



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102448491 A

(43) 申请公布日 2012. 05. 09

(21) 申请号 201080025067. 0

(22) 申请日 2010. 04. 01

(30) 优先权数据

61/165, 732 2009. 04. 01 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011. 11. 30

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2010/029694 2010. 04. 01

(87) PCT申请的公布数据

W02010/115046 EN 2010. 10. 07

(71) 申请人 迈阿密大学

地址 美国佛罗里达州

(72) 发明人 P·M·达夫塔里安 P·塞拉菲尼

V·P·莱蒙 黎薇 A·凯弗尔

B·B·布隆贝格 V·L·佩雷

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司 31100

代理人 余颖

(51) Int. Cl.

A61K 39/38 (2006. 01)

权利要求书 4 页 说明书 27 页

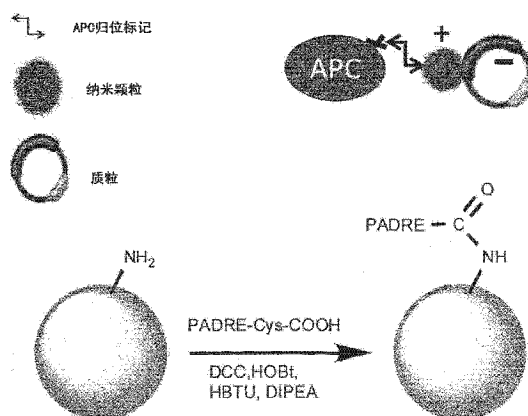
序列表 11 页 附图 18 页

(54) 发明名称

疫苗组合物和其使用方法

(57) 摘要

采用基于纳米颗粒的疫苗、组合物、药盒和方法有效体内递送一种或多种抗原用于免疫和生成抗体(例如单克隆抗体),以及有效递送肽、蛋白、siRNA、RNA或DNA到PAPC或MHC II型阳性细胞(例如肿瘤细胞)。例如,抗原可以是引起对象(例如哺乳动物)中感兴趣基因表达和诱导针对所表达蛋白的强烈和特异免疫应答的DNA。抗原也可以是经加工并呈递的免疫原性肽或多肽。在一种实施方式中,本文所述基于纳米颗粒的体内递送抗原方法包括注射疫苗,所述疫苗由偶联带电枝状物(例如PADRE衍生枝状物)的编码至少一种抗原的DNA、或至少一种抗原肽或多肽组成,所述枝状物也偶联T辅助表位(例如PADRE)。带负电的质粒自然结合带正电的PADRE-枝状物,而肽或多肽抗原若非带负电则可化学连接PADRE-枝状物。或者,可使用带负电的枝状物。本文所述组合物、药盒、疫苗和方法具有预防和治疗性应用,即可用作预防剂防止对象中疾病或病症发生以及治疗患病或有病症的对象。本文所述疫苗可用于产生针对任何传染性病原体或癌症的免疫应答。



1. 一种疫苗,所述疫苗包括至少一种带电、高度分支的聚合枝状物,其偶联有至少一种 T 辅助肽和编码至少一种抗原的核酸,其中所述至少一种 T 辅助肽和所述核酸偶联于所述至少一种带电、高度分支的聚合枝状物的外表面,从而所述至少一种 T 辅助肽特异性结合专职抗原呈递细胞且所述至少一种 T 辅助肽、至少一种带电的高度分支聚合枝状物和核酸的组合能诱导针对所述至少一种抗原的免疫应答。

2. 如权利要求 1 所述的疫苗,其特征在于,所述至少一种枝状物结合聚肌胞苷酸。

3. 如权利要求 1 所述的疫苗,其特征在于,所述疫苗还包括药学上可接受的载体和油包水乳液。

4. 如权利要求 1 所述的疫苗,其特征在于,所述至少一种 T 辅助肽是 Pan-DR 表位 (PADRE)。

5. 如权利要求 4 所述的疫苗,其特征在于,所述至少一种 T 辅助肽是各具有 SEQ ID NO : 1 所示氨基酸序列的 2 个 PADRE 表位。

6. 如权利要求 1 所述的疫苗,其特征在于,所述核酸是表达载体且所述至少一种抗原是癌抗原或来自传染性病原体的抗原。

7. 如权利要求 1 所述的疫苗,其特征在于,所述至少一种 T 辅助肽是流感 HA。

8. 如权利要求 1 所述的疫苗,其特征在于,所述至少一种带电、高度分支的聚合枝状物是 PAMAM 枝状物。

9. 一种疫苗,所述疫苗包括至少一种带电、高度分支的聚合枝状物,其偶联有至少一种 T 辅助肽和至少一种肽或多肽抗原,其中所述至少一种 T 辅助肽和所述至少一种肽或多肽抗原偶联于所述至少一种带电、高度分支的聚合枝状物的外表面,从而所述至少一种 T 辅助肽特异性结合专职抗原呈递细胞且所述至少一种 T 辅助肽、至少一种带电的高度分支聚合枝状物和至少一种肽或多肽抗原的组合能诱导针对所述至少一种肽或多肽抗原的免疫应答。

10. 如权利要求 9 所述的疫苗,其特征在于,所述至少一种带电、高度分支的聚合枝状物还偶联不同于所述至少一种肽或多肽抗原的第二种肽或多肽抗原。

11. 如权利要求 9 所述的疫苗,其特征在于,所述疫苗还包括第二种带电、高度分支的聚合枝状物,其偶联有至少一种 T 辅助肽和不同于所述至少一种肽或多肽抗原的第二种肽或多肽抗原,其中所述至少一种 T 辅助肽和所述第二种肽或多肽抗原偶联于所述第二种带电、高度分支的聚合枝状物的外表面,从而所述至少一种 T 辅助肽特异性结合专职抗原呈递细胞且所述至少一种 T 辅助肽、所述第二种带电的高度分支聚合枝状物和所述第二种肽或多肽抗原的组合能诱导针对所述第二种肽或多肽抗原的免疫应答。

12. 如权利要求 9 所述的疫苗,其特征在于,所述至少一种带电、高度分支的聚合枝状物结合聚肌胞苷酸。

13. 如权利要求 9 所述的疫苗,其特征在于,所述疫苗还可包括药学上可接受的载体。

14. 如权利要求 9 所述的疫苗,其特征在于,所述疫苗还可包括油包水乳液。

15. 如权利要求 9 所述的疫苗,其特征在于,所述至少一种 T 辅助肽是 Pan-DR 表位。

16. 如权利要求 15 所述的疫苗,其特征在于,所述至少一种 T 辅助肽是各具有 SEQ ID NO : 1 所示氨基酸序列的 2 个 Pan-DR 表位。

17. 如权利要求 9 所述的疫苗,其特征在于,所述至少一种肽或多肽抗原是癌抗原或来

自传染性病原体的抗原。

18. 如权利要求 9 所述的疫苗,其特征在于,所述至少一种 T 辅助肽是流感 HA。

19. 如权利要求 9 所述的疫苗,其特征在于,所述至少一种带电、高度分支的聚合枝状物是 PAMAM 枝状物。

20. 一种递送抗原给哺乳动物并诱导所述哺乳动物中生成针对所述抗原的单克隆抗体的方法,所述方法包括以下步骤:将含有至少一种带电、高度分支的聚合枝状物的组合物给予哺乳动物,所述枝状物偶联有至少一种 T 辅助肽和至少一种肽或多肽抗原或编码至少一种抗原的核酸,其中所述至少一种 T 辅助肽和所述核酸或至少一种肽或多肽抗原偶联于所述至少一种带电、高度分支的聚合枝状物的外表面,从而所述至少一种 T 辅助肽特异性结合专职抗原呈递细胞且所述至少一种 T 辅助肽、至少一种带电的高度分支聚合枝状物、和所述核酸或至少一种肽或多肽抗原的组合能诱导针对所述至少一种肽或多肽抗原的免疫应答,所述组合物的量有效诱导 MHC II 型介导的 T 辅助细胞激活,其中将所述组合物给予所述哺乳动物导致生成针对所述至少一种肽或多肽抗原的单克隆抗体。

21. 如权利要求 20 所述的方法,其特征在于,所述哺乳动物患有癌症,所述至少一种肽或多肽抗原是癌抗原,所述组合物是癌症疫苗。

22. 如权利要求 21 所述的方法,其特征在于,所述组合物的给予在所述哺乳动物中不产生局部不良反应。

23. 如权利要求 20 所述的方法,其特征在于,所述哺乳动物患有传染病,所述至少一种肽或多肽抗原来自传染性病原体,所述组合物是所述传染性病原体的疫苗。

24. 如权利要求 23 所述的方法,其特征在于,所述组合物的给予在所述哺乳动物中不产生局部不良反应。

25. 如权利要求 20 所述的方法,其特征在于,所述至少一种带电、高度分支的聚合枝状物结合聚肌胞苷酸。

26. 如权利要求 20 所述的方法,其特征在于,所述组合物还可包括药学上可接受的载体。

27. 如权利要求 20 所述的方法,其特征在于,所述组合物还可包括油包水乳液。

28. 如权利要求 20 所述的方法,其特征在于,所述至少一种 T 辅助肽是 PADRE 表位。

29. 如权利要求 28 所述的方法,其特征在于,所述至少一种 T 辅助肽是各具有 SEQ ID NO:1 所示氨基酸序列的 2 个 PADRE 表位。

30. 如权利要求 20 所述的方法,其特征在于,所述至少一种 T 辅助肽是流感 HA。

31. 如权利要求 20 所述的方法,其特征在于,所述至少一种带电、高度分支的聚合枝状物是 PAMAM 枝状物。

32. 如权利要求 20 所述的方法,其特征在于,所述至少一种带电、高度分支的聚合枝状物还偶联有不同于所述至少一种肽或多肽抗原的第二种肽或多肽抗原。

33. 如权利要求 21 所述的方法,其特征在于,所述组合物还可包括第二种带电、高度分支的聚合枝状物,其偶联有至少一种 T 辅助肽和不同于所述至少一种肽或多肽抗原的第二种肽或多肽抗原,其中所述至少一种 T 辅助肽和所述第二种肽或多肽抗原偶联于所述第二种带电、高度分支的聚合枝状物的外表面,从而所述至少一种 T 辅助肽特异性结合专职抗原呈递细胞且所述至少一种 T 辅助肽、所述第二种带电的高度分支聚合枝状物和所述第二

种肽或多肽抗原的组合能诱导针对所述第二种肽或多肽抗原的免疫应答。

34. 如权利要求 20 所述的方法,其特征在于,所述哺乳动物是啮齿类动物或兔并从所述哺乳动物中收获单克隆抗体。

35. 如权利要求 34 所述的方法,其特征在于,所述单克隆抗体通过以下步骤制备:从所述哺乳动物中收获所述抗体,确定所述抗体效价,从所述哺乳动物中取出脾,并与骨髓瘤融合。

36. 如权利要求 35 所述的方法,其特征在于,所述抗体人源化。

37. 一种组合物,所述组合物包括至少一种带电、高度分支的聚合枝状物,其偶联有至少一种 T 辅助肽和至少一种 siRNA,其中所述至少一种 T 辅助肽和所述至少一种 siRNA 偶联于所述带电、高度分支的聚合枝状物的外表面,从而所述至少一种 T 辅助肽特异性结合专职抗原呈递细胞。

38. 如权利要求 37 所述的组合物,其特征在于,所述至少一种带电、高度分支的聚合枝状物是 PAMAM 枝状物,所述至少一种 T 辅助肽是 PADRE,所述 siRNA 针对 CTLA-4、Foxp3、CD28、IDO 或精氨酸酶 1。

39. 一种将 siRNA 递送到专职抗原呈递细胞的方法,所述方法包括以下步骤:

(a) 提供含有至少一种带电、高度分支的聚合枝状物的组合物,所述枝状物偶联有至少一种 T 辅助肽和至少一种 siRNA,其中所述至少一种 T 辅助肽和所述至少一种 siRNA 偶联于所述带电、高度分支的聚合枝状物的外表面,从而所述至少一种 T 辅助肽特异性结合专职抗原呈递细胞;

(b) 将所述组合物在一定条件下给予哺乳动物对象,该条件下偶联有至少一种 T 辅助肽和至少一种 siRNA 的所述至少一种带电、高度分支的聚合枝状物结合专职抗原呈递细胞且所述 siRNA 进入所述专职抗原呈递细胞。

40. 如权利要求 39 所述的方法,其特征在于,所述带电、高度分支的聚合枝状物是 PAMAM 枝状物,所述至少一种 T 辅助肽是 PADRE。

41. 如权利要求 39 所述的方法,其特征在于,所述 siRNA 针对 CTLA-4、Foxp3、CD28、IDO 或精氨酸酶 1。

42. 如权利要求 40 所述的方法,其特征在于,所述 siRNA 防止所述专职抗原呈递细胞中的 CTLA-4、Foxp3、CD28、IDO 或精氨酸酶 1 表达。

43. 一种在哺乳动物中抑制 MHC II 型肿瘤细胞增殖或诱导 MHC II 型肿瘤细胞凋亡的方法,所述方法包括以下步骤:将含有至少一种带正电、高度分支的聚合枝状物的组合物给予哺乳动物,所述枝状物偶联有至少一种 T 辅助肽且结合有编码蛋白的核酸,其中所述至少一种 T 辅助肽和所述核酸偶联和结合于所述至少一种带正电、高度分支的聚合枝状物的外表面,从而所述至少一种 T 辅助肽特异性结合 MHC II 型肿瘤细胞且所述至少一种 T 辅助肽、所述至少一种带正电、高度分支的聚合枝状物、和所述核酸或由核酸编码的蛋白的组合抑制 MHC II 型肿瘤细胞增殖或诱导 MHC II 型肿瘤细胞凋亡。

44. 如权利要求 43 所述的方法,其特征在于,所述 MHC II 型肿瘤细胞是淋巴瘤或淋巴瘤的一部分。

45. 如权利要求 43 所述的方法,其特征在于,所述带正电、高度分支的聚合枝状物是 PAMAM 枝状物,所述至少一种 T 辅助肽是 PADRE。

46. 一种递送核酸到细胞的方法,所述方法包括使所述细胞接触含有至少一种带正电、高度分支的聚合枝状物的组合物,所述枝状物偶联有至少一种 T 辅助表位和至少一种编码肽或蛋白的核酸,其中所述至少一种 T 辅助表位和所述核酸偶联于至少一种带正电、高度分支的聚合枝状物的外表面,从而所述至少一种 T 辅助表位特异性结合所述细胞且所述至少一种 T 辅助表位、至少一种带正电的高度分支聚合枝状物和所述核酸的组合被所述细胞内化。

47. 如权利要求 46 所述的方法,其特征在于,所述肽或蛋白在所述细胞内表达。

48. 如权利要求 46 所述的方法,其特征在于,所述带正电、高度分支的聚合枝状物是 PAMAM 枝状物,所述至少一种 T 辅助肽是 PADRE。

49. 一种用于递送核酸给细胞的组合物,所述组合物包括至少一种带正电、高度分支的聚合枝状物,其偶联有至少一种 T 辅助肽和和至少一种编码肽或蛋白的核酸,其中所述至少一种 T 辅助肽和所述核酸偶联于至少一种带正电、高度分支的聚合枝状物的外表面,从而所述至少一种 T 辅助肽特异性结合所述细胞且所述至少一种 T 辅助肽、至少一种带正电的高度分支聚合枝状物和所述核酸的组合被所述细胞内化。

50. 如权利要求 46 所述的组合物,其特征在于,所述带正电、高度分支的聚合枝状物是 PAMAM 枝状物,所述至少一种 T 辅助肽是 PADRE。

疫苗组合物和其使用方法

[0001] 相关申请的交叉参考

[0002] 本申请要求 2009 年 4 月 1 日提交的美国临时专利申请号 61/165,732 的优先权。本申请要求此在先专利申请的权益,其全部内容通过引用纳入本文。

发明领域

[0003] 本发明一般涉及化学和免疫学领域。本发明更具体涉及诱导对象中免疫应答的疫苗、组合物和方法。

背景技术

[0004] 通过使用疫苗预防微生物感染和致病过程被认为是抵御疾病的最有效和理想过程。在感染或疾病前以刺激宿主生物中免疫应答的方式将抗原或免疫原引入生物。然而,传统的疫苗策略不能有效增强保护抵御许多病原或癌症。在超过 100 种病原中,通过传统疫苗策略仅制成约 20 种成功的疫苗。在诱导高细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 反应的那些疫苗中,一些疫苗常由于免疫原性较弱、免疫回避机制和假性印迹而显示中等的目标反应率。目前的疫苗递送方法在诱导保护性免疫应答方面成功率中等,因为它们不诱导强“危险信号”,它们启动作为反馈机制的抑制反应且它们递送抗原给非专职性抗原呈递细胞 (APC)。例如,目前的癌症疫苗即使在产生高 CTL 反应时,也仅显示中等 (2.6%) 目标反应率。它们有许多缺点,包括免疫原性差和免疫回避机制。此外,最具前景的癌症疫苗 (基于树突细胞和基于 G-vax) 非常昂贵且这些疫苗的制备很复杂 (例如需要个人化和 GMP 生产)。

[0005] 基因疫苗或基因免疫涉及将遗传物质引入哺乳动物宿主以产生抗原,其被视作包括癌症疫苗在内的疫苗可能途径。递送的编码所述感兴趣抗原的哺乳动物表达载体引起体内表达和随后发生的抗原特异反应。此外,基因是带负电的聚合物,不能跨细胞膜到达细胞核以表达感兴趣蛋白。基因免疫提供许多优点,包括产生体内表达的全谱天然表位、相较于体外表达重组蛋白可获得天然构象的蛋白、诱导抗体和细胞免疫应答、无需昂贵且往往挑战性的抗原生产步骤。然而,基因疫苗有一些缺点,包括破坏对自体抗原的耐受性、体内递送核酸到细胞和核较差、缺乏对特定细胞类型的特异性、和免疫应答较弱。

[0006] 其他疫苗形式也有缺点。例如,病毒递送基因产生对病毒载体的强免疫应答且涉及安全问题。从细菌中纯化蛋白和生产用作抗原的肽花费较大且耗时。

[0007] 目前,没有可靶向 APC 以生成特异和较强免疫应答而副作用没有或很少的经济、有效疫苗形式。因此,非常需要靶向专职 APC 并引发较强和特异细胞和抗体反应且安全、经济、易用的疫苗。

[0008] 发明概述

[0009] 本文描述了基于纳米颗粒的组合物、药盒和方法及平台,用于体内递送抗原或编码抗原的核酸到专职性 APC (PAPC) 以产生对该抗原的较强和特异免疫应答。本文还描述了基于纳米颗粒的组合物、药盒、方法和平台,用于递送 siRNA 给 PAPC 和递送核酸、肽或蛋白给细胞 (例如表达 MHC II 型的肿瘤细胞)。目前疫苗策略的一个主要缺陷在于其诱导包

括调节 T 细胞在内的抑制细胞。已知将抗原靶向递送给 PAPC 可减少或阻止抑制机制激活,特别是调节 T 细胞的抑制机制。所述组合物、药盒和方法包括联用 MHC 靶向和免疫原性肽(例如 PADRE、HA)与带电(例如带正电)高度分支的聚合枝状物(例如 PAMAM 和其他枝状物)作为靶向递送核酸、肽或多肽给特定细胞的载体,从而产生基于纳米颗粒的新方法用于基因或蛋白免疫。本文所述的典型疫苗包括带电(例如带正电)高度分支的聚合枝状物,其偶联 MHC 靶向和免疫原性肽如 T 辅助肽(例如,表位如 PADRE 肽或流感 HA)、至少一种多肽抗原或编码所述至少一种抗原的核酸、和任选的聚 I-C。本文所述带正电、高度分支的聚合枝状物有效结合带负电的生物分子,包括 DNA、RNA 和其他。偶联 T 辅助肽(例如,表位如 PADRE 肽或流感 HA)的带电(例如带正电)高度分支的聚合枝状物提供了由于递送特异抗原给 PAPC 而提高功效的疫苗。在本文所述实验中,显示首次使用 PADRE 以通过其结合 MHC II 型分子而靶向 PAPC。本文所述实验描述了 2 种不同靶向肽的有效使用,所述肽的独特特征是结合 MHC II 型。因此,本文所述疫苗、方法和组合物涵盖所有 MHC II 型结合肽。本文所述疫苗、药盒和组合物提供了体内特异且有效转染 PAPC、和普遍的内置通用 T 辅助活性,其引起自体 PAPC 成熟并因而产生较强和特异免疫应答。

[0010] 枝状物由于提供对大小和形状的结构控制(负荷空间)而成为理想的 DNA 递送候选物,它们为生物相容性(无毒性和无免疫原性),具有精确支架特性,具有针对特定靶向部分的明确表面可修饰功能,具有细胞粘附和内吞作用及递送到细胞质或核的能力,具有可接受的生物降解性(在体内安全降解的能力),能简单和持续地可重复(临床级)合成。在本文所述实验中,偶联 DNA、siRNA、肽或多肽的带正电、高度分支的聚合枝状物包括在人和小鼠中都靶向 APC 并激活 T 辅助细胞的肽(例如 PADRE 肽或流感 HA)。所述 PADRE 肽具有 2 个主要功能:因其结合 PAPC 上存在的 MHC II 型而护送 DNA 到 PAPC 且它刺激 T 辅助细胞,该细胞促进细胞毒性 T 细胞生成和抗体反应所需的类型转换。此新型纳米构建物具有基因和肽递送及免疫的独特性质。本文所述实验也显示偶联 PADRE 的带正电、高度分支的聚合枝状物(PAMAM 枝状物)在治疗性设定中使 B 16/LU8 小鼠中已建立且高侵入性黑色素瘤延迟生长并使其尺寸减小 50%,在 B16/OVA 预防性设定中显示肿瘤 100%消除,诱导针对免疫所用基因产物的强免疫应答,证明在小鼠和人 APC 中的转染效率提至 2 或 3 倍,体内递送编码 GFP 的质粒从而产生引流淋巴结,有效递送 siRNA 到人 B 细胞、T 细胞、和鼠巨噬细胞。

[0011] 本文所述组合物和疫苗是特制的理想免疫平台,因为它们靶向 MHC II 型阳性细胞,其中所有或几乎所有都是 PAPC。然而,同样重要的是 MHC II 型阳性细胞表达很重要的抑制或促进 T 细胞激活的共抑制和共刺激分子(包括但不限于 CD80、CD86、B7-H1、B7-H4、B7-DC、CD137、OX40、Foxp3 和其推定共刺激受体)。靶向调控这些途径中相关分子的表达可用于 i) 癌症、传染病的免疫治疗/接种或者其他新疫苗方法如针对成瘾或不孕或中和对象中疾病诱导剂的疫苗接种,以及控制自身免疫。本文所述的将疫苗靶向递送给 APC 通过产生强许多的免疫应答、减少抑制/反馈机制、和降低疫苗剂量从而预防毒性,为与目前疫苗策略相关的挑战提供解决方法。

[0012] 因此,本文所述疫苗包括至少一种带电、高度分支的聚合枝状物,其偶联至少一种 T 辅助肽和编码至少一种抗原的核酸,其中所述至少一种 T 辅助肽和所述核酸偶联于所述至少一种带电、高度分支的聚合枝状物的外表面,从而所述至少一种 T 辅助肽特异性结合

专职抗原呈递细胞且所述至少一种 T 辅助肽、至少一种带电的高度分支聚合枝状物和核酸的组合能诱导针对所述至少一种抗原的免疫应答。在疫苗中,所述至少一种枝状物能结合聚肌胞苷酸。该实施方式可包括药学上可接受载体和 / 或油包水乳液。在一种实施方式中,所述至少一种 T 辅助肽是 Pan-DR 表位 (PADRE),例如各具有 SEQ ID NO :1 所示氨基酸序列的 2 个 PADRE 表位。所述至少一种 T 辅助肽也可以是流感 HA。所述核酸可以是表达载体且所述至少一种抗原可以是癌抗原或来自传染性病原体的抗原。所述至少一种带电、高度分支的聚合枝状物可以是 PAMAM 枝状物。

[0013] 本文还描述以下疫苗:该疫苗包括至少一种带电、高度分支的聚合枝状物,其偶联至少一种 T 辅助肽和至少一种肽或多肽抗原,其中所述至少一种 T 辅助肽和所述至少一种肽或多肽抗原偶联于所述至少一种带电、高度分支的聚合枝状物的外表面,从而所述至少一种 T 辅助肽特异性结合专职抗原呈递细胞且所述至少一种 T 辅助肽、至少一种带电的高度分支聚合枝状物和至少一种肽或多肽抗原的组合能诱导针对所述至少一种肽或多肽抗原的免疫应答。在一种实施方式中,所述至少一种带电、高度分支的聚合枝状物还偶联不同于所述至少一种肽或多肽抗原的第二种肽或多肽抗原。所述疫苗还可包括第二种带电、高度分支的聚合枝状物,其上偶联至少一种 T 辅助肽和不同于所述至少一种肽或多肽抗原的第二种肽或多肽抗原,其中所述至少一种 T 辅助肽和所述第二种肽或多肽抗原偶联于所述第二种带电、高度分支的聚合枝状物的外表面,从而所述至少一种 T 辅助肽特异性结合专职抗原呈递细胞且所述至少一种 T 辅助肽、所述第二种带电的高度分支聚合枝状物和所述第二种肽或多肽抗原的组合能诱导针对所述第二种肽或多肽抗原的免疫应答。所述至少一种带电、高度分支的聚合枝状物可结合聚肌胞苷酸。所述疫苗还可包括药学上可接受载体和 / 或油包水乳液。所述至少一种 T 辅助肽可以是 Pan-DR 表位,例如各具有 SEQ ID NO :1 所示氨基酸序列的 2 个 Pan-DR 表位。在另一实施方式中,所述至少一种 T 辅助肽是流感 HA。所述至少一种肽或多肽抗原可以是癌抗原或来自传染性病原体的抗原。所述至少一种带电、高度分支的聚合枝状物可以是 PAMAM 枝状物。

[0014] 本文还描述了将抗原递送给哺乳动物并诱导该哺乳动物中生成针对所述抗原的单克隆抗体的方法。所述方法包括以下步骤:将含有至少一种带电、高度分支的聚合枝状物的组合物给予哺乳动物,所述枝状物偶联至少一种 T 辅助肽和至少一种肽或多肽抗原或所述至少一种抗原的编码核酸,其中所述至少一种 T 辅助肽和所述核酸或至少一种肽或多肽抗原偶联于所述至少一种带电、高度分支的聚合枝状物的外表面,从而所述至少一种 T 辅助肽特异性结合专职抗原呈递细胞且所述至少一种 T 辅助肽、至少一种带电的高度分支聚合枝状物、和所述核酸或至少一种肽或多肽抗原的组合能诱导针对所述至少一种肽或多肽抗原的免疫应答,所述组合物的量有效诱导 MHC II 型介导的 T 辅助细胞激活,其中将所述组合物给予所述哺乳动物导致生成针对所述至少一种肽或多肽抗原的单克隆抗体。在所述哺乳动物患有癌症的一种实施方式中,所述至少一种肽或多肽抗原是癌抗原,所述组合物是癌症疫苗。通常,给予所述组合物在所述哺乳动物中不产生局部不良反应。在所述哺乳动物患有传染病的另一个实施方式中,所述至少一种肽或多肽抗原来自传染性病原体,所述组合物是所述传染性病原体的疫苗,通常在所述哺乳动物中不产生局部不良反应。所述至少一种带电、高度分支的聚合枝状物可结合聚肌胞苷酸和 / 或可包括一个药学上可接受载体和 / 或油包水乳液。

[0015] 在本方法的一种实施方式中,所述至少一种 T 辅助肽是 PADRE 表位,例如各具有 SEQ ID NO:1 所示氨基酸序列的 2 个 PADRE 表位。所述至少一种 T 辅助肽也可以是流感 HA。所述至少一种带电、高度分支的聚合枝状物可以是 PAMAM 枝状物。所述至少一种带电、高度分支的聚合枝状物还可偶联不同于所述至少一种肽或多肽抗原的第二种肽或多肽抗原。所述组合物还可包括第二种带电、高度分支的聚合枝状物,其偶联至少一种 T 辅助肽和不同于所述至少一种肽或多肽抗原的第二种肽或多肽抗原,其中所述至少一种 T 辅助肽和所述第二种肽或多肽抗原偶联于所述第二种带电、高度分支的聚合枝状物的外表面,从而所述至少一种 T 辅助肽特异性结合专职抗原呈递细胞且所述至少一种 T 辅助肽、所述第二种带电的高度分支聚合枝状物和所述第二种肽或多肽抗原的组合能诱导针对所述第二种肽或多肽抗原的免疫应答。

[0016] 在一个生产和收获抗体的实施方式中,所述哺乳动物可以是啮齿类动物或兔并从所述哺乳动物中收获单克隆抗体。在此实施方式中,所述单克隆抗体通过以下步骤制备:从所述哺乳动物中收获所述抗体,确定所述抗体效价,从所述哺乳动物中取出脾,与骨髓瘤融合。所述抗体可人源化处理。

[0017] 本文还描述以下组合物:该组合物包括至少一种带电、高度分支的聚合枝状物,其偶联至少一种 T 辅助肽和至少一种 siRNA,其中所述至少一种 T 辅助肽和所述至少一种 siRNA 偶联于所述带电、高度分支的聚合枝状物的外表面,从而所述至少一种 T 辅助肽特异性结合专职抗原呈递细胞。所述至少一种带电、高度分支的聚合枝状物可以是 PAMAM 枝状物,所述至少一种 T 辅助肽可以是 PADRE,所述 siRNA 可针对例如 CTLA-4、Foxp3、CD28、IDO 或精氨酸酶 1。

[0018] 本文进一步描述将 siRNA 递送给专职抗原呈递细胞的方法,包括以下步骤:提供含有至少一种带电、高度分支的聚合枝状物的组合物,所述枝状物偶联至少一种 T 辅助肽和至少一种 siRNA,其中所述至少一种 T 辅助肽和所述至少一种 siRNA 偶联于所述带电、高度分支的聚合枝状物的外表面,从而所述至少一种 T 辅助肽特异性结合专职抗原呈递细胞;将所述组合物在一定条件下给予哺乳动物对象,所述条件下偶联至少一种 T 辅助肽和至少一种 siRNA 的所述至少一种带电、高度分支的聚合枝状物结合专职抗原呈递细胞且所述 siRNA 进入所述专职抗原呈递细胞。所述带电、高度分支的聚合枝状物可以是 PAMAM 枝状物,所述至少一种 T 辅助肽可以是例如 PADRE,所述 siRNA 可针对例如 CTLA-4、Foxp3、CD28、IDO 或精氨酸酶 1。在一种实施方式中,所述 siRNA 防止所述专职抗原呈递细胞中的 CTLA-4、Foxp3、CD28、IDO 或精氨酸酶 1 表达。

[0019] 本文还描述了在哺乳动物中抑制 MHC II 型肿瘤细胞(例如淋巴瘤或淋巴瘤的部分)增殖或诱导 MHC II 型肿瘤细胞凋亡的方法。此方法包括以下步骤:将含有至少一种带正电、高度分支的聚合枝状物的组合物给予哺乳动物,所述枝状物偶联至少一种 T 辅助肽且结合编码蛋白的核酸,其中所述至少一种 T 辅助肽和所述核酸偶联并结合于所述至少一种带正电、高度分支的聚合枝状物的外表面,从而所述至少一种 T 辅助肽特异性结合 MHCII 型肿瘤细胞且所述至少一种 T 辅助肽、所述至少一种带正电、高度分支的聚合枝状物、和所述核酸或由核酸编码的蛋白的组合抑制 MHC II 型肿瘤细胞增殖或诱导 MHC II 型肿瘤细胞凋亡。所述带正电、高度分支的聚合枝状物可以是例如 PAMAM 枝状物,所述至少一种 T 辅助肽可以是例如 PADRE。然而,可使用任何适当的带正电、高度分支的聚合枝状物和 T 辅助肽。

[0020] 本文所述的递送核酸给细胞的方法包括使所述细胞接触含有至少一种带正电、高度分支的聚合枝状物的组合物,所述枝状物偶联至少一种 T 辅助表位和至少一种编码肽或蛋白的核酸,其中所述至少一种 T 辅助表位和所述核酸偶联于至少一种带正电、高度分支的聚合枝状物的外表面,从而所述至少一种 T 辅助表位特异性结合所述细胞且所述至少一种 T 辅助表位、至少一种带正电的高度分支聚合枝状物和所述核酸的组合被所述细胞内化。在此方法中,所述肽或蛋白通常在所述细胞内表达。尽管可使用任何合适的带正电、高度分支的聚合枝状物和 T 辅助肽,所述带正电、高度分支的聚合枝状物可以是例如 PAMAM 枝状物,所述至少一种 T 辅助肽可以是例如 PADRE。

[0021] 本文所述的用于递送核酸给细胞的组合物包括至少一种带正电、高度分支的聚合枝状物,其偶联至少一种 T 辅助肽和至少一种编码肽或蛋白的核酸,其中所述至少一种 T 辅助肽和所述核酸偶联于至少一种带正电、高度分支的聚合枝状物的外表面,从而所述至少一种 T 辅助肽特异性结合所述细胞且所述至少一种 T 辅助肽、至少一种带正电的高度分支聚合枝状物和所述核酸的组合被所述细胞内在化。所述带正电、高度分支的聚合枝状物可以是 PAMAM 枝状物,所述至少一种 T 辅助肽可以是例如 PADRE。然而,可使用任何合适的带正电、高度分支的聚合枝状物和 T 辅助肽。

[0022] 除非另有说明,本文使用的所有技术术语都具有本发明所属领域普通技术人员通常所理解的同样含义。

[0023] 如本文所用,“核酸”或“核酸分子”指具有 2 个或更多核苷酸如 RNA(核糖核酸)和 DNA(脱氧核糖核酸)和化学修饰核苷酸的链。“纯化”核酸分子在天然产生该核酸的细胞或生物中的其他核酸序列基本彼此分离(例如,30、40、50、60、70、80、90、95、96、97、98、99、100%无污染物)。所述术语包括例如纳入载体、质粒、病毒或者原核或真核生物基因组的重组核酸分子。纯化核酸的例子包括 cDNA、基因组核酸片段、聚合酶链式反应(PCR)生成的核酸、通过限制性酶处理基因组核酸形成的核酸、重组核酸、和化学合成的核酸分子。“重组”核酸分子是通过人工组合原本独立的 2 种序列区段制成,例如通过化学合成或通过遗传工程技术操作分离的核酸区段。

[0024] 涉及肽、寡肽或蛋白中的氨基酸残基时,术语“氨基酸残基”、“氨基酸”和“残基”可互换使用,且如本文所用指经酰胺键或模拟酰胺键与至少一种其他氨基酸或氨基酸模拟物共价连接的氨基酸或氨基酸模拟物。

[0025] 如本文所用,“蛋白”和“多肽”同义使用,指任何氨基酸的肽接链,无论其长度或翻译后修饰,例如糖基化或磷酸化。

[0026] 涉及核酸分子、多肽或传染性病原体时,术语“天然”指自然产生的(例如野生型(WT))核酸、多肽或传染性病原体。

[0027] 如本文所用,术语“抗原”或“免疫原”指由抗体特异性识别和结合的分子。

[0028] 涉及表位(例如 T 辅助表位)时,生物活性指能够结合适当 MHC 分子,且在肽用于刺激 CTL 反应的情况下诱导针对靶抗原或抗原模拟物的 T 辅助反应和 CTL 反应。

[0029] 术语“特异结合”和“特异性结合”指在成对物质如酶/底物、受体/激动剂、抗体/抗原等之间发生的结合,所述结合可由共价或非共价相互作用或者共价和非共价相互作用的组合来介导。当 2 种物质相互作用产生非共价结合的复合物时,所述发生的结合通常是静电、氢键或亲脂相互作用的结果。因此,在产生结合复合物的 2 种物质间的相互作用具

有抗体 / 抗原或酶 / 底物相互作用的特征时,成对物质间发生“特异结合”。具体地,所述特异结合的特征是配对的一个成员结合一种特定物质且不结合该结合成员对应物所属化合物家族内的其他物质。

[0030] 如本文所用,术语“Pan-DR 表位”、“Pan-HLA-DR 结合表位”、“PADRE”和“PADRE 肽”指约 4 到约 20 个残基的肽,其能以高亲和力结合 12 个最常见 DR 等位基因 (DR1、2w2b、2w2a、3、4w4、4w14、5、7、52a、52b、52c 和 53) 中的至少约 7 个。“高亲和力”在本文中定义为 IC_{50} % 小于 200nm 的结合。例如,高亲和力结合包括 IC_{50} % 小于 3100nM 的结合。对于结合 MHC II 型,结合亲和力阈值通常为 1,000nm,结合亲和力小于 100nm 一般被视作高亲和力。美国专利号 5,736,142 详述了 PADRE 肽的构建和应用,其通过引用纳入本文。

[0031] 本文使用的“T 辅助肽”指由 T 辅助细胞的 T 细胞受体识别的肽。例如,本文所述的 PADRE 肽是 T 辅助肽。

[0032] 如本文所用,术语“枝状物”指带电 (例如,带正电、带负电)、大致呈球形的高度分支聚合大分子。带正电、高度分支的聚合枝状物的一个示例是 PAMAM 枝状物。术语“PAMAM 枝状物”和“聚酰胺-胺枝状物”指叔胺位于分支点且通过酰胺官能团形成结构层间连接的枝状物类型。

[0033] 术语“PAMAM 枝状物”和“聚酰胺-胺枝状物”指叔胺位于分支点且通过酰胺官能团形成结构层间连接的枝状物类型。PAMAM 枝状物的表面显示许多正电荷。

[0034] 术语“衍生枝状物”指其表面偶联一个或多个官能团的枝状物。

[0035] “PADRE 衍生枝状物”或“PADRE- 枝状物”是纳米构建物,其中一个或多个 PADRE 肽共价结合于带电 (例如带正电)、高度分支的聚合枝状物 (例如 PAMAM 枝状物) 表面的官能团。

[0036] 术语“偶联”指一个分子或试剂物理或化学连接或附于另一分子或试剂。偶联的示例包括共价连接和静电复合。术语“复合”、“与之复合”和“偶联”在本文中可互换使用。

[0037] 如本文所用,短语“序列同一性”指对齐 2 种序列 (例如,核酸序列、氨基酸序列) 以最大化亚基匹配即考虑缺口和插入时,所述 2 种序列中对应位置的相同亚基百分数。可用序列分析软件 (例如加利福尼亚州圣地亚哥的 Accelrys CGC 公司的序列分析软件包) 测量序列同一性。

[0038] 短语“分离”或“生物纯”指物质几乎或基本没有其天然状态下发现的正常伴随成分。

[0039] 如本文所用,术语“纳米颗粒”指大小以纳米计的微观粒子。例如,纳米颗粒是 PADRE- 枝状物偶联物或是结合多个 PADRE- 枝状物偶联物与核酸或氨基酸物质的颗粒,其总直径范围在约 2-500nm 范围内。

[0040] 术语“抗体”包括多克隆抗体、单克隆抗体 (mAb)、嵌合抗体、人源化抗体、针对能以可溶或结合形式标记的抗体的抗独特型 (抗 Id) 抗体、以及其片段、区域或衍生物,其通过任何已知技术提供,例如但不限于酶切割、肽合成或重组技术。

[0041] 如本文所用,术语“佐剂”指可调节增强体液和 / 或细胞免疫应答的任何物质。

[0042] 如本文所用,术语“展示”或“表面暴露”视作同义词,指抗原或其他分子存在于某一结构如纳米颗粒 (例如 PADRE- 枝状物) 的外表面 (例如易为免疫位点识别)。

[0043] 术语“多价”指纳米颗粒上展示超过一个拷贝或类型的抗原或分子。

[0044] 如本文所用,“疫苗”包括所有预防和治疗性疫苗。本文所述疫苗组合物适于以生物相容形式体内给予对象。本文使用的表述“适于体内给予的生物相容形式”指待给予的物质形式,该形式的治疗效果胜过任何毒性效果。所述物质可给予任何动物,例如人。在一些实施方式中,将本文所述的疫苗给予哺乳动物例如啮齿类动物或兔,用于产生针对特定抗原的单克隆抗体。

[0045] 短语“免疫应答”指诱导特异性针对一种或几种抗原的抗体和 / 或免疫细胞介导的反应。诱导免疫应答取决于许多因素,包括受攻击生物的免疫原性构成、该抗原的化学组成和构型、该抗原的给予方式和时间段。免疫应答有许多面,其中一些由免疫系统细胞表现(例如 B 淋巴细胞、T 淋巴细胞、巨噬细胞和浆细胞)。免疫系统细胞可通过与抗原或免疫系统其他细胞的相互作用、释放细胞因子和对所述细胞因子反应而参与免疫应答。免疫应答一般分成 2 种主要类别 – 体液和细胞介导。免疫应答的体液部分包括生成特异于抗原的抗体。细胞介导部分包括产生针对所述抗原的迟发型超敏和细胞毒性效应细胞。

[0046] 短语“治疗有效量”和“有效剂量”指足以产生治疗上(例如临床上)所需结果的量;所述结果的具体性质根据治疗疾病的性质而变化。例如,待治疗的疾病是癌症时,所述结果可以是消除包括癌症肿瘤在内的癌细胞。本文所述的组合物和疫苗可以每天一次或多次到每周一次或多次给予。技术人员应理解某些因素可影响有效治疗对象所需的剂量和时间,包括但不限于疾病或紊乱的严重性、先前的治疗、对象的总体健康和 / 或年龄、和存在的其他疾病。此外,用治疗有效量的本发明组合物或疫苗治疗对象可包括单一治疗或系列治疗。

[0047] 如本文所用,术语“治疗”定义为将本文所述或由本文所述方法鉴定的治疗剂施用于或给予患者,或将所述治疗剂施用于或给予患者的分离组织或细胞系,所述患者患有疾病、有疾病症状或易染病,目的是治愈、痊愈、缓解、减轻、改变、医治、改良、改善或影响疾病、疾病症状或易染病倾向。

[0048] 术语“患者”、“对象”和“个体”在本文中可互换使用,指待治疗的哺乳动物对象,优选人患者。在一些情况下,本发明的方法用于实验动物、兽医应用、开发疾病的动物模型,包括但不限于啮齿类动物(包含小鼠、大鼠和仓鼠)以及非人灵长类动物。

[0049] 下文描述合适的疫苗、组合物、药盒和方法,但与本文所述相似或等同的疫苗、组合物、药盒和方法也可用于本发明的实施或测试。本文述及的所有出版物、专利申请和专利都通过引用全文纳入本文。如有冲突,以本说明书为准,包括定义。下面讨论的具体实施方式仅是说明性,并非旨在限制。

[0050] 附图简要说明

[0051] 图 1 是 PADRE- 枝状物的一对示意图,所述枝状物可混合质粒或者连接肽或多肽抗原以靶向 APC。图 1 显示本文所述的 PADRE- 枝状物提供可纳入任意感兴趣抗原或编码任意感兴趣抗原的核酸的平台。本文所述的 PADRE- 枝状物是设计成被专职 APC 捕获的先天免疫激活剂。

[0052] 图 2 是一系列人 B 细胞的流式细胞分析点图,显示与红色荧光标记的短核酸序列复合的 PADRE- 枝状物的体外递送。此核酸是红色标记的 dsRNA 寡聚物,设计用于 RNAi 分析以促进对 siRNA 寡核苷酸递送到哺乳动物细胞的评估和优化。细胞与 PADRE- 枝状物 / 多核苷酸复合物或对照共培养 4 小时,然后去除培养基并加入新鲜培养基。所述图像显示

用 Alexa Fluor 标记的 dsRNA 寡聚物递送到纯化人 B 细胞内。第 4 列最下方图像显示寡聚物递送到约 92% 的细胞中。

[0053] 图 3 是显示体内 DNA 递送 PADRE- 枝状物的系列照片。将 PADRE- 枝状物 /GFP 质粒复合物注入皮肤 (5 μ g 总质粒) 和角膜 (1 μ g/ 角膜)。拍摄活的麻醉小鼠的立体荧光显微图像。左图显示皮肤中的 GFP 表达, 右图显示角膜中的 GFP 表达。

[0054] 图 4 显示治疗小鼠中已建立的肿瘤。C57BL 小鼠用编码 GFP (一次) 或 OVA (二次) 的质粒皮下免疫。收集 3 只小鼠的血清并进行 ELISA (左) 或 FLISA (右)。

[0055] 图 5 是显示 PADRE- 枝状物治疗已建立肿瘤的一对图。植入 B16 黑素瘤细胞 (顶部) 或 TSA (底部) 的小鼠在肿瘤移植后第 2 天或 3 天接种疫苗, 接着在一周后加强免疫。

[0056] 图 6 的流式细胞分析系列直方图显示与复合有 PADRE- 枝状物的 GFP 质粒 (5 μ g) 共培养后的 GFP 表达, 下图是人外周血单核细胞 (PBMC), 上图是人 B 细胞。左侧直方图为枝状物 /GFP 质粒复合物用作对照。

[0057] 图 7 的流式细胞分析系列点图显示通过 PDD 体外递送蛋白: 白蛋白 -FITC 到人 B 细胞。左侧图像显示 PDD/ 白蛋白 -FITC 递送到纯化的人 B 细胞内。收集人纯化 B 细胞并与 PDD/ 白蛋白 -FITC 共培养。左侧直方图显示在 PDD/ 白蛋白 -FITC 加入人 B 细胞后的早晨, 人 B 细胞内的白蛋白 -FITC 递送。顶部直方图显示单独的 B 细胞, 中部直方图显示枝状物 / 白蛋白 -FITC 复合物加入人 B 细胞, 底部直方图显示 PDD/ 白蛋白 -FITC 复合物加入人 B 细胞的结果。右侧图是加入 PDD/ 白蛋白 -FITC 复合物 1 小时后 B 细胞摄取白蛋白的荧光显微图像。

[0058] 图 8 的流式细胞分析系列点图显示淋巴结中体内靶向 DC。左图示意显示注入和取出淋巴结和分析的时间轴, 右图显示对 PDD/GFP 质粒或枝状物 /GFP 质粒注射位点相邻淋巴结细胞相对原初淋巴结所得数据分析的一对流式细胞分析点图。这些图像显示淋巴结相邻注射位点中 PADRE- 枝状物体内靶向小鼠 DC 和 B 细胞。淋巴细胞用 CD11c (DC 标记)、MHC II 型和 CD20 (B 细胞标记物) 染色。右上方直方图显示注入枝状物 /GFP 质粒在约 6% DC 中引起 GFP 表达, 而下方点图清晰显示注入 PDD/GFP 质粒在 > 70% DC 中引起 GFP 表达。

[0059] 图 9 显示带有不同 T 辅助表位的枝状物 DRHA 在淋巴结中体内靶向 DC, 表明 DRHA 促进 GFP 转染到 DC 内。此实验类似图 8 所述, 差异在于 Balb/c 小鼠与偶联 Iad 限制性 HA 肽的枝状物联用。在注入 DRHA/GFP 质粒或枝状物 /GFP 质粒后第 5 天取出毗邻 DRHA/GFP 质粒或枝状物 /GFP 质粒注射位点的淋巴结和原初淋巴结。所述图表显示针对 DC 用 CD11c (DC 标记) 染色后获自淋巴结细胞的流式细胞分析数据。上图显示如所述处理的小鼠引流淋巴结中发现的 GFP 阳性的 DC 数量。下图显示 DC 内 GFP 的平均荧光强度。这些结果清楚表明 DRHA 不仅增加体内转染的 DC 数量, 还提高进入所述细胞的质粒分子数。

[0060] 图 10 是用与红色 (Alexa Fluor) 标记 dsRNA 寡聚物复合的 PADRE- 枝状物转染的人 B 细胞的显微图。

[0061] 图 11 是用与红色 (Alexa Fluor) 标记 dsRNA 寡聚物复合的枝状物转染的狒狒 PBMC (左图) 和用与红色 (Alexa Fluor) 标记 dsRNA 寡聚物复合的 PADRE- 枝状物转染的细胞 (右图) 的一对显微图。在加入 PDD/dsRNA-Alexa-Fluor 或对照复合物到狒狒 PBMC 2 小时后拍摄荧光显微图像。所述图像显示通过 PDD 靶向递送多核苷酸到猴 PBMC 的高效性。

[0062] 图 12 是用与 GFP 编码质粒复合的枝状物转染的狒狒 PBMC (左图) 和用与 GFP 编

码质粒复合的 PADRE- 枝状物转染的细胞（右图）的一对显微图。用与 GFP 质粒复合的枝状物转染狍狍 PBMC（左图）和用与 GFP 质粒复合的 PADRE- 枝状物转染细胞（右图）。在加入 PDD/GFP 质粒或对照复合物到狍狍 PBMC 后 1 天拍摄荧光显微图像。所述图像显示通过 PDD 靶向递送质粒和质粒所编码基因表达的高效性。

[0063] 图 13 的结果显示用与质粒（DRP-ova 质粒）复合的 PADRE- 枝状物单次 DNA 免疫优于质粒（EP-ova 质粒）的体内电穿孔。

[0064] 图 14 是用免疫小鼠血清的 in-cell Western 分析中多孔板的一对照片，显示用 PDD/ 质粒 -PCARD 抗原 2 次免疫后小鼠中诱导的高效价抗体反应。多孔板含有用抗原编码质粒转染的 cos-7 细胞（左图）和用对照质粒转染的 cos-7（右图）。

[0065] 图 15 是用免疫小鼠血清的 in-cell Western 分析中多孔板的图和系列照片，显示用 PDD/ 质粒 2 次免疫后小鼠中诱导的高效价抗体反应。还显示了用与编码 GFP 或 ova 的质粒复合的 PADRE- 枝状物免疫一次或者用与编码 CCR5、vgPCR、CathL 或 p2 的质粒复合的 PADRE- 枝状物免疫二次后的 in-cell Western FLI SA 结果。

[0066] 图 16 是用免疫小鼠血清的 in-cell Western 分析中多孔板的一对照片，显示用 PDD/ 质粒 -VgPCR 免疫一次的小鼠中诱导的抗体反应在用 PDD/ 质粒 -VgPCR 第二次免疫后进一步增强。这些结果显示用 PDD/ 质粒 -VgPCR 单次免疫产生的抗体反应在加强免疫时提高。

[0067] 图 17 显示 G5 枝状物、偶联物和肽的紫外可见光谱。

[0068] 图 18 显示在预防性设定中通过本文所述疫苗（PADRE- 枝状物 /OVA 质粒）消除 B16/OVA 肿瘤。

[0069] 发明详述

[0070] 本文描述了基于纳米颗粒的疫苗、组合物、药盒和方法，用于有效体内递送一种或多种免疫用抗原和生成抗体（例如单克隆抗体），以及用于有效递送肽、蛋白、siRNA、RNA 或 DNA 到 PAPC 或 MHC II 型阳性细胞（例如肿瘤细胞）。在典型疫苗或组合物中，带电（例如带正电）、高度分支的聚合枝状物偶联 MHC 靶向和免疫原性肽如 T 辅助肽（例如，表位如 PADRE 肽或流感 HA 等）且与至少一个分子偶联或结合以诱导对象中对特定抗原的免疫应答。所述分子可以是细菌、真菌、原生动物或病毒来源的蛋白或肽，或衍生自这些抗原的片段、碳水化合物、或碳水化合物模拟肽。所述分子也可包括用于治疗自身免疫病的自体抗原。另外，所述抗原分子也可含有一种或多种核酸，包括哺乳动物质粒中编码至少一种抗原的核酸。例如，抗原可以是引起对象（例如哺乳动物）中一种或多种免疫原性蛋白表达和诱导针对所表达蛋白的强烈和特异免疫应答的一种或多种核酸。在另一个示例中，抗原也可以是经加工并呈递的免疫原性肽或多肽。带电（例如带正电）、高度分支的聚合枝状物可偶联二种或更多不同抗原，且类似地可偶联各编码不同抗原的二种或更多核酸。本文所述的疫苗或其他组合物可包括与一种抗原偶联的多个带电（例如带正电）、高度分支的聚合枝状物（例如，与 5 拷贝特定抗原偶联的 5 个枝状物），或与多个不同抗原偶联的多个带电（例如带正电）、高度分支的聚合枝状物（例如，与 5 种不同抗原偶联的 5 个枝状物）。所述枝状物基于该枝状物（正电）与抗原（负电）的相反电荷而形成与抗原（核酸或蛋白）的复合物（偶联物），或所述偶联可以是共价化学连接。

[0071] 在一种实施方式中，本文所述的基于纳米颗粒体内递送抗原的方法包括注射疫

苗,所述疫苗由与带电(例如带正电)的高度分支聚合枝状物(例如 PADRE 衍生枝状物(PDD))结合的抗原编码 DNA 质粒、或与该枝状物偶联的抗原肽或多肽组成,所述枝状物还偶联 MHC 靶向和免疫原性肽如 T 辅助肽(例如,表位如 PADRE 肽或流感 HA 等)。带负电的质粒自然结合带正电的 PADRE- 枝状物,而肽或多肽抗原若非带负电则可化学连接 PADRE- 枝状物。在其他实施方式中,枝状物带负电以结合带正电的蛋白和肽。表面暴露的抗原或编码抗原的核酸可通过本领域已知的任何合适方法与所述枝状物偶联。偶联方法包括离子或非离子性质的化学复合、静电结合或共价结合。如本文所述偶联 T 辅助表位的枝状物可以是多价的;它可在其表面呈递超过一个拷贝或种类的抗原或核酸。呈递多价或凝聚抗原(或编码抗原的核酸)可改善对象的免疫应答。一个或多个拷贝或种类的抗原或核酸可通过 2 个或更多单独接头或间隔件或者通过共同接头或间隔件与枝状物结合。本文所述组合物、药盒和疫苗具有预防和治疗性应用,即可用作预防剂防止对象中疾病或病症发生,以及治疗患病或有病症的对象。本文所述疫苗可用于产生免疫应答抵御任何传染性病原体或癌症。

[0072] 本文所述治疗剂可用于靶向单核细胞,特别是 B 细胞,且可用于治疗并发的 B 细胞慢性淋巴细胞白血病和多发性骨髓瘤。本文所述的纳米颗粒(例如 PADRE 衍生枝状物)与治疗剂(例如药物)的组合可以多种形式使用,例如纳米颗粒与治疗剂的混合物,静电结合以形成复合物,化学偶联所述治疗剂与纳米颗粒等。治疗剂的示例包括但不限于毒素、iRNA、siRNA、微小 RNA、质粒(例如编码肿瘤抑制基因)、自杀基因(例如 TK)或者阻断或改变肿瘤增殖和/或存活的任何基因、Taxol®(紫杉醇)(百时美施贵宝公司(Bristol-Myers Squibb))、抗体、美法仑、强的松、萨力多胺(MPT)、Velcade®(硼替佐米)(千年制药公司(Millennium Pharmaceuticals))、来那度胺和地塞米松或这些试剂的任意组合。

[0073] 类似地,本文所述组合物和方法可用于治疗自身免疫失调,其中所述治疗剂到达(递送到)免疫细胞,所述免疫细胞包括单核细胞、DC、T 细胞或 B 细胞。本文所述组合物可与佐剂例如(但不限于)聚 I:C 一起使用,其带负电且如本文所述与纳米颗粒平台形成复合物。

[0074] 下述优选实施方式描述了这些组合物、疫苗、药盒和方法的适应性变化。然而,通过这些实施方式的描述,可基于下面描述形成和/或实施本发明的其他方面。

[0075] 生物学方法

[0076] 本文描述了涉及常规分子生物学技术的方法。这类技术在本领域公知且在方法学专著中有详述,如 Molecular Cloning :A Laboratory Manual(《分子克隆:实验室手册》)第 3 版,第 1-3 卷,Sambrook 等编,冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press),纽约州冷泉港,2001;Current Protocols in Molecular Biology(《新编分子生物学操作》),Ausubel 等编,纽约格林出版社和韦利科学出版社(Greene Publishing and Wiley-Interscience),1992(定期更新)。免疫学技术在本领域公知且在方法学专著中有详述,如 Immunology(《免疫学》)第 93 卷,Frederick W.Alt 编,学术出版公司(Academic Press, Inc.),马萨诸塞州伯灵顿,2007;Making and Using Antibodies :A Practical Handbook(《抗体制作与使用:实用手册》),Gary C.Howard 和 Matthew R.Kaser 编,CRC 出版社(CRC Press),佛罗里达州波卡拉顿,2006;Medical Immunology(《医学免疫学》)第 6 版,Gabriel Virella 编,健康信息出版公司(Informa Healthcare Press),

英国伦敦,2007;Harlow 和 Lane 的 ANTIBODIES :A Laboratory Manual(《抗体:实验室手册》),冷泉港实验室出版社,纽约州冷泉港,1988。基因转移和基因治疗的常规方法也可调整用于本发明。参见例如 Gene Therapy :Principles and Applications(《基因治疗:原理和应用》),T.Blackenstein 编,施普林格出版公司(Springer Verlag),1999;Gene Therapy Protocols(Methods in Molecular Medicine)(《基因治疗方案(分子医学方法)》)P.D.Robbins 编,美国休曼出版社(Humana Press),1997。生产疫苗和给予疫苗的方法也在本领域公知且详述于例如 Vaccine Protocols(Methods in Molecular Medicine)(《疫苗方案(分子医学方法)》),Andrew Robinson、Martin P.Cranage 和 Michael J.Hudson,第2版,美国休曼出版社,新泽西州托托华,2003;Vaccine Adjuvants and Delivery Systems(《疫苗佐剂和递送系统》),Manmohan Singh,第1版,约翰韦利公司,新泽西州霍伯肯,2007;Arvin A.M. 和 Greenberg H.B.,Virology 344:240-249,2006;和 R.Morenweiser, Gene Therapy 增刊 1:S103-S110,2005。构建和使用疫苗以及 PAMAM 枝状物也描述于例如 Arashkia 等,Virus Genes 40(1):44-52,2010;Velders 等,J Immunol. 166:5366-5373,2001;和 S.Chauhan, N.K.Jain, P.V.Diwan. (2009)Pre-clinical and behavioural toxicity profile of PAMAM dendrimers in mice(“PAMAM 枝状物在小鼠中的临床前和行为毒性分布”),Proceedings of the Royal Society A:Mathematical, Physical and Engineering Sciences(《皇家学会论文集 A:数学、物理和工程科学》)(在线出版日期:2009 年 12 月 3 日)。

[0077] 偶联核酸、肽或多肽的枝状物的合成

[0078] 枝状物作为支架集中 DNA,为和带负电的 DNA 或 RNA 发生强静电作用优选完全带正电的枝状物。例如,所得枝状物 /T 辅助表位 /DNA 复合物具有的净电荷取决于可调整的 N/P 比例(胺与磷酸根或电荷比)。本文所述枝状物偶联 T 辅助肽(例如,表位如 PADRE 肽或流感 HA)和抗原、编码抗原的核酸、或 siRNA,其中所述至少一种 T 辅助肽和所述抗原、核酸、或 siRNA 偶联于所述枝状物的外表面,从而所述至少一种 T 辅助肽特异性结合 PAPC。在一种实施方式中,枝状物偶联至少一个 PADRE 肽(例如 2、3、4、5 个等)和肽或多肽抗原。在此实施方式中,枝状物通常偶联或结合(例如通过静电结合)多个所述肽或多肽抗原。当抗原是小抗原(特别是小肽或碳水化合物)时,偶联或结合数个抗原(例如多个相同抗原)可能特别有用,因为小抗原通常由于半抗原相关大小问题而不能引发有效免疫应答。因此在本文所述枝状物 /T 辅助肽 / 核酸偶联物中包括多拷贝的抗原可提高所述抗原的免疫原性。在另一实施方式中,枝状物偶联 PADRE 肽且结合编码抗原的核酸。在另一实施方式中,枝状物偶联 PADRE 肽且结合针对感兴趣基因的 siRNA。在这些实施方式中,可用任何合适方法制备所述枝状物并偶联 T 辅助肽(例如,表位如 PADRE 肽或流感 HA)及结合核酸(例如 DNA、siRNA)或肽或多肽。生成和使用枝状物的方法在本领域熟知且已有描述,例如 Zhang J-T 等,Macromol.Biosci. 2004,4,575-578 及美国专利号 4,216,171 和 5,795,582,其都通过引用纳入本文。也参见:D.A.Tomalia, A.M.Naylor 和 W.A.Goddard III, Starburst Dendrimers:Molecular-Level Control of Size,Shape,Surface Chemistry,Topology, and Flexibility from Atoms to Macroscopic Matter(“星形枝状物:分子水平控制大小、形状、表面化学、拓扑学和从原子到宏观物质的灵活性”),Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 29(1990),138-175。在本文所述实验中,使用 PAMAM 枝状物。然而,可使用任何合

适的带正电、高度分支的聚合枝状物。其他带正电、高度分支的聚合枝状物的示例包括聚(丙烯亚胺)(PPI)枝状物,或更普遍的是其表面具有伯胺基的任何其他枝状物。

[0079] 本文所述 PADRE 枝状物(PADRE 衍生枝状物)可通过任何合适方法制备。制作和使用 PADRE 的方法在本领域已知。参见例如美国专利号 5,736,142。为生成美国专利号 5,736,142 所述 PADRE 肽,使用最初由 Jardetzky 等(EMBO J. 9:1797-1083,1990)描述的策略,将含有 MHC 结合关键侧链的锚定残基插入 13 个残基的聚丙氨酸肽。例如, PADRE 肽可根据美国专利号 5,736,142 所述方法制得,或可购得(例如来自 Anaspec 公司,加利福尼亚州佛利蒙市)。由于尺寸相对较小,所述 PADRE 肽可根据常规技术在溶液或固体支持物上合成。多种自动化合成仪有市售且能根据已知操作使用。或者,可使用重组 DNA 技术,其中将编码 T 辅助表位的核苷酸序列插入表达载体,转化或转染到合适宿主细胞中且在适于表达的条件下培养。这些过程在本领域公知,由 Sambrook 等(同上)所综述,其通过引用纳入本文。本文所述 PADRE 肽可包括 N 和 C 末端残基的修饰。技术人员应理解可修饰 N 和 C 末端以改变所述肽的物理或化学性质,例如用于影响结合、稳定、生物利用度、易于连接性等。本文所述 PADRE 肽可以多种方式修饰以提供所需特性,例如改善药理学特征,而同时保持未修饰肽的几乎所有生物学活性。

[0080] 在本文所述实验中,通过所述 PADRE 肽的 -COOH 末端与所述枝状物某一胺基间的简单酰胺偶联来制成所述 PADRE-枝状物偶联物。所述 PADRE 肽(Ac-D-Ala-Lys-Cha-Val-Ala-Ala-Trp-Thr-Leu-Lys-Ala-Ala-Ala-D-Ala-Ahx-Cys-OH)(SEQ ID NO:1, Ac = 乙酰化; D-Ala = D-丙氨酸; Cha = 环己基丙氨酸; Ahx = 氨基己酸)以乙酰化形式购自 Anaspec 公司(加利福尼亚州佛利蒙市)以保护胺基末端并防止其反应。购买的肽具有 95% 的最小纯度。所述酰胺偶联反应在 DMF 溶液中以标准条件进行(参见图 1,底部示意图)。为控制附于各枝状物表面的 PADRE 表位数量,反应中使用 2:1 的肽/枝状物攻击比,尝试每个枝状物仅结合几个肽以使大部分胺基保持游离从而在该枝状物上有大量正电荷。在典型实施方式中,本文所述的多个 PADRE-枝状物偶联物是其上附有 0、1、2、3 个等 PADRE(或其他肽)的枝状物分布。预期相对群体遵循泊松分布。PADRE(aKXVAAWTLKAAa, SEQ ID NO:2)以高或中等亲和力($IC_{50} < 1,000nM$)结合 16 个最常见 HLA-DR 分子中的 15 个((Kawashima 等, Human Immunology 59:1-14(1998); Alexander 等, Immunity 1:751-761(1994))。然而,在大多数人中还结合 MHC II 型并激活 CD4T 辅助细胞的其他肽也可用于标记所述枝状物。

[0081] 肽的示例包括但不限于破伤风类毒素(TT)肽 830-843;Panina-Bordignon 等(Eur. J. Immunology 19:2237-2242(1989))描述的“通用”表位;和与大部分人 HLA 及许多小鼠的 MHC II 型反应的以下肽:aKFVAAWTLKAAa(SEQ ID NO:3)、aKYVAAWTLKAAa(SEQ ID NO:4)、aKFVAAWTLKAAa(SEQ ID NO:5)、aKXVAAWTLKAAa(SEQ ID NO:6)、aKYVAAWTLKAAa(SEQ ID NO:7)、aKFVAAWTLKAAa(SEQ ID NO:8)、aKXVAAWTLKAAa(SEQ ID NO:9)、aKYVAAWTLKAAa(SEQ ID NO:10)、aKFVAAWTLKAAa(SEQ ID NO:11)、aKXVAAWTLKAAa(SEQ ID NO:12)、aKYVAAWTLKAAa(SEQ ID NO:13)、AKXVAAWTLKAAA(SEQ ID NO:2)、AKFVAAWTLKAAA(SEQ ID NO:14)、AKYVAAWTLKAAA(SEQ ID NO:15)、AKFVAAWTLKAAA(SEQ ID NO:16)、AKXVAAWTLKAAA(SEQ ID NO:17)、AKYVAAWTLKAAA(SEQ ID NO:18)、AKFVAAWTLKAAA(SEQ ID NO:19)、AKXVAAWTLKAAA(SEQ ID NO:20)、AKYVAAWTLKAAA(SEQ ID NO:21)、AKFVAAWTLKAAA(SEQ ID NO:22)、AKXVAAWTLKAAA(SEQ ID NO:23)、和

AKYVAANTLKAAA (SEQ ID NO :24) (a = D- 丙氨酸, X = 环己基丙氨酸)。可用表位的另一示例是结合小鼠 Ba1b/c MHC II 型 IaD 的 HA 肽序列 SFERFEIFPKE (SEQ ID NO :25) (来自前病毒 PR8 病毒 HA)。

[0082] 所述产物通过相对纯水透析来纯化至少 24 小时且随后在真空中干燥。通过 ^1H NMR、紫外-可见光谱和 MALDI-TOF 质谱鉴定所收集产物, 清油。所述 PADRE- 枝状物偶联物的 NMR 谱显示对应于该枝状物质子的大峰和对应所述肽质子的一小组峰。所述 PADRE- 枝状物偶联物的 MALDI-TOF 质谱在 m/z 比枝状物自身观察所得峰高约 3,000 个单位处显示峰。超出的质量对应于约 2 个肽表位。所述偶联物的紫外-可见光谱显示在色氨酸吸收的波长范围内的明显吸收。

[0083] 质粒 DNA 与所述 PADRE- 枝状物偶联物的复合通过将这 2 种成分在用 PBS 缓冲至生理 pH 的水溶液中混合来完成。典型 N/P (胺对磷酸根) 比是 10 : 1。采用凝胶电泳显示 DNA 的完整复合。在生理 pH 值下, 氨基 ($-\text{NH}_2$) 质子化, 赋予所述枝状物高正电荷且使其特别适于递送带负电的 DNA 或 RNA 到细胞中。在水溶液中, 所述带正电枝状物和所述带负电核酸产生可相对容易渗透并跨生物膜的凝聚物或纳米颗粒。

[0084] 偶联 T 辅助表位而不是 PADRE 的枝状物一般通过与上述 PADRE 衍生枝状物类似的方法制备。例如, 所述肽的酸性末端与所述枝状物表面胺基之一的共价结合可通过多种熟知的合成方法进行, 例如使用碳二亚胺作为活化剂的酰胺化。在另一例子中, 用 2 种合成途径使这些肽结合端氨基枝状物。通过乙酰化保护所述肽表位的氨基末端。第 1 种途径使用末端半胱氨酸残基的羧酸以经标准酰胺化学实现结合。第 2 种途径利用半胱氨酸的巯基 (如存在于所述肽上, 否则可加入) 以使其与此前经马来酰亚胺处理加入所述枝状物表面的烯基基团反应。2 种途径都可用表位使枝状物功能化。每枝状物高至多个肽表位 (例如 2、3、4、5、6 等) 可提高 DNA 递送剂的靶向特性, 改善其用于免疫目的性质。然而, 保留相当数量未反应胺基很重要, 从而所述枝状物通过在生理 pH 值下的质子化获得高正电荷。本文所述枝状物可偶联任意 T 辅助表位。T 辅助表位的另一示例是流感 HA。

[0085] 通常, 本文所述组合物、药盒和方法使用 5 代 (G5) 枝状物。然而, 可使用其他代枝状物 (见表 1)。

[0086] 表 1 PAMAM 枝状物

[0087]

代	分子量	直径 (nm)	表面基团
0	517	1.5	4
1	1,430	2.2	8
2	3,256	2.9	16
3	6,909	3.6	32
4	14,215	4.5	64
5	28,826	5.4	128

6	58, 0548	6. 7	256
---	----------	------	-----

[0088] 带电聚合载体疫苗和组合物

[0089] 本文所述疫苗包括至少一种带电（例如带正电）聚合载体如枝状物，其偶联或结合 MHC 靶向和免疫原性肽如 T 辅助肽（例如，表位如 PADRE 肽或流感 HA）和至少一种肽或多肽抗原或者至少一种编码所述至少一种抗原的核酸，使得所述至少一种 MHC 靶向和免疫原性肽和所述至少一种核酸或者至少一种肽或多肽抗原偶联于所述带电（例如带正电）聚合载体（例如枝状物）的外表面，且所述 MHC 靶向和免疫原性肽（例如 T 辅助肽）特异性结合 PAPC。所述至少一种 T 辅助肽、至少一种枝状物和至少一种肽或多肽抗原或至少一种编码所述至少一种抗原的核酸的组合能诱导针对所述至少一种抗原的免疫应答，包括诱导 MHC II 型介导的 T 辅助细胞活化。疫苗还可包括油包水乳液。将所述疫苗给予哺乳动物可产生针对所述抗原的单克隆抗体。本文所述位于枝状物之上或之内的一个或多个抗原诱导免疫应答抵御由不同致病条件引起的疾病发生。在一种实施方式中，所述抗原可源自但不限于致病细菌，真菌或病毒生物，链球菌（Streptococcus）、念珠菌（Candida）、布氏杆菌（Brucella）、沙门氏菌（Salmonella）、志贺氏菌（Shigella）、假单胞菌（Pseudomonas）、包特菌（Bordetella）、梭菌（Clostridium）、诺沃克病毒、炭疽杆菌（Bacillus anthracis）、结核分支杆菌（Mycobacterium tuberculosis）、人免疫缺陷病毒（HIV）、衣原体（Chlamydia）、人乳头瘤病毒、流感病毒、副粘病毒种、疱疹病毒、巨细胞病毒、水痘－带状疱疹病毒、爱波斯坦－巴尔病毒、肝炎病毒、疟原虫（Plasmodium）、毛滴虫（Trichomonas）、性传播疾病致病剂、病毒性脑炎致病剂、原虫病致病剂、真菌致病剂、细菌致病剂、癌细胞、或其混合物。

[0090] 所述至少一种枝状物还可偶联聚肌胞苷酸（Poly(I:C)），所述疫苗或组合物还能包括药学上可接受的载体。在一种实施方式中，所述至少一个 T 辅助表位是 Pan-DR 表位，例如各具有 SEQ ID NO :1 所示氨基酸序列的 2 个 Pan-DR 表位。在另一实施方式中，所述 T 辅助表位是流感 HA。然而，所述 T 辅助表位可以是激活或有助于激活 CD4+T 辅助细胞的任何表位。CD8T 细胞的扩张和刺激和 B 细胞生成抗体都需要 T 辅助表位激活 CD4+T 辅助细胞，两者对于诱导保护性免疫应答抵御传染剂或癌症都至关重要。在所述枝状物偶联抗原编码核酸的实施方式中，所述核酸一般是表达载体。所述表达载体通常包括与抗原编码基因、克隆位点、聚腺苷酸化序列、可选择标记和细菌复制起点操作性连接的真核启动子。通常，所述抗原是典型的癌抗原或来自传染性病原体的抗原。所述至少一种枝状物通常是 G5 枝状物。类似地，在所述枝状物偶联肽或多肽抗原的实施方式中，所述抗原通常是癌抗原或来自传染性病原体的抗原，所述至少一种枝状物是 G5 枝状物。在一些实施方式中，所述疫苗或组合物可纳入佐剂。

[0091] 枝状物是护送 DNA（和其他核酸，包括 DNA、RNA、siRNA、微小 RNA、RNAi 等）到细胞内的有效载体。然而，枝状物由于多种原因在作为疫苗递送平台方面历来失败。首先，枝状物缺乏佐剂活性；它们缺少先天免疫的有效刺激，且它们不产生“危险信号”。枝状物也提供的 APC 靶向弱且通常适应性免疫刺激较差。特别需要特异性靶向 PAPC、诱导“危险信号”、聚集专职性单核细胞到注射位点且安全的强佐剂疫苗递送系统，在处理免疫原性较低的弱抗原或“自体”抗原或与免疫系统已发展出耐受性的“自体”抗原有高度同源性的抗原时尤

其需要。弱抗原或免疫原性较低的抗原不产生或产生低水平特异性免疫应答、抗体反应或细胞介导的免疫应答。本文所述疫苗平台是与 DNA 或者肽或多肽抗原复合的生物可降解纳米颗粒。所述平台通过其 MHC II 型配体靶向 PAPC, 通过其高度带正电外膜结合并透过所述细胞膜, 其安全并易于规模化大批量生产, 且由于对所述分子的修饰性质可作为强佐剂。在典型实施方式中, 所述至少一种枝状物是 G5PAMAM 枝状物, 它是高度分支的聚合大分子且由于其溶解度提高而是理想的赋形剂。G5 对递送 DNA 到细胞中是特别理想的。本文所述典型疫苗包括油包水乳液, 其诱导瞬时危险信号从而聚集单核细胞到所述注射位点。这些细胞在接受 DNA 后来到局部淋巴结并呈递抗原。含有结合 MHC II 型分子侧翼的通用 T 辅助激动剂如 PADRE 可集中枝状物复合物用于 PAPC 以及辅助 T 细胞。此改变使惰性和弱枝状物成为所表达感兴趣抗原的强免疫增强剂。含有具佐剂活性以及贮存效果的疏水载体即油乳液 (例如 Montanide ISA 720) 引起抗原缓慢释放。含有 poly(I:C) 进一步增强诱导针对感兴趣抗原的免疫应答。由于 poly(I:C) 具有负净电荷, 其容易结合枝状物, 且是提高免疫应答强度的佐剂。这些特征作为强“危险信号”并聚集更多单核细胞 (包括 APC) 到所述注射位点。总体上, 这些特征刺激先天免疫并使诱导有效免疫应答所需的促炎细胞因子环境表达增加。

[0092] 在疫苗的一种实施方式中, 所述 T 辅助肽是 PADRE 表位且所述枝状物是 PADRE 衍生的。PADRE 是结合大部分 MHC II 型的人工设计肽, PADRE 肽偶联枝状物 (例如 PADRE 衍生枝状物) 使所得复合物或偶联物成为表达高水平 MHC II 型的 PAPC 的配体。因而此复合物成为对表达 MHCII 型或 PAPC 的细胞有高亲和力的通用靶向疫苗递送系统。PADRE 也激活 T 辅助细胞且产生促炎细胞因子环境, 聚集其他免疫细胞到注射位点。结合枝状物后, PADRE 还可通过诱导“危险信号”提高抗原吸收。PADRE 衍生枝状物提供优于当前已知疫苗的多个优点。首先, G5 枝状物是高度带电、可生物降解分子, 能结合并进入细胞膜而非常有效地产生强蛋白表达。其次, PADRE 是结合许多小鼠和人 MHC II 型分子的通用 T 辅助表位。它是合成的非天然 T 辅助表位 [AKchxAVAAWTLKAAA (SEQ ID NO :26) (chxA = 环己基丙氨酸)]。当融合所述枝状物表面时, PADRE 结合并激活具有 MHC II 型的原代细胞, 包括所有 PAPC。各枝状物可结合多个 PADRE 表位 (例如 2、3、4、5 个等)。用适当间隔件完成所述结合以保留赋予所述肽免疫原性的结合性质。可采用接头或间隔分子偶联抗原或其他分子与本文所述枝状物偶联物。间隔件可以是氨基酸的任意组合, 包括 AAA、KK、GS、GSGGGGS (SEQ ID NO : 27)、RS 或 AAY。如本文所用, 术语“接头”或“间隔件”指介于所述枝状物与所述表面暴露分子如 MHC II 型配体、CD4+T 辅助表位、多肽、或者偶联或结合所述枝状物 (例如 PADRE- 枝状物) 和表面暴露分子的治疗剂之间的化学基团。接头优选一端偶联所述表面分子且另一端偶联所述纳米颗粒 (例如 PADRE- 枝状物)。链接可以用同或异双功能试剂进行, 即 SPDP、DSS、SIAB。deJongh 等在 PCT/DK00/00531 (WO 01/22995) 公开了连接方法, 其通过引用全文纳入本文。

[0093] 第三, 在所述疫苗也包括油包水乳液的实施方式中, 所述油包水乳液诱导瞬时“危险信号”使得单核细胞聚集于所述注射位点。这些细胞在接受 DNA 后来到局部淋巴结并呈递抗原。此外, 为进一步提高诱导免疫应答, 合成的双链 RNA (dsRNA) poly(I:C) 可结合所述枝状物 (例如 PADRE- 枝状物)。Poly(I:C) 是具有负电荷的 Toll 样受体 3 (TLR-3) 激动剂并因而易结合枝状物。Poly(I:C) 是佐剂且由于其负电荷可结合所述枝状物并提高免疫应

答强度。Poly(I:C) 与枝状物的结合对单克隆抗体的生产（下述）特别有用，因为其减少注射频率和间隔。

[0094] 本文所述编码抗原的核酸可以是 RNA 形式（例如 mRNA、微小 RNA、siRNA、shRNA 或合成的化学修饰 RNA）或 DNA 形式（例如 cDNA、基因组 DNA 和合成 DNA）。所述 DNA 可以是双链或单链，如果是单链则可以是编码（有义）链或非编码（反义）链。在一种实施方式中，核酸可以是永生生化或原代肿瘤细胞系中分离或扩增的 RNA 分子。

[0095] 如上所述，在一种实施方式中，诱导免疫应答的疫苗包括至少一种枝状物，其偶联至少一种 T 辅助表位和编码抗原的核酸，其中所得复合物诱导针对所述抗原的免疫应答。与需要使用例如病毒载体或体内电穿孔的其他基因免疫方法相比，这些组合物和方法安全、简单、迅速许多。使用 DNA 诱导体液或细胞免疫应答具有多项优点。首先，使用 DNA 提供全谱原初（天然）加工表位。枝状物与 T 辅助表位和抗原编码核酸的偶联也提供通用疫苗递送靶向所有人 MHC (AKA, HLA) 中 > 95% 的 APC 且不再需要纯化难以提纯的蛋白。这类蛋白可以是多蛋白复合物的一部分，可以是膜蛋白，且可以是不正确折叠和不溶的。本文所述枝状物偶联物不需要蛋白的糖基化或翻译后修饰，它们标记蛋白结构或折叠的干扰，大幅节约成本和时间。PADRE- 枝状物靶向并递送核酸到小鼠、狒狒和人的 PBMC，使得此平台成为从小鼠到非人灵长类动物和人的快速翻译研究的理想候选。

[0096] 同样如上所述，在另一实施方式中，诱导免疫应答的疫苗包括油包水乳液和至少一种枝状物，其偶联至少一种 T 辅助肽（例如，表位如 PADRE 肽或流感 HA）和一种肽或多肽抗原，其中所述至少一种 T 辅助表位和所述肽或多肽抗原偶联于所述枝状物外表面且能诱导针对所述肽或多肽抗原的免疫应答。具有弱免疫原性的肽或多肽如本文所述偶联（复合）T 辅助表位 / 枝状物复合物时诱导强免疫应答。带负电荷的多肽和肽可与例如 PADRE- 枝状物复合，而不需要共价结合。例如，PADRE- 枝状物的油包水乳液产生进一步的佐剂活性和贮存效果。

[0097] 如上所示，本文所述组合物和疫苗具有预防和治疗性应用；它们可用于预防或防止对象中疾病或病症发生以及治疗患病或具有病症的对象。本文所述疫苗可用于引起免疫应答抵御任何传染性病原体或癌症。传染性病原体的示例包括病毒，例如但不限于流感、HIV、登革病毒、轮状病毒、HPV、HBV、HCV、CMV、HSV、HZV 和 EBV，以及病原体，包括疟疾的致病剂，恶性疟原虫 (*Plasmodium(p) falciparum*)、三日疟原虫 (*P. malariae*)、卵形疟原虫 (*P. ovale*)、间日疟原虫 (*P. vivax*) 和诺氏疟原虫 (*P. knowlesi*)；包括利什曼原虫 (*Leishmania(L)*) 的致病剂，硕大利什曼原虫 (*L. major*)、热带利什曼原虫 (*L. tropica*)、埃塞俄比亚利什曼原虫 (*L. aethiopica*)、墨西哥利什曼原虫 (*L. mexicana*)、杜氏利什曼原虫 (*L. donovani*)、婴儿利什曼原虫 (*L. infantum*) 同恰氏利什曼原虫 (*L. chagas*)；包括炭疽杆菌、百日咳杆菌 (*Bordetella pertussis*)、肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumonia*) 和脑膜炎球菌 (*meningococcus*) 在内的病原细菌。在本文所述实验中，PADRE- 枝状物消除小鼠中已建立的黑素瘤。然而，本文所述与 T 辅助肽和抗原或抗原编码核酸偶联的枝状物可用于产生针对任何癌症的特异性免疫应答。其他癌症的示例包括 HPV 引起的宫颈癌（例如 E7/E7 肿瘤相关抗原 (TAA) 或编码这些抗原的质粒可复合本文所述 T 辅助表位 / 枝状物（例如 PADRE- 枝状物））、人黑素瘤（例如 TRP-1、TRP-2、gp-100、MAGE-1、MAGE-3 和 / 或 p53 可用作 TAA 且复合本文所述 T 辅助表位 / 枝状物（例如 PADRE- 枝状物））、和前列腺癌（例如

TSA 可用作 TAA 且复合本文所述 T 辅助表位 / 枝状物 (例如 PADRE- 枝状物))。对于肺肿瘤、乳腺肿瘤和白血病也类似,可使用任意合适 TAA,许多已有描述。许多这种 TAA 在不同癌症中共有 (例如 CEA、MUC-1、Her2、CD20)。TAA 或编码这些抗原的质粒的混合物可用于制成本文所述通用、多用途癌症疫苗。在本文所述疫苗的一个示例中,CD4 表位 / 枝状物 (例如 PADRE- 枝状物)可复合超过一种抗原或超过一种编码所述抗原的质粒。或者,各与一种抗原或编码一种抗原的一种质粒复合的多个疫苗可用作不同病原体或不同癌症的疫苗。

[0098] 将抗原递送给哺乳动物并诱导免疫应答的方法

[0099] 本文描述了将抗原递送给哺乳动物 (例如人)并诱导生产针对该抗原的单克隆抗体以引起所述哺乳动物中免疫应答的方法。一种典型的方法包括以下步骤:将含有至少一种带电 (例如带正电)聚合载体 (例如枝状物)的组合物给予哺乳动物,所述载体偶联有 MHC 靶向和免疫原性肽 (例如,T 辅助肽如 PADRE 肽或流感 HA 等)和至少一种肽或多肽抗原或者至少一种编码所述至少一种抗原的核酸,其中所述至少一种 T 辅助肽和所述至少一种核酸或者至少一种肽或多肽抗原偶联于所述带电 (例如带正电)聚合载体 (例如枝状物)的外表面,使得所述至少一种 MHC 靶向和免疫原性肽 (例如 T 辅助肽)特异性结合 PAPC 且所述至少一种 MHC 靶向和免疫原性肽 (例如 T 辅助肽)、至少一种带电 (例如带正电)聚合载体 (例如枝状物)和所述至少一种核酸或者至少一种肽或多肽抗原的组合能诱导针对该抗原的免疫应答。在此方法中,所述组合物给予的量有效诱导 MHC II 型介导的 T 辅助细胞激活,在所述哺乳动物中产生单克隆抗体和针对该抗原的免疫应答。组合物还可包括油包水乳液。所述至少一种枝状物通常还偶联 poly (I:C),所述组合物通常还包括药学上可接受载体。所述至少一种 T 辅助表位可以是 Pan-DR 表位,例如各具有 SEQ ID NO :1 氨基酸序列的 2 个 Pan-DR 表位。或者,所述至少一种 T 辅助表位可以是除了 Pan-DR 以外的表位 (PADRE 表位),例如流感 HA。通常,所述至少一种枝状物是 G5 枝状物。

[0100] 在一种实施方式中,所述哺乳动物患有癌症,所述抗原是癌抗原,所述组合物是所述癌症的疫苗。在另一实施方式中,所述哺乳动物患有传染病,所述抗原是来自传染性病原体的抗原,所述组合物是所述传染性病原体的疫苗。在这类实施方式中,给予所述组合物通常在哺乳动物中不产生局部不良反应。这些方法通常通过在所述哺乳动物外制成所述组合物 (例如疫苗)并将所述组合物给予所述哺乳动物来进行,所给予的量足以在所述哺乳动物中刺激免疫应答抵御所述抗原,例如癌抗原或来自传染性病原体的抗原。本文所述组合物、疫苗和方法可用于任何合适对象,例如动物如哺乳动物 (例如人类、啮齿类、狗、猫、山羊、绵羊、牛、马等)。患有癌症或传染病或者具有发病风险的人类病人是典型对象。

[0101] 递送 siRNA 到 PAPC 的组合物和方法

[0102] 本文也描述递送 siRNA 到 PAPC 的组合物和方法。在一种典型实施方式中,递送 siRNA 到 PAPC 的组合物包括至少一种带电 (例如带正电)聚合载体 (例如枝状物),其偶联有至少一种 MHC 靶向和免疫原性肽 (例如 T 辅助肽)和 siRNA。所述至少一种 MHC 靶向和免疫原性肽 (例如 T 辅助表位)和所述 siRNA 偶联于所述至少一种带电 (例如带正电)聚合载体 (例如枝状物)的外表面,从而所述至少一种 T 辅助表位特异性结合 PAPC。所述 siRNA 可针对 (特异于)任何感兴趣的基因 (例如 Foxp3、CD-28、CTLA-4)。所述组合物还可包括油包水乳液。

[0103] 递送 siRNA 到 PAPC 的典型方法包括以下步骤:提供含有至少一种枝状物的组合

物,所述枝状物偶联有至少一种 T 辅助肽和至少一种 siRNA,其中所述至少一种 T 辅助肽和所述至少一种 siRNA 偶联于所述枝状物的外表面,从而所述至少一种 T 辅助肽特异性结合 PAPC;将所述组合物在一定条件下给予哺乳动物,该条件下偶联有至少一种 T 辅助肽和至少一种 siRNA 的所述至少一种枝状物结合 PAPC 且所述 siRNA 进入所述 PAPC 并在所述 PAPC 内表达。所述组合物还可包括油包水乳液。在此方法中,所述 siRNA 可针对(特异于)任何感兴趣的基因(例如 Foxp3)以使感兴趣基因的表达沉默。在一个示例中,用针对 Foxp3 的 siRNA 使 Foxp3 的表达沉默, Foxp3 是诱导调节 T 细胞的分子,该细胞抑制免疫应答并作为免疫应答的负调节。此实施方式对癌症治疗特别有用,其中调节 T 细胞抑制免疫治疗和干预。调节 T 细胞表达 MHC II 型且可通过 PADRE-枝状物或其他 CD4 表位-枝状物而靶向。另一个示例是 CD4T 细胞上传递抑制信号给 T 细胞的 CTLA-4。在 CTLA-4 特异性 siRNA 复合 PADRE-枝状物的实施方式中,所述复合物靶向含 CD4T 细胞的 MHC II 型表达细胞并使 CTLA-4 表达沉默。CTLA-4 表达越低则针对病原体或癌症的免疫应答越高,且当递送到 PAPC 中时其防止或减少免疫应答抑制分子的表达(或当宿主进行免疫接种时,提高针对病原体、癌症的免疫应答)或者提高免疫应答,包括 B7.1、LFA-3、ICAM-1(诱导 T 细胞活化所需的信号 2),用于治疗自身免疫病如银屑病。

[0104] 在典型实施方式中,本文所述组合物包括的 siRNA 特异于共抑制和共刺激分子及其推定的共刺激受体(例如 Foxp3、CD28、CTLA-4)。序列特异性 siRNA 结合靶核酸分子,抑制其表达。siRNA 有效处理异常细胞、异常细胞生长和肿瘤,包括由传染性致病剂导致的肿瘤。提供了递送 siRNA 的组合物和其治疗方法。

[0105] 本领域已知构建和使用核酶、siRNA 和反义分子的方法(例如, Isaka Y., Curr Opin Mol Ther 第 9 卷:132-136,2007;Sioud M. 和 Iversen P.O., Curr Drug Targets 第 6 卷:647-653,2005;Mouldy Sioud 的 Ribozymes and siRNA Protocols(Methods in Molecular Biology)(《核酶和 siRNA 方案(分子生物学方法)》)第 2 版,2004,美国休曼出版社,纽约州纽约市)。“反义”核酸可包括与编码蛋白的“有义”核酸互补的核苷酸序列,例如与双链 cDNA 分子编码链互补或与 mRNA 序列互补。所述反义核酸可与感兴趣基因的完整编码链或仅其中一部分互补。在另一实施方式中,所述反义核酸分子与编码感兴趣基因的核苷酸序列编码链的“非编码区”(例如 5' 和 3' 非翻译区)反义。反义试剂可包括例如约 8 到约 80 个核碱基(即约 8 到约 80 个核苷酸),如约 8 到约 50 个核碱基,或约 12 到约 30 个核碱基。反义化合物包括核酶、外部指导序列(EGS)寡核苷酸(寡核苷酸酶)、和其他与靶核酸杂交并调节其表达的催化性短 RNA 或催化性寡核苷酸。反义化合物可包括至少 8 个连续核碱基的延伸,其与靶基因(即感兴趣基因)序列互补。寡核苷酸不必与其可特异性杂交的靶核酸序列 100% 互补。当寡核苷酸与靶标的结合干扰所述靶分子正常功能引起功能丧失,并存在足够的互补度以防止所述寡核苷酸在特异性结合所需条件下与非靶标序列非特异性结合时,寡核苷酸是可特异性杂交的,特异性结合所需条件在体内分析或治疗性处理的情况下即生理条件,或者在体外分析的情况下即进行所述分析的条件。

[0106] RNA 干扰(RNAi)是显著有效过程,其中双链 RNA(dsRNA,本文中也称小干扰 RNA 为 siRNA,或者称双链小干扰 RNA 为 ds siRNA)在动物和植物细胞中诱导序列特异性同源 mRNA 降解(Hutvagner 和 Zamore, Curr. Opin. Genet. Dev., 12:225-232(2002);Sharp, Genes Dev., 15:485-490(2001))。在哺乳动物细胞中,可通过双股小干扰 RNA 引发 RNAi(siRNA)

(Chiu 等, *Mol. Cell.*, 10 :549-561(2002) ;Elbashir 等, *Nature*, 411 :494-498(2001)), 或是通过微小 RNA(miRNA)、功能性小发夹 RNA(shRNA)、或用 DNA 模板与 RNA 聚合酶 III 启动子在体内表达的其他 dsRNA(Zeng 等, *Mol. Cell*, 9 :1327-1333(2002) ;Paddison 等, *Genes Dev.*, 16 :948-958(2002) ;Lee 等, *Nature Biotechnol.*, 20 :500-505(2002) ;Paul 等, *Nature Biotechnol.*, 20 :505-508(2002) ;Tuschl, T., *Nature Biotechnol.*, 20 :440-448(2002) ;Yu 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99 (9) :6047-6052(2002) ;McManus 等, *RNA*, 8 :842-850(2002) ;Sui 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99 (6) :5515-5520(2002))。

[0107] 所述 dsRNA 分子通常每条链包括 16-30 个核苷酸,例如 16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29 或 30 个,其中一条链与所述 mRNA 中的靶区域基本相同,例如至少 80% (或更多,例如 85%、90%、95%或 100%) 相同,例如有 3、2、1 或 0 个错配核苷酸,而另一条链与第一条链相同或基本相同。每条链也可具有一个或多个突出端(即非互补)核苷酸,例如 1、2、3、4 个或更多突出端核苷酸,如 dTdTdT。

[0108] 所述 dsRNA 分子可化学合成,或者可从 DNA 模板体外转录或从例如 shRNA 体内转录。可用本领域任何已知方法设计所述 dsRNA 分子;本领域已知多种算法,参见例如 Tuschl 等, *Genes Dev* 13(24) :3191-7(1999),且许多可在网上获得。

[0109] 阴性对照 siRNA 通常与所选 siRNA 具有相同的核苷酸组成,但与所述合适基因组没有显著的序列互补性。这种阴性对照可通过随机置乱所选 siRNA 核苷酸序列来设计;可进行同源性搜索以确保阴性对照不与所述合适基因组中任何其他基因同源。此外,可通过将一个或多个碱基错配引入序列来设计阴性对照 siRNA。在一些实施方式中,siRNA 可用修饰核苷酸(例如 2F-RNA)生成以使该 siRNA 抗核酸酶。

[0110] 产生抗体的方法和药盒

[0111] 本文描述了产生抗体的方法和药盒,所述抗体可给予对象用于治疗或预防性目的。目前递送 DNA 到细胞的方法效率低、复杂且诱导的免疫应答弱。然而,本文所述组合物和方法引起的强抗体反应显示快速和高表达感兴趣抗原。在一个产生抗体的方法中,本文所述枝状物/T 辅助肽偶联物(例如 PADRE- 枝状物)可与肽或多肽或核酸(例如 DNA)复合(偶联)。poly(I:C) 与枝状物的结合对产生单克隆抗体特别有用,因为它减少注射间的频率和间隔。在下述实验中,单次注入复合 DNA 的 PADRE- 枝状物后,显示 GFP 在角膜和皮肤中的递送和表达以及强体液反应。目前 50% 的药物靶向最难以纯化的膜蛋白。本文所述组合物、药盒和方法提供靶向难以纯化蛋白的工具而不需纯化它们。

[0112] 多克隆抗体是在免疫动物血清内包含的异质抗体分子群。因此,可用本文所述组合物、药盒和方法生成的抗体包括多克隆抗体,以及单克隆抗体、单链抗体、Fab 片段、F(ab')₂ 片段、和用 Fab 表达库生成的分子。单克隆抗体是特定抗原的同质抗体群,可用本文所述枝状物/T 辅助表位偶联物和标准杂交瘤技术制备(参见例如 Kohler 等, *Nature* 256 :495,1975 ;Kohler 等, *Eur. J. Immunol.* 6 :511,1976 ;Kohler 等, *Eur. J. Immunol.* 6 :292,1976 ;Hammerling 等, *Monoclonal Antibodies and T Cell Hybridomas*(《多克隆抗体和 T 细胞杂交瘤》,纽约爱思唯尔公司(Elsevier),1981 ;Ausubel 等,同上)。具体地,可通过生成抗体分子的任何技术获得单克隆抗体,用例如 Kohler 等, *Nature* 256 :495,1975 和美国专利号 4,376,110 所述的培养连续细胞系;人 B 细胞杂交瘤技术(Kosbor 等, *Immunology Today* 4 :72,1983 ;Cole 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80 :2026,1983) 和 EBV- 杂交瘤技术

(Cole 等, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy (《单克隆抗体和癌症治疗》), ARL 公司 (Alan R. Liss), 第 77-96 页, 1983)。这些抗体可以是任何免疫球蛋白种类, 包括 IgG、IgM、IgE、IgA、IgD 和其任意亚类。如本文所述产生 mAb 的杂交瘤可在体外或体内培养。体内生成高效价 mAb 的能力使得本文所述组合物、药盒和方法对于 mAb 生成特别有用。

[0113] 本文所述组合物、药盒和方法中枝状物 /T 辅助肽 (例如 PADRE- 枝状物) 与编码蛋白或抗原的核酸复合 (偶联或结合) 而无需纯化蛋白或抗原, 因为所述编码抗原或蛋白的核酸 (例如质粒 DNA 或 mRNA) 提供以下优点: i) 免除冗长和 / 或昂贵和 / 或费时的蛋白纯化步骤, ii) 通过宿主的细胞机制体内表达所述蛋白的天然形式, 避免常规蛋白纯化所得蛋白非天然形式的问题, 和 ii) 产生治疗性单克隆抗体的理想方法, 其中所述靶标是所述蛋白或抗原的自然 / 天然形式。

[0114] 通过应用已知技术以在动物如小鼠中生成抗体, 可制得针对特定抗原的人抗体。参见例如 Fishwild, D.M. 等, Nature Biotechnology 14(1996):845-851; Heijnen, I. 等, Journal of Clinical Investigation 97(1996):331-338; Lonberg, N. 等, Nature 368(1994):856-859; Morrison, S.L., Nature 368(1994):812-813; Neuberger, M., Nature Biotechnology 14(1996):826; 美国专利号 5,545,806; 5,569,825; 5,877,397; 5,939,598; 6,075,181; 6,091,001; 6,114,598; 和 6,130,314。通过应用已知方法如美国专利号 5,530,101; 5,585,089; 5,693,761 和 5,693,762 所述, 可从非人抗体制得针对特定抗原的类人 or 人源化抗体。

[0115] 一旦生成多克隆或单克隆抗体, 可通过蛋白质印迹、免疫沉淀分析经标准方法或其他合适方法测试所述抗体的特异性抗原识别, 例如 Ausubel 等, 同上所述。可通过系列注射产生抗血清, 优选包括至少 3 次加强注射。

[0116] 可通过已知技术生成识别并结合特异表位的抗体片段。例如, 这类片段包括但不限于可通过胃蛋白酶消化所述抗体分子产生的 $F(ab')_2$ 片段、可通过还原 $F(ab')_2$ 片段二硫桥产生的 Fab 片段。或者, 可构建 Fab 表达库 (Huse 等, Science 246:1275, 1989) 以快速和简单鉴定具有所需特异性的单克隆 Fab 片段。

[0117] 递送抗原给哺乳动物并在该哺乳动物中诱导产生针对所述抗原的单克隆抗体以获得单克隆抗体的典型方法包括将含有至少一种枝状物的组合物给予哺乳动物, 所述枝状物偶联有至少一种 T 辅助肽和肽或多肽抗原或者编码所述抗原的核酸, 其中所述至少一种 T 辅助肽和所述核酸或者肽或多肽抗原偶联于所述至少一种枝状物的外表面, 从而所述至少一种 T 辅助肽特异性结合 PAPC 且所述至少一种 T 辅助肽、至少一种枝状物和所述核酸或者肽或多肽抗原的组合能诱导针对该抗原的免疫应答。在此方法中, 所述组合物给予的量有效诱导 MHC II 型介导的 T 辅助细胞激活, 导致产生针对该抗原的单克隆抗体。在小鼠内生成抗体的方法中, 如上所述用抗原免疫小鼠后, 从一只或多只小鼠中收获抗体并筛选高效价。选择具有高效价的小鼠, 从该小鼠中取出脾。然后, 与骨髓瘤融合, 筛选最佳结合克隆。

[0118] 本文也描述了对抗原产生抗体 (例如单克隆抗体) 而无需蛋白纯化的药盒。典型的药盒包括含有多个本文所述枝状物 /T 辅助肽复合物 (偶联物) (例如 PADRE 衍生枝状物、偶联有流感 HA 的枝状物等) 的容器、和 pH 通常为 7.4 的生理缓冲液。在缓冲液或培养基的一个示例中, 所述缓冲液或培养基包括伊格尔氏最低限度必需培养基, 用 HEPES

和碳酸氢钠缓冲,补充有次黄嘌呤、胸苷、丙酮酸钠、L-谷氨酰胺、和小于10%的牛血清白蛋白或包括胰岛素和/或转铁蛋白的带100mg/L CaCl_2 的单独血清蛋白,其中内毒素水平低于1.0EU/mL。在此实施方式中,药盒用户将至少一种编码一种抗原的核酸(例如DNA质粒)用缓冲液稀释至100-200 $\mu\text{g/ml}$,温和振荡的同时将所述组合物(T辅助-枝状物)添加到经稀释的质粒DNA。在典型实施方式中,使用比例为10:1的T辅助-枝状物与质粒DNA(N:P),大约是7倍(重量)的组合物与1倍(重量)的DNA质粒。在一种实施方式中,遵循以下条件。室温孵育10分钟后,将含有10-20 μg 质粒DNA/组合物的100 μl 混合物皮下注入小鼠。在14天中进行类似加强免疫,然后通过标准方法进行初始筛选、融合和最终筛选单克隆抗体。除了核酸外,本文所述组合物和药盒可偶联蛋白或抗原。在这样的实施方式中,同样10:1比例的所述组合物与蛋白通常形成复合物。本文所述药盒中的用法说明描述了在需要时形成适当比例、缓冲的操作方案 and 进行优化和解决问题的方法。质粒DNA或蛋白/抗原与本文所述PADRE-枝状物偶联物的复合通过在水溶液中混合这2种成分来完成,水溶液用含PBS的生理缓冲液缓冲于生理pH。典型N/P(胺与磷酸根)比是10:1。采用凝胶电泳或其他合适试验证实DNA与PADRE-枝状物的完整复合。

[0119] 本文所述药盒可与编码感兴趣抗原的任何载体或质粒一起使用。通常包括制备和使用本文所述枝状物/T辅助表位复合物(偶联物)的说明材料。尽管说明材料一般包括书面或印刷材料,它们并不限于如此。本文的药盒和方法涵盖任何能保存这些说明并将其与终端用户交流的介质。这类介质包括但不限于电子存储介质(例如磁盘、磁带、胶卷、芯片)、光学介质(例如CD ROM)等。这类介质可包括提供这些说明材料的网址。

[0120] 递送核酸到细胞的组合物和方法

[0121] 在本文所述实验中,递送编码GFP的基因被特异性递送到MHC II型细胞(表达MHC II型的细胞)且观察到所述基因表达。因此,本文所述组合物和方法可用于任何基因治疗应用。递送核酸到细胞的组合物通常包括至少一种带正电、高度分支的聚合枝状物,其偶联有至少一种T辅助肽和至少一种编码肽或蛋白的核酸,其中所述至少一种T辅助肽和所述核酸偶联于所述至少一种带正电、高度分支的聚合枝状物的外表面,从而所述至少一种T辅助肽特异性结合所述细胞且所述至少一种T辅助肽、至少一种带正电的高度分支聚合枝状物和所述核酸的组合被所述细胞内化。递送核酸给细胞的方法通常包括使所述细胞接触含有至少一种带正电、高度分支的聚合枝状物的组合物,所述枝状物偶联有至少一种T辅助肽和至少一种编码肽或蛋白的核酸,其中所述至少一种T辅助肽和所述核酸偶联于至少一种带正电、高度分支的聚合枝状物的外表面,从而所述至少一种T辅助肽特异性结合所述细胞且所述至少一种T辅助肽、至少一种带正电的高度分支聚合枝状物和所述核酸的组合被所述细胞内化。在典型实施方式中,所述肽或蛋白在所述细胞内表达。

[0122] 给予组合物

[0123] 本文所述疫苗和组合物可以任何适当制剂形式给予哺乳动物(例如狗、猫、猪、马、啮齿类、非人灵长类、人)。例如,含有与siRNA偶联的PADRE-枝状物的组合物或含有与核酸或者肽或多肽抗原复合的PADRE-枝状物的疫苗能配制在药学上可接受载体或稀释剂如生理盐水或缓冲盐溶液中。可基于给予模式和途径及标准药学实践选择合适的载体和稀释剂。示范性药学上可接受载体和稀释剂以及药物制剂的描述可参见本领域标准教材Remington's Pharmaceutical Sciences(《雷明顿药学科学》)以及USP/NF。所述组合物

可添加其他物质以稳定和 / 或保存所述组合物。

[0124] 本文所述组合物和疫苗可通过任何常规技术给予哺乳动物。这种给予通常是胃肠外（例如静脉内、皮下、瘤内、肌肉内、腹膜内或鞘内引入）。所述组合物也可直接给予靶位点。所述组合物可以单次大剂量注射、多次注射或通过连续输注（例如静脉内、腹膜透析、泵输注）给予。对于胃肠外给予，所述组合物优选制成灭菌无热原形式。在治疗性应用中，将本文所述组合物和疫苗给予已患癌症或感染有感兴趣病原体（例如病毒）的个体。在预防性应用中，将本文所述组合物和疫苗给予具有癌症或传染病（即感染有感兴趣病原体（例如病毒））发病风险（例如遗传倾向或环境接触）的个体。

[0125] 在治疗性应用中，将本文所述组合物和疫苗给予已患癌症或感染有感兴趣病原体（例如病毒）的个体。在预防性应用中，将本文所述组合物和疫苗给予具有发展（例如遗传倾向，或环境接触）癌症或传染病（即感染有感兴趣病原体（例如病毒））风险的个体。

[0126] 有效剂量

[0127] 优选以有效量将本文所述疫苗和组合物给予哺乳动物（例如狗、猫、猪、马、啮齿类、非人灵长类、人），即所述量能在处理的哺乳动物中产生所需结果（例如防止或消除哺乳动物中的癌，提供保护抵御传染病等）。可如下所述确定这个治疗有效量。

[0128] 本文所述疫苗和组合物的毒性和治疗功效可通过标准药理学过程测定，使用培养细胞或实验动物以测定 LD_{50} （使 50% 群体死亡的剂量）。毒性和治疗效果间的剂量比是治疗指数且可表示为 LD_{50}/ED_{50} 比。优选表现出高治疗指数的那些组合物。尽管可使用显示副作用的那些组合物，必须仔细设计递送系统使这些副作用的潜在损害最小化。优选组合物的剂量优选在含有低或无毒 ED_{50} 的范围内。根据所用剂型和给予途径，所述剂量可在此范围内变化。

[0129] 对于 70kg 的病人，本文所述组合物和疫苗用于初始免疫（即用于治疗或预防性给予）的治疗有效量范围通常为约 $1 \mu g$ 到约 $25,000 \mu g$ （例如 $1, 100, 500, 2000, 2500, 10,000, 15,000, 25,000 \mu g$ ）偶联有抗原或结合有编码所述抗原的核酸的 T 辅助表位 / 枝状物的复合物（例如， $0.14 \mu g-357 \mu g$ 的质粒 DNA 或蛋白和 $0.86 \mu g-2142.85 \mu g$ 的 T 辅助 - 枝状物），然后是约 $1 \mu g$ 到约 $2500 \mu g$ 复合物（疫苗）的加强剂量，根据病人反应和通过测量病人血液中的特定 CTL 活性和 / 或抗体反应所得情况进行数周到数月的加强免疫方案。在一种实施方式中，可以比上面剂量高 > 133 倍的剂量将枝状物每天给予哺乳动物共 15 次而无毒性（参见 Abhay Singh Chauhan 等 2009 Proc. R. Soc. A, 466, 第 1535-1550 页，2009）。

[0130] 对于治疗目前患有癌或传染病的对象和 / 或刚诊断出有癌或传染病的对象，在急性感染情况下，给药优选在疾病第一征兆或检测到或手术取出肿瘤时或于诊断后不久便开始。然后是加强剂量，直到至少病症显著减轻且之后持续一段时间。在慢性感染中，可能需要负荷剂量，然后是加强剂量。对于预防性用途，给药可以在个体意识到癌症倾向时就开始，或在预期面临传染病之前。

[0131] 如医学和兽医领域所熟知，任一对象的剂量取决于许多因素，包括所述对象的尺寸、体表面积、年龄、待给予的具体组合物、给予时间和途径、总体健康、和同时给予的其他药物。已在临床前研究以及临床试验中测试枝状物如 PAMAM。近期，FDA 授予 III 期临床试验中的 VivaGel®（星药公司（Starpharma），澳大利亚墨尔本）“快速通道”地位。已知枝

状物在角膜中的治疗性用途,枝状物已用于角膜基因递送。在角膜应用中使用枝状物的示例包括角膜新生血管治疗、光动力治疗、和作为角膜等价物的组织工程。将 Poly(I:C) 作为干扰素的“天然”诱导剂给予人已超过 40 年。多项近期临床试验检测了不同剂量和给药途径的安全性和增强的免疫原性;重复报道和确立了总体安全性和增强的免疫原性。

实施例

[0132] 通过以下具体实施例进一步描述本发明。所述实施例仅提供用于说明且不应以任何形式构成对本发明范围的限制。

[0133] 实施例 1- 基于纳米颗粒的佐剂 / 靶向基因免疫平台

[0134] 治疗已建立的黑素肿瘤

[0135] 采用裸露 DNA 的基因免疫用于生成天然形式的抗原。然而,目前基因免疫方法的低体内转染效率、缺乏有效递送和弱特异性严重限制其功效。为克服这些限制,本文开发并描述了抗肿瘤 DNA 免疫的新型灵活的平台,1) 可体内特异性有效转染 PAPC,2) 提供“危险信号”,引起自体 PAPC 成熟并从而引起强免疫应答,和 3) 激活可进一步加强所产生免疫应答的 T 辅助细胞。

[0136] 本文所述基于枝状物的新型纳米颗粒通常通过偶联 2 种反应物来制备:5 代端氨基 PAMAM 枝状物、和靶向 / 免疫增强肽或通用 T 辅助表位 (PADRE)。下述数据显示此平台 i) 获得目标抗肿瘤效果,C57BL 小鼠中已建立的高侵入性 B16/LU8 黑素肿瘤的肿瘤尺寸减小 50%, ii) 诱导针对免疫所用基因的产物的强免疫应答和 ii) 使小鼠和人 APC 的转染效率升至 2-3 倍。此外,采用偶联 PADRE- 枝状物的 GFP 编码质粒的体内实验显示引流淋巴结中产生 GFP。

[0137] 材料和方法

[0138] 如上所述并加以下列改良而生成 PADRE 衍生的 PAMAM- 枝状物。通过以适当 N/P 比在室温孵育 10 分钟来产生所述 PADRE- 枝状物 /DNA 或 siRNA 复合物。将这种复合物加入原代 PBMC 或脾细胞的体外研究或皮下注射用于免疫目的。图 1 显示 5 代 PAMAM 枝状物的 PADRE 修饰 (偶联)。

[0139] 为维持高度带正电表面以结合多个核酸,一个枝状物分子通常有 2 个偶联其表面的 PADRE 肽从而可保持其正净电荷。将 PADRE 加入所述枝状物引起特异性靶向 APC 和强 CD4 辅助。所述 PADRE 衍生的 PAMAM- 枝状物不仅护送编码抗原的质粒,还刺激先天和适应性免疫并作为“危险信号”。

[0140] 用无内毒素的 MaxiPrep 试剂生成不同质粒 (包括 pEGFP-C1、pMAX、GFP、TRP-2、P2、PCARD 和 PCDNA3.1 中的 OVA)。通过标准方法进行荧光免疫吸附试验 (FLISA) 和免疫荧光检测 (IFA)。简要地,将转染的 cos-7 细胞以 0.02×10^6 / 孔接种于 96 孔板,固定细胞并进行透化。为测量产生的体液反应,将稀释血清加入所述孔且采用 IRDye 800CW 标记的第二抗小鼠 IgG 测量抗体反应。

[0141] 为制备枝状物 /DNA 复合物,将溶于无内毒素 PBS 中的 $1 \mu\text{g} / \mu\text{L}$ 制备 DNA 与枝状物或枝状物 -PADRE 以不同电荷比复合。室温孵育 10 分钟后,将所述复合物加入细胞培养物或皮下、真皮内注射或注入角膜基质腔内。

[0142] 为免疫荷载 B16-LU8 黑素肿瘤的小鼠,5 组雌性 C57BL 小鼠皮下移植 (0.02×10^6)

B16-F10 细胞。在肿瘤移植后第 2 和 10 天,不同组分别接受 i) 无处理,ii) 仅 PCDNA3.1(载体对照),iii) 与单独枝状物复合的 TRP-2,或 iv) 与 PADRE-枝状物复合的 TRP-2。每周进行 2 次肿瘤测量。

[0143] 结果

[0144] 鉴定已制备的 PADRE-枝状物。通过所述肽 -COOH 末端与所述枝状物胺基之间的简单酰胺偶联制成所述肽 -枝状物偶联物。反应中使用 2 : 1 的肽 / 枝状物攻击比例,尝试各枝状物仅结合几个肽以保留大部分游离胺基离从而在该枝状物上有大量正电荷。所述产物通过相对纯水透析来纯化至少 24 小时,随后真空干燥。通过 ¹H NMR、紫外 - 可见光谱和 MALDI-TOF 质谱鉴定所收集产物,清油。NMR 显示对应于所述枝状物质子的大峰和所述肽质子的一小组峰。所述 PADRE-枝状物偶联物的 MALDI-TOF 质谱在 m/z 比枝状物自身观察到的峰高约 3,000 个单位处显示峰。超出的质量对应于约 2 个肽表位(图 17)。

[0145] 所述数据确认各枝状物上平均存在 2 个 PADRE(图 17)。显示了将多个核酸体外递送到自体 APC 内。以 1 : 5 和 1 : 10 的电荷比达到最佳的体外多核苷酸递送 / 转染人原代外周单核细胞。图 2 显示 siRNA 通过 PADRE-枝状物递送(~% 86)到纯化的人 B 细胞,其中复合(偶联)PADRE-枝状物的 Alexa Fluor 标记 siRNA 与 B 细胞一起孵育 4 小时。细胞用 CD19/FITC 染色且红色通道(PE)代表有 siRNA/Alexa Fluor.man 的细胞。

[0146] 参见图 3,显示 PADRE-枝状物的体内 DNA 递送。编码 GFP 或 TRP-2 的质粒单独注射或者与 PADRE-枝状物或枝状物(即不复合 PADRE 的枝状物)复合注射。图像显示注射后 24 和 16 小时在皮肤(左)和角膜(右)中的 GFP 表达。已证实注射 PADRE-枝状物复合物后 24 和 16 小时在皮肤和角膜中都有 GFP 有效表达。证实了体内的淋巴结靶向。皮下注射 PADRE-枝状物 /GFP 质粒复合物(5 μg 总质粒)后 8 天,取出相邻淋巴结并与仅注射 GFP-DNA 的小鼠淋巴结作比较。在免疫后第 8 天拍摄网状淋巴结的荧光显微图像。观察到毗邻注射位点的淋巴结中的抗原表达,但对照淋巴结中未观察到抗原表达。

[0147] 证实了体内淋巴结靶向。皮下注射 PADRE-枝状物 /GFP 质粒复合物(5 μg 总质粒)后 8 天,取出相邻淋巴结并与仅注射 GFP-DNA 的小鼠淋巴结作比较。在免疫后第 8 天拍摄网状淋巴结的荧光显微图像。观察到毗邻注射位点的淋巴结中的抗原表达,但对照淋巴结中未观察到抗原表达。

[0148] 如图 4 所示,给予 PADRE-枝状物 / 质粒复合物后产生特异性免疫应答。用质粒 / PADRE-枝状物复合物免疫一次(GFP)或二次(OVA)后观察到强体液反应。

[0149] 图 5 所示数据显示 PADRE-枝状物治疗已建立肿瘤。已知 B16 黑素瘤是侵入性小鼠肿瘤模型。移植 B16 黑素瘤细胞(顶部)或 TSA(底部)的小鼠在肿瘤移植后第 2 或 3 天进行免疫接种,接着在 1 周后进行加强免疫。后续肿瘤测量清楚证实给予 PADRE-枝状物可具体在 C57BL(Iab)中产生保护性免疫应答,C57BL(Iab)对 PADRE 结合有较高亲和性。C57BL 也通过诱导 T 辅助细胞而对 PADRE 响应更强。

[0150] 参见图 5,所述结果表明目标抗肿瘤效果,已建立的高侵入性 B16/LU8 肿瘤的肿瘤尺寸减小 50%。有意选择此侵入性模型以显示该平台的效能,其他平台都失败了。肿瘤生长延迟和肿瘤尺寸减小是前所未有的。事实上,肿瘤移植后第 22 天,在测试组(即这些动物接受如本文所述疫苗)中未检测到肿瘤或无可触摸的肿瘤,这与所有对照组显著不同。此免疫所用 DNA 量(疫苗剂量)比正常所用(20 μg,共 2 次免疫)低许多。图 5 中,下方图是

用 Balb/c 小鼠的阴性对照,其中 PADRE 结合不适当,Balb/c TSA 肿瘤模型中的类似实验未显示效果。这清楚显示通过 MHC II 型的递送系统的特异性。

[0151] 这些数据清楚证实本文所述的靶向佐剂纳米颗粒平台导致基因递送、所编码抗原的强表达、抗原呈递和诱导保护性免疫应答。因此,本文所述 PADRE- 枝状物是新型有效的佐剂 / 靶向递送工具和平台,用于 i) 无蛋白的 (单克隆) 抗体生成, ii) 免疫治疗 / 防止具有假象印迹 (deceptive imprinting) 的恶性肿瘤和传染病,和 iii) 递送 siRNA 用于基于免疫的多种治疗干预。

[0152] 实施例 2- 体外靶向递送和转染效率

[0153] 参见图 6, 体外靶向递送 PBMC 产生 77% 的 B 细胞转染效率。获得来自健康供体的人 PBMC。以 600 万细胞 / 毫升 RPMI 培养基培养 PBMC, 所述培养基含有 10% 胎牛血清。将 5 μ g 的 GFP 编码质粒稀释于 100 μ l 生理缓冲液 PBS, 振荡的同时将溶于 50 μ l PBS 的 5 μ g PADRE- 枝状物加入 DNA。室温孵育 10 分钟后, 将 GFP 质粒和 PADRE- 枝状物的混合物 / 复合物加入 PBMC。在 37°C / 5% CO₂ 培养箱孵育 24 小时后, PBMC 用 CD19PE 染色且通过流式细胞仪分析细胞。在总 PBMC 的 43% 中观察到 GFP 表达, 而在 B 细胞上分选时 77% 的 B 细胞表达 GFP。对照组中, 用相同比例的枝状物和 GFP 质粒孵育的 PBMC 在总 PBMC 或 B 细胞中约 11% 和 7% 显示 GFP 表达。与仅用培养基的 PBMC 比较, 未观察到主要的活力变化。这是多个实验的代表。这些实验证实 i) 将 GFP 质粒递送到 PBMC 特别是表达 MHC II 型的细胞 (B 细胞), 和 ii) 由 PBMC 特别是由 B 细胞表达 GFP。

[0154] 实施例 3- 将肽 / 蛋白体内递送到小鼠 DC 和体外递送到人 B 细胞

[0155] 将 PDD/ 白蛋白-FITC 递送到纯化的人 B 细胞 (图 7)。参见图 8, 此图显示 PADRE- 枝状物体内靶向小鼠 DC 和其功效以及注射和淋巴结分析的时间轴。此实验的结果表明 i) (图 7) 在不到 2 小时内将混合 PADRE- 枝状物的白蛋白-FITC (一种蛋白) 递送入人 B 细胞内, ii) (图 8) 在皮下注射后第 5 天, 将偶联枝状物的 PADRE (一种表位) 体内递送到淋巴结的 B 细胞和 DC (所述 PADRE- 枝状物复合 GFP 质粒以显影所述复合物递送到淋巴结 / B 细胞 / DC), iii) (图 9) 在皮下注射后第 5 天, 将偶联枝状物的流感 HA 辅助表位 (一种表位) 体内递送到淋巴结的 DC (所述 PADRE- 枝状物复合 GFP 质粒以显影所述复合物递送到淋巴结 DC)。这些数据代表多个实验, 在一些实验中皮下注射各自复合 GFP 质粒的 PADRE- 枝状物或 HA- 枝状物后第 3 天取出淋巴结。这些结果确立了以下示例: 将偶联 FITC 的蛋白递送到包括 B 细胞和 DC 在内的 APC 通过 FITC 显影, 以及将偶联枝状物的 2 种肽 PADRE 和 HA 辅助表位递送到淋巴结细胞中, 其中 GFP 质粒复合肽-枝状物以促进显影和分析所述复合物 (与复合 GFP 编码质粒的枝状物肽相连)。在注射纳米颗粒 (PADRE- 枝状物 / GFP 编码质粒) 与对照 5 天后, 通过在相邻淋巴结中靶向和扩增 DC 的体内流式细胞分析数据显示特异性体外和体内转染 DC (78% 相比 ~ 7% 的 GFP 表达)。PADRE 衍生枝状物 (PDD) 可增强递送, 因为它有助于以高亲和力结合 APC 上所表达 MHC II 型的 PADRE 的调理效果。类似地, 皮下注射时将 HA- 枝状物 (DRHA) / GFP 质粒体内递送到相邻淋巴结中 (图 9)。应注意在小鼠中, PADRE 结合 IAb 的 MHC II 型 (C57BL 小鼠) (图 8), 而所选 HA 表位结合 IAd 的 MHC II 型 (Balb/c 小鼠) (图 9)。显示了用 2 种不同表位在 2 个不同小鼠品系中体内递送获得类似结果的可行性。APC 靶向的递送引起 PADRE- 枝状物 / GFP 质粒在人 PBMC (图 6) 和纯化的人 B 细胞 (图 6) 和 C57BL 小鼠脾细胞中表达 GFP, 和递送 PADRE- 枝状物 /*dsRNA 到人 B 细胞 (图

10) 和猴 PBMC(图 11)内是通过本文所述组合物将肽递送到 PAPC 的其他体外证明。由于使用以结合 MHC II 型为独特特征的 2 种不同靶向肽,如本文中的实验所示起作用,因此本文所述疫苗、方法和组合物涵盖所有 MHC II 型结合肽。参见图 9,也制备与流感 HA 辅助表位偶联的枝状物(HDD)。HDD 可用于 balb/c 小鼠。HDD 在注入小鼠时靶向相邻淋巴结中的 DC。

[0156] 实施例 4-PADRE-枝状物递送 siRNA 到人 B 细胞和非人灵长类 PBMC 以及 PADRE-枝状物递送质粒到非人灵长类 PBMC。

[0157] 参见图 10,复合 dsRNA(对照 siRNA)的 PADRE-枝状物显示体外靶向传递。将 0.1 μ g dsRNA 稀释于 100 μ l PBS,振荡的同时将溶于 20 μ l PBS 的 0.7 μ g PADRE-枝状物加入 Alexa Fluor 标记的 ds DNA。室温孵育 10 分钟后,将所述复合物加入在 24 孔板孔中的 100 万个纯化 B 细胞(在加有 10%胎牛血清的 RPMI 中)。在 37°C /5% CO₂ 培养箱孵育约 1 小时后,冲洗细胞并将其放置回所述孔(在加有 10%胎牛血清的 1ml 新鲜 RPMI 中),在荧光显微镜下以红色通道分析。亮场和红色通道下的细胞覆盖图像证实人 B 细胞吸收 Alexa Fluor 标记的 dsRNA(图 10)。细胞在 37°C /5% CO₂ 培养箱孵育过夜后用 CD19(B 细胞标记物)染色并通过流式细胞仪分析(图 2)。如图 2 所示,> 80%的 B 细胞是 Alexa Fluor(标记 dsRNA)阳性,而对照枝状物/dsRNA-Alexa Fluor 约 6%是阳性。这些结果清楚证实 PADRE-枝状物强力递送核酸到 PAPC。

[0158] 测试来自狒狒(阿拉伯狒狒, *papio hamadryas*)的 1 个样品和来自食蟹猕猴(*macaca fascicularis*)的 2 个不同样品的 PBMC。图 11 所示代表性荧光显微图像在加入各自复合 siRNA/Alexa Fluor 的 PADRE-枝状物或枝状物后 2 小时获取。类似地,将复合 GFP 质粒的 PADRE-枝状物或枝状物加入 PBMC,孵育 24 小时后分析(图 12)。结果显示 PADRE-枝状物在低于 2 小时内将核酸递送到猴 PBMC 中,而枝状物仅显示中等递送。这些结果强烈提示 PADRE-枝状物对非人灵长类动物起作用。

[0159] 实施例 5-比较 PADRE-枝状物纳米颗粒和 IN-CELL-ART™ 平台

[0160] 本文所述 PADRE-枝状物提供特异性靶向 PAPC,与 IN-CELL-ART 的非特异递送到所有细胞相反。IN-CELL-ART™ 平台包括 704 聚合物,通过电穿孔将 DNA 递送到细胞而无特异性内置佐剂活性或用于结合 APC 的任何配体。目前,已知体内电穿孔是最佳的非病毒性基因免疫法。本文所述 PADRE-枝状物提供 IN-CELL-ART 平台不具有的 T 辅助细胞诱导。在上述实验中,显示所述 PADRE-枝状物在治疗性肿瘤模型中有效,而 IN-CELL-ART 未显示在在体内肿瘤模型中有效。在上述实验中,PADRE-枝状物作为与体内电穿孔作比较的有力对照(图 13)。相反,IN-CELL-ART 仅显示与裸露 DNA 的比较。本文所述单次免疫 PADRE-枝状物与用于增强体液反应的体内电穿孔作比较。为进行此实验,将 PADRE-枝状物与 5 μ g 质粒室温混合,10 分钟后,用所述混合物皮下注射至小鼠。在单次接种后第 28 天用表达 50k B16F10 的 OVA 攻击用已接种偶联 OVA 编码质粒的 PADRE-枝状物免疫的小鼠和对照小鼠。接受与质粒偶联的 PADRE-枝状物的所有小鼠在肿瘤移植后第 25 天时受保护,而经体外电穿孔接受质粒的小鼠中 40%受保护,仅接受 DNA 的对照组中 0%受保护。如图 13 所示,结果显示用 PADRE-枝状物/质粒(DRP-ova)的单次 DNA 接种在诱导抗 ova 抗体体液反应上优于体内电穿孔(EP)递送质粒(EP-ova)。

[0161] 实施例 6-PADRE-枝状物在小鼠中诱导强体液反应

[0162] 如图 14-16 所示,复合质粒的 PADRE- 枝状物在小鼠中引发强体液反应。

[0163] 实施例 7- 通过 PADRE- 枝状物 /OVA 疫苗在预防性设定中消除 B16/OVA 肿瘤

[0164] 6 周龄的雌性 C57BL 小鼠以每笼 5 只分组接受 i) 无处理, ii) 用 DermaVax 电转仪通过“体内电穿孔”2 次免疫 $20\mu\text{g}$ OVA 质粒,或 iii) 用 PADRE- 枝状物 /OVA 质粒 2 次免疫 (各 $20\mu\text{g}$)。免疫间隔 2 周进行。免疫后 10 天,所有小鼠在右肋接受皮下注射 (移植) $100\mu\text{l}$ PBS 中的 50,000 B16/OVA 肿瘤细胞。每周 2 次测量肿瘤且对每周数据进行作图,如图 18 所示。用 PADRE- 枝状物 / $20\mu\text{g}$ OVA 质粒的 2 次接种使得所有免疫小鼠中的 B16/OVA 肿瘤完全消除,而 100% 无处理小鼠和 60% 经“体内电穿孔”接种小鼠维持荷瘤。杀死所有肿瘤大于 15% 体重的荷瘤小鼠。

[0165] 其他实施方式

[0166] 可对部分或全部的所述组合物、药盒和方法步骤进行任何改进。本文引用的包括出版物、专利申请和专利在内的所有参考文献通过引用纳入本文。使用本文提供的任何和所有实施例或示例性用语 (例如,“如”) 旨在阐述本发明,除非另有说明否则不对本发明范围构成限制。例如,尽管本文所述实验包括消除 B16 黑素瘤和诱导对 GFP、OVA、PCARD、CCR5、vgPCR、muPAR、CathL 或 p2 抗原的强体液反应,本文所述疫苗、组合物和方法可用于多种其他治疗和预防性应用,包括防止和消除其他癌类型、诱导免疫应答并因而诱导针对任何感兴趣抗原 (例如来自传染性病原体的抗原) 的免疫。在另一实施例中,本文所述疫苗、组合物和方法可用于递送对细胞而言不是抗原的蛋白或肽。在此实施例中,用于递送肽或蛋白到细胞的典型组合物包括至少一种带电、高度分支的聚合枝状物,其偶联有至少一种 T 辅助肽和至少一种肽或蛋白,其中所述至少一种 T 辅助肽和所述至少一种肽或蛋白偶联于所述至少一种带电、高度分支的聚合枝状物的外表面,从而所述至少一种 T 辅助肽特异性结合所述细胞。本文中关于本发明或所述优选实施方式的性质和优点的任何表述不用于限制,不应认为这些表述限制了所附权利要求。更普遍地,本说明书的语言不用于表明任何非权利要求的元素对本发明实施必不可少。在适用法律允许情况下,本发明包括对所附权利要求中引用对象的全部改进和等同方式。此外,除非本文另有说明或明显与上下文矛盾,本发明包括任意上述元素组合的所有可能变化。

[0001]

序列表

<110> 迈阿密大学 (University of Miami)
P.M. 达夫塔里安 (Daftarian, Pirouz)
A. 凯弗尔 (Kaifer, Angel)
P. 塞拉菲尼 (Serafini, Paolo)
V.L. 佩雷 (Perez, Victor)
B.B. 布隆贝格 (Blomberg, Bonnie)
V.P. 莱蒙 (Lemmon, Vance)
黎薇

<120> 疫苗组合物和其使用方法

<130> 7230-61W0

<150> US 60/165,732

<151> 2009-04-01

<160> 27

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 乙酰化 D-丙氨酸

<222> (1)..(1)

<220>

<221> Ala

<222> (3)..(3)

<223> 环己基丙氨酸

<220>

<221> D-丙氨酸

<222> (14)..(14)

<220>

<221> 氨基己酸

<222> (15)..(15)

<223> 氨基己酸

<400> 1

[0002]

Ala Lys Xaa Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala Xaa Cys
1 5 10 15

<210> 2
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<220>
<221> D-Ala
<222> (1)..(1)

<220>
<221> 丙氨酸
<222> (3)..(3)
<223> 环己基丙氨酸

<220>
<221> D-Ala
<222> (13)..(13)

<400> 2

Ala Lys Xaa Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala
1 5 10

<210> 3
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<220>
<221> D-Ala
<222> (1)..(1)

<220>
<221> D-Ala
<222> (13)..(13)

<400> 3

Ala Lys Phe Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala
1 5 10

[0003]

<210> 4
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<220>
<221> D-Ala
<222> (1).. (1)

<220>
<221> D-Ala
<222> (13).. (13)

<400> 4

Ala Lys Tyr Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala
1 5 10

<210> 5
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<220>
<221> D-Ala
<222> (1).. (1)

<220>
<221> D-Ala
<222> (13).. (13)

<400> 5

Ala Lys Phe Val Ala Ala Tyr Thr Leu Lys Ala Ala Ala
1 5 10

<210> 6
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

[0004]

<220>

<221> D-Ala

<222> (1).. (1)

<220>

<221> Ala

<222> (3).. (3)

<223> 环己基丙氨酸

<220>

<221> D-Ala

<222> (13).. (13)

<400> 6

Ala Lys Xaa Val Ala Ala Tyr Thr Leu Lys Ala Ala Ala
1 5 10

<210> 7

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> D-Ala

<222> (1).. (1)

<220>

<221> D-Ala

<222> (13).. (13)

<400> 7

Ala Lys Tyr Val Ala Ala Tyr Thr Leu Lys Ala Ala Ala
1 5 10

<210> 8

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> D-Ala

[0005]

<222> (1).. (1)

<220>

<221> D-Ala

<222> (13).. (13)

<400> 8

Ala Lys Phe Val Ala Ala His Thr Leu Lys Ala Ala Ala
1 5 10

<210> 9

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> D-Ala

<222> (1).. (1)

<220>

<221> 环己基丙氨酸

<222> (3).. (3)

<220>

<221> D-Ala

<222> (13).. (13)

<400> 9

Ala Lys Xaa Val Ala Ala His Thr Leu Lys Ala Ala Ala
1 5 10

<210> 10

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> D-Ala

<222> (1).. (1)

<220>

<221> D-Ala

[0006]

<222> (13)..(13)

<400> 10

Ala Lys Tyr Val Ala Ala His Thr Leu Lys Ala Ala Ala
1 5 10

<210> 11

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> D-Ala

<222> (1)..(1)

<220>

<221> D-Ala

<222> (13)..(13)

<400> 11

Ala Lys Phe Val Ala Ala Asn Thr Leu Lys Ala Ala Ala
1 5 10

<210> 12

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> D-Ala

<222> (1)..(1)

<220>

<221> 环己基丙氨酸

<222> (3)..(3)

<220>

<221> D-Ala

<222> (13)..(13)

<400> 12

[0007]

Ala Lys Xaa Val Ala Ala Asn Thr Leu Lys Ala Ala Ala
1 5 10

<210> 13
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<220>
<221> D-Ala
<222> (1).. (1)

<220>
<221> D-Ala
<222> (13).. (13)

<400> 13

Ala Lys Tyr Val Ala Ala Asn Thr Leu Lys Ala Ala Ala
1 5 10

<210> 14
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 14

Ala Lys Phe Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala
1 5 10

<210> 15
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 15

Ala Lys Tyr Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala
1 5 10

[0008]

<210> 16
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 16

Ala Lys Phe Val Ala Ala Tyr Thr Leu Lys Ala Ala Ala
1 5 10

<210> 17
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<220>
<221> 环己基丙氨酸
<222> (3).. (3)

<400> 17

Ala Lys Xaa Val Ala Ala Tyr Thr Leu Lys Ala Ala Ala
1 5 10

<210> 18
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 18

Ala Lys Tyr Val Ala Ala Tyr Thr Leu Lys Ala Ala Ala
1 5 10

<210> 19
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

[0009]

<400> 19

Ala Lys Phe Val Ala Ala His Thr Leu Lys Ala Ala Ala
1 5 10

<210> 20

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 环己基丙氨酸

<222> (3)..(3)

<400> 20

Ala Lys Xaa Val Ala Ala His Thr Leu Lys Ala Ala Ala
1 5 10

<210> 21

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 21

Ala Lys Tyr Val Ala Ala His Thr Leu Lys Ala Ala Ala
1 5 10

<210> 22

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 22

Ala Lys Phe Val Ala Ala Asn Thr Leu Lys Ala Ala Ala
1 5 10

<210> 23

[0010]

<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<220>
<221> 环己基丙氨酸
<222> (3)..(3)

<400> 23

Ala Lys Xaa Val Ala Ala Asn Thr Leu Lys Ala Ala Ala
1 5 10

<210> 24
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 24

Ala Lys Tyr Val Ala Ala Asn Thr Leu Lys Ala Ala Ala
1 5 10

<210> 25
<211> 11
<212> PRT
<213> 前病毒 PR8 病毒

<400> 25

Ser Phe Glu Arg Phe Glu Ile Phe Pro Lys Glu
1 5 10

<210> 26
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<220>
<221> 环己基丙氨酸
<222> (3)..(3)

[0011]

<400> 26

Ala Lys Xaa Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala
1 5 10

<210> 27

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 27

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

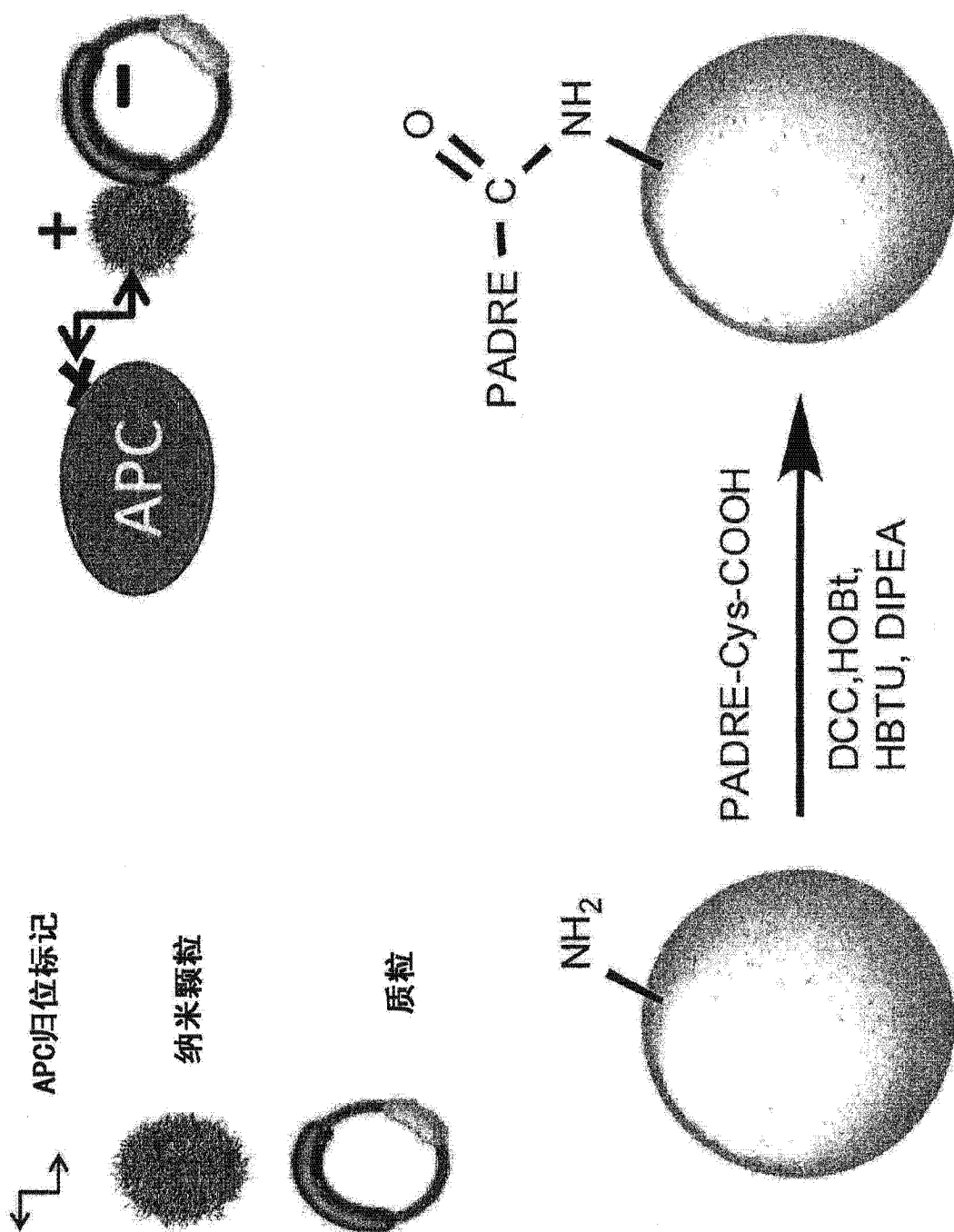


图 1

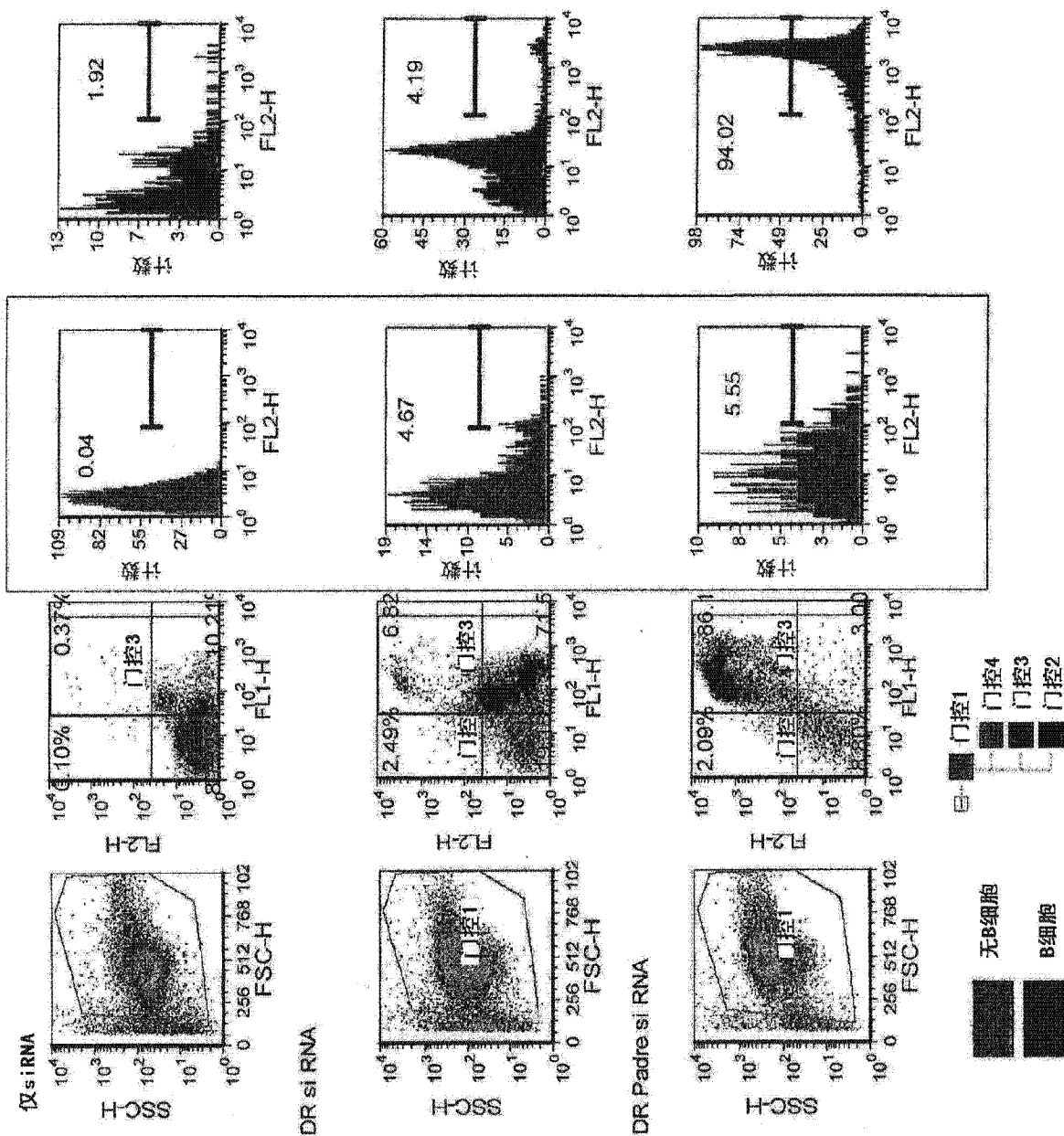


图 2

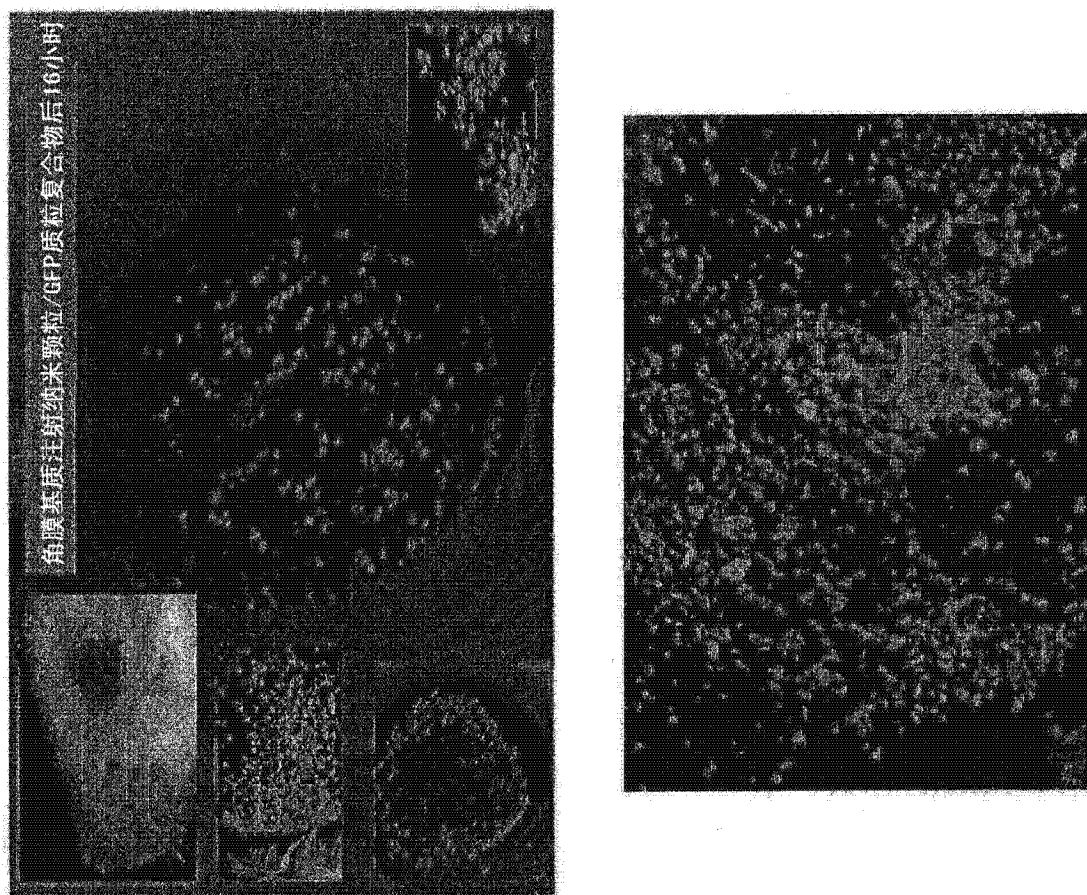


图 3

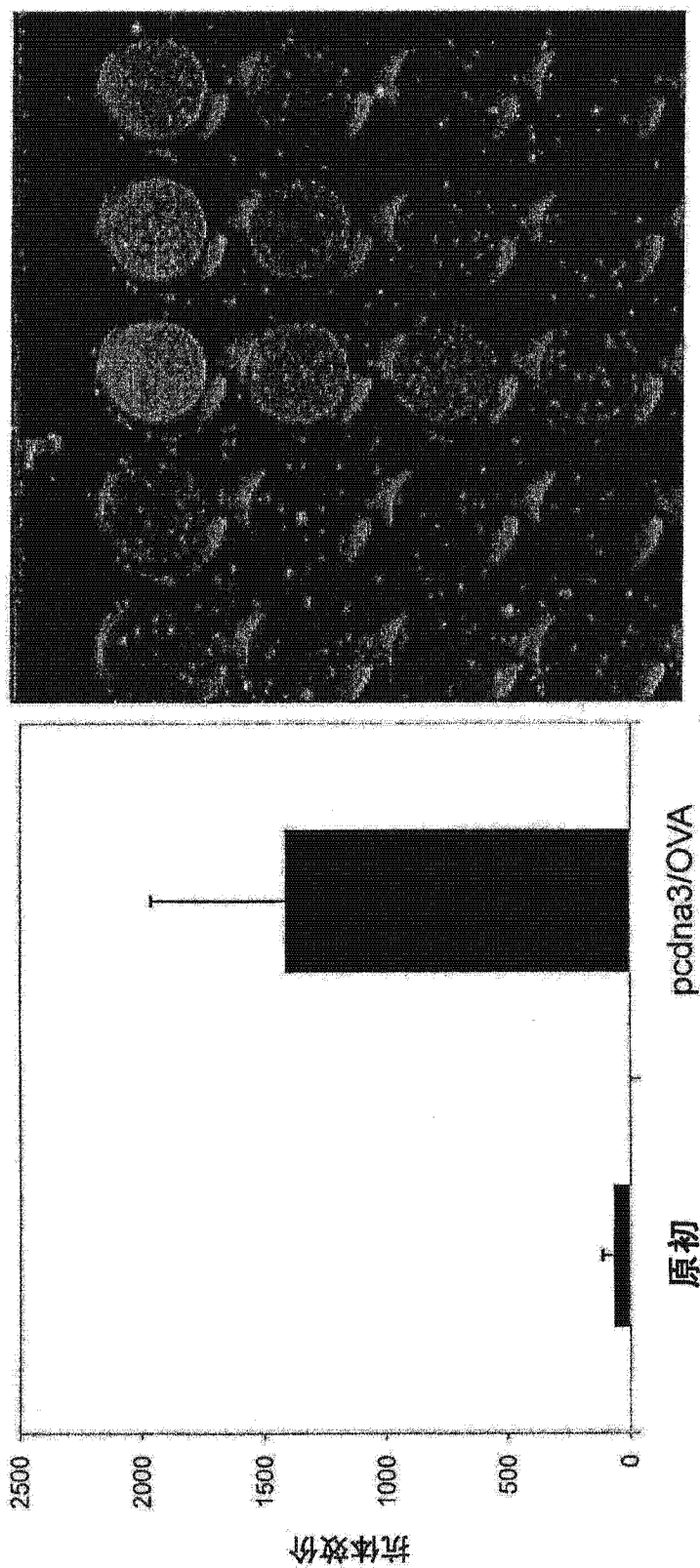


图 4

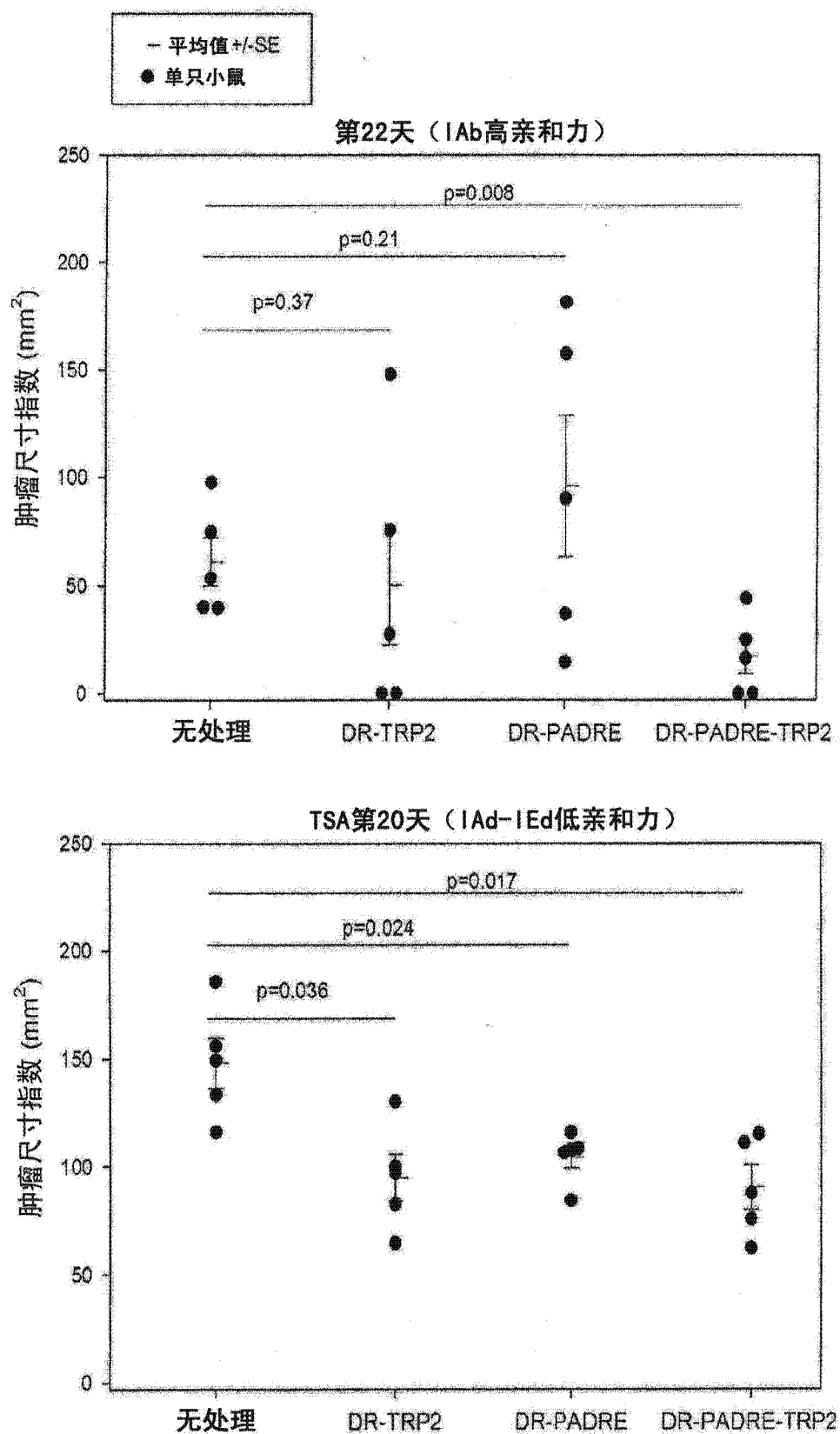


图 5

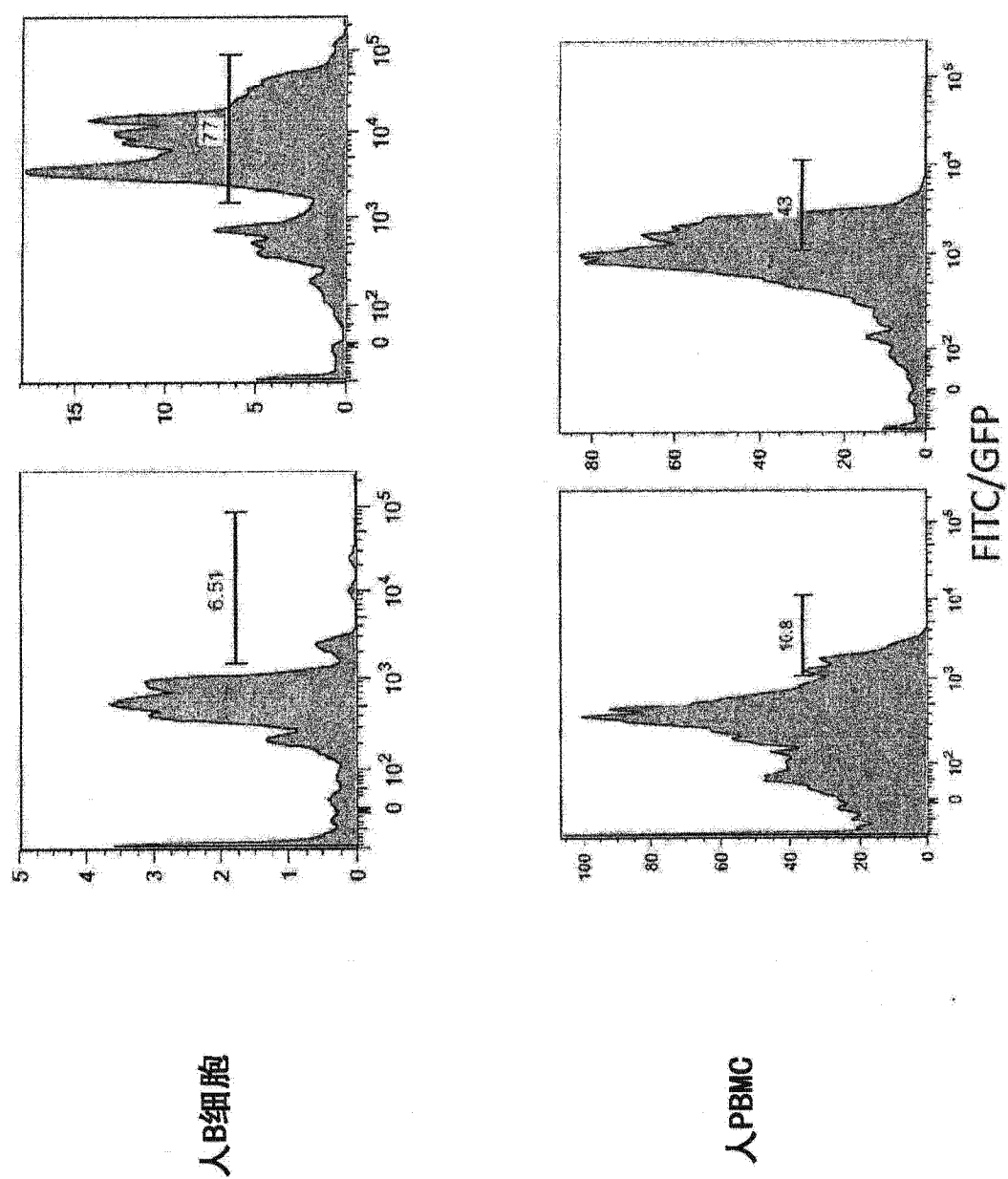


图 6

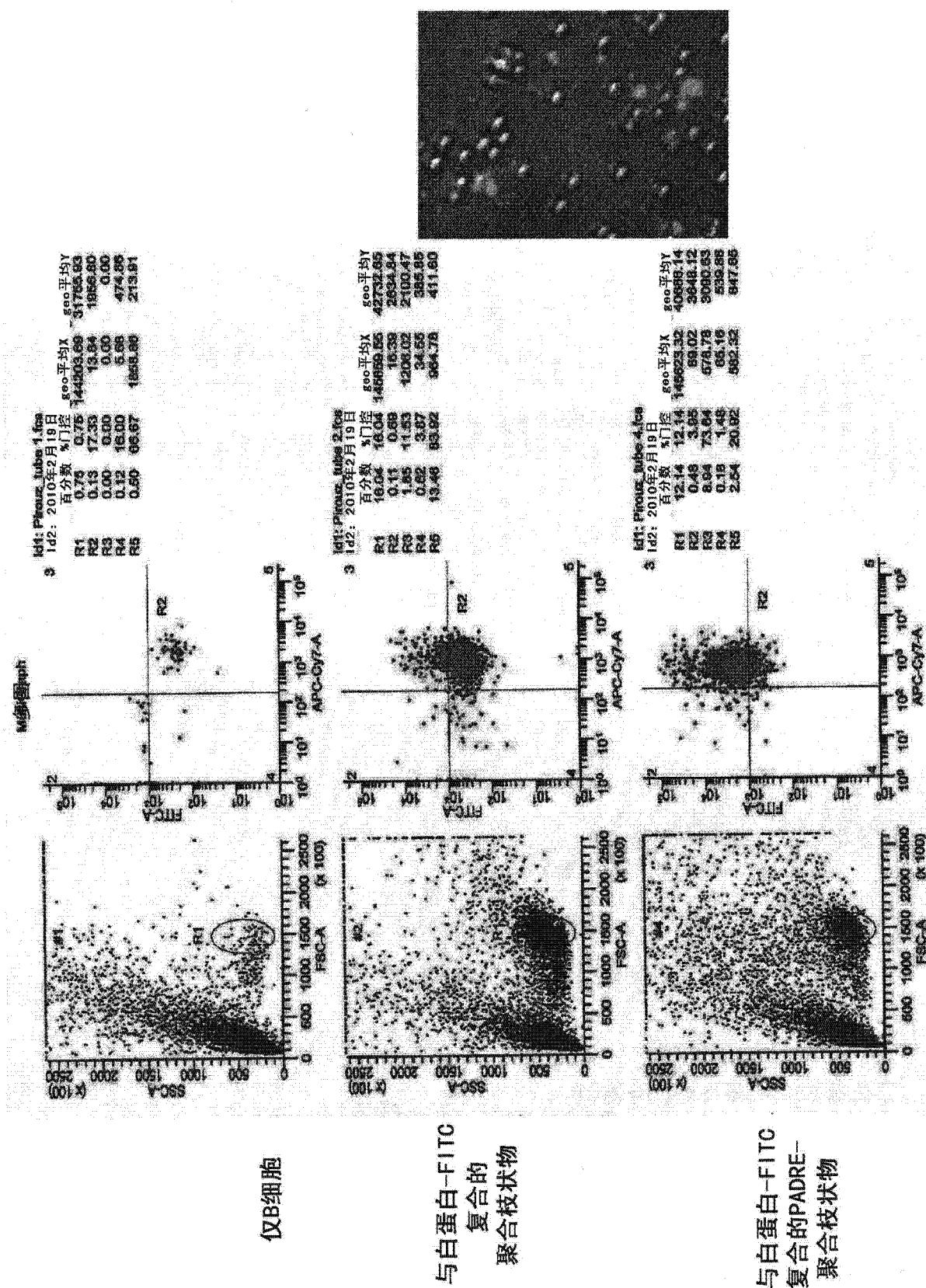


图 7

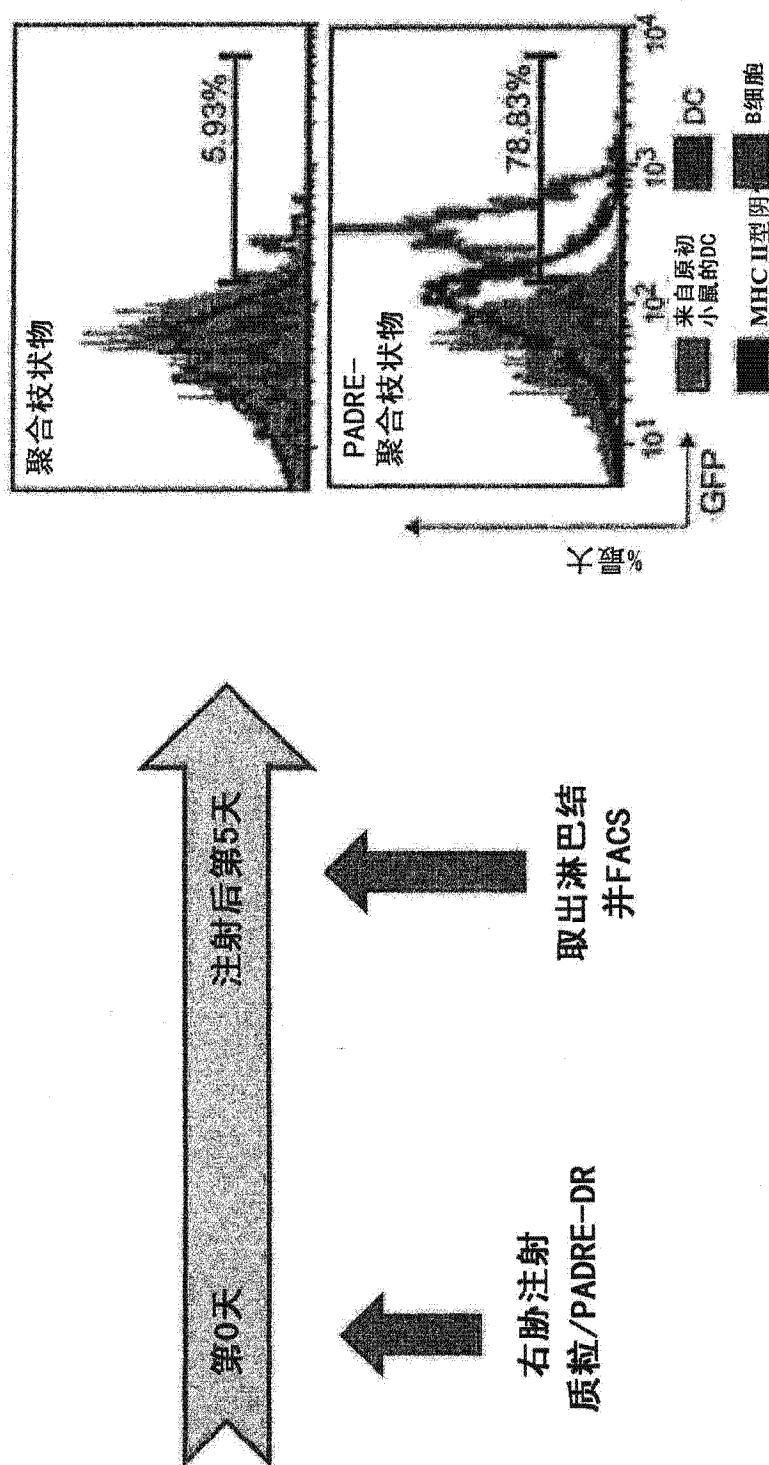


图 8

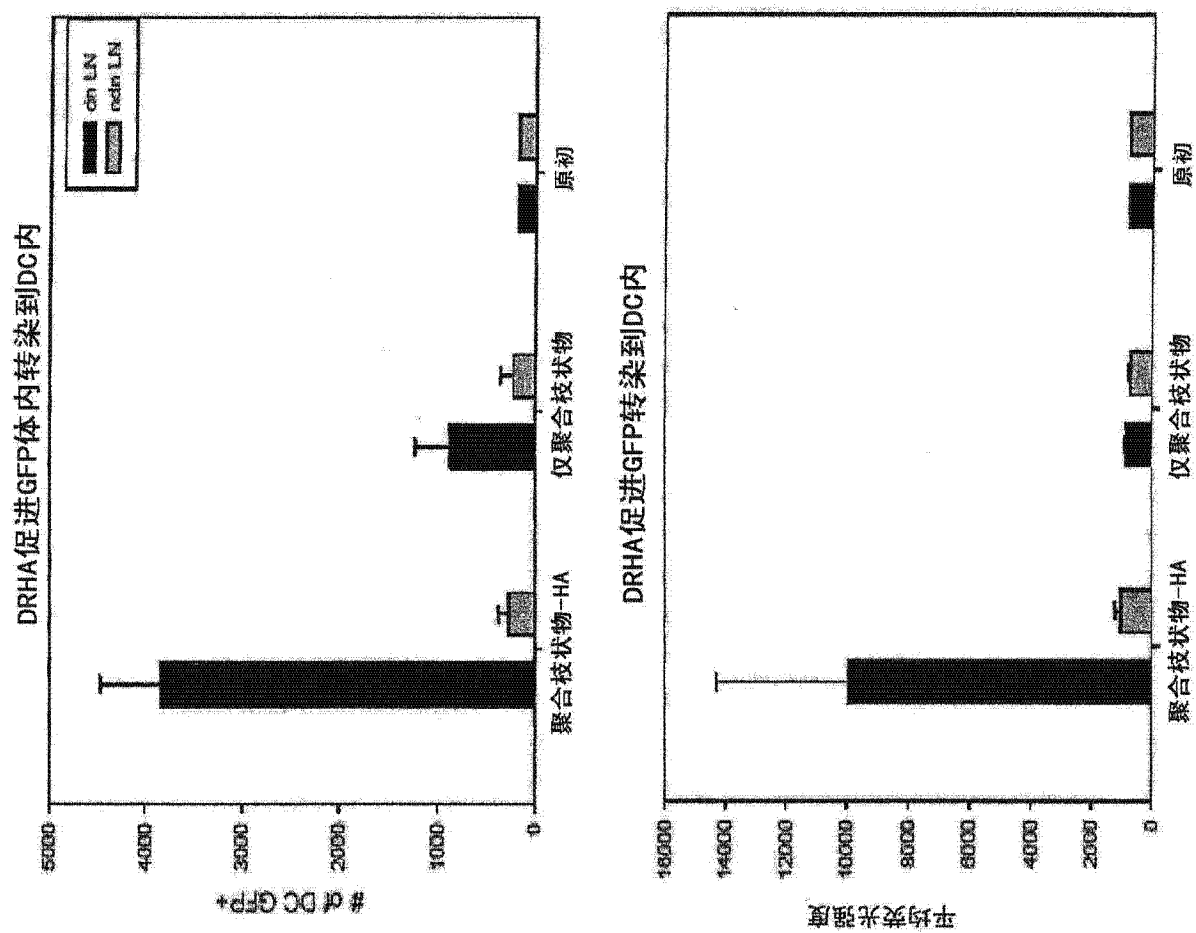


图 9

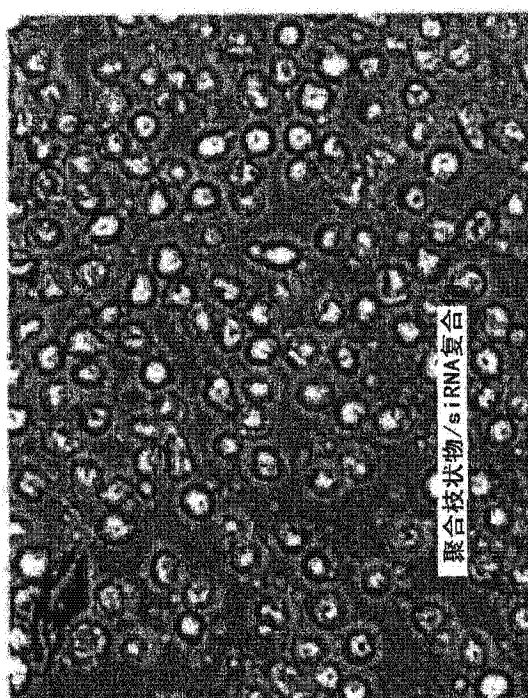


图 10

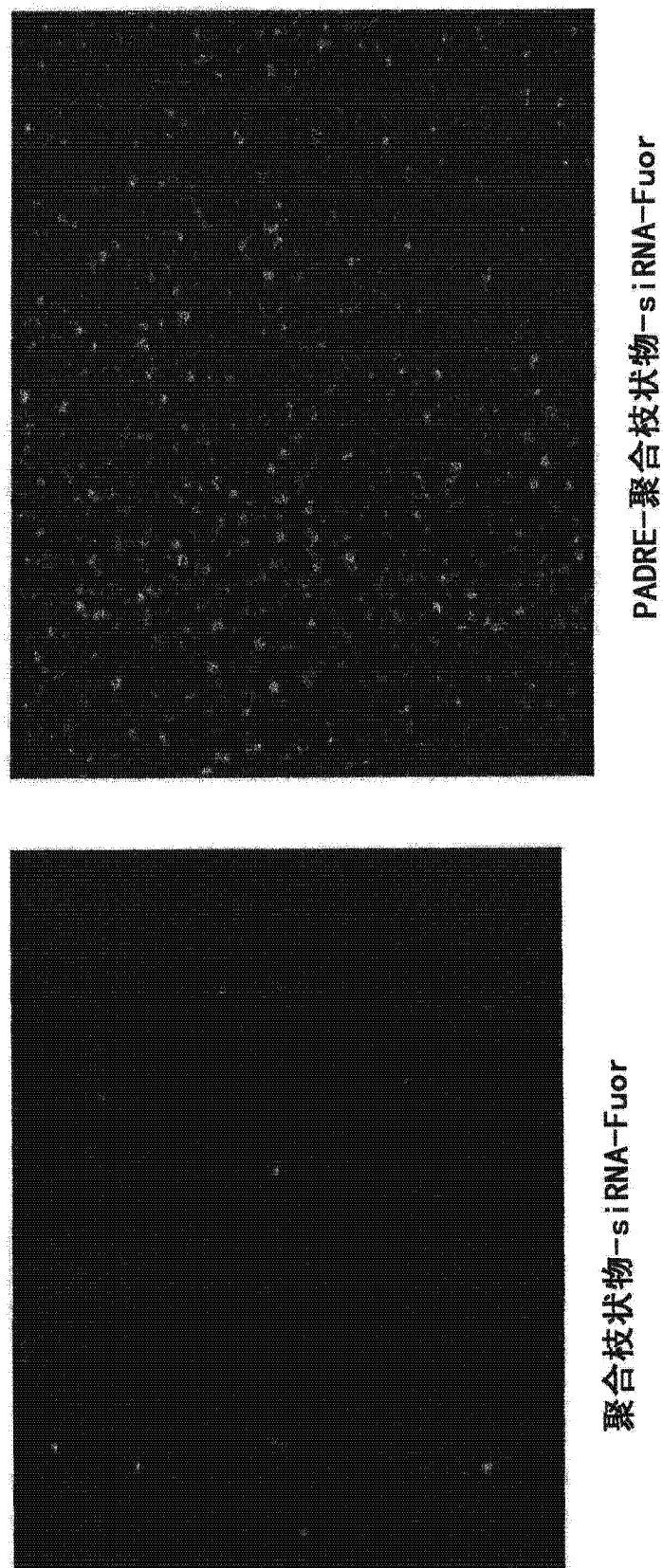


图 11

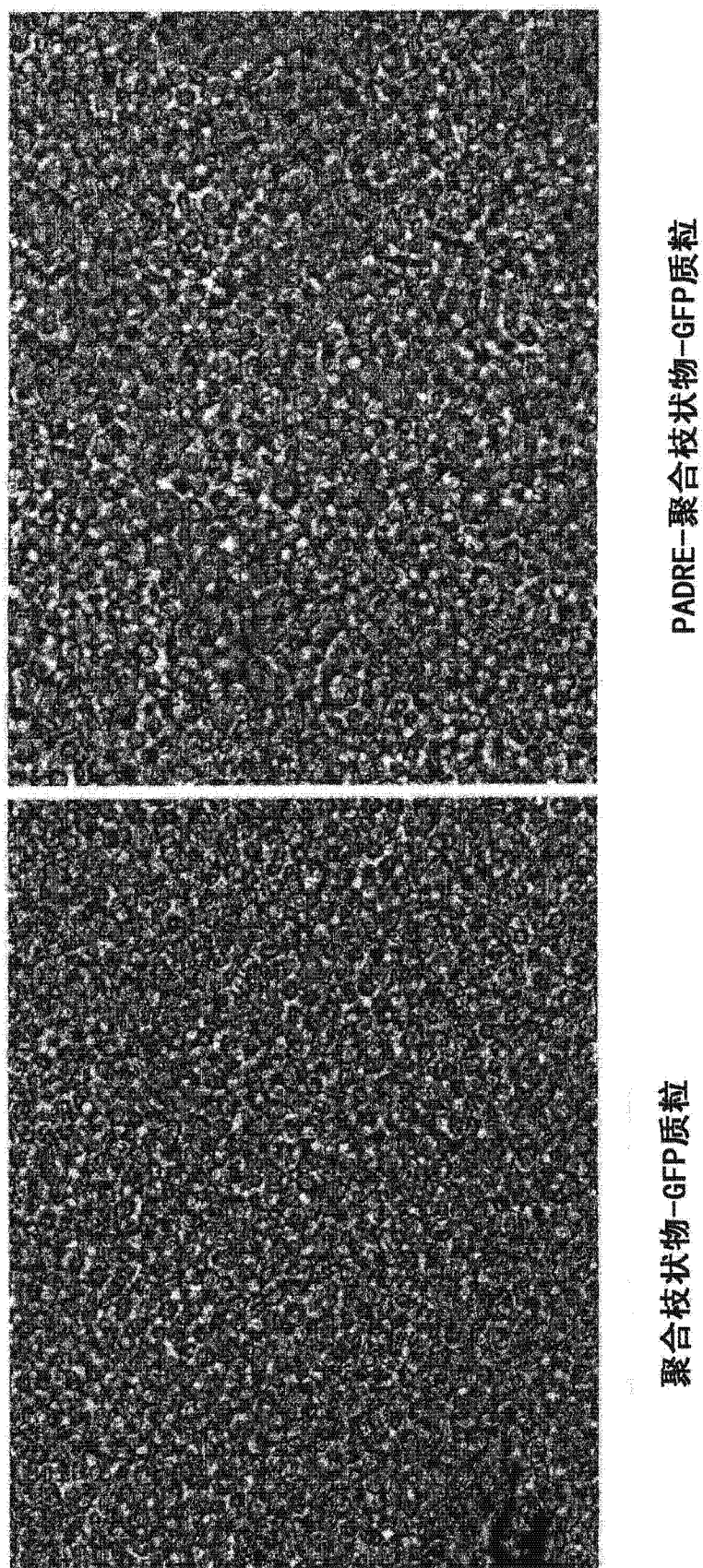


图 12

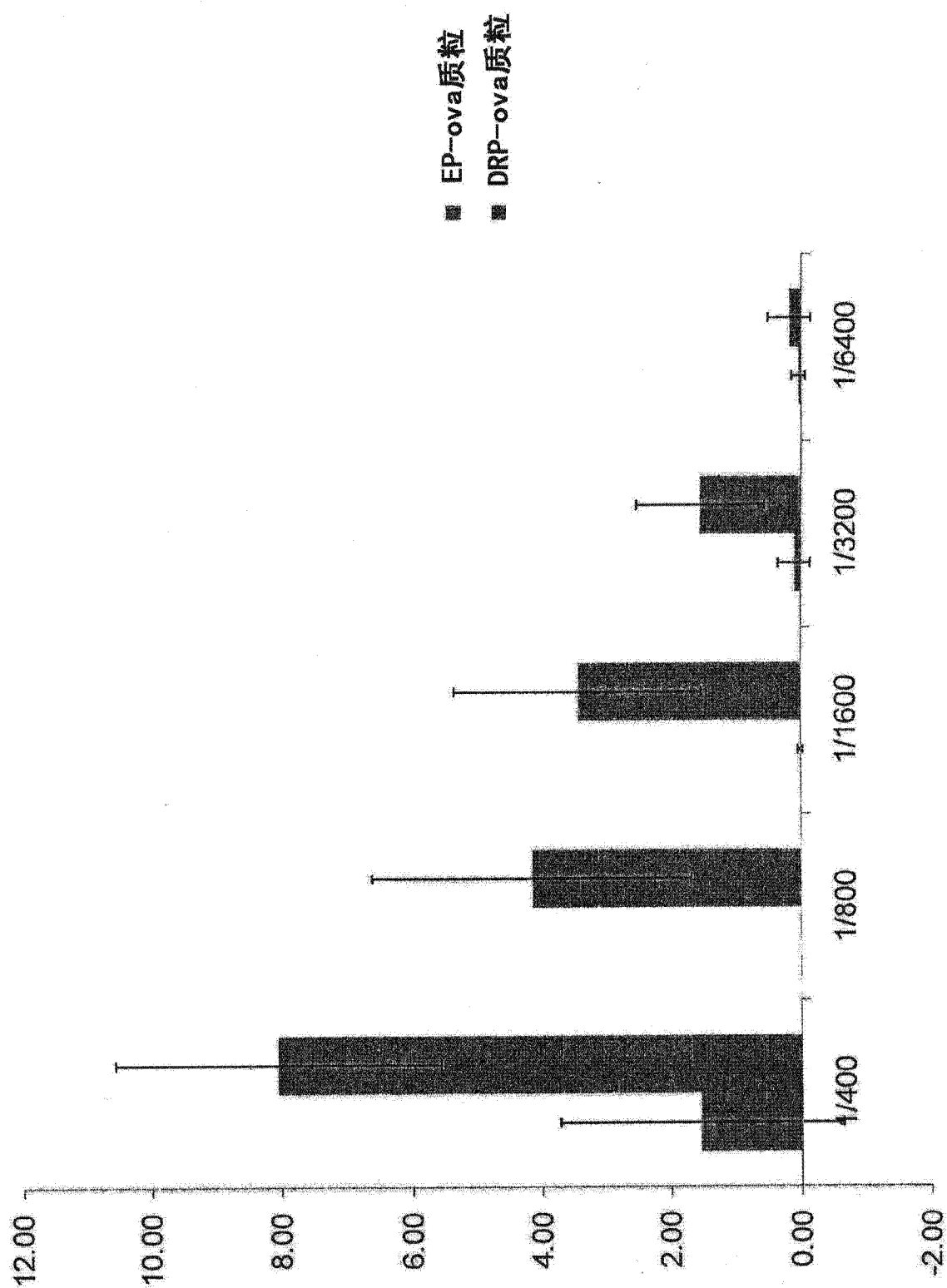


图 13

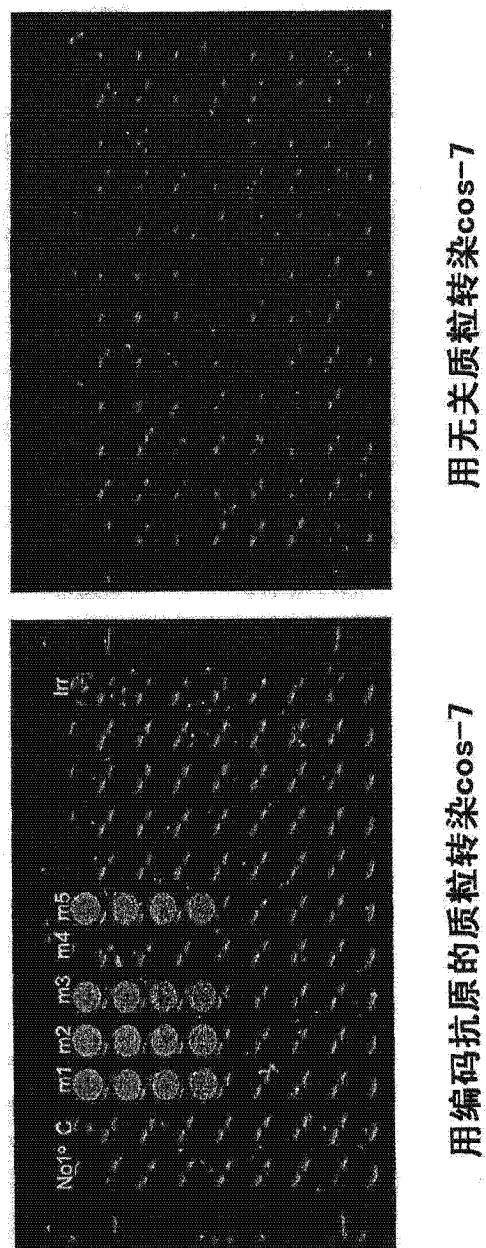


图 14

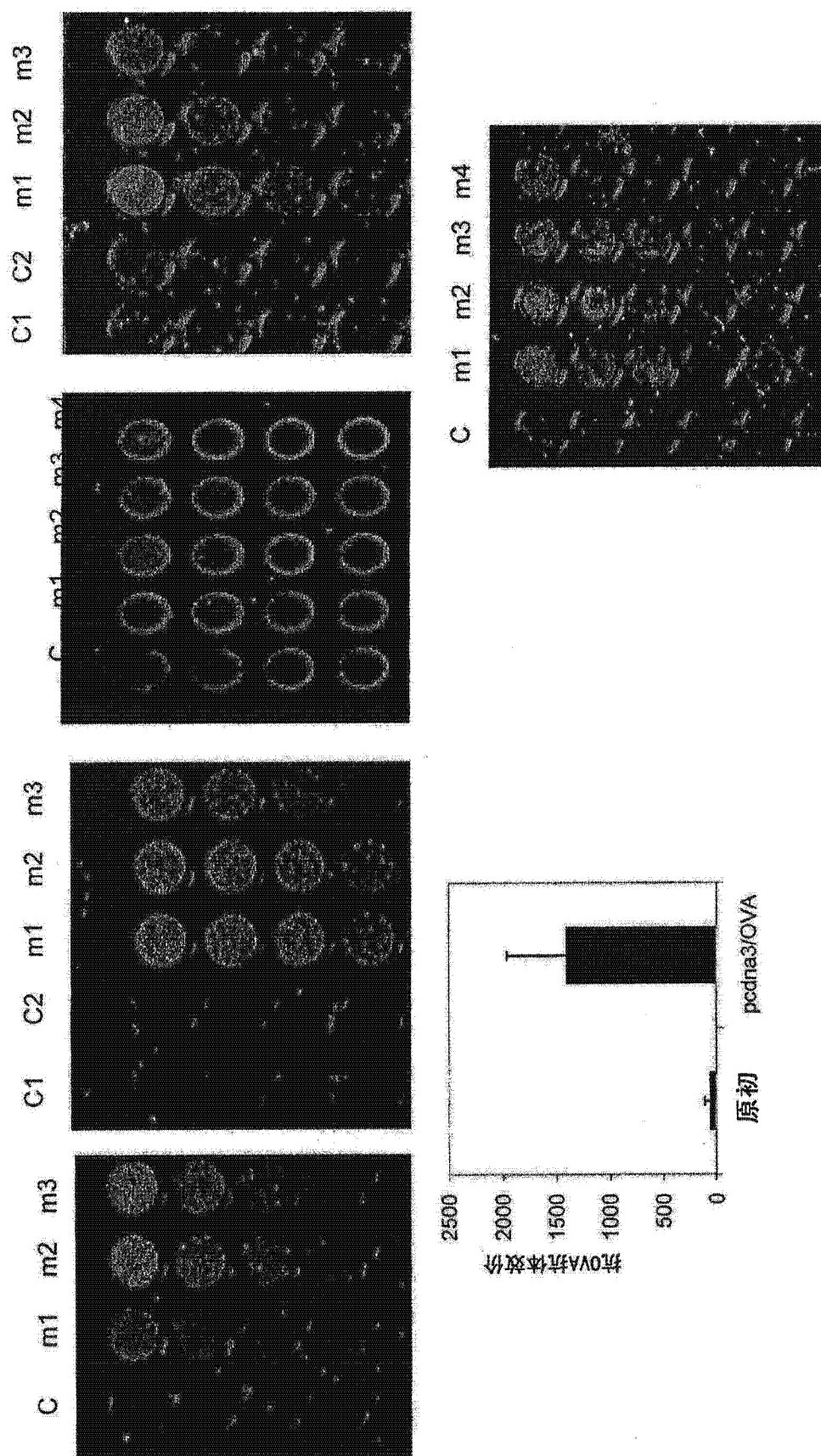


图 15

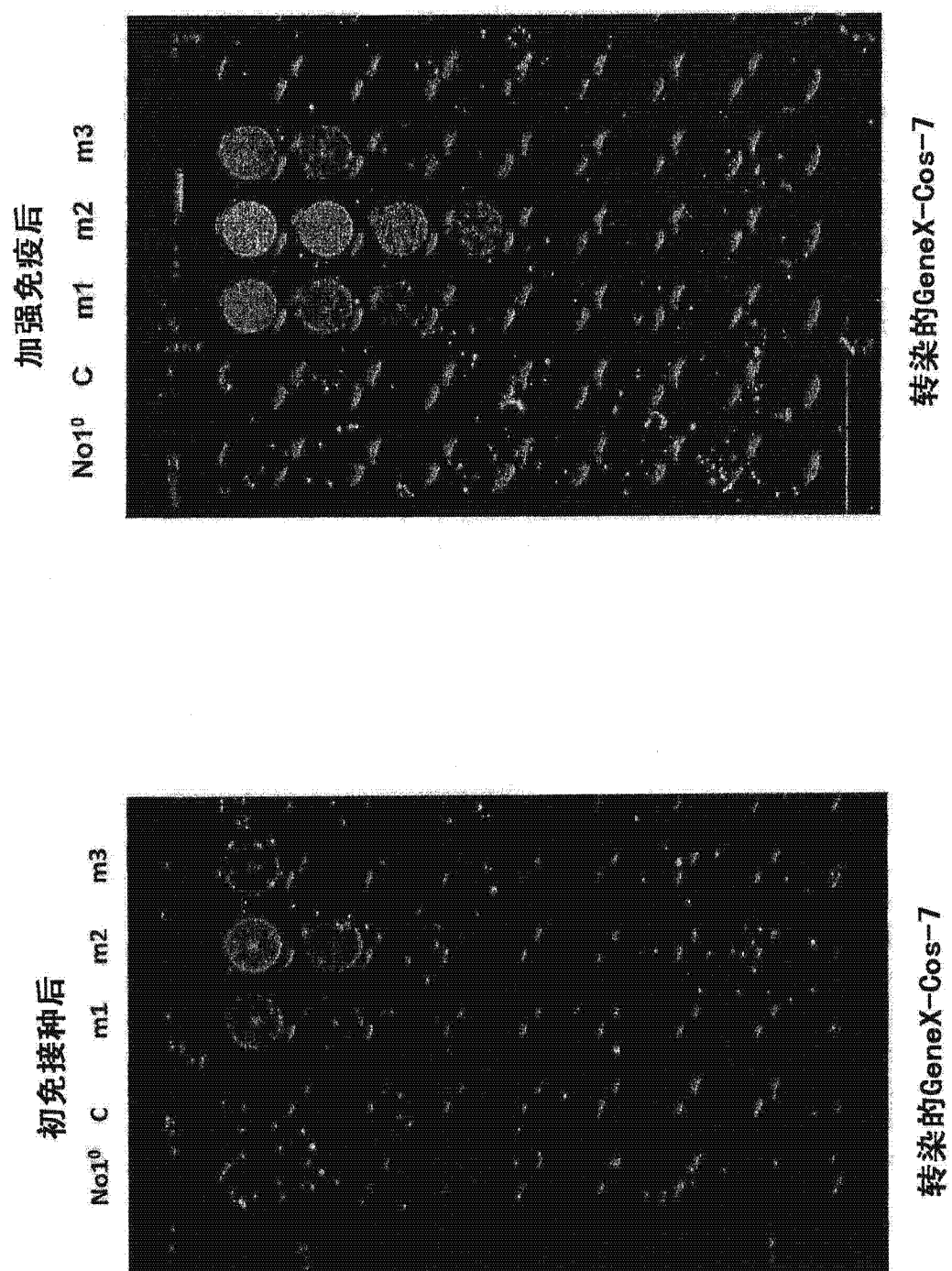


图 16

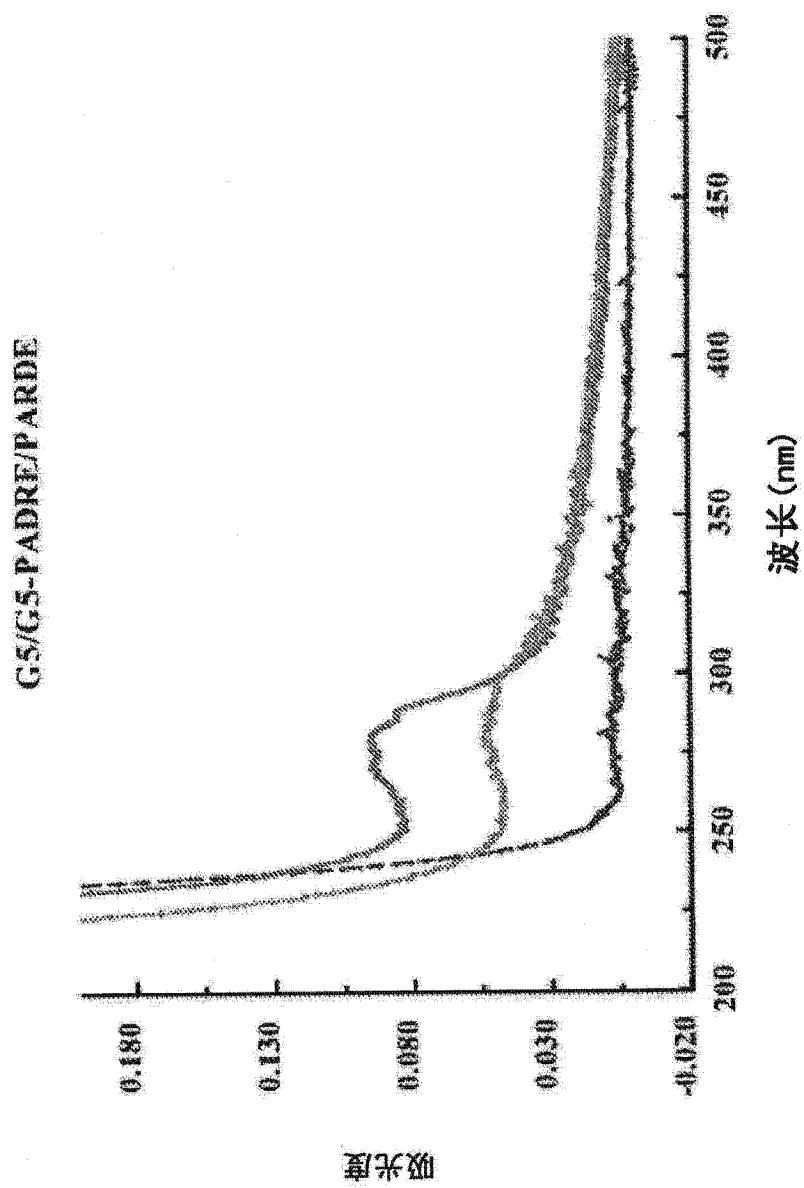


图 17

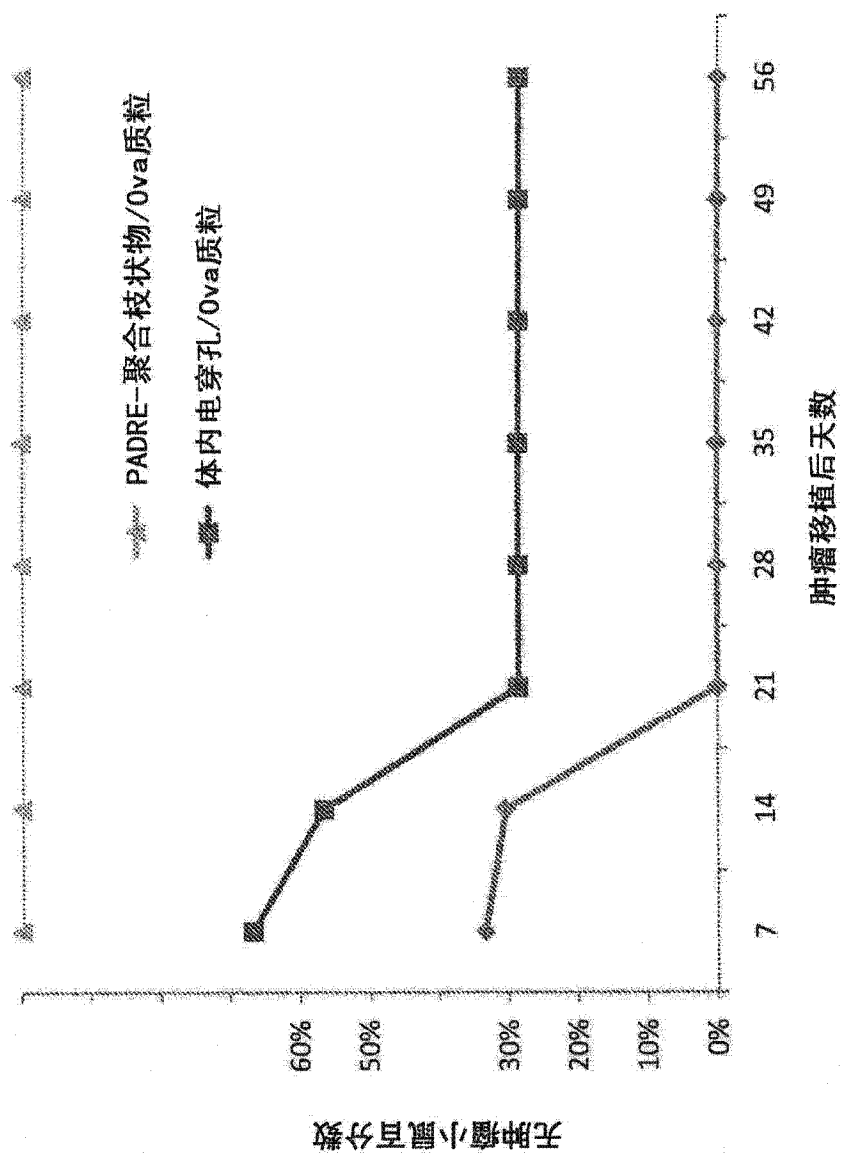


图 18