



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102056622 B

(45) 授权公告日 2016. 04. 06

(21) 申请号 200980120883. 7

(22) 申请日 2009. 05. 22

(30) 优先权数据

61/059, 043 2008. 06. 05 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2010. 12. 03

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/CA2009/000692 2009. 05. 22

(87) PCT国际申请的公布数据

W02009/146523 EN 2009. 12. 10

(73) 专利权人 免疫疫苗技术有限公司

地址 加拿大新斯科舍省

(72) 发明人 M·曼索尔 L·萨玛特尔

L·D·麦克唐纳 M·卡尔柯达

G·M·威尔

A·富恩特斯-奥尔特加

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

公司 11245

代理人 赵蓉民 杜艳玲

(51) Int. Cl.

A61K 39/00(2006. 01)

(56) 对比文件

WO 2007/041832 A1, 2007. 04. 19,

Bruno Guy. The perfect mix: recent progress in adjuvant research. 《NATURE REVIEWS MICROBIOLOGY》. 2007, 第5卷(第7期), 505-517.

Bo Jin et al. Induction of potent cellular immune response in mice by hepatitis C virus NS3 protein with double-stranded RNA. 《IMMUNOLOGY》. 2007, 第122卷(第1期), 15-27.

审查员 孙婷婷

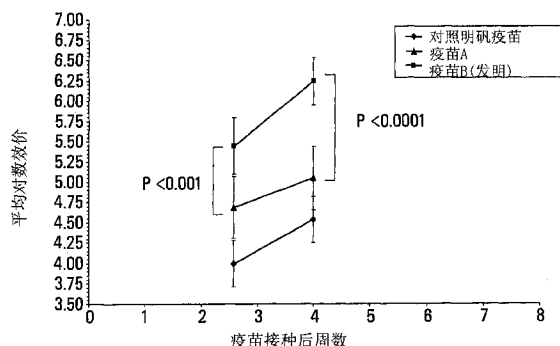
权利要求书2页 说明书39页 附图7页

(54) 发明名称

包含脂质体、抗原、多核苷酸和含疏水物质的连续相的载体的组合物

(57) 摘要

本发明提供了一种组合物,其包含:抗原;脂质体;Poly I:C多核苷酸;和包含疏水物质的连续相的载体。还提供了制备和使用该组合物的方法。



1. 可注射疫苗制剂, 包含:

(a) 抗原, 在需要其的受试者中引起针对其的免疫应答, 其中所述抗原选自源自细菌、病毒、真菌、寄生虫或肿瘤细胞的抗原; 源自动物变应原、食物变应原、药物变应原、激素或酶的抗原; 和源自存活素或 β -淀粉样肽的多肽;

(b) 脂质体;

(c) Poly I:C 多核苷酸; 和

(d) 包含疏水物质的连续相的载体。

2. 根据权利要求 1 所述的可注射疫苗制剂, 其中所述 Poly I:C 多核苷酸包含 RNA 或 DNA。

3. 根据权利要求 1 所述的可注射疫苗制剂, 其中所述 Poly I:C 多核苷酸包含 RNA 和 DNA。

4. 根据权利要求 1-3 中任一项所述的可注射疫苗制剂, 其中所述 Poly I:C 多核苷酸是均聚物或杂聚物。

5. 根据权利要求 1-3 中任一项所述的可注射疫苗制剂, 其中所述 Poly I:C 多核苷酸包含均聚的 Poly I:C 多核苷酸和杂聚的 Poly I:C 多核苷酸。

6. 根据权利要求 1-5 中任一项所述的可注射疫苗制剂, 其中所述源自细菌、病毒、真菌或寄生虫的抗原是传染性疾病抗原。

7. 根据权利要求 1-5 中任一项所述的可注射疫苗制剂, 其中所述动物变应原是昆虫变应原。

8. 根据权利要求 1-5 中任一项所述的可注射疫苗制剂, 其中所述源自细菌的抗原是细菌变应原。

9. 根据权利要求 1-5 中任一项所述的可注射疫苗制剂, 其中所述激素是促性腺激素释放激素。

10. 一种制备可注射疫苗制剂的方法, 所述方法包括以任意的顺序组合:

(a) 抗原, 在需要其的受试者中引起针对其的免疫应答, 其中所述抗原选自源自细菌、病毒、真菌、寄生虫或肿瘤细胞的抗原; 源自动物变应原、食物变应原、药物变应原、激素或酶的抗原; 和源自存活素或 β -淀粉样肽的多肽;

(b) 脂质体;

(c) Poly I:C 多核苷酸; 和

(d) 包含疏水物质的连续相的载体。

11. 根据权利要求 10 所述的方法, 其中所述抗原包封在所述脂质体中。

12. 根据权利要求 10 或 11 所述的方法, 其中所述 Poly I:C 多核苷酸包封在所述脂质体中。

13. 根据权利要求 10 或 11 所述的方法, 其中所述 Poly I:C 多核苷酸加在所述脂质体的外部。

14. 根据权利要求 10-13 中任一项所述的可注射疫苗制剂, 其中所述源自细菌、病毒、真菌或寄生虫的抗原是传染性疾病抗原。

15. 根据权利要求 10-13 中任一项所述的可注射疫苗制剂, 其中所述动物变应原是昆虫变应原。

16. 根据权利要求 10-13 中任一项所述的可注射疫苗制剂,其中所述源自细菌的抗原是细菌变应原。

17. 根据权利要求 10-13 中任一项所述的可注射疫苗制剂,其中所述激素是促性腺激素释放激素。

18. 根据权利要求 10-17 中任一项所述的方法制备的可注射疫苗制剂。

19. 根据权利要求 1-9 和 18 中任一项所述的可注射疫苗制剂在制备用于在所述受试者中诱发对所述抗原的抗体应答和 / 或细胞介导的免疫应答的药物中的应用。

20. 根据权利要求 1-9 和 18 中任一项所述的可注射疫苗制剂在制备用于治疗 and / 或预防由细菌、病毒、真菌或寄生虫引起的疾病的药物中的应用,其中所述疫苗制剂中的所述抗原源自细菌、病毒、真菌或寄生虫。

21. 根据权利要求 1-9 和 18 中任一项所述的可注射疫苗制剂在制备用于治疗 and / 或预防由动物变应原、食物变应原、或药物变应原引起的疾病的药物中的应用,其中所述疫苗制剂中的所述抗原源自变应原。

22. 根据权利要求 1-9 和 18 中任一项所述的可注射疫苗制剂在制备用于治疗 and / 或预防由表达所述疫苗制剂中的所述抗原的肿瘤细胞引起的疾病的药物中的应用。

23. 根据权利要求 20 所述的应用,其中所述治疗和 / 或预防包括诱发所述受试者中对所述抗原的抗体和 / 或细胞介导的免疫应答,其中所述受试者患有病毒感染或处于发生病毒感染的危险中。

24. 根据权利要求 23 所述的应用,其中所述病毒感染是流感病毒感染。

25. 根据权利要求 22 所述的应用,其中所述治疗和 / 或预防包括诱发所述受试者中对所述抗原的抗体和 / 或细胞介导的免疫应答,其中所述受试者患有癌症或处于发生癌症的危险中。

26. 根据权利要求 1-9 和 18 中任一项所述的可注射疫苗制剂在制备用于治疗 and / 或预防神经变性疾病的药物中的应用,其中所述神经变性疾病与所述疫苗制剂中的所述抗原的表达相关,并且其中所述神经变性疾病是阿尔茨海默病。

包含脂质体、抗原、多核苷酸和含疏水物质的连续相的载体的组合物

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于 2008 年 6 月 5 日申请的美国临时专利申请号 61/059,043 的权益和优先权。

技术领域

[0003] 本申请涉及包含脂质体、抗原、Poly I:C 多核苷酸和含疏水物质的连续相的载体的组合物,及其应用。

背景技术

[0004] 常规疫苗可以包含抗原、佐剂和药学可接受的载体。已知 Poly I:C 多核苷酸可以用作佐剂。还已知脂质体可以用于疫苗组合物中(参见申请人的已授权的美国专利 6,793,923)。然而,就申请人的知识而言,本领域没有教导或暗示将抗原、Poly I:C 多核苷酸、脂质体和疏水性载体组合在疫苗组合物中。

发明内容

[0005] 申请人现在已经发现,与包含在水性载体中的 Poly I:C 多核苷酸的常规疫苗组合物或包含脂质体、疏水性载体和明矾佐剂的组合物相比,包含抗原、Poly I:C 多核苷酸、脂质体和含疏水物质的连续相的载体的组合物可以出人意料地提供更高的抗体效价和更高百分比的激活的或记忆性 CD8⁺T 细胞。

[0006] 因此,在一个方面,本发明提供了一种组合物,其包含:(a) 抗原;(b) 脂质体;(c) Poly I:C 多核苷酸;和(d) 含疏水物质的连续相的载体。

[0007] 在另一个方面,本发明提供了一种制备组合物的方法,所述方法包括以任意的顺序合并:(a) 抗原;(b) 脂质体;(c) Poly I:C 多核苷酸;和(d) 含疏水物质的连续相的载体。在一个实施方案中,所述抗原包封在脂质体中。在一个实施方案中,所述 Poly I:C 多核苷酸包封在脂质体中。

[0008] 在另一个方面,本发明提供了根据上述方法制备的组合物。

[0009] 在另一个方面,本发明提供了包括将如上所述的组合物施用于受试者的方法。在一个实施方案中,该方法是诱发该受试者中针对所述抗原的抗体应答或细胞介导的免疫应答的方法。

[0010] 在结合附图评阅本发明的具体实施方案的下列描述后,本发明的其他方面和特征对于本领域普通技术人员来说将是显而易见的。

附图说明

[0011] 在附图中,其仅以实例的方式图示说明了本发明的实施方案:

[0012] 图 1 是显示三组小鼠(n = 9 或 10) 如下接种疫苗的结果的图:1 组小鼠用在配制

成脂质体 /Poly I:C/ 疏水性载体疫苗 (疫苗 B, 本发明) 的 30 微升剂量中的 1 微克 rHA 和 4 微克 Poly I:C 进行疫苗接种。2 组小鼠用包含 30 微升剂量的脂质体 / 明矾 / 疏水性载体制剂中的 1 微克 rHA 和 60 微克明矾的疫苗 A 进行处理。3 组小鼠用 1 微克 rHA 和 60 微克明矾 /30 微升剂量的对照明矾疫苗进行疫苗接种。体液免疫应答通过如本文所述的 ELISA 测量。对于每个处理组,对于每个时间点将终点抗体效价的 log10 值进行平均并计算标准差。使用 T 检验 (student T test) 计算 P 值。

[0013] 图 2 是显示两组小鼠 (n = 9 或 10) 如下接种疫苗的结果的图:1 组小鼠用在配制成脂质体 /Poly I:C/ 疏水性载体疫苗 (疫苗 B, 本发明) 的 30 微升剂量中的 1 微克 rHA 和 4 微克 Poly I:C 进行疫苗接种。2 组小鼠用 1 微克 rHA 和 4 微克 Poly I:C/30 微升剂量的对照 Poly I:C 疫苗进行处理。体液免疫应答通过如本文所述的 ELISA 测量。对于每个处理组,对于每个时间点将终点抗体效价的 log10 值进行平均并计算标准差。使用 T 检验计算 P 值。

[0014] 图 3 是显示两组小鼠 (n = 8 或 9) 如下接种疫苗的结果的图:1 组小鼠用单剂量的在配制成冻干脂质体 /Poly I:C/ 疏水性载体疫苗 (疫苗 C, 本发明) 的 50 微升剂量中的 1 微克 rHA 和 10 微克 Poly I:C 进行疫苗接种。2 组小鼠用 1 微克 rHA 和 100 微克明矾 /50 微升剂量的对照明矾疫苗进行处理;小鼠在疫苗接种后 21 天加强免疫。体液免疫应答通过如本文所述的 ELISA 测量。对于每个处理组,对于每个时间点将终点抗体效价的 log10 值进行平均并计算标准差。

[0015] 图 4. 在用配制在脂质体 /Poly I:C/ 油性载体疫苗中的 rHA 抗原进行疫苗接种后增强的抗 rHA 抗体应答。两组小鼠 (n = 9 或 10) 如下接种疫苗:1 组小鼠用在配制成脂质体 /Poly I:C/ 疏水性载体疫苗 (疫苗 B, 本发明) 的 30 微升剂量中的 1 微克 rHA 和 4 微克 Poly I:C 进行疫苗接种。2 组小鼠用疫苗 A,30 微升剂量的脂质体 / 明矾 / 疏水性载体制剂中的 1 微克 rHA 和 60 微克明矾进行处理。体液免疫应答通过如本文所述的 ELISA 测量。对于每个处理组,对于每个时间点将终点抗体效价的 log10 值进行平均并计算标准差。使用 T 检验计算 P 值。

[0016] 图 5. 在用配制在脂质体 /Poly I:C/ 油性载体疫苗中的 rHA 抗原进行疫苗接种后增强的抗 rHA 抗体应答。两组小鼠 (n = 9 或 10) 如下接种疫苗:1 组小鼠用在配制成脂质体 /Poly I:C/ 疏水性载体疫苗 (疫苗 B, 本发明) 的 30 微升剂量中的 1 微克 rHA 和 4 微克 Poly I:C 进行疫苗接种。2 组小鼠用 1 微克 rHA 和 4 微克 Poly I:C/30 微升剂量的对照 Poly I:C 疫苗进行处理。体液免疫应答通过如本文所述的 ELISA 测量。对于每个处理组,对于每个时间点将终点抗体效价的 log10 值进行平均并计算标准差。使用 T 检验计算 P 值。

[0017] 图 6. 在用配制在冻干脂质体 /Poly I:C/ 油性载体疫苗中的 rHA 抗原进行疫苗接种后增强的抗 rHA 抗体应答。两组小鼠 (n = 9 或 10) 如下接种疫苗:1 组小鼠用单剂量的在配制成冻干脂质体 /Poly I:C/ 疏水性载体疫苗 (疫苗 D, 本发明) 的 50 微升剂量中的 1.5 微克 rHA 和 12.5 微克 PolyI:C 进行疫苗接种。2 组小鼠用 1.5 微克 rHA 和 100 微克明矾 /50 微升剂量的对照明矾疫苗进行处理;小鼠在疫苗接种后 28 天 (4 周) 加强免疫。体液免疫应答通过如本文所述的 ELISA 测量。对于每个处理组,对于每个时间点将终点抗体效价的 log10 值进行平均并计算标准差。使用 T 检验计算 P 值。

[0018] 图 7. 疫苗接种后 CD8⁺ 阳性 T 细胞群内的抗原特异性 CD8 细胞数目。三组 BALB/c 小鼠 (n = 4) 如下进行疫苗接种: 1 组小鼠用在配制成冻干脂质体 /Poly I:C/ 疏水性载体疫苗 (疫苗 D, 本发明) 的 50 微升剂量中的 1.5 微克 rHA 和 12.5 微克基于 RNA 的 Poly I:C 佐剂进行肌肉疫苗接种。2 组小鼠用 50 微升的疫苗 D 皮下接种。3 组小鼠用在 50 微升的 50 毫摩尔磷酸盐缓冲液 (pH 7.0) 中的 1.5 微克 rHA 和 100 微克 Imject Alum 佐剂进行肌肉接种。所有疫苗仅给予一次而不用加强免疫。在疫苗接种后 22 天使用三色流式细胞分析在动物的脾细胞中检测抗原特异性 CD8⁺T 细胞。细胞用抗 CD8 β -APC, 抗 CD19-FITC 和对携带 rHA、I9L 的优势免疫表位的 H2-Dd 特异的 PE- 五聚体进行染色。结果表示为 CD8 β 阳性 /CD19 阴性细胞群的群体中五聚体阳性细胞的平均百分比, +/- 标准差。减去在从原态 (naïve) 细胞中分离的脾细胞中检测的背景染色。与 3 组相比 *p = < 0.025, **p = < 0.005。

[0019] 图 8. 针对在本发明中配制的 rHA 的单次疫苗接种后的血凝抑制 (HAI) 效价。一组小鼠和一组兔 (n = 5) 如下进行疫苗接种: 该组小鼠用在配制成冻干脂质体 /Poly I:C/ 疏水性载体疫苗 (疫苗 E, 本发明) 的 50 微升剂量中的 0.5 微克 rHA 和 12 微克 Poly I:C 进行疫苗接种。该组兔用在 200 微升剂量的冻干脂质体 /Poly I:C/ 疏水性载体制剂中的疫苗 F (本发明), 2 微克 rHA 和 50 微克 Poly I:C 进行处理。体液免疫应答通过如本文所述的血凝抑制测定, 在疫苗接种前 (接种前) 和接种后 4 周 (兔) 或 5 周 (小鼠) 进行测量。对于每个处理组, 将 HAI 效价的 log10 值进行平均并计算标准差。

[0020] 图 9. 在用配制的脂质体 /Poly I:C/ 油性载体疫苗中的 β -淀粉样蛋白和 F21E 肽的混合物接种后增强的抗 β -淀粉样蛋白抗体应答。两组小鼠 (n = 9) 如下进行疫苗接种: 1 组小鼠用在配制成脂质体 /明矾/ 疏水性载体疫苗 (疫苗 G) 的 100 微升剂量中的 10 微克 β -淀粉样蛋白、20 微克 F21E 和 200 微克明矾进行疫苗接种。2 组小鼠用 10 微克 β -淀粉样蛋白、20 微克 F21E 和 10 微克 Poly I:C/ 配制成脂质体 /Poly I:C/ 疏水性载体 (疫苗 H, 本发明) 的 100 微升剂量进行处理。体液免疫应答通过如本文所述的 ELISA 测定。对于每个处理组, 对每个时间点将终点抗体效价的 log10 值进行平均并计算标准差。使用 T 检验计算 P 值。

[0021] 图 10. 配制的脂质体 /poly I:C/ 疏水性载体制剂中的疫苗能够引起细胞和体液免疫应答。两组小鼠 (n = 5) 如下进行疫苗接种: 1 组小鼠用在配制成冻干脂质体 /Poly I:C (高)/ 疏水性载体疫苗 (疫苗 E, 本发明) 的 50 微升剂量中的 0.5 微克 rHA 和 12 微克 Poly I:C 进行疫苗接种。2 组小鼠用 0.5 微克 rHA 和 2.5 微克 Poly I:C/ 配制成冻干脂质体 /Poly I:C (低)/ 疏水性载体 (疫苗 I, 本发明) 的 50 微升剂量进行处理。体液 (IgG1) 和细胞 (IgG2A) 免疫应答的指示剂通过如本文所述的 ELISA 进行测量。对于每个处理组, 对每个时间点将终点抗体效价的 log10 值进行平均并计算标准差。

[0022] 图 11 是显示用表达 HPV16 E7 的 C3 细胞植入并且在 8 天后如下进行疫苗接种的 C57BL/6 小鼠的平均肿瘤体积的图: 1 组小鼠用含有配制的具有疏水性载体的乳液中的 15 微克 FP 抗原和 150 微克基于 RNA 的 Poly I:C 的 100 微升 (对照乳剂疫苗) 进行疫苗接种。2 组小鼠用含有配制的脂质体 /Poly I:C/ 疏水性载体中的 15 微克 FP 抗原和 150 微克 Poly I:C 的 100 微升 (疫苗 K, 本发明) 进行疫苗接种。3 组小鼠仅接受 100 微升 PBS。所有组含 8 只小鼠。植入后一周一次测量肿瘤尺寸, 测量 5 周。图 11 显示对每组计算的平均肿瘤体积 +/- SEM。使用 T 检验计算 1 组和 2 组的 P 值, *p = < 0.1, **p = < 0.05。

[0023] 图 12 是显示用表达 HPV16E7 的 C3 细胞植入并且在 5 天后如下进行疫苗接种的 C57BL/6 小鼠的平均肿瘤体积的图 :1 组小鼠接受含有配制在脂质体 /Poly I:C/ 疏水性载体中的 10 微克 FP 抗原和 20 微克基于 DNA 的 Poly I:C 的 100 微升 (疫苗 L, 本发明)。2 组小鼠接受含有配制在冻干脂质体 /Poly I:C/ 疏水性载体中的 10 微克 FP 抗原和 20 微克基于 DNA 的 Poly I:C 的 50 微升 (疫苗 M, 本发明)。3 组小鼠接受含有配制在冻干脂质体 /疏水性载体中的 10 微克 FP 抗原的 50 微升 (佐剂对照)。4 组小鼠仅接受 100 微升 PBS。所有组含 10 只小鼠。植入后一周一次测量肿瘤尺寸,测量 5 周。图 12 显示对每组计算的平均肿瘤体积 $\pm$ SEM。使用 T 检验计算 2 组和 3 组的 P 值, $*p = < 0.5$ 。

[0024] 图 13. 在用配制在冻干脂质体 /Poly I:C/ 油性载体疫苗中的 rHA 抗原进行疫苗接种后增强的抗 rHA 细胞应答。两组小鼠 ($n = 9$ 或 10) 如下进行免疫 :1 组小鼠用单剂量的在配制成冻干脂质体 /Poly I:C/ 疏水性载体疫苗 (疫苗 D, 本发明) 的 50 微升剂量中的 1.5 微克 rHA 和 12.5 微克 Poly I:C 进行疫苗接种。2 组小鼠用 1.5 微克 rHA 和 100 微克明矾 /50 微升剂量的对照明矾疫苗进行处理 ;小鼠在疫苗接种后 28 天 (4 周) 加强免疫。抗原特异性细胞应答通过对 H2-Kd 表位 IYSTVASSL 特异的 CD8+T 细胞的五聚体染色和流式细胞术进行测量。如本发明所述进行疫苗接种的小鼠产生抗原特异性的长效细胞应答。使用 T 检验计算 P 值。

具体实施方式

[0025] 本申请涉及包含脂质体、抗原、Poly I:C 多核苷酸和含疏水物质的连续相的载体的组合物和它们的应用。

[0026] 与包含在水性载体中的 Poly I:C 多核苷酸的常规疫苗组合物或包含脂质体、疏水性载体和明矾佐剂的组合物相比,将抗原、Poly I:C 多核苷酸、脂质体和含疏水物质的连续相的载体结合在一起的本发明组合物提供了令人惊讶地更高的抗体效价。

[0027] 实施例 1 和 2 中描述的数据总结在表 1 中 :

[0028] 表 1.

[0029]

	组合物	抗体效价(log10)	抗体效价(未取对数的)
(1)	rHA 抗原 明矾佐剂 脂质体 疏水性载体	5.41	256,000
(2)	rHA 抗原 Poly I:C PBS 载体	6.01	1,024,000
(3)	rHA 抗原 Poly I:C 脂质体 疏水性载体	6.91	8,192,000

[0030] rHA = 重组 H5N1 流感病毒血凝素糖蛋白

[0031] PBS = 磷酸盐缓冲盐水载体

[0032] 从上表(表 1)将看出,本发明的组合物(3)提供的抗体效价大于脂质体加疏水性载体的组合(1),或 Poly I:C(2)的使用的加和作用。(1)和(2)的加和作用为 $256,000 + 1,024,000 = 1,280,000$ 的未取对数的抗体效价。而(3)中用 Poly I:C 替换明矾佐剂得到了出人意料高的 8,192,000 的未取对数的抗体效价,其为预期的加和作用的 6.4 倍。此外,用组合物(3)生成的抗体应答是长效的,并且在上述较早的时间点时(接种后 4 周)观察到的作用在接种后 16 周得以维持(实施例 4 和 5)。本文实施例 4 和 5 中所述的数据概述在表 2 中:

[0033] 表 2

[0034]

	组合物	平均抗体效价 (log10)	平均抗体效价 (未取对数的)
(1)	rHA 抗原 明矾佐剂 脂质体 疏水性载体	5.11	128,824
(2)	rHA 抗原 Poly I:C PBS 载体	5.23	169,824
(3)	rHA 抗原 Poly I:C 脂质体 疏水性载体	6.21	1,621,810

[0035] (1) 和 (2) 的加和作用将为 $128,824 + 169,824 = 298,648$ 的未取对数的平均抗体效价。而 (3) 中用 Poly I:C 替换明矾佐剂得到了出人意料高的 1,612,810 的未取对数的平均抗体效价, 其为预期的加和作用的 5.4 倍。

[0036] 上述用组合物 (3) 观察到的结果在单独研究中重复, 所述研究使用由抗原 (rHA)、Poly I:C、冻干脂质体和疏水性载体组成的组合物并且在实施例 3 中描述。使用此组合物在接种后 8 周时观察到的平均抗体效价为 2,884,031 (未取对数的)——相比用递送两次以提高其活性的标准明矾佐剂疫苗观察到的平均效价 147,910 (未取对数的)。使用所述组合物的一次免疫观察到了此 19.4 倍的平均效价增加。

[0037] 包含 Poly I:C、脂质体和疏水性载体的疫苗组合物具有生成针对宽范围的抗原的抗体应答和 / 或细胞应答的潜力。实施例 1 至实施例 6 和实施例 8 和实施例 9 证明了当将针对重组蛋白 (rHA) 或短肽 (β -淀粉样蛋白) 的组合物所有组分结合时产生显著较高的抗体应答的能力。这些令人惊奇的高抗体效价在不在疫苗组合物中特定使用 Poly I:C 多核苷酸 (实施例 1、4 和 9) 时观察不到, 在尽管单独使用 Poly I:C 与抗原但缺少脂质体和疏水性载体 (实施例 2 和 5) 时也观察不到。类似地, 组合物所有组分的组合产生显著更有效的和更长效的细胞免疫应答, 如针对重组蛋白和含有已知 CTL 表位的短肽的实施例 7 和实施例 11-13 中所说明的那样。当用该组合物通过至少两种免疫途径 (实施例 7) 免疫时检测到显著的抗原特异性免疫应答。使用所述的本发明在控制肿瘤生长方面的异乎寻常的功效在不在组合物中特定使用 Poly I:C 多核苷酸 (实施例 12) 时观察不到, 以及在尽管与抗原一起使用 Poly I:C 多核苷酸和疏水性载体但不使用脂质体 (实施例 11) 时也观察不到。使用所述组合物所有组分 (实施例 6、7、10 和 13) 采用至少一次免疫同时产生强力的和长效的体液和细胞应答的能力说明了该组合物在宽范围的医疗应用中的特定有用性, 所述医疗应用包括感染性疾病和癌症。

[0038] 根据本文所述的实施例的总和清楚的是,由抗原、脂质体、疏水性载体和含有一种以上的化学构型的肌苷和胞嘧啶残基的核糖-或脱氧核糖-多核苷酸组成的疫苗组合物能够诱发异乎寻常地强的免疫应答。实施例还描述了一种以上的制备所需组合物的方法。

[0039] 抗原

[0040] 本发明的组合物包含一种或更多种抗原。如本文所用,术语“抗原”是指可特异性地结合抗体或 T 细胞受体的物质。

[0041] 可用于本发明的组合物的抗原包括但不限于多肽、微生物或其部分,例如活的、减毒的、灭活的或杀死的细菌、病毒或原生动物或其部分。

[0042] 如本文和权利要求书中所用,术语“抗原”还包括多核苷酸,其编码发挥抗原功能的多肽。基于核酸的接种策略是已知的,其中将含有多核苷酸的疫苗组合物施用至受试者。多核苷酸编码的抗原多肽在所述受试者中表达,使得抗原多肽最终存在于该受试者中,如同疫苗组合物自身已含有所述多肽。为了本发明的目的,术语“抗原”如上下文所示包括编码发挥抗原功能的多肽的这类多核苷酸。

[0043] 本发明中可用作抗原的多肽或其片段包括,但不限于,源自霍乱类毒素、破伤风类毒素、白喉类毒素、乙型肝炎表面抗原、血细胞凝集素、神经氨酸酶、流感 M 蛋白、PfHRP2、pLDH、醛缩酶、MSP1、MSP2、AMA1、Der-p-1、Der-f-1、亲脂素 (Adipophilin)、AFP、AIM-2、ART-4、BAGE、 α -甲胎蛋白、BCL-2、Bcr-Abl、BING-4、CEA、CPSF、CT、细胞周期蛋白 D1Ep-CAM、EphA2、EphA3、ELF-2、FGF-5、G250、促性腺激素释放激素、HER-2、肠羧基酯酶 (intestinal carboxyl esterase, iCE)、IL13R α 2、MAGE-1、MAGE-2、MAGE-3、MART-1、MART-2、M-CSF、MDM-2、MMP-2、MUC-1、NY-EOS-1、MUM-1、MUM-2、MUM-3、p53、PBF、PRAME、PSA、PSMA、RAGE-1、RNF43、RU1、RU2AS、SART-1、SART-2、SART-3、SAGE-1、SCRN 1、SOX2、SOX10、STEAP1、存活素、端粒酶、TGF β RII、TRAG-3、TRP-1、TRP-2、TERT 和 WT1 的那些。

[0044] 本发明中可用作抗原的病毒或其部分包括但不限于:牛痘病毒 (Cowpoxvirus)、痘苗病毒 (Vaccinia virus)、假牛痘病毒、1 型人疱疹病毒、2 型人疱疹病毒、巨细胞病毒、A-F 型人腺病毒、多瘤病毒、人乳头状瘤病毒、细小病毒、甲型肝炎病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、人类免疫缺陷病毒、正呼肠病毒、轮状病毒、埃博拉病毒、副流感病毒、甲型流感病毒、乙型流感病毒、丙型流感病毒、麻疹病毒、腮腺炎病毒、风疹病毒、肺炎病毒、人类呼吸道合胞病毒、狂犬病病毒、加利福尼亚脑炎病毒、日本脑炎病毒、汉坦病毒、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒、冠状病毒、肠道病毒、鼻病毒、脊髓灰质炎病毒、诺沃克病毒、黄病毒、登革热病毒、西尼罗河病毒、黄热病病毒和水痘。

[0045] 本发明中可用作抗原的细菌或其部分包括,但不限于,炭疽 (Anthrax)、布鲁杆菌属 (Brucella)、念珠菌属 (Candida)、肺炎衣原体 (Chlamydia pneumoniae)、鹦鹉热衣原体 (Chlamydia psittaci)、霍乱 (Cholera)、肉毒梭菌 (Clostridium botulinum)、粗球孢子菌 (Coccidioides immitis)、隐球菌属 (Cryptococcus)、白喉 (Diphtheria)、大肠杆菌 (Escherichia coli) 0157:H7、出血性大肠杆菌 (Enterohemorrhagic Escherichia coli)、肠毒素大肠杆菌 (Enterotoxigenic Escherichia coli)、流感嗜血杆菌 (Haemophilus influenzae)、幽门螺旋杆菌 (Helicobacter pylori)、军团菌属 (Legionella)、钩端螺旋体属 (Leptospira)、李斯特菌属 (Listeria)、脑膜炎双球菌 (Meningococcus)、肺炎支原体 (Mycoplasma pneumoniae)、分枝杆菌属 (Mycobacterium)、百日咳 (Pertussis)、

肺炎 (Pneumonia)、沙门氏菌属 (Salmonella)、志贺氏菌属 (Shigella)、葡萄球菌属 (Staphylococcus)、肺炎链球菌 (Streptococcus pneumoniae) 和小肠结肠耶尔森氏菌 (Yersinia enterocolitica)。

[0046] 抗原可以可选地为原生动物来源,例如恶性疟原虫 (Plasmodium falciparum),其引起疟疾。

[0047] 术语“多肽”包括氨基酸的任何链而不考虑长度(例如至少 6、8、10、12、14、16、18 或 20 个氨基酸)或翻译后修饰(例如糖基化或磷酸化),并包括例如天然蛋白、合成或重组多肽和肽、变性多肽和肽、表位、杂交分子、变体、同系物、类似物、拟肽、肽模拟物 (peptidomimetics) 等。因此变体或衍生物包括:缺失,包括截短和片段;插入和添加,例如保守置换、定点突变和等位基因变体;和修饰,包括具有共价连接到所述肽的一个或多个非氨基酰基基团(例如糖、脂等)的拟肽和翻译后修饰。此处使用的术语“保守氨基酸置换”或“保守置换”指在肽中给定的位点由一个氨基酸置换另一个,其中可进行置换而相关功能基本不丧失。在进行这种改变时,相似氨基酸残基的置换可以基于侧链取代基的相关相似性进行,例如它们的大小、电荷、疏水性、亲水性等,并且这样的置换可以用常规检测来分析它们对肽功能的影响。具体地,保守置换的非限制性实例包括下列实例:

[0048]	原始残基	保守置换
[0049]	Ala	Ser
[0050]	Arg	Lys
[0051]	Asn	Gln, His
[0052]	Asp	Glu
[0053]	Cys	Ser
[0054]	Gln	Asn
[0055]	Glu	Asp
[0056]	His	Asn ;Gln
[0057]	Ile	Leu, Val
[0058]	Leu	Ile ;Val
[0059]	Lys	Arg ;Gln ;Glu
[0060]	Met	Leu ;Ile
[0061]	Phe	Met ;Leu ;Tyr
[0062]	Ser	Thr
[0063]	Thr	Ser
[0064]	Trp	Tyr
[0065]	Tyr	Trp ;Phe
[0066]	Val	Ile ;Leu

[0067] 可以使用与优选抗原序列具有基本同一性的多肽或肽。如果当最优比对(允许有空位)时两个序列具有至少大约 50% 的序列同一性,或者如果所述序列共有确定的功能基序,那么这两个序列就被认为是具有基本同一性。在可选的实施方式中,如果最优比对的序列在一特定区域具有至少 60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 的同一性,则可认为它们是基本相同的(即具有基本同一性)。术语“同一性”指的是两个多

肽分子间的序列相似性。同一性可以通过比较被比对序列中的每个位点来确定。氨基酸序列间的同一性程度是这些序列——例如特定区域中——共有的位点处相同或匹配的氨基酸数量的函数。用于同一性比较的序列的最优比对可以用本领域已知的各种算法来进行,包括 ClustalW 程序,其可获自 <http://clustalw.genome.ad.jp>;局部同源性算法,Smith 和 Waterman,1981, Adv. Appl. Math. 2:482;同源性比对算法,Needleman 和 Wunsch,1970, J. Mol. Biol. 48:443;相似性搜索方法,Pearson 和 Lipman,1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444;和这些算法的计算机化工具(例如,美国威斯康星州麦迪逊遗传学计算机集团的威斯康星遗传学软件包中的 GAP、BESTFIT、FASTA 和 TFASTA)。序列同一性也可以用 BLAST 算法来确定,该算法记载于 Altschul 等,1990, J. Mol. Biol. 215:403-10(采用公开的默认设置)。例如,可以使用“BLAST 2 Sequences”工具,其可通过美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information)获得(通过因特网在 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/bl2seq/wblast2.cgi>),以下列的默认设置选择“blastp”程序:预期阈值 10;字长 3;矩阵 BLOSUM 62;空位罚分存在(gap costs existence)11,延伸(extension)1。在另一个实施方案中,本领域技术人员可以容易地和适当地仅通过目测来对比任何指定序列和推算序列同一性和/或同源性。

[0068] 用来实施本发明的多肽和肽可以分离自天然来源,可以是合成的,或可以是重组产生的多肽。多肽和蛋白质可以在体外或体内重组表达。用来实施本发明的肽和多肽可以使用本领域中已知的任何方法制备和分离。用来实施本发明的多肽和肽也可以使用本领域中熟知的化学方法整体地或部分地合成。参见,例如,Caruthers(1980) Nucleic Acids Res. Symp. Ser. 215-223;Hom(1980) Nucleic Acids Res. Symp. Ser. 225-232;Banga, A. K, Therapeutic Peptides and Proteins, Formulation, Processing and Delivery Systems(1995) Technomic Publishing Co., Lancaster, Pa。例如,可以使用各种固相技术来进行肽合成(参见,例如,Roberge(1995) Science 269:202;Merrifield(1997) Methods Enzymol. 289:3-13)和可以例如,使用 ABI 431A 肽合成仪(Perkin Elmer)根据生产厂商提供的说明书来实现自动合成。

[0069] 在一些实施方案中,抗原可以是纯化的抗原,例如,约 25% - 50% 纯,约 50% - 约 75% 纯,约 75% - 约 85% 纯,约 85% - 约 90% 纯,约 90% - 约 95% 纯,约 95% - 约 98% 纯,约 98% - 约 99% 纯或大于 99% 纯。

[0070] 如上所述,术语“抗原”还包括多核苷酸,其编码发挥抗原功能的多肽。基于核酸的接种策略是已知的,其中将含有多核苷酸的疫苗组合物施用至受试者。多核苷酸编码的抗原多肽在所述受试者中表达,使得抗原多肽最终存在于该受试者中,如同疫苗组合物自身已含有所述多肽。为了本发明的目的,术语“抗原”如上下文所示,包括编码发挥抗原功能的多肽的这类多核苷酸。

[0071] 如本文所用,术语“多核苷酸”包括任何长度(例如 9、12、18、24、30、60、150、300、600、1500 或更多个核苷酸)或链数(例如单链或双链)的核苷酸链。多核苷酸可以是 DNA(例如基因组 DNA 或 cDNA)或 RNA(例如 mRNA)或其组合。它们可以是自然发生的或合成的(例如化学合成的)。可预期的是,多核苷酸可含有在核苷酸链中一个或更多个含氮碱基、戊糖或磷酸基的修饰。这些修饰是本领域已知的并可以用于例如提高多核苷酸稳定性的目的。

[0072] 多核苷酸可以以各种形式递送。在一些实施方案中,裸多核苷酸可以以线性形式使用,或插入质粒诸如表达质粒中而使用。在其他的实施方案中,可以使用活载体诸如病毒或细菌载体。

[0073] 可以存在协助 DNA 转录为 RNA 和 / 或 RNA 翻译为多肽的一个或多个调控序列。在一些情况下,诸如在为信使 RNA (mRNA) 分子的多核苷酸的情况下,不需要与转录过程相关的调控序列 (例如,启动子),并且可以在缺少启动子的条件下实现蛋白表达。技术人员可以根据情况需要而包括适当的调控序列。

[0074] 在一些实施方案中,多核苷酸存在于表达盒中,其中其可操作地连接于调控序列,该调控序列将容许该多核苷酸在施用本发明的组合物的受试者中表达。表达盒的选择取决于施用该组合物的受试者以及表达的多肽所需的特征。

[0075] 典型地,表达盒包括在受试者中有功能的启动子并且可以是组成型的或诱导型的;核糖体结合位点;如需要的话,起始密码子 (ATG);编码目的多肽的多核苷酸;终止密码子;和任选地 3' 末端区 (翻译和 / 或转录终止子)。可以包括附加序列诸如编码信号肽的区。编码目的多肽的多核苷酸可以是与表达盒中的其他调控序列的任一个同源的或异源的。与目的多肽一起表达的序列,诸如信号肽编码区,典型地位于编码待表达蛋白的多核苷酸附近并且置于适当的阅读框中。由编码单独的待表达蛋白或连同待表达的任何其他序列 (例如,信号肽) 一起的多核苷酸构成的可读框置于启动子的控制下,使得在施用组合物的受试者中发生转录和翻译。

[0076] 在相关的实施方案中,抗原可以是变应原,并且可以非限制性地来自植物、动物、真菌、昆虫、食物、药物、粉尘和螨的细胞、细胞提取物、蛋白、多肽、肽、多糖、多糖偶联物、多糖和其他分子的肽和非肽模拟物、小分子、脂质、糖脂和碳水化合物。变应原包括但不限于环境空气源性变应原;植物花粉 (例如,豚草 / 花粉症);杂草花粉变应原;草花粉变应原;约翰逊草;树花粉变应原;黑麦草;蜘蛛过敏原 (如户尘螨变应原);仓库螨变应原;柳杉花粉 / 花粉症;霉菌 / 真菌孢子变应原;动物变应原 (如狗,豚鼠,仓鼠,沙鼠,大鼠,小鼠等变应原),食物变应原 (如甲壳类,坚果;柑橘类水果;面粉;咖啡);昆虫变应原 (如跳蚤,蟑螂);毒液类;(膜翅目,黄蜂,蜜蜂,胡蜂,大黄蜂,火蚁);细菌变应原 (如链球菌抗原;寄生虫变应原如蛔虫抗原);病毒抗原;药物变应原 (如青霉素);激素 (如胰岛素);酶 (如链激酶);和能够充当不完全抗原或半抗原的药物或化学品 (如酸酐和异氰酸酯)。

[0077] Poly I:C 多核苷酸

[0078] Poly I:C 多核苷酸是含有肌苷酸残基 (I) 和胞苷酸残基 (C) 的双链多核苷酸分子 (RNA 或 DNA, 或 DNA 和 RNA 的组合), 并且其诱导炎性细胞因子诸如干扰素的产生。它们典型地由全部由含胞嘧啶的核苷酸组成的一条链和全部由含肌苷的核苷酸组成的一条链构成, 尽管有可能是其他的构型。例如, 每条链可以含有含胞嘧啶和含肌苷的核苷酸二者。在一些情况下, 一条链或两条链可以另外地含有一个或更多个非胞嘧啶或非肌苷核苷酸。

[0079] 已报道, Poly I:C 可以每 16 个残基进行分段, 对其干扰素激活潜力没有影响 (Bobst, 1981)。此外, 每 12 个重复胞苷酸残基引入尿苷残基而错配的 Poly I:C 分子的干扰素诱导潜力 (Hendrix, 1993) 表明, 12 个残基的最小双链 Poly I:C 分子足以促进干扰素产生。其他人也已提出小至 6-12 个残基的区域——其对应于双链多核苷酸的 0.5-1 个螺旋角——能够引发诱导过程 (Greene, 1978)。如果是合成制备的, Poly I:C 多核苷酸典

型地长度为约 20 个或更多的残基（通常地，长度为 22、24、26、28 或 30 个残基）。如果半合成地制备（例如，使用酶），链的长度可以为 500、1000 或更多的残基。

[0080] Poly I:C 充当病毒基因组的模拟物并且特别用于调节体内免疫系统。例如，据报道合成的 poly I:poly C 均聚物当通过静脉内或肌肉注射体内全身递送时通过非特异性地诱导 γ 干扰素而增强先天免疫 (Krown 1985, Zhu 2007)。过去已经描述了聚肌苷酸和胞苷酸聚合物的几种变体 (de Clercq 1978, Bobst 1981, De Clercq 1975, Guschlbauer 1977, Fukui 1977, Johnston 1975, US3906092 1971, Kamath 2008, Ichinohe 2007)，它们中的一些包括共价修饰残基的使用，核糖和脱氧核糖肌苷酸和胞苷酸残基的使用，均聚物和含有肌苷酸和胞苷酸残基的交替共聚物的使用，和引入特定的残基以形成错配的聚合物。

[0081] 含有肌苷酸和胞苷酸的双链多核苷酸的使用已经报道用于治疗许多病毒疾病 (Kende 1987, Poast 2002, 6, 468, 558 2002, Sarma 1969, Stephen 1977, Levy 1978)、癌症 (Durie 1985, Salazar 1996, Theriault 1986, Nakamura 1982, Talmadge 1985, Droller 1987)、自身免疫性疾病如多发性硬化症 (Bever 1986) 和其他感染性疾病诸如疟疾 (Awasthi 1997, Puri 1996)。在一些情况下，通过将分子与正电荷的聚赖氨酸和羧甲基纤维素络合，有效地保护该多核苷酸在体内免受核酸酶的降解 (Stephen 1977, Levy 1985)，或通过将 Poly I:C 与正电荷的合成肽络合 (Schellack 2006)，Poly I:C 分子的功效得以进一步增强。

[0082] 除了作为先天免疫的非特异性增强剂的用途，Poly I:C 还用作疫苗组合物中的佐剂。先天免疫的增强可以导致增强的抗原特异性适应性免疫，可能是通过这样的机制，该机制至少部分地涉及 NK 细胞、巨噬细胞和 / 或树突细胞 (Chirigos 1985, Salem 2006, Alexopoulou 2001, Trumpfheller 2008)。在此背景下应用 Poly I:C 分子的证据来自控制感染性疾病的许多疫苗研究 (Houston 1976, Stephen 1977, Ichinohe 2007, Sloat 2008, Agger 2006, Padalko 2004) 和通过多种疫苗方法对癌症的预防或治疗 (Zhu 2007, Cui 2006, Salem 2005, Fujimura 2006, Llopiz 2008)。这些研究证明 Poly I:C 增强体液应答，这从针对特异性感染性疾病抗原的增强的抗体应答来看是显然的。Poly I:C 还是抗原特异性细胞应答的增效剂 (Zhu 2007, Zaks 2006, Cui 2006, Riedl 2008)。Poly I:C 分子的佐剂化作用被认为至少部分地通过它们与 toll 样受体 (TLR) 诸如 TLR3、TLR4、TLR7、TLR8 和 TLR9 的相互作用诱导 γ -干扰素而发生 (Alexopoulou 2001, Trumpfheller 2008, Schellack 2006, Riedl 2008)，TLR3 与大多数 Poly I:C 分子特别相关。证据还表明 Poly I:C 分子可以至少部分地通过与 TLR 以外的受体相互作用而发挥其效应，所述受体诸如 RNA 解旋酶视黄酸诱导的蛋白 I (RIG-I/ 黑素瘤分化相关基因 5 (MDA5) (Alexopoulou 2001, Yoneyama 2004, Gowen 2007, Dong 2008)。Poly I:C 分子的作用机制仍然有待充分地理解。

[0083] 因此，如本文所使用的，“polyI:C”或“Poly I:C 多核苷酸”是双链多核苷酸分子 (RNA 或 DNA，或 DNA 和 RNA 的组合)，其每条链含有至少 6 个邻接的肌苷酸或胞苷酸残基，或 6 个以任何顺序邻接的选自肌苷酸和胞苷酸的残基（例如，IICIIIC 或 ICICIC），并且其能够诱导或增强哺乳动物受试者中至少一种炎性细胞因子诸如干扰素的产生。Poly I:C 多核苷酸将典型地具有约 8、10、12、14、16、18、20、22、24、25、28、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、150、200、250、300、500、1000 或更多个残基的长度。认为上限是不重要的。优选的 Poly I:C 多核苷酸可以具有约 6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28 或 30

个核苷酸的最小长度和约 1000、500、300、200、100、90、80、70、60、50、45 或 40 个核苷酸的最大长度。

[0084] Poly I:C 多核苷酸的每条链可以是肌苷酸残基或胞苷酸残基的均聚物,或每条链可以是含有肌苷酸和胞苷酸残基两者的杂聚物。在每种情况下,聚合物可以被一个或更多个非肌苷酸或非胞苷酸残基(例如,尿苷)中断,条件是存在如上所述的至少一个 6 个 I、6 个 C 或 6 个 I/C 的邻接区。典型地,Poly I:C 多核苷酸的每条链每 6 个 I/C 残基将含有不超过 1 个非 I/C 残基,更优选地每 8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28 或 30 个 I/C 残基不超过 1 个非 I/C 残基。

[0085] Poly I:C 多核苷酸中的肌苷酸或胞苷酸(或其他)残基可以如本领域中已知的那样被衍生或修饰,条件是保留 Poly I:C 多核苷酸促进炎性细胞因子诸如干扰素的产生的能力。衍生物或修饰作用的非限制性实例包括例如,叠氮基修饰,氟修饰,或使用硫酯(或类似的)键代替天然的磷酸二酯键以增强体内的稳定性。Poly I:C 多核苷酸还可以通过例如,将该分子与正电荷的聚赖氨酸和羧甲基纤维素络合,或与正电荷的合成肽络合而被修饰,以便例如增强其对体内降解的抗性。

[0086] Poly I:C 多核苷酸将典型地以约 0.001mg-1mg/ 单位剂量组合物的量包含在本发明的组合物中。

[0087] 脂质体

[0088] 脂质体是含有被包围的含水容积的完全封闭的脂双层膜。脂质体可以是单层囊泡(具有单个双层膜)或特征为多膜多层的多层囊泡,每个双层可以通过含水层与相邻层隔开,或可以不通过含水层与相邻层隔开。脂质体的综合讨论可见于 Gregoriadis G. Immunol. Today, 11:89-97, 1990 和 Frezard, F., Braz. J. Med. Bio. Res., 32:181-189, 1999。如本文和权利要求中所使用的,术语“脂质体”意在包涵如上所述的所有这样的囊泡结构,包括但不限于在本领域中描述为“类脂囊泡(niosome)”,“传递体(transfersome)”和“病毒体(virosome)”的那些。

[0089] 虽然任何脂质体,包括由古细菌脂类制成的脂质体,都可以用于本发明中,但特别有用的脂质体在脂质体制剂中使用磷脂类和未酯化的胆固醇。胆固醇用来稳定脂质体,并且稳定脂质体的任何其他化合物可取代胆固醇。其他脂质体稳定化合物为本领域技术人员已知。例如,饱和的磷脂产生具有较高转变温度的脂质体,该高转变温度表明增加的稳定性。

[0090] 制备脂质体中优选使用的磷脂是具有选自磷酸甘油、磷酸乙醇胺、磷酸丝氨酸、磷酸胆碱和磷酸肌醇的至少一种头基的那些磷脂。更优选的是包含为 94-100% 磷脂酰胆碱的脂质的脂质体。这样的脂质是以卵磷脂 Phospholipon® 90G 市售的。当在脂质体制剂中还使用未酯化的胆固醇时,胆固醇的用量相当于磷脂量的大约 10%。如果使用胆固醇之外的化合物稳定脂质体,本领域技术人员能够容易地确定在所述组合物中需要的量。

[0091] 例如,应用天然脂类、合成脂类、神经鞘脂类、醚脂类、甾醇类、心磷脂、阳离子脂类和用聚乙二醇和其他聚合物修饰的脂类,可以得到脂质体组合物。合成脂类可包括下列脂肪酸组分:月桂酰、肉豆蔻酰、棕榈酰、硬脂酰、花生酰、油酰、亚油酰(linoleoyl)、芥酰或这些脂肪酸的组合

[0092] 载体

[0093] 组合物的载体包含疏水物质,优选液体疏水物质的连续相。所述连续相可以是基本纯的疏水物质或疏水物质的混合物。此外,载体可以是水在疏水物质中的乳液或水在疏水物质混合物中的乳液,前提是疏水物质构成连续相。并且,在另一个实施方式中,载体可以行使佐剂的功能。

[0094] 本文所述的用于所述组合物的疏水物质是药学上和 / 或免疫上可接受的那些物质。载体优选为液体,但是在大气温度下不是液体的某些疏水物质可以被液化——例如通过加温,并且也可用于本发明。在一个实施方式中,疏水载体可以是磷酸盐缓冲盐水 / 弗式不完全佐剂 (PBS/FIA) 乳液。

[0095] 油或油包水乳液是尤其适宜用于本发明的载体。油应该是药学上和 / 或免疫上可接受的。适合的油包括,例如,矿物油 (尤其是轻的或低粘度矿物油诸如 Drakeol® 6VR)、植物油 (例如大豆油)、坚果油 (例如花生油) 或其混合物。在一个实施方案中,油是油酸二缩甘露酯的矿物油溶液,其可以 Montanide® ISA 51 购得。也可使用动物脂肪和人工疏水聚合材料,特别是在大气温度下是液体或可以相对容易地被液化的那些。

[0096] 其他组分

[0097] 组合物可进一步包含一种或更多种药学可接受的佐剂、赋形剂等等,如本领域已知的:参见,例如雷明顿制药学 (Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pa., USA 1985) 和 1999 年出版的美国药典:国家处方集 (The United States Pharmacopoeia: The National Formulary) (USP 24 NF19)。

[0098] 术语“佐剂”是指增强针对抗原的免疫应答的化合物或混合物。佐剂可用作缓慢释放抗原的组织贮库 (tissue depot), 并也可用作淋巴系统激活剂,其非特异性地增强免疫应答 (Hood 等, Immunology, 第二版, Benjamin/Cummings: Menlo Park, C. A., 1984; 参见 Wood 和 Williams, In: Nicholson, Webster 和 May (eds.), Textbook of Influenza (流行性感 冒手册), 第 23 章, 317-323 页)。通常,在缺少佐剂时单独用抗原进行初次激发将不能引起体液免疫应答。

[0099] 合适的佐剂包括但不限于:明矾、其他铝化合物、卡介苗 (BCG)、TiterMax®、Ribi®、不完全弗氏佐剂 (IFA)、皂甙、表面活性物质例如溶血卵磷脂、普卢兰尼克多元醇 (pluronic polyol)、聚阴离子、肽、短小棒状杆菌 (Corynebacterium parvum)、QS-21、弗氏完全佐剂 (FCA)、TLR 激动剂家族的佐剂例如 CpG、鞭毛蛋白 (flagellin)、脂肽、肽聚糖、咪唑并喹啉、单链 RN、脂多糖 (LPS)、热休克蛋白 (HSP) 以及神经酰胺和衍生物例如 α Gal-cer。合适的佐剂还包括处于它们多肽或 DNA 编码形式的细胞因子或趋化因子,例如但不限于:GM-CSF、TNF- α 、IFN- γ 、IL-2、IL-12、IL-15、IL-21。适当的明矾佐剂以 Imject Alum® (Pierce, Rockford, IL) 的商品名销售,其由氢氧化铝 (45mg/ml) 和氢氧化镁 (40mg/ml) 以及无活性稳定剂的水溶液组成。

[0100] 所用的佐剂量取决于抗原量和佐剂类型。本领域技术人员可容易确定具体应用中所需的佐剂量。

[0101] 在施用本发明组合物的受试者中引起的免疫应答可以被制成使免疫应答偏向抗体或细胞介导的免疫应答。这可以通过应用试剂诸如佐剂来实现,所述试剂主要诱导 Th1 或 Th2 应答。例如,含 CpG 寡核苷酸 (其中 CpG 二核苷酸是未甲基化的) 可以用来主要诱发 Th1 应答,因此有助于细胞介导的应答。

[0102] 组合物

[0103] 制备脂质体的方法是本领域熟知的。参见例如 Gregoriadis(1990) 和 Frezard(1999), 二者在前文均被引用。用于制备脂质体的任何合适的方法可用于本发明的实践, 或脂质体可以获自商业来源。通常通过使将形成脂双层的脂质体组分 (例如磷脂和胆固醇) 与水溶液水合来制备脂质体, 所述水溶液可以是纯水或溶于水的一种或更多种组分的溶液, 例如磷酸盐缓冲液盐水 (PBS), 不含磷酸盐的盐水或其它任何生理学相容的水溶液。

[0104] 在一个实施方案中, 脂质体组分或脂质体组分的混合物, 例如磷脂 (例如 Phospholipon[®] 90G) 和胆固醇, 可以溶解在有机溶剂例如氯仿和甲醇的混合物中, 然后过滤 (例如 PTFE 0.2 μ m 滤器) 并干燥——例如通过旋转蒸发, 以去除溶剂。

[0105] 所产生的脂质混合物的水合作用可以通过例如将脂质混合物注射入水溶液或超声处理脂质混合物和水溶液来实现。在脂质体形成过程中, 脂质体组分形成单一的双层 (单层) 或多个双层 (多层), 其包围脂质体组分与之水合的水溶液的体积。

[0106] 在一些实施方案中, 然后将脂质体脱水, 例如通过冷冻-干燥或冻干。

[0107] 脂质体与包括连续疏水相的载体组合。这可以多种方式进行。

[0108] 如果载体仅由疏水物质或疏水物质的混合物组成 (例如使用 100% 矿物油载体), 那么脂质体可仅与疏水物质混合, 或如果存在多种疏水物质, 脂质体可与它们的任意一种或组合混合。

[0109] 而如果包括连续相疏水物质的载体含有非连续水相, 那么载体通常会采用水相在疏水相中的乳液形式, 例如油包水乳状液。这种组合物可含有乳化剂来稳定乳液并促进脂质体的均匀分布。在这点上, 即使使用无水载体, 乳化剂也可有用, 用于促进载体中脂质体的均匀分布。典型的乳化剂包含二缩甘露糖醇油酸酯 (Arlacel[™] A), 卵磷脂, Tween[™] 80 和 Spans[™] 20、80、83 和 85。通常地, 疏水物质与乳化剂的体积比 (v/v) 在约 5 : 1 至约 15 : 1 的范围, 约 10 : 1 的比值是优选的。

[0110] 脂质体可以添加至完成的乳状液, 或在乳化作用前它们可以存在于水相或疏水相中。

[0111] 抗原可以在配制过程的各个不同阶段引入。超过一种类型的抗原可以并入组合物中 (例如, 灭活的病毒, 减毒的活病毒, 蛋白或多肽)。

[0112] 在一些实施方案中, 抗原存在于用于水合用于形成脂质体的脂双层的组分 (例如一种或更多种磷脂和胆固醇) 的水溶液中。在这种情况下, 抗原会被包封在脂质体中, 存在于它的水相内部中。如果产生的脂质体不洗涤或干燥, 以使存在剩余的水溶液最终与包括连续相疏水物质的载体混合, 那么在终产物中在脂质体外部可存在另外的抗原是可能的。在相关技术中, 在与水溶液进行水合作用之前, 抗原可以与用于形成脂质体脂双层的组分混合。

[0113] 在一个可选的方法中, 在载体与脂质体组合之前、过程中或之后, 抗原可与包括连续相疏水物质的载体混合。如果载体是乳液, 在乳化作用之前, 抗原可以与水相或疏水相或二者混合。可选地, 在乳化作用之后, 抗原可以与载体混合。

[0114] 将抗原与载体组合的技术可以与如上所述在脂质体中包封抗原一起使用, 以使抗原既存在于脂质体中又存在于包括连续相疏水物质的载体中。

[0115] 上述用于将抗原引入至组合物中的步骤也适用于 Poly I:C。即, Poly I:C 可以引入至例如下列的任意一种或更多种中: (1) 用来水合用于形成脂质体的脂双层的组分的水溶液; (2) 用来形成脂质体的脂双层的组分; 或 (3) 在载体与脂质体组合之前、过程中或之后, 包括连续相疏水物质的载体。如果载体是乳液, Poly I:C 可以在乳化作用之前与水相或疏水相或二者混合。可选地, 在乳化作用之后, Poly I:C 可以与载体混合。

[0116] 将 Poly I:C 与载体组合的技术可以与在脂质体中包封 Poly I:C 一起使用, 以使 Poly I:C 既存在于脂质体中又存在于包括连续相疏水物质的载体中。

[0117] Poly I:C 可以与抗原一起在相同的加工步骤中, 或独立地在不同的加工步骤中并入组合物中。例如, 抗原和 Poly I:C 可以均存在于用来水合形成脂双层的脂质体组分的水溶液中, 使得抗原和 Poly I:C 两者均包封在脂质体中。可选地, 抗原可以包封在脂质体中, 且 Poly I:C 与包括连续相的疏水物质的载体混合。要理解许多这样的组合是可能的。

[0118] 如果组合物含有一种或更多种佐剂, 佐剂可与抗原一起在相同的加工步骤, 或独立地在不同的加工步骤中并入组合物中。例如, 抗原和佐剂可以均存在于用来水合形成脂双层的脂质体组分的水溶液中, 使得抗原和佐剂两者均包封在脂质体中。可选地, 抗原可以包封在脂质体中, 且佐剂与包括连续相的疏水物质的载体混合。

[0119] 可以向这样的组合物中加入稳定剂诸如糖、抗氧化剂或防腐剂, 它们保持生物学活性或改善化学稳定性以延长抗原、佐剂、脂质体或连续疏水性载体的货架期。

[0120] 在一些实施方案中, 可以使用抗原 / poly I:C 混合物, 在此情况下抗原和 Poly I:C 多核苷酸同时合并入组合物中。“抗原 / poly I:C 混合物”是指其中抗原和 Poly I:C 多核苷酸至少在合并入组合物之前处于相同的稀释剂中的实施方案。在抗原 / poly I:C 混合物中的抗原和 Poly I:C 多核苷酸可以是化学连接的, 诸如通过共价结合, 但不必须如此。

[0121] 类似地, 在一些实施方案中, 可以使用抗原 / 佐剂混合物, 在此情况下抗原和佐剂同时合并入组合物中。“抗原 / 佐剂混合物”是指其中抗原和佐剂至少在合并入组合物之前处于相同的稀释剂中的实施方案。在抗原 / 佐剂混合物中的抗原和佐剂可以是化学连接的, 诸如通过共价结合, 但不必须如此。

[0122] 在一些实施方案中, 包括连续相的疏水物质的载体可以本身具有佐剂活性。不完全弗式佐剂是具有佐剂作用的疏水性载体的一个实例。如本文和权利要求中所使用的, 当使用术语“佐剂”时, 意在表示除了由包括连续相的疏水物质的载体提供的任何佐剂活性以外存在佐剂。

[0123] 如本文所述的组合物可以被配制为适合于口服、经鼻、直肠或肠胃外施用的形式。肠胃外施用包括静脉内、腹膜内、皮内、皮下、肌肉内、经上皮、肺内、鞘内和外部施用方式。优选的途径包括肌肉内、皮下和皮内施用以获得贮库效果。在其中本发明的组合物用于治疗癌症肿瘤的实施方案中, 组合物可以被配制用于通过直接注射至肿瘤中或肿瘤附近而进行递送。在一些实施方案中, 组合物可以均匀地递送在肿瘤上或遍及肿瘤以增加生物分布并且因此提高治疗益处。

[0124] 在进一步的实施方案中, 本发明的组合物可以与基于 DNA 的 Poly I:C、基于 RNA 的 poly I:C 或基于 RNA 和 DNA 的 poly I:C 的混合物一起配制。就此而言, RNA 和 DNA 混合物可以: 涉及核苷酸, 使得每条链可以包括 DNA 和 RNA 核苷酸; 涉及多条链, 使得每个双链多核苷酸具有一条 DNA 链和一条 RNA 链; 涉及多核苷酸, 使得组合物含有 Poly I:C 多核苷酸,

其每一个完全由 RNA 构成或完全由 DNA 构成 ;或其组合。

[0125] 在其他的实施方案中,本发明的组合物可以被配制用于与 T 细胞表位或 B 细胞表位组合。T 细胞表位可以是通用 T 细胞表位,且 B 细胞表位可以是通用 B 细胞表位。如本文所使用,“通用表位 (universal epitope)”可以是例如,被多品种动物的 T 细胞或 B 细胞广泛识别的任何表位。在一个实施方案中, T 细胞表位可以是破伤风类毒素肽诸如 F21E。在另一个实施方案中, T 细胞表位可以是 PADRE,一种通用的辅助 T 细胞表位。可以适合用于本发明上下文中的其他通用表位是技术人员所知晓的或可以使用常规技术容易鉴定的。

[0126] 在相关的实施方案中,本发明的组合物包括 Poly I:C 多核苷酸和抗原,其中就分子的重量或数量而言, Poly I:C 多核苷酸和抗原以小于 1 : 1,000, 小于 1 : 900, 小于 1 : 800, 小于 1 : 700, 小于 1 : 500, 小于 1 : 400, 小于 1 : 300, 小于 1 : 200, 小于 1 : 100, 小于 1 : 50, 小于 1 : 10, 小于 1 : 5, 小于 1 : 2, 约 1 : 1, 大于 2 : 1, 大于 5 : 1, 大于 10 : 1, 大于 50 : 1, 大于 100 : 1, 大于 200 : 1, 大于 300 : 1, 大于 400 : 1, 大于 500 : 1, 大于 600 : 1, 大于 700 : 1, 大于 800 : 1, 大于 900 : 1, 大于 1,000 : 1 的比率存在。

[0127] 引起最佳免疫应答的 Poly I:C 多核苷酸与抗原的最佳量可以取决于许多因素,包括但不限于组合物、疾病、受试者,并且可以容易地由技术人员使用标准的研究来确定,所述标准研究包括,例如,观察宿主中的抗体效价和其他免疫源应答。

[0128] 试剂盒和试剂

[0129] 本发明任选地作为试剂盒提供给使用者。例如,本发明的试剂盒含有本发明组合物的一种或更多种。试剂盒可进一步包含一种或更多种另外的试剂、包装材料、用于容纳试剂盒组分的容器,以及详述使用试剂盒组分的优选方法的一套说明书或用户手册。

[0130] 使用方法

[0131] 本发明发现在期望将抗原施用于受试者的任何情况下都有用。受试者可以是脊椎动物,例如鱼、鸟或哺乳动物,优选人类。

[0132] 在一些实施方式中,本发明的组合物可以施用至受试者以引起和 / 或提高针对抗原的抗体应答。

[0133] 如本文所使用的,“引起”免疫应答是诱导和 / 或强化免疫应答。如本文所使用的,“增强”免疫应答是相对于先前的免疫应答状态——例如,在施用本发明的组合物之前——提高、改善或加强免疫应答而利于宿主。

[0134] “抗体”是蛋白质,其包括基本上或部分由免疫球蛋白基因或免疫球蛋白基因片段编码的一个或更多个多肽。公认的免疫球蛋白基因包括 κ 、 λ 、 α 、 γ 、 δ 、 ϵ 和 μ 恒定区基因,以及各种免疫球蛋白可变区基因。轻链分为 κ 或 λ 。重链分为 γ 、 μ 、 α 、 δ 或 ϵ , 其进而分别确定免疫球蛋白类型 IgG、IgM、IgA、IgD 和 IgE。典型的免疫球蛋白 (抗体) 结构单元包括含有四个多肽的蛋白质。每个抗体结构单元由两对相同的多肽链组成,每一对具有一个“轻”链和一个“重”链。每个链的 N- 末端限定可变区,其主要负责抗原识别。抗体结构单元 (例如 IgA 和 IgM 类的结构单元) 也可相互并与另外的多肽链组装成寡聚体形式,例如与 J- 链多肽缔合的 IgM 五聚体。

[0135] 抗体是称为 B 淋巴细胞 (B 细胞) 的白细胞亚型的抗原特异性糖蛋白产物。抗原与 B 细胞表面表达的抗体结合可诱导抗体应答,其包括刺激 B 细胞而激活,进行有丝分裂以

及最终分化成浆细胞,其被特化用于抗原特异性抗体的合成和分泌。

[0136] 如本文所用,术语“抗体应答”是指应答于抗原引入至受试者机体,在受试者机体内抗原特异性抗体量的增加。

[0137] 评价抗体应答的一个方法是测量与特定抗原具有反应性的抗体的效价。这可以使用本领域已知的各种方法进行,例如获自动物的含抗体物质的酶联免疫吸附测定(ELISA)。例如,结合特定抗原的血清抗体的效价可以在暴露至抗原之前和之后在受试者中测定。在暴露至抗原后,抗原特异性抗体效价的统计学显著增加将表明受试者已经发动针对抗原的抗体应答。

[0138] 可以用来检测抗原特异性抗体的存在的其他测定法包括,但不限于,免疫学测定(例如,放射免疫测定(RIA)),免疫沉淀测定和蛋白印迹(例如,Western印迹)测定;和中和测定(例如,在体外或体内测定中病毒感染性的中和)。

[0139] 在一些实施方式中,本发明的组合物可以施用至受试者以引起和/或提高针对抗原的细胞介导的免疫应答。如本文所用,术语“细胞介导的免疫应答”是指应答于抗原引入至受试者机体,在受试者机体内抗原特异性细胞毒性T淋巴细胞、巨噬细胞、天然杀伤细胞或细胞因子的量的增加。

[0140] 在历史上,免疫系统分为两个分支:体液免疫,其免疫保护功能可在体液中发现(含有抗体的无细胞体液或血清);以及细胞免疫,其免疫保护功能与细胞相关。细胞介导的免疫是这样的免疫应答,其涉及巨噬细胞、天然杀伤细胞(NK)、抗原特异性细胞毒性T淋巴细胞的激活以及应答于“非自身”抗原而释放各种细胞因子。细胞免疫是适应性免疫应答的重要组分,并且是在细胞通过它们与抗原递呈细胞例如树突细胞、B淋巴细胞的相互作用以及较小程度地与巨噬细胞的相互作用而识别抗原之后,通过各种机制来保护机体,例如:

[0141] 1. 激活抗原特异性细胞毒性T淋巴细胞,其能够诱导在细胞表面上展示外来抗原表位的体细胞凋亡,例如病毒感染的细胞、具有细胞内细菌的细胞以及展示肿瘤抗原的癌细胞;

[0142] 2. 激活巨噬细胞和天然杀伤细胞,使得它们能够破坏细胞内病原体;以及

[0143] 3. 刺激细胞分泌各种细胞因子,其影响涉及适应性免疫应答和先天免疫应答的其他细胞的功能。

[0144] 细胞介导的免疫在去除病毒感染的细胞中最有效,而且还参与防御真菌、原生动物、癌症和细胞内细菌。它还在移植排斥中发挥主要作用。

[0145] 疫苗接种后细胞介导的免疫应答的检测

[0146] 由于细胞介导的免疫涉及各种细胞类型的参与并通过不同机制介导,可使用几个方法来证明接种后的免疫诱导。它们可广义地分为检测:i)特异的抗原递呈细胞;ii)特异的效应子细胞及它们的功能,以及iii)可溶介质例如细胞因子的释放。

[0147] i) 抗原递呈细胞:树突细胞和B细胞(以及较小程度的,巨噬细胞)被配置有可进行T细胞的增强活化的特定的免疫刺激受体,并且称为专职抗原呈递细胞(APC)。感染或接种后,在抗原递呈至效应子细胞例如CD4和CD8细胞毒性T细胞的过程中,在这些细胞上这些免疫刺激分子(也称为共刺激分子)被上调。这种共刺激分子(例如CD80、CD86、MHC I类或MHC II类)可通过使用流式细胞术用荧光染料偶联的针对这些分子的抗体连同特异

性识别 APC 的抗体（例如对于树突细胞的 CD11c）一起进行检测。

[0148] ii) 细胞毒性 T 细胞：（也称为 Tc、杀伤性 T 细胞或细胞毒性 T 淋巴细胞（CTL））是 T 细胞亚群，其诱导病毒（和其他病原体）感染的细胞或表达肿瘤抗原的细胞死亡。这些 CTL 直接攻击在其表面上携带某些外源或异常分子的其他细胞。这种细胞毒性能力可以使用体外细胞溶解测定（铬释放测定）加以检测。因此，当负载抗原的靶细胞被接种或感染后体内产生的特异性 CTL 裂解时，适应性细胞免疫的诱导可通过这种细胞毒性 T 细胞的存在加以证明。

[0149] 幼稚细胞毒性 T 细胞在它们的 T 细胞受体（TCR）与肽结合的 MHC I 类分子强烈地相互作用时被激活。这种亲和性取决于抗原 /MHC 复合物的类型和方向，并且是这种亲和性保持 CTL 和感染的细胞结合在一起。一旦激活，CTL 进行称为克隆扩增的过程，其中它获得功能性，并快速分裂以产生大量的“防卫”效应子细胞（“armed”-effector cells）。然后，激活的 CTL 在整个机体内游走寻找具有独特 MHC I 类 + 肽的细胞。这可用于通过在流式细胞术测定中使用肽-MHC I 类四聚体在体外鉴定这种 CTL。

[0150] 当暴露至这些感染的或机能紊乱的体细胞时，效应子 CTL 释放穿孔蛋白和粒溶素（granulysin）：它们是在靶细胞质膜中形成孔的细胞毒素，使离子和水流进感染的细胞并导致所述细胞裂解或溶解。CTL 释放粒酶，它是经由孔进入细胞以诱导凋亡（细胞死亡）的丝氨酸蛋白酶。这些分子从 CTL 的释放可以用作接种后成功诱导细胞免疫应答的度量。这可以通过酶联免疫吸附测定（ELISA）或酶联免疫斑点测定（ELISPOT）进行，其中 CTL 可以定量测定。由于 CTL 还能够产生重要的细胞因子例如 IFN- γ ，产生 IFN- γ 的 CD8 细胞的定量测量可通过 ELISPOT 和通过流式细胞术测量这些细胞中的细胞内 IFN- γ 来实现。

[0151] CD4+ “辅助”T 细胞。CD4+ 淋巴细胞或辅助 T 细胞是免疫应答介质，并在建立和最大化适应性免疫应答的能力方面发挥重要作用。这些细胞不具有细胞毒性或吞噬活性；并且不能杀死感染的细胞或清除病原体，但其通过引导其他细胞进行这些任务而在本质上“管理”免疫应答。两个类型的效应子 CD4+T 辅助细胞应答可以通过专职 APC 诱导，其命名为 Th1 和 Th2，每个被设计为清除不同类型的病原体。

[0152] 辅助 T 细胞表达 T 细胞受体（TCR），其识别结合到 II 类 MHC 分子的抗原。幼稚辅助 T 细胞的活化使其释放细胞因子，其影响许多细胞类型的活性，包括激活它的 APC。辅助 T 细胞需要比细胞毒性 T 细胞温和得多的活化刺激。辅助 T 细胞可提供“辅助”激活细胞毒性细胞的额外信号。两个类型的效应子 CD4+T 辅助细胞应答可以通过专职 APC 诱导，其命名为 Th1 和 Th2，每个被设计为清除不同类型的病原体。两种 Th 细胞群在产生的效应蛋白（细胞因子）谱方面不同。通常，Th1 细胞通过激活巨噬细胞和细胞毒性 T 细胞来辅助细胞免疫应答；而 Th2 细胞通过刺激 B 细胞转变成浆细胞和通过形成抗体来促进体液免疫应答。例如，由 Th1 细胞调控的应答可以诱导小鼠中的 IgG2a 和 IgG2b（人中的 IgG1 和 IgG3）并且有助于针对抗原的细胞介导的免疫应答。如果对抗原的 IgG 应答由 Th2 型细胞调控，其可以主要地增强小鼠中的 IgG1（人中的 IgG2）的产生。与 Th1 或 Th2 应答相关的细胞因子的测量将提供成功接种的度量。这可以通过为 Th1- 细胞因子例如 IFN- γ 、IL-2、IL-12、TNF- α 及其他，或 Th2- 细胞因子例如 IL-4、IL-5、IL10 等等设计的特异 ELISA 来实现。

[0153] iii) 细胞因子的测量：从局部淋巴结的释放提供了成功免疫的良好指示。作为抗原递呈和 APC 及免疫效应子细胞例如 CD4 和 CD8T 细胞成熟的结果，若干细胞因子由淋巴结

细胞释放。在抗原存在的情况下,通过体外培养这些 LNC,可以通过测量某些重要的细胞因子例如 IFN- γ 、IL-2、IL-12、TNF- α 和 GM-CSF 是否释放来检测抗原特异性免疫应答。这可使用培养上清液和重组细胞因子作为标准,通过 ELISA 进行。

[0154] 成功的免疫可以以技术人员已知的许多方式来确定,包括,但不限于,检测功能抗体的血细胞凝集抑制反应(HAI)和血清中和抑制测定;激发研究,其中接种疫苗的受试者用相关的病原体激发以确定疫苗接种的功效;以及使用荧光激活细胞分选(FACS)来确定表达特定细胞表面标志物的细胞群,例如,在激活的淋巴细胞或记忆淋巴细胞的鉴定中。技术人员还可以使用其他已知的方法确定用本发明的组合物进行的免疫是否引起抗体和/或细胞介导的免疫应答。参见,例如,Current Protocols in Immunology Coligan 等,ed. (Wiley Interscience,2007)。

[0155] 在进一步的实施方案中,本发明的组合物可以施用于受试者以引起和/或增强针对抗原的抗体和细胞介导的免疫应答。

[0156] 本发明在预防和治疗易于通过抗原施用而预防和/或治疗的任何疾病中具有广泛用途。本发明的代表性应用包括癌症治疗和预防、基因治疗、辅助治疗、感染性疾病治疗和预防、变态反应治疗和预防、自身免疫疾病治疗和预防、神经变性疾病治疗以及动脉粥样硬化治疗、药物依赖性治疗和预防、用于疾病治疗和预防的激素控制、用于避孕目的的生物过程的控制。

[0157] 疾病的预防或治疗包括获得有利或期望的结果,包括临床结果。有利或期望的临床结果可包括但不限于:一个或更多症状或状况的减轻或改善、疾病程度的降低、疾病状态的稳定、疾病发展的防止、疾病扩散的防止、疾病进程的延迟或减慢、疾病发作的延迟或减慢、赋予针对疾病引发因子的保护性免疫以及疾病状态的改善或减轻。预防或治疗还可意味着延长患者的存活时间,使其高于缺乏治疗所预期的时间,还可意味着暂时地抑制疾病进程,但更优选地,它涉及例如通过防止在受试者中的感染来防止疾病的发生。

[0158] 技术人员可确定对任何具体应用的合适治疗方案、施用途径、剂量等等,以获得期望的结果。可考虑的因素包括例如:抗原性质;要预防或治疗的疾病状态;受试者的年龄、身体条件、体重、性别和饮食;以及其他临床因素。参见,例如,"Vaccine Handbook(疫苗手册)",Researcher's Associates(Gaku-yuu-kai)of The National Institute of Health 编辑(1994);"Manual of Prophylactic Inoculation(预防接种指南),第8版",Mikio Kimura,Munehiro Hirayama,和 Harumi Sakai,Kindai Shuppan 编辑(2000);"Minimum Requirements for Biological Products(生物学产品最低要求)",Association of Biologicals Manufacturers of Japan(日本生物制品协会)编辑(1993)。

[0159] 免疫应答

[0160] 本发明的组合物可以用来在需要其的受试者中诱导针对配制在该组合物中的抗原的抗体应答和/或细胞介导的免疫应答。可以在需要其的受试者中引发和/或增强针对任何抗原和/或表达该抗原的细胞的免疫应答。因此,在本发明的实施方案中,组合物可以包含来自细菌、病毒、真菌、寄生虫、变应原或肿瘤细胞的抗原,并且可以被配制用于治疗 and/或预防分别由细菌、病毒、真菌、寄生虫、变应原或肿瘤细胞导致的疾病。

[0161] 本发明的组合物可以适用于治疗和/或预防需要其的受试者中的癌症。该受试者

可以患有癌症或可以处于发生癌症的危险中。可以通过使用或施用本发明的组合物治疗和 / 或预防的癌症包括但不限于, 癌、腺癌、淋巴瘤、白血病、肉瘤、母细胞瘤、骨髓瘤和生殖细胞肿瘤。在一个实施方案中, 癌症可以由病原体诸如病毒导致。与癌症的发生相关的病毒是技术人员已知的, 并且包括但不限于, 人乳头状瘤病毒 (HPV)、约翰 - 坎宁安病毒 (John Cunningham virus) (JCV)、8 型人疱疹病毒、EB 病毒 (Epstein Barr Virus) (EBV)、Merkel 细胞多瘤病毒 (Merkel cell polyomavirus)、丙型肝炎病毒和人 T 细胞白血病病毒 -1。本发明的组合物可以用于治疗或预防癌症, 例如, 用在减小癌症严重性或预防癌症复发中。可以受益于本发明的组合物的癌症包括表达一种或更多种肿瘤特异性抗原的任何恶性细胞。

[0162] 本发明的组合物可以适于用于治疗 and / 或预防需要其的受试者中的病毒感染。受试者可以被病毒感染或可以处于发生病毒感染的危险中。可以通过使用或施用本发明的组合物治疗和 / 或预防的病毒感染包括, 但不限于, 牛痘病毒、痘苗病毒、假牛痘病毒、1 型人疱疹病毒、2 型人疱疹病毒、巨细胞病毒、A-F 型人腺病毒、多瘤病毒、人乳头状瘤病毒、细小病毒、甲型肝炎病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、人类免疫缺陷病毒、正呼肠病毒、轮状病毒、埃博拉病毒、副流感病毒、甲型流感病毒、乙型流感病毒、丙型流感病毒、麻疹病毒、腮腺炎病毒、风疹病毒、肺炎病毒、人类呼吸道合胞病毒、狂犬病病毒、加利福尼亚脑炎病毒、日本脑炎病毒、汉坦病毒、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒、冠状病毒、肠道病毒、鼻病毒、脊髓灰质炎病毒、诺沃克病毒 (Norovirus)、黄病毒、登革热病毒、西尼罗河病毒、黄热病病毒和水痘。

[0163] 在一个实施方案中, 本发明的组合物可以用来治疗和 / 或预防需要其的受试者中的流感病毒感染。流感病毒是正粘病毒科家族的一种单链 RNA 病毒, 并且经常基于病毒颗粒外部上的两个大糖蛋白——血凝素 (HA) 和神经氨酸酶 (NA)——进行表征。甲型流感病毒的大量 HA 亚型已经被鉴定 (Kawaoka 等, *Virology* (1990) 179 :759-767 ; Webster 等, " Antigenic variation among type A influenza viruses (甲型流感病毒中的抗原变异), " 127-168 页。见 : P. Palese 和 D. W. Kingsbury (ed.), *Genetics of influenza viruses* (流感病毒遗传学). Springer-Verlag, New York)。

[0164] 本发明的组合物可以适于用于治疗 and / 或预防需要其的受试者中的神经变性疾病, 其中所述神经变性疾病与抗原的表达相关。受试者可以患有神经变性疾病或可以处于发生神经变性疾病的危险中。可以通过使用或施用本发明的组合物治疗和 / 或预防的神经变性疾病包括, 但不限于, 阿尔茨海默病, 帕金森氏病, 亨廷顿病和肌萎缩侧索硬化 (ALS)。

[0165] 在一个实施方案中, 本发明的组合物可以用来治疗需要其的受试者中的阿尔茨海默病。阿尔茨海默病的特征为在患者的脑内的 β -淀粉样斑块和 / 或 tau 蛋白与阿尔茨海默病的关联性 (参见, 例如, Goedert 和 Spillantini, *Science*, 314 :777-781, 2006)。1 型单纯疱疹病毒也被认为在携带 apoE 基因的易受感染形式的人中具有致病作用 (Itzhaki 和 Wozniak, *J Alzheimers Dis* 13 :393-405, 2008)。

[0166] 相对于用对照组合物处理的受试者, 用本发明的组合物施用或治疗的受试者可以产生对抗原的抗体和 / 或细胞介导的免疫应答的增加。如本文所述, “对照组合物” 可以指不包含要求保护的组合物的至少一种组分的任何组合物。因此对照组合物不包含下列的至少一种 1) 抗原, 2) 脂质体, 3) Poly I:C 或 4) 疏水性载体。在一个实施方案中, 对照组合物不包含 Poly I:C。在其他实施方案中, 对照组合物可以包含明矾代替 Poly I:C。

[0167] 用本发明的组合物施用或治疗的受试者可以引起的抗体免疫应答为用对照组合物治疗的受试者的至少 1.50 倍,至少 1.75 倍,至少 2 倍,至少 2.5 倍,至少 3 倍,至少 3.5 倍,至少 4 倍,至少 4.5 倍或至少 5 倍高。在一个实施方案中,来自用本发明的组合物治疗的受试者的血清的抗体效价(以 log 10 值表示)比用对照组合物治疗的受试者高至少 0.05,至少 0.10,至少 0.15,至少 0.20,至少 0.25 或至少 0.30。

[0168] 用本发明的组合物施用或治疗的受试者可以引起的细胞介导的免疫应答为用对照组合物治疗的受试者的至少 1.50 倍,至少 1.75 倍,至少 2 倍,至少 2.5 倍,至少 3 倍,至少 3.5 倍,至少 4 倍,至少 4.5 倍,或至少 5 倍高。

[0169] 用本发明的组合物施用或治疗的受试者可以引起的记忆性 T 细胞群为用对照组合物治疗的受试者的至少 1.50 倍,至少 1.75 倍,至少 2 倍,至少 2.5 倍,至少 3 倍,至少 3.5 倍,至少 4 倍,至少 4.5 倍,或至少 5 倍高。

[0170] 相对于用对照组合物治疗的受试者,用本发明的组合物施用或治疗的受试者可以预防受试者中肿瘤的发生和 / 或延缓该肿瘤的发作。

[0171] 通过下面非限制性的实施例进一步说明本发明。

[0172] 实施例 1

[0173] 无病原体的 6-8 周龄雌性 CD1 小鼠获自 Charles River Laboratories(St Constant, QC, Canada) 并根据机构指南 (institutional guidelines) 在滤器控制的空气循环中圈养,水和食物随意。

[0174] H5N1 重组血凝素蛋白购自 Protein Sciences(Meridien, CT, USA)。此重组蛋白具有 72,000 道尔顿的近似分子量并且对应于血凝素糖蛋白,血凝素糖蛋白是存在于 H5N1 流感病毒的表面上的抗原性蛋白。此后,此重组蛋白标注为 rHA,其用作测试疫苗制剂的功效率的模型抗原。rHA 以 1 微克 /30 微升的剂量使用。

[0175] 疫苗功效通过酶联免疫吸附测定 (ELISA) 评价,该方法容许检测免疫动物的血清中的抗原特异性抗体水平。对以规则间隔从免疫小鼠采集的血清进行 ELISA(例如每四周),用于监测对指定疫苗制剂的抗体应答。简言之,96 孔微量滴定板用抗原 (rHA,1 微克 / 毫升) 在 4 摄氏度下包被过夜,用 3% 明胶封闭 30 分钟,然后在 4 摄氏度下与血清连续稀释液温育过夜,该连续稀释液以 1/2000 的稀释度开始。然后向每孔中以 1/500 稀释度加入二级试剂(与碱性磷酸酶偶联的蛋白 G,EMD chemicals,Gibbstown,NJ,USA),在 37 摄氏度下 1 小时。在与含有 1 毫克 / 毫升 4- 硝基苯磷酸二钠盐六水合物 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Switzerland) 的溶液温育 60 分钟后,使用微量滴定板读数仪 (ASYS Hitech GmbH, Austria) 测量每孔的 405nm 吸光度。如 Frey A. 等 (Journal of Immunological Methods, 1998, 221 :35-41) 中所述计算终点效价。计算的效价代表与来自原态的未免疫的对照小鼠的血清样品相比,在来自免疫小鼠的血清样品中观察到吸光度统计学显著增加时的最高稀释度。效价表示为终点稀释度的 log10 值。

[0176] 为了配制本文所述的疫苗, S100 卵磷脂和胆固醇 (Lipoid GmbH, Germany) 的 10 : 1 w : w 均质混合物在磷酸盐缓冲盐水 (pH 7.4) 中的 rHA 溶液的存在下水合以形成包封有 rHA 的脂质体。简言之,33 微克 rHA 首先悬浮在 300 微升磷酸盐缓冲盐水 (pH 7.4) 中,然后加入 132 毫克 S100 卵磷脂 / 胆固醇混合物以形成大约 450 微升包封有 rHA 抗原的脂质体悬浮液。该脂质体制剂物通过将材料经过装有 200nm 聚碳酸酯膜的手动微型挤出机

(Avanti, Alabaster, AL, USA) 挤出。对于每 450 微升含有 rHA 的脂质体悬浮液,加入 2 毫克 Imject Alum 佐剂 (Pierce, Rockford, IL, USA)。对于每 500 微升脂质体 / 抗原 / 佐剂悬浮液,加入等体积的与弗式不完全佐剂等效的矿物油载体 (已知为 Montanide(TM) ISA 51, 由 Seppic, France 供应) 以形成油包水乳液,所述油包水乳液具有包含在该乳液的水相内的脂质体悬浮液和形成连续疏水相的油。每个疫苗剂量由 30 微升的上述含有脂质体的乳液、rHA 抗原、明矾佐剂和矿物油载体的乳液组成。此疫苗制剂将称为脂质体 / 明矾 / 疏水性载体。

[0177] 为了配制对应于本发明的疫苗,使用上述相同的步骤,不同之处如下:在形成包封 rHA 的脂质体后,和将脂质体悬浮液通过 200nm 聚碳酸酯膜挤出后,向每 450 微升脂质体加入 133 微克 Poly I:C 佐剂 (Pierce, Rockford, IL, USA)。对于每 500 微升脂质体 / 抗原 / 佐剂悬浮液,加入等体积的矿物油载体 (Montanide(TM) ISA 51, Seppic, France) 以形成油包水乳液,所述油包水乳液具有包含在该乳液的水相内的脂质体悬浮液和形成连续相的油。每个疫苗剂量由 30 微升的上述含有脂质体、rHA 抗原、Poly I:C 佐剂和矿物油载体的乳液组成。此特定的制剂将称为脂质体 / Poly I:C / 疏水性载体。

[0178] 上述两种乳液制剂的功效与对照疫苗的功效进行比较,所述对照疫苗由 30 微升磷酸盐缓冲盐水 (pH 7.4) 中的 1 微克 rHA 和 60 微克明矾佐剂组成。两组小鼠 (每组 9 或 10 只小鼠) 如下用脂质体疫苗制剂肌内注射 1 次 (无加强免疫): 1 组小鼠用如上所述配制在 30 微升脂质体 / Poly I:C / 疏水性载体中的包含 1 微克 rHA 抗原的疫苗 B 进行疫苗接种。每个疫苗剂量有效地包含 4 微克 Poly I:C。2 组小鼠用如上所述配制在 30 微升脂质体 / 明矾 / 疏水性载体中的包含 1 微克 rHA 的疫苗 A 进行疫苗接种。每个疫苗剂量有效地包含 60 微克明矾。对照组小鼠 (3 组, n = 10) 肌内注射由悬浮在磷酸盐缓冲盐水中的 1 微克 rHA 和 60 微克明矾组成的对照明矾疫苗。在免疫后 18 天和 28 天时从所有小鼠采集血清样品。这些血清中的抗体效价通过如上所述的 ELISA 检验。

[0179] 3 组小鼠在施用明矾佐剂化的对照疫苗后如期望的那样产生可检测到的抗原特异性抗体应答。并不令人惊奇地,用脂质体 / 明矾 / 疏水性载体制剂接种的 2 组小鼠产生相当高的抗体应答。尽管这些结果被预期到,但在脂质体 / Poly I:C / 疏水性载体制剂 (1 组小鼠) 中使用 Poly I:C 佐剂代替明矾佐剂产生了一些出人意料的结果;抗体效价显著地高于由脂质体 / 明矾 / 疏水性载体制剂 (2 组) 所产生的效价。

[0180] 用上述的水性对照制剂接种的 3 组小鼠在接种后 18 天和 28 天时产生的终点效价达到 1/32,000 和 1/64,000 (log₁₀ 值分别为 4.51 和 4.81)。2 组中接种后 18 天和 28 天时的终点效价达到 1/256,000 (log₁₀ 值为 5.41)。在接种后 18 天和 28 天 (4 周) 时这些抗体应答的存在证实作为疫苗接种的结果产生了真正的免疫应答。用对应于本发明的制剂注射的 1 组小鼠能够产生增强的免疫应答,在接种后 18 天时终点效价达到 1/1,024,000 (log₁₀ 值为 6.01) 和在免疫后 4 周时达到 1/8,192,000 (log₁₀ 值为 6.91)。这些结果表明,含有 Poly I:C 佐剂的脂质体 / 疏水性载体制剂与脂质体 / 明矾 / 疏水性载体和水性 / 明矾对照疫苗接种相比,能够产生显著增强的体内免疫应答。

[0181] 实施例 2

[0182] 无病原体的 6-8 周龄雌性 CD1 小鼠获自 Charles River Laboratories (St Constant, QC, Canada) 并根据机构指南在滤器控制的空气循环中圈养,水和食物随意。

[0183] 如实施例 1, H5N1 重组血凝素蛋白购自 Protein Sciences (Meridien, CT, USA), 此重组蛋白对应于 H5N1 流感病毒的表面上的血凝素糖蛋白。此后, 此重组蛋白标注为 rHA, 其用作测试疫苗制剂的功效益的模型抗原。rHA 以 1 微克 / 30 微升的剂量使用。

[0184] 为了配制对应于本发明的疫苗, 使用如实施例 1 中所述的相同步骤。概述地, 33 微克 rHA 悬浮在 300 微升磷酸盐缓冲盐水 (pH 7.4) 中, 然后加入 132 毫克 S100 卵磷脂 / 胆固醇混合物 (Lipoid GmbH, Germany) 以形成大约 450 微升包封有 rHA 抗原的脂质体悬浮液。该脂质体制剂通过将材料经过装有 200nm 聚碳酸酯膜的手动微型挤出机 (Avanti, Alabaster, AL, USA) 挤出。对于每 450 微升含有 rHA 的脂质体悬浮液, 加入 133 微克 Poly I:C 佐剂 (Pierce, Rockford, IL, USA)。对于每 500 微升脂质体 / 抗原 / 佐剂悬浮液, 加入等体积的矿物油载体 (Montanide(TM) ISA 51, Seppic, France) 以形成油包水乳液, 所述油包水乳液具有包含在该乳液的水相内的脂质体悬浮液和形成连续疏水相的油。每个疫苗剂量由 30 微升的上述含有脂质体、rHA 抗原、Poly I:C 佐剂和矿物油载体的乳液组成。此特定的制剂将称为脂质体 / Poly I:C / 疏水性载体。

[0185] 上述脂质体 / Poly I:C / 疏水性载体疫苗的功效益与含有 Poly I:C 佐剂的水性对照疫苗的功效益进行比较。两组小鼠 (每组 9 或 10 只小鼠) 用 30 微升 / 剂量肌肉注射 1 次。1 组小鼠用如上所述配制在 30 微升脂质体 / Poly I:C / 疏水性载体中的包含 1 微克 rHA 和 4 微克 Poly I:C 的疫苗 B 进行疫苗接种。2 组小鼠用 30 微升配制在磷酸盐缓冲盐水 (pH 7.4) 中的包含 1 微克 rHA 和 4 微克 Poly I:C 的对照 Poly I:C 疫苗注射。在免疫后 18 天和 28 天时从所有小鼠采集血清样品。血清样品的 rHA 抗体效价通过如实施例 1 中所述的 ELISA 检验。

[0186] 2 组小鼠在施用 Poly I:C 佐剂化的对照疫苗后产生了可检测到的抗原特异性抗体应答。用脂质体 / Poly I:C / 疏水性载体制剂接种的 1 组小鼠产生与 2 组相比显著增强的终点效价。2 组小鼠在接种后 18 天时产生的效价达到 1/128,000 (log₁₀ 值为 5.11) 和在接种后 28 天 (4 周) 时达到 1/1,024,000 (log₁₀ 值为 6.01)。如在实施例 1 中注意到, 这些抗体应答的存在证实作为疫苗接种的结果产生了真正的免疫应答。用对应于本发明的疫苗接种的 1 组小鼠能够产生的终点效价在接种后 18 天时达到 1/1,024,000 (log₁₀ 值为 6.01) 和在接种后 4 周时达到 1/8,192,000 (log₁₀ 值为 6.91)。这些结果表明含有 Poly I:C 佐剂的脂质体 / 疏水性载体制剂与水性 / Poly I:C 对照疫苗接种相比, 能够产生显著增强的体内免疫应答。

[0187] 实施例 3

[0188] 无病原体的 6-8 周龄雌性 CD1 小鼠获自 Charles River Laboratories (St Constant, QC, Canada) 并根据机构指南在滤器控制的空气循环中圈养, 水和食物随意。

[0189] 如实施例 1 和 2, H5N1 重组血凝素蛋白购自 Protein Sciences (Meridien, CT, USA), 此重组蛋白对应于 H5N1 流感病毒的表面上的血凝素糖蛋白。此后, 此重组蛋白标注为 rHA, 其用作测试疫苗制剂的功效益的模型抗原。rHA 以 1 微克 / 50 微升的剂量使用。

[0190] 为了配制本文所述的疫苗, S100 卵磷脂和胆固醇 (Lipoid GmbH, Germany) 的 10 : 1 w : w 均质混合物在磷酸盐缓冲液中的 rHA 和 Poly I:C 佐剂 (Pierce, Rockford, IL, USA) 溶液的存在下水合, 以形成包封有 rHA 和佐剂的脂质体。简言之, 20 微克 rHA 和 200 微克 Poly I:C 首先悬浮在 250 微升 50 毫摩尔磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 中, 然后加入 132

毫克 S100 卵磷脂 / 胆固醇混合物以形成大约 400 微升包封有 rHA 抗原和 Poly I:C 佐剂的脂质体悬浮液。该脂质体制剂使用 50 毫摩尔磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 稀释一半,然后通过将材料经过装有 200nm 聚碳酸酯膜的手动微型挤出机 (Avanti, Alabaster, AL, USA) 挤出。然后使用 Virtis Advantage 冻干仪 (SP Industries, Warminster, PA, USA) 冻干确定尺寸 (sized) 的脂质体。对于每 800 微升含有 rHA 和 Poly I:C 的原始脂质体悬浮液,1 毫升与弗式不完全佐剂等效的矿物油载体 (已知为 Montanide (TM) ISA 51, 由 Seppic, France 供应) 用来重建冻干的脂质体。每个疫苗剂量由 50 微升的组合脂质体、rHA 抗原、Poly I:C 佐剂和矿物油载体的上述制剂组成。此疫苗制剂将称为冻干脂质体 / Poly I:C / 疏水性载体。

[0191] 上述的冻干脂质体制剂的功效与由 50 微升 50 毫摩尔磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 中的 1 微克 rHA 和 100 微克 Imject Alum 佐剂 (Pierce, Rockford, IL, USA) 组成的对照疫苗的功​​效进行比较。1 组小鼠 (N = 8) 用如上所述配制在 50 微升冻干脂质体 / Poly I:C / 疏水性载体中的包含 1 微克 rHA 抗原和 10 微克 Poly I:C 佐剂的疫苗 C 注射 1 次 (无加强免疫)。2 组小鼠 (N = 9) 用悬浮在 50 毫摩尔磷酸盐缓冲液中的包含 1 微克 rHA 和 100 微克明矾佐剂的对照明矾疫苗接种两次 (第 0 天和第 21 天)。在免疫后 3、4 和 8 周时从所有小鼠采集血清样品。这些血清中的 rHA 抗体效价通过如实施例 1 中所述的 ELISA 检验。

[0192] 2 组小鼠在施用明矾佐剂化的对照疫苗后产生了可检测到的抗原特异性抗体应答。用单剂量的冻干脂质体 / Poly I:C / 疏水性载体制剂接种的 1 组小鼠产生与 2 组相比显著增强的终点效价,尽管 2 组动物接种两次 (初次免疫结合加强免疫)。2 组小鼠在接种后 3 周 (加强免疫前) 时产生的效价达到 1/128,000 (log₁₀ 值为 5.11) 以及在 4 周和 8 周 (加强免疫后) 时分别达到 1/1,024,000 (log₁₀ 值为 6.01) 和 1/512,000 (log₁₀ 值为 5.71)。如在实施例 1 中注意到,这些抗体应答的存在证实疫苗接种产生了真正的免疫应答。用对应于本发明的疫苗接种的 1 组小鼠能够产生的终点效价在接种后 3 周时达到 1/2,048,000 (log₁₀ 值为 6.31) 以及在免疫后 4 周和 8 周时达到 1/8,192,000 (log₁₀ 值为 6.91)。这些结果表明单剂量含有 Poly I:C 佐剂的冻干脂质体 / 疏水性载体制剂与加强免疫的水性明矾对照疫苗接种相比,能够产生显著增强的体内免疫应答。在此实施例中产生的免疫应答与实施例 1 和 2 中给出的本发明的疫苗所产生的免疫应答相当。

[0193] 实施例 4

[0194] 无病原体的 6-8 周龄雌性 CD1 小鼠获自 Charles River Laboratories (St Constant, QC, Canada) 并根据机构指南在滤器控制的空气循环中圈养,水和食物随意。

[0195] 如前面的实施例,对应于存在于 H5N1 流感病毒的表面上的血凝素糖蛋白的 H5N1 重组血凝素蛋白 (Protein Sciences, Meriden, CT, USA) 此后标注为 rHA,其用作测试疫苗制剂的功​​效的模型抗原。rHA 以 1 微克 / 30 微升的剂量使用。

[0196] 在此所述的疫苗如实施例 1 中所述配制。简言之,33 微克 rHA 悬浮在 300 微升磷酸盐缓冲盐水 (pH 7.4) 中,然后加入 132 毫克均质 (10 : 1, w : w) 的 S100 卵磷脂 / 胆固醇混合物 (Lipoid GmbH, Germany) 以形成大约 450 微升包封有 rHA 抗原的脂质体悬浮液。该脂质体制剂通过将材料经过装有 200nm 聚碳酸酯膜的手动微型挤出机 (Avanti, Alabaster, AL, USA) 挤出。对于每 450 微升含有 rHA 的脂质体悬浮液,加入 2 毫克 Imject Alum 佐剂 (Pierce, Rockford, IL, USA)。对于每 500 微升脂质体 / 抗原 / 佐剂悬浮液,加入等体积的

矿物油载体 (Montanide(TM) ISA 51, Seppic, France) 以形成油包水乳液, 所述油包水乳液具有包含在该乳液的水相内的脂质体悬浮液和形成连续疏水相的油。每个疫苗剂量由 30 微升的上述含有脂质体的乳液、rHA 抗原、明矾佐剂和矿物油载体的乳液组成。此疫苗制剂将称为脂质体 / 明矾 / 疏水性载体。

[0197] 为了配制对应于本发明的疫苗, 使用上述相同的步骤, 不同之处如下: 在形成包封 rHA 的脂质体后, 和将脂质体悬浮液通过 200nm 聚碳酸酯膜挤出后, 每 450 微升脂质体加入 133 微克基于 RNA 的 Poly I:C 佐剂 (Pierce, Rockford, IL, USA)。对于每 500 微升脂质体 / 抗原 / 佐剂悬浮液, 加入等体积的矿物油载体 (Montanide(TM) ISA 51, Seppic, France) 以形成油包水乳液, 所述油包水乳液具有包含在该乳液的水相内的脂质体悬浮液和形成连续相的油。每个疫苗剂量由 30 微升的上述含有脂质体、rHA 抗原、Poly I:C 佐剂和矿物油载体的乳液组成。此特定的制剂将称为脂质体 / Poly I:C / 疏水性载体。

[0198] 上述两种乳液制剂的功效如实施例 1 中所述进行比较。两组小鼠 (每组 9 或 10 只小鼠) 如下用脂质体疫苗制剂肌内注射 1 次 (无加强免疫): 1 组小鼠用配制在 30 微升脂质体 / Poly I:C / 疏水性载体中的包含 1 微克 rHA 抗原和 4 微克 Poly I:C 佐剂的疫苗 B (本发明) 进行疫苗接种。2 组小鼠用配制在 30 微升脂质体 / 明矾 / 疏水性载体中的 1 微克 rHA 和 60 微克明矾佐剂进行疫苗接种。2 组疫苗是含有通用佐剂明矾的对照制剂 (疫苗 A)。在免疫后 18 天和 28 天时, 然后每 4 周总计 16 周从所有小鼠采集血清样品。这些血清中的抗体效价通过如实施例 1 中所述的 ELISA 检验。

[0199] 2 组中的终点效价在免疫后 8 周和 12 周时达到 1/256,000, 在免疫后 16 周时达到 1/512,000 ($\log_{10}$ 值分别为 5.41 和 5.71)。用对应于本发明的制剂注射的 1 组小鼠能够产生增强的免疫应答, 在接种后 8, 12 和 16 周时终点效价达到 1/4,096,000 ($\log_{10}$ 值为 6.61)。这些结果证实含有 Poly I:C 佐剂的脂质体 / 疏水性载体制剂能够产生显著增强的体内免疫应答, 所述免疫应答为使用缺少 Poly I:C 的对照疫苗所达到的免疫应答的平均 10 倍 (在接种后 4 周和 16 周之间的所有时间点 P 值 < 0.01)。产生的免疫应答的大幅度增加是在抗原 / 脂质体 / 佐剂 / 矿物油载体组合物中使用 Poly I:C 佐剂特异性地代替明矾的结果。用本发明的疫苗产生的较强免疫应答是稳定的, 因为与含有明矾的疫苗相比, 其以显著高的水平持续最小 16 周。

[0200] 实施例 5

[0201] 无病原体的 6-8 周龄雌性 CD1 小鼠获自 Charles River Laboratories (St Constant, QC, Canada) 并根据机构指南在滤器控制的空气循环中圈养, 水和食物随意。

[0202] 如前面实施例, H5N1 重组血凝素蛋白购自 Protein Sciences (Meriden, CT, USA), 此重组蛋白对应于 H5N1 流感病毒的表面上的血凝素糖蛋白。此后, 此重组蛋白标注为 rHA, 其用作测试疫苗制剂的功效的模型抗原。rHA 以 1 微克 / 30 微升的剂量使用。

[0203] 为了配制对应于本发明的疫苗, 使用如实施例 2 中所述的相同步骤。概述地, 33 微克 rHA 悬浮在 300 微升磷酸盐缓冲盐水 (pH 7.4) 中, 然后加入 132 毫克 S100 卵磷脂 / 胆固醇混合物 (Lipoid GmbH, Germany) 以形成大约 450 微升包封有 rHA 抗原的脂质体悬浮液。该脂质体制剂通过将材料经过 200nm 聚碳酸酯膜挤出。对于每 450 微升含有 rHA 的脂质体悬浮液, 加入 133 微克基于 RNA 的 Poly I:C 佐剂 (Pierce, Rockford, IL, USA)。对于每 500 微升脂质体 / 抗原 / 佐剂悬浮液, 加入等体积的矿物油载体 (Montanide(TM) ISA 51,

Seppic, France) 以形成油包水乳液, 所述油包水乳液具有包含在该乳液的水相内的脂质体悬浮液和形成连续疏水相的油。每个疫苗剂量由 30 微升的上述含有脂质体、rHA 抗原、Poly I:C 佐剂和矿物油载体的乳液组成。此疫苗制剂将称为脂质体 /Poly I:C/ 疏水性载体。

[0204] 上述脂质体 /Poly I:C/ 疏水性载体疫苗的功效与含有 rHA 抗原和基于 RNA 的 Poly I:C 佐剂的水性对照疫苗的功效进行比较。两组小鼠 (每组 9 或 10 只小鼠) 用 30 微升 / 剂量肌内注射 1 次。1 组小鼠用如上所述配制为脂质体 /Poly I:C/ 疏水性载体的包含 1 微克 rHA 和 4 微克 Poly I:C 的疫苗 B 进行疫苗接种。2 组小鼠用配制在磷酸盐缓冲盐水 (pH 7.4) 中的包含 1 微克 rHA 和 4 微克 Poly I:C 的对照 Poly I:C 疫苗注射。在免疫后 18 天和 28 天时和然后每 4 周总计 16 周从所有小鼠采集血清样品。血清样品中的 rHA 抗体效价通过如实施例 1 中所述的 ELISA 检验。

[0205] 2 组小鼠在施用 Poly I:C 佐剂化的对照疫苗后产生了可检测到的抗原特异性抗体应答。用脂质体 /Poly I:C/ 疏水性载体制剂接种的 1 组小鼠与 2 组相比产生显著增强的终点效价。2 组小鼠在接种后 8 周时产生的效价达到 1/512,000 (log₁₀ 值为 5.71) 和在接种后 12 周和 16 周时达到 1/2,048,000 (log₁₀ 等于 6.31)。如前所注意到, 这些抗体应答的存在证实疫苗接种产生了真正的免疫应答。用对应于本发明的疫苗接种的 1 组小鼠能够产生的终点效价在接种后 8、12 和 16 周时达到 1/4,096,000 (log₁₀ 值为 6.61)。这些结果证实含有 Poly I:C 佐剂的脂质体 / 疏水性载体制剂与水性 /Poly I:C 对照疫苗接种相比, 能够产生持久的和显著较高的体内免疫应答 (在接种后 4 周和 16 周时 P 值 < 0.02)。在疫苗中存在脂质体和疏水性载体的情况下达到的抗体效价在早期时间点 (接种后 4 周) 为平均 7 倍高, 并且在晚期时间点 (接种后 16 周) 时为平均 9 倍高。这表明脂质体和疏水性载体组分对于产生观察到的强免疫应答是重要的。

[0206] 实施例 6

[0207] 无病原体的 6-8 周龄雌性 BALB/c 小鼠获自 Charles River Laboratories (St Constant, QC, Canada) 并根据机构指南在滤器控制的空气循环中圈养, 水和食物随意。

[0208] 如实施例 1-5, H5N1 重组血凝素蛋白购自 Protein Sciences (Meriden, CT, USA), 此重组蛋白对应于 H5N1 流感病毒的表面上的血凝素糖蛋白。此后, 此重组蛋白标注为 rHA, 其用作测试疫苗制剂的功效的模型抗原。rHA 以 1.5 微克 /50 微升的剂量使用。

[0209] 为了配制对应于本发明的疫苗, S100 卵磷脂和胆固醇 (Lipoid GmbH, Germany) 的 10 : 1 (w : w) 均质混合物在磷酸盐缓冲液中的 rHA 的存在下水合以形成包封有 rHA 的脂质体, 并且紧接着加入 Poly I:C (Pierce, Rockford, IL, USA)。简言之, 30 微克 rHA 悬浮在 750 微升 50 毫摩尔磷酸盐缓冲液 (pH 7.0) 中, 然后加入 132 毫克 S100 卵磷脂 / 胆固醇混合物以形成大约 900 微升包封有 rHA 抗原的脂质体悬浮液。该脂质体制剂通过将材料以 100 毫升 / 分钟的流速经过装有 200nm 聚碳酸酯膜的半自动挤出机 (Avestin, Ottawa, ON, Canada) 而挤出。将在 50 毫摩尔磷酸盐缓冲液 (pH 7.0) 中的 250 微克的基于 RNA 的 Poly I:C 佐剂加入至确定尺寸的脂质体中以将该制剂稀释至 1 毫升。然后使用 Virtis Advantage 冻干仪 (SP Industries, Warminster, PA, USA) 冻干脂质体。对于每 1 毫升含有 rHA 和 Poly I:C 的原始脂质体悬浮液, 800 微升矿物油载体 (Montanide (TM) ISA 51, Seppic, France) 用来重建冻干的脂质体。每个疫苗剂量由 50 微升的含有脂质体、rHA 抗原、Poly I:C 佐剂和矿物油载体的上述制剂组成。此疫苗制剂将称为冻干脂质体 /Poly I:C/ 疏水性载体。

[0210] 上述的冻干脂质体制剂的功效与由 50 微升 50 毫摩尔磷酸盐缓冲液 (pH 7.0) 中的 1.5 微克 rHA 和 100 微克 Imject Alum 佐剂 (Pierce, Rockford, IL, USA) 组成的对照疫苗的功​​效进行比较。1 组小鼠 (N = 10) 用如上所述配制在 50 微升冻干脂质体 /Poly I:C/ 疏水性载体中的包含 1.5 微克 rHA 抗原和 12.5 微克基于 RNA 的 Poly I:C 佐剂的疫苗 D 肌肉注射 1 次 (无加强免疫)。2 组小鼠 (在第 3 周和第 4 周时 N = 10, 在第 6 周和第 9 周时由于 1 只动物未按计划非疫苗相关性的终止而减少至 N = 9) 用悬浮在 50 毫摩尔磷酸盐缓冲液中的包含 1.5 微克 rHA 和 100 微克明矾佐剂的对照明矾疫苗接种两次 (第 0 天和第 28 天)。在免疫后 3, 4, 6 和 9 周时从所有小鼠采集血清样品。这些血清中的 rHA 抗体效价通过如实施例 1 中所述的 ELISA 检验。

[0211] 2 组小鼠仅在施用 2 个剂量 (初次免疫和加强免疫) 的明矾佐剂化的对照疫苗后产生了抗原特异性抗体应答。用单剂量的冻干脂质体 /PolyI:C/ 疏水性载体制剂接种的 1 组小鼠在检测的所有时间点时产生与 2 组相比显著增强的终点效价, 尽管 2 组动物接种两次。2 组小鼠在初次接种后 3 周记录本底效价, 并且一个个体在 4 周时产生了最大效价, 为 1/8,000 ($\log_{10}$ 等于 3.39)。在加强免疫后, 2 组小鼠在免疫后 6 周和 9 周时产生的效价达到 1/64,000 ($\log_{10}$ 值为 4.81)。用对应于本发明的疫苗接种的 1 组小鼠能够产生的终点效价在接种后 3 周和 4 周时达到 1/128,000 ($\log_{10}$ 值为 5.11) 以及在免疫后 6 周和 9 周时达到 1/512,000 ($\log_{10}$ 值为 5.71)。这些结果证实, 使用与实施例 3 中使用的不同小鼠种类, 单剂量含有 Poly I:C 佐剂的冻干脂质体 /疏水性载体制剂与甚至加强免疫的水性 /明矾对照疫苗接种相比, 能够产生显著增强的体内体液免疫应答。在接种后 4 周时抗体水平为单剂量的对照疫苗的 24 倍高 (P 值 < 0.001), 且在接种后 9 周的较晚时间点时为两次剂量的对照疫苗的 9 倍高 (P 值 < 0.01)。此外, 来自实施例 3 和 6 的结果表明 Poly I:C 佐剂可以在脂质体挤出之前或之后并入冻干脂质体 /疏水性载体制剂中。

[0212] 实施例 7

[0213] 无病原体的 6-8 周龄雌性 BALB/c 小鼠获自 Charles River Laboratories (St Constant, QC, Canada) 并根据机构指南在滤器控制的空气循环中圈养, 水和食物随意。

[0214] 如实施例 1-6, H5N1 重组血凝素蛋白购自 Protein Sciences (Meriden, CT, USA), 此重组蛋白对应于 H5N1 流感病毒的表面上的血凝素糖蛋白。此后, 此重组蛋白标注为 rHA, 其用作测试疫苗制剂的功​​效的模型抗原。rHA 以 1.5 微克 /50 微升的剂量使用。

[0215] 在此实施例中, 冻干脂质体 /Poly I:C/ 疏水性载体肌肉施用一次 (无加强免疫) 或皮下施用一次 (无加强免疫), 以评价抗原特异性细胞毒性淋巴细胞应答的产生。

[0216] 为了配制对应于本发明的疫苗, 使用如实施例 6 中所述的相同步骤。概括地, 通过将 S100 卵磷脂和胆固醇 (Lipoid GmbH, Germany) 的 10 : 1 (w : w) 均质混合物在磷酸盐缓冲液中的 rHA 的存在下水合来配制脂质体, 接着加入基于 RNA 的 Poly I:C (Pierce, Rockford, IL, USA)。将脂质体悬浮液冻干, 并且重新悬浮在矿物油载体 (Montanide ISA 51 (TM), SEPPIC, France) 中。每个疫苗剂量 (疫苗 D) 由 50 微升的含有脂质体 (6.6mg 的 S100/胆固醇脂质)、rHA 抗原 (1.5 微克)、Poly I:C 佐剂 (12.5 微克) 和矿物油载体的上述制剂组成。此疫苗制剂将称为冻干脂质体 /Poly I:C/ 疏水性载体。1 组中的小鼠 (n = 4) 如实施例 6 中那样肌肉接受此制剂。2 组小鼠 (n = 4) 皮下接受此疫苗。

[0217] 3 组中的小鼠 (n = 4) 接种以对照明矾疫苗, 该对照明矾疫苗由 50 微升 50 毫

摩尔磷酸盐缓冲液 (pH 7.0) 中的 1.5 微克 rHA 和 100 微克 Imject Alum 佐剂 (Pierce, Rockford, IL, USA) 组成。小鼠肌肉注射 1 次 (无加强免疫)。4 组小鼠 (n = 2) 是原态的, 并且不接受任何免疫。

[0218] 接种后 24 天, 动物通过二氧化碳诱导的窒息处死。收集脾脏, 并且应用标准步骤制备单独的单细胞悬液。使用 ACK 裂解缓冲液 (蒸馏水中的 0.15M NH₄Cl, 10mM KHC0₃, 0.1mM Na₂EDTA) 裂解红细胞。为了增加抗原特异性 T 细胞, 脾细胞以 1×10^6 细胞 / 毫升在 RPMI 1640 (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) 完全培养基中在 37 °C、5 % 二氧化碳下培养 4 天, 所述培养基含有 1 % 青霉素 / 链霉素 / 谷氨酰胺、0.1 % 2- 巯基乙醇 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 和 10 % 胎牛血清 (Hyclone, Logan, UT, USA) ——补充有 20 单位 / 毫升重组人 IL-2 (Sigma-Aldrich) 和 10 微克 / 毫升 rHA。在脾细胞上进行三色流式细胞分析以检测抗原特异性 CD8⁺T 细胞。细胞用 FC-block (eBioscience, San Diego, CA, USA) 在室温下处理 10 分钟进行封闭。然后细胞用获自 Proimmune (Bradenton, FL, USA) 的藻红蛋白 (PE) - 标记的 IYSTVASSL (I9L) / H2-Kd 五聚体在 4 °C 下染色 20 分钟。I9L 是 rHA (518-528) 的 H2-Kd 免疫优势表位, 并且该五聚体试剂检测小鼠对此表位的 MHC I 递呈。然后细胞用抗 CD19- 异硫氰酸荧光素 (FITC) (eBioscience) 和抗 CD8 β - 别藻蓝蛋白 (APC) (eBioscience) 在 4 °C 下避光染色 30 分钟, 在含有 0.1 % 多聚甲醛的 50 毫摩尔磷酸盐缓冲液 (pH 7.0) 中洗涤和固定。在 FACSCalibur (TM) 流式细胞仪 (BD Bioscience, Mississauga, ON, Canada) 上获得 5×10^5 个细胞, 并且使用 WinList 6.0 软件 (Verity Inc, Topsham, ME, USA) 分析。基于前向散射和侧向散射圈出结果, 并且抗原特异性 CD8⁺ T 细胞定义为五聚体阳性、CD8 β 阳性和 CD19 阴性。使用双尾 t 检验进行统计学分析。

[0219] 用对照的基于明矾的制剂接种的小鼠产生小的抗原特异性 CD8⁺ T 细胞群 (0.045 %)。通过肌肉或皮下途径递送的用本发明的冻干脂质体 / Poly I:C / 疏水性载体制剂免疫的小鼠产生显著较高的抗原特异性 CD8⁺ T 细胞群 (分别为 0.23 % 和 0.17 % ; 与明矾对照相比均为 $p = < 0.025$)。这些结果证明本发明中配制的 rHA 可以经肌肉或皮下递送, 并且产生与使用明矾的常规疫苗制剂相比显著较高的代表细胞免疫应答的抗原特异性 CD8⁺ T 细胞群。

[0220] 实施例 8

[0221] 无病原体的 6-8 周龄雌性 CD1 小鼠, 和重量为 2-3 千克的雌性新西兰白兔均获自 Charles River Laboratories (St Constant, QC, Canada) 并根据机构指南在滤器控制的空气循环中圈养, 水和食物随意。

[0222] 如实施例 1-7, H5N1 重组血凝素蛋白购自 Protein Sciences (Meriden, CT, USA), 此重组蛋白对应于 H5N1 流感病毒的表面上的血凝素糖蛋白。此后, 此重组蛋白标注为 rHA, 其用作测试疫苗制剂的功效益模型抗原。小鼠中 rHA 以 0.5 微克 / 50 微升的剂量使用, 在兔中以 2 微克 / 200 微升的剂量使用。

[0223] 疫苗功效通过由 Benchmark Biolabs (Lincoln, NE, USA) 进行的血凝素抑制测定 (HAI) 来评价。简言之, 血清样品用破坏受体的酶预处理, 并且预吸附至鸡红细胞以避免任何非特异性的血凝素抑制反应。血清的连续稀释液然后与 0.7 % 马红细胞、0.5 % 牛血清白蛋白和 8HA 单位的 A / 越南 / 1203 / 2004 [H5N1] 流感病毒温育。计算的效价代表血清样品可以完全地抑制红细胞的血凝集时的最高稀释度。

[0224] 为了配制对应于本发明的第一种疫苗, S100 卵磷脂和胆固醇 (Lipoid GmbH, Germany) 的 10 : 1(w : w) 均质混合物在磷酸盐缓冲液中的 rHA 的存在下水合以形成包封有 rHA 的脂质体, 并且接着加入 Poly I:C(Pierce, Rockford, IL, USA)。简言之, 10 微克 rHA 首先悬浮在 650 微升 50 毫摩尔磷酸盐缓冲液 (pH 7.0) 中, 然后加入 132 毫克 S100 卵磷脂 / 胆固醇混合物以形成大约 800 微升包封有 rHA 抗原的脂质体悬浮液。该脂质体制剂通过将材料经过装有 200nm 聚碳酸酯膜的手动微型挤出机 (Avanti, Alabaster, AL, USA) 而随后挤出。将在 50 毫摩尔磷酸盐缓冲液 (pH 7.0) 中的 240 微克的 Poly I:C 佐剂加入确定尺寸的脂质体中。然后使用 Virtis Advantage 冻干仪 (SP Industries, Warminster, PA, USA) 冻干脂质体。使用矿物油载体 (Montanide(TM) ISA 51, 由 Seppic, France 供应) 重建冻干的材料达到溶解的脂质体的最初 1 毫升体积。递送给小鼠的每个疫苗剂量由 50 微升的组合脂质体、rHA 抗原、Poly I:C 佐剂和矿物油载体的上述制剂组成。此疫苗制剂将称为冻干脂质体 /Poly I:C/ 疏水性载体。

[0225] 为了配制也对应于本发明的第二种疫苗, 使用上述相同的步骤, 不同之处如下: 在形成包封 rHA 抗原的脂质体后, 将脂质体制剂通过将材料经过装有两个 400nm 聚碳酸酯膜的手动微型挤出机而挤出。将在 50 毫摩尔磷酸盐缓冲液 (pH 7.0) 中的 250 微克的基于 RNA 的 Poly I:C 佐剂加入确定尺寸的脂质体中, 以将制剂稀释至 1 毫升。然后使用 Virtis Advantage 冻干仪冻干脂质体并使用矿物油载体 (Montanide(TM) ISA 51, Seppic, France) 重建冻干的材料达到最初的 1 毫升。递送给兔的每个疫苗剂量由 200 微升的含有脂质体、rHA 抗原、Poly I:C 佐剂和矿物油载体的上述制剂组成。此疫苗制剂将称为冻干脂质体 /Poly I:C/ 疏水性载体。

[0226] 使用两种不同的动物模型测试上述冻干的脂质体制剂的功效。动物用相当的制剂接种; 注射体积根据动物的尺寸适当地调节。一组小鼠 (N = 5) 用如上所述配制在 50 微升的冻干脂质体 /Poly I:C/ 疏水性载体中的包含 0.5 微克 rHA 抗原和 12 微克 Poly I:C 佐剂的疫苗 F 肌肉注射。一组兔 (N = 5) 用如上所述配制在 200 微升的冻干脂质体 /Poly I:C/ 疏水性载体中的包含 2 微克 rHA 抗原和 50 微克 Poly I:C 佐剂的疫苗 E 皮下注射。所有动物在注射前放血, 然后在免疫后 4 周或 5 周时再次放血。这些血清中的 HAI 效价通过上述的 H5N1 血凝素抑制测定进行检验。

[0227] 在用冻干脂质体 /Poly I:C/ 疏水性载体制剂免疫后 4 周或 5 周时, 小鼠和兔均产生指示对流感 H5N1 有保护作用的 HAI 效价。40(log₁₀ 等于 1.60) 的 HAI 血清效价一般被认为意味着个体具有保护水平的靶向特定流感株的抗体。在接种后 5 周时, 小鼠产生的效价在 128(log₁₀ 为 2.11) 至 512(log₁₀ 为 2.71) 的范围内。在免疫后 4 周时, 兔产生的 HAI 效价在 64(log₁₀ 等于 1.81) 至 1024(log₁₀ 为 3.01) 的范围内。通常认为在上述剂量下使用的 rHA 的单次接种不能够诱导在所有接种受试者中达到的高 HAI 效价。在两种不同的动物模型中产生的此大小的效价显示, 该冻干脂质体 /Poly I:C/ 疏水性载体制剂在至少接种后 4 周在所有接种受试者中产生保护范围内的强抗体水平 (HAI > 20 或 log 值 > 1.3) 方面特别有效。

[0228] 实施例 9

[0229] 无病原体的 6-8 周龄雌性 CD1 小鼠获自 Charles River Laboratories (St Constant, QC, Canada) 并根据机构指南在滤器控制的空气循环中圈养, 水和食物随意。

[0230] 淀粉样 β 蛋白片段 (1-43) 购自 Anaspec (San Jose, CA, USA) 并且用作模型抗原以测试疫苗制剂的功效。此肽此后称为 β -淀粉样蛋白, 具有大致 4,600 道尔顿的分子量, 且与阿尔茨海默病患者的脑中斑块的形成相关。 β -淀粉样蛋白以 10 微克/100 微升的剂量使用。

[0231] 21 氨基酸肽 FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE, 此后称为 F21E, 购自 NeoMPS (San Diego, CA, USA)。此破伤风类毒素肽 (氨基酸 947-967) 被鉴定为 T-辅助表位。F21E 用作模型 T-辅助表位以测试疫苗制剂的功效; 其以 20 微克/100 微升的剂量使用。

[0232] 如实施例 1-6, 疫苗功效通过酶联免疫吸附测定 (ELISA) 评价。使用与实施例 1 中所述的相同步骤, 作出一些改变以容许检测 β -淀粉样蛋白特异性抗体。简言之, 96 孔微量滴定板用抗原 (β -淀粉样蛋白, 1 微克/毫升) 在 4 摄氏度下包被过夜, 用 3% 明胶封闭 30 分钟, 然后在 4 摄氏度下与血清连续稀释液温育过夜, 该连续稀释液一般以 1/1000 的稀释度开始。然后向每孔中以 1/500 稀释度加入二级试剂 (与碱性磷酸酶偶联的蛋白 G, EMD chemicals, Gibbstown, NJ, USA), 在 37 摄氏度下 1 小时。在与含有 1 毫克/毫升 4-硝基苯磷酸二钠盐六水合物 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Switzerland) 的溶液温育 60 分钟后, 使用微量滴定板读数仪 (ASYS Hitech GmbH, Austria) 测量每孔的 405nm 吸光度。如 Frey A. 等 (Journal of Immunological Methods, 1998, 221:35-41) 中所述计算终点效价。计算的效价代表与来自原态的未免疫的对照小鼠的血清样品相比, 在来自免疫小鼠的血清样品中观察到吸光度的统计学显著增加时的最高稀释度。效价表示为终点稀释度的 $\log_{10}$ 值。

[0233] 为了配制本文所述的疫苗, S100 卵磷脂和胆固醇 (Lipoid GmbH, Germany) 的 10 : 1 (w : w) 均质混合物在磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 中的 β -淀粉样蛋白和 F21E 的存在下水合以形成包封有抗原和 T-辅助剂的脂质体。简言之, 100 微克 β -淀粉样蛋白和 200 微克 F21E 首先悬浮在 300 微升磷酸盐缓冲盐水 (pH 7.4) 中, 然后加入 132 毫克 S100 卵磷脂/胆固醇混合物以形成大约 450 微升包封有 β -淀粉样蛋白抗原和 F21E T-辅助剂的脂质体悬浮液。该脂质体制剂通过将材料经过装有 400nm 聚碳酸酯膜的手动微型挤出机 (Avanti, Alabaster, AL, USA) 而挤出。对于每 450 微升含有 β -淀粉样蛋白和 F21E 的脂质体悬液, 加入 2 毫克 Imject Alum 佐剂 (Pierce, Rockford, IL, USA)。对于每 500 微升脂质体/抗原/T-辅助剂/佐剂悬浮液, 加入等体积的矿物油载体 (已知为 Montanide (TM) ISA 51, 由 Seppic, France 供应) 以形成油包水乳液, 所述油包水乳液具有包含在该乳液的水相内的脂质体悬浮液和形成连续疏水相的油。每个疫苗剂量由 100 微升的上述含有脂质体、 β -淀粉样蛋白、F21E T-辅助剂、明矾佐剂和矿物油载体的乳液组成。此疫苗制剂将称为脂质体/明矾/疏水性载体。

[0234] 为了配制对应于本发明的疫苗, 使用上述的相同步骤, 不同之处如下: 在形成包封 β -淀粉样蛋白和 F21E 的脂质体后, 和将脂质体制剂通过 400nm 聚碳酸酯膜后, 每 450 微升脂质体加入 100 微克基于 RNA 的 Poly I:C 佐剂 (Pierce, Rockford, IL, USA)。对于每 500 微升脂质体/抗原/T-辅助剂/佐剂悬浮液, 加入等体积的矿物油载体 (Montanide (TM) ISA 51, Seppic, France) 以形成油包水乳液, 所述油包水乳液具有包含在该乳液的水相内的脂质体悬浮液和形成连续相的油。每个疫苗剂量由 100 微升的上述含有脂质体、 β -淀粉样蛋白抗原、F21E T-辅助剂、Poly I:C 佐剂和矿物油载体的乳液组成。此疫苗制剂将称为脂质体/Poly I:C/疏水性载体。

[0235] 比较上述两种乳液制剂的功效。两组小鼠（每组 9 只小鼠）如下用脂质体疫苗制剂腹腔内注射：2 组小鼠用如上所述配制在 100 微升脂质体 / 明矾 / 疏水性载体中的包含 10 微克 β -淀粉样蛋白和 20 微克 F21E 的疫苗 G 进行疫苗接种。每个疫苗剂量有效地含有 200 微克明矾。1 组小鼠用如上所述配制在 100 微升脂质体 / Poly I:C / 疏水性载体中的包含 10 微克 β -淀粉样蛋白抗原和 20 微克 F21E 的疫苗 H 进行疫苗接种。每个疫苗剂量有效地含有 10 微克 Poly I:C。在免疫后 4、8 和 12 周时从所有小鼠采集血清样品。这些血清中的抗体效价通过如上所述的 ELISA 检验。

[0236] 用单剂量的脂质体 / 明矾 / 疏水性载体制剂接种的 2 组小鼠如期望的那样产生可检测到的抗原特异性抗体应答。在接种后 4 周和 8 周时的终点效价达到 1/32,000 ($\log_{10}$ 值为 4.51)，且在 12 周时达到 1/64,000 ($\log_{10}$ 值为 4.81)。这些抗体应答的存在证实疫苗接种产生了真正的免疫应答。用对应于本发明的制剂注射一次的 1 组小鼠能够产生增强的免疫应答，在接种后 4、8 和 12 周时终点效价达到 1/256,000 ($\log_{10}$ 值为 5.41)。在每个时间点上本发明产生的效价平均为由含有通用佐剂明矾的对照制剂产生的效价的 7 倍。本发明实现的效价的增加在统计学上是显著的（在接种后 8 周和 12 周时 P 值 < 0.01 ）。这些结果通过使用不同抗原模型证实，含有 Poly I:C 佐剂的脂质体 / 疏水性载体制剂与脂质体 / 明矾 / 疏水性载体疫苗接种相比，能够产生显著增强的体内免疫应答。

[0237] 实施例 10

[0238] 无病原体的 6-8 周龄雌性 CD1 小鼠获自 Charles River Laboratories (St Constant, QC, Canada) 并根据机构指南在滤器控制的空气循环中圈养，水和食物随意。

[0239] H5N1 重组血凝素蛋白购自 Protein Sciences (Meriden, CT, USA)。此重组蛋白具有 72,000 道尔顿的近似分子量并且对应于血凝素糖蛋白，血凝素糖蛋白是存在于 H5N1 流感病毒的表面上的抗原性蛋白。此后，此重组蛋白标注为 rHA，其用作测试疫苗制剂的功效的模型抗原。rHA 以 0.5 微克 / 50 微升剂量使用。

[0240] 体液 (TH1) 和细胞 (TH2) 免疫应答两者通过酶联免疫吸附测定 (ELISA) 评价，该方法容许检测免疫动物的血清中的抗原特异性抗体水平。简言之，96 孔微量滴定板用抗原 (rHA, 1 微克 / 毫升) 在 4 摄氏度下包被过夜，用 3% 明胶封闭 30 分钟，然后在 4 摄氏度下与血清连续稀释液温育过夜，该连续稀释液一般以 1/2000 的稀释度开始。然后将二抗——抗 IgG 以 1/2000 的稀释度加入至每孔中，在 37 摄氏度下 1 小时。对于指示 TH1 细胞应答的 IgG2A 抗体的检测，使用羊抗鼠 IgG2A (SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA)。为了检测 TH2 体液应答，使用羊抗鼠 IgG1 (SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA) 二级试剂。在与含有 1 毫克 / 毫升 4-硝基苯磷酸二钠盐六水合物 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Switzerland) 的溶液温育 60 分钟后，使用微量滴定板读数仪 (ASYS Hitech GmbH, Austria) 测量每孔的 405nm 吸光度。如 Frey A. 等 (Journal of Immunological Methods, 1998, 221:35-41) 中所述计算终点效价。计算的效价代表与来自原态的未免疫的对照小鼠的血清样品相比，在来自免疫小鼠的血清样品中观察到吸光度统计学显著增加时的最高稀释度。效价表示为终点稀释度的 $\log_{10}$ 值。

[0241] 为了配制对应于本发明的疫苗，如实施例 8 中所述，S100 卵磷脂和胆固醇 (Lipoid GmbH, Germany) 的 10 : 1 w : w 均质混合物在磷酸盐缓冲液中的 rHA 溶液的存在下水合以形成包封有 rHA 的脂质体，并且随后加入基于 RNA 的 Poly I:C (Pierce, Rockford, IL,

USA)。简言之,10 微克 rHA 首先悬浮在 650 微升 50 毫摩尔磷酸盐缓冲液 (pH 7.0) 中,然后加入 132 毫克 S100 卵磷脂 / 胆固醇混合物以形成大约 800 微升封装有 rHA 抗原的脂质体悬浮液。然后,该脂质体制剂通过将材料经过装有 200nm 聚碳酸酯膜的手动微型挤出机 (Avanti, Alabaster, AL, USA) 而挤出。将在 50 毫摩尔磷酸盐缓冲液 (pH 7.0) 中的 Poly I:C 佐剂加入至确定尺寸的脂质体中以将制剂稀释至 1 毫升。对于“高剂量”Poly I:C 制剂,加入磷酸缓冲液中的 240 微克 Poly I:C,且对于“低剂量”Poly I:C 制剂加入 50 微克 Poly I:C。然后使用 Virtis Advantage 冻干仪 (SP Industries, Warminster, PA, USA) 冻干脂质体。使用矿物油载体 (Montanide(TM) ISA 51, 由 Seppic, France 供应) 重建冻干的材料达到溶解的脂质体的最初 1 毫升体积。每个疫苗剂量由 50 微升的含有脂质体、rHA 抗原、Poly I:C 佐剂和矿物油载体的上述制剂组成。这些疫苗制剂将称为冻干脂质体 /Poly I:C(高) / 疏水性载体和冻干脂质体 /Poly I:C(低) / 疏水性载体。

[0242] 比较用含有 Poly I:C 佐剂的冻干脂质体制剂接种产生的 TH1 和 TH2 应答。两组小鼠 (每组 N = 5) 用 50 微升的配制为冻干脂质体 /Poly I:C(高) / 疏水性载体 (1 组) 的包含 0.5 微克 rHA 和 12 微克 Poly I:C 的疫苗 E 或配制为冻干脂质体 /Poly I:C(低) / 疏水性载体 (2 组) 的包含 0.5 微克 rHA 和 2.5 微克 Poly I:C 的疫苗 I 肌肉注射。在免疫后 5 周时采集血清样品,并且如上所述检验 IgG1 和 IgG2A 抗体效价。

[0243] 在免疫后 5 周时 1 组小鼠产生的 IgG1 效价达到 2,048,000 (log₁₀ 值为 6.31), 其与实施例 3 中使用的类似冻干脂质体 /Poly I:C / 疏水性载体制剂的体液应答结果相当。指示细胞应答的 IgG2A 效价在接种后 5 周时达到 4,096,000 (log₁₀ 等于 6.61)。用低剂量 Poly I:C 接种的 2 组小鼠在接种后 5 周时产生的 IgG1 效价达到 4,096,000 (log₁₀ 为 6.61), 且 IgG2A 效价也达到 4,096,000。结果显示,在冻干脂质体 / 疏水性载体制剂中以各种浓度配制的 Poly I:C 佐剂能够产生体液 (TH2) 和细胞 (TH1) 免疫应答两者。这些结果表明,上述制剂能够在接种的受试者中产生细胞和体液免疫应答。

[0244] 实施例 11

[0245] 无病原体的 4-6 周龄雌性 C57BL6 小鼠获自 Charles River Laboratories (St Constant, QC, Canada) 并根据机构指南在滤器控制的空气循环中圈养,水和食物随意。

[0246] 疫苗制剂中使用的抗原是由与通用 T 辅助表位 PADRE 融合的 HPV16 E7 的 H2-Db 免疫优势表位 (49-57 ;RAHYNIVTF) 组成的融合蛋白。此抗原以后称为 FP,其由 Anaspec Inc. (San Jose, CA) 合成。佐剂为由 Sigma-Genosys (St. Louis, MO) 提供的基于 RNA 的聚肌苷 - 胞嘧啶 RNA 分子。

[0247] 包含脂质体、基于 RNA 的 Poly I:C 分子和疏水性载体的本发明的功效在体内使用 C3 肿瘤激发 (tumor challenge) 模型进行测试。C3 细胞含有人乳头瘤病毒 16 (HPV16) 基因组并且因此在其表面上存在 HPV16E7 表位 (氨基酸 49-57 ;RAHYNIVTF),其可以成为疫苗接种的靶标。C3 细胞当皮下注射时生长成可测量到的实体肿瘤。在第 0 天三组小鼠 (每组 n = 8) 在侧腹皮下植入表达 HPV16 E7 的肿瘤细胞系 C3 (5×10⁵ 个细胞 / 小鼠)。在第 8 天时,1 组和 2 组中的小鼠在对侧侧腹皮下接种 100 微升疫苗。3 组仅接受 PBS,并且用作肿瘤生长对照。使用测径器每周一次测量肿瘤体积以记录最短的直径和最长的直径持续至植入后 5 周。肿瘤体积使用下列的公式计算:最长测量值 × (最短测量值)²除以 2。

[0248] 用来免疫 1 组的对照疫苗 (常规乳液) 通过将 300 微克 FP 抗原和 3 毫克 Poly I:C

佐剂在 1 毫升 PBS 中混合进行配制。对于每 500 微升抗原 / 佐剂悬浮液,加入等体积的矿物油载体 (Montanide(TM) ISA 51,由 Seppic,France 供应)以形成油包水乳液。每个疫苗剂量由 100 微升的上述含有 FP 抗原 (15 微克)和 Poly I:C 佐剂 (150 微克)和矿物油载体的乳液组成。此疫苗制剂将称为 Poly I:C/ 疏水性载体。

[0249] 为了配制对应于本发明的用于 2 组的疫苗 (疫苗 K),使用如实施例 1 中所述的相同步骤。简言之,150 微克 FP 抗原与溶解在叔丁醇中的 DOPC 卵磷脂 / 胆固醇混合物 (10 : 1, w : w ;Lipoid GmbH, Germany) 混合并冻干。脂质体通过加入含有 1.5 毫克 Poly I:C 的 1 毫升 50 毫摩尔磷酸盐缓冲液 (pH 7.0) 进行配制。该脂质体制剂通过将材料经过装有 200nm 聚碳酸酯膜的手动微型挤出机 (Avanti, Alabaster, AL, USA) 而挤出。脂质体尺寸使用 Malvern 粒度分析仪 (Worcestershire, United Kingdom) 在 200nm 处进行确认。对于每 500 微升脂质体 / 抗原 / 佐剂悬浮液,加入等体积的矿物油载体 (Montanide(TM) ISA 51,由 Seppic, France 供应)以形成油包水乳液,所述油包水乳液具有包含在该乳液的水相内的脂质体悬浮液和形成连续疏水相的油。每个疫苗剂量由 100 微升的上述含有脂质体 (13.2 毫克 DOPC/ 胆固醇)、FP 抗原 (15 微克)、Poly I:C 佐剂 (150 微克)和矿物油载体的乳液组成。此疫苗制剂将称为脂质体 /Poly I:C/ 疏水性载体。

[0250] 此试验的结果显示在图 11 中。1 组小鼠对肿瘤生长具有部分的保护作用,并且在植入后 4 周时形成可测量到的肿瘤。用本发明接种的 2 组小鼠形成显著较小的肿瘤,其仅在 5 周时可检测到 ($p < 0.1$)。对照组中的小鼠以预期的动力学形成肿瘤,在植入后 3 周时开始。

[0251] 这些结果表明,在脂质体 /Poly I:C/ 疏水性载体制剂中配制的肿瘤特异性抗原比当用 Poly I:C/ 疏水性载体配制时更有效地治疗性地处理小鼠中已形成的肿瘤。最佳治疗效应仅当脂质体存在于制剂中时可以实现,这清楚地表明脂质体是本发明的关键组分。

[0252] 实施例 12

[0253] 无病原体的 4-6 周龄雌性 C57BL6 小鼠获自 Charles River Laboratories (St Constant, QC, Canada) 并根据机构指南在滤器控制的空气循环中圈养,水和食物随意。

[0254] 如实施例 11,疫苗制剂中使用的抗原是由与通用 T 辅助表位 PADRE 融合的 HPV16 E7 的 H2-Db 免疫优势表位 (49-57 ;RAHYNIVTF) 组成的融合蛋白。此抗原以后称为 FP,其由 Anaspec Inc. (San Jose, CA) 合成。佐剂为由 13 个 (IC) 重复单位组成的基于 DNA 的聚肌苷 - 胞嘧啶 DNA 分子,并由 Operon MWG (Huntsville, AL, USA) 合成。

[0255] 包含脂质体、基于 DNA 的 Poly I:C 和疏水性载体的本发明的功效在体内使用之前描述的 C3 肿瘤激发模型进行测试。在第 0 天四组小鼠 (每组 $n = 8$) 在侧腹皮下植入表达 HPV16 E7 的肿瘤细胞系 C3 (5×10^5 个细胞 / 小鼠)。在第 5 天时,1-3 组中的小鼠在对侧侧腹皮下接种疫苗。4 组仅接受 PBS,并且用作肿瘤生长对照。使用测径器每周一次测量肿瘤体积以记录最短的直径和最长的直径持续至植入后 5 周。肿瘤体积使用下列的公式计算: 最长测量值 $\times$ (最短测量值)²除以 2。

[0256] 1 组中的小鼠用包含脂质体 / 抗原 / polyIC/ 疏水性载体的疫苗 L 接种。疫苗如实施例 11 中配制。每个剂量体积为 100 微升并且含有脂质体、FP 抗原 (10 微克)、Poly IC (20 微克),并且用矿物油载体乳化。2 组中的小鼠用包含冻干脂质体 / 抗原 / polyIC/ 疏水性载体的疫苗 M 接种。简言之, DOPC 卵磷脂和胆固醇的 10 : 1 (w : w) 均质混合物 (Lipoid

GmbH, Germany) 在 0.5% PEG/ 水中的 200 微克 FP 和 400 微克 polyIC 的存在下水合以形成 1 毫升包封有抗原和佐剂的脂质体。该脂质体制剂通过将材料经过装有两个 400nm 聚碳酸酯膜的手动挤出机 (Avanti, Alabaster, AL, USA) 20 次而挤出。脂质体尺寸使用 Malvern 粒度分析仪 (Worcestershire, United Kingdom) 在 200nm 处进行确认。含有抗原和佐剂的脂质体使用 Virtis Advantage 冻干仪 (SP Industries, Warminster, PA, USA) 冻干。冻干的材料用矿物油载体 (Montanide(TM) ISA 51, Seppic, France) 在油中重建至溶解的脂质体的最初体积。每个剂量体积为 50 微升并含有脂质体 (6.6mg DOPC/ 胆固醇)、FP(10 微克)、poly I:C(20 微克) 和矿物油载体。3 组中的小鼠用如 2 组配制的冻干脂质体 / 抗原 / 疏水性载体接种, 不同之处为不含 poly IC 佐剂 (佐剂对照)。

[0257] 此试验的结果显示在图 12 中。1 组和 2 组小鼠在整个研究时间内均不形成可测量到的肿瘤。用具有 FP 但不含佐剂的冻干脂质体制剂接种的 3 组小鼠在植入后 3 周时开始形成肿瘤。PBS 对照组中的小鼠以预期的动力学形成肿瘤, 在植入后 3 周时开始。

[0258] 这些结果表明, 本发明的疫苗制剂需要 poly IC 佐剂从而在肿瘤激发模型中有效。在此实施例中, 在脂质体 / 疏水性载体或在冻干脂质体 / 疏水性载体制剂中配制的基于 DNA 的 Poly I:C 佐剂形成有效的免疫应答, 以少至一次的免疫获得治疗效应。

[0259] 实施例 13

[0260] 无病原体的 6-8 周龄雌性 BALB/c 小鼠获自 Charles River Laboratories (St Constant, QC, Canada) 并根据机构指南在滤器控制的空气循环中圈养, 水和食物随意。

[0261] 如前面的实施例, H5N1 重组血凝素蛋白购自 Protein Sciences (Meriden, CT, USA), 此重组蛋白对应于 H5N1 流感病毒的表面上的血凝素糖蛋白。此后, 此重组蛋白标注为 rHA, 其用作测试疫苗制剂的功效的模型抗原。rHA 以 1.5 微克 / 50 微升的剂量使用。

[0262] 类似于实施例 7 中所述的方法通过记忆性 CD8 细胞的免疫荧光染色来评价疫苗功效。来自 BALB/c 小鼠的同系脾细胞在 37 摄氏度下用 10 微克 / 毫升脂多糖激活 48 小时, 并且得到的母细胞用 50 微克 / 毫升丝裂霉素 C 在室温下处理 20 分钟。在反复洗涤后, 激活的母细胞用作用于扩充来自接种小鼠的 flu 特异性 CD8 记忆细胞的抗原递呈刺激物细胞。来自原态的或免疫小鼠的脾细胞与母细胞以 5 : 1 的比率培养, 并且用 0.1 微克 / 毫升的 rHA 在 37 摄氏度、5% 二氧化碳下刺激 6 天。收获细胞用于用抗 CD8- 异硫氰酸荧光素 (FITC) (eBioscience, San Diego, CA, USA) 抗体和藻红蛋白 (PE)- 偶联的 Pro5 Flu- 五聚体试剂 (H2-Kd, IYSTVASSL, Proimmune, Oxford, UK) 免疫荧光染色。抗 CD19- 别藻蓝蛋白 (APC) (eBioscience) 也用来排除五聚体与 B 细胞的任何非特异性结合。染色的细胞收集在 FACSCalibur 流式细胞仪 (BD Bioscience, Mississauga, ON, Canada) 上, 并且数据分析使用 WinList 6.0 软件 (Verity Software House, Topsham, ME, USA) 完成。基于前向散射和侧向散射圈出结果, 并且抗原特异性 CD8T 细胞定义为五聚体阳性、CD8 β 阳性和 CD19 阴性。使用 t 检验进行统计学分析。

[0263] 为了配制对应于本发明的疫苗, 使用如实施例 6 和 7 中所述的相同步骤。概括地, 通过将 S100 卵磷脂和胆固醇 (Lipoid GmbH, Germany) 的 10 : 1 (w : w) 均质混合物在磷酸盐缓冲液 (pH 7.0) 中的 rHA 的存在下水合来形成包封 rHA 的脂质体, 接着加入基于 RNA 的 Poly I:C (Pierce, Rockford, IL, USA)。该脂质体悬浮液通过半自动挤出机 (Avestin, Ottawa, ON, Canada) 挤出, 并且将确定尺寸的脂质体冻干 (Virtis Advantage freeze

dryer, SP Industries, Warminster, PA, USA), 在矿物油载体 (Montanide(TM) ISA 51, Seppic, France) 中重建。每个疫苗剂量由 50 微升的含有脂质体、rHA 抗原、Poly I:C 佐剂和矿物油载体的上述制剂组成。此疫苗制剂将称为冻干脂质体 /Poly I:C/ 疏水性载体。

[0264] 上述的冻干脂质体制剂的功效与由 50 微升 50 毫摩尔磷酸盐缓冲液 (pH 7.0) 中的 1.5 微克 rHA 和 100 微克 Imject Alum 佐剂 (Pierce, Rockford, IL, USA) 组成的对照疫苗的功效进行比较。1 组小鼠 (N = 5) 用如上所述配制在 50 微升冻干脂质体 /Poly I:C/ 疏水性载体中的 1.5 微克 rHA 抗原和 12.5 微克的 Poly I:C 佐剂肌内注射 1 次 (无加强免疫)。此疫苗对应于实施例 6 和 7 中使用的相同疫苗 (疫苗 D, 本发明)。2 组小鼠 (N = 5) 用由悬浮在 50 毫摩尔磷酸盐缓冲液中的 1.5 微克 rHA 和 100 微克明矾佐剂组成的对照疫苗接种两次 (第 0 天和第 28 天)。在接种后 21 周时将动物通过二氧化碳诱导的窒息处死, 收集脾脏并且使用标准步骤制备单独的单细胞悬液。然后使用上述的 flu 五聚体免疫荧光染色评价 flu 特异性 CD8 记忆 T 细胞的存在。

[0265] 用对照的基于明矾的制剂接种的小鼠产生小的抗原特异性 CD8 记忆 T 细胞群体, 平均群体大小为 0.02% 并且被认为是本底 (标准差 0.02%)。在另一组中用对应于本发明的冻干脂质体 /Poly I:C/ 疏水性载体制剂接种的小鼠产生显著较高群体的抗原特异性 CD8 记忆 T 细胞 ($P \leq 0.02$), 平均群体大小为 0.51% (标准差 0.10%)。这些结果是显著的, 因为它们证明含有 Poly I:C 佐剂的单剂量冻干脂质体 /疏水性载体制剂产生大的、持久的、抗原特异性 CD8 记忆 T 细胞群, 而即使在两次免疫后水性 /明矾对照疫苗也不能产生任何显著的和持久的细胞应答。

[0266] 参考文献

[0267] Yoneyama M, Kikuchi M, Natsukawa T, Shinobu N, Imaizumi T, Miyagishi M, Taira K, Akira S, Fujita T. 2004. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol* 5(7): 730-7.

[0268] Dong LW, Kong XN, Yan HX, Yu LX, Chen L, Yang W, Liu Q, Huang DD, Wu MC, Wang HY. 2008. Signal regulatory protein alpha negatively regulates both TLR3 and cytoplasmic pathways in type I interferon induction. *Mol Immunol* 45(11): 3025-35. Epub 2008 May 8.

[0269] Trumpfheller C, Caskey M, Nchinda G, Longhi MP, Mizenina O, Huang Y, Schlesinger SJ, Colonna M, Steinman RM. 2008. The microbial mimic poly IC induces durable and protective CD4+ T cell immunity together with a dendritic cell targeted vaccine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008 Feb 19; 105(7): 2574-9.

[0270] Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. 2001. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 413(6857): 732-8.

[0271] Chirigos MA, Schlick E, Ruffmann R, Budzynski W, Sinibaldi P, Gruys E. 1985. *J Biol Response Mod* 4(6): 621-7. Pharmacokinetic and therapeutic activity of polyinosinic-polycytidylic acid stabilized with poly-L-lysine in carboxymethylcellulose [poly(I, C)-LC].

- [0272] Gowen BB, Wong MH, Jung KH, Sanders AB, Mitchell WM, Alexopoulou L, Flavell RA, Sidwell RW. 2007. TLR3 is essential for the induction of protective immunity against Punta Toro Virus infection by the double-stranded RNA (dsRNA), poly(I:C12U), but not Poly(I:C): differential recognition of synthetic dsRNA molecules. *J Immunol* 178(8):5200-8.
- [0273] Padalko E, Nuyens D, De Palma A, Verbeken E, Aerts JL, De Clercq E, Carmeliet P, Neyts J. 2004. The interferon inducer ampligen[poly(I)-poly(C12U)] markedly protects mice against coxsackie B3 virus-induced myocarditis. *Antimicrob Agents Chemother* 48(1):267-74.
- Nordlund J J, Wolff SM, Levy HB. 1970. Inhibition of biologic activity of poly I:poly C by human plasma. *Proc Soc Exp Biol Med* 133(2):439-44.
- [0274] Agger EM, Rosenkrands I, Olsen AW, Hatch G, Williams A, Kritsch C, Lingnau K, von Gabain A, Andersen CS, Korsholm KS, Andersen P. 2006. Protective immunity to tuberculosis with Ag85B-ESAT-6 in a synthetic cationic adjuvant system IC31. *Vaccine* 24(26):5452-60.
- [0275] Schellack C, Prinz K, Egyed A, Fritz JH, Wittmann B, Ginzler M, Swatosch G, Zauner W, Kast C, Akira S, von Gabain A, Buschle M, Lingnau K. 2006. IC31, a novel adjuvant signaling via TLR9, induces potent cellular and humoral immune responses. *Vaccine* 24(26):5461-72.
- [0276] Llopiz D, Dotor J, Zabaleta A, Lasarte JJ, Prieto J, Borrás-Cuesta F, Sarobe P. 2008. Combined immunization with adjuvant molecules poly(I:C) and anti-CD40 plus a tumor antigen has potent prophylactic and therapeutic antitumor effects. *Cancer Immunol Immunother* 57(1):19-29.
- [0277] Riedl K, Riedl R, von Gabain A, Nagy E, Lingnau K. 2008. The novel adjuvant IC31((R)) strongly improves influenza vaccine-specific cellular and humoral immune responses in young adult and aged mice. *Vaccine* 2008 May 5 epub.
- [0278] Levy HB. 1985. *J Biol Response Mod* 4(5):475-80. Historical overview of the use of polynucleotides in cancer.
- [0279] Ichinohe T, Tamura S, Kawaguchi A, Ninomiya A, Imai M, Itamura S, Odagiri T, Tashiro M, Takahashi H, Sawa H, Mitchell WM, Strayer DR, Carter WA, Chiba J, Kurata T, Sata T, Hasegawa H. 2007. Cross-protection against H5N1 influenza virus infection is afforded by intranasal inoculation with seasonal trivalent inactivated influenza vaccine. *J Infect Dis* 196(9):1313-20.
- [0280] Sloat BR, Shaker DS, Le UM, Cui Z. 2008. Nasal immunization with the mixture of PA63, LF, and a PGA conjugate induced strong antibody responses against all three antigens. *FEMS Immunol Med Microbiol* 52(2):169-79.
- [0281] Salem ML, EI-Naggar SA, Kadima A, Gillanders WE, Cole DJ. 2006. The adjuvant effects of the toll-like receptor 3 ligand polyinosinic-cytidylic acid poly(I:C) on antigen-specific CD8⁺ T cell responses are partially dependent on

NK cells with the induction of a beneficial cytokine milieu. *Vaccine* 24(24) : 5119-32.

[0282] Kamath AT, Valenti MP, Rochat AF, Agger EM, Lingnau K, von Gabain A, Andersen P, Lambert PH, Siegrist CA. 2008. Protective anti-mycobacterial T cell responses through exquisite in vivo activation of vaccine-targeted dendritic cells. *Eur J Immunol*. 38(5) :1247-56.

[0283] Cui Z, Qiu F. 2006. Synthetic double-stranded RNA poly(I:C) as a potent peptide vaccine adjuvant: therapeutic activity against human cervical cancer in a rodent model. *Cancer Immunol Immunother* 55(10) :1267-79.

[0284] Salem ML, Kadima AN, Cole DJ, Gillanders WE. 2005. Defining the antigen-specific T-cell response to vaccination and poly(I:C)/TLR3 signaling: evidence of enhanced primary and memory CD8 T-cell responses and antitumor immunity. *J Immunother*. 28(3) :220-8.

[0285] Fujimura T, Nakagawa S, Ohtani T, Ito Y, Aiba S. 2006. Inhibitory effect of the polyinosinic-polycytidylic acid/cationic liposome on the progression of murine B16F10 melanoma. *Eur J Immunol* 36(12) :3371-80.

[0286] Krown SE, Kerr D, Stewart WE 2nd, Field AK, Oettgen HF. 1985. Phase I trials of poly(I, C) complexes in advanced cancer. *J Biol Response Mod* 1985 Dec ;4(6) : 640-9.

[0287] Zhu X, Nishimura F, Sasaki K, Fujita M, Dusak JE, Eguchi J, Fellows-Mayle W, Storkus WJ, Walker PR, Salazar AM, Okada H. 2007. Toll like receptor-3 ligand poly-ICLC promotes the efficacy of peripheral vaccinations with tumor antigen-derived peptide epitopes in murine CNS tumor models. *J Transl Med*. 12 :10.

[0288] de Clercq E, Torrence PF, Stollar BD, Hobbs J, Fukui T, Kakiuchi N, Ikehara M. 1978. Interferon induction by a 2'-azido-2'-deoxyinosinic acid). polycytidylic acid. *Eur J Biochem*. 88(2) :341-9.

[0289] Bobst AM, Langemeier PW, Torrence PF, De Clercq E. 1981. Interferon induction by poly(inosinic acid). poly(cytidylic acid) segmented by spin-labels. *Biochemistry* 20(16) :4798-803.

[0290] De Clercq E, Hattori M, Ikehara M. 1975. Antiviral activity of polynucleotides: copolymers of inosinic acid and N2-dimethylguanylic of 2-methylthioinosinic acid. *Nucleic Acids Res* 1975 2(1) :121-9.

[0291] Guschlbauer W, Blandin M, Drocourt JL, Thang MN. 1977. Poly-2'-deoxy-2'-fluoro-cytidylic acid: enzymatic synthesis, spectroscopic characterization and interaction with poly-inosinic acid. *Nucleic Acids Res* 4(6) :1933-43.

[0292] Fukui T, Kakiuchi N, Ikehara M. Polynucleotides. 1977. XLV Synthesis and properties of poly(2'-azido-2'-deoxyinosinic acid). *Nucleic Acids Res*. 4(8) : 2629-39.

- [0293] Johnston ML, Stollar BD, Torrence PF, Witkop B. 1975. Structural features of double-stranded polyribonucleotides required for immunological specificity and interferon induction. *Proc Natl Acad Sci USA*. 72(11) :4564-8.
- [0294] Kende M, Lupton HW, Rill WL, Gibbs P, Levy HB, Canonico PG. 1987. Ranking of prophylactic efficacy of poly(ICLC) against Rift Valley fever virus infection in mice by incremental relative risk of death. *Antimicrob Agents Chemother*. 31(8) : 1194-8.
- [0295] Poast J, Seidel HM, Hendricks MD, Haslam JA, Levy HB, Baron S. 2002. Poly I:CLC induction of the interferon system in mice: an initial study of four detection methods. *J Interferon Cytokine Res* 22(10) :1035-40.
- [0296] Sarma PS, Shiu G, Neubauer RH, Baron S, Huebner RJ. 1969. *Proc Natl Acad Sci U S A* 62(4) :1046-51. Virus-induced sarcoma of mice: inhibition by a synthetic polyribonucleotide complex.
- [0297] Stephen EL, Sammons ML, Pannier WL, Baron S, Spertzel RO, Levy HB. 1977. Effect of a nuclease-resistant derivative of polyribonucleosinic-polyribocytidylic acid complex on yellow fever in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *J Infect Dis* 136(1) :122-6.
- [0298] Levy HB, Lvovsky E. 1978. Topical treatment of vaccinia virus infection with an interferon inducer in rabbits. *J Infect Dis*. 137(1) :78-81.
- [0299] Durie BG, Levy HB, Voakes J, Jett JR, Levine AS. 1985. Poly(I, C)-LC as an interferon inducer in refractory multiple myeloma. *J Biol Response Mod*. 4(5) : 518-24.
- [0300] Salazar AM, Levy HB, Ondra S, Kende M, Scherokman B, Brown D, Mena H, Martin N, Schwab K, Donovan D, Dougherty D, Pulliam M, Ippolito M, Graves M, Brown H, Ommaya A. 1996. Long-term treatment of malignant gliomas with intramuscularly administered polyinosinic-polycytidylic acid stabilized with polylysine and carboxymethylcellulose: an open pilot study. *Neurosurgery* 38(6) :1096-103; discussion 1103-4.
- [0301] Theriault RL, Hortobagyi GN, Buzdar AU, Levy HB, Hersh EM. 1986. Evaluation of polyinosinic-polycytidylic and poly-L-lysine in metastatic breast cancer. *Cancer Treat Rep*. 70(11) :1341-2.
- [0302] Nakamura O, Shitara N, Matsutani M, Takakura K, Machida H. 1982. Phase I-II trials of poly(ICLC) in malignant brain tumor patients. *J Interferon Res* 2(1) : 1-4.
- [0303] Bever CT Jr, Salazar AM, Neely E, Ferraraccio BE, Rose JW, McFarland HF, Levy HB, McFarlin DE. 1986. Preliminary trial of poly ICLC in chronic progressive multiple sclerosis. *Neurology* 36(4) :494-8.
- [0304] Talmadge JE, Adams J, Phillips H, Collins M, Lenz B, Schneider M, Chirigos M. 1985. Immunotherapeutic potential in murine tumor models

of polyinosinic-polycytidylic acid and poly-L-lysine solubilized by carboxymethylcellulose. *Cancer Res* 45(3):1066-72.

[0305] Droller MJ. 1987. Immunotherapy of metastatic renal cell carcinoma with polyinosinic-polycytidylic acid. *J Urol*. 137(2):202-6.

[0306] Awasthi A, Mehrotra S, Bhakuni V, Dutta GP, Levy HB, Maheshwari RK. 1997. Poly ICLC enhances the antimalarial activity of chloroquine against multidrug-resistant *Plasmodium yoelii nigeriensis* in mice. *J Interferon Cytokine Res*. 17(7):419-23.

[0307] Puri SK, Dutta GP, Levy HB, Maheshwari RK. 1996. Poly ICLC inhibits *Plasmodium cynomolgi* B malaria infection in rhesus monkeys. *J Interferon Cytokine Res*. 16(1):49-52.

[0308] Houston WE, Crabbs CL, Stephen EL, Levy HB. 1976. Modified polyriboinosinic-polycytidylic acid, an immunological adjuvant. *Infect Immun* 14(1):318-9.

[0309] Stephen EL, Hilmas DE, Mangiafico JA, Levy HB. 1977. Swine influenza virus vaccine: potentiation of antibody responses in rhesus monkeys. *Science* 197(4310):1289-90.

[0310] Zaks K, Jordan M, Guth A, Sellins K, Kedl R, Izzo A, Bosio C, Dow S. 2006. Efficient immunization and cross-priming by vaccine adjuvants containing TLR3 or TLR9 agonists complexed to cationic liposomes. *J Immunol* 176(12):7335-45.

[0311] Hendrix CW, Margolick JB, Petty BG, Markham RB, Nerhood L, Farzadegan H, Ts'o PO, Lietman PS. 1993. Biologic effects after a single dose of poly(I):poly(C 12U) in healthy volunteers. *Antimicrob Agents Chemother*. 37(3):429-35.

[0312] Greene JJ, Alderfer JL, Tazawa I, Tazawa S, Ts'o PO, Malley JA, Carter WA. 1978. Interferon induction and its dependence on the primary and secondary structure of poly(inosinic acid).poly(cytidylic acid). *Biochemistry* 17(20):4214-20.

[0313] 本说明书中引用的所有出版物和专利申请在此通过引用并入,如同具体并单独地指出每个单独的出版物或专利申请通过引用并入。对任何出版物的引用是用于其在本申请日之前的公开,并且不应解释为承认由于在先发明,本发明无权先于此出版物而获得授权。

[0314] 如本说明书和所附权利要求所用,单数形式“一”(“a”、“an”)和“该/所述”(“the”)包含复数指代物,除非上下文另外明确指出。除非另有定义,本文所用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域普通技术人员通常理解的含义相同的含义。

[0315] 尽管先前发明已通过图示和实施例的方式进行某些详述以便于清楚的理解,但是根据本发明的教导对本领域普通技术人员显而易见的是,可以对其进行某些改变和修改而不偏离所附权利要求的精神或范围。

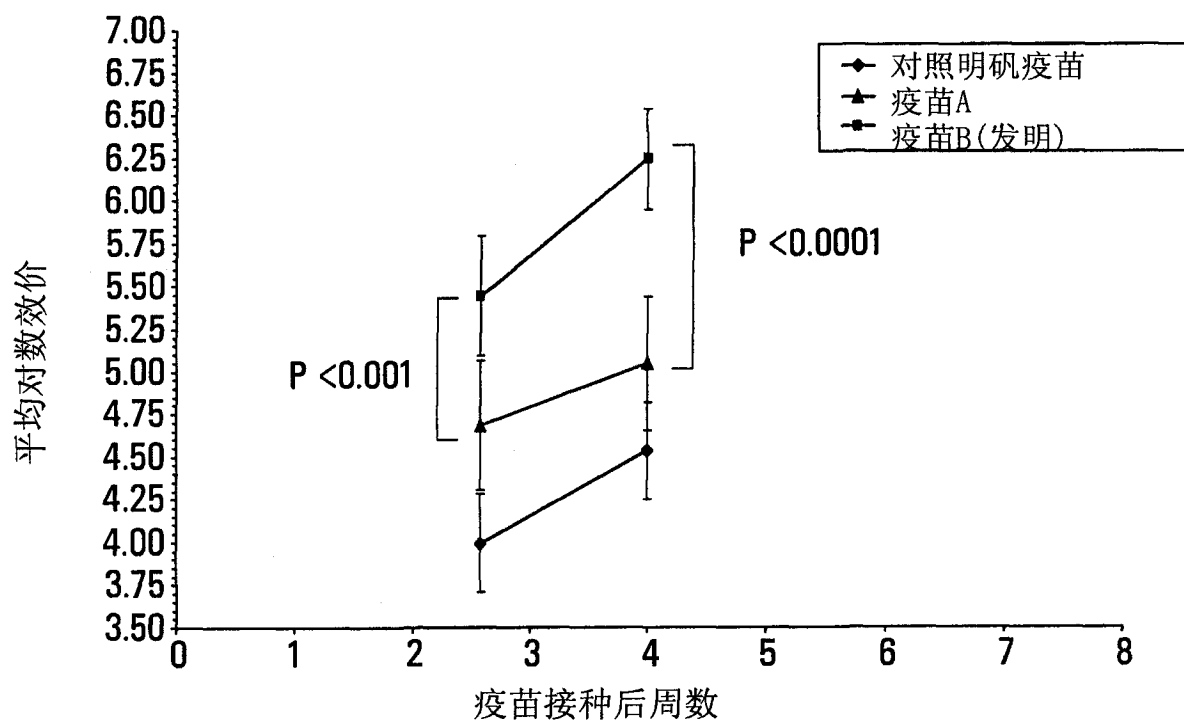


图 1

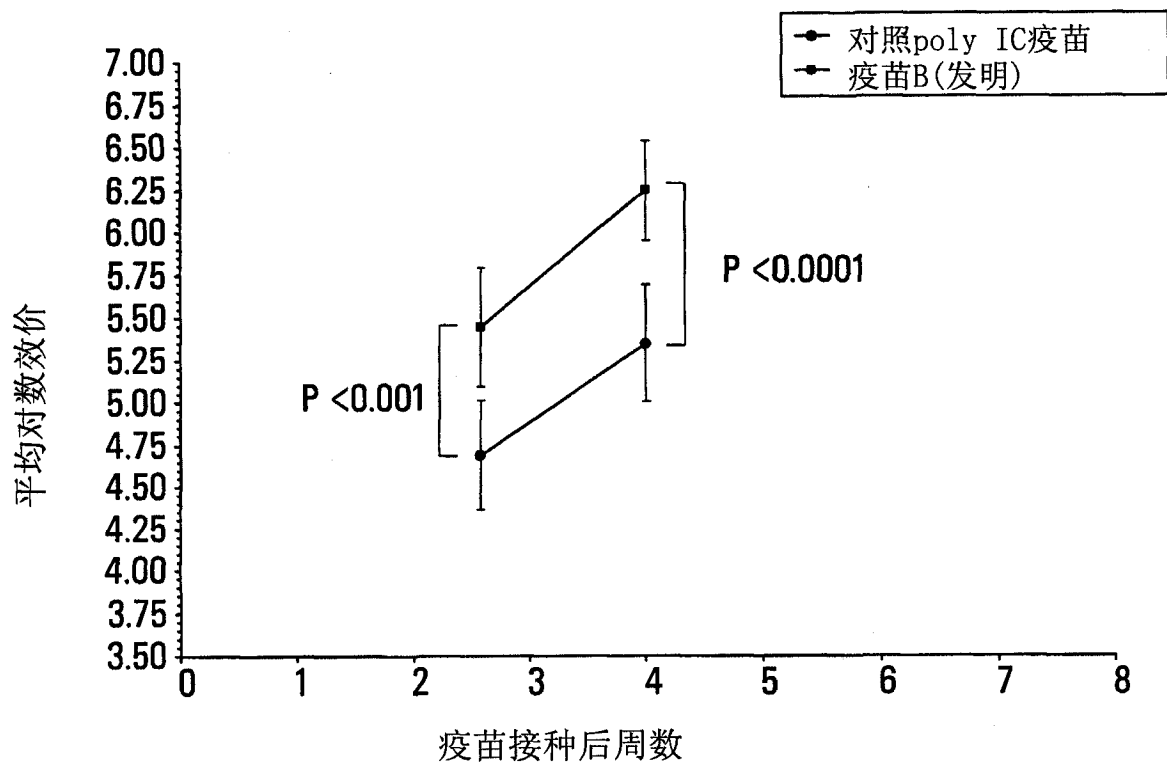


图 2

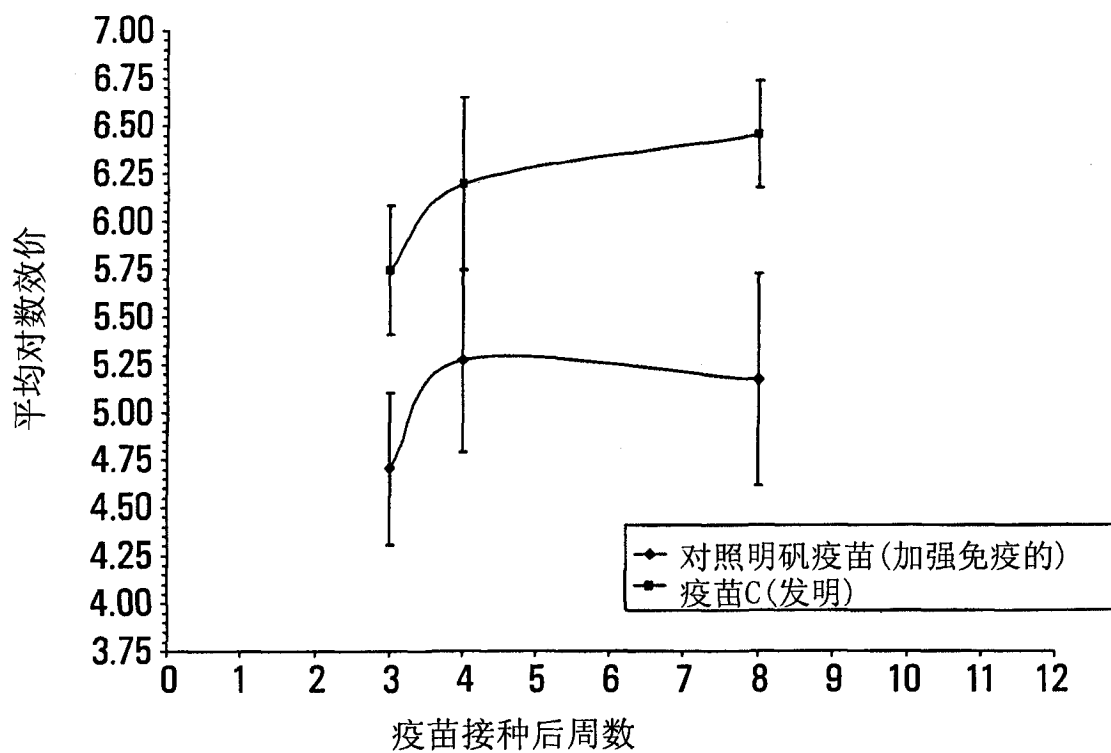


图 3

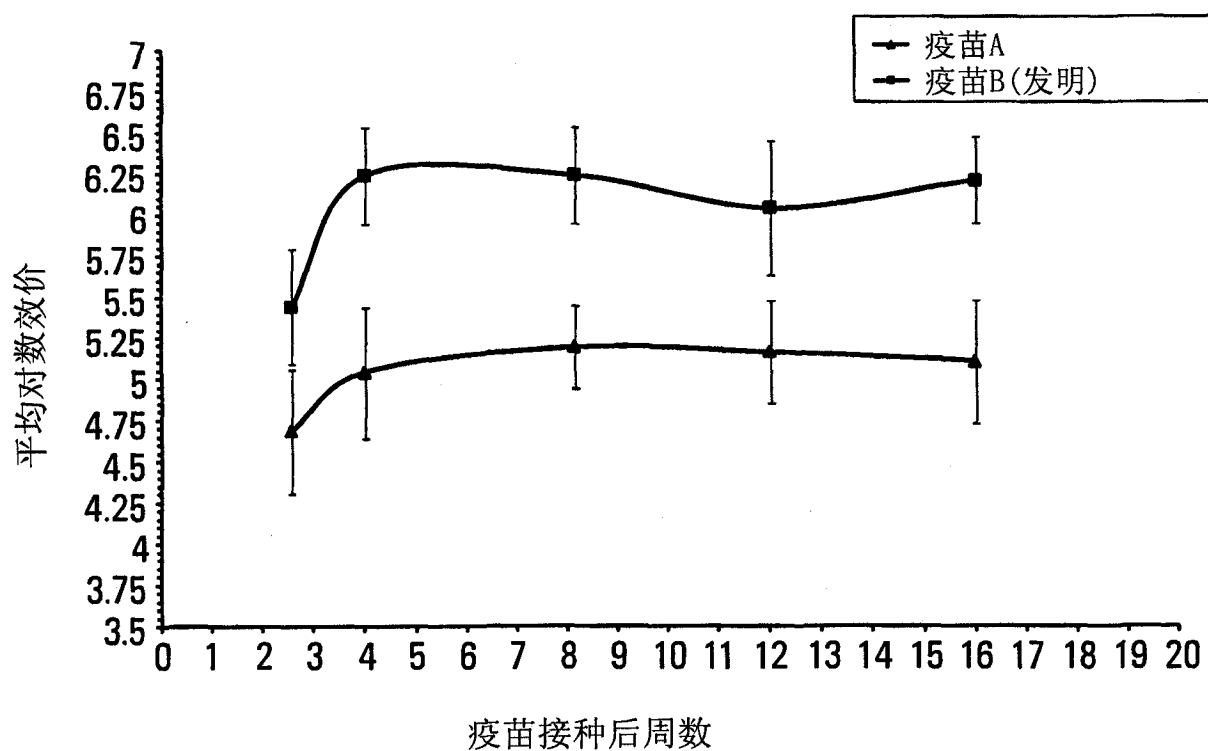


图 4

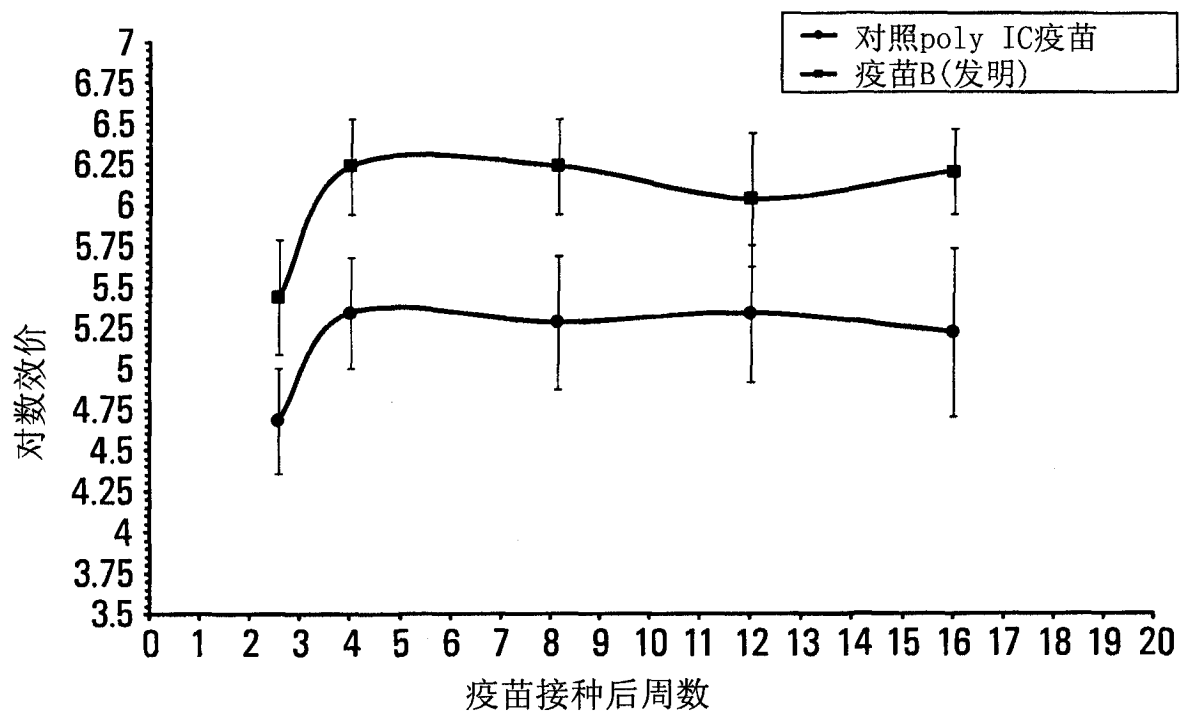


图 5

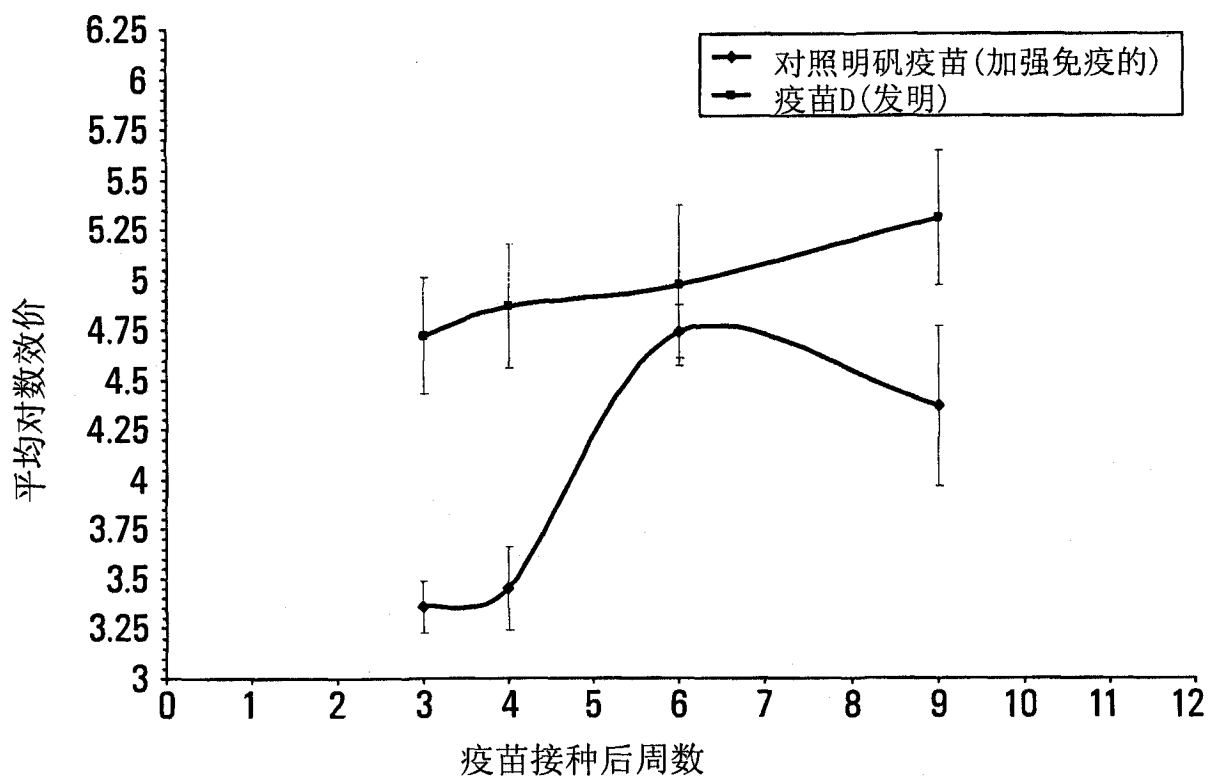


图 6

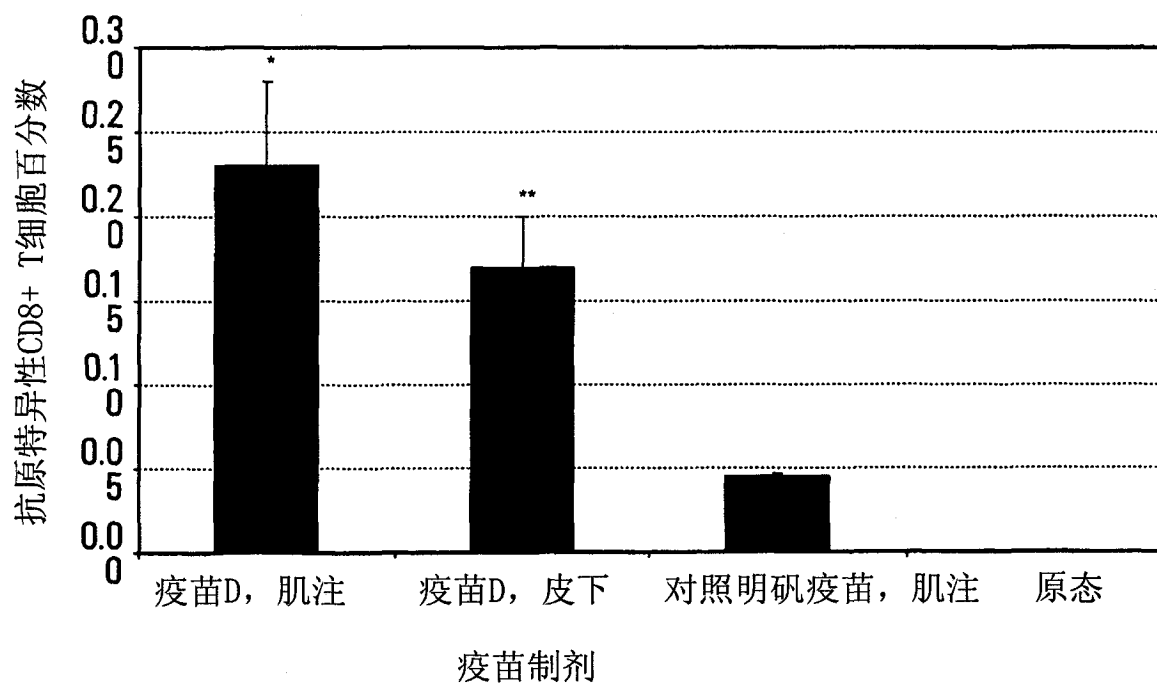


图 7

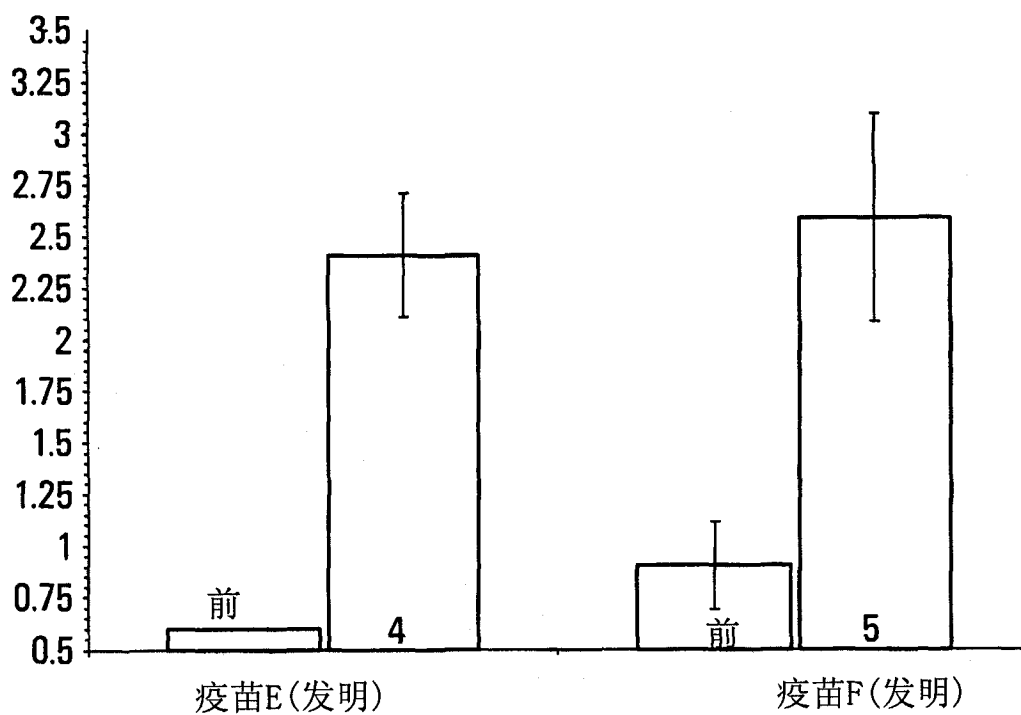


图 8

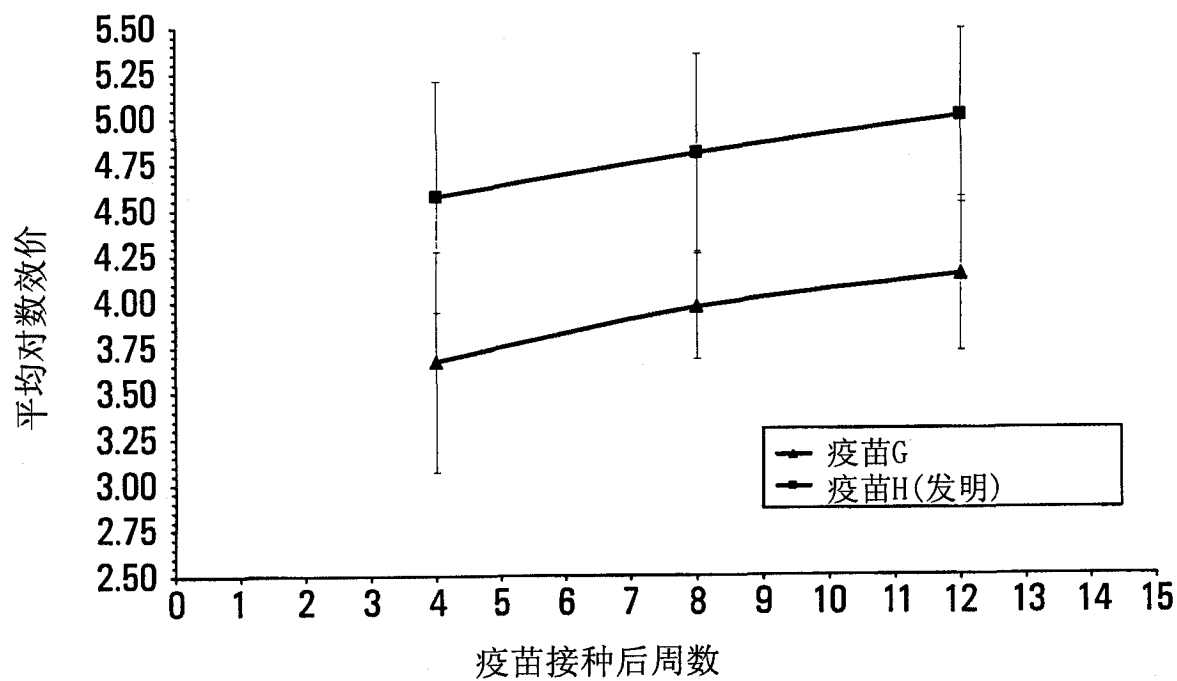


图 9

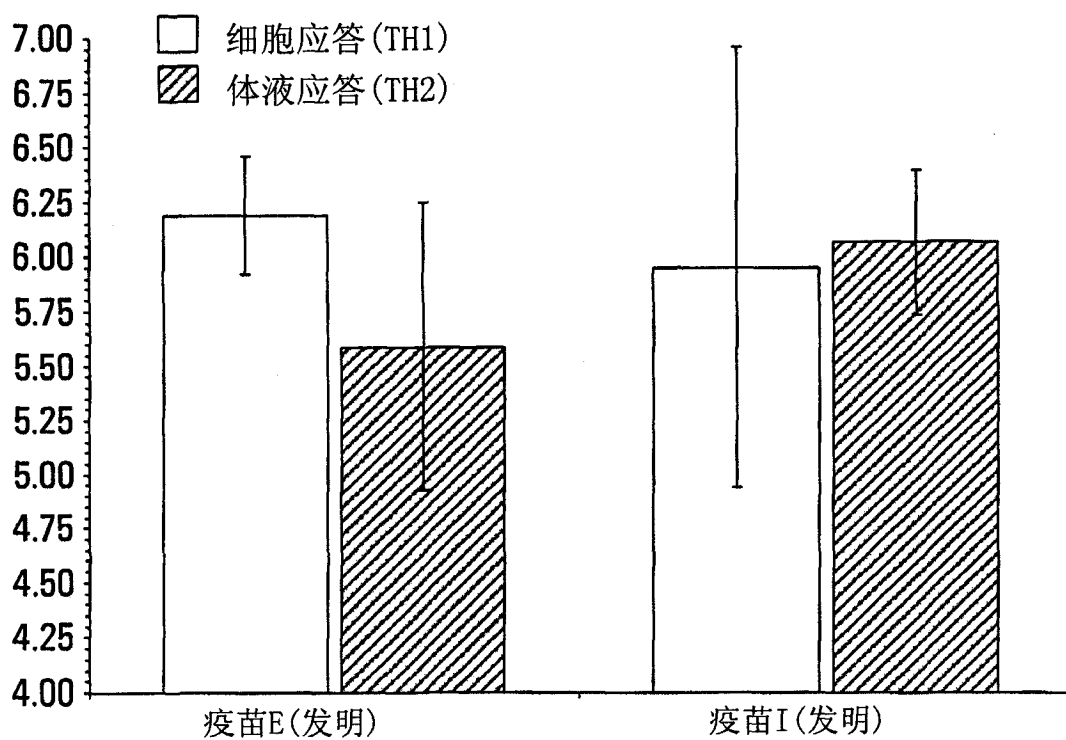


图 10

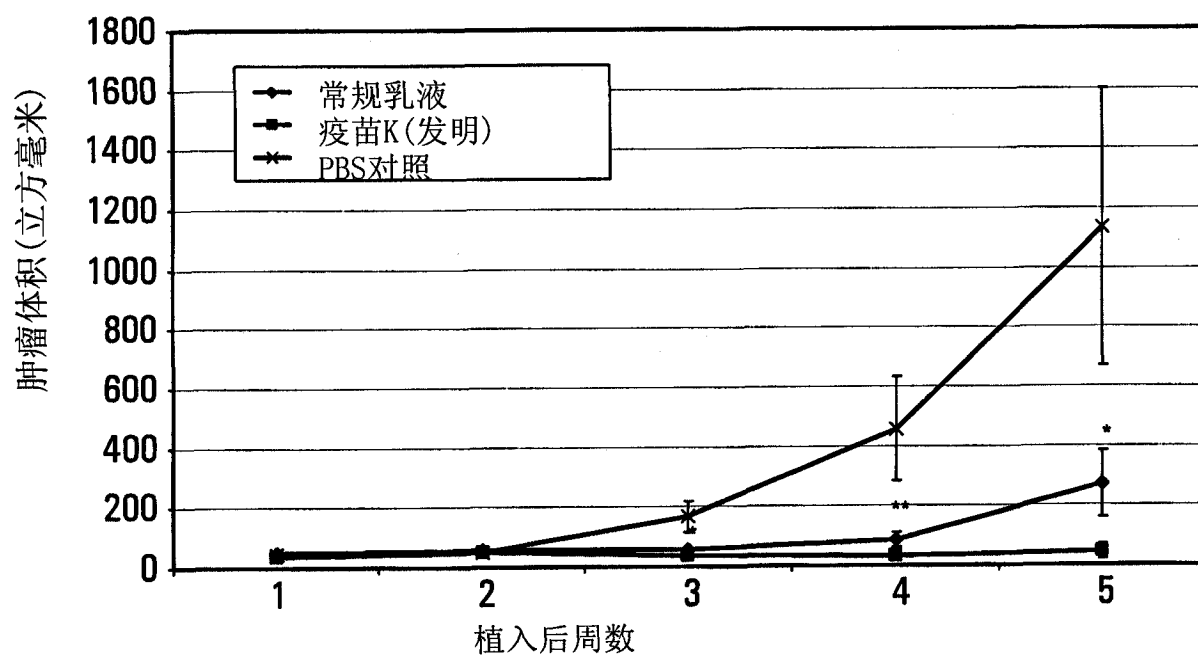


图 11

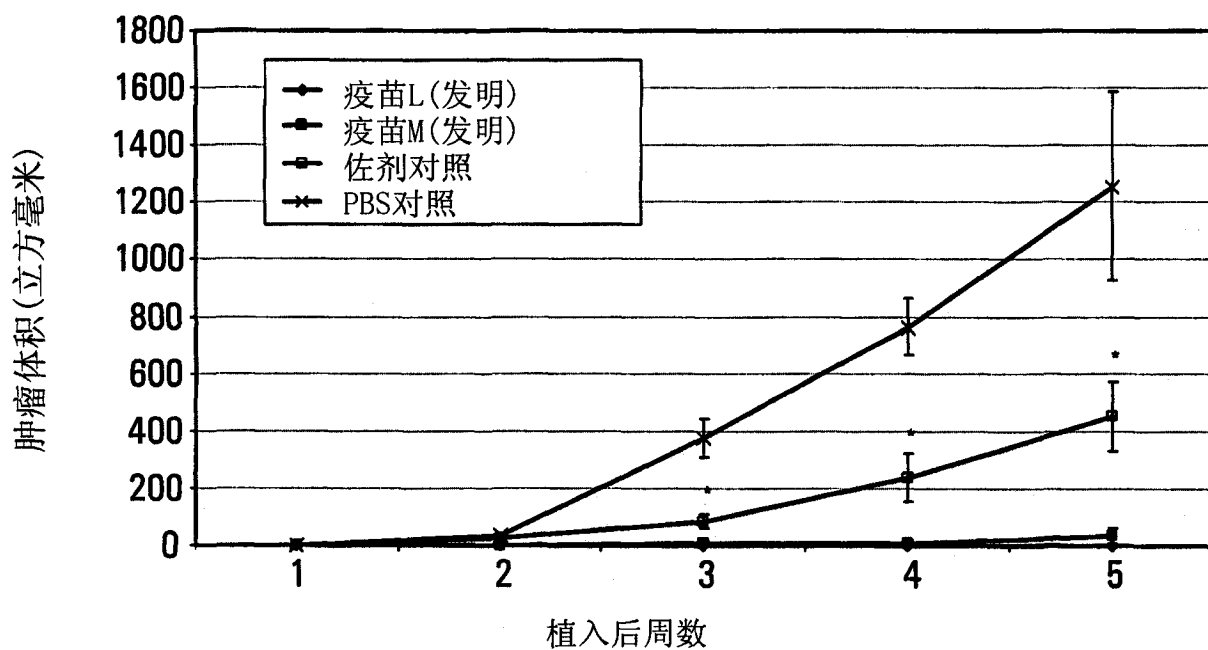


图 12

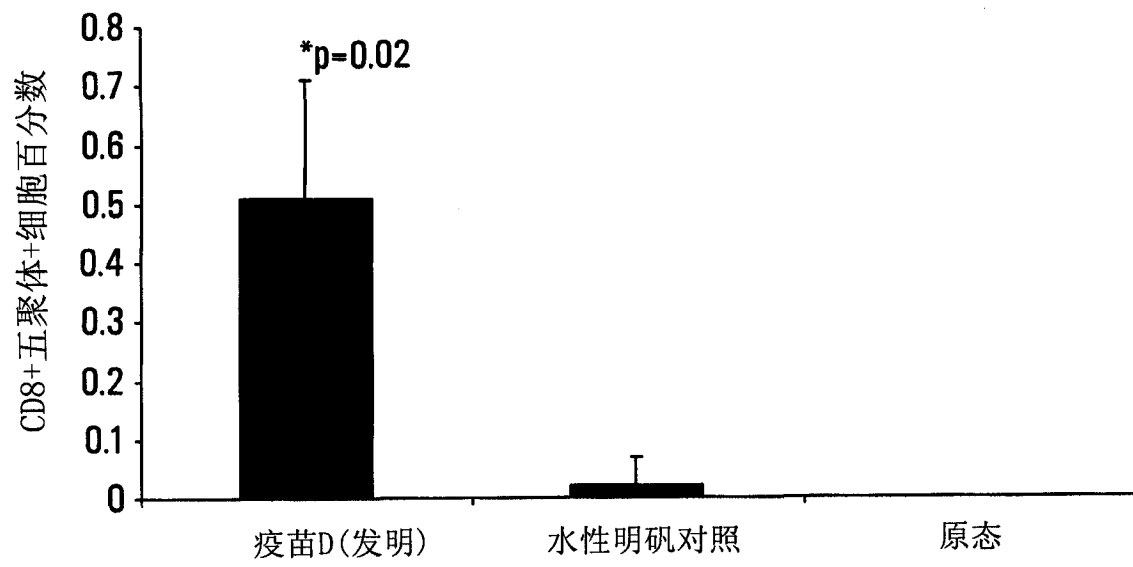


图 13