



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103717235 A

(43) 申请公布日 2014. 04. 09

(21) 申请号 201280031072. 1

代理人 李华英

(22) 申请日 2012. 06. 22

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

A61K 39/395 (2006. 01)

61/500, 993 2011. 06. 24 US

61/513, 840 2011. 08. 01 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2013. 12. 24

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2012/043890 2012. 06. 22

(87) PCT国际申请的公布数据

W02012/178118 EN 2012. 12. 27

(71) 申请人 埃皮托吉尼西斯有限公司

地址 美国康涅狄格

(72) 发明人 M·瓦贾迪 S·帕德拉赫

(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

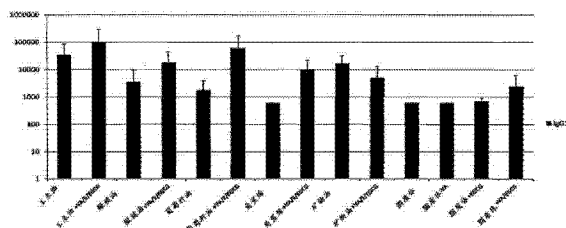
权利要求书2页 说明书28页 附图15页

(54) 发明名称

作为抗原特异性免疫调节剂的包含选择的载体、维生素、单宁和类黄酮的组合的药物组合物

(57) 摘要

本发明提供能够在受试者中调节免疫应答(包括增强或抑制免疫应答)的佐剂组合物。通过增强或抑制抗原呈递活性;经由诸如自然杀伤细胞的激活或抑制、和/或B和/或T细胞的亚型的直接激活来增强或抑制天然免疫应答,这些佐剂组合物也可用于增强或抑制抗原的免疫原性。也提供制备佐剂组合物的方法以及使用佐剂组合物的方法。在某些实施方案中,组合物包含以下组合:药学上可接受的载体、类黄酮、单宁和维生素。



1. 一种组合物,包含选自维生素 A、维生素 E 及其混合物的维生素;选自芥子油、玉米油、橄榄油、葡萄籽油、角鲨烯和油酸的药学上可接受的油载体;以及类黄酮。
2. 根据权利要求 1 所述的组合物,其中所述维生素包括维生素 A 和维生素 E。
3. 根据权利要求 1 或 2 所述的组合物,其还包含维生素 D。
4. 根据权利要求 1 或 2 所述的组合物,其中所述类黄酮是儿茶素。
5. 根据权利要求 3 所述的组合物,其中所述儿茶素是表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)。
6. 根据权利要求 1、2 或 5 所述的组合物,其中所述组合物包含约 10% 至约 75%v/v 芥子油。
7. 根据权利要求 6 所述的组合物,其中所述组合物包含 10v/v 芥子油。
8. 根据权利要求 6 所述的组合物,其中所述组合物包含 50%v/v 芥子油。
9. 根据权利要求 6 所述的组合物,其中所述组合物包含 75%v/v 芥子油。
10. 根据权利要求 1、2 或 5 所述的组合物,其中所述组合物还包含至少一种抗原。
11. 一种组合物,包含选自维生素 A、维生素 E 及其混合物的维生素;氢氧化铝和类黄酮。
12. 根据权利要求 11 所述的组合物,其中所述类黄酮是儿茶素。
13. 根据权利要求 12 所述的组合物,其中所述儿茶素是 EGCG。
14. 一种组合物,包含维生素 D、维生素 E、类黄酮和 10% 芥子油。
15. 根据权利要求 13 所述的组合物,其中所述类黄酮是儿茶素。
16. 根据权利要求 14 所述的组合物,其中所述儿茶素是 EGCG。
17. 一种组合物,包含维生素 D、维生素 E、类黄酮和氢氧化铝。
18. 根据权利要求 17 所述的组合物,其中所述类黄酮是儿茶素。
19. 根据权利要求 18 所述的组合物,其中所述儿茶素是 EGCG。
20. 根据权利要求 17 所述的组合物,其包含约 2.5% 至 50%v/v 氢氧化铝。
21. 根据权利要求 20 所述的组合物,其包含 2.5%v/v 氢氧化铝。
22. 根据权利要求 20 所述的组合物,其包含 50%v/v 氢氧化铝。
23. 一种组合物,包含维生素 A 和油酸。
24. 根据权利要求 23 所述的组合物,其还包含类黄酮。
25. 根据权利要求 24 所述的组合物,其中所述类黄酮是儿茶素。
26. 根据权利要求 25 所述的组合物,其中所述儿茶素是 EGCG。
27. 根据权利要求 23 所述的组合物,其还包含约 10% 至约 50% 油酸。
28. 根据权利要求 27 所述的组合物,其包含 40% 油酸。
29. 一种组合物,包含维生素 A、单宁和芥子油。
30. 根据权利要求 29 所述的组合物,其中所述单宁是没食子酸。
31. 根据权利要求 29 所述的组合物,其包含 50% 芥子油。
32. 根据权利要求 31 所述的组合物,其还包含抗原。
33. 一种组合物,包含选自维生素 A、维生素 E 及其混合物的维生素;脂质体和油酸;以及类黄酮。
34. 一种在哺乳动物受试者中调节免疫应答的方法,其包括向所述受试者施用根据权

利要求 1、11、14、23、29 和 33 所述的组合物。

35. 根据权利要求 34 所述的方法,其中所述调节为增强。

36. 根据权利要求 34 所述的方法,其中所述调节为抑制。

作为抗原特异性免疫调节剂的包含选择的载体、维生素、单宁和类黄酮的组合物

技术领域

[0001] 本公开涉及佐剂组合物和其使用方法。

发明背景

[0002] 疫苗是性价比非常高的医疗干预方法。然而, 尽管通过疫苗接种已经预防许多疾病, 但是仍然有许多其他疾病待预防和 / 或治疗。而且, 对于已经存在疫苗的许多疾病来说, 仍然需要改善的疫苗。制备有效疫苗的主要障碍是疫苗缺乏或者低免疫原性。通过使用佐剂和递送系统能够增加疫苗的有效性。

发明概要

[0003] 本发明提供能够在受试者中调节免疫应答 (包括增强或抑制免疫应答) 的佐剂组合物。通过增强或抑制抗原呈递活性; 经由诸如自然杀伤细胞的激活或抑制、和 / 或 B 和 / 或 T 细胞、或其他细胞的亚型的直接激活来增强或抑制天然免疫应答, 这些佐剂组合物也可用于增强或抑制抗原的免疫原性。也提供制备佐剂组合物的方法以及使用佐剂组合物的方法。

[0004] 在某些实施方案中, 组合物包括药学上可接受的载体; 至少一种类黄酮和 / 或至少一种单宁和至少一种维生素。

[0005] 在某些情况下, 药学上可接受的载体可以为有机载体或无机载体。无机载体的例子包括铝盐, 例如, 氢氧化铝或磷酸铝。有机载体的例子包括脂质体、油类等。在某些实施方案中, 药学上可接受的载体可以为油, 例如动物油、植物油、石油、合成油等。动物油的例子包括鱼油、鲨鱼肝油等。植物油的例子包括芥子油、椰子油、红花油等。

[0006] 在某些实施方案中, 类黄酮是其衍生物和 / 或盐。本发明的类黄酮的非限制性例子包括儿茶素、类黄酮衍生物、和类黄酮衍生物盐。在某些情况下, 类黄酮是儿茶素、或其衍生物或者盐。

[0007] 在某些实施方案中, 单宁是其衍生物和 / 或盐。本发明的单宁的非限制性例子包括没食子酸、没食子酸衍生物、和没食子酸衍生物盐。在某些情况下, 单宁是没食子酸、或其衍生物或者盐。

[0008] 在某些实施方案中, 维生素是其衍生物和 / 或盐。维生素可以为水溶性维生素, 例如, 维生素 B 和维生素 C, 或者脂溶性维生素, 例如, 维生素 A、D、K 和 E。

[0009] 在某些实施方案中, 组合物可以包括药学上可接受的载体; 儿茶素、或其衍生物或者盐; 没食子酸或其衍生物; 和维生素 A、或其衍生物或者盐。在某些实施方案中, 组合物包括药学上可接受的载体; 儿茶素、或其衍生物或者盐; 和维生素 E、或其衍生物或者盐。

[0010] 本发明的组合物可还包含异硫氰酸烯丙酯, 特别是其中施用途为通过皮肤的粘膜或经上皮。因此, 在某些实施方案中, 组合物包括药学上可接受的载体; 类黄酮, 例如儿茶素; 维生素, 例如维生素 A 以及异硫氰酸烯丙酯。

[0011] 在某些实施方案中,目标抗原与类黄酮、以及与药学上可接受的载体的混合物通过诸如口服、舌下、鼻内的粘膜途径以任意方式的物理缀合可诱导免疫抑制,例如以口服耐受的形式,即对宿主的随后抗原接触的系统性和/或粘膜免疫无应答。如果药学上可接受的载体是脂质或脂肪酸,则除了或替代抗原与类黄酮以任意方式的物理缀合之外,目标抗原能够与脂质或脂肪酸物理缀合。

[0012] 在某些其他方面中,组合物包括抗原。在某些实施方案中,抗原可以与组合物中的药学上可接受的载体、类黄酮或维生素缀合。在某些实施方案中,药学上可接受的载体可包含一种或多种脂肪酸,例如油酸、亚油酸、 α 亚麻酸;或者脂质,抗原可通过任何方式与它们缀合或物理连接。

[0013] 可通过大量途径向诸如哺乳动物的受试者施用组合物,例如,鼻内、肺部、舌下、口服、口腔、阴道内、直肠内、眼用、皮内、透皮、经皮、皮下、静脉内和肌肉内。

[0014] 也提供制备组合物的方法,该方法包括掺合药学上可接受的载体、类黄酮和维生素以制备组合物。

[0015] 本文也提供使用组合物的方法。该方法包括向受试者施用组合物以调节受试者的免疫应答。

[0016] 在描述本发明和本发明的具体示例性实施方案之前,应当理解,本发明并不限于所描述的特定实施方案,其理所当然可以变化。也应当理解,本文所使用的术语仅为了描述特定实施方案。

[0017] 尽管在本发明的实施或测试中也可使用与本文所描述那些相似或相等同的任何方法和材料,但现仅描述某些优选的方法和材料。本文所提到的所有出版物均通过引用方式并入本文中以公开和描述与引用的出版物相关的方法和/或材料。

[0018] 必须注意,除非本文明确另有表述,如本文所使用的单数形式“一个(a)”、“一种(an)”和“所述(the)”包括复数形式。因此,例如,提到“组合物”或“佐剂组合物”包括一种和/或多种该组合物;提到“维生素”包括一种、两种、或多种维生素;以及提到“类黄酮”或“单宁”包括一种、两种或多种类黄酮、单宁等等。

附图简述

[0019] 为了更完整理解本发明及其优势,并仅以非限制性例子的方式,联合示意性附图参照以下描述,其中:

[0020] 图 1A 是显示在有或没有 LPS 下,使用各种组分(M0:芥子油;RA:视黄酸;VD3:维生素 D3;RP:棕榈酸视黄酯;CH:水合儿茶素;EGCG:表没食子儿茶素没食子酸酯;VE:维生素 E(α -生育酚)),poly(I:C)、alum(imject) 体外激活四天之后或者没有激活下通过鼠脾细胞产生的白介素 6(IL-6) 的条形图;

[0021] 图 1B 是显示在有或没有 LPS 下,使用各种组分(M0:芥子油;RA:视黄酸;VD3:维生素 D3;RP:棕榈酸视黄酯;CH:水合儿茶素;EGCG:表没食子儿茶素没食子酸酯;VE:维生素 E(α -生育酚)),poly(I:C)、alum(imject) 体外激活四天之后或者没有激活下通过鼠脾细胞产生的白介素 1- α 的条形图;

[0022] 图 1C 是显示在有或没有 LPS 下,使用各种组分(M0:芥子油;RA:视黄酸;VD3:维生素 D3;RP:棕榈酸视黄酯;CH:水合儿茶素;EGCG:表没食子儿茶素没食子酸酯;VE:维生

素 E(α -生育酚))、poly(I:C)、alum(imject) 体外激活四天之后或者没有激活下通过鼠脾细胞产生的 TNF- α 的条形图;

[0023] 图 2A 是显示类黄酮 (EGCG)、维生素 E(VE) 和芥子油 (MO) 增强单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1;也称为 CCL2)、白介素 13(IL-13)、白介素 12p70(IL-12p70) 的协同效应的条形图;

[0024] 图 2B 是显示在进行单次肌肉内(IM)接种之后芥子油(MO)作为维生素 A(VA;视黄酸)或儿茶素(水合儿茶素)的疫苗递送系统增加血清抗流感 HA IgG1 应答,其中应答作为在一次 IM 接种之后 3 周时测定的血清 IgG1ELISA 滴度显示,并且也显示 p 值;

[0025] 图 3 是显示与 PBS 和 poly(I:C)(TLR3 激动剂、dsRNA 同源物)相比,在芥子油(MO)中的各种组分,即维生素 E(VE; α -生育酚)、表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)、棕榈酸视黄酯(RP;维生素 A)中配制的 HIVgp120BaL 在两次粘膜接种(鼻内和舌下的组合(IN/SL))(2WP2)或者两次粘膜接种之后一次全身(肌肉内)接种(2WP3)之后两周的血清 IgG1 抗-HIVgp120BaL 滴度的条形图;

[0026] 图 4 是显示使用营养免疫增强递送系统(NIDS,其包含维生素 A、维生素 E、EGCG 和 MO)、和 Poly(I:C)进行两次粘膜接种(IN/SL)和一次全身(IM)强化接种之后与使用 Imject"Alum"进行三次 IM 接种相比,在髂淋巴结中增强的局部 Th1 和 TH2 细胞因子应答的条形图;

[0027] 图 5 是显示使用 NIDS 中的 gp120CN54 或者单独的 gp120CN54 两次粘膜接种(左)以及在两次粘膜接种之后两次全身接种(右)的血清抗体应答的条形图;

[0028] 图 6 是显示使用 NIDS 中的 gp120CN54 或者单独的 gp120CN54 进行两次粘膜接种和两次全身接种之后一周时在阴道洗液中抗-gp120CN54IgG1 和 IgA 的条形图;

[0029] 图 7 是显示进行 NIDS(在芥子油中含有维生素 A 和 E 以及儿茶素)vs. poly(I:C) TLR3 激动剂 vs. Imject Alum 的气囊皮肤注射之后显著降低促炎细胞因子和趋化因子的条形图,其中数值为注射之后六小时收集的囊中流体以 pg/ml 表示的每组 3 只小鼠的平均值(Y-轴);

[0030] 图 8 是显示使用 NIDS(在 50%芥子油中包含维生素 A 和 E 以及 EGCG)进行小鼠的肌肉内接种之后六小时血清 TNF- α 和 IL-6 的条形图,其中数值以每组 6 只小鼠的平均 pg/ml 显示;

[0031] 图 9 是显示与使用单独的 Alum 接种相比,使用维生素 A、E 和类黄酮以及 Alum 的组合的 IM 接种增强血清应答的条形图;

[0032] 图 10 是显示使用 10%MO 的抗原特异性免疫抑制以及使用 Alum 的免疫增强的条形图;

[0033] 图 11 是显示使用单独的油酸或者使用维生素 A 进行 IM 接种之后抗原特异性免疫增强以及通过在油酸中的表没食子儿茶素没食子酸酯和维生素 A 的组合进行 IM 接种之后协同免疫抑制的条形图;

[0034] 图 12 是显示使用单独的油酸、油酸+EGCG、油酸+VA、油酸+cat 和油酸+VA+cat 进行接种之后抗原特异性 TH1 增强和 TH2 抑制的条形图;

[0035] 图 13 是显示与使用联合 VA 和 EGCG 的油酸相比较,使用单独的油酸进行接种之后协同性抗原非特异性免疫抑制的条形图;

[0036] 图 14 是显示使用 NIDS(棕榈酸视黄酯、表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)、 α -生育酚、50%芥子油)vs. Alum vs. 无油 NIDS+Alum 进行 IM 接种之后免疫增强的条形图；

[0037] 图 15 是显示使用 VE、EGCG、氢氧化铝(Alum) 单次肌肉内注射之后 6 小时血清 IL-5 应答的抗原非特异性增强的条形图；

[0038] 图 16 是显示通过单宁(没食子酸)、维生素 A 和 MO 的协同效应达到抗原特异性免疫增强的条形图；

[0039] 图 17A&B 是显示使用在 10%、50% 或 75% 芥子油中的维生素 A 和 E 以及儿茶素进行接种之后对 TH2 的抑制和 TH1 细胞因子应答的增强的条形图；

[0040] 图 18 是显示通过 VA 和 EGCG 针对在脂质体中的 HIV-1gp120 蛋白的血清抗体应答协同增强的条形图；

[0041] 图 19 是显示在使用 VA、VE、EGCG 和角鲨烯油基载体接种之后协同免疫增强的条形图；

[0042] 图 20 是显示通过具有各种油基载体的 VA、VE 和 EGCG 来系统免疫增强(在 Y-轴上的血清 IgG1 抗体滴度)的条形图；

[0043] 图 21 是显示使用 VA、EGCG 和 MO 进行单次 IM 注射之后 6 小时血清 IL-15 细胞因子应答的抗原非特异性增强的条形图；以及

[0044] 图 22 是显示使用 VE、EGCG 和 MO 进行单次 IM 注射之后 6 小时血清 IL-5 和 IL-12p70 细胞因子应答(在 Y-轴上的 pg/ml)的抗原非特异性增强的条形图。

[0045] 示例性实施方案的详述

[0046] 本公开提供能够在受试者中调节免疫应答的佐剂组合物。通过增强抗原呈递；经由诸如自然杀伤 T 细胞的激活、和/或直接 B 或 T(或其他)细胞激活来增强天然免疫应答，这些佐剂组合物也可用于增强抗原的免疫原性。也提供制备佐剂组合物的方法以及使用佐剂组合物的方法。

[0047] 定义

[0048] 措辞“佐剂组合物”是指当向受试者施用时能够在受试者中诱导免疫应答的组合物。当联合抗原施用，“佐剂组合物”能够引起抗原特异性免疫应答。

[0049] 对抗原或组合物的“免疫应答”是在受试者中发生对在目标抗原或组合物中存在的分子的天然、体液和/或细胞免疫应答。天然免疫应答是免疫系统的任意细胞和/或上皮细胞、内皮细胞等的早期(在数小时和数天内)免疫应答。“体液免疫应答”是指主要通过抗体分子介导的免疫应答，而“细胞免疫应答”是主要通过 T-淋巴细胞和/或其他白细胞介导的一种免疫应答。

[0050] 措辞“药理学上可接受的”是指对于当受试者为非人类时的兽用药物用途和当受试者为人时的人用药物用途基本上安全和可接受的物质。

[0051] 术语“抗原组分”是指在恰当条件下通过免疫系统(例如，与抗体结合或者经处理以通过诸如 T 细胞引起细胞免疫应答)能够识别的任何物质。抗原组分含有一种或者多种表位。B 细胞表位至少包括约 3-5 个氨基酸，例如，4 个或更多个氨基酸。半抗原或多糖也可用作 B 细胞表位。诸如细胞毒性 T 细胞(CTL)表位的 T 细胞表位可至少包括约 7-9 个氨基酸，例如 8 或更多个氨基酸。辅助 T 细胞表位可包括至少约 12-20 个氨基酸。术语“抗

原组分”表示亚单位抗原（即，由与抗原天然缔合的整个有机体中分离的抗原）、以及杀死、减毒或失效的细菌、病毒、真菌、寄生虫或其他微生物、朊病毒、变应原或者任何其他致病物质。抗原组分可以为经修饰的蛋白，其包括诸如对天然蛋白序列的缺失、加成和取代（基本天然保守）。术语抗原组分也表示编码蛋白或肽抗原的核酸（DNA 或者 RNA）。

[0052] 如本文所使用的“穿透增强”或“渗透增强”是指增加抗原通过皮肤或粘膜的通透性以增加抗原通过皮肤或粘膜以及进入淋巴结或者血流的速率。

[0053] “治疗有效量”或者“有效量”是指当向哺乳动物或者其他受试者施用以预防或治疗疾病时，有效地作用于疾病的这种预防或治疗的化合物的量。“治疗有效量”可随化合物、待治疗的受试者的疾病和它的严重程度以及年龄、体重等而变化。

[0054] 概况

[0055] 本发明提供能够调节免疫应答的佐剂组合物。通过增强抗原呈递、经由诸如自然杀伤细胞的激活和 / 或通过直接 B 和 T 细胞或者其他细胞（例如上皮、内皮等）激活来增强天然免疫应答，这些佐剂组合物可用于在没有抗原下诱导免疫应答或者增强抗原的免疫原性。佐剂组合物也可用于抑制免疫应答。也提供制备佐剂组合物的方法以及使用佐剂组合物的方法。

[0056] 组合物

[0057] 本文提供的佐剂组合物可包括：药学上可接受的载体；黄酮；单宁；以及维生素。维生素可以为脂溶性维生素，例如，维生素 A、维生素 E、和维生素 D；或者水溶性维生素，例如，维生素 C 和维生素 B、和 / 或这些维生素的衍生物或者盐。组合物可含有两种或多种维生素。在某些实施方案中，佐剂组合物可包括两种或多种类黄酮和 / 或两种或多种维生素。在特别优选的实施方案中，维生素是维生素 A、维生素 E、维生素 D 及其组合。

[0058] 在某些情况下，药学上可接受的载体可以为有机载体或无机载体。无机载体的例子包括 alum 和其他铝盐，例如，氢氧化铝 (Alum) 或者磷酸铝。有机载体的例子包括脂质体、油类等。在某些实施方案中，药学上可接受的载体可以为油，例如，动物油、植物油、石油、合成油等。动物油的例子包括鱼油、鲨鱼肝油、角鲨烯油、角鲨烯等。植物油的例子包括芥子油、玉米油、橄榄油、葡萄籽油、椰子油、红花油等。在特别优选的实施方案中，药学上可接受的载体为鱼油，例如鲨鱼烯油或角鲨烯。

[0059] 在另一实施方案中，本文提供的组合物包括：具有或者没有异硫氰酸烯丙酯（芥菜精油）的药学上可接受的油、和至少一种黄酮、至少一种单宁以及至少一种维生素。

[0060] 在一些实施方案中，组合物包含水包油型乳剂。通过使用高压匀化工艺可制备水包油型乳剂，所述工艺通过施加 500-30000psi 的压力以迫使乳剂通过窄喷嘴，得到均匀的乳剂。在某些实施方案中，均匀乳剂包含 30-100nm 的液滴 / 粒子尺寸。

[0061] 在一些实施方案中，在组合物中包含抗原的情况下，在制备乳剂时加入抗原，而在其他实施方案中，在已经制备乳剂之后加入抗原，并且仅与已经形成的乳剂简单地混合。抗原也可由组合物单独地施用。

[0062] 在某些实施方案中，本文提供的佐剂组合物包括：药学上可接受的油；至少一种类黄酮和 / 或单宁；以及至少一种维生素。在某些实施方案中，油可以为动物油，例如鱼油或者植物油，例如芥子油。

[0063] 在另一实施方案中，本文提供的组合物包括：具有或者没有异硫氰酸烯丙酯（芥

菜精油)的芥子油;至少一种类黄酮;和至少一种维生素。

[0064] 在某些实施方案中,药学上可接受的油不包括油体。由包括植物细胞、动物细胞、真菌细胞和细菌细胞的含有油体(或者油体类似的结构)的任何细胞中可分离药学上可接受的油。在某些实施方案中,药学上可接受的油是植物油。

[0065] 在油料作物的种子中,该油料作物包括经济重要作物,例如大豆、油菜籽、向日葵和棕榈,水不溶性油部分保存在如本领域已知的油体、油质体、脂质体或圆球体的离散的亚细胞结构中(Huang1992, Ann. Rev. Plant Mol. Biol. 43:177-200)。除了化学上称为脂肪酸的甘油酯的油类(三酰基甘油酯)的混合物之外,油体包含磷脂和大量相关的蛋白质,总称为油体蛋白。由结构学观点而言,认为油体是通过磷脂单层囊封的三酰基甘油酯基质,在磷脂单层中嵌入油体蛋白(Huang, 1992, Ann. Rev. Plant Mol. Biol. 43:177-200)。在植物品种的油体部分中存在的种子油是各种三酰基甘油酯的混合物,其中精确组合物取决于油类来源的植物种类。

[0066] 在某些实施方案中,本发明的药学上可接受的油不包括基本上完整的油体。如本文所使用的术语“基本上完整的油体”是指在游离油形式中它们总种子油含量释放不超过50%(v/v)的油体。在某些实施方案中,药学上可接受的油是由油体破裂释放的游离油。在某些实施方案中,药学上可接受的油是游离油,并且在游离油中存在的油体从游离油形式的总种子油含量释放大于50%(v/v)。

[0067] 在某些实施方案中,在本文所描述的组合物中药学上可接受的油是通过导致油体破裂的工艺制备的游离油,使得游离油不包含大量水平的完整油体。在某些实施方案中,通过存在于细胞中的40%至95%,例如约45%-90%、约50%-90%、约60%-90%、约70%至90%、例如约40%、约50%、约60%、约70%、约80%、约90%的油以游离油的形式释放的工艺制备药学上可接受的油,其中游离油是不以油体形式存在的油。换言之,以脂肪酸或三酰基甘油酯的形式的游离油是未被诸如油质蛋白的油体蛋白包围或者囊封、或者含有磷脂单层。在某些实施方案中,药学上可接受的载体是游离油,其未被磷脂单层包围或囊封。

[0068] 在某些实施方案中,药学上可接受的载体是游离油,其不包含显著水平的植物蛋白,例如,在油体中发现的蛋白,例如,油体蛋白,例如,油质蛋白。在某些实施方案中,本文提供的组合物不包含大于0.001%-50%重量/体积(w/v)的植物蛋白,例如,大于约0.001%、大于约0.01%、大于约0.1%、大于约1%、大于约10%、大于约20%、大于约30%、大于约40%、大于约50%w/v的植物蛋白。

[0069] 在某些实施方案中,药学上可接受的载体可以为植物油。植物油可以由植物中分离,例如,植物种子。植物油可通过存在于植物种子中的油以不包含显著水平的油体的游离油的形式释放的工艺制备。

[0070] 在某些实施方案中,药学上可接受的载体可以为如上所述的游离油。游离油不包含显著水平的油体。在某些实施方案中,游离油不包含大于0.0000001%重量/体积至50%重量/体积的油体。在某些情况下,存在的油体小于在本文描述的组合物中存在的游离油中50%重量/体积、小于40%重量/体积、小于30%重量/体积、小于20%重量/体积、小于10%重量/体积、小于5%重量/体积、小于1%重量/体积、小于0.5%重量/体积、小于0.1%重量/体积。

[0071] 在某些实施方案中,在本文提供的组合物中存在的游离油不包含大于0.001%-50%

重量 / 体积 (w/v) 的植物蛋白,例如,油体蛋白,例如,大于约 0.001%、大于约 0.01%、大于约 0.1%、大于约 1%、大于约 10%、大于约 20%、大于约 30%、大于约 40%、大于约 50%)w/v 的植物蛋白。

[0072] 类黄酮包含类黄酮衍生物、盐和盐的衍生物。在某些实施方案中,类黄酮是黄酮、黄酮醇、二氢黄酮、儿茶素、花青素或异黄酮、或其衍生物、盐、或者衍生物的盐。在某些实施方案中,类黄酮是儿茶素,例如,水合儿茶素。

[0073] 维生素包括维生素衍生物、盐和衍生物的盐。在某些实施方案中,维生素包括一种或多种维生素,例如,维生素 A、维生素 E、维生素 D、维生素 C 和维生素 B、及其衍生物、盐和衍生物的盐。在某些优选的实施方案中,维生素是维生素 A。在其他优选的实施方案中,维生素是维生素 E。

[0074] 佐剂组合物可另外包含其他添加剂,例如防腐剂、着色剂、增香剂等。佐剂组合物可另外包含抗原。

[0075] 药学上可接受的有机载体

[0076] 如本文所使用的“药学上可接受的植物油载体”是指通过所需途径(例如,全身或粘膜途径,包括口服和局部递送途径)适于向人或非人动物施用的植物油。通过本公开涵盖可食用佐剂组合物。

[0077] “植物油”是指由植物或植物产品可获得的油,以及涵盖由种子(包括坚果、谷物)、水果、根、花、茎等可获得的油。例子包括玉米油、芥子油、橄榄油、葡萄籽油、椰子油、红花油、大豆油、角鲨烯油或角鲨烯等。本公开的植物油涵盖由非遗传修饰和由遗传修饰植物可获得的油类。植物油涵盖具有发红药的性质的植物油,即,例如,当局部施加至皮肤时,促进毛细血管扩张和增加血液循环的油类。植物油可来源于植物或者植物产品(例如,非遗传修饰或者遗传修饰的植物或者植物产品)、或者通过合成制备,例如,通过混合在植物油中发现的单独的组分,其中单独的组分可源自任何来源,例如,植物或植物产品、动物、动物产品、石油、或者由合成制备。提供植物油或者单独的脂肪酸的来源的植物可以经遗传修饰。

[0078] 在某些实施方案中,植物油是芥子油。如本文所使用的“芥子油”是指由十字花科的芥菜植物的种子可获得的油,其中在提取中没有施加热下可获得油(例如,通过冷压提取方法可获得)。在没有施加热下由芥菜植物的种子可获得的芥子油比使用基于热的提取方法(例如,通过施加蒸汽)由相同种子可获得的油具有更少量的(例如,未达显著量或可检测量)异硫氰酸烯丙酯。可获得用作本公开的组合物中的载体的芥子油来源的十字花科芥菜植物包括但不限于:芜菁 (*Brassica rapa*) (食用绿叶菜类)、黑芥 (*Brassica nigra*) (黑芥菜)、芥菜 (*Brassica juncea*) (棕芥菜)、白芥 (*Brassica hirta*) (白或黄芥菜)、伊索比亚芥 (*Brassica carinata*) (埃塞俄比亚芥)、甘蓝 (*Brassica oleracea*) (田芥菜)、芸苔 (*Brassica campestris*) (包括欧洲油菜 (*Brassica napus* L.) 和小白菜 (*B. campestris* L.)) 和甘蓝型冬油菜 (*Brassica napus.*)。通过“芥子油”涵盖的油类能够包括由油菜籽可获得的油。

[0079] 如在前一部分所示,植物油优选为游离油以及本身不包含大量水平的基本上完整的油体。在某些实施方案中,植物油是芥花籽油 (*canola oil*)。这些芥花籽油可具有以下组成:6-8% 饱和脂肪酸(具有 3.5 棕榈酸);14.4% 单不饱和脂肪酸(具有 60% 油酸);以

及 69.3% 多不饱和脂肪酸（具有 20% 亚油酸、10% α 亚麻酸）。

[0080] 在某些实施方案中，在本文描述的组合物中使用的植物油可包含约 14%-70% 单不饱和脂肪酸、约 18%-22% 多不饱和脂肪酸和约 5%-12% 饱和脂肪酸。单不饱和脂肪酸可具有约 18%-51% 芥酸和约 7%-22% 油酸；多不饱和脂肪酸可具有约 9-15% 亚麻酸和约 6-24% 亚油酸，以及饱和脂肪酸可具有约 3-4% 棕榈酸。

[0081] 在某些实施方案中，在本文描述的组合物中使用的植物油可包含约 14%-70% 单不饱和脂肪酸、18%-22% 多不饱和脂肪酸和 5%-12% 饱和脂肪酸。

[0082] 在某些实施方案中，在本文描述的组合物中使用的植物油可包含约 14%-20% 单不饱和脂肪酸、18%-20% 多不饱和脂肪酸和 5%-6% 饱和脂肪酸。

[0083] 在某些实施方案中，在本文描述的组合物中使用的植物油可包含约 60%-70% 单不饱和脂肪酸、约 18%-22% 多不饱和脂肪酸和约 5%-6% 饱和脂肪酸。

[0084] 在某些实施方案中，在植物油是芥子油的情况下，芥子油可具有以下组成：单不饱和脂肪酸（芥酸（18-51%）、油酸（7-22%））；多不饱和脂肪酸（亚麻酸（9-15%）和亚油酸（6-24%））；以及 5% 饱和脂肪酸。芥子油可另外也包括其他组分，例如，蛋白（30%）、酚醛、肌醇六磷酸钙镁和二硫酚硫酮。芥子油也可含有 490mg/100gm 的钙。芥子油也可含有 9-15% ω 3 脂肪酸。

[0085] 在一些实施方案中，芥子油是由芜菁可获得的一种油。由芜菁获得的芥子油包括具有以下组成的油：5.4% 饱和脂肪酸（具有 2.7% 棕榈酸、1.0% 硬脂酸、0.6% 山嵛酸、和 1.1% 其他饱和脂肪酸）；67.3% 单不饱和脂肪酸（具有 23.3% 油酸、10.0% 鳕油酸、33.8% 芥酸）；以及 20.6% 多不饱和脂肪酸（具有 9.4% 亚油酸、9.9% α 亚麻酸）。

[0086] 在某些实施方案中，植物油载体可以为一种或多种植物油的混合物，例如，芥子油（具有或者没有加入的 AIT）和玉米油；芥子油（具有或者没有加入的 AIT）和大豆油；芥子油（具有或者没有加入的 AIT）和椰子油。本公开也涵盖具有本身为发红药的植物油载体和/或与发红药油联合的组合物。发红药油的例子包括冬绿树的油、芥子油、和迷迭香油（迷迭香 (*Rosmarinus officinalis*))。

[0087] 在其他实施方案中，油载体可以为单一脂肪酸（例如油酸）或者两种或多种脂肪酸的组合。

[0088] 在某些实施方案中，药学上可接受的载体可以为以诸如 1:1 的各种比例的由植物或动物油或者遗传修饰的有机体中分离或者通过化学合成制备的脂肪酸形式的油，例如 ω 3（例如，十二碳五烯酸（EPA）、和二十二碳六烯酸（DHA））或者 ω -6 脂肪酸（例如亚油酸）。

[0089] 在某些实施方案中，植物油可含有或者仅有来自以下植物的角鲨烯：所述植物包括但不限于苋菜籽、米糠、小麦胚和橄榄。

[0090] 药学上可接受的动物油载体

[0091] 在某些实施方案中，药学上可接受的载体可以为油，例如动物油。动物油包括源自动物来源的油或者由单独的脂肪酸合成的油以及经混合制成类似于动物油的油。动物油的例子包括鱼油、鲨鱼肝油、鳕鱼油、动物角鲨烯、黄油、鸡油、猪油、奶品乳脂、或其组合等。在优选的实施方案中，药学上可接受的载体包含鱼油。

[0092] 药学上可接受的石油载体

[0093] 在某些实施方案中,药学上可接受的载体可以为油,例如石油 (fossil oil)。在某些实施方案中,药学上可接受的载体可以为矿物油。矿物油或液化石油是蒸馏石油的副产品以由原油制备汽油和其他基于石油的产品。矿物油主要由与矿脂 (也称为“白矿脂”) 相关的烷烃 (通常为 15 至 40 个碳) 和环烷烃构成。它具有约 $0.8\text{g}/\text{cm}^3$ 的密度。矿物油市售分轻和重等级,并且通常在药店可找到。有三种基本类型的精制矿物油:石蜡油、以正烷烃计算;环烷油,以环烷烃计算;和芳香油,以芳香烃计算。

[0094] 其他药学上可接受的载体

[0095] 据理解,本发明的载体能够为任何合适的药学上可接受的载体。在某些实施方案中,药学上可接受的载体可以为病毒体、脂质体或 ISCOMS。

[0096] 药学上可接受的无机载体

[0097] 在某些实施方案中,本文描述的佐剂组合物可包括药学上可接受的无机载体,例如矿物基佐剂,例如,钙盐 (例如,磷酸钙);铝盐,例如 alum,例如,氢氧化铝或磷酸铝。

[0098] 以 Imject (Pierce, Rockford, Ill.) 商标市售的合适的 alum 佐剂可用作在本文描述的组合物中的无机载体,该 alum 佐剂由氢氧化铝 ($45\text{mg}/\text{ml}$) 和氢氧化镁 ($40\text{mg}/\text{ml}$) 以及无活性的稳定剂的水性溶液组成。

[0099] 氢氧化铝可以为氢氧化铝盐,其通常至少部分为晶体。通过红外 (IR) 光谱法能够将氢氧化铝氧化物 (可通过式 $\text{AlO}(\text{OH})$ 表示) 与诸如氢氧化铝 $\text{Al}(\text{OH})_3$ 的其他铝化合物区分。

[0100] 磷酸铝可以为羟基磷酸铝,通常也含有少量的硫酸盐 (即,羟基磷酸铝硫酸盐)。它们可由沉淀获得,并且在沉淀期间的反应条件和浓度影响磷酸根取代所述盐中羟基的程度。羟基磷酸盐通常具有介于 0.3 至 1.2 之间的 PO_4/Al 摩尔比。由于羟基的存在,羟基磷酸盐能够与严格的 AlPO_4 区分。磷酸铝通常为非晶形,特别是羟基磷酸盐。常见的佐剂是具有介于 0.84 和 0.92 之间的 PO_4/Al 摩尔比的非晶形羟基磷酸铝。磷酸铝通常为微粒状 (例如,如在电子透射显微照片中所见的板状形态)。在任意抗原吸收之后,粒子通常的直径的范围为 $0.5\text{--}20\text{ }\mu\text{m}$ (例如约 $5\text{--}10\text{ }\mu\text{m}$)。

[0101] 在本文所述的佐剂组合物中铝盐的浓度可以为 $<10\text{mg}/\text{ml}$, 例如 $<5\text{mg}/\text{ml}$ 、 $<4\text{mg}/\text{ml}$ 、 $<3\text{mg}/\text{ml}$ 、 $<2\text{mg}/\text{ml}$ 、 $<1\text{mg}/\text{ml}$ 等。在某些实施方案中,铝盐浓度的范围可以为介于 0.3 至 $1\text{mg}/\text{ml}$ 之间。

[0102] 在某些实施方案中,可使用氢氧化铝和磷酸铝或磷酸镁的混合物。在某些情况下,可以有比氢氧化物更多的磷酸铝,例如,至少 2:1 的重量比,例如, $>5:1$ 、 $>6:1$ 、 $>7:1$ 、 $>8:1$ 、 $>9:1$ 等,或反之亦然。

[0103] 类黄酮

[0104] 佐剂组合物可包括一种或多种类黄酮或其衍生物、或盐或者衍生物的盐。类黄酮 (也称为生物类黄酮) 是在水果和植物中发现的植物化学物质。类黄酮具有以下类型:黄酮 (例如,芹菜配基、藤黄菌素);黄酮醇 (例如,五羟黄酮、杨梅黄酮);黄烷酮 (例如,柚苷配基、橙皮苷)、儿茶素 (例如,表儿茶素、儿茶素、没食子酸酯;例如,表没食子儿茶素、没食子儿茶素、表儿茶素没食子酸酯和表没食子儿茶素没食子酸酯)、花色苷 / 花色苷 (例如,花青素、花葵素)、和异黄酮 (例如,染料木素、黄豆苷原)。

[0105] 在优选的实施方案中,类黄酮是儿茶素。在某些实施方案中,佐剂组合物可包含表

没食子儿茶素没食子酸酯 (EGCG)、儿茶素 (多酚) 的形式。在一些实施方案中, 佐剂组合物可包含儿茶素, 例如, 水合儿茶素。在一些实施方案中, 儿茶素不是儿茶素的多聚形式。

[0106] 在某些情况下, 佐剂组合物可包含 EGCG 衍生物, 例如在美国专利 No. 7, 544, 816 中描述的那些。

[0107] 在某些实施方案中, 佐剂组合物可包含植物化学物质, 例如类黄酮、及其类似物, 例如在美国专利 No. 7, 601, 754 中描述的那些。

[0108] 单宁

[0109] 单宁是植物源性多酚的亚类并对蛋白具有高亲和力。“单宁”是具有鞣革性质或者使明胶从溶液中沉淀 (称为收敛性的性质) 的一组多聚苯酚物质的一般描述性名称。它们分子量的范围为 500 至 3,000, 并且可在几乎所有植物部位中找到它们: 树皮、木头、叶子、水果、和根。它们被分为两组, 可水解和可浓缩的单宁。可水解单宁基于没食子酸, 通常作为具有 D- 葡萄糖的多种酯类, 而更多浓缩的单宁 (通常称为原花色素) 由类黄酮单体衍生。通过转运至植物的木头纤维的黄烷衍生物的浓缩可形成单宁。可选择地, 通过苯醌单元的聚合可形成单宁。单宁的分子作用之一是通过所谓非特异性力例如氢键连结和疏水作用以及通过共价键形成与蛋白复合。因此, 它们抗菌作用的方式可与它们使细菌粘附素、酶、细胞外膜转运蛋白等失活的能力相关。它们也与多糖复合。尚未探索该特定活性的抗菌意义 (Clinical Microbiology Reviews; 1999 年 10 月, 第 12 卷; 第 564-582 页)。单宁的可变的免疫应答阻碍对这些植物代谢物的性质的研究。越来越多的证据表明个别单宁种类的选择性结合亲和力, 这部分解释免疫功能的差异。通过选择的一组称为原花青素的单宁 (也称为浓缩的单宁) 能够激活 γ - δ TCR+T 细胞 (Crit Rev Immunol. 2008; 28(5): 377-402. Response of gammadelta T Cells to plant-derived tannins. Holderness J, Hedges JF, Daughenbaugh K, Kimmel E, Graff J, Freedman B, Jutila MA)。就结构而言, 单宁分为没食子单宁、鞣花单宁、复合单宁、和浓缩的单宁。(1) 没食子单宁全部为其中没食子酰基单元或者它们的间位缩酚酸衍生物与各种多醇-、儿茶素-或三萜类单元结合的那些单宁。(2) 鞣花单宁是其中至少两个没食子酰基单元彼此 C-C 偶联, 并且不含有配糖连接的儿茶素单元的那些单宁。(3) 复合单宁是其中儿茶素单元与没食子丹宁或者鞣花单宁单元配糖结合的单宁。(4) 浓缩的单宁全部为通过一种儿茶素的 C-4 和另一单聚儿茶素的 C-8 或 C-6 的连接形成的低聚和多聚原花色素。单宁例子包括但不限于: 单宁酸、没食子酸、(-)- 表没食子儿茶素没食子酸酯 (EGCG)、(-)- 表儿茶素没食子酸酯 (ECG)、白藜芦醇、白皮杉醇 (piceatannol)、老鹳草素 (geraniin)、赤芍素和柯里拉京 (corilagin)、槭丹单宁 (Acertannin)、金缕梅单宁 (Hamamelitannin) (Nat. Prod. Rep., 2001, 18, 641-649)。

[0110] 维生素

[0111] 佐剂组合物也包括一种或多种维生素、前维生素、或维生素衍生物、盐或者其衍生物的盐。一种或多种维生素可以为维生素 A、维生素 E、维生素 D、维生素 C 和维生素 B、维生素 K、及其衍生物和盐的一种或多种。

[0112] 维生素 A 是来源于两种来源的脂溶性维生素: 预成型的类视色素和前维生素类胡萝卜素。诸如视黄醛和视黄酸的类视色素在类似于肝脏、肾脏、卵和乳制品的动物来源中找到。类似于 β 胡萝卜素的类胡萝卜素 (其具有最高维生素 A 活性) 在诸如黑色或黄色蔬菜和胡萝卜的植物中找到。维生素 A 也称为视黄醇、视黄酸、抗干眼醇、维生素 A 醇、维生素 A1、

全反式-3,7-二甲基-9-(2,6,6-三甲基-1-环己烯-1-基)-2,4,6,8-壬四烯-1-醇。在某些情况下,维生素A的酸式衍生物,全反式视黄酸(ATRA)可以包括在佐剂组合物中。在某些情况下,佐剂组合物可包括类视色素,例如,异维A酸(Ro4-3780)、阿维A酯(R010-9359;合成类视色素)、棕榈酸视黄酯或莫维A胺(Ro11-1430)。在某些情况下,维生素A棕榈酸盐(VA)可以包括在佐剂组合物中。

[0113] 维生素E也是脂溶性维生素。在表现出维生素E活性的八种天然物质(α -、 β -、 δ -和 γ -生育酚以及 α -、 β -、 δ -和 γ -生育三烯酚)中,因为当在动物模型体系中评估时, α -生育酚(α -T)表现出所有维生素中最高生物活性,它通常被认为是最重要的维生素。维生素E也与(±)- α -生育酚和DL-全-消旋- α -生育酚、5,7,8-三甲基母育酚、D- α -生育酚、2,5,7,8-四甲基-2-(4',8',12'-三甲基十三烷基)-6-色原烷醇、和非氧化形式(+)- α -生育酚乙酸酯和相关的全-消旋- α -生育酚乙酸酯同义。相关的分子是D- α -生育酚琥珀酸酯、维生素E琥珀酸酯。

[0114] 在某些实施方案中,在佐剂组合物中包括的维生素E可以为 α -生育酚(α -T)。在其他情况下,诸如 α -生育酚琥珀酸酯的维生素E类似物(α -TOS)可以包括在佐剂组合物中。

[0115] 维生素D是一组脂溶性激素原,它的两种主要形式为维生素D₂(或者麦角钙化甾醇)和维生素D₃(或者胆钙化醇)。由太阳下暴露、食物、和补充剂中得到的维生素D生物学上为惰性,并且必须进行两次羟基化反应以在体内被激活。钙三醇(1,25-二羟基胆钙化醇)是在体内发现的维生素D的活性形式。术语维生素D是指这些代谢物和其他物质的其他类似物。在某些实施方案中,佐剂组合物可以包括1,25-二羟基维生素D₃(DHVD₃)。

[0116] 维生素C是水溶性维生素。维生素C或者L-抗坏血酸是人类必需的营养物质。在动物和植物中大量必需代谢反应都需要抗坏血酸盐(抗坏血酸的离子)。维生素C的药效团是抗坏血酸盐离子。在活的有机体中,因为抗坏血酸盐保护身体免受氧化应力,所以它是抗氧化剂,并且在多种必要的酶反应中它是辅因子。维生素C是抗坏血酸盐的纯L-对映异构体;相反的D-对映异构体没有生理意义。

[0117] 维生素B是水溶性维生素复合物。在某些实施方案中,维生素B是维生素B₉(叶酸)。

[0118] 添加剂

[0119] 在某些实施方案中,佐剂组合物的植物油载体可包括作为添加剂的以0.1-2%的最终剂量体积的优选剂量的异硫氰酸烯丙酯(AIT)。异硫氰酸烯丙酯(AIT)也称为芥菜的挥发油或者芥菜精油或芥子油。AIT是式CH₂CHCH₂NCS的有机硫化合物。AIT是芥菜、山葵、和芥末的刺激味源。它微溶于水,但在大部分有机溶剂中溶解较好。异硫氰酸烯丙酯来源于黑色或棕色印度芥菜的种子。当这些芥菜籽破裂时,酶黑芥菜酶释放并作用于称为黑芥菜硫苷酸钾的硫代葡萄糖苷以得到异硫氰酸烯丙酯。异硫氰酸烯丙酯在植物中用作防御食草动物,因为它对植物自身有害,所以它作为硫代葡萄糖苷的无害形式保存,并由黑芥菜酶来释放。当动物咀嚼植物时,释放异硫氰酸烯丙酯,它使动物恶心。通过烯丙基氯和硫氰酸钾的反应来商业上制备异硫氰酸烯丙酯:CH₂=CHCH₂Cl+KSCN→CH₂=CHCH₂NCS+KCl。以这种方式获得的产品有时称为合成芥子油。也可通过种子的干馏来释放异硫氰酸烯丙酯。以这种方式获得的产品称为芥菜的挥发油,并且通常为约92%纯度。它在食物中主要用作增香

剂。合成的异硫氰酸烯丙酯用作杀虫剂、杀菌剂、和杀线虫剂,以及在某些情况下用于保护作物。

[0120] 在某些情况下,特别是在所需施用途为粘膜的情况下,佐剂组合物可包含药理学上可接受的载体 AIT、至少一种类黄酮和至少一种维生素。

[0121] 佐剂组合物可包括皂草苷和它的衍生物 QS-21。

[0122] 叶绿醇(一种饮食双萜醇,结构上类似于天然存在的异戊二烯类佐剂)的衍生物,引起所有主要 IgG 亚类的滴度增加,特别是 IgG2a 和细胞毒性效应 T 细胞应答。因此,佐剂组合物可包括叶绿醇或它的衍生物。然而,在某些实施方案中,它可优选没有包括叶绿醇。

[0123] 佐剂组合物可包括其他添加剂或载体,例如,明胶、抗生素、山梨醇、蔗糖、乳糖、其他糖类、生物粘着剂、粘膜粘着剂(例如,透明质酸或其衍生物,例如, HYAFF)、亲水性聚合物和水凝胶、聚环氧乙烷均聚物、壳聚糖、蜂蜡等。

[0124] 佐剂组合物可进一步包括免疫原性增强剂,例如,脂多糖;肠毒素,例如来自大肠杆菌的热不稳定性毒素、来自霍乱弧菌的霍乱毒素;tol1 样受体激动剂(例如, CpG 或 CpG 寡核苷酸)。

[0125] 佐剂组合物可联合其他递送系统,例如, alum、脂质体、病毒体、水包油型乳剂。

[0126] 使用大、缓慢代谢的大分子可配制佐剂组合物,例如蛋白、多糖、聚乳酸、聚乙醇酸、聚合氨基酸、氨基酸共聚物、和非活性病毒粒子。粒性载体的例子包括来源于聚甲基丙烯酸甲酯聚合物的那些、以及来源于称为 PLG 的聚(交酯)和聚(交酯-共-乙交酯)的微粒。

[0127] 佐剂组合物可包括诸如来自大肠杆菌的全毒素的突变形式,它包含突变的 A 亚单位和 B 亚单位,其可以为单聚,例如在野生型全毒素中。B 亚单位优选未经突变。然而,据设想,突变的 A 亚单位可用在分离 B 亚单位中,其为基本纯化形式或者与其他试剂复合,该突变的 A 亚单位可取代 B 亚单位和/或它的功能性结构。在组合物中使用的 LT 突变体包括具有以下一种或多种突变的突变体:在位置 63 处丝氨酸的 A 亚单位中的突变、以及在位置 72 处丙氨酸的 A 亚单位中的突变,例如,在位置 63 处丝氨酸被赖氨酸取代,而在位置 72 处丙氨酸被精氨酸取代。

[0128] 佐剂组合物可包括霍乱毒素("CT")或其脱毒的突变体和微粒(即,粒子直径为约 100nm 至约 150 μ m,更优选的直径为约 200nm 至约 30 μ m,以及又更优选的直径为约 500nm 至约 10 μ m),其由生物可降解和无毒的材料形成(例如,聚(α -羟基酸)、聚羟丁酸、聚原酸酯、聚酸酐、聚己酸内酯等)。

[0129] 使用聚(α -羟基酸),特别是由聚(交酯)("PLA"),D, L-交酯和乙交酯或者羟基乙酸的共聚物,例如聚(D, L-交酯-共-乙交酯)("PLG"或"PLGA")、或者 D, L-交酯和己内酯的共聚物,可配制本文公开的佐剂组合物。微粒可来源于任何不同聚合起始材料,其具有各种分子量,以及在诸如 PLG(多种交酯:乙交酯比率)的共聚物的情况下,对不同聚合起始材料的选择主要是选择的问题,其部分取决于共同施用的抗原。如果组合物包括抗原,则抗原可包入微粒内,或者可吸收在它们的表面上。

[0130] 在某些实施方案中,本文公开的组合物包括免疫调节因子,例如能够调节免疫应答的蛋白。免疫调节因子的非限制性例子包括淋巴因子(也称为细胞因子),例如 IL-6、TGF- β 、IL-1、IL-2、IL-3 等);和趋化因子(例如,分泌性蛋白,例如巨噬细胞抑制因子、

RANTES、巨噬细胞炎性 1 α (MIP1- α) 等)。诸如 TRANCE、flt-3L 的某些细胞因子和 CD40L 的分泌形式能够增强 APC 的免疫调节能力。可单独或者联合本文公开的组合物使用的细胞因子的非限制性例子包括白介素 -2 (IL-2)、干细胞因子 (SCF)、白介素 3 (IL-3)、白介素 6 (IL-6)、白介素 12 (IL-12)、G-CSF、粒细胞巨噬细胞 - 集落刺激因子 (GM-CSF)、白介素 -1 α (IL-1 α)、白介素 -11 (IL-11)、MIP-1 γ 、白血病抑制因子 (LIF)、c-kit 配体、血小板生成素 (TPO)、CD40 配体 (CD40L)、肿瘤坏死因子相关的激活诱导细胞因子 (TRANCE) 和 flt3 配体 (flt-3L)。

[0131] 在某些实施方案中,其中药学上可接受的载体为油基以及组合物包含油基乳剂。在这些实施方案中,油基乳剂可以不包括有机磷酸盐,例如在磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 中使用的那些。

[0132] 在某些实施方案中,油基乳剂可不包括乙醇或者其他醇类以及没有季铵化合物,例如选自烷基二甲基苯甲基氯化铵、二烷基二甲基氯化铵、正烷基二甲基苯甲基氯化铵、和正烷基二甲基乙基苯甲基氯化铵的那些。

[0133] 在某些实施方案中,油基乳剂可不包括含有选自以下的化合物的阳离子卤素: 卤化十六烷吡啶、十六烷基三甲基卤化铵、十六烷基二甲基乙基卤化铵、十六烷基二甲基苯甲基卤化铵、十六烷基三丁基卤化磷、十二烷基三甲基卤化铵、和十四烷基三甲基卤化铵。

[0134] 佐剂组合物可进一步包括乳化剂,例如,卵磷脂,例如两亲性以及人和 / 或兽用用途可接受的磷脂和 / 或表面活性剂。

[0135] 表面活性剂是本领域技术人员众所周知的,并且其中包括阴离子表面活性剂 (例如吐温 80)、阳离子表面活性剂 (例如 CTAB) 或者两性离子表面活性剂 (例如 CHAPS)。通过本领域技术人员可测定用于人和 / 或兽用用途的表面活性剂的可接受性。如果一部分表面活性剂分子为疏水性以及一部分为亲水性,则表面活性剂具有两亲性。在本文公开的佐剂组合物中使用的表面活性剂的例子包括但不限于: 吐温表面活性剂和司盘表面活性剂。吐温和司盘表面活性剂包括但不限于单月桂酸酯 (吐温 20、吐温 21、司盘 20)、单棕榈酸酯 (吐温 40、司盘 40)、单硬脂酸酯 (吐温 60、吐温 61、司盘 60)、三硬脂酸酯 (吐温 65、司盘 65)、单油酸酯 (吐温 80、吐温 81、司盘 80) 和三油酸酯 (吐温 85、司盘 85)。

[0136] 佐剂组合物可包括近似生理条件所需要的药学上可接受的辅料,例如 pH 调节和缓冲剂等,例如,乙酸钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙、乳酸钠、磷酸盐缓冲液等。

[0137] 佐剂组合物可包括药用发红药,例如,辣椒素 (来源于牛角椒、小辣椒 (*Capsicum minimum*))、水杨酸酯 (例如冬绿树的油,水杨酸甲酯)、烟酸酯、擦洗用酒精; 常见草本发红药包括: 丁香 (*Eugenia caryophyllus*)、大蒜 (*Allium sativum*)、姜 (*Zingiber officinale*)、山葵 (*Cochlearia armoracia*)、芥菜 (例如,白芥 (*Brassica alba*) 或者黑芥 (*B. nigra*))、荨麻 (大荨麻 (*Urtica dioica*))、迷迭香油 (迷迭香)、芸香 (*Ruta graveolens*)。

[0138] 抗原

[0139] 可联合一种或多种抗原组分施用本文公开的佐剂组合物。可使用需要诱导免疫应答的任何抗原。由病毒、真菌、或细菌、或者其他人和 / 或动物病原体、或者癌症细胞可得到这些抗原组分。抗原组分可以为过敏原。全长蛋白或其片段、以及经修饰或者未经修饰的蛋白可用作抗原组分。抗原组分也包括多糖。在一些情况下,抗原组分可以为编码抗原的

DNA 或 RNA,例如,源自病原体或者癌症细胞的 DNA 或 RNA。

[0140] 许多人癌症表达对癌症细胞具有特异性的细胞表面分子,即,在正常人体细胞中它们不会表达出可检测水平或者显著水平。这些抗原的例子包括但不限于以下各种糖脂和多糖、 α -胎蛋白 (AFP) 和癌抗原 CA125、CA15-3、和 CA19-9。

[0141] AFP:血清 AFP 升高至异常高值发生在多种恶性疾病中—包括非精原细胞瘤睾丸癌和原发性肝细胞癌—以及一些良性疾,包括肝炎和肝硬化。

[0142] CA125:癌症抗原 125(CA125)是与上皮卵巢癌相关的表面抗原,迄今为止 CA125 为残余上皮卵巢癌的最敏感的标志物。在患有肺、子宫颈、输卵管和子宫癌以及子宫内膜异位的患者中 CA125 也可升高。

[0143] CA15-3:癌症抗原 15-3(CA15-3)用于监控手术后乳腺癌患者复发,特别是转移性疾病。已经显示,CA15-3 用于早期检测卵巢癌的复发。在结肠、肺和肝肿瘤中 CA15-3 水平也升高。

[0144] CA19-9:在具有某些胃肠恶性肿瘤的受试者中血清 CA19-9 通常也升高,例如胰腺癌、结肠直肠癌、胃癌和肝癌。持续升高的血清 CA19-9 值可以与进行性恶性疾病和差的治疗反应相关。下降的 CA19-9 值可以为良好的预后和对治疗的良好反应的指标。

[0145] 传染性海绵样脑病 (TSE) 是一组神经变性疾病,它的特征在于快速退变恶化(认知功能和/或协调能力),它们通常导致死亡。TSE 发生在人和动物身上。TSE 最可能的病因是称为 PrP^{Sc}(以羊搔痒症命名)的朊病毒蛋白质形式,其是朊病毒病的最古老已知存在形式,其起源于绵羊和山羊。朊病毒是如何导致脑损伤目前尚不清楚,但是所有猜测均认为,形成淀粉样原纤维的由 PrP^{Sc} 转译后修饰的天然朊病毒蛋白质 (PrP^C) 是发病机理的主要事件。

[0146] 在人中,克罗伊茨菲尔德-雅各布二氏病 (Creutzfeldt-Jakob disease) (CJD) 是最普遍的 TSE(发病率为 1/ 一百万 / 年)。临床上,患者可被诊断可能或很可能为 CJD 患者,但必须得到神经病理上一致性,从而得到明确诊断。神经病理学研究基于组织病变三大元素:棘细胞层水肿、神经元损耗、和反应性星形细胞胶质化。

[0147] 朊病毒蛋白质 (PrP) 开始被描述为引起传染性海绵样脑病 (TSE) 的传染物的基本组分。TSE 是一组神经退行性疾患。包括人类的克罗伊茨菲尔德-雅各布二氏病和库鲁症、牛海绵状脑病、羊搔痒症、和在鹿和麋中慢性消耗性疾病。尽管对 TSE 的病理生理学的理解仍然较少,几乎不变的特征为在受感染的个体的经感染组织中 PrP(羊搔痒症 PrP,称为 PrP^{Sc}) 的异常同种型的积累。发现 PrP 通过宿主的独特基因,Prnp(在人中 PRNP) 来编码,它的结构在种类之间显著保守。它的生理产品在许多组织中表达为可变水平下的称为细胞 PrP (PrP^C) 的 GPI- 锚定膜蛋白。

[0148] 联合本文所述的佐剂组合物使用的抗原组分包括来源于包括病毒、细菌或真菌、或者癌症的任意病原体的抗原组分。这些抗原组分包括例如,以它们天然形式或者增强免疫原性优选形式的病原体的结构以及非结构蛋白,例如 HIV 的 Env、Gag 和 Pol 或者 RSV 的 F 蛋白或者流感的 HA。

[0149] 可包含在佐剂组合物中的其他抗原组分为:来自脑膜炎双球菌 (*N. meningitidis*) 血清组 B 的蛋白抗原,例如在国际专利申请公开:W099/24578;W099/36544;W099/57280;W000/22430;和 W096/29412 中的那些;来自脑膜炎双球菌血清组 B 的外膜囊 (OMV) 制剂,例

如在国际专利申请 W00152885 中公开的那些 ; 来自脑膜炎双球菌血清组 A、C、W135 和 / 或 Y 的寡糖抗原 ; 来自肺炎链球菌的糖抗原 ; 来自肝炎 A 病毒的抗原, 例如非活性病毒, 例如来自肝炎 B 病毒的抗原, 例如表面和 / 或核心抗原, 来自肝炎 C 病毒的抗原 ; 百日咳杆菌, 例如来自百日咳杆菌的百日咳全毒素 (PT) 和丝状血球凝集素 (FHA), 任选也联合百日咳杆菌粘附素和 / 或凝集原 2、白喉抗原, 例如白喉类毒素、破伤风抗原, 例如破伤风类毒素 ; 来自嗜血杆菌属流感 B 的糖抗原, 来自淋病奈瑟菌的抗原), 例如国际专利申请公开 W099/24578 ; W099/36544 ; W099/57280)。其他目标抗原包括来自以下的抗原 : 肺炎衣原体 (例如国际专利申请 W00202606 ; 国际专利申请公开 : W099/27105 ; W000/27994 ; W000/37494) ; 沙眼衣原体 (例如国际专利申请 W099/28475) ; 牙龈红棕色单胞菌 ; 脊髓灰质炎抗原, 例如 IPV 或 OPV ; 狂犬病抗原, 例如冷冻干燥的非活性病毒 (例如 77, RabAvert. TM)、麻疹、腮腺炎和 / 或风疹抗原、流感抗原, 例如血球凝集素和 / 或神经氨酸酶表面蛋白, 呼吸道合胞病毒, 例如 F 或 G 蛋白, 病毒的杯状病毒科, 例如诺如病毒和沙波病毒 ; 呼肠孤病毒科, 例如轮状病毒、单纯疱疹病毒、朊病毒、沙门氏菌、大肠杆菌、霍乱弧菌、粘膜炎莫拉菌、无乳链球菌 (B 族链球菌属) [例如国际专利申请 PCT/GB01/04789] ; 酿脓链球菌 (A 族链球菌属) [例如国际专利申请 PCT/GB01/04789] ; 金黄色葡萄球菌 ; 呼吸道合胞病毒, 例如 F 或 G 蛋白 ; 病毒的杯状病毒科, 例如诺如病毒和沙波病毒 ; 呼肠孤病毒科, 例如轮状病毒、单纯疱疹病毒、沙门氏菌。

[0150] 糖或碳水化合物抗原组分可与载体蛋白缀合。示例性载体蛋白是细菌毒素或者类毒素, 例如白喉、霍乱、大肠杆菌热稳定或者破伤风类毒素、CRM. sub. 197 白喉类毒素、脑膜炎双球菌外膜蛋白 [欧洲专利申请 0372501]、合成肽 [欧洲专利申请 0378881&0427347]、热激蛋白 [国际专利申请 W093/17712]、百日咳蛋白 [国际专利申请 W098/58668 ; 也参见 EP04711771, 来自流感嗜血杆菌的蛋白 D [国际专利申请 W000/56360.]、来自艰难梭菌的毒素 A 或 B [国际专利申请 W000/61761]。在必要处使用任何合适的交联剂能够进行任何合适的缀合反应。

[0151] 所公开的免疫调节 / 佐剂组合物可包括抗原组分, 其是编码如上所述的多肽抗原或蛋白抗原的核酸。能够作为 DNA 或 RNA- 基疫苗和载体疫苗提供的核酸抗原组分的例子包括 HIV、疱疹、肝炎和流感的疫苗。

[0152] 组合物的例子

[0153] 在以下表 1 中提供示例性组合物。

[0154] 表 1

[0155]

佐剂组合物	油载体	黄酮和/或单宁	维生素
1	芥子油 (+/- AIT)	水合儿茶素和/或没食子酸	VA
2	芥子油 (+/- AIT)	水合儿茶素和/或没食子酸	VE
3	芥子油 (+/- AIT)	水合儿茶素和/或没食子酸	VC
4	芥子油 (+/- AIT)	水合儿茶素和/或没食子酸	VD
5	芥子油 (+/- AIT)	水合儿茶素和/或没食子酸	VA+ VE
6	芥子油 (+/- AIT)	水合儿茶素和/或没食子酸	VA+ VD
7	芥子油 (+/- AIT)	水合儿茶素和/或没食子酸	-
8	芥子油 (+/- AIT)	-	VA
9	芥子油 (+/- AIT)	-	VE
10	芥子油 (+/- AIT)	-	VC
11	芥子油 (+/- AIT)	-	VD
12	芥子油 (+/- AIT)	-	VA+ VE
13	芥子油 (+/- AIT)	-	VA+ VD
14	橄榄油 (+/- AIT)	水合儿茶素和/或没食子酸	VA
15	橄榄油 (+/- AIT)	水合儿茶素和/或没食子酸	VE
16	橄榄油 (+/- AIT)	水合儿茶素和/或没食子酸	VC
17	橄榄油 (+/- AIT)	水合儿茶素和/或没食子酸	VD
18	橄榄油 (+/- AIT)	水合儿茶素和/或没食子酸	VA+ VE
19	橄榄油 (+/- AIT)	水合儿茶素和/或没食子酸	-
20	橄榄油 (+/- AIT)	水合儿茶素和/或没食子酸	VA+ VD
21	橄榄油 (+/- AIT)	-	VA
22	橄榄油 (+/- AIT)	-	VE
23	橄榄油 (+/- AIT)	-	VC
24	橄榄油 (+/- AIT)	-	VD
25	橄榄油 (+/- AIT)	-	VA+ VE
26	橄榄油 (+/- AIT)	-	VA+ VE

[0156] 以上所述的佐剂组合物 1-26 为示例性以及可包括另外的组分,例如,另外的油载体,例如,向日葵籽油、椰子油、大豆油。在其他实施方案中,以上所述的组合物 1-26 不含有另外的油载体,例如,向日葵油、椰子油、大豆油。

[0157] 在表 1 中描述的佐剂组合物 1-26 以及在说明书中描述的其他佐剂组合物可包括另外的组分,例如,添加剂,例如,抗原、防腐剂、着色剂、增香剂、缓冲剂、盐等。

[0158] 佐剂组合物的组分以及它们相关的量

[0159] 本文描述的佐剂组合物可用于诱导免疫应答,例如, Th-1 应答。Th-1 应答可特别适合于应答病毒感染、细胞内病原体、和肿瘤细胞,这是由于它包括 IL-2 和 IFN- α , 其激活 CTL。

[0160] 本文描述的佐剂组合物可用于诱导免疫应答,例如, Th-2 应答。Th-2 应答可更适于应答细胞外细菌和蠕虫寄生虫以及也可介导过敏反应,因为已知 IL-4 和 IL-5 诱导 IgE 产生和嗜伊红性粒细胞激活。

[0161] 如果需要更高的 Th-2 应答,则在佐剂组合物中可包括维生素 A (例如,全反式视黄酸 (ATRA), 维生素 A 的酸衍生物)。在某些情况下,可需要引起 Th-1 类型的免疫应答。在这些情况下,佐剂组合物可包括药学上可接受的载体、维生素 C (例如,抗坏血酸盐) 和 / 或维生素 D 和 / 或维生素 E 以及类黄酮、和 / 或单宁,例如没食子酸。

[0162] 佐剂组合物可包括药学上可接受的载体和:在佐剂组合物中的类黄酮和维生素 A;或者类黄酮、维生素 C 和维生素 A;或者类黄酮、维生素 D 和维生素 A;或者类黄酮、维生素 E 和维生素 A;或者类黄酮、维生素 C 和 E 以及维生素 A;或者类黄酮、维生素 C 和 D 以及维生素 A;或者类黄酮、维生素 D 和 E 以及维生素 A。应理解,各个上述组合物可包括所述维生素或其盐或者衍生物。类似地,类黄酮可以为类黄酮或其盐或者衍生物。

[0163] 在某些实施方案中,与包括药学上可接受的载体 (例如,芥子油) 和类黄酮或者药学上可接受的载体 (例如,芥子油) 以及维生素 (例如,维生素 A、C、D 和 / 或 E) 的佐剂组合物的作用相比,在佐剂组合物中药学上可接受的载体 (例如,鱼油或芥子油)、类黄酮、和维生素 (例如,维生素 A、C、D 和 / 或 E) 的加入可导致增强的免疫应答 (例如,协同效应)。

[0164] 本文公开的佐剂组合物可包括鱼油或芥子油或者另一药学上可接受的油载体。具有发红药性质的药学上可接受的油载体,例如芥子油,适于制备通过粘膜或者皮肤的上皮细胞或者通过例如肌肉内或者上皮内施用直接注射施用的佐剂组合物。当施用途径是粘膜途径时,则认为特别优选包含异硫氰酸烯丙酯的组合物。

[0165] 在本文所述的佐剂组合物中以液态使用的诸如鱼油、油酸和 / 或芥子油的药学上可接受的油载体的体积可以在佐剂组合物的总体积的 1-95% 范围内。因此,在某些情况下,药学上可接受的油载体可构成至少约 1%、至少约 5%、至少约 10%、至少约 20%、至少约 30%、至少约 40%、至少约 50%、至少约 60%、至少约 70%、至少约 80%、至少约 90%、或者至少约 95% 体积 / 总体积的主题佐剂组合物。在某些实施方案中,药学上可接受的油,例如 MO, 包含约 1% 至约 95%v/v 的本发明的组合物,更优选为约 5% 至 90%、10% 至 75%、10% 至 50%、50% 至 75%、50% 至 90%v/v 的组合物。在特别优选的实施方案中,组合物能够增强免疫应答以及包含约 50% 至 75%MO, 以及更优选为 50% 或 75%MO。在进一步优选的实施方案中,组合物能够抑制免疫应答以及包含约 10%MO。在进一步优选的实施方案,组合物包含约 10% 至约 50% 油酸,以及更优选为约 40% 油酸。

[0166] 诸如 Alum 的药学上可接受的载体的体积可以在约 1% 至约 75% 佐剂组合物的总体积范围,以及更优选为总体积的约 2.5% 至约 50%。在特别优选的实施方案中,组合物包含 2.5% 或 50%Alum。

[0167] 根据受试者的体重可测定在主题佐剂组合物中可包含的维生素 (或它的盐或者衍生物) 的量。通常,所推荐的每日允许量可用于确定可存在于主题佐剂组合物的维生素

的量。

[0168] 例如,在主题佐剂组合中可包括的维生素 A 的量可以在 1-250 μ g/kg 体重的范围内,例如,1 μ g/kg、5 μ g/kg、10 μ g/kg、20 μ g/kg、30 μ g/kg、50 μ g/kg、70 μ g/kg、90 μ g/kg、110 μ g/kg、130 μ g/kg、150 μ g/kg、170 μ g/kg、190 μ g/kg、210 μ g/kg、230 μ g/kg 或 250 μ g/kg 体重。

[0169] 例如,在主题佐剂组合中可包括的维生素 C 的量可以在 1-100mg/kg 体重的范围内,例如,1、5、10、15、30、50、70、80、90 或 100mg/kg 体重。

[0170] 例如,在主题佐剂组合中可包括的维生素 D 的量可以在 0.01-10 μ g/kg 体重的范围内,例如,0.01、0.5、1、2、5、7、8、9 或 10 μ g/kg 体重。

[0171] 例如,在主题佐剂组合中可包括的维生素 E 的量可以在 0.01-10mg/kg 体重的范围内,例如,0.01、0.05、0.1、0.5、1、2、5、7、8、9 或 10mg/kg 体重。

[0172] 在主题佐剂组合中可包括的类黄酮(或它的盐或衍生物)的量可以根据受试者的体重来测定。诸如儿茶素(例如水合儿茶素)的类黄酮的量可以为 1-100mg/kg 受试者的体重的范围内,例如,1、5、10、15、30、50、70、80、90 或 100mg/kg 体重。

[0173] 在主题佐剂组合中可包括的单宁(或它的盐或衍生物)的量可以根据受试者的体重来测定。诸如儿茶素(例如水合儿茶素)的类黄酮的量可以为 1-100mg/kg 受试者的体重的范围内,例如,1、5、10、15、30、50、70、80、90 或 100mg/kg 体重。

[0174] 佐剂组合可以在混悬液、片剂(待吞咽或咀嚼)、快速溶解片剂或者凝胶或带状物、胶囊、粉末、凝胶、霜剂、洗液、软膏、气溶胶的形式等。

[0175] 向人受试者施用的示例性佐剂组合可包括 3-80% 体积/体积的油,例如,至少约 3%、至少约 10%、至少约 15%、至少约 20%、至少约 25%、至少约 30%、至少约 40%、至少约 50%、至少约 60%、至少约 70%、或至少约 80% 体积/体积的油。

[0176] 向人受试者施用的示例性佐剂组合可包括 0.1-100mg 的维生素 A,例如,0.1、0.5、1、5、10、15、30、50、70、80、90 或 100mg 的维生素 A。

[0177] 向人受试者施用的示例性佐剂组合可包括 0.1-400mg 的维生素 E,例如,0.1、0.5、1、5、10、15、30、50、70、80、90、100、200、300 或 400mg 的维生素 E。

[0178] 向人受试者施用的示例性佐剂组合可包括 0.1-2000mg 的维生素 C,例如,0.1、0.5、1、10、30、100、130、200、300、600、900、1000、1300、1500、1800 或 2000mg 的维生素 C。

[0179] 向人受试者施用的示例性佐剂组合可包括 0.1-2000mg 的维生素 B₉,例如,0.1、0.5、1、10、30、100、130、200、300、600、900、1000、1300、1500、1800 或 2000mg 的维生素 B₉。

[0180] 向人受试者施用的示例性佐剂组合可包括 0.1-2000mg 的水合儿茶素或表没食子儿茶素没食子酸酯,例如,0.1、0.5、1、10、30、100、130、200、300、600、900、1000、1300、1500、1800 或 2000mg 的水合儿茶素或表没食子儿茶素没食子酸酯。

[0181] 向人受试者施用的示例性佐剂组合可包括 0.001-10mg 的 AIT,例如,0.001、0.005、0.01、0.05、0.1、0.5、1、2、5、7、8、9 或 10mg 的 AIT。

[0182] 如本文所使用的体积/体积是指在佐剂组合物的总体积中组分的体积。

[0183] 通过施用某些免疫调节多核苷酸能够在哺乳动物中诱导 Th1- 类型的免疫应答。免疫调节多核苷酸包括称为免疫调节序列("ISS")的序列,通常包括 CG 二核苷酸。例如,参见 PCT 公开 W098/55495、W097/28259、美国专利 No. 6,194,388 和 6,207,646。因此,在某

些实施方案中,主题佐剂组合物可包括 ISS。

[0184] 在某些实施方案中,主题佐剂组合物可包括如上所述的乳化剂(例如,卵磷脂或者表面活性剂,例如,去污剂)。在佐剂组合物中乳化剂的浓度取决于不同因素。例如,在佐剂组合物中药学上可接受的油浓度越高,则需要越多的乳化剂。通常,在主题佐剂组合物中表面活性剂或其他乳化剂的浓度为 1.5% 至 5%v/v、或者 1.5% 至 3%v/v、或者 1.5% 至 2.5%、或者 2%v/v。当使用多于一种表面活性剂时,则在佐剂组合物中使用的所有表面活性剂的浓度为 1.5% 至 5%、或者 1.5% 至 3%、或者 1.5% 至 2.5%、或者 2%v/v。

[0185] 本文公开的佐剂组合物可不包括抗原组分。不包括抗原组分的佐剂组合物可用于基本和非特异性增强或抑制免疫应答,从而例如用作每日服用的常用免疫增强剂或者免疫抑制剂。可选择地,可联合抗原施用不包括抗原的佐剂组合物,即,在接种之前、同时或之后。

[0186] 包括抗原组分的佐剂组合物

[0187] 在某些实施方案中,主题佐剂组合物可包括一种或多种抗原组分。

[0188] 在佐剂组合物中抗原组分的浓度可大幅度变化,并且按照所选择的特定施用途径和受试者的需求,主要根据流体体积、粘度、体重等选择。在药物制剂中抗原组分的浓度可大幅度变化,即,由小于约 0.1%、通常为或至少为约 2% 至多达 20% 至 30% 或者更多的重量/体积,并且按照选择的特定施用方式,主要根据抗原性质、流体体积、粘度等选择。在某些实施方案中,抗原可以为 0.1%-30%w/v 的佐剂组合物,例如,0.1%-25%、0.5%-20%、1%-15%、2%-10%、3%-8% 或 5%-6%w/v 的佐剂组合物。

[0189] 制备佐剂组合物的方法

[0190] 本文也提供制备佐剂组合物的方法。该方法包括掺合药学上可接受的载体、类黄酮和/或单宁和维生素以制备组合物。

[0191] 使用大量方法由各种来源可获得主题佐剂组合物的组分。可选择地,可化学合成组分。在某些情况下,组分可由天然来源分离以及可另外修饰,例如,化学修饰。例如,可由芥菜植物种子来提取芥子油。可选择地,药学上可接受的植物油或者动物油载体可由供应商购买。维生素 A、C、D 和 E 可由 Sigma Aldrich 化学公司购入,其由标准生物化学方法制备和生产。类黄酮,例如儿茶素,例如水合儿茶素可由 Sigma Aldrich 化学公司购入,通过标准生物化学方法制备和生产。

[0192] 通常,儿茶素可由绿茶提取或者化学合成。朝鲜和中国绿茶、和普洱、印度黑茶、龙井茶、铁观音、竹叶、茉莉、乌龙茶、花、红茶可用于提取儿茶素,例如,表没食子儿茶素、儿茶素、表儿茶素、表没食子儿茶素没食子酸酯和表儿茶素没食子酸酯。中国绿茶是儿茶素的丰富来源。与其他类型的茶相比,绿茶是更好的儿茶素来源。

[0193] 维生素 A(例如,视黄酸)、维生素 D(例如,钙三醇(1,25-二羟基胆钙化醇)、维生素 E(例如, α -生育酚)和水合儿茶素可以溶解在乙醇中,例如,200proof 乙醇。维生素 C 和维生素 B 可溶解在碱性溶液中,例如碳酸氢钠缓冲液。抗原可溶解在水、缓冲剂(例如,PBS)或者盐水溶液中。可制备佐剂组合物的个别组分的储备溶液,然后可将适量组分混合在一起以得到主题佐剂组合物。使用 PBS 或者盐水可调节主题佐剂组合物的总体积。

[0194] 在某些实施方案中,可将药学上可接受的油和类黄酮和/或单宁和任选的维生素与诸如吐温®-80 的表面活性剂以如上所述的量混合在一起。在施用之前,通过重复回收

和释放药理学上可接受的油、表面活性剂和另一组分的混合物可乳化佐剂组合物。

[0195] 在某些实施方案中,药理学上可接受的有机或无机载体可与水溶性类黄酮、单宁、和维生素衍生物混合。

[0196] 在掺合之前或者在形成佐剂组合物之后可消毒佐剂组合物的组分。在施用之前可将佐剂组合物与凝胶混合,或者配制至微粒内等。

[0197] 可将本文公开的佐剂组合物配制至喷雾剂(例如,鼻腔喷雾剂)、滴剂(例如,滴鼻剂)、凝胶、粉末、片剂或胶囊、贴剂等。适于通过吸入施用的佐剂组合物受到特别关注,包括但不限于形成气溶胶的液体悬浮剂以及用于干燥粉末吸入递送系统的粉末形式。适于通过主题佐剂组合物的吸入的装置包括但不限于雾化器、汽化器、喷雾器、和干燥粉末吸入递送装置。

[0198] 可将本文公开的佐剂组合物配制至液体或乳剂内。在配制的过程中,可形成任何类型的乳剂,其包括但不限于水包油型乳剂、油包水型乳剂、多倍(例如两倍、三倍、四倍等)乳剂、和反相乳剂。本发明的组合物可以为两相的形式,其中一相均匀地分散在另一相中,得到均匀宏观外观。在形成包含两个或多个非均匀分散相的组合物中,在使用乳剂之前,可振荡或者搅拌两相。在某些实施方案中,如上所示,通过使用高压匀化工艺可制备水包油型乳剂,所述工艺通过施加 500-30000psi 的压力以迫使乳剂通过窄喷嘴,导致具有 30-100nm 的液滴/粒子尺寸的均匀乳剂。

[0199] 在某些实施方案中,本文提供的组合物不包含在美国专利申请 No. 20080254188 中描述的增溶剂。在某些实施方案中,本文所述的组合物不是水溶性制剂,而且,它们是水不溶性制剂,例如,乳剂。术语水溶性是指当加入水性介质(例如,水)时,制剂溶解在水性介质中以制备基本澄清的溶液。在一个例子中,在没有加热所得混合物到环境温度(例如, 25°C)以上的情况下制剂就溶解在水性介质中。基本澄清是指组合物透明并且基本上没有明显粒子和/或沉淀(例如,没有明显浑浊、模糊或其他非均相)。

[0200] 使用佐剂组合物的方法

[0201] 本公开提供在受试者中调节免疫应答的方法,例如,刺激或者抑制天然、细胞和/或体液免疫应答。本文公开的佐剂组合物能够用于防病、预防、和/或治疗各种传染和肿瘤疾病。

[0202] 病症

[0203] 在某些实施方案中,本文公开的佐剂组合物可用于施用诸如疫苗的抗原的情况。疫苗可以为防病/预防疫苗或者治疗疫苗。在感染之前给予防病/预防疫苗以预防或抵抗疾病,而在感染或疾病发作之后给予治疗疫苗。

[0204] 防病/预防疫苗包含与受试者可能存在风险的疾患相关的一种或多种表位(例如,作为预防结核病的疫苗的结核分枝杆菌抗原)。

[0205] 治疗疫苗包含作用于个体的与特定疾患相关的一种或多种表位,例如在结核病患者中结核分枝杆菌或牛分枝杆菌表面抗原;在容易过敏的个体中个体敏感(即,过敏脱敏疗法)的抗原;具有癌症的个体的肿瘤细胞(例如,如在美国专利 No. 5,484,596 中描述);或者在癌症患者中与抗原相关的肿瘤。

[0206] 可联合抗原给予佐剂组合物(例如,在相同组合物中或者同时使用单独的组合物)或者可单独地施用佐剂组合物(例如,在施用抗原之前或之后至少 12 小时)。在某些

实施方案中,将抗原与佐剂组合物掺合。

[0207] 主题佐剂组合物和抗原的施用可导致改善一种或多种症状或者缓解期望疫苗治疗的疾患的一种或多种症状的随后发作。如对本领域技术人员显而易见,准确症状和它们改善的方式取决于待治疗的疾患。例如,在治疗疫苗用于结核病的情况下,佐剂组合物与抗原的施用可导致减少或者延缓咳嗽、胸膜或胸壁痛、发烧和 / 或其他本领域已知的其他症状发作。在疫苗是过敏脱敏疗法中使用的过敏原的情况下,佐剂组合物与抗原的施用可导致减少或延缓过敏症状的发作(例如,减少鼻炎、变应性结膜炎、IgE 的循环水平、和 / 或组胺的循环水平)。

[0208] 主题佐剂组合物也可预防性用于增加对由大量细菌或病毒病原体引起的感染的抵抗,该细菌或病毒病原体包括采用作为生物战争或生物恐怖活动的试剂的天然或遗传修饰的有机体。

[0209] 其他实施方案涉及具有预先存在的疾病或疾患的受试者的免疫调节治疗,该疾病或疾患例如癌症或感染性疾病。因为大部分癌症表达在身体其他细胞中没有发现的肿瘤相关抗原和 / 或肿瘤特异性抗原,所以癌症是受关注的目标。通过直接激活细胞免疫系统细胞(例如,CTL)或者体液免疫系统的组分、或者通过对临近细胞(所述细胞由包括巨噬细胞和自然杀伤 T(NKT) 细胞的免疫系统靶向)的旁观者效应, Th1- 类型免疫应答的刺激导致肿瘤细胞死亡。

[0210] 也能够向具有通过细胞外病原体(例如,细菌或原生动物)或者通过细胞内病原体(例如,病毒)导致的传染性疾病的受试者施用本文公开的佐剂组合物。

[0211] 在某些实施方案中,可通过施用本文公开的佐剂组合物来治疗患有与 Th2- 类型免疫应答相关的疾患的受试者,例如(但不限于)过敏、过敏引起的哮喘、特应性皮炎、嗜酸性胃肠炎、嗜酸性食管炎、和过敏性支气管肺部曲霉病。例如,可将包含药学上可接受的油载体、类黄酮和至少一种维生素 C、D 和 E 的佐剂组合物施用至患有与一种或多种 Th1- 类型免疫应答相关的细胞因子的 Th2- 类型免疫应答递增水平相关的疾患的受试者,其可导致与受试者对过敏原的应答相关的 Th2- 类型免疫应答特征降低。具有与 Th2- 类型免疫应答相关的疾患的受试者的免疫调节导致降低或改善或者延缓一种或多种疾患症状的发作。在疾患是过敏或过敏引起的哮喘的情况下,对一种或多种症状的改善包括以下的一种或多种的减少:鼻炎、变应性结膜炎、IgE 的循环水平、组胺的循环水平和 / 或对“营救”吸入器疗法的需求(例如,通过定量吸入器或者喷雾器施用的吸入型沙丁胺醇)。

[0212] 施用途径

[0213] 可通过大量施用途径向受试者施用本文提供的佐剂组合物。示例施用途径包括粘膜,例如,口服、舌下、鼻内、吸入、眼用、阴道内、直肠内;和全身,例如,肌肉内、皮内、透皮、腹膜内、皮下或经皮。在某些实施方案中,至少两种施用途径的组合可用于诱导免疫应答。例如,可使用粘膜途径和全身施用途径的组合。

[0214] 根据个体受试者和疾病状况以及本领域普通技术人员显而易见的其他因素可改变施用途径。

[0215] 当施用途径是粘膜或经上皮(通过皮肤)途径时,则优选包含异硫氰酸烯丙酯的组合物。

[0216] 在某些实施方案中,在没有破坏粘膜表面下,通过粘膜表面可施用本文所述的佐

剂组合物。

[0217] 在具有或者没有抗原下可使用主题佐剂组合物。当联合抗原使用时,可同时施用佐剂组合物和抗原或者在施用抗原之前或之后可施用佐剂组合物。当联合抗原使用时,可将抗原与佐剂组合物混合。

[0218] 可将本文提供的佐剂组合物作为微米-或纳米-粒子在凝胶或片剂(例如,快速溶解)形式中提供。通过诸如口服或舌下途径可施用这些制剂。对于鼻内施用,可将佐剂组合物作为鼻腔喷雾剂配制在诸如乳剂形式或滴剂中。对于经皮施用,可在凝胶、洗剂或软膏形式中给予佐剂组合物。对于全身注射,可将佐剂组合物作为乳剂和/或微米/纳米粒子配制给予。对于直肠施用,可将佐剂组合物配制为诸如栓剂或凝胶。对于阴道施用,可将佐剂组合物配制为诸如凝胶、乳剂、软膏。

[0219] 在某些实施方案中,可通过以下所示顺序的不同途径的组合向受试者施用本文公开的佐剂组合物:

[0220] i. 全身、粘膜;

[0221] ii. 全身、全身、粘膜、粘膜;

[0222] iii. 全身、粘膜、全身;

[0223] iv. 粘膜、粘膜、全身、全身;

[0224] v. 粘膜、全身、全身;

[0225] vi. 例如粘膜、全身、粘膜。

[0226] 当全身或粘膜施用佐剂组合物多于一次时,则两次或更多次全身或粘膜施用可以为相同的全身(例如,两次肌肉内注射)或者粘膜途径(两次鼻内(IN)/舌下(SL)施用)或者不同(例如,一次肌肉内注射和一次静脉内注射;一次IN施用和一次SL施用)。

[0227] 剂量

[0228] 向受试者施用的本文所述的佐剂组合物的剂量可根据施用途径和体重确定,以及范围可以为0.001ml/kg体重至1ml/kg体重。佐剂组合物施用的次数可变化,并且可根据多种因素来确定。这些因素对于本领域技术人员而言显而易见,以及可包括待预防或治疗的疾病、病原体或癌症的类型、抗原的结构性质、施用途径、在受试者中引起的免疫应答的水平、免疫应答的类型等。

[0229] 受试者

[0230] 本文所述的佐剂组合物可用于在能够增加免疫应答的各种受试者中引起免疫应答。在某些情况下,可向任意数量的需要其的脊索动物亚门施用本文所述的佐剂组合物,该脊索动物亚门包括哺乳动物(人、其他非人灵长类、驯养动物,例如,家禽)、禽类、鱼类、或者任何其他动物。在某些情况下,可向人类施用佐剂组合物。在某些情况下,可向牛施用佐剂组合物。在某些情况下,可向鸡、马、绵羊、山羊施用佐剂组合物。在某些情况下,可向猪科动物施用佐剂组合物。在某些情况下,可向猫和狗施用佐剂组合物。

[0231] 免疫应答的检测

[0232] 免疫应答的调节可以为体液的和/或细胞的,以及可使用本领域的标准技术来测定。以多种方式可检测受试者中的免疫应答,包括测量抗原特异性抗体、IFN- γ 、IFN- α 、IL-2、IL-12、TNF- α 、IL-6、IL-4、IL-5、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、IL-18、IL-22、和其他细胞因子的一种或多种的表达水平以及检测诸如T细胞扩增的应答、诸如CD4⁺T细胞、NK细

胞或 CTL 的淋巴细胞的特异性种群激活、以及树状细胞和巨噬细胞成熟和激活。

[0233] 用于测量特异性抗体应答的方法包括酶联免疫吸附测定 (ELISA), 并且在本领域众所周知。使用荧光激活细胞分类术 (FACS) 能够得到诸如 CD4⁺T 细胞的淋巴细胞的具体类型数目的测量。细胞毒性和 CTL 测定描述在 Raz 等人 (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:9519-9523 中。例如通过诸如 ELISA 能够测定细胞因子浓度。评估对免疫原的免疫应答的这些和其他测定是本领域众所周知的。例如, SELECTED METHODS IN CELLULAR IMMUNOLOGY (1980) Mishell 和 Shiigi 编辑, W.H. Freeman and Co.

[0234] 试剂盒

[0235] 也提供包括本文所述的佐剂组合物的组分的一种或多种无菌容器的试剂盒。单一组分可保存在单独的无菌容器中或者两种或更多种组分可保存在单一容器中。任选地, 试剂盒也可包括含有所需抗原的容器。

[0236] 在一些实施方案中, 无菌容器可任选具有吸取特定体积 / 量的组分的入口, 例如, 用于引入注射器以抽取某一体积的药理学上可接受的载体的口。

[0237] 在一些实施方案中, 本文所述的佐剂组合物的组分的容器可以不是无菌的, 但是应当相当清洁。

[0238] 试剂盒可进一步包括一组适当的使用说明 (通常书面使用说明), 该使用说明与用于免疫调节 (例如, 减轻传染疾病的症状、增加 IFN- γ 水平、增加 IFN- α 水平、或减轻 IgE- 相关的疾患) 的佐剂组合物的使用相关。

[0239] 试剂盒可包括包装在任何方便、合适包装中的佐剂组合物的组分。例如, 如果组分为干燥的制剂 (例如, 冷冻干燥或干燥的粉末), 则可使用具有弹性塞子的小瓶, 从而通过注入流体经过弹性塞子可容易地重新悬浮组分。具有非弹性、可移动瓶塞 (例如, 密闭玻璃) 或者弹性塞子的安瓿瓶可用于佐剂组合物的液体组分。也涵盖联合具体装置、诸如吸入器、鼻腔施用装置 (例如, 喷雾器) 或滴眼剂的粘膜施用装置使用的包装。

[0240] 与佐剂组合物的使用相关的使用说明通常包括免疫调节的剂量、给药方案、和施用途径相关的信息。含有佐剂组合物的组分或者预混合的佐剂组合物的容器可以为单位剂量、散装 (例如, 多剂量包装) 或亚单位剂量。由本文公开的试剂盒所提供的使用说明通常为在标签或包装插页 (例如, 包括在试剂盒中的纸片) 上的书面使用说明, 但也可包括机器可识别的使用说明 (例如, 在磁性或光学存储盘上保存的使用说明)。

实施例:

[0241] 实施例 1: 在使用脂多糖激活真核细胞之后维生素 A 和类黄酮的协同调节作用

[0242] 为了确定在有或者没有脂多糖 (LPS) 下单独或者联合的类黄酮、水合儿茶素 (CH)、表没食子儿茶素没食子酸酯 (EGCG)、和维生素、维生素 D3 (VD3)、维生素 E (α -生育酚; VE)、视黄酸 (RA; 维生素 A 衍生物) 和棕榈酸视黄酯 (RP; 维生素 A 衍生物) 的免疫调节作用, 体外激活鼠脾细胞 4 天, 并通过 ELISA 分析培养物上清液中 IL-6 的存在。在 LPS 的存在下 RA 和 CH 的组合对降低 IL-6 和 IL-1 α 的产生具有令人惊讶的协同效应 (图 1A 和图 1B)。而且, 在缺乏 LPS 激活下, RA 和 CH 的组合协同降低 TNF α 产生 (图 1C)。

[0243] 实施例 2: 在单独或者联合芥子油 (MO) 下, 联合 EGCG、 α -生育酚 (维生素 E; VE) 的来自 HIV-1BaL 的 gp120 的单次肌肉内注射, 得到体内雌性 BALB/c 小鼠 (6-8 周龄) 中

对早期免疫应答的类黄酮和维生素的组合的协同效应,并且与无佐剂(盐水)的接种相比较。在注射之后 16 小时,使用 EGCG、VE 和 MO 协同增加 MCP1、IL-12p70 和 IL-13 的血清水平(图 2A)。

[0244] 在 BALB/c 小鼠的起始体内研究中,进行单次肌肉内(IM)接种之后,与没有使用 MO 的接种相比,使用来自季节性流感菌株(H1N1;0.5 μ g)的血球凝集素(HA)、维生素 A(VA;30 μ g)、或水合儿茶素(cat;120 μ g)和芥子油(MO)的组合增强血清抗-HA IgG1 应答(图 2B)。

[0245] 在进行粘膜和全身接种之后,儿茶素和维生素 A 以及芥籽油的组合协同增强局部和全身 B 和 T 细胞应答。

[0246] 在进行粘膜和全身接种之后,测定导致显著更高血清 IgG 应答的 VA(棕榈酸视黄酯;RP;30 μ g)、VE(2mg)和 cat(120 μ g)以及 50%(体积/体积)MO 的组合。在两次粘膜和随后两次 IM 接种之后,VA+cat+MO 或者 VA+VE+cat+MO 的组合引起最高血清 IgG 应答(图 3)。而且,检测到由阴道粘膜排出的 TH1(IL-2 和 TNF α)和 TH2(IL-5)在髂淋巴结中的应答显著增强(图 4)。在该研究中,进行 NIDS(VA+E+EGCG+MO)和 TLR3 激动剂 poly(I:C)的比较,其显示在进行粘膜和全身接种之后,NIDS 引起比 poly(I:C)更高的抗体应答。

[0247] 在粘膜中使用 VA+cat+MO,随后全身接种进行研究,其与使用亚型 C gp120CN54、无佐剂相比,显示在使用 VA+cat+MO 接种之后显著增加的血清 IgG1、IgG2a、和 IgA(图 5)以及 IgA 增加的阴道灌洗 IgG1 和 IgA(图 6)。有趣地,不仅针对来源于同源性 CN54 亚型 B/C 的 gp120,还针对多种异源性亚型 B HIV-1 菌株,即 BaL、CM、SF162 和 IIIB,血清 IgG1 抗体滴度有显著增加。这些数据已经出版(Yu M, Vajdy M. A novel retinoic acid, catechin hydrate and mustard oil-based emulsion for enhanced cytokine and antibody responses against multiple strains of HIV-1 following mucosal and systemic vaccinations. Vaccine. 2011 年 3 月, 16;29(13):2429-36. 2011 年 1 月 25 日电子出版)。

[0248] 实施例 3:在细胞毒性的小鼠气囊模型中与 poly I:C 和 imject alum 相比, NIDS 诱导显著早期促炎细胞因子和趋化因子产生减少

[0249] 通过采用鼠气囊模型来进行局部细胞毒性测试。不论通过早期局部细胞因子和趋化因子产生是否能够描绘 NIDS 的体内免疫增强作用,都建立该模型。将 NIDS 的小鼠疫苗剂量当量(各剂量含有 30 μ g 棕榈酸视黄酯、2mg 维生素 E(α -生育酚、120 μ g 表没食子儿茶素没食子酸酯、和 50% 体积/体积芥子油)、poly(I:C)和 imject alum 七次注射至气囊内,在 6 小时之后收集上清液,并进行多重 Luminex 测定,从而测定多种天然细胞因子和趋化因子。与注入 NIDS 相比,进行 poly(I:C)和 imject alum 的注射之后,发现 TNF α 、IL-6、IP-10、KC、MCP-1、MIP-1 α 、MIP-1 β 、MIP-2、RANTES、和 G-CSF 显著升高(图 7)。

[0250] 为了找到以上气囊模型结果的体内支撑依据,在进行 NIDS vs. poly(I:C) vs. 无佐剂的单次 IM 注射之后 6 小时测定在小鼠血清中早期促炎细胞因子 TNF α 和 IL-6 的体内产生。我们发现,在使用 poly(I:C) vs. NIDS 或者无佐剂的 IM 接种之后,血清 TNF α 和 IL-6 显著增加(图 8)。

[0251] 在另一研究中,测定维生素 A 和 E 以及类黄酮的组合的免疫调节作用以评估该作用是否依赖于芥籽油的存在或者使用其他药用载体是否也有效。为了该目的,在有或没有维生素 A+E 和 EGCG 的存在下,使用来自 HIV-1 菌株 BaL 的 gp120、使用 Alum(氢氧化铝 2.5%;

Invivogen) 肌肉内 (IM) 接种 BALC/c 小鼠一次或两次。在单次 IM 接种之后, 将维生素 A+E 和 EGCG 加入 Alum 显著增强血清抗体 (Ig (H+L)) 应答 (图 9)。而且, 将维生素 A+E 和 EGCG 加入 Alum 降低抗原特异性血清 IgE (明显 TH2 应答的指示), 而在进行两次 IM 接种之后, 它增加抗原特异性血清 IgG2a 应答 (图 9)。

[0252] 实施例 4: 通过降低 MO 的免疫抑制和使用无机载体 Alum 的免疫增强

[0253] 将数组 4 只 / 组雌性 BALB/C 小鼠肌肉内在 3 周间隔下两次接种含有来自 HIV-1 的 BaL 菌株的 2.5 μ g gp120 的各种疫苗制剂。在第二次接种之后 2 周 (2WP2) 通过 ELISA 测量血清 gp120- 特异性 IgG1 滴度。使用 50% 芥子油 (MO) 或 10%MO 中的棕榈酸视黄酯 (RP ; 54IU)、表没食子儿茶素没食子酸酯 (EGCG ; 120 μ g) 的组合来接种两组的小鼠。使用 50%MO 或 10%MO 中的维生素 D3 (VD3 ; 20IU)、维生素 E (VE ; 2mg) 和 EGCG 的组合来接种另外两组的小鼠。使用单独的 2.5% 磷酸铝 (Alum) 或者与维生素 D3 (VD3)、维生素 E (VE) 和 EGCG 的组合混合来接种另外两组的小鼠。使用盐水中的 gp120 来接种一组小鼠。

[0254] 参照图 10, 在棕榈酸视黄酯 (RP) 和表没食子儿茶素没食子酸酯 (EGCG) 的存在下, 芥子油 (MO) 由 50% 至 10% 的降低显著抑制血清 IgG1 抗原特异性应答。在 VD3、VE 和 EGCG 的存在下 MO 由 50% 至 10% 的降低显著抑制血清 IgG1 抗原特异性应答。而且, 与单独使用 Alum 接种相比, 将 VD3、VE 和 EGCG 加入 Alum 显著增强血清 IgG1 抗原特异性应答。

[0255] 实施例 5: 使用单独的油酸 (脂肪酸, 40% 体积 / 体积) 或者联合维生素 A 进行接种之后抗原特异性免疫增强; 以及通过油酸中的表没食子儿茶素没食子酸酯和维生素 A 的组合得到协同免疫抑制。

[0256] 将数组 4 只 / 组雌性 BALB/C 小鼠肌肉内在 3 周间隔下两次接种含有来自 HIV-1 的 BaL 分化枝的 2.5 μ g gp120 的各种疫苗制剂。在第二次接种之后 2 周 (2WP2) 通过 ELISA 测量血清 gp120- 特异性 IgG1 滴度。使用单独或者不同组合的在 40% 油酸中的棕榈酸视黄酯 (RP ; 54IU)、表没食子儿茶素没食子酸酯 (EGCG ; 120 μ g) 的组合来接种小鼠。如在图 11 中所示, 与油酸 +EGCG、VA+ 单独的 EGCG 或者无佐剂相比, 单独与 RP 联合的单种脂肪酸 (油酸) 增强血清 IgG1 抗原特异性应答。而且, 图 11 显示: 与单独的油酸或者无佐剂相比, 将 EGCG 加入 RP 和油酸协同抑制血清 IgG1 抗原特异性应答。

[0257] 与联合维生素 A、和儿茶素的油酸相比, 在单独使用油酸 (脂肪酸, 40% 体积 / 体积) 单独接种之后达到协同性抗原非特异性免疫抑制。

[0258] 将数组 4 只 / 组雌性 BALB/C 小鼠肌肉内接种含有来自 HIV-1 的 BaL 菌株的 2.5 μ g gp120 的各种疫苗制剂。在接种之后 6 小时通过 ELISA 测量血清细胞因子和趋化因子。使用单独或者不同组合的在 40% 油酸中维生素 A (VA ; 棕榈酸视黄酯 54IU)、表没食子儿茶素没食子酸酯 (EGCG ; 120 μ g) 的组合来接种小鼠。

[0259] 图 12 显示: 与单独的油酸、油酸 + 维生素 A、或者油酸联合 EGCG 相比, 在使用联合维生素 A 和儿茶素的油酸 (一种脂肪酸, 40% 体积 / 体积) 的单次注射之后得到协同性抗原非特异性免疫抑制。

[0260] 实施例 7: 与联合维生素 A 和儿茶素的油酸相比, 单独使用油酸 (脂肪酸, 40% 体积 / 体积) 接种之后的协同性抗原 - 非特异性免疫抑制

[0261] 将数组 4 只 / 组雌性 BALB/C 小鼠肌肉内接种一次含有来自 HIV-1 的 BaL 菌株的 2.5 μ g gp120 的各种疫苗制剂。在接种之后 6 小时通过 ELISA 测量血清细胞因子和趋化因

子。使用单独或者各种组合的在 40% 油酸中的维生素 A (VA ;棕榈酸视黄酯 54IU)、表没食子儿茶素没食子酸酯 (EGCG ;120 μ g) 的组合来接种小鼠。

[0262] 图 13 显示 :该研究的结果表明与单独的油酸、油酸 + 维生素 A、或者油酸联合 EGCG 相比,在使用联合维生素 A 和儿茶素的油酸 (一种脂肪酸,40% 体积 / 体积) 进行单次注射之后得到协同性抗原非特异性免疫抑制。

[0263] 实施例 8 :使用 NIDS、或 Alum、或者无油 NIDS&Alum 的抗 -HIV-gp120Ig 应答和 IgG2a 应答的增强和 IgE 应答的降低

[0264] 将数组 4 只 / 组雌性 BALB/C 小鼠肌肉内接种一次或两次,用于比较 NIDS (在 50%MO 中的 54IU 棕榈酸视黄酯, +120 μ g 表没食子儿茶素没食子酸酯, +2mg α 生育酚) vs. Alum vs. Alum+ 无油 NIDS 在进行一次 (3WP1)、两次 (2WP2) IM 接种之后诱导针对 HIV-gp120BaL (2.5 μ g/ 给药) 的 TH1 :TH2 抗体应答。

[0265] 图 14 显示 :在进行单次 IM 接种之后,与 NIDS vs. Alum vs. Alum+ 无油 NIDS 相比,加入维生素 A 和 E 以及儿茶素显著增强血清总抗 -env Ig 应答,以及显著增强血清 IgG2a, 同时降低血清 IgE 应答。

[0266] 实施例 9 :在使用 VE、EGCG 和 Alum 进行单次肌肉内注射之后 6 小时血清 IL-5 应答的抗原非特异性增强

[0267] 将数组 3 只 / 组雌性 BALB/C 小鼠肌肉内注射一次含有棕榈酸视黄酯 (RP ;维生素 A ;54IU)、表没食子儿茶素没食子酸酯 (EGCG ;120 μ g)、和 / 或 2.5%Alum (来自 Invivogen, San Diego, CA 的 50% 体积 / 体积) 的各种制剂。在注射之后 6 小时收集血清, 并通过多重 luminex 测定测量 IL-5 细胞因子应答。

[0268] 在使用 Alum 进行单次肌肉内注射之后 6 小时,维生素 A 和 EGCG 的组合诱导血清 IL-5 的抗原非特异性协同增强 (图 15)。

[0269] 实施例 10 :通过没食子酸 (多酚单宁)、维生素 A 和芥子油 (MO) 的协同效应的抗原特异性免疫增强。

[0270] 将数组 3-4 只 / 组雌性 BALB/C 小鼠肌肉内在 3 周间隔下两次接种含有来自 HIV-1 的 BaL 菌株的 2.5 μ g gp120 的各种疫苗制剂。在第二次接种之后 2 周 (2WP2) 通过 ELISA 测量血清 gp120- 特异性 IgG1 滴度。每剂疫苗含有单独或者不同组合的在 50%MO 中的维生素 A (VA ;棕榈酸视黄酯 ;54IU)、没食子酸 (120 μ g)。

[0271] 来自这些研究的数据显示抗原特异性免疫增强 :没食子酸 (多酚单宁)、维生素 A 和芥子油 (MO) 的协同效应协同增强血清抗原特异性 IgG1 (TH2) 和 IgG2a (TH1) 抗体应答 (图 16)。

[0272] 实施例 11 :使用在 10% 或 50% 或者 75% 芥子油 (MO) 中的维生素 A 和 E 以及儿茶素进行接种之后 TH2 的抑制和 TH1 细胞因子应答的增强

[0273] 将数组 4 只 / 组雌性 BALB/C 小鼠肌肉内在 3 周间隔下两次接种含有来自 HIV-1 的 BaL 菌株的 2.5 μ g gp120 的各种疫苗制剂。在第二次接种之后 2 周 (2WP2) 通过 ELISA 测量血清 gp120- 特异性 IgG1 滴度。由脾脏制备 2WP2 单细胞悬液以及使用 2 μ g/ml 的 gp120 离体激活过夜,并在一天之后收集上清液,然后通过多重 Luminex 测定来测量各种细胞因子。使用在 10%、50% 或 75% 芥子油 (MO) 中的棕榈酸视黄酯 (RP ;54IU)、维生素 E (VE ;2mg)、表没食子儿茶素没食子酸酯 (EGCG ;120 μ g) 的组合来接种各组小鼠。使用在 50%MO 或 10%MO

中的维生素 D3(VD3 ;20IU)、维生素 E(VE) 和 EGCG 的组合来接种另外两组小鼠。在有或没有 RP 下,使用单独的或者与维生素 C(VC)、VE 和 EGCG 的组合混合的 2.5% 磷酸铝 (Alum) 来接种另外两组的小鼠。使用在盐水中或者在角鲨烯油基载体 (AdjuMF59 ;Invivogen, San Diego, CA) 中的 gp120 来接种一组小鼠。

[0274] 与使用盐水接种相比,在 75%MO 中的 RP(54IU)+VE(2mg)+EGCG(120 μ g) 显著增强血清 IgG1 和 IgG2a(TH1)、和脾 IFN γ (TH1),而降低 IL-5(TH2) 应答(图 17A 和图 17B)。与使用在 10%MO 中的 RP+VE+EGCG 接种相比,在 75%MO 中的 RP+VE+EGCG 显著增强血清 IgG2a(TH1)、和脾 IFN- γ (TH1) 应答(图 17A 和图 17B)。

[0275] 实施例 12 :维生素 A 和儿茶素协同增强针对 HIV-1 (BaL 菌株) gp120 蛋白的血清抗体应答

[0276] 将数组 4 只 / 组雌性 BALB/C 小鼠肌肉内在 2.5 周间隔下两次接种在测量直径为 150nm 的脂质体(由双肉豆蔻磷脂酰胆碱(2%W/V)、双肉豆蔻磷脂酰甘油(0.6%W/V)、胆固醇(0.4%W/V)、蔗糖(9%W/V)、丁二酸二钠六水合物(0.27%W/V) 构成)中的 2.5 μ g gp120, 其具有单独的维生素 A(VA :棕榈酸视黄酯 ;54IU) 或表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG ; 120 μ g), 或者 VA 和 EGCG 的组合。在最后接种之后 2 周通过 ELISA 测量总血清免疫球蛋白(Ig 重链和轻链)。

[0277] 图 18 显示与脂质体混合的 VA 和 EGCG 的组合协同增强血清抗体应答。

[0278] 实施例 13 :维生素 A 和 E 以及儿茶素角鲨烯油基载体的协同免疫增强作用

[0279] 将数组 4 只 / 组雌性 BALB/C 小鼠肌肉内在 3 周间隔下两次接种含有来自 HIV-1 的 BaL 菌株的 2.5 μ g gp120 的各种疫苗制剂。在第二次接种之后 2 周(2WP2) 通过 ELISA 测量血清 gp120- 特异性 IgG1 滴度。使用在 5% 体积 / 体积角鲨烯油中的棕榈酸视黄酯(RP ; 54IU)、表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG ;120 μ g) 接种两组小鼠。

[0280] 图 19 显示 :将 VA 和 EGCG 加入角鲨烯油基载体协同增强血清 IgG1 应答。

[0281] 实施例 14 :使用各种油基载体的维生素 A 和 E 以及儿茶素的协同免疫增强作用

[0282] 将数组 4 只 / 组雌性 BALB/C 小鼠肌肉内在 3 周间隔下两次接种含有来自 HIV-1 的 BaL 菌株的 2.5 μ g gp120 的各种疫苗制剂。在第二次接种之后 2 周(2WP2) 通过 ELISA 测量血清 gp120- 特异性 IgG1 滴度。使用在 50%(体积 / 体积) 玉米油、或 50%(体积 / 体积) 橄榄油、或 50%(体积 / 体积) 葡萄籽油、或 5%(体积 / 体积) 角鲨烯油、或 40%(体积 / 体积) 矿物油中的棕榈酸视黄酯(RP ;54IU)、表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG ;120 μ g) 的组合来接种两组小鼠。

[0283] 该研究的结果显示在图 20 中,其表明与单独使用各油载体的接种相比,加入 VA、VE 和 EGCG 至除了矿物油之外的任何油载体均显著增强血清 IgG1 抗原特异性应答。

[0284] 实施例 15 :在使用 VA、EGCG、和 MO 单次肌肉内注射之后 6 小时的血清 IL-15 细胞因子应答的抗原非特异性增强

[0285] 将数组 3 只 / 组雌性 BALB/C 小鼠肌肉内注射一次含有棕榈酸视黄酯(RP ;54IU)、表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG ;120 μ g)、和 / 或 50% 体积 / 体积芥子油(MO) 的各种制剂。在注射之后 6 小时收集血清,并通过多重 Luminex 测定测量 IL-15 细胞因子应答。

[0286] 图 21 显示 :在进行单次肌肉注射之后 6 小时,RP、EGCG、MO 的组合诱导血清 IL-15 的抗原非特异性协同增强。

[0287] 实施例 16 :在使用维生素E、表没食子儿茶素没食子酸酯、芥子油(MO) 单次肌肉内注射之后 6 小时的血清 IL-5 和 IL-12p70 细胞因子应答的抗原非特异性增强

[0288] 将数组 3 只 / 组雌性 BALB/C 小鼠肌肉内注射一次含有 α -生育酚(维生素 E ; 2mg)、表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG ;120 μ g)、和 / 或 50% 体积 / 体积芥子油(MO) 的各种制剂。在注射之后 6 小时收集血清,并通过多重 Luminex 测定测量 IL-13 和 IL-12p70 细胞因子应答。

[0289] 图 22 显示 :在进行单次肌肉注射之后 6 小时,维生素 E、EGCG、MO 的组合诱导血清 IL-13 和 IL-12p70 的抗原非特异性协同增强。

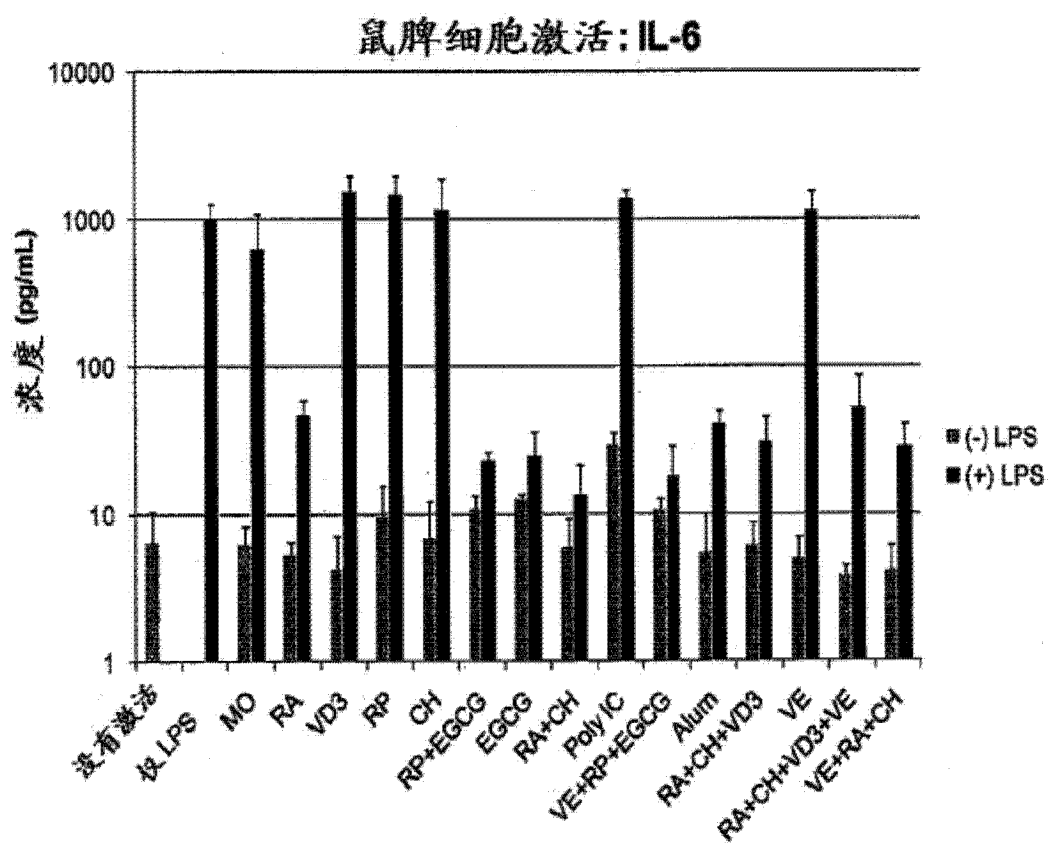


图 1A

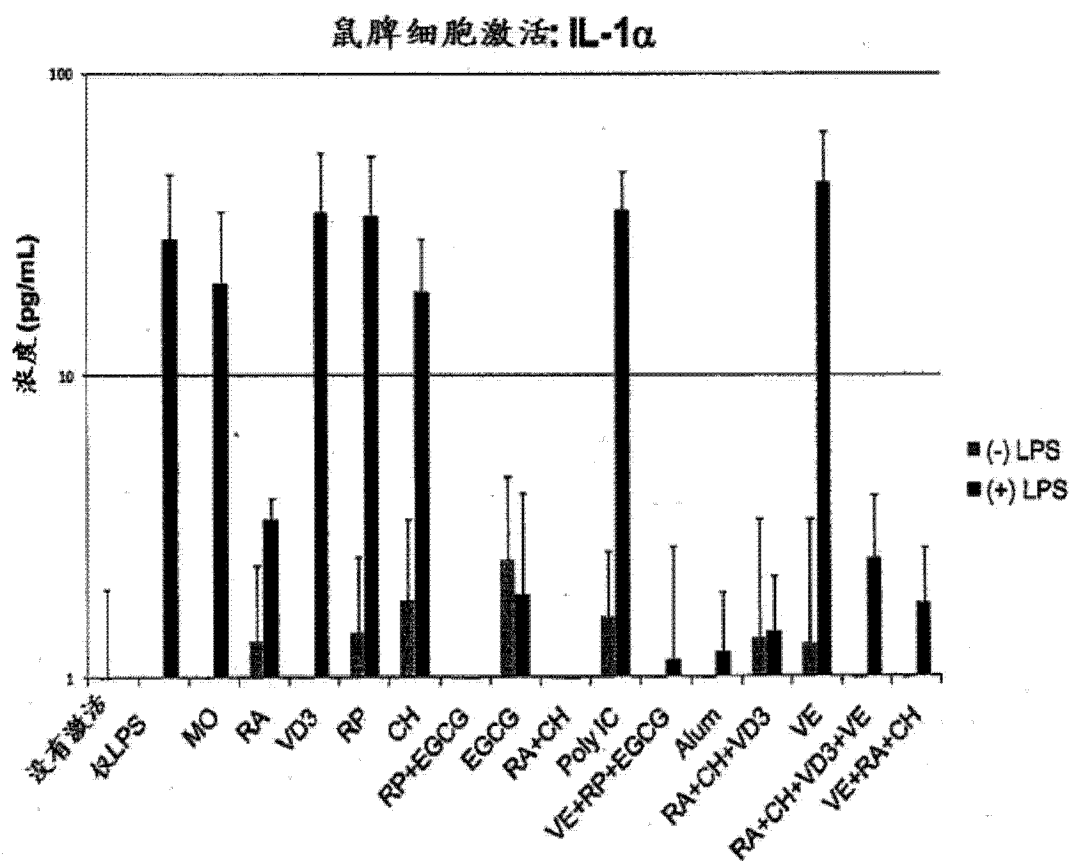


图 1B

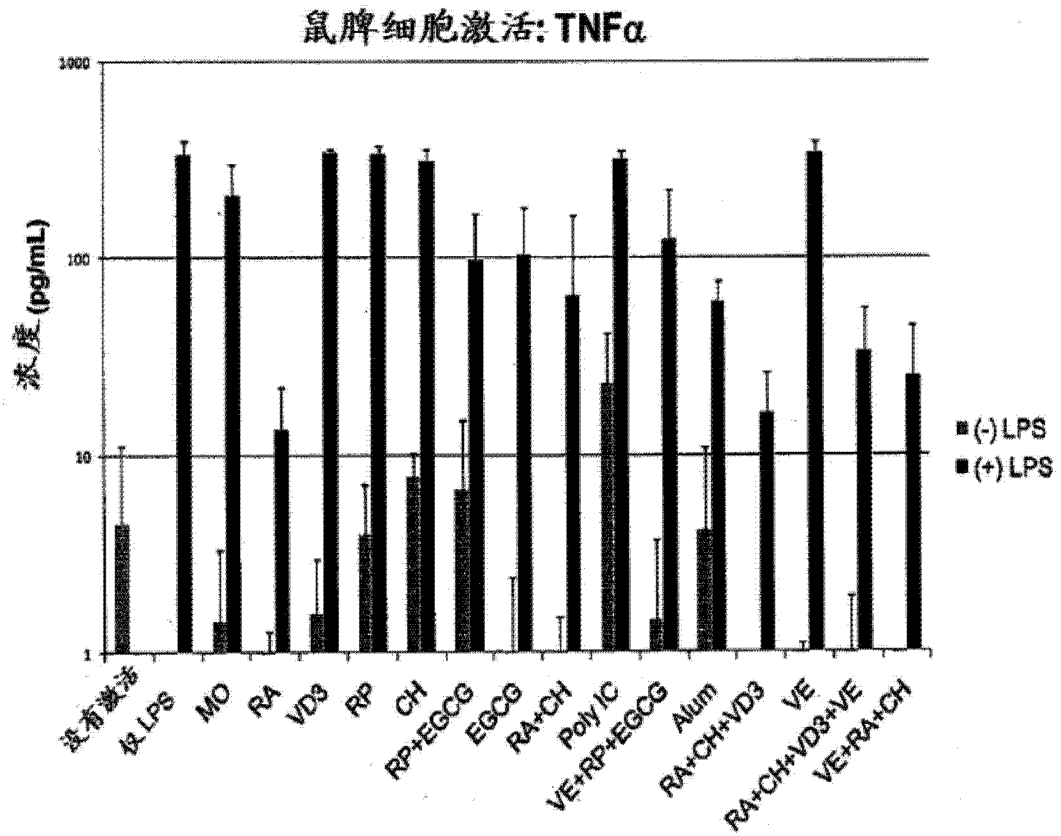


图 1C

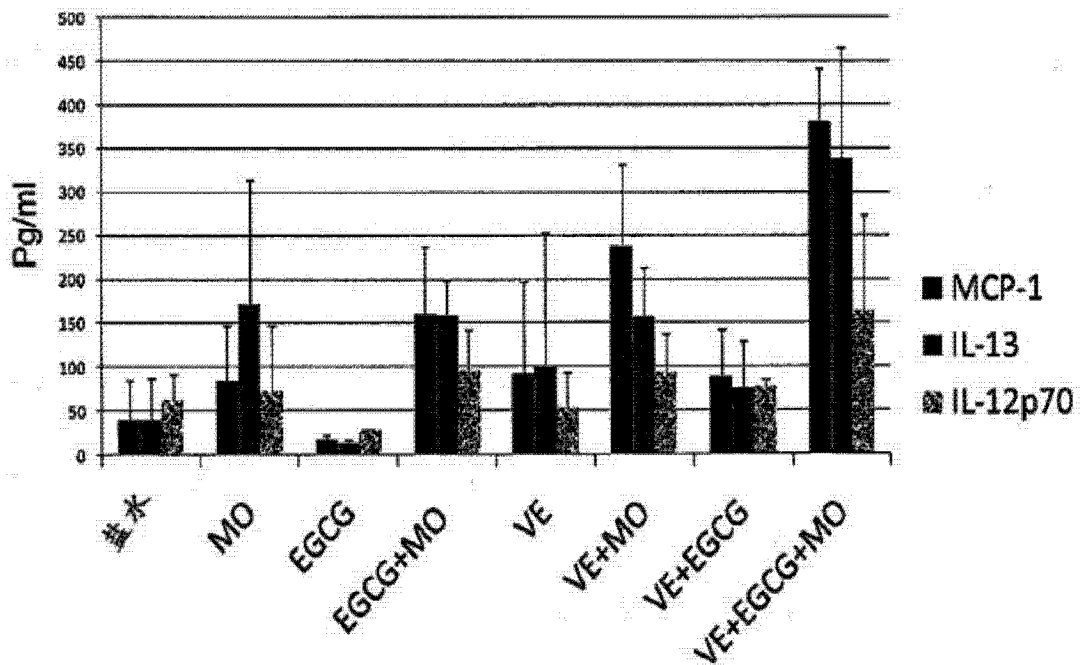


图 2A

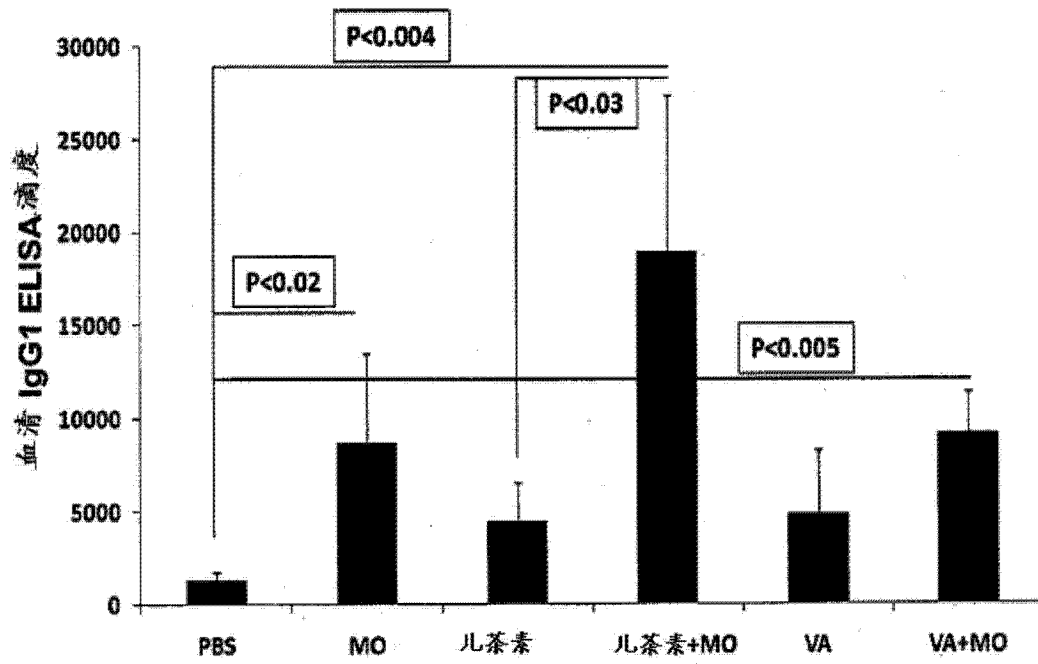


图 2B

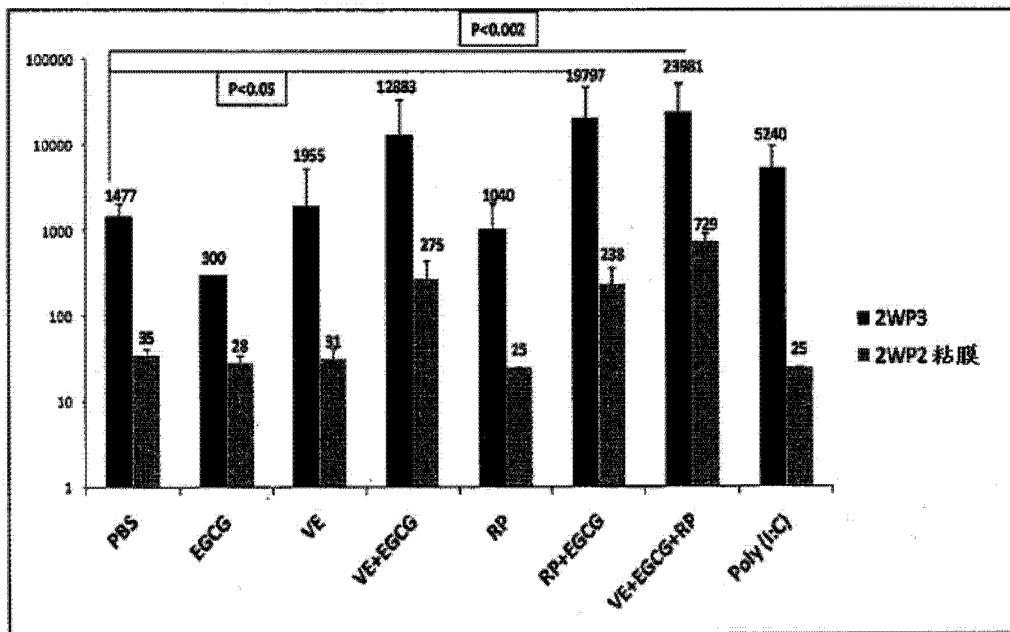


图 3

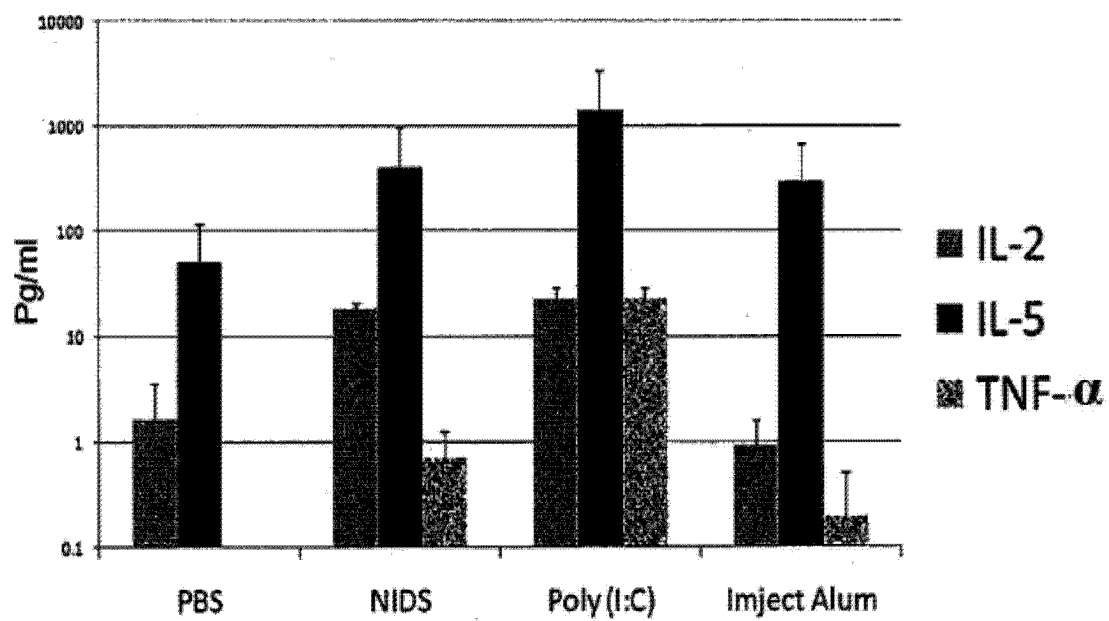


图 4

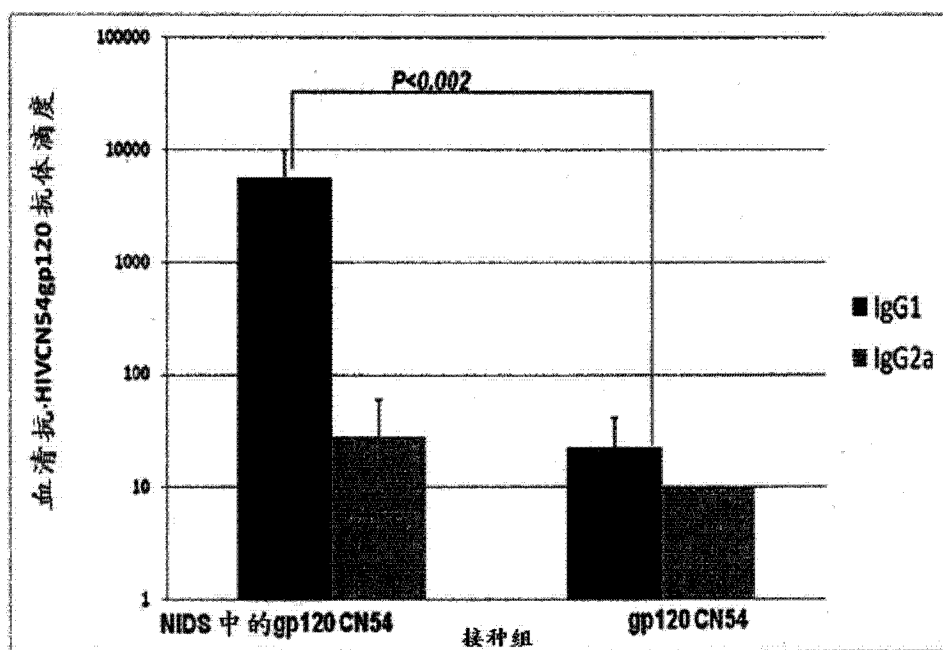


图 5A

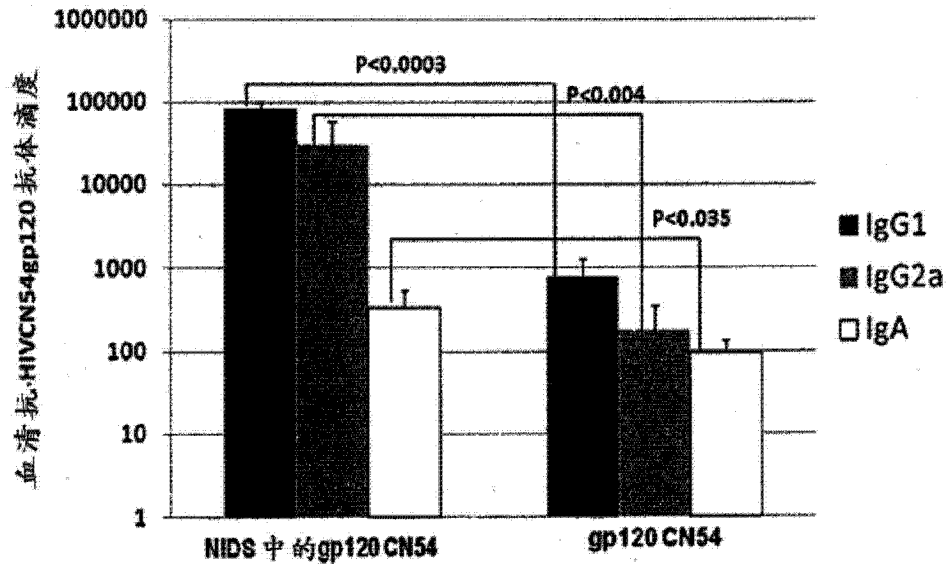


图 5B

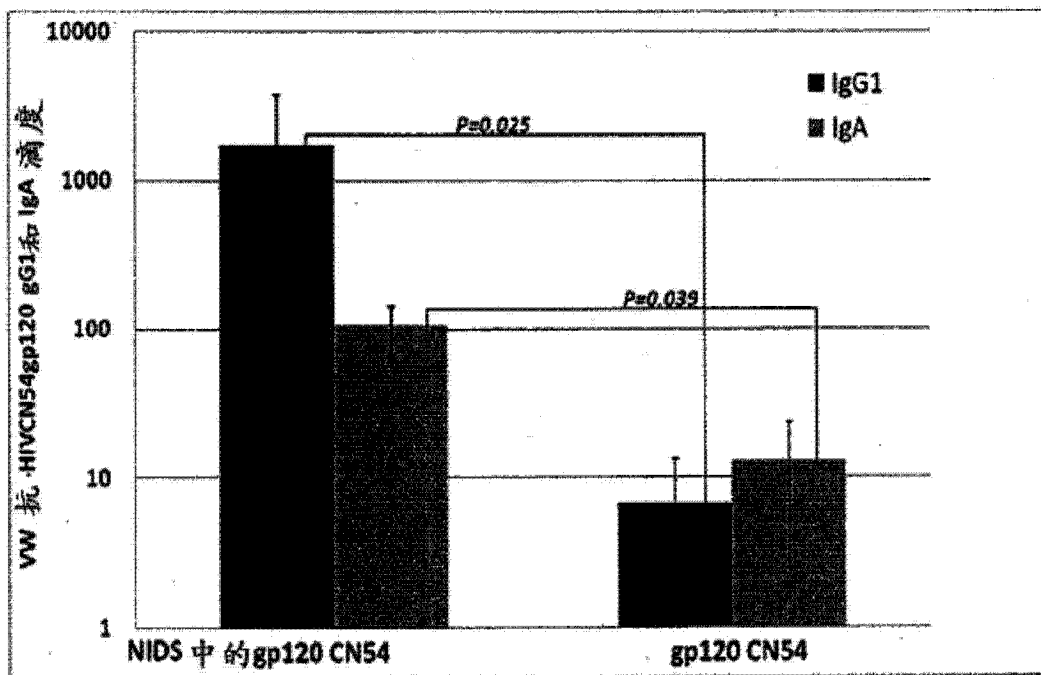


图 6

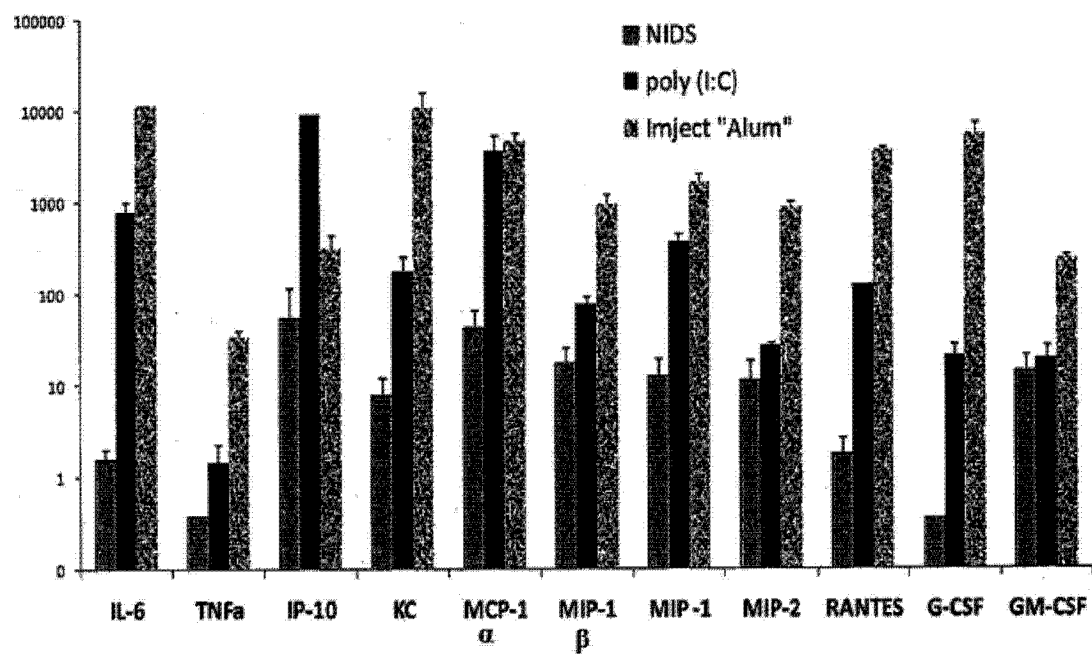


图 7

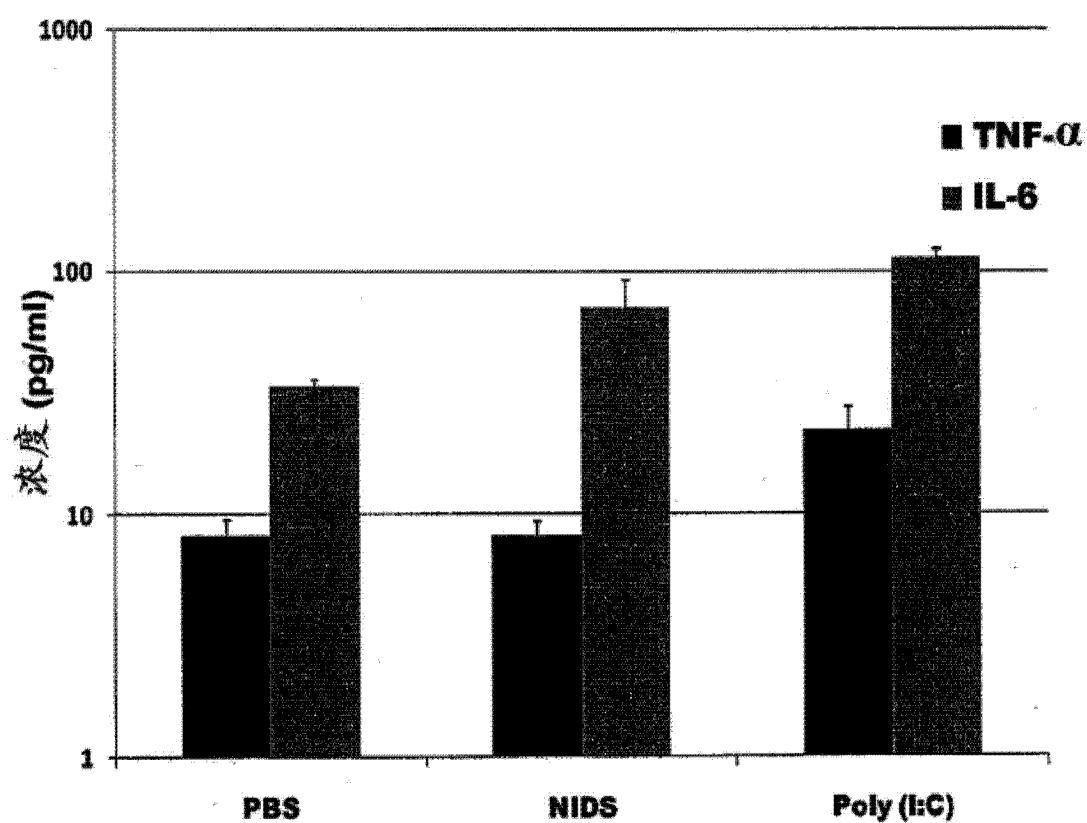


图 8

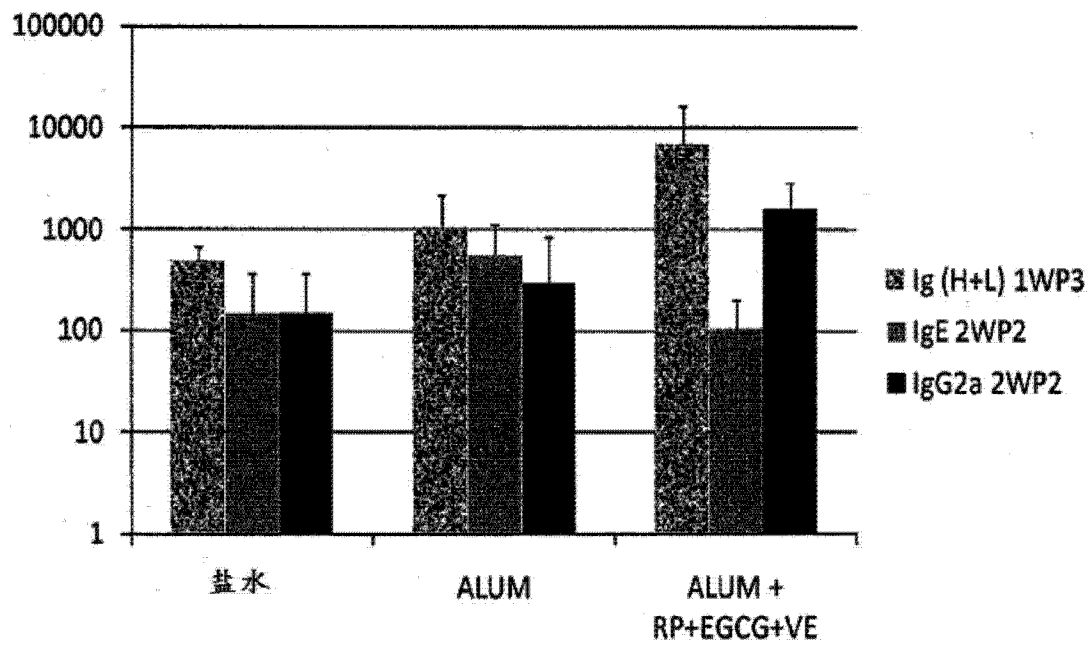


图 9

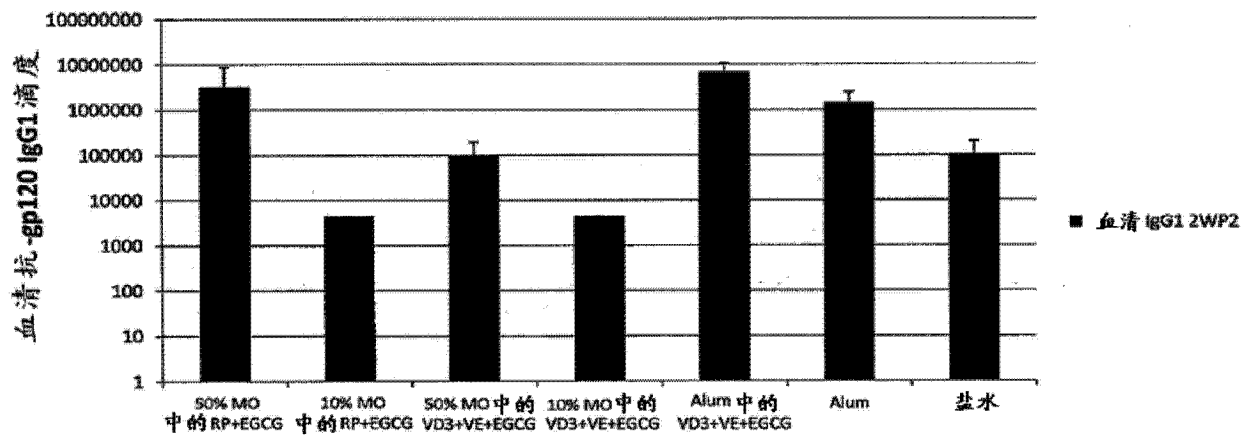


图 10

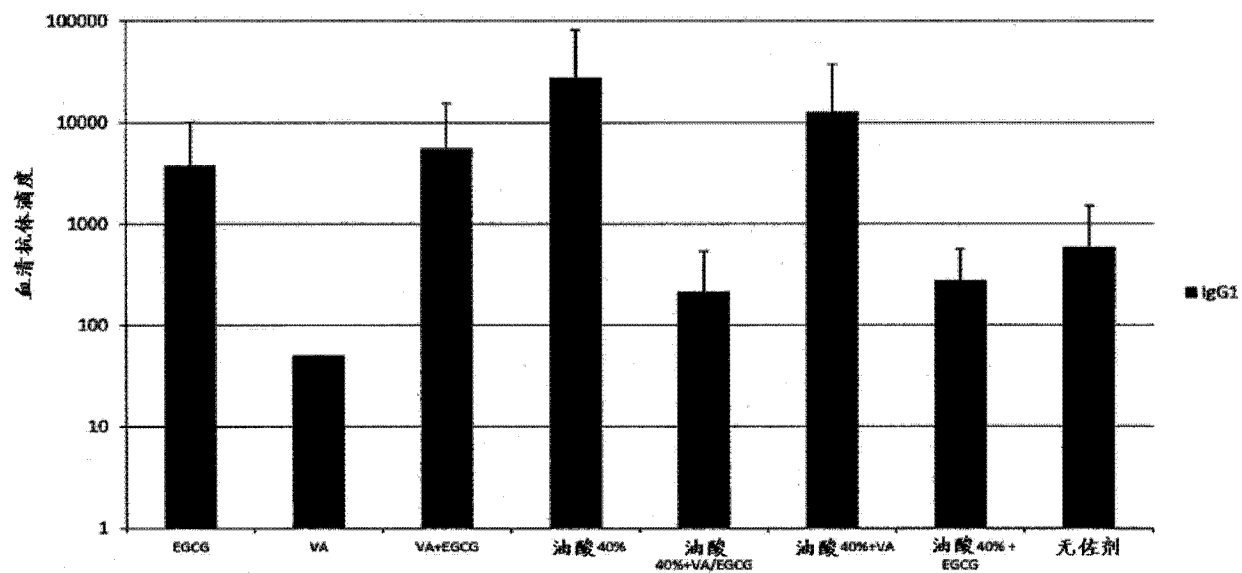


图 11

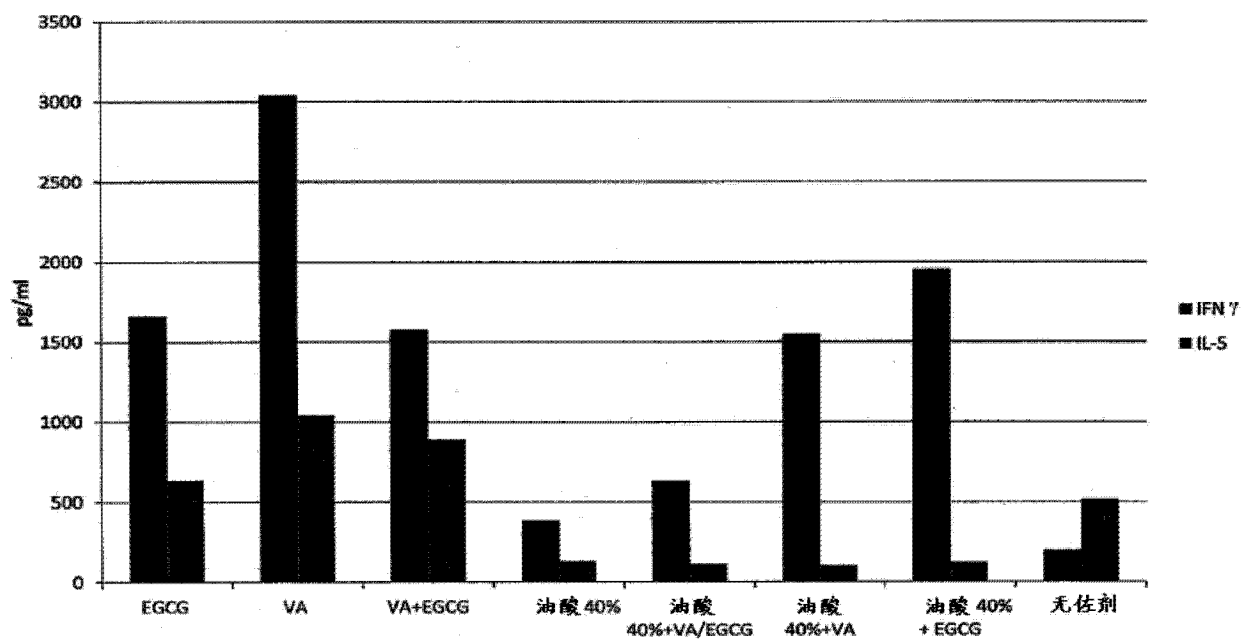


图 12

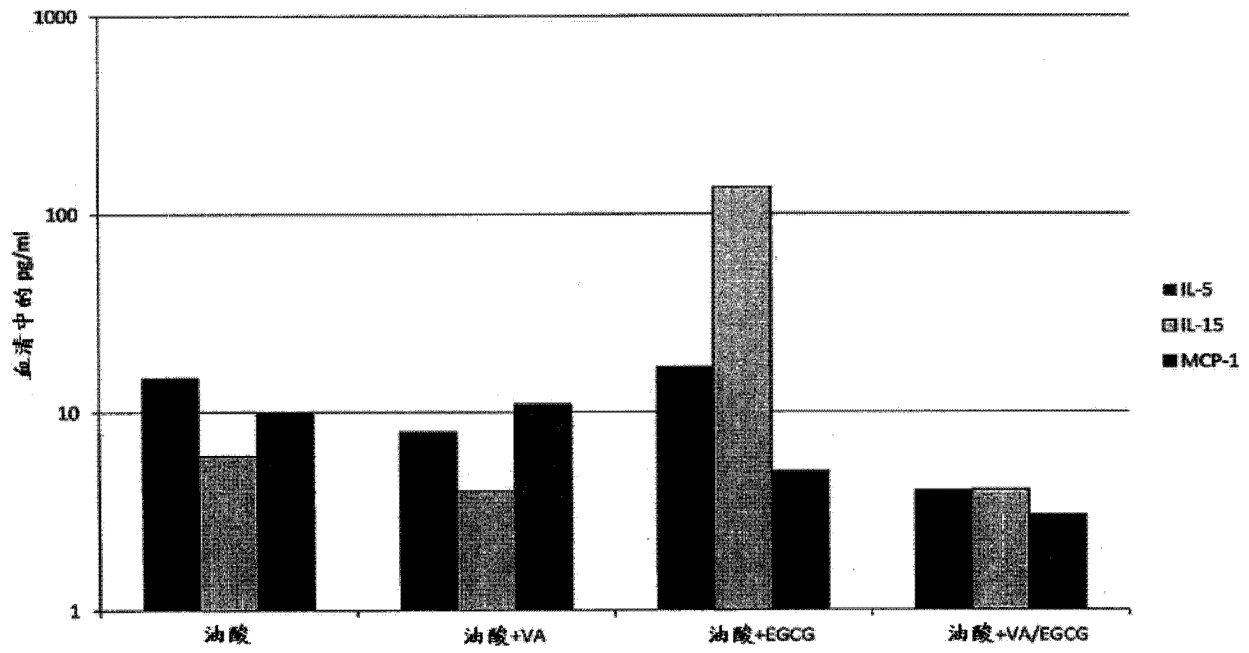


图 13

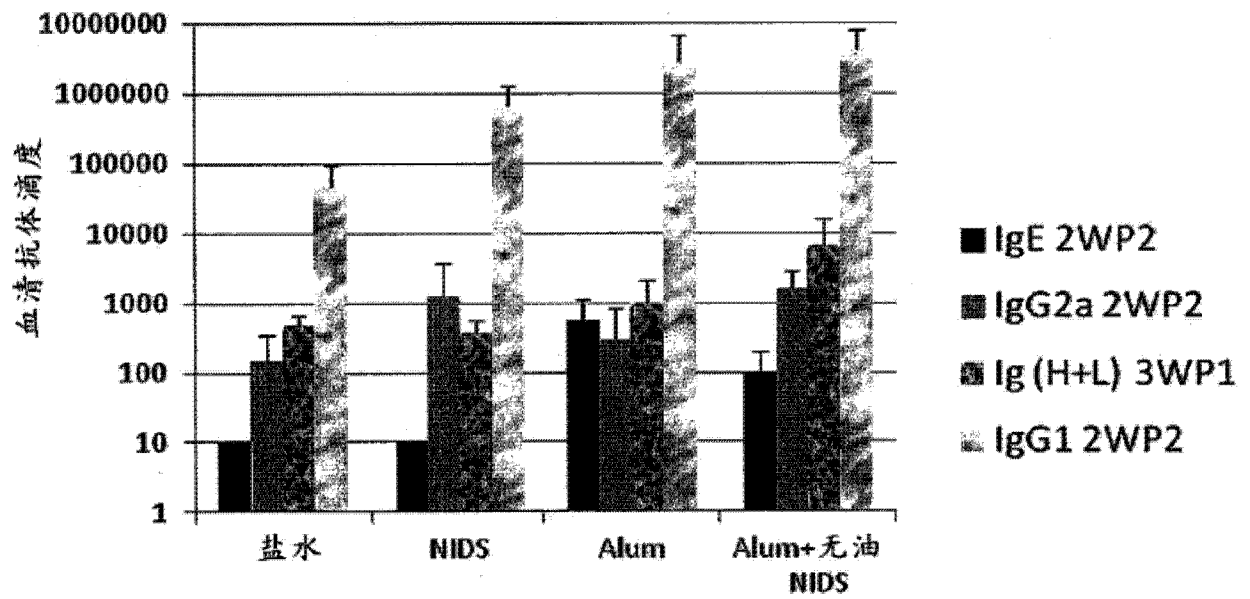


图 14

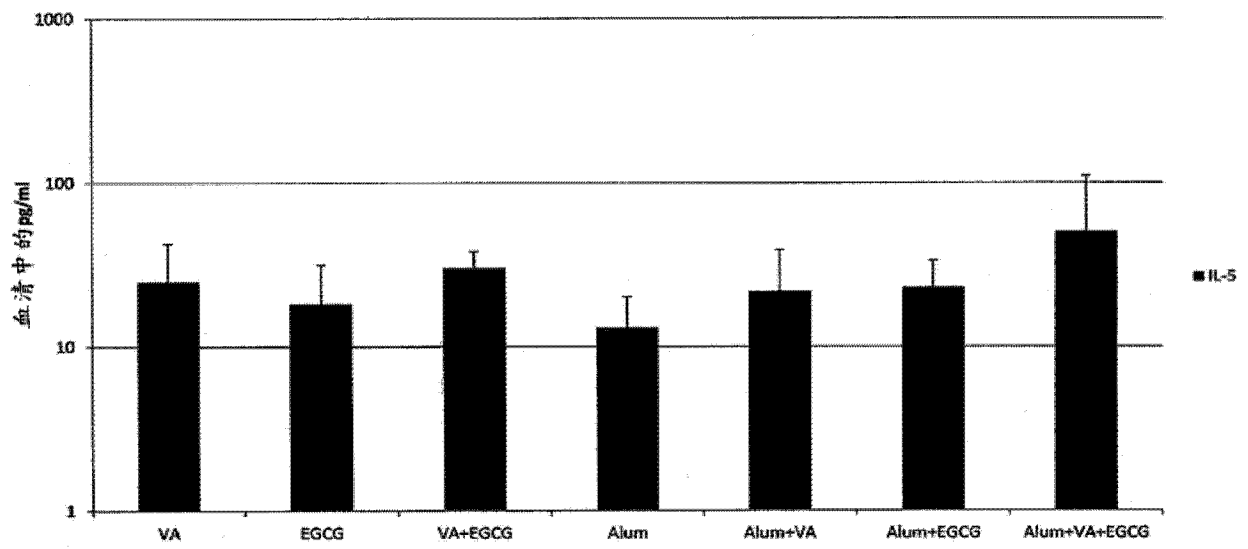


图 15

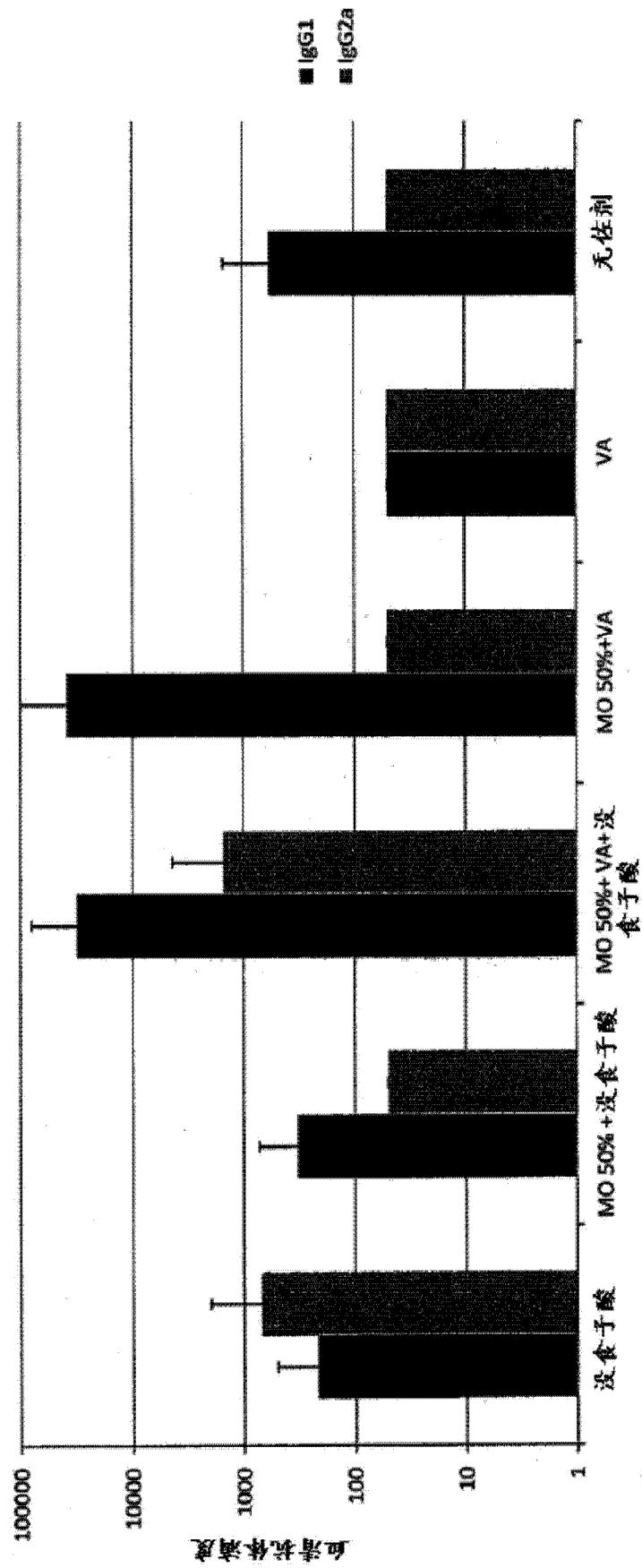


图 16

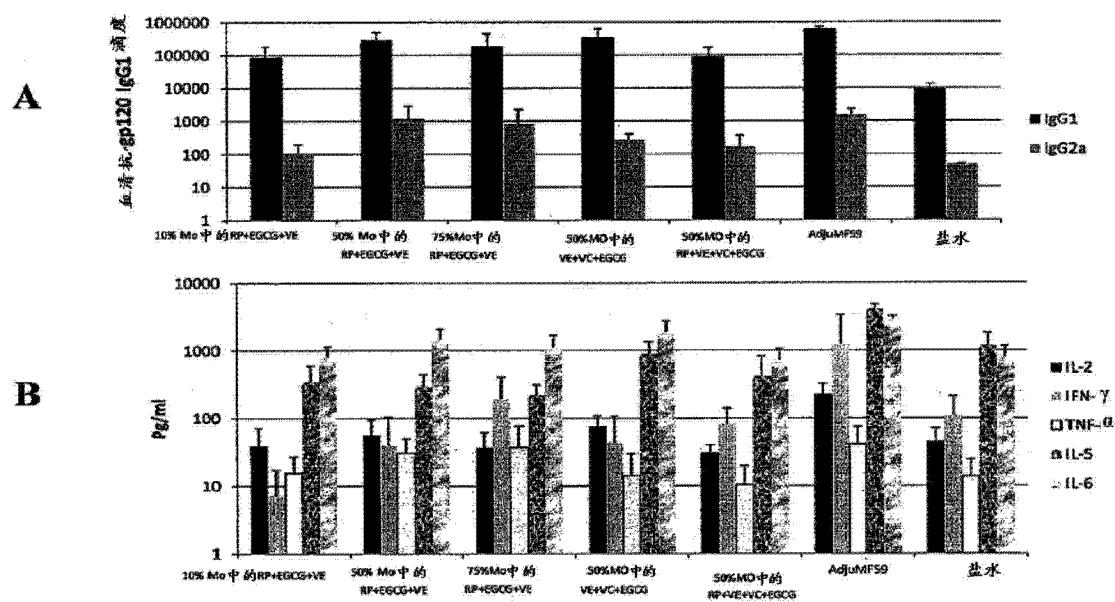


图 17

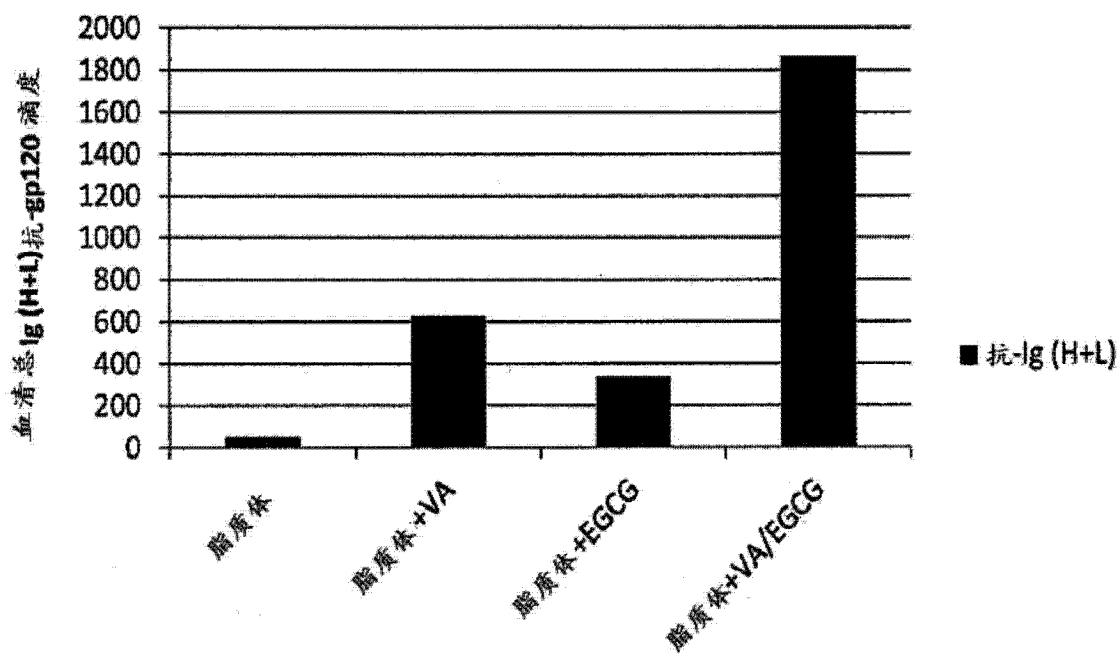


图 18

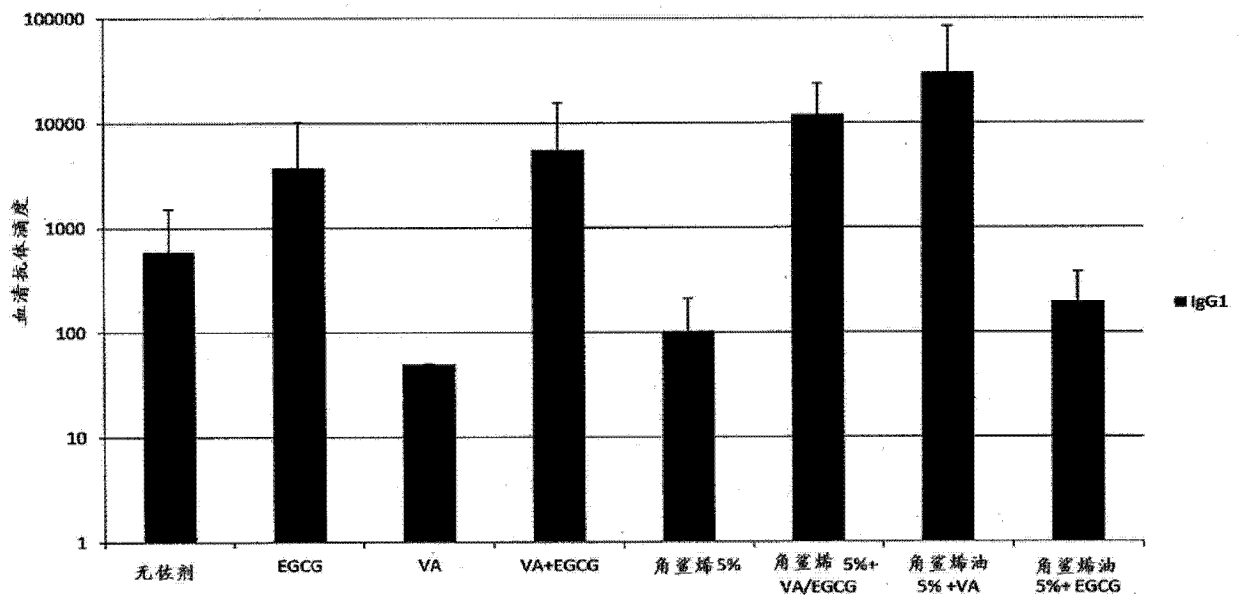


图 19

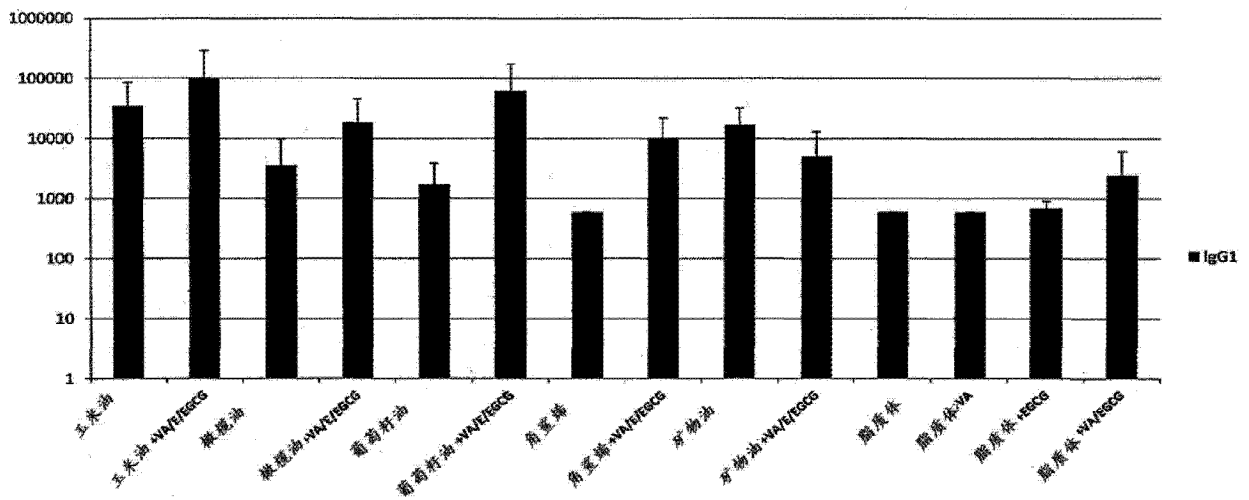


图 20

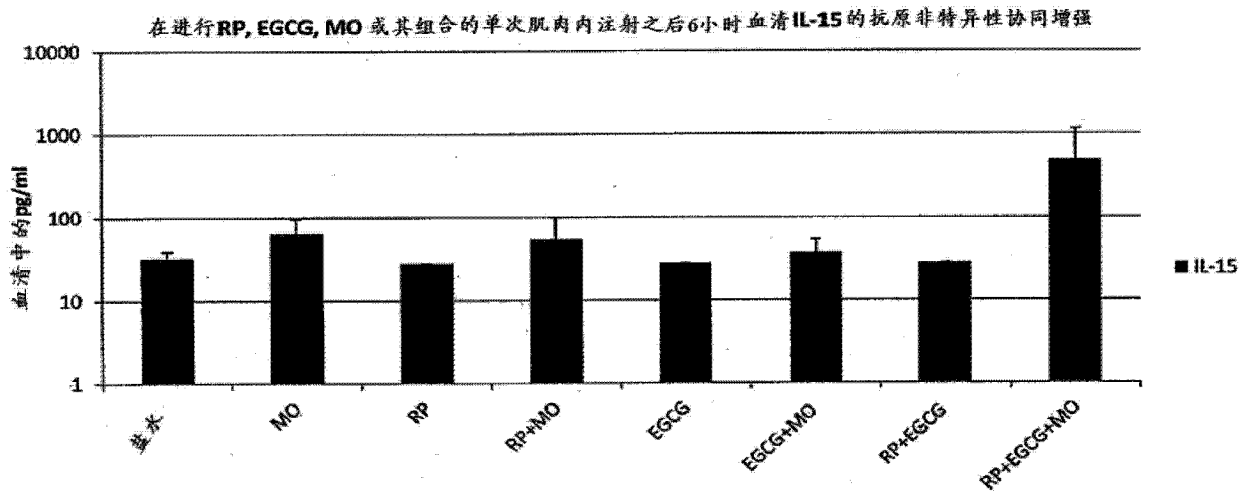


图 21

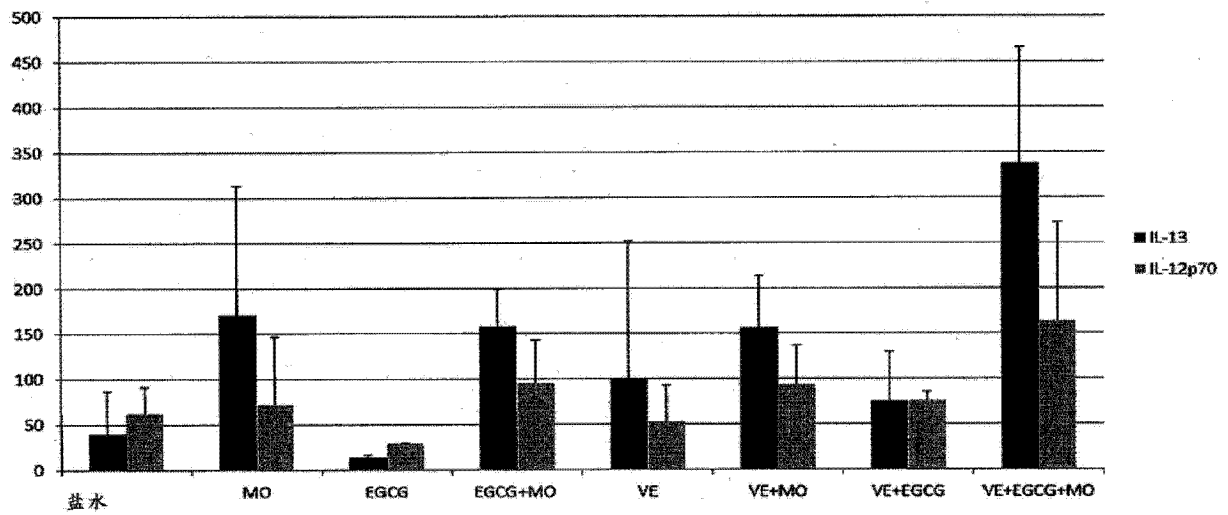


图 22