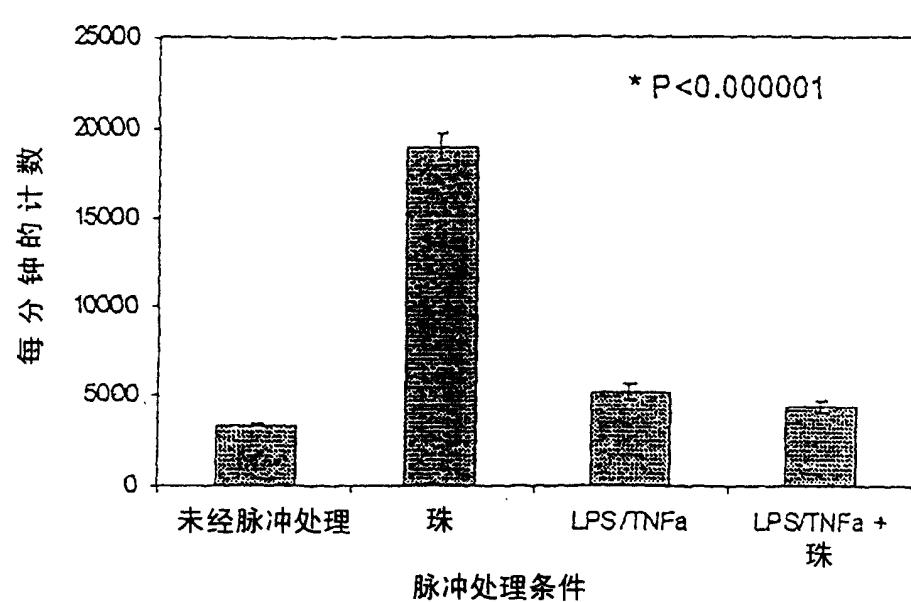


图 7

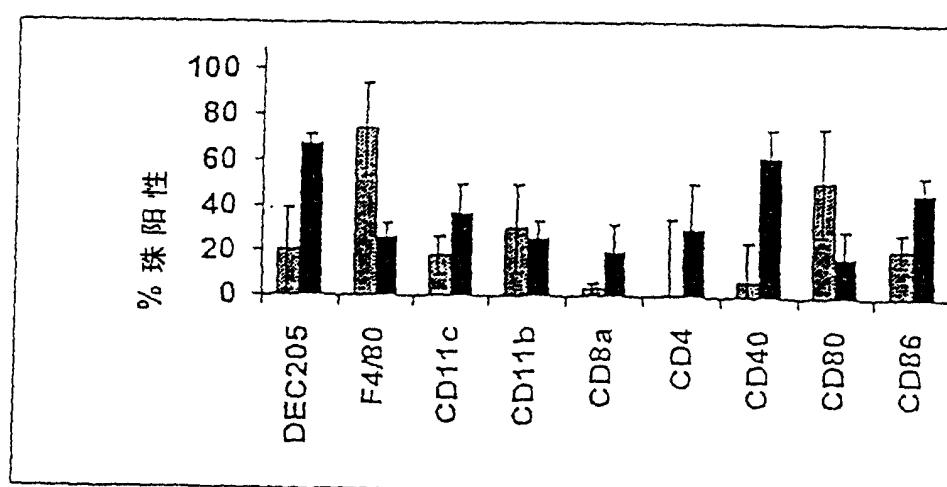


图8A

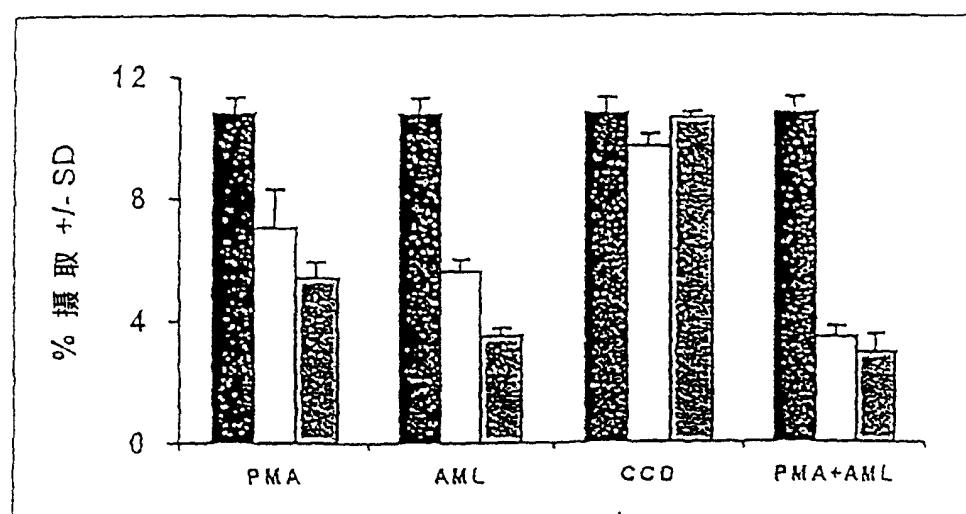


图8B

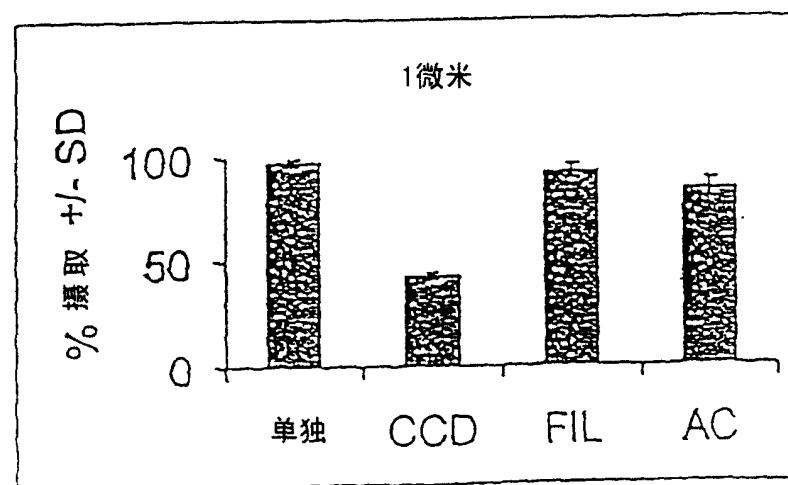
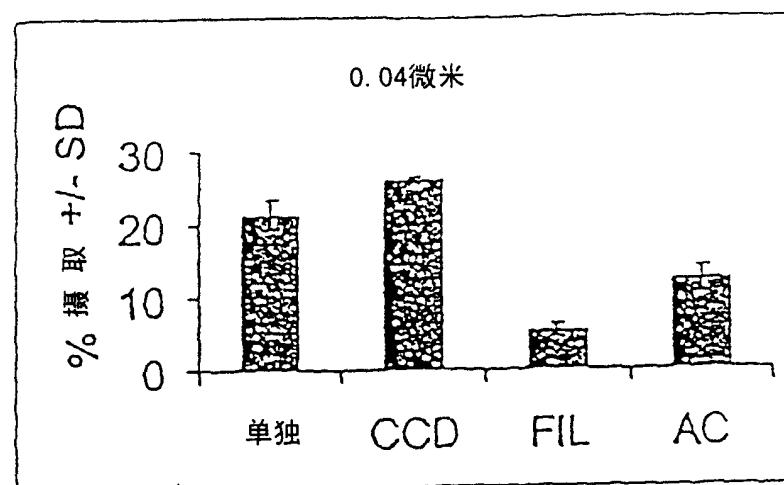


图9

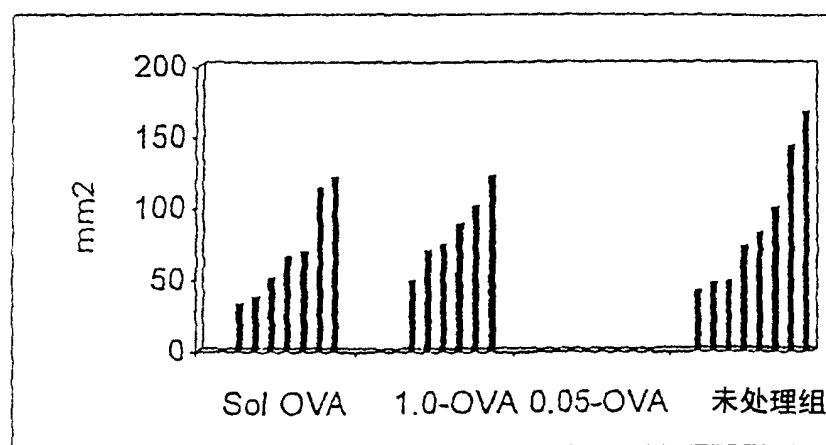


图10

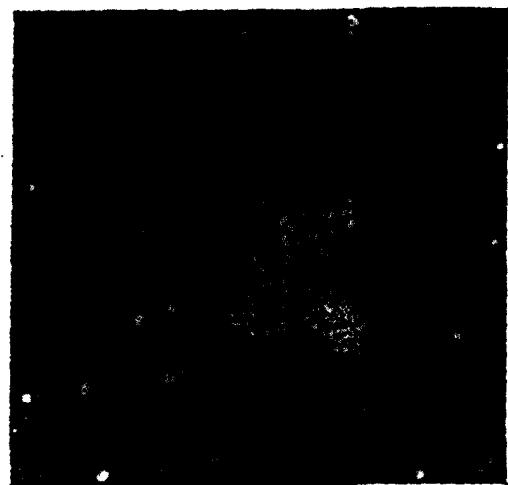
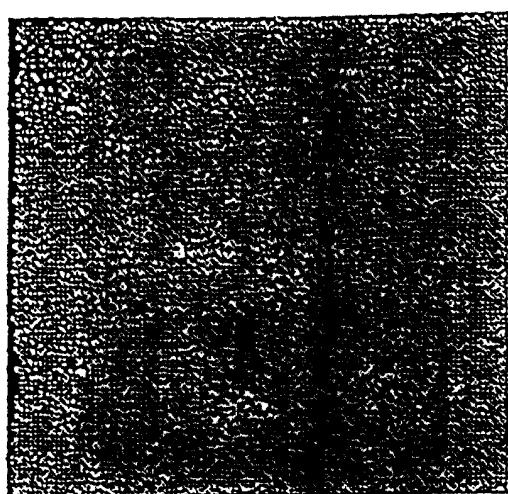


图 11

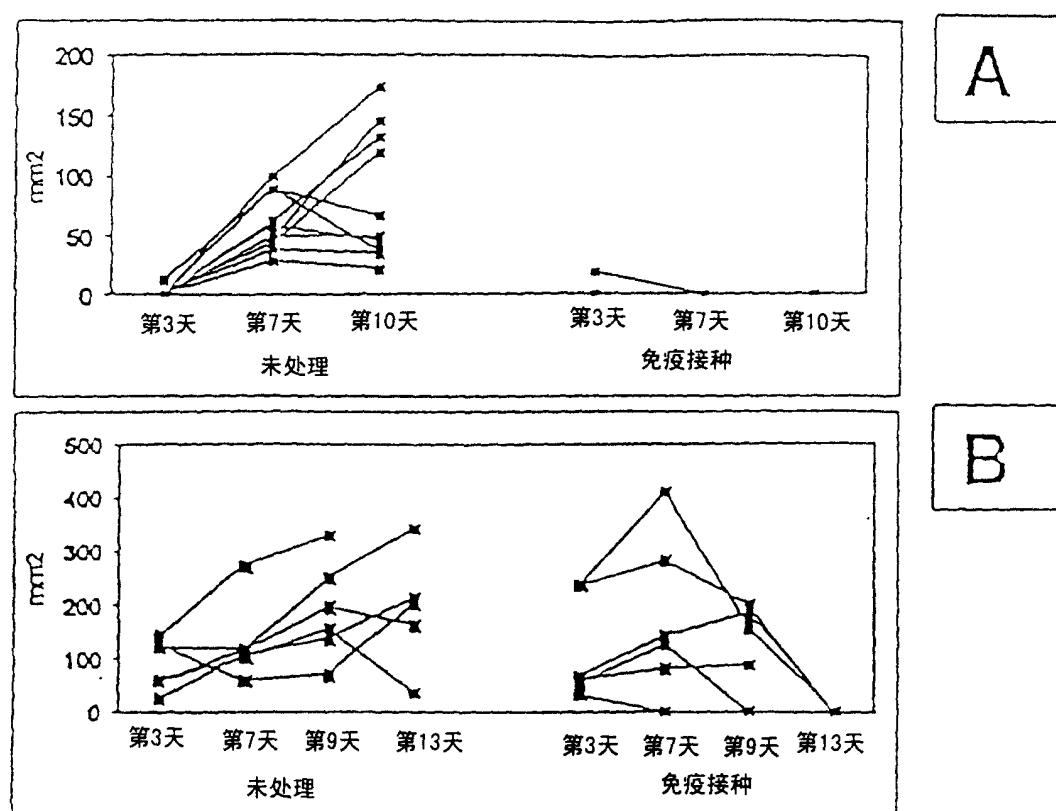


图12

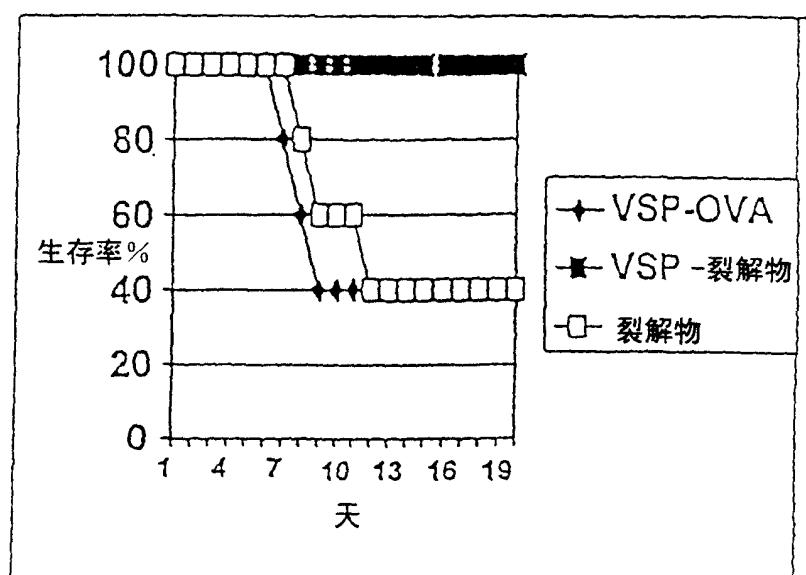


图13

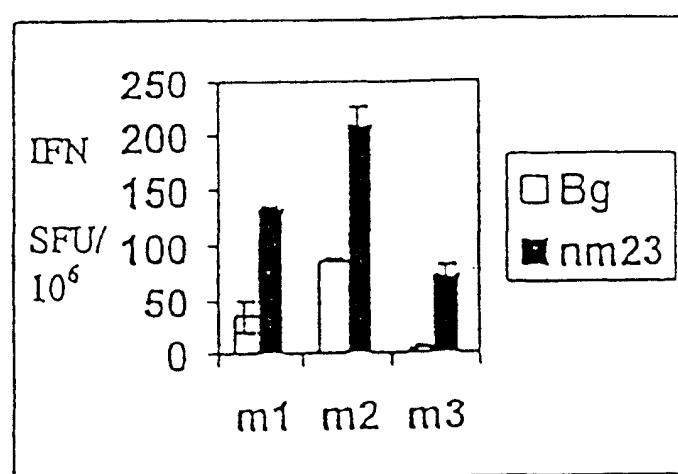


图14

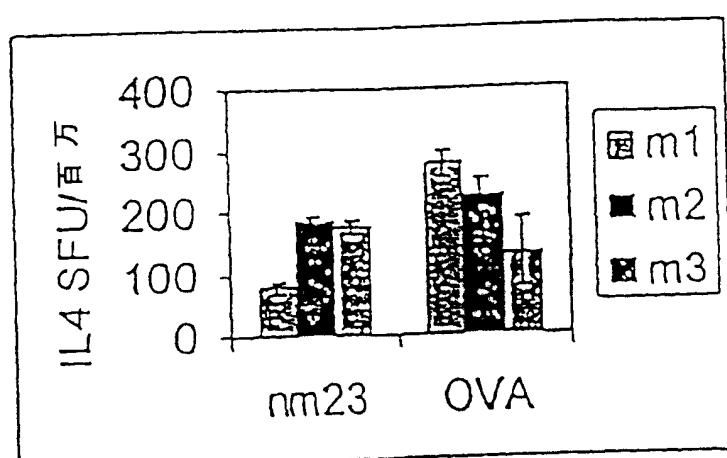


图 15A

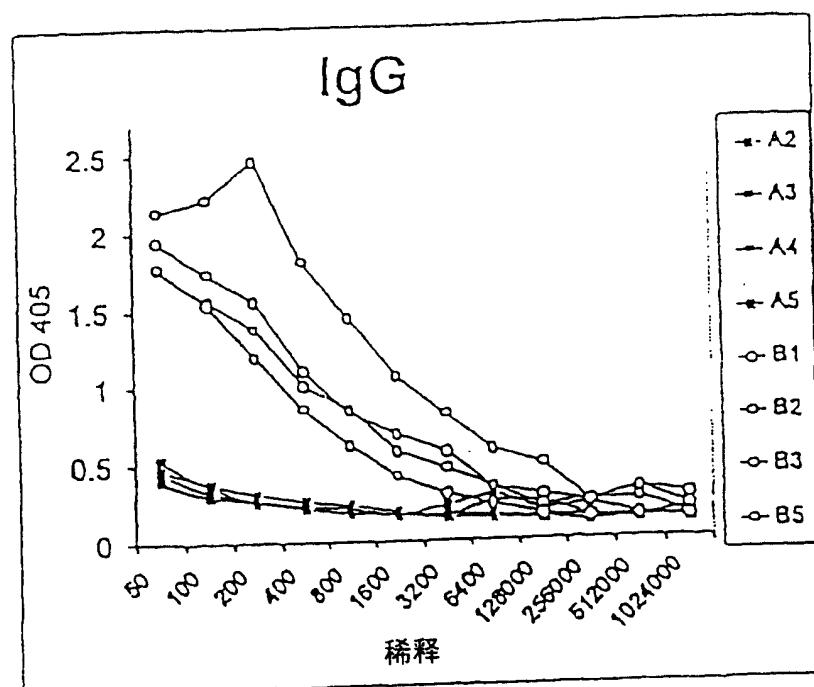


图15B

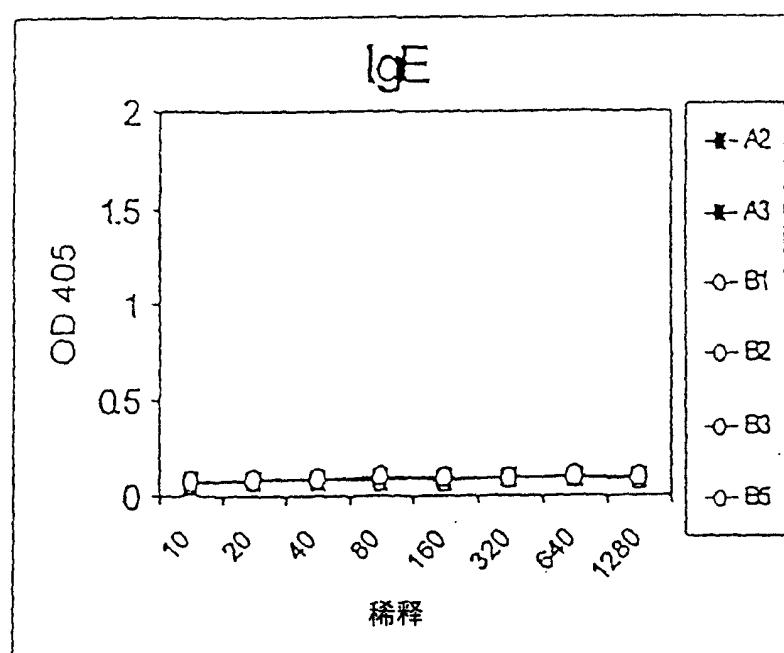


图 16

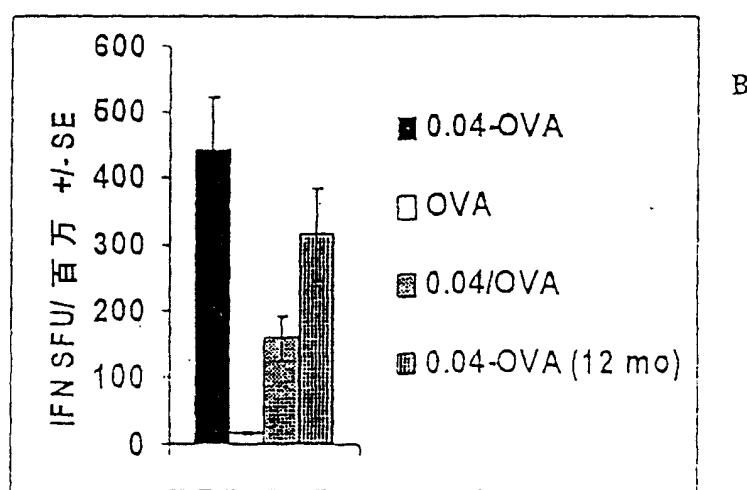
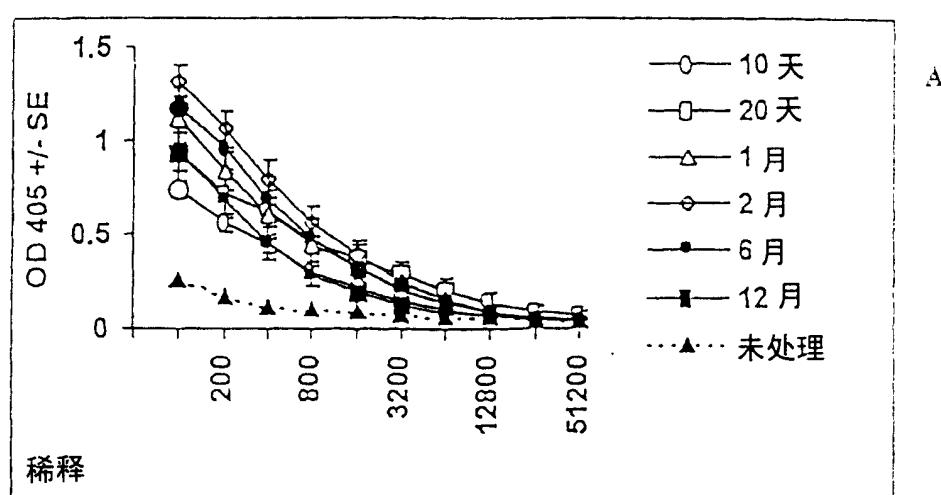


图 17

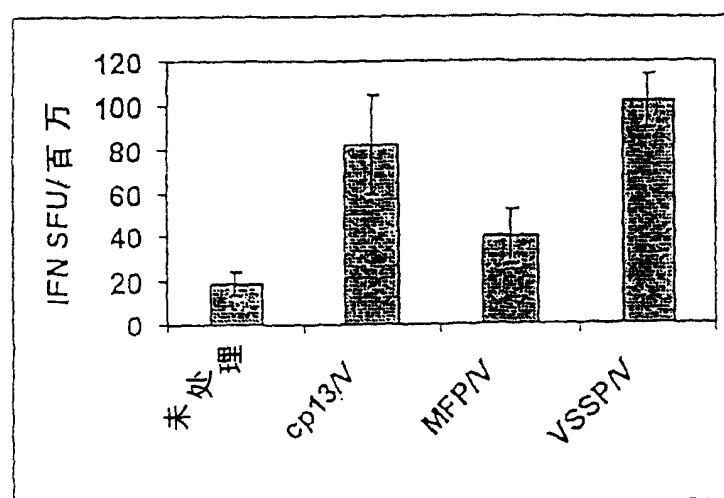


图 18

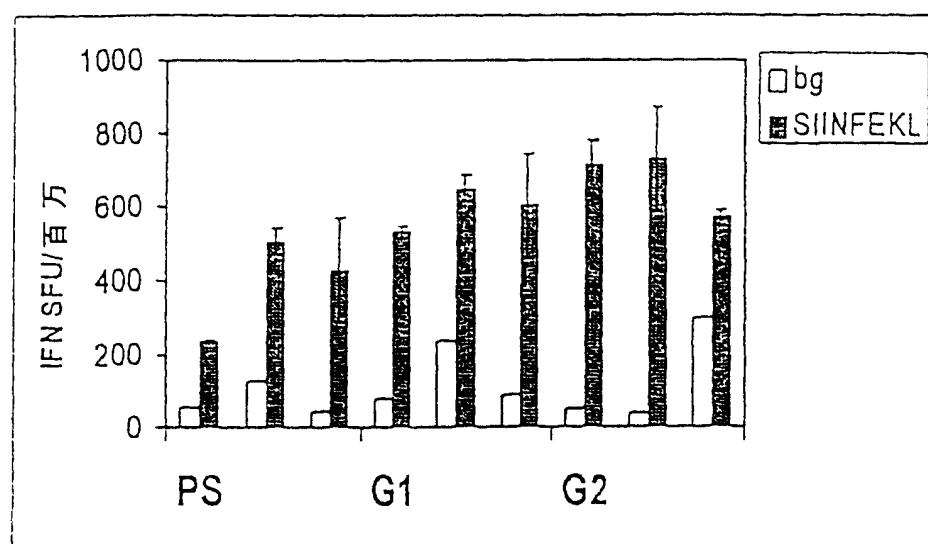


图19

