



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115279401 A

(43) 申请公布日 2022. 11. 01

(21) 申请号 202080097299.0

(74) 专利代理机构 广州嘉权专利商标事务所有
限公司 44205

(22) 申请日 2020.12.21

专利代理师 黄琳娟

(30) 优先权数据

1918963.8 2019.12.20 GB

(51) Int.Cl.

A61K 39/39 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.08.22

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2020/087456 2020.12.21

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/123430 EN 2021.06.24

(71) 申请人 都柏林圣三一学院教务长研究员学
者及董事会其他成员

地址 爱尔兰都柏林

(72) 发明人 E·拉韦尔 N·穆诺茨-沃尔夫

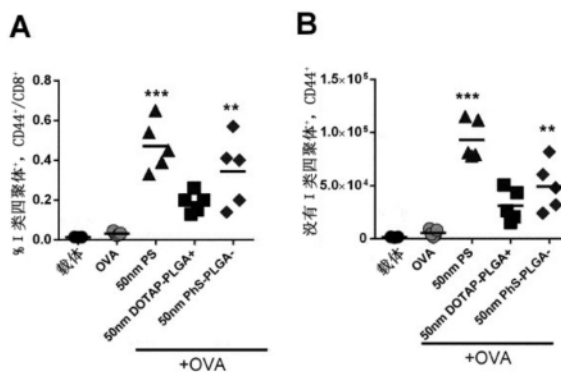
权利要求书2页 说明书24页
序列表1页 附图13页

(54) 发明名称

聚合物纳米颗粒作为疫苗佐剂

(57) 摘要

本发明提供了一种具有从50nm至65nm直径的生物相容性聚合物颗粒及其使用方法。本发明还提供了一种诱导抗原特异性CD8T细胞和Th1反应的方法。



1. 一种直径小于80nm的聚合物纳米颗粒,其用于诱导受试者针对免疫原性物质的CD8反应和/或Th1反应。
2. 根据权利要求1所使用的聚合物纳米颗粒,其中所诱导的反应是CD8反应。
3. 根据权利要求1所使用的聚合物纳米颗粒,其中所诱导的反应是Th1反应。
4. 根据权利要求1所使用的聚合物纳米颗粒,其中所诱导的反应是CD8反应和Th1反应。
5. 根据权利要求2所使用的聚合物纳米颗粒,其中所述CD8反应由Caspase 11和/或Gasdermin D介导。
6. 根据权利要求3所使用的聚合物纳米颗粒,其中所述Th1反应由Caspase 11和/或Gasdermin D介导。
7. 根据前述权利要求中任一项所使用的聚合物纳米颗粒,其中所述反应是在没有辅佐剂的情况下诱导的。
8. 根据前述权利要求中任一项所使用的聚合物纳米颗粒,其中所述聚合物纳米颗粒具有从约30nm至约65nm的直径。
9. 根据权利要求8所使用的聚合物纳米颗粒,其中所述聚合物纳米颗粒具有从约40nm至约60nm的直径。
10. 根据前述权利要求中任一项所使用的聚合物纳米颗粒,其中所述聚合物纳米颗粒被配制为组合物,所述组合物包括所述纳米颗粒和所述免疫原性物质,其中所述纳米颗粒和免疫原性物质在所述组合物中混合。
11. 根据权利要求10所使用的聚合物纳米颗粒,其中所述免疫原性物质吸附到所述纳米颗粒的表面和/或在所述组合物中是未结合的。
12. 根据前述权利要求中任一项所使用的聚合物纳米颗粒,其中所述纳米颗粒不含内毒素。
13. 根据前述权利要求中任一项所使用的聚合物纳米颗粒,其中所述纳米颗粒是生物相容性的。
14. 根据前述权利要求中任一项所使用的聚合物纳米颗粒,其中所述纳米颗粒是实心颗粒。
15. 根据前述权利要求中任一项所使用的聚合物纳米颗粒,其中所述纳米颗粒是可生物降解的。
16. 根据前述权利要求中任一项所使用的聚合物纳米颗粒,其中所述聚合物是聚(D,L-丙交酯-共-乙交酯)(PLGA)、聚乳酸(PLA)、聚磷腈或壳聚糖。
17. 根据前述权利要求中任一项所使用的聚合物纳米颗粒,其中所述免疫原性物质是抗原。
18. 一种包括佐剂和免疫原性物质的组合物,其中所述佐剂包括具有约40nm至约60nm直径的生物相容性和/或可生物降解聚合物纳米颗粒,并且其中所述佐剂和免疫原性物质在所述组合物中混合。
19. 根据权利要求18所述的组合物,其中所述免疫原性物质吸附到所述纳米颗粒的表面和/或在所述组合物中是未结合的。
20. 根据权利要求18或19所述的组合物,其中所述纳米颗粒不含内毒素。
21. 根据权利要求18至20中任一项所述的组合物,其中所述纳米颗粒是实心的。

22. 根据权利要求18至21中任一项所述的组合物,其是疫苗组合物。
23. 根据权利要求18至22中任一项所述的组合物,其用于诱导受试者CD8反应和/或Th1反应的方法。
24. 根据权利要求18至22中任一项所述的组合物,其用于治疗或预防受试者的疾病或病症的方法。
25. 根据权利要求24所使用的组合物,其中所述疾病或病症是细菌感染或病毒感染或癌症或慢性传染病。
26. 根据权利要求25所使用的组合物,其中所述疾病选自包括以下的组:SARS-CoV-2、流感、肝炎、带状疱疹、登革热、寨卡病毒、由细胞内细菌或需要有效激活巨噬细胞以进行细胞内杀灭的细菌引起的感染、由分枝杆菌引起的感染、细胞内寄生虫或具有细胞内发育阶段的寄生虫。
27. 根据权利要求22所述的疫苗组合物,其用于预防或治疗受试者的病症或疾病的疫苗治疗。
28. 一种向受试者接种疫苗的方法,包括向受试者施用权利要求18至22中任一项所述的组合物。
29. 一种治疗或预防受试者疾病的方法,所述方法包括向受试者施用权利要求18至22中任一项所述的组合物。
30. 一种诱导受试者CD8反应和/或Th1反应的方法,所述方法包括向受试者施用权利要求18至22中任一项所述的组合物。

聚合物纳米颗粒作为疫苗佐剂

技术领域

[0001] 本发明涉及聚合物颗粒。具体而言,本发明涉及直径为 $50\text{nm}\pm 10\text{nm}$ 的生物相容性和/或可生物降解的聚合物纳米颗粒及其使用方法。特别地,本发明涉及作为用于除抗体反应外诱导细胞介导免疫的佐剂的直径为 $50\text{nm}\pm 10\text{nm}$ 的生物相容性和/或可生物降解的聚合物纳米颗粒。本发明还涉及直径为 $50\text{nm}\pm 10\text{nm}$ 的聚合物纳米颗粒,其可以刺激对抗原的 caspase-11和/或Gasdermin D依赖性细胞免疫。

背景技术

[0002] 疫苗是预防传染病和引起疾病的微生物传播的最有效方法之一。疫苗是为受试者提供获得性疾病免疫力的制剂,由此在受试者中得以预防疾病,或仅遭受轻微症状。

[0003] 传统上,疫苗是用少量弱的或死亡的微生物(例如,引起疾病的病毒或细菌)制成的。随着疫苗研究的发展,人们发现,没有必要使用整个微生物来提供保护,且相反,可以使用微生物中称为抗原的小部分。包含纯化抗原的疫苗引起较少的不良反应,且比由整个微生物制成的疫苗更安全。然而,高纯度的抗原往往太弱而无法激活受试者的免疫系统。为了解决这个问题,一种称为佐剂的附加成分与抗原合并加入疫苗。这种佐剂的作用是“启动”免疫系统,并且帮助免疫系统对抗原做出更强的反应。

[0004] 批准用于人类疫苗的佐剂很少。大多数经批准的佐剂通过诱导抗体在受试者血液中循环来诱导保护,从而中和微生物。然而,复杂的微生物,例如那些引起流感、结核病或疟疾的微生物可以躲避这些抗体,或者抗体本身不能介导保护。因此,对复杂微生物的保护需要额外的防御机制,即称为细胞介导免疫,并且其不涉及抗体。它涉及吞噬细胞、细胞毒性T淋巴细胞的激活和各种对抗原反应的细胞因子。有几种类型的效应 CD4^+ T辅助细胞反应类型,其可以由抗原呈递细胞(APC)诱导,其中包括称为Th1反应和Th2反应的反应。Th1反应对细胞内病原体(宿主细胞内的病毒和细菌)有效,并且能破坏受感染的细胞,是对癌症的有效预防。 CD8^+ T细胞在针对细胞内病原体(包括病毒和细菌)的细胞介导免疫中也发挥着重要作用,并且用于肿瘤监测。目前缺乏能够促进这些保护性细胞免疫类型的有效佐剂。

[0005] 聚合物纳米颗粒,包括聚(D,L-丙交酯-共-乙交酯)-PLGA聚合物颗粒,已经在许多临床前的情景中作为佐剂进行了测试。然而,尽管许多研究小组作出了努力,但还没有在临床应用中PLGA纳米颗粒能够比佐剂更有效地促进所需的细胞介导免疫的报道。此外,为了诱导这样的效果,目前报道的PLGA颗粒需要辅佐剂或复杂包封。

[0006] 虽然PLGA颗粒已经被有效用作药物载体,但它们尚未有效用于疫苗行业。一般来说,报道的细胞介导免疫(CMI)的诱导是较差的。这导致了与Toll样受体(TLR)激动剂和其他辅佐剂或复杂抗原包封的其他共制剂策略或者接合方法,其使制剂稳定性复杂化、增加成本,且这成为其转化为临床相关制剂的挑战。

[0007] 几个小组已经研究了PLGA纳米颗粒和微粒及其在调节免疫反应中的应用。

[0008] CA2753567公开了具有疏水段(PGLA)和亲水段(难降解多糖,例如葡聚糖)的颗粒。这些颗粒的优选直径规定为 $0.1\mu\text{m}$ 至 $50\mu\text{m}$ 之间。

[0009] Oyewumi et al. (Expert Rev Vaccines, 2010) 是纳米颗粒作为免疫佐剂与颗粒大小和产生的免疫反应相关的综述。然而,作者得出结论,总的来说由于相互矛盾的数据,他们无法准确预测决定Th1或Th1/Th2混合的免疫应答结果的颗粒大小范围。

[0010] CA02731995公开了一种使用微粒诱导Th1免疫应答的方法。颗粒的尺寸至少50%小于5 μm ,优选地小于3 μm 。其进一步说明微粒的平均直径是大于或等于2.2 μm 。

[0011] W02012054425公开了一种用于肿瘤治疗的组合物,并且该研究的目的是产生强烈的Th1反应。公开了优选地由PLGA制成的颗粒。平均直径是约100nm至20 μm ,200nm至15 μm ,最优是500nm至约10 μm 。所使用的颗粒还需要辅佐剂来诱导作用。

[0012] O'Grady et al. (J Immunol, 2019) 公开了聚苯乙烯纳米颗粒,其在疫苗接种后驱动了抗原特异性细胞免疫。

[0013] Chenxi Li, et al. (Applied materials and interfaces, 2018, 10, 2874-2889) 公开了两亲性二嵌段共聚物聚(2-乙基-2-恶唑啉)聚(D,L-丙交酯)(PEOz-PLA)与端羧基Pluronic F127结合以构建用于传递卵清蛋白抗原的纳米颗粒。该体系包括一种辅佐剂,TLR7,以诱导应答。

[0014] W02017/151922公开了包括抗原和共聚物的疫苗,其中所述抗原位于聚合物颗粒的核心。US2015/0342883也公开了作为递送剂的有机聚合物纳米颗粒。

[0015] Carmen Garcia Arevelo et al. (Molecular Pharmaceutics, 2013, 10, 586-597) 公开了一种基因工程弹性蛋白样块核心组合体(ELbcR),它允许生产基于抗原颗粒的构建体,所述构建体组装成纳米囊泡。在小鼠中报告了Th2/IL-5反应。

[0016] Fazren Azmi et al. (Bioorganic and Medicinal Chemistry) 公开了脂质体与肽的偶联,促进非聚合物颗粒的形成并用于疫苗构建体。

[0017] 除PLGA外,其他一些颗粒系统,例如Schinis et al. (Immunol Rev. 2020 Jul; 296(1): 169-190) 中所描述的颗粒系统,其已显示具有一定的佐剂活性,但大多数是非常复杂的制剂,除了抗原包封或共价结合抗原外,还需要多种成分来发挥作用。复杂的多组分颗粒产品不适合大规模生产,且代表了疫苗行业的一个缺陷。此类体系的另一个普遍问题是缺乏关于其作用机制或其作为有效佐剂所需的免疫途径的了解。

[0018] 本发明通过提供一种生物相容性纳米颗粒用于解决现有技术中的问题,该纳米颗粒可以被用作佐剂来促进细胞介导的CD8和/或Th1反应,而无需辅佐剂。

发明内容

[0019] 本发明提供了一种纯的、不含内毒素的聚合物纳米颗粒,其使用混合抗原成功且令人惊讶地诱导了有效的Th1和细胞毒性T淋巴细胞(CTL)反应。该纳米颗粒能够在没有辅佐剂的情况下诱导反应。在这之前现有技术中尚没有被报告或预测。本发明代表了制剂简化方面的优势。

[0020] 本发明人已经证明PLGA颗粒是CD8⁺T细胞和细胞因子IFN- γ 抗原特异性分泌的有效诱导剂。IFN- γ 是Th1反应的标志。本发明人已经进一步证明这种反应不能由较大的可生物降解PLGA或较大的生物相容性聚苯乙烯颗粒驱动。

[0021] 因此,本发明提供了一种新的策略,通过使用纯化抗原和可生物降解的PLGA颗粒进行接种疫苗来诱导有效的CD8或Th1反应,这在以前没有描述过。

[0022] 本发明人还证明了本发明的50nm纳米颗粒诱导CD8反应的能力是取决于焦亡相关途径。该途径可以导致细胞程序性免疫原性死亡和/或细胞过度激活。

[0023] 在本发明之前,PLGA颗粒制剂工艺的局限性将其生产限制在80nm和250 μ m之间的尺寸。包括用于制造本发明中使用的50nm颗粒的微流控技术在内的新平台允许对颗粒大小进行精细控制,获得具有低多分散指数的颗粒,避免了有害溶剂的使用,并允许扩大佐剂的生产规模。

[0024] 本发明的一个方面提供了一种直径小于80nm的聚合物纳米颗粒,用于在受试者中诱导CD8反应和/或Th1反应。

[0025] 所使用的聚合物纳米颗粒如本文所述,并被称为“本发明的纳米颗粒”。

[0026] 所述反应是针对受试者中的免疫原性物质。通常,所述免疫原性物质是一种抗原。

[0027] 优选地,该用途是诱导受试者对抗原的CD8反应。通常,纳米颗粒会诱导或影响受试者的焦亡相关途径。

[0028] 在一个实施例中,诱导CD8反应和Th1反应。

[0029] 优选地,所述聚合物纳米颗粒具有从约30nm至约65nm的直径,优选地,从约40nm至约60nm。

[0030] 通常,在所述用途中,所述聚合物纳米颗粒与免疫原性物质混合。

[0031] 优选地,所述免疫原性物质吸附到所述纳米颗粒的表面和/或在包含所述纳米颗粒的组合物或制剂中游离。

[0032] 最优选地,所使用的聚合物纳米颗粒是生物相容性的。

[0033] 通常,所使用的纳米颗粒是不含内毒素的。

[0034] 特别地,所使用的纳米颗粒是空心颗粒。

[0035] 在一个实施例中,所使用的纳米颗粒是以包括本发明的纳米颗粒的组合物或本发明的纳米颗粒的制剂的形式提供。通常,所述组合物还包括免疫原性物质。所述免疫原性物质与组合物中的免疫原性物质混合。

[0036] 在一个实施例中,所述组合物是疫苗组合物。

[0037] 在一个实施例中,所述组合物是佐剂。

[0038] 还提供了本发明的纳米颗粒作为佐剂的用途。

[0039] 本发明的一个方面提供了一种具有小于80nm直径的聚合物纳米颗粒(在此称为“本发明的纳米颗粒”),优选地,直径为从40nm至60nm,更优选地,从约52nm至约65nm,或从52nm至60nm。

[0040] 所述聚合物纳米颗粒是生物相容性的。

[0041] 在一个实施例中,本发明的纳米颗粒包括生物相容性聚合物。优选地,所述纳米颗粒是聚合物颗粒。优选地,所述纳米颗粒是聚(D,L-丙交酯-共-乙交酯)(PLGA)聚合物纳米颗粒。所述纳米颗粒是聚乳酸(PLA)纳米颗粒。通常,所述生物相容性聚合物选自包括PLGA、PLA、聚磷腈和壳聚糖的组。

[0042] 本发明的一个方面提供了本发明的生物相容性聚合物纳米颗粒的制剂(“本发明纳米颗粒的制剂”)。

[0043] 在一个实施例中,所述制剂中至少90%的纳米颗粒具有小于80nm的直径,优选地从40nm至60nm。

- [0044] 在一个实施例中,所述制剂中至少90%的纳米颗粒具有从约52nm至65nm的直径,优选地从52nm至60nm。
- [0045] 优选地,所述制剂中的纳米颗粒是均匀或单分散的。
- [0046] 作为本发明的一个方面,提供了一种包括本发明纳米颗粒的组合物。
- [0047] 通常,所述组合物包括至少一种免疫原性物质。
- [0048] 在一个实施例中,所述组合物是疫苗。
- [0049] 在一个实施例中,所述组合物是药物组合物。
- [0050] 在一个实施例中,所述免疫原性物质是抗原。
- [0051] 通常,所述聚合物纳米颗粒与组合物中的免疫原性物质混合。
- [0052] 优选地,所述免疫原性物质吸附到纳米颗粒的表面和/或在组合物中游离。
- [0053] 在本发明的一个实施例中,所述组合物中至少90%的纳米颗粒具有小于80nm的直径。
- [0054] 在本发明的一个实施例中,所述组合物中至少90%的纳米颗粒具有从40nm至60m的直径,或从约52nm至约65nm,优选地52nm至60nm。
- [0055] 在一个实施例中,所述组合物包括多个纳米颗粒。
- [0056] 在一个实施例中,所述组合物还包括医药上可接受的载体或盐。
- [0057] 本发明的一个方面提供了包括本发明纳米颗粒的佐剂。
- [0058] 本发明的一个方面提供了本发明的纳米颗粒、制剂或组合物,并且如本文所述,用于疫苗治疗以预防或治疗受试者的病症或疾病。在一个实施例中,所述疾病或病症是细菌感染或病毒感染。优选地,所述疾病或病症是癌症。
- [0059] 所述疾病或症状可以是一种慢性传染病。所述慢性传染病可以选自但不限于结核病、病毒感染、细胞内细菌和细胞内寄生虫。
- [0060] 本发明的一个方面提供了一种治疗或预防受试者疾病或病症的方法,包括向患者施用治疗或预防有效量的本发明的纳米颗粒、制剂或组合物的步骤。
- [0061] 本发明的另一方面提供了本发明的纳米颗粒、制剂或组合物以及如本文所述的用于诱导受试者对抗原的Th1反应和/或CD8反应。
- [0062] 本发明的另一方面是一种在受试者中产生对抗原的Th1和/或CD8反应的方法,包括向所述受试者施用治疗有效量的本发明的纳米颗粒、制剂或组合物。
- [0063] 本发明的另一方面提供本发明的纳米颗粒、制剂或组合物作为载体,以向受试者递送活性剂。所述活性剂可以是药物,例如用于癌症治疗的药物,优选地是化学治疗药物。
- [0064] 定义和一般偏好
- [0065] 本文所使用的除非另有明确说明,否则以下术语除了在本领域中可能享有的任何更宽泛(或更窄)的含义外旨在具有以下含义:
- [0066] 本文引用的所有参考文献均全部通过引用将其整体并入本文。
- [0067] 除非上下文另有要求,否则此处单数的使用应理解为包括复数,且反之亦然。使用的与实体相关的术语“a”或“an”应理解为指该实体中的一个或多个。因此,术语“a”(或“an”)、“一个或多个”和“至少一个”在此是互换使用的。
- [0068] 如本文所用,术语“包括”或其变体,例如“comprises”或“comprising”应理解为指包括任何列举的整体(例如特征(feature)、元素、特征(characteristic)、属性、方法/工艺

步骤或限制)或整体的组合(例如特征(feature)、元素、特征(characteristic)、属性、方法/工艺步骤或限制),但不排除任何其他整体或整体组合。因此,如本文所使用的,术语“包括”是包括的或开放的,并且不排除其他的、未引用的整体或方法/工艺步骤。

[0069] 当在本文中使用时,术语“细胞介导免疫”指由激活的T细胞和/或其他白细胞产生的细胞因子、趋化因子和其他此类分子的产生,包括来自CD4⁺和CD8⁺T细胞的细胞因子、趋化因子和其他此类分子的产生。

[0070] 本文使用的术语“纳米颗粒”指直径小于1,000nm的颗粒。所述纳米颗粒可以是实心或空心的。所述纳米颗粒可以是多孔的。

[0071] 术语“免疫反应”应理解为受试者中诱导的体液和/或细胞反应。

[0072] 当本文使用术语“抗原”时指一种物质,当引入体内时,其在体内诱导免疫反应。该术语可以与术语“免疫原”互换使用

[0073] 在本说明书中,术语“疫苗”应理解为指包括本发明纳米颗粒和至少一种抗原的组合物或制剂。疫苗的制剂在文献中有详细描述,例如US4599230和US4601903,其完整的内容通过引用并入本文。

[0074] 术语“佐剂”应理解为指一种增强受体对抗原免疫反应的药剂。

[0075] 术语“治疗有效量”应理解为指导致对疾病或病症具有临床意义的治疗、减轻或预防的量。所述量因受试者而异,取决于个体的年龄和一般状况、给药方式和其他因素。因此,虽然不可能明确规定准确的有效量,但本领域技术人员将能够通过使用常规实验和背景常识在任何个体情况下确定适当的“有效”量。治疗结果包括消除或减轻病状、减轻疼痛或不适、延长生存期、改善活动度和其他临床改善指标。治疗结果不一定是完全治愈。

[0076] 在具体实施例中,术语“医药上可接受”指经美国联邦或州政府的监管机构批准,或列入《美国药典》或其他公认的用于动物且尤其是人类的药典中。

[0077] 当本文使用术语“聚合物材料”时是指包括一种或多种聚合物的材料。

[0078] “PLGA”是一种共聚物,通常通过两种不同单体(乙醇酸和乳酸的环二聚体(1,4-二氧六环-2,5-二酮)的开环共聚方法合成。PLGA通常是按照所用单体的摩尔比确定,例如,PLGA75:25表示组成是75%乳酸和25%乙醇酸的共聚物。

[0079] 术语“载体”指用于施用治疗药物的稀释剂、佐剂、赋形剂或载体。通常,它是医药上可接受的载体。此类载体可以是无菌液体,例如水和油,包括石油、动物、植物或合成来源的液体,例如花生油、豆油、矿物油、芝麻油等。当制剂或组合物是经静脉施用时,水是优选的载体。盐溶液、葡萄糖水溶液和甘油水溶液也可以用作液体载体,尤其是对于可注射溶液。特别地,载体可以用于人类治疗。用于治疗用途的可接受载体在药学领域是众所周知的,例如,在雷明顿药物科学(Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A.R.Gennaro edit.1985))中有所描述。合适载体的示例包括蔗糖、乳糖、淀粉、葡萄糖、甲基纤维素、硬脂酸镁、甘露醇、山梨醇和表面活性剂(例如DOTAP和磷脂酰丝氨酸等)。合适稀释剂的示例包括乙醇、甘油、水、PBS、Tris缓冲盐溶液和其他生理缓冲液。药物载体的选择可根据预期给药途径和标准制药规范选择。优选地,所包括的任何载体是以微量存在。任何载体的性质和用量不应该不可接受地改变本发明抗原的优点。

[0080] 术语“赋形剂”指可能存在于本发明制剂成品中的任何基本辅料。通常,它是一种药学上可接受的赋形剂。例如,术语“赋形剂”包括但不限于载体、粘合剂、崩解剂、填料(稀

释剂)、润滑剂、悬浮剂/分散剂、涂层剂、稳定剂、染料、乳化剂、软化剂、防腐剂和/或表面活性剂。合适的赋形剂包括但不限于淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、大米、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、滑石粉、氯化钠、脱脂奶粉、甘油、丙二醇、水、乙醇等。所述赋形剂可以特别用于人类治疗。本文所描述的各种不同形式的药物组合物的此类合适赋形剂的示例可以在A Wade和PJ Weller编辑的《药用辅料手册》(1994年第2版)中找到。可以根据预期给药途径和标准制药规范选择药用赋形剂。

[0081] 术语“表面活性剂”包括非离子表面活性剂、阳离子表面活性剂、阴离子表面活性剂和两性表面活性剂等。例如,可以添加表面活性剂以确保冻干纳米颗粒可以在尺寸没有不可接受的增加(例如,没有显著聚集)的情况下再悬浮。该表面活性剂可以特别用于人类治疗。

[0082] 所述组合物或制剂中可以提供防腐剂、稳定剂或染料。防腐剂的示例包括苯甲酸钠、山梨酸和对羟基苯甲酸酯。也可以使用抗氧化剂和悬浮剂。

[0083] 术语“医药上可接受”指经美国联邦或州政府监管机构批准或列入《美国药典》或用于动物且尤其是人类的其他公认的药典。

[0084] 本发明的制剂或组合物可以使用会保护化合物免受快速释放的载体制备(例如控释制剂,包括植入物、透皮贴剂和微囊化的递送系统)。用于制备此类组合物的方法是已知的。提供了医药上可接受的物质,其可以期望地提高制剂或组合物的保质期或有效性。

[0085] 在实施本发明时,本发明采用的抗原的量或剂量范围通常是有效诱导、促进或增强与本发明的纳米颗粒、制剂或组合物相关的生理反应的量或剂量范围。

[0086] 当在本文中使用时,术语“癌症”时,可从选自包括但不限于胃肠道癌、头颈癌、神经系统癌、肾癌、肾细胞癌、视网膜癌、黑色素瘤、胃癌、肝癌、泌尿系统肿瘤、结直肠癌和膀胱癌、多发性骨髓瘤、胶质母细胞瘤、淋巴瘤、纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、骨肉瘤、脊索瘤、血管肉瘤、内皮肉瘤、淋巴管肉瘤、淋巴管内皮肉瘤、滑膜瘤、间皮瘤、尤因氏肉瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、结肠癌、胰腺癌、乳腺癌;ER-阳性乳腺癌;卵巢癌;鳞状细胞癌;基底细胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌;乳头状癌、乳头状腺癌、囊腺癌、髓样癌、支气管癌、肾细胞癌、肝细胞癌、胆管癌、绒毛膜癌、精原细胞瘤、胚胎癌、肾母细胞瘤、宫颈癌、子宫癌、睾丸肿瘤、肺癌、小细胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、胶质瘤;星形细胞瘤、髓母细胞瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤、松果体瘤、血管母细胞瘤、听神经瘤、少突胶质瘤、脑膜瘤、视网膜母细胞瘤和白血病、上皮癌、实体瘤和血液恶性肿瘤、转移癌。通常,癌症的治疗涉及减少癌细胞的存活、增殖和迁移或侵袭中的一种或多种。

[0087] 在本说明书中,术语“组合物”应被理解为指由人类人工制作的东西,并且不包括自然产生的组成。该组合物可以用于人类或动物使用。

[0088] 术语“哺乳动物”应被理解为指高等哺乳动物,尤其是人类。然而,该术语还包括非哺乳动物(例如鱼类)。所述人可以是婴儿、幼儿、儿童、青少年、成年人或老年人。所述哺乳动物可以是动物。

[0089] 本文中使用的术语“治疗(treat、treatment和treating)”指获得有益或预期结果(例如临床结果)的方法。

[0090] 本文使用的术语“预防(prevention)”可与“预防(prophylaxis)”互换使用,并且可以指感染或疾病的完全预防或该感染或疾病的症状发展的预防;感染或疾病或其症状的

延迟发作;或随后发生的感染或疾病或其症状的严重程度降低。

[0091] 如本文所用的,术语“疫苗”指免疫原性组合物,例如本发明的制剂,其是用于诱导提供保护性免疫的免疫反应(例如,保护受试者免受病原体感染和/或降低由病原体感染引起的疾病或病症的严重性,或防止癌细胞存活、扩散或生长)。

[0092] 如本文所用的,“免疫原性组合物”是包含本发明的纳米颗粒和抗原的组合物,其中向受试者施用该组合物导致受试者产生对该抗原的细胞免疫反应。在本文中,该术语可以与“疫苗制剂”互换使用。

[0093] 如本文所使用的,“多分散指数”(PDI)是基于尺寸的样本异质性度量。多分散性可以由同一物体中的粒径分布引起。测量多分散指数的方法在本领域是已知的。计算PDI的一种方法是来自称为Zetasizer(其使用了动态光散射)的机器中携带的累积分析。PDI可以采用0到1之间的值。多分散指数越低,纳米颗粒越均匀。值越接近1,粒径变化越大。在本文中,本发明的纳米颗粒或本发明制备的纳米颗粒通常具有0.26+/-0.10的PDI或更低。

[0094] 如本文所使用的,“CD8 T细胞反应”是对细胞毒性T细胞的诱导,细胞毒性T细胞表达CD8受体,并且可以杀死细胞、增殖并产生关于识别表达其靶抗原的细胞的细胞因子。

[0095] 如本文所使用的,“Th1反应”是对Th1细胞的诱导,Th1细胞属于CD4+T细胞谱系,其促进针对细胞内病原体和癌症的细胞介导免疫。Th1细胞产生特定的细胞因子,尤其是干扰素- γ ,这对其功能很重要。

附图说明

[0096] 参考附图,将从以下仅以示例方式给出的实施例的描述中更清楚地理解本发明,其中:

[0097] 图1:50nm PLGA纳米颗粒当与蛋白质抗原施用时促进CD8⁺T细胞反应和抗原特异性IFN- γ 。C5/BL/6小鼠在第0天和第14天通过肌肉内途径用带正电的(PLGA-DOTAP)或带负电的(PLGA-PhS)颗粒和卵清蛋白(OVA)免疫。在第21天,通过流式细胞术分析脾细胞,以使用四聚体对特异于H-2Kb OVA表位SIINFEKL的CD8⁺T细胞的百分比(A)和数量(B)进行定量。在所有情况中使用50nm聚苯乙烯(PS)颗粒作为阳性对照。结果显示为平均值 \pm SEM,符号代表个体动物。(C)用该抗原再刺激72h后,通过ELISA分析IFN- γ 分泌。

[0098] 星号表示根据多重比较ANOVA和Dunnett多重比较测试计算的统计差异,以确定与单独OVA比较的差异。

[0099] 图2:当与蛋白质抗原一起施用,较大的PLGA颗粒不能诱导CD8⁺T细胞反应和IFN- γ 。C57BL/6小鼠在第0天和第14天通过肌肉内途径用颗粒和卵清蛋白(OVA)免疫。在第21天,通过流式细胞术分析脾细胞,以使用四聚体对特异于H-2Kb OVA表位SIINFEKL的CD8⁺T细胞的百分比(A)和数量(B)进行定量。结果显示为平均值 \pm SEM,符号代表个体动物。(C)用该抗原再刺激72h后,通过ELISA分析IFN- γ 表达。聚苯乙烯纳米颗粒用作阳性对照(+Ctrl);所有组中抗CD3刺激是用于确认IFN- γ 产生(右边一组)。

[0100] 星号表示根据多重比较ANOVA和Dunnett多重比较测试计算的统计差异,以确定与单独OVA比较的差异。

[0101] 图3:50nm纳米颗粒通过免疫原性细胞死亡途径诱导抗原-特异性CD8 T细胞反应。在第0天和第14天,用单独OVA或与颗粒(PS)一起通过肌肉注射(i.m.)免疫小鼠。在初免和

增强免疫期间,通过腹腔注射(i.p.)或i.m.途径用250 μ g的坏死磷酰胺(NSF)处理小鼠,以抑制细胞焦亡。在第21天,通过流式细胞术使用四聚体测定特异于H-2Kb OVA表位SIINFEKL的脾CD8⁺T细胞的频率,结果显示为平均值 \pm SEM,符号代表个体动物。星号表示根据多重比较ANOVA和Dunnett多重比较测试计算的统计差异,以确定与OVA+50nm PS相比的差异。

[0102] 图4:Caspase 11(含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶11)对纳米颗粒诱导的抗原-特异性CD8反应是必需的。Caspase-11敲除(Casp11 KO)或野生型(WT)小鼠在第7天和第14天通过肌肉途径用50nm颗粒加OVA接种疫苗;单独OVA或PBS作为空白对照。在第21天,使用H-2Kb/OVA(SIINFEKL)MHC四聚体量化脾脏中的抗原特异性反应。(A)OVA特异性CD8⁺占总CD8⁺T细胞的百分比;(B)脾脏中OVA特异性CD8⁺T细胞的总数。统计的误差按照单因素方差分析和Bonferroni事后检验。星号表示显著差异,** $P < 0.01$,* $P < 0.05$ 。

[0103] 图5:使用PLGA 50:50、PLGA:DDA(双十八烷基溴化铵)或PLGA PhS(磷脂酰丝氨酸)1:1(w/w)配制的纳米颗粒的性质。配制后,使用Zetasizer-Nano Z系统对纳米颗粒进行表征,以使用激光多普勒微电泳测量水分散体中的zeta电位和电泳迁移率。尺寸(nm)、多分散指数(PDI)和zeta电位(ZP)在表格中显示。结果表示为平均值和标准差(SD),且代表至少两个单独批次的纳米颗粒。

[0104] 图6:说明了由50nm的PS纳米颗粒驱动的有效抗原特异性抗肿瘤免疫。A)荷瘤小鼠激发部位的肿瘤生长速率,显示为平均肿瘤体积 \pm SEM。使用双因素方差分析和Tukeys多重比较检验确定PBS和50nm接种小鼠之间的统计显著性,其中* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 和*** $p < 0.001$ 。(n=每组7只小鼠)。B)激发小鼠的Kaplan-Meier生存分析。使用Mantel-Cox检验确定PBS和50nm接种小鼠之间的统计显著性,其中* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 和*** $p < 0.001$ 。

[0105] 图7:聚合物颗粒的注射增强了抗原特异性抗体反应,与尺寸无关。根据之前对于(A)肌肉途径(10 μ g OVA+1mg颗粒或明矾)或(B)腹腔途径(1 μ g OVA、4mg颗粒或明矾)优化的剂量,在第0天和第14天用无内毒素卵清蛋白(OVA)或OVA与不同尺寸的颗粒免疫C57BL/6小鼠。对于皮下免疫,使用OVA(C)或葡萄球菌凝集因子A-C1fA(D,E)作为抗原(50 μ g OVA或1 μ g C1fA,4mg颗粒)。PBS用作空白对照组,Alhydrogel[®](明矾)用作i.m.和i.p.的金标准对照。在第21天,采集血样,通过ELISA测量血清中抗原特异性IgG滴度。在37 $^{\circ}$ C下,通过测量先前结晶紫染色的固定细菌中的Abs570nm,测试接种小鼠的血清抑制金黄色葡萄球菌粘附于纤维蛋白原的能力,以确定中和抗体。粘附性是表示为按照无血清情况下细菌粘附性计算的最大值(100%)相关的抑制百分比。结果显示为平均值 \pm SEM,每个符号代表个体动物。星号表示根据多重比较ANOVA和Dunnette检验计算的统计差异($p > 0.0001$),以确定与单独抗原相比的差异。在仅注射PBS的小鼠中未检测到特异性抗体。通过i.p.和s.c.进行的2个实验以及通过i.m.途径进行的1个实验为代表。

[0106] 图8:粒径影响抗体类型转换,但不影响抗体中和活性。在第7天和第14天,通过肌肉内途径(A-C)用颗粒和OVA或通过皮下途径(D-G)用颗粒和C1fA免疫小鼠。在第21天收集血清,通过ELISA分析抗原特异性IgG同种型。结果显示为平均值 \pm SEM,符号代表个体动物。星号表示根据多重比较ANOVA和Dunette检验计算的统计差异,以确定与单独抗原相比的差异。2个实验为代表。

[0107] 图9:50nm颗粒促进IgG2c类型转换所需的抗原特异性IFN- γ 的分泌。在第0天和第14天,通过肌肉途径用颗粒和OVA免疫小鼠。在第21天收集脾脏和血清。(A)用OVA重新刺激

的脾细胞,抗CD3作为阳性对照(内部一组),或左边未受刺激。IFN- γ 的产生通过ELISA确定。对于n=4/组,条形代表平均值 \pm SEM。(B)通过ELISA确定血清中OVA特异性总IgG滴度和同种型。结果显示为平均值 \pm SEM,符号代表个体动物。在所有组中,星号表示根据多重比较ANOVA和Dunnettest多重比较检验计算的统计差异,以确定与单独OVA相比的差异。

[0108] 图10:通过50nm颗粒唯一地诱导CD8⁺T细胞反应,与给药途径或聚合物无关。在第0天和第14天,通过i.m.(A)或i.p.(B)途径用单独OVA或与明矾或颗粒结合免疫小鼠。在第21天,通过流式细胞术分析脾细胞,以使用四聚体定量特异于H-2Kb OVA表位SIINFEKL的CD8⁺T细胞的数量。星号表示根据多重比较ANOVA和Dunnettest多重比较检验计算的统计差异,以确定与单独OVA相比的差异。通过i.m.的1个实验和通过i.p.的2个实验为代表。按照与之前相同的接种方案进行i.m.注射后,比较了50nm聚苯乙烯(PS)和50nm聚乳酸-乙醇酸共聚物(PLGA)的功效;(C)在第21天,通过流式细胞术分析脾细胞,以使用四聚体定量特异于H-2Kb OVA表位SIINFEKL的CD8⁺T细胞的数量(显示为平均值 \pm SEM)和(D)代表性点图。(E)显示了接种50nm PS、100nm PLGA或500nm PLGA后SIINFEKL特异性CD8⁺、CD44⁺T细胞的平均值 \pm SEM与各自的点图(F)。在脾细胞的离体刺激后通过ELISA测量了抗原特异性IFN- γ 反应,以比较50nm PS与50nm PLGA(G)和50nm PS与100nm和500nm PLGA(H)。星号表示根据多重比较ANOVA和Dunnettest多重比较检验计算的统计差异,以确定与单独OVA相比的差异。通过i.m.的1个实验和通过i.p.的2个实验为代表。

[0109] 图11:50nm颗粒诱导抗原特异性CD4⁺T细胞和长期CD8⁺T细胞记忆。(A)在第7天和第14天,使用单独I-Ab限制性流感核蛋白肽NP₃₁₁₋₃₂₅或与不同尺寸的PS颗粒或明矾(作为阳性对照)结合进行i.p.免疫WT小鼠。在第21天,使用二类(C-II)四聚体(Tmer)通过FACS评估脾脏中抗原特异性CD4⁺反应。接种50nm PS颗粒可以有效增加抗原特异性CD4⁺T细胞反应的数量。(B)使用通过NP₃₁₁₋₃₂₅与OVA结合(OVA-NP311)产生的融合抗原强化免疫后i.m.接种后7天,50nm PS还增强了NP₃₁₁₋₃₂₅ CD4⁺T细胞反应。(C)H-2Kb OVA表位SIINFEKL的CD8⁺T细胞的数量和百分比在用50nm PS和融合NP₃₁₁-OVA抗原进行i.m.初免/加强接种后的7天也上调了。(D)左上角的图显示在用PS+NP₃₁₁-OVA进行初免/加强i.m.接种后的100天,在脾脏中检测到了Ag特异性CD8⁺记忆T细胞。点图显示C-I Tmer⁺CD8⁺T细胞超过总CD8⁺淋巴细胞。蓝色直方图显示脾脏中C-I Tmer⁺记忆CD8⁺T细胞中CD69、CD103和CD62L的表面标记表达;灰色直方图显示每个标记的未染色对照。左下角的图显示了在接种后并用融合抗原重新刺激72小时的第100天通过ELISA测得采集的脾细胞中IFN- γ 的产量。条形代表平均值 \pm SEM。星号代表根据单因素方差分析和多重比较事后Dunnett检验的显著差异,*P \leq 0.05,*P \leq 0.01。(A)1个实验(n=5/组)的代表,(B)2个实验(n=3/组)的代表;(C)2个实验(n=3/组)的代表;(D)1个实验(n=3/组)的代表。

[0110] 图12:50nm PS纳米颗粒驱动有效的抗原特异性抗肿瘤免疫。在第0天和第14天用PBS、单独OVA(10 μ g)或50nm PS颗粒(1mg)加OVA(10 μ g)接种小鼠,然后按照(A)中在第28天通过3.5 \times 10⁵个B16-OVA肿瘤细胞进行s.c攻击。每天测量肿瘤。蜘蛛图(B)显示了按照肿瘤体积(mm³)测量的肿瘤的早期发展。每行代表个体小鼠。在攻击的早期阶段,荷瘤小鼠的百分比和Kaplan-Meier生存图描述在(C)中。荷瘤小鼠百分比的扩展分析和生存分析在(D)中显示。对于PBS和OVA组(n=19)和50nm+PS、50nm+OVA组(n=17)的荷瘤小鼠的分析。对于生存,PBS和OVA使用n=14,且50nm+OVA使用n=12。生存分析的统计显著性使用Mantel-Cox检

验确定,其中 $*p<0.05$ 、 $**p<0.01$ 和 $***p<0.001$ 。CP表示各组中完全免受肿瘤攻击的动物数相对于总数。

[0111] 图13:IL-1和IL-18信号分别调节纳米颗粒诱导的IFN- γ 和CD8⁺T细胞反应。按照之前的用单独OVA或与50nm颗粒结合通过i.m.途径免疫缺乏IL1-R1或IL-18的WT或小鼠。(A和E)通过ELISA测量在第21天获得的血清中抗原特异性体液反应。(B,C和F,G)图显示了接种小鼠在加强免疫7天后脾脏中OVA H-2Kb CD8⁺T细胞的百分比和数量。(D和H)通过ELISA进行体外分析,接种7天后和用OVA刺激72h后采集的脾细胞上清液中IFN- γ 分泌物的分析。星号表示统计差异,使用韦尔奇校正的非配对t检验用于比较ELISA每个菌株内的OVA与50nm+OVA或根据ANOVA和Dunnette的多重比较试验计算以确定接受相同处理的WT 50nm+OVA与敲除小鼠之间的差异。四聚体⁺细胞的定量是显示为Tmer⁺、CD8⁺、CD44⁺相对于活CD8⁺总数。星号表示与单独OVA的显著差异,ns:根据单向方差分析和Dunnette事后检验不显著。IFN- γ 的定量显示为平均值 \pm SEM;显示了50nm+OVA与单独OVA的显著差异。 $*p<0.05$ 、 $**p<0.01$ 和 $***p<0.001$ 。

[0112] 图14:Caspase 11是抗原特异性CD8反应所必需的。在第7天和第14天,通过肌肉途径向Caspase-11敲除(Casp11 KO)或野生型(WT)小鼠肌肉接种1mg 50nm颗粒加10mg OVA或颗粒、OVA和0.25mg Caspase 1抑制剂Y-VAD。在第21天,使用H-2Kb/OVA(SIINFEKL)MHC四聚体在脾脏中量化抗原特异性反应。PBS或单独OVA用作载体或单独抗原对照。(A)OVA特异性CD8⁺在总CD8⁺T细胞中的百分比;(B)脾脏中OVA特异性CD8⁺T细胞的总数。根据单因素方差分析和Bonferroni事后检验的统计差异。星号表示显著差异 $**P<0.01$, $*P<0.05$ 。

[0113] 图15:聚合物纳米颗粒独立于Caspase-1、Caspase-1-11或Gasdermin D诱导抗体反应。C57BL/6小鼠在第0天和第14天通过肌肉内途径用无内毒素卵清蛋白(OVA)或OVA和50nm聚苯乙烯颗粒免疫(10 μ g OVA+1mg颗粒)。PBS作为载体对照组。在第21天,采集血样,并在第28天通过ELISA测定血清中的抗原特异性IgG滴度。(A)为了评估caspase-1的作用,一组小鼠在初免和加强时接受了Caspase-1抑制剂Ac-YVAD-cmk和疫苗。(B)为了研究Caspase-11的作用,一组Caspase-11缺陷小鼠与野生型小鼠一起接种相同的制剂。(C)通过评价注射了疫苗的小鼠体内的抗体,评估Gasdermin D在体液反应中的作用,在初免和加强期间,该疫苗接种时通过肌肉或腹腔注射所述制剂获得Gasdermin D抑制剂坏死磷酰胺(NSF)。

[0114] 结果是显示为平均值 \pm SEM和每个符号代表个体动物。星号代表,根据多重比较ANOVA和Dunnette检验计算的统计差异($p>0.0001$),以确定与单独抗原相比的差异。以PBS组中的抗体作为基线以定义检测限。

[0115] 图16:50nm颗粒诱导肌管中的细胞死亡。C2C12小鼠成肌细胞被分化成肌管,并用指定浓度的50nm或1 μ m聚合物颗粒刺激过夜。根据LDH释放试验测量细胞死亡,并表示为细胞毒性百分比。尼日利亚霉素和脂多糖被用作细胞死亡的阳性对照。

[0116] 通过下述本发明的各种非限制性实施例的详细描述,本发明的其他优点和特征将变得显而易见。本文中引用的所有参考文献(包括说明书)通过引用将其全部并入本文。

具体实施方式

[0117] 细胞介导免疫的一种类型依赖于称为CD8⁺T细胞(具有细胞毒性活性)和Th1细胞

(其分泌IFN- γ)的细胞的增殖。Th1反应在某些急慢性疾病中是必需的。然而,许多广泛使用的佐剂(包括明矾)使免疫反应偏向于Th2反应,并且主要促进抗体反应。

[0118] 目前,缺乏可以促进Th1细胞介导反应的有效佐剂。同样,目前的临床佐剂无法诱导功能性CD8 T细胞反应,因为这些反应通常需要更高的激活阈值(同时激活CD4 T细胞和树突状细胞)。

[0119] CD8 T细胞对于抵御细胞内病原体(包括病毒、细菌、分枝杆菌和寄生虫)是必需的,且也有助于抵御癌症。CD8 T细胞具有直接杀死感染或恶性细胞的能力,且还可以提供激活免疫系统的细胞因子。细胞焦亡是一种程序性细胞死亡程序,其是与细胞膜孔形成、细胞质肿胀、细胞膜破裂和胞浆内容物(例如IL-1 β 和IL-18)释放到细胞外环境有关,增强局部或全身炎症反应。细胞焦亡被认为是由Gasdermins蛋白介导的。细胞焦亡分子途径的激活涉及Caspase-11的激活,其随后激活成孔蛋白Gasdermins D(GSDMD)。细胞焦亡途径成分的激活并不总是导致细胞死亡,但已证明通过活性氧物质的产生促进细胞内的过度激活状态。细胞死亡或细胞的过度激活都会诱导内源性免疫原性分子的释放,这些分子可以激活免疫系统并促进有效的免疫反应。这一途径已被证明促进感染期间的细胞免疫,但到目前为止,尚未证明颗粒佐剂能够促进细胞免疫。本发明人已经令人惊讶地发现,颗粒诱导涉及称为细胞焦亡的一种细胞死亡类型的途径的能力是其促进CD8反应的关键。

[0120] 本发明通过提供一种佐剂解决现有技术的问题,该佐剂可以令人惊讶地促进受试者对免疫原性物质的CD8 T细胞和/或Th1细胞介导的免疫反应。

[0121] 在一个实施例中,所述CD8 T细胞反应是一种由Caspase-11或Gasdermins D或由Caspase-11和Gasdermins D两者介导的反应。在一个实施例中,所述CD8 T细胞反应是一种由IL-1和/或IL-18介导的反应。

[0122] 在一个实施例中,所述CD8 T细胞反应是一种由Caspase 11、Gasdermins D、IL-1和IL-18介导的反应。

[0123] 在一个实施例中,所述Th1反应是一种由Caspase 11或Gasdermin D或由Caspase 11和Gasdermin D两者介导的反应。在一个实施例中,所述Th1反应是一种由IL-1和/或IL-18介导的反应。

[0124] 在一个实施例中,所述Th1反应是一种由Caspase 11、Gasdermins D、IL-1和IL-18介导的反应。

[0125] 该佐剂可以在无需辅佐剂的情况下引起这种效果。这与现有技术的聚合物颗粒形成对比,现有技术的聚合物颗粒在使用中需要辅佐剂。这简化了制剂并限制了不想要的炎症反应或毒性,这些反应或毒性与辅佐剂有关联,辅佐剂可以是有效的,但也具有显著的反应性,例如To11样受体激动剂。

[0126] 本发明人已经证明了能够在受试者中诱导Th1和CD8保护反应的纳米颗粒的准确尺寸。这在之前没有报道过。

[0127] 该佐剂是聚合物纳米颗粒(本文称为“本发明的纳米颗粒”)。

[0128] 本发明提供了一种生物相容性聚合物纳米颗粒(即本发明的纳米颗粒),用于诱导受试者的CD8反应和/或Th1反应。这种反应是一种针对免疫原性物质的反应。在一个实施例中,同时引起CD8反应和Th1反应。这对癌症和病毒疫苗应用特别有益。

[0129] 免疫原性物质是如本文所描述的。

[0130] 本发明的纳米颗粒包括生物相容性聚合物。可以使用任何合适的聚合物。所述生物相容性聚合物可从选自但不限于包括PLGA、PLA、聚磷腈和壳聚糖的组。优选地,所述纳米颗粒是聚(D,L-丙交酯-共-乙交酯)(PLGA)聚合物纳米颗粒。

[0131] 本发明的纳米颗粒很小,优选具有从约30nm至约80nm的直径(即粒径)。优选地,所述颗粒具有从约40nm至60nm,或50nm至60nm尺寸的直径,通常为35nm、40nm、45nm、50nm、51nm、52nm、53nm、54nm、55nm、56nm、57nm、58nm、59nm、60nm、61nm、62nm、63nm、64nm、65nm、70nm或75nm尺寸的直径。它可以小于或等于这些值。

[0132] 本发明的纳米颗粒可以是可生物降解的。它可以是不可降解的。

[0133] 本发明的纳米颗粒可以具有0.36或更小的PDI,优选为0.26或更小。它可以在1.6和3.6之间。具有低多分散性的优点意味着大多数颗粒具有理想的尺寸,以增强CD8和/或Th1反应。这也具有减少所需的佐剂剂量的潜力,因为所述颗粒都在驱动这种有益反应的范围内。

[0134] 本发明的纳米颗粒可以具有正电荷、中性电荷或负电荷。通常,纳米颗粒的效果与其电荷无关。

[0135] 本发明的纳米颗粒是大小和形状均匀的。通常,所述纳米颗粒基本上是球形的。

[0136] 本发明的纳米颗粒可以是多种纳米颗粒。

[0137] 本发明的纳米颗粒可以进一步包括辅佐剂。辅佐剂是本领域已知的,所有合适的辅佐剂都包含在本文中。

[0138] 本发明的纳米颗粒不含内毒素。现有技术中报告的PLGA制造方法经常引入污染物,例如内毒素,其作为辅佐剂。由于不含内毒素,也使得本发明的颗粒适用于人类。特别地,所述纳米颗粒是实心或空心颗粒。

[0139] 本发明的方法或本发明的应用中使用的纳米颗粒可以是本发明纳米颗粒的制剂,或包括本发明纳米颗粒的组合物。两者均如本文所述。

[0140] 在一个实施例中,本发明提供了本发明纳米颗粒的制剂。通常,所述制剂中的纳米颗粒的平均尺寸或尺寸分布的平均值在从约30nm至80nm,优选从约40nm至约60nm,或52nm和65nm,通常为从约52至60nm。优选地,制剂中至少80%的纳米颗粒具有从约30nm至约80nm尺寸的直径,优选从40nm至60nm。优选地,至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%的纳米颗粒具有从约30nm至约80nm尺寸的直径,优选从40nm至60nm。优选地,所述颗粒具有从约50nm至60nm尺寸的直径,通常为35nm、40nm、45nm、50nm、51nm、52nm、53nm、54nm、55nm、56nm、57nm、58nm、59nm、60nm、61nm、62nm、63nm、64nm、65nm、70nm或75nm。它可以小于或等于这些值。

[0141] 本发明提供了一种包括本发明纳米颗粒的组合物。该组合物可以进一步包括至少一种免疫原性物质。

[0142] 通常,所述免疫原性物质是一种抗原。抗原的实例包括含多肽的抗原、含多糖的抗原和含多核苷酸的抗原等。抗原可以是衍生的,例如,可以从肿瘤细胞和病原体(例如病毒、细菌、真菌和寄生虫等)中衍生。应当意识到抗原可以是情况所需的任何合适抗原。

[0143] 所述抗原可以是任何合适的抗原。实例包括但不限于结核抗原(例如H56)、肺炎球菌抗原(例如溶血素、PspA、结合肺炎球菌多糖)、包括流感抗原在内的病毒抗原(例如流感核蛋白、神经氨酸酶、血凝素,或人乳头状瘤病毒蛋白和肽)、肿瘤衍生抗原(例如癌胚抗原

(CEA), T细胞识别的黑色素瘤抗原 (MelanA/Mart-1), MUC-1、NY-ESO-1、生存素 (Surviving)、HER2/neu、GM2等或其组合。

[0144] 应理解所述组合物可以包括多种纳米颗粒。通常, 制剂中的纳米颗粒的平均尺寸或尺寸分布的平均值在从约30nm至80nm, 优选为40nm至60nm, 或约52nm和65nm, 通常为从约52至60nm。优选地, 制剂中至少80%的纳米颗粒具有从约30nm至约80nm尺寸的直径。优选地, 至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%的纳米颗粒具有从约30nm至约80nm的直径, 优选从40nm至60nm。优选地, 所述颗粒具有从约50nm至60nm的直径, 通常为35nm、40nm、45nm、50nm、51nm、52nm、53nm、54nm、55nm、56nm、57nm、58nm、59nm、60nm、61nm、62nm、63nm、64nm、65nm、70nm或75nm。它可以小于或等于这些值。

[0145] 可以通过本领域已知的任何适当方法将纳米颗粒和免疫原性物质(其可以是至少一种抗原)结合在组合物中。例如, 所述颗粒可以与免疫原性物质混合。在这样的实例中, 所述纳米颗粒和所述抗原是可逆转地结合在一起和/或包封。与现有技术相比, 在本实施例中, 不需要将免疫原性物质包封或不可逆转地结合到所述纳米颗粒。在该实施例中, 在组合物中所述抗原可以吸收到所述纳米颗粒和/或与所述纳米颗粒混合, 即所述抗原可以游离在组合物中。

[0146] 在一个实施例中, 所述免疫原性物质可以包埋或包封在所述纳米颗粒。

[0147] 所述免疫原性物质可以附着于所述纳米颗粒。

[0148] 本发明提供了一种包括本发明的制剂和至少一种抗原的组合物。

[0149] 本发明的组合物可以是疫苗。本发明的疫苗可以是预防性的。本发明的疫苗可以是治疗性的。特别地, 本发明的组合物是适用于抗癌和抗病毒疫苗或针对细胞内细菌和寄生虫的疫苗。

[0150] 所述组合物可以进一步包括医药上可接受的载体或盐。

[0151] 本发明的组合物可以是药物组合物。

[0152] 在一个实施例中, 所述组合物可以进一步包括佐剂或辅佐剂。此类佐剂在本领域中是已知的, 且在此涵盖所有合适的佐剂。

[0153] 所述组合物可以进一步包括活性剂。所述活性剂可以是任何已知的活性剂, 例如药物。所述活性剂可以是用于癌症治疗的药物, 例如化疗药物。

[0154] 本发明还提供包括本发明纳米颗粒的制剂。本发明公开的与本发明组合物有关的所有特征同样适用于所述制剂。

[0155] 提供了一种包括本发明纳米颗粒或本发明制剂的组合物。所述组合物可以是免疫原性组合物或药物组合物。在本发明的具体实施例中, 在使用中, 所述组合物可以注射到肿瘤中, 并与内源性释放的癌症抗原作用, 以引起Th1和CD8 T细胞反应, 而不是在给药之前将纳米颗粒与抗原混合。

[0156] 提供了包括本发明纳米颗粒的佐剂。所述纳米颗粒可以包括至少一种抗原。

[0157] 还提供了一种向受试者接种疫苗的方法。所述方法涉及向所述受试者施用本发明的组合物或本发明的纳米颗粒。所述受试者可以是人或动物。递送可以通过任何已知方法或如本发明所述进行。

[0158] 还提供了一种向受试者递送免疫原性物质或抗原以诱导对该物质或抗原的免疫

反应的方法。所述方法包括向受试者施用本发明的纳米颗粒、制剂或组合物。

[0159] 还提供了一种将本发明的纳米颗粒、制剂或组合物传递给受试者的方法。这可以用于治疗、预防或诊断目的。所述受试者可以是人或动物。递送可以通过任何已知方法或如本发明所述进行。

[0160] 本发明还提供了一种治疗或预防受试者疾病或病症的方法，包括向受试者施用治疗有效量的本发明纳米颗粒、制剂或组合物的步骤。所述受试者可以是人或动物。疾病和病症如本发明所公开的。

[0161] 本发明还提供了一种在受试者中诱导Th1反应和/或CD8 T细胞反应的方法。所述方法包括向受试者施用治疗有效量的本发明的纳米颗粒、制剂或组合物。

[0162] 本发明还提供了本发明的纳米颗粒、制剂或组合物用作治疗或预防受试者疾病或病症的佐剂。

[0163] 本发明还提供了本发明的纳米颗粒、制剂或组合物用于治疗或预防受试者的疾病或病症。所述受试者可以是人或动物。所述疾病或病症可以是病毒感染或细菌感染。所述疾病或病症可以是任何靶点癌症。

[0164] 这些疾病包括但不限于病毒感染，例如SARS-CoV-2、流感、肝炎、带状疱疹、登革热、寨卡病毒；或由细胞内细菌引起的感染，例如单核细胞增生李斯特氏菌、流产布氏杆菌，或需要巨噬细胞的有效激活用于细胞内杀灭的细菌，例如B型链球菌、金黄色葡萄球菌、肺炎链球菌等；分枝杆菌包括但不限于结核分枝杆菌、细胞内寄生虫或具有细胞内发育阶段的寄生虫，例如弓形虫、利什曼原虫和疾病（例如癌症）。Th1反应对于治疗或预防这些疾病是必需的。

[0165] 引入或施用方法包括但不限于皮内、肌肉内、腹腔内、静脉内、粘膜、皮下、鼻内，例如气溶胶、硬膜外、脑内、舌下、肿瘤内和口腔途径。通常，本发明的纳米颗粒或制剂配制为通过注射施用。当然，对于口腔或舌下，不需要注射。对于皮内施用，可以使用带有微针的贴片。制剂或组合物可以通过任何方便的途径施用，例如通过输液或灌注，通过上皮或内粘膜（例如口腔粘膜、直肠和肠粘膜等）吸收。施用可以是全身或局部的。此外，希望通过任何合适的途径将本发明的制剂或组合物引入中枢神经系统，包括脑室内和鞘内注射；脑室内注射可以通过脑室内导管来实施，例如，连接到储液囊，例如Ommaya储液囊。也可以采用肺部施用，例如通过使用吸入器或雾化器以及使用雾化剂的制剂。优选地，施用的方法是通过肌肉内施用。

[0166] 测量粒径的方法是本领域已知的。聚合物纳米颗粒的粒径可以使用Malvern nano ZS通过动态光散射(DLS)来确定。所述方法可以按照所附实施例中所描述的进行。

[0167] 本发明的纳米颗粒可以使用本领域任何已知的合适方法制备，例如微流控技术。所述方法可以按照所附实施例中所描述的进行。

[0168] 在使用中，本发明的组合物是用于向受试者接种疫苗。在受试者接种疫苗后，本发明的纳米颗粒促进所述受试者中CD8 T细胞和/或Th1细胞的产生。特别地，颗粒的小尺寸使这种技术效果能够发生。

[0169] 本发明人已经证明本发明的PLGA颗粒是CD8 T细胞和细胞因子IFN- γ 的抗原特异性分泌的有效诱导剂。IFN- γ 是Th1反应的标志。这些结果在图1A、B和C进行说明。本发明人进一步证明这种反应不能由较大的PLGA颗粒驱动（如图2A和2B所示出的）。本发明提供了一

种新的策略,通过使用纯化抗原和可生物降解的PLGA颗粒接种疫苗以诱导有效的CD8和Th1反应,这在之前还没有被描述。

[0170] 本发明人还证明了本发明的50nm纳米颗粒诱导CD8反应的能力是取决于与细胞焦亡(程序性免疫原性细胞死亡)相关的途径。在图3和图4对此进行说明。发明人提供了一种新的用于佐剂诱导细胞免疫的机制。

[0171] 本发明人已经令人惊讶地发现,颗粒诱导称为细胞焦亡的细胞死亡类型的能力是其促进CD8反应能力的关键。

[0172] 举例

[0173] 现在将参考具体实例描述本发明。这些仅仅是示例性的,并且仅用于说明性的目的:它们不是旨在以任何方式限制所要求保护的权利要求或本发明所描述的范围。这些实例构成了目前用于实施本发明的最佳模式。

[0174] 实施例

[0175] 实施例1

[0176] 当与蛋白质抗原一起施用,50nm PLGA纳米颗粒促进CD8⁺T细胞反应和IFN- γ 。

[0177] 材料和方法

[0178] C57BL/6小鼠在第0天和第14天通过肌肉途径用2mg颗粒(50nm)和20 μ g卵清蛋白(OVA)免疫。在第21天,通过流式细胞术分析脾细胞,以使用四聚体定量H-2Kb OVA表位SIINFEKL特异性CD8⁺T细胞的百分比(图1A)和数量(图1B),并在用抗原重新刺激后评估脾细胞中的IFN- γ 分泌(图1C)。

[0179] 在第1天和第14天,用1mg带正电荷或负电荷的生物相容性不可降解聚苯乙烯颗粒(根据之前用羧基或胺基衍生)与10 μ g抗原OVA-NP311混合(其是由卵清蛋白和流感核蛋白肽NP311-325组成的融合蛋白)免疫其他小鼠。在第21天,通过流式细胞术分析脾细胞,以使用四聚体定量H-2Kb OVA表位SIINFEKL特异性的CD⁺8T细胞百分比(图1D)。

[0180] 结果和分析

[0181] 结果显示为平均值 \pm SEM,符号代表个体动物。图1(C)说明了用抗原重新刺激72h后通过ELISA分析的IFN- γ 表达。

[0182] 这些结果表明,本发明的PLGA颗粒是CD8⁺T细胞和细胞因子IFN- γ (其是Th1反应的标志)的有效诱导剂(图1A、B和1C)。

[0183] 这些结果表明,纳米颗粒可以诱导抗原特异性CD8反应,与聚合物的电荷或降解性无关(图1D)。

[0184] 实施例2

[0185] 当与蛋白质抗原一起施用,较大的PLGA纳米颗粒(100nm和500nm)不能诱导CD8⁺T细胞反应和IFN- γ 。

[0186] 材料和方法

[0187] C57BL/6小鼠在第0天和第14天通过肌肉内途径用颗粒(100nm和500nm)和卵清蛋白(OVA)免疫。在第21天,通过流式细胞术分析脾细胞,以使用四聚体定量H-2Kb OVA表位SIINFEKL特异性CD8⁺T细胞的百分比(A)和数量(B)。

[0188] 结果和结论

[0189] 结果显示为平均值 \pm SEM,符号代表个体动物。图2(C)说明了用抗原重新刺激72小

时后通过ELISA分析的IFN- γ 表达。聚苯乙烯纳米颗粒用作阳性对照(+Ctrl)。

[0190] 图1所示的使用本发明颗粒的反应不能由其他较大尺寸的PLGA颗粒驱动(图2A-B)。

[0191] 实施例3

[0192] 50nm纳米颗粒通过细胞焦亡依赖途径诱导抗原特异性CD8⁺T细胞反应。

[0193] 材料和方法

[0194] 小鼠在第0天和第14天通过肌肉内(i.m.)途径用单独OVA或与50nm颗粒一起免疫。在初免和加强期间通过腹腔(i.p.)或i.m.途径用250 μ g坏死磷酰胺(NSF)处理小鼠以抑制细胞焦亡。在第21天,通过流式细胞术分析脾细胞,以使用四聚体定量H-2Kb OVA表位SIINFEKL(SEQ ID NO.1)特异性CD8⁺T细胞的百分比(图3)。

[0195] 结果和结论

[0196] 结果显示为平均值 \pm SEM,符号代表个体动物。星号表示根据多重比较ANOVA和Dunnett多重比较检验计算的统计差异,以确定与OVA+50nm PS相比的差异。

[0197] 本发明人证明了,这些小PLGA纳米颗粒诱导CD8反应的能力是取决于程序性坏死(图3)。图4显示了50nm颗粒需要Caspase 11(一种涉及细胞焦亡的蛋白质)来驱动CD8反应。

[0198] 实施例4

[0199] 50nm粒径的阴离子聚合物纳米颗粒的制备和粒径计算。

[0200] 材料和方法

	材料	供应商
	PLGA 50:50	Sigma Aldrich
[0201]	磷脂酰丝氨酸(脑PS)	Lipoid
	Tris 缓冲液 pH 7.4 10 mM	Oxoid
	DMSO	Fisher Scientific

[0202] 纳米颗粒制剂

[0203] 脂质和聚合物储备液和缓冲液的制备

[0204] 步骤1:脂质和聚合物一起称重并溶解在DMSO中。如有需要可选地使用加热和水浴超声来实现物质的完全溶解。

[0205] 聚合物和脂质的最终总浓度为0.5mg/mL,即0.25mg/mL的PLGA和0.25mg/mL的PS。

[0206] 重量比1:1

[0207] 步骤3:Tris缓冲液制备为10mM和pH 7.4。注意:使用0.1M HCl调节pH值。

[0208] 步骤4:使用0.22 μ m过滤器过滤缓冲液,以避免任何杂质或污染。

[0209] 微流体

[0210] 步骤5:聚合物纳米颗粒(NP)的理想最终浓度为20mg/mL,因此,使用NanoassemblrTM(Precision Nanosystems, Inc.)产生160mL的颗粒,流速比为1:1,总流速为10mL/min。初始和最终废物体积分别为0.35和0.05。

[0211] 切向流过滤(TFF)

[0212] 步骤6:为了去除溶剂并将颗粒浓缩到所需的浓度,使用了切向流过滤(Spectrum

Labs)。使用TFF将160mL聚合物NP浓缩至2mL,并使用24mL Tris缓冲液(10mM,pH 7.4)清洗溶剂(12次清洗)。

[0213] 步骤7:测量所得颗粒的尺寸、PDI和ZP。如果结果在所需范围内,则颗粒就准备完成。

[0214] 注意:如果颗粒大于预期(因为所需的颗粒范围是非常窄的),可以使用Bioruptor对颗粒水浴超声90s(1个循环)。

[0215] 分析技术

[0216] 使用Malvern ZS测量粒径、尺寸分布和Zeta电位。

[0217] 使用Malvern nano ZS (Malvern Instruments,Worcestershire,UK)通过动态光散射(DLS)测定聚合物纳米颗粒的粒径。在25℃下对样品进行了三次测量,样品事先在Tris缓冲液(pH7.4,10mM)中稀释(10倍稀释)并使用0.22μm过滤,以获得最佳衰减器数量(att.7-9)的最佳颗粒浓度。用1mL样品充满方形一次性塑料反应杯,并放置在使用4mW He-Ne 633nm激光的仪器中分析样品。对于Zeta电位,按照用于尺寸测量的相同方式稀释样品,并使用细胞毛细管电泳反应杯。使用了Malvern Dispersion Technology Software (DTS) v.7.12 (Malvern Instruments,Worcestershire,UK)进行收集和数据分析。

[0218] 液态产品关键产品参数(KPP)的定义

[0219] 为了确保产品可以参考其物理化学特征可靠地定义,您的制剂HSPC:Chol:DSPE-PEG2000:DOX会使用以下方法表征:

试验	解释	规格
1. 外观	质量测试	
[0220] 2. 粒径&粒径分布	囊泡尺寸和尺寸分布会使用光子相关谱法和激光衍射测量(按照合适的方法)	尺寸: 50-60 nm PDI: 0.15 - 0.25
3. 颗粒表面电荷	将测量 zeta 电位以给出双分子层组成的指示	高阴离子 Zeta 电位: -65 mV

[0221] 实施例5

[0222] 制备粒径为50nm的阳离子聚合物纳米颗粒

材料	供应商
聚乳酸-乙醇酸共聚物 (PLGA) 50: 50 Mw: 30,000 – 60,000	Sigma Aldrich
[0223] 双十八烷基二甲基(溴化铵)(DDA)	Avanti Polar Lipids
Tris 缓冲液 pH 7.4 10 mM 氯仿: 甲醇	Oxoid Fisher Scientific

[0224] 纳米颗粒制剂

[0225] 脂质和聚合物原料储备液及缓冲液的制备

[0226] 步骤1.单独的脂质和聚合物溶解在氯仿:甲醇(9:1v/v)的混合物中。储备液浓度制备为:

- [0227] -PLGA 50:50:20mg/mL,溶于氯仿:甲醇(9:1v/v)
- [0228] -DDA:20mg/mL,溶于氯仿:甲醇(9:1v/v)
- [0229] 步骤2.将两种储备液混合在一起,并倒入圆底烧瓶中
- [0230] 重量比1:1
- [0231] 最终浓度:20mg/mL
- [0232] 最终体积:2mL
- [0233] 步骤3.Tris缓冲液制备为10mM和pH 7.4。
- [0234] 注意:使用0.1M HCl调节pH值
- [0235] 步骤4.使用0.22 μ m过滤器过滤缓冲液以避免任何杂质或污染。
- [0236] 使用类脂膜和水浴超声波仪制造阳离子聚合物制剂
- [0237] 步骤5.使用旋转蒸发器在200rpm下蒸发有机溶剂15min
- [0238] 步骤6.使用2mL过滤后的Tris缓冲液(10mM,pH 7.4)对类脂膜再水化,直至完全溶解
- [0239] 步骤7.将阳离子聚合物颗粒转移到15mL离心管中,并将其放入Bioruptor® Plus超声波仪(Diagenode,Liege Science Park,3 Rue bois Saint Jean,4102 Ougrée,Belgium)
- [0240] 该系统使用来自放置在水箱下方磁铁的超声波,并将超声波能量间接转移给样品。
- [0241] 步骤8.运行一个周期:一个周期90s(x 10次),两个周期之间有30s的延迟
- [0242] 分析技术
- [0243] 步骤9.使用Malvern ZS测量粒径、粒径分布和Zeta电位
- [0244] 使用Malvern nano ZS (Malvern Instruments,Worcestershire,UK)通过动态光散射(DLS)测定聚合物纳米颗粒的粒径。在25 $^{\circ}$ C下对样品进行了三次测量,样品事先在Tris缓冲液(pH7.4 10mM)中稀释(10倍稀释),并使用0.22 μ m过滤以获得最佳衰减器数量(att.7-9)的最佳颗粒浓度。用1mL稀释的样品充满方形一次性塑料反应杯,并放置在使用4mW He-Ne 633nm激光的仪器中分析样品。对于Zeta电位,按照用于尺寸测量的相同的方式稀释样品,并使用细胞毛细管电泳反应杯。使用了Malvern Dispersion Technology Software (DTS) v.7.12 (Malvern Instruments,Worcestershire,UK)进行收集和数据分析。
- [0245] 液态产品关键产品参数(KPP)的定义

	试验	解释	Specification
[0246]	1. 外观	质量测试	
	2. 粒径&粒径分布	囊泡尺寸和尺寸分布会使用光子相关谱	尺寸: ~55-65 nm
		法和激光衍射测量(按照合适的方法)	PDI: 0.15 - 0.25
[0247]	3. 颗粒表面电荷	将测量 zeta 电位以给出双分子层组成的指示	高阳离子 Zeta 电位: +70 mV

[0248] 实施例6

[0249] 小鼠的抗原特异性抗肿瘤免疫。

[0250] 材料和方法

[0251] 在第0天和第7天用PBS、单独OVA肽(10 μ g)或50nm PS颗粒(1mg)加OVA肽(10 μ g)接种小鼠,然后用 3.5×10^5 B16-OVA肿瘤细胞进行s.c攻击。

[0252] 结果和结论

[0253] 如图6A和B所示,由50nm PS纳米颗粒驱动了有效的抗原特异性抗肿瘤免疫。图6A显示了诱导后22天没有肿瘤生长,图6B显示了诱导后20天100%存活。

[0254] 实施例7

[0255] 粒径不影响抗体的数量或中和能力,但影响同种型类型转换。

[0256] 传统预防性疫苗的成功主要依赖于诱导对T细胞依赖性表位的持久抗体反应。因此,疫苗设计和佐剂发现使用抗体滴度和中和活性作为疫苗效力和佐剂性的主要相关因素。

[0257] 因此,发明人评估了粒径如何影响抗体反应的数量和质量。聚合物聚苯乙烯(PS)颗粒是具有内在佐剂特性的生物相容性颗粒,其与包括PLGA在内的其他可生物降解聚合物相比可以更好地控制粒径。因此,选择直径为50nm至100 μ m的PS颗粒作为模型颗粒佐剂。

[0258] 将PS颗粒与OVA以预先确定的抗原/颗粒比例(针对肌肉内(i.m.)、腹腔内(i.p.)或皮下(s.c.)施用而优化)混合。在第0天和第14天用载体、单独OVA或PS+OVA接种小鼠,并在第21天评估在血清中OVA特异性IgG反应。所有粒径为50nm-30 μ m的颗粒引起强烈的OVA特异性IgG反应,尽管较大的100 μ m颗粒通过i.p.给予效率稍低。PS颗粒诱导的反应与通过i.m.(图7A)和i.p.途径(图7B)通过金标准佐剂明矾诱导的OVA特异性IgG滴度数量相当。发明人先前证明了当s.c.给予时,400nm范围内的PLGA颗粒诱导抗原特异性抗体。为了测定PS颗粒是否能引起类似的反应,按照上述方案用PS+OVA通过s.c.接种小鼠,并测试了纳米范围(200nm和430nm)内的其他尺寸。同样,在s.c.接种后,所有粒径都诱导了强劲的OVA特异性IgG,包括纳米范围内的所有粒径(图7C)。最后,为了确定颗粒是否能够诱导对临床相关抗原的保护性体液反应,用与颗粒混合的重组葡萄球菌凝集因子A(C1fA)通过s.c.接种小鼠。C1fA是金黄色葡萄球菌的一种表面蛋白和毒力因子,与纤维蛋白原和纤维蛋白结合,在体内和体外促进细菌粘附于血凝块和包裹在血浆蛋白中的生物材料。可通过中和抗C1fA的抗体来阻断细菌的粘附,这允许发明人通过测量接种小鼠的血清在体外抑制金黄色葡萄球菌粘附到固定化纤维蛋白原的能力来确定用颗粒接种后诱导的抗体的功能性。所有粒径范围内的颗粒均诱导C1fA IgG(图7D),并显示出相当的中和活性(图7E)。

[0259] 最后,发明人通过分析抗体同种型来评估体液反应的质量。所有测试粒径的颗粒通过i.m.(图8A)和s.c.(图8D)均诱导相当的IgG1滴度,当s.c.给予C1fA(图8E)时,多种粒径诱导了IgG2b。特别地,在i.m.接种OVA(图8C)或s.c.接种C1fA(图8F)后,只有50nm的颗粒诱导类型转换为IgG2c。总之,这些数据表明虽然抗体的体液反应和功能整体数量与粒径无关,但通过用50nm颗粒调节类型转换,粒径能决定抗体反应的质量,呈现出选择性诱导抗原特异性IgG2c的独特能力。IgG2c反应需要IFN。因此,IgG2c的选择性增强帮助发明人发现颗粒在促进Th1反应方面是有效的。

[0260] 实施例8

[0261] 抗原特异性IFN- γ 的尺寸依赖性诱导驱动IgG2c类型转换。

[0262] 抗体同种型转换受T淋巴细胞衍生细胞因子影响。在啮齿动物中,IL-4促进向IgG1和IgE的转换,而IFN- γ 分别刺激C57/BL6或BALB/c小鼠的IgG2c/IgG2a。之前,发明人证明与明矾相比,与OVA或结核候选抗原H56结合的50nm聚苯乙烯颗粒具有更高的诱导Th1反应的能力。假设小纳米颗粒促进IgG2c类型转换的这一独特能力与其相比于较大颗粒驱动IFN- γ 分泌的优越能力有关。为了验证这一假设,通过抗原重新刺激离体脾细胞来评估细胞因子的分泌,这些脾细胞获得于之前i.m.接种OVA和不同尺寸PS的小鼠。与哪些从仅接种抗原或与任何其他粒径结合接种的小鼠获得的脾细胞相比,来自用50nm PS颗粒接种的动物的脾细胞是唯一在OVA后显著上调IFN- γ 分泌的细胞(图9A)。IFN- γ 敲除(*Ifng*^{-/-})小鼠用50nm PS+OVA的接种不能诱导IgG2c,证明IFN- γ 对IgG2c转换是基本的,而在*Ifng*^{-/-}和野生型(WT)小鼠中,IgG、IgG1和IgG2b水平保持相差不多(图9B)。这些结果证明50nm颗粒促进IFN- γ 驱动的抗体类型向IgG2c转换。

[0263] 实施例9

[0264] 颗粒直径决定持久抗原特异性CD8⁺和CD4⁺T细胞反应的诱导,与疫苗接种途径无关,并针对黑色素瘤给予保护。

[0265] 颗粒的固有特性(例如尺寸、几何形状和疏水性)影响CTL和IFN- γ 反应的诱导,但其他因素(例如免疫途径)也起着重要的作用。通过主要影响抗原和佐剂向淋巴结转运的动力学,这些因素可以影响靶向DC亚群,且因此影响CD8⁺T细胞交叉启动的效率。小纳米颗粒(>200nm)在注射部位被局部吸收,但也可以在注射后短时间内自由到达淋巴结,直接靶向驻留的DC,包括CD8 α ⁺DC和浆细胞样DC(pDC),它们专门用于抗原的交叉呈递和CD8⁺T细胞的启动。相反,<200nm的颗粒更有可能被注射部位的驻留细胞吸收,这些细胞将颗粒运送到淋巴结。虽然小的纳米尺寸颗粒可以有效地启动CTL反应,但颗粒的固有特性(例如尺寸与免疫策略的影响)对颗粒制剂诱导CD8⁺T细胞反应的相对贡献尚未完全解决。为了解决粒径是否可以独立于接种途径驱动CTL,发明人评估了用混合OVA和不同直径的颗粒免疫后的抗原特异性CD8⁺T细胞反应,使用之前相同的初免/加强方案进行i.p.或i.m.施用。在加强7天后,通过流式细胞术使用H-2Kb OVA表位SIINFEKL的四聚体对抗原特异性CD8⁺T细胞反应进行定量。值得注意的是,只有50nm颗粒诱导i.p.或i.m.接种动物的脾脏中抗原特异性CD8⁺T细胞的显著增加(图10A-B),这表明尺寸而不是给药途径是通过聚合物颗粒启动CD8⁺T细胞反应的关键。

[0266] 为了研究颗粒组成是否影响这种反应,还比较了接受单独生物相容性OVA或与50nm PS颗粒或直径为50-60nm、100nm和500nm的可生物降解PLGA颗粒结合的小鼠中的抗原特异性CD8⁺T细胞。重要的是,只有50nm PLGA颗粒在i.m.接种后能够诱导大量抗原特异性CD8⁺T细胞反应,与通过50nm PS颗粒引起的CTL反应相当(图10C-D)。相比之下,100nm和500nm颗粒不能刺激CD8⁺T反应(图10E-F)。同样,当用抗原体外刺激时,只有来自接种50nm PLGA颗粒的动物的脾细胞诱导了抗原特异性IFN- γ 的产生,与来自接种50nm PS颗粒的小鼠的脾细胞(图10G)相当。然而,从用抗原和100nm或500nm PLGA免疫的动物分离的脾细胞中未检测到IFN- γ (图10H),这表明决定诱导Th1反应的是尺寸而不是聚合物组成。

[0267] 为了确定尺寸是否也影响CD4⁺T细胞反应,用单独流感A核衣壳蛋白肽(SEQ ID NO.2) QVYSLIRPNENPAHK(NP₃₁₁₋₃₂₅)或与颗粒结合接种小鼠。NP₃₁₁₋₃₂₅(C57BL/6小鼠中已知的II类限制性表位)的使用,使我们克服OVA I-A(b)四聚体的不良性能,因为用于NP₃₁₁₋₃₂₅的

合适MHC-II四聚体是可用的。明矾被用作阳性对照,且正如所预测的(McKee et al, International Immunology, 20, 659-669, 2008),它在第21天诱导了最高增加的抗原特异性CD4⁺T细胞。50nm PS颗粒在其诱导Ag-特异性CD4⁺T细胞反应的能力方面跟随明矾,而与单独抗原相比,其他测试的尺寸均未诱导显著反应(图11A)。为了证明50nm颗粒在与蛋白质加上肽混合(通过i.m.途径)时能够诱导CD4⁺T细胞反应,用通过OVA and NP₃₁₁₋₃₂₅化学结合产生的融合抗原(NP₃₁₁-OVA)与50nm颗粒混合或单独NP₃₁₁-OVA对小鼠i.m.接种。加强后7天,在接受50nm PS+NP₃₁₁-OVA的小鼠的脾脏中NP₃₁₁₋₃₂₅特异性CD4⁺T细胞的数量增加(图11B)。正如所料,这些动物还上调了SIINFEKL I类限制性CD8⁺T细胞(图11C)。在加强后100天,评估了50nm颗粒诱导的抗原特异性T细胞反应的幅度。用NP₃₁₁-OVA+50nm颗粒接种的动物中,I类SIINFEKL特异性CD8⁺T细胞仍上调,与那些仅接受抗原的动物相反(图11D,左上图和点图)。这些细胞的特征是典型记忆标记物CD69的上调、CD62L和CD103表达的缺乏(图11D,直方图)。之前,我们确定用50nm PS颗粒i.m.接种后,CD4⁺T细胞是抗原特异性IFN- γ 的主要生产者。与单独抗原相比,用50nm PS+NP₃₁₁-OVA免疫的小鼠在加强后的100天用NP₃₁₁-OVA对脾细胞的重新刺激显著增强IFN- γ 的分泌,表明功能性Ag-特异性CD4⁺记忆T细胞的存在(图11D,左下图)。

[0268] 为了进一步评估接种纳米颗粒引起的反应的功能性,发明人使用基因工程表达疫苗抗原OVA (B16-OVA)的癌细胞评估了它们针对B16-F10黑色素瘤模型提供预防性保护的能力。选择该模型是因为保护作用是强依赖于IFN- γ 和抗原特异性CD8⁺和CD4⁺T细胞。在i.m.加强接种14天后,将B16-OVA细胞经s.c.植入,每天监测和记录肿瘤生长(图12A)。中期评估表明用50nm PS颗粒和OVA接种的小鼠完全免受黑色素瘤的攻击,而模拟组(PBS)中的所有动物均形成肿瘤,并在植入后第25天死亡。尽管与PBS相比,单独OVA接种延缓了肿瘤的发展,但是80%的动物仍然在植入后两周内形成肿瘤,且75%的动物在第35天死于攻击(图12B)。肿瘤植入后100天的扩展分析表明用50nm PS+OVA接种给予针对B16黑色素瘤的持久保护性免疫(图12C)。

[0269] 总之,我们的结果表明尺寸关键性地决定了聚合物颗粒诱导抗原特异性Th1和CD8⁺T细胞反应的能力,并确定50nm作为促进接种后持久和耐用CMI的最佳尺寸。由50nm颗粒诱导的CMI与免疫途径和聚合物组成无关,因为可生物降解的PLGA颗粒引起了相当的反应。

[0270] 实施例10

[0271] IL-1和IL-18分别为纳米颗粒诱导IFN- γ 和CD8⁺T细胞反应所必需。

[0272] IL-1家族细胞因子通过促进抗原呈递细胞成熟或直接作用于淋巴细胞来重点地调节T细胞的启动、扩增和存活。

[0273] 用50nm颗粒和OVA接种缺乏IL-1R1和IL-18的小鼠表明诱导OVA特异性IgG反应不需要任何细胞因子。总的来说,除了IgG2b的产生,在KO株和WT小鼠中细胞因子数量和IgG同种型特征是相似的,这表明在I118^{-/-}小鼠中显示出增加滴度的趋势(图13A)。相反,OVA H-2Kb限制性CD8⁺T细胞的分析显示通过50nm颗粒诱导CTL反应是需要IL-18的,因为与野生型(WT)动物相比,I118^{-/-}小鼠脾脏中抗原特异性CD8⁺T细胞的百分比和总数均显著减少。有趣的是,尽管有报告表明IL-1可以直接促进CD8⁺T细胞的扩增和效应器功能(Ben-Sasson et al., Journal of experimental medicine, 210, 491-502, 2013a; Ben-Sasson et al., Cold Spring Harbour symposia on quantitative biology 78, 117-124, 2013b),OVA特异性

CD8⁺T细胞数量不被受损的IL-1信号影响(图13B-C)。用50nm+OVA接种的小鼠之间的比较显示当用OVA刺激时,Il1r1^{-/-}始终比WT产生显著更少的IFN- γ ,而与WT相比,Il18^{-/-}小鼠显示了意想不到结果,相反IFN- γ 的分泌持续显著增加(图13D)。

[0274] 实施例11

[0275] 非经典炎症小体感受器Caspase-11和细胞焦亡效应器GSDMD是纳米颗粒诱导的细胞介导免疫的基本介质。

[0276] 蛋白酶caspase-1 (casp-1) 控制包括IL-18和IL-1 β 在内的无先导蛋白质的分泌。上游感知各种感染性和非感染性刺激,包括PAMP、颗粒物、离子流或线粒体功能不全和氧化还原应激,触发炎症小体组装,这些炎症小体募集pro-caspase-1,导致自体溶解和激活。除了casp-1经典炎症小体外,使用小鼠caspase-11(或人类caspase 4/5)或caspase-8的非经典炎症小体可以驱动包括IL-1和IL-18在内的无先导蛋白质的分泌。因此,发明人试图确定caspase-1或caspase-11是否有助于50nm聚合物颗粒诱导的抗原特异性CMI。为了对此评估,发明人在接种时通过局部注射Ac-YVAD-fmk在药理学上抑制了casp-1。同时,也对casp-11缺陷小鼠(Casp11^{-/-})进行接种。

[0277] 与WT小鼠相比,casp-1的药理抑制并没有显著改变抗原特异性CD8⁺T细胞的诱导(图14A,B)。然而,来自Ac-YVAD-fmk处理动物的脾细胞的抗原重新刺激显示出IFN- γ 分泌减少的趋势(图14C)。casp-1的抑制并没有改变抗体反应的数量或质量(图15A)。另一方面,与接受颗粒的WT小鼠相比,casp-11缺乏显著减损了颗粒诱导的抗原特异性CD8⁺T细胞反应,包括在脾脏中的SIINFEKL特异性CTL百分比和总数方面(图13D,E)。与WT脾细胞相比,casp-11缺乏也引起了抗原刺激后IFN- γ 分泌的4倍减少(图13F)。与之前一样,casp-11缺陷并不影响抗体反应(图15B)。

[0278] 经典caspase-1炎症小体或caspase-11非经典炎症小体的激活导致GSDMD的下游裂解。裂解的GSDMD N-结构域与细胞膜内侧的酸性磷脂相互作用,并寡聚体化形成跨膜孔。GSDMD孔允许IL-1 β 和IL-18的释放以及细胞焦亡细胞死亡。然而,当细胞处于过度激活状态时,取决于激活环境细胞因子的释放可以在细胞死亡期间发生或独立于细胞死亡。

[0279] 发明人假设颗粒可以通过直接靶向骨骼肌细胞发挥作用(包括诱导局部死亡),这会相反释放危险相关分子模式,这些分子模式可以作为增强免疫反应的内源性佐剂。根据LDH释放体外数据,50nm颗粒诱导分化小鼠肌管中的细胞死亡。相比之下,1 μ m颗粒没有诱导(图16)。

[0280] 发明人试图研究颗粒诱导的CMI和体液反应在体内是否需要GSDMD。抑制剂坏死磷酰胺(NSA)与GSDMD C191残基结合,阻碍p30-GSDMD寡聚体化。因此,NSA选择性阻断人和小鼠细胞中的细胞焦亡和IL-1 β 释放,而不影响TLR信号、炎症小体形成或Gasdermin E介导的细胞死亡,且虽然NSA抑制人类中的程序性细胞坏死效应器混合系激酶区域样(MLKL)蛋白,但在小鼠细胞中未发现这种效应。为了评估局部和全身GSDMD激活在颗粒诱导反应中的相关性,小鼠在接种前1h经腹腔施用NSA或在免疫时局部肌肉施用。无论抑制剂的施途径如何,GSDMD的抑制对抗体反应没有影响(图15C)。另一方面,NSF的i.p.注射诱导抗原特异性CD8⁺T细胞的部分减少,而其通过局部施用NSA来消除(图13G)。这表明GSDMD的局部激活对通过50nm颗粒的CTL反应启动是必需的。此外,NSA的局部施用下调了体外重新刺激脾细胞中的IFN- γ 反应(图13I)。

[0281] 总而言之,数据表明50nm聚合物颗粒触发非经典炎症小体感受器caspase-11和GSDMD的局部激活,促进注射部位细胞的细胞焦亡,二次caspase-1激活以及随之释放的活性IL-1和IL-18分别促进抗原特异性IFN- γ 和CD8⁺T细胞反应。

[0282] 讨论

[0283] 尽管候选数量增加,但尚未将聚合物颗粒佐剂纳入任何临床批准的疫苗中。佐剂合理设计中最关键的两个步骤是:定义将颗粒特性与特异性免疫特征联系起来的设计原则;并阐明他们的作用方式。尺寸重叠的多分散制剂的使用、不同抗原掺入方法、包括辅佐剂或免疫策略改变导致了相互矛盾的结果,并阻止了与特定类型免疫反应有联系的最佳粒径的鉴别。

[0284] 发明人使用生物相容性和高度单分散性、无内毒素的聚苯乙烯颗粒与蛋白质抗原混合作为模型颗粒疫苗,以解决关于粒径在佐剂驱动免疫中的作用的长期问题。这些研究表明粒径不同地调节免疫反应的分立组成,即体液反应和细胞反应。在抗体的大小数量或中和能力方面,粒径对体液反应没有显著影响(图7和8)。然而,它关键地决定了实心聚合物颗粒促进细胞介导的对蛋白质抗原免疫的能力。发明人明确地将50 \pm 10nm确定为通过聚合物纳米颗粒(图9和图10)诱导CD8⁺T细胞反应和IFN- γ 的最佳尺寸,而与给药途径或所使用的抗原无关。此外,发明人证明了黑色素瘤模型的有效性,因为与癌细胞表达的抗原预防性给予的颗粒具有保护作用(图12),并提供了持久的CD8⁺T细胞反应的证据(图11D)。

[0285] 50nm颗粒诱导CMI的能力超越了模型聚苯乙烯颗粒,因为发明人证明了由PLGA制成的50nm可生物降解颗粒也诱导抗原特异性CD8⁺T细胞反应和IFN- γ 产生(与PS颗粒相当)。相反,其100nm和500nm的PLGA对应物未能诱导CMI(图10C-H)。PLGA颗粒是最有前途的候选佐剂之一,因为许多PLGA颗粒和其他产品已被FDA和EMA批准供人类使用。虽然PLGA颗粒已被有效用作药物载体,但它们尚未进入疫苗行业。一般来说,CMI的诱导是缺乏的。这导致了使用TLR激动剂和其他辅佐剂或复杂抗原包封或连接方法的其他辅制剂策略,这种尝试对制剂稳定性不利、增加成本并且将其转化为临床相关制剂具有挑战性。在本发明之前,PLGA颗粒制剂工艺的局限性将其生产限制在80nm到250 μ m之间的尺寸。但包括用于制造本研究中使用的50nm颗粒的微流控技术在内的新平台现在允许对粒径的精细控制,得到多分散指数低的颗粒,避免有害溶剂的使用,并允许佐剂的大规模生产。这与能够促进CMI的最佳粒径的确定一起可以重点地加速用于抗癌和抗病毒疫苗的PLGA佐剂的开发。

[0286] 发明人将非经典炎症小体感受器caspase-11和细胞焦亡效应器GSDMD确定为通过50nm颗粒诱导的CMI诱导中的新因子(图14)。重点要强调的是,此前已经报道了对于GLA-SE而言caspase-11在诱导Th1反应中的作用。GLA-SE参与非经典炎症小体的途径的能力归因于吡喃葡萄糖基脂质部分,其可以以其原始配体LPS类似的方式与caspase-11相互作用。然而,本研究中使用的颗粒和抗原没有显示LPS污染的证据,因为它们未能在未启动的树突状细胞中诱导IL-6、TNF- α 或IL-1 β 分泌,已知其可以在感应到低至10pg/ml的LPS浓度后产生炎症细胞因子。因此,50nm颗粒诱导能够直接与caspase-11结合的特定DAMP的释放似乎是合理的。

[0287] 颗粒诱导CMI需要GSDMD表明,颗粒诱导了不同的内源性casp-11配体,或者casp-11激活的下游结果是细胞依赖性的。事实上,虽然颗粒在体外培养时导致树突状细胞有限的细胞死亡,但它们在骨骼肌管中会诱导溶解细胞死亡和casp-11激活。

[0288] 对于纳米颗粒诱导的CMI, IL-1和IL-18都是需要的。数据表明IL-1和IL-18作为IL-1R1信号调控Th1和CTL反应的分工工作对IFN- γ 的分泌是必需的,我们证明了IFN- γ 的分泌取决于CD4⁺T细胞,而IL-18主要参与有助于CD8⁺T细胞反应(图13A)。这一发现与IFN- γ 缺乏不影响纳米颗粒诱导的CD8⁺T细胞数量的事实一致(图9B)。

[0289] 虽然经典和非经典炎性小体可以触发细胞焦亡,但IL-1 β 前体和IL-18前体的裂解通常需要caspase-1活性。因此,阻断casp-1酶活性(从而激活IL-1和IL18)应该会导致IL-1诱导的IFN- γ 产生和IL-18驱动的CD8⁺T细胞反应的消除。然而,Ac-YVAD-fmk的施用仅影响IFN- γ 的分泌,而CD8反应保持不变。有趣的是,许多报道表明在肠道感染沙门氏菌期间,caspase-4炎性小体(小鼠casp-11的人类直系同源物之一)直接裂解IL-18,而在沙门氏菌感染模型中,caspase-11(而非caspase-1)介导IL-18的蛋白水解激活。因此,本发明人提出caspase-11直接介导由50nm颗粒触发的IL-18激活。

[0290] 总之,发明人证明粒径的改变可以作为一种增强聚合物颗粒佐剂诱导持久和保护性CD8⁺T和Th1反应能力的策略。发明人首次证明了非经典炎性小体感受器caspase-11和细胞焦亡效应器Gasdermin D以颗粒佐剂的作用模式参与,强调了非经典炎性小体激活对于由纳米颗粒疫苗诱导的细胞介导免疫的重要性。这些结果为抗癌和抗病毒疫苗的合理设计开辟了新途径。

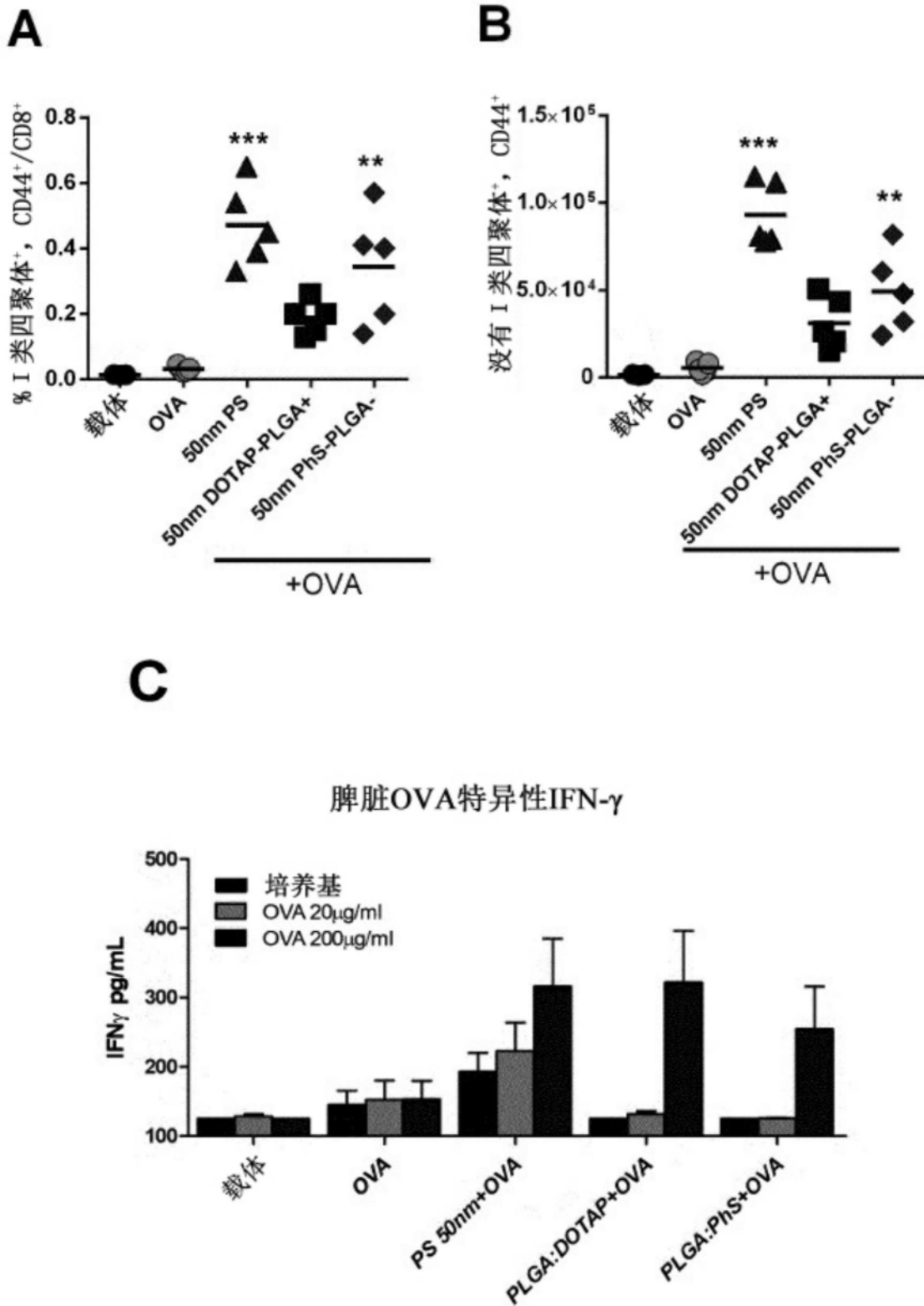


图1

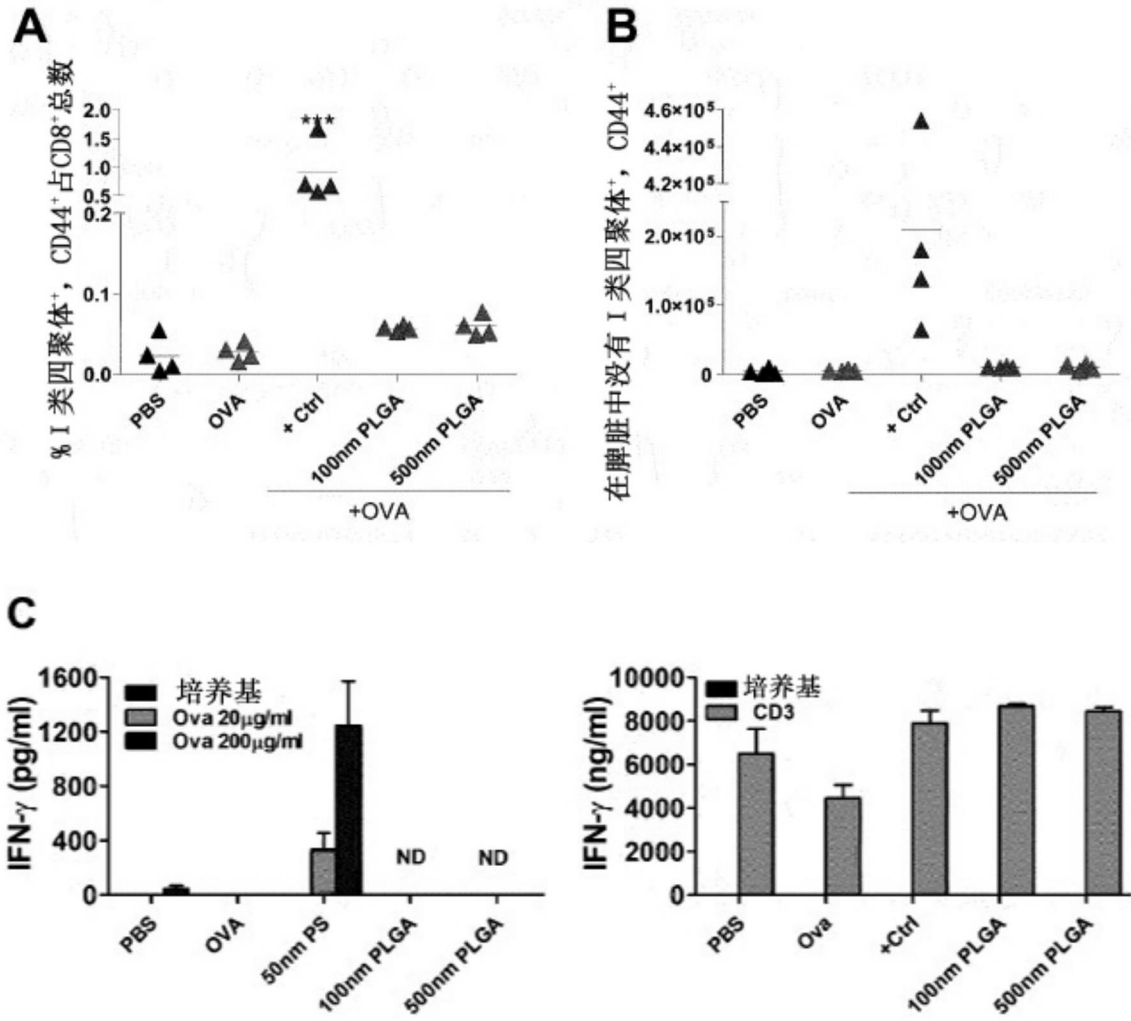


图2

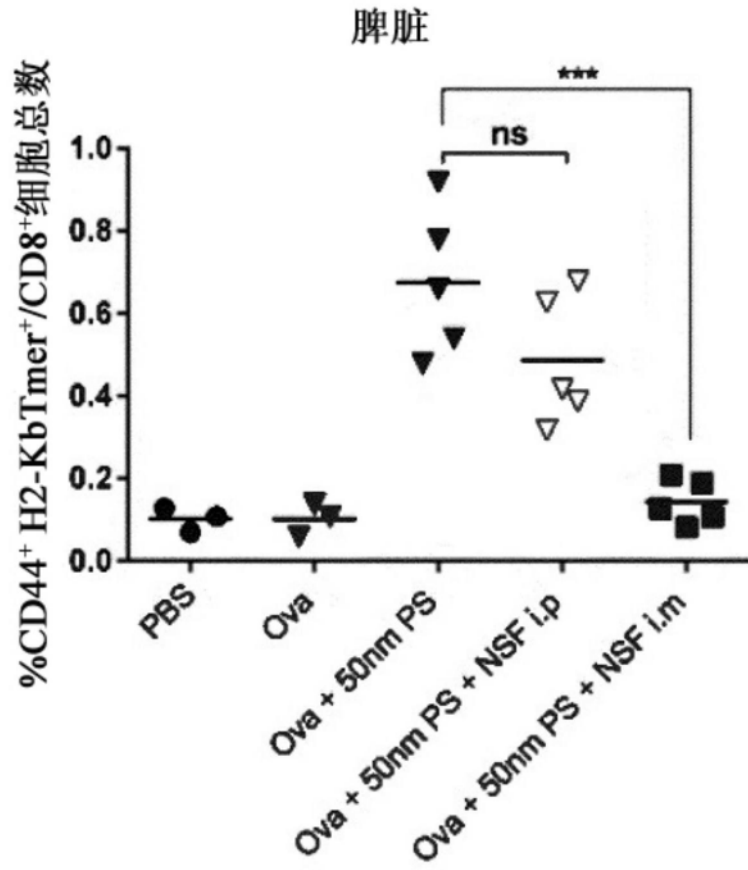


图3

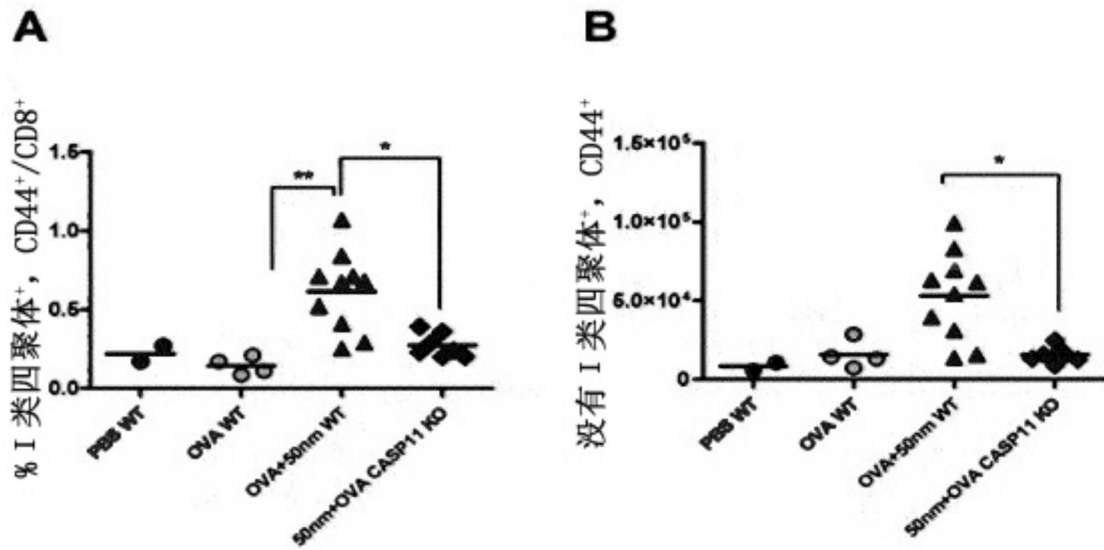


图4

阳离子PLGA NPs			
	尺寸	PDI	ZP
	59.8233	0.2370	30.0302
	60.7867	0.2463	30.5165
	61.0100	0.2267	30.6183
平均值	60.5400	0.2367	30.3883
SD	0.5149	0.0080	0.2567

阴离子PLGA NPs			
	尺寸	PDI	ZP
	61.2867	0.2077	-61.6667
	63.2000	0.1783	-65.1000
	60.3067	0.1990	-69.0000
平均值	61.5978	0.1950	-65.2556
SD	1.2015	0.0123	2.9958

图5

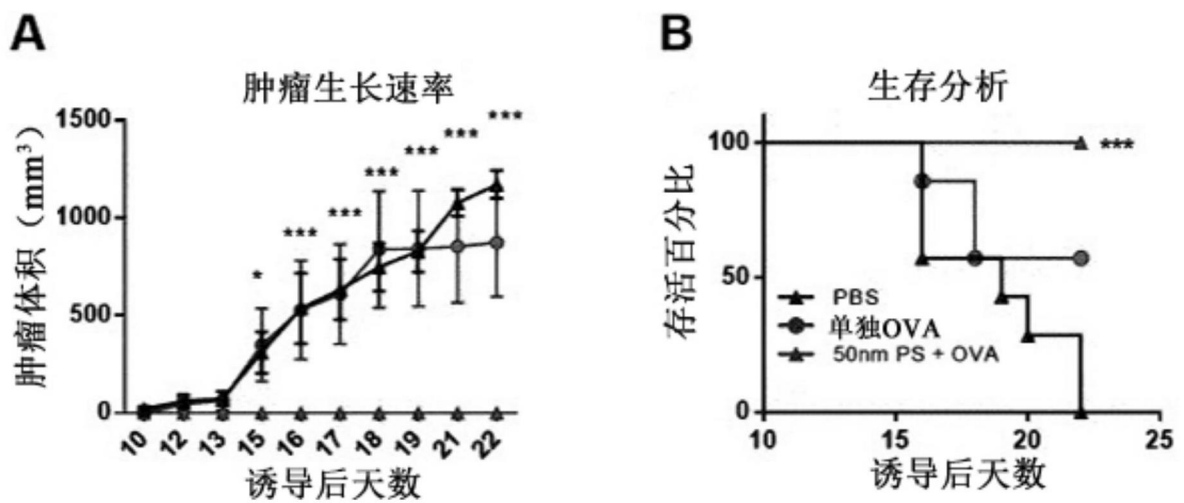


图6

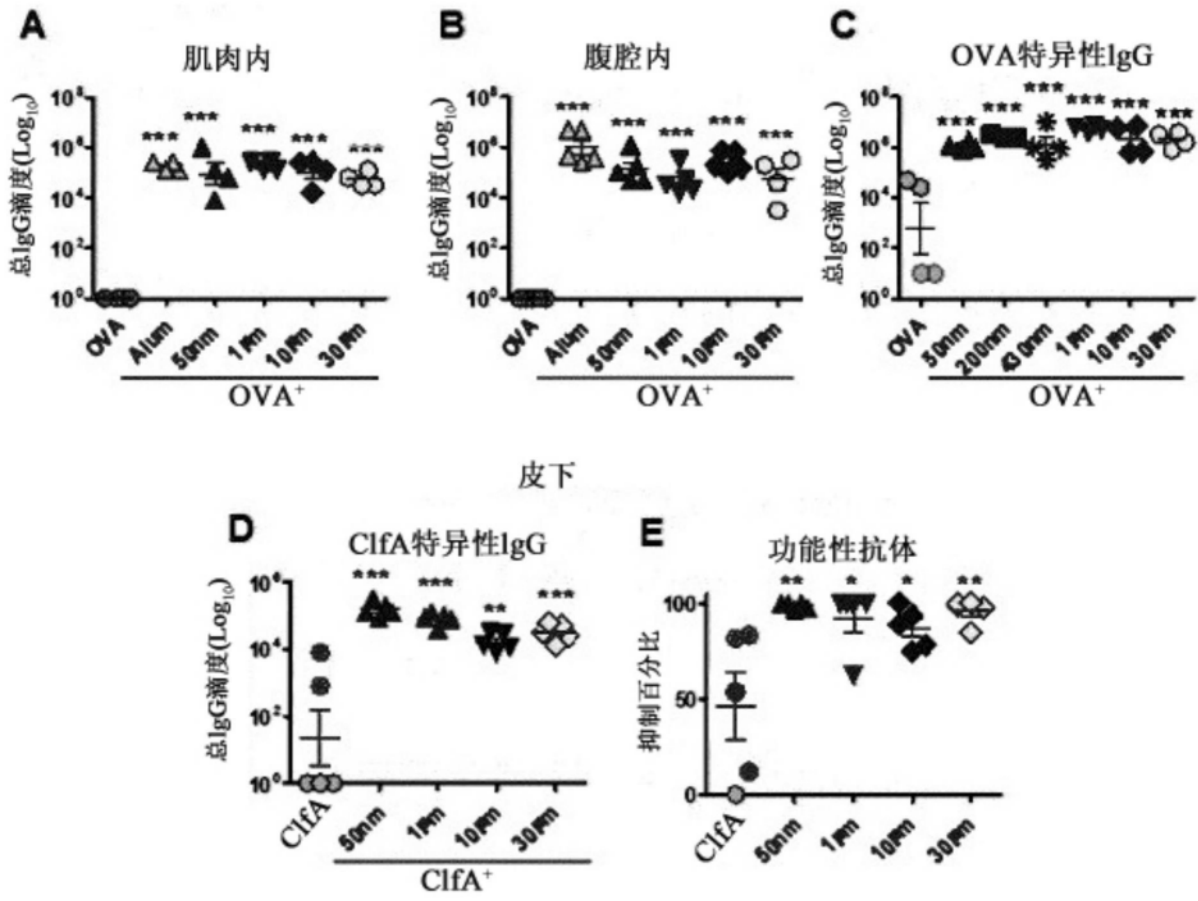


图7

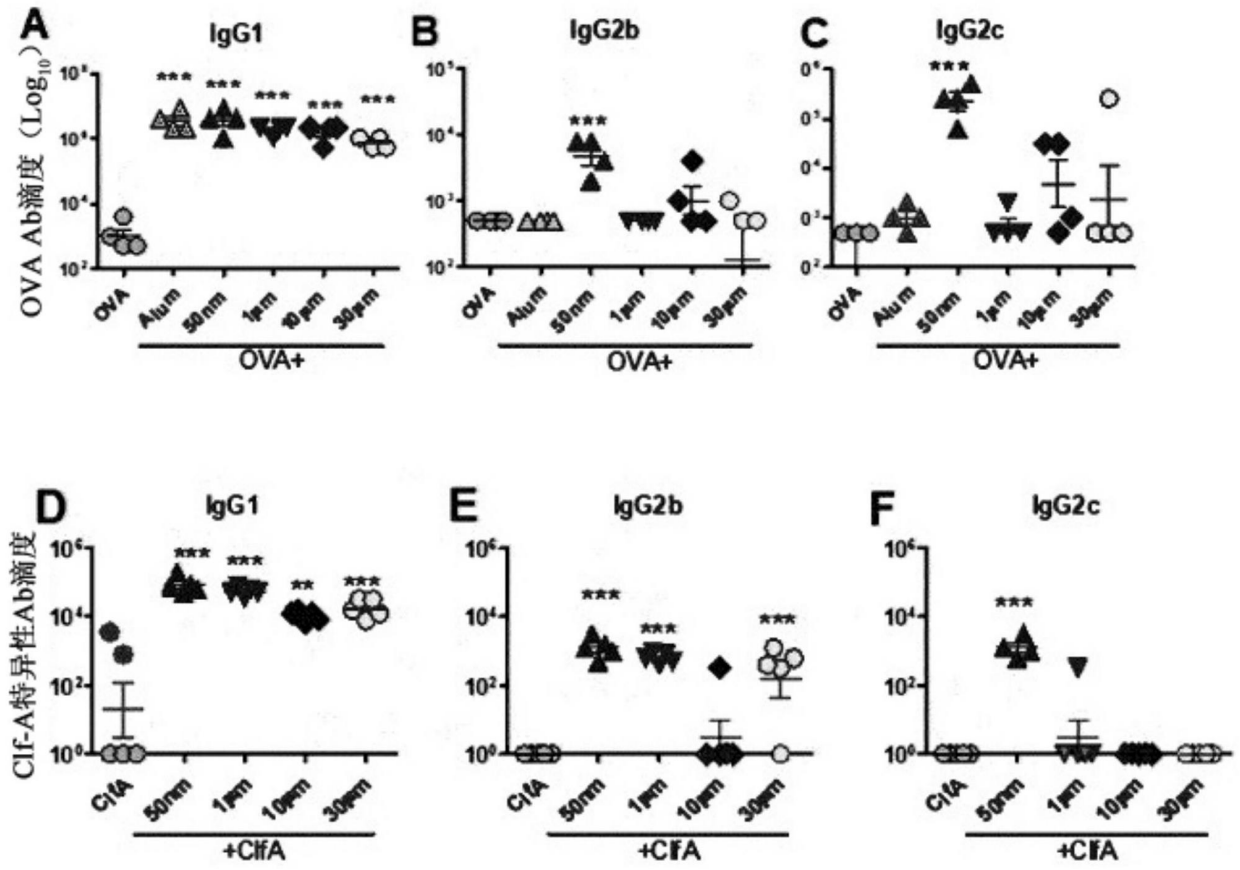


图8

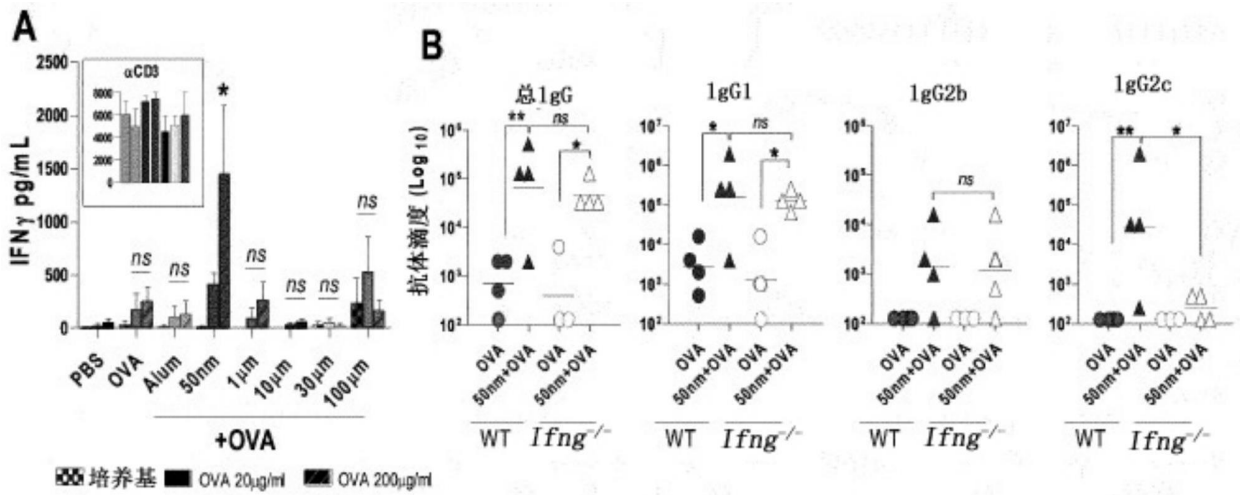


图9

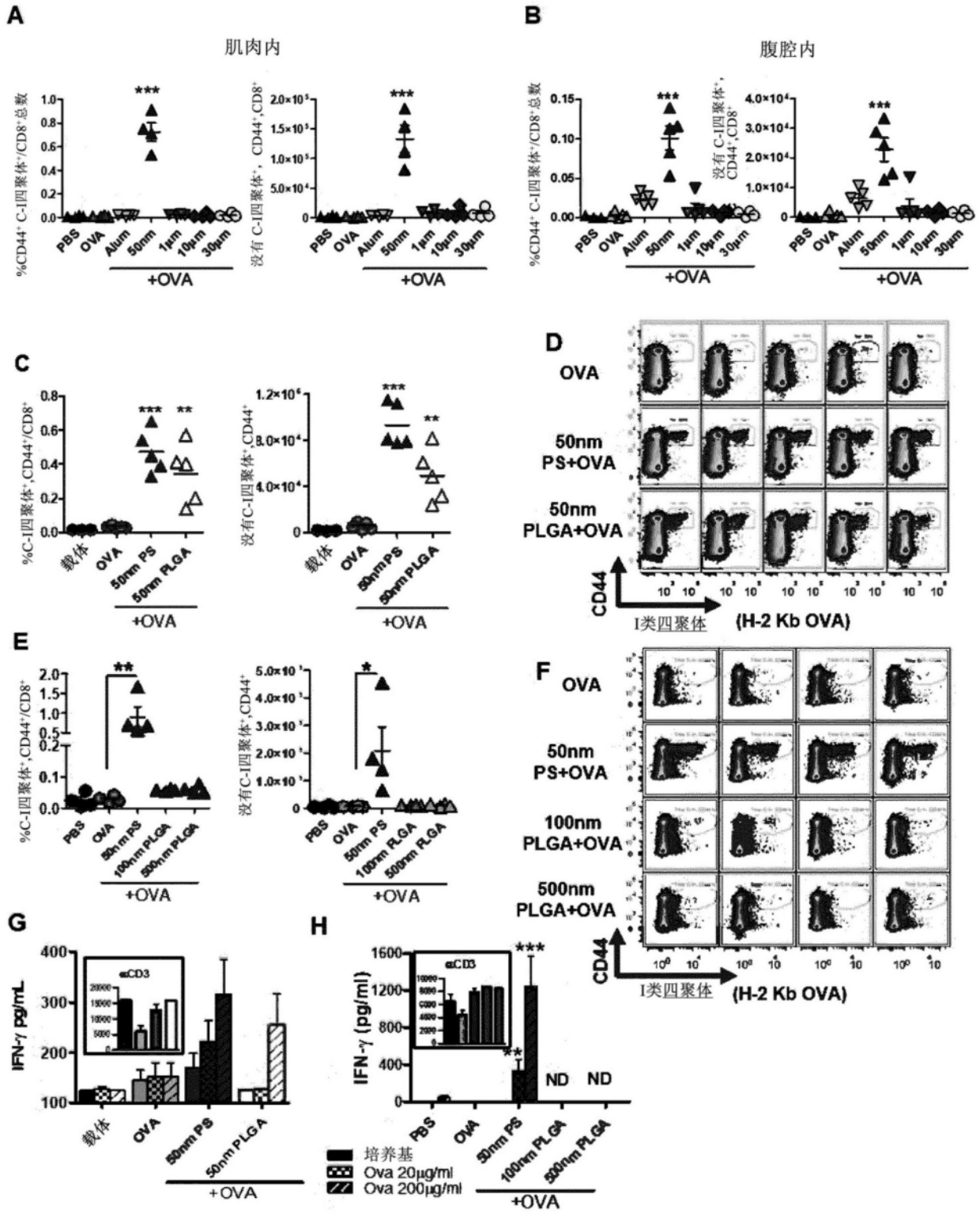


图10

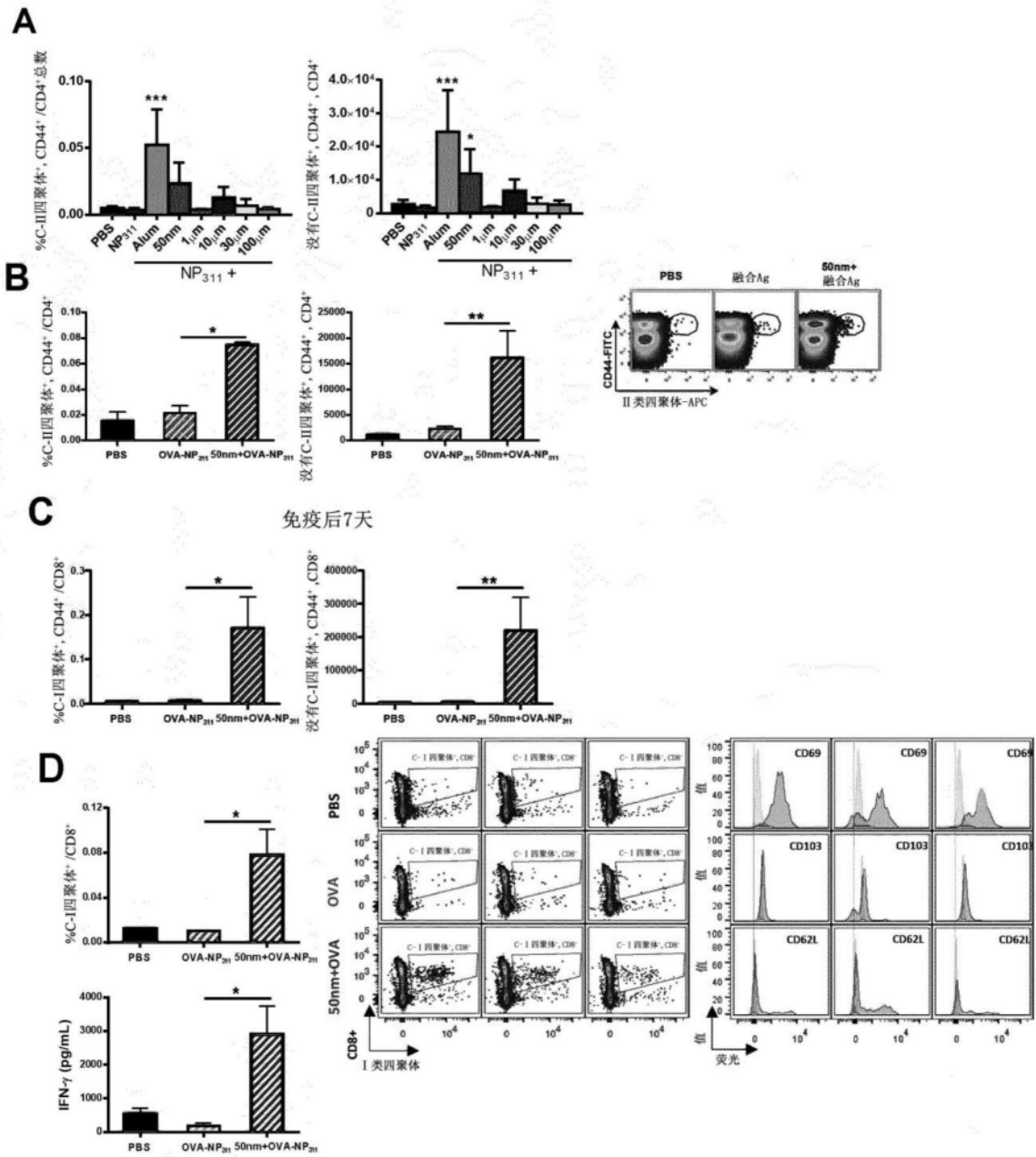


图11

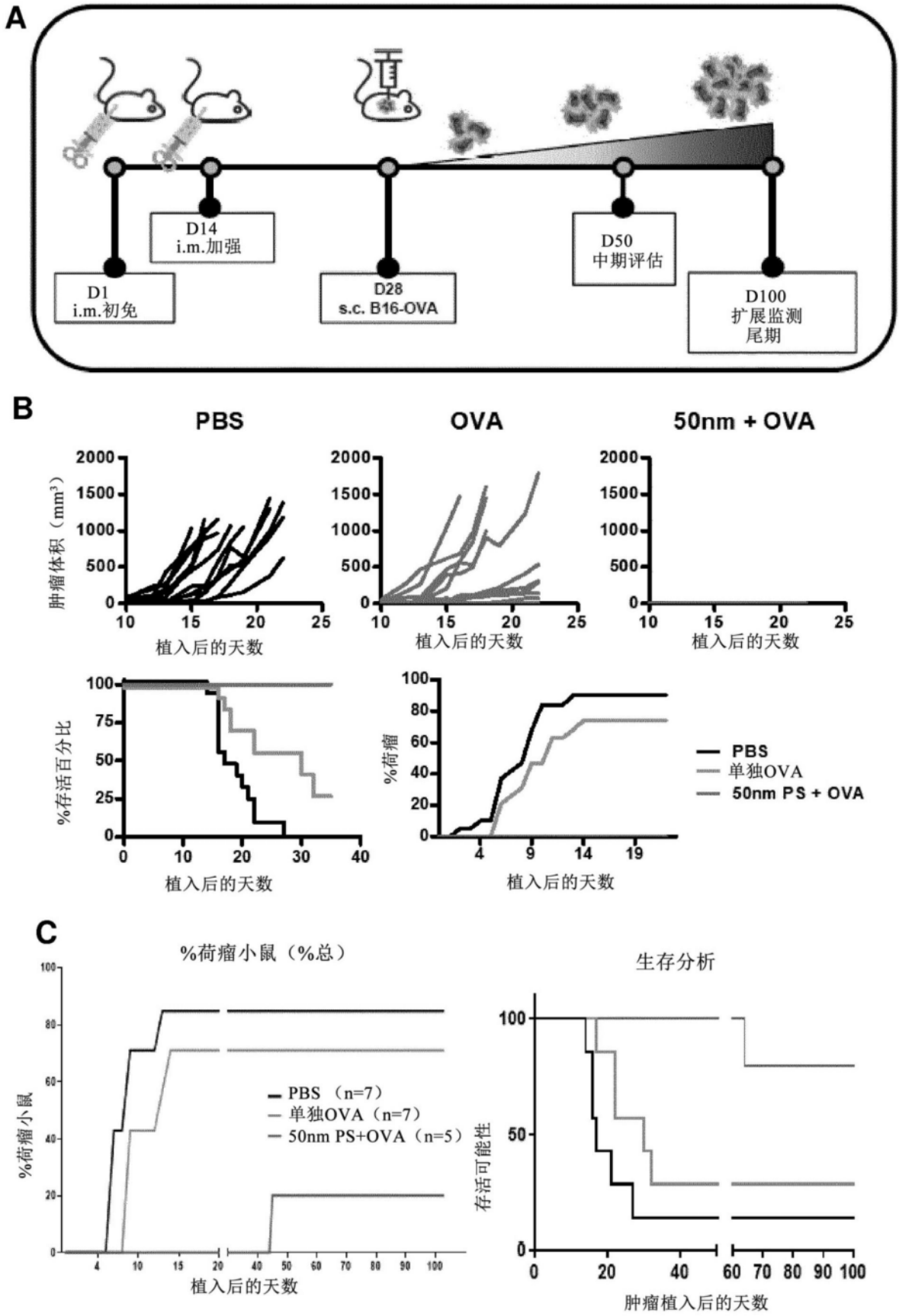


图12

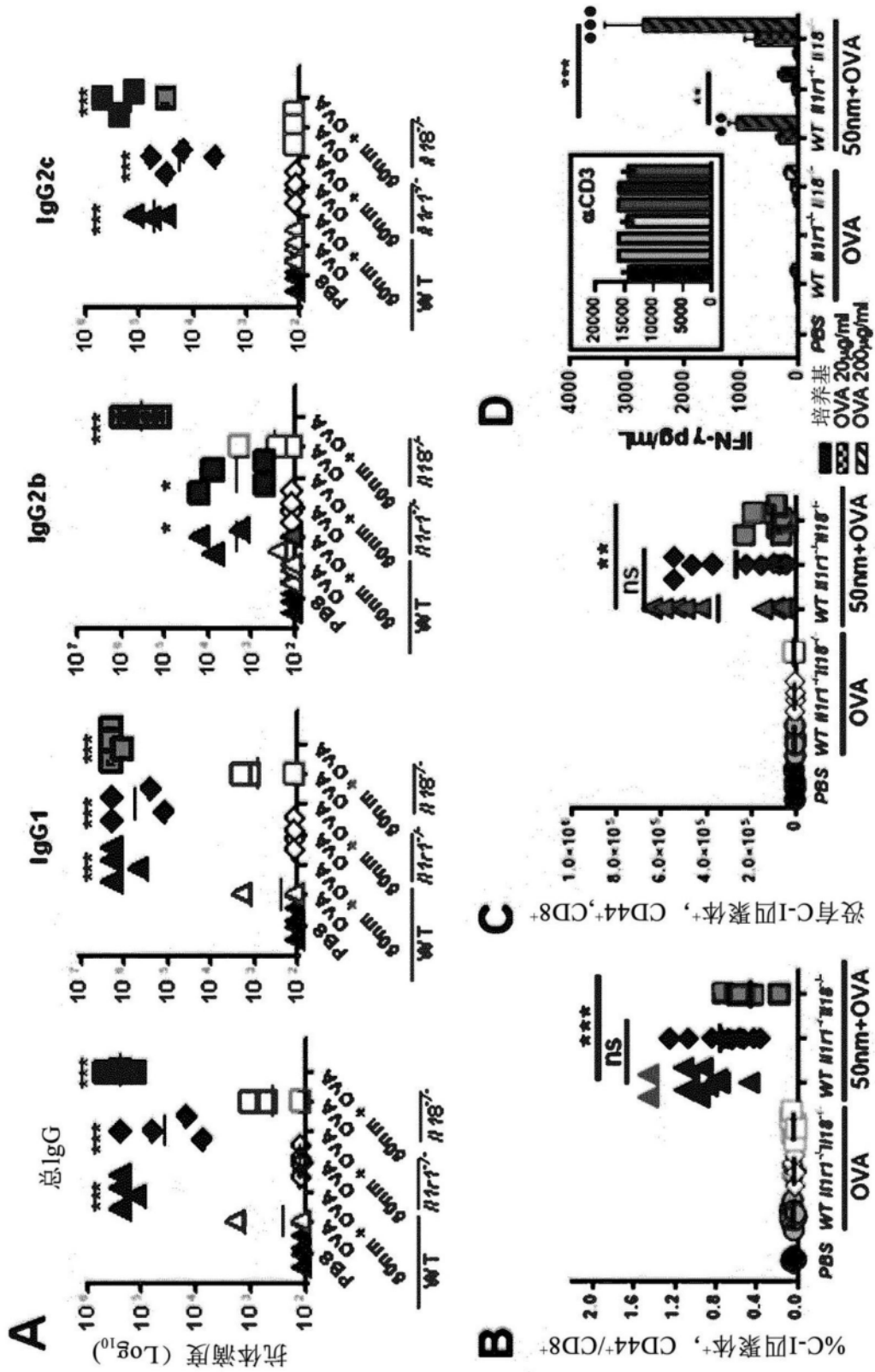


图13

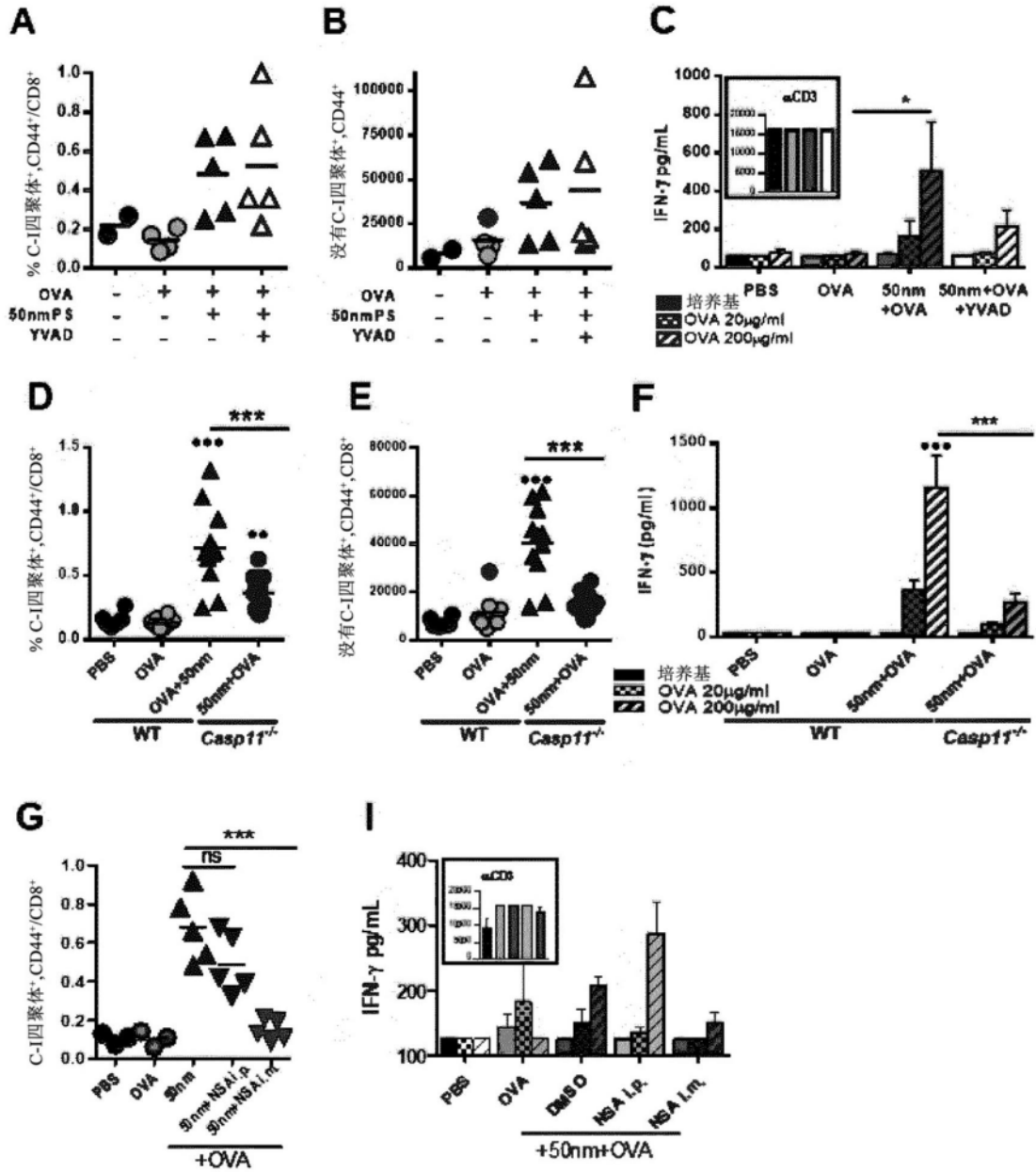


图14

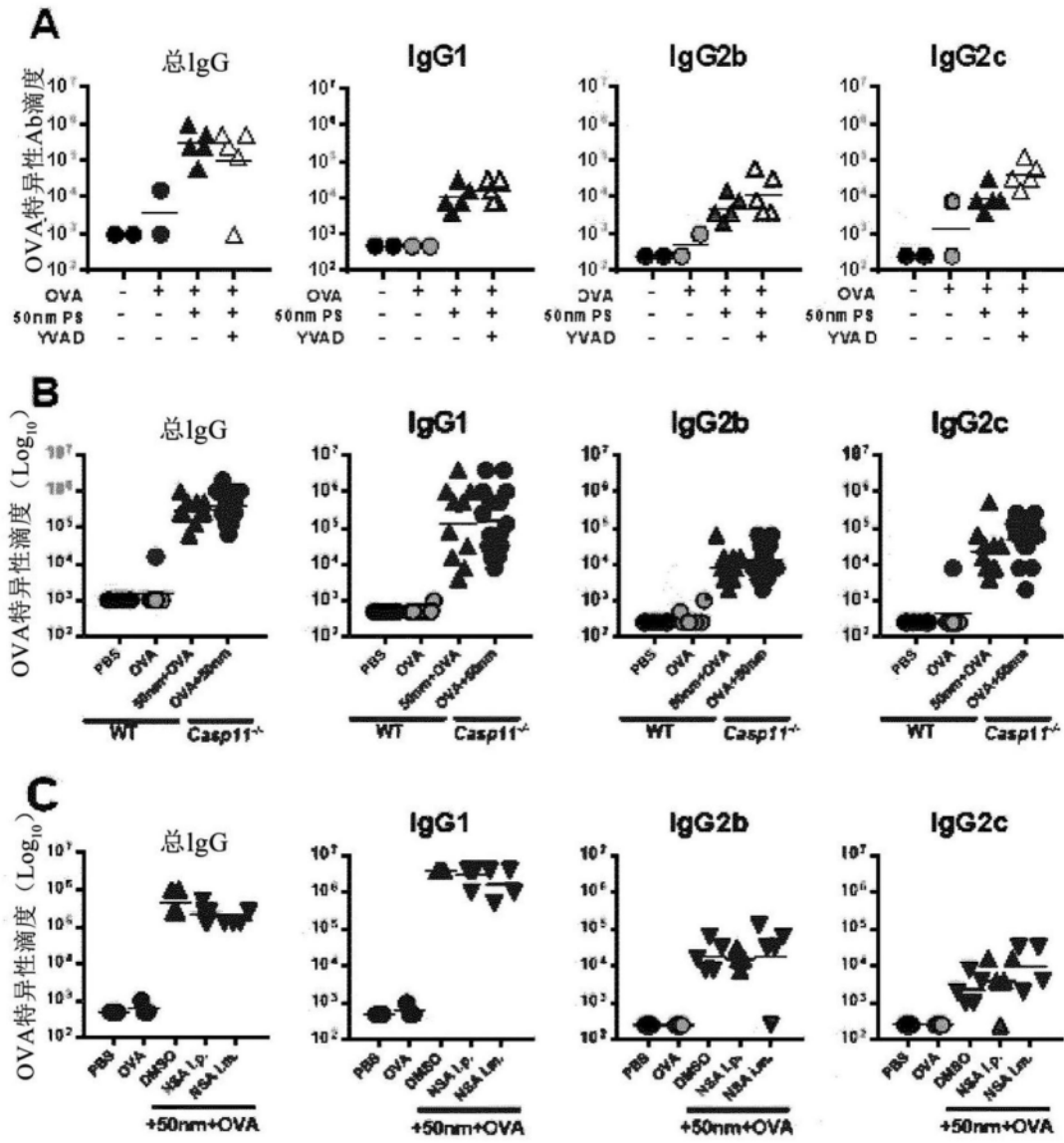


图15

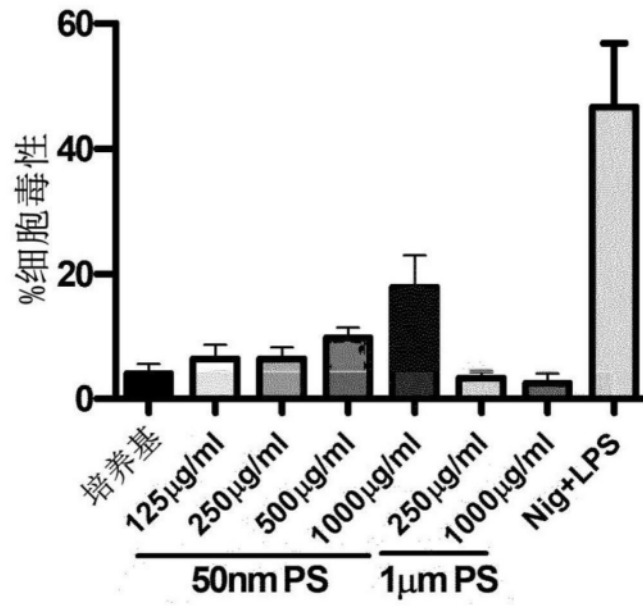


图16