



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102427828 A

(43) 申请公布日 2012. 04. 25

(21) 申请号 201080017587. 7

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2010. 03. 09

A61K 47/48 (2006. 01)

(30) 优先权数据

A61K 31/465 (2006. 01)

61/209, 629 2009. 03. 09 US

A61K 31/55 (2006. 01)

A61P 37/02 (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011. 10. 21

(86) PCT申请的申请数据

PCT/EP2010/052997 2010. 03. 09

(87) PCT申请的公布数据

W02010/103017 EN 2010. 09. 16

(71) 申请人 威廉·亨利

地址 英国巴克斯

(72) 发明人 威廉·亨利

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 罗菊华

权利要求书 2 页 说明书 31 页 附图 5 页

(54) 发明名称

含具有信号肽的细菌毒素作为载体的半抗原-载体缀合物和它们在免疫原性组合物中的用途

(57) 摘要

本发明涉及用于诱导针对目标抗原的免疫应答的免疫原性组合物。尤其是, 本发明提供免疫原性组合物, 其包括抗原-载体缀合物, 其中载体是含信号肽的细菌毒素。本发明也提供产生具有增强的免疫原性的免疫原性组合物的方法, 包括在抗原-载体缀合物(例如半抗原-载体缀合物)中将信号肽添加到细菌载体。本发明也提供使用这些免疫原性组合物在受试者中诱导针对半抗原的免疫应答的方法。

1. 免疫原性组合物,所述组合物包括:
 - (i) 具有包括氨基酸序列 Ala-Pro-Gly-Tyr-Ala-His-Gly,或其 C-端片段的信号肽的霍乱毒素 B(CTB);及
 - (ii) 半抗原,其中组合物能诱导针对成瘾药物的免疫应答。
2. 权利要求 1 的免疫原性组合物,其中针对成瘾药物的免疫应答大于由与权利要求 1 的相同但缺少所述信号肽的免疫原性组合物诱导的针对成瘾药物的免疫应答。
3. 权利要求 1 的免疫原性组合物,其中成瘾药物是可卡因。
4. 权利要求 1 的免疫原性组合物,其中成瘾药物是烟碱。
5. 权利要求 1~4 中任一项的免疫原性组合物,其中所述免疫原性组合物包括佐剂。
6. 权利要求 5 的免疫原性组合物,其中所述佐剂是氢氧化铝。
7. 免疫原性组合物,所述组合物包括:
 - (i) 具有包括氨基酸序列 Ala-Pro-Gly-Tyr-Ala-His-Gly,或其 C-端片段的信号肽的 CTB;及
 - (ii) 烟碱或其衍生物,其中组合物能诱导针对烟碱的免疫应答。
8. 权利要求 7 的免疫原性组合物,其中针对烟碱的免疫应答大于由与权利要求 7 的相同但缺少所述信号肽的免疫原性组合物诱导的针对烟碱的免疫应答。
9. 权利要求 7 或 8 的免疫原性组合物,其中所述免疫原性组合物包括佐剂。
10. 权利要求 9 的免疫原性组合物,其中所述佐剂是氢氧化铝。
11. 在受试者中诱导针对成瘾药物的免疫应答的方法,包括给受试者施用有效量的免疫原性组合物,所述组合物包括:
 - (i) 具有包括氨基酸序列 Ala-Pro-Gly-Tyr-Ala-His-Gly,或其 C-端片段的信号肽的霍乱毒素 B(CTB);及
 - (ii) 半抗原,其中组合物能诱导针对成瘾药物的免疫应答。
12. 权利要求 11 的方法,其中成瘾药物是烟碱。
13. 权利要求 11 的方法,其中成瘾药物是可卡因。
14. 在受试者中诱导针对烟碱的免疫应答的方法,包括给受试者施用有效量的免疫原性组合物,所述组合物包括:
 - (i) 具有包括氨基酸序列 Ala-Pro-Gly-Tyr-Ala-His-Gly,或其 C-端片段的信号肽的霍乱毒素 B(CTB);及
 - (ii) 烟碱或其衍生物,其中组合物能诱导针对烟碱的免疫应答。
15. 权利要求 11~14 中任一项的方法,其中免疫原性组合物随佐剂施用。
16. 权利要求 15 的方法,其中所述佐剂是氢氧化铝。
17. 疫苗接种受试者抵抗成瘾药物的方法,包括给受试者施用有效量的免疫原性组合物,所述组合物包括:
 - (i) 具有包括氨基酸序列 Ala-Pro-Gly-Tyr-Ala-His-Gly,或其 C-端片段的信号肽的

霍乱毒素 B(CTB) ;及

(ii) 半抗原,

其中组合物能诱导针对成瘾药物的免疫应答。

18. 权利要求 17 的方法,其中成瘾药物是烟碱。

19. 权利要求 17 的方法,其中成瘾药物是可卡因。

20. 疫苗接种受试者抵抗烟碱的方法,包括给受试者施用有效量的免疫原性组合物,所述组合物包括:

(i) 具有包括氨基酸序列 Ala-Pro-Gly-Tyr-Ala-His-Gly,或其 C-端片段的信号肽的霍乱毒素 B(CTB) ;及

(ii) 烟碱或其衍生物,

其中组合物能诱导针对烟碱的免疫应答。

21. 权利要求 17 ~ 20 中任一项的方法,其中免疫原性组合物随佐剂施用。

22. 权利要求 21 的方法,其中所述佐剂是氢氧化铝。

23. 治疗有需要的受试者的药物成瘾或药物依赖性的方法,包括给受试者施用有效量的免疫原性组合物,所述组合物包括:

(i) 具有包括氨基酸序列 Ala-Pro-Gly-Tyr-Ala-His-Gly,或其 C-端片段的信号肽的霍乱毒素 B(CTB) ;及

(ii) 半抗原,

其中组合物能诱导针对成瘾药物的免疫应答。

24. 权利要求 23 的方法,其中药物成瘾或依赖性为烟碱成瘾或依赖性。

25. 权利要求 23 的方法,其中药物成瘾或依赖性为可卡因成瘾或依赖性。

26. 治疗有需要的受试者的烟碱成瘾或烟碱依赖性的方法,包括给受试者施用有效量的免疫原性组合物,所述组合物包括:

(i) 具有包括氨基酸序列 Ala-Pro-Gly-Tyr-Ala-His-Gly,或其 C-端片段的信号肽的霍乱毒素 B(CTB) ;及

(ii) 烟碱或其衍生物,

其中组合物能诱导针对烟碱的免疫应答。

27. 权利要求 23 ~ 26 中任一项的方法,其中免疫原性组合物随佐剂施用。

28. 权利要求 27 的方法,其中所述佐剂是氢氧化铝。

含具有信号肽的细菌毒素作为载体的半抗原 - 载体缀合物 和它们在免疫原性组合物中的用途

【技术领域】

[0001] 本发明涉及用于诱导针对目标抗原的免疫应答的免疫原性组合物。尤其是,本发明提供包括抗原 - 载体缀合物的免疫原性组合物,其中载体是含信号肽的细菌毒素。本发明也提供产生具有增强的免疫原性的免疫原性组合物的方法,包括在抗原 - 载体缀合物(例如半抗原 - 载体缀合物)中将信号肽添加到细菌载体。本发明也提供使用这些免疫原性组合物在受试者中诱导针对半抗原的免疫应答的方法。

【背景技术】

[0002] 细菌毒素 - 半抗原缀合物是目前临床试验中作为对于药物成瘾的治疗剂。在这些持续试验中,当将含半抗原 / 药物(例如,可卡因 - 细菌毒素缀合物或烟碱 - 细菌毒素缀合物)的免疫原性组合物施用于成瘾的个体时,引起特异于药物的抗体。例如,当治疗组合物是可卡因 - 载体缀合物时,治疗诱导抗 - 可卡因抗体应答,其降低受试者血流或粘膜组织中的可卡因,由此降低药物的心理学成瘾性质。用烟碱 - 载体缀合物处理诱导抗 - 烟碱抗体及减少来自烟碱使用的满足感。

【发明概述】

[0004] 载体是细菌毒素的药物 - 载体缀合物的初始临床成功提出了对具有甚至更大的免疫原性的药物 - 细菌毒素缀合物的需求。具有增强的免疫原性的药物 - 细菌毒素缀合物的产生具有以更少剂量,以更低剂量,和 / 或以更大的剂量之间的时间间隔施用的临床优势。具有更大的潜力的缀合物的利用度也将大大辅助所述疫苗的大规模产生。本发明部分基于如下发现,包括缀合于含信号肽的霍乱毒素 B(CTB) 载体的烟碱的半抗原 - 载体缀合物相比缺乏信号肽的烟碱 - CTB 缀合物具有增强的免疫原性。

[0005] 本文提供免疫原性组合物,其包括细菌毒素,免疫原性通过含信号肽增强。在一实施方式中,信号肽是细菌毒素的内源性信号肽或其片段。在一实施方式中,信号肽包括氨基酸序列 Ala-Pro-Gly-Tyr-Ala-His-Gly。在其他实施方式中,信号肽包括氨基酸序列 Gly-Tyr-Ala-His-Gly。在其他实施方式中,信号肽包括氨基酸序列 Tyr-Ala-His-Gly。在其他实施方式中,信号肽包括氨基酸序列 Ala-His-Gly。在其他实施方式中,信号肽包括氨基酸序列 His-Gly。在其他实施方式中,信号肽包括单 Gly 残基。在一些实施方式中,本发明的,免疫原性组合物包括一种或更多这些肽的混合物。

[0006] 在本发明的另一实施方式中,免疫原性组合物包括含信号肽的细菌毒素,选自:细菌 ADP- 核糖基化外毒素亚基肽,霍乱毒素 B(CTB) 大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*) 热 - 不稳定的肠毒素 (LT),白喉毒素,破伤风类毒素,百日咳毒素和丝状血凝素,志贺毒素及假单胞菌外毒素。其他有用的细菌毒素载体包括具有增强粘膜应答的能力的任何细菌毒素,例如,细菌毒素的 LTB 家族中的任何毒素。

[0007] 在一些实施方式中,细菌毒素载体含其内源性信号肽。在一些实施方式中,本发明的细菌毒素载体,例如 CTB 或任何上述的细菌毒素,含异源信号肽。

[0008] 本发明提供免疫原性组合物,其包括抗原和载体,其中载体是含信号肽的细菌毒素和抗原是针对其期望产生免疫应答的任何分子。在本发明的一实施方式中,抗原缀合于载体。在一些实施方式中,抗原是半抗原。本发明部分基于如下发,含信号肽的细菌毒素载体相比缺乏信号肽的细菌毒素载体提供更大的针对缀合的半抗原的免疫应答。在一些实施方式中,半抗原是已知当以与缺乏信号肽(或信号肽不稳定,及期望增强的免疫)的细菌毒素的缀合物存在时具有免疫原性的半抗原。

[0009] 在本发明的一些实施方式中,缀合于含信号肽的细菌毒素的半抗原是烟碱或烟碱的衍生物。在一些实施方式中,半抗原是可卡因或另一成瘾药物。在一些实施方式中,半抗原是病原体的抗原。在一些实施方式中,抗原-细菌毒素缀合物中的抗原不是半抗原。

[0010] 本发明也提供使用上述的免疫原性组合物在受试者中诱导针对半抗原的免疫的方法。

[0011] 本发明也提供产生包括含信号肽的细菌毒素载体的免疫原性组合物的方法。在一些实施方式中,方法涉及在细胞内表达细菌毒素,其中细菌毒素含信号肽。在一些实施方式中,细菌毒素是 CTB,而产生其的细胞是霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*) 213 株。

【附图说明】

[0012] 图 1. rCTB(重组霍乱毒素 B) 的氨基酸序列。

[0013] 图 2. 霍乱弧菌 (*V. cholerae*) 213 和 401 中 2 种 rCTB 表达系统的比较。当在 213 株中产生时,检测 rCTB 的形式含达 7 个氨基酸长度的信号序列。当 rCTB 在 401 株中产生时检测不到稳定的信号序列。

[0014] 图 3. (A) 许多可能的,任意标记的,半抗原-载体缀合物的“分支”的表示,鉴定用于容易理解用于本发明的实践的适合的化合物和缀合物。(B) 可能的,任意标记的,半抗原-载体缀合物的“分支”的表示,鉴定用于容易理解本发明的实践中使用的适合的化合物和缀合物,其中 Q' 是修饰的含 T-细胞表位的载体,例如修饰的蛋白载体。

[0015] 图 4. 在本发明的免疫原性组合物的制备中有用的烟碱和一些其衍生物和代谢物的表示。

【发明详述】

[0017] 使用本发明的方法和组合物,及更尤其,本文所示技术,本领域技术人员可将任何选择的含信号肽的细菌毒素载体与任何选择的抗原(例如,半抗原)连接,以制造本发明的抗原-载体缀合物。任意数的载体和抗原和/或半抗原可存在于本发明的单个缀合物分子。

【1. 用于本发明的免疫原性组合物的载体】

[0019] 本发明提供包括抗原-载体缀合物(例如半抗原-载体缀合物)的免疫原性组合物,其中载体是含信号肽的细菌毒素。在一些实施方式中,细菌毒素含其内源性信号肽。在一些实施方式中,细菌毒素已经加工为含信号肽。在一些实施方式中,细菌毒素保留其信号肽,例如,其未从细菌毒素去除。

[0020] 在本发明中,免疫原性组合物包括抗原(例如半抗原)及载体,其中载体是含信号肽的细菌毒素。在本发明的一实施方式中,抗原缀合于载体。在一些实施方式中,细菌毒素来自革兰氏阴性细菌。在一些实施方式中,毒素来自革兰氏阳性细菌。在一些实施方式中,革兰氏阴性细菌是大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*)。在一些实施方式中,细菌是

革兰氏阳性芽孢杆菌,葡萄球菌,链球菌,链霉菌或柔膜体(支原体)。在一些实施方式中,载体是细菌外毒素。在一些实施方式中,载体是已经修饰而降低其毒性的细菌毒素。用于根据本发明使用的细菌毒素包括,但不限于,霍乱毒素,优选 CTB(包括重组 CTB(rCTB)),大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*)毒素,例如热-不稳定的肠毒素(LT),热-稳定的外毒素(ST),细胞毒性坏死因子(CNF),细胞致死性肿胀毒素(CLDT),或肠聚集性大肠埃希氏菌(*E. coli*)热-稳定的毒素(EAST),白喉毒素(Dtx),破伤风毒素,志贺毒素,肉毒毒素,葡萄球菌毒素,例如金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) α 毒素,剥脱素 B 或杀白细胞素,葡萄球菌毒性休克综合征毒素(TSST-1),葡萄球菌肠毒素或剥脱性毒素,链球菌毒素,例如肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)的肺炎链球菌溶血素,链球菌溶血素 O,红疹毒素(链球菌致热外毒素(SPE)),及酿脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*)的其他致热毒素,梭菌毒素,例如难辨梭菌(*Clostridium difficile*)的毒素 A/毒素 B, ι 家族, C2 家族(毒素 C 和 D),或 C3 毒素,或肉毒梭菌(*Clostridium botulinum*)的神经毒素 A~G,产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*)的 α 毒素, β -2 毒素或产气荚膜梭菌细胞溶素 O(产气荚膜梭菌肠毒素),脆弱拟杆菌(*Bacteroides fragilis*)的肠毒素,嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)/气单胞菌溶素,百日咳博德特菌(*Bordetella pertussis*)的丝状血凝素(FHA),梭菌属(*Clostridium*)或芽孢杆菌属(*Bacillus*)二元毒素,链激酶,百日咳博德特菌(*Bordetella pertussis*)的腺苷酸环化酶毒素(百日咳 AC;“百日咳毒素”)或其皮肤坏死毒素,炭疽芽孢杆菌(*Bacillus anthracis*)水肿因子(EF),炭疽毒素(致死因子(LF)),大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*)的溶血素,单核细胞增多性利斯特菌(*Listeria monocytogenes*)的利斯特菌溶血素,及假单胞菌属(*Pseudomonas*)外毒素(外毒素 A)。在一些实施方式中,优选使用细菌 ADP-核糖基化外毒素,例如,霍乱毒素,白喉毒素,百日咳毒素,假单胞菌属(*Pseudomonas*)外毒素 A,或大肠埃希氏菌(*E. coli*)LT。在一些实施方式中,将细菌 ADP-核糖基化外毒素的催化性亚基(通常,“A”亚基)用作载体。在其他实施方式中,优选细菌 ADP-核糖基化外毒素(通常,“B”亚基)的受体-结合亚基。再一实施方式中,将亚基或其片段二者用作载体。在一些实施方式中,使用细菌孔隙-形成毒素,例如产气荚膜梭菌细胞溶素 O,溶血素,利斯特菌溶血素,炭疽 EF, α 毒素,肺炎链球菌溶血素,链球菌溶血素 O,或杀白细胞素。在一些实施方式中,载体是致热外毒素,或其修饰的形式,例如葡萄球菌肠毒素血清型 A~E,G 和 H,组 A 链球菌致热外毒素 A~C,葡萄球菌剥脱素毒素,及葡萄球菌 TSST-1。尤其有用的细菌毒素载体包括具有增强粘膜免疫应答的能力的任何细菌毒素,例如,CTB 或细菌毒素的大肠埃希氏菌(*E. coli*)热-不稳定的肠毒素(LTB)家族中的任何毒素。

[0021] 在本发明的一些实施方式中,细菌毒素载体含其内源性信号肽(即,当蛋白翻译时存在于细菌毒素上的信号肽)或其片段。在其他实施方式中,细菌毒素载体含存在于毒素所来源的相同的细菌的信号肽,但信号肽通常存在于该细菌的不同的蛋白上。在一些实施方式中,使用毒素载体或其免疫原性片段,其正常不具有信号肽及向其添加信号肽。在一个所述实施方式中,破伤风毒素加工为含信号肽。

[0022] 在一些实施方式中,本发明的细菌毒素载体,例如 CTB 或任何上述的细菌毒素,含异源信号肽。在一些实施方式中,异源信号肽是分泌前导序列,例如本领域技术人员已知的那些及包括,例如,组织纤溶酶原活化物(tpa)前导序列,烟草发病机制-相关的 1b(PR1b)

信号肽,或本领域已知的任何其他信号肽或其片段。在一些实施方式中,信号肽是细菌信号肽。用于本发明的实践的细菌信号肽可选自 CTB 信号肽(本文所述的片段或,例如,登录号 No. P01556),大肠埃希氏菌(*E. coli*)热不稳定的肠毒素亚基 B 信号肽(例如,登录号 No. P13811),白喉毒素信号肽(例如,登录号 No. P00588),百日咳毒素信号肽(见,例如,美国专利 4,883,761 或登录号 No. P04977 和 P04978),志贺毒素信号肽(见,例如,登录号 No. Q9FBI2 和 Q7BQ98),假单胞菌属(*Pseudomonas*)外毒素 A(例如,登录号 No. P11439),FHA 毒素的长信号肽,TSST-1 信号肽,链球菌毒素信号肽,葡萄球菌蛋白 A 信号肽,产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*) α 毒素信号肽,产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*) β -2 毒素信号肽(见,例如,美国专利 7,144,998),梭菌属(*Clostridium*)和芽孢杆菌属(*Bacillus*)二元毒素的 A 和 B 亚基信号肽。见以下表 1 的用于本发明的例示细菌毒素信号肽的非-限制列表。显示了全长信号肽序列;但是,片段,例如,10 个氨基酸或更少,或 5 个氨基酸或更少的 C-端片段,等,可用于本发明的实践。信号肽或其片段可为 1~3 个氨基酸长度,3~5 个氨基酸长度,5~10,优选 7 个氨基酸长度,10~15 个氨基酸长度,15~20 个氨基酸长度,20~25 个氨基酸长度,25~30 个氨基酸长度,30~35 个氨基酸长度,35~40 个氨基酸长度,或 40~50 个或更多氨基酸长度。在其他实施方式中,本发明中所用的信号肽或其片段与天然存在的信号肽具有 90%或更佳,85%或更佳,80%或更佳,75%或更佳,70%或更佳,65%或更佳,或 60%或更佳序列同一性。

[0023] 在一些实施方式中,CTB 信号肽或其片段,例如以下部分 1.1 中描述的,是非 CTB 的细菌毒素载体上的异源信号肽。

[0024] 为本申请的目的,信号肽是引导蛋白的翻译后或共-翻译运输的短的(通常 3~60 个氨基酸长,但如果使用片段可更短,且可更长,例如,在 FHA 中)肽链。信号肽可也已知靶向信号,信号序列,转运肽或定位信号。通常,信号肽的氨基酸序列在真核生物中引导蛋白到内质网及在原核生物中到细胞膜。例如,许多细菌外毒素是用由几个(1~3)带电的氨基酸组成的氨基末端信号肽和(14~20)疏水氨基酸延伸段合成的。信号肽可在翻译期间结合及插入到细胞质膜,从而其合成期间分泌毒素。通常,信号肽被切割作为毒素释放到周质。或者,毒素可在胞浆内合成,然后结合到前导序列用于穿过膜。包括以所述方式发挥作用的信号肽,或通过其他机理发挥作用的那些以用于本发明。

[0025] 表 1. 用于本发明的例示细菌毒素信号肽

[0026]

细菌毒素蛋白	登录号 No.	信号肽氨基酸序列(蛋白中的氨基酸位置)
CTB	P01556	MIKLFKFGVFF TVLLSSAYAH G (1 ~ 21)
大肠埃希氏菌 (<i>E. coli</i>) LT-B	P13811	MNKVKFYVLF TALLSSLCAH G (1 ~ 21)
白喉毒素	P00588	MLVRGYVVSR KLFASILIGA LLGIGAPPSA HA (1 ~ 32)
百日咳毒素-A	P04977	MRCTRAIRQT ARTGWLTWLA ILAVTAPVTS PAWA (1 ~ 34)
百日咳毒素-B	P04978	MPIDRKTLC H LLSVLPLALL GSHVARA (1 ~ 27)
志贺毒素-A	Q9FBI2	MKIIIFRVLT FFFVIFSVNV VA (1 ~ 22)
志贺毒素-B	Q7BQ98	MKKTLLIAAS LSFFSASALA (1 ~ 20)
假单胞菌属 (<i>Pseudomonas</i>) 外毒素 A	P11439	MHLTPHWIPL VASLGLLAGG SFASA (1 ~ 25)

[0027] 本领域已知的任何细菌毒素载体可修饰为含根据本发明使用的信号肽。用于将信号肽序列添加到细菌毒素的标准技术包括重组 DNA 技术或允许以任一 DNA, RNA 或蛋白水平加工蛋白的任何其他技术。为了确保信号肽的增强的稳定性,无论信号肽对于载体是内源性的或通过重组 DNA 技术添加的,本领域技术人员可在替代性的系统中选择产生细菌毒素载体,例如哺乳动物细胞,昆虫细胞(使用,例如,杆状病毒表达系统),细菌细胞,优选,用于 CTB 信号肽,霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*) 株 213,或植物细胞,例如,通过在烟草植物中转基因表达,及选择从其分离带有信号肽的细菌毒素的最佳系统。用于增强带有信号肽的细菌毒素的产生和分离的其他方法包括:在任一蛋白表达期间和/或后添加蛋白酶抑制剂(例如,信号肽酶抑制剂)的系统中表达,或在用于转位或转位后处理的设备缺陷的系统中表达。可根据本发明使用经优化而带有信号肽的细菌毒素蓄积和/或具有增强的稳定性的任何其他系统。

[0028] 在一些实施方式中,本发明的细菌毒素载体含至少一个 T 细胞表位,其能刺激受试者的 T 细胞,其进而辅助 B 细胞起始及维持持续的抗体产生到整个缀合物的部分,包括半抗原部分。由此,由于选择载体,因为其是免疫原性的,期望在多样的患者群针对疫苗的强免疫应答。在优选实施方式中,载体,如半抗原,必需足够外源,以引起针对疫苗的强免疫应答。保守性但不必要的方法是使用载体,多数患者未暴露于该载体,以避免载体-诱导的表位阻遏的现象。但是,即便载体-诱导的表位阻遏发生,其可管理,由于其已经通过剂量变化 (DiJohn et al. (1989) Lancet 1415-1418) 和其他流程变化 (Etlinger et al. (1990) Science 249:423-425),包括使用 CTB (Stok et al. (1994) Vaccine 12:521-526) 克服。利用已免疫患者的载体蛋白的疫苗可商购。再者,含大量的赖氨酸的载体尤其适合于根据方法本发明的缀合。在某些实施方式中,因此,本发明的细菌毒素载体经修饰,从而它们的免疫原性性质增强。

[0029] 【1.1. CTB 作为载体】

[0030] 霍乱毒素是由霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*) 产生的肠毒素,及由 5 个同一 B 亚基,

各亚基具有 11.6KDa 的分子量(103 氨基酸)及一个 27.2KDa 的 A 亚基(230 氨基酸)组成(Finkelstein(1988)Immunochem. Mol. Gen. Anal. Bac. Path. 85-102)。结合亚基, CTB, 结合细胞表面的神经节苷脂 GM1(Sixma et al. (1991)Nature 351 :371-375 ;Orlandi et al. (1993)J. Biol. Chem. 268 :17038-17044)。CTA 是进入细胞及催化 G 蛋白的 ADP- 核糖基化, 组成性活化腺苷酸环化酶的酶促亚基(Finkelstein(1988)Immunochem. Mol. Gen. Anal. Bac. Path. pp. 85-102)。在 A 亚基缺失下, 霍乱毒素无毒性。

[0031] 在本发明的优选实施方式中, CTB 是细菌毒素载体。CTB 是能刺激强全身性和粘膜抗体应答的高度免疫原性蛋白亚基(Lycke(1992)J. Immunol. 150 :4810-4821 ;Holmgren et al. (1994)Am. J. Trop. Med. Hyg. 50 :42-54 ;Silbart et al. (1988)J. Immun. Meth. 109 :103-112 ;Katz et al. (1993)Infection Immun. 61 :1964-1971)。此组合的 IgA 和 IgG 抗- 半抗原应答在阻断, 例如, 期望经鼻或通过吸入施用免疫的可卡因或其他物质, 及在阻断在口和肺中吸收的烟碱或其他物质中高度期望。此外, CTB 已显示在用于霍乱疫苗的临床试验中对于人使用是安全的(Holmgren et al., supra ;Jertborn et al. (1994)Vaccine12 :1078-1082 ; " The Jordan Report, Accelerated Development of Vaccines" 1993., NIAID, 1993)。本发明发现, 当 CTB 含信号肽时, 包括 CTB 的半抗原- 载体缀合物具有甚至更大的免疫原性。

[0032] 在本发明的一实施方式中, 细菌毒素载体是 CTB 和其信号肽是其内源性信号肽, 或其片段。在一实施方式中, CTB 信号肽包括氨基酸序列 Ala-Pro-Gly-Tyr-Ala-His-Gly。在其他实施方式中, 信号肽包括氨基酸序列 Gly-Tyr-Ala-His-Gly。在其他实施方式中, 信号肽包括氨基酸序列 Tyr-Ala-His-Gly。在其他实施方式中, 信号肽包括氨基酸序列 Ala-His-Gly。在其他实施方式中, 信号肽包括氨基酸序列 His-Gly。在其他实施方式中, 信号肽包括单 Gly 残基。在本发明的一些实施方式中, 免疫原性组合物包括一种或更多这些肽的混合物。

[0033] 在某些实施方式中, CTB 带有异源信号肽。

[0034] 【1. 1. 1. CTB 制备】

[0035] 制造及使用 CTB 作为用于并入毒素- 载体缀合物的载体的方法是已知的。例如, 见, 美国专利申请公开 No. 2005-0124061, 公开于 2005 年 6 月 9 日 ;美国专利 No. 5, 876, 727, 授权于 1999 年 3 月 2 日 ;及美国专利 No. 5, 760, 184 ;各将其通过引用整体并入本文。根据这些方法, 及本文所示的方法产生的 CTB, 可经修饰从而其含如本文所述的信号肽。

[0036] 在优选的实施方式中, CTB 在霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*) 株 213 中产生。见, 例如, 国际专利申请公开 No. WO 2005/042749, 公开于 2005 年 5 月 12 日, 将其通过引用整体并入本文。

[0037] 在其他实施方式中, CTB 在大肠埃希氏菌 (*E. coli*) 中产生 (见, 例如, U. S. 专利申请公开 No. 2005-0124061, 通过引用整体并入本文)。增强含信号肽或其片段的 CTB 的形式的分离的方法是优选的。描述了 CTB 五聚体的高水平重组体表达的产生 (L' hoir et al. (1990)Gene89 :47-52 ;Slos et al. (1994)Protein Exp. Purif. 5 :518-526)。

[0038] 天然的 CTB 是可商购的, 及可使用本领域技术人员已知的标准蛋白加工技术修饰为具有信号肽。重组 CTB 可通过如所述的神经节苷脂 GM1 柱亲和层析纯化 (Tayot et al. (1981)Eur. J. Biochem. 113 :249-258)。重组 CTB 五聚体在 ELISA 中结合神经节苷脂 GM1

及在蛋白印迹和 ELISA 中与五聚体 - 特异性抗体反应。重组 CTB 是也可从其他来源得到, 例如 SBL Vaccin AB。

[0039] 可优选 CTB 的五聚体结构用于结合神经节苷脂 GM1。五聚体对于 SDS 稳定, 只要样品未经热沸, 允许通过 SDS-PAGE 评定五聚化。天然的 CTB 是五聚体及可在 SDS-PAGE 上容易从变性的单体 CTB 区分。五聚体结构在 4 ~ 9 的 pH 范围维持, 其辅助各种缀合化学。起初表达的重组 CTB 是单体。获得五聚体 CTB 的一种方式是通过调节表达恰当地折叠的五聚体 CTB。已发现细胞质表达提供得多更高水平的单体 CTB。本领域技术人员知晓折叠单体 CTB 为五聚体 CTB 的方法 (见, 例如, L' hoir et al. (1990) Gene 89 :47-52)。再折叠单体 CTB 以获得五聚体 CTB 的替代方案是通过 ELISA 产生能结合 GM1- 神经节苷脂的五聚体重组 CTB 的周质表达。本领域技术人员可发现用于用前导 (Slos et al., supra; Sandez et al. (1989) Proc. Nat' l. Acad. Sci. 86 :481-485; Lebens et al. (1993) BioTechnol. 11 :1574-1578) 或翻译后再折叠 (L' hoir et al., supra; Jobling et al. (1991) Mol. Microbiol. 5 :1755-1767) 获得五聚体重组 CTB 的几种方法, 例如周质表达。

[0040] 已表达的重组 CTB 的量和纯化的量, 一旦优化, 以大发酵批产生。本领域已知用于表达及纯化重组蛋白的方法, 例如, 美国专利申请系列 No. 07/807, 529。例如, CTB 可通过亲和层析纯化 (Tayot et al. (1981) Eur. J. Biochem. 113 :249-258), 缀合于可卡因或烟碱衍生物, 及缀合物可然后进一步纯化。分析纯化的 CTB 和得到的缀合物的纯度及 CTB 的五聚体结构的维持。技术包括 SDS-PAGE, 天然的 PAGE, 凝胶过滤层析, 蛋白印迹, 直接和 GM1- 捕获 ELISA, 及与生物素化的 CTB 的竞争 ELISA。通过质量光谱法, 反相 HPLC 和通过分析由半抗原的存在得到的 UV 吸光度的增加测量半抗原化水平。优化缀合物的溶解度和稳定性, 以制备全 - 标制剂。实施例中给出这些分析的一些细节。

[0041] 尽管 CTB 的五聚体结构是本发明的实践的优选的载体, 且 GM1 结合是测定 CTB 的五聚体形式存在的有效测定, 本发明不限于使用 CTB 的五聚体形式。也含盖可为用于本发明操作的其他形式的 CTB (例如, 单体, 二聚体, 等)。如果利用不是 CTB 的五聚体形式的载体, 则本领域技术人员将使用适当的测定来测定所需的载体的存在和活性, 例如, 使用 GM1 结合测定 CTB 的五聚体形式的存在。

[0042] 另一对于用作载体有用的 CTB 是霍乱毒素, 其提供超过 CTB 的改善的粘膜应答。已报告酶学地活跃的 A 亚基佐剂增强活性 (Liang et al. (1988) J. Immunol. 141 :1495-1501; Wilson et al. (1993) Vaccine 11 :113-118; Snider et al. (1994) J. Immunol. 153 :647)。

[0043] 【2. 用于本发明的缀合物的抗原】

[0044] 本文所述的组合物和方法在诱导针对广泛的抗原 (例如得自或源于患病的细胞或组织的, 或来自人或动物病原体的, 或来自滥用药物的抗原) 的免疫应答中。如本文所用, 抗原以其自身可或可不是免疫原性的。也含盖以它们的自身和 / 或相比典型的半抗原尺寸上更大是免疫原性的抗原以用于本发明的缀合物, 由于信号肽添加到载体将增加针对抗原的免疫应答。

[0045] 如本文所用, 抗原也包括本发明的缀合物针对其引发免疫应答的靶。例如, 抗原 - 载体缀合物中的抗原可为肝炎病毒表位, 且缀合物将针对其引发免疫应答的抗原是肝炎病毒本身。

[0046] 为本发明的目的, 术语 " 病原体 " 广义用于指疾病或病情的特定成因物质, 及包

括提供引起免疫应答的分子源的任何物质。由此,病原体包括,但不限于,病毒,细菌,真菌,原生动物,寄生虫,癌细胞等。一般,免疫应答通过由病原体产生的一种或更多种肽或碳水化合物抗原引起。鉴定适合的抗原,获得及制备所述分子,及然后确定适合的剂量,测定适合的免疫原性和用所述抗原治疗的方法是本领域熟知的。见例如,Plotkin et al. (1994) *Vaccines*, 2nd Edition, W. B. Saunders, Philadelphia, Pa. 可用于免疫接种脊椎动物受试者(尤其,人和非-人哺乳动物)的抗原的源的非-限制例,由此包括病毒,细菌,真菌和其他病原性生物。

[0047] 病毒抗原包括,但不限于,得自或源于病毒肝炎家族的那些,包括甲型肝炎病毒(HAV),乙型肝炎病毒(HBV),丙型肝炎病毒(HCV),丁型肝炎病毒(HDV),戊型肝炎病毒(HEV)和庚型肝炎病毒(HGV)。见,例如,国际公开 No. WO 89/04669; WO 90/11089; 及 WO 90/14436。HCV 基因组编码几种病毒蛋白,包括 E1 和 E2。见,例如, Houghton et al. (1991) *Hepatology* 14:381-388。含编码这些蛋白,以及其抗原性片段的序列的基因组片段,将用于本方法。类似地,已知来自 HDV 的 δ -抗原的编码序列(见,例如, U. S. pat. No. 5, 378, 814)。

[0048] 以相同方式,可在本发明中将来自疱疹病毒家族的广泛的蛋白用作抗原,包括源于 1 和 2 型单纯疱疹病毒(HSV)的蛋白,例如 HSV-1 和 HSV-2 糖蛋白 gB, gD 和 gH; 来自水痘带状疱疹病毒(VZV),爱泼斯坦-巴尔病毒(EBV)和巨细胞病毒(CMV)的抗原,包括 CMV gB 和 gH; 及来自其他人疱疹病毒的抗原,例如 HHV6 和 HHV7(见,例如 Chee et al. (1990) *Cytomegaloviruses* (J. K. McDougall, ed., Springer-Verlag, pp. 125-169; McGeoch et al. (1988) *J. Gen. Virol.* 69:1531-1574; U. S. Pat. No. 5, 171, 568; Baer et al. (1984) *Nature* 310:207-211; and Davison et al. (1986) *J. Gen. Virol.* 67:1759-1816.))。

[0049] 已知和报告了人免疫缺陷病毒(HIV)抗原,例如多种 HIV-1 和 HIV-2 分离物的 gp120 分子,包括各种 HIV 的遗传亚型的成员(见,例如, Myers et al., Los Alamos Database, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, N. Mex. (1992); and Modrow et al. (1987) *J. Virol.* 61:570-578),且源于或得自任何这些分离物的含抗原的基因组片段将用于本发明。此外,源于或得自任何各种 HIV 分离物的其他免疫原性蛋白将在本文所用,包括含一种或更多各种包膜蛋白的片段,例如 gp160 和 gp41, gag 抗原,例如 p24gag 和 p55gag,以及源于 HIV 的 pol, env, tat, vif, rev, nef, vpr, vpu 及 LTR 区的蛋白。

[0050] 源于或得自其他病毒的抗原将也在本文所用,例如无限制地,来自下列科成员的抗原:小 RNA 病毒科(Picornaviridae)(例如,脊髓灰质炎病毒,鼻病毒,等);嵌杯病毒科(Caliciviridae);披膜病毒科(Togaviridae)(例如,风疹病毒,登革热病毒,等);黄病毒科(Flaviviridae);冠状病毒科(Coronaviridae);呼肠孤病毒科(Reoviridae)(例如,轮状病毒,等);双 RNA 病毒科(Birnaviridae);弹状病毒科(Rhabdoviridae)(例如,狂犬病病毒,等);正粘病毒科(Orthomyxoviridae)(例如,流感病毒 A, B 和 C 型,等);纤丝病毒科(Filoviridae);副粘病毒科(Paramyxoviridae)(例如,腮腺炎病毒,麻疹病毒,呼吸道合胞病毒,副流感病毒,等);到布尼亚病毒科(Bunyaviridae);沙粒病毒科(Arenaviridae);逆转录病毒科(Retroviridae)(例如, HTLV-I; HTLV-II; HIV-1(也被称为 HTLV-III, LAV, ARV, hTLR, 等)),包括但不限于来自分离物 HIV IIIb, HIV SF2, HIV LAV, HIV LAI, HIV MN; HIV-1 CM235, HIV-1 US4; HIV-2 的抗原;猿猴免疫缺陷病毒(SIV);乳头瘤病毒属

(Papillomavirus), 蜱 - 源脑炎病毒 ; 等。对于这些和其他病毒的描述见, 例如 Virology, 3rd Edition (W. K. Joklik ed. 1988) ; Fundamental Virology, 2nd Edition (B. N. Fields and D. M. Knipe, eds. 1991)。

[0051] 在一些背景中, 得自或源于一般经粘膜表面进入身体且已知导致或相关于人疾病的病毒病原体的选择的病毒抗原是优选的, 例如但不限于 HIV (AIDS), 流感病毒 (流感), 单纯疱疹病毒 (生殖感染, 冷疮, STD), 轮状病毒 (腹泻), 副流感病毒 (呼吸性感染), 脊髓灰质炎病毒 (脊髓灰质炎), 呼吸道合胞病毒 (呼吸性感染), 麻疹和风疹病毒 (麻疹, 风疹), 风疹病毒 (风疹), 及鼻病毒 (普通感冒)。

[0052] 含细菌和寄生虫抗原的基因组片段可得自或源于造成疾病的已知的成因物质, 所述疾病包括但不限于白喉, 百日咳, 破伤风, 结核, 细菌或真菌肺炎, 中耳炎, 淋病, 霍乱, 伤寒, 脑膜炎, 单核细胞增多症, 鼠疫, 痢疾或沙门氏菌病, 军团病, 莱姆病, 麻风, 疟疾, 钩虫病, 盘尾丝虫病, 血吸虫病, 锥虫病, 利什曼病, 贾第虫病, 阿米巴病, 丝虫病, 疏螺旋体病和旋毛虫病。可得自或源于非常规病毒的其他抗原是例如库鲁病, Creutzfeldt-Jakob 病 (CJD), 羊瘙痒病, 传染性貂脑病, 及慢性消耗病的成因物质, 或来自蛋白性感染性粒子, 例如与疯牛病相关的朊病毒。

[0053] 特定病原体可包括结核分枝杆菌 (*M. tuberculosis*), 衣原体, 淋病奈瑟球菌 (*N. gonorrhea*), 志贺菌属 (*Shigella*), 沙门氏菌属 (*Salmonella*), 霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*), 苍白密螺旋体 (*Treponema pallidum*), 假单胞菌属 (*Pseudomonas*), 百日咳博德特菌 (*Bordetella pertussis*), 布鲁氏菌属 (*Brucella*), 土拉热弗朗西斯菌 (*Francisella tularensis*), 幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*), 问号钩端螺旋体 (*Leptospira interrogans*), 嗜肺军团菌 (*Legionella pneumophila*), 鼠疫耶尔森菌 (*Yersinia pestis*), 链球菌属 (*Streptococcus*) (A 和 B 型), 肺炎球菌属 (*Pneumococcus*), 脑膜炎球菌, 流感嗜血杆菌 (*Hemophilus influenza*) (b 型), 鼠弓形虫 (*Toxoplasma gondii*), 弯曲菌病, 粘膜炎莫拉菌 (*Moraxella catarrhalis*), 腹股沟肉芽肿和放线菌病 ; 真菌病原体, 其包括念珠菌病和曲霉菌病 ; 寄生虫病原体, 其包括绦虫属 (*Taenia*), 吸虫属 (*Flukes*), 蛔虫, 阿米巴病, 贾第虫病, 隐孢子虫属 (*Cryptosporidium*), 血吸虫属 (*Schistosoma*), 卡氏肺囊虫 (*Pneumocystis carinii*), 滴虫病和旋毛虫病。由此, 本发明也可用于提供适合的针对多种兽医学疾病的免疫应答, 例如口蹄疫, 冠状病毒, 多杀巴斯德菌 (*Pasteurella multocida*), 螺杆菌属 (*Helicobacter*), 寻常圆线虫 (*Strongylus vulgaris*), 胸膜炎肺炎放线杆菌 (*Actinobacillus pleuropneumonia*), 牛病毒腹泻病毒 (BVDV), 肺炎克雷伯菌 (*Klebsiella pneumoniae*), 大肠埃希氏菌 (*E. coli*), 百日咳博德特菌 (*Bordetella pertussis*), 副百日咳博德特菌 (*Bordetella parapertussis*) 及支气管炎博德特菌 (*Bordetella bronchiseptica*)。

[0054] 在一些实施方式中, 目标抗原可为过敏原。" 过敏原 " 是可在已用过敏原致敏的个体中起始超敏反应状态, 或可引发立即超敏反应的抗原。过敏原通常是结合于具有变应原性的性质的蛋白的蛋白或化学品 ; 但是, 过敏原也可包括源于各种人造或天然的源的有机或无机材料 (例如植物材料, 金属, 化妆品或去污剂中的成分, 胶乳, 等)。用于方法本发明的一类适合的过敏原可包括, 但不限于, 花粉, 动物毛皮垢屑, 草, 霉菌, 粉剂, 抗生素, 刺昆虫毒, 发现各种环境 (包括化学和金属), 药物和食品过敏原。常见的树过敏原

包括来自三角叶杨, 杨, 白杨, 桦, 枫, 栎, 榆, 山核桃及美国山核桃树的花粉; 常见的植物过敏原包括来自黑麦, 豕草, 英国车前草, 酸模及藜的那些; 植物接触过敏原包括来自毒栎, 毒常春藤及荨麻的那些; 常见的草过敏原包括梯牧草, 约翰逊, 百慕大, 羊茅及早熟禾过敏原; 常见的过敏原也可得自霉菌或真菌, 例如链格孢属 (*Alternaria*), 镰孢属 (*Fusarium*), 单孢枝霉属 (*Hormodendrum*), 曲霉属 (*Aspergillus*), 小多胞菌属 (*Micropolyspora*), 毛霉菌属 (*Mucor*) 和嗜热放线菌; 青霉素和四环素是常见的抗生素过敏原; 表皮过敏原可得自屋室或有机粉尘 (一般真菌起源), 来自昆虫, 例如屋尘螨 (*Dermatophagoides pteronyssinus*), 或来自动物源, 例如羽毛, 及猫和狗毛皮垢屑; 常见的食品过敏原包括乳和干酪 (diary), 蛋, 小麦, 坚果 (例如, 花生), 海味 (例如, 贝), 豌豆, 豆和谷蛋白过敏原; 常见的环境过敏原包括金属 (镍和金), 化学品 (甲醛, 三硝基酚及松节油), 胶乳, 橡胶, 纤维 (棉花或棉), 仿粗麻布, 毛发染料, 化妆品, 去污剂和香料过敏原; 常见的药物过敏原包括局部麻醉和水杨酸过敏原; 抗生素过敏原包括青霉素和磺酰胺过敏原; 及常见的昆虫过敏原包括蜜蜂, 黄蜂及蚂蚁毒, 及蟑螂萆过敏原。尤其良好表征的过敏原包括, 但不限于, Der pI 过敏原的主要及隐蔽表位 (Hoyne et al. (1994) *Immunology* 83:190-195), 蜜蜂毒磷脂酶 A2 (PLA) (Akdis et al. (1996) *J. Clin. Invest.* 98:1676-1683), 桦花粉过敏原 Bet v 1 (Bauer et al. (1997) *Clin. Exp. Immunol.* 107:536-541), 及多-表位重组体草过敏原 rKBG8.3 (Cao et al. (1997) *Immunology* 90:46-51)。这些和其他适合的过敏原可商购和/或可根据已知的技术作为提取物容易制备。

[0055] 在特定实施方式中, 目标抗原可为肿瘤-特异性抗原。为本发明的目的, 肿瘤-特异性抗原包括, 但不限于, 任何各种 MAGE (黑色素瘤相关的抗原 E), 包括 MAGE 1, MAGE 2, MAGE 3 (HLA-A1 肽), MAGE 4, 等; 任何各种酪氨酸酶 (HLA-A2 肽); 突变 Ras; 突变 p53; 及 p97 黑色素瘤抗原。其他肿瘤-特异性抗原包括与进展的癌相关的 Ras 肽和 p53 肽, 与宫颈癌相关的 HPV 16/18 和 E6/E7 抗原, 与乳腺癌相关的 MUC1-KLH 抗原, 与结直肠癌相关的 CEA (癌胚抗原), 与黑色素瘤相关的 gp100 或 MART1 抗原, 及与前列腺癌相关的 PSA 抗原。已知 p53 基因序列 (见例如, Harris et al. (1986) *Mol. Cell. Biol.* 6:4650-4656) 且将其以登录号 No. M14694 保藏在 GenBank。由此, 本发明的佐剂组合物可用于实施治疗子宫颈, 乳腺, 结直肠, 前列腺, 肺癌, 及黑色素瘤的免疫治疗方法。

[0056] 本发明使用的抗原可使用本领域技术人员已知的各种方法得到或产生。尤其是, 抗原可使用标准纯化技术从天然的源直接分离。或者, 抗原可使用已知的技术重组产生。见, 例如, Sambrook, Fritsch & Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Vols. I, II and III, Second Edition (1989); *DNA Cloning*, Vols. I and II (D. N. Glover ed. 1985)。本文所用的抗原也可基于描述的氨基酸序列, 经化学聚合物合成 (例如固相肽合成) 来合成。本领域技术人员已知所述方法。对于固相肽合成技术见, 例如, J. M. Stewart and J. D. Young, *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2nd Ed., Pierce Chemical Co., Rockford, Ill. (1984) and G. Barany and R. B. Merrifield, *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*, editors E. Gross and J. Meienhofer, Vol. 2, Academic Press, New York, (1980), pp. 3-254; 及对于典型溶液合成见 M. Bodansky, *Principles of Peptide Synthesis*, Springer-Verlag, Berlin (1984) and E. Gross and J. Meienhofer, Eds., *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*, supra, Vol. 1。

[0057] 如果需要,可使用重组方法得到编码上述抗原的多核苷酸序列,例如通过筛选来自表达所述基因的细胞的 cDNA 和基因组库,或通过从已知包括那些的载体衍生基因。此外,期望的基因可使用标准技术直接分离自含那些的细胞和组织,例如苯酚提取和 cDNA 或基因组 DNA 的 PCR。对于用于获得及分离 DNA 的技术的说明见,例如,以上 Sambrook 等人。多核苷酸序列也可合成产生,而非克隆。

[0058] 【2.1. 用于本发明的免疫原性组合物的半抗原】

[0059] 本发明的抗原可为半抗原。在一实施方式中,本发明中所用的“半抗原”是特异性地与抗体反应且不能独自刺激免疫应答但当与含 T 细胞表位的载体复合形成半抗原-载体缀合物时具有免疫原性的低-分子量有机化合物。在其他实施方式中,半抗原是难独自具有免疫原性。而且,半抗原表征为半抗原-载体缀合物的特异性-决定部分,这是说,其能以其游离的状态与特异于半抗原的抗体反应。在一些实施方式中,在非-免疫的受试者中,缺失针对半抗原的抗体的形成。在一些实施方式中,在非-免疫的受试者中,可有低水平的针对半抗原的抗体,或期望针对半抗原的免疫应答增加的针对半抗原的抗体的水平。在本发明中,在某些实施方式中,术语半抗原应包括更特异性药物/是药物的半抗原,部分药物的类似物,或药物衍生物的概念。免疫原性组合物,或,在一些实施方式中,疫苗,当起初施用,将产生“期望的可测量的结果”。起初,期望的可测量的结果是产生高滴度的抗-半抗原抗体(血清中约 0.1mg/ml ~ 1mg/ml 或更多的特定抗体)。但是,适合于个体的剂量方案的操作给出及维持持续的期望的治疗效果。“期望的治疗效果”是足够的部分的游离的半抗原的中和以在随后暴露于半抗原之后,在治疗可接受的时帧之内,通过特异于半抗原的抗-半抗原抗体降低或消除半抗原的药理学效应(例如,烟碱或可卡因)。本领域技术人员通过评定待免疫的受试者的特征,待中和的半抗原(例如,滥用药物),以及施用模式来实现确定治疗可接受的时帧,耗费多长时间来获得足够的针对给定半抗原的抗体应答和所述抗体应答维持多长时间。使用此和其他免疫流程作为模型,本领域技术人员将预期免疫或保护到最后几个月,达多于一年的时期。

[0060] 达到本发明的缀合物的一个方面包括足够修饰半抗原,以致使其能缀合或接合于载体而维持足够的结构,从而其被识别为游离态半抗原(例如,作为游离的可卡因或烟碱)。必要的是,免疫接种的个体具有识别游离的半抗原(例如,可卡因或烟碱)的抗体。放射免疫测定和竞争 ELISA 测定实验可测量至游离的半抗原的抗体滴度。目标抗体是半抗原-特异性抗体,且在一些实施方式中,是可卡因-特异性抗体或烟碱-特异性抗体。应认识到,用于说明优选的实施方式的原理和方法可从本公开延伸到各种疾病,病情或药物成瘾和毒性应答的治疗中有用的宽范围的半抗原-载体缀合物。

[0061] 各种半抗原可用于本发明的实践。在一些实施方式中,半抗原是选自以上部分 2 的抗原的抗原。在一些实施方式中,半抗原是药物,例如,

[0062] 致幻剂,例如美司卡林及 LSD;

[0063] 大麻素,例如 THC;

[0064] 刺激物,例如苯丙胺,可卡因,芬美曲秦,哌甲酯;

[0065] 烟碱;

[0066] 抑郁剂,例如,非巴比妥酸盐(例如溴化物,氯醛水合物等),甲喹酮,巴比妥酸盐,地西洋,氟西洋,苯环利定和氟西汀;

[0067] 阿片和其衍生物,例如,海洛因,美沙酮,吗啡,麦啉,可待因,喷他佐辛和右丙氧芬;以及

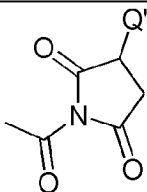
[0068] "策划药"例如"销魂"。

[0069] 【3. 制备抗原-载体和半抗原-载体缀合物的方法】

[0070] 在此部分使用源于可卡因和可卡因代谢物,主要是去甲可卡因的衍生物,苯甲酰芽子碱及芽子碱甲基酯的半抗原,及各种载体,包括重组 CTB(rCTB) 例示本发明的缀合物的制备。这些方法可适于使用任何其他半抗原,下一部分中以烟碱例示。

[0071] 半抗原-载体连接的长度和性质是,半抗原在自载体结构域的足够的距离替换以允许其被针对其起初产生的抗体最佳识别。接头的长度通过改变策略性地放置在选自下列的"分支"之内的 $-\text{CH}_2$ 基团数来优化:

[0072]

CJ 0	Q
CJ 1	$(\text{CH}_2)_n\text{Q}$
CJ 1.1	CO_2Q
CJ 1.2	COQ
CJ 1.3	OCH_3
CJ 2	$\text{OCO}(\text{CH}_2)_n\text{Q}$
CJ 2.1	$\text{OCOCH}=\text{Q}$
CJ 2.2	$\text{OCOCH}(\text{O})\text{CH}_2$
CJ 2.3	$\text{OCO}(\text{CH}_2)_n\text{CH}(\text{O})\text{CH}_2$
CJ 3	$\text{CO}(\text{CH}_2)_n\text{COQ}$
CJ 3.1	$\text{CO}(\text{CH}_2)_n\text{CNQ}$
CJ 4	$\text{OCO}(\text{CH}_2)_n\text{COQ}$
CJ 4.1	$\text{OCO}(\text{CH}_2)_n\text{CNQ}$
CJ 5	$\text{CH}_2\text{OCO}(\text{CH}_2)_n\text{COQ}$
CJ 5.1	$\text{CH}_2\text{OCO}(\text{CH}_2)_n\text{CNQ}$
CJ 6	$\text{CONH}(\text{CH}_2)_n\text{Q}$
CJ 7	$\text{Y}(\text{CH}_2)_n\text{Q}$
CJ 7.1	$\text{CH}_2\text{Y}(\text{CH}_2)_n\text{Q}$
CJ 8	$\text{OCOCH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{Q}$
CJ 8.1	$\text{OCO}(\text{CH}_2)_n\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{Q}$
CJ 9	OCOC_6H_5
CJ 10	 , 其中 Q' 是修饰的蛋白; 及
CJ 11	$\text{YCO}(\text{CH}_2)_n\text{COQ}$.

[0073] (也见美国专利申请公开 No. 2005-0124061, 通过引用整体并入本文)。关于以上分支, n 是整数, 其优选选自约 1 ~ 约 20, 更尤其约 3 ~ 约 6; Y 优选选自 S, O 和 NH; 及 Q 优选选自:

[0074] (i) -H;

[0075] (ii) -OH;

[0076] (iii) $-\text{CH}_2$;

[0077] (iv) $-\text{CH}$;

- [0078] (iv a) $-OCH_3$;
- [0079] (v) $-COOH$;
- [0080] (vi) 卤素 ;
- [0081] (vii) 活化的酯, 例如 2- 硝基 -4- 磺苯基酯和 N- 氧基琥珀酰亚胺酯 ;
- [0082] (viii) 向载体反应性的基团, 例如混合的酐, 酰卤化物, 酰叠氮化物, 烷基卤, N- 马来酰亚胺, 亚氨基酯, 异氰酸酯和异硫氰酸酯 ;
- [0083] (ix) 载体 ; 以及
- [0084] (x) 通过其 “CJ” 参照号标识的另一 “分支”。
- [0085] 含 T 细胞表位的载体可经通过本领域技术人员已知的方法修饰, 以辅助缀合于半抗原 (例如, 通过硫醇化)。例如用 2- 亚氨基硫烷 (Traut 试剂) 或通过琥珀酰化, 等。为简便起见, $(CH_2)_Q$, 其中 Q = H, 可称为 (CH_3) , 甲基或 Me, 但是, 应知, 其适合于如图 3a 和 3b 中所所示的 “分支” 中标识的基序。其他本文所用的商业上可获得的化合物的缩写包括 :
- [0086] BSA = 牛血清白蛋白
- [0087] DCC = 二环己基碳二亚胺
- [0088] DMF = N, N- 二甲基甲酰胺
- [0089] EDC (或 EDAC) = N- 乙基 -N' - (3- (二甲基氨基) 丙基) 碳二亚胺盐酸盐
- [0090] EDTA = 乙二胺四乙酸, 二钠盐
- [0091] HATU = O- (7- 氮杂苯并三唑 -1- 基) -1, 1, 3, 3- 四甲基脲鎓六氟磷酸盐
- [0092] NMM = N- 甲基吗啉
- [0093] HBTU = 2- (1H- 苯并三唑 -1- 基) -1, 1, 3, 3- 四甲基脲鎓六氟磷酸盐
- [0094] TNTU = 2- (5- 降菠烯 -2, 3- 二羧基亚氨基) -1, 1, 3, 3- 四甲基脲鎓四氟硼酸盐
- [0095]

PyBroP®=溴-三-吡咯烷基-磷六氟磷酸盐

- [0096] HOBt = N- 羟基苯并三唑
- [0097] 另外, 几种命名的化合物的 IUPAC 命名法是 :
- [0098] 去甲可卡因 :
- [0099] 3 β - (苯甲酰氧基) -8- 氮杂双环 [3. 2. 1] 辛烷 -2 β - 羧酸甲基酯
- [0100] 苯甲酰芽子碱 :
- [0101] 3 β - (苯甲酰氧基) -8- 甲基 -8- 氮杂双环 [3. 2. 1] 辛烷 -2 β - 羧酸
- [0102] 可卡因 :
- [0103] 3 β - (苯甲酰氧基) -8- 甲基 -8- 氮杂双环 [3. 2. 1] 辛烷 -2 β - 羧酸甲基酯
- [0104] 芽子碱甲基酯 :
- [0105] 3 β - (羟基) -8- 甲基 -8- 氮杂双环 [3. 2. 1] 辛烷 -2 β - 羧酸甲基酯
- [0106] 烟碱
- [0107] 1- 甲基 -2- (3- 吡啶基) 吡咯烷
- [0108] 可替宁
- [0109] N- 甲基 -2- (3- 吡啶基) -5- 吡咯烷酮
- [0110] **【4. 烟碱缀合物的制备】**
- [0111] 本发明的新烟碱 - 载体缀合物源于烟碱和烟碱代谢物。图 4 显示烟碱和一些其衍

生物和代谢物。

[0112] 除了适应以上描述的方法用于制备烟碱-载体缀合物,烟碱-载体缀合物的前体可通过分别用 3- 溴丁酸乙酯,5- 溴缬草酸,6- 溴己酸或 8- 溴辛酸选择性地烷基化无水甲醇中的 (S)-(-)- 烟碱中的吡啶氮来合成。将这些反应的产物使用 HATU 缀合于载体蛋白。

[0113] 在另一实施方式中,向二氯甲烷中的原烟碱 (50mmol) 溶液添加三乙基胺 (75mmol),之后是琥珀酸酐 (100mmol)。将溶液在回流下加热 18 小时。将反应混合物用 10% 含水盐酸,饱和的碳酸氢钠溶液,盐水和水依次洗涤。干燥 (MgSO_4) 后在减压下去除溶剂,将残留物使用硅胶急骤层析纯化以提供期望的产物。

[0114] 在进一步实施方式中,将琥珀酰化的原烟碱用于合成烟碱缀合物。向 DMF (0.1ml) 中的琥珀酰化的原烟碱 ($5\mu\text{mol}$) 溶液中,添加二异丙基乙胺 (10mmol),之后是 HATU ($5.5\mu\text{mol}$)。10 分钟后,将浅黄色溶液滴加到 pH8.8 (0.9ml) 的 0.1M 硼酸钠缓冲液中的 HEL 或 BSA ($500\mu\text{g}$) 溶液,并将混合物在环境温度下搅拌 18 小时。通过小心添加 0.1M 含水盐酸将缀合物溶液的 pH 调至 pH7.0,之后是通过透析来纯化。将透析液通过 $0.2\mu\text{m}$ 过滤器过滤,并通过质量光谱分析或 UV 吸光度测量半抗原化水平。以下描述用于制造烟碱-载体缀合物的这些和其他方法。

[0115] 【4.1. 方法 A:(S)- 烟碱的 N' - 丁酸加合物】

[0116] 向无水甲醇 (50ml) 中的 (S)- 烟碱 (0.031mol) 溶液于冰-水温度在氩下,滴加乙基-4- 溴丁酸 (0.0341mol) 10 分钟。使得到的橙色溶液升温至环境温度及搅拌 18 小时。减压去除溶剂留下棕色残留物,将其用己烷沉淀,以给出期望的酯的分析纯样品。

[0117] 将酯 (36mg) 溶于甲醇 (3ml) 和 1M 氢氧化钠溶液 (5ml) 及于环境温度搅拌 18 小时。减压去除溶剂和残留物溶解于 10% 盐酸和用乙酸乙酯提取。干燥 (MgSO_4) 后减压去除溶剂以产生期望的化合物。

[0118] 【4.2. 方法 B:(S)- 烟碱的 N' - 缬草酸加合物】

[0119] 向无水甲醇 (50ml) 中的 (S)- 烟碱 (0.031mol) 溶液于冰-水温度在氩下,滴加 1- 溴缬草酸 (0.0341mol) 10 分钟。使得到的橙色溶液升温至环境温度及搅拌 18 小时。减压去除溶剂留下棕色残留物,将其用己烷沉淀,以给出期望的化合物的分析纯样品。

[0120] 【4.3. 方法 C:(S)- 烟碱的 N' - 己酸加合物】

[0121] 向无水甲醇 (50ml) 中的 (S)- 烟碱 (0.031mol) 溶液于冰-水温度在氩下,滴加 1- 溴己酸 (0.0341mol) 10 分钟。使得到的橙色溶液升温至环境温度及搅拌 18 小时。减压去除溶剂留下棕色残留物,将其用己烷沉淀,以给出期望的化合物的分析纯样品。

[0122] 【4.4. 方法 D:(S)- 烟碱的 N' - 辛酸加合物】

[0123] 向无水甲醇 (50ml) 中的 (S)- 烟碱 (0.031mol) 溶液于冰-水温度在氩下,滴加适当的 1- 溴辛酸 (0.0341mol) 10 分钟。使得到的橙色溶液升温至环境温度及搅拌 18 小时。减压去除溶剂留下棕色残留物,将其用己烷沉淀,以给出期望的化合物的分析纯样品。

[0124] 【4.5. 其他方法】

[0125] 在某些实施方式中,向 DMF (1.6ml) 中的烟碱 ($6.27 \times 10^{-5}\text{mol}$) 的适当的 N' - 链烷酸类似物溶液,添加 DIEA ($1.25 \times 10^{-4}\text{mol}$) 和 HATU ($7.53 \times 10^{-5}\text{mol}$)。于环境温度 10 分钟后,将浅黄色溶液加入 0.1M 碳酸氢钠 (pH8.3 (14.4ml)) 中的 HEL 或 BSA (16.5mg) 及搅拌 18 小时。通过于 4°C 对 PBS 透析过夜来纯化缀合物溶液。使用激光解吸质量光谱分析分析缀

合物以测定半抗原数。

[0126] 在 CTB 是载体的优选的实施方式中,向 DMF (1.6ml) 中的烟碱 ($6.27 \times 10^{-5} \text{mol}$) 的适当的 N' - 链烷酸类似物溶液,添加 DIEA ($1.25 \times 10^{-4} \text{mol}$) 和 HATU ($7.53 \times 10^{-5} \text{mol}$)。于环境温度 10 分钟后,将浅黄色溶液加入 0.1M 碳酸氢钠 (pH8.3) (14.4ml) 中的 rCTB (16.6mg) 及搅拌 18 小时。通过于 4°C 对 PBS 透析过夜来纯化缀合物溶液。使用激光解吸质量光谱分析分析缀合物以测定半抗原数。

[0127] 【5. 免疫原性组合物和它们的使用方法】

[0128] 本发明提供包括半抗原 - 载体缀合物的免疫原性组合物,其中载体是具有信号肽的细菌毒素。在一实施方式中,半抗原是烟碱或烟碱衍生物。在另一实施方式中,半抗原是可卡因或可卡因衍生物。在一实施方式中,细菌毒素载体是具有其内源性信号肽或其片段的 CTB。本发明的免疫原性组合物包括所述毒素 - 载体缀合物和任选生理学载体或赋形剂。本发明提供产生所述免疫原性组合物的方法,包括在允许载体与信号肽或其片段分离的系统中产生细菌毒素载体,或载体分离后添加信号肽然后缀合其到半抗原。在一些实施方式中,半抗原是蛋白性物质,所述情况中,缀合物可通过在基材中扩展来重组产生。本发明提供诱导免疫应答的方法,包括给受试者施用有效量的本发明的免疫原性组合物。本发明提供防止,管理和 / 或治疗疾病或病情 (包括药物成瘾) 的方法,包括施用有效量的本发明的免疫原性组合物。在一些实施方式中,待预防的,管理的和 / 或治疗的药物成瘾是可卡因成瘾。在其他实施方式中,待预防的,管理的和 / 或治疗的药物成瘾是烟碱成瘾。

[0129] 本文定义的,本发明的免疫原性组合物能在细胞,组织,器官和 / 或受试者或患者中诱导免疫应答。如本文所用,术语“受试者”或“患者”互换使用。如本文所用,术语“受试者”和“受试者”指动物 (例如,鸟,爬行动物及哺乳动物),优选哺乳动物包括非 - 灵长类动物 (例如,骆驼,驴,斑马,牛,猪,马,山羊,羊,猫,狗,大鼠和小鼠) 和灵长类动物 (例如,猴,黑猩猩,及人),及最优选人。在某些实施方式中,受试者或患者患有药物成瘾。在某些实施方式中,受试者或患者处于发展或再发展药物成瘾的风险中。

[0130] 在本发明的一些实施方式中,免疫原性组合物是“疫苗,”即,用于给受试者或患者施用。

[0131] 在本发明的一些实施方式中,免疫原性组合物诱导来自适应性免疫系统的免疫应答,例如 B 细胞应答和 / 或 T 细胞应答。在一些实施方式中,通过免疫原性组合物诱导的免疫应答是抗体应答。在一些实施方式中,免疫原性组合物诱导体液免疫应答,例如干扰素应答和 / 或白细胞介素应答,例如,白细胞介素 -4 应答。在一些实施方式中,免疫原性组合物诱导一种或更多类型的免疫应答而非另一免疫应答。在某些实施方式中,免疫原性组合物诱导免疫应答的组合。而且,在一些实施方式中,免疫原性组合物可诱导具有其他体内生物学结果的稳健的 IFN 应答,提供保护免于随后的疾病或病情或同时的疾病或病情。在一些实施方式中,免疫原性组合物可诱导具有其他体内生物学结果的稳健的 $\text{TNF } \alpha$ 或白细胞介素应答,提供保护免于随后的疾病或病情或同时的疾病或病情。

[0132] 在某些实施方式中,由包括载体是含信号肽的细菌毒素的缀合物的本发明的免疫原性组合物诱导的免疫应答,相比施用安慰剂或其他阴性对照的受试者 (宿主) 或宿主细胞增加 5 ~ 10%, 10 ~ 20%, 20 ~ 30%, 30 ~ 40%, 40 ~ 50%, 50 ~ 60%, 60 ~ 70%, 70 ~ 80%, 80 ~ 90%, 90 ~ 100% 或更多。在某些实施方式中,由包括载体是含信号肽的

细菌毒素的缀合物的本发明的免疫原性组合物诱导的免疫应答相比施用安慰剂或其他阴性对照的受试者（宿主）或宿主细胞增加约 1～约 100 倍，约 5～约 80 倍，约 20～约 80 倍，约 1～约 10 倍，或约 1～约 5 倍，或约 40～约 80 倍，或 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 或 100 倍。

[0133] 在某些实施方式中，由包括载体是含信号肽的细菌毒素的缀合物的本发明的免疫原性组合物诱导的免疫应答相比施用缺乏信号肽的缀合物的受试者（宿主）或宿主细胞增加 5～10%，10～20%，20～30%，30～40%，40～50%，50～60%，60～70%，70～80%，80～90%，90～100% 或更多。在某些实施方式中，由包括载体是含信号肽的细菌毒素的缀合物的本发明的免疫原性组合物诱导的免疫应答相比施用缺乏信号肽的缀合物的受试者（宿主）或宿主细胞增加约 1～约 100 倍，约 5～约 80 倍，约 20～约 80 倍，约 1～约 10 倍，或约 1～约 5 倍，或约 40～约 80 倍，或 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 或 100 倍。

[0134] 在某些实施方式中，由包括载体是含信号肽的细菌毒素的缀合物的本发明的免疫原性组合物诱导的抗体应答相比施用缺乏信号肽的缀合物的受试者（宿主）或宿主细胞增加 5～10%，10～20%，20～30%，30～40%，40～50%，50～60%，60～70%，70～80%，80～90%，90～100% 或更多。在某些实施方式中，由包括载体是含信号肽的细菌毒素的缀合物的本发明的免疫原性组合物诱导的抗体应答相比施用缺乏信号肽的缀合物的受试者（宿主）或宿主细胞增加约 1～约 100 倍，约 5～约 80 倍，约 20～约 80 倍，约 1～约 10 倍，或约 1～约 5 倍，或约 40～约 80 倍，或 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 或 100 倍。

[0135] 在某些实施方式中，由包括载体是含信号肽的细菌毒素的缀合物的本发明的免疫原性组合物诱导的干扰素应答或白细胞介素应答，优选 IL-4 应答相比施用缺乏信号肽的缀合物的受试者（宿主）或宿主细胞增加 5～10%，10～20%，20～30%，30～40%，40～50%，50～60%，60～70%，70～80%，80～90%，90～100% 或更多。在某些实施方式中，由包括载体是含信号肽的细菌毒素的缀合物的本发明的免疫原性组合物诱导的干扰素应答或白细胞介素应答，优选 IL-4 应答相比施用缺乏信号肽的缀合物的受试者（宿主）或宿主细胞增加约 1～约 100 倍，约 5～约 80 倍，约 20～约 80 倍，约 1～约 10 倍，或约 1～约 5 倍，或约 40～约 80 倍，或 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 或 100 倍。

[0136] 在一些实施方式中，本发明的免疫原性组合物包括有效量的本发明的缀合物，及药学可接受的载体。术语“药学可接受的”是指获得联邦或州政府的调控机构批准或列于美国药典或其他通常认可的药典而用于动物，及更尤其用于人。术语“载体”指伴随药物制剂施用的稀释剂，佐剂，赋形剂或媒质。也可采用盐溶液和含水右旋糖和甘油溶液作为液体载体，尤其用于可注射溶液。适合的赋形剂包括淀粉，葡萄糖，乳糖，蔗糖，明胶，麦芽，稻，面粉，白垩，硅胶，硬脂酸钠，单硬脂酸甘油，滑石粉，氯化钠，干燥的脱脂乳，甘油，丙二醇，水，乙醇等。适合的药物载体的例是描述于 E. W. Martin 的“Remington's Pharmaceutical Sciences”。制剂应适合施用模式。特定组合物也可依赖于是否突变体病毒是活的或灭活的。

[0137] 可将本发明的免疫原性组合物施用于幼稚受试者，即，未患疾病，病情，药物成瘾，

或未曾及目前未感染感染性制剂的受试者。可将本发明的免疫原性组合物施用于幼稚受试者,即,未患疾病,病情,药物成瘾,或未曾及目前未感染感染性制剂,但易感于患所述疾病,病情,药物成瘾,或感染的受试者。也可将本发明的免疫原性组合物施用于患和 / 或曾患疾病,病情,药物成瘾,或感染的受试者。

[0138] 许多方法可用于导入免疫原性组合物,例如,本文所述的疫苗制剂。这些包括但不限于鼻内,气管内,口服,真皮内,肌内,腹膜内,静脉内,结膜及皮下途径。作为肠胃外施用的替代,本发明也含盖农业目的的大量施用途径,例如经饮用水或在喷雾中。优选经免疫原性组合物所靶向的物质的天然的施用或感染途径导入本发明的突变体病毒。

[0139] 在某些实施方式中,本发明的免疫原性组合物不导致完全保护或治愈(即,从药物成瘾),但相比未处理的受试者导致更低水平的成瘾。益处包括,但不限于,疾病或病情的症状的降低的严重性和疾病或病情的持续时间的减小。

[0140] 在某些实施方式中,本发明的免疫原性组合物用于保护幼稚受试者免于疾病或病情(例如,感染或药物成瘾)。

[0141] 本发明的免疫原性组合物的预防性和 / 或治疗效果部分基于达到或诱导免疫应答(例如,体液免疫应答或适应性免疫应答)。一方面,免疫原性组合物在任一受试者或其动物模型(例如小鼠,大鼠,猪,山羊,羊或狗模型)中诱导针对抗原或半抗原的抗体的可检测的血清滴度。抗体的血清滴度可使用本领域技术人员已知的技术测定,例如,免疫测定例如 ELISA。在特定实施方式中,通过施用本发明的免疫原性组合物产生的抗体是中和抗体。

[0142] 在一实施方式中,本发明的免疫原性组合物施用于受试者或其动物模型导致特异性结合到半抗原或抗原的抗体的约 $1\ \mu\text{g/ml}$, 约 $2\ \mu\text{g/ml}$, 约 $5\ \mu\text{g/ml}$, 约 $6\ \mu\text{g/ml}$, 约 $10\ \mu\text{g/ml}$, 约 $15\ \mu\text{g/ml}$, 约 $20\ \mu\text{g/ml}$, 约 $25\ \mu\text{g/ml}$, 约 $50\ \mu\text{g/ml}$, 约 $75\ \mu\text{g/ml}$, 约 $100\ \mu\text{g/ml}$, 约 $125\ \mu\text{g/ml}$, 约 $150\ \mu\text{g/ml}$, 约 $175\ \mu\text{g/ml}$, 约 $200\ \mu\text{g/ml}$, 约 $225\ \mu\text{g/ml}$, 约 $250\ \mu\text{g/ml}$, 约 $275\ \mu\text{g/ml}$, 约 $300\ \mu\text{g/ml}$, 约 $325\ \mu\text{g/ml}$, 约 $350\ \mu\text{g/ml}$, 约 $375\ \mu\text{g/ml}$, 或更高的血清滴度。在优选实施方式中,血清滴度是 $100\ \mu\text{g/ml}$ 或更高。在一些实施方式中,本发明的免疫原性组合物的施用导致 $100\ \mu\text{g/ml} \sim 1\text{mg/ml}$ 或更高,优选高于约 $500\ \mu\text{g/ml}$ 的血浆滴度。可在受试者或在动物模型中测定免疫应答,然后将该应答关联或外推到受试者(例如,人或家畜,例如猪,羊,山羊或牛)中预测的应答。

[0143] 在一实施方式中,本发明提供在受试者中预防,治疗,管理或改善至少一种疾病或病情(例如,药物成瘾或病毒感染)的方法,方法包括给所述受试者施用有效量的包括本发明的缀合物的免疫原性组合物。在一些实施方式中,施用于受试者或动物模型的免疫原性组合物的剂量是约 $10 \sim 20\ \mu\text{g}$ 。在一些实施方式中,施用于受试者或动物模型的免疫原性组合物的剂量是约 $75 \sim 100\ \mu\text{g}$ 。在一些实施方式中,施用于受试者或动物模型的免疫原性组合物的剂量是约 $500 \sim 1000\ \mu\text{g}$ 。

[0144] 本发明提供在受试者中预防,治疗,管理或改善至少一种疾病或病情(例如,药物成瘾或病毒感染)的方法,方法包括给所述受试者施用有效量的包括本发明的缀合物的免疫原性组合物,其中有效量是相对于未施用本发明的免疫原性组合物的或施用细菌毒素缺乏信号肽的半抗原-细菌毒素缀合物的受试者,导致死亡率减小,住院治疗减少,疾病或病情的严重性减小和 / 或疾病或病情的临床症状减小的量。在特定优选实施方式中,受试者是人。在某些实施方式中,受试者是小鼠或大鼠。

[0145] 将在特定疾病或病情的治疗,预防和/或改善中有效的本发明的免疫原性组合物的量将依赖于疾病性质,及可通过标准临床技术确定。此外,可任选采用体外测定,以辅助鉴定最佳剂量范围。组合物中待采用的精确的剂量也将依赖于施用途径,及疾病或病症的严重性,及应根据医师的判断及各受试者的环境决定。但是,用于施用的适合的剂量范围通常是约 10 ~ 20 μ g, 20 ~ 50 μ g, 50 ~ 75 μ g, 75 ~ 100 μ g, 100 ~ 200 μ g, 200 ~ 300 μ g, 300 ~ 400 μ g, 400 ~ 500 μ g, 500 ~ 600 μ g, 600 ~ 700 μ g, 700 ~ 800 μ g, 800 ~ 900 μ g 或 900 ~ 1000 μ g, 或更多。有效剂量可从源于体外或动物模型测试系统的剂量应答曲线外推。

[0146] 在各种实施方式中,将本发明的免疫原性组合物或由它们产生的抗体与用于预防或治疗至少一种疾病或病情的一种或更多其他治疗组合施用于受试者。在某些实施方式中,以少于 5 分钟间隔,少于 30 分钟间隔,1 小时间隔,以约 1 小时间隔,以约 1 ~ 约 2 小时间隔,以约 2 小时 ~ 约 3 小时间隔,以约 3 小时 ~ 约 4 小时间隔,以约 4 小时 ~ 约 5 小时间隔,以约 5 小时 ~ 约 6 小时间隔,以约 6 小时 ~ 约 7 小时间隔,以约 7 小时 ~ 约 8 小时间隔,以约 8 小时 ~ 约 9 小时间隔,以约 9 小时 ~ 约 10 小时间隔,以约 10 小时 ~ 约 11 小时间隔,以约 11 小时 ~ 约 12 小时间隔,以约 12 小时 ~ 18 小时间隔,18 小时 ~ 24 小时间隔,24 小时 ~ 36 小时间隔,36 小时 ~ 48 小时间隔,48 小时 ~ 52 小时间隔,52 小时 ~ 60 小时间隔,60 小时 ~ 72 小时间隔,72 小时 ~ 84 小时间隔,84 小时 ~ 96 小时间隔,或 96 小时 ~ 120 小时间隔施用治疗(例如,预防性或治疗性制剂)。在优选实施方式中,在相同的患者或受试者访问之内施用 2 次或更多治疗。可与本发明的免疫原性组合物或通过组合物本发明的产生的抗体组合施用的制剂的非-限制例如下。

[0147] **【5.1. 本发明的免疫原性组合物的用途】**

[0148] 在一些实施方式中,本发明的组合物有用于治疗或预防疾病,病情或感染。在某些实施方式中,病情是药物成瘾或药物过敏。在某些特定实施方式中,药物是烟碱。在其他实施方式中,药物是可卡因。在优选实施方式中,本发明的免疫原性组合物相比细胞成分和/或相比载体呈现对于半抗原的特异性。在另一实施方式中,本发明的免疫原性组合物在真核细胞,优选哺乳动物细胞中呈现低细胞毒性。

[0149] 在一实施方式中,本发明的免疫原性组合物降低或抑制药物成瘾,依赖性 or 过敏。在特定实施方式中,免疫原性组合物在受试者中消除或降低药物成瘾或药物依赖性 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, 75 ~ 99.5%, 85 ~ 99.5% 或 90 ~ 99.8%, 如通过本文所述的或本领域技术人员已知的测定法测定。因此,本发明的免疫原性组合物有用于预防,治疗和/或管理药物成瘾或药物依赖性的方法。在特定实施方式中,本发明的免疫原性组合物有用于预防,治疗和/或管理呈现对其他治疗的抗性的疾病或病情。

[0150] 在某些实施方式中,本发明的免疫原性组合物抑制或降低血流循环中所靶向的药物或抗原至少 20% ~ 25%, 优选至少 25% ~ 30%, 至少 30% ~ 35%, 至少 35% ~ 40%, 至少 40% ~ 45%, 至少 45% ~ 50%, 至少 50% ~ 55%, 至少 55% ~ 60%, 至少 60% ~ 65%, 至少 65% ~ 70%, 至少 70% ~ 75%, 至少 75% ~ 80%, 或达至少 85%, 如通过标准本领域技术人员已知的测定法,或本文所述的测定法测量。

[0151] 在一些实施方式中,本发明的免疫原性组合物抑制或降低所靶向的药物或抗原从一种器官,组织或细胞穿透到另一器官,组织或细胞,如使用标准本领域技术人员已知的测

定法,或本文所述的测定法测量。在一些实施方式中,本发明的免疫原性组合物抑制或降低药物,例如可卡因或烟碱,进入脑的能力至少 20%~25%,优选至少 25%~30%,至少 30%~35%,至少 35%~40%,至少 40%~45%,至少 45%~50%,至少 50%~55%,至少 55%~60%,至少 60%~65%,至少 65%~70%,至少 70%~75%,至少 75%~80%,或达至少 85%,如使用标准本领域技术人员已知的测定法,或本文所述的测定法测量。

[0152] 【5.2. 预防性和治疗性方法】

[0153] 本发明提供预防,治疗和 / 或管理疾病或病情,例如药物成瘾的方法,所述方法包括给有需要的受试者施用一种或更多本发明的免疫原性组合物。在一实施方式中,本发明提供预防,治疗 / 及或管理可卡因成瘾或烟碱成瘾的方法。

[0154] 本发明也提供预防,治疗和 / 或管理疾病或病情的方法,所述方法包括给有需要的受试者施用一种或更多本发明的免疫原性组合物,及一种或更多其他治疗(例如,预防性或治疗性制剂)。在特定实施方式中,其他治疗是目前使用的,曾经使用的或已知在预防,治疗和 / 或管理疾病或病情中有用的。以下提供所述预防性或治疗性方法的非-限制例。

[0155] 本发明的联合治疗可依次或同时施用。在一实施方式中,本发明的联合治疗包括本发明的化合物和具有相同的作用机理的至少一种其他治疗。在另一实施方式中,本发明的联合治疗包括本发明的化合物和相比所述化合物具有不同的作用机理的至少一种其他治疗。

[0156] 在特定实施方式中,本发明的联合治疗通过与免疫原性组合物一起发挥作用而具有加和性或协同效应来改善本发明的免疫原性组合物的预防性和 / 或治疗效果。在另一实施方式中,本发明的联合治疗降低与单独采取的各治疗相关的副作用。

[0157] 可将联合治疗的预防或治疗剂在相同的免疫原性组合物中施用于受试者。或者,联合治疗的预防或治疗剂可在分离的免疫原性组合物中同时施用于受试者。可将预防或治疗剂通过相同的或不同的施用途径施用于受试者。

[0158] 在特定实施方式中,将包括一种或更多本发明的缀合物和药学可接受的载体或赋形剂的免疫原性组合物施用于受试者,优选人,以预防,治疗和 / 或管理药物成瘾。根据本发明,免疫原性组合物也可包括一种或更多其他预防或治疗剂。在特定实施方式中,其他预防或治疗剂是目前使用的,曾经使用的或已知在预防,治疗和 / 或管理药物成瘾或与其相关的症状或病情中有用的,例如,精神病学或心理学病情。

[0159] 可将本发明的免疫原性组合物用作对于疾病或病情的任何线治疗,例如,第 1,第 2,第 3,第 4 或第 5 线治疗。在一些实施方式中,根据本发明施用本发明的免疫原性组合物的受试者在施用本发明的免疫原性组合物之前未接受治疗。在其他实施方式中,根据本发明施用本发明的免疫原性组合物的受试者在施用本发明的免疫原性组合物之前已接受治疗。在一些实施方式中,根据本发明施用本发明的免疫原性组合物的受试者用现有的治疗难治,或对现有的治疗经历不利的副作用,或现有的治疗由于对受试者无法接受的水平的毒性会中止。

[0160] 本发明提供在用对病情的常规治疗难治的受试者中治疗和 / 或管理疾病或病情,例如,药物成瘾的方法,方法包括给所述受试者施用一剂量的预防性或治疗有效量的本发明的免疫原性组合物。

[0161] 【5.2.1. 在与本发明的缀合物或免疫原性组合物组合中有用的制剂】

[0162] 可用于与本发明的免疫原性组合物组合用于预防, 治疗和 / 或管理疾病或病情的治疗性或预防性制剂包括, 但不限于, 小分子, 合成药物, 肽 (包括环状肽), 多肽, 蛋白, 核酸 (例如, DNA 和 RNA 核苷酸, 包括, 但不限于反义核苷酸序列, 三重螺旋, RNAi 和编码生物学活跃的蛋白, 多肽或肽的核苷酸序列), 抗体, 合成或天然的无机分子, 模拟制剂, 及合成或天然的有机分子。所述制剂的特定例包括, 但不限于, 免疫调节剂 (例如, 干扰素), 抗-炎性制剂 (例如, 肾上腺类皮质激素, 皮质甾醇 (例如, 倍氯米松, 布地奈德, 氟尼缩松, 氟替卡松, 曲安西龙, 甲基泼尼松龙, 泼尼松龙, 泼尼松, 氢化可的松), 糖皮质类固醇, 甾和非-甾体抗-炎性药物 (例如, 阿司匹林, 布洛芬, 双氯芬酸和 COX-2 抑制剂), 疼痛接触剂, 抗-精神病剂, 抗-抑郁剂, 抗-焦虑药物, 抗-癫痫剂, 白三烯拮抗剂 (例如, 孟鲁司特, 甲基黄嘌呤, 扎鲁司特和齐留通), β 2-激动剂 (例如, 沙丁胺醇, biterol, 非诺特罗, 异他林, 奥西那林, 吡布特罗, 沙丁胺醇, 特布他林福莫特罗, 沙美特罗和沙丁胺醇特布他林), 抗胆碱能药制剂 (例如, 异丙托溴铵和氧托溴铵), 柳氮磺吡啶, 青霉胺, 氨苯砒, 抗组胺药, 抗-疟疾制剂 (例如, 羟氯喹), 抗-病毒制剂 (例如, 核苷类似物 (例如, 齐多夫定, 阿昔洛韦, 更昔洛韦, 阿糖腺苷, 碘苷, 曲氟尿苷和利巴韦林), 膦甲酸, 金刚烷胺, 金刚乙胺, 沙奎那韦, 茚地那韦, 利托那韦和 AZT) 和抗生素 (例如, 更生霉素 (以前是放线菌素), 博来霉素, 红霉素, 青霉素, 普卡霉素和安曲霉素 (AMC))。

[0163] 已知有用的, 或曾经使用的或目前用于预防, 管理和 / 或治疗疾病或病情, 或与所述疾病或病情相关的疾病或病情的任何治疗, 可用于与本发明的免疫原性组合物根据本文所述的发明组合。对于有关已或目前用于预防, 治疗和 / 或管理各种疾病或病情的治疗 (例如, 预防性或治疗性制剂) 的信息, 见, 例如, Gilman et al., Goodman and Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10th ed., McGraw-Hill, New York, 2001; The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, Berkow, M. D. et al. (eds.), 17th Ed., Merck Sharp & Dohme Research Laboratories, Rahway, NJ, 1999; Cecil Textbook of Medicine, 20th Ed., Bennett and Plum (eds.), W. B. Saunders, Philadelphia, 1996。

[0164] 可用于与本发明的免疫原性组合物组合的抗菌剂, 包括抗生素包括, 但不限于, 氨基糖苷抗生素, 糖肽, 氯霉素抗生素, 安沙霉素抗生素, 头孢菌素, 头霉素噁唑烷酮, 青霉素, 喹诺酮, 加明链霉素, 四环素及其类似物。

[0165] 在特定实施方式中, 本发明的免疫原性组合物用于与其他蛋白合成抑制剂组合, 包括但不限于, 链霉素, 新霉素, 红霉素, 卡波霉素和螺旋霉素。

[0166] 在一实施方式中, 抗菌剂选自: 氨苄西林, 阿莫西林, 环丙沙星, 庆大霉素, 卡那霉素, 新霉素, 青霉素 G, 链霉素, 磺胺和万古霉素。在另一实施方式中, 抗菌剂选自: 阿奇霉素, 头孢尼西, 头孢替坦, 头孢噻吩, 头霉素, 金霉素, 克拉霉素, 克林霉素, 环丝氨酸, 达福普汀, 多西环素, 红霉素, 利奈唑胺, 莫匹罗星, 土霉素, 奎奴普丁, 利福平, 大观霉素和甲氧苄啶。

[0167] 用于与本发明的免疫原性组合物组合的抗菌剂的额外的, 非-限制例包括下列: 氨基糖苷抗生素 (例如, 安普霉素, 阿贝卡星, 班贝霉素, 布替罗星, 地贝卡星, 新霉素, 新霉素, 十一烯酸盐, 奈替米星, 巴龙霉素, 核糖霉素, 西索米星和大观霉素), 氯霉素抗生素 (例如, 叠氮氯霉素, 氯霉素, 氟苯尼考和甲砒霉素), 安沙霉素抗生素 (例如, 利福米特和利福平), 碳头孢烯 (例如, 氯碳头孢), 碳青霉烯 (例如, 比阿培南和亚胺培南), 头孢菌素

(例如, 头孢克洛, 头孢羟氨苄, 头孢孟多, 头孢曲秦, 头孢西酮, 头孢唑兰, 头孢咪唑, 头孢匹胺和头孢匹罗), 头霉素 (例如, 头孢拉宗, 头孢美唑和头孢米诺), 叶酸类似物 (例如, 甲氧苄啶), 糖肽 (例如, 万古霉素), 林肯胺 (例如, 克林霉素和林可霉素), 大环内酯 (例如, 阿奇霉素, 卡波霉素, 克拉霉素, 地红霉素, 红霉素和醋硬脂酸红霉素), 单酰胺菌素 (例如, 氨基曲南, 卡芦莫南和替吉莫南), 硝基呋喃 (例如, 呋喃他酮和呋唑氯铵), 氧头孢烯 (例如, 氟氧头孢和拉氧头孢), 噁唑烷酮 (例如, 利奈唑胺), 青霉素 (例如, 苄星青霉素, 匹美西林, 阿莫西林, 巴氨西林, 苄基青霉素, 苄基青霉素钠, 依匹西林, 芬贝西林, 氟氯西林, 培那西林, 氢碘酸喷沙西林, 青霉素 O, 苄乙苄胺, 青霉素 O, 青霉素 V, 青霉素 V 苄星青霉素, 青霉素 V 海巴明, 青霉素环素及非奈西林钾), 喹诺酮及其类似物 (例如, 西诺沙星, 环丙沙星, 克林沙星, 氟甲喹, 格帕沙星, 左氧氟沙星和莫西沙星), 链霉素杀阳菌素 (例如, 奎奴普丁和达福普汀), 磺酰胺 (例如, 乙酰磺胺甲氧吡嗪, 苄磺胺, 诺丙磺胺, 酞磺醋胺, 磺胺柯定和磺胺西汀), 砒 (例如, 地百里砒, 葡胺苯砒钠, 及苯丙砒) 和四环素 (例如, 阿哌环素, 金霉素, 氯莫环素和地美环素)。额外的例包括环丝氨酸, 莫匹罗星, 抗结核菌素安福霉素, 杆菌肽, 卷曲霉素, 多粘菌素, 恩多霉素, 恩维霉素和 2,4 二氨基嘧啶 (例如, 溴莫普林)。

[0168] 可用于与本发明的免疫原性组合物组合的抗病毒剂包括, 但不限于, 非-核苷反转录酶抑制剂, 核苷反转录酶抑制剂, 蛋白酶抑制剂和融合抑制剂。在一实施方式中, 抗病毒剂选自: 金刚烷胺, 磷酸奥塞米韦, 金刚乙胺和扎那米韦。在另一实施方式中, 抗病毒剂是非-核苷反转录酶抑制剂, 其选自地拉韦啶, 依法韦仑和奈韦拉平。在另一实施方式中, 抗病毒剂是核苷反转录酶抑制剂, 其选自阿巴卡韦, 去羟肌苷, 恩曲他滨, 恩曲他滨, 拉米夫定, 司他夫定, 替诺福韦 DF, 扎西他滨和齐多夫定。在另一实施方式中, 抗病毒剂是蛋白酶抑制剂, 其选自氨普那韦, 阿扎那韦, 呋山那韦, 茚地那韦, 洛匹那韦, 奈非那韦, 利托那韦和沙奎那韦。在另一实施方式中, 抗病毒剂是融合抑制剂, 例如恩夫韦肽。用于与本发明的免疫原性组合物组合的抗病毒剂的额外的, 非-限制例包括下列: 利福平, 核苷反转录酶抑制剂 (例如, AZT, ddT, ddC, 3TC, d4T), 非-核苷反转录酶抑制剂 (例如, 地拉韦啶依法韦仑, 奈韦拉平), 蛋白酶抑制剂 (例如, 氨普那韦, 茚地那韦, 利托那韦和沙奎那韦), 碘苷, 西多福韦, 阿昔洛韦, 更昔洛韦, 扎那米韦, 金刚烷胺和帕利珠单抗。抗-病毒制剂的其他例包括但不限于醋孟南; 阿昔洛韦; 阿昔洛韦钠; 阿德福韦; 阿洛韦定; 阿韦舒托; 金刚烷胺盐酸盐 (SYMMETREL™); 阿拉诺丁; 阿立酮; 甲磺酸阿替韦啶; 阿夫立定; 西多福韦; 西潘茶碱; 盐酸阿糖胞苷; 甲磺酸地拉韦啶; 地昔洛韦; 去羟肌苷; 二噁沙利; 依度尿苷; 恩韦拉登; 恩韦胂; 泛昔洛韦; 法莫汀盐酸盐; 非西他滨; 非阿尿苷; 麟利酯; 麟甲酸钠; 麟乙酸钠; 更昔洛韦; 更昔洛韦钠; 碘苷; 乙氧丁酮醛; 拉米夫定; 洛布卡韦; 美莫汀盐酸盐; 美替沙胂; 奈韦拉平; 磷酸奥塞米韦 (TAMIFLU™); 喷昔洛韦; 吡罗达韦; 利巴韦林; 金刚乙胺盐酸盐 (FLUMADIN™); 甲磺酸沙奎那韦; 索金刚胺盐酸盐; 索立夫定; 维司托隆; 司他夫定; 替洛隆盐酸盐; 曲氟尿苷; 伐昔洛韦盐酸盐; 阿糖腺苷; 磷酸阿糖腺苷; 阿糖腺苷磷酸钠; 韦罗胂; 扎西他滨; 扎那米韦 (RELENZA™); 齐多夫定; 及净韦胂。

[0169] 【5.3. 施用本发明的缀合物或免疫原性组合物的方法】

[0170] 可将本发明的免疫原性组合物施用于患者, 优选患可用免疫治疗修正的疾病或病情的哺乳动物, 更优选人。在特定实施方式中, 将包括如本文所述的缀合物或其药学可接受的盐的本发明的免疫原性组合物, 施用于患者, 优选哺乳动物, 更优选人, 作为针对疾病或

病情,例如,药物成瘾的预防性测量。在另一实施方式中,将包括如本文所述的缀合物或其药学可接受的盐的本发明的免疫原性组合物,施用于患者,优选人,以预防未曾患所述疾病或病情的受试者的疾病。

[0171] 可将本发明的免疫原性组合物施用于受试者,优选患待通过免疫原性组合物靶向的疾病或病情的哺乳动物,更优选人。在特定实施方式中,将包括本文所述的缀合物或其药学可接受的盐的本发明的免疫原性组合物施用于受试者,优选哺乳动物,更优选人,作为针对所述疾病或病情的预防性测量。

[0172] 当施用于患者,优选将包括本文所述的缀合物或其药学可接受的盐的本发明的免疫原性组合物作为任选包括药学可接受的媒质的组合物的成分施用。组合物可经口,经鼻,通过吸入,或通过任何其他方便的途径,例如,通过输注或推注,通过由上皮或粘膜皮肤衬层(例如,口腔粘膜,直肠和肠粘膜)吸收施用,且可与另一生物学活性剂一起施用。施用可为全身性的或局部的。已知各种递送系统,例如,作为气雾剂或通过包裹在脂质体,微粒,微胶囊,胶囊和可用于施用包括本文所述的缀合物或其药学可接受的盐的本发明的免疫原性组合物。

[0173] 施用方法包括但不限于肠胃外,真皮内,肌内,腹膜内,静脉内,皮下,鼻内,硬膜上,口服,舌下,鼻内,脑内,阴道内,经皮,经直肠,通过吸入,或局部,尤其到耳,鼻,眼或皮肤。施用模式基于医师的考虑。在多数实例中,施用将导致本发明的化合物或其药学可接受的盐释放到血流。

[0174] 在特定实施方式中,期望局部施用包括本文所述的缀合物或其药学可接受的盐的本发明的免疫原性组合物。此可实现,例如,及不限于,通过局部输注,局部应用,例如,连同创伤敷裹,通过注射,利用导管,利用栓剂,或利用植入物,所述植入物是多孔,非-多孔或胶质材料,包括膜,例如 sialastic 膜,或纤维。

[0175] 在某些实施方式中,期望将包括本文所述的缀合物或其药学可接受的盐的本发明的免疫原性组合物通过任何适合的途径,包括心室内,鞘内和硬膜上注射导入中枢神经系统。心室内注射可通过,例如,附接于贮器,例如奥马耶贮器的心室内导管辅助。

[0176] 也可采用肺部施用,例如,通过使用吸入器或雾化器,及用雾化剂配制,或经在氟碳或合成肺部表面活性剂中灌注。在某些实施方式中,可将包括本文所述的缀合物或其药学可接受的盐的本发明的免疫原性组合物用传统结合剂和媒质例如甘油三酯配制为栓剂。

[0177] 在另一实施方式中,将包括本文所述的缀合物或其药学可接受的盐的本发明的免疫原性组合物在囊泡,尤其是脂质体中递送(见 Langer,1990, Science 249:1527-1533; Treat et al., in Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Bacterial infection, Lopez-Berestein and Fidler(eds.), Liss, New York, pp. 353-365(1989); Lopez Berestein, ibid., pp. 317-327; see generally ibid)。

[0178] 在另一实施方式中,将包括本文所述的缀合物或其药学可接受的盐的本发明的免疫原性组合物在受控释放系统中递送(见,例如, Goodson, in Medical Applications of Controlled Release, supra, vol. 2, pp. 115-138(1984))。可使用讨论于综述 Langer, 1990, Science 249:1527-1533 的受控释放系统的例。在一实施方式中,可使用泵(见 Langer, supra; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201; Buchwald et al., 1980, Surgery 88:507; Saudek et al., 1989, N. Engl. J. Med. 321:574)。在另一实施方式中,可使用聚合

物材料(见Medical Applications of Controlled Release,Langer and Wise(eds.),CRC Pres., Boca Raton, Florida(1974);Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball(eds.), Wiley, New York(1984);Ranger and Peppas,1983,J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23 :61;see also Levy et al.,1985, Science 228 :190;During et al.,1989, Ann. Neurol. 25 :351;Howard et al.,1989, J. Neurosurg. 71 :105)。在特定实施方式中,将包含包括本文所述的缀合物或其药学可接受的盐的本发明的免疫原性组合物的受控释放系统放在接近于待预防的,治疗的和/或管理的病毒感染。根据此实施方式,受控释放系统与感染的紧密接近可导致如果全身施用仅需要一部分剂量的组合物。

[0179] 【5.4. 剂量和频度】

[0180] 本发明的缀合物的量,或包括所述缀合物的免疫原性组合物的量将在可通过标准临床技术测定的疾病或病情的预防,治疗和/或管理中有效。可任选采用体外或体内测定来辅助鉴定最佳剂量范围。待采用的精确的剂量也将例如依赖于施用途径,待治疗的疾病或病情类型,及疾病或病情的严重性,及应根据医师的判断及各患者的或受试者的环境决定。

[0181] 缀合物,响应缀合物产生的抗体,或本发明的免疫原性组合物的例示剂量包括 mg 或 μg 量/kg 受试者或样品重量(例如,约 $1\mu\text{g/kg}$ ~ 约 500mg/kg , 约 $5\mu\text{g/kg}$ ~ 约 100mg/kg , 或约 $1\mu\text{g/kg}$ ~ 约 $50\mu\text{g/kg}$)。在特定实施方式中,每天剂量是至少 50mg , 75mg , 100mg , 150mg , 250mg , 500mg , 750mg 或至少 1g 。

[0182] 在一实施方式中,剂量是 $0.01 \sim 5000\text{mM}$, $1 \sim 300\text{mM}$, $10 \sim 100\text{mM}$ 和 $10\text{mM} \sim 1\text{M}$ 的浓度。在另一实施方式中,剂量是至少 $5\mu\text{M}$, 至少 $10\mu\text{M}$, 至少 $50\mu\text{M}$, 至少 $100\mu\text{M}$, 至少 $500\mu\text{M}$, 至少 1mM , 至少 5mM , 至少 10mM , 至少 50mM , 至少 100mM , 或至少 500mM 的浓度。

[0183] 在一实施方式中,剂量是 $0.01 \sim 5000\text{mM}$, $1 \sim 300\text{mM}$, $10 \sim 100\text{mM}$ 和 $10\text{mM} \sim 1\text{M}$ 的浓度。在另一实施方式中,剂量是至少 $5\mu\text{M}$, 至少 $10\mu\text{M}$, 至少 $50\mu\text{M}$, 至少 $100\mu\text{M}$, 至少 $500\mu\text{M}$, 至少 1mM , 至少 5mM , 至少 10mM , 至少 50mM , 至少 100mM , 或至少 500mM 的浓度。在特定实施方式中,剂量是 $0.25\mu\text{g/kg}$ 或更高,优选 $0.5\mu\text{g/kg}$ 或更高, $1\mu\text{g/kg}$ 或更高, $2\mu\text{g/kg}$ 或更高, $3\mu\text{g/kg}$ 或更高, $4\mu\text{g/kg}$ 或更高, $5\mu\text{g/kg}$ 或更高, $6\mu\text{g/kg}$ 或更高, $7\mu\text{g/kg}$ 或更高, $8\mu\text{g/kg}$ 或更高, $9\mu\text{g/kg}$ 或更高, 或 $10\mu\text{g/kg}$ 或更高, $25\mu\text{g/kg}$ 或更高, 优选 $50\mu\text{g/kg}$ 或更高, $100\mu\text{g/kg}$ 或更高, $250\mu\text{g/kg}$ 或更高, $500\mu\text{g/kg}$ 或更高, 1mg/kg 或更高, 5mg/kg 或更高, 6mg/kg 或更高, 7mg/kg 或更高, 8mg/kg 或更高, 9mg/kg 或更高, 或 10mg/kg 或更高患者的体重。

[0184] 在另一实施方式中,剂量是 $10 \sim 20\mu\text{g}$, $20 \sim 50\mu\text{g}$, $50 \sim 75\mu\text{g}$, $75 \sim 100\mu\text{g}$, $100 \sim 200\mu\text{g}$, $200 \sim 300\mu\text{g}$, $300 \sim 400\mu\text{g}$, $400 \sim 500\mu\text{g}$, $500 \sim 600\mu\text{g}$, $600 \sim 700\mu\text{g}$, $700 \sim 800\mu\text{g}$, $800 \sim 900\mu\text{g}$ 或 $900 \sim 1000\mu\text{g}$, 或更高的单元剂量。在一些实施方式中,剂量是 5mg , 优选 10mg , 50mg , 100mg , 150mg , 200mg , 250mg , 300mg , 350mg , 400mg , 500mg , 550mg , 600mg , 650mg , 700mg , 750mg , 800mg 或更高的单元剂量。在另一实施方式中,剂量是跨约 5mg ~ 约 100mg , 优选约 100mg ~ 约 $200\mu\text{g}$, 约 150mg ~ 约 300mg , 约 150mg ~ 约 400mg , $250\mu\text{g}$ ~ 约 500mg , 约 500mg ~ 约 800mg , 约 500mg ~ 约 1000mg , 或约 5mg ~ 约 1000mg 的单元剂量。

[0185] 在某些实施方式中,用于口服施用的适合的剂量范围是约 0.001mg ~ 约 500mg 的缀合物,抗体或本发明的免疫原性组合物,或其药学可接受的盐 /kg 体重 / 天。在特定实施方式中本发明的,口服剂量是约 0.01mg ~ 约 100mg/kg 体重 / 天,约 0.1mg ~ 约 75mg/kg 体重 / 天或约 0.5mg ~ 5mg/kg 体重 / 天。本文所述的剂量指施用的总量;这是说,如果施用多于一种化合物,则,在一些实施方式中,剂量对应于施用的总量。在特定实施方式中,口服组合物含以重量计约 10% ~ 约 95% 本发明的化合物。

[0186] 用于静脉内 (i. v.) 施用的适合的剂量范围是约 0.01mg ~ 约 100mg/kg 体重 / 天,约 0.1mg ~ 约 35mg/kg 体重 / 天,及约 1mg ~ 约 10mg/kg 体重 / 天。在一些实施方式中,用于鼻内施用的适合的剂量范围是约 0.01pg/kg 体重 / 天 ~ 约 1mg/kg 体重 / 天。栓剂通常含约 0.01mg ~ 约 50mg 的本发明的化合物 /kg 体重 / 天和以重量计约 0.5% ~ 约 10% 的范围包括活性成分。

[0187] 用于真皮内,肌肉内,腹膜内,皮下,硬膜上,舌下,脑内,阴道内,经皮施用或通过吸入施用的建议的剂量在约 0.001mg ~ 约 500mg/kg 的体重 / 天的范围内。用于局部施用的适合的剂量包括在约 0.001mg ~ 约 50mg 的范围内的剂量,依赖于施用面积。有效剂量可来源于体外或动物模型测试系统的剂量 - 应答曲线外推。所述动物模型和系统是本领域熟知的。

[0188] 在另一实施方式中,受试者施用一个或更多剂量的预防性或治疗有效量的本发明的缀合物,响应缀合物产生的抗体,或本发明的免疫原性组合物,其中预防性或治疗有效量对于各剂量不是相同的。在另一实施方式中,受试者施用一个或更多剂量的预防性或治疗有效量的本发明的缀合物,响应缀合物产生的抗体,或本发明的免疫原性组合物,其中施用于所述受试者的预防性或治疗有效量的剂量增加例如,0.01 μ g/kg, 0.02 μ g/kg, 0.04 μ g/kg, 0.05 μ g/kg, 0.06 μ g/kg, 0.08 μ g/kg, 0.1 μ g/kg, 0.2 μ g/kg, 0.25 μ g/kg, 0.5 μ g/kg, 0.75 μ g/kg, 1 μ g/kg, 1.5 μ g/kg, 2 μ g/kg, 4 μ g/kg, 5 μ g/kg, 10 μ g/kg, 15 μ g/kg, 20 μ g/kg, 25 μ g/kg, 30 μ g/kg, 35 μ g/kg, 40 μ g/kg, 45 μ g/kg 或 50 μ g/kg, 随治疗进展。在另一实施方式中,受试者施用一个或更多剂量的预防性或治疗有效量的本发明的缀合物,响应缀合物产生的抗体,或本发明的免疫原性组合物,其中剂量降低,例如,0.01 μ g/kg, 0.02 μ g/kg, 0.04 μ g/kg, 0.05 μ g/kg, 0.06 μ g/kg, 0.08 μ g/kg, 0.1 μ g/kg, 0.2 μ g/kg, 0.25 μ g/kg, 0.5 μ g/kg, 0.75 μ g/kg, 1 μ g/kg, 1.5 μ g/kg, 2 μ g/kg, 4 μ g/kg, 5 μ g/kg, 10 μ g/kg, 15 μ g/kg, 20 μ g/kg, 25 μ g/kg, 30 μ g/kg, 35 μ g/kg, 40 μ g/kg, 45 μ g/kg 或 50 μ g/kg, 随治疗进展。

[0189] 在某些实施方式中,受试者施用一个或更多剂量的有效量的本发明的缀合物,响应缀合物产生的抗体,或本发明的免疫原性组合物,其中有效量的剂量抑制或降低身体或循环抗原中的半抗原水平至少 20% ~ 25%,优选至少 25% ~ 30%,至少 30% ~ 35%,至少 35% ~ 40%,至少 40% ~ 45%,至少 45% ~ 50%,至少 50% ~ 55%,至少 55% ~ 60%,至少 60% ~ 65%,至少 65% ~ 70%,至少 70% ~ 75%,至少 75% ~ 80%,或达至少 85%。在其他实施方式中,受试者施用一个或更多剂量的有效量的本发明的缀合物,响应缀合物产生的抗体,或本发明的免疫原性组合物,其中有效量的剂量抑制或降低疾病或病情,例如,药物成瘾的严重性,至少 20% ~ 25%,优选至少 25% ~ 30%,至少 30% ~ 35%,至少 35% ~ 40%,至少 40% ~ 45%,至少 45% ~ 50%,至少 50% ~ 55%,至少 55% ~ 60%,至少 60% ~

65%，至少 65%～70%，至少 70%～75%，至少 75%～80%，或达至少 85%。

[0190] 在其他实施方式中，受试者施用一个或更多剂量的有效量的本发明的缀合物，响应缀合物产生的抗体，或本发明的免疫原性组合物的，其中有效量的剂量抑制或降低烟碱或可卡因成瘾至少 20%～25%，优选至少 25%～30%，至少 30%～35%，至少 35%～40%，至少 40%～45%，至少 45%～50%，至少 50%～55%，至少 55%～60%，至少 60%～65%，至少 65%～70%，至少 70%～75%，至少 75%～80%，或达至少 85%。在其他实施方式中，受试者施用一个或更多剂量的有效量的本发明的缀合物，响应缀合物产生的抗体，或本发明的免疫原性组合物，其中有效量的剂量抑制或降低由缀合物靶向的抗原到受试者中的其他细胞，组织或器官的能力至少 20%～25%，优选至少 25%～30%，至少 30%～35%，至少 35%～40%，至少 40%～45%，至少 45%～50%，至少 50%～55%，至少 55%～60%，至少 60%～65%，至少 65%～70%，至少 70%～75%，至少 75%～80%，或达至少 85%。

[0191] 已或目前正用于预防，治疗和 / 或管理疾病或病情或与其相关的疾病或病情的不是本发明的缀合物，响应缀合物产生的抗体，或本发明的免疫原性组合物的预防或治疗剂的剂量可使用临床医师可得到的参考文献确定，例如，Physicians' Desk Reference (55th ed. 2001)。优选地，与一种或更多本发明的缀合物，响应缀合物产生的抗体，或本发明的免疫原性组合物组合利用低于已或目前用于预防，治疗和 / 或管理疾病或病情的剂量的剂量。

[0192] 提供上述施用日程表仅用于说明目的，且不应认为是限制。本领域技术人员将容易了解全部剂量在本发明的范围之内。

[0193] 【5.5. 试剂盒】

[0194] 本发明提供药包或试剂盒，其包括一个或更多填充有本发明的缀合物，响应缀合物产生的抗体，或本发明的免疫原性组合物的容器。试剂盒可用于上述方法。尤其是，试剂盒可用于预防，治疗和 / 或管理疾病或病情，例如，药物成瘾（例如，可卡因或烟碱成瘾）。

[0195] 在一实施方式中，试剂盒在一个或更多容器中包括本发明的缀合物，响应缀合物产生的抗体，或本发明的免疫原性组合物。在另一实施方式中，试剂盒在一个或更多容器中包括本发明的缀合物，响应缀合物产生的抗体，或本发明的免疫原性组合物，及在一个或更多其他容器中包括一种或更多其他预防或治疗剂。在特定实施方式中，试剂盒还包括使用本发明的缀合物，响应缀合物产生的抗体，或本发明的免疫原性组合物的使用说明，以及对本发明的缀合物，响应缀合物产生的抗体，或本发明的免疫原性组合物的副作用的说明，及用于特定施用途径的剂量信息。任选与所述容器相关的可为以由调控药物或生物学产品的生产，使用或销售的政府机构指示的形式的警示，该警示反映由生产，使用或销售的机构的用于人施用的批准。

[0196] 【5.6. 用于诱导针对成瘾药物的免疫应答的免疫原性组合物】

[0197] 此部分使用来自使用药物（可卡因或烟碱）半抗原 - 载体缀合物的实验的例来例示本发明的免疫原性组合物。这些教导可适于使用分别包括任何抗原或半抗原的抗原 - 载体和半抗原 - 载体缀合物，以产生针对任何上述抗原或半抗原，或期望免疫应答，尤其改善的免疫应答的任何其他抗原的免疫应答。

[0198] 也可将本发明的药物 - 缀合物，以及本发明的组合物，用作治疗剂，以治疗药物成

瘾或药物依赖性,或作为预防剂。在预防性用途中,可在任何暴露于药物之前将包括它们的药物-缀合物或免疫原性组合物施用于哺乳动物,以产生抗-药物抗体。产生的抗-药物抗体将存在于哺乳动物中,以结合随后导入免疫原性组合物的施用的任何药物,及因此最小化或阻止成为对药物成瘾的机会。

[0199] 本发明的免疫原性组合物可作为疫苗用于受试者。含至少一种药物/半抗原-载体缀合物的这些组合物能引起足够高滴度的特异于药物/半抗原的抗体的产生,以至于随后用药物/半抗原攻击后,所述抗体能降低药物的成瘾性质。对半抗原-载体缀合物的期望的免疫应答是抗-半抗原和抗-载体抗体二者的形成。当引起及维持足够的量的抗-药物特异性抗体时达到治疗性水平,以实现对接种后导入的药物的中和攻击。本发明的治疗性方案允许初始疫苗接种和任何追加后用于抗体产生的足够的时间。而且,最佳抗-药物疫苗含包括作为半抗原的药物和载体的最佳组合的至少一种药物/半抗原载体缀合物,从而抗-药物抗体的产生能达到最佳治疗性水平,这是说,在几个月之内用选择的药物以足够高滴度留在体内以抵御随后攻击。更具体而言,抗体滴度保持足够高,以在随后依赖于个体暴露于药物约2个月~约一年或更久,更通常至少3个月后提供有效应答。此最佳组合物由半抗原-载体缀合物,赋形剂及,任选佐剂组成。

[0200] 当用于处理烟碱时,本发明定义半抗原-载体缀合物,其中半抗原是烟碱或烟碱衍生物,其可用于免疫哺乳动物,尤其人,以引起能结合游离的药物和防止药物转运到脑中的奖赏系统的抗-烟碱抗体,由此消除成瘾药物摄取行为(例如,吸烟香烟)。认为烟碱结合脑中烟酸乙酰胆碱受体的 α -亚基,其导致多巴胺释放增加。认为脑中增加的数的烟酸乙酰胆碱受体增强烟碱的生理依赖性。如以上与可卡因相关讨论,抗-烟碱抗体将大概限制烟碱跨血-脑屏障到脑的分布,由此降低其药理学效应。但是,烟碱的情况中的抗体干扰,可具有超过可卡因的一些优势。例如,有一些水平的用烟碱递送的标准化;这是说,各香烟含平均9mg的烟碱,其中1~3mg在吸烟期间有效施予。此外,烟碱的峰血浆浓度是25~50ng/ml,其显著低于可卡因(0.3~1 μ g/ml)。此应提供用中度高亲和性抗体干扰的理想机会。

[0201] 用本发明的免疫原性半抗原-载体缀合物组合物初始疫苗接种创建高滴度的体内半抗原-特异性抗体。免疫接种的受试者血浆的周期性测试对于测定个体有效剂量有用。通过周期性追加增加及维持滴度水平。预期此治疗剂将用于与当前药物恢复程序(包括咨询)组合。而且,本发明的治疗组合物可旨在单种药物或几种药物同时或相继及可用于与其他治疗组合。例如,使用本发明的治疗性半抗原-载体缀合物组合物和方法而与常规药理学方法和之前讨论的“短期”被动免疫组合以增强总体治疗效应而无不利的相互作用。

[0202] 本发明的免疫原性半抗原-载体缀合物组合物通过将一种或更多半抗原分子与含T细胞表位的载体偶联而制备,以获得能刺激T细胞(免疫原性)的半抗原-载体缀合物,其导致T细胞增殖和活化相关B细胞及刺激特定抗体产生的介质的特征释放。

[0203] 目标抗体是特异于半抗原-载体缀合物(也称为半抗原-载体复合物)的半抗原部分的那些。公开了含任一与相同的药物(交叉-免疫)或与多种药物(共-免疫)的缀合物的组合的治疗组合物。所述多种药物的缀合物的共-混合物在治疗多药滥用中尤其有用。

[0204] 在选择适合于根据本发明缀合的药物中,本领域技术人员将选择具有可能引起高抗体滴度的性质的药物。但是,如果选择的分子类似于对个体是内源性的那些分子,针对所述分子产生的抗体可与身体内的许多不同的分子交叉-反应而给出不期望的效应。由此,待选择作为半抗原的药物(药物/半抗原)必需足够外源及足够的尺寸,以避免引起针对通常在人体内发现的分子的抗体。由于这些原因,醇,例如,将不适合于本发明的治疗剂。针对治疗组合物产生的抗体对于中和任一血流或粘膜或二者中的药物高度特异及足够的量。无意限制本发明,适合于治疗组合物的药物(不以重要性的顺序)是:

[0205] 致幻剂,例如美司卡林及 LSD;

[0206] 大麻素,例如 THC;

[0207] 刺激物,例如苯丙胺,可卡因,芬美曲秦,哌甲酯;

[0208] 烟碱;

[0209] 抑郁剂,例如,非巴比妥酸盐(例如溴化物,氯醛水合物等),甲喹酮,巴比妥酸盐,地西洋,氟西洋,苯环利定和氟西汀;

[0210] 阿片和其衍生物,例如,海洛因,美沙酮,吗啡,麦啉,可待因,喷他佐辛和右丙氧芬;以及

[0211] "策划药"例如"销魂"。

[0212] 【5.6.1. 使用佐剂】

[0213] 为本发明的目的,佐剂用于增强针对特定抗原或半抗原的免疫应答,例如,当佐剂与免疫原性组合物共-施用,免疫应答大于由相当的量的不随佐剂施用的免疫原性组合物引起的免疫应答,或佐剂用于引导针对共-施用的抗原的特定类型或一类免疫应答。"有效量"的本发明的佐剂的共-施用将是增强针对共-施用的免疫原性组合物的免疫学应答的量,以至于,例如,需要更低或更少免疫原性组合物的剂量来产生有效免疫应答。

[0214] 如本文所用,术语"共-施用"是指佐剂和免疫原性组合物的任一同时或同时施用,例如,当二者存在于相同的组合物或在分离的组合物中在几乎相同的时间但在不同的位点施用,以及佐剂和免疫原性组合物在分离的组合物中在不同的时间的递送,包括递送到不同的位点。例如,可在相同的或不同的位点递送免疫原性组合物之前或随后递送佐剂。佐剂和免疫原性组合物递送之间的时间可跨约几分钟间隔,到几小时间隔,到几天间隔。

[0215] 不掩盖载体的效应的任何佐剂被认为在本发明的免疫原性组合物中有效(见,Edelman(1980)Rev. Infect. Dis. 2:370-373)。旨在展示针对可卡因成瘾的治疗性疫苗的可行性的初始实验使用有力的佐剂 CFA。但是,CFA 在人中不优选。目前批准用于人的有用的佐剂是矾,包括氢氧化铝(Spectrum Chem. Mtg. Corp., New Brunswick, N. J.)或磷酸铝(Spectrum)。一般,疫苗吸附到矾,其具有非常有限的溶解度。鼠模型中的初步数据提示,矾能诱导强抗-可卡因抗体应答,及 MF59(Chiron, Emeryville, Calif.)或 RIBI 佐剂也是适合的。

[0216] 可注意到,用 CTB 作为载体蛋白的有效免疫不要求有力的佐剂。通过免疫用 CTB-可卡因缀合物任一使用矾作为佐剂或缺乏任何添加的佐剂诱导高滴度抗-可卡因抗体应答。对于不是 CTB 的载体,本领域技术人员将能确定适当的佐剂,如果需要。

[0217] 佐剂的使用在免疫流程中常有益。为了评定矾对于免疫应答的贡献,将小鼠用在

盐水中或吸附到矾的 10 μ g 可卡因-CTB PS-5.53 腹膜内免疫。将小鼠在第 27 天使用相同的流程加施。对于两组动物,在第 43 天检测到高水平的可卡因-特异性抗体(不用矾的 14687 的滴度,和用矾的 16775 的滴度)。用吸附到矾的可卡因-CTB 免疫也显示对于用皮下或肌内施用途径有效。因此,对此抗原,矾的使用是可接受的。

[0218] 矾佐剂的添加可增加针对注射的蛋白的免疫应答,获得足够的抗体滴度要求测试在注射药物-载体缀合物后矾对抗体应答的贡献。为了评定矾的贡献,将小鼠用 10 μ g 可卡因-rCTB PS-5.189 免疫,其中 CTB 在细菌中重组表达。在盐水中或吸附到矾上给小鼠肌内注射,并在第 14 天再次注射。对这些批的可卡因-CTB 缀合物,需要矾的添加,以便产生抗-可卡因抗体,如通过 ELISA 检测。

[0219] 【5.6.2. 赋形剂和辅助剂】

[0220] 本发明的免疫原性组合物可任选含一种或更多药学可接受的赋形剂,包括但不限于无菌水,盐溶液,例如盐水,磷酸钠,氯化钠,醇,阿拉伯胶,植物油,苜蓿基醇,聚乙二醇,明胶,甘露糖醇,碳水化合物,硬脂酸镁,粘土蜡,脂肪酸酯,羟基甲基纤维素和缓冲液。本领域技术人员可使用其他适合的赋形剂。治疗组合物可任选包括至少一种辅助制剂,例如,分散介质,包被,例如脂质和脂质体,表面活性剂,例如润湿剂和乳化剂,润滑剂,防腐剂,例如抗菌剂和抗真菌剂,稳定剂和本领域技术人员熟知的其他制剂。本发明的组合物也可含其他可加入以增强药物的治疗性质或致使替代性的施用模式的佐剂,制剂和/或惰性药理学可接受的赋形剂。

[0221] 可将如上产生的高度纯化的半抗原-载体缀合物配制入适合于人治疗的本发明的免疫原性组合物。如果待通过注射(即,皮下注射)施用本发明的治疗组合物,则优选为高度纯化的半抗原-载体缀合物在药学可接受的 pH(这是说,约 4~9 的范围)的水溶液中是可溶性的,以至于组合物是流体和存在容易施用。但是,施用高度纯化的半抗原-载体缀合物在水溶液中的悬浮液中的组合物是可能的,且所述悬浮液在本发明的范围之内。组合物也任选包括药学可接受的赋形剂,佐剂和辅助制剂或补充性活性化合物。依赖于施用模式,任选的成分将确保治疗组合物的期望性质,例如,适当的流动性,不期望的微生物的作用的防止,增强的生物利用度或延长的吸收。

[0222] 本发明的免疫原性组合物应无菌,在制备,存储,分布及使用的条件下稳定,及保存抵御微生物(例如细菌和真菌)的污染作用。用于制备本发明的治疗组合物以便维持组合物的完整性的优选的方法是制备缀合物和药学赋形剂的制剂,以至于组合物可为冷冻干燥的粉形式,其在使用之前在赋形剂或辅助制剂,例如无菌水中复原。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉的情况中,优选的制备方法是真空干燥,冷冻干燥或自旋干燥,其产生活性成分加来自其之前无菌过滤的溶液的任何其他所需成分的粉末。

[0223] 本发明的活性化合物可根据制剂学常规方法处理,以产生用于施用给患者(例如,哺乳动物包括人)的治疗组合物。优选的施用模式是鼻内,气管内,口服,真皮和/或注射。施用模式的一种尤其适合的组合包括用鼻内加施初始注射。

[0224] 对于肠胃外应用,尤其适合的是可注射的,无菌溶液,优选油性或水溶液,以及悬浮液,乳剂或植入物,包括栓剂。安瓿是方便的单元剂量。对于肠内应用,尤其适合的是片剂,糖锭剂,液体,悬浮液,滴剂,栓剂或胶囊,其可包括肠衣。在采用甜味的媒质时,可使用糖浆,酏剂,等。

[0225] 可配制持续的或直接的释放组合物,例如,脂质体或活性化合物(缀合物)用区别可降解的包被(例如,通过微胶囊化,多个包被,等)保护的那些。也可冷冻-干燥新化合物及使用得到的冻干物,例如,用于制备注射用产品。

[0226] 为局部应用,采用作为包括与局部应用相容的载体及具有优选大于水的动态粘度的不可喷雾的形式,粘到半-固体或固体形式。适合的制剂包括但不限于溶液,悬浮液,乳剂,乳油,软膏等,它们是,如果需要,灭菌或与辅助制剂混合。为局部应用,适合的是可喷射的气雾剂制剂,其中活性化合物,优选与适合的赋形剂或辅助制剂组合,包装在挤压瓶内或与加压的挥发物,正常是气体推进剂混合。

[0227] 通过本发明的组合物和方法产生的抗体可具有跨 150KDa ~ 1,000KDa 的分子量。当用优化的治疗组合物中的缀合物疫苗接种后,受试者是暴露于游离的可卡因或烟碱时,游离的可卡因或烟碱被可卡因-特异性或烟碱-特异性抗体靶向。抗体体内识别药物不必需药物的形式或结构的变化。而不旨在限制本发明,认为免疫接种的个体暴露于可卡因或烟碱后,抗-药物抗体将阻断可卡因和烟碱的效应。至少 3 种机理被认为贡献于阻断活性。第 1,抗体不能穿过血-脑屏障。因此,认为可卡因或烟碱,当结合于抗-可卡因或抗-烟碱抗体时,将不穿过血-脑屏障和将不能引发其对多巴胺转运子的效应。第 2,抗体通过简单立体阻断阻止药物结合其受体。

[0228] 此机理期望在阻断药物的一些非-CNS 效应(例如心脏毒性)中运作及在阻断针对其他具有非-CNS 靶的药物的抗体活性中运作。第 3,可卡因和烟碱二者由于酶促和非-酶促降解,产生失活代谢物而具有相对短的体内半衰期。可卡因和烟碱尤其是足够小的药物,从而它们可交联抗体是非常不可能的,由此,对于任一药物生理学显著的免疫复合物形成将发生是高度不可能的。

[0229] 粘膜应用的再进一步实施方式用于本发明的实践。例如,共聚物微球用于诱导或增强粘膜免疫应答。这些小,可生物降解的微球包裹及保护缀合物及辅助通过粘膜免疫系统摄取。尽管它们最广泛用于口服免疫,它们也已被报告用鼻内免疫是有效的(Walker(1994)Vaccine12:387-399)。惰性聚合物例如 1 ~ 10 μ m 直径的聚(丙交酯-共-乙交酯)(PLG)在这点上尤其有用(Holmgren et al. (1994)Am. J. Trop. Med. Hyg. 50:42-54;Serva(1994)Science 265:1522-1524)。

[0230] 除了优选的缀合物,进行与不同的缀合物的交叉-免疫,以便最小化抗体交叉-反应性。将小鼠用缀合物(更具有施细菌毒素载体缀合物)初施,及然后在第 14 天用偶联于不同的载体,BSA 的交互缀合物加施。仅识别可卡因缀合物的抗体-分泌 B 细胞亚组最大程度地刺激和扩展。认为因为 2 种缀合物的与可卡因分子的附接点不同,识别特异性增加。然后通过竞争 ELISA 确证诱导的抗血清的特异性。

[0231] 再者,含多于一种缀合物的免疫原性组合物刺激多克隆抗体,由此在随后攻击后增强抗体应答。

【实施例】

[0232] 此实施例展示,当 rCTB 含信号肽时,在半抗原-载体缀合物中包括烟碱作为半抗原和 rCTB 作为载体的免疫原性组合物具有增强的免疫原性。rCTB 用具有氨基酸序列 Ala-Pro-Gly-Tyr-Ala-His-Gly 的信号肽翻译(图 1)。此信号序列不存在于成熟的 CTB。

rCTB 在 2 种表达系统,霍乱弧菌 (*V. cholerae*) 株 213 和 401 中产生。当在 213 株中产生时,检测到 rCTB 的形式含达 7 个氨基酸长度的信号序列。当 rCTB 在 401 株中表达时检测不到稳定的信号序列,而是,氨基-端是丙氨酸残基,而非正常存在于天然的,成熟的 CTB 的苏氨酸(图 2)。含来自 213 株的 rCTB 的烟碱-CTB 缀合物相比使用来自 401 株的 rCTB 产生的缀合物具有 2 倍增强的免疫原性,展示,当在烟碱-载体缀合物中使用含信号肽的细菌毒素作为载体时,具有增强的免疫原性。

[0233] 【等同体】

[0234] 本领域技术人员将认可或能使用不超过常规实验确定许多本文所述的发明的特定实施方式的等同体。所述等同体期望被后述权利要求含盖。

[0235] 将本文引用的全部参考文献通过引用整体并入本文,及如同各个公开或专利或专利申请特别和个别指定通过引用整体并入本文的程度。

[0236] 本发明不限于本文所述的特定实施方式的范围。实际上,除了本文所述的那些之外的本发明的各种修饰将对于本领域技术人员从前述描述和附图是显而易见的。所述修饰期望落入随附的权利要求的范围之内。

[0237] 【阐释的实施方式】

[0238] 本发明可通过以下段落所示的非-限制实施方式阐释。

[0239] 1. 免疫原性组合物,所述组合物包括:含信号肽的细菌毒素和抗原。

[0240] 2. 免疫原性组合物,所述组合物包括:含信号肽的细菌毒素和抗原,其中组合物能诱导针对抗原的免疫应答。

[0241] 3. 免疫原性组合物,所述组合物包括:含信号肽的细菌毒素和半抗原。

[0242] 4. 免疫原性组合物,所述组合物包括:含信号肽的细菌毒素和半抗原,其中组合物能诱导针对成瘾药物的免疫应答。

[0243] 5. 免疫原性组合物,所述组合物包括:含信号肽的细菌毒素和烟碱或其衍生物,其中组合物能诱导针对烟碱的免疫应答。

[0244] 6. 免疫原性组合物,所述组合物包括:(i) 具有包括氨基酸序列 Ala-Pro-Gly-Tyr-Ala-His-Gly,或其 C-端片段的信号肽的霍乱毒素 B(CTB);及(ii) 烟碱或其衍生物,其中组合物能诱导针对烟碱的免疫应答。

[0245] 7. 段落 6 的免疫原性组合物,其中针对烟碱的免疫应答大于由与段落 6 相同但缺少所述信号肽的免疫原性组合物诱导的针对烟碱的免疫应答。

[0246] 8. 段落 1~3 中任一个的免疫原性组合物,其中含信号肽的细菌毒素是霍乱毒素 B(CTB)。

[0247] 9. 段落 8 的免疫原性组合物,其中 CTB 信号肽包括氨基酸序列 Ala-Pro-Gly-Tyr-Ala-His-Gly,或其 C-端片段。

[0248] 10. 段落 4 的免疫原性组合物,其中含信号肽的细菌毒素是霍乱毒素 B(CTB)。

[0249] 11. 段落 10 的免疫原性组合物,其中 CTB 信号肽包括氨基酸序列 Ala-Pro-Gly-Tyr-Ala-His-Gly,或其 C-端片段。

[0250] 12. 段落 1~5 中任一个的免疫原性组合物,其中细菌毒素是大肠埃希氏菌 (*E. coli*) 热不稳定的肠毒素亚基 B。

[0251] 13. 段落 1~5 中任一个的免疫原性组合物,其中细菌毒素是白喉毒素。

- [0252] 14. 段落 1 ~ 5 中任一个的免疫原性组合物,其中细菌毒素是百日咳毒素。
- [0253] 15. 段落 1 ~ 5 中任一个的免疫原性组合物,其中细菌毒素是志贺毒素。
- [0254] 16. 段落 1 ~ 5 中任一个的免疫原性组合物,其中细菌毒素是假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 外毒素 A。
- [0255] 17. 段落 1 ~ 5 中任一个的免疫原性组合物,其中所述免疫原性组合物包括佐剂。
- [0256] 18. 段落 17 的免疫原性组合物,其中所述佐剂是氢氧化铝。
- [0257] 19. 段落 6 的免疫原性组合物,其中所述免疫原性组合物包括佐剂。
- [0258] 20. 段落 19 的免疫原性组合物,其中所述佐剂是氢氧化铝。
- [0259] 21. 段落 8,10 或 12 ~ 16 中任一个的免疫原性组合物,其中细菌毒素含其内源性信号肽,或其片段。
- [0260] 22. 在受试者中诱导免疫应答的方法,包括给受试者施用有效量的段落 1 ~ 21 中任一个的免疫原性组合物。
- [0261] 23. 在受试者中诱导针对成瘾药物的免疫应答的方法,包括给受试者施用有效量的段落 4,10 或 11 的免疫原性组合物。
- [0262] 24. 段落 23 的方法,其中成瘾药物是烟碱。
- [0263] 25. 段落 23 的方法,其中成瘾药物是可卡因。
- [0264] 26. 在受试者中诱导针对烟碱的免疫应答的方法,包括给受试者施用有效量的段落 5 的免疫原性组合物。
- [0265] 27. 在受试者中诱导针对烟碱的免疫应答的方法,包括给受试者施用有效量的段落 6 或 7 的免疫原性组合物。
- [0266] 28. 治疗有需要的受试者的药物成瘾或药物依赖性的方法,包括给受试者施用有效量的段落 4,10 或 11 的免疫原性组合物。
- [0267] 29. 段落 28 的方法,其中药物成瘾或依赖性为烟碱成瘾或依赖性。
- [0268] 30. 段落 28 的方法,其中药物成瘾或依赖性为可卡因成瘾或依赖性。
- [0269] 31. 治疗有需要的受试者的烟碱成瘾或烟碱依赖性的方法,包括给受试者施用有效量的段落 5 的免疫原性组合物。
- [0270] 32. 治疗有需要的受试者的烟碱成瘾或烟碱依赖性的方法,包括给受试者施用有效量的段落 6 或 7 的免疫原性组合物。
- [0271] 33. 疫苗接种受试者抵抗成瘾药物的方法,包括给受试者施用有效量的段落 4,10 或 11 的免疫原性组合物。
- [0272] 34. 段落 33 的方法,其中成瘾药物是烟碱成瘾。
- [0273] 35. 段落 33 的方法,其中成瘾药物是可卡因。
- [0274] 36. 疫苗接种受试者抵抗烟碱的方法,包括给受试者施用有效量的段落 5 的免疫原性组合物。
- [0275] 37. 疫苗接种受试者抵抗烟碱的方法,包括给受试者施用有效量的段落 6 或 7 的免疫原性组合物。

rCTB的氨基酸序列

-7 -5 -4 -3 -1 1 10
Ala-Pro-Gly-Tyr-Ala-His-Gly-Thr-Pro-Gln-Asn-Ile-Thr-Asp-Leu-Cys-Ala-Glu-

20

Tyr-His-Asn-Thr-Gln-Ile-His-Thr-Leu-Asn-Asp-Lys-Ile-Phe-Ser-Tyr-Thr-Glu-Ser-

30

40

Leu-Ala-Gly-Lys-Arg-Glu-Met-Ala-Ile-Ile-Thr-Phe-Lys-Asn-Gly-Ala-Thr-Phe-

50

60

Gln-Val-Glu-Val-Pro-Gly-Ser-Gln-His-Ile-Asp-Ser-Gln-Lys-Lys-Ala-Ile-Glu-Arg-

70

80

Met-Lys-Asp-Thr-Leu-Arg-Ile-Ala-Tyr-Leu-Thr-Glu-Ala-Lys-Val-Glu-Lys-Leu-

90

100

Cys-Val-Trp-Asn-Asn-Lys-Thr-Pro-His-Ala-Ile-Ala-Ala-Ile-Ser-Met-Ala-Asn

编号为1的苏氨酸残基是通常见于天然CTB的第1个氨基酸。编号为-1、-3、-4、-5和-7的那些氨基酸是各种rCTB成分的N-末端残基。

图 1

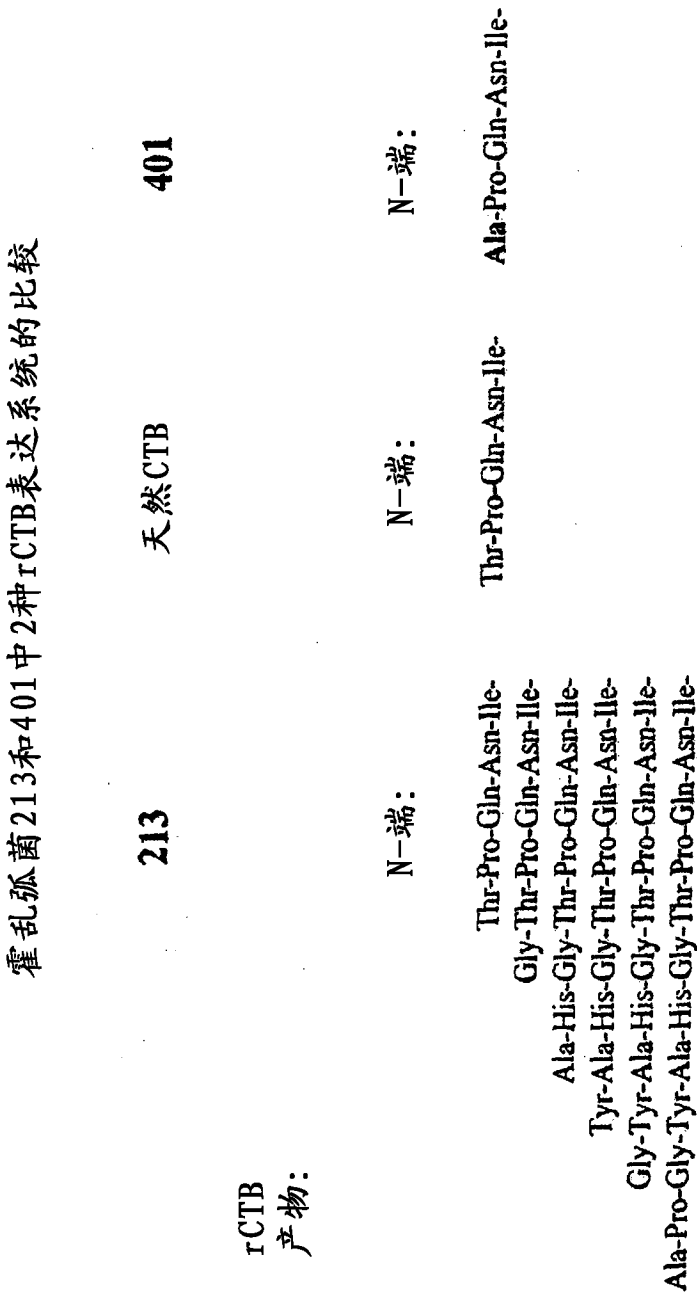


图 2

CJ#	分支	可变
CJ 0	Q	Q = H, OH, CH ₃ , 卤素, COOH, 载体蛋白, 修饰的载体蛋白
CJ 1	(CH ₂) _n Q	Q = H, COOH, 卤素, 2-硝基-4-磺苯基酯, N-氧基琥珀酰亚胺酯, 载体蛋白, 修饰的载体蛋白, CJ, 1.2
CJ 1.1	CO ₂ Q	Q = H, CH ₃
CJ 1.2	COQ	Q = H, 卤素, 1-氧基-2-硝基-4-磺苯基, N-氧基琥珀酰亚胺, N-马来酰亚胺, 载体蛋白, CJ 10
CJ 2	OCO(CH ₂) _n Q	Q = COOH, 卤素, 2-硝基-4-磺苯基酯, N-氧基琥珀酰亚胺酯, 载体蛋白, 修饰的载体蛋白
CJ 2.1	OCOCH=Q	Q = H
CJ 2.2	OCOCH(O)CH ₂	
CJ 2.3	OCO(CH ₂) _n CH(O)CH ₂	
CJ 3	CO(CH ₂) _n COQ	Q = H, OH, 卤素, 1-氧基-2-硝基-4-磺苯基, N-氧基琥珀酰亚胺, N-马来酰亚胺, 载体蛋白, CJ 10
CJ 3.1	CO(CH ₂) _n CNQ	Q = OCH ₃ 或载体蛋白
CJ 4	OCO(CH ₂) _n COQ	Q = H, OH, 卤素, 1-氧基-2-硝基-4-磺苯基, N-氧基琥珀酰亚胺, N-马来酰亚胺, 载体蛋白, CJ 10
CJ 4.1	CO(CH ₂) _n CNQ	Q = OCH ₃ 或载体蛋白
CJ 5	CH ₂ OCO(CH ₂) _n COQ	Q = H, OH, 卤素, 1-氧基-2-硝基-4-磺苯基, N-氧基琥珀酰亚胺, N-马来酰亚胺, 载体蛋白, CJ 10
CJ 5.1	CO(CH ₂) _n CNQ	Q = OCH ₃ 或载体蛋白
CJ 6	CONH(CH ₂) _n Q	Q = H, COOH, 卤素, 2-硝基-4-磺苯基酯, N-氧基琥珀酰亚胺酯, 载体蛋白, 修饰的载体蛋白
CJ 7	Y(CH ₂) _n Q	Y = S, O, NH; Q = 卤素, COOH, 载体蛋白, 修饰的载体蛋白
CJ 7.1	CH ₂ Y(CH ₂) _n Q	Y = S, O, NH; Q = 卤素, COOH, 载体蛋白, 修饰的载体蛋白
CJ 8	OCOCH(OH)CH ₂ Q	Q = 载体蛋白, 修饰的载体蛋白
CJ 8.1	OCO(CH ₂) _n CH(OH)CH ₂ Q	Q = 载体蛋白, 修饰的载体蛋白
CJ 9	OCOC ₂ H ₅	
CJ 11	YCO(CH ₂) _n COQ	Y = S, O, NH; Q = OH, 载体蛋白, 修饰的载体蛋白或卤素

图 3A

选择性分支的替代性表示

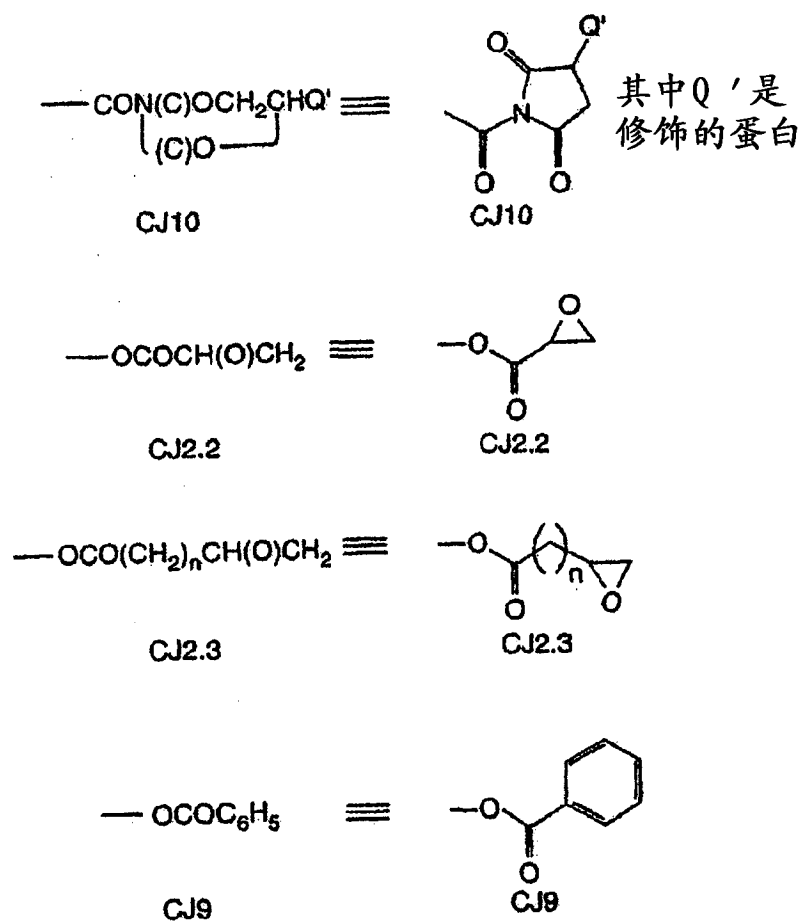


图 3B

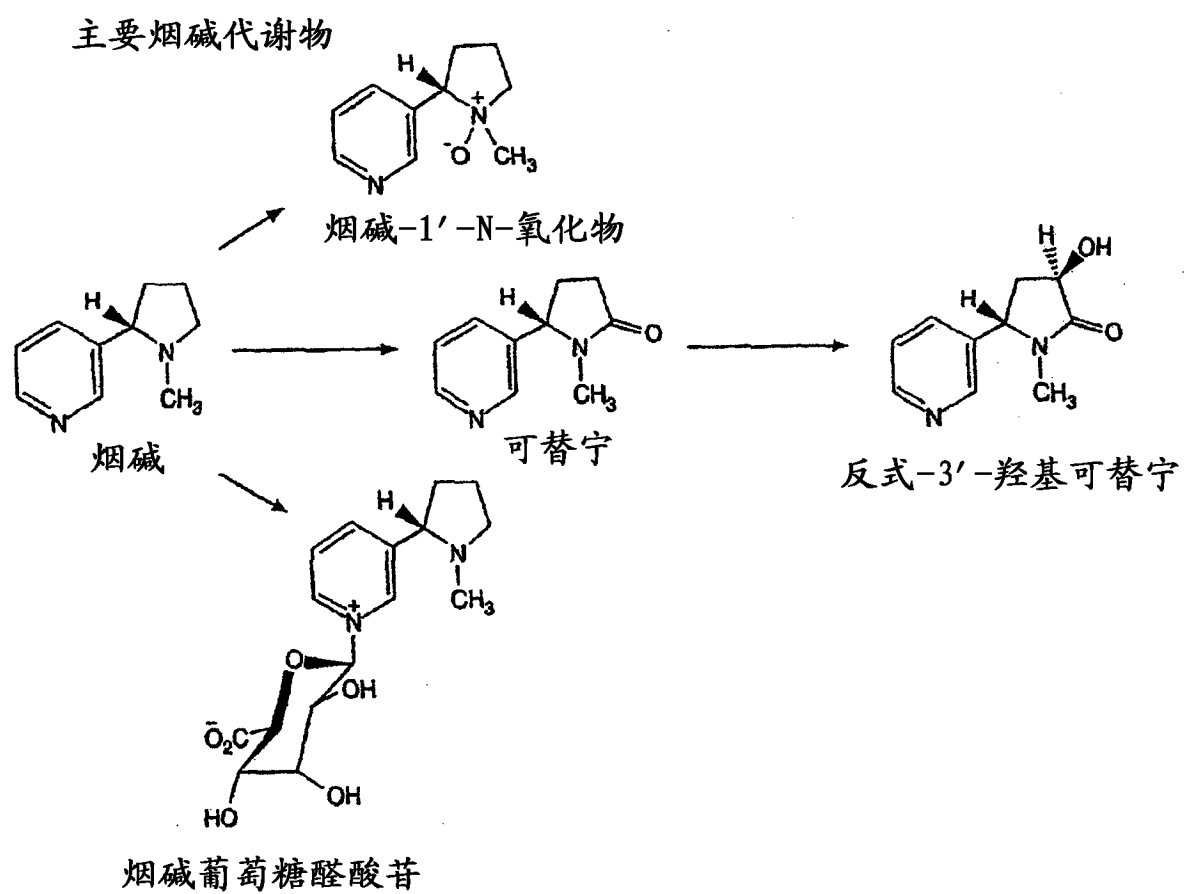


图 4