(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107115314 B
(45)授权公告日 2022.04.29

(21)申请号 201710100219.2
(22)申请日 2012.05.24
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 107115314 A
(43)申请公布日 2017.09.01
(30)优先权数据
61/492,626 2011.06.02 US
(62)分案原申请数据
201280035048.5 2012.05.24
(73)专利权人 加利福尼亚大学董事会
地址 美国加利福尼亚州
(72)发明人 张良方 罗尼·弘博·方
哲铭(杰克)·胡 乔纳森·科普
(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 李敏春 艾娟
(51)Int.Cl.
A61K 9/50(2006.01)
A61K 9/51(2006.01)
A61K 47/34(2017.01)
A61K 47/46(2006.01)
(56)对比文件
CN 101926984A ,2010.12.29
CA 2213906A1 ,1998.03.23
审查员 于彦民

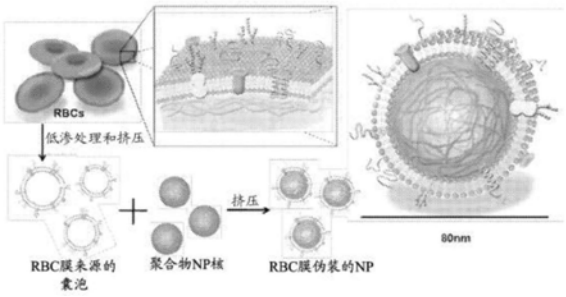
权利要求书5页 说明书114页 附图17页

(54)发明名称

膜包封的纳米颗粒及使用方法

(57)摘要

本申请涉及膜包封的纳米颗粒及使用方法。本发明提供了纳米颗粒及其使用和制造方法。本发明的纳米颗粒包含a)内核,其包含非细胞物质;和b)外表面,其包含源自细胞的细胞膜或源自病毒的膜。还提供了包含本发明的纳米颗粒的药物递送系统或药物组合物。本发明进一步提供了包含本发明的纳米颗粒的免疫原性组合物和使用本发明的免疫原性组合物用于引发免疫应答和用于治疗或预防如肿瘤或癌症的疾病或病状、或与插入细胞膜的毒素相关的疾病或病状的方法。本发明还提供了包含所述免疫原性组合物的疫苗,所述免疫原性组合物包含本发明的纳米颗粒。



CN 107115314 B

1.一种纳米颗粒,其包含:

a)内核,其包含非细胞物质;和

b)外表面,其包含源自细胞的质膜,并且

其中所述内核支撑着所述外表面,所述质膜源自细菌、白细胞(WBC)、血小板、肿瘤细胞、免疫细胞、干细胞、内皮细胞、上皮细胞、神经细胞或突触囊泡,所述纳米颗粒具有10nm至1μm的直径,所述纳米颗粒大致缺乏病毒的成分,并且所述内核包含选自由以下各项组成的组的生物相容的或合成的材料:聚(乳酸-乙醇酸)共聚物、聚乳酸、聚乙醇酸、聚己酸内酯、聚赖氨酸以及聚谷氨酸。

2.如权利要求1所述的纳米颗粒,其中所述内核包含选自由以下各项组成的组的生物相容的或合成的材料:聚(乳酸-乙醇酸)共聚物、聚乳酸、聚乙醇酸、聚己酸内酯以及聚谷氨酸。

3.如权利要求1所述的纳米颗粒,其中所述质膜源自脊椎动物、非人哺乳动物或人。

4.如权利要求3所述的纳米颗粒,其中所述质膜源自哺乳动物细胞。

5.如权利要求3所述的纳米颗粒,其中所述质膜源自人细胞。

6.如权利要求1所述的纳米颗粒,其中所述质膜癌细胞。

7.如权利要求1所述的纳米颗粒,其中所述质膜包括源自白细胞的质膜。

8.如权利要求1所述的纳米颗粒,其进一步包含可释放的货物。

9.如权利要求8所述的纳米颗粒,其中所述可释放的货物位于所述内核之内或之上、在所述内核与所述外表面之间、或在所述外表面之内或之上。

10.如权利要求8所述的纳米颗粒,其中所述可释放的货物的释放通过所述纳米颗粒与靶细胞、组织、器官或受试者之间的接触、或通过所述纳米颗粒周围的物理参数的变化而触发。

11.如权利要求8所述的纳米颗粒,其中所述可释放的货物是治疗剂、预防剂、诊断剂或标记试剂、预后剂或其组合。

12.如权利要求8所述的纳米颗粒,其中所述可释放的货物是金属颗粒、聚合物颗粒、树状聚合物颗粒或无机颗粒。

13.如权利要求1所述的纳米颗粒,其中所述纳米颗粒的直径为30nm至300nm。

14.如权利要求1所述的纳米颗粒,其中所述纳米颗粒缺乏所述质膜所源自的细胞的至少50%的成分。

15.如权利要求14所述的纳米颗粒,其中所述质膜包括源自白细胞的质膜,并且所述纳米颗粒缺乏所述白细胞的至少50%的成分。

16.如权利要求1所述的纳米颗粒,其中所述纳米颗粒维持所述质膜或所述质膜的成分的至少50%的天然结构完整性或活性。

17.如权利要求1所述的纳米颗粒,其中所述纳米颗粒是生物相容的或生物可降解的。

18.如权利要求1所述的纳米颗粒,其中所述内核包含PLGA,并且所述外表面包含源自白细胞的质膜。

19.如权利要求6所述的纳米颗粒,其中所述内核包含PLGA并且所述外表面包含源自癌细胞的质膜。

20.如权利要求1所述的纳米颗粒,其中所述纳米颗粒缺乏对所述质膜所源自的物种或

受试者的至少50％的免疫原性。

21.如权利要求1所述的纳米颗粒，其中所述外表面包含天然存在的质膜，并且进一步包含合成膜。

22.一种药物递送系统，其包含有效量的如权利要求1至21中任一项所述的纳米颗粒。

23.如权利要求22所述的药物递送系统，其进一步包含另一种活性成分或医学上或药学上可接受的载体或赋形剂。

24.一种药物组合物，其包含有效量的如权利要求1至21中任一项所述的纳米颗粒和药学上可接受的载体或赋形剂。

25.如权利要求24所述的药物组合物，其进一步包含另一种活性成分。

26.有效量的如权利要求1至21中任一项所述的纳米颗粒用于制造用于在有需要的受试者中治疗或预防疾病或病状的药物的用途。

27.一种用于制造纳米颗粒的方法，其包括：

a)组合内核和外表面，所述内核包含非细胞物质，所述外表面包含源自细胞的质膜；和

b)对所述组合施加外源能量以便形成包含所述内核和所述外表面的纳米颗粒，并且

其中所述内核支撑着所述外表面，所述质膜源自细菌、白细胞(WBC)、血小板、肿瘤细胞、免疫细胞、干细胞、内皮细胞、上皮细胞、神经细胞或突触囊泡，所述纳米颗粒具有10nm至1μm的直径，所述纳米颗粒大致缺乏病毒的组分，并且所述内核包含选自由以下各项组成的组的生物相容的或合成的材料：聚(乳酸-乙醇酸)共聚物、聚乳酸、聚乙醇酸、聚己酸内酯、聚赖氨酸以及聚谷氨酸。

28.如权利要求27所述的方法，其中所述外源能量是机械能、声能或热能。

29.如权利要求27所述的方法，其中所述质膜是源自细胞的天然存在的质膜。

30.如权利要求28所述的方法，其中所述外表面进一步包含合成膜，并且所产生的纳米颗粒包含所述内核和外表面，所述外表面包含所述质膜和所述合成膜。

31.一种肿瘤特异性免疫原性组合物，其包含有效量的纳米颗粒，所述纳米颗粒包含内核和外表面，所述内核包含非细胞物质，所述外表面包含源自肿瘤细胞的质膜，其中所述内核支撑着所述外表面，所述纳米颗粒具有10nm至1μm的直径，所述纳米颗粒大致缺乏病毒的组分，并且所述内核包含选自由以下各项组成的组的生物相容的或合成的材料：聚(乳酸-乙醇酸)共聚物、聚乳酸、聚乙醇酸、聚己酸内酯、聚赖氨酸以及聚谷氨酸。

32.如权利要求31所述的肿瘤特异性免疫原性组合物，其中所述质膜源自良性肿瘤细胞、潜在恶性肿瘤细胞、癌细胞、癌细胞系或受试者的癌细胞。

33.如权利要求31所述的肿瘤特异性免疫原性组合物，其中所述纳米颗粒的所述外表面中的所述质膜保留其至少50％的结构完整性用于引发对所述肿瘤细胞的免疫应答。

34.如权利要求31所述的肿瘤特异性免疫原性组合物，其中所述内核包含生物相容性材料或合成材料，所述合成材料选自由聚(乳酸-乙醇酸)共聚物、聚乳酸、聚乙醇酸、聚己酸内酯、聚赖氨酸以及聚谷氨酸组成的组。

35.如权利要求31所述的肿瘤特异性免疫原性组合物，其中所述内核包含聚(乳酸-乙醇酸)共聚物。

36.如权利要求32所述的肿瘤特异性免疫原性组合物，其中所述纳米颗粒进一步包含另一种活性成分或可释放的货物。

37.如权利要求32所述的肿瘤特异性免疫原性组合物，其中所述纳米颗粒的直径为30nm至300nm。

38.如权利要求32所述的肿瘤特异性免疫原性组合物，其中所述纳米颗粒缺乏所述细胞膜所源自的肿瘤细胞的至少50％的成分。

39.如权利要求32所述的肿瘤特异性免疫原性组合物，其进一步包含免疫原性佐剂或免疫增强剂。

40.如权利要求32所述的肿瘤特异性免疫原性组合物，其中所述纳米颗粒的所述外表面包含源自肿瘤细胞的质膜，并且进一步包含合成膜。

41.一种疫苗，其包含如权利要求32至40中任一项所述的肿瘤特异性免疫原性组合物。

42.有效量的如权利要求1至21中任一项所述的纳米颗粒用于制造肿瘤或癌症特异性免疫原性组合物，或有效量的如权利要求32至40中任一项所述的肿瘤特异性免疫原性组合物用于制造用于治疗或保护受试者不受肿瘤影响的疫苗的用途。

43.一种用于治疗或预防与插入细胞膜的毒素相关的疾病或病状的药物组合物，其中所述药物组合物包含有效量的纳米颗粒，所述纳米颗粒包含内核和外表面，所述内核包含非细胞物质，所述外表面包含源自靶细胞的质膜，其中所述内核支撑着所述外表面，所述质膜源自白细胞(WBC)、血小板、肿瘤细胞、免疫细胞、干细胞、内皮细胞、上皮细胞、神经细胞或突触囊泡，所述纳米颗粒具有10nm至1μm的直径，所述纳米颗粒大致缺乏病毒的组分，并且所述内核包含选自由以下各项组成的组的生物相容的或合成的材料：聚(乳酸-乙醇酸)共聚物、聚乳酸、聚乙醇酸、聚己酸内酯、聚赖氨酸以及聚谷氨酸。

44.如权利要求43所述的药物组合物，其中作为自然病理机制的一部分，所述毒素插入到所述靶细胞的质膜中，或所述纳米颗粒的所述外表面中的所述质膜保留所述毒素。

45.如权利要求43所述的药物组合物，其中所述毒素是细菌、真菌或动物毒素。

46.如权利要求43所述的药物组合物，其中所述纳米颗粒的所述外表面保留其结构完整性用于保留所述毒素。

47.如权利要求43所述的药物组合物，其中所述纳米颗粒的所述外表面包含天然存在的质膜，并且进一步包含合成膜。

48.如权利要求43所述的药物组合物，其中所述纳米颗粒是生物相容的、生物可降解的，或包含合成材料。

49.如权利要求43所述的药物组合物，其中所述外表面包含源自白细胞的质膜。

50.如权利要求43所述的药物组合物，其进一步包含另一种活性成分或药学上可接受的载体或赋形剂。

51.有效量的如权利要求43至50中任一项所述的药物组合物用于制造用于在受试者中治疗或预防与插入细胞膜的毒素相关的疾病或病状的药物的用途。

52.一种免疫原性组合物，其包含有效量的纳米颗粒，所述纳米颗粒包含内核和外表面，所述内核包含非细胞物质，所述外表面包含源自细胞的质膜和插入细胞膜的毒素，其中所述内核支撑着所述外表面，所述质膜源自白细胞(WBC)、血小板、肿瘤细胞、免疫细胞、干细胞、内皮细胞、上皮细胞、神经细胞或突触囊泡，所述纳米颗粒具有10nm至1μm的直径，所述纳米颗粒大致缺乏病毒的组分，并且所述内核包含选自由以下各项组成的组的生物相容的或合成的材料：聚(乳酸-乙醇酸)共聚物、聚乳酸、聚乙醇酸、聚己酸内酯、聚赖氨酸以及

聚谷氨酸。

53.如权利要求52所述的免疫原性组合物,其中作为自然病理机制的一部分,所述毒素插入到所述靶细胞的质膜中。

54.如权利要求52所述的免疫原性组合物,其中所述纳米颗粒的所述外表面中的所述质膜保留所述毒素。

55.如权利要求52所述的免疫原性组合物,其中所述纳米颗粒的所述外表面中的所述毒素保留其至少50%的天然结构完整性用于引发对天然毒素的免疫应答。

56.如权利要求52所述的免疫原性组合物,其中所述毒素是细菌、真菌或动物毒素。

57.如权利要求52所述的免疫原性组合物,其中所述纳米颗粒的所述外表面包含天然存在的质膜,并且进一步包含合成膜。

58.如权利要求52所述的免疫原性组合物,其中所述纳米颗粒是生物相容的、生物可降解的,或包含合成材料。

59.如权利要求52所述的免疫原性组合物,其中所述毒素是细菌毒素。

60.如权利要求52所述的免疫原性组合物,其中所述外表面包含源自白细胞的质膜。

61.如权利要求52所述的免疫原性组合物,其进一步包含另一种活性成分或免疫原性佐剂或免疫增强剂。

62.一种疫苗,其包含如权利要求52至61中任一项所述的免疫原性组合物。

63.有效量的纳米颗粒用于制造针对插入细胞膜的毒素的免疫原性组合物的用途,其中所述纳米颗粒包含内核和外表面,所述内核包含非细胞物质,所述外表面包含源自细胞的质膜和所述插入细胞膜的毒素,其中所述内核支撑着所述外表面,所述质膜源自白细胞(WBC)、血小板、肿瘤细胞、免疫细胞、干细胞、内皮细胞、上皮细胞、神经细胞或突触囊泡,所述纳米颗粒具有10nm至1μm的直径,所述纳米颗粒大致缺乏病毒的组分,并且所述内核包含选自由以下各项组成的组的生物相容的或合成的材料:聚(乳酸-乙醇酸)共聚物、聚乳酸、聚乙醇酸、聚己酸内酯、聚赖氨酸以及聚谷氨酸。

64.有效量的如权利要求52至61中任一项所述的免疫原性组合物用于制造用于保护受试者不受插入细胞膜的毒素影响的疫苗的用途。

65.如权利要求1所述的纳米颗粒,其中所述质膜源自白细胞(WBC)、血小板、肿瘤细胞、免疫细胞、干细胞、内皮细胞、上皮细胞或神经细胞。

66.如权利要求65所述的纳米颗粒,其中所述免疫细胞是巨噬细胞、单核细胞、B细胞或T细胞。

67.如权利要求65所述的纳米颗粒,其中所述干细胞是造血干细胞、骨髓干细胞、间质干细胞、心脏干细胞或神经干细胞。

68.如权利要求1至21和64至67中任一项所述的纳米颗粒,其中所述内核具有正方形、矩形、三角形、圆盘形、立方体样的形状、立方体、长方体、圆锥形、圆柱形、棱柱形、棱锥形或直角圆柱形。

69.如权利要求11所述的纳米颗粒,其中所述治疗剂是抗生素、抗微生物剂、生长因子、化学治疗剂或其组合。

70.如权利要求11所述的纳米颗粒,其中所述治疗剂是阿霉素。

71.如权利要求24所述的药物组合物,其被配置用于口服、经鼻、吸入、肠道外、静脉内、

腹膜内、皮下、肌肉内、皮内、局部或直肠施用。

72.如权利要求26所述的用途，其中所述受试者是人或非人哺乳动物。

73.如权利要求26所述的用途，其中所述纳米颗粒中的所述质膜源自所述受试者的相同物种的细胞或源自所述受试者的细胞。

74.如权利要求73所述的用途，其中所述纳米颗粒中的所述质膜源自所述受试者的相同物种的白细胞。

75.如权利要求26所述的用途，其进一步包括向所述有需要的受试者施用另一种活性成分或药学上可接受的载体或赋形剂，或经由药物递送系统施用所述纳米颗粒。

76.如权利要求26所述的用途，其用于治疗或预防传染病、寄生虫病、肿瘤、血液和造血器官的疾病、涉及免疫机制的病症、内分泌、营养以及代谢疾病、精神和行为病症、神经系统疾病、眼睛及附件疾病、眼部疾病或病状、耳朵和乳突疾病、循环系统疾病、呼吸系统疾病、消化系统疾病、皮肤和皮下组织疾病、肌骨骼系统和结缔组织疾病、生殖泌尿系统、妊娠、分娩以及产后疾病、来源于产期的病状、先天性畸形、变形、染色体异常、损伤、中毒、外因所致的结果以及发病和死亡的外因。

77.如权利要求76所述的用途，其中所述传染病由细菌、病毒、寄生虫或真菌引起。

78.如权利要求77所述的用途，其中所述细菌是金黄色葡萄球菌(staphylococcus aureus)或肺炎双球菌(streptococcus pneumoniae)。

79.如权利要求76所述的用途，其中所述肿瘤是癌症。

80.如权利要求8所述的纳米颗粒，其中所述可释放的货物是树状聚合物颗粒。

膜包封的纳米颗粒及使用方法

[0001] 本申请是申请日为2012年05月24日，申请号为201280035048.5，发明名称为“膜包封的纳米颗粒及使用方法”的申请的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求2011年6月2日提交的美国临时申请序列号61/492,626的优先权，所述临时申请的全部内容以引用的方式并入本文。

[0004] 关于联邦政府赞助研究的声明

[0005] 本发明在NSF授予号CMMI 1031239、在NIH授予号U54CA119335以及在DMR授予号1216461下由政府支持完成。政府对本发明具有某些权利。

发明领域

[0006] 本发明涉及用于递送由细胞膜包封的、包括药物活性剂的合成纳米颗粒材料的方法和组合物。

[0007] 发明背景

[0008] 长循环聚合物纳米颗粒具有显着的临床作用，因为它们有望持续地全身递送并且通过被动和主动机制(1-3)更好地靶向。已探索出不同方法包括修改粒度、表面、形状以及柔性来延长体内颗粒停留时间(4-6)。当前用于纳米颗粒隐形涂层的黄金标准(gold standard)是聚乙二醇(PEG)。采用PEG作为纳米颗粒表面上的隐形部分已经获得了极大的成功并且产生了若干临床产物(2、3)，但最近对抗PEG免疫应答的观察结果已触发了对其生物相关性进行进一步调查研究的兴趣(7)。如聚(羧基甜菜碱)和聚(磺基甜菜碱)的合成两性离子材料已被提议作为PEG的替代物，原因是它们的强水合作用对非特异性蛋白质吸附具有高耐受性(8、9)。另外，分子与细胞生物学的最近进展已启发科学家和纳米技术学家仿照红细胞(RBC)制作纳米载体，所述红细胞是天然的长循环递送载体。已采用RBC的性质(如其结构和表面蛋白)作为设计线索来设计下一代递送平台(10-12)。

[0009] 虽然为了贯通合成纳米材料与生物实体之间的鸿沟已作出很大的努力，但是模拟RBC的递送载体仍是生物医学研究者所难以捉摸的。一个主要的挑战在于通过生物细胞的复杂表面化学作用使纳米颗粒功能化是困难的。尽管最近在减少与免疫抑制性RBC膜蛋白(CD47)结合之后聚苯乙烯珠粒的巨噬细胞吞噬方面有很大的进步(11)，但是当前基于化学作用的生物偶联技术经常导致蛋白质变性。另外，这些自底向上的方法很大程度上不能在纳米级基底上复制复杂的蛋白质组成。

[0010] 因此，需要的是用于递送合成纳米颗粒材料的改进的方法和组合物。本发明解决了本领域中的这些需要和其它相关需要。

[0011] 发明概述

[0012] 本发明提供了新型纳米颗粒及其使用和制造方法。更确切地说，本发明的纳米颗粒包含a)内核，其包含非细胞物质；和b)外表面，其包含源自细胞的细胞膜或源自病毒的膜。在某些实施方案中，本发明的纳米颗粒的内核包含生物相容的和/或合成的材料，包括但不限于聚(乳酸-乙醇酸)共聚物、聚乳酸、聚乙醇酸、聚己酸内酯、聚赖氨酸、聚谷氨酸以

及任何其它适合的合成材料或类似材料。

[0013] 在某些实施方案中，本发明的纳米颗粒的外表面包含细胞膜，所述细胞膜包括质膜或源自单细胞有机体(例如细菌或真菌)或多细胞有机体(例如植物、动物、非人哺乳动物、脊椎动物或人)的细胞内膜。在某些实施方案中，本发明的纳米颗粒的外表面包含天然存在的细胞膜或病毒膜和/或进一步包含合成膜。

[0014] 在某些实施方案中，本发明的纳米颗粒的外表面的细胞膜源自血细胞(例如，红细胞(RBC)、白细胞(WBC)或血小板)。在其它实施方案中，外表面的细胞膜源自免疫细胞(例如，巨噬细胞、单核细胞、B细胞或T细胞)、肿瘤细胞或癌细胞以及其它细胞(如上皮细胞、内皮细胞或神经细胞)。在其它实施方案中，外表面的细胞膜源自非终末分化的细胞，如干细胞，包括造血干细胞、骨髓干细胞、间充质干细胞、心脏干细胞、神经干细胞。非终末分化的细胞可以在多能状态下从组织中分离出来或被诱导变为多能的。在另外的其它实施方案中，细胞膜源自细胞组分或细胞器，包括但不限于外来体、分泌囊泡、突触囊泡、内质网(ER)、高尔基体、线粒体、液泡或细胞核。

[0015] 在某些实施方案中，本发明进一步提供了本发明的纳米颗粒包含可释放的货物，所述可释放的货物可以位于纳米颗粒的内部或表面上的任何地方。用于使可释放的货物从本发明的纳米颗粒中释放出来的触发原因包括但不限于：纳米颗粒与靶细胞、组织、器官或受试者之间的接触，或纳米颗粒周围的环境参数变化，如pH、离子状态、温度、压力以及其它物理或化学变化。在某些实施方案中，可释放的货物包含一种或多种治疗剂、预防剂、诊断剂或标记试剂、预后剂(例如，成像标志物)或其组合。在另外的某些其它实施方案中，可释放的货物是金属颗粒，聚合物颗粒、树状聚合物颗粒或无机颗粒。

[0016] 本发明的纳米颗粒可以具有任何适合的形状。例如，本发明的纳米颗粒和/或其内核的形状可以为球形、正方形、矩形、三角形、圆盘形、立方体样的形状、立方体、长方体(立方形)、圆锥形、圆柱形、棱柱形、棱锥形、直角圆柱形以及其它规则或不规则的形状。本发明的纳米颗粒可以具有任何适合的大小。

[0017] 本发明进一步提供了在某些实施方案中本发明的纳米颗粒的直径为约10nm至约10μm。在某些实施方案中，本发明的纳米颗粒的直径为约50nm至约500nm。在其它实施方案中，纳米颗粒的直径可以为约10nm、20nm、30nm、40nm、50nm、60nm、70nm、80nm、90nm、100nm、110nm、120nm、130nm、140nm、150nm、200nm、300nm、400nm、500nm、600nm、700nm、800nm、900nm、1μm、2μm、3μm、4μm、5μm、6μm、7μm、8μm、9μm以及10μm或在约10nm至约10μm范围内的任何适合的子范围，例如直径为约50nm至约150nm。在某些实施方案中，内核支撑着外表面。

[0018] 本发明进一步提供了本发明的纳米颗粒大致缺乏细胞膜源自于其的细胞的成分或病毒膜源自于其的病毒的成分。例如，本发明的纳米颗粒可以缺乏以类型和/或数量计至少10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％、95％、96％、97％、98％、99％或100％的细胞膜源自于其的细胞的成分或病毒膜源自于其的病毒的成分。

[0019] 在另外的某些其它实施方案中，本发明的纳米颗粒大致维持了细胞膜、源自病毒的膜或细胞膜或病毒膜的成分的天然结构完整性或活性。细胞膜的结构完整性包括细胞膜、源自病毒的膜或细胞膜或病毒膜的成分的一级结构、二级结构、三级结构或四级结构，并且细胞膜的活性包括但不限于结合活性、受体活性、信号传导通路活性以及普通天然存在的细胞膜、源自病毒的膜或细胞膜或病毒膜的成分将会具有的任何其它活性。在某些实

施方案中，本发明的纳米颗粒是生物相容的和/或生物可降解的。例如，本发明的纳米颗粒可以维持细胞膜、源自病毒的膜或细胞膜或病毒膜的成分以类型和/或数量计至少10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％、95％、96％、97％、98％、99％或100％的天然结构完整性或活性。

[0020] 在某些实施方案中，本发明的纳米颗粒包含源自红细胞的细胞质膜和包含聚(乳酸-乙醇酸)共聚物(PLGA)的内核，其中纳米颗粒大致上缺乏血红蛋白。例如，本发明的纳米颗粒可以缺乏以类型和/或数量计至少10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％、95％、96％、97％、98％、99％或100％的质膜源自于其的红细胞的血红蛋白。

[0021] 这种本发明的纳米颗粒在体内血液循环中的半衰期为聚乙二醇(PEG)涂覆的可比较纳米颗粒的半衰期的至少约2至5倍。在某些实施方案中，这种本发明的纳米颗粒在体内血液循环中的半衰期为至少约5小时至约40小时或更长。

[0022] 在某些实施方案中，本发明的纳米颗粒大致缺乏对细胞膜源自于其的物种或受试者的免疫原性。例如，本发明的纳米颗粒可以缺乏以类型和/或数量计至少10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％、95％、96％、97％、98％、99％或100％的对细胞膜源自于其的物种或受试者的免疫原性。

[0023] 本发明进一步提供了一种包含本发明的纳米颗粒的药物递送系统和/或药物组合物。在某些实施方案中，本发明的药物递送系统和/或药物组合物进一步包含一种或多种额外的活性成分和/或医学上或药学上可接受的载体或赋形剂，其可以与本发明的纳米颗粒一起或组合施用。

[0024] 本发明进一步提供了一种用于使用本发明的纳米颗粒、包含所述纳米颗粒的药物递送系统或药物组合物在有需要的受试者中治疗和/或预防疾病或病状的方法。在某些实施方案中，用于本发明的方法的纳米颗粒的细胞膜源自所述受试者的相同物种的细胞或源自所述受试者的细胞。在某些实施方案中，用于本发明的方法的纳米颗粒的细胞膜源自所述受试者的相同物种的红细胞，并且所述红细胞与受试者的血型相同。在某些实施方案中，经由任何适合的施用途径施用纳米颗粒、药物递送系统或药物组合物。例如，可以经由口服、经鼻、吸入、亲本、静脉内、腹膜内、皮下、肌肉内、皮内、局部或直肠途径施用纳米颗粒、药物递送系统或药物组合物。

[0025] 在其它实施方案中，经由药物递送系统施用纳米颗粒。在另外的其它实施方案中，本发明的方法进一步包括向有需要的受试者施用另一种活性成分或药学上可接受的载体或赋形剂。本发明的方法进一步提供了可以向有需要的受试者的靶部位系统施用本发明的纳米颗粒。还提供了有效量的本发明的纳米颗粒用于制造用于在有需要的受试者中治疗或预防疾病或病状的药物的用途。

[0026] 此外，本发明提供了一种包含有效量的纳米颗粒的免疫原性组合物，所述纳米颗粒包含内核和外表面，所述内核包含非细胞物质，所述外表面包含源自细胞的细胞膜或质膜和抗原或半抗原。还提供了一种包含本发明的免疫原性组合物的疫苗。本发明进一步提供了一种使用本发明的免疫原性组合物用于在有这种引发需要的受试者中引发对抗原或半抗原的免疫应答的方法，和使用本发明的包含免疫原性组合物的疫苗用于保护受试者不受抗原或半抗原影响的方法。在某些实施方案中，免疫应答是T细胞或B细胞介导的免疫应答。还提供了有效量的本发明的纳米颗粒用于制造针对抗原或半抗原的免疫原性组合物的

用途，和有效量的免疫原性组合物用于制造用于保护受试者不受抗原或半抗原影响的疫苗的用途。

[0027] 本发明进一步提供了一种用于制造本发明的纳米颗粒的方法，所述方法包括使包含非细胞物质的纳米颗粒内核与源自细胞的细胞膜或源自病毒的膜混合，同时施加外源能量以便形成纳米颗粒。在某些实施方案中，外源能量是机械能，例如由挤压所施加的机械能。在其它实施方案中，外源能量是声能，例如由声处理所施加的声能。在另外的其它实施方案中，外源能量是热能，例如由加热所施加的热能。在另外的其它实施方案中，本发明的方法进一步包括使包含非细胞物质的纳米颗粒内核与源自细胞的天然存在的细胞膜或源自病毒的天然存在的膜连同合成膜一起混合，同时施加外源能量以便形成纳米颗粒，所述纳米颗粒包含内核和外表面，所述外表面包含细胞膜或病毒膜以及合成膜。

[0028] 本发明进一步提供了一种包含有效量的纳米颗粒的肿瘤特异性免疫原性组合物，所述纳米颗粒包含内核和外表面，所述内核包含非细胞物质，所述外表面包含源自肿瘤细胞的细胞膜，其中细胞膜大致上保留其结构完整性用于引发对肿瘤细胞的免疫应答。例如，本发明的纳米颗粒可以维持其以类型和/或数量计至少10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％、95％、96％、97％、98％、99％或100％的结构完整性用于引发对肿瘤细胞的免疫应答。

[0029] 在某些实施方案中，内核支撑着此类纳米颗粒的外表面。在某些实施方案中，此类纳米颗粒的内核包含PLGA，并且外表面包含源自肿瘤细胞的质膜。在其它实施方案中，此类纳米颗粒的外表面包含天然存在的细胞膜或病毒膜，并且进一步包含合成膜。

[0030] 包含在本发明的肿瘤特异性免疫原性组合物中的纳米颗粒大致上缺乏细胞膜源自于其的肿瘤细胞的成分。例如，本发明的纳米颗粒可以缺乏以类型和/或数量计至少10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％、95％、96％、97％、98％、99％或100％的细胞膜源自于其的肿瘤细胞的成分。

[0031] 在某些实施方案中，本发明的肿瘤特异性免疫原性组合物中的纳米颗粒的直径为约10nm至约10μm。在某些实施方案中，这种纳米颗粒的直径为约50nm至约500nm。在某些实施方案中，本发明的肿瘤特异性免疫原性组合物中的纳米颗粒进一步包含另一种活性成分或可释放的货物。在另外的其它实施方案中，本发明的肿瘤特异性免疫原性组合物进一步包含免疫原性佐剂或免疫增强剂。

[0032] 本发明进一步提供了一种包含肿瘤特异性免疫原性组合物的疫苗。还提供了用于使用本发明的肿瘤特异性免疫原性组合物或疫苗在有需要的受试者中治疗或预防肿瘤的方法。本发明进一步提供了有效量的本发明的纳米颗粒用于制造用于治疗或预防受试者不受肿瘤影响的癌症或肿瘤特异性免疫原性组合物或疫苗的用途。

[0033] 本发明进一步提供了一种用于治疗或预防与插入细胞膜的毒素相关的疾病或病状的包含本发明的纳米颗粒的药物组合物，其中包含在药物组合物中的纳米颗粒包含内核和外表面，所述内核包含非细胞物质，所述外表面包含源自靶细胞(例如，红细胞)的细胞膜或质膜。在某些实施方案中，插入到靶细胞的细胞膜或质膜中的毒素是自然病理机制的一部分，或纳米颗粒的外表面中的细胞膜或质膜大致上保留毒素。在某些实施方案中，毒素是细菌(例如，金黄色葡萄球菌(S.aureus))、植物、真菌或动物毒素。

[0034] 在某些实施方案中，内核支撑着外表面，并且纳米颗粒的外表面中的细胞膜大致

上保留其结构完整性用于大致上保留毒素。在另外的某些其它实施方案中，纳米颗粒的外表面包含天然存在的细胞膜或病毒膜，并且进一步包含合成膜或添加至细胞膜的合成的或天然存在的组分。在另外的某些其它实施方案中，包含在这种药物组合物中的纳米颗粒是生物相容的、生物可降解的，或包含合成材料。在另外的某些其它实施方案中，本发明的药物组合物进一步包含另一种活性成分或药学上可接受的载体或赋形剂。

[0035] 还提供了用于使用本发明的纳米颗粒以及包含所述纳米颗粒的药物组合物治疗或预防与插入细胞膜的毒素相关的疾病或病状的方法。本发明进一步提供了有效量的包含纳米颗粒的药物组合物用于制造用于在有需要的受试者中治疗或预防与插入细胞膜的毒素相关的疾病或病状的药物的用途。

[0036] 此外，本发明提供了一种包含有效量的纳米颗粒的免疫原性组合物，所述纳米颗粒包含内核和外表面，所述内核包含非细胞物质，所述外表面包含源自细胞的细胞膜或质膜和插入细胞膜的毒素。还提供了一种包含本发明的免疫原性组合物的疫苗。本发明进一步提供了一种使用本发明的免疫原性组合物用于在有这种引发需要的受试者中引发对插入细胞膜的毒素的免疫应答的方法，和使用包含免疫原性组合物的本发明的疫苗用于保护受试者不受插入细胞膜的毒素影响的方法。在某些实施方案中，免疫应答是T细胞或B细胞介导的免疫应答。还提供了有效量的本发明的纳米颗粒用于制造针对插入细胞膜的毒素的免疫原性组合物的用途，和有效量的免疫原性组合物用于制造用于保护受试者不受插入细胞膜的毒素影响的疫苗的用途。

[0037] 本发明涵盖治疗、预防、诊断和/或预后任何疾病、病症或生理性或病理性病状，包括但不限于：传染病；寄生虫病；肿瘤；血液和造血器官疾病；涉及免疫机制的病症；内分泌、营养以及代谢疾病；精神和行为病症；神经系统疾病；眼睛及附件疾病；耳朵和乳突疾病；循环系统疾病；呼吸系统疾病；消化系统疾病；皮肤和皮下组织疾病；肌骨骼系统和结缔组织疾病；生殖泌尿系统疾病；妊娠、分娩以及产后；来源于产期的病状；先天性畸形；变形；染色体异常；损伤；中毒；外部原因结果以及发病和死亡的外部原因。

[0038] 在一些实施方案中，本发明的纳米颗粒、药物递送系统、药物组合物以及方法可以用来治疗或预防列于表1中的示例性癌症和肿瘤，递送列于表2中的示例性癌症药物，治疗或预防列于表3中的示例性眼部疾病或病状，递送列于表4中的示例性眼部药物，治疗或预防列于表5中的影响肺的示例性疾病或病状，递送列于表6中的示例性肺/呼吸疾病药物，治疗或预防列于表7中的影响心脏的示例性疾病或病状，或递送列于表8中的示例性心脏药物。在一些实施方案中，本发明的纳米颗粒、药物递送系统、药物组合物以及方法可以用来治疗或预防列于表9中的示例性病状。表1至表9在本说明书的结尾处附于本文。

[0039] 在一些实施方案中，本发明的纳米颗粒、药物递送系统、药物组合物以及方法可以用来递送列于美国食品药品管理局出版的Orange Book:Approved Drug Products with Therapeutic Equivalence Evaluations(2012年3月现行版)中的示例性药物；列于The Merck Index(美国出版物,第14版印刷,Whitehouse Station,N.J.,USA)及其在线版本(The Merck Index Online^{SM},最终加载于网络的时间:2012年5月1日,星期二)中的示例性药物；以及列于美国食品药品管理局出版的Biologics Products&Establishments中的示例性药物，并且可以用来治疗或预防对应的疾病和病症。

[0040] 本申请还包括以下内容：

[0041] (1)一种纳米颗粒，其包含：

[0042] a)内核，其包含非细胞物质；和

[0043] b)外表面，其包含源自细胞的细胞膜或源自病毒的膜。

[0044] (2)如项目(1)所述的纳米颗粒，其中所述内核包含选自由以下各项组成的组的生物相容的或合成的材料：聚(乳酸-乙醇酸)共聚物(PLGA)、聚乳酸(PLA)、聚乙醇酸(PGA)、聚己酸内酯(PCL)、聚赖氨酸以及聚谷氨酸。

[0045] (3)如项目(1)至(2)中任一项所述的纳米颗粒，其中所述内核支撑着所述外表面。

[0046] (4)如项目(1)至(3)中任一项所述的纳米颗粒，其中所述细胞膜包括质膜或细胞内膜。

[0047] (5)如项目(1)至(4)中任一项所述的纳米颗粒，其中所述细胞膜源自单细胞有机体或多细胞有机体，所述单细胞有机体选自细菌和真菌，所述多细胞有机体选自植物、脊椎动物、非人哺乳动物以及人。

[0048] (6)如项目(1)至(5)中任一项所述的纳米颗粒，其中所述细胞膜源自血细胞、肿瘤细胞、癌细胞、免疫细胞、干细胞、内皮细胞、外来体、分泌囊泡或突触囊泡。

[0049] (7)如项目(6)所述的纳米颗粒，其中所述细胞膜包括源自红细胞的质膜。

[0050] (8)如项目(1)至(7)中任一项所述的纳米颗粒，其进一步包含可释放的货物。

[0051] (9)如项目(8)所述的纳米颗粒，其中所述可释放的货物位于所述内核之内或之上、在所述内核与所述外表面之间、或在所述外表面之内或之上。

[0052] (10)如项目(8)至(9)中任一项所述的纳米颗粒，其中所述可释放的货物的释放通过所述纳米颗粒与靶细胞、组织、器官或受试者之间的接触、或通过所述纳米颗粒周围的物理参数的变化而触发。

[0053] (11)如项目(8)至(10)中任一项所述的纳米颗粒，其中所述可释放的货物是治疗剂、预防剂、诊断剂或标记试剂、预后剂或其组合。

[0054] (12)如项目(8)至(11)中任一项所述的纳米颗粒，其中所述可释放的货物是金属颗粒、聚合物颗粒、树状聚合物颗粒或无机颗粒。

[0055] (13)如项目(1)至(12)中任一项所述的纳米颗粒，其中所述纳米颗粒的直径为约10nm至约10μm。

[0056] (14)如项目(1)至(13)中任一项所述的纳米颗粒，其中所述纳米颗粒大致上缺乏所述细胞膜源自于其的细胞的成分或所述病毒膜源自于其的病毒的成分。

[0057] (15)如项目(14)所述的纳米颗粒，其中所述细胞膜包括源自红细胞的质膜，并且所述纳米颗粒大致上缺乏血红蛋白。

[0058] (16)如项目(1)至(15)中任一项所述的纳米颗粒，其中所述纳米颗粒大致上维持所述细胞膜、所述源自病毒的膜或所述细胞膜或病毒膜的成分的天然结构完整性或活性。

[0059] (17)如项目(1)至(16)中任一项所述的纳米颗粒，其中所述纳米颗粒是生物相容的或生物可降解的。

[0060] (18)如项目(1)所述的纳米颗粒，其中所述内核包含PLGA，并且所述外表面包含源自红细胞的质膜。

[0061] (19)如项目(18)所述的纳米颗粒，其中所述纳米颗粒在体内血液循环中的半衰期为PEG涂覆的可比较纳米颗粒的半衰期的至少约2至5倍，或在体内血液循环中的半衰期为

至少约5小时至约40小时。

[0062] (20)如项目(1)至(19)中任一项所述的纳米颗粒,其中所述纳米颗粒大致上缺乏对所述细胞膜源自于其的物种或受试者的免疫原性。

[0063] (21)如项目(1)至(20)中任一项所述的纳米颗粒,其中所述外表面包含天然存在的细胞膜或病毒膜,并且进一步包含合成膜。

[0064] (22)一种药物递送系统,其包含有效量的如项目(1)至(21)中任一项所述的纳米颗粒。

[0065] (23)如项目(22)所述的药物递送系统,其进一步包含另一种活性成分或医学上或药学上可接受的载体或赋形剂。

[0066] (24)一种药物组合物,其包含有效量的如项目(1)至(21)中任一项所述的纳米颗粒和药学上可接受的载体或赋形剂。

[0067] (25)如项目(24)所述的药物组合物,其进一步包含另一种活性成分。

[0068] (26)一种用于在有需要的受试者中治疗或预防疾病或病状的方法,其包括向所述受试者施用有效量的如项目(1)至(21)中任一项所述的纳米颗粒、如项目(22)至(23)中任一项所述的药物递送系统、或如项目(24)至(25)中任一项所述的药物组合物。

[0069] (27)如项目(26)所述的方法,其中所述受试者是人或非人哺乳动物。

[0070] (28)如项目(26)至(27)中任一项所述的方法,其中所述纳米颗粒中的所述细胞膜源自所述受试者的相同物种的细胞或源自所述受试者的细胞。

[0071] (29)如项目(28)所述的方法,其中所述纳米颗粒中的所述细胞膜源自所述受试者的相同物种的红细胞,并且所述红细胞与所述受试者的血型相同。

[0072] (30)如项目(26)至(29)中任一项所述的方法,其进一步包括向所述有需要的受试者施用另一种活性成分或药学上可接受的载体或赋形剂,或经由药物递送系统施用所述纳米颗粒。

[0073] (31)有效量的如项目(1)至(21)中任一项所述的纳米颗粒用于制造用于在有需要的受试者中治疗或预防疾病或病状的药物的用途。

[0074] (32)一种用于制造纳米颗粒的方法,其包括:

[0075] a)组合内核和外表面,所述内核包含非细胞物质,所述外表面包含源自细胞的细胞膜或源自病毒的膜;和

[0076] b)对所述组合施加外源能量以便形成包含所述内核和所述外表面的纳米颗粒。

[0077] (33)如项目(32)所述的方法,其中所述外源能量是机械能、声能或热能。

[0078] (34)如项目(32)所述的方法,其中所述细胞膜是源自细胞的天然存在的细胞膜,或膜是源自病毒的天然存在的膜。

[0079] (35)如项目(33)所述的方法,其中所述外表面进一步包含合成膜,并且所产生的纳米颗粒包含所述内核和外表面,所述外表面包含所述细胞膜或病毒膜和所述合成膜。

[0080] (36)一种肿瘤特异性免疫原性组合物,其包含有效量的纳米颗粒,所述纳米颗粒包含内核和外表面,所述内核包含非细胞物质,所述外表面包含源自肿瘤细胞的细胞膜。

[0081] (37)如项目(36)所述的肿瘤特异性免疫原性组合物,其中所述细胞膜源自良性肿瘤细胞、潜在恶性肿瘤细胞、癌细胞、癌细胞系或受试者的癌细胞。

[0082] (38)如项目(36)或(37)所述的肿瘤特异性免疫原性组合物,其中所述纳米颗粒的

所述外表面中的所述细胞膜大致上保留其结构完整性用于引发对所述肿瘤细胞的免疫应答。

[0083] (39)如项目(36)至(38)中任一项所述的肿瘤特异性免疫原性组合物,其中所述内核支撑着所述外表面。

[0084] (40)如项目(36)至(39)中任一项所述的肿瘤特异性免疫原性组合物,其中所述内核包含PLGA,并且所述外表面包含源自肿瘤细胞的质膜。

[0085] (41)如项目(37)至(40)中任一项所述的肿瘤特异性免疫原性组合物,其中所述纳米颗粒进一步包含另一种活性成分或可释放的货物。

[0086] (42)如项目(37)至(41)中任一项所述的肿瘤特异性免疫原性组合物,其中所述纳米颗粒的直径为约10nm至约10μm。

[0087] (43)如项目(37)至(42)中任一项所述的肿瘤特异性免疫原性组合物,其中所述纳米颗粒大致上缺乏所述细胞膜源自于其的肿瘤细胞的成分。

[0088] (44)如项目(37)至(43)中任一项所述的肿瘤特异性免疫原性组合物,其进一步包含免疫原性佐剂或免疫增强剂。

[0089] (45)如项目(37)至(44)中任一项所述的肿瘤特异性免疫原性组合物,其中所述纳米颗粒的所述外表面包含天然存在的细胞膜或病毒膜,并且进一步包含合成膜。

[0090] (46)一种疫苗,其包含如项目(37)至(45)中任一项所述的肿瘤特异性免疫原性组合物。

[0091] (47)一种用于在有需要的受试者中治疗或预防肿瘤的方法,其包括向所述受试者施用有效量的如项目(37)至(45)中任一项所述的肿瘤特异性免疫原性组合物或如项目(46)所述的疫苗。

[0092] (48)如项目(47)所述的方法,其中所述受试者是人或非人哺乳动物。

[0093] (49)如项目(47)或(48)所述的方法,其中所述细胞膜源自所述受试者的相同物种的肿瘤细胞或所述受试者的肿瘤细胞。

[0094] (50)如项目(47)至(49)中任一项所述的方法,其进一步包括向所述受试者施用另一种活性成分或药学上可接受的载体或赋形剂。

[0095] (51)有效量的如项目(1)至(21)中任一项所述的纳米颗粒用于制造肿瘤或癌症特异性免疫原性组合物,或有效量的如项目(37)至(45)中任一项所述的肿瘤特异性免疫原性组合物用于制造用于治疗或保护受试者不受肿瘤影响的疫苗的用途。

[0096] (52)一种用于治疗或预防与插入细胞膜的毒素相关的疾病或病状的药物组合物,其中所述药物组合物包含有效量的纳米颗粒,所述纳米颗粒包含内核和外表面,所述内核包含非细胞物质,所述外表面包含源自靶细胞的细胞膜或质膜。

[0097] (53)如项目(52)所述的药物组合物,其中作为自然病理机制的一部分,所述毒素插入到所述靶细胞的细胞膜或质膜中,或所述纳米颗粒的所述外表面中的所述细胞膜或质膜大致上保留所述毒素。

[0098] (54)如项目(52)或(53)所述的药物组合物,其中所述毒素是细菌、真菌或动物毒素。

[0099] (55)如项目(52)至(54)中任一项所述的药物组合物,其中所述内核支撑着所述外表面,并且所述纳米颗粒的所述外表面中的所述细胞膜大致上保留其结构完整性用于大致

上保留所述毒素。

[0100] (56)如项目(52)至(55)中任一项所述的药物组合物，其中所述纳米颗粒的所述外表面包含天然存在的细胞膜或病毒膜，并且进一步包含合成膜。

[0101] (57)如项目(52)至(56)中任一项所述的药物组合物，其中所述纳米颗粒是生物相容的、生物可降解的，或包含合成材料。

[0102] (58)如项目(52)至(57)中任一项所述的药物组合物，其中所述外表面包含源自红细胞的质膜。

[0103] (59)如项目(52)至(58)中任一项所述的药物组合物，其进一步包含另一种活性成分或药学上可接受的载体或赋形剂。

[0104] (60)一种用于在有需要的受试者中治疗或预防与插入细胞膜的毒素相关的疾病或病状的方法，其包括向所述受试者施用有效量的如项目(52)至(59)中任一项所述的药物组合物。

[0105] (61)如项目(60)所述的方法，其中所述受试者是人或非人哺乳动物。

[0106] (62)如项目(60)或(61)所述的方法，其中所述细胞膜或质膜源自所述受试者的相同物种的细胞或所述受试者的细胞。

[0107] (63)如项目(62)所述的方法，其中所述质膜源自所述受试者的相同物种的红细胞，并且所述红细胞与所述受试者的血型相同。

[0108] (64)如项目(60)至(63)中任一项所述的方法，其进一步包括向所述受试者施用另一种活性成分或药学上可接受的载体或赋形剂。

[0109] (65)有效量的如项目(52)至(59)中任一项所述的药物组合物用于制造用于在受试者中治疗或预防与插入细胞膜的毒素相关的疾病或病状的药物的用途。

[0110] (66)一种免疫原性组合物，其包含有效量的纳米颗粒，所述纳米颗粒包含内核和外表面，所述内核包含非细胞物质，所述外表面包含源自细胞的细胞膜和插入细胞膜的毒素。

[0111] (67)如项目(66)所述的免疫原性组合物，其中所述细胞膜是源自细胞的质膜。

[0112] (68)如项目(66)或(67)所述的免疫原性组合物，其中作为自然病理的一部分，所述毒素插入到所述靶细胞的细胞膜或质膜中，或所述纳米颗粒的所述外表面中的所述细胞膜或质膜大致上保留所述毒素。

[0113] (69)如项目(66)至(68)中任一项所述的免疫原性组合物，其中所述纳米颗粒的所述外表面中的所述毒素大致上保留其天然结构完整性用于引发对天然毒素的免疫应答。

[0114] (70)如项目(66)至(69)中任一项所述的免疫原性组合物，其中所述毒素是细菌、真菌或动物毒素。

[0115] (71)如项目(66)至(70)中任一项所述的免疫原性组合物，其中所述纳米颗粒的所述外表面包含天然存在的细胞膜或病毒膜，并且进一步包含合成膜。

[0116] (72)如项目(66)至(71)中任一项所述的免疫原性组合物，其中所述纳米颗粒是生物相容的、生物可降解的，或包含合成材料。

[0117] (73)如项目(66)至(72)中任一项所述的免疫原性组合物，其中所述内核支撑着所述外表面。

[0118] (74)如项目(66)至(73)中任一项所述的免疫原性组合物，其中所述外表面包含源

自红细胞的质膜。

[0119] (75)如项目(66)至(74)中任一项所述的免疫原性组合物,其进一步包含另一种活性成分或免疫原性佐剂或免疫增强剂。

[0120] (76)一种疫苗,其包含如项目(66)至(75)中任一项所述的免疫原性组合物。

[0121] (77)一种用于在受试者中引发对插入细胞膜的毒素的免疫应答的方法,其包括向所述受试者施用有效量的如项目(66)至(75)中任一项所述的免疫原性组合物。

[0122] (78)一种用于保护受试者不受插入细胞膜的毒素影响的方法,其包括向所述受试者施用有效量的如项目(76)所述的疫苗。

[0123] (79)如项目(77)或(78)所述的方法,其中所述毒素是细菌、真菌或动物毒素。

[0124] (80)如项目(77)至(79)中任一项所述的方法,其中所述受试者是人或非人哺乳动物。

[0125] (81)如项目(77)至(80)中任一项所述的方法,其中所述细胞膜或质膜源自所述受试者的相同物种的细胞或所述受试者的细胞。

[0126] (82)如项目(81)所述的方法,其中所述质膜源自所述受试者的相同物种的红细胞,并且所述红细胞与所述受试者的血型相同。

[0127] (83)如项目(77)至(82)中任一项所述的方法,其进一步包括向所述受试者施用另一种活性成分或药学上可接受的载体或赋形剂。

[0128] (84)如项目(77)至(83)中任一项所述的方法,其中所述免疫应答是T细胞介导的免疫应答或B细胞介导的免疫应答。

[0129] (85)有效量的纳米颗粒用于制造针对插入细胞膜的毒素的免疫原性组合物的用途,其中所述纳米颗粒包含内核和外表面,所述内核包含非细胞物质,所述外表面包含源自细胞的细胞膜和所述插入细胞膜的毒素。

[0130] (86)有效量的如项目(66)至(75)中任一项所述的免疫原性组合物用于制造用于保护受试者不受插入细胞膜的毒素影响的疫苗的用途。

[0131] 附图简述

[0132] 本领域普通技术人员将理解以下所描述的附图仅是出于说明的目的。附图不旨在以任何方式限制本教义的范围。

[0133] 图1:RBC膜涂覆的PLGA纳米颗粒(NP)的制备过程的示意图。

[0134] 图2:RBC膜涂覆的PLGA纳米颗粒的结构表征。图2A:用乙酸双氧铀负染色纳米颗粒并且随后用TEM观察。图2B:在14天内DLS测量纳米颗粒的大小、多分散性指数(PDI)以及表面ζ电势。图2C:扫描荧光显微镜图像,其演示了在被HeLa细胞内在化之后RBC膜(用绿色罗丹明-DMPE染料可视化)和聚合物核(用红色DiD染料可视化)的共同定位。将RBC膜涂覆的纳米颗粒与HeLa细胞一起孵育6小时。洗涤掉多余的纳米颗粒并且随后固定细胞用于成像。

[0135] 图3:RBC膜涂覆的纳米颗粒(NP)的膜蛋白保留、血清中的颗粒稳定性以及体内循环时间。图3A:使掏空的RBC、RBC膜来源的囊泡以及纯化的RBC膜涂覆的PLGA纳米颗粒中的蛋白质溶解并在聚丙烯酰胺凝胶上分离。图3B:在100%胎牛血清中孵育RBC膜涂覆的PLGA纳米颗粒、PEG涂覆的脂质-PLGA混杂的纳米颗粒以及裸露PLGA纳米颗粒,并且监测560nm处的吸光度持续4小时。图3C:通过小鼠尾静脉静脉内注射DiD-负载的纳米颗粒。在不同时间点眶内抽取血液并且测量670nm处的荧光以便评估纳米颗粒的系统循环寿命(n=每组6

个)。

[0136] 图4:RBC膜涂覆的聚合物纳米颗粒的生物分布。将荧光标记的纳米颗粒静脉内注射到小鼠中。在每个时间点(分别为24小时、48小时和72小时),收集来自随机分组的小鼠子组的器官,使其均质化并且定量荧光。图4A:每克组织的荧光强度(n=每组6个)。图4B:每种器官的相对信号。

[0137] 图5:小鼠红细胞(RBC)在低渗溶液中溶血治疗之前(左图)和之后(右图)的相差显微图像。通过相差变化来验证RBC内部的内容物(血红蛋白)除去,这表明了RBC内的介质改变。

[0138] 图6:如通过动态光散射(DLS)测量的在RBC空胞衍生、5分钟声处理、400nm挤压以及100nm挤压后的RBC膜来源的囊泡的平均直径。

[0139] 图7:在72小时内PEG化的脂质-PLGA混杂的纳米颗粒(NP)中的DiD染料的荧光保留。

[0140] 图8:如通过DLS测量的在RBC膜涂覆之前(左)和之后(右)的PLGA纳米颗粒(NP)的平均粒径。

[0141] 图9:RBCm遮掩(cloak)的NP的构造材料和制备过程的示意性图解。通过DLS测量RBC空胞、RBCm来源的囊泡、聚合物内核以及RBCm遮掩的NP的流体动力学大小。

[0142] 图10:在不同的初始药物输入下RBCm遮掩的NP中的阿霉素(DOX)负载产率。分别通过两种相异的负载机制将药物分子负荷到NP中:物理包封和化学偶联。

[0143] 图11:DOX负载的RBCm遮掩的NP的体外稳定性测试。通过化学偶联或物理包封将DOX负载到NP中。图11(A):DOX负载的RBCm遮掩的NP在PBS缓冲液中在粒度(直径,nm)和多分散性指数(PDI)方面的长期稳定性,所述粒度和多分散性指数在室温下监测持续7天的时间。图11(B):通过测量在560nm波长下的UV吸光度来评定DOX负载的RBCm遮掩的NP和裸露NP核(没有RBCm遮掩物)在100%FBS中的稳定性。

[0144] 图12(A):RBCm遮掩的NP和PEG化的NP的DOX释放概况。针对这些释放研究,对于化学偶联和物理包封而言NP内的初始DOX浓度分别为5wt%和1.8wt%。图12(B):对于物理包封系统,绘制药物释放百分比对时间的平方根的图,其使用扩散占主导的Higuchi模型产生了线性拟合。

[0145] 图13:针对从AML患者的外周血中建立的Kasumi-1细胞系的比较细胞毒性研究,其中正方形代表具有化学偶联的DOX的RBCm遮掩的NP,圆形代表具有物理包封的DOX的RBCm遮掩的NP,而三角形代表游离DOX。所有样品在MTT测定之前与Kasumi-1细胞一起孵育72小时(n=4)。

[0146] 图14:癌细胞膜遮掩的免疫刺激性纳米颗粒作为癌症治疗疫苗的示意性图解。

[0147] 图15:制备癌细胞膜遮掩的聚合物纳米颗粒的三步法的图解:合成佐剂负载的聚合物纳米颗粒、制造癌细胞膜来源的囊泡、以及使聚合物纳米颗粒与囊泡融合。

[0148] 图16:示意性图解了所提议的个体化癌症治疗疫苗的工作机制:(i)从个体患者的肿瘤中收集癌细胞,并且使用天然的癌细胞膜来包裹佐剂负载的纳米颗粒;(ii)未成熟的树突状细胞吸收这些免疫刺激性纳米颗粒并且因而触发它们成熟;(iii)成熟的树突状细胞将癌抗原递呈至细胞毒性T细胞,并且激活针对抗原的免疫应答;(iv)活化的细胞毒性T细胞破坏表达特异性癌抗原的肿瘤。

[0149] 图17a:TEM图像显示出癌细胞膜遮掩的PLGA纳米颗粒的核-壳结构。图17b:由DLS所测量的纳米颗粒直径。图17c:透析的癌细胞膜遮掩的纳米颗粒与全癌细胞相比的蛋白质和DNA含量的SDS-PAGE。图17d:去卷积荧光显微图像证明了膜材料与PLGA核的共同递送。用NBD染料(绿色)染色癌细胞膜,用DiD染料(红色)负载聚合物核并且用DAPI(蓝色)染色细胞核。

[0150] 图18(A):中和的PFT中的毒素纳米海绵的示意图。纳米海绵由基底支撑的RBC双层膜构成,PFT可以并入所述双层膜中。图18(B):α毒素存在下的单一纳米海绵的TEM可视化。用乙酸双氧铀负染色样品(比例尺=20nm)。图18(C):与α-毒素混合的纳米海绵的TEM可视化(比例尺=80nm)。

[0151] 图19(A):在与PBS、PEG化的PLGA纳米颗粒、PEG化的脂质体、RBC膜囊泡以及毒素纳米海绵溶液中制备的α-毒素一起孵育30分钟后的离心的RBC。在最后体积为2mL的PBS中,每个管含有5%纯化的RBC、3μgα毒素以及200μg对应的纳米制剂。图19(B):基于540nm处吸光度的RBC溶血的定量。图19(C):过滤与3μgα-毒素混合的200μg纳米制剂,并且通过SDS-PAGE分析毒素吸收。制备3μg未过滤的α-毒素作为参比。图19(D):亲脂性染料(DMPE-罗丹明(红色))与纳米制剂合并以便指明在与细胞一起孵育时膜材料的分布。与人脐静脉内皮细胞一起孵育1h之后,染料的宽范围分布(左)表明膜囊泡有可能与细胞膜融合,并且与众不同的微粒(右)表明纳米海绵的膜材料被细胞内地吸收。图19(E):之前与纳米海绵混合或未混合下的不同量的α-毒素的溶血活性。总纳米海绵含量固定为200μg,并且在含有5%RBC的2mL PBS溶液中检验溶血作用。图19(F):用不同量的纳米海绵实现的对α-毒素溶血作用的抑制。总毒素含量固定为9μg,并且在含有5%RBC的2mL PBS溶液中检验溶血作用。

[0152] 图20:将150μL的12μg/mLα-毒素和由100μg纳米海绵中和的相同制剂皮下注射到小鼠的侧腹区域中。图20(A):注射之后3天,在注射毒素的小鼠上观察到代表性的皮肤损害。图20(B):纳米海绵中和的毒素注射未显示出对皮肤的可观察的作用。图20(C):组织学切片显现出毒素在表皮中造成可证实的炎性浸润、细胞凋亡、坏死以及水肿(比例尺=80μm)。图20(D):在注射纳米海绵中和的毒素之后,在表皮中没有观察到异常(比例尺=80μm)。图20(E):肌肉纤维撕裂、原纤维间水肿以及中性粒细胞从周围脉管系统外渗显现出毒素对肌肉的损坏(比例尺=20μm)。图20(F):正常肌肉纤维结构,并且无炎性病征表明毒素被纳米海绵中和(比例尺=20μm)。

[0153] 图21:静脉内注射75μg/kgα-毒素(黑色)后15天时间内的小鼠存活率;毒素注射之后(红色)或之前(蓝色)2分钟静脉内施用80mg/kg纳米海绵的小鼠存活率。使用时序检验获得p值。仅注射毒素的小鼠具有0%的存活率;之后接种纳米海绵的小鼠具有44%的存活率($p=0.0091$);预先接种纳米海绵的小鼠具有89%的存活率($p<0.0001$)。通过静脉内途径经由尾静脉进行所有的注射($n=9$)。

[0154] 图22:毒素纳米海绵的制备过程的示意图。

[0155] 图23:用于主动毒素免疫的膜涂覆的纳米颗粒的示意性图解。

[0156] 图24:在颈部区域皮下接种葡萄球菌α溶血素、加热变性的毒素或纳米颗粒中和的毒素的小鼠的代表性图像。接种后72小时,检验小鼠并且在颗粒/毒素接种的小鼠上没有观察到皮肤损害。

[0157] 图25:每周一次接种加热变性的毒素或纳米颗粒中和的毒素进行3次后,提取接种

的小鼠的血清并且使用ELIZA检测针对α溶血素的抗体滴度。纳米颗粒/毒素组显示出与加热变性的毒素组相等的抗体滴度。

[0158] 图26:通过首先将毒素与来自接种的小鼠的血清稀释物一起孵育来进行红细胞溶血作用测定。随后将混合物与RBC混合,并且检测溶血活性。来自纳米颗粒/毒素接种的小鼠的血清显示出毒素活性的显著抑制。

[0159] 图27:在经历毒素挑战之前,小鼠接种纳米颗粒中和的α溶血素每周一次进行三次,在毒素挑战中静脉内注射致死剂量的α溶血素。对非免疫的小鼠注射相同剂量的毒素作为对照。颗粒/毒素免疫的小鼠在72小时标记处显示出100%的存活率,然而非免疫的小鼠在6小时标记之后没有一个存活(n=10)。

[0160] 图28:用于毒素中和的膜涂覆的纳米颗粒的示意性图解。

[0161] 发明详述

[0162] 除非另外指明,否则本发明的实践将采用纳米技术、纳米工程学、分子生物学(包括重组技术)、微生物学、细胞生物学、生物化学、免疫学以及药理学的常规技术,所述技术属于本领域技能之内。以下文献中充分地解释了此类技术:如Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第2版(Sambrook等,1989);Oligonucleotide Synthesis(M.J.Gait编著,1984);Animal Cell Culture(R.I.Freshney编著,1987);Methods in Enzymology(Academic Press,Inc.);Current Protocols in Molecular Biology(F.M.Ausubel等编著,1987,以及定期更新内容);PCR:The Polymerase Chain Reaction(Mullis等编著,1994);以及Remington,The Science and Practice of Pharmacy,第20版,(Lippincott,Williams&Wilkins 2003)。

[0163] 除非另外定义,否则本文中使用的所有技术性和科学性术语具有与本发明所属领域中的普通技术人员通常所理解的相同的含义。本文中引用的所有专利、申请、公布的申请以及其它公布以引用的方式全部并入。如果在此小节中列出的定义与以引用的方式并入本文的专利、申请、公布的申请以及其它公布陈述的定义相反或以另外的方式不一致,那么相比以引用的方式并入本文的定义,在此小节中列出的定义占优势。

[0164] 为了促进理解本发明,本文中所使用的许多术语和缩写在下文定义如下:

[0165] 当介绍本发明或其优选实施方案的要素时,冠词“一个/种(a)”、“一个/种(an)”、“所述(the)”以及“所述(said)”旨在意指存在一个或多个要素。术语“包含”、“包括”以及“具有”旨在为包括性的并且意指除所列出的要素之外可以存在额外的要素。

[0166] 当在一系列两个或更多个事项中使用时,术语“和/或”意指任何一个所列出的事项可以单独或与所列出的事项中的任何一个或多个组合采用。例如,表述“A和/或B”旨在意指A和B之一或两者,即单独A、单独B或A与B组合。表述“A、B和/或C”旨在意指单独A、单独B、单独C、A与B组合、A与C组合、B与C组合或A、B与C组合。

[0167] 细胞膜:如本文中所使用的术语“细胞膜”是指在细胞或突发性病毒颗粒之内或周围充当选择性屏障的封闭或分隔结构的生物膜。细胞膜选择性地可透过离子和有机分子,并且控制物质运动进出细胞。细胞膜包含磷脂单层或双层和任选地相关的蛋白质和碳水化合物。如本文中所使用,细胞膜是指获自细胞或细胞器的天然存在的生物膜的膜,或源自于其的膜。如本文中所使用,术语“天然存在的”是指在自然中存在的膜。如本文中所使用,术语“源自于其”是指天然膜的任何后续修饰,如分离细胞膜、产生膜的部分或片段、从由细胞

或细胞器取得的膜中去除某些组分(如脂质、蛋白质或碳水化合物)和/或添加所述组分至所述膜中。可以通过任何适合的方法从天然存在的膜得到膜。例如,可以从细胞或病毒中制备或分离膜,并且所制备或分离的膜可以与其它物质或材料组合以便形成衍生的膜。在另一个实例中,细胞或病毒可以被重组工程化以便产生"非天然"物质,所述物质在体内并入所述细胞或病毒的膜中,并且细胞膜或病毒膜可以从细胞或病毒中制备或分离出以便形成衍生的膜。

[0168] 在不同实施方案中,覆盖单层或多层纳米颗粒的细胞膜可以进一步被修饰为其它脂质组分(如胆固醇、游离脂肪酸以及磷脂)饱和的或不饱和的,还可以包括内源的或添加的蛋白质和碳水化合物,如细胞表面抗原。在此类情况下,过量的其它脂质组分可以被添加至膜壁,直到膜壁中的浓度达到平衡所述膜壁才会脱落,这可以取决于纳米颗粒环境。膜还可以包含可能会或可能不会增加纳米颗粒活性的其它试剂。在其它实例中,官能团如抗体和适配体可以被添加至膜的外表面以便增强位点靶向至如癌细胞中发现的细胞表面表位。纳米颗粒的膜还可以包含颗粒,所述颗粒可以是生物可降解的阳离子纳米颗粒(包括但不限于金、银)和合成纳米颗粒。

[0169] 合成或人工的膜:如本文中所使用,术语"合成膜"或"人工膜"是指由有机材料如聚合物和液体以及无机材料生产的人造膜。各种各样的合成膜在本领域中是众所周知的。

[0170] 病毒膜:如本文中所使用,术语"源自病毒的膜"是指覆盖病毒的核酸或蛋白质衣壳的病毒包膜,并且通常含有源自宿主细胞膜的部分(磷脂和蛋白质)的细胞膜蛋白质并且包括一些病毒糖蛋白。病毒包膜与宿主的膜融合,从而允许衣壳和病毒基因组进入并且感染宿主。

[0171] 纳米颗粒:如本文中所使用的术语"纳米颗粒"是指至少一个尺寸(例如,高度、长度、宽度或直径)为约1nm与约10μm之间的纳米结构、颗粒、囊泡或其片段。对于全身性使用,平均直径为约50nm至约500nm、或100nm至250nm可以是优选的。术语"纳米结构"包括,但不必限于颗粒和工程化的特征。颗粒和工程化的特征可以具有例如规则的或不规则的形状。此类颗粒也被称为纳米颗粒。纳米颗粒可以由有机材料或其它材料组成,并且可以替代地用多孔颗粒实现。可以用呈单层形式的纳米颗粒或用具有纳米颗粒结块的层来实现纳米颗粒的层。如本文中所使用,纳米颗粒包括被外表面覆盖的内核,所述外表面包含如本文中所讨论的膜。本发明涵盖了现今已知的和后来开发的可以涂覆有本文中所描述的膜的任何纳米颗粒。

[0172] 药物活性的:如本文中所使用的术语"药物活性的"是指物质对活物并且具体是对人体的细胞和组织的有益生物活性。"药物活性剂"或"药物"是有药物活性的物质并且"药物活性成分"(API)是药物中有药物活性的物质。

[0173] 药学上可接受的:如本文中所使用的术语"药学上可接受的"意指除了安全用于动物并且更具体地用于人和/或非人哺乳动物的其它制剂之外,得到联邦或州政府管理机构批准或列于美国药典、其它公认的药典中。

[0174] 药学上可接受的盐:如本文中所使用的术语"药学上可接受的盐"是指化合物的酸加成盐或碱加成盐,如在本公开中的多药物偶联物。药学上可接受的盐是保留母体化合物的活性并且不对受试者造成任何有害或不良影响的任何盐,所述受试者是所述盐被施用至其并且在上下文中在其中施用所述盐的受试者。药学上可接受的盐可以源自氨基酸,包括

但不限于半胱氨酸。用于产生作为本领域普通技术人员已知的盐的化合物的方法(参见例如Stahl等,Handbook of Pharmaceutical Salts:Properties,Selection,and Use,Wiley-VCH;Verlag Helvetica Chimica Acta,Zürich,2002;Berge等,J Pharm.Sci.66:1,1977)。在一些实施方案中,"药学上可接受的盐"旨在意指本文中表示的化合物的游离酸或碱的盐,所述盐是非毒性的、生物可耐受的或以另外的方式为生物上适合于施用给受试者的。通常参见Berge等,J.Pharm.Sci.,1977,66,1-19。优选的药学上可接受的盐是药理学有效的并且适合于与受试者的组织接触而没有不当毒性、刺激或过敏反应的那些盐。本文中描述的化合物可以拥有足够酸性的基团、足够碱性的基团、这两种类型的官能团、或每种类型多于一种,并且相应地与许多无机或有机碱以及无机和有机酸进行反应以便形成药学上可接受的盐。

[0175] 药学上可接受的盐的实例包括硫酸盐、焦硫酸盐、硫酸氢盐、亚硫酸盐、亚硫酸氢盐、磷酸盐、磷酸一氢盐、磷酸二氢盐、偏磷酸盐、焦磷酸盐、氯化物、溴化物、碘化物、乙酸盐、丙酸盐、癸酸盐、辛酸盐、丙烯酸盐、甲酸盐、异丁酸盐、己酸盐、庚酸盐、丙炔酸盐、草酸盐、丙二酸盐、琥珀酸盐、辛二酸盐、癸二酸盐、富马酸盐、马来酸盐、丁炔-1,4-二酸盐、己炔-1,6-二酸盐、苯甲酸盐、氯苯甲酸盐、甲基苯甲酸盐、二硝基苯甲酸盐、羟基苯甲酸盐、甲氧基苯甲酸盐、邻苯二甲酸盐、磺酸盐、甲基磺酸盐、丙基磺酸盐、苯磺酸盐、二甲苯磺酸盐、萘-1-磺酸盐、萘-2-磺酸盐、苯乙酸盐、苯丙酸盐、苯丁酸盐、柠檬酸盐、乳酸盐、γ-羟基丁酸盐、乙醇酸盐、酒石酸盐以及扁桃酸盐。

[0176] 药学上可接受的载体:如本文中所使用的术语"药学上可接受的载体"是指化合物如多药物偶联物与其一起施用的赋形剂、稀释剂、防腐剂、增溶剂、乳化剂、佐剂和/或载体。此类载体可以是无菌的液体如水和油,包括石油、动物、植物或合成源的那些,如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等,聚乙二醇,甘油,丙二醇或其它合成溶剂。抗菌剂,如苄醇或对羟基苯甲酸甲酯;抗氧化剂,如抗坏血酸或亚硫酸氢钠;螯合剂,如乙二胺四乙酸;以及用于调节张力的试剂,如氯化钠或葡萄糖也可以是载体。用于产生组合物与载体的组合的方法是本领域普通技术人员所已知的。在一些实施方案中,语言"药学上可接受的载体"旨在包括与药物施用相容的任何和所有的溶剂、分散介质、涂层、等渗剂以及吸收延迟剂等。使用此类介质和试剂用于药物活性物质在本领域中是众所周知的。参见,例如Remington,The Science and Practice of Pharmacy,第20版,(Lippincott,Williams&Wilkins 2003)。除非任何常规的介质或试剂与活性化合物不相容,否则在组合物中的这种使用被涵盖在内。

[0177] 磷脂:如本文中所使用的术语"磷脂"是指含有甘油二酯、磷酸基团以及简单有机分子(如胆碱)的任何众多脂质。磷脂的实例包括但不限于磷脂酸(磷脂酸脂)(PA)、磷脂酰乙醇胺(脑磷脂)(PE)、磷脂酰胆碱(卵磷脂)(PC)、磷酯酰丝氨酸(PS)以及磷酸肌醇,所述磷酸肌醇包括但不限于磷脂酰肌醇(PI)、磷脂酰肌醇磷酸脂(PIP)、磷脂酰肌醇二磷酸脂(PIP2)以及脂酰肌醇三磷酸脂(PIP3)。PC的额外实例包括如本领域中所定义的DDPC、DLPC、DMPC、DPPC、DSPC、DOPC、POPC、DRPC以及DEPC。

[0178] 治疗有效量:如本文中所使用,术语"治疗有效量"是指当鉴于受试者的疾病或病状的性质和严重性向具体受试者施用时将会具有希望的治疗作用的那些量,例如将会治愈、预防、抑制或至少部分地阻止或部分地预防靶标疾病或病状的量。更具体的实施方案被包括在以下药物制剂和施用方法小节中。在一些实施方案中,术语"治疗有效量"或"有效

量”是指当单独或与额外的治疗剂组合施用于细胞、组织或受试者时有效预防或改善疾病或病状(如疾病或病状的感染或进展)的治疗剂的量。治疗有效剂量进一步是指足以导致改善症状(例如治疗、治愈、预防或改善相关医学病状)、或增加治疗、治愈、预防或改善此类病状的速率的治疗剂的量。当应用于单独施用的单独活性成分时,治疗有效剂量是指所述单独的成分。当应用于组合时,治疗有效剂量是指产生治疗作用的活性成分的组合的量,无论是组合地、连续地或是同时施用。

[0179] 疫苗:能够在患者中引发对特异性抗原的有益的主动或被动免疫应答的组合物。虽然可能希望保护性免疫,但是应理解的是各种水平的暂时免疫应答可以是有益的。

[0180] “治疗(treating)”或“治疗(treatment)”或“缓解”是指其中目的是减缓(减轻)而不是治愈靶向的病理病状或病症或预防病状的复发的治疗性治疗。如果在接受治疗量的治疗剂之后,受试者显示出可观察和/或可测量的具体疾病的一种或多种病征和症状的减少或消失,那么受试者被成功地“治疗”。患者也可以由感觉到疾病的病征或症状的减少。如果患者经历稳定的疾病,也可以认为患者被治疗。在一些实施方案中,用治疗剂进行的治疗有效地使患者的疾病在治疗之后3个月、优选地6个月、更优选地一年、甚至更优选地在治疗之后2年或更多年消失。用于评定对疾病的成功治疗和改进的这些参数易于通过本领域具有适当技能的医师所熟悉的常规程序来测量。

[0181] 术语“组合”是指一种剂量单位形式的固定组合或用于组合施用的部分的套件,其中化合物和组合搭档(例如,以下所解释的另一种药物,又称为“治疗剂”或“助剂”)可以同时独立地施用或在时间间隔内分开施用,尤其是这些时间间隔允许组合搭档显示出合作效应(例如,协同效应)的情况下。如本文中所使用的术语“共同施用”或“组合施用”等意指涵盖向有需要的单个受试者(例如,患者)施用所选择的组合搭档,并且旨在包括其中不必通过相同的施用途径或同时施用试剂的治疗方案。如本文中所使用的术语“药物组合”意指通过混合或组合多于一种活性成分得到的产品,并且包括活性成分的固定和非固定组合。术语“固定组合”意指活性成分例如化合物和组合搭档以单一实体或剂量的形式同时施用于患者。术语“非固定组合”意指活性成分例如化合物和组合搭档作为分开的实体同时、并发或循序地但没有具体时间限制地向施用于患者,其中这种施用在患者体内提供了治疗有效水平的两种化合物。后者还应用于鸡尾酒疗法,例如施用三种或更多种活性成分。

[0182] 应理解,本文中描述的本发明的方面和实施方案包括方面和实施方案、“由其组成”和/或“主要由其组成”。

[0183] 贯穿本公开,以范围形式呈现本发明的各方面。应当理解,范围形式的描述仅是为了方便和简洁的目的,并且不应当被解释为刻板地限制本发明的范围。因此,范围的描述应当被认为具有确切公开的所有可能的子范围以及所述范围内的单独数值。例如,如1至6的范围描述应当被认为具有确切公开的子范围,如1至3、1至4、1至5、2至4、2至6、3至6等等,以及所述范围内的单独数字,例如1、2、3、4、5以及6。不管范围的宽度,这都适用。

[0184] 通过结合附图的以下说明,本发明的其它目的、优点以及特征将变得清楚。

[0185] 本发明提供了新型纳米颗粒、其使用和制造方法。更确切地说,本发明的纳米颗粒包含a)内核,其包含非细胞物质;和b)外表面,其包含源自细胞的膜或源自病毒的膜。

[0186] 在某些实施方案中,本发明的纳米颗粒的内核支撑着外表面并且可以具有任何形状,包括但不限于球形、正方形、矩形、三角形、圆盘形、立方体样的形状、立方体、长方体(立

方形)、圆锥形、圆柱形、棱柱形、棱锥形、直角圆柱形以及其它规则或不规则的形状。在其它实施方案中,内核的非细胞物质包含生物相容的合成材料,包括但不限于:聚(乳酸-乙醇酸)共聚物、聚乳酸、聚乙醇酸、聚己酸内酯、聚赖氨酸、聚谷氨酸以及任何其它适合的合成材料或类似材料。

[0187] 在某些实施方案中,本发明的纳米颗粒的外表面的膜包含天然存在的细胞膜,所述细胞膜源自任何单细胞有机体(例如细菌或真菌)或多细胞有机体(例如植物、动物、非人哺乳动物或人)的细胞的质膜。天然存在的细胞质膜维持膜的天然结构完整性和活性。例如,脂质双层结构和包埋在其中的至少一些相关的膜蛋白是完整的,这样使得膜包封大致上对膜源自于其的物种或受试者缺乏免疫原性。

[0188] 在某些实施方案中,细胞包括但不限于:血细胞,如红细胞(RBC)、白细胞(WBC)以及血小板;免疫细胞,如巨噬细胞、单核细胞、B细胞以及T细胞;肿瘤细胞或癌细胞;以及其它细胞,如上皮细胞、内皮细胞以及神经细胞。在其它实施方案中,外表面的膜源自非终末分化的细胞或多能干细胞,如造血干细胞、骨髓干细胞、间充质干细胞、心脏干细胞或神经干细胞。在另外的其它实施方案中,细胞膜源自细胞组分,包括但不限于外来体、分泌囊泡或突触囊泡。在某些实施方案中,本发明的纳米颗粒的外表面进一步包含合成膜或合成组分连同天然衍生的膜。

[0189] 根据本发明的膜可以通过本文中描述的和本领域中已知的方法获得和组装,例如,参见Desilets等,Anticancer Res.21:1741-47;Lund等,J Proteome Res 2009,8(6),3078-3090;Graham,Methods Mol Biol 1993,19,97-108;Vayro等,Biochem J 1991,279(Pt 3),843-848;Navas等,Cancer Res 1989,49(8),2147-2156;Henon等,C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D 1977,285(1),121-122;以及Boone等,J Cell Biol 1969,41(2),378-392),所述文献的全部内容以引用的方式并入本文。

[0190] 本发明进一步提供了本发明的纳米颗粒包含可释放的货物,所述可释放的货物可以位于纳米颗粒的内部或表面上的任何地方。在某些实施方案中,可释放的货物位于本发明的纳米颗粒的内核之内或之上。在其它实施方案中,可释放的货物位于本发明的纳米颗粒的内核与外表面之间。在另外的其它实施方案中,可释放的货物位于本发明的纳米颗粒的外表面之内或之上。用于使可释放的货物从本发明的纳米颗粒中释放出来的触发原因包括但不限于纳米颗粒与靶细胞、组织、器官或受试者之间的接触,或纳米颗粒周围的环境参数变化,如pH、离子状态、温度、压力以及其它物理或化学变化。

[0191] 在某些实施方案中,可释放的货物包含一种或多种治疗剂、预防剂、诊断剂或标记试剂、预后剂或其组合。治疗剂的实例包括但不限于:抗生素、抗微生物剂、生长因子、化学治疗剂或其组合。示例性的诊断剂或预后剂可以是成像标志物。在另外的某些其它实施方案中,可释放的货物是金属颗粒,包括金颗粒、银颗粒或氧化铁颗粒。在其它实施方案中,可释放的货物是聚合物颗粒,包括聚(乳酸-乙醇酸)共聚物(PCL)颗粒、壳聚糖颗粒、羟丙基甲基丙烯酰胺共聚物(HPMA)颗粒。在其它实施方案中,可释放的货物是树状聚合物颗粒或无机颗粒,包括二氧化硅颗粒、多孔二氧化硅颗粒、磷酸钙颗粒或量子点;或金属颗粒,包括金颗粒、银颗粒或氧化铁颗粒。

[0192] 本发明进一步提供了本发明的纳米颗粒可以呈任何适合的形状,包括但不限于:球形、正方形、矩形、三角形、圆盘形、立方体样形状、立方体、长方体(立方形)、圆锥形、圆柱

形、棱柱形、棱锥形、直角圆柱形以及其它规则或不规则的形状，并且所述纳米颗粒的直径为约10nm至约10μm。在某些实施方案中，本发明的纳米颗粒的直径为约50nm至约500nm。

[0193] 本发明进一步提供了纳米颗粒可以大致上缺乏细胞膜源自于其的细胞的成分或病毒膜源自于其的病毒的成分。在某些实施方案中，本发明的纳米颗粒大致上缺乏细胞膜源自于其的细胞的细胞质、细胞核和/或细胞器。在另外的某些实施方案中，本发明的纳米颗粒大致上维持了细胞膜、源自病毒的膜或细胞膜或病毒膜的成分的天然结构完整性或活性。细胞膜的结构完整性包括细胞膜、源自病毒的膜或细胞膜或病毒膜的成分的一级结构、二级结构、三级结构或四级结构，并且细胞膜的活性包括但不限于结合活性、受体活性、信号传导通路活性以及普通天然存在的细胞膜、源自病毒的膜或细胞膜或病毒膜的成分将会具有的任何其它活性。在某些实施方案中，本发明的纳米颗粒是生物相容的和/或生物可降解的。

[0194] 在某些实施方案中，本发明的纳米颗粒包含源自红细胞的细胞质膜和包含聚(乳酸-乙醇酸)共聚物(PLGA)的内核，其中纳米颗粒大致上缺乏血红蛋白并且在体内血液循环中的半衰期为涂覆有聚乙二醇(PEG)的具有聚(乳酸-乙醇酸)共聚物(PLGA)内核的纳米颗粒的半衰期的2至5倍。在某些实施方案中，这种纳米颗粒在体内血液循环中的半衰期为至少约5小时至约40小时。

[0195] 本发明还提供了一种包含药物递送系统的药物组合物，所述药物递送系统包含有效量的本发明的纳米颗粒。在某些实施方案中，本发明的药物组合物进一步包含一种或多种额外的活性成分，具有或不具有医学上或药学上可接受的载体或赋形剂，所述载体或赋形剂可以与本发明的纳米颗粒一起或组合施用。

[0196] 在某些实施方案中，本发明的药物组合物是包含纳米颗粒的肿瘤特异性免疫原性组合物，所述纳米颗粒涂覆有源自癌细胞(如良性肿瘤细胞、潜在恶性肿瘤细胞、受试者的肿瘤细胞或癌细胞或细胞系)的细胞膜，具有结构完整性用于引发对肿瘤或癌细胞的免疫应答。在其它实施方案中，本发明的药物组合物是包含肿瘤特异性免疫原性组合物的癌症疫苗。

[0197] 在其它实施方案中，本发明的药物组合物包含纳米颗粒，所述纳米颗粒包含插入细胞膜的毒素，其中纳米颗粒的外表面的细胞膜源自靶细胞或细胞组分或细胞内组分，并且保留细菌、真菌以及动物源的毒素。在某些实施方案中，靶细胞包括但不限于：血细胞，如红细胞(RBC)、白细胞(WBC)以及血小板；免疫细胞，如巨噬细胞、单核细胞、B细胞以及T细胞；肿瘤或癌细胞；以及其它细胞，如上皮细胞、内皮细胞以及神经细胞；或非终末分化的或多能干细胞，如造血干细胞、骨髓干细胞、间充质干细胞、心脏干细胞或神经干细胞。在某些实施方案中，靶细胞是红细胞。在其它实施方案中，细胞内组分包括但不限于外来体、分泌囊泡或突触囊泡。在某些实施方案中，药物组合物是免疫原性组合物，其包含在外表面上涂覆细胞膜的纳米颗粒，所述细胞膜保留结构完整性用于保留毒素或用于引发对天然毒素的免疫应答。在其它实施方案中，本发明的药物组合物是包含免疫原性组合物的疫苗。

[0198] 包含本发明的纳米颗粒的本发明的药物组合物或药物递送系统可以经由任何适合的施用途径来施用，所述施用途径包括但不限于口服、经鼻、吸入、亲本、静脉内、腹膜内、皮下、肌肉内、皮内、局部或直肠途径。

[0199] 本发明进一步提供了一种用于引发对有需要的受试者的靶细胞的免疫应答的方

法。本发明的方法包括向有需要的受试者施用有效量的包含本发明的纳米颗粒的药物组合物或药物递送系统，其中所施用的纳米颗粒的细胞膜大致上保留结构完整性用于引发对靶细胞的免疫应答。如本文中所使用，靶细胞是指任何适合的细胞，包括但不限于：血细胞(例如RBC、WBC或血小板)、免疫细胞(例如B细胞、T细胞、巨噬细胞或单核细胞)、肿瘤细胞或癌细胞(例如良性肿瘤细胞、恶性肿瘤细胞)或干细胞(例如造血干细胞、骨髓干细胞、间充质干细胞、心脏干细胞或神经干细胞)。在某些实施方案中，靶细胞是红细胞。在其它实施方案中，靶细胞是肿瘤或癌细胞。在某些实施方案中，免疫应答是主动的免疫应答。在其它实施方案中，免疫应答是被动的免疫应答。在另外的其它实施方案中，免疫应答是保护性疫苗接种。在某些实施方案中，疫苗接种是肿瘤或癌症特异性疫苗接种。

[0200] 本发明进一步提供了一种用于在有需要的受试者中引发针对插入细胞膜的毒素的免疫应答的方法。本发明的方法包括向有需要的受试者施用有效量的包含本发明的纳米颗粒的药物组合物或药物递送系统，其中纳米颗粒的细胞膜保留结合用于递送至靶细胞的毒素和毒素的天然结构完整性以便引发针对靶细胞的免疫应答。在某些实施方案中，靶细胞是红细胞，并且毒素是细菌、真菌或动物毒素。在某些实施方案中，免疫应答是主动的免疫应答。在其它实施方案中，免疫应答是被动的免疫应答。在另外的其它实施方案中，免疫应答是保护性疫苗接种。

[0201] 本发明进一步提供了本发明的方法可以用于在有需要的受试者中治疗或预防疾病、病症或病状，所述疾病或病状包括但不限于：传染病；寄生虫病；肿瘤；血液和造血器官的疾病；涉及免疫机制的病症；内分泌、营养以及代谢疾病；精神和行为病症；神经系统疾病；眼睛及附件疾病；耳朵和乳突疾病；循环系统疾病；呼吸系统疾病；消化系统疾病；皮肤和皮下组织疾病；肌骨骼系统和结缔组织疾病；生殖泌尿系统、妊娠、分娩以及产后疾病；来源于产期的病状；先天性畸形；变形；染色体异常；损伤；中毒；外因所致的结果以及发病和死亡的外因。

[0202] 在某些实施方案中，本发明的方法用于治疗或预防由病原微生物(如细菌、病毒、寄生虫或真菌)引起的传染病。在其它实施方案中，本发明的方法用于治疗或预防癌症或肿瘤病状。如本文中所使用，有需要的受试者是指动物、非人哺乳动物或人。如本文中所使用，“动物”包括宠物、农场动物、经济动物、运动动物以及实验动物，如猫、狗、马、母牛、公牛、猪、驴、绵羊、羊羔、山羊、小鼠、兔、鸡、鸭、鹅、灵长类动物(包括猴和黑猩猩)。在某些实施方案中，用于本发明的方法的纳米颗粒的细胞膜源自受试者的相同物种的细胞。在某些实施方案中，用于本发明的方法的纳米颗粒的细胞膜源自受试者的相同物种的红细胞，并且红细胞与受试者的血型相同。在某些实施方案中，在本发明的方法中使用的纳米颗粒的细胞膜源自受试者的细胞。

[0203] 本发明进一步提供了用于引发对有需要的受试者的靶细胞的免疫应答或治疗或预防疾病、病症或病状的本发明的方法进一步包括将一种或多种其它的活性成分(具有或不具有药学上可接受的载体)与包含本发明的纳米颗粒的药物组合物或药物递送系统一起或组合施用于有需要的受试者。本发明的方法进一步提供了向有需要的受试者的靶部位施用本发明的纳米颗粒，所述靶部位包括但不限于：靶皮肤部分、血液或血浆、靶器官、靶肿瘤部位或靶细胞，并且进一步提供了触发可释放的货物在靶部位处释放的机制。用于触发可释放的货物的机制包括但不限于：本发明的纳米颗粒与靶细胞、组织、器官或受试者之间的

接触，或本发明的纳米颗粒周围的环境参数变化，如pH、离子状态、温度、压力以及其它物理或化学变化。

[0204] 本发明进一步提供了一种用于制造纳米颗粒以及其包含纳米颗粒的药物组合物或药物递送系统的方法。制造纳米颗粒的这种本发明的方法包括：a)组合内核和外表面，所述内核包含非细胞物质，所述外表面包含源自细胞或病毒的膜，并且任选地合成膜；和b)对组合施加外源能量以便形成纳米颗粒，其中内核支撑着外表面。在某些实施方案中，外源能量是由挤压所施加的机械能。在其它实施方案中，外源能量是由声处理所施加的声能。在另外的其它实施方案中，外源能量是由加热所施加的热能。本发明的方法涵盖了现今存在或后来开发的用于形成纳米颗粒的任何其它适合的外源能量递送系统。

[0205] 癌症特异性免疫原性组合物或疫苗

[0206] 本发明提供了一种包含有效量的纳米颗粒的肿瘤特异性免疫原性组合物，所述纳米颗粒包括内核和外表面，所述内核包含非细胞物质，所述外表面包含源自肿瘤细胞的细胞膜以及任选地合成膜。在某些实施方案中，细胞膜源自良性肿瘤细胞、潜在恶性肿瘤细胞或癌细胞。在某些实施方案中，细胞膜源自癌细胞系。在其它实施方案中，细胞膜源自受试者的癌细胞。本发明的肿瘤特异性免疫原性组合物可以进一步提供：纳米颗粒的外表面中的细胞膜大致上保留其结构完整性用于引发对肿瘤细胞的免疫应答。如本文中所使用，结构完整性包括细胞膜或其成分的一级结构、二级结构、三级结构或四级结构。

[0207] 在某些实施方案中，内核包含生物相容的或合成的材料，并且支撑着纳米颗粒的外表面。内核材料的实例包括但不限于：聚(乳酸-乙醇酸)共聚物(PLGA)、聚乳酸(PLA)、聚乙醇酸(PGA)、聚己酸内酯(PCL)、聚赖氨酸、聚谷氨酸以及可以用于此目的的现今已知的或后来开发的任何其它合成材料或类似材料。在某些实施方案中，内核包含PLGA并且外表面包含源自肿瘤细胞的质膜。

[0208] 在某些实施方案中，本发明的肿瘤特异性免疫原性组合物包含纳米颗粒，所述纳米颗粒进一步包含一种或多种活性成分或可释放的货物，并且所述纳米颗粒可以呈任何形状，包括但不限于球形、正方形、矩形、三角形、圆盘形、立方体样的形状、立方体、长方体(立方形)、圆锥形、圆柱形、棱柱形、棱锥形、直角圆柱形以及其它规则或不规则的形状。纳米颗粒的直径可以为约10nm至约10μm。在某些实施方案中，肿瘤特异性免疫原性组合物中的纳米颗粒的直径为约10nm、20nm、30nm、40nm、50nm、60nm、70nm、80nm、90nm、100nm、110nm、120nm、130nm、140nm、150nm、200nm、300nm、400nm、500nm、600nm、700nm、800nm、900nm、1μm、2μm、3μm、4μm、5μm、6μm、7μm、8μm、9μm以及10μm。在某些实施方案中，肿瘤特异性免疫原性组合物中的纳米颗粒大致上缺乏细胞膜源自于其的肿瘤细胞的成分。

[0209] 本发明进一步提供了肿瘤特异性免疫原性组合物进一步包含免疫原性佐剂或免疫增强剂。如本文中所使用，“免疫原性佐剂”是可以诱导和/或增强针对抗原的免疫应答的物质或组合物。如本文中所使用，“免疫增强剂”是指在接种时增强免疫应答的试剂。本发明涵盖了现今已知或后来开发的任何适合的免疫原性佐剂或免疫增强剂，并且与本发明的纳米颗粒一起或组合使用的免疫原性佐剂或免疫增强剂的类型受到具体地限制。示例性的免疫原性佐剂可以是弗氏完全佐剂，所述弗氏完全佐剂是轻矿物油、Arlacel去污剂以及灭活的结核分枝杆菌的混合物。示例性的免疫增强剂包括卡介苗(Bacille Calmette-Guerin)(BCG)、短棒状杆菌(Corynebacterium Parvum)、流产布鲁氏菌(Brucella abortus)提取

物、葡聚糖、左旋咪唑、替洛隆(tilorone)、酶以及非毒性病毒。

[0210] 本发明进一步提供了含有前面提到的肿瘤特异性免疫原性组合物和抗原的疫苗。在某些实施方案中，抗原由选自由以下各项组成的组的一种或两种或更多种抗原组成：肿瘤组织、肿瘤细胞、肿瘤细胞成分、肿瘤抗原蛋白以及肿瘤抗原肽，并且所述抗原用于肿瘤的预防性和/或治疗性治疗。如果外来蛋白用作抗原，用前面提到的肿瘤特异性免疫原性组合物可以有效地在非人的哺乳动物中产生针对所述抗原的抗体。因此，本发明提供了产生抗体的动物和产生抗体的细胞或源自产生抗体的动物的抗体基因。因此，本发明提供了一种肿瘤疫苗，所述肿瘤疫苗包含前面提到的肿瘤特异性免疫原性组合物用于施用到受试者(包括人)的肿瘤组织中，以便在哺乳动物的活体中诱导抗肿瘤免疫应答。

[0211] 本发明进一步提供了一种用于诱导全身性或抗肿瘤的免疫应答，由此得以在受试者中治疗或预防肿瘤的方法，所述方法包括向有需要的受试者施用有效量的前面提到的肿瘤特异性免疫原性组合物或来自其的疫苗的步骤，其中前面提到的肿瘤特异性免疫原性组合物或疫苗中的纳米颗粒的外表面的细胞膜大致上保留其结构完整性用于引发对肿瘤细胞的免疫应答。如本文中所使用，免疫应答可以是T细胞介导的免疫应答、和/或B细胞介导的免疫应答。如本文中所使用，肿瘤是指良性肿瘤、潜在恶性肿瘤或癌症。在某些实施方案中，肿瘤是癌症，并且可以通过本发明的方法治疗或预防的癌症的类型不受限制。

[0212] 在某些实施方案中，前面提到的肿瘤特异性免疫原性组合物或疫苗中的纳米颗粒的外表面的细胞膜源自受试者的相同或不同物种的或相同或不同的受试者的癌细胞系、或癌细胞。如本文中所使用，“受试者”是指非人哺乳动物、动物或人。

[0213] 本发明进一步提供了将一种或多种其它活性成分(具有或不具有药学上可接受的载体或赋形剂)与前面提到的肿瘤特异性免疫原性组合物或疫苗一起或组合施用于有需要的受试者。本发明的肿瘤特异性免疫原性组合物或疫苗以及其它活性成分可以经由任何适合的施用途径单独或组合施用，所述施用途径包括但不限于：口服、经鼻、吸入、亲本、静脉内、腹膜内、皮下、肌肉内、皮内、局部或直肠途径。在某些实施方案中，本发明的肿瘤特异性免疫原性组合物或疫苗以及其它活性成分经由药物递送系统施用于有需要的受试者。本文中所使用的施用途径的类型或其它活性成分的类型不受具体限制。

[0214] 与插入细胞膜的毒素相关的疾病或病状的治疗

[0215] 本发明提供了一种用于治疗或预防与插入细胞膜的毒素相关的疾病或病状的药物组合物，所述药物组合物包含有效量的纳米颗粒，所述纳米颗粒包括内核和外表面，所述内核包含非细胞物质，所述外表面包含源自靶细胞的细胞膜以及任选地合成膜。在某些实施方案中，内核支撑着外表面并且包含生物相容的或合成的材料。生物相容的或合成的材料的实例包括但不限于：聚(乳酸-乙醇酸)共聚物(PLGA)、聚乳酸(PLA)、聚乙醇酸(PGA)、聚己酸内酯(PCL)、聚赖氨酸、聚谷氨酸以及任何其它适合的生物相容的或合成的材料。本发明涵盖了现今已知的或后来开发的可以用于纳米颗粒的内核中的任何生物相容的或合成的材料，并且此类材料的类型不受具体限制。

[0216] 在某些实施方案中，细胞膜是源自红细胞的质膜，并且其中纳米颗粒的外表面中的细胞膜或质膜大致上保留其结构完整性用于大致上保留毒素。在某些实施方案中，作为自然病理机制的一部分，毒素插入到靶细胞的细胞膜或质膜中。

[0217] 如本文中所使用，“毒素”是指植物、动物、微生物(包括但不限于细菌、病毒、真菌、

立克次体或原生动物)的有毒物质或产物;或传染性物质;或重组或合成的分子,无论它们的起源和产生方法如何。在某些实施方案中,“毒素”包括在活细胞或有机体内产生的细菌、真菌或动物的毒素。

[0218] 在某些实施方案中,细菌毒素包括外毒素和内毒素。如本文中所使用,“外毒素”由细菌产生并且主动分泌,而“内毒素”是细菌本身的一部分(例如,细菌外膜),并且不被释放出来直到细菌被免疫系统杀死为止。本发明涵盖了现今已知的和后来发现的任何外毒素和内毒素。插入在细胞膜中的细菌毒素的类型不受具体限制。在某些实施方案中,细菌毒素是来自金黄色葡萄球菌的插入细胞膜的毒素,如α-溶血素。

[0219] 本发明进一步涵盖了现今已知的和后来发现的任何真菌毒素,包括但不限于:黄曲霉毒素、橘霉素、麦角胺、伏马菌素(fumonisin)、麦角缬氨酸、赭曲毒素、拟茎点霉素、根霉菌胺、甚孢菌素、单端孢菌烯毒素(例如葡萄穗霉毒素、脱氧雪腐镰刀菌烯醇)、玉米烯酮。插入在细胞膜中的真菌毒素的类型不受具体限制。

[0220] 本发明中涵盖的动物毒素包括由动物产生的任何有毒物质。动物毒素的实例包括但不限于心血管毒素、胃肠毒素、呼吸毒素、神经性毒素、肾脏/器官衰竭毒素。本发明涵盖现今已知的和后来发现的任何动物毒素,并且插入在细胞膜中的动物毒素的类型不受具体限制。在某些实施方案中,插入到细胞膜中的动物毒素来自节肢动物,如昆虫纲、蛛形纲以及甲壳纲;或爬行动物,如鳄目、喙头目、有鳞目(包括蜥蜴和蛇)以及龟鳖目。

[0221] 在某些实施方案中,本发明的用于治疗或预防与插入细胞膜的毒素相关的疾病或病状的药物组合物包含纳米颗粒,所述纳米颗粒进一步包含一种或多种其它活性成分或可释放的货物,具有或不具有药学上可接受的载体或赋形剂。包含在所述药物组合物中的纳米颗粒是生物可降解的,并且可以呈任何形状,包括但不限于:球形、正方形、矩形、三角形、圆盘形、立方体样的形状、立方体、长方体(立方形)、圆锥形、圆柱形、棱柱形、棱锥形、直角圆柱形以及其它规则或不规则的形状。纳米颗粒的直径可以为约10nm至约10μm。在某些实施方案中,肿瘤特异性免疫原性组合物中的纳米颗粒的直径为约10nm、20nm、30nm、40nm、50nm、60nm、70nm、80nm、90nm、100nm、110nm、120nm、130nm、140nm、150nm、200nm、300nm、400nm、500nm、600nm、700nm、800nm、900nm、1μm、2μm、3μm、4μm、5μm、6μm、7μm、8μm、9μm以及10μm。

[0222] 本发明进一步提供了一种在受试者中治疗或预防与插入细胞膜的毒素相关的疾病或病状的方法,所述方法包括向有此治疗或预防需要的受试者施用有效量的前面提到的药物组合物。如本文中所使用,“受试者”是指非人哺乳动物、动物或人。在某些实施方案中,前面提到的药物组合物中的纳米颗粒的外表面的细胞膜源自受试者的相同物种的细胞。在某些实施方案中,质膜源自受试者的相同物种的红细胞,并且RBC与受试者的血型相同。在其它实施方案中,细胞膜或质膜源自受试者的细胞。

[0223] 本发明进一步提供了将一种或多种其它活性成分(具有或不具有药学上可接受的载体或赋形剂)与前面提到的药物组合物一起或组合施用于有需要的受试者。本发明的前面提到的药物组合物以及其它活性成分可以经由任何适合的施用途径单独或组合施用,所述施用途径包括但不限于:口服、经鼻、吸入、亲本、静脉内、腹膜内、皮下、肌肉内、皮内、局部或直肠途径。在某些实施方案中,本发明的前面提到的药物组合物以及其它活性成分经由药物递送系统施用于有需要的受试者。本文中所使用的施用途径的类型或其它活性成分

的类型不受具体限制。

[0224] 用于与插入细胞膜的毒素相关的疾病或病状的疫苗

[0225] 本发明提供了一种免疫原性组合物，所述免疫原性组合物包含有效量的纳米颗粒，所述纳米颗粒包括内核和外表面，所述内核包含非细胞物质，所述外表面包含源自细胞的细胞膜和插入细胞膜的毒素以及任选地合成膜。在某些实施方案中，内核支撑着外表面并且包含生物相容的或合成的材料。生物相容的或合成的材料的实例包括但不限于：聚(乳酸-乙醇酸)共聚物(PLGA)、聚乳酸(PLA)、聚乙醇酸(PGA)、聚己酸内酯(PCL)、聚赖氨酸、聚谷氨酸以及任何其它适合的生物相容的或合成的材料。本发明涵盖了现今已知的或后来开发的可以用于纳米颗粒的内核中的任何生物相容的或合成的材料，并且此类材料的类型不受具体限制。

[0226] 在某些实施方案中，细胞膜是源自细胞(如红细胞)的质膜，并且其中纳米颗粒的外表面中的细胞膜或质膜大致上保留其结构完整性用于大致上保留毒素或用于引发对天然毒素的免疫应答。如本文中所使用，毒素的结构完整性包括结合至靶细胞的毒素的一级结构、二级结构、三级结构和/或四级结构。在某些实施方案中，作为自然病理的一部分，毒素插入到靶细胞的细胞膜或质膜中。以上充分地描述了“毒素”的定义和类型。在某些实施方案中，前面提到的免疫原性组合物中的纳米颗粒是生物可降解的。

[0227] 在某些实施方案中，本发明的免疫原性组合物包含纳米颗粒，所述纳米颗粒进一步包含一种或多种活性成分或可释放的货物，并且所述纳米颗粒可以呈任何形状，包括但不限于球形、正方形、矩形、三角形、圆盘形、立方体样的形状、立方体、长方体(立方形)、圆锥形、圆柱形、棱柱形、棱锥形、直角圆柱形以及其它规则或不规则的形状。纳米颗粒的直径为约10nm至约10μm。在某些实施方案中，肿瘤特异性免疫原性组合物中的纳米颗粒的直径为约10nm、20nm、30nm、40nm、50nm、60nm、70nm、80nm、90nm、100nm、110nm、120nm、130nm、140nm、150nm、200nm、300nm、400nm、500nm、600nm、700nm、800nm、900nm、1μm、2μm、3μm、4μm、5μm、6μm、7μm、8μm、9μm以及10μm。在某些实施方案中，免疫原性组合物中的纳米颗粒大致上缺乏细胞膜源自于其的细胞的成分。

[0228] 本发明进一步提供到免疫原性组合物进一步包含免疫原性佐剂或免疫增强剂。以上充分地描述了免疫原性佐剂或免疫增强剂的定义和类型。本发明涵盖了现今已知或后来开发的任何适合的免疫原性佐剂或免疫增强剂，并且与本发明的纳米颗粒一起或组合使用的免疫原性佐剂或免疫增强剂的类型不受具体限制。

[0229] 本发明进一步提供了一种含有前面提到的免疫原性组合物的疫苗。在此实施方案中，插入细胞膜的毒素用作抗原，用前面提到的免疫原性组合物可以有效地在非人的哺乳动物中产生针对插入细胞膜的毒素的抗体。因此，本发明提供了产生抗体的动物和产生抗体的细胞或源自产生抗体的动物的抗体基因。因此，本发明提供了一种疫苗，所述疫苗包含前面提到的免疫原性组合物用于施用到受试者(包括人)的靶组织中，以便在哺乳动物的活体中诱导免疫应答。

[0230] 本发明进一步提供了一种用于诱导全身性或抗疾病的免疫应答，由此得以在受试者中治疗或预防靶标疾病的方法，所述方法包括向有需要的受试者施用有效量的前面提到的免疫原性组合物或来自其的疫苗的步骤，其中前面提到的免疫原性组合物或疫苗中的纳米颗粒的外表面的细胞膜大致上保留其结构完整性用于引发对靶标疾病细胞的免疫应答。

如本文中所使用，免疫应答是T-细胞介导的免疫应答、B-细胞介导的免疫应答。本发明涵盖任何疾病、病症或生理性或病理性病状，包括但不限于：传染病；寄生虫病；肿瘤；血液和造血器官疾病；涉及免疫机制的病症；内分泌、营养以及代谢疾病；精神和行为病症；神经系统疾病；眼睛及附件疾病；耳朵和乳突疾病；循环系统疾病；呼吸系统疾病；消化系统疾病；皮肤和皮下组织疾病；肌骨骼系统和结缔组织疾病；生殖泌尿系统、妊娠、分娩以及产后疾病；来源于产期的病状；先天性畸形；变形；染色体异常；损伤；中毒；外因所致的结果以及发病和死亡的外因。

[0231] 在某些实施方案中，前面提到的免疫原性组合物或疫苗中的纳米颗粒的外表面的细胞膜源自受试者的相同或不同物种的、或相同或不同受试者的细胞系、或疾病细胞。如本文中所使用，“受试者”是指非人哺乳动物、动物或人。

[0232] 本发明进一步提供了将一种或多种其它活性成分(具有或不具有药学上可接受的载体或赋形剂)与前面提到的免疫原性组合物或疫苗一起或组合施用于有需要的受试者。本发明的前面提到的免疫原性组合物或疫苗以及其它活性成分可以经由任何适合的施用途径单独或组合施用，所述施用途径包括但不限于：口服、经鼻、吸入、亲本、静脉内、腹膜内、皮下、肌肉内、皮内、局部或直肠途径。在某些实施方案中，本发明的免疫原性组合物或疫苗以及其它活性成分经由药物递送系统施用于有需要的受试者。本文中所使用的施用途径的类型或其它活性成分的类型不受具体限制。

实施例

[0233] 根据下列实施例可以进一步理解本教义的方面，所述实施例不应当被解释为以任何方式限制本教义的范围。本文中描述的一些实施例还被描述在Hu等，PNAS，108(27)：10980-10985(2011)中，所述文献的内容以引用的方式全部并入。

[0234] 实施例1

[0235] 作为仿生递送平台的红细胞膜伪装的聚合物纳米颗粒

[0236] 通过挤压聚(乳酸-乙醇酸)共聚物(PLGA)颗粒与预先形成的RBC膜来源的囊泡，发明人用包括脂质和对应的表面蛋白的双层RBC膜涂覆亚100nm的聚合物颗粒。此方法目的在于用红细胞外部伪装纳米颗粒表面用于长循环，同时保留聚合物核的适用性。发明人报道了此仿生纳米颗粒递送平台的物理特征、物理化学特性、蛋白质含量、药物代谢动力学以及生物分布。

[0237] RBC膜涂覆的纳米颗粒的制备过程分为两个部分：由RBC得到膜囊泡和囊泡-颗粒融合(图1)。RBC膜囊泡的衍生遵循先前报道的方法并稍作修改(13)。简单地说，首先通过离心和PBS洗涤从来自查尔斯河实验室(Charles River Laboratories)(Wilmington,MA)的雄性ICR小鼠(6至8周)的新鲜血液中提纯RBC。然后在低渗环境下使分离的RBC经历膜破裂，以便去除其细胞内内容物。接下来，洗涤掏空的RBC，并且通过100nm多孔膜挤压以便产生RBC膜来源的囊泡。为了合成RBC膜伪装的聚合物纳米颗粒，首先使用溶剂置换方法由0.67dL/g羧基封端的PLGA聚合物制备直径为约70nm的PLGA颗粒(14)。

[0238] 随后，通过机械挤压使所得到的PLGA纳米颗粒与RBC膜来源的囊泡融合。基于对PLGA聚合物密度、纳米粒度、红细胞脂质含量以及脂质分子的估算投影面积的计算，将每毫克的PLGA纳米颗粒与源自1mL血液的囊泡混合用于完全的颗粒涂覆。通过具有100nm孔隙的

装置，物理挤压混合物。机械力促进亚100nm的PLGA纳米颗粒穿过脂质双层，从而致使囊泡-颗粒融合。反复穿过挤压机克服了先前报道的关于脂质体-颗粒融合的问题，如宽泛的粒度分布、不完全的颗粒涂覆以及不一致的脂质壳(15)。还应当指出，贯穿整个制备过程，保留RBC膜的双层结构以便使膜蛋白的损失和损坏减到最小。

[0239] 为了表征RBC膜涂覆的PLGA纳米颗粒，首先用乙酸双氧铀负染色颗粒，并且然后使用透射电子显微镜(TEM)来观察(图2A)。所得到的图像显现出在脂质双层涂覆的聚合物颗粒中所预期的核-壳结构。粒度为约80nm并且符合由动态光散射(DLS)测量的动力学直径。仔细检验揭示聚合物核的直径为约70nm并且外部脂质壳的厚度为7nm至8nm。脂质层的厚度与所报道的RBC的膜宽度一致(16)，这表明膜成功转位至聚合物颗粒表面。

[0240] 为了检验所得到的模拟RBC的纳米颗粒的长期稳定性，将它们悬浮在1mg/mL浓度的1X PBS中，并且然后通过DLS监测粒度、多分散性指数(PDI)以及ζ电势(图2B)。在两周的时间里，粒度从85nm增加至130nm，ζ电势从-10.2mV降低至-12.7mV，并且PDI相对相同保持在0.26。大小和ζ电势的变化很可能由颗粒溶液中少量多余的囊泡融合所引起。为了验证核-壳颗粒结构的完整性，在囊泡-颗粒融合之前，将疏水性DiD荧光团(激发/发射＝644nm/655nm)和亲脂性罗丹明-DMPE染料(激发/发射＝557nm/571nm)分别负载到聚合物核和RBC膜来源的囊泡中。将所得到的双荧光团标记的纳米颗粒与HeLa细胞一起孵育6小时，并且使用荧光显微镜来观察。在图2C中，各自对应于不同颗粒室的DiD(红色)和罗丹明-DMPE(绿色)在相同位置上重叠。此荧光共同定位表明在被细胞内在化之后，纳米颗粒的完整核-壳结构。

[0241] 结构研究之后，检验颗粒的蛋白质含量。用30nm多孔膜透析RBC膜涂覆的纳米颗粒持续24小时以便去除未结合的蛋白质，并且随后用十二烷基硫酸钠(SDS)处理以便使膜蛋白溶解。平行制备掏空的RBC和RBC膜来源的囊泡的样品作为比较。通过聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)进行的蛋白质分离表明：在整个颗粒合成中，膜蛋白的组成大部分得以保留并且可以在RBC膜涂覆的PLGA纳米颗粒上鉴别(图3A)。这个发现表明了双层细胞膜的转位还使相关的膜蛋白转移至纳米颗粒表面。因为固体PLGA核排除了蛋白质实体并且未结合的蛋白质通过透析被过滤掉，所以检测到的膜蛋白大多数可能固着在纳米颗粒周围的双层脂质膜中。所得到的含有蛋白质的脂质膜涂覆的颗粒可以比作充分研究的聚合物支撑的刨平脂质双层模型，所述模型已显示出保留膜相关的蛋白质的功能性(15)。然而，观察到蛋白质组成的微小变化，因为接近51kDa的带显著更弱。微弱的带很可能对应于与血影蛋白细胞骨架蛋白相关的外周膜蛋白，在机械挤压用于囊泡-颗粒融合的过程中所述外周膜蛋白失去，如可以通过约200kDa处的带消失所观察到的。

[0242] 然后发明人确定RBC膜涂覆的纳米颗粒的血清稳定性和体内循环半衰期。为了正确理解结果，设定为大小相似的裸露PLGA纳米颗粒(约75nm)和结构类似的PEG(Mw 2000)功能化的脂质-聚合物混杂纳米颗粒(约80nm)被分别用作阴性对照和阳性对照。对于血清稳定性测试，使用先前引用的吸光度方法来监测胎牛血清(FBS)存在情况下的粒度变化(17、18)。因为颗粒越多诱导光散射越高，所以可以通过监测吸光度值的增加来观察不稳定的颗粒的聚集。将每种类型的纳米颗粒悬浮在100％FBS中，最终纳米颗粒浓度为1mg/mL。所有的样品在37℃下孵育，并且在每次吸光度测量之前轻轻摇动。560nm处所测量的吸光度值表明RBC膜涂覆的纳米颗粒具有与PEG功能化的脂质-聚合物混杂纳米颗粒相等的血清稳定性，

因为在4小时内没有一个样品显示出任何可观察到的吸光度变化(图3B)。相比之下,裸露PLGA纳米颗粒显示出稳定性低,因为当与血清溶液混合时它们会立即聚集。

[0243] 为了研究每种类型的纳米颗粒的系统循环时间,发明人将疏水性DiD荧光染料负载至所有三种类型的纳米颗粒。染料显示出最小的释放(72小时内<20%),并且已被广泛引用作为用于纳米颗粒循环研究的标志物(19、20)。针对每种颗粒类型,将50μL的3mg/mL DiD负载的纳米颗粒通过尾静脉注射注射到一组6个小鼠中。为了避免与不同血型相关的免疫应答,经受循环研究的小鼠为相同品系,从其收集RBC以制备纳米颗粒。在注射之后不同时间点从小鼠眼眶收集20μL血液用于荧光测量。

[0244] 图3C显示出RBC膜涂覆的纳米颗粒具有优于PEG功能化的纳米颗粒的血液保留。在24小时和48小时标记处,与PEG涂覆的纳米颗粒所展现出的11%和2%相比,RBC膜涂覆的纳米颗粒分别展现出29%和16%的总保留。另一方面,在第一次血液抽取中的2分钟标记处,裸露PLGA纳米颗粒显示出可忽略的信号,这是基于它们在血清中的快速聚集所预期到的。图3C插图中的半对数曲线图更好地图解了药物代谢动力学概况的差异,因为循环半衰期可以从半对数信号的斜率得到。基于已应用在先前研究中以拟合纳米颗粒的循环结果的二室模型(21,22),计算出RBC膜涂覆的纳米颗粒的消除半衰期为39.6小时并且PEG涂覆的纳米颗粒的消除半衰期为15.8小时。

[0245] 或者,图3C中的循环数据可以通过单向非线性清除模型来解释,其中纳米颗粒清除的原因(即清除部位和调理素蛋白的可用性)连续减少使得颗粒吸收减慢。Simberg等已报道在注射原始颗粒之前通过注射“诱饵”颗粒,可以使原始颗粒的循环半衰期延长接近5倍(23)。合理预期到,RES系统的饱和可以延迟额外的颗粒吸收并且解释非线性颗粒消除速率。基于此非线性消除模型,对于RBC膜涂覆的纳米颗粒而言第一表观半衰期(即,清除50%的颗粒)为9.6小时,并且对于PEG涂覆的纳米颗粒而言为6.5小时。不管药物代谢动力学模型,RBC膜涂覆的纳米颗粒具有更长的消除半衰期,这表明与常规PEG隐形涂层相比RBC膜涂层在延迟体内清除方面更优越。这个发现进一步证实了纳米颗粒被RBC膜上的功能性组分修饰,所述膜含有抑制巨噬细胞吸收的免疫抑制蛋白(24)。因为这些膜蛋白来自宿主血液中所收集的天然RBC,所以预期它们会在移位至聚合物纳米颗粒的表面之后刺激可忽略的免疫应答。根据TEM可视化、SDS-PAGE结果以及循环半衰期研究,发明人证明了细胞膜的转移和对应的功能性表面蛋白用于使用所报道的技术进行纳米颗粒功能化。

[0246] 然后发明人确定了RBC膜涂覆的纳米颗粒的体内组织分布以便进一步评估它们作为递送载体的潜力。针对生物分布研究,通过尾静脉使18只小鼠接受150μL的3mg/mL DiD-负载的纳米颗粒的注射。在颗粒注射后的每个24小时、48小时以及72小时时间点处,使6只小鼠安乐死,并且收集它们的肝脏、肾脏、脾脏、脑、肺、心脏以及血液。对于荧光定量,洗涤不同时间点处所收集的器官、称重、在1mL PBS中均质化并且然后通过荧光分光光度计进行测量。图4A显示出每克组织的纳米颗粒含量。RES系统的两种主要器官(肝脏和脾脏)包含最高量的纳米颗粒。然而,在3个时间点处,在血液中也观察到了显著的荧光水平。

[0247] 为了更好地理解总体颗粒分布,使荧光信号乘以所测量的对应器官的重量,其中血液的重量估算为总体重的6%。图4B显示出每种器官中归一化为总荧光的相对信号。在核算组织质量之后,可以观察到纳米颗粒主要分布在血液和肝脏中。来自血液的荧光信号与循环半衰期研究的数据有良好地相关性,其中24小时、48小时以及72小时标记处的纳米颗

粒保留分别为21％、15％以及11％。同样，随着血液荧光降低，观察到肝脏中的信号对应增加，这表明血液中的荧光源最终被RES系统占据。这种结果验证了所观察的血液荧光来自长循环的纳米颗粒而不是染料泄漏，这将由肾脏分泌并且导致来自肝脏的信号强度减少。值得注意的是，与先前报道的RBC来源的脂质体相比，RBC膜涂覆的聚合物纳米颗粒具有显著更长的循环时间，所述RBC来源的脂质体在小于30分钟内从血液循环中清除(13)。RBC膜涂覆的纳米颗粒的这种延长的循环时间可以归因于更高的结构刚度、更好的颗粒稳定性以及更多的可靠的货物/染料包封。与所公布的其它小鼠模型中纳米颗粒循环的数据相比(14、25、26)，所述数据大多数在24小时之后显示出可忽略的血液保留，RBC膜涂覆的纳米颗粒展现出优越的体内停留时间并且具有用于生物医学应用作为有力递送平台的巨大潜力。

[0248] 本文中所报道的红细胞膜涂覆的纳米颗粒结构上与通常引用的脂质-聚合物混杂的纳米颗粒类似，它们迅速地出现作为有前景的多功能药物递送平台，所述递送平台含有脂质体和聚合物纳米颗粒两者的所需特征(27、28)。与具有相似大小的聚合物纳米颗粒相比，由于脂质单层涂层所提供的扩散屏障，脂质-聚合物混杂的纳米颗粒已显示出更持久的药物释放概况。来自RBC膜涂覆的纳米颗粒的药物释放动力学被预期为甚至更渐进的，因为RBC膜提供了针对药物扩散的更密集的且双层的脂质屏障。此研究中的膜涂覆方法还可以延伸至其它纳米结构，因为脂质涂层的多功能性已用于二氧化硅纳米颗粒和量子点(29-31)。另外的颗粒功能化可以在制备RBC膜涂覆的纳米结构之前，通过插入修饰的脂质、脂质衍生物或跨膜蛋白至脂质膜来实现。

[0249] 关于将这些RBC膜涂覆的纳米颗粒转化为临床药物递送载体，将有许多挑战和机会。不同于在动物研究中，人红细胞包含可以分类为许多不同血型的众多表面抗原。为了优化颗粒的长循环药物递送，如在输血的情况下，颗粒需要与患者的血液交叉相配。为了更多功能地应用于广泛的患者群体，可以在合成步骤过程中选择性地耗尽颗粒的那些免疫原性蛋白质。或者，此仿生递送平台可以是用于个体化医疗的简洁方法，借此通过使用其自身的RBC膜作为颗粒涂层而针对单独的患者定制药物递送纳米载体，且免疫原性风险较小。

[0250] 最后，发明人示范了用于长循环货物递送的红细胞膜伪装的聚合物纳米颗粒的合成。所采取的技术提供了通过自顶向下的方法制作模拟细胞的纳米颗粒，所述方法省略了蛋白质鉴别、纯化以及偶联的劳动力密集的过程。所提议的方法还提供了用于跨膜蛋白固着的双层介质，并且避免了可能危害靶蛋白质的完整性和功能性的化学修饰。发明人证明了脂质层可以直接源自活细胞。天然细胞膜和它们相关的功能性转位至颗粒表面代表了纳米颗粒功能化的独特且有力的自顶向下的方法。

[0251] 材料和方法

[0252] 红细胞(RBC)空胞衍生。根据先前公布的经修改的实验方案制备缺乏细胞质内容物的RBC空胞(32)。首先，通过使用含有一滴肝素溶液(Cole-Parmer,Vernon Hills,IL)的注射器进行心脏穿刺，从由查尔斯河实验室(Wilmington,MA)获得的雄性ICR小鼠(6至8周)中抽取全血。然后在4℃，在2000rpm下使全血离心5分钟，接着小心地去除血清和血沉棕黄层。在低渗介质处理用于溶血之前，用冰冷的1X PBS洗涤所得到的填充的RBC。在冰浴中，将洗涤的RBC悬浮在0.25X PBS中持续20分钟，并且在2000rpm下离心5分钟。去除血红蛋白，而收集粉色沉淀。使用相差显微镜法验证所得到的RBC空胞，这显现出细胞内容物变化的完整细胞结构(图5)。

[0253] RBC膜来源的囊泡的制备。使用FS30D浴式超声仪(Fisher Scientific,Pittsburgh,PA)在42kHz频率和100W功率下,在加盖的玻璃小瓶中对收集的RBC空胞进行声处理5分钟。随后使用Avanti小型挤压机(Avanti Polar Lipids,Alabaster,AL),将所得到的囊泡逐次挤压通过400nm并且然后100nm的聚碳酸酯多孔膜。为了可视化RBC膜来源的囊泡中的脂质体室,在囊泡制备过程中,使1mL全血与20ug的1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-(丽丝胺罗丹明B磺酰基)(铵盐)(DMPE-RhB)(Avanti Polar Lipids,Alabaster,AL)混合。在每个制备步骤之后,通过动态光散射(DLS)测量RBC膜来源的囊泡的大小(图6)。

[0254] PLGA纳米颗粒的制备。在溶剂置换过程中,使用0.67dL/g羧基封端的50:50聚($_{DL}$-丙交酯-乙交酯)共聚物(LACTEL Absorbable Polymers,Cupertino,CA)制备PLGA聚合物核。首先将PLGA聚合物溶解在1mg/mL浓度的丙酮中。为了制造1mg的PLGA纳米颗粒,逐滴添加1mL溶液至3mL水中。然后露天搅拌混合物2小时。用10K MWCO Amicon Ultra-4离心过滤器(Millipore,Billerica,MA)过滤所得到的纳米颗粒溶液,并且再悬浮在1mL PBS(1X,pH=7.4)中。出于荧光显微镜成像和体内颗粒追踪的目的,在PLGA纳米颗粒合成之前,将2μg的1,1'-二十八烷基-3,3,3',3'-四甲基吲哚二羰花青、4-氯苯磺酸酯(DiD)染料(Invitrogen,Carlsbad,CA)添加至PLGA丙酮溶液中。使用透析方法检测DiD染料从PLGA纳米颗粒中的释放,其中将100μL制备的纳米颗粒溶液负载到具有3.5kDa分子量截留的Slide-A-Lyzer MINI透析微管(Pierce,Rockford,IL)中。在37℃下,在PBS中透析纳米颗粒。在透析过程中,每12个小时更换PBS溶液。在每个预定的时间点处,使用Infinite M200多平台读取器(TeCan,Switzerland)分开收集来自三个小型透析单元的纳米颗粒溶液用于染料定量(图7)。作为对照颗粒,通过纳米沉淀方法制备PEG涂覆的脂质-PLGA混杂的纳米颗粒。

[0255] 组织培养物和纳米颗粒内吞作用。将人上皮癌病细胞系(HeLa)维持在补充有10%胎牛血清白蛋白、盘尼西林/链霉素(Gibco-BRL)、L-谷酰胺(Gibco-BRL)、MEM非必需氨基酸(Gibco-BRL)、碳酸氢钠(Cellgro,Herndon,VA)以及丙酮酸钠(Gibco-BRL)的RPMI(Gibco BRL,Grand Island,NY)中。在37℃、5%CO_2下培养细胞,并且与前面提到的介质一起铺在带小室玻片(Cab-Tek II,八孔;Nunc,Rochester,NY)上。在实验当天,在添加100μg的DMPE-RhB和DiD标记的RBC膜涂覆的PLGA纳米颗粒之前,用预先加温的PBS洗涤细胞并且用预先加温的RPMI介质孵育30分钟。在37℃下,将纳米颗粒与细胞一起孵育4小时。然后用PBS洗涤细胞3次,在室温下用组织固定剂(Millipore,Bellerica,MA)固定30分钟,用4′,6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI,细胞核染色)染色,封固在ProLong Gold抗褪色剂(Invitrogen)中,并且使用去卷积扫描荧光显微镜(DeltaVision System,Applied Precision,Issaquah,WA)成像。使用100X油浸物镜,分别在DAPI、FITC以及CY5滤光片下获得蓝色、绿色以及红色荧光的数字图像。使用softWoRx软件覆盖并且去卷积图像。

[0256] RBC膜来源的囊泡与PLGA纳米颗粒的融合。为了使RBC膜来源的囊泡与PLGA纳米颗粒融合,将1mg的PLGA纳米颗粒与由1mL全血制备的RBC膜来源的囊泡混合,并且然后使用Avanti小型挤压机通过100nm聚碳酸酯多孔膜挤压7次。基于RBC的膜体积和完全涂覆1mg PLGA纳米颗粒所要求的总膜体积估算混合比。用于估算的参数包括小鼠RBC的平均表面积(75μm^2)(34)、RBC的膜厚度(7nm)、50:50PLGA纳米颗粒的密度(1.34g/cm^3)(35)、小鼠血液中

的红细胞浓度(每毫升70亿)(36)、以及由DLS在RBC膜涂覆之前和之后所测量的平均粒度(图8)。使用过量的血液来弥补RBC空胞衍生和挤压过程中的膜损失。用30nm多孔膜透析所得到的RBC膜涂覆的PLGA纳米颗粒持续24小时,并且通过氮气吹扫浓缩。透析和浓缩后,粒度和多分散性保持相同。

[0257] RBC膜涂覆的PLGA纳米颗粒的表征。使用Nano-ZS,型号ZEN3600(Malvern,U.K.),通过DLS测量纳米颗粒大小(直径,nm)、多分散性以及表面电荷(ζ电势,mV)。将纳米颗粒(约500μg)悬浮在1X PBS(约1mL)中,并且在室温下重复进行测量三次持续2周。通过将纳米颗粒悬浮在100%胎牛血清(FBS)(Hyclone,Logan,UT)中进行血清稳定性测试,最终纳米颗粒浓度为1mg/mL。首先将颗粒浓缩至2mg/mL,并且然后添加相等体积的浓缩的2X FBS。使用Infinite M200多平台读取器进行吸光度测量。在每次测量之前,在37℃下在轻摇下孵育样品。在4小时的时间里,大约每30分钟取得560nm处的吸光度。

[0258] 透射电子显微镜成像。使用透射电子显微镜检验RBC膜涂覆的纳米颗粒的结构。将浓度为4μg/mL的一滴纳米颗粒溶液沉积在辉光放电的碳涂覆的栅格上。沉积样品之后五分钟,用10滴蒸馏水清洗栅格。将1滴1%乙酸双氧铀着色剂添加至栅格中。随后干燥栅格并且使用FEI 200KV Sphera显微镜观察。

[0259] 使用SDS-PAGE进行蛋白质表征。在SDS样品缓冲液(Invitrogen)中制备RBC空胞、RBC膜来源的囊泡以及透析的RBC膜涂覆的PLGA纳米颗粒。然后使用NovexSureLockXcell电泳系统(Invitrogen),在3-(N-吗啉代)丙磺酸(MOPS)运行缓冲液中在NuPAGE®Novex 4%至12%Bis-Tris 10孔微型凝胶上运行样品。在150V下运行样品1小时,并且将所得到的聚丙烯酰胺凝胶在SimplyBlue(Invitrogen)中染色过夜用于可视化。

[0260] 药物代谢动力学和生物分布研究。所有动物程序遵照加州大学圣地亚哥分校动物保护和使用制度委员会的准则。在来自查尔斯河实验室(Wilmington,MA)的雄性ICR小鼠(6至8周)上进行实验。为了评估RBC膜涂覆的纳米颗粒的循环半衰期,将150μL的DiD-负载的纳米颗粒注射到小鼠尾静脉中。在1分钟、5分钟、15分钟、30分钟以及注射后的1小时、2小时、4小时、8小时、24小时、48小时以及72小时处收集20μL血液。还平行测试了相同剂量的含DiD的PEG涂覆的脂质-PLGA混杂的纳米颗粒和裸露PLGA纳米颗粒作为对照。每个颗粒组包含6个小鼠。在荧光测量之前,在96孔板中用30μL PBS稀释所收集的血液样品。计算药物动力学参数以拟合二室模型。

[0261] 为了研究不同组织中的纳米颗粒的生物分布,18只小鼠通过尾静脉接受150μL的3mg/mL DiD-负载的纳米颗粒的注射。在颗粒注射后的每个24小时、48小时以及72小时时间点处,随机选择6只小鼠并且使其安乐死。收集它们的肝脏、肾脏、脾脏、脑、肺、心脏以及血液。仔细称重所收集的器官并且然后在1mL PBS中均质化。血液总重量被估算为小鼠体重的6%。通过Infinite M200多平台读取器确定每个样品的荧光强度。

[0262] 参考文献

[0263] 1.Moghimi SM,Hunter AC,Murray JC(2001)Long-circulating and target-specific nanoparticles:theory to practice.Pharmacol Rev53:283-318。

[0264] 2.Davis ME,Chen ZG,Shin DM(2008)Nanoparticle therapeutics:an emerging treatment modality for cancer.Nat Rev Drug Discov7:771-782。

[0265] 3.Peer D,等(2007)Nanocarriers as an emerging platform for cancer

therapy.Nat Nanotechnol 2:751-760。

[0266] 4.Yoo JW,Chambers E,Mitragotri S(2010)Factors that control the circulation time of nanoparticles in blood:challenges,solutions and future prospects.Curr Pharm Des 16:2298-2307。

[0267] 5.Geng Y,等(2007)Shape effects of filaments versus spherical particles in flow and drug delivery.Nat Nanotechnol 2:249-255。

[0268] 6.Alexis F,Pridgen E,Molnar LK,Farokhzad OC(2008)Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles.Mol Pharm 5:505-515。

[0269] 7.Knop K,Hoogenboom R,Fischer D,Schubert US(2010)Poly(ethylene glycol)in drug delivery:pros and cons as well as potential alternatives.Angew Chem Int Ed 49:6288-6308。

[0270] 8.Jiang SY,Cao ZQ(2010)Ultralow-fouling,functionalizable,and hydrolyzable zwitterionic materials and their derivatives for biological applications.Adv Mater 22:920-932。

[0271] 9.Yang W,Zhang L,Wang S,White AD,Jiang S(2009)Functionalizable and ultra stable nanoparticles coated with zwitterionic poly(carboxybetaine)in undiluted blood serum.Biomaterials30:5617-5621。

[0272] 10.Doshi N,Zahr AS,Bhaskar S,Lahann J,Mitragotri S(2009)Red blood cell-mimicking synthetic biomaterial particles.Proc Natl Acad Sci USA 106:21495-21499。

[0273] 11.Tsai RK,Rodriguez PL,Discher DE(2010)Self inhibition of phagocytosis:the affinity of'marker of self'CD47for SIRPalpha dictates potency of inhibition but only at low expression levels.Blood Cells Mol Dis 45:67-74。

[0274] 12.Merkel TJ,等(2011)Using mechanobiological mimicry of red blood cells to extend circulation times of hydrogel microparticles.Proc Natl Acad Sci U S A 108:586-591。

[0275] 13.Desilets J,Lejeune A,Mercer J,Gicquaud C(2001)Nanoerythrosomes,a new derivative of erythrocyte ghost:IV.Fate of reinjected nanoerythrosomes.Anticancer Res 21:1741-1747。

[0276] 14.Cheng J,等(2007)Formulation of functionalized PLGA-PEG nanoparticles for in vivo targeted drug delivery.Biomaterials28:869-876。

[0277] 15.Tanaka M,Sackmann E(2005)Polymer-supported membranes as models of the cell surface.Nature 437:656-663。

[0278] 16.Hochmuth RM,Evans CA,Wiles HC,McCown JT(1983)Mechanical measurement of red cell membrane thickness.Science220:101-102。

[0279] 17.Fang RH,Aryal S,Hu CM,Zhang L(2010)Quick synthesis of lipid-polymer hybrid nanoparticles with low polydispersity using a single-step

sonication method.Langmuir 26:16958-16962。

[0280] 18.Popielarski SR,Pun SH,Davis ME(2005)A nanoparticle-based model delivery system to guide the rational design of gene delivery to the liver.1.Synthesis and characterization.Bioconjug Chem 16:1063-1070。

[0281] 19.Goutayer M,等(2010)Tumor targeting of functionalized lipid nanoparticles:assessment by in vivo fluorescence imaging.Eur J Pharm Biopharm 75:137-147。

[0282] 20.Xiao K,等(2009)A self-assembling nanoparticle for paclitaxel delivery in ovarian cancer.Biomaterials 30:6006-6016。

[0283] 21.Gratton SE,等(2007)Nanofabricated particles for engineered drug therapies:a preliminary biodistribution study of PRINT nanoparticles.J Control Release 121:10-18。

[0284] 22.Peracchia MT,等(1999)Stealth PEGylated polycyanoacrylate nanoparticles for intravenous administration and splenic targeting.J Control Release 60:121-128。

[0285] 23.Simberg D,等(2007)Biomimetic amplification of nanoparticle homing to tumors.Proc Natl Acad Sci U S A 104:932-936。

[0286] 24.Oldenborg PA,等(2000)Role of CD47as a marker of self on red blood cells.Science 288:2051-2054。

[0287] 25.Gu F,等(2008)Precise engineering of targeted nanoparticles by using self-assembled biointegrated block copolymers.Proc Natl Acad Sci USA 105:2586-2591。

[0288] 26.Avgoustakis K,等(2003)Effect of copolymer composition on the physicochemical characteristics,in vitro stability,and biodistribution of PLGA-mPEG nanoparticles.Int J Pharm 259:115-127。

[0289] 27.Zhang L.(2010)Lipid-polymer hybrid nanoparticles:synthesis, characterization and applications.Nano LIFE 1:163-173。

[0290] 28.Sengupta S,等(2005)Temporal targeting of tumour cells and neovasculature with a nanoscale delivery system.Nature 436:568-572。

[0291] 29.Valencia PM,等(2010)Single-step assembly of homogenous lipid-polymeric and lipid-quantum dot nanoparticles enabled by microfluidic rapid mixing.ACS Nano 4:1671-1679。

[0292] 30.Liu J,Stace-Naughton A,Jiang X,Brinker CJ(2009)Porous nanoparticle supported lipid bilayers(protocells)as delivery vehicles.J Am Chem Soc 131: 1354-1355。

[0293] 31.van Schooneveld MM,等(2010)Imaging and quantifying the morphology of an organic-inorganic nanoparticle at the sub-nanometre level.Nat Nanotechnol 5:538-544。

[0294] 32.Dodge JT,Mitchell C,Hanahan DJ(1963)The preparation and chemical

characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes.Arch Biochem Biophys 100:119-130。

[0295] 33.Zhang L,等(2008)Self-assembled lipid-polymer hybrid nanoparticles: A robust drug delivery platform.ACS Nano 2:1696-1702。

[0296] 34.Waugh RE,Sarelius IH(1996)Effects of lost surface area on red blood cells and red blood cell survival in mice.Am J Physiol271:C1847-1852。

[0297] 35.Arnold MM,Gorman EM,Schieber LJ,Munson EJ,Berkland C(2007) NanoCipro encapsulation in monodisperse large porous PLGA microparticles.J Control Release 121:100-109。

[0298] 36.Jacobs RL,Alling DW,Cantrell WF(1963)An evaluation of antimalarial combinations against plasmodium berghei in the mouse.J Parasitol 49:920-925。

[0299] 37.Lund,R.;Leth-Larsen,R.;Jensen,O.N.;Ditzel,H.J.,Efficient isolation and quantitative proteomic analysis of cancer cell plasma membrane proteins for identification of metastasis-associated cell surface markers.J Proteome Res 2009,8(6),3078-3090。

[0300] 38.Graham,J.M.,Isolation of membranes from tissue culture cells.Methods Mol Biol 1993,19,97-108。

[0301] 39.Vayro,S.;Kemp,R.;Beechey,R.B.;Shirazi-Beechey,S.,Preparation and characterization of basolateral plasma-membrane vesicles from sheep parotid glands.Mechanisms of phosphate and D-glucose transport.Biochem J 1991,279(Pt 3),843-848。

[0302] 40.Navas,P.;Nowack,D.D.;Morre,D.J.,Isolation of purified plasma membranes from cultured cells and hepatomas by two-phase partition and preparative free-flow electrophoresis.Cancer Res 1989,49(8),2147-2156。

[0303] 41.Henon,M.;Bedouin,A.;Polonovski,J.,[Isolation,identification and characterization of a plasma membrane preparation of guinea pig macrophages].C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D 1977,285(1),121-122。

[0304] 42.Boone,C.W.;Ford,L.E.;Bond,H.E.;Stuart,D.C.;Lorenz,D.,Isolation of plasma membrane fragments from HeLa cells.J Cell Biol1969,41(2),378-392。

[0305] 实施例2

[0306] 用于控制的药物负载和释放的红细胞膜遮掩的聚合物纳米颗粒

[0307] 被红细胞膜(RBCm)遮掩的聚合物纳米颗粒(NP)给予长循环寿命和控制的药物保留和释放的组合优点。在本文中,对于开发此模拟细胞的NP平台用于先进的药物递送应用,发明人进行研究以便获得对其药物负载、药物释放动力学以及基于细胞的功效的更好理解。确切地说,为了研究药物从RBCm遮掩的NP的释放,发明人比较了两种策略用于负载阿霉素(DOX)(模型抗癌药物)到RBCm遮掩的NP中:物理包封和化学偶联。通过使用急性髓性白血病(AML)Kasumi-1细胞系检验体外功效。

[0308] 发明人发现化学偶联策略产生更持久的药物释放概况。此外,通过配制与RBCm遮掩的NP聚合物核相同但表面涂层不同的PEG化的NP,发明人证明RBCm遮掩物提供了延迟包

封的药物分子向外扩散的屏障。对于AML Kasumi-1细胞系的功效研究，与游离DOX相比，RBCm遮掩的NP展现出更高的毒性。这些结果表明RBCm遮掩的NP是用于治疗各种疾病(如血癌)的治疗剂的控制和持续递送的有价值的递送平台。

[0309] 引言

[0310] 在过去几十年中，纳米级工程材料的进展已产生在临床应用中的无数的基于纳米颗粒(NP)的药物递送系统[1、2]。这些纳米药物的独特优点，特别是它们通过改变的药物代谢动力学和生物分布概况对现有治疗剂的改进，使它们能够在血流中循环延长的时间[3、4]。因此，相当多的研究兴趣集中在天然和合成制成的新型材料的研究上，所述新型材料允许NP省略巨噬细胞吸收和系统清除[5、6]。同时，策略目的在于通过修改NP物理化学特性(包括大小、形状、变形)而延长体内颗粒停留时间，并且还已广泛地探索了表面特征[7、8]。

[0311] 从这个角度看，发明人近来开发了红细胞膜(RBCm)遮掩的NP药物递送系统，其具有来自RBC的长循环寿命与来自聚合物颗粒的控制的药物保留和释放的组合优点[9]。基于挤压与预先形成的RBCm来源的囊泡混合的聚合物颗粒的自顶向下的方法，将具有保存的膜蛋白的整个RBCm移位至亚100nm聚合物核的表面，从而形成被红细胞外部遮掩的NP用于长系统循环。此模拟细胞的策略提供了包围聚合物核的细胞膜介质用于跨膜蛋白固着，因此避免了可能危害蛋白质的完整性和功能性的常规NP表面功能化中的化学修饰。

[0312] 在继续努力进一步开发此模拟细胞的NP平台用于先进的药物递送应用中，在本文中发明人报道了负载小分子化学治疗药物如阿霉素(DOX)(模型抗癌药物)到NP中的配制策略，并且研究了药物释放动力学，重点在于强调RBCm遮掩物在药物保留中起到的作用。确切地说，为了负载DOX分子到NP核中，发明人探索了两种相异的策略：物理包封药物分子到聚合物基质中和化学偶联药物分子至聚合物骨架，并且显示出它们产生相异的药物负载产率和释放动力学。发明人进一步用与RBCm遮掩的NP相同的聚合物核配制NP，但由聚(乙二醇)(PEG，PEG化的NP)而不是RBCm进行涂覆。两种递送系统的药物释放概况的比较证明了RBCm遮掩物提供延迟包封的药物分子向外扩散的屏障，并且因而可以被潜在地用于更好地控制药物释放。另外，在检验RBCm遮掩的NP的治疗潜力中，发明人选择急性髓性白血病(AML)Kasumi-1细胞系，并且显示出与相同量的游离DOX相比，DOX-负载的RBCm遮掩的NP展现出更高的毒性。

[0313] 材料和方法

[0314] 2.1.RBC空胞衍生

[0315] 根据先前公布的实验方案制备缺乏细胞质内容物的RBC空胞[9、10]。简单地说，对通过用含有一滴肝素溶液(Cole-Parmer)的注射器心脏穿刺而从雄性ICR小鼠(6至8周，查尔斯河实验室)中抽取的全血进行离心(在4℃下，800×g持续5分钟)，以便去除血清和血沉棕黄层。在冰冷的1×PBS中洗涤填充的RBC，通过低渗介质处理用于溶血，并且然后在冰浴中将其悬浮在0.25×PBS中持续20分钟。通过在800×g下对悬浮液进行离心5分钟，去除血红蛋白。收集粉色沉淀形式的RBC空胞。

[0316] 2.2.RBCm来源的囊泡的制备

[0317] 使用FS30D浴式超声仪(Fisher Scientific)在42kHz频率和100W功率下，在加盖的玻璃小瓶中对收集的RBC空胞进行声处理5分钟。随后通过使用Avanti小型挤压机(Avanti Polar Lipids)，将所得到的囊泡反复挤压通过400nm并且然后200nm的聚碳酸酯

多孔膜。每次挤压之后，通过动态光散射(DLS,Nano-ZS,型号ZEN3600)监测RBCm来源的囊泡的大小。

[0318] 2.3.L-丙交酯的开环聚合

[0319] 基于公布的实验方案合成DOX-聚(丙交酯酸)(PLA)偶联物[11、12]。简单地说，在室温下，在填充有氩气的手套箱中通过烷氧基络合物(BDI)ZnN(SiMe$_3$)$_2$催化L-丙交酯(Sigma-Aldrich,USA)的开环聚合。将(BDI)ZnN(SiMe$_3$)$_2$(6.4mg,0.01mmol)和DOX(Jinan Wedo Co.,Ltd.,Jinan,China)(5.4mg,0.01mmol)混合在无水四氢呋喃(THF,0.5mL)中，其中逐滴添加被溶解在2mL无水THF中的L-丙交酯(101mg,0.7mmol)。在如通过^{1}H NMR(Varian Mercury 400MHz光谱仪)所指示L-丙交酯被完全消耗之后，在冷二乙醚中沉淀粗产物并且通过多个溶解-沉淀循环来纯化。通过^{1}H NMR证实偶联，并且通过凝胶渗透色谱法(GPC,Viscotek,USA)证明偶联物的分子量为约10,000g/mol。

[0320] 2.4.NP核的制备和DOX的负载

[0321] 首先将DOX-PLA偶联物溶解在乙腈中以便形成1mg/mL溶液，并且逐滴添加1mL这种溶液至3mL水中。然后露天搅拌混合物2小时，从而允许乙腈蒸发。通过Amicon Ultra-4离心过滤器(Millipore,10kDa截留)过滤所得到的NP核溶液，并且然后将其再悬浮在1mL蒸馏水中。为了物理包封DOX，首先将1mg聚(乳酸-乙醇酸)共聚物(PLGA,0.67dL/g,羧基封端的,LACTEL吸收性聚合物)溶解到1mL乙腈中，接着添加预先溶解在25μL二甲亚砜(DMSO)中的DOX。根据以上所描述的相似程序以便产生含有NP核的悬浮液。

[0322] 2.5.RBCm来源的囊泡与NP核的融合

[0323] 为了使RBCm来源的囊泡与前面提到的NP核融合，首先将含有1mg NP核的悬浮液与由1mL全血制备的RBCm来源的囊泡混合。然后用Avanti小型挤压机，通过100nm聚碳酸酯多孔膜对混合物挤压11次。为了完全涂覆1mg的NP核，使用过量的血液来弥补RBC空胞衍生和挤压过程中的膜损失[9]。

[0324] 2.6.PEG化的NP的制备

[0325] 首先将重量比为1:1的DOX-PLA偶联物和PLA-PEG-COOH(10kDa,PDI＝1.12)[13]溶解在1mg/mL浓度的乙腈中，接着通过如以上所描述的相同程序产生NP悬浮液。为了将DOX物理包封到PEG化的NP中，首先将1mg聚(乳酸-乙醇酸)共聚物(PLGA,0.67dL/g,羧基封端的,LACTEL吸收性聚合物)溶解到1mL乙腈中，接着添加溶解在25μL DMSO中的100μg DOX。使用如以上所描述的相同程序来产生NP悬浮物。

[0326] 2.7.NP稳定性研究

[0327] 通过使用DLS监测粒度来评定NP在PBS中的稳定性。确切地说，将500μg NP悬浮在1mL 1×PBS中，并且在室温下，在一周时间里每24小时重复测量大小三次。在测量之间，在37℃下在轻摇下孵育样品。通过在560nm波长下监测UV吸光度来评估NP血清稳定性。确切地说，首先在PBS中将NP浓缩至2mg/mL，接着添加相等体积的2×胎牛血清(FBS,Hyclone)。在37℃下，通过使用Infinite M200多平台读取器在2小时时间里大约每1分钟测量吸光度。

[0328] 2.8.药物负载产率和释放的测量

[0329] 通过在480nm激发波长下测量580nm处的荧光强度来确定溶液中的DOX浓度。为了确定NP的DOX负载产率，在将100μL NP溶液与100μL 0.1M HCl的乙腈溶液一起孵育24小时之后进行以上荧光测量。为了绘制DOX释放概况，将200μL NP溶液(1mg/mL)负载到Slide-A-

Lyzer MINI透析微管(Pierce,Rockford,IL,分子量截留＝3.5kDa)中,并且然后在37℃下用2L的PBS(pH＝7.4)透析。在整个透析过程中,每12个小时更换PBS缓冲液。在每个预定的时间点处,收集来自三个小型透析单元的NP溶液并且测量DOX浓度。

[0330] 2.9.细胞活力测定

[0331] 使用MTT测定(Promega Corporation,Madison,WI,USA),针对由极性骨髓性白血病(AML)患者的外周血建立的Kasumi-1细胞系评价游离DOX和DOX负载的NP的细胞毒性。首先将细胞种在96孔板中(每个孔大约5×10^3个),并且然后孵育24小时。在添加游离DOX或DOX负载的NP之后,再另外孵育细胞72小时。然后通过根据由供应商提供的实验方案,使用MTT测定来确定细胞活力。

[0332] 结果和讨论

[0333] 3.1.RBCm遮掩的NP的制备

[0334] RBCm遮掩的NP的制备过程是基于先前公布的实验方案并且示意性地图解在图9中[9]。简单地说,纯化的RBC首先在低渗环境下经历膜破裂,以便去除其细胞内内容物。接下来,洗涤掏空的RBC(直径为约2μm),并且挤压通过100nm多孔膜以便产生RBC膜来源的囊泡(直径为约200nm)。同时,通过使用溶剂置换方法制备聚合物核(直径为约70nm),如由PLA或PLGA制成的那些聚合物核。随后使所得到的聚合物核与RBC膜来源的囊泡混合,并且通过100nm孔隙物理挤压混合物,其中两种组分在机械力下融合并且形成RBCm遮掩的NP(直径为约90nm)。

[0335] 3.2.阿霉素(DOX)到RBCm遮掩的NP中的负载

[0336] 在此研究中,发明人检测了作为模型药物的DOX负载到RBCm遮掩的NP中的两种相异方法:物理包封和化学偶联。通过首先使DOX和聚合物在乙腈中混合,接着通过沉淀到水中实现物理包封。在这种情况下,可以通过不同的配制参数改变药物负载产率。例如,当初始DOX与PLGA的重量比从5%变化至20%时,负载产率从0.9%增加至1.8%(参见图10)。

[0337] 或者,可以通过将药物分子共价偶联至聚合物骨架而将DOX分子负载到NP核中。直观地,DOX分子可以通过羟基被直接偶联至羧基封端的PLA链;然而,此方法引起聚合物-药物偶联物的不均匀性,这很大程度上是因为聚合物链的多分散性、缺乏对含有多个羟基的DOX分子的区域和化学选择性偶联的控制、以及缺乏对偶联效率的控制。因此,发明人采取了一种替代的方法,其中在L-丙交酯单体和作为催化剂的(BDI)ZnN$(SiMe_3)_2$存在下,DOX的羟基用来启动开环聚合(ROP)并且导致PLA-DOX偶联物的形成[11、12]。在此方法中,如通过药物分子本身启动聚合反应,偶联效率可以达到接近100%。另外,金属酰胺基催化剂(BDI)ZnN$(SiMe_3)_2$优选地允许PLA在DOX的C_{14}-OH位置而不是其更加空间位阻的C_4'-和C_9-OH位置上增长。反应终止之后,通过使用反复的溶解-沉淀循环来纯化产物,并且然后通过使用^{1}H-NMR色谱法进行表征。存在对应于DOX分子和PLA骨架两者的质子共振峰,包括δ＝7.5ppm与8.0ppm之间的DOX的芳香族质子、δ＝1.5ppm处的-CH_3基团的质子以及δ＝5.2ppm处的PLA的-CH基团,因此证实了PLA-DOX偶联物的形成[11]。

[0338] 与物理包封(其中药物负载产率主要取决于配制参数)相比,在化学偶联中,药物负载产率由聚合物链长指示,聚合物链长反过来由聚合条件如引发剂(DOX)与单体比率确定。例如,在将偶联物配制到NP中之后,对应于近似5%负载产率的DOX,发现在我们的研究中合成的PLA-DOX偶联物具有10kDa的分子量和1.16的窄多分散性指数(PDI)。

[0339] 3.3.负载DOX的RBCm遮掩的NP的体外稳定性

[0340] 接下来,发明人研究了负载DOX的RBCm遮掩的NP在生理学相关的缓冲溶液中的稳定性。在PBS中,通过在不同时间点处测量NP大小来监测NP稳定性,因为不稳定的颗粒趋于聚集并且它们的大小增加。在此研究(图11A)中,通过使用物理包封和化学偶联而负载有DOX分子的NP显示出约90nm的相似的初始直径,而在一周时间跨度里没有显著的大小增加。相似地,在相同时间跨度里仅观察到NP的PDI稍微有所变化,这表明负载DOX的RBCm遮掩的NP在PBS中的高稳定性。通过监测560nm(反应颗粒聚集程度的特征性波长)处UV吸光度而进一步检验血清中的NP稳定性[14、15]。通过物理包封或化学偶联而负载有DOX分子的RBCm遮掩的NP在两小时的时间跨度里显示出接近恒定的在560nm处的吸光度(图11B),这表明NP在100%胎牛血清(FBS)中高度稳定。相比之下,当添加到FBS中时,由PLGA或PLA-DOX偶联物制成而没有RBCm遮掩物的裸露聚合物核的吸光度立即增加。这些结果显示出RBCm遮掩物显著起到使NP在缓冲溶液和血清中稳定的作用。从实践的角度看,未涂覆的聚合物颗粒在缓冲溶液中快速聚集提供了选择性沉淀未涂覆的颗粒并在制备RBCm遮掩的NP之后从它们之中去除未涂覆的颗粒的方法。

[0341] 3.4.DOX从RBCm遮掩的NP中释放的动力学

[0342] 在配制稳定的DOX负载的RBCm遮掩的NP后,发明人继续研究调查它们的DOX释放动力学(图12)。发明人首先检验不同的药物负载机制将如何影响DOX从RBCm遮掩的NP中释放。结果显示出,当DOX分子被物理包封到聚合物基质中时,药物释放速率显著更快,如在前两个小时内20%的DOX分子从RBCm遮掩的NP中释放。相比之下,当检验化学偶联的制剂时,在前两个小时内,仅有5%的DOX分子释放。这种差异已归因于以下事实:DOX分子共价键合至聚合物骨架要求药物分子在它们可以从聚合物基质扩散出用于释放之前首先通过大量腐蚀从聚合物中水解[11、12、16]。由药物-聚合物共价偶联引起的更持久的释放概况还表明响应于环境触发的化学接头可以在开发RBCm遮掩的NP时实现控制更佳的药物释放用于先进的药物递送应用[13、17]。

[0343] 为了获得对于RBCm遮掩物对药物保留所起到的作用的更好理解,发明人根据已确立的程序通过共混PLA-PEG二嵌段共聚物来产生NP并且产生PEG化的NP,其中NP核被涂覆并且通过周围的PEG层而不是RBCm遮掩物来稳定[18]。如果两种制剂具有相似的NP核,药物释放的差异主要由RBCm遮掩物和表面PEG涂层在药物保留方面能力不同而引起。通过比较从RBCm遮掩的NP与从PEG化的NP中的DOX释放,发明人发现RBCm遮掩的NP的释放速率更低:在前72小时内,在RBCm遮掩的NP中释放大约20%的DOX,然而相同时间跨度里从PEG化的NP中释放40%的DOX。事实上,通过使用由PLGA-PEG二嵌段共聚物配制的NP,已发现表面PEG分子阻碍药物从NP核中释放[19]。

[0344] 因此,与RBCm遮掩的NP相比DOX从PEG化的NP中以更高的速率释放的观察结果表明,RBCm确实充当DOX释放的扩散屏障。还依照先前研究的此观察结果显示出磷脂涂层可以充当药物扩散的屏障[20]。RBCm遮掩物所起到的这一作用进一步表明目的在于工程化脂质膜涂层的策略可以在某些环境因素下允许响应性药物从RBCm遮掩的NP中释放,除了通过聚合物核中所包含的化学偶联所实现的那些[21]。

[0345] 为了获得对于膜涂层对药物保留的影响的定量理解,使用在先前颗粒药物释放研究中建立的数学模型来分析药物释放概况。因为PLGA的降解为大约几周[22、23],这显著低

于物理负载系统所观察到的药物释放，所以扩散占主导的Higuchi模型被应用于含有物理包封的DOX的RBCm涂覆的NP和PEG化的NP中。绘制药物释放百分比对时间平方根的图，产生线性拟合：RBCm遮掩的NP和PEG化的NP分别为R^2＝0.98和R^2＝0.96(图12B)。拟合的良好性暗指扩散控制的药物释放机制，并且进一步允许通过以下Higuchi方程推导扩散系数[24、25]：

[0346] $M_t = Kt^{1/2}$ (1)

[0347] $K = A(2C_{ini}DC_s)^{1/2}$ (2)

[0348] 其中，M_t为时间t(以小时计)处的药物释放，K为Higuchi常数，C_{ini}为初始药物浓度，C_s为药物溶解度，A为颗粒的总表面积，并且D为扩散系数。给定颗粒尺寸、药物负载产率、DOX在水中的溶解度(1.18g/L)以及药物释放数据，针对RBCm遮掩的NP和PEG化的NP确定扩散系数分别为6.6×10^{-16}平方厘米/秒和8.2×10^{-16}平方厘米/秒，所述扩散系数还与先前报道的从PLGA/PLA NP中的药物扩散率一致[26]。在我们的研究中，双层膜涂层使药物扩散率减少了1.2倍。这种由RBCm遮掩物带来的延迟作用将很可能随着不同的粒度、聚合物类型以及治疗性货物而改变。

[0349] 另一方面，将零级模型、一级模型以及Higuchi模型应用于化学偶联的DOX的药物释放概况得到较差的拟合(数据未示出)，这表明在另外的药物裂解与药物从聚合物基质中扩散出相结合时的复杂释放动力学。精确制作RBCm遮掩物对化学偶联的DOX所施加的延迟作用的模型超出本研究的范围。

[0350] 然而，因为在RBCm遮掩的NP和PEG化的NP中存在相同的颗粒核，所以聚合物基质弛豫和连接键水解裂解不是引起在DOX释放概况中观察到的差异的主导因素。反而，发明人将RBCm遮掩的NP的更缓慢的释放速率归因于两种扩散占主导的组分：水扩散到聚合物基质中和裂解的药物向外扩散到聚合物基质上[27]。因为膜涂层在物理包容系统中显示出降低药物扩散率，所以它很可能影响共价偶联物系统中的水的流入和裂解药物的流出，从而产生更持久的药物释放概况。

[0351] 3.5.DOX负载的RBCm遮掩的NP的细胞毒性

[0352] 最后，发明人检验了DOX负载的RBCm遮掩的NP针对AML Kasumi-1细胞系的治疗潜力。AML(其特征在于白血病胚细胞在血流中不受控的生长和积聚的疾病)被选为疾病靶标，这是由于RBCm遮掩的NP在血流中的长循环寿命和它们的持续的药物释放概况。当前治疗AML的标准为高剂量蒽环类药物，这引起对心脏毒性的深切关注[28]。以持续的方法释放治疗化合物的长循环NP提供了减少必要的给药并改进治疗功效的机会。在72小时孵育时间里，与游离DOX相比，其中物理负载或共价偶联DOX的RBCm遮掩的NP展现出更高的毒性(图13)。此功效增强可以很可能地归因于NP的内吞吸收，这使得高有效载荷的药物能够进入细胞内区域[29]。相比之下，游离DOX依赖于被动的膜扩散用于细胞进入，这是效率较低的并且易受膜结合的药物流出泵的影响[30-32]。本研究表明了具有延长循环寿命、持续的药物释放以及改进的细胞内化的RBCm遮掩的NP是用于血癌治疗的平台。保证另外的研究以便研究调查这些NP的体内治疗潜力。

[0353] 结论

[0354] 概括地说，在本文中，发明人检验了两种用于将药物负载到RBCm遮掩的NP递送系统中的策略：物理包封和化学偶联。释放研究表明化学偶联策略产生更持久的药物释放概

况。发明人进一步配制了与RBCm遮掩的NP相比NP核相同但表面涂层不同的PEG化的NP。通过比较这两种递送系统的药物释放概况，发明人证明RBCm遮掩提供了减慢包封的药物分子向外扩散的屏障。这些结果提供了NP核中的药物-聚合物连接键的化学修饰和NP表面涂层上的工程化可以获得对RBCm遮掩的NP的药物释放的更好控制。在通过使用AML Kasumi-1细胞系的以下功效研究中，与游离DOX相比，RBCm遮掩的NP展现出更高的毒性。先前观察到的血流中的长系统循环寿命和在此报道的持续的药物释放动力学表明此仿生药物递送系统提供了用于治疗各种疾病如血癌的有效载荷的可行的全身性递送。这些RBCm遮掩的NP提供了有力的药物递送系统，其组合了合成聚合物和天然细胞膜两者的优点。

[0355] RBCm遮掩的NP代表了新型类别的NP制剂，所述NP制剂一同带来了RBC的长循环寿命与合成聚合物的控制的药物保留和释放。此NP制剂可以通过工程化这两部分以便改进治疗有效载荷的全身递送来进一步定制。此制剂提供了有力的递送平台，并且对生物医学应用和纳米技术研究都产生显著影响。

[0356] 本实施例的执行概要提供如下：

[0357] 为了组合来自RBC的长循环寿命和来自聚合物颗粒的控制的药物保留和释放的优点，发明人配制了亚100nm大小的RBCm遮掩的NP，其包含：由PLA或PLGA制成的亚100nm的聚合物核，和由RBCm制成的具有保存的膜蛋白的红细胞外部。

[0358] 发明人检验了两种相异的将作为模型药物的DOX负载至RBCm遮掩的NP中的方法：物理包封，其产生范围为0.9％至1.8％的负载产率；和共价偶联，其产生大约5％的负载产率。

[0359] 通过监测NP大小和UV吸光度，发明人发现当与不具有RBCm遮掩物的裸露聚合物核相比时，RBCm遮掩的NP具有优越的稳定性，暗指RBCm遮掩物在使NP在生物溶液中稳定方面起到显著作用。

[0360] 释放研究显示出药物-聚合物共价偶联方法比物理包封具有更持久的释放概况，这证明当开发RBCm遮掩的NP用于先进的药物递送应用时，响应于环境触发的化学接头可以实现控制更佳的药物释放。

[0361] 通过将RBCm遮掩的NP与PEG化的NP比较，发明人发现RBCm充当用于DOX释放的扩散屏障。此观察结果与使用Higuchi方程的定量分析一致。因此，目的在于工程化脂质膜涂层的策略还可以使得响应性药物在某些环境因素下从RBCm遮掩的NP中释放。

[0362] 当与游离DOX相比时，DOX负载的RBCm遮掩的NP增强了针对AML Kasumi-1细胞的功效。此功效增强可以很可能地归因于NP的内吞吸收，这使得高有效载荷的药物能够进入细胞内区域。

[0363] 参考文献

[0364] 1.Davis ME,Chen Z,Shin DM.Nanoparticle therapeutics:an emerging treatment modality for cancer.Nat.Rev.Drug Discov.7(9),771-782(2008)。

[0365] 2.Petros RA,DeSimone JM.Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications.Nat.Rev.Drug Discov.9(8),615-627(2010)。

[0366] 3.Peer D,Karp JM,Hong S,FaroKhzad OC,Margalit R,Langer R.Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy.Nat.Nanotechnol.2(12),751-760(2007)。

[0367] 4.Farokhzad OC,Langer R.Impact of Nanotechnology on Drug Delivery.ACS Nano 3(1),16-20(2009)。

[0368] 5.Alexis F,Pridgen E,Molnar LK,Farokhzad OC.Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles.Mol.Pharm.5(4),505-515(2008)。

[0369] 6.Knop K,Hoogenboom R,Fischer D,Schubert US.Poly(ethylene glycol)in Drug Delivery:Pros and Cons as Well as Potential Alternatives.Angew.Chem.Int.Edit.49(36),6288-6308(2010)。

[0370] 7.Geng Y,Dalhaimer P,Cai S等Shape effects of filaments versus spherical particles in flow and drug delivery.Nat.Nanotechnol.2(4),249-255(2007)。

[0371] 8.Yoo J-W,Chambers E,Mitragotri S.Factors that Control the Circulation Time of Nanoparticles in Blood:Challenges,Solutions and Future Prospects.Curr.Pharm.Design 16(21),2298-2307(2010)。

[0372] 9.Hu CM,Zhang L,Aryal S,Cheung C,Fang RH,Zhang L.Erythrocyte membrane-camouflaged polymeric nanoparticles as a biomimetic delivery platform.Proc.Natl.Acad.Sci.USA 108(27),10980-10985(2011)。

[0373] 10.Dodge JT,Mitchell C,Hanahan DJ.The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes.Arch.Biochem.Biophys.100,119-130(1963)。

[0374] 11.Aryal S,Hu CM,Zhang L.Polymeric nanoparticles with precise ratiometric control over drug loading for combination therapy.Mol.Pharm.8(4),1401-1407(2011)。

[0375] 12.Tong R,Cheng J.Ring-opening polymerization-mediated controlled formulation of polylactide-drug nanoparticles.J.Am.Chem.Soc.131(13),4744-4754(2009)。

[0376] 13.Aryal S,Hu CM,Zhang L.Polymer--cisplatin conjugate nanoparticles for acid-responsive drug delivery.ACS Nano 4(1),251-258(2010)。

[0377] 14.Popielarski SR,Pun SH,Davis ME.A nanoparticle-based model delivery system to guide the rational design of gene delivery to the liver.1.Synthesis and characterization.Bioconjug.Chem.16(5),1063-1070(2005)。

[0378] 15.Fang RH,Aryal S,Hu CM,Zhang L.Quick synthesis of lipid-polymer hybrid nanoparticles with low polydispersity using a single-step sonication method.Langmuir 26(22),16958-16962(2010)。

[0379] 16.Tong R,Cheng J.Controlled Synthesis of Camptothecin-Polylactide Conjugates and Nanoconjugates.Bioconjug.Chem.21(1),111-121(2010)。

[0380] 17.Gao W,Chan JM,Farokhzad OC.pH-Responsive Nanoparticles for Drug Delivery.Mol.Pharm.7(6),1913-1920(2010)。

[0381] 18.Gu F,Zhang L,Teply BA等Precise engineering of targeted

nanoparticles by using self-assembled biointegrated block copolymers.Proc.Natl.Acad.Sci.USA 105(7),2586-2591(2008)。

[0382] 19.Takae S,Miyata K,Oba M等PEG-detachable polyplex micelles based on disulfide-linked block catiomers as bioresponsive nonviral gene vectors.J.Am.Chem.Soc.130(18),6001-6009(2008)。

[0383] 20.Zhang L,Chan JM,Gu FX等Self-assembled lipid-polymer hybrid nanoparticles:A robust drug delivery platform.ACS Nano 2(8),1696-1702(2008)。

[0384] 21.Pornpattananangkul D,Zhang L,Olson S等Bacterial Toxin-Triggered Drug Release from Gold Nanoparticle-Stabilized Liposomes for the Treatment of Bacterial Infection.J.Am.Chem.Soc.133(11),4132-4139(2011)。

[0385] 22.Avgoustakis K,Beletsi A,Panagi Z,Klepetsanis P,Karydas AG,Ithakissios DS.PLGA-mPEG nanoparticles of cisplatin:in vitro nanoparticle degradation,in vitro drug release and in Vivo drug residence in blood properties.J.Control.Release 79(1-3),123-135(2002)。

[0386] 23.Li J,Jiang G,Ding F.The effect of pH on the polymer degradation and drug release from PLGA-mPEG microparticles.J.Appl.Polym.Sci.109(1),475-482(2008)。

[0387] 24.Higuchi T.Rate of release of medicaments from ointment bases containing drugs in suspension.J.Pharm.Sci.50,874-875(1961)。

[0388] 25.Siepmann J,Peppas NA.Higuchi equation:derivation,applications,use and misuse.Int.J.Pharm.418(1),6-12(2011)。

[0389] 26.Budhian A,Siegel SJ,Winey KI.Controlling the in vitro release profiles for a system of haloperidol-loaded PLGA nanoparticles.Int.J.Pharm.346(1-2),151-159(2008)。

[0390] 27.Pitt CG,Schindler A.The kinetics of drug cleavage and release from matrices containing covalent polymer-drug conjugates.J.Control.Release 33(3),391-395(1995)。

[0391] 28.Lowenberg B,Ossenkoppele GJ,van Putten W等High-Dose Daunorubicin in Older Patients with Acute Myeloid Leukemia.New Engl.J.Med.361(13),1235-1248(2009)。

[0392] 29.Hu C-MJ,Zhang L.Therapeutic Nanoparticles to Combat Cancer Drug Resistance.Curr.Drug Metab.10(8),836-841(2009)。

[0393] 30.Huwyler J,Cerletti A,Fricker G,Eberle AN,Drewe J.By-passing of P-glycoprotein using immunoliposomes.J.Drug Target.10(1),73-79(2002)。

[0394] 31.Rapoport N,Marin A,Luo Y,Prestwich GD,Muniruzzaman M.Intracellular uptake and trafficking of pluronic micelles in drug-sensitive and MDR cells:Effect on the intracellular drug localization.J.Pharm.Sci.91(1),157-170(2002)。

[0395] 32.Sahoo SK,Labhasetwar V.Enhanced anti proliferative activity of

transferrin-conjugated paclitaxel-loaded nanoparticles is mediated via sustained intracellular drug retention.Mol.Pharm.2(5),373-383(2005)。

[0396] 实施例3

[0397] 用于个体化免疫治疗的具有癌细胞膜的纳米颗粒

[0398] 本实施例提供了一种免疫治疗性系统,其具有优于现有方法的若干优点。

[0399] 1)当前策略仅集中在由所讨论的一般癌症类型表达的个体肿瘤相关性抗原(TAA)上。癌症是异质性疾病,并且这样一种方法的一个限制是一位患者的癌症的抗原表达可以完全不同于另一位患者。这导致小于最优百分比的患者是接受此类治疗的实际候选人的。另一个问题是靶向单个TAA导致针对癌症的较弱的总体免疫应答,从而允许它最终突变并且发展耐受性。所描述的发明通过经由收集来自每个单独的患者的自体肿瘤的膜物质而针对其定制治疗来解决这些问题。此方法允许在纳米颗粒上精确地再创造抗原表达谱,这给予免疫系统增加针对癌症的强烈的、多管齐下的应答的机会。

[0400] 2)当前策略的另一个限制是它们在极大程度上要求TAA化学偶联至免疫佐剂。这样做是为了共同定位抗原与佐剂,这最终允许免疫系统增加针对将以另外的方式具有低免疫原性的自体抗原的应答。这样一种方法所带来的问题是化学偶联经常可以使抗原变形,从而导致差的APC递呈。另外,化学偶联的随机性质可以导致低产率,并且导致无法推广这样一种系统同时用于不同种类的TAA。所描述的发明解决了前面提到的这两个问题。通过将完整的细胞膜移位至纳米颗粒上,所有表面膜TAA处于它们的天然环境中并且因此以它们的天然形式被APC如实地递呈。纳米颗粒核的使用允许以可调的佐剂与抗原比率共同递送免疫佐剂与抗原物质,这是用传统的化学偶联系统所不能做到的事情。

[0401] 3)大多数当前的癌症疫苗是具有不利的药物代谢动力学和生物分布的小化合物。一旦体内注射,这些化合物可以从靶部位扩散开来或在被APC吸收之前降解。所描述的发明用各种各样的方式克服了这种情况。首先,因为膜被纳米颗粒表面支撑着,它不太可能与不希望的靶标融合。以此方式,可以保存抗原并且使其以其最优形式稳定直到被APC吸收。另外,纳米颗粒系统是大于小化合物的幅值量级;纳米颗粒的大小还可以在大范围内微调。通过控制纳米颗粒核大小为约200nm至300nm,可以防止从靶部位扩散开来,从而允许APC过来并且有效地吸收颗粒。同时,纳米颗粒的小尺寸还允许最大化膜物质可以在其上停留的表面积,从而导致每剂量递送更多的抗原物质。

[0402] 本实施例提供了癌细胞膜物质源自患者的肿瘤或源自建立的细胞系并且用于涂覆纳米颗粒,其中免疫佐剂负载在里面以便产生有效力的癌症疫苗(图14)。使用此平台,可能将来自癌细胞表面的所有抗原物质递送至抗原递呈细胞(APC)。另外,免疫佐剂的共同递送将允许免疫系统增加针对以另外的方式有微弱的免疫原性的物质的强烈应答。此策略可以用来治疗广泛的癌症类型,包括但不限于:膀胱癌、骨癌、脑癌、乳癌、宫颈癌、结肠直肠癌、胃癌、肝癌、卵巢癌、胰腺癌、肺癌、皮肤癌以及前列腺癌。

[0403] 所描述的癌症疫苗可以用于预防性和治疗性的目的。使用建立的癌细胞系作为膜来源,患者可以针对表达常见抗原基序的癌症接种疫苗。另一方面,使用源自单独患者肿瘤的膜物质,可以增加针对患者确切癌症类型强烈的免疫应答。这将广泛影响对给定患者与患者间疾病异质性的癌症的治疗。

[0404] 治疗准备:

[0405] 1)癌细胞源自患者切除的肿瘤或源自常见的癌细胞系，

[0406] 2)使用如分级分离的方法，从细胞得到膜物质。实施例如下：

[0407] -对癌细胞进行机械均质化以便使膜破裂，

[0408] -离心沉淀匀浆以便沉淀细胞内内容物并且收集上清液与膜。

[0409] 3)使用如纳米沉淀的方法制备负载有佐剂的纳米颗粒。实施例如下：

[0410] -将聚合物(例如PLGA)和佐剂(例如单磷酰脂质A)溶解在有机相中，

[0411] -将有机相纳米沉淀为水相以便形成具有所需的大小的纳米颗粒。

[0412] 4)如下制造最后的免疫治疗性颗粒：

[0413] -物理挤压从癌细胞中收集的膜物质以便形成更小的膜囊泡，

[0414] -与囊泡一起挤压预先制成的负载佐剂的核以便形成最后颗粒(图15)。

[0415] 治疗施用：

[0416] 1)皮下施用纳米颗粒制剂

[0417] 2)或者，静脉内施用治疗

[0418] 作用机制(图16)：

[0419] 1)当注射到患者中时，触发初级的免疫应答，

[0420] 2)APC迁移至炎症部位并且吸收颗粒，

[0421] 3)当吸收时，颗粒降解，从而释放免疫佐剂，

[0422] 4)当检测免疫佐剂时，APC成熟，

[0423] 5)现在将纳米颗粒表面上的抗原物质递呈在APC的外部上，

[0424] 6)将成熟APC上的抗原递呈至CD8+T细胞，

[0425] 7)当与癌症特异性抗原接合时，CD8+T细胞活化并且变为细胞毒性T细胞，以及

[0426] 8)针对癌细胞抗原的细胞毒性T细胞增殖并且攻击肿瘤。

[0427] 本实施例提供了基于癌细胞涂覆的纳米颗粒的免疫治疗性疫苗，和制造这样一种疫苗的可行性(图17)。发明人已证实制造具有包封的有效载荷的癌细胞膜涂覆的纳米颗粒是可能的。源自癌细胞的膜物质缺乏大的细胞内内容物，并且有效地移位至纳米颗粒表面。另外，发明人已证实，当被细胞吸收时，共同定位了纳米颗粒核的内容物和外部膜物质，这代表验证设计成功的最重要的数据。本文中，发明人进行了证明平台功效所要求的体外和体内实验。这些实验包括：1)证实通过用我们的纳米颗粒制剂脉冲未成熟的树突状细胞实现的癌细胞抗原物质的递呈，2)证实当与来自第一实验的成熟树突状细胞共同培养时CD8+T细胞的活化，3)使用具有B16黑素瘤鼠科模型的C57BL/6确定体内治疗功效和当直接施用治疗时观察肿瘤大小的减少。

[0428] 所描述的发明具有用于商业化的巨大潜力。因为它易于制造，可对每个单独的患者个体化，并且可以向几乎任何形式的癌症推广，这种技术最终将驻留在癌症治疗的前线。在治疗方面，可以与手术一起使用此免疫治疗性的治疗。来自切除的肿瘤的材料用来制造疫苗，向患者施用所述疫苗以便破坏任何肿瘤残余物并且预防肿瘤复发。在预防方面，可以推广治疗以便使用常见癌症的建立的细胞系来针对许多癌症类型接种疫苗。

[0429] 参考文献：

[0430] 1.Cho,Nam-Hyuk等“A Multifunctional Core-Shell Nanoparticle for Dendritic Cell-Based Cancer Immunotherapy.”Nature Nanotechnology:6,675-82

(2011)。

[0431] 2.Li,Haiyan等“Alpha-Alumina Nanoparticles Induce Efficient Autophagy-Dependent Cross-Presentation and Potent Antitumour Response.”Nature Nanotechnology 6,645-650(2011)。

[0432] 3.Moon,James J等“Interbilayer-Crosslinked Multilamellar Vesicles as Synthetic Vaccines for Potent Humoral and Cellular Immune Responses.”Nature Materials 10.3(2011):243-251。

[0433] 4.Tongchusak,S等“Induction of Anti-Tumor Cytotoxic T Cell Responses Through PLGA-Nanoparticle Mediated Antigen Delivery.”Biomaterials(2011),32(14):3666-78。

[0434] 实例4

[0435] 仿生毒素纳米海绵

[0436] 抗毒素治疗提供了清除身体毒力因子的潜力,所述毒力因子构成众多的健康威胁,包括细菌感染、有毒损伤以及生物武器。然而尽管不断努力发展抗毒素,但是安全有效的治疗选择仍是有限的。本文中,发明人构建了仿生纳米海绵并且证明了其能够吸收并且中和来自金黄色葡萄球菌的α-毒素。由聚合物纳米颗粒支撑的RBC膜双层组成,这些纳米海绵易于吸收破坏膜的毒素并且使它们从其细胞靶标转移开。在小鼠模型中,纳米海绵显著地减小了毒素的毒性。此生物启发的纳米制剂呈现了用于抗毒素治疗的纳米医学的进展。

[0437] 对毒素介导的疾病和损伤的意识不断增加激励了对安全且更有效的抗毒素解决方案的研究。此外,毒素靶向的抗毒力治疗逐渐成为针对传染病的强大策略,在所述传染病之中,耐抗生素的细菌的威胁不断上升(1)。现有的抗毒素平台,如抗血清(2),单克隆抗体(3、4)、小分子抑制剂(5、6)以及分子印迹聚合物(7、8)通过靶向其分子结构来中和毒素。然而,包括高免疫原性、低生物相容性、差的药物代谢动力学以及对毒素特异性的定制合成的需要的因素限制了它们的临床采用。使用生物可降解的PLGA聚合物和红细胞的膜组分,发明人构建了靶向成孔毒素(PFT)作用机制的仿生纳米海绵。

[0438] PFT是在自然中发现的最常见的蛋白质毒素(9、10)。这些毒素通过在细胞膜中形成孔隙而使细胞破裂并且改变其渗透性。在细菌感染中,PFT的攻击通过对微生物防御和营养起关键作用而组成主要的毒力机制(10)。已发现,在金黄色葡萄球菌中,破坏膜的α毒素表达水平直接与菌株毒力相关(11)。研究已证明抑制α毒素可以减小金黄色葡萄球菌感染的严重性(11、12),并且相似的PFT靶向的策略已显示出针对其它病原体的治疗潜力,所述其它病原体包括产气荚膜梭菌(Clostridium perfringens)、大肠杆菌(Escherichia coli)(13)、单核细胞增多性李斯特氏菌(Listeria monocytogenes)(14、15)、炭疽杆菌(Bacillus anthracis)(16)以及肺炎双球菌(Streptococcus pneumoniae)(17、18)。

[0439] 除了它们在细菌发病机理中的作用之外,PFT还通常被采用在动物的有毒攻击中,包括海葵、蝎子以及蛇的那些(19)。已变得明显的是针对这些广泛的细胞溶解毒素的有效治疗将解决大量健康问题。已鉴别了超过80个家族的PFT,展示出多种多样的分子结构和相异的表位靶标。尽管有这些差异,但在穿刺细胞膜方面这些毒素之间的功能相似性为具有广泛应用的机制靶向的抗毒素平台提供了设计线索。通常,PFT通过自发并入磷脂双层中而使细胞膜破裂。与脂质膜相互作用的这种倾向已启发了许多基于双层膜平台的应用(20-

22)。本文中,发明人应用纳米颗粒稳定的RBC膜的用途来吸收并且阻止破坏膜的蛋白质。使用葡萄球菌的α-毒素作为PFT模型,发明人证明了这些纳米海绵可以中和毒素的剧毒成孔活性(图18A)。

[0440] 通过挤压红细胞膜囊泡与70nm PLGA纳米颗粒来制备毒素纳米海绵(图22),得到直径约85nm的核-壳纳米结构(图18B、图18C)。RBC膜囊泡源自从小鼠的全血纯化的RBC,并且PLGA颗粒由纳米沉淀方法制备。这种红细胞膜涂覆技术先前被报道为伪装纳米颗粒,从而改进其血清稳定性并且延长其体内循环半衰期(23)。在本研究中,视察了这些颗粒支撑的RBC膜与溶血的α毒素之间的相互作用。在透射电子显微镜下,纳米海绵显现出核-壳结构,所述核-壳结构由包裹在RBC双层中的聚合物核组成(图18C)。

[0441] 为了确立纳米海绵中和α毒素的能力,将200μg纳米海绵与在PBS中的3μgα毒素混合,持续30min。随后将混合物与5%的纯化的小鼠RBC混合。作为比较,将相等量的PEG化的PLGA颗粒、PEG化的脂质体以及具有可比较大小的RBC膜囊泡与毒素混合。孵育30分钟后,离心溶液并且观察上清液的释放的血红蛋白。如在图19A中所显示,纳米海绵样品显著地不同于其它样品,展现出澄清的上清液,这表明RBC未破坏。使用毒素处理的和PBS处理的RBC溶液作为阳性对照和阴性对照,通过测量540nm处上清液的吸光度来定量溶血作用的程度。虽然PEG化的PLGA纳米颗粒、PEG化的脂质体以及RBC膜囊泡无法阻止毒素的溶血活性,但是具有纳米海绵的样品显示出完全的毒素抑制。

[0442] 为了更好地阐明α-毒素抑制背后的机制,使纳米制剂/毒素混合物过滤通过Sepharose® CL-4B柱以便分离出游离漂浮的、未结合的毒素。考虑α毒素趋于自发并入红细胞膜(24)和衬底支撑的膜双层(25)中,RBC膜囊泡和纳米海绵预期会在运行穿过过滤柱之后保留毒素。SDS-PAGE分析后,发现RBC膜囊泡和纳米海绵保留大部分的α毒素(分别为95.3%和90.2%),如毒素参比的具有相似强度的34kDa蛋白质带所指示(图19C)。另一方面,毒素蛋白带在PEG化的PLGA NP和PEG化的脂质体样品中几乎不存在(分别为3.4%和4.7%),这表明PEG化的制剂与毒素的相互作用较少。这种缺乏毒素保留可以归因于亲水性PEG涂层,所述亲水性PEG涂层通过空间排斥排除蛋白质相互作用。被固体核稳定并且被RBC膜组分伪装的纳米海绵可以直接与毒素靶标进行相互作用。

[0443] 虽然RBC膜囊泡也吸收α毒素,但是它们不能减少毒素的溶血活性凸显了聚合物核在纳米海绵中的作用。为了更好地理解RBC膜囊泡与纳米海绵的中和能力之间的不同,使用由膜染料(DMPE-罗丹明)制备的两种纳米制剂进行细胞吸收研究。荧光显微镜法有效地显现出两种纳米制剂在与细胞一起孵育时的不同命运(图19D)。在具有RBC膜囊泡的样品中,广泛分布的红色荧光遮盖了整个细胞区域,这可以从这些不稳定的囊泡与细胞膜融合得到解释。此观察结果与先前对脂质体RBC膜囊泡的研究一致,所述脂质体RBC膜囊泡易于被吸收在细胞膜上并且不经历细胞内吞作用(26)。相比之下,纳米海绵显示出细胞内区域内相异的荧光颗粒,这证明了聚合物核使RBC膜组分稳定并且实现其细胞吸收的能力。这些发现帮助证实了溶血作用研究的结果,在所述情况下,具有结合的α-毒素的RBC囊泡很可能与RBC融合并且因此不能阻止溶血作用。另一方面,纳米海绵能够阻止毒素并且使它们远离其它RBC膜。另外,图19D表明纳米海绵可以促进膜结合的毒素的内吞吸收。此纳米颗粒诱导的进入机制将增强所吸附的蛋白质的内溶酶体消化,从而预防毒素可能造成的进一步破坏。

[0444] 为了进一步表征纳米海绵,通过滴定研究检验所述纳米海绵的毒素吸收容量。将

不同量的α-毒素与200μl的1mg/ml纳米海绵的PBS溶液一起孵育30分钟。作为对照，在缺乏纳米海绵的情况下制备相同浓度的α毒素。随后将毒素/纳米海绵混合物添加至含有5％RBC的1.8mL PBS溶液中，并且在30分钟孵育后监测溶血作用(图19E)。在缺乏纳米海绵的情况下，用1.2μg的α毒素(42％)观察到显著的溶血作用，而用3.6μg的α毒素实现接近完全的溶血作用。然而，在纳米海绵治疗下，用高达9μg的α毒素观察到可忽略不计的溶血作用，而用30μg毒素实现完全的溶血作用。此数据表明纳米海绵显著减少α毒素活性，但是有容量限制。对总毒素含量固定为9μg的纳米海绵的另外的滴定研究揭示溶血活性的抑制与纳米海绵的量直接相关(图19F)。接近9μg毒素可以完全地被200μg纳米海绵中和。基于滴定数据、纳米海绵的大小、PLGA的密度以及毒素的分子量，纳米海绵的吸收容量估算为每个颗粒173个毒素单体。作为比较，由纳米海绵的表面积和毒素蛋白的投影面积估算理论容量为每个颗粒约2000个毒素单体。更低的实验值可以归因于毒素分子之间的位阻和在纳米海绵的表面上RBC膜蛋白的存在。

[0445] 通过皮下施用体内测试纳米海绵中和α毒素的能力。在右侧腹皮肤下注射α毒-素或α-毒素/纳米海绵混合物之后72小时，比较小鼠中的皮肤损害形成。以12μg/mL浓度注射150μL后，单独的α毒素诱导了严重的皮肤损害，在对照组中具有可证实的水肿和炎症(图20A)。然而，与100μg纳米海绵混合(约69:1的毒素与颗粒比)看起来似乎中和了毒素，因为在小鼠上不存在可观察的损害(图20B)。仔细观察从对照组中收获的皮肤组织，显示出坏死、细胞凋亡以及中性粒细胞炎性浸润与真皮水肿(图20C)。此外，毒素对下面的肌肉组织造成损害，如通过原纤维间水肿、肌肉纤维撕裂以及相当数量的中性粒细胞从周围脉管系统外渗所证明的(图20E)。这与接受毒素/纳米海绵混合物的小鼠的组织样品中所观察到的(图20D和图20F)形成强烈对比，其显示出皮肤组织结构中正常的上皮结构和完整的纤维结构，在肌肉组织结构中没有可见的浸润(图20D、图20F)。

[0446] 通过在小鼠中全身性施用来评估纳米海绵的解毒能力。首先通过用80mg/kg的纳米海绵静脉内注射小鼠来验证纳米海绵的安全性。剂量是良好耐受的，因为2周时间里接种的组没有展现出死亡(数据未示出)。当证实制剂的安全性时，检验通过预先接种和之后接种两者实施的治疗。通过尾静脉注射浓注致死剂量的α毒素(75μg/kg)，已知所述剂量诱导小鼠中急剧死亡。在两个实验组中，在毒素注射之前2分钟或之后2分钟注射80mg/kg的纳米海绵。在对照组中，在毒素注射的6h内观察到100％死亡率(n＝9，图21)。在之后接种纳米海绵的组中，死亡率显著地减小至56％(p值为0.0091；n＝9)。在预先接种的组中，存活率进一步改进，其中仅观察到11％的死亡率(p值<0.0001；n＝9)。结果表明纳米海绵给予针对体内α毒素的保护。当预防性地给予时，发现纳米海绵的益处更高，这不出意料地给予α毒素溶血作用的快速动力学(27)。在这两个处理组中，6h标记后没有观察到额外的死亡，从而表明吸附的毒素被解毒而不仅仅是具有其毒性延迟。这些结果表明这些纳米海绵在预防性和缓解性背景下的有潜力的临床应用。

[0447] 总之，鉴于PFT的功能特性，将由PLGA纳米颗粒支撑的RBC膜组成的纳米海绵构建作为抗毒素解决方案。发明人证明了膜可及性和结构完整性是经由此平台实现毒素中和的关键方面。纳米海绵在体外抑制了α毒素的溶血活性，并且极大地减小了小鼠中的毒素损害。此吸收毒素的平台在治疗性纳米颗粒和抗毒素治疗中呈现新的范例。不像通过亲水性涂层排除蛋白质相互作用的常规隐秘策略，RBC膜覆盖的纳米海绵可以与毒性蛋白相互作

用并且在体内充当毒素诱饵。并且不像其它结构特异性的抗毒素平台，纳米海绵解决了常见的破坏膜的机制并且具有治疗各种PFT诱导的损害和疾病的潜力。更重要地，当局部或全身性施用时，平台引起并发症的风险很小，因为它完全由生物相容的和生物可降解的材料组成。聚合物核还可以被其它治疗性货物取代以便产生针对传染病的多模式治疗。因为PFT是最常见的毒素，所以纳米海绵平台在临床上具有极大的治疗影响。

[0448] 纳米海绵的实验吸收容量

[0449] PLGA的密度：ρ＝1.2g/mL

[0450] 聚合物核的半径：r＝35nm

[0451] 纳米海绵的质量：$M_{ns} = \rho \times \frac{4}{3}\pi r^3 = 2.2\times10^{-16}$ 克/颗粒＝ 1.30×10^{8} 克/摩尔

[0452] α-毒素的质量：M_t＝34,000克/摩尔

[0453] 基于观察结果，9μg毒素可以完全被200μg NP吸附：

[0454] 200μg纳米海绵约1.5×10^{-12}摩尔

[0455] 9μgα-毒素约2.6×10^{-10}摩尔

[0456] 毒素:NP＝173:1

[0457] 纳米海绵的理论吸收容量

[0458] 纳米海绵的平均直径：r_{ns}＝42.5nm

[0459] 纳米海绵表面积：$A_{ns}=4\pi r_{ns}^2=22697nm^2$

[0460] 假定纳米海绵上α毒素为完全填充的七聚环。

[0461] 基于低聚化的α毒素环的外径为10nm(1)，环的投影面积为：$A_{毒素七聚体} = \pi r_{ring}^2 = 78.5\ nm^2$

[0462] 每个纳米海绵的低聚化环的数目＝22697/78.5＝289个七聚环

[0463] 每个纳米海绵的α毒素单体＝289×7＝2024

[0464] 材料和方法

[0465] 毒素纳米海绵的制备

[0466] 如先前所报道，合成纳米海绵颗粒(2)。将从6周龄雄性ICR小鼠(查尔斯河实验室)中收集的全血在800xg下离心5分钟，以便分离RBC。然后使RBC经受低渗处理，并且通过在800xg下离心5分钟来收集RBC空胞。使用小型挤压机(Avanti Polar Lipids)，将所得到的空胞逐次挤压通过400nm和100nm聚碳酸酯多孔膜。使用溶剂置换方法，使用0.67dL/g羧基封端的50:50聚($_{DL}$-丙交酯-乙交酯)共聚物(LACTEL Absorbable Polymers)同时制备PLGA聚合物核。将PLGA溶解在1mg/mL的乙腈中。为了制造1mg的颗粒，逐滴添加1mL的PLGA溶液到3mL水中。露天搅拌所得到的混合物2h，并且使用10kDa分子量截留Amicon Ultra-4离心过滤器(Millipore)浓缩。通过将PLGA纳米颗粒与由新鲜血液制备的囊泡(1mg PLGA/1mL血液)挤压通过100nm聚碳酸酯膜来合成最后的RBC纳米海绵。必要时，使用氮气吹扫来浓缩纳米颗粒。PLGA聚合物的重量用于纳米海绵所引用的所有后续质量值。通过使用Malvern ZEN 3600Zetasizer重复进行三次动态光散射测量来获得纳米海绵的大小，其显示出平均大小为85nm。

[0467] 毒素纳米海绵的透射电子显微术

[0468] 将100μg的RBC纳米海绵与3μg金黄色葡萄球菌α毒素(Sigma Aldrich)一起孵育15分钟。以4μg/mL的纳米海绵浓度将一滴纳米颗粒溶液沉积在辉光放电的碳涂覆的栅格上。沉积之后一分钟,用10滴蒸馏水洗掉液滴并且用1%乙酸双氧铀染色。在200kV下,在FEI Sphera显微镜下使样品成像。

[0469] PEG化的PLGA纳米颗粒、PEG化的脂质体以及RBC膜囊泡的制备

[0470] 根据纳米沉淀方法制备PEG化的纳米颗粒。简单地说,将1mg的PEG-PLGA二嵌段共聚物溶解在1mL的乙腈中,并且在恒定搅拌下添加至含有3mL水的小瓶中。然后在通风柜中蒸发有机溶剂,持续2h。然后使用10kDa分子量截留的Amicon Ultra-4离心过滤器(Millipore)洗涤NP溶液三次。通过机械挤压制备PEG化的脂质体。简单地说,1mg的卵磷脂酰胆碱(Egg PC)和200μg的DSPE-PEG-羧基(Avanti极性脂质)溶解在1mL的氯仿中。然后蒸发有机溶剂以便形成干燥的脂质薄膜。用1mL PBS再水化脂质薄膜,接着涡旋1分钟并且在FS30D浴式超声仪(Fisher Scientific)中进行声处理3分钟。随后将制剂挤压通过100nm孔隙大小的聚碳酸酯膜11次,以便形成窄分布的脂质体。根据针对纳米海绵制备所描述的RBC纯化和膜挤压实验方案制备RBC膜囊泡。通过使用动态光散射进行三次重复测量来获得纳米制剂的大小,其显示出PEG化的PLGA纳米颗粒、PEG化的脂质体以及RBC膜囊泡的平均大小分别为90nm、105nm以及120nm。

[0471] RBC纳米海绵竞争性中和测定

[0472] 将3μgα-毒素与含有1mg/mL的RBC纳米海绵、PEG化的PLGA纳米颗粒、PEG化的脂质体以及RBC膜囊泡的200μL PBS溶液一起孵育30分钟。用9μgα-毒素的PBS溶液制备阴性对照。然后溶液与1.8mL的5%纯化的小鼠RBC一起再孵育30分钟。孵育后,在14,000rpm下,在Beckman Coulter Microfuge® 22R离心机中对每个样品进行离心沉淀10分钟。使用Tecan Infinite M200多平台读取器,在540nm处分析上清液中的血红蛋白的吸光度以便测定RBC溶解的程度。重复进行实验三次。

[0473] RBC纳米海绵结合研究

[0474] 将9μgα-毒素与含有1mg/mL的RBC纳米海绵、PEG化的PLGA纳米颗粒、PEG化的脂质体以及RBC膜囊泡的200μL PBS溶液一起孵育30分钟。孵育之后,将样品过滤通过Sepharose® CL-4B尺寸排阻柱以便去除未结合的毒素。然后冻干样品,并且在SDS样品缓冲液(Invitrogen)中制备。与过滤的样品同时制备9μg的纯α毒素作为参比。使用Novex® XCell SureLock电泳系统(Invitrogen),在4%至12%的Bis-Tris 10-孔微型凝胶的MOPS运行缓冲液上分离所制备的样品。在200V下运行样品50分钟,并且将所得到的聚丙烯酰胺凝胶在SimplyBlue(Invitrogen)中染色过夜用于可视化。为了定量毒素保留,使用具有由0.3μg、1μg、3μg以及9μg的纯α-毒素制备的毒素标准物的ImageJ分析34kDa处的带强度。

[0475] α-毒素滴定研究

[0476] 将200μL的1mg/mL纳米海绵的PBS溶液与30μg、9μg、3.6μg、1.2μg、0.6μg以及0.3μg的α-毒素一起孵育30分钟。作为对照组,在缺乏纳米海绵的情况下也制备含有相同浓度α毒素的溶液。然后将样品溶液和对照溶液与1.8mL的5%小鼠RBC的PBS溶液一起孵育30分钟。在14,000rpm下对每个样品离心沉淀10分钟。在540nm处分析上清液中的血红蛋白的吸光度以便测定RBC溶解的程度。重复进行实验三次。

[0477] 纳米海绵滴定研究

[0478] 制备PBS溶液以便含有200μg、60μg、20μg、6μg以及2μg的不同量的毒素纳米海绵。将每种纳米海绵溶液与9μg的α-毒素的PBS溶液混合，并且稀释至最终体积为200μL。孵育30分钟后，将溶液添加至1.8mL的5％小鼠RBC的PBS溶液中并且孵育30分钟。然后在14,000rpm下对溶液离心沉淀10分钟。在540nm处分析上清液中的血红蛋白的吸光度以便测定RBC溶解的程度。重复进行实验三次。

[0479] RBC纳米海绵的细胞吸收

[0480] 为了检验细胞吸收后的纳米海绵和RBC膜囊泡的膜物质，在机械挤压进入膜囊泡之前，将10μg的DMPE-罗丹明(Avanti极性脂质)添加至源自1mL全血的RBC空胞中。使用所得到的染料负载的RBC膜囊泡来制备纳米海绵。在介质199中将荧光纳米海绵和膜囊泡与浓度为300μg/mL的人脐静脉内皮细胞(HUVEC)(ATCC#CRL-1730)一起孵育1小时，所述介质199具有Hanks'BSS、具有L-谷酰胺、HEPES以及1.4g/L NaHCO3(Lonza)，其补充有100U/mL盘尼西林与100μg/mL链霉素(Invitrogen)和50μg/mL内皮细胞生长补充物(Biomedical Technologies,Inc.)。然后抽出介质并且在新鲜介质中孵育细胞1h。第二个孵育周期后，用PBS洗涤细胞，用10％福尔马林(Millipore)固定，并且用含有DAPI的Vectashield®(Invitrogen)封固。使用60X油浸物镜在应用精密DeltaVision去卷积扫描荧光显微镜上使细胞成像。

[0481] 经由皮下途径的毒素中和

[0482] 将RBC纳米海绵与α-毒素以0.67mg/mL纳米海绵和12μg/mL a毒素的最终浓度在PBS中一起孵育15分钟。然后将体积为150μL的混合物皮下注射到6周龄雌性nu/nu裸小鼠(查尔斯河实验室)的侧腹区域中。在注射后的第3天，使小鼠成像。切下5μm的皮肤样品和肌肉样品，并且使用用于组织学的H&E染色。

[0483] 经由全身途径的毒素中和

[0484] 事先在蒸馏水中制备浓度为20mg/mL的RBC纳米海绵和浓度为60μg/mL的α-毒素。对于预先接种研究，通过尾静脉对6周龄雄性ICR小鼠静脉内注射80mg/kg(剂量/体重)的纳米海绵，随后在2分钟后注射75μg/kg的α-毒素。对于之后接种研究，首先对6周龄雄性ICR小鼠注射75μg/kg的α-毒素，随后在2分钟后注射80mg/kg的纳米海绵。对照物仅注射75μg/kg的α-毒素溶液。每组的样品量为9。

[0485] 1.A.E.Clatworthy,E.Pierson,D.T.Hung,Targeting virulence:a new paradigm for antimicrobial therapy.Nat Chem Biol 3,541(Sep,2007)。

[0486] 2.D.G.Beghini等,Anti-sera raised in rabbits against crotoxin and phospholipase A2 from Crotalus durissus cascavella venom neutralize the neurotoxicity of the venom and crotoxin.Toxicon 44,141(Aug,2004)。

[0487] 3.Z.Chen等,Potent neutralization of anthrax edema toxin by a humanized monoclonal antibody that competes with calmodulin for edema factor binding.Proc Natl Acad Sci U S A 106,13487(Aug 11,2009)。

[0488] 4.W.W.Kum,A.W.Chow,Inhibition of staphylococcal enterotoxin A-induced superantigenic and lethal activities by a monoclonal antibody to toxic shock syndrome toxin-1.J Infect Dis 183,1739(Jun 15,2001)。

[0489] 5.C.C.McCormick,A.R.Caballero,C.L.Balzli,A.Tang,R.J.O'Callaghan,Chemical inhibition of alpha-toxin,a key corneal virulence factor of Staphylococcus aureus.Invest Ophthalmol Vis Sci 50,2848(Jun,2009)。

[0490] 6.D.T.Hung,E.A.Shakhnovich,E.Pierson,J.J.Mekalanos,Small-molecule inhibitor of Vibrio cholerae virulence and intestinal colonization.Science 310,670(Oct 28,2005)。

[0491] 7.Y.Hoshino等,The rational design of a synthetic polymer nanoparticle that neutralizes a toxic peptide in vivo.Proc Natl Acad Sci U S A 109,33(Jan 3,2012)。

[0492] 8.Y.Hoshino等,Recognition,neutralization,and clearance of target peptides in the bloodstream of living mice by molecularly imprinted polymer nanoparticles:a plastic antibody.J Am Chem Soc 132,6644(May 19,2010)。

[0493] 9.R.J.Gilbert,Pore-forming toxins.Cell Mol Life Sci 59,832(May,2002)。

[0494] 10.C.J.Rosado等,The MACPF/CDC family of pore-forming toxins.Cell Microbiol 10,1765(Sep,2008)。

[0495] 11.J.Bubeck Wardenburg,O.Schneewind,Vaccine protection against Staphylococcus aureus pneumonia.J Exp Med 205,287(Feb 18,2008)。

[0496] 12.M.Shoham,Antivirulence agents against MRSA.Future Med Chem 3,775(May,2011)。

[0497] 13.P.O'Hanley,G.Lalonde,G.Ji,Alpha-hemolysin contributes to the pathogenicity of piliated digalactoside-binding Escherichia coli in the kidney:efficacy of an alpha-hemolysin vaccine in preventing renal injury in the BALB/c mouse model of pyelonephritis.Infect Immun 59,1153(Mar,1991)。

[0498] 14.B.T.Edelson,E.R.Unanue,Intracellular antibody neutralizes Listeria growth.Immunity 14,503(May,2001)。

[0499] 15.B.T.Edelson,P.Cossart,E.R.Unanue,Cutting edge:paradigm revisited:antibody provides resistance to Listeria infection.J Immunol163,4087(Oct 15,1999)。

[0500] 16.A.Nakouzi,J.Rivera,R.F.Rest,A.Casadevall,Passive administration of monoclonal antibodies to anthrolysin O prolong survival in mice lethally infected with Bacillus anthracis.BMC Microbiol8,159(2008)。

[0501] 17.J.E.Alexander等,Immunization of mice with pneumolysin toxoid confers a significant degree of protection against at least nine serotypes of Streptococcus pneumoniae.Infect Immun 62,5683(Dec,1994)。

[0502] 18.L.A.Kirkham等,Construction and immunological characterization of a novel nontoxic protective pneumolysin mutant for use in future pneumococcal vaccines.Infect Immun 74,586(Jan,2006)。

[0503] 19.I.Andreeva-Kovalevskaya Zh,A.S.Solonin,E.V.Sineva,V.I.Ternovsky,Pore-forming proteins and adaptation of living organisms to environmental

conditions.Biochemistry(Mosc)73,1473(Dec,2008)。

[0504] 20.G.Ma,Q.Cheng,Vesicular polydiacetylene sensor for colorimetric signaling of bacterial pore-forming toxin.Langmuir 21,6123(Jul 5,2005)。

[0505] 21.D.Pornpattananangkul等,Bacterial toxin-triggered drug release from gold nanoparticle-stabilized liposomes for the treatment of bacterial infection.J Am Chem Soc 133,4132(Mar 23,2011)。

[0506] 22.D.Branton等,The potential and challenges of nanopore sequencing.Nat Biotechnol 26,1146(Oct,2008)。

[0507] 23.C.M.Hu,L.Zhang,S.Aryal,C.Cheung,R.H.Fang,Erythrocyte membrane-camouflaged polymeric nanoparticles as a biomimetic delivery platform.Proc Natl Acad Sci U S A 108,10980(Jul5,2011)。

[0508] 24.A.S.Klainer,M.A.Madoff,L.Z.Cooper,L.Weinstein,Staphylococcal Alpha-Hemolysin:Detection on the Erythrocyte Membrane by Immunofluorescence.Science 145,714(Aug 14,1964)。

[0509] 25.J.Chalmeau,N.Monina,J.Shin,C.Vieu,V.Noireaux,alpha-Hemolysin pore formation into a supported phospholipid bilayer using cell-free expression.Biochim Biophys Acta 1808,271(Jan,2011)。

[0510] 26.M.Moorjani等,Nanoerythrosomes,a new derivative of erythrocyte ghost II:identification of the mechanism of action.Anticancer Res 16,2831(Sep-Oct,1996)。

[0511] 27.S.Vandana,M.Raje,M.V.Krishnasastry,The role of the amino terminus in the kinetics and assembly of alpha-hemolysin of Staphylococcus aureus.J Biol Chem 272,24858(Oct 3,1997)。

[0512] 28.A.Valeva等,J Biol Chem 276,14835(May 4,2001)。

[0513] 29.C.M.Hu,L.Zhang,S.Aryal,C.Cheung,R.H.Fang,Proc Natl Acad Sci U S A 108,10980(Jul 5,2011)。

[0514] 实例5

[0515] 用于主动毒素免疫的细胞膜涂覆的纳米颗粒

[0516] 目前,毒素疫苗接种的主要方法是使用变性的毒素。然而,此方法在中和毒素毒力方面可能是无效的,并且会破坏毒素蛋白抗原性所必需的天然结构。已经施用毒性降低的基因工程化的毒素用于毒素疫苗接种。然而,这些制剂需要针对特定的毒素种类定制制成并且造价昂贵。

[0517] 用于安全毒素免疫的中和毒素的颗粒是独特的并且先前没有描述过。现有的毒素免疫方法通过加热或化学品而造成变性,这会影响毒素的免疫原性;或产生工程化的非毒性蛋白质对应物,它们可能是昂贵和繁琐的。降低毒素毒性与保存疫苗抗原性之间的权衡为毒素免疫方面提出重大的挑战。本发明提供了优于现有技术的主要优点,因为它在没有破坏其天然结构的情况下中和了毒素毒力。它易于制备并且可应用于大量的毒素种类。

[0518] 涂覆在细胞膜中的纳米颗粒被用作递送相关抗原用于主动免疫的平台。已显示出膜双层涂覆的颗粒可以吸收细菌毒素并且使其解毒。这些中和的、颗粒结合的蛋白质丧失

毒力但还保留其免疫原性，并且在体内递送以便诱导免疫应答。此策略用来使毒素钝化用于主动免疫，此时受试者获得针对初始毒素靶标的防御(图23)。所述技术治疗广泛的感染和疾病，包括但不限于：产气荚膜梭菌、大肠杆菌、单核细胞增多性李斯特氏菌、炭疽杆菌、肺炎双球菌、金黄色葡萄球菌以及酿脓链球菌(Streptococcus pyogenes)。颗粒的亚微米大小使所述平台易于被抗原递呈细胞吸收。

[0519] 来自金黄色葡萄球菌的成孔毒素如α-溶血素通过刺穿细胞膜而引起细胞损害。本文中描述的毒素纳米海绵由聚合物核组成，所述聚合物核被涂覆在红细胞的膜物质中。类似于真正的细胞纳米颗粒上的膜与毒素相互作用。一旦毒素被粘附至纳米海绵，它们被稳定的结构锁住并且因此不能造成进一步的损害(图24)。中和的毒素保留其天然结构和构象以便诱导针对毒素靶标的适应性免疫。

[0520] 本实例提供了用于主动毒素免疫的细胞膜涂覆的纳米颗粒。使用由小鼠的红细胞和PLGA聚合物制备的纳米颗粒，发明人已成功中和了金黄色葡萄球菌的α-溶血素，并且在不造成任何可观察的损害的情况下在小鼠中皮下递送它们(图25)。当用颗粒/毒素制剂进行3个过程的接种时，小鼠展现出与用热变性毒素接种的那些小鼠相同水平的针对毒素靶标的血清滴度(图26)。因此，发明人已证明了颗粒/毒素免疫的小鼠的血清可以抑制α-溶血素的溶血活性(图27)。在其中对一组10只小鼠静脉内注射致死剂量的毒素的毒素挑战中，颗粒/毒素免疫的小鼠显示出100％存活，而未免疫的小鼠在6小时标记后无一存活(图28)。

[0521] 成孔毒素是许多主要传染病的关键毒力因子，所述传染病包括但不限于葡萄球菌感染、肺炎、炭疽、气性坏疽以及链球菌性喉炎。本发明可以用作毒素疫苗接种以便治疗或预防这些感染。

[0522] 参考文献：

[0523] 用于免疫的变性毒素

[0524] 1.Eaton M.,“Chemical Modification of Purified Diphtheria Toxin.”The Journal of Immunology.1937(33):419-436。

[0525] 2.Goshi K,Cluff L,Johnson J.“Studies on the Pathogenesis of Staphylococcal Infection.”The Journal of Experimental Medicine.1961,113(2):259-270。

[0526] 用于免疫的工程化的非活性毒素

[0527] 1.Heveker N,Kiessig ST,Glaser R,Hungerer KD,Von Baehr R.,“Anti-Alpha-Hemolysin Monoclonal Antibodies Mediate Protection against Staphylococcus aureus Pneumonia.”Infection and Immunity.2009,77(7):2712-2718。

[0528] 2.Wardenburg B,Schneewind O.,“Vaccine protection against Staphylococcus aureus pneumonia.”The Journal of Experimental Medicine.2008,205(2):287-294。

[0529] 提供以上阐明的详述来帮助本领域普通技术人员实践本发明。然而，本文中描述和要求的发明不限于本文中公开的具体实施方案的范围，因为这些实施方案旨在作为本发明若干方面的说明。任何等同的实施方案旨在属于本发明的范围之内。事实上，根据以上描述，除了本文中所显示和描述的那些实施方案之外，对本发明的各种修改对于本领域普通技术人员而言将是显而易见的，所述各种修改不背离本发明的发现的精神或范围。此类修

改还旨在属于所附权利要求书的范围内。

[0530] 出于所有目的将本申请中引用的所有公布、专利、专利申请以及其它参考文献以引用的方式整体并入本文，其程度正如出于所有目的将每个单独的公布、专利、专利申请或其它参考文献具体且单独地指明以便以引用的方式整体并入本文。本文中的参考文献的引用不应该被解释为承认其为本发明的现有技术。

导管类型腺癌
外分泌腺癌
结肠直肠子宫内膜异位症中的原发性子宫内膜样腺癌
食道腺癌
输卵管腺癌
胎儿肺腺癌
胆囊腺癌
肝样腺癌
原位子宫颈腺癌
肝内外胆管腺癌
泪腺腺癌

[0531]

表 1-示例性癌症和肿瘤

阿克曼(ackerman)肿瘤
恶性阑尾腺癌
胃癌腺癌变体
产生甲胎蛋白的食道腺癌
顶浆分泌腺癌
阑尾腺癌
前庭大腺腺癌
膀胱腺癌
明细胞腺癌
胶质腺癌

睾丸网腺癌

小肠腺癌

胸腺腺癌

未知原发部位的腺癌

脐尿管腺癌

尿道腺癌

阴道腺癌

恶性乳腺癌

苗勒氏(Müllerian)腺癌

腺癌综合征/睾丸肿瘤

促结缔组织增生性成釉细胞瘤

[0532]

大肠腺癌

低级骨外内淋巴囊腺癌

粘液腺癌

前列腺粘液腺癌

胃粘液腺癌

嗜酸瘤细胞腺癌

胰腺腺癌

乳头状膀胱腺癌

多形性腺癌

多形性低级腺癌

近端空肠腺癌

askin 肿瘤

成星形细胞瘤

星形细胞瘤

间变性星形细胞瘤

原浆性星形细胞瘤

[0533]

恶性成釉细胞瘤

淀粉样

巨细胞成血管细胞瘤

恶性血管内乳头状血管内皮瘤

恶性血管内皮瘤

恶性侵袭性阴囊血管粘液瘤

恶性侵袭性阴囊血管粘液瘤

血管肉瘤

心血管肉瘤

肺动脉血管肉瘤

威尔逊-琼斯(Wilson-Jones)血管肉瘤

恶性支气管肺非典型类癌瘤

恶性支气管肺典型类癌瘤

恶性结肠直肠类癌瘤

恶性胃类癌瘤

恶性胃肠阑尾类癌瘤

恶性杯状细胞类癌瘤

恶性肺类癌瘤

恶性肺类癌瘤

恶性直肠类癌瘤

恶性肾脏类癌瘤

恶性小肠类癌瘤

[0534]

表 1-续

毛细胞型星形细胞瘤

丘脑神经胶质瘤星形细胞瘤

胸膜肺胚细胞瘤(PPB)

肺胚细胞瘤

恶性卵巢交界性肿瘤

布-洛二氏瘤 巨大尖锐湿疣

牙源性钙化上皮瘤(CEOT)

腹膜癌

恶性类癌瘤

恶性非典型类癌瘤

成釉细胞癌

肛门癌

间变性癌

间变性胸腺癌

间变性甲状腺癌

顶浆分泌癌

肛周基底细胞癌

外阴基底细胞癌

食道基底样鳞状细胞癌

NOS 基底样鳞状细胞癌

基底样肺癌

[0535]

恶性胸腺类癌瘤

腺泡细胞癌(ACC)

腺泡细胞癌

腺样基底子宫颈癌

腺样囊性癌(AdCC)

腺样囊性乳癌(ACCB)

腺样囊性乳转移癌(ACC-M)

腺鳞癌

腺鳞状肝癌

腺鳞状胰腺癌

肾上腺皮质癌

肾集合管癌

筛状癌

筛状乳癌

囊性癌

十二指肠癌

上皮-肌上皮癌(EMC)

[0536]

胆管癌

胆道癌

细支气管肺泡癌(BAC)

支气管未分化原性小细胞癌

脉络丛癌

纤毛细胞癌

膀胱明细胞癌

外分泌明细胞癌

牙源性明细胞癌

胸腺明细胞癌

集合管癌(CDC)

表 1-续
胆囊癌
巨细胞癌
肝细胞癌
Hurthle 细胞癌
甲状腺 Hurthle 细胞癌
岛状癌
甲状腺岛状癌
胰岛细胞癌
大细胞神经内分泌癌(LCNEC)
淋巴上皮瘤样胸腺癌
男性乳癌
甲状腺髓样癌
睑板腺癌
梅克尔细胞癌(MCC)
化生性乳癌
微囊性附件癌
混合性腺泡内分泌癌
中度分化型神经内分泌癌
肺粘液性细支气管肺泡癌
外分泌粘液癌
粘液表皮样癌

[0537]

支气管粘液表皮样癌	毛母质癌
鼻咽/白种人癌(NPC)	脑垂体癌
神经内分泌癌	泌尿道上皮浆细胞样膀胱癌
肺神经内分泌癌	低分化型神经内分泌癌(PDNEC)
伴有神经内分泌特征的非小细胞肺癌	原发性骨内癌
牙源性癌	外卵巢原发性腹膜癌(EOPPC)
乳头状癌	低分化型肾细胞癌(RCC)
乳头状乳癌	嫌色性(ChC)低分化型肾细胞癌(RCC)
甲状旁腺癌	明细胞(CCC)肾细胞癌(RCC)
壁细胞癌	集合管(CDC)肾细胞癌(RCC)
阴茎癌	乳头状(PC)肾细胞癌(RCC)

[0538]

小细胞食道癌

小细胞肺外癌

小细胞胃肠道癌

小细胞神经内分泌(燕麦细胞)癌(SCNC)

小细胞胰腺癌

小细胞肾癌

[0539]

肉瘤样肾细胞癌(RCC)

肉瘤样结肠癌

肉瘤样胸腺癌

皮脂腺癌

乳头状浆液性卵巢癌(PsOC)

印指环状细胞癌

小细胞癌

前列腺小细胞未分化癌

前列腺小细胞未分化癌(SCUUP)

小细胞肛门直肠神经内分泌癌

小细胞结肠直肠癌

淋巴上皮瘤样鳞状细胞癌

鼻咽鳞状细胞癌

非角质化型鳞状细胞癌

口腔鳞状细胞癌

卵巢鳞状细胞癌

胃鳞状细胞癌

指甲下鳞状细胞癌(SCC)

胸腺鳞状细胞癌

甲状舌管囊肿鳞状细胞癌(TGDC)

甲状腺鳞状细胞癌

尿道鳞状细胞癌

[0540]

表 1-续

小细胞胃癌

小细胞胸腺癌

小肠癌

附件导管囊肿鳞状细胞癌

非典型鳞状细胞癌

乳鳞状细胞癌

食道扩散变形性骨炎样鳞状细胞癌

食道鳞状细胞癌

胸腺角质化型鳞状细胞癌(KTSC)

喉鳞状细胞癌

鼻腔鼻窦未分化癌(SNUC)

胸腺未分化癌

伴有淋巴样间质的未分化癌

阴道癌

疣状癌

伴有梭形细胞化生的乳癌

伴有化生的骨-软骨样变体乳癌

伴有肉瘤化生的乳癌

高度分化型神经内分泌癌(WDNEC)

高度分化型胸腺癌(WDTC)

癌肉瘤

[0541]

阴道鳞状细胞癌

外阴鳞状细胞癌

末端导管癌

睾丸癌

移行细胞癌

前列腺移行细胞癌

毛根鞘癌

输卵管癌

乳管状癌

鼻咽型未分化癌(UCNT)

原发性鼻腔鼻窦鼻咽未分化癌

肢端滑膜软骨肉瘤

经典的原发性硬膜内软骨肉瘤

明细胞软骨肉瘤

喉明细胞软骨肉瘤

基于硬膜的软骨肉瘤

颅内软骨肉瘤

[0542]

子宫癌肉瘤

软骨肿瘤

喉软骨肿瘤

恶性化学感受组织瘤

绿色瘤

胆道癌

原发性硬化胆道炎

成软骨细胞瘤

恶性软骨样汗管瘤(MCS)

恶性肺软骨瘤(Carney 三联征)

软骨肉瘤

脊椎脊索癌
绒毛膜癌
食道绒毛膜癌
胃绒毛膜癌
卵巢绒毛膜癌
胃绒毛膜癌
原发性肺绒毛膜癌/男性
皮肤恶性肿瘤
恶性圆柱瘤
恶性顶浆分泌圆柱瘤
腺泡细胞囊腺癌

[0543]

表 1-续

间叶性软骨肉瘤
骨外骨髓样软骨肉瘤
脊索癌
斜坡脊索癌
家族性脊索癌
颅内腔脊索癌
NOS 脊索癌
perifericum 脊索癌
骶骨脊索癌
颅底脊索癌

胚胎发育不良性神经上皮肿瘤(DNT)

无性细胞瘤

卵巢无性细胞瘤

恶性小汗腺汗孔瘤

恶性小汗腺螺旋腺瘤

恶性脑膜间质瘤

恶性胎盘 emlanoma

胰腺内分泌肿瘤

内胚窦瘤

卵巢子宫内膜样肿瘤

室管膜瘤

[0544]

粘液性囊腺癌

胰腺囊腺癌

浆液性囊腺癌

胆囊-假乳头状肿瘤/胰腺

恶性乳腺叶状囊肉瘤

叶状囊肉瘤

隆突性皮肤纤维肉瘤(DFSP)

纤维肉瘤变体隆突性皮肤纤维肉瘤

NOS 隆突性皮肤纤维肉瘤

着色的隆突性皮肤纤维肉瘤

促结缔组织增生性小圆细胞瘤(DSRCT)

恶性肾纤维组织细胞瘤

恶性纤维组织肿瘤

恶性孤立性纤维肿瘤

非典型纤维黄瘤

卵泡肿瘤

成神经节细胞瘤

[0545]

卵巢上皮癌(EOC)

阑尾上皮细胞瘤

口腔上皮细胞瘤

穿掘性上皮瘤

红白血病

鼻腔神经胶质瘤

纤维肉瘤

恶性纤维组织细胞瘤

恶性纤维组织细胞瘤(MFH)

血管瘤样恶性纤维组织细胞瘤

脑内恶性纤维组织细胞瘤

巨细胞成胶质细胞瘤

胶质瘤

视神经胶质瘤

血管球瘤

恶性血管球瘤

胰高血糖素瘤综合征

恶性粒细胞瘤

唇恶性粒细胞瘤

卵巢粒层细胞瘤

基质细胞粒层细胞瘤

两性母细胞瘤

[0546]

表 1-续

胃肠道自主神经肿瘤
生殖细胞瘤
颅内生殖细胞瘤(GCTs)
卵巢生殖细胞瘤
睾丸生殖细胞瘤(GCTS)
生殖细胞瘤(精原细胞瘤)
松果体生殖细胞瘤
妊娠滋养细胞瘤
非内分泌性巨细胞瘤
脊髓多形性成胶质细胞瘤

组织细胞瘤

恶性组织细胞增多症

霍奇金氏病

膀胱霍奇金氏病

血液霍奇金氏病

骨霍奇金氏病

骨髓霍奇金氏病

乳房霍奇金氏病

心血管系统霍奇金氏病

中枢神经系统霍奇金氏病

结缔组织疾病霍奇金氏病

[0547]

肝间叶错构瘤(MHL)

血管内皮瘤

上皮样血管内皮瘤

梭形细胞血管内皮瘤

甲状腺血管内皮瘤

肺上皮样血管内皮瘤(PEH)

血管外皮瘤(HEPC)

血管内皮瘤

肝母细胞瘤

遗传性非息肉性结肠直肠癌(HNPCC)

恶性乳头状汗腺瘤

皮肤霍奇金氏病

睾丸霍奇金氏病

胸腺霍奇金氏病

甲状腺霍奇金氏病

高度分化型低钾血症和盐酸缺乏综合征

炎性成肌纤维细胞瘤(IMT)

[0548]

内分泌系统霍奇金氏病

胃肠道霍奇金氏病

泌尿生殖器霍奇金氏病

头颈部霍奇金氏病

肾脏霍奇金氏病

肺霍奇金氏病

肌肉奇金氏病

神经系统霍奇金氏病

前列腺霍奇金氏病

生殖系统霍奇金氏病

呼吸系统霍奇金氏病

表 1-续

肺部炎性成肌纤维细胞瘤(IMT)	肾上腺平滑肌肉瘤
甲状腺岛状乳头状癌	胃上皮样平滑肌肉瘤
恶性胰岛瘤	食道平滑肌肉瘤
无功能胰岛细胞瘤	肺平滑肌肉瘤
胰腺胰岛细胞	口腔平滑肌肉瘤
库肯勃瘤(Krukenberg)	胰腺平滑肌肉瘤
朗格汉斯细胞组织细胞增生症(LCH)	原发性骨平滑肌肉瘤(PLMSB)
成平滑肌瘤	肾平滑肌肉瘤
静脉内平滑肌瘤病	会阴表面平滑肌肉瘤
平滑肌肉瘤	子宫平滑肌肉瘤
	外阴平滑肌肉瘤

[0549]

慢性骨髓性白血病(CML)

皮肤白血病

嗜酸性白血病

髓外白血病

毛细胞白血病(HCL)

霍奇金氏细胞白血病

急性 T 细胞成淋巴细胞白血病(ALL)

T 细胞前淋巴细胞白血病

早幼粒细胞白血病

莱迪希(Leydig)细胞瘤(LCT)

脂肪星形细胞瘤

[0550]

急性成红细胞白血病(FAB M6)

急性淋巴细胞白血病(ALL)

急性单核细胞白血病

急性髓性白血病(AML)

急性非淋巴细胞白血病(ANLL)

急性非成淋巴细胞白血病

急性非分化型白血病(AUL)

成人 T 细胞白血病

嗜碱性白血病

中枢神经系统白血病

慢性淋巴细胞白血病(CLL)

血管中心性淋巴瘤

来血管性大细胞淋巴瘤

B 细胞淋巴瘤

肝脏低级 B 细胞淋巴瘤

唾腺 B 细胞淋巴瘤

[0551]

成脂细胞瘤

脂肪肉瘤

喉脂肪肉瘤

粘液样脂肪肉瘤

多形性脂肪肉瘤

原发性肠系膜脂肪肉瘤

肾脂肪肉瘤

高度分化型脂肪肉瘤

卵巢低恶性潜在肿瘤(LMP)

腮腺淋巴上皮瘤

肾上腺淋巴瘤

表 1-续
膀胱淋巴瘤
骨淋巴瘤
乳房淋巴瘤
MALT 型乳房淋巴瘤
伯基特氏(Burkitt's)淋巴瘤
心血管系统淋巴瘤
中枢神经系统淋巴瘤
子宫颈淋巴瘤
胸壁淋巴瘤
结肠直肠淋巴瘤 粘膜相关性淋巴肿瘤
皮肤 B 细胞淋巴瘤
皮肤 T 细胞淋巴瘤(CTCL)
弥漫性大细胞淋巴瘤
十二指肠淋巴瘤
内分泌淋巴瘤
食道淋巴瘤
滤泡性淋巴瘤
胆囊淋巴瘤
胃肠道淋巴瘤
生殖道淋巴瘤
头颈部淋巴瘤

[0552]

MALT 淋巴瘤

套细胞淋巴瘤

地中海淋巴瘤

肌肉淋巴瘤

鼻淋巴瘤

神经系统淋巴瘤

非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)

非霍奇金氏乳房淋巴瘤

非霍奇金氏结外定位淋巴瘤

非霍奇金氏喉淋巴瘤

非霍奇金氏肺淋巴瘤

[0553]

心脏淋巴瘤

肝胆淋巴瘤

HIV 相关性淋巴瘤

血管内淋巴瘤

大细胞间变性 Ki-1 阳性淋巴瘤

肾淋巴瘤

大肠淋巴瘤

间变性大细胞淋巴瘤

喉淋巴瘤

肺淋巴瘤

成淋巴细胞淋巴瘤(LBL)

原发性乳房淋巴瘤

原发性中枢神经系统淋巴瘤

原发性肺淋巴瘤

前列腺淋巴瘤

肺淋巴瘤

肾淋巴瘤

[0554]

非霍奇金氏睾丸淋巴瘤

眼部淋巴瘤

口腔淋巴瘤

眼眶淋巴瘤

卵巢淋巴瘤

胰腺淋巴瘤 胰腺淋巴瘤

鼻旁窦淋巴瘤

阴茎淋巴瘤

外周神经系统淋巴瘤

咽淋巴瘤

垂体淋巴瘤

甲状腺淋巴瘤

气管淋巴瘤

输尿管淋巴瘤

尿道淋巴瘤

泌尿系统淋巴瘤

子宫淋巴瘤

血管内淋巴瘤病

MALT 肿瘤

成神经管细胞瘤

肾上腺黑色素瘤

无黑色素黑色素瘤

[0555]

表 1-续

呼吸系统淋巴瘤
阴囊淋巴瘤
皮肤淋巴瘤
小肠淋巴瘤
小肠淋巴瘤
软组织淋巴瘤
精索淋巴瘤
胃淋巴瘤
T 细胞淋巴瘤(CTCL)
睾丸淋巴瘤

促结缔组织增生黑色素瘤

内分泌黑色素瘤

食道黑色素瘤

胆囊黑色素瘤

胃肠道黑色素瘤

泌尿生殖道黑色素瘤

头颈部黑色素瘤

心脏黑色素瘤

眼内黑色素瘤

口腔内黑色素瘤

肾黑色素瘤

[0556]

肛门黑色素瘤

肛门直肠黑色素瘤

胆系黑色素瘤

膀胱黑色素瘤

脑黑色素瘤

乳房黑色素瘤

心肺系统黑色素瘤

中枢神经系统黑色素瘤

子宫颈黑色素瘤

脉络膜黑色素瘤

结膜黑色素瘤

心包黑色素瘤

垂体黑色素瘤

胎盘黑色素瘤

前列腺黑色素瘤

肺黑色素瘤

直肠黑色素瘤

[0557]

喉黑色素瘤

软脑膜黑色素瘤

肺黑色素瘤

鼻粘膜黑色素瘤

口腔黑色素瘤

骨样组织形成/成骨黑色素瘤

卵巢黑色素瘤

胰腺黑色素瘤

鼻旁窦黑色素瘤

甲状旁腺黑色素瘤

阴茎黑色素瘤

输尿管黑色素瘤

尿道黑色素瘤

子宫黑色素瘤

阴道黑色素瘤

外阴黑色素瘤

恶性间变性脑膜瘤

恶性成血管细胞脑膜瘤

恶性非典型脑膜瘤

恶性乳头状脑膜瘤

间质间叶性肿瘤

间叶瘤

[0558]

表 1-续

肾盂黑色素瘤

鼻腔鼻窦黑色素瘤

骨骼系统黑色素瘤

小肠黑色素瘤

小肠黑色素瘤

脊髓黑色素瘤

脾脏黑色素瘤

胃黑色素瘤

睾丸黑色素瘤

甲状腺黑色素瘤

IgM 骨髓瘤

肌上皮瘤

唾腺肌恶性上皮瘤

肾母细胞瘤

神经母细胞瘤

肾神经外胚层肿瘤

前列腺神经内分泌肿瘤

神经纤维肉瘤

恶性结节性汗腺瘤

少突神经胶质瘤

间变性少突神经胶质瘤

[0559]

中胚层肾瘤

恶性间皮瘤

恶性胸膜间皮瘤

乳头状间皮瘤

恶性间皮瘤/鞘膜(MMTV)

胰腺微腺癌

胰腺混合细胞瘤

中胚叶混合肿瘤(MMT)

粘膜相关性淋巴组织(MALT)

输卵管恶性混合型苗勒管瘤

子宫颈恶性混合型苗勒管瘤

乳房恶性叶状肿瘤

恶性毛发质瘤

髓外浆细胞瘤(EMP)

喉浆细胞瘤

孤立性浆细胞瘤

恶性多形性腺瘤

[0560]

低级少突神经胶质瘤

骨肉瘤

乳腺外佩吉特病(EMPD)

乳腺佩吉特病

胰母细胞瘤

恶性副神经节瘤

肾上腺外恶性副神经节瘤

恶性节细胞性副神经节瘤

恶性喉副神经节瘤

恶性外周神经鞘瘤(MPNST)

恶性嗜铬细胞瘤

恶性腹膜假性粘液瘤(PMP)

颅咽管瘤(raniopharyngioma)

网状内皮瘤

网状血管内皮瘤

视网膜母细胞瘤

三边视网膜母细胞瘤

非典型畸形 AT/RT 横纹肌样畸胎瘤

恶性横纹肌样瘤

横纹肌肉瘤(RMS)

眼眶横纹肌肉瘤

腺泡状横纹肌肉瘤

[0561]

表 1-续

多形性黄色星形细胞瘤(PXA)

丛状纤维组织细胞瘤

多胚瘤

声带息肉样肿瘤

隔膜恶性原发性损害

胸壁原发性恶性损害

胸膜原发性恶性损害

原发性鼻腔鼻窦鼻咽未分化(PSNPC)

原始神经外胚层肿瘤(PNET)

恶性增殖性外毛根鞘瘤

软部分明细胞肉瘤

滤泡树突状细胞肉瘤

子宫内膜间质肉瘤(ESS)

上皮样肉瘤

尤因氏肉瘤(EWS)

尤因氏骨外肉瘤(EOE)

尤因氏原始神经外胚层肿瘤肉瘤

输卵管肉瘤

恶性纤维粘液样肉瘤

粒细胞肉瘤

相互交叉网状细胞肉瘤

[0562]

葡萄状横纹肌肉瘤

中枢神经系统横纹肌肉瘤

胸壁横纹肌肉瘤

睾丸旁横纹肌肉瘤(PTR)

成人前列腺肉瘤

成人软组织肉瘤

腺泡状软肉瘤(ASPS)

膀胱肉瘤

葡萄状肉瘤

中枢神经系统肉瘤

肾明细胞肉瘤

原发性肺肉瘤

原发性肺肉瘤(PPS)

前列腺肉瘤

肺动脉树肉瘤

肾肉瘤

呼吸树肉瘤

[0563]

脑内肉瘤

颅内肉瘤

卡波西肉瘤

卡波西口腔内肉瘤

肾肉瘤

纵隔膜肉瘤

脑膜肉瘤

神经性肉瘤

卵巢肉瘤

垂体肉瘤

多形性软组织肉瘤

表 1-续

软组织肉瘤	脑膜肉瘤病
胃肠间质肉瘤(GIST)	肉瘤化生
卵巢间质肉瘤	恶性神经鞘瘤
滑膜肉瘤	皮肤细胞恶性神经鞘瘤
关节内滑膜肉瘤	上皮样恶性神经鞘瘤
肺滑膜肉瘤	食道恶性神经鞘瘤
真肉瘤	nos 恶性神经鞘瘤
子宫肉瘤	钙化大细胞支持细胞瘤
阴道肉瘤	支持细胞-莱迪希(Leydig)细胞瘤(SLCT)
外阴肉瘤	肺小细胞癌 小细胞肺癌(SCLC)
	胰腺实性假乳头状肿瘤

[0564]

结肠直肠间质瘤

胃肠道间质瘤(GIST)

性腺(性索)间质瘤(GSTS)

卵巢间质瘤

小肠间质瘤

卵巢甲状腺瘤

鼻腔鼻窦畸胎瘤肉瘤(SNTCS)

未成熟畸胎瘤

脊柱髓内畸胎瘤

成熟畸胎瘤

心包畸胎瘤

[0565]

生长抑制瘤

梭形细胞瘤

伴有胸腺样元素的主轴上皮肿瘤

肾汗腺圆柱瘤

乳头状鳞状上皮瘤

类固醇细胞瘤

斯图尔特-特雷韦斯综合征

性索间质细胞瘤

睾丸间质细胞

间质黄体瘤

内淋巴间质缩瞳(ESM)

外阴癌

华氏巨球蛋白血症

威尔姆斯肿瘤 肾母细胞瘤

肺威尔姆斯肿瘤

[0566]

甲状腺畸胎瘤

卵泡膜细胞瘤 间质黄体瘤

恶性胸腺瘤

髓样恶性胸腺瘤

间变性甲状腺/脑

皮肤毛母细胞瘤

鼻腔恶性蝾螈瘤

输卵管滋养细胞瘤

胎盘部位滋养细胞瘤

尿道癌

血管活性肠肽瘤(胰岛细胞)

[0567]

表 2-示例性癌症药物

醋酸阿比特龙	苯丁酸氮芥(Ambochlorin)(瘤可宁(Chlorambucil))
氨甲喋呤(Abitrexate)(甲氨蝶呤)	苯丁酸氮芥(瘤可宁)
阿霉素(盐酸多柔比星)	氨基乙酰丙酸
Adrucil(氟尿嘧啶)	阿那曲唑
癌伏妥(依维莫司)	阿瑞匹坦
艾特乐(咪喹莫特)	瑞宁得(阿那曲唑)
阿地白介素	阿诺斯(依西美坦)
阿仑单抗	奈拉滨(Arranon)(奈拉滨(Nelarabine))
爱宁达(培美曲塞二钠)	三氧化二砷
阿乐喜(盐酸帕洛诺司琼)	Arzerra(奥法木单抗)
	阿瓦斯汀(贝伐单抗)

[0568]

阿扎胞苷	卡铂
盐酸苯达莫司汀	Cerubidine (盐酸柔红霉素)
贝伐单抗	Cervarix (重组 HPV 二价疫苗)
贝沙罗汀	西妥昔单抗
百克沙(托西莫单抗和 II31 碘托西莫单抗)	苯丁酸氮芥
博来霉素	顺铂
硼替佐米	Clafen (环磷酰胺)
卡巴他赛	氯法拉滨
坎帕斯(阿仑单抗)	Clofarex (氯法拉滨)
依立替康 (Camptosar)(盐酸依立替康 (Irinotecan Hydrochloride))	Clolar (氯法拉滨)
卡培他滨	环磷酰胺

地尼白介素

德尼单抗

DepoCyt (脂质体阿糖胞苷)

DepoFoam (脂质体阿糖胞苷)

盐酸右雷佐生

多西他赛

[0569]

Cyfos (异环磷酰胺)

阿糖胞苷

脂质体阿糖胞苷

Cytosar-U (阿糖胞苷)

癌得星(环磷酰胺)

达卡巴嗪

达克金(地西他滨)

达沙替尼

盐酸柔红霉素

地西他滨

依加瑞克

盐酸厄洛替尼

Etopophos (磷酸依托泊苷)

依托泊苷

磷酸依托泊苷

依维莫司

易维特(盐酸雷洛昔芬)

依西美坦

法乐通(托瑞米芬)

法洛德(氟维司群)

氟隆(来曲唑)

非格司亭

[0570]

表 2-续

盐酸阿霉素

Efudex (氟尿嘧啶)

埃立特(拉布立酶)

表阿霉素(盐酸表柔比星)

乐沙定(奥沙利铂)

艾曲波帕乙醇胺盐

Emend (阿瑞匹坦)

盐酸表柔比星

爱必妥(西妥昔单抗)

甲磺酸艾日布林

吉妥珠单抗奥佐米星

健择(盐酸吉西他滨)

格列卫(甲磺酸伊马替尼)

Halaven (甲磺酸艾日布林)

赫赛汀(曲妥珠单抗)

重组 HPV 二价疫苗

重组 HPV 四价疫苗

Hycamtin (盐酸拓扑替康)

替伊莫单抗

Ifex (异环磷酰胺)

异环磷酰胺

[0571]

氟达拉滨(磷酸氟达拉滨)

磷酸氟达拉滨

Fluoroplex (氟尿嘧啶)

氟尿嘧啶

Folex (甲氨蝶呤)

Folex PFS (甲氨蝶呤)

Folotyn (普拉曲沙)

氟维司群

加德西(重组 HPV 四价疫苗)

吉非替尼

盐酸吉西他滨

[0572]

异环磷酰胺(Ifosfamidum) (异环磷酰胺(Ifosfamide)) Kepivance (帕利夫明)

甲磺酸伊马替尼 二甲苯磺酸拉帕替尼

咪喹莫特 来那度胺

易普利单抗 来曲唑

易瑞沙(吉非替尼) 亚叶酸钙

盐酸伊立替康 瘤可然(苯丁酸氮芥)

Istodax (罗米地辛)

伊沙匹隆

Ixempra (伊沙匹隆)

Jevtana (卡巴他赛)

Keoxifene (盐酸雷洛昔芬)

[0573]

表 2-续

醋酸亮丙瑞林	Matulane (盐酸丙卡巴肼)
Levulan (氨基乙酰丙酸)	Methazolastone (替莫唑胺)
Linfolizin (苯丁酸氮芥)	甲氨蝶呤
LipoDox (盐酸阿霉素脂质体)	甲氨蝶呤 LPF (甲氨蝶呤)
脂质体阿糖胞苷	Mexate (甲氨蝶呤)
利普安(醋酸亮丙瑞林)	Mexate-AQ (甲氨蝶呤)
Lupron Depot (醋酸亮丙瑞林)	Mozobil (普乐沙福)
Lupron Depot-Ped (醋酸亮丙瑞林)	Mylosar (阿扎胞苷)
Lupron Depot-3 月 (醋酸亮丙瑞林)	麦洛塔(吉妥珠单抗奥佐米星)
Lupron Depot-4 月 (醋酸亮丙瑞林)	纳米颗粒紫杉醇(紫杉醇白蛋白稳定的纳米制剂)
	奈拉滨

帕利夫明

盐酸帕洛诺司琼

帕尼单抗

Paraplat (卡铂)

伯尔定(卡铂)

盐酸帕唑帕尼

培门冬酶

培美曲塞二钠

紫杉醇(顺铂)

紫杉醇-AQ (顺铂)

普乐沙福

[0574]

Neosar (环磷酰胺)

优保津(非格司亭)

多吉美(甲苯磺酸索拉非尼)

尼罗替尼

诺瓦得士(柠檬酸他莫昔芬)

Nplate (罗米司亭)

奥法木单抗

培门冬酶(培加帕加司)

Ontak (地尼白介素)

奥沙利铂

紫杉醇

雷利米得(来那度胺)

Rheumatrex (甲氨蝶呤)

Rituxan (利妥昔单抗)

利妥昔单抗

罗米地辛

[0575]

普拉曲沙

强的松

盐酸丙卡巴肼

Proleukin (阿地白介素)

普罗利亚(地诺单抗)

Promacta (艾曲波帕乙醇胺)

普罗文奇(Sipuleucel-T)

盐酸雷洛昔芬

拉布立酶

重组 HPV 二价疫苗

重组 HPV 四价疫苗

[0576]

表 2-续

罗米司亭	昔诺韦(沙利度胺)
红比霉素(盐酸柔红霉素)	滑石
Sclerosol 胸膜内气雾剂(滑石)	柠檬酸他莫昔芬
Sipuleucel-T	Tarabine PFS (阿糖胞苷)
甲苯磺酸索拉非尼	特罗凯(盐酸厄洛替尼)
施达赛(达沙替尼)	贝沙罗汀(Targretin) (贝沙罗汀(Bexarotene))
无菌滑石粉(滑石)	尼洛替尼(Tasigna) (尼洛替尼(Nilotinib))
Steritalc (滑石)	紫杉酚(紫杉醇)
苹果酸舒尼替尼	泰索帝(多西他赛)
索坦(苹果酸舒尼替尼)	替莫唑胺(Temodar) (替莫唑胺(Temozolomide))
	替莫唑胺

Trisenox (三氧化二砷)	西罗莫司
Tykerb (拉帕替尼二甲苯磺酸酯)	沙利度胺
凡德他尼	Thalomid (沙利度胺)
维克替比(帕尼单抗)	Toposar (依托泊苷)
Velban (硫酸长春碱)	盐酸拓扑替康
万珂(硼替佐米)	托瑞米芬
Velsar (硫酸长春碱)	驮瑞塞尔(西罗莫司脂化物)
VePesid (依托泊苷)	托西莫单抗和 I 131 碘托西莫单抗
Viadur (醋酸亮丙瑞林)	Totect (盐酸右雷佐生)
维达扎(阿扎胞苷)	曲妥珠单抗
硫酸长春碱	Treanda (盐酸苯达莫司汀)

[0577]

Zolinza (伏立诺他)

择泰(唑来膦酸)

Zytiga (醋酸阿比特龙)

[0578]

Vincasar PFS (硫酸长春碱)

硫酸长春新碱

伏立诺他

Votrient (盐酸帕唑帕尼)

维尔康沃林(亚叶酸钙)

希罗达(卡培他滨)

Xgeva(地诺单抗)

易普利姆玛(伊匹单抗)

Zevalin (替伊莫单抗)

Zinecard (盐酸右雷佐生)

唑来膦酸

[0579]

表 3-示例性眼部疾病和病状

"眼后部"疾病的实例包括

- 黄斑水肿，如血管造影黄斑囊样水肿
- 视网膜缺血和脉络膜新血管形生
- 黄斑变性
- 视网膜疾病(例如，糖尿病视网膜病变、糖尿病视网膜水肿、视网膜脱落)；炎性疾病如葡萄膜炎(包括全葡萄膜炎)或未知原因(先天性)的或与全身性(例如，自身免疫)疾病相关的脉络膜炎(包括多灶性脉络膜炎)；表层巩膜炎或巩膜炎
- 鸟枪弹样视网膜脉络膜病变
- 血管疾病(视网膜缺血、视网膜血管炎、脉络膜血管功能缺陷、脉络膜血栓形成)
- 视神经新血管形成
- 视神经炎

"眼前部"疾病的实例包括:

- 睑炎
- 角膜炎
- 虹膜炎
- 福斯氏异色性虹膜睫状体炎
- 慢性葡萄膜炎或前葡萄膜炎
- 结膜炎
- 过敏性结膜炎(包括季节性或永久性、春天性、异位性以及巨大乳头状的过敏性结膜炎)
- 干燥性角结膜炎(干眼综合征)

- 超敏反应
- 结膜水肿
- 结膜静脉淤血
- 眶周蜂窝组织炎；急性泪囊炎
- 非特异性脉管炎
- 结节病

[0580]

- 虹膜睫状体炎
- 虹膜炎
- 巩膜炎
- 表层巩膜炎
- 角膜水肿
- 巩膜疾病
- 眼部瘢痕性类天疱疮
- 睫状体平坦部炎
- 波斯纳睫状体综合征
- 白塞氏疾病
- 小柳原田综合征

丙美卡因

Timoptic

舒净露

维速达尔(维替泊芬)

扶他林

适利达

[0581]

表 4-示例性眼部药物

阿托品

溴莫尼定(阿法根)

Ciloxan

红霉素

庆大霉素

左布诺洛尔(贝他根)

美替洛尔(Optipranolol)

Optivar

帕坦洛

PredForte

[0582]

表5-影响肺的示例性疾病和病状

非结核分枝杆菌	急性支气管炎	尘肺	肺炎
百日咳	急性呼吸窘迫综合征(ARDS)	石棉沉着病	原发性纤毛运动障碍
哮喘	支气管扩张	毛细支气管炎	支气管肺发育不良
棉尘肺	慢性支气管炎	球孢子菌病(球菌)	COPD
囊性纤维化	气肿	汉坦病毒肺综合征	组织胞浆菌病
人偏肺病毒	超敏性肺炎	流感	肺癌
淋巴管瘤病	间皮瘤		

[0583]

表 5-续

肺纤维化
肺血管疾病
呼吸道合胞病毒
结节病
重度急性呼吸系统综合征
矽肺
睡眠呼吸暂停
婴儿猝死综合征
肺结核

表 6-示例性的肺/呼吸系统疾病药物：

安可来
安可来
他达拉非(Adcirca) (他达拉非(tadalafil))
Aldurazyme (拉罗尼酶)
Allegra (盐酸非索非那定)
Allegra-D
Alvesco (环索奈德)
氮卓斯汀鼻用喷雾
定喘乐(异丙托溴铵)
安奇(阿莫西林/克拉维酸)

[0584]

地洛他定

胺药氯雷他定制剂(10 mg 氯雷他定快速分解片剂)

克敏能糖浆(氯雷他定)

克敏能-D 24 小时延长的释放片剂(10 mg 氯雷他定，240 mg 硫酸伪麻黄碱)

富马酸氯马斯汀糖浆

Covera-HS (异搏定)

固尔苏

[0585]

静脉内 Avelox (盐酸莫西沙星)

拜复乐(曲安奈德)吸入气雾剂

Biaxin XL (克拉霉素缓释片)

鼻舒乐

Brovana (酒石酸福莫特罗)

Cafcit 注射液

Cayston (氨曲南吸入溶液)

先力腾(头孢布烯)

头孢唑啉和葡萄糖 USP

新菌灵(头孢呋辛酯)

环丙沙星(盐酸环丙沙星)

表 6-续

Daliresp (罗氟司特(roflumilast))	肯立克(Ketek) (泰利霉素(telithromycin))
Dulera (糠酸莫米他松+二水合富马酸福莫特罗)	Letairis (安倍生坦坦(ambrisentan))
DuoNeb (硫酸沙丁胺醇和异丙托溴铵)	5%硫酸奥西那林吸入溶液
Dynabac	Nasacort AQ (曲安奈德)鼻用喷雾
丙酸氟替卡松(Flonase)鼻用喷雾	Nasacort AQ (曲安奈德)鼻用喷雾
葛兰素氟替卡松	NasalCrom 鼻用喷雾
福莫特罗气雾剂(富马酸福莫特罗吸入粉末)	OcuHist
Infasurf	头孢地尼
厄他培南	Patanase (盐酸奥洛他定)
易瑞沙(Iressa) (吉非替尼(gefitinib))	利福喷丁
	沙丁胺醇 HFA 吸入气雾剂

[0586]

[0587]

百慕时(阿法链道酶)	帕利珠单抗
百慕时(阿法链道酶)	氯马斯汀(富马酸氯马斯汀)
Qvar (二丙酸倍氯米松)	氯马斯汀(富马酸氯马斯汀)
Raxar (格帕沙星)	Teflaro (头孢洛林)
Remodulin (曲罗尼尔)	加替沙星
RespiGam (呼吸道合胞病毒免疫球蛋白静脉内注射)	Tikosyn 胶囊
雷诺考特鼻用喷雾	奈多罗米(奈多罗米钠)
Sclerosol 胸膜内气雾剂	奈多罗米(奈多罗米钠)
沙美特罗	奈多罗米(奈多罗米钠)
顺尔宁	Tobi
易得喷吸入剂(噻托溴铵)	全可利(波生坦)

左西替利嗪(盐酸左西替利嗪)
撒共姆(司帕沙星)片剂
Zemaira (α1-蛋白酶抑制剂)
他唑巴坦(无菌哌拉西林钠/他唑巴坦钠)

表 6-续

齐留通(Zyflo) (Zileuton)
仙特明(Zyrtec) (盐酸西替利嗪(cetirizine HCl))

[0588]

Tri-鼻用喷雾(去炎松缩丙酮喷雾)
Tripedia (白喉和破伤风类毒素和无细胞百日咳疫苗所吸收的)
Tygacil (替加环素)
Tyvaso (曲罗尼尔)
Vancenase AQ 84 mcg 双强度
Vanceril 84 mcg 双强度(二丙酸倍氯米松，84 mcg)吸入气雾剂
喘乐宁 HFA (硫酸沙丁胺醇吸入气雾剂)
威视派克(碘克沙醇)
索雷尔(奥马珠单抗)
塞普拉考

心脏瓣膜病

感染性心内膜炎

先天性心脏病

冠心病

心房粘液瘤

HOCM

长 QT 综合征

沃尔弗帕金森怀特氏综合征

室上性心动过速

心房扑动

[0589]

表 7-影响心脏的示例性疾病和病状

心房粘液瘤	心脏病发作
长 QT 综合征	动脉粥样硬化
沃尔弗帕金森怀特氏综合征	高血压
室上性心动过速	局部缺血性心脏病
心房扑动	心律失常
	心动过速
	心脏杂音
	风湿性心脏病
	肺心病
	高血压性心脏病

[0590]

[0591]

表 8-示例性心脏药物

ACE 抑制剂	卡托普利(captopril)和氢氯噻嗪，卡托普利氢氯噻嗪(Capozide)
乙酰水杨酸，阿司匹林(Ecotrin)	
阿替普酶(alteplase)，阿克伐司(Activase) (TPA)	卡托普利，开博通(Capoten)
阿尼普酶(anistreplase)注射液，依米那酶(Eminase)	硫酸氢氯吡格雷，波立维(Plavix)
阿司匹林和抗血小板药物	考来维纶(colesevelam)，考来维纶(Welchol)
阿替洛尔(atenolol)，天诺敏(Tenormin)	口服双嘧达莫(dipyridamole)，潘生丁(Persantine)
阿托伐他汀(atorvastatin)，立普妥(Lipitor)	依那普利(enalapril)和氢氯噻嗪，依那普利氢氯噻嗪(Vaseretic)
贝那普利(benazepril)，洛汀新(Lotensin)	依那普利(enalapril)，依那普利(Vasotec)
β 阻断剂	依泽替米贝(ezetimibe)和辛伐他汀(simvastatin)，维多灵(Vytorin)
胆酸螯合剂	钙通道阻断剂

[0592]

贝特类	烟酸和洛伐他汀，Advicor
氟伐他汀(fluvastatin)，来适可(Lescol)	烟酸，Niacor，缓释烟酸(Niaspan)，斯洛伐克-烟酸
福辛普利钠(fosinopril sodium)，蒙诺(Monopril)	硝化甘油，Nitro-Bid，Nitro-Dur，Nitrostat，Transderm-Nitro，Minitran，贴保宁，硝脑
赖诺普利(lisinopril)和氢氯噻嗪，阿斯利康(Zestoretic)，Prinzide	口服氧烯洛尔
赖诺普利，捷赐瑞(Zestril)，Prinivil	普伐斯汀，普拉固
洛伐他汀(lovastatin)，美降脂(Mevacor)，Altocor	口服普伐斯汀/缓冲的阿司匹林，Pravigard PAC
硫酸镁注射液	普萘洛尔，心得安，心得安 LA
美托洛尔(metoprolol)，酒石酸美托洛尔(Lopressor)，Toprol XL	口服喹那普利 hcl/氢氯噻嗪，Accuretic
口服莫西普利，莫西普利	喹那普利，Accupril
纳多洛尔，康加尔多	雷米普利，Altace

[0593]

瑞替普酶注射液，瑞替普酶(Retavase)

辛伐他汀，素果

他汀

注射链激酶，Kabikinase，Streptase

口服托拉塞米，Demadex

群多普利，Mavik

[0594]

表 9-示例性的细菌、病毒、真菌以及寄生虫病状

由以下引起的细菌感染:

- 伯氏菌属
- 肺炎双球菌
- 金黄色葡萄球菌
- 结核分支杆菌
- 麻风分支杆菌
- 奈瑟氏淋球菌(Neisseria gonorrheae)
- 沙眼衣原体(Chlamydia trachomatis)
- 绿脓假单胞菌(Pseudomonas aeruginosa)

由以下引起的病毒感染:

- 单纯性疱疹
- 带状疱疹
- 巨细胞病毒

由以下引起的真菌感染:

- 烟曲霉菌(Aspergillus fumigatus)
- 白色念珠菌(Candida albicans)
- 组织胞浆菌(Histoplasmosis capsulatum)
- 隐球菌属(Cryptococcus species)
- 卡氏肺囊虫(Pneumocystis carinii)

由以下引起的寄生虫感染:

[0595]

- 弓形虫
- 克氏锥虫
- 利什曼虫属
- 棘阿米巴属
- 兰伯氏贾第虫
- 隔状虫属(Septata species)
- 犬恶丝虫

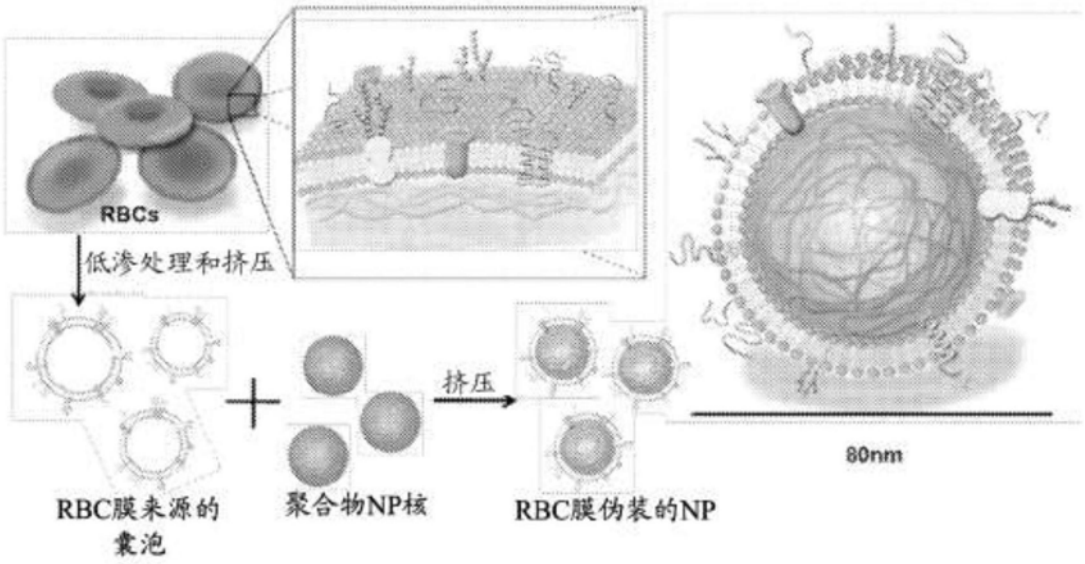

RBCs
低渗处理和挤压
挤压
80nm
RBC膜来源的囊泡
聚合物NP核
RBC膜伪装的NP

图1

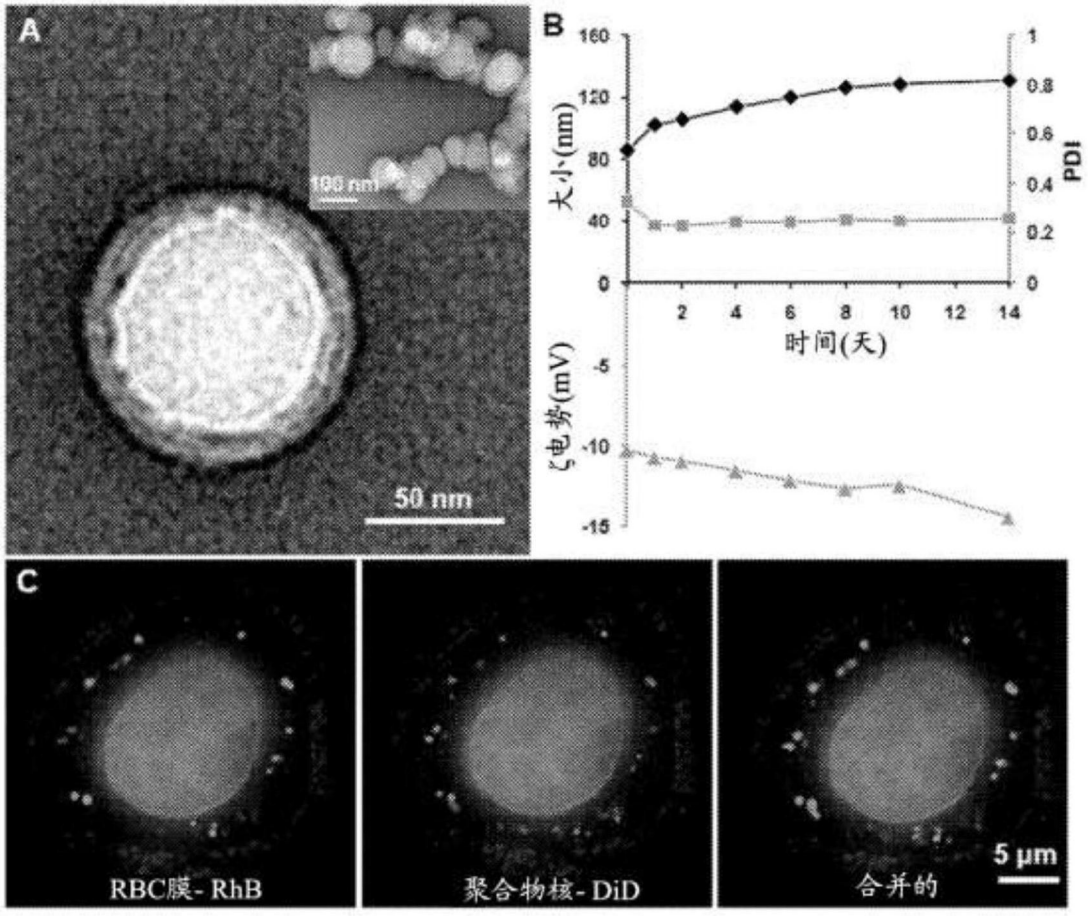

A
100 nm
50 nm
B
大小(nm)
PDI
时间(天)
ζ电势(mV)
C
RBC膜- RhB
聚合物核- DiD
合并的
5 μm

图2

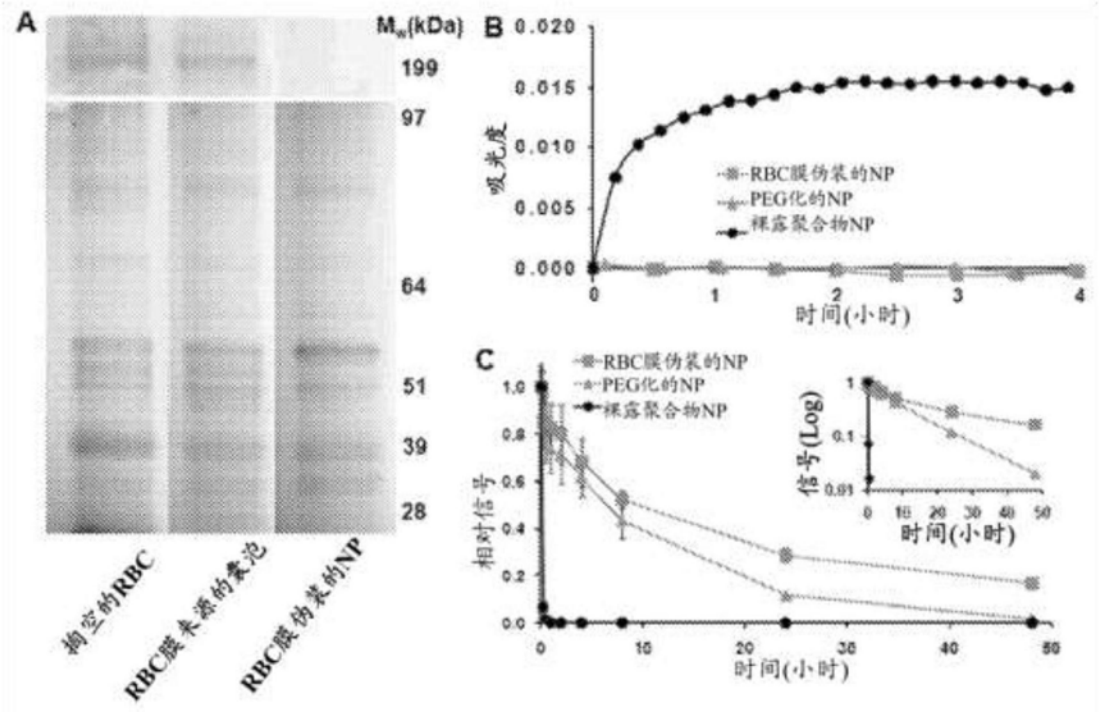

A
M_w(kDa)
199
97
64
51
39
28
掏空的RBC
RBC膜来源的囊泡
RBC膜仿装的NP
B
吸光度
0.020
0.015
0.010
0.005
0.000
RBC膜仿装的NP
PEG化的NP
裸露聚合物NP
时间(小时)
C
相对信号
信号(Log)
时间(小时)

图3

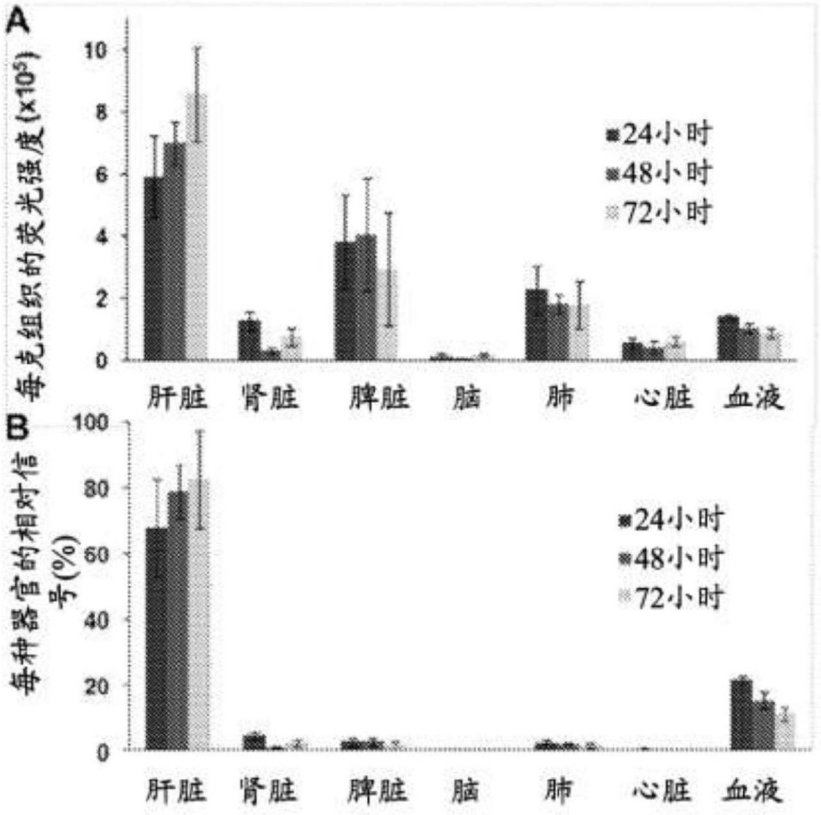

A
每克组织的荧光强度(x10⁵)
24小时
48小时
72小时
肝脏
肾脏
脾脏
脑
肺
心脏
血液
B
每种器官的相对信号(%)
24小时
48小时
72小时
肝脏
肾脏
脾脏
脑
肺
心脏
血液

图4

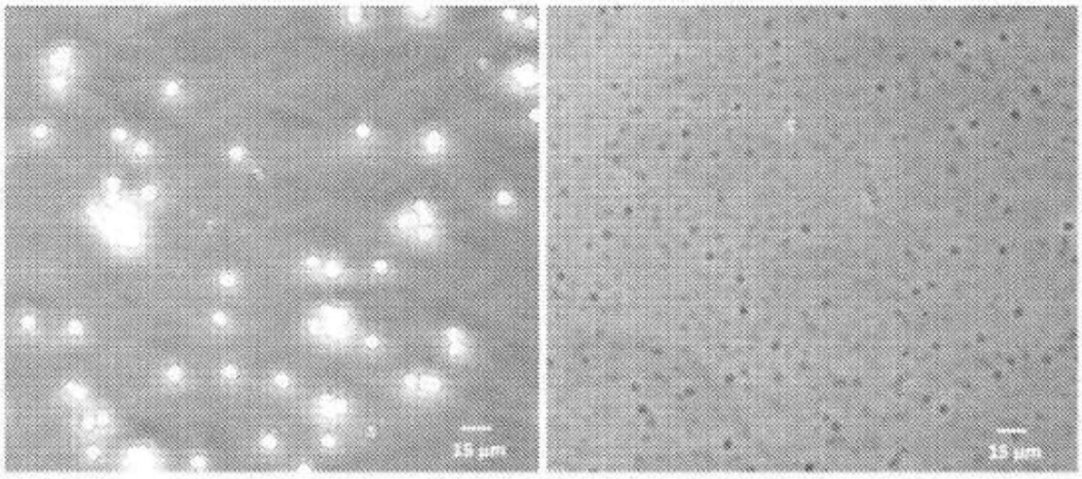

15 μm
15 μm

图5

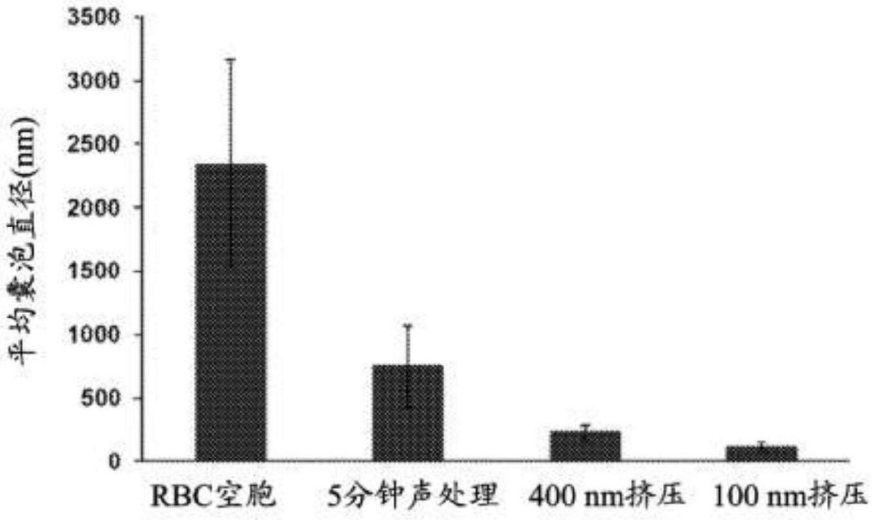

3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
平均囊泡直径(nm)
RBC空胞
5分钟声处理
400 nm挤压
100 nm挤压

图6

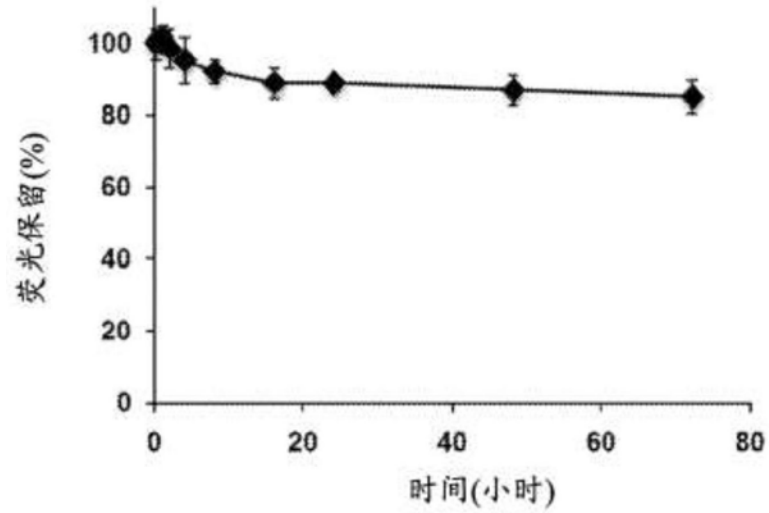

100
80
60
40
20
0
荧光保留(%)
0
20
40
60
80
时间(小时)

图7

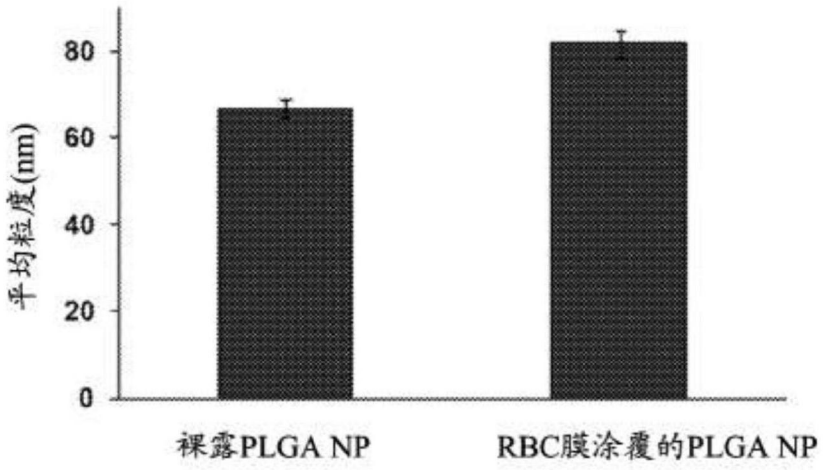

80
60
40
20
0
平均粒度(nm)
裸露PLGA NP
RBC膜涂覆的PLGA NP

图8

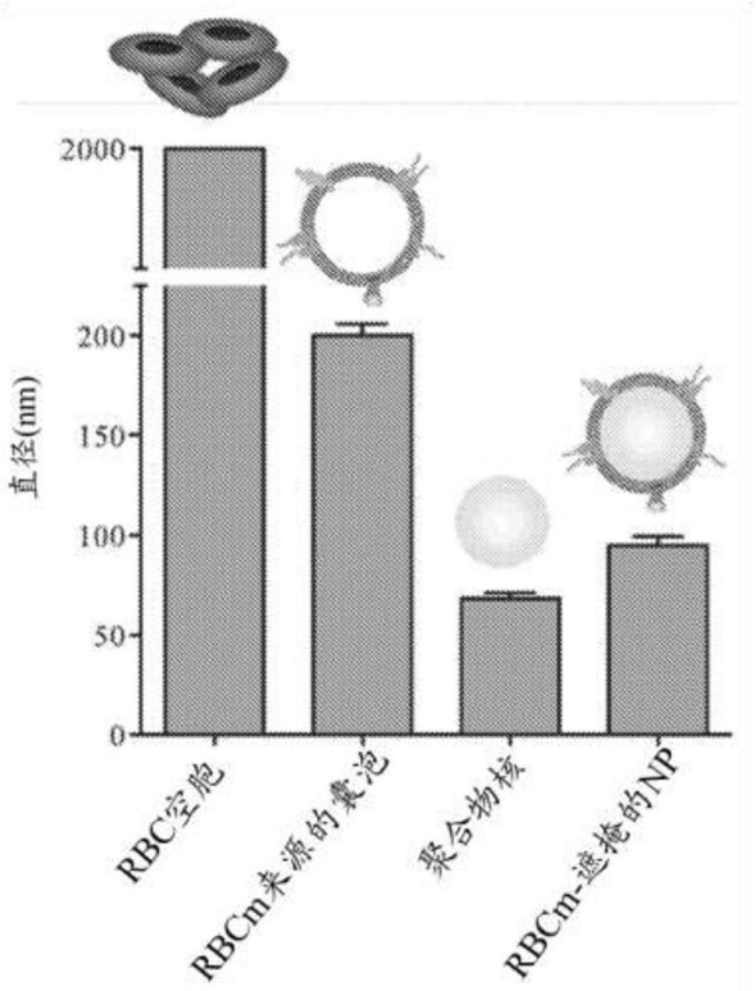


图9

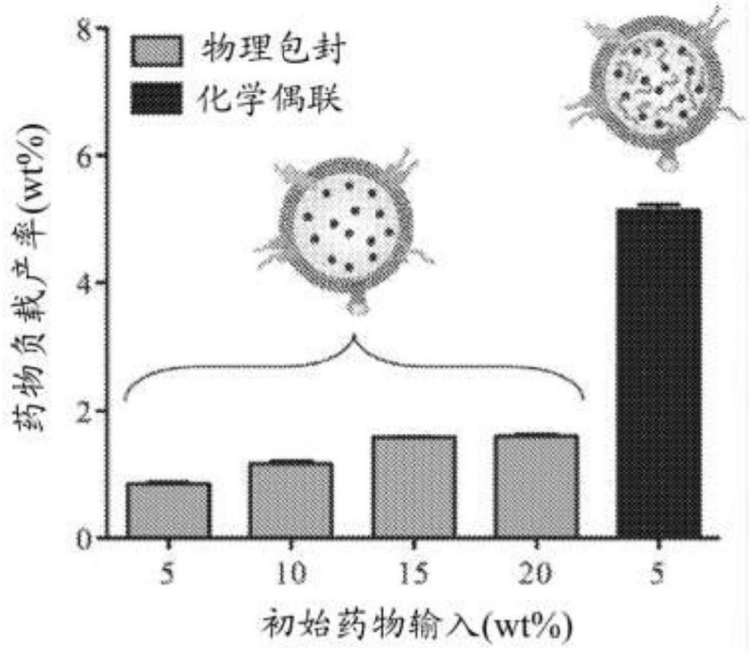


图10

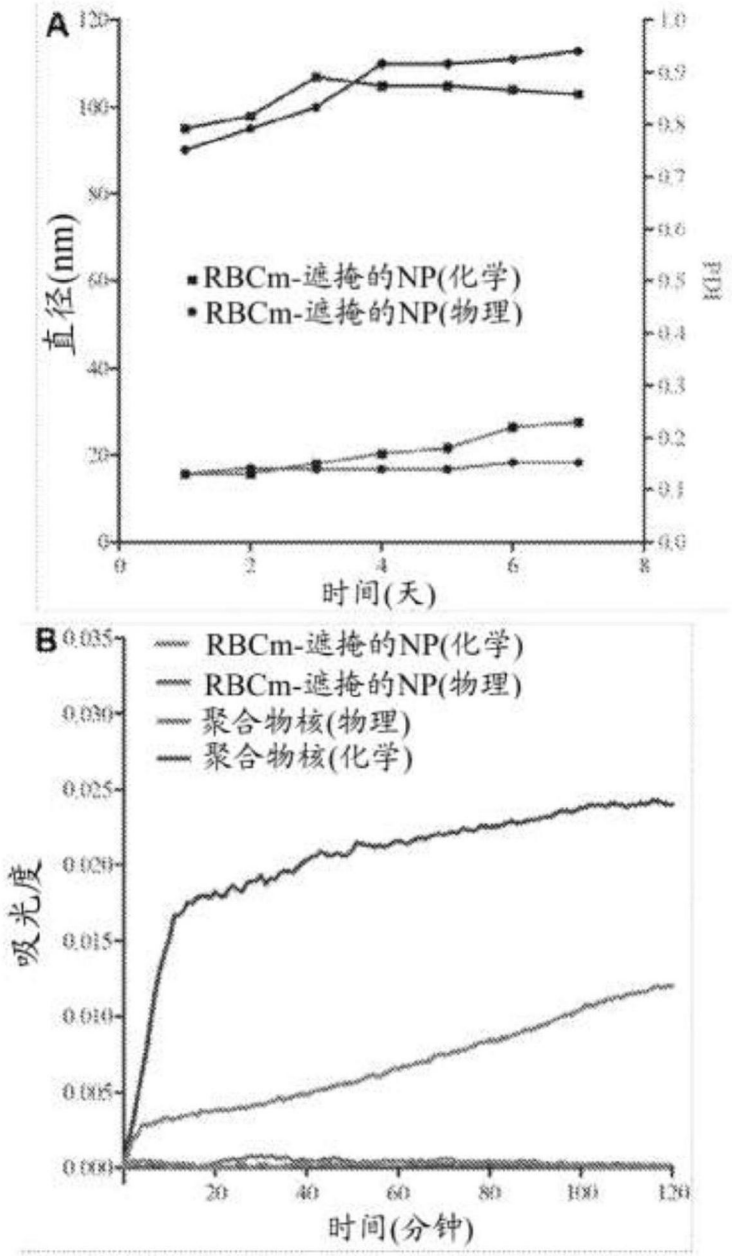

A
直径(nm)
PDI
RBCm-遮掩的NP(化学)
RBCm-遮掩的NP(物理)
时间(天)
B
RBCm-遮掩的NP(化学)
RBCm-遮掩的NP(物理)
聚合物核(物理)
聚合物核(化学)
吸光度
时间(分钟)

图11

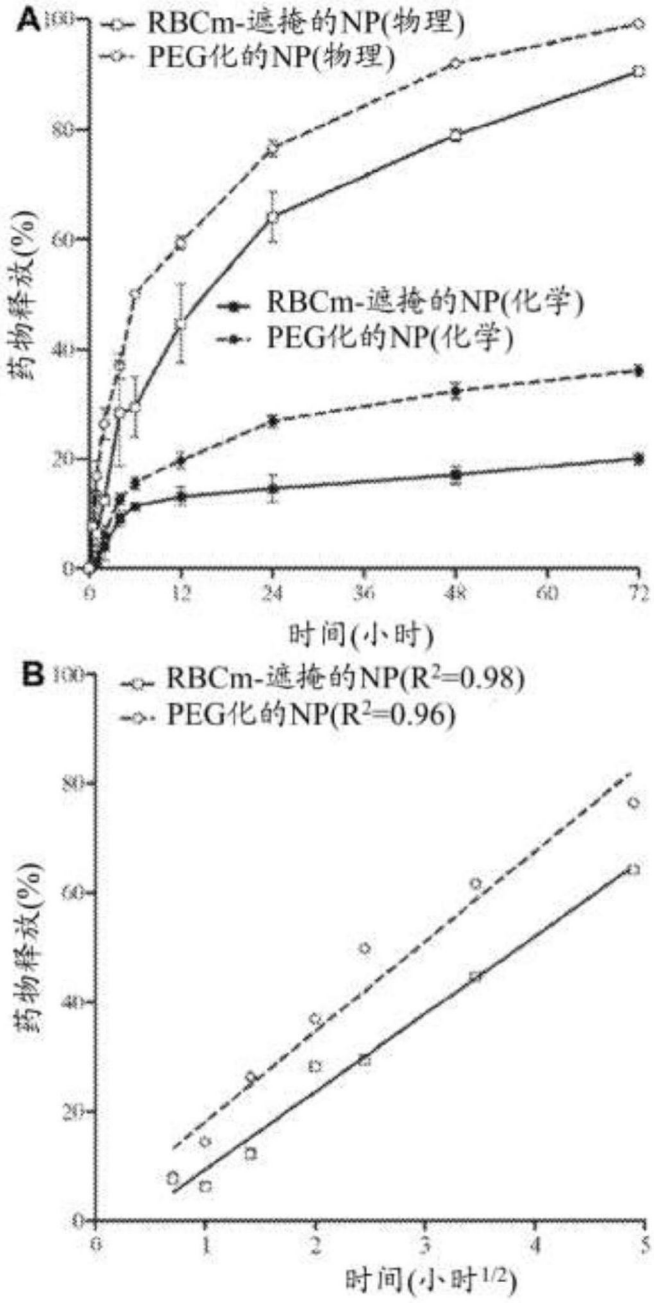

A
RBCm-遮掩的NP(物理)
PEG化的NP(物理)
RBCm-遮掩的NP(化学)
PEG化的NP(化学)
药物释放(%)
时间(小时)
B
RBCm-遮掩的NP(R2=0.98)
PEG化的NP(R2=0.96)
药物释放(%)
时间(小时1/2)

图12

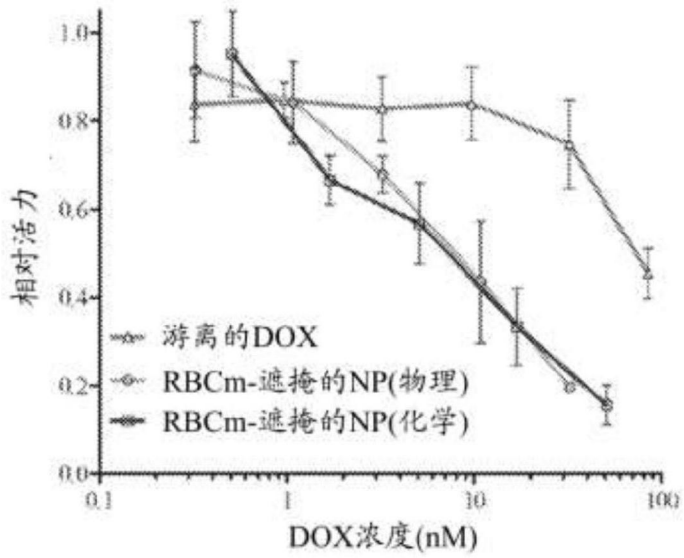

1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
相对活力
游离的DOX
RBCm-遮掩的NP(物理)
RBCm-遮掩的NP(化学)
0.1
1
10
100
DOX浓度(nM)

图13

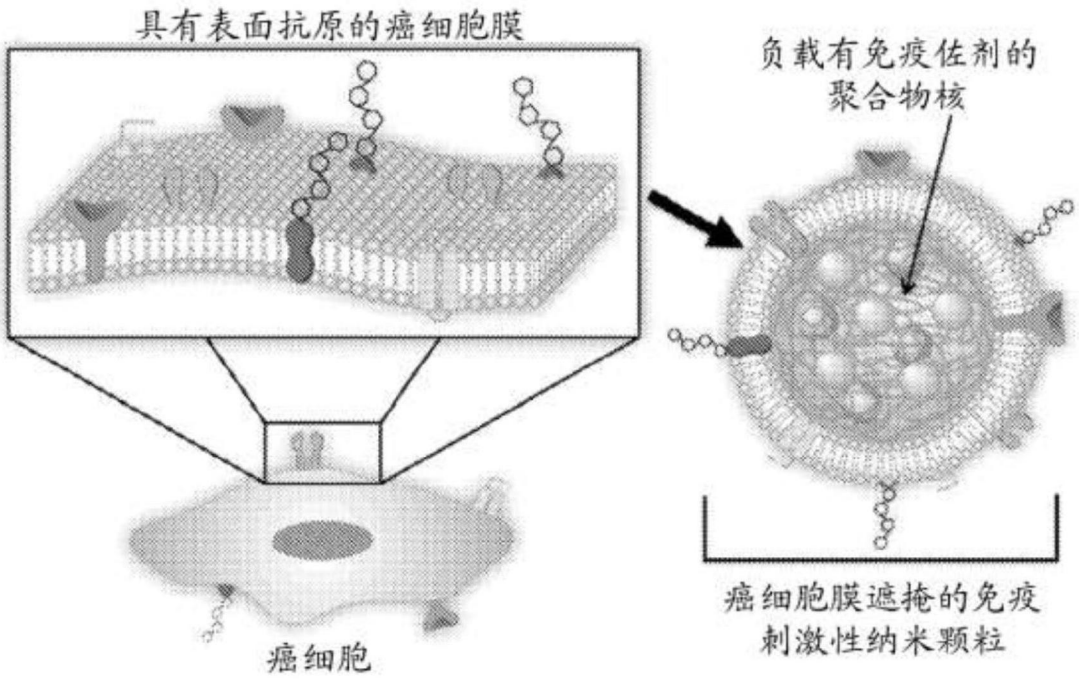

具有表面抗原的癌细胞膜
负载有免疫佐剂的
聚合物核
癌细胞膜遮掩的免疫
刺激性纳米颗粒
癌细胞

图14

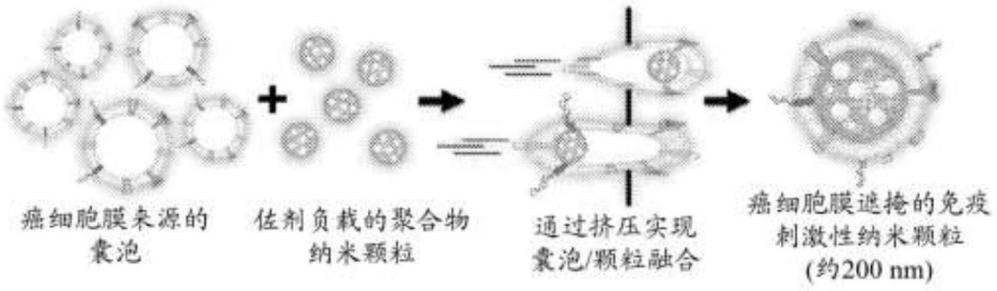

癌细胞膜来源的
囊泡
佐剂负载的聚合物
纳米颗粒
通过挤压实现
囊泡/颗粒融合
癌细胞膜逃掩的免疫
刺激性纳米颗粒
(约200 nm)

图15

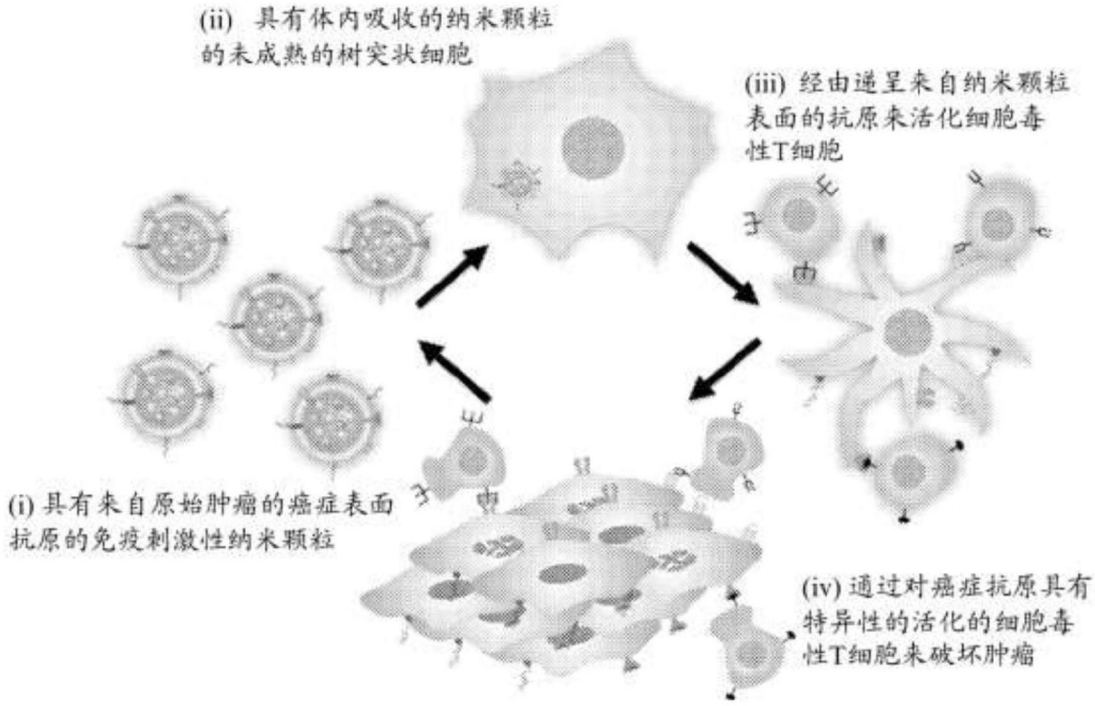

(ii) 具有体内吸收的纳米颗粒
的未成熟的树突状细胞
(iii) 经由递呈来自纳米颗粒
表面的抗原来活化细胞毒
性T细胞
(i) 具有来自原始肿瘤的癌症表面
抗原的免疫刺激性纳米颗粒
(iv) 通过对癌症抗原具有
特异性的活化的细胞毒
性T细胞来破坏肿瘤

图16

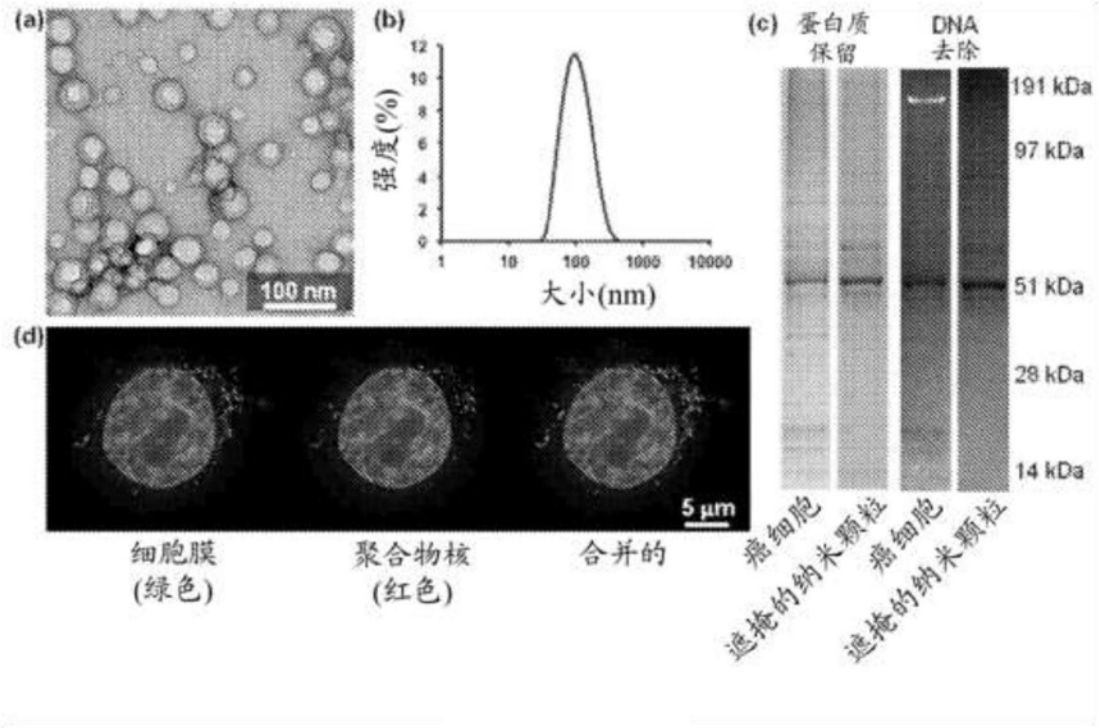

(a)
100 nm
(b)
强度(%)
大小(nm)
(c)
蛋白质保留
DNA去除
191 kDa
97 kDa
51 kDa
28 kDa
14 kDa
癌细胞
遮掩的纳米颗粒
癌细胞
遮掩的纳米颗粒
(d)
5 μm
细胞膜(绿色)
聚合物核(红色)
合并的

图17

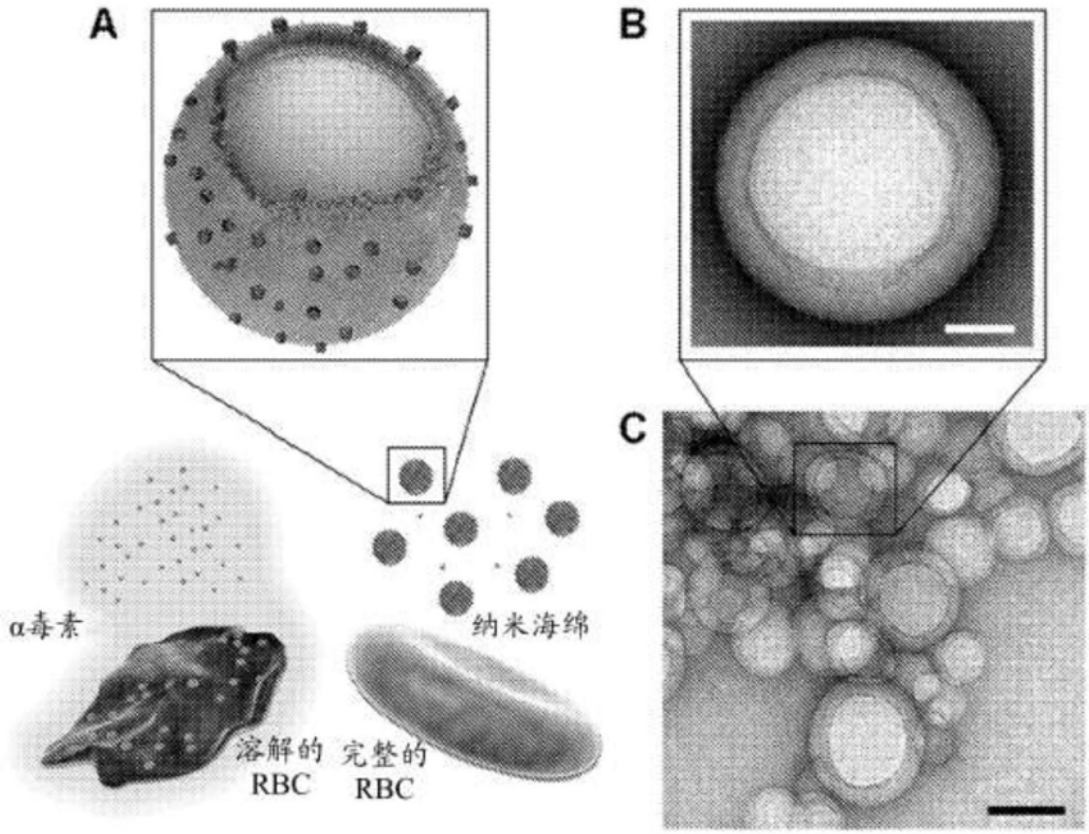

A
B
C
α毒素
纳米海绵
溶解的RBC
完整的RBC

图18

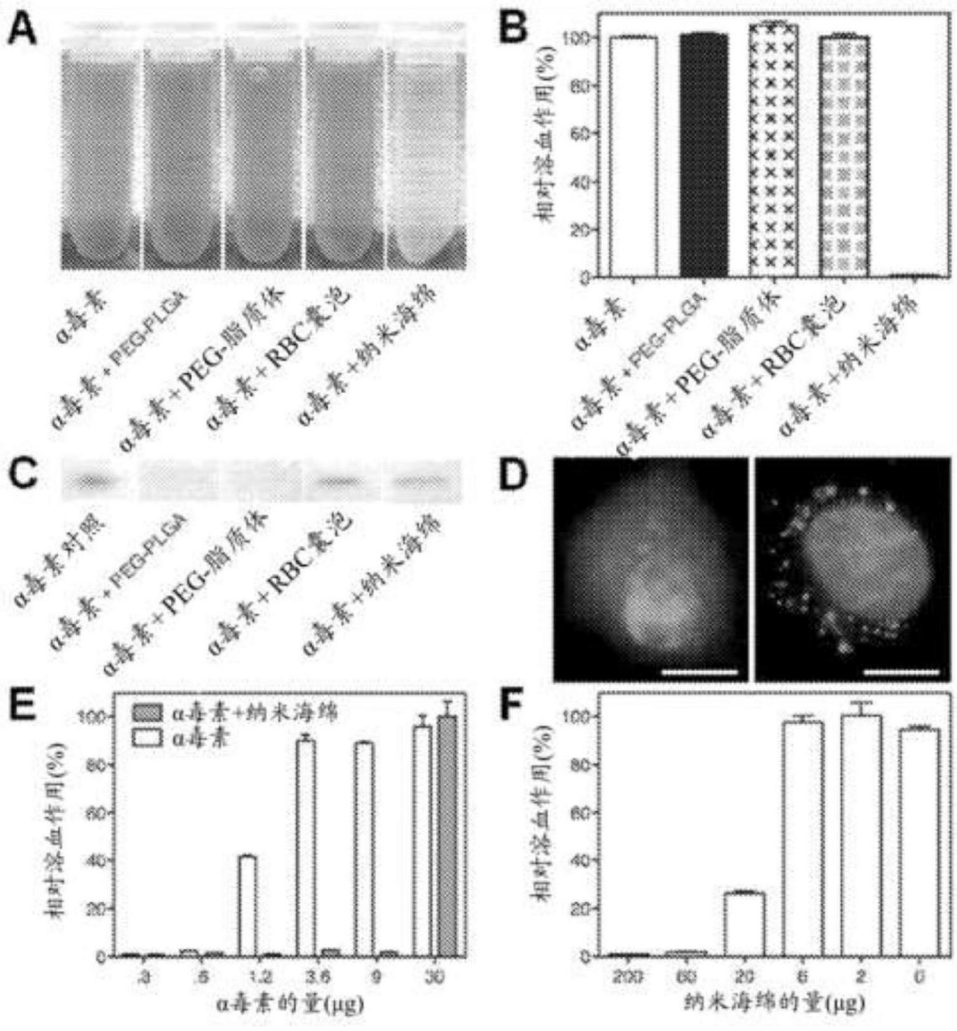

A
α毒素
α毒素+PEG-PLGA
α毒素+PEG-脂质体
α毒素+RBC囊泡
α毒素+纳米海绵
B
相对溶血作用(%)
C
α毒素对照
D
E
α毒素+纳米海绵
α毒素
相对溶血作用(%)
α毒素的量(μg)
F
相对溶血作用(%)
纳米海绵的量(μg)

图19

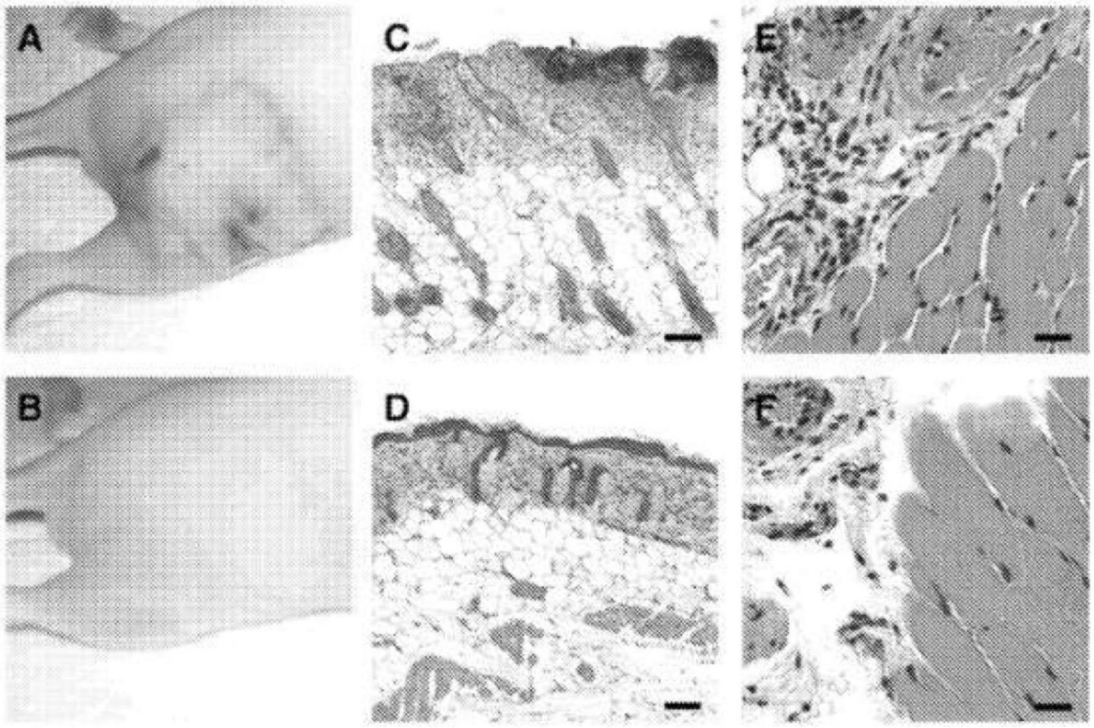

A
C
E
B
D
F

图20

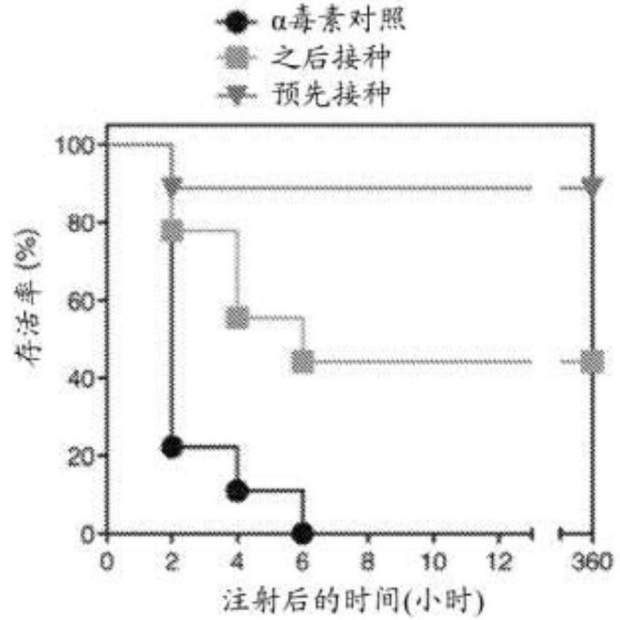

α毒素对照
之后接种
预先接种
存活率(%)
100
80
60
40
20
0
0
2
4
6
8
10
12
360
注射后的时间(小时)

图21

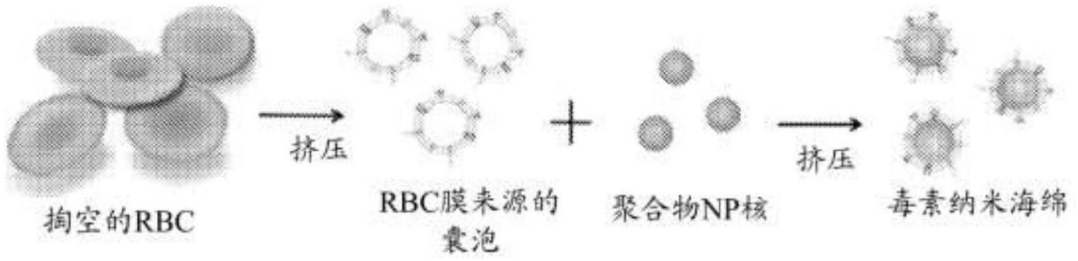

挤压
挤压
掏空的RBC
RBC膜来源的囊泡
聚合物NP核
毒素纳米海绵

图22

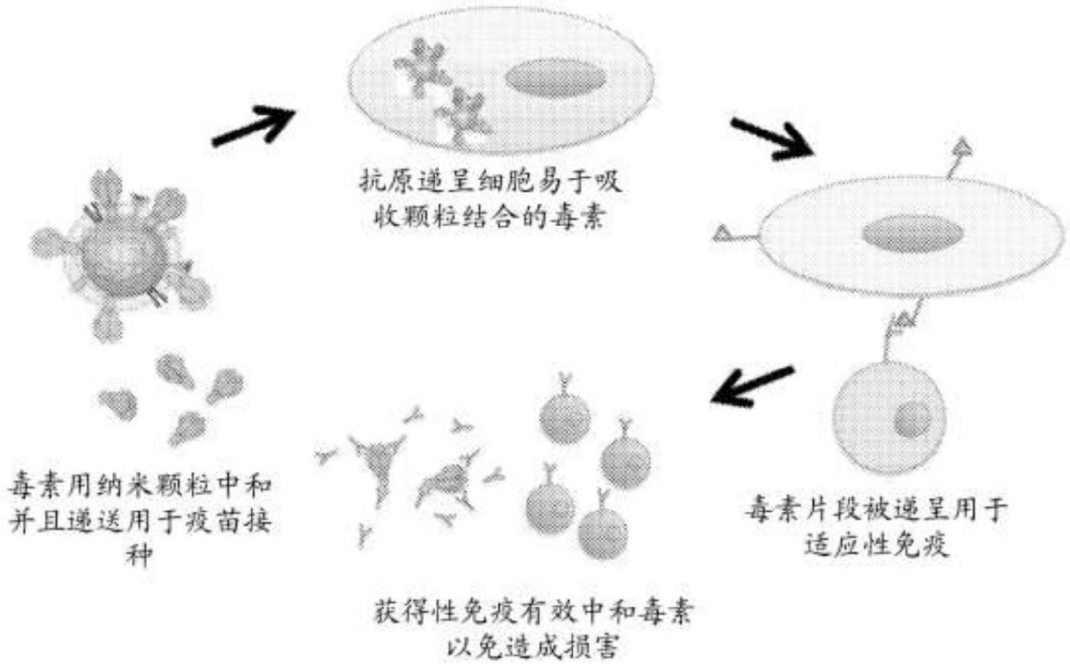

抗原递呈细胞易于吸收颗粒结合的毒素
毒素片段被递呈用于适应性免疫
获得性免疫有效中和毒素以免造成损害
毒素用纳米颗粒中和并且递送用于疫苗接种

图23

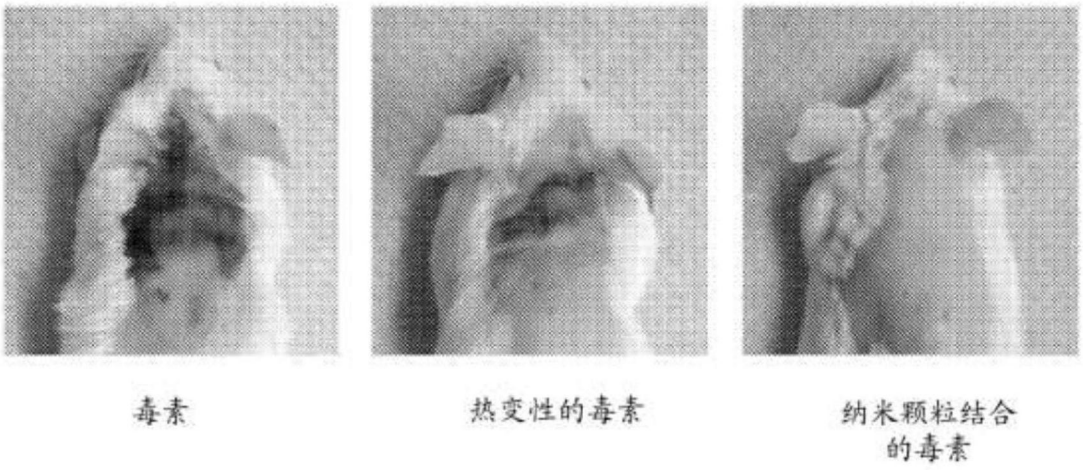

毒素
热变性的毒素
纳米颗粒结合的毒素

图24

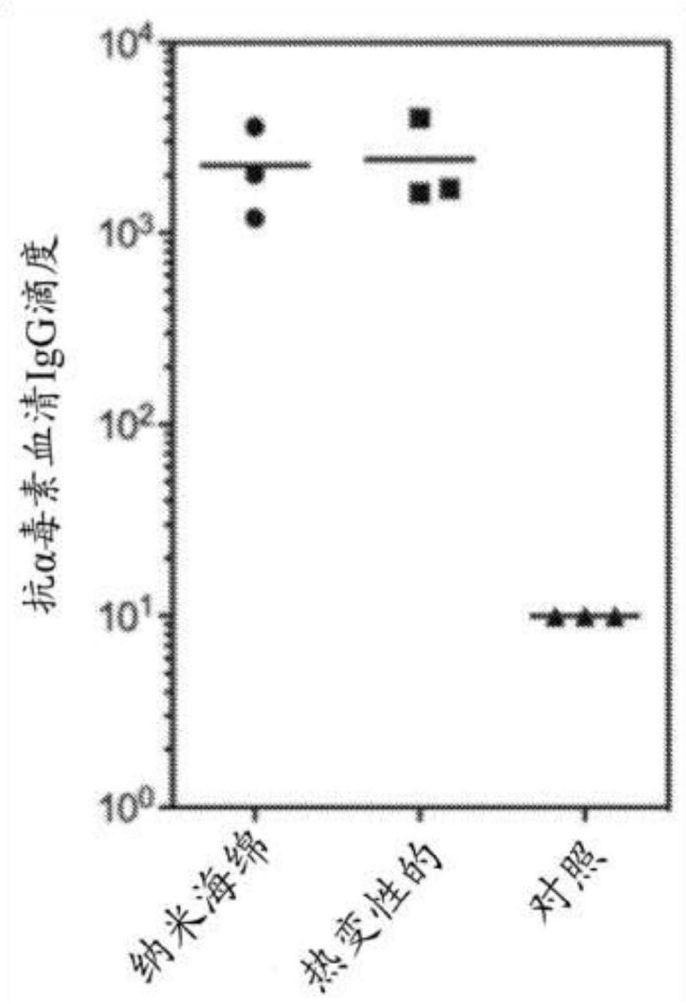


图25

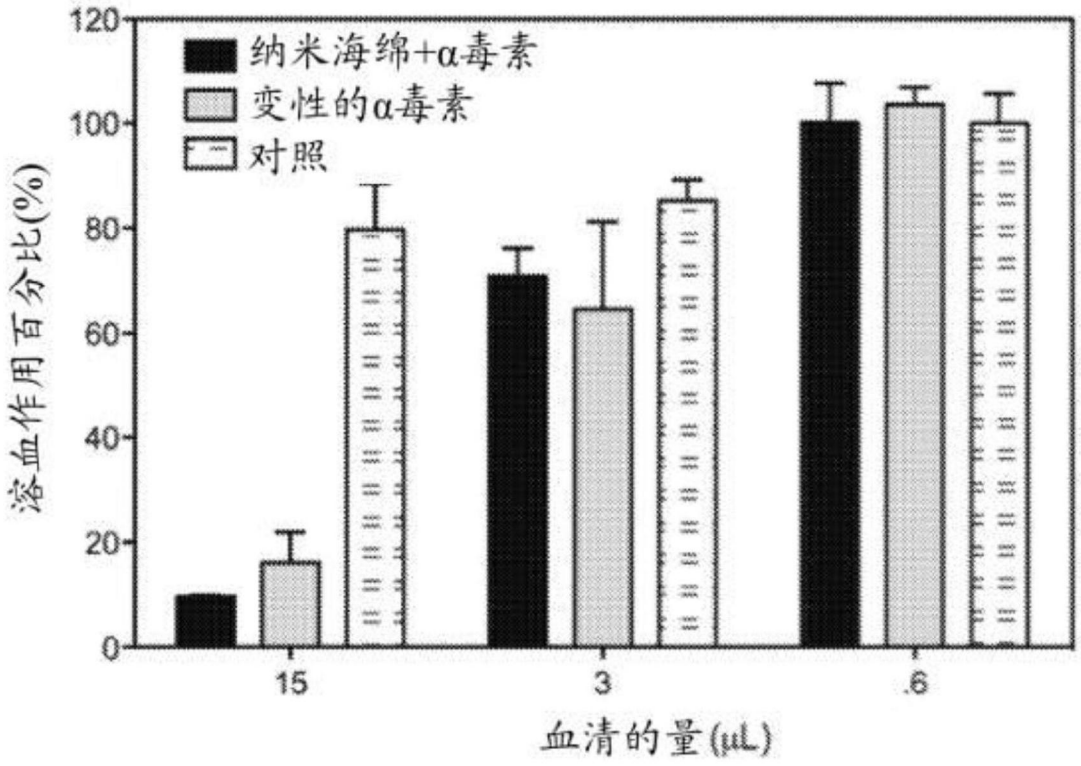


图26

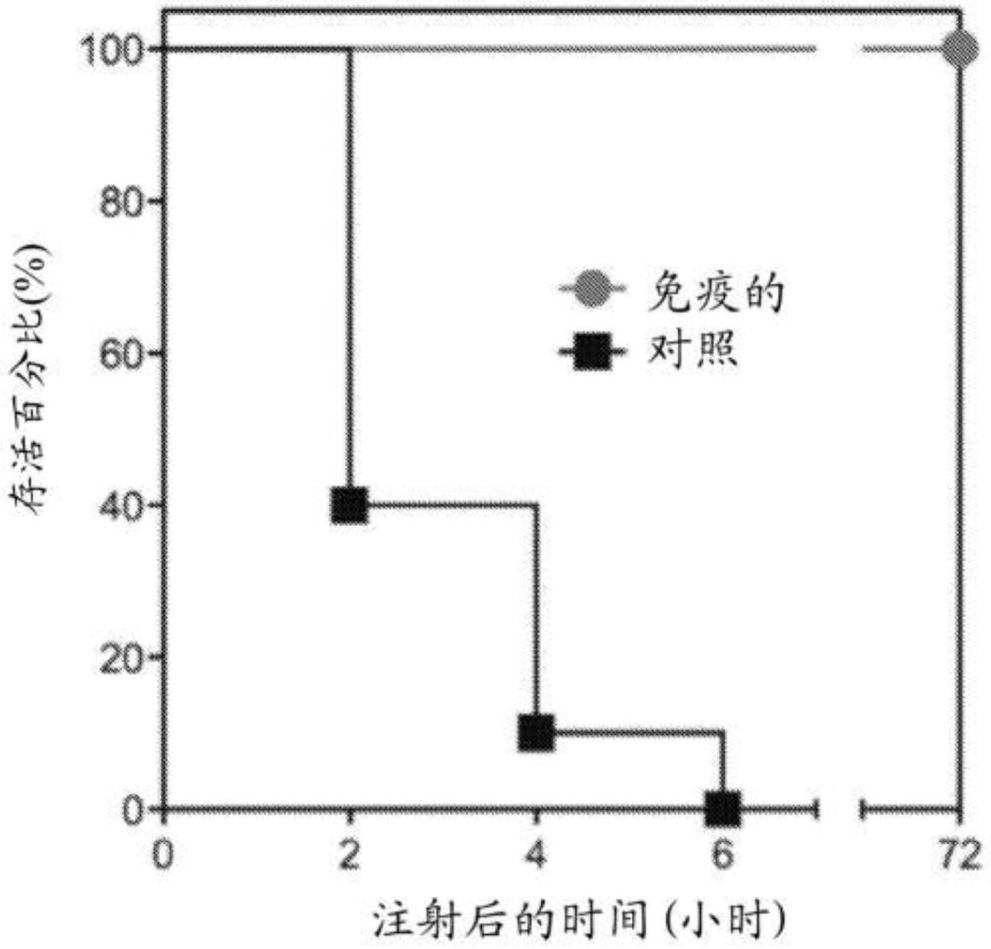

100
80
60
40
20
0
存活百分比(%)
免疫的
对照
0
2
4
6
72
注射后的时间(小时)

图27

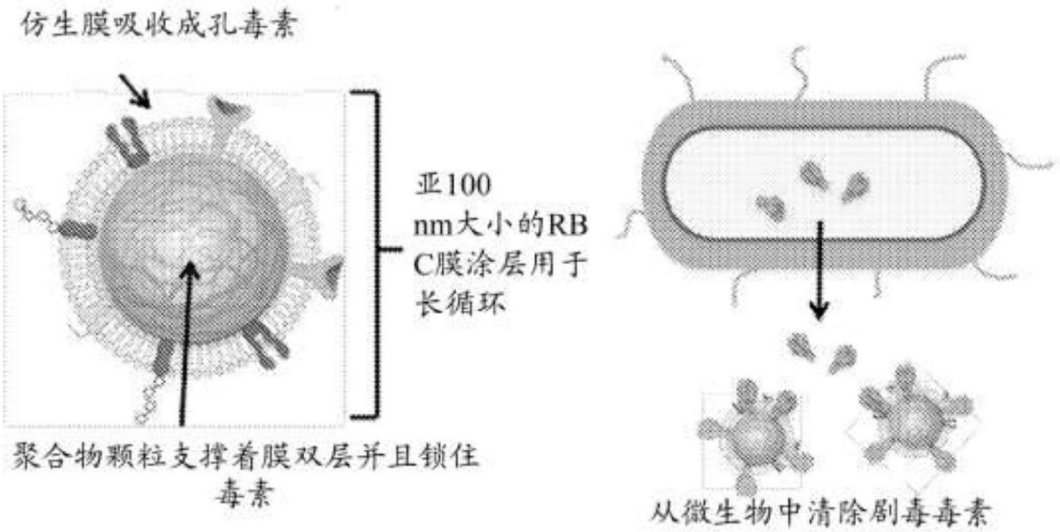

仿生膜吸收成孔毒素
亚100
nm大小的RB
C膜涂层用于
长循环
聚合物颗粒支撑着膜双层并且锁住
毒素
从微生物中清除剧毒毒素

图28