



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01816557.5

[43] 公开日 2004 年 10 月 6 日

[11] 公开号 CN 1535140A

[22] 申请日 2001.9.28 [21] 申请号 01816557.5

[30] 优先权

[32] 2000.9.28 [33] US [31] 60/236,077

[86] 国际申请 PCT/US2001/030541 2001.9.28

[87] 国际公布 WO2002/026212 英 2002.4.4

[85] 进入国家阶段日期 2003.3.28

[71] 申请人 希龙公司

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 J·-H·方 M·辛格

D·奥黑根 M·霍拉

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所

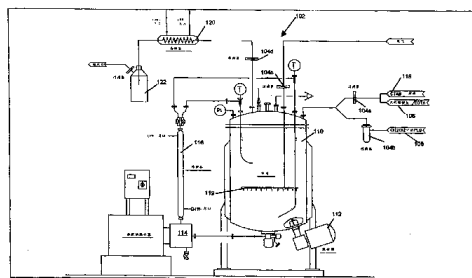
代理人 徐 迅

权利要求书 6 页 说明书 32 页 附图 1 页

[54] 发明名称 微粒体组合物及其生产方法

[57] 摘要

本文公开了吸附了大分子和去污剂的复合物的微粒体，以及制备这种微粒体的方法及其使用。该微粒体包含如聚(α-羟基酸)、多羟基丁酸、聚己内酯、聚原酸酯、聚酐等的聚合物，并使用阳离子、阴离子或非离子去污剂形成。微粒体的表面吸附了生物活性大分子(如核酸、多肽、抗原和佐剂)和去污剂的复合物。较佳的聚合物是聚(D, L-丙交酯-共-乙交酯)，优选的聚合物其丙交酯/乙交酯的摩尔比为 40:60 到 60:40，分子量为 30,000 道尔顿到 70,000 道尔顿。优选的大分子是细菌和病毒抗原(如 HIV 抗原、B 型脑膜炎抗原、链球菌 B 抗原和流感 A 血凝素抗原)以及编码这些抗原的核苷酸。



1. 一种生物活性微粒体组合物，其特征在于，该组合物含有：
微粒体，该微粒体含有（a）选自聚（ α -羟基酸）、多羟基丁酸、聚己内酯、
5 聚原酸酯、聚酐、聚氰基丙烯酸酯的聚合物；和（b）与聚合物结合的第一去污剂部分；和
吸附到微粒体表面的复合物，所述复合物含有（a）第一生物活性大分子
和（b）第二去污剂部分；
其中所述第一去污剂部分和第二去污剂部分含有相同的去污剂或不同的
10 去污剂，其中所述第一生物活性大分子选自多肽、多核苷酸、多核苷、抗原、
药物、激素、酶、转录介体或翻译介体、代谢途径中间物、免疫调节剂和佐剂。
2. 如权利要求1所述的微粒体组合物，其特征在于，所述聚合物是选自
聚(L-丙交酯)、聚(D,L-丙交酯)和聚(D,L-丙交酯-共-乙交酯)的聚（ α -羟基酸）。
- 15 3. 如权利要求1所述的微粒体组合物，其特征在于，所述聚合物是聚(D,L-
丙交酯-共-乙交酯)。
4. 如权利要求3所述的微粒体组合物，其特征在于，所述聚(D,L-丙交酯
-共-乙交酯)的丙交酯/乙交酯的摩尔比为 30:70 到 70:30，分子量范围为
10,000-100,000 道尔顿。
- 20 5. 如权利要求3所述的微粒体组合物，其特征在于，所述聚(D,L-丙交酯
-共-乙交酯)的丙交酯/羟基乙酸的摩尔比为 40:60 到 60:40，分子量范围为
30,000-70,000 道尔顿。
6. 如权利要求1所述的微粒体组合物，其特征在于，所述第一和第二去
污剂部分含有相同的去污剂。
- 25 7. 如权利要求6所述的微粒体组合物，其特征在于，所述第一和第二去
污剂部分含有阳离子去污剂。
8. 如权利要求1所述的微粒体组合物，其特征在于，所述第一和第二去
污剂部分含有不同的去污剂。
9. 如权利要求8所述的微粒体组合物，其特征在于，所述第一去污剂部

分含有非离子去污剂，第二去污剂部分含有阳离子去污剂。

10. 如权利要求 9 所述的微粒体组合物，其特征在于，所述第一去污剂部分含有 PVA，第二去污剂部分含有 CTAB。

11. 如权利要求 1 所述的微粒体组合物，其特征在于，所述第一生物活
5 性大分子是多肽或多核苷酸。

12. 如权利要求 1 所述的微粒体组合物，其特征在于，所述第一生物活性大分子是选自 HIV 抗原、B 型脑膜炎抗原、链球菌 B 抗原和 A 型流感血凝素抗原的抗原。

13. 如权利要求 12 所述的微粒体组合物，其特征在于，所述 HIV 抗原选
10 自 gp120、gp140、p24gag、p55gag。

14. 如权利要求 1 所述的微粒体组合物，其特征在于，所述第一生物活性大分子是编码抗原的多核苷酸，该抗原选自 gp120、gp140、p24gag、p55gag 和流感 A 血球凝集素抗原。

15. 如权利要求 1 所述的微粒体组合物，其特征在于，所述第一生物活性大分子选自质粒、ELVIS 载体和 RNA 载体构建物。

16. 如权利要求 1 所述的微粒体组合物，其特征在于，它还含有选自多肽、多核苷酸、多核苷、抗原、药物、激素、酶、转录介体或翻译介体、代谢途径中间物、免疫调节剂和佐剂的第二生物活性大分子。

17. 如权利要求 16 所述的微粒体组合物，其特征在于，所述第二生物活
20 性大分子是佐剂。

18. 如权利要求 17 所述的微粒体组合物，其特征在于，所述佐剂选自 CpG 寡核苷酸、LTK63、LTR72、MPL 和铝盐。

19. 如权利要求 17 所述的微粒体组合物，其特征在于，所述佐剂是磷酸铝。

20. 如权利要求 1 所述的微粒体组合物，其特征在于，所述聚合物是选自聚(L-丙交酯)、聚(D,L-丙交酯)和聚(D,L-丙交酯-共-乙交酯)的聚(α -羟基酸)，所述第一和第二去污剂部分含有阳离子去污剂，所述第一生物活性大分子是多核苷酸。
25

21. 如权利要求 1 所述的微粒体组合物，其特征在于，所述聚合物是聚(D,L-丙交酯-共-乙交酯)，所述第一和第二去污剂部分含有 CTAB，所述第一生物活
30

性大分子是编码抗原的多核苷酸，该抗原选自 HIV 抗原、B 型脑膜炎抗原、链球菌 B 抗原和 A 型流感血凝素抗原。

22. 如权利要求 21 所述的微粒体组合物，其特征在于，所述抗原是选自 gp120、gp140、p24gag、p55gag 的 HIV 抗原。

5 23. 如权利要求 22 所述的微粒体组合物，其特征在于，所述第一生物活性大分子是 pCMV-p55gag。

24. 如权利要求 20 所述的微粒体组合物，其特征在于，所述第一去污剂部分和第二去污剂部分含有相同的阳离子去污剂，在组合物中，所述与聚合物结合的第一去污剂部分约占总去污剂的 10-90%。

10 25. 如权利要求 24 所述的微粒体组合物，其特征在于，在组合物中，所述与聚合物结合的第一去污剂部分约占总去污剂的 10-60%。

26. 如权利要求 25 所述的微粒体组合物，其特征在于，所述阳离子去污剂是 CTAB。

15 27. 如权利要求 10 所述的微粒体组合物，其特征在于，所述聚合物是选自聚(L-丙交酯)、聚(D,L-丙交酯)和聚(D,L-丙交酯-共-乙交酯)的聚(α -羧基酸)，所述第一生物活性大分子是多核苷酸。

28. 如权利要求 1-27 所述的微粒体组合物，其特征在于，所述组合物还含有药学上可接受的赋形剂。

20 29. 权利要求 28 所述的微粒体组合物的用途，其特征在于，用于疾病诊断。

30. 权利要求 28 所述的微粒体组合物的用途，其特征在于，用于疾病治疗。

31. 权利要求 28 所述的微粒体组合物的用途，其特征在于，用作疫苗。

25 32. 权利要求 28 所述的微粒体组合物的用途，其特征在于，用于增强免疫反应。

33. 一种向脊椎动物对象传递治疗有效量的生物活性大分子的方法，其特征在于，所述方法包括向所述脊椎动物对象给予权利要求 28 所述的微粒体组合物的步骤。

34. 一种生产微粒体组合物的方法，其特征在于，所述方法包括：

30 (a) 形成一种乳剂，该乳剂包括 (i) 选自聚(α -羧基酸)、多羟基丁酸、

聚己内酯、聚原酸酯、聚酞、聚氰基丙烯酸酯的聚合物，(ii)有机溶剂，(iii)去污剂和 (iv) 水；以及

(b) 从该乳剂中除去有机溶剂，形成微粒体；

其中，微粒体组合物中的总去污剂约有 10-90%与微粒体结合，其余的未
5 结合，所述微粒体不进行洗涤步骤。

35. 如权利要求 34 所述的方法，其特征在于，所述的乳剂是水包油包水乳剂，它由以下方法制备：

(a) 用含有水的第一水相乳化含有聚合物和有机溶剂的有机相，形成油包水乳剂；和

10 (b) 用(a)步骤形成的乳剂乳化含有阳离子去污剂和水的第二水相，形成水包油包水乳剂。

36. 如权利要求 34 所述的方法，其特征在于，除去有机溶剂后进行交叉流过滤步骤。

37. 如权利要求 36 所述的方法，其特征在于，所述去污剂是阳离子去污剂，它在乳剂中与聚合物的重量比约为 0.05:1 到约 0.5:1。
15

38. 如权利要求 37 所述的方法，其特征在于，所述乳剂中提供的阳离子去污剂与聚合物的重量比约为 0.1:1 到约 0.5:1，所述聚合物是聚(D,L-丙交酯-共-乙交酯)，所述阳离子去污剂是 CTAB。

39. 如权利要求 34 所述的方法，其特征在于，所述去污剂是阳离子去污剂，它在乳剂中与聚合物的重量比约为 0.001:1 到约 0.05:1。
20

40. 如权利要求 39 所述的方法，其特征在于，所述乳剂中提供的阳离子去污剂与聚合物的重量比约为 0.002:1 到约 0.04:1，其中阳离子去污剂是 CTAB，聚合物是聚(D,L-丙交酯-共-乙交酯)，并且微粒体不进行从组合物中除去过量 CTAB 的步骤。

41. 如权利要求 34 所述的方法，其特征在于，所述聚合物是聚(D,L-丙交酯-共-乙交酯)，其丙交酯/乙交酯的摩尔比范围为 40:60 到 60:40，其分子量为 30,000-70,000 道尔顿。
25

42. 一种微粒体组合物，其特征在于，它由权利要求 34 所述的方法制得。

43. 一种生产生物活性微粒体组合物的方法，其特征在于，所述方法包
30 括：

(a) 采用权利要求 34 所述的方法提供微粒体组合物；和

(b) 用生物活性大分子培养该微粒体组合物。

44. 如权利要求 43 所述的方法，其特征在于，所述生物活性大分子是多核苷酸。

5 45. 一种生产微粒体组合物的方法，其特征在于，所述方法包括：

采用乳化方法提供微粒体，所述微粒体包含：(a) 选自聚(α -羟基酸)、多羟基丁酸、聚己内酯、聚原酸酯、聚酐、聚氰基丙烯酸酯的聚合物；和 (b) 与所述聚合物结合的第一去污剂部分；

和在微粒体的表面吸附上生物活性大分子与第二去污剂的复合物；

10 其中第一去污剂部分和第二去污剂部分含有相同或不同的去污剂，所述生物活性大分子选自多肽、多核苷酸、多核苷、抗原、药物、激素、酶、转录介体或翻译介体、代谢途径中间物、免疫调节剂和佐剂。

46. 如权利要求 45 所述的方法，其特征在于，第一和第二去污剂部分含有相同的去污剂。

15 47. 如权利要求 46 所述的方法，其特征在于，所述的聚合物是选自聚(L-丙交酯)、聚(D,L-丙交酯)和聚(D,L-丙交酯-共-乙交酯)的聚(α -羟基酸)，所述第一和第二去污剂部分含有是阳离子去污剂，所述生物活性大分子是多核苷酸。

48. 如权利要求 47 所述的方法，其特征在于，在组合物中，所述与聚合物结合的第一去污剂部分约占总去污剂的 10-90%，在乳化过程中加入对应于第一和
20 第二去污剂部分的去污剂。

49. 如权利要求 48 所述的方法，其特征在于，所述乳化过程包括：

用含有水的第一水相乳化含有聚合物和有机溶剂的有机相，形成油包水乳剂；和

用步骤 (a) 形成的乳剂乳化含有去污剂和水的第二水相，形成水包油包水
25 乳剂。

50. 如权利要求 48 所述的方法，其特征在于，在组合物中，所述与聚合物结合的第一去污剂部分约占总去污剂的 10-60%。

51. 如权利要求 50 所述的方法，其特征在于，所述阳离子去污剂是 CTAB。

52. 如权利要求 45 所述的方法，其特征在于，所述第一去污剂部分含有第一
30 去污剂，第二去污剂部分含有不同于第一去污剂的第二去污剂。

53. 如权利要求 52 所述的方法, 其特征在于, 在乳化过程中加入所述第一去污剂, 在该乳化过程之后加入第二去污剂。

54. 如权利要求 53 所述的方法, 其特征在于, 所述第二去污剂与生物活性大分子同时加入。

5 55. 如权利要求 53 所述的方法, 其特征在于, 所述聚合物是选自聚(L-丙交酯、聚(D,L-丙交酯)和聚(D,L-丙交酯-共-乙交酯)的聚(α -羟基酸), 所述第一去污剂是非离子去污剂, 第二去污剂是阳离子去污剂, 所述生物活性大分子是多核苷酸。

10 56. 如权利要求 55 所述的方法, 其特征在于, 所述第一去污剂是 PVA, 第二去污剂是 CTAB。

57. 如权利要求 45 所述的方法, 其特征在于, 所述聚合物是聚(D,L-丙交酯-共-乙交酯), 其丙交酯/乙交酯的摩尔比为 40:60 到 60:40, 其分子量为 30,000-70,000 道尔顿。

微粒体组合物及其生产方法

5 相关申请描述

本申请涉及 2000 年 9 月 28 日申请的专利申请序列号 60/236,077 的相关申请，该申请在这里全部引入，以作参考。

技术领域

10 本发明总的涉及药物组合物。具体地说，本发明涉及具有吸附表面的微粒体、制备这种微粒体的方法及其应用。另外，本发明涉及含有可生物降解的微粒体的组合物，其中生物活性剂如治疗用的多核苷酸、多肽、抗原和佐剂都吸附在微粒体的表面。

15 背景

为了获得受控的、胃肠外传递的治疗用化合物，使用了微粒载体。将这种载体设计为在传递系统中长时间地保持活性剂。微粒载体的例子包括衍生自聚甲基丙烯酸甲酯聚合物的微粒载体，以及衍生自聚(丙交酯)（见美国专利 3,773,919）、聚(丙交酯-共-乙交酯)（被称做 PLG，见美国专利 4,767,628）
20 和聚乙二醇（被称作 PEG、见美国专利 5,648,095）的微粒体。聚甲基丙烯酸甲酯聚合物是不可降解的，而 PLG 颗粒则通过酯键的随机非酶促水解成乳酸和羟基乙酸而被生物降解，所生成的乳酸和羟基乙酸沿着正常的代谢途径排泄。

例如，美国专利 5,648,095 描述了具有胶囊化药物的微球体作为药物传递
25 系统在鼻、口、肺和口腔的传递中的用途。还描述了含有各种多肽生长因子的缓释制剂。见例如，国际出版号 WO 94/ 12158，美国专利 5,134,122 和国际出版号 WO 96/37216。

Fattal 等，*Journal of Controlled Release* 53:137-143(1998)描述了从吸附了寡核苷酸的聚烷基氨基丙烯酸酯（PACA）制备的极小颗粒。

还已使用了具有吸附或嵌入抗原的微粒载体，试图引发适当的免疫反应。这种载体给免疫系统提供了一个选择性抗原的多个拷贝，并促进局部淋巴结中抗原的引入和保持。这些颗粒可以被巨噬细胞吞噬，并且可以通过细胞因子释放增强抗原表达。例如，共同拥有的 1998 年 1 月 29 日的待授权申请 5 09/015,652 描述了使用吸附了抗原和包裹了抗原的微粒体刺激细胞介导的免疫反应，以及制备这类微粒体的方法。

例如，在共同拥有的 1998 年 1 月 29 日申请的待授权美国专利申请序列号第 09/015,652 中，公开了一种微粒体的形成方法，它包括将聚合物与有机溶剂混合，然后加入乳液稳定剂，如表面活性剂聚乙烯醇 (PVA)，然后蒸发 10 有机溶剂，即形成微粒体。微粒体的表面具有聚合物和稳定剂。然后使大分子如 DNA、多肽和抗原吸附到这些微粒体的表面上。

美国专利 5,814,482 和 6,015,686 公开了真核生物分层载体起始系统 (ELVIS 载体)，特别是从 α 病毒基因组 (如新培斯病毒) 衍生和构建得到的载体，用于刺激针对抗原的免疫反应、抑制病原体的方法、以及向 (尤其是) 真核生物 15 的细胞和动物传递异源核苷酸序列。

共同拥有的国际专利申请 PCT/US99/17308 和待授权美国专利申请 09/715,902 公开了吸附了大分子的微粒体的制备方法，这些大分子例如药物、多核苷酸、多肽、蛋白质、激素、酶、转录介体或翻译介体、代谢途径中间物中间物、免疫调节剂、抗原、佐剂或它们的组合物等。微粒体包含如聚(α - 20 羟基酸) (如 PLG)、多羟基丁酸、聚己内酯、聚原酸酯、聚酞等的聚合物，并使用如阳离子、阴离子或非离子去污剂制成。

虽然吸附了抗原的 PLG 微粒体比其它更毒的系统提供了重要的优越性，但是生物活性剂在微粒体表面上的吸附仍需改进。例如，将如多核苷酸、大的多肽等带电的或庞大的生物活性剂吸附到微粒体的表面常常很困难或不 25 可能。因此，仍需要用于这种制剂、尤其是用于高度敏感又难以配制的药物的灵活的传递系统。

发明综述

本发明人发现，通过确保在吸附时存在与大分子形成复合物的去污剂， 30 从而可提高大分子与微粒体的吸附去污剂。该存在可以通过例如在大分子吸

附时分别提供一定量的去污剂，或者确保生产微粒体的方法产生含有大量游离去污剂的产物而得以完成。这一方法与以前的技术方法有差别，在以前的方法中，在吸附大分子前，微粒体被彻底清洗，以除去残余的去污剂。例如，在上述 PCT/US99/17308 的实施例 5 中，在暴露于感兴趣的大分子前，先用水洗涤微粒体多次（即用水离心洗涤 4 次），这样的洗涤步骤基本上全部除去了游离的去污剂，结果在最终产物中 99% 以上的剩余的去污剂与微粒结合。

因此，根据本发明的第一个方面，提供的微粒体组合物包括：（1）微粒体，它还包含聚合物以及与聚合物结合的第一去污剂部分；和（2）生物活性大分子与第二去污剂部分的复合物，该复合物吸附于微粒体的表面。第一去污剂部分和第二去污剂部分可以含有相同的去污剂或不同的去污剂。

较佳的生物活性大分子选自多肽、多核苷酸、多核苷、抗原、药物、激素、酶、转录介体或翻译介体、代谢途径中间物、免疫调节剂和佐剂。较佳的聚合物是聚(α -羟基酸)，更佳的选自聚(L-丙交酯)、聚(D,L-丙交酯)和聚(D,L-丙交酯-共-乙交酯)。更佳的是聚(D,L-丙交酯-共-乙交酯)聚合物。较佳的聚(D,L-丙交酯-共-乙交酯)聚合物其丙交酯与乙交酯的摩尔比范围为 30:70 到 70:30，更佳为 40:60 到 60:40，其分子量为 10,000 到 100,000 道尔顿，更佳为 30,000 到 70,000 道尔顿。更佳的生物活性大分子包括细菌和病毒抗原（例如 HIV 抗原如 gp120、gp140、p24gag 和 p55gag，B 型脑膜炎抗原、链球菌 B 抗原、流感 A 血球凝聚素抗原）以及编码抗原的多核苷酸。生物活性大分子可以存在于例如质粒、ELVIS 载体或 RNA 载体构建物的形式中。特别优选的生物活性大分子是 pCMV-p55gag。

在一些实施例中，提供的微粒体组合物还具有生物活性大分子，它们可以是结合的或是游离的，甚至可以嵌在聚合物当中。例如，提供的微粒体组合物具有佐剂，具体而言是一个 Th1 刺激性佐剂。较佳的佐剂包括 CpG 寡聚核苷酸、LTK63、LTR72、MPL 和铝盐，包括磷酸铝。

在一些实施例中，第一去污剂部分和第二去污剂部分含有相同的去污剂。用于这一目的的优选去污剂是阳离子去污剂，例如 CTAB。在这样的实施例中，第一去污剂部分（它与聚合物结合）更佳约占组合物中总去污剂的 5-95%，更佳约占 10-90%，甚至更佳约占 10-60%，最佳约占 25-40%。

在其它实施例中，第一去污剂部分和第二去污剂部分含有不同的去污剂。

例如，第一去污剂可以含有非离子去污剂（如 PVA），第二去污剂可以含有阳离子去污剂（如 CTAB）。

根据本发明的另一方面，将一种药学上可接受的赋形剂加入上述微粒体组合物。

- 5 本发明的另一方面涉及向脊椎动物对象对象传递大分子，包括给予脊椎动物对象对象上述微粒体组合物。

在另一方面，本发明涉及在脊椎动物对象中引起细胞和/或体液免疫反应的方法，包括给予脊椎动物对象治疗有效量的上述微粒体组合物。

- 10 本发明另一方面涉及免疫方法，包括给予脊椎动物对象治疗有效量的上述微粒体组合物。

本发明其它方面涉及上述微粒体组合物用于疾病诊断、疾病治疗、疫苗、和/或增强免疫反应。

- 15 本发明的其它方面还涉及生产微粒体组合物的方法。通常，这些方法包括（a）形成乳剂，该乳剂包含（i）聚合物，选自聚（ α -羟基酸）、多羟基丁酸、聚己内酯、聚原酸酯、聚酞、聚氰基丙烯酸酯，（ii）有机溶剂，（iii）去污剂和（iv）水；随后，（b）除去有机溶剂。在此实施例中，得到的组合物中约 10-90%的总去污剂较佳地与微粒体结合，更佳约为 10-60%，最佳约为 25-40%。通常，这些微粒体组合物随后如上所述与生物活性大分子一起培养，以产生生物活性组合物。

- 20 较佳的乳剂是一种水包油包水(water-in-oil-in-water)乳剂，形成的方法包括：（a）用含有水的第一水相乳化含有聚合物和有机溶剂的有机相，形成油包水乳剂；和（b）用步骤（a）形成的乳剂乳化含有阳离子去污剂和水的第二水相，形成水包油包水乳剂。

- 25 在一些较佳的实施例中，去污剂是阳离子去污剂，在乳剂中提供的去污剂与聚合物的重量比约为 0.05:1 到 0.5:1。在这些实施例中，该方法较佳还包括，在溶剂除去步骤后，交叉流(cross-flow)过滤微粒。在具体的实施例中，聚合物是聚(D,L-丙交酯-共-乙交酯)，阳离子去污剂是 CTAB，乳剂中提供的阳离子去污剂与聚合物的重量比约为 0.1:1 到 0.5:1。

- 30 在其它较佳的实施例中，乳剂中提供的去污剂是阳离子去污剂，其与聚合物的重量比约为 0.001:1 到 0.05:1。在这种较低的水平上，通常不需要除去

过量去污剂的过滤或洗涤步骤。在具体的实施例中，阳离子去污剂是 CTAB，聚合物是聚(D,L-丙交酯-共-乙交酯)，乳剂中提供的阳离子去污剂与聚合物的重量比约为 0.002:1 到 0.04:1，微粒体不经过从组合物中除去过量 CTAB 的步骤。

- 5 本发明的其它方面还涉及生产微粒体组合物的方法，这些方法包括：(1) 在乳化过程中提供一种微粒体，该微粒体含有聚合物和与微粒体结合的第一去污剂部分；和 (2) 将生物活性大分子和第二去污剂部分的复合物吸附到微粒体表面。第一去污剂部分和第二去污剂部分可含有相同的去污剂或不同的去污剂。聚合物较佳地选自聚(α -羟基酸)、多羟基丁酸、聚己内酯、聚原酸酯、聚酞、聚氰基丙烯酸酯。
- 10 酯、聚酞、聚氰基丙烯酸酯。

在一些实施例中，第一和第二去污剂部分含有相同的去污剂。去污剂较佳是阳离子去污剂，例如 CTAB。在这些实施例中，微粒体组合物中大约 10-90%，更佳约 10-60%，最佳约 25-40%的总去污剂以与微粒体结合的第一去污剂部分的形式存在。通常，乳化过程中加入全部去污剂。

- 15 在其它实施例中，第一去污剂部分含有第一去污剂，第二去污剂部分含有不同于第一去污剂的第二去污剂。典型的，在乳化过程中加入第一去污剂，在随后的乳化过程加入第二去污剂，较佳与生物活性大分子同时加入。较佳的是，第一去污剂部分含有非离子去污剂，如 PVA，第二去污剂部分含有阳离子去污剂，如 CTAB。

- 20 鉴于本文所公开的本发明的这些和其它实施例，本领域普通的技术人员容易做到。

附图的简要说明

图 1 是适用于生产本发明微粒体的装置示意图。

25

发明的详细描述

除非另外说明，否则本发明的实施将使用，本领域技术人员所熟知的化学、聚合物化学、生物化学、分子生物学、免疫学和药理学等常规方法。这些技术在文献中有全面的解释。见如 *Remington's Pharmaceutical Sciences*，第

- 30 18 版 (Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1990); *Methods In*

Enzymology (S. Colowick 和 N. Kaplan 编, Academic Press, Inc.); *Handbook of Experimental Immunology*, I - IV 卷, (D. M. Weir 和 C. C. Blackwell 编, 1986, Blackwell 科学出版社), Sambrook, 等, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (第二版, 1989); *Handbook of Surface and Colloidal Chemistry* (Birdi, K.S.编, CRC Press, 1997) 和 *Seymour/Carraher's Polymer Chemistry* (第四版, Marcel Dekker Inc., 1996).

本文引用的所有出版物、专利和专利出版物, 不论是上文或下文中的, 全部引入以作参考。

本说明书和附带的权利要求书中使用的单数形式“一个”和“该”包括其复数形式, 除非文中另外明确指出。因此, 例如, 术语“微粒体”指一个或很多微粒体, 等等。

A. 定义

描述本发明时将使用下列术语, 定义如下:

除非另外说明, 本文所用的所有百分比和比值都为重量比。

本文所用的术语“微粒体”指直径为约 10nm 到 150 μm 的微粒, 更佳是直径约为 200 nm 到 30 μm , 最佳是直径约为 500nm 到 10 μm 。较佳的是, 微粒体具有允许肠胃外或粘膜给予而不阻塞针头和毛细管的直径。微粒体的大小可通过本领域熟知的技术, 如光子相关光谱、激光衍射和/或扫描电镜容易地测定。术语“颗粒”也可使用于指这里所定义的微粒体。

本文所使用的聚合物微粒体是由无菌、无毒和可生物降解的材料制得的。这类材料包括(不仅限于此)聚(α -羟基酸)、多羟基丁酸、聚己内酯、聚原酸酯、聚酐、PACA、和聚氰基丙烯酸酯。较佳的是, 本发明使用的微粒体是衍生自聚(α -羟基酸), 特别是由聚(丙交酯) (“PLA”) 或 D,L-丙交酯和乙交酯或羟基乙酸的共聚物, 如聚(D,L-丙交酯-共-乙交酯) (“PLG” 或 “PLGA”), 或 D,L-丙交酯和己内酯的共聚物衍生得到的聚合物微粒体。这些聚合物微粒体可衍生自任何各种聚合起始材料, 这些材料具有各种分子量, 就共聚物如 PLG 而言, 为各种丙交酯与乙交酯的比值, 聚合起始材料的选择将是一个大问题, 部分依赖于共给予的大分子。下面更全面地讨论这些参数。

本文所用的术语“去污剂”包括表面活性剂、分散剂、悬浮剂和乳剂稳

定剂。阴离子去污剂包括，但不仅限于此，SDS（十二烷基硫酸钠），SLS（月桂基硫酸钠），DSS（二磺基琥珀酸酯）、硫酸脂肪化醇等。阳离子去污剂包括，但不仅限于，溴棕三甲铵（十六烷基三甲基溴化铵或“CTAB”）、氯化苯甲烷铵(benzalkonium chloride)、DDA（二甲基 2-十八烷基溴化铵）、DOTAP
5 （二油酰基-3-三甲基铵-丙烷）等等。非离子去污剂包括，但不仅限于，非离子表面活性剂如 PVA、聚维酮（也称做聚乙烯吡咯烷酮或 PVP）、脱水山梨聚糖酯、聚山梨醇酯、聚氧乙烯化乙二醇单醚、聚氧乙烯化烷基苯酚、聚羟亚烃等。

微粒体形成后，去污剂与之结合或游离。结合处，去污剂与微粒体可通
10 过任意机制结合，这些机制包括（但不仅限于）离子键结合、氢键结合、共价键结合、物理俘获、范德华力结合、以及通过亲水/疏水相互作用结合。

这里所用的术语“大分子”是指(不限于此)药物、多核苷酸、多肽、激素、酶、转录和翻译介质、代谢途径中间物、免疫调节剂、抗原、佐剂或他们的组合物。下面将更详细地描述本发明使用的具体的大分子。“复合的”
15 大分子是已与去污剂形成联合的大分子，这类大分子之后可顺从地吸附于微粒体上。

术语“药物”指生物活性化合物，如抗生素、抗病毒剂、生长因子、激素等等，将在下文做更详细讨论。

术语“佐剂”指辅助或调节药物作用的任何物质，包括但不仅限于免疫
20 学佐剂，它使对抗原的免疫反应增强或免疫反应多样化。

“多核苷酸”是一种核苷酸聚合物，它典型地编码生物活性（如免疫性的或治疗性的）蛋白质或多肽。依据多核苷酸编码的多肽的性质，一个多核苷酸包括的核苷酸可少到 10 个，例如多核苷酸编码抗原。另外，“多核苷酸”可包括双链和单链序列，并涉及（但不仅限于）病毒 cDNA、原核或真核生物
25 mRNA、病毒的基因组 RNA 和 DNA 序列（例如 RNA 和 DNA 病毒以及逆转录酶病毒）或原核生物 DNA，特别是合成的 DNA 序列。该术语还包括任何已知的 DNA 和 RNA 的碱基类似物的序列。该术语还包括对天然序列的变异，如缺失，添加和替换（自然情况下通常是保守的），较佳是使核酸分子编码治疗用的或抗原性蛋白质。这些变异可以是蓄意的，如通过定点诱变，或偶
30 然突变，如通过产生抗原的宿主的突变。

术语“多肽”和“蛋白质”指氨基酸残基的聚合物，并不限于最小长度的产物。因此，肽、寡肽、二聚体、多聚体等都包括在此定义中。该定义包含全长蛋白质及其片段。该定义还包括对天然序列的变异，如缺失，添加和替换（自然情况下通常是保守的），较佳是使蛋白质保持引起免疫反应的能力或对所给予的对象具有治疗效果。

“抗原”意指一个分子，该分子含有一个或多个表位，当根据本发明抗原存在时，所述表位能够刺激宿主免疫系统产生细胞抗原-特异性免疫反应，或体液抗体反应。抗原本身或当与另一分子结合存在时，能够引起细胞或体液应答。正常地，一个表位包括约 3-15 个，通常约 5-15 个氨基酸。给定蛋白质的表位可以用本领域熟知的各种表位定位技术进行鉴别。例如，可参见 *Methods in Molecular Biology*, 66 卷中的 *Epitope Mapping Protocols* (Glenn E. Morris 编, 1996) Humana Press, Totowa, New Jersey。例如，可通过如在固体支持物上同时合成大量的肽(该肽对应于蛋白质分子的一部分)，并在肽还结合在支持物上时，使肽与抗体反应而测定线性表位。本领域已知这些技术，并描述在如美国专利 4,708,871; Geysen 等 (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 3998-4002; Geysen 等 (1986) *Molec. Immunol.* 23: 709-715, 本文将它们的全部内容引用以做参考。类似地，通过测定氨基酸的空间构象，如使用 X-射线晶体学和二维核磁共振，可容易地鉴别出构象表位。例如，可参见 *Epitope Mapping Protocols*, 同上。

本文术语“抗原”是指双亚基的抗原，也就是从其天然所结合的完整机体、以及被杀死的、减毒的或者灭活的细菌、病毒、寄生虫或其它微生物中分离得到的抗原。抗体如抗-独特型抗体或其片段，和可模拟抗原或抗原决定子的合成肽模拟型(mimotope)也包括在本文的抗原定义之中。类似地，表达治疗性的或免疫遗传蛋白、或体内的抗原决定子(如在基因治疗和核酸免疫应用中)的寡聚核苷酸或多核苷酸也包括在本文的抗原定义中。

另外，为了本发明的目的，抗原可以衍生自任何一些已知的病毒、细菌、寄生虫和真菌，以及任何各种肿瘤抗原。并且，为了本发明的目的，“抗原”指一种蛋白质并包括对其天然序列的变异，如缺失、添加和替换（通常自然条件下是保守的），只要该蛋白质保持引发免疫反应的能力。这些变异可以是故意的，通过定点突变或偶然突变如通过产生抗原的宿主突变实现。

对抗原或组合物的“免疫反应”是在对象的体液和/或细胞免疫反应中产生的针对存在于感兴趣的组合物中的分子的的反应。为了本发明的目的，“体液免疫反应”指抗体分子介导的免疫反应，而“细胞免疫反应”是由 T-淋巴细胞和/或其它白细胞介导的免疫反应。细胞免疫的一个重要方面涉及由细胞毒性 T 细胞（“CTL”）引起的抗原特异性反应。CTL 对肽抗原具有特异性，该抗原与由主要组织相容性复合物（MHC）编码的蛋白质结合并递呈。CTL 帮助诱导和促进细胞内微生物的细胞内破坏，或者感染这种微生物的细胞溶解。细胞免疫的另一个方面涉及由辅助 T 细胞引起的抗原特异性反应。辅助 T 细胞协助刺激非特异性效应细胞对抗那些在其表面上具有与 MHC 分子结合的肽抗原的细胞的功能，并且集中于此活性上。“细胞免疫反应”还指细胞因子、趋化因子和由活化的 T-细胞和/或其它白细胞产生(包括衍生自 CD4+和 CD8+T-细胞)的其它这类分子的生。

一种组合物，例如一种免疫原性组合物，或引起细胞免疫反应的疫苗，可以通过在细胞表面呈递与 MHC 分子结合的抗原而使脊椎动物对象敏感。细胞介导的免疫反应就在其表面呈递抗原的细胞中发生，或者在接近的位置上发生。另外，可以产生抗原特异性 T-淋巴细胞，以使免疫宿主将来得到保护。

可通过一些分析测定具体的抗原或组合物刺激细胞介导的免疫反应的能力，如通过淋巴增殖（淋巴细胞活化）分析，CTL 细胞毒性细胞分析，通过在一个致敏的对象体内分析对抗原特异的 T-淋巴细胞，或者通过测量 T 细胞应答抗原的重复刺激而产生的细胞因子。这种分析在本领域是熟知的。见如 Erickson 等, *J. Immunol.* (1993) 151:4189-4199; Doe 等, *Eur. J. Immunol.* (1994) 24:2369-2376; 以及下面的实施例。

因此，本文所使用的免疫反应可以是刺激 CTL 的生产的反应，和/或是刺激辅助 T-细胞的生产或活化的反应。感兴趣的抗原也可引发抗体介导的免疫反应。所以，免疫反应可以包括一个或多个以下效果：B-细胞引起的抗体的生产，和/或抑制性 T 细胞和/或特异性地针对感兴趣的组合物或疫苗中的抗原的 $\gamma\delta$ T 细胞的活化。这些反应可用于中和感染，和/或调节抗体-补体，或抗体依赖性细胞毒性（ADCC），以给免疫的宿主提供保护。可以用本领域熟知的标准免疫分析和中和分析测定这些反应。

含有吸附于微粒体上的选择抗原的一种组合物，当它拥有的引起免疫反

应的能力比不与微粒体一起传递的等量抗原引起的免疫反应能力强的时候，显示“增强的免疫原性”，因此，一种组合物可以显示“增强的免疫原性”是因为由于抗原吸附到微粒体上而具有更强的免疫原性的缘故，或者是因为为了在所给予的对象中引发免疫反应而需要使用低剂量的抗原的缘故。通过

5 给予动物微粒体/抗原组合物和抗原对照，然后采用本领域所熟知的两种正在使用的标准分析方法(如放射免疫分析和 ELISA)比较抗体的滴度，从而可测定这种增强的免疫原性。

本文术语，“有效量”或“药理学有效量”的含有吸附了大分子的微粒体的组合物是指一种治疗或诊断感兴趣的疾病、无毒但足够量的微粒体/大分子组合物。例如，这些表述方式可指足以提供所需反应(如免疫学反应)和产生相应的治疗效果的量，或者在传递治疗蛋白质的情况下，足以影响对象的治疗效果的量，如下文所述。下文将要指出的是，所需的确切量随患者不同而不同，依据它们的物种、年龄、对象的总体条件、要治疗的病症的严重程度、以及感兴趣的具体大分子、给药的方式等等。在任何个别的案例中合适的“有效”量可以由本领域的普通技术人员使用常规实验方法进行测定。

15

“脊椎动物对象”是指科达(cordata)亚门的任何成员，包括但不限于哺乳动物如牛、绵羊、猪、山羊、马和人；家养动物如狗和猫；和鸟类，包括驯化的、野生的和比赛鸟类如公鸡和母鸡包括小鸡、火鸡和其它鸡形目鸟类。该术语不指定具体年龄，因此，包括成体和新生的动物。

20 “药理学上可接受的”或“药理学可接受的”指非生物学的或不理想材料，即材料可以和微粒体制剂一起给予个体，而不会在个体体内引起不理想的生物反应，或与组合物中含有的任何其它成分进行有害的相互作用。

术语“赋形剂”指通常在完成剂型中提供的物质，包括赋形药、粘合剂、崩散剂、填充剂（稀释剂）、滑润剂、助流剂（流动增强剂）、浓缩助剂、

25 颜料、甜味剂、防腐剂、悬浮/分散剂、膜形成器/包衣、调味剂和印刷墨水。

“生理学 pH”或“生理学范围内的 pH”指约 7.2-8.0 范围内(包括本数)的 pH，更典型为约 7.2-7.6 范围内(包括本数)的 pH。

本文所用的“治疗”指任何 (i) 感染和再感染的预防，如传统疫苗中进行的，(ii) 症状的减少或消除，和 (iii) 所怀疑的病原体或病症的基本或完全消除。治疗可以是预防性的（感染前）或治疗性的（感染后）。

30

本文使用的短语“核酸”指 DNA、RNA，或它们形成的嵌合体。

本文使用的短语“含有至少一个 CpG 基序的寡聚核苷酸”指含有至少一个 CpG 二核苷酸的多核苷酸。含有至少一个 CpG 基序的寡聚核苷酸可含有多个 CpG 基序。这些寡聚核苷酸在本领域中也称作“CpG 寡聚核苷酸”。本文所用的短语“CpG 基序”指胞嘧啶核苷和鸟嘌呤核苷依次连接的寡聚核苷酸的二核苷酸部分。在胞嘧啶的位置上可用 5-甲基胞嘧啶替代。

本文中“ α 病毒 RNA 载体复制子”、“RNA 载体复制子”、“RNA 载体构建物”和“复制子”指在靶细胞中能指导自身进行扩增或体内自我复制的 RNA 分子。 α 病毒衍生的 RNA 载体复制子应含有如下顺序的元件：复制所需的顺式 5'病毒序列（也称作 5'CSE），表达时编码生物活性 α 病毒非结构蛋白（如 nsP1、nsP2、nsP3、nsP4）的序列，复制所需的顺式 3'病毒序列（也称作 3'CSE），和聚腺苷酸化序列。 α 病毒衍生的 RNA 载体复制子还可含有病毒亚基因组“连接区域”启动子、来自一个或多个结构蛋白基因或其部分的序列、具有足够大小以产生活病毒的外部核酸分子，以及要表达的异源序列。

本文中“真核生物分层载体起始系统”、“ELVIS”或“ELVIS 载体”指能指导感兴趣的序列或基因表达的系统。真核生物分层载体起始系统应包含：能够在体内（即细胞内）启动 cDNA 合成 RNA 的 5'启动子，和在真核细胞内能够指导其自身复制并表达异源序列的病毒载体序列。在较佳的实施例中，核酸载体序列是 α 病毒衍生序列，含有能够启动 α 病毒 RNA 的转录的 5'序列（也称作 5'CSE），以及当表达时编码生物活性 α 病毒非结构蛋白（即 nsP1、nsP2、nsP3、nsP4）的序列，和 α 病毒 RNA 聚合酶识别序列（也称作 3'CSE）。另外，载体序列可包括病毒亚基因组“连接区域”启动子、从一个或多个结构蛋白基因或其部分得到的序列、具有足够大小以允许最佳扩增的外部核酸分子、要表达的异源序列、用于插入异源序列的一个或多个限制位点，以及聚腺苷酸化序列。真核生物分层载体起始系统还可包括剪接识别序列、催化性核酶加工序列、核输出信号和转录终止序列。

“ α 病毒载体构建物”指能够指导感兴趣的序列或基因表达的装配物。这种载体构建物通常含有能够启动 α 病毒 RNA 的转录的 5'序列（也称作 5'CSE）、以及当表达时编码生物活性 α 病毒非结构蛋白（即 nsP1、nsP2、nsP3、

nsP4) 的序列、和 α 病毒 RNA 聚合酶识别序列(也称作 3'CSE), 以及聚腺苷酸序列。另外, 这种载体构建物可包括病毒亚基因组“连接区域”启动子、从一个或多个结构蛋白基因或其部分得到的序列、具有足够大小以允许产生活病毒的外部核酸分子、体外或体内能够启动从 cDNA 合成病毒 RNA 的 5'启动子、要表达的异源序列, 以及用于插入异源序列的一个或多个限制位点。

本文使用的短语“载体构建物”通常指 ELVIS 载体, 它包含 RNA 载体构建物的 cDNA 补体、RNA 载体构建物本身、 α 病毒载体构建物等等。

根据本发明的一些实施例, 提供了治疗(包括预防性的和/或治疗性的免疫)宿主动物抵抗病毒、真菌、支原体、细菌、或原生动感染以及肿瘤的组合物和方法。本发明的方法用于对哺乳动物, 较佳的是人给予预防和/或治疗性的免疫。本发明的方法还可用于除人外其它的哺乳动物, 包括生物医学研究应用。

B. 总的方法

15 本发明人发现, 通过确保在吸附时存在与大分子形成复合物的去污剂, 从而可提高大分子与微粒体的吸附。去污剂而且, 大量的各种分子, 包括带电的和/或庞大的大分子都可被吸附。因此, 本发明的微粒体/大分子组合物可以用作输送生物活性成分的传递系统, 以用于治疗、预防和/或诊断各种各样的疾病。

20 本发明可用于传送各种各样的大分子, 包括但不限于药物如抗生素和抗病毒剂、非类固醇抗炎药、止痛剂、血管扩张剂、心血管药物、治精神病的药、精神抑制药、抗抑郁剂、抗帕金森症药、 β -受体阻断剂、钙通路阻断剂、舒缓激肽抑制剂、ACE-抑制剂、血管扩张剂、促乳素抑制剂、类固醇、激素对抗剂、抗组胺剂、血清素对抗剂、肝素、化疗剂、抗肿瘤药和生长因子, 包括但不限于 PDGF、EGF、KGF、IGF-1 和 IGF-2、FGF、编码治疗性或免疫性蛋白的多核苷酸、用于疫苗的免疫蛋白质及其表位, 包括肽激素的激素, 如胰岛素、胰岛素原、生长激素、GHRH、LHRH、EGF、生长激素抑制素、SNX-111、BNP、促胰岛素、ANP、FSH、LH、PSH 和 hCG、性腺类固醇激素(雄激素、雌激素和黄体酮)、甲状腺-刺激激素、抑制素、胆囊收缩素、ACTH、CRF、强啡肽、内啡肽、内皮素、纤连蛋白片段、甘丙肽、胃

25

30

泌素、促胰岛素、胰高血糖素、GTP-结合蛋白片段、鸟苷蛋白、白细胞激肽、爪蟾抗菌肽、肥大细胞脱粒肽、皮抑菌肽(dermaseptin)、系统素、神经调节肽、神经降压肽、胰抑制素、胰多肽、P物质、促胰液素、胸腺素等，酶、转录介体或翻译介体、代谢途径中间物中间物、免疫调节剂，如各种细胞因子，包
5 括白细胞介素-1、白细胞介素-2、白细胞介素-3、白细胞介素-4，和 γ -干扰素、抗原和佐剂。

在较佳的实施例中，大分子是一种抗原。本发明的具体的优越性是在脊椎动物对象中，吸附了抗原的微粒体产生细胞介导的免疫反应的能力。本发明的抗原/微粒体针对选择性抗原引发细胞介导的免疫反应的能力，提供了抵
10 抗各种各样的病原体感染的强有力的工具。因此，本发明的抗原/微粒体可以掺和入疫苗组合物。

本领域所描述的质粒载体和 ELVIS 载体的各种使用效果可以通过将选择性质粒和 ELVIS 载体吸附到微粒体的吸附表面上而得到加强，这促进了载体以及载体中包含的异源性核酸序列导入动物细胞中。换句话说，可将 RNA 载体构建物吸附到本发明的聚合物微粒体或亚微粒乳剂上，用于有效地将异源性核酸序列传递入动物细胞中。共同拥有的 2000 年 9 月 28 日申请的美国临时专利申请（代理案卷号第 CHIR-0270 号；系列号 60/236,105）公开了这种
15 吸附于一些微粒体上的多核苷酸的使用。因此，在较佳的实施例中，大分子是多核苷酸，如质粒、ELVIS 载体、或 RNA 载体构建物。本发明具体的优点是吸附了 ELVIS 载体的微粒体在脊椎动物对象中产生细胞介导的免疫反应的能力。专利申请 60/236,105 进一步描述了多肽抗原(包括 HIV 多肽抗原)吸附在微粒体上。本发明的抗原/微粒体针对选择性抗原引发细胞介导的免疫反应的能力提供了一个抵御各种致病原感染的有力手段。因此，本发明的抗原/微粒体可以掺入疫苗组合物。

25 所以，除了常规的抗体反应，本文描述的系统还可以提供如表达的抗原与 I 类 MHC 分子的联合，这样就可以产生(mount)针对感兴趣的抗原的体内细胞免疫反应，这种反应刺激 CTL 的生产，以在将来识别该抗原。另外，通过辅助 T-细胞该方法可引发抗原特异性反应。因此，对于需要细胞和/或体液免疫反应的情况，本发明的方法将使用任何大分子，较佳是衍生自可诱导抗体的
30 的病毒病原体的抗原、T-细胞辅助表位和 T-细胞细胞毒素表位。这种抗原包

括但不仅限于由人和动物病毒编码的抗原，对应于结构蛋白或非结构蛋白。

本发明的微粒体对于针对通常引起弱的免疫反应的细胞内病毒的免疫特别有用。例如，本发明将可用于刺激针对来自疱疹病毒家族的各种蛋白质的免疫反应，这些蛋白质包括衍生自单纯疱疹病毒（HSV）类型 1 和 2 的蛋白质，
5 如 HSV-1 和 HSV-2 糖蛋白 gB、gD 和 gH；衍生自水痘带状疱疹病毒（VZV）、EB 病毒（EBV）和巨细胞病毒（CMV）的抗原，包括 CMV gB 和 gH；以及衍生自其它人疱疹病毒的抗原，如 HHV6 和 HHV7 [例如，可参见 Chee 等，*Cytomegaloviruses* (J. K. McDougall 编，Springer - Verlag 1990) 125-169 页，一篇关于巨细胞病毒蛋白质编码内容的综述；McGeoch 等，*J. Gen. Virol.* (1988)
10 69: 1531-1574，关于各种 HSV-1 编码蛋白质的讨论；美国专利 5,71,568，关于 HSV-1 和 HSV-2 gB 和 gD 蛋白及其编码基因的讨论；Baer 等 *Nature* (1984) 310:207-211，EBV 基因组中蛋白质编码序列的识别；和 Davison 和 Scott，*J. Gen. Virol.* (1986) 67:1759-1816 关于 VZV 的综述]。

肝炎病毒家族 [包括肝炎 A 病毒（HAV）、肝炎 B 病毒（HBV）、肝炎
15 C 病毒（HCV）、 δ 肝炎病毒（HDV）、肝炎 E 病毒（HEV）、和肝炎 G 病毒（HGV）] 的抗原也可以方便地用于本发明描述的方法。作为例子，HCV 的病毒基因组序列是已知的，获得序列的方法也是已知的。见如，国际出版物 WO89/04669；WO90/11089；和 WO90/14436。HCV 基因组编码几种蛋白质，包括 E1（也称 E）和 E2（也称 E2/NS1）和 N-末端核壳蛋白（称为“核
20 心”） [见 Houghton 等，*Hepatology* (1991) 14:381-388，关于 HCV 蛋白(包括 E1 和 E2)的讨论]。这些蛋白质中的每一种以及它们的抗原片段将在本发明的组合物和方法中使用。

类似地，来自 HDV 的 δ -抗原序列是已知的（见如美国专利 5,378,814）并且该抗原也可方便地用于本发明的组合物和方法。另外，衍生自 HBV 的抗
25 原，如核心抗原、表面抗原(sAg)、以及前表面(presurface)序列(pre-S1 和 pre-S2，以前称作 pre-S)，以及上述的组合，如 sAg/pre-S1、sAg/pre-S2、sAg/pre-S1/ pre-S2 和 pre-S1/pre-S2 将在本文所用。见如“HBV 疫苗-从实验室到获得许可——一个案例的研究”，Mackett, M.和 Williamson, J. D., *Human Vaccines and Vaccination*, 159-176 页，关于 HBV 结构的讨论；美国专利 4,722,840, 5,098,704,
30 5,324,513, 本文将它们的全部内容引入以作参考；Beames 等，*J. Virol.* (1995) 69:

6833-6838, Birnbaum 等, *J. Virol.* (1990) 64:3319-3330; 和 Zhou 等, *J. Virol.* (1991) 65:5457-5464.

衍生自其它病毒的抗原也可用于本公开的组合物和方法中, 例如, 但不限于此, 来自小 RNA 病毒科成员的蛋白质(如脊髓灰质炎病毒等); 杯状病毒科; 披盖病毒科(如: 风疹病毒、登革病毒等); 黄病毒科; 冠形病毒科; 呼肠弧病毒科; 双 RNA 病毒科; 弹状病毒科(如狂犬病毒等); 线状病毒科; 副粘病毒科(如流行性腮腺炎病毒、麻疹病毒、呼吸合胞病毒等); 正粘病毒科(如流感病毒 A、B、C 型等); 本雅病毒科; 沙粒病毒科; 反转录病毒科 [HTLV-I; HTLV-II; HIV-1(也称作 HTLV-III, LAV, ARV, hTLR 等)], 包括但不仅限于, 来自分离物 HIV_{IIIb}, HIV_{SF2}, HIV_{LAV}, HIV_{LAI}, HIV_{MN}) 的抗原; HIV-1_{CM235}, HIV-1_{US4}; HIV-2; 尤其是猿免疫缺陷病毒(SIV)。另外抗原也可衍生自人乳头瘤病毒(HPV)和蜱媒脑炎病毒。见如 *Virology*, 第 3 版(W. K. Joklik 编, 1988); *Fundamental Virology*, 第 2 版(B. N. Fields 和 D. M. Knipe 编, 1991), 关于这些和其它病毒的描述。

15 更具体地说, 已知和报道了来自任何上述 HIV 分离物的 gp120 或 gp140 包膜蛋白, 包括各种 HIV 遗传亚类成员 [见如 Mayer 等, Los Alamos Database, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, New Mexico(1992); Myers 等, *Human Retroviruses and Aids*, 1990, Los Alamos, New Mexico: Los Alamos National Laboratory; 和 Modrow 等 *J. Virol.* (1987)61:570-578, 关于 HIV 分离物的多样性的包膜序列的比较), 衍生自任何这些分离物的抗原将用于本方法。另外, 本发明同样适用于衍生自任何各种 HIV 分离物的其它免疫原性的蛋白质, 包括任一不同的胞膜蛋白如 gp160 和 gp41, gag 抗原如 p24gag 和 p55gag, 以及衍生自 pol 和 tat 区域的蛋白质。

25 流感病毒是本发明特别使用的病毒的又一个例子。具体地说, 对于免疫反应的产生, 特别感兴趣的是 A 型流感病毒的包膜糖蛋白 HA 和 NA。已鉴别了大量的 A 型流感病毒的 HA 亚类(Kawaoka 等, *Virology* (1990) 179:759-767; Webster 等, “A 型流感病毒中的抗原变化” 127-168 页, P. Palese 和 D. W. Kingsbury (编), *Genetics of influenza viruses*. Springer-Verlag, 纽约)。因此, 衍生自任何这些分离物的蛋白质也用于这里所描述的组合物和方法。

30 本文描述的组合物和方法还使用了大量的细菌抗原, 例如衍生自引起白

喉、霍乱、肺结核、破伤风、百日咳、脑膜炎和其它疾病的生物的抗原，包括但不限于，百日咳博德特氏菌(*Bordetella pertussis*)、脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitides*, A、B、C、Y)，淋病奈瑟球菌(*Neisseria gonorrhoeae*)、幽门螺旋菌(*Helicobacter pylori*)、流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenza*)、B型感嗜血杆菌(*Hemophilus influenza* type B, HIB)、幽门螺旋菌以及它们的组合物。衍生自脑膜炎奈瑟球菌 B 抗原的例子在如下共同拥有的专利申请中公开：PCT/US99/09346；PCT IB98/01665；PCT IB99/00103。寄生虫抗原的例子包括衍生自引起疟疾和莱姆病的生物的抗原。

本发明使用的其它抗原，其中一些也列在本申请的其它地方，包括如下（参考文献如下所列）：

-衍生自脑膜炎奈瑟球菌血清组 B 的蛋白质抗原，如下文参考文献中 1-7。

-衍生自脑膜炎奈瑟球菌血清组 B 的外膜载体 (OMV) 制剂，如下文参考文献 8, 9, 10, 11 等所公开的。

-衍生自脑膜炎奈瑟球菌血清组 A、C、W135 和/或 Y 的糖类抗原，如下文参考文献 12 中所公开的衍生自血清组 C 的寡糖（也见参考文献 13）。

-衍生自肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)的糖类抗原[如参考文献 14, 15, 16]。

-衍生自淋病奈瑟球菌的抗原[如参考文献 1, 2, 3]。

-衍生自肺炎衣原体(*Chlamydia pneumoniae*)的抗原[如参考文献 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23]。

-衍生自沙眼衣原体的抗原[如 24]。

-衍生自 A 型肝炎病毒的抗原，如灭活病毒[如参考文献 25, 26]。

-衍生自 B 型肝炎病毒的抗原，如表面和/或核心病毒[如参考文献 26, 27]。

-衍生自 C 型肝炎病毒的抗原[如参考文献 28]。

-衍生自百日咳杆菌(*Bordetella pertussis*)的抗原，如百日咳全毒素 (PT) 和衍生自百日咳杆菌的丝状血细胞凝集素 (FHA)，还任意地与维持素(pertactin) 和/或凝集元 2 和 3 结合[如参考文献 29, 30]。

-白喉抗原，如白喉类毒素[如参考文献 31 的第 3 章]，如 CRM₁₉₇ 突变体[如参考文献 32]。

-破伤风抗原，如破伤风类毒素[如参考文献 31 的第 4 章]。

-衍生自幽门螺旋菌的蛋白质抗原，如 CagA[如参考文献 33]，VacA[如参考文献 33]，NAP[如参考文献 34]，HopX[如参考文献 35]，HopY[如参考文献 35]，和/或尿素酶。

-衍生自流感嗜血杆菌 B 的糖类抗原[如参考文献 13]。

5 -衍生自牙龈卟啉单胞菌(*Porphyramonas gingivalis*)的抗原[如参考文献 36]。

-脊髓灰质炎抗原[如参考文献 37, 38]如 IPV 或 OPV。

-狂犬病抗原[如参考文献 39]，如冻干灭活病毒[如参考文献 40, Rabavert™]。

10 -麻疹、腮腺炎和/或风疹抗原[如参考文献 31 的第 9, 10 和 11 章]。

-流感抗原[如参考文献 31 的第 19 章]，如红血球凝集素和/或神经氨酸酶表面蛋白。

-衍生自粘膜炎莫拉氏菌(*Moraxella catarrhalis*)[如参考文献 41]。

-衍生自无乳链球菌的抗原 (B 组链球菌) [如参考文献 42, 43]。

15 -衍生自化脓链球菌的抗原 (A 组链球菌) [如参考文献 43, 44, 45]。

-衍生自金黄色葡萄球菌的抗原[如参考文献 46]。

-含有一种或多种这些抗原的组合物。

当使用糖类或碳水化合物抗原时，较佳的是这类抗原与载体蛋白偶联，以增强免疫原性[如参考文献 47-56]。较佳的载体蛋白是细菌毒素或类毒素，

20 如白喉或破伤风类毒素。CRM₁₉₇ 白喉类毒素是特别优选的。其它适合的载体蛋白包括脑膜炎外膜蛋白[如参考文献 57]，合成肽[如参考文献 58, 59]，热休克蛋白[如参考文献 60]，百日咳蛋白[参考文献 61, 62]，衍生自流感病毒的蛋白质 D[参考文献 63]，衍生自 *C. difficile* 的毒素 A 或 B[参考文献 64]等。当一种混合物含有来自血清组 A 和 C 的囊糖类时，较佳是的 MenA 糖与 MenC 糖

25 的比 (w/w) 大于 1 (如 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 10:1 或更高)。从不同的脑膜炎血清组得到的糖类可以与相同或不同的载体蛋白偶联。

可以使用任何一种适合的偶联反应，所需之处可以配有任意适合的连接子。

30 需要时毒性蛋白抗原可被脱毒 (如:用化学和/或方法脱去百日咳毒素的毒性) [参考文献 30]。

当组合物含有白喉抗原时，较佳的是该组合物还含有破伤风抗原和百日咳抗原。类似地，当组合物含有破伤风抗原时，较佳的是该组合物还含有白喉抗原和百日咳抗原。类似地，当组合物含有百日咳抗原时，较佳的是该组合物还含有白喉抗原和破伤风抗原。

- 5 很明显本发明可用于传递各种大分子，因此而治疗和/或诊断大量的疾病。在一些实施例中本发明的大分子/微粒体组合物可用于定点特异性靶位传递。例如，静脉内给予大分子/微粒体组合物可用于针对肺、肝、脾、血液循环或骨髓。

10 通过任何结合-相互反应机制，使大分子吸附到吸附的微粒体表面，这些机制包括但不限于，离子键结合、氢键结合、共价键结合、范德华力结合、和通过亲水/疏水基相互作用结合。本领域普通的技术人员可以容易地选择适合于要吸附的大分子类型的去污剂。

例如，在带电的去污剂(如阴离子或阳离子去污剂)中生产微粒体去污剂，可产生表面带有净负电荷或净正电荷的微粒体。例如，用阴离子去污剂如十二烷基硫酸钠(SDS)生产的微粒体(如 SDS-PLG 的微粒体)吸附带正电的抗原(如蛋白质)。类似地，用阳离子去污剂如 CTAB 生产的微粒体(如 PLG/CTAB 微粒体)吸附带负电的大分子(如 DNA)。如果要吸附的大分子具有正电荷和负电荷区域，那么阳离子或阴离子或非离子去污剂都适用。

20 本发明使用的用于生产微粒体的可生物降解的聚合物很容易地从 Boehringer Ingelheim、Germany and Birmingham Polymers, Inc.、Birmingham, AL. 购得。例如，本文使用的形成微粒体的聚合物包括均聚物、共聚物和衍生自如下物质的聚合物混合物：多羟基丁酸、聚羟基戊酸、聚羟基乙酸(PGA)、聚乳酸(PLA)、聚二噁酮(polydioxanone)、聚己内酯、聚原酸酯、和多酐。更佳的是聚(α -羟基酸)，如聚(L-丙交酯)、聚(D,L-丙交酯)(本文将这两者都称作“PLA”)，多(羟基丁酸)，D,L-丙交酯和乙交酯的共聚物，如聚(D,L-丙交酯-共-乙交酯)(本文称作“PLG”或“PLGA”)或 D,L-丙交酯和己内酯的共聚物。本文使用的特别优选的聚合物是 PLA 和 PLG 聚合物。这些聚合物以各种分子量存在，本领域熟练的技术人员很容易测定用于给定用途的适当的分子量。因此，如对于 PLA，适合的分子量将在 2000-5000 数量级。对于 PLG，
25 合适的分子量通常在约 10,000-200,000 范围内，较佳的约 15,000-150,000。
30

如果使用一种共聚物如 PLG 形成微粒体, 则在本文中可使用各种丙交酯和乙交酯比值, 该比值很达程度上是选择的结果, 部分依赖于共给予的大分子和所需降解的比例。例如, 一个 50:50 的 PLG 聚合物, 含有 50% 的 D,L-丙交酯和 50% 的乙交酯, 将提供一个快速消融的共聚物, 而由于增加了丙交酯成分, 75:25 的 PLG 降解得比较慢, 85:15 和 90:10 的降解得更慢。很显然, 本领域熟练的工作人员可根据例如抗原的特性和怀疑的病症, 容易地测定适合的丙交酯和乙交酯的比例。另外, 为了得到所给大分子期望的释放动力学和提供初级和次级免疫反应, 本文使用具有各种丙交酯:乙交酯比例的微粒体混合物。本发明的微粒体的降解速率还可通过聚合物分子量和聚合物结晶性等因子得到控制。具有各种丙交酯:乙交酯比例和分子量的 PLG 共聚物可以容易地从包括 Boehringer Ingelheim、Germany and Birmingham Polymers, Inc., Birmingham, AL. 等的许多地方购得。这些聚合物也可以使用本领域已知的技术, 简单缩聚乳酸成分而合成, 如 Tabata 等, *J. Biomed. Mater. Res.* (1988) 22: 837-858 中所描述的。

使用本领域熟知的任何一种方法制备微粒体, 例如, 在一些实施例中, 可以使用双重乳剂/溶剂蒸发技术, 如美国专利 3,523,907 和 Ogawa 等, *Chem. Pharm. Bull.* (1988) 36:1095-1103 中所描述制备微粒体。这些技术涉及由聚合物溶液微滴组成的初级乳剂的形成, 该乳剂随后与含有微粒稳定剂/表面活性剂的连续水相混合。

在其它的实施例中, 还可使用 Thomasin 等 *J. Controlled Release* (1996) 41:131; 美国专利 2, 800, 457; Masters, K. (1976) *Spray Drying* 第二版, Wiley, New York 中描述的喷干和凝聚技术, 以及 Hall 等, (1980) "Wurster Process", *Controlled Release Technologies: Methods, Theory, and Applications* (A.F.Kydonieus 编), 第二卷, 133-154 页, CRC Press, Boca Raton, Florida 和 Deasy, P. B., *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* (1988) S (2): 99-139) 描述的空气-悬浮涂层技术, 如全涂层(pan coating)和 Wurster 涂层, 以及离子凝胶化技术 [描述于如 Lim 等 *Science* (1980) 210: 908-910.] 来制备微粒体。

在较佳的实施例中, 根据 O' Hagan 等, *Vaccine* (1993) 11: 965-969, PCT/US99/ 17308 (WO 00/06123), O' Hagan 等和 Jeffery 等, *Pharm. Res.* (1993) 10: 362. 描述的方法, 可使用一种水包油包水溶剂 (w/o/w) 蒸发系统形成微粒体。

通常，将具体的聚合物溶解于有机溶剂中，如乙酸乙酯、二甲基氯（也称作亚甲基氯和二氯甲烷）、乙腈、丙酮、氯仿等。有机溶剂中提供的聚合物约占 1-30%，较佳约占 2-15%，更佳约占 3-10%，最佳约占 4-6%。然后将聚合物溶液与水溶液混合并乳化形成 o/w 乳剂。该水溶液可以是，例如，去离子水、生理盐水，或缓冲溶液如磷酸盐缓冲溶液（PBS）、柠檬酸钠/EDTA 缓冲溶液。较佳的是，聚合物溶液与水溶液的体积比范围约为 5:1 到 20:1，更佳约为 10:1。使用任何适合的设备进行乳化，典型的是一个高剪切装置，如匀浆器。

然后较佳地使一体积的 o/w 乳剂与较大体积的水溶液结合，该水溶液较佳地含有阳离子、阴离子或非离子去污剂。水溶液与 o/w 乳剂的体积比典型的约为 2:1 到 10:1，更典型的约为 4:1。适合用于实施本发明的阴离子、阳离子和非离子去污剂的例子在上文已列出，分别包括 SDS、CTAB 和 PVA。一些大分子可更容易地吸附到具有去污剂混合物的微粒体上，例如，PVA 和 DOTAP 的混合物。另外，在一些例子中，可能需要将去污剂加入到上述有机溶剂中。在使用非离子去污剂如 PVA 时，其在溶液中的浓度典型地约为 2-15%，更典型的约为 4-10%。使用阳离子或阴离子去污剂时，其在溶液中的浓度典型地约为 0.05-5%，更典型地约为 0.25-1%。通常，使用的去污剂与聚合物的重量比约为 0.00001:1 到约 0.5:1，较佳约为 0.0001:1 到 0.5:1，更佳约为 0.001:1 到 0.5:1 更佳约为 0.005:1 到 0.5:1。

然后匀浆复合物以生产稳定的 w/o/w 双重乳剂。然后蒸发有机溶剂。可以控制配方参数，使制备的小微粒在 $0.05\ \mu\text{m}$ (50nm) 到较大微粒 $50\ \mu\text{m}$ 或更大的范围内。见如，Jeffery 等，*Pharm. Res.* (1993) 10: 362-368; McGee 等，*J. Microencap.* (1996)。例如，减少搅拌产生了较大的微粒，增加了内部相体积。使用具有高浓度的乳剂稳定剂的低水相体积生产小微粒。

用于进行上述步骤的较佳的装置在图 1 中图示说明。参考图 1 显示一个生产水槽流水线，通常指定为 102。水槽流水线 102 设计成“封闭系统”，这样在加工过程中保持无菌的环境。选择所有的设备零部件，较佳使它们能就地清洁，并且能耐高压加热。所有的滤器 104a-d 较佳是含氟聚合物滤器，如购自 Pall 公司的 Super-Chemient™ 全-含氟聚合物滤器。最初，水溶液(如柠檬酸钠/EDTA 缓冲溶液 106)和有机聚合物溶液(如二氯甲烷中的 PLG 溶液)被过

滤并加入水槽 110，在那里通过搅拌器 112 它们继续混合然后将混合物加入并通过串联的匀浆器 114（如一个高速、高剪切耐高压加热的串联的匀浆器，如 Kinematica MT5000），形成 o/w 乳剂。该乳剂从串联的匀浆器 114 出来以后，通过例如水冷凝器 116 而被冷却，然后再回到水槽 110。当这些内容物乳化到
5 所需的程度，将一种水性去污剂溶液(如在水 118 中的 CTAB 溶液)加入水槽 110，然后将此内容物再次加入串联的混合器 114 中，于是形成 w/o/w 乳剂。经过足够的乳化后，通过分配器 119 用氮提纯所得 w/o/w 乳剂，除去有机溶剂。过滤充满氮的溶剂，并在冷凝器 120 中冷却，在容器 122 中收集溶剂。

实施例中，当所使用的去污剂与聚合物重量比较大时（如：去污剂与聚
10 合物的比约为 0.05:1 到 0.5:1，更佳约为 0.10:1 到 0.50:1；最佳的约为 0.2:1 到 0.4:1），需要洗涤微粒以除去过量的去污剂去污剂。典型的，在从最终的乳剂中除去有机溶剂后进行这一洗涤步骤，例如，通过溶剂蒸发（如图 1 中有关步骤进行的一样）、溶剂提取或两者共用。

在一些实施例中，离心洗涤微粒体。这一过程减少了去污剂的总量，并
15 获得其游离的去污剂的量相对于结合的去污剂少的最终组合物去污剂。例如，在下面实施例 2 中，进行了洗涤步骤（即用水离心洗涤 4 次），产生的微粒含有约 1% w/w CTAB，当中有 99%以上结合于微粒体，低于 1% 的处于游离形式。

在其它更佳的实施例中，对微粒体采用了去污剂减少去污剂的方法，尽管
20 如此，仍然保留了大量的游离形式的去污剂。例如，可以进行一个交叉流过滤步骤以保留相当数量的游离去污剂。典型的，这样类型的过滤步骤产生含有约 0.2-5% w/w 去污剂的总去污剂的微粒体，其中约 10-60%的去污剂结合到微粒体上，约 40-90%处于游离形式。更佳的是，约 25-40%结合到微粒体，约 60-75%是游离的。例如，在下面实施例 5 中描述的方法，生产的微粒体含
25 有约 1% w/w 的总 CTAB，其中约 30%结合于微粒体，约 70%是游离的。

在使用了足够小的去污剂与聚合物比(如去污剂与聚合物的比约为 0.001:1
到 0.05:1，较佳的约 0.002:1 到 0.04:1，甚至更佳的约 0.006:1 到 0.02:1)的一些
30 实施例中，不需要洗涤微粒体以除去过量的去污剂。典型的，这类方法产生具有约 0.2-5% w/w 去污剂的微粒体，其中约 10-60%结合于微粒体，约 40-90%处于游离的形式。更佳的是，约 25-40%结合于微粒体，约 60-75%是游离的形

式。例如，在下面实施例 6 中描述的方法中，生产具有约 1%w/w CTAB 的微粒体，其中约 30%的 CTAB 结合到微粒体，约 70%游离。

可通过如激光散射，使用例如氩-氛激光分光剂测定粒径。通常，在室温测定粒径，测定涉及对该样品进行多次分析（如 5-10 次），以获得这些
5 粒径的平均值。还可使用扫描电镜（SEM）容易地测定粒径。制备后，微粒体可以原样保存或冻干以备将来使用。为了使大分子吸附到微粒体上，可使微粒体制备物简单地与感兴趣的大分子混合，得到的制剂在使用前可再冻干。但是，如上面所指出的，本发明发现大分子与聚合物微粒体的吸附可以通过在吸附大分子时确保存在大量的游离形式的去污剂而得到改进。如果在如此
10 制备的微粒体组合物中存在非常少的去污剂游离形式（如约 5%或更少），较佳是使微粒体与大分子和增量的去污剂一起培养。使用的去污剂与大分子的重量比较佳约为 0.002:1-0.05:1，更佳的约 0.005-0.02:1。

另一方面，如此制备的微粒体组合物中大量的去污剂以游离的形式存在（如约 50-90%游离，更佳的约 60-75%），通过将微粒体与感兴趣的大分子简
15 单地培养可以得到好的结果，这时任选使用增量的去污剂。

不被理论所束缚，在上述两个例子中，认为利用游离的去污剂与感兴趣的大分子形成复合物，使得大分子更易于吸附于微粒体。

通常，将大分子加入微粒体，产生吸附了大分子的微粒体，其大分子与微粒体的重量比约为 0.0001:1-0.25:1，较佳为 0.001:1-0.1:1，更佳为 0.01:1-
20 0.05:1。微粒体中的大分子含量可以使用标准方法进行测定。

本发明的微粒体可含有嵌于其中或包裹于其中的大分子，以及吸附于其上的大分子。因此，例如，本领域熟练的技术人员可以依据本发明制备具有蛋白质吸附于其上的包裹了佐剂的微粒体，或者有佐剂吸附于其上的包裹了蛋白质的微粒体。本领域熟练的技术人员同样可以依据本发明制备具有复合的
25 的 ELVIS 载体吸附于其上的包裹了佐剂的微粒体，或者核酸质粒吸附于其上的包裹了抗原的微粒体。本发明设计吸附于微粒体上或嵌于微粒体中的复合物大分子的各种组合物，以及其它大分子如抗原分子的各种组合物。

如上所述，一旦生产出吸附了大分子的微粒体，就将它们制成药物组合物(包括疫苗)，用于治疗 and/或诊断各种各样的疾病。该组合物通常包括一种或
30 多种药学上可接受的的赋形剂。例如，可使用的载体如水、盐水、甘油、聚

乙二醇、透明质酸、乙醇等。其它赋形剂如湿润剂或乳化剂、生物缓冲剂等也可存在于这种载体中。生物缓冲剂实际上可以是药学上可接受的和使制剂具有所需的 pH (即生理范围内的 pH) 的任何溶液。缓冲溶液的例子包括盐、磷酸缓冲盐溶液、Tris 缓冲盐溶液、Hank's 缓冲盐溶液等。也可将本领域已知的其它的赋形剂引入最终的剂型中, 包括粘合剂、崩解剂、填充物 (稀释剂)、润滑剂、助流剂 (流动增强剂)、压缩辅助剂、颜料、甜味剂、防腐剂、悬浮/分散剂、膜形成剂/包衣、调味剂和印刷油墨。

可使用佐剂增强药物组合物的效果。佐剂可以与本发明的微粒体同时给予, 如佐剂在同一组合物中或分离的组合物中。另外, 佐剂也可在给予本发明的微粒体组合物前或后给予。在另一个实施例中, 佐剂, 如免疫学佐剂, 可包裹于微粒体内。可使用本领域已知的任何一种方法使佐剂与任何一种大分子一样包裹在微粒体内。见如美国专利 3,523,907; Ogawa 等 *Chem Pharm. Bull.* (1988) 36: 1095-1103; O' Hagan 等 *Vaccine* (1993) 11: 965-969 和 Jefferey 等 *Pharm. Res* (1993) 10: 362。另外, 如上述任何大分子一样, 佐剂可以吸附于微粒体。

免疫学佐剂包括但不限于: (1) 铝盐(alum), 如氢氧化铝、磷酸铝、硫酸铝等; (2) 其它水包油乳剂制剂 [含有或不含有其它特异性免疫刺激剂如胞壁肽 (见下文) 或细菌细胞壁成分], 例如 (a) 使用微流化剂如 110Y 型微流化剂 (Microfluidics, Newton, MA) 制备成亚微型颗粒的 MF59, 含有 5% 的角鲨烯、0.5% Tween 80, 和 0.5% 的 Span85 [尽管不需要, 但可任选地含有各个量的 MTP-PE (见下文)] (国际出版物 WO90/ 14837, *Vaccine design* 中第 10 章: *the subunit an adjuvant approach*, Powell 和 Newman 编, Plenum Press 1995); (b) SAF, 含有 10% 的角鲨烯、0.4% Tween 80, 5% 的聚醚-阻断聚合物 L121 和 thr-MDP (见下文), 也微流化成亚微型乳剂或涡旋产生较大粒径的乳剂; 和 (c) RibitTM 佐剂系统 (RAS) (Ribi Immuochem, Hamilton, MT) 含有 2% 的角鲨烯、0.2% Tween 80 以及一种或多种细菌细胞壁成分, 选自单磷酰基酯 A (MPL), 海藻糖二聚月桂烯 (TDM), 和细胞壁骨架 (CWS), 较佳是 MPL+CWS (DetoxTM) (关于本文使用的适合的亚微型水包油乳剂的讨论见共同拥有的 1998 年 1 月 29 日提交的专利申请 09/015,736); (3) 可使用皂角苷佐剂, 如 Quil A 或 QS21 [(如 StimulonTM (Cambridge Bioscience,

Worcester, MA)] , 或由其产生的微粒体如 ISCOM (免疫刺激复合物), 该 ICOMS 可不具有另外的去污剂, 如 WO00/07621; (4) 弗氏完全佐剂 (CFA) 以及弗氏不完全佐剂 (IFA); (5) 细胞因子, 如白细胞介素 [如 IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12 (WO99/44636) 等]、干扰素 (如 γ 干扰素)、巨噬细胞集落刺激因子 (M-CSF)、肿瘤坏死因子 (TNF) 等; (6) 单磷酸基酯 A (MPL) 或 3-O-去酰基化 MPL (3dMPL), 如 GB-2220221、EP-A-0689454, 当使用肺炎球菌糖类时, 基本上没有 alum, 如 WO00/56358; (7) 3dMPL 与例如 QS21 和/或水包油乳剂的组合, 如 EP-A-0835318、EP-A-0735898、EP-A-0761231; (8) 含有 CpG 基序的寡聚核苷酸 (Roman 等, *Nat.Med.*, 1997, 3, 849-854; Weiner 等, *PNAS USA*, 1997, 94, 10833-10837; Davis 等, *J.Immunol.* 1988, 160, 870-876; Chu 等, *J.Exp.Med.*, 1997, 186, 1623-1631; Lipford 等, *Eur. J. Immunol.* 1997, 27, 2340-2344; Moldoveanu 等, *Vaccine*, 1988, 16, 1216-1224, Krieg 等, *Nature*, 1995, 374, 546-549; Klinman 等, *PNAS USA*, 1996, 93, 2879-2883; Ballas 等, *J.Immunol.*, 1996, 157, 1840-1845; Cowdery 等 *J.Immunol.*, 1996, 156, 4570-4575; Halpern 等, *Cell Immunol.*, 1996, 167, 72-78; Yamamoto 等, *Jpn. J. Cancer Res.*, 1988, 79, 866-873; Stacey 等, *J.Immunol.*, 1996, 157, 2116-2122; Messina 等, *J. Immunol.*, 1991, 147, 1759-1764; Yi 等, *J. Immunol.*, 1996, 157, 4918-4925; Yi 等 *J.Immunol.*, 1996, 157, 5394-5402; Yi 等 *J. Immunol.*, 1998, 160, 4755-4761; 和 Yi 等 *J. Immunol.*, 1998, 160, 5898-5906; 国际专利申请 WO/96/02555, WO 98/16247, WO 98/18810, WO 98/40100, WO 98/55495, WO 98/37919 和 WO 98/52581), 即含有至少一个 CG 二核苷酸, 可任选地用 5-甲基胞嘧啶代替胞嘧啶; (9) 聚氧乙烯乙醚或聚氧乙烯酯如 WO 99/ 52549; (10) 结合了辛苯聚糖(octoxynol) 的聚氧乙烯山梨聚糖酯表面活性剂 (WO 01/21207), 或与至少一种另外的非离子表面活性剂如辛苯聚糖结合的聚氧乙烯烷基醚或酯表面活性剂 (WO 01/21152); (11) 皂角苷和免疫刺激寡聚肽 (如 CpG 寡肽) (WO 00/62800); (12) 免疫刺激物和金属盐颗粒, 如 WO 00/23105; (13) 皂角苷和水包油乳剂如 WO 99/11241; (14) 皂角苷 (如 QS21) +3dMPL +IL-12(任意地加上固醇)如 WO 98/57659; (15) 细菌 ADP-核糖基化毒素的脱毒突变体, 如霍乱毒素 (CT)、百日咳毒素 (PT) 或大肠杆菌热不稳定毒素 (LT), 特别是 LT-K63

(在 63 位赖氨酸代替野生型氨基酸), LT-R72 (在 72 位精氨酸代替野生型氨基酸), CT-S109 (在 109 位丝氨酸代替野生型氨基酸), 和 PT-K9/G129 (在 9 位赖氨酸代替野生型氨基酸和在 129 位甘氨酸代替野生型氨基酸) (见如国际专利 WO 93/13202 和 WO 92/19265); 和 (16) 其它作为增强组合物
5 效果的免疫刺激剂的物质。较佳的是 alum (特别是磷酸铝和/或氢氧化铝) 和 MF59。

胞壁酰肽包括但不限于 N-乙酰基-胞壁酰基-L-苏氨酸-D-异谷氨酰胺 (thr-MDP)、N-乙酰基-去甲胞壁酰基(normuranmyl)-L-丙氨酸-D-异谷氨酰胺 (nor-MDP)、N-乙酰基胞壁酰基-L-丙氨酸-D-异谷氨酰胺基-L-丙氨酸-2-
10 (1'-2'-二棕榈酰基-sn-甘油-3-羟基磷酰基氧)-乙胺 (MTP-PE) 等。

佐剂的其它例子见 *Vaccine Design, The Subunit and the Adjuvant Approach*, Powell, M.F 和 Newman, M.J.编, Plenum Press, (1995)。

组合物将含有 “治疗有效量” 感兴趣的大分子, 也就是说组合物中大分子/微粒体的量将使对象产生足够的反应, 以预防、减少、除去或诊断症状。
15 所需的适当的量是变化的, 例如依赖于接受治疗的对象; 接受治疗的对象的年龄和大体的条件; 治疗状况的严重程度; 在免疫反应的情况下, 对象免疫系统合成抗体的能力; 希望保护的程度和选择的具体抗原以及给予的方式; 以及其它的因素。本领域熟练的技术人员可以容易地测定适合的有有效量。因此, “治疗有效量” 通常在一个较大的范围内, 该范围可由常规试验测定。
20 例如, 为了本发明的目的, 大分子是多核苷酸, 每剂传送的大分子有效剂量典型地在 1ng-1mg 范围内, 更佳的约在 10ng-1 μ g, 最佳的约 50ng-500ng; 大分子是抗原时, 每剂传送的大分子有效剂量典型地在约 1 μ g-100mg 范围内, 更佳的约在 10 μ g-1mg, 最佳的约 50 μ g-500 μ g。

一旦制得本发明的组合物, 可将其肠胃外给予, 如通过注射。组合物可
25 皮下注射、腹膜内注射、静脉注射或肌肉注射。其它给药方式包括鼻、粘膜、直肠、阴道、口和肺部给予, 栓剂和经真皮或表皮应用。

可以使用单剂量方案或多剂量方案进行剂量治疗。多剂量方案是指在初期疗程中可以分 1-10 次剂量分期服药, 在随后的时间间隔里, 根据所选择维持和/或加强治疗效应的目的, 施以其它给药剂量, 例如, 在 1-4 个月内施以
30 第二剂量, 如果需要, 几个月后给予又一个剂量。剂量的服用方法至少部分

还决定于患者的需要和依赖于医生的判断。

另外，如果希望预防疾病，通常在用感兴趣的病原体初步感染前给予疫苗大分子。如果需要治疗，如症状还原或复发，通常初步感染后给予大分子。

5

实施例

以下是本发明进行的具体的实施例的例子。这些实施例仅仅是为了说明本发明的目的，而不以任何方式限制本发明的范围。

关于使用的数字（如量、温度等）力求精确，但实验中的误差和偏差当然是允许的。

10

实施例 1

使用 PVA 制备空白微粒体

如下使用聚乙烯醇制备空白微粒体（如不含有吸附或嵌入的大分子）。
溶液使用：

- 15 (1) 含有 6% RG 504 PLG (Boehinger Ingelheim) 的二氯甲烷。
 (2) 含 10% 聚乙烯醇 (PVA) (ICN) 的水溶液。

具体地说，通过使 10ml 的聚合物溶液与 1.0ml 的蒸馏水混合，使用具有 10mm 探针的全向台式匀浆器(Omni benchtop homogenizer)以 10K rpm 匀浆 3 分钟，形成水-油乳剂。将该 w/o 乳剂加入到 40ml 的 10% PVA 溶液，并匀浆
20 3 分钟，形成水/油/水(w/o/w)乳剂。搅拌该 w/o/w 乳剂过夜，以蒸发溶剂，形成微粒体。形成的微粒体用水离心洗涤 4 次，并冻干。用 Malvern Master 筛选器分出微粒体以备将来使用。

实施例 2

25

使用 CTAB 制备空白微粒体

如下使用 CTAB 制备空白微粒体。溶液使用：

- (1) 含有 4% RG 504 PLG (Boehinger Ingelheim) 的二甲基氧。
(2) 5% CTAB (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) 水溶液。

具体地说，通过使 12.5ml 的聚合物溶液与 1.25ml 的蒸馏水混合，使用
30 具有 10mm 探针的全向台式匀浆器以 10K rpm 匀浆 3 分钟，形成 w/o 乳剂。w/o

乳剂加入到 50ml 的 0.5% CTAB 溶液，并匀浆 3 分钟，形成水-油-水(w/o/w)乳剂。搅拌该 w/o/w 乳剂过夜，以蒸发溶剂，形成微粒体。然后用 38 μ 筛孔的滤器过滤形成的微粒体，用水离心洗涤 4 次，冻干。用 Malvern Master 筛选器分出微粒体以备将来使用。

5

实施例 3

使用 SDS 制备空白微粒体

如下使用 SDS 制备空白微粒体。溶液使用：

(1) 含有 6% RG 504 PLG (Boehinger Ingelheim) 的二甲基氧。

10 (2) 1% SDS (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) 水溶液。

具体地说，通过使 12.5ml 的聚合物溶液与 50ml 的 SDS 溶液混合，使用具有 10mm 探针的全向台式匀浆器以 10K rpm 匀浆 3 分钟，形成乳剂。搅动乳剂过夜以蒸发溶剂，形成微粒体。用 38 μ 筛孔的滤器过滤形成的微粒体，用水离心洗涤 4 次，冻干备用。用 Malvern Master 筛选器分出微粒体以备将来

15 使用。

实施例 4

吸附 DNA/CTAB 复合物的微粒体

使用标准溶剂蒸发方法制备空白 PLG/PVA 微粒体。对于 1gm 批次，将 2ml

20 去离子水(DI)与 16ml 的 RG504(PLG 聚合物) 在二氯甲烷(DCM)中的 6% w/v 溶液匀浆。该乳液匀浆 2 分钟，然后加入 60ml 的 10% w/v 的聚乙烯醇溶液 (PVA)。将所得的多重的乳剂进一步匀浆 3 分钟，然后放置磁力搅拌器搅拌过夜，蒸发溶剂。用去离子水洗涤得到的微粒体 2 次并冻干。筛选微粒体大小，发现其大小约为 1 μ m。

25 为了制备 DNA 制剂，将 100mg 的 PLG/PVA 微粒体与 1mg CTAB 和 1mg DNA(pCMV p55gag)在 5ml 的 TE 缓冲液中培养。4 $^{\circ}$ C 下轻微搅拌悬浮液过夜以充分吸附。微粒体在 5000rpm 离心一次，用 50ml 的 PE 缓冲溶液洗涤沉淀物一次。在 3ml 的 DI 水溶液中悬浮得到的沉淀物，然后将微粒体冻干。

通过微粒体的消耗(上清液的测定)和碱性水解来测定实际吸附的 DNA。

30 发现 DNA 负载为 0.91% (w/w)，负载效率为 91%。

在第一天, 10mg 制剂在体外 1ml 的 TE 缓冲液中没有释放任何游离 DNA。

实施例 5

使用 CTAB 交叉流过滤技术制备空白微粒体

5 如下使用 CTAB 制备空白微粒体。溶液使用: (1) 含有 6% RG 504 PLG
 (Boehinger Ingelheim) 的二氯甲烷, (2) 0.5% CTAB (Sigma Chemical Co.,
 St. Louis, MO) 水溶液, (3) 柠檬酸钠/EDTA 水溶液。使用图 1 所示的设备
 制备微粒体, 将 80ml 的聚合物溶液与 10ml 的柠檬酸钠/EDTA 溶液在水槽中
 持续混合。然后混合物在串联的匀浆器中匀浆, 直到得到具有平均粒径为 1-2
10 微米的扩散相的 (水相) o/w 乳剂。此时, 在不停地混合的同时, 向水槽中加
 入 310ml CTAB 溶液。然后将混合物在串联的匀浆器中匀浆, 直到得到具有平
 均粒径为 1 微米的扩散相的 (o/w 相) 稳定的 w/o/w 乳剂。得到的 w/o/w 乳剂
 用氮提纯以除去有机溶剂, 这样形成的微粒体用购自 Millipore 的 0.1 微米的
15 交叉流过滤器箱过滤, 用总共 4 升的去离子水除去过量的 CTAB。最后交叉流
 过滤后, 收集悬浮液, 它含有约 1% 的 CTAB, 其中 30% 以结合的形式存在,
 70% 以游离形式存在。

实施例 6

使用 CTAB 非-洗涤技术制备空白微粒体

20 如下使用 CTAB 制备空白微粒体。溶液使用: (1) 含有 6% RG 504 PLG
 (Boehinger Ingelheim) 的二氯甲烷, (2) 0.01825% CTAB (Sigma Chemical Co.,
 St. Louis, MO) 水溶液, (3) 柠檬酸钠/EDTA 水溶液。用图 1 所示的设备制
 备微粒体, 将 300ml 的聚合物溶液与 60ml 的柠檬酸钠/EDTA 溶液在水槽中持
25 续混合。然后使混合物在串然的匀浆器中匀浆, 直到得到具有平均颗粒大小
 为 1 微米的扩散相的 (水相) o/w 乳剂。此时, 向水槽中加入 1.8 升 CTAB 溶
 液持续混合, 然后将混合物在串联的匀浆器中匀浆, 直到得到具有平均粒径
 为 1 微米的扩散相的 (o/w 相) 稳定的 w/o/w 乳剂。得到的 w/o/w 乳剂用氮提
 纯以除去有机溶剂, 微粒体悬浮液在 Malvern Master 筛选器中筛选大小, 以
30 备将来使用。这些微粒体含有约 1% 的 CTAB, 其中 30% 以结合的形式存在,

70%以游离的形式存在。

实施例 7

吸附了 p55 DNA 微粒体的免疫原性

- 5 通过将 100mg 的实施例 6 中制成的微粒体悬浮液(体积为 10ml),与 1.0mg 的 DNA (在巨细胞病毒早期启动子的控制下编码 HIVp55gag 蛋白质的 pCMVgag 质粒)在体积为 0.5nl 的 Tris-EDTA 缓冲溶液中培养,制备 DNA 制剂。该悬浮液在 4℃下培养 12 小时。培养后,离心载有 DNA 的微粒体,用 Tris-EDTA 缓冲溶液洗涤,悬浮于去离子水中,冻干。得到的微粒体的 DNA
- 10 负载约为 1% w/w。

然后,具有 DNA 负载的微粒体在 2 个总 DNA 水平上肌肉注射给小鼠。单独的 DNA 也在相同的 2 个水平注射作为对照。每一制剂注射 10 只小鼠,28 天后强化小鼠。第二次免疫后 2 周,收集血清,测定每一血清的几何平均滴度 (GMT),及它的标准差 (SE)。结果总结于下表:

制剂	几何平均滴度 (GMT)	标准差 (SE)
PLG-CTAB p55DNA(1% w/w 负载), 1 μg	15, 565	4, 764
PLG-CTAB p55DNA(1% w/w 负载), 10 μg	27, 277	5, 693
1 μg p55 DNA	367	1, 572
10 μg p55 DNA	2, 185	1, 652

- 15 尽管详细描述了本发明的较佳的实施例,应该理解在不偏离本发明附加的权利要求书中定义的精神和范围的情况下,可以进行明显的改变。

参考文献

- 参考文献 1 - 国际专利申请 WO99/24578.
- 参考文献 2 - 国际专利申请 WO99/36544.
- 5 参考文献 3 - 国际专利申请 WO99/57280.
- 参考文献 4 - 国际专利申请 WO00/22430.
- 参考文献 5- Tettelin等, (2000) *Science* 287:1809-1815.
- 参考文献 6 - 国际专利申请 WO96/29412
- 参考文献 7 - Pizza 等. (2000) *Science* 287:1816-1820.
- 10 参考文献 8 - 国际专利申请 PCT/IB01/00166.
- 参考文献 9 - Bjune 等. (1991) *Lancet* 338(8775):1093-1096.
- 参考文献 10 - Fukasawa 等. (1990) *Vaccine* 17:2951-2958.
- 参考文献 11 - Rosenqvist 等. (1998) *Dev. Biol. Stand* 92:323-333.
- 参考文献 12- Costantino 等. (1992) *Vaccine* 10:691-698.
- 15 参考文献 13- Costantino 等. (1999) *Vaccine* 17:1251-1263.
- 参考文献 14- Watson (2000), *Pediatr Infect Dis J* 19:331-332.
- 参考文献 15- Rubin (2000) *Pediatr Clin North Am* 47:269-285, v.
- 参考文献 16- Jedrzejewski (2001) *Microbiol Mol Biol Rev* 65:187-207.
- 参考文献 17 - 国际专利申请, 申请于2001年6月3日, 从 GB-0016363.4
- 20 公开优先权.
- 参考文献 18 - Kalman 等. (1999) *Nature Genetics* 21 :385-389.
- 参考文献 19- Read 等. (2000) *Nucleic Acids Res* 28:1397-406.
- 参考文献 20- Shirai 等. (2000) *J. Infect. Dis.* 181(3增刊):S524-S527.
- 参考文献 21 - 国际专利申请 WO99/27105.
- 25 参考文献 22 - 国际专利申请 WO00/27994.
- 参考文献 23 - 国际专利申请 WO00/37494.
- 参考文献 24 - 国际专利申请 WO99/28475.
- 参考文献 25 - Bell (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19:1187-1188.
- 参考文献 26 - Iwarson (1995) *APMIS* 103:321-326.
- 30 参考文献 27 - Gerlich 等. (1990) *Vaccine* , 第8增刊:S63-68和79-80.

- 参考文献 28 -Hsu 等. (1999) *Clin Liver Dis* 3:901-915.
- 参考文献 29 -Gustafsson 等. (1996) *N.Engl.J.Med.* 334:349-355.
- 参考文献 30 -Rappuoli 等. (1991) *TIBTECH* 9:232-238.
- 参考文献 31-Plotkin 和 Mortimer.编, *Vaccines(1988)*. ISBN 0-7216-1946-5 0.
- 参考文献 32 -Del Giudice 等.(1998) *Molecular Aspects of Medicine* 19:1-70.
- 参考文献 33 -国际专利申请 WO93/18150.
- 参考文献 34 -国际专利申请 WO99/53310.
- 参考文献 35 -国际专利申请 WO98/04702.
- 10 参考文献 36 -Ross 等. (2001) *Vaccine* 19:4135-4142.
- 参考文献 37 -Sutter 等. (2000) *Pediatr Clin North Am* 47:287-308.
- 参考文献 38 -Zimmerman和Spann (1999) *Am Fam Physician* 59:113-118, 125-126.
- 参考文献 39 -Dreesen (1997) *Vaccine* 15增刊:S2-6.
- 15 参考文献 40-*MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1998,1,16; 47 (1) :12, 19.
- 参考文献 41 -McMichael (2000) *Vaccine* 19增刊, 1:S101-107.
- 参考文献 42 -Schuchat (1999) *Lancet* 353(9146):51-6.
- 参考文献 43 -GB 专利申请 0026333.5, 0028727.6 和0105640.7.
- 参考文献 44 -Dale(1999) *Infect Dis Clin North Am* 13:227 -43, viii.
- 20 参考文献 45 -Ferretti 等. (2001) *PNAS USA* 98:4658-4663.
- 参考文献 46 -Kuroda 等. (2001) *Lancet* 357(9264):1225-1240; 也见1218-1219页.
- 参考文献 47 -Ramsay 等. (2001) *Lancet* 357(9251):195-196.
- 参考文献 48- Lindberg (1999) *Vaccine* 17增刊, 2:S28-36.
- 25 参考文献 49 -Buttery和Moxon (2000) *J R Coll Physicians London* 34:163-168.
- 参考文献 50 -Ahmad和Chapnick(1999) *Infect Dis Clin North Am* 13:113-133, vii.
- 参考文献 51 -Goldblatt (1998) *J. Med. Microbiol.* 47:563-567.
- 30 参考文献 52 -欧洲专利 0 477 508.

参考文献 53-美国专利 No. 5, 306, 492.

参考文献 54 -国际专利申请 WO98/42721.

参考文献 55 -*Conjugate Vaccines* (Cruse 等编) ISBN 3805549326, 具体的
vol. 10:48-114.

5 参考文献 56- Hermanson (1996) *Bioconjugate Techniques* ISBN:
0123423368和012342335X.

参考文献 57 -欧洲专利申请0372501.

参考文献 58 -欧洲专利申请0378881.

参考文献 59 -欧洲专利申请0427347.

10 参考文献 60 -国际专利申请 WO93/17712.

参考文献 61 -国际专利申请 WO98/58668.

参考文献 62 -欧洲专利申请 0471177.

参考文献 63 -国际专利申请 WO00/56360.

参考文献 64 -国际专利申请 WO00/61761.

15

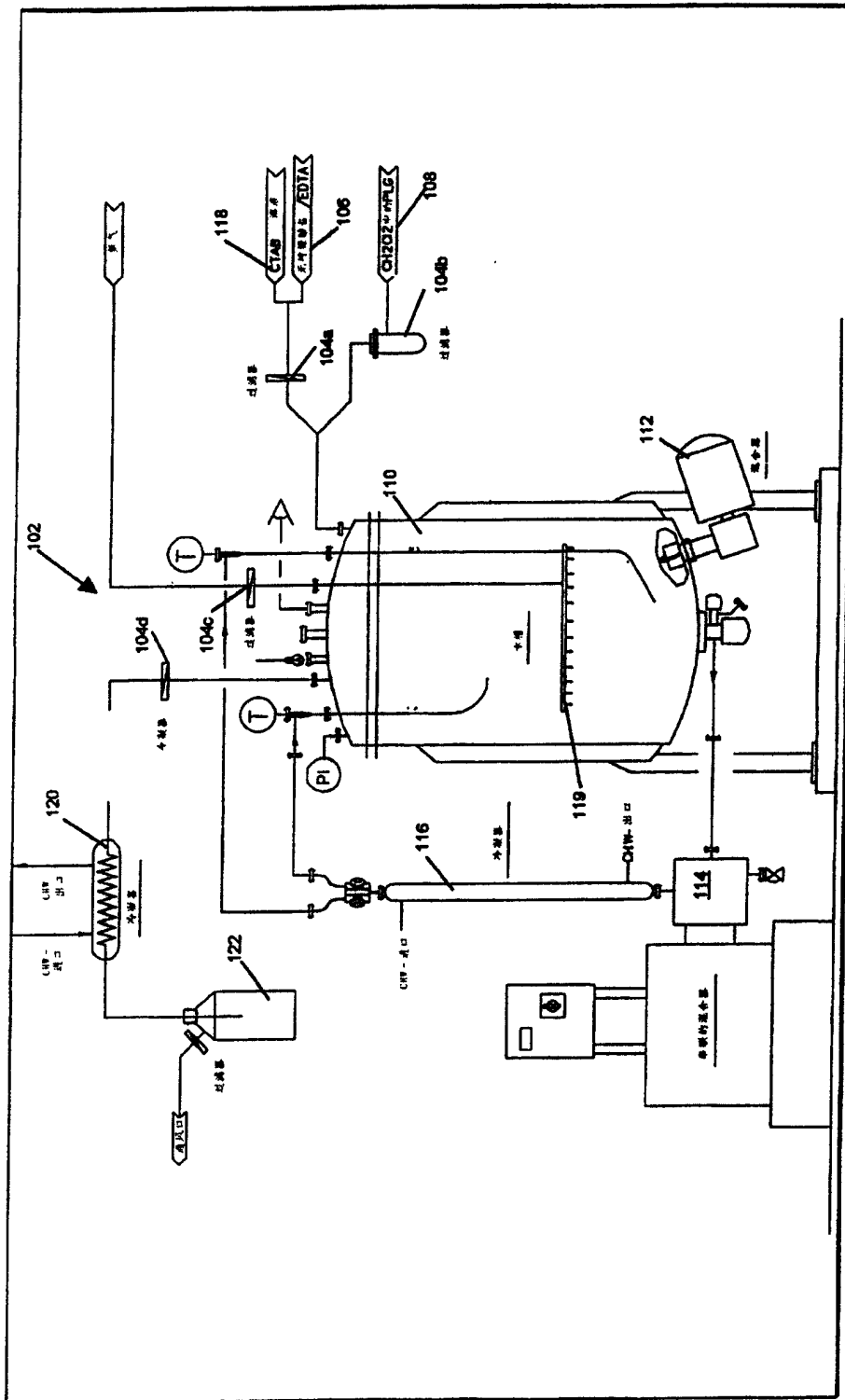


图 1