



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 102245199 B

(45)授权公告日 2018.10.26

(21)申请号 200980149914.1

布莱根妇女医院

(22)申请日 2009.10.09

(72)发明人 J·史 F·亚历亚西

(65)同一申请的已公布的文献号

M·扬纳科内 E·A·莫斯曼

申请公布号 CN 102245199 A

P·巴斯托 R·兰格

(43)申请公布日 2011.11.16

O·C·法鲁赫扎德

U·冯安德里安 E·通蒂

(30)优先权数据

PCT/US2008/011932 2008.10.12 US

12/428,381 2009.04.22 US

(74)专利代理机构 北京戈程知识产权代理有限公司 11314

代理人 程伟

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2011.06.10

(51)Int.Cl.

A61K 39/00(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2009/060250 2009.10.09

(56)对比文件

US 20040022840 A1, 2004.02.05, 实施例1-

11.

CN 1976687 A, 2007.06.06, 实施例1, 4-7,

说明书第7页第5段.

(87)PCT国际申请的公布数据

W02010/042876 EN 2010.04.15

(73)专利权人 麻省理工学院

地址 美国马萨诸塞州

专利权人 哈佛大学校长及研究员协会

审查员 康旭亮

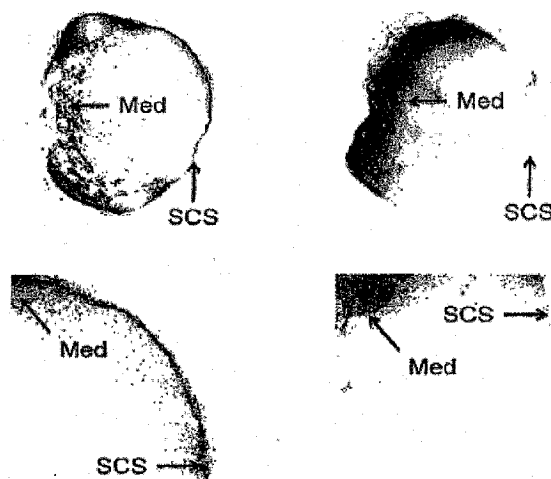
权利要求书3页 说明书119页 附图55页

(54)发明名称

通过免疫纳米疗法靶向抗原呈递细胞

(57)摘要

本发明提供了用于将纳米载体传送至免疫系统的细胞的组合物和系统。本发明提供了能够刺激T细胞和/或B细胞中的免疫应答的纳米载体。本发明提供了包含免疫特征表面的纳米载体。该纳米载体在施用于患者时能够靶向抗原呈递细胞。本发明提供了包含纳米载体的药物组合物。本发明提供了设计、制造和使用纳米载体及其药物组合物的方法。



1. 一种组合物,其包含:

- 1) 合成纳米载体;和
- 2) 药物学上可接受的赋形剂;

其中所述合成纳米载体是由亲水性-疏水性的两性聚合物自组装成的,其中一些聚合物具有结合至两性聚合物亲水性聚合物末端的部分,从而形成免疫特征表面,

和对抗体的结合相比较,所述免疫特征表面以高亲合力且低亲和性结合抗原呈递细胞表面,其中所述的抗体特异于抗原呈递细胞的表面受体,

其中第一部分是T细胞抗原或B细胞抗原;

还包含免疫刺激剂来促进对抗原的耐受,其中所述的免疫刺激剂选自:免疫抑制剂、和诱导调节性T细胞的试剂。

2. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述部分以获得至少10%的在抗原呈递细胞结合试验中对于单克隆抗体观察到的最大固定化需要的密度相等或更高的密度存在,只要在抗原呈递细胞结合试验中,对于所述部分的半最大结合密度是对于单克隆抗体的半最大结合密度的至少两倍。

3. 根据权利要求2所述的组合物,其中所述部分以获得至少20%的在抗原呈递细胞结合试验中对于单克隆抗体观察到的最大固定化需要的密度相等或更高的密度存在。

4. 根据权利要求2所述的组合物,其中对于所述部分的半最大结合密度是对于单克隆抗体的半最大结合密度的至少四倍。

5. 根据权利要求2所述的组合物,其中所述抗原呈递细胞结合试验包括:

a) 制备一系列底物,其具有一系列表面涂层密度的涂层功能性部分,其中所述功能性部分能够结合树突细胞或被膜下淋巴窦巨噬细胞表面受体;

b) 将一系列底物暴露于树突细胞或被膜下淋巴窦巨噬细胞的单细胞悬浮液,持续预定的时间段;

c) 从一系列底物中除去未粘附的抗原呈递细胞,并将粘附的抗原呈递细胞固定于一系列底物;

d) 对于一系列底物中的每种底物,定量每单位表面积的粘附抗原呈递细胞数量;

e) 将来自d)的结果相对功能性部分的涂层密度作出曲线;

f) 通过测定一系列底物的每单位表面积的粘附抗原呈递细胞的最大数量来获得最大固定化的值;和

g) 通过测定提供50%最大值的表面涂层密度来获得半最大结合密度的值。

6. 根据权利要求2所述的组合物,其中所述单克隆抗体是抗-CD1c (BDCA-1) 克隆AD5-8E7或大鼠抗-小鼠CD169克隆3D6.112。

7. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述免疫特征表面包含B-细胞抗原。

8. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述免疫特征表面包含多个不同的部分。

9. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述免疫特征表面包含一个或多个部分,当所述一个或多个部分在pH为7.2-7.4的缓冲水溶液中时,其为带正电、带负电或中性的。

10. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述免疫刺激剂、或抗原:

i) 在所述免疫特征表面上;

ii) 位于所述纳米载体的第二表面上;或

iii) 包埋在所述纳米载体的核心区域内。

11. 根据权利要求1所述的组合物, 其中所述纳米载体的平均几何直径在60nm至400nm之间。

12. 根据权利要求1所述的组合物, 其中所述药物学上可接受的赋形剂选自: 溶剂、分散介质、稀释剂或其它液体载体、分散或悬浮助剂、表面活性剂、等张试剂、增稠剂或乳化剂、防腐剂、固体粘合剂和润滑剂。

13. 根据权利要求1所述的组合物, 其还包含靶向部分。

14. 根据权利要求13所述的组合物, 其中所述靶向部分靶向被膜下淋巴窦巨噬细胞。

15. 根据权利要求13所述的组合物, 其中所述靶向部分靶向树突细胞。

16. 根据权利要求13所述的组合物, 其中所述组合物基本上没有激活补体。

17. 根据权利要求1所述的组合物, 其中所述部分选自小的有机部分、无机部分、核酸和多核苷酸、氨基酸、多肽、糖蛋白、神经节苷脂、脂质、磷脂、碳水化合物和多糖。

18. 根据权利要求1所述的组合物, 其中所述免疫抑制剂选自: 环孢霉素、类固醇、氨甲蝶呤、乙嘧啶、三甲喋呤、青霉胺、和咪唑硫嘌呤;

所述的诱导调节性T细胞的试剂选自: 雷帕霉素、TGF- β 、和维甲酸。

19. 根据权利要求15所述的组合物, 其中所述树突细胞是静止树突细胞, 其中所述靶向部分不引起静止树突细胞的成熟。

20. 权利要求1至19任一项所述的组合物在制备用于向患者施用首次剂量的药物中的用途。

21. 根据权利要求20所述的用途, 进一步包括, 在1天至1年的间隔后将第二次剂量的所述组合物施用于所述患者。

22. 根据权利要求21所述的用途, 其中所述间隔为1天至1月。

23. 根据权利要求21所述的用途, 其中所述间隔为1天至1周。

24. 一种制备用于增加被膜下淋巴窦巨噬细胞的抗原摄入的药物的方法, 包括制备组合物, 所述组合物包含:

1) 合成纳米载体,

所述合成纳米载体是由亲水性-疏水性的两性聚合物自组装成的, 其中一些聚合物具有结合至两性聚合物亲水性聚合物末端的部分, 其中所述的部分构成免疫特征表面,

和对抗体的结合相比较, 所述免疫特征表面以高亲和力且低亲和性结合抗原呈递细胞表面, 其中所述的抗体特异于抗原呈递细胞的表面受体,

其中第一部分是T细胞抗原或B细胞抗原; 还包含免疫刺激剂来促进对抗原的耐受, 其中所述的免疫刺激剂选自免疫抑制剂、和诱导调节性T细胞的试剂;

其中所述抗原: i) 在所述免疫特征表面上; ii) 位于所述纳米载体的第二表面上; 或 iii) 包埋在所述纳米载体的核心区域内; 和

2) 药物学上可接受的赋形剂。

25. 根据权利要求24所述的方法, 其中所述被膜下淋巴窦巨噬细胞是CD169+巨噬细胞。

26. 根据权利要求24所述的方法, 其中所述免疫刺激剂位于:

i) 在所述免疫特征表面上;

ii) 所述纳米载体的第二表面上; 或

iii) 包埋在所述纳米载体的核心区域内。

27. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述合成纳米载体基本上没有激活补体。

28. 根据权利要求24所述的方法,其中所述抗体是抗-CD1c (BDCA-1) 克隆AD5-8E7或大鼠抗-小鼠CD169克隆3D6.112。

通过免疫纳米疗法靶向抗原呈递细胞

[0001] 相关申请

[0002] 本申请是2008年10月12日提交的PCT申请系列No. PCT/US08/011932的部分继续,并且要求其优先权。本申请还要求2009年4月22日提交的美国专利申请系列号12/428,381的优先权。在此将上述申请的全部内容引入作为参考。

[0003] 政府支持

[0004] 本发明是在由NIH授予的Grant Nos. EB003647、AI072252和AI069259的政府支持下进行的。政府在本发明中具有一定的权利。

背景技术

[0005] 很多现有的对抗微生物病原体的疫苗包含病原微生物的活减毒或非剧毒株。很多疫苗包含杀灭的或其他灭活的微生物。其它疫苗利用病原体裂解物的纯化成分,如表面碳水化合物或重组病原体衍生的蛋白。利用活减毒的或灭活的病原体的疫苗通常产生有力的免疫应答,但是它们的用途有局限性。例如,活的疫苗株有时候会引起传染性病状,尤其是施用于免疫受损的受体时。此外,很多病原体,特别是病毒,它们的基因组经受了持续快速的突变,这使其能够逃脱针对抗原上不同的疫苗株的免疫应答。

[0006] 鉴于疫苗产生的困难,很多疫苗供应严重短缺。例如,2007年10月美国发生了流感、水痘和甲肝疫苗的短缺。在一些情况下,疫苗短缺的发生是由于没有足够的生产商将其设备投入到疫苗生产以维持需求。在一些情况下,疫苗短缺是由于疫苗效力低造成的,这意味着必须向每个个体施以很大数量的疫苗产品以达到预防性效果。例如,一些疫苗不能作为完整生物体施用(即使是减毒的或杀灭的),因为它们引起传染性病状。替代地,这样的疫苗通常包含纯化的病原体成分,其通常导致效力小得多的免疫应答。

[0007] 因此,本领域对生产高免疫原性、有效疫苗的系统和方法存在着需求。对能够有效地诱导长效免疫应答的改良疫苗组合物也存在着需求。为了治疗和预防传染性疾病,对高免疫原性但不引起疾病的改良疫苗组合物存在着需求。

发明内容

[0008] 本发明提供了用于调节免疫系统的合成纳米载体。合成纳米载体包含一个或多个表面。在一些具体实施方案中,至少一个表面包含免疫特征表面。任选,本发明的合成纳米载体含有一种或多种免疫调节剂、免疫刺激剂和靶向剂(本文中也称为“靶向部分”)。免疫调节剂诱导B和/或T细胞中的免疫应答。免疫刺激剂帮助刺激免疫系统(以一种最终能够加强、抑制、引导或重引导免疫应答的方式)。免疫特征表面识别一个或多个与抗原呈递细胞相关的目标。任选的靶向剂识别一个或多个与特定的器官、组织、细胞和/或亚细胞位点相关的目标。在一些具体实施方案中,合成纳米载体包含如下的表面:该表面包含含量能给部分有效提供体液应答的多个部分。例如,将合成纳米载体施用于患者时,获得体液应答。纳米载体在预防和/或治疗那些通过免疫系统调节而易于治疗的疾病、失调或症状的药物制剂和药盒中是有用的。这样的症状包括那些通过特异性或非特异性加强免疫应答、特异性

或非特异性抑制免疫应答或特异性或非特异性引导/重引导免疫应答而调节的疾病、失调或症状。

[0009] 如本发明中将更详细描述免疫特征表面,为将纳米载体特异性地靶向抗原呈递细胞(APC)作好了准备。特别地,免疫特征表面为纳米载体高亲合力地结合APC表面作好了准备。此外,高亲合力结合特异于APC细胞。例如,在一些具体实施方案中,本发明的纳米载体能够特异性地靶向被膜下淋巴窦巨噬细胞(SCS-Mph)。施用于患者时,这样的纳米载体聚集在淋巴结的被膜下淋巴窦区域。在其他具体实施方案中,本发明的纳米载体能够特异性地靶向树突细胞并引发T-细胞应答。在一些优选的具体实施方案中,免疫特征表面提供了纳米载体与APC表面的低亲和性、高亲合力结合。在一些具体实施方案中,包含免疫特征表面的纳米载体呈现出与APC的特定低亲和性高亲合力结合,但未提供这样的与其他类型细胞的结合。本发明中将提供免疫特征表面的更多详细内容。

[0010] 免疫特征表面与目标APC的能力是施用于患者时,使得本发明的纳米载体可以将免疫刺激剂和免疫调节剂传送到B-细胞和/或T-细胞的关键特征。这种传送使得本发明的纳米载体可以引发免疫系统应答,或增强免疫系统应答。在一些具体实施方案中,本发明的合成纳米载体包含如下的表面:该表面包含含量能给部分有效提供体液应答的多个部分。

[0011] 如本领域技术人员所认识到的,免疫系统调节在如下情况中尤其有用,其中,与医学治疗相关的情况,如,例如,用于预防和/或治疗传染病、癌症、自体免疫疾病(包括类风湿性关节炎),与移植相关的免疫抑制,以改善移植排斥,抵抗令人上瘾的物质的免疫,以及对抗生物危害物和其它毒性物质的免疫。免疫系统调节作为工业和学术研究环境中的工具也是有用的,例如,如,免疫动物以生产抗体。

[0012] 本发明的一个方面是提供疫苗。根据本发明的疫苗通常含有抗原。在一个具体实施方案中,抗原通过共价或非共价方式与纳米载体物理“结合”。非共价键包括,例如,离子键、疏水键、物理截留等,以下将全部进行更详细的描述。将这样自身携带抗原的纳米载体包括在以下称为疫苗纳米载体的范畴内。在另一个具体实施方案中,纳米载体具有与之结合的免疫刺激剂,以用于增强、抑制、引导或重引导免疫应答,优选为对抗原的免疫应答。在这种情况下,抗原可以与结合试剂的纳米载体(载体上结合了免疫刺激剂)制备物混合以形成疫苗。当然抗原也可以与纳米载体结合,包括下面所讨论的,结合了免疫刺激试剂的相同纳米载体。抗原也可以是免疫特征表面的一部分。

[0013] 在很多情况下,本发明的制备物将包括一个或多个纳米载体。在一些具体实施方案中,制备物包括具有免疫特征表面的纳米载体,其中纳米载体结合免疫调节剂、免疫刺激剂和靶向剂中的一种或多种,但不是全部。在一些具体实施方案中,制备物是纳米载体的混合物,其具有携带免疫调节剂、免疫刺激剂和靶向剂中的一种或多种,但不是全部的亚群体。在一些具体实施方案中,制备物是不同纳米载体的混合物,每种纳米载体携带免疫调节剂、免疫刺激剂和靶向剂中的一种或多种,但不是全部。制备物同样可以是纳米载体中的一个,其中每个纳米载体具有与之结合的全部免疫调节剂、免疫刺激剂和靶向剂。在这种情况下,纳米载体自身,除了它们输送的试剂之外,可以是相同或不同的。在此提及的靶向剂(并且本发明中将更详细地描述)是,例如,B-细胞靶向部分或T-细胞靶向部分。将认识到,在整个本发明的公开内容中,这些部分是除存在于免疫特征表面上的多个部分以外的并且提供纳米载体靶向APC的部分。

[0014] 重要的是,发现本发明的纳米载体对于刺激免疫系统是强有力的。重要的是,发现纳米载体可以被制成,从免疫学观点来看,是模拟暴露于自然界中的抗原时或在疫苗技术之前免疫系统所“看到”的情况的改进。在这个方面,出乎意料地发现了如果与纳米载体共价结合,佐剂的活性会显著增强。还出乎意料地发现了纳米载体的免疫特征表面甚至能够在没有特定细胞靶向剂的情况下帮助将免疫调节剂或免疫刺激剂靶向合适的免疫细胞。

[0015] 本文中描述的系统允许以产生改善的免疫调节的方式操作那些影响免疫系统的参数。本发明的一个重要方面是可以控制纳米载体的尺寸、试剂密度、靶向程度和位置、降解和试剂释放等。本发明的众多方面实现这些益处中的一个或多个,以下将更详细地描述。特别地,以下描述了免疫调节制备物,这样的制备物的合成纳米载体成分,特异性和优选的纳米载体,特异性和优选的免疫调节剂、免疫刺激剂和靶向剂,本发明纳米载体的成分部分和构建模块,以及制造这样的纳米载体的方法,包括涉及自体装配的纳米载体的优选方法。此外,描述了用于产生与弱抗原和不被T细胞识别的抗原(例如,碳水化合物和小分子抗原)相关的有力的免疫调节的制备物和系统。在一些方面中,提供了包含纳米载体(例如,靶向特定器官、组织、细胞或亚细胞位点的纳米载体)的组合物。在一些具体实施方案中,纳米载体靶向一种或多种次级淋巴组织或器官。在一些具体实施方案中,次级淋巴组织或器官是淋巴结、脾、派亚氏淋巴丛、阑尾或扁桃体。

[0016] 纳米载体骨架(和本文中所提供的试剂结合或包埋的纳米载体)可以由聚合物和/或非聚合物分子组成。因此,纳米载体骨架可以是基于蛋白、基于核酸或基于碳水化合物的。在一些具体实施方案中,骨架是大分子。在一些具体实施方案中,骨架由氨基酸或核酸组成。在一些具体实施方案中,骨架由分子的交联链组成,如核酸。在一些具体实施方案中,骨架由RNAi交联链组成。在一些具体实施方案中,骨架是基于聚氨基的。纳米载体可以是,但不限于,一个或多个基于脂质的纳米颗粒、聚合纳米颗粒、金属纳米颗粒、基于表面活性剂的乳液、树枝状化合物和/或使用纳米材料的组合发展出来的纳米颗粒,如脂质-聚合物纳米颗粒。

[0017] 在一些具体实施方案中,纳米载体由一个或多个聚合物组成。在一些具体实施方案中,一个或多个聚合物是水溶性的、无粘附性聚合物。在一些具体实施方案中,聚合物是聚乙二醇(PEG)或聚环氧乙烷(PEO)。在一些具体实施方案中,聚合物是聚烷撑二醇或聚亚烷基氧化物。在一些具体实施方案中,一个或多个聚合物是生物可降解聚合物。在一些具体实施方案中,一个或多个聚合物是生物相容性聚合物,其为水溶性的、无粘附性聚合物和生物可降解聚合物的偶联物。在一些具体实施方案中,生物可降解聚合物是聚乳酸(PLA)、聚(羟基乙酸)(PGA)或聚(乳酸/羟基乙酸)(PLGA)。在一些具体实施方案中,纳米载体由PEG-PLGA聚合物组成。

[0018] 在一些具体实施方案中,纳米载体通过自体装配形成。自体装配指的是使用那些能够使自身适应以可预见的方式可预见地且可再生地形成纳米载体的成分形成纳米载体的过程。在一些具体实施方案中,使用两性生物材料形成纳米载体,该生物材料相对彼此使自身适应来形成可预见尺寸、组成和组成位置的纳米载体。根据本发明,两性生物材料可以结合免疫调节剂、免疫刺激剂和/或靶向剂,从而当纳米载体自体装配时,在纳米载体上/内存在可再生模式的试剂的位置和密度。

[0019] 在一些具体实施方案中,纳米载体是微米颗粒、纳米颗粒或微微米颗粒。在一些具

体实施方案中,微米颗粒、纳米颗粒或微微米颗粒是自体装配的。

[0020] 在一些具体实施方案中,纳米载体具有正 ζ 电势。在一些具体实施方案中,纳米载体在中性pH下带有净正电荷。在一些具体实施方案中,纳米载体在其表面包含一个或多个胺部分。在一些具体实施方案中,胺部分是伯、仲、叔或季胺。在一些具体实施方案中,胺部分是脂肪族胺。在一些具体实施方案中,纳米载体包含含有胺的聚合物。在一些具体实施方案中,纳米载体包含含有胺的脂质。在一些具体实施方案中,纳米载体包含在中性pH下带有正电荷的蛋白或肽。在一些具体实施方案中,纳米载体是乳胶颗粒。在一些具体实施方案中,在其表面具有一个或多个胺部分的纳米载体在中性pH下带有净正电荷。

[0021] 在一些具体实施方案中,本文中提供的组合物的纳米载体具有500纳米以下的平均几何直径。在一些具体实施方案中,纳米载体具有50纳米以上但500纳米以下的平均几何直径。在一些具体实施方案中,纳米载体群体的平均几何直径为约60纳米、75纳米、100纳米、125纳米、150纳米、175纳米、200纳米、225纳米、250纳米、275纳米、300纳米、325纳米、350纳米、375纳米、400纳米、425纳米、450纳米或475纳米。在一些具体实施方案中,平均几何直径为100-400纳米、100-300纳米、100-250纳米或100-200纳米。在一些具体实施方案中,平均几何直径为60-400纳米、60-350纳米、60-300纳米、60-250纳米或60-200纳米。在一些具体实施方案中,平均几何直径为75-250纳米。在一些具体实施方案中,纳米载体的群体中30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更多的纳米载体具有500纳米以下的直径。在一些具体实施方案中,纳米载体的群体中10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更多的纳米载体具有50纳米以上但500纳米以下的直径。在一些具体实施方案中,纳米载体的群体中10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更多的纳米载体具有约60纳米、75纳米、100纳米、125纳米、150纳米、175纳米、200纳米、225纳米、250纳米、275纳米、300纳米、325纳米、350纳米、375纳米、400纳米、425纳米、450纳米或475纳米的直径。在一些具体实施方案中,纳米载体的群体中10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更多的纳米载体具有100-400纳米、100-300纳米、100-250纳米或100-200纳米的直径。在一些具体实施方案中,纳米载体的群体中10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更多的纳米载体具有60-400纳米、60-350纳米、60-300纳米、60-250纳米或60-200纳米的直径。在一些前述的具体实施方案中,纳米载体为纳米颗粒。

[0022] 本文中提供的纳米载体可用于调节免疫应答(例如,增强、抑制、引导或重引导),并包含免疫特征表面。在一些具体实施方案中,这样的免疫应答是体液免疫应答。在其他具体实施方案中,这样的免疫应答是细胞免疫应答。在一些具体实施方案中,这样的免疫应答是细胞和体液免疫应答的组合。纳米载体可以包含免疫调节剂、免疫刺激剂和靶向剂中的至少一种。在一些具体实施方案中,纳米载体包含B细胞抗原、T细胞抗原、免疫刺激剂和靶向剂中的至少一种。在一些具体实施方案中,纳米载体包含B细胞抗原、T细胞抗原、免疫刺激剂和靶向剂中的至少两种。在一些具体实施方案中,纳米载体包含B细胞抗原、T细胞抗原、免疫刺激剂和靶向剂中的至少三种。在一些具体实施方案中,纳米载体包含B细胞抗原、T细胞抗原、免疫刺激剂和靶向剂的全部。

[0023] 在一些具体实施方案中,纳米载体包含B细胞抗原。B细胞抗原位于纳米载体的免疫特征表面上,纳米载体的第二个表面上,包埋于纳米载体内,或其组合。在一些具体实施方案中,B细胞抗原以激活B细胞受体的密度位于纳米载体的表面上。在一些具体实施方案

中,B细胞抗原与纳米载体结合。在一些具体实施方案中,B细胞抗原与纳米载体共价结合。在一些具体实施方案中,B细胞抗原与纳米载体非共价结合。在一些具体实施方案中,纳米载体进一步包含靶向部分。在一些具体实施方案中,B细胞抗原是弱免疫原性抗原。在一些具体实施方案中,B细胞抗原是小分子。在一些具体实施方案中,B细胞抗原是令人上瘾的物质。在一些具体实施方案中,B细胞抗原是毒素。在一些具体实施方案中,包含于纳米载体中的毒素是完整分子或其部分。在一些具体实施方案中,B细胞抗原不是T细胞抗原。在一些具体实施方案中,B细胞抗原是碳水化合物。在一些具体实施方案中,B细胞抗原是退行性疾病抗原、传染病抗原、癌症抗原、特应性疾病抗原、自体免疫疾病抗原、同种抗原、异种抗原、令人上瘾的物质或代谢性疾病酶或酶产物。

[0024] 在一些具体实施方案中,纳米载体包含T细胞抗原。在一些具体实施方案中,T细胞抗原位于纳米载体的免疫特征表面上,纳米载体的第二个表面上,包埋于纳米载体内,或其组合。在一些具体实施方案中,T细胞抗原与纳米载体结合。在一些具体实施方案中,T细胞抗原与纳米载体共价结合。在一些具体实施方案中,T细胞抗原与纳米载体非共价结合。在一些具体实施方案中,抗原是退行性疾病抗原、传染病抗原、癌症抗原、特应性疾病抗原、自体免疫疾病抗原、同种抗原、异种抗原、令人上瘾的物质或代谢性疾病酶或酶产物。在一些具体实施方案中,T细胞抗原是“通用”T细胞抗原(即,可以与不相关B细胞抗原使用的T细胞抗原,包括碳水化合物,以刺激T细胞辅助)。在一些具体实施方案中,纳米载体进一步包含靶向部分。再次,在此提及的靶向部分(并且在本发明中将有更详细的描述)是除了存在于免疫特征表面上的多个部分以外并且提供纳米载体靶向APC的靶向部分。

[0025] 在一些具体实施方案中,纳米载体同时包含B细胞抗原和T细胞抗原。在一些具体实施方案中,B细胞抗原和T细胞抗原是不同的抗原。在一些具体实施方案中,B细胞抗原和T细胞抗原是相同的抗原。在一些具体实施方案中,B细胞抗原位于纳米载体的免疫特征表面上,纳米载体的第二个表面上(例如,共价或非共价结合)或同时位于纳米载体的表面上(例如,共价或非共价结合)和包埋于纳米载体内(例如,共价或非共价结合),而T细胞抗原位于纳米载体的免疫特征表面上,纳米载体的第二个表面上(例如,共价或非共价结合),包埋于纳米载体内(例如,共价或非共价结合),或同时位于纳米载体的表面上(例如,共价或非共价结合)和包埋于纳米载体内(例如,共价或非共价结合)。

[0026] 在其中纳米载体同时包含B细胞抗原和T细胞抗原的一些具体实施方案中,纳米载体进一步包含免疫刺激剂。在一些具体实施方案中,免疫刺激剂位于纳米载体的表面上和/或包埋于纳米载体内。在一些具体实施方案中,免疫刺激剂与纳米载体结合。在一些具体实施方案中,免疫刺激剂与纳米载体共价结合。在一些具体实施方案中,免疫刺激剂与纳米载体非共价结合。

[0027] 在其中纳米载体同时包含B细胞抗原和T细胞抗原的一些具体实施方案中,纳米载体进一步包含靶向剂。再次,在此提及的靶向剂(并且在本发明中将有更详细的描述)是除了存在于免疫特征表面上的多个部分以外并且提供纳米载体靶向APC的靶向剂。在一些具体实施方案中,靶向剂位于纳米载体的免疫特征表面上,位于纳米载体的第二个表面上。在一些具体实施方案中,靶向剂与纳米载体结合。在一些具体实施方案中,靶向剂与纳米载体共价结合。在一些具体实施方案中,靶向剂与纳米载体非共价结合。

[0028] 在其中纳米载体同时包含B细胞抗原和T细胞抗原的一些具体实施方案中,纳米载

体进一步包含免疫刺激剂和靶向剂。在一些具体实施方案中,免疫刺激剂位于纳米载体的表面上(例如,共价或非共价结合)和/或包埋于纳米载体内(例如,共价或非共价结合),而靶向剂位于纳米载体的表面上(例如,共价或非共价结合)。

[0029] 在一些具体实施方案中,纳米载体包含免疫刺激剂。在一些具体实施方案中,免疫刺激剂位于纳米载体的表面上。在一些具体实施方案中,免疫刺激剂包埋于纳米载体内。在一些具体实施方案中,免疫刺激剂同时位于纳米载体的表面上和包埋于纳米载体内。在一些具体实施方案中,位于纳米载体表面上的免疫刺激剂不同于包埋于纳米载体内的免疫刺激剂。在一些具体实施方案中,位于纳米载体表面上的与包埋于纳米载体内的免疫刺激剂是相同的。

[0030] 在一些具体实施方案中,纳米载体包含一种以上的免疫刺激剂,在该情况中,免疫刺激剂是不同的。

[0031] 在一些具体实施方案中,纳米载体包含免疫特征表面,免疫刺激剂和抗原。在一些具体实施方案中,抗原是B细胞抗原或T细胞抗原。在一些具体实施方案中,免疫刺激剂是免疫抑制剂(抑制免疫应答)。在一些具体实施方案中,免疫抑制剂是环孢霉素、类固醇、氨甲蝶呤或任何干扰T细胞激活的试剂。在一些具体实施方案中,免疫刺激剂诱导调节性T细胞(例如TGF- β 、雷帕霉素或维甲酸)。在一些具体实施方案中,诱导调节性T细胞的免疫抑制剂或试剂促进对抗原耐受的获得。在一些具体实施方案中,纳米载体进一步包含靶向剂。在一些具体实施方案中,纳米载体可用于抑制患者中的免疫系统和/或促进耐受性。

[0032] 在其中纳米载体包含免疫特征表面和免疫刺激剂的一些具体实施方案中,纳米载体进一步包含B细胞抗原和/或T细胞抗原。在一些具体实施方案中,B细胞抗原是弱免疫原性的抗原。在一些具体实施方案中,B细胞抗原是小分子。在一些具体实施方案中,B细胞抗原是碳水化合物。在一些具体实施方案中,B细胞抗原是令人上瘾的物质。在一些具体实施方案中,B细胞抗原是毒素。在一些具体实施方案中,T细胞抗原是退行性疾病抗原、传染病抗原、癌症抗原、特应性疾病抗原、自体免疫疾病抗原、同种抗原、异种抗原、令人上瘾的物质或代谢性疾病酶或酶产物。在一些具体实施方案中,T细胞抗原是通用T细胞抗原。在一些具体实施方案中,纳米载体进一步包含靶向剂。

[0033] 在一些具体实施方案中,纳米载体可用于在患者中诱导或增强对弱免疫原性的抗原(例如,小分子或碳水化合物)的免疫应答。在一些具体实施方案中,纳米载体可用于在患者中诱导或增强对令人上瘾的物质的免疫应答。在一些具体实施方案中,纳米载体可用于在患者中诱导或增强对毒素的免疫应答。在一些具体实施方案中,纳米载体可用于治疗已经上瘾或易于上瘾的患者。在一些具体实施方案中,纳米载体可用于治疗已经暴露于或即将暴露于毒素的患者。在一些具体实施方案中,纳米载体可用于治疗和/或预防传染病、癌症或自体免疫疾病(包括类风湿性关节炎)。在其它具体实施方案中,纳米载体可用于与移植相关的免疫抑制,以改善移植排斥。

[0034] 在一些具体实施方案中,纳米载体进一步包含靶向部分。在一些具体实施方案中,靶向部分位于纳米载体的免疫特征表面上,或纳米载体的第二个表面上。在一些具体实施方案中,靶向部分与纳米载体结合。在一些具体实施方案中,靶向部分与纳米载体共价结合。在一些具体实施方案中,靶向部分与纳米载体非共价结合。

[0035] 在一些方面中,提供了包含纳米载体的组合物,所述纳米载体包含(a)聚合物与免

疫特征部分(即,免疫特征表面上多个部分中的一个)的偶联物,(b)聚合物与抗原的偶联物,(c)聚合物与免疫刺激剂的偶联物,和/或(d)聚合物与靶向部分的偶联物。在一些具体实施方案中,纳米载体包含聚合物与抗原的偶联物,和聚合物与免疫刺激剂的偶联物。在一些具体实施方案中,纳米载体包含聚合物与抗原的偶联物,和聚合物与靶向部分的偶联物。在一些具体实施方案中,纳米载体包含聚合物与免疫刺激剂的偶联物,和聚合物与靶向部分的偶联物。在一些具体实施方案中,纳米载体包含聚合物与抗原的偶联物、聚合物与免疫刺激剂的偶联物,和聚合物与靶向部分的偶联物。在一些具体实施方案中,偶联物是共价偶联物或非共价偶联物或其任意组合。在一些具体实施方案中,抗原是B细胞抗原。在一些具体实施方案中,纳米载体进一步包含聚合物与T细胞抗原的偶联物。在一些具体实施方案中,这样的偶联物是共价的或非共价的偶联物。在一些具体实施方案中,抗原是T细胞抗原。在一些具体实施方案中,纳米载体进一步包含聚合物与B细胞抗原的偶联物。在一些具体实施方案中,这样的偶联物是共价的或非共价的偶联物。

[0036] 在一些方面中,提供了包含纳米载体的组合物,所述纳米载体包含一个或多个下式X-L1-Y-L2-Z的分子,其中X是生物可降解聚合物,Y是水溶性的、无粘附性聚合物,Z是靶向部分、免疫调节剂、免疫刺激剂或药剂,L1和L2是键或连接分子,其中Y或Z可以不存在,但Y和Z不能同时不存在。在一些具体实施方案中,纳米载体包含抗原、免疫刺激剂或二者。在一些具体实施方案中,药剂是抗原。在一些具体实施方案中,抗原是退行性疾病抗原、传染病抗原、癌症抗原、特应性疾病抗原、自体免疫疾病抗原、同种抗原、异种抗原、令人上瘾的物质或代谢性疾病酶或酶产物。Z可以是本文中所述的任何抗原。在一些具体实施方案中,Z是靶向部分。在一些具体实施方案中,Z是与细胞表面上表达的受体结合的靶向部分。在一些具体实施方案中,Z是与可溶性受体结合的靶向部分。在一些具体实施方案中,可溶性受体是补体蛋白或预先存在的抗体。在一些具体实施方案中,靶向部分是用于将纳米载体输送至抗原呈递细胞、T细胞或B细胞。在一些具体实施方案中,抗原呈递细胞是树突状细胞(DC)、滤泡树突状细胞(FDC)或巨噬细胞。在一些具体实施方案中,巨噬细胞是被膜下窦巨噬细胞(SCS-Mph)。在一些具体实施方案中,Y是PEG或PEO。在一些具体实施方案中,Y是聚烷撑二醇或聚亚烷基氧化物。在一些具体实施方案中,X是PLGA、PLA或PGA。在一些具体实施方案中,Z不存在。

[0037] 本发明的纳米载体包含如下的表面:该表面包含免疫特征表面。在一些方面中,组合物包含纳米载体,所述纳米载体包含一个或多个下式X-L1-Y-L2-I的分子,其中X、L1、Y和L2如之前所述的,并且I是免疫特征部分(即,免疫特征表面上的多个部分中的一个)。如在此所述的,免疫特征表面(通过免疫特征表面上的多个部分)提供了与APC的低亲和性、高亲和力的结合。

[0038] 在一些方面中,提供了包含纳米载体的组合物,所述纳米载体包含免疫特征表面。在一些方面中,提供了包含纳米载体的组合物,所述纳米载体包含免疫刺激剂。在一些具体实施方案中,组合物进一步包含抗原和/或靶向部分。在一些具体实施方案中,抗原、靶向部分和免疫刺激剂中的至少一个与水溶性的、无粘附性聚合物偶联。在一些具体实施方案中,抗原、靶向部分和免疫刺激剂中的至少一个与生物可降解聚合物偶联。在一些具体实施方案中,抗原、靶向部分和免疫刺激剂中的至少一个与生物相容性聚合物偶联。在一些具体实施方案中,生物相容性聚合物为水溶性的、无粘附性聚合物偶联至生物可降解聚合物的偶

联物。在一些具体实施方案中,抗原是B细胞抗原。在一些具体实施方案中,B细胞抗原不是T细胞抗原。在一些具体实施方案中,纳米载体进一步包含T细胞抗原。在一些具体实施方案中,抗原是T细胞抗原。

[0039] 在一些方面中,提供了包含纳米载体的组合物,所述纳米载体包含免疫特征表面、小分子、免疫刺激剂和T细胞抗原。在一些具体实施方案中,小分子位于纳米载体的免疫特征表面上,纳米载体的第二个表面上或同时在纳米载体的表面上和包埋于纳米载体内。在一些具体实施方案中,小分子是令人上瘾的物质。在一些具体实施方案中,小分子是毒素。在一些具体实施方案中,毒素来自于化学武器、生物战的试剂或有害的环境试剂。在一些具体实施方案中,小分子偶联至聚合物。在一些具体实施方案中,聚合物是水溶性的无粘附性聚合物、生物可降解聚合物或生物相容性聚合物。在一些具体实施方案中,聚合物是生物相容性聚合物。在一些具体实施方案中,免疫刺激剂位于纳米载体的表面上,或同时在纳米载体的表面上和包埋于纳米载体内。在一些具体实施方案中,免疫刺激剂偶联至聚合物。在一些具体实施方案中,聚合物是水溶性的无粘附性聚合物、生物可降解聚合物或生物相容性聚合物生物可降解聚合物。在一些具体实施方案中,聚合物是水溶性的无粘附性聚合物或生物可降解聚合物。在一些具体实施方案中,纳米载体进一步包含靶向部分。在一些具体实施方案中,靶向部分偶联至聚合物。在一些具体实施方案中,聚合物是水溶性的无粘附性聚合物、生物可降解聚合物或生物相容性聚合物生物可降解聚合物。在一些具体实施方案中,聚合物是生物相容性聚合物。在一些具体实施方案中,水溶性的无粘附性聚合物是PEG或PEO。在一些具体实施方案中,水溶性的无粘附性聚合物是聚烷撑二醇或聚亚烷基氧化物。在一些具体实施方案中,生物可降解聚合物是PLGA、PLA或PGA。在一些具体实施方案中,生物相容性聚合物是水溶性的无粘附性聚合物与生物可降解聚合物的偶联物。

[0040] 在一些具体实施方案中,提供了包含纳米载体的组合物,所述纳米载体包含免疫特征表面、免疫刺激剂、T细胞抗原和靶向部分。在一些具体实施方案中,免疫特征表面包含多个能够提供与APC表面的低亲和性结合的部分。在一些具体实施方案中,免疫刺激剂是TLR 7/8激动剂。在一些具体实施方案中,免疫刺激剂是R848(也称为瑞喹莫德(Resiquimod))或咪喹莫特。在一些具体实施方案中,免疫特征表面上的多个部分位于纳米载体的表面上,或同时位于纳米载体的表面上和包埋于纳米载体内。在一些具体实施方案中,免疫特征表面上的多个部分偶联至聚合物,优选共价偶联。在一些具体实施方案中,聚合物是水溶性的无粘附性聚合物、生物可降解聚合物或生物相容性聚合物。在一些具体实施方案中,免疫特征表面上的多个部分偶联至生物相容性聚合物。在一些具体实施方案中,免疫刺激剂位于纳米载体的表面上,包埋于纳米载体内,或同时位于纳米载体的表面上和包埋于纳米载体内。在一些具体实施方案中,免疫刺激剂偶联至聚合物。在一些具体实施方案中,聚合物是水溶性的无粘附性聚合物、生物可降解聚合物或生物相容性聚合物生物可降解聚合物。在一些具体实施方案中,免疫刺激剂偶联至生物可降解聚合物。在一些具体实施方案中,靶向部分偶联至聚合物。在一些具体实施方案中,聚合物是水溶性的无粘附性聚合物、生物可降解聚合物或生物相容性聚合物生物可降解聚合物。在一些具体实施方案中,靶向部分偶联至生物相容性聚合物。在一些具体实施方案中,水溶性的无粘附性聚合物是PEG或PEO。在一些具体实施方案中,水溶性的无粘附性聚合物是聚烷撑二醇或聚亚烷基氧化物。在一些具体实施方案中,生物可降解聚合物是PLGA、PLA或PGA。在一些具体实施方案

中,生物相容性聚合物是水溶性的无粘附性聚合物与生物可降解聚合物的偶联物。

[0041] 在一些方面中,提供了包含纳米载体的组合物,所述纳米载体包含弱免疫原性抗原、免疫刺激剂和T细胞抗原。在一些具体实施方案中,弱免疫原性抗原位于纳米载体的表面上,或同时位于纳米载体的表面上和包埋于纳米载体内。在一些具体实施方案中,弱免疫原性抗原是小分子或碳水化合物。在一些具体实施方案中,弱免疫原性抗原是令人上瘾的物质。在一些具体实施方案中,弱免疫原性抗原是毒素。在一些具体实施方案中,弱免疫原性抗原共价偶联至聚合物。在一些具体实施方案中,聚合物是水溶性的无粘附性聚合物、生物可降解聚合物或生物相容性聚合物生物可降解聚合物。在一些具体实施方案中,免疫刺激剂位于纳米载体的表面上,或同时位于纳米载体的表面上和包埋于纳米载体内。在一些具体实施方案中,免疫刺激剂共价偶联至聚合物。在一些具体实施方案中,聚合物是水溶性的无粘附性聚合物、生物可降解聚合物或生物相容性聚合物生物可降解聚合物。在一些具体实施方案中,纳米载体还包含靶向部分。在一些具体实施方案中,靶向部分共价偶联至聚合物。在一些具体实施方案中,聚合物是水溶性的无粘附性聚合物、生物可降解聚合物或生物相容性聚合物生物可降解聚合物。

[0042] 在一些方面中,提供了包含纳米载体的组合物,所述纳米载体靶向特异性细胞、组织或器官并调节免疫应答,所述纳米载体包含在其表面上密度为激活B细胞的B细胞抗原和免疫刺激剂。在一些具体实施方案中,纳米载体进一步包含靶向部分。在一些具体实施方案中,组合物是药物组合物并进一步包含药物学上可接受的载体。在一些具体实施方案中,药物组合物是疫苗组合物。

[0043] 在一些方面中,提供了包含抗原呈递细胞-靶向部分和纳米载体的组合物,如药物组合物。在一些具体实施方案中,抗原呈递细胞-靶向部分和纳米载体是偶联的。在一些具体实施方案中,偶联物是共价偶联物。在一些具体实施方案中,偶联物是非共价偶联物。

[0044] 在一些方面中,提供了包含免疫刺激剂和纳米载体的组合物,如药物组合物。在一些具体实施方案中,免疫刺激剂和纳米载体是偶联的。在一些具体实施方案中,偶联物是共价偶联物。在一些具体实施方案中,偶联物是非共价偶联物。

[0045] 在一些方面中,提供了包含具有式X-L1-Y-L2-Z的分子的组合物,其中X是生物可降解聚合物,Y是水溶性的无粘附性聚合物,Z是靶向部分、免疫刺激剂或药剂,并且L1和L2是键或连接分子,其中Y或者Z可以不存在,但Y和Z不能同时不存在。

[0046] 在一些方面中,提供了包含具有式X-L1-Y-L2-I的分子的组合物,其中I是免疫特征部分,X是生物可降解聚合物,Y是水溶性的无粘附性聚合物,并且L1和L2是键或连接分子,其中Y或I可以不存在,但Y或I不能同时不存在。

[0047] 在一些方面中,提供了包含具有式T-L1-X-L2-Y-L3-Z的分子的组合物,其中T是T细胞抗原,X是生物可降解聚合物,Y是水溶性的无粘附性聚合物,Z是靶向部分、免疫刺激剂或药剂,其中L1、L2和L3是键或连接分子,并且其中T、Y和Z中的任意一个或两个可以不存在,但T、Y和Z不能三者同时不存在。在一些具体实施方案中,药剂是抗原。在一些具体实施方案中,抗原是B细胞抗原或T细胞抗原。

[0048] 在一些方面中,提供了包含具有式T-L1-X-L2-Y-L3-I的分子的组合物,其中I是免疫特征部分,T是T细胞抗原,X是生物可降解聚合物,Y是水溶性的无粘附性聚合物,Z是靶向部分、免疫刺激剂或药剂,其中L1、L2和L3是键或连接分子,并且其中T、Y和Z中的任意一个

或两个可以不存在,但T、Y和Z不能三者同时不存在。在一些具体实施方案中,药剂是抗原。在一些具体实施方案中,抗原是B细胞抗原或T细胞抗原。

[0049] 在一些具体实施方案中,Z是退行性疾病抗原、传染病抗原、癌症抗原、特应性疾病抗原、自体免疫疾病抗原、同种抗原、异种抗原、半抗原、令人上瘾的物质或代谢性疾病酶或酶产物。在一些具体实施方案中,Z是任一种本文中所描述的B细胞抗原。在一些具体实施方案中,Z是任一种本文中所提供的T细胞抗原。

[0050] 在一些具体实施方案中,Z是结合细胞表面上表达的受体的靶向部分。在一些具体实施方案中,Z是结合可溶性受体的靶向部分。在一些具体实施方案中,可溶性受体是补体或预先存在的抗体。在一些具体实施方案中,靶向部分用于靶向抗原呈递细胞、T细胞或B细胞。

[0051] 在一些具体实施方案中,Y是PEG或PEO。在一些具体实施方案中,Y是聚烷撑二醇或聚亚烷基氧化物。

[0052] 在一些具体实施方案中,X是PLGA、PGA或PLA。

[0053] 在一些具体实施方案中,Z不存在。在一些具体实施方案中,Y不存在。

[0054] 在一些方面中,提供了包含免疫刺激剂和聚合物的偶联物的药物组合物。在一些具体实施方案中,偶联物是共价偶联物。在一些具体实施方案中,偶联物是非共价偶联物。在一些具体实施方案中,聚合物是水溶性的无粘附性聚合物、生物可降解聚合物或生物相容性聚合物。在一些具体实施方案中,聚合物是生物相容性聚合物。在一些具体实施方案中,生物相容性聚合物是生物可降解聚合物或水溶性的无粘附性聚合物。在一些具体实施方案中,生物相容性聚合物是水溶性的无粘附性聚合物与生物可降解聚合物的偶联物。在一些具体实施方案中,聚合物是合成的。在一些具体实施方案中,药物组合物包含一个或多个纳米载体,其中偶联物是一个或多个纳米载体的成分。在一些具体实施方案中,组合物进一步包含抗原。在一些具体实施方案中,药物组合物不包含抗原。在一些具体实施方案中,组合物还包含靶向剂。

[0055] 在一些方面中,提供了包含免疫刺激剂和聚合物的偶联物的疫苗组合物。在一些具体实施方案中,偶联物是共价偶联物。在一些具体实施方案中,偶联物是非共价偶联物。在一些具体实施方案中,聚合物是水溶性的无粘附性聚合物、生物可降解聚合物或生物相容性聚合物。在一些具体实施方案中,水溶性的无粘附性聚合物是聚乙二醇。在一些具体实施方案中,聚合物是生物相容性聚合物。在一些具体实施方案中,生物相容性聚合物是生物可降解聚合物或水溶性的无粘附性聚合物。在一些具体实施方案中,生物相容性聚合物是水溶性的无粘附性聚合物与生物可降解聚合物的偶联物。在一些具体实施方案中,聚合物是合成的。在一些具体实施方案中,药物组合物包含一个或多个纳米载体,其中偶联物是一个或多个纳米载体的成分。在一些具体实施方案中,组合物进一步包含抗原。在一些具体实施方案中,药物组合物不包含抗原。在一些具体实施方案中,组合物进一步包含靶向剂。

[0056] 在一些具体实施方案中,B细胞抗原是蛋白或肽。在一些具体实施方案中,B细胞抗原是非蛋白抗原(即,不是蛋白或肽)。在一些具体实施方案中,蛋白或肽来自传染剂。在一些具体实施方案中,传染剂是细菌、真菌、病毒、原生动物或寄生虫。在一些具体实施方案中,病毒是痘病毒、小痘病毒、埃博拉病毒、马尔堡病毒、登革热病毒、流感病毒、副流感病毒、呼吸道合胞病毒、麻疹病毒、人免疫缺陷病毒、人乳头瘤病毒、水痘-带状疱疹病毒、单纯

疱疹病毒、细胞巨化病毒、EB病毒、JC病毒、棒状病毒、轮状病毒、鼻病毒、腺病毒、乳头瘤病毒、细小病毒、小核糖核酸病毒、脊髓灰质炎病毒、引起腮腺炎的病毒、引起狂犬病的病毒、呼吸道肠道病毒、风疹病毒、外衣病毒、粘病毒、逆转录病毒、嗜肝DNA病毒、柯萨奇病毒、马脑脊髓炎病毒、日本脑炎病毒、黄热病毒、裂谷热病毒、甲肝病毒、乙肝病毒、丙肝病毒、丁肝病毒或戊肝病毒。

[0057] 在一些具体实施方案中,B细胞抗原是小分子。在一些具体实施方案中,小分子是被滥用的物质、令人上瘾的物质或毒素。

[0058] 在一些具体实施方案中,B细胞抗原是令人上瘾的物质。在一些具体实施方案中,令人上瘾的物质是麻醉药、迷幻剂、刺激物、咳嗽抑制剂、镇定剂或止痛药。在一些具体实施方案中,B细胞抗原是鸦片或苯化重氮。

[0059] 在一些具体实施方案中,B细胞抗原是毒素。在一些具体实施方案中,毒素来自化学武器。在一些具体实施方案中,来自化学武器的毒素是肉毒杆菌毒素或磷杂环戊二烯。来自化学武器的毒素还包括,但不限于,0-烷基(<C10,包括环烷基)烷基(Me、Et、n-Pr或i-Pr)-膦酰基氟化物(例如,沙林:0-异丙基甲基膦酰基氟化物,梭曼:0-频哪基甲基膦酰基氟化物),0-烷基(<C10,包括环烷基)N,N-二烷基(Me、Et、n-Pr或i-Pr)膦酰胺氟化物(例如,塔崩:0-乙基N,N-二甲基膦酰胺氟化物),0-烷基(H或<C10,包括环烷基)S-2-二烷基(Me、Et、n-Pr或i-Pr)-氨基乙基烷基(Me、Et、n-Pr或i-Pr)硫代磷酸盐及相应的烷基化或质子化盐(例如,VX:0-乙基S-2-二异丙基氨基乙基甲基硫代磷酸盐),硫芥子气:2-氯乙基氯甲基硫醚,芥子气:双(2-氯乙基)硫醚、双(2-氯乙基硫)甲烷,倍半芥子气:1,2-双(2-氯乙基硫)乙烷、1,3-双(2-氯乙基硫)-正丙烷、1,4-双(2-氯乙基硫)-正丁烷、1,5-双(2-氯乙基硫)-正戊烷、双(2-氯乙基硫甲基)乙醚,0-芥子:双(2-氯乙基硫乙基)乙醚,路易斯毒气(Lewisite):路易斯毒气1:2-氯乙烯二氯肿,路易斯毒气2:双(2-氯乙烯)氯肿,路易斯毒气3:三(2-氯乙烯)肿,氮芥:HN1:双(2-氯乙基)乙胺,HN2:双(2-氯乙基)甲胺,HN3:三(2-氯乙基)胺,蛤蚌毒素,蓖麻毒素,阿米吨(Amiton):0,0-二乙基S-(2-(二乙基氨基)乙基)硫代磷酸盐及相应的烷基化或质子化盐,PFIB:1,1,3,3,3-五氟-2-(三氟甲基)-1-丙烯,二苯羟乙酸-3-喹啉环酯(BZ),光气:碳酰氯,氯化氰,氰化氢和三氯硝基甲:三氯硝基甲烷。在一些具体实施方案中,纳米载体中包含的毒素是上述任何一项的完整分子或其一部分。

[0060] 在一些具体实施方案中,B细胞抗原是生物危害性或有害环境试剂。在一些具体实施方案中,有害环境试剂是砷、铅、汞、氯乙烯、多氯联苯、苯、多环芳香烃、镉、苯并(a)芘、苯并(b)荧蒽、氯仿、二氯-二苯基-三氯乙烯(DDT),P,P'-阿罗克洛1254(aroclor 1254),阿罗克洛1260(aroclor 1260)、二苯并(a,h)蒽、三氯乙烯、狄氏剂(dieldrin)、六价铬或p,p'-二氯二苯基二氯乙烯(DDE,P,P')。

[0061] 在一些具体实施方案中,B细胞抗原是碳水化合物。在一些具体实施方案中,碳水化合物来自传染剂。在一些具体实施方案中,传染性试剂是细菌、真菌、病毒、原生动物或寄生虫。在一些具体实施方案中,细菌是假单胞菌属(Pseudomonas)、肺炎球菌属(Pneumococcus)、大肠杆菌(E.coli)、葡萄球菌属(Staphylococcus)、链球菌属(Streptococcus)、密螺旋体(Treponema)、包柔氏螺旋体(Borrelia)、衣原体(Chlamydia)、嗜血杆菌属(Haemophilus)、梭菌属(Clostridium)、沙门氏菌属(Salmonella)、军团杆菌属(Legionella)、弧菌(Vibrio)或肠球菌属(Enterococci)细菌或分支杆菌属

(Mycobacterium)。在一些具体实施方案中,病毒是痘病毒、小痘病毒、埃博拉病毒、马尔堡病毒、登革热病毒、流感病毒、副流感病毒、呼吸道合胞病毒、麻疹病毒、人类免疫缺陷病毒、人类乳头瘤病毒、水痘-带状疱疹病毒、单纯疱疹病毒、细胞巨化病毒、EB病毒、JC病毒、棒状病毒、轮状病毒、鼻病毒、腺病毒、乳头瘤病毒、细小病毒、小核糖核酸病毒、脊髓灰质炎病毒、引起腮腺炎的病毒、引起狂犬病的病毒、呼吸道肠道病毒、风疹病毒、外衣病毒、粘病毒、逆转录病毒、嗜肝DNA病毒、柯萨奇病毒、马脑脊髓炎病毒、日本脑炎病毒、黄热病毒、裂谷热病毒、甲肝病毒、乙肝病毒、丙肝病毒、丁肝病毒或戊肝病毒。

[0062] 在一些具体实施方案中,B细胞抗原是自体抗原。在一些具体实施方案中,自体抗原是蛋白或肽、脂蛋白、脂质、碳水化合物或核酸。在一些具体实施方案中,自体抗原是酶、结构蛋白、分泌的蛋白、细胞表面受体或细胞因子。在一些具体实施方案中,细胞因子是TNF、IL-1或IL-6。在一些具体实施方案中,自体抗原是胆固醇酯转移蛋白(CETP)、与阿尔茨海默氏病相关的A β 蛋白、加工A β 蛋白的病理形式的蛋白水解酶、与动脉粥样硬化相关的LDL或HIV-1的共同受体。在一些具体实施方案中,加工A β 蛋白的病理形式的蛋白水解酶是 β -分泌酶。在一些具体实施方案中,与动脉粥样硬化相关的LDL是氧化的或最小化修饰的。在一些具体实施方案中,HIV-1的共同受体是CCR5。在一些具体实施方案中,自体抗原是自体免疫疾病抗原。

[0063] 在一些具体实施方案中,B细胞抗原是退行性疾病抗原、传染病抗原、癌症抗原、特异性疾病抗原、自体免疫疾病抗原或代谢性疾病酶或其酶产物。

[0064] 在一些具体实施方案中,抗原是癌症抗原。在一些具体实施方案中,癌症抗原是Melan-A/MART-1,二肽酰肽酶IV(DPPIV),腺苷脱氨酶-结合蛋白(ADA β p),亲环蛋白b,结直肠相关抗原(CRC)--C017-1A/GA733,癌胚抗原(CEA)及其免疫原性表位CAP-1和CAP-2,etv6,aml1,前列腺特异性抗原(PSA)及其免疫原性表位PSA-1、PSA-2和PSA-3,前列腺特异性膜抗原(PSMA),T-细胞受体/CD3- ζ 链,肿瘤抗原的MAGE家族(例如,MAGE-A1、MAGE-A2、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-A5、MAGE-A6、MAGE-A7、MAGE-A8、MAGE-A9、MAGE-A10、MAGE-A11、MAGE-A12、MAGE-Xp2(MAGE-B2)、MAGE-Xp3(MAGE-B3)、MAGE-Xp4(MAGE-B4)、MAGE-C1、MAGE-C2、MAGE-C3、MAGE-C4、MAGE-C5),肿瘤抗原的GAGE家族(例如,GAGE-1、GAGE-2、GAGE-3、GAGE-4、GAGE-5、GAGE-6、GAGE-7、GAGE-8、GAGE-9),BAGE,RAGE,LAGE-1,NAG,GnT-V,MUM-1,CDK4,酪氨酸酶,p53,MUC家族,HER2/neu,p21ras,RCAS1, α -胎蛋白,E-钙粘附蛋白, α -钙紧张素, β -钙紧张素和 γ -钙紧张素,p120ctn,gp100^{Pme1117},PRAME,NY-ESO-1,大脑糖原磷酸酶,SSX-1,SSX-2(HOM-MEL-40),SSX-1,SSX-4,SSX-5,SCP-1,CT-7,cdc27,腺瘤样的结肠息肉病蛋白(APC),胞衬蛋白,P1A,连接蛋白37,Ig-独特型,p15,gp75,GM2和GD2神经节苷脂,病毒产品例如人乳头瘤病毒蛋白,肿瘤抗原的Smad家族,1mp-1,EBV编码的核抗原(EBNA)-1,或c-erbB-2。

[0065] 在一些具体实施方案中,传染病抗原是病毒抗原。在一些具体实施方案中,病毒抗原是来自痘病毒、小痘病毒、埃博拉病毒、马尔堡病毒、登革热病毒、流感病毒、副流感病毒、呼吸道合胞病毒、麻疹病毒、人免疫缺陷病毒、人乳头瘤病毒、水痘-带状疱疹病毒、单纯疱疹病毒、细胞巨化病毒、EB病毒、JC病毒、棒状病毒、轮状病毒、鼻病毒、腺病毒、乳头瘤病毒、细小病毒、小核糖核酸病毒、脊髓灰质炎病毒、引起腮腺炎的病毒、引起狂犬病的病毒、呼吸道肠道病毒、风疹病毒、外衣病毒、粘病毒、逆转录病毒、嗜肝DNA病毒、柯萨奇病毒、马脑脊

髓炎病毒、日本脑炎病毒、黄热病毒、裂谷热病毒、甲肝病毒、乙肝病毒、丙肝病毒、丁肝病毒或戊肝病毒的抗原。

[0066] 在一些具体实施方案中,B细胞抗原是弱免疫原性抗原。在一些具体实施方案中,弱免疫原性抗原是非蛋白抗原。在一些具体实施方案中,弱免疫原性抗原是碳水化合物或小分子。在一些具体实施方案中,弱免疫原性抗原是被滥用的物质、令人上瘾的物质或毒素。在一些具体实施方案中,毒素来自化学武器。在一些具体实施方案中,弱免疫原性抗原是有害环境试剂。在一些具体实施方案中,弱免疫原性抗原是自体抗原。

[0067] 通常,T细胞抗原是蛋白或肽。在一些具体实施方案中,T细胞抗原是退行性疾病抗原、传染病抗原、癌症抗原、特应性疾病抗原、自体免疫疾病抗原、同种抗原、异种抗原、接触致敏剂、半抗原或代谢性疾病酶或酶产物。

[0068] 在一些具体实施方案中,T细胞抗原来自传染剂。在一些具体实施方案中,传染剂是细菌、真菌、病毒、原生动物或寄生虫。在一些具体实施方案中,传染病抗原是病毒抗原。在一些具体实施方案中,病毒抗原是来自痘病毒、小痘病毒、埃博拉病毒、马尔堡病毒、登革热病毒、流感病毒、副流感病毒、呼吸道合胞病毒、麻疹病毒、人免疫缺陷病毒、人乳头瘤病毒、水痘-带状疱疹病毒、单纯疱疹病毒、细胞巨化病毒、EB病毒、JC病毒、棒状病毒、轮状病毒、鼻病毒、腺病毒、乳头瘤病毒、细小病毒、小核糖核酸病毒、脊髓灰质炎病毒、引起腮腺炎的病毒、引起狂犬病的病毒、呼吸道肠道病毒、风疹病毒、外衣病毒、粘病毒、逆转录病毒、嗜肝DNA病毒、柯萨奇病毒、马脑脊髓炎病毒、日本脑炎病毒、黄热病毒、裂谷热病毒、甲肝病毒、乙肝病毒、丙肝病毒、丁肝病毒或戊肝病毒的抗原。

[0069] 在一些具体实施方案中,T细胞抗原是通用T细胞抗原。在一些具体实施方案中,通用T细胞抗原是源自破伤风类毒素、EB病毒或流感病毒的一种或多种肽。

[0070] 在一些具体实施方案中,免疫刺激剂是白细胞介素、干扰素、细胞因子等。在一些具体实施方案中,免疫刺激剂是钟样(toll-like)受体(TLR)激动剂、细胞因子受体激动剂、CD40激动剂、Fc受体激动剂、含有CpG的免疫刺激核酸、补体受体激动剂或佐剂。在一些具体实施方案中,TLR激动剂是TLR-1、TLR-2、TLR-3、TLR-4、TLR-5、TLR-6、TLR-7、TLR-8、TLR-9或TLR-10激动剂。在一些具体实施方案中,Fc受体激动剂是Fc- γ 受体激动剂。在一些具体实施方案中,补体受体激动剂与CD21或CD35结合。在一些具体实施方案中,补体受体激动剂诱导纳米载体的内源性补体调理。在一些具体实施方案中,细胞因子受体激动剂是细胞因子。在一些具体实施方案中,细胞因子受体激动剂是小分子、抗体、融合蛋白或适配子。在一些具体实施方案中,免疫刺激剂是佐剂。在一些具体实施方案中,佐剂诱导细胞因子的生物合成。在一些具体实施方案中,佐剂是明矾、MF59、R848、霍乱毒素、鲨烯、磷酸盐佐剂或四氯十氧化物。在一些具体实施方案中,佐剂是单磷酸脂质A (MPL, SmithKline Beecham); 皂角苷,包括QS21 (SmithKline Beecham); 免疫刺激寡核苷酸(例如,Kreig等,Nature 374:546-9, 1995, 首先描述的CpG免疫刺激寡核苷酸); 不完全弗氏佐剂; 完全弗氏佐剂; montanide; 维生素E和各种从生物可降解油(如,鲨烯和/或生育酚、Quil A、Ribi Detox、CRL-1005或L-121)制备的油包水型乳剂。

[0071] 在特定的具体实施方案中,免疫刺激剂可以是天然或合成的钟样受体(TLR)的激动剂。在特定的具体实施方案中,免疫刺激剂可以是钟样受体(TLR)-7的配体,如CpG,其诱导I型干扰素的产生; DC表面分子CD40的激动剂; 促进DC成熟的试剂; TLR-4激动剂; 细胞因

子;从坏死细胞中释放的促炎性刺激剂(例如,尿酸盐晶体);激活的补体级联成分(例如CD21、CD35等);等等。

[0072] 在一些具体实施方案中,靶向部分结合细胞表面上表达的受体。在一些具体实施方案中,靶向部分结合可溶性受体。在一些具体实施方案中,可溶性受体是补体蛋白或预先存在的抗体。在一些具体实施方案中,靶向部分用于将纳米载体传送至抗原呈递细胞、T细胞或B细胞。在一些具体实施方案中,抗原呈递细胞是巨噬细胞。在一些具体实施方案中,巨噬细胞是被膜下窦巨噬细胞。在一些具体实施方案中,抗原呈递细胞是树突状细胞。在一些具体实施方案中,抗原呈递细胞是滤泡树突细胞。

[0073] 在一些具体实施方案中,靶向部分是结合CD11b、CD169、甘露糖受体、DEC-205、CD11c、CD21/CD35、CX3CR1或Fc受体的分子。在一些具体实施方案中,靶向部分是结合CD169、CX3CR1或Fc受体的分子。在一些具体实施方案中,结合CD169的分子是抗-CD169抗体。在一些具体实施方案中,结合CX3CR1的分子是CX3CL1(fractalkine)。在一些具体实施方案中,靶向部分包含免疫球蛋白的Fc部分。在一些具体实施方案中,靶向部分包含IgG的Fc部分。在一些具体实施方案中,免疫球蛋白的Fc部分是人免疫球蛋白的Fc部分。在一些具体实施方案中,IgG的Fc部分是人IgG的Fc部分。在一些具体实施方案中,靶向部分是可溶性受体,CRFc。在一些具体实施方案中,CRFc可用于靶向被膜下窦中的巨噬细胞,但不靶向髓质的巨噬细胞。在一些具体实施方案中,靶向部分是一个或多个胺部分。

[0074] 在一些方面中,本文中提供的组合物是免疫原性的。

[0075] 在一些方面中,提供了一种方法,包括向患者施用有效量的本文中提供的任意组合物以调节免疫应答。在一些具体实施方案中,组合物为有效诱导或增强免疫应答的量。在一些具体实施方案中,组合物为有效抑制免疫应答的量。在一些具体实施方案中,组合物为有效引导或重引导免疫应答的量。在一些具体实施方案中,该方法用于本文中所鉴定症状的预防和/或治疗。

[0076] 在一些具体实施方案中,其中将方法用于诱导或增强免疫应答,患者患有或者易于患上癌症、传染病、非自体免疫代谢性或退行性疾病、特应性疾病或上瘾。在一些具体实施方案中,患者已经暴露于或可能暴露于毒素。在一些具体实施方案中,患者已经暴露于或可能暴露于来自化学武器的毒素。在一些具体实施方案中,患者已经暴露于或可能暴露于来自有害环境物质的毒素。在一些具体实施方案中,纳米载体包含B细胞抗原、免疫刺激剂和T细胞抗原,如通用T细胞抗原。在一些具体实施方案中,纳米载体进一步包含靶向部分。

[0077] 在一些具体实施方案中,其中将方法用于治疗或预防上瘾(或用于治疗暴露于或可能暴露于毒素的患者),纳米载体包含令人上瘾的物质或毒素、佐剂和T细胞。在一些具体实施方案中,该方法在刺激物到达其效应物部位(例如,大脑)之前产生结合并中和刺激物的高效价抗体。在一些具体实施方案中,令人上瘾的物质或毒素以高密度位于纳米载体表面上。

[0078] 在一些具体实施方案中,传染病是慢性病毒感染。在一些具体实施方案中,慢性病毒感染是HIV、HPV、HBV或HCV感染。在一些具体实施方案中,传染病是细菌感染或由细菌感染引起。在一些具体实施方案中,患者患有或易于患上假单胞菌感染、肺炎球菌感染、肺结核、疟疾、利什曼病、幽门螺旋杆菌(*H. pylori*)感染、葡萄球菌感染或沙门氏菌感染。在一些具体实施方案中,传染病是真菌感染或由真菌感染引起。在一些具体实施方案中,传染病是

寄生虫感染或由寄生虫感染引起。在一些具体实施方案中,传染病是原生动物感染或由原生动物感染引起。在一些具体实施方案中,患者患有或易于患上流感。

[0079] 在一些具体实施方案中,自体免疫疾病是狼疮、多发性硬化、类风湿性关节炎、I型糖尿病、炎症性肠病、甲状腺炎或乳糜泻。在一些具体实施方案中,患者已经接受或即将接受移植,并且该方法可用于防止或改善移植排斥。在一些具体实施方案中,纳米载体包含抗原和免疫抑制剂或诱导调节性T细胞的试剂。在一些具体实施方案中,纳米载体还包含靶向部分。通常,其中方法是用于抑制免疫应答的方法,在佐剂不存在的情况下提供抗原。

[0080] 在一些方面中,提供了用于将免疫调节剂传送至免疫系统细胞的疫苗纳米载体。在一些具体实施方案中,疫苗纳米载体包含至少一种能够诱导B细胞和/或T细胞中的免疫应答的免疫调节剂。在特定的具体实施方案中,存在于纳米载体表面上的免疫调节剂刺激B细胞,而包埋于纳米载体内的免疫调节剂得到加工并递呈至T细胞。在一些具体实施方案中,疫苗纳米载体包含至少一个用于将疫苗纳米载体选择性地传送至特异性抗原呈递细胞(APC)的靶向部分。

[0081] 在一些具体实施方案中,免疫调节剂可以包含分离的和/或重组的蛋白或肽、碳水化合物、糖蛋白、糖肽、蛋白聚糖、灭活的生物体和病毒、死的生物体和病毒、遗传改变的生物体或病毒,和细胞提取物。在一些具体实施方案中,免疫调节剂可以包含核酸、碳水化合物、脂质和/或小分子。在一些具体实施方案中,免疫调节剂是引发免疫应答的试剂。在一些具体实施方案中,免疫调节剂是抗原。在一些具体实施方案中,免疫调节剂用于疫苗。

[0082] 在一些具体实施方案中,免疫调节剂是源自病原体的任何蛋白和/或其它抗原。病原体可以是病毒、细菌、真菌、原生动物、寄生虫等。在一些具体实施方案中,免疫调节剂可以为完整的杀灭生物体、肽、蛋白、糖蛋白、糖肽、蛋白聚糖、碳水化合物或其组合的形式。

[0083] 在一些具体实施方案中,疫苗纳米载体的所有免疫调节剂彼此相同。在一些具体实施方案中,疫苗纳米载体的所有免疫调节剂是不同的。在一些具体实施方案中,疫苗纳米载体精确地包含一种截然不同类型(即,物种)的免疫调节剂。例如,免疫调节剂是抗原时,疫苗纳米载体中的所有抗原都相同。在一些具体实施方案中,疫苗纳米载体精确地包含两种截然不同类型的免疫调节剂。在一些具体实施方案中,疫苗纳米载体包含两种以上的截然不同类型的免疫调节剂。

[0084] 在一些具体实施方案中,疫苗纳米载体包含单一类型的刺激B细胞中的免疫应答的免疫调节剂。在一些具体实施方案中,疫苗纳米载体包含单一类型的刺激T细胞中的免疫应答的免疫调节试剂。在一些具体实施方案中,疫苗纳米载体包含两种类型免疫调节剂,其中第一种免疫调节剂刺激B细胞,和第二种免疫调节剂刺激T细胞。在一些具体实施方案中,上述任一种试剂可以同时刺激B细胞和T细胞,但不必需是这样。在特定的具体实施方案中,上述免疫调节剂分别只刺激B细胞或T细胞。在一些具体实施方案中,疫苗纳米载体包含两种以上类型的免疫调节剂,其中一种或多种类型的免疫调节剂刺激B细胞,和一种或多种类型的免疫调节剂刺激T细胞。

[0085] 在一些具体实施方案中,疫苗纳米载体包括脂膜(例如,脂双层、脂单层等)。至少一种免疫调节剂可以与脂膜结合。在一些具体实施方案中,至少一种免疫调节剂嵌入疫苗纳米载体的脂膜内,嵌入脂双层的腔内,与脂膜的内表面结合,和/或包埋于脂膜内。

[0086] 在一些具体实施方案中,疫苗纳米载体包括聚合物(例如,聚合核心)。免疫调节剂

可以与聚合物结合,和在一些具体实施方案中,至少一种类型的免疫调节剂与聚合物结合。在一些具体实施方案中,免疫调节剂嵌入疫苗纳米载体的聚合物内,与聚合物的内表面结合,和/或包埋于聚合物内,和,在一些具体实施方案中,至少一种类型的免疫调节剂嵌入疫苗纳米载体的聚合物内,与聚合物的内表面结合,和/或包埋于聚合物内。

[0087] 在一些具体实施方案中,本发明的疫苗纳米载体包含低于90重量%、低于75重量%、低于50重量%、低于40重量%、低于30重量%、低于20重量%、低于15重量%、低于10重量%、低于5重量%、低于1重量%、或者低于0.5重量%的免疫调节剂。

[0088] 在一些具体实施方案中,除了与免疫特征表面结合的多个部分(即,提供纳米载体靶向APC的部分)以外,疫苗纳米载体与至少一个靶向部分结合。附加的靶向部分不同于存在于免疫特征表面上的多个部分,因为附加靶向部分通常提供与受体的高亲和性结合(并且,因此,在本文中可替换地称为“高亲和性靶向部分”)。在一些具体实施方案中,靶向部分可以是核酸、多肽、肽、糖蛋白、糖肽、蛋白聚糖、碳水化合物、脂质、小分子等。例如,靶向部分可以是结合细胞型特异性标记物的核酸靶向部分(例如,适配子,Spiegelmer®等)。在一些具体实施方案中,靶向部分可以是针对细胞表面蛋白的天然产生的或合成的配体,例如,DEC-205、CD169、CD11b等。靶向部分的实例还包括本文中其它地方提供的那些,例如上文描述的那些。

[0089] 根据本发明,靶向部分识别一个或多个与特定的器官、组织、细胞和/或亚细胞位点相关的“受体”、“目标”或“标记物”。在一些具体实施方案中,目标可以是与一种或一些细胞类型、与一种或一些疾病,和/或与一个或一些发育阶段唯一相关或主要相关的标记物。所靶向的细胞的实例包括抗原呈递细胞(APC),如树突细胞、滤泡树突细胞和巨噬细胞。巨噬细胞的一个实例是被膜下窦巨噬细胞。所靶向的其它的细胞包括T细胞和B细胞。在一些具体实施方案中,目标可以包含蛋白、碳水化合物、脂质和/或核酸。在一些具体实施方案中,目标是肿瘤标记物。在一些具体实施方案中,目标是APC标记物。在一些具体实施方案中,目标是T细胞标记物。在一些具体实施方案中,靶向部分靶向次级淋巴组织或器官。次级淋巴组织或器官包括淋巴结、脾、派亚氏淋巴丛、阑尾或扁桃体。

[0090] 在一些具体实施方案中,目标是树突细胞标记物。在一些具体实施方案中,DC标记物包括DC-205、CD11c、II类MHC、CD80、CD86、DC-SIGN、CD11b、BDCA-1、BDCA-2、BDCA-4、Siglec-H、CX3CR1和/或Langerin。本发明中其他地方提供了这样的标记物的实例。

[0091] 在一些具体实施方案中,目标是被膜下窦巨噬细胞标记物。在一些具体实施方案中,SCS-Mph标记物包括CD169(即,唾液酸粘附素)、CD11b(即,CD11b/CD18、Mac-1、CR3或 $\alpha\beta$ 2整合素)、Fc受体和/或甘露糖受体(即,多价血凝素),这些皆为主要在SCS-Mph上表达的蛋白。本发明中其他地方提供了这样的标记物的实例。

[0092] 在特定的具体实施方案中,目标是B细胞标记物。在一些具体实施方案中,B细胞标记物可以包括补体受体、CR1(即,CD35)或CR2(即,CD21),这些是在B细胞上表达的蛋白。在一些具体实施方案中,可以通过B细胞标记物(如CD19、CD20和/或CD22)实现B细胞靶向。在一些具体实施方案中,可以通过B细胞标记物(如CD40、CD52、CD80、CXCR5、VLA-4、II类MHC、表面IgM或IgD、APRL和/或BAFF-R)实现B细胞靶向。本发明中其他地方提供了这样的标记物的实例。

[0093] 在一些具体实施方案中,目标是FDC标记物。在一些具体实施方案中,FDC标记物包

括补体受体、CR1 (即, CD35) 或CR2 (即, CD21), 这些是在FDC上表达的蛋白。本发明中其他地方提供了这样的标记物的实例。

[0094] 在一些具体实施方案中, 疫苗纳米载体包含单一类型的靶向部分, 其引导疫苗纳米载体传送至单一的细胞类型 (例如, 仅传送至SCS-Mph)。在一些具体实施方案中, 疫苗纳米载体包含单一类型的靶向部分, 其引导疫苗纳米载体传送至多种细胞类型 (例如, 既输送至SCS-Mph又输送至FDC, 或既输送至SCS-Mph又输送至DC)。在一些具体实施方案中, 疫苗纳米载体包含两种类型的靶向部分, 其中第一种类型的靶向部分引导疫苗纳米载体传送至一种细胞类型, 和第二种类型靶向部分引导疫苗纳米载体传送至第二种细胞类型。例如, 在一些具体实施方案中, 第一种类型靶向部分引导传送至SCS-Mph, 和第二种类型靶向部分引导传送至DC。作为另一个实例, 第一种类型靶向部分引导传送至SCS-Mph, 和第二种类型的靶向部分引导传送至FDC。

[0095] 在一些具体实施方案中, 本发明的疫苗纳米载体包含低于50重量%、低于40重量%、低于30重量%、低于20重量%、低于15重量%、低于10重量%、低于5重量%、低于1重量%或低于0.5重量%的靶向部分。

[0096] 在一些具体实施方案中, 疫苗纳米载体可以转运一种或多种类型的能够帮助刺激免疫应答的免疫刺激剂。在一些具体实施方案中, 免疫刺激剂通过激活APC以增强其免疫刺激能力而增强免疫应答。在一些具体实施方案中, 免疫刺激剂通过扩大针对特异性抗原的淋巴细胞应答而增强免疫应答。在一些具体实施方案中, 免疫刺激剂通过诱导介质的局部释放 (例如, 从多种细胞类型中释放的细胞因子) 而增强免疫应答。

[0097] 在一些具体实施方案中, 疫苗纳米载体包含同时刺激B细胞和T细胞的单一类型的免疫刺激剂。在一些具体实施方案中, 疫苗纳米载体包含两种类型的免疫刺激剂, 其中第一种类型的免疫刺激剂刺激B细胞, 和第二种类型的免疫刺激剂刺激T细胞。在一些具体实施方案中, 疫苗纳米载体包含两种以上类型的免疫刺激剂, 其中一种或多种类型的免疫刺激剂刺激B细胞, 和一种或多种类型免疫刺激剂刺激T细胞。

[0098] 在一些具体实施方案中, 可以使用各种试验来确定在B细胞或B细胞组, 或T细胞或T细胞组中的免疫应答是否被调节。在一些具体实施方案中, 该试验确定了细胞或细胞组是否变成“激活”的。

[0099] 在一些具体实施方案中, 可以使用各种试验来确定在T细胞或T细胞组中的免疫应答是否得到刺激。在一些具体实施方案中, 可以通过测定抗原诱导的T细胞产生的细胞因子情况来确定T细胞中的免疫应答的刺激。在一些具体实施方案中, 可以通过测定抗原诱导的T细胞的增殖情况来确定T细胞中的免疫应答的刺激。在一些具体实施方案中, 如果T细胞激活的细胞标记物相对于未刺激的细胞在不同水平 (例如, 更高或更低的水平) 表达, 则确定T细胞中有免疫应答待刺激。

[0100] 在一些具体实施方案中, 可以使用各种试验来确定在B细胞或B细胞组中的免疫应答是否得到刺激。在一些具体实施方案中, 可以通过测量抗体效价、抗体亲和性、中和试验中的抗体表现、类别转换重组、抗原特异性抗体的亲和成熟、记忆B细胞的发育、长生浆细胞 (其能够长时间地产生大量的高亲和性抗体) 的发育、生发中心的反应和/或中和试验中的抗体表现来确定B细胞中的免疫应答的刺激。

[0101] 疫苗纳米载体是包含免疫特征表面的实体。疫苗纳米载体还可以包含至少一种能

够刺激B细胞和/或T细胞中的免疫应答的免疫调节剂。可以根据本发明使用任何疫苗纳米载体。

[0102] 在一些具体实施方案中,纳米载体具有100微米(μm)以下的最大尺寸(例如,直径)。在一些具体实施方案中,本发明的纳米载体具有300纳米或以下的最大尺寸(例如,直径)。在一些具体实施方案中,本发明的纳米载体具有250纳米或以下的最大尺寸(例如,直径)。在一些具体实施方案中,本发明的纳米载体具有200纳米或以下的最大尺寸(例如,直径)。在一些具体实施方案中,本发明的纳米载体具有150纳米或以下的最大尺寸(例如,直径)。在一些具体实施方案中,本发明的纳米载体具有100纳米或以下最大尺寸(例如,直径)。在一些具体实施方案中,本发明的纳米载体具有25纳米至200纳米的最大尺寸。在一些具体实施方案中,本发明的纳米载体具有20纳米至100纳米的最大尺寸。

[0103] 根据本发明可以使用多种不同的纳米载体。在一些具体实施方案中,纳米载体为球体或椭圆柱体。在一些具体实施方案中,纳米载体为平的或板状的。在一些具体实施方案中,纳米载体为立方体或长方体。在一些具体实施方案中,纳米载体为椭圆或椭圆形。在一些具体实施方案中,纳米载体为圆柱体、圆锥体或棱锥。纳米载体包含一个或多个表面,所述一个或多个表面的至少一个包含免疫特征表面。纳米载体可以是实心的或空心的,且可以包含一层或多层。在一些具体实施方案中,每层相对于其它层具有独特的组成和独特的性质。仅举一例,纳米载体可以具有核心/壳结构,其中核心是一层(例如,聚合核心),而壳是第二层(例如,脂双层或单层)。纳米载体可以包含多个不同的层。在一些具体实施方案中,一层可以是实质上交联的,第二层不是实质上交联的,等等。在一些具体实施方案中,一层、一些层或所有不同的层可以包含一种或多种免疫调节剂、靶向部分、免疫刺激剂和/或其组合。在一些具体实施方案中,一层包含免疫调节剂、靶向部分和/或免疫刺激剂,第二层不包含免疫调节剂、靶向部分和/或免疫刺激剂,等等。在一些具体实施方案中,每个单层包含不同的免疫调节剂、靶向部分、免疫刺激剂和/或其组合。

[0104] 在一些具体实施方案中,纳米载体可以任选包含一种或多种脂质。在一些具体实施方案中,纳米载体是脂质体。在一些具体实施方案中,纳米载体包含脂双层,和/或多个脂双层。例如,脂双层可以形成纳米载体的外表面,在这种情况下,将包含脂双层壳的纳米载体称为脂质体。脂质体纳米载体通常具有相对可塑的表面,并且纳米载体可以采用各种形状(例如,球形、椭圆形、圆柱形等),这将取决于环境因素。因此,将认识到,这些纳米载体的最大直径在不同的环境中将有所改变。通常,脂质体纳米载体包含磷脂。在一些具体实施方案中,纳米载体包含脂单层。在一些具体实施方案中,纳米载体是胶束。在一些具体实施方案中,纳米载体包含由脂质层(例如,脂双层、脂单层等)环绕的聚合基质核心。在一些具体实施方案中,纳米载体包含由脂质层(例如,脂双层、脂单层等)环绕的非聚合物核心(例如,金属颗粒、量子点、陶瓷颗粒、骨颗粒、病毒颗粒等)。

[0105] 在一些具体实施方案中,纳米载体包含一个或多个聚合物。在一些具体实施方案中,聚合基质可由包被层(例如,脂质体、脂单层、胶束等)环绕。在一些具体实施方案中,免疫调节剂、靶向部分和/或免疫刺激剂可以与聚合基质结合。在这样的具体实施方案中,免疫调节剂、靶向部分和/或免疫刺激剂有效包埋于纳米载体内。然而,将认识到,免疫特征表面上的多个部分(即,提供靶向APC)是位于纳米载体的表面上,该表面是外表面,并且暴露于纳米载体周围的环境中。

[0106] 在一些具体实施方案中,免疫调节剂、靶向部分和/或免疫刺激剂可以与纳米载体共价结合。在此提及的靶向部分(并且在本文中更详细地描述)是,例如,B细胞靶向部分或T-细胞靶向部分。将认识到这些部分是除了免疫特征表面上存在的多个部分以外的并且提供纳米载体靶向APC的部分。在一些具体实施方案中,共价结合由连接物介导。在一些具体实施方案中,免疫调节剂、靶向部分和/或免疫刺激剂与纳米载体非共价结合。例如,在一些具体实施方案中,免疫调节剂、靶向部分和/或免疫刺激剂包埋于聚合基质、脂膜等内,或由聚合基质、脂膜等环绕,和/或分散在整个聚合基质、脂膜等中。可替换地或另外地,免疫调节剂、靶向部分和/或免疫刺激剂可以通过疏水性相互作用、电荷相互作用、范德华力等与聚合基质、脂膜等结合。

[0107] 各种聚合物以及从其形成聚合基质的方法在药物传送领域中是已知的。通常,聚合基质包含一个或多个聚合物。根据本发明可以使用任何聚合物。聚合物可以是天然的或非天然的(合成的)聚合物。聚合物可以是包含两个或更多个单体的均聚物或共聚物。就序列而言,共聚物可以是无规,嵌段或包含无规和嵌段序列的组合。根据本发明的聚合物可以是有机聚合物。在一些具体实施方案中,聚合物是树状聚合物或聚合物的共混物。

[0108] 聚合物的实例包括聚乙烯,聚碳酸酯(例如,聚(1,3-二噁烷-2酮)),聚酐(例如,聚(癸二酸酐)),聚羧基酸(例如,聚(β -羟基烷酸酯)),聚丙烯基延胡索酸酯(polypropylfumerate),聚己内酯,聚酰胺(例如,聚己内酰胺),聚缩醛,聚醚,聚酯(例如,聚交酯,聚乙交酯),聚(原酸酯),聚氰基丙烯酸酯,聚乙烯醇,聚氨酯,聚磷腈,聚丙烯酸酯,聚甲基丙烯酸酯,聚脲,聚苯乙烯和聚胺。

[0109] 在一些具体实施方案中,纳米载体包含包埋于反胶束内的免疫调节剂。仅举一例,脂质体纳米载体可以包含包埋于脂质体膜内的疏水性免疫调节剂,和在脂质体纳米载体内部发现的与反胶束包埋的亲水性免疫调节剂。

[0110] 在一些具体实施方案中,纳米载体不包括聚合成分。在一些具体实施方案中,纳米载体包含金属颗粒、量子点、陶瓷颗粒、骨颗粒、病毒颗粒等。在一些具体实施方案中,免疫调节剂、靶向部分和/或免疫刺激剂与这样的非聚合纳米载体的表面结合。在一些具体实施方案中,非聚合纳米载体是非聚合成分的聚集体,如金属原子(例如,金原子)的聚集体。在一些具体实施方案中,免疫调节剂、靶向部分和/或免疫刺激剂与非聚合成分的聚集体的表面结合,包埋于非聚合成分的聚集体内,由非聚合成分的聚集体环绕,和/或分散在整个非聚合成分的聚集体中。

[0111] 在一些具体实施方案中,纳米载体可以任选包含一个或多个两性实体(即,同时具有亲水性和疏水性的实体)。在一些具体实施方案中,两性实体可以促进具有增加的稳定性、改善的一致性或提高的粘性的纳米载体的产生。

[0112] 在一些具体实施方案中,纳米载体包含一个或多个与纳米载体的外表面结合和/或包埋于纳米载体内的纳米颗粒。

[0113] 可以使用本领域已知的任何方法制备纳米载体。例如,颗粒纳米载体制剂可以通过以下方法制成:如,纳米沉淀,使用流体通道的流动聚焦,喷雾干燥,单一和双乳剂溶剂挥发,溶剂提取,相分离,碾磨,微乳化程序,纳米印迹法,微制造,纳米制造,牺牲层,单凝聚和复凝聚,以及本领域普通技术人员公知的其他方法。可替换地或另外地,可以使用用于单分散半导体、导电性的、磁性的、有机的和其它纳米颗粒的水性和有机溶剂综合体。

[0114] 在一些具体实施方案中,免疫调节剂、靶向部分和/或免疫刺激剂不与纳米载体共价结合。例如,纳米载体可以包含聚合基质,和免疫调节剂、靶向部分和/或免疫刺激剂等与本发明的纳米载体的聚合基质的表面结合,包埋于本发明的纳米载体的聚合基质内,和/或分散在整个本发明的纳米载体的聚合基质中。免疫调节剂可以通过纳米载体的扩散、降解和/或其组合而被释放。在一些具体实施方案中,纳米载体的聚合物通过骨架侵蚀而降解。在一些具体实施方案中,纳米载体的聚合物通过表面侵蚀而降解。

[0115] 在一些具体实施方案中,免疫特征部分、免疫调节剂、靶向部分和/或免疫刺激剂与颗粒共价结合。在一些具体实施方案中,共价结合通过一个或多个连接物介导。根据本发明可以使用任何合适的连接物。在一些具体实施方案中,连接物是可分裂的连接物(例如,酯键、酰胺键、二硫键等)。

[0116] 在一些具体实施方案中,纳米载体通过自体装配来制备。举例来说,将脂质与亲脂性免疫调节剂混合,然后在固体表面上制成薄膜。将亲水性免疫调节剂溶于水性溶液中,然后将其加入脂膜中,以在振荡下将脂质水解。将具有亲脂性免疫调节剂的脂质体整合入双层壁中,并且脂质体腔内的亲水性免疫调节剂自发组装。在一些具体实施方案中,将预制的聚合纳米颗粒在轻微振荡下与小脂质体混合以诱导脂质体融合至聚合纳米颗粒表面上。

[0117] 作为另一个实例,首先将待包埋的亲水性免疫调节剂通过在挥发性的水混溶性有机溶剂中与天然来源的且无毒的两性实体混合而整合至反胶束中。在一些具体实施方案中,在形成反胶束完成后,加入生物可降解聚合物。将所得到的生物可降解聚合物-反胶束混合物与不可溶于聚合物的亲水性非溶剂结合,通过溶剂快速扩散至非溶剂中以及有机溶剂的挥发而形成纳米颗粒。

[0118] 在一些具体实施方案中,脂单层稳定的聚合纳米载体用于传送一种或多种免疫调节剂。在一些具体实施方案中,首先将亲水性免疫调节分子与脂质的极性端基团进行化学偶联。在含有一种或多种水混溶性溶剂的水性溶液中将偶联物与一定比例的未偶联脂质分子混合。在水混溶性或部分水混溶性的有机溶剂中将生物可降解聚合材料与待包埋的疏水性免疫调节剂混合。将所得到的聚合物溶液加入偶联和未偶联脂质的水性溶液中,通过有机溶剂快速扩散至水中以及有机溶剂的挥发而产生纳米颗粒。

[0119] 本文中所述的组合物和方法可用于预防和/或治疗多种传染病、失调和/或病症。本文中的其他地方提供了其它疾病、失调和/或病症的实例。在一些具体实施方案中,根据本发明的疫苗纳米载体可用于疾病、失调和/或病症的一个或多个症状或特征的治疗、减轻、改善、缓解、延迟其发作、抑制其进展,减轻其严重程度和/或降低其发生率。在一些具体实施方案中,本发明的疫苗纳米载体可用于微生物感染(例如,细菌感染、真菌感染、病毒感染、寄生虫感染等)的一个或多个症状或特征的治疗、减轻、改善、缓解、延迟其发作、抑制其进展,减轻其严重程度和/或降低其发生率。在一些具体实施方案中,微生物感染的预防和/或治疗包括向有需要的患者施用治疗有效量的本发明的疫苗纳米载体,以达到所需要效果所必需的量和时间来施用。在本发明的特定具体实施方案中,本发明疫苗纳米载体的“治疗有效量”是指对本文中提供的疾病、失调和/或病症的一个或多个症状或特征能有效地治疗、减轻、改善、缓解、延迟其发作、抑制其进展,减轻其严重程度和/或降低其发生率的量。

[0120] 在一些具体实施方案中,本发明的预防和/或治疗实验方案包括向患者施用治疗有效量的一种或多种本发明的疫苗纳米载体,从而调节免疫应答(例如,同时刺激T细胞和/

或B细胞)。

[0121] 本发明提供了新型的组合物,其包含治疗有效量的一种或多种疫苗纳米载体和一种或多种药物学上可接受的赋形剂。在一些具体实施方案中,本发明提供了包含本文中所述的本发明疫苗纳米载体的药物组合物。组合物可以包括一种以上类型的纳米载体,每种类型具有不同的成分(例如,免疫调节剂、靶向剂、免疫刺激剂、赋形剂等)。根据一些具体实施方案,提供了向有需要的患者(例如,人)施用包含本发明组合物的药物组合物的方法。

[0122] 在一些具体实施方案中,在诊断疾病、失调和/或病症之前、同时和/或之后将治疗有效量的本发明疫苗纳米载体组合物传送至病人和/或动物。在一些具体实施方案中,在疾病、失调和/或病症的症状发作之前、同时和/或之后将治疗量的本发明疫苗纳米载体组合物传送至病人和/或动物。在特定的具体实施方案中,在暴露于传染剂之前将治疗量的本发明疫苗纳米载体组合物传送至病人和/或动物。在特定的具体实施方案中,在暴露于传染剂之后将治疗量的本发明疫苗纳米载体组合物传送至病人和/或动物。在特定的具体实施方案中,在暴露于令人上瘾的物质或毒素之前将治疗量的本发明疫苗纳米载体组合物传送至病人和/或动物。在特定的具体实施方案中,在暴露于令人上瘾的物质或毒素之后将治疗量的本发明疫苗纳米载体组合物传送至病人和/或动物。

[0123] 在一些具体实施方案中,本发明的药物组合物通过多种途径施用,包括口服、静脉内、肌内、动脉内、髓内、鞘内、皮下、心室内、经皮、真皮内、直肠、阴道内、腹膜内、局部(通过粉末、膏剂、霜剂和/或滴液)、经皮、粘膜、鼻、口腔、肠、舌下;通过气管内灌注、支气管灌注和/或吸入;和/或作为口喷雾剂、鼻喷雾剂和/或气溶胶。在特定的具体实施方案中,组合物经口服施用。在特定的具体实施方案中,组合物通过非肠道施用。在特定的具体实施方案中,组合物通过肌内注射施用。

[0124] 在特定的具体实施方案中,延缓疾病、失调和/或病症(例如,特定的微生物感染)发作和/或进展的疫苗纳米载体可以通过与一种或多种治疗疾病、失调和/或病症的症状的另外的治疗剂联合施用。例如,疫苗纳米载体可以与抗癌剂、抗炎剂、抗生素或抗病毒剂联合使用。

[0125] 本发明提供了多种包含一种或多种本发明的纳米载体的药盒。例如,本发明提供了包含本发明的纳米载体和使用说明书的药盒。药盒可以包含多种不同的纳米载体。药盒可以包含以任何组合的各种附加成分或反应剂中的任何一种。根据本发明的特定具体实施方案,药盒可以包括,例如(i)包含至少一种免疫调节剂(其中至少一种免疫调节剂能够同时刺激T细胞和/或B细胞应答),至少一种靶向部分,和/或至少一种免疫刺激剂的纳米载体;(ii)向有需要的患者施用纳米载体的说明书。在特定的具体实施方案中,药盒可以包括,例如,(i)至少一种免疫调节剂,其中至少一种免疫调节剂能够同时刺激T细胞和B细胞应答;(ii)至少一种靶向部分;(iii)至少一种免疫刺激剂;(iv)聚合基质前体;(v)脂质和两性实体;(vi)从单独成份(i)-(v)制备本发明的疫苗纳米载体的说明书。

[0126] 在一些具体实施方案中,药盒包含本发明的纳米载体和进行混合的说明书。在一些具体实施方案中,这样的药盒还包含免疫刺激剂和/或抗原。这样的药盒的纳米载体可以包含免疫调节剂(例如,T细胞抗原,如通用T细胞抗原)和/或靶向部分。T细胞抗原和/或靶向部分可以在纳米载体的表面上。在一些具体实施方案中,免疫调节剂和抗原是相同的。在一些具体实施方案中,它们是不同的。

[0127] 在一些具体实施方案中,本发明提供了一种组合物,其包含以下成分:(1)具有至少一个表面的合成纳米载体,其中合成纳米载体的第一个表面包含免疫特征表面;和(2)药物学上可接受的赋形剂。

[0128] 在一些具体实施方案中,本发明提供了一种方法,包括将至少一个剂量的组合物施用于患者,该组合物包含:(1)具有至少一个表面的合成纳米载体,其中合成纳米载体的第一表面包含免疫特征表面;和(2)药物学上可接受的赋形剂。

[0129] 在一些具体实施方案中,本发明提供了一种组合物,其包含:(1)合成纳米载体,其包含:(a)至少一个表面,其中合成纳米载体的第一个表面包含免疫特征表面;和(b)抗原,其中该抗原:(i)位于免疫特征表面上;(ii)位于纳米载体的第二个表面上;或(iii)包埋在纳米载体核心区域内;和(2)药物学上可接受的赋形剂。

[0130] 在一些具体实施方案中,本发明提供了增加被膜下淋巴窦巨噬细胞的抗原摄入的方法。该方法包括按其需要对患者施用组合物,该组合物包含:(1)合成纳米载体,其包含:(a)至少一个表面,其中合成纳米载体的第一个表面包含免疫特征表面;和(b)抗原,其中该抗原:(i)位于免疫特征表面上;(ii)位于纳米载体的第二个表面上;或(iii)包埋在纳米载体核心区域内;和(2)药物学上可接受的赋形剂。

[0131] 在之前的一些具体实施方案中,免疫特征表面包含多个含量能有效提供免疫特征表面与抗原呈递细胞的低亲和性和高亲合力结合的部分。

[0132] 如以下将进一步详细讨论的,本发明中所呈现的数据提供了证据:可以产生结合了本发明中别处所定义的免疫特征表面的合成纳米载体。通过将荧光合成纳米载体注入小鼠的脚垫中,接着随后分析合成纳米载体分布以及与引流淋巴结中的专职抗原呈递细胞(APC)的结合,证明了免疫特征表面诱导的合成纳米载体靶向被膜下淋巴窦巨噬细胞(SCS-Mph)和树突细胞(DC)的证据。例如,如以下更详细描述,图27证明了与羧基修饰的合成纳米载体相比,胺修饰的合成纳米载体更有效地靶向SCS-Mph。因此,胺修饰形成免疫特征表面的一个具体实施方案。图38和40证明了包含尼古丁的免疫特征表面赋予同时靶向SCS-Mph和DC。图41中提供了介导增强的合成纳米载体在SCS-Mph上聚集的免疫特征表面的进一步的例子。

[0133] 如下所述,图39证明了尼古丁免疫特征表面通过低亲和性/高亲合力相互作用与APC相互作用。微量滴定平板表面覆盖宽范围浓度的尼古丁(使用尼古丁-PEG-PLA)或CD11c的高亲和性MAb,这是在DC上特异性表达的糖蛋白。图A显示了高亲和性MAb有效地结合并固定了已经加入微量滴定平板中的悬浮DC。相反,即使在最高的可用尼古丁密度(10^{15} 分子/平方厘米)下,该密度高于相同试验条件下介导有效DC结合的MAb密度至少3个数量级,与未覆盖的对照表面相比时,尼古丁免疫特征表面覆盖的平板没有有效地捕获DC。这证明了在所用的试验条件下,尼古丁免疫特征表面对小鼠DC的亲和性太低,以致在温和地清洗平板时不能产生足够机械强度的DC结合来抵抗DC分离。无论如何,基于本发明中所呈现的体内靶向结果,有理由得出结论,尼古丁免疫特征表面可以以足够高的亲合力结合APC,以抵抗具有尼古丁免疫特征表面的合成纳米载体的分离。虽然其它机理可能在起作用,通过以下的情况来解释两个试验之间的差异:体内试验过程中作用于尼古丁-APC键上的力量远低于体外试验中DC在平板洗涤过程中经受的力量。

[0134] 图36中的实验进一步证明了包含免疫特征表面(如,包含尼古丁的免疫特征表面)

的合成纳米载体有效地将佐剂和基于蛋白的抗原传送到APC,导致有效的T辅助细胞激活。这通过以下事实来证明:用结合了R848和OVA抗尼古丁IgG的PLA-PEG-尼古丁合成纳米载体免疫时,与未接受OT-II细胞的小鼠相比,接受了天然OT-II(即,OVA-特异性的)T辅助细胞小鼠中的效价增强了约10倍。这种效应表明免疫特征修饰的合成纳米载体内所含的佐剂(R848)和T细胞抗原(OVA)有效地靶向了将OVA递呈至T细胞的DC。已经接受了OT-II细胞的动物中的OVA-特异性T细胞的更高可用性导致了增强的辅助应答,其随后增强了B细胞的抗尼古丁抗体的产生。因此,即使其对于APC的结合亲和性太低,以致通过体外捕获试验无法检测,但可形成根据以上标准的免疫特征表面的部分可增强合成纳米载体的免疫原性。

[0135] 在上文描述的任何具体实施方案中,除非文中另外明确指出,否则单词偶联的意思是共价或非共价偶联。在上文描述的任何具体实施方案中,单词包埋的意思是通过混合、通过环绕核心的壳、通过共价结合纳米载体表面的内部等方式物理地陷在其中。

[0136] 本申请参考各种授权的专利、公开的专利申请、期刊论文和其他出版物,通过引用全部并入本文中。

附图说明

[0137] 图1:用于最佳体液和细胞免疫应答的联合疫苗靶向策略。复合疫苗携带内源的T细胞抗原、佐剂(未显示)和用于DC、FDC和SCS-Mph的靶向部分,以及用于B细胞识别的表面抗原。在s.c.或i.m.注射时,材料通过引流淋巴管到达淋巴结并在每个APC上积累(为了简明:只显示了APC特异性的靶向部分,但每个APC都获得了整个复合物)。DC将复合物内在化并消化,将I类和II类MHC中的抗原性肽分别呈递至CD8和CD4T细胞。激活的T细胞分化成调节细胞免疫应答的效应/记忆($T_{Eff/Mem}$)细胞。 T_{FH} 细胞向B细胞提供帮助,B细胞最初被SCS-Mph上的抗原刺激,并在此过程中获得并加工T细胞抗原以重新刺激 T_{FH} 。 T_{FH} 细胞提供的帮助允许发生GC反应,在该过程中,B细胞增殖并产生高亲和性抗体。

[0138] 图2:SCS-Mph结合淋巴上携带的病毒颗粒并将其递呈至滤泡B细胞。(A)小鼠腭淋巴结的皮层的免疫组织化学染色,用抗-CD169染色,并用小麦胚芽凝集素复染。在足垫注射红色荧光泡性口炎病毒(VSV)后30分钟,收获淋巴结。在引流淋巴结的被膜下窦中,红色的病毒专有性地与CD169⁺巨噬细胞共区域化。(B)注射VSV后30分钟,在被膜下窦(SCSf)的基底下面的淋巴结巨噬细胞(Mph)和滤泡B细胞(B1)的电子显微镜图显示VSV位于表面,位于Mph的吞噬溶酶体内以及Mph和B细胞的交界处(箭头)。(C)向未处理小鼠(B6)的足垫中注射VSV导致病毒特异性B细胞上表面表达的IgM的迅速下调,这是B细胞激活的信号。足垫注射氯屈膦酸脂质体(CLL)后SCS-Mph的耗尽消除了B细胞激活,这表明SCS-Mph对于将微粒抗原递呈至B细胞是必需的。

[0139] 图3:示例性脂质体纳米载体,其中亲脂性免疫调节剂整合在膜中,和亲水性免疫调节剂包埋于脂质体内。

[0140] 图4:示例性纳米颗粒稳定化的脂质体纳米载体,其中亲脂性免疫调节剂整合在膜中,和亲水性免疫调节剂包埋于脂质体内。

[0141] 图5:示例性脂质体-聚合物纳米载体,其中亲脂性免疫调节剂整合在膜中,和疏水性免疫调节剂包埋于聚合物纳米颗粒内。

[0142] 图6:示例性纳米颗粒稳定化的脂质体-聚合物纳米载体,其中亲脂性免疫调节剂

整合在膜中,和疏水性免疫调节剂包埋于聚合纳米颗粒内。

[0143] 图7:示例性的含有反胶束的脂质体-聚合物纳米载体,其中亲脂性免疫调节剂整合在膜中,和亲水性免疫调节剂包埋于反胶束内。

[0144] 图8:示例性的含有反胶束的纳米颗粒稳定化的脂质体-聚合物纳米载体,其中亲脂性免疫调节剂整合在膜中,和亲水性免疫调节剂包埋于脂质体内。

[0145] 图9:示例性的脂质稳定化的聚合物纳米载体,其中亲水性免疫调节剂与脂单层偶联,和疏水性免疫调节剂包埋于聚合物核心内。

[0146] 图10:示例性的含有反胶束的脂质稳定化的聚合纳米载体,其中亲水性免疫调节剂与脂单层偶联,和亲水性免疫调节剂包埋于聚合物核心内。

[0147] 图11:淋巴携带的VSV被SCS巨噬细胞捕获。(A) 腭LN中的VSV的MP-IVM显微图像(数字:足垫注射后的分钟;比例尺标记:100微米)。(B) 注射后三个小时,VSV在C57BL/6→Act(EGFP)接受者中聚集(比例尺标记:50微米)。(C) 注射后5分钟,LN中的VSV的电子显微镜图像。显示中心显微镜图像的示意图(左),和更高的放大倍数(右)。箭头指明VSV颗粒(比例尺标记:2微米)。(D) VSV-引流LN的共焦显微镜图像(30分钟)。比例尺标记:100微米(左),15微米(右)。(E) 注入野生型、C3缺陷型或CLL耗尽的小鼠后2小时,腭LN中的VSV效价。***: $p < 0.001$ (双因子变异数分析(two-way ANOVA), Bonferroni's post-test)。(F) DH-LMP2a小鼠中的VSV捕获。*: $p < 0.05$ (未配对t检验)。(G) 未处理小鼠和CLL处理小鼠中足垫注射后的VSV效价(两个相似实验中的一个; $n = 3$)。ProxLN: 腹股沟、主动脉旁的LN; BrachLN: 臂LN。(H) TD插管后淋巴、脾和血液中的病毒效价; *: $p < 0.05$ (未配对t检验)。(E-H) 中的水平线代表平均值。

[0148] 图12:外周LN中CD169⁺巨噬细胞的表征。(A-C) 从天然C57BL/6小鼠的LN汇聚的单核细胞的世系标记物表达分析。(A) 在对CD169⁺群体选通(gating)后(中图),分析细胞中两个与巨噬细胞结合的表面标记物(I-Ab (II类MHC) 和CD11b) 的表达(下图)。在上图显示了用抗-CD169同种型对照的染色。(B) 进一步分析CD169⁺I-Ab⁺CD11b⁺细胞中CD68、F4/80、CD11c和Gr-1的表达。选通以鉴别标记物+的细胞,除了CD11c染色外,其中放置标记物以鉴定常规CD11c^{high}树突细胞(覆盖)。数字表示在直方图门下面的CD169⁺I-Ab⁺CD11b⁺细胞的百分率。数据是3-5个具有相似结果的实验的代表。(C) 图B中数据的定量分析,误差条表示SEM。(D-G) 来自天然C57BL/6小鼠的腭LN的共焦显微镜图像,显示了在CD169⁺细胞上所选标记物的共表达(箭头)。比例尺标记:左栏为125微米和所有其它栏为20微米。

[0149] 图13:CLL处理之后腭LN的形态学变化。(A) 未处理对照小鼠(-CLL, 左栏) 和6-10天前接受CLL足垫注射的动物的腭LN(上面三行) 和脾(下面一行) 的共焦显微镜图像。CLL处理耗尽了LN中的CD169⁺巨噬细胞(上面一行),但未耗尽脾中的;Lyve-1⁺髓质淋巴内皮细胞(第二行) 和皮层的CD11c^{high}树突细胞(第三行) 不受影响。(B) 经过和未经过CLL处理的腭LN中的细胞亚群频率,数据来自 $n = 3$ 小鼠,以平均值 $\pm$ SEM表示; *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$; 未配对斯氏t检验。(C) 足垫注射50微升CLL后6-10天,腭LN中不同的I-Ab⁺CD11b⁺白细胞亚群的频率。每个符号表示从一只小鼠汇聚的腭LN。对I-Ab⁺CD11b⁺细胞选通后通过流式细胞计量术检测腭LN中总的单核细胞中的细胞亚群频率,如图12A所示。(D) 未处理(-CLL) 或足垫注射CLL(+CLL) 后7天,腭LN的免疫组织化学分析。比例尺标记:300微米。(E) CLL处理后7天和足垫注射20微克VSV-IND后5分钟,代表性的腭LN中的SCS的超结构。注意到完全不存在SCS巨

噬细胞和病毒颗粒。比例尺标记:2微米。

[0150] 图14: 腮腺LN中荧光病毒和乳胶纳米颗粒的保留。(A) 足垫注射Alexa-568标记的腺病毒(AdV)后30分钟, 腮腺LN的共焦显微镜图像。用FITC- α -CD169和Alexa-647- α -B220将冷冻切片染色以鉴别B细胞。比例尺标记:100微米(左图)和15微米(右图)。(B) SCS巨噬细胞捕获的AdV颗粒的透射电子显微镜图像。上图显示低放大倍数视图(中图)的带注释示意图。中图中的带框区域在下图中被放大, 箭头表示电子密集的球状AdV颗粒。比例尺标记:2微米(上图和中图)和1微米(下图)。(C-D) 经足垫注射20微克Alexa-568标记的UV灭活的AdV(C)或VV(D)后30分钟, 来自C57BL/6小鼠腮腺LN的共焦显微镜图像。荧光病毒聚集在B滤泡上面的皮层SCS中, 通过FITC- α -B220染色鉴定, 也聚集在髓质中, 其中病毒不仅被CD169⁺巨噬细胞结合, 还被LYVE-1⁺淋巴内皮细胞结合。比例尺标记代表125微米(左图)和25微米(右图)。(E) 后足垫注射Alexa-568标记的VSV和大约10¹¹个Crimson荧光团(直径200纳米)后30分钟, 腮腺LN的共焦显微镜图像。用FITC- α -CD169将冷冻的LN切片进行复染。注意到与VSV不同, 乳胶珠在引流LN中保留性较差。比例尺标记:125微米。

[0151] 图15: 足垫注射CLL对引流LN中VSV分布的影响。共焦显微镜图像显示: 无CLL处理(A)或CLL处理后7天(B), 荧光VSV颗粒定位于腮腺LN中。通过FITC- α -B220染色鉴别B滤泡。在髓质(加框区域)中, VSV被LYVE-1⁺细胞结合, 这不受CLL处理的影响。比例尺标记:125微米(左栏)和25微米(右栏)。

[0152] 图16: SCS巨噬细胞将源自淋巴的AdV递呈至滤泡B淋巴细胞。(A) 腮腺LN中B滤泡上面的SCS中的CD169⁺巨噬细胞的共焦显微镜图像。用小麦胚芽凝集素(WGA)将冷冻切片进行复染以鉴别胞外基质, 并用 α -B220进行复染以检测B细胞。注意到一些B细胞位于SCS中, 并且一个B细胞似乎在滤泡和SCS之间迁移(箭头)。比例尺标记:25微米。足垫注射AdV后30分钟, 腮腺LN中的SCS巨噬细胞和周围细胞的电子显微镜图像(B)和示意图(C)。比例尺标记:2微米。(C)中画出的框表示在图(D)和(E)中以更高倍数显示的区域。这些图显示了SCS巨噬细胞和B细胞之间的界面处(箭头)的AdV颗粒的两个实例。星号表示其它的结合巨噬细胞的AdV颗粒。比例尺标记:500纳米。

[0153] 图17: 巨噬细胞介导的淋巴携带的VSV跨越SCS基底的转移改变了病毒特异性B细胞的行为。(A) 电子显微镜图像和示意图(中间)显示了VSV注射后30分钟, 巨噬细胞渗透腮腺LN的SCS的基底。比例尺标记:10微米(左)和2微米(右)。箭(arrow): 含有经消化的VSV的液泡。箭头: 巨噬细胞和B细胞之间接触的区域中的病毒体。(B) 腮腺LN中的多克隆和VI10YEN B细胞的MP-IVM。比例尺标记:50微米。(C) VSV注射后VI10YEN B细胞/对照B细胞的区域比例。结果来自3个图像/组。(D、E) 腮腺LN中相对于SCS的VI10YEN B细胞定位。**: $p < 0.01$ (用Bonferroni's post-test的单因素方差分析(one-way ANOVA))。

[0154] 图18: VSV血清型和VSV-IND特异性VI10YEN B细胞的表征。(A) 纯化的VSV裂解液的SDS-PAGE凝胶(12%)。顶端: VSV-IND和VSV-NJ。N和P蛋白在VSV-NJ中共同迁移, 大约的分子量显示于括号中。(B) Alexa-488标记的VSV-IND(中间一行)或VSV-NJ(下面一行)与来自C57BL/6小鼠(左栏)或VI10YEN小鼠(右栏)的B细胞的结合。上面一行显示用针对VI10YEN BCR的抗-个体基因型抗体35.61进行的对照染色(Dang和Rock, 1991, J. Immunol., 146: 3273)。(C) 经CD43^{neg}纯化的、Fluo-LOJO装载的来自VI10YEN小鼠(上面一行)或C57BL/6小鼠(下面一行)的B细胞中的胞内钙流动。随时间进程连续收集事件, 星号表示加入抗体或病毒

的时间点。以1000/B细胞使用病毒颗粒,以10微克/ 10^6 B细胞使用抗-IgM- (Fab)₂。(D) 足垫注射10微克UV-VSV或UV-VSV-AlexaFluor-488-IND免疫后4天和10天,C57BL/6小鼠血清中的总Ig和IgG的中和试验。(E) 暴露于来自VSV贮液的上清液的VI10YEN B细胞中的钙流动。通过透过蔗糖垫进行超离心产生上清液,引起病毒效价下降大约10,000倍,以不稀释(右上)或1:100稀释(右下)用于B细胞中。作为对照,将VSV贮液稀释至相等的病毒效价(MOI;左图)。结果证明存在抗原性的VSV-G,其不与我们的病毒制备物中的病毒颗粒结合。

[0155] 图19:VSV诱导的VI10YEN B细胞与ICAM-1和VCAM-1的粘附。(A,B) 纯化的天然和VSV-IND激活(30分钟暴露)的VI10YEN B细胞粘附至以所示浓度的重组ICAM-1-Fc (A) 或VCAM-1-Fc (B) 覆盖的塑料板。显示了两个三次重复实验的汇集数据。水平线表示平均数。(C,D) C57BL/6小鼠的腭LN中ICAM-1和VCAM-1表达的共焦显微镜图像。比例尺标记:50微米。(E) 纯化的天然野生型和VI10YEN B细胞粘附至以所示pfu-等价浓度的UV灭活的VSV-IND覆盖的塑料皿。数据以三次重复的平均值 $\pm$ SEM来表示。

[0156] 图20:SCS巨噬细胞对于LN中VSV特异性B细胞的早期激活是必需的。(A) 共焦显微镜图像显示MHC-II与VSV-IND定殖于(注射后30分钟)SCS处(箭头)的VI10YEN x MHCII (EGFP) B细胞,而不是深层滤泡(星号)。比例尺标记:25微米。(B) 与VSV结合的和与VSV分离的VI10YEN x MHCII (EGFP) B细胞与SCS的距离。水平线:中值。足垫注射VSV-IND后,VI10YEN (C) 和多克隆B细胞(D) 上的BCR表达的动力学。(E) 注射VSV-IND(20微克)后,经CLL处理的或未处理的腭LN中的VI10YEN细胞上的BCR表达。平均荧光强度按照无病毒值(虚线)进行校正。平均值 $\pm$ SEM(3-5只小鼠)。注射VSV-IND(0.4微克)后6小时,对照(F) 和CLL处理的(G) 腭LN中的VI10YEN B细胞的共焦显微镜图像。比例尺标记:125微米。(H) 注射所示剂量的VSV-IND后6小时,T/B边界和滤泡中的VI10YEN B细胞频率。平均值 $\pm$ SEM;n=3-4个滤泡/2只小鼠;*:p<0.05;**:p<0.01;***:p<0.001(t检验)。

[0157] 图21:病毒注射后引流LN中的VI10YEN B细胞移动性。VSV足垫注射后约5-35分钟,深层滤泡和SCS/表面滤泡中野生型(三角)和VI10YEN B细胞(圆圈)的3D瞬时速度的中值。水平线代表平均值;*:p<0.05;**:p<0.01;(单因素方差分析,Bonferroni's post-test)。注意到特异性B细胞在整个滤泡中减慢下来,可能是我们的制备物中游离VSV-G的影响结果(参见图18)。CLL处理和未处理的popLN中的对照实验显示了相似的B细胞移动性参数。

[0158] 图22:注射VSV-IND后,病毒引流和非引流LN中的VI10YEN B细胞上激活标记物诱导的时间过程。用CMTMR将VI10YEN B细胞荧光标记,并将其转移至天然小鼠,18小时后接受20微克UV灭活的VSV-IND注射(时间0小时)。在所示的时间间隔后收集引流腭LN(popLN)和末梢臂LN(brachLN)以产生单细胞悬浮液。对(A) B220⁺CMTMR⁺VI10YEN细胞或(B) B220⁺CMTMR⁻内源性对照B细胞选通后,通过流式细胞计量术检测B细胞上CD69和CD86的表达。

[0159] 图23:接受过继性转移CMTMR标记的VI10YEN B细胞和CMAC标记的多克隆B细胞的混合物的小鼠(右栏)的腭LN的共焦(左栏和中栏)和MP-IVM显微镜图像(右栏)。接下来的一天,在足垫注射20微克UV灭活的VSV-IND,并在所示的时间点通过外科手术制备用于MP-IVM的引流腭LN或收获用于共焦分析的冷冻切片。MP-IVM图像显示:早在病毒注射后30分钟,VSV特异性的B细胞,而不是多克隆B细胞,就与SCS中的VSV接触了。在注射后6个小时,VI10YEN B细胞重新定位至T/B边界。比例尺标记:左栏为150微米,其它栏为25微米。

[0160] 图24:使用来自人IgG的Fc片段的SCS-Mph体内靶向。(A) 左边的FACS直方图记录了

荧光PEG-PLGA纳米颗粒(直径约100纳米)与淋巴结巨噬细胞的结合。(B)Fc-纳米颗粒(NP)靶向SCS-Mph和滤泡树突细胞。

[0161] 图25:在淋巴结被膜下窦(SCS)中的巨噬细胞上,而非髓质中的巨噬细胞中,鉴别出趋化因子受体CX3CR1(fractalkine受体)。右侧显微镜图像是来自双敲入小鼠的淋巴结的3D影像,其中绿色荧光蛋白(GFP)在CX3CR1基因座中表达,而红色荧光蛋白(RFP)报告另一种趋化因子受体CCR2的表达。通过它们明显的绿色荧光可以容易地鉴别出SCS-Mph,而髓质巨噬细胞主要表达RFP。

[0162] 图26:SCS-Mph表达趋化因子受体CX3CR1。图像显示了来自敲入小鼠(其经过遗传工程化以从CX3CR1基因座表达GFP)的淋巴结的单细胞悬浮液的FACS曲线。通过可溶性受体CRFc(其结合SCS中的巨噬细胞,而不是髓质中的巨噬细胞)染色而鉴别SCS-Mph。CRFc阴性CX3CR1表达(即,GFP-high)细胞是常规的表达该趋化因子受体的树突细胞。

[0163] 图27:足垫注射直径为0.2微米的表面用胺(左图和中图)或羧基部分(右图)修饰的乳胶珠后24小时,来自小鼠腭淋巴结的冷冻切片的荧光显微镜图像。两套珠子均购自Invitrogen(Cat.no.F8763和F8805)。用抗-CD169将左侧和右侧的切片进行复染。将图像方向进行调整,使得髓质(用抗-CD169进行浅的弥漫染色)面向右边,而被膜下窦(SCS)区域(用抗-CD169进行深度染色)面向左边。注意到红色的胺修饰的颗粒主要定位于SCS,而蓝色的羧基修饰的珠子主要保留在髓质中。

[0164] 图28:(A)携带抗原的靶向纳米颗粒是高度免疫原性的并诱导高抗体效价。(B)纳米颗粒疫苗引发的诱导的免疫应答赋予针对致死剂量的VSV的有力保护。

[0165] 图29:通过免疫调节纳米颗粒在体内激活T细胞。(A)NP对CD4T细胞激活的影响。(B)与CpG佐剂(TLR9激动剂)混合的NP对CD8T细胞应答的影响。(C)共包埋的佐剂对CD8T细胞激活的影响。

[0166] 图30:显示了示例性的R848偶联策略。

[0167] 图31:显示了释放分布图数据。随时间进程从包含包埋在纳米颗粒中的R848的制剂释放的R848的百分数。

[0168] 图32:显示了释放分布图数据。随时间进程从包含包埋在纳米颗粒中的SIINFEKL的制剂释放的SIINFEKL的百分数。

[0169] 图33:显示了在已对小鼠施用几种制剂之一后,在小鼠淋巴结(LN)中的经测定的OT-I细胞数。

[0170] 图34a:显示了在已用各种游离佐剂孵育的树突细胞表面上的CD40、CD80和CD86蛋白表达的增加。

[0171] 图34b:显示了在树突细胞已用具有或不具有纳米颗粒的各种组合物孵育后,在树突细胞中的CD86的平均荧光强度(MFI)。

[0172] 图34c:显示了在已用各种纳米颗粒组合物孵育的树突细胞表面上的CD40、CD80和CD86蛋白表达的增加,以及与用脂多糖(LPS)孵育的DC的比较。

[0173] 图35:显示了FACS数据,该数据显示T细胞增殖。

[0174] 图36:显示了施与小鼠各种组合物后长达23周,小鼠抗-尼古丁IgG效价和浓度。

[0175] 图37:显示了施与小鼠各种组合物后21天,小鼠抗-尼古丁IgG效价和浓度。

[0176] 图38a:显示了与对照纳米颗粒相比,注入小鼠足垫后4小时,SCS中尼古丁修饰的

纳米颗粒的相对积聚。

[0177] 图38b:显示了与对照纳米颗粒相比,注入小鼠足垫后24小时,尼古丁修饰纳米颗粒与DC的相对定殖。

[0178] 图39a:显示了体外DC吸附至具有固定化抗-CD11c抗体的表面。

[0179] 图39b:显示了体外DC吸附至具有固定化尼古丁的表面。

[0180] 图40(a)-(b):显示了与对照纳米颗粒相比,在注入小鼠足垫后,在SCS中尼古丁修饰纳米颗粒的积聚。

[0181] 图41(a)-(d):显示了在将纳米颗粒注入小鼠足垫后,在腭淋巴结的SCS和髓质区域中的GM3修饰的纳米颗粒的积聚。

具体实施方式

[0182] 定义

[0183] 被滥用的物质:如本文中所用的术语“被滥用的物质”是指由患者(例如,人)为了该物质所指明的目的之外的目的而摄入或以医生所指导的方式或剂量之外的方式或剂量而摄入的任何物质。在一些具体实施方案中,被滥用的物质是药物,如非法药物。在某些具体实施方案中,被滥用的物质是非处方药。在一些具体实施方案中,被滥用的物质是处方药。在一些具体实施方案中,被滥用的物质是令人上瘾的物质。在一些具体实施方案中,被滥用的物质具有改变情绪的效应,并且因此包括吸入剂和溶剂。在其他具体实施方案中,被滥用的物质是不具有改变情绪效应或兴奋性质的物质,并且因此包括合成代谢类固醇。被滥用的物质包括但不限于,大麻成分(例如,印度大麻、大麻)、镇静剂(例如,巴比妥酸盐、苯二氮卓、氟硝西泮(Rohypnol)、GHB、安眠酮(quaaludes))、意识状态分离麻醉药(例如,克他命、PCP)、迷幻剂(例如,LSD、酶斯卡灵、裸盖菇素)、鸦片样物质和吗啡衍生物(例如,可待因、芬太奴、海洛因、吗啡、鸦片)、刺激剂(安非他明、可卡因、狂喜迷幻药(MDMA)、甲基苯丙胺、哌醋甲酯(利他林))、合成代谢类固醇和吸入剂。在一些具体实施方案中,用于包含在纳米载体中的被滥用的物质是完整分子或其一部分。

[0184] 令人上瘾的物质:如本文中所用的术语“令人上瘾的物质”是引起迷恋、强迫或物理依赖性、或心理依赖性的物质。在一些具体实施方案中,令人上瘾的物质是非法药物。在其它具体实施方案中,令人上瘾的物质是非处方药。在其他具体实施方案中,令人上瘾的物质是处方药。令人上瘾的物质包括,但不限于,可卡因、海洛因、大麻和甲基苯丙胺。在一些具体实施方案中,用于包含在纳米载体中的令人上瘾的物质是完整分子或其一部分。

[0185] 施用或施与:(1)以药理学上有用的方式将药理学上活性的材料,如本发明的组合物,给药于患者,(2)以药理学上有用的方式将给药的这些材料指引至患者,或(3)以药理学上有用的方式指引患者自体给药这些材料。

[0186] 氨基酸:如本文中所用的术语“氨基酸”在其最广泛意义上是指能够被引入多肽链中的任何化合物和/或物质。在一些具体实施方案中,氨基酸具有一般结构 $\text{H}_2\text{N}-\text{C}(\text{H})(\text{R})-\text{COOH}$ 。在一些具体实施方案中,氨基酸是天然产生的氨基酸。在一些具体实施方案中,氨基酸是合成氨基酸;在一些具体实施方案中,氨基酸是D-氨基酸;在一些具体实施方案中,氨基酸是L-氨基酸。“标准氨基酸”或“天然氨基酸”是指天然产生的肽中通常发现的二十种标准L-氨基酸中的任何一种。“非标准氨基酸”是指除了标准氨基酸之外的任何氨基酸,不论

其是合成制备的还是从天然来源获得的。如本文中所用的,“非天然氨基酸”包括化学产生的或修饰的氨基酸,包括但不限于盐,氨基酸衍生物(如,酰胺)和/或取代物。氨基酸,包括肽的羧基-和/或氨基-端氨基酸,可以通过能够改变肽的循环半衰期而对其活性没有不利影响的甲基化、酰胺化、乙酰化和/或以其它化学基团的取代而被修饰。氨基酸可以参与二硫键。术语“氨基酸”与“氨基酸残基”可互换使用,并可以指代游离氨基酸和/或肽的氨基酸残基。在使用该术语的上下文中可以清晰地显示其是指游离氨基酸还是指肽的残基。

[0187] 动物:如本文中所用的,术语“动物”是指动物界的任何成员。在一些具体实施方案中,“动物”是指任何发育阶段的人。在一些具体实施方案中,“动物”是指任何发育阶段的非人动物。在某些具体实施方案中,非人动物是指哺乳动物(例如,啮齿动物、小鼠、大鼠、兔、猴、狗、猫、绵羊、牛、灵长类和/或猪)。在一些具体实施方案中,动物包括,但不限于,哺乳动物、鸟类、爬行动物、两栖动物、鱼和/或软体动物。在一些具体实施方案中,动物可以是转基因动物、遗传工程化动物和/或克隆体。

[0188] 抗体:如本文中所用的,术语“抗体”是指任何免疫球蛋白,不论是天然的或完全或部分合成产生的。其所有的保持特异性结合能力的衍生物也包括在该术语中。该术语还涵盖了任何具有与免疫球蛋白结合结构域同源或很大程度上同源的结合结构域的蛋白。这样的蛋白可以来自天然来源,或部分或全部合成产生。抗体可以是单克隆或多克隆的。抗体可以是任何免疫球蛋白类别的成员,包括任何的人类类别:IgG、IgM、IgA、IgD和IgE。如本文中所用的,术语“抗体片段”或“抗体的特征性部分”可互换使用,并且指抗体的任何小于其全长的衍生物。抗体片段能够保持全长抗体的特异性结合能力的至少显著性的部分。这样的抗体片段的实例包括但不限于Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、Fv、dsFv二抗和Fd片段。抗体片段还包括Fc片段。抗体片段可以通过任何方式产生。例如,抗体片段可以通过完整抗体的片段化经酶或化学产生和/或其可以通过从编码部分抗体序列的基因经重组产生。可替换地或另外地,抗体片段可以全部或部分合成产生。抗体片段可任选包含单链抗体片段。可替换地或另外地,抗体片段可以包含多条连接在一起(例如,通过二硫键)的链。抗体片段可任选包含多分子复合体。功能性抗体片段通常包含至少约50个氨基酸,更通常将包含至少约200个氨基酸。

[0189] 大约:除非另有指明或从上下文可以断定,否则在指称数字时如本文所用的术语“大约”或“约”通常包括落在该数字的每一方向(大于或小于)5%、10%、15%或20%范围内的数字(除非当这样的数字将低于可能数值的0%或超过可能数值的100%)。

[0190] 与……结合:如本文中所用的,术语“与……结合”是指两个或更多实体通过直接或间接的共价或非共价相互作用而连接的状态。在一些具体实施方案中,结合是共价的。在一些具体实施方案中,共价结合由连接物部分介导。在一些具体实施方案中,结合是非共价的(例如,电荷相互作用、亲和性相互作用、金属配合、物理吸附、主客体相互作用、疏水性相互作用、 π - π 堆积相互作用、氢键相互作用、范德华力相互作用、磁性相互作用、静电相互作用、偶极-偶极相互作用等)。例如,在一些具体实施方案中,实体(例如,免疫调节剂、靶向部分、免疫刺激剂、纳米颗粒等)可以与疫苗纳米载体共价结合。在一些具体实施方案中,实体(例如,免疫调节剂、靶向部分、免疫刺激剂、纳米颗粒等)可以与疫苗纳米载体非共价结合。例如,实体可以与本发明的疫苗纳米载体的脂双层、脂单层、聚合基质等的表面结合,包埋于本发明的疫苗纳米载体的脂双层、脂单层、聚合物等之内,由本发明的疫苗纳米载体的

脂双层、脂单层、聚合基质等环绕,和/或分布在整个本发明的疫苗纳米载体的脂双层、脂单层、聚合基质等之中。在实体可以通过游离(即,非偶联的)形式的特定名称提及的情况中,将认识到,除非特意指出,即使实体与第二个实体偶联时,实体也可以通过相同名称来表示。

[0191] 生物相容性:如本文中所用的,术语“生物相容性”是指对细胞无毒性的物质。在一些具体实施方案中,如果在体内向细胞加入一种物质而不在体内诱导炎性和/或其它副作用,则认为该物质是“生物相容性”。在一些具体实施方案中,如果在体外或在体内向细胞加入一种物质而引起低于或等于约50%、约45%、约40%、约35%、约30%、约25%、约20%、约15%、约10%、约5%、或低于约5%的细胞死亡,则认为该物质是“生物相容性”。

[0192] 生物可降解:如本文所用的,术语“生物可降解”是指在生理条件下降解的物质。在一些具体实施方案中,生物可降解物质是通过细胞机制分解的物质。在一些具体实施方案中,生物可降解物质是通过化学过程分解的物质。

[0193] B细胞抗原:如本文所用的,术语“B细胞抗原”是指任何由B细胞中的免疫应答识别并激发B细胞中的免疫应答的抗原。在一些具体实施方案中,是B细胞抗原的抗原也是T细胞抗原。在某些具体实施方案中,B细胞抗原不同时是T细胞抗原。在某些具体实施方案中,当本文提供的纳米载体同时包含B细胞抗原和T细胞抗原时,B细胞抗原和T细胞抗原不是相同的抗原,虽然在一些具体实施方案中B细胞抗原和T细胞抗原每个均可以同时是B细胞抗原和T细胞抗原。在其它具体实施方案中,纳米载体的B细胞抗原和T细胞抗原是相同的。

[0194] 细胞类型:如本文中所用的,术语“细胞类型”是指具有定义细胞类型的一组与众不同的形态学、生物化学和/或功能特征的细胞形式。本领域技术人员将认识到可以在不同的特异性水平定义细胞类型。例如,T细胞和B细胞是不同的细胞类型,其可以彼此区分开来,但共同具有某些作为更广的“淋巴细胞”(其均为淋巴细胞的成员)细胞类型的特性的特征。通常,不同类型的细胞可以基于多种基因(本领域称为特定细胞类型(例如,特性世系的细胞类型)的“标记物”)的差异性表达而彼此区分开来。在一些具体实施方案中,不同类型的细胞可以基于其不同的功能而彼此区分开来。“细胞类型特异性标记物”是这样的基因产物或其修饰形式,其在一种或多种细胞类型上相对于全部其它或多数其它细胞类型来说有显著较高水平的表达,并且其表达是该细胞类型的特征。很多细胞类型特异性标记物在本领域中是这样识别的。

[0195] 剂型:适于施用于患者的介质、载体、媒介或装置中的药物。本文中将提供剂型的实例。

[0196] 有害环境试剂:如本文中所用的,术语“有害环境试剂”是指环境中发现的任何有害物质。这样的物质通常被认为具有健康风险。有害环境试剂包括被认为具有健康风险而实际上可能不具有风险的物质。有害环境试剂包括但不限于砷、铅、汞、氯乙烯、多氯联苯、苯、多环芳香烃、镉、苯并(a)芘、苯并(b)荧蒽、氯仿、DDT,P,P'-、阿罗克洛1254、阿罗克洛1260、二苯并(a,h)蒽、三氯乙烯、狄氏剂、六价铬和DDE,P,P'。在一些具体实施方案中,包含于纳米载体中的有害环境试剂是完整分子或其一部分。

[0197] 体外:如本文中所用的,术语“体外”是指在人工环境中发生的事件,例如,在试管或反应管中,在细胞培养物中等,而不是在生物体内(例如动物、植物和/或微生物)。

[0198] 体内:如本文中所用的,术语“体内”是指在生物体(例如,动物、植物和/或微生物)

内发生的事件。

[0199] 免疫刺激剂:如本文中所用的,术语“免疫刺激剂”是指调节针对抗原的免疫应答的试剂,但不是抗原或源自抗原。如本文中所用的,“调节”是指诱导、增强、抑制、引导或重引导免疫应答。这样的试剂包括刺激(或增强)针对抗原的免疫应答的免疫刺激剂,但是如上所述,其不是抗原或源自抗原。因此,免疫刺激剂包括佐剂。在一些具体实施方案中,免疫刺激剂位于纳米载体表面上和/或包埋于纳米载体内。在一些具体实施方案中,纳米载体表面上的免疫刺激剂与包埋于纳米载体内的免疫刺激剂不同。在一些具体实施方案中,纳米载体包含一种以上类型的免疫刺激剂。在一些具体实施方案中,一种以上类型的免疫刺激剂作用于不同的途径。免疫刺激剂的实例包括本文中别处提供的那些。在一些具体实施方案中,所有合成纳米载体的免疫刺激剂彼此相同。在一些具体实施方案中,合成纳米载体包含各种不同类型的免疫刺激剂。在一些具体实施方案中,合成纳米载体包含多个单独的免疫刺激剂,其全部彼此相同。在一些具体实施方案中,合成纳米载体仅仅只包含一种类型的免疫刺激剂。在一些具体实施方案中,合成纳米载体只包含两种不同类型的免疫刺激剂。在一些具体实施方案中,合成纳米载体包含多于两种不同类型的免疫刺激剂。在一些具体实施方案中,合成纳米载体包含脂膜(例如,脂双层、脂单层等),其中至少一种类型的免疫刺激剂与脂膜结合。在一些具体实施方案中,至少一种类型的免疫刺激剂包埋于脂膜内。在一些具体实施方案中,至少一种类型的免疫刺激剂包埋于脂双层的腔内。在一些具体实施方案中,合成纳米载体包含至少一种类型的与脂膜内表面结合的免疫刺激剂。在一些具体实施方案中,至少一种类型的免疫刺激剂包埋于合成纳米载体的脂膜内。在一些具体实施方案中,至少一种类型的免疫刺激剂可以位于合成纳米载体的多个位置。本领域普通技术人员将认识到之前的实施例只是许多不同方式的代表,其中多个免疫刺激剂可以与合成纳米载体的不同位点结合。多个免疫刺激剂可以位于任意组合的合成纳米载体的位点。

[0200] 核酸:如本文中所用的,术语“核酸”在其最广泛的意义上是指被引入或能够被引入寡核苷酸链的任何化合物和/或物质。在一些具体实施方案中,核酸是指通过磷酸二酯键被引入或能够被引入寡核苷酸链的化合物和/或物质。在一些具体实施方案中,“核酸”是指单个核酸残基(例如,核苷酸和/或核苷)。在一些具体实施方案中,“核酸”是指包含单个核酸残基的寡核苷酸链。如本文中所用的,术语“寡核苷酸”和“多核苷酸”可以互换使用。在一些具体实施方案中,“核酸”包括RNA以及单链和/或双链DNA和/或cDNA。此外,术语“核酸”、“DNA”、“RNA”和/或相似的术语包括核酸类似物,即,具有磷酸二酯骨架之外的类似物。例如,所谓的“肽核酸”,其在本领域是已知的,在骨架中具有肽键而不是磷酸二酯键,被认为包含在本发明的范围内。术语“编码氨基酸序列的核苷酸序列”包括彼此为简并形式和/或编码相同氨基酸序列的所有核苷酸序列。编码蛋白和/或RNA的核苷酸序列可以包括内含子。核酸可以从天然来源纯化,使用重组表达系统产生,并任选进行纯化、化学合成等。在合适的情况下,例如,在化学合成分子的情况中,核酸可以包含核苷酸类似物,如具有化学修饰的碱基或糖、骨架修饰等的类似物。除非另外指出,否则核酸序列以5'至3'的方向呈现。本文中所用的术语“核酸片段”是指为较长的核酸序列的一部分的核酸序列。在很多具体实施方案中,核酸片段包含至少3、4、5、6、7、8、9、10或更多个残基。在一些具体实施方案中,核酸是天然核苷或包含天然核苷(例如,腺苷、胸苷、鸟苷、胞苷、尿苷、脱氧腺苷、脱氧胸苷、脱氧鸟苷和脱氧胞苷);核苷类似物(例如,2-氨基腺苷、2-硫胸苷、肌苷、吡咯并嘧啶、3-甲基

腺苷、5-甲基胞苷、C-5丙炔基-胞苷、C-5丙炔基-尿苷、2-氨基腺苷、C-5溴尿苷、C-5氟尿苷、C-5碘尿苷、C-5丙炔基-尿苷、C-5丙炔基-胞苷、C5-甲基胞苷、2-氨基腺苷、7-脱氮腺苷、7-脱氮鸟苷、8-加氧腺苷、8-加氧鸟苷、0(6)-甲基鸟苷和2-硫胞苷);化学修饰的碱基;生物修饰的碱基(例如,甲基化的碱基);夹层碱基;修饰的糖(例如,2'-氟核糖、核糖、2'-脱氧核糖、阿拉伯糖和己糖);和/或修饰的磷酸基团(例如,硫代磷酸盐和5'-N-亚磷酰胺连接)。

[0201] 颗粒:如本文中所用的术语,“颗粒”是指任何具有10微米(μm)以下直径的实体。通常,颗粒具有最长为1000纳米或更低的尺寸(例如,直径)。在一些具体实施方案中,颗粒具有300纳米或更低的直径。颗粒包括微米颗粒、纳米颗粒和微微米颗粒。在一些具体实施方案中,纳米颗粒具有200纳米或更低的直径。在一些具体实施方案中,纳米颗粒具有100纳米或更低的直径。在一些具体实施方案中,纳米颗粒具有50纳米或更低的直径。在一些具体实施方案中,纳米颗粒具有30纳米或更低的直径。在一些具体实施方案中,纳米颗粒具有20纳米或更低的直径。在一些具体实施方案中,纳米颗粒具有10纳米或更低的直径。在一些具体实施方案中,颗粒可以是聚合物的基质。在一些具体实施方案中,颗粒可以是非聚合颗粒(例如,金属颗粒、量子点、陶瓷、无机材料、骨等)。颗粒还可以是脂质体和/或胶束。如本文所用的术语“纳米颗粒”是指任何具有低于1000纳米直径的颗粒。

[0202] 药物学上可接受的赋形剂:加入本发明组合物中以进一步帮助组合物施用的药物学上无活性的物质。药物学上可接受的赋形剂的实例包括,但不限于,碳酸钙、磷酸钙、各种稀释剂、各种糖和各种类型的淀粉、纤维素衍生物、明胶、植物油和聚乙二醇。

[0203] 弱免疫原性的抗原:如本文中所用的,术语“弱免疫原性的抗原”是指没有引发任何或所需的足够水平的免疫应答的抗原。如本文中所用的“足够”是指当在不含本文描述的纳米载体的组合物中施用(例如,在不存在纳米载体时作为游离抗原与佐剂混合),引发可检测的或保护性免疫应答的能力。在一些具体实施方案中,所需的免疫应答是治疗或预防疾病或病症。在某些具体实施方案中,所需的免疫应答减缓疾病或病症的一种或多种症状。弱免疫原性的抗原包括但不限于自体抗原、小分子和碳水化合物。

[0204] 自体抗原:如本文中所用的,术语“自体抗原”是指针对动物内的抗原引发免疫应答时,动物体内可以产生自体免疫性(例如,自体免疫疾病)的正常物质。自体抗原可以是蛋白或肽、脂蛋白、脂质、碳水化合物或核酸。核酸可以是DNA或RNA。自体抗原包括但不限于酶、结构蛋白、分泌的蛋白、细胞表面受体和细胞因子。在一些具体实施方案中,自体抗原是细胞因子,并且细胞因子是TNF、IL-1或IL-6。在一些具体实施方案中,自体抗原是胆固醇酯转移蛋白(CETP)、负责将胆固醇从高密度脂蛋白(HDL)转移到低密度脂蛋白胆固醇(LDL)的血清蛋白、与阿尔茨海默氏病相关的A β 蛋白、加工A β 蛋白的病理形式的蛋白水解酶、与动脉硬化症相关的LDL或HIV-1的共同受体。在一些具体实施方案中,加工A β 蛋白的病理形式的蛋白水解酶是 β -分泌酶。在一些具体实施方案中,与动脉硬化症相关的LDL是氧化的或最小化修饰的。在一些具体实施方案中,HIV-1的共同受体是CCR5。

[0205] 小分子:通常,“小分子”在本领域中被理解为具有低于约2000克/摩尔大小的有机分子。在一些具体实施方案中,小分子为低于约1500克/摩尔或低于约1000克/摩尔。在一些具体实施方案中,小分子为低于约800克/摩尔或低于约500克/摩尔。在一些具体实施方案中,小分子是非聚合和/或非寡聚的。在一些具体实施方案中,小分子不是蛋白、肽或氨基酸。在一些具体实施方案中,小分子不是核酸或核苷酸。在一些具体实施方案中,小分子不

是糖或多糖。

[0206] 特异性结合:如本文中所用的,术语“特异性结合”是指第一个和第二个部分的非共价物理结合,其中第一个和第二个部分之间的结合为每个部分与发生结合的环境中存在的多数或所有其它部分间的结合的至少2倍强、至少5倍强、至少10倍强、至少50倍强、至少100倍强,或比之更强烈。如果在所应用的条件下,例如在生理条件下,如那些在细胞内或与细胞存活相一致,平衡解离常数 K_d 为 10^{-3} M或更低、 10^{-4} M或更低、 10^{-5} M或更低、 10^{-6} M或更低、 10^{-7} M或更低、 10^{-8} M或更低、 10^{-9} M或更低、 10^{-10} M或更低、 10^{-11} M或更低或 10^{-12} M或更低,则两个或更多实体的结合可以认为是特异性的。在一些具体实施方案中,特异性结合可以通过多个较弱的相互作用(例如,多个单独的相互作用,其中每个单独的相互作用的特征在于高于 10^{-3} M的 K_d)来实现。在一些具体实施方案中,特异性结合(其可被称为“分子识别”)是两个实体之间的可饱和结合相互作用,其依赖于每个实体上的官能团的互补方向。特异性结合相互作用的实例包括适配子-适配子靶向相互作用、抗体-抗原相互作用、抗生物素蛋白-生物素相互作用、配体-受体相互作用、金属-螯合剂相互作用、互补核酸之间的杂交等。

[0207] 患者:如本文中所用的,术语“患者”或“病人”是指可以施用本发明组合物的任何生物体,例如,用于实验、诊断和/或治疗目的。典型的患者包括动物(例如,哺乳动物,如非人灵长类和人;禽类;家养或家畜,如猫、狗、绵羊、山羊、牛、马和猪;实验室动物,如小鼠、大鼠和豚鼠;兔子;鱼;爬行动物;动物园和野生动物)和/或植物。通常,“患者”是动物,包括哺乳动物,如人和灵长类;等等。

[0208] 患有:“患有”疾病、失调和/或病症的个体已经被诊断、可能被诊断或表现出疾病、失调和/或病症的一个或多个症状。

[0209] 易于患上:“易于患上”疾病、失调和/或病症的个体尚未被诊断患有和/或可能未表现出疾病、失调和/或病症的症状。在一些具体实施方案中,疾病、失调和/或病症与微生物感染(例如,细菌感染、病毒感染、真菌感染、寄生虫感染等)相关。在一些具体实施方案中,易于患上微生物感染的个体可能暴露于微生物(例如,通过摄取、吸入、身体接触等)。在一些具体实施方案中,易于患上微生物感染的个体可能暴露于被微生物感染的个体。在一些具体实施方案中,易于患上微生物感染的个体是在微生物流行地点的个体(例如,旅行到微生物流行地点的个体)。在一些具体实施方案中,易于患上疾病、失调和/或病症的个体将会患上疾病、失调和/或病症。在一些具体实施方案中,易于患上疾病、失调和/或病症的个体将不会患上疾病、失调和/或病症。在一些具体实施方案中,患者患有或易于患上癌症、传染性疾病、非自体免疫代谢性疾病或退行性疾病或上瘾。在一些具体实施方案中,患者患有或易于患上细菌、真菌、原生动物、寄生虫或病毒感染。这样的传染的诱因可以是本文中提供的任何一种生物体。在一些具体实施方案中,患者患有或易于患上结核、疟疾、利什曼病、幽门螺旋杆菌(*H. pylori*)、葡萄球菌(*Staphylococcus*)感染或沙门氏菌(*Salmonella*)感染。在一些具体实施方案中,患者患有或易于患上流感。在一些具体实施方案中,患者患有或易于患上自体免疫疾病。

[0210] 合成纳米载体:“合成纳米载体”意思是未在自然界中发现的并且至少具有低于或等于5微米大小尺寸的不连续物体。特别将白蛋白纳米颗粒包括为合成的纳米载体。根据本发明的合成纳米载体没有引起实质性的载体效应;优选它们没有引起载体效应。在某些优选的具体实施方案中,将合成纳米载体进行修饰以降低或消除载体效应。例如,这可以通过

将各种材料(例如,聚乙二醇)与合成纳米载体偶联来实现,以降低合成纳米载体的免疫原性性质。

[0211] 合成纳米载体可以是,但不限于,一个或多个基于脂质的纳米载体、聚合纳米颗粒、金属纳米颗粒、基于表面活性剂的乳液、树状聚合物、巴克球(buckyball)、纳米线、病毒样颗粒、基于肽或蛋白的颗粒(如白蛋白纳米颗粒)和/或使用纳米材料的组合物(如,脂质-聚合物纳米颗粒)产生的纳米颗粒。合成纳米载体可以是各种不同的形状,包括但不限于,球形、立方体、金字塔形、长方形、圆柱形、环形等。根据本发明的合成纳米载体包含一个或多个表面。适用于本发明实践的示例性合成纳米载体包含:(1)Gref等的US专利5,543,158中公开的生物可降解纳米颗粒,(2)Saltzman等的公开US专利申请20060002852的聚合纳米颗粒,或(4)DeSimone等的公开US专利申请20090028910的平板印刷构建的纳米颗粒。根据本发明的具有等于或低于约100纳米最小尺寸(优选等于或低于约100纳米)的合成纳米载体不包含具有激活补体的羟基的表面,或可替换地包含基本上由不是激活补体的羟基的部分组成的表面。在优选的具体实施方案中,根据本发明的具有等于或低于约100纳米最小尺寸(优选等于或低于约100纳米)的合成纳米载体不包含基本上激活补体的表面,或可替换地包含基本上由基本上不激活补体的部分组成的表面。在更优选的具体实施方案中,根据本发明的具有等于或低于约100纳米最小尺寸(优选等于或低于约100纳米)的合成纳米载体不包含激活补体的表面,或可替换地包含基本上由不激活补体的部分组成的表面。

[0212] 术语“纳米载体”、“合成纳米载体”及其变形通常可以在本文中互换使用。

[0213] T细胞抗原:如本文中所用的,术语“T细胞抗原”是指任何由T细胞中的免疫应答识别并激发的抗原(例如,由T细胞上的T细胞受体通过结合至主要组织相容性复合体分子(MHC)的抗原或其一部分的递呈而被特异性识别的抗原)。在一些具体实施方案中,是T细胞抗原的抗原也是B细胞抗原。在其它具体实施方案中,T细胞抗原不同时是B细胞抗原。T细胞抗原通常是蛋白或肽。T细胞抗原可以是刺激CD8+T细胞应答、刺激CD4+T细胞应答或同时刺激二者的抗原。因此,在一些具体实施方案中,纳米载体能够有效地同时刺激两种类型的应答。

[0214] 目标:如本文中所用的,术语“目标”或“标记物”是指能够特异性结合至特定靶向部分的任何实体。在一些具体实施方案中,目标与一种或多种特定的组织类型特异性结合。在一些具体实施方案中,目标与一种或多种特定的细胞类型特异性结合。例如,细胞类型特异性标记物通常比参考细胞群体中的细胞类型的表达水平高至少2倍。在一些具体实施方案中,细胞类型特异性标记物的存在水平比参考群体中的平均表达高至少3倍、至少4倍、至少5倍、至少6倍、至少7倍、至少8倍、至少9倍、至少10倍、至少50倍、至少100倍或至少1000倍。对细胞类型特异性标记物的检测或测量使得可能将一种或多种目标细胞类型从很多、大部分或所有其它细胞类型中区分开。在一些具体实施方案中,目标包含蛋白、碳水化合物、脂质和/或核酸,如本文所述。

[0215] 靶向的:如果特异性结合目标,对于本文描述的目的,则认为该物质是“靶向的”。在一些具体实施方案中,在严格条件下靶向部分特异性结合目标。如果靶向部分特异性结合目标,从而将完整纳米载体传送至特异性器官、组织、细胞和/或亚细胞位点,则认为包含靶向部分的本发明的纳米载体,如疫苗纳米载体,是“靶向的”。

[0216] 靶向部分:如本文中所用的,术语“靶向部分”和“高亲和性靶向部分”可互换使用,

并且指的是任何与细胞的成分结合的部分。通常,靶向部分与细胞成分的结合将是高亲和性结合相互作用。除了免疫特征表面上存在的并提供靶向(和高亲合力结合)APC的多个部分,本发明的纳米载体可以进一步包含一个或多个其他靶向部分。在一些具体实施方案中,靶向部分与细胞的成分特异性结合。这样的成分被称为“目标”或“标记物”。靶向部分可以是多肽、糖蛋白、核酸、小分子、碳水化合物、脂质等。在一些具体实施方案中,靶向部分是抗体或其特征性部分。在一些具体实施方案中,靶向部分是受体或其特征性部分。在一些具体实施方案中,靶向部分是配体或其特征性部分。在一些具体实施方案中,靶向部分是与细胞类型特异性标记物结合的核酸靶向部分(例如,适配子)。在一些具体实施方案中,靶向部分是小分子。在一些具体实施方案中,靶向部分位于纳米载体的表面上。在其它具体实施方案中,靶向部分包埋于纳米载体内。在其它具体实施方案中,靶向部分与纳米载体结合。在一些具体实施方案中,靶向部分与纳米载体共价结合。在其它具体实施方案中,靶向部分与纳米载体非共价结合。在其它具体实施方案中,靶向部分结合细胞表面上表达的受体。在一些具体实施方案中,靶向部分结合可溶性受体。在一些具体实施方案中,可溶性受体是补体蛋白或预先存在的抗体。在其它具体实施方案中,靶向部分用于将纳米载体传送至抗原呈递细胞、T细胞或B细胞。在一些具体实施方案中,抗原呈递细胞是巨噬细胞。在其它具体实施方案中,巨噬细胞是被膜下窦巨噬细胞。在其它具体实施方案中,抗原呈递细胞是树突细胞。在一些具体实施方案中,抗原呈递细胞是滤泡树突细胞。靶向部分的特异性非限制性实例包括与CD11b、CD169、甘露糖受体、DEC-205、CD11c、CD21/CD35、CX3CR1或Fc受体结合的分子。在一些具体实施方案中,结合上述任何一个的分子是抗体或其抗原结合片段(例如,抗-CD169抗体)。在一些具体实施方案中,结合Fc受体的分子是包含免疫球蛋白(例如,IgG)的Fc部分的分子。在其它具体实施方案中,免疫球蛋白的Fc部分是人Fc部分。在一些具体实施方案中,结合CX3CR1的分子是CX3CL1(fractalkine)。结合CD169的靶向部分包括抗-CD169抗体和CD169的配体,例如,唾液酸化的CD227、CD43、CD206或这些配体的保持结合功能的部分,例如可溶性部分。

[0217] 治疗有效量:如本文中所用的,术语“治疗有效量”意思是向患有或易于患上疾病、失调和/或病症的患者施用,对于疾病、失调和/或病症足以治疗、减轻、改善、缓解、减轻其征状、预防、延迟其发作、抑制其进展,减轻其严重程度和/或降低其发生率的治疗性、预防性和/或诊断性试剂(例如本发明的疫苗纳米载体)的量。该术语还旨在指本文提供的调节患者的免疫应答的纳米载体或其组合物的量。

[0218] 治疗剂:如本文中所用的,术语“治疗剂”是指向患者施用,具有治疗性、预防性和/或诊断性效应和/或引发所需生物学和/或药理学效应的任何试剂。

[0219] 治疗:如本文中所用的,术语“治疗”是指特别的疾病、失调和/或病症的一个或多个症状或特征的部分或完全地减轻、改善、缓解、延迟其发作、抑制其进展,减轻其严重程度和/或降低其发生率。例如,“治疗”微生物感染可以指的是抑制微生物的存活、生长和/或传播。可以为了降低发展与疾病、失调和/或病症相关的病理的风险的目的而向未表现出疾病、失调和/或病症的迹象的患者和/或只表现出疾病、失调和/或病症的早期迹象的患者施加治疗。在一些具体实施方案中,治疗包括向患者传送本发明的疫苗纳米载体。

[0220] 通用T细胞抗原:如本文中所用的,术语“通用T细胞抗原”是指能够促进T细胞帮助并增强针对完全不相关抗原的免疫应答的T细胞抗原。通用T细胞抗原包括破伤风类毒素,

以及源自破伤风类毒素、EB病毒或流感病毒的一种或多种肽。通用T细胞抗原还包括流感病毒的成分,如红血球凝聚素、神经氨酸苷酶或核蛋白,或一种或多种源自其的肽。

[0221] 疫苗纳米载体:如本文中所用的,术语“疫苗纳米载体”是指包含至少一种免疫调节剂或免疫刺激剂的合成纳米载体。在某些具体实施方案中,疫苗纳米载体包括至少两种类型免疫调节剂。在一些具体实施方案中,免疫调节剂是抗原,并且疫苗纳米载体包含2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多种抗原。不同的抗原可以是完全不同的抗原分子或源自完全不同的抗原分子,或者不同的抗原可以是来自相同的抗原分子的不同表位。在其它具体实施方案中,疫苗纳米载体包含2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个来自相同抗原分子的不同表位。疫苗纳米载体可以是任何形式的颗粒。在一些具体实施方案中,疫苗纳米载体能够刺激T细胞和/或B细胞中的免疫应答。在其它具体实施方案中,疫苗纳米载体能够增强、抑制、引导或重引导免疫应答。在一些具体实施方案中,本领域可利用的任何试验可用于确定T细胞和/或B细胞是否已经被刺激。在一些具体实施方案中,可以通过监控抗原诱导的细胞因子的产生、抗原诱导的T细胞的增殖和/或抗原诱导的蛋白表达变化来检验T细胞刺激。在一些具体实施方案中,可以通过监控抗体效价、抗体亲和性、中和检验中抗体的表现、类别转换重组、抗原特异性抗体的亲和成熟、记忆B细胞的发育、长生血浆细胞(其能够长时间地产生大量的高亲和性抗体)的发育、生发中心的反应和/或中和检验中抗体的表现来检验B细胞的刺激。在一些具体实施方案中,疫苗纳米载体还包含至少一个能够帮助将疫苗纳米载体传送至患者内的特定目标(例如,器官、组织、细胞和/或亚细胞位点)的靶向部分。在一些具体实施方案中,疫苗纳米载体还包含至少一种能够帮助刺激T细胞和/或B细胞中免疫应答的免疫刺激剂。在一些具体实施方案中,疫苗纳米载体还包含至少一个允许可调的膜坚固性和可控的脂质体稳定性的纳米颗粒。在一些具体实施方案中,疫苗纳米载体包含脂质、两性化合物、聚合物、糖、聚合基质和/或非聚合颗粒。

[0222] 载体效应:建立对合成纳米载体的免疫应答,而不是对期望适应性免疫应答的抗原。由于其化学组成或结构,合成纳米载体的材料能够刺激强烈免疫应答时,可以产生载体效应。

[0223] 水溶性的无粘附性聚合物:如本文中所用的,术语“水溶性的无粘附性聚合物”是指在水中可溶并且可赋予降低的生物垢特性的聚合物。在一些具体实施方案中,水溶性的无粘附性聚合物是聚乙二醇、聚环氧乙烷、聚烷撑二醇和聚亚烷基氧化物。

[0224] 疫苗

[0225] 疫苗接种通常本质上是被动或主动的。通常,主动疫苗接种包括将患者的免疫系统暴露于一种或多种被识别为不需要、不想要和/或异源并且激发内源性免疫应答的试剂,这些免疫应答引起抗原特异性原态淋巴细胞的激活,然后产生分泌抗体的B细胞或抗原特异性效应和记忆T细胞或二者。这种方式可以引起长期的保护性免疫力,其可通过重新暴露于相同的抗原性材料而不时地被增强。针对主动免疫接种的成功免疫应答的长期性的前景使得该策略在多数临床实践中比被动免疫接种更可取,在被动免疫接种中,接受者被注射预制的抗体或抗原特异性效应淋巴细胞,这产生迅速的特别的保护,但通常不会建立持久性免疫力。

[0226] 在人体中正在应用或已经应用了大量多种的疫苗制剂。人体中最常见的施用途径是肌肉内(i.m.)注射,但是疫苗还可以通过口服、鼻内、皮下、吸入或静脉内使用。在多数情

况下,源自疫苗的抗原最初被递呈至区域淋巴结中的天然淋巴细胞。

[0227] 目前一些针对例如微生物病原体的疫苗由活的减毒的微生物或微生物的非毒性变体菌株或杀灭的或另外灭活的生物体组成。其它疫苗利用或多或少的纯化的病原体裂解物的成分,如表面碳水化合物或重组的源自病原体的蛋白,其有时与其它分子融合,特别是可赋予辅助活性的蛋白。

[0228] 使用活的减毒的或灭活的病原体的疫苗通常产生有力的免疫应答,但是它们的使用具有局限性。例如,活的疫苗菌株有时候会引起传染性病状,特别是施用于免疫受损的接受者时。此外,很多病原体,特别是病毒,在它们的基因组中持续进行迅速的变异,这允许它们逃脱针对抗原性不同疫苗菌株的免疫应答。但是,大部分或所有的病原体被认为具有不容易突变的特定抗原性决定簇,因为它们与必需的功能相关。针对这些保守性表位(而不是更可变的、非必需的表位)的抗体能够提供抵抗高度突变的病毒的保护(Baba等,2000, Nat. Med., 6:200;通过引用并入本文中)。基于活的或杀灭的完整病原体的疫苗不一定促进对这些关键表位的识别,但是可能实质上“迷惑”免疫系统将其攻击聚集在高度可变的决定簇。因此,本发明包括以下认识:模拟病毒颗粒的高免疫原性颗粒性质但呈现出选择性的必需的不可变表位的工程化疫苗纳米载体能够产生比完整微生物有力得多且“防逃脱的”的中和抗体和效应T细胞应答。

[0229] 仍然尚未完全了解疫苗刺激引流淋巴结中的抗体应答(或不能这样)的精确机理。B和T细胞最初被隔绝在不同的解剖区域,分别为位于表面的B滤泡和周围的副皮质区和深皮层。在抗原激发时,滤泡中的抗原特异性B细胞和T细胞区域中的CD4T细胞被激活,然后朝着两个隔间之间更宽的区域迁移。吞噬了淋巴携带的抗原的B细胞加工所获得的材料并开始递呈II类MHC表面分子中的抗原性肽,然后由激活的CD4T细胞(T_{FH} 细胞)识别。抗原识别允许 T_{FH} 细胞向B细胞提供帮助,这构成有力的存活信号并激发B滤泡内生发中心(GC)的形成。GC反应促进类别转换重组、抗原特异性抗体的亲和成熟,和记忆B细胞与长生血浆细胞(其能够长时间地产生大量的高亲和性抗体)的形成。因此,本发明包括以下认识:疫苗纳米载体可以具有允许抗原性材料被B和T细胞同时有效识别并诱导有力的GC反应的成分(图1)。

[0230] 本发明描述了用来开发用于疫苗传送的疫苗纳米载体的系统,其能够克服目前疫苗技术的上述这些局限性。本发明包括以下认识:淋巴携带的病毒颗粒(其具有数十至数百纳米的直径并诱导有力的细胞和抗体应答)被捕获并被保留在引流淋巴结的被膜下窦的巨噬细胞(即,被膜下窦巨噬细胞,缩写为SCS-Mph)的表面上。这些巨噬细胞参与完整的病毒颗粒至滤泡B细胞的有效早期递呈。在一些具体实施方案中,本发明的纳米载体模拟病毒颗粒并靶向SCS-Mph。如实施例1所示,在皮下注射Cy5包被的聚(乳酸羟基乙酸)(PLGA)纳米颗粒(50纳米-150纳米)(其被单层脂和聚乙二醇表面稳定化)后,注射的纳米颗粒容易地进入淋巴并结合在引流淋巴结的被膜下窦,与淋巴携带的病毒相似。携带刺激B细胞和/或T细胞的免疫调节剂的相似纳米载体在免疫接种患者中是特别有用的。

[0231] 因此,本发明包括以下认识:携带免疫调节剂的纳米载体(例如,淋巴携带的病毒大小的纳米载体)能够在淋巴结中被识别,就像它们是病毒一样,并且可以激发有力的免疫应答,例如,颗粒包括由B细胞和/或T细胞识别的免疫调节剂时。

[0232] 通过在表面上携带免疫调节剂和/或在内部装载相似或不同的免疫调节剂,纳米载体能够将这些免疫调节剂同时传送到免疫系统的不同细胞并刺激它们。在某些具体实施

方案中,存在于纳米载体表面上的免疫调节剂刺激B细胞,包埋于纳米载体内部的免疫调节剂在淋巴组织内(和通过激活后的B细胞)被抗原呈递细胞(APC),如树突细胞(DC),加工并呈递给T细胞。在一些具体实施方案中,通过用靶向部分(例如,抗体或其片段、肽或多肽、Affibody®、Nanobody™、AdNectin™、Avimer™、适配子、Spiegelmer®、小分子、脂质、碳水化合物等)修饰纳米载体的表面,纳米载体能够选择性地使免疫调节剂传送到特异性抗原呈递细胞,如DC、SCS-Mph、FDC、T细胞、B细胞和/或其组合。纳米载体可以是,但不限于,一个或多个脂质纳米颗粒、聚合纳米颗粒、金属纳米颗粒、基于表面活性剂的乳剂、树状聚合物和/或使用纳米材料的组合(例如脂质-聚合物纳米颗粒)产生的纳米颗粒。在标题为“疫苗纳米载体”的部分中进一步详细描述了疫苗纳米载体。

[0233] T细胞

[0234] 本发明提供了用于将例如免疫调节剂传送到免疫系统的细胞的疫苗纳米载体。在一些具体实施方案中,疫苗纳米载体包含至少一种能被传送到APC的免疫调节剂,然后APC加工该免疫调节剂并将其输送到T细胞。

[0235] 专职APC可以非常有效地使抗原内在化,通过吞噬或通过内吞,然后展示抗原的片段,与APC膜上的II类主要组织相容性复合体(II类MHC)分子或I类MHC分子相结合。CD4T细胞识别APC膜上的抗原-II类MHC分子复合体并与之相互作用,而CD8T细胞识别抗原-I类MHC分子复合体并与之相互作用。然后APC产生另外的共刺激信号以及调节性细胞因子,从而引起T细胞的激活。

[0236] 免疫调节剂

[0237] 本发明提供了包含一种或多种免疫调节剂的疫苗纳米载体。在一些具体实施方案中,包含一种或多种免疫调节剂的本发明的纳米载体被用作疫苗。在一些具体实施方案中,免疫调节剂可以包含分离和/或重组的蛋白或肽、碳水化合物、糖蛋白、糖肽、蛋白聚糖、灭活的生物体和病毒、死的生物体和病毒、遗传改变的生物体或病毒,和细胞提取物。在一些具体实施方案中,免疫调节剂可以包含核酸、碳水化合物、脂质和/或小分子。在一些具体实施方案中,免疫调节剂是激发免疫应答的试剂。在其他具体实施方案中,免疫调节剂是编码蛋白或肽的多核苷酸,蛋白或肽被表达时,免疫应答被激发。在一些具体实施方案中,免疫调节剂是抗原。在一些具体实施方案中,免疫调节剂是蛋白或肽。在一些具体实施方案中,将免疫调节剂用于疫苗。

[0238] 在一些具体实施方案中,免疫调节剂是源自病原体的任何蛋白和/或其它抗原。病原体可以是病毒、细菌、真菌、原生动物、寄生虫等。在一些具体实施方案中,免疫调节剂可以包括细菌生物体的抗原,如包柔氏螺旋体属(*Borrelia*)物种、炭疽芽胞杆菌(*Bacillus anthracis*)、伯氏疏螺旋体(*Borrelia burgdorferi*)、百日咳嗜血杆菌(*Bordetella pertussis*)、弯曲杆菌(*Camphylobacter jejuni*)、衣原体属(*Chlamydia*)物种、鹦鹉热衣原体(*Chlamydial psittaci*)、生殖道沙眼衣原体(*Chlamydial trachomatis*)、梭菌属(*Clostridium*)物种、破伤风梭菌(*Clostridium tetani*)、内毒杆菌(*Clostridium botulinum*)、产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*)、白喉杆菌(*Corynebacterium diphtheriae*)、柯克斯体属(*Coxiella*)物种、肠球菌属(*Enterococcus*)物种、埃立克体属(*Ehrlichia*)物种、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、土拉热弗郎西丝菌(*Francisella tularensis*)、嗜血杆菌属(*Haemophilus*)物种、流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*)、

副流感嗜血杆菌 (*Haemophilus parainfluenzae*)、乳酸菌属 (*Lactobacillus*) 物种、军团杆菌属 (*Legionella*) 物种、嗜肺军团菌 (*Legionella pneumophila*)、问号钩端螺旋体 (*Leptospira interrogans*)、李斯特菌属 (*Listeria*) 物种、单核增生性李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*)、分支杆菌属 (*Mycobacterium*) 物种、结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*)、麻风分枝杆菌 (*Mycobacterium leprae*)、支原体属 (*Mycoplasma*) 物种、肺炎支原体 (*Mycoplasma pneumoniae*)、奈瑟菌属 (*Neisseria*) 物种、脑膜炎奈瑟菌 (*Neisseria meningitidis*)、淋病奈瑟菌 (*Neisseria gonorrhoeae*)、肺炎球菌属 (*Pneumococcus*) 物种、假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 物种、绿脓杆菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、沙门氏菌属 (*Salmonella*) 物种、伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhi*)、鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella enterica*)、立克次氏体属 (*Rickettsia*) 物种、落矶山热立克次体 (*Rickettsia rickettsii*)、地方性斑疹伤寒立克次氏体 (*Rickettsia typhi*)、志贺氏杆菌属 (*Shigella*) 物种、葡萄状球菌属 (*Staphylococcus*) 物种、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus*) 物种、链球菌属 (*Streptococcus*) 物种、肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*)、脓链球菌 (*Streptococcus pyogenes*)、变种链球菌 (*Streptococcus mutans*)、密螺旋体属 (*Treponema*) 物种、梅毒螺旋体 (*Treponema pallidum*)、弧菌属 (*Vibrio*) 物种、霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*)、鼠疫耶尔森氏菌 (*Yersinia pestis*) 等。

[0239] 在一些具体实施方案中,免疫调节剂可以包括病毒生物体的抗原,如痘病毒、小痘病毒(天花)、埃博拉病毒、嗜肝DNA病毒、马尔堡病毒、登革热病毒、甲型和乙型流感病毒、副流感病毒、呼吸道合胞病毒、麻疹(麻疹病毒)、人免疫缺陷病毒(HIV)、人乳头瘤病毒(HPV)、水痘-带状疱疹病毒、单纯疱疹病毒1和2、细胞巨化病毒、EB病毒、JC病毒、棒状病毒、轮状病毒、鼻病毒、腺病毒、正粘病毒、乳头瘤病毒、细小病毒、小核糖核酸病毒、脊髓灰质炎病毒、腮腺炎、狂犬病、呼吸道肠道病毒、风疹病毒、外衣病毒、逆转录病毒、柯萨奇病毒、马脑脊髓炎病毒、日本脑炎病毒、黄热病毒、裂谷热病毒、甲肝病毒、乙肝病毒、丙肝病毒、丁肝病毒和戊肝病毒等。病毒生物体包括为dsDNA病毒、ssDNA病毒、dsRNA病毒、(+) ssRNA病毒(-) sRNA病毒、ssRNA-RT病毒和dsDNA-RT病毒的那些。

[0240] 在一些具体实施方案中,免疫调节剂可以包括真菌、原生动物和/或寄生虫生物的抗原,如曲霉属 (*Aspergillus*) 物种、假丝酵母属 (*Candida*) 物种、白色念珠菌 (*Candida albicans*)、热带假丝酵母 (*Candida tropicalis*)、隐球酵母属 (*Cryptococcus*) 物种、新型隐球酵母 (*Cryptococcus neoformans*)、溶组织内阿米巴 (*Entamoeba histolytica*)、荚膜组织胞浆菌 (*Histoplasma capsulatum*)、利什曼虫属 (*Leishmania*) 物种、星形诺卡氏菌 (*Nocardia asteroides*)、恶性疟原虫 (*Plasmodium falciparum*)、刚地弓形虫 (*Toxoplasma gondii*)、阴道毛滴虫 (*Trichomonas vaginalis*)、弓形体属 (*Toxoplasma*) 物种、布氏锥虫 (*Trypanosoma brucei*)、曼森氏住血吸虫 (*Schistosoma mansoni*) 等。

[0241] 在一些具体实施方案中,免疫调节剂可以包括HCV的E1和/或E2蛋白。在一些具体实施方案中,免疫调节剂可以包括HIV的gp120。在一些具体实施方案中,免疫调节剂可以包括流感病毒的红血球凝聚素和/或神经氨酸酶。在一些具体实施方案中,免疫调节剂可以包括肺炎链球菌的肺炎球菌多糖或家族1和/或家族2PspA或金黄色葡萄球菌的5型和8型荚膜多糖或识别粘附性基质分子的微生物表面成分。在一些具体实施方案中,免疫调节剂可以包括白色念珠菌的甘露聚糖或新型隐球酵母的隐球菌荚膜多糖。在一些具体实施方案

中,免疫调节剂可以包括恶性疟原虫的PfEMP1或其它在疟原虫感染的红血球上表达的源自寄生虫的抗原或刚地弓形虫的GRA7。

[0242] 本文中所述的任何抗原均可以是完全杀灭的生物体、肽、蛋白、糖蛋白、糖肽、蛋白聚糖、编码蛋白或肽的核酸、碳水化合物、小分子或其组合的形式。

[0243] 在一些具体实施方案中,免疫调节剂源自己已经存在至少一种疫苗的微生物。在一些具体实施方案中,免疫调节剂源自尚未开发疫苗的微生物。

[0244] 在一些具体实施方案中,疫苗纳米载体包含至少一种类型的免疫调节剂。在一些具体实施方案中,疫苗纳米载体的所有免疫调节剂彼此相同。在一些具体实施方案中,疫苗纳米载体包含许多不同的免疫调节剂。在一些具体实施方案中,疫苗纳米载体包含多个单独的免疫调节剂,它们均是相同的。在一些具体实施方案中,疫苗纳米载体只包含一种类型的免疫调节剂。在一些具体实施方案中,疫苗纳米载体只包含两种不同类型的免疫调节剂。在一些具体实施方案中,疫苗纳米载体包含两种以上不同类型的免疫调节剂。在一些具体实施方案中,疫苗纳米载体包含3、4、5、6、7、8、9、10或更多种不同类型的免疫调节剂。

[0245] 在一些具体实施方案中,疫苗纳米载体包含两种类型的免疫调节剂,二者源自同一个属的微生物。在一些具体实施方案中,疫苗纳米载体包含两种类型的免疫调节剂,二者源自同一个属和种的微生物。在一些具体实施方案中,疫苗纳米载体包含两种类型的免疫调节剂,二者源自同一个属、种和株的微生物。在一些具体实施方案中,疫苗纳米载体包含两种类型的免疫调节剂,二者源自同一个克隆的微生物。

[0246] 在一些具体实施方案中,疫苗纳米载体包含两种以上类型的免疫调节剂,其均源自同一个属的微生物。在一些具体实施方案中,疫苗纳米载体包含两种以上类型的免疫调节剂,其均源自同一个属和种的微生物。在一些具体实施方案中,疫苗纳米载体包含两种以上类型的免疫调节剂,其均源自同一个属、种和株的微生物。在一些具体实施方案中,疫苗纳米载体包含两种以上类型的免疫调节剂,其均源自同一个克隆的微生物。

[0247] 在一些具体实施方案中,疫苗纳米载体包含两种或更多种类型的免疫调节剂,其均源自同一个属的微生物。在一些具体实施方案中,疫苗纳米载体包含两种或更多种类型的免疫调节剂,其均源自同一个属和种的微生物。在一些具体实施方案中,疫苗纳米载体包含两种或更多种类型的免疫调节剂,其均源自同一个属、种和株的微生物。

[0248] 在一些具体实施方案中,疫苗纳米载体包含两种或更多种类型的免疫调节剂,其源自同一个种的不同株的微生物。在一些具体实施方案中,疫苗纳米载体包含两种或更多种类型的免疫调节剂,其源自同一个属的不同种的微生物。在其它具体实施方案中,疫苗纳米载体包含两种或更多种类型的免疫调节剂,每个源自不同属的微生物。

[0249] 在一些具体实施方案中,疫苗纳米载体包含一种类型的免疫调节剂,其同时刺激B细胞和T细胞中的免疫应答。在一些具体实施方案中,疫苗纳米载体包含两种类型的免疫调节剂,其中第一种免疫调节剂刺激B细胞,第二种类型的免疫调节剂刺激T细胞。在某些具体实施方案中,一种或两种试剂可以刺激T细胞和B细胞。在一些具体实施方案中,疫苗纳米载体包含两种以上类型的免疫调节剂,其中一种或多种类型的免疫调节剂刺激B细胞,并且一种或多种类型的免疫调节剂刺激T细胞。

[0250] 在一些具体实施方案中,疫苗纳米载体包含至少一种类型免疫调节剂,其与疫苗纳米载体的外表面结合。在一些具体实施方案中,结合是共价的。在一些具体实施方案中,

共价结合由一个或多个连接物介导。在一些具体实施方案中,结合是非共价的。在一些具体实施方案中,非共价结合由电荷相互作用、亲和性相互作用、金属配合、物理吸附、主客体相互作用、疏水性相互作用、 π - π 堆积相互作用、氢键结合相互作用、范德华力相互作用、磁性相互作用、静电相互作用、偶极-偶极相互作用和/或其组合所介导。对于免疫调节试剂如何与疫苗纳米载体结合的更详细描述,请参见以下标题为“疫苗纳米载体的产生”的部分。

[0251] 在一些具体实施方案中,疫苗纳米载体包括脂膜(例如,脂双层、脂单层等)。至少一种免疫调节剂可以与脂膜结合。在一些具体实施方案中,至少一种免疫调节剂包埋于脂膜内。一些具体实施方案中,至少一种免疫调节剂包埋在脂双层的腔内。在一些具体实施方案中,疫苗纳米载体包含至少一种与脂膜的内表面结合的免疫调节剂。在一些具体实施方案中,至少一种免疫调节剂包埋于疫苗纳米载体的脂膜内。在一些具体实施方案中,至少一种类型的免疫调节剂可以位于疫苗纳米载体的多个位点。例如,第一种类型的免疫调节剂可以嵌入脂膜内,第二种类型的免疫调节剂可以包埋于疫苗纳米载体的脂膜内。再举另一个实例,第一种类型的免疫调节剂可以与脂膜的外表面结合,第二种类型的免疫调节剂可以与疫苗纳米载体的脂膜的内表面结合。在一些具体实施方案中,第一种类型的免疫调节剂可以嵌于疫苗纳米载体的脂双层的腔内,并且脂双层可以包埋聚合基质,第二种类型的免疫调节剂可以分布在所述聚合基质中。在一些具体实施方案中,第一种类型的免疫调节剂和第二种类型的免疫调节剂可以位于疫苗纳米载体的相同位点(例如,它们都与疫苗纳米载体的外表面结合;它们都包埋于疫苗纳米载体内;等)。

[0252] 在一些具体实施方案中,疫苗纳米载体包括聚合物(例如,聚合物核心)。至少一种类型的免疫调节剂可以与聚合物结合。在一些具体实施方案中,至少一种类型的免疫调节剂嵌入聚合物内。在一些具体实施方案中,疫苗纳米载体包含至少一种类型与聚合物的内表面结合的免疫调节剂。在一些具体实施方案中,至少一种类型的免疫调节剂包埋于疫苗纳米载体的聚合物内。在一些具体实施方案中,至少一种类型的免疫调节剂可以位于疫苗纳米载体的多个位点。例如,第一种类型的免疫调节剂可以嵌于聚合物内,而第二种类型的免疫调节剂可以包埋于环绕疫苗纳米载体的聚合物核心的脂膜内。再举另一个实例,第一种类型的免疫调节剂可以与聚合物的外表面结合,而第二种类型的免疫调节剂可以嵌于疫苗纳米载体的聚合物内。

[0253] 本领域普通技术人员将认识到之前的实例只是多种免疫调节剂可以与疫苗纳米载体的不同位点结合的很多不同方式的代表。多种免疫调节剂可以位于疫苗纳米载体的任意位点的组合。另外,之前的实例也适用于纳米载体的其它试剂(例如,免疫刺激剂)。

[0254] 在一些具体实施方案中,免疫调节剂是T细胞抗原,并且T细胞抗原源自疫苗接种所要针对的相同病原体。在这种情况下,最初刺激少量的天然T细胞以产生病原体特异性效应和记忆T细胞。在一些具体实施方案中,抗原可以取自不相关的来源,例如对其已经存在广泛的免疫力的传染剂(例如,破伤风类毒素或流感病毒的常见成分,例如红血球凝聚素、神经氨酸苷酶或核蛋白)。在后一种情况下,疫苗利用针对以前的感染或疫苗接种而产生的记忆T细胞的存在。记忆细胞通常对抗原重新激发反应更加迅速并且有力,因此,可以提供帮助B细胞的优越来源。

[0255] 其它的T细胞抗原包括,但不限于,退行性疾病抗原、传染病抗原、癌症抗原、同种抗原、特异性疾病抗原、自体免疫疾病抗原、接触敏感剂、半抗原、异种抗原或代谢性疾病酶

或其酶产物。在一些具体实施方案中,传染病抗原是病毒抗原,其包括源自本文中描述的任何病毒的任何抗原。T细胞抗原的实例包括本文中别处提供的那些。

[0256] 在一些具体实施方案中,将T细胞抗原作为完整蛋白整合至纳米载体中。在一些具体实施方案中,将T细胞抗原作为修饰的蛋白整合至纳米载体中。在一些具体实施方案中,T细胞抗原作为突变的蛋白整合至纳米载体中。在一些具体实施方案中,T细胞抗原作为重叠肽的集合来提供,其可以增强抗原整合至II类MHC复合体中,从而进一步促进辅助应答。在一些具体实施方案中,T细胞抗原作为非重叠肽的集合来提供,其可以增强抗原整合至II类MHC复合体中,从而进一步促进辅助应答。在一些具体实施方案中,T细胞抗原作为编码抗原的核酸来提供。

[0257] 在一些具体实施方案中,本发明的纳米载体,如疫苗纳米载体,包含低于90重量%,低于75重量%、低于50重量%、低于40重量%、低于30重量%、低于20重量%、低于15重量%、低于10重量%、低于5重量%、低于1重量%或低于0.5重量%的免疫调节剂。

[0258] 靶向部分

[0259] 在一些具体实施方案中,本发明的纳米载体包含一个或多个靶向部分。在本发明的某些具体实施方案中,纳米载体与一个或多个靶向部分结合。靶向部分可以是与器官、组织、细胞、胞外基质和/或亚细胞位点相关成分结合的任何部分。在一些具体实施方案中,将这样的成分称为“目标”或“标记物”,这些在以下进一步详细讨论。

[0260] 靶向部分可以是核酸、多肽、糖蛋白、碳水化合物、脂质、小分子等。例如,靶向部分可以是结合细胞类型特异性标记物的核酸靶向部分(例如,适配子,Spiegelmer®,等)。通常,适配子是结合特定目标(如,多肽)的寡核苷酸(例如,DNA、RNA或其类似物或衍生物)。在一些具体实施方案中,靶向部分可以是细胞表面受体的天然产生的或合成的配体,例如生长因子、激素、LDL、转运蛋白等。靶向部分可以是抗体,该术语旨在包括抗体片段、抗体的特征性部分、单链抗体等。可以使用合成的结合蛋白,如Affibodies®、Nanobodies™、AdNectins™、Avimers™等。例如,可以通过使用如噬菌体展示这样的程序来鉴定肽靶向部分。已经使用这个广泛使用的技术来鉴定多种不同细胞类型的细胞特异性配体。

[0261] 根据本发明,靶向部分识别与特定器官、组织、细胞和/或亚细胞位点结合的一个或多个“目标”或“标记物”。在一些具体实施方案中,目标可以是与一种或一些细胞类型、与一种或一些疾病和/或与一种或一些发育时期独特地相关或主要相关的标记物。细胞类型特异性标记物通常在该细胞类型中比在参考细胞群体(其可以由例如含有大约相同数量细胞(例如,大约相同数目的细胞、大约相同体积的细胞、大约相同质量的细胞等)的混合物组成)中的表达水平高至少2倍。在一些具体实施方案中,细胞类型特异性标记物的存在水平比参考群体中的平均表达高至少3倍、至少4倍、至少5倍、至少6倍、至少7倍、至少8倍、至少9倍、至少10倍、至少50倍、至少100倍、至少500倍、至少1000倍、至少5000倍或至少10,000倍。对细胞类型特异性标记物的检测或测量使得可以将目标细胞类型从很多、大部分或所有其它细胞类型中区分开。

[0262] 在一些具体实施方案中,目标可以包含蛋白、碳水化合物、脂质和/或核酸。在某些具体实施方案中,目标可以包含蛋白和/或其特征性部分,如肿瘤标记物、整联蛋白、细胞表面受体、跨膜蛋白、胞间蛋白、离子通道、膜转运蛋白、酶、抗体、嵌合蛋白、糖蛋白等。在某些具体实施方案中,目标可以包含碳水化合物和/或其特征性部分,如糖蛋白、糖(例如,单糖、

二糖、多糖)、多糖包被(即,大部分真核细胞外表面上的富含碳水化合物的外周区)等。在某些具体实施方案中,目标可以包含脂质和/或其特征性部分,如油、脂肪酸、甘油酯、激素、类固醇(例如,胆固醇、叶酸)、维生素(例如,维生素E)、磷脂、鞘脂类、脂蛋白等。在某些具体实施方案中,目标可以包含核酸和/或其特征性部分,如DNA核酸;RNA核酸;修饰的DNA核酸;修饰的RNA核酸;包括DNA、RNA、修饰的DNA和修饰的RNA的任意组合的核酸;等。

[0263] 在一些具体实施方案中,靶向部分可以是来自VSV的表面糖蛋白分子。VSV包含单一表面分子VSV-G,其为钟样受体激动剂。VSV有效地靶向免疫系统的细胞,所以在一些具体实施方案中,疫苗纳米载体可以包含VSV表面分子,以将疫苗纳米载体靶向免疫系统的细胞。

[0264] 在一些具体实施方案中,目标是肿瘤标记物。在一些具体实施方案中,肿瘤标记物是在肿瘤细胞中但不在健康和/或正常细胞中表达的抗原。在一些具体实施方案中,肿瘤标记物是在肿瘤细胞中比在健康和/或正常细胞中更普遍存在的抗原。示例性肿瘤标记物包括但不限于gp100;Melan-A;酪氨酸激酶;PSMA;HER-2/neu;MUC-1;拓扑异构酶IIa;唾液酸-Tn;癌胚抗原;ErbB-3-结合蛋白-1; α -胎蛋白;和睾丸癌抗原MAGE-A1、MAGE A4和NY-ESO-1。

[0265] 在一些具体实施方案中,目标是APC标记物。在一些具体实施方案中,APC目标是在APC中但不在非APC中表达的抗原。在一些具体实施方案中,APC目标是在APC中比在非APC中更普遍存在的抗原。示例性APC标记物包括,但不限于,CD11c、CD11b、CD14、CD40、CD45、CD163、CD169(唾液酸粘附素)、DEC205(CD205)、II类MHC、DC-SIGN、CD21/CD35和Fc γ RI、PD-L2。在一些具体实施方案中,APC标记物包括任何DC和/或巨噬细胞标记物,其实例在本文中有描述。

[0266] 在某些具体实施方案中,目标是DC标记物。在一些具体实施方案中,DC目标是在DC中但不在非DC中表达的抗原。在一些具体实施方案中,DC目标是在DC中比在非DC中更普遍存在的抗原。示例性DC标记物在下面标题为“树突细胞”的部分列出并且包括本文在别处所提供的。

[0267] 在某些具体实施方案中,目标是T细胞标记物。在一些具体实施方案中,T细胞目标是在T细胞中但不在非T细胞中表达的抗原。在一些具体实施方案中,T细胞目标是在T细胞中比在非T细胞中更普遍存在的抗原。示例性T细胞标记物在下面标题为“T细胞靶向部分”的部分列出并且包括本文在别处所提供的。

[0268] 在一些具体实施方案中,目标优选在特定的细胞类型中表达。例如,APC、DC和/或T细胞中的APC、DC和/或T细胞目标的表达相对于参考群体来说在APC、DC和/或T细胞中为至少2倍、至少3倍、至少4倍、至少5倍、至少10倍、至少20倍、至少50倍、至少100倍、至少500倍或至少1000倍过表达。在一些具体实施方案中,参考群体可以包含非APC、FDC和/或T细胞。

[0269] 在一些具体实施方案中,激活的APC、DC和/或T细胞中的APC、DC和/或T细胞目标的表达相对于参考群体来说在激活的APC、DC和/或T细胞中为至少2倍、至少3倍、至少4倍、至少5倍、至少10倍、至少20倍、至少50倍、至少100倍、至少500倍或至少1000倍过表达。在一些具体实施方案中,参考群体可以包含非激活的APC、DC和/或T细胞。

[0270] 在一些具体实施方案中,本发明的纳米载体,如疫苗纳米载体,包含低于50重量%、低于40重量%、低于30重量%、低于20重量%、低于15重量%、低于10重量%、低于5重

量%、低于1重量%或低于0.5重量%的靶向部分。

[0271] 在一些具体实施方案中,靶向部分与纳米载体共价结合。在一些具体实施方案中,共价结合由连接物介导。在一些具体实施方案中,靶向部分与纳米载体不是共价结合。例如,靶向部分可以与本发明颗粒的聚合基质的表面结合、包埋于本发明颗粒的聚合基质中、由本发明颗粒的聚合基质环绕和/或分布遍及本发明颗粒的聚合基质中。例如,在一些具体实施方案中,靶向部分可以包埋于纳米载体的脂质体膜和/或聚合基质内、由纳米载体的脂质体膜和/或聚合基质环绕和/或分布遍及纳米载体的脂质体膜和/或聚合基质中。可替换地或另外地,靶向部分可以通过电荷相互作用、亲和性相互作用、金属配合、物理吸附、主客体相互作用、疏水性相互作用、 π - π 堆积相互作用、氢键结合相互作用、范德华力相互作用、磁性相互作用、静电相互作用、偶极-偶极相互作用和/或其组合与纳米载体结合。靶向部分与疫苗纳米载体的结合在以下标题为“疫苗纳米载体的产生”的部分中有更详细的描述。

[0272] 树突细胞

[0273] 树突细胞(DC)是一类骨髓白细胞;它们是在对T淋巴细胞的最有力的抗原呈递细胞之中。静止DC以非成熟的耐受态存在于很多组织中,包括淋巴结,即,它们递呈中等至高水平的肽-MHC复合物,但其中几乎没有或没有共刺激分子并且不分泌T细胞所需的用于分化成效应细胞的细胞因子。接受非成熟DC递呈的特异性抗原的T细胞开始增殖几天,但是然后它们通过细胞凋亡而死亡或变得对进一步激活无反应。接着发生的抗原特异性T细胞应答的消除赋予宿主针对该抗原的选择性耐受。与此相反,当DC获得抗原而它们暴露于成熟刺激物时,细胞迅速上调MHC和共刺激分子并分泌几种细胞因子。现在成熟的DC是效应T细胞和免疫记忆的有力诱导者。DC的成熟可以由很多信号诱导,如某些炎性细胞因子、DC表达的CD40的连接、TLR的激动剂(例如,细菌内毒素)、免疫复合物、激活的补体、坏死细胞、凋亡细胞、游离尿酸盐、尿素盐晶体和/或HMGB-1。

[0274] DEC-205(即,CD205)是表面表达的多功能血凝素,其在DC和淋巴组织中的胸腺上皮细胞中选择性表达。皮下注射嵌合 α -DEC-205单克隆抗体进行的体内实验已经表明:在小鼠和人类中,配体与DEC-205的结合诱导有效的内在化和后续的内吞材料的加工以在MHC分子中递呈(Hawiger等,2001,J.Exp.Med.194:769;Bonifaz等,2002,J.Exp.Med.,196:1627;和Bozzacco等,2007,Proc.Natl.Acad.Sci.,USA,104:1289;每篇均通过引入并入本文中)。在皮内或皮下注射时,嵌合抗体通过淋巴管转运至引流淋巴结,在引流淋巴结嵌合抗体与常驻的DC特异性结合,因此提供将抗原靶向静止DC的方式,而没有引起它们的成熟。靶向的DC然后将诱导T细胞对所递呈抗原的耐受性,而不是免疫力。然而,与诱导DC成熟的免疫刺激剂(例如 α -CD40或一种或多种DC表达的TLR的配体;在以下标题为“免疫刺激试剂”的部分有更进详细的讨论)一起靶向DEC-205时,疫苗则作为有力的免疫刺激剂优先促进细胞毒性和Th1型的效应T细胞应答。

[0275] 可以通过结合DC-205、CD11c、II类MHC、CD80、CD86、DC-SIGN、CD11b、BDCA-1、BDCA-2、BDCA-4、Siglec-H、CX3CR1和/或Langerin的部分来实现靶向DC。

[0276] 在一些具体实施方案中,可以通过与任何主要在DC上表达和/或存在的实体(即,DC标记物)(例如,蛋白、脂质、碳水化合物、小分子等)特异性结合的任何靶向部分来实现DC靶向。示例性DC标记物包括但不限于,CD1a(R4,T6,HTA-1);CD1b(R1);CD1c(M241,R7);CD1d(R3);CD1e(R2);CD11b(α M整联蛋白链,CR3,Mol,C3niR,Mac-1);CD11c(α X整联蛋白,p150,

95,AXb2);CDw117(乳糖基神经酰胺,LacCer);CD19(B4);CD33(gp67);CD 35(CR1,C3b/C4b受体);CD 36(GpIIIB,GPIV,PASIV);CD39(ATP脱氢酶,NTP脱氢酶-1);CD40(Bp50);CD45(LCA,T200,B220,LY5);CD45RA;CD45RB;CD45RC;CD45RO(UCHL-1);CD49d(VLA-4 α , α 4整联蛋白);CD49e(VLA-5 α , α 5整联蛋白);CD58(LFA-3);CD64(Fc γ RI);CD72(Ly-19.2,LY-32.2,LYb-2);CD73(Ecto-5'核苷酸酶);CD74(Ii,不变链);CD80(B7,B7-1,BB1);CD81(TAPA-1);CD83(HB15);CD85a(ILT5,LIR3,HL9);CD85d(ILT4,LIR2,MIR10);CD85j(ILT2,LIR1,MIR7);CD85k(ILT3,LIR5,HM18);CD86(B7-2/B70);CD88(C5aB);CD97(BL-KDD/F12);CD 101(IGSF2,P126,V7);CD116(GM-CSFR α);CD120a(TMFRI,p55);CD120b(TNFR II,p75,TNFR p80);CD123(IL-3R α);CD139;CD148(HPTP- η ,p260,DEP-1);CD 150(SLAM,IPO-3);CD 156b(TACE,ADAM 17,cSVP);CD 157(Mo5,BST-1);CD 167a(DDR1,trkE,cak);CD168(RHAMM,IHABP,HMMR);CD169(唾液酸粘附素,Siglec-1);CD170(Siglec-5);CD171(L1CAM,NILE);CD172(SIRP-1 α ,MyD-1);CD172b(SIRP β);CD180(RP105,Bgp95,LY64);CD184(CXCR4,NPY3R);CD193(CCR3);CD196(CCR6);CD197(CCR7(wsCDw197));CDw197(CCR7,EBI1,BLR2);CD200(OX2);CD205(DEC-205);CD206(MMR);CD207(Langerin);CD208(DC-LAMP);CD209(DC-SIGN);CDw218a(IL18R α);CDw218b(IL8R β);CD227(MUC1,PUM,PEM,EMA);CD230(朊病毒蛋白(PrP));CD252(OX40L,TNF(配体)超家族,成员4);CD258(LIGHT,TNF(配体)超家族,成员14);CD265(TRANSE-R,TNF-R超家族,成员11a);CD271(NGFR,p75,TNFR超家族,成员16);CD273(B7DC,PDL2);CD274(B7H1,PDL1);CD275(B7H2,ICOSL);CD276(B7H3);CD277(BT3.1,B7家族:嗜乳脂蛋白3);CD283(TLR3,钟样受体3);CD289(TLR9,钟样受体9);CD295(LEPR);CD298(ATP1B3,Na⁺K⁺ATP酶 β 3亚基);CD300a(CMRF-35H);CD300c(CMRF-35A);CD301(MGL1,CLECSF14);CD302(DCL1);CD303(BDCA2);CD304(BDCA4);CD312(EMR2);CD317(BST2);CD319(CRACC,SLAMF7);CD320(8D6);和CD68(gp110,巨噬涎蛋白);II类MHC;BDCA-1;Siglec-H;其中括号中所列名称代表别名。

[0277] T细胞靶向部分

[0278] 在一些具体实施方案中,可以通过特异性结合任何主要在T细胞上表达和/或存在的实体(即,T细胞标记物)(例如蛋白、脂质、碳水化合物、小分子等)的任何靶向部分来实现T细胞靶向。示例性T细胞标记物包括,但不限于,CD2(E-玫瑰花结R,T11,LFA-2);CD3(T3);CD3 α ;CD3 β ;CD3 ϵ ;CD4(L3T4,W3/25,T4);CD5(T1,Tp67,Leu-1,LY-1);CD6(T12);CD7(gp40,Leu 9);CD8a(Leu2,T8,Lyt2,3);CD8b(CD8,Leu2,Lyt3);CD11a(LFA-1 α , α 整联蛋白链);CD11b(α M整联蛋白链,CR3,Mol,C3niR,Mac-1);CD11c(α X整联蛋白,p150,95,AXb2);CD15s(唾液酰Lewis X);CD15u(3'硫代Lewis X);CD15su(6硫代-唾液酰Lewis X);CD16b(Fc γ R111b);CDw17(乳糖基神经酰胺,LacCer);CD 18(整联蛋白 β 2CD11a,b,c β -亚基);CD26(DPP IV外酶,ADA结合蛋白);CD27(T14,S152);CD28(Tp44,T44);CD29(血小板GP11a, β -1整联蛋白,GP);CD31(PECAM-1,Endocam);CD35(CR1,C3b/C4b受体);CD37(gp52-40);CD38(ADP-核糖基/环化酶,T10);CD43(涎福林(Sialophorin),白细胞唾液素(Leukosialin));CD44(ECMR II,H-CAM,Pgp-1);CD45(LCA,T200,B220,LY5);CD45RA(p56lck,p59fyn,Src激酶);CD45RB(p56lck,p59fyn,Src激酶);CD45RC(p56lck,p59fyn,Src激酶);CD46(MCP);CD47(gp42,IAP,OA3,Neurophilin);CD47R(MEM-133);CD48(Blast-1,Hulym3,BCM-1,OX-45);CD49c(VLA-3 α , α 3整联蛋白);CD49d(VLA-4 α , α 4整联蛋白);CD49e(VLA-5 α , α 5整联蛋

白);CD49f (VLA-6 α , α 6整联蛋白gp1c);CD50 (ICAM-3);CD52 (CAMPATH-1,HES);CD53 (OX-44);CD54 (ICAM-1);CD55 (DAF);CD56 (Leu-19,NKH-1,NCAM);CD57 (HNK1,Leu-7);CD58 (LFA-3);CD59 (1F5Ag,H19,保护素 (Protectin),MAC1F,MIRL,P-18);CD60a (GD3);CD60b (9-O-乙酰基GD3);CD60c (7-O乙酰基GD3);CD62L (L-选择素,LAM-1,LECAM-1,MEL-14,Leu8,TQ1);CD73 (Ecto-5'-核苷酸酶);CD75 (唾液酸掩蔽的乳糖胺);CD75S (α 2,6唾液酸化的乳糖胺);CD81 (TAPA-1);CD82 (4F9,C33,IA-4,KAI1,R2);CD84 (P75,GR6);CD85a (ILT5,LIR3,HL9);CD85j (ILT2,LIR1,MIR7);CD87 (uPAR);CDw92 (p70);CD94 (Kp43);CD95 (APO-1,FAS,TNFRSF6);CD98 (4F2,FRP-1,RL-388);CD99 (MIC2,E2);CD99R (CD99Mab限制的);CD100 (SEMA4D);CD 102 (ICAM-2);CD108 (SEMA7A,JMH血型组抗原);CDw119 (IFN γ R,IFN γ Ra);CD120a (TNFRI,p55);CD120b (TNFRII,p75,TNFR p80);CD121a (1型IL-1R);CD121b (2型IL-1R);CD122 (IL2R β);CD124 (IL-4R α);CD 126 (IL-6R α);CD127 (p90,IL-7R,IL-7R α);CD128a (IL-8R α ,CXCR1,(暂时重命名为CD181));CD128b (IL-8R β ,CXCR2,(暂时重命名为CD182));CD130 (gp130);CD132 (常见的 γ 链,IL-2R γ);CD 147 (Basigin,EMMPRIN,M6,OX47);CD 148 (HPTP- η ,p260,DEP-1);CD150 (SLAM,IPO-3);CD153 (CD30L,TNSF8);CD156b (TACE,ADAM17,cSVP);CD158a (KIR2DL1,p58.1);CD158b1 (KIR2DL2,p58.2);CD158b2 (KIR2DL3,p58.3);CD158c (KIR2DS6,KIRX);CD158|e1/e2 (KIR3DL1/S1,p70);CD159F (KIR2DL5);CD158g (KIR2DS5);CD158h (KIR2DS1,p50.1);CD158i (KIR2DS4,p50.3);CD158j (KIR2DS2,p50.2);CD158k (KIR3DL2,p140);CD159a (NKG2A);CD160 (BY55,NK1,NK28);CD161 (NKR,NKRP1A);CD162 (PSGL-1);CD164 (MGC-24,MUC-24);CD171 (L1CAM,NILE);CD172g (SIRP γ);CD181 (CXCR1,(以前称作CD128a));CD182 (CXCR2,(以前称作CD128b));CD183 (CXCR3,GPR9);CD184 (CXCR4,NPY3R);CD185 (CXCR5);CD186 (CXCR6);CD191 (CCR1);CD192 (CCR2);CD193 (CCR3);CD195 (CCR5);CD196 (CCR6);CD197 (CCR7 (以前是CDw197));CDw197 (CCR7,EBI1,BLR2);CDw198 (CCR8);CDw199 (CCR9);CD205 (DEC-205);CDw210 (CK);CDw217 (CK);CDw218a (IL18R α);CDw218b (IL18R β);CD220 (胰岛素R);CD221 (IGF1R);CD222 (M6P-R,IGFII-R);CD223 (LAG-3);CD224 (GGT);CD225 (Leu13);CD226 (DNAM-1,PTA1);CD229 (Ly9);CD230 (朊病毒蛋白 (PrP));CD244 (2B4,P38,NAIL);CD245 (p220/240);CD247 (CD3 ζ 链);CD261 (TRAIL-R1,TNF-R超家族,成员10a);CD262 (TRAIL-R2,TNF-R超家族,成员10b);CD263 (TRAIL-R3,TNF-R超家族,成员10c);CD264 (TRAIL-R4,TNF-R超家族,成员10d);CD265 (TRANCE-R,TNF-R超家族,成员11a);CD268 (BAFFR,TNF-R超家族,成员13C);CD272 (BTLA);CD275 (B7H2,ICOSL);CD277 (BT3.1,B7家族:嗜乳脂蛋白3);CD294 (CRTH2,PGRD2,G蛋白偶联受体44);CD295 (LEPR);CD296 (ART1,ADP-核糖转移酶1);CD298 (ATP1B3,Na K ATP酶 β 3亚基);CD300a (CMRF-35H);CD300c (CMRF-35A);CD305 (LAIR1);CD314 (NKG2D);CD316 (EW12);CD317 (BST2);CD319 (CRACC,SLAMF7);CD321 (JAM1);CD322 (JAM2);CDw328 (Siglec7);和CD68 (gp110,巨噬涎蛋白);其中括号中所列名称代表别名。

[0279] 在一些具体实施方案中,可以通过结合(如特异性结合)激活时主要在T细胞上表达和/或存在的任何实体(即,激活的T细胞目标)(例如,蛋白、脂质、碳水化合物、小分子等)的任何靶向部分来实现T细胞靶向。示例性的激活T细胞的靶向部分包括,但不限于,CD1a (RA,T6,HTA-1);CD1b (R1);Cd1c (M241,R7);CD1d (R3);CD9 (p24,DRAP-1,MRP-1);CD25 (Tac 抗原,IL-2R α ,p55);CD30 (Ber-H2,Ki-1);CD39 (ATP脱氢酶,NTP脱氢酶-1);CD45RO (UCHL-

1) ; CD49a (VLA-1 α , α 1整合素) ; CD49b (VLA-2 α , gp1a, α 2整联蛋白) ; CD69 (AIM, EA 1, MLR3, gp34/28, VEA) ; CD70 (Ki-24, CD27配体) ; CD74 (Ii, 不变链) ; CD80 (B7, B7-1, BB1) ; CD86 (B7-2/B70) ; CD96 (TACTILE) ; CD97 (BL-KDD/F12) ; CD101 (IGSF2, P126, V7) ; CD103 (HML-1, 整联蛋白 α E, ITGAE) ; CD107a (LAMP-1) ; CD107b (LAMP-2) ; CD109 (8A3, E123 7D1) ; CD134 (OX40, TNFRSF4) ; CDw137 (4-1BB, ILA) ; CD146 (Muc 18, S-endo, MCAM, Me1-CAM) ; CD152 (CTLA-4) ; CD154 (CD40L, gp39, TRAP-1, T-BAM) ; CD166 (ALCAM, KG-CAM, SC-1, BEN, DM-GRASP) ; CD178 (Fas配体) ; CD227 (MUC1, PUM, PEM, EMA) ; CD253 (TRAIL, TNF (配体) 超家族, 成员10) ; CD254 (TRANCE, RANKL, TNF (配体) 超家族, 成员11) ; CD258 (LIGHT, TMF (配体) 超家族, 成员14) ; CD267 (TACI, TNF-R超家族, 成员13B) ; CD273 (B7DC, PDL2) ; CD274 (B7H1, PDL1) ; CD278 (ICOS) ; CD279 (PD1) ; 和CD312 (EMR2) ; 其中括号中所列名称代表别名。

[0280] 靶向部分的分子特征

[0281] 核酸靶向部分。如本文中所用, “核酸靶向部分”是选择性地结合目标的核酸。在一些具体实施方案中, 核酸靶向部分是核酸适配子。适配子通常是与特定器官、组织、细胞、细胞外基质成分和/或亚细胞位点相关的特异性目标结构结合的多核苷酸。一般地, 适配子的靶向功能是基于适配子的三维结构。在一些具体实施方案中, 适配子与目标的结合通常是由适配子和目标的二维和/或三维结构之间的相互作用所介导。在一些具体实施方案中, 适配子与目标的结合不仅仅是基于适配子的初级序列, 还基于适配子和/或目标的三维结构。在一些具体实施方案中, 适配子通过互补性Watson-Crick碱基配对与它们的目标结合, 这种结合被打乱碱基配对的结构(例如, 发夹环)所打乱。

[0282] 在一些具体实施方案中, 核酸靶向部分是Spiegelmer®。通常, Spiegelmer®是高亲和性的L-对映体的寡核苷酸配体, 与D-寡核苷酸相比, 其显示出对酶降解的高度抗性。在一些具体实施方案中, Spiegelmer®按照适配子的设计和使用来进行设计和使用。

[0283] 本领域普通技术人员将认识到, 根据本发明, 可以使用本文中所述的任何能够特异性结合目标的核酸。

[0284] 本发明的核酸(包括核酸靶向部分和/或待传送的功能性RNA, 例如RNAi试剂、核酶、tRNA等, 以下更详细描述)可以根据任何可获得的技术来制备, 包括但不限于, 化学合成、酶合成、较长前体的酶或化学分裂等。合成RNA的方法在本领域是已知的(参见, 例如Gait, M.J. (编辑) Oligonucleotide synthesis: a practical approach, Oxford [Oxfordshire], Washington, DC: IRL Press, 1984; 和Herdewijn, P. (编辑) Oligonucleotide synthesis: methods and applications, Methods in molecular biology, v. 288 (Clifton, N.J.) Totowa, N.J.: Humana Press, 2005; 两篇均通过引用并入本文中)。

[0285] 形成核酸靶向部分的核酸可以包含天然产生的核苷、修饰的核苷、天然产生的在一个或多个核苷之间插入烃连接物(例如, 亚烷基)或聚醚连接物(例如PEG连接物)的核苷、在一个或多个核苷之间插入烃或PEG连接物的修饰核苷, 或其组合。在一些具体实施方案中, 核酸靶向部分的核苷酸或修饰核苷酸可以被烃连接物或聚醚连接物替换, 只要核酸靶向部分的结合亲和性和选择性不被该替换实质性降低(例如, 目标的核酸靶向部分的解离常数应该不高于约 1×10^{-3} M)。

[0286] 本领域技术人员将领会到: 根据本发明的核酸可以包含完全是在天然产生的核酸

中发现的核苷酸类型,或者替代地可以包括一个或多个核苷酸类似物或具有与天然产生的核酸不同的结构。U.S. 专利6,403,779;6,399,754;6,225,460;6,127,533;6,031,086;6,005,087;5,977,089及其中的参考文献公开了可以使用的各种特异性核苷酸类似物和修饰。参见Crooke,S.(编辑)Antisense Drug Technology:Principles,Strategies,and Applications(第1版),Marcel Dekker;ISBN:0824705661,第1版(2001);通过引用并入本文中;以及其中的参考文献。例如,2'-修饰包括卤素、烷氧基和烯丙氧基基团。在一些具体实施方案中,2'-OH基团被选自H、OR、R、卤素、SH、SR₁、NH₂、NHR、NR₂或CN的基团取代,其中R是C₁-C₆烷基、烯基或炔基,并且卤素是F、Cl、Br或I。修饰的连接实例包括硫代磷酸酯和5'-N-亚磷酰胺连接。

[0287] 根据本发明可以使用包含各种不同的核苷酸类似物、修饰的骨架或非天然产生的核苷间连接的核酸。本发明的核酸可以包括天然核苷(即,腺苷、胸苷、鸟苷、胞苷、尿苷、脱氧腺苷、脱氧胸苷、脱氧鸟苷和脱氧胞苷)或修饰的核苷。修饰的核苷的实例包括碱基修饰的核苷(例如,阿糖胞苷、肌苷、异鸟苷、水粉蕈素、假尿苷、2,6-二氨基嘌呤、2-氨基嘌呤、2-硫胸苷、3-脱氮-5-氮胞苷、2'-脱氧尿苷、3-硝基吡咯、4-甲基吡咯、4-硫尿苷、4-硫胸苷、2-氨基腺苷、2-硫胸苷、2-硫尿苷、5-溴胞苷、5-碘尿苷、肌苷、6-氮尿苷、6-氯嘌呤、7-脱氮腺苷、7-脱氮鸟苷、8-氮腺苷、8-叠氮腺苷、苯并咪唑、M1-甲基腺苷、吡咯并嘧啶、2-氨基-6-氯嘌呤、3-甲基腺苷、5-丙炔基胞苷、5-丙炔基尿苷、5-溴尿苷、5-氟尿苷、5-甲基胞苷、7-脱氮腺苷、7-脱氮鸟苷、8-加氧腺苷、8-加氧鸟苷、O(6)-甲基鸟苷和2-硫胞苷),化学或生物修饰的碱基(例如,甲基化的碱基),修饰的糖(例如,2'-氟核糖、2'-氨基核糖、2'-叠氮核糖、2'-O-甲基核糖、L-对映体核苷阿拉伯糖和己糖),修饰的磷酸酯基团(例如,硫代磷酸酯和5'-N-亚磷酰胺连接)及其组合。用于核酸的化学合成的天然和修饰的核苷酸单体可以容易地获得。在一些情况下,包含这样的修饰的核酸相对于仅由天然核苷酸组成的核酸表现出提高的特性。在一些具体实施方案中,本文中所述的核酸修饰用于减少和/或防止核酸酶(例如,外切核酸酶、内切核酸酶等)的消化。例如,可以通过在一条链或两条链的3'端加入核苷酸类似物以减少消化,从而稳定核酸的结构。

[0288] 修饰的核酸不必在分子的全长上统一修饰。不同的核苷酸修饰和/或骨架结构可以存在于核酸的不同位置。本领域普通技术人员将领会到:核苷酸类似物或其它修饰可以位于核酸的任何位置,使得核酸的功能实质上不受影响。仅举一例,修饰可以位于适配子的任何位置,使得适配子特异性结合适配子目标的能力实质上不受影响。修饰区域可以位于一条链或两条链的5'-端和/或3'-端。例如,可以使用其中两条链的任一条链的5'-和/或3'-端的大约1个至大约5个残基是核苷酸类似物和/或具有骨架修饰的修饰适配子。修饰可以是5'或3'端修饰。核酸链可以包含至少50%未修饰的核苷酸,至少80%未修饰的核苷酸,至少90%未修饰的核苷酸或100%未修饰的核苷酸。

[0289] 根据本发明的核酸可以包含例如糖、核苷或核苷间连接的修饰,如在U.S. 专利公开2003/0175950、2004/0192626、2004/0092470、2005/0020525和2005/0032733中描述的那些。本发明包括使用具有其中所述的任意一种或多种修饰的任意核酸。例如,已经报道许多末端偶联物,例如,脂质,如胆固醇、石胆酸、月桂酸或长烷基支链,能够提高细胞摄入。可以使用例如本领域已知的任何合适的试验测试类似物和修饰,例如,来选择那些产生提高的治疗剂的传送,提高的适配子与适配子目标的特异性结合等。在一些具体实施方案中,根据

本发明的核酸可以包含一个或多个非天然核苷连接。在一些具体实施方案中,将适配子的3'-端、5'-端或3'-端和5'-端的一个或多个内部核苷酸颠倒以产生连接,例如3'-3'连接或5'-5'连接。

[0290] 在一些具体实施方案中,根据本发明的核酸是非合成的,而是从其天然环境中分离的天然产生的物质。

[0291] 小分子靶向部分。在一些具体实施方案中,根据本发明的靶向部分可以是小分子。在特定的具体实施方案中,小分子为低于约2000克/摩尔的大小。在一些具体实施方案中,小分子为低于约1500克/摩尔或低于约1000克/摩尔。在一些具体实施方案中,小分子为低于约800克/摩尔或低于约500克/摩尔。

[0292] 在特定的具体实施方案中,小分子是寡聚体。在一些具体实施方案中,小分子是非寡聚体。在一些具体实施方案中,小分子是天然产物或具有基于天然产物的完整结构的部分结构(例如,亚结构)的天然产物样化合物。在特定的具体实施方案中,小分子是合成产物。在一些具体实施方案中,小分子可以来自化学文库。在特定的具体实施方案中,小分子可以来自制药公司的历史文库。在一些具体实施方案中,小分子是美国食品与药品管理局批准的药物,如在美国联邦法规(C.F.R.)中所提供的。

[0293] 本领域普通技术人员将领会到根据本发明可以使用特异性结合本文中所述的所需目标的任何小分子。

[0294] 蛋白靶向部分。在一些具体实施方案中,根据本发明的靶向部分可以是蛋白或肽。在特定的具体实施方案中,肽大小的范围为约5至约100、约5至约50、约10至约75、约15至约50或约20至约25个氨基酸。在一些具体实施方案中,肽序列可以基于蛋白的序列。在一些具体实施方案中,肽序列可以是氨基酸的随机排列。

[0295] 术语“多肽”和“肽”在本文中可互换使用,“肽”通常是指长度为低于约100个氨基酸的多肽。多肽可以含有L-氨基酸、D-氨基酸或二者,并且可以含有任何的氨基酸修饰或本领域中已知的类似物。有用的修饰包括例如末端乙酰化、酰胺化、脂化、磷酸化、糖基化、酰基化、法呢基化、硫酸化等。

[0296] 根据本发明可以用作靶向部分的示例性蛋白包括但不限于抗体、受体、细胞因子、肽激素、糖蛋白、糖肽、蛋白聚糖、源自组合文库的蛋白(例如,AvimersTM、Affibodies[®]等),及其特征性部分。可以使用合成的结合蛋白,如NanobodiesTM、AdNectinsTM等。在一些具体实施方案中,蛋白靶向部分可以是肽。

[0297] 本领域普通技术人员将体会到根据本发明可以使用特异性结合本文中所述的所需目标的任何蛋白和/或肽。

[0298] 在一些具体实施方案中,靶向部分可以是抗体和/或其特征性部分。术语“抗体”是指任何免疫球蛋白,不论是天然的或完全或部分合成产生的,还指其衍生物及其特征性部分。抗体可以是单克隆或多克隆的。抗体可以是任何免疫球蛋白类别的成员,包括任何人类类别:IgG、IgM、IgA、IgD和IgE。

[0299] 如本文中所用的,抗体片段(即,抗体的特征性部分)是指小于全长的抗体的任何衍生物。在一些具体实施方案中,抗体片段保持全长抗体的特异性结合能力的至少显著部分。这样的抗体片段的实例包括但不限于Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、Fv、dsFv二抗和Fd片段。抗体片段还包括但不限于Fc片段。

[0300] 抗体片段可以通过任何方式产生。例如,抗体片段可以通过完整抗体的片段化而酶或化学产生和/或其可以通过从编码部分抗体序列的基因经重组产生。可替换地或另外地,抗体片段可以全部或部分合成产生。抗体片段可任选包含单链抗体片段。可替换地或另外地,抗体片段可以包含多条链,例如通过二硫键连接在一起。抗体片段任选包含多分子复合体。功能性抗体片段通常包含至少约50个氨基酸,更通常将包含至少约200个氨基酸。

[0301] 在一些具体实施方案中,抗体可以包括嵌合(例如,“人源化”)和单链(重组)抗体。在一些具体实施方案中,抗体可以具有减少的效应功能和/或双特异性分子。在一些具体实施方案中,抗体可以包括通过Fab表达文库产生的片段。

[0302] 单链Fv(scFv)是仅由通过多肽连接物共价互相结合的可变轻链(VL)和可变重链(VH)组成的重组抗体片段。VL或VH可以包含NH₂-末端结构域。多肽连接物的长度和组成可以变化,只要两个可变结构域能够无显著空间位阻地桥连。通常,连接物主要包含一段甘氨酸和丝氨酸残基,其中散布一些谷氨酸或赖氨酸残基以增加溶解性。

[0303] 二抗是二聚的scFv。二抗通常具有比大部分scFv更短的肽连接物,并且它们经常显示出作为二聚体结合的偏爱。

[0304] Fv片段是由通过非共价相互作用结合在一起的一个VH和一个VL结构域组成的抗体片段。如本文所用的术语“dsFv”是指具有以稳定VH-VL对的工程化分子间二硫键的Fv。

[0305] F(ab')₂片段是实质上等同于通过胃蛋白酶在pH 4.0-4.5消化免疫球蛋白而获得的抗体片段。片段可以通过重组产生。

[0306] Fab'片段是实质上等同于通过连接F(ab')₂片段中的两个重链片段的二硫桥的还原而获得的抗体片段。Fab'片段可以通过重组产生。

[0307] Fab片段是实质上等同于通过酶(例如,木瓜蛋白酶)消化免疫球蛋白而获得的抗体片段。Fab片段可以通过重组产生。Fab片段的重链片段是Fd片。

[0308] 碳水化合物靶向部分。在一些具体实施方案中,根据本发明的靶向部分可以包含碳水化合物。在一些具体实施方案中,碳水化合物可以是包含由糖苷键连接的单糖(或其衍生物)的多糖,如本领域所知。这样的糖包括,但不限于,葡萄糖、果糖、半乳糖、核糖、乳糖、蔗糖、麦芽糖、海藻糖、纤维二糖、甘露糖、木糖、阿拉伯糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、甘露糖醛酸、葡萄糖胺、半乳糖胺和神经氨酸。在一些具体实施方案中,碳水化合物可以是普鲁兰多糖、纤维素、微晶纤维素、羟丙基甲基纤维素、羟基纤维素、甲基纤维素、右旋糖苷、环右旋糖苷、糖原、淀粉、羟乙基淀粉、卡拉胶、糖基、直链淀粉、壳聚糖、N,O-羟甲基壳聚糖、海藻胶和海藻酸、淀粉、几丁质、肝素、魔芋、葡甘聚糖、石耳素、肝素、透明质酸、卡德兰和黄原胶中的一种或多种。

[0309] 在一些具体实施方案中,碳水化合物可以是酰胺化、羧基化和/或硫酸化的。在一些具体实施方案中,亲水性多糖可以通过引入大量的侧链疏水性基团而被修饰成疏水性的。在一些具体实施方案中,疏水性碳水化合物可以包括醋酸纤维素、醋酸普鲁兰多糖、醋酸魔芋、醋酸直链淀粉和醋酸右旋糖苷。

[0310] 本领域普通技术人员将领会到根据本发明可以使用特异性结合本文中所述的所需目标的任何碳水化合物。

[0311] 脂质靶向部分。在一些具体实施方案中,根据本发明的靶向部分可以包含一个或多个脂肪酸基团或其盐。在一些具体实施方案中,脂肪酸基团可以包含可消化的长链(例

如, C₈-C₅₀)、取代或非取代的烃。在一些具体实施方案中, 脂肪酸基团可以是C₁₀-C₂₀脂肪酸或其盐。在一些具体实施方案中, 脂肪酸基团可以是C₁₅-C₂₀脂肪酸或其盐。在一些具体实施方案中, 脂肪酸基团可以是C₁₅-C₂₅脂肪酸或其盐。在一些具体实施方案中, 脂肪酸基团可以是不饱和的。在一些具体实施方案中, 脂肪酸基团可以是单不饱和的。在一些具体实施方案中, 脂肪酸基团可以是多不饱和的。在一些具体实施方案中, 不饱和脂肪酸基团的双键可以是顺式构象。在一些具体实施方案中, 不饱和脂肪酸的双键可以是反式构象。

[0312] 在一些具体实施方案中, 脂肪酸基团可以是丁酸、己酸、辛酸、癸酸、月桂酸、肉豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸、花生酸、山嵛酸或二十四酸中的一种或多种。在一些具体实施方案中, 脂肪酸基团可以是棕榈油酸、油酸、十八碳烯酸、亚油酸、 α -亚油酸、 γ -亚油酸、花生四烯酸、鳕烯酸、花生四烯酸、二十碳五烯酸、二十二碳六烯酸或芥子酸中的一种或多种。

[0313] 本领域普通技术人员将领会到根据本发明可以使用特异性结合本文中所述的所需目标的任何脂肪酸基团。

[0314] 新型靶向部分

[0315] 任何新型靶向部分可以应用于根据本发明的疫苗纳米载体中。本领域已知的任何方法可以用于设计、鉴别和/或分离新型靶向部分。例如, 利用分子库的标准技术和体外结合试验可以用于鉴定新型靶向部分。

[0316] 核酸靶向部分(例如, 适配子、Spiegelmers®)可以使用任何可获得的方法来设计和/或鉴别。在一些具体实施方案中, 通过鉴别来自核酸候选混合物的核酸靶向部分而设计和/或鉴别核酸靶向部分。指数级富集的配体系统进化(SELEX)或其变化形式是常用的从核酸候选混合物中鉴别与目标结合的核酸靶向部分的方法(参见例如美国专利6,482,594;6,458,543;6,458,539;6,376,190;6,344,318;6,242,246;6,184,364;6,001,577;5,958,691;5,874,218;5,853,984;5,843,732;5,843,653;5,817,785;5,789,163;5,763,177;5,696,249;5,660,985;5,595,877;5,567,588和5,270,163;每篇均通过引用并入本文中)。可替换地或另外地, Polyplex In Vivo Combinatorial Optimization (PICO) 是一种用于在体内和/或体外从核酸候选混合物中鉴别与目标结合的核酸靶向部分(例如, 适配子)的方法, 在发明名称为“System for Screening Particles”, 2006年12月15日提交的同时待决的PCT申请US06/47975中有描述, 通过引用并入本文中。

[0317] 免疫刺激剂

[0318] 在一些具体实施方案中, 纳米载体可以转运一种或多种帮助刺激免疫应答的免疫刺激剂。在一些具体实施方案中, 免疫刺激剂通过激活APC以增强它们的免疫刺激能力而增强免疫应答。在一些具体实施方案中, 免疫刺激剂通过扩大对特异性抗原的淋巴细胞应答而增强免疫应答。在一些具体实施方案中, 免疫刺激剂通过诱导介质的局部释放(如来自多种细胞类型的细胞因子)而增强免疫应答。在一些具体实施方案中, 免疫刺激剂抑制或重引导免疫应答。在一些具体实施方案中, 免疫刺激剂诱导调节性T细胞。

[0319] 在一些具体实施方案中, 疫苗纳米载体的所有免疫刺激剂彼此相同。在一些具体实施方案中, 疫苗纳米载体包含许多不同类型的免疫刺激剂。在一些具体实施方案中, 疫苗纳米载体包含多个单独的免疫刺激剂, 它们彼此都相同。在一些具体实施方案中, 疫苗纳米载体只包含一种类型免疫刺激剂。在一些具体实施方案中, 疫苗纳米载体只包含两种不同类型的免疫刺激剂。在一些具体实施方案中, 疫苗纳米载体包含多于两种的不同类型的免

疫刺激剂。

[0320] 在一些具体实施方案中,疫苗纳米载体包含同时刺激B细胞和T细胞的单一类型的免疫刺激剂。在一些具体实施方案中,疫苗纳米载体包含两种类型的免疫刺激剂,其中第一种类型免疫刺激剂刺激B细胞,第二种类型免疫刺激剂刺激T细胞。在一些具体实施方案中,疫苗纳米载体包含多于两种类型的免疫刺激剂,其中一种或多种类型的免疫刺激剂刺激B细胞,一种或多种类型的免疫刺激剂刺激T细胞。

[0321] 在一些具体实施方案中,疫苗纳米载体包含至少一种类型的与疫苗纳米载体的外表面结合的免疫刺激剂。在一些具体实施方案中,结合是共价的。在一些具体实施方案中,共价结合由一个或多个连接物介导。在一些具体实施方案中,结合是非共价的。在一些具体实施方案中,非共价结合由电荷相互作用、亲和性相互作用、金属配合、物理吸附、主客体相互作用、疏水性相互作用、 π - π 堆积相互作用、氢键结合相互作用、范德华力相互作用、磁性相互作用、静电相互作用、偶极-偶极相互作用和/或其组合所介导。免疫刺激剂与疫苗纳米载体的结合在以下标题为“疫苗纳米载体的产生”的部分中有更详细的描述。

[0322] 在一些具体实施方案中,疫苗纳米载体包含脂膜(例如,脂双层、脂单层等),其中至少一种类型的免疫刺激剂可以与脂膜结合。在一些具体实施方案中,至少一种类型的免疫刺激剂嵌入脂膜内。在一些具体实施方案中,至少一种类型的免疫刺激剂嵌入脂双层的腔内。在一些具体实施方案中,疫苗纳米载体包含至少一种类型的与脂膜的内表面结合的免疫刺激剂。在一些具体实施方案中,至少一种类型的免疫刺激剂包埋于疫苗纳米载体的脂膜内。在一些具体实施方案中,至少一种类型的免疫刺激剂可以位于疫苗纳米载体的多个位点。例如,第一种类型的免疫刺激剂可以嵌于脂膜内,第二种类型的免疫刺激剂可以包埋于疫苗纳米载体的脂膜内。再举另一个实例,第一种类型的免疫刺激剂可以与脂膜的外表面结合,第二种类型的免疫刺激剂可以与疫苗纳米载体的脂膜的内表面结合。在一些具体实施方案中,第一种类型的免疫刺激剂可以嵌于疫苗纳米载体的脂双层的腔内,脂双层中可以包埋聚合物基质,第二种类型的免疫刺激剂可以分布在所述聚合物基质中。在一些具体实施方案中,第一种类型的免疫刺激剂和第二种类型的免疫刺激剂可以位于疫苗纳米载体的相同位点(例如,它们都与疫苗纳米载体的外表面结合;它们都包埋于疫苗纳米载体内,等)。本领域普通技术人员将认识到之前的实例只是多种免疫刺激剂可以与疫苗纳米载体的不同位点结合的很多不同方式的代表。多种免疫刺激剂可以位于疫苗纳米载体的任意位点的组合。

[0323] 在某些具体实施方案中,免疫刺激剂可以是白细胞介素、干扰素、细胞因子等。在特定的具体实施方案中,免疫刺激剂可以是钟样受体(TLR)的天然或合成的激动剂。在特定的具体实施方案中,疫苗纳米载体引入钟样受体(TLR)-7的配体,例如CpG,其诱导I型干扰素的产生。在特定的具体实施方案中,免疫刺激剂可以是DC表面分子CD40的激动剂。在某些具体实施方案中,为了刺激免疫力而不是耐受性,纳米载体引入促进DC成熟(引发天然T细胞的需要)和细胞因子(如,I类干扰素,其促进抗体应答和抗病毒免疫力)产生的免疫刺激剂。在一些具体实施方案中,免疫调节剂可以是TLR-4激动剂,例如细菌脂多糖(LPS)、VSV-G和/或HMGB-1。在一些具体实施方案中,免疫调节剂是细胞因子,其为通过细胞释放的小蛋白或生物因子(5kD-20kD的范围)且对于细胞-细胞相互作用、交流和其它细胞的行为具有特异性效应。在一些具体实施方案中,免疫刺激剂可以是从小细胞释放的促炎性刺激剂

(例如,尿酸盐晶体)。在一些具体实施方案中,免疫刺激剂可以是激活的补体级联成分(例如CD21、CD35等)。在一些具体实施方案中,免疫刺激剂可以是激活的免疫复合体的成分。免疫刺激剂包括TLR-1、TLR-2、TLR-3、TLR-4、TLR-5、TLR-6、TLR-7、TLR-8、TLR-9和TLR-10激动剂。免疫刺激剂还包括补体受体激动剂,如与CD21或CD35结合的分子。在一些具体实施方案中,补体受体激动剂诱导纳米载体的内源性补体调理。免疫刺激剂还包括细胞因子受体激动剂,如细胞因子。在一些具体实施方案中,细胞因子受体激动剂是小分子、抗体、融合蛋白或适配子。

[0324] 在一些具体实施方案中,存在超过一种类型的免疫刺激剂。在一些具体实施方案中,不同的免疫刺激剂各自作用于不同的途径。因此,免疫刺激剂可以是不同的钟样受体、钟样受体和CD40、钟样受体和炎性体的成分,等等。

[0325] 在一些具体实施方案中,免疫刺激剂可以是佐剂。因此,在一些具体实施方案中,本发明提供了包含与一种或多种佐剂配制的疫苗纳米载体的药物组合物。如本文中所述的,术语“佐剂”指的是不构成特异性抗原但是增强对所施用抗原的免疫应答的试剂。

[0326] 在一些具体实施方案中,本发明涉及使用能够携带佐剂(包埋的和/或在表面上)的纳米载体将佐剂传送至靶向位置(例如抗原呈递细胞(APC)的细胞表面),其中该纳米载体包含:(i)在表面上的一个或多个分子,以靶向特异性细胞;(ii)一个或多个在共价结合聚合物或包埋于纳米颗粒内时能够引发免疫应答的分子。具体实施方案涉及增强哺乳动物中的免疫应答效力,包括施用有效量的本发明的佐剂的纳米颗粒传送,以增强哺乳动物对一种或多种抗原的免疫应答。本具体实施方案还涉及使用本发明的组合物的接种方法。

[0327] 例如,在一些具体实施方案中,将佐剂包埋于本发明的纳米颗粒内。通常,在此情况下,佐剂以游离形式存在,即佐剂并未偶联形成纳米颗粒的聚合物。如本文中所示例的,在以常规方式制备纳米颗粒的过程中包埋佐剂。对患者施用,佐剂从纳米颗粒释放的分布图将取决于多种因素,包括纳米颗粒的尺寸、形成纳米颗粒的聚合物的溶解速率(如果溶解发生),形成纳米颗粒的聚合物的分子量,以及佐剂的化学性质(其将影响佐剂在纳米颗粒中的位置、扩散速率等)。包埋于聚合物纳米颗粒内的佐剂的量将在纳米颗粒的形成过程中确定。

[0328] 例如,在一些具体实施方案中,将佐剂偶联形成纳米颗粒的聚合物。通常,在此情况下,佐剂在纳米颗粒的表面上或接近纳米颗粒的表面而表达。在一些具体实施方案中,使用能够自体装配成纳米颗粒的两性聚合物,并将佐剂共价结合至该聚合物的一端。例如,在用于形成聚合物的聚合反应中,可将佐剂用作引发物种。当该佐剂偶联(即共价结合)至聚合物的末端时,经聚合物的自体装配,佐剂聚集至纳米颗粒的外围或核心。例如,在包含疏水嵌段和亲水嵌段的聚合物中(其中该聚合物允许自体装配为具有疏水核心和亲水外围的纳米颗粒),偶联至亲水嵌段末端的佐剂将聚集在纳米颗粒的外围。在一些优选的具体实施方案中,佐剂聚集在纳米颗粒的表面并保留在作为免疫刺激剂的位置中。对于包含偶联的佐剂的纳米颗粒制剂,佐剂在纳米颗粒表面的密度将是多种因素的函数,该因素包括形成纳米颗粒的聚合物的分子量,纳米颗粒的密度以及该佐剂的化学性质。

[0329] 在一些具体实施方案中,使用包埋的佐剂和偶联的佐剂的组合。

[0330] 例如,在一些具体实施方案中,疫苗纳米载体与一种或多种佐剂配制,如凝胶类型的佐剂(例如,氢氧化铝、磷酸铝、磷酸钙等);微生物佐剂(例如,包括CpG基序的免疫调节

DNA序列;内毒素,例如单磷酸基脂质A;外毒素,例如霍乱毒素、大肠杆菌热不稳定毒素和百日咳毒素;胞壁酰二肽等);油乳剂和基于乳化剂的佐剂(例如,弗氏佐剂,MF59 [Novartis]、SAF等);颗粒佐剂(例如,脂质体、生物可降解微球体、皂角苷等);合成佐剂(例如,非离子嵌段共聚物、胞壁酰肽类似物、聚磷腈、合成多核苷酸等);基于表面活性剂的佐剂,和/或其组合。其它的示例性佐剂包括一些聚合物(例如,U.S. 专利5,500,161中描述的聚磷腈,将其引入本文中作为参考))、QS21、鲨烯、四氯十氧化物等。

[0331] T细胞激活试验

[0332] 在一些具体实施方案中,可以应用各种试验来确定T细胞或T细胞组中的免疫应答是否被激活(即,T细胞或T细胞组是否变成“激活的”)。在一些具体实施方案中,可以通过测量抗原诱导的T细胞产生的细胞因子而确定T细胞中免疫应答的刺激。在一些具体实施方案中,可以通过测量抗原诱导的T细胞产生的IFN γ 、IL-4、IL-2、IL-10、IL-17和/或TNF α 而确定T细胞中免疫应答的刺激。在一些具体实施方案中,通过胞内细胞因子染色然后进行流式细胞计量术而测定抗原诱导的T细胞的细胞因子产生。在一些具体实施方案中,通过表面捕获染色然后进行流式细胞计量术而测定抗原诱导的T细胞的细胞因子产生。在一些具体实施方案中,通过确定激活的T细胞培养物上清液中细胞因子的浓度而测定抗原诱导的T细胞的细胞因子产生。在一些具体实施方案中,这可以通过ELISA来测量。

[0333] 在一些具体实施方案中,通过ELISPOT试验测量抗原诱导的T细胞的细胞因子产生。通常,ELISPOT试验应用与三明治酶联免疫吸附试验(ELISA)技术非常相似的技术。将抗体(例如,单克隆抗体,多克隆抗体等)无菌地覆盖在后衬为PVDF(聚偏二氟乙烯)的微型板上。根据对待测细胞因子的特异性选择抗体。将平板封闭(例如,使用与该试验中的任一种抗体非反应性的血清蛋白)。以不同的密度将目标细胞与抗原或有丝分裂原一起涂布于平板上,然后置于潮湿的37°C CO₂孵箱内持续一定的时间。激活的细胞所分泌的细胞因子在局部被高表面区域的PVDF膜上覆盖的抗体所捕获。洗涤孔以除去细胞、碎片和培养液成分后,向孔中加入对细胞因子特异性的二抗(例如,生物素化的多克隆抗体)。该抗体与靶细胞因子的不同表位反应,并因此用于检测所捕获的细胞因子。在洗涤以除去任何未结合的生物素化抗体后,然后使用抗生物素-HRP和沉淀底物(例如,AEC、BCIP/NBT)显示所检测的细胞因子。着色的终产物(点,通常为黑蓝色)通常代表单个的产生细胞因子的细胞。可以通过人工对点进行计数(例如,使用解剖显微镜),或使用自动计数器,以捕获微孔图像并分析点的数目和大小。在一些具体实施方案中,每个点对应于单个的产生细胞因子的细胞。

[0334] 在一些具体实施方案中,如果约1%至约100%的抗原特异性T细胞产生细胞因子,则称T细胞中的免疫应答得到刺激。在一些具体实施方案中,如果至少约1%、至少约5%、至少约10%、至少约25%、至少约50%、至少约75%、至少约90%、至少约95%、至少约99%或约100%的抗原特异性T细胞产生细胞因子,则称T细胞中的免疫应答得到刺激。

[0335] 在一些具体实施方案中,如果免疫的患者比天然对照包含高至少约10倍、至少约50倍、至少约100倍、至少约500倍、至少约1000倍、至少约5000倍、至少约10,000倍、至少约50,000倍、至少约100,000倍或高出至少约100,000倍以上的产生细胞因子的细胞,则称T细胞中的免疫应答得到刺激。

[0336] 在一些具体实施方案中,通过测量抗原诱导的T细胞的增殖来确定T细胞中免疫应答的刺激。在一些具体实施方案中,可以通过分裂T细胞中H³-胸苷的摄入来测量抗原诱导

的增殖(有时称为“淋巴细胞转化测试”,或“LTT”)。在一些具体实施方案中,如果 H^3 -胸苷的摄入(以 γ 计数器的计数数目给出)比天然对照高至少约5倍、至少约10倍、至少约20倍、至少约50倍、至少约100倍、至少约500倍、至少约1000倍、至少约5000倍、至少约10,000倍、或高至少约10,000倍,则称发生了抗原诱导的增殖。

[0337] 在一些具体实施方案中,可以通过流式细胞计量术来测量抗原诱导的增殖。在一些具体实施方案中,可以通过羧基荧光素琥珀酰亚胺酯(CFSE)稀释试验来测量抗原诱导的增殖。CFSE是一种无毒的、荧光的、透膜染料,其通过琥珀酰反应性基团结合细胞质蛋白(例如,T细胞蛋白)的氨基基团。当细胞分裂时,CFSE标记的蛋白在子代细胞中均等分布,因此随着每次分裂细胞荧光减半。因此,在各自的抗原存在下培养后,抗原特异性T细胞的荧光丧失(CFSE^{low}),可以与培养物中的其它细胞(CFSE^{high})区分开来。在一些具体实施方案中,如果CFSE稀释(以CFSE^{low}细胞占所有的CFSE⁺细胞的百分率表示)是至少约5%、至少约10%、至少约25%、至少约50%、至少约75%、至少约90%、至少约95%或至少约100%,则称发生了抗原诱导的增殖。

[0338] 在一些具体实施方案中,如果T细胞激活的细胞标记物相对于未刺激细胞以不同的水平(例如,更高或更低的水平)表达,则称T细胞中的免疫应答得到刺激。在一些具体实施方案中,CD11aCD27、CD25、CD40L、CD44、CD45RO和/或CD69在激活的T细胞中比在未刺激的T细胞中表达更高。在一些具体实施方案中,L-选择素(CD62L)、CD45RA和/或CCR7在激活的T细胞中比在未刺激的T细胞中表达更低。

[0339] 在一些具体实施方案中,通过检测效应CD8⁺T细胞对抗抗原脉冲的靶细胞的细胞毒性来测量T细胞中的免疫应答。例如,可以进行⁵¹铬(⁵¹Cr)释放试验。在该试验中,效应CD8⁺T细胞结合感染的在I类MHC上递呈病毒肽的细胞,并给感染的细胞发出细胞凋亡的信号。如果加入效应CD8⁺T细胞前用⁵¹Cr标记细胞,则释放到上清液中的⁵¹Cr的含量与被杀灭的目标的数目成比例。

[0340] 本领域普通技术人员将认识到以上所述的试验仅仅是可用于确定是否发生T细胞激活的示例性方法。本领域技术人员已知的可用于确定是否发生T细胞激活的任何试验均落入本发明的范围内。本文中所述的试验以及其它可用于确定是否发生T细胞激活的试验描述于Current Protocols in Immunology(免疫学通用实验方案)(John Wiley & Sons, Hoboken, NY, 2007;引入本文中作为参考)。

[0341] B细胞

[0342] 本发明提供了用于将例如免疫调节剂传送至免疫系统的细胞的疫苗纳米载体。在一些具体实施方案中,疫苗纳米载体包含至少一种可以被呈递至B细胞的免疫调节剂(即,B细胞抗原)。

[0343] 免疫调节剂

[0344] B细胞和T细胞通过不同的机理识别抗原。如上所述,T细胞识别加工形式的抗原(例如,被APC的MHC分子递呈至T细胞受体的肽片段)。B细胞识别天然形式的抗原。B细胞通过B细胞受体(BCR)和/或膜上结合的免疫球蛋白识别血液或淋巴中的游离(例如,可溶性的)抗原。

[0345] 免疫调节试剂可以是B细胞抗原。B细胞抗原包括,但不限于,蛋白、肽、小分子和碳水化合物。在一些具体实施方案中,B细胞抗原是非蛋白抗原(即,不是蛋白或肽抗原)。在一

些具体实施方案中,B细胞抗原是与传染性试剂结合的碳水化合物。在一些具体实施方案中,B细胞抗原是与传染剂结合的糖蛋白或糖肽。传染剂可以是细菌、病毒、真菌、原生动物或寄生虫。在一些具体实施方案中,B细胞抗原是弱免疫原性的抗原。在一些具体实施方案中,B细胞抗原是被滥用的物质或其部分。在一些具体实施方案中,B细胞抗原是令人上瘾的物质或其部分。

[0346] 令人上瘾的物质包括,但不限于,麻醉药、咳嗽抑制剂、镇定剂和镇静剂。令人上瘾的物质的实例包括本文中别处提供的那些。在一些具体实施方案中,B细胞抗原是毒素,例如来自化学武器的毒素。在一些具体实施方案中,来自化学武器的毒素是肉毒杆菌毒素或磷杂环戊二烯。来自化学武器的毒素包括,但不限于,0-烷基(<C10,包括环烷基)烷基(Me、Et、n-Pr或i-Pr)-膦酰基氟化物(例如,沙林:0-异丙基甲基膦酰基氟化物,梭曼:0-频哪基甲基膦酰基氟化物),0-烷基(<C10,包括环烷基)N,N-二烷基(Me、Et、n-Pr或i-Pr)膦酰胺氟化物(例如,塔崩:0-乙基N,N-二甲基膦酰胺氟化物),0-烷基(H或<C10,包括环烷基)S-2-二烷基(Me、Et、n-Pr或i-Pr)-氨基乙基烷基(Me、Et、n-Pr或i-Pr)硫代磷酸盐及相应的烷基化或质子化盐(例如,VX:0-乙基S-2-二异丙基氨基乙基甲基硫代磷酸盐),硫芥子气:2-氯乙基氯甲基硫醚,芥子气:双(2-氯乙基)硫醚、双(2-氯乙基硫)甲烷,倍半芥子气:1,2-双(2-氯乙基硫)乙烷、1,3-双(2-氯乙基硫)-n-丙烷、1,4-双(2-氯乙基硫)-n-丁烷、1,5-双(2-氯乙基硫)-n-戊烷、双(2-氯乙基硫甲基)乙醚,0-芥子:双(2-氯乙基硫乙基)乙醚,路易斯毒气(Lewisite):路易斯毒气1:2-氯乙烯二氯肿,路易斯毒气2:双(2-氯乙烯)氯肿,路易斯毒气3:三(2-氯乙烯)肿,氮芥:HN1:双(2-氯乙基)乙胺,HN2:双(2-氯乙基)甲胺,HN3:三(2-氯乙基)胺,蛤蚌毒素,蓖麻毒素,阿米吨(Amiton):0,0-二乙基S-(2-(二乙基氨基)乙基)硫代磷酸盐及相应的烷基化或质子化盐,PFIB:1,1,3,3,3-五氟-2-(三氟甲基)-1-丙烯,二苯羟乙酸-3-喹啉环酯(BZ),光气:碳酰氯,氯化氰,氰化氢和三氯硝基甲:三氯硝基甲烷。

[0347] B细胞抗原还可以是有害环境试剂。有害环境试剂包括,但不限于,砷、铅、汞、氯乙烯、多氯联苯、苯、多环芳香烃、镉、苯并(a)芘、苯并(b)荧蒽、氯仿、DDT、P,P',阿罗克洛1254(aroclor 1254)、阿罗克洛1260(aroclor 1260)、二苯并(a,h)蒽、三氯乙烯、狄氏剂、六价铬和DDE,P,P'。这样的试剂的实例包括本文中别处提供的那些。

[0348] 在一些具体实施方案中,B细胞抗原是自体抗原。在其它具体实施方案中,B细胞抗原是同种抗原、接触致敏剂、退行性疾病抗原、半抗原、传染病抗原、癌症抗原、特应性疾病抗原、自体免疫疾病抗原、令人上瘾的物质、异种抗原或代谢性疾病酶或其酶产物。这样的抗原的实例包括本文中别处提供的那些。

[0349] 如上所述,本发明提供了包含例如一种或多种免疫调节剂的疫苗纳米载体。在一些具体实施方案中,包含一种或多种免疫调节剂的本发明纳米载体用作疫苗。在一些具体实施方案中,向B细胞的抗原递呈可以通过在纳米载体的表面上递呈结构上完整的免疫调节剂而最优化。在一些具体实施方案中,结构上完整的免疫调节剂以高拷贝数目和/或密度在疫苗纳米载体的表面上得到呈递。

[0350] 在一些具体实施方案中,免疫调节剂可以包含分离的和/或重组的蛋白或肽、灭活的生物体和病毒、死的生物体和病毒、遗传改变的生物体或病毒,和细胞提取物。在一些具体实施方案中,免疫调节剂可以包含核酸、碳水化合物、脂质和/或小分子。在一些具体实施

方案中,免疫调节剂是激发免疫应答的试剂。在一些具体实施方案中,免疫调节剂是抗原。在一些具体实施方案中,免疫调节剂用于疫苗。可以在以上标题为“B细胞”的部分中找到对于免疫调节试剂的进一步描述。

[0351] 如上所述,疫苗纳米载体可以包含一种类型的免疫调节剂,其同时刺激B细胞和T细胞。在一些具体实施方案中,疫苗纳米载体包含两种类型的免疫调节剂,其中第一种类型的免疫调节剂刺激B细胞,第二种类型的免疫调节剂刺激T细胞。在一些具体实施方案中,疫苗纳米载体包含两种以上类型的免疫调节剂,其中一种或多种类型的免疫调节剂刺激B细胞,一种或多种类型的免疫调节剂刺激T细胞。

[0352] 靶向部分

[0353] 如上所述,本发明的纳米载体包含一个或多个靶向部分。关于根据本发明的靶向部分的一般性和特异性特性的讨论,参见以上标题为“T细胞”的部分中小标题为“靶向部分”的内容。在一些具体实施方案中,靶向部分靶向特定的细胞类型。在某些具体实施方案中,目标是B细胞标记物。在一些具体实施方案中,B细胞目标是在B细胞中而不在非B细胞中表达的抗原。在一些具体实施方案中,B细胞目标是在B细胞中比在非B细胞中更普遍存在的抗原。

[0354] 在某些具体实施方案中,目标是SCS-Mph标记物。在一些具体实施方案中,SCS-Mph目标是在SCS-Mph中但不在非SCS-Mph中表达的抗原。在一些具体实施方案中,SCS-Mph目标是在SCS-Mph中比在非SCS-Mph中更普遍存在的抗原。示例性的SCS-Mph标记物在下面标题为“被膜下淋巴窦巨噬细胞”的部分列出并且包括本文中别处提供的那些。

[0355] 在某些具体实施方案中,目标是FDC标记物。在一些具体实施方案中,FDC目标是在FDC中但不在非FDC中表达的抗原。在一些具体实施方案中,FDC目标是在FDC中比在非FDC中更普遍存在的抗原。示例性FDC标记物在下面标题为“滤泡树突状细胞”的部分列出并且包括本文中别处提供的那些。

[0356] 在一些具体实施方案中,目标优先在特定的细胞类型中表达。例如,SCS-Mph、FDC和/或B细胞中的SCS-Mph、FDC和/或B细胞目标的表达相对于参考群体在SCS-Mph、FDC和/或B细胞中为至少2倍、至少3倍、至少4倍、至少5倍、至少10倍、至少20倍、至少50倍、至少100倍、至少500倍或至少1000倍过表达。在一些具体实施方案中,参考群体可以包含非SCS-Mph、FDC和/或B细胞。

[0357] 在一些具体实施方案中,激活的SCS-Mph、FDC和/或B细胞中的SCS-Mph、FDC和/或B细胞目标的表达相对于参考群体在激活的SCS-Mph、FDC和/或B细胞中为至少2倍、至少3倍、至少4倍、至少5倍、至少10倍、至少20倍、至少50倍、至少100倍、至少500倍或至少1000倍过表达。在一些具体实施方案中,参考群体可以包含非激活的SCS-Mph、FDC和/或B细胞。

[0358] 被膜下窦巨噬细胞

[0359] 本发明包括以下认识:抗原靶向被膜下窦巨噬细胞(SCS-Mph)涉及淋巴携带的病原体(如病毒)向滤泡B细胞的有效早期递呈(图2)。如实施例1所述,向小鼠足垫皮下注射泡性口炎病毒(VSV)或腺病毒(AdV)后,病毒颗粒被引流淋巴结中的CD169⁺SCS-Mph有效地且选择性地保留。这些淋巴结中的VSV特异性B细胞受体(BCR)转基因B细胞被迅速激活并在该病毒攻击时产生特别高的抗体效价。通过注射负载了氯曲膦酸盐的脂质体(其对Mph是毒性的)耗尽SCS-Mph消除了早期的B细胞激活,这表明SCS-Mph对于淋巴携带颗粒抗原向B细

胞递呈来说是必需的。

[0360] 在固定表面上,而不是在溶液中,通过呈递至B细胞的多价抗原更有力地激活了B细胞。不希望受到任一种理论的束缚,本发明提出了为什么许多包被的病毒(例如VSV)引发针对其包被糖蛋白的有力中和抗体应答的原因:抗原性蛋白在病毒颗粒的表面上以非常高的密度得到呈递,并且病毒颗粒以相对不可移动的方式被呈递至B细胞,即,结合SCS-Mph的质膜。本发明包括以下认识:通过在皮下注射时靶向SCS-Mph并在其表面上递呈多价的构象完整的抗原而模拟病毒颗粒的疫苗载体能够刺激有力的B细胞应答。

[0361] 在一些具体实施方案中,SCS-Mph靶向通过结合CD169(即,唾液酸粘附素)、CD11b(即,CD11b/CD18、Mac-1、CR3或 α M β 2整联蛋白)、和/或甘露糖受体(即,多价凝集素)、蛋白(这些蛋白皆为主要在SCS-Mph上表达)的部分实现。这样的部分的例子包括在本文中别处提供的那些。

[0362] 在一些具体实施方案中,可以通过特异性结合主要在巨噬细胞上表达和/或存在的任意实体(例如蛋白、脂质、碳水化合物、小分子等)(即,SCS-Mph标记物)的任意靶向部分来实现SCS-Mph靶向。示例性的SCS-Mph标记物包括,但不限于,CD4(L3T4,W3/25,T4);CD9(p24,DRAP-1,MRP-1);CD11a(LFA-1 α , α L整联蛋白链);CD11b(α M整联蛋白链,CR3,Mo1,C3nIR,Mac-1);CD11c(α X整联蛋白,p150,95,AXb2);CDw12(p90-120);CD13(APN,gp150,EC3.4.11.2);CD14(LPS-R);CD15(X-半抗原,Lewis,X,SSEA-1,3-FAL);CD15s(唾液酰LewisX);CD15u(3'硫代Lewis X);CD15su(6硫代-唾液酰Lewis X);CD16a(FcRIIIA);CD16b(Fc γ RIIb);CDw17(乳糖基神经酰胺,LacCer);CD18(整联蛋白 β 2,CD11a,b,c β -亚基);CD26(DPP-IV外酶,ADA结合蛋白);CD29(血小板GPIIa, β -1整联蛋白,GP);CD31(PECAM-1,Endocam);CD32(Fc γ RII);CD33(gp67);CD35(CR1,C3b/C4b受体);CD36(GpIIb,GPIV,PASIV);CD37(gp52-40);CD38(ADP-核糖基环化酶,T10);CD39(ATP脱氢酶,NTP脱氢酶-1);CD40(Bp50);CD43(涎福林,白细胞唾液素);CD44(ECMRII,H-CAM,Pgp-1);CD45(LCA,T200,B220,Ly5);CD45RA;CD45RB;CD45RC;CD45RO(UCHL-1);CD46(MCP);CD47(gp42,IAP,OA3,Neurophilin);CD47R(MEM-133);CD48(Blast-1,Hulym3,BCM-1,OX-45);CD49a(VLA-1 α , α 1整联蛋白);CD49b(VLA-2 α ,gp1a, α 2整联蛋白);CD49c(VLA-3 α , α 3整联蛋白);CD49e(VLA-5 α , α 5整联蛋白);CD49f(VLA-6 α , α 6整联蛋白,gplc);CD50(ICAM-3);CD51(整联蛋白 α ,VNR- α ,Vitronectin-R α);CD52(CAMPATH-1,HE5);CD53(OX-44);CD54(ICAM-1);CD55(DAF);CD58(LFA-3);CD59(1F5Ag,H19,保护素(Protectin),MAC1F,MIRL,P-18);CD60a(GD3);CD60b(9-O-乙酰基GD3);CD61(GP-IIIa, β 3整联蛋白);CD62L(L-选择素,LAM-1,LECAM-1,MEL-14,Leu8,TQ1);CD63(LIMP,MLA1,gp55,NGA,LAMP-3,ME491);CD64(Fc γ RI);CD65(神经酰胺,VIM-2);CD65s(唾液酰化-CD65,VIM2);CD72(Ly-19.2,Ly-32.2,Lyb-2);CD74(Ii,不变链);CD75(唾液酸遮掩的乳糖胺);CD75S(α 2,6唾液酰化乳糖胺);CD80(B7,B7-1,BB1);CD81(TAPA-1);CD82(4F9,C33,IA4,KAI1,R2);CD84(p75,GR6);CD85a(ILT5,LIR2,HL9);CD85d(ILT4,LIR2,MIR10);CD85j(ILT2,LIR1,MIR7);CD85k(ILT3,LIR5,HM18);CD86(B7-2/B70);CD87(uPAR);CD88(C5aR);CD89(IgA Fc受体,Fc α R);CD91(α 2M-R,LRP);CDw92(p70);CDw93(GR11);CD95(APO-1,FAS,TNFRSF6);CD97(BL-KDD/F12);CD98(4F2,FRP-1,RL-388);CD99(MIC2,E2);CD99R(CD99 Mab限制的);CD100(SEMA4D);CD101(IGSF2,P126,V7);CD102(ICAM-2);CD111(PVRL1,HveC,PRR1,Nectin 1,HIGR);CD112(HveB,PRR2,PVRL2,Nectin2);

CD114 (CSF3R, G-CSRF, HG-CSFR) ; CD115 (c-fms, CSF-1R, M-CSFR) ; CD116 (GM-CSFR α) ; CDw119 (IFN γ R, IFN γ RA) ; CD120a (TNFRI, p55) ; CD120b (TNFRII, p75, TNFR p80) ; CD121b (2型IL-1R) ; CD122 (IL2R β) ; CD123 (IL-3R α) ; CD124 (IL-4R α) ; CD127 (p90, IL-7R, IL-7R α) ; CD128a (IL-8R α , CXCR1, (暂时命名为CD181)) ; CD128b (IL-8R β , CSCR2, (暂时命名为CD182)) ; CD130 (gp130) ; CD131 (常见的 β 亚基) ; CD132 (常见的 γ 链, IL-2R γ) ; CDw136 (MSP-R, RON, p158-ron) ; CDw137 (4-1BB, ILA) ; CD139 ; CD141 (血栓调节蛋白, 胎儿调节素) ; CD147 (Basigin, EMMPRIN, M6, OX47) ; CD148 (HPTP- η , p260, DEP-1) ; CD155 (PVR) ; CD156a (CD156, ADAM8, MS2) ; CD156b (TACE, ADAM17, cSVP) ; CDw156C (ADAM10) ; CD157 (Mo5, BST-1) ; CD162 (PSGL-1) ; CD164 (MGC-24, MUC-24) ; CD 165 (AD2, gp37) ; CD168 (RHAMM, IHABP, HMMR) ; CD169 (唾液酸粘附素, Siglec-1) ; CD170 (Siglec 5) ; CD171 (L1CAM, NILE) ; CD172 (SIRP-1 α , MyD-1) ; CD172b (SIRP β) ; CD180 (RP105, Bgp95, Ly64) ; CD181 (CXCR1, (以前称作CD128a)) ; CD182 (CXCR2, (以前称作CD128b)) ; CD184 (CXCR4, NPY3R) ; CD191 (CCR1) ; CD192 (CCR2) ; CD195 (CCR5) ; CDw197 (CCR7 (以前是CDw197)) ; CDw198 (CCR8) ; CD204 (MSR) ; CD205 (DEC-205) ; CD206 (MMR) ; CD207 (Langerin) ; CDw210 (CK) ; CD213a (CK) ; CDw217 (CK) ; CD220 (胰岛素R) ; CD221 (IGF1R) ; CD222 (M6P-R, IGFII-R) ; CD224 (GGT) ; CD226 (DNAM-1, PTA1) ; CD230 (朊病毒蛋白 (PrP)) ; CD232 (VESP-R) ; CD244 (2B4, P38, NAIL) ; CD245 (p220/240) ; CD256 (APRIL, TALL2, TNF (配体) 超家族, 成员13) ; CD257 (BLYS, TALL1, TNF (配体) 超家族, 成员13b) ; CD261 (TRAIL-R1, TNF-R超家族, 成员10a) ; CD262 (TRAIL-R2, TNF-R超家族, 成员10b) ; CD263 (TRAIL-R3, TNF-R超家族, 成员10c) ; CD264 (TRAIL-R4, TNF-R超家族, 成员10d) ; CD265 (TRANCE-R, TNF-R超家族, 成员11a) ; CD277 (BT3.1, B7家族: 嗜乳脂蛋白3) ; CD280 (TEM22, ENDO 180) ; CD281 (TLR1, 钟样受体1) ; CD282 (TLR2, 钟样受体2) ; CD284 (TLR4, 钟样受体4) ; CD295 (LEPR) ; CD298 (ATP1B3, Na K ATP酶, β 3亚基) ; CD300a (CMRF-35H) ; CD300c (CMRF-35A) ; CD300e (CMRF-35L1) ; CD302 (DCL1) ; CD305 (LAIR1) ; CD312 (EMR2) ; CD315 (CD9P1) ; CD317 (BST2) ; CD321 (JAM1) ; CD322 (JAM2) ; CDw328 (Siglec7) ; CDw329 (Siglec9) ; CD68 (gp 110, 巨噬涎蛋白) ; 和/或甘露糖受体; 其中括号中所列名称代表别名。这样的标记物的实例包括本文中别处提供的那些。

[0363] 在一些具体实施方案中, 可以通过特异性结合激活时主要在巨噬细胞上表达和/或存在的任意实体(例如蛋白、脂质、碳水化合物、小分子等)(即, 激活的SCS-Mph标记物)的任意靶向部分来实现SCS-Mph靶向。示例性的激活的SCS-Mph标记物包括, 但不限于, CD1a (R4, T6, HTA-I) ; CD1b (R1) ; CD1c (M241, R7) ; CD44R (CD44v, CD44v9) ; CD49d (VLA-4 α , α 4整联蛋白) ; CD69 (AIM, EA 1, MLR3, gp34/28, VEA) ; CD105 (内皮糖蛋白 (Endoglin)) ; CD142 (组织因子, 促凝血酶原激酶, F3) ; CD143 (ACE, 肽基二肽酶A, 激肽酶II) ; CD153 (CD30L, TNSF8) ; CD163 (M130, GHI/61, RM3/1) ; CD166 (ALCAM, KG-CAM, SC-1, BEN, DM-GRASP) ; CD227 (MUC1, PUM, PEM, EMA) ; CD253 (TRAIL, TNF (配体) 超家族, 成员10) ; CD273 (B7DC, PDL2) ; CD274 (B7H1, PDL1) ; CD275 (B7H2, ICOSL) ; CD276 (B7H3) ; CD297 (ART4, ADP-核糖转移酶4) ; 和Dombrock血型糖蛋白; 其中括号中所列名称代表别名。这样的标记物的实例包括本文中别处提供的那些。

[0364] B细胞靶向部分

[0365] 在一些具体实施方案中, 可以通过结合补体受体, CR1 (即, CD35) 或CR2 (即, CD21) , B细胞以及FDC上表达的蛋白的部分来实现B细胞靶向。在一些具体实施方案中, 可以通过B

细胞标记物,如CD19、CD20和/或CD22,来实现B细胞靶向。在一些具体实施方案中,可以通过B细胞标记物,如CD40、CD52、CD80、CXCR5、VLA-4、II类MHC、表面IgM或IgD、APRL和/或BAFF-R来实现B细胞靶向。本发明包括以下认识:通过补体受体或其它APC相关的分子特异性的部分同时靶向B细胞会增强体液应答。

[0366] 在一些具体实施方案中,可以通过特异性结合主要在B细胞上表达和/或存在的任意实体(例如蛋白、脂质、碳水化合物、小分子等)(即,B细胞标记物)的任意靶向部分来实现B细胞靶向。示例性的B细胞标记物包括,但不限于,CD1c(M241,R7);CD1d(R3);CD2(E-玫瑰花结R,T11,LFA-2);CD5(T1,Tp67,Leu-1,Ly-1);CD6(T12);CD9(p24,DRAP-1,MRP-1);CD11a(LFA-1 α , α L整联蛋白链);CD11b(α M整联蛋白链,CR3,Mo1,C3niR,Mac-1);CD11c(α X整联蛋白,P150,95,AXb2);CDw17(乳酸神经酰胺,LacCer);CD18(整联蛋白 β 2,CD11a,b,c β -亚基);CD19(B4);CD20(B1,Bp35);CD21(CR2,EBV-R,C3dR);CD22(BL-CAM,Lyb8,Siglec-2);CD23(FceRII,B6,BLAST-2,Leu-20);CD24(BBA-1,HSA);CD25(Tac抗原,IL-2R α ,p55);CD26(DPP IV内酶,ADA结合蛋白);CD27(T14,S152);CD29(血小板GP1Ia, β -1整联蛋白,GP);CD31(PECAM-1,Endocam);CD32(FC γ RII);CD35(CR1,C3b/C4b受体);CD37(gp52-40);CD38(ADP-核糖基环化酶,T10);CD39(ATP脱氢酶,NTP脱氢酶-1);CD40(Bp50);CD44(ECMR1I,H-CAM,Pgp-1);CD45(LCA,T200,B220,Ly5);CD45RA;CD45RB;CD45RC;CD45RO(UCHL-1);CD46(MCP);CD47(gp42,IAP,OA3,神经菌毛素);CD47R(MEM-133);CD48(Blast-1,Hulym3,BCM-1,OX-45);CD49b(VLA-2 α ,gp1a, α 2整联蛋白);CD49c(VLA-3 α , α 3整联蛋白);CD49d(VLA-4 α , α 4整联蛋白);CD50(ICAM-3);CD52(CAMPATH-1,HES);CD53(OX-44);CD54(ICAM-1);CD55(DAF);CD58(LFA-3);CD60a(GD3);CD62L(L-选择素,LAM-1,LECAM-1,MEL-14,Leu8,TQ 1);CD72(Ly-19.2,Ly-32.2,Lyb-2);CD73(Ecto-5'-核苷酸酶);CD74(Ii,不变链);CD75(唾液酸遮掩的乳糖胺);CD75S(α 2,6唾液酰化乳糖胺);CD77(Pk抗原,BLA,CTH/Gb3);CD79a(Ig α ,MB1);CD79b(Ig β ,B29);CD80;CD81(TAPA-1);CD82(4F9,C33,IA4,KAI1,R2);CD83(HB15);CD84(P75,GR6);CD85j(ILT2,LIR1,MIR7);CDw92(p70);CD95(APO-1,FAS,TNFRSF6);CD98(4F2,FRP-1,RL-388);CD99(MIC2,E2);CD100(SEMA4D);CD102(ICAM-2);CD108(SEMA7A,JMH血型组抗原);CDw119(IFN γ R,IFN γ Ra);CD120a(TNFR1,p55);CD 120b(TNFR1I,p75,TNFR p80);CD121b(2型IL-1R);CD122(IL2R β);CD124(IL-4R α);CD130(gp130);CD132(常见的 γ 链,IL-2R γ);CDw137(4-1BB,ILA);CD139;CD147(Basigin,EMMPRIN,M6,OX47);CD150(SLAM,IPO-3);CD162(PSGL-1);CD164(MGC-24,MUC-24);CD166(ALCAM,KG-CAM,SC-1,BEN,DM-GRASP);CD167a(DDR1,TrkE,cak);CD171(L1CMA,NILE);CD175s(唾液酸-Tn(S-Tn));CD180(RP105,Bgp95,Ly64);CD184(CXCR4,NPY3R);CD185(CXCR5);CD192(CCR2);CD196(CCR6);CD197(CCR7(以前是CDw197));CDw197(CCR7,EBI1,BLR2);CD200(OX2);CD205(DEC-205);CDw210(CK);CD213a(CK);CDw217(CK);CDw218a(IL18R α);CDw218b(IL18R β);CD220(胰岛素R);CD221(IGF1R);CD222(M6P-R,IGF1I-R);CD224(GGT);CD225(Leu13);CD226(DNAM-1,PTA1);CD227(MUC1,PUM,PEM,EMA);CD229(Ly9);CD230(朊病毒蛋白(Prp));CD232(VESP-R);CD245(p220/240);CD247(CD3 ζ 链);CD261(TRAIL-R1,TNF-R超家族,成员10a);CD262(TRAIL-R2,TNF-R超家族,成员10b);CD263(TRAIL-R3,TNF-R超家族,成员10c);CD264(TRAIL-R4,TNF-R超家族,成员10d);CD265(TRANSE-R,TNF-R超家族,成员11a);CD267(TACI,TNF-R超家族,成员13B);CD268(BAFFR,TNF-R超家族,成员13C);CD269(BCMA,TNF-R

超家族,成员16);CD275(B7H2,ICOSL);CD277(BT3.1.B7家族:嗜乳脂蛋白3);CD295(LEPR);CD298(ATP1B3 Na K ATP酶B3亚基);CD300a(CMRF-35H);CD300c(CMRF-35A);CD305(LAIR1);CD307(IRTA2);CD315(CD9P1);CD316(EW12);CD317(BST2);CD319(CRACC,SLAMF7);CD321(JAM1);CD322(JAM2);CDw327(Siglec6,CD33L);CD68(gp 100,巨噬涎蛋白);CXCR5;VLA-4;II类MHC;表面IgM;表面IgD;APRL;和/或BAFF-R;其中括号中所列名称代表别名。标记物的实例包括本文中别处提供的那些。

[0367] 在一些具体实施方案中,可以通过特异性结合激活时主要在B细胞上表达和/或存在的任意实体(例如蛋白、脂质、碳水化合物、小分子等)(即,激活的B细胞标记物)的任意靶向部分来实现B细胞靶向。示例性的激活的B细胞标记物包括,但不限于,CD1a(R4,T6,HTA-1);CD1b(R1);CD15s(唾液酰Lewis X);CD15u(3'硫代Lewis X);CD15su(6硫代-唾液酰Lewis X);CD30(Ber-H2,Ki-1);CD69(AIM,EA 1,MLR3,gp34/28,VEA);CD70(Ki-24,CD27配体);CD80(B7,B7-1,BB1);CD86(B7-2/B70);CD97(BL-KDD/F12);CD125(IL-5R α);CD126(IL-6R α);CD138(多配体蛋白聚糖-1(Syndecan-1),类肝素硫酸盐蛋白聚糖);CD152(CTLA-4);CD252(OX40L,TNF(配体)超家族,成员4);CD253(TRAIL,TNF(配体)超家族,成员10);CD279(PD1);CD289(TLR9,钟样受体9);和CD312(EMR2);其中括号中所列名称代表别名。标记物的实例包括本文中别处提供的那些。

[0368] 滤泡树突细胞

[0369] 最初检测到之前未知抗原的B细胞通常表达对该抗原具有亚最适结合亲和性的B细胞受体(BCR,即,具有跨膜结构域的抗体)。然而,当B细胞进入生发中心(GC)反应时,B细胞能够将其产生的抗体的亲和性增加几个数量级。这个通常持续几周的事件取决于累积、保留并递呈抗原性材料至激活的B细胞的FDC。B细胞,虽然有力地增殖,反复地使编码抗体的抗原结合位点的遗传序列发生变异并进行类别转换重组以形成分泌的高亲和性抗体,大部分为IgG同种型。GC反应还刺激长命的记忆B细胞和保持高保护性抗体效价(通常为很多年)的浆细胞的产生。预测在皮下注射时靶向FDC并被长期保留在FDC表面的疫苗载体增强针对疫苗接种应答的GC反应并提高所需体液免疫应答的亲和性和长期性。

[0370] 在一些具体实施方案中,可以通过结合补体受体,CR1(即,CD35)或CR2(即,CD21),FDC以及B细胞上表达的蛋白的部分来实现FDC靶向。部分的例子包括本文中别处提供的那些。

[0371] 包含多个靶向部分的疫苗纳米载体

[0372] GC反应和B细胞存活不仅需要FDC,而且还依赖于由激活的CD4T细胞提供的帮助。当CD4T细胞首先被将II类MHC中的同源肽(pMHC)呈递以获得滤泡帮助(T_{FH})表型的DC刺激时,提供的帮助是最有效的。然后新生成的T_{FH}细胞朝着B滤泡迁移并向呈递相同pMHC复合体的那些B细胞提供帮助。为此,B细胞首先获得抗原性材料(例如,病毒或病毒样疫苗),将其内在化并加工(即,提取装载至II类MHC的肽),然后将pMHC呈递至T_{FH}细胞。

[0373] 因此,本发明包括以下认识:刺激最适体液免疫力的疫苗能够结合几个特征和成分(图1):(a)靶向DC并被DC呈递的针对CD4T细胞的抗原性材料;(b)能够以天然形式被SCS-Mph递呈至抗原特异性滤泡B细胞的表面抗原;(c)为了递呈至T_{FH}细胞,被滤泡B细胞获得并被滤泡B细胞加工的能力(本发明包括以下认识:B细胞容易获得来自SCS-Mph的颗粒物质并将其内在化);(d)到达FDC并以完整形式被长期保留在FDC上的能力;和(e)赋予APC完全免

疫原性并避免或克服耐受的辅助活性。

[0374] 在一些具体实施方案中,疫苗纳米载体包含至少一个靶向部分。在一些具体实施方案中,疫苗纳米载体的所有靶向部分是彼此相同的。在一些具体实施方案中,疫苗纳米载体包含各种不同类型的靶向部分。在一些具体实施方案中,疫苗纳米载体包含多个单独的靶向部分,所有的彼此相同。在一些具体实施方案中,疫苗纳米载体只包含一种类型的靶向部分。在一些具体实施方案中,疫苗纳米载体只包含两种不同类型的靶向部分。在一些具体实施方案中,疫苗纳米载体包含多于两种不同类型的靶向部分。

[0375] 在一些具体实施方案中,疫苗纳米载体包含单一类型的靶向部分,其引导疫苗纳米载体传送至单一的细胞类型(例如,只传送至SCS-Mph)。在一些具体实施方案中,疫苗纳米载体包含单一类型的靶向部分,其引导疫苗纳米载体传送至多种细胞类型(例如,同时传送至SCS-Mph和FDC)。在一些具体实施方案中,疫苗纳米载体包含两种类型的靶向部分,其中第一种类型的靶向部分引导疫苗纳米载体传送至一种细胞类型,第二种类型的靶向部分引导疫苗纳米载体传送至第二种细胞类型。在一些具体实施方案中,疫苗纳米载体包含两种以上类型的靶向部分,其中一种或多种类型的靶向部分引导疫苗纳米载体传送至一种细胞类型,一种或多种类型的靶向部分引导疫苗纳米载体传送至第二种细胞类型。仅举一例,疫苗纳米载体可以包含两种类型的靶向部分,其中第一种类型的靶向部分引导疫苗纳米载体传送至DC,第二种类型的靶向部分引导疫苗纳米载体传送至SCS-Mph。

[0376] 在一些具体实施方案中,疫苗纳米载体包含至少一个靶向部分,其与疫苗纳米载体的外表面结合。在一些具体实施方案中,结合是共价的。在一些具体实施方案中,共价结合由一个或多个连接物介导。在一些具体实施方案中,结合是非共价的。在一些具体实施方案中,非共价结合由电荷相互作用、亲和性相互作用、金属配合、物理吸附、主客体相互作用、疏水性相互作用、 π - π 堆积相互作用、氢键相互作用、范德华力相互作用、磁性相互作用、静电相互作用、偶极-偶极相互作用和/或其组合所介导。

[0377] 在一些具体实施方案中,疫苗纳米载体包括脂膜(例如,脂双层、脂单层等),其中至少一个靶向部分与脂膜结合。在一些具体实施方案中,至少一个靶向部分嵌入脂膜内。在一些具体实施方案中,至少一个靶向部分嵌入脂双层的腔内。在一些具体实施方案中,至少一个靶向部分可以位于疫苗纳米载体的多个位点。例如,第一个靶向部分可以嵌于脂膜内,第二种免疫刺激剂可以与疫苗纳米载体的外表面结合。再举一例,第一个靶向部分和第二个靶向部分均可以与疫苗纳米载体的外表面结合。

[0378] 免疫刺激剂

[0379] 如上所述,在一些具体实施方案中,疫苗纳米载体可以转运一种或多种帮助刺激免疫应答的免疫刺激剂。在一些具体实施方案中,疫苗纳米载体包含同时刺激B细胞和T细胞的单一类型的免疫刺激剂。在一些具体实施方案中,疫苗纳米载体包含两种类型的免疫刺激剂,其中第一种类型的免疫刺激剂刺激B细胞,第二种类型的免疫刺激剂刺激T细胞。在一些具体实施方案中,疫苗纳米载体包含两种以上类型的免疫刺激剂,其中一种或多种类型的免疫刺激剂刺激B细胞,一种或多种类型的免疫刺激剂刺激T细胞。对于根据本发明可以使用的免疫刺激剂的更详细描述,参见以上部分。

[0380] B细胞激活试验

[0381] 在一些具体实施方案中,可以使用各种试验来确定B细胞或B细胞组中的免疫应答

是否得到刺激(即,B细胞或B细胞组是否变成“激活的”)。在一些具体实施方案中,可以通过测量抗体效价来测定B细胞中免疫应答的刺激。通常,“抗体效价”是指在特定的稀释度下抗体结合并中和抗原的能力。例如,高抗体效价是指在甚至是高稀释度下抗体结合并中和抗原的能力。在一些具体实施方案中,如果在比未免疫个体或预免疫血清高至少约5倍、至少约10倍、至少约20倍、至少约50倍、至少约100倍、至少约500倍、至少约1000倍或多于约1000倍的稀释度下,测量抗体效价为阳性,则称B细胞中免疫应答得到刺激。

[0382] 在一些具体实施方案中,可以通过测量抗体亲和性来测定B细胞中免疫应答的刺激。特别地,如果抗体具有低于 10^{-7} M、低于 10^{-8} M、低于 10^{-9} M、低于 10^{-10} M、低于 10^{-11} M、低于 10^{-12} M或更低的平衡解离常数(K_d),则称B细胞中免疫应答得到刺激。

[0383] 在一些具体实施方案中,如果发生了类别转换重组,则称B细胞中T细胞依赖性免疫应答得到刺激。特别地,从IgM转换至IgG同种型或转换至IgA或转换至这些同种型的混合物是B细胞中T细胞依赖性免疫应答的指征。

[0384] 在一些具体实施方案中,通过测量抗原特异性抗体的亲和性成熟来测定B细胞中的免疫应答。亲和性成熟发生于生发中心反应过程中,由此激活的B细胞反复地使编码抗原结合区域的免疫球蛋白基因发生变异。产生突变抗体(其对抗原具有更高的亲和性)的B细胞优选被允许存活并增殖。因此,随着时间的进行,GC中的B细胞产生的抗体逐渐获得更高的亲和性。在一些具体实施方案中,该过程的结果是高抗体效价的存在(例如,甚至在高稀释度下,结合并中和抗原的高亲和性IgG抗体)。

[0385] 在一些具体实施方案中,如果形成了记忆B细胞和/或能够长时间地产生大量高亲和性抗体的长生血浆细胞,则称B细胞中的免疫应答得到刺激。在一些具体实施方案中,在为了测试记忆B细胞和/或能够长时间地产生大量高亲和性抗体的长生血浆细胞的存在而进行疫苗接种后的不同的时间间隔(例如,2周、1个月、2个月、6个月、1年、2年、5年、10年、15年、20年、25年或更长)测定抗体效价。在一些具体实施方案中,通过测量体液应答来确定存在记忆B细胞和/或能够长时间地产生大量高亲和性抗体的长生血浆细胞(例如,如果相对于最初致敏的过程,在之后的加强疫苗接种后体液应答显著性更迅速且产生更高的效价)。

[0386] 在一些具体实施方案中,如果发生有力的生发中心反应,则称B细胞中的免疫应答得到刺激。在一些具体实施方案中,可以通过进行组织学实验来目测有力的生发中心反应。在一些具体实施方案中,可以通过进行含有抗原的淋巴组织(例如,疫苗引流淋巴结、脾等)的免疫组织化学来检测有力的生发中心反应。在一些具体实施方案中,免疫组织化学之后进行流式细胞计量术。

[0387] 在一些具体实施方案中,可以通过鉴定抗体同种型(例如,IgG、IgA、IgE、IgM)来确定B细胞中的免疫应答的刺激。在某些具体实施方案中,B细胞产生IgG同种型的抗体是所需的B细胞中的免疫应答。

[0388] 在一些具体实施方案中,通过在中和试验中分析抗体功能来确定B细胞中的免疫应答。特别地,将不存在血清时微生物(例如,病毒、细菌、真菌、原生动物、寄生虫等)在体外感染易感细胞系的能力与向细胞生长的培养基中加入了不同稀释度的免疫和非免疫血清的状态相比较。在某些具体实施方案中,如果微生物的感染在约1:5、约1:10、约1:50、约1:100、约1:500、约1:1000、约1:5000、约1:10,000或更低的稀释度下被中和,则称B细胞中的免疫应答得到刺激。

[0389] 在一些具体实施方案中,通过用通常为致死剂量的微生物感染经免疫的和未免疫的小鼠组(例如,疫苗接种后3周或更久)来确定疫苗在动物模型中的功效。监控两个组的存活程度和存活持续时间,通常描绘于Kaplan-Meier曲线中。为了确定增强的存活是否是由B细胞应答引起,可以将来自免疫小鼠的血清转移为“被动疫苗”,以确定对非免疫小鼠对抗致死性感染的保护。

[0390] 本领域普通技术人员将认识到以上所述的试验仅仅是可用于确定是否发生B细胞激活的示例性方法。可用于确定是否发生B细胞激活的任何本领域技术人员已知的试验皆落入本发明的范围内。此处描述的试验以及其它的可用于确定是否发生B细胞激活的试验在Current Protocols in Immunology(免疫学通用实验方案)(John Wiley & Sons, Hoboken, NY, 2007; 引入本文中作为参考)中有描述。

[0391] 纳米载体

[0392] 本文中所述的任一种纳米载体可以是疫苗纳米载体。尽管本文中提供的一些公开内容特意提出了疫苗纳米载体,将认识到,除非另外指出,公开内容不限于疫苗纳米载体,而且适用于本文中所述的任一种纳米载体。

[0393] 在一些具体实施方案中,疫苗纳米载体是合成纳米载体,其包含例如至少一种能够刺激B细胞和T细胞中的一种或两种中的免疫应答的免疫调节剂。免疫调节剂可以以本文中更详细描述的一种方式与纳米载体结合。

[0394] 在一些具体实施方案中,纳米载体是生物可降解和生物相容性的。通常,生物相容性物质对细胞是非毒性的。在一些具体实施方案中,如果加入细胞中导致低于一定阈值的细胞死亡(例如,低于50%、20%、10%、5%或更低的细胞死亡),则认为该物质是生物相容性的。在一些具体实施方案中,如果加入细胞中没有引起不利作用,则认为该物质是生物相容性的。通常,生物可降解物质是在治疗相关时间段(例如、几周、几个月或几年)之内在生理条件下进行分解的物质。在一些具体实施方案中,生物可降解物质是通过细胞机制分解的物质。在一些具体实施方案中,生物可降解物质是通过化学过程分解的物质。在一些具体实施方案中,纳米载体既是生物相容性物质又是生物可降解物质。在一些具体实施方案中,纳米载体是生物相容性物质但不是生物可降解物质。在一些具体实施方案中,纳米载体是生物可降解物质但不是生物相容性物质。

[0395] 在一些具体实施方案中,根据本发明的纳米载体是具有低于5微米(μm)最大尺寸(例如,直径)的任何实体。在一些具体实施方案中,本发明的纳米载体具有低于3微米的最大尺寸。在一些具体实施方案中,本发明的纳米载体具有低于1000纳米(nm)的最大尺寸。在一些具体实施方案中,本发明的纳米载体具有低于900纳米、800纳米、700纳米、600纳米、500纳米、400纳米、300纳米、200纳米或100纳米的最大尺寸。在一些具体实施方案中,本发明的纳米载体具有300纳米或更低的最大尺寸(例如,直径)。在一些具体实施方案中,本发明的纳米载体具有250纳米或更低的最大尺寸(例如,直径)。在一些具体实施方案中,本发明的纳米载体具有200纳米或更低的最大尺寸(例如,直径)。在一些具体实施方案中,本发明的纳米载体具有150纳米或更低的最大尺寸(例如,直径)。在一些具体实施方案中,本发明的纳米载体具有100纳米或更低的最大尺寸(例如,直径)。在本发明的一些具体实施方案中使用更小的纳米载体,例如具有50纳米或更低的最大尺寸。在一些具体实施方案中,本发明的纳米载体具有25纳米至200纳米范围的最大尺寸。在一些具体实施方案中,本发明的纳

米载体具有20纳米至100纳米范围的最大尺寸。在一些具体实施方案中,本文中提供的组合物的纳米载体具有低于500纳米的平均几何直径。在一些具体实施方案中,纳米载体具有高于50纳米但低于500纳米的平均几何直径。在一些具体实施方案中,纳米载体群的平均几何直径为约60纳米、75纳米、100纳米、125纳米、150纳米、175纳米、200纳米、225纳米、250纳米、275纳米、300纳米、325纳米、350纳米、375纳米、400纳米、425纳米、450纳米或475纳米。在一些具体实施方案中,平均几何直径为100-400纳米、100-300纳米、100-250纳米或100-200纳米。在一些具体实施方案中,平均几何直径为60-400纳米、60-350纳米、60-300纳米、60-250纳米或60-200纳米。在一些具体实施方案中,平均几何直径为75-250纳米。

[0396] 在一些具体实施方案中,本发明的纳米载体具有高于1000纳米 (nm) 的最大尺寸。在一些具体实施方案中,本发明的纳米载体具有高于900纳米、800纳米、700纳米、600纳米、500纳米、400纳米、300纳米、200纳米或100纳米的最大尺寸。在一些具体实施方案中,本发明的纳米载体具有300纳米或更高的最大尺寸(例如,直径)。在一些具体实施方案中,本发明的纳米载体具有250纳米或更高的最大尺寸(例如,直径)。在一些具体实施方案中,本发明的纳米载体具有200纳米或更高的最大尺寸(例如,直径)。在一些具体实施方案中,本发明的纳米载体具有150纳米或更高的最大尺寸(例如,直径)。在一些具体实施方案中,本发明的纳米载体具有100纳米或更高的最大尺寸(例如,直径)。在本发明一些实施方案中,使用了更小的纳米载体,例如,具有50纳米或更高的最大尺寸。

[0397] 在一些具体实施方案中,纳米载体具有低于1000纳米的直径。在一些具体实施方案中,纳米载体具有大约750纳米的直径。在一些具体实施方案中,纳米载体具有大约500纳米的直径。在一些具体实施方案中,纳米载体具有大约450纳米的直径。在一些具体实施方案中,纳米载体具有大约400纳米的直径。在一些具体实施方案中,纳米载体具有大约350纳米的直径。在一些具体实施方案中,纳米载体具有大约300纳米的直径。在一些具体实施方案中,纳米载体具有大约275纳米的直径。在一些具体实施方案中,纳米载体具有大约250纳米的直径。在一些具体实施方案中,纳米载体具有大约225纳米的直径。在一些具体实施方案中,纳米载体具有大约200纳米的直径。在一些具体实施方案中,纳米载体具有大约175纳米的直径。在一些具体实施方案中,纳米载体具有大约150纳米的直径。在一些具体实施方案中,纳米载体具有大约125纳米的直径。在一些具体实施方案中,纳米载体具有大约100纳米的直径。在一些具体实施方案中,纳米载体具有大约75纳米的直径。在一些具体实施方案中,纳米载体具有大约50纳米的直径。在一些具体实施方案中,纳米载体具有大约25纳米的直径。

[0398] 在某些具体实施方案中,纳米载体尺寸大于肾脏排泄限制(例如,具有大于6纳米直径的纳米载体)。在某些具体实施方案中,纳米载体足够小,以避免通过肝脏将纳米载体从血流中清除出来(例如,具有小于1000纳米直径的纳米载体)。通常,纳米载体的生物化学特征应当通过降低肾脏排泄和肝脏清除,使得纳米载体可以在血浆中循环更长时间。

[0399] 通常希望使用就大小、形状和/或组成而言相对统一的纳米载体群,使得每个纳米载体具有相似的特性。例如,至少80%,至少90%,或至少95%的纳米载体可以具有落入5%、10%或20%平均直径或最大尺寸内的直径或最大尺寸。在一些具体实施方案中,对于大小、形状和/或组成,纳米载体群可以是不同的。在一些具体实施方案中,纳米载体群的30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更多的纳米载体具有低于500纳米的直径。在一

些具体实施方案中,纳米载体群的10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更多的纳米载体具有高于50纳米但低于500纳米的直径。在一些具体实施方案中,纳米载体群的10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更多的纳米载体具有约60纳米、75纳米、100纳米、125纳米、150纳米、175纳米、200纳米、225纳米、250纳米、275纳米、300纳米、325纳米、350纳米、375纳米、400纳米、425纳米、450纳米或475纳米的直径。在一些具体实施方案中,纳米载体群的10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更多的纳米载体具有100-400纳米,100-300纳米、100-250纳米或100-200纳米的直径。在一些具体实施方案中,纳米载体群的10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更多的纳米载体具有60-400纳米、60-350纳米、60-300纳米、60-250纳米或60-200纳米的直径。

[0400] 根据本发明可以使用各种不同的纳米载体。在一些具体实施方案中,纳米载体是球体或椭球体。在一些具体实施方案中,纳米载体为平的或板状的。在一些具体实施方案中,纳米载体为立方体或长方体。在一些具体实施方案中,纳米载体为椭圆或椭圆形。在一些具体实施方案中,纳米载体为圆柱体、圆锥体、环形线圈(即,甜甜圈形)或棱锥形。在一些具体实施方案中,颗粒是脂质体。在一些具体实施方案中,颗粒是胶束。将清楚这些形状中的每一种落入“颗粒”的一般类别中,并且本发明的纳米载体可以包含纳米颗粒(即,具有低于1000纳米直径的颗粒)、微米颗粒(即,具有低于1000微米直径的颗粒)或微微米颗粒(即,具有低于1纳米直径的颗粒)。将进一步认识到,在一些具体实施方案中(如,基于脂质的纳米载体,如以下将更详细描述),纳米载体不是刚性的并且具有基于环境而改变的形状和直径。

[0401] “合成纳米载体的最大尺寸”意思是沿着合成纳米载体任何一个轴测量的纳米载体的最大尺寸。“合成纳米载体的最小尺寸”意思是沿着合成载体任何一个轴测量的合成纳米载体的最小尺寸。例如,对于球状合成纳米载体,合成纳米载体的最大和最小尺寸基本上是相同的,并且将是其直径的大小。相似地,对于立方体的合成纳米载体,合成纳米载体的最小尺寸将是其高、宽或长的最小数值,同时合成纳米载体的最大尺寸将是其高、宽或长的最大数值。在一个具体实施方案中,基于样品中的合成纳米载体的总数,样品中至少75%,优选80%,更优选90%的合成纳米载体的最小尺寸高于100纳米。在一个具体实施方案中,基于样品中的合成纳米载体的总数,样品中至少75%,优选80%,更优选90%的合成纳米载体的最大尺寸等于或低于5微米。优选,基于样品中的合成纳米载体的总数,样品中至少75%,优选80%,更优选90%的合成纳米载体的最小尺寸高于110纳米,更优选高于120纳米,更优选高于130纳米,再更优选高于150纳米。优选,基于样品中的合成纳米载体的总数,样品中至少75%,优选80%,更优选90%的合成纳米载体的最大尺寸等于或低于3微米,更优选等于或低于2微米,更优选等于或低于1微米,更优选等于或低于800纳米,更优选等于或低于600纳米,再更优选等于或低于500纳米。在优选的具体实施方案中,基于样品中的合成纳米载体的总数,样品中至少75%,优选80%,更优选90%的合成纳米载体的最大尺寸等于或高于100纳米,更优选等于或高于120,更优选高于130纳米,更优选高于140纳米,再更优选高于150纳米。通过将合成纳米载体悬浮于液体(通常为水性)介质中并使用动态光散射(例如,使用Brookhaven ξ PALS工具)来获得合成纳米载体大小的测量。纳米载体可以是实心的或空心的,并且可以包含一个或多个层。在一些具体实施方案中,每个层相对于其它层具有独特的成分和独特的特性。仅举一例,纳米载体可以具有核心/外壳结构,其中核心是

一层(例如,聚合核心),而外壳是第二层(例如,脂双层或单层)。纳米载体可以包含多个不同的层。在一些具体实施方案中,一层可以是实质上交联的,第二层不是实质上交联的,等等。在一些具体实施方案中,一层、一些层或所有不同的层可以包含一种或多种免疫调节剂、靶向部分、免疫刺激剂和/或其组合。在一些具体实施方案中,一层包含免疫调节剂、靶向部分和/或免疫刺激剂,第二层不包含免疫调节剂、靶向部分和/或免疫刺激剂,等等。在一些具体实施方案中,每一个单独的层包含不同的免疫调节剂、靶向部分、免疫刺激剂和/或其组合。

[0402] 脂质纳米载体

[0403] 在一些具体实施方案中,纳米载体可任选地包含一种或多种脂质。在一些具体实施方案中,纳米载体可以包含脂质体。在一些具体实施方案中,纳米载体可以包含脂双层。在一些具体实施方案中,纳米载体可以包含脂单层。在一些具体实施方案中,纳米载体可以包含胶束。在一些具体实施方案中,纳米载体可以包含核心,核心包含由脂质层(例如,脂双层、脂单层等)环绕的聚合基质。在一些具体实施方案中,纳米载体可以包含由脂质层(例如,脂双层、脂单层等)环绕的非聚合核心(例如,金属颗粒、量子点、陶瓷颗粒、骨颗粒、病毒颗粒等)。

[0404] 在一些具体实施方案中,纳米载体可以包含脂双层,所述脂双层的方向使得纳米载体的内部和外部是亲水性的,而脂双层的腔是疏水性的。包含脂双层的疫苗纳米载体的实例描述于实施例2中并在图3-8中显示。在一些具体实施方案中,疏水性免疫调节剂、靶向部分和/或免疫刺激剂可以与脂双层的腔结合(例如,嵌于其内)。在一些具体实施方案中,亲水性免疫调节剂、靶向部分和/或免疫刺激剂可以与纳米载体内部和/或外部结合(例如,共价或非共价结合、包埋于其内等)。在一些具体实施方案中,亲水性免疫调节剂、靶向部分和/或免疫刺激剂可以与脂双层的内表面和/或外表面结合(例如,共价或非共价结合、包埋于其内等)。在一些具体实施方案中,脂双层的内部亲水性表面与两性实体结合。在一些具体实施方案中,两性实体的方向使得两性实体的亲水端与脂双层的内表面结合,并且两性实体的疏水端朝向纳米载体的内部,从而在纳米载体内部产生疏水性的环境。

[0405] 在一些具体实施方案中,纳米载体可以包含脂单层,所述脂单层的方向使得纳米载体的内部是疏水性的,纳米载体的外部是亲水性的。包含脂单层的疫苗纳米载体的实例描述于实施例2中并在图9和10中显示。在一些具体实施方案中,疏水性免疫调节剂、靶向部分和/或免疫刺激剂可以与纳米载体的内部和/或脂单层的内表面结合(例如,共价或非共价结合、包埋于其内等)。在一些具体实施方案中,亲水性免疫调节剂、靶向部分和/或免疫刺激剂可以与纳米载体的外部和/或脂单层的外表面结合(例如,共价或非共价结合、包埋于其内等)。在一些具体实施方案中,脂双层的内疏水性表面与两性实体结合。在一些具体实施方案中,两性实体的方向使得两性实体的疏水端与脂双层的内表面结合,并且两性实体的亲水端朝向纳米载体的内部,从而在纳米载体内部产生亲水性的环境。

[0406] 在一些具体实施方案中,纳米载体可以包含一个或多个与纳米载体的外表面结合的纳米颗粒。包含与纳米载体的外表面结合的纳米颗粒的疫苗纳米载体的实例描述于实施例2中并在图4、6和8中显示。

[0407] 纳米载体中脂质的百分比范围可以为0重量%至99重量%、10重量%至99重量%、25重量%至99重量%、50重量%至99重量%或75重量%至99重量%。在一些具体实施方案

中,纳米载体中脂质的百分比范围可以为0重量%至75重量%、0%至50重量%、0重量%至25重量%或0%至10重量%。在一些具体实施方案中,纳米载体中脂质的百分比为大约1重量%、大约2重量%、大约3重量%、大约4重量%、大约5重量%、大约10重量%、大约15重量%、大约20重量%、大约25重量%或大约30重量%。

[0408] 在一些具体实施方案中,脂质是油。通常,纳米载体中可以包括任何本领域已知的任何油。在一些具体实施方案中,油可以包含一个或多个脂肪酸基团或其盐。在一些具体实施方案中,脂肪酸基团包含可消化的长链(例如,C₈-C₅₀)取代的或未取代的烃。在一些具体实施方案中,脂肪酸基团可以是C₁₀-C₂₀脂肪酸或其盐。在一些具体实施方案中,脂肪酸基团可以是C₁₅-C₂₀脂肪酸或其盐。在一些具体实施方案中,脂肪酸基团可以是C₁₅-C₂₅脂肪酸或其盐。在一些具体实施方案中,脂肪酸基团可以是不饱和的。在一些具体实施方案中,脂肪酸基团可以是单不饱和的。在一些具体实施方案中,脂肪酸基团可以是多不饱和的。在一些具体实施方案中,不饱和脂肪酸基团的双键可以是顺式构象。在一些具体实施方案中,不饱和脂肪酸的双键可以是反式构象。

[0409] 在一些具体实施方案中,脂肪酸基团可以是丁酸、己酸、辛酸、癸酸、月桂酸、肉豆蔻酸,棕榈酸,硬脂酸,花生酸、二十二酸或二十四酸中的一种或多种。在一些具体实施方案中,脂肪酸基团可以是棕榈油酸、油酸、十八碳烯酸、亚油酸、 α -亚麻酸、 γ -亚油酸、花生四烯酸、廿碳烯-9-酸、花生四烯酸、十二碳五烯酸、二十二碳六烯酸或芥子酸中的一种或多种。

[0410] 在一些具体实施方案中,油是液态甘油三酯。

[0411] 适合用于本发明的油包括,但不限于,扁桃(almond)、杏仁(apricot kernel)、鳄梨、巴西桐(babassu)、香柠檬、黑加仑种子、琉璃苣、刺楸、甘菊、油菜、香菜、巴西棕榈(carnauba)、蓖麻、肉桂、可可脂、椰子、鳕鱼肝、咖啡、玉米、棉花种子、鹌鹑、桉树、夜来香、鱼类、亚麻籽、香叶醇、葫芦、葡萄籽、榛子坚果、牛膝草、荷荷巴油、夏威夷胡桃、薰衣草(lavandin)、薰衣草(lavender)、柠檬、木姜子、澳洲坚果、锦葵、芒果籽、绣线菊籽、水貂、肉豆蔻、橄榄、橙、橘棘鲷、棕榈、棕榈仁、桃仁、花生、罂粟种子、南瓜种子、油菜籽、米糠、迷迭香、红花、檀香、sasquana、香薄荷、沙棘、芝麻、牛油树脂、硅树脂、大豆、向日葵、茶树、蓟、椿(tsubaki)、香根草、胡桃和小麦胚芽油,及其组合。适合用于本发明的油,包括,但不限于硬脂酸丁酯、辛酸三甘油酯、癸酸三甘油酯、环甲硅油、癸二酸二乙酯、二甲硅油360、豆蔻酸异丙酯、矿物油、辛基十二醇、油醇、硅树脂油,及其组合。在一些具体实施方案中,脂是激素(例如,雌激素、睾丸激素)、类固醇(例如,胆固醇、叶酸)、维生素(例如,维生素E)、磷脂(例如,缩醛磷脂酰胆碱)、鞘脂类(例如,神经酰胺)或脂蛋白(例如,阿朴脂蛋白)。

[0412] 包含聚合基质的纳米载体

[0413] 在一些具体实施方案中,纳米载体可以包含一种或多种聚合物。在一些具体实施方案中,聚合基质可由覆盖层(例如脂质体、脂单层、胶束等)环绕。在一些具体实施方案中,免疫调节剂、靶向部分和/或免疫刺激剂可以与聚合基质结合。在这样的具体实施方案中,免疫调节剂、靶向部分和/或免疫刺激剂有效包埋于纳米载体内。

[0414] 在一些具体实施方案中,免疫调节剂、靶向部分和/或免疫刺激剂可以与聚合基质共价结合。在一些具体实施方案中,共价结合由连接物介导。在一些具体实施方案中,免疫调节剂、靶向部分和/或免疫刺激剂与聚合基质非共价结合。例如,在一些具体实施方案中,

免疫调节剂、靶向部分和/或免疫刺激剂可以包埋于聚合基质内、由聚合基质环绕,和/或分布在整个聚合基质中。可替换地或另外地,免疫调节剂、靶向部分和/或免疫刺激剂可以通过疏水性相互作用、电荷相互作用、范德华力等与聚合基质结合。

[0415] 各种聚合物以及从其形成聚合基质的方法在药物传送领域中是已知的。通常,聚合基质包含一个或多个聚合物。根据本发明可以使用任何聚合物。聚合物可以是天然的或非天然的(合成的)聚合物。聚合物可以是包含两个或更多个单体的均聚物或共聚物。就序列而言,共聚物可以是无规,嵌段或包含无规和嵌段序列的组合。通常,根据本发明的聚合物是有机聚合物。

[0416] 聚合物的实例包括聚乙烯,聚碳酸酯(例如,聚(1,3-二噁烷-2酮)),聚酐(例如,聚(癸二酸酐)),聚羧基酸(例如,聚(β -羟基烷酸酯)),聚丙基延胡索酸酯,聚己内酯,聚酰胺(例如,聚己内酰胺),聚缩醛,聚醚,聚酯(例如,聚交酯,聚乙交酯),聚(原酸酯),聚氰基丙烯酸酯,聚乙烯醇,聚氨酯,聚磷腈,聚丙烯酸酯,聚甲基丙烯酸酯,聚脲,聚苯乙烯和聚胺。

[0417] 在一些具体实施方案中,根据本发明的聚合物包括根据21C.F.R. §177.2600由美国食品与药品管理局(FDA)批准用于人类的聚合物,包括但不限于聚酯(例如,聚乳酸、聚(乳酸-共-羟基乙酸)、聚己内酯、聚戊内酯、聚(1,3-二噁烷-2酮));聚酐(例如,聚(癸二酸酐));聚醚(例如,聚乙二醇);聚脲;聚甲基丙烯酸酯;聚丙烯酸酯;和聚腈基丙烯酸酯。

[0418] 在一些具体实施方案中,聚合物可以是亲水性的。例如,聚合物可以包含阴离子基团(例如,磷酸盐基团、硫酸盐基团、羧酸盐基团);阳离子基团(例如,季胺基团);或极性基团(例如,羟基基团、巯基基团、胺基团)。在一些具体实施方案中,包含亲水性聚合基质的纳米载体在纳米载体内产生亲水性环境。在一些具体实施方案中,亲水性免疫调节剂、靶向部分和/或免疫刺激剂可以与亲水性聚合基质结合。

[0419] 在一些具体实施方案中,聚合物可以是疏水性的。在一些具体实施方案中,包含疏水性聚合物基质的纳米载体在纳米载体内产生疏水性环境。在一些具体实施方案中,疏水性免疫调节剂、靶向部分和/或免疫刺激剂可以与疏水性聚合基质结合。

[0420] 在一些具体实施方案中,可以用一个或多个部分和/或官能团来修饰聚合物。根据本发明可以使用任何部分或官能团。在一些具体实施方案中,可以用聚乙二醇(PEG)、碳水化合物和/或源自多糖的聚缩醛来修饰聚合物(Papisov, 2001, ACS Symposium Series, 786:301;引入本文中作为参考)。

[0421] 在一些具体实施方案中,可以用脂质或脂肪酸基团来修饰聚合物,其性质在下文中更详细描述。在一些具体实施方案中,脂肪酸基团可以是丁酸、己酸、辛酸、癸酸、月桂酸、肉豆蔻酸,棕榈酸,硬脂酸,花生酸、二十二酸或二十四酸中的一种或多种。在一些具体实施方案中,脂肪酸基团可以是棕榈油酸、油酸、十八碳烯酸、亚油酸、 α -亚油酸、 γ -亚油酸、花生四烯酸、廿碳烯-9-酸、花生四烯酸、十二碳五烯酸、二十二碳六烯酸或芥子酸中的一种或多种。

[0422] 在一些具体实施方案中,聚合物可以是聚酯,包括包含乳酸和羟基乙酸单元的共聚物,如聚(乳酸-共-羟基乙酸)和聚(丙交酯-共-乙交酯)共聚物,在本文中一起被称为“PLGA”;以及包含羟基乙酸单元的均聚物(本文称为“PGA”)和包含乳酸单元的均聚物(例如,聚-L-乳酸、聚-D-乳酸、聚-D,L-乳酸、聚-L-丙交酯、聚-D-丙交酯和聚-D,L-丙交酯,在本文中一起被称为“PLA”)。在一些具体实施方案中,示例性的聚酯包括,例如,聚羧基酸;

PEG共聚物以及丙交酯和乙交酯的共聚物(例如,PLA-PEG共聚物、PGA-PEG共聚物、PLGA-PEG共聚物,及其衍生物)。在一些具体实施方案中,聚酯包括,例如,聚酐、聚(原酸酯)、聚(原酸酯)-PEG共聚物、聚(己内酯)、聚(己内酯)-PEG共聚物、聚赖氨酸、聚赖氨酸-PEG共聚物、聚(吡丙啶)、聚(吡丙啶)-PEG的共聚物、聚(L-丙交酯-共-L-赖氨酸)、聚(丝氨酸酯)、聚(4-羟基-L-脯氨酸酯)、聚[α -(4-氨基丁基)-L-羟基乙酸],及其衍生物。

[0423] 在一些具体实施方案中,聚合物可以是PLGA。PLGA是乳酸和羟基乙酸的生物相容性和生物可降解共聚物,并且各种形式的PLGA是通过乳酸:羟基乙酸的比率来表征的。乳酸可以是L-乳酸、D-乳酸或D,L-乳酸。可以通过改变乳酸:羟基乙酸的比率来调整PLGA的降解速率。在一些具体实施方案中,根据本发明的所用PLGA的特征在于乳酸:羟基乙酸的比率是大约85:15、大约75:25、大约60:40、大约50:50、大约40:60、大约25:75或大约15:85。

[0424] 在一些具体实施方案中,聚合物可以是一种或多种丙烯酸聚合物。在某些具体实施方案中,丙烯酸聚合物包括,例如,丙烯酸和甲基丙烯酸共聚物、甲基丙烯酸甲酯共聚物、甲基丙烯酸乙氧基乙酯、甲基丙烯酸氰乙基酯、甲基丙烯酸氨基烷基酯共聚物、聚(丙烯酸)、聚(甲基丙烯酸)、甲基丙烯酸烷基酰胺共聚物、聚(甲基丙烯酸甲酯)、聚(甲基丙烯酸酐)、甲基丙烯酸甲酯、聚甲基丙烯酸酯、聚(甲基丙烯酸甲酯)共聚物、聚丙烯酰胺、甲基丙烯酸氨基烷基酯共聚物、甲基丙烯酸缩水甘油酯共聚物、聚氰基丙烯酸酯,和包含一种或多种前述聚合物的组合。丙烯酸聚合物可以包含丙烯酸和甲基丙烯酸酯完全聚合化的共聚物,具有少量的季铵基团。

[0425] 在一些具体实施方案中,聚合物可以是阳离子聚合物。通常,阳离子聚合物能够缩合和/或保护带负电的核酸链(例如,DNA、RNA或其衍生物)。含有胺的聚合物,如聚(赖氨酸)(Zauner等,1998,Adv. Drug Del. Rev., 30:97;和Kabanov等,1995,Bioconjugate Chem., 6:7;将两篇都引入本文中作为参考)、聚(吡丙啶)(PEI; Boussif等,1995, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 1995, 92:7297;引入本文中作为参考)和聚(酰氨基胺)树状聚合物(Kukowska-Latallo等,1996, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 93:4897; Tang等,1996, Bioconjugate Chem., 7:703;和Haensler等,1993, Bioconjugate Chem., 4:372;所有文献引入本文中作为参考),在生理pH下带正电,与核酸形成离子对,在各种细胞系中介导转染。

[0426] 在一些具体实施方案中,聚合物可以是带有阳离子侧链的可降解聚酯(Putnam等,1999, Macromolecules, 32:3658; Barrera等,1993, J. Am. Chem. Soc., 115:11010; Kwon等,1989, Macromolecules, 22:3250; Lim等,1999, J. Am. Chem. Soc., 121:5633;和Zhou等,1990, Macromolecules, 23:3399;所有文献引入本文中作为参考)。这样的聚酯的实例包括聚(L-丙交酯-共-L-赖氨酸)(Barrera等,1993, J. Am. Chem. Soc., 115:11010;引入本文中作为参考),聚(丝氨酸酯)(Zhou等,1990, Macromolecules, 23:3399;引入本文中作为参考),聚(4-羟基-L-脯氨酸酯)(Putnam等,1999, Macromolecules, 32:3658;和Lim等,1999, J. Am. Chem. Soc., 121:5633;二者皆引入本文中作为参考),和聚(4-羟基-L-脯氨酸酯)(Putnam等,1999, Macromolecules, 32:3658;和Lim等人,1999, J. Am. Chem. Soc., 121:5633;二者皆引入本文中作为参考)。

[0427] 在一些具体实施方案中,根据本发明的聚合物可以是碳水化合物,其性质将在下文中更详细描述。在一些具体实施方案中,碳水化合物可以是包含由糖苷键连接的单糖(或其衍生物)的多糖,如本领域所知。在一些具体实施方案中,碳水化合物可以是普鲁兰多糖、

纤维素、微晶纤维素、羟丙基甲基纤维素、羟基纤维素、甲基纤维素、右旋糖苷、环右旋糖苷、糖原、淀粉、羟乙基淀粉、卡拉胶、糖基、直链淀粉、壳聚糖、N,0-羟甲基壳聚糖、海藻胶和海藻酸、淀粉、几丁质、肝素、魔芋、葡甘聚糖、石耳素、肝素、透明质酸、卡德兰和黄原胶中的一种或多种。

[0428] 在一些具体实施方案中,根据本发明的聚合物可以是蛋白或肽,其性质将在下文更详细描述。根据本发明可用的示例性蛋白包括,但不限于,白蛋白、胶原、聚(氨基酸)(例如,聚赖氨酸)、抗体等。

[0429] 在一些具体实施方案中,根据本发明的聚合物可以是核酸(即,多核苷酸),其性质将在下文更详细描述。根据本发明可用的示例性多核苷酸包括,但不限于,DNA、RNA等。

[0430] 在一些具体实施方案中,本发明涉及纳米颗粒-抗原生物偶联物系统作为诱导抗体产生的平台的用途。如本文中所用的受控释放聚合物系统或基于系统的囊泡是结合活性剂(如,治疗剂、诊断剂、预测剂或预防剂)的聚合物,使得活性剂以预先设计的方式从材料中释放和/或引发出来。可以将聚合物-抗原生物偶联物系统合成为均聚物,双嵌段、三嵌段和/或多嵌段共聚物。聚合物-抗原生物偶联物系统的合成包括从单体聚合以及不同聚合物的偶联。纳米颗粒系统可以包括生物可降解、化学可降解或同时生物和化学可降解的聚合物。用于受控释放聚合物系统的合适聚合物的实例包括,但不限于,聚(乳酸)、聚(乳酸)衍生物、PEG化聚(乳酸)、聚(乳酸-共-羟基乙酸)、聚(乳酸-共-羟基乙酸)衍生物、PEG化聚(乳酸-共-羟基乙酸)、聚(酐)、PEG化聚(酐)、聚(原酸酯)、聚(原酸酯)衍生物、PEG化聚(原酸酯)、聚(己内酯)、聚(己内酯)衍生物、PEG化聚(己内酯)、聚赖氨酸、聚赖氨酸衍生物、PEG化聚赖氨酸、聚(吡丙啶)、聚(吡丙啶)衍生物、PEG化聚(吡丙啶)、聚(丙烯酸)、聚(丙烯酸)衍生物、PEG化聚(丙烯酸)、聚(尿烷)、PEG化聚(尿烷)、聚(尿烷)衍生物,及其组合。

[0431] 这些和其它聚合物的性质及其制备方法在本领域是已知的(参见,例如,美国专利号6,123,727;5,804,178;5,770,417;5,736,372;5,716,404;6,095,148;5,837,752;5,902,599;5,696,175;5,514,378;5,512,600;5,399,665;5,019,379;5,010,167;4,806,621;4,638,045和4,946,929;Wang等,2001,J. Am. Chem. Soc., 123:9480;Lim等,2001,J. Am. Chem. Soc., 123:2460;Langer, 2000, Acc. Chem. Res., 33:94;Langer, 1999, J. Control. Release, 62:7;和Uhrich等,1999, Chem. Rev., 99:3181;所有文献引入本文中作为参考)。一般地说,多种合成合适聚合物的方法在以下的文献中有描述:Concise Encyclopedia of Polymer Science and Polymeric Amines and Ammonium Salts(聚合物科学以及聚合胺和铵盐的简明百科全书),Goethals编辑,Pergamon Press,1980;Odian的Principles of Polymerization(聚合原理),John Wiley & Sons,第四版,2004;Allcock等的Contemporary Polymer Chemistry,Prentice-Hall,1981;Deming等,1997, Nature, 390:386;和美国专利号6,506,577;6,632,922;6,686,446和6,818,732;所有文献引入本文中作为参考。

[0432] 在一些具体实施方案中,聚合物可以是直链或支链聚合物。在一些具体实施方案中,聚合物可以是树状聚合物。在一些具体实施方案中,聚合物可以是彼此实质上交联的。在一些具体实施方案中,聚合物可以是无实质交联的。在一些具体实施方案中,聚合物可以不进行交联步骤而用于本发明。

[0433] 还应该理解,本发明的纳米载体可以包含嵌段共聚物、接枝共聚物、共混物、混合

物和/或任何前述和其它聚合物的加合物。

[0434] 本领域技术人员将认识到本文中所列举的聚合物表示根据本发明可用的聚合物的示例性而非穷举性的列举。

[0435] 在一些具体实施方案中,疫苗纳米载体包含嵌入反胶束内的免疫调节剂。仅举一例,脂质体纳米载体可以包含嵌入脂质体膜内的疏水性免疫调节剂,和嵌入脂质体纳米载体的内部中发现的反胶束内的亲水性免疫调节剂。

[0436] 非聚合纳米载体

[0437] 在一些具体实施方案中,纳米载体不包含聚合成分。在一些具体实施方案中,纳米载体可以包含金属颗粒、量子点、陶瓷颗粒、骨颗粒、病毒颗粒等。在一些具体实施方案中,免疫调节剂、靶向部分和/或免疫刺激剂可以与这样的非聚合物纳米载体的表面结合。在一些具体实施方案中,非聚合纳米载体是非聚合成分的聚集体,例如金属原子(例如,金原子)的聚集体。在一些具体实施方案中,免疫调节剂、靶向部分和/或免疫刺激剂与非聚合成分的聚集体的表面结合,包埋于非聚合成分的聚集体内,或由非聚合成分的聚集体环绕,和/或分布在整个非聚合成分的聚集体中。

[0438] 在本发明的某些具体实施方案中,非聚合纳米载体包含梯度或单相合金。在本发明的某些具体实施方案中,纳米载体包含具有光学和/或磁性可测性质的颗粒。

[0439] 包含两性实体的纳米载体

[0440] 在一些具体实施方案中,纳米载体可以任选包含一个或多个两性实体。在一些具体实施方案中,两性实体能够促进产生具有增加的稳定性、改善的一致性或提高的粘性的纳米载体。在一些具体实施方案中,两性实体可以与脂膜(例如,脂双层、脂单层等)的内表面结合。例如,如果脂膜的内表面是亲水性的,则包埋于脂纳米载体内的空间是亲水性的。但是,如果两性实体与亲水性脂膜的内表面结合以致于两性实体的亲水端与亲水性脂膜的内表面结合并且两性实体的疏水端与纳米载体的内部结合,则包埋于纳米载体内的空间是疏水性的。

[0441] 纳米载体中的两性实体的百分比范围可以为0重量%至99重量%、10重量%至99重量%、25重量%至99重量%、50重量%至99重量%或75重量%至99重量%。在一些具体实施方案中,纳米载体中两性实体的百分比范围可以为0重量%至75重量%、0重量%至50重量%、0重量%至25重量%或0重量%至10重量%。在一些具体实施方案中,纳米载体中两性实体的百分比可以为大约1重量%、大约2重量%、大约3重量%、大约4重量%、大约5重量%、大约10重量%、大约15重量%、大约20重量%、大约25重量%或大约30重量%。

[0442] 任何本领域已知的两性实体均适合用于制造根据本发明的纳米载体。这样的两性实体包括,但不限于,磷酸甘油酯;磷脂酰胆碱;二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC);二油酰基磷脂酰乙醇胺(DOPE);二油酰基氧基丙基三乙基铵(DOTMA);二油酰基磷脂酰胆碱;胆固醇;胆固醇酯;二酰基甘油;二酰基甘油琥珀酸酯;二磷脂酰甘油(DPPG);十六烷醇;脂肪醇,如聚乙二醇(PEG);聚环氧乙烷-9-月桂醚;表面活性脂肪酸,如棕榈酸或油酸;脂肪酸;脂肪酸单甘油酯;脂肪酸二甘油酯;脂肪酸酰胺;三油酸山梨酯(Span®85)甘胆酸盐;单月桂酸山梨酯(Span®20);聚山梨酸酯20(Tween®20);聚山梨酸酯60(Tween®60);聚山梨酸酯65(Tween®65);聚山梨酸酯80(Tween®80);聚山梨酸酯85(Tween®85);聚环氧乙烷单硬脂酸酯;表面活性肽;poloxomer;脂肪酸山梨酯,如三油酸山梨酯;卵磷脂;溶血卵磷脂;磷脂酰丝氨酸;磷

脂酰肌醇;鞘磷脂;磷脂酰乙醇胺(脑磷脂);心磷脂;磷脂酸;脑苷脂;联十六烷醇磷酸酯;二棕榈酰磷脂酰甘油;硬脂酸胺;十二烷基胺;十六烷基胺;棕榈酸乙酯;蓖麻醇酸甘油酯;硬脂酸十六烷酯;肉豆蔻酸异丙酯;四丁酚醛;聚(乙二醇)5000-磷脂酰乙醇胺;聚(乙二醇)400-单硬脂酸酯;磷脂;具有高表面积性质的合成和/或天然去污剂;脱氧胆酯;环化糊精;离液序列高的盐;离子配对试剂;及其组合。两性实体成分可以是不同两性实体的混合物。这些两性实体可以从天然来源提取和纯化,或者在实验室中合成制备。在某些特定的具体实施方案中,可购得两性实体。

[0443] 本领域技术人员将认识到,这仅仅是具有表面活性的物质的示例性而非穷举性的列举。任何两性实体可用于生产根据本发明所用的纳米载体。

[0444] 包含碳水化合物的疫苗纳米载体

[0445] 在一些具体实施方案中,纳米载体可任选包含一种或多种碳水化合物。纳米载体中的碳水化合物的百分比范围可以为0重量%至99重量%、10重量%至99重量%、25重量%至99重量%、50重量%至99重量%或75重量%至99重量%。在一些具体实施方案中,纳米载体中碳水化合物的百分比范围可以为0重量%至75重量%、0重量%至50重量%、0重量%至25重量%或0重量%至10重量%。在一些具体实施方案中,纳米载体中碳水化合物的百分比可以为大约1重量%、大约2重量%、大约3重量%、大约4重量%、大约5重量%、大约10重量%、大约15重量%、大约20重量%、大约25重量%或大约30重量%。

[0446] 碳水化合物可以是天然的或合成的。碳水化合物可以源自天然的碳水化合物。在某些具体实施方案中,碳水化合物是单糖,包括但不限于葡萄糖、果糖、半乳糖、核糖、乳糖、蔗糖、麦芽糖、海藻糖、纤维二糖、甘露糖、木糖、阿拉伯糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、甘露糖醛酸、葡萄糖胺、半乳糖胺和神经氨酸。在某些具体实施方案中,碳水化合物是二糖,包括但不限于乳糖、蔗糖、麦芽糖、海藻糖和纤维二糖。在某些具体实施方案中,碳水化合物是多糖,包括但不限于,普鲁兰多糖、纤维素、微晶纤维素、羟丙基甲基纤维素(HPMC)、羟纤维素(HC)、甲基纤维素(MC)、右旋糖苷、环右旋糖苷、糖原、淀粉、羟乙基淀粉、卡拉胶、糖基、直链淀粉、壳聚糖、N,0-羟甲基壳聚糖、海藻胶和海藻酸、淀粉、几丁质、肝素、魔芋、葡甘聚糖、石耳素、肝素、透明质酸、卡德兰和黄原胶。在某些具体实施方案中,碳水化合物是糖醇,包括但不限于甘露糖醇、山梨糖醇、木糖醇、赤藻糖醇、麦芽糖醇和乳糖醇。

[0447] 颗粒以及与疫苗纳米载体结合的颗粒

[0448] 在一些具体实施方案中,根据本发明的疫苗纳米载体可以包含一个或多个颗粒。在一些具体实施方案中,一个或多个颗粒与疫苗纳米载体结合。在一些具体实施方案中,疫苗纳米载体包含一个或多个与纳米载体的外表面结合的颗粒。在一些具体实施方案中,颗粒可以与疫苗纳米载体通过共价键结合。在一些具体实施方案中,颗粒可以与疫苗纳米载体通过非共价相互作用结合(例如,电荷相互作用、亲和性相互作用、金属配合、物理吸附、主客体相互作用、疏水性相互作用、 π -堆积相互作用、氢键相互作用、范德华力相互作用、磁性相互作用、静电相互作用、偶极-偶极相互作用和/或其组合)。在一些具体实施方案中,疫苗纳米载体包含一个或多个包埋于纳米载体中的颗粒。在一些具体实施方案中,疫苗纳米载体包含一个或多个嵌于纳米载体表面中的颗粒(例如,嵌于脂双层中)。在一些具体实施方案中,与纳米载体结合的颗粒允许可调的膜刚性和可控的脂质体稳定性。

[0449] 在一些具体实施方案中,与疫苗纳米载体结合的疫苗纳米载体颗粒可以包含聚合

基质,如上所述。在一些具体实施方案中,与疫苗纳米载体结合的疫苗纳米载体颗粒可以包含非聚合成分(例如,金属颗粒、量子点、陶瓷颗粒、骨颗粒、病毒颗粒等),如上所述。

[0450] 在一些具体实施方案中,与疫苗纳米载体结合的疫苗纳米载体颗粒可以带有负电荷。在一些具体实施方案中,与疫苗纳米载体结合的疫苗纳米载体颗粒可以带有正电荷。在一些具体实施方案中,与疫苗纳米载体结合的疫苗纳米载体颗粒可以是电中性的。

[0451] 在一些具体实施方案中,颗粒在其表面具有一个或多个胺部分。胺部分可以是,例如,脂肪族胺部分。在某些具体实施方案中,胺是伯、仲、叔或季胺。在某些具体实施方案中,颗粒包含含有胺的聚合物。在某些具体实施方案中,颗粒包含含有胺的脂质。在某些具体实施方案中,颗粒包含在中性pH带有正电荷的蛋白或肽。在一些具体实施方案中,在颗粒表面具有一个或多个胺部分的颗粒在中性pH下带有净正电荷。在本发明的颗粒中还可以使用在中性pH下提供正电荷的其它化学部分。

[0452] 在一些具体实施方案中,颗粒在表面上具有一个或多个负电荷(在中性pH下)部分。例如,颗粒在表面上具有一个或多个羧酸或磷酸基团。在一些具体实施方案中,在其表面上具有一个或多个羧酸或磷酸部分的颗粒在中性pH下具有净负电荷。在中性pH下提供负电荷的其他化学部分也可以用于本发明的颗粒中。

[0453] 在一些具体实施方案中,颗粒在表面上具有一个或多个基本上中性(在中性pH下)的部分。例如,颗粒在表面上具有一个或多个醚基团。在一些具体实施方案中,在其表面上具有一个或多个醚部分的颗粒在中性pH下基本上不具有净电荷。在中性pH下提供中性电荷的其他化学部分也可以用于本发明的颗粒中。

[0454] 为了影响表面的电荷而存在于纳米载体表面上的化合物的一些非限制实例包括1-棕榈酰-2-油酰-sn-甘油-3-胆碱磷酸(POPC)、1,2-二油酰-3-三甲铵-丙烷氯化物盐(DOTAP)、单唾液酰神经节苷脂GM3、1,2-二十六烷酰-sn-甘油-3-磷酸-L-丝氨酸钠盐(DPPS)、单磷酸脂质A和N-4-硝基苯并-2-氧杂-1,3-二唑磷脂酰乙醇胺(NBD-PE)。

[0455] ζ 电势是颗粒的表面电势的度量。在一些具体实施方案中,与纳米载体结合的纳米载体颗粒具有正的 ζ 电势。在一些具体实施方案中,颗粒具有-50mV至+50mV范围的 ζ 电势。在一些具体实施方案中,颗粒具有-25mV至+25mV范围的 ζ 电势。在一些具体实施方案中,颗粒具有-10mV至+10mV范围的 ζ 电势。在一些具体实施方案中,颗粒具有-5mV至+5mV范围的 ζ 电势。在一些具体实施方案中,颗粒具有0mV至+50mV范围的 ζ 电势。在一些具体实施方案中,颗粒具有0mV至+25mV范围的 ζ 电势。在一些具体实施方案中,颗粒具有0mV至+10mV范围的 ζ 电势。在一些具体实施方案中,颗粒具有0mV至+5mV范围的 ζ 电势。在一些具体实施方案中,颗粒具有-50mV至0mV范围的 ζ 电势。在一些具体实施方案中,颗粒具有-25mV至0mV范围的 ζ 电势。在一些具体实施方案中,颗粒具有-10mV至0mV范围的 ζ 电势。在一些具体实施方案中,颗粒具有-5mV至0mV范围的 ζ 电势。在一些具体实施方案中,颗粒具有基本上中性的 ζ 电势(即,大约0mV)。

[0456] 可以使用本领域任何已知的方法制备颗粒(例如,纳米颗粒、微米颗粒)。例如,颗粒制剂可以通过以下方法制成:如纳米沉淀、使用液体通道的流动聚焦、喷雾干燥、单一和双乳剂溶剂挥发、溶剂提取、相分离、碾磨、微乳程序、微细加工、纳米级加工、牺牲层、单凝聚和复凝聚,以及其它本领域普通技术人员熟知的方法。可替换地或另外地,用于单分散半导体、导电性的、磁性的、有机的和其它纳米颗粒的水性和有机溶剂体系已经得到了描述

(Pellegrino等,2005,Small,1:48;Murray等,2000,Ann.Rev.Mat.Sci.,30:545;和Trindade等,2001,Chem.Mat.,13:3843;所有文献引入本文中作为参考)。

[0457] 在某些具体实施方案中,可以通过纳米沉淀方法或喷雾干燥来制备颗粒。可以改变制备颗粒中所用的条件以产生所需的尺寸或性质(例如,疏水性、亲水性、外部形状、“粘度”、形状等)的颗粒。所用的制备颗粒的方法和条件(例如,溶剂、温度、浓度、空气流速等)可以取决于待传送的治疗剂和/或聚合基质的组成。

[0458] 制备用于传送胶囊化试剂的微米颗粒的方法在文献中有描述(参见,例如,Doubrow编辑,“Microcapsules and Nanoparticles in Medicine and Pharmacy”(医学和药学中的微胶囊和纳米颗粒),CRC Press,Boca Raton,1992;Mathiowitz等,1987,J.Control.Release,5:13;Mathiowitz等,1987,Reactive Polymers,6:275;和Mathiowitz等,1988,J.Appl.Polymer Sci.,35:755;将所有文献引入本文中作为参考)。

[0459] 如果通过以上任何方法制备的颗粒具有所需范围外的尺寸范围,则可使用例如筛网对颗粒进行大小筛分。

[0460] 免疫特征表面

[0461] 本发明的合成纳米载体包含一个或多个表面,并且在一些具体实施方案中,至少一个表面包含免疫特征表面。

[0462] 免疫特征表面是包含多个部分的表面,其中:(1)免疫特征表面不包括是抗体Fc片段(portion)的部分;和(2)这些部分以有效提供基于亲合力的与哺乳动物抗原呈递细胞结合的含量存在。

[0463] 基于亲合力的结合是基于亲合力作用的结合(这种类型的结合也称为“高亲合力”结合)。在优选的具体实施方案中,如下使用体内试验接着体外试验来确定免疫特征表面的存在(尽管确定基于亲合力作用的结合(即,“高亲合力”结合)存在的其他方法也可以用于本发明的实践中)。

[0464] 体内试验使用两组携带不同荧光标记的合成纳米载体,一组合成纳米载体具有免疫特征表面,而另一组用作对照。为了测试免疫特征表面在体内是否可以将合成纳米载体靶向抗原呈递细胞,将两组合成纳米载体1:1混合并注射入小鼠的足垫中。通过在纳米载体注射后1至4小时和24小时的时间点分别收集注射小鼠的引流淋巴结来测量树突细胞和被膜下淋巴窦巨噬细胞上的合成纳米载体积聚。将淋巴结进行加工,用于冷冻切片的共焦荧光免疫组织学,用小鼠-CD11c(克隆HL3,BD BIOSCIENCES®或小鼠-CD169(来自SEROtec®的克隆3D6.112))的荧光抗体进行复染,并使用合适图像处理软件,如ADOBE®PHOTOSHOP®,通过测面积法来分析。如果包含免疫特征表面的合成纳米载体结合树突细胞和/或被膜下淋巴窦巨噬细胞的频率高于对照纳米载体至少1.2倍,优选至少1.5倍,更优选至少2倍,则建立了由免疫特征表面引起的抗原呈递细胞的靶向。

[0465] 在优选的具体实施方案中,伴随体内试验的体外试验确定了生物相容性表面上人或小鼠树突细胞或小鼠被膜下淋巴窦巨噬细胞(总地称为“体外抗原呈递细胞”)的固定,该生物相容性表面覆盖有免疫特征表面包含的部分或体外抗原呈递细胞表达的表面抗原特异性的抗体(对于人树突细胞:来自Miltenyi Biotec®的抗-CD11c(BDCA-1)克隆AD5-8E7,对于小鼠树突细胞:抗-CD11c(α X整联蛋白)克隆HL3,BD BIOSCIENCES®,或对于小鼠被膜下淋巴窦巨噬细胞:来自SEROtec®的抗-CD169克隆3D6.112),使得(i)对应于最大的固定于

已经用免疫特征表面包含的部分覆盖的表面的体外抗原呈递细胞的最佳覆盖密度不可检测或是用抗体覆盖表面观察到的至少10%，优选至少20%，更优选至少25%；和(ii)如果通过免疫特征表面的体外抗原呈递细胞的固定化是可检测的，待检测的免疫特征表面在免疫特征表面包含的部分的覆盖密度高于支持半最大结合的抗体覆盖密度的至少2倍，优选至少3倍，更优选至少4倍下支持半最大结合。

[0466] 免疫特征表面在pH=7.2-7.4下可以是正电荷的、负电荷的或中性电荷的。免疫特征表面可以由相同部分或不同部分的混合物构成。在一些具体实施方案中，免疫特征表面可以包含B细胞抗原。在免疫特征表面中可能有用的部分的实例包括：甲氧基基团、正电荷的胺基(例如，叔胺)、唾液酸乳糖、抗生物素蛋白和/或抗生物素蛋白衍生物，如中性链亲和素(NeutrAvidin)，以及上述任一种的残基。在一个具体实施方案中，免疫特征表面包含的部分与本发明的纳米载体的表面偶联。在另一个具体实施方案中，免疫特征表面与本发明的纳米载体的表面偶联。

[0467] 应当注意到免疫特征表面包含的部分给予了高亲合力结合。不是所有存在于纳米载体上的部分将给予高亲合力结合，如该定义中特意限定的，以及本发明说明书中概括描述的。因此，即使表面可以包含多个部分(有时称为“矩阵”)，这并不意味着这样的表面自然就是免疫特征表面，缺少表明这样的表面给予根据本发明的定义和公开内容的结合的数据。

[0468] 在一些具体实施方案中，多个部分是除了抗体Fc片段以外的部分。在一些具体实施方案中，多个部分选自免疫刺激部分(如本文中所述的)、免疫调节部分(如本文中所述的)、靶向部分(如本文中所述的)、小的有机部分(例如，尼古丁)、寡聚物和聚合物(包括合成的聚合物，如PEG)、无机部分、核酸和多核苷酸(例如，DNA和RNA片段)、氨基酸、多肽、糖蛋白、生物活性物质(如本文中所述的)、神经节苷脂、脂质、磷脂、碳水化合物、多糖和上述任一种的片段。在一些具体实施方案中，免疫特征表面可以包含B-细胞抗原或T-细胞抗原。上述部分的任意组合也在本发明的范围内。将认识到这些部分与免疫特征表面的键合可能涉及合适的修饰，如用与表面结合的键替代与部分中原子结合的键。

[0469] 在一些具体实施方案中，多个部分与免疫特征表面的键合是通过部分和纳米载体成分之间的共价键。例如，在包含聚合材料的纳米载体的情况中，多个部分可以与聚合物共价键合。然而，在一些情况中，可以使用非共价相互作用，包括离子或氢键合，或分散力。

[0470] 免疫特征表面可以包含多个相同的部分或不同部分的混合物。例如，2、3、4、5、6、7、8、9或10个不同类型的部分可以存在于免疫特征表面中。

[0471] 当免疫特征表面存在于pH范围为7.2-7.4的缓冲水溶液中时，免疫特征表面可以是全部正电荷的、负电荷的或中性电荷的。将清楚，在不同部分的混合物存在于免疫特征表面上时，免疫特征表面可以在任何特定pH下结合正电荷、负电荷和/或中性电荷部分的组合。

[0472] 免疫特征表面提供了与抗原呈递细胞(APC)的高亲合力结合，特别是表达MHC II分子的APC。例如，在一些具体实施方案中，免疫特征表面提供与树突细胞(DC)的高亲合力结合。在一些其他具体实施方案中，免疫特征表面提供与巨噬细胞的高亲合力结合，例如，被膜下淋巴窦巨噬细胞(SCS Mphs)。在一些具体实施方案中，免疫特征表面提供了与B细胞的高亲合力结合(即，包含B-细胞抗原的免疫特征表面)。在一些具体实施方案中，免疫特征

表面提供了与DC、SCS Mphs或B-细胞的高亲合力和低亲和性结合。

[0473] 免疫特征表面包含多个部分,并且多个部分可以是全部相同的部分或是不同部分的混合物。多个部分存在于能够以高亲合力结合APC表面的表面上。在一些具体实施方案中,多个部分存在于能够以高亲合力和低亲和性结合APC表面的表面上。

[0474] 免疫特征表面中有一部分实例包括:小的有机分子,如甘露糖、马来酰亚胺、POPC、DPPS、DOPS、单磷酸基脂质A、NBD-PE及其衍生物;官能团,如甲氧基、胺、羧酸及其类似物;多糖,如唾液酸乳糖和单唾液酰神经节苷脂GM3;蛋白和多肽,如抗生物素蛋白、中性链亲和素(NeutrAvidin)、溶菌酶、寡聚物G、蛋白G及其衍生物,等等。

[0475] 免疫特征表面中存在的部分能够指引纳米载体至APC的程度将改变。例如,提供更特异性靶向APC(即,更特异性地能够以高亲合力和低亲和性结合APC)的免疫特征表面的部分将导致在如SCS这样的区域中更高积聚的纳米载体制剂。

[0476] 应当注意到免疫特征表面包含的部分给予了高亲合力结合。不是所有存在于纳米载体上的部分将给予高亲合力结合,如该定义中特意列出的,以及本发明说明书中概括描述的。因此,即使表面可以包含多个部分(有时称为“矩阵”),这并不意味着这样的表面自然就是免疫特征表面,缺少表明这样的表面给予根据本发明的定义和公开内容的结合的数据。

[0477] 在一些具体实施方案中,施予患者时,具有包含免疫特征表面的表面的纳米载体能够靶向特异性APC。例如,在一些具体实施方案中,具有免疫特征表面的纳米载体能够靶向DC。在一些具体实施方案中,具有免疫特征表面的纳米载体能够靶向巨噬细胞,如SCS-Mph。在一些具体实施方案中,具有免疫特征表面的纳米载体能够靶向B-细胞。在该上下文中,术语“靶向”用来表示施予患者时,具有免疫特征表面的纳米载体的组合物易于在特定的区域中积聚。这样的积聚可以在施予的几分钟(例如,少于1分钟,少于5分钟,或少于10分钟,或少于30分钟)、几小时(例如,少于1小时,或少于2小时,或少于5小时,或少于10小时),或几天(例如,少于1天,或少于2天,或少于5天)内发生。

[0478] 在一些具体实施方案中,通过本发明的纳米载体基本上不能激活补体系统。例如,在一些具体实施方案中,纳米载体不激活典型的补体途径和/或可替换的补体途径。与US公开专利申请2008/0031899的实施例9中公开的羟基化纳米载体相比,并且使用相同实施例9的方法来测定,基本上不激活补体的纳米载体显示出低于50%,优选低于35%,更优选低于25%的C3a含量增加。

[0479] 纳米载体的生产

[0480] 可以使用本领域任何已知的方法制备纳米载体。例如,颗粒纳米载体制剂可以通过以下方法制成:如纳米沉淀,使用流体通道的流动聚焦,喷雾干燥,单一和双乳剂溶剂挥发,溶剂提取,相分离,碾磨,微乳程序,微细加工,纳米级加工,牺牲层,单凝聚和复凝聚,以及其它本领域普通技术人员熟知的方法。可替换地或另外地,用于单分散半导体、导电性的、磁性的、有机的和其它纳米颗粒的水性和有机溶剂合成已经得到了描述(Pellegrino等,2005,Small,1:48;Murray等,2000,Ann.Rev.Mat.Sci.,30:545;和Trindade等,2001,Chem.Mat.,13:3843;所有文献都引入本文中作为参考)。

[0481] 在某些具体实施方案中,可以通过纳米沉淀方法或喷雾干燥来制备纳米载体。可以改变制备纳米载体中所用的条件以产生所需的尺寸或性质(例如,疏水性、亲水性、外部

形状、“粘度”、形状等)的颗粒。所用的制备纳米载体的方法和条件(例如,溶剂、温度、浓度、空气流速等)可以取决于纳米载体的组成和/或所得结构。

[0482] 制备根据本发明的合成纳米载体中有用的方法在文献中有描述(参见,例如,Doubrow编辑,“Microcapsules and Nanoparticles in Medicine and Pharmacy”(医学和药学中的微胶囊和纳米载体),CRC Press,Boca Raton,1992;Mathiowitz等,1987,J.Control.Release,5:13;Mathiowitz等,1987,Reactive Polymers,6:275;和Mathiowitz等,1988,J.Appl.Polymer Sci.,35:755;所有文献引入本文中作为参考)。

[0483] 在一些具体实施方案中,本发明的疫苗纳米载体包含至少一种免疫调节剂,任选包含,脂膜、聚合基质和/或非聚合颗粒。在某些具体实施方案中,本发明的疫苗纳米载体包含至少一种免疫调节剂;脂膜、聚合基质和/或非聚合颗粒;和至少一个靶向部分。在某些具体实施方案中,本发明的疫苗纳米载体包含至少一种免疫调节剂;脂膜、聚合基质和/或非聚合颗粒;至少一个靶向部分;和至少一种免疫刺激剂。在某些具体实施方案中,本发明的疫苗纳米载体包含至少一种免疫调节剂;脂膜、聚合基质和/或非聚合颗粒;至少一个靶向部分;至少一种免疫刺激剂;和至少一个纳米颗粒。

[0484] 本发明的纳米载体可以使用任何可获得的方法制备。希望将免疫调节剂、靶向部分和/或免疫刺激剂结合疫苗纳米载体,而没有对免疫调节剂、靶向部分和/或免疫刺激剂的三维特征和构象有不利影响。希望疫苗纳米载体应该能够在全身施用后避免被单核吞噬细胞系统摄入,从而其能够到达体内的特异性细胞。

[0485] 在一些具体实施方案中,免疫调节剂、靶向部分、免疫刺激剂和/或纳米颗粒不与疫苗纳米载体共价结合。例如,疫苗纳米载体可以包含聚合基质,和免疫调节剂、靶向部分、免疫刺激剂和/或纳米颗粒可与本发明的疫苗纳米载体的聚合基质的表面结合,包埋于本发明的疫苗纳米载体的聚合基质内,和/或分布在整个本发明的疫苗纳米载体的聚合基质中。免疫调节剂可以通过疫苗纳米载体的扩散、降解和/或其组合而被释放。在一些具体实施方案中,聚合物通过骨架侵蚀而降解。在一些具体实施方案中,聚合物通过表面侵蚀而降解。

[0486] 在一些具体实施方案中,免疫调节剂、靶向部分、免疫刺激剂和/或纳米颗粒与疫苗纳米载体共价结合。对于这样的疫苗纳米载体,通过破坏结合而实现免疫调节剂释放并传送到目标位点。例如,如果免疫调节剂与纳米载体通过可分裂连接物结合,则在连接物分裂后,免疫调节剂被释放并传送到目标位点。

[0487] 在一些具体实施方案中,免疫调节剂、靶向部分、免疫刺激剂和/或纳米颗粒不与疫苗纳米载体共价结合。例如,疫苗纳米载体可以包含聚合物,并且免疫调节剂、靶向部分、免疫刺激剂和/或纳米颗粒与本发明的疫苗纳米载体的聚合物的表面结合,包埋于本发明的疫苗纳米载体的聚合物内,由本发明的疫苗纳米载体的聚合物环绕,和/或分布在整个本发明的疫苗纳米载体的聚合物中。在一些具体实施方案中,免疫调节剂、靶向部分、免疫刺激剂和/或纳米颗粒与疫苗纳米载体物理结合。

[0488] 物理结合可以通过多种不同方式来实现。物理结合可以是共价的或非共价的。疫苗纳米载体、免疫调节剂、靶向部分、免疫刺激剂和/或纳米颗粒可以彼此直接结合,例如,通过一个或多个共价键,或通过一个或多个连接物结合。在一个具体实施方案中,连接物与免疫调节剂、靶向部分、免疫刺激剂和/或纳米颗粒形成一个或多个共价或非共价键,且与

免疫调节剂、靶向部分、免疫刺激剂和/或纳米颗粒形成一个或多个共价或非共价键,从而将它们彼此连接起来。在一些具体实施方案中,第一个连接物与疫苗纳米载体形成共价或非共价键,且第二个连接物与免疫调节剂、靶向部分、免疫刺激剂和/或纳米颗粒形成共价或非共价键。这两个连接物彼此之间形成一个或多个共价或非共价键。

[0489] 根据本发明可使用任何合适的连接物。连接物可用于形成酰胺键、酯键、二硫键等。连接物可以含有碳原子或杂原子(例如,氮、氧、硫等)。通常,连接物为1至50个原子长、1至40个原子长、1至25个原子长、1至20个原子长、1至15个原子长、1至10个原子长或1至10个原子长。连接物可以被各种取代基取代,包括但不限于,氢原子、烷基、烯基、炔基、氨基、烷基氨基、二烷基氨基、三烷基氨基、羟基、烷氧基、卤素、芳基、杂环、芳香族杂环、氰基、酰胺、氨基甲酰、羧酸、酯、硫醚、烷基硫醚、硫醇和脲基基团。如本领域技术人员所认识到的,这些基团的每一个可以依次被取代。

[0490] 在一些具体实施方案中,连接物是脂肪族或杂脂肪族连接物。在一些具体实施方案中,连接物是聚烷基连接物。在某些具体实施方案中,连接物是聚醚连接物。在某些具体实施方案中,连接物是聚乙烯连接物。在某些特定的具体实施方案中,连接物是聚乙二醇(PEG)连接物。

[0491] 在一些具体实施方案中,连接物是可分裂的连接物。仅举一些实例,可分裂的连接物包括蛋白酶可分裂的肽连接物、核酶敏感性核酸连接物、脂酶敏感性脂连接物、糖苷酶敏感性碳水化合物连接物、pH敏感性连接物、缺氧敏感性连接物、光可分裂连接物、热不稳定性连接物、酶可分裂连接物(例如,酯酶分裂连接物)、超声敏感性连接物、x-射线可分裂连接物等。在一些具体实施方案中,连接物不是可分裂的连接物。

[0492] 多种方法中的任何方法可用于将连接物与疫苗纳米载体结合。一般的策略包括被动吸附(例如,通过静电相互作用)、多价螯合、特异性结合对成员之间的高亲和性非共价结合、共价键形成等(Gao等,2005,Curr.Op.Biotechnol.,16:63;引入本文中作为参考)。在一些具体实施方案中,可以使用点击化学将连接物与颗粒结合。

[0493] 可以使用双功能交联试剂。这样的试剂含有两个反应基团,从而提供共价连接两个目标基团的方式。化学交联试剂中的反应基团通常属于不同类别的官能团,如琥珀酰亚胺酯、马来酰亚胺和吡啶二硫化物。示例性交联剂包括,例如,碳二亚胺、N-羟基琥珀酰亚胺-4-叠氮水杨酸(NHS-ASA)、二甲基庚二亚胺二盐酸盐(DMP)、二甲基辛二亚胺(DMS)、3,3'-二硫双丙亚胺(DTBP)、N-琥珀酰亚胺3-[2-吡啶二硫]-丙氨(SPDP)、琥珀酰亚胺 α -甲基丁酸酯、生物素氨基己酰-6-氨基-己酸N-羟基-琥珀酰亚胺酯(SMCC)、琥珀酰亚胺-[(N-马来酰亚胺丙氨)-十二乙二醇]酯(NHS-PEO12)等。例如,碳二亚胺介导的酰胺的形成和活性酯马来酰亚胺酯介导的胺和巯基偶联是广泛使用的方法。

[0494] 在一些具体实施方案中,可以通过将一个分子上的胺基团偶联至第二个分子上的硫醇基团(有时通过两步或三步反应序列)而形成疫苗纳米载体。含有硫醇的分子可以通过使用杂双功能交联试剂(例如,同时含有琥珀酰亚胺酯和马来酰亚胺、吡啶二硫或碘乙酰胺的试剂)与含有胺的分子反应。可以使用胺-羧酸和硫醇-羧酸交联、巯基马来酰亚胺偶联化学(例如,马来酰亚胺苯甲酰-N-羟基马来酰亚胺酯(MBS)方法)等。可以分别通过赖氨酸或半胱氨酸侧链中的胺或硫醇基团,或通过N-端氨基,将多肽方便地偶联至颗粒。核酸(如RNA)可以通过末端氨基合成。可以使用各种偶联试剂(例如,琥珀酰亚胺3-(2-吡啶二硫)丙

酸酯 (SPDP) 和硫代琥珀酰亚胺-4-(N-马来酰亚胺甲基) 环己烷-1-羧酸盐 (硫-SMCC)) 来结合疫苗纳米载体的各种成分。疫苗纳米载体可以使用表面具有的官能团 (例如, 氨基或羧基) 来制备, 以促进与生物分子的结合。

[0495] 可以使用非共价特异性结合相互作用。例如, 颗粒或生物分子可以用生物素官能团化, 而另一个则进行链霉菌抗生物素官能团化。这两个部分彼此非共价地特异性结合且具有高亲和性, 从而将颗粒和生物分子结合起来。可以类似地使用其它特异性结合对。或者, 组氨酸标记的生物分子可以与偶联至镍-氮川三乙酸 (Ni-NTA) 的颗粒结合。

[0496] 任何生物分子与颗粒、靶向部分和/或治疗剂结合。间隔物可以是, 例如, 短肽链 (例如, 长度为1至10个氨基酸, 例如, 长度为1、2、3、4或5个氨基酸) 核酸、烷基链等。

[0497] 对于其它的关于结合和/或偶联方法和交联剂的一般性信息, 可参见期刊 Bioconjugate Chemistry, American Chemical Society 出版, Columbus OH, PO Box 3337, Columbus, OH, 43210; “Cross-Linking” (交联), Pierce Chemical Technical Library, 可在Pierce网站获得, 最初在1994-95 Pierce Catalog出版, 及其中引用的参考文献; Wong SS, Chemistry of Protein Conjugation and Cross-linking (蛋白偶联和交联化学), CRC Press Publishers, Boca Raton, 1991; 和Hermanson, G.T., Bioconjugate Techniques (生物偶联结合), Academic Press, Inc., San Diego, 1996。

[0498] 可替换地或另外地, 疫苗纳米载体可以通过非共价相互作用直接或间接地与免疫调节剂、靶向部分、免疫刺激剂和/或纳米颗粒结合。非共价相互作用包括但不限于电荷相互作用、亲和性相互作用、金属配合、物理吸附、主客体相互作用、疏水性相互作用、TT堆积相互作用、氢键相互作用、范德华力相互作用、磁性相互作用、静电相互作用、偶极-偶极相互作用和/或其组合。

[0499] 在一些具体实施方案中, 疫苗纳米载体可以通过电荷相互作用与免疫调节剂、靶向部分、免疫刺激剂和/或纳米颗粒结合。例如, 疫苗纳米载体可以具有阳离子表面或与阳离子聚合物 (如聚 (赖氨酸) 或聚 (吡啶)) 反应以提供阳离子表面。然后疫苗纳米载体表面可以通过电荷相互作用与带负电的免疫调节剂、靶向部分、免疫刺激剂和/或纳米颗粒结合。通常, 免疫调节剂、靶向部分、免疫刺激剂和/或纳米颗粒的一端与带负电的聚合物 (例如, 聚 (羧酸)) 或另外的可以与阳离子聚合物表面相互作用的寡核苷酸序列结合, 而没有破坏免疫调节剂、靶向部分、免疫刺激剂和/或纳米颗粒的功能。

[0500] 在一些具体实施方案中, 疫苗纳米载体可以通过亲和性相互作用与免疫调节剂、靶向部分、免疫刺激剂和/或纳米颗粒结合。例如, 生物素可以与疫苗纳米载体的表面结合而链霉菌抗生物素可以与免疫调节剂、靶向部分、免疫刺激剂和/或纳米颗粒结合; 或者相反, 生物素可以与免疫调节剂、靶向部分、免疫刺激剂和/或纳米颗粒结合而链霉菌抗生物素可以与疫苗纳米载体的表面结合。生物素基团和链霉菌抗生物素可以通过连接物 (如亚烷基连接物或聚醚连接物) 与疫苗纳米载体结合或与免疫调节剂、靶向部分、免疫刺激剂和/或纳米颗粒结合。生物素和链霉菌抗生物素通过亲和性相互作用结合, 从而将疫苗纳米载体与免疫调节剂、靶向部分、免疫刺激剂和/或纳米颗粒结合。

[0501] 在一些具体实施方案中, 疫苗纳米载体可以通过金属配位与免疫调节剂、靶向部分、免疫刺激剂和/或纳米颗粒结合。例如, 聚组氨酸可以与免疫调节剂、靶向部分、免疫刺激剂和/或纳米颗粒的一端结合, 和氮川三乙酸可以与疫苗纳米载体的表面结合。金属 (如

Ni²⁺) 将螯合聚组氨酸和氮川三乙酸, 从而将免疫调节剂、靶向部分、免疫刺激剂和/或纳米颗粒与疫苗纳米载体结合。

[0502] 在一些具体实施方案中, 疫苗纳米载体可以通过物理吸附与免疫调节剂、靶向部分、免疫刺激剂和/或纳米颗粒结合。例如, 疏水性尾巴 (如聚甲基丙烯酸酯或具有至少约10个碳的烷基基团) 可以与免疫调节剂、靶向部分、免疫刺激剂和/或纳米颗粒的一端结合。疏水性尾巴将吸附至疏水性疫苗纳米载体的表面, 从而将免疫调节剂、靶向部分、免疫刺激剂和/或纳米颗粒与疫苗纳米载体结合。

[0503] 在一些具体实施方案中, 疫苗纳米载体可以通过主客体相互作用与免疫调节剂、靶向部分、免疫刺激剂和/或纳米颗粒结合。例如, 大环主体 (如葫芦脲或环状糊精) 可以与疫苗纳米载体的表面结合, 和客体基团 (如烷基基团、聚乙二醇或二氨基烷基基团) 可以与免疫调节剂、靶向部分、免疫刺激剂和/或纳米颗粒结合; 或者相反, 主体基团可以与免疫调节剂、靶向部分、免疫刺激剂和/或纳米颗粒结合, 和客体基团可以与疫苗纳米载体的表面结合。在一些具体实施方案中, 主体和/或客体分子可以通过连接物 (如亚烷基连接物或聚醚连接物) 与免疫调节剂、靶向部分、免疫刺激剂和/或纳米颗粒或疫苗纳米载体结合。

[0504] 在一些具体实施方案中, 疫苗纳米载体可以通过氢键相互作用与免疫调节剂、靶向部分、免疫刺激剂和/或纳米颗粒结合。例如, 具有特定序列的寡核苷酸可以与疫苗纳米载体的表面结合, 和基本上互补的序列可以与免疫调节剂、靶向部分、免疫刺激剂和/或纳米颗粒的一端或两端结合, 使得没有破坏免疫调节剂、靶向部分、免疫刺激剂和/或纳米颗粒的功能。然后免疫调节剂、靶向部分、免疫刺激剂和/或纳米颗粒通过与疫苗纳米载体结合的寡核苷酸的互补性碱基配对而与疫苗纳米载体结合。如果一个寡核苷酸上约80%的核酸碱基通过寡核苷酸碱基配对系统 (如Watson-Crick碱基配对、反向Watson-Crick碱基配对、Hoogsten碱基配对等) 与第二个寡核苷酸上的碱基形成氢键, 则两个寡核苷酸是基本上互补的。通常, 希望与疫苗纳米载体结合的寡核苷酸序列和与免疫调节剂、靶向部分、免疫刺激剂和/或纳米颗粒通过与疫苗纳米载体结合的互补性寡核苷酸之间形成至少约6个互补性碱基对。

[0505] 在一些具体实施方案中, 疫苗纳米载体通过自体装配形成。对于疫苗纳米载体的自体装配的详细实例, 参见实施例1和2。在某些具体实施方案中, 制备小脂质体 (10纳米-1000纳米) 并用于将一种或多种免疫调节剂传送至免疫系统的细胞 (图3)。通常, 脂质体是人工构建的圆球体脂泡, 其数十至数千纳米的可控直径意味着单独的脂质体包含体积为飞升 (10⁻²¹L) 至飞升 (10⁻¹⁵L) 的生物相容性腔室, 这些腔室可用于包埋并储存各种物质, 如蛋白、酶、DNA和药物分子。脂质体可以包含具有两性性质的脂双层: 双层的内表面和外表面均为亲水性的, 双层的腔是疏水性的。亲脂性分子可以自主嵌入脂质体膜并将其亲水性结构域保留在外面, 由于膜的双功能性的优势, 亲水性分子可以与脂质体的外表面化学地偶联。

[0506] 在某些具体实施方案中, 脂质与亲脂性免疫调节剂混合, 然后在固体表面上形成薄膜。亲水性免疫调节剂溶解于水性溶液中, 然后将其加入脂膜中, 以在振荡下将脂质水解。脂质体与整合到双层壁中的亲脂性免疫调节剂和位于脂质体腔内的亲水性免疫调节剂自发组装。

[0507] 在某些具体实施方案中, 用于脂质体中的脂质可以是下列物质中的一种或多种, 但不限于此: 磷脂酰胆碱、脂质A、胆固醇、多萜醇、鞘氨醇、鞘磷脂、神经酰胺、糖基神经酰

胺、脑苷脂、磷脂、植物鞘氨醇、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰甘油、磷脂酰肌醇、磷脂酰丝氨酸、心磷脂、磷脂酸和溶血磷脂。在某些具体实施方案中,免疫调节剂可以与脂质体的表面偶联。在一些具体实施方案中,脂质体内携带相同或不同的免疫调节剂。在一些具体实施方案中,脂质体表面膜可以用能够选择性地免疫调节剂传送到特异性抗原表达细胞的靶向部分修饰。

[0508] 在一些具体实施方案中,将纳米颗粒稳定化的脂质体用于将一种或多种免疫调节剂传送到免疫系统的细胞(图4)。通过允许小的带电的纳米颗粒(1纳米-30纳米)吸附至脂质体表面上,脂质体-纳米颗粒复合体不但具有上述仅仅脂质体的性质(图3),还具有可调的膜刚性和可控的脂质体稳定性。当小的带电的纳米颗粒到达带有相反电荷或无净电荷的脂质体表面时,纳米颗粒与膜之间的静电或电荷-偶极相互作用吸引纳米颗粒停留在膜表面上,被脂膜部分包裹住。这诱导脂质体的局部膜弯曲和小球表面的张力,二者均能够调节膜的刚性。这个方面对于使用脂质体进行疫苗传送是至关重要的,脂质体用以模拟病毒,病毒的坚固性取决于病毒膜内其它生物成分的组成。此外,被吸附的纳米颗粒形成带电的壳,其保护脂质体抵抗融合,从而增强脂质体稳定性。在某些具体实施方案中,将小的纳米颗粒与脂质体在轻微振荡下混合,并且纳米颗粒自主粘附至脂质体表面。在特定的具体实施方案中,小的纳米颗粒可以是,但不限于,聚合纳米颗粒、金属纳米颗粒、无机或有机纳米颗粒、其杂合物,和/或其组合。

[0509] 在一些具体实施方案中,脂质体-聚合物纳米载体用于将一种或多种免疫调节剂传送到免疫系统的细胞(图5)。替代保持脂质体内部中空,可以将亲水性免疫调节剂包埋。图3显示了装载了双嵌段共聚物纳米颗粒的脂质体,以形成脂质体包被的聚合纳米载体,其同时具有脂质体和聚合物纳米颗粒的性质,而排除了一些它们的局限性。在一些具体实施方案中,脂质体壳可用于携带亲脂性或偶联亲水性免疫调节剂,并且聚合核心可用于传送疏水性免疫调节剂。

[0510] 在某些具体实施方案中,将预制的聚合纳米颗粒(40纳米-1000纳米)与小的脂质体(20纳米-100纳米)在轻微振荡下混合,以诱导脂质体融合至聚合物纳米颗粒表面上。在特定的具体实施方案中,双嵌段共聚物纳米颗粒可以是,但不限于,一种或多种的以下物质:聚(D,L乳酸)-嵌段-聚(乙二醇)(PLA-b-PEG)、聚(D,L羟基乙酸)-嵌段-聚(乙二醇)(PLG-b-PEG)、聚(D,L乳酸-共-羟基乙酸)-嵌段-聚(乙二醇)(PLGA-b-PEG)和聚(ϵ -己内酯)-嵌段-聚(乙二醇)(PCL-b-PEG)。

[0511] 在一些具体实施方案中,将纳米颗粒稳定化的脂质体-聚合物纳米载体用于输送一种或多种免疫调节剂(图6)。通过小的纳米颗粒(1纳米-30纳米)吸附至脂质体-聚合物纳米载体表面,纳米载体不但具有上述纳米颗粒稳定化的脂质体(图4)和上述脂质体-聚合物纳米颗粒(图5)的性质,还具有可调的膜刚性和可控的脂质体稳定性。

[0512] 在一些具体实施方案中,将含有反胶束的脂质体-聚合物纳米载体用于输送一种或多种免疫调节剂(图7)。由于上述脂质体-聚合物纳米载体(图5和6)限于携带聚合纳米颗粒内的疏水性免疫调节剂,所以在此将小的反胶束(1纳米-20纳米)制成包埋亲水性免疫调节剂,然后与双嵌段共聚物混合以制成脂质体的聚合核心。

[0513] 在某些具体实施方案中,首先将待包埋的亲水性免疫调节剂通过在挥发性的可与水混溶的有机溶剂中与天然来源的且无毒的两性实体混合而整合至反胶束中。在某些具体

实施方案中,两性实体可以是,但不限于,以下物质中的一种或多种:磷脂酰胆碱、脂质A、胆固醇、多萜醇、鞘氨醇、鞘磷脂、神经酰胺、糖基神经酰胺、脑苷脂、硫脂、植物鞘氨醇、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰甘油、磷脂酰肌醇、磷脂酰丝氨酸、心磷脂、磷脂酸和溶血磷脂。在一些具体实施方案中,挥发性的可与水混溶的有机溶剂可以是,但不限于:四氢呋喃、丙酮、乙腈或二甲基甲酰胺。在一些具体实施方案中,在完成反胶束形成后向该混合物中加入生物可降解聚合物。将得到的生物可降解聚合物-反胶束混合物与聚合物不溶性的亲水性非溶剂混合,通过溶剂快速扩散至非溶剂中以及有机溶剂的挥发而形成纳米颗粒。在某些具体实施方案中,聚合物不溶性的亲水性非溶剂可以是,但不限于,以下物质中的一种或多种:水、乙醇、甲醇及其混合物。含有反胶束的聚合物纳米颗粒与脂分子混合以形成上述脂质体-聚合物复合体结构(图5)。

[0514] 在一些具体实施方案中,含有反胶束的纳米颗粒稳定化的脂质体-聚合物纳米载体用于传送一种或多种免疫调节剂(图8)。通过将小的纳米颗粒(1纳米-30纳米)吸附至脂质体-聚合物纳米载体表面上,纳米载体不但具有上述纳米颗粒稳定化的脂质体(图4)和上述含有反胶团的脂质体-聚合物纳米颗粒(图7)的性质,还具有可调的膜刚性和可控的脂质体稳定性。

[0515] 在一些具体实施方案中,脂单层稳定化的聚合物纳米载体用于传送一种或多种免疫调节剂(图9)。与上述脂质体-聚合物纳米载体(图5-8)相比,这个系统就试剂和制备而言具有简单性的性质。在一些具体实施方案中,疏水性均聚物可以形成聚合物核心,与图5-8中所用的双嵌段共聚物(其同时具有疏水性和亲水性片段)相反。脂质稳定化的聚合纳米载体可以在一个单一步骤内制成,而不是先分别制备聚合物纳米颗粒和脂质体然后再将其融合在一起。

[0516] 在某些具体实施方案中,亲水性免疫调节分子首先与脂质头部基团化学偶联。偶联物在含有一种或多种与水混溶的溶剂的水性溶液中以特定比例与未偶联的脂质分子混合。在某些具体实施方案中,两性实体可以是,但不限于,以下物质中的一种或多种:磷脂酰胆碱、脂质A、胆固醇、多萜醇、鞘氨醇、鞘磷脂、神经酰胺、脑苷脂、硫脂、植物鞘氨醇、磷脂酰乙醇胺、糖基神经酰胺、磷脂酰甘油、磷脂酰肌醇、磷脂酰丝氨酸、心磷脂、磷脂酸和溶血磷脂。在一些具体实施方案中,与水混溶的溶剂可以是,但不限于:丙酮、乙醇、甲醇和异丙醇。生物可降解聚合物材料与疏水性免疫调节剂混合以包埋于与水混溶或部分与水混溶的有机溶剂中。在特定的具体实施方案中,生物可降解聚合物可以是,但不限于,以下物质中的一种或多种:聚(D,L-乳酸)、聚(D,L-羟基乙酸)、聚(ϵ -己内酯),或其以各种摩尔比例的共聚物。在一些具体实施方案中,与水混溶的有机溶剂可以是但不限于:丙酮、乙醇、甲醇或异丙醇。在一些具体实施方案中,部分与水混溶的有机溶剂可以是,但不限于:乙腈、四氢呋喃、乙酸乙酯、异丙醇、乙酸异丙酯或二甲基甲酰胺。将所得到的聚合物溶液加入到偶联的和未偶联的脂质的水性溶液中,通过有机溶剂快速扩散至水中以及有机溶剂的挥发而形成纳米颗粒。

[0517] 在一些具体实施方案中,将包含反胶束的脂单层稳定化的聚合纳米颗粒用于传送一种或多种免疫调节剂(图10)。由于上述脂质体稳定化的聚合物纳米载体(图9)限制于携带疏水性免疫调节剂,所以在此制成小的反胶束(1纳米-20纳米),以包埋亲水性免疫调节剂,然后与生物可降解聚合物混合,以制成聚合纳米载体核心。

[0518] 应该理解,可以以任何合适的方式制备本发明的组合物,并且本发明不以任何方式限于使用本文中所述方法产生的组合物。合适方法的选择可能需要注意所结合的特定部分的性质。

[0519] 如果需要,可以使用各种方法将结合了免疫调节剂、靶向部分、免疫刺激剂和/或纳米颗粒的疫苗纳米载体与未结合免疫调节剂、靶向部分、免疫刺激剂和/或纳米颗粒的疫苗纳米载体分离开来,或与结合了不同数目的免疫调节剂、靶向部分、免疫刺激剂和/或纳米颗粒的疫苗纳米载体分离开来。例如,可以使用尺寸排除色谱、琼脂糖凝胶电泳或过滤以分离结合了不同数目实体的疫苗纳米载体群和/或将疫苗纳米载体与其它实体分离开来。一些方法包括尺寸排除或阴离子交换色谱。

[0520] 在一些具体实施方案中,本发明的疫苗纳米载体在无菌条件下制备。这可以保证所得到的疫苗是无菌的和无传染性的,从而与活体疫苗相比改善了安全性。这提供了有价值的安全度量,特别是当接受疫苗的患者具有免疫缺陷、患有感染和/或易于感染的时候。

[0521] 在一些具体实施方案中,本发明的疫苗纳米载体可以是冻干的并储存在悬浮液中或作为冻干粉末储存,这取决于为了延长时间而不损失活性的制备策略。

[0522] 应用

[0523] 本文中所述的组合物和方法可用于诱导、增强、抑制、引导或重引导免疫应答。本文中所述的组合物和方法可用于预防和/或治疗任何癌症、传染病、代谢性疾病、退行性疾病、自体免疫疾病、炎性疾病、免疫性疾病或其它失调和/或病症。本文中所述的组合物和方法还可用于治疗上瘾症,如对本文中所述的任一种令人上瘾的物质上瘾。本文中所述的组合物和方法还可用于预防和/或治疗由暴露于毒素、有害物质、环境毒素或其它有害试剂而引起的病症。患者包括,但不限于,人和/或其它灵长类;哺乳动物,包括商业有关的哺乳动物,如牛、猪、马、绵羊、猫和/或狗;和/或鸟类,包括商业有关的鸟类,例如鸡、鸭、鹅和/或火鸡。

[0524] 在一些具体实施方案中,根据本发明的疫苗纳米载体可用于疾病、失调和/或病症的一个或多个症状或特征的治疗、减轻、改善、缓解、延迟其发作、抑制其进展,减轻其严重程度和/或降低其发生率。在一些具体实施方案中,本发明的疫苗纳米载体可用于微生物感染(例如,细菌感染、真菌感染、病毒感染、寄生虫感染等)的一个或多个症状或特征的治疗、减轻、改善、缓解、延迟其发作、抑制其进展,减轻其严重程度和/或降低其发生率。

[0525] 在本发明的一个方面中,提供了疾病、失调或病症(例如,微生物感染)的预防和/或治疗方法。在一些具体实施方案中,疾病、失调或病症的预防和/或治疗包括向有需要的患者施用治疗有效量的本发明疫苗纳米载体,以获得所需效果所必需的量和时间。在本发明的某些具体实施方案中,本发明的疫苗纳米载体的“治疗有效量”是指对微生物感染的一个或多个症状或特征能有效地治疗、减轻、改善、缓解、延迟其发作、抑制其进展,减轻其严重程度和/或降低其发生率的量。在一些具体实施方案中,“治疗有效量”是有效调节免疫系统的量。这样的量可以是有免疫原性的量,即足以在患者中引发可检测的免疫应答(例如,可检测的抗体应答和/或可检测的T细胞应答)的量。

[0526] 本发明的预防和/或治疗实验方案包括向健康患者(例如,未表现出任何微生物感染症状和/或未被诊断具有微生物感染的患者;未暴露于毒素的患者,未摄取被滥用物质或令人上瘾物质的患者,等等)施用治疗有效量的一种或多种本发明的疫苗纳米载体。例如,

可以在发生微生物感染之前,暴露于毒素、被滥用物质、令人上瘾物质等之前,和/或发生其相关症状之前,使用本发明的疫苗纳米载体接种健康患者;可以在症状和/或暴露/摄取发生的实质上同时(例如,48小时内、24小时内或12小时内)处理风险患者(例如,暴露于遭受微生物感染个体的病人,到微生物/毒素流行的地方旅行的人;等等)。当然,已知患有微生物感染、已经暴露于毒素或摄入被滥用物质或令人上瘾物质的个体可以在任何时间接受治疗。

[0527] 在一些具体实施方案中,本发明的预防和/或治疗试验方案包括向患者施用治疗有效量的一种或多种本发明的疫苗纳米载体,使得T细胞和B细胞中的免疫应答都得到刺激。

[0528] 在一些具体实施方案中,通过将所选的免疫调节剂与针对不同APC的靶向部分和免疫刺激剂组合,可以使免疫应答(例如,效应物应答)偏向优先引发针对给定适应症的最想要的类型的免疫应答,例如体液免疫、1型T细胞应答、2型T细胞应答、细胞毒性T细胞应答和/或这些应答的组合。因此,相同的平台可以用于大范围的不同的临床应用,包括针对病原体宿主的预防性疫苗以及对已经存在的疾病(如感染、自体免疫疾病和/或癌症)的免疫治疗。

[0529] 癌症包括但不限于胆管癌;脑癌;乳腺癌;宫颈癌;绒毛膜癌;结肠癌;子宫内膜癌;食管癌;胃癌;上皮肿瘤;淋巴瘤;肝癌;肺癌(例如,小细胞和非小细胞);黑素瘤;神经母细胞瘤;口腔癌;卵巢癌;胰腺癌;前列腺癌;直肠癌;肉瘤;皮肤癌;睾丸癌;甲状腺癌和肾癌,以及其他癌与肉瘤。

[0530] 自体免疫疾病包括但不限于,类风湿性关节炎、风湿热、溃疡性结肠炎、腹腔疾病、节段性回肠炎、炎性肠病、胰岛素依赖型糖尿病、糖尿病、少年糖尿病、自发性自体免疫性糖尿病、胃炎、自体免疫性萎缩性胃炎、自体免疫性肝炎、甲状腺炎、桥本甲状腺炎、自体免疫性甲状腺炎、胰岛炎、卵巢炎、睾丸炎、葡萄膜炎、晶状体源性葡萄膜炎、多发性硬化、重症肌无力、原发性粘液水肿、甲状腺毒症、恶性贫血、自体免疫性溶血性毒液贫血、爱迪生氏病、硬皮病、肺出血肾炎综合征、格林-巴利综合征、格雷夫斯氏病、血管球性肾炎、牛皮癣、寻常性天疱疮、类天疱疮、交感性眼炎、特发性血小板减少性紫癜、特发性白细胞减少症、Sjogren综合征、韦格纳肉芽肿病、多/皮肤炎或系统性红斑狼疮。

[0531] 炎症性疾病和/或失调包括,例如,心血管疾病、慢性阻塞性肺病(COPD)、支气管扩张、慢性胆囊炎、肺结核、桥本甲状腺炎、脓毒症、结节病、硅肺和其它肺尘症,以及伤口中移植的外源体,但不限于此。如本文中所用的术语“脓毒症”是指公认的与宿主对微生物入侵的全身性炎性反应相关的临床综合征。本文所用的术语“脓毒症”是指通常表现为发烧或体温过低、心动过速和呼吸急促的病症,并且在严重的情况下可发展为低血压、器官功能障碍,甚至死亡。

[0532] 在一些具体实施方案中,本发明涉及适用于引发免疫应答的纳米颗粒组合物。

[0533] 在一些具体实施方案中,本发明涉及增强哺乳动物中免疫应答效力,包括施用有效量的本发明的纳米颗粒,以增强哺乳动物对一种或多种抗原的免疫应答。本发明还涉及哺乳动物的免疫接种方法。

[0534] 药物组合物

[0535] 本发明提供了新型组合物,其包含治疗有效量的一种或多种疫苗纳米载体和一种

或多种药物学上可接受的赋形剂。在一些具体实施方案中,本发明提供了药物组合物,其包含本发明的疫苗纳米载体和/或本文中所述的任一种组合物。这样的药物组合物可以任选包含一种或多种另外的治疗活性物质。根据一些具体实施方案,提供了向有需要的患者施用包含本发明的组合物的药物组合物的方法。在一些具体实施方案中,本发明的组合物施用于人。对于本发明的目的,词语“活性成分”通常指本发明的疫苗纳米载体,其包含至少一种免疫调节剂和任选包含一种或多种靶向部分、免疫刺激剂和/或纳米颗粒。

[0536] 尽管本文中提供的药物组合物的描述主要是针对适合施用于人的药物组合物,但是技术人员应该理解这样的组合物通常适合施用于所有种类的动物。为使得组合物适合施用于各种动物而对适合施用于人的药物组合物的改变是熟知的,并且普通兽医药理技术人员能够仅仅通过常规的实验(如果有的话)来设计和/或进行这样的改变。考虑到本发明的药物组合物所施用的个体包括,但不限于,人和/或其它灵长类;哺乳动物,包括商业相关的哺乳动物,如牛、猪、马、绵羊、猫和/或狗;和/或鸟类,包括商业相关的鸟类,如鸡、鸭、鹅和/或火鸡。

[0537] 本文中所述的药物组合物制剂可以通过药学领域已知的或从今以后发展的任何方法来制备。通常,这样的制备方法包括将活性成分与一种或多种赋形剂和/或一种或多种其它辅佐性成分结合的步骤,然后,如果必要和/或需要,将产物成型和/或包装成所需的单剂或多剂单位。

[0538] 本发明的药物组合物可以以单一单位剂量和/或多个单一单位剂量来制备、包装和/或散装销售。如本文中所用的,“单位剂量”是包含预定量活性成分的药物组合物的不连续量。活性成分的量通常等于向患者施用的活性成分的剂量和/或该剂量的方便的份数,如,例如,该剂量的一半或三分之一。

[0539] 本发明药物组合物中的活性成分、药物学上可接受的赋形剂和/或任何其它成分的相对量将根据待治疗的患者的身份、尺寸和/或条件进行改变,进一步根据组合物的施用途径来进行改变。举例来说,组合物可以包含0.1%至100%(重量/重量)的活性成分。

[0540] 本发明的药物制剂可以另外包含药物学上可接受的赋形剂,本文中所用的赋形剂包括任何和所有的溶剂、分散介质、稀释剂或其它液体载体、分散或悬浮助剂、表面活性剂、等张试剂、增稠剂或乳化剂、防腐剂、固体粘合剂、润滑剂等,按照特定剂型需要。Remington的The Science and Practice of Pharmacy (药物科学和实践),第21版,A.R.Gennaro,(Lippincott,Williams & Wilkins,Baltimore,MD,2006;引入本文中作为参考)公开了各种用于配制药物组合物的赋形剂和已知的用于制备药物组合物的技术。任何常规的赋形剂,除非其与物质或其衍生物不相容,如产生任何不想要的生物效应或者以有害的方式与药物组合物中的其它任何成分相互作用,否则考虑其使用在本发明的范围内。

[0541] 在一些具体实施方案中,药学上可接受的赋形剂是至少95%、96%、97%、98%、99%或100%纯的。在一些具体实施方案中,赋形剂被批准用于人类和兽医用途。在一些具体实施方案中,赋形剂由美国食品与药品管理局批准。在一些具体实施方案中,赋形剂是药物级的。在一些具体实施方案中,赋形剂符合美国药典(USP)、欧洲药典(EP)、英国药典和/或国际药典的标准。

[0542] 用于制备药物组合物的药物学上可接受的赋形剂包括,但不限于,惰性稀释剂、分散和/或造粒剂、表面活性剂和/或乳化剂、崩解剂、粘合剂、防腐剂、缓冲剂、润滑剂和/或

油。这样的赋形剂可以任选包括在本发明的制剂中。根据配制者的判断,组合物中可以存在赋形剂,如可可油和栓剂蜡、着色剂、包衣剂、甜味剂、香料和香味剂。

[0543] 示例性的稀释剂包括,但不限于,碳酸钙、碳酸钠、磷酸钙、磷酸二钙、硫酸钙、磷酸氢钙、磷酸钠乳糖、蔗糖、纤维素、微晶纤维素、高岭土、甘露醇、山梨醇、肌醇、氯化钠、干淀粉、玉米淀粉、糖粉等,及其组合。

[0544] 示例性的造粒和/或分散剂包括,但不限于,马铃薯淀粉、玉米淀粉、木薯淀粉、羟甲基乙酸淀粉钠、粘土、褐藻酸、瓜尔豆胶、柑橘果肉、琼脂、膨润土、纤维素和木制品、天然海绵、阳离子交换树脂、碳酸钙、硅酸盐、碳酸钠、交联聚(乙烯吡咯烷酮)(交聚维酮)、羧甲基淀粉钠(羟甲基淀粉钠)、羧甲基纤维素、交羧甲基纤维素钠(交联甲羧纤维素)、甲基纤维素、预糊化淀粉(淀粉1500)、微晶淀粉、水不溶性淀粉、羧甲基纤维素钙、镁铝硅酸盐(Veegum)、十二烷基硫酸钠、季铵盐类化合物等,及其组合。

[0545] 示例性表面活性剂和/或乳化剂包括,但不限于,天然乳化剂(例如,阿拉伯树胶、琼脂、褐藻酸、褐藻酸钠、黄芪胶、chondrux、胆固醇、黄原胶、果胶、明胶、蛋黄、酪蛋白、羊毛脂、胆固醇、蜡和卵磷脂),胶粘土(例如,斑脱土[铝硅酸盐]和Veegum[镁铝硅酸盐]),长链氨基酸衍生物,高分子量醇(例如,硬脂醇、十六醇、油醇、单硬脂酸三醋精、乙二醇双硬脂酸酯、单硬脂酸甘油酯和丙二醇单硬脂酸酯、聚乙烯醇),卡波姆(例如,羧基聚甲叉、聚丙烯酸、丙烯酸聚合物和羧基乙烯聚合物),卡拉胶,纤维素衍生物(例如,羧甲基纤维素钠、粉状纤维素、羟甲基纤维素、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、甲基纤维素),山梨脂肪酸酯(例如,聚环氧乙烷单月桂酸山梨酯[吐温®20]、聚环氧乙烷山梨聚糖[[吐温®60]、聚环氧乙烷单油酸山梨酯[[吐温®80]、单棕榈酸山梨酯[司盘®40]、单硬脂酸山梨酯[司盘®60]、三硬脂酸山梨酯[司盘®65]、单油酸甘油酯、单油酸山梨酯[司盘®80]、聚环氧乙烷酯(例如,聚环氧乙烷单硬脂酸酯[Myrj®45]、聚环氧乙烷氢化蓖麻油、聚乙氧基化蓖麻油、聚甲醛硬脂酸酯和Solutol),蔗糖脂肪酸酯,聚乙二醇脂肪酸酯(例如,Cremophor®),聚环氧乙烷酯(例如,聚环氧乙烷月桂酸酯[Brij®30]),聚(乙烯-吡咯烷酮),二乙二醇单月桂酸酯,三乙醇胺油酸酯,油酸钠,油酸钾,油酸乙酯,油酸,月桂酸乙酯,硫酸月桂酸钠,Pluronic F 68, Poloxamer 188,西曲溴铵,氯化十六烷基吡啶,苄烷氯铵,多库酯钠等,和/或其组合。

[0546] 示例性的粘合剂包括但不限于,淀粉(例如,玉米淀粉和淀粉糊);明胶;糖(例如,蔗糖、葡萄糖、右旋糖、糊精、糖浆、乳糖、乳糖醇、甘露醇);天然和合成的树胶(例如,阿拉伯胶、褐藻酸钠、爱尔兰苔藓提取物、潘瓦尔(panwar)胶、茄替胶、isapol壳的粘液、羧甲基纤维素、甲基纤维素、乙基纤维素、羟乙基纤维素、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、微晶纤维素、醋酸纤维素、聚(乙烯吡咯烷酮)、镁铝硅酸盐(Veegum)和落叶松阿拉伯半乳聚糖);褐藻酸盐;聚乙烯氧化物;聚乙二醇;无机钙盐;硅酸;聚甲基丙烯酸酯;蜡;水;醇;等等;及其组合。

[0547] 示例性的防腐剂包括抗氧化剂、螯合剂、抗微生物防腐剂、抗真菌防腐剂、醇防腐剂、酸性防腐剂和其它防腐剂。示例性的抗氧化剂包括,但不限于, α 生育酚、抗坏血酸、抗坏血酸棕榈酸酯、丁基羟基茴香醚、丁基羟基甲苯、单硫甘油、偏亚硫酸氢钾、丙酸、五倍子酸丙酯、抗坏血酸钠、重亚硫酸钠、偏亚硫酸氢钠和硫酸钠。示例性的螯合剂包括乙二胺四乙酸(EDTA)、单水合柠檬酸、乙二胺四乙基二钠、乙二胺四乙基二钾、乙二胺四乙酸、富马酸、苹果酸、磷酸、乙二胺四乙基钠、酒石酸和乙二胺四乙基三钠。示例性的抗微生物防腐剂包

括,但不限于,苄烷氯铵、苄索氯铵、苯甲醇、溴硝醇、溴化十六烷基三甲铵、氯化十六烷基吡啶、双氯苯双胍己烷、氯丁醇、氯甲酚、氯二甲苯酚、甲酚、乙醇、甘油、海克替啶、咪唑啉基脲、苯酚、苯氧基乙醇、苯乙基醇、苯汞基硝酸盐、丙烯乙二醇和硫柳汞。示例性的抗真菌防腐剂包括,但不限于,对羟基苯甲酸丁酯、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯、对羟基苯甲酸丙酯、安息香酸、羟基安息香酸、安息香钾、山梨酸钾、安息香酸钠、丙酸钠和山梨酸。示例性的醇防腐剂包括,但不限于,乙醇、聚乙二醇、苯酚、酚化合物、双酚、氯丁醇、羟基安息香酸盐和苯乙基醇。示例性的酸性防腐剂包括,但不限于,维生素A、维生素C、维生素E、 β -胡萝卜素、柠檬酸、乙酸、脱氢乙酸、抗坏血酸、山梨酸和植酸。其它的防腐剂包括,但不限于,生育酚、生育酚乙酸酯、甲磺酸次肟酯(deteroxime mesylate)、溴化十六烷基三甲铵、丁基羟基茴香醚(BHA)、丁基羟基甲苯(BHT)、乙二胺、硫酸月桂酸钠(SLS)、十二烷基醚硫酸钠(SLES)、重亚硫酸钠、偏亚硫酸氢钠、硫酸钾、偏亚硫酸氢钾、Glydant Plus®、Phenonip®、对羟基苯甲酸甲酯、Germall 115、Germaben II、Neolone™、Kathon™和Euxyl®。在某些具体实施方案中,防腐剂是抗氧化剂。在其它具体实施方案中,防腐剂是螯合剂。

[0548] 示例性的缓冲剂包括,但不限于,柠檬酸盐缓冲液、乙酸盐缓冲液、磷酸盐缓冲液、氯化铵、碳酸钙、氯化钙、柠檬酸钙、葡乳醛酸钙、葡庚糖酸钙、葡萄糖酸钙、D-葡萄糖酸、甘油磷酸钙、乳酸钙、丙酮酸、乙酰丙酸钙、戊酸、磷酸氢钙、磷酸、磷酸钙、磷酸氢氧化钙、乙酸钾、氯化钾、葡萄糖酸钾、钾混合物、磷酸氢二钾、磷酸二氢钾、磷酸钾混合物、醋酸钠、重碳酸钠、氯化钠、柠檬酸钠、乳酸钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、磷酸钠混合物、氨基丁三醇、氢氧化镁、氢氧化铝、褐藻酸、无热原的水、等渗盐、林格(Ringer)溶液、乙醇等,及其组合。

[0549] 示例性的润滑剂包括但不限于,硬脂酸镁、硬脂酸钙、硬脂酸、硅石、滑石、麦芽、甘油山嵛酸酯、氢化植物油、聚乙二醇、安息香酸钠、醋酸钠、氯化钠、亮氨酸、硫酸月桂酸镁、硫酸月桂酸钠等,及其组合。

[0550] 示例性的油包括,但不限于,扁桃、杏仁、鳄梨、巴西桐、香柠檬、黑加仑种子、琉璃苣、刺楸、甘菊、油菜、香菜、巴西棕榈、蓖麻、肉桂、可可脂、椰子、鳕鱼肝、咖啡、玉米、棉花种子、鹌鹑、桉树、夜来香、鱼类、亚麻籽、香叶醇、葫芦、葡萄籽、榛子坚果、牛膝草、肉豆蔻酸异丙酯、荷荷巴油、夏威夷胡桃、薰衣草(lavandin)、薰衣草(lavender)、柠檬、木姜子、澳洲坚果、锦葵、芒果籽、绣线菊籽、水貂、肉豆蔻、橄榄、橙、橘棘鲷、棕榈、棕榈仁、桃仁、花生、罂粟种子、南瓜种子、油菜籽、米糠、迷迭香、红花、檀香、sasquana、香薄荷、沙棘、芝麻、牛油树脂、硅树脂、大豆、向日葵、茶树、薊、椿、香根草、胡桃和小麦胚芽油。示例性的油包括,但不限于,硬脂酸丁酯、辛酸三甘油酯、癩酸三甘油酯、环甲硅油、癩二酸二乙酯、二甲硅油360、豆蔻酸异丙酯、矿物油、辛基十二醇、油醇、硅树脂油,及其组合。

[0551] 用于口服和非肠道施用的液体剂型包括,但不限于,药物学上可接受的乳剂、微乳剂、溶液、悬浮液、糖浆和酏剂。除了活性成分外,液体剂型可以包含本领域常用的惰性稀释剂,如,例如,水或其它溶剂、增溶剂和乳化剂,如乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苯甲醇、安息香酸苯甲酯、丙烯甘油、1,3-丁烯甘油、二甲基甲酰胺、油(特别是,棉花籽、花生、玉米、胚芽、橄榄、蓖麻和芝麻油)、甘油、四氢呋喃基醇、聚乙二醇和山梨聚糖的脂肪酸酯,及其混合物。除了惰性稀释剂外,口服组合物还可以包括佐剂,如润湿剂、乳化剂和悬浮剂、甜味剂、香料和香味剂。在用于非肠道施用的某些具体实施方案中,将本发明的疫苗纳米载体与增溶剂(例如,Cremophor®、醇、油、改性油、乙二醇、聚山梨酸酯、环糊精、聚合物,及其组

合)混合。

[0552] 可注射制剂,例如,无菌可注射水性悬浮液或油质悬浮液,可以使用合适的分散剂或润湿剂和悬浮剂,根据本领域已知的方法来配制。无菌可注射制剂可以是在无毒非肠道可接受的稀释剂或溶剂中的无菌可注射溶液、悬浮液或乳液,例如,如,在1,3-丁二醇中的溶液。可使用的可接受的载体和溶剂为水、林格溶液、U.S.P和等渗氯化钠溶液。此外,无菌的固定油可常规地用作溶剂或悬浮介质。为此目的,可以应用任何温和的固定油,包括合成的单甘油酯或二甘油酯。此外,将脂肪酸(如油酸)用于注射物的制备中。

[0553] 可注射制剂可通过例如阻挡细菌的滤器过滤或通过掺入无菌固体组合物形式的灭菌剂来灭菌,可以在使用前将无菌固体组合物溶解或分散于无菌水或其他无菌可注射介质中。

[0554] 为了延长药物的功效,经常需要减慢皮下或肌肉注射的药物的吸收。这可以通过使用晶体或水溶性差的无定形材料的液体悬浮液来实现。然后药物的吸收速率取决于溶解速率,而溶解速率又取决于晶体尺寸和晶型。或者,可以通过将药物溶解或悬浮于油性介质而实现非肠道施药的延迟吸收。

[0555] 用于直肠或阴道施用的组合物通常是栓剂,其可通过将本发明的疫苗纳米载体与合适的非刺激性赋形剂混合来制备,赋形剂如可可油、聚乙二醇或栓剂蜡,其在环境温度下为固体而在体温时为液体,并因此在直肠或阴道腔内融化并释放活性成分。

[0556] 用于口服施用的固体剂型包括胶囊、片剂、丸剂、粉剂和颗粒。在这样的固体剂型中,将活性成分与以下物质混合:至少一种惰性的药物学上可接受的赋形剂,如柠檬酸钠或磷酸氢钙和/或a)填充剂或增量剂,如淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露醇和硅酸,b)粘合剂,如,例如,羧甲基纤维素、藻酸盐、明胶、聚乙烯吡咯酮、蔗糖和阿拉伯树胶,c)湿润剂,如甘油,d)崩解剂,如琼脂、碳酸钙、马铃薯或木薯淀粉、褐藻酸、某些硅酸盐和碳酸钠,e)溶液保留剂,如石蜡,f)吸收加速剂,如季胺化合物,g)润湿剂,如,例如,十六烷醇和单硬脂酸甘油酯,h)吸收剂,如高岭土和斑脱土,和i)润滑剂,如滑石、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固体聚乙二醇、硫酸月桂酸钠及其混合物。在胶囊、片剂和丸剂的情况下,剂型可以包含缓冲剂。

[0557] 相似类型的固体组合物可以用作软或硬填充的明胶胶囊中的填充剂,使用赋形剂,如乳糖或奶糖,以及高分子量聚乙二醇等。片剂、糖锭、胶囊、丸剂和颗粒的固体剂型可以通过包衣和壳,如肠溶衣和制药领域熟知的其它包衣来制备。它们可以任选包含乳浊剂并可以是仅仅或优先在肠道的特定部分释放活性成分的组合物,任选,以缓释的方式释放。可用的包埋组合物的实例包括聚合物物质和蜡。相似类型的固体组合物可以用作软和硬填充的明胶胶囊中的填充剂,使用赋形剂,如乳糖或奶糖,以及高分子量聚乙二醇等。

[0558] 活性成分可以与一种或多种上述赋形剂形成微胶囊形式。片剂、糖锭、胶囊、丸剂和颗粒的固体剂型可以通过包衣和壳来制备,如肠溶衣、控释包衣和制药领域熟知的其它包衣。在这样的固体剂型中,活性成分可以与至少一种惰性稀释剂(如蔗糖、乳糖或淀粉)混合。按照通常的实践,除了惰性稀释剂之外,这样的剂型可以包括另外的物质,例如成片润滑剂和其它的成片助剂,如硬脂酸镁和微晶纤维素。在胶囊、片剂和丸剂的情况下,剂型可以包含缓冲剂。它们可以任选包含乳浊剂并可以是仅仅或优先在肠道的特定部分释放活性成分的组合物,任选,以缓释的方式释放。可用的包埋组合物的实例包括聚合物物质和蜡。

[0559] 根据本发明的疫苗纳米载体的局部和/或经皮施用的剂型包括膏剂、糊剂、霜剂、

洗剂、凝胶、粉剂、溶液、喷雾、吸入剂和/或贴剂。通常,在无菌条件下将活性成分与药物学上可接受的赋形剂和/或任何需要的防腐剂和/或可能需要的缓冲剂混合。另外,本发明考虑到使用经皮的贴剂,其通常提供控制活性成分传送至身体的额外优点。可以通过例如将活性成分溶解和/或分散于合适的介质中来制备这样的剂型。可替换地或另外地,可以通过提供速率控制膜和/或通过将活性成分分散于聚合物基质和/或凝胶中来控制速率。

[0560] 适用于皮内传送本文中所述的药物组合物的装置包括短的针装置,如在U.S.专利4,886,499;5,190,521;5,328,483;5,527,288;4,270,537;5,015,235;5,141,496和5,417,662中所述的那些。可以通过限制针刺入皮肤的有效穿透长度的装置(如在PCT公开W0 99/34850中所述的那些及其功能等价物)来施用皮内组合物。喷射注射装置(其通过液体喷射注射器和/或针(刺破角质层并在到达真皮时产生喷射)将液体疫苗传送至真皮)是适合的。喷射注射装置在例如U.S.专利5,480,381;5,599,302;5,334,144;5,993,412;5,649,912;5,569,189;5,704,911;5,383,851;5,893,397;5,466,220;5,339,163;5,312,335;5,503,627;5,064,413;5,520,639;4,596,556;4,790,824;4,941,880;4,940,460和PCT公开W0 97/37705和W097/13537中有描述。弹道粉末/颗粒传送装置(其使用压缩气体以加速粉末形式的疫苗穿过皮肤外层到达真皮)是适合的。可替换地或另外地,常规的注射器可用于皮内施用的经典曼托(mantoux)方法。

[0561] 适于局部施用的制剂包括,但不限于,液体和/或半液体制剂,如擦剂、洗剂、水包油和/或油包水乳剂,如霜剂、膏剂和/或糊剂,和/或溶液和/或悬浮液。可局部施用的制剂可以包含例如约1%至约10%(w/w)的活性成分,虽然活性成分的浓度可以高达溶剂中活性成分的溶解性限度。用于局部施用的制剂还可以包含一种或多种本文中所述的其它成分。

[0562] 本发明的药物组合物可以以适于通过口腔的肺部施用的制剂来制备、包装和/或出售。这样的制剂可以包含干燥颗粒,其包含活性成分且直径范围为约0.5微米至约7微米或约1微米至约6微米。这样的组合物方便地为干粉的形式,使用包含干粉储存室的装置(可以向该储存室引入推进剂流以使粉末分散)和/或使用自推进溶剂/粉末分散容器(如在密封容器内包含溶解于和/或悬浮于低沸推进剂的活性成分的装置)施用。这样的粉末包含颗粒,其中至少98重量%的颗粒具有0.5微米以上的直径且至少95%数目的颗粒具有7微米以下的直径。或者,至少95重量%的颗粒具有1微米以上的直径且至少90%数目的颗粒具有6微米以下的直径。干粉组合物可以包括固体精细粉末稀释剂,如糖,并方便地作为单位剂型提供。

[0563] 低沸推进剂通常包括在大气压下具有低于65°F沸点的液体推进剂。通常,推进剂构成组合物的50%至99.9%(w/w),并且活性成分构成组合物的0.1%至20%(w/w)。推进剂可以进一步包含另外的成分,如液态非离子和/或固体阴离子表面活性剂和/或固体稀释剂(其可以具有与包含活性成分的颗粒相同数量级的颗粒尺寸)。

[0564] 制成肺部传送的本发明的药物组合物可提供溶液和/或悬浮液的滴液形式的活性成分。这样的制剂可作为包含活性成分的水性和/或稀释醇溶液和/或悬浮液来制备、包装和/或出售,任选是无菌的,并且可以使用任何喷雾和/或雾化装置方便地施用。这样的制剂还可以包含一种或多种另外的成分,包括但不限于,调味剂(如,糖精钠)、挥发油、缓冲剂、表面活性剂和/或防腐剂,如甲基羟基苯甲酸酯。通过此施用途径提供的液滴具有约0.1微米至约200微米范围的平均直径。

[0565] 本文中所述的可用于肺部传送的制剂可用于鼻内输送本发明的药物组合物。另一种适合鼻内施用的制剂是包含活性成分的粗粉,其具有约0.2微米至约500微米的平均颗粒。这样的制剂以吸鼻的方式施用,即,从靠近鼻孔的粉末容器迅速吸入鼻通道。

[0566] 适合用于鼻施用的制剂可以包含例如少至约0.1% (w/w) 到多达100% (w/w) 的活性成分,且可以包含本文中所述的一种或多种其它成分。本发明的药物组合物可以以适合于口腔施用的制剂来制备、包装和/或出售。这样的制剂可以是例如使用常规方法制成的片剂和/或锭剂形式,和可以包含例如0.1%至20% (w/w) 的活性成分,剩余部分 (balance) 包含口服可溶解和/或可降解的组合物和任选包含一种或多种本文中所述的其它成分。或者,适合于口腔施用的制剂可以包含粉末和/或气雾化和/或离子化的溶液和/或悬浮液,其包含活性成分。这样的粉末、气雾化和/或离子化的制剂当分散时具有约0.1微米至约200微米范围的平均颗粒和/或滴液尺寸,并且可以进一步包含一种或多种本文中所述的其它成分。

[0567] 本发明的药物组合物可以以适合于口腔施用的制剂来制备、包装和/或出售。这样的制剂可以是例如滴眼液的形式,其包括例如水性或油性液体赋形剂中的0.1%/1.0% (w/w) 的活性成分的溶液和/或悬浮液。这样的滴液还可以包含缓冲剂、盐和/或一种或多种本文中所述的其它成分。可用的其它眼部施用的制剂包括那些在包含微晶形式和/或脂质体制备物中的活性成分的制剂。将滴耳液和/或滴眼液考虑在本发明的范围内。

[0568] 在例如Remington: The Science and Practice of Pharmacy (雷明顿: 药物科学和实践), 第21版, Lippincott Williams & Wilkins, 2005中有关于制备和/或生产药物制剂的一般性考虑。

[0569] 施用

[0570] 在一些具体实施方案中,在诊断出疾病、失调和/或病症之前、同时和/或之后将治疗有效量的本发明的疫苗纳米载体组合物传送至病人和/或动物。在一些具体实施方案中,在疾病、失调和/或病症的症状出现之前、同时和/或之后将治疗有效量的本发明的组合物传送至病人和/或动物。在一些具体实施方案中,疫苗纳米载体的量对于疾病、失调和/或病症的一个或多个症状或特征足以治疗、减轻、改善、缓解、延迟其发作、抑制其进展,减轻其严重程度和/或降低其发生率。在一些具体实施方案中,疫苗纳米载体的量足以在患者中引发可检测的免疫应答。在一些具体实施方案中,疫苗纳米载体的量足以在患者中引发可检测的抗体应答。在一些具体实施方案中,疫苗纳米载体的量足以在患者中引发可检测的T细胞应答。在一些具体实施方案中,疫苗纳米载体的量足以在患者中引发可检测的抗体和T细胞应答。在一些具体实施方案中,纳米载体提供的优点是纳米载体能够以远低于常规疫苗所需的抗原浓度引发有力的应答。

[0571] 根据本发明的方法,可以使用对治疗有效的任何含量和任何施用途径施用组合物。所需的精确含量在患者与患者之间是不同的,这取决于患者的类型、年龄和一般状况、感染的严重性、特别的组合物、其施用方式、其活性模式等。本发明的组合物通常制成容易施用且剂量一致的剂量单元形式。然而,将会理解,将由主治医生在合理的医学判断范围内决定本发明组合物的每日总用量。任何特定患者或生物的特异性治疗有效量水平将取决于多种因素,包括所治疗的病症和该病症的严重程度;所用的特异性活性成分的活性;所用的特异性组合物;患者的年龄、体重、一般健康状况、性别和膳食;所用的特异性活性成分的施用时间、施用途径和排泄速率;治疗持续的时间;与所用的特异性活性成分联用的或同时使

用的药物;以及医学领域熟知的类似因素。

[0572] 本发明的药物组合物可以通过任何途径施用。在一些具体实施方案中,本发明的药物组合物通过多种途径施用,包括,口服、静脉内、肌内、动脉内、骨髓内、鞘内、皮下、心室内、经皮、皮内、直肠、阴道内、腹膜内、局部(如通过粉剂、膏剂、霜剂和/或滴剂)、经皮、粘膜、鼻、口腔、肠道、舌下;通过气管灌輸、支气管灌輸和/或吸入;和/或作为口喷雾剂、鼻喷雾剂和/或气雾剂。特别考虑的途径为口服施用、静脉内注射、肌内注射和/或皮下注射。在一些具体实施方案中,本发明的疫苗纳米载体为非肠道施用。在一些具体实施方案中,本发明的疫苗纳米载体为静脉内施用。在一些具体实施方案中,本发明的疫苗纳米载体为口服施用。

[0573] 通常,最合适的施用途径将取决于多种因素,包括疫苗纳米载体的性质(例如,其在胃肠道环境中的稳定性)、患者的状况(例如,患者是否能够耐受口服施用)等。考虑到可能的药物传送科学进展,本发明包括通过任何合适的途径传送本发明的药物组合物。

[0574] 在某些具体实施方案中,本发明的疫苗纳米载体可以以每天范围为约0.001毫克/千克至约100毫克/千克、约0.01毫克/千克至约50毫克/千克、约0.1毫克/千克至约40毫克/千克、约0.5毫克/千克至约30毫克/千克、约0.01毫克/千克至约10毫克/千克、约0.1毫克/千克至约10毫克/千克或约1毫克/千克至约25毫克/千克患者体重的量施用,一天一次或多次,以获得所需的治疗功效。所需剂量的传送可以一天三次、一天两次、一天一次、每隔一天一次、每隔两天一次、每周一次、每两周一次、每三周一次或每四周一次。在某些具体实施方案中,所需剂量可以利用多次施用来进行传送(例如,2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或更多次施用)。

[0575] 在一些具体实施方案中,本发明包括“治疗鸡尾酒”,其包含本发明疫苗纳米载体的群体。在一些具体实施方案中,疫苗纳米载体的群体内的所有疫苗纳米载体包含单一类型的靶向部分,其能够结合多个目标(例如,能够同时结合SCS-Mph和FDC)。在一些具体实施方案中,疫苗纳米载体的群体内的不同疫苗纳米载体包含不同的靶向部分,所有的不同靶向部分均与相同的目标结合。在一些具体实施方案中,不同的疫苗纳米载体包含不同的靶向部分,所有的不同靶向部分能够与不同的目标结合。在一些具体实施方案中,这样的不同目标可以与相同的细胞类型结合。在一些具体实施方案中,这样的不同目标可以与不同的细胞类型结合。

[0576] 在合适的情况中,本发明的纳米颗粒生物偶联物可以本身(纯的)或以药物学上可接受盐的形式来施用。用于药物中时,盐应当是药物学上可接受的,但非药物学上可接受的盐可以方便地用于制备其药物学上可接受的盐,并且没有从本发明的范围中排除。这样的药物学上可接受的盐包括,但不限于,从以下酸制得的那些:盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸、马来酸、醋酸、水杨酸、p-甲苯磺酸、酒石酸、柠檬酸、甲烷磺酸、蚁酸、丙二酸、琥珀酸、萘-2-磺酸和苯磺酸。此外,药物学上可接受的盐可以制成碱金属或碱土金属,如羧酸基团的钠盐、钾盐或钙盐。

[0577] 用于制备肠包衣口服制剂的包胶物质包括醋酸邻苯二甲酸纤维素、聚醋酸乙烯邻苯二甲酸酯、羟丙基甲基纤维素邻苯二甲酸酯和丙烯酸酯共聚物。优选固体口服制剂,如胶囊或片剂。酞剂和糖浆也是公知的口服制剂。气雾剂制剂的成分包括溶解的活性成分、抗氧化剂、溶剂混合物和用于溶液制剂的推进剂,以及微粉化和悬浮的活性成分、分散剂和用于

悬浮制剂的推进剂。本发明的口服、气雾剂和鼻制剂可以与现有技术的注射制剂区分开来，因为这些制剂可以不是无菌的，但注射制剂必须是无菌的。

[0578] 在本发明的一些具体实施方案中，以多个剂量来进行纳米载体的施用。例如，可以将2、3、4、5、6、7、8、9或10剂施用于病人。按照需要的剂量给药也在本发明的范围之内，并且可以包括以规律的时间表重复剂量。可以以任何适于获得所需生物作用的间隔来分隔剂量，如1天至1年之间，或1天至1个月之间，或1天至1周之间。

[0579] 在一些具体实施方案中，第一剂纳米载体引发了接受该剂量的患者中的T细胞增殖。在一些具体实施方案中，将第一剂纳米载体施用于病人后，患者中的T细胞血清浓度高于200毫微克/毫升，或高于250毫微克/毫升，或高于300毫微克/毫升，或高于400毫微克/毫升，或高于500毫微克/毫升。在一些具体实施方案中，在施用随后剂量的纳米载体后获得和/或维持患者中这样的T细胞血清浓度。

[0580] 联合治疗

[0581] 将认识到，本发明的疫苗纳米载体和药物组合物可以用于联合治疗中。用于联合方案中的治疗（治疗剂或程序）的特定组合将考虑到所需的治疗剂和/或程序的相容性以及要达到的所需治疗效果。将认识到，所用治疗可以对于相同的目的达到所需的效果（例如，用于抵抗特定类型的微生物感染接种疫苗的本发明疫苗纳米载体可以与另一种用于治疗相同微生物感染的药剂同时施用），或者它们可以达到不同的效果（例如控制疫苗纳米载体的任何副作用）。

[0582] 在一些具体实施方案中，本发明的药物组合物可以单独施用或与一种或多种其它治疗剂联合施用。“联合”不是旨在暗示试剂必须同时施用和/或配制成用于同时传送，尽管这些传送方法落入本发明的范围内。可以在一种或多种其它所需的治疗剂或医疗程序的同时，之前或之后施用组合物。通常，每种药剂按照对该药剂确定的剂量和/或时间表施用。另外，本发明包括与可以提高生物利用率、减少和/或改变其代谢、抑制其排泄和/或改变其在体内分布的试剂联合传送本发明的药物组合物。

[0583] 用于联合方案中的治疗（治疗剂和/或程序）的特定组合将考虑到所需的治疗剂的相容性和/或程序和/或要达到的所需治疗效果。将认识到，所用治疗可以对于相同的病症达到所需的效果（例如，本发明疫苗纳米载体可以与另一种用于治疗相同的病症的药剂同时施用），和/或它们可以达到不同的效果（例如控制疫苗纳米载体的任何副作用）。在一些具体实施方案中，本发明的疫苗纳米载体与美国食品与药品管理局批准的第二种治疗剂一起施用。

[0584] 还将认识到联合使用的治疗活性剂可以在单一组合物中一起施用或在不同的组合物中分别施用。

[0585] 通常，预期联合使用的药剂以不超过其单独使用时的水平使用。在一些具体实施方案中，联合使用时的水平低于单独使用时的那些水平。

[0586] 在一些具体实施方案中，本发明的疫苗纳米载体可以与试剂联合使用，所述试剂包括，例如治疗剂、诊断剂和/或预防剂。根据本发明传送的示例性试剂包括但不限于，小分子、有机金属化合物、核酸、蛋白（包括多聚蛋白、蛋白复合体等）、肽、脂质、碳水化合物、激素、金属、放射性元素和化合物、药物、疫苗、免疫剂等，和/或其组合。

[0587] 在某些具体实施方案中，延迟特定微生物感染的发作和/或发展的疫苗纳米载体

可以与一种或多种治疗微生物感染症状的其它治疗剂联合施用。仅举一例,暴露于狂犬病病毒时,包含用于接种抵抗狂犬病病毒的免疫调节剂的纳米载体可以与一种或多种用于治疗狂犬病病毒症状的治疗剂(例如,用于治疗偏执狂(其为狂犬病病毒感染的症状)的抗精神病药)联合施用。

[0588] 在一些具体实施方案中,包含本发明疫苗纳米载体的药物组合物包含低于50重量%、低于40重量%、低于30重量%、低于20重量%、低于15重量%、低于10重量%、低于5重量%、低于1重量%或低于0.5重量%的待传送药剂。

[0589] 本文中提供的药物组合物可以进一步包含一种或多种其他生物活性物质。通常,这些物质的非限制性实例包括真核和原核细胞、病毒、载体、蛋白、肽、核酸、多糖和碳水化合物、脂质、糖蛋白以及在施用于动物时发挥生物作用的合成有机和无机药物。这些生物活性物质的组合也在本发明范围之内。为了易于参考,并且除非另外指出,术语“活性物质”还用于包括可检测的化合物,如不透射线的化合物,包括空气和钡、磁性化合物等。其他活性物质可以为水溶性或水不溶性的。生物活性物质的更多实例包括抗血管生成因子、抗体、抗微生物剂、抗疟疾药、抗阿米巴药、抗原生动物剂、抗真菌剂、抗病毒剂、抗肿瘤化合物、生长因子激素、酶、免疫活性剂和药物,如类固醇或抗生素。以下列出了这些和其他类别的生物活性物质的非限制性实例,并且对于传送至靶向细胞或组织的目的,可以包埋于纳米传送系统中。

[0590] 在一些具体实施方案中,疫苗纳米载体与一种或多种具有药物活性的小分子和/或有机化合物联合施用。在一些具体实施方案中,试剂是临床上使用的药物。在一些具体实施方案中,药物是抗癌剂,抗生素,抗病毒剂,抗HIV剂,抗寄生虫剂,抗原生动物剂,麻醉剂,抗凝血剂,酶抑制剂,甾体类试剂,甾体类或非甾体类抗炎剂,抗组胺剂,免疫抑制剂,抗癌剂,抗原,疫苗,抗体,解充血药,镇静剂,鸦片,止痛剂,退烧药,避孕药,激素,前列腺素,妊娠前试剂,抗青光眼试剂,眼药,抗类胆碱,止痛剂,抗抑郁剂,抗精神病药,神经毒素,催眠药,镇定剂,抗惊厥剂,肌肉放松剂,抗帕金森剂,抗痉挛剂,肌肉收缩剂,通道阻滞剂,缩瞳剂,抗分泌剂,抗血栓药剂,抗凝血剂,抗类胆碱, β -肾上腺素阻滞剂,利尿剂,心血管活性剂,血管活性剂,血管舒张剂,抗高血压剂,血管生成剂,细胞-细胞外基质相互作用调节剂(例如,细胞生长抑制剂和抗粘附分子),DNA、RNA或蛋白合成抑制剂等。

[0591] 在某些具体实施方案中,小分子试剂可以是任何药物。在一些具体实施方案中,药物是已经被合适的政府机构或监察机构认为是可以安全并有效用于人类或动物的药物。例如,由FDA根据21C.F.R. §§330.5, 331-361和440-460(引入本文中作为参考)所列的批准用于人类用途的药物;由FDA根据21C.F.R. §§500-589(引入本文中作为参考)所列的用于兽医用途的药物。所有列出的药物认为可以被接受而用于本发明。

[0592] 可以在Pharmaceutical Drugs: Syntheses, Patents, Applications(药物:合成,专利,应用), Axel Kleemann和Jurgen Engel, Thieme Medical Publishing, 1999, Goodman和Gilman, The Pharmacological Basis of Therapeutics(治疗药物基础), 第9版, McGraw-Hill 1996, 和Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals, Budavari等编辑, CRC Press, 1996中找到关于适用于本发明的类别和特异性药物的更加完整的列表。将这些书本的相关部分引入本文中作为参考。

[0593] 在一些具体实施方案中,疫苗纳米载体与一种或多种核酸(例如,功能性RNA、功能

性DNA等)联合用于特异性位点,如组织、细胞或亚细胞位点。例如,用于延迟特定微生物感染的发作和/或发展的本发明的疫苗纳米载体可以与减少微生物蛋白表达的RNAi试剂联合施用。核酸的分子特性在以上标题为“核酸靶向部分”的部分中有描述。

[0594] 在一些具体实施方案中,疫苗纳米载体与一种或多种蛋白或肽联合施用。在一些具体实施方案中,待传送的试剂可以是肽、激素、红细胞生成素、胰岛素、细胞因子、疫苗接种用的抗原等。在一些具体实施方案中,待传送的试剂可以是抗体和/或其特征性部分。它们的分子特性在以上标题为“蛋白靶向部分”的部分中有描述。

[0595] 在一些具体实施方案中,疫苗纳米载体与一种或多种碳水化合物联合施用,如与蛋白(例如,糖蛋白、蛋白聚糖等)结合的碳水化合物。碳水化合物可以是天然或合成的。碳水化合物还可以是衍生的天然碳水化合物。在某些具体实施方案中,碳水化合物可以是单糖或复合糖。在某些具体实施方案中,碳水化合物是单糖,包括但不限于葡萄糖、果糖、半乳糖和核糖。在某些具体实施方案中,碳水化合物是二糖,包括但不限于乳糖、蔗糖、麦芽糖、海藻糖和纤维二糖。在某些具体实施方案中,碳水化合物是多糖,包括但不限于纤维素、微晶纤维素、羟丙基甲基纤维素(HPMC)、甲基纤维素(MC)、右旋糖苷、葡萄聚糖、糖原、黄原胶、结冷胶、淀粉和普鲁兰多糖。在某些具体实施方案中,碳水化合物是糖醇,包括但不限于甘露糖醇、山梨糖醇、木糖醇、赤藻糖醇、麦芽糖醇和乳糖醇。碳水化合物的分子特性在上文中标题为“包含碳水化合物的疫苗纳米载体”的部分中有描述。

[0596] 在一些具体实施方案中,疫苗纳米载体与一种或多种脂质联合施用,例如与蛋白(例如,脂蛋白)结合的脂质。可以用于本发明的示例性的脂质包括,但不限于,油、脂肪酸、饱和脂肪酸、不饱和脂肪酸、必需脂肪酸、顺式脂肪酸、反式脂肪酸、甘油酯、甘油单酯、甘油二酯、甘油三酯、激素、类固醇(例如,胆固醇、叶酸)、维生素(例如,维生素E)、磷脂、鞘脂和脂蛋白。脂质的分子特性在以上标题为“脂质疫苗纳米载体”的部分中有描述。

[0597] 治疗剂的更多实例包括以下的:

[0598] 抗肿瘤化合物。实例包括亚硝基脲(例如,亚硝基氮芥、环己亚硝基脲、甲基环己亚硝基脲、链脲佐菌素)、甲胍(例如,甲苄胍、氮烯唑胺)。

[0599] 类固醇激素。实例包括糖皮质激素、雌激素、孕激素、雄激素、四氢脱氧皮质酮、细胞因子和生长因子、天门冬酰胺酶。

[0600] 免疫活性化合物。实例包括免疫抑制剂(例如,乙嘧啶、三甲喋呤、青霉胺、环孢霉素、咪唑硫嘌呤)和免疫刺激剂(例如,左旋咪唑、二乙基二硫代氨基甲酸酯、脑啡肽、内啡肽)。

[0601] 抗微生物化合物。实例包括抗生素,例如, β -内酰胺、青霉素、头孢菌素、carbapenims和单环内酰胺类、 β -内酰胺酶抑制剂、氨基糖苷类、大环内酯类、四环素和壮观霉素。

[0602] 抗疟疾药、抗阿米巴药、抗原生动物剂、抗病毒剂和抗真菌剂。实例包括两性霉素B、无环鸟苷、疱疹净、病毒唑、三氟尿苷、阿糖腺苷、丙氧鸟苷。更多的抗病毒剂包括逆转录酶抑制剂和核苷类似物,例如,ddI、ddC、3TC、ddA、AZT;蛋白酶抑制剂,例如,Invirase、ABT-538;RNA加工中的抑制剂,例如,病毒唑。

[0603] 杀寄生虫药、antihelmintics、放射药、胃肠道药、血液学化合物和免疫球蛋白。凝血蛋白,例如,抗血友病因子和因子IX复合物。抗凝血剂,例如,双香豆素和肝素钠。溶纤维

剂抑制剂,如抗血纤溶环酸。

[0604] 心血管药物和外周抗肾上腺素药。中枢作用的抗高血压药,例如,甲基多巴、甲基多巴HCl,抗高血压直接血管舒张药,例如,氯甲苯噻嗪、肼苯哒嗪HCl。影响肾素-血管紧张素系统的药物。外周血管舒张药,如芬妥胺。抗狭心药和强心甘。纤维扩张剂,例如,氨利酮、米利酮、依诺昔酮、甲硫咪唑酮、伊马唑旦和硫马唑。抗节律紊乱药、钙进入阻断剂和影响血脂的药物,例如,雷尼替丁、波生坦、莱阻林。

[0605] 呼吸药。类交感神经药,例如,舒喘宁、比托特罗甲磺酸盐、盐酸多巴酚丁胺、盐酸多巴胺、麻黄碱So、肾上腺素、盐酸芬氟拉明、盐酸异丙基肾上腺素、盐酸甲氧胺、去甲肾上腺素酒石酸氢盐、盐酸苯肾上腺素、盐酸羟苄羟麻黄碱。

[0606] 胆碱模拟药,例如,乙酰胆碱Cl。抗胆碱酯酶剂,例如氯噻西隆Cl。乙酰胆碱酯酶再活化剂。肾上腺素阻断药,例如,盐酸醋丁洛尔、氨酰心安、盐酸艾司洛尔、盐酸拉贝洛尔、美托洛尔、纳多洛尔、芬妥胺甲磺酸盐和盐酸心得安。抗毒蕈碱药,例如,溴甲辛托品、阿托品S04、克利溴铵、胃长宁、异丙托溴铵和氢溴酸东莨菪碱。

[0607] 神经递质和神经递质剂,例如,乙酰胆碱、腺苷、三磷酸腺苷。氨基酸神经递质,例如,刺激性氨基酸、GABA、甘氨酸。源于生物的胺神经递质,例如,多巴胺、肾上腺素、组胺、去甲肾上腺素、真蛎胺、血清素、酪胺。神经肽、一氧化氮和K⁺通道毒素。抗帕金森病药。实例包括amaltidine HCl、苯托品甲磺酸盐,例如,卡比多巴。

[0608] 激素。垂体激素,例如,绒毛膜促性腺素、促皮质素、促卵泡激素、生长激素、iorticotropin、促甲状腺激素释放激素、促甲状腺激素、抗利尿激素和赖氨加压素。肾上腺激素,例如,二丙酸倍氯米松、倍他米松、地塞米松和去炎松。胰激素,例如,胰高血糖素和胰岛素。甲状旁腺激素,例如,二氢速固醇(dihydrochysterol)。甲状腺激素,例如,羟乙磷酸钠降钙素、左甲状腺素钠、碘塞罗宁钠、复方甲状腺素(liotrix)、甲状腺球蛋白、醋酸特立帕肽。抗甲状腺药。雌激素。孕激素和拮抗剂,和激素避孕药。睾丸激素。胃肠激素,例如,缩胆囊素、肠高血糖素、促生长激素神经肽(galanin)、胃抑制多肽、表皮生长因子-尿抑胃激素、胃抑制多肽、胃泌素-释放肽、胃泌素、五肽胃泌素、四肽胃泌素、促胃动素、肽YY、分泌素、血管活性肠肽、辛卡利特。

[0609] 酶。实例包括透明质酸酶、链激酶、组织血纤蛋白溶解酶原激活剂、尿激酶、PGE-腺苷脱氨酶。

[0610] 肽和蛋白。纳米颗粒生物偶联物系统可以包裹肽/蛋白和/或可以用肽/蛋白将表面功能化。肽和蛋白的实例包括锚蛋白、视紫红质抑制蛋白、细菌膜蛋白、网格蛋白、连接蛋白、卵清蛋白、来自衣壳或包膜的病毒蛋白(如HA或VSVG)、抗肌萎缩蛋白、内皮缩血管肽受体、血影蛋白、选择蛋白、细胞因子;趋化因子;生长因子、胰岛素、促红细胞生成素(EPO)、肿瘤坏死因子(TNF)、神经肽、神经肽Y、神经加压素、转化生长因子 α 、转化生长因子 β 、干扰素(IFN)和激素、生长抑制剂,例如,染料木黄酮、类固醇等;糖蛋白,例如,ABC转运子、血小板糖蛋白、GPIb-IX复合物、GPIIb-IIIa复合物、玻璃体结合蛋白、血栓调节蛋白、CD4、CD55、CD58、CD59、CD44、淋巴细胞功能相关抗原、胞间粘附分子、血管细胞粘附分子、Thy-1、反向转运子、CA-15-3抗原、纤连蛋白、昆布氨酸、髓磷脂相关糖蛋白、GAP、GAP-43。

[0611] 细胞因子和细胞因子受体。可以通过本发明的纳米颗粒载体传送的细胞因子及其受体的实例包括,但不限于,白细胞介素-1(IL-1)、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、

IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、IL-1受体、IL-2受体、IL-3受体、IL-4受体、IL-5受体、IL-6受体、IL-7受体、IL-8受体、IL-9受体、IL-10受体、IL-11受体、IL-12受体、IL-13受体、IL-14受体、IL-15受体、IL-16受体、IL-17受体、IL-18受体、淋巴因子抑制因子、巨噬细胞集落刺激因子、血小板衍生的生长因子、干细胞因子、肿瘤生长因子 β 、肿瘤坏死因子、淋巴毒素、Fas、粒细胞集落刺激因子、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子、干扰素 α 、干扰素 β 、干扰素 γ 。

[0612] 生长因子、蛋白激素及其受体。实例包括促红细胞生成素、血管生成素、肝细胞生长因子、成纤维细胞生长因子、角化细胞生长因子、神经生长因子、肿瘤生长因子 α 、血栓形成素、甲状腺刺激因子、甲状腺释放激素、神经营养素、表皮生长因子、VEGF、纤毛神经营养因子、LDL、生长调节素、胰岛素生长因子、胰岛素样生长因子I和II。

[0613] 趋化因子及其受体。实例包括：ENA-78、ELC、GRO- α 、GRO- β 、GRO- γ 、HRG、LIF、IP-10、MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MIP-1 α 、MIP-1 β 、MIG、MDC、NT-3、NT-4、SCF、LIF、瘦素、RANTES、淋巴细胞趋化因子、嗜酸细胞活化趋化因子-1、嗜酸细胞活化趋化因子-2、TARC、TECK、WAP-1、WAP-2、GCP-1、GCP-2、 α -趋化因子受体：CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4、CXCR5、CXCR6、CXCR7 β -趋化因子受体：CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7。

[0614] 抗体。可以通过本发明的纳米颗粒载体用作靶向配体的抗体实例包括：(a) 抗分化抗原CD-1至CD-166的簇以及这些分子的配体或反受体；(b) 抗细胞因子抗体，例如，抗-IL-1至抗-IL-18，以及这些分子的受体；(c) 抗免疫受体抗体、对抗T细胞受体的抗体、主要组织相容性复合物I和II、B细胞受体、选择蛋白杀灭剂抑制受体、杀灭剂抑制受体、OX-40、MadCAM-1、Gly-CAM1、整联蛋白、cadherens、唾液酸粘附素、Fas、CTLA-4、Fc γ -受体、Fc α -受体、Fc ϵ -受体、Fc μ 受体及其配体；(d) 抗金属蛋白酶抗体，例如，胶原酶、MMP-1至MMP-8、TIMP-1、TIMP-2；抗-细胞裂解前炎性分子，例如，穿孔素、补体成分、前列腺类化合物、一氧化氮、凝血噁烷；和(e) 抗-粘附分子，例如，癌胚抗原、核纤层蛋白、纤连蛋白。

[0615] 可以通过本发明的纳米颗粒载体传送的已知治疗剂的特定实例包括，但不限于：(a) 卡普多普瑞尔、蒙诺、普拉固、厄贝沙坦、波立维、施复捷、塞弗络星/头孢羟氨苄、氨曲南、惠妥滋、泽瑞特、马斯平、凡毕士、伯尔定、顺铂、紫杉醇、UFT、布斯帕、奈法唑酮、Stadol NS、Estrace、格华止(Bristol-Myers Squibb)；(b) 希克劳、罗拉碳头孢、地红霉素、百忧解、达尔丰、培高利特、再普乐、赖脯胰岛素注射剂、爱希、健择、易维特(Eli Lilly)；(c) Vasotec、Naseretic、美降之、斯伐他汀、赖诺普利/赖诺普利氢氯噻嗪、波依定、Cozaar、IHyzaar、法莫替丁、奥美拉唑、Primaxin、诺氟沙星、重组乙型肝炎疫苗、水痘病毒疫苗、噻吗洛尔IXE、多佐胺、波斯卡、福善美、信尼麦、克滤满、保法止、万络、顺尔宁、利扎曲坦、依维菌素(Merck & Co.)；(d) 大扶康、优立新、舒普深、希舒美、特洛芬、硝苯地平XL、可多华、络活喜、多非利特、费定、舍曲林、Zeldox、瑞易宁XL、仙特明、依立曲坦、万艾可、屈洛昔芬、安理申、立普妥(Pfizer)；(e) 头孢泊肟、甲磺酸地拉韦啶、西多福韦、键豪宁、格列本脲/Glyn./Glyb.、Fragrnin、Total Medrol、Xanax、alprazolam、思尔明、Halcion、l triazolam、替拉扎特、卡麦角林、瑞波西汀、普拉帕索、法玛新、阿霉素、开普拓、美诺立尔、Depo-Provera、凯威捷、托特罗定、雌激素阴道环、喜朗、适利达、落建(Pharmacia & Upjohn)；(f) 吉非贝齐、喹那普利、癩能停、盐酸他克林、加巴喷丁、Loestrin、Dilzem、雌二醇贴剂、Estrstep、曲格列酮、立普妥、氨苄青霉素、FemHRT、苏拉明和克林沙星(Warner

Lambert)。

[0616] 本领域技术人员将认知到这是可以结合本发明的疫苗纳米载体传送的治疗剂、诊断剂和/或预防剂的示例性的,而不是覆盖性的列表。任何治疗剂、诊断剂和/或预防剂可以与根据本发明的疫苗纳米载体一起施用。

[0617] 药盒

[0618] 本发明提供了多种包含一种或多种本发明纳米载体的药盒。例如,本发明提供了包含本发明疫苗纳米载体和使用说明书的药盒。药盒可以包含多种不同的疫苗纳米载体。药盒可以包含任意组合的任意数目的其它成分或试剂。在此不一一列举所有不同的组合,但是每个组合均包括在本发明的范围内。

[0619] 根据本发明的某些具体实施方案,药盒可以包括,例如:(i) 包含至少一种免疫调节剂的疫苗纳米载体,其中至少一种免疫调节剂能够刺激T细胞和B细胞应答;(ii) 向有需要的患者施用疫苗纳米载体的说明书。

[0620] 在某些具体实施方案中,药盒可以包括,例如:(i) 包含至少一种免疫调节剂的疫苗纳米载体,其中至少一种免疫调节剂能够刺激T细胞和B细胞应答,至少一个靶向部分和/或至少一种免疫调节剂;(ii) 向有需要的患者施用疫苗纳米载体的说明书。

[0621] 在某些具体实施方案中,药盒可以包括,例如:(i) 至少一种免疫调节剂,其中至少一种免疫调节剂能够刺激T细胞和B细胞应答;(ii) 至少一个靶向部分;(iii) 至少一种免疫刺激剂;(iv) 聚合基质前体;(v) 脂质和两性实体;(vi) 从单独成份(i)-(v) 装配本发明的疫苗纳米载体的说明书。

[0622] 在一些具体实施方案中,药盒包括本发明的纳米载体和如何进行混合的说明书。在一些具体实施方案中,这样的药盒还包括免疫刺激剂和/或免疫调节剂(例如,B细胞或T细胞抗原)。这样的药盒的纳米载体可以包含免疫调节剂(例如,T细胞抗原,如通用T细胞抗原)和/或靶向部分。T细胞抗原和/或靶向部分可以位于纳米载体的表面上。在一些具体实施方案中,免疫调节剂和抗原是相同的。在一些具体实施方案中,它们是不同的。

[0623] 药盒通常包括本发明的疫苗纳米载体的使用说明书。例如,说明书可以包括产生疫苗纳米载体、向有需要的患者施用疫苗纳米载体等的方案和/或描述产生疫苗纳米载体、向有需要的患者施用疫苗纳米载体等的条件。药盒通常包括一个或多个器皿或容器,使得一些或所有的单个成分和试剂可以分开存储。药盒还可以包括将单个的容器以相对封闭的方式封装以用于商业销售的装置,例如,塑料盒,其中可以装入说明书、包装材料,如泡沫塑料等。药盒之中或之上或药盒中包括的一个或多个器皿或容器之中或之上可以有标识符,例如,条形码,射频识别(ID) 标签等。标识符可用于例如唯一确定用于质量控制、存货控制、追踪、工作站之间的移动等目的的药盒。

[0624] 实施例

[0625] 实施例1:淋巴结中的被膜下窦巨噬细胞清除淋巴携带的病毒并将其呈递至抗病毒B细胞

[0626] 材料和方法

[0627] 方法概述

[0628] 从感染的BSRT7细胞的培养物上清液纯化VSV-IND和VSV-NJ病毒粒,以未修饰形式或用Alexa-568(红色)或Alexa-488(绿色)荧光标记使用。将用于组织成像的荧光病毒进行

UV照射以防止产生非荧光的子代。对VSV-IND颗粒进行荧光标记或UV照射不影响其抗原性或者在VI10YEN细胞中引发钙流动的能力(未显示)。将荧光病毒注射入足垫后,收获引流的腭淋巴结以进行电子显微镜分析或产生用于免疫染色和共焦显微镜的冷冻切片。为了显示淋巴结中过继性转移的B细胞,将VI10YEN和野生型B细胞进行荧光标记并通过静脉内注射共转染至野生型或突变的受体小鼠。18小时后,当B细胞回归到B细胞滤泡时,以标记或未标记的VSV注射小鼠的右足垫。之后在不同的时间间隔,通过MP-IVM观察引流的腭淋巴结或者将其收获以用于共焦显微镜观察或进行流式细胞计量术以分析病毒特异性和对照B细胞的激活状态。在一些实验中,通过sc注射CLL而消除腭淋巴结中的巨噬细胞,动物用于此后7-10天的实验。在预先进行CLL处理和不预先进行CLL处理的淋巴结上进行各种标记物的MP-IVM、电子显微镜、免疫组化和流式细胞计量术分析。通过向足垫注射确定数量的活体VSV然后在VSV注射2小时或6小时后收获组织而检测VSV从足垫注射位点向血液和其它器官的繁殖。为了测量病毒效价,将组织匀浆并用于空斑试验中。一些病毒繁殖实验在胸管插管之后进行。

[0629] 小鼠和抗体

[0630] C57BL/6和BALB/c小鼠购自Taconic Farms (Germantown, NY)。VI10YEN (Hangartner等,2003,Proc.Natl.Acad.Sci.,USA,100:12883;引入本文中作为参考),C3^{-/-} (Wessels等,1995,Proc.Natl.Acad.Sci.,USA,92:11490;引入本文中作为参考),MHCII-EGFP (Boes等,2002,Nature,418:983;引入本文中作为参考),Act-EGFP (Wright等,2001,Blood,97:2278),和DH-LMP2A小鼠 (Casola等,2004,Nat.Immunol.,5:317;引入本文中作为参考)在Harvard Medical School和the Immune Disease Institute (IDI)的栅栏动物场饲养。通过以两剂650rad照射Act (EGFP) 小鼠,并以C57BL/6骨髓还原而产生辐射嵌合体,在使用之前使其重建8周。在一些实验中,在实验之前7-10天通过足垫注射30微升的膦酸盐脂质体 (CLL) 而除去SCS巨噬细胞。

[0631] 膦酸盐是Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, 德国的惠赠。其它用于制备脂质体的试剂为:磷脂酰胆碱 (LIPOID E PC, Lipoid GmbH, Ludwigshafen, 德国) 和胆固醇 (Sigma-Aldrich)。

[0632] 根据National Institutes of Health的指南,将小鼠养在无特异性病原体和无抗病毒抗体的条件下。所有实验的动物程序都经过Institutional Animal Committees of Harvard Medical School和IDI批准。

[0633] 除了抗-B220-Alexa647 (Invitrogen-Caltag)、抗-LYVE-1 (Millipore-Upstate)、山羊-抗-兔子-APC (Invitrogen)、山羊-抗-GFP-FITC (Rockland)、抗-FITC-Alexa488 (Invitrogen) 和Fab抗-IgM-FITC (Jackson ImmunoResearch) 之外,抗体购自BDBiosciences (San Jose, CA)。以下抗体购自AbD-Serotec:抗-CD68-Alexa647、抗-CD11b-Alexa647、F4/80-Alexa647、抗-CD169-FITC (3D6)。用于检测VI10YEN小鼠中的VI10BCR的抗-个体基因型抗体35.61 (Hangartner等,2003,Proc.Natl.Acad.Sci.,USA,100:12883;引入本文中作为参考)根据标准方法从杂交瘤上清液中产生。

[0634] 流式细胞计量术

[0635] 在对小鼠进行后眼窝放血并以ACK缓冲剂 (0.15M NH₄Cl, 1mM KHCO₃, 0.1mM EDTA (二钠盐), pH7.2) 裂解红细胞后将血液样品进行流式细胞计量分析。通过小心地切碎组织

然后于37℃在DMEM(Invitrogen-Gibco)(其中存在250微克/毫升liberase CI(Roche)加50微克/毫升DN酶-I(Roche))中消化40分钟而产生用于流式细胞计量术的淋巴结和脾的单细胞悬浮液。消化20分钟后,将样品剧烈地通过18G针头以确保器官完全分离。所有的流式细胞计量分析在FACS缓冲液(含有PBS和2mM EDTA和2%FBS(Invitrogen-GIBCO))中在FACScalibur(BD Pharmingen)上进行,并通过FlowJo软件(Treestar Inc., Ashland, OR)进行分析。为了测定钙流,以4μM Fluo-LOJO(Teflabs)(处于含有10%FCS的DMEM中)于37℃标记细胞90分钟。细胞穿过FCS离心并立即使用。

[0636] 病毒和VSV空斑试验

[0637] 在BSRT7细胞上以0.01的MOI繁殖VSV血清型Indiana(VSV-IND,源自Mudd-Summers的克隆,体外拯救的(Whelan等,1995,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,92:8388;引入本文中作为参考)和空斑纯化的)或New Jersey(VSV-NJ,Pringle Isolate,空斑纯化的)。通过在2000x g离心,通过0.45微米无菌过滤器过滤感染细胞的上清液并在40,000x g进行超离心90分钟,从而将感染细胞的上清液从细胞碎片中除去。将沉淀(Pellet)重悬浮于PBS并通过透过NTE(0.5mM NaCl、10mM Tris-HCl,pH 7.5,5mM EDTA,pH 8)中的10%蔗糖垫的超离心(157,000xg,60分钟)进行纯化。重悬浮于PBS中过夜后,通过BCA试验(Pierce)定量测定病毒蛋白,通过空斑试验定量测定感染力。一些斑以AlexaFluor-488或AlexaFluor-568(Invitrogen-Molecular Probes)的羧酸马来酰亚胺酯(Alexa染料摩尔数比病毒颗粒高104-105倍)进行标记。通过穿过NTE中的10%蔗糖的超离心除去未偶联的染料,将沉淀重悬浮于PBS并冷冻储存。通过在绿色猴肾细胞(Vero)上进行空斑试验来定量测定VSV制备物的感染力。以Potter-Elvehjem匀浆器将器官匀浆后,类似地测定来自感染小鼠器官的VSV效价。如果需要,在病毒制备过程中,从157,000x g的超离心中收集大约4毫升的上清液并以10,000MWC Amicon Ultra(Millipore)进行浓缩。为了对浓缩上清液中的剩余感染力作出解释,将VSV贮液稀释至等于浓缩上清液中的感染力的水平,将VI10YEN B细胞中的钙流与进一步稀释100倍的VSV和上清液进行比较。根据标准程序(Leopold等,1998,Human Gene Therapy,9:367;引入本文中作为参考)产生UV灭活的、AlexaFluor-568标记的腺病毒5(AdV5)。所有的传染性工作均在指定的BL2+工作站上根据制度指南进行,并经过Harvard Committee on Microbiological Safety的批准。

[0638] VSV中和试验

[0639] 在含有2%FCS的MEM中将经过免疫的小鼠的血清预稀释40倍。将连续2倍稀释物与等体积的VSV(500pfu/ml)混合并在37℃下在5%CO₂中孵育90分钟。将100微升的血清-病毒混合物转移至96孔平板中的Vero细胞单层上并在37℃下孵育1小时。用含有1%甲基纤维素的100微升的DMEM将单层覆盖并在37℃下孵育24小时。然后,除去覆盖,将单层固定并以0.5%的结晶紫染色。将空斑数减少50%的最高血清稀释作为效价。为了测定IgG效价,与等体积的盐水中的0.1mM巯基乙醇预处理未稀释的血清。

[0640] 粘附试验

[0641] 用重组小鼠VCAM-1-Fc或ICAM-1-Fc(R&D体系)的稀释物或PBS中的纯化VSV-IND将96孔板(Corning)覆盖过夜,重复三份。阴性对照孔用4%BSA覆盖,阳性对照孔用1毫克/毫升的多聚L赖氨酸覆盖。在4℃下用Hanks Balanced Salt Solution(HBSS)/1%BSA将板子封闭1-2小时,并洗涤。使用CD43磁性珠子(Miltenyi,Bergisch Gladbach,德国)通过磁性

细胞分离法负选择来自VI10YEN或C57BL/6小鼠的天然B细胞,并以 3×10^5 /孔加入到平板中的HBSS(含有1%BSA、1mM Ca_2^+ 和1mM Mg_2^+ ,存在或不存在UV灭活的VSV-IND(MOI为1000)中,37℃持续30分钟。轻轻洗涤(在含有1%的BSA的HBSS中洗涤3次)后,用PBS/10%戊二醛将平板固定10分钟,用0.5%结晶紫/20%甲醇染色45分钟并在水中洗涤。通过加入1%的SDS洗脱染料,30分钟后通过分光光度法测定570纳米处的吸光率(SpectraMax340PC微量板阅读器和SoftmaxPro 3.1.2软件,Molecular Devices Corporation)。

[0642] 共焦显微镜检查

[0643] 对于一些分析,将20微克AlexaFluor-568或AlexaFluor-488标记的VSV-IND或VSV-NJ注入C57BL/6小鼠的两只后足垫,持续30分钟。对于其它实验,将 1×10^7 在实验前一天负选择的来自VI10YEN x MHCII-EGFP小鼠的天然B细胞注入小鼠。在预定的时间点,通过足垫注射磷酸盐缓冲的L-赖氨酸和1%多聚甲醛/高碘酸盐(PLP)将腭淋巴结原位固定。除去腭淋巴结并在PLP中于4℃孵育3-5小时后,在0.1M PBS(pH 7.2)中洗涤腭淋巴结,并在PBS中渐增系列的10%、20%和30%蔗糖中冷冻保存。在TBS组织冷冻液(Triangle Biomedical Sciences,Durham NC)中将样品急冻并储存在-80℃。将40微米厚的切片装配在Superfrost Plus玻片(Fisherbrand)上,用1微克/毫升抗体2.4G2(BD Pharmingen)封闭Fc受体后,在湿室中用荧光抗体进行染色。将样品在FluorSave试剂溶液(EMD-Calbiochem)中装配并储存于4℃直至进行分析。使用OlympusBX50WI显微镜和10x/0.4或60x/1.2W的物镜通过BioRad共焦显微镜系统收集图像。使用LaserSharp2000软件(BioRad Cell Science,Hemel Hempstead,Great Britain)和Photoshop CS(Adobe)分析图像。通过对位于T/B边界50微米内的细胞进行计数来定量位于T/B边界的B细胞,由B220复染显示,任何位于更中心区域的细胞被认为是滤泡。

[0644] 电子显微镜检查

[0645] 通过足垫注射0.1M甲次砷酸盐缓冲液中(pH7.4)的2%甲醛和2.5%戊二醛在原位固定腭淋巴结。切除淋巴结并浸没在相同的缓冲液中于4℃过夜,在甲次砷酸盐缓冲液中洗涤,并以1%四氧化锇/1.5%氰亚铁酸钾(水中)于室温黑暗中进行锇染色,持续1小时。在水中洗涤后,将样品在0.05M马来酸盐缓冲液(pH5.15)中洗涤3-4次。在马来酸盐缓冲液中的1%的乙酸铀酰中将样品复染2个小时并在水中洗涤3次。通过在水中的乙醇(70%-90%-100%)的稀释物中孵育15分钟将样品脱水,在氧化丙烯中孵育1小时,然后转移至1:1混合的Epon和氧化丙烯中,于室温过夜。将样品转移至填充新鲜混合Epon的包埋模具中并于60℃加热24-48小时以进行聚合。在Harvard Medical School EM设备的Tecnai G2 Spirit BioTWIN电子显微镜上分析样品。

[0646] 腭LN的活体内多光子显微镜检查(MP-IVM)

[0647] 使用CD43珠子(Miltenyi)通过磁性分离负选择天然B细胞。使用10 μM 的5-(和6-)((4-氯甲基)苯甲酰)氨基)四甲基若丹明(CMTMR;Invitrogen)于37℃标记VI10YEN B细胞,持续20分钟,使用10 μM 的7-氨基-4氯甲基香豆素(CMAC;Invitrogen)于37℃标记C57BL/6B细胞,持续25分钟。在一些实验中,在野生型和VI10YEN B细胞之间交换标记以排除非特异性染料效应。将每个群体的 $5-6 \times 10^6$ 个B细胞混合并在分析前一天通过尾部静脉注入C57BL/6受体小鼠来进行过继性转移。在一些实验中,受体C57BL/6小鼠已经在实验前7-10天接受了后足垫注射30微升的CLL以除去SCS巨噬细胞(Delemarre等,1990,

J. Leukoc. Biol., 47:251; 引入本文中作为参考)。过继性转移B细胞后18小时,通过静脉内注射克他命(50毫克/千克)和甲苯噻嗪(10毫克/千克)将受体小鼠麻醉。通过微手术方法制备右侧腭淋巴结以用于MP-IVM,将其放置于客户自制的显微镜平台上,如所述的(Mempel等,2004,Nature,427:154; 引入本文中作为参考)。小心地分离出血管和传入淋巴管。将暴露的淋巴结浸没于正常盐水中并用玻璃盖玻片覆盖。将热电偶置于淋巴结旁边以监控局部温度,将其保持在36-38°C。在800纳米的激发波长(来自可调的MaiTai Ti:蓝宝石激光器(Spectra-Physics))在BioRad 2100MP系统上进行MP-IVM。通过31G针头将荧光标记的VSV(20微升中含有20微克)注入同时观察的受体小鼠的右后足垫中。为了进行细胞迁移的四维离线分析,通过20x/0.95水浸目镜(Olympus)用电子放大1.8x-3x每15秒获取11个具有4微米z间距的光学x-y部分的堆积。用非去扫描检测器(non-descanned detector)通过400/40纳米、450/80纳米、525/50纳米和630/120纳米通带过滤器检测发射的荧光信号和第二谐波信号以产生三色图像。使用Volocity软件(Improvision)将图像堆积的序列转化为赋予体积的四维的时延影像。使用Volocity通过半自动化细胞追踪和通过Matlab(Mathworks)进行的计算机化分析确定3D即时速率。通过不知情观察者进行的人工影像分析确定SCS上的细胞积聚。每2分钟,在SCS、表面滤泡(从SCS<50微米的距离)和深层滤泡(从SCS>50微米的距离)上数出VI10YEN B细胞和多克隆B细胞,记录整个30分钟的影像中每个室中的VI10YEN/多克隆B细胞的比例。

[0648] 胸导管插管

[0649] 为了胸导管插管,在插管前30分钟,小鼠p.o.接受200微升橄榄油以促进淋巴管的可视化。然后用甲苯噻嗪(10毫克/千克)和盐酸克他命(50毫克/千克)将动物麻醉。将聚乙烯导管(PE-10)插入右侧颈静脉以持续灌输(2ml/小时)含有1U/ml肝素(American Pharmaceutical partners, Los Angeles, CA)的林格乳酸盐(Abbott Laboratories, North Chicago, IL)。使用解剖显微镜,通过左肋下切口将TD暴露出来。用肝素化(50U/ml)的磷酸盐缓冲盐水(DPBS, Mediatech, Herndon, VA)冲洗Silastic®硅管(0.012" I.D., Dow Corning, Midland, USA),并通过大约0.3毫米的切口将其插入到乳糜池中,并以异丁基氰基丙烯酸盐单体(Nexaband®, Abbott Laboratories)固定。将管的剩余部分通过后腹壁取出来。然后,使用6-0不可吸收的连续缝合线(Sofsilks, Tyco Healthcare Group, Norwalk, CO)将腹部切口封闭。淋巴流平衡30分钟后,用108pfu的VSV-IND在足垫注射动物,在冰上收集淋巴样品,持续收集6小时。胸管淋巴收集6小时后取出淋巴和器官并按照上文所述斑化。按照上文所述将淋巴和器官斑化。在一些实验中,通过外科手术将引流腭淋巴结和主动脉淋巴结切除,将周围的淋巴管烧灼以防止淋巴携带的病毒进入血液。

[0650] 结果和讨论

[0651] 淋巴结(LN)阻止病原体(如进入机体表面的病毒)从感染的外周位点散布到全身。它们也是针对源自病原体的抗原的获得性免疫应答的分期依据(von Andrian和Mempel, 2003, Nat. Rev. Immunol., 3:867; 和Karrer等, 1997, J. Exp. Med., 185:2157; 在此将两篇都引入作为参考)。尚不清楚病毒颗粒如何从输入性淋巴被清除并递呈至同源的B细胞以诱导抗体应答。在此,我们在被膜下窦(SCS)的基底和淋巴结的髓质中鉴别出CD11b⁺CD169⁺MHCII⁺巨噬细胞群,其在皮下注射(s.c.)几分钟之内捕获病毒颗粒。SCS巨噬细胞跨过SCS基底将表面结合的病毒颗粒转运并将其递呈至下面的滤泡中的迁移性B细胞。选择性除去这些巨

噬细胞破坏了局部病毒保留,恶化了宿主的病毒血症,并破坏了局部B细胞激活。这些发现表明CD169⁺巨噬细胞具有双重生理学功能。它们作为先天“捕蝇纸”而阻止淋巴结携带的病原体的全身性扩散,并且在淋巴组织处作为重要的门户以促进B细胞识别特定的抗原并启动体液免疫应答。

[0652] 我们研究了进入外周组织的病毒颗粒在引流的淋巴结中如何被处理。以荧光标记的UV灭活的泡性口炎病毒(VSV)(一种由昆虫叮咬传播的引起细胞病变的棒状病毒)(Mead等,2000,Ann.N.Y.Acad.Sci.,916:437;引入本文中作为参考)注射小鼠后足垫并引发T非依赖性中和性B细胞应答(Bachmann等,1995,Eur.J.Immunol.,25:3445;引入本文中作为参考)。使用多光子活体内显微镜检查(MP-IVM),在注射的足垫引流的腭淋巴结中(Mempel等,2004,Nature,427:154;引入本文中作为参考),我们观察到皮下注射后几分钟之内VSV以离散的碎片在SCS基底上聚积,而SCS的软组织和顶部仍然没有病毒(图11A)。病毒沉积变得越来越密集,形成显著的不规则网状式样,其在数小时内保持固定在位置中。

[0653] 为了表征淋巴结中VSV结合位点的偏好性,我们用野生型骨髓重建了几只照射的Act(EGFP)小鼠。所产生的B6→Act(EGFP)嵌合体在非造血细胞中表达EGFP,推测为SCS基底和顶部的淋巴内皮细胞。将荧光VSV足垫注入C57BL/6→Act(EGFP)嵌合体时,病毒颗粒淹没了SCS。3小时后,未结合的腔内VSV已经消失,但是SCS基底显示出强烈的VSV碎片,其不与EGFP⁺细胞共存,这暗示VSV被造血细胞捕获(图11B)。为了描绘推测的捕获VSV的白细胞,我们在VSV注射5分钟之后收获的腭淋巴结上进行了电子显微镜检查(图11C)。子弹状电子密集的VSV颗粒选择性地结合分散大细胞(其位于SCS内或在SCS基底正下)表面上的离散区域。位于SCS基底下方的VSV结合细胞通常通过延伸进入SCS腔的突出与淋巴腔室接触。

[0654] 淋巴结的超结构研究已经表明SCS含有很多巨噬细胞(Clark,1962,Am.J.Anat.,110:217;和Farr等,1980,Am.J.Anat.,157:265;将两篇都引入作为参考),所以我们假设VSV保留细胞属于这一群体。确实,足垫注射30分钟后获得的冷冻淋巴结切片的共焦显微镜观察显示VSV与巨噬细胞标记物CD169/唾液酸粘附素共同定位于SCS(图11D)。使用流式细胞计量术,我们在淋巴结中的大约1%-2%的单核细胞(MNC)中检测到了CD169,其统一地共表达CD11b和MHC-II,这表明结合VSV的细胞确实是巨噬细胞(图12)。多数CD169⁺细胞也表达其它的巨噬细胞标记物,包括CD68和F4/80,而极少表达粒细胞/单核细胞标记物Gr-1。CD169⁺细胞也表达CD11c,但是比CD11c^{high}常规树突细胞(DC)水平要低。在经皮沉积数分钟后完整病毒粒进入淋巴并且迅速且选择性地入髓质和引流淋巴结的SCS中的巨噬细胞上积聚。

[0655] 为了研究病毒固定的机理,将活体VSV(20微克含有 2×10^8 pfu)注入后足垫,2小时后测定引流淋巴结中的病毒效价。在补体C3缺失的小鼠的引流淋巴结中VSV的保留没有缺陷(图11E)。缺少分泌的免疫球蛋白的DH-LMP2a小鼠在脾中病毒效价降低,但是腭淋LN中不降低(图11F)。因此,LN中VSV的固定是通过与脾边缘区域巨噬细胞使用的不同的机理发生,脾边缘区域巨噬细胞中VSV的固定需要C3和天然抗体以捕获血液携带的VSV(Ochsenbein等,1999,J.Exp.Med.,190:1165;和Ochsenbein等,1999,Science,286:2156;将两篇都引入本文中作为参考)。可以想象到,LN中VSV表面糖蛋白(VSV-G)可能被表达巨噬细胞的与碳水化合物结合的清道夫受体所识别(Taylor等,2005,Ann.Rev.Immunol.,23:901;引入本文中作为参考),但是精确的机理需要进一步的研究。

[0656] 巨噬细胞捕获病毒对于病毒传播和抗病毒免疫力的意义是什么呢?为了解释这个问题,我们通过足垫注射磷酸盐脂质体来除去位于淋巴结中的巨噬细胞 (CLL; Delemarre 等, 1990, *J. Leukoc. Biol.*, 47:251; 引入本文中作为参考)。在所用的剂量下, 皮下注射 CLL 选择性地消除了注射点引流的淋巴结中的巨噬细胞, 包括腠部、腹股沟和主动脉旁 LN (Delemarre 等, 1990, *J. Leukoc. Biol.*, 47:251; 引入本文中作为参考), 而留下了末梢淋巴结和脾中的巨噬细胞 (图 13A、B)。在不同的处于淋巴结中的 CD11b⁺MHC II⁺ 的吞噬细胞中, CLL 优选除去 CD169⁺ 亚群, 而 LYVE-1⁺ 细胞和常规的 DC 保持不变。在处理之后 7 天, CLL 处理的腠淋巴结的 B 细胞数目增加且滤泡增大, 但是其它的形态学参数 (例如, T/B 边界的划分和 SCS 超结构) 保持不变 (图 13C-E)。

[0657] 与未处理的 LN 相比, 我们从 CLL 处理的小鼠的引流淋巴结中恢复的病毒效价约低 10 倍 (图 11G), 这表明巨噬细胞的消除引起淋巴过滤的无效率。确实, 在 CLL 处理的小鼠的血液、脾和非引流淋巴结中 VSV 的效价显著性升高。病毒从注射位点向血液的传播严格取决于淋巴引流, 这是因为, 当病毒被注射到在胸导管 (TD) 中携带阻塞管的小鼠的足垫时 (甚至是在 CLL 处理的小鼠中) 检测不到循环的 VSV。在未处理小鼠的 TD 淋巴液中病毒效价低, 但是可以检测到, 但是在 CLL 处理的动物中显著性升高 (图 11H)。这表明病毒从外周组织早期传播的主要途径是淋巴, 其通过处于淋巴结中的阻止淋巴携带的 VSV 全身性扩散 CLL 敏感性的巨噬细胞来监控。

[0658] 这个捕获机理并非对 VSV 特异的; CD169⁺SCS 巨噬细胞也保留腺病毒 (AdV; 图 11A-C) 和牛痘病毒 (VV, 图 14D), 这表明巨噬细胞作为抵抗很多结构不同的病原体的屏障。相反, 在足垫注射后, 病毒大小的橡胶珠 (200 纳米) 在 SCS 中的保留性较差 (图 14E)。因此, SCS 巨噬细胞区别淋巴携带的病毒和其它相似大小的颗粒。荧光 VSV、AdV 和 VV 也在引流淋巴结的髓质聚集, 在那里它们不仅被 CD169^{low} 细胞结合 (图 11D), 还被 CD169⁻LYVE-1⁺ 淋巴内皮细胞结合 (图 14C、D)。这在 CLL 处理的淋巴结中得到确证, 其中 VSV 专有性地在髓质的 LYVE-1⁺ 细胞上聚集 (图 15)。

[0659] 接着, 我们研究了 B 细胞如何识别捕获的 VSV。在 SCS 腔内, 腠 LN 几乎不含 B 细胞 (图 16A), 但是我们发现在电子显微图中没有发现 SCS 内结合病毒的淋巴细胞的迹象。反而, 延伸跨过 SCS 基底的巨噬细胞将病毒颗粒递呈至表面滤泡内的 B 细胞。在注射 VSV (图 17A) 或 AdV (图 16B-E) 后, 在 B 细胞-巨噬细胞界面处可以容易地检测到病毒体, 这至少持续 4 个小时。这表明为了将病毒颗粒递呈至 B 细胞, SCS 巨噬细胞将病毒颗粒穿梭跨过 SCS 基底。转胞吞作用似乎是不可能的, 因为极少在 SCS 巨噬细胞中含有 VSV 的泡显示出病毒降解的迹象。此外, 我们通过 MP-IVM 没有检测到结合病毒的巨噬细胞的实质性运动性, 至少在刺激后首 6 个小时内没有检测到。因此, 病毒颗粒最可能通过沿着巨噬细胞表面移动而到达淋巴结软组织。值得注意的是: 从外周位点迁移的 DC 也将 VSV 和其他抗原递呈至 B 细胞 (Ludewig 等, 2000, *Eur. J. Immunol.*, 30:185; 和 Qi 等, 2006, *Science*, 312:1672; 将两篇都引入作为参考), 但是源自足垫的 DC 不可能在这些非常早的事件中发挥作用, 因为它们需要更长的时间迁移至腠 LN。SCS 基底对于淋巴携带的病毒来说不是不可逾越的; CD169⁺巨噬细胞似乎作为病毒转运并递呈至 B 细胞的守卫和促进者。

[0660] 接着, 使用两种血清型的 VSV (Indiana (VSV-IND) 和 New Jersey (VSV-NJ) (图 18; Roost 等, 1996, *J. Immunol. Methods*, 189:233; 引入本文中作为参考) 研究了天然 B 细胞对病

毒遭遇应答的方法。我们将野生型B细胞与来自VI10YEN小鼠的B细胞(其表达不与VSV-NJ结合的VSV-IND特异性B细胞受体)进行了比较(Hangartner等,2003,Proc.Natl.Acad.Sci., USA,100:12883;引入本文中作为参考)。相反,一小部分(2%-5%)的野生型B细胞同时结合两种血清型而不被激活。这可能反映出与VSV-G的低亲和性反应或间接的相互作用,例如通过补体(Roszbacher和Shlomchik,2003,J.Exp.Med.,198:591;引入本文中作为参考)。为了检测体内应答,将经不同标记的野生型和VI10YEN B细胞进行过继性转移并允许回归至淋巴结滤泡。然后将荧光的UV灭活的病毒注入足垫并在约5-35分钟后通过MP-IVM记录膈LN。在不含病毒的淋巴结或注射VSV-NJ后,VI10YEN和对照B细胞显示出相同的分布(图17B-C)。相反,在注射VSV-IND后,VI10YEN细胞迅速在SCS基底以下和在SCS基底上聚集。在CLL处理的和未处理的淋巴结中,基础B细胞活动性和分布没有差异,表明在两种条件下,VSV特异性B细胞以相等的可能性探测SCS。然而,在CLL处理的淋巴结中,荧光病毒没有被保留在SCS上并且VI10YEN B细胞不能在该区域聚集,这表明SCS巨噬细胞对两个事件均是必需的(图17B)。

[0661] 为了严格定量VI10YEN B细胞的分布,在VSV刺激30分钟后收获LN并通过共焦显微镜进行分析。整个的滤泡VI10YEN群体保留其总体分布(图17D),但是在含有VSV-IND的淋巴结中(而不是在含有VSV-NJ的淋巴结中)位于SCS以下 ≤ 50 微米的细胞亚群向SCS偏移(图17E)。因为化学趋向性信号,所以VI10YEN B细胞似乎不可能重新分布于SCS,因为无反应性多克隆B细胞表达相同的化学趋向因子受体。更可能的是,运动性的VI10YEN细胞与结合巨噬细胞的VSV-IND的随机接触引发依赖于BCR的“终止信号”(Okada等,2005,PloS Biol.,3:e150;引入本文中作为参考):短时间暴露于VSV-IND激活VI10YEN B细胞上的LFA-1和/或 $\alpha 4$ 整联蛋白(Dang和Rock,1991,J.Immunol.,146:3273;引入本文中作为参考),这导致粘附至各自的配体ICAM-1和VCAM-1,二者均在SCS上表达(图19)。此外,VSV-IND与SCS巨噬细胞的结合可能为VI10YEN B细胞通过BCR的直接粘附提供底物。

[0662] 为了研究B细胞检测到捕获的病毒体时如何处理,我们测试了来自VI10YEN x MHCII-EGFP小鼠的B细胞,这允许我们显示与内涵体MHC-II共定位的内吞的VSV以作为B细胞引发的指示(Vascotto等,2007,Curr.,Opin.,Immunol.,19:93;引入本文中作为参考)。在注射后30分钟内,表面滤泡中的VI10YENx MHCII-EGFP B细胞具有严重内在化的VSV-IND,但没有VSV-NJ颗粒(图20A、B)。在深层滤泡中很少有携带病毒的VSV特异性B细胞,但仍可以检测到。这些细胞可能具有从鲜有的在表面携带VSV的多克隆B细胞获得的病毒体,或者可能对应于VI10YEN细胞,VI10YEN细胞在获得VSV-IND后不能停留在SCS。

[0663] 尽管我们的组织学发现证明完整的病毒粒优先被SCS和表面滤泡中的B细胞检测到并获得,而对B细胞活动性的MP-IVM测定显示出更广的抗原传播。在VSV-IND注射后,VI10YEN细胞在整个B滤泡中表现出迅速的速率下降(图21)。在CLL处理和对照淋巴结中同样有此发现,这表明病毒抗原不依赖于巨噬细胞到达B细胞。这种抗原性材料最可能由游离病毒蛋白(自然感染的不可逆的副产物)组成。确实,我们的VSV贮液的纯化上清液在VI10YEN B细胞中诱导强烈的钙流动(图18E)。已知小的淋巴携带的蛋白迅速扩散至滤泡和激活同源的B细胞(Pape等,2007,Immunity,26:491;引入本文中作为参考)。因此,注射病毒上清液抑制了滤泡VI10YEN B细胞的移动而没有诱导其在SCS的聚集,这表明游离的VSV-G包含在病毒接种体内并且是活性的。这可以解释VSV-IND注射的巨噬细胞非依赖性的广泛

的滤泡效应。

[0664] 为了确定遭遇病毒之后的VI10YEN B细胞激活的动力学,我们测定了常见的激活标记物(图22)。在VSV-IND刺激之后6小时,共刺激分子CD86首先被上调。CD69被更迅速地诱导,但是在多克隆B细胞上同样被诱导,推测是被多向性IFN- α 信号所诱导(Barchet等,2002,J.Exp.Med.,195:507;和Shiow等,2006,Nature,440:540;将两篇都引入作为参考)。早在刺激后30分钟表面IgM(图20C、D)即被下调,在2小时内达到最大值,当>70%的VI10YEN细胞是BCR^{low/neg}的时候。因此,BCR的内在化为病毒特异性B细胞的激活提供了最早的特异性读出。明显地,在皮下注射20微克的VSV-IND后的头两个小时内,CLL处理的淋巴结中的VI10YEN B细胞不能下调其BCR(图20E),这表明SCS巨噬细胞对于将捕获的病毒体有效的早期递呈至B细胞是必需的。

[0665] 引发的B细胞最终恳求来自CD4⁺T细胞的帮助(Vascotto等,2007,Curr.,Opin.,Immunol.,19:93;引入本文中作为参考)以进行类别转换重组和生发中心的形成。为了接触T细胞,新激活的B细胞朝着T/B边界迁移(Okada等,2005,PLoS Biol.,3:e150;和Reif等,Nature,416:94;将两篇都引入作为参考)。这个机理在富含巨噬细胞的小鼠中有效进行;多数VI10YEN B细胞在足垫注射少至40ng的VSV-IND后的6小时内重新分布于T/B边界(图20F、H和23)。相反,在CLL处理的小鼠中需要高100倍的病毒剂量以引发VI10YEN B细胞的完全的重新分布(图20G、H)。注射后12小时,多数VSV特异性细胞到达T-B边界,不论注射剂量为多少。因此,即使没有SCS巨噬细胞,滤泡B细胞最终也会被源自VSV的抗原激活,虽然效率较低。

[0666] 综上,我们证明LN中的CD169⁺巨噬细胞具有双重作用:它们捕获淋巴携带的病毒,阻止其全身性传播;并且它们指引捕获的病毒体跨越SCS基底以有效地递呈并激活滤泡B细胞。

[0667] 实施例2:示例性的基于脂质的疫苗纳米技术构建

[0668] 脂质体纳米载体

[0669] 在一些具体实施方案中,生产小的脂质体(10纳米-1000纳米)并在一些具体实施方案中用于将一种或多种免疫调节剂传送至免疫系统的细胞(图3)。通常,脂质体是人工构建的圆球体脂泡,其数十至数千纳米的可控直径意味着单独的脂质体包含体积为仄升(10^{-21} L)至飞升(10^{-15} L)的生物可兼容腔室,这些腔室可用于包埋并储存各种货物,例如蛋白、酶、DNA和药物分子。脂质体可以包含具有两性性质的脂双层:双层的内表面和外表面均为亲水性的,双层的腔是疏水性的。亲脂性分子可以自发嵌入脂质体膜并将其亲水性结构域保留在外面,由于膜的双功能性的优势,亲水性分子可以与脂质体的外表面化学地偶联。

[0670] 在某些具体实施方案中,脂质与亲脂性免疫调节剂混合,然后形成固体表面上的薄膜。亲水性免疫调节剂溶解于水性溶液中,然后将此水性溶液加入到脂膜中,在振荡下将脂水解。将具有整合到双层壁中的亲脂性免疫调节剂和位于脂质体腔内的亲水性免疫调节剂的脂质体自主装配。

[0671] 纳米颗粒稳定化的脂质体纳米载体

[0672] 在一些具体实施方案中,纳米颗粒稳定化的脂质体用于将一种或多种免疫调节剂传送至免疫系统的细胞(图4)。当小的带电的纳米颗粒到达带有相反电荷或无净电荷的脂质体表面时,纳米颗粒与膜之间的静电或电荷-偶极相互作用吸引纳米颗粒停留在膜表面,

被脂膜部分包裹住。这诱导脂质体的局部的膜的弯曲和整体表面的收缩,二者均调节膜的刚性。这个方面对于使用脂质体进行疫苗传送(以模拟病毒,病毒的坚固性取决于病毒膜内其它生物成分的组成)是至关重要的。此外,被吸附的纳米颗粒形成带电的壳,其保护脂质体抵抗融合,从而增强脂质体稳定性。在某些具体实施方案中,小的纳米颗粒与脂质体在轻微振荡下混合,纳米颗粒自主地粘附至脂质体表面。

[0673] 脂质体-聚合物纳米载体

[0674] 在一些具体实施方案中,脂质体-聚合物纳米载体用于将一种或多种免疫调节剂传送至免疫系统的细胞(图5)。替代保持脂质体内部中空,亲水性免疫调节剂可被包埋。图3显示了装载了双嵌段共聚物纳米颗粒的脂质体,以形成脂质体包被的聚合物纳米载体,其同时具有脂质体和聚合物纳米颗粒的性质,而排除了一些它们的局限性。在一些具体实施方案中,脂质体壳可用于携带亲脂性免疫调节剂或偶联亲水性免疫调节剂,聚合物核心可用于传送疏水性免疫调节剂。在某些具体实施方案中,预制的聚合纳米颗粒(40纳米-1000纳米)与小的脂质体(20纳米-100纳米)在轻微振荡下混合,以诱导脂质体融合至聚合物纳米颗粒表面上。

[0675] 纳米颗粒稳定化的脂质体-聚合物纳米载体

[0676] 在一些具体实施方案中,纳米颗粒稳定化的脂质体-聚合物纳米载体用于传送一种或多种免疫调节剂(图6)。通过小的纳米颗粒(1纳米-30纳米)吸附至脂质体-聚合物纳米载体表面,纳米载体不但具有上述纳米颗粒稳定化的脂质体(图4)和上述脂质体-聚合物纳米颗粒的性质(图5),还具有可调的膜刚性和可控的脂质体稳定性。

[0677] 包含反胶束的脂质体-聚合物纳米载体

[0678] 在一些具体实施方案中,含有反胶束的脂质体-聚合物纳米载体用于传送一种或多种免疫调节剂(图7)。由于上述脂质体-聚合物纳米载体(图5和6)限于在聚合物纳米颗粒内携带疏水性免疫调节剂,所以在这里将小的反胶束(1纳米-20纳米)制成以包埋亲水性免疫调节剂,然后与双嵌段共聚物混合以制成脂质体的聚合核心。

[0679] 在某些具体实施方案中,首先将待包埋的亲水性免疫调节剂通过在挥发性的与水混溶的有机溶剂中与天然来源的且无毒的两性实体混合而整合至反胶束中。将得到的生物可降解聚合物-反胶束混合物与聚合物不溶性的亲水性非溶剂结合,通过溶剂快速扩散至非溶剂中以及有机溶剂的挥发而形成纳米颗粒。含有反胶束的聚合纳米颗粒与脂质分子混合以形成上述脂质体-聚合物复合体结构(图5)。

[0680] 包含反胶束的纳米颗粒稳定化的脂质体-聚合物纳米载体

[0681] 在一些具体实施方案中,含有反胶束的纳米颗粒稳定化的脂质体-聚合物纳米载体用于输送一种或多种免疫调节剂(图8)。通过将小的纳米颗粒(1纳米-30纳米)吸附至脂质体-聚合物纳米载体表面,纳米载体不但具有上述纳米颗粒稳定化的脂质体(图4)和上述含有反胶束的脂质体-聚合物纳米颗粒的性质(图7),还具有可调的膜刚性和可控的脂质体稳定性。

[0682] 脂单层稳定化的聚合纳米载体

[0683] 在一些具体实施方案中,脂单层稳定化的聚合纳米载体用于传送一种或多种免疫调节剂(图9)。与上述脂质体-聚合纳米载体(图5-8)相比较,这个系统具有试剂和制备意义上的简单性。在一些具体实施方案中,疏水性均聚物可以形成聚合核心,而不是图5-8中所

用的双嵌段共聚物,其同时具有疏水性和亲水性片段。脂稳定化的聚合纳米载体可以在一个单一步骤中制成,而不是先分别制备聚合纳米颗粒和脂质体然后再将其结合在一起。

[0684] 在某些具体实施方案中,亲水性免疫调节分子首先与脂质头部基团化学偶联。偶联物在含有一种或多种与水混溶的溶剂的水性溶液中以一定比例与未偶联的脂分子混合。生物可降解聚合物与疏水性免疫调节剂混合以包埋于与水混溶或部分与水混溶的有机溶剂。将得到的聚合物溶液加入到偶联的脂质和未偶联的脂质的水性溶液中,通过有机溶剂快速扩散至水中以及有机溶剂的挥发而形成纳米颗粒。

[0685] 包含反胶束的脂单层-稳定化聚合纳米载体

[0686] 在一些具体实施方案中,包含反胶束的脂单层稳定化的聚合纳米颗粒用于传送一种或多种免疫调节剂(图10)。由于上述脂稳定化的聚合纳米载体(图9)限于携带疏水性免疫调节剂,所以在这里将小的反胶束(1纳米-20纳米)制成以包埋亲水性免疫调节剂,并与生物可降解聚合物混合以制成聚合纳米载体核心。

[0687] 实施例3:使用来自人IgG的Fc片段在体内靶向SCS-Mph

[0688] 将未进行荧光修饰的对照纳米颗粒(上图,图24A)或Fc表面偶联的靶向纳米颗粒(中图和下图,图24A)注入麻醉小鼠的足垫,1小时后切除引流的淋巴结并制备用于流式细胞计量术的单细胞悬浮液。通过注射装载氯曲膦酸盐的脂质体来消除淋巴结巨噬细胞后一个星期,同样以靶向纳米颗粒注射小鼠(下图,图24A)。基于CD11b的高表达,门内的细胞群体被鉴定为与纳米颗粒结合的巨噬细胞。这些结果表明:(i)纳米颗粒的结合取决于氯曲膦酸盐敏感性巨噬细胞的存在;和(ii)相对于对照纳米颗粒,靶向纳米颗粒结合约两倍的巨噬细胞。

[0689] 图24的右图显示了注射蓝色荧光对照纳米颗粒(上图,图24A)或靶向纳米颗粒(中图和下图,图24A)后冷冻的淋巴结切片的荧光显微图。以抗-CD169和鉴别髓质(上图和下图,图24A)或B细胞(中图,图24A)的标记物将切片进行复染。注射纳米颗粒之后1小时,在髓质中发现多数对照颗粒(上图,图24A),而靶向纳米颗粒与CD169+SCS-Mph定殖于B细胞滤泡附近(中图,图24A)。注射后24小时,在SCS和髓质之间的皮层区域中看到靶向纳米颗粒的离散的细胞尺寸的累积,表明迁移性树突细胞的摄取和转移。

[0690] 用红色荧光B细胞i.v.注射和1:1的对照和Fc靶向纳米颗粒混合物足垫注射小鼠。24小时后,当一些转化的B细胞迁移进入B细胞滤泡时,切除引流的淋巴结并切片以进行共焦显微镜观察和绿色:蓝色荧光比例的定量图像分析。被膜下窦(SCS)区域含有相似水平的蓝色和绿色纳米颗粒(右侧圈起来的细胞,图24B),而与Fc靶向纳米颗粒结合的绿色荧光在SCS中大约高两倍。在B滤泡内也有显著的绿色纳米颗粒累积,如分散的红色B细胞所显示。这些区域具有特征性的尺寸、形状和滤泡树突细胞(FDC)的分布,像巨噬细胞和树突细胞一样已知为表达丰富的Fc受体。

[0691] 实施例4:携带抗原的靶向纳米颗粒为高度免疫原性的且诱导高抗体效价

[0692] 用UV灭活的水疱性口炎病毒(VSV,Indiana血清型)或用VSV的经纯化的免疫原性被膜糖蛋白(VSV-G)免疫小鼠组(5只/组)。VSV-G以可溶形式与明矾混合供给,或者VSV-G与非靶向或靶向(具有表面固定的人类Fc)PLGA纳米颗粒(含有或不含明矾佐剂)偶联供给。估计游离VSV-G的剂量比以纳米颗粒输送的VSV-G的剂量约高10倍。小鼠在初次免疫之后55天接受增强性注射,10周后获取血清并测定Vero细胞上VSV-介导的空斑形成的中和情况。结

果显示为阻断至少50%空斑形成的最高血清稀释时的效价。每个符号表示一只小鼠中中和抗-VSV的效价。接受含有VSV-G的Fc靶向纳米颗粒免疫的小鼠组(该组中的具有最高抗体效价的两只动物在所测的最高稀释度时完全中和了空斑的形成,所以实际的效价甚至可能更高)产生比其它任何组都显著性高的中和抗-VSV效价。

[0693] 纳米颗粒(NP)疫苗引发的诱导的免疫应答赋予对致死剂量的VSV的有力的保护。虽然所有接受疫苗的组均显示出一些保护,但是只有一组(其接受VSV-G偶联至Fc靶向NP外加明矾)显示出对致死性感染的100%保护。接受游离VSV-G(VSV-G+明矾)的受体接受的抗原比供给VSV-G偶联至纳米颗粒的动物约高10倍。作为阴性对照,一个小组的小鼠接受不含VSV-G的Fc靶向纳米颗粒(NP-Fc),其没有产生保护。

[0694] 实施例5:通过免疫调节纳米颗粒体内T细胞激活

[0695] 用CFSE标记的CD4T细胞(来自OT-II供体小鼠,该小鼠表达对II类MHC中呈递的鸡白蛋白(OVA)特异性的转基因的TCR)通过静脉注射C57BL6J小鼠。然后,通过使用游离的OVA或纳米颗粒(其由PLA或PLGA组成,其中包埋等量的OVA作为模型抗原)注射一只足垫而进行免疫接种实验。所有的抗原性混合物还包含作为佐剂的CpG(一种TLR9激动剂)。注射动物,免疫后3天杀死动物,在来自不同组织的单细胞悬浮液中通过流式细胞计量术测定OT-II T细胞激活。

[0696] 未刺激的5,6-羧基-马来酰亚胺-荧光素-酯(CFSE)标记的T细胞没有分裂,所以统一携带高浓度的CFSE,这导致明亮地荧光细胞的单一的窄峰。相反,激活的T细胞发生分裂并且在此过程中在两个子代细胞之间平均分配荧光素染料,这导致每次连续分裂之后荧光的强度逐渐减弱。因此,CFSE荧光左偏移得越多,T细胞被激活得越厉害。结果表明:(i)在引流的淋巴结中(popLN,上面一行),纳米颗粒包埋的抗原比游离的抗原产生更强烈的CD4T细胞应答;(ii)在末梢淋巴组织中,包括臂淋巴结(中间一行)和脾(下面一行)只有纳米颗粒诱导局部T细胞增殖,而游离OVA不诱导局部T细胞增殖。在接受游离OVA的受体中,臂淋巴结和脾仅含有未分裂的细胞或含有非常低CFSE含量的细胞。后者的群体不指示局部T细胞激活,而是指示其它地方激活的T细胞的迁移。

[0697] 用CFSE标记的CD8T细胞(来自OT-I供体小鼠,该小鼠表达对I类MHC中递呈的鸡白蛋白(OVA)特异性的转基因的T细胞受体(TCR))静脉注射C57BL6J小鼠。其它实验方案与上面一段所述的相同。

[0698] 如上所述用来自OT-I供体小鼠的CFSE标记的CD8T细胞通过静脉注射C57BL6J小鼠。但是,在该实验中,使用CL097(一种激活TLR-7和TLR-8的咪唑喹啉化合物)作为佐剂并测试了不同的佐剂传送方法。在足垫注射与游离佐剂(160毫微克)混合的游离OVA(1微克或100毫微克)后3天,计算引流的淋巴结中OT-I T细胞的总数目,从而测定该情况下T细胞的激活。所有接受纳米颗粒的动物均接受含有或不含有160毫微克CL097的100毫微克的OVA。那些包埋于纳米颗粒中而不是与PLA聚合物共价结合的材料以[]表示。以连字符标示CL097与PLA的共价键。以游离形式混合于相同腔室内的材料以“+”分开。这些结果显示在接受包埋于纳米颗粒中的OVA(其中佐剂与赋形剂共价连接)的动物中,CD8T细胞的增殖显著性增加。

[0699] 实施例6. 纳米颗粒的形成

[0700] 将PLA-PEG-COOH(DCM中3毫克/毫升)与PLA-R848(DCM中3毫克/毫升)或R848(DCM/

DMSO (5%) 中15.7毫克/毫升) 混合。将500微升PLA-PEG-COOH溶液加入500微升PLA-R848中, 涡旋, 加入500微升OVA (水中5毫克/毫升) 或SIINFEKL肽 (2毫克/毫升), 用SINOMIX (超声波仪S-4000) 超声波处理 (15秒, 50振幅), 加入2毫升PVA溶液 (水中1%重量/体积), 超声波处理 (15秒, 50振幅) 并将溶液滴入40毫升水中。搅拌2小时, 用水洗涤3次, 用PBS洗涤1次。对于包埋R848制剂, 将500微升PLA-PEG-COOH溶液加入400微升游离PLA (3.75毫克/毫升) 和100微升R848中, 涡旋, 加入500微升OVA (水中5毫克/毫升) 或SIINFEKL肽 (2毫克/毫升), 超声波处理 (15秒, 50振幅), 加入2毫升PVA溶液 (水中1%重量/体积), 超声波处理 (15秒, 50W), 并将溶液滴入40毫升水中。搅拌2小时, 用水洗涤3次, 用PBS洗涤1次。

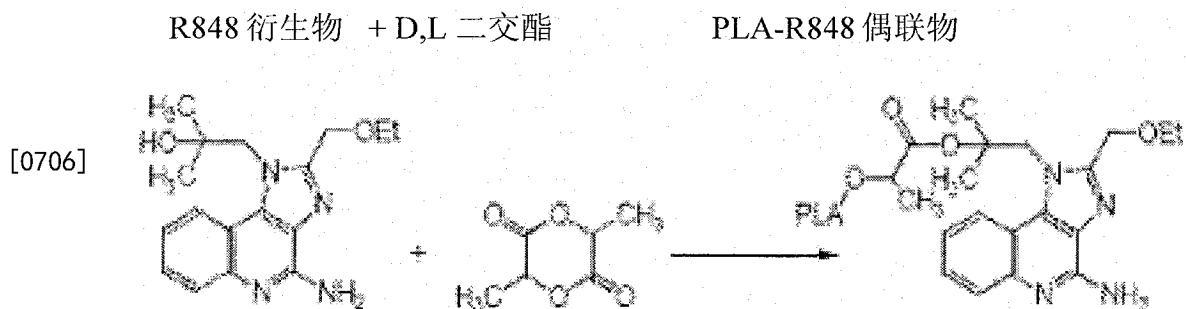
[0701] 实施例7. PLA-R848的合成

[0702] 方法1, 乙基己酸锡催化剂。

[0703] 将咪唑啉瑞喹莫德 (R-848, 100毫克, 3.18×10^{-4} 摩尔)、D/L交酯 (5.6克, 3.89×10^{-2} 摩尔) 和无水硫酸钠 (4.0克) 加入装有搅拌棒和冷凝器的双颈圆底烧瓶。将该烧瓶及内容物在50℃下真空干燥8小时。随后用氩气冲洗该烧瓶, 并加入甲苯 (100毫升)。在油浴装置中在120℃下搅拌反应, 直至所有交酯溶解, 并随后通过移液管加入乙基己酸锡 (75毫克、60微升)。随后在氩气下继续加热16小时。冷却后, 加入水 (20毫升) 并继续搅拌30分钟。用另外的甲苯 (200毫升) 稀释反应物, 随后用水 (200毫升) 清洗。随后依次用含5%浓盐酸的10%氯化钠溶液 (200毫升) 清洗该甲苯溶液, 继而用饱和碳酸氢钠 (200毫升) 清洗。TLC (二氧化硅, 含10%甲醇的二氯甲烷) 显示, 该溶液不含游离的R-848。将该溶液经硫酸镁干燥、过滤并在真空下蒸发, 以获得3.59克的聚乳酸-R-848偶联物。将聚合物的一部分在碱中水解, 并通过HPLC检查R-848含量。通过与R-848浓度对HPLC应答的标准曲线作对比, 可确定该聚合物每克聚合物包含4.51毫克的R-848。通过GPC确定该聚合物的分子量为约19,000。

[0704] 方法2, 二异丙基酰胺锂催化剂。

[0705] 在使用前, 将咪唑啉 (R-848)、D/L交酯和相关玻璃器具均在50℃下真空干燥8小时。将R-848 (33毫克, 1.05×10^{-4} 摩尔) 和无水甲苯 (5毫升) 加入装有搅拌棒和冷凝器的圆底烧瓶。将该烧瓶加热至回流, 以溶解全部R-848。将该溶液在氮气下搅拌并冷却至室温, 以提供精细分散的R-848的悬浮液。向该悬浮液加入二异丙基酰胺锂溶液 (THF中2.0M, 50微升, 1.0×10^{-4} 摩尔), 其后在室温下继续搅拌5分钟。在氮气下, 通过注射器将所形成的该浅黄色溶液加入D/L交酯的热 (120℃) 溶液 (1.87克, 1.3×10^{-2} 摩尔) 中。移除热, 并在室温下搅拌该浅黄色溶液1小时。将该溶液用二氯甲烷 (200毫升) 稀释, 并随后用1%的盐酸 (2X50毫升) 清洗, 继而用饱和碳酸氢钠溶液 (50毫升) 清洗。将该溶液经硫酸镁干燥、过滤并在真空下蒸发, 以获得聚乳酸-R-848偶联物。TLC (二氧化硅, 含10%甲醇的二氯甲烷) 显示, 该溶液不含游离的R-848。将聚合物溶于二氯甲烷 (10毫升), 并将该溶液滴入搅拌的己烷 (200毫升) 中。通过倾析分离沉淀的聚合物, 并将其在真空下干燥, 以获得1.47克作为白色固体的聚乳酸-R-848偶联物。将聚合物的一部分在碱中水解, 并通过HPLC检查R-848含量。通过与R-848浓度对HPLC应答的标准曲线作对比, 可确定该聚合物每克聚合物包含10.96毫克的R-848。



[0707] 实施例8. 包埋的R848的形成: 包埋和释放

[0708] 将500微升的PLA-PEG-COOH溶液 (DCM中3毫克/毫升) 加入至500微升的PLA-R848, 振荡, 加入500微升OVA或SIINFEKL肽, 超声波处理 (15秒, 50振幅), 加入2毫升PVA溶液 (水中1% w/v), 超声波处理 (15秒, 50W), 并将溶液滴入40毫升水中。搅拌2小时, 用水洗涤3次, 用PBS洗涤1次。假设PLAR848的EE%为100%, 而装载量估计为~5-10%。通过与PLA-PEG-COOH混合以形成纳米颗粒的PLA-R848的量来控制装载量。使用逆向C18柱 (Supelco) 进行HPLC实验, 其中流动相速度为1毫升/分钟。该流动相由0.1%的TFA/水和0.1%的TFA/ACN/水 (60:40) 组成。检测波长为320纳米。进样体积为100微升。

[0709] 将1.57毫克游离的R848 (溶于5% DMSO/DCM, 15.7毫克/毫升) 与PLA-PEGCOOH/PLA (1:1, DCM中总共3毫克/毫升, 1毫升) 混合, 并通过双乳剂技术纳米沉淀。最终NP[R848]溶液为1.0毫升, 且平均Np尺寸为~250纳米。游离的R848包埋的EE%为3.54%, 而装载量为1.85重量%。

[0710] 在37°C下在2升PBS缓冲溶液中进行R848释放实验。将0.5毫升的NP溶液 (1毫克/毫升) 加入微量透析盒 (mini-dialysis cassette) (3500Da), 其浸没于PBS溶液中。每个时间点, 提取 (3次重复) 500微升的样品, 并在注射入HPLC以进行分析之前将100微升的溶液与100微升乙腈混合。

[0711] 使用逆向C18柱 (Supelco) 进行HPLC实验以确定释放的R848的浓度/量, 其中流动相速度为1毫升/分钟。该流动相由0.1%的TFA/水和0.1%的TFA/ACN/水 (60:40) 组成。检测波长为320纳米。注入体积为100微升。

[0712] 数据在图32中显示。

[0713] 实施例9. SIINFEKL的形成: 包埋和释放

[0714] SIINFEKL是与小鼠I类MHC (H2k-b) 结合且被转基因OT-I T细胞所识别的源自鸡白蛋白 (OVA) 的免疫原性肽。通过双乳剂技术将500微升2毫克/毫升的SIINFEKL包埋在1毫升PLA-PEG-COOH/PLAR848溶液 (1:1, DCM中总共3毫克/毫升) 内。最终NPR848[SIINFEKL]溶液为1.5毫升。平均NP尺寸为~220纳米。SIINFEKL的包埋率 (EE%) 为1.32%, 而装载量为0.44重量%。

[0715] 在37°C下在11毫升PBS缓冲溶液中进行SIINFEKL释放实验。将0.5毫升NP溶液加入微量透析盒 (mini-dialysis cassette) (3500Da), 其浸没于PBS溶液中。每次, 取出2毫升的PBS并以2毫升新鲜的PBS替换。将样品冷冻干燥并溶解于150微升去离子水中以进行HPLC分析。

[0716] 使用逆向C18柱 (Supelco) 进行HPLC实验以确定释放的SIINFEKL的量, 其中速度为1毫升/分钟。该流动相包括0.1%的TFA/水和0.1%的TFA/ACN/水 (60:40); 其中时间梯度为

0-16分钟100%→40%TFA/水和16-38分钟40%→0%TFA/水。检测波长为215纳米。注入体积为100微升。对于每个时间点,由3个平行样品确定SIINFEKL的释放量并取均值。

[0717] SIINFEKL释放的数据在图29C中显示。

[0718] 实施例10. 包埋的OVA的形成:包埋和释放

[0719] 在37℃下在10毫升PBS缓冲溶液中进行OVA释放实验。具有包埋的OVA (3次重复) 的3毫克NP溶液,其浸没于10毫升PBS溶液中。每个时间点,收集0.5毫升的溶液,离心(8分钟,13转每分钟),收集上清液,并离心纳米颗粒以进行BCA定量。

[0720] 方法1:使用BCA试验以进行OVA定量。用BCA缓冲溶液在60℃下直接孵育NP-OVA 30分钟。

[0721] 结果:

[0722] 1.0%PVA:1.09毫克/毫升;EE%21.8%;装载量36.3重量%。

[0723] 1.5%PVA:1.18毫克/毫升;EE%23.6%;装载量39.3重量%。

[0724] 2.0%PVA:1.39毫克/毫升;EE%27.8%;装载量46.3重量%。

[0725] 方法2:使用蛋白凝胶电泳以进行OVA定量。

[0726] 在装载的缓冲溶液在95℃下直接孵育NP-OVA 5分钟。使用Bio-Rad预制凝胶(10%PAGE),200V下30分钟。

[0727] 结果:

[0728] 1.0%PVA:~0.6毫克/毫升;EE%12%;装载量~20重量%。

[0729] 凝胶电泳数据表明,虽然在NP-OVA组合中已存在一些OVA的分解/变性,大部分OVA仍未变化。

[0730] OVA的体内传送和加工。

[0731] DQ-OVA是由与荧光体(fluorophor)偶联的OVA组成,该荧光体保持为非荧光的直至OVA被呈递抗原的细胞(大部分为DC)所蛋白水解地(proteolytically)加工。施用包埋于NP的OVA后的小鼠LN的分析证明,在皮下注射(sq injection)后,包埋于NP的OVA在引流淋巴结中被DC所加工、转运和呈递。

[0732] 实施例11. CD8T细胞的体内激活

[0733] 根据本文所述的程序,制备并在体内测试具有OVA抗原和CL097佐剂的纳米颗粒。制备下述6种组合物:(1)游离的OVA;(2)游离的OVA和游离的CL097;(3)NP[OVA](即,包含包埋的OVA的纳米颗粒);(4)NP[OVA+CL097](即,包含包埋的OVA和包埋的CL097的纳米颗粒);(5)NP-CL097[OVA](即,与CL097偶联并包含包埋的OVA的纳米颗粒);和OVA+NP-CL097(即,游离的OVA和与CL097偶联的纳米颗粒)。淋巴结(LN) T细胞数的数据在图33中显示。

[0734] 图34提供在施用下述组合物后一天在小鼠淋巴结肿观察到的OT-I细胞计数:(1)游离的SIINFEKL;(2)游离的SIINFEKL和游离的R848;(3)包埋于纳米颗粒中的SIINFEKL;和(4)包埋于与R848偶联的纳米颗粒中的SIINFEKL。数据显示,包埋SIINFEKL并与R848偶联的纳米颗粒获得了最高的OT-I细胞计数。该细胞计数仅在一天后测定;可预期,如果在多于一天之后测定,组合物(1)、(2)和(3)的OT-I细胞计数将低于该观察值,而如果在多于一天之后测定,组合物(4)的OT-I细胞计数将与该观察值相似。

[0735] 实施例12. 纳米颗粒靶向

[0736] I. 通过含有配体的脂质体的被膜下淋巴窦巨噬细胞(SCS-Mph)靶向

[0737] 脂质体制备和表征。通过泡囊挤出法来制备小的单层脂质体。将溶解于氯仿中的脂质在氮气流下干燥,接着3小时真空干燥。接着,将脂质在PBS缓冲液中复水。五次冻-融循环后,将脂质体通过含有100-纳米孔的聚碳酸酯滤器(Whatman)挤出二十次。使用粒径分析仪(Brookhaven Instruments),通过动态光散射来表征由该方法制备的脂质体。

[0738] 测试脂质体的SCS-Mph靶向。(1) 制备几种含有1-棕榈酰-2-油酰-sn-甘油-3-胆碱磷酸(POPC)、单唾液酸神经节苷脂GM3和N-4-硝基苯并-2-氧杂-1,3-二唑磷脂酰乙醇胺(NBD-PE)的脂质体的样品。整个样品中的GM3密度为约10至约30摩尔%。脂质浓度大约1毫克/毫升,而平均脂质体大小为约110纳米。靶向数据表明了较高的GM3密度可以导致较好的靶向。特别地,数据表明了sc注射后一小时引流LN中SCS Mph上的脂质体积聚。(2) 还制备仅包含POPC和NBD-PE的脂质体作为对照。在测试的条件下,观察到没有靶向。脂质浓度和脂质体大小与(1)相似。

[0739] II. 含有配体的聚合物纳米颗粒的SCS-Mph靶向

[0740] 1. 纳米颗粒(NP)制备和表征。通过纳米沉淀方法来制备NP。将100微升聚合物(乙腈中5毫克/毫升的PLA-PEG-COOH)逐滴加入500微升DI水中。将溶液在400rpm下搅拌2小时,并通过使用Amicon管(100KDa),用DI水洗涤两次,用PBS洗涤一次。NP溶液的终浓度为约1毫克/毫升。使用粒径分析仪(Brookhaven Instruments),通过动态光散射来测定平均粒径(约74纳米)。

[0741] 2. 配体偶联。将包含溶菌酶、蛋白G、抗-CD169和唾液乳糖的配体通过EDC/NHS反应与NP表面偶联。聚合物纳米沉淀后,用DI水将NP溶液洗涤两次。然后通过用EDC/NHS(15毫克/毫升)溶液孵育1小时来激活表面羧酸基团。用DI水,然后PBS缓冲液,将过量EDC和NHS洗掉。然后将NP溶液与配体溶液(聚合物与配体的摩尔比对于蛋白为1:1,对于唾液乳糖为1:2)混合2小时,并用PBS缓冲液洗涤三次。对于PLA-PEG-OCH₃靶向实验,按照(1)中所述的相同程序制备了NP。对于NP成像,在纳米沉淀实验中,将10%PLA-Alexa Fluor 647与PLA-PEG聚合物混合。

[0742] 结论:共焦荧光成像表明了NP-OCH₃和NP-抗CD169都能结合SCS-Mph,并且NP-唾液乳糖在SCS中很少积聚。在特别设定的实验条件下观察到NP-溶菌酶和NP-蛋白G与SCS-Mph没有结合。

[0743] III. 含有配体的聚苯乙烯珠的SCS-Mph靶向

[0744] 1、聚苯乙烯珠和配体偶联。NeutrAvidin标记的珠子(FluoSpheres,0.01克/毫升)购自Invitrogen。平均大小为约200纳米。将包括生物素化的抗-CD169和生物素化的寡聚物G(12mer)的配体通过孵育2小时来结合NeutrAvidin标记的珠子。

[0745] 2、结果。抗-CD169和寡聚物G偶联的珠子都在SCS-Mph上积聚。

[0746] 实施例13.T-细胞表达

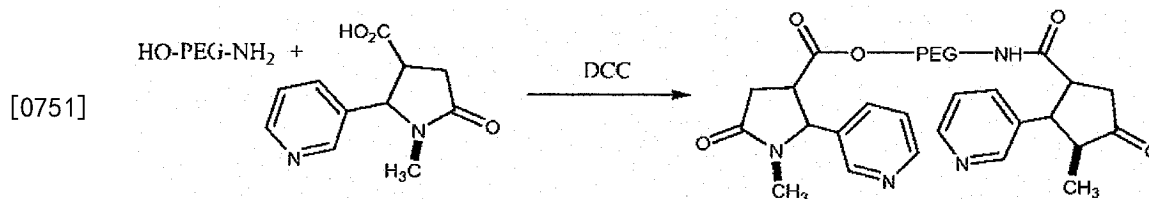
[0747] 制备包含多种游离佐剂(即,不与纳米颗粒结合)的多个浓度的一系列溶液。该佐剂为CL097、咪喹莫特、LPS、R848和R854。为确定这些佐剂诱导树突细胞的激活的能力,将DC在不同佐剂溶液的存在下孵育一夜。测定激活标记物(CD40、CD80和CD86)的表面表达。数据显示在图35a中,结果以相对于未处理树突细胞的诱导倍数来表示。使用相同的实验程序,测试普通纳米颗粒(即,非功能化的或不与免疫刺激或免疫调节部分结合的)的活性,并与LPS作比较以显示NP本身并不诱导DC激活。数据在图35b中显示。再次地,使用相同的实验程

序,比较普通NP、具有包埋的R848的NP (NP[R848])、与R848结合的NP (NP-R848) 以及游离LPS在诱导DC活性中的活性。数据在图35c中显示。

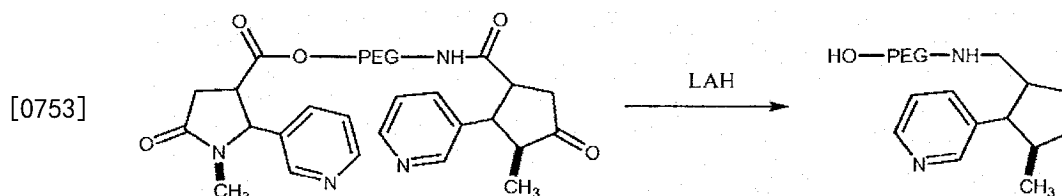
[0748] 图36提供显示T细胞增殖的FACS数据。用细胞质染料CFSE标记天然T细胞。当细胞分裂时,该染料在子代细胞中分裂以使得它们是半荧光的。如果这些细胞进一步分裂,它们变成四分之一荧光的,依次类推。这样,峰代表了细胞分裂的次数。测试了下列制剂:游离的SIINFEKL;游离的SIINFEKL和游离的R848;具有包埋的SIINFEKL的NP (NP[SIINFEKL]);和具有偶联的R848和包埋的SIINFEKL的NP (NP-R848[SIINFEKL])。

[0749] 实施例14. 偶联物形成

[0750] 根据以下反应式,使用双端功能化PEG,形成了可铁宁-PEG-可铁宁偶联物:

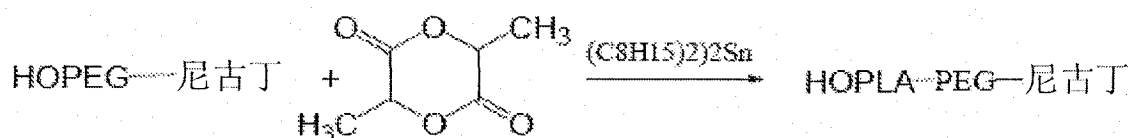


[0752] 用氢化铝锂还原可铁宁-PEG-可铁宁形成了HO-PEG-尼古丁:



[0754] 相似地,根据以下反应,使用HO-PEG-尼古丁作为开环聚合中的引发剂,制备了PLA和PEG的共聚物,与尼古丁偶联:

[0755]



[0756] 使用50%PLA-PEG-尼古丁和50%PLA制备了尼古丁-NP,并通过皮下(sc)注射施用于小鼠。sc注射后1小时收集引流LN,并用APC-B220将切片染色,以标记B细胞(灰色)和抗-尼古丁Ab(克隆HB-9123),接着Alexa568-抗-小鼠IgG(红色)。荧光数据表明sc注射后1小时,尼古丁-NP在引流LN的SCS中积聚。

[0757] 实施例15. 免疫小鼠中的抗-尼古丁IgG

[0758] 在第一系列的实验中,在第0天用尼古丁免疫纳米治疗组合物将C57BL6小鼠组(4-5只)进行免疫,并在2、4和8周加强。通过ELISA测量了Ab效价,并与来自抗-尼古丁MAb的标准曲线相比,来计算浓度。在接种加强T细胞辅助之前,一组小鼠接受了OVA-特异性OT-II T细胞(5×10^5 IV)。数据显示于图36中。通过免疫制剂来识别曲线。例如,标记“尼古丁+R848+OVA”的数据表示用含有游离尼古丁、游离R848和游离OVA的制剂免疫的小鼠。标记“PLA-尼古丁[OVA]”的数据表示用含有用OVA包埋的PLA-尼古丁纳米颗粒的制剂免疫的小鼠。

[0759] 在第二系列的实验中,测定了其他的尼古丁效价,并显示于图37中。其他数据显示了最初(3周)效价。就注射的剂量和时间而言,实验方案与第一系列相同。然而,测试了几种新的颗粒制剂,以确定:a)之前冷冻的纳米颗粒(含有50%尼古丁-PEG-PLA)是否保持其免

疫原性;b) 尼古丁-PEG-PLA的内含物如何影响抗体效价;和c) 纳米颗粒(50%尼古丁-PEG-PLA)是否在II类MHC缺陷小鼠中工作。制剂如下:(1) 具有50%尼古丁-PEG-PLA和50%PLA-R848的NP,用OVA包埋,制备后就使用(即,没有冷冻);(2) 具有50%尼古丁-PEG-PLA和50%PLA-R848的NP,用OVA包埋,冷冻过夜并随后融化后使用;(3) 具有5%尼古丁-PEG-PLA、45%PLA-PEG和50%PLA-R848的NP;(4) 具有25%尼古丁-PEG-PLA、25%PLA-PEG和50%PLA-R848的NP;(5) 具有75%尼古丁-PEG-PLA和25%PLA-R848的NP,其中以常规剂量给予两次制剂,以保持R848剂量恒定;(6) 具有50%尼古丁-PEG-PLA和50%PLA的NP,用OVA包埋,其中就在注射前将游离R848混入制剂中;(7) 具有50%尼古丁-PEG-PLA纳米颗粒和50%PLA-R848的NP,用OVA包埋,其中在接种疫苗前小鼠接受了OVA特异性OT-II T细胞;(8) 具有50%尼古丁-PEG-PLA和50%PLA-R848的NP,用OVA包埋,II类MHC缺陷小鼠;和(9) 具有50%尼古丁-PEG-PLA和50%PLA的NP,用OVA包埋,II类MHC缺陷小鼠。由于ELISA灵敏度的差异,该系列中效价的绝对量级不能与第一系列的数据直接比较。获得了以下结论:a) 之前冷冻并融化的NP仍然是免疫原性的;b) 接受尼古丁-PEG-PLA含量为5至50%的NP(通常具有相同的50%含量的R848-PLA)的小鼠中的早期抗体效价相似,但使用含有75%尼古丁-PEG-PLA的NP时,抗体效价较低;c) 在MHC-II缺陷小鼠中诱导了对尼古丁-NP的体液应答,表明诱导T-无关性IgG应答的能力。

[0760] 图36和37中的数据显示出游离尼古丁(即,未偶联),即使是连同PLA-R848、R848和/或OVA一起施用,没有引发尼古丁抗体的产生。然而,尼古丁纳米颗粒确实引发了这样的产生。即使不存在T细胞辅助,本文中所述的尼古丁纳米颗粒引起了实质性的抗体产生。

[0761] 总之,图36中所示的数据进一步证明包含免疫特征表面(如包含尼古丁的免疫特征表面)的合成纳米载体有效地将佐剂和基于蛋白的抗原传送到APC,导致有效的T辅助细胞激活。这通过以下事实得到了证实:用结合了R848和OVA的PLA-PEG-尼古丁合成纳米载体免疫时,与没有接受OT-II细胞的小鼠相比,接受了天然OT-II(即,OVA特异性)T辅助细胞的小鼠中,抗尼古丁IgG效价增强了约10倍。这种效应表明免疫特征修饰的合成纳米载体内的佐剂(R848)和T细胞抗原(OVA)有效地靶向了将OVA递呈至T细胞的DC。接受了OT-II细胞的动物中更高的OVA特异性T细胞的利用率导致了增强的辅助应答,其随后加强了B细胞的抗尼古丁抗体产生。因此,可以形成根据以上标准的免疫特征表面的部分可以加强合成纳米载体的免疫原性,即使其与APC的结合亲和性太低以致不能通过体外捕获试验检测时。

[0762] 实施例16. 纳米颗粒在体内靶向淋巴结APC

[0763] 淋巴结APC上的尼古丁修饰的和对照(PLA-PEG)纳米颗粒的体内积聚。使用双-乳液程序来产生荧光纳米颗粒(约100纳米)。尼古丁颗粒由50%PLA-PEG-Nic(约15kD PLA)、15%PLGA-染料-PLGA(约15kD PLGA总)和35%PLA(约15kD)组成,而使用50%PLA-PEG(约15kD PLA,甲氧基终止的PEG)、15%PLGA-染料-PLGA(约15kD PLGA总)和35%PLA(约15kD)对照颗粒制得了对照颗粒。为了评价靶向DC,产生了两组对照颗粒,用和未用包埋的OVA蛋白(OVA)。产生所有组的颗粒,以结合PLGA-若丹明-B(=PLGA-染料)作为绿色(543纳米)荧光标记。此外,还产生了对照颗粒(未用OVA),以结合Alexa 647,其具有光谱上不同的(红色)荧光发射。将所有绿色颗粒与等量的红色对照颗粒混合,并将混合物注入青年C57/BL6小鼠的足垫中。4小时或24小时后,收集了引流淋巴结,并在4℃下用含有1%多聚甲醛/高碘酸盐的磷酸盐缓冲的L-赖氨酸固定过夜,通过PBS中递增系列的10%、20%和30%蔗糖来

进行冷冻保护,在组织冷冻介质(Triangle Biomedical Sciences,Durham,NC)中速冻,并制备用于冷冻切片的免疫荧光分析。使用Adobe Photoshop CS3,通过数字共焦显微镜成像的侧面法来确定APC的靶向。在图38a和38b中提供了数据。

[0764] 在图38a中,使用4h样品,通过定量完整淋巴结切片(F-总)和设定为SCS(F-scs)的目标区域(ROI)中绿色(测试)和红色(对照)荧光像素的总数来测定被膜上淋巴窦(SCS)巨噬细胞上的积聚。“相对积聚”通过 $F\text{-scs}/F\text{-总} \times 100\%$ 来给出。如数据中所示,与对照(“PLA-PEG 4小时”)相比,含有尼古丁的样品(“尼古丁4小时”)在SCS中产生了明显更高的相对积聚。

[0765] 在图38b中,在24小时样品中进行了CD11c定殖分析,以评价树突细胞(DC)的靶向。通过用蓝色荧光抗-CD11c染色来鉴定T细胞区域中的DC,并限定为ROI。测量定殖于ROI的绿色和红色像素的数量,并表达为比例。红色和绿色荧光对照颗粒以及含有包埋OVA的颗粒显示出DC上的相似积聚,而由尼古丁构成的免疫特征表面给予了统计学上显著的APC靶向。

[0766] 总之,本文中呈现的数据提供了证据:可以产生结合本文中别处所限定免疫特征表面的合成纳米载体。如上文所述,通过将荧光合成纳米载体注入小鼠足垫,接着随后分析引流淋巴结中合成纳米载体的分布以及与专职抗原呈递细胞(APC)的结合,证明了免疫特征表面诱导了合成纳米载体靶向被膜下淋巴窦巨噬细胞(SCS-Mph)和树突细胞(DC)的证据。

[0767] 实施例17.树突细胞结合的体外比较

[0768] 用不同密度的固定化抗-CD11c或尼古丁覆盖的微滴定平板上的小鼠DC的体外积聚用于提供免疫特征表面特性的更多证据。数据显示于图39a和39b中。

[0769] 在图39a中,用磷酸盐缓冲盐水(PBS;Mediatech Inc.,Manassas,VA)中所示浓度的纯化仓鼠抗-小鼠CD11c抗体(克隆HL3,BD Biosciences,San Jose,CA)将MAXISORP™ NUNC-IMMUNO™ 96 MICROWELL™ 平板(Thermo Fisher Scientific,Waltham,MA)在37℃下覆盖1小时。然后将平板在PBS中洗涤3次。通过来自供体C57BL/6小鼠(Charles River,Wilmington,MA)脾脏的阳性免疫磁性细胞分选(约98%CD11c+;Miltenyi Biotec)来纯化树突细胞(DC)。用含有10%(vol/vol)胎牛血清(FCS;Invitrogen,Carlsbad,CA)的RPMI(Mediatech Inc.,Manassas,VA)中的5mM CFSE(羧基荧光素二醋酸琥珀酰亚胺酯;Invitrogen,Carlsbad,CA)将DC在25℃下孵育7分钟,洗涤,并以所示浓度加入每个孔中。然后将平板在37℃下在60rpm的摇床上培养15分钟。通过在PBS中浸没将平板洗涤两次,用4%多聚甲醛固定,并使用Perkin Elmer Victor Fluorescence Plate Reader(485纳米/535纳米,1.0s)阅读。数据显示表面固定化CD11c抗体在所测试的所有浓度下明显结合树突细胞。

[0770] 在图39b中,用未稀释使用的(100%)或以不同比例与甲氧基封端的PEG-PLA混合的PLA-PEG-尼古丁覆盖微滴定平板。通过测量尼古丁-特异性MAb的结合来证实尼古丁固定化(克隆402C10;Bjerkce等,J Immunol Methods.1986年6月24日,90(2):203-13)。估计用100%PLA-PEG-尼古丁覆盖的平板呈现1015尼古丁分子/平方厘米,而最大的抗-CD11c MAb覆盖(1微克)导致了 10^{11} 个IgG分子/平方厘米的大致密度。将DC纯化、染色并加入平板,如图(A)。如(A)中一样,将平板孵育、洗涤、固定和阅读。尽管用作纳米载体上的免疫特征时,尼古丁给予了体内APC靶向特性(如实施例16中所证明的),与APC的结合亲和性太低,以致不

能介导可检测的APC结合,即使在比给予最大APC结合需要的高亲和性抗体的覆盖密度高4个数量级的覆盖密度下。这进一步证明了尼古丁-NP提供了低亲和性,高亲合力表面。

[0771] 图39a和39b证明了尼古丁免疫特征表面通过低亲和性/高亲合力相互作用与APC相互作用。用宽范围浓度的尼古丁(使用尼古丁-PEG-PLA)或CD11c的高亲和性MAb(在DC上特异性表达的糖蛋白)表面覆盖微滴定平板。图A显示了高亲和性MAb有效地结合并固定已经加入了微滴定平板中的悬浮DC。相反,与未覆盖的对照表面相比,尼古丁免疫特征表面覆盖的平板没有有效地捕获DC,即使在最高可获得的尼古丁密度(10^{15} 分子/平方厘米),其高于相同试验条件下介导有效DC结合的MAb浓度至少3个数量级。这证明了在所用的试验条件下,用于小鼠DC的尼古丁免疫特征表面的亲和性太低,以致不能在温和地清洗平板时允许具有足够机械强度的DC结合来抵抗DC分离。无论如何,基于本文中呈现的体内靶向结果,有理由得出结论,尼古丁免疫特征表面可以足够的高亲合力结合APC,以抵抗合成纳米载体与尼古丁免疫特征表面的分离。

[0772] 实施例18.APC靶向的体内测试

[0773] 图27中的数据(之前所述的)证明了胺修饰的合成纳米载体比羧酸酯修饰的合成纳米载体更有效地靶向SCS-Mph。因此,胺修饰形成了免疫特征表面的一个具体实施方案。

[0774] 此外,图40a和40b证明了包含尼古丁的免疫特征表面给予了靶向SCS-Mph,而对照颗粒没有给予这样的靶向。将PLA-PEG-尼古丁(左)或PLA-PEG对照纳米颗粒(右)注入青年C57/BL6小鼠的足垫中。颗粒与对图36所述的免疫实验中的相同。引流淋巴结收集1小时后,用含有1%多聚甲醛/高碘酸盐的磷酸盐缓冲L-赖氨酸在4℃下固定过夜,通过PBS中递增系列的10%、20%和30%蔗糖来进行冷冻保护,在组织冷冻介质(Triangle Biomedical Sciences,Durham,NC)中速冻,并制备用于冷冻切片的免疫荧光分析。用尼古丁特异性MAb将切片染色(克隆402C10;Bjerkce等,J Immunol Methods.1986年6月24日;90(2):203-13),接着Alexa568-偶联的抗-小鼠IgG2a二抗Ab。使用相同的设定获取并加工抗体染色的数字灰度图像。为了提高可见度,使用Adobe Photoshop CS3将图像数字转化。在图40a和40b中,通过箭头来表示SCS区域。在图40a中,在SCS中观察到了显著含量的纳米颗粒,而在图40b中,在SCS中观察到没有显著含量的纳米颗粒。

[0775] 作为使用多种表面结合部分的免疫特征表面的更多实例,图41(a)-(d)提供了显示GM3赋予纳米颗粒靶向SCS的数据。

[0776] 通过泡囊挤出法来制备单层脂质体。将溶解于氯仿中的脂质在氮气流下干燥,接着3小时真空干燥。接着,将脂质在PBS缓冲液中复水。五次冻-融循环后,将脂质体通过含有100-纳米孔的聚碳酸酯滤器(Whatman)挤出二十次。使用粒径分析仪(Brookhaven Instruments),通过动态光散射来表征由该方法制备的脂质体,发现平均脂质体尺寸为约110纳米。

[0777] 将POPC/GM3(30摩尔%)/NBD-PE(a,c)或POPC/NBD-PE(b,d)注入年轻成年C57/BL6小鼠的足垫中。1小时后,收集引流淋巴结,并在4℃下用含有1%多聚甲醛/高碘酸盐的磷酸盐缓冲的L-赖氨酸固定过夜,通过PBS中递增系列的10%、20%和30%蔗糖来进行冷冻保护,在组织冷冻介质(Triangle Biomedical Sciences,Durham,NC)中速冻,并制备用于冷冻切片的免疫荧光分析。得到了脂质体荧光信号的数字灰度图像,并将其使用相同的设置来处理。为了提高可见度,使用Adobe Photoshop CS3将图像数字转化。在图41中,“SCS”指

被膜下淋巴窦,而“Med”指髓质。

[0778] 图41(a)和41(b)显示了淋巴结的横截面视图。图41(c)和41(d)显示了被膜下淋巴窦区域的特写。

[0779] 如图41中所示,对照的纳米颗粒和GM3修饰的纳米颗粒都保留在髓质中,但仅GM3修饰的纳米颗粒在SCS中聚集,表明GM3神经节苷脂可形成免疫特征表面,以靶向纳米载体至被膜下淋巴窦巨噬细胞。

[0780] 等同物和范围

[0781] 本领域技术人员将认识到或仅通过常规实验可以确定本文描述的本发明的特定具体实施方案的很多等同物。本发明的范围不旨在限于以上的说明书,而是由随附的权利要求书所限定。

[0782] 本领域技术人员将认识到或仅通过常规实验可以确定本文描述的本发明的特定具体实施方案的很多等同物。本发明的范围不旨在限于以上的说明书,而是由随附的权利要求书所限定。

[0783] 除非另外指出或从上下文中可以断定,否则权利要求书中的冠词例如“一”(“a”, “an”)和“所述”(“the”)可以指一个或多于一个。因此,例如,当提及“纳米颗粒”时,包括多个这样的纳米颗粒,提及“细胞”时包括本领域技术人员已知的一个或多个细胞,等等。除非另有指明或从上下文中可以断定,否则权利要求书或说明书中所包括的“或者”(在一组的一个或多个成员之间)被认为是满足一个、多于一个或所有的组成员存在于、应用于给定的产品或方法或与给定的产品或方法相关。本发明包括这样的具体实施方案,其中恰有一个组成员存在于、应用于给定的产品或方法或与给定的产品或方法相关。本发明包括这样的具体实施方案,其中多于一个组成员或所有组成员存在于、应用于给定的产品或方法或与给定的产品或方法相关。此外,应该理解,本发明包括所有这样的变体、组合和排列,其中来自一个或多个所列的权利要求的一个或多个限定、元素、从句、描述性术语等被引入另一个权利要求。例如,任何从属于另一个权利要求的权利要求可以被修改为包括任何其它的从属于同一个基础权利要求的权利要求中的一个或多个限定。此外,除非另有指明或者本领域普通技术人员可以断定会产生矛盾或不一致性,否则,当权利要求提及组合物时,应该理解为包括为了本文描述的任何目的使用该组合物的方法,并且包括根据本文描述的任何制备方法或其它本领域已知的方法制备该组合物的方法。

[0784] 当元素以例如马库什组的形式列表呈现时,应该理解为也公开元素的各个亚组,并可以从组中除去任何元素。通常应该理解为,当本发明或本发明的方面被称作包含特定的元素、特征等的时候,本发明的某些具体实施方案或本发明的方面由这样的元素、特征等组成或基本上由这样的元素、特征等组成。为了简单起见,在本文中并没有以那样的语言具体列出那样的具体实施方案。应该注意的是,术语“包含”旨在为开放式的并允许包括另外的要素或步骤。

[0785] 当给出范围时,包括端点值。此外,应该理解的是,除非另有指明或者由上下文和本领域普通技术人员的理解可以断定,否则在本发明的不同具体实施方案中,作为范围表述的数值可以认为是所述范围内的任何具体数值或亚范围,直至范围下限的单位的十分之一,除非上下文另有指明。

[0786] 另外,应该理解,任何落入现有技术范围内的本发明的任何特定具体实施方案可

以明确地从任何一个或多个权利要求中排除。因为这样的具体实施方案被认为是本领域普通技术人员已知的,所以即使在本文没有明确指出排除,也可以将其排除。不论任何原因,可以从任何一个或多个权利要求中排除本发明的组合物的任何特定具体实施方案(例如,任何免疫调节剂、任何靶向部分、任何免疫刺激剂、任何抗原呈递细胞、任何疫苗纳米载体结构、任何微生物、任何施用方法、任何预防性和/或治疗性应用等),不管是否与存在的现有技术相关。

[0787] 以上和全文中所讨论的出版物仅仅是因为它们早于本申请的申请日的公开内容而提供。这方面的任何内容不应被理解为承认本发明人没有权利通过更早的公开而使本发明早于这样的公开物。

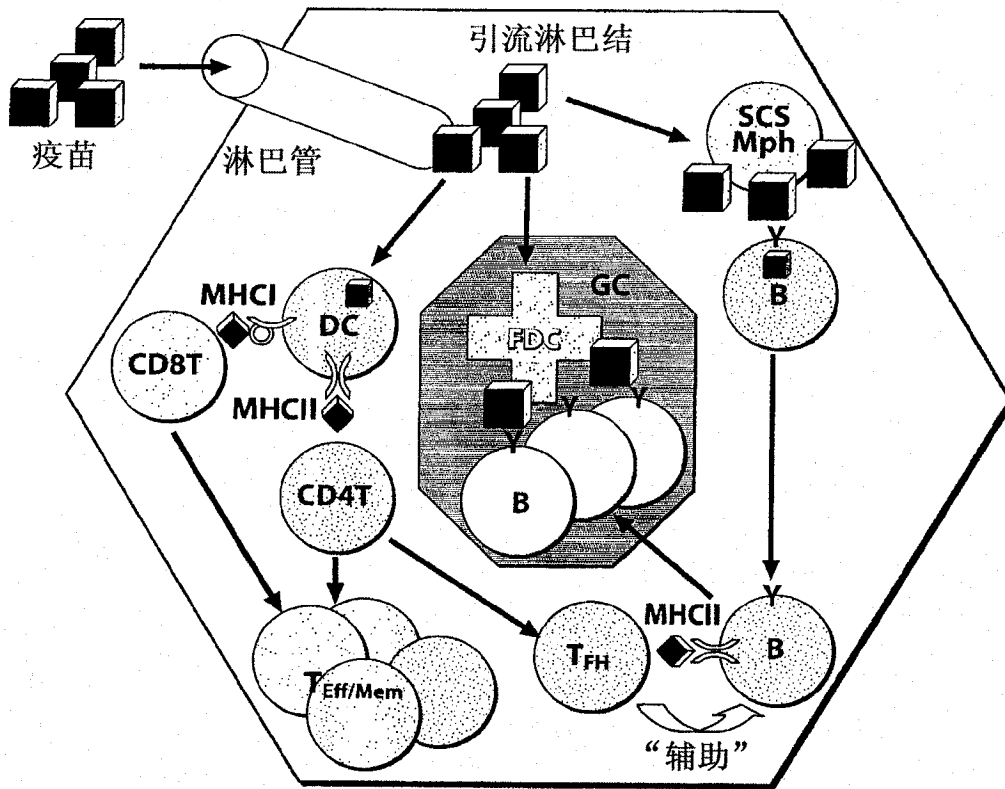


图1

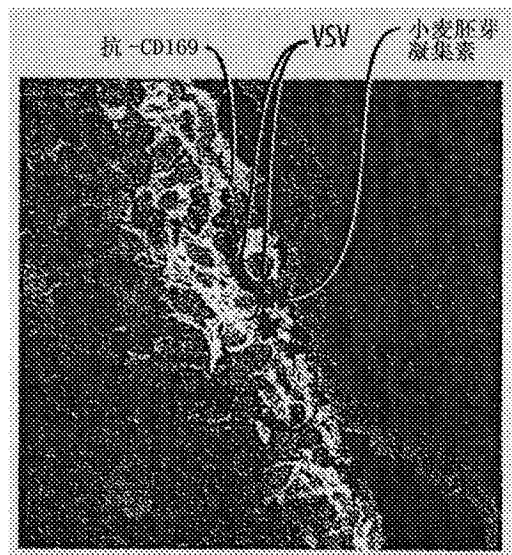


图2A

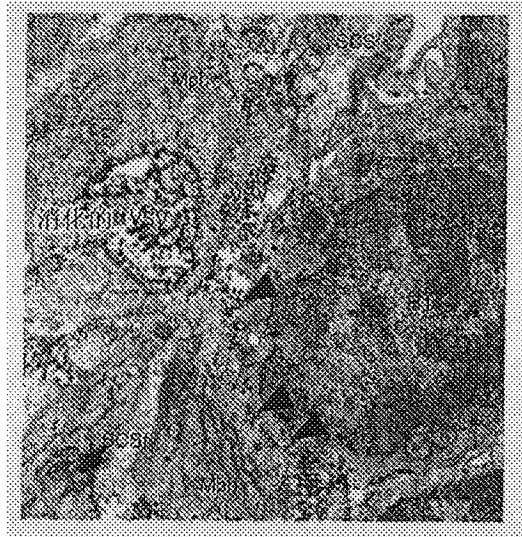


图2B

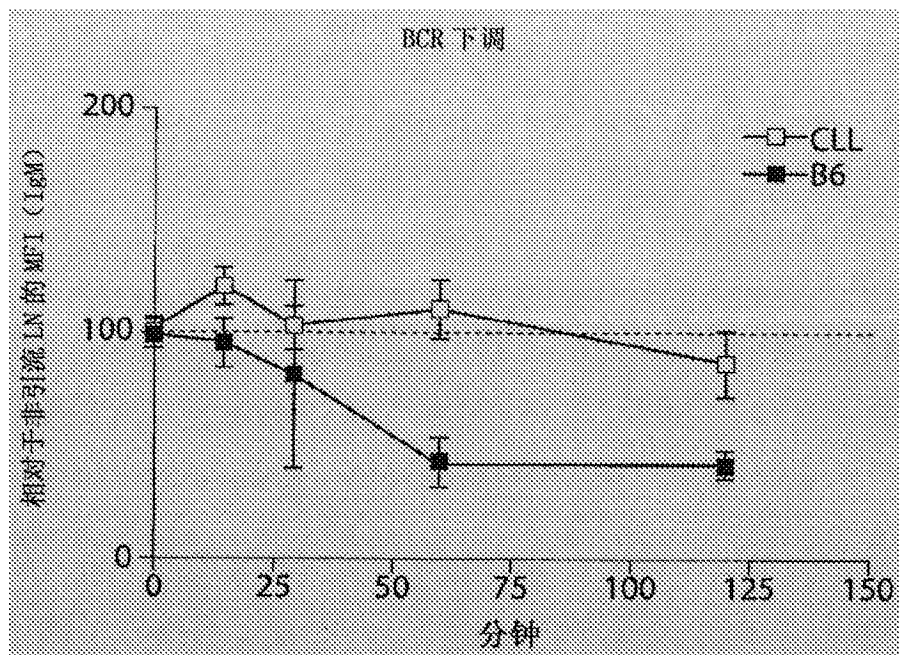


图2C

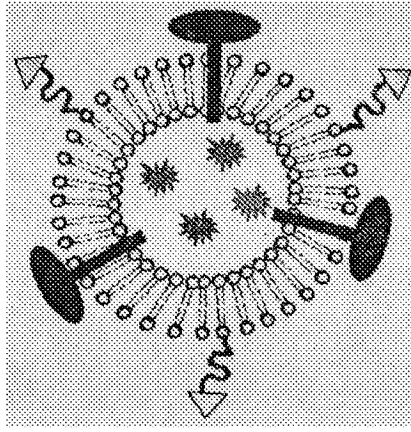


图3

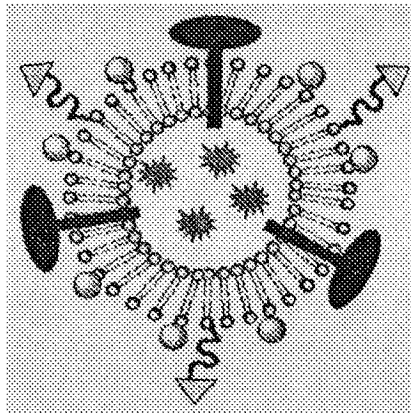


图4

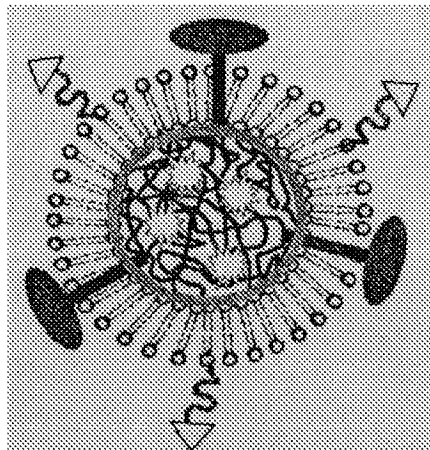


图5

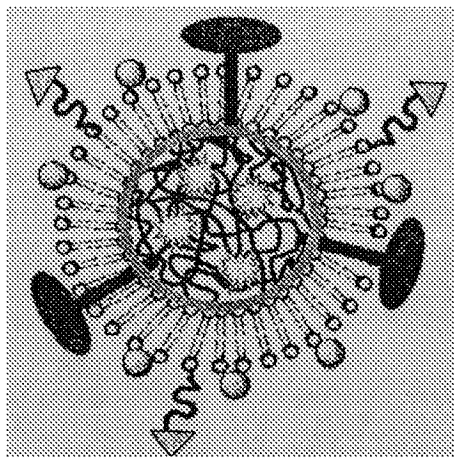


图6

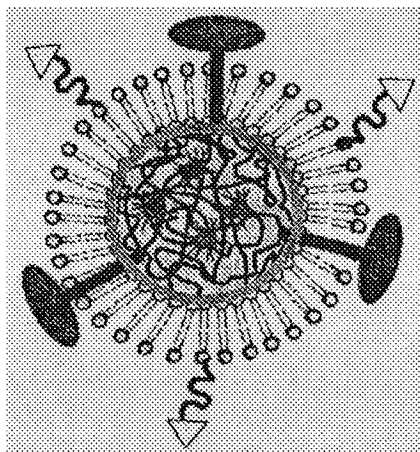


图7

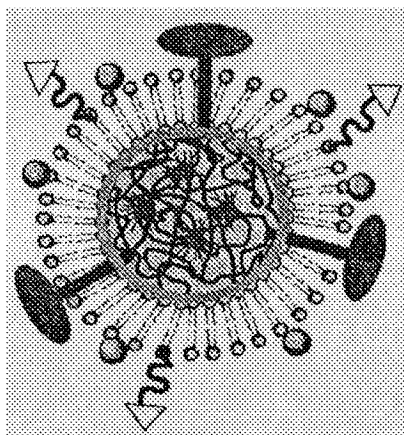


图8

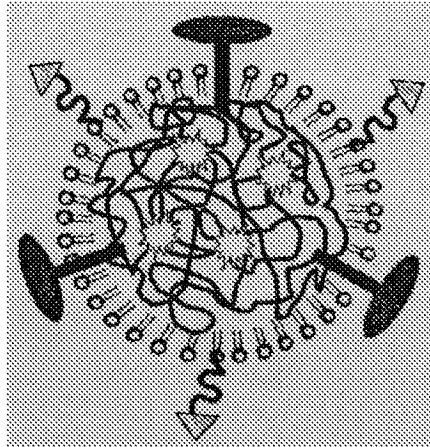


图9

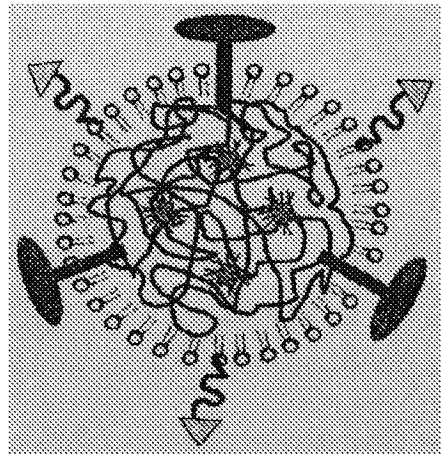


图10

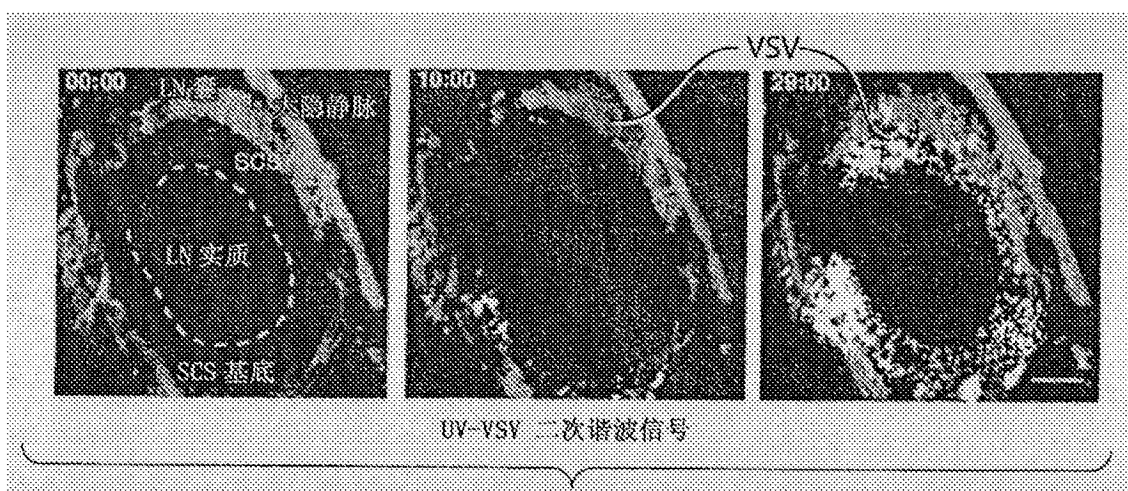


图11A

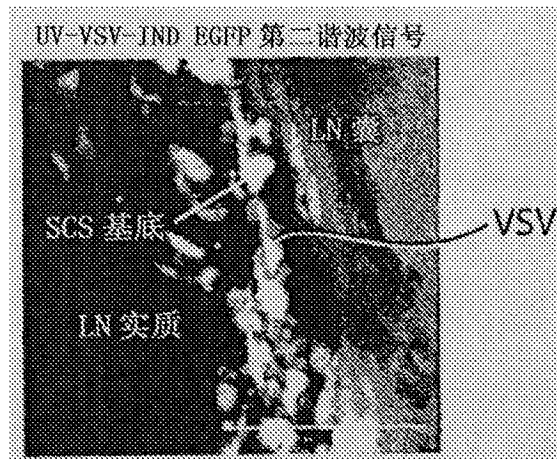


图11B

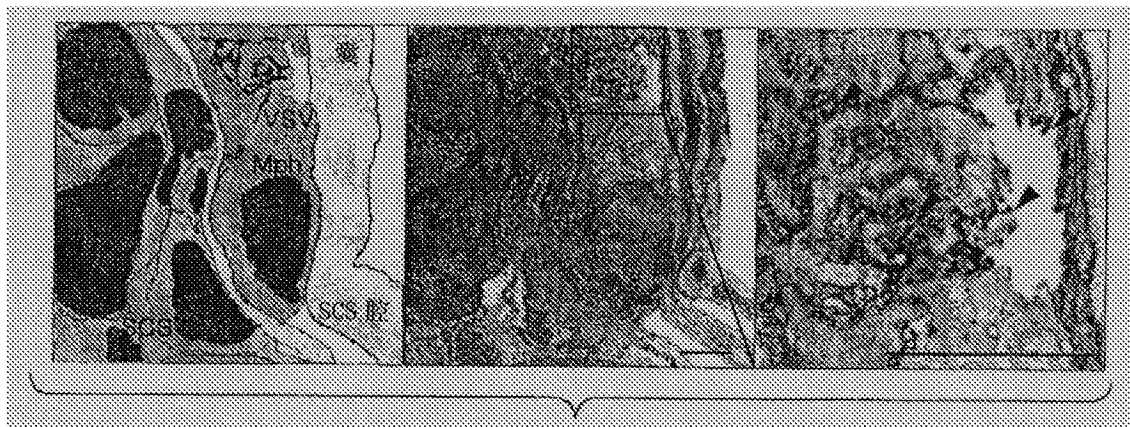


图11C



图11D

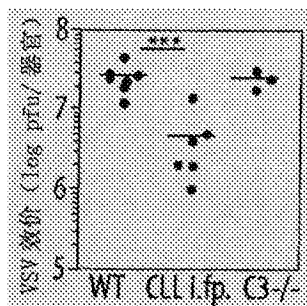


图11E

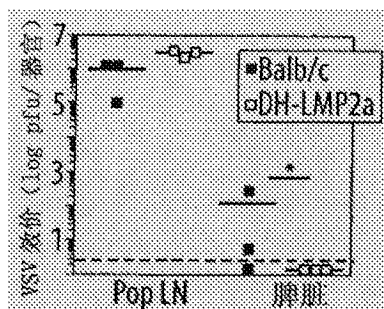


图11F

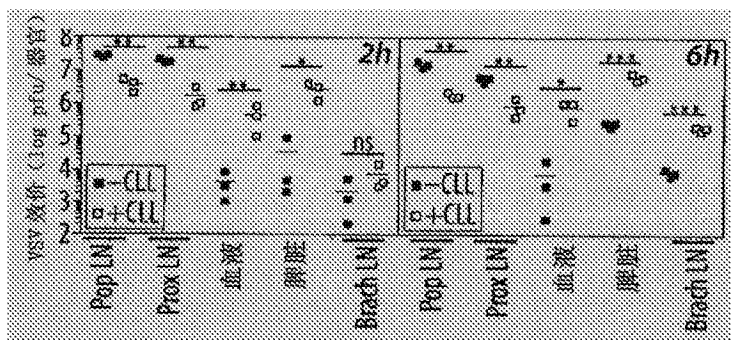


图11G

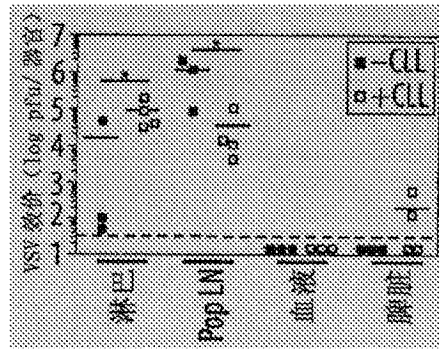


图11H

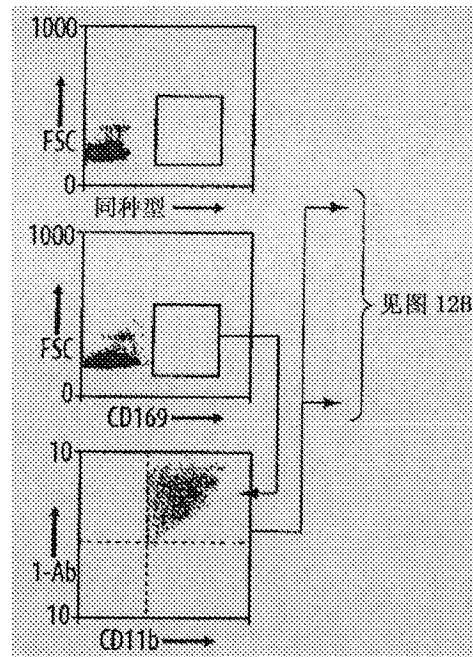


图12A

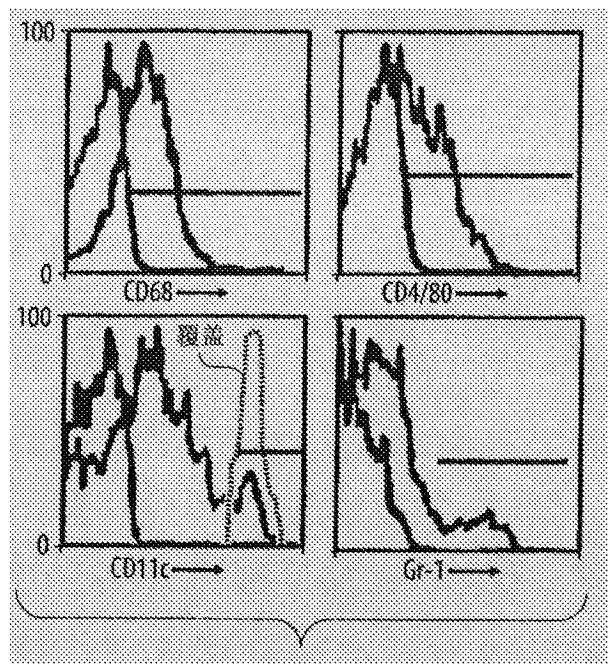


图12B

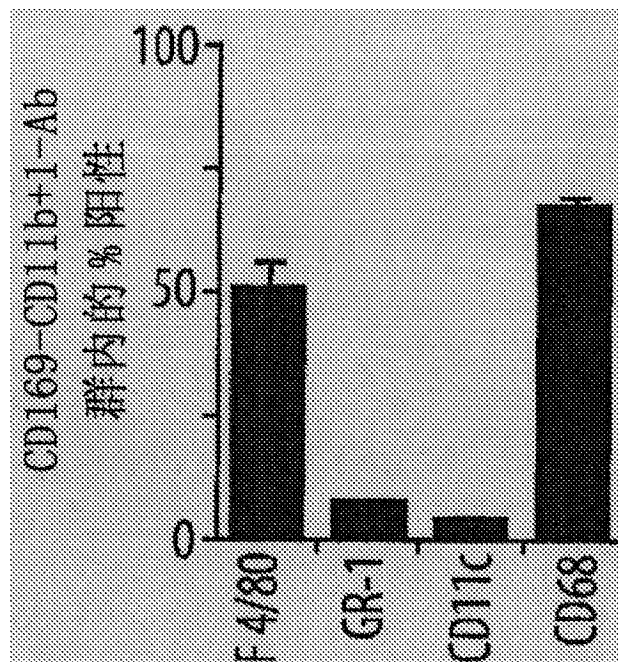


图12C

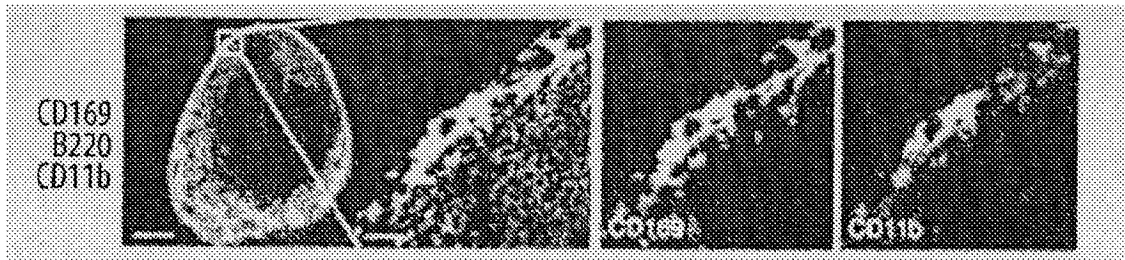


图12D

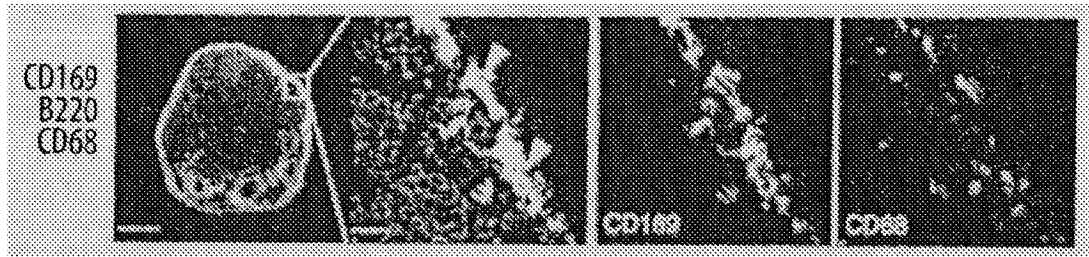


图12E

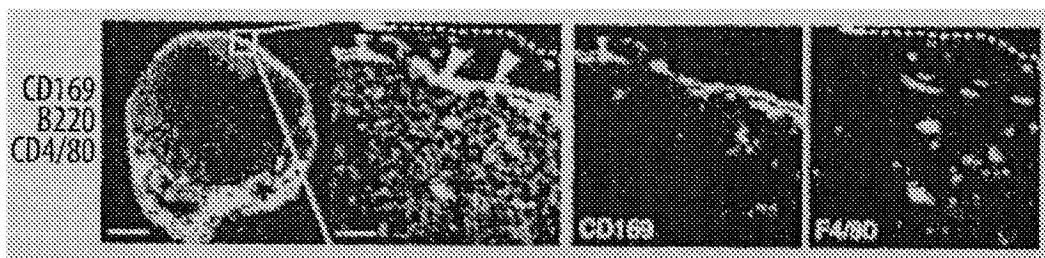


图12F

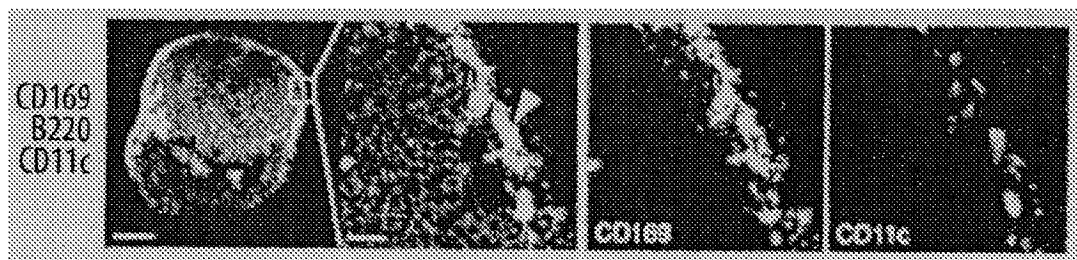


图12G

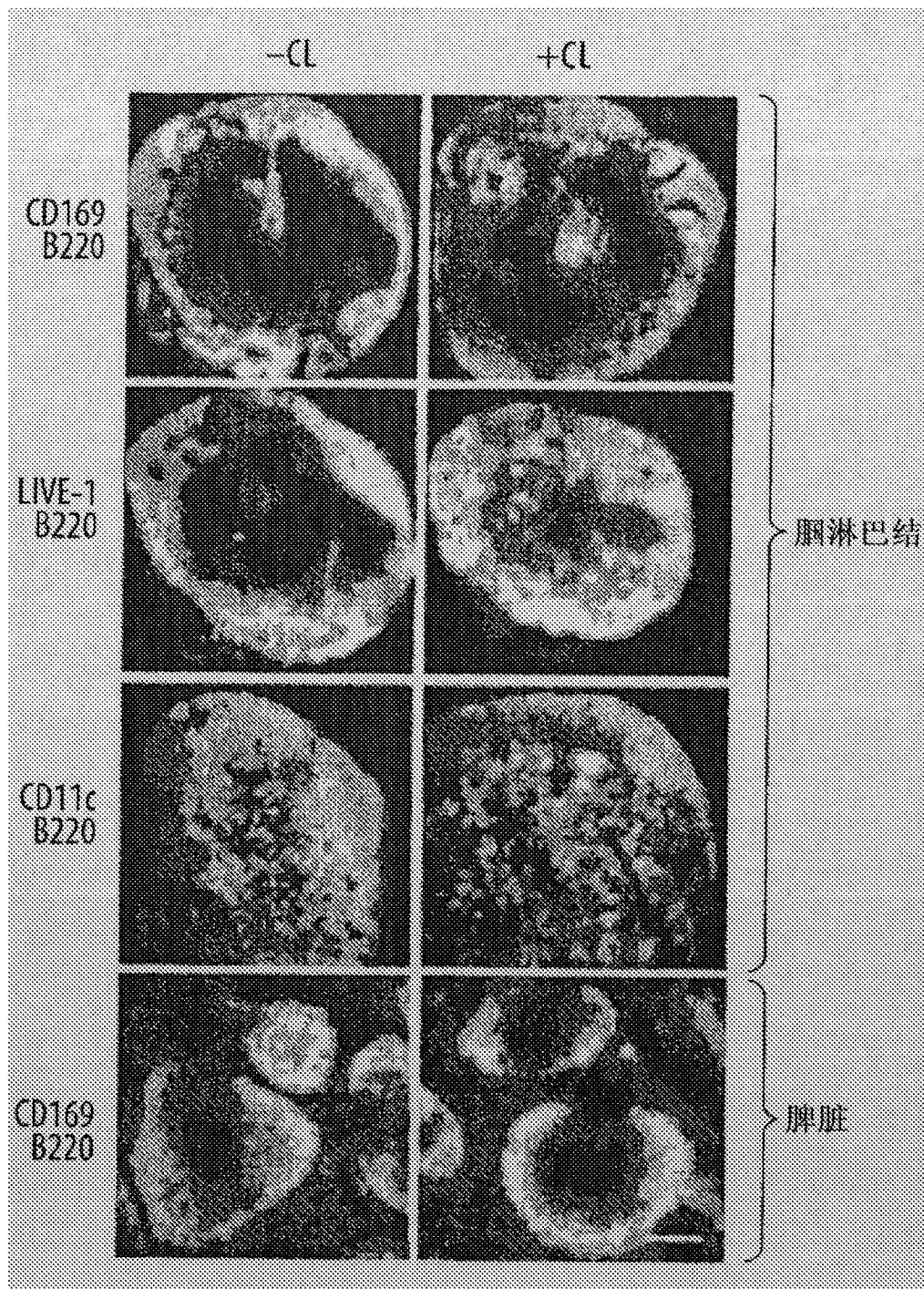


图13A

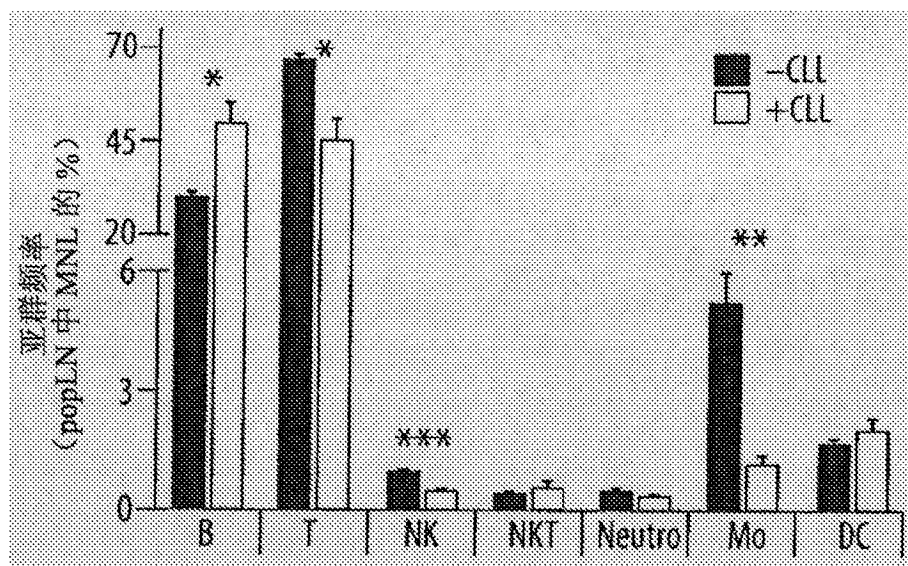


图13B

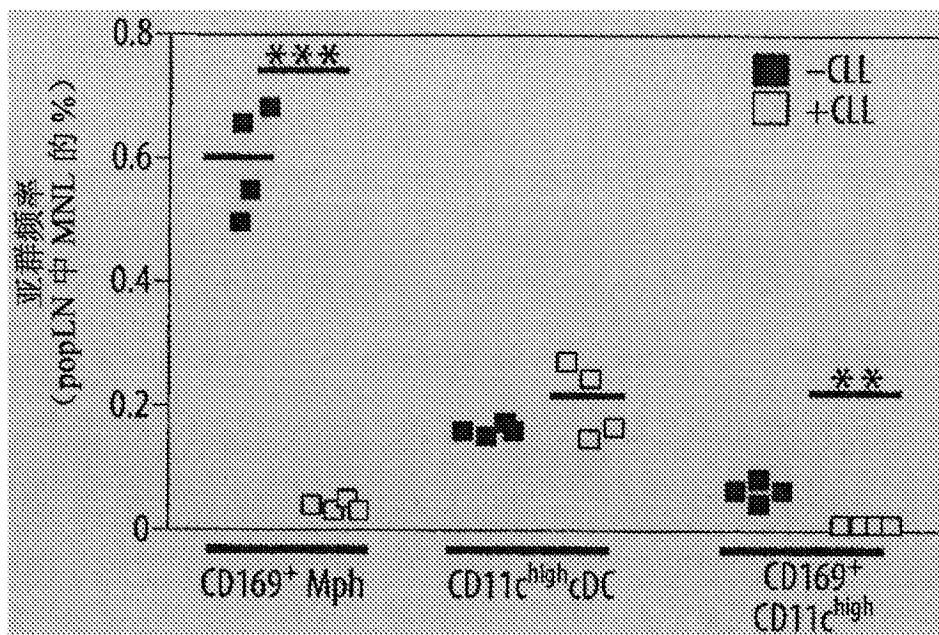


图13C

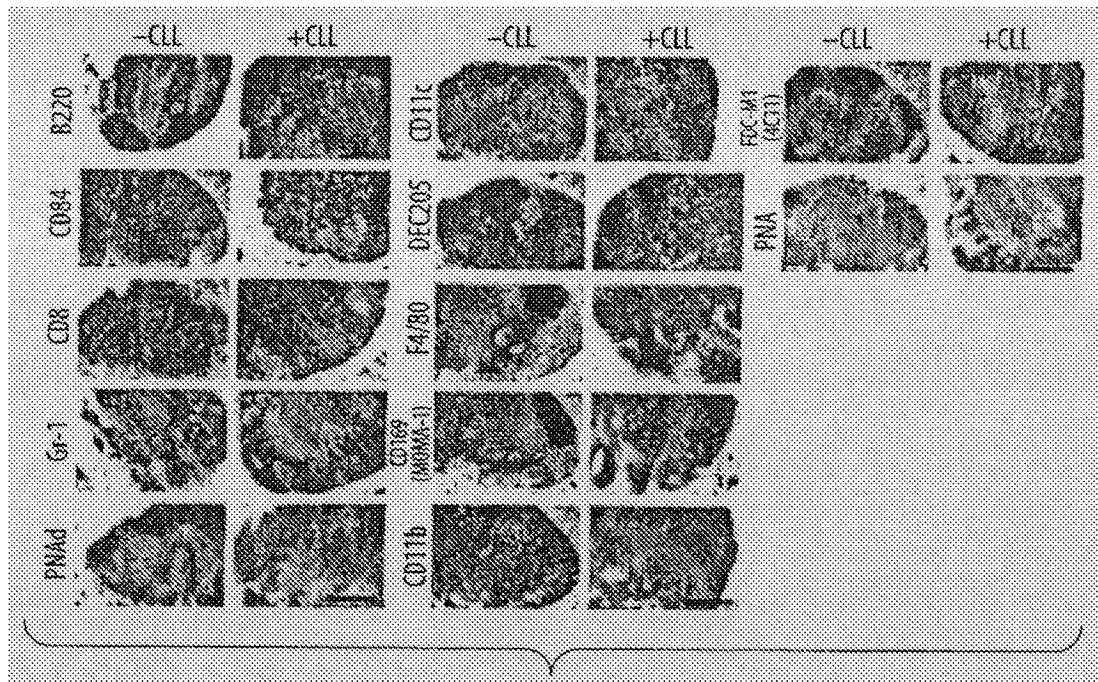


图13D

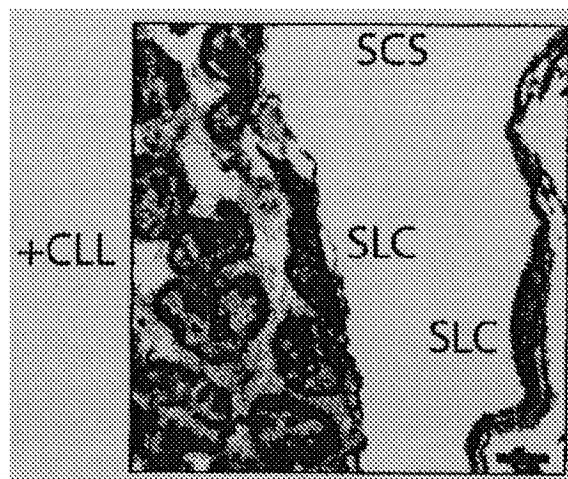


图13E

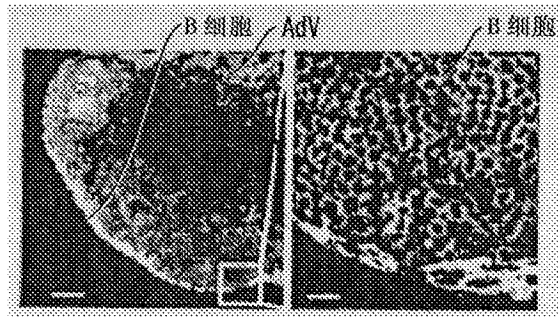


图14A

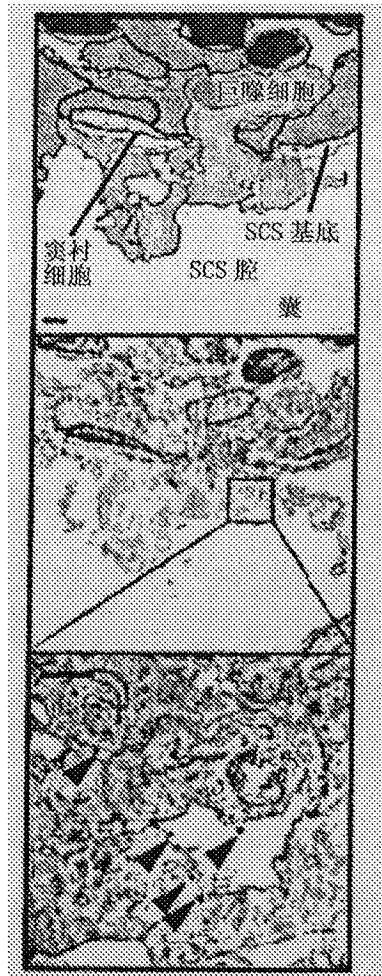


图14B

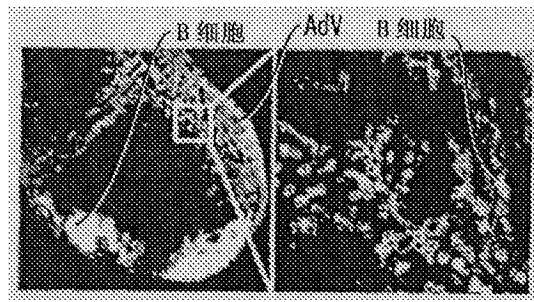


图14C

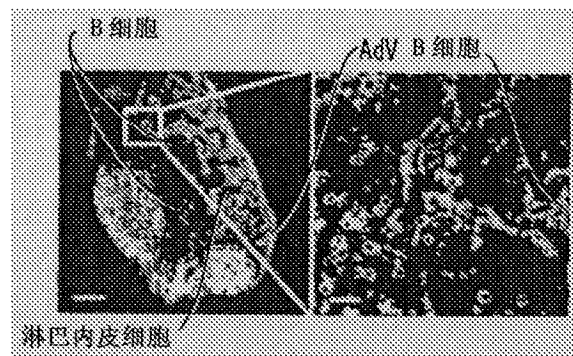


图14D

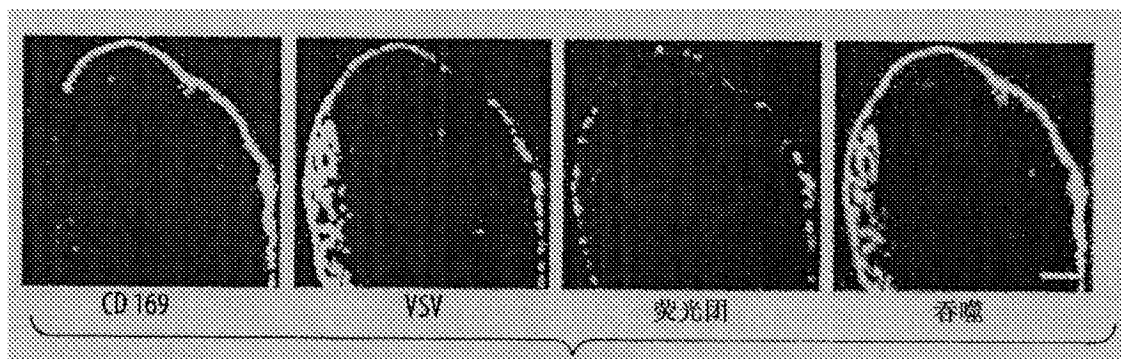


图14E

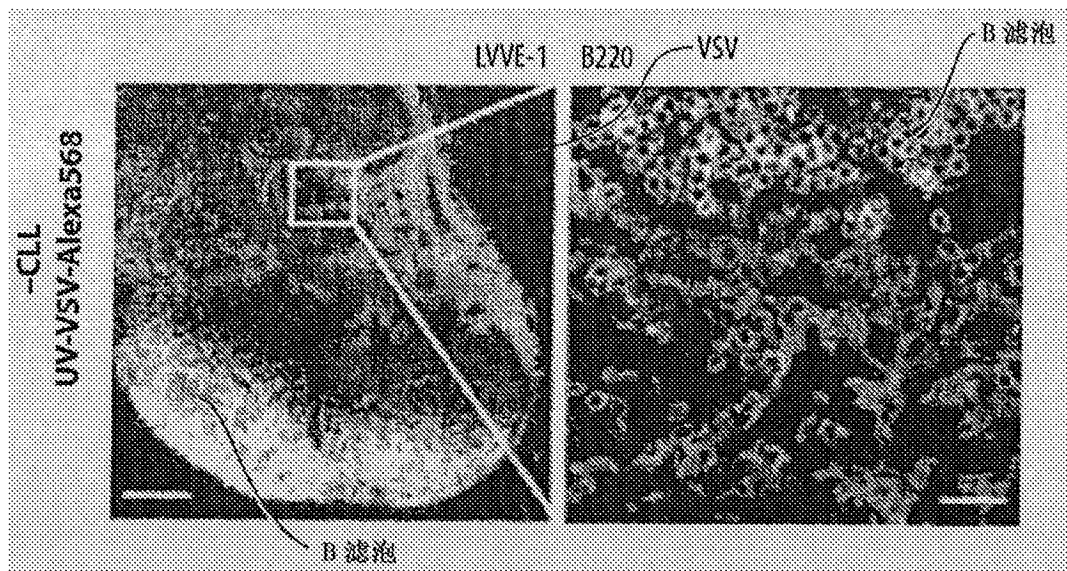


图15A

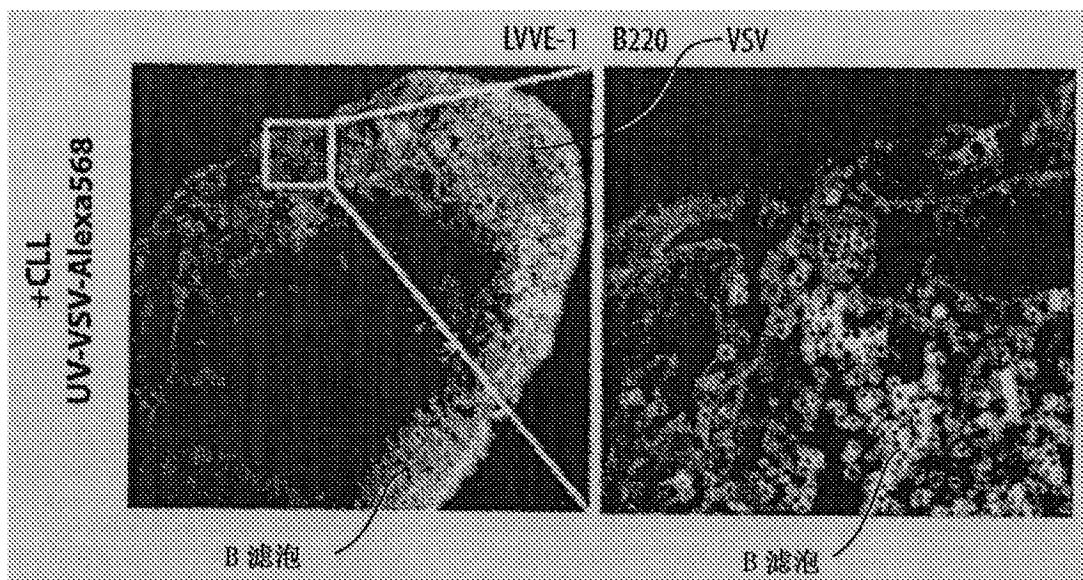


图15B

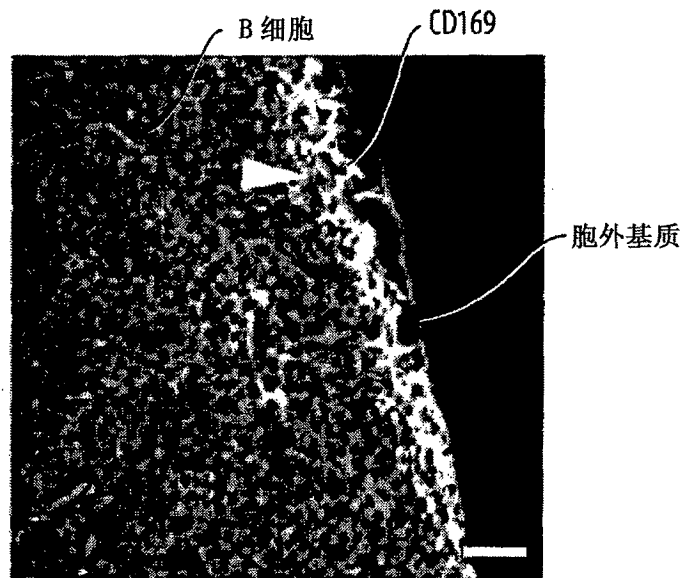


图16A



图16B

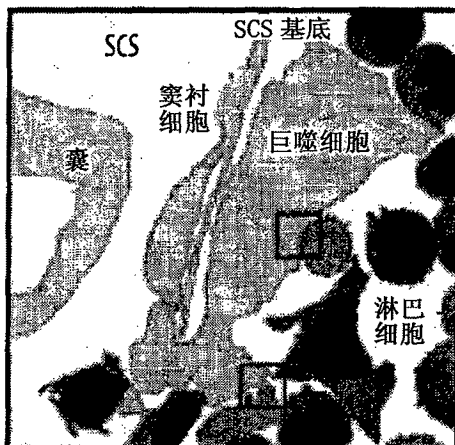


图16C

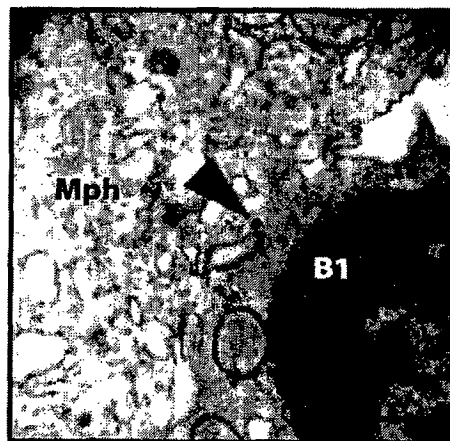


图16D

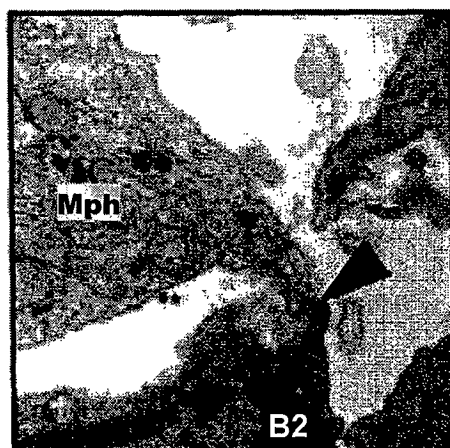


图16E

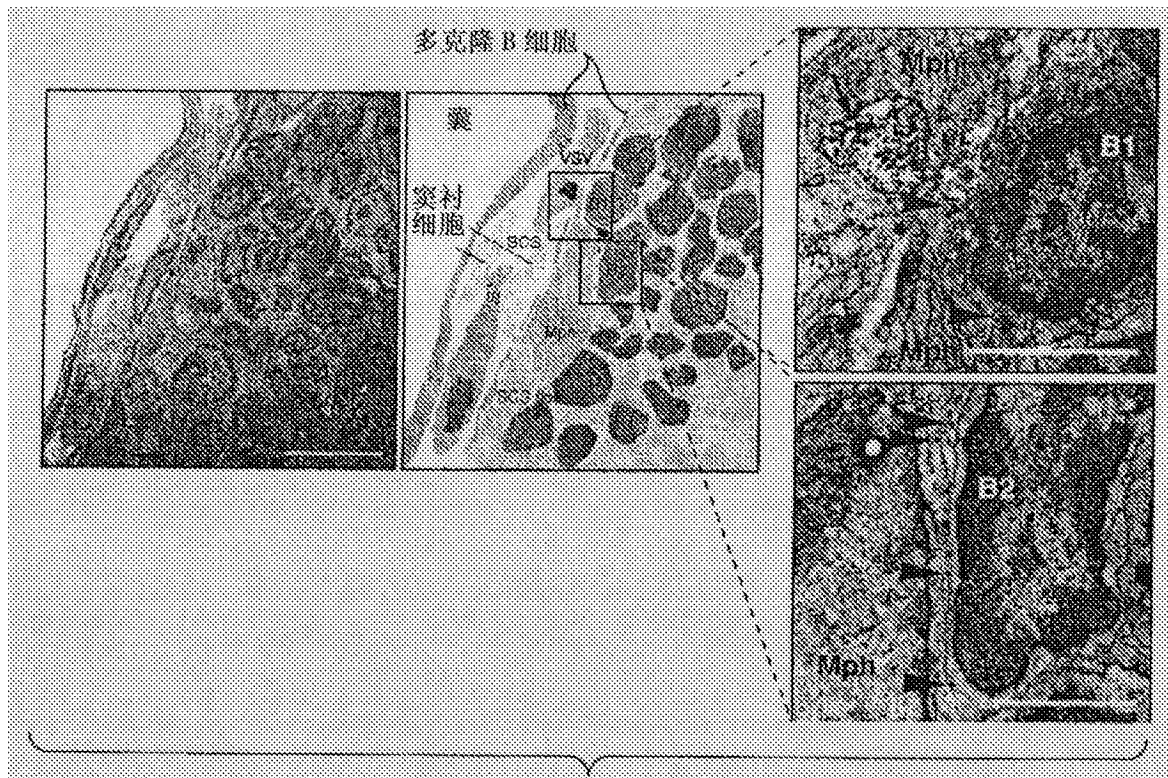


图17A

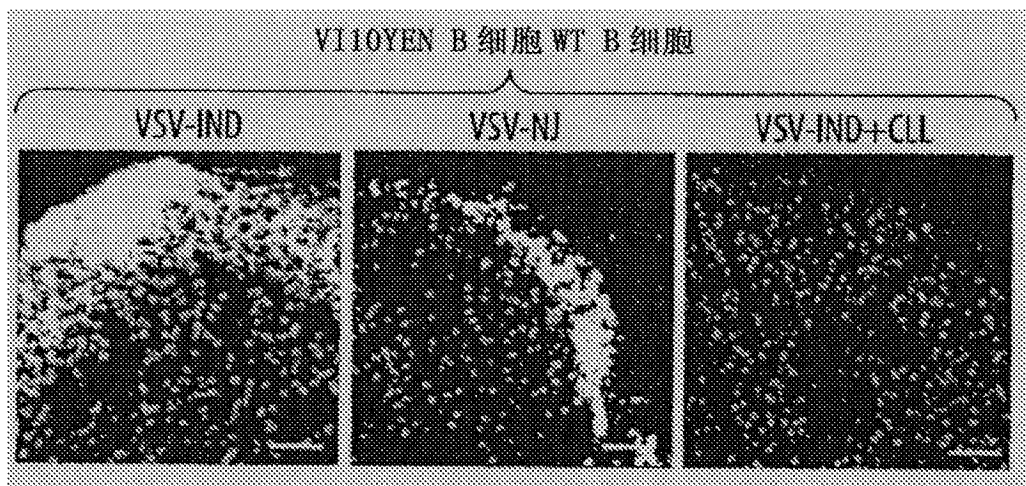


图17B

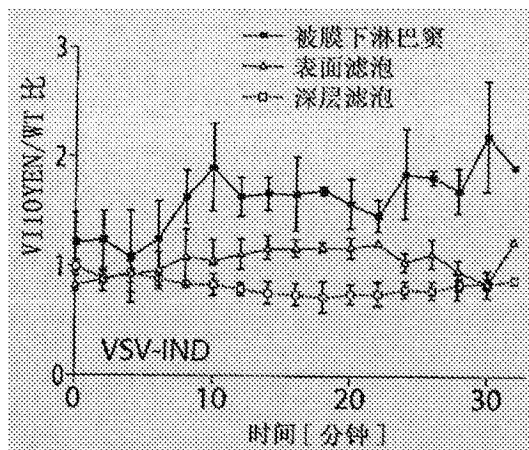


图17C-1

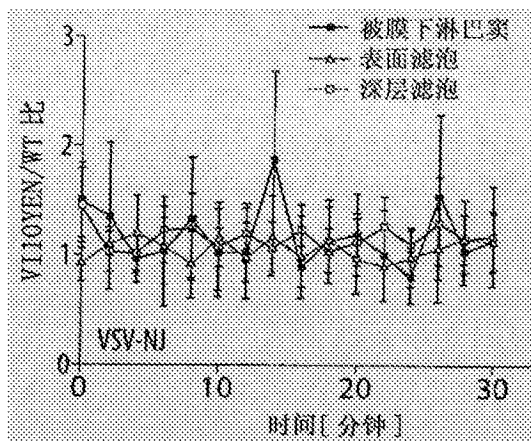


图17C-2

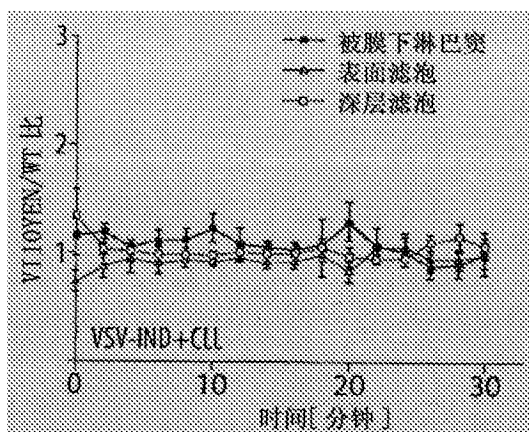


图17C-3

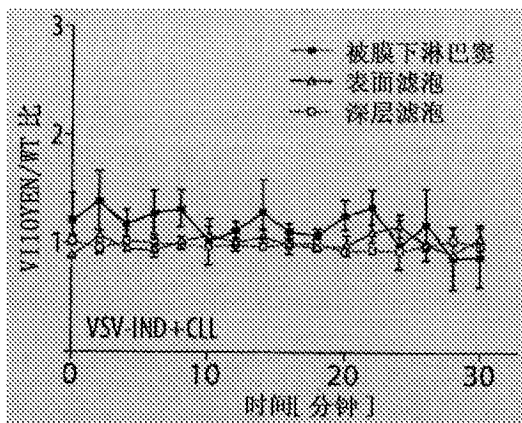


图17C-4

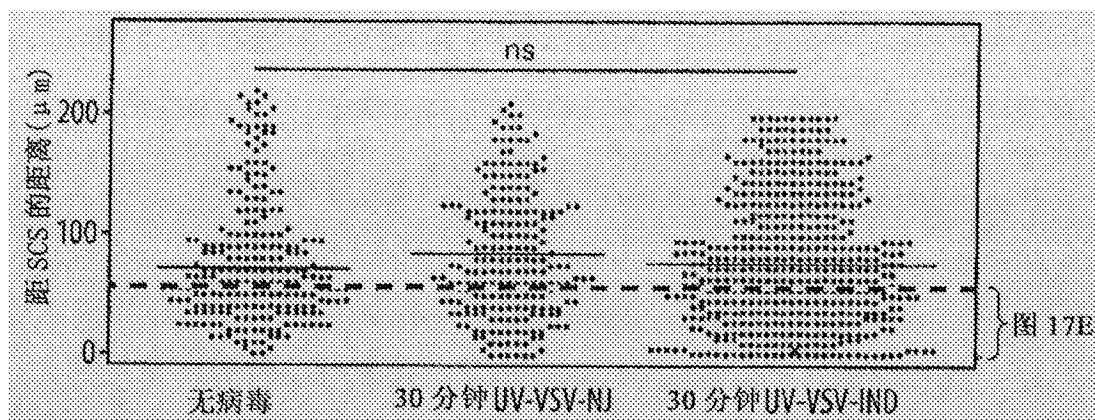


图17D

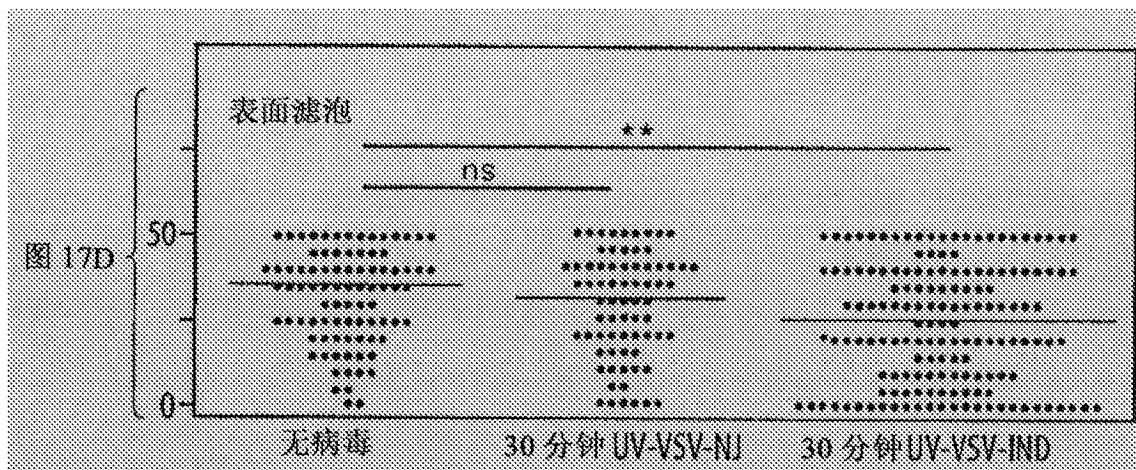


图17E

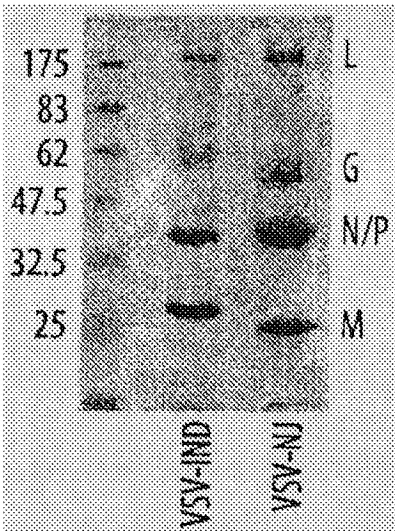


图18A

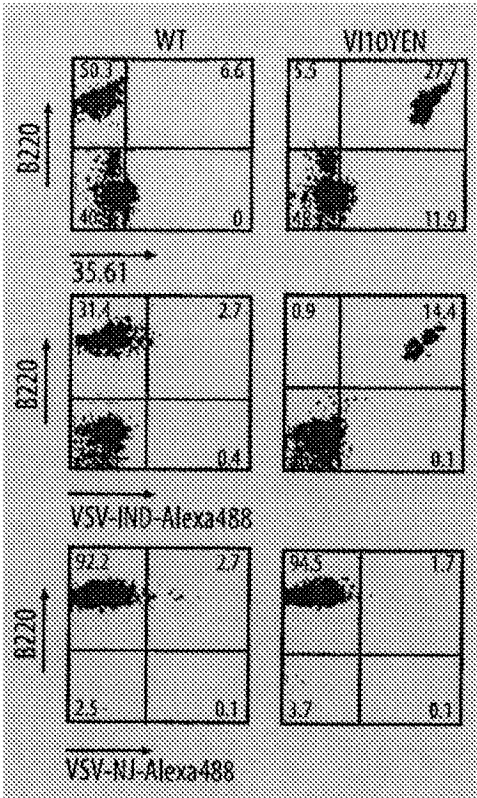


图18B

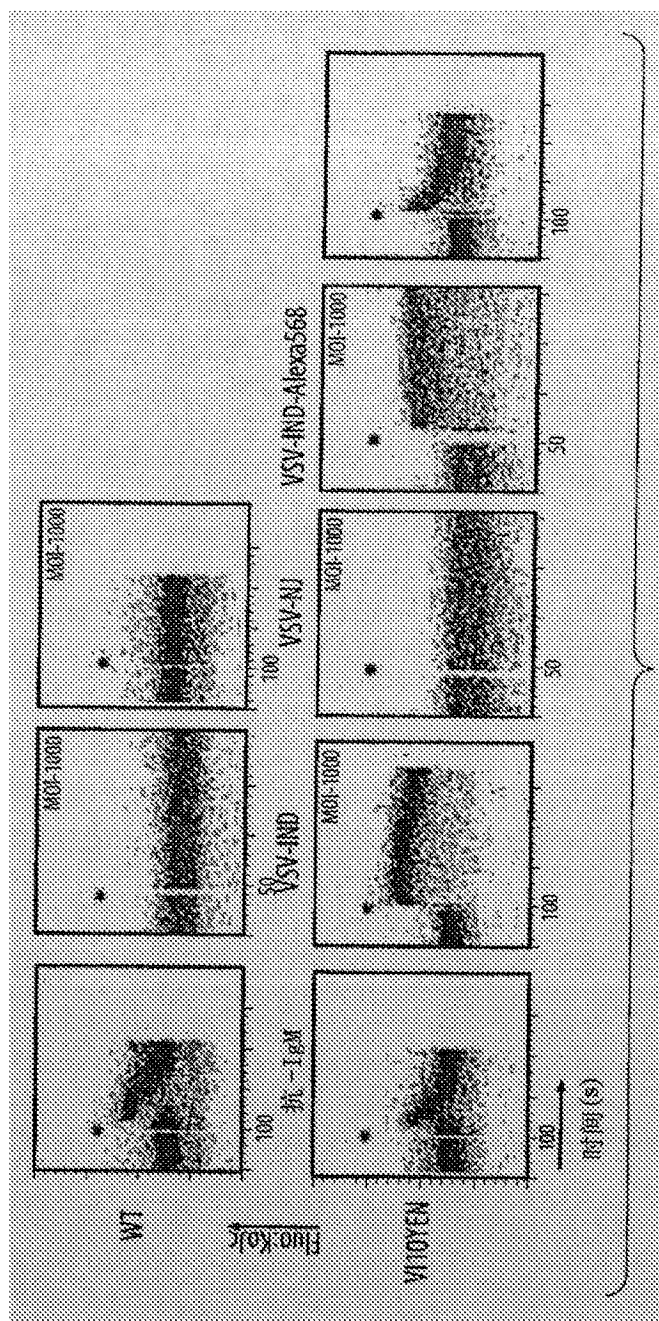


图18C

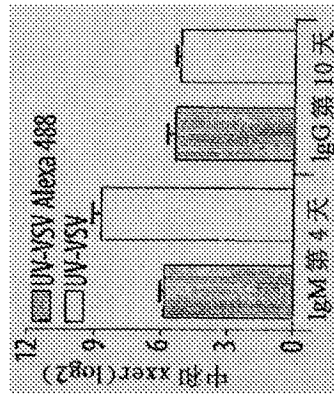


图18D

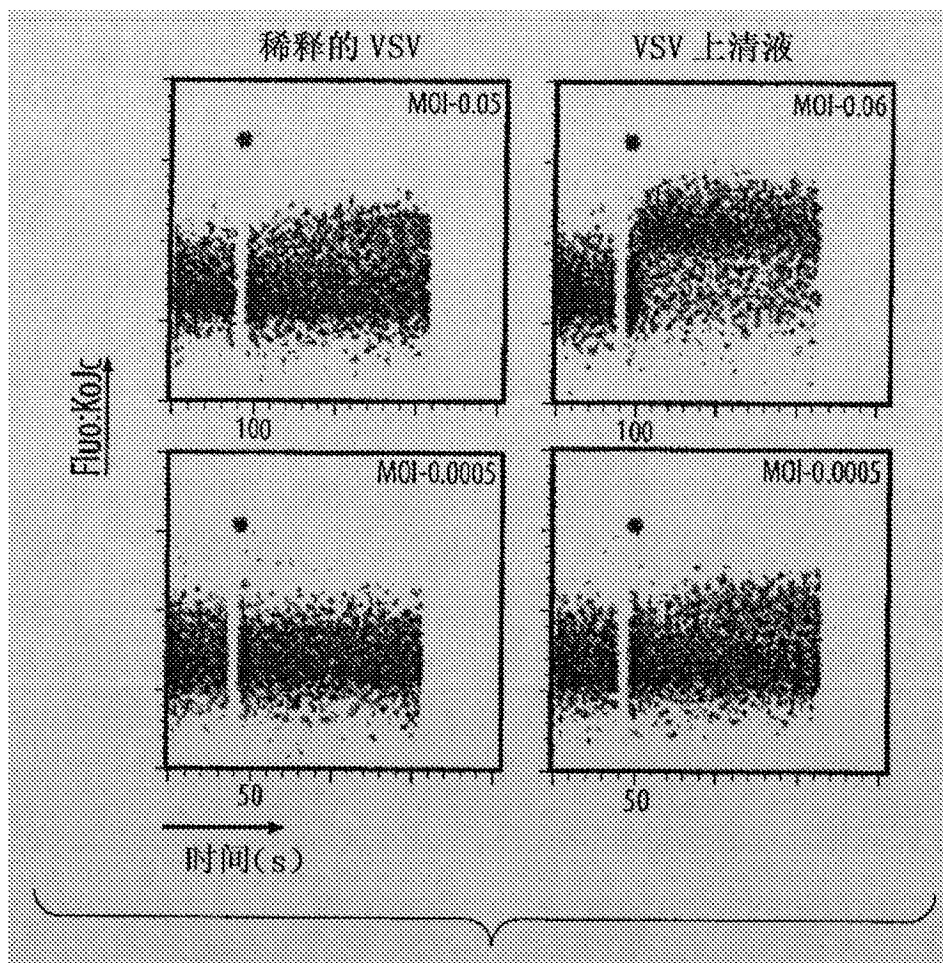


图18E

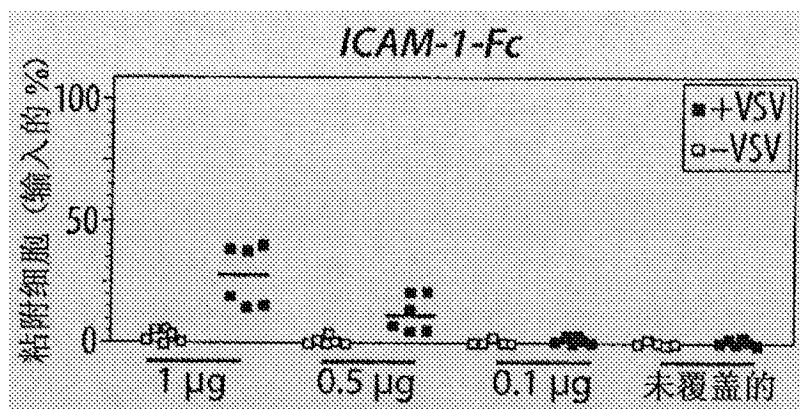


图19A

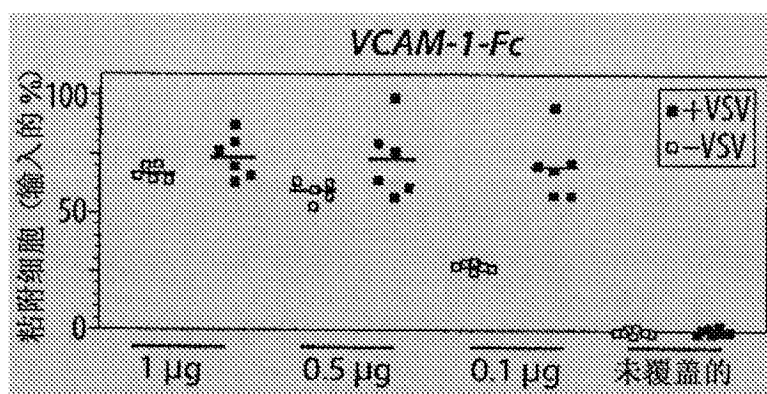


图19B

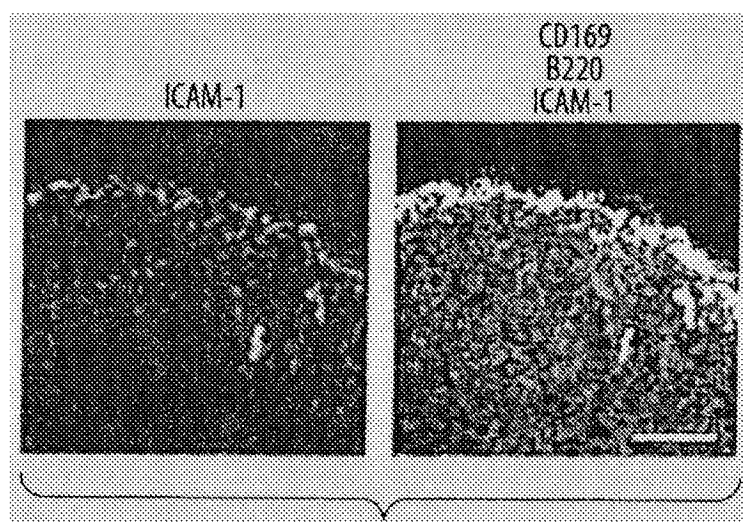


图19C

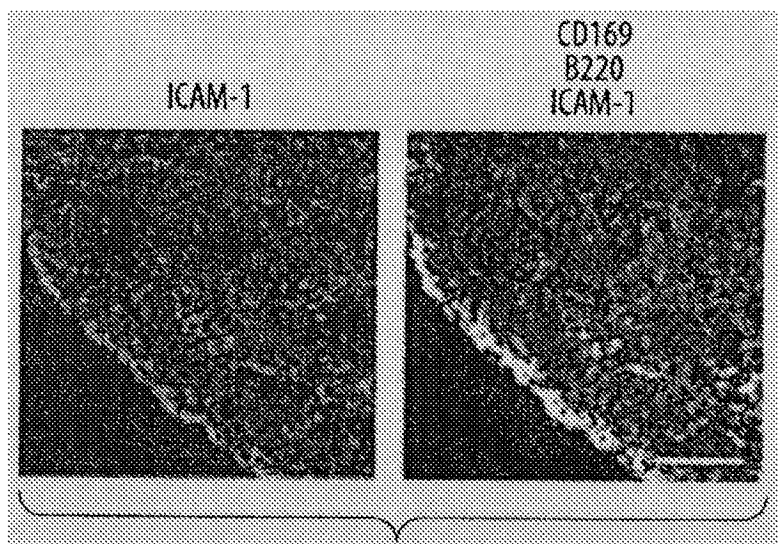


图19D

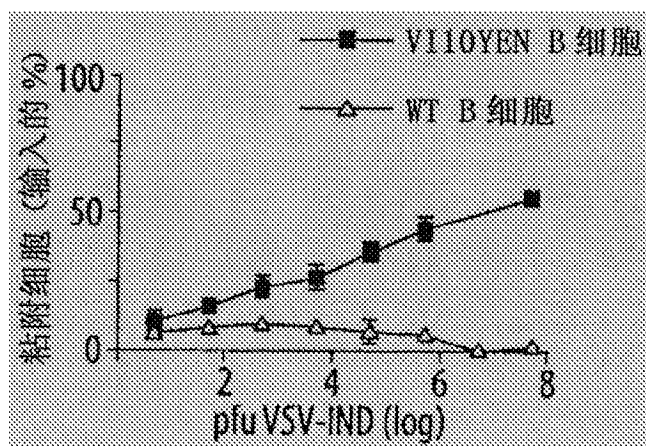


图19E

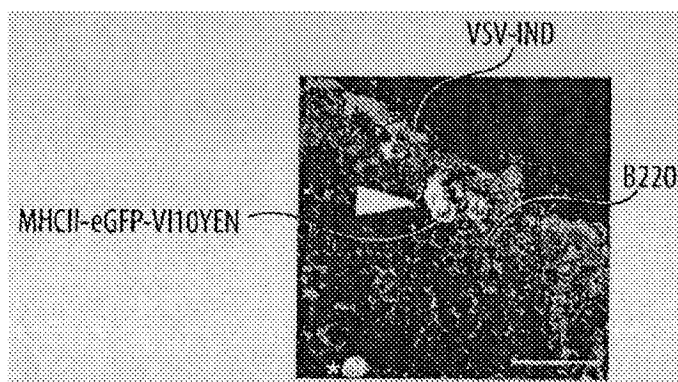


图20A

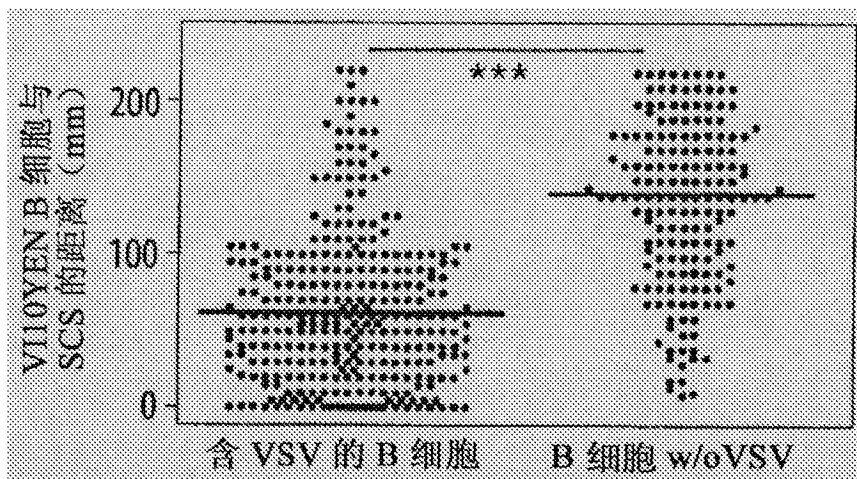


图20B

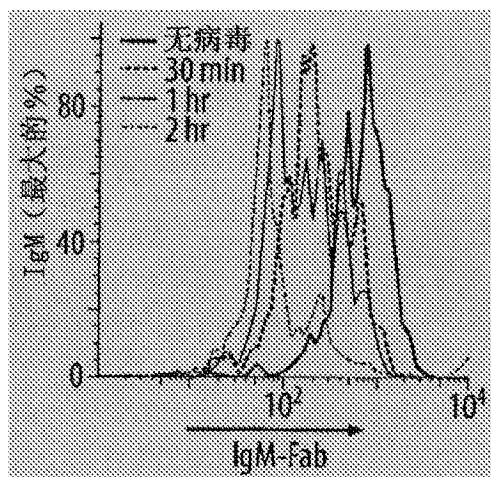


图20C

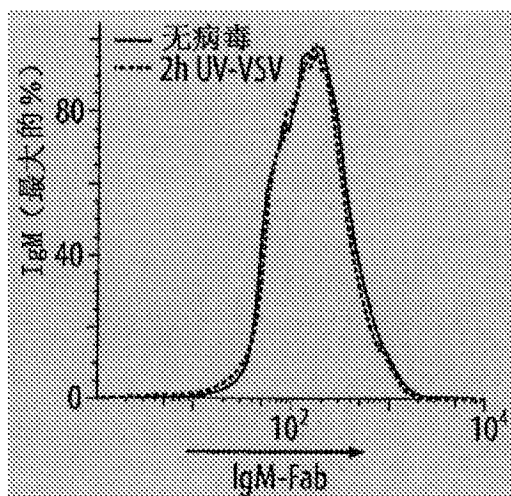


图20D

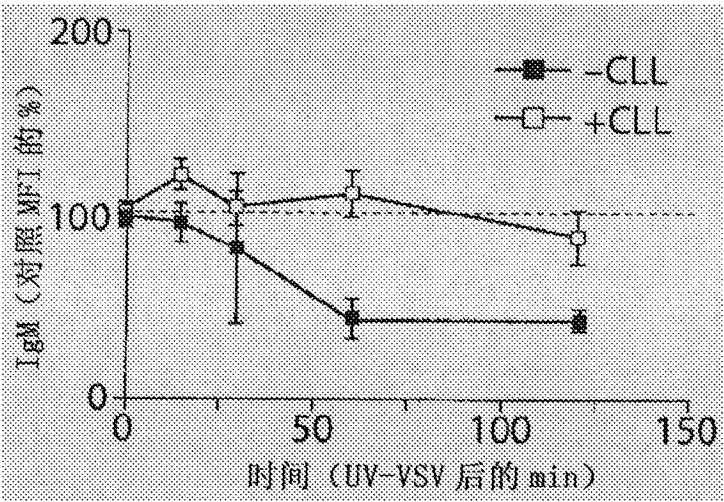


图20E

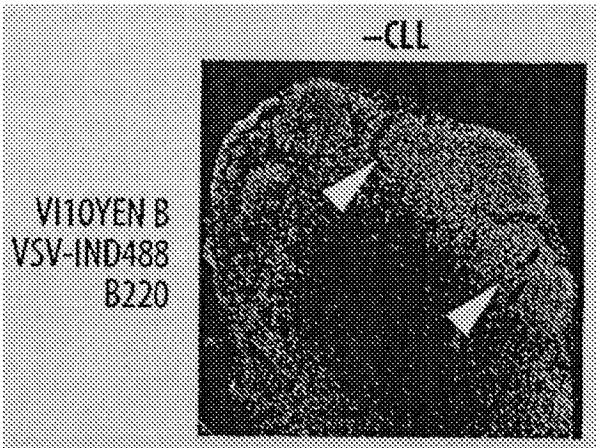


图20F

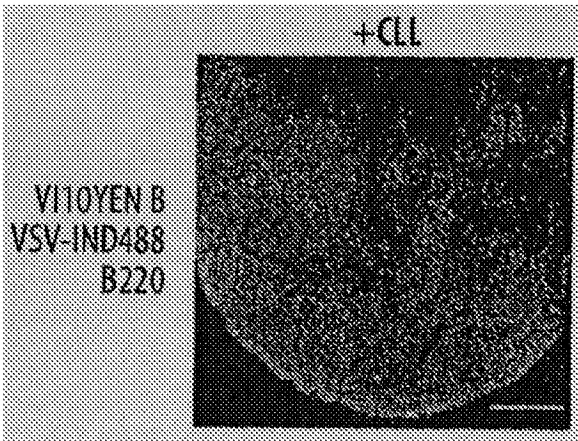


图20G

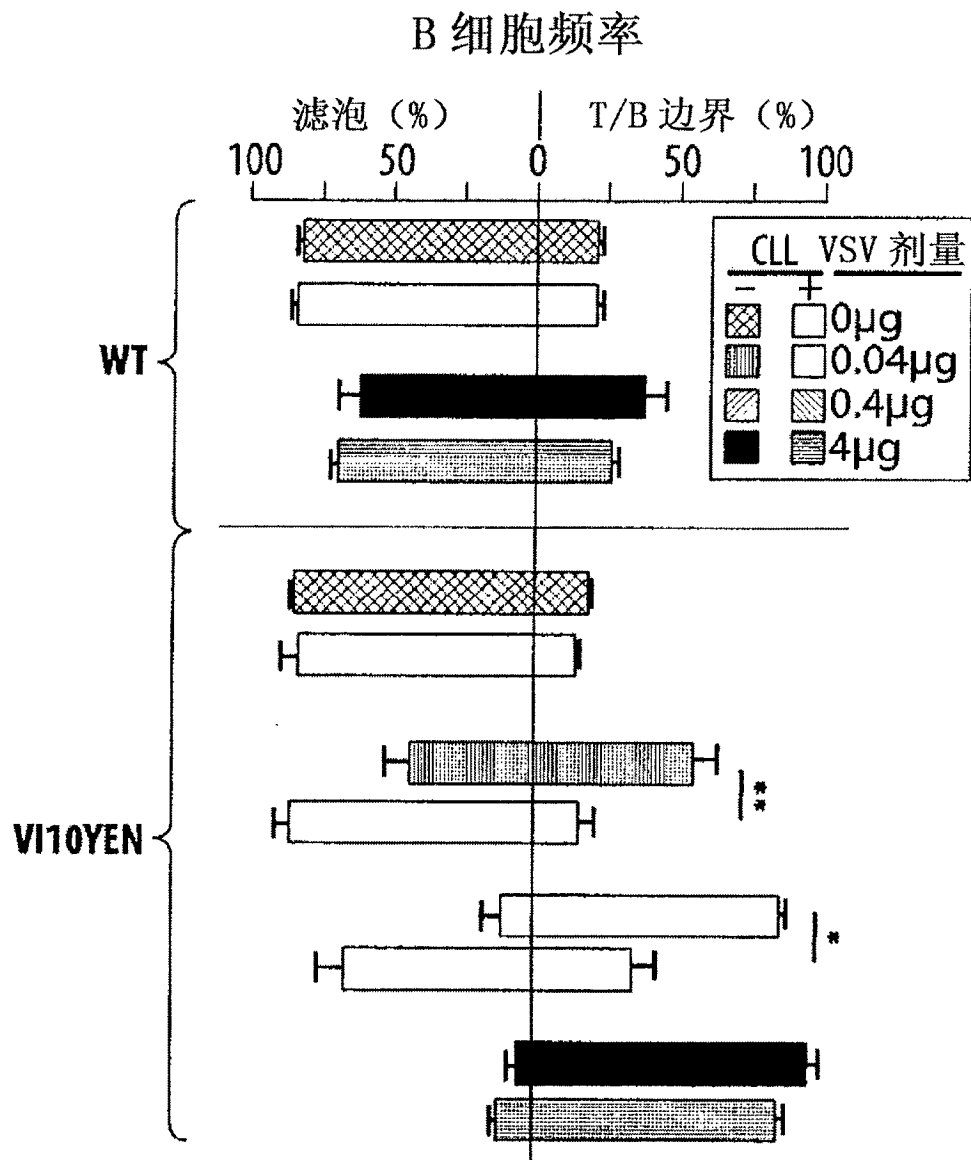


图20H

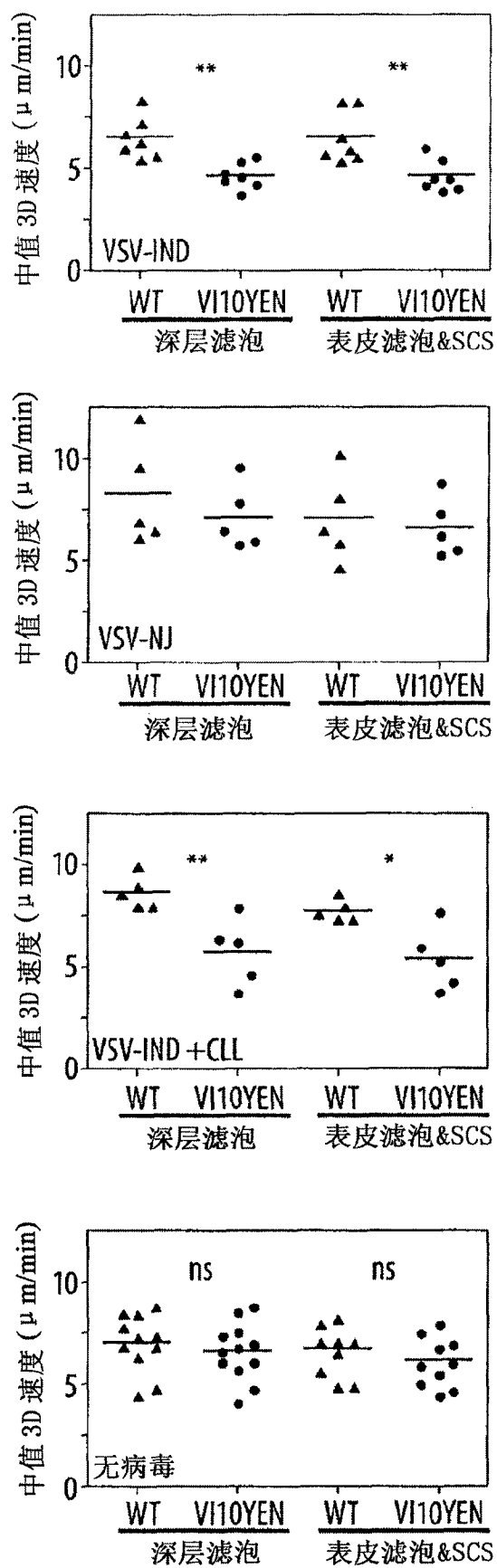


图21

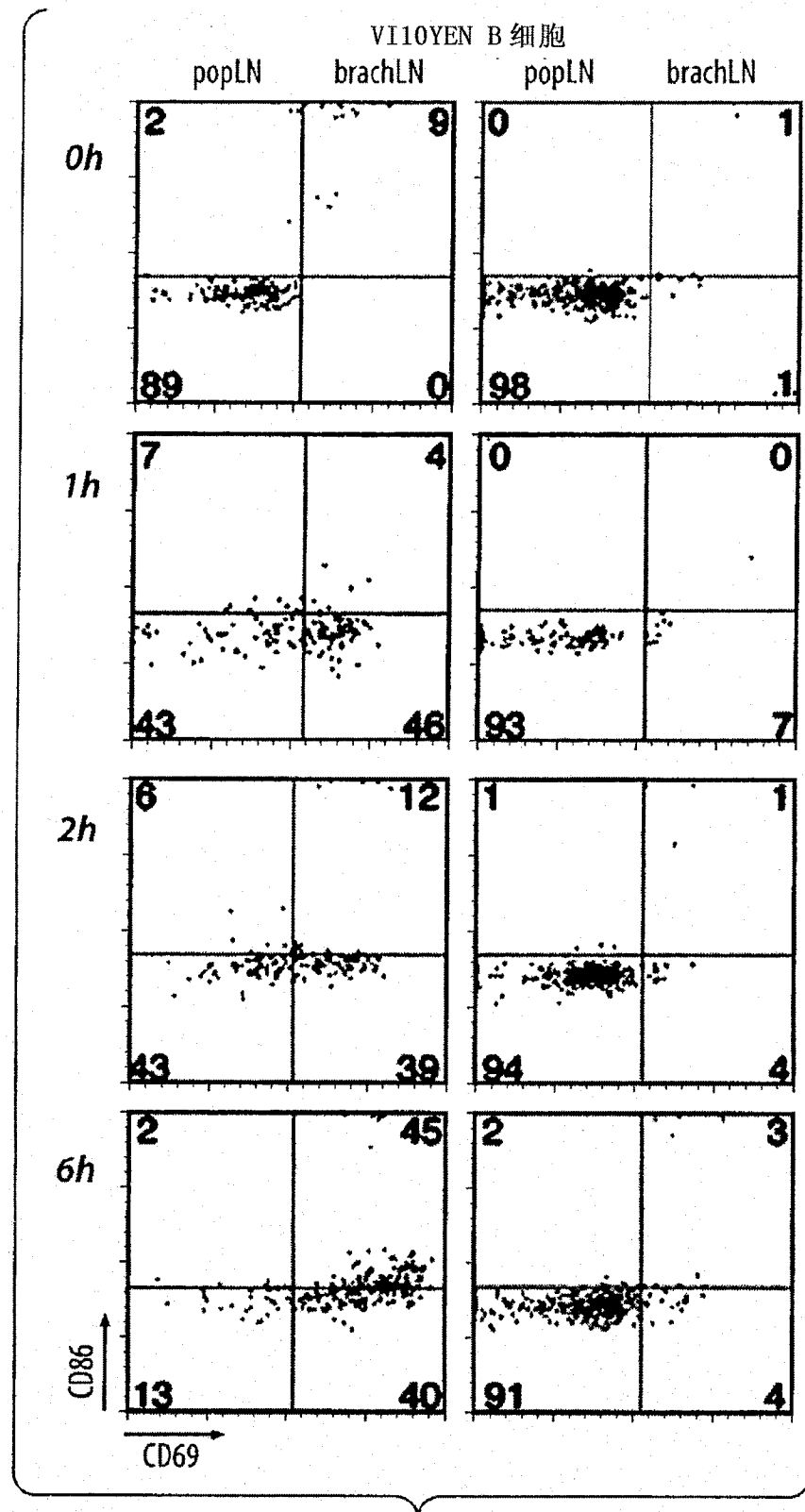


图22A

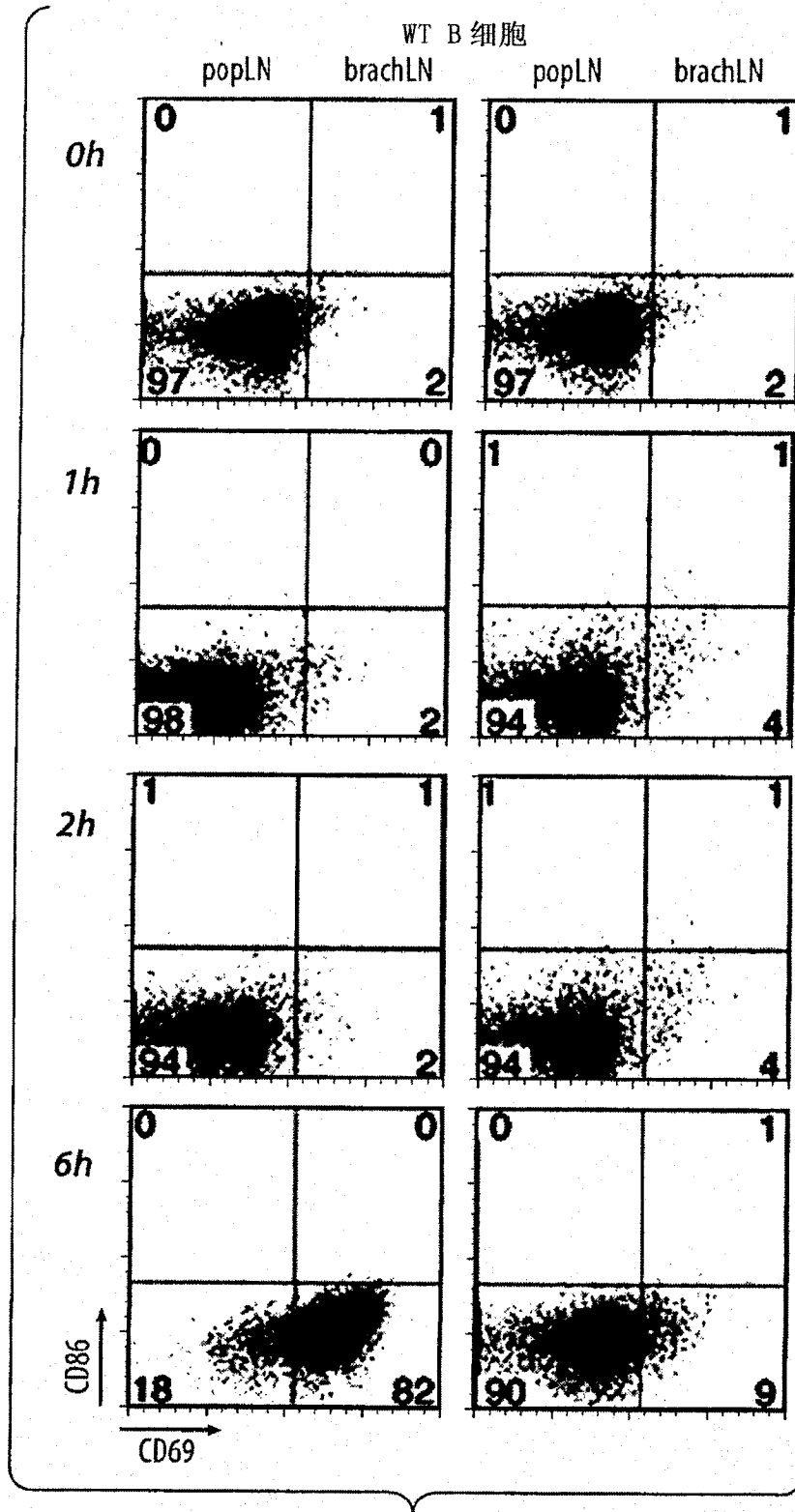


图22B

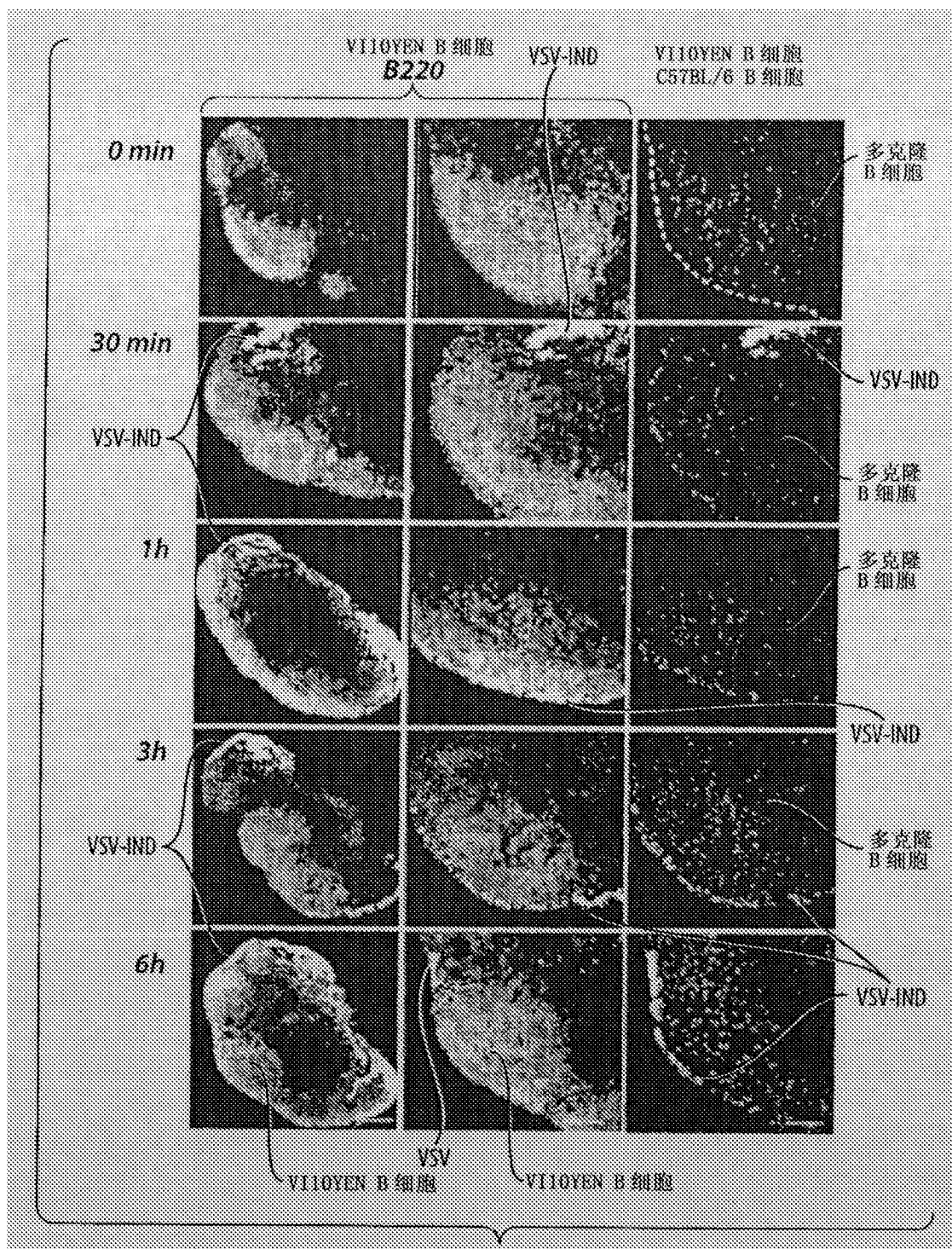


图23

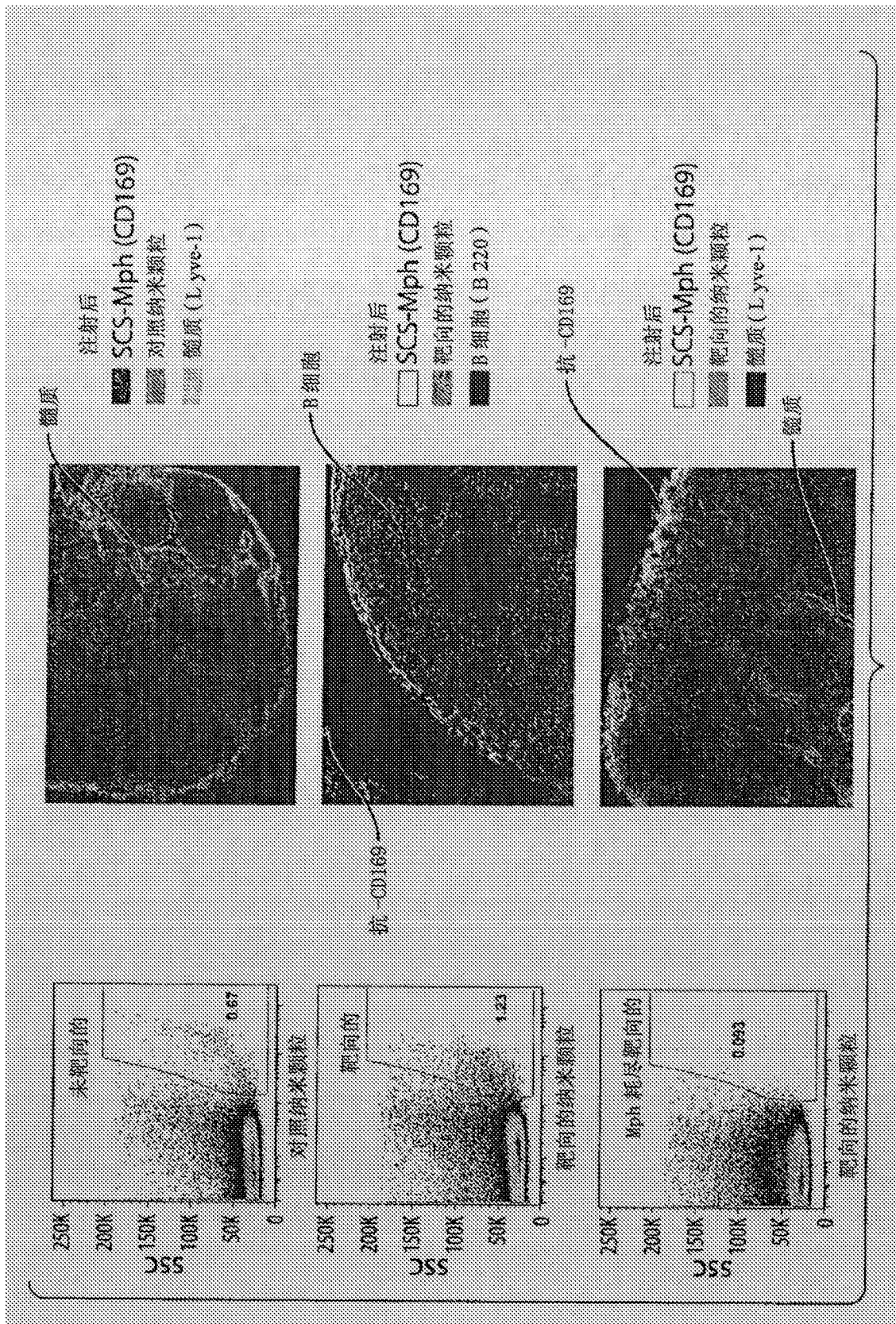


图24A

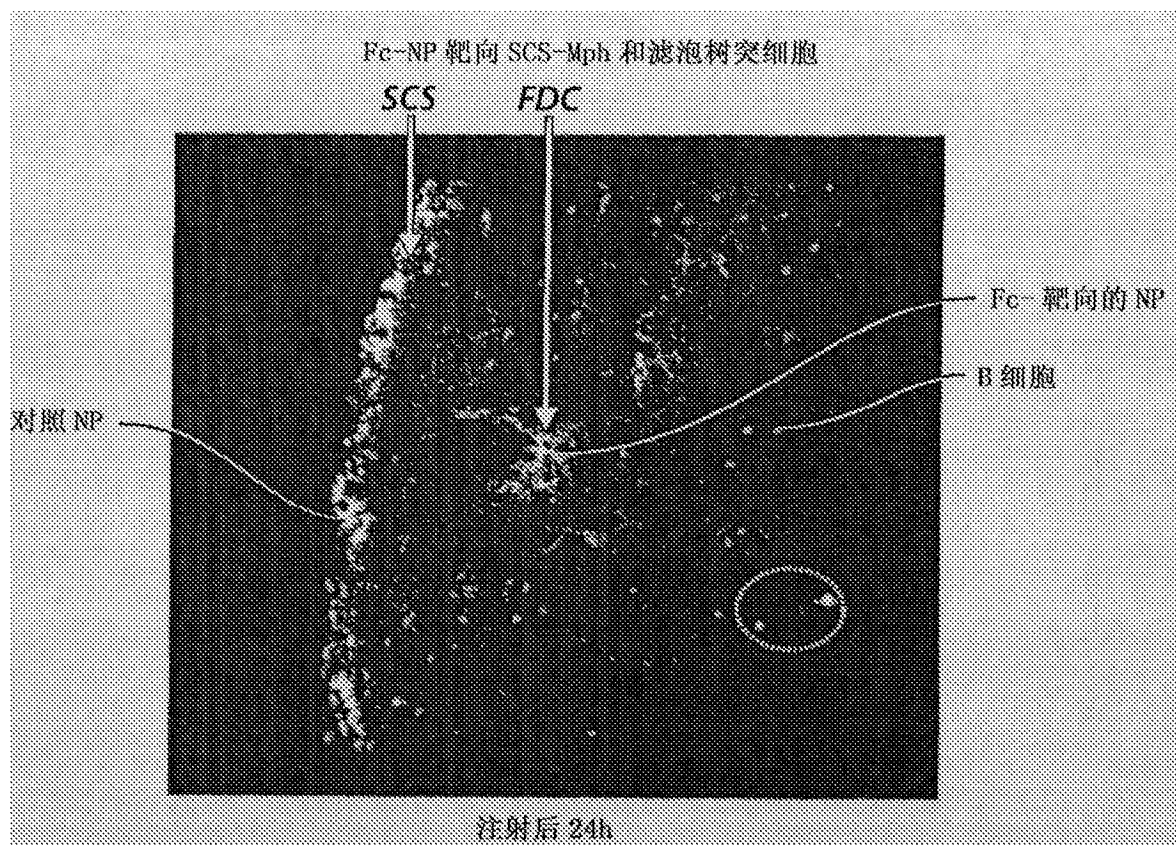


图24B

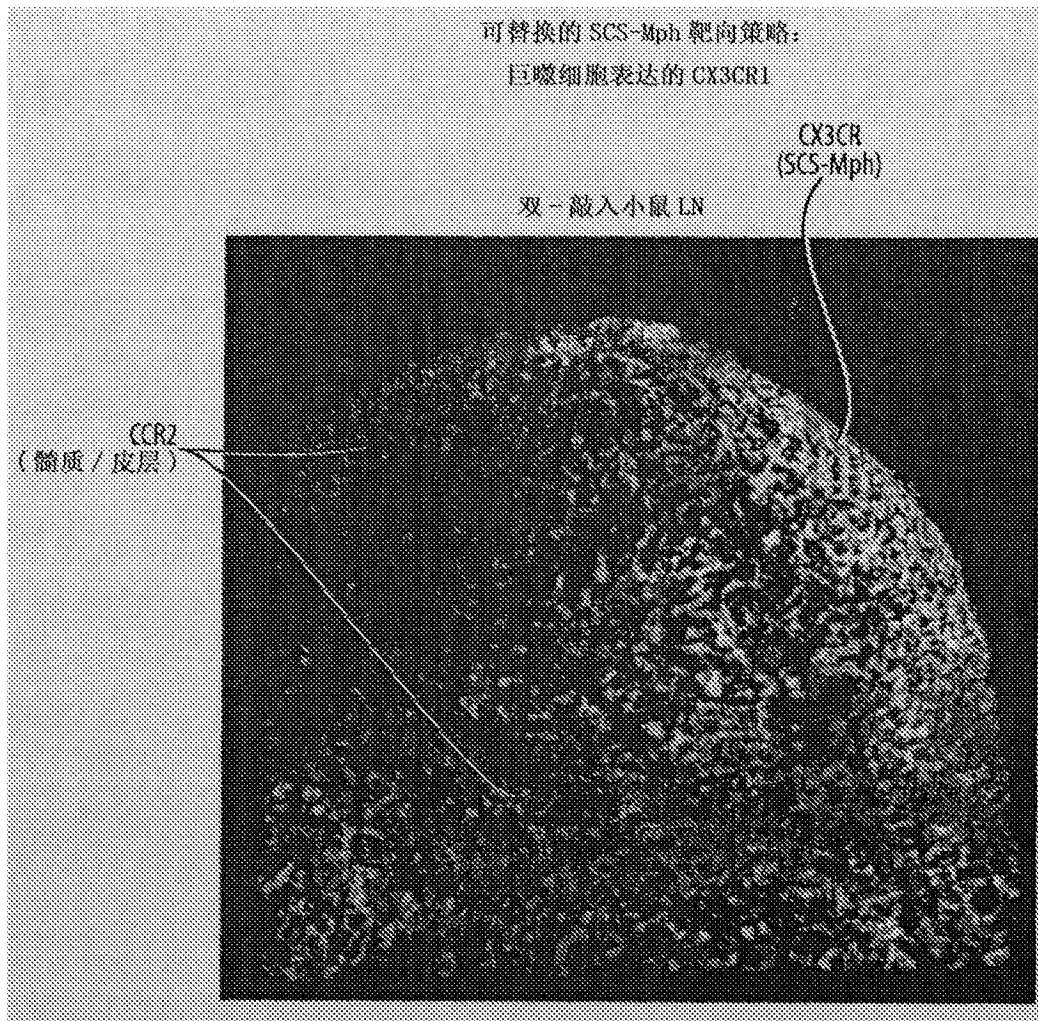


图25

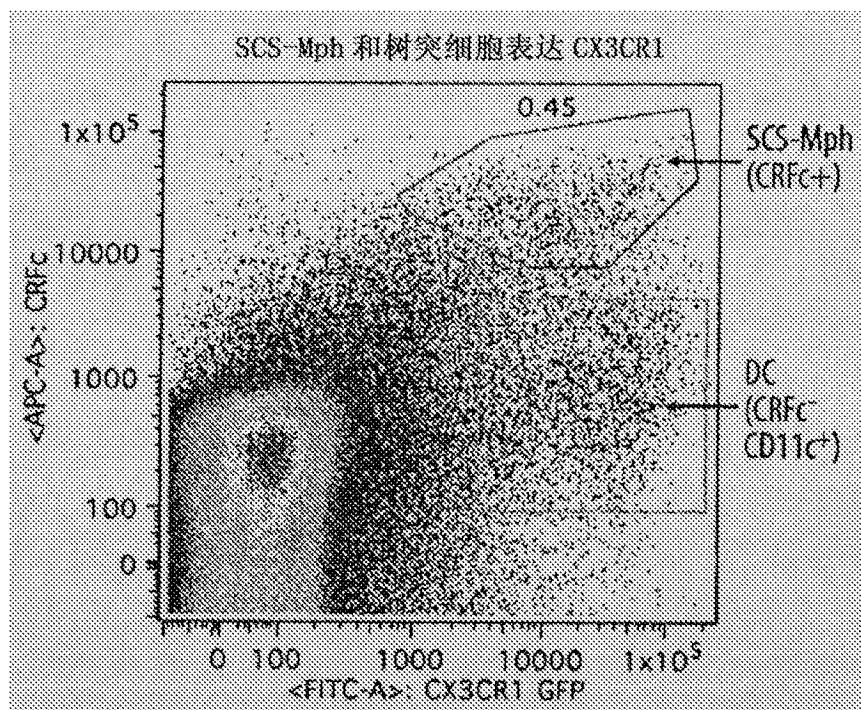


图26

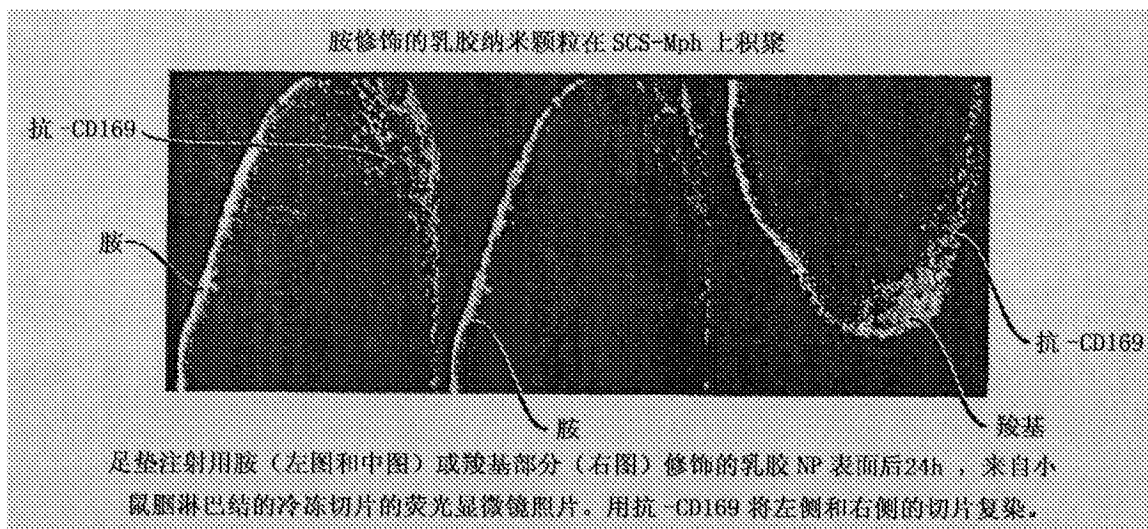


图27

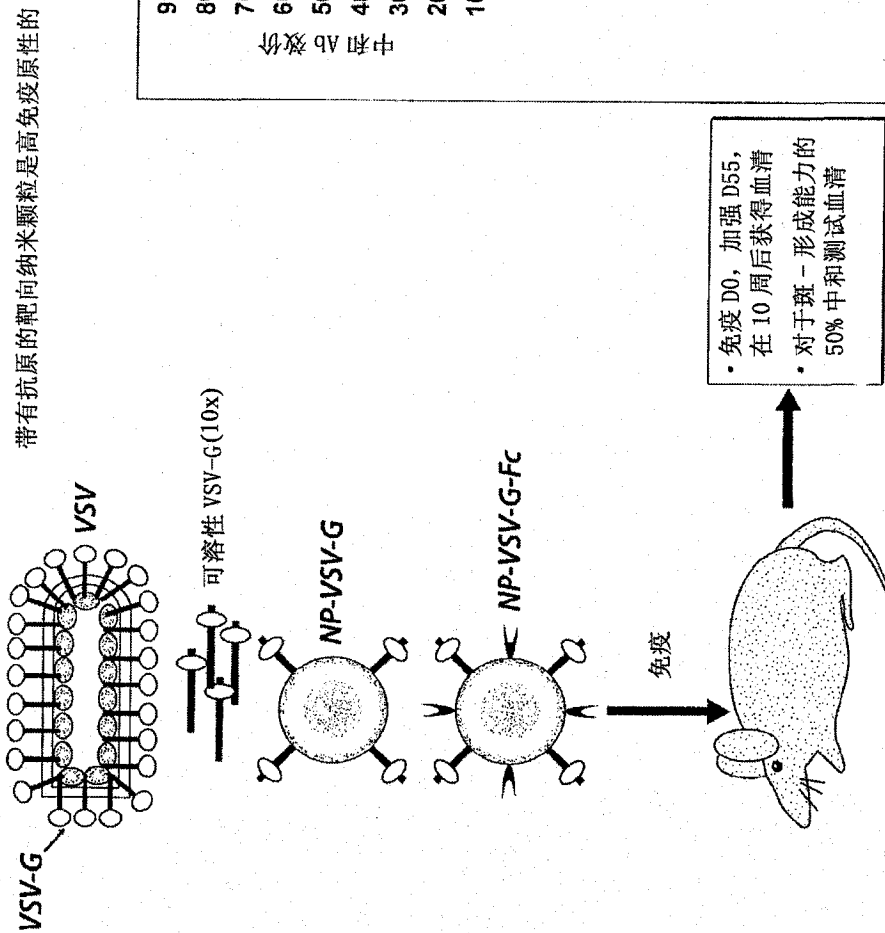


图28A

用带有抗原的靶向纳米颗粒的接种保护对抗 VSV 的致命感染

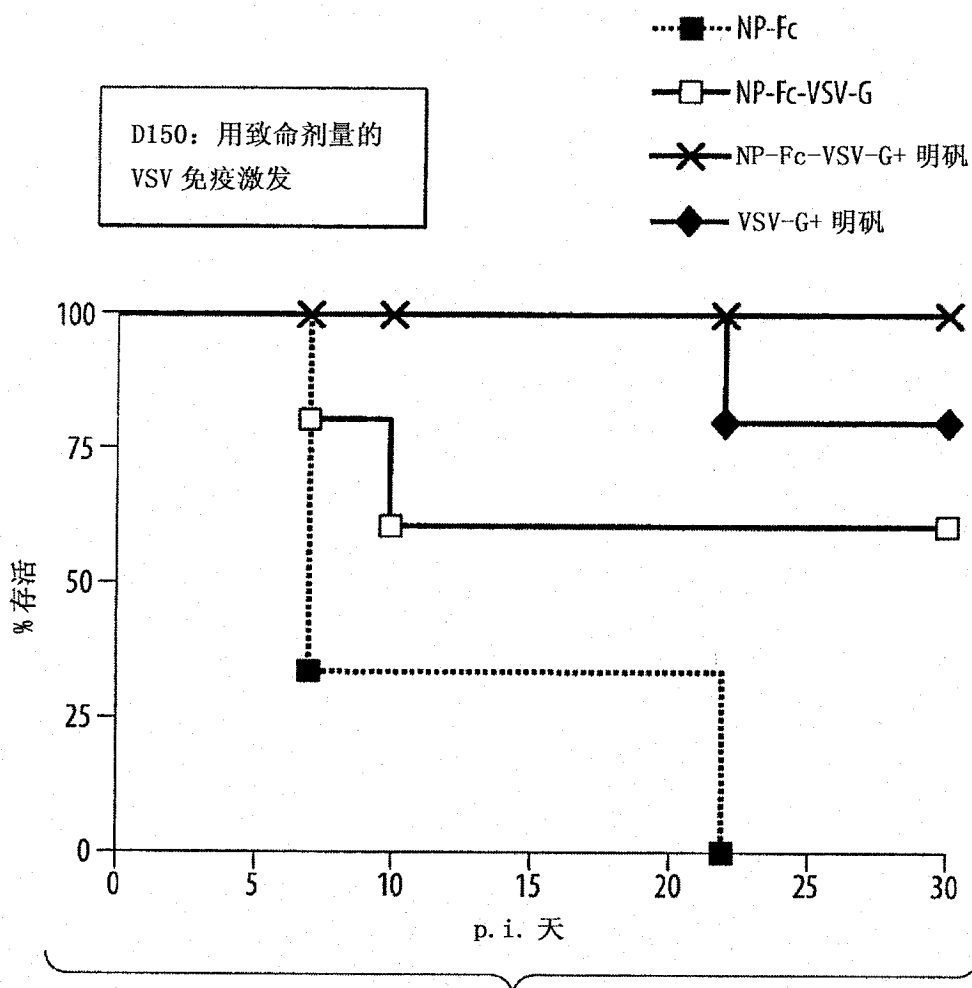


图28B

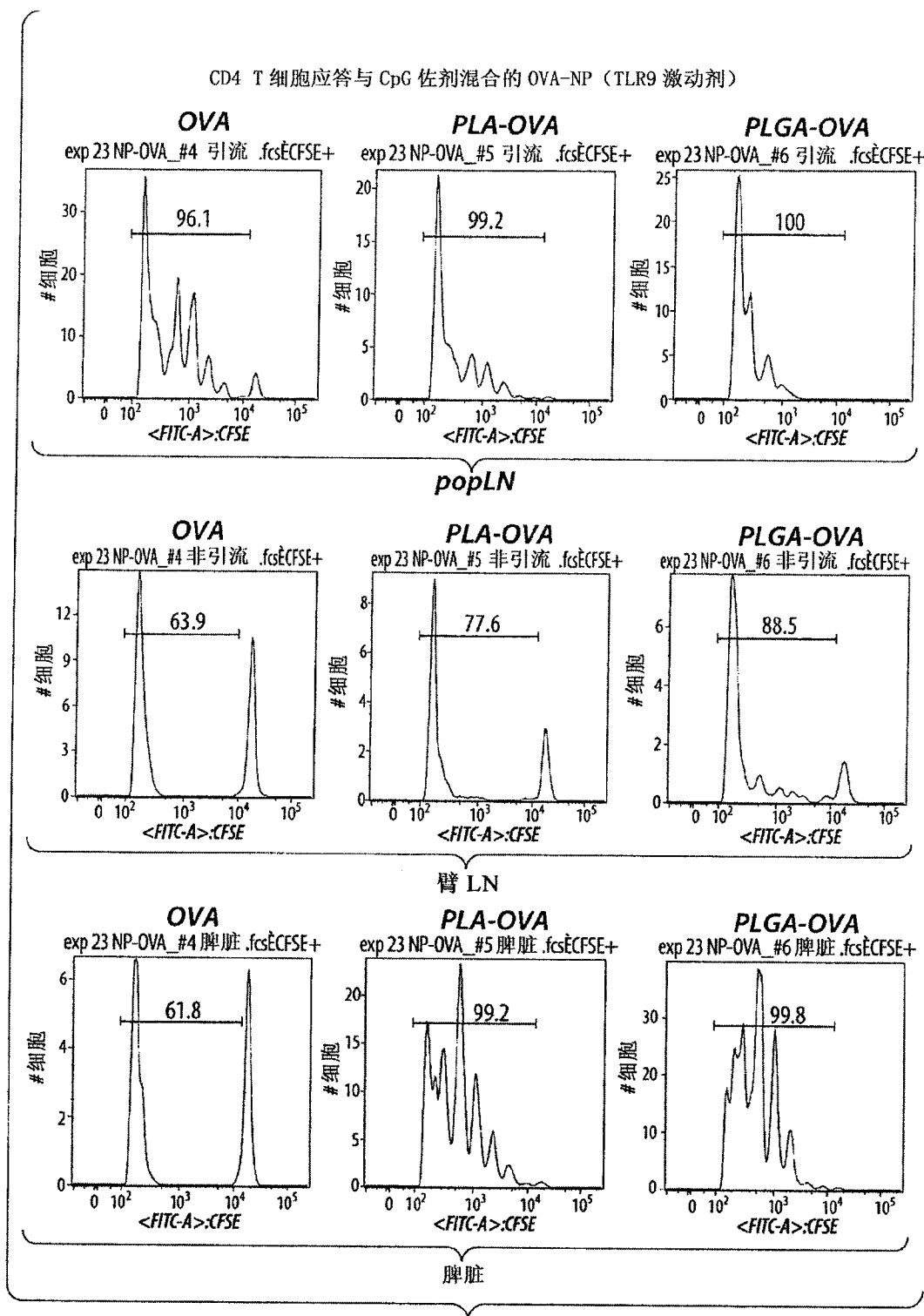


图29A

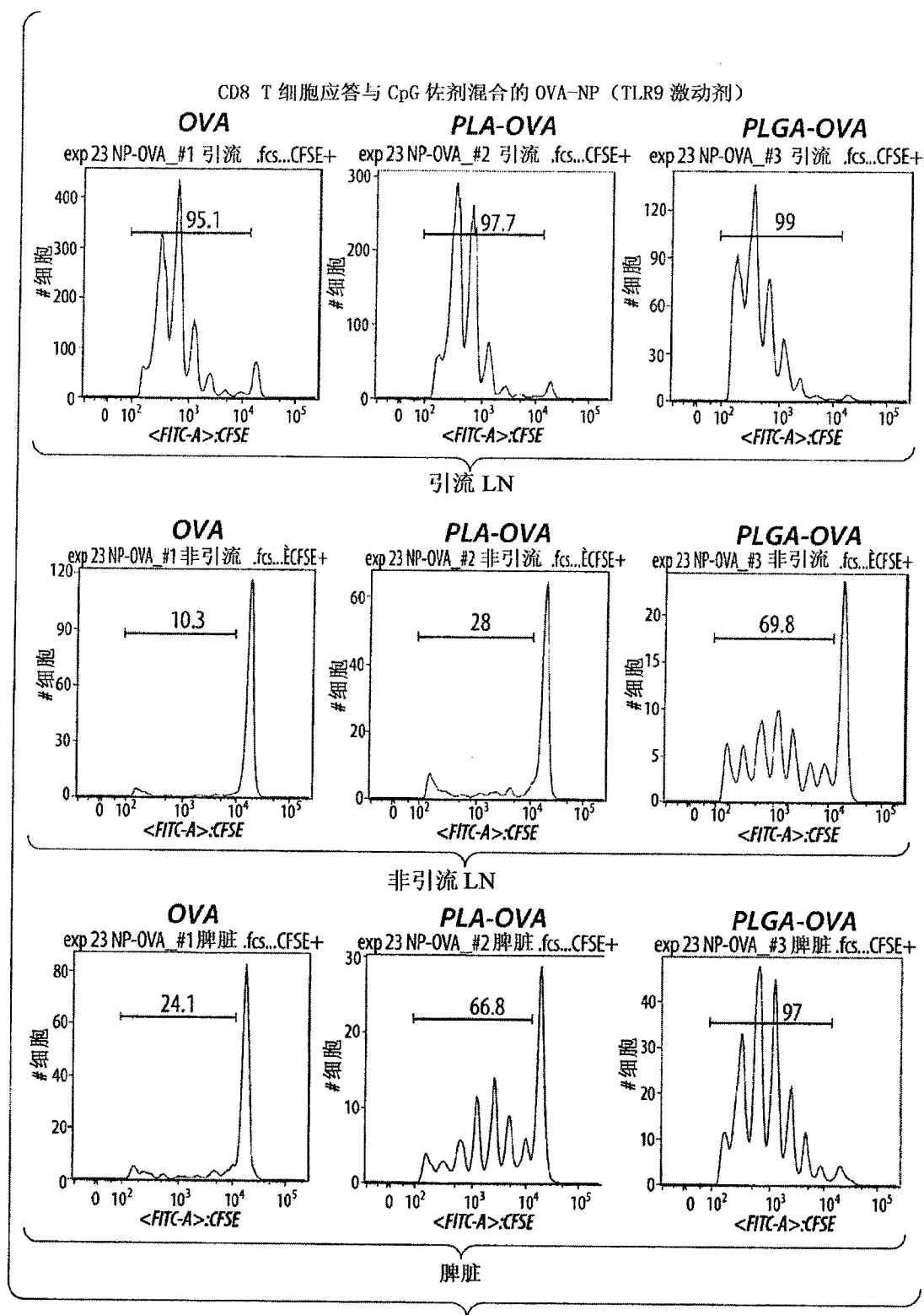


图 29B

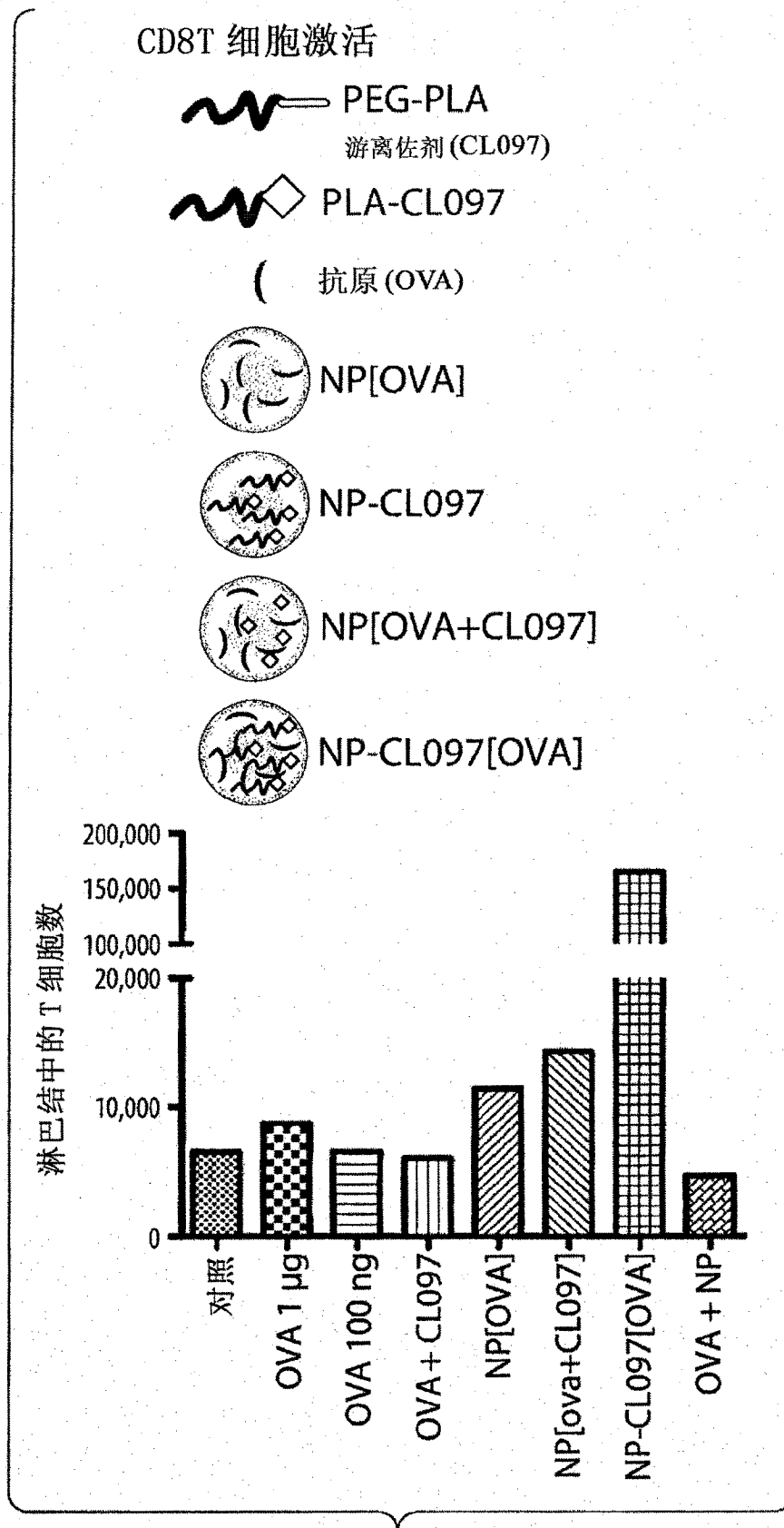


图29C

R848 偶联

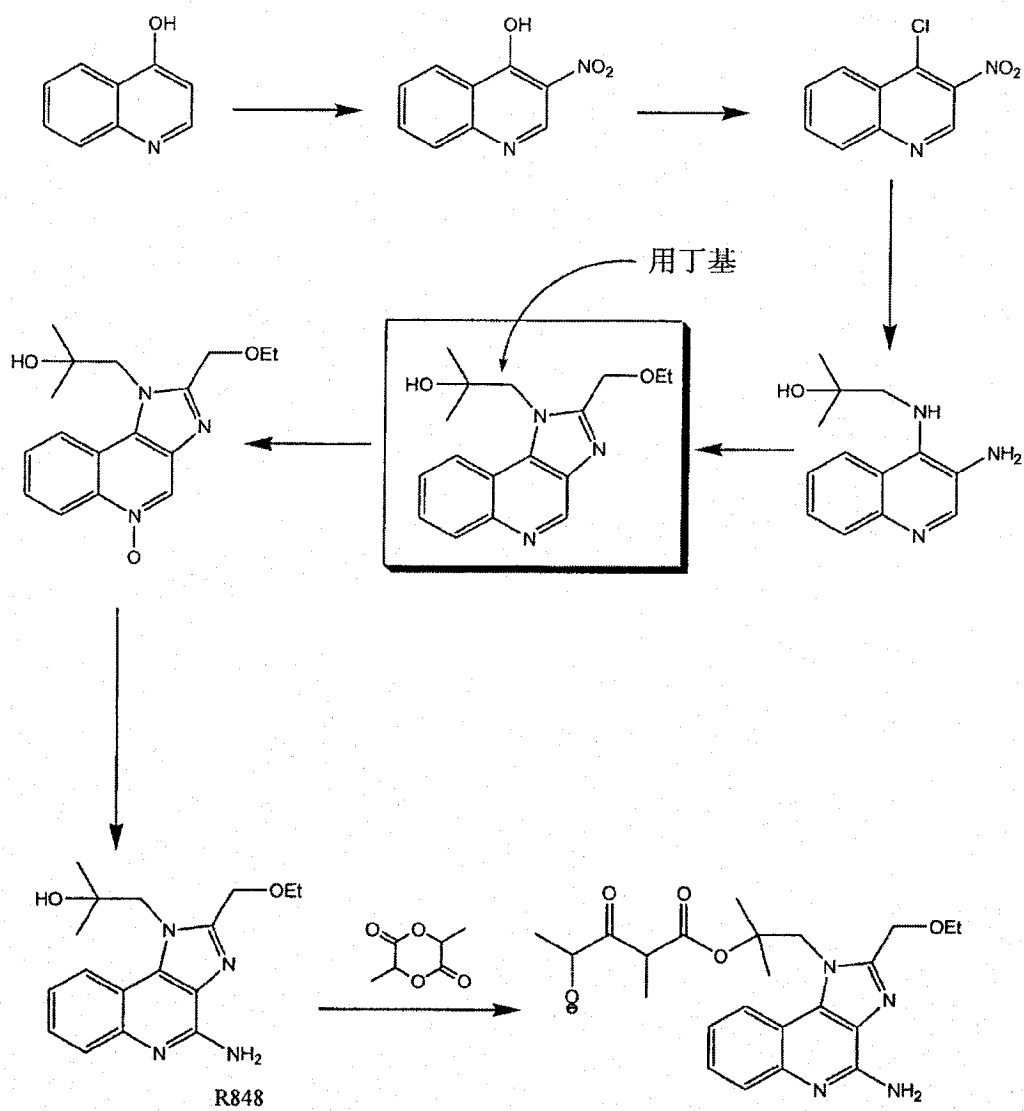


图30

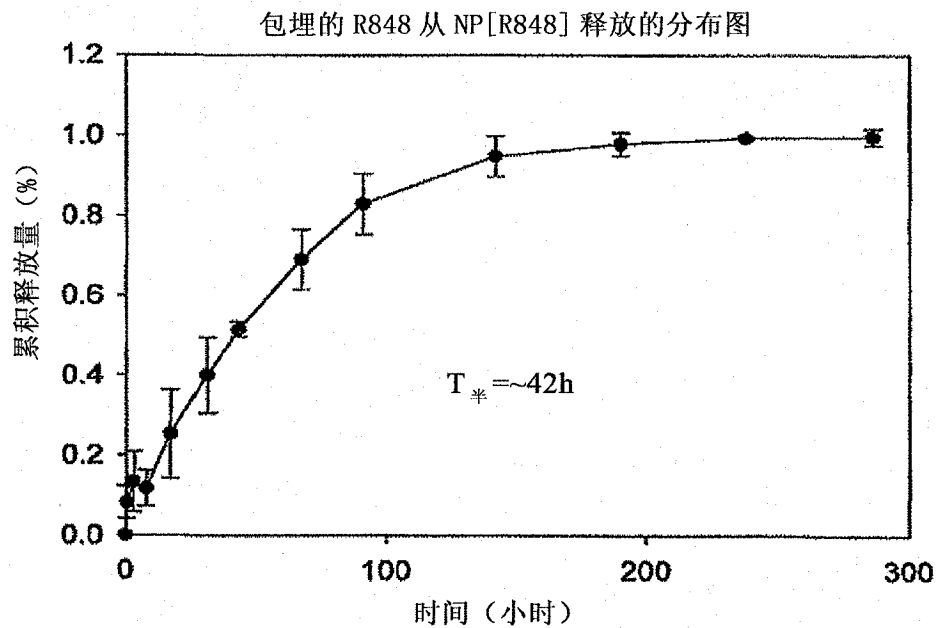


图31

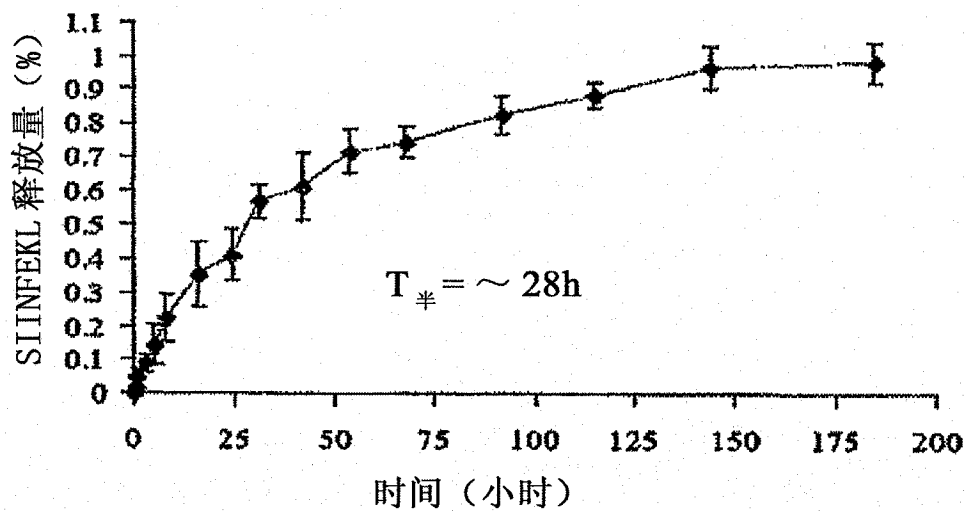


图32

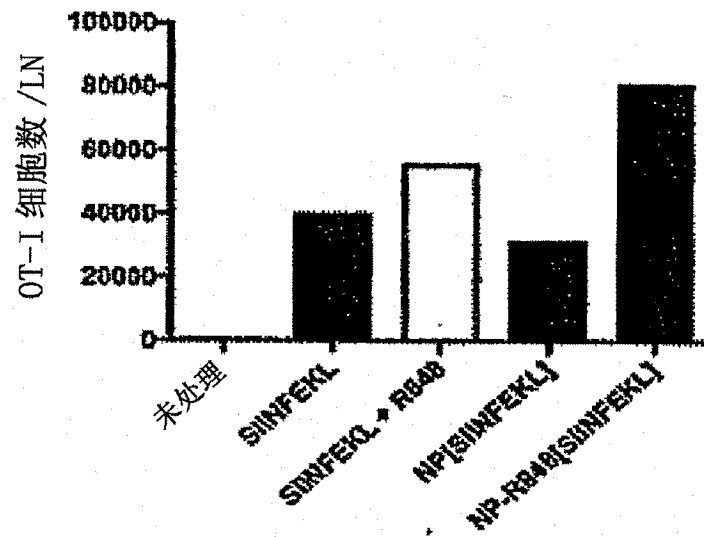


图33

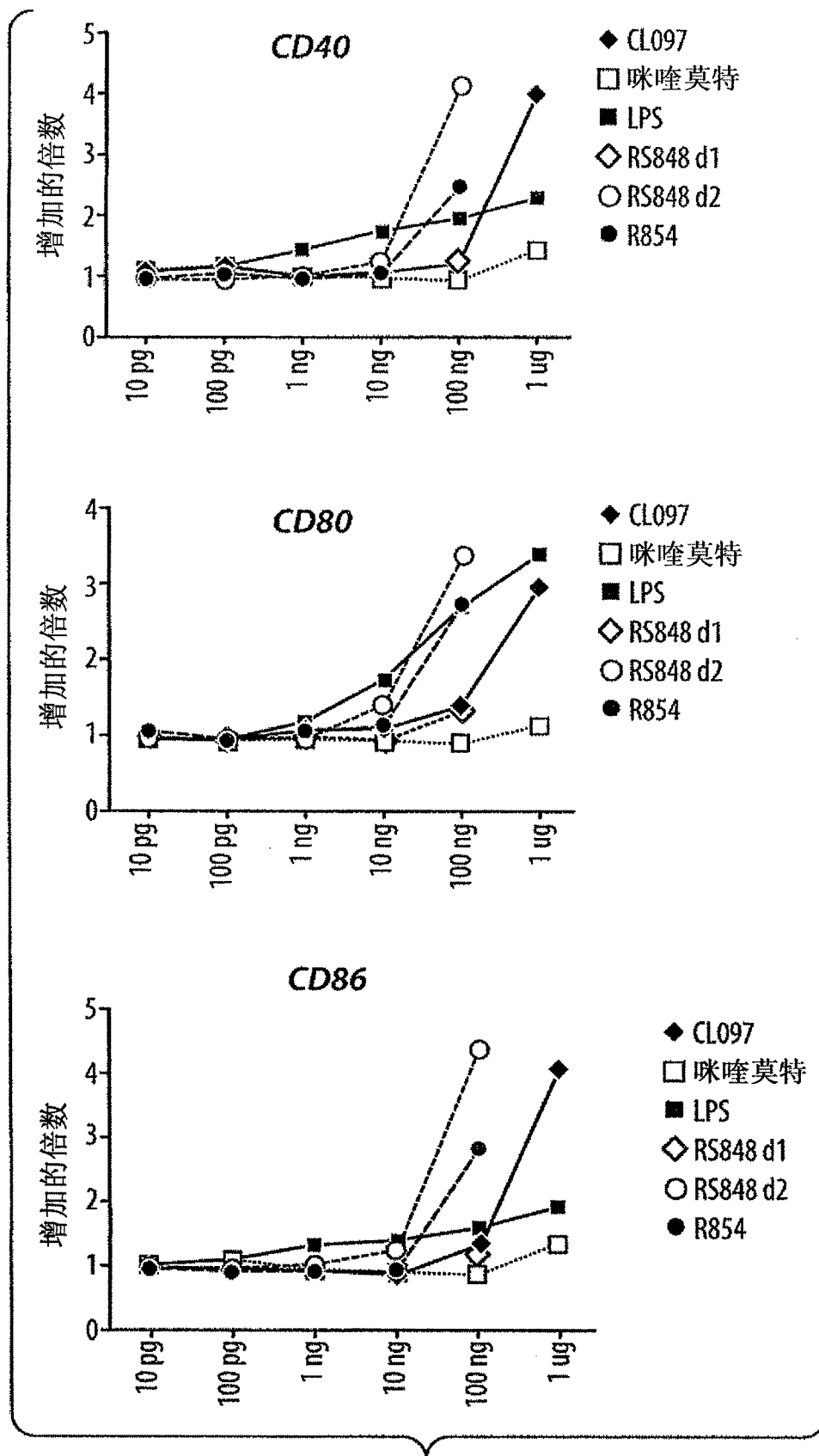


图34A

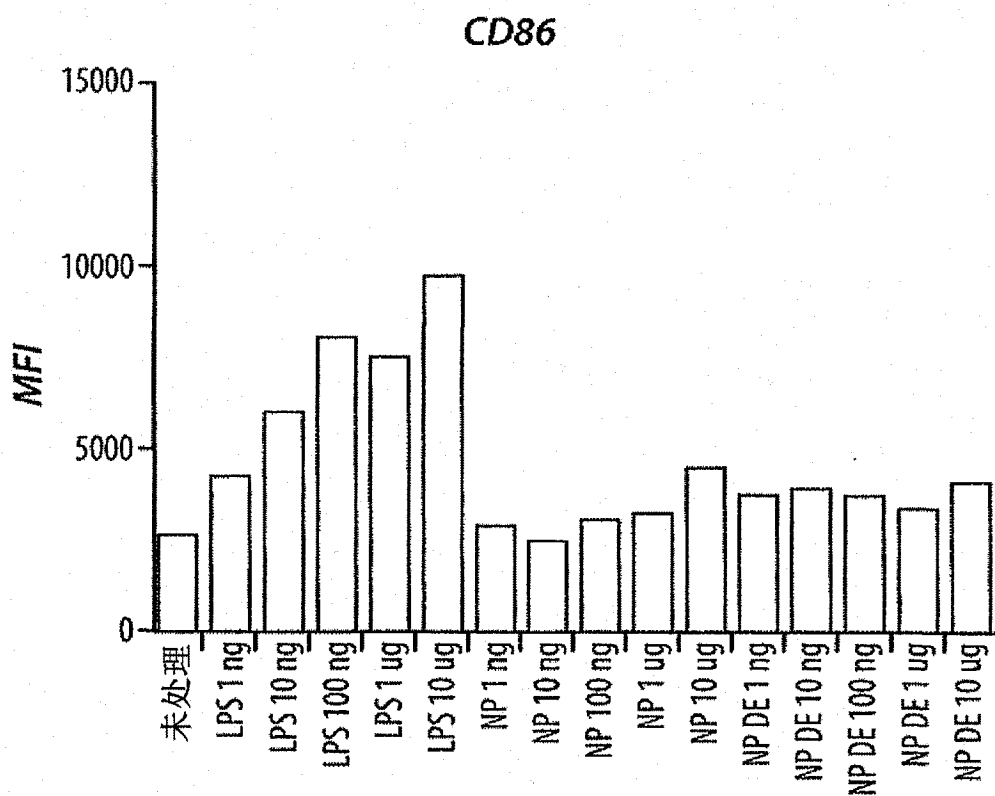


图34B

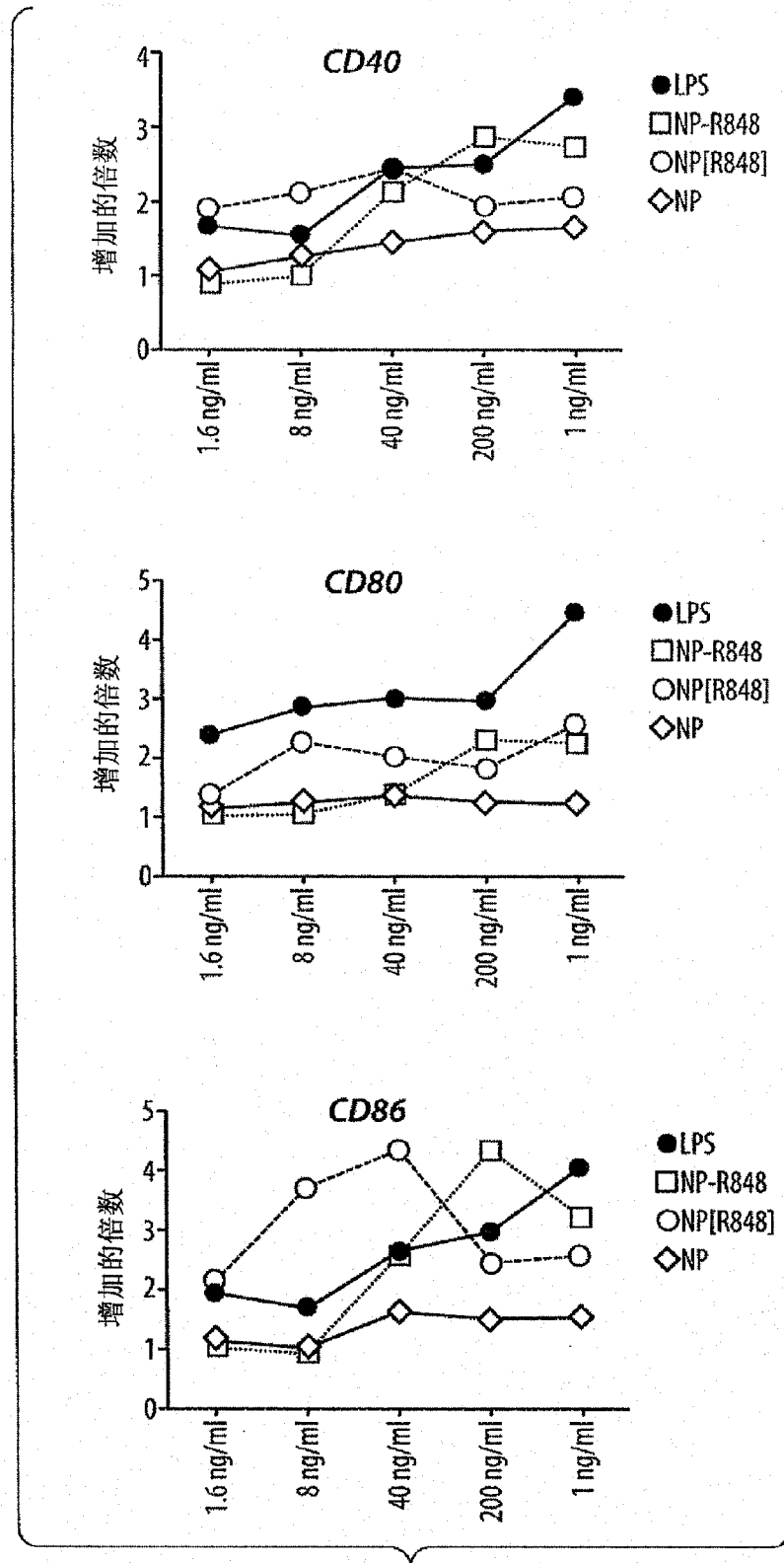


图34C

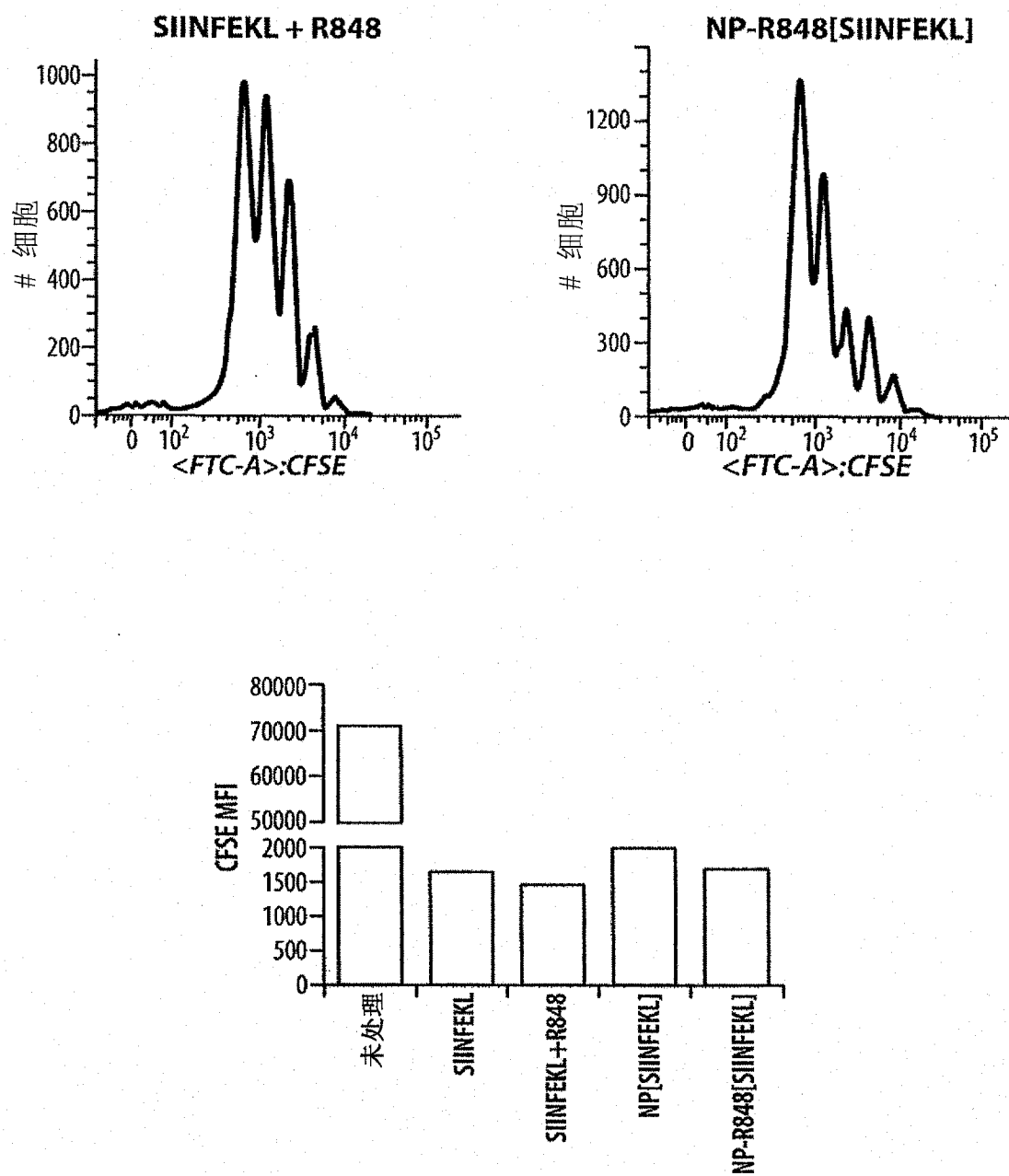


图35

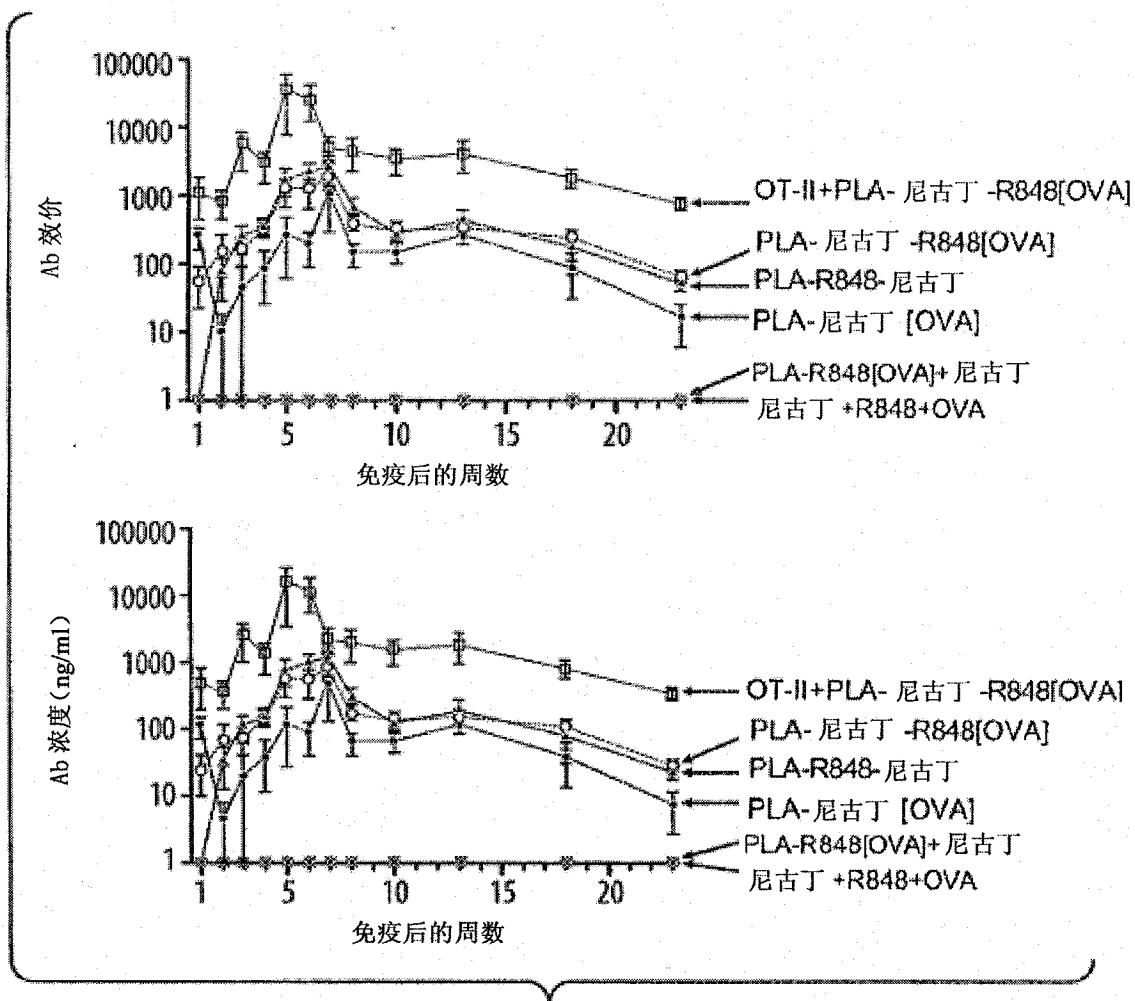


图36

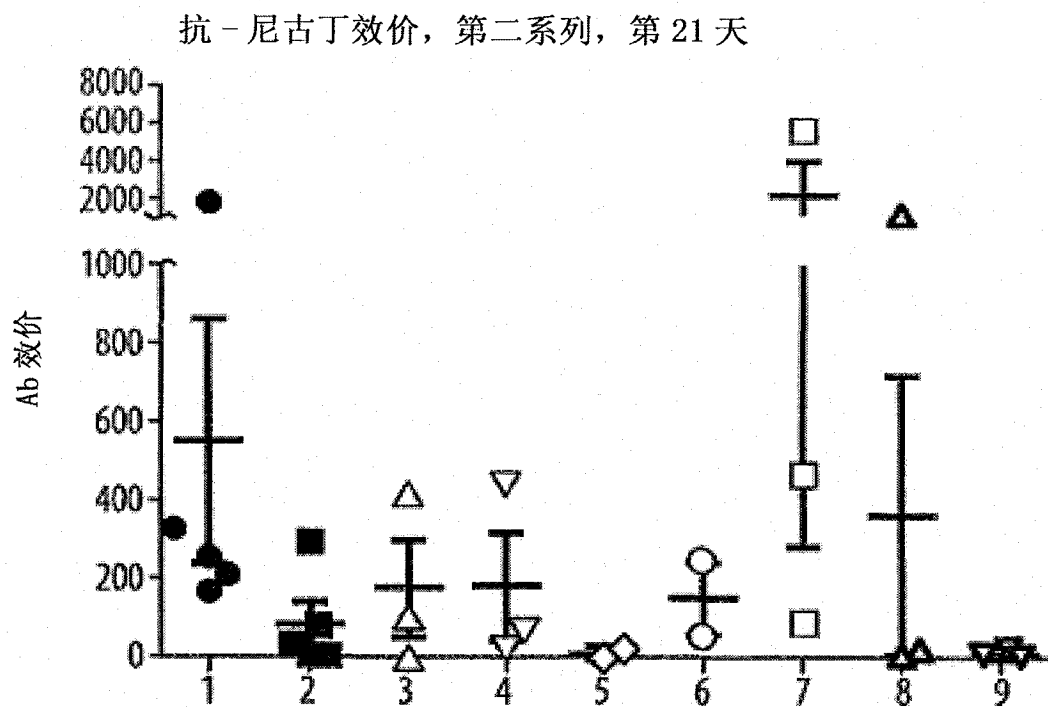


图37

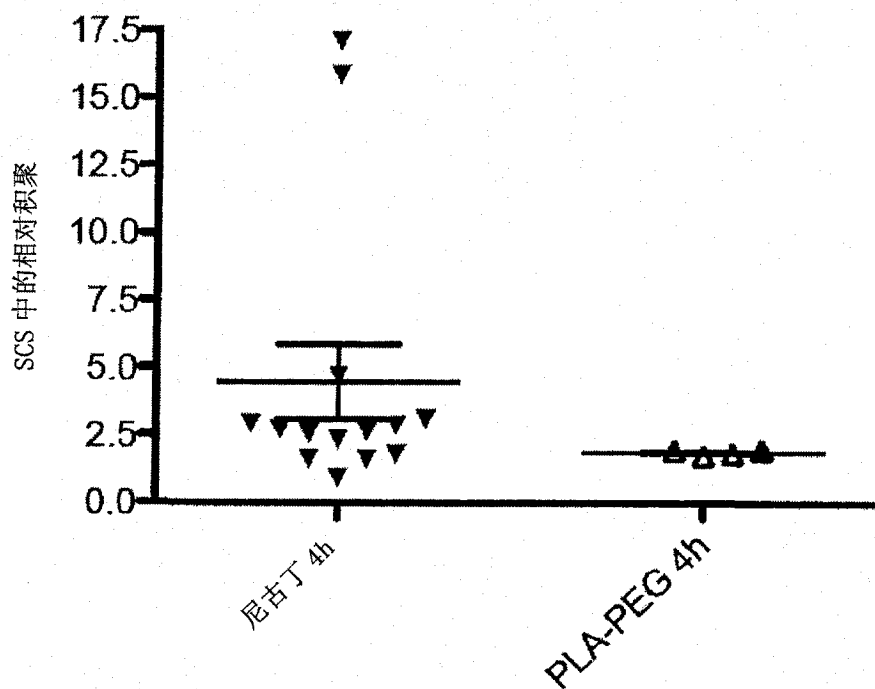


图38A

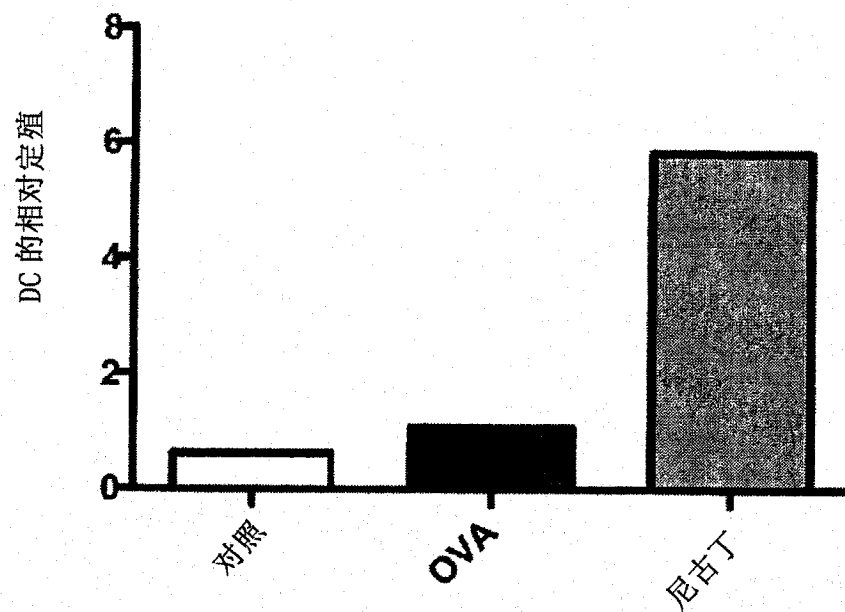


图38B

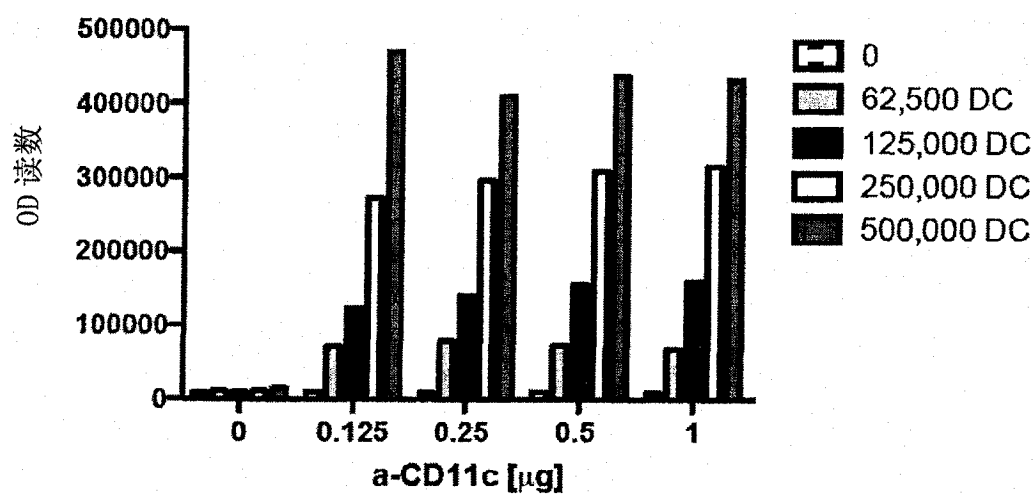


图39A

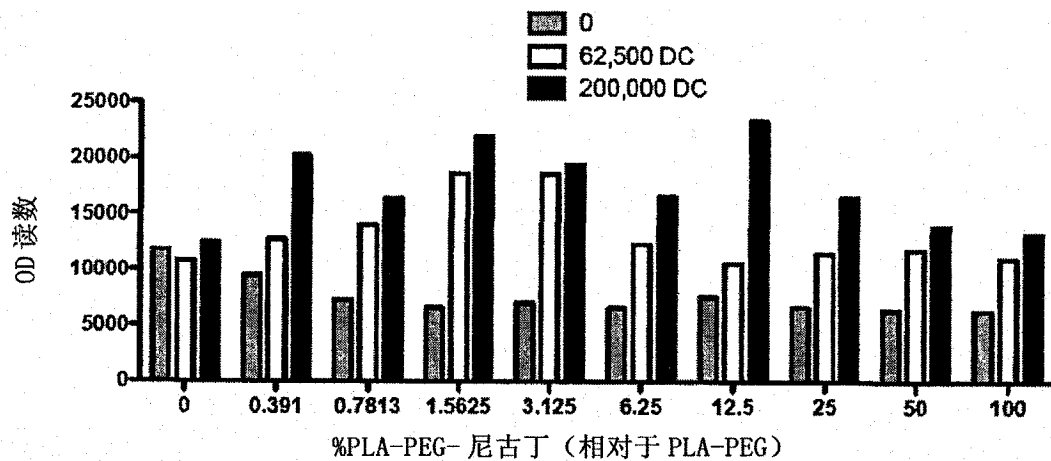


图39B

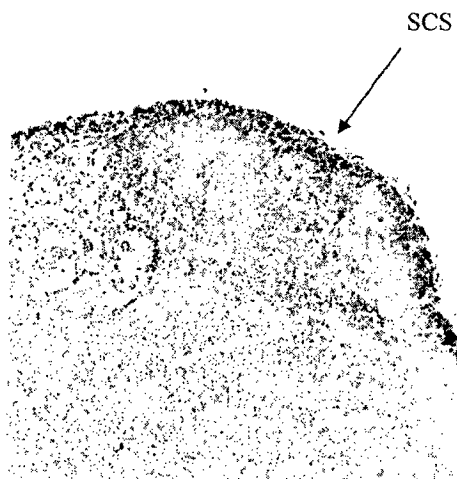


图40A

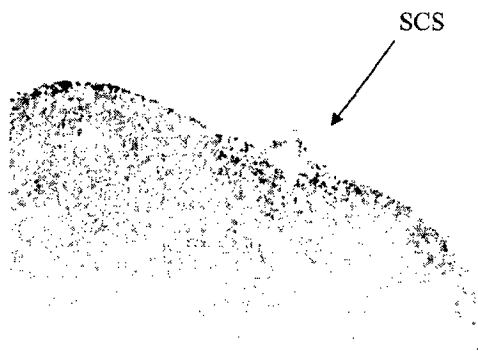


图40B

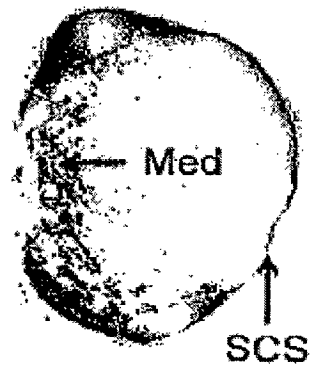


图41A

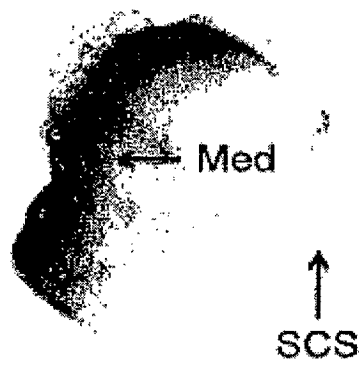


图41B

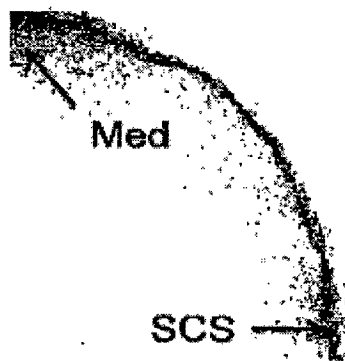


图41C

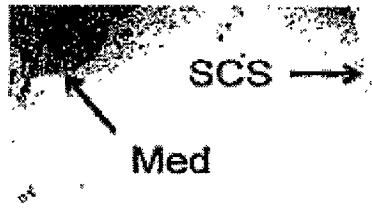


图41D