



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104066444 A

(43) 申请公布日 2014. 09. 24

(21) 申请号 201280055234. 5

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2012. 09. 12

A61K 39/00 (2006. 01)

A61K 45/00 (2006. 01)

(30) 优先权数据

61/533, 512 2011. 09. 12 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 05. 09

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2012/054786 2012. 09. 12

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/039989 EN 2013. 03. 21

(71) 申请人 PDS 生物科技公司

地址 美国新泽西州

(72) 发明人 F. 贝杜-阿多 G. 孔 E. 雅各布森

C. 默瑟 K. 约翰逊

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

代理人 杜艳玲 梁谋

权利要求书2页 说明书19页

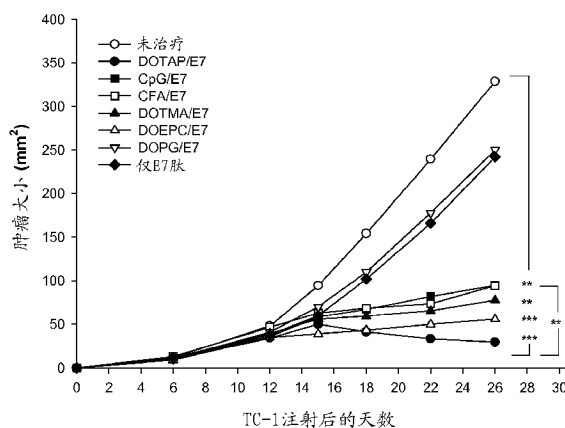
序列表5页 附图7页

(54) 发明名称

微粒疫苗制剂

(57) 摘要

本公开内容提供了包含至少一种肽抗原装配物和至少一种佐剂的疫苗制剂。本公开内容也提供了在哺乳动物中诱导免疫应答的方法和利用所述疫苗制剂治疗哺乳动物中的疾病的方法。



1. 疫苗制剂,其包含佐剂和抗原装配物。
2. 权利要求 1 的疫苗制剂,其中所述佐剂是免疫调节剂。
3. 权利要求 1 或权利要求 2 的疫苗制剂,其中所述佐剂是阳离子脂质。
4. 权利要求 3 的疫苗制剂,其中所述阳离子脂质选自 DOTAP、DOTMA、DOEPC 和它们的组合。
5. 权利要求 3 或权利要求 4 的疫苗制剂,其中所述阳离子脂质是 DOTAP。
6. 权利要求 1 或权利要求 2 的疫苗制剂,其中所述佐剂是阳离子脂质的对映异构体。
7. 权利要求 6 的疫苗制剂,其中所述对映异构体是 R-DOTAP。
8. 权利要求 1-7 中的任一项的疫苗制剂,其中所述抗原装配物是胶束结构。
9. 权利要求 1-8 中的任一项的疫苗制剂,其中所述抗原装配物包含一种或多种选自癌症抗原、病毒抗原、细菌抗原和病原性抗原的抗原。
10. 权利要求 9 的疫苗制剂,其中至少一种抗原是 HPV 蛋白或肽。
11. 权利要求 9 或权利要求 10 的疫苗制剂,其中至少一种抗原是黑素瘤抗原。
12. 权利要求 9-11 中的任一项的疫苗制剂,其中一种或多种抗原是经修饰以增加或降低抗原疏水性的抗原。
13. 权利要求 9-12 中的任一项的疫苗制剂,其中至少一种抗原选自:RAHYNIVTF (SEQ. ID. NO: 1)、GQAEPDRAHYNIVTF (SEQ. ID. NO: 2)、KSSGQAEPDRAHYNIVTF (SEQ. ID. NO: 3)、YMLDLQPETT (SEQ. ID. NO: 4)、KSSYMLDLQPETT (SEQ. ID. NO: 5)、KSSMHGDTPTLHEYMLDLQPETT (SEQ. ID. NO: 6)、KSSLLMGTLGIVCPICSQKP (SEQ. ID. NO: 7)、KVPRNQDWL (SEQ. ID. NO: 8)、SYVDFVWL (SEQ. ID. NO: 9)、KYICNSSCM (SEQ. ID. NO: 10) 和 KSSKVPRNQDWL (SEQ. ID. NO: 11)。
14. 一种在哺乳动物中诱导免疫应答的方法,所述方法包括下述步骤:给所述哺乳动物施用有效量的疫苗制剂,其中所述疫苗制剂包含佐剂和抗原装配物。
15. 一种治疗哺乳动物的疾病的方法,所述方法包括下述步骤:给所述哺乳动物施用有效量的疫苗制剂,其中所述疫苗制剂包含佐剂和抗原装配物。
16. 权利要求 14 或权利要求 15 的方法,其中所述佐剂是免疫调节剂。
17. 权利要求 14-16 中的任一项的方法,其中所述佐剂是阳离子脂质。
18. 权利要求 17 的方法,其中所述阳离子脂质选自 DOTAP、DOTMA、DOEPC 和它们的组合。
19. 权利要求 17 或权利要求 18 的方法,其中所述阳离子脂质是 DOTAP。
20. 权利要求 14-16 中的任一项的方法,其中所述佐剂是阳离子脂质的对映异构体。
21. 权利要求 20 的方法,其中所述对映异构体是 R-DOTAP。
22. 权利要求 14-21 中的任一项的方法,其中所述抗原装配物是胶束结构。
23. 权利要求 14-22 中的任一项的方法,其中所述抗原装配物包含一种或多种选自癌症抗原、病毒抗原、细菌抗原和病原性抗原的抗原。
24. 权利要求 23 的方法,其中至少一种抗原是 HPV 蛋白或肽。
25. 权利要求 23 或权利要求 24 的方法,其中至少一种抗原是黑素瘤抗原。
26. 权利要求 23-25 中的任一项的方法,其中一种或多种抗原是经修饰以增加或降低抗原疏水性的抗原。
27. 权利要求 23-26 中的任一项的方法,其中至少一种抗原选自:RAHYNIVTF

(SEQ. ID. NO: 1)、GQAEPDRAHYNIVTF (SEQ. ID. NO: 2)、KSSGQAEPDRAHYNIVTF (SEQ. ID. NO: 3)、YMLDLQPETT (SEQ. ID. NO: 4)、KSSYMLDLQPETT (SEQ. ID. NO: 5)、KSSMHGDTPTLHEYMLDLQPETT (SEQ. ID. NO: 6)、KSSLLMGTLGIVCPICSQKP (SEQ. ID. NO: 7)、KVPRNQDWL (SEQ. ID. NO: 8)、SYVDFFVWL (SEQ. ID. NO: 9)、KYICNSSCM (SEQ. ID. NO: 10) 和 KSSKVPRNQDWL (SEQ. ID. NO: 11)。

微粒疫苗制剂

[0001] 相关申请的交叉引用

本申请要求 2011 年 9 月 12 日提交的美国临时申请系列号 61/533,512 在美国法典第 35 篇第 119(e) 条下的权益,其整个公开内容通过引用并入本文。

技术领域

[0002] 用于人类使用的安全且有效的免疫疗法和治疗疫苗的开发仍然是全世界患者的一个重要医学需求。通常,疫苗制剂包含抗原以刺激靶向的免疫应答。但是,有些开发的疫苗是无效的,因为它们广泛哺乳动物群体中是免疫应答的弱刺激物。例如,疫苗制剂中的抗原在哺乳动物中可能是差免疫原性的。另外,有些疫苗可能不会将抗原有效地递送给哺乳动物的免疫系统的抗原呈递细胞 (“APC”)。

[0003] 此外,已知疫苗制剂中的有些抗原是哺乳动物中的免疫应答的差刺激物。其它抗原可能需要被哺乳动物免疫系统加工成特定抗原表位才能成为有效的。所以,必须递送更大量的这些抗原。但是,使用纳米颗粒递送系统可能不会有效地且安全地完成如此更大量的递送。在水溶液中施用蛋白和肽抗原也可能不是有益的,因为这样的抗原通常是弱免疫原性的和难以被 APC 摄取。尽管将抗原开发成病毒样颗粒 (VLP) 已经取得成功,VLP 的生产成本过高且需要使用大重组蛋白,因而经常需要融合蛋白和特殊的、复杂的装配技术。此外,VLP 排除了肽抗原的应用。

[0004] 背景和发明内容

疫苗通常还包括佐剂,以尝试增强疫苗制剂中的抗原的效力。例如,通常利用佐剂诸如油包水乳剂、明矾(例如,铝盐)和其它化学物质来增强哺乳动物中的抗原应答。除了传统的佐剂以外,还可以使用具有固有免疫效应的其它佐剂(例如,流感病毒体和 Chiron 的 MF59)。但是,这些佐剂也是不希望的,因为得自动物模型的证据(根据关于 HSV 和流行性感冒疫苗的临床试验报告)提示,它们仅仅增强中和抗体的产生,而不是增强动物中的 T- 细胞应答。

[0005] 因此,需要新疫苗制剂,其有效地递送抗原或促进抗原呈递细胞的抗原摄取,以便刺激哺乳动物中的免疫应答。此外,新的且有效的刺激哺乳动物中细胞介导的免疫应答的方法(可能通过在疫苗制剂中包含安全且有效的免疫学调节剂 (“免疫调节剂”))也是非常合乎需要的。因此,本公开内容提供了疫苗制剂和使用所述制剂的方法,所述制剂表现出合乎需要的性能并为哺乳动物中免疫应答的简单性、抗原摄取和诱导中的改善提供有关的优点。

[0006] 本公开内容提供了疫苗制剂,其包含至少一种肽抗原装配物和至少一种佐剂。本公开内容也提供了在哺乳动物中诱导免疫应答的方法和利用所述疫苗制剂治疗哺乳动物中的疾病的方法。

[0007] 与本领域的其它制剂和方法相比,根据本公开内容的疫苗制剂和方法提供了几个优点。首先,所述疫苗制剂包括佐剂,所述佐剂是免疫调节剂,以增强、指导或促进哺乳动物中的适当免疫应答。免疫调节剂如果被包含在疫苗制剂中,则具有有效地强化哺乳动物对

抗原的免疫应答的潜力。例如,免疫调节剂可以有利地实现一个或多个以下目的:(1)改善APC中的抗原递送和/或加工,(2)诱导产生免疫调节性细胞因子,后者有利于发展针对抗原的免疫应答,由此促进细胞介导的免疫,包括细胞毒性的T-淋巴细胞(“CTL”),(3)减少免疫接种的次数或有效疫苗所需的抗原量,(4)增加疫苗抗原的生物学或免疫学半衰期,和(5)通过抑制免疫抑制因子克服对抗原的免疫耐受。在某些实施方案中,基于阳离子脂质的佐剂可以用作有效的免疫调节佐剂,且可以在疫苗制剂中引起优良的T-细胞和抗体免疫应答。

[0008] 其次,与传统的疫苗制剂相比,所述疫苗制剂(诸如微粒疫苗制剂)包括天然的或自形成的抗原装配物(诸如胶束结构或双层结构),其有效地促进APC对更大量的抗原的摄取。这样的抗原装配物允许合适形式的抗原制剂被哺乳动物中的APC摄取和加工,从而产生更有效的抗原特异性免疫应答。此外,蛋白或肽抗原在水性介质中自发形成简单的结构化的微粒结构(诸如胶束结构或双层结构)会允许所述结构可被APC有效地摄取和加工。所以,可以与佐剂混合地或联合地施用有效的疫苗制剂。

[0009] 第三,可以修饰在抗原装配物中利用的肽或蛋白,使得亲水基团与亲脂基团之比能够形成双层结构或胶束结构。通过多种方式,诸如通过将亲脂基团(例如,烃链或疏水氨基酸序列)连接至亲水肽,反之则将亲水基团连接至疏水蛋白或肽,可以实现蛋白或肽抗原的修饰。还可以基于肽的大小和期望的疏水性或亲水性的程度来调整连接的基团的大小。

[0010] 最后,如在本公开内容中证实的,与经由传统的脂质体或胶束包封的疫苗制剂施用相同量的抗原和佐剂相比,这样的疫苗制剂会导致显著提高的疫苗免疫原性。

[0011] 预见到下述编号的实施方案,且为非限制性的:

1. 一种疫苗制剂,其包含佐剂和抗原装配物。

[0012] 2. 条款1的疫苗制剂,其中所述制剂是微粒疫苗制剂。

[0013] 3. 条款1或条款2的疫苗制剂,其中所述佐剂和所述抗原装配物是混合物。

[0014] 4. 条款1-3中的任一项的疫苗制剂,其中所述佐剂是免疫调节剂。

[0015] 5. 条款1-4中的任一项的疫苗制剂,其中所述佐剂是纳米颗粒。

[0016] 6. 条款1-5中的任一项的疫苗制剂,其中所述佐剂是阳离子脂质。

[0017] 7. 条款6的疫苗制剂,其中所述阳离子脂质是纯化的。

[0018] 8. 条款6或条款7的疫苗制剂,其中所述阳离子脂质选自DOTAP、DOTMA、DOEPC和它们的组合。

[0019] 9. 条款6-8中的任一项的疫苗制剂,其中所述阳离子脂质是DOTAP。

[0020] 10. 条款6-8中的任一项的疫苗制剂,其中所述阳离子脂质是DOTMA。

[0021] 11. 条款6-8中的任一项的疫苗制剂,其中所述阳离子脂质是DOEPC。

[0022] 12. 条款1-5中的任一项的疫苗制剂,其中所述佐剂是阳离子脂质的对映异构体。

[0023] 13. 条款12的疫苗制剂,其中所述对映异构体是纯化的。

[0024] 14. 条款12或条款13的疫苗制剂,其中所述对映异构体是R-DOTAP或S-DOTAP。

[0025] 15. 条款12-14中的任一项的疫苗制剂,其中所述对映异构体是R-DOTAP。

[0026] 16. 条款12-14中的任一项的疫苗制剂,其中所述对映异构体是S-DOTAP。

[0027] 17. 条款1-16中的任一项的疫苗制剂,其中所述抗原装配物是自装配结构。

- [0028] 18. 条款 1-17 中的任一项的疫苗制剂,其中所述抗原装配物是胶束结构。
- [0029] 19. 条款 1-17 中的任一项的疫苗制剂,其中所述抗原装配物是脂质双层结构。
- [0030] 20. 条款 1-19 中的任一项的疫苗制剂,其中所述抗原装配物是管状结构。
- [0031] 21. 条款 1-19 中的任一项的疫苗制剂,其中所述抗原装配物是球形结构。
- [0032] 22. 条款 1-21 中的任一项的疫苗制剂,其中所述抗原装配物包含一种或多种抗原。
- [0033] 23. 条款 1-22 中的任一项的疫苗制剂,其中一种或多种抗原是基于蛋白的抗原。
- [0034] 24. 条款 1-23 中的任一项的疫苗制剂,其中一种或多种抗原是基于肽的抗原。
- [0035] 25. 条款 1-24 中的任一项的疫苗制剂,其中一种或多种抗原选自癌抗原、病毒抗原、细菌抗原和病原性抗原。
- [0036] 26. 条款 1-25 中的任一项的疫苗制剂,其中一种或多种抗原是病毒抗原。
- [0037] 27. 条款 1-26 中的任一项的疫苗制剂,其中一种或多种抗原是细菌抗原。
- [0038] 28. 条款 1-27 中的任一项的疫苗制剂,其中一种或多种抗原是病原性抗原。
- [0039] 29. 条款 28 的疫苗制剂,其中所述病原性抗原是合成的或重组的抗原。
- [0040] 30. 条款 1-29 中的任一项的疫苗制剂,其中至少一种抗原是 HPV 蛋白或肽。
- [0041] 31. 条款 1-30 中的任一项的疫苗制剂,其中至少一种抗原是黑素瘤抗原。
- [0042] 32. 条款 31 的疫苗制剂,其中所述黑素瘤抗原选自 gp100 (KVPRNQDWL [SEQ. ID. No. 8])、TRP2 (SYVDFFVWL [SEQ. ID. No. 9]) 和 p53 (KYICNSSCM [SEQ. ID. No. 10]) 和它们的组合。
- [0043] 33. 条款 1-32 中的任一项的疫苗制剂,其中至少一种抗原选自脂蛋白、脂肽以及用具有增加的疏水性或降低的疏水性的氨基酸序列修饰的蛋白或肽。
- [0044] 34. 条款 1-33 中的任一项的疫苗制剂,其中一种或多种抗原是脂质化的抗原或经过修饰以增加抗原疏水性的抗原。
- [0045] 35. 条款 1-34 中的任一项的疫苗制剂,其中至少一种抗原是经修饰的蛋白或肽。
- [0046] 36. 条款 35 的疫苗制剂,其中所述经修饰的蛋白或肽键合至疏水基团。
- [0047] 37. 条款 35 或条款 36 的疫苗制剂,其中所述键合至疏水基团的经修饰的蛋白或肽进一步包含在所述抗原和所述疏水基团之间的接头序列。
- [0048] 38. 条款 37 的疫苗制剂,其中所述疏水基团是棕榈酰基。
- [0049] 39. 条款 1-38 中的任一项的疫苗制剂,其中至少一种抗原是未修饰的蛋白或肽。
- [0050] 40. 条款 1-39 中的任一项的疫苗制剂,其中至少一种抗原选自:RAHYNIVTF (SEQ. ID. NO: 1)、GQAEPDRAHYNIVTF (SEQ. ID. NO: 2)、KSSGQAEPDRAHYNIVTF (SEQ. ID. NO: 3)、YMLDLQPETT (SEQ. ID. NO: 4)、KSSYMLDLQPETT (SEQ. ID. NO: 5)、KSSMHGDTPTLHEYMLDLQPETT (SEQ. ID. NO: 6)、KSSLLMGTLGIVCPICSQKP (SEQ. ID. NO: 7)、KVPRNQDWL (SEQ. ID. NO: 8)、SYVDFFVWL (SEQ. ID. NO: 9)、KYICNSSCM (SEQ. ID. NO: 10) 和 KSSKVPRNQDWL (SEQ. ID. NO: 11)。
- [0051] 41. 条款 1-40 中的任一项的疫苗制剂,其中至少一种抗原是 RAHYNIVTF (SEQ. ID. NO: 1)。
- [0052] 42. 条款 1-41 中的任一项的疫苗制剂,其中至少一种抗原是 GQAEPDRAHYNIVTF (SEQ. ID. NO: 2)。

- [0053] 43. 条款 1-42 中的任一项的疫苗制剂,其中至少一种抗原是 KSSGQAEPDRAHYNIVTF (SEQ. ID. NO: 3)。
- [0054] 44. 条款 43 的疫苗制剂,其中 KSSGQAEPDRAHYNIVTF (SEQ. ID. NO: 3) 被修饰成另外包含疏水基团。
- [0055] 45. 条款 44 的疫苗制剂,其中所述疏水基团是棕榈酰基。
- [0056] 46. 条款 1-45 中的任一项的疫苗制剂,其中至少一种抗原是 YMLDLQPETT (SEQ. ID. NO: 4)。
- [0057] 47. 条款 1-46 中的任一项的疫苗制剂,其中至少一种抗原是 KSSYMLDLQPETT (SEQ. ID. NO: 5)。
- [0058] 48. 条款 47 的疫苗制剂,其中 KSSYMLDLQPETT (SEQ. ID. NO: 5) 被修饰成另外包含疏水基团。
- [0059] 49. 条款 48 的疫苗制剂,其中所述疏水基团是棕榈酰基。
- [0060] 50. 条款 1-49 中的任一项的疫苗制剂,其中至少一种抗原是 KSSMHGDTPTLHEYMLDLQPETT (SEQ. ID. NO: 6)。
- [0061] 51. 条款 50 的疫苗制剂,其中 KSSMHGDTPTLHEYMLDLQPETT (SEQ. ID. NO: 6) 被修饰成另外包含疏水基团。
- [0062] 52. 条款 51 的疫苗制剂,其中所述疏水基团是棕榈酰基。
- [0063] 53. 条款 1-52 中的任一项的疫苗制剂,其中至少一种抗原是 KSSLLMGTLGIVCPICSQKP (SEQ. ID. NO: 7)。
- [0064] 54. 条款 53 的疫苗制剂,其中 KSSLLMGTLGIVCPICSQKP (SEQ. ID. NO: 7) 被修饰成另外包含疏水基团。
- [0065] 55. 条款 54 的疫苗制剂,其中所述疏水基团是棕榈酰基。
- [0066] 56. 条款 1-55 中的任一项的疫苗制剂,其中至少一种抗原是 KVPRNQDWL (SEQ. ID. NO: 8)。
- [0067] 57. 条款 1-56 中的任一项的疫苗制剂,其中至少一种抗原是 SYVDFVWL (SEQ. ID. NO: 9)。
- [0068] 58. 条款 1-57 中的任一项的疫苗制剂,其中至少一种抗原是 KYICNSSCM (SEQ. ID. NO: 10)。
- [0069] 59. 条款 1-58 中的任一项的疫苗制剂,其中至少一种抗原是 KSSKVPRNQDWL (SEQ. ID. NO: 11)。
- [0070] 60. 条款 59 的疫苗制剂,其中 KSSKVPRNQDWL (SEQ. ID. NO: 11) 被修饰成另外包含疏水基团。
- [0071] 61. 条款 60 的疫苗制剂,其中所述疏水基团是棕榈酰基。
- [0072] 62. 条款 1-61 中的任一项的疫苗制剂,其中所述制剂通过激活促分裂原激活蛋白 (MAP) 激酶信号传递途径而在哺乳动物中诱导免疫应答。
- [0073] 63. 条款 62 的疫苗制剂,其中通过刺激细胞外信号调节的激酶 (“ERK”)-1、ERK-2 和 p38 中的至少一种,激活所述 MAP 激酶信号传递途径。
- [0074] 64. 条款 1-63 中的任一项的疫苗制剂,其中所述制剂在哺乳动物中增强功能性的、抗原特异性的 CD8+ T 淋巴细胞应答。

- [0075] 65. 条款 62-64 中的任一项的疫苗制剂,其中所述哺乳动物是人。
- [0076] 66. 一种在哺乳动物中诱导免疫应答的方法,所述方法包括下述步骤:给所述哺乳动物施用有效量的疫苗制剂,其中所述疫苗制剂包含佐剂和抗原装配物。
- [0077] 67. 条款 66 的方法,其中经由所述哺乳动物的免疫系统细胞中的 MAP 激酶信号传递途径,激活所述免疫应答。
- [0078] 68. 条款 67 的方法,其中通过刺激 ERK-1、ERK-2 和 p38 中的至少一种,激活所述 MAP 激酶信号传递途径。
- [0079] 69. 条款 66-68 中的任一项的方法,其中所述免疫应答会激活所述哺乳动物中的细胞毒性的 T 淋巴细胞。
- [0080] 70. 条款 69 的方法,其中所述细胞毒性的 T 淋巴细胞是 CD8+ T 细胞。
- [0081] 71. 条款 66-70 中的任一项的方法,其中所述施用会增强所述哺乳动物中的功能性的、抗原特异性的 CD8+ T 淋巴细胞应答。
- [0082] 72. 条款 66-71 中的任一项的方法,其中所述免疫应答会激活所述哺乳动物中的抗体应答。
- [0083] 73. 条款 66-72 中的任一项的方法,其中所述免疫应答会激活所述哺乳动物中的干扰素- γ (IFN- γ)。
- [0084] 74. 条款 66-73 中的任一项的方法,其中所述制剂是微粒疫苗制剂。
- [0085] 75. 条款 66-74 中的任一项的方法,其中所述佐剂和所述抗原装配物是混合物。
- [0086] 76. 条款 66-75 中的任一项的方法,其中所述佐剂是免疫调节剂。
- [0087] 77. 条款 66-76 中的任一项的方法,其中所述佐剂是纳米颗粒。
- [0088] 78. 条款 66-77 中的任一项的方法,其中所述佐剂是阳离子脂质。
- [0089] 79. 条款 78 的方法,其中所述阳离子脂质是纯化的。
- [0090] 80. 条款 78 或条款 79 的方法,其中所述阳离子脂质选自 DOTAP、DOTMA、DOEPC 和它们的组合。
- [0091] 81. 条款 78-80 中的任一项的方法,其中所述阳离子脂质是 DOTAP。
- [0092] 82. 条款 78-80 中的任一项的方法,其中所述阳离子脂质是 DOTMA。
- [0093] 83. 条款 78-80 中的任一项的方法,其中所述阳离子脂质是 DOEPC。
- [0094] 84. 条款 66-78 中的任一项的方法,其中所述佐剂是阳离子脂质的对映异构体。
- [0095] 85. 条款 84 的方法,其中所述对映异构体是纯化的。
- [0096] 86. 条款 84 或条款 85 的方法,其中所述对映异构体是 R-DOTAP 或 S-DOTAP。
- [0097] 87. 条款 84-86 中的任一项的方法,其中所述对映异构体是 R-DOTAP。
- [0098] 88. 条款 84-86 中的任一项的方法,其中所述对映异构体是 S-DOTAP。
- [0099] 89. 条款 66-88 中的任一项的方法,其中所述抗原装配物是自装配结构。
- [0100] 90. 条款 66-89 中的任一项的方法,其中所述抗原装配物是胶束结构。
- [0101] 91. 条款 66-89 中的任一项的方法,其中所述抗原装配物是脂质双层结构。
- [0102] 92. 条款 66-91 中的任一项的方法,其中所述抗原装配物是管状结构。
- [0103] 93. 条款 66-91 中的任一项的方法,其中所述抗原装配物是球形结构。
- [0104] 94. 条款 66-93 中的任一项的方法,其中所述抗原装配物包含一种或多种抗原。
- [0105] 95. 条款 94 的方法,其中一种或多种抗原是基于蛋白的抗原。

- [0106] 96. 条款 94 的方法,其中一种或多种抗原是基于肽的抗原。
- [0107] 97. 条款 94-96 中的任一项的方法,其中一种或多种抗原选自癌抗原、病毒抗原、细菌抗原和病原性抗原。
- [0108] 98. 条款 94-97 中的任一项的方法,其中一种或多种抗原是病毒抗原。
- [0109] 99. 条款 94-97 中的任一项的方法,其中一种或多种抗原是细菌抗原。
- [0110] 100. 条款 94-97 中的任一项的方法,其中一种或多种抗原是病原性抗原。
- [0111] 101. 条款 100 的方法,其中所述病原性抗原是合成的或重组的抗原。
- [0112] 102. 条款 94-101 中的任一项的方法,其中至少一种抗原是 HPV 蛋白或肽。
- [0113] 103. 条款 94-102 中的任一项的方法,其中至少一种抗原是黑素瘤抗原。
- [0114] 104. 条款 103 的方法,其中所述黑素瘤抗原选自 gp100 (KVPRNQDWL [SEQ. ID. No. 8])、TRP2 (SYVDFVWL [SEQ. ID. No. 9]) 和 p53 (KYICNSSCM [SEQ. ID. No. 10]) 和它们的组合。
- [0115] 105. 条款 94-104 中的任一项的方法,其中至少一种抗原选自脂蛋白、脂肽以及用具有增加的疏水性或降低的疏水性的氨基酸序列修饰的蛋白或肽。
- [0116] 106. 条款 94-105 中的任一项的方法,其中一种或多种抗原是脂质化的抗原或经过修饰以增加抗原疏水性的抗原。
- [0117] 107. 条款 94-106 中的任一项的方法,其中至少一种抗原是经修饰的蛋白或肽。
- [0118] 108. 条款 107 的方法,其中所述经修饰的蛋白或肽键合至疏水基团。
- [0119] 109. 条款 107 或条款 108 的方法,其中所述键合至疏水基团的经修饰的蛋白或肽进一步包含在所述抗原和所述疏水基团之间的接头序列。
- [0120] 110. 条款 109 的方法,其中所述疏水基团是棕榈酰基。
- [0121] 111. 条款 94-110 中的任一项的方法,其中至少一种抗原是未修饰的蛋白或肽。
- [0122] 112. 条款 94-111 中的任一项的方法,其中至少一种抗原选自:RAHYNIVTF (SEQ. ID. NO: 1)、GQAEPDRAHYNIVTF (SEQ. ID. NO: 2)、KSSGQAEPDRAHYNIVTF (SEQ. ID. NO: 3)、YMLDLQPETT (SEQ. ID. NO: 4)、KSSYMLDLQPETT (SEQ. ID. NO: 5)、KSSMHGDTPTLHEYMLDLQPETT (SEQ. ID. NO: 6)、KSSLLMGTLGIVCPICSQKP (SEQ. ID. NO: 7)、KVPRNQDWL (SEQ. ID. NO: 8)、SYVDFVWL (SEQ. ID. NO: 9)、KYICNSSCM (SEQ. ID. NO: 10) 和 KSSKVPRNQDWL (SEQ. ID. NO: 11)。
- [0123] 113. 条款 94-112 中的任一项的方法,其中至少一种抗原是 RAHYNIVTF (SEQ. ID. NO: 1)。
- [0124] 114. 条款 94-113 中的任一项的方法,其中至少一种抗原是 GQAEPDRAHYNIVTF (SEQ. ID. NO: 2)。
- [0125] 115. 条款 94-114 中的任一项的方法,其中至少一种抗原是 KSSGQAEPDRAHYNIVTF (SEQ. ID. NO: 3)。
- [0126] 116. 条款 115 的方法,其中 KSSGQAEPDRAHYNIVTF (SEQ. ID. NO: 3) 被修饰成另外包含疏水基团。
- [0127] 117. 条款 116 的方法,其中所述疏水基团是棕榈酰基。
- [0128] 118. 条款 94-117 中的任一项的方法,其中至少一种抗原是 YMLDLQPETT (SEQ. ID. NO: 4)。

- [0129] 119. 条款 94-118 中的任一项的方法,其中至少一种抗原是 KSSYMLDLQPETT (SEQ. ID. NO: 5)。
- [0130] 120. 条款 119 的方法,其中 KSSYMLDLQPETT (SEQ. ID. NO: 5) 被修饰成另外包含疏水基团。
- [0131] 121. 条款 120 的方法,其中所述疏水基团是棕榈酰基。
- [0132] 122. 条款 94-121 中的任一项的方法,其中至少一种抗原是 KSSMHGDTPTLHEYMLDLQPETT (SEQ. ID. NO: 6)。
- [0133] 123. 条款 122 的方法,其中 KSSMHGDTPTLHEYMLDLQPETT (SEQ. ID. NO: 6) 被修饰成另外包含疏水基团。
- [0134] 124. 条款 123 的方法,其中所述疏水基团是棕榈酰基。
- [0135] 125. 条款 94-124 中的任一项的方法,其中至少一种抗原是 KSSLLMGTLGIVCPICSQKP (SEQ. ID. NO: 7)。
- [0136] 126. 条款 125 的方法,其中 KSSLLMGTLGIVCPICSQKP (SEQ. ID. NO: 7) 被修饰成另外包含疏水基团。
- [0137] 127. 条款 126 的方法,其中所述疏水基团是棕榈酰基。
- [0138] 128. 条款 94-127 中的任一项的方法,其中至少一种抗原是 KVPRNQDWL (SEQ. ID. NO: 8)。
- [0139] 129. 条款 94-128 中的任一项的方法,其中至少一种抗原是 SYVDFVWL (SEQ. ID. NO: 9)。
- [0140] 130. 条款 94-129 中的任一项的方法,其中至少一种抗原是 KYICNSSCM (SEQ. ID. NO: 10)。
- [0141] 131. 条款 94-130 中的任一项的方法,其中至少一种抗原是 KSSKVPRNQDWL (SEQ. ID. NO: 11)。
- [0142] 132. 条款 131 的方法,其中 KSSKVPRNQDWL (SEQ. ID. NO: 11) 被修饰成另外包含疏水基团。
- [0143] 133. 条款 132 的方法,其中所述疏水基团是棕榈酰基。
- [0144] 134. 条款 66-133 中的任一项的方法,其中所述哺乳动物是人。
- [0145] 135. 一种治疗哺乳动物的疾病的方法,所述方法包括下述步骤:给所述哺乳动物施用有效量的疫苗制剂,其中所述疫苗制剂包含佐剂和抗原装配物。
- [0146] 136. 条款 135 的方法,其中所述方法是预防性处理。
- [0147] 137. 条款 135 的方法,其中所述疾病是癌症。
- [0148] 138. 条款 135-137 中的任一项的方法,其中所述施用会经由所述哺乳动物的免疫系统细胞中的 MAP 激酶信号传递途径而激活所述免疫应答。
- [0149] 139. 条款 138 的方法,其中通过刺激 ERK-1、ERK-2 和 p38 中的至少一种,激活所述 MAP 激酶信号传递途径。
- [0150] 140. 条款 135-139 中的任一项的方法,其中所述免疫应答会激活所述哺乳动物中的细胞毒性的 T 淋巴细胞。
- [0151] 141. 条款 140 的方法,其中所述细胞毒性的 T 淋巴细胞是 CD8+ T 细胞。
- [0152] 142. 条款 135-141 中的任一项的方法,其中所述免疫应答会激活所述哺乳动物中

的抗体应答。

[0153] 143. 条款 135-142 中的任一项的方法,其中所述免疫应答会激活所述哺乳动物中的干扰素- γ (IFN- γ)。

[0154] 144. 条款 135-143 中的任一项的方法,其中所述施用会增强功能性的、抗原特异性的 CD8+ T 淋巴细胞应答。

[0155] 145. 条款 135-144 中的任一项的方法,其中所述制剂是微粒疫苗制剂。

[0156] 146. 条款 135-145 中的任一项的方法,其中所述佐剂和所述抗原装配物是混合物。

[0157] 147. 条款 135-146 中的任一项的方法,其中所述佐剂是免疫调节剂。

[0158] 148. 条款 135-147 中的任一项的方法,其中所述佐剂是纳米颗粒。

[0159] 149. 条款 135-148 中的任一项的方法,其中所述佐剂是阳离子脂质。

[0160] 150. 条款 149 的方法,其中所述阳离子脂质是纯化的。

[0161] 151. 条款 149 或条款 150 的方法,其中所述阳离子脂质选自 DOTAP、DOTMA、DOEPC 和它们的组合。

[0162] 152. 条款 149-151 中的任一项的方法,其中所述阳离子脂质是 DOTAP。

[0163] 153. 条款 149-151 中的任一项的方法,其中所述阳离子脂质是 DOTMA。

[0164] 154. 条款 149-151 中的任一项的方法,其中所述阳离子脂质是 DOEPC。

[0165] 155. 条款 135-148 中的任一项的方法,其中所述佐剂是阳离子脂质的对映异构体。

[0166] 156. 条款 155 的方法,其中所述对映异构体是纯化的。

[0167] 157. 条款 155 或条款 156 的方法,其中所述对映异构体是 R-DOTAP 或 S-DOTAP。

[0168] 158. 条款 155-157 中的任一项的方法,其中所述对映异构体是 R-DOTAP。

[0169] 159. 条款 155-157 中的任一项的方法,其中所述对映异构体是 S-DOTAP。

[0170] 160. 条款 135-159 中的任一项的方法,其中所述抗原装配物是自装配结构。

[0171] 161. 条款 135-160 中的任一项的方法,其中所述抗原装配物是胶束结构。

[0172] 162. 条款 135-160 中的任一项的方法,其中所述抗原装配物是脂质双层结构。

[0173] 163. 条款 135-162 中的任一项的方法,其中所述抗原装配物是管状结构。

[0174] 164. 条款 135-162 中的任一项的方法,其中所述抗原装配物是球形结构。

[0175] 165. 条款 135-164 中的任一项的方法,其中所述抗原装配物包含一种或多种抗原。

[0176] 166. 条款 165 的方法,其中一种或多种抗原是基于蛋白的抗原。

[0177] 167. 条款 165 或条款 166 的方法,其中一种或多种抗原是基于肽的抗原。

[0178] 168. 条款 165-167 中的任一项的方法,其中一种或多种抗原选自癌抗原、病毒抗原、细菌抗原和病原性抗原。

[0179] 169. 条款 165-168 中的任一项的方法,其中一种或多种抗原是病毒抗原。

[0180] 170. 条款 165-168 中的任一项的方法,其中一种或多种抗原是细菌抗原。

[0181] 171. 条款 165-168 中的任一项的方法,其中一种或多种抗原是病原性抗原。

[0182] 172. 条款 165-168 中的任一项的方法,其中所述病原性抗原是合成的或重组的抗原。

- [0183] 173. 条款 165-172 中的任一项的方法,其中至少一种抗原是 HPV 蛋白或肽。
- [0184] 174. 条款 165-173 中的任一项的方法,其中至少一种抗原是黑素瘤抗原。
- [0185] 175. 条款 174 的方法,其中所述黑素瘤抗原选自 gp100 (KVPRNQDWL [SEQ. ID. No. 8])、TRP2 (SYVDFFVWL [SEQ. ID. No. 9]) 和 p53 (KYICNSSCM [SEQ. ID. No. 10]) 和它们的组合。
- [0186] 176. 条款 165-175 中的任一项的方法,其中至少一种抗原选自脂蛋白、脂肽以及用具有增加的疏水性或降低的疏水性的氨基酸序列修饰的蛋白或肽。
- [0187] 177. 条款 165-176 中的任一项的方法,其中一种或多种抗原是脂质化的抗原或经过修饰以增加抗原疏水性的抗原。
- [0188] 178. 条款 165-177 中的任一项的方法,其中至少一种抗原是经修饰的蛋白或肽。
- [0189] 179. 条款 178 的方法,其中所述经修饰的蛋白或肽键合至疏水基团。
- [0190] 180. 条款 178 的方法,其中所述键合至疏水基团的经修饰的蛋白或肽进一步包含在所述抗原和所述疏水基团之间的接头序列。
- [0191] 181. 条款 180 的方法,其中所述疏水基团是棕榈酰基。
- [0192] 182. 条款 165-181 中的任一项的方法,其中至少一种抗原是未修饰的蛋白或肽。
- [0193] 183. 条款 165-182 中的任一项的方法,其中至少一种抗原选自:RAHYNIVTF (SEQ. ID. NO: 1)、GQAEPDRAHYNIVTF (SEQ. ID. NO: 2)、KSSGQAEPDRAHYNIVTF (SEQ. ID. NO: 3)、YMLDLQPETT (SEQ. ID. NO: 4)、KSSYMLDLQPETT (SEQ. ID. NO: 5)、KSSMHGDTPTLHEYMLDLQPETT (SEQ. ID. NO: 6)、KSSLLMGTLGIVCPICSQKP (SEQ. ID. NO: 7)、KVPRNQDWL (SEQ. ID. NO: 8)、SYVDFFVWL (SEQ. ID. NO: 9)、KYICNSSCM (SEQ. ID. NO: 10) 和 KSSKVPRNQDWL (SEQ. ID. NO: 11)。
- [0194] 184. 条款 165-183 中的任一项的方法,其中至少一种抗原是 RAHYNIVTF (SEQ. ID. NO: 1)。
- [0195] 185. 条款 165-184 中的任一项的方法,其中至少一种抗原是 GQAEPDRAHYNIVTF (SEQ. ID. NO: 2)。
- [0196] 186. 条款 165-185 中的任一项的方法,其中至少一种抗原是 KSSGQAEPDRAHYNIVTF (SEQ. ID. NO: 3)。
- [0197] 187. 条款 186 的方法,其中 KSSGQAEPDRAHYNIVTF (SEQ. ID. NO: 3) 被修饰成另外包含疏水基团。
- [0198] 188. 条款 187 的方法,其中所述疏水基团是棕榈酰基。
- [0199] 189. 条款 165-188 中的任一项的方法,其中至少一种抗原是 YMLDLQPETT (SEQ. ID. NO: 4)。
- [0200] 190. 条款 165-189 中的任一项的方法,其中至少一种抗原是 KSSYMLDLQPETT (SEQ. ID. NO: 5)。
- [0201] 191. 条款 190 的方法,其中 KSSYMLDLQPETT (SEQ. ID. NO: 5) 被修饰成另外包含疏水基团。
- [0202] 192. 条款 191 的方法,其中所述疏水基团是棕榈酰基。
- [0203] 193. 条款 165-192 中的任一项的方法,其中至少一种抗原是 KSSMHGDTPTLHEYMLDLQPETT (SEQ. ID. NO: 6)。

- [0204] 194. 条款 193 的方法, 其中 KSSMHGDTPTLHEYMLDLQPETT (SEQ. ID. NO: 6) 被修饰成另外包含疏水基团。
- [0205] 195. 条款 194 的方法, 其中所述疏水基团是棕榈酰基。
- [0206] 196. 条款 165-195 中的任一项的方法, 其中至少一种抗原是 KSSLLMGTLGIVCPICSQKP (SEQ. ID. NO: 7)。
- [0207] 197. 条款 196 的方法, 其中 KSSLLMGTLGIVCPICSQKP (SEQ. ID. NO: 7) 被修饰成另外包含疏水基团。
- [0208] 198. 条款 197 的方法, 其中所述疏水基团是棕榈酰基。
- [0209] 199. 条款 165-198 中的任一项的方法, 其中至少一种抗原是 KVPRNQDWL (SEQ. ID. NO: 8)。
- [0210] 200. 条款 165-199 中的任一项的方法, 其中至少一种抗原是 SYVDFVWL (SEQ. ID. NO: 9)。
- [0211] 201. 条款 165-200 中的任一项的方法, 其中至少一种抗原是 KYICNSSCM (SEQ. ID. NO: 10)。
- [0212] 202. 条款 165-201 中的任一项的方法, 其中至少一种抗原是 KSSKVPRNQDWL (SEQ. ID. NO: 11)。
- [0213] 203. 条款 202 的方法, 其中 KSSKVPRNQDWL (SEQ. ID. NO: 11) 被修饰成另外包含疏水基团。
- [0214] 204. 条款 203 的方法, 其中所述疏水基团是棕榈酰基。
- [0215] 205. 条款 135-204 中的任一项的方法, 其中所述哺乳动物是人。

附图说明

- [0216] 图 1 显示了与用 E7 抗原类似地配制的传统佐剂相比, 与 HPV-16 E7 肽抗原组合的不同阳离子脂质佐剂的抗肿瘤免疫应答。
- [0217] 图 2 显示了与 R-DOTAP/pE7₄₉₋₅₇ 复合物(其中氨基酸 43-48 不存在于抗原区域中)相比, R-DOTAP/pE7₄₃₋₅₇ 复合物的不同脂质体包封的制剂的肿瘤消退效力。
- [0218] 图 3 显示了与空 R-DOTAP 脂质体纳米颗粒相比, 使用改进的 HVP-16 E7₄₃₋₅₇ 胶束与 R-DOTAP 或 S-DOTAP 脂质体佐剂纳米颗粒的混合物的肿瘤消退效力。
- [0219] 图 4 显示了疫苗制剂的负染色电子显微术图像, 所述疫苗制剂含有由棕榈酰基 -KSSGQAEPDRAHYNIVTF [SEQ. ID. No. 3] 组成的圆柱形 pE7_{43-57M} 胶束和球形阳离子脂质 R-DOTAP 纳米颗粒。
- [0220] 图 5 显示了含有抗原装配物和佐剂的混合物的疫苗制剂的负染色电子显微术图像, 所述抗原装配物和佐剂共存于所述配制的混合物中, 所述抗原装配物在包含棕榈酰基 -KSSYMLDLQPETT [SEQ. ID. NO: 5) 的球形胶束结构中, 且所述佐剂包含球形 R-DOTAP 脂质体纳米颗粒。
- [0221] 图 6 显示了疫苗制剂的负染色电子显微术图像, 所述疫苗制剂含有由 pE7_{1-20M} 或棕榈酰基 - KSSMHGDTPTLHEYMLDLQPETT [SEQ. ID. No. 6] 组成的圆柱形结构和球形阳离子脂质 R-DOTAP 纳米颗粒。
- [0222] 图 7 显示了 ELISPOT 研究的结果, 所述 ELISPOT 研究比较了针对在以下制剂中的

黑素瘤肽 gp100 的抗原特异性免疫应答:含有被包封在 R-DOTAP 佐剂中的不同黑素瘤抗原的疫苗制剂,和与 R-DOTAP 脂质体佐剂一起共同施用的黑素瘤肽胶束性制剂。

[0223] 图 8 显示了 ELISPOT 研究的结果,所述 ELISPOT 研究比较了针对以下 HPV-16 肽的抗原特异性免疫应答:以与胶束相同的剂量配制并与不同佐剂一起共同施用的 HPV-16 肽,和被包封在脂质体佐剂中的 HPV-16 肽。

[0224] 下文描述了本发明的不同实施方案。在本文描述的一个实施方案中,提供了一种疫苗制剂。所述疫苗制剂包含佐剂和抗原装配物。

[0225] 在另一个实施方案中,提供了一种在哺乳动物中诱导免疫应答的方法。所述方法包括下述步骤:给所述哺乳动物施用有效量的疫苗制剂,其中所述疫苗制剂包含佐剂和抗原装配物。

[0226] 在另一个实施方案中,提供了一种治疗哺乳动物的疾病的方法。所述方法包括下述步骤:给所述哺乳动物施用有效量的疫苗制剂,其中所述疫苗制剂包含佐剂和抗原装配物。

[0227] 在不同的实施方案中,所述疫苗制剂包含佐剂和抗原装配物。本文中使用的术语“佐剂”表示,增强、增加和 / 或加强哺乳动物对抗原的免疫应答的物质。本文中使用的术语“抗原装配物”表示含有一种或多种抗原的组合物。

[0228] 在本文所述的某些实施方案中,所述疫苗制剂是微粒疫苗制剂。在某些实施方案中,所述佐剂和所述抗原装配物是混合物。

[0229] 在本文所述的某些实施方案中,所述佐剂是免疫调节剂。本文中使用的术语“免疫调节剂”表示,增强、指导和 / 或促进哺乳动物中的免疫应答的免疫学调节剂。

[0230] 在本文所述的某些实施方案中,所述佐剂是纳米颗粒。本文中使用的术语“纳米颗粒”表示,具有在纳米级测量的尺寸的颗粒。本文中使用的“纳米颗粒”表示,具有小于约 1,000 纳米尺寸的结构颗粒。在某些实施方案中,所述纳米颗粒是脂质体。

[0231] 在本文所述的某些实施方案中,所述佐剂是阳离子脂质。本文中使用的术语“阳离子脂质”表示,在生理 pH 携带净正电荷或者具有可质子化的基团且在低于 pKa 的 pH 时带正电荷的许多脂质物质中的任一种。

[0232] 根据本公开内容的合适阳离子脂质包括、但不限于:3-β [4N-(1N, 8-二胍基精脒)-氨基酰基]胆固醇 (BGSC);3-β [N,N-二胍基乙基-氨基乙烷)-氨基酰基]胆固醇 (BGTC);N,N¹N²N³四-甲基四棕榈基精胺 (cellfectin);N-叔丁基-N'-十四烷基-3-十四烷基-氨基丙脒 (CLONfectin);二甲基双十八烷基溴化铵 (DDAB);1,2-二肉豆蔻基氧基丙基-3-二甲基-羟基乙基溴化铵 (DMRIE);2,3-二油酰基氧基-N-[2(精胺甲氨基)乙基]-N,N-二甲基-1-三氟乙酸丙铵) (DOSPA);1,3-二油酰基氧基-2-(6-羧基精胺基)-丙酰胺 (DOSPER);4-(2,3-二-棕榈酰基氧基-丙基)-1-甲基-1H-咪唑 (DPIM);N,N,N',N'-四甲基-N,N'-双(2-羟乙基)-2,3-二油酰基氧基-1,4-丁烷-二碘化铵) (Tfx-50);N-1-(2,3-二油酰基氧基)丙基-N,N,N-三甲基氯化铵 (DOTMA) 或其它 N-(N,N-1-二烷氧基)-烷基-N,N,N-三取代的铵表面活性剂;1,2-二油酰基-3-(4'-三甲基铵基)丁醇-sn-甘油 (DOBT) 或胆甾醇基 (4'三甲铵)丁酸酯 (ChOTB),其中三甲铵基团经由丁醇间隔臂连接至双链(对于 DOTB)或胆甾醇基(对于 ChOTB);DORI (DL-1,2-二油酰基-3-二甲基氨基丙基-β-羟乙基铵)或 DORIE (DL-1,2-O-二油酰

基-3-二甲基氨基丙基- β -羟乙基铵)(DORIE)或如在WO 93/03709中公开的其类似物;1,2-二油酰基-3-琥珀酰-sn-甘油胆碱酯(DOSC);胆甾醇半琥珀酸酯(ChOSC);脂多胺(lipopolyamines)诸如双十八烷基氨基甘氨酸精胺(DOGS)和二棕榈酰基磷脂酰乙醇戊基精胺(DPPES),胆甾醇基-3 β -羧基-氨基-亚乙基三甲基碘化铵,1-二甲基氨基-3-三甲基铵基-DL-2-丙基-胆甾醇基碘化甲酸酯,胆甾醇基-3-0-羧基氨基亚乙胺,胆甾醇基-3- β -氧基琥珀氨基-亚乙基三甲基碘化铵,1-二甲基氨基-3-三甲基铵基-DL-2-丙基-胆甾醇基-3- β -氧基碘化琥珀酸酯,2-(2-三甲基铵基)-乙基甲基氨基乙基-胆甾醇基-3- β -氧基碘化琥珀酸酯,3- β -N-(N',N'-二甲基氨基乙烷)氨甲酰基胆固醇(DC-cho1),和3- β -N-(聚乙烯亚胺)-氨甲酰基胆固醇;0,0'-二肉豆蔻基-N-赖氨酸天冬氨酸盐(DMKE);0,0'-二肉豆蔻基-N-赖氨酸-谷氨酸盐(DMKD);1,2-二肉豆蔻基氧基丙基-3-二甲基-羟基乙基溴化铵(DMRIE);1,2-二月桂酰基-sn-甘油-3-乙基磷酸胆碱(DLEPC);1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油-3-乙基磷酸胆碱(DMEPC);1,2-二油酰基-sn-甘油-3-乙基磷酸胆碱(DOEPC);1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-乙基磷酸胆碱(DPEPC);1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-乙基磷酸胆碱(DSEPC);1,2-二油酰基-3-三甲铵丙烷(DOTAP);二油酰基二甲基氨基丙烷(DODAP);1,2-棕榈酰基-3-三甲铵丙烷(DPTAP);1,2-二硬脂酰基-3-三甲铵丙烷(DSTAP),1,2-肉豆蔻酰基-3-三甲铵丙烷(DMTAP);和十二烷基硫酸钠(SDS)。此外,也预见到所述的阳离子脂质中的任一种的结构变体和衍生物的运用。

[0233] 在某些实施方案中,所述阳离子脂质选自DOTAP、DOTMA、DOEPC和它们的组合。在其它实施方案中,所述阳离子脂质是DOTAP。在其它实施方案中,所述阳离子脂质是DOTMA。在其它实施方案中,所述阳离子脂质是DOEPC。在某些实施方案中,所述阳离子脂质是纯化的。

[0234] 在某些实施方案中,所述阳离子脂质是阳离子脂质的对映异构体。术语“对映异构体”表示这样的阳离子脂质的立体异构体:其为它的相应物立体异构体的不可重叠的镜像,例如R和S对映异构体。在不同的实施例中,所述对映异构体是R-DOTAP或S-DOTAP。在一个实施例中,所述对映异构体是R-DOTAP。在另一个实施例中,所述对映异构体是S-DOTAP。在某些实施方案中,所述对映异构体是纯化的。

[0235] 在本文描述的不同的实施方案中,所述抗原装配物是自装配结构。在本文描述的不同的实施方案中,所述抗原装配物是胶束结构。本文中使用的术语“胶束”表示分子的聚集体,诸如在胶体系统中。在其它实施方案中,所述抗原装配物是脂质双层结构。在某些实施方案中,所述抗原装配物是管状结构。在其它实施方案中,所述抗原装配物是球形结构。

[0236] 在本文描述的不同的实施方案中,所述抗原装配物包含一种或多种抗原。本文中使用的术语“抗原”表示具有以下特征的任意试剂(例如,蛋白、肽、多糖、糖蛋白、糖脂、核酸或它们的组合):其当被引入(直接地或在表达以后(如在例如DNA疫苗中))具有免疫系统的哺乳动物中时,会被所述哺乳动物的免疫系统识别,且能够引起免疫应答。如本文中定义的,抗原诱导的免疫应答可以是体液或细胞介导的,或二者兼有。当某种试剂能够与免疫系统的抗原识别分子(诸如免疫球蛋白(抗体)或T细胞抗原受体(TCR))特异性地相互作用时,所述试剂被称作“抗原性的”。

[0237] 在某些实施方案中,一种或多种抗原是基于蛋白的抗原。在其它实施方案中,一种

或多种抗原是基于肽的抗原。在不同的实施方案中,一种或多种抗原选自癌抗原、病毒抗原、细菌抗原和病原性抗原。本文中使用的“微生物抗原”是微生物的抗原,且包括、但不限于传染性的病毒、传染性的细菌、传染性的寄生虫和传染性的真菌。微生物抗原可以是完整的微生物及其天然分离物、片段或衍生物,与天然存在的微生物抗原相同或类似且优选地诱导对相应微生物(即天然存在的微生物抗原的来源微生物)特异性的免疫应答的合成化合物。在一个实施方案中,所述抗原是病毒抗原。在另一个实施方案中,所述抗原是细菌抗原。在不同的实施方案中,所述抗原是病原性抗原。在某些实施方案中,所述病原性抗原是合成的或重组的抗原。

[0238] 在某些实施方案中,所述抗原是癌症抗原。本文中使用的“癌症抗原”是与肿瘤或癌细胞相关的分子或化合物(例如,蛋白、肽、多肽、脂蛋白、脂肽、糖蛋白、糖肽、脂质、糖脂、碳水化合物、RNA 和 / 或 DNA),且其当在 MHC 分子背景中在抗原呈递细胞表面上表达时能够激发免疫应答(体液的和 / 或细胞的)。例如,癌症抗原可以是肿瘤相关的抗原。肿瘤相关的抗原包括自身抗原以及具有以下特征的其它抗原:当施用给哺乳动物时,其尽管不可与癌症特异性地结合,但是会增强针对肿瘤或癌细胞的免疫应答和 / 或减少肿瘤或癌细胞的生长。在一个实施方案中,至少一种抗原是 HPV 蛋白或肽。

[0239] 在某些实施方案中,至少一种抗原是黑素瘤抗原。在一个实施方案中,所述黑素瘤抗原选自 gp100 (KVPRNQDWL [SEQ. ID. No. 8])、TRP2 (SYVDFVWL [SEQ. ID. No. 9]) 和 p53 (KYICNSSCM [SEQ. ID. No. 10]) 和它们的组合。

[0240] 在不同的实施方案中,至少一种抗原选自脂蛋白、脂肽以及用具有增加的疏水性或降低的疏水性的氨基酸序列修饰的蛋白或肽。在某些实施方案中,一种或多种抗原是经过修饰以增加抗原疏水性的抗原。在一个实施方案中,至少一种抗原是经修饰的蛋白或肽。在某些实施方案中,所述经修饰的蛋白或肽键合至疏水基团。在其它实施方案中,所述键合至疏水基团的经修饰的蛋白或肽进一步包含在所述抗原和所述疏水基团之间的接头序列。在某些实施方案中,所述疏水基团是棕榈酰基。在其它实施方案中,至少一种抗原是未修饰的蛋白或肽。

[0241] 在本公开内容的某些实施方案中,至少一种抗原选自:RAHYNIVTF (SEQ. ID. NO: 1)、GQAEPDRAHYNIVTF (SEQ. ID. NO: 2)、KSSGQAEPDRAHYNIVTF (SEQ. ID. NO: 3)、YMLDLQPETT (SEQ. ID. NO: 4)、KSSYMLDLQPETT (SEQ. ID. NO: 5)、KSSMHGDTPTLHEYMLDLQPETT (SEQ. ID. NO: 6)、KSSLLMGTLGIVCPICSQKP (SEQ. ID. NO: 7)、KVPRNQDWL (SEQ. ID. NO: 8)、SYVDFVWL (SEQ. ID. NO: 9)、KYICNSSCM (SEQ. ID. NO: 10) 和 KSSKVPRNQDWL (SEQ. ID. NO: 11)。在一个实施方案中,至少一种抗原是 RAHYNIVTF (SEQ. ID. NO: 1)。在另一个实施方案中,至少一种抗原是 GQAEPDRAHYNIVTF (SEQ. ID. NO: 2)。在另一个实施方案中,至少一种抗原是 KSSGQAEPDRAHYNIVTF (SEQ. ID. NO: 3)。在某些实施方案中, KSSGQAEPDRAHYNIVTF (SEQ. ID. NO: 3) 被修饰成另外包含疏水基团。在一个实施方案中,所述疏水基团是棕榈酰基。

[0242] 在其它实施方案中,至少一种抗原是 YMLDLQPETT (SEQ. ID. NO: 4)。在另一个实施方案中,至少一种抗原是 KSSYMLDLQPETT (SEQ. ID. NO: 5)。在另一个实施方案中, KSSYMLDLQPETT (SEQ. ID. NO: 5) 被修饰成另外包含疏水基团。在一个实施方案中,所述疏水基团是棕榈酰基。

[0243] 在其它实施方案中,至少一种抗原是 KSSMHGDTPTLHEYMLDLQPETT (SEQ. ID. NO: 6)。在另一个实施方案中,KSSMHGDTPTLHEYMLDLQPETT (SEQ. ID. NO: 6) 被修饰成另外包含疏水基团。在一个实施方案中,所述疏水基团是棕榈酰基。

[0244] 在其它实施方案中,至少一种抗原是 KSSLLMGTLGIVCPICSQKP (SEQ. ID. NO: 7)。在某些实施方案中,KSSLLMGTLGIVCPICSQKP (SEQ. ID. NO: 7) 被修饰成另外包含疏水基团。在一个实施方案中,所述疏水基团是棕榈酰基。

[0245] 在某些实施方案中,至少一种抗原是 KVPRNQDWL (SEQ. ID. NO: 8)。在其它实施方案中,至少一种抗原是 SYVDFFVWL (SEQ. ID. NO: 9)。在其它实施方案中,至少一种抗原是 KYICNSSCM (SEQ. ID. NO: 10)。在另一个实施方案中,至少一种抗原是 KSSKVPRNQDWL (SEQ. ID. NO: 11)。在某些实施方案中,KSSKVPRNQDWL (SEQ. ID. NO: 11) 被修饰成另外包含疏水基团。在一个实施方案中,所述疏水基团是棕榈酰基。

[0246] 在本文描述的不同的实施方案中,所述疫苗制剂通过激活促分裂原激活蛋白 (MAP) 激酶信号传递途径而在哺乳动物中诱导免疫应答。佐剂(诸如阳离子脂质)对免疫应答的诱导描述在,例如,PCT/US2008/057678 (WO/2008/116078 ;“Stimulation of an Immune Response by Cationic Lipids”)和 PCT/US2009/040500 (WO/2009/129227 ;“Stimulation of an Immune Response by Enantiomers of Cationic Lipids”),二者的整个公开内容通过引用并入本文。在某些实施方案中,通过刺激细胞外信号调节的激酶 (“ERK”) -1、ERK-2 和 p38 中的至少一种,激活 MAP 激酶信号传递途径。在其它实施方案中,所述制剂会增强功能性的、抗原特异性的 CD8+ T 淋巴细胞应答。术语“哺乳动物”是本领域技术人员众所周知的。在一个实施方案中,所述哺乳动物是人。

[0247] 在本文描述的一个实施方案中,提供了一种在哺乳动物中诱导免疫应答的方法。所述方法包括下述步骤:给所述哺乳动物施用有效量的疫苗制剂,其中所述疫苗制剂包含佐剂和抗原装配物。前面描述的疫苗制剂的实施方案适用于本文描述的在哺乳动物中诱导免疫应答的方法。

[0248] 在某些实施方案中,经由所述哺乳动物的免疫系统细胞中的 MAP 激酶信号传递途径,激活所述免疫应答。在不同的实施方案中,通过刺激 ERK-1、ERK-2 和 p38 中的至少一种,激活所述 MAP 激酶信号传递途径。

[0249] 在其它实施方案中,所述免疫应答会激活所述哺乳动物中的细胞毒性的 T 淋巴细胞。在一个实施方案中,所述细胞毒性的 T 淋巴细胞是 CD8+ T 细胞。在另一个实施方案中,所述施用会增强功能性的、抗原特异性的 CD8+ T 淋巴细胞应答。在另一个实施方案中,所述免疫应答会激活所述哺乳动物中的抗体应答。在其它实施方案中,所述免疫应答会激活所述哺乳动物中的干扰素 - γ (IFN- γ)。

[0250] 在本文描述的一个实施方案中,提供了一种治疗哺乳动物的疾病的方法。所述方法包括下述步骤:给所述哺乳动物施用有效量的疫苗制剂,其中所述疫苗制剂包含佐剂和抗原装配物。前面描述的疫苗制剂和在哺乳动物中诱导免疫应答的方法的实施方案适用于本文描述的治疗哺乳动物的疾病的方法。

[0251] 在某些实施方案中,本文中关于传染性病原体使用的“治疗”和“处理”表示:增加对象对病原体感染的抗性 or 降低对象被病原体感染的可能性的预防性处理;和 / 或在对象已被感染后的治疗,以便对抗感染,例如减少或消除感染或防止其恶化。在一个实施方案

中,所述方法是预防性处理。

[0252] 实施例 1

包含抗原的一种佐剂和多种佐剂的制备

可以使用单独的阳离子脂质来制备佐剂。可替换地,可以使用阳离子脂质和其它免疫调节剂的混合物来制备佐剂。可以使用基于阳离子脂质的包含抗原的制剂来制备疫苗制剂。在本实施例中,使用 DOTAP 作为一种示例性的阳离子脂质,并使用 HPV 蛋白 E7 肽抗原作为一种示例性的抗原。

[0253] 在将阳离子脂质制备成脂质体的所有操作中,使用无菌注射用水(WFI)或缓冲液。在该实施例中,使用脂质膜制备脂质体。用于掺入脂质体中的 E7 抗原是 H-2D^b 限制的、源自 HPV 16 E7 蛋白的 CTL 表位(氨基酸 49-57, RAHYNIVTF [SEQ. ID. NO. 1])。如下在玻璃瓶中制备脂质膜:(1) 将脂质溶解于有机溶剂诸如氯仿中,和(2) 在稳定的干燥氮气流下蒸发氯仿溶液。通过将所述膜保持在真空下过夜,除去痕量的有机溶剂。然后通过加入所需量的 WFI 或缓冲液以制备 4-10 mg/mL 的终浓度,将脂质膜水合。然后将混悬液挤出为 200 nm 的大小并在 4°C 保存。

[0254] 为了制备包含抗原的阳离子脂质,用 E7 肽的水溶液将 DOTAP 脂质膜再水合。也可以使用本领域技术人员众所周知的在一般脂质体制备中使用的其它方法。

[0255] 实施例 2

抗原肽微粒结构的制备

可以将肽序列制备为与本发明一起使用的抗原。在本实施例中,使用 HPV 蛋白 E7 肽抗原作为一种示例性的抗原。可以针对合适的亲水性来选择肽序列,且可以通过将疏水分子或序列连接至 N-端氨基酸残基来修饰肽序列。例如,可以将疏水链(诸如棕榈酸部分)共价地连接至肽的 N-端氨基酸残基。得到的抗原肽微粒结构可以是,例如,胶束或双层。

[0256] 在该实施例中,选择肽序列,并以在 20-50 μg/μl 范围内的浓度悬浮于合适的溶剂中。基于特定疫苗的期望特征,其它浓度可能是合适的。

[0257] 在该实施例中,通过在选定的水性介质中稀释脂质化的肽的储备溶液来制备胶束或双层。这些稀释液通常含有 0.5-2 mg/ml 的给定肽,但是可以取决于特定疫苗的期望特征所需的抗原的量而变化。

[0258] 然后将肽微粒结构与包含阳离子脂质的空脂质体纳米颗粒 1:1 (v/v) 混合。

[0259] 实施例 3

阳离子脂质佐剂相对于传统佐剂而言的抗肿瘤效力

可以将用作佐剂的阳离子脂质的抗肿瘤效力与已知会诱导抗原特异性的 CTL 活性的传统的众所周知的佐剂进行比较。在该实施例中,将不同的脂质佐剂与 HPV 蛋白 E7 肽抗原 RAHYNIVTF (SEQ. ID. NO: 1) (aka “E7”) 一起配制为脂质体。不同的阳离子脂质包括 DOTAP、DOTMA 和 DOEPC。阴离子脂质包括 DOPG。也在该实施例中,还将传统的众所周知的佐剂 CpG 和弗氏完全佐剂(“CFA”)与 E7 一起配制。

[0260] 为了将阳离子脂质/E7 制剂的诱导针对肿瘤的免疫应答的效力与其它佐剂进行比较,在建立肿瘤后 6 天,用 E7 肽配制的脂质体治疗 6-12 只荷瘤小鼠/制剂。阳离子脂质佐剂制剂包含在 100 nmol 剂量的阳离子脂质组合物中的阳离子脂质(DOTAP、DOEPC 和 DOTMA)。阴离子脂质佐剂制剂包含 DOPG。传统的众所周知的佐剂制剂包含非常确定的强佐

剂 CFA 或 CpG ODN1826。对照组不包括治疗和仅包括 e7 抗原（即，没有佐剂）。

[0261] 在第 0 天，通过将 10^5 个 TC-1 细胞注射进每只小鼠的胁腹中，在小鼠中建立皮下 HPV- 阳性肿瘤。在第 6 天，小鼠接受在 0.10 ml 注射剂中的制剂的单次皮下注射。

[0262] 如在图 1 中所示，在第 26 天，接受 CFA 或 CpG 制剂和不同阳离子脂质制剂的小鼠都表现出与对照组相比肿瘤生长的有效抑制。接受阴离子脂质制剂的小鼠没有表现出肿瘤消退。与用基于确定佐剂的制剂 CpG/E7 或 CFA/E7 配制的那些制剂相比，接受基于阳离子脂质的制剂 DOTAP/E7、DOTMA/E7 和 DOEPC/E7 制剂的小鼠表现出更好的抗癌活性 ($p < 0.01$)。

[0263] 实施例 4

包含阳离子脂质纳米颗粒和抗原装配物的疫苗制剂的抗肿瘤效力

通过评价肿瘤消退，可以评价疫苗制剂的抗肿瘤效力。在该实施例中，所述疫苗制剂包含阳离子脂质纳米颗粒和呈管状结构的肽抗原装配物。此外，在本实施例中的示例性的阳离子脂质是 R-DOTAP，且示例性的抗原装配物是 HPV-16 E7 胶束。

[0264] 在该实施例中，将 H-2D^b 限制的源自 HPV 16 E7 蛋白的 CTL 表位（氨基酸 49-57，RAHYNIVTF [SEQ. ID. NO. 1]）延伸至氨基酸 43-57，GQAEPDRAHYNIVTF，[SEQ. ID. No. 2]。然后用氨基酸 KSS 进一步延伸 SEQ. ID. No. 2，并将疏水的棕榈酰基链连接至伸长的肽。作为结果，有效地促进胶束或双层形成（即，棕榈酰基 -KSSGQAEPDRAHYNIVTF [SEQ. ID. No. 3]）。当配制和评价时，观察到 SEQ. ID. No. 2 为弱抗原，类似于 SEQ. ID. No. 1。

[0265] 将大约 0.2-0.4 mg/ml (0.1-0.2mM) 的肽抗原包封进 2 mg/ml (2.9mM) 的包含 R-DOTAP 的脂质体纳米颗粒中，从而导致弱免疫应答和有效肿瘤消退的缺乏（参见图 2）。但是，与经由阳离子脂质佐剂递送系统实现的递送相比，将肽抗原序列配制进仅包含 SEQ. ID. No. 3 的微粒结构中会允许递送更高剂量的抗原。因而，可以得到克服所述肽的弱抗原性的有效方式。

[0266] 为了评价该方案，如在上面实施例 3 中所述，建立 HPV- 阳性的肿瘤。在第 6 天，小鼠（5 只 / 组）接受不同疫苗制剂的单次皮下注射：

- 制剂 1（阴性对照）：包含 R-DOTAP 的空脂质体纳米颗粒。

[0267] - 制剂 2：2.3 mg/ml 的 R-DOTAP 脂质体纳米颗粒和 1.1 mg/ml 的作为胶束的 SEQ. ID. No. 3 肽抗原装配物的混合物（0.10 ml 注射剂）。

[0268] - 制剂 3：2.3 mg/ml 的 S-DOTAP 脂质体纳米颗粒和 1.1 mg/ml 的作为胶束的 SEQ. ID. No. 3 肽抗原装配物的混合物（0.10 ml 注射剂）。

[0269] 图 3 显示了用制剂 2 注射的小鼠中的有效肿瘤消退。负染色扫描电子显微术显示了呈管状胶束结构的抗原装配物和呈球形 R-DOTAP 脂质体纳米颗粒的佐剂的混合物在配制的疫苗混合物中的共存（图 4）。本实施例证实，包含佐剂（例如，R-DOTAP 脂质体纳米颗粒）和抗原装配物（例如，作为胶束颗粒的 HPV E7 肽抗原）的疫苗制剂可以有效地促进动物中的肿瘤消退。

[0270] 实施例 5

使用包含阳离子脂质纳米颗粒和含有单一肽抗原的抗原装配物的疫苗制剂在人源化的 HLA-A2 转基因小鼠中引起的免疫应答

已知干扰素- γ (IFN- γ) 的诱导源自激活的抗原特异性的细胞毒性的 T- 淋巴细胞 (CD8+ T- 细胞)，且其对于动物中有效的治疗性免疫应答的发展而言是重要的。通过经由酶

联免疫吸附斑点 (ELISPOT) 测定来测量 IFN- γ 的诱导,可以评价使用包含阳离子脂质纳米颗粒和抗原装配物的疫苗制剂在人源化的 HLA-A2 转基因小鼠中引起的免疫应答。在该实施例中,所述疫苗制剂包含阳离子脂质纳米颗粒(例如, R-DOTAP)以及具有不同组成和结构的肽抗原装配物。

[0271] 在本实施例中评价了 2 种不同的疫苗制剂。制剂 1 包含阳离子脂质 R-DOTAP 佐剂纳米颗粒,并利用非常确定的 HPV-16 E7 HLA-A2 抗原性的人肽抗原 YMLDLQPETT [SEQ. ID. No. 4]。通过连接 3 个氨基酸和棕榈酸来修饰 SEQ. ID. No. 4,以得到序列棕榈酰基-KSSYMLDLQPETT [SEQ. ID. No. 5]。根据本文所述的方法,自发地形成微粒肽结构。制剂 1 含有大约 2.8 mg/ml 的 R-DOTAP 佐剂纳米颗粒的佐剂和大约 0.83 mg/ml 的 SEQ. ID. No. 5 肽的抗原装配物。

[0272] 在第 0 和 7 天,给小鼠注射 0.1ml 制剂 1。将小鼠处死,并在第 14 天从每只小鼠取出脾细胞进行评价。从免疫的小鼠收获脾细胞,并接种进 96-孔板的孔中(大约 250,000 个脾细胞/孔)。然后将各个孔暴露于肽抗原 YMLDLQPETT [SEQ. ID. No. 4],并分析免疫应答。在该测定中形成的每个斑点代表单个反应性的脾细胞,并且该分析的读出会提供在 96-孔板上形成的斑点的数目。因而,ELISPOT 测定提供了定量测定来有效地确定针对抗原 YMLDLQPETT 实现的免疫应答。在表 1 中显示了 ELISPOT 测定的结果,其证实了制剂 1 的高效力。

[0273] 表 1:通过 ELISPOT 测量的免疫应答

制剂编号	肽抗原序列/组成	得到的抗原颗粒结构	每 250,000 个脾细胞的 IFN- γ 斑点的平均数
#1	- 棕榈酰基-KSSYMLDLQPETT	球形	262.2
#2	- 棕榈酰基-KSSMHGDTPTLHEYMLDLQPETT	管状	122.4

[0274] 制剂 2 包含阳离子脂质 R-DOTAP 佐剂纳米颗粒,并利用选择 HPV-16 E7 蛋白的 N-端的前 20 个氨基酸的肽。将该肽修饰成棕榈酰基-KSSMHGDTPTLHEYMLDLQPETT [SEQ. ID. No. 6]。根据本文所述的方法,自发地形成微粒肽结构。制剂 2 含有大约 2.8 mg/ml 的 R-DOTAP 佐剂纳米颗粒的佐剂和大约 0.95 mg/ml 的 SEQ. ID. No. 6 肽的抗原装配物。

[0275] 在第 0 和 7 天,给小鼠注射 0.1ml 制剂 2。将小鼠处死,并在第 14 天从每只小鼠取出脾细胞进行评价。如在表 1 中所示,再次证实了响应于制剂 2 的免疫接种的强免疫应答。

[0276] 负染色扫描电子显微术显示了在配制的混合物中共存的呈球形胶束结构的包含棕榈酰基-KSSYMLDLQPETT 的抗原装配物和包含球形 R-DOTAP 脂质体纳米颗粒的佐剂(即制剂 1)的混合物的存在(参见图 5)。

[0277] 图 6 显示了在配制的混合物中共存的呈管状胶束结构的包含棕榈酰基-KSSMHGDTPTLHEYMLDLQPETT 的抗原装配物和包含球形 R-DOTAP 脂质体纳米颗粒的佐剂(即制剂 2)。

[0278] 实施例 6

使用包含阳离子脂质纳米颗粒和含有多种肽抗原的抗原装配物的疫苗制剂在人源化的 HLA-A2 转基因小鼠中引起的免疫应答

类似于实施例 5, 可以利用 ELISPOT 来评价包含阳离子脂质纳米颗粒和抗原装配物的疫苗制剂的效力。在该实施例中, 所述疫苗制剂包含阳离子脂质纳米颗粒 (例如, R-DOTAP) 和含有 3 种肽抗原的肽抗原装配物。

[0279] 在本实施例中的制剂包含阳离子脂质 R-DOTAP 佐剂纳米颗粒和含有 3 种肽抗原的混合胶束结构的抗原装配物。评价了针对肽序列 YMLDLQPETT 的免疫应答。混合的肽颗粒由 SEQ. ID. No. 5、SEQ. ID. No. 6 和棕榈酰基-KSSLLMGTLGIVCPICSQKP [SEQ. ID. No. 7] 组成。该制剂含有大约 2.8 mg/ml 的 R-DOTAP 佐剂纳米颗粒的佐剂和大约 1 mg/ml 的每种肽的抗原装配物。

[0280] 在第 0 和 7 天, 给小鼠注射 0.1ml 制剂。将小鼠处死, 并在第 14 天从每只小鼠取出脾细胞进行评价。如在表 2 中所示, 响应于该制剂的免疫接种, 表现出强免疫应答。

[0281] 表 2: 通过 ELISPOT 测量的免疫应答

肽抗原序列/组成	得到的抗原颗粒结构	每 250,000 个脾细胞的 IFN- γ 斑点的平均数
- 棕榈酰基-KSSGQAEPDRAHYNIVTF, - 棕榈酰基-KSSMHGDTPTLHEYMLDLQPETT, 和 - 棕榈酰基-KSSLLMGTLGIVCPICSQKP	管状	447.1

[0282] 实施例 7

使用包含阳离子脂质纳米颗粒和含有胶束黑素瘤抗原的抗原装配物的疫苗制剂引起的免疫应答

通过 ELISPOT, 可以评价使用包含阳离子脂质纳米颗粒和抗原装配物的疫苗制剂在 C57/BL6 小鼠中引起的免疫应答。在该实施例中, 所述疫苗制剂包含阳离子脂质纳米颗粒 (例如, R-DOTAP) 和呈胶束结构的黑素瘤抗原的肽抗原装配物。

[0283] 在该实施例中, 制剂 A 包含阳离子脂质 R-DOTAP 佐剂纳米颗粒和包封如下 3 种黑素瘤抗原的抗原装配物: gp100 (KVPRNQDWL [SEQ. ID. No. 8])、TRP2 (SYVDFFVWL [SEQ. ID. No. 9]) 和 p53 (KYICNSSCM [SEQ. ID. No. 10])。制剂 A 含有大约 4.3mM R-DOTAP 佐剂纳米颗粒的佐剂和大约 0.25mM gp100 肽。

[0284] 为了递送更大量的 gp100 抗原, 开发了胶束性制剂。使用经修饰的抗原棕榈酰基-KSS KVPRNQDWL [SEQ. ID. No. 11] 来开发胶束性制剂。制剂 B 包含约 4.4mM 脂质体 R-DOTAP 包封的 TRP2 和大约 0.46mM gp100 的胶束性制剂。如在实施例 2 中所述, 制备从经修饰的抗原制成的胶束。如在实施例 5 中所述, 通过 ELISPOT 评价疫苗在 C57/BL6 小鼠中的有效性。

[0285] 图 7 显示了与脂质体包封的 gp100 抗原相比, 针对胶束性制剂形式的包含 gp100 抗原的制剂的免疫应答的超过 20 倍增加。认为该免疫应答的增强归因于经由所述胶束性制剂递送的 gp100 抗原的量的几乎倍增。

[0286] 实施例 8

使用胶束性抗原装配物和脂质体包封的抗原装配物的疫苗制剂引起的免疫应答的比较

通过 ELISPOT, 可以评价使用包含不同阳离子脂质纳米颗粒和不同抗原装配物的疫苗制剂引起的免疫应答。在该实施例中, 可以使用不同的阳离子脂质纳米颗粒 (例如, DOEPC 或 DOTMA) 或乳剂佐剂 Montanide 来配制疫苗制剂。此外, 可以使用呈胶束结构或脂质体包封的结构的抗原装配物来配制疫苗制剂。

[0287] 在本实施例中评价了多种不同的疫苗制剂。在一种制剂中, 抗原装配物包含肽抗原 [SEQ. ID. No. 2] (0.11mM) 和阳离子脂质佐剂 DOEPC (1mM)。在第二种制剂中, 抗原装配物包含用于使胶束能够形成的经修饰的肽抗原 [SEQ. ID. No. 3] (0.11mM) 和阳离子脂质佐剂 DOEPC (1mM)。在第三种制剂中, 抗原装配物包含肽抗原 [SEQ. ID. No. 2] (0.11mM) 和阳离子脂质佐剂 DOTMA (1mM)。在第四种制剂中, 抗原装配物包含经修饰的肽抗原 [SEQ. ID. No. 3] (0.11mM) 和阳离子脂质佐剂 DOTMA (1mM)。在第五种制剂中, 抗原装配物包含肽抗原 [SEQ. ID. No. 2] (0.11mM) 和乳剂佐剂 Montanide。在第六种制剂中, 抗原装配物包含经修饰的肽抗原 [SEQ. ID. No. 3] (0.11mM) 和乳剂佐剂 Montanide。

[0288] 在抗原装配物包含未修饰的肽抗原 [SEQ. ID. No. 2] 的制剂中, 将所述抗原装配物配制为脂质体包封的。相反, 在抗原装配物包含经修饰的肽抗原 [SEQ. ID. No. 3] 的制剂中, 将所述抗原装配物配制为胶束的, 并与佐剂以 1:1 比例混合, 以便维持与对应的脂质体制剂相比相同的抗原和佐剂含量。分别根据实施例 1 和实施例 2 的方案来制备脂质体包封的抗原装配物和胶束性抗原装配物。通过经由 ELISPOT 确定抗原特异性免疫应答, 评价不同疫苗制剂的效力。

[0289] 图 8 显示了本实施例的结果。当以胶束形式与特定佐剂一起递送抗原装配物时, 相同剂量的抗原和佐剂会导致非常优良的抗原特异性免疫应答。重要的是, 当使用以脂质体包封形式递送的抗原装配物时, 观察到的免疫应答是非常弱的。

[0290] 观察到的免疫应答也取决于与胶束抗原一起施用的具体佐剂, 如用 DOTMA、DOEPC 和 Montanide 所看到的。DOTMA 制剂表现出比 DOEPC 制剂优良的免疫应答, 并且两种阳离子脂质制剂都优于乳剂佐剂 Montanide。

[0291] 尽管已经在前述描述中详细地举例说明和描述了本发明, 这样的举例说明和描述在性质上应当视作示例性的且非限制性的, 应当理解, 仅仅描述了示例性实施方案, 并且期望保护落入本发明范围内的所有变化和修改。本领域普通技术人员可以容易地设计他们自己的实现, 所述实现包含本文描述的一个或多个特征且因而落入本公开内容的范围内。

序列表

<110> PDS BIOTECHNOLOGY CORPORATION

BEDU-ADD0, Frank

CONN, Gregory

JACOBSON, Eric

MERCER, Carol

JOHNSON, Kenya

<120> 微粒疫苗制剂

<130> 50165-222751

<150> 61/533,512

<151> 2011-09-12

<160> 11

<170> PatentIn 3.5 版

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe

1

5

<210> 2

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人

<400> 2

Gly Gln Ala Glu Pro Asp Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe

1

5

10

15

<210> 3

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 伸长的肽

<400> 3

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

1

5

10

15

Thr Phe

<210> 4

<211> 10

<212> PRT

<213> 智人

<400> 4

Tyr Met Leu Asp Leu Gln Pro Glu Thr Thr

1

5

10

<210> 5

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 伸长的肽

<400> 5

Lys Ser Ser Tyr Met Leu Asp Leu Gln Pro Glu Thr Thr

1 5 10

<210> 6

<211> 23

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 伸长的肽

<400> 6

Lys Ser Ser Met His Gly Asp Thr Pro Thr Leu His Glu Tyr Met Leu

1 5 10 15

Asp Leu Gln Pro Glu Thr Thr

20

<210> 7

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 伸长的肽

<400> 7

Lys Ser Ser Leu Leu Met Gly Thr Leu Gly Ile Val Cys Pro Ile Cys

1 5 10 15

Ser Gln Lys Pro

20

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 伸长的肽

<400> 8

Lys Val Pro Arg Asn Gln Asp Trp Leu

1

5

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 9

Ser Tyr Val Asp Phe Phe Val Trp Leu

1

5

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 伸长的肽

<400> 10

Lys Tyr Ile Cys Asn Ser Ser Cys Met

1

5

<210> 11

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 伸长的肽

<400> 11

Lys Ser Ser Lys Val Pro Arg Asn Gln Asp Trp Leu

1

5

10

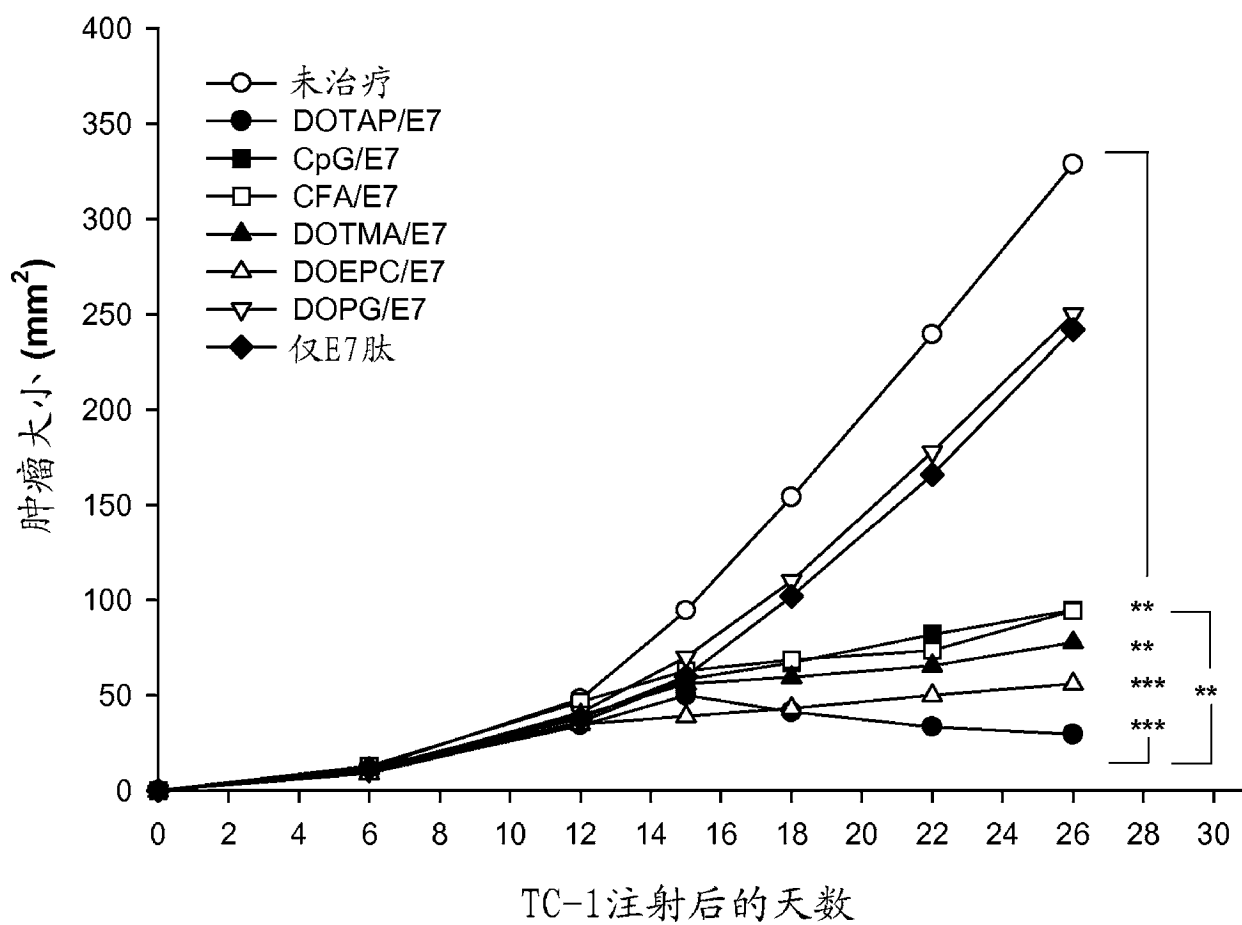


图 1

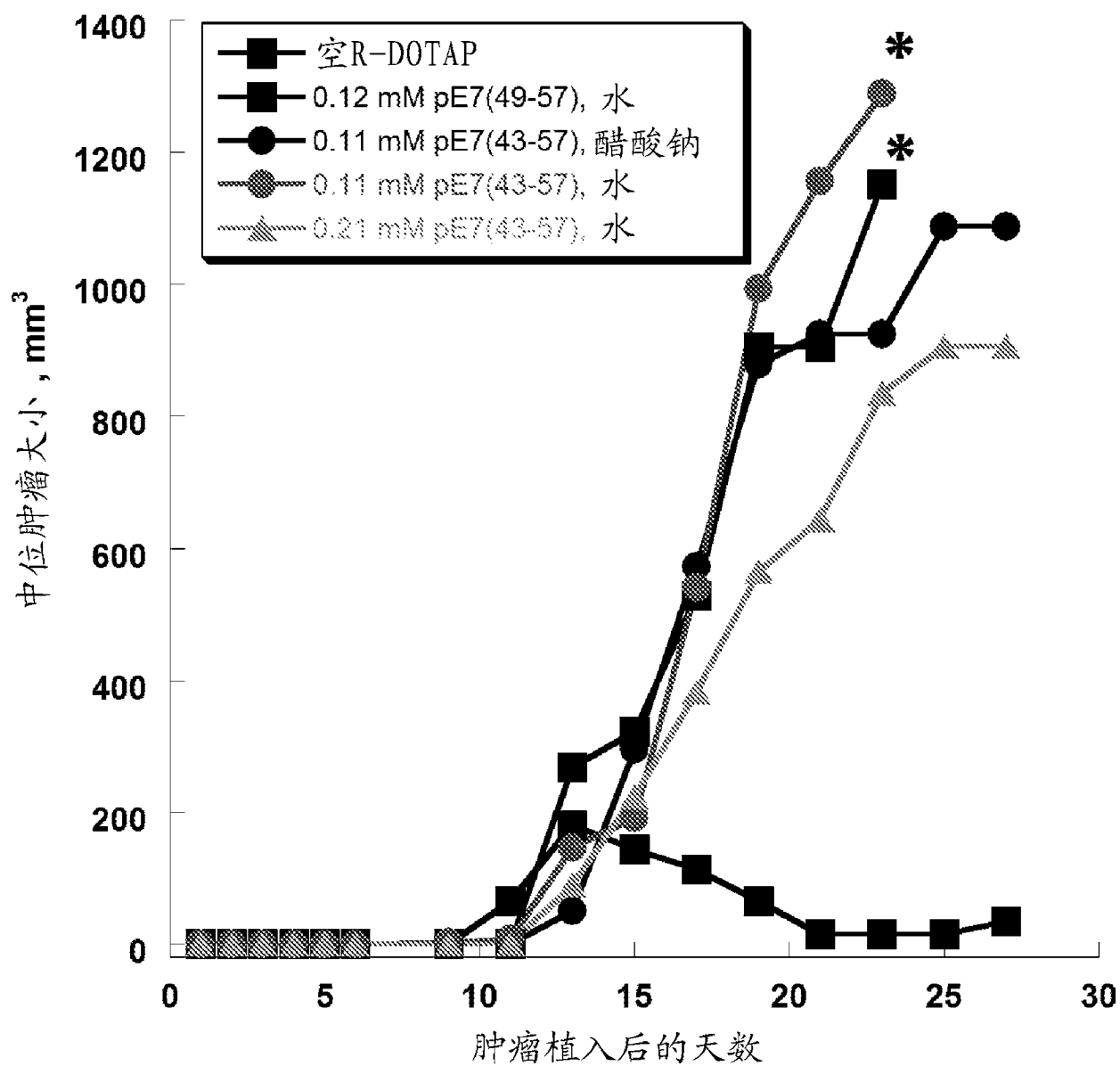


图 2

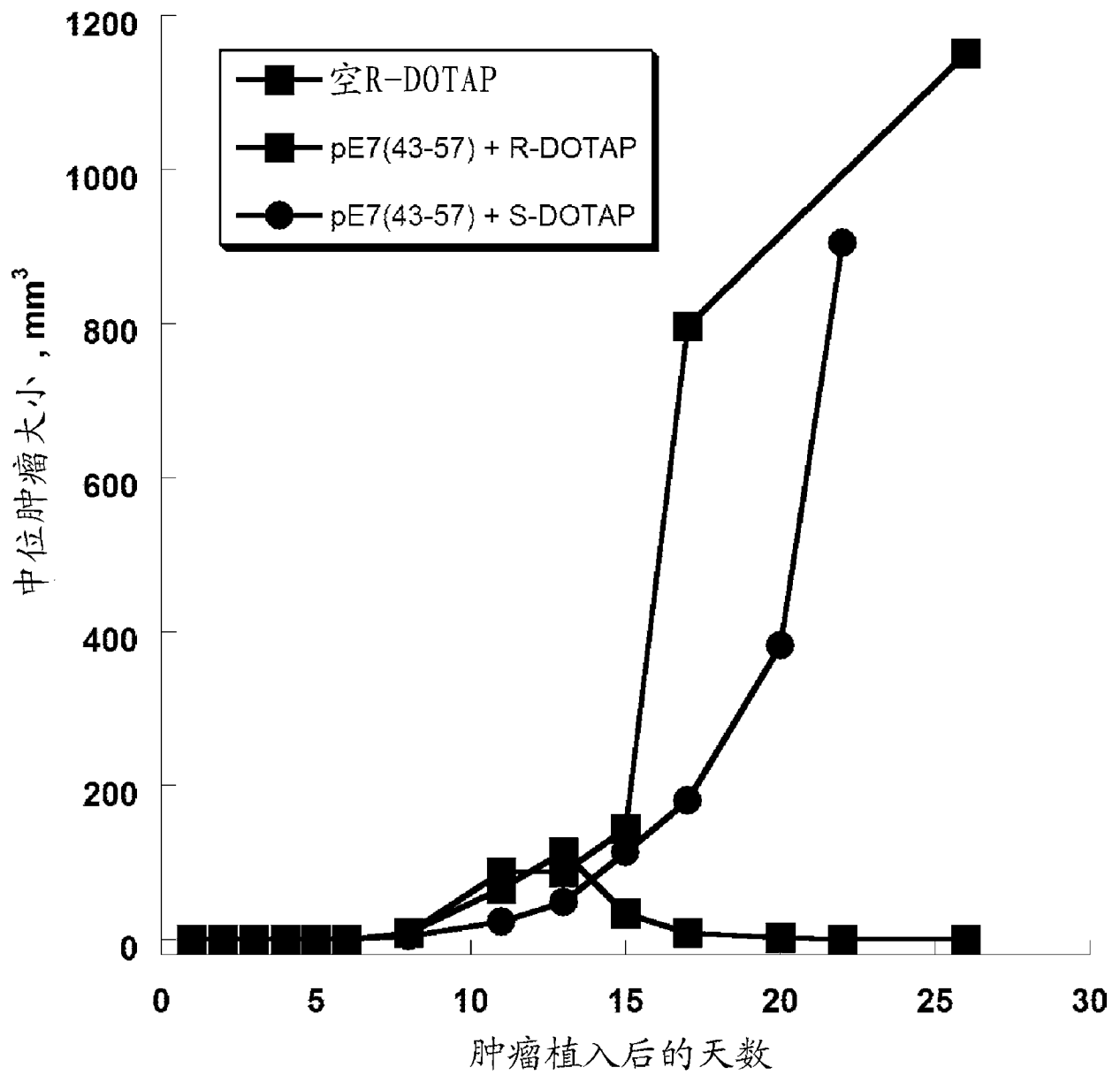
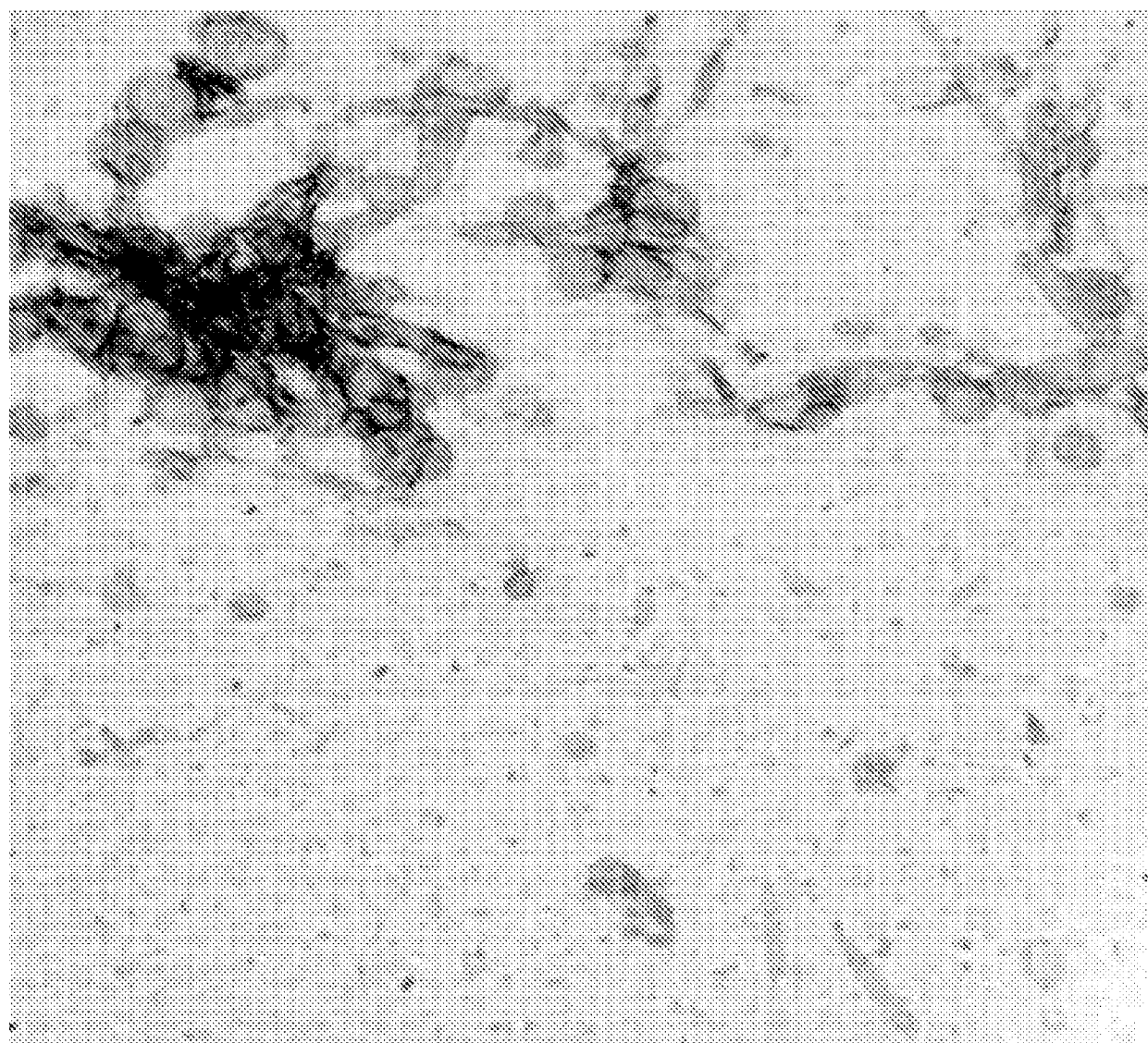


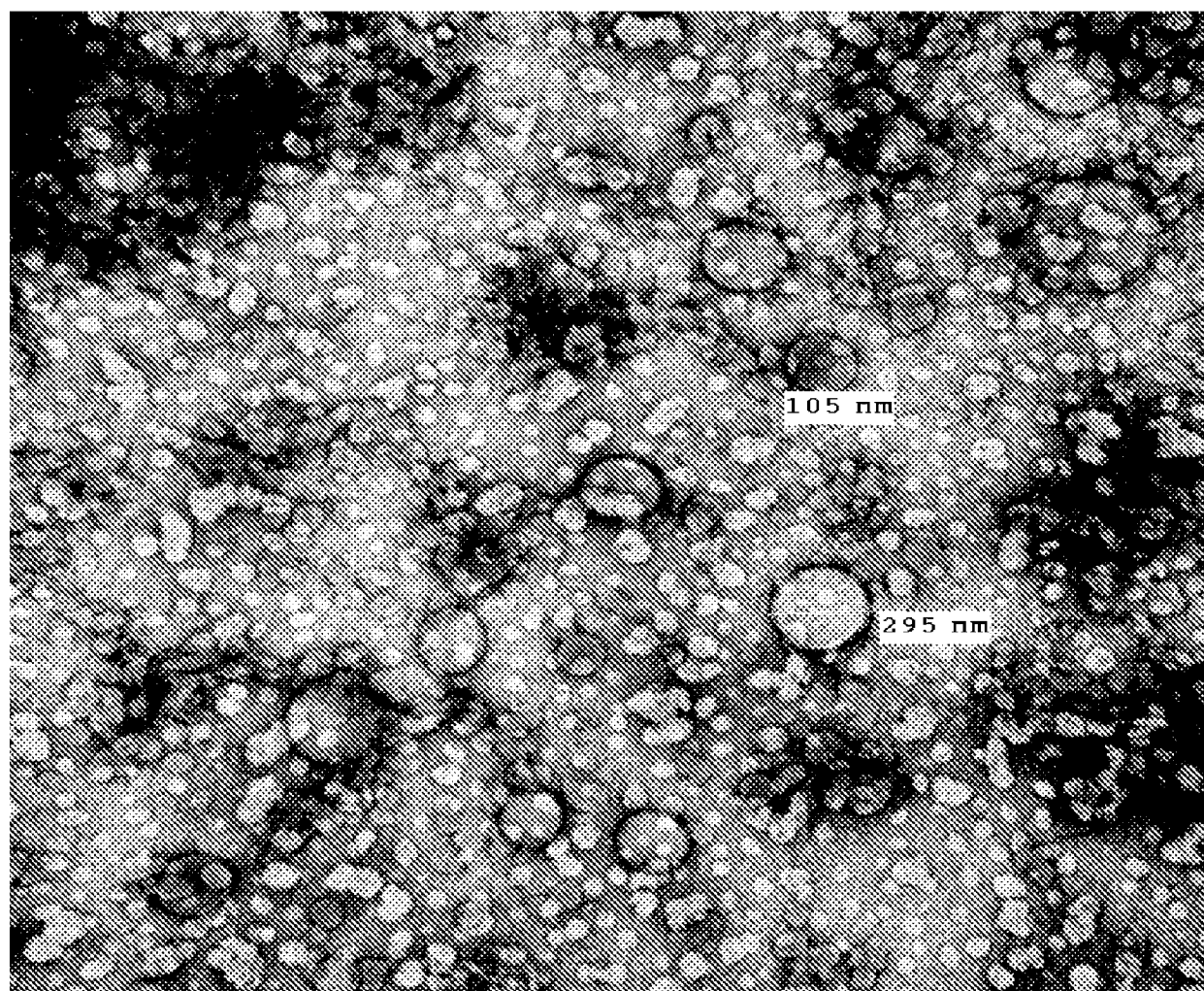
图 3



Eric Jacobson 060211-014
Carol's
Print Mag: 48000x @ 7.0 in
1:19:43 p 06/03/11
TEM Mode: Imaging

500 nm
HV=80.0kV
Direct Mag: 48000x
X:-240.3 Y: 789.6 T:0
AMT Camera System

图 4



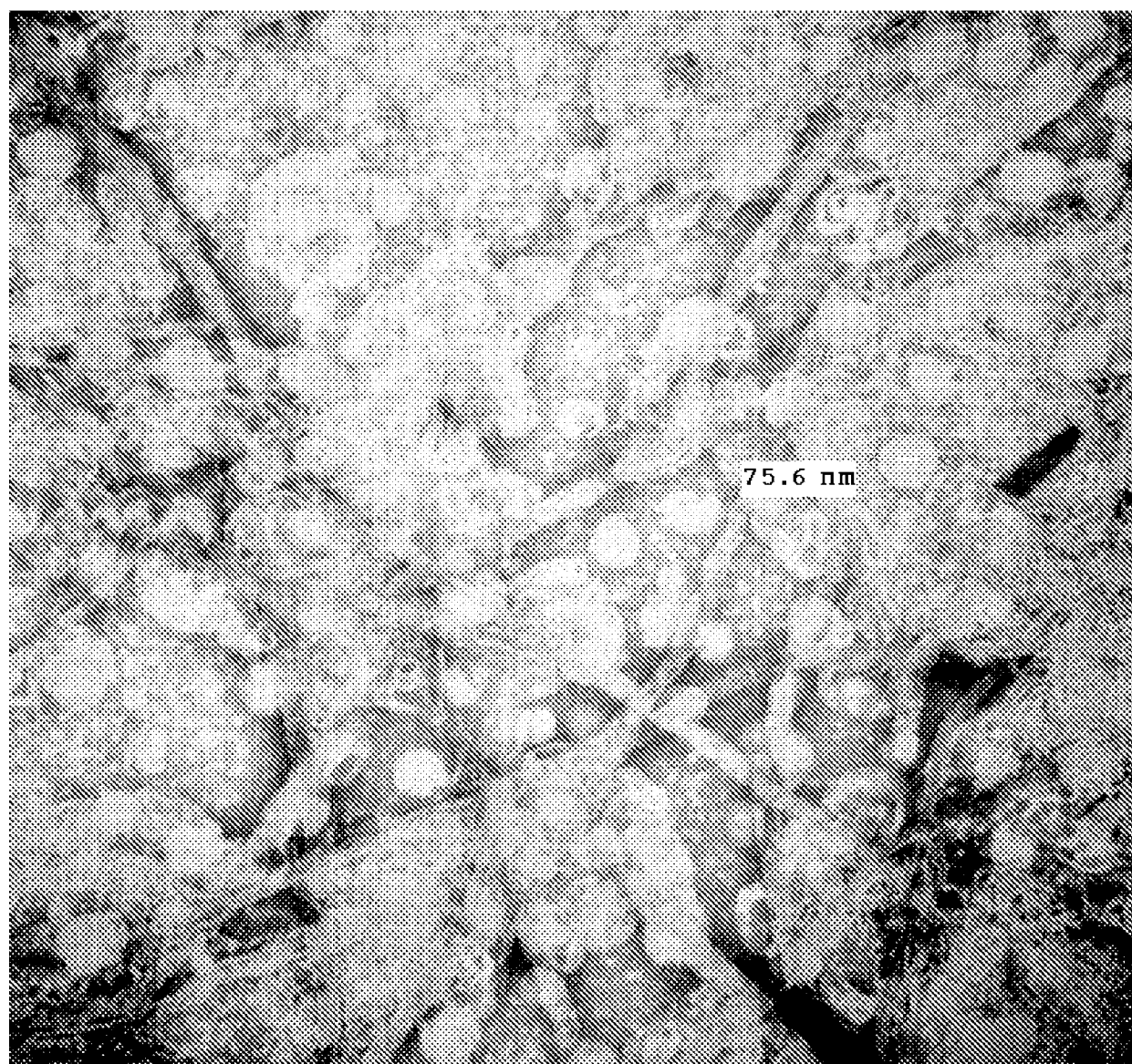
8.15.11.053

pE7:11-20.micelles.DOTAP
diluted 1:2 with DOTAP
Print Mag: 48000x @ 7.0 in
11:24:27 a 08/15/11
TEM Mode: Imaging
low mag grid 3

500 nm

HV=80.0kV
Direct Mag: 40000x
X:-509.6 Y:-148.7 T:0
AMT Camera System

图 5



8.16.11.008

pE7:11-20 micelles 1:2 with H₂O

Print Mag: 144000x @ 7.0 in

10:06:20 a 08/16/11

TEM Mode: Imaging

100 nm

HV=80.0kV

Direct Mag: 120000x

X:-136.1 Y:-157 T:0

AMT Camera System

图 6

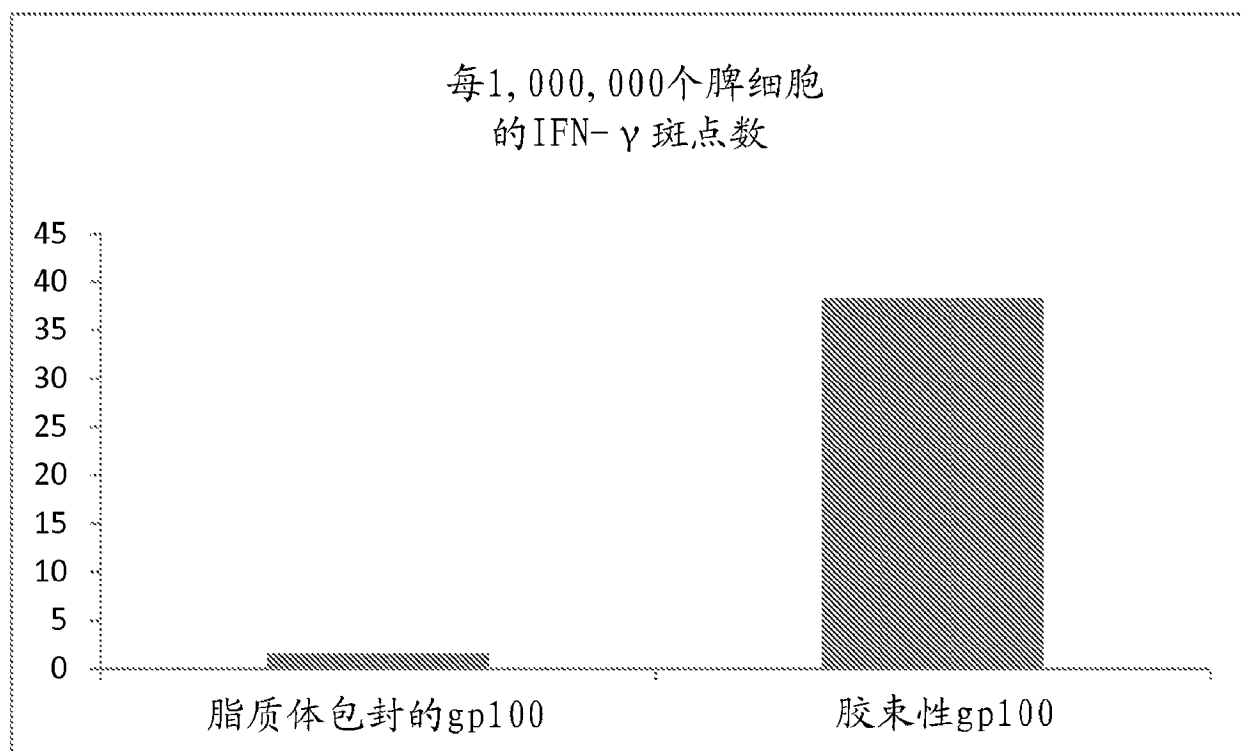


图 7

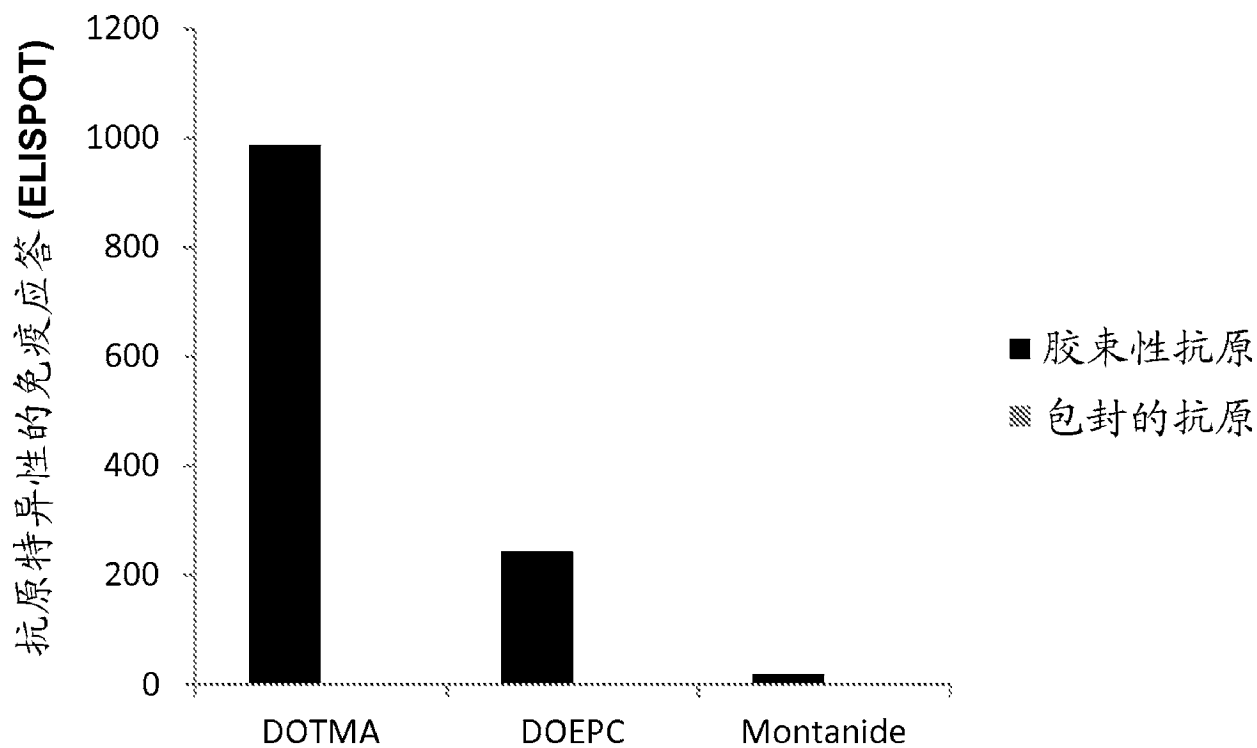


图 8