



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108430505 A

(43)申请公布日 2018.08.21

(21)申请号 201680078577.1

(22)申请日 2016.11.15

(30)优先权数据

62/256,875 2015.11.18 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.07.11

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/CA2016/051324 2016.11.15

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/083963 EN 2017.05.26

(71)申请人 免疫疫苗技术有限公司

地址 加拿大新斯科舍

(72)发明人 G·M·韦尔 L·D·麦克唐纳

R·利韦斯基 M·曼苏尔

(74)专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

代理人 张全信 赵蓉民

(51)Int.Cl.

A61K 39/39(2006.01)

A61P 37/04(2006.01)

权利要求书4页 说明书63页

序列表24页 附图2页

(54)发明名称

包括聚肌胞苷酸多核苷酸佐剂和基于脂质的佐剂的辅助系统以及无水疫苗组合物

(57)摘要

本公开内容提供了辅助系统,其包括:(a)聚肌胞苷酸多核苷酸佐剂;(b)基于脂质的佐剂;(c)两亲化合物;和(d)疏水运载体。还提供了无水或基本上不含水的疫苗组合物,其包括相同的组分连同一种或多种抗原。本公开内容还提供了这样的组合物在诱导抗体(体液)和/或细胞介导的免疫应答中的用途和它们用于治疗通过抗体和/或细胞介导的免疫应答减轻的疾病、障碍或病痛的方法。

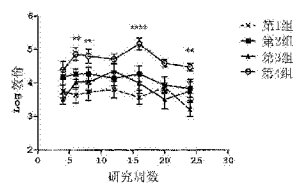


图1a

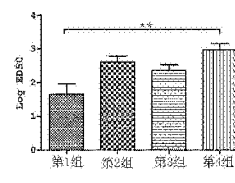


图1b

1. 辅助系统,其包括:
 - (a) 聚肌胞苷酸多核苷酸佐剂;
 - (b) 基于脂质的佐剂;
 - (c) 两亲化合物;和
 - (d) 疏水运载体。
2. 组合物,其包括权利要求1所述的辅助系统和抗原,其中所述组合物无水或基本上不含水。
3. 权利要求2所述的组合物,其中基本上不含水的组合物包括以重量/重量计所述运载体的总重量的小于大约10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.1%、0.05%或0.01%的水。
4. 权利要求2或3所述的组合物,其中所述基于脂质的佐剂:
 - i) 包括一种或多种脂肽,其中所述脂肽中的至少一种包括作为所述脂质组分的棕榈酸;
 - ii) 包括二棕榈酰-S-丙三基-半胱氨酸(PAM₂Cys)或三棕榈酰-S-丙三基-半胱氨酸(PAM₃Cys);和/或
 - iii) 是PAM₂Cys-Ser-(Lys)₄(SEQ ID NO:1)或PAM₃Cys-Ser-(Lys)₄(SEQ ID NO:1)。
5. 权利要求2至4中任一项所述的组合物,其中所述聚肌胞苷酸多核苷酸佐剂:
 - i) 包括RNA、DNA或其组合;
 - ii) 是双链的并且每条链是肌苷酸或胞苷酸残基的均聚物或是双链的并且每条链是包括肌苷酸和胞苷酸残基二者的杂聚物;和/或
 - iii) 是包括均聚物聚肌胞苷酸多核苷酸和杂聚物聚肌胞苷酸多核苷酸二者的混合物。
6. 权利要求2至5中任一项所述的组合物,其中所述两亲化合物是二油酰磷脂酰胆碱(DOPC)、包括DOPC的磷脂的混合物、卵磷脂、或包括卵磷脂的磷脂的混合物。
7. 权利要求6所述的组合物,其中所述脂质围绕所述抗原形成闭合的囊泡结构,其中所述闭合的囊泡结构是单层囊泡结构或双层囊泡结构。
8. 权利要求2至7中任一项所述的组合物,其中所述运载体是油或油的混合物,所述油选自植物油、坚果油、和矿物油;或所述运载体是矿物油溶液中的二缩甘露醇油酸酯。
9. 权利要求2至8中任一项所述的组合物,其中所述基于脂质的佐剂是PAM₃Cys-Ser-(Lys)₄(SEQ ID NO:1);所述聚肌胞苷酸多核苷酸佐剂是不同链长度的聚肌苷酸和聚胞苷酸的混合物,所述混合物包括989,486道尔顿的近似分子量;并且所述运载体是Montanide®ISA 51 VG。
10. 权利要求2至9中任一项所述的组合物,其中所述抗原是多肽;编码多肽的多核苷酸;碳水化合物;微生物或其部分;或毒素。
11. 权利要求10所述的组合物,其中所述抗原源自病毒,源自细菌,源自原生动物,或源自膜表面结合癌症抗原。
12. 权利要求11所述的组合物,其中所述存活素抗原是:
 - i) 肽抗原,其包括来自所述存活素蛋白的氨基酸序列(SEQ ID NO:69)或其修饰变体;或编码所述肽抗原的核酸分子;
 - ii) 肽抗原,其包括选自FEELTLGEF(SEQ ID NO:70);FTELTGEF(SEQ ID NO:71);

LTLGEFLKL (SEQ ID NO:72); LMLGEFLKL (SEQ ID NO:73); RISTFKNWPF (SEQ ID NO:74); RISTFKNWPK (SEQ ID NO:75); STFKNWPFL (SEQ ID NO:76); 或 LPPAWQPFL (SEQ ID NO:77), 或其任意组合的氨基酸序列; 或编码所述肽抗原的核酸分子; 或

iii) 包括氨基酸序列: FTELTLGEF (SEQ ID NO:71); LMLGEFLKL (SEQ ID NO:73); RISTFKNWPK (SEQ ID NO:75); STFKNWPFL (SEQ ID NO:76); 和 LPPAWQPFL (SEQ ID NO:77) 的五种肽抗原的混合物。

13. 权利要求2至12中任一项所述的组合物, 其中所述抗原包括至少一种B细胞表位、至少一种CTL表位或其组合。

14. 权利要求2至13中任一项所述的组合物, 进一步包括辅助性T表位。

15. 权利要求14所述的组合物, 其中所述辅助性T表位是包括氨基酸序列 AKXVAAWTLKAAA (SEQ ID NO:79) 的PADRE; 包括氨基酸序列 FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE (SEQ ID NO:80) 的破伤风类毒素肽F21E; 或包括氨基酸序列 AQYIKANSKFIGITEL (SEQ ID NO:78) 的修饰的破伤风类毒素肽A16L; 其中所述辅助性T表位被任选地缀合或融合至所述抗原。

16. 权利要求2至15中任一项所述的组合物, 其中所述聚肌胞苷酸多核苷酸佐剂是Toll样受体3 (TLR3) 激动剂并且所述基于脂质的佐剂是所述TLR1/2异源二聚体的激动剂。

17. 权利要求2至16中任一项所述的组合物, 其能够以单一剂量诱导抗体免疫应答和/或细胞介导的免疫应答。

18. 权利要求17所述的组合物, 其包括低的每单位剂量的量的所述聚肌胞苷酸多核苷酸佐剂和所述基于脂质的佐剂, 其中:

i) 与包括较高的每单位剂量的量的所述聚肌胞苷酸多核苷酸佐剂和所述基于脂质的佐剂的相同的对照组合物比较, 所述低的每单位剂量的量能够提供增强的免疫原性; 例如, 所述组合物诱导与所述相同的对照组合物相比高至少大约2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍或10倍的抗体免疫应答和/或与所述相同的对照组合物相比高至少1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍或5倍的细胞免疫应答; 和/或

ii) 与包括等价的每单位剂量的量或较高的每单位剂量的量的所述聚肌胞苷酸多核苷酸佐剂和所述基于脂质的佐剂、不包括所述两亲化合物, 并且被配制为油乳液组合物的相同的对照组合物比较, 所述低的每单位剂量的量能够提供增强的免疫原性; 例如, 所述组合物诱导与所述相同的对照组合物相比至少等价或高至少1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍或10倍的抗体免疫应答。

19. 权利要求18所述的组合物, 其中:

i) 所述较高的每单位剂量的量的聚肌胞苷酸多核苷酸佐剂和基于脂质的佐剂比所述低的每单位剂量的量的聚肌胞苷酸多核苷酸佐剂和基于脂质的佐剂大至少大约2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、15倍、20倍或50倍;

ii) 所述较高的每单位剂量的量的聚肌胞苷酸多核苷酸佐剂和基于脂质的佐剂是每个剂量至少大约10微克、大约15微克、大约20微克或更多;

iii) 所述低的每单位剂量的量的聚肌胞苷酸多核苷酸佐剂和基于脂质的佐剂是每个剂量大约0.2微克、大约0.5微克、大约1微克、大约5微克或更少; 和/或

iv) 对象接种疫苗之后大约十二周, 所述低的每单位剂量的量的聚肌胞苷酸多核苷酸佐剂和基于脂质的佐剂能够以至少大约 1.5×10^7 、 2.0×10^7 、 2.5×10^7 、 3.0×10^7 或 3.5×10^7

的非对数抗体效价诱导抗原特异性抗体免疫应答。

20. 权利要求2至19中任一项所述的组合物,其用于治疗或预防通过抗体免疫应答和/或细胞介导的免疫应答减轻的疾病或障碍;用于治疗或预防由细菌、病毒、真菌、寄生虫、变应原、或表达所述抗原的肿瘤细胞引起的疾病;和/或用于使用针对所述抗原产生的抗体中和毒素、病毒、细菌或变应原。

21. 一种方法,其包括给需要其的对象施用权利要求2至19中任一项所述的组合物。

22. 根据权利要求21所述的方法,其是用于诱导所述对象中针对所述抗原的抗体应答和/或细胞介导的免疫应答的方法。

23. 根据权利要求22所述的方法,其是用于治疗 and/或预防由细菌、病毒、真菌、寄生虫、变应原、或表达所述抗原的肿瘤细胞引起的疾病的方法。

24. 根据权利要求23所述的方法,其中所述疾病是流感、由人呼吸道合胞病毒引起的呼吸道感染、百日咳、炭疽、疟疾、或癌症。

25. 根据权利要求22所述的方法,其是用于治疗 and/或预防神经变性疾病的方法,其中所述神经变性疾病与所述抗原的表达相关联。

26. 一种使用抗体中和毒素、病毒、细菌或变应原的方法,所述方法包括给对象施用权利要求2至19中任一项所述的组合物。

27. 试剂盒,其在一个或多个单独的容器中包括聚肌胞苷酸多核苷酸佐剂;基于脂质的佐剂;两亲化合物;和疏水运载体,其中:

i) 所述聚肌胞苷酸多核苷酸佐剂;所述基于脂质的佐剂;所述两亲化合物;和所述疏水运载体每种在单独的容器中;

ii) 所述聚肌胞苷酸多核苷酸佐剂;所述基于脂质的佐剂;和所述两亲化合物一起在第一容器中并且所述疏水运载体在第二容器中;

iii) 所述聚肌胞苷酸多核苷酸佐剂和所述基于脂质的佐剂一起在第一容器中;所述两亲化合物在第二容器中;并且所述疏水运载体在第三容器中;

iv) 所述聚肌胞苷酸多核苷酸佐剂和所述基于脂质的佐剂一起在第一容器中并且所述两亲化合物和所述疏水运载体一起在第二容器中;或

v) 所述聚肌胞苷酸多核苷酸佐剂在第一容器中,所述基于脂质的佐剂在第二容器中,并且所述两亲化合物和所述疏水运载体一起在第三容器中。

28. 权利要求27所述的试剂盒,进一步包括:

i) 抗原,其中所述抗原与所述聚肌胞苷酸多核苷酸佐剂、所述基于脂质的佐剂、所述两亲化合物、所述疏水运载体、和/或其任意混合物中的任一种或多种一起在容器中;或所述抗原在单独的容器中;

ii) 辅助性T表位,其中所述辅助性T表位与所述聚肌胞苷酸多核苷酸佐剂、所述基于脂质的佐剂、所述两亲化合物、所述疏水运载体、所述抗原和/或其任意混合物中的任一种或多种一起在容器中;或所述T辅助物在单独的容器中,其中所述辅助性T表位被任选地缀合或融合至所述抗原并且此时与所述抗原在相同的容器中;和/或

iii) 用于制备药物组合物的说明和/或用于诱导对象中的抗体应答和/或细胞介导的免疫应答的说明。

29. 权利要求27或28所述的试剂盒,其用于制备无水或基本上不含水的组合物,其中所

述基本上不含水的组合物包括以重量/重量计所述运载体的总重量的小于大约10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.1%、0.05%或0.01%的水。

包括聚肌胞苷酸多核苷酸佐剂和基于脂质的佐剂的辅助系统 以及无水疫苗组合物

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2015年11月18日提交的美国临时专利申请号62/256,875的权益和优先权,其由此通过引用以其全部并入本文。

技术领域

[0003] 本公开内容一般地涉及辅助系统和疫苗组合物,其在诱导和/或加强免疫对象中的抗原特异性体液免疫应答和细胞介导的免疫应答中具有增强的功效。

背景技术

[0004] 包含限定的蛋白质或肽抗原的疫苗的免疫原性不足以生成快速的和持续的免疫力。这可以有时采用佐剂强化对抗原的免疫应答而被克服(Schijns和Lavelle 2011)。通常存在两个大类的佐剂:递送系统和免疫刺激剂(Dubensky和Reed 2010,Schijns和Lavelle 2011,Hafner,Corthesy et al.2013)。通过提供稳定性和抗原与免疫系统的持续的相互作用,疫苗的递送系统可以充当佐剂(Alving,Peachman et al.2012)。疫苗还可以掺入作为佐剂的具有免疫刺激活性的分子化合物,目的是通过直接激活免疫系统的细胞来进一步增强疫苗的免疫原性。

[0005] 免疫刺激性佐剂是限定的分子激动剂,其经由专用的受体由免疫系统识别,例如聚肌胞苷酸刺激Toll样受体3,并且Pam3CSK4 (SEQ ID NO:1) 刺激Toll样受体1/2 (Duthie, Windish et al.2011,Ogawa,Liu et al.2011)。免疫刺激剂可以激活免疫系统并且还指导针对疫苗抗原生成的免疫应答的类型。例如,许多疫苗的效力与抗体的生成相关;然而,对于其它类型的疫苗,主要由CD8+T细胞介导的强的细胞毒性免疫应答是期望的。可以通过包括免疫刺激剂来操纵针对疫苗抗原生成的免疫应答的类型,该免疫刺激剂激活在免疫细胞——其可以通过生成细胞因子和趋化因子起始这些应答——上发现的特定受体。

[0006] 基于铝的佐剂(共同称为alum)在当前许可的人和兽医疫苗中是最常见的(Gupta 1998,Wilson-Welder,Torres et al.2009)。通过混合抗原与铝盐比如氢氧化铝或磷酸铝制备alum疫苗(Gupta 1998,Stills 2005)。在注射之后,alum形成抗原的短期贮存(Gupta, Chang et al.1996)并且通过巨噬细胞促进疫苗的吞噬(Heimlich,Regnier et al.1999,Rimaniol,Gras et al.2004)。alum佐剂还可以充当免疫刺激物,这是由于它们已经显示激活由先天免疫细胞表达的NLRP3炎性体(Kang和Locksley 2009,He,Zou et al.2015)。通过在免疫位点处引起坏死、通过募集免疫细胞加强炎性应答,alum还间接地激活多种危险感测受体(Kool,Soullie et al.2008)。alum佐剂倾向于诱导以IL-4产生、IgG1与IgE抗体和嗜曙红细胞激活为特征的2型免疫应答(Wilson-Welder,Torres et al.2009)。

[0007] 乳液-制剂疫苗是基于铝的疫苗的替代物。通过使用油比如弗氏不完全佐剂(IFA)或Montanide™ISA51VG乳化溶解在水性缓冲液中的抗原来制备这些制剂。乳液制剂还形成短期贮存以促进通过先天免疫细胞的疫苗吞噬并且还导致2型免疫应答(Leenaars,Koedam

et al.1998)。在乳液中使用的油可以赋予独特的免疫刺激并且已经显示导致比alum辅助的疫苗更强的免疫应答(De Gregorio, Caproni et al.2013)。然而,由于抗原对免疫系统的无效呈递,乳液制剂可能导致T细胞耐受性(Aichele, Brduscha-Riem et al.1995, Hailemichael, Dai et al.2013)。乳液制剂还受实际考虑限制,比如它们可能制备麻烦、必需储存在2-8℃下和具有有限的保存期限(Koh, Higgins et al.2006, Kumru, Joshi et al.2014)。另外,乳液制剂与毒性和反应原性相关,其已经排除其批准用于人用途(Graham, McElrath et al.2010)。

[0008] 因为递送系统型佐剂和/或免疫刺激剂型佐剂之间和之中的相互作用或关联可能具有不可预测的效果,并且可能通常发生拮抗或无变应性而非协同,所以发现最佳的辅助系统是困难的。

[0009] 对如下辅助系统和疫苗组合物的研发存在需要:其用于针对各种抗原生成强的体液免疫应答和细胞介导的免疫应答。在本公开内容中,申请人描述了用于增强抗原特异性免疫原性的新型辅助系统和疫苗组合物。

发明内容

[0010] 在实施方式中,本公开内容涉及辅助系统,其包括:(a) 聚肌胞苷酸多核苷酸佐剂;(b) 基于脂质的佐剂;(c) 两亲化合物;和(d) 疏水运载体。

[0011] 在另一个实施方式中,本公开内容涉及组合物,其包括:(a) 抗原;(b) 聚肌胞苷酸多核苷酸佐剂;(c) 基于脂质的佐剂;(d) 两亲化合物;和(e) 疏水运载体。如本文描述的,组合物是无水的或基本上不含水。

[0012] 在本文描述的辅助系统和组合物的一些实施方式中,基于脂质的佐剂包括至少一个棕榈酸部分,比如例如,如本文描述的棕榈酸佐剂。在具体的实施方式中,基于脂质的佐剂是Pam-3-Cys-Ser-(Lys) 4 (Pam3CSK4; SEQ ID NO:1)。

[0013] 在本文描述的辅助系统和组合物的一些实施方式中,聚肌胞苷酸多核苷酸佐剂是近似分子量为989486道尔顿的聚肌胞苷酸的传统形式,其包含变化链长度的聚肌胞苷酸和聚胞苷酸的混合物(Thermo Scientific;USA)。

[0014] 在本文描述的辅助系统和组合物的一些实施方式中,两亲化合物是磷脂,比如例如DOPC或S100卵磷脂,其在实施方式中与胆固醇一起使用。

[0015] 在本文描述的辅助系统和组合物的一些实施方式中,疏水运载体是油,比如例如基于矿物油的运载体(例如Montanide® ISA 51)。

[0016] 在另一个实施方式中,本公开内容涉及包括给需要其的对象施用如本文描述的组合物方法,其用于诱导所述对象中对所述抗原的抗体应答和/或细胞介导的免疫应答。

[0017] 在另一个实施方式中,本公开内容涉及用于治疗 and/或预防由细菌、病毒、真菌、寄生虫、变应原、或表达抗原的肿瘤细胞引起的疾病的方法,所述方法包括给对象施用如本文描述的组合物。

[0018] 在另一个实施方式中,本公开内容涉及治疗和/或预防神经变性疾病的方法,其中神经变性疾病与抗原的表达相关,所述方法包括给对象施用如本文描述的组合物。

[0019] 在另一个实施方式中,本公开内容涉及用于使用抗体中和毒素、病毒、细菌或变应原的方法,所述方法包括给对象施用如本文描述的组合物。

[0020] 在另一个实施方式中,本公开内容涉及试剂盒,其在一个或多个单独的容器中包括聚肌胞苷酸多核苷酸佐剂;基于脂质的佐剂;两亲化合物;和疏水运载体。

[0021] 在查阅下列描述连同所附权利要求和附图之后,本公开内容的其它方面、实施方式和特征将对本领域技术人员将变得明显。

附图说明

[0022] 在附图中,其仅借助实例图解了本发明的实施方式:

[0023] 图1图解了响应于以基于油的无水疫苗——其不包含佐剂,包含聚肌胞苷酸、Pam3CSK4 (SEQ ID NO:1) 或聚肌胞苷酸和Pam3CSK4 (SEQ ID NO:1) 的组合——接种疫苗的抗体效价和功能活性。以在基于油的无水疫苗——其不包含佐剂(组1),包含单独的聚肌胞苷酸(组2)、单独的Pam3CSK4 (SEQ ID NO:1) (组3) 或聚肌胞苷酸和Pam3CSK4 (SEQ ID NO:1) 的组合(组4)——中配制的重组PA炭疽抗原给CD-1小鼠 (n=10) 接种疫苗。图1a:使用ELISA 随着时间测量血清中的抗体效价,通过双向ANOVA以及Bonferroni事后检验与组1比较进行统计学分析。图1b:在第8周测量血清的炭疽毒素中和酸性,通过单向ANOVA以及Tukey事后检验进行统计学分析。

[0024] 图2图解了在免疫之后12周测量的血清抗体应答。以在alum辅助的疫苗(组1)、具有1微克的每种聚肌胞苷酸和Pam3CSK4 (SEQ ID NO:1) 佐剂的基于油的无水疫苗(组2)、具有20微克的每种聚肌胞苷酸和Pam3CSK4 (SEQ ID NO:1) 佐剂的基于油的无水制剂(组3)、具有1微克的每种聚肌胞苷酸和Pam3CSK4 (SEQ ID NO:1) 佐剂的乳液(组4)、或20微克的每种聚肌胞苷酸和Pam3CSK4 (SEQ ID NO:1) 佐剂的乳液(组5) 中配制的重组HA抗原给小鼠 (CD-1) 接种疫苗。通过比较指示的组的学生T检验进行统计学分析。

[0025] 图3图解了以多种剂量的聚肌胞苷酸和Pam3CSK4 (SEQ ID NO:1) 佐剂组合接种疫苗的小鼠的IFN- γ ELISPOT应答。以基于油的无水疫苗制剂——其包含下列剂量的聚肌胞苷酸和Pam3CSK4 (SEQ ID NO:1) 佐剂组合:0.2微克(组1)、1.0微克(组2)、5.0微克(组3)、10.0微克(组4)——中的R9F-PADRE抗原给C57BL6小鼠 (n=4) 接种疫苗。使用在接种疫苗后八天从小鼠分离的脾细胞进行IFN- γ ELISPOT,一只幼稚的、未接种疫苗的小鼠充当阴性对照。应答显示为平均数 $\pm$ SEM。通过单向ANOVA以及Tukey事后检验进行统计,*p<0.05。

具体实施方式

[0026] 高度纯化的和合成的抗原,比如蛋白质或肽,是差免疫原性的并且因而需要免疫刺激剂比如佐剂以促进稳健的免疫应答。通常存在两个大类的佐剂:递送系统和免疫刺激剂(Dubensky和Reed 2010,Schijns和Lavelle 2011,Hafner,Corthesy et al.2013)。

[0027] alum佐剂在当前许可的人和兽医疫苗中是最常见的(Gupta 1998,Wilson-Welder,Torres et al.2009)。alum佐剂倾向于诱导以IL-4产生、IgG1与IgE抗体和嗜曙红细胞激活为特征的2型免疫应答(Wilson-Welder,Torres et al.2009)。

[0028] 乳液-制剂疫苗是基于铝的疫苗的替代物。乳液制剂形成短期贮存以促进通过先天免疫细胞的疫苗吞噬并且还倾向于诱导2型免疫应答(Leenaars,Koedam et al.1998)。虽然乳液已经显示导致比alum辅助的疫苗更强的免疫应答(De Gregorio,Caproni et al.2013),但是这些制剂具有显著的限制(例如T细胞耐受性、毒性和反应原性),其已经排

除其批准用于人用途 (Graham, McElrath et al. 2010)。

[0029] 免疫刺激物佐剂可以被掺入alum或乳液疫苗,其目标是增加疫苗免疫原性和促进1型免疫应答的发展。1型免疫应答的特征在于细胞毒性T淋巴细胞的活性并且对某些疫苗适应症是期望的 (Hansen, Met et al. 2012, Gallo 2015)。作为实例,toll样受体 (TLR) 的激动剂可以被用于此目的 (Duthie, Windish et al. 2011)。

[0030] TLR是作为病原体相关分子模式 (PAMP) 的传感器起作用的一组受体。TLR主要在先天免疫细胞上发现并且到它们的激活的TLR信号传导导致针对表达PAMP的病原体的类型定制的独特免疫应答 (Duthie, Windish et al. 2011)。存在在人中表达的10种TLR蛋白 (Chang 2010)。每种TLR专用于检测某种类型的PAMP;PAMP激动剂包括分子比如双链DNA和RNA、鞭毛蛋白、细菌脂肽、和脂多糖。这些受体具有结构同源性,其共享富含亮氨酸的重复的马蹄形细胞外结构、单个螺旋跨膜结构域、和细胞内Toll-白介素1受体信号传导结构域 (TIR) 基序 (Watters, Kenny et al. 2007, Song和Lee 2012)。大多数TLR在细胞表面膜上发现,但是一组细胞内TLR——3、7、8、和9——在内膜比如内体上表达并且识别多种形式的核酸 (Chang 2010)。

[0031] TLR在连接各自的配体——其起始下游信号传导级联——之后装配为同源二聚体 (Song和Lee 2012)。TLR2是例外,因其与TLR1或TLR6并且可能在人与TLR10形成异源二聚体 (Govindaraj, Manavalan et al. 2010)。每种TLR2异源二聚体具有不同的配体特异性 (Takeuchi, Sato et al. 2002)。TLR作为免疫刺激佐剂的靶标是最广泛研究的受体类别,这是因为它们的配体中的许多是已知的并且可以合成地生产 (Duthie, Windish et al. 2011)。然而,其它类别的受体可以是新型免疫刺激佐剂的重要的靶标 (Pulendran和Ahmed 2006, Ishii和Akira 2007)。

[0032] TLR激动剂可以合成地制作并且包括在疫苗制剂中,其目标是通过刺激特定类型的免疫细胞来刺激特定类型的免疫应答。当组合时,一些TLR激动剂已经展现了协同活性。最强力的组合中的一些是与聚肌胞苷酸 (TLR3激动剂) 或LPS (TLR4激动剂),这可能是因为TLR3和TLR4使用TRIF衔接蛋白发信号而其余TLR主要依赖于MyD88衔接蛋白 (Napolitani, Rinaldi et al. 2005, Ghosh, Mickelson et al. 2007, Wells, Cowled et al. 2008, Zhu, Egelston et al. 2008, Suet Ting Tan, Lin et al. 2013)。然而,由于预暴露于一种TLR激动剂可能导致对其它激动剂的耐受性,时机是关键的 (Sato, Nomura et al. 2000, Bagchi, Herrup et al. 2007)。

[0033] 聚肌胞苷酸是激活TLR3的合成的双链RNA分子。聚肌胞苷酸还可以刺激RIG-I和MDA5、感测核酸并且参与抗病毒免疫力的非TLR细胞内受体 (Kato, Takeuchi et al. 2006)。通过这三种受体,聚肌胞苷酸导致产生引起1型免疫应答的1型干扰素 (Hafner, Cortes et al. 2013)。在体内,以聚肌胞苷酸辅助的疫苗可以诱导强力的细胞毒性T细胞免疫应答 (Zhu, Fallert-Junecko et al. 2010, Tsuji, Sabbatini et al. 2013)。然而,由于这些受体在各种细胞上的表达,使用聚肌胞苷酸作为佐剂由于可能导致的全身毒性受到限制 (Anders, Zecher et al. 2005, Farina, York et al. 2010)。

[0034] Pam3CSK4 (SEQ ID NO:1) 是合成的细菌三酰基脂肽,其激活TLR1/2异源二聚体。Pam3CSK4 (SEQ ID NO:1) 是B细胞的强力的活化剂并且可以刺激类别转换的抗体的体外产生 (Agrawal和Gupta 2011, Pone, Zhang et al. 2012, Pone, Lou et al. 2015)。在体内,包含

Pam3CSK4 (SEQ ID NO:1) 作为佐剂的疫苗可以诱导强力的抗体介导的免疫力 (Stegmann, Kamphuis et al.2010,Caproni,Tritto et al.2012)。

[0035] 由于其互补增强免疫系统的不同方面,聚肌胞苷酸和Pam3CSK4 (SEQ ID NO:1) 的组合具有成为有效的佐剂系统的潜力。就这一点而言,以聚肌胞苷酸和Pam3CSK4 (SEQ ID NO:1) 的组合进行刺激已经报道对巨噬细胞 (Bagchi,Herrup et al.2007) 和树突细胞 (Vanhoutte,Page et al.2008) 具有体外协同活性。当过继性地转移至荷瘤小鼠时,以聚肌胞苷酸和Pam3CSK4 (SEQ ID NO:1) 体外活化并且装载抗原的树突细胞可以有效地提供保护免于肿瘤生长 (Lim,Kuhn et al.2012)。在美国专利号8,216,595 (Moon et al.2012) 中,聚肌胞苷酸和Pam3CSK4 (SEQ ID NO:1) 被用作乳液疫苗中的佐剂系统,每种剂量是20微克。以未公开的剂量体积肌肉内施用疫苗。然而,基于小鼠中此类型注射的当前指南,假设剂量体积是50微升 (Diehl,Hull et al.2001)。

[0036] 本公开内容涉及新型辅助系统,其包括:(a) 聚肌胞苷酸多核苷酸佐剂;(b) 基于脂质的佐剂;(c) 两亲化合物;和(d) 疏水运载体。本文公开的疫苗组合物额外地包括至少一种抗原。

[0037] 如本文展现的,现在已经令人吃惊地和出乎意料地发现无水疫苗组合物——其包括本文公开的辅助系统——能够以较低剂量的聚肌胞苷酸和基于脂质的佐剂生成显著较高的抗体效价和较强力的细胞介导的免疫应答。

[0038] 如本文使用的,术语“剂量”和“每单位剂量”可以可交换地使用。术语意图指的是在每次施用的情况下给予对象的疫苗组分(例如抗原、佐剂等)的总量或总数量。

[0039] 使用本文公开的组合物以仅一次免疫提高稳健的和持久的抗原特异性抗体免疫应答的能力(实施例1)说明了辅助系统和组合物在大范围的医学应用中具体的有用性,比如例如本文描述的那些。在无水疫苗组合物中,与包括仅一种佐剂的组合物比较,本文公开的辅助系统能够生成显著更高的抗体效价持续延长的时段(图1)。而且,使用本文公开的辅助系统生成的抗体具有增加的功能性能力(图2)。

[0040] 在下面的表1和2中概述了在本文的实施例2和3中描述的数据。

[0041] 表1:

[0042]

	组合物	抗体效价(log 10)	SEM	抗体效价(非对数)
(1)	HA 抗原 alum 佐剂 PBS 运载体	5.182	0.168	260,000
(2)	HA 抗原 聚肌胞苷酸(1 µg) Pam3CSK4 (SEQ ID NO: 1) (1 µg) S100 脂质/胆固醇 无水油运载体	7.252	0.192	29,440,000
(3)	HA 抗原 聚肌胞苷酸(20 µg) Pam3CSK4 (SEQ ID NO: 1) (20 µg) S100 脂质/胆固醇 无水油运载体	6.462	0.161	4,544,000
(4)	HA 抗原 聚肌胞苷酸(1 µg) Pam3CSK4 (SEQ ID NO: 1) (1 µg) 油乳液	6.537	0.144	4,096,000
(5)	HA 抗原 聚肌胞苷酸(20 µg) Pam3CSK4 (SEQ ID NO: 1) (20 µg) 油乳液	7.064	0.194	15,360,000

[0043] HA抗原=H5N1,甲型/越南/1203/2004;蛋白质科学(Protein Sciences),美国

[0044] PBS=磷酸盐缓冲盐水

[0045] 由上面的表格(表1)可见,本文公开的疫苗组合物能够提供显著增强的抗体免疫应答,甚至在20倍更低剂量的佐剂的情况下。以如本文公开的无水基于油的组合物中1微克的聚肌胞苷酸和Pam3CSK4 (SEQ ID NO:1) 佐剂(组2)生成的抗体免疫应答比油乳液组合物中等价的剂量(组4)大多于7倍,并且比包括20倍更多(即20微克)的聚肌胞苷酸和Pam3CSK4 (SEQ ID NO:1) 佐剂的油乳液组合物(组5)大大约2倍。另外,当使用20倍更低剂量的佐剂时,通过本文公开的无水组合物生成的抗体免疫应答是大约6.5倍更大(比较组2和组3)。这些结果是令人吃惊的和出乎意料的。

[0046] 表2:

[0047]

	组合物	通过 ELISPOT 的斑点形成单位(SFU)
(1)	R9F 抗原 PADRE 辅助性 T 表位 聚肌胞苷酸(0.2 μ g) Pam3CSK4 (SEQ ID NO: 1) (0.2 μ g) DOPC/胆固醇 无水油运载体	418 $\pm$ 13
(2)	R9F 抗原 PADRE 辅助性 T 表位 聚肌胞苷酸(1 μ g) Pam3CSK4 (SEQ ID NO: 1) (1 μ g) DOPC/胆固醇 无水油运载体	260 $\pm$ 70
(3)	R9F 抗原 PADRE 辅助性 T 表位 聚肌胞苷酸(5 μ g) Pam3CSK4 (SEQ ID NO: 1) (5 μ g) DOPC/胆固醇 无水油运载体	247 $\pm$ 76
(4)	R9F 抗原 PADRE 辅助性 T 表位 聚肌胞苷酸(10 μ g) Pam3CSK4 (SEQ ID NO: 1) (10 μ g) DOPC/胆固醇 无水油运载体	149 $\pm$ 25

[0048] R9F抗原=HPV16E7₄₉₋₅₇ (RAHYNIVTF;SEQ ID NO:2)

[0049] DOPC=1,2-二油酰-sn-丙三基-3-磷酸胆碱

[0050] 由上面的表格(表2)可见,本文公开的无水疫苗组合物能够刺激强力的细胞介导的免疫应答。令人吃惊地,当以较低剂量的聚肌胞苷酸和Pam3CSK4(SEQ ID NO:1)佐剂使用时,组合物是最有效的。以1微克(组2)和5微克(组3)的聚肌胞苷酸和Pam3CSK4(SEQ ID NO:1)佐剂给药的疫苗组合物比以10微克的聚肌胞苷酸和Pam3CSK4(SEQ ID NO:1)佐剂(组4)给药的疫苗组合物几乎2倍更有效。降低剂量甚至进一步至0.2微克的聚肌胞苷酸和Pam3CSK4(SEQ ID NO:1)佐剂(组1)导致甚至更有效的细胞介导的免疫应答,其是以1和5微克剂量获得的应答的大约1.5倍并且是以10微克剂量获得的应答的大约2.8倍。这些结果是令人吃惊的和出乎意料的。

[0051] 由本文描述的实例清楚的是,本文公开的辅助系统和疫苗组合物能够诱导不寻常强的抗体和细胞介导的免疫应答,并且令人吃惊地,随着佐剂的剂量增加,通过血清抗体或IFN- γ ELISPOT应答测量的免疫应答降低。

[0052] 辅助系统

[0053] 在实施方式中,本文公开了用于疫苗组合物或其它药物组合物的辅助系统。辅助

系统包括：(a) 聚肌胞苷酸多核苷酸佐剂；(b) 基于脂质的佐剂；(c) 两亲化合物；和 (d) 疏水运载体。

[0054] 在一些实施方式中，辅助系统可以是无水或基本上无水制剂，其包括聚肌胞苷酸多核苷酸佐剂；基于脂质的佐剂；两亲化合物；和疏水运载体。在一些实施方式中，辅助系统可以是包括聚肌胞苷酸多核苷酸佐剂；基于脂质的佐剂；两亲化合物；和疏水运载体的制剂，其可以任选地通过本领域已知的方法被干燥（例如冷冻干燥、冻干、旋转蒸发、加压蒸发等）以形成无水或基本上无水制剂。

[0055] 如本文使用的，术语“辅助系统”指的是组分的组合，其一起能够增加疫苗组合物诱导或加强对疫苗组合物中的一种或多种抗原的抗原特异性免疫应答——例如抗体免疫应答和/或细胞介导的免疫应答——的功效。在如本文描述的具体实施方式中，辅助系统被用于制备无水的或基本上不含水的疫苗组合物。

[0056] “增加疫苗组合物的功效”的意思是本文公开的辅助系统，当在疫苗组合物中使用，能够诱导增强的免疫原性，例如增强的抗体和/或细胞介导的免疫应答。增强的免疫应答可以例如与如下进行比较：(i) 不包括本文公开的辅助系统的所有组分的组合物；(ii) 不是无水的或基本上不含水的组合物（例如乳液）；和/或 (iii) 包含较高的每单位剂量的量的聚肌胞苷酸和/或基于脂质的佐剂的组合物。

[0057] 在另一个实施方式中，“增加疫苗组合物的功效”的意思是本文公开的辅助系统，当在疫苗组合物中使用，能够以较低的每单位剂量的量被施用，同时仍提供有效的抗体和/或细胞介导的免疫应答。在实施方式中，通过使用较低的每单位剂量的量的佐剂（在如本文公开的疫苗组合物中）生成的免疫应答至少等价于以较高的每单位剂量的量生成的免疫应答。在其它实施方式中，通过使用较低的每单位剂量的量的佐剂（在如本文公开的疫苗组合物中）生成的免疫应答强于以较高的每单位剂量的量生成的免疫应答。

[0058] 如本文使用的，“增强的免疫原性”或“增强的免疫应答”意思是免疫应答有利于对象被提高、改进或强化。增强可以例如相对于对象的先前的免疫应答状态（例如在应用如本文公开的组合物前）或与由替代组合物提供的免疫应答进行比较。

[0059] 聚肌胞苷酸多核苷酸佐剂

[0060] 聚肌胞苷酸多核苷酸是包含肌苷酸残基 (I) 和胞苷酸残基 (C) 的多核苷酸分子 (RNA或DNA，或DNA和RNA的组合)，并且其诱导炎性细胞因子比如干扰素的产生。在一些实施方式中，聚肌胞苷酸多核苷酸是双链的。在这样的实施方式中，它们通常由如下组成：完全由包含胞嘧啶的核苷酸构成的一条链和完全由包含肌苷的核苷酸构成的一条链，但是其它构型是可能的。例如，每条链可以包含含有胞嘧啶的核苷酸和含肌苷的核苷酸二者。在一些情况下，任一条链或两条链可以另外包含一个或多个非胞嘧啶或非肌苷核苷酸。

[0061] 在另一个实施方式中，聚肌胞苷酸多核苷酸可以是包含肌苷酸残基 (I) 和胞苷酸残基 (C) 的单链分子。作为实例，并且非限制性地，单链聚肌胞苷酸可以是重复dIdC的序列。在具体的实施方式中，单链聚肌胞苷酸的序列可以是 (IC)₁₃ 的 26-mer 序列，即 ICICICICICICICICICICICICICIC (SEQ ID NO:3)。如技术人员将领会的，由于它们的性质（例如互补性），预期重复dIdC的这些单链分子将天然地形成同源二聚体，所以它们在概念上类似于聚肌苷酸/聚胞苷酸二聚体。

[0062] 已经报道了聚肌胞苷酸可以每16个残基被分段而没有对其干扰素激活潜能的影

响(Bobst,1981)。另外,通过每12个重复胞苷酸残基引入尿苷残基错配的聚肌胞苷酸分子的干扰素诱导潜能(Hendrix,1993),表明12个残基的最小双链聚肌胞苷酸分子足以促进干扰素产生。其它也已经表明小至6-12个残基的区域——其相当于双链多核苷酸的0.5-1个螺旋转角——能够触发诱导过程(Greene,1978)。如果合成地制作,则聚肌胞苷酸多核苷酸的长度通常是大约20或更多个残基(一般22、24、26、28或30个残基的长度)。如果半合成地制作(例如使用酶),则链的长度可以是500、1000或更多个残基。

[0063] 聚肌胞苷酸充当病毒基因组的模拟物并且对体内调节免疫系统特别有用。合成的聚肌胞苷酸均聚物例如已经被报道当通过静脉内或肌肉内注射体内全身递送时通过非特异性地诱导干扰素 γ 来增强先天免疫(Krown 1985,Zhu 2007)。多年来已经描述了聚肌胞苷酸和胞苷酸聚合物的数种变体(de Clercq 1978,Bobst 1981,de Clercq 1975,Guschlbauer 1977,Fukui 1977,Johnston 1975,美国专利号3,906,092,Kamath 2008,Ichinohe 2007),其中的一些包括使用共价修饰的残基、使用核糖和脱氧核糖肌苷酸和胞苷酸残基、使用包含肌苷酸和胞苷酸残基的均聚物和交替共聚物、和引入特定的残基以产生错配的聚合物。

[0064] 已经报道将包含肌苷酸和胞苷酸的双链多核苷酸用于治疗大量病毒性疾病(Kende 1987,Poast 2002,美国专利号6,468,558,Sarma 1969,Stephen 1977,Levy 1978)、癌症(Durie 1985,Salazar 1996,Theriault 1986,Nakamura 1982,Talmadge 1985,Droller 1987)、自身免疫性疾病如多发性硬化(Bever 1986)、和其它传染性疾病比如疟疾(Awasthi 1997,Puri 1996)。聚肌胞苷酸分子的功效在一些情况下已经被进一步增强,其通过使分子与带正电荷的聚赖氨酸和羧甲基纤维素络合,有效地保护多核苷酸免于体内核酸酶降解(Stephen 1977,Levy 1985),或通过使聚肌胞苷酸与带正电荷的合成肽络合(Schellack 2006)。

[0065] 除其用作先天免疫的非特异性增强剂之外,聚肌胞苷酸还被用作疫苗组合物中的佐剂。先天免疫的增强可以导致增强的抗原特异性适应性免疫,其可能通过至少部分涉及NK细胞、巨噬细胞和/或树突细胞的机制(Chirigos 1985,Salem 2006,Alexopoulou 2001,Trumpfheller 2008)。在此背景下使用聚肌胞苷酸分子的证据源自用于防治传染性疾病(Houston 1976,Stephen 1977,Ichinohe 2007,Sloat 2008,Agger 2006,Padalko 2004)和通过各种疫苗模式预防或治疗癌症(Zhu 2007,Cui 2006,Salem 2005,Fujimura 2006,Llopiz 2008)的多种疫苗研究。由针对特异性传染性疾病抗原增强的抗体应答明显可见,这些研究展现了聚肌胞苷酸增强体液应答。聚肌胞苷酸还是抗原特异性细胞应答的增效剂(Zhu 2007,Zaks 2006,Cui 2006,Riedl 2008)。至少部分通过它们与tol1样受体(TLR)比如TLR3、TLR4、TLR7、TLR8和TLR9的相互作用诱导干扰素- γ (Alexopoulou 2001,Trumpfheller 2008,Schellack 2006,Riedl 2008)——其中TLR3对于大多数聚肌胞苷酸分子特别相关,认为发生了聚肌胞苷酸分子的辅助作用。证据还表明至少部分通过与除TLR之外的受体,比如RNA解旋酶视黄酸诱导的蛋白I(RIG-I)/黑素瘤分化相关基因5(MDA5)相互作用,聚肌胞苷酸分子可以发挥其作用(Alexopoulou 2001,Yoneyama 2004,Gowen 2007,Dong 2008)。聚肌胞苷酸分子的作用机制被完全地理解。

[0066] 因此,如本文使用的,“聚肌胞苷酸”、“聚肌胞苷酸多核苷酸”或“聚肌胞苷酸多核苷酸佐剂”是双链或单链多核苷酸分子(RNA或DNA,或DNA和RNA的组合),其每条链包含至少

6个连续的肌苷酸或胞苷酸残基,或以任何顺序选自肌苷酸和胞苷酸的6个连续的残基(例如IICIC(SEQ ID NO:4)或ICICIC(SEQ ID NO:5)),并且其能够诱导或增强哺乳动物对象中至少一种炎性细胞因子比如干扰素的产生。聚肌胞苷酸多核苷酸将通常具有大约8、10、12、14、16、18、20、22、24、25、26、28、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、150、200、250、300、500、1000或更多个残基的长度。优选的聚肌胞苷酸多核苷酸可以具有大约6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、或30个核苷酸的最小长度和大约1000、500、300、200、100、90、80、70、60、50、45或40个核苷酸的最大长度。

[0067] 双链聚肌胞苷酸多核苷酸的每条链可以是肌苷酸或胞苷酸残基的均聚物,或每条链可以是包含肌苷酸和胞苷酸残基二者的杂聚物。在任一种情况下,聚合物可以被一个或多个非肌苷酸或非胞苷酸残基(例如尿苷)中断,条件是存在如上面描述的6个I、6个C或6个I/C残基的至少一个连续的区域。通常,聚肌胞苷酸多核苷酸的每条链将包含每6个I/C残基不多于1个非I/C残基,更优选地,每8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28或30个I/C残基不多于1个非I/C残基。

[0068] 可以如本领域已知的衍生化或修饰聚肌胞苷酸多核苷酸中的肌苷酸或胞苷酸(或其它)残基,条件是保留聚肌胞苷酸多核苷酸促进产生炎性细胞因子比如干扰素的能力。衍生物或修饰的非限制实例包括例如叠氮基修饰、氟修饰、或使用硫酯(或类似的)键代替天然的磷酸二酯键以增强体内稳定性。聚肌胞苷酸多核苷酸还可以被修饰以例如增强其对体内降解的抗性,其通过例如使分子与带正电荷的聚赖氨酸和羧甲基纤维素络合,或与带正电荷的合成肽络合。

[0069] 在一些实施方式中,聚肌胞苷酸多核苷酸佐剂是传统形式的聚肌胞苷酸,其中近似分子量为989,486道尔顿,其包含不同链长度的数百个碱基对的聚肌苷酸和聚胞苷酸的混合物(Thermo Scientific;USA)。

[0070] 确定适当的每单位剂量的聚肌胞苷酸多核苷酸在本领域技术人员的能力内,尤其是鉴于本文提供的公开内容。在一些实施方式中,每单位剂量将是与常规比较低剂量的量的聚肌胞苷酸多核苷酸佐剂。如本文公开的,辅助系统能够以低的每单位剂量的量的佐剂生成强免疫应答。在实施方式中,如在小鼠中计算的,低剂量的量的聚肌胞苷酸多核苷酸佐剂是每单位剂量的组合物小于10、9、8、7、6、5、4、3、2、1或0.5微克,或对于人等价转换的每单位剂量。在具体的实施方式中,如在小鼠中计算的,低剂量的量的聚肌胞苷酸多核苷酸佐剂是每单位剂量大约0.2、0.3、0.4、0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5或5微克,或对于人等价转换的剂量。小鼠中的典型剂量体积是例如50微升。非限制性地,人中的典型剂量体积可以在50-500微升之间。因而,在一些实施方式中,人中转换的低剂量的量将在2-50微克之间,例如每单位剂量大约2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、40或50微克。

[0071] 基于脂质的佐剂

[0072] 如本文使用的,基于脂质的佐剂是包括至少一个脂质部分或脂质组分的佐剂。

[0073] 表述“脂质部分”或“脂质组分”指的是任何脂肪酸(例如脂肪酰基)或其衍生物,包括例如甘油三酯、甘油二酯、和甘油单酯。示例性脂肪酸非限制性地包括棕榈酰基、肉豆蔻酰基、硬脂酰基和癸酰基或任何C2至C30饱和或不饱和脂肪酰基,优选地任何C14至C22饱和或不饱和脂肪酰基,并且更优选地C16饱和或不饱和脂肪酰基。因而,如本文提及的,表述“基于脂质的佐剂”涵盖包括脂肪酰基或其衍生物的佐剂。

[0074] 基于脂质的佐剂以最低水平包含至少一个脂质部分,或合成的/半合成的脂质部分类似物,其可以被连接至氨基酸、寡肽或其它分子(例如碳水化合物、聚糖、多糖、生物素、罗丹明等)上。因而,非限制性地,基于脂质的佐剂可以是,例如,脂氨基酸、脂肽、脂聚糖、脂多糖或脂磷壁酸。而且,脂质部分或包含脂质部分的结构可以被共价或非共价连接至抗原以产生具有内置(built-in)辅助性质的抗原化合物。例如,并且非限制性地,基于脂质的部分可以包括阳离子(例如镍)以给非共价连接提供正电荷。在一些实施方式中,脂质部分或包含脂质部分的结构可以通过在颗粒——非限制性地包括脂质体、PGLA纳米颗粒、树状聚体或任何其它合适的颗粒——中共包囊被连接至抗原,其目的是促使或保持脂质部分紧密靠近抗原,使得它们可以被高效地共递送。

[0075] 在一些实施方式中,脂质部分或脂质组分可以是天然存在的,比如例如来自革兰氏阳性或革兰氏阴性菌的细胞壁组分(例如脂蛋白)、绿色红假单胞菌、或支原体。在其它实施方式中,脂质部分或脂质组分可以是合成的或半合成的。

[0076] 基于脂质的佐剂可以包括棕榈酸(PAM),作为佐剂的脂质部分或组分中的至少一种。这样的基于脂质的佐剂在本文被称为“棕榈酸佐剂”。棕榈酸是在大肠杆菌的免疫反应性Braun脂蛋白中发现的低分子量脂质。棕榈酸的其它常见化学名称包括,例如,以IUPAC命名法的十六酸和1-十五羧酸。棕榈酸的分子式是 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{CO}_2\text{H}$ 。如本领域技术人员将理解的,可以变更棕榈酸的脂质链是可能的。例如,如美国专利公布US 2008/0233143;US 2010/0129385;和US 2011/0200632中描述了可以在本文用作棕榈酸佐剂的示例性化合物,以及它们的合成方法,其公开内容并入本文。

[0077] 如上面对脂质部分一般描述的,棕榈酸佐剂以最低水平包含至少一个棕榈酸部分,其可以被连接至氨基酸、寡肽或其它分子上。棕榈酸部分或包含棕榈酸的结构可以被共价或非共价连接至抗原以产生具有内置辅助性质的抗原化合物。棕榈酸部分或包含棕榈酸的化学结构可以被缀合至半胱氨酸肽(Cys)以允许佐剂的多种结构构型,包括线性和支化结构。半胱氨酸残基一般在C端处由极性残基比如丝氨酸(Ser)和/或赖氨酸(Lys)延伸以产生具有提高的可溶性的佐剂化合物。包含棕榈酸的佐剂化合物可以与抗原混杂,通过非共价相互作用与抗原缔合,或可选地共价连接至抗原——直接地或借助连接体/间隔区——以生成增强的免疫应答。最一般地,两个棕榈酸部分被附加至丙三基骨架和半胱氨酸残基以产生二棕榈酰-S-丙三基-半胱氨酸(PAM_2Cys)或三棕榈酰-S-丙三基-半胱氨酸(PAM_3Cys),其还可以被用于如上面描述的多种构型。

[0078] 棕榈酸佐剂已知激活引起抗体快速增殖和产生的B细胞。识别与疫苗制剂中的佐剂共递送的抗原并且通过亲和力成熟的B细胞将随着对抗原的增加的特异性增殖。激活的B细胞已知分泌大量的可溶性免疫球蛋白抗体,其可以结合至在血液中存在可溶性靶标,比如细菌。抗体效应子功能是i) 调理; ii) 抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC); iii) 补体激活; iv) 中和。虽然大多数B细胞将成熟为分泌抗体的浆细胞,但是一部分应当分化为记忆B细胞,其在免疫应答已经控制感染后存留。这提供了针对后续暴露于病原体的长期免疫力。理想地,预防性疫苗应当诱导强的记忆B细胞群。

[0079] 因此,在实施方式中,基于脂质的佐剂是任何类型的包括棕榈酸部分或组分的佐剂。在实施方式中,基于脂质的佐剂是包括一种或多种棕榈酸部分的脂肽。棕榈酸部分可以被修饰或操纵以提高其体外或体内稳定性,增强其与受体的结合(比如例如,如下面描述的

tol1样受体)或增强其生物学活性。

[0080] 在具体的实施方式中,棕榈酸佐剂可以包括PAM₂Cys。

[0081] 在另一个具体的实施方式中,棕榈酸佐剂可以包括PAM₃Cys。

[0082] 在另一个具体的实施方式中,棕榈酸佐剂可以是Pam-2-Cys-Ser-(Lys) 4 (SEQ ID NO:1) 或Pam-3-Cys-Ser-(Lys) 4 (SEQ ID NO:1)。这样的棕榈酸佐剂是可获得的,例如,作为来自EMC Microcollections GmbH(德国)和InvivoGen(美国加利福尼亚州圣迭戈市)的研究试剂。

[0083] 从EMC Microcollections还可获得的是Pam-2-Cys-Ser-(Lys) 4 (SEQ ID NO:1) 和Pam-3-Cys-Ser-(Lys) 4 (SEQ ID NO:1) 的多种类似物,包括标记的类似物。这些类似物在本文被涵盖并且非限制性地包括PAM₃Cys-SK₄ (SEQ ID NO:1) (β -照射的)、R-PAM₃Cys-SK₄ (SEQ ID NO:1)、

[0084] S-PAM₃Cys-SK₄ (SEQ ID NO:1)、PAM₃Cys-SK₄ (生物素-Aca-Aca)

[0085] (SEQ ID NO:1)、PAM₃Cys-SK₄ (荧光素-Aca-Aca) (SEQ ID NO:1)、

[0086] PAM₃Cys-SK₄ (罗丹明-Aca-Aca) (SEQ ID NO:1)、

[0087] PAM₃Cys-SK₄-FLAG-标签 (SEQ ID NO:1)、

[0088] PAM₃Cys-SSNAKIDQLSSDVQT (SEQ ID NO:6)、

[0089] PAM₃Cys-SSNKSTTGSGETTTA (SEQ ID NO:7)、

[0090] PAM₃Cys-SSTKPVSQDTSPKPA (SEQ ID NO:8)、

[0091] PAM₃Cys-SSGSKPSGGPLPAK (SEQ ID NO:9)、

[0092] PAM₃Cys-SSGNKSAPSSSASSS (SEQ ID NO:10)、

[0093] PAM₃Cys-GSHQMKSEGHANMQL (SEQ ID NO:11)、

[0094] PAM₃Cys-SSSNDAAGNGAAQT (SEQ ID NO:12)、

[0095] PAM₃Cys-KQNVSSLDEKNSVSV (SEQ ID NO:13)、

[0096] PAM₃Cys-NNSGKDGNTSANSAD (SEQ ID NO:14)、

[0097] PAM₃Cys-NNGGPELKSDEVAKS (SEQ ID NO:15)、

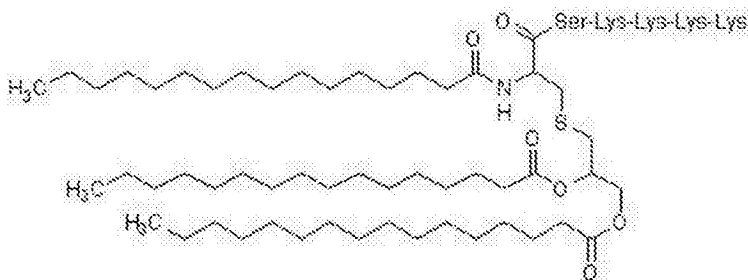
[0098] PAM₃Cys-SQEPAAPAAEATPAG (SEQ ID NO:16)、

[0099] PAM₃Cys-SSSKSSDSSAPKAYG (SEQ ID NO:17)、

[0100] PAM₃Cys-AQEKEAKSELDYDQT (SEQ ID NO:18)、Pam₂Cys-SK₄ (RR和RS立体异构体的混合物) (SEQ ID NO:1)、R-Pam₂Cys-SK₄ (RR立体异构体) (SEQ ID NO:1)、S-Pam₂Cys-SK₄ (RS立体异构体) (SEQ ID NO:1)、PamCys (Pam)-SK₄ (SEQ ID NO:19)、Pam₂Cys-SK₄ (生物素-Aca-Aca)-NH₂ (SEQ ID NO:1)、Pam₂Cys-SK₄ (荧光素-Aca-Aca)-NH₂ (SEQ ID NO:1)、PAM₂Cys-SK₄ (罗丹明-Aca-Aca)-NH₂ (SEQ ID NO:1)、和PAM₂Cys-SK₄-FLAG-标签 (SEQ ID NO:1)。在适当的地方,棕榈酸佐剂或其类似物可以用作立体化学限定的化合物或立体异构体的混合物。

[0101] 在具体的实施方式中,本文公开的辅助系统和组合物的基于脂质的佐剂是Pam-3-Cys-Ser-(Lys) 4 (SEQ ID NO:1) :

[0102]



[0103] 在一些实施方式中,基于脂质的佐剂是激活或增加toll样受体 (TLR) 的活性并且优选地激活或增加TLR2的活性的那种。如本文使用的,激活或增加TLR2的活性可以涵盖其以任何单体、同源二聚体或异源二聚体形式的激活,和具体地TLR2作为与TLR1或TLR6的异源二聚体(即TLR1/2或TLR2/6)的激活,如下面进一步详细描述。

[0104] TLR是主要在白细胞比如树突细胞 (DC) 和巨噬细胞、专职性抗原呈递细胞上发现的跨膜受体的保守家族。TLR已经特异性地进化以识别和诱导对病原体相关分子模式比如例如细菌脂蛋白和脂肽和病毒双链RNA的免疫应答。已经在小鼠和人中鉴定了多于10种不同的TLR,但是一些的配体和信号传导途径仍是未知的(参见下面的表3)。在人中存在13个鉴定的TLR,1到13编号。

[0105] 表3:

[0106]

受体	激动剂的类型	衔接分子	细胞定位	激动剂实例
TLR1/2	细菌脂肽	MyD88	表面	Pam3Cys
TLR3	dsRNA	TRIF	细胞内	聚肌胞苷酸
TLR4	脂多糖	MyD88/TRIF	表面	LPS、MPL
TLR5	蛋白质	MyD88	表面	鞭毛蛋白
TLR2/6	细菌二酰基脂肽	MyD88	表面	酵母聚糖、Pam2Cys
TLR7	ssRNA	MyD88	细胞内	咪喹莫特、洛索立宾
TLR8	ssRNA、小的合成化合物	MyD88	细胞内	雷西莫特、R848
TLR9	未甲基化的 DNA	MyD88	细胞内	CpG

[0107] TLR通常形成同源二聚体,例外是TLR2,其与导致不同配体特异性的TLR1或TLR6形成异源二聚体。TLR2介导下游信号传导,所以这些异源二聚体通常被共同称为TLR2 (Takeuchi 2010)。刺激DC上的TLR导致MHC和共刺激分子的上调,其增强这些细胞的抗原呈递功能,以及Th1型细胞因子的产生和交叉呈递的促进 (Lahiri 2008;Welters 2007;Matsumoto 2008;Blander 2008)。因为通过TLR的刺激对强化免疫应答具有直接作用,所以已经研究TLR激动剂作为潜在的佐剂 (Barchet 2008)。

[0108] TLR具有称为Toll-白介素1受体 (TIR) 的保守细胞质结构域,其与衔接分子——其促进导致细胞激活的下游信号传导途径——缔合。TLR可以通过与它们缔合的衔接蛋白MyD88或TRIF被概括地分类。单独的TLR4可以通过两条途径发信号。两条信号传导途径在激活转录因子NF- κ B上交汇 (Ouyang 2007)。数个研究已经展现,虽然不同的TLR共享一些下游信号传导分子,但是每种受体产生独特概况的促炎介质 (Welters 2007;Seya 2006;Ghosh 2006;Re 2004;Avril 2009)。没有完全说明TLR受体的完整下游途径,但是激活的差异可能是由于配体的强度、受体的亚细胞定位、细胞类型和干扰素调控因子 (IRF) 的存在。

[0109] 棕榈酸佐剂已经被报道通过Toll样受体2 (TLR2) 发信号。例如, PAM₂Cys被异源二聚体TLR2和TLR6识别。还作为实例, PAM₃Cys, 其被异源二聚体TLR1和TLR2识别, 触发以体液活性为代表的抗菌应答。相比之下, 来自病毒的双链RNA被TLR3识别并且诱导通常特征在于干扰素释放和T细胞活性的抗病毒应答。介导细胞应答已经与TLR2相关联。

[0110] 已经在各种动物模型和在人的I期临床试验中测试了Pam₃Cys, 没有报道副作用 (Moyle 2008; Wiedemann 1991)。在鼠DC上TLR激动剂的筛选中, 使用Pam₃Cys刺激体外产生了高水平的促炎细胞因子IL-12p40、IL-6和TNF α , 其相对于测试的其它TLR激动剂使用仅少量的佐剂取得 (Welters 2007)。

[0111] 在一些实施方式中, 本文公开的辅助系统的基于脂质的佐剂激活或增加TLR的活性, 或充当TLR的激动剂。在具体的实施方式中, 基于脂质的佐剂激活或增加TLR2的活性。非限制性地, 这样的基于脂质的佐剂可以是激活或增加TLR的活性的棕榈酸佐剂, 比如包括PAM₂Cys或PAM₃Cys (例如Pam-2-Cys-Ser-(Lys) 4 (SEQ ID NO:1) 或Pam-3-Cys-Ser-(Lys) 4 (SEQ ID NO:1)) 的棕榈酸佐剂。

[0112] 充当TLR激动剂的其它合成的基于棕榈酸的脂蛋白也可以用于本文公开的辅助系统, 非限制性地包括上面描述的棕榈酸佐剂和类似物以及从InvivoGen (美国加利福尼亚州圣迭戈市) 和EMC Microcollections GmbH (德国) 可获得的合成的二酰化脂蛋白FSL-1。FSL-1 (Pam₂CGDPKHPKSF; SEQ ID NO:20) 是合成的脂蛋白, 其代表支原体唾囊的44-kDa脂蛋白LP44的N-端部分。FSL-1包括PAM₂Cys并且与巨噬细胞活化脂肽-2 (MALP-2) ——一种发酵支原体源性脂肽——具有类似的框架结构。假设FSL-1和MALP-2——其包含脂化的N-端二酰化半胱氨酸残基——被二聚体TLR2和TLR6 (TLR2/6) 识别。合成的MALP-2是从Enzo Life Sciences (美国纽约州法明岱尔市) 可获得的。

[0113] 在实施方式中, 基于脂质的佐剂包括FSL-1或MALP-2, 或基于脂质的佐剂是FSL-1或MALP-2。在适当的地方, FSL-1或MALP-2可以被用作立体化学限定的化合物或立体异构体的混合物。FSL-1或MALP-2可以被标记 (例如生物素、荧光素、罗丹明等)。FSL-1还作为FSL-1Ala-扫描集合 (EMC Microcollections) 可获得, 其包括九种不同的FSL-1-Ala化合物。这些FSL-1-Ala分子中的每种在本文被单独地或组合地涵盖。

[0114] 包括棕榈酸的基于脂质的佐剂的进一步的实施方式可以包括TLR2配体比如单酰化脂肽的子结构。非限制性地, 这些可以包括, 例如, Pam-Dhc-SKKKK (SEQ ID NO:19)、Pam-CSKKKK (SEQ ID NO:1)、Pam-Dhc-GDPKHPKSF (SEQ ID NO:21) 或Pam-CGDPKHPKSF (SEQ ID NO:20; EMC Microcollections)。

[0115] 确定适当的每单位剂量的基于脂质的佐剂在本领域技术人员的能力内, 尤其是鉴于本文提供的公开内容。在一些实施方式中, 每单位剂量将是与常规比较低剂量的量的基于脂质的佐剂。如本文公开的, 辅助系统能够以低的每单位剂量的量的佐剂生成强免疫应答。在实施方式中, 如在小鼠中计算的, 低剂量的量的基于脂质的佐剂是每单位剂量的组合物小于10、9、8、7、6、5、4、3、2、1或0.5微克, 或对于人等价转换的每单位剂量。在具体的实施方式中, 如在小鼠中计算的, 低剂量的量的基于脂质的佐剂是每单位剂量大约0.2、0.3、0.4、0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5或5微克, 或对于人等价转换的剂量。小鼠中的典型剂量体积是例如50微升。非限制性地, 人中的典型剂量体积可以在50-500微升之间。因而, 在一些实施方式中, 人中转换的低剂量的量将在2-50微克之间, 例如每单位剂量大约2、3、4、

5、10、15、20、25、30、35、40、40或50微克。

[0116] 两亲化合物

[0117] “两亲化合物”是具有亲水和疏水(亲脂)部分或特性的化合物。术语“两亲化合物”可以与“两亲物(amphiphile)”或“两亲体(amphiphilic)”可交换地使用。在一些实施方式中,合适的两亲化合物还可以包括乳化剂,比如本文下面描述的那些。在本文由术语“两亲化合物”涵盖的乳化剂的示例性实施方式非限制性地包括聚山梨醇酯(例如失水山梨醇单油酸酯),二缩甘露醇油酸酯(Arlacel™A),卵磷脂,Tween™80,以及Spans™20、80、83和85。两亲化合物可以促进具有亲水亲和力的疫苗组分在不存在水的情况下掺入疏水运载体比如油。疫苗组分可以非限制性地包括抗原和/或佐剂和/或可以促进产生免疫应答的其它成分(例如辅助性T表位)。

[0118] 非限制性地,两亲化合物的疏水部分通常是大的烃部分,比如形式 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n$ 的长链,其中 $n>4$ 。两亲化合物的亲水部分经常是带电基团或极性不带电基团。带电基团包括阴离子和阳离子基团。阴离子带电基团的实例包括下列(其中分子的疏水部分由“R”表示):羧酸根: RCO_2^- ;硫酸根: RSO_4^- ;磺酸根: RSO_3^- ;和磷酸根(磷脂中的带电官能团)。阳离子带电基团包括例如胺: RNH_3^+ (“R”再次表示分子的疏水部分)。不带电极性基团包括例如具有大的R基团的醇,比如二酰基甘油(DAG)。两亲化合物可以具有数个疏水部分、数个亲水部分、或二者中的数种。蛋白质和一些嵌段共聚物是实例。类固醇、胆固醇、脂肪酸、胆酸、和皂苷也是两亲物。

[0119] 存在众多可以使用的两亲化合物,并且本文公开的辅助系统和疫苗组合物可以包含单一类型的两亲化合物或不同类型的两亲化合物的混合物。

[0120] 在实施方式中,两亲化合物是脂质。虽然可以使用任何两亲脂质,但是特别合适的脂质可以包括具有至少一个脂肪酸链——其包含至少4个碳,并且长度通常是大约4至28个碳——的那些。脂肪酸链可以包含任意数目的饱和和/或不饱和键。脂质可以是天然脂质或合成脂质。两亲脂质的非限制性实例可以包括磷脂、鞘脂、鞘磷脂、脑苷脂、神经节苷脂、醚脂质、甾醇、心磷脂、阳离子脂质以及以聚(乙二醇)和其它聚合物修饰的脂质。合成脂质可以非限制性地包括下列脂肪酸组成:这些脂肪酸的月桂酰、肉豆蔻酰基、棕榈酰、硬脂酰、花生四烯酰、油酰、亚油酰、二十二碳烯酰(erucoyl)、或组合。

[0121] 在实施方式中,两亲化合物是磷脂或磷脂的混合物。宽泛限定的,“磷脂”是在后产生水解磷酸、醇、脂肪酸、和含氮碱基的一组脂质化合物的成员。

[0122] 可以使用的磷脂包括,例如并且非限制性地,具有选自磷酸甘油、磷酸乙醇胺、磷酸丝氨酸、磷酸胆碱(例如DOPC;1,2-二油酰-sn-丙三基-3-磷酸胆碱)和磷酸肌醇的至少一种头基的那些。在一些实施方式中,可以使用DOPC和未脂化的胆固醇的混合物。在其它实施方式中,可以使用类脂S100卵磷脂和未脂化的胆固醇的混合物。当使用未脂化的胆固醇时,可以以等价于大约10%的重量的磷脂的量使用胆固醇(例如以10:1w/w的DOPC:胆固醇比或10:1w/w的S100卵磷脂:胆固醇比)。胆固醇被用于稳定磷脂囊泡的形成。如果使用除胆固醇之外的化合物,本领域技术人员可以容易地确定需要的量。

[0123] 另一种常见的磷脂是鞘磷脂。鞘磷脂包含鞘氨醇,一种具有长的不饱和烃链的氨基醇。脂肪酸基侧链通过酰胺键被连接至鞘磷脂的氨基,以形成神经酰胺。鞘氨醇的羟基被酯化为磷酸胆碱。与磷酸甘油酯一样,鞘磷脂是两亲的。

[0124] 还使用的卵磷脂是通常源自鸡蛋或绵羊毛的磷脂的天然混合物。

[0125] 所有这些和其它磷脂可以被用于本发明的实践。磷脂可以购自,例如,Avanti lipids (Alabaster,AL,USA) 和lipoid LLC (Newark,NJ,USA)。

[0126] 在实施方式中,两亲化合物可以基本上均匀地分散在疏水运载体中,由此单独的两亲化合物的存在足以促进将具有亲水亲和力的疫苗组分(例如抗原)掺入疏水运载体。

[0127] 在另一个实施方式中,两亲化合物可以与抗原紧密地缔合,以便于使得抗原可混溶于疏水运载体。“紧密地缔合”的意思是两亲化合物与抗原如此靠近:抗原以可混溶于疏水运载体的形式呈现。紧密缔合可以或可以不涉及抗原和两亲物之间的物理相互作用。通常,两亲化合物的亲水部分朝向抗原上的亲水部分取向。两亲化合物可以保持基本上彼此分隔开或它们可以形成多种不同类型的结构、组装物或阵列。

[0128] 两亲化合物可以形成的结构、组装物或阵列的类型的示例性实施方式非限制性地包括:单层片、双层片、多层片、单层囊泡结构(例如胶团)、双层囊泡结构(例如单层或多层囊泡)、或其多种组合。“单层”意思是两亲化合物不形成双层,而是保留在具有如下的层中:在一侧上取向的疏水部分和在相反侧上取向的亲水部分。“双层”意思是两亲化合物形成两层的片,通常具有朝向双层的中心内部取向的每层的疏水部分以及外部取向的亲水部分。然而,相反的构型也是可能的。术语“多层”意思是涵盖单层和双层结构的任意组合。采用的形式可以取决于使用的特异性抗原、特异性两亲化合物、和/或特异性疏水运载体。

[0129] 在实施方式中,由两亲化合物形成的结构、组装物或阵列可以部分地或完全地环绕抗原。作为实例,两亲化合物可以围绕抗原形成封闭的囊泡结构。

[0130] 在实施方式中,囊泡结构是单层囊泡结构。这样的结构的实例是胶团。典型的胶团在水溶液中与亲水部分——其与周围的水溶液接触——形成聚集体,隔绝胶团中心的疏水部分。相比之下,在疏水运载体中,逆/反胶团与疏水部分——其与周围的水溶液接触——形成,隔绝胶团中心的亲水部分。球形的反胶团可以在核心内包裹具有亲水亲和力的抗原。

[0131] 在实施方式中,囊泡结构是胶团或逆/反胶团。非限制性地,胶团或逆/反胶团的大小在2nm (20Å) 至20nm (200Å) 的直径的范围内。在具体的实施方式中,胶团或逆/反胶团的大小是大约10nm的直径。

[0132] 在另一个实施方式中,囊泡结构是双层囊泡结构,比如例如,脂质体。脂质体是完全闭合的脂双层膜,其包含截留的水性体积。脂质体可以是单层囊泡(具备单个双层膜)或以多膜双层为特征的多层囊泡,每个双层可以或可以不与下一个通过水性层分隔。可以在Gregoriadis G.Immunol.Today,11:89-97,1990和Frezard,F.,Braz.J.Med.Bio.Res.,32:181-189,1999中发现脂质体的一般讨论。脂质体可以吸附实际上任何类型的细胞并且然后释放包含的试剂(例如抗原)。可选地,脂质体可以与靶标细胞融合,由此脂质体的内含物注入靶标细胞。可选地,脂质体可以被具有吞噬细胞性的细胞内吞。

[0133] 脂质体已经被用于制备组合物,其包括作为囊泡以包囊抗原的疏水运载体以及稳定制剂的乳化剂(参见例如W02002/038175、W02007/041832、W02009/039628、W02009/146523和W02013/049941)。亲水抗原通常被截留在水性内部中,而疏水抗原可以被插入脂双层中或分散在油相中。

[0134] 双层和多层囊泡结构的其它实施方式非限制性地包括:泡囊(niosome)、传递体(transfersome)、病毒体、多层囊泡(MLV)、寡层(oligolamellar)囊泡(OLV)、单层囊泡

(UV)、小的单层囊泡(SUV)、中型的单层囊泡(MUV)、大的单层囊泡(LUV)、巨型的单层囊泡(GUV)、多囊(multivesicular)囊泡(MVV)、通过反相蒸发方法制成的单层或寡层囊泡(REV)、通过反相蒸发方法制成的多层囊泡(MLV-REV)、稳定的数层(plurilamellar)囊泡(SPLV)、冷冻的和解冻的MLV(FATMLV)、通过挤出方法制备的囊泡(VET)、通过弗氏压碎器制备的囊泡(FPV)、通过融合制备的囊泡(FUV)、脱水-再水化囊泡(DRV)、和气泡体(bubblesome)(BSV)。技术人员将认识到用于制备这些囊泡结构的技术是本领域熟知的(参见例如Kreuter, J., ed., Colloidal Drug Delivery Systems, vol. 66, Marcel Dekker, Inc., 1994)。

[0135] 疏水运载体

[0136] 本文公开的辅助系统和组合物包括疏水运载体, 优选地液体疏水物质。

[0137] 疏水运载体可以是基本上纯的疏水物质或疏水物质的混合物。在本文描述的组合物中有用的疏水物质是药学上和/或免疫学上可接受的那些。运载体通常是液体但是在大气温度下非液体的某些疏水物质可以被液化, 例如通过加温, 并且也可以是有用的。

[0138] 油或油的混合物是在本文公开的辅助系统和组合物中使用的特别合适的运载体。油应当是药学上和/或免疫学上可接受的。合适的油包括, 例如, 矿物油(尤其是轻的或低粘度的矿物油比如Drakeol® 6VR)、植物油(例如, 大豆油)、坚果油(例如, 花生油)、或其混合物。因而, 在实施方式中, 疏水运载体是疏水物质比如植物油、坚果油或矿物油。还可以使用动物脂肪和人造疏水聚合物材料, 特别是在大气温度下为液体或可以相对容易地液化的那些。

[0139] 在一些实施方式中, 疏水运载体可以是或包括弗氏不完全佐剂(IFA)、基于矿物油的模式疏水运载体。在另一个实施方式中, 疏水运载体可以是或包括矿物油溶液中的二缩甘露醇油酸酯, 比如作为Montanide® ISA 51 (SEPPIC, France) 可商购的那种。虽然这些运载体通常被用于制备油包水乳液, 但是本公开内容通过如下避免此类型的制剂: 使用两亲化合物在不存在大量水的情况下悬浮组分, 如本文描述的。

[0140] 免疫疫苗技术有限公司(Immunovaccine Inc.)已经研发出称为DepoVax™ (DPX) 的疫苗递送平台。DPX是可以使用任何抗原或抗原的混合物配制的油包脂质制剂。与基于油包水乳液的疫苗——其依赖于油包埋包含抗原和佐剂的水滴——不同, 基于DepoVax™的制剂依赖于脂质以促进抗原和佐剂直接掺入油, 而不需要乳化。此途径的优势包括: (1) 增强亲水抗原/佐剂在油稀释剂中的溶解度, 其否则将在水基稀释剂中正常具有最大溶解度, 和(2) 消除疫苗施用之前累赘的乳化程序。

[0141] 在一些实施方式中, 本文公开的辅助系统和疫苗组合物的疏水运载体可以是免疫疫苗技术有限公司的递送平台DepoVax™。

[0142] 疫苗组合物

[0143] 本文公开的辅助系统可以与一种或多种抗原组合或混合以提供疫苗组合物, 比如例如, 如本文公开的无水疫苗组合物。

[0144] 如本文使用的, 术语“疫苗”、“疫苗组合物”或“组合物”可以可交换地使用, 如上下文要求的。

[0145] 如本文公开的疫苗组合物可以以治疗有效量被施用至对象。如本文使用的, “治疗有效量”意思是对刺激、诱导、维持、强化或增强对象中的免疫应答有效的疫苗或活性成分

(例如,一种或多种抗原)的量。在一些实施方式中,疫苗的治疗有效量是在特定疾病或障碍的治疗中能够诱导对象中临床应答的量。确定疫苗的治疗有效量在本领域技术人员的能力内,尤其是鉴于本文提供的公开内容。治疗有效量可以根据各种因素比如对象的状况、重量、性别和年龄变化。

[0146] 在实施方式中,疫苗组合物包括如本文公开的辅助系统,连同一种或多种抗原。因而,在实施方式中,本公开内容涉及组合物,其包括:(a) 抗原;(b) 聚肌胞苷酸多核苷酸佐剂;(c) 基于脂质的佐剂;(d) 两亲化合物;和(e) 疏水运载体。聚肌胞苷酸多核苷酸佐剂;基于脂质的佐剂;两亲化合物;和疏水运载体如本文上面公开的。

[0147] 抗原

[0148] 本文公开的组合物可以包括一种或多种抗原。

[0149] 如本文使用的,术语“抗原”指的是可以特异性地结合至免疫系统的组分的任何物质或分子。在一些实施方式中,组合物的合适的抗原在本文中是能够诱导或生成对象中的免疫应答的那些。能够诱导免疫应答的抗原据说是免疫原性的,并且还可以称为免疫原。因而,如本文使用的,术语“抗原”包括免疫原并且术语可以可交换地使用,除非另外具体地说明。术语抗原,如本文使用的,还包括半抗原。如本领域理解的,半抗原是如下小分子,其是抗原性的(例如能够被免疫系统的组分结合),但不是免疫原性的,除非它被附加至运载体分子。

[0150] 可以在本文公开的组合物中有用的抗原包括例如并且非限制性地,多肽,碳水化合物,微生物或其部分,比如活的、减弱的、灭活的或杀死的细菌,病毒或原生动物,或其部分。抗原可以是,例如,病原性生物剂,毒素,变应原,肽,合适的天然的、非天然的、重组的或变性的蛋白质或多肽、或其片段,或能够诱导或加强对象中的免疫应答的表位。在一些实施方式中,抗原可以是源自动物的抗原(动物抗原),比如例如人(人抗原),或基本上与其相关的抗原。

[0151] 如本文使用的,术语“源自”非限制性地涵盖:直接从原始来源(例如对象)分离或获得的抗原;与来自原始来源的抗原相同或基本上相关的合成的或重组生成的抗原;或由原始来源的抗原制备的抗原或其片段。当陈述抗原“来自”来源时,术语“来自”可以与“源自”等同。如此上下文中的术语“基本上相关”意思是抗原可以通过化学、物理或其它手段(例如序列修饰)被修饰,但是得到的产物保持能够针对原始抗原或与原始抗原相关联的疾病或障碍生成免疫应答。

[0152] 如本文使用的,术语“抗原”还包括编码起抗原作用的多肽的多核苷酸。基于核酸的免疫策略是已知的,其中包含多核苷酸的疫苗组合物被施用至对象。由多核苷酸编码的抗原性多肽在对象中表达,以便抗原性多肽最终在对象中存在,正如同疫苗组合物自身包含多肽一样。出于本公开内容的目的,上下文指示的术语“抗原”涵盖如此多核苷酸,其编码起抗原作用的多肽。

[0153] 在一些实施方式中,抗原是包括至少一种如下面限定的B细胞表位或CTL表位的分子,并且其当合适地施用至对象时诱导或强化对疾病具有保护性的体液和/或细胞介导的免疫应答。

[0154] 在一些实施方式中,抗原可以是与癌症、传染性疾病、或成瘾疾病相关联的抗原。

[0155] 作为组合物中的抗原可能有用的病毒或其部分在本文包括例如,并且非限制性

地,牛痘病毒、痘苗病毒、假牛痘病毒、疱疹病毒、人疱疹病毒1、人疱疹病毒2、巨细胞病毒、人腺病毒A-F、多瘤病毒、人乳头瘤病毒(HPV)、细小病毒、甲型肝炎病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、人免疫缺陷病毒(HIV)、正呼肠孤病毒、轮状病毒、埃博拉病毒、副流感病毒、流感病毒(例如H5N1流感病毒、甲型流感病毒、乙型流感病毒、丙型流感病毒)、麻疹病毒、腮腺炎病毒、风疹病毒、肺炎病毒、呼吸道合胞病毒、人呼吸道合胞病毒、狂犬病病毒、加利福尼亚脑炎病毒、日本脑炎病毒、汉坦病毒、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒、冠状病毒、肠病毒、鼻病毒、脊髓灰质炎病毒、诺如病毒、黄病毒、登革病毒、西尼罗病毒、黄热病病毒和水痘。

[0156] 在实施方式中,本文公开的组合物包括对治疗和/或预防需要其的对象中的流感病毒感染可能潜在地有用的抗原。流感是正粘病毒科的单链RNA病毒并且通常基于病毒颗粒外的两种主要的糖蛋白血凝素(HA)和神经氨酸酶(NA)进行表征。已经鉴定了甲型流感的众多HA亚型(Kawaoka et al.1990;Webster et al.1983)。在一些实施方式中,抗原可以源自HA或NA糖蛋白。在具体的实施方式中,抗原可以是重组HA抗原(H5N1,甲型/越南/1203/2004;Protein Sciences;USA),比如源自以Genbank登录号AY818135发现的序列或其任意合适的序列变体。

[0157] 在另一个实施方式中,本文公开的组合物包括对治疗和/或预防需要其的对象中的埃博拉病毒感染可能潜在地有用的抗原。

[0158] 在另一个实施方式中,本文公开的组合物包括对治疗和/或预防需要其的对象中的人乳头瘤病毒(HPV)感染可能潜在地有用的抗原。在更具体的实施方式中,本文公开的组合物包括对治疗和/或预防HPV相关宫颈癌或HPV相关头颈癌可能潜在地有用的抗原。在一些实施方式中,抗原是包括序列RAHYNIVTF(HPV16E7(H-2Db)肽49-57;R9F;SEQ ID NO:2)的肽。

[0159] 在另一个实施方式中,本文公开的组合物包括对治疗和/或预防需要其的对象中的呼吸道合胞病毒(RSV)感染可能潜在地有用的抗原。在更具体的实施方式中,本文公开的组合物包括对治疗和/或预防与RSV感染相关联的肺病可能潜在地有用的抗原。在一些实施方式中,抗原源自如在例如W02012/065997中公开的小疏水蛋白质的胞外域。在一些实施方式中,抗原的序列源自RSV毒株(stain)A的小疏水结构域:NKLCEYNVFHNKTFELPRARVNT(SEQ ID NO:22)(Schepens et al.2014;W0 2012/065997),或其任意合适的序列变体。

[0160] 作为组合物中的抗原可能有用的细菌或其部分在本文包括例如,并且非限制性地,炭疽(炭疽杆菌)、布鲁氏杆菌属、百日咳博代氏杆菌、念珠菌属、肺样衣原体、鹦鹉热衣原体、霍乱、肉毒梭状芽胞杆菌、粗球孢子菌、隐球菌属、白喉、大肠杆菌0157:H7、肠出血性大肠杆菌、肠毒性大肠杆菌、流感嗜血杆菌、幽门螺杆菌、军团菌属、钩端螺旋体属、李斯特菌属、脑膜炎球菌属、肺炎衣原体、分枝杆菌属、百日咳、肺炎、沙门氏菌属、志贺氏菌属、葡萄球菌属、肺样双球菌和小肠结肠炎耶尔森氏菌。

[0161] 在实施方式中,本文公开的组合物包括对治疗和/或预防需要其的对象中的炭疽杆菌感染(即炭疽)可能潜在地有用的抗原。非限制性地,组合物中包含的抗原可以例如是炭疽重组保护性抗原(rPA)(List Biological Laboratories,Inc.;Campbell,CA)或炭疽突变体重组保护性抗原(mrPA)(Pfenex,Inc.;San Diego,CA)。在一些实施方式中,抗原可以源自以Genbank登录号P13423发现的序列,或其任意合适的序列变体。

[0162] 作为组合物中的抗原可能有用的原生动物或其部分在本文包括例如,并且非限制

性地,疟原虫属(镰状疟原虫、三日疟原虫、间日疟原虫、卵形疟原虫或诺尔斯疟原虫),其引起疟疾。

[0163] 在实施方式中,本文公开的组合物包括对治疗和/或预防需要其的对象中的三日疟原虫感染(即疟疾)可能潜在地有用的抗原。

[0164] 抗原可以可选地是天然存在的或合成的毒素或变应原。“毒素”,如本文使用的,指的是由活细胞或生物体(例如植物、动物、微生物等)产生的能够引起疾病或病痛的任何物质、或传染性物质、或能够产生副作用的重组或合成分子。毒素可以是例如小分子、肽、或蛋白质。毒素包括药物物质比如,例如,可卡因。毒素可以能够被抗体中和。在这样的实施方式中,抗原可以引发产生抗体,其结合至循环(例如血液)中的毒素并且隔绝循环(例如血液)中的毒素,从而潜在地阻止其递送至身体的另一个区域(例如脑)。

[0165] “变应原”,如本文使用的,指的是可以引起变态反应的任何物质。变应原可以非限制性地源自植物、动物、真菌、昆虫的细胞、细胞提取物、蛋白质、多肽、肽、多糖、多糖缀合物、多糖和其它分子的肽和非肽模拟物、小分子、脂质、糖脂、和碳水化合物,食物,药物,灰尘,和螨虫。变应原包括但不限于环境气源性变应原;植物花粉(例如豕草/枯草热);杂草(weed)花粉变应原;禾本科植物(grass)花粉变应原;约翰逊草(Johnson grass);树木花粉变应原;黑麦草;蛛形纲变应原(例如屋尘螨变应原);贮藏螨(storage mite)变应原;日本香柏花粉/枯草热;霉菌/真菌孢子变应原;动物变应原(例如,狗、豚鼠、仓鼠、沙鼠、大鼠、小鼠等变应原);食物变应原(例如甲壳动物;坚果;柑橘;面粉;咖啡);昆虫变应原(例如跳蚤、蟑螂);毒液:(膜翅目、小黄蜂、蜜蜂、胡蜂、大黄蜂、火蚁);细菌变应原(例如链球菌抗原;寄生虫变应原比如蛔虫抗原);病毒抗原;药物变应原(例如青霉素);激素(例如胰岛素);酶(例如链激酶);和能够充当不完全抗原或半抗原的药物或化学品(例如酸酐和异氰酸酯)。

[0166] 在半抗原被用于本文公开的组合物时,其可以被附加至运载体,比如例如蛋白质,以形成半抗原-运载体加合物。半抗原-运载体加合物能够引发免疫应答,而半抗原自身将通常不引发应答。半抗原的非限制性实例是苯胺、漆酚(毒葛中的毒素)、胍苯哒嗪、荧光素、生物素、地高辛和二硝基苯酚。

[0167] 在另一个实施方式中,抗原可以是与疾病相关联的抗原,其中期望隔绝循环中的抗原,比如例如淀粉样蛋白(例如阿耳茨海默病)。因而,在一些实施方式中,如本文公开的组合物包括在治疗和/或预防需要其的对象中的神经变性疾病可能潜在地有用的抗原,其中神经变性疾病与抗原的表达相关联。

[0168] 在另一个实施方式中,抗原可以是在WO 2007/041832中公开的抗原中的任一种或多种,比如例如在WO 2007/041832的第17-19页处的表1中公开的肽抗原。

[0169] 例如,并且非限制性地,作为组合物中的抗原可能有用的多肽或其片段在本文包括源自霍乱类毒素、破伤风类毒素、白喉类毒素、乙型肝炎表面抗原、血凝素(例如H5N1重组血凝素蛋白)、炭疽重组保护性抗原(List Biological Laboratories, Inc.; Campbell, CA)、炭疽突变体重组保护性抗原(Pfenex, Inc.; San Diego, CA)、神经氨酸酶、流感M蛋白、PfHRP2、pLDH、缩醛酶、MSP1、MSP2、AMA1、Der-p-1、Der-f-1、脂肪分化相关蛋白(Adipophilin)、AFP、AIM-2、ART-4、BAGE、 α -胎蛋白、BCL-2、Bcr-Abl、BING-4、CEA、CPSF、CT、细胞周期蛋白D1Ep-CAM、EphA2、EphA3、ELF-2、FGF-5、G250、促性腺激素释放激素(GNRH)、HER-2、肠羧酸酯酶(iCE)、IL13R α 2、MAGE-1、MAGE-2、MAGE-3、MART-1、MART-2、M-CSF、MDM-2、

MMP-2、MUC-1、NY-EOS-1、MUM-1、MUM-2、MUM-3、百日咳类毒素蛋白、p53、PBF、PRAME、PSA、PSMA、RAGE-1、RNF43、RU1、RU2AS、SART-1、SART-2、SART-3、SAGE-1、SCRN 1、SOX2、SOX10、STEAP1、存活素、端粒酶、TGFβRII、TRAG-3、TRP-1、TRP-2、TERT和WT1的那些。

[0170] 术语“多肽”涵盖任何氨基酸链，而不管长度（例如，至少6、8、10、12、14、16、18、或20个氨基酸）或翻译后修饰（例如，糖基化或磷酸化），并且包括，例如，天然蛋白质、合成或重组多肽和肽、表位、杂交分子、变体、同源物、类似物、类肽、肽模拟物等。其变体或衍生物包括缺失，包括截短物和片段；插入和添加，例如保守置换、定向突变和等位基因变体；和修饰——包括共价连接至肽的具有一种或多种非氨基酰基的类肽（例如，糖、脂质等）——和翻译后修饰。如本文使用的，术语“保守氨基酸置换”或“保守置换”指的是在肽的给定位置处将一个氨基酸置换为另一个，其中可以完成置换而并不大量失去相关功能。在做出这样的改变中，可以在侧链取代基的相对类似性——例如，它们的大小、电荷、疏水性、亲水性等——的基础上完成相似氨基酸残基的置换，并且可以通过常规测试针对这样的置换试验它们对肽的功能的作用。保守置换的具体的非限制形式包括下列实例：

[0171]

原始残基	保守置换
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln、His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
His	Asn、Gln
Ile	Leu、Val
Leu	Ile、Val
Lys	Arg、Gln、Glu
Met	Leu、Ile
Phe	Met、Leu、Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Val	Ile、Leu

[0172] 可以使用与抗原序列具有基本同一性的多肽或肽。当任选地比对时（具有允许的空位），如果两个序列共享至少大约50%序列同一性，或如果序列共享限定的功能基序，则它们被认为具有基本同一性。在可选的实施方式中，如果任选地比对的序列在规定区域内共享至少60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性，则它们可以被认为是基本上同一的（即，具有基本同一性）。术语“同一性”指的是两个多肽分子之间的序列相似性。可以通过比较比对序列中的每个位置来测定同一性。氨基酸序列之间的同一性程度是在序列共享的位置处同一或匹配的氨基酸的数目的函数，例如，在规定区域内。

可以使用各种算法实施用于比较同一性的序列的最佳比对,如本领域已知的,包括在<http://clustalw.genome.ad.jp>处可获的ClustalW程序、Smith和Waterman (1981)的局部同源性算法、Needleman和Wunsch (1970)的同源性比对算法、Pearson和Lipman (1988)的相似性搜索方法、和这些算法的计算机化实施(比如Wisconsin遗传学软件程序包中的GAP、BESTFIT、FASTA和TFASTA, Genetics Computer Group, Madison, WI, U.S.A.)。还可以使用在Altschul et al. (1990) (使用公开的默认设定)中描述的BLAST算法测定序列同一性。例如,可以使用通过美国国家生物技术信息中心(通过在<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/bl2seq/wblast2.cgi>处的因特网)可获得的“BLAST 2Sequences”工具,其在下列默认设定下选择“blastp”程序:期望阈值10;字长3;矩阵BLOSUM 62;空位罚分(gap cost)存在11,延长1。在另一个实施方式中,本领域技术人员可以容易地和适当地比对任何给定的序列并且通过仅目视检查推断出同一性和/或同源性。

[0173] 用于实践本发明的多肽和肽可以从天然来源分离,是合成的,或是重组生成的多肽。肽和蛋白质可以在体外或体内重组表达。可以使用本领域中的任何方法制作和分离用于实践本发明的肽和多肽。还可以使用本领域熟知的化学方法完整地或部分地合成用于实践本发明的多肽和肽。参见例如,Caruthers 1980、Hom 1980、Banga, 1995。例如,肽合成可以使用多种固相技术进行(参见例如,Roberge 1995、Merrifield 1997)并且自动化合成可以例如使用ABI 431A肽合成器(Perkin Elmer)依据由制造商提供的指示实现。

[0174] 在一些实施方式中,抗原可以是纯化的抗原,例如,大约25%至50%纯的、大约50%至大约75%纯的、大约75%至大约85%纯的、大约85%至大约90%纯的、大约90%至大约95%纯的、大约95%至大约98%纯的、大约98%至大约99%纯的、或大于99%纯的。

[0175] 如上面记载的,术语“抗原”还包括编码起抗原功能的多肽的多核苷酸。如本文使用的,术语“多核苷酸”涵盖任何长度(例如9、12、18、24、30、60、150、300、600、1500或更多个核苷酸)或数目的链(例如单链或双链)的核苷酸链。多核苷酸可以是DNA(例如基因组DNA或cDNA)或RNA(例如mRNA)或其组合。它们可以是天然存在的或合成的(例如化学合成的)。考虑多核苷酸可以在核苷酸链中包含一个或多个含氮碱基、戊糖或磷酸基团的修饰。这样的修饰是本领域熟知的并且可以出于例如提高多核苷酸的稳定性的目的。

[0176] 可以以多种形式递送多核苷酸。在一些实施方式中,可以使用裸的多核苷酸,以线性形式或插入质粒,比如表达质粒。在其它实施方式中,可以使用活载体比如病毒或细菌载体。

[0177] 可以存在帮助将DNA转录为RNA和/或将RNA翻译为多肽的一个或多个调控序列。在一些情况下,比如在多核苷酸是信使RNA (mRNA) 分子的情况下,不需要与转录过程相关的调控序列(例如启动子),并且可以在不存在启动子的情况下实现蛋白质表达。技术人员可以根据情况需要包括合适的调控序列。

[0178] 在一些实施方式中,多核苷酸以表达盒存在,其中它被可操作地连接至调控序列,其将允许在施用如本文公开的组合物对象中表达多核苷酸。表达盒的选择取决于施用组合物对象以及表达的多肽期望的特征。

[0179] 通常,表达盒包括启动子,其在对象中是功能性的并且可以是组成型或诱导型的;核糖体结合位点;起始密码子(ATG),如果必要的话;编码感兴趣的多肽的多核苷酸;终止密码子;和任选地3'端区域(翻译和/或转录终止子)。可以包括另外的序列比如编码信号肽的

区域。编码感兴趣的多肽的多核苷酸可以与表达盒中的其它调控序列中的任一种同源或异源。与感兴趣的多肽一起表达的序列,比如信号肽编码区,通常邻近编码待表达的蛋白质的多核苷酸定位并且放置在适当的阅读框中。在控制启动子下放置由多核苷酸——其编码单独表达的蛋白质或与待表达的任何其它序列一起表达的蛋白质(例如信号肽)——构成的开放阅读框,使得在施用组合物的对象中发生转录和翻译。

[0180] 在实施方式中,本文公开的组合物包括为自身抗原的抗原。在实施方式中,本文公开的组合物包括为癌症相关抗原的抗原。

[0181] 在使用如本文描述的组合物的单次治疗中使用的抗原的量可以取决于抗原的类型和对象的特性(例如大小、重量、年龄、性别等)变化。本领域技术人员将能够在不过度实验的情况下确定用于具体应用的抗原的有效量。如本文使用的术语“有效量”意思是对取得期望的结果在剂量上有效和持续必需时段的量。

[0182] 在实施方式中,如在小鼠中计算的,组合物可以包括每单位剂量大约0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5或10微克的抗原,或对于人等价转换的剂量。在一些实施方式中,组合物可以包括与聚肌胞苷酸和/或基于脂质的佐剂等价剂量的抗原。在具体的实施方式中,如在小鼠中计算的,组合物可以包括每单位剂量大约1微克的抗原,或对于人等价转换的剂量。非限制性地,用于人施用的每单位剂量的量的抗原可以至多500微克,并且通常是100微克或更小。

[0183] 可以使用本文早先提供的等式计算从人到鼠研究的剂量转换。

[0184] 癌症相关抗原

[0185] 在一些实施方式中,抗原可以是癌症或肿瘤相关蛋白或其片段。许多癌症或肿瘤相关蛋白是本领域已知的,比如例如,并且非限制性地,在WO 2007/041832中公开的那些。

[0186] 在一些实施方式中,癌症可能由病原体比如病毒引起。与癌症发展关联的病毒是本领域技术人员已知的并且包括但不限于人乳头瘤病毒(HPV)、John Cunningham virus(JCV)、人疱疹病毒8、EB病毒(EBV)、梅克尔细胞多瘤病毒、丙型肝炎病毒和人T细胞白血病病毒-1。因而,在实施方式中,本文公开的组合物可以包括与如下病毒相关联的抗原:该病毒与癌症的发展关联。

[0187] 在一些实施方式中,抗原可以是能够诱导特异性细胞毒性T-淋巴细胞(CTL)免疫应答——其能够有效地识别靶向的肿瘤细胞上的特异性构象并且引起它们的破坏——的任一种。

[0188] 在还进一步的实施方式中,抗原可以包括选自下列表格的肽序列:

[0189] 表4:

[0190]

抗原	序列	HLA	专利
Mart-1/Melan-A	AAGIGILTV (SEQ ID NO: 23)	A2	US 5,844,075
	EAAGIGILTV (SEQ ID NO: 24)	A2	US 5,844,075
	ILTVILGVL (SEQ ID NO: 25)	A2	US 5,844,075
	AEEAAGIGIL (SEQ ID NO: 26)	B45	US 7,037,509
	AEEAAGIGILT (SEQ ID NO: 27)	B45	未知
MCIR	TILLGIFFL (SEQ ID NO: 28)	A2	未知
	FLALIICNA (SEQ ID NO: 29)	A2	未知
Gp100	KTWGQYWQV (SEQ ID NO: 30)	A2	US 5,844,075
	AMLGTHTMEV (SEQ ID NO: 31)	A2	未知
	MLGTHTMEV (SEQ ID NO: 32)	A2	未知
	SLADTNSLAV (SEQ ID NO: 33)	A2	US 5,844,075
	ITDQVPFSV (SEQ ID NO: 34)	A2	US 5,844,075

[0191]

	LLDGTATLRL (SEQ ID NO: 35)	A2	US 5,844,075
	YLEPGPVTA (SEQ ID NO: 36)	A2	US 5,844,075
	VLYRYGSFSV (SEQ ID NO: 37)	A2	US 5,844,075
	RLPRIFCSC (SEQ ID NO: 38)	A2	未知
	LIYRRRLMK (SEQ ID NO: 39)	A3	未知
	ALNFPQSQK (SEQ ID NO: 40)	A3	未知
	SLIYRRRLMK (SEQ ID NO: 41)	A3	未知
	ALLAVGATK (SEQ ID NO: 42)	A3	US 6,558,671
	ALLAVGATK (SEQ ID NO: 42)	A3	US 6,977,074
	VYFFLPDHL (SEQ ID NO: 43)	A24	未知
	SNDGPTLI (SEQ ID NO: 44)	Cw8	未知
PSA	VSHSFPHPY (SEQ ID NO: 45)	A1	US 6,037,135
	FLTPKKLQCV (SEQ ID NO: 46)	A2	US 6,881,405
	VISNDVCAQV (SEQ ID NO: 47)	A2	未知
PSM	HSTNGVTRIY (SEQ ID NO: 48)	A1	未知
酪氨酸酶	KCDICTDEY (SEQ ID NO: 49)	A1	US 7,019,112
	SSDYVIPIGT (SEQ ID NO: 50)	A1	未知
	YMDGTMSQV (SEQ ID NO: 51)	A2	US 6,096,313
	MLLAVLYCL (SEQ ID NO: 51)	A2	US 6,291,430
	AFLPWHRLF (SEQ ID NO: 53)	A24	US 6,291,430
	SEIWRDIDF (SEQ ID NO: 54)	B44	US 6,291,430
	MSLQRQFLR (SEQ ID NO: 55)	A31	US 5,831,016
TRP1	SVYDFFVWL (SEQ ID NO: 56)	A2	US 7,067,120
TRP2	TLDSQVMSL (SEQ ID NO: 57)	A2	未知
	LLGPGRPYR (SEQ ID NO: 58)	A31	US 5,831,016
p53	ANDPIFVVL (SEQ ID NO: 59)	Cw8	未知

[0192] 在具体的实施方式中,如本文公开的组合物可以包括源自HPV的抗原。在实施方式中,抗原可以源自HPV的E6、E7、L1或L2蛋白。

[0193] 在实施方式中,HPV的E6蛋白的抗原包括肽序列TIHDIILECV (T10V;SEQ ID NO: 60)。在另一个实施方式中,HPV的E7蛋白的抗原包括RAHYNIVTF (R9F;SEQ ID NO: 2)、YMLDLQPETT (Y10T;SEQ ID NO: 61)、LLMGTLGIV (L9V;SEQ ID NO: 62)、或TLGIVCPI (T8I;SEQ ID NO: 63)的肽序列。

[0194] 在其它实施方式中,源自HPV的抗原可以是在W01993/022338、W02002/070006、W02006/115413、W02008/147187、W02009/002159或W02010/123365中公开的中的HPV抗原的一种或多种。

[0195] 在另一个实施方式中,抗原可以源自肿瘤相关蛋白,比如例如,黑素瘤相关蛋白。在进一步的实施方式中,黑素瘤相关蛋白是酪氨酸相关蛋白-2 (TRP-2) 或p53。在一个实施方式中,源自TRP-2蛋白的抗原包括肽序列SVYDFVWL (S9L;SEQ ID NO:56)。在另一个实施方式中,源自TRP-2蛋白的抗原包括肽序列VYDFVWL (V8L;SEQ ID NO:64)。在另一个实施方式中,源自p53蛋白的抗原包括选自KYMCNSSCM (K9M;野生型p53;SEQ ID NO:65)、KYICNSSCM (mK9M;修饰的p53;SEQ ID NO:66)、和AKXVAAWTLKAAKYICNSSCM (mK9M;SEQ ID NO:67)的肽序列。

[0196] 在实施方式中,组合物中包含的抗原可以包括本文描述的抗原中的一种或多种的混合物,任选地融合在一起作为在抗原之间具有或不具有间隔区序列的融合蛋白。

[0197] 在其它实施方式中,并且非限制性地,抗原可以来自膜表面结合癌症相关蛋白。表面结合癌症相关蛋白(或其抗原)可以能够被抗体识别。

[0198] 在具体的实施方式中,如本文公开的组合物可以包括一种或多种存活素抗原。

[0199] 存活素,也称为包含杆状病毒凋亡抑制剂重复5 (baculoviral inhibitor of apoptosis repeat-containing 5) (BIRC5),是参与凋亡的负调控的蛋白质。其已经被分类为凋亡蛋白抑制剂(IAP)的家族的成员。存活素是16.5kDa细胞质蛋白,其包含单个BIR基序和高度带电的羧基端卷曲区域而不是RING指。编码存活素的基因与效应细胞蛋白酶受体-1 (EPR-1)的序列几乎相同,但是以相反的方向取向。存活素(智人)的编码序列的长度是包括终止密码子的429个核苷酸:

[0200]

```
atgggtgccc cgaagttggc cctgcoctgg cagcccttcc tcaaggacca cggatctct      60
acattcaga actggccctt cttggagggr tgcgcoctga cccggagag gatggcagag      120
gctggcttca tccatgccc cactgagaac gagccagact tggccagtg tttcttctgc      180
ttcaaggagc tggaaaggctg ggagccagat gacgacccca tagaggaaac taaaaagcat      240
tcgtccgggtt ggccttctct ttctgtcaag aagcagtttg aagaattaac ccttggtgaa      300
tttttgaaac tggacagaga aagagccasg aacaaaattg caaaggaaac caacaataag      360
aagaaagaat ttgaggaaac tgggaagaaa gtgcgcogtg ccctcgagca gotggctgcc      420
atggattga
```

SEQ ID NO: 68

[0201] 编码的蛋白质存活素(智人)的长度是142个氨基酸:

[0202]

```

Met Gly Ala Pro Thr Leu Pro Pro Ala Trp Gln Pro Phe Leu Lys Asp
1           5           10           15

His Arg Ile Ser Thr Phe Lys Asn Trp Pro Phe Leu Glu Gly Cys Ala
20           25           30

Cys Thr Pro Glu Arg Met Ala Glu Ala Gly Phe Ile His Cys Pro Thr
35           40           45

Glu Asn Glu Pro Asp Leu Ala Gln Cys Phe Phe Cys Phe Lys Glu Leu
50           55           60

Glu Gly Trp Glu Pro Asp Asp Asp Pro Ile Glu Glu His Lys Lys His
65           70           75           80

Ser Ser Gly Cys Ala Phe Leu Ser Val Lys Lys Gln Phe Glu Glu Leu
85           90           95

Thr Leu Gly Glu Phe Leu Lys Leu Asp Arg Glu Arg Ala Lys Asn Lys
100          105          110

Ile Ala Lys Glu Thr Asn Asn Lys Lys Lys Glu Phe Glu Glu Thr Ala
115          120          125

Lys Lys Val Arg Arg Ala Ile Glu Gln Leu Ala Ala Met Asp
130          135          140

```

SEQ ID NO: 69

[0203] 推断存活素蛋白起作用以抑制胱天蛋白酶激活,从而导致对凋亡或程序性细胞死亡的负调控。与此功能一致,存活素已经被鉴定为在许多类型的癌症而非在正常组织中不变地上调的前几个基因之一(参见例如Altieri et al.1999;和美国专利号6,245,523)。此事实因此使得存活素成为癌症疗法的理想靶标,这是由于靶向癌细胞而非正常细胞。事实上,存活素在包括大部分人癌症的许多肿瘤类型中高度表达,并且已经报道了预后价值。

[0204] 在一些实施方式中,如本文公开的组合物可以包括一种或多种存活素抗原。如本文使用的,术语“存活素抗原”涵盖任何源自存活素蛋白的肽、多肽、或其变体(例如存活素肽变体)或其片段。术语“存活素抗原”还涵盖编码本文描述的存活素肽、存活素肽变体或存活素肽功能性等价物的多核苷酸。多核苷酸可以是DNA(例如基因组DNA或cDNA)或RNA(例如mRNA)或其组合。它们可以是天然存在的或合成的(例如化学合成的)。考虑多核苷酸可以包含核苷酸链中一个或多个含氮碱基、戊糖或磷酸基团的修饰。这样的修饰是本领域熟知的并且可以出于例如改进多核苷酸的稳定性的目的。

[0205] 在实施方式中,存活素抗原可以包括全长存活素多肽或编码全长存活素多肽的核酸。可选地,存活素抗原可以是包括任何长度的存活素蛋白的片段的存活素肽。示例性实施方式包括如下存活素肽:其包括至少5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个氨基酸残基。在具体的实施方式中,存活素肽由七肽、八肽、九肽、十肽或十一肽——其分别由存活素蛋白(例如SEQ ID NO:69)的7、8、9、10、11个连续氨基酸残基构成——构成。存活

素抗原的具体实施方式包括大约9或10个氨基酸的存活素肽。

[0206] 本公开内容的存活素抗原还涵盖存活素肽的变体和功能性等价物。存活素肽的变体和功能性等价物涵盖展示如下氨基酸序列的肽：其与存活素蛋白的特异性序列比较具有差异，比如一种或多种氨基酸置换、缺失或添加，或其任意组合。差异可以被测量为如存活素蛋白序列和存活素肽变体或存活素肽功能性等价物之间同一性的减小。

[0207] 可以使用本领域熟知的算法计算氨基酸序列之间的同一性。当存活素肽变体或功能性等价物在其整体长度内至少70%同一于存活素蛋白的肽序列，比如与存活素蛋白的肽序列至少75%同一、至少80%同一、至少85%同一、至少90%同一、或至少95%同一，包括96%、97%、98%或99%同一时，它们被认为落入“存活素抗原”的含义内。在具体的实施方式中，存活素肽变体具有至少85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一于SEQ ID NO: 69的连续氨基酸序列的序列。

[0208] 存活素抗原可以源自其的存活素蛋白是来自其中表达该蛋白质的任何动物物种的存活素蛋白。具体的实施方式是来自人的存活素蛋白 (SEQ ID NO:69)。基于选择的存活素蛋白的序列，可以通过存活素蛋白或编码核酸的任何适当的化学或酶处理得到存活素抗原。可选地，可以使用本领域普通技术人员熟悉的任何常规肽或核酸合成程序来合成存活素抗原。

[0209] 存活素抗原 (肽或核酸) 可以具有为存活素的天然序列的序列。可选地，存活素抗原可以通过一种或多种置换、缺失或添加修饰的肽或核酸序列，比如例如本文描述的存活素肽变体或功能性等价物。增加肽的免疫原性的存活素肽的示例性程序和修饰包括，例如，在WO 2004/067023中描述的那些，其包含增加肽与HLA I类分子的结合的在锚固位置处引入的氨基酸置换。

[0210] 在实施方式中，存活素抗原是源自存活素蛋白的任何肽，或其任何存活素肽变体，其能够结合MHC I类HLA分子。按此逻辑，存活素抗原可以是任何存活素肽或其存活素肽变体，其能够诱导或加强对象中的免疫应答。

[0211] 在实施方式中，存活素抗原是包括来自存活素蛋白的氨基酸序列 (例如SEQ ID NO:69) 的肽抗原，其能够引发对象中的细胞毒性T-淋巴细胞 (CTL) 应答，或编码所述肽的核酸分子。

[0212] 在实施方式中，组合物包括一种或多种基于存活素蛋白的氨基酸序列比如在SEQ ID NO:69中陈述的氨基酸序列的合成存活素肽或其变体。

[0213] 已经例如在WO 2004/067023和WO 2006/081826中描述了存活素肽、存活素肽变体和存活素功能性等价物，以及它们用于诊断和治疗目的，特别是在癌症中的用途。在这些出版物中公开的新型肽被发现能够在癌症患者中引发细胞毒性T-淋巴细胞 (CTL) 应答。具体而言，在WO 2004/067023中，发现MHC I类局限的肽可以源自存活素蛋白，其能够结合至MHC I类HLA分子并且从而在遭受大范围癌症疾病的患者中引发离体和原位CTL免疫应答二者。

[0214] 在实施方式中，如本文公开的组合物可以包括在WO 2004/067023和WO 2006/081826中公开的存活素肽、存活素肽变体或存活素肽功能性等价物中的任一种或多种。

[0215] 在另一个实施方式中，如本文公开的组合物可以包括存活素肽、存活素肽变体或存活素肽功能性等价物中的一种或多种：其具有结合选自HLA-A、HLA-B或HLA-C分子的任何MHC I类分子的能力。

[0216] 可以与存活素肽、存活素肽变体、或存活素肽功能性等价物结合的示例性MHC I类HLA-A分子非限制性地包括HLA-A1、HLA-A2、HLA-A3、HLA-A9、HLA-A10、HLA-A11、HLA-A19、HLA-A23、HLA-A24、HLA-A25、HLA-A26、HLA-A28、HLA-A29、HLA-A30、HLA-A31、HLA-A32、HLA-A33、HLA-A34、HLA-A36、HLA-A43、HLA-A66、HLA-A68、和HLA-A69。

[0217] 可以与存活素肽、存活素肽变体、或存活素肽功能性等价物结合的示例性MHC I类HLA-B分子非限制性地包括HLA-B5、HLA-B7、HLA-B8、HLA-B12、HLA-B13、HLA-B14、HLA-B15、HLA-B16、HLA-B17、HLA-B18、HLA-B21、HLA-B22、HLA-B27、HLA-B35、HLA-B37、HLA-B38、HLA-B39、HLA-B40、HLA-B41、HLA-B42、HLA-B44、HLA-B45、HLA-B46和HLA-B47。

[0218] 可以与存活素肽、存活素肽变体、或存活素肽功能性等价物结合的示例性MHC I类HLA-C分子非限制性地包括HLA-C1、HLA-C2、HLA-C3、HLA-C4、HLA-C5、HLA-C6、HLA-C7和HLA-C16。

[0219] 在具体的实施方式中，如本文公开的组合物可以包括选自如下的存活素肽抗原中的一种或多种：

[0220]	i)	FEELTLGEF	(SEQ ID NO: 70)	[HLA-A1]
	ii)	FTELTLGEF	(SEQ ID NO: 71)	[HLA-A1]
	iii)	LTLGEFLKL	(SEQ ID NO: 72)	[HLA-A2]
	iv)	LMLGEFLKL	(SEQ ID NO: 73)	[HLA-A2]
	v)	RISTFKNWPF	(SEQ ID NO: 74)	[HLA-A3]
	vi)	RISTFKNWPK	(SEQ ID NO: 75)	[HLA-A3]
	vii)	STFKNWPFL	(SEQ ID NO: 76)	[HLA-A24]
	viii)	LPPAWQPFL	(SEQ ID NO: 77)	[HLA-B7]

[0221] 上面列出的存活素肽非限制性地代表由本公开内容涵盖的示例性MHC I类局限的肽。在右边方括号中显示了被认为结合各个存活素肽的特异性MHC I类HLA分子。如本文公开的组合物可以以任何合适的组合包括这些存活素肽中的一种或多种。

[0222] 在进一步的实施方式中，如本文公开的组合物可以以任何合适的组合包括下面列出的五种存活素肽中的任一种或多种：

[0223]	i)	FTELTLGEF	(SEQ ID NO: 71)	[HLA-A1]
	ii)	LMLGEFLKL	(SEQ ID NO: 73)	[HLA-A2]
	iii)	RISTFKNWPK	(SEQ ID NO: 75)	[HLA-A3]
	iv)	STFKNWPFL	(SEQ ID NO: 76)	[HLA-A24]
	v)	LPPAWQPFL	(SEQ ID NO: 77)	[HLA-B7]

[0224] 在具体的实施方式中，如本文公开的组合物包括上面列出的所有五种存活素肽抗原。

[0225] 在一些实施方式中，除所述至少一种存活素抗原之外，如本文公开的组合物还可以包括一种或多种另外的抗原，比如例如本文描述的那些。

[0226] CTL表位和B细胞表位

[0227] 如上面提及的，在一些实施方式中，抗原是包括至少一种B细胞表位或CTL表位的

分子。

[0228] 表位可以具有任何化学性质,非限制性地包括肽、碳水化合物、脂质、糖肽和糖脂。在具体的实施方式中,表位是源自本文描述的任何抗原的肽。表位可以与天然存在的表位相同,或可以是天然存在的表位的修饰形式。

[0229] B细胞表位是由B细胞和由抗体识别的表位。B细胞肽表位的长度通常是至少五个氨基酸,更通常至少六个氨基酸,还更通常至少七个或八个氨基酸,并且可以是连续的(“线性的”)或不连续的(“构象的”);后者例如通过折叠蛋白质以使一级氨基酸序列的非连续部分物理靠近而形成。B细胞表位还可以是碳水化合物表位。

[0230] 在实施方式中,本文描述的组合物抗原可以是或包括能够诱导体液免疫应答的B细胞表位。

[0231] 在一些实施方式中,本文描述的组合物抗原可以是或包括与传染性疾病相关联的B细胞表位。例如,抗原可以是或包括源自病毒比如例如流感病毒或呼吸道合胞病毒的B细胞表位。在另一个实施方式中,B细胞表位可以是源自H5N1流感病毒的血凝素糖蛋白的表位。

[0232] 在另一个实施方式中,本文描述的组合物抗原可以是或包括源自细菌比如例如百日咳博代氏杆菌或炭疽杆菌的B细胞表位。在具体的实施方式中,B细胞表位可以由百日咳博代氏杆菌产生的百日咳类毒素蛋白的表位。在另一个具体的实施方式中,B细胞表位可以是炭疽重组保护性抗原(rPA)或炭疽突变体重组保护性抗原(mrPA)的表位。

[0233] 在另一个实施方式中,本文描述的组合物抗原可以是或包括源自原生动物比如源自疟原虫属的B细胞表位。

[0234] 在进一步的实施方式中,组合物可以包括作为用于诱导体液免疫应答的抗原的B细胞表位的混合物。B细胞表位可以被连接以形成单个多肽。

[0235] CTL表位是由细胞毒性T淋巴细胞识别的分子。CTL表位通常在与MHC分子复合的抗原-呈递细胞的表面上呈递。如本文使用的,术语“CTL表位”指的是与抗原(包括半抗原)的天然CTL表位基本上相同的分子(例如肽)。与其天然对应物比较,CTL表位可以被修饰,比如一个或两个氨基酸。除非另外说明,本文提及CTL表位指的是能够被细胞占据并且在抗原-呈递细胞的表面上呈递的未结合分子。

[0236] CTL表位通常应当是可以被修改以由T细胞受体识别使得可以发生细胞介导的免疫应答的表位。对于肽,CTL表位可以与I类或II类MHC分子相互作用。由MHC I类分子呈递的CTL表位的长度通常在8和15个氨基酸之间,并且更通常在9和11个氨基酸之间。由MHC II类分子呈递的CTL表位的长度通常在5和24个氨基酸之间,并且更通常在13和17个氨基酸之间。如果抗原大于这些长度,则它将被免疫系统加工为更适合与MHC I或II类分子相互作用的大小的片段。因此,CTL表位可以是比上面提及的那些更大的肽的一部分。

[0237] 许多CTL表位是已知的。鉴定另外的CTL表位的数种技术是本领域公认的。一般而言,这些包含制备潜在地提供CTL表位的分子和表征针对该分子的免疫应答。

[0238] 在实施方式中,本文描述的组合物抗原可以是或包括能够诱导CTL应答的CTL表位。例如,抗原可以是源自病毒比如HPV的CTL表位。

[0239] 在另一个实施方式中,抗原可以是或包括源自HPV的E6或E7蛋白的CTL表位。例如,并且非限制性地,HPV的E6蛋白的CTL表位可以包括肽序列TIHDIILECV(T10V;SEQ ID NO:

60) 并且HPV的E7蛋白的CTL表位可以包括肽序列RAHYNIVTF (R9F;SEQ ID NO:2)、YMLDLQPETT (Y10T;SEQ ID NO:61)、LLMGTLGIV (L9V;SEQ ID NO:62)、和TLGIVCPI (T81;SEQ ID NO:63)。

[0240] 在另一个实施方式中,CTL表位可以是肿瘤相关蛋白,比如例如本文描述的存活素肽中的一种或多种或黑素瘤相关蛋白的表位。在实施方式中,黑素瘤相关蛋白可以是酪氨酸相关蛋白-2 (TRP-2) 或p53,其可以通过多种方法——包括重组技术或化学合成——获得。

[0241] 例如,并且非限制性地,TRP-2源性蛋白的CTL表位可以包括肽序列SVYDFFVWL (S9L;SEQ ID NO:56) 或VYDFFVWL (V8L;SEQ ID NO:64)。p53源性蛋白的CTL表位可以包括,例如,肽序列KYMCNSSCM (K9M;野生型p53;SEQ ID NO:65)、KYICNSSCM (mK9M;修饰的p53;SEQ ID NO:66) 或AKXVAAWTLKAAAKYICNSSCM (mK9M;SEQ ID NO:67)。

[0242] 在进一步的实施方式中,组合物可以包括作为用于诱导CTL应答的抗原的CTL表位的混合物。CTL表位可以被连接以形成单个多肽。

[0243] 在一些实施方式中,B细胞和CTL表位是疾病相关和/或疾病特异性表位。这样的疾病包括但不限于本文稍早描述的那些中的任一种。例如,并且非限制性地,疾病可以是癌症(比如,例如,乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、成胶质细胞瘤或弥漫性大B细胞淋巴瘤)、传染病(比如,例如,由人乳头瘤病毒 (HPV) 感染、呼吸道合胞病毒 (RSV) 感染、流感病毒感染、埃博拉病毒感染、炭疽杆菌感染、或三日疟原虫感染引起或与其相关联的疾病) 或成瘾疾病(比如,例如,可卡因成瘾)。

[0244] 其它组分

[0245] 本文公开的组合物可以进一步包括如本领域已知的一种或多种另外的组分(参见例如Remington's Pharmaceutical Sciences (Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pa., USA 1985; 和The United States Pharmacopoeia: The National Formulary (USP 24NF19) published in 1999), 只要组合物保持无水或基本上不含水。

[0246] 在一些实施方式中,疫苗组合物可以另外地包括辅助性T表位、乳化剂和/或赋形剂。

[0247] 辅助性T表位

[0248] 在一些实施方式中,本文公开的组合物还可以包括至少一种辅助性T表位或辅助性T抗原。

[0249] 辅助性T表位是具有T-辅助活性的氨基酸(天然或非天然氨基酸)的序列。辅助性T表位被辅助性T淋巴细胞识别,其在建立和最大化免疫系统的能力中发挥重要作用,并且参与激活和指导其它免疫细胞,比如例如细胞毒性T淋巴细胞。

[0250] 辅助性T表位可以由连续或不连续表位构成。因此不是T-辅助物的每个氨基酸是表位的必需部分。因此,辅助性T表位,包括辅助性T表位的类似物和区段,能够增强或刺激免疫应答。免疫显性辅助性T表位在具有广泛相异的MHC类型的动物和人群中是广泛反应性的 (Celis et al. (1988) J. Immunol. 140:1808-1815; Demotz et al. (1989) J. Immunol. 142:394-402; Chong et al. (1992) Infect. Immun. 60:4640-4647)。所述肽的T-辅助结构域可以具有大约10至大约50个氨基酸,和更具体地大约10至大约30个氨基酸。当

存在多个辅助性T表位时,则每个辅助性T表位独立地作用。

[0251] 在一些实施方式中,辅助性T表位可以形成本文描述的抗原的一部分。具体而言,如果抗原具有足够的大小,则它可以包含起辅助性T表位作用的表位。在其它实施方式中,辅助性T表位是与抗原分隔的分子。

[0252] 在另一个实施方式中,辅助性T表位类似物可以包括在辅助性T表位中置换、缺失和插入一个至大约10个氨基酸残基。T-辅助区段是辅助性T表位的连续部分,其足以增强或刺激免疫应答。T-辅助区段的实例是源自单个较长肽的一系列重叠肽。

[0253] 在具体的实施方式中,如本文公开的组合物可以包括修饰的破伤风毒素肽A16L(830至844);AQYIKANSKFIGITEL(SEQ ID NO:78)作为辅助性T表位或抗原,其中丙氨酸残基添加至其氨基端以增强稳定性(Slingluff et al.,Clin Cancer Res.,7:3012-3024,2001)。

[0254] 可以在当前的组合物中使用的辅助性T表位的其它来源包括,例如,乙型肝炎表面抗原辅助性T细胞表位、百日咳毒素辅助性T细胞表位、麻疹病毒F蛋白辅助性T细胞表位、沙眼衣原体主要外膜蛋白辅助性T细胞表位、白喉毒素辅助性T细胞表位、镰状疟原虫环孢子(circumsporozoite)辅助性T细胞表位、曼氏裂体吸虫磷酸丙糖异构酶辅助性T细胞表位、大肠杆菌TraT辅助性T细胞表位和任何这些辅助性T表位的免疫增强类似物和区段。

[0255] 在一些实施方式中,辅助性T表位可以是通用的辅助性T表位。如本文使用的通用的辅助性T表位指的是以如下方式结合至大量MHC II类分子的肽或其它免疫原性分子,或其片段:该方式以II类(CD4+T细胞)局限的方式激活T细胞功能。通用的辅助性T表位的实例是包括肽序列AKXVAAWTLKAAA(SEQ ID NO:79)的PADRE(全-DR表位),其中X可以是环己基丙氨酰。PADRE特异性地具有CD4+辅助性T表位,即,它刺激PADRE特异性CD4+T-辅助应答的诱导。

[0256] 除稍早提及的修饰的破伤风毒素肽A16L之外,破伤风类毒素也具有以与PADRE相同的方式工作的其它辅助性T表位。破伤风和白喉毒素具有用于人CD4+细胞的通用表位(Diethelm-Okita,B.M.et al.,J.Infect.Diseases,181:1001-1009,2000)。在另一个实施方式中,辅助性T表位可以是破伤风类毒素肽,比如包括肽序列FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE(氨基酸947-967;SEQ ID NO:80)的F21E。

[0257] 在某些实施方式中,辅助性T表位被融合至如本文公开的组合物中一种或多种抗原中的至少一种(例如融合肽)。

[0258] 乳化剂

[0259] 在一些实施方式中,本文公开的疫苗组合物可以包括一种或多种乳化剂。乳化剂可以是纯的乳化剂或乳化剂的混合物。乳化剂(一种或多种)应当是药学上和/或免疫学上可接受的。

[0260] 乳化剂的使用可以与制备无水或基本上不含水的组合物特别相关。例如,在一些实施方式中,当两亲化合物或混合物被重悬入疏水运载体时,乳化剂可以被用于帮助稳定两亲化合物,两亲化合物和抗原的混合物,或两亲化合物、抗原和其它疫苗组分(例如聚肌胞苷酸和/或基于脂质的佐剂、辅助性T表位等)的混合物。乳化剂的使用可以例如促进两亲化合物或混合物在疏水运载体中更均匀的分布。

[0261] 乳化剂可以是两亲的并且因此乳化剂可以包括大范围的化合物。在一些实施方式

中,乳化剂可以是表面活性剂,比如例如非离子型表面活性剂。可以使用的乳化剂的实例包括聚山梨醇酯——其是衍生自聚乙二醇化的山梨醇的油性液体——和失水山梨醇酯。聚山梨醇酯可以包括例如失水山梨醇单油酸酯。典型的乳化剂是本领域熟知的并且非限制性地包括二缩甘露醇油酸酯(Arlacel™A),卵磷脂,Tween™80,Spans™20、80、83和85。在实施方式中,在疫苗组合物中使用的乳化剂是二缩甘露醇油酸酯。

[0262] 乳化剂通常与疏水运载体预混合。在一些实施方式中,可以使用已经包含乳化剂的疏水运载体。例如,疏水运载体比如Montanide™ISA 51已经包含乳化剂二缩甘露醇油酸酯。在其它实施方式中,疏水运载体可以在与两亲化合物,两亲化合物和抗原的混合物,或两亲化合物、抗原和其它疫苗组分(例如聚肌胞苷酸和/或基于脂质的佐剂、辅助性T表位等)的混合物组合前与乳化剂混合。

[0263] 以对如下有效的量使用乳化剂:促进两亲化合物在疏水运载体中的均匀分布和/或帮助形成本文描述的结构、组装物或阵列。通常,疏水运载体与乳化剂的体积比(v/v)在大约5:1至大约15:1,更具体地10:1的范围中。

[0264] 组合物的无水性质

[0265] 本文公开的辅助系统被设计用于制备无水或基本上不含水的疫苗组合物,即疫苗组合物不是乳液。

[0266] “无水”的意思是组合物完全不包含水。在另一个实施方式中,组合物可以基本上不含水。术语“基本上不含水”意欲涵盖疏水运载体仍可能包含少量水的实施方式,条件是水存在于运载体的不连续相中。例如,组合物的各个组分可能具有少量的通过过程比如冻干或蒸发可能不被完全去除的结合水并且某些疏水运载体可以包含少量的溶解于其中的水。通常,如本文公开的“基本上不含水”的组合物包含例如小于以重量/重量计组合物的运载体组分的总重量的大约10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.1%、0.05%或0.01%的水。仍包含少量水的组合物不包含使得将形成乳液的足够量的水。

[0267] 如本文展现的,已经令人惊讶地和出乎意料地发现,包括本文公开的辅助系统的无水疫苗组合物能够使用较低剂量的聚肌胞苷酸和基于脂质的佐剂生成显著较高的抗体效价和较强力的细胞介导的免疫应答。

[0268] 因而,在实施方式中,本文公开的无水疫苗组合物包括低的每单位剂量的量的聚肌胞苷酸多核苷酸佐剂和基于脂质的佐剂,如本文上面描述的。

[0269] 在本文公开的无水组合物的一些实施方式中,与包括较高的每单位剂量的量的聚肌胞苷酸多核苷酸佐剂和基于脂质的佐剂的相同的对照组合物比较,低的每单位剂量的量能够提供增强的免疫原性。在一些实施方式中,本文公开的无水组合物诱导与如限定的相同对照组合物相比高至少大约2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍或10倍的抗体免疫应答。在具体的实施方式中,本文公开的无水组合物诱导与如限定的相同对照组合物相比高大约6.5倍的抗体免疫应答。

[0270] 在本文公开的无水组合物的一些实施方式中,与包括等价的每单位剂量的量或较高的每单位剂量的量的聚肌胞苷酸多核苷酸佐剂和基于脂质的佐剂、不包括两亲化合物并且被配制为油乳液组合物的相同的对照组合物比较,低的每单位剂量的量能够提供增强的免疫原性。在一些实施方式中,本文公开的无水组合物诱导与如限定的相同对照组合物相比至少等价或高至少1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍或10倍的抗体免疫应答。

和/或与相同对照组合物相比高至少1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍或5倍的细胞免疫应答。在具体的实施方式中,本文公开的无水组合物诱导与如限定的相同对照组合物相比高大约2倍的抗体免疫应答。在具体的实施方式中,本文公开的无水组合物诱导与如限定的相同对照组合物相比高大约2-3倍的细胞免疫应答。

[0271] 在一些实施方式中,较高的每单位剂量的量可以比低的每单位剂量的量大至少大约2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、15倍、20倍或50倍。

[0272] 在一些实施方式中,如在小鼠中计算的,聚肌胞苷酸多核苷酸佐剂和基于脂质的佐剂的较高的每单位剂量的量是每个剂量至少大约10微克、大约15微克、大约20微克或更多,或对于人等价转换的每单位剂量。人中转换的高的每单位剂量的量可以例如是每单位剂量大约200微克或更多。

[0273] 在一些实施方式中,如在小鼠中计算的,聚肌胞苷酸多核苷酸佐剂和基于脂质的佐剂的低的每单位剂量的量是每个剂量大约0.2微克、大约0.5微克、大约1微克、大约5微克或更少,或对于人等价转换的每单位剂量。如本文较早描述的,在一些实施方式中,人中转换的低剂量的量可以在2-50微克之间,例如每单位剂量大约2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、40或50微克。

[0274] 在一些实施方式中,对象接种疫苗之后大约十二周,低的每单位剂量的量能够以至少大约 1.5×10^7 、 2.0×10^7 、 2.5×10^7 、 3.0×10^7 或 3.5×10^7 的非对数抗体效价诱导抗原特异性抗体免疫应答。在具体的实施方式中,对象接种疫苗之后大约十二周,低的每单位剂量的量能够以大约 $2.9-3.0 \times 10^7$ 之间的非对数抗体效价诱导抗原特异性抗体免疫应答。

[0275] 不固执于任何具体的行动理论,认为当使用本公开内容的无水组合物时,制剂产生持续数周的强的贮存,其允许抗原的延长的清除和疫苗与免疫系统的相互作用。就这一点而言,已经报道了基于油包脂质的制剂在3周的免疫内取得峰值清除,并且清除以较慢速率继续六个月(Brewer et al.2014)。这与如下形成对比:在几小时至一周内快速释放抗原的水性疫苗制剂;或形成短期贮存的乳液。

[0276] 如较早描述的,认为时机对TLR激动剂的效力是关键,这是因为预暴露于一种TLR激动剂可能导致对其它激动剂的耐受。通过在注射部位处促进保留疫苗组分(例如佐剂和抗原)的强的贮存效应持续延长的潜伏期,本文公开的无水疫苗组合物可以特别适合于实现同时暴露。

[0277] 而且,如较早描述的,聚肌胞苷酸的受体在各种细胞上的表达已经限制了将聚肌胞苷酸用作佐剂。然而,本文令人惊讶地展现了无水疫苗组合物能够使用显著减少剂量的聚肌胞苷酸佐剂(例如20倍减少)生成强的抗体和细胞介导的免疫应答。这可以代表显著的优势,这是由于使用较低的每单位剂量的量的聚肌胞苷酸可以降低全身暴露。同样,由无水组合物产生的强的贮存效应也可以限制全身暴露。

[0278] 试剂盒和试剂

[0279] 本文公开的辅助系统或疫苗组合物作为试剂盒被任选地提供给用户。例如,本公开内容的试剂盒包含本文公开的辅助系统或组合物的一种或多种组分。试剂盒可以进一步包括一种或多种另外的试剂、包装材料、用于容纳试剂盒的组分的容器、和详述使用试剂盒组分的优选方法的指令集或用户手册。在实施方式中,容器是小瓶。

[0280] 在一方面,本文公开了试剂盒,其包括在一个或多个单独的容器中的聚肌胞苷酸

多核苷酸佐剂;基于脂质的佐剂;两亲化合物;和疏水运载体。试剂盒可以采用任何数目的合适形式。

[0281] 在试剂盒的第一实施方式中,聚肌胞苷酸多核苷酸佐剂;基于脂质的佐剂;两亲化合物;和疏水运载体每个被提供在单独的容器中。

[0282] 在试剂盒的第二实施方式中,聚肌胞苷酸多核苷酸佐剂;基于脂质的佐剂;和两亲化合物被一起提供在第一容器中并且疏水运载体被提供在第二容器中。在此实施方式中,第一容器的组分可以是冻干的干饼形式,并且可以例如刚好在注射之前制备无水疫苗组合物,这是通过重悬第一容器的内容物与抗原和来自第二容器的疏水运载体。

[0283] 在试剂盒的第三实施方式中,聚肌胞苷酸多核苷酸佐剂和基于脂质的佐剂被一起提供在第一容器中;两亲化合物被提供在第二容器中;并且疏水运载体被提供在第三容器中。

[0284] 在试剂盒的第四实施方式中,聚肌胞苷酸多核苷酸佐剂和基于脂质的佐剂被一起提供在第一容器中并且两亲化合物和疏水运载体被一起提供在第二容器中。

[0285] 在试剂盒的第五实施方式中,聚肌胞苷酸多核苷酸佐剂被提供在第一容器中,基于脂质的佐剂被提供在第二容器中,并且两亲化合物和疏水运载体被一起提供在第三容器中。

[0286] 在试剂盒的第六实施方式中,聚肌胞苷酸多核苷酸、基于脂质的佐剂、两亲化合物和疏水运载体均被一起提供在单个容器中。

[0287] 在另一方面,如本文描述的试剂盒可以另外包括如本文描述的抗原。在一个实施方式中,抗原可以与聚肌胞苷酸多核苷酸佐剂、基于脂质的佐剂、两亲化合物、疏水运载体、和/或其任意混合物中的任一种或多种被一起提供在容器中。在另一个实施方式中,抗原可以被提供在单独的容器中。

[0288] 在具体的实施方式中,聚肌胞苷酸多核苷酸、基于脂质的佐剂、两亲化合物和抗原作为冻干的干饼被一起提供在第一容器中,并且疏水运载体被一起提供在第二容器中。在此实施方式中,可以例如刚好在注射之前制备无水疫苗组合物,这是通过在来自第二容器的疏水运载体中重悬第一容器的内容物。

[0289] 在另一方面,如本文描述的试剂盒可以另外包括如本文描述的辅助性T表位。在一个实施方式中,辅助性T表位可以与聚肌胞苷酸多核苷酸佐剂、基于脂质的佐剂、两亲化合物、疏水运载体、抗原和/或其任意混合物中的任一种或多种一起提供在容器中。在另一个实施方式中,T辅助物可以提供在单独的容器中。

[0290] 如本文描述的试剂盒可以进一步包括用于制备疫苗组合物并且具体而言无水或基本上不含水的疫苗组合物的说明。在一些实施方式中,试剂盒可以进一步包括用于诱导对象中的抗体应答和/或细胞介导的免疫应答的说明。

[0291] 在本文描述的试剂盒的具体实施方式中,基于脂质的佐剂是PAM₃Cys-Ser-(Lys)₄ (SEQ ID NO:1);聚肌胞苷酸多核苷酸佐剂是不同链长度的聚肌苷酸和聚胞苷酸的混合物,所述混合物包括989,486道尔顿的近似分子量;两亲化合物是S100脂质和胆固醇的混合物或二油酰磷脂酰胆碱(DOPC)和胆固醇的混合物;并且疏水运载体是Montanide® ISA 51VG。

[0292] 在任何上面的实施方式中,佐剂、抗原、和/或T-辅助物可以在溶液中,准备好在疏

水运载体中重构前混合和冻干;或可以已经被冻干或准备好在疏水运载体中重构。在任何一个实施方式中,在疏水运载体中重构提供了无水或基本上不含水的疫苗组合物。

[0293] 免疫应答和使用方法

[0294] 本文公开的辅助系统和组合物可以应用于期望给对象施用抗原的任何情况。对象可以是脊椎动物,比如鱼、鸟或哺乳动物,优选地人。

[0295] 如本文提及的,“免疫应答”可以是细胞介导的免疫应答或抗体(体液)免疫应答。

[0296] 在一些实施方式中,本文公开的疫苗组合物可以被用于诱导细胞介导的免疫应答。

[0297] 如本文使用的,“诱导”免疫应答是引发和/或强化免疫应答。诱导免疫应答涵盖相对于现有免疫应答状态——例如在施用本文公开的组合物前——有利于宿主增强、提升、提高或加强免疫应答的情况。

[0298] 如本文使用的,术语“细胞介导的免疫应答”、“细胞免疫力”、“细胞免疫应答”或“细胞毒性T-淋巴细胞(CTL)免疫应答”(在本文可交换地使用)指的是以如下表征的免疫应答:激活巨噬细胞和天然杀伤细胞、产生抗原特异性细胞毒性T淋巴细胞和/或响应于抗原释放多种细胞因子。细胞毒性T淋巴细胞是T淋巴细胞的亚组(一种类型的白细胞),其能够诱导感染的体细胞或肿瘤细胞死亡;它们杀伤感染病毒(或其它病原体)的细胞,或以其它方式受损或功能失调的细胞。

[0299] 大部分细胞毒性T细胞表达可以识别结合至I类MHC分子的特异性肽抗原的T细胞受体。通常,细胞毒性T细胞还表达CD8(即CD8+T细胞),其被吸引至部分I类MHC分子。此亲和力保持细胞毒性T细胞和靶标细胞在抗原特异性激活期间紧密地结合在一起。

[0300] 细胞免疫力通过如下保护身体,例如,激活抗原特异性细胞毒性T-淋巴细胞(例如抗原特异性CD8+T细胞),其能够裂解在其表面上展示外源抗原的表位的体细胞,比如病毒感染的细胞、具有细胞内细菌的细胞、和展示肿瘤抗原的癌细胞;激活巨噬细胞和天然杀伤细胞,使得它们能够破坏细胞内病原体;和刺激细胞分泌各种影响参与适应性免疫应答和先天免疫应答的其它细胞的功能的细胞因子。

[0301] 细胞免疫力是适应性免疫应答的重要组成,并且在通过它们与抗原-呈递细胞比如树突细胞、B淋巴细胞和较小程度上巨噬细胞的相互作用由细胞识别抗原之后,通过多种机制保护身体,比如:

[0302] 1. 激活抗原特异性细胞毒性T-淋巴细胞,其能够在其表面上展示外源抗原的表位的体细胞比如病毒感染的细胞、具有细胞内细菌的细胞、和展示肿瘤抗原的癌细胞中诱导凋亡;

[0303] 2. 激活巨噬细胞和天然杀伤细胞,使得它们能够破坏细胞内病原体;和

[0304] 3. 刺激细胞分泌各种影响参与适应性免疫应答和先天免疫应答的其它细胞的功能的细胞因子。

[0305] 细胞介导的免疫力在去除病毒感染的细胞中是最有效的,但是还参与抵御真菌、原生动物、癌症、和细胞内细菌。其还在移植排斥中发挥主要作用。

[0306] 由于细胞介导的免疫力涉及多种细胞类型的参与并且由不同的机制介导,所以数种方法可以被用于展现接种疫苗之后免疫力的诱导。这些可以宽泛地分类为检测:i) 特异性抗原呈递细胞;ii) 特异性效应细胞和其功能和iii) 可溶性介体比如细胞因子的释放。

[0307] i) 抗原呈递细胞:树突细胞和B细胞(和较小程度上巨噬细胞)装备有允许增T细胞的增强激活的特别的免疫刺激受体,并且称为专业的抗原呈递细胞(APC)。这些免疫刺激分子(也称为共刺激分子)在抗原呈递至效应细胞比如CD4和CD8细胞毒性T细胞的过程期间,在感染或接种疫苗以后在这些细胞上被上调。这样的共刺激分子(比如CD40、CD80、CD86、MHC I类或MHC II类)可以被检测到,例如,通过使用利用针对这些分子的荧光物缀合的抗体连同特异性识别APC的抗体(比如用于树突细胞的CD11c)的流式细胞术。

[0308] ii) 细胞毒性T细胞:(也称为Tc、杀伤T细胞、或细胞毒性T-淋巴细胞(CTL))是T细胞的亚组,其诱导感染有病毒(和其它病原体)或表达肿瘤抗原的细胞死亡。这些CTL直接攻击在其表面上携带某些外源或异常分子的其它细胞。可以使用体外细胞溶解试验(铬释放试验)检测这样的细胞毒性的能力。因而,可以通过存在这样的细胞毒性T细胞展现诱导适应性细胞免疫力,其中,当负载抗原的靶标细胞被在接种疫苗或感染之后体内生成的特异性CTL裂解时。

[0309] 当它们的T细胞受体(TCR)与肽结合的MHC I类分子强烈相互作用时激活幼稚的细胞毒性T细胞。此亲和力取决于抗原/MHC复合物的类型和取向,并且其保持CTL和感染的细胞结合在一起。一旦激活,CTL经历称为克隆扩展的过程,其在该过程中增加功能并且迅速分裂以产生一批“武装的”效应细胞。激活的CTL将然后遍及身体行进以搜寻荷载该独特的MHC I类+肽的细胞。通过在流式细胞计数试验中使用肽-MHC I类四聚物,这可以被用于体外鉴定这样的CTL。

[0310] 当暴露于这些感染的或功能失调的体细胞时,效应物CTL释放穿孔素和粒溶素(granulysin):在靶标细胞的质膜中形成孔的细胞毒素,其允许离子和水流入感染的细胞并且引起其爆裂或裂解。CTL释放粒酶——一种经由孔进入细胞以诱导凋亡(细胞死亡)的丝氨酸蛋白酶。这些分子从CTL的释放可以被用作在接种疫苗之后成功诱导细胞介导的免疫应答的量度。这可以通过酶联免疫吸附试验(ELISA)或酶联免疫斑点试验(ELISPOT)进行,其中CTL可以被定量地测量。由于CTL也能够产生重要的细胞因子比如IFN- γ ,可以通过ELISPOT和通过这些细胞中细胞内IFN- γ 的流式细胞计数测量实现产IFN- γ 的CD8细胞的定量测量。

[0311] CD4+“辅助性”T细胞:CD4+淋巴细胞或辅助性T细胞是免疫应答介体,并且在建立和最大化适应性免疫应答的能力中发挥重要作用。这些细胞不具有细胞毒性或吞噬活性;并且不能杀伤感染的细胞或清除病原体,但是通过指导其它细胞执行这些任务而大体上“管理”免疫应答。两种类型的效应物CD4+辅助性T细胞应答可以由专业的APC——指定Th1和Th2,每个设计为消除不同类型的病原体——诱导。

[0312] 辅助性T细胞表达识别结合至II类MHC分子的抗原的T细胞受体(TCR)。幼稚的辅助性T细胞的激活引起其释放细胞因子,其影响许多细胞类型的活性,包括激活它的APC。辅助性T细胞需要与细胞毒性T细胞相比温和得多的激活刺激。辅助性T细胞可以提供“帮助”激活细胞毒性细胞的额外信号。两种类型的效应物CD4+辅助性T细胞应答可以由专业的APC——指定Th1和Th2,每个设计为消除不同类型的病原体——诱导。两种Th细胞群不同于产生的效应蛋白(细胞因子)的模式。一般而言,Th1细胞通过激活巨噬细胞和细胞毒性T细胞帮助细胞介导的免疫应答;而Th2细胞通过刺激B细胞转化为浆细胞和通过形成抗体来促进体液免疫应答。例如,由Th1细胞调控的应答可以诱导小鼠中的IgG2a和IgG2b(人中的

IgG1和IgG3)并且有利于针对抗原的细胞介导的免疫应答。如果针对抗原的IgG应答由Th2型细胞调控,则其可以显著地增强小鼠中IgG1(人中IgG2)的产生。与Th1或Th2应答相关联的细胞因子的测量将给出成功接种疫苗的量度。这可以通过设计用于Th1-细胞因子比如IFN- γ 、IL-2、IL-12、TNF- α 等或Th2-细胞因子比如IL-4、IL-5、IL10等的特异性ELISA实现。

[0313] iii) 测量细胞因子:由局部淋巴结释放给出成功免疫的良好指示。由于抗原呈递以及APC和免疫效应细胞比如CD4和CD8T细胞的成熟,数种细胞因子被淋巴结细胞释放。通过在存在抗原的情况下体外培养这些LNC,通过测量是否释放某些重要的细胞因子比如IFN- γ 、IL-2、IL-12、TNF- α 和GM-CSF来检测抗原特异性免疫应答。这可以通过使用培养上清液和重组细胞因子作为标准物的ELISA进行。

[0314] 可以以技术人员已知的大量方法确定成功免疫,包括但不限于检测功能性抗体的血凝抑制(HAIJ)和血清中和抑制试验;攻击研究,其中使用相关联的病原体攻击接种疫苗的对象以测定接种疫苗的功效;和使用荧光激活细胞分选(FACS)测定表达特异性细胞表面标志物的细胞群,例如在鉴定激活的或记忆淋巴细胞中。技术人员还可以使用其它已知的方法确定使用如本文公开的组合物免疫是否引发抗体和/或细胞介导的免疫应答。参见,例如,Current Protocols in Immunology Coligan et al.,ed.(Wiley Interscience, 2007)。

[0315] 在一些实施方式中,本文公开的疫苗组合物可以被用于诱导抗体免疫应答。

[0316] 与细胞介导的免疫力相对的“抗体免疫应答”或“体液免疫应答”(在本文可交换地使用)由分泌的抗体介导,该抗体在B淋巴细胞谱系的细胞(B细胞)中产生。这样的分泌的抗体结合至抗原,比如例如在外源物质的表面上的那些、病原体(例如病毒、细菌等)和/或癌细胞,并且标记它们用于破坏。

[0317] 如本文使用的,“体液免疫应答”指的是抗体产生并且还可以包括,另外地或可选地,伴随其的附属过程,比如例如生成和/或激活辅助性T-细胞2(Th2)或辅助性T-细胞17(Th17)、细胞因子产生、同种型转换、亲和力成熟和记忆细胞激活。“体液免疫应答”还可以包括抗体的效应物功能,比如例如毒素中和、经典的补体激活、和促进吞噬和病原体消除。体液免疫应答通常由CD4+Th2细胞辅助并且因此该细胞类型的激活或生成还可以指示体液免疫应答。术语“体液免疫应答”在本文与“抗体应答”或“抗体免疫应答”可交换使用。

[0318] “抗体”是包括由免疫球蛋白基因或免疫球蛋白基因的片段基本上或部分编码的一种或多种多肽的蛋白质。公认的免疫球蛋白基因包括 κ 、 λ 、 α 、 γ 、 δ 、 ϵ 和 μ 恒定区基因,以及无数免疫球蛋白可变区基因。轻链被分类为 κ 或 λ 。重链被分类为 γ 、 μ 、 α 、 δ 、或 ϵ ,其又分别限定免疫球蛋白种类IgG、IgM、IgA、IgD和IgE。典型的免疫球蛋白(抗体)结构单位包括包含四种多肽的蛋白质。每个抗体结构单位由两个相同的多肽链对组成,每个具有一条“轻”链和一条“重”链。每条链的N-端限定了主要负责抗原识别的可变区。(例如IgA和IgM种类的)抗体结构单位还可以彼此和与另外的多肽链装配为低聚物形式,例如与J-链多肽缔合的IgM五聚物。

[0319] 抗体是称为B淋巴细胞(B细胞)的白细胞的亚组的抗原特异性糖蛋白产物。抗原与在B细胞的表面上表达的抗体的接合可以诱导包括刺激B细胞的抗体应答以变为激活的、经历有丝分裂和最终分化为浆细胞,其对合成和分泌抗原特异性抗体是特化的。

[0320] B细胞是免疫应答期间抗体的唯一生产者并且因而对有效的体液免疫是关键要

素。除产生大量抗体之外，B细胞还充当抗原-呈递细胞并且可以将抗原呈递至T细胞，比如辅助性T CD4或细胞毒性CD8+T细胞，因而传播免疫应答。B细胞以及T细胞是适应性免疫应答的一部分。在活性免疫应答期间，例如通过接种疫苗或天然感染进行诱导，抗原特异性B细胞被激活和克隆扩展。在扩展期间，B细胞进化以具有对表位较高的亲和力。可以间接通过激活的辅助性T细胞，并且直接通过刺激受体比如TLR诱导B细胞的增殖。

[0321] 抗原呈递细胞，比如树突细胞和B细胞，被吸引至接种疫苗位点并且可以与疫苗组合物中包含抗原的和佐剂相互作用。通常，佐剂刺激细胞变得激活并且抗原提供了靶标的蓝图。不同类型的佐剂可以给细胞提供不同的刺激信号。例如，聚肌胞苷酸 (TLR3激动剂) 可以激活树突细胞，而非B细胞。佐剂比如Pam3Cys、Pam2Cys和FSL-1尤其擅长激活和起始B细胞的增殖，其预期促进抗体应答的产生 (Moyle et al., Curr Med Chem, 2008; So., J Immunol, 2012)。

[0322] 体液免疫应答是有效的传染性疾病的常见机制之一 (例如阻止病毒或细菌侵入者)。然而，体液免疫应答还可以对防治癌症有用。然而癌症疫苗通常被设计以产生可以识别和破坏癌细胞的细胞介导的免疫应答，B细胞介导的应答可以通过其它机制靶向癌细胞，其在一些情况下可以与细胞毒性T细胞协作用于最大益处。B细胞介导的 (例如体液免疫应答介导的) 抗肿瘤应答的实例非限制性地包括：1) 由B细胞产生的抗体，其结合至在肿瘤细胞或影响肿瘤发生的其它细胞上发现的表面抗原。这样的抗体可以例如通过抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC) 或补体固定诱导靶标细胞的杀伤，其潜在地导致释放可以由免疫系统识别的另外的抗原；2) 结合至肿瘤细胞上的受体以阻断其刺激和实际上中和其效应的抗体；3) 结合至由肿瘤或肿瘤相关细胞释放或与其相关联的因子以调节支持癌症的信号传导或细胞途径的抗体；和4) 结合至细胞内靶标并且通过当前未知的机制调节抗肿瘤活性的抗体。

[0323] 评价抗体应答的一种方法是测量与特定抗原反应的抗体的效价。这可以使用本领域已知的各种方法比如从动物获得的包含抗体的物质的酶联免疫吸附试验 (ELISA) 进行。例如，可以在暴露于抗原之前和之后在对象中测定结合至特定抗原的血清抗体的效价。抗原特异性抗体的效价在暴露于抗原之后的统计学显著增加将指示对象已经组织了对抗原的抗体应答。

[0324] 非限制性地，可以用于检测抗原特异性抗体的存在的其它试验包括免疫学试验 (例如放射免疫试验 (RIA))、免疫沉淀试验、和蛋白质印迹 (例如Western印迹) 试验；和中和试验 (例如，在体外或体内试验中中和病毒传染性)。

[0325] 本文公开的疫苗组合物对治疗或预防通过细胞介导的免疫应答或体液免疫应答减轻的疾病和/或障碍可以是有用的。疫苗可以应用于期望给对象施用抗原以引导细胞介导的免疫应答或体液免疫应答的任何情况。

[0326] 在实施方式中，本公开内容涉及包括给需要其的对象施用如本文描述的组合物的方法。在一些实施方式中，方法用于诱导所述对象中对所述抗原的抗体应答和/或细胞介导的免疫应答。在一些实施方式中，方法用于治疗 and/或预防由细菌、病毒、真菌、寄生虫、变应原、或表达抗原的肿瘤细胞的引起的疾病。

[0327] 如本文使用的，“治疗”或“…的治疗”，或“预防”或“…的预防”指的是用于获得益处或期望结果的途径。有益结果或期望结果可以包括但不限于缓和或减轻一种或多种症状

或病症、降低疾病程度、稳定疾病状态、阻止疾病发展、阻止疾病传播、延迟或减慢疾病进展(例如阻抑)、延迟或减慢疾病发作、针对引起疾病的试剂赋予保护性免疫和减轻或减缓疾病状态。“治疗”或“预防”还可以意味着延长患者的存活超过在不存在治疗的情况下预期的存活,并且还可以意味着暂时抑制疾病进展或阻止疾病发生,比如通过阻止对象中感染。“治疗”或“预防”还可以指的是肿瘤质量大小的减小、肿瘤侵袭性降低等。

[0328] “治疗”还可以区别于“预防”,在于“治疗”通常在已经患有疾病或障碍或已知已经暴露于传染剂的对象中发生,而“预防”通常在未患有疾病或障碍或未知已经暴露于传染剂的对象中发生。如将领会的,可以在治疗和预防中存在重叠。例如,“治疗”对象中的疾病,而同时“预防”疾病的症状或进展是可能的。而且,至少在接种疫苗的背景下,“治疗”和“预防”可以重叠,其中对象的治疗是诱导免疫应答,其可以具有预防病原体感染或预防由病原体感染引起的潜在疾病或症状的后续效果。这些预防方面在本文由表述比如“治疗传染性疾病”或“治疗癌症”涵盖。

[0329] 在实施方式中,本文公开的方法和组合物可以被用于治疗和/或预防需要其的对象中的癌症。对象可以患有癌症或可以处于发展出癌症的风险下。

[0330] 如本文使用的,术语“癌症”、“癌细胞”、“肿瘤”和“肿瘤细胞”(可交换地使用)指的是展示异常生长——其表征为显著失去对细胞增殖的控制——的细胞或已经永生化的细胞。术语“癌症”或“肿瘤”包括转移性以及非转移性癌症或肿瘤。可以使用本领域通常接受的标准诊断癌症,包括恶性肿瘤的存在。

[0331] 非限制性地,可能能够通过使用或施用如本文公开的组合物治疗和/或预防的癌症包括癌、腺癌、淋巴瘤、白血病、肉瘤、胚细胞瘤、骨髓瘤、和生殖细胞肿瘤。非限制性地,特别合适的实施方式可以包括成胶质细胞瘤、多发性骨髓瘤、卵巢癌、乳腺癌、输卵管癌、前列腺癌或腹膜癌。在一个实施方式中,癌症可以由病原体比如病毒引起。与癌症发展相关联的病毒是技术人员已知的,并且包括但不限于人乳头瘤病毒(HPV)、JC病毒(JCV)、人疱疹病毒8、EB病毒(EBV)、梅克尔细胞多瘤病毒、丙型肝炎病毒和人T细胞白血病病毒-1。在另一个实施方式中,癌症可以是表达一种或多种癌症特异性抗原(例如存活素)的癌症。

[0332] 在具体的实施方式中,癌症是乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、输卵管癌、腹膜癌、成胶质细胞瘤或弥漫性大B细胞淋巴瘤。

[0333] 本文公开的方法和组合物对治疗或预防癌症可以是有用的;例如,癌症严重度降低(例如肿瘤大小、侵袭性和/或侵入性、恶性等)或癌症复发的预防。

[0334] 在另一个实施方式中,本文公开的方法和组合物可以被用于治疗和/或预防需要其的对象中传染性疾病,比如由病毒感染引起的。对象可以感染有病毒或可以处于发展出病毒感染的风险下。可以通过使用或施用如本文公开的组合物治疗和/或预防的病毒感染非限制性地包括牛痘病毒、痘苗病毒、假牛痘病毒、人疱疹病毒1、人疱疹病毒2、巨细胞病毒、人腺病毒A-F、多瘤病毒、人乳头瘤病毒(HPV)、细小病毒、甲型肝炎病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、人免疫缺陷病毒、正呼肠孤病毒、轮状病毒、埃博拉病毒、副流感病毒、甲型流感病毒、乙型流感病毒、丙型流感病毒、麻疹病毒、腮腺炎病毒、风疹病毒、肺炎病毒、人呼吸道合胞病毒、狂犬病病毒、加利福尼亚脑炎病毒、日本脑炎病毒、汉坦病毒、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒、冠状病毒、肠病毒、鼻病毒、脊髓灰质炎病毒、诺如病毒、黄病毒、登革病毒、西尼罗病毒、黄热病病毒和水痘。在具体的实施方式中,病毒感染是人乳头瘤病毒、埃博

拉病毒、人呼吸道合胞病毒或流感病毒。

[0335] 在另一个实施方式中,本文公开的方法或组合物可以被用于治疗 and/或预防需要其的对象中传染性疾病,比如由非病毒病原体(比如细菌或原生动物)引起的。对象可以感染有病原体或可以处于发展出病原体感染的风险下。非限制性地,示例性细菌病原体可以包括炭疽(炭疽杆菌)、布鲁氏杆菌属、百日咳博代氏杆菌、念珠菌属、肺样衣原体、鹦鹉热衣原体、霍乱、肉毒梭状芽胞杆菌、粗球孢子菌、隐球菌属、白喉、大肠杆菌0157:H7、肠出血性大肠杆菌、肠毒性大肠杆菌、流感嗜血杆菌、幽门螺杆菌、军团菌属、钩端螺旋体属、李斯特菌属、脑膜炎球菌属、肺炎衣原体、分枝杆菌属、百日咳、肺炎、沙门氏菌属、志贺氏菌属、葡萄球菌属、肺样双球菌和小肠结肠炎耶尔森氏菌。在具体的实施方式中,细菌感染是炭疽。非限制性地,示例性原生动物病原体可以包括引起疟疾的疟原虫属的那些(镰状疟原虫、三日疟原虫、间日疟原虫、卵形疟原虫或诺尔斯疟原虫)。

[0336] 在另一个实施方式中,本文公开的方法或组合物可以被用于治疗 and/或预防需要其的对象中的神经变性疾病,其中神经变性疾病与抗原的表达相关联。对象可以患有神经变性疾病或可以处于发展出神经变性疾病的风险下。可以通过本文公开的方法或组合物治疗和/或预防的神经变性疾病非限制性地包括阿耳茨海默病、帕金森病、亨廷顿舞蹈症、和肌萎缩性脊髓侧索硬化症(ALS)。

[0337] 在另一个实施方式中,本文公开的方法或组合物可以被用于治疗 and/或预防成瘾疾病(比如,例如,可卡因成瘾)。

[0338] 在另一个实施方式中,本文公开的方法或组合物可以被用于使用抗体中和毒素、病毒、细菌或变应原,所述方法包括给对象施用如本文描述的组合物。例如,响应于疫苗中的抗原产生的抗体可以中和或隔绝毒素、病毒、细菌或变应原。在实施方式中,毒素是药物物质,比如,例如,可卡因。

[0339] 用于制备疫苗组合物的方法

[0340] 可以通过考虑本公开内容的本领域已知的方法制备辅助系统和疫苗组合物,包括在实例中描述的非限制性方法。下面非限制性地描述了用于制备本文公开的辅助系统和疫苗组合物的示例性实施方式。

[0341] 如在此部分中使用的,术语“抗原”通常用于描述可以如何在本公开内容的疫苗组合物中配制抗原。术语“抗原”涵盖单数形式“抗原”和复数的“抗原”。所有抗原并非必须以相同的方式引入疫苗组合物。

[0342] 在用于制备疫苗组合物的实施方式中,抗原、佐剂和任选地其它疫苗组分(例如辅助性T表位)在合适的溶剂中与两亲化合物一起被重构。疫苗组分然后被干燥以形成干饼,并且干饼在疏水运载体中重悬。可以通过本领域已知的多种手段进行干燥步骤,比如通过冷冻干燥、冻干、旋转蒸发、加压蒸发等。也可以使用不损害组分的完整性的低热干燥。热还可以被用于帮助重悬抗原/两亲化合物混合物。

[0343] “合适的溶剂”是适合溶解抗原、佐剂和/或两亲化合物的溶剂,并且可以由技术人员确定。在实施方式中,可以使用磷酸钠缓冲液(0.2M, pH 6.0)或磷酸钠缓冲液(0.1M, pH 7.0)。在另一个实施方式中,可以使用极性质子溶剂比如醇(例如叔丁醇、正丁醇、异丙醇、正丙醇、乙醇或甲醇)、水、乙酸盐缓冲液、甲酸或氯仿。在一些情况下,相同的溶剂可以被用于溶解两亲化合物、抗原和佐剂中的每种,并且然后混合溶解的组分。可选地,抗原、佐剂和

两亲化合物可以在溶解之前混合,并且然后溶解在一起。在进一步的替代方案中,溶解两亲化合物、抗原或佐剂中的仅一种或多种,并且添加不可溶的组分(一种或多种)。

[0344] 在具体的实施方式中,为了制备疫苗组合物,在具有S100脂质和胆固醇(Lipoid,德国)的磷酸钠缓冲液中一起地或单独地重构抗原和佐剂。这些疫苗组分然后被冻干以形成干饼。就在注射之前,在ISA51VG油(SEPPIC,法国)中重悬干饼以制备无水基于油的疫苗组合物。

[0345] 在另一个实施方式中,为了制备疫苗组合物,在具有脂质DOPC和胆固醇(Lipoid,德国)的0.2%PEG-H₂O中重构缀合的抗原/辅助性T表位。聚肌胞苷酸和基于脂质的佐剂在水中重构,并且然后添加至抗原-脂质混合物。这些疫苗组分然后被冻干以形成干饼。就在注射之前,在ISA51VG油(SEPPIC,法国)中重悬干饼以制备无水疫苗组合物。

[0346] 在上面的实施方式中,不受限于具体的行动理论,认为去除(干燥)溶剂在两亲化合物分子的阵列——其中其亲水头基朝向疫苗组分取向——中留下疫苗组分,包括抗原。疫苗组分和两亲化合物可以然后在不存在水的情况下被悬浮于疏水运载体(比如油)中,这是由于已经使它们充分地疏水。

[0347] 可以在配制过程的任何阶段添加如本文描述的另外的组分,比如辅助性T表位。例如,一种或多种这样另外的组分可以在溶解之前或之后与抗原、佐剂和/或两亲化合物组合,或添加至溶解的混合物。在另一个实施方式中,替代地,另外的组分可以添加至或与抗原、佐剂和两亲化合物的干燥混合物组合,或在疏水运载体中重悬抗原、佐剂和两亲化合物的干燥混合物之前或之后与疏水运载体组合。在实施方式中,辅助性T表位以与抗原相同的方式被添加至疫苗组合物。在实施方式中,抗原和辅助性T表位是融合肽。

[0348] 在一些实施方式中,当疫苗组分重悬于疏水运载体时,可以适合的是在疏水运载体中包括乳化剂以帮助稳定干饼的疫苗组分。以足以在疏水运载体中重悬抗原、佐剂和两亲化合物的干燥混合物并且维持抗原、佐剂和两亲化合物悬浮于疏水运载体的量提供乳化剂。例如,乳化剂可以以疏水运载体的大约5%至大约15%重量/重量或重量/体积存在。

[0349] 维持生物学活性或提高化学稳定性以延长任何疫苗组分的保存期限的稳定剂比如糖、抗氧化剂、或防腐剂可以被添加至这样的组合物。

[0350] 可以以与上面关于疫苗组合物描述的类似方式制备如本文公开的辅助系统,例外是不包括抗原。为了然后制备无水疫苗组合物,抗原与两亲化合物单独地制备,干燥,使用疏水运载体重悬,并且然后与辅助系统混合。可选地,抗原可以被直接添加至辅助系统,单独地或在与两亲化合物掺混后。

[0351] 实施方式

[0352] 本公开内容的具体实施方式非限制性地包括下列:

[0353] (1) 辅助系统,其包括:

[0354] (a) 聚肌胞苷酸多核苷酸佐剂;

[0355] (b) 基于脂质的佐剂;

[0356] (c) 两亲化合物;和

[0357] (d) 疏水运载体。

[0358] (2) 段落(1)的辅助系统,其中基于脂质的佐剂包括一种或多种脂肽。

[0359] (3) 段落(2)的辅助系统,其中脂肽中的至少一种包括作为脂质组分的棕榈酸。

- [0360] (4) 段落 (1) 至 (3) 中任一项的辅助系统,其中基于脂质的佐剂包括二棕榈酰-S-丙三基-半胱氨酸(PAM₂Cys)或三棕榈酰-S-丙三基-半胱氨酸(PAM₃Cys)。
- [0361] (5) 段落 (4) 的辅助系统,其中基于脂质的佐剂是PAM₂Cys-Ser-(Lys) 4 (SEQ ID NO:1) 或PAM₃Cys-Ser-(Lys) 4 (SEQ ID NO:1)。
- [0362] (6) 段落 (5) 的辅助系统,其中基于脂质的佐剂是PAM₃Cys-Ser-(Lys) 4 (SEQ ID NO:1)。
- [0363] (7) 段落 (1) 至 (6) 中任一项的辅助系统,其中聚肌胞苷酸多核苷酸佐剂包括RNA、DNA或其组合。
- [0364] (8) 段落 (1) 至 (7) 中任一项的辅助系统,其中聚肌胞苷酸多核苷酸佐剂是双链的并且每条链是肌苷酸或胞苷酸残基的均聚物。
- [0365] (9) 段落 (1) 至 (7) 中任一项的辅助系统,其中聚肌胞苷酸多核苷酸佐剂是双链的并且每条链是包括肌苷酸和胞苷酸残基二者的杂聚物。
- [0366] (10) 段落 (1) 至 (7) 中任一项的辅助系统,其中聚肌胞苷酸多核苷酸佐剂是包括均聚物聚肌胞苷酸多核苷酸和杂聚物聚肌胞苷酸多核苷酸二者的混合物。
- [0367] (11) 段落 (1) 至 (7) 中任一项的辅助系统,其中聚肌胞苷酸多核苷酸佐剂是不同链长度的聚肌苷酸和聚胞苷酸的混合物,所述混合物包括989,486道尔顿的近似分子量。
- [0368] (12) 段落 (1) 至 (11) 中任一项的辅助系统,其中两亲化合物是脂质。
- [0369] (13) 段落 (12) 的辅助系统,其中脂质围绕抗原形成闭合的囊泡结构。
- [0370] (14) 段落 (13) 的辅助系统,其中闭合的囊泡结构是单层囊泡结构或双层囊泡结构。
- [0371] (15) 段落 (14) 的辅助系统,其中单层囊泡结构是胶团。
- [0372] (16) 段落 (14) 的辅助系统,其中双层囊泡结构是单层或多层脂质体。
- [0373] (17) 段落 (12) 至 (16) 中任一项的辅助系统,其中脂质是磷脂或磷脂的混合物。
- [0374] (18) 段落 (17) 的辅助系统,其中磷脂是二油酰磷脂酰胆碱(DOPC)或磷脂的混合物包括DOPC。
- [0375] (19) 段落 (17) 的辅助系统,其中磷脂是卵磷脂或磷脂的混合物包括卵磷脂。
- [0376] (20) 段落 (19) 的辅助系统,其中卵磷脂是类脂S100。
- [0377] (21) 段落 (1) 至 (20) 中任一项的辅助系统,其中运载体是油或油的混合物。
- [0378] (22) 段落 (21) 的辅助系统,其中运载体包括植物油、坚果油、或矿物油。
- [0379] (23) 段落 (22) 的辅助系统,其中运载体是矿物油或是矿物油溶液中的二缩甘露醇油酸酯。
- [0380] (24) 段落 (23) 的辅助系统,其中运载体是Montanide®ISA 51VG。
- [0381] (25) 组合物,其包括:
- [0382] (a) 抗原;
- [0383] (b) 聚肌胞苷酸多核苷酸佐剂;
- [0384] (c) 基于脂质的佐剂;
- [0385] (d) 两亲化合物;和
- [0386] (e) 疏水运载体,
- [0387] 其中组合物是无水的或基本上不含水。

- [0388] (26) 段落 (25) 的组合物,其是无水的。
- [0389] (27) 段落 (25) 的组合物,其包括以重量/重量计运载体的总重量的小于大约10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.1%、0.05%或0.01%的水。
- [0390] (28) 段落 (25) 至 (27) 中任一项的组合物,其中基于脂质的佐剂包括一种或多种脂肽。
- [0391] (29) 段落 (28) 的组合物,其中脂肽中的至少一种包括作为脂质组分的棕榈酸。
- [0392] (30) 段落 (25) 至 (29) 中任一项的组合物,其中基于脂质的佐剂包括二棕榈酰-S-丙三基-半胱氨酸(PAM₂Cys)或三棕榈酰-S-丙三基-半胱氨酸(PAM₃Cys)。
- [0393] (31) 段落 (30) 的组合物,其中基于脂质的佐剂是PAM₂Cys-Ser-(Lys) 4 (SEQ ID NO:1) 或PAM₃Cys-Ser-(Lys) 4 (SEQ ID NO:1)。
- [0394] (32) 段落 (31) 的组合物,其中基于脂质的佐剂是PAM₃Cys-Ser-(Lys) 4 (SEQ ID NO:1)。
- [0395] (33) 段落 (25) 至 (32) 中任一项的组合物,其中聚肌胞苷酸多核苷酸佐剂包括RNA、DNA或其组合。
- [0396] (34) 段落 (25) 至 (33) 中任一项的组合物,其中聚肌胞苷酸多核苷酸佐剂是双链的并且每条链是肌苷酸或胞苷酸残基的均聚物。
- [0397] (35) 段落 (25) 至 (33) 中任一项的组合物,其中聚肌胞苷酸多核苷酸佐剂是双链的并且每条链是包括肌苷酸和胞苷酸残基二者的杂聚物。
- [0398] (36) 段落 (25) 至 (33) 中任一项的组合物,其中聚肌胞苷酸多核苷酸佐剂是包括均聚物聚肌胞苷酸多核苷酸和杂聚物聚肌胞苷酸多核苷酸二者的混合物。
- [0399] (37) 段落 (25) 至 (33) 中任一项的组合物,其中聚肌胞苷酸多核苷酸佐剂是不同链长度的聚肌苷酸和聚胞苷酸的混合物,所述混合物包括989,486道尔顿的近似分子量。
- [0400] (38) 段落 (25) 至 (37) 中任一项的组合物,其中两亲化合物是脂质。
- [0401] (39) 段落 (38) 的组合物,其中脂质围绕抗原形成闭合的囊泡结构。
- [0402] (40) 段落 (39) 的组合物,其中闭合的囊泡结构是单层囊泡结构或双层囊泡结构。
- [0403] (41) 段落 (40) 的组合物,其中单层囊泡结构是胶团。
- [0404] (42) 段落 (40) 的组合物,其中双层囊泡结构是单层或多层脂质体。
- [0405] (43) 段落 (38) 至 (42) 中任一项的组合物,其中脂质是磷脂或磷脂的混合物。
- [0406] (44) 段落 (43) 的组合物,其中磷脂是二油酰磷脂酰胆碱(DOPC)或磷脂的混合物包括DOPC。
- [0407] (45) 段落 (43) 的组合物,其中磷脂是卵磷脂或磷脂的混合物包括卵磷脂。
- [0408] (46) 段落 (45) 的组合物,其中卵磷脂是类脂S100。
- [0409] (47) 段落 (25) 至 (46) 中任一项的组合物,其中运载体是油或油的混合物。
- [0410] (48) 段落 (47) 的组合物,其中运载体包括植物油、坚果油、或矿物油。
- [0411] (49) 段落 (48) 的组合物,其中运载体是矿物油或是矿物油溶液中的二缩甘露醇油酸酯。
- [0412] (50) 段落 (49) 的组合物,其中运载体是Montanide® ISA 51VG。
- [0413] (51) 段落 (25) 至 (50) 中任一项的组合物,其中抗原是多肽;编码多肽的多核苷酸;碳水化合物;微生物或其部分;或毒素。

[0414] (52) 段落 (51) 的组合物,其中抗原:(i) 源自病毒、细菌或原生动物;(ii) 膜表面结合癌症抗原;或 (iii) 毒素。

[0415] (53) 段落 (52) 的组合物,其中抗原源自埃博拉病毒、人乳头瘤病毒 (HPV)、流感病毒、呼吸道合胞病毒、百日咳博代氏杆菌、炭疽杆菌或三日疟原虫。

[0416] (54) 段落 (53) 的组合物,其中源自炭疽杆菌的抗原是源自炭疽毒素的重组保护性抗原 (PA)。

[0417] (55) 段落 (53) 的组合物,其中源自 HPV 的抗原包括氨基酸序列 RAHYNIVTF (SEQ ID NO:2)。

[0418] (56) 段落 (53) 的组合物,其中源自流感病毒的抗原是重组 HA 抗原。

[0419] (57) 段落 (52) 的组合物,其中膜表面结合癌症抗原是存活素抗原。

[0420] (58) 段落 (57) 的组合物,其中存活素抗原是肽抗原,其包括来自存活素蛋白的氨基酸序列 (SEQ ID NO:69) 或其修饰变体;或编码所述肽抗原的核酸分子。

[0421] (59) 段落 (57) 的组合物,其中存活素抗原是肽抗原,其包括选自 FEELTLGEF (SEQ ID NO:70); FTELTLGEF (SEQ ID NO:71); LTLGEFLKL (SEQ ID NO:72); LMLGEFLKL (SEQ ID NO:73); RISTFKNWPF (SEQ ID NO:74); RISTFKNWPK (SEQ ID NO:75); STFKNWPFL (SEQ ID NO:76); 或 LPPAWQPFL (SEQ ID NO:77), 或其任意组合的氨基酸序列;或编码所述肽抗原的核酸分子。

[0422] (60) 段落 (57) 的组合物,其包括五种肽抗原的混合物,该五种肽抗原包括氨基酸序列: FTELTLGEF (SEQ ID NO:71); LMLGEFLKL (SEQ ID NO:73); RISTFKNWPK (SEQ ID NO:75); STFKNWPFL (SEQ ID NO:76); 和 LPPAWQPFL (SEQ ID NO:77)。

[0423] (61) 段落 (52) 的组合物,其中毒素是药物物质,例如可卡因。

[0424] (62) 段落 (25) 至 (61) 中任一项的组合物,其中抗原包括至少一种 B 细胞表位、至少一种 CTL 表位或其组合。

[0425] (63) 段落 (25) 至 (62) 中任一项的组合物,进一步包括辅助性 T 表位。

[0426] (64) 段落 (63) 的组合物,其中辅助性 T 表位被缀合或融合至抗原。

[0427] (65) 段落 (62) 或 (63) 的组合物,其中 T-辅助物是包括氨基酸序列 AKXVAAWTLKAAA (SEQ ID NO:79) 的 PADRE;包括氨基酸序列 FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE (SEQ ID NO:80) 的破伤风类毒素肽 F21E;或包括氨基酸序列 AQYIKANSKFIGITEL (SEQ ID NO:78) 的修饰的破伤风类毒素肽 A16L。

[0428] (66) 段落 (25) 至 (65) 中任一项的组合物,其中聚肌胞苷酸多核苷酸佐剂是 To11 样受体 3 (TLR3) 激动剂并且基于脂质的佐剂是 TLR1/2 异源二聚体的激动剂。

[0429] (67) 段落 (25) 至 (66) 中任一项的组合物,其能够以单一剂量诱导抗体免疫应答和/或细胞介导的免疫应答。

[0430] (68) 段落 (67) 的组合物,其包括低的每单位剂量的量的聚肌胞苷酸多核苷酸佐剂和基于脂质的佐剂。

[0431] (69) 段落 (68) 的组合物,其中与包括较高的每单位剂量的量的聚肌胞苷酸多核苷酸佐剂和基于脂质的佐剂的相同的对照组合物比较,低的每单位剂量的量能够提供增强的免疫原性。

[0432] (70) 段落 (69) 的组合物,其中组合物诱导与如限定的相同对照组合物相比高至少

大约2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍或10倍的抗体免疫应答。

[0433] (71) 段落 (68) 的组合物,其中与包括等价的每单位剂量的量或较高的每单位剂量的量的聚肌胞苷酸多核苷酸佐剂和基于脂质的佐剂、不包括两亲化合物并且被配制为油乳液组合物的相同的对照组合物比较,低的每单位剂量的量能够提供增强的免疫原性。

[0434] (72) 段落 (71) 的组合物,其中组合物诱导与如限定的相同对照组合物相比至少等价或高至少大约1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍或10倍的抗体免疫应答和/或与相同对照组合物相比高至少1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍或5倍的细胞免疫应答。

[0435] (73) 段落 (69) 至 (72) 中任一项的组合物,其中较高的每单位剂量的量比低的每单位剂量的量大至少大约2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、15倍、20倍或50倍。

[0436] (74) 段落 (69) 至 (73) 中任一项的组合物,其中较高的每单位剂量的量的聚肌胞苷酸多核苷酸佐剂和基于脂质的佐剂是每个剂量至少大约10微克、大约15微克、大约20微克或更多。

[0437] (75) 段落 (68) 至 (74) 中任一项的组合物,其中低的每单位剂量的量的聚肌胞苷酸多核苷酸佐剂和基于脂质的佐剂是每个剂量大约0.2微克、大约0.5微克、大约1微克、大约5微克或更少。

[0438] (76) 段落 (68) 至 (75) 中任一项的组合物,其中对象接种疫苗之后大约十二周,低的每单位剂量的量能够以至少大约 1.5×10^7 、 2.0×10^7 、 2.5×10^7 、 3.0×10^7 或 3.5×10^7 的非对数抗体效价诱导抗原特异性抗体免疫应答。

[0439] (77) 段落 (25) 至 (76) 中任一项的组合物,其用于治疗或预防通过抗体免疫应答和/或细胞介导的免疫应答减轻的疾病或障碍。

[0440] (78) 段落 (25) 至 (77) 中任一项的组合物,其用于治疗或预防:由细菌、病毒、真菌、寄生虫、变应原、或表达抗原的肿瘤细胞引起的疾病。

[0441] (79) 段落 (25) 至 (77) 中任一项的组合物,其用于使用针对抗原产生的抗体中和毒素、病毒、细菌或变应原。

[0442] (80) 方法,其包括给需要其的对象施用段落 (25) 至 (77) 中任一项的组合物。

[0443] (81) 根据段落 (80) 的方法,其是用于诱导所述对象中针对所述抗原的抗体应答和/或细胞介导的免疫应答的方法。

[0444] (82) 根据段落 (81) 的方法,其是用于治疗或预防由细菌、病毒、真菌、寄生虫、变应原、或表达抗原的肿瘤细胞引起的疾病的方法。

[0445] (83) 根据段落 (82) 的方法,其中疾病是流感、由人呼吸道合胞病毒引起的呼吸道感染、百日咳、炭疽或疟疾。

[0446] (84) 根据段落 (82) 的方法,其中疾病是癌症。

[0447] (85) 根据段落 (81) 的方法,其是用于治疗和/或预防神经变性疾病的方法,其中神经变性疾病与抗原的表达相关联。

[0448] (86) 根据段落 (85) 的方法,其中神经变性疾病是阿耳茨海默病。

[0449] (87) 使用抗体中和毒素、病毒、细菌或变应原的方法,所述方法包括给对象施用段落 (25) 至 (77) 中任一项的组合物。

[0450] (88) 段落 (87) 的方法,其中毒素是药物物质,例如可卡因。

[0451] (89) 试剂盒, 其在一个或多个单独的容器包括聚肌胞苷酸多核苷酸佐剂, 任选地如段落 (7) 至 (11) 中任一项中限定的; 基于脂质的佐剂, 任选地如段落 (2) 至 (6) 中任一项中限定的; 两亲化合物, 任选地如段落 (12) 至 (20) 中任一项中限定的; 和疏水运载体, 任选地如段落 (21) 至 (24) 中任一项中限定的。

[0452] (90) 段落 (89) 的试剂盒, 其中聚肌胞苷酸多核苷酸佐剂; 基于脂质的佐剂; 两亲化合物; 和疏水运载体每种在单独的容器中。

[0453] (91) 段落 (89) 的试剂盒, 其中聚肌胞苷酸多核苷酸佐剂; 基于脂质的佐剂; 和两亲化合物一起在第一容器中并且疏水运载体在第二容器中。

[0454] (92) 段落 (89) 的试剂盒, 其中聚肌胞苷酸多核苷酸佐剂和基于脂质的佐剂一起在第一容器中; 两亲化合物在第二容器中; 并且疏水运载体在第三容器中。

[0455] (93) 段落 (89) 的试剂盒, 其中聚肌胞苷酸多核苷酸佐剂和基于脂质的佐剂一起在第一容器中并且两亲化合物和疏水运载体一起在第二容器中。

[0456] (94) 段落 (89) 的试剂盒, 其中聚肌胞苷酸多核苷酸佐剂在第一容器中, 基于脂质的佐剂在第二容器中, 并且两亲化合物和疏水运载体一起在第三容器中。

[0457] (95) 段落 (89) 至 (94) 中任一项的试剂盒, 进一步包括抗原, 其中抗原与聚肌胞苷酸多核苷酸佐剂、基于脂质的佐剂、两亲化合物、疏水运载体、和/或其任意混合物中的任一种或多种一起在容器中; 或抗原在单独的容器中。

[0458] (96) 段落 (95) 的试剂盒, 其中抗原如段落 (51) 至 (62) 中任一项中限定的。

[0459] (97) 段落 (95) 或 (96) 的试剂盒, 进一步包括辅助性T表位, 其中辅助性T表位与聚肌胞苷酸多核苷酸佐剂、基于脂质的佐剂、两亲化合物、疏水运载体、抗原和/或其任意混合物中的任一种或多种一起在容器中; 或T辅助物在单独的容器中。

[0460] (98) 段落 (97) 的试剂盒, 其中辅助性T表位在与抗原相同的容器中并且与抗原隔离或被缀合或融合至抗原。

[0461] (99) 段落 (97) 或 (98) 的试剂盒, 其中T-辅助物是包括氨基酸序列AKXVAAWTLKAAA (SEQ ID NO:79) 的PADRE; 包括氨基酸序列FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE (SEQ ID NO:80) 的破伤风类毒素肽F21E; 或包括氨基酸序列AQYIKANSKFIGITEL (SEQ ID NO:78) 的修饰的破伤风毒素肽A16L。

[0462] (100) 段落 (89) 至 (99) 中任一项的试剂盒, 进一步包括用于制备药物组合物的说明和/或用于诱导对象中的抗体应答和/或细胞介导的免疫应答的说明。

[0463] (101) 段落 (89) 至 (100) 中任一项的试剂盒, 其用于制备无水或基本上不含水的组合物, 其中基本上不含水的组合物包括以重量/重量计运载体的总重量的小于大约10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.1%、0.05%或0.01%的水。

[0464] (102) 段落 (89) 至 (101) 中任一项的试剂盒, 其中基于脂质的佐剂如段落 (2) 至 (6) 中任一项中限定的; 聚肌胞苷酸多核苷酸佐剂如段落 (7) 至 (11) 中任一项中限定的; 两亲化合物如段落 (12) 至 (20) 中任一项中限定的; 和/或疏水运载体如段落 (21) 至 (24) 中任一项中限定的。

[0465] (103) 段落 (89) 至 (102) 中任一项的试剂盒, 其中基于脂质的佐剂是PAM₃Cys-Ser-(Lys)₄ (SEQ ID NO:1); 聚肌胞苷酸多核苷酸佐剂是不同链长度的聚肌苷酸和聚胞苷酸的混合物, 所述混合物包括989,486道尔顿的近似分子量; 两亲化合物是S100脂质和胆固醇的

混合物或二油酰磷脂酰胆碱 (DOPC) 和胆固醇的混合物;并且疏水运载体是 Montanide® ISA 51VG。

[0466] 通过下列非限制性实施例进一步说明本发明。

[0467] 实施例

[0468] 实施例1:

[0469] 6-8周龄无病原体CD-1小鼠购自Charles River Laboratories (St.Constant,PQ) 并且根据机构指南在过滤器控制的空气循环下以自由采食水和食物进行饲养。

[0470] 使用源自炭疽毒素的重组PA抗原(List Biologicals)以及佐剂聚肌胞苷酸(Thermo-Fisher,USA)和/或Pam3CSK4(SEQ ID NO:1;EMC Microcollections,德国)制备所有疫苗。为了制备基于油的无水制剂,在具有S100脂质(德国Lipoid;120毫克/毫升)和胆固醇(Lipoid,德国;12毫克/毫升)的磷酸钠缓冲液(0.2M,pH 6.0)中制备抗原和/或聚肌胞苷酸和/或Pam3CSK4(SEQ ID NO:1)佐剂。此制品然后被冻干以形成干饼。就在注射之前,将干饼重悬在ISA51VG油(SEPPIC,法国)中。最终疫苗制品剂量体积是50微升并且包含1微克的PA抗原(20微克/毫升)以及1微克的聚肌胞苷酸和/或Pam3CSK4(SEQ ID NO:1)佐剂,如指示的(20微克/毫升的浓度)。

[0471] 小鼠接受肌肉内接种疫苗,其递送为在每个左肋和右肋上25毫升。使用不含佐剂的基于油的无水制剂对第1组(n=10)接种疫苗。使用包含聚肌胞苷酸佐剂的基于油的无水制剂对第2组(n=10)接种疫苗。使用包含Pam3CSK4(SEQ ID NO:1)佐剂的基于油的无水制剂对第3组(n=10)接种疫苗。使用包含聚肌胞苷酸和Pam3CSK4(SEQ ID NO:1)二者的基于油的无水制剂对第4组(n=10)接种疫苗。

[0472] 通过在接种疫苗之后第4、6、8、12、16、20和24周收集的血清的终点效价测定疫苗的免疫原性。简而言之,在4℃下,使用碳酸钠缓冲液(pH 9.5)中1微克/毫升的重组PA抗原过夜涂覆96孔EIA板。第二天,板使用100毫摩尔tris缓冲盐水/吐温(TBST)进行洗涤并且使用3%明胶(Biorad,USA)在37℃下封闭1小时。使用TBST彻底地洗涤板,然后血清被添加至每个板的顶行并且使用TBST沿每列向下制备1:1稀释液。在每个板上,阴性对照列不包括血清。板在4℃下培育过夜。为了显色,板使用TBST洗涤并且使用1:1000稀释的缀合至碱性磷酸酶的蛋白G(Calbiochem,USA)在37℃下培育1小时,然后使用100毫摩尔Tris-缓冲液(无吐温)进行洗涤,并且然后使用Tris-缓冲液中1微克/毫升的4-硝基磷酸苯酯在37℃下培育。使用ELISA酶标仪测量OD₄₀₅。抗体终点效价被测定为得出阴性对照的平均OD₄₀₅以上1个标准偏差OD₄₀₅需要的稀释的倒数。值以Log(10)表达。

[0473] 在一些时间点处,还进行毒素中和试验以评估血清中抗体的功能。简而言之,使用炭疽毒素(来自List Biologicals,USA的重组PA和LF蛋白)在37℃下培育血清的稀释物30分钟。血清-毒素制品然后被添加至每孔包含 5×10^4 个J774靶标细胞的96孔板。板在37℃/5%CO₂下培育4小时。为了测定细胞在培育后的生存能力,MTT被添加至每孔并且板在37℃/5%CO₂下培育2小时。然后使用酶标仪在OD₅₇₀下测量甲臯的数量。然后针对稀释和由曲线的拐点测定的ED50标绘OD₅₇₀。ED50被表达为Log(10)。

[0474] 血清效价结果显示在图1a中。通过在每个时间点比较第1组与每组的双向ANOVA以及Bonferroni事后测试来测量统计学。本发明的疫苗,表示为第4组,在7个时间点中的4个生成的效价比由施用于第1组的疫苗生成的那些显著更高。由施用于第2和3组的疫苗生成

的效价不比第1组的那些显著更高。

[0475] 使用在第8周收集的血清进行毒素中和试验并且结果显示在图1b中。通过单向ANOVA以及Tukey事后测试来测量统计学。本发明的疫苗,表示为第4组,生成的ED50比第1组显著更高。第2和3组的ED50不显著不同于第1组。

[0476] 此数据说明,与不包含佐剂的类似制剂比较,使用聚肌胞苷酸和Pam3CSK4 (SEQ ID NO:1) 佐剂组合配制的基于油的无水疫苗可以生成显著更高的抗体效价持续延长的时段,并且这不可以通过使用这些佐剂中的仅一种实现。针对此疫苗生成的抗体也具有增加的功能能力。

[0477] 实施例2:

[0478] 6-8周龄无病原体CD-1小鼠购自Charles River Laboratories (St.Constant,PQ) 并且根据机构指南在过滤器控制的空气循环下以自由采食水和食物进行饲养。

[0479] 使用重组HA抗原 (H5N1,甲型/越南/1203/2004;Protein Sciences,USA) 以及佐剂:铝胶 (Brentagg,Canada),或聚肌胞苷酸 (Thermo-Fisher,USA) 和Pam3CSK4 (SEQ ID NO:1;EMC Microcollections,德国) 制备所有疫苗。为了制备铝胶辅助的制剂(alum),在磷酸钠缓冲液(0.1M,pH 7.0)中制备抗原并且与铝胶混合。最终疫苗制品在50微升剂量体积中包含1微克的抗原。为了制备乳液制剂,首先在磷酸钠缓冲液(0.1M,pH 7.0)中制备抗原以及聚肌胞苷酸和Pam3CSK4 (SEQ ID NO:1) 佐剂,然后与ISA51VG油 (SEPPIC,France) 1:1 (v/v) 混合。最终疫苗制品在50微升剂量体积中包含1微克的抗原以及1或20微克的每种聚肌胞苷酸和Pam3CSK4 (SEQ ID NO:1) 佐剂(20微克/毫升或400微克/毫升的浓度)。为了制备基于油的无水制剂,在具有S100脂质 (Lipoid,德国;120毫克/毫升) 和胆固醇 (Lipoid,德国;12毫克/毫升) 的磷酸钠缓冲液(0.1M,pH 7.0)中制备抗原以及聚肌胞苷酸和Pam3CSK4 (SEQ ID NO:1) 佐剂。此制品然后被冻干以形成干饼。就在注射之前,将干饼重悬在ISA51VG油 (SEPPIC,法国) 中。最终疫苗制品剂量体积是50微升并且包含1微克的HA抗原(20微克/毫升) 以及1或20微克的每种聚肌胞苷酸和Pam3CSK4 (SEQ ID NO:1) 佐剂(20微克/毫升或400微克/毫升的浓度)。

[0480] 小鼠接受肌肉内接种疫苗,其递送为在每个左肋和右肋上25毫升。使用alum辅助的疫苗对第1组(n=8) 接种疫苗。使用包含1微克剂量的每种聚肌胞苷酸和Pam3CSK4 (SEQ ID NO:1) 的基于油的无水制剂对第2组(n=8) 接种疫苗。使用包含20微克剂量的每种聚肌胞苷酸和Pam3CSK4 (SEQ ID NO:1) 的基于油的无水制剂对第3组(n=8) 接种疫苗。使用包含1微克剂量的每种聚肌胞苷酸和Pam3CSK4 (SEQ ID NO:1) 的乳液制剂对第4组(n=4) 接种疫苗。使用包含20微克剂量的每种聚肌胞苷酸和Pam3CSK4 (SEQ ID NO:1) 的乳液制剂对第5组(n=4) 接种疫苗。

[0481] 通过在接种疫苗之后12周收集的血清的终点效价测定疫苗的免疫原性。简而言之,在4℃下,使用碳酸钠缓冲液(pH 9.5)中1微克/毫升的重组HA抗原过夜涂覆96孔EIA板。第二天,板使用100毫摩尔tris缓冲盐水/吐温(TBST) 进行洗涤并且使用3%明胶(Biorad,USA) 在37℃下封闭1小时。使用TBST彻底地洗涤板,然后血清被添加至每个板的顶行并且使用TBST沿每列向下制备1:1稀释液。在每个板上,阴性对照列不包括血清。板在4℃下培育过夜。为了显色,板使用TBST洗涤并且使用1:1000稀释的缀合至碱性磷酸酶的蛋白G (Calbiochem,USA) 在37℃下培育1小时,然后使用100毫摩尔Tris-缓冲液(无吐温) 进行洗

涤,并且然后使用Tris-缓冲液中1微克/毫升的4-硝基磷酸苯酯在37℃下培育。使用ELISA酶标仪测量OD₄₀₅。抗体终点效价被测定为得到阴性对照的平均OD₄₀₅以上1个标准偏差OD₄₀₅需要的稀释的倒数。值以Log (10) 表达。结果显示在图2中。

[0482] 结果显示在表5和图2中。本发明的疫苗,表示为第2组,比第1组、第3组和第4组生成显著更高的应答 ($p < 0.05$)。第2组和第5组之间的应答不显著不同 ($p > 0.05$)。使用学生t检验在组之间计算统计学显著性。

[0483] 此数据证明基于油的制剂可以被用于使用低剂量组合的佐剂聚肌胞苷酸和Pam3CSK4 (SEQ ID NO:1) (20微克/毫升) 针对抗原生成高的抗体效价。应答比得上使用20×更高剂量的佐剂 (400微克/毫升) 制备的乳液制剂并且显著高于具有相同低剂量的佐剂的乳液制剂生成的应答。

[0484] 表5:在免疫后12周,在接种疫苗的小鼠中测量的血清抗体效价的原始数据。

[0485]

组	疫苗	n	平均效价	SEM
1	Alum	8	5.182	0.168
2	1 微克聚肌胞苷酸 + Pam3CSK4 (SEQ ID NO: 1), 基于油的	8	7.252	0.192
3	20 微克聚肌胞苷酸 + Pam3CSK4 (SEQ ID NO: 1) , 基于油的	8	6.462	0.161
4	1 微克聚肌胞苷酸 + Pam3CSK4 (SEQ ID NO: 1), 乳液	4	6.537	0.144
5	20 微克聚肌胞苷酸 + Pam3CSK4 (SEQ ID NO: 1), 乳液	4	7.064	0.194

[0486] 实施例3:

[0487] 6-8周龄无病原体C57BL6小鼠购自Charles River Laboratories (St.Constant, PQ) 并且根据机构指南在过滤器控制的空气循环下以自由采食水和食物进行饲养。

[0488] 使用缀合至通用辅助性T表位PADRE (R9F-PADRE; NeoMPS, USA) 的抗原HPV16E7₄₉₋₅₇ (R9F:RAHYNIVTF; SEQ ID NO:2) 以及佐剂聚肌胞苷酸 (Thermo-Fisher, USA) 和Pam3CSK4 (SEQ ID NO:1); EMC Microcollections, 德国) 制备所有疫苗。为了制备基于油的无水制剂, 首先在具有脂质DOPC (Lipoid, 德国; 120毫克/毫升) 和胆固醇 (Lipoid, 德国; 12毫克/毫升) 的0.2% PEG-H₂O中稀释R9F-PADRE抗原。在水中制备佐剂 (聚肌胞苷酸和Pam3CSK4; SEQ ID NO:1) 的混合物并且然后添加至抗原-脂质混合物。疫苗组分然后被冻干以形成干饼。就

在注射之前,将干饼重悬在ISA51VG油(SEPPIC,法国)中。最终疫苗制品剂量体积是50微升并且包含1微克的R9F-PADRE抗原(20微克/毫升)以及0.2微克(4微克/毫升)、1.0微克(20微克/毫升)、5.0微克(100微克/毫升)或10.0微克(200微克/毫升)的每种佐剂。

[0489] 小鼠接受皮下接种疫苗,其递送为在右肋中50毫升。使用包含0.2微克剂量的每种聚肌胞苷酸和Pam3CSK4(SEQ ID NO:1)的基于油的无水疫苗制剂中的R9F-PADRE对第1组(n=4)接种疫苗。使用包含1.0微克剂量的每种聚肌胞苷酸和Pam3CSK4(SEQ ID NO:1)的基于油的无水疫苗制剂中的R9F-PADRE对第2组(n=4)接种疫苗。使用包含5.0微克剂量的每种聚肌胞苷酸和Pam3CSK4(SEQ ID NO:1)的基于油的无水疫苗制剂中的R9F-PADRE对第3组(n=4)接种疫苗。使用包含10.0微克剂量的每种聚肌胞苷酸和Pam3CSK4(SEQ ID NO:1)的基于油的无水疫苗制剂中的R9F-PADRE对第4组(n=4)接种疫苗。

[0490] 通过在免疫后八天进行的IFN- γ ELISPOT实验评价疫苗制剂的免疫原性。简而言之,处死所有小鼠并且去除脾脏。一只首次接受试验的(naïve)小鼠也被处死并且充当首次接受试验的、未接种疫苗的对照。制备单个细胞悬浮液并且脾细胞被转载入ELISPOT板(BD Bioscience,USA)的抗IFN- γ 涂覆的孔(500000个细胞/孔)。在ELISPOT板中,使用10微克/毫升的HPV15E7₄₉₋₅₇肽(R9F:RAHYNIVTF;SEQ ID NO:2)或不包含肽(背景)的培养基刺激细胞18小时。第二天,使用AEC试剂盒(Sigma,USA)使板显色并且使用Immunospot酶标仪(Cellular Technologies Ltd,USA)计数个体IFN- γ 分泌细胞。结果显示在图3中。通过单向ANOVA以及Tukey事后检验进行统计学。

[0491] 第1组中的小鼠针对使用R9F肽的刺激生成 418 ± 13 斑点形成单位(SFU)的平均应答。针对背景的应答可忽略, <10 SFU。第2组中的小鼠针对使用R9F肽的刺激生成 260 ± 70 SFU的平均应答。针对背景的应答可忽略, <10 SFU。第3组中的小鼠针对使用R9F肽的刺激生成 247 ± 76 SFU的平均应答。针对背景的应答可忽略, <10 SFU。第4组中的小鼠针对使用R9F肽的刺激生成 149 ± 25 SFU的平均应答。针对背景的应答可忽略, <10 SFU。此应答显著低于由第1组生成的应答,* $p < 0.05$ 。

[0492] 这些结果证明了聚肌胞苷酸和Pam3CSK4(SEQ ID NO:1)佐剂组合可以针对疫苗抗原刺激强力的IFN- γ 免疫应答并且当以小于200微克/毫升的剂量使用时是最有效的。

[0493] 本说明书中引用的所用出版物和专利申请均通过引用并入本文,如同每个单独的出版物或专利申请被具体地和分别地指示通过引用并入本文一样。任何出版物的引用是针对其在申请日之前的公开内容,并且不应当被解释为承认以在先发明为由,本发明无权先于该出版物。

[0494] 虽然已经出于理解清楚的目的借助说明和实例对前述发明的一些细节进行了描述,但是鉴于本发明的教导对于本领域技术人员明显的是,可对其进行某些改变和修改,而不脱离所附权利要求的精神或范围。

[0495] 必须要注意的是,如本说明书和所附权利要求书中使用的,单数形式“一个”、“一种”和“该”包括复数指代,除非上下文明确另外指示。除非另外限定,本文使用的所有技术和科学术语均与本发明所属领域技术人员的普遍理解具有相同含义。

[0496] 短语“和/或”,如本文在说明书和权利要求书中使用的,应被理解为意思是如此关联的要素中的“任一种或二者”,即在一些情况下关联地存在和在其它情况下分离地存在的要素。使用“和/或”列举的多个要素应当以相同的方式进行解释,即,如此关联的要素中的

“一种或多种”。通过“和/或”条款具体确定的要素以外的其它要素可以任选地存在,无论与具体确定的那些要素相关或不相关。因而,作为非限制性实例,提及“A和/或B”,在连同开放式语言如“包括”使用时,在一个实施方式中,可以指的是仅仅A(任选地包括B以外的其它要素);在另一个实施方式中,可以指的是仅仅B(任选地包括A以外的其它要素);在又一个实施方式中,可以指的是A和B二者(任选地包括其它要素);等等。

[0497] 如本文在说明书和权利要求书中使用的,“或”应当被理解为涵盖与如上面限定的“和/或”相同的含义。例如,当区分列表中的项目时,“或”或“和/或”应当被解释为是包括性的,即,包括大量或列出的要素中的至少一种,而且还包括其中的多于一种,并且任选地,包括另外的未列出的项目。

[0498] 如本文使用的,无论在说明书还是在所附权利要求书中,过渡术语“包括”、“含有”、“带有”、“具有”、“包含”、“涉及”等将被理解为是包括性的或开放式的(即,意思是包括但不限于),并且它们不排除未叙述的要素、材料或方法步骤。关于本文的权利要求和示例性实施方式段落,仅过渡短语“由……构成”和“基本上由……构成”分别是封闭式的或半封闭式的过渡短语。过渡短语“由……构成”排除任何未具体叙述的任何要素、步骤、或成分。过渡短语“基本上由……构成”将范围限制于规定的要素、材料或步骤和不实质上影响本文公开和/或要求保护的发明的基本特性(一种或多种)的那些。

[0499] 参考文献

[0500] 1) Agger, E.M.; Rosenkrands, I.; Olsen, A.W.; Hatch, G.; Williams, A.; Kritsch, C.; Lingnau, K.; von Gabain, A.; Andersen, C.S.; Korsholm, K.S.; Andersen, P. (2006) Protective immunity to tuberculosis with Ag85B-ESAT-6 in a synthetic cationic adjuvant system IC31, *Vaccine* 24(26), 5452-5460.

[0501] 2) Agrawal, S.; Gupta, S. (2011) TLR1/2, TLR7, and TLR9 signals directly activate human peripheral blood naive and memory B cell subsets to produce cytokines, chemokines, and hematopoietic growth factors, *J. Clin. Immunol.* 31(1), 89-98.

[0502] 3) Aichele, P.; Brduscha-Riem, K.; Zinkernagel, R.M.; Hengartner, H.; Pircher, H. (1995) T cell priming versus T cell tolerance induced by synthetic peptides, *J. Exp. Med.* 182(1), 261-266.

[0503] 4) Alexopoulou, L.; Holt, A.C.; Medzhitov, R.; Flavell, R.A. (2001) Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- κ B by Toll-like receptor 3, *Nature* 413(6857), 732-738.

[0504] 5) Altieri, D.C.; Marchisio, P.C. (1999) Survivin apoptosis: an interloper between cell death and cell proliferation in cancer, *Lab. Invest.* 79(11), 1327-1333.

[0505] 6) Altschul, S.F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E.W.; Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool, *J. Mol. Biol.* 215(3), 403-410.

[0506] 7) Alving, C.R.; Peachman, K.K.; Rao, M.; Reed, S.G. (2012) Adjuvants for human vaccines, *Curr. Opin. Immunol.* 24(3), 310-315.

[0507] 8) Anders, H.J.; Zecher, D.; Pawar, R.D.; Patole, P.S. (2005) Molecular

mechanisms of autoimmunity triggered by microbial infection, *Arthritis.Res.Ther.*7 (5) ,215-224.

[0508] 9) Avril,T.;de Tayrac,M.;Leberre,C.;Quillien,V. (2009) Not All Polyriboinosinic-polyribocytidylic Acids (Poly I:C) are Equivalent for Inducing Maturation of Dendritic Cells: Implication for α -type-1 Polarized DCs, *J.Immunother.*32 (4) ,353-362.

[0509] 10) Awasthi,A.;Mehrotra,S.;Bhakuni,V.;Dutta,G.P.;Levy,H.B.;Maheshwari,R.K. (1997) Poly ICLC enhances the antimalarial activity of chloroquine against multidrug-resistant *Plasmodium yoelii nigeriensis* in mice, *J.Interferon Cytokine Res.*17 (7) ,419-423.

[0510] 11) Bagchi,A.;Herrup,E.A.;Warren,H.S.;Trigilio,J.;Shin,H.S.;Valentine,C.;Hellman,J. (2007) MyD88-dependent and MyD88-independent Pathways in Synergy, Priming, and Tolerance between TLR Agonists, *J.Immunol.*178 (2) ,1164-1171.

[0511] 12) Banga,A.K. *Therapeutic Peptides and Proteins, Formulation, Processing and Delivery Systems* (Lancaster, PA: Technomic Publishing Co., 1995) .

[0512] 13) Barchet,W.;Wimmenauer,V.;Schlee,M.;Hartmann,G. (2008) Accessing the therapeutic potential of immunostimulatory nucleic acids, *Curr.Opin.Immunol.*20 (4) ,389-395.

[0513] 14) Berinstein,N.L.;Karkada,M.;Morse,M.A.;Nemunaitis,J.J.;Chatta,G.;Kaufman,H.;Odunsi,K.;Nigam,R.;Sammatur,L.;MacDonald,L.D.;Weir,G.M.;Stanford,M.M.;Mansour,M. (2012) First-in-man application of a novel therapeutic cancer vaccine formulation with the capacity to induce multi-functional T cell responses in ovarian, breast and prostate cancer patients, *J.Transl.Med.*10 (156) ,1-12.

[0514] 15) Berinstein,N.L.;Karkada,M.;Oza,A.M.;Odunsi,K.;Villella,J.A.;Nemunaitis,J.J.;Morse,M.A.;Pejovic,T.;Bentley,J.;Buyse,M.;Nigam,R.;Weir,G.M.;MacDonald,L.D.;Quinton,T.;Rajagopalan,R.;Sharp,K.;Penwell,A.;Sammatur,L.;Burzykowski,T.;Stanford,M.M.;Mansour,M. (2015) Survivin-targeted immunotherapy drives robust polyfunctional T cell generation and differentiation in advanced ovarian cancer patients, *Oncoimmunology* 4 (8) ,e1026529-1-e1026529-10.

[0515] 16) Bever,C.T.Jr.;Salazar,A.M.;Neely,E.;Ferraraccio,B.E.;Rose,J.W.;McFarland H.F.;Levy,H.B.;McFarlin,D.E. (1986) Preliminary trial of poly ICLC in chronic progressive multiple sclerosis, *Neurology* 36 (4) ,494-498.

[0516] 17) Blander,J.M. (2008) Phagocytosis and antigen presentation: a partnership initiated by Toll-like receptors, *Ann.Rheum.Dis.*67 (Suppl 3) ,iii44-iii49.

[0517] 18) Bobst,A.M.;Langemeier,P.W.;Torrence,P.F.;De Clercq,E. (1981) Interferon Induction by Poly (inosinic acid) • Poly (cytidylic acid) Segmented by Spin-Labels, *Biochemistry* 20 (16) ,4798-4803.

- [0518] 19) Brewer, K.D.; Lake, K.; Pelot, N.; Stanford, M.M.; DeBay, D.R.; Penwell, A.; Weir, G.M.; Karkada, M.; Mansour, M.; Bowen, C.V. (2014) Clearance of depot vaccine SPI0-labeled antigen and substrate visualized using MRI, *Vaccine* 32 (51), 6956-6962.
- [0519] 20) Caproni, E.; Tritto, E.; Cortese, M.; Muzzi, A.; Mosca, F.; Monaci, E.; Baudner, B.; Seubert, A.; De Gregorio, E. (2012) MF59 and Pam3CSK4 Boost Adaptive Responses to Influenza Subunit Vaccine through an IFN Type I-Independent Mechanism of Action, *J. Immunol.* 188 (7), 3088-3098.
- [0520] 21) Caruthers, M.H.; Beaucage, S.L.; Efcavitch, J.W.; Fisher, E.F.; Matteucci, M.D.; Stabinsky, Y. (1980) New chemical methods for synthesizing polynucleotides, *Nucleic Acids Res. Symp. Ser.* (7), 215-223.
- [0521] 22) Chang, Z.L. (2010) Important aspects of Toll-like receptors, ligands and their signaling pathways, *Inflamm. Res.* 59 (10), 791-808.
- [0522] 23) Chirigos, M.A.; Schlick, E.; Ruffmann, R.; Budzynski, W.; Sinibaldi, P.; Gruys, E. (1985) Pharmacokinetic and therapeutic activity of polyinosinic-polycytidylic acid stabilized with poly-L-lysine in carboxymethylcellulose [poly (I,C) -LC], *J. Biol. Response Mod.* 4 (6), 621-627.
- [0523] 24) Cui, Z.; Qiu, F. (2006) Synthetic double-stranded RNA poly (I:C) as a potent peptide vaccine adjuvant: therapeutic activity against human cervical cancer in a rodent model, *Cancer Immunol. Immunother.* 55 (10), 1267-1279.
- [0524] 25) de Clercq, E.; Hattori, M.; Ikehara, M. (1975) Antiviral activity of polynucleotides: copolymers of inosinic acid and N2-dimethylguanylic of 2-methylthioinosinic acid, *Nucleic Acids Res.* 2 (1), 121-129.
- [0525] 26) de Clercq, E.; Torrence, P.F.; Stollar, B.D.; Hobbs, J.; Fukui, T.; Kakiuchi, N.; Ikehara, M. (1978) Interferon induction by a 2'-modified double-helical RNA, poly (2'-azido-2'-deoxyinosinic acid). polycytidylic acid, *Eur. J. Biochem.* 88 (2), 341-349.
- [0526] 27) De Gregorio, E.; Caproni, E.; Ulmer, J.B. (2013) Vaccine adjuvants: mode of action, *Front. Immunol.* 4 (214), 1-6.
- [0527] 28) Diehl, K.H.; Hull, R.; Morton, D.; Pfister, R.; Rabemampianina, Y.; Smith, D.; Vidal, J.M.; van de Vorstenbosch, C. (2001) A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes, *J. Appl. Toxicol.* 21 (1), 15-23.
- [0528] 29) Dong, L.W.; Kong, X.N.; Yan, H.X.; Yu, L.X.; Chen, L.; Yang, W.; Liu, Q.; Huang, D.D.; Wu, M.C.; Wang, H.Y. (2008) Signal regulatory protein alpha negatively regulates both TLR3 and cytoplasmic pathways in type I interferon induction, *Mol. Immunol.* 45 (11), 3025-3035.
- [0529] 30) Droller, M.J. (1987) Immunotherapy of metastatic renal cell carcinoma with polyinosinic-polycytidylic acid, *J. Urol.* 137 (2), 202-206.

- [0530] 31) Dubensky, T.W. Jr.; Reed, S.G. (2010) Adjuvants for cancer vaccines, *Semin. Immunol.* 22 (3), 155-161.
- [0531] 32) Durie, B.G.; Levy, H.B.; Voakes, J.; Jett, J.R.; Levine, A.S. (1985) Poly (I, C) -LC as an interferon inducer in refractory multiple myeloma, *J. Biol. Response Mod.* 4 (5), 518-524.
- [0532] 33) Duthie, M.S.; Windish, H.P.; Fox, C.B.; Reed, S.G. (2011) Use of defined TLR ligands as adjuvants within human vaccines, *Immunol. Rev.* 239 (1), 178-196.
- [0533] 34) Farina, G.A.; York, M.R.; Di Marzio, M.; Collins, C.A.; Meller, S.; Homey, B.; Rifkin, I.R.; Marshak-Rothstein, A.; Radstake, T.R.; Lafyatis, R. (2010) Poly (I:C) drives type I IFN- and TGF β -mediated inflammation and dermal fibrosis simulating altered gene expression in systemic sclerosis, *J. Invest. Dermatol.* 130 (11), 2583-2593.
- [0534] 35) Fujimura, T.; Nakagawa, S.; Ohtani, T.; Ito, Y.; Aiba, S. (2006) Inhibitory effect of the polyinosinic-polycytidylic acid/cationic liposome on the progression of murine B16F10 melanoma, *Eur. J. Immunol.* 36 (12), 3371-3380.
- [0535] 36) Fukui, T.; Kakiuchi, N.; Ikehara, M. (1977) Polynucleotides. XLV Synthesis and properties of poly (2'-azido-2'-deoxyinosinic acid), *Nucleic Acids Res.* 4 (8), 2629-2639.
- [0536] 37) Gallo, R.C. (2015) Developing a Successful HIV Vaccine, *J. Infect. Dis.* 212 (Suppl 1), S40-S41.
- [0537] 38) Ghosh, T.K.; Mickelson D.J.; Fink, J.; Solberg, J.C.; Inglefield, J.R.; Hook, D.; Gupta, S.K.; Gibson, S.; Alkan, S.S. (2006) Toll-like receptor (TLR) 2-agonists-induced cytokines and chemokines: I. Comparison with T cell receptor-induced responses, *Cell. Immunol.* 243 (1), 48-57.
- [0538] 39) Ghosh, T.K.; Mickelson, D.J.; Solberg, J.C.; Lipson, K.E.; Inglefield, J.R.; Alkan, S.S. (2007) TLR-TLR cross talk in human PBMC resulting in synergistic and antagonistic regulation of type-1 and 2 interferons, IL-12 and TNF- α , *Int. Immunopharmacol.* 7 (8), 1111-1121.
- [0539] 40) Govindaraj, R.G.; Manavalan, B.; Lee, G.; Choi, S. (2010) Molecular modeling-based evaluation of hTLR10 and identification of potential ligands in Toll-like receptor signaling, *PLoS One* 5 (9), e12713-1-e12713-13.
- [0540] 41) Gowen, B.B.; Wong, M.H.; Jung, K.H.; Sanders, A.B.; Mitchell, W.M.; Alexopoulou, L.; Flavell, R.A.; Sidwell, R.W. (2007) TLR3 is essential for the induction of protective immunity against Punta Toro Virus infection by the double-stranded RNA (dsRNA), poly (I:C12U), but not Poly (I:C): differential recognition of synthetic dsRNA molecules, *J. Immunol.* 178 (8), 5200-5208.
- [0541] 42) Graham, B.S.; McElrath, M.J.; Keefer, M.C.; Rybczyk, K.; Berger, D.; Weinhold, K.J.; Ottinger, J.; Ferarri, G.; Montefiori, D.C.; Stablein, D.; Smith, C.; Ginsberg, R.; Eldridge, J.; Duerr, A.; Fast, P.; Haynes, B.F.; AIDS Vaccine Evaluation

Group. (2010) Immunization with cocktail of HIV-derived peptides in montanide ISA-51 is immunogenic, but causes sterile abscesses and unacceptable reactogenicity, PLoS One 5 (8), e11995-1-e11995-8.

[0542] 43) Greene, J.J.; Alderfer, J.L.; Tazawa, I.; Tazawa, S.; Ts'o, P.O.; O'Malley, J.A.; Carter, W.A. (1978) Interferon induction and its dependence on the primary and secondary structure of poly(inosinic acid).poly(cytidylic acid), Biochemistry 17 (20), 4214-4220.

[0543] 44) Gupta, R.K. (1998) Aluminum compounds as vaccine adjuvants, Adv. Drug Deliv. Rev. 1998, 32 (3), 155-172.

[0544] 45) Gupta, R.K.; Chang, A.C.; Griffin, P.; Rivera, R.; Siber, G.R. (1996) In vivo distribution of radioactivity in mice after injection of biodegradable polymer microspheres containing ¹⁴C-labeled tetanus toxoid, Vaccine 14 (15), 1412-1416.

[0545] 46) Guschlbauer, W.; Blandin, M.; Drocourt, J.L.; Thang, M.N. (1977) Poly-2'-deoxy-2'-fluoro-cytidylic acid: enzymatic synthesis, spectroscopic characterization and interaction with poly-inosinic acid, Nucleic Acids Res. 4 (6), 1933-1943.

[0546] 47) Hafner, A.M.; Corthésy, B.; Merkle, H.P. (2013) Particulate formulations for the delivery of poly (I:C) as vaccine adjuvant, Adv. Drug. Deliv. Rev. 65 (10), 1386-1399.

[0547] 48) Hailemichael, Y.; Dai, Z.; Jaffarzad, N.; Ye, Y.; Medina, M.A.; Huang, X.F.; Dorta-Estremera, S.M.; Greeley, N.R.; Nitti, G.; Peng, W.; Liu, C.; Lou, Y.; Wang, Z.; Ma, W.; Rabinovich, B.; Sowell, R.T.; Schluns, K.S.; Davis, R.E.; Hwu, P.; Overwijk, W.W. (2013) Persistent antigen at vaccination sites induces tumor-specific CD8⁺T cell sequestration, dysfunction and deletion, Nat. Med. 19 (4), 465-472.

[0548] 49) Hansen, M.; Met, O.; Svane, I.M.; Andersen, M.H. (2012) Cellular based cancer vaccines: type 1 polarization of dendritic cells, Curr. Med. Chem. 19 (25), 4239-4246.

[0549] 50) He, P.; Zou, Y.; Hu, Z. (2015) Advances in aluminum hydroxide-based adjuvant research and its mechanism, Hum. Vaccin. Immunother. 11 (2), 477-488.

[0550] 51) Heimlich, J.M.; Regnier, F.E.; White, J.L.; Hem, S.L. (1999) The in vitro displacement of adsorbed model antigens from aluminium-containing adjuvants by interstitial proteins, Vaccine 17 (22), 2873-2881.

[0551] 52) Hendrix, C.W.; Margolick, J.B.; Petty, B.G.; Markham, R.B.; Nerhood, L.; Farzadegan, H.; Ts'o, P.O.; Lietman, P.S. (1993) Biologic effects after a single dose of poly (I):poly (C12U) in healthy volunteers, Antimicrob. Agents Chemother. 37 (3), 429-435.

[0552] 53) Horn, T.; Vasser, M.P.; Struble, M.E.; Crea, R. (1980) Synthesis of oligonucleotides on cellulose. Part II: Design and synthetic strategy to the

synthesis of 22 oligodeoxynucleotides coding for gastric inhibitory polypeptide (GIP), *Nucleic Acids Symp. Ser.* (7), 225-232.

[0553] 54) Houston, W.E.; Crabbs, C.L.; Stephen, E.L.; Levy, H.B. (1976) Modified polyriboinosinic-polyribocytidylic acid, an immunological adjuvant, *Infect. Immun.* 14(1), 318-319.

[0554] 55) Ichinohe, T.; Tamura, S.; Kawaguchi, A.; Ninomiya, A.; Imai, M.; Itamura, S.; Odagiri, T.; Tashiro, M.; Takahashi, H.; Sawa, H.; Mitchell, W.M.; Strayer, D.R.; Carter, W.A.; Chiba, J.; Kurata, T.; Sata, T.; Hasegawa, H. (2007) Cross-protection against H5N1 influenza virus infection is afforded by intranasal inoculation with seasonal trivalent inactivated influenza vaccine, *J. Infect. Dis.* 196(9), 1313-1320.

[0555] 56) Ishii, K.J.; Akira, S. (2007) Toll or toll-free adjuvant path toward the optimal vaccine development, *J. Clin. Immunol.* 27(4), 363-371.

[0556] 57) Johnston, M.I.; Stollar, B.D.; Torrence, P.F.; Witkop, B. (1975) Structural features of double-stranded polyribonucleotides required for immunological specificity and interferon induction, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 72(11), 4564-4568.

[0557] 58) Kamath, A.T.; Valenti, M.P.; Rochat, A.F.; Agger, E.M.; Lingnau, K.; von Gabain, A.; Andersen, P.; Lambert, P.H.; Siegrist, C.A. (2008) Protective anti-mycobacterial T cell responses through exquisite in vivo activation of vaccine-targeted dendritic cells, *Eur. J. Immunol.* 38(5), 1247-1256.

[0558] 59) Kang, S.J.; Locksley, R.M. (2009) The inflammasome and alum-mediated adjuvant activity, *Fl000 Biol. Rep.* 1(15), 1-5.

[0559] 60) Kato, H.; Takeuchi, O.; Sato, S.; Yoneyama, M.; Yamamoto, M.; Matsui, K.; Uematsu, S.; Jung, A.; Kawai, T.; Ishii, K.J.; Yamaguchi, O.; Otsu, K.; Tsujimura, T.; Koh, C.S.; Reis e Sousa, C.; Matsuura, Y.; Fujita, T.; Akira, S. (2006) Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses, *Nature* 441(7089), 101-105.

[0560] 61) Kawaoka, Y.; Yamnikova, S.; Chambers, T.M.; Lvov, D.K.; Webster, R.G. (1990) Molecular characterization of a new hemagglutinin, subtype H14, of influenza A virus, *Virology* 179(2), 759-767.

[0561] 62) Kende, M.; Lupton, H.W.; Rill, W.L.; Gibbs, P.; Levy, H.B.; Canonico, P.G. (1987) Ranking of Prophylactic Efficacy of Poly(ICLC) against Rift Valley Fever Virus Infection in Mice by Incremental Relative Risk of Death, *Antimicrob. Agents Chemother.* 31(8), 1194-1198.

[0562] 63) Koh, Y.T.; Higgins, S.A.; Weber, J.S.; Kast, W.M. (2006) Immunological consequences of using three different clinical/laboratory techniques of emulsifying peptide-based vaccines in incomplete Freund's adjuvant, *J. Transl. Med.* 4(42), 1-12.

- [0563] 64) Kool, M.; Soullié, T.; van Nimwegen, M.; Willart, M.A.M.; Muskens, F.; Jung, S.; Hoogsteden, H.C.; Hammad, H.; Lambrecht, B.N. (2008) Alum adjuvant boosts adaptive immunity by inducing uric acid and activating inflammatory dendritic cells, *J. Exp. Med.* 205 (4), 869–882.
- [0564] 65) Krown, S.E.; Kerr, D.; Stewart, W.E. 2nd; Field, A.K.; Oettgen, H.F. (1985) Phase I trials of poly(I,C) complexes in advanced cancer, *J. Biol. Response Mod.* 4 (6), 640–649.
- [0565] 66) Kumru, O.S.; Joshi, S.B.; Smith, D.E.; Middaugh, C.R.; Prusik, T.; Volkin, D.B. (2014) Vaccine instability in the cold chain: Mechanisms, analysis and formulation strategies, *Biologicals* 42 (5), 237–259.
- [0566] 67) Lahiri, A.; Das, P.; Chakravorty, D. (2008) Engagement of TLR signaling as adjuvant: towards smarter vaccine and beyond, *Vaccine* 26 (52), 6777–6783.
- [0567] 68) Leenaars, M.; Koedam, M.A.; Hendriksen, C.F.; Claassen, E. (1998) Immune responses and side effects of five different oil-based adjuvants in mice, *Vet. Immunol. Immunopathol.* 61 (2–4), 291–304.
- [0568] 69) Levy, H.B. (1985) Historical overview of the use of polynucleotides in cancer, *J. Biol. Response Mod.* 4 (5), 475–480.
- [0569] 70) Levy, H.B.; Lvovsky, E. (1978) Topical treatment of vaccinia virus infection with an interferon inducer in rabbits, *J. Infect. Dis.* 137 (1), 78–81.
- [0570] 71) Lim, S.N.; Kuhn, S.; Hyde, E.; Ronchese, F. (2012) Combined TLR stimulation with Pam3Cys and Poly I:C enhances Flt3-ligand dendritic cell activation for tumor immunotherapy, *J. Immunother.* 35 (9), 670–679.
- [0571] 72) Llopiz, D.; Dotor, J.; Zabaleta, A.; Lasarte, J.J.; Prieto, J.; Borrás-Cuesta, F.; Sarobe, P. (2008) Combined immunization with adjuvant molecules poly (I:C) and anti-CD40 plus a tumor antigen has potent prophylactic and therapeutic antitumor effects, *Cancer Immunol. Immunother.* 57 (1), 19–29.
- [0572] 73) Matsumoto, M.; Seya, T. (2008) TLR3: interferon induction by double-stranded RNA including poly (I:C). *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60 (7), 805–812.
- [0573] 74) Merrifield, B. (1997) Concept and early development of solid-phase peptide synthesis, *Methods Enzymol.* 289, 3–13.
- [0574] 75) Moyle, P.M.; Toth, I. (2008) Self-adjuvanting lipopeptide vaccines, *Curr. Med. Chem.* 15 (5), 506–516.
- [0575] 76) Nakamura, O.; Shitara, N.; Matsutani, M.; Takakura, K.; Machida, H. (1982) Phase I–II trials of poly (ICLC) in malignant brain tumor patients, *J. Interferon. Res.* 2 (1), 1–4.
- [0576] 77) Napolitani, G.; Rinaldi, A.; Bertoni, F.; Sallusto, F.; Lanzavecchia, A. (2005) Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a Thelper type 1-polarizing program in dendritic cells, *Nat. Immunol.* 6 (8), 769–776.

- [0577] 78) Needleman, S.B.; Wunsch, C.D. (1970) A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins, *J. Mol. Biol.* 48 (3), 443-453.
- [0578] 79) Ogawa, C.; Liu, Y.J.; Kobayashi, K.S. (2011) Muramyl dipeptide and its derivatives: peptide adjuvant in immunological disorders and cancer therapy, *Curr. Bioact. Compd.* 7 (3), 180-197.
- [0579] 80) Ouyang, X.; Negishi, H.; Takeda, R.; Fujita, Y.; Taniguchi, T.; Honda, K. (2007) Cooperation between MyD88 and TRIF pathways in TLR synergy via IRF5 activation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 354 (4), 1045-1051.
- [0580] 81) Padalko, E.; Nuyens, D.; De Palma, A.; Verbeken, E.; Aerts, J.L.; De Clercq, E.; Carmeliet, P.; Neyts, J. (2004) The Interferon Inducer Ampligen [poly(I)-poly(C₁₂U)] Markedly Protects Mice against Coxsackie B3 Virus-Induced Myocarditis, *Antimicrob. Agents Chemother.* 48 (1), 267-274.
- [0581] 82) Pearson, W.R.; Lipman, D.J. (1988) Improved tools for biological sequence comparison, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85 (8), 2444-2448.
- [0582] 83) Poast, J.; Seidel, H.M.; Hendricks, M.D.; Haslam, J.A.; Levy, H.B.; Baron, S. (2002) Poly I:CLC induction of the interferon system in mice: an initial study of four detection methods, *J. Interferon Cytokine Res.* 22 (10), 1035-1040.
- [0583] 84) Pone, E.J.; Lou, Z.; Lam, T.; Greenberg, M.L.; Wang, R.; Xu, Z.; Casali, P. (2015) B cell TLR1/2, TLR4, TLR7 and TLR9 interact in induction of class switch DNA recombination: modulation by BCR and CD40, and relevance to T-independent antibody responses, *Autoimmunity* 48 (1), 1-12.
- [0584] 85) Pone, E.J.; Zhang, J.; Mai, T.; White, C.A.; Li, G.; Sakakura, J.K.; Patel, P.J.; Al-Qahtani, A.; Zan, H.; Xu, Z.; Casali, P. (2012) BCR-signalling synergizes with TLR-signalling for induction of AID and immunoglobulin class-switching through the non-canonical NF- κ B pathway, *Nat. Commun.* 3 (767), 1-12.
- [0585] 86) Pulendran, B.; Ahmed, R. (2006) Translating innate immunity into immunological memory: implications for vaccine development, *Cell* 124 (4), 849-863.
- [0586] 87) Puri, S.K.; Dutta, G.P.; Levy, H.B.; Maheshwari, R.K. (1996) Poly ICLC inhibits Plasmodium cynomolgi B malaria infection in rhesus monkeys, *J. Interferon. Cytokine Res.* 16 (1), 49-52.
- [0587] 88) Re, F.; Strominger, J.L. (2004) IL-10 released by concomitant TLR2 stimulation blocks the induction of a subset of Th1 cytokines that are specifically induced by TLR4 or TLR3 in human dendritic cells, *J. Immunol.* 173 (12), 7548-7555.
- [0588] 89) Riedl, K.; Riedl, R.; von Gabain, A.; Nagy, E.; Lingnau, K. (2008) The novel adjuvant **IC31**[®] strongly improves influenza vaccine-specific cellular and humoral immune responses in young adult and aged mice, *Vaccine* 26 (27-28), 3461-

3468。

[0589] 90) Rimaniol, A.C.; Gras, G.; Verdier, F.; Capel, F.; Grigoriev, V.B.; Porcheray, F.; Sauzeat, E.; Fournier, J.G.; Clayette, P.; Siegrist, C.A.; Dormont, D. (2004) Aluminum hydroxide adjuvant induces macrophage differentiation towards a specialized antigen-presenting cell type, *Vaccine* 22 (23-24), 3127-3135.

[0590] 91) Roberge, J.Y.; Beebe, X.; Danishefsky, S.J. (1995) A strategy for a convergent synthesis of N-linked glycopeptides on a solid support, *Science* 269 (5221), 202-204.

[0591] 92) Salazar, A.M.; Levy, H.B.; Ondra, S.; Kende, M.; Scherokman, B.; Brown, D.; Mena, H.; Martin, N.; Schwab, K.; Donovan, D.; Dougherty, D.; Pulliam, M.; Ippolito, M.; Graves, M.; Brown, H.; Ommaya, A. (1996) Long-term treatment of malignant gliomas with intramuscularly administered polyinosinic-polycytidylic acid stabilized with polylysine and carboxymethylcellulose: an open pilot study, *Neurosurgery* 38 (6), 1096-1103, discussion at 1103-1104.

[0592] 93) Salem, M.L.; Kadima, A.N.; Cole, D.J.; Gillanders, W.E. (2005) Defining the antigen-specific T-cell response to vaccination and poly(I:C)/TLR3 signaling: evidence of enhanced primary and memory CD8 T-cell responses and antitumor immunity, *J. Immunother.* 28 (3), 220-228.

[0593] 94) Salem, M.L.; El-Naggar, S.A.; Kadima, A.; Gillanders, W.E.; Cole, D.J. (2006) The adjuvant effects of the toll-like receptor 3 ligand polyinosinic-cytidylic acid poly(I:C) on antigen-specific CD8+T cell responses are partially dependent on NK cells with the induction of a beneficial cytokine milieu, *Vaccine* 24 (24), 5119-5132.

[0594] 95) Sarma, P.S.; Shiu, G.; Neubauer, R.H.; Baron, S.; Huebner, R.J. (1969) Virus-induced sarcoma of mice: inhibition by a synthetic polyribonucleotide complex, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 62 (4), 1046-1051.

[0595] 96) Sato, S.; Nomura, F.; Kawai, T.; Takeuchi, O.; Mühlradt, P.F.; Takeda, K.; Akira, S. (2000) Synergy and Cross-Tolerance Between Toll-Like Receptor (TLR) 2- and TLR4-Mediated Signaling Pathways, *J. Immunol.* 165 (12), 7096-7101.

[0596] 97) Schellack, C.; Prinz, K.; Egyed, A.; Fritz, J.H.; Wittmann, B.; Ginzler, M.; Swatosch, G.; Zauner, W.; Kast, C.; Akira, S.; von Gabain, A.; Buschle, M.; Lingnau, K. (2006) IC31, a novel adjuvant signaling via TLR9, induces potent cellular and humoral immune responses, *Vaccine* 24 (26), 5461-5472.

[0597] 98) Schepens B; Sedeyn K; Vande Ginste L; De Baets S; Schotsaert M; Roose K; Houspie L; Van Ranst M; Gilbert B; Van Rooijen N; Fiers W; Piedra P; Saelens X. (2014) Protection and mechanism of action of a novel human respiratory syncytial virus vaccine candidate based on the extracellular domain of small hydrophobic protein, *EMBO Molecular Medicine* 6, 1436-54.

[0598] 99) Schijns, V.E.; Lavelle, E.C. (2011) Trends in vaccine adjuvants, *Expert*

Rev.Vaccines 10 (4) ,539-550。

[0599] 100) Seya,T.;Akazawa,T.;Tsujiita,T.;Matsumoto,M. (2006) Role of Toll-like receptors in adjuvant-augmented immune therapies,Evid.Based Complement Alternat.Med.3 (1) ,31-38。

[0600] 101) Sloat,B.R.;Shaker,D.S.;Le,U.M.;Cui,Z. (2008) Nasal immunization with the mixture of PA63,LF,and a PGA conjugate induced strong antibody responses against all three antigens,FEMS Immunol.Med.Microbiol.52 (2) ,169-179。

[0601] 102) Smith,T.F.;Waterman,M.S. (1981) Comparison of biosequences, Adv.Appl.Math.2 (4) ,482-489。

[0602] 103) Song,D.H.;Lee,J.O. (2012) Sensing of microbial molecular patterns by Toll-like receptors,Immunol.Rev.250 (1) ,216-229。

[0603] 104) Stegmann,T.;Kamphuis,T.;Meijerhof,T.;Goud,E.;de Haan,A.;Wilschut,J. (2010) Lipopeptide-adjuvanted respiratory syncytial virus virosomes:A safe and immunogenic non-replicating vaccine formulation,Vaccine 28 (34) ,5543-5550。

[0604] 105) Stephen,E.L.;Sammons,M.L.;Pannier,W.L.;Baron,S.;Spertzel,R.O.;Levy,H.B. (1977) Effect of a nuclease-resistant derivative of polyribonucleosinic-polyribocytidylic acid complex on yellow fever in rhesus monkeys (Macaca mulatta) ,J.Infect.Dis.136 (1) ,122-126。

[0605] 106) Stills,H.F.,Jr. (2005) Adjuvants and antibody production:dispelling the myths associated with Freund's complete and other adjuvants,ILAR J.46 (3) ,280-293。

[0606] 107) Suet Ting Tan,R.;Lin,B.;Liu,Q.;Tucker-Kellogg,L.;Ho,B.;Leung,B.P.;Ling Ding,J. (2013) The synergy in cytokine production through MyD88-TRIF pathways is co-ordinated with ERK phosphorylation in macrophages,Immunol.Cell Biol.91 (5) ,377-387。

[0607] 108) Takeuchi,O.;Akira,S. (2010) Pattern recognition receptors and inflammation,Cell 140 (6) ,805-820。

[0608] 109) Takeuchi,O.;Sato,S.;Horiuchi,T.;Hoshino,K.;Takeda,K.;Dong,Z.;Modlin,R.L.;Akira,S. (2002) Cutting edge:role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins,J.Immunol.169 (1) ,10-14。

[0609] 110) Talmadge,J.E.;Adams,J.;Phillips,H.;Collins,M.;Lenz,B.;Schneider,M.;Chirigos,M. (1985) Immunotherapeutic potential in murine tumor models of polyinosinic-polycytidylic acid and poly-L-lysine solubilized by carboxymethylcellulose,Cancer Res.45 (3) ,1066-1072。

[0610] 111) Theriault,R.L.;Hortobagyi,G.N.;Buzdar,A.U.;Levy,H.B.;Hersh,E.M. (1986) Evaluation of polyinosinic-polycytidylic and poly-L-lysine in metastatic breast cancer,Cancer Treat.Rep.70 (11) ,1341-1342。

[0611] 112) Trumpfheller,C.;Caskey,M.;Nchinda,G.;Longhi,M.P.;Mizenina,O.;

Huang, Y.; Schlesinger, S. J.; Colonna, M.; Steinman, R. M. (2008) The microbial mimic poly IC induces durable and protective CD4+T cell immunity together with a dendritic cell targeted vaccine, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105 (7), 2574-2579.

[0612] 113) Tsuji, T.; Sabbatini, P.; Jungbluth, A. A.; Ritter, E.; Pan, L.; Ritter, G.; Ferran, L.; Spriggs, D.; Salazar, A. M.; Gnjjatic, S. (2013) Effect of Montanide and poly-ICLC adjuvant on human self/tumor antigen-specific CD4+T cells in phase I overlapping long peptide vaccine trial, *Cancer Immunol. Res.* 1 (5), 340-350.

[0613] 114) Vanhoutte, F.; Paget, C.; Breuilh, L.; Fontaine, J.; Vendeville, C.; Goriely, S.; Ryffel, B.; Faveeuw, C.; Trottein, F. (2008) Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR3 synergy and cross-inhibition in murine myeloid dendritic cells, *Immunol. Lett.* 116 (1), 86-94.

[0614] 115) Watters, T. M.; Kenny, E. F.; O'Neill, L. A. (2007) Structure, function and regulation of the Toll/IL-1 receptor adaptor proteins, *Immunol. Cell. Biol.* 85 (6), 411-419.

[0615] 116) Wells, J. W.; Cowled, C. J.; Farzaneh, F.; Noble, A. (2008) Combined triggering of dendritic cell receptors results in synergistic activation and potent cytotoxic immunity, *J. Immunol.* 181 (5), 3422-3431.

[0616] 117) Wiedemann, F.; Link, R.; Pompe, K.; Jacobshagen, U.; Schaefer, H. E.; Wiesmüller, K. H.; Hummel, R. P.; Jung, G.; Bessler, W.; Böltz, T. (1991) Histopathological studies on the local reactions induced by complete Freund's adjuvant (CFA), bacterial lipopolysaccharide (LPS), and synthetic lipopeptide (P3C) conjugates, *J. Pathol.* 164 (3), 265-271.

[0617] 118) Webster, R. G.; Laver, W. G.; Air, G. M. Antigenic variation among type A influenza viruses, p. 127-168. In: Palese, P. & Kingsbury, D. W., eds. *Genetics of influenza viruses*. (New York: Springer-Verlag, 1983).

[0618] 119) Welters, M. J.; Bijker, M. S.; van den Eeden, S. J.; Franken, K. L.; Melief, C. J.; Offringa, R.; van der Burg, S. H. (2007) Multiple CD4 and CD8 T-cell activation parameters predict vaccine efficacy in vivo mediated by individual DC-activating agonists, *Vaccine* 25 (8), 1379-1389.

[0619] 120) Wilson-Welder, J. H.; Torres, M. P.; Kipper, M. J.; Mallapragada, S. K.; Wannemuehler, M. J.; Narasimhan, B. (2009) Vaccine adjuvants: current challenges and future approaches, *J. Pharm. Sci.* 98 (4), 1278-1316.

[0620] 121) Yoneyama, M.; Kikuchi, M.; Natsukawa, T.; Shinobu, N.; Imaizumi, T.; Miyagishi, M.; Taira, K.; Akira, S.; Fujita, T. (2004) The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses, *Nat. Immunol.* 5 (7), 730-737.

[0621] 122) Zaks, K.; Jordan, M.; Guth, A.; Sellins, K.; Kedl, R.; Izzo, A.; Bosio, C.; Dow, S. (2006) Efficient immunization and cross-priming by vaccine adjuvants containing TLR3 or TLR9 agonists complexed to cationic liposomes,

J. Immunol. 176 (12), 7335-7345。

[0622] 123) Zhu, Q.; Egelston, C.; Vivekanandhan, A.; Uematsu, S.; Akira, S.; Klinman, D.M.; Belyakov, I.M.; Berzofsky, J.A. (2008) Toll-like receptor ligands synergize through distinct dendritic cell pathways to induce T cell responses: implications for vaccines, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 105 (42), 16260-16265。

[0623] 124) Zhu, X.; Nishimura, F.; Sasaki, K.; Fujita, M.; Dusak, J.E.; Eguchi, J.; Fellows-Mayle, W.; Storkus, W.J.; Walker, P.R.; Salazar, A.M.; Okada, H. (2007) Toll like receptor-3 ligand poly-ICLC promotes the efficacy of peripheral vaccinations with tumor antigen-derived peptide epitopes in murine CNS tumor models, J. Transl. Med. 5 (10), 1-15。

[0624] 125) Zhu, X.; Fallert-Junecko, B.A.; Fujita, M.; Ueda, R.; Kohanbash, G.; Kastenhuber, E.R.; McDonald, H.A.; Liu, Y.; Kalinski, P.; Reinhart, T.A.; Salazar, A.M.; Okada, H. (2010) Poly-ICLC promotes the infiltration of effector T cells into intracranial gliomas via induction of CXCL10 in IFN-alpha and IFN-gamma dependent manners, Cancer Immunol. Immunother. 59 (9), 1401-1409。

序列表

<110> 免疫疫苗技术有限公司

<120> 包括聚肌胞苷酸多核苷酸佐剂和基于脂质的佐剂的辅助系统以及无水疫苗组合物

<130> 78961-194

<150> US 62/256,875

<151> 2015-11-18

<160> 80

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 棕榈酸佐剂

<220>

<221> Misc_Feature

<222> (1) .. (1)

<223> 连接至PAM、PAM2或PAM3

<220>

<221> Misc_Feature

<222> (6) .. (6)

<223> 任选地缀合至生物素-Aca-Aca、荧光素-Aca-Aca、罗丹明-Aca-Aca、或FLAG-标

签

<400> 1

Cys Ser Lys Lys Lys Lys

1 5

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> HPV R9F肽

<400> 2

Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe

1 5

<210> 3

<211> 26

<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 聚肌胞苷酸多核苷酸
<220>
<221> 修饰的碱基
<222> (1) .. (1)
<223> 肌苷
<220>
<221> 修饰的碱基
<222> (3) .. (3)
<223> 肌苷
<220>
<221> 修饰的碱基
<222> (5) .. (5)
<223> 肌苷
<220>
<221> 修饰的碱基
<222> (7) .. (7)
<223> 肌苷
<220>
<221> 修饰的碱基
<222> (9) .. (9)
<223> 肌苷
<220>
<221> 修饰的碱基
<222> (11) .. (11)
<223> 肌苷
<220>
<221> 修饰的碱基
<222> (13) .. (13)
<223> 肌苷
<220>
<221> 修饰的碱基
<222> (15) .. (15)
<223> 肌苷
<220>
<221> 修饰的碱基
<222> (17) .. (17)

<223> 肌苷
<220>
<221> 修饰的碱基
<222> (19) .. (19)
<223> 肌苷
<220>
<221> 修饰的碱基
<222> (21) .. (21)
<223> 肌苷
<220>
<221> 修饰的碱基
<222> (23) .. (23)
<223> 肌苷
<220>
<221> 修饰的碱基
<222> (25) .. (25)
<223> 肌苷
<400> 3
nncncncnc nncncncnc nncnc 26
<210> 4
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成多核苷酸
<220>
<221> 修饰的碱基
<222> (1) .. (2)
<223> 肌苷
<220>
<221> 修饰的碱基
<222> (4) .. (5)
<223> 肌苷
<400> 4
nncnnc 6
<210> 5
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多核苷酸
<220>
<221> 修饰的碱基
<222> (1) .. (1)
<223> 肌苷
<220>
<221> 修饰的碱基
<222> (3) .. (3)
<223> 肌苷
<220>
<221> 修饰的碱基
<222> (5) .. (5)
<223> 肌苷
<400> 5
ncncnc 6
<210> 6
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 棕榈酸佐剂
<220>
<221> Misc_Feature
<222> (1) .. (1)
<223> 连接至PAM3
<400> 6
Cys Ser Ser Asn Ala Lys Ile Asp Gln Leu Ser Ser Asp Val Gln Thr
1 5 10 15
<210> 7
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 棕榈酸佐剂
<220>
<221> Misc_Feature
<222> (1) .. (1)
<223> 连接至PAM3

<400> 7

Cys Ser Ser Asn Lys Ser Thr Thr Gly Ser Gly Glu Thr Thr Thr Ala

1 5 10 15

<210> 8

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 棕榈酸佐剂

<220>

<221> Misc_Feature

<222> (1) .. (1)

<223> 连接至PAM3

<400> 8

Cys Ser Ser Thr Lys Pro Val Ser Gln Asp Thr Ser Pro Lys Pro Ala

1 5 10 15

<210> 9

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 棕榈酸佐剂

<220>

<221> Misc_Feature

<222> (1) .. (1)

<223> 连接至PAM3

<400> 9

Cys Ser Ser Gly Ser Lys Pro Ser Gly Gly Pro Leu Pro Asp Ala Lys

1 5 10 15

<210> 10

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 棕榈酸佐剂

<220>

<221> Misc_Feature

<222> (1) .. (1)

<223> 连接至PAM3

<400> 10

Cys Ser Ser Gly Asn Lys Ser Ala Pro Ser Ser Ser Ala Ser Ser Ser
1 5 10 15

<210> 11

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 棕榈酸佐剂

<220>

<221> Misc_Feature

<222> (1) .. (1)

<223> 连接至PAM3

<400> 11

Cys Gly Ser His Gln Met Lys Ser Glu Gly His Ala Asn Met Gln Leu
1 5 10 15

<210> 12

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 棕榈酸佐剂

<220>

<221> Misc_Feature

<222> (1) .. (1)

<223> 连接至PAM3

<400> 12

Cys Ser Ser Ser Asn Asn Asp Ala Ala Gly Asn Gly Ala Ala Gln Thr
1 5 10 15

<210> 13

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 棕榈酸佐剂

<220>

<221> Misc_Feature

<222> (1) .. (1)

<223> 连接至PAM3

<400> 13

Cys Lys Gln Asn Val Ser Ser Leu Asp Glu Lys Asn Ser Val Ser Val

1 5 10 15

<210> 14

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 棕榈酸佐剂

<220>

<221> Misc_Feature

<222> (1) .. (1)

<223> 连接至PAM3

<400> 14

Cys Asn Asn Ser Gly Lys Asp Gly Asn Thr Ser Ala Asn Ser Ala Asp

1 5 10 15

<210> 15

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 棕榈酸佐剂

<220>

<221> Misc_Feature

<222> (1) .. (1)

<223> 连接至PAM3

<400> 15

Cys Asn Asn Gly Gly Pro Glu Leu Lys Ser Asp Glu Val Ala Lys Ser

1 5 10 15

<210> 16

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 棕榈酸佐剂

<220>

<221> Misc_Feature

<222> (1) .. (1)

<223> 连接至PAM3

<400> 16

Cys Ser Gln Glu Pro Ala Ala Pro Ala Ala Glu Ala Thr Pro Ala Gly

1 5 10 15

<210> 17

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 棕榈酸佐剂

<220>

<221> Misc_Feature

<222> (1) .. (1)

<223> 连接至PAM3

<400> 17

Cys Ser Ser Ser Lys Ser Ser Asp Ser Ser Ala Pro Lys Ala Tyr Gly

1 5 10 15

<210> 18

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 棕榈酸佐剂

<220>

<221> Misc_Feature

<222> (1) .. (1)

<223> 连接至PAM3

<400> 18

Cys Ala Gln Glu Lys Glu Ala Lys Ser Glu Leu Asp Tyr Asp Gln Thr

1 5 10 15

<210> 19

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 棕榈酸佐剂

<220>

<221> Misc_Feature

<222> (1) .. (1)

<223> 连接至PAM-CYS (PAM) 或PAM-Dhc

<400> 19

Ser Lys Lys Lys Lys

1 5

<210> 20

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的二酰化脂蛋白FSL-1

<220>

<221> Misc_Feature

<222> (1) .. (1)

<223> 连接至PAM或PAM2

<400> 20

Cys Gly Asp Pro Lys His Pro Lys Ser Phe

1 5 10

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 棕榈酸佐剂

<220>

<221> Misc_Feature

<222> (1) .. (1)

<223> 连接至PAM-Dhc

<400> 21

Gly Asp Pro Lys His Pro Lys Ser Phe

1 5

<210> 22

<211> 23

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> RSV SHe A肽

<400> 22

Asn Lys Leu Cys Glu Tyr Asn Val Phe His Asn Lys Thr Phe Glu Leu

1 5 10 15

Pro Arg Ala Arg Val Asn Thr

20

<210> 23

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 23

Ala Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val

1

5

<210> 24

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 24

Glu Ala Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val

1

5

10

<210> 25

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 25

Ile Leu Thr Val Ile Leu Gly Val Leu

1

5

<210> 26

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 26

Ala Glu Glu Ala Ala Gly Ile Gly Ile Leu

1

5

10

<210> 27

<211> 11

<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<400> 27
Ala Glu Glu Ala Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr
1 5 10
<210> 28
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<400> 28
Thr Ile Leu Leu Gly Ile Phe Phe Leu
1 5
<210> 29
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<400> 29
Phe Leu Ala Leu Ile Ile Cys Asn Ala
1 5
<210> 30
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<400> 30
Lys Thr Trp Gly Gln Tyr Trp Gln Val
1 5
<210> 31
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>

<223> 合成肽

<400> 31

Ala Met Leu Gly Thr His Thr Met Glu Val

1 5 10

<210> 32

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 32

Met Leu Gly Thr His Thr Met Glu Val

1 5

<210> 33

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 33

Ser Leu Ala Asp Thr Asn Ser Leu Ala Val

1 5 10

<210> 34

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 34

Ile Thr Asp Gln Val Pro Phe Ser Val

1 5

<210> 35

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 35

Leu Leu Asp Gly Thr Ala Thr Leu Arg Leu

1	5	10
<210> 36		
<211> 9		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成肽		
<400> 36		
Tyr Leu Glu Pro Gly Pro Val Thr Ala		
1	5	
<210> 37		
<211> 10		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成肽		
<400> 37		
Val Leu Tyr Arg Tyr Gly Ser Phe Ser Val		
1	5	10
<210> 38		
<211> 9		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成肽		
<400> 38		
Arg Leu Pro Arg Ile Phe Cys Ser Cys		
1	5	
<210> 39		
<211> 9		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成肽		
<400> 39		
Leu Ile Tyr Arg Arg Arg Leu Met Lys		
1	5	
<210> 40		
<211> 9		

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 40

Ala Leu Asn Phe Pro Gly Ser Gln Lys

1 5

<210> 41

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 41

Ser Leu Ile Tyr Arg Arg Arg Leu Met Lys

1 5 10

<210> 42

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 42

Ala Leu Leu Ala Val Gly Ala Thr Lys

1 5

<210> 43

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 43

Val Tyr Phe Phe Leu Pro Asp His Leu

1 5

<210> 44

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 44

Ser Asn Asp Gly Pro Thr Leu Ile

1 5

<210> 45

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 45

Val Ser His Ser Phe Pro His Pro Leu Tyr

1 5 10

<210> 46

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 46

Phe Leu Thr Pro Lys Lys Leu Gln Cys Val

1 5 10

<210> 47

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 47

Val Ile Ser Asn Asp Val Cys Ala Gln Val

1 5 10

<210> 48

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 48

His Ser Thr Asn Gly Val Thr Arg Ile Tyr

1	5	10
---	---	----

<210> 49

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 49

Lys Cys Asp Ile Cys Thr Asp Glu Tyr

1	5
---	---

<210> 50

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 50

Ser Ser Asp Tyr Val Ile Pro Ile Gly Thr Tyr

1	5	10
---	---	----

<210> 51

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 51

Tyr Met Asp Gly Thr Met Ser Gln Val

1	5
---	---

<210> 52

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 52

Met Leu Leu Ala Val Leu Tyr Cys Leu

1	5
---	---

<210> 53

<211> 9

<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<400> 53
Ala Phe Leu Pro Trp His Arg Leu Phe
1 5
<210> 54
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<400> 54
Ser Glu Ile Trp Arg Asp Ile Asp Phe
1 5
<210> 55
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<400> 55
Met Ser Leu Gln Arg Gln Phe Leu Arg
1 5
<210> 56
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<400> 56
Ser Val Tyr Asp Phe Phe Val Trp Leu
1 5
<210> 57
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>

<223> 合成肽

<400> 57

Thr Leu Asp Ser Gln Val Met Ser Leu

1 5

<210> 58

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 58

Leu Leu Gly Pro Gly Arg Pro Tyr Arg

1 5

<210> 59

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 59

Ala Asn Asp Pro Ile Phe Val Val Leu

1 5

<210> 60

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> HPV T10V肽

<400> 60

Thr Ile His Asp Ile Ile Leu Glu Cys Val

1 5 10

<210> 61

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> HPV Y10T肽

<400> 61

Tyr Met Leu Asp Leu Gln Pro Glu Thr Thr

1	5	10
<210> 62		
<211> 9		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> HPV L9V肽		
<400> 62		
Leu Leu Met Gly Thr Leu Gly Ile Val		
1	5	
<210> 63		
<211> 8		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> HPV T8I肽		
<400> 63		
Thr Leu Gly Ile Val Cys Pro Ile		
1	5	
<210> 64		
<211> 8		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> TRP-2 V8L肽		
<400> 64		
Val Tyr Asp Phe Phe Val Trp Leu		
1	5	
<210> 65		
<211> 9		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> p53 K9M肽		
<400> 65		
Lys Tyr Met Cys Asn Ser Ser Cys Met		
1	5	
<210> 66		
<211> 9		

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> p53 mK9M肽

<400> 66

Lys Tyr Ile Cys Asn Ser Ser Cys Met

1 5

<210> 67

<211> 22

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> PADRE and p53 mK9M肽

<220>

<221> Misc_Feature

<222> (3) .. (3)

<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

<400> 67

Ala Lys Xaa Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala Lys Tyr Ile

1 5 10 15

Cys Asn Ser Ser Cys Met

20

<210> 68

<211> 429

<212> DNA

<213> 智人

<400> 68

atgggtgccc cgacgttgcc cctgcctgg cagcccttc tcaaggacca ccgcattctct 60
acattcaaga actggccctt cttggagggc tgcgcttgea ccccgagcgc gatggccgag 120
gctggcttca tccactgccc cactgagaac gagccagact tggcccagtg tttcttctgc 180
ttcaaggagc tggaaggctg ggagccagat gacgacccca tagaggaaca taaaaagcat 240
tcgtccggtt gcgctttcct ttctgtcaag aagcagtttg aagaattaac ctttggtgaa 300
tttttgaaac tggacagaga aagagccaag aacaaaattg caaaggaaac caacaataag 360
aagaaagaat ttgaggaaac tgcgaagaaa gtgcgccgtg ccatcgagca gctggctgcc 420
atggattga 429

<210> 69

<211> 142

<212> PRT

<213> 智人

<400> 69

Met Gly Ala Pro Thr Leu Pro Pro Ala Trp Gln Pro Phe Leu Lys Asp
1 5 10 15
His Arg Ile Ser Thr Phe Lys Asn Trp Pro Phe Leu Glu Gly Cys Ala
 20 25 30
Cys Thr Pro Glu Arg Met Ala Glu Ala Gly Phe Ile His Cys Pro Thr
 35 40 45
Glu Asn Glu Pro Asp Leu Ala Gln Cys Phe Phe Cys Phe Lys Glu Leu
 50 55 60
Glu Gly Trp Glu Pro Asp Asp Asp Pro Ile Glu Glu His Lys Lys His
65 70 75 80
Ser Ser Gly Cys Ala Phe Leu Ser Val Lys Lys Gln Phe Glu Glu Leu
 85 90 95
Thr Leu Gly Glu Phe Leu Lys Leu Asp Arg Glu Arg Ala Lys Asn Lys
 100 105 110
Ile Ala Lys Glu Thr Asn Asn Lys Lys Lys Glu Phe Glu Glu Thr Ala
 115 120 125
Lys Lys Val Arg Arg Ala Ile Glu Gln Leu Ala Ala Met Asp
 130 135 140

<210> 70

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 存活素HLA-A1野生型

<400> 70

Phe Glu Glu Leu Thr Leu Gly Glu Phe
1 5

<210> 71

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 修饰的存活素HLA-A1

<400> 71

Phe Thr Glu Leu Thr Leu Gly Glu Phe
1 5

<210> 72

<211> 9

<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 存活素HLA-A2野生型
<400> 72
Leu Thr Leu Gly Glu Phe Leu Lys Leu
1 5
<210> 73
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 修饰的存活素HLA-A2
<400> 73
Leu Met Leu Gly Glu Phe Leu Lys Leu
1 5
<210> 74
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 存活素HLA-A3野生型
<400> 74
Arg Ile Ser Thr Phe Lys Asn Trp Pro Phe
1 5 10
<210> 75
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 修饰的存活素HLA-A3
<400> 75
Arg Ile Ser Thr Phe Lys Asn Trp Pro Lys
1 5 10
<210> 76
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>

<223> 存活素HLA-A24野生型

<400> 76

Ser Thr Phe Lys Asn Trp Pro Phe Leu

1 5

<210> 77

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 存活素HLA-B7野生型

<400> 77

Leu Pro Pro Ala Trp Gln Pro Phe Leu

1 5

<210> 78

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 破伤风毒素肽A16L

<400> 78

Ala Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu

1 5 10 15

<210> 79

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 辅助性T表位PADRE

<220>

<221> Misc_Feature

<222> (3) .. (3)

<223> Xaa可以是环己基丙氨酰

<400> 79

Ala Lys Xaa Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala

1 5 10

<210> 80

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 破伤风类毒素肽F21E

<400> 80

Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser

1

5

10

15

Ala Ser His Leu Glu

20

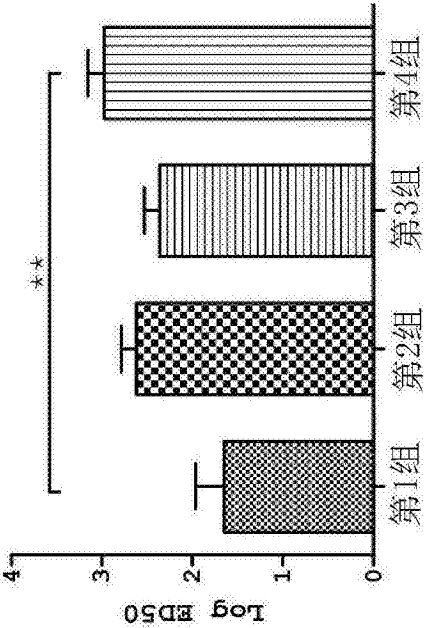


图1b

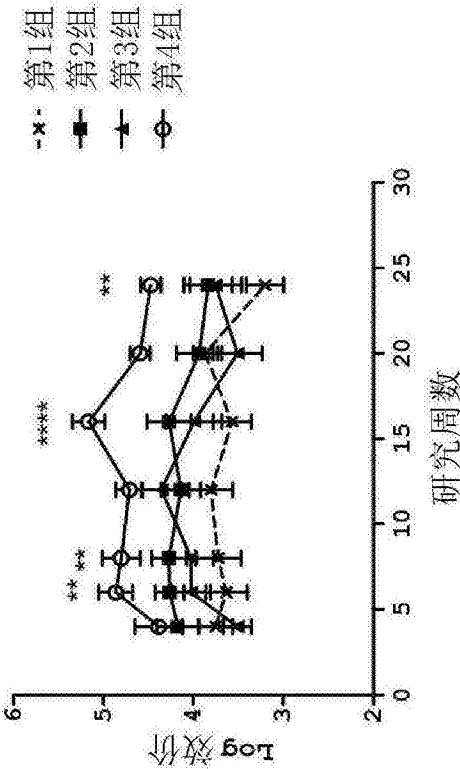


图1a

图1

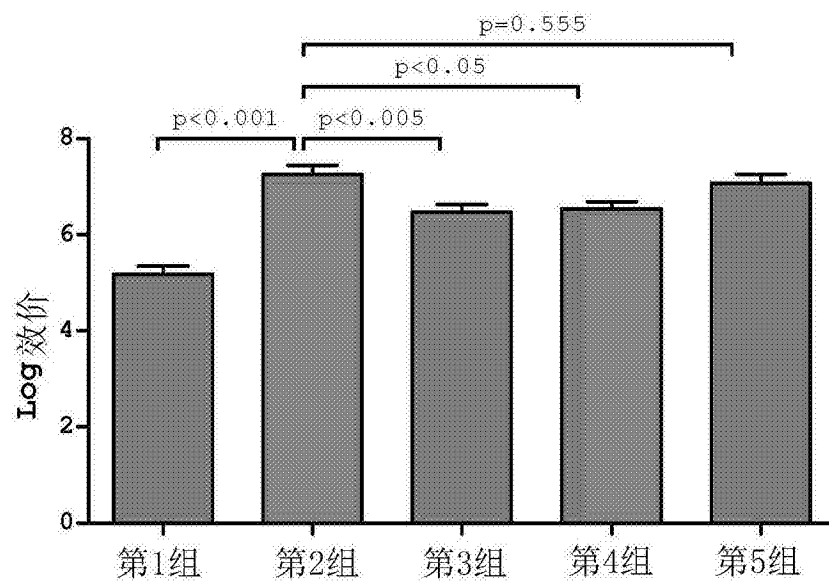


图2

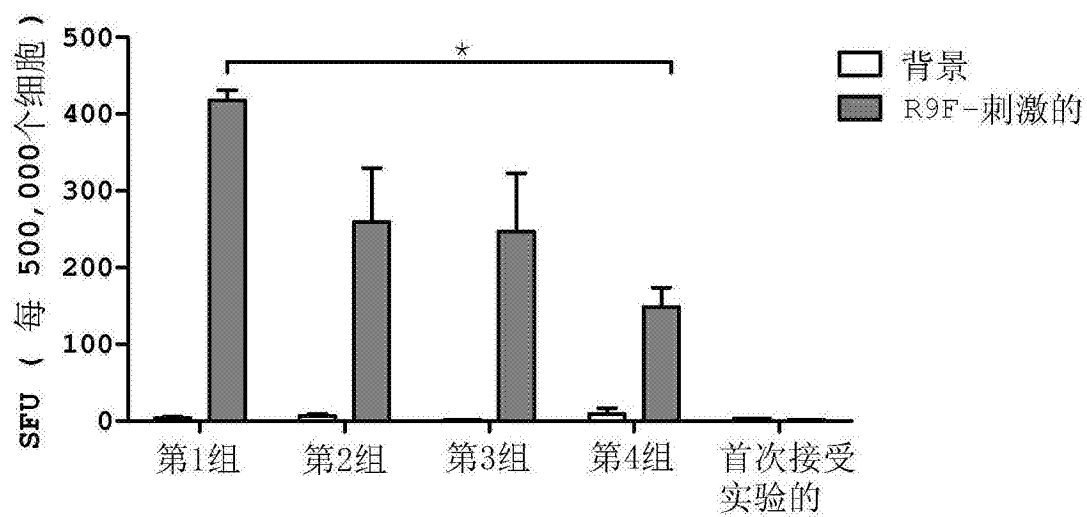


图3