



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103998058 B

(45) 授权公告日 2021. 11. 05

(21) 申请号 201280059879.6

(22) 申请日 2012.10.05

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 103998058 A

(43) 申请公布日 2014.08.20

(30) 优先权数据
61/544,020 2011.10.06 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2014.06.05

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/CA2012/050705 2012.10.05

(87) PCT国际申请的公布数据
W02013/049941 EN 2013.04.11

(73) 专利权人 免疫疫苗技术有限公司
地址 加拿大,新斯科舍

(72) 发明人 M·曼苏尔 L·D·麦克唐纳

G·M·韦尔 L·萨玛特 K·莎普

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

代理人 赵蓉民 陆惠中

(51) Int.Cl.
A61K 39/39 (2006.01)
A61K 9/127 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01)

(56) 对比文件
CN 101282742 A, 2008.10.08
US 2010209452 A1, 2010.08.19
CN 101815529 A, 2010.08.25

审查员 田颖

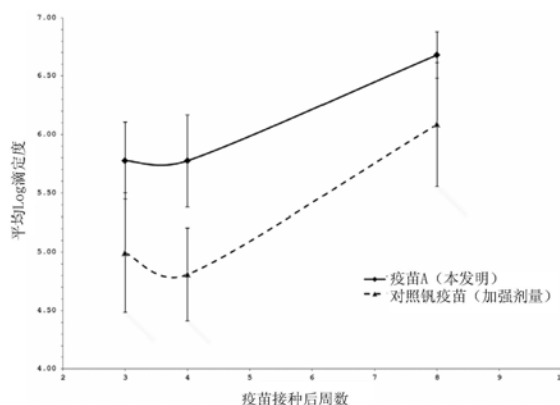
权利要求书1页 说明书32页 附图5页

(54) 发明名称

包括激活或增加TLR2活性的佐剂的脂质体组合物及其应用

(57) 摘要

本发明提供组合物,其包括脂质体、能够诱导体液免疫应答的抗原、包括疏水物质连续相的载体、和激活或增加TLR2活性的佐剂。本发明还提供这种组合物在诱导体液应答中的应用和其用于治疗通过体液免疫应答缓解的疾病、病症或病变的方法。



1. 无水组合物,其用于通过诱导针对传染病的病原体的保护性体液免疫应答而针对所述传染病接种疫苗,所述组合物包括:

包括矿物油连续相的载体;

含有所述病原体的抗原的重构的脂质体,

其中所述抗原包含B细胞表位并且能够诱导体液免疫应答,并且其中所述抗原是多肽或微生物或其部分;

和激活或增加Toll样受体2 (TLR2) 活性的佐剂,其中所述佐剂包括二棕榈酰基-S-甘油基-半胱氨酸-丝氨酸-(赖氨酸) 4 (PAM₂Cys-Ser-(Lys) 4) 或三棕榈酰基-S-甘油基-半胱氨酸-丝氨酸-(赖氨酸) 4 (PAM₃Cys-Ser-(Lys) 4);

和其中所述抗原没有共价或非共价偶联至所述佐剂。

2. 权利要求1所述的组合物,其中所述佐剂通过TLR1/2或TLR2/6的TLR2二聚体激活或增加TLR2的活性。

3. 权利要求1或2所述的组合物,其中所述抗原包括多个B细胞表位。

4. 权利要求1或2所述的组合物,其中所述B细胞表位衍生自病毒或细菌,包括,例如,流感病毒、百日咳杆菌、或炭疽杆菌。

5. 权利要求4所述的组合物,其中所述B细胞表位是H5N1流感病毒的血凝素蛋白的表位、百日咳类毒素蛋白的表位、或炭疽重组保护性抗原的表位,或热失活流感菌株A/PR/8/34 (H1N1) 的表位。

6. 权利要求1至5中任一项所述的组合物,其中所述重构的脂质体含有所述抗原和所述佐剂。

7. 权利要求1至6中任一项所述的组合物,其中所述组合物能够以单剂量诱导体液免疫应答。

8. 权利要求1所述的组合物,其中所述脂质体由磷脂和胆固醇组成。

9. 权利要求1所述的组合物,其中所述载体是处于矿物油溶液中的油酸二缩甘露醇。

10. 权利要求9所述的组合物,其中所述载体是 Montanide® ISA 51。

11. 权利要求1所述的组合物,其中所述脂质体包括S100卵磷脂和胆固醇或二油酰基-磷脂酰胆碱(DOPC) 和胆固醇;所述载体是 Montanide® ISA 51;和所述佐剂是PAM₃Cys-Ser-(Lys) 4。

12. 权利要求11所述的组合物,其中所述抗原选自H5N1重组血凝素蛋白、百日咳类毒素蛋白、炭疽重组保护性抗原和热失活流感菌株A/PR/8/34 (H1N1) 。

包括激活或增加TLR2活性的佐剂的脂质体组合物及其应用

[0001] 相关申请的交叉参考

[0002] 本申请要求2011年10月6日提交的美国临时专利申请号61/544,020的权益和优先权,其全部内容被引入本文作为参考。

发明领域

[0003] 本申请涉及增强抗原特异性抗体在免疫化个体中的生成的疫苗组合物。

[0004] 发明背景

[0005] 疫苗接种引起的免疫应答可被宽泛地分成体液或细胞类型。一般需要体液应答来防止病毒或细菌侵入者,而抗病毒感染细胞和癌细胞的免疫力一般涉及细胞介导的应答。体液免疫力的特征在于B细胞的高水平抗体生成,而细胞免疫力的特征在于细胞毒性CD8T淋巴细胞的激活增加。

[0006] 疫苗诱导的免疫力类型在很大程度上取决于疫苗包括的佐剂类型。基于棕榈酸的佐剂,如二棕榈酰基-S-甘油基-半胱氨酸(PAM₂Cys)和三棕榈酰基-S-甘油基-半胱氨酸(PAM₃Cys)及其变体,已被报道增强抗多种抗原的体液和细胞应答。基于实践原因,这种佐剂的溶解度一般通过添加亲水性非免疫原性氨基酸残基(例如,赖氨酸)被提高。这种佐剂已经与抗原混合,但在多种情况中,棕榈酸系佐剂在给予个体前已被共价连接于抗原。棕榈酸佐剂已经利用脂质体作为载体与抗原被共同递送。蛋白质基和糖基抗原已与棕榈酸佐剂组合,生成抗体和T细胞应答。棕榈酸佐剂对于癌症应用的用途已被充分记载,其中活性主要由细胞应答介导。

[0007] 虽然棕榈酸衍生物被已知增殖B细胞、诱导同型转换、诱导人B淋巴细胞分化成分泌IgG的浆细胞和增加几种共刺激分子(MHC I,II,CD80,等)的表达,但文献中棕榈酸佐剂诱导抗体应答的报道从能够增强抗体应答到不特别有效用于生成这种应答各有不同。

[0008] 因此,仍需要研发生成抗多种抗原的强体液应答的疫苗组合物。本发明提供包含脂质基佐剂并且特别有效用于在免疫化个体中诱导高水平抗体的疫苗组合物。

[0009] 发明概述

[0010] 一方面,提供组合物,包括:脂质体;抗原,其能够诱导体液免疫应答;载体,其包括疏水物质连续相;和佐剂,其激活或增加Toll样受体2(TLR2)活性,例如,通过与TLR2二聚体如TLR1/2或TLR2/6相互作用。

[0011] 在本文描述的组合物实施方式中,佐剂是脂质基佐剂。

[0012] 在本文描述的组合物实施方式中,脂质基佐剂是棕榈酸佐剂。

[0013] 在本文描述的组合物实施方式中,脂质基佐剂包括二棕榈酰基-S-甘油基-半胱氨酸(PAM₂Cys)或三棕榈酰基-S-甘油基-半胱氨酸(PAM₃Cys);或脂质基佐剂是Pam-2-Cys-Ser-(Lys)₄或Pam-3-Cys-Ser-(Lys)₄。

[0014] 在本文描述的另一组合物实施方式中,脂质基佐剂是,或包括:合成二酰化脂蛋白FSL-1(Pam2CGDPKHPKSF)、衍生自唾液支原体(Mycoplasma salivarium)的合成脂蛋白、或来自发酵支原体(Mycoplasma fermentans)的巨噬细胞激活脂肽(MALP-2)。

[0015] 在实施方式中,本发明的组合物可包括本文描述的佐剂组合至少一种其他适当的佐剂。

[0016] 在本文描述的另一组合物实施方式中,抗原是多肽或糖。

[0017] 在本文描述的组合物实施方式中,抗原包括一个B细胞表位或多个B细胞表位。

[0018] 在本文描述的另一组合物实施方式中,抗原是膜表面结合的癌抗原;毒素;过敏原,如花粉;或淀粉状蛋白质。

[0019] 在本文描述的另一组合物实施方式中,脂质体包括磷脂或未酯化胆固醇。

[0020] 在另一实施方式中,本文描述的组合物能够通过单剂量在个体中诱导体液免疫应答。

[0021] 进一步方面,本发明提供用于治疗或预防通过体液免疫应答缓解的疾病或病症的方法,所述方法包括将本文描述的组合物给予个体。

[0022] 另一方面,本发明提供治疗或预防下列的方法:传染病;涉及膜表面结合的癌抗原的癌症;或为了治疗需要隔离循环中的抗原如淀粉状蛋白质的疾病或病症,例如阿尔茨海默氏症,所述方法包括将本文描述的组合物给予个体。

[0023] 另一方面,本发明提供用抗体中和毒素、病毒、细菌或过敏原的方法,所述方法包括将本文描述的组合物给予个体。

[0024] 在本发明的实施方式中,个体在此指代哺乳动物。

[0025] 在本发明的另一实施方式中,个体在此指代人。

[0026] 根据另一方面,本发明涉及试剂盒,其可用于治疗或预防本文描述的疾病或病症,或用抗体中和毒素、病毒、细菌或过敏原,其中试剂盒包括本文描述的组合物及其使用说明。

[0027] 根据另一方面,本发明涉及制备本文描述的本发明组合物的方法。

[0028] 通过结合附图阅读下文对本发明具体实施方式的描述,本发明的其他方面和特征对于本领域技术人员而言是显而易见的。

[0029] 附图简述

[0030] 在仅作为实例来示例本发明实施方式的图中:

[0031] 图1示例由根据本发明制备的疫苗(“疫苗A”)生成的体液免疫应答。两组小鼠($n=8$ 或 9)如下接种疫苗:第1组小鼠用50微升剂量中1微克rHA和1微克Pam-3-Cys-Ser-(Lys) 4的单剂量接种疫苗,其被配制为无水/脂质体/P3C/疏水载体疫苗(疫苗A)。第2组小鼠用每50微升剂量的对照疫苗1微克rHA和50微克矾(alum)治疗;小鼠在疫苗接种后28天加强剂量。如上所述通过ELISA测量体液免疫应答。对于每个治疗组,将端点抗体滴定度的log10值取平均,并计算每个时间点的标准偏差。

[0032] 图2示例单次给予根据本发明制备的疫苗(“疫苗B”)的作用。三组小鼠($n=9$ 或 11)如下接种疫苗:第1组小鼠用50微升剂量中1微克PT和1微克Pam-3-Cys-Ser-(Lys) 4的单剂量接种疫苗,其被配制为无水/脂质体/P3C/疏水载体疫苗(疫苗B)。第2组和第3组小鼠用每100微升剂量的对照疫苗1微克PT和100微克矾治疗;第2组小鼠获得单剂量,第3组小鼠在第21和31天加强剂量。第4组小鼠保持无接种疫苗。使小鼠在疫苗接种后56天受到百日咳杆菌(*Bordetella pertussis*)气雾接种攻击,并在攻击后8和15天建立细菌肺计数。对于每个治疗组,每肺的集落形成单位log10值取平均,并计算每个时间点的标准偏差。

[0033] 图3示例单次给予根据本发明制备的疫苗(“疫苗C”)的作用。两组兔子(N=8)如下接种疫苗:第1组兔子用100微升剂量中8微克rPA和2微克Pam-3-Cys的单剂量接种疫苗,其被配制为脂质体/P3C/疏水载体疫苗(疫苗C)。第2组兔子用每100微升剂量的对照疫苗8微克rPA和350微克氢氧化铝治疗;兔子在疫苗接种后28和84天加强剂量。如上所述通过ELISA测量体液免疫应答。对于每个治疗组,将端点抗体滴定度的log10值取平均,并计算每个时间点的标准偏差。

[0034] 图4示例,本发明的疫苗A——具体地包括抗原、脂质体、棕榈酸佐剂和疏水载体,能够模拟最大免疫原性。四组小鼠(N=10)如下接种疫苗:第1组小鼠用50微升剂量中1微克rHA和1微克Pam-3-Cys的单剂量接种疫苗,其被配制为脂质体/P3C/疏水载体疫苗(疫苗A,本发明)。第2组小鼠用每50微升剂量中1微克rHA和1微克P3C治疗。第3组小鼠用每50微升剂量中1微克rHA和1微克P3C治疗,其被配制为水性/脂质体/P3C疫苗。第4组小鼠用1微克rHA治疗,其被配制为脂质体/疏水载体疫苗。如上所述通过ELISA测量体液应答。对于每个治疗组,将端点抗体滴定度的log10值取平均,并计算每个时间点的标准偏差。

[0035] 图5示例,本发明的疫苗D——包括脂质基佐剂(即,Pam-3-Cys),能够增强对失活病毒疫苗制剂的免疫应答。图(A)显示临床评分,图(B)显示在单次疫苗接种后28天、被A/PR/8/34(H1N1)流感攻击的小鼠的总存活率。第1组小鼠用50微升盐水治疗。第2组小鼠用50微升 2.56×10^3 TCID₅₀A/PR/8/34和矾治疗。第3组小鼠用50微升 2.56×10^3 TCID₅₀A/PR/8/34和1微克Pam-3-Cys治疗,其被配制为脂质体/P3C/疏水载体疫苗(疫苗D)。在病毒攻击后,每天跟踪各小鼠的临床标志,进行10天,并在物理表现、体态、活性水平/行为、体温、体重和水合作用的基础上进行评分。将任何评分>12(总共可能18)的小鼠执行安乐死。

[0036] 图6示例,本发明的疫苗A能够刺激特异性免疫应答,明显强于利用不同佐剂制备的比较疫苗(脂质体/IMQ/疏水载体)。两组小鼠(N=9)如下接种疫苗:第1组小鼠用50微升剂量中1微克rHA和1微克Pam-3-Cys的单剂量接种疫苗,其被配制为脂质体/P3C/疏水载体疫苗(疫苗A)。第2组小鼠用每50微升剂量中1微克rHA和1微克咪喹莫特(Imiquimod)治疗,其被配制为脂质体/IMQ/疏水载体疫苗(对照疫苗)。如上所述通过ELISA测量体液免疫应答。对于每个治疗组,计算端点抗体滴定度的log10值。通过非配对t检验进行统计学分析, $P < 0.005$ 。

[0037] 图7示例,Pam3Cys和Pam2Cys均能够诱导有效的B细胞增殖。在抗Ig&抗CD40存在的情况下用三种不同浓度的Pam2Cys(A)、Pam3Cys(B)、Poly I:C(C)或LPS(D)体外刺激从C57BL6小鼠纯化的B细胞三天。通过 $[^3\text{H}]$ -胸苷掺入测量增殖,并以每分钟计数(CPM)定量。 $N = 2-10$,通过ANOVA进行统计学分析。

[0038] 发明详述

[0039] 疫苗诱导的免疫力类型在很大程度上取决于疫苗包括的佐剂类型。这种应答的量级和持续时间取决于所用佐剂类型以及将抗原和佐剂呈递至免疫系统的组合物或方法。例如,活减毒病毒可用于递送目标抗原的基因,然后该目标抗原在体内生成,从而容易被抗原呈递细胞呈递;脂质体可用于将抗原和佐剂直接共同递送至抗原呈递细胞,以使免疫应答优于裸抗原和佐剂的能力。

[0040] 本发明提供这样的疫苗组合物:其应用激活或增加TLR2活性的佐剂,从而生成出乎预料地强烈的抗体应答。在一些实施方式中,本发明的疫苗组合物能够以如单剂量的小

剂量保护个体免受致病剂影响,而如本文实例所示,对照疫苗不能够产生这种抗体水平并且不能够以同等程度保护接种疫苗的个体。

[0041] 本发明的组合物,其组合能够诱导体液免疫应答的抗原、激活或增加TLR2活性的佐剂、脂质体和包括疏水物质连续相的载体,其提供的抗体滴定度惊人地高于水性铝基对照组合物。另外,单剂量的本发明组合物能够有效地保护小鼠免遭细菌攻击,并使其完全清除肺部感染,这对于水性铝基对照组合物而言是观察不到的。

[0042] 利用本发明所述组合物的组分(例如,实施例1至4)通过至少一种免疫化产生稳健而持久的体液免疫应答的能力说明了这些组合物在宽范围医疗用途——如例如本文描述的那些——中的具体有用性。如本文实例所示,本发明的组合物可在至少早如免疫化后三周产生强烈的和增强的免疫应答,并且免疫应答持久,其中抗体滴定度保持高至少免疫化后24周(例如,图3)。

[0043] 本发明的组合物——包括抗原、脂质体、激活或增加TLR2活性的佐剂、和包括疏水物质连续相的载体,可产生稳健而持久的体液免疫应答。例如,本文实施例4中描述的数据显示,第1组(本发明的疫苗)小鼠产生的抗体滴定度显著高于无脂质体(第2组)、无疏水载体(第3组)、或无脂质基佐剂(第4组)的对照组小鼠产生的抗体滴定度。

[0044] 因此,本发明的包含脂质基佐剂的疫苗组合物能够在免疫化个体中生成强体液免疫应答,和高水平抗体生成。

[0045] 本文描述的组合物可有效用于治疗或预防通过体液免疫应答(例如涉及B-细胞和抗体生成)缓解的疾病和/或病症。组合物在需要将抗原给予个体以诱导体液免疫应答或抗体生成的任何情况获得应用。

[0046] 如本文所用,“诱导”免疫应答是引起和/或加强免疫应答。诱导免疫应答包括这样的情况:使免疫应答相对于在前免疫应答状态——例如给予本发明的组合物前——增强、升高、提高或强化至对宿主的益处。

[0047] 体液免疫应答,与细胞介导的免疫力相反,由B淋巴细胞系的细胞(B细胞)生成的分泌抗体介导。这种分泌的抗体结合于抗原——如例如外源物质和/或病原体(例如,病毒、细菌、等)表面上的那些,并将其标记,以进行破坏。

[0048] “抗体”是包括由免疫球蛋白基因或免疫球蛋白基因片段基本上或部分编码的一个或多个多肽的蛋白质。公认的免疫球蛋白基因包括 κ 、 λ 、 α 、 γ 、 δ 、 ϵ 和 μ 恒定区基因以及各种免疫球蛋白可变区基因。轻链分成 κ 或 λ 。重链分成 γ 、 μ 、 α 、 δ 、或 ϵ ,其进而分别限定免疫球蛋白种类IgG、IgM、IgA、IgD和IgE。典型的免疫球蛋白(抗体)结构单元包括包含四个多肽的蛋白质。各抗体结构单元由相同的两对多肽链组成,各对具有一条“轻”链和一条“重”链。各链的N端限定可变区,其主要负责抗原识别。抗体结构单元(例如,IgA和IgM类)还可相互和与另外的多肽链组装成低聚形式,例如,与J链多肽结合,组装成IgM五聚体。

[0049] 抗体是被称为B淋巴细胞(B细胞)的血液白细胞亚组的抗原特异性糖蛋白产物。抗原与B细胞表面表达的抗体的结合可诱导抗体应答,包括刺激B细胞激活、进行有丝分裂和最终分化成浆细胞,其特化为合成和分泌抗原特异性抗体。

[0050] B细胞是免疫应答期间唯一的抗体生产者,因此是有效体液免疫力的关键要素。除生成大量抗体外,B细胞还充当抗原呈递细胞,并且可将抗原呈递至T细胞,如T辅助CD4或细胞毒性CD8,因此增殖免疫应答。B细胞以及T细胞,是适应性免疫应答的部分,而适应性免疫

应答对于疫苗效力而言是必不可少的。在通过疫苗接种或自然感染诱导的主动免疫应答期间,抗原特异性B细胞被激活和无性扩张。在扩张期间,B细胞进化,从而对表位具有较高亲和力。B细胞的增殖可由激活的T辅助细胞间接诱导,也可通过受体如Toll样受体(TLRs)刺激被直接诱导。

[0051] 抗原呈递细胞,如树突细胞和B细胞,被布置在疫苗接种位点,并且可与抗原和疫苗包含的佐剂相互作用。佐剂刺激细胞激活,并且抗原提供目标(靶)的蓝图。不同类型的佐剂向细胞提供不同的刺激信号。例如,Polyl I:C (TLR3激动剂)可激活树突细胞,而非B细胞。佐剂,如Pam3Cys、Pam2Cys和FSL-1,尤其适于激活和启动B细胞增殖,其被预期促进抗体应答产生(Moyle et al., Curr Med Chem, 2008; So., J Immunol, 2012)。

[0052] 如本文所用,术语“抗体应答”是指响应抗原在个体体内的引入,个体体内的抗原特异性抗体量增加。

[0053] 一种评价抗体应答的方法是测量抗体与具体抗原的反应性的滴定度。这可利用多种本领域已知的方法进行,如得自动物的含抗体物质的酶联免疫吸附分析(ELISA)。例如,可在暴露于抗原之前和之后确定个体内结合于具体抗原的血清抗体的滴定度。暴露于抗原后抗原特异性抗体的滴定度的统计学显著增加将指示个体已具有对抗原的抗体应答。

[0054] 其他可用于检测抗原特异性抗体是否存在的分析非限制性地包括免疫学分析(例如,放射免疫分析(RIA)、免疫沉淀分析、和蛋白质印迹(例如,Western印迹)分析;和中和分析(例如,体外或体内分析中的病毒感染性中和)。

[0055] 本发明的组合物,通过刺激强抗体应答,能够防止个体罹患与能够诱导体液免疫应答的抗原有关的疾病、病症或病变。

[0056] 非限制性地,这包括例如,传染病、涉及抗体识别的膜表面结合的癌抗原的癌症、需要隔离循环中的抗原如淀粉状蛋白质的疾病(例如阿尔茨海默氏症);用抗体中和毒素;用抗体中和病毒或细菌;或中和过敏原(例如花粉)以治疗过敏。

[0057] 本文所述的“体液免疫应答”涉及抗体生成和其伴随的附属过程,如例如,T辅助2(Th2)细胞激活和细胞因子生成、同型转换、亲和力成熟和记忆细胞激活。其还指代抗体的效应器功能,如例如毒素中和、典型补体激活和促进吞噬作用和病原体清除。CD4+Th2细胞辅助体液免疫应答,因此该细胞类型的激活或生成也指示本文所述的体液免疫应答。

[0058] 本文所述的“体液免疫应答”还可包括T辅助17(Th17)细胞的生成和/或激活。Th17细胞是辅助-效应T淋巴细胞亚组,其特征在于分泌宿主防卫细胞因子,如IL-17、IL-17F和IL-22。Th17细胞被认为与Th1和Th2细胞在发育方面有所不同,并且已被假设促进体液免疫应答,如例如,在抗微生物免疫力和防止感染中提供重要作用。其生成IL-22,被认为刺激上皮细胞生成抗微生物蛋白质,并且IL-17的生成可能涉及嗜中性白细胞的募集、激活和迁移,从而防止宿主被不同细菌和真菌属感染。

[0059] 体液免疫应答是有效传染病疫苗的主要机制。但是,体液免疫应答还可有效用于抵抗癌症。与癌症疫苗——其被设计以生成可识别和破坏癌细胞的细胞毒性CD8T细胞应答——不同,B细胞介导的应答可通过其他机制靶向癌细胞,该其他机制可在一些情况下协同细胞毒性CD8T细胞以获得最大效益。B细胞介导的(例如体液免疫应答介导的)抗肿瘤应答的机制的实例非限制性地包括:1) B细胞生成的抗体,其结合于影响肿瘤发生的肿瘤细胞或其他细胞上发现的表面抗原。这种抗体可例如通过抗体依赖性细胞介导的细胞毒性

(ADCC)或补体结合来诱导靶细胞被杀死,潜在地导致可被免疫系统识别的另外的抗原释放;2)结合于肿瘤细胞上的受体以阻止其刺激和事实上中和其效应的抗体;3)结合于由肿瘤或肿瘤相关细胞释放的或与肿瘤或肿瘤相关细胞相关的因子以调节支撑癌症的信号传导或细胞路径的抗体;和4)结合于胞内靶标并通过当前未知的机制介导抗肿瘤活性的抗体。

[0060] 若干方法可用于证明疫苗接种后体液免疫力的诱导。这些可被广泛地分成检测下列:i)特异性抗原呈递细胞;ii)特异性效应细胞及其功能;和iii)可溶性介体如细胞因子的释放。

[0061] i) 抗原呈递细胞:树突细胞和B-细胞(在范围较小时,巨噬细胞)装配有使T细胞激活增强的特殊免疫刺激受体,并且被称为专属抗原呈递细胞(APC)。感染或疫苗接种后这些细胞上的这些免疫刺激分子(也被称为共刺激分子)在抗原呈递至效应细胞如CD4和CD8细胞毒性T细胞的过程中被上调。可通过利用流式细胞计来检测这种共刺激分子(如CD80、CD86、MHC I类或MHC II类),其中荧光染料结合抗体连同特异性识别APC的抗体(如树突细胞的CD11c)指向这些分子。

[0062] ii) CD4+“辅助”T-细胞:CD4+淋巴细胞,或辅助T细胞,是免疫应答介体,并且在建立和最大化适应性免疫应答能力方面具有重要作用。这些细胞无细胞毒性或吞噬细胞活性;并且无法杀死感染细胞或清除病原体,但实质上通过引导其他细胞进行这些工作来“管理”免疫应答。两类效应CD4+T辅助细胞应答可由专属APC诱导,该专属APC被命名为Th1和Th2,分别被设计以消除不同类型的病原体。

[0063] 辅助T细胞表达识别结合于II类MHC分子的抗原的T-细胞受体(TCR)。天然辅助T-细胞的激活使其释放细胞因子,该细胞因子影响多种细胞类型的活性,包括将其激活的APC。两种Th细胞群,Th1和Th2,其区别在于生成的效应蛋白(细胞因子)模式。通常,Th1细胞通过激活巨噬细胞和细胞毒性T-细胞来协助细胞免疫应答;而Th2细胞通过刺激B细胞转化成浆细胞和通过形成抗体促进体液免疫应答。Th2类细胞调节的应答可显著增加小鼠体内IgG1(人体内IgG2)的生成。Th1或Th2应答相关细胞因子的测量将给出成功疫苗接种的测量。这可通过如下实现:特异性ELISA,其被设计用于Th1-细胞因子,如IFN- γ 、IL-2、IL-12、TNF- α 等,或Th2-细胞因子,如IL-4、IL-5、IL10等。

[0064] 另一Th细胞群是Th17细胞。Th17细胞相关的细胞因子测量也可给出成功疫苗接种的测量。这可例如通过特定ELISA实现,该ELISA被设计用于Th17细胞因子,如IL-17、IL-17F和IL-22。

[0065] iii) 细胞因子测量:从局部淋巴结释放的细胞因子的测量给出成功免疫化的良好指示。由于APC和免疫效应细胞如CD4和CD8T细胞的抗原呈递和成熟,若干细胞因子被淋巴结细胞释放。通过在抗原存在的情况下体外培养这些LNC,抗原特异性免疫应答可通过如下检测:测量是否释放用于检测体液免疫应答的某些重要细胞因子如IL-4、IL-5、和IL10。这可利用培养物上清液和重组细胞因子作为标准品、通过ELISA进行。

[0066] 成功的免疫化可进一步以技术人员已知的多种其他方式确定,该方式包括但不限于,血凝抑制(HAI)和血清中和抑制分析,以检测功能性抗体;攻击研究,其中用相关病原体攻击疫苗接种个体,以确定疫苗接种的效力;和荧光激活细胞分类(FACS)应用,以确定表达特定细胞表面标记物的细胞群——例如在激活或记忆淋巴细胞的识别中。而且,刺激体液

免疫应答的疫苗效力可通过ELISA检测免疫化个体的血清中的抗原特异性抗体水平来进行评估。技术人员还可利用其他已知的方法确定本发明组合物的免疫化是否引起体液(或抗体介导的)应答。参见,例如,Current Protocols in Immunology Coligan et al.,ed. (Wiley Interscience,2007)。术语“传染病”,如本文所用,可例如指代病原性生物体(pathogenic biological agents)的感染、存在和/或生长所导致的任何可传染疾病、传染性疾病或可传播疾病。非限制性地,感染性病原体可包括例如病毒、细菌、真菌、原生动物和寄生虫。传染病的非限制性实例包括流感(例如,被流感病毒感染)、呼吸道感染如例如细支气管炎和肺炎(例如,被呼吸道合胞体病毒感染)、百日咳(pertussis或whooping cough)(例如,被百日咳杆菌感染)、炭疽(例如,被炭疽杆菌(*Bacillus anthracis*)感染)和疟疾(例如,被三日疟原虫(*Plasmodium malariae*)、镰状疟原虫(*Plasmodium falciparum*)、间日疟原虫(*Plasmodium vivax*)、卵形疟原虫(*Plasmodium ovale*)或诺尔斯氏疟原虫(*Plasmodium knowlesi*)感染)。

[0067] 如本文所用,术语“癌症”、“癌细胞”、“肿瘤”和“肿瘤细胞”(可互换使用)指代呈现异常生长的细胞,其特征在于细胞增殖显著失控;或永生化细胞。术语“癌症”或“肿瘤”包括转移性以及非转移性癌症或肿瘤。癌症可利用本领域普遍接受的标准进行诊断,包括恶性肿瘤的存在。

[0068] “毒素”,如本文所用,指代由能够导致疾病或病变的活细胞或生物体(例如植物、动物、微生物、等)生成的任何物质,或感染性物质,或能够产生反作用的重组或合成的分子。毒素可以是例如小分子、肽、或蛋白质。毒素包括药物物质,如例如,可卡因。

[0069] “过敏原”,如本文所用,指代可导致过敏的任何物质。过敏原和可非限制性地衍生自细胞、细胞提取物、蛋白质、多肽、肽、多糖、多糖结合物、多糖和其他分子的肽和非肽模拟物、小分子、脂质、糖脂、和植物糖、动物、真菌、昆虫、食物、药物、灰尘和螨类。过敏原包括但不限于环境气源性过敏原;植物花粉(例如豕草/枯草热);杂草花粉过敏原;草花粉过敏原;约翰逊草(*Johnson grass*);树花粉过敏原;黑麦草;蜘蛛过敏原(例如屋尘螨过敏原);仓储螨过敏原;日本雪松花粉/枯草热;霉菌/真菌孢子过敏原;动物过敏原(例如,犬、豚鼠、仓鼠、沙鼠、大鼠、小鼠,等,过敏原);食物过敏原(例如甲壳类;坚果;柑桔类水果;面粉;咖啡);昆虫过敏原(例如跳蚤、蟑螂);毒物:(膜翅目(Hymenoptera),小黄蜂(yellow jacket)、蜜蜂、黄蜂、马蜂、火蚁);细菌过敏原(例如链球菌抗原;寄生虫过敏原,如蛔虫抗原);病毒抗原;药物过敏原(例如青霉素);激素(例如胰岛素);酶(例如链激酶);和能够充当不完全抗原或半抗原的药物或化学物质(例如酸酐和异氰酸酯)。

[0070] 当半抗原用于本发明的组合物时,其可连接于载体,如例如蛋白质,以形成半抗原-载体加合物。半抗原-载体加合物能够引起体液免疫应答,而半抗原本身不引起抗体生成。半抗原的非限制性实例是苯胺、漆酚(毒藤的毒素)、肼苯哒嗪(hydralazine)、荧光素、生物素、狄戈辛昔元和二硝基酚。

[0071] 本文所述的“治疗”(treating或treatment),或“预防”(preventing或prevention)指代获得有益或理想结果——包括临床结果——的方法。有益或理想临床结果可包括但不限于,减轻或缓解一种或多种症状或情况、降低疾病程度、稳定疾病状况、防止疾病发展、防止疾病蔓延、延迟或减缓疾病进程、延迟或减缓疾病发作、赋予抗致病体保护免疫力以及缓解或缓和疾病状况。“治疗”或“预防”还可意为延长患者生命超过无治疗情

况下的预期,并且还可为暂时抑制疾病进程,虽然更优选地,其涉及预防疾病发生,如通过预防个体感染。

[0072] 待治疗的对象可以是任何脊椎动物,优选哺乳动物,更优选人。

[0073] 佐剂

[0074] 本发明组合物的适当佐剂是激活或增加TLR2活性的佐剂。在一些实施方式中,佐剂是脂质基佐剂,其包括任何包含至少一种脂质部分或脂质组分的佐剂。

[0075] 如本文所用,表述“脂质部分”或“脂质组分”指代任何脂肪酸(例如脂肪酰基)或其衍生物,包括例如甘油三酯、甘油二酯和甘油单酯。示例性脂肪酸非限制性地包括棕榈酰基、肉豆蔻酰基、硬脂酰基和癸酰基或任何C2至C30饱和或不饱和脂肪酰基,优选任何C14至C22饱和或不饱和脂肪酰基,更优选C16饱和或不饱和脂肪酰基。因此,如本文所述,表述“脂质基佐剂”包括任何包含脂肪酰基或其衍生物的佐剂。

[0076] 本发明的脂质基佐剂在最低限度上包含至少一种脂质部分或合成/半合成的脂质部分类似物,其可偶联到氨基酸、寡肽或其他分子(例如,糖、聚糖、多糖、生物素、若丹明等)上。因此,非限制性地,脂质基佐剂可以是,例如,脂氨基酸、脂肽、脂聚糖、脂多糖或脂磷壁酸。此外,脂质部分或包含脂质部分的结构可共价或非共价偶联至抗原,生成具有内在佐剂性质的抗原性化合物。例如并且非限制性地,脂质基部分可包括阳离子(例如镍),为非共价偶联提供正电荷。

[0077] 在一些实施方式中,脂质部分或脂质组分可以是天然存在的,如例如细胞壁组分(例如脂蛋白)——来自革兰氏阳性或革兰氏阴性细菌、绿色红假单胞菌(*Rhodopseudomonas viridis*)或支原体。在其他实施方式中,脂质部分或脂质组分可以是合成或半合成的。

[0078] 脂质基佐剂可包括棕榈酸(PAM),作为佐剂的脂质部分或组分中的至少一种。这种脂质基佐剂在本文中被称为“棕榈酸佐剂”。棕榈酸是在大肠杆菌(*Escherichia coli*)的免疫学反应性Braun脂蛋白中发现的低分子量脂质。棕榈酸的其他常用化学名称包括,例如,在IUPAC命名法中的十六烷酸和1-十五烷羧酸。棕榈酸的分子式是 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{CO}_2\text{H}$ 。本领域技术人员将理解,棕榈酸的脂质链可被改变。本文中可用作棕榈酸佐剂的示例性化合物及其合成方法,被述及于例如美国专利公开US2008/0233143;US2010/0129385;和US2011/0200632,其公开内容被引入本文。

[0079] 如上关于脂质部分所述,通常,棕榈酸佐剂在最低限度上包含至少一种棕榈酸部分,其可偶联到氨基酸、寡肽或其他分子上。棕榈酸部分或包含棕榈酸的结构可共价或非共价偶联至抗原,生成具有内在佐剂性质的抗原性化合物。棕榈酸部分或包含棕榈酸的化学结构可结合于半胱氨酸肽(Cys),从而能够实现佐剂的不同结构构型,包括线性和分支结构。半胱氨酸残基通常通过极性残基——如在C端的丝氨酸(Ser)和/或赖氨酸(Lys)——延伸,生成溶解度提高的佐剂化合物。包含佐剂化合物的棕榈酸可与抗原混合,通过非共价相互作用与抗原连接,或可选地直接地或利用连接体/间隔体共价连接于抗原,以产生增强的免疫应答。最常见地,两个棕榈酸部分连接于甘油骨架和半胱氨酸残基,以生成二棕榈酰基-S-甘油基-半胱氨酸(PAM_2Cys)或三棕榈酰基-S-甘油基-半胱氨酸(PAM_3Cys),其也可用于上述多种构型。

[0080] 已知棕榈酸佐剂激活B细胞,导致抗体快速增殖和生成。B细胞识别在疫苗制剂中

与佐剂共同递送的抗原,并且通过亲和力成熟,将增殖并且增加对抗原的特异性。已知激活的B细胞分泌大量可结合于血液中存在可溶性靶如细菌的可溶性免疫球蛋白抗体。抗体的效应器功能是i) 调理作用;ii) 抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC);iii) 补体激活;iv) 中和。虽然大部分B细胞将长成抗体分泌浆细胞,但部分将分化成在免疫应答已经控制感染后存留的记忆B细胞。这提供长期免疫力,抵抗以后对病原体的暴露。理想地,预防性疫苗应诱导强记忆B细胞群。

[0081] 因此,在实施方式中,本发明组合物的佐剂是任何类型的包括棕榈酸部分或组分的佐剂。棕榈酸部分可被修饰或调整,以提高其体外或体内稳定性,增强其与受体(如例如, Toll样受体,如下所述)结合或增强其生物活性。

[0082] 在具体实施方式中,棕榈酸佐剂可包括PAM₂Cys。

[0083] 在另一具体实施方式中,棕榈酸佐剂可包括PAM₃Cys。

[0084] 在另一具体实施方式中,棕榈酸佐剂可以是Pam-2-Cys-Ser-(Lys)₄或Pam-3-Cys-Ser-(Lys)₄。这种棕榈酸佐剂可例如作为研究试剂获自EMC Microcollections GmbH(德国)和InvivoGen(San Diego, California, USA)。

[0085] 还可获自EMC Microcollections的是Pam-2-Cys-Ser-(Lys)₄和Pam-3-Cys-Ser-(Lys)₄的不同类似物,包括标记类似物。这些类似物被包括在本文中,并且非限制性地包括:PAM₃Cys-SK₄(β-照射)、R-PAM₃Cys-SK₄、S-PAM₃Cys-SK₄、PAM₃Cys-SK₄(生物素-Aca-Aca)、PAM₃Cys-SK₄(荧光素-Aca-Aca)、PAM₃Cys-SK₄(若丹明-Aca-Aca)、PAM₃Cys-SK₄-FLAG-标记、PHC-SK₄、PHC-SK₄(生物素-Aca-Aca)、PAM₃Cys-SSNAKIDQLSSDVQT、PAM₃Cys-SSNKSTTGSGETTTA、PAM₃Cys-SSTKPVSQDTSPKPA、PAM₃Cys-SSGSKPSGG PLPDAK、PAM₃Cys-SSGNKSAPSSASSS、PAM₃Cys-GSHQMKSEGHANMQL、PAM₃Cys-SSSNDAAGNGAAQT、PAM₃Cys-KQNVSSLDEKNSVSV、PAM₃Cys-NNSGKDGNTSA NSAD、PAM₃Cys-NNGGPELKSDEVAKS、PAM₃Cys-SQEPAAPAAEATPAG、PAM₃Cys-SSSKSSDSSAPKAYG、PAM₃Cys-AQEKEAKSELDDYDQT、Pam₂Cys-SK₄(RR和RS立体异构体混合物)、R-Pam₂Cys-SK₄(RR立体异构体)、S-Pam₂Cys-SK₄(RS立体异构体)、PamCys(Pam)-SK₄、Pam₂Cys-SK₄(生物素-Aca-Aca)-NH₂、Pam₂Cys-SK₄(荧光素-Aca-Aca)-NH₂、Pam₂Cys-SK₄(若丹明-Aca-Aca)-NH₂和PAM₂Cys-SK₄-FLAG-标记。在适当时,可作为立体化学限定的化合物或作为立体异构体混合物使用棕榈酸佐剂或其类似物。

[0086] 佐剂是激活或增加Toll样受体(TLRs)活性的佐剂,优选激活或增加TLR2活性。如本文所用,“激活”或“增加”TLR活性的佐剂包括任何佐剂,在一些实施方式中包括脂质基佐剂,其充当TLR激动剂。进一步,激活或增加TLR2活性包括其任何单体、同型二聚体或异型二聚体形式的激活,并且尤其包括TLR2——作为与TLR1或TLR6的异型二聚体(即,TLR1/2或TLR2/6)——激活,,如下文进一步详细描述。

[0087] TLRs是一保守族的跨膜受体,其主要被发现于白细胞如树突细胞(DCs)和巨噬细胞,专属抗原呈递细胞上。TLRs已特异性地进化,以识别和诱导对病原体相关分子模式免疫应答,该病原体相关分子模式如例如细菌脂蛋白和脂肽和病毒双链RNA。在小鼠和人体内已确定10种以上不同的TLRs,虽然其中一些的配体和信号传导路径还未知(参见下文表1)。人体内有13种TLRs已被确定,编号1至13。

受体	激动剂类型	适配分子	细胞位置	激动剂实例
TLR1/2	细菌脂肽	MyD88	表面	Pam3Cys
TLR3	dsRNA	TRIF	胞内	Poly I:C
TLR4	脂多糖	MyD88/TRIF	表面	LPS, MPL
TLR5	蛋白质	MyD88	表面	鞭毛蛋白
[0088] TLR2/6	细菌二酰基脂肽	MyD88	表面	酵母聚糖, Pam2Cys
TLR7	ssRNA	MyD88	胞内	咪喹莫特, 洛索立宾
TLR8	ssRNA, 小分子合成化合物	MyD88	胞内	瑞喹莫德, R848
TLR9	非甲基化 DNA	MyD88	胞内	CpG

[0089] TLR一般形成同型二聚体,而TLR2例外,其与TLR1或TLR6形成异型二聚体,导致配体特异性不同。TLR2介导下游信号传导,因此这些异型二聚体通常被统称为TLR2 (Takeuchi, O. and S. Akira, Cell, 2010, 140 (6) : p. 805-20)。TLR对DC的刺激导致MHC和共刺激分子上调,其增强这些细胞的抗原呈递功能,以及Th1型细胞因子的生成和交叉呈递的促进 (Lahiri et al., Vaccine, 2008, 26 (52) : p. 6777-83; Welters et al., Vaccine, 2007, 25 (8) : p. 1379-89; Matsumoto et al., Adv Drug Deliv Rev, 2008, 60 (7) : p. 805-12; Blander, J.M., Ann Rheum Dis, 2008, 67 Suppl 3 : p. iii44-9)。由于通过TLR刺激对于增加免疫应答具有直接影响,TLR激动剂已被研究作为可能的佐剂 (Barchet et al., Curr Opin Immunol, 2008, 20 (4) : p. 389-95)。

[0090] TLR具有保守细胞溶质区,该保守细胞溶质区被称为Toll-白介素1受体 (TIR),其与促进导致细胞激活的下游信号传导路径的适配分子联接。TLR可通过其所联接的适配蛋白MyD88或TRIF被宽泛地分类。单独的TLR4可通过两路径进行信号传导。两信号传导路径会合于激活转录因子NF-KB (Ouyang et al., Biochem Biophys Res Commun, 2007, 354 (4) : p. 1045-51)。若干研究已经证明,虽然不同TLR共同具有一些下游信号传导分子,但各受体产生独特的促炎性介体特征 (Welters et al., Vaccine, 2007, 25 (8) : p. 1379-89; Seya et al., Evid Based Complement Alternat Med, 2006, 3 (1) : p. 31-8 and discussion 133-7; Ghosh et al., Cell Immunol, 2006, 243 (1) : p. 48-57; Re, F. and Strominger, J.L., J Immunol, 2004, 173 (12) : p. 7548-55; Avril et al., J Immunother, 2009, 32 (4) : p. 353-62)。TLR受体的整个下游路径未被完全阐明,但激活差异可能是源于配体强度、受体的亚细胞位置、细胞类型和干扰素调节因子 (IRF) 的存在。

[0091] 棕榈酸佐剂已被报道通过Toll样受体2 (TLR2) 进行信号传导。例如, PAM₂Cys通过异型二聚体TLR2和TLR6识别。另作为实例, PAM₃Cys——通过异型二聚体TLR1和TLR2识别——引发抗细菌应答,该抗细菌应答的特征在于体液活性。相反,来自病毒的双链RNA通过TLR3识别,并且诱导抗病毒应答,通常该抗病毒应答的特征在于干扰素释放和T细胞活性。介导细胞应答已被与TLR2关联。

[0092] Pam₃Cys已在多种动物模型中和人I期临床试验中得到测试,未报道有副作用 (Moyle, P.M. and Toth, I., Curr Med Chem, 2008, 15 (5) : p. 506-16; Wiedemann et al., J

Pathol, 1991, 164 (3) : p. 265-71)。在对于鼠类DC的TLR激动剂筛选中, Pam₃Cys体外刺激生成高水平的促炎性细胞因子IL-12p40、IL-6和TNF α , 该高水平促炎性细胞因子的获得相对于其他测试TLR激动剂仅利用少量佐剂(Welters et al., Vaccine, 2007, 25 (8) : p. 1379-89)。

[0093] 本领域技术人员将理解, 本发明包括激活或增加TLR活性或充当TLR激动剂的佐剂, 具体地, 脂质基佐剂。在具体实施方式中, 脂质基佐剂激活或增加TLR2活性。非限制性地, 这种脂质基佐剂可以是激活或增加TLR活性的棕榈酸佐剂, 如包括PAM₂Cys或PAM₃Cys的棕榈酸佐剂。

[0094] 其他可用作本发明组合物中的脂质基佐剂的示例性TLR2激动剂非限制性地包括细胞壁组分, 如革兰氏阳性细菌的脂磷壁酸和脂蛋白和分枝杆菌的脂阿糖甘露聚糖。这些细胞壁组分中的多种可购自InvivoGen (San Diego, California, USA), 如耻垢分枝杆菌 (*M. smegmatis*) 的脂阿糖甘露聚糖 (LAM-MS), 耻垢分枝杆菌的脂甘露聚糖 (LM-MS), 牙龈卟啉单胞菌 (*P. gingivalis*) 的脂多糖 (LPS-PG Ultrapure), 和枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) 的脂磷壁酸 (LTA-BS) 和金黄色葡萄球菌 (*S. aureus*) 的脂磷壁酸 (LTA-SA)。在一些实施方式中, 激活或增加TLR2活性的脂质基佐剂可包括包含任一种或多种上述细胞壁组分的热致死细菌。这种热致死细菌可购自例如InvivoGen (San Diego, California, USA)。

[0095] 本发明还包括充当TLR激动剂的合成脂蛋白, 并且其非限制性地包括上述棕榈酸佐剂和类似物, 以及合成二酰化脂蛋白FSL-1——其可购自InvivoGen (San Diego, California, USA) 和EMC Microcollections GmbH (德国)。FSL-1 (Pam2CGDPKHPKSF) 是合成脂蛋白, 其代表唾液支原体的44-kDa脂蛋白LP44的N端部分。FSL-1包括PAM₂Cys, 并且具有类似于巨噬细胞激活脂肽-2 (MALP-2) ——发酵支原体衍生脂肽——的框架结构。假设包含脂化N端二酰化半胱氨酸残基的FSL-1和MALP-2通过二聚体TLR2和TLR6/TLR2/6识别)。合成的MALP-2可购自Enzo Life Sciences (Farmingdale, New York, USA)。

[0096] 在实施方式中, 本发明的脂质基佐剂包括FSL-1或MALP-2, 或脂质基佐剂是FSL-1或MALP-2。在适当时, FSL-1或MALP-2可作为立体化学限定的化合物, 或作为立体异构体混合物来使用。FSL-1或MALP-2可被标记 (例如生物素、荧光素、若丹明、等)。FSL-1也可作为包括9种不同FSL-1-Ala化合物的FSL-1Ala-扫描集合 (EMC Microcollections) 获得。这些FSL-1-Ala分子中的每一个均单独或组合地被包括在本文中。

[0097] 本发明的脂质基佐剂的进一步实施方式可包括TLR2配体的亚结构, 如单酰基化脂肽。非限制性地, 这些可包括, 例如, Pam-Dhc-SKKKK、Pam-CSKKKK、Pam-Dhc-GDPKHPKSF或Pam-CGDPKHPKSF (EMC Microcollections)。

[0098] 其他激活或增加TLR2活性的脂质基佐剂可例如通过如下确定: 利用InvivoGen (San Diego, California, USA) HEK-Blue® TLR2激活报告系统。该系统能够评价潜在TLR2配体刺激人 (hTLR2) 或鼠 (mTLR2) 细胞中的TLR2的能力。

[0099] 在一些实施方式中, 本发明组合物的脂质基佐剂是仅激活或增加TLR2、异型二聚体TLR1和TLR2 (TLR1/2)、和/或异型二聚体TLR2和TLR6 (TLR2/6) 的活性的脂质基佐剂, 而不激活其他TLRs。在进一步的实施方式中, 脂质基佐剂仅激活或增加异型二聚体TLR1/2和/或TLR2/6的活性, 而不激活其他TLRs。

[0100] 本发明的组合物可包括上述佐剂组合至少一种其他适当的佐剂。至少一种其他佐

剂的示例性实施方式包括但绝不限于,合成来源、非生物来源或生物来源(包括但不限于,具有其组分的病毒颗粒、病毒样颗粒、病毒和细菌)的有机和无机化合物、聚合物、蛋白质、肽、糖。

[0101] 相容性佐剂的进一步实例可非限制性地包括,趋化因子、Toll样受体激动剂、集落刺激因子、细胞因子、1018ISS、铝盐、Amplivax、AS04、AS15、ABM2、Adjumer、Algammulin、AS01B、AS02(SBASA)、AS02A、BCG、钙三醇、壳聚糖、霍乱毒素、CP-870、893、CpG、polyIC、CyaA、二甲基十八烷基溴化铵(DDA)、酞酸二丁酯(DBP)、dSLIM、 γ 菊糖、GM-CSF、GMDP、甘油、IC30、IC31、咪喹莫特、ImuFact IMP321、IS Patch、ISCOM、ISCOMATRIX、JuvImmune、LipoVac、LPS、脂核蛋白质、MF59、单磷酸基脂质A、Montanide® IMS1312、Montanide® 系佐剂、OK-432、OM-174、OM-197-MP-EC、ONTAK、PepTel载体系统、其他棕榈酰基分子、PLG微粒、瑞喹莫德、角鲨烯、SLR172、YF-17DBCG、QS21、QuilA、P1005、泊洛沙姆、皂角苷、合成多核苷酸、酵母聚糖、百日咳毒素。

[0102] 因此,组合物可包括一种或多种药学上可接受的佐剂,其中组合物的至少一种佐剂是激活或增加TLR2活性的佐剂。

[0103] 在另一实施方式中,抗原可偶联于脂质部分,如例如,棕榈酸部分,以提供佐剂性质。组合物还可进一步包括本领域已知的药学上可接受的赋形剂、稀释剂等。参见,例如,Remington's Pharmaceutical Sciences(Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pa., USA1985)和1999年公开的The United States Pharmacopoeia: The National Formulary(USP24NF19)。

[0104] 在实施方式中,这种另外的适当的佐剂可包括包含CpG的寡脱氧核苷酸(CpG ODN),如5'-TCCATGACGTTCC TGACGTT-3'。技术人员可在靶向物种和效力的基础上选择适当的CpG。

[0105] 所用佐剂量取决于抗原量和佐剂类型。本领域技术人员可容易通过经验测试确定具体应用所需的佐剂量。

[0106] 抗原

[0107] 本发明的组合物包括一种或多种抗原。如本文所用,术语“抗原”指代可特异性地结合于抗体的物质。组合物的适当抗原是能够诱导个体的体液免疫应答的那些抗原。

[0108] 可用于本发明组合物的抗原非限制性地包括,多肽,糖,微生物或其部分——如活的减毒、失活或被杀死的细菌、病毒或原生动物,或其部分。抗原可以是,例如,病原性生物体、毒素、过敏原、肽、适当的天然、非天然、重组或变性蛋白质或多肽、或其片段、或能够在个体内产生体液免疫应答的表位。

[0109] 如本文和权利要求书中所用,术语“抗原”还包括编码充当抗原的多肽的多核苷酸。核酸系疫苗接种策略是已知的,其中将包含多核苷酸的疫苗组合物给予个体。多核苷酸编码的抗原性多肽在个体中表达,使得抗原性多肽最终存在于个体中,如同疫苗组合物本身包含多肽。基于本发明的目的,术语“抗原”,在上下文述及时,包括编码充当抗原的多肽的这种多核苷酸。

[0110] 可用作本发明抗原的多肽或其片段非限制性地包括,衍生自霍乱类毒素、破伤风类毒素、白喉类毒素、乙型肝炎表面抗原、血凝素(例如H5N1重组血凝素蛋白)、炭疽重组保护性抗原(List Biologics; Campbell, CA)、神经氨酸酶、流感M蛋白质、PfHRP2、pLDH、醛缩

酶、MSP1、MSP2、AMA1、Der-p-1、Der-f-1、Adipophilin、AFP、AIM-2、ART-4、BAGE、 α -胎蛋白、BCL-2、Bcr-Abl、BING-4、CEA、CPSF、CT、细胞周期蛋白D1Ep-CAM、EphA2、EphA3、ELF-2、FGF-5、G250、促性腺激素释放激素、HER-2、肠羧基酯酶(iCE)、IL13R α 2、MAGE-1、MAGE-2、MAGE-3、MART-1、MART-2、M-CSF、MDM-2、MMP-2、MUC-1、NY-EOS-1、MUM-1、MUM-2、MUM-3、百日咳类毒素蛋白、p53、PBF、PRAME、PSA、PSMA、RAGE-1、RNF43、RU1、RU2AS、SART-1、SART-2、SART-3、SAGE-1、SCRN1、SOX2、SOX10、STEAP1、存活素、端粒酶、TGF β RII、TRAG-3、TRP-1、TRP-2、TERT和WT1的那些。

[0111] 可用作本发明中的抗原的病毒或其部分非限制性地包括,牛痘(Cowpox)病毒、牛痘(Vaccinia)病毒、假牛痘病毒、人疱疹病毒1、人疱疹病毒2、细胞巨化病毒、人腺病毒A-F、多瘤病毒、人乳头瘤病毒、微小病毒、甲型肝炎病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、人免疫缺陷病毒、正呼肠病毒、轮状病毒、埃博拉病毒、副流感病毒、流感病毒(例如H5N1流感病毒、流感A病毒、流感B病毒、流感C病毒)、麻疹病毒、腮腺炎病毒、风疹病毒、肺病毒、人呼吸道合胞体病毒、狂犬病病毒、加利福尼亚脑炎病毒、日本脑炎病毒、汉坦病毒、淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒、冠形病毒、肠道病毒、鼻病毒、脊髓灰质炎病毒、诺洛病毒(Norovirus)、黄病毒、登革热病毒、西尼罗病毒、黄热病毒和水痘。

[0112] 在实施方式中,本发明的组合物可用于治疗和/或预防对其有需要个体的流感病毒感染。流感是正粘病毒科的单链RNA病毒,通常其特征在于病毒颗粒外侧的两个大分子糖蛋白,血凝素(HA)和神经氨酸酶(NA)。流感A的多种HA亚型已被确定(Kawaoka et al., Virology(1990) 179:759-767; Webster et al., "Antigenic variation among type A influenza viruses," p.127-168. In: P. Palese and D.W. Kingsbury (ed.), Genetics of influenza viruses. Springer-Verlag, New York)。

[0113] 可用作本发明中的抗原的细菌或其部分非限制性地包括,炭疽(炭疽杆菌)、布鲁氏菌(Brucella)、百日咳杆菌、假丝酵母(Candida)、肺炎衣原体(Chlamydia pneumoniae)、鹦鹉热衣原体(Chlamydia psittaci)、霍乱、肉毒杆菌(Clostridium botulinum)、粗球孢子菌(Coccidioides immitis)、隐球菌(Cryptococcus)、白喉、大肠杆菌0157:H7、肠出血性大肠杆菌、肠产毒性大肠杆菌、流感嗜血杆菌(Haemophilus influenzae)、幽门螺杆菌(Helicobacter pylori)、军团杆菌(Legionella)、钩端螺旋体(Leptospira)、李斯特菌(Listeria)、脑膜炎球菌(Meningococcus)、肺炎支原体(Mycoplasma pneumoniae)、分枝杆菌、百日咳菌、肺炎菌、沙门氏菌(Salmonella)、志贺氏菌(Shigella)、葡萄球菌(Staphylococcus)、肺炎链球菌(Streptococcus pneumoniae)和小肠结肠炎耶尔森菌(Yersinia enterocolitica)。

[0114] 抗原可以可选地具有原生动物来源,例如导致疟疾的疟原虫属(镰状疟原虫、三日疟原虫、间日疟原虫、卵形疟原虫或诺尔斯氏疟原虫)。

[0115] 抗原可以可选地是天然存在的或合成的毒素,如药物物质(例如,可卡因)。

[0116] 术语“多肽”包括任意氨基酸链,与长度(例如,至少6、8、10、12、14、16、18、或20个氨基酸)或翻译后修饰(例如,糖基化或磷酸化)无关,并且包括,例如,天然蛋白质、合成或重组多肽和肽、表位、杂交分子、变体、同系物、类似物、类肽、肽模拟物等。因此,变体或衍生物包括缺失,其包括截短和片段;插入和添加,例如,保守型置换,位点定向性突变体和等位基因变体;和修饰,其包括具有共价连接于肽的一个或多个非氨酰基(例如,糖、脂质等)和

翻译后修饰的类肽。如本文所用,术语“保守型氨基酸置换”或“保守型置换”指代一个氨基酸置换处于肽中给定位置的另一氨基酸,其中置换可进行而不用显著损失相关功能。在做出这种改变时,相似的氨基酸残基的置换可在侧链取代基的相对相似性——例如,其尺寸、电荷、疏水性、亲水性及类似性质——的基础上进行,并且可通过常规测试分析这种置换对肽功能的影响。保守型置换的具体非限制性实例包括下列实例:

原残基	保守型置换
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln, His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
His	Asn; Gln
[0117] Ile	Leu, Val
Leu	Ile; Val
Lys	Arg; Gln; Glu
Met	Leu; Ile
Phe	Met; Leu; Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp; Phe
Val	Ile; Leu

[0118] 可使用与优选抗原序列具有基本上同一性的多肽或肽。两序列如果在最佳地对齐(具有允许的空位)时具有至少约50%的序列同一性,或如果序列共享限定的功能性基序,则其被认为具有基本上同一性。在可选的实施方式中,最佳对齐的序列,如果其指定序列中共享至少60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性,则可被认为基本上相同(即,具有基本上同一性)。术语“同一性”指代两多肽分子之间的序列相似性。同一性可通过比较对齐序列的每个位置来确定。氨基酸序列之间的同一性程度取决于序列共享位置处相同或匹配氨基酸的数量,例如,指定区域中。同一性比较的序列的最佳对齐可利用本领域已知的多种算法进行,包括ClustalW程序——可在<http://clustalw.genome.ad.jp>获得,Smith and Waterman,1981,Adv.Appl.Math2:482的局部同源性算法,Needleman and Wunsch,1970,J.Mol.Biol.48:443的同源性对齐算法,Pearson and Lipman,1988,Proc.Natl.Acad.Sci.USA85:2444的相似性方法研究,和这些算法的计算机化执行(如GAP,BESTFIT,FASTA and TFASTA in the Wisconsin Genetics Software Package,Genetics Computer Group,Madison,WI,U.S.A.)。序列同一性还可利用Altschul et al.,1990,J.Mol.Biol.215:403-10描述的BLAST算法来确定(利用公开的默认设置)。例

如,可使用“BLAST2序列”工具——可通过National Center for Biotechnology Information获得(通过互联网<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/bl2seq/wblast2.cgi>),在下列默认设置处选择“blastp”程序:期望阈值10;字长3;矩阵BLOSUM62;空位成本存在(gap costs existence)11,延伸(extension)1。在另一实施方式中,本领域技术人员可容易且适当地对齐任何给定序列和仅通过视觉检查推断序列同一性和/或同源性。

[0119] 用于实践本发明的多肽和肽可以是分离自天然来源、被合成、或被重组生成的多肽。肽和蛋白质可在体外或体内被重组表达。用于实践本发明的肽和多肽可利用本领域已知的任何方法制备和分离。用于实践本发明的多肽和肽还可整体或部分利用本领域公知的化学方法合成。参见例如,Caruthers(1980)Nucleic Acids Res.Symp.Ser.215-223;Hom(1980)Nucleic Acids Res.Symp.Ser.225-232;Banga,A.K,Therapeutic Peptides and Proteins,Formulation,Processing and Delivery Systems(1995)Technomic Publishing Co.,Lancaster,Pa.。例如,肽合成可利用不同固相技术进行(参见例如,Roberge(1995)Science269:202;Merrifield(1997)Methods Enzymol.289:3-13),并可实现自动合成,例如,根据生产商提供的说明,利用ABI431A肽合成器(Perkin Elmer)。

[0120] 在一些实施方式中,抗原可以是纯化的抗原,例如,约25%至50%纯,约50%至约75%纯,约75%至约85%纯,约85%至约90%纯,约90%至约95%纯,约95%至约98%纯,约98%至约99%纯,或大于99%纯。

[0121] 如上所述,术语“抗原”还包括编码充当抗原的多肽的多核苷酸。如本文和权利要求书所用,术语“多核苷酸”包括任何链长度(例如,9、12、18、24、30、60、150、300、600、1500个或更多核苷酸)或链数目(例如,单链或双链)的核苷酸链。多核苷酸可以是DNA(例如,基因组DNA或cDNA)或RNA(例如,mRNA)或其组合。其可以是天然存在的或合成的(例如化学合成)。考虑多核苷酸可在核苷酸链中包含一种或多种含氮碱基、戊糖或磷酸基团的修饰。这种修饰是本领域公知的,并且可目的在于例如提高多核苷酸稳定性。

[0122] 多核苷酸可以不同形式被递送。在一些实施方式中,可使用裸多核苷酸——线性形式或插入质粒如表达质粒。在其他实施方式中,可使用活载体,如病毒或细菌载体。

[0123] 可存在一种或多种调节序列,其协助DNA转录成RNA和/或RNA翻译成多肽。在一些情况下,如作为信使RNA(mRNA)分子的多核苷酸的情况下,不需要转录过程相关的调节序列(例如,启动子),并且可在启动子不存在的情况下发生蛋白质表达。如情况需要,技术人员可包括适当的调节序列。

[0124] 在一些实施方式中,多核苷酸存在于表达盒,其中其可操作地连接于调节序列,该调节序列使多核苷酸在本发明组合物所给予的个体内表达。表达盒的选择取决于组合物所给予的个体以及表达多肽的预期特征。

[0125] 一般,表达盒包括启动子——在个体内具有功能性,并且可以是组成型或诱导型;核糖体结合位点;起始密码子(ATG),如需;编码目标多肽的多核苷酸;终止密码子;和任选地3'末端区域(翻译和/或转录终止子)。可包括另外的序列,如编码信号肽的区域。编码目标多肽的多核苷酸可与表达盒中任意其他调节序列是同源或异源的。与目标多肽一起表达的序列,如信号肽编码区域,一般位置相邻于编码所要表达的蛋白质的多核苷酸,并且定位在适当阅读框中。开放式阅读框——由仅编码所要表达的蛋白质的多核苷酸,或编码所要

表达的蛋白质连同任何其他所要表达的序列(例如信号肽)的多核苷酸构成,在启动子的控制下定位,使得转录和翻译在组合物所给予的个体内发生。

[0126] 用于本文所述组合物单次治疗的抗原量可根据抗原类型和个体尺寸而改变。本领域技术人员将能够确定用于具体应用的抗原有效量,而无需过度实验。术语“有效量”,如本文所用,意为在必需的剂量和时间段下有效实现预期结果的量。

[0127] 在另一实施方式中,抗原可以是或包括能够诱导体液免疫应答的B细胞表位。例如,抗原可以是或包括衍生自病毒——如例如,流感病毒或呼吸道合胞体病毒——的B细胞表位。

[0128] 在另一实施方式中,B细胞表位可以是衍生自H5N1流感病毒的血凝素糖蛋白的表位。

[0129] 在另一实施方式中,抗原可以是或包括衍生自细菌——如例如,百日咳杆菌或炭疽杆菌——的B细胞表位。

[0130] 在另一实施方式中,B细胞表位可以是百日咳杆菌生成的百日咳类毒素蛋白的表位。

[0131] 在另一实施方式中,B细胞表位可以是炭疽重组保护性抗原的表位。

[0132] 在另一实施方式中,抗原可以是或包括传染病相关的B细胞表位。

[0133] 在另一实施方式中,抗原可以是或包括衍生自原生动物如疟原虫属的B细胞表位。

[0134] 在另一实施方式中,抗原可以是癌症或肿瘤相关蛋白,如例如,能够被抗体识别的膜表面结合癌抗原。

[0135] 可通过本发明组合物的应用或给予治疗和/或预防的癌症非限制性地包括,癌、腺癌、淋巴瘤、白血病、肉瘤、胚细胞瘤、骨髓瘤和生殖细胞肿瘤。在一个实施方式中,癌症可由病原体如病毒引起。技术人员已知与癌症发展关联的病毒,其包括但不限于,人乳头瘤病毒(HPV),John Cunningham病毒(JCV),人疱疹病毒8,Epstein Barr病毒(EBV),Merkel细胞多瘤病毒,丙型肝炎病毒和人T细胞白血病病毒-1。本发明的组合物可用于治疗或预防癌症,例如,降低癌症严重程度或预防癌症复发。可从本发明的组合物获益的癌症包括表达一种或多种肿瘤特异性抗原的任何恶性细胞。

[0136] 在另一实施方式中,抗原可以是能够被抗体中和的毒素或过敏原。在实施方式中,毒素是药物物质,如例如,可卡因。

[0137] 在另一实施方式中,抗原可以是疾病相关的抗原,其中需要隔离循环中的抗原,如例如,淀粉状蛋白质(例如阿尔茨海默氏症)。因此,本发明的组合物可适用于治疗和/或预防对其有需要的个体的神经退行性疾病,其中神经退行性疾病与抗原表达有关。个体可患有神经退行性疾病或可处于患有神经退行性疾病的风险。可通过本发明组合物的应用或给予治疗和/或预防的神经退行性疾病非限制性地包括,阿尔茨海默氏症、帕金森病、亨廷顿病、和肌萎缩性侧索硬化症(ALS)。例如,

[0138] 阿尔茨海默氏症的特征在于患者脑内 β -淀粉状空斑和/或tau蛋白与阿尔茨海默氏症的关联(参见,例如,Goedert and Spillantini,Science,314:777-781,2006)。单纯疱疹病毒1型也已被提出在携带apoE基因的易感形式的人体内具有致病作用(Itzhaki and Wozniak,J Alzheimers Dis13:393-405,2008)。

[0139] 在进一步的实施方式中,组合物可包括B细胞表位混合物,作为诱导体液免疫应答

的抗原。B细胞表位可连接形成单个多肽。

[0140] 在另一实施方式中,抗原可以是能够诱导对于靶向肿瘤细胞上的特异性构象的特异性体液免疫应答的任何肽或多肽。

[0141] T辅助表位

[0142] T辅助表位是具有T辅助活性的氨基酸序列(天然或非天然氨基酸)。T辅助表位被T辅助淋巴细胞识别,T辅助淋巴细胞在建立和最大化免疫系统能力中具有重要作用,并且涉及激活和引导其他免疫细胞,如例如,B细胞抗体种类转换。

[0143] T辅助表位可由连续或不连续的表位组成。因此,T辅助不必每个氨基酸都是表位的一部分。因此,T辅助表位,包括T辅助表位的类似物和区段,能够增强或刺激免疫应答。免疫显性T辅助表位在具有广泛发散性MHC类型的动物和人群中广泛具有反应性(Celis et al. (1988) J. Immunol. 140:1808-1815; Demotz et al. (1989) J. Immunol. 142:394-402; Chong et al. (1992) Infect. Immun. 60:4640-4647)。主题肽的T辅助结构域具有约10至约50个氨基酸,优选约10至约30个氨基酸。当存在多个T辅助表位时,则各T辅助表位独立地发挥作用。

[0144] 在一个实施方式中,本文描述的组合物还可包括至少一种T辅助表位。在一些情况中,T辅助表位可形成抗原的部分。具体地,如果抗原尺寸足够,其可包含充当T辅助表位的表位。在其他实施方式中,T辅助表位是独立于抗原的分子。

[0145] 在另一实施方式中,T辅助表位类似物可包括T辅助表位中1至约10个氨基酸残基的置换、缺失和插入。T辅助区段是足以增强或刺激免疫应答的T辅助表位的连续部分。T辅助区段的实例是一系列衍生自单个较长肽的重叠肽。

[0146] 用于本发明的T辅助表位的来源包括,例如,乙型肝炎表面抗原辅助T细胞表位、百日咳毒素辅助T细胞表位、麻疹病毒F蛋白质辅助T细胞表位、沙眼衣原体(*Chlamydia trachomatis*)主要外膜蛋白质辅助T细胞表位、白喉毒素辅助T细胞表位、镰状疟原虫环孢子(circumsporozoite)辅助T细胞表位、曼氏血吸虫(*Schistosoma mansoni*)磷酸丙糖异构酶辅助T细胞表位、大肠杆菌TraT辅助T细胞表位和这些T辅助表位中任意种的免疫增强性类似物和区段。

[0147] 在一个实施方式中,T辅助表位是一般性T辅助表位。一般性T辅助表位,如本文所用,指代以下列方式结合于多种MHC II类分子的肽或其他免疫原性分子或其片段:以II类(CD4⁺T细胞)限制方式激活T-细胞功能。

[0148] 在另一实施方式中,T辅助表位可以是一般性T辅助表位,如PADRE (pan-DR表位),包括肽序列AKXVAAWTLKAAA,其中X可以是环己基丙氨酰基。PADRE具体地具有CD4⁺T辅助表位,即,其刺激PADRE特异性CD4⁺T辅助应答的诱导。

[0149] 破伤风类毒素的T辅助表位以与PADRE类似的方式工作。破伤风和白喉毒素具有人CD4⁺细胞的一般性表位。(Diethelm-Okita, B.M. et al., Universal epitopes for human CD4⁺ cells on tetanus and diphtheria toxins. J. Infect. Diseases, 181:1001-1009, 2000)。在另一实施方式中,T辅助表位可以是破伤风类毒素肽,如F21E,包括肽序列FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE(氨基酸947-967)。

[0150] 在另一实施方式中,T辅助表位融合于至少一种抗原(即,肽)或抗原混合物,以制成融合肽。

[0151] 载体

[0152] 组合物的载体包括连续相的疏水物质,优选地液体疏水物质。连续相可以是基本上纯疏水物质或疏水物质混合物。此外,载体可以是水在疏水物质中的乳液或水在疏水物质混合物中的乳液,条件是疏水物质构成连续相。进一步,在另一实施方式中,载体可充当佐剂。

[0153] 可用于本文描述的组合物的疏水物质是药学和/或免疫学可接受的那些疏水物质。载体优选是液体,但某些在环境温度下不是液体的疏水物质可被液化——例如通过加热,并且也可用于本发明。在一个实施方式中,疏水载体可以是磷酸缓冲盐水/弗氏不完全佐剂(PBS/FIA)乳液。

[0154] 油或油包水乳液是尤其适用于本发明的载体。油应当是药学和/或免疫学可接受的。适当的油包括,例如,矿物油(特别是轻质或低粘度矿物油如Drakeol®6VR)、植物油(例如,大豆油)、坚果油(例如,花生油)或其混合物。在实施方式中,油是处于矿物油溶液中的油酸二缩甘露醇,其可以Montanide® ISA51商购。还可使用动物脂肪和人造疏水性聚合物材料,尤其是在环境温度下为液体或可相对容易液化的那些。

[0155] 在本文中组合物被描述为无水脂质体悬浮液(“无水”)的实施方式中,这些“无水”组合物的疏水载体可仍包含少量水,条件是水存在于载体的非连续相中。例如,组合物各个组分可具有结合水,该结合水不可通过诸如冻干或蒸发的方法被完全去除,并且某些疏水载体可包含少量溶解在其中的水。总体上,被描述为“无水”的本发明组合物包含,例如,基于组合物载体组分总重量,重量/重量小于约10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.1%、0.05%或0.01%的水。

[0156] 脂质体

[0157] 脂质体是完全封闭的脂质双层膜,其包含截留的水空间(volume)。脂质体可以是单室囊泡(具有一个双层膜),或多室囊泡,其特征在于多膜双层,每个双层可与下一个双层通过水层分离或可不与下一个双层通过水层分离。脂质体的概括讨论可在Gregoriadis G. Immunol. Today, 11:89-97, 1990; 和Frezard, F., Braz. J. Med. Bio. Res., 32:181-189, 1999中找到。如本文和权利要求书中所用,术语“脂质体”意图包括如上所述的所有这种囊泡结构,非限制性地包括,在本领域被描述为“泡囊(niosomes)”,“传递体(transfersomes)”和“病毒颗粒”的那些。

[0158] 虽然任何脂质体可用于本发明,包括由古细菌脂质制成的脂质体,但特别有用的脂质体应用脂质体制剂中的磷脂和未酯化胆固醇。胆固醇用于稳定化脂质体,并且任何其他稳定化脂质体的化合物可代替胆固醇。其他稳定化化合物的脂质体是本领域技术人员已知的。例如,饱和磷脂生成脂质体,其具有较高转变温度,表示稳定性增加。

[0159] 优选用于脂质体制备的磷脂是至少一个头部基团选自磷酸甘油、磷酸乙醇胺、磷酸丝氨酸、磷酸胆碱和磷酸肌醇的那些磷脂。更优选包括的脂质是94-100%磷脂酰胆碱的脂质体。这种脂质可以卵磷脂Phospholipon®90G商购。当未酯化胆固醇也用于脂质体制剂时,胆固醇的使用量等同于约10%的磷脂重量。如果非胆固醇的化合物用于稳定化脂质体,则本领域技术人员可容易地确定组合物中的所需量。

[0160] 脂质体组合物可例如通过如下获得:利用天然脂质、合成脂质、鞘类脂质、醚脂质、固醇、心磷脂、阳离子脂质和用聚(乙二醇)和其他聚合物修饰的脂质。合成的脂质可包括下

列脂肪酸组分；月桂酰基、肉豆蔻酰基、棕榈酰基、硬脂酰基、花生酰基、油酰基、亚油酰基、芥酰基、或这些脂肪酸的组合。

[0161] 组合物

[0162] 本发明的进一步实施方式包括制备本发明组合物的方法，本发明组合物包括脂质体；能够诱导体液免疫应答的抗原；包括疏水物质连续相的载体；和激活或增加TLR2活性的佐剂。

[0163] 制备脂质体的方法在本领域公知。参见例如Gregoriadis (1990) 和Frezard (1999)，二者均被前述引用。任何适当的制备脂质体的方法可用于本发明实践，或脂质体可得自商业来源。脂质体一般通过如下制备：使将形成脂质双层的脂质体组分（例如磷脂和胆固醇）与水溶液水合，该水溶液可以是纯水或一种或多种组分溶解在水中的溶液，例如磷酸缓冲盐水（PBS）、无磷酸盐水、或任何其他生理相容性水溶液。

[0164] 在实施方式中，脂质体组分或脂质体组分混合物——如磷脂（例如Phospholipon® 90G）和胆固醇，可溶解在有机溶剂中，如氯仿和甲醇的混合物，然后过滤（例如PTFE 0.2μm过滤器）和干燥——例如通过旋转蒸发，以去除溶剂。

[0165] 所得脂质混合物的水合可通过如下发生：例如将脂质混合物注入水溶液，或超声处理脂质混合物和水溶液。在脂质体形成期间，脂质体组分形成围绕脂质体组分所水合的水溶液的空间的单个双层（单室）或多个双层（多室）。

[0166] 在一些实施方式中，然后使脂质体脱水，如通过冷冻-干燥或冻干。

[0167] 将脂质体与包括连续疏水相的载体组合。这可以多种方式进行。

[0168] 如果载体仅由疏水物质或疏水物质混合物组成（例如，使用100%矿物油载体），则脂质体可仅与疏水物质混合，或如果存在多种疏水物质，则与其中任一种或其组合混合。

[0169] 如果相反，包括疏水物质连续相的载体包含不连续的水相，则载体将一般采取水相在疏水相中的乳液形式，如油包水乳液。这种组合物可包含乳化剂，以稳定化乳液和促进脂质体均匀分布。对此，即使使用无水载体，乳化剂可以是有用的，其目的在于促进脂质体在载体中均匀分布。典型的乳化剂包括油酸二缩甘露醇（Arlacel™ A）、卵磷脂（例如，S100卵磷脂）、磷脂、吐温™80、和Spans™20、80、83和85。一般，疏水物质与乳化剂的体积比（v/v）处于约5:1至约15:1的范围内，优选约10:1的比。

[0170] 脂质体可被加入成品乳液，或其可在乳化前存在于水相或疏水相中。

[0171] 抗原可在制备过程中的多种不同阶段被引入。多于一种类型的抗原可被掺入组合物（例如，失活病毒、减毒活病毒、蛋白质或多肽）。

[0172] 在一些实施方式中，抗原存在于用于水合组分的水溶液中，该组分用于形成脂质体的脂质双层（例如磷脂（一种或多种）和胆固醇）。在这种情况下，抗原将被包封在脂质体中，存在于其水性内部。如果不洗涤或干燥所得脂质体——使得存在残留水溶液，其最终与包括疏水物质连续相的载体混合，则在最终产物中另外的抗原可存在于脂质体外。在相关技术中，抗原可在与水溶液水合前与用于形成脂质体的脂质双层的组分混合。抗原还可被加入预先形成的脂质体，在这种情况下抗原可被主动加载到脂质体中，或结合于脂质体表面，或抗原可留在脂质体外部。在这种实施方式中，在添加抗原前，预先形成的脂质体可以是空脂质体（例如，不包含被包封的抗原或脂质基佐剂），或预先形成的脂质体可包含掺入或连接于脂质体的脂质基佐剂。这些步骤可优选在与包括疏水物质连续相的载体混合前进

行。

[0173] 在可选的方法中,取而代之,抗原可在载体与脂质体组合之前、期间、或之后与包括疏水物质连续相的载体混合。如果载体是乳液,则抗原可在乳化前与水相或疏水相中任一者或两者混合。可选地,抗原可在乳化后与载体混合。

[0174] 组合抗原与载体的技术可与如上所述抗原包封在脂质体中一起应用,使得抗原同时存在于脂质体和包括疏水物质连续相的载体中。

[0175] 上述将抗原引入组合物的程序还适用于本发明组合物的佐剂。即,佐剂可被引入例如下列任一种或多种:(1)用于水合组分的水溶液,该组分用于形成脂质体的脂质双层;(2)脂质体的脂质双层形成后的水溶液;(3)用于形成脂质体的脂质双层的组分;或(4)在载体与脂质体组合之前、期间或之后的包括疏水物质连续相的载体。如果载体是乳液,则佐剂可在乳化之前、期间或之后与水相或疏水相中的任一者或两者混合。

[0176] 组合佐剂与载体的技术可与佐剂包封在脂质体中或佐剂加入脂质体一起应用,使得佐剂存在于脂质体内和/或脂质体外和包括疏水物质连续相的载体中。

[0177] 佐剂可与抗原一起在相同处理步骤被掺入组合物,或单独地在不同处理步骤被掺入组合物。例如,抗原和佐剂可存在于用于水合形成脂质双层的脂质体组分的水溶液中,使得抗原和佐剂被包封在脂质体中。可选地,抗原可被包封在脂质体中,并且佐剂与包括疏水物质连续相的载体混合。在进一步的实施方式中,佐剂可在抗原包封步骤后通过如下被掺入组合物:使脂质体-抗原制剂经过手动微型挤出器,然后在例如磷酸盐缓冲液中混合获得的脂质体-抗原制剂与脂质基佐剂。佐剂还可在已经形成脂质体后单独或与抗原一起被掺入组合物,使得佐剂可连接于脂质体或留在脂质体外。佐剂还可在添加抗原前被掺入或连接于脂质体,其中抗原留在预先形成的脂质体外或通过进一步处理加载到脂质体中/连接于脂质体。在这种实施方式中,所得脂质体-抗原-佐剂制剂可被冻干,然后在包括疏水物质连续相的载体中重构。将理解,可以有多种这样的组合。

[0178] 如果组合物包含一种或多种进一步的佐剂,则这种另外的佐剂可以类似于上文关于佐剂所述的方式或通过组合几种可适于另外的佐剂(一种或多种)的方法被掺入组合物。

[0179] 保持生物活性或提高化学稳定性以延长抗原、佐剂、脂质体或连续疏水载体的保质期的稳定剂如糖、抗氧化剂、或防腐剂可被加入这种组合物。

[0180] 在一些实施方式中,可使用抗原/佐剂混合物,在这种情况下,抗原和佐剂被同时掺入组合物。“抗原/佐剂混合物”指代抗原和佐剂至少在掺入组合物前处于相同稀释剂中的实施方式。抗原/佐剂混合物中的抗原和佐剂可以但无需一定要化学连接,如通过共价结合。

[0181] 在一些实施方式中,包括疏水物质连续相的载体本身可具有佐剂活性。不完全弗氏佐剂是具有佐剂作用的疏水载体的实例。如本文和权利要求书中所用,当使用术语“佐剂”时,这意图表示除包括疏水物质连续相的载体提供的任何佐剂活性外还存在佐剂。

[0182] 在实施方式中,为配制本发明的组合物,将S100卵磷脂和胆固醇(例如10:1w:w)的均质混合物在抗原存在的情况下、任选地在磷酸盐缓冲液中进行水合,以形成包封抗原的脂质体。然后可挤出脂质体制剂——任选地通过手动微型挤出器,并与佐剂混合——任选地在磷酸盐缓冲液中,以掺入佐剂。然后可冻干和在包括疏水物质连续相的载体中重构该悬浮液,以形成无水脂质体悬浮液。

[0183] 在一些实施方式中,可通过如下配制组合物:使S100卵磷脂和胆固醇(例如10:1w:w)的均质混合物在抗原和适当佐剂(例如Pam-3-Cys)存在的情况下,任选地在磷酸盐缓冲液中,进行水合,以形成包封抗原和佐剂的脂质体。然后可稀释脂质体/抗原/佐剂制剂至足够量——任选地用水,并冻干。然后可在包括疏水物质连续相的载体(例如,矿物油或Montanide® ISA51)中重构冻干的脂质体,以形成无水脂质体悬浮液。

[0184] 在一些实施方式中,可通过如下配制组合物:使二油酰基-磷脂酰胆碱(DOPC)和胆固醇(例如10:1w:w)的均质混合物在抗原和适当佐剂(例如Pam-3-Cys-Ser-(Lys)4)存在的情况下,任选地在磷酸盐缓冲液中,进行水合,以形成包封抗原和佐剂的脂质体。然后可冻干脂质体/抗原/佐剂制剂,并将所得产物在包括疏水物质连续相的载体(例如矿物油或Montanide® ISA51)中重构,以形成无水脂质体悬浮液。

[0185] 可选地,抗原或抗原/佐剂复合物可连接、接触或独立于脂质体,并且不被包封在脂质体中。一些亲水性抗原或亲水性抗原/佐剂复合物的脂质体包封效能可很差,使得在被置于疏水环境或冷冻-干燥后,大部分抗原连接于脂质体外表面。这是本发明的另一实施方式。

[0186] 在进一步的实施方式中,具有B细胞表位和(融合于抗原的或单独的)PADRE的抗原(肽或多肽)可被一起包封在脂质体中。在另一实施方式中,多于一种抗原可一起被布置在相同脂质体中。在进一步的实施方式中,可使用具有T辅助表位的其他物质代替PADRE,例如,破伤风类毒素肽(一种或多种)。在另一实施方式中,佐剂,优选包括PAM₂Cys或PAM₃Cys的棕榈酸系佐剂,也可被包封在脂质体中。脂质体优选悬浮于PBS中。然后该悬浮液乳化在疏水载体中,该疏水载体如例如ISA51或矿物油。结果是包含抗原(一种或多种)和佐剂(一种或多种)的脂质体悬浮在PBS中,其进而乳化在疏水载体中,例如,ISA51或矿物油。

[0187] 在一个实施方式中,得自肌肉内注入单剂量本发明组合物——包括脂质体/H5N1重组血凝素蛋白(抗原)/Pam-3-Cys-Ser-(Lys)4(佐剂)/疏水载体(疫苗A)——的小鼠的抗体滴定度,与水性铝系对照疫苗治疗(并且加强剂量)的小鼠相比,在免疫化后3、4和8周显著增强(图1)。例如,本发明的疫苗A能够生成在疫苗接种后3和4周上至1/2,048,000的端点抗体滴定度和在疫苗接种后8周上至1/8,192,000的端点抗体滴定度,而对照疫苗的端点抗体滴定度在疫苗接种后3、4和8周仅分别上至1/512,000、1/256,000和1/4,096,000。这些结果表明,本发明的组合物,与相比单剂量或加强剂量的水性铝系对照疫苗相比,能够在单剂量后生成增强的体内体液免疫应答。

[0188] 在一个实施方式中,通过包括脂质体/百日咳类毒素蛋白(抗原)/Pam-3-Cys-Ser-(Lys)4(佐剂)/疏水载体(疫苗B)的本发明组合物的单次治疗导致的小鼠免疫化能够使细菌肺计数从百日咳杆菌攻击后第8天的每肺高如 6.2×10^4 cfu减少至攻击后第15天的每肺0cfu(图2)。这些结果表明,单剂量的本发明组合物有效地保护小鼠防止细菌攻击,并使其完全清除肺感染。

[0189] 在一个实施方式中,得自肌肉内注入单剂量本发明组合物——包括脂质体/炭疽重组保护性抗原(抗原)/Pam-3-Cys(佐剂)/疏水载体(疫苗C)——的兔子的抗体滴定度,在早期时间点(加强剂量前)与用水性铝系对照疫苗治疗的兔子相比,显著增强(图3)。例如,本发明的疫苗C能够生成在疫苗接种后3和4周上至1/2,048,000的端点抗体滴定度和在疫苗接种后8周上至1/8,192,000的端点抗体滴定度,而对照疫苗的端点抗体滴定度在疫苗接种

后3、4和8周分别仅上至1/64,000、1/256,000和1/2,048,000。这些结果表明,本发明的组合物能够在早如单次疫苗接种后三周生成惊人强烈的体内体液免疫应答。

[0190] 在一个实施方式中,得自肌肉内注入单剂量本发明疫苗A(第1组)的小鼠的抗体滴定度,与单剂量给予无脂质体(第2组)、无疏水载体(第3组)或无脂质基佐剂(第4组)的对照组合物相比,显著增强(图4)。例如,本发明的疫苗C能够生成在疫苗接种后8周上至1/2,048,000的端点抗体滴定度,而第2、3和4组在相同时间点分别仅能够生成1/64,000、1/128,000和1/128,000的端点抗体滴定度。这些结果显示,本发明的组合物——包括下列中的每一个:抗原、脂质体、脂质基佐剂和包括疏水物质连续相的载体,能够引起稳健而持久的体内体液免疫应答。

[0191] 本文描述的组合物可以下述形式配制:适于口、鼻、直肠或胃肠外给予。胃肠外给予包括静脉内、腹膜内、皮内、皮下、肌肉内、经皮、肺内、鞘内、和局部给予方式。优选的途径是肌肉内、皮下和皮内,以实现持久作用。

[0192] 技术人员可确定对于任何具体应用而言适当的治疗方案、给予途径、剂量等,从而实现预期结果。可考虑的因素包括,例如:抗原性质;所要预防或治疗的疾病状态;个体年龄、身体情况、体重、性别和饮食;和其他临床因素。参见,例如,“Vaccine Handbook”,由Researcher's Associates (Gaku-yuu-kai) of The National Institute of Health编辑(1994);“Manual of Prophylactic Inoculation, 8th edition”,由Mikio Kimura, Munehiro Hirayama和Harumi Sakai编辑,Kindai Shuppan(2000);“Minimum Requirements for Biological Products”,由Association of Biologicals Manufacturers of Japan编辑(1993)。

[0193] 引起最佳免疫应答的最佳佐剂和抗原量可取决于多种因素,非限制性地包括,组合物、疾病、个体,并且可容易被技术人员利用标准研究确定,该标准研究包括,例如,宿主的抗体滴定度和其他免疫原性应答的观察。

[0194] 本文描述的组合物可在单独施用中给予时有效。

[0195] 在另一实施方式中,本文描述的组合物可与其他治疗组合应用——在其他治疗之前或之后。

[0196] 试剂盒和试剂

[0197] 本发明任选地作为试剂盒被提供给使用者。例如,本发明的试剂盒包含本发明组合物中的一种或多种。试剂盒可进一步包括一种或多种另外的试剂、封装材料、容纳试剂盒组分的容器、和详细介绍使用试剂盒组分的优选方法的说明设施或使用者手册。

[0198] 本发明的实施方式

[0199] 本发明的具体实施方式非限制性地包括下列:

[0200] 1. 组合物,包括下列,由下列组成,或基本上由下列组成:脂质体;能够诱导体液免疫应答的抗原;包括疏水物质连续相的载体;和激活或增加TLR2活性的佐剂,优选脂质基佐剂。

[0201] 2. 条款1所述的组合物,其中所述佐剂激活或增加Toll样受体2 (TLR2) 或TLR2二聚体如TLR1/2或TLR2/6的活性。

[0202] 3. 条款1所述的组合物,其中所述佐剂仅激活或增加选自TLR2、异型二聚体TLR1/2和异型二聚体TLR2/6的Toll样受体 (TLR) 的活性,而不激活或增加其他TLR的活性。

[0203] 4. 条款1至3中任一项所述的组合物,其中所述佐剂是包括下列,由下列组成,或基本上由下列组成的化合物:至少一种天然、合成或半合成的脂质部分、脂质组分、或其类似物或衍生物,包括例如,脂氨基酸、脂聚糖、脂多糖、脂磷壁酸或革兰氏阳性或革兰氏阴性细菌、绿色红假单胞菌或支原体的细胞壁组分。

[0204] 5. 条款1至4中任一项所述的组合物,其中所述佐剂包括下列,由下列组成,或基本上由下列组成:PAM₂Cys-Ser-(Lys) 4、PAM₃Cys-Ser-(Lys) 4、PAM₃Cys-SKKKK (β-照射)、R-PAM₃Cys-SKKKK、S-PAM₃Cys-SKKKK、PAM₃Cys-SKKKK (生物素-Aca-Aca)、PAM₃Cys-SKKKK (荧光素-Aca-Aca)、PAM₃Cys-SKKKK (若丹明-Aca-Aca)、PAM₃Cys-SKKKK-FLAG-标记、PHC-SKKKK、PHC-SKK KK (生物素-Aca-Aca)、PAM₃Cys-SSNAKIDQLSSDVQT、PAM₃Cys-SSNKSTTGSGETTTA、PAM₃Cys-SSTKPVSQDTSPKPA、PAM₃Cys-SSGSKPSGGPLPDAK、PAM₃Cys-SSGNKSA PSSSASSS、PAM₃Cys-GSHQMKSEGHANMQL、PAM₃Cys-SSSNDAAGNGAAQT、PAM₃Cys-KQNVSSLDEKNSVSV、PAM₃Cys-NNSGKDGN TSANSAD、PAM₃Cys-NNGGPE LKSDEVAKS、PAM₃Cys-SQEPAAAPAEATPAG、PAM₃Cys-SSSKSSDSSAPKAYG、PAM₃Cys-AQEKEAKSEL DYDQT、PAM₂Cys-SKKKK (RR和RS立体异构体混合物)、R-PAM₂Cys-SKKKK (RR立体异构体)、S-PAM₂Cys-SKKKK (RS立体异构体)、PAMCys (PAM) -SKKKK、PAM₂Cys-SKKKK (生物素-Aca-Aca) -NH₂、PAM₂Cys-SKKKK (荧光素-Aca-Aca) -NH₂、PAM₂Cys-SKKKK (若丹明-Aca-Aca) -NH₂、PAM₂Cys-SKK KK-FLAG-标记、PAM-Dhc-SKKKK、PAM-CSKKKK、PAM-Dhc-GDPKHPKSF、PAM-CGDPKH PKSF、FSL-1 (Pam2CGDPKHPKSF)、FSL-1-Ala、巨噬细胞激活脂肽-2 (MALP-2)、来自耻垢分枝杆菌的脂阿糖甘露聚糖 (LAM-MS)、来自耻垢分枝杆菌的脂甘露聚糖 (LM-MS)、来自牙龈卟啉单胞菌的脂多糖 (LPS-PG Ultrapure)、来自枯草芽孢杆菌的脂磷壁酸 (LTA-BS)、来自金黄色葡萄球菌的脂磷壁酸 (LTA-SA)、或其衍生物或类似物,或是包括革兰氏阳性或革兰氏阴性细菌的细胞壁组分的热致死细菌。

[0205] 6. 条款1至5中任一项所述的组合物,其中所述佐剂是棕榈酸佐剂。

[0206] 7. 条款1至6中任一项所述的组合物,其中所述佐剂包括下列,由下列组成,或基本上由下列组成:二棕榈酰基-S-甘油基-半胱氨酸 (PAM₂Cys) 或三棕榈酰基-S-甘油基-半胱氨酸 (PAM₃Cys)。

[0207] 8. 条款1至6中任一项所述的组合物,其中所述佐剂是PAM₂Cys-Ser-(Lys) 4、PAM₃Cys-Ser-(Lys) 4、FSL-1或MALP-2。

[0208] 9. 条款8所述的组合物,其中所述佐剂是PAM₂Cys-Ser-(Lys) 4。

[0209] 10. 条款8所述的组合物,其中所述佐剂是PAM₃Cys-Ser-(Lys) 4。

[0210] 11. 条款1至10中任一项所述的组合物,其除激活或增加TLR2活性的佐剂外进一步包括至少一种其他适当佐剂。

[0211] 12. 条款1至11中任一项所述的组合物,其中所述抗原是多肽或糖。

[0212] 13. 条款1至12中任一项所述的组合物,其中所述抗原包括下列,由下列组成,或基本上由下列组成:一个B细胞表位或多个B细胞表位。

[0213] 14. 条款13所述的组合物,其中所述B细胞表位衍生自病毒或细菌。

[0214] 15. 条款14所述的组合物,其中所述B细胞表位衍生自流感病毒、百日咳杆菌或炭疽杆菌。

[0215] 16. 条款15所述的组合物,其中所述B细胞表位是H5N1流感病毒的血凝素蛋白的表位、百日咳类毒素蛋白的表位、或炭疽重组保护性抗原的表位。

[0216] 17. 条款1至13中任一项所述的组合物,其中所述抗原是:传染病相关抗原;膜表面结合癌抗原;毒素;过敏原如花粉;或需要隔离循环中的抗原的疾病相关的抗原,如例如,淀粉状蛋白质。

[0217] 18. 条款17所述的组合物,其中所述传染病是流感、人呼吸道合胞体病毒引起的呼吸道感染、百日咳、炭疽或疟疾。

[0218] 19. 条款17所述的组合物,其中所述毒素是药物物质,如可卡因。

[0219] 20. 条款1至13中任一项所述的组合物,其中所述抗原是半抗原-载体加合物。

[0220] 21. 条款1至20中任一项所述的组合物,其中所述脂质体包括下列,由下列组成,或基本上由下列组成:磷脂或未酯化胆固醇。

[0221] 22. 条款1至21中任一项所述的组合物,其中所述抗原被包封在脂质体中,或抗原和佐剂均包封在脂质体中。

[0222] 23. 条款1至22中任一项所述的组合物,其是无水脂质体悬浮液。

[0223] 24. 条款1至23中任一项所述的组合物,其中所述组合物能够以单剂量诱导体液免疫应答。

[0224] 25. 条款24所述的组合物,其中所述体液免疫应答的特征在于抗原特异性抗体生成。

[0225] 26. 条款25所述的组合物,其能够生成抗原特异性抗体,所述抗原特异性抗体在个体疫苗接种后约3周时的抗体滴定度为上至约1/2,048,000。

[0226] 27. 条款25所述的组合物,其能够生成抗原特异性抗体,所述抗原特异性抗体在个体疫苗接种后约8周时的抗体滴定度为上至约1/8,192,000。

[0227] 28. 条款24至27中任一项所述的组合物,其中所述体液免疫应答与T辅助2 (Th2) 细胞或T辅助17 (Th17) 细胞的激活或生成有关。

[0228] 29. 条款1至28中任一项所述的组合物,用于治疗或预防通过体液免疫应答缓解的疾病或病症。

[0229] 30. 条款1至28中任一项所述的组合物,用于治疗或预防:传染病;涉及膜表面结合的癌抗原的癌症;或需要隔离循环中的抗原的疾病或病症,如阿尔茨海默氏症。

[0230] 31. 条款1至28中任一项所述的组合物,用于通过抗体中和毒素、病毒、细菌或过敏原。

[0231] 32. 治疗或预防通过体液免疫应答缓解的疾病或病症的方法,所述方法包括下列,由下列组成,或基本上由下列组成:将条款1至28中任一项所述的组合物给予个体。

[0232] 33. 治疗或预防传染病;涉及膜表面结合的癌抗原的癌症;或需要隔离循环中的抗原的疾病或病症如阿尔茨海默氏症的方法,所述方法包括下列,由下列组成,或基本上由下列组成:将条款1至28中任一项所述的组合物给予个体。

[0233] 34. 条款33所述的方法,其中所述传染病是流感、人呼吸道合胞体病毒引起的呼吸道感染、百日咳、炭疽或疟疾。

[0234] 35. 通过抗体中和毒素、病毒、细菌或过敏原的方法,所述方法包括下列,由下列组成,或基本上由下列组成:将条款1至28中任一项所述的组合物给予个体。

[0235] 36. 条款35所述的方法,其中所述毒素是药物物质,如可卡因。

[0236] 37. 条款32至36中任一项所述的方法,其中所述个体是哺乳动物,优选人。

[0237] 38. 试剂盒,有效用于治疗或预防通过体液免疫应答缓解的疾病或病症;或有效用于治疗或预防传染病;涉及膜表面结合的癌抗原的癌症;或需要隔离循环中的抗原的疾病或病症,如阿尔茨海默氏症;或有效用于通过抗体中和毒素、病毒、细菌或过敏原,其中所述试剂盒包括下列,由下列组成,或基本上由下列组成:条款1至28中任一项所述的组合物,及其使用说明。

[0238] 39. 制备条款1所述的组合物的方法,包括下列,由下列组成,或基本上由下列组成:使S100卵磷脂和胆固醇的均质混合物在抗原存在的情况下进行水合,以形成包封抗原的脂质体制剂;将脂质体制剂挤出,然后与佐剂混合;冻干和在包括疏水物质连续相的载体中重构所得产物。在可选的实施方式中,水合步骤可在二油酰基-磷脂酰胆碱(DOPC)和胆固醇的均质混合物存在的情况下进行。

[0239] 40. 制备条款1所述的组合物的方法,包括下列,由下列组成,或基本上由下列组成:使二油酰基-磷脂酰胆碱(DOPC)和胆固醇的均质混合物在抗原和佐剂存在的情况下进行水合,以形成包封抗原和佐剂的脂质体制剂;冻干和在包括疏水物质连续相的载体中重构脂质体制剂。在可选的实施方式中,水合步骤可在S100卵磷脂和胆固醇的均质混合物存在的情况下进行。

[0240] 本发明通过下列非限制性实例被进一步示例。

实施例

[0241] 实施例1

[0242] 无病原体雌性CD1小鼠,6-8周龄,得自Charles River Laboratories (St Constant, QC, Canada),并按照机构指导被安置,水和食物自由采食,处于在过滤器控制的空气循环下。

[0243] H5N1重组血凝素蛋白,购自Protein Sciences (Meridien, CT, USA)。该重组蛋白具有72,000道尔顿的近似分子量,并且相应于血凝素糖蛋白——H5N1流感病毒表面存在的抗原性蛋白。这种重组蛋白,在后文中被命名为rHA,用作模型抗原,以测试疫苗制剂的效力。rHA以1微克每50微升剂量使用。

[0244] 通过如下评估疫苗效力:酶联免疫吸附分析(ELISA)——能够检测免疫化动物血清中的抗原特异性抗体水平的方法。对以固定间隔(例如,每四周)从免疫化小鼠收集的血清进行ELISA,可用于监测对给定疫苗制剂的抗体应答。简言之,用抗原(rHA,1微克/毫升)涂覆96孔微量滴定板,在4摄氏度下过夜,用3%明胶阻断30分钟,然后通过系列血清稀释度在4摄氏度下培育过夜,一般起始于1/2000的稀释度。然后将1/500稀释度的二级试剂(结合于碱性磷酸酶的蛋白质G,EMD化学物质,Gibbstown, NJ, USA)加入各孔,在37摄氏度下1小时。在通过包含1毫克/毫升4-硝基苯磷酸二钠盐六水合物(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Switzerland)的溶液60分钟培育后,利用微量滴定板读取器(ASYS Hitech GmbH, Austria)测量各孔的405纳米吸光度。按照Frey A. et al. (Journal of Immunological Methods, 1998, 221: 35-41)所述,计算端点滴定度。计算的滴定度表示,来自免疫化小鼠的血清样品中观察到的吸光度,相对于来自天然非免疫化对照小鼠的血清样品,统计学显著增加时的最高稀释度。滴定度表示为端点稀释度的log10值。

[0245] 为配制相应于本发明的疫苗,使S100卵磷脂和胆固醇(Lipoid GmbH, 德国)的10:

1w:w均质混合物在磷酸盐缓冲液中存在rHA的情况下进行水合,以形成包封rHA的脂质体。简言之,将775微升的50毫摩尔磷酸盐缓冲液(pH7.4)中20微克rHA加入132毫克S100卵磷脂/胆固醇混合物,以形成约900微升包封rHA抗原的脂质体悬浮液。然后通过使材料经过配备200纳米聚碳酸酯膜的手动微型挤出器(Avanti,Alabaster,AL,USA),挤出脂质体制剂。为掺入佐剂,将尺寸设定的脂质体混合物与20微克Pam-3-Cys-Ser-(Lys)4(被命名为P3C)佐剂(EMC Microcollections GmbH,德国)在100微升磷酸盐缓冲液中充分混合。在用水稀释一半最终混合物后,利用Virtis Advantage冷冻干燥机(SP Industries,Warminster,PA,USA)将脂质体悬浮液冻干。对于每1毫升包含rHA和P3C的原始脂质体悬浮液,利用800微升矿物油载体——相当于弗氏不完全佐剂(已知作为Montanide® ISA51,由Seppic,法国供应)重构冻干的脂质体,以形成无水脂质体悬浮液。各疫苗剂量由50微升上述制剂组成,该制剂包含脂质体、rHA抗原、P3C佐剂和矿物油载体。该疫苗制剂将被称为无水/脂质体/P3C/疏水载体。

[0246] 将上述无水脂质体制剂的效力与对照疫苗的效力进行比较,该对照疫苗由1微克rHA和50微克氢氧化铝(alhydrogel,Sigma,Mississauga,ON,Canada,在后文中被称为矾(alum))在50微升的50毫摩尔磷酸盐缓冲液(pH7.4)中组成。一组小鼠(N=9)被注射一次(无加强剂量)配制在50微升无水/脂质体/P3C/疏水载体中的1微克rHA抗原和1微克P3C佐剂,如上所述。第2组小鼠(N=8)通过悬浮于50毫摩尔磷酸盐缓冲液中的1微克rHA和50微克矾佐剂接种疫苗两次(第0天和第28天)。全部小鼠均在侧翼区肌肉内接种疫苗,并且在免疫化后3、4和8周收集血清样品。通过ELISA检测这些血清的rHA抗体滴定度,如上所述。

[0247] 该实验结果显示在图1中。第2组小鼠在给予矾佐剂对照疫苗后生成可检测的抗原特异性抗体应答。第1组小鼠——用无水/脂质体/P3C/疏水载体制剂接种疫苗,与第2组那些相比,生成显著增强的端点滴定度。第2组小鼠分别在疫苗接种后第3周和第4周(在加强剂量前)生成上至1/512,000(log10值为5.71)和上至1/256,000(log10值为5.41)的滴定度,和在疫苗接种后8周(在加强剂量后)生成上至1/4,096,000(log10等于6.61)的滴定度。这种抗体应答的存在验证由于疫苗接种生成真免疫应答。第1组小鼠——用相应于本发明的疫苗接种,能够在疫苗接种后3和4周时生成达到上至1/2,048,000(log10值为6.31)的端点滴定度,和在免疫化后8周时生成1/8,192,000(log10值为6.91)的端点滴定度。这些结果表明,单剂量包含棕榈酸佐剂的无水/脂质体/疏水载体制剂,与单剂量(第3周和第4周数据点)或加强剂量的(第8周数据点)水性矾系对照疫苗相比,能够生成增强的体内免疫应答。

[0248] 实施例2

[0249] 无病原体的年轻成年雌性Balb/C小鼠得自Charles River Laboratories(St Constant, QC, Canada),并按照机构指导被安置,水和食物自由采食,处于在过滤器控制的空气循环下。

[0250] 百日咳类毒素蛋白来自Biocine(Connaught Biosciences,Toronto,ON,Canada)。这种多亚基蛋白具有106千道尔顿的近似分子量,并且相应于百日咳杆菌——百日咳的致病细菌——生成的抗原性毒素。这种蛋白质,在后文中被命名为PT,用作模型抗原,以测试疫苗制剂的效力。PT以1微克每50微升剂量使用。

[0251] 疫苗效力通过用百日咳杆菌进行活细菌攻击来评估。在疫苗接种后56天,用 9.1×10^8 百日咳杆菌气雾接种攻击小鼠。将几个小鼠立即处死,以建立基线细菌肺计数。监测并

在攻击后8和15天处死剩余小鼠，建立细菌肺计数。

[0252] 为配制相应于本发明的疫苗，使DOPC和胆固醇 (Lipoid GmbH, 德国) 的10:1w:w均质混合物在磷酸盐缓冲液中存在PT和Pam-3-Cys-Ser- (Lys) 4 (被命名为P3C) 的情况下进行水合，以形成包封PT和P3C的脂质体。简言之，将850微升50毫摩尔磷酸盐缓冲液中各20微克PT和P3C加入132毫克S100卵磷脂/胆固醇混合物，以形成约1毫升包封PT抗原和P3C佐剂的脂质体悬浮液。然后利用Virtis Advantage冷冻干燥机 (SP Industries, Warminster, PA, USA) 冻干脂质体制剂。对于每1毫升包含rHA和P3C的原始脂质体悬浮液，利用800微升矿物油载体——相当于弗氏不完全佐剂 (已知作为 **Montanide® ISA51**, 由Seppic, 法国供应) ——重构冻干的脂质体，以形成无水脂质体悬浮液。各疫苗剂量由50微升上述制剂组成，该制剂包含脂质体、PT抗原、P3C佐剂和矿物油载体。该疫苗制剂将被称为无水/脂质体/P3C/疏水载体。

[0253] 将上述无水脂质体制剂的效力与对照疫苗的效力进行比较，该对照疫苗由1微克PT和100微克氢氧化铝佐剂 (Alhydrogel, Sigma, Mississauga, ON, Canada, 在后文中被称为矾) 在100微升50毫摩尔磷酸盐缓冲液 (pH7.0) 中组成。一组小鼠 (N=11) 被注射一次 (无加强剂量) 如上所述配制在50微升无水/脂质体/P3C/疏水载体中的1微克PT抗原和1微克P3C佐剂。第2组小鼠 (N=9) 和第3组小鼠 (N=9) 用悬浮在100微升磷酸盐缓冲液中的1微克PT和100微克铝佐剂接种疫苗一次或三次 (第0天、第21天、和第31天)。小鼠在侧翼区肌肉内接种疫苗。第4组小鼠 (N=10) 在研究期间保持不接种疫苗。全部小鼠均在免疫化后第56天被攻击，并在攻击后8和15天建立细菌肺计数，如上所述。

[0254] 该实验结果显示在图2中。第4组 (天然) 小鼠不能够清除感染，细菌计数在攻击后8天高如每肺 2.5×10^5 cfu，在攻击后15天每肺 4.7×10^3 cfu。第2组小鼠——用单剂量矾佐剂对照疫苗接种，其细菌肺计数在攻击后8和15天分别高如每肺 8.9×10^3 和 3.1×10^2 cfu。第3组小鼠——用三剂量对照疫苗接种，其肺计数在各相同时间点高如每肺 3.5×10^3 和 1.8×10^3 cfu。第1组小鼠——用单剂量相应于本发明的疫苗接种，其细菌肺计数在攻击后8天高如每肺 6.2×10^4 cfu，在攻击后第15天全部动物每肺0cfu。单剂量相应于本发明的疫苗有效地保护小鼠防止细菌攻击，并使其完全清除肺感染。

[0255] 实施例3

[0256] 无病原体雌性新西兰白兔，重2-3kg，得自Charles River Laboratories (St Constant, QC, Canada)，并按照机构指导被安置，水和食物自由采食，处于在过滤器控制的空气循环下。

[0257] 炭疽重组保护性抗原购自List Biologics (Campbell, CA)。这种重组蛋白具有83,000道尔顿的近似分子量，并相应于保护性抗原蛋白——炭疽杆菌生成的三蛋白质外毒素的细胞结合组分。这种重组蛋白——在后文中被命名为rPA，用作模型抗原，以测试疫苗制剂的效力。rPA以8微克每100微升剂量使用。

[0258] 通过如下评估疫苗效力：酶联免疫吸附分析 (ELISA) ——能够检测免疫化动物血清中的抗原特异性抗体水平的方法。以固定间隔 (例如，每四周) 对从免疫化小鼠收集的的血清进行ELISA，可用于监测对给定疫苗制剂的抗体应答。ELISA如实施例1所述进行，利用1微克/毫升的rPA作为涂覆抗原。

[0259] 为配制相应于本发明的疫苗，使DOPC卵磷脂和胆固醇 (Lipoid GmbH, 德国) 的10:

1w:w均质混合物在rPA和Pam-3-Cys (P3C) 存在的情况下进行水合,以形成包封rHA和P3C的脂质体。简言之,将850微升无菌水中的80微克rPA和20微克P3C加入132毫克DOPC卵磷脂/胆固醇混合物,以形成约1毫升包封rHA抗原和P3C佐剂的脂质体悬浮液。在用无菌水稀释至足够量后,利用Virtis Advantage冷冻干燥机(SP Industries,Warminster,PA,USA)冻干脂质体悬浮液。对于每1毫升包含rPA和P3C的原始脂质体悬浮液,利用800微升矿物油载体——相当于弗氏不完全佐剂(已知作为Montanide® ISA51,由Seppic,法国供应)——重构冻干的脂质体,以形成无水脂质体悬浮液。各疫苗剂量由100微升上述制剂组成,该制剂包含脂质体、rPA抗原、P3C佐剂、和矿物油载体。该疫苗被命名为疫苗C(发明)。

[0260] 将上述疫苗制剂的效力与对照疫苗的效力进行比较,该对照疫苗由8微克rPA和350微克氢氧化铝(Alhydrogel)佐剂(Sigma, Mississauga, ON, Canada)在100微升无菌水中组成。一组兔子(N=8)被注射一次(无加强剂量)如上所述配制在100微升疫苗制剂中的8微克rPA抗原和2微克P3C佐剂(第1组)。第2组兔子(N=8)用悬浮在无菌水中的8微克rPA和350微克矾佐剂接种疫苗三次(第0、28和84天)。全部兔子均在右腓肠肌肌内接种疫苗,并且在免疫化后3、4、8、12、16、20和24周收集血清样品。通过ELISA检测这些血清的rPA抗体滴定度,如上所述。

[0261] 该实验结果显示在图3中。第2组兔子在给予矾佐剂对照疫苗后生成可检测的抗原特异性抗体应答。第1组兔子——用疫苗C制剂接种疫苗,与第2组那些相比,在早期(加强剂量前)时间点生成显著增强的端点滴定度。第2组兔子分别在疫苗接种后3和4周(在加强剂量前)生成上至1/64,000(平均log10值为4.66)和上至1/256,000(平均log10值为4.73)的滴定度,和在疫苗接种后8周(在加强剂量后)生成上至1/2,048,000(平均log10等于5.86)的滴定度。这种抗体应答的存在验证了由于疫苗接种生成的真免疫应答。第1组兔子——用相应于本发明的疫苗接种,能够在疫苗接种后3和4周时生成达到上至1/2,048,000(平均log10值为6.20和6.09)的端点滴定度,和在免疫化后8周时生成达到上至1/8,192,000(平均log10值为6.53)的端点滴定度。这些结果显示,单剂量包含Pam-3-Cys佐剂的脂质体/疏水载体制剂能够体内生成的抗体平均高于通过水性矾对照疫苗可实现的抗体的34.6倍和22.9倍(分别在3和4周),证明早在单次疫苗接种后三周生成惊人强免疫应答的能力。

[0262] 实施例4

[0263] 无病原体雌性CD1小鼠,6-8周龄,得自Charles River Laboratories(St Constant, QC, Canada),并按照机构指导被安置,水和食物自由采食,处于在过滤器控制的空气循环下。

[0264] H5N1重组血凝素蛋白购自Protein Sciences(Meriden, CT, USA)。这种重组蛋白具有72,000道尔顿的近似分子量,并且相应于血凝素糖蛋白——H5N1流感病毒表面存在的抗原性蛋白。这种重组蛋白,在后文中被命名为rHA,用作模型抗原,以测试疫苗制剂的效力。rHA以1微克每50微升剂量使用。

[0265] 通过如下评估疫苗效力:酶联免疫吸附分析(ELISA)——能够检测免疫化动物血清中的抗原特异性抗体水平的方法。以固定间隔(例如,每四周)对从免疫化小鼠收集的血清进行ELISA,可用于监测对给定疫苗制剂的抗体应答。ELISA如实施例1所述进行。

[0266] 为配制相应于本发明的疫苗,使S100卵磷脂和胆固醇(Lipoid GmbH,德国)的10:1w:w均质混合物在磷酸盐缓冲液中存在rHA和Pam-3-Cys (P3C)的情况下进行水合,以形成

包封rHA和P3C的脂质体。简言之,将850微升50毫摩尔磷酸盐缓冲液中rHA和P3C各20微克加入132毫克S100卵磷脂/胆固醇混合物,以形成约1毫升包封rHA抗原和P3C佐剂的脂质体悬浮液。将脂质体制剂用无菌水稀释至足够量,然后利用Virtis Advantage冷冻干燥机(SP Industries,Warminster,PA,USA)冻干。对于每1毫升包含rHA和P3C的原始脂质体悬浮液,利用800微升矿物油载体(Montanide® ISA51,由Seppic,法国供应)重构冻干的脂质体,以形成无水脂质体悬浮液。各疫苗剂量由50微升上述制剂组成,该制剂包含脂质体、rHA抗原、P3C佐剂、和矿物油载体。该疫苗制剂将被称为脂质体/P3C/疏水载体。该制剂用于接种第1组小鼠(n=10)。

[0267] 第2组小鼠(n=10)在脂质体/疏水载体不存在的情况下用1微克rHA和1微克P3C每50微升剂量治疗。第3组小鼠(n=10)用下列治疗:1微克rHA和1微克P3C每50微升剂量,其被配制为水性/脂质体/P3C疫苗,在疏水载体不存在的情况下。第4组小鼠(n=10)用下列治疗:1微克rHA,其被配制为脂质体/疏水载体疫苗,在P3C不存在的情况下。全部小鼠均在侧翼区肌内接种疫苗,并且在免疫化后3、4、8、12、16和20周收集血清样品。如述通过ELISA检测这些血清的rHA抗体滴定度。

[0268] 测试这些疫苗制剂的效力,以评价这些疫苗制剂的组分的相对贡献(参见图4)。全部对照组(第2、3和4组)小鼠的滴定度始终低于用疫苗A接种的第1组的滴定度,表明该制剂的全部组分均可对于增强的免疫原性非常重要。例如,在疫苗接种后第8周,第1组(用疫苗A接种)的小鼠能够生成达到上至1/2,048,000(平均log10值为5.65)的端点滴定度,而第2、3和4组的小鼠分别能够生成1/64,000(平均log10值为4.41)、1/128,000(平均log10值为4.44)和1/128,000(平均log10值为4.69)的端点滴定度。第1组小鼠生成的滴定度显著高于($p<0.0001$,通过方差单向分析)三对照疫苗组中任一组生成的滴定度。这表明在模拟该制剂最大免疫原性方面涉及疫苗制剂A的全部组分,具体地抗原、脂质体、棕榈酸佐剂和疏水载体。

[0269] 实施例5

[0270] 无病原体雌性Balb/C小鼠,6-12周龄,得自Charles River Laboratories(St Constant, QC, Canada),并按照机构指导被安置,水和食物自由采食,处于在过滤器控制的空气循环下。

[0271] 疫苗制剂所用抗原是热失活流感菌株A/PR/8/34(H1N1)。通过在鸡蛋中增殖制备病毒原料。迅速解冻等份A/PR/8/34病毒原料,并置于56摄氏度水浴30分钟,以使病毒热失活。

[0272] 将疫苗在第0天、在异氟醚麻醉下肌内给予大腿肌中(一个疫苗剂量分成两个注射,每腿一个)。在疫苗接种后当周称重小鼠,以确保疫苗本身不致病。

[0273] 在第28天,用异氟醚将小鼠麻醉,并鼻内接种 $10\times\text{MLD}_{50}$ 病毒(两次单独给予25微升,每次各鼻孔等分)。然后通过如下监测小鼠10天:测量重量、温度、和水合,和观察表现、体态、和行为。将达到预定发病点的小鼠执行安乐死。

[0274] 第1组小鼠(n=10)仅用盐水接种,其充当阴性对照疫苗。

[0275] 第2组小鼠(n=10)用配制在Alhydrogel中的 $2.56\times 10^3\text{TCID}_{50}$ 热失活流感菌株A/PR/8/34(H1N1)接种。

[0276] 第3组小鼠(n=10)用脂质体/P3C/疏水载体疫苗接种。简而言之,使S100卵磷脂和

胆固醇 (Lipoid GmbH, 德国) 的10:1 (w:w) 均质混合物在热失活流感菌株A/PR/8/34和无菌水存在的条件下进行水合, 以形成约850微升包封抗原的脂质体。然后添加Pam-3-Cys (P3C) 佐剂, 充分混合脂质体, 并将混合物用无菌水稀释至足够量, 然后利用Virtis Advantage冷冻干燥机 (SP Industries, Warminster, PA, USA) 冻干。对于每1毫升包含A/PR/8/34和P3C的原始脂质体悬浮液, 利用800微升矿物油载体 (Montanide® ISA51, Seppic, 法国) 重构冻干的脂质体, 以形成无水脂质体悬浮液。各剂量体积为50微升, 并且包含脂质体、流感菌株A/PR/8/34 (2.56×10^3 TCID₅₀)、P3C (1微克)、和矿物油载体。

[0277] 该实验结果显示在图5中。第1组小鼠——仅用盐水接种, 迅速产生流感感染的临床标志, 并到第4天全部死于感染。第2组小鼠——用配制在Alhydrogel中的抗原接种, 证实在流感感染后中等严重的临床症状, 其中30%动物死于感染。但是, 第3组小鼠——用脂质体/P3C/疏水载体疫苗接种, 具有相对较轻的临床症状, 并且100%存活于流感感染。

[0278] 这些观察结果证明, 配制在本发明疫苗中的Pam-3-Cys可增强对失活病毒疫苗制剂的免疫应答, 如感染后对病毒的控制增强证明。

[0279] 实施例6

[0280] 无病原体雌性CD1小鼠, 6-8周龄, 得自Charles River Laboratories (St Constant, QC, Canada), 并按照机构指导被安置, 水和食物自由采食, 处于在过滤器控制的空气循环下。

[0281] 如实施例1和4, H5N1重组血凝素蛋白——相应于H5N1流感病毒表面的血凝素糖蛋白, 购自Protien Sciences (Meriden, CT, USA)。这种重组蛋白, 在后文中被命名为rHA, 用作模型抗原, 以测试疫苗制剂的效力。rHA以1微克每50微升剂量使用。

[0282] 通过如下评估疫苗效力: 酶联免疫吸附分析 (ELISA) ——能够检测免疫化动物血清中的抗原特异性抗体水平的方法。以固定间隔 (例如, 每四周) 对从免疫化小鼠收集的血清进行ELISA, 可用于监测对给定疫苗制剂的抗体应答。ELISA如实施例1所述进行。

[0283] 本实施例中两疫苗均如实施例4描述配制。总体而言, 对于相应于本发明的疫苗, 利用处于50毫摩尔磷酸盐缓冲液中的rHA抗原和Pam-3-Cys (P3C) 佐剂使S100卵磷脂和胆固醇进行水合。将最终脂质体制剂冻干, 然后用ISA51重构。最终疫苗由50微升如下制剂组成, 该制剂包含脂质体、1微克rHA抗原、1微克P3C佐剂、和矿物油载体。该疫苗制剂将被称为脂质体/P3C/疏水载体。该制剂用于接种第1组小鼠 (n=9)。

[0284] 第2组小鼠 (n=9) 用包含脂质体、1微克rHA、1微克咪喹莫特 (IMQ) 佐剂、和矿物油载体的制剂治疗。该疫苗将被称为脂质体/IMQ/疏水载体。总体而言, 利用50毫摩尔磷酸盐缓冲液中的rHA抗原和IMQ佐剂 (InvivoGen, San Diego, CA, USA), 使S100卵磷脂和胆固醇进行水合。将最终脂质体制剂冻干, 然后用ISA51重构。

[0285] 全部小鼠均在侧翼区肌肉内接种疫苗, 并且在免疫化后4周收集血清样品。如实施例1所述, 通过ELISA检测这些血清的rHA抗体滴定度。

[0286] 测试这些疫苗制剂的效力, 以评价脂质体/疏水载体制剂中P3C佐剂的相对贡献 (参见图6)。第2组小鼠在给予咪喹莫特佐剂的对照疫苗后生成可检测的抗原特异性抗体应答。第1组小鼠——用脂质体/P3C/疏水载体制剂接种, 与第2组那些相比, 生成显著增强的端点滴定度 ($P < 0.005$)。第2组小鼠在疫苗接种后28天 (4周) 生成上至1/128,000 (\log_{10} 值为5.11) 的滴定度。如实施例1所述, 这种抗体应答的存在验证了由于疫苗接种生成的真免疫

应答。第1组小鼠,用相应于本发明的疫苗接种,能够在免疫化后四周生成达到上至1/1,024,000(log10值为6.01)的端点滴定度。该数据表明,相应于本发明的疫苗(脂质体/P3C/疏水载体)能够刺激特异性体液免疫应答,该特异性体液免疫应答显著强于利用不同佐剂制备的比较疫苗(脂质体/IMQ/疏水载体)。

[0287] 实施例7

[0288] 无病原体雌性C57BL6小鼠,6-8周龄,得自Charles River Laboratories(St Constant, QC, Canada),并按照机构指导被安置,水和食物自由采食,处于在过滤器控制的空气循环下。

[0289] 终结未治疗“天然”小鼠,并收集脾。由脾细胞制备单个细胞悬浮液,并利用ACK裂解缓冲液裂解血液红细胞。利用来自Miltenyi(Auburn, CA, USA)的阴性选择磁分离试剂盒分离B细胞。将细胞重新悬浮于完全RPMI介质,该介质包含10%FBS、1%青霉素-链霉素、1%L-谷氨酰胺和0.1%β-巯基乙醇(c-RPMI),最终浓度为 2×10^6 细胞/mL。将B细胞与抗Ig(2.5ug/mL;BD Biosciences, Mississauga, Canada)和抗CD40(1ug/mL;BD Biosciences)一起加入96孔板的孔(2×10^5 细胞/孔)。使用下列佐剂刺激B细胞,一式三份:Pam2Cys(EMC Microcollections, Tuebingen, 德国)、Pam3Cys(EMC Microcollections)、Poly I:C(Thermo Fisher, MI, USA)和LPS(Sigma-Aldrich, Oakville, Canada),或不使用佐剂。除LPS的剂量为100ng/mL、10ng/mL和1ng/mL外,各佐剂的剂量为10ug/mL、1ug/mL和0.1ug/mL。将细胞在37°C/5%CO₂下培育3天。在实验结束前18小时,将[³H]-胸苷加入各孔,最终浓度为0.2uCi/孔。利用Titertek Cell Harvester(Skatron Instruments, Sterling, VA, USA)将板收集于过滤膜上,然后利用Beckman LS6000IC液体闪烁计数器(Beckman Coulter Inc., Mississauga, ON, Canada)计数该过滤膜。通过将三份每分钟计数(CPM)平均化来定量增殖,该每分钟计数代表[³H]-胸苷的掺入量。

[0290] 佐剂刺激B细胞的结果显示,Pam3Cys和Pam2Cys可诱导有效的B细胞增殖,Poly I:C则不(参见图7)。LPS,被包括作为阳性对照,已知诱导低浓度B细胞增殖。基于这些结果有理由预期,包含Pam2Cys或Pam3Cys的疫苗将在体内对B细胞具有类似影响,并且将能够促进生成类似水平的抗原特异性抗体。

[0291] 说明书中引用的全部出版物和专利申请均被合并作为参考,如同具体和分别地指出各单独出版物或专利申请被合并作为参考。任何出版物的引用是引用其在申请日前的公开内容,并且不应被解释为承认,以在先发明为由,本发明无权先于该出版物。

[0292] 虽然已以理解清楚为目的通过示例和实例对前述发明的一些细节进行描述,但基于本发明的教导对于本领域技术人员显而易见的是,可对其进行某些改变和改动,而没有脱离所附权利要求的精神或范围。

[0293] 必须要注意的是,如说明书和权利要求书中所用,单数形式“a”、“an”和“the”包括复数指代,除非上下文明确另外指示。除非另外限定,本文所用的所有技术和科学术语均与本发明所属领域技术人员的普遍理解具有相同含义。

[0294] 短语“和/或”,如说明书和权利要求书中所用,应被理解意为如此关联的要素中的“任一者或两者”,即在一些情况下关联地存在和在其他情况下分离地存在的要素。通过“和/或”列举的多个要素应被解释为处于相同情况,即,如此关联的要素中的“一个或多个(一种或多种)”。通过“和/或”格式具体确定的要素以外其他要素可任选地存在,无论与具

体确定的那些要素相关或不相关。因此,作为非限制性实施例,“A和/或B”的指代,在结合开放式语言如“包括”使用时,在一个实施方式中,可指代仅A(任选地包括B以外的其他要素);在另一实施方式中,可指代仅B(任选地包括A以外的其他要素);在又一实施方式中,可指代A和B(任选地包括其他要素);等等。

[0295] 如说明书和权利要求书中所用,“或”应被理解为包括与上文限定的“和/或”相同的含义。例如,当区分列表中的项目时,“或”或“和/或”应被解释为是包括性的,即,包括多个要素或要素列表中的至少一种,但还包括多于一种,和任选地,另外的未列举项目。

[0296] 如本文所用——无论在说明书还是所附权利要求书中,过渡术语“包括”(comprising或including)、“带有”、“具有”、“包含”、“涉及”及类似形式将被理解为是包括性的或开放式的(即,意为包括但不限于),并且其不排除未记载的要素、材料或方法步骤。关于权利要求,仅过渡短语“由……组成”和“基本上由……组成”分别是封闭式的或半封闭式的过渡短语。过渡短语“由……组成”排除任何未具体记载的要素、步骤、或成分。过渡短语“基本上由……组成”将范围限制于所述要素、材料或步骤和不实质上影响本文公开和/或主张的发明的基本特征(一个或多个)的那些。

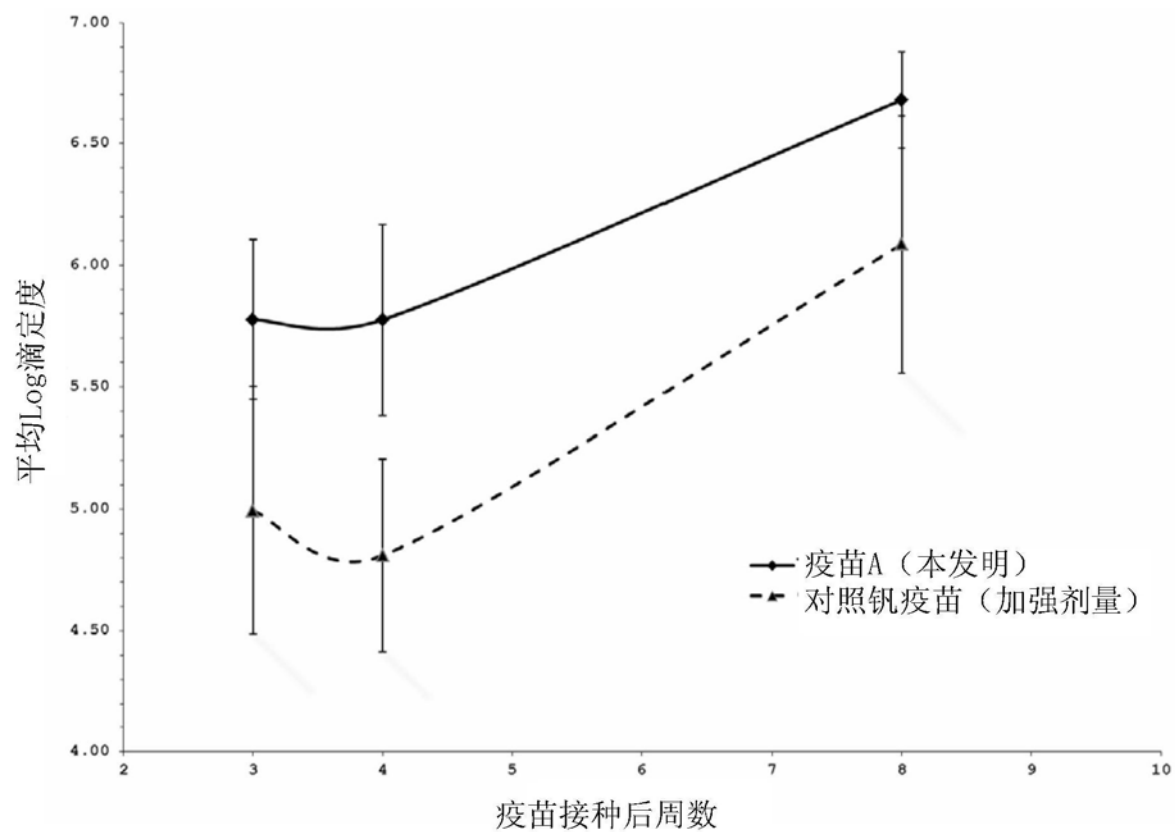


图1

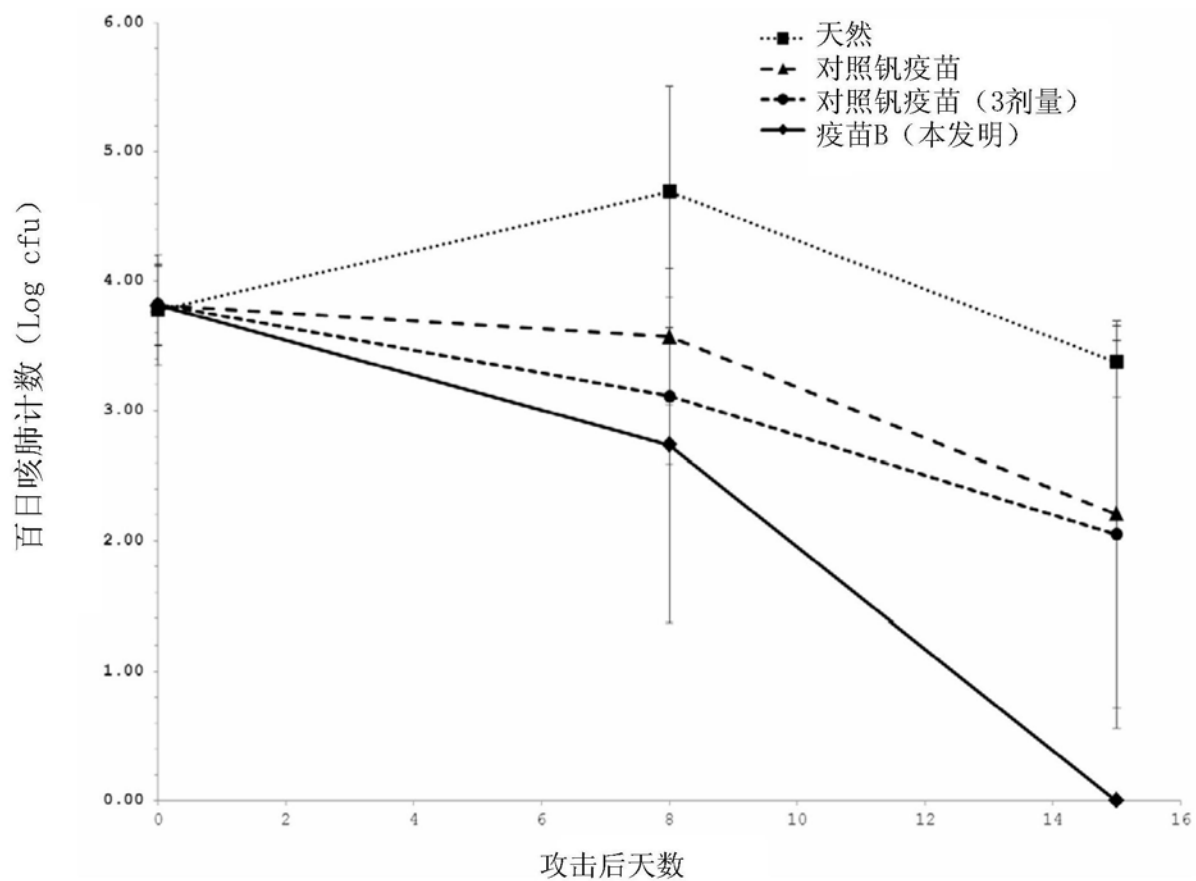


图2

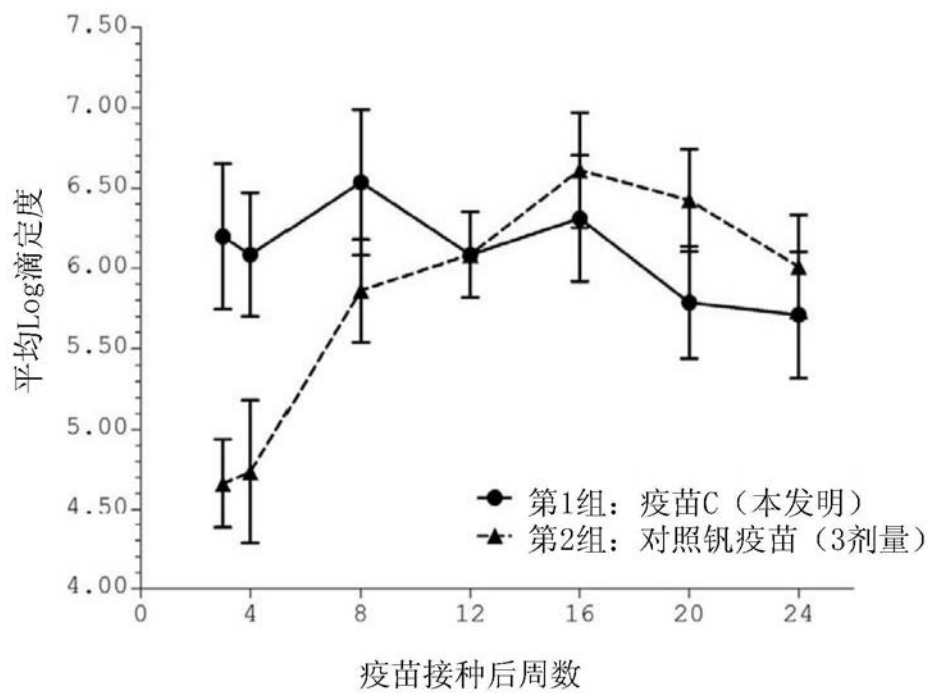


图3

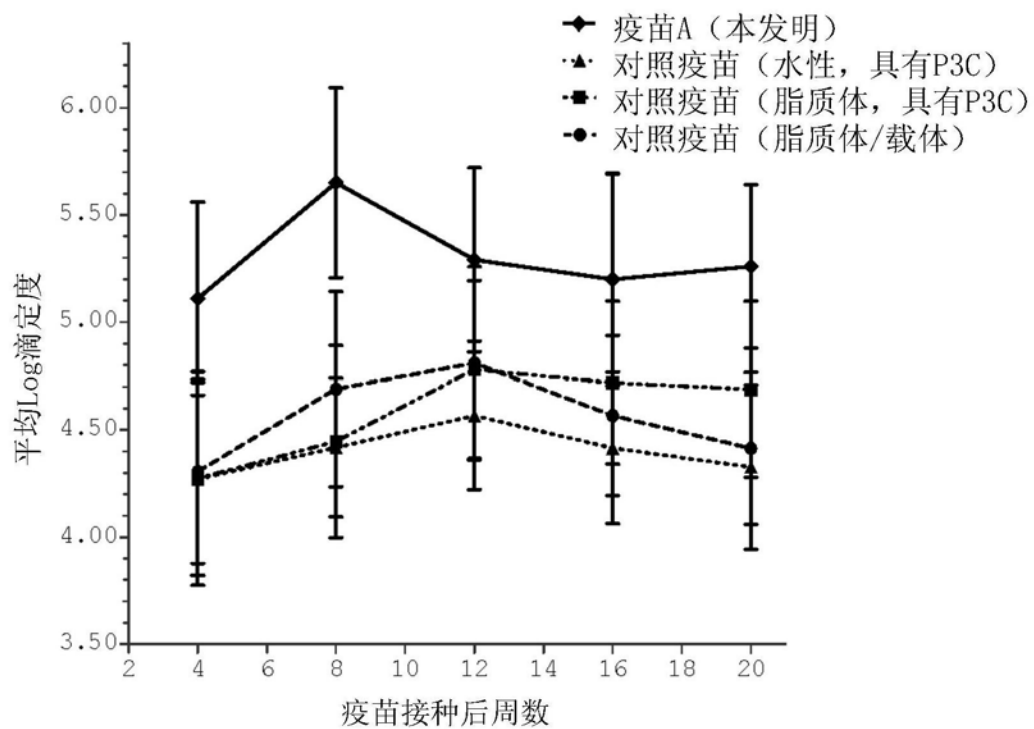


图4

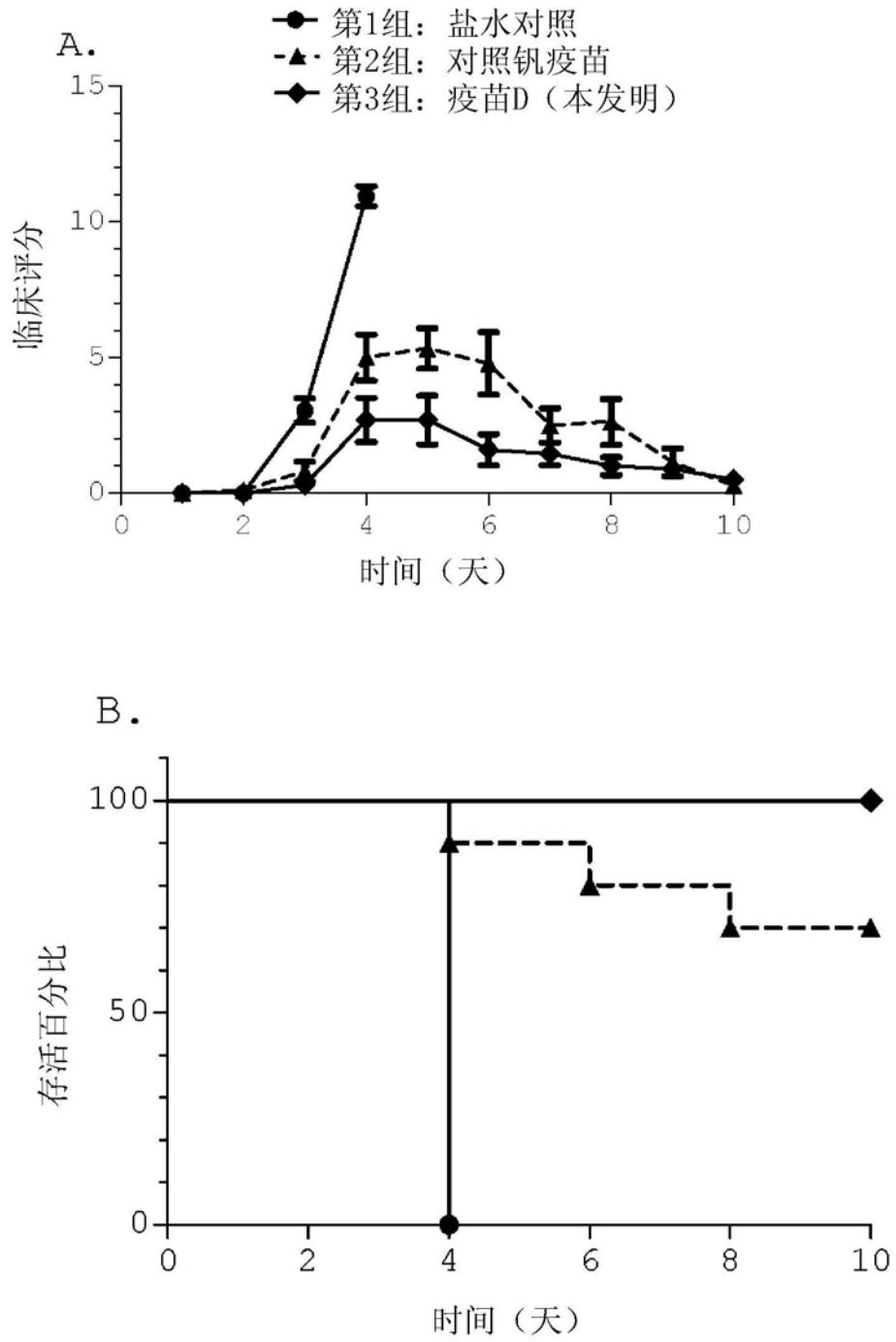


图5

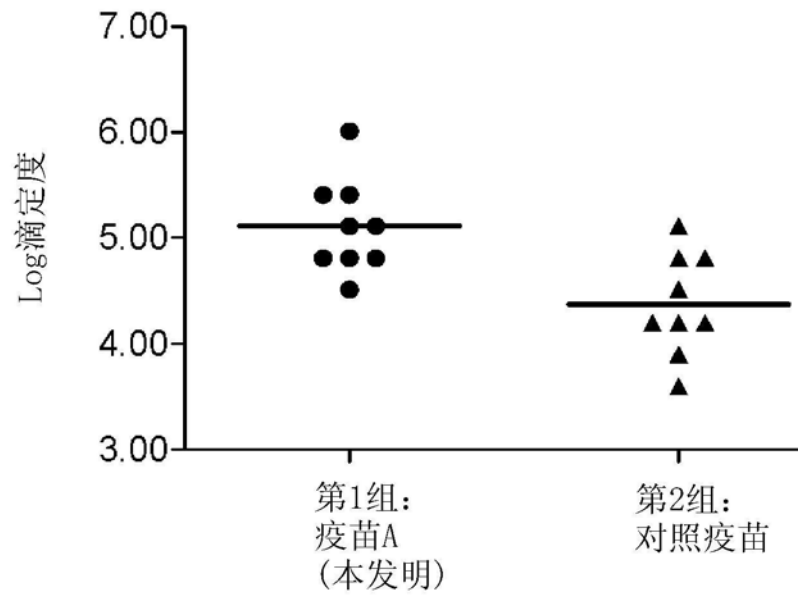


图6

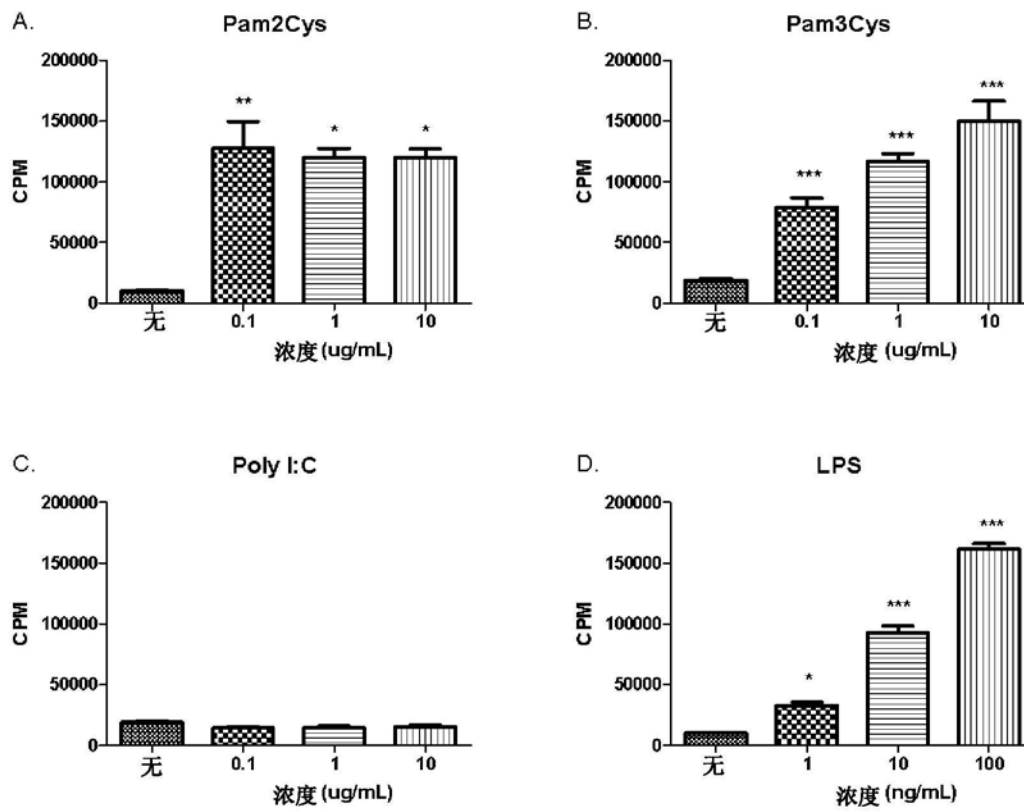


图7