

(19) 中华人民共和国国家知识产权局



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103491957 A

(43) 申请公布日 2014.01.01

(21) 申请号 201280020302.4

(72) 发明人 克里斯托弗·弗雷泽 岸本·隆·慧

(22) 申请日 2012.04.27

罗伯托·A·马尔多纳多

(30) 优先权数据

61/480,946 2011.04.29 US

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

61/513,514 2011.07.29 US

代理人 彭鲲鹏 郑斌

61/531,153 2011.09.06 US

(51) Int. Cl.

61/531,180 2011.09.06 US

A61K 31/445(2006.01)

61/531,215 2011.09.06 US

A61K 39/38(2006.01)

61/531,209 2011.09.06 US

A61K 39/395(2006.01)

61/531,147 2011.09.06 US

A61K 9/16(2006.01)

61/531,204 2011.09.06 US

A61K 9/14(2006.01)

61/531,168 2011.09.06 US

A61K 47/48(2006.01)

61/531,175 2011.09.06 US

A61K 47/30(2006.01)

61/531,194 2011.09.06 US

61/531,164 2011.09.06 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2013.10.25

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2012/035366 2012.04.27

(87) PCT国际申请的公布数据

W02012/149255 EN 2012.11.01

(71) 申请人 西莱克塔生物科技公司

权利要求书8页 说明书62页 附图4页

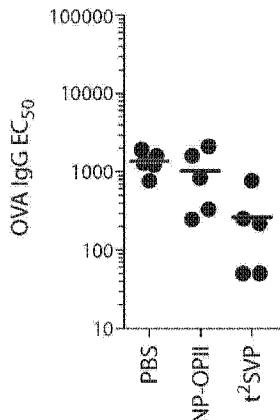
(54) 发明名称

用于降低针对治疗性蛋白的免疫应答的致耐受性合成纳米载体

(57) 摘要

在此披露了包含治疗性蛋白 APC 可呈递抗原和免疫抑制剂的合成纳米载体组合物、以及相关的方法，这些治疗性蛋白 APC 可呈递抗原和免疫抑制剂提供了对治疗性蛋白特异的致耐受性免疫应答。

CN 103491957 A



1. 一种组合物，包含：
 - (i) 第一群体的合成纳米载体，这些第一群体的合成纳米载体与免疫抑制剂偶联，和
 - (ii) 第二群体的合成纳米载体，这些第二群体的合成纳米载体与治疗性蛋白 APC 可呈递抗原偶联。
2. 如权利要求 1 所述的组合物，其中该第一群体和第二群体是相同的。
3. 如权利要求 1 或 2 所述的组合物，其中这些免疫抑制剂包括一种抑制素、一种 mTOR 抑制剂、一种 TGF- β 信号剂、一种皮质类固醇、一种线粒体功能抑制剂、一种 P38 抑制剂、一种 NF- κ β 抑制剂、一种腺苷受体激动剂、一种前列腺素 E2 激动剂、一种磷酸二酯酶 4 抑制剂、一种 HDAC 抑制剂、或一种蛋白酶体抑制剂。
4. 如权利要求 4 所述的组合物，其中该 mTOR 抑制剂是雷帕霉素。
5. 如权利要求 1-4 中任一项所述的组合物，其中这些治疗性蛋白 APC 可呈递抗原包含一种治疗性蛋白的 MHC I 类限制性和 / 或 MHC II 类限制性表位。
6. 如权利要求 5 所述的组合物，其中这些治疗性蛋白 APC 可呈递抗原包含一种治疗性蛋白的 MHC II 类限制性表位。
7. 如权利要求 1-6 中任一项所述的组合物，其中这些治疗性蛋白 APC 可呈递抗原包含一种治疗性蛋白的 B 细胞表位。
8. 如权利要求 1-6 中任一项所述的组合物，其中这些治疗性蛋白 APC 可呈递抗原基本上不包含治疗性蛋白的 B 细胞表位。
9. 如权利要求 1-8 中任一项所述的组合物，其中这些治疗性蛋白 APC 可呈递抗原包括一种用于蛋白质替代或蛋白质补充疗法的治疗性蛋白、或其片段。
10. 如权利要求 1-9 中任一项所述的组合物，其中这些治疗性蛋白 APC 可呈递抗原包括一种可输注或可注射的治疗性蛋白、酶、酶辅助因子、激素、血液或凝血因子、细胞因子、干扰素、生长因子、单克隆抗体、多克隆抗体、或与庞贝氏病相关的蛋白质、或其片段。
11. 如权利要求 10 所述的组合物，其中该可输注或可注射的治疗性蛋白包括托珠单抗 (Tocilizumab)、 α -1 抗胰蛋白酶、Hematide、白蛋白干扰素 α -2b、Rhucin、替莫瑞林 (tesamorelin)、奥瑞珠单抗 (ocrelizumab)、贝利木单抗 (belimumab)、聚乙二醇重组尿酸酶 (pegloticase)、 α -他利昔酶 (taliglucerase alfa)、阿加糖酶 α (agalsidase alfa)、或葡糖脑苷脂酶 α (velaglucerase alfa)。
12. 如权利要求 10 所述的组合物，其中该酶包括氧化还原酶、转移酶、水解酶、裂解酶、异构酶或连接酶。
13. 如权利要求 10 所述的组合物，其中酶包括用于针对溶酶体贮积症的酶替代疗法的酶。
14. 如权利要求 13 所述的组合物，其中用于针对溶酶体贮积症的酶替代疗法的酶包括伊米昔酶 (imiglucerase)、 α -半乳糖苷酶 A (α -gal A)、阿加糖酶 β 、酸性 α -葡萄糖苷酶 (GAA)、阿葡糖苷酶 α 、LUMIZYME、MYOZYME、芳基硫酸酯酶 B、拉罗尼酶 (laronidase)、ALDURAZYME、艾度硫酸酯酶 (idursulfase)、ELAPRASE、芳基硫酸酯酶 B 或 NAGLAZYME。
15. 如权利要求 10 所述的组合物，其中该细胞因子包括一种淋巴因子、白细胞介素、趋化因子、1 型细胞因子、或一种 2 型细胞因子。
16. 如权利要求 10 所述的组合物，其中该血液和凝血因子包括因子 I、因子 II、组织因

子、因子 V、因子 VII、因子 VIII、因子 IX、因子 X、因子 Xa、因子 XII、因子 XIII、血管性血友病因子、前激肽释放酶、高分子量激肽原、纤连蛋白、抗凝血酶 III、肝素辅助因子 II、蛋白 C、蛋白 S、蛋白 Z、蛋白 Z 相关蛋白酶抑制剂 (ZPI)、血纤溶酶原、 α 2-抗纤维蛋白溶酶、组织型纤溶酶原激活物 (tPA)、尿激酶、纤溶酶原激活物抑制剂 -1 (PAI1)、纤溶酶原激活物抑制剂 -2 (PAI2)、癌性促凝物质、或阿法依伯汀。

17. 如权利要求 1-16 中任一项所述的组合物，其中该组合物处于有效产生针对该治疗性蛋白 APC 可呈递抗原的一种致耐受性免疫应答的量。

18. 如权利要求 1-17 中任一项所述的组合物，其中当向受试者给予时，该组合物处于有效降低治疗性蛋白特异性抗体的产生和 / 或 CD4+T 细胞增殖和 / 或活性和 / 或 B 细胞增殖和 / 或活性的量。

19. 如权利要求 1-18 中任一项所述的组合物，其中平均在这些第一和 / 或第二群体的合成纳米载体上的该免疫抑制剂和 / 或治疗性蛋白 APC 可呈递抗原的负载是在 0.0001% 与 50% 之间。

20. 如权利要求 19 所述的组合物，其中平均在这些第一和 / 或第二群体的合成纳米载体上的该免疫抑制剂和 / 或治疗性蛋白 APC 可呈递抗原的负载是在 0.1% 与 10% 之间。

21. 如权利要求 1-20 中任一项所述的组合物，其中该第一群体和 / 或第二群体的这些合成纳米载体包括脂质纳米颗粒、聚合物纳米颗粒、金属纳米颗粒、基于表面活性剂的乳液、树枝状化合物、巴基球、纳米线、病毒样颗粒、或肽或蛋白质颗粒。

22. 如权利要求 21 所述的组合物，其中该第一和 / 或第二群体的这些合成纳米载体包括脂质纳米颗粒。

23. 如权利要求 22 所述的组合物，其中该第一和 / 或第二群体的这些合成纳米载体包括脂质体。

24. 如权利要求 21 所述的组合物，其中该第一和 / 或第二群体的这些合成纳米载体包括金属纳米颗粒。

25. 如权利要求 24 所述的组合物，其中这些金属纳米颗粒包括金纳米颗粒。

26. 如权利要求 21 所述的组合物，其中该第一和 / 或第二群体的这些合成纳米载体包括聚合物纳米颗粒。

27. 如权利要求 26 所述的组合物，其中该聚合物纳米颗粒包括聚合物，该聚合物是一种非甲氧基封端的普朗尼克聚合物。

28. 如权利要求 26 或 27 所述的组合物，其中这些聚合物纳米颗粒包括聚酯、与聚醚偶联的聚酯、聚氨基酸、聚碳酸酯、聚缩醛、聚缩酮、多糖、聚乙基噁唑啉、或聚乙烯亚胺。

29. 如权利要求 28 所述的组合物，其中该聚酯包含一种聚 (乳酸)、聚 (乙醇酸)、聚 (乳酸 - 乙醇酸) 共聚物、或聚己酸内酯。

30. 如权利要求 28 或 29 所述的组合物，其中这些聚合物纳米颗粒包括聚酯以及与聚醚偶联的聚酯。

31. 如权利要求 28-30 中任一项所述的组合物，其中该聚醚包括聚乙二醇或聚丙二醇。

32. 如权利要求 1-31 中任一项所述的组合物，其中使用对该第一和 / 或第二群体的这些合成纳米载体进行的动态光散射而获得的粒度分布的平均值是大于 100nm 的直径。

33. 如权利要求 32 所述的组合物，其中该直径大于 150nm。

34. 如权利要求 33 所述的组合物,其中该直径大于 200nm。
35. 如权利要求 34 所述的组合物,其中该直径大于 250nm。
36. 如权利要求 35 所述的组合物,其中该直径大于 300nm。
37. 如权利要求 1-36 中任一项所述的组合物,其中该第一群体和 / 或第二群体的这些合成纳米载体的长宽比大于 1 :1、1 :1.2、1 :1.5、1 :2、1 :3、1 :5、1 :7 或 1 :10。
38. 如权利要求 1-37 中任一项所述的组合物,其中该组合物进一步包含一种药学上可接受的赋形剂。
39. 一种包含如权利要求 1 至 38 中任一项所述的组合物的剂型。
40. 一种包括向受试者给予如权利要求 1-38 中任一项所述的组合物或如权利要求 39 所述的剂型的方法,该受试者正被给予或将被给予一种治疗性蛋白。
41. 如权利要求 40 所述的方法,其中该方法进一步包括向该受试者给予该治疗性蛋白。
42. 如权利要求 40 或 41 所述的方法,其中在给予该组合物或剂型之前、与此同时或在此之后给予该治疗性蛋白。
43. 如权利要求 40-42 中任一项所述的方法,其中向该受试者给予一个或多个维持剂量的该组合物或剂型。
44. 如权利要求 40-43 中任一项所述的方法,其中该方法进一步包括在给予该组合物或剂型和 / 或该治疗性蛋白之前和 / 或之后评定该受试者中所不希望的免疫应答的产生。
45. 如权利要求 44 所述的方法,其中该所不希望的免疫应答是产生治疗性蛋白特异性抗体和 / 或 CD4+T 细胞增殖和 / 或活性和 / 或 B 细胞增殖和 / 或活性。
46. 如权利要求 40-45 中任一项所述的方法,其中该治疗性蛋白包括一种用于蛋白质替代或蛋白质补充疗法的治疗性蛋白。
47. 如权利要求 40-45 中任一项所述的方法,其中该治疗性蛋白包括一种可输注或可注射的治疗性蛋白、酶、酶辅助因子、激素、血液或凝血因子、细胞因子、干扰素、生长因子、单克隆抗体、多克隆抗体、或与庞贝氏病相关的蛋白质。
48. 如权利要求 47 所述的方法,其中该可输注或可注射的治疗性蛋白包含托珠单抗 (Tocilizumab)、 α -1 抗胰蛋白酶、Hematide、白蛋白干扰素 α -2b、Rhucin、替莫瑞林 (tesamorelin)、奥瑞珠单抗 (ocrelizumab)、贝利木单抗 (belimumab)、聚乙二醇重组尿酸酶 (pegloticase)、 α -他利昔酶 (taliglucerase alfa)、阿加糖酶 α (agalsidase alfa)、或葡糖脑苷脂酶 α (velaglucerase alfa)。
49. 如权利要求 47 所述的方法,其中该酶包括氧化还原酶、转移酶、水解酶、裂解酶、异构酶、或连接酶。
50. 如权利要求 47 所述的方法,其中酶包括用于针对溶酶体贮积症的酶替代疗法的酶。
51. 如权利要求 50 所述的方法,其中用于针对溶酶体贮积症的酶替代疗法的酶包括伊米昔酶 (imiglucerase)、 α -半乳糖苷酶 A (α -gal A)、阿加糖酶 β 、酸性 α -葡萄糖苷酶 (GAA)、阿葡糖苷酶 α 、LUMIZYME、MYOZYME、芳基硫酸酯酶 B、拉罗尼酶 (laronidase)、ALDURAZYME、艾度硫酸酯酶 (idursulfase)、ELAPRASE、芳基硫酸酯酶 B、或 NAGLAZYME。
52. 如权利要求 47 所述的方法,其中该细胞因子包括一种淋巴因子、白细胞介素、趋化

因子、1型细胞因子、或一种2型细胞因子。

53. 如权利要求47所述的方法，其中该血液和凝血因子包括因子I、因子II、组织因子、因子V、因子VII、因子VIII、因子IX、因子X、因子Xa、因子XII、因子XIII、血管性血友病因子、前激肽释放酶、高分子量激肽原、纤连蛋白、抗凝血酶III、肝素辅助因子II、蛋白C、蛋白S、蛋白Z、蛋白Z相关蛋白酶抑制剂(ZPI)、纤溶酶原、 α -2-抗纤维蛋白溶酶、组织型纤溶酶原激活物(tPA)、尿激酶、纤溶酶原激活物抑制剂-1(PAI1)、纤溶酶原激活物抑制剂-2(PAI2)、癌性促凝物质、或阿法依伯汀。

54. 如权利要求40-53中任一项所述的方法，其中通过静脉内、腹膜内、透粘膜、经口、皮下、肺部、鼻内、皮内或肌肉内给予来进行这些第一和/或第二群体的合成纳米载体和/或治疗性蛋白的给予。

55. 如权利要求54所述的方法，其中通过吸入或静脉内、皮下或透粘膜给予来进行这些第一和/或第二群体的合成纳米载体和/或治疗性蛋白的给予。

56. 一种方法，包括：

向受试者给予一种组合物，该组合物包含：

(i) 第一群体的合成纳米载体，这些第一群体的合成纳米载体与免疫抑制剂偶联，和

(ii) 第二群体的合成纳米载体，这些第二群体的合成纳米载体与治疗性蛋白APC可呈递抗原偶联，

其中，该组合物的量是有效于减少对抗这些治疗性蛋白APC可呈递抗原的一种所不希望的免疫应答的产生。

57. 一种方法，包括：

通过给予一种组合物来降低受试者中一种所不希望的免疫应答的产生，该组合物包含：

(i) 第一群体的合成纳米载体，这些第一群体的合成纳米载体与免疫抑制剂偶联，和

(ii) 第二群体的合成纳米载体，这些第二群体的合成纳米载体与治疗性蛋白APC可呈递抗原偶联。

58. 一种方法，包括：

根据一种治疗方案向受试者给予一种组合物，该治疗方案先前已显示在一个或多个测试受试者中降低针对治疗性蛋白APC可呈递抗原的一种所不希望的免疫应答的产生；

其中，该组合物包含：

(i) 第一群体的合成纳米载体，这些第一群体的合成纳米载体与免疫抑制剂偶联，和

(ii) 第二群体的合成纳米载体，这些第二群体的合成纳米载体与治疗性蛋白APC可呈递抗原偶联。

59. 如权利要求56-58中任一项所述的方法，其中该第一群体和第二群体是相同的。

60. 如权利要求56-59中任一项所述的方法，其中该方法进一步包括提供或鉴定该受试者。

61. 如权利要求56-60中任一项所述的方法，其中该方法进一步包括在给予该组合物之前和/或之后评定该受试者中该所不希望的免疫应答的产生。

62. 如权利要求61所述的方法，其中该所不希望的免疫应答是产生治疗性蛋白特异性抗体和/或CD4+T细胞增殖和/或活性和/或B细胞增殖和/或活性。

63. 如权利要求 56-62 中任一项所述的方法,其中这些免疫抑制剂包含一种抑制素、一种 mTOR 抑制剂、一种 TGF- β 信号剂、一种皮质类固醇、一种线粒体功能抑制剂、一种 P38 抑制剂、一种 NF- κ β 抑制剂、一种腺苷受体激动剂、一种前列腺素 E2 激动剂、一种磷酸二酯酶 4 抑制剂、一种 HDAC 抑制剂、或一种蛋白酶体抑制剂。

64. 如权利要求 63 所述的方法,其中该 mTOR 抑制剂是雷帕霉素。

65. 如权利要求 56-64 中任一项所述的方法,其中这些治疗性蛋白 APC 可呈递抗原包含一种治疗性蛋白的 MHC I 类限制性和 / 或 MHC II 类限制性表位。

66. 如权利要求 65 所述的方法,其中这些治疗性蛋白 APC 可呈递抗原包含一种治疗性蛋白的 MHC II 类限制性表位。

67. 如权利要求 56-66 中任一项所述的方法,其中这些治疗性蛋白 APC 可呈递抗原包含一种治疗性蛋白的 B 细胞表位。

68. 如权利要求 56-67 中任一项所述的方法,其中该治疗性蛋白包括用于蛋白质替代或蛋白质补充疗法的治疗性蛋白。

69. 如权利要求 56-68 中任一项所述的方法,其中该治疗性蛋白包括一种可输注或可注射的治疗性蛋白、酶、酶辅助因子、激素、血液或凝血因子、细胞因子、干扰素、生长因子、单克隆抗体、多克隆抗体、或与庞贝氏病相关的蛋白质。

70. 如权利要求 69 所述的方法,其中该可输注或可注射的治疗性蛋白包括托珠单抗 (Tocilizumab)、 α -1 抗胰蛋白酶、Hematide、白蛋白干扰素 α -2b、Rhucin、替莫瑞林 (tesamorelin)、奥瑞珠单抗 (ocrelizumab)、贝利木单抗 (belimumab)、聚乙二醇重组尿酸酶 (pegloticase)、 α -他利昔酶 (taliglucerase alfa)、阿加糖酶 α (agalsidase alfa)、或葡糖脑苷脂酶 α (velaglucerase alfa)。

71. 如权利要求 69 所述的方法,其中该酶包括氧化还原酶、转移酶、水解酶、裂解酶、异构酶、或连接酶。

72. 如权利要求 69 所述的方法,其中酶包括用于针对溶酶体贮积症的酶替代疗法的酶。

73. 如权利要求 72 所述的方法,其中用于针对溶酶体贮积症的酶替代疗法的酶包括伊米昔酶 (imiglucerase)、 α -半乳糖苷酶 A (α -gal A)、阿加糖酶 β 、酸性 α -葡萄糖苷酶 (GAA)、阿葡糖苷酶 α 、LUMIZYME、MYOZYME、芳基硫酸酯酶 B、拉罗尼酶 (laronidase)、ALDURAZYME、艾度硫酸酯酶 (idursulfase)、ELAPRASE、芳基硫酸酯酶 B、或 NAGLAZYME。

74. 如权利要求 69 所述的方法,其中该细胞因子包括一种淋巴因子、白细胞介素、趋化因子、1 型细胞因子、或一种 2 型细胞因子。

75. 如权利要求 69 所述的方法,其中该血液和凝血因子包括因子 I、因子 II、组织因子、因子 V、因子 VII、因子 VIII、因子 IX、因子 X、因子 Xa、因子 XII、因子 XIII、血管性血友病因子、前激肽释放酶、高分子量激肽原、纤连蛋白、抗凝血酶 III、肝素辅助因子 II、蛋白 C、蛋白 S、蛋白 Z、蛋白 Z 相关蛋白酶抑制剂 (ZPI)、纤溶酶原、 α 2-抗纤维蛋白溶酶、组织型纤溶酶原激活物 (tPA)、尿激酶、纤溶酶原激活物抑制剂 -1 (PAI1)、纤溶酶原激活物抑制剂 -2 (PAI2)、癌性促凝物质、或阿法依伯汀。

76. 如权利要求 56-75 中任一项所述的方法,其中该组合物处于有效降低治疗性蛋白特异性抗体的产生和 / 或 CD4+T 细胞增殖和 / 或活性和 / 或 B 细胞增殖和 / 或活性的量。

77. 如权利要求 56-76 中任一项所述的方法,其中平均在这些第一群体和 / 或第二群体的合成纳米载体上的该免疫抑制剂和 / 或治疗性蛋白 APC 可呈递抗原的负载是在 0.0001% 与 50% 之间。

78. 如权利要求 56-76 中任一项所述的方法,其中平均在这些第一群体和 / 或第二群体的合成纳米载体上的该免疫抑制剂和 / 或治疗性蛋白 APC 可呈递抗原的负载是在 0.1% 与 10% 之间。

79. 如权利要求 56-78 中任一项所述的方法,其中该第一群体和 / 或第二群体的这些合成纳米载体包括脂质纳米颗粒、聚合物纳米颗粒、金属纳米颗粒、基于表面活性剂的乳液、树枝状化合物、巴基球、纳米线、病毒样颗粒、或肽或蛋白质颗粒。

80. 如权利要求 79 所述的方法,其中该第一和 / 或第二群体的这些合成纳米载体包括脂质纳米颗粒。

81. 如权利要求 80 所述的方法,其中该第一和 / 或第二群体的这些合成纳米载体包括脂质体。

82. 如权利要求 79 所述的方法,其中该第一和 / 或第二群体的这些合成纳米载体包括金属纳米颗粒。

83. 如权利要求 82 所述的方法,其中这些金属纳米颗粒包括金纳米颗粒。

84. 如权利要求 79 所述的方法,其中该第一和 / 或第二群体的这些合成纳米载体包括聚合物纳米颗粒。

85. 如权利要求 84 所述的方法,其中该聚合物纳米颗粒包括聚合物,该聚合物是一种非甲氧基封端的普朗尼克聚合物。

86. 如权利要求 84 或 85 所述的方法,其中这些聚合物纳米颗粒包括聚酯、与聚醚偶联的聚酯、聚氨基酸、聚碳酸酯、聚缩醛、聚缩酮、多糖、聚乙基噁唑啉或聚乙烯亚胺。

87. 如权利要求 86 所述的方法,其中该聚酯包括一种聚(乳酸)、聚(乙醇酸)、聚(乳酸-乙醇酸)共聚物、或聚己酸内酯。

88. 如权利要求 86 或 87 所述的方法,其中这些聚合物纳米颗粒包括聚酯以及与聚醚偶联的聚酯。

89. 如权利要求 86-88 中任一项所述的方法,其中该聚醚包括聚乙二醇或聚丙二醇。

90. 如权利要求 56-89 中任一项所述的方法,其中使用对该第一和 / 或第二群体的这些合成纳米载体进行的动态光散射而获得的粒度分布的平均值是大于 100nm 的直径。

91. 如权利要求 90 所述的方法,其中该直径大于 150nm。

92. 如权利要求 91 所述的方法,其中该直径大于 200nm。

93. 如权利要求 92 所述的方法,其中该直径大于 250nm。

94. 如权利要求 93 所述的方法,其中该直径大于 300nm。

95. 如权利要求 56-94 中任一项所述的组合物,其中该第一群体和 / 或第二群体的这些合成纳米载体的长宽比大于 1 : 1、1 : 1.2、1 : 1.5、1 : 2、1 : 3、1 : 5、1 : 7 或 1 : 10。

96. 如权利要求 56-95 中任一项所述的方法,其中该组合物进一步包含一种药学上可接受的赋形剂。

97. 如权利要求 56-96 中任一项所述的方法,其中该方法进一步包括向该受试者给予该治疗性蛋白。

98. 如权利要求 97 所述的方法,其中在给予该组合物之前、与此同时或在此之后给予该治疗性蛋白。

99. 如权利要求 56-98 中任一项所述的方法,其中向该受试者给予一个或多个维持剂量的该组合物。

100. 如权利要求 56-99 中任一项所述的方法,其中该方法进一步包括在给予该组合物和 / 或治疗性蛋白之前和 / 或之后评定该受试者中一种所不希望的免疫应答的产生。

101. 如权利要求 100 所述的方法,其中该所不希望的免疫应答是产生治疗性蛋白特异性抗体和 / 或 CD4+T 细胞增殖和 / 或活性和 / 或 B 细胞增殖和 / 或活性。

102. 如权利要求 56-101 中任一项所述的方法,其中该给予是通过静脉内、腹膜内、透粘膜、经口、皮下、肺部、鼻内、皮内或肌肉内给予进行的。

103. 如权利要求 102 所述的方法,其中该给予是通过吸入或静脉内、皮下或透粘膜给予进行的。

104. 一种方法,包括 :

(i) 产生第一群体的合成纳米载体,这些第一群体的合成纳米载体与免疫抑制剂偶联,并且

(ii) 产生第二群体的合成纳米载体,这些第二群体的合成纳米载体与治疗性蛋白 APC 可呈递抗原偶联。

105. 如权利要求 104 所述的方法,其中该第一群体和第二群体是相同的。

106. 如权利要求 104 或 105 所述的方法,其中产生的这些第一和第二群体的合成纳米载体是如在权利要求 1-38 中任一项所定义的。

107. 如权利要求 104-106 中任一项所述的方法,其中该方法进一步包括产生一种组合物的一种剂型,该组合物包含产生的这些第一和第二群体的合成纳米载体。

108. 如权利要求 104-107 中任一项所述的方法,其中该方法进一步包括制造一种包含这些第一群体和第二群体的合成纳米载体的组合物、或可供受试者给予的剂型。

109. 如权利要求 104-108 中任一项所述的方法,其中该方法进一步包括评定使用一种包含这些第一群体和第二群体的合成纳米载体的组合物的一种所不希望的免疫应答的降低。

110. 如权利要求 109 所述的方法,其中该所不希望的免疫应答是产生治疗性蛋白特异性抗体和 / 或 CD4+T 细胞增殖和 / 或活性和 / 或 B 细胞增殖和 / 或活性。

111. 一种用于生产一种组合物或剂型的工艺,该组合物或剂型包含 :

(i) 第一群体的合成纳米载体,这些第一群体的合成纳米载体与免疫抑制剂偶联,和

(ii) 第二群体的合成纳米载体,这些第二群体的合成纳米载体与治疗性蛋白 APC 可呈递抗原偶联,

该工艺包括如在权利要求 104-110 中任一项所述的方法中所定义的步骤。

112. 一种通过如权利要求 104-111 中任一项所述的方法或工艺可获得的组合物或剂型。

113. 一种供在治疗或预防中使用的如权利要求 1-38 和 112 中任一项所述的组合物或如权利要求 39 所述的剂型。

114. 一种如权利要求 1-38 和 112 中任一项所述的组合物或如权利要求 39 所述的剂

型,用于在一种诱导针对治疗性蛋白抗原的一种致耐受性免疫应答的方法、基于细胞的疗法、蛋白质替代疗法、蛋白质补充疗法、或如在权利要求 40-110 中任一项所定义的方法中使用。

115. 如权利要求 1-38 和 112 中任一项所述的组合物或如权利要求 39 所述的剂型用于制造一种药剂的用途,该药剂用于在一种诱导针对治疗性蛋白抗原的一种致耐受性免疫应答的方法、基于细胞的疗法、蛋白质替代疗法、蛋白质补充疗法、或如在权利要求 40-110 中任一项所定义的方法中使用。

116. 一种包含如权利要求 112-114 中任一项所述的组合物的剂型。

用于降低针对治疗性蛋白的免疫应答的致耐受性合成纳米载体

[0001] 相关申请

[0002] 本申请根据美国法典第 35 篇第 119 条要求 2011 年 4 月 29 日提交的美国临时申请 61/480,946、2011 年 7 月 29 日提交的美国临时申请 61/513,514、2011 年 9 月 6 日提交的美国临时申请 61/531,147、2011 年 9 月 6 日提交的美国临时申请 61/531,153、2011 年 9 月 6 日提交的美国临时申请 61/531,164、2011 年 9 月 6 日提交的美国临时申请 61/531,168、2011 年 9 月 6 日提交的美国临时申请 61/531,175、2011 年 9 月 6 日提交的美国临时申请 61/531,180、2011 年 9 月 6 日提交的美国临时申请 61/531,194、2011 年 9 月 6 日提交的美国临时申请 61/531,204、2011 年 9 月 6 日提交的美国临时申请 61/531,209、2011 年 9 月 6 日提交的美国临时申请 61/531,215 的权益，这些临时申请各自的全部内容通过引用结合在此。

发明领域

[0003] 本发明涉及具有治疗性蛋白抗原呈递细胞 (APC) 可呈递抗原和免疫抑制剂的多种合成纳米载体组合物、以及相关的方法。这些组合物和方法允许通过 APC 有效摄取来使免疫应答向有利于发展对治疗性蛋白特异的致耐受性免疫应答的方向转变。提供的这些组合物和方法因此可以用来在受试者中产生一种致耐受性免疫应答，在该受试者中给予了一种治疗性蛋白或预期会产生所不希望的免疫应答。

[0004] 发明背景

[0005] 治疗性处理（如蛋白质或酶替代疗法）常常对特定的治疗剂产生所不希望的免疫应答。在此类情况下，免疫系统的细胞将这种治疗剂识别为外来的并且试图破坏它，正如这些细胞试图破坏时感染生物（如细菌和病毒）一样。可以通过使用免疫抑制剂药物来降低这样的所不希望的免疫应答。然而，常规的免疫抑制剂药物是广泛作用的 (broad-acting)。另外，为了维持免疫抑制，免疫抑制剂药物疗法通常是一个终生的命题。令人遗憾的是，使用广泛作用的免疫抑制剂与严重副作用（如肿瘤、感染、肾毒性以及代谢紊乱）的风险相关联。因此，新的免疫抑制剂疗法将是有益的。

[0006] 发明概述

[0007] 在一方面，提供了一种组合物，该组合物包含 (i) 第一群体的合成纳米载体和 (ii) 第二群体的合成纳米载体，这些第一群体的合成纳米载体与免疫抑制剂偶联，这些第二群体的合成纳米载体与治疗性蛋白 APC 可呈递抗原偶联。在一个实施例中，该第一群体和第二群体是相同的群体。在另一个实施例中，该第一群体和第二群体是不同的群体。

[0008] 在又另一个实施例中，这些免疫抑制剂包含一种抑制素、一种 mTOR 抑制剂、一种 TGF- β 信号剂、一种皮质类固醇、一种线粒体功能抑制剂、一种 P38 抑制剂、一种 NF- κ β 抑制剂、一种腺苷受体激动剂、一种前列腺素 E2 激动剂、一种磷酸二酯酶 4 抑制剂、一种 HDAC 抑制剂或一种蛋白酶体抑制剂。在再另一个实施例中，该 mTOR 抑制剂是雷帕霉素或一种雷帕霉素类似物。

[0009] 在一些实施例中，通过使该治疗性蛋白与这些合成纳米载体偶联来提供这些治疗性蛋白 APC 可呈递抗原。在其他实施例中，通过偶联从该治疗性蛋白获得或衍生的一种多肽或肽来提供这些治疗性蛋白 APC 可呈递抗原。在一个另外的实施例中，这些治疗性蛋白 APC 可呈递抗原包含一种治疗性蛋白的 MHC I 类限制性表位和 / 或 MHC II 类限制性表位和 / 或 B 细胞表位。在另一个实施例中，这些治疗性蛋白 APC 可呈递抗原包含一种治疗性蛋白的 MHC II 类限制性表位。在另一个实施例中，这些治疗性蛋白 APC 可呈递抗原基本上不包含治疗性蛋白的 B 细胞表位。在另一个实施例中，这些治疗性蛋白 APC 可呈递抗原包含一种治疗性蛋白的 MHC II 类限制性表位并且基本上不包含治疗性蛋白的 B 细胞表位。

[0010] 在一个实施例中，这些治疗性蛋白 APC 可呈递抗原包含一种用于蛋白质替代或蛋白质补充疗法的治疗性蛋白、或其片段或衍生物。在另一个实施例中，这些治疗性蛋白 APC 可呈递抗原包含一种可输注或可注射的治疗性蛋白、酶、酶辅助因子、激素、血液或凝血因子、细胞因子、干扰素、生长因子、单克隆抗体、多克隆抗体或与庞贝氏病相关的蛋白质、或任何上述物质的片段或衍生物。在另一个实施例中，该可输注或可注射的治疗性蛋白包含托珠单抗 (Tocilizumab)、 α -1 抗胰蛋白酶、Hematide、白蛋白干扰素 α -2b、Rhucin、替莫瑞林 (tesamorelin)、奥瑞珠单抗 (ocrelizumab)、贝利木单抗 (belimumab)、聚乙二醇重组尿酸酶 (pegloticase)、 α -他利昔酶 (taliglucerase alfa)、阿加糖酶 α (agalsidase alfa) 或葡萄糖脑苷脂酶 α (velaglucerase alfa)。在另一个实施例中，该酶包括氧化还原酶、转移酶、水解酶、裂解酶、异构酶或连接酶。在另一个实施例中，该酶包括用于针对溶酶体贮积症的酶替代疗法的酶。在另一个实施例中，用于针对溶酶体贮积症的酶替代疗法的酶包括伊米昔酶 (imiglucerase)、 α -半乳糖苷酶 A (α -gal A)、阿加糖酶 β 、酸性 α -葡萄糖苷酶 (GAA)、阿葡萄糖苷酶 α 、LUMIZYME、MYOZYME、芳基硫酸酯酶 B、拉罗尼酶 (laronidase)、ALDURAZYME、艾度硫酸酯酶 (idursulfase)、ELAPRASE、芳基硫酸酯酶 B 或 NAGLAZYME。在另一个实施例中，细胞因子包括淋巴因子、白细胞介素、趋化因子、1 型细胞因子或一种 2 型细胞因子。在另一个实施例中，血液和凝血因子包括因子 I、因子 II、组织因子、因子 V、因子 VII、因子 VIII、因子 IX、因子 X、因子 Xa、因子 XII、因子 XIII、血管性血友病因子 (von Willebrand factor)、前激肽释放酶、高分子量激肽原、纤连蛋白、抗凝血酶 III、肝素辅助因子 II、蛋白 C、蛋白 S、蛋白 Z、蛋白 Z 相关蛋白酶抑制剂 (ZPI)、纤溶酶原、 α 2-抗纤维蛋白溶酶、组织型纤溶酶原激活物 (tPA)、尿激酶、纤溶酶原激活物抑制剂 -1 (PAI1)、纤溶酶原激活物抑制剂 -2 (PAI2)、癌性促凝物质或阿法依伯汀。在再另一个实施例中，该治疗性蛋白在基于细胞的疗法的细胞中表达、通过这些细胞来表达或在这些细胞上表达。

[0011] 在一个实施例中，该组合物处于有效产生针对治疗性蛋白 APC 可呈递抗原或从其获得或衍生这些抗原的治疗性蛋白的致耐受性免疫应答的量。在另一个实施例中，当向受试者给予时，该组合物处于有效降低治疗性蛋白特异性抗体的产生的量。

[0012] 在另一个实施例中，平均在这些第一和 / 或第二群体的合成纳米载体上的免疫抑制剂和 / 或抗原的负载是在 0.0001% 与 50% 之间。在再另一个实施例中，平均在这些第一和 / 或第二群体的合成纳米载体上的免疫抑制剂和 / 或抗原的负载是在 0.1% 与 10% 之间。

[0013] 在一个实施例中，该第一群体和 / 或第二群体的合成纳米载体包括脂质纳米颗粒、聚合物纳米颗粒、金属纳米颗粒、基于表面活性剂的乳液、树枝状化合物、巴基球

(buckyball)、纳米线、病毒样颗粒、或肽或蛋白质颗粒。在另一个实施例中，该第一和 / 或第二群体的合成纳米载体包括脂质纳米颗粒。在又一个实施例中，该第一和 / 或第二群体的合成纳米载体包括脂质体。在再另一个实施例中，该第一和 / 或第二群体的合成纳米载体包括金属纳米颗粒。在一个另外的实施例中，这些金属纳米颗粒包含金纳米颗粒。在又一个另外的实施例中，该第一和 / 或第二群体的合成纳米载体包括聚合物纳米颗粒。在另一个实施例中，这些聚合物纳米颗粒包含聚合物，这些聚合物是非甲氧基封端的普朗尼克聚合物。在再一个另外的实施例中，这些聚合物纳米颗粒包含聚酯、与聚醚偶联的聚酯、聚氨基酸、聚碳酸酯、聚缩醛、聚缩酮、多糖、聚乙基噁唑啉或聚乙烯亚胺。在另一个实施例中，聚酯包含一种聚（乳酸）、聚（乙醇酸）、聚（乳酸 - 乙醇酸）共聚物或聚己酸内酯。在又一个实施例中，这些聚合物纳米颗粒包含聚酯以及与聚醚偶联的聚酯。在另一个实施例中，该聚醚包含聚乙二醇或聚丙二醇。

[0014] 在另一个实施例中，使用对该第一和 / 或第二群体的合成纳米载体进行的动态光散射而获得的粒度分布的平均值大于 100nm 的直径。在另一个实施例中，该直径大于 150nm。在另一个实施例中，该直径大于 200nm。在另一个实施例中，该直径大于 250nm。在另一个实施例中，该直径大于 300nm。

[0015] 在一个另外的实施例中，该第一群体和 / 或第二群体的合成纳米载体的长宽比是大于 1 : 1、1 : 1.2、1 : 1.5、1 : 2、1 : 3、1 : 5、1 : 7 或 1 : 10。

[0016] 在又一个实施例中，该组合物进一步包含一种药学上可接受的赋形剂。

[0017] 在另一方面，提供了一种包含在此提供的任何这些组合物的剂型。

[0018] 在另一方面，提供了一种包括向正被给予或将被给予一种治疗性蛋白的受试者给予在此提供的任何这些组合物或剂型的方法。在一个实施例中，该方法进一步包括向该受试者给予该治疗性蛋白。在另一个实施例中，在给予该组合物或剂型之前、与此同时或在此之后给予该治疗性蛋白。在又一个实施例中，向该受试者给予一个或多个维持剂量的该组合物或剂型。

[0019] 在又另一个实施例中，该方法进一步包括在给予该组合物或剂型和 / 或该治疗性蛋白之前和 / 或之后评定该受试者中的所不希望的免疫应答的产生。在一个实施例中，该所不希望的免疫应答是产生治疗性蛋白特异性抗体。在另一个实施例中，该所不希望的免疫应答是对该治疗性蛋白特异的 CD4+T 细胞增殖和 / 或活性。在又另一个实施例中，该所不希望的免疫应答是对该治疗性蛋白特异的 B 细胞增殖和 / 或活性。

[0020] 在一个实施例中，该治疗性蛋白包含一种用于蛋白质替代或蛋白质补充疗法的治疗性蛋白。在另一个实施例中，该治疗性蛋白包含一种可输注或可注射的治疗性蛋白、酶、酶辅助因子、激素、血液或凝血因子、细胞因子、干扰素、生长因子、单克隆抗体、多克隆抗体或与庞贝氏病相关的蛋白质。在另一个实施例中，该可输注或可注射的治疗性蛋白包含托珠单抗、 α -1 抗胰蛋白酶、Hematide、白蛋白干扰素 α -2b、Rhucin、替莫瑞林、奥瑞珠单抗、贝利木单抗、聚乙二醇重组尿酸酶、 α -D-半乳糖苷酶、阿加糖酶 α 或葡萄糖脑苷脂酶 α 。在另一个实施例中，酶包括氧化还原酶、转移酶、水解酶、裂解酶、异构酶或连接酶。在另一个实施例中，酶包括一种用于针对溶酶体贮积症的酶替代疗法的酶。在另一个实施例中，用于针对溶酶体贮积症的酶替代疗法的酶包括伊米昔酶、 α -D-半乳糖苷酶 A (α -gal A)、阿加糖酶 β 、酸性 α -葡萄糖苷酶 (GAA)、阿葡糖苷酶 α 、LUMIZYME、MYOZYME、芳基硫酸酯酶 B、拉罗尼酶、

ALDURAZYME、艾度硫酸酯酶、ELAPRASE、芳基硫酸酯酶 B 或 NAGLAZYME。在另一个实施例中，细胞因子包括淋巴因子、白细胞介素、趋化因子、1型细胞因子或2型细胞因子。在另一个实施例中，血液和凝血因子包括因子 I、因子 II、组织因子、因子 V、因子 VII、因子 VIII、因子 IX、因子 X、因子 Xa、因子 XII、因子 XIII、血管性血友病因子、前激肽释放酶、高分子量激肽原、纤连蛋白、抗凝血酶 III、肝素辅助因子 II、蛋白 C、蛋白 S、蛋白 Z、蛋白 Z 相关蛋白酶抑制剂 (ZPI)、纤溶酶原、 α 2-抗纤维蛋白溶酶、组织型纤溶酶原激活物 (tPA)、尿激酶、纤溶酶原激活物抑制剂 -1 (PAI1)、纤溶酶原激活物抑制剂 -2 (PAI2)、癌性促凝物质或阿法依伯汀。在再另一个实施例中，治疗性蛋白质在基于细胞的疗法的细胞中表达、通过这些细胞来表达或在这些细胞上表达。

[0021] 在一个实施例中，通过静脉内、腹膜内、透粘膜、经口、皮下、肺部、鼻内、皮内或肌肉内给予来进行这些第一和 / 或第二群体的合成纳米载体和 / 或治疗性蛋白的给予。在另一个实施例中，通过吸入或静脉内、皮下或透粘膜给予来进行这些第一和 / 或第二群体的合成纳米载体和 / 或治疗性蛋白的给予。

[0022] 在再另一个方面，提供了一种包括向受试者给予一种组合物的方法，该组合物包含 (i) 第一群体的合成纳米载体和 (ii) 第二群体的合成纳米载体，这些第一群体的合成纳米载体与免疫抑制剂偶联，这些第二群体的合成纳米载体与治疗性蛋白 APC 可呈递抗原偶联，其中该组合物处于有效降低针对这些治疗性蛋白 APC 可呈递抗原的所不希望的免疫应答的产生的量。在又另一个方面，提供了一种包括通过给予一种组合物而降低在受试者中所不希望的免疫应答的产生的方法，该组合物包含 (i) 第一群体的合成纳米载体和 (ii) 第二群体的合成纳米载体，这些第一群体的合成纳米载体与免疫抑制剂偶联，这些第二群体的合成纳米载体与治疗性蛋白 APC 可呈递抗原偶联。在一个另外的方面，提供了一种包括根据一种治疗方案 (protocol) 向受试者给予一种组合物的方法，该治疗方案先前已显示可降低一个或多个测试受试者中针对治疗性蛋白 APC 可呈递抗原的所不希望的免疫应答的产生；其中该组合物包含 (i) 第一群体的合成纳米载体和 (ii) 第二群体的合成纳米载体，这些第一群体的合成纳米载体与免疫抑制剂偶联，这些第二群体的合成纳米载体与治疗性蛋白 APC 可呈递抗原偶联。在一个实施例中，该第一群体和第二群体是相同的群体。在另一个实施例中，该第一群体和第二群体是不同的群体。

[0023] 在又一个实施例中，该方法进一步包括提供或鉴定该受试者。在再另一个实施例中，该方法进一步包括在给予该组合物之前和 / 或之后评定该受试者中的所不希望的免疫应答的产生。在一个实施例中，所不希望的免疫应答是产生治疗性蛋白特异性抗体和 / 或对该治疗性蛋白特异的 CD4+T 细胞增殖和 / 或活性和 / 或对该治疗性蛋白特异的 B 细胞增殖和 / 或活性。

[0024] 在另一个实施例中，这些免疫抑制剂包括一种抑制素、一种 mTOR 抑制剂、一种 TGF- β 信号剂、一种皮质类固醇、一种线粒体功能抑制剂、一种 P38 抑制剂、一种 NF- κ β 抑制剂、一种腺苷受体激动剂、一种前列腺素 E2 激动剂、一种磷酸二酯酶 4 抑制剂、一种 HDAC 抑制剂或一种蛋白酶体抑制剂。在又一个实施例中，该 mTOR 抑制剂是雷帕霉素或一种雷帕霉素类似物。

[0025] 在一些实施例中，通过使该治疗性蛋白与这些合成纳米载体偶联来提供这些治疗性蛋白 APC 可呈递抗原。在其他实施例中，通过偶联从该治疗性蛋白获得或衍生的一种多

肽或肽来提供这些治疗性蛋白 APC 可呈递抗原。在一个另外的实施例中，这些治疗性蛋白 APC 可呈递抗原包含治疗性蛋白的 MHC I 类限制性表位和 / 或 MHC II 类限制性表位和 / 或 B 细胞表位。在另一个实施例中，这些治疗性蛋白 APC 可呈递抗原包含治疗性蛋白的 MHC II 类限制性表位。在另一个实施例中，这些治疗性蛋白 APC 可呈递抗原基本上不包含治疗性蛋白的 B 细胞表位。在另一个实施例中，这些治疗性蛋白 APC 可呈递抗原包含治疗性蛋白的 MHC II 类限制性表位并且基本上不包含治疗性蛋白的 B 细胞表位。

[0026] 在一个实施例中，该治疗性蛋白包括用于蛋白质替代或蛋白质补充疗法的治疗性蛋白。在另一个实施例中，该治疗性蛋白包括一种可输注或可注射的治疗性蛋白、酶、酶辅助因子、激素、血液或凝血因子、细胞因子、干扰素、生长因子、单克隆抗体、多克隆抗体或与庞贝氏病相关的蛋白质。在另一个实施例中，该可输注或可注射的治疗性蛋白包括托珠单抗、 α -1 抗胰蛋白酶、Hematide、白蛋白干扰素 α -2b、Rhucin、替莫瑞林、奥瑞珠单抗、贝利木单抗、聚乙二醇重组尿酸酶、 α -他利昔酶、阿加糖酶 α 或葡萄糖脑苷脂酶 α 。在另一个实施例中，酶包括氧化还原酶、转移酶、水解酶、裂解酶、异构酶或连接酶。在另一个实施例中，酶包括用于针对溶酶体贮积症的酶替代疗法的酶。在另一个实施例中，用于针对溶酶体贮积症的酶替代疗法的酶包括伊米昔酶、 α -半乳糖苷酶 A (α -gal A)、阿加糖酶 β 、酸性 α -葡萄糖苷酶 (GAA)、阿葡萄糖苷酶 α 、LUMIZYME、MYOZYME、芳基硫酸酯酶 B、拉罗尼酶、ALDURAZYME、艾度硫酸酯酶、ELAPRASE、芳基硫酸酯酶 B 或 NAGLAZYME。在另一个实施例中，细胞因子包括淋巴因子、白细胞介素、趋化因子、1 型细胞因子或 2 型细胞因子。在另一个实施例中，血液和凝血因子包括因子 I、因子 II、组织因子、因子 V、因子 VII、因子 VIII、因子 IX、因子 X、因子 Xa、因子 XII、因子 XIII、血管性血友病因子、前激肽释放酶、高分子量激肽原、纤连蛋白、抗凝血酶 III、肝素辅助因子 II、蛋白 C、蛋白 S、蛋白 Z、蛋白 Z 相关蛋白酶抑制剂 (ZPI)、纤溶酶原、 α 2-抗纤维蛋白溶酶、组织型纤溶酶原激活物 (tPA)、尿激酶、纤溶酶原激活物抑制剂 -1 (PAI1)、纤溶酶原激活物抑制剂 -2 (PAI2)、癌性促凝物质或阿法依伯汀。在再另一个实施例中，该治疗性蛋白质在基于细胞的疗法的细胞中表达、通过这些细胞来表达或在这些细胞上表达。

[0027] 在一个实施例中，该组合物处于有效降低治疗性蛋白特异性抗体的产生和 / 或对该治疗性蛋白特异的 CD4+T 细胞增殖和 / 或活性和 / 或对该治疗性蛋白特异的 B 细胞增殖和 / 或活性的量。

[0028] 在另一个实施例中，平均在这些第一和 / 或第二群体的合成纳米载体上的免疫抑制剂和 / 或抗原的负载是在 0.0001% 与 50% 之间。在再另一个实施例中，平均在这些第一和 / 或第二群体的合成纳米载体上的免疫抑制剂和 / 或抗原的负载是在 0.1% 与 10% 之间。

[0029] 在一个实施例中，该第一群体和 / 或第二群体的合成纳米载体包括脂质纳米颗粒、聚合物纳米颗粒、金属纳米颗粒、基于表面活性剂的乳液、树枝状化合物、巴基球、纳米线、病毒样颗粒或肽或蛋白质颗粒。在另一个实施例中，该第一和 / 或第二群体的合成纳米载体包括脂质纳米颗粒。在又另一个实施例中，该第一和 / 或第二群体的合成纳米载体包括脂质体。在再另一个实施例中，该第一和 / 或第二群体的合成纳米载体包括金属纳米颗粒。在一个另外的实施例中，这些金属纳米颗粒包括金纳米颗粒。在又一个另外的实施例中，该第一和 / 或第二群体的合成纳米载体包括聚合物纳米颗粒。在另一个实施例中，这些

聚合物纳米颗粒包括聚合物，聚合物是非甲氧基封端的普朗尼克聚合物。在再一个另外的实施例中，聚合物纳米颗粒包含聚酯、与聚醚偶联的聚酯、聚氨基酸、聚碳酸酯、聚缩醛、聚缩酮、多糖、聚乙基噁唑啉或聚乙烯亚胺。在另一个实施例中，聚酯包括聚（乳酸）、聚（乙醇酸）、聚（乳酸-乙醇酸）共聚物或聚己酸内酯。在又一个实施例中，聚合物纳米颗粒包括聚酯以及与聚醚偶联的聚酯。在再另一个实施例中，该聚醚包括聚乙二醇或聚丙二醇。

[0030] 在另一个实施例中，使用对该第一和 / 或第二群体的合成纳米载体进行的动态光散射而获得的粒度分布的平均值是大于 100nm 的直径。在另一个实施例中，该直径大于 150nm。在另一个实施例中，该直径大于 200nm。在另一个实施例中，该直径大于 250nm。在另一个实施例中，该直径大于 300nm。

[0031] 在一个另外的实施例中，该第一群体和 / 或第二群体的合成纳米载体的长宽比大于 1 : 1、1 : 1.2、1 : 1.5、1 : 2、1 : 3、1 : 5、1 : 7 或 1 : 10。

[0032] 在再一个另外的实施例中，该组合物进一步包含一种药学上可接受的赋形剂。

[0033] 在又一个另外的实施例中，该方法进一步包括向该受试者给予该治疗性蛋白。在一个实施例中，在给予该组合物之前、与此同时或在此之后给予该治疗性蛋白。

[0034] 在另一个实施例中，向该受试者给予一个或多个维持剂量的该组合物。

[0035] 在再另一个实施例中，该方法进一步包括在给予该组合物和 / 或治疗性蛋白之前和 / 或之后评定该受试者中的所不希望的免疫应答的产生。在另一个实施例中，该所不希望的免疫应答是产生治疗性蛋白特异性抗体和 / 或对该治疗性蛋白特异的 CD4+T 细胞增殖和 / 或活性和 / 或对该治疗性蛋白特异的 B 细胞增殖和 / 或活性。

[0036] 在一个实施例中，通过静脉内、腹膜内、透粘膜、经口、皮下、肺部、鼻内、皮内或肌肉内给予来进行这些第一和 / 或第二群体的合成纳米载体和 / 或治疗性蛋白的给予。在另一个实施例中，通过吸入或静脉内、皮下或透粘膜给予来进行这些第一和 / 或第二群体的合成纳米载体和 / 或治疗性蛋白的给予。

[0037] 在一个另外的方面，提供了一种方法，该方法包括 (i) 产生与免疫抑制剂偶联的第一群体的合成纳米载体，和 (ii) 产生与治疗性蛋白 APC 可呈递抗原偶联的第二群体的合成纳米载体。在一个实施例中，该第一群体和第二群体是相同的群体。在另一个实施例中，该第一群体和第二群体是不同的群体。在又一个实施例中，产生的这些第一和第二群体的合成纳米载体是如在此任何地方所提供的来定义的。

[0038] 在一个实施例中，该方法进一步包括产生一种组合物的剂型，该组合物包含产生的这些第一和第二群体的合成纳米载体。在再另一个实施例中，该方法进一步包括制造一种包含这些第一群体和第二群体的合成纳米载体的组合物、或可供受试者给予的剂型。在一个另外的实施例中，该方法进一步包括评定使用一种包含这些第一群体和第二群体的合成纳米载体的组合物时的所不希望的免疫应答的降低。在一个实施例中，该所不希望的免疫应答是产生治疗性蛋白特异性抗体和 / 或对该治疗性蛋白特异的 CD4+T 细胞增殖和 / 或活性和 / 或对该治疗性蛋白特异的 B 细胞增殖和 / 或活性。

[0039] 在又一个另外的方面，提供了一种用于生产一种组合物或剂型的工艺，该组合物或剂型包含 (i) 第一群体的合成纳米载体，这些第一群体的合成纳米载体与免疫抑制剂偶联，和 (ii) 第二群体的合成纳米载体，这些第二群体的合成纳米载体与治疗性蛋白 APC 可呈递抗原偶联，该工艺包括如在此提供的任何方法中所定义的步骤。

[0040] 在另一方面，提供了一种通过在此提供的任何方法或工艺可获得的组合物或剂型。

[0041] 在又一个方面，在此提供的任何这些组合物或剂型可以用于治疗或预防。

[0042] 在再另一个方面，在此提供的任何这些组合物或剂型可以在诱导针对治疗性蛋白抗原的致耐受性免疫应答的方法、基于细胞的疗法、蛋白质替代疗法、蛋白质补充疗法或在此提供的任何方法中使用。

[0043] 在一个另外的方面，提供了在此提供的任何这些组合物或剂型用于制造一种药剂的用途，该药剂用于诱导针对治疗性蛋白抗原的致耐受性免疫应答的方法、基于细胞的疗法、蛋白质替代疗法、蛋白质补充疗法或在此提供的任何方法中。

[0044] 在再另一个方面，提供了一种包含在此提供的任何这些组合物的剂型。

[0045] 在提供的任何这些组合物和方法的一些实施例中，预防性地、在免疫应答早期（例如，在 IgM 阶段过程中）和 / 或在建立成熟记忆应答和 / 或 IgG 抗体应答之前给予在此提供的这些组合物。在此提供的任何这些组合物和方法的实施例中，这些组合物和方法可以降低效应 T 细胞与抗原反应的频率和 / 或这些效应 T 细胞产生促炎细胞因子的能力。在此提供的任何这些组合物和方法的其他实施例中，这些组合物和方法增加了抑制性调节性 T 细胞或 B 细胞的频率，这些抑制性调节性 T 细胞或 B 细胞减少了所不希望的治疗性蛋白免疫应答的发生。

[0046] 在此提供的任何这些组合物和方法的一个实施例中，作为包含以上提到的这些表位的蛋白质的抗原可以与这些合成纳米载体偶联。在另一个实施例中，包含以上提到的这些表位、但包含位于这一个或多个表位的一端或两端侧面的另外氨基酸的多肽或肽可以与这些合成纳米载体偶联。在另一个实施例中，这些表位本身与这些合成纳米载体偶联。

[0047] 附图简要说明

[0048] 图 1 显示了来自 Treg 的流式细胞检测分析的结果。

[0049] 图 2 显示了使用包含免疫抑制剂（雷帕霉素或辛伐他汀）的本发明的合成纳米载体对抗原特异性的效应 T 细胞的数目影响（在单次注射之后）。

[0050] 图 3 显示了使用包含免疫抑制剂（雷帕霉素或辛伐他汀）的本发明的合成纳米载体使脾淋巴结细胞的数目减少（在多次注射之后）。

[0051] 图 4 证明了使用包含免疫抑制剂雷帕霉素和 ova 抗原的合成纳米载体使抗 OVA IgG 抗体减少。

[0052] 图 5 证明了在对照组和被动组中，使用包含免疫抑制剂雷帕霉素和 OVA 抗原的合成纳米载体使抗 OVA IgG 抗体减少。

[0053] 图 6 显示了使用包含 ova 肽和免疫抑制剂雷帕霉素的合成纳米载体的给予使抗原特异性 IgG 水平降低。

[0054] 图 7 证明使用包含 ova 肽和免疫抑制剂雷帕霉素的合成纳米载体使抗原特异性的 B 细胞的数目减少。

[0055] 图 8 证明了来自用包含 ova 肽和免疫抑制剂的合成纳米载体治疗的哮喘模型动物受试者的灌洗样品中 CD4+T 细胞的数目减少。

[0056] 图 9 证明了在哮喘模型动物受试者中用包含 ova 肽和免疫抑制剂雷帕霉素的合成纳米载体进行处理所引起的分裂 CD4+T 细胞的百分数降低。

[0057] 发明详细说明

[0058] 在详细描述本发明之前,应当理解本发明不局限于具体举例说明的材料或工艺参数,因为这些当然可以变化。还应当理解在此使用的术语只是为了描述本发明的具体实施例的目的,并不旨在限制使用可替代的术语来描述本发明。

[0059] 无论在前或在后,在此引用的所有公开物、专利以及专利申请,出于所有目的特此通过引用以其全文结合在此。

[0060] 如在本说明书和所附权利要求中所使用,单数形式“一个(种)(a, an)”和“该(the)”包括复数指代物,除非内容另外明确表明。例如,提及的“一种聚合物”包括两种或更多种此类分子的混合物或不同分子量的单个聚合物种类的混合物;提及的“一种合成纳米载体”包括两种或更多种此类合成载体的混合物或多个此类合成纳米载体;提及的“一种DNA分子”包括两种或更多种此类DNA分子的混合物或多个此类DNA分子;提及的“一种免疫抑制剂”包括两种或更多种此类物质的混合物或多个免疫抑制剂分子;诸如此类。

[0061] 如在此所使用,术语“包括(comprise)”或其变体,如“包括(comprises)”或“包括(comprising)”意在表明包括任何列举的整体(例如,一个特点、要素、特征、特性、方法/工艺步骤或限制)或整体的组(例如,多个特点、多个要素、多个特征、多个特性、多种方法/多个工艺步骤或多个限制),但是不排除任何其他整体或整体的组。因此,如在此所使用,术语“包括”是包含性的但是不排除另外的、未列举的整体或方法/工艺步骤。

[0062] 在此处提供的任何这些组合物和方法的多个实施例中,“包括”可用“基本上由……组成(consisting essentially of)”或“由……组成(consisting of)”来替代。短语“基本上由……组成”在此用来要求限定的一个或多个整体或步骤以及不实质上影响所要求的发明的特征或功能的那些。如在此所使用,术语“组成(consisting)”用来表明仅存在所列举的整体(例如,一个特点、要素、特征、特性、方法/工艺步骤或限制)或整体的组(例如,多个特点、多个要素、多个特征、多个特性、多种方法/多个工艺步骤或多个限制)。

[0063] A. 前言

[0064] 如先前所提到的,目前常规的免疫抑制剂是广泛作用的并且通常导致免疫系统的总体系统性下调。在此提供的这些组合物和方法通过例如允许靶向递送至感兴趣的免疫细胞而允许更具针对性的免疫作用。因此,这些组合物和方法可以以一种更有方向性的方式实现免疫抑制。已经发现,包含MHC II类限制性表位的递送免疫抑制剂和抗原可以有效地降低抗原特异性抗体的产生以及降低抗原特异性CD4+T细胞和B细胞的产生。因为此类免疫应答可以有益于抵消在用治疗性蛋白进行治疗性处理的过程中产生的所不希望的免疫应答,本发明在促进受试者中的致耐受性免疫应答中是有用的,这些受试者已经接受、正在接受或将要接受针对其产生或预期会针对其产生所不希望的免疫应答的治疗性蛋白。在一些实施例中,本发明防止或抑制了所不希望的免疫应答,这些所不希望的免疫应答可以中和某些治疗性处理的有益作用。

[0065] 本发明的诸位发明人已经意外地并且令人惊讶地发现,通过实践在此披露的本发明,可以克服以上指出的问题和限制。具体地说,诸位发明人已经意外地发现,提供诱导针对治疗性蛋白的致耐受性免疫应答的合成纳米载体组合物和相关方法是有可能的。在此描述的这些组合物包括了包含(i)第一群体的合成纳米载体和(ii)第二群体的合成纳米载

体的组合物,这些第一群体的合成纳米载体与免疫抑制剂偶联,这些第二群体的合成纳米载体与治疗性蛋白 APC 可呈递抗原偶联。

[0066] 在另一方面,提供了在此的任何这些组合物的多种剂型。可以将此类剂型给予一位受试者,如对其有需要(例如,对治疗性蛋白特异的致耐受性免疫应答有需要)的受试者。在一个实施例中,该受试者是已经、正在或将要用针对其产生或预期会针对其产生所不希望的免疫应答的治疗性蛋白进行治疗的受试者。

[0067] 在另一方面,向受试者给予在此提供的任何这些组合物。可以按有效降低针对一种或多种治疗性蛋白的所不希望的免疫应答的产生的量给予该组合物。在一个实施例中,根据一种治疗方案向受试者给予一种组合物,该治疗方案先前已显示可以降低一个或多个受试者中针对多种治疗性蛋白的所不希望的免疫应答的产生。该所不希望的免疫应答可以是产生治疗性蛋白特异性抗体、CD4+T 细胞增殖和 / 或活性、或 B 细胞增殖和 / 或活性、或其组合。这些所不希望的免疫应答还可以是产生来自上述所不希望的免疫应答下游的其他免疫应答。在多个实施例中,有效的量或治疗方案产生或已经显示可产生所希望的免疫应答。此类免疫应答包括降低上述任何所不希望的免疫应答或其组合。此类免疫应答包括任何致耐受性免疫应答,如在此描述的那些。

[0068] 可以在向受试者给予一种治疗性蛋白之前、与此同时或在此之后向该受试者给予这些组合物。在一些实施例中,在该受试者中建立成熟记忆应答之前给予这些合成纳米载体组合物。在一些实施例中,提供的这些方法可以进一步包括给予该治疗性蛋白。在多个实施例中,还可以作为一个或多个维持剂量向已经接受、正在接受或将要接受治疗性蛋白的受试者给予所提供的这些组合物。在此类实施例中,给予所提供的这些组合物,使得所不希望的免疫应答的产生被降低持续一定长度的时间。在此在其他地方提供了此类长度的例子。

[0069] 在又一个方面,提供了一种 (i) 产生第一群体的合成纳米载体和 (ii) 产生第二群体的合成纳米载体的方法,这些第一群体的合成纳米载体与免疫抑制剂偶联,这些第二群体的合成纳米载体与治疗性蛋白 APC 可呈递抗原偶联。在一个实施例中,该方法进一步包括产生一种剂型,该剂型包含这些第一和第二群体的合成纳米载体。

[0070] 现在,在以下将更详细地描述本发明。

[0071] B. 定义

[0072] “给予 (Administering)”或“给予 (administration)”意指以药理学上有用的方式向受试者提供一种物质。

[0073] 在用于向受试者给予的一种组合物或剂型的背景下的“有效的量”是指在该受试者中产生一种或多种希望的免疫应答(例如,产生致耐受性免疫应答(例如,减少抗原特异性 CD4+T 细胞或抗原特异性 B 细胞的增殖、激活、诱导、募集、或减少抗原特异性抗体的产生))的该组合物或剂型的量。因此,在一些实施例中,有效的量是产生一种或多种这些希望的免疫应答的在此提供的一种组合物的任何量。这个量可以出于体外或体内目的。对于体内目的而言,该量可以是临床医师将认为对有抗原特异性耐受需要的受试者可以具有临床益处的量。

[0074] 有效的量可以仅涉及降低所不希望的免疫应答的水平,虽然在一些实施例中,它涉及完全防止所不希望的免疫应答。有效的量还可以涉及延迟所不希望的免疫应答的发

生。有效的量还可以是产生所希望的治疗终点或所希望的治疗结果的在此提供的一种组合物的量。有效的量优选在受试者中导致针对抗原的致耐受性免疫应答。可以通过常规方法来监测任何上述免疫应答的实现。

[0075] 在提供的任何这些组合物和方法的一些实施例中，该有效的量是其中使所希望的免疫应答在该受试者中持续至少 1 周、至少 2 周、至少 1 个月、至少 2 个月、至少 3 个月、至少 4 个月、至少 5 个月、至少 6 个月、至少 9 个月、至少 1 年、至少 2 年、至少 5 年、或更长时间的量。在提供的任何这些组合物和方法的其他实施例中，该有效的量是产生一种可测量的所希望的免疫应答（例如，可测量的免疫应答（例如，针对一种特异性抗原）降低）持续至少 1 周、至少 2 周、至少 1 个月、至少 2 个月、至少 3 个月、至少 4 个月、至少 5 个月、至少 6 个月、至少 9 个月、至少 1 年、至少 2 年、至少 5 年、或更长时间的量。

[0076] 当然，有效的量将取决于正被治疗的具体受试者；病症、疾病或紊乱的严重性；个体患者的参数，包括年龄、身体状况、体型以及体重；治疗持续时间；同步疗法（如果有）的性质；特定的给药途径、以及健康执业医师的知识和专业技能内的类似因素。这些因素为本领域普通技术人员所熟知，并且可以仅用常规实验方法解决。通常优选的是使用最大剂量，即根据正确医学判断的最高安全剂量。然而，本领域普通技术人员应当理解，出于医学原因、心理原因或几乎任何其他原因，患者可以坚持较低剂量或耐受剂量。

[0077] 通常，本发明的组合物中的这些免疫抑制剂和 / 或抗原的剂量可以在从约 10 μg/kg 至约 100,000 μg/kg 的范围内。在一些实施例中，这些剂量可以在从约 0.1mg/kg 至约 100mg/kg 的范围内。在再其他的实施例中，这些剂量可以在从约 0.1mg/kg 至约 25mg/kg、约 25mg/kg 至约 50mg/kg、约 50mg/kg 至约 75mg/kg、或约 75mg/kg 至约 100mg/kg 的范围内。可替代地，可以基于提供希望的量的免疫抑制剂和 / 或抗原的合成纳米载体的数目给予该剂量。例如，有用的剂量包括每剂量大于 10^6 个、 10^7 个、 10^8 个、 10^9 个或 10^{10} 个合成纳米载体。有用的剂量的其他例子包括每剂量从约 1×10^6 至约 1×10^{10} 个、约 1×10^7 至约 1×10^9 个、或约 1×10^8 至约 1×10^9 个合成纳米载体。

[0078] “抗原”意指 B 细胞抗原或 T 细胞抗原。“抗原的一种或多种类型”意指共享相同的、或基本上相同的抗原特性的分子。在一些实施例中，抗原可以是蛋白质类、多肽类、肽类、脂蛋白类、糖脂类、多核苷酸类、多糖类，或被包含或表达在细胞中。在一些实施例中，例如当没有很好定义或表征这些抗原时，这些抗原可以被包含在细胞或组织制品、细胞碎片、细胞外来体、条件培养基等等之内。可以与受试者暴露于引起所不希望的免疫应答者相同的形式将一种抗原与这些合成纳米载体组合，但该抗原还可以是其片段或衍生物。然而，当为一个片段或衍生物时，针对由这样的受试者遇到的形式的所希望的免疫应答是使用所提供的这些组合物和方法的优选结果。

[0079] “抗原特异性”是指由该抗原或其部分的存在引起的、或产生特异地识别或结合该抗原的多种分子的任何免疫应答。例如，在该免疫应答是抗原特异性抗体产生的条件下，产生了特异地结合该抗原的多种抗体。作为另一个例子，在该免疫应答是抗原特异性 B 细胞或 CD4+T 细胞增殖和 / 或活性的情况下，该增殖和 / 或活性由单独地或与 MHC 分子复合的该抗原或其部分、B 细胞等等的识别引起。

[0080] “评定一种免疫应答”是指对体外或体内免疫应答的水平、存在或不存在、降低、增加等等进行的任何测量或测定。可以在从受试者中获得的一个或多个样品上进行此类测量

或测定。可以用在此提供的任何方法或本领域中已知的其他方法来进行此类评定。

[0081] “处于风险中”的受试者是健康执业医师认为其具有患上在此所提供的疾病、紊乱或病症的机会的受试者、或健康执业医师认为其具有经历在此所提供的所不希望的免疫应答的机会的受试者。

[0082] 如在此所使用的“平均值”是指算术平均值，除非另外指出。

[0083] “B 细胞抗原”意指由 B 细胞识别并且触发 B 细胞中的免疫应答的任何抗原（例如由 B 细胞或其上的受体特异性地识别的抗原）。在一些实施例中，作为一种 T 细胞抗原的抗原也是一种 B 细胞抗原。在其他实施例中，该 T 细胞抗原并不也是一种 B 细胞抗原。B 细胞抗原包括但不限于蛋白质类、肽类等等。在一些实施例中，B 细胞抗原包括非蛋白抗原（即，不是一种蛋白质或肽抗原）。

[0084] “同时”意指以时间相关的、优选地时间充分相关的方式向受试者给予两种或更多种物质，以便提供对免疫应答的调节。在多个实施例中，可以通过以相同剂型给予两种或更多种物质而发生同时给予。在其他实施例中，同时给予可以涵盖以不同剂型、但在指定时间段内、优选在 1 个月内、更优选在 1 周内、再更优选在 1 天内并且甚至更优选在 1 小时内给予两种或更多种物质。

[0085] “偶联 (Couple)”或“偶联 (Coupled)”或“偶联 (Couples)”（诸如此类）意指使一个实体（例如一个部分）与另一个实体在化学上结合。在一些实施例中，偶联是共价的，这意味着该偶联是在两个实体之间存在共价键的背景下发生的。在非共价的实施例中，通过非共价相互作用介导非共价偶联，这些非共价相互作用包括但不限于：电荷相互作用、亲和相互作用、金属配位、物理吸附、主 - 客体相互作用、疏水相互作用、TT 堆积相互作用、氢键相互作用、范德华相互作用、磁相互作用、静电相互作用、偶极 - 偶极相互作用、和 / 或其组合。在多个实施例中，封装是偶联的一种形式。

[0086] “衍生的”意指由一种材料或与一种材料相关的信息制备的，而不是从该材料“获得的”。此类材料可以是直接取自一种生物材料的材料的实质性地改变或加工的形式。此类材料还包括从与一种生物材料相关的信息所产生的材料。

[0087] “剂型”意指在一种适用于向受试者给予的介质、载体、媒介物或装置中的药理学和 / 或免疫学活性材料。

[0088] “封装”意指将物质的至少一个部分封闭在合成纳米载体内。在一些实施例中，一种物质被完全封闭在合成纳米载体内。在其他实施例中，被封装的物质的大部分或全部不暴露于该合成纳米载体外的局部环境。在其他实施例中，不超过 50%、40%、30%、20%、10% 或 5%（重量 / 重量）暴露于局部环境。封装不同于吸附，吸附是将物质的大部分或全部置于合成纳米载体的表面上，并且使得该物质暴露于该合成纳米载体外的局部环境。

[0089] “表位”，又称为抗原决定簇，是由免疫系统，确切地由例如抗体、B 细胞、或 T 细胞识别的抗原部分。如在此所使用，“MHC I 类限制性表位”是通过在有核细胞上发现的 MHC I 类分子呈递给免疫细胞的表位。“MHC II 类限制性的表位”是通过在抗原呈递细胞 (APC) 上（例如，在专门的抗原呈递免疫细胞上，如在巨噬细胞、B 细胞以及树突状细胞上，或在非造血细胞如肝细胞上）发现的 MHC II 类分子呈递给免疫细胞的表位。“B 细胞表位”是由抗体或 B 细胞识别的分子结构。在一些实施例中，该表位本身是一种抗原。

[0090] 许多表位是本领域普通技术人员已知的，并且根据本发明的一些方面适合的示例

性表位包括但不限于列在免疫表位数据库 (www.immuneepitope.org, 维塔·R(Vita R)、札瑞布斯基·L(Zarebski L)、格林鲍姆·JA(Greenbaum JA)、埃马米·H(Emami H)、霍夫·I(Hoof I)、萨利姆·N(Salimi N)、达美乐·R(Damle R)、赛特·A(Sette A)、彼得斯·B(Peters B), 免疫表位数据库 2.0(The immune epitope database2.0). 核酸研究(Nucleic Acids Res), 2010 年 1 月; 38(数据库发行号): D854–62; 该免疫表位数据库的全部内容以及 2011 年 8 月的 IEDB2.4 版本的所有数据库条目, 并且具体地说在其中披露的所有表位通过引用结合在此) 中的那些。还可以使用公开可获得的算法来鉴定表位, 这些算法例如在以下文献中描述的算法: 王平(Wang P)、西德尼·J(Sidney J)、金姆·Y(Kim Y)、赛特·A(Sette A)、伦德·O(Lund O)、尼耳森·M(Nielsen M)、彼得斯·B(Peters B), 2010, 用于 HLA DR、DP 以及 DQ 分子的肽结合预测(peptide binding predictions for HLA DR, DP and DQ molecules), BMC 生物信息学(BMC Bioinformatics)2010, 11: 568; 王平(Wang P)、西德尼·J(Sidney J)、道·C(Dow C)、莫斯·B(Mothé B)、赛特·A(Sette A)、彼得斯·B(Peters B), 2008, MHC II 类肽结合预测的系统性评定和一致方法的评估(A systematic assessment of MHC class II peptide binding predictions and evaluation of a consensus approach), PLoS 计算生物学(PLoS Comput Biol.)4(4): e1000048; 尼耳森·M(Nielsen M)、伦德·O(Lund O), 2009, NN-比对, 用于 MHC II 类肽结合预测的基于人工神经网络的比对算法(NN-align. An artificial neural network-based alignment algorithm for MHC class II peptide binding prediction), BMC 生物信息学(BMC Bioinformatics), 10: 296; 尼耳森·M(Nielsen M)、伦德高·C(Lundsgaard C)、伦德·O(Lund O), 2007, 使用新颖的稳定化矩阵比对方法 SMM-比对预测 MHC II 类结合亲和性(Prediction of MHC class II binding affinity using SMM-align, a novel stabilization matrix alignment method), BMC 生物信息学(BMC Bioinformatics), 8: 238; 裴·HH(Bui HH)、西德尼·J(Sidney J)、彼得斯·B(Peters B)、萨塞默塞·M(Sathiamurthy M)、真一·A(Sinichi A)、潘顿·KA(Purton KA)、莫斯·BR(Mothé BR)、奇萨利·FV(Chisari FV)、沃特金斯·DI(Watkins DI)、赛特·A(Sette A), 2005, 免疫遗传学(Immunogenetics), 57: 304–314; 斯图尔尼奥洛·T(Storniolo T)、博诺·E(Bono E)、丁·J(Ding J)、拉德里查尼·L(Raddrizzi L)、图雷西·O(Tuereci O)、萨因·U(Sahin U)、布雷桑勒·M(Braxenthaler M)、加利亚西·F(Gallazzi F)、普罗狄·MP(Protti MP)、西尼加利亚·F(Sinigaglia F)、汉姆莫·J(Hammer J), 1999, 使用 DNA 微阵列和虚拟的 HLA II 类矩阵产生组织特异性的和混杂的 HLA 配体数据库(Generation of tissue-specific and promiscuous HLA ligand databases using DNA microarrays and Virtual HLA class II matrices). 自然生物技术(Nat Biotechnol), 17(6): 555–561; 尼耳森·M(Nielsen M)、伦德高·C(Lundsgaard C)、沃林·P(Worning P)、拉尔莫勒·SL(Lauemoller SL)、拉姆博特·K(Lamberth K)、布斯·S(Buus S)、布鲁纳克·S(Brunak S)、伦德·O(Lund O), 2003, 使用具有新颖序列表示的神经网络可靠预测 T 细胞表位(Reliable prediction of T-cell epitopes using neural networks with novel sequence representations), 蛋白质科学(Protein Sci)12: 1007–1017; 裴·HH(Bui HH)、西德尼·J(Sidney J)、彼得斯·B(Peters B)、萨塞默塞·M(Sathiamurthy M)、真一·A(Sinichi A)、潘顿·KA(Purton KA)、莫斯·BR(Mothé BR)、奇萨利·FV(Chisari FV)、沃特金斯·DI(Watkins DI)、赛特·A(Sette A)

A), 2005, 特异性 MHC 结合预测工具的自动产生和评估 :ARB 矩阵应用 (Automated generation and evaluation of specific MHC binding predictive tools :ARB matrix applications), 免疫遗传学 (Immunogenetics) 57 :304-314; 彼得斯 · B(Peters B)、赛特 · A(Sette A), 2005, 使用稳定化的矩阵方法产生描述生物过程的序列特异性的定量模型 (Generating quantitative models describing the sequence specificity of biological processes with the stabilized matrix method), BMC 生物信息学 (BMC Bioinformatics) 6 :132; 周 · PY(Chou PY)、法斯曼 · GD(Fasman GD), 1978, 由氨基酸序列预测蛋白质的二级结构 (Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence), 酶学相关领域分子生物学进展 (Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol) 47 :45-148; 伊米妮 · EA(Emini EA)、休斯 · JV(Hughes JV)、珀洛 · DS(Perlone DS)、博格 · J(Boger J), 1985, 由病毒特异性合成肽诱导中和甲型肝炎病毒的抗体 (Induction of hepatitis A virus-neutralizing antibody by a virus-specific synthetic peptide), 病毒学期刊 (J Virol) 55 :836-839; 卡普拉斯 · PA(Karplus PA)、舒尔兹 · GE(Schulz GE), 1985, 预测蛋白质中的链柔性 (Prediction of chain flexibility in proteins), 自然科学 (Naturwissenschaften) 72 :212-213; 科拉斯卡 · AS(Kolaskar AS)、顿考恩卡 · PC(Tongaonkar PC), 1990, 用于预测蛋白质抗原上的抗原决定簇的半经验方法 (A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens), FEBS 快报 (FEBS Lett) 276 :172-174; 帕克 · JM(Parker JM)、郭 · D(Guo D)、霍奇斯 · RS(Hodges RS), 1986, 来源于高效液相色谱法肽保留数据的新型亲水性标度 : 预测的表面残基与抗原性和源自 X 射线的可接近位点的相关性 (New hydrophilicity scale derived from high-performance liquid chromatography peptide retention data : correlation of predicted surface residues with antigenicity and X-ray-derived accessible sites), 生物化学 (Biochemistry) 25 :5425-5432; 拉森 · JE(Larsen JE)、伦德 · O(Lund O)、尼耳森 · M(Nielsen M), 2006, 用于预测线性 B 细胞表位的改进方法 (Improved method for predicting linear B-cell epitopes), 免疫研究 (Immunome Res) 2 :2; 波诺马连科 · JV(Ponomarenko JV)、伯恩 · PE(Bourne PE), 2007, 抗体 - 蛋白质相互作用 : 基准数据集和预测工具评估 (Antibody-protein interactions :benchmark datasets and prediction tools evaluation), BMC 结构生物学 (BMC Struct Biol) 7 :64; 哈斯特安德森 · P(Haste Andersen P)、尼耳森 · M(Nielsen M)、伦德 · O(Lund O), 2006, 使用蛋白质 3D 结构预测不连续 B 细胞表位中的残基 (Prediction of residues in discontinuous B-cell epitopes using protein 3D structures), 蛋白质科学 (Protein Sci) 15 :2558-2567; 波诺马连科 · JV(Ponomarenko JV)、裴 · H(Bui H)、李 · W(Li W)、福斯德 · N(Fusseder N)、伯恩 · PE(Bourne PE)、赛特 Sette A、彼得斯 · B(Peters B), 2008, E11iPro : 用于预测抗体表位的新型基于结构的工具 (E11iPro : a new structure-based tool for the prediction of antibody epitopes), BMC 生物信息学 (BMC Bioinformatics) 9 :514; 尼耳森 · M(Nielsen M)、伦德高 · C(Lundegaard C)、布里加 · T(Blicher T)、彼得斯 · B(Peters B)、赛特 · A(Sette A)、贾斯特逊 · S(Justesen S)、布斯 · S(Buus S) 以及伦德 · O(Lund O), 2008, PLoS 计算生物学 (PLoS Comput Biol.) 4(7)e1000107, 肽结合具有已知序列的任何 HLA-DR 分子的定量预测 :

NetMHCIIPan (Quantitative predictions of peptide binding to any HLA-DR molecule of known sequence :NetMHCIIPan) ;这些文献各自的全部内容通过引用结合在此以用于披露用于鉴定表位的方法和算法。

[0091] “产生”意指本身直接地或间接地（如但不限于，通过依赖某人的语言或行为采取行动的不相关的第三方）引起一种行为（如一种免疫应答（例如，致耐受性免疫应答））发生。

[0092] “鉴定”是允许临床医师将受试者识别为可能从在此提供的这些方法和组合物中获益者的任何行为或一系列行为。优选地，鉴定的受试者是对如在此所提供的致耐受性免疫应答有需要者。该行为或一系列行为可以是本身直接地或间接地，如但不限于，通过依赖某人的语言或行为采取行动的不相关的第三方。

[0093] “免疫抑制剂”意指引起 APC 具有免疫抑制性（例如，致耐受性作用）的一种化合物。免疫抑制作用通常是指由 APC 产生或表达细胞因子或其他因子，该产生或表达降低、抑制或防止所不希望的免疫应答、或促进所希望的免疫应答。当该 APC 对识别由该 APC 呈递的抗原的免疫细胞产生一种免疫抑制作用时，该免疫抑制作用被称为是对呈递的抗原特异的。此种作用在此还称为致耐受性作用。不受任何具体理论束缚，认为该免疫抑制或致耐受作用是该免疫抑制剂被递送至该 APC 上的结果，优选在一种抗原（例如，一种给予的抗原或已经存在于体内的抗原）存在的情况下。因此，该免疫抑制剂包括提供针对一种抗原的致耐受性免疫应答的化合物，这些化合物可以被或可以不被提供在相同的组合物或不同的组合物中。在一个实施例中，该免疫抑制剂是引起 APC 促进一个或多个免疫效应细胞中的调节表型的免疫抑制剂。例如，可以通过抑制抗原特异性 CD4+T 细胞或 B 细胞的产生、诱导、刺激或募集；抑制抗原特异性抗体的产生、Treg 细胞（例如，CD4+CD25highFoxP3+Treg 细胞）的产生、诱导、刺激或募集等等，对该调节表型进行表征。这可以是 CD4+T 细胞或 B 细胞转化为调节表型的结果。这还可以是在其他免疫细胞（如 CD8+T 细胞、巨噬细胞以及 iNKT 细胞）中诱导 FoxP3 的结果。在一个实施例中，该免疫抑制剂是在 APC 加工抗原之后影响该 APC 的应答的免疫抑制剂。在另一个实施例中，该免疫抑制剂不是干扰抗原加工的免疫抑制剂。在一个另外的实施例中，该免疫抑制剂不是一种细胞凋亡信号分子。在另一个实施例中，该免疫抑制剂不是一种磷脂。

[0094] 免疫抑制剂包括但不限于：抑制素；mTOR 抑制剂，如雷帕霉素或一种雷帕霉素类似物；TGF- β 信号剂；TGF- β 受体激动剂；组蛋白去乙酰化酶抑制剂，如曲古抑菌素 A (Trichostatin A)；皮质类固醇类；线粒体功能抑制剂，如鱼藤酮 (rotenone)；P38 抑制剂；NF- κ β 抑制剂，如 6Bio、地塞米松、TCPA-1、IKK VII；腺苷受体激动剂；前列腺素 E2 激动剂 (PGE2)，如米索前列醇 (Misoprostol)；磷酸二酯酶抑制剂，如磷酸二酯酶 4 抑制剂 (PDE4)，如咯利普兰 (Rolipram)；蛋白酶体抑制剂；激酶抑制剂；G- 蛋白偶联受体激动剂；G- 蛋白偶联受体拮抗剂；糖皮质激素类；类视黄醇类；细胞因子抑制剂；细胞因子受体抑制剂；细胞因子受体激活剂；过氧化物酶体增殖物激活受体拮抗剂；过氧化物酶体增殖物激活受体激动剂；组蛋白去乙酰化酶抑制剂；钙调磷酸酶 (calcineurin) 抑制剂；磷酸酶抑制剂；PI3KB 抑制剂，如 TGX-221；自噬 (autophagy) 抑制剂，如 3- 甲基腺嘌呤；芳香烃受体抑制剂；蛋白酶体抑制剂 I (PSI)；以及氧化的 ATP，如 P2X 受体阻断剂。免疫抑制剂还包括 IDO、维生素 D3、环孢霉素类（如环孢霉素 A）、芳香烃受体抑制剂、白藜芦醇、硫唑嘌呤

(Aza)、6-巯基嘌呤 (6-MP)、6-硫鸟嘌呤 (6-TG)、FK506、萨菲菌素 A (sanglifehrin A)、沙美特罗 (salmeterol)、吗替麦考酚酯 (mycophenolate mofetil) (MMF)、阿司匹林以及其他 COX 抑制剂、尼氟酸、雌三醇以及雷公藤甲素 (triptolide)。在多个实施例中，免疫抑制剂可以包含在此提供的任何药剂 (agent)。

[0095] 免疫抑制剂可以是对 APC 直接提供免疫抑制 (例如，致耐受) 作用的一种化合物，或该免疫抑制剂可以是间接 (即，在给予之后以某种方式被加工之后) 提供免疫抑制 (例如，致耐受) 作用的一种化合物。因此，免疫抑制剂包括在此提供的任何化合物的前药形式。

[0096] 免疫抑制剂还可以包括编码在此提供的产生免疫抑制 (例如，致耐受) 免疫应答的肽、多肽或蛋白质的核酸。因此，在多个实施例中，免疫抑制剂是编码一种产生免疫抑制 (例如，致耐受) 免疫应答的肽、多肽或蛋白质的核酸，并且该免疫抑制剂是与合成纳米载体偶联的核酸。

[0097] 该核酸可以是 DNA 或 RNA，如 mRNA。在多个实施例中，这些发明的组合物包含一种互补物，如一种全长互补物，或在此提供的任何这些核酸的一种简并物 (由于遗传密码的简并性)。在多个实施例中，核酸是一种表达载体，当转染至细胞系中时，该表达载体可以被转录。在多个实施例中，该表达载体可以包含除其他之外的质粒、逆转录病毒、或腺病毒。可以使用标准的分子生物学方法来分离或合成核酸，例如通过使用聚合酶链反应来产生核酸片段，然后对该核酸片段进行纯化并且克隆至表达载体中。对本发明的实践有用的另外技术可以在 2007 年约翰威立国际出版公司 (John Wiley and Sons, Inc.) 的现代分子生物学实验方案 (Current Protocols in Molecular Biology)；分子克隆：实验室手册 (第三版) 萨姆布鲁克 (Molecular Cloning :A Laboratory Manual (Third Edition) Joseph Sambrook)，彼得麦卡勒姆癌症研究所 (Peter MacCallum Cancer Institute)，墨尔本 (Melbourne)，澳大利亚 (Australia)；大卫罗素 (David Russell)，德克萨斯大学西南医学中心 (University of Texas Southwestern Medical Center)，达拉斯 (Dallas)，冷泉港 (Cold Spring Harbor) 中找到。

[0098] 在多个实施例中，在此提供的这些免疫抑制剂与合成纳米载体偶联。在多个优选的实施例中，免疫抑制剂是除了构成该合成纳米载体的结构的材料之外的一个成分。例如，在一个实施例中，在合成纳米载体由一种或多种聚合物构成的情况下，该免疫抑制剂是除了这一种或多种聚合物之外的并且与其偶联的一种化合物。作为另一个实例，在一个实施例中，在该合成纳米载体由一种或多种脂质构成的情况下，该免疫抑制剂又是除了这一种或多种脂质之外的并且与其偶联的。在多个实施例中，例如在该合成纳米载体的材料也产生一种免疫抑制 (例如，致耐受) 作用的情况下，该免疫抑制剂是产生一种免疫抑制 (例如，致耐受) 作用的、除了该合成纳米载体材料之外而存在的一种成分。

[0099] 其他示例性的免疫抑制剂包括但不限于：小分子药物、天然产物、抗体 (例如，对抗 CD20、CD3、CD4 的抗体)、基于生物制剂的药物、基于碳水化合物的药物、纳米颗粒、脂质体、RNAi、反义核酸、适体、氨甲蝶呤、NSAID；芬戈莫德 (fingolimod)；那他珠单抗 (natalizumab)；阿仑单抗 (alemtuzumab)；抗 CD3；他克莫司 (tacrolimus) (FK506) 等等。另外的免疫抑制剂对于本领域的技术人员是已知的，并且本发明在此方面不受限制。

[0100] 免疫抑制剂或治疗性蛋白 APC 可呈递抗原的“负载”是基于整个合成纳米载体中

的材料的总重量,与合成纳米载体偶联的免疫抑制剂或治疗性蛋白 APC 可呈递抗原的量(重量 / 重量)。通常,该负载被计算为在一个群体的合成纳米载体上的平均值。在一个实施例中,平均在这些第一群体的合成纳米载体上的免疫抑制剂的负载是在 0.0001% 与 50% 之间。在另一个实施例中,平均在这些第一群体和 / 或第二群体的合成纳米载体上的该治疗性蛋白 APC 可呈递抗原的负载是在 0.0001% 与 50% 之间。在又另一个实施例中,该免疫抑制剂和 / 或治疗性蛋白 APC 可呈递抗原的负载是在 0.01% 与 20% 之间。在一个另外的实施例中,该免疫抑制剂和 / 或治疗性蛋白 APC 可呈递抗原的负载是在 0.1% 与 10% 之间。在再一个另外的实施例中,该免疫抑制剂和 / 或治疗性蛋白 APC 可呈递抗原的负载是在 1% 与 10% 之间。在又另一个实施例中,平均在该群体的合成纳米载体上的免疫抑制剂和 / 或治疗性蛋白 APC 可呈递抗原的负载是至少 0.1%、至少 0.2%、至少 0.3%、至少 0.4%、至少 0.5%、至少 0.6%、至少 0.7%、至少 0.8%、至少 0.9%、至少 1%、至少 2%、至少 3%、至少 4%、至少 5%、至少 6%、至少 7%、至少 8%、至少 9%、至少 10%、至少 11%、至少 12%、至少 13%、至少 14%、至少 15%、至少 16%、至少 17%、至少 18%、至少 19% 或至少 20%。在又一个另外的实施例中,平均在该群体的合成纳米载体上的免疫抑制剂和 / 或治疗性蛋白 APC 可呈递抗原的负载是 0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19% 或 20%。在以上实施例中的一些实施例中,平均在一个群体的合成纳米载体上的免疫抑制剂和 / 或治疗性蛋白 APC 可呈递抗原的负载是不大于 25%。在多个实施例中,如实例中所描述对该负载进行计算。

[0101] 在提供的任何这些组合物和方法的多个实施例中,如下计算该负载:收集近似 3mg 的合成纳米载体,并且离心以使上清液与合成纳米载体沉淀物分离。向该沉淀物添加乙腈,并且对样品进行超声处理并离心以去除任何不溶的材料。在 RP-HPLC 上注射该上清液和沉淀物,并且在 278nm 处读取吸光度。该沉淀物中的 μg 用来计算%包载(负载),在上清液和沉淀物中的 μg 用来计算回收的总 μg 。

[0102] “维持剂量”是指在初始剂量已经在受试者中产生免疫抑制(例如,致耐受)应答之后,为了持续所希望的免疫抑制(例如,致耐受)应答而向受试者给予的剂量。维持剂量例如可以是维持在该初始剂量之后所实现的致耐受作用、防止该受试者中的所不希望的免疫应答、或防止该受试者变为处于经历所不希望的免疫应答(包括所不希望的水平的免疫应答)风险的受试者的剂量。在一些实施例中,该维持剂量是足以持续适当水平的所希望的免疫应答的剂量。

[0103] “合成纳米载体的最大尺寸”意指沿着该合成纳米载体的任何轴线测量的纳米载体的最大尺寸。“合成纳米载体的最小尺寸”意指沿着该合成纳米载体的任何轴线测量的合成纳米载体的最小尺寸。例如,对于球形合成纳米载体而言,合成纳米载体的最大和最小尺寸将是基本上相同的,并且将是该合成纳米载体的直径的大小。类似地,针对立方形合成纳米载体,合成纳米载体的最小尺寸将是它的高度、宽度或长度中最小的,而合成纳米载体的最大尺寸将是它的高度、宽度或长度中最大的。在一个实施例中,基于样品中的合成纳米载体的总数,样品中至少 75%、优选地至少 80%、更优选地至少 90% 的这些合成纳米载体的最小尺寸等于或大于 100nm。在一个实施例中,基于样品中的合成纳米载体的总数,样品中至少 75%、优选地至少 80%、更优选地至少 90% 的这些合成纳米载体的最小尺寸等于或小

于 5 μm。优选地，基于样品中的合成纳米载体的总数，样品中至少 75%、优选地至少 80%、更优选地至少 90% 的这些合成纳米载体的最小尺寸大于 110nm、更优选地大于 120nm、更优选地大于 130nm、并且还更优选地大于 150nm。发明的合成纳米载体的最大尺寸与最小尺寸的长宽比可以取决于实施例而变化。例如，这些合成纳米载体的最大尺寸与最小尺寸的长宽比可以从 1 : 1 至 1,000,000 : 1、优选地从 1 : 1 至 100,000 : 1、更优选地从 1 : 1 至 10,000 : 1、更优选地从 1 : 1 至 1000 : 1、再更优选地从 1 : 1 至 100 : 1、并且又更优选地从 1 : 1 至 10 : 1 变化。优选地，基于样品中的合成纳米载体的总数，样品中至少 75%、优选地至少 80%、更优选地至少 90% 的这些合成纳米载体的最大尺寸等于或小于 3 μm、更优选地等于或小于 2 μm、更优选地等于或小于 1 μm、更优选地等于或小于 800nm、更优选地等于或小于 600nm、并且还更优选地等于或小于 500nm。在多个优选的实施例中，基于样品中的合成纳米载体的总数，样品中至少 75%、优选地至少 80%、更优选地至少 90% 的这些合成纳米载体的最小尺寸等于或大于 100nm、更优选地等于或大于 120nm、更优选地等于或大于 130nm、更优选地等于或大于 140nm、并且还更优选地等于或大于 150nm。通过将这些合成纳米载体悬浮在一种液体（通常是水性）介质中，并且使用动态光散射 (DLS)（例如使用一台 Brookhaven ZetaPALS 仪器），获得合成纳米载体尺寸（例如，直径）的测量值。例如，可以将具有合成纳米载体的悬浮液从水性缓冲剂中稀释到纯化水中以达到近似 0.01 至 0.1mg/mL 的最终的合成纳米载体悬浮液浓度。可以在一个适合的比色皿中直接制备稀释的悬浮液，或转移至该比色皿中以用于 DLS 分析。然后可以将该比色皿置于 DLS 中，允许其平衡至受控的温度，并且然后扫描充分的时间以在介质的粘度和样品的折射率的适当输入的基础上获得稳定且可再现的分布。然后报告有效直径，或该分布的平均值。合成纳米载体的“尺寸”或“大小”或“直径”意指使用动态光散射获得的粒度分布的平均值。

[0104] “MHC”是指主要组织相容性复合体，即在大多数脊椎动物中发现的编码 MHC 分子的一个大的基因组区或基因家族，这些 MHC 分子将被加工的蛋白质的片段或表位展示在细胞表面上。细胞表面上的 MHC : 肽的呈递允许通过免疫细胞（通常是 T 细胞）来监视。存在两大类 MHC 分子：I 类和 II 类。通常，I 类 MHC 分子被发现在有核细胞上并且将肽呈递给细胞毒性 T 细胞。II 类 MHC 分子被发现在某些免疫细胞（主要是巨噬细胞、B 细胞以及树突状细胞）上，这些免疫细胞共同称为专职性 APC。MHC 区中最有名的基因是编码细胞表面上的抗原呈递蛋白的亚型。在人类中，这些基因被称为人白细胞抗原 (HLA) 基因。

[0105] “非甲氧基封端的聚合物”意指具有以除了甲氧基之外的部分结束的至少一个末端的聚合物。在一些实施例中，该聚合物具有以除了甲氧基之外的部分结束的至少两个末端。在其他实施例中，该聚合物不具有以甲氧基结束的末端。“非甲氧基封端的普朗尼克聚合物”意指除了在两个末端处具有甲氧基的线性普朗尼克聚合物之外的一种聚合物。如在此所提供的聚合物纳米颗粒可以包含非甲氧基封端的聚合物或非甲氧基封端的普朗尼克聚合物。

[0106] “获得”意指直接从一种材料中取得并且基本上不用改变和 / 或加工而使用。

[0107] “药学上可接受的赋形剂”意指与列举的这些合成纳米载体一起使用以配制本发明的组合物的药理学上非活性的材料。药学上可接受的赋形剂包含本领域中已知的各种材料，包括但不限于糖类（如葡萄糖、乳糖，等等）、防腐剂（如抗微生物剂）、复原助剂、着色剂、盐水（如磷酸盐缓冲盐水）、以及缓冲剂。

[0108] “治疗方案 (Protocol)”是指针对受试者的一种或多种物质的任何给药方案。给药方案可以包括给药的量、频率和 / 或方式。在一些实施例中，此种治疗方案可以用来向一个或多个测试受试者给予本发明的一种或多种组合物。然后可以对这些测试受试者中的免疫应答进行评定，以便确定该治疗方案是否对降低所不希望的免疫应答或产生所希望的免疫应答（例如，促进致耐受性作用）有效。还可以代替或除了前面提到的这些免疫应答之外，对任何其他治疗性和 / 或预防性作用进行评定。可以使用在此提供的任何方法或本领域中已知的其他方法确定一个治疗方案是否具有所希望的作用。例如，可以从已经根据一个具体的治疗方案而被给予了在此提供的一种组合物的受试者中获得一群细胞，以便确定特异性免疫细胞、细胞因子、抗体等等是否被减少、产生、激活等等。用于检测免疫细胞的存在和 / 或数目的有用方法包括但不限于流式细胞检测方法（例如，FACS）和免疫组织化学方法。用于免疫细胞标记物的特异性染色的抗体和其他结合剂是商业上可获得的。此类试剂盒典型地包括用于多种抗原的染色试剂，这些染色试剂允许来自异质细胞群体的所希望的细胞群的基于 FACS 的检测、分离和 / 或定量。

[0109] “提供受试者”是引起临床医师与受试者接触并且向其给予在此提供的一种组合物或在其上进行在此提供的一种方法的任何行为或一系列行为。优选地，该受试者是对如在此所提供的一种致耐受性免疫应答有需要者。该行为或一系列行为可以是本身直接地或间接地，如但不限于，通过依赖某人的语言或行为采取行动的不相关的第三方。

[0110] “受试者”意指动物，包括温血哺乳动物，如人类和灵长类；鸟类；家庭饲养动物或农场动物，如猫、狗、绵羊、山羊、牛、马以及猪；实验动物，如小鼠、大鼠以及豚鼠；鱼类；爬行动物；动物园和野生动物；等等。

[0111] “基本上无 B 细胞表位”是指不存在处于刺激 B 细胞应答的基本上激活的量的 B 细胞表位（在抗原的背景下是其本身、与一种载体结合、或与一种发明的组合物结合）。在多个实施例中，基本上无 B 细胞表位的一种组合物不含可测量的量的抗原的 B 细胞表位。在其他实施例中，此种组合物可以包含可测量的量的抗原的 B 细胞表位，但所述量并不有效于产生一种可测量的 B 细胞免疫应答（在抗原的背景下是其本身、与一种载体结合、或与一种发明的组合物结合），如抗原特异性抗体产生或抗原特异性 B 细胞增殖和 / 或活性，或并不有效于产生一种显著可测量的 B 细胞免疫应答（在抗原的背景下是其本身、与一种载体结合、或与一种发明的组合物结合）。在一些实施例中，一种显著可测量的 B 细胞免疫应答是在受试者中产生或将预期会产生不利的临床结果的 B 细胞免疫应答。在其他实施例中，一种显著可测量的 B 细胞免疫应答是大于由对照抗原（例如，已知不包含该抗原的 B 细胞表位或不刺激 B 细胞免疫应答的抗原）产生的相同类型免疫应答（例如，抗原特异性抗体产生或抗原特异性 B 细胞增殖和 / 或活性）的水平的 B 细胞免疫应答。在一些实施例中，一种显著可测量的 B 细胞免疫应答（如抗体滴度的测量值（例如，通过 ELISA））比由一种对照物（例如，对照抗原）产生的相同类型应答大 2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、6 倍、7 倍、8 倍、9 倍、10 倍、15 倍、20 倍或更多倍。在其他实施例中，基本上无 B 细胞表位的一种组合物是产生很少至不产生抗原特异性抗体滴度的组合物（在抗原的背景下是其本身、与一种载体结合、或与一种发明的组合物结合）的组合物。此类组合物包括产生的抗体滴度（如 EC50 值）为小于 500、400、300、200、100、50、40、30、20 或 10 的那些。在一些实施例中，一种显著可测量的 B 细胞免疫应答是比由一种对照物产生的相同类型应答大 10%、25%、50%、100%、2 倍、

3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍或更多倍的B细胞数目或增殖的测量值。用于测量B细胞应答的其他方法是本领域普通技术人员已知的。

[0112] 在多个实施例中,为了确保一种组合物基本上不包含B细胞表位,对抗原进行选择,使得这些抗原不包含用于与如在此所提供的与合成纳米载体偶联的B细胞表位。在其他实施例中,为了确保一种组合物基本上不包含抗原的B细胞表位,产生与该抗原偶联的合成纳米载体并且测试其B细胞免疫应答(例如,抗原特异性抗体产生、B细胞增殖和/或活性)。然后可以选择展现出希望的特性的多种组合物。

[0113] “一种或多种合成纳米载体”意指在自然中未发现的、并且在大小上具有小于或等于5微米的至少一个尺寸的离散物体。白蛋白纳米颗粒通常被包括为合成纳米载体,然而在某些实施例中,这些合成纳米载体并不包含白蛋白纳米颗粒。在多个实施例中,发明的合成纳米载体不包含壳聚糖。在其他实施例中,发明的合成纳米载体不是基于脂质的纳米颗粒。在另外多个实施方案中,发明的合成纳米载体不包含磷脂。

[0114] 一种合成纳米载体可以是但不限于以下各项中的一种或多种:基于脂质的纳米颗粒(在此又称为脂质纳米颗粒,即构成它们结构的大多数材料是脂质的纳米颗粒)、聚合物纳米颗粒、金属纳米颗粒、基于表面活性剂的乳液、树枝状化合物、巴基球、纳米线、病毒样颗粒(即,主要由病毒结构蛋白构成、但不是感染性的或具有低感染性的颗粒)、基于肽或蛋白质的颗粒(在此又称为蛋白质颗粒,即构成它们结构的大多数材料是肽或蛋白质的颗粒)(如白蛋白纳米颗粒)、和/或使用纳米材料的组合而发展的纳米颗粒(如脂质-聚合物纳米颗粒)。合成纳米载体可以具有各种不同的形状,包括但不限于:球形、立方形、锥形、长方形、圆柱形、螺旋管形,等等。根据本发明的合成纳米载体包含一个或多个表面。可以适合用于实践本发明的示例性的合成纳米载体包含:(1)披露在格列夫(Gref)等人的美国专利5,543,158中的可生物降解的纳米颗粒、(2)萨尔兹曼(Saltzman)等人的公开美国专利申请20060002852的聚合物纳米颗粒、(3)戴斯蒙(DeSimone)等人的公开美国专利申请20090028910的光刻构建(lithographically constructed)的纳米颗粒、(4)冯·艾德里安(von Andrian)等人的W02009/051837的披露内容、或(5)披露在佩纳德斯(Penades)等人的公开美国专利申请2008/0145441中的纳米颗粒、(6)披露在德洛斯里奥斯(de los Rios)等人的公开美国专利申请20090226525中的蛋白质纳米颗粒、(7)披露在西贝尔(Sebbel)等人的公开美国专利申请20060222652中的病毒样颗粒、(8)披露在巴赫曼(Bachmann)等人的公开美国专利申请20060251677中的与核酸偶联的病毒样颗粒、(9)披露在W02010047839A1或W02009106999A2中的病毒样颗粒、(10)披露在P·保利赛利(P. Paolicelli)等人的“可以高效结合并递送病毒样颗粒的表面修饰的基于PLGA的纳米颗粒(Surface-modified PLGA-based Nanoparticles that can Efficiently Associate and Deliver Virus-like Particles)”纳米医学(Nanomedicine),5(6):843-853(2010)中的纳米沉淀的纳米颗粒、或(11)披露在美国公开号2002/0086049中的凋亡细胞、凋亡小体、或合成或半合成的模拟物。在多个实施例中,合成纳米载体可以具有大于1:1、1:1.2、1:1.5、1:2、1:3、1:5、1:7、或大于1:10的长宽比。

[0115] 具有等于或小于约100nm、优选地等于或小于100nm的最小尺寸的根据本发明的合成纳米载体不包含具有使补体活化的羟基的表面,或可替代地包含主要由不是使补体活化的羟基的部分组成的表面。在一个优选的实施例中,具有等于或小于约100nm、优选地等

于或小于 100nm 的最小尺寸的根据本发明的合成纳米载体不包含基本上使补体活化的表面, 或可替代地包含主要由不是基本上使活化补体的部分组成的表面。在一个更优选的实施例中, 具有等于或小于约 100nm、优选地等于或小于 100nm 的最小尺寸的根据本发明的合成纳米载体不包含使补体活化的表面, 或可替代地包含主要由不使补体活化的部分组成的表面。在多个实施例中, 合成纳米载体排除病毒样颗粒。在多个实施例中, 合成纳米载体可以具有大于 1 :1、1 :1.2、1 :1.5、1 :2、1 :3、1 :5、1 :7、或大于 1 :10 的长宽比。

[0116] “T 细胞抗原”意指 CD4+T 细胞抗原或 CD8+ 细胞抗原。“CD4+T 细胞抗原”意指由 CD4+T 细胞识别并且触发 CD4+T 细胞中的免疫应答的任何抗原, 例如经由结合到 II 类主要组织相容性复合体分子 (MHC) 上的抗原或其一部分的呈递而被 CD4+T 细胞上的 T 细胞受体特异性地识别的抗原。“CD8+T 细胞抗原”意指由 CD8+T 细胞识别并且触发 CD8+T 细胞中的免疫应答的任何抗原, 例如经由结合到 I 类主要组织相容性复合体分子 (MHC) 上的抗原或其一部分的呈递而被 CD8+T 细胞上的 T 细胞受体特异性地识别的抗原。在一些实施例中, 作为 T 细胞抗原的抗原也是一种 B 细胞抗原。在其他实施例中, 该 T 细胞抗原并不也是一种 B 细胞抗原。T 细胞抗原通常是蛋白类或肽类。

[0117] “治疗性蛋白”是指可以向受试者给予并且具有一种治疗性作用的任何蛋白质或基于蛋白质的疗法。此类疗法包括蛋白质替代和蛋白质补充疗法。此类疗法还包括给予外源或外来的蛋白质、抗体疗法、以及细胞或基于细胞的疗法。治疗性蛋白包括酶、酶辅助因子、激素、凝血因子、细胞因子、生长因子、单克隆抗体、以及多克隆抗体。在此在其他地方提供了其他治疗性蛋白的实例。可以在细胞之中、之上或由细胞产生治疗性蛋白, 并且可以从此类细胞中获得治疗性蛋白、或以此类细胞的形式给予这些治疗性蛋白。在多个实施例中, 在以下细胞之中、之上或由以下细胞产生该治疗性蛋白: 哺乳动物细胞、昆虫细胞、酵母细胞、细菌细胞、植物细胞、转基因动物细胞、转基因植物细胞等等。可以在此类细胞中重组地产生该治疗性蛋白。可以在病毒转化的细胞之中、之上或由病毒转化的细胞产生该治疗性蛋白。还可以在自体细胞之中、之上或由自体细胞产生该治疗性蛋白, 这些自体细胞已经被转染、转导或以另外的方式操纵以表达该治疗性蛋白。可替代地, 可以作为一种核酸或通过将一种核酸引入到病毒、VLP、脂质体等等中来给予该治疗性蛋白。可替代地, 可以从此类形式中获得该治疗性蛋白并且作为该治疗性蛋白本身而给予。因此, 受试者包括已经接受、正接受或将要接受上述任何物质的任何受试者。此类受试者包括已经接受、正接受或将要接受以下各项的受试者: 基因治疗; 已经被转染、转导或以另外的方式操纵以表达一种治疗性蛋白、多肽或肽的自体细胞; 或表达一种治疗性蛋白、多肽或肽的细胞。

[0118] “治疗性蛋白 APC 可呈递抗原”意指与一种治疗性蛋白结合的抗原 (即, 该治疗性蛋白或其片段可以产生针对该治疗性蛋白的免疫应答 (例如, 产生治疗性蛋白特异性抗体))。通常, 治疗性蛋白 APC 可呈递抗原可以通过免疫系统 (例如, 免疫系统的细胞, 如通过包括但不限于树突状细胞、B 细胞或巨噬细胞的抗原呈递细胞而呈递) 被呈递用于识别。该治疗性蛋白 APC 可呈递抗原可以通过例如 T 细胞被呈递用于识别。此类抗原可以经由结合到 I 类或 II 类主要组织相容性复合体分子 (MHC) 上的抗原的表位的呈递而被 T 细胞识别并且触发 T 细胞中的免疫应答。治疗性蛋白 APC 可呈递抗原通常包括蛋白质类、多肽类、肽类、脂蛋白类, 或被包含在或表达在细胞之中、之上或由细胞表达。在一些实施例中, 这些治疗性蛋白抗原与合成纳米载体偶联, 并且包含 MHC I 类限制性表位和 / 或 MHC II 类限制

性表位和 / 或 B 细胞表位。在其他实施例中，这些抗原不包含 B 细胞表位，如当包括这些 B 细胞表位将使所不希望的免疫免疫加剧时。在其他实施例中，这些抗原包含 MHC II 类限制性表位并且基本上不包含 B 细胞表位。优选地，对该治疗性蛋白特异的一种或多种致耐受性免疫应答由在此提供的这些组合物产生。

[0119] “致耐受免疫应答”意指可以导致对一种抗原或表达此种抗原的一种细胞、组织、器官等等特异的免疫抑制的任何免疫应答。此类免疫应答包括对该抗原或表达此抗原的细胞、组织、器官等等特异的所不希望的免疫应答的任何降低、延迟或抑制。此类免疫应答还包括对该抗原或表达此抗原的细胞、组织、器官等等特异的所希望的免疫应答的任何刺激、产生、诱导、促进或募集。因此，致耐受性免疫应答包括不存在或降低针对抗原的所不希望的免疫应答，这可以通过抗原反应性细胞以及存在或促进抑制性细胞来介导。在此所提供的致耐受性免疫应答包括免疫耐受性。“产生致耐受性免疫应答”意指产生对一种抗原或表达此抗原的细胞、组织、器官等等特异的任何上述免疫应答。该致耐受性免疫应答可以是 MHC I 类限制性呈递和 / 或 MHC II 类限制性呈递和 / 或 B 细胞呈递和 / 或由 CD1d 进行的呈递等等的结果。

[0120] 致耐受性免疫应答包括 CD4+T 细胞、CD8+T 细胞或 B 细胞增殖和 / 或活性的任何降低、延迟或抑制。致耐受性免疫应答还包括抗原特异性抗体产生的降低。致耐受性免疫应答还可以包括导致调节性细胞的刺激、诱导、产生或募集的任何应答，这些调节性细胞如 CD4+Treg 细胞、CD8+Treg 细胞、Breg 细胞等等。在一些实施例中，该致耐受性免疫应答是导致转变为一种调节性表型的致耐受性免疫应答，该调节性表型的特征在于产生、诱导、刺激或募集调节性细胞。

[0121] 致耐受性免疫应答还包括导致 CD4+Treg 细胞和 / 或 CD8+Treg 细胞的刺激、产生或募集的任何应答。CD4+Treg 细胞可以表达转录因子 FoxP3 并且抑制炎症应答和自身免疫性炎性疾病（自身免疫性疾病中的人调节性 T 细胞 (Human regulatory T cells in autoimmune diseases)，科夫塔诺维奇 • GL (Cvetanovich GL)、哈弗 • DA (Hafler DA)，免疫学当前观点 (Curr Opin Immunol.) 2010 年 12 月 ;22(6) :753-60，调节性 T 细胞和自身免疫性 (Regulatory T cells and autoimmunity)，维拉 • J (Vila J)、艾萨克 • JD (Isaacs JD)、安德森 • AE (Anderson AE)，血液学当前观点 (Curr Opin Hematol.) 2009 年 7 月 ;16(4) :274-9）。此类细胞还抑制 T 细胞对 B 细胞的帮助并且诱导对自身和外来抗原的耐受性（基于 FoxP3+ 调节性 T 细胞活化和扩增的过敏和自身免疫性的治疗性方法 (Therapeutic approaches to allergy and autoimmunity based on FoxP3+regulatory T-cell activation and expansion)，宫良 • M (Miyara M)、永 • K (Wing K)、板口 • (Sakaguchi S)，过敏临床免疫学期刊 (J Allergy Clin Immunol), 2009 年 4 月 ;123(4) :749-55）。当抗原由 APC 上的 II 类蛋白质呈递时，CD4+Treg 细胞识别这种抗原。识别由 I 类 (和 Qa-1) 呈递的抗原的 CD8+Treg 细胞还可以抑制 T 细胞对 B 细胞的帮助，并且导致诱导对自身和外来抗原二者的耐受性的抗原特异性抑制的活化。已经显示，Qa-1 与 CD8+Treg 细胞的相互作用的破坏可使免疫应答失调，并且导致自身抗体形成和自身免疫性致命性系统性红斑狼疮的产生（金 (Kim) 等人，自然 (Nature)，2010 年 9 月 16 日, 467 (7313) :328-32）。还已经显示，CD8+Treg 细胞可抑制包括类风湿性关节炎和结肠炎的自身免疫性炎性疾病的模型（自身免疫性关节炎中的 CD4+CD25+ 调节性 T 细胞 (CD4+CD25+regulatory T cells

in autoimmune arthritis), 欧·S(Oh S)、兰金·AL(Rankin AL)、卡顿·AJ(Caton AJ), 免疫性评论(Immunol Rev), 2010年1月;233(1):97-111, 炎性肠病中的调节性T细胞(Regulatory T cells in inflammatory bowel disease). 博登·EK(Boden EK)、斯奈普·SB(Snapper SB), 肠胃病学当前观点(Curr Opin Gastroenterol), 2008年11月;24(6):733-41)。在一些实施例中, 提供的这些组合物可以有效地产生两种类型的应答(CD4+Treg和CD8+Treg)。在其他实施例中, 可以在其他免疫细胞(如巨噬细胞、iNKT细胞等等)中诱导FoxP3, 并且在此提供的这些组合物同样可以产生这些应答中的一种或多种。

[0122] 致耐受性免疫应答还包括但不限于:诱导调节性细胞因子, 如Treg细胞因子;诱导抑制性细胞因子;抑制炎性细胞因子(例如, IL-4、IL-1b、IL-5、TNF- α 、IL-6、GM-CSF、IFN- γ 、IL-2、IL-9、IL-12、IL-17、IL-18、IL-21、IL-22、IL-23、M-CSF、C反应性蛋白、急性期蛋白、趋化因子(例如, MCP-1、RANTES、MIP-1 α 、MIP-1 β 、MIG、ITAC或IP-10);产生抗炎性细胞因子(例如, IL-4、IL-13、IL-10等等)、趋化因子(例如, CCL-2、CXCL8)、蛋白酶(例如, MMP-3、MMP-9)、白三烯(例如, CysLT-1、CysLT-2)、前列腺素(例如, PGE2)或组胺;抑制向Th17、Th1或Th2免疫应答的极化;抑制效应细胞特异性细胞因子:Th17(例如, IL-17、IL-25)、Th1(IFN- γ)、Th2(例如, IL-4、IL-13);抑制Th1特异性、Th2特异性或TH17特异性的转录因子;抑制效应T细胞的增殖;诱导效应T细胞的凋亡;诱导致耐受性的树突状细胞特异性的基因;诱导FoxP3表达;抑制IgE诱导或IgE介导的免疫应答;抑制抗体应答(例如, 抗原特异性抗体的产生);抑制T辅助细胞应答;产生TGF- β 和/或IL-10;抑制自身抗体的效应子功能(例如, 细胞耗尽、细胞或组织损伤、或补体活化的抑制);等等。

[0123] 任何上述的免疫应答可以在一个或多个动物模型中体内测量或可以在体外测量。本领域普通技术人员熟悉此类体内或体外测量。所不希望的免疫应答或致耐受性免疫应答可以使用例如评定免疫细胞数目和/或功能的方法、四聚物分析、ELISPOT、基于流式细胞检测的细胞因子表达、细胞因子分泌的分析、细胞因子表达谱绘制、基因表达谱绘制、蛋白质表达谱绘制、细胞表面标记分析、基于PCR的免疫细胞受体基因用法的检测(参见T·克雷(T. Clay)等人,“用于监测针对癌症的主动免疫治疗的细胞免疫应答的测定(Assays for Monitoring Cellular Immune Response to Active Immunotherapy of Cancer)”临床癌症研究(Clinical Cancer Research)7:1127-1135(2001))等等来监测。所不希望的免疫应答或致耐受性免疫应答还可以使用例如评定血浆或血清中的蛋白质水平的方法、免疫细胞增殖和/或功能测定等等来监测。在一些实施例中, 致耐受性免疫应答可以通过评定FoxP3的诱导来监测。另外, 在实例中更详细地描述了具体方法。

[0124] 优选地, 致耐受性免疫应答导致对在此描述的疾病、紊乱或病症的发展、进展或病理的抑制。可以用具有此类疾病、紊乱或病症的动物模型来测量这些发明的组合物是否可以导致对在此描述的疾病、紊乱或病症的发展、进展或病理的抑制。在一些实施例中, 可以通过确定临床终点、临床功效、临床症状、疾病生物标记和/或临床得分来评定所不希望的免疫应答的降低或致耐受性免疫应答的产生。还可以用诊断试验评定所不希望的免疫应答或致耐受性免疫应答, 以便评定在此所提供的疾病、紊乱或病症的存在或不存在。可以进一步通过测量受试者中的治疗性蛋白水平和/或功能的方法来评定所不希望的免疫应答。

[0125] 在一些实施例中, 可以在给予在此提供的合成纳米载体的一种组合物之前和/或在给予一种治疗性蛋白之前监测或评定受试者中的所不希望的免疫应答或致耐受性免疫

应答的产生。在其他实施例中,可以在给予在此提供的合成纳米载体的一种组合物之后和 / 或在给予一种治疗性蛋白之后评定所不希望的免疫应答或致耐受性免疫应答的产生。在一些实施例中,在给予合成纳米载体的该组合物之后、但在给予该治疗性蛋白之前完成该评定。在其他实施例中,在给予该治疗性蛋白之后、但在给予该组合物之前完成该评定。在再其他的实施例中,在给予这些合成纳米载体和该治疗性蛋白二者之前进行该评定,而在又其他的实施例中,在给予这些合成纳米载体和该治疗性蛋白二者之后进行该评定。在另外的多个实施例中,在给予这些合成纳米载体和 / 或该治疗性蛋白之前和之后都进行该评定。在再其他的实施例中,在受试者上进行多于一次的该评定,以便确定令人希望的免疫状态被维持在该受试者中,该受试者例如为已经被给予、正被给予或将要被给予一种治疗性蛋白的受试者。

[0126] 可以通过测定一个或多个抗体滴度来评定抗体应答。“抗体滴度”意指抗体产生的可测量水平。用于测量抗体滴度的方法是本领域中已知的并且包括酶联免疫吸附测定 (ELISA)。在多个实施例中,该抗体应答可以被定量为例如抗体的数目、抗体的浓度、或滴度。这些值可以是绝对的或它们可以是相对的。用于定量抗体应答的测定包括抗体捕获测定、酶联免疫吸附测定 (ELISA)、抑制液相吸附测定 (inhibition liquid phase absorption assay, ILPAA)、火箭免疫电泳 (rocket immunoelectrophoresis, RIE) 测定、以及线状免疫电泳 (line immunoelectrophoresis, LIE) 测定。当比较一种抗体应答与另一种抗体应答时,优选地使用相同类型的定量值 (例如,滴度) 和测量方法 (例如,ELISA) 进行该比较。

[0127] 用于测量抗体滴度的 ELISA 方法 (例如,一种典型的夹心 ELISA) 可以由以下步骤组成:(i) 制备一种 ELISA- 板包被材料,使得感兴趣的抗体靶标与一种底物聚合物或其他适合的材料偶联;(ii) 在一种水溶液 (如 PBS) 中制备该包被材料,并且将该包被材料溶液递送至一个多孔板的孔中用于使该包被层过夜沉积在该多孔板上;(iii) 用洗涤缓冲液 (如含 0.05% 吐温 -20 的 PBS) 彻底洗涤该多孔板以去除过量的包被材料;(iv) 通过施加一种稀释剂溶液 (如含 10% 胎牛血清的 PBS) 来封闭该板的非特异性结合;(v) 用洗涤缓冲液将该封闭 / 稀释剂溶液从该板上洗涤下来;(vi) 根据需要用稀释剂对含有抗体和适当标准品 (阳性对照) 的一种或多种血清样品进行稀释,以获得适当地使 ELISA 应答饱和的浓度;(vii) 在该多孔板上对这些血浆样品进行连续稀释,这样以涵盖适用于产生 ELISA 应答曲线的浓度范围;(viii) 孵育该板以提供抗体 - 靶标结合;(ix) 用洗涤缓冲液洗涤该板以去除未结合抗原的抗体;(x) 添加适当浓度的处于相同稀释剂中的一种第二检测抗体,如能够结合第一抗体的一种生物素偶联的检测抗体;(xi) 用所施加的该检测抗体孵育该板,随后用洗涤缓冲液进行洗涤;(xii) 添加将与生物素化的抗体上发现的生物素结合的酶 (如链霉亲和素 -HRP (辣根过氧化物酶)) 并且进行孵育;(xiii) 洗涤该多孔板;(xiv) 将一种或多种底物 (如 TMB 溶液) 添加至该板上;(xv) 当显色完全时施加一种终止溶液 (如 2N 硫酸);(xvi) 在针对该底物的特定波长下读取这些板孔的光密度 (450nm 减去 570nm 处的读数);(xvi) 对数据应用一个适合的多参数曲线拟合,并且将半最大有效浓度 (EC50) 定义为达到这些板标准品的半最大值 OD 值时的曲线上的浓度。

[0128] “所不希望的免疫应答”是指由暴露于抗原而引起的、促进或加剧在此提供的疾病、紊乱或病症 (或其症状) 的,或是在此提供的疾病、紊乱或病症的症状的任何所不希望

的免疫应答。此类免疫应答通常对受试者的健康具有负面影响或表明对受试者的健康的负面影响。所不希望的免疫应答包括抗原特异性抗体产生、抗原特异性 B 细胞增殖和 / 或活性、或抗原特异性 CD4+T 细胞增殖和 / 或活性。

[0129] C. 发明组合物

[0130] 在此提供了多种致耐受性的合成纳米载体组合物和相关的方法，这些致耐受性的合成纳米载体组合物包含免疫抑制剂和治疗性蛋白 APC 可呈递抗原。此类组合物和方法是对降低所不希望的免疫应答的产生和促进对治疗性蛋白特异的致耐受性免疫应答的产生有用的。可以向希望有针对治疗性蛋白的致耐受性免疫应答的受试者给予这些组合物。此类受试者包括已经被、正在被或将要被给予一种治疗性蛋白的那些。在多个实施例中，对受试者给予在此提供的这些合成纳米载体，并且然后给予一种或多种治疗性蛋白。在其他实施例中，对受试者给予一种治疗性蛋白并且然后是所提供的这些合成纳米载体。在再其他的实施例中，同时给予这些合成纳米载体和这一种或多种治疗性蛋白。

[0131] 如上所提到的，这些合成纳米载体被设计成包含免疫抑制剂和（在一些实施例中）抗原，针对该抗原的致耐受性作用是所希望的。在多个实施例中，这些抗原包含 MHC II 类限制性表位，当与免疫抑制剂结合呈递时，这些表位可以导致致耐受性作用，如抗原特异性 CD4+T 细胞增殖和 / 或活性的降低。所得到的这些致耐受性作用还包括抗原特异性 B 细胞增殖和 / 或活性的降低、和 / 或抗原特异性抗体产生的降低。根据本发明，可以使用各种各样的合成纳米载体。在一些实施例中，合成纳米载体是球体或球状体。在一些实施例中，合成纳米载体是扁平的或盘状的。在一些实施例中，合成纳米载体是立方体或立方形的。在一些实施例中，合成纳米载体是卵形或椭圆形的。在一些实施例中，合成纳米载体是圆柱体、锥体、或锥形。

[0132] 在一些实施例中，希望使用在大小、形状、和 / 或构成方面较一致的一个群体的合成纳米载体，使得每一合成纳米载体具有相似特性。例如，基于合成纳米载体的总数，至少 80%、至少 90%、或至少 95% 的这些合成纳米载体可以具有归属在这些合成纳米载体的平均直径或平均尺寸的 5%、10% 或 20% 之内的最小尺寸或最大尺寸。在一些实施例中，一个群体的合成纳米载体可以在大小、形状、和 / 或构成方面是不均匀的。

[0133] 合成纳米载体可以是实心的或空心的，并且可以包含一个或多个层。在一些实施例中，每一层相对于其他一层或多层具有独特的构成和独特的特性。为了作为一个实例给出，合成纳米载体可以具有一个核 / 壳结构，其中该核是一个层（例如一个聚合物核）并且该壳是一个第二层（例如一个脂质双层或单层）。合成纳米载体可以包括多个不同的层。

[0134] 在一些实施例中，合成纳米载体可以任选地包含一种或多种脂质。在一些实施例中，合成纳米载体可以包含一种脂质体。在一些实施例中，合成纳米载体可以包含一个脂质双层。在一些实施例中，合成纳米载体可以包含一个脂质单层。在一些实施例中，合成纳米载体可以包含一种微胶粒。在一些实施例中，合成纳米载体可以包含一个核，该核包含被一个脂质层（例如，脂质双层、脂质单层等等）围绕的一种聚合物基质。在一些实施例中，合成纳米载体可以包含被一个脂质层（例如，脂质双层、脂质单层等等）围绕的一个非聚合物核（例如，金属颗粒、量子点、陶瓷颗粒、骨颗粒、病毒颗粒、蛋白质、核酸、碳水化合物等等）。

[0135] 在其他实施例中，合成纳米载体可以包含金属颗粒、量子点、陶瓷颗粒等等。在一些实施例中，非聚合物合成纳米载体是非聚合组分的一个聚集体，如金属原子（例如金原

子) 的一个聚集体。

[0136] 在一些实施例中,合成纳米载体可以任选地包含一种或多种两亲实体。在一些实施例中,两亲实体可以促进具有增加的稳定性、改进的均匀性、或增加的粘度的合成纳米载体的产生。在一些实施例中,两亲实体可以与一个脂质膜(例如,脂质双层、脂质单层等等)的内表面结合。在本领域中已知的许多两亲实体可以适用于制造根据本发明的合成纳米载体。此类两亲实体包括但不限于:磷酸甘油酯类;磷脂酰胆碱类;二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC);二油烯基磷脂酰基乙醇胺(DOPE);二油烯基氧丙基三乙基铵(DOTMA);二油酰基磷脂酰胆碱;胆固醇;胆固醇酯;二酰基甘油;二酰基甘油琥珀酸酯;二磷脂酰基甘油(DPPG);十六烷醇;脂肪醇类,如聚乙二醇(PEG);聚氧乙烯-9-月桂基醚;一种表面活性脂肪酸,如棕榈酸或油酸;脂肪酸类;脂肪酸甘油单酯类;脂肪酸甘油二酯类;脂肪酸酰胺类;脱水山梨糖醇三油酸酯(**Span®85**)甘油胆酸酯;脱水山梨糖醇单月桂酸酯(**Span®20**);聚山梨醇酯20(**Tween®20**);聚山梨醇酯60(**Tween®60**);聚山梨醇酯65(**Tween®65**);聚山梨醇酯80(**Tween®80**);聚山梨醇酯85(**Tween®85**);聚氧乙烯单硬脂酸酯;表面活性素;泊洛沙姆;一种脱水山梨糖醇脂肪酸酯,如脱水山梨糖醇三油酸酯;卵磷脂;溶血卵磷脂;磷脂酰丝氨酸;磷脂酰肌醇;鞘磷脂;磷脂酰乙醇胺(脑磷脂);心磷脂;磷脂酸;脑苷脂;双十六烷基磷酸酯;二棕榈酰磷脂酰甘油;硬脂酰胺;十二烷胺;十六烷胺;乙酰基棕榈酸酯;蓖麻油酸甘油酯;十八酸十六烷基酯;肉豆蔻酸异丙酯;四丁酚醛(tyloxapol);聚(乙二醇)5000-磷脂酰乙醇胺;聚(乙二醇)400-单硬脂酸酯;磷脂;具有高表面活性剂特性的合成的和/或天然的洗涤剂;脱氧胆酸酯;环糊精;离液序列高的盐;离子对试剂;以及它们的组合。两亲实体组分可以是不同两亲实体的混合物。本领域普通技术人员将认识到,这是具有表面活性剂活性的物质的示例性的、而不是全面的清单。任何两亲实体可以用于有待根据本发明使用的合成纳米载体的生产中。

[0137] 在一些实施例中,合成纳米载体可以任选地包含一种或多种碳水化合物。碳水化合物可以是天然的或合成的。碳水化合物可以是衍生的天然碳水化合物。在某些实施例中,碳水化合物包含单糖或二糖,包括但不限于:葡萄糖、果糖、半乳糖、核糖、乳糖、蔗糖、麦芽糖、海藻糖、纤维二糖(cellbiose)、甘露糖、木糖、阿拉伯糖、葡糖醛酸、半乳糖醛酸、甘露糖醛酸、葡糖胺、半乳糖胺、以及神经氨酸。在某些实施例中,碳水化合物是一种多糖,包括但不限于:支链淀粉、纤维素、微晶纤维素、羟丙基甲基纤维素(HPMC)、羟基纤维素(HC)、甲基纤维素(MC)、葡聚糖、环葡聚糖、糖原、羟乙基淀粉、卡拉胶、多聚糖(glycon)、直链淀粉、壳聚糖、N,O-羧甲基壳聚糖、藻胶和海藻酸、淀粉、甲壳质、菊糖、魔芋、葡萄甘露聚糖(glucosmannan)、石耳素、肝素、透明质酸、凝胶多糖、以及黄原胶。在实施例中,这些发明的合成纳米载体并不包含(或特别排除)碳水化合物,如多糖。在某些实施例中,该碳水化合物可以包含一种碳水化合物衍生物,如一种糖醇,包括但不限于:甘露醇、山梨醇、木糖醇、赤藓糖醇、麦芽糖醇、以及乳糖醇。

[0138] 在一些实施例中,合成纳米载体可以包含一种或多种聚合物。在一些实施例中,这些合成纳米载体包含一种或多种聚合物,该聚合物是非甲氧基封端的普朗尼克聚合物。在一些实施例中,构成这些合成纳米载体的至少1%、2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、

97%、或 99%（重量 / 重量）的这些聚合物是非甲氧基封端的普朗尼克聚合物。在一些实施例中，构成这些合成纳米载体的所有这些聚合物是非甲氧基封端的普朗尼克聚合物。在一些实施例中，这些合成纳米载体包含一种或多种聚合物，该聚合物是非甲氧基封端的聚合物。在一些实施例中，构成这些合成纳米载体的至少 1%、2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、或 99%（重量 / 重量）的这些聚合物是非甲氧基封端的聚合物。在一些实施例中，构成这些合成纳米载体的所有这些聚合物是非甲氧基封端的聚合物。在一些实施例中，这些合成纳米载体包含一种或多种聚合物，这些聚合物不包含普朗尼克聚合物。在一些实施例中，构成这些合成纳米载体的至少 1%、2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、或 99%（重量 / 重量）的这些聚合物不包含普朗尼克聚合物。在一些实施例中，构成这些合成纳米载体的所有这些聚合物不包含普朗尼克聚合物。在一些实施例中，可以由包被层（例如脂质体、脂质单层、微胶粒等）环绕这样一种聚合物。在一些实施例中，合成纳米载体的不同成分可以与该聚合物偶联。

[0139] 可以通过多种方法中的任一种使这些免疫抑制剂和 / 或抗原与这些合成纳米载体偶联。通常，该偶联可以是这些免疫抑制剂和 / 或抗原与这些合成纳米载体之间键合的结果。这种键合可以导致这些免疫抑制剂和 / 或抗原附着至合成纳米载体的表面上和 / 或被包含（封装）在合成纳米载体之内。然而，在一些实施例中，这些免疫抑制剂和 / 或抗原由于这些合成纳米载体的结构而被合成纳米载体封装，而不是键合至合成纳米载体上。在多个优选的实施例中，合成纳米载体包含如在此所提供的一种聚合物，并且这些免疫抑制剂和 / 或抗原与聚合物偶联。

[0140] 当由于这些免疫抑制剂和 / 或抗原与合成纳米载体之间的键合而发生偶联时，该偶联可以经由一个偶联部分而发生。一个偶联部分可以是通过其使免疫抑制剂和 / 或抗原键合至合成纳米载体上的任何部分。此类部分包括共价键（如一个酰胺键或酯键）、以及使免疫抑制剂和 / 或抗原键合（共价地或非共价地）至该合成纳米载体上的单独的分子。此类分子包括连接物或聚合物或其单元。例如，该偶联部分可以包含免疫抑制剂和 / 或抗原静电结合至其上的一种带电荷的聚合物。作为另一个实例，该偶联部分可以包含它共价结合至其上的一种聚合物或其单元。

[0141] 在多个优选的实施例中，这些合成纳米载体包含如在此所提供的一种聚合物。这些合成纳米载体可以是完全聚合的或它们可以是聚合物与其他材料的混合物。

[0142] 在一些实施例中，具有合成纳米载体的这些聚合物结合以形成一种聚合物基质。在这些实施例中的一些中，一种组分（如一种免疫抑制剂或抗原）可以与该聚合物基质中的一种或多种聚合物共价结合。在一些实施例中，共价结合是由一个连接物介导的。在一些实施例中，一种组分可以与该聚合物基质中的一种或多种聚合物非共价结合。例如，在一些实施例中，一种组分可以被封装在一种聚合物基质之内、被聚合物基质围绕、和 / 或分散在整个聚合物基质中。可替代地或另外地，一种组分可以通过疏水相互作用、电荷相互作用、范德华力等等与一种聚合物基质中的一种或多种聚合物结合。用于从其形成聚合物基质的各种各样的聚合物和方法是常规已知的。

[0143] 聚合物可以是天然的或非天然的（合成的）聚合物。聚合物可以是均聚物或包含

两种或更多种单体的共聚物。在序列方面,共聚物可以是随机的、嵌段的,或包含随机序列与嵌段序列的组合。典型地,根据本发明的聚合物是有机聚合物。

[0144] 在一些实施例中,聚合物包含一种聚酯、聚碳酸酯、聚酰胺、或聚醚、或其单元。在其他实施例中,聚合物包含聚(乙二醇)(PEG)、聚丙二醇、聚(乳酸)、聚(乙醇酸)、聚(乳酸-乙醇酸)共聚物、或一种聚己酸内酯、或其单元。在一些实施例中,优选的是该聚合物是可生物降解的。因此,在这些实施例中,优选的是如果该聚合物包含一种聚醚(如聚(乙二醇)或聚丙二醇或其单元),则该聚合物包含一种聚醚和一种可生物降解的聚合物的嵌段共聚物,使得该聚合物是可生物降解的。在其他实施例中,该聚合物不仅仅包含一种聚醚或其单元,如聚(乙二醇)或聚丙二醇或其单元。

[0145] 适合用于本发明的聚合物的其他实例包括但不限于:聚乙烯、聚碳酸酯(例如聚(1,3-二噁烷-2酮))、聚酐(例如聚(癸二酸酐))、聚丙基延胡索酸酯(polypropylfumarate)、聚酰胺(例如聚己内酰胺)、聚缩醛、聚醚、聚酯(例如聚丙交酯、聚乙交酯、丙交酯-乙交酯共聚物、聚己酸内酯、多羟基酸(例如聚(β -羟基烷酸酯)、聚(原酸酯)、聚氰基丙烯酸酯、聚乙烯醇、聚氨酯、聚磷腈、聚丙烯酸酯、聚甲基丙烯酸酯、聚脲、聚苯乙烯、以及聚胺、聚赖氨酸、聚赖氨酸-PEG共聚物、以及聚(乙烯亚胺)、聚(乙烯亚胺)-PEG共聚物。

[0146] 在一些实施例中,根据本发明的聚合物包括在 21C. FR. § 177. 2600 下已经由美国食品与药品管理局(FDA)批准用于人的聚合物,包括但并不局限于聚酯(例如聚乳酸、聚(乳酸乙醇酸)共聚物、聚己内酯、聚戊内酯、聚(1,3-二噁烷-2酮));聚酐(例如聚(癸二酸酐));聚醚(例如聚乙二醇);聚氨酯;聚甲基丙烯酸酯;聚丙烯酸酯;以及聚氰基丙烯酸酯。

[0147] 在一些实施例中,聚合物可以是亲水性的。例如,聚合物可以包含阴离子基团(例如磷酸根、硫酸根、羧酸根);阳离子基团(例如,季胺基团);或极性基团(例如,羟基基团、硫醇基团、胺基团)。在一些实施例中,包含一种亲水性聚合物基质的合成纳米载体在该合成纳米载体内产生亲水环境。在一些实施例中,聚合物可以是疏水性的。在一些实施例中,包含疏水性聚合物基质的合成纳米载体在该合成纳米载体内产生疏水环境。聚合物亲水性或疏水性的选择可以影响被结合(例如偶联)在合成纳米载体之内的材料的性质。

[0148] 在一些实施例中,聚合物可以用一个或多个部分和/或官能团修饰。根据本发明,可以使用各种各样的部分或官能团。在一些实施例中,可以用聚乙二醇(PEG)、用碳水化合物、和/或用衍生自多糖类的非环状聚缩醛来修饰聚合物(Papisov(巴比索夫),2001,ACS Symposium Series, 786 :301)。可以使用Gref(格里夫)等人的美国专利号5543158、或Von Andrian(冯安德里安)等人的WO公开W02009/051837中的全部传授内容进行某些实施例。

[0149] 在一些实施例中,可以用脂质或脂肪酸基团修饰聚合物。在一些实施例中,脂肪酸基团可以是丁酸、己酸、辛酸、癸酸、月桂酸、肉豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸、花生酸、山嵛酸、或廿四烷酸中的一种或多种。在一些实施例中,脂肪酸基团可以是棕榈烯酸、油酸、异油酸、亚麻酸、 α -亚麻酸、 γ -亚麻酸、花生四烯酸、二十碳烯酸、花生四烯酸、二十碳五烯酸、二十二碳六烯酸、或芥酸中的一种或多种。

[0150] 在一些实施例中,聚合物可以是聚酯,包括共聚物,这些共聚物包括乳酸和乙醇酸单元(例如聚(乳酸乙醇酸共聚物)和聚(丙交酯乙交酯共聚物)),在此统称为“PLGA”;

以及包括乙醇酸单元的均聚物，在此称为“PGA”，以及乳酸单元（例如聚-L-乳酸、聚-D-乳酸、聚-D,L-乳酸、聚-L-丙交酯、聚-D-丙交酯、以及聚-D,L-丙交酯），在此统称为“PLA”。在一些实施例中，示例性的聚酯包括，例如多羟基酸；PEG 共聚物和丙交酯与乙交酯的共聚物（例如 PLA-PEG 共聚物、PGA-PEG 共聚物、PLGA-PEG 共聚物），以及它们的衍生物）。在一些实施例中，聚酯包括例如聚（己内酯）、聚（己内酯）-PEG 共聚物、聚(L-丙交酯--L-赖氨酸共聚物）、聚（丝氨酸酯）、聚(4-羟基-L-脯氨酸酯)、聚[α -(4-氨基丁基)-L-乙醇酸]、以及它们的衍生物。

[0151] 在一些实施例中，聚合物可以是 PLGA。PLGA 是一种生物相容的并且生物可降解的乳酸和乙醇酸的共聚物，并且多种形式的 PLGA 特征在于乳酸：乙醇酸的比率。乳酸可以是 L-乳酸、D-乳酸、或 D,L-乳酸。可以通过改变乳酸：乙醇酸的比率调整 PLGA 的降解速率。在一些实施例中，根据本发明的将使用的 PLGA 特征在于大约 85:15、大约 75:25、大约 60:40、大约 50:50、大约 40:60、大约 25:75、或者大约 15:85 的乳酸：乙醇酸比率。

[0152] 在一些实施例中，聚合物可以是一种或多种丙烯酸聚合物。在某些实施例中，丙烯酸聚合物包括，例如丙烯酸和甲基丙烯酸的共聚物、甲基丙烯酸甲酯共聚物、甲基丙烯酸乙氧基乙酯、甲基丙烯酸氰基乙基酯、甲基丙烯酸氨基烷基酯共聚物、聚(丙烯酸)、聚(甲基丙烯酸)、甲基丙烯酸烷基酰胺共聚物、聚(甲基丙烯酸甲酯)、聚(甲基丙烯酸酸酐)、甲基丙烯酸甲酯、聚甲基丙烯酸酯、聚(甲基丙烯酸甲酯)共聚物、聚丙烯酰胺、甲基丙烯酸氨基烷基酯共聚物、甲基丙烯酸缩水甘油酯共聚物、聚腈基丙烯酸酯、以及包括一种或多种以上聚合物的组合。该丙烯酸聚合物可以包含具有低含量的季铵基团的丙烯酸酯和甲基丙烯酸酯的完全聚合的共聚物。

[0153] 在一些实施例中，聚合物可以是阳离子型聚合物。通常，阳离子型聚合物能够缩合和/或保护核酸（例如 DNA、或它的衍生物）的带负电的链。含有胺的聚合物（例如聚(赖氨酸)(Zauner(泽纳)等人, 1998, 先进药物递送综述, 30:97; 以及 Kabanov(卡巴诺夫)等人, 1995, 生物共轭化学, 6:7)、聚(亚乙基亚胺)(PEI; Boussif(波希夫)等人, 1995, 美国科学院院刊, 1995, 92:7297)、以及聚(酰胺胺)树枝状聚合物(Kukowska(库科斯卡)-Latallo(拉塔罗)等人, 1996, 美国科学院院刊, 93:4897; Tang(唐)等人, 1996, 生物共轭化学, 7:703; 以及 Haensler(亨斯勒)等人, 1993, 生物共轭化学, 4:372) 在生理 pH 下是带正电的，在多种细胞系中与核酸形成离子对，并且介导转染。在多个实施例中，这些发明的合成纳米载体可以不包含（或可以排除）阳离子型聚合物。

[0154] 在一些实施例中，聚合物可以是带有阳离子侧链的可降解聚酯(Putnam(普特南)等人, 1999, 大分子, 32:3658; Barrera(巴雷拉)等人, 1993, 美国化学会志, 115:11010; Kwon(权)等人, 1989, 大分子, 22:3250; Lim(林)等人, 1999, 美国化学会志, 121:5633; 以及 Zhou(周)等人, 1990, 大分子, 23:3399)。这些聚酯的实例包括聚(L-丙交酯-L-赖氨酸共聚物)(Barrera(巴雷拉)等人, 1993, 美国化学会志, 115:11010)、聚(丝氨酸酯)(Zhou(周)等人, 1990, 大分子, 23:3399)、聚(4-羟基-L-脯氨酸酯)(Putnam(普特南)等人, 1999, 大分子, 32:3658; 以及 Lim(林)等人, 1999, 美国化学会志, 121:5633)、以及聚(4-羟基-L-脯氨酸酯)(Putnam(普特南)等人, 1999, 大分子, 32:3658; 以及 Lim(林)等人, 1999, 美国化学会志, 121:5633)。

[0155] 这些和其他聚合物的特性以及用于制备它们的方法在本领域中是熟知的（参

见,例如美国专利 6,123,727 ;5,804,178 ;5,770,417 ;5,736,372 ;5,716,404 ;6,095,148 ;5,837,752 ;5,902,599 ;5,696,175 ;5,514,378 ;5,512,600 ;5,399,665 ;5,019,379 ;5,010,167 ;4,806,621 ;4,638,045 ;以及 4,946,929 ;Wang(王)等人,2001,美国化学会志,123 :9480 ;Lim(林)等人,2001,美国化学会志,123 :2460 ;Langer(朗格尔),2000,化学研究评述,33 :94 ;Langer(朗格尔),1999,控释杂志,62 :7 ;以及 Uhrich(乌利希)等人,1999,化学评论,99 :3181)。更一般地,在 Concise Encyclopedia of Polymer Science and Polymeric Amines and Ammonium Salts, Goethals(戈萨尔斯) 编辑, 培格曼出版社, 1980 中; 在 Principles of Polymerization by Odian, 约翰·威利父子出版公司, 第四版, 2004 中; 在 Allcock(阿尔库克) 等人的 Contemporary Polymer Chemistry, Prentice-Hall, 1981 中; 在 Deming(德明) 等人, 1997, 自然, 390 :386 中; 以及在美国专利 6,506,577、6,632,922、6,686,446、以及 6,818,732 中说明了用于合成某些适合的聚合物的多种方法。

[0156] 在一些实施例中, 聚合物可以是线型聚合物或分支聚合物。在一些实施例中, 聚合物可以是树枝状化合物。在一些实施例中, 聚合物可以是基本上彼此交联的。在一些实施例中, 聚合物可以基本上不交联。在一些实施例中, 聚合物可以根据本发明进行使用而不经历交联步骤。进一步理解的是, 本发明的合成纳米载体可以包含嵌段共聚物、接枝共聚物、共混物、混合物、和 / 或任何上述及其他聚合物的加合物。本领域的那些技术人员将认识到, 在此列出的这些聚合物代表根据本发明可以使用的聚合物的示例性的、而不是全面的清单。

[0157] 在一些实施例中, 合成纳米载体不包含聚合物组分。在一些实施例中, 合成纳米载体可以包含金属颗粒、量子点、陶瓷颗粒等等。在一些实施例中, 非聚合物合成纳米载体是非聚合组分的一个聚集体, 如金属原子(例如金原子)的一个聚集体。

[0158] 根据本发明的多种组合物包含与药学上可接受的赋形剂(如防腐剂、缓冲剂、盐水或磷酸盐缓冲盐水)组合的合成纳米载体。可以使用常规药物制造和配制技术制造这些组合物, 以实现有用的剂型。在一个实施例中, 将发明的合成纳米载体与防腐剂一起悬浮在注射用无菌盐水溶液中。

[0159] 在多个实施例中, 当制备合成纳米载体作为载体时, 用于将组分与合成纳米载体偶联的方法可以是有用的。如果该组分是小分子, 那么在组装这些合成纳米载体之前将该组分附接至聚合物上可能是有利的。在多个实施例中, 制备具有用于将该组分与合成纳米载体偶联的表面基团的合成纳米载体也可能是有利的, 该偶联是通过使用这些表面基团而不是将该组分附接至聚合物上且随后在合成纳米载体的构建中使用这种聚合物共轭物来进行。

[0160] 在某些实施例中, 该偶联可以是共价连接物。在多个实施例中, 根据本发明的多肽可以经由 1,2,3- 三唑连接物共价偶联至外表面上, 该连接物通过纳米载体表面上的叠氮基团与含有炔基的抗原或免疫抑制剂进行 1,3- 偶极环加成反应、或通过纳米载体表面上的炔与含有叠氮基团的抗原或免疫抑制剂进行 1,3- 偶极环加成反应而形成。此类环加成反应优选地是在铜(I) 催化剂以及适合的 Cu(I)- 配体和将 Cu(II) 化合物还原成催化活性的 Cu(I) 化合物的还原剂存在下进行的。此类 Cu(I) 催化的叠氮 - 炔环加成反应(CuAAC) 也可以称为点击反应。

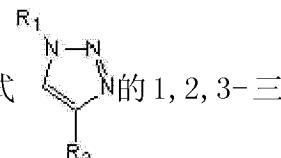
[0161] 另外, 共价偶联可以包含共价连接物, 该共价连接物包含酰胺连接物、二硫化物连

接物、硫醚连接物、腙连接物、酰肼连接物、亚胺或肟连接物、脲或硫脲连接物、脒连接物、胺连接物、以及磺酰胺连接物。

[0162] 酰胺连接物经由一种组分（如抗原或免疫抑制剂）上的胺与第二组分（如纳米载体）的羧酸基团之间的酰胺键形成。该连接物中的酰胺键可以用被适当保护的氨基酸与被活化的羧酸（如被 N- 羟基丁二酰亚胺活化的酯）、使用任何常规酰胺键形成反应制成。

[0163] 二硫化物连接物经由在例如 RI-S-S-R2 的形式的两个硫原子之间形成二硫 (S-S) 键制成。二硫键可以通过含有硫醇基 / 疏基 (-SH) 的组分与聚合物或纳米载体上另一个被活化的硫醇基或含有硫醇基 / 疏基的纳米载体与含有被活化的硫醇基的组分进行硫醇交换形成。

[0164] 三唑连接物（特别是其中 R1 和 R2 可以是任何化学实体的形式



唑）是通过附接至第一组分（如纳米载体）上的叠氮基与附接至第二组分（如免疫抑制剂或抗原）上的末端炔的 1, 3- 偶极环加成反应制成。该 1, 3- 偶极环加成反应在有或无催化剂的情况下、优选地在有经由 1, 2, 3- 三唑官能团连接两个组分的 Cu(I) 催化剂的情况下进行。夏普里斯 (Sharpless) 等人，在德国应用化学 (Angew. Chem. Int. Ed.) , 41 (14), 2596, (2002) 中以及梅尔达尔 (Meldal) 等人，在化学评述 (Chem. Rev.) , 2008, 108 (8), 2952–3015 中详细描述了此化学作用，并且该化学作用常常被称为“点击”反应或 CuAAC。

[0165] 在多个实施例中，制备了一种在聚合物链末端含有一个叠氮基或炔基的聚合物。然后使用此聚合物来制备合成纳米载体，以此方式使得多个炔或叠氮基放置在该纳米载体的表面上。可替代地，可以通过另一种途径制备该合成纳米载体，并且随后用炔或叠氮基功能化。该组分是在或者炔（如果该聚合物含有叠氮基）或者叠氮基（如果该聚合物含有炔）存在下制备。然后在具有或不具有催化剂的情况下允许该组分与该纳米载体经由 1, 3- 偶极环加成反应进行反应，该催化剂将该组分经由 1, 4- 二取代的 1, 2, 3- 三唑连接物共价偶联至颗粒上。

[0166] 硫醚连接物通过以例如 R1-S-R2 的形式形成硫 - 碳（硫醚）键制成。硫醚可以通过用第二组分上的烷基化基团（如卤基或环氧基）烷基化一种组分上的硫醇基 / 疏基 (-SH) 制成。硫醚连接物还可以通过将一种组分上的硫醇基 / 疏基与作为迈克尔受体的含有马来酰亚胺基团或乙烯砜基团的第二组分上的缺电子烯基进行迈克尔加成来形成。以另一种方式，硫醚连接物可以通过一种组分上的硫醇基 / 疏基与第二组分上的烯基进行自由基硫醇 - 烯反应来制备。

[0167] 肼连接物通过一种组分上的酰肼基与第二组分上的醛基 / 酮基进行反应制成。

[0168] 酰肼连接物通过一种组分上的肼基与第二组分上的羧酸基团进行反应来形成。此类反应通常使用类似于形成酰胺键的化学方法（其中羧酸用活化试剂活化）来进行。

[0169] 亚胺或肟连接物通过一种组分上的胺或 N- 烷氧基胺基（或氨氧基）与第二组分上的醛或酮基进行反应来形成。

[0170] 脲或硫脲连接物通过一种组分上的氨基与第二组分上的异氰酸酯或异硫氰酸酯基进行反应来制备。

- [0171] 胍连接物通过一种组分上的胺基与第二组分上的亚氨酸酯基团进行反应来制备。
- [0172] 胍连接物通过一种组分上的胺基与第二组分上的烷基化基团（如卤基、环氧基、或磺酸酯基）进行烷基化反应制成。可替代地，胺连接物还可以用适合的还原试剂（如氰基硼氢化钠或三乙酰氧基硼氢化钠）、通过一种组分上的胺基与第二组分上的醛基或酮基进行还原胺化反应制成。
- [0173] 磺酰胺连接物通过一种组分上的胺基与第二组分上的磺酰基卤化物（如磺酰氯）基团进行反应制成。
- [0174] 砷连接物通过亲核试剂与乙烯砜进行迈克尔加成制成。或者该乙烯砜或者该亲核试剂可以位于纳米载体的表面上或附接至一种组分上。
- [0175] 该组分还可以经由非共价共轭方法与纳米载体共轭。例如，带负电荷的抗原或免疫抑制剂可以通过静电吸附与带正电荷的纳米载体共轭。含有金属配体的组分还可以经由金属-配体络合物与含有金属络合物的纳米载体共轭。
- [0176] 在多个实施例中，该组分可以在组装该合成纳米载体之前附接至聚合物（例如聚乳酸-嵌段-聚乙二醇）上，或可以形成该合成纳米载体而使得反应性或可活化基团在它的表面上。在后一种情况下，可以制备该组分以使其具有与由这些合成纳米载体的表面呈现的附接化学性质相容的基团。在其他实施例中，可以使用一种适合的连接物将肽组分附接至 VLP 或脂质体上。连接物是能够将两个分子连接在一起的化合物或试剂。在一个实施例中，该连接物可以是在赫曼森 (Hermanson) 2008 中所描述的同双功能或异双功能试剂。例如，可以在 EDC 存在下用同双功能连接物（己二酸二酰肼 (ADH)）处理表面上含有羧基的 VLP 或脂质体合成纳米载体，以形成具有 ADH 连接物的相应合成纳米载体。然后使所得被 ADH 连接的合成纳米载体经由 NC 上的该 ADH 连接物的另一端与含有酸基团的肽组分共轭，以产生相应的 VLP 或脂质体肽共轭物。
- [0177] 针对可获得的共轭方法的详细描述，参见 2008 年由学术出版公司 (Academic Press, Inc.) 出版的第 2 版，赫曼森 • G T (Hermanson G T) “生物共轭技术 (Bioconjugate Techniques)”。除了共价附接之外，该组分可以通过吸附至预先形成的合成纳米载体上来偶联、或它可以通过在该合成纳米载体形成过程中进行封装来偶联。
- [0178] 在此所提供的任何免疫抑制剂可以与该合成纳米载体偶联。免疫抑制剂包括但不限于：抑制素；mTOR 抑制剂，如雷帕霉素或一种雷帕霉素类似物；TGF- β 信号剂；TGF- β 受体激动剂；组蛋白去乙酰化酶 (HDAC) 抑制剂；皮质类固醇类；线粒体功能抑制剂，如鱼藤酮；P38 抑制剂；NF- κ β 抑制剂；腺苷受体激动剂；前列腺素 E2 激动剂；磷酸二酯酶抑制剂，如磷酸二酯酶 4 抑制剂；蛋白酶体抑制剂；激酶抑制剂；G- 蛋白偶联受体激动剂；G- 蛋白偶联受体拮抗剂；糖皮质激素类；类视黄醇类；细胞因子抑制剂；细胞因子受体抑制剂；细胞因子受体活化剂；过氧化物酶体增殖物激活受体拮抗剂；过氧化物酶体增殖物激活受体激动剂；组蛋白去乙酰化酶抑制剂；钙调磷酸酶抑制剂；磷酸酶抑制剂，以及氧化的 ATP。免疫抑制剂还包括 IDO、维生素 D3、环孢霉素 A、芳香烃受体抑制剂、白藜芦醇、硫唑嘌呤、6- 硫基嘌呤、阿司匹林、尼氟酸、雌三醇、雷公藤甲素、白细胞介素（例如，IL-1、IL-10）、环孢霉素 A、siRNA 靶向细胞因子或细胞因子受体等。
- [0179] 抑制素的实例包括：阿托伐他汀 (atorvastatin) (**LIPITOR®**、**TORVAST®**)、西立伐他汀 (cerivastatin)、氟伐他汀

(fluvastatin) (**LESCOL®**、**LESCOL® XL**)、洛伐他汀
(lovastatin) (**MEVACOR®**、**ALTOCOR®**、**ALTOPREV®**)、
美伐他汀 (mevastatin) (**COMPACTIN®**)、匹伐他汀
(pitavastatin) (**LIVALO®**、**PIAVA®**)、罗苏伐他汀
(rosuvastatin) (**PRAVACHOL®**、**SELEKTINE®**、**LIPOSTAT®**)、罗苏伐他汀(**CRESTOR®**)以及辛伐他汀(simvastatin) (**ZOCOR®**、**LIPEX®**)。

[0180] mTOR 抑制剂的实例包括：雷帕霉素和其类似物（例如，CCL-779、RAD001、AP23573、C20-甲代烯丙基雷帕霉素 (C20-Marap)、C16-(S)-丁基磺酰氨基雷帕霉素 (C16-BSrap)、C16-(S)-3-甲基吲哚雷帕霉素 (C16-iRap)（贝尔 (Bayle) 等人, 化学与生物学 (Chemistry&Biology) 2006, 13 :99-107)）、AZD8055、BEZ235 (NVP-BEZ235)、大黄根酸 (大黄酚)、德福罗莫司 (deforolimus) (MK-8669)、依维莫司 (everolimus) (RAD0001)、KU-0063794、PI-103、PP242、替西罗莫司 (temsirolimus) 以及 WYE-354 (可获自赛立克公司 (Sealleck), 休斯顿 (Houston), 德克萨斯州 (TX), 美国 (USA))。

[0181] TGF-β 信号剂的实例包括：TGF-β 配体（例如，活化素 A、GDF1、GDF11、骨形态发生蛋白、nodal、TGF-β）和它们的受体（例如，ACVR1B、ACVR1C、ACVR2A、ACVR2B、BMPR2、BMPR1A、BMPR1B、TGF β RI、TGF β RII）、R-SMADS/co-SMADS（例如，SMAD1、SMAD2、SMAD3、SMAD4、SMAD5、SMAD8）、以及配体抑制剂（例如，卵泡抑素、头蛋白、腱蛋白、DAN、lefty、LTBP1、THBS1、核心蛋白聚糖）。

[0182] 线粒体功能抑制剂的实例包括：苍术昔 (二钾盐)、米酵菌酸 (三铵盐)、羧基氯化间氯苯腙、羧基苍术昔 (例如, 来自苍术属植物 (*Atractylis gummiifera*))、CGP-37157、(-)-鱼藤素 (例如, 来自栓皮豆 (*Mundulea sericea*))、F16、己糖激酶 II VDAC 结合域肽、寡霉素、鱼藤酮、Ru360、SFK1、以及缬氨霉素 (例如, 来自极暗黄链霉菌 (*Streptomyces fulvissimus*)) (EMD4 生物科学 (EMD4Biosciences), 美国 (USA))。

[0183] P38 抑制剂的实例包括：SB-203580 (4-(4-氟苯基)-2-(4-甲基亚硫酰基苯基)-5-(4-吡啶基)1H-咪唑)、SB-239063 (反式-1-(4-羟基环己基)-4-(氟苯基)-5-(2-甲氧基-嘧啶-4-基)咪唑)、SB-220025 (5-(2-氨基-4-嘧啶基)-4-(4-氟苯基)-1-(4-哌啶基)咪唑)、以及 ARRY-797。

[0184] NF (例如, NK-κ β) 抑制剂的实例包括：IFRD1、2-(1,8-萘啶-2-基)-苯酚、5-氨基水杨酸、BAY11-7082、BAY11-7085、CAPE (咖啡酸苯乙酯)、马来酸二乙酯、IKK-2 抑制剂 IV、IMD0354、乳胞素 (lactacystin)、MG-132 [Z-Leu-Leu-Leu-CHO]、NF κ B 活化抑制剂 III、NF-κ B 活化抑制剂 II、JSH-23、小白菊内酯 (parthenolide)、氧化苯胂 (PAO)、PPM-18、吡咯烷二硫代氨基甲酸铵盐、QNZ、R0106-9920、棟酰胺 (rocaglamide)、棟酰胺 AL、棟酰胺 C、棟酰胺 I、棟酰胺 J、洛克米兰醇 (rocaglaol)、(R)-MG-132、水杨酸钠、雷公藤甲素 (PG490)、蟛蜞菊内酯 (wedelolactone)。

[0185] 腺苷受体激动剂的实例包括 CGS-21680 和 ATL-146e。

[0186] 前列腺素 E2 激动剂的实例包括 E- 前列腺素类激素 2 (E-Prostanoid2) 和 E- 前列腺素类激素 4。

[0187] 磷酸二酯酶抑制剂 (非选择性和选择性抑制剂) 的实例包括：咖啡因、氨茶碱

碱、IBMX(3-异丁基-1-甲基黄嘌呤)、副黄嘌呤、己酮可可碱、可可碱、茶碱、甲基化的黄嘌呤类、长春西汀(vinpocetine)、EHNA(赤-9-(2-羟基-3-壬基)腺嘌呤)、阿那格雷(anagrelide)、伊诺昔酮(enoximone)(PERFANTM)、米利酮(milrinone)、左昔孟坦(levosimendan)、松叶菊碱(mesembrine)、异丁司特(ibudilast)、吡拉米司特(piclamilast)、木犀草素(luteolin)、屈他维林(drotaverine)、罗氟司特(roflumilast)(DAXASTM、DALIRESPTM)、西地那非(sildenafil)(REVATION[®]、VIAGRA[®])、他达拉非(tadalafil)(ADCIRCA[®]、CIALIS[®])、伐地那非(vardenafil)(LEVITRA[®]、STAXYN[®])、乌地那非(udenafil)、阿伐那非(avanafil)、淫羊藿苷(icariin)、4-甲基哌嗪、以及吡唑并嘧啶-7-1。

[0188] 蛋白酶体抑制剂的实例包括硼替佐米(bortezomib)、双硫仑(disulfiram)、表儿茶素-3-没食子酸盐、以及盐孢菌酰胺A(salinosporamide A)。

[0189] 激酶抑制剂的实例包括：贝伐单抗(bevacizumab)、BIBW2992、西妥昔单抗(cetuximab)(ERBITUX[®])、伊马替尼(imatinib)(GLEEVEC[®])、曲妥单抗(trastuzumab)(HERCEPTIN[®])、吉非替尼(gefitinib)(IRESSA[®])、兰尼单抗(ranibizumab)(LUCENTIS[®])、哌加他尼(pegaptanib)、索拉非尼(sorafenib)、达沙替尼(dasatinib)、舒尼替尼(sunitinib)、埃罗替尼(erlotinib)、尼罗替尼(nilotinib)、拉帕替尼(lapatinib)、帕尼单抗(panitumumab)、凡德他尼(vandetanib)、E7080、帕唑帕尼(pazopanib)、木利替尼(mubritinib)。

[0190] 糖皮质激素类的实例包括：氢化可的松(皮质醇)、醋酸可的松、强的松(prednisone)、泼尼松龙(prednisolone)、甲泼尼龙(methylprednisolone)、地塞米松(dexamethasone)、倍他米松(betamethasone)、曲安西龙(triamcinolone)、倍氯米松(beclometasone)、醋酸氟氢可的松、醋酸脱氧皮质酮(DOCA)、以及醛固酮。

[0191] 类视黄醇类的实例包括：视黄醇、视黄醛、维甲酸(视黄酸, RETIN-A[®])、异维甲酸(Accutane[®]、Amnesteem[®]、Claravis[®]、Sotret[®])、阿利维甲酸(alitretinoin)(PANRETIN[®])、依曲替酯(etretinate)(TEGISONTM)和它的代谢物阿维A(acitretin)(SORIATANE[®])、他扎罗汀(tazarotene)(Tazorac[®]、Avage[®]、Zorac[®])、贝沙罗汀(bexarotene)(TARGRETIN[®])、以及阿达帕林(adapalene)(DIFFERIN[®])。

[0192] 细胞因子抑制剂的实例包括IL1ra、IL1受体拮抗剂、IGFBP、TNF-BF、尿调节素(uromodulin)、α-2-巨球蛋白、环孢霉素A、戊烷脒、以及己酮可可碱(Pentopak[®]、Pentoxil[®]、Trental[®])。

[0193] 过氧化物酶体增殖物活化的受体拮抗剂的实例包括GW9662、PPARγ拮抗剂III、G335、T0070907(EMD4生物科学(EMD4Biosciences),美国(USA))。

[0194] 过氧化物酶体增殖物活化的受体激动剂的实例包括：吡格列酮(pioglitazone)、环格列酮(ciglitazone)、氯贝特(clofibrate)、GW1929、GW7647、L-165,041、LY171883、PPARγ活化剂、Fmoc-Leu、曲格列酮(troglitazone)、以及WY-14643(EMD4生物科学

(EMD4Biosciences), 美国 (USA))。

[0195] 组蛋白去乙酰化酶抑制剂的实例包括：异氢肟酸类（或异氢肟酸酯类），如曲古抑菌素 A (trichostatin A)；环状四肽类（如曲破辛 B (trapoxin B)）和缩肽类；苯甲酰胺类；亲电酮类；脂肪族酸化合物，如苯基丁酸酯和丙戊酸；异羟肟酸类，如伏立诺他 (vorinostat) (SAHA)、贝林司他 (belinostat) (PXD101)、LAQ824、以及帕比司他 (panobinostat) (LBH589)；苯甲酰胺类，如恩替诺特 (entinostat) (MS-275)、CI994、以及莫替司他 (mocetinostat) (MGCD0103)、烟酰胺；NAD 的衍生物、二氢香豆素、萘并吡喃酮 (naphthopyranone)、以及 2-羟基萘醛类。

[0196] 钙调磷酸酶抑制剂的实例包括环孢霉素、匹美莫司 (pimecrolimus)、伏环孢素 (voclosporin)、以及他克莫司 (tacrolimus)。

[0197] 磷酸酶抑制剂的实例包括：BN82002 盐酸盐、CP-91149、花萼海绵诱癌素 A (calyculin A)、斑蝥酸 (cantharidic acid)、斑蝥素 (cantharidin)、氯氰菊酯 (cypermethrin)、乙基-3,4-迪磷他汀 (ethyl-3,4-dephostatin)、福司曲星 (fostriecin) 钠盐、MAZ51、甲基-3,4-迪磷他汀 (methyl-3,4-dephostatin)、NSC95397、去甲斑蝥素 (norcantharidin)、来自凹形原甲藻 (prorocentrum concavum) 的冈田酸铵盐、冈田酸、冈田酸钾盐、冈田酸钠盐、氧化苯胂、各种磷酸酶抑制剂混合、蛋白质磷酸酶 IC、蛋白质磷酸酶 2A 抑制蛋白、蛋白质磷酸酶 2A1、蛋白质磷酸酶 2A2、原钒酸钠。

[0198] 在一些实施例中，在此所描述的这些治疗性蛋白 APC 可呈递抗原也与合成纳米载体偶联。在一些实施例中，这些治疗性蛋白 APC 可呈递抗原与这些免疫抑制剂偶联至其上的相同或不同的合成纳米载体偶联。在其他实施例中，这些治疗性蛋白 APC 可呈递抗原不与任何合成纳米载体偶联。治疗性蛋白 APC 可呈递抗原包括在此提供的任何治疗性蛋白、或其片段或衍生物。

[0199] 治疗性蛋白包括但不限于：可输注的治疗性蛋白、酶、酶辅助因子、激素、凝血因子、细胞因子和干扰素、生长因子、单克隆抗体、及多克隆抗体（例如，作为替代疗法向受试者给予的多克隆抗体）、以及与庞贝氏病相关的蛋白质（例如，阿葡糖苷酶 α、rhGAA（例如，Myozyme 和 Lumizyme（健赞公司 (Genzyme)））。治疗性蛋白还包括涉及在凝血级联系统中的蛋白质。治疗性蛋白包括但不限于：因子 VIII、因子 VII、因子 IX、因子 V、血管性血友病因子、von Hildebrand 因子、组织型纤溶酶原激活物、胰岛素、生长激素、α 促红细胞生成素、VEGF、促血小板生成素、溶菌酶、抗凝血酶等等。治疗性蛋白还包括脂肪因子类，如瘦素和脂联素。如下和在此其他地方描述了治疗性蛋白的其他实例。还包括作为抗原而提供的任何治疗性蛋白的片段或衍生物。

[0200] 在具有溶酶体贮积症的受试者的酶替代疗法中使用的治疗性蛋白的实例包括但不限于：用于治疗高雪病的伊米昔酶（例如，CEREZYME™）、用于治疗法布里病的 α-半乳糖苷酶 A (α-gal A)（例如，阿加糖酶 β、FABRYZYME™）、用于治疗庞贝氏病的酸性 α-葡萄糖苷酶 (GAA)（例如，阿葡糖苷酶 α、LUMIZYME™、MYOZYME™）、用于治疗粘多糖病的芳基硫酸酯酶 B（例如，拉罗尼酶 (laronidase)、ALDURAZYME™、艾度硫酸酯酶、ELAPRASE™、芳基硫酸酯酶 B、NAGLAZYME™）。

[0201] 酶的实例包括氧化还原酶、转移酶、水解酶、裂解酶、异构酶、以及连接酶。

[0202] 激素的实例包括：褪黑素 (N-乙酰基-5-甲氧基色胺)、血清素、甲状腺素（或四

碘甲状腺原氨酸) (一种甲状腺激素)、三碘甲状腺原氨酸 (一种甲状腺激素)、肾上腺素 (Epinephrine) (或肾上腺素 (adrenaline))、去甲肾上腺素 (Norepinephrine) (或去甲肾上腺素 (noradrenaline))、多巴胺 (或催乳素抑制激素)、抗苗勒氏管激素 (或苗勒氏管抑制因子或激素)、脂联素、促肾上腺皮质激素 (Adrenocorticotropic hormone) (或促肾上腺皮质激素 (corticotropin))、血管紧张素原和血管紧张素、抗利尿激素 (Antidiuretic hormone) (或加压素 (vasopressin)、精氨酸加压素 (arginine vasopressin))、心房利钠肽 (或心房肽)、降钙素、缩胆囊素 (Cholecystokinin)、促肾上腺皮质激素释放激素、红细胞生成素、促卵泡激素、胃泌素、胃饥饿素 (Ghrelin)、胰高血糖素 (Glucagon)、胰高血糖素样肽 (GLP-1)、GIP、促性腺激素释放激素、生长激素释放激素、人绒毛膜促性腺激素、人胎盘催乳素、生长激素、抑制素 (Inhibin)、胰岛素、胰岛素样生长因子 (或生长调节素)、瘦素、促黄体激素、促黑素细胞激素、阿立新 (Orexin)、催产素、甲状旁腺激素、催乳素、松弛素、分泌素、促生长素抑制素、促血小板生成素、促甲状腺激素 (或促甲状腺素)、促甲状腺素释放激素、皮质醇、醛固酮、睾酮、脱氢表雄酮、雄烯二酮、二氢睾酮、雌二醇、雌酮、雌三醇、黄体酮、骨化三醇 (1, 25- 二羟基维生素 D3)、骨化二醇 (25- 羟基维生素 D3)、前列腺素类、白三烯类、前列腺环素、凝血噁烷、催乳素释放激素、促脂解素、脑利钠肽、神经肽 Y、组胺、内皮素、胰多肽、肾素、以及脑啡肽。

[0203] 血液和凝血因子的实例包括 : 因子 I (纤维蛋白原)、因子 II (凝血酶原)、组织因子、因子 V (促凝血球蛋白原、易变因子)、因子 VII (稳定因子、前转变素)、因子 VIII (抗血友病球蛋白)、因子 IX (克雷司马斯因子 (Christmas factor) 或血浆促凝血酶原激酶组分)、因子 X (斯图亚特因子 (Stuart-Prower factor))、因子 Xa、因子 XI、因子 XII (哈格曼因子 (Hageman factor))、因子 XIII (纤维蛋白稳定因子)、血管性血友病因子、前激肽释放酶 (费莱彻因子 (Fletcher factor))、高分子量激肽原 (HMWK) (菲茨杰拉德因子)、纤连蛋白、纤维蛋白、凝血酶、抗凝血酶 III、肝素辅助因子 II、蛋白 C、蛋白 S、蛋白 z、蛋白 z 相关蛋白酶抑制剂 (ZPI)、纤溶酶原、 α 2- 抗纤维蛋白溶酶、组织型纤溶酶原激活物 (tPA)、尿激酶、纤溶酶原激活物抑制剂 -1 (PAI1)、纤溶酶原激活物抑制剂 -2 (PAI2)、癌性促凝物质、以及阿法依泊汀 (益比奥 (Epoprostetron)、普罗克里特 (Procris))。

[0204] 细胞因子的实例包括 : 淋巴因子、白细胞介素、及趋化因子、1 型细胞因子 (如 IFN- γ 、TGF- β)、以及 2 型细胞因子 (如 IL-4、IL-10、以及 IL-13)。

[0205] 生长因子的实例包括 : 肾上腺髓质素 (AM)、血管生成素 (Ang)、自分泌运动因子、骨形态发生蛋白 (BMP)、脑源性神经营养因子 (BDNF)、表皮生长因子 (EGF)、红细胞生成素 (EPO)、成纤维细胞生长因子 (FGF)、胶质细胞系源性神经营养因子 (GDNF)、粒细胞集落刺激因子 (G-CSF)、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF)、生长分化因子 -9 (GDF9)、肝细胞生长因子 (HGF)、肝细胞瘤源性生长因子 (HDGF)、胰岛素样生长因子 (IGF)、促移行因子、肌生长抑制素 (GDF-8)、神经生长因子 (NGF) 和其他神经营养蛋白、血小板源性生长因子 (PDGF)、促血小板生成素 (TPO)、 α - 转化生长因子 (TGF- α)、 β - 转化生长因子 (TGF- β)、 α - 肿瘤坏死因子 (TNF- α)、血管内皮生长因子 (VEGF)、Wnt 信号通路、胎盘生长因子 (PlGF)、[(胎牛生长激素)] (FBS)、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、以及 IL-7。

[0206] 单克隆抗体的实例包括 : 阿巴伏单抗 (Abagovomab)、阿昔单抗 (Abciximab)、阿达木单抗 (Adalimumab)、阿德木单抗 (Adecatumumab)、阿非莫单抗 (Afelimomab)、阿夫

土珠 (Afutuzumab)、培化阿珠单抗 (Alacizumab pegol)、ALD、阿仑单抗 (Alemtuzumab)、喷替酸阿妥莫单抗 (Altumomab pentate)、麻安莫单抗 (Anatumomab mafenatox)、安芦珠单抗 (Anrukizumab)、抗胸腺细胞球蛋白、阿泊珠单抗 (Apolizumab)、阿西莫单抗 (Arcitumomab)、阿塞珠单抗 (Aselizumab)、那他珠单抗 (Atlizumab) (托珠单抗 (tocilizumab))、阿托木单抗 (Atorolimumab)、巴品珠单抗 (Bapineuzumab)、巴利昔单抗 (Basiliximab)、巴维昔单抗 (Bavituximab)、贝妥莫单抗 (Bectumomab)、贝利木单抗 (Belimumab)、贝那利珠单抗 (Benralizumab)、柏替木单抗 (Bertilimumab)、贝索单抗 (Besilesomab)、贝伐单抗 (Bevacizumab)、比西单抗 (Biciromab)、比伐珠单抗 - 美登素 (Bivatuzumab mertansine)、兰妥莫单抗 (Blinatumomab)、贝伦妥单抗 - 维多汀 (Brentuximab vedotin)、布雷奴单抗 (Briakinumab)、卡那单抗 (Canakinumab)、莫坎妥珠单抗 (Cantuzumab mertansine)、卡罗单抗喷地肽 (Capromab pendetide)、卡妥索单抗 (Catumaxomab)、西利珠单抗 (Cedelizumab)、赛妥珠单抗 (Certolizumab pegol)、西妥昔单抗 (Cetuximab)、泊西他珠单抗 (Citatuzumab bogatox)、西妥木单抗 (Cixutumumab)、克立昔单抗 (Clenoliximab)、克伐珠单抗 (Clivatuzumab tetraxetan)、可那木单抗 (Conatumumab)、达西珠单抗 (Dacetuzumab)、达利珠单抗 (Daclizumab)、达雷木单抗 (Daratumumab)、地诺单抗 (Denosumab)、地莫单抗 (Detumomab)、阿托度单抗 (Dorlimomab aritox)、达利珠单抗 (Dorlixizumab)、依美昔单抗 (Ecromeximab)、依库珠单抗 (Eculizumab)、埃巴单抗 (Edobacomab)、依决洛单抗 (Edrecolomab)、依法利珠单抗 (Efalizumab)、依芬古单抗 (Efungumab)、依洛珠单抗 (Elotuzumab)、艾西莫单抗 (Elsilimomab)、培化恩莫单抗 (Enlimomab pegol)、西艾匹莫单抗 (Epitumomab cituxetan)、依帕珠单抗 (Epratuzumab)、厄利珠单抗 (Erlizumab)、厄妥索单抗 (Ertumaxomab)、埃达珠单抗 (Etaracizumab)、艾维单抗 (Exbivirumab)、法索单抗 (Fanolesomab)、法拉莫单抗 (Faralimumab)、法利珠单抗 (Farletuzumab)、泛维珠单抗 (Felvizumab)、非扎奴单抗 (Fezakinumab)、芬妥木单抗 (Figitumumab)、芳妥珠单抗 (Fontolizumab)、福拉韦单抗 (Foravirumab)、夫苏木单抗 (Fresolimumab)、加利昔单抗 (Galiximab)、罗氏单抗 (Gantenerumab)、加维莫单抗 (Gavilimomab)、吉妥珠单抗 - 奥唑米星 (Gemtuzumab ozogamicin)、GC1008、吉瑞昔单抗 (Girentuximab)、格雷帕珠单抗 - 维德汀 (Glembatumumab vedotin)、戈利木单抗 (Golimumab)、戈利昔单抗 (Gomiliximab)、伊巴珠单抗 (Ibalizumab)、替伊莫单抗 (Ibritumomab tiuxetan)、伊戈伏单抗 (Igovomab)、英西单抗 (Imciromab)、英夫利昔单抗 (Infliximab)、英妥木单抗 (Intetumumab)、伊诺莫单抗 (Inolimomab)、伊珠单抗 - 奥加米星 (Inotuzumab ozogamicin)、伊匹单抗 (Ipilimumab)、伊妥木单抗 (Iratumumab)、凯利昔单抗 (Keliximab)、拉贝珠单抗 (Labetuzumab)、来金珠单抗 (Lebrikizumab)、来马索单抗 (Lemalesomab)、乐德木单抗 (Lerdelimumab)、来沙木单抗 (Lexatumumab)、利韦单抗 (Libivirumab)、林妥珠单抗 (Lintuzumab)、罗佛珠单抗 - 美登素 (Lorvotuzumab mertansine)、鲁卡木单抗 (Lucatumumab)、鲁昔单抗 (Lumiliximab)、马帕木单抗 (Mapatumumab)、马司莫单抗 (Maslimomab)、马妥珠单抗 (Matuzumab)、美泊利单抗 (Mepolizumab)、美替木单抗 (Metelimumab)、米拉珠单抗 (Milatuzumab)、明瑞莫单抗 (Minretumomab)、米妥莫单抗 (Mitumomab)、莫罗木单抗 (Morolimumab)、莫维珠单抗 (Motavizumab)、莫罗单

抗-CD3 (Muromonab-CD3)、他那可洛单抗 (Nacolomab tafenatox)、他那莫单抗 (Naptumomab estafenatox)、那他珠单抗 (Natalizumab)、奈巴库单抗 (Nebacumab)、奈昔木单抗 (Necitumumab)、奈瑞莫单抗 (Nerelimumab)、尼妥珠单抗 (Nimotuzumab)、莫诺非莫单抗 (Nofetumomab merpantan)、奥瑞珠单抗 (Ocrelizumab)、奥度莫单抗 (Odulimumab)、奥法木单抗 (Ofatumumab)、奥拉雷单抗 (Olaratumab)、奥马珠单抗 (Omalizumab)、莫奥珠单抗 (Oportuzumab monatox)、奥戈伏单抗 (Oregovomab)、奥昔珠单抗 (Otelixizumab)、帕吉昔单抗 (Pagibaximab)、帕利珠单抗 (Palivizumab)、帕尼单抗 (Panitumumab)、帕诺库单抗 (Panobacumab)、帕考珠单抗 (Pascolizumab)、帕尼单抗 (Pemtumomab)、帕妥珠单抗 (Pertuzumab)、培克珠单抗 (Pexelizumab)、平妥单抗 (Pintumomab)、普立昔单抗 (Priliximab)、普托木单抗 (Pritumumab)、瑞非韦鲁 (Rafivirumab)、礼来单抗 (Ramucirumab)、来尼珠单抗 (Ranibizumab)、瑞希巴库 (Raxibacumab)、瑞加韦单抗 (Regavirumab)、瑞利珠单抗 (Reslizumab)、利妥木单抗 (Rilotumumab)、利妥珠单抗 (Rituximab)、罗妥木单抗 (Robatumumab)、罗利珠单抗 (Rontalizumab)、罗韦来单抗 (Rovelizumab)、芦利珠单抗 (Ruplizumab)、喷地肽沙妥莫单抗 (Satumomab pendetide)、司韦单抗 (Sevirimab)、西罗珠单抗 (Sibrotuzumab)、西法木单抗 (Sifalimumab)、司妥昔单抗 (Siltuximab)、希普利珠单抗 (Siplizumab)、苏兰珠单抗 (Solanezumab)、索尼普单抗 (Sonepcizumab)、索土珠单抗 (Sontuzumab)、司他芦单抗 (Stamulumab)、硫索单抗 (Sulesomab)、他珠单抗 (Tacatuzumab tetraxetan)、他度珠单抗 (Tadocizumab)、他利珠单抗 (Talizumab)、他尼珠单抗 (Tanezumab)、帕他莫单抗 (Taplitumomab aritox)、特非珠单抗 (Tefibazumab)、阿替莫单抗 (Telimumab aritox)、替妥莫单抗 (Tenatumomab)、替奈昔单抗 (Teneliximab)、替利珠单抗 (Teplizumab)、替西莫单抗 (Ticilimumab) (替西木单抗 (tremelimumab))、替加珠单抗 (Tigatuzumab)、托珠单抗 (Tocilizumab) (阿替珠单抗 (atlizumab))、托利珠单抗 (Toralizumab)、托西莫单抗 (Tositumomab)、曲妥珠单抗 (Trastuzumab)、曲美木单抗 (Tremelimumab)、西莫白细胞介素单抗 (Tucotuzumab celmoleukin)、妥韦单抗 (Tuvirumab)、乌珠单抗 (Urtoxazumab)、优特克单抗 (Ustekinumab)、伐利昔单抗 (Vapaliximab)、维多珠单抗 (Vedolizumab)、维妥珠单抗 (Veltuzumab)、维帕莫单抗 (Vepalimomab)、维西珠单抗 (Visilizumab)、伏洛昔单抗 (Volociximab)、伏妥莫单抗 (Votumumab)、扎鲁木单抗 (Zalutumumab)、扎木单抗 (Zanolimumab)、齐拉木单抗 (Ziralimumab)、以及阿佐莫单抗 (Zolimomab aritox)。

[0207] 输注疗法或可注射的治疗性蛋白的实例包括：例如，塔西单抗 (Tocilizumab) (罗氏公司 (Roche) /**Actemra®**)、 α -1 抗胰蛋白酶 (卡美达公司 (Kamada) /AAT)、**Hematide®** (Affymax 和 Takeda, 合成肽)、白蛋白干扰素 α -2b (诺华公司 (Novartis) /Zalbin™)、**Rhucin®** (嫁接集团 (Pharming Group), C1 抑制剂替代疗法)、替莫瑞林 (tesamorelin) (治疗技术公司 (Theratechnologies) /Egrifta, 合成生长激素释放因子)、奥瑞珠单抗 (ocrelizumab) (遗传技术公司 (Genentech)、罗氏公司 (Roche) 以及生物遗传公司 (Biogen))、杯利单抗 (belimumab) (葛兰素史克公司 (GlaxoSmithKline) /**Benlysta®**)、聚乙二醇重组尿酸酶 (Savient 制药公司 /Krystexxa™)、 α -他利昔酶 (Protalix 公司 /Uplyso)、阿加糖酶 α (夏尔公司 (Shire) /**Replagal®**)、葡糖脑苷脂酶 α (夏尔公司 (Shire))。

[0208] 对根据本发明的方面有用的另外的治疗性蛋白对于本领域普通技术人员而言将是显而易见的，并且本发明在此方面是不受限的。

[0209] 在一些实施例中，可以对一种组分（如抗原或免疫抑制剂）进行分离。分离是指该成分与它的天然环境分离并且以容许对它进行鉴定或使用的足够量存在。这意味着，例如，该成分可以 (i) 通过表达克隆选择性地产生或 (ii) 如通过色谱法或电泳进行纯化。分离的成分可以是基本上纯的，但是不需要如此。由于在药物制剂中分离的成分可以与药学上可接受的赋形剂相混合，按该制剂的重量计该成分可以仅包含小的百分比。虽然如此，该成分是分离的原因在于，它已经从在活系统中可能与其结合的物质中分离出来，即从其他脂质或蛋白质中分离出来。可以对在此提供的任何成分进行分离并且以分离的形式包含在这些组合物中。

[0210] D. 制造和使用本发明的组合物和相关方法的方法

[0211] 可以使用本领域中已知的各种各样的方法制备合成纳米载体。例如，可以通过如纳米沉淀、使用流体通道的流动聚焦、喷雾干燥、单和双乳液溶剂蒸发、溶剂萃取、相分离、研磨、微乳液步骤、微制造、纳米制造、牺牲层、简单和复杂凝聚法的方法、以及本领域的那些普通技术人员熟知的其他方法形成合成纳米载体。可替代地或另外地，已经说明了用于单分散半导体，传导性的、磁性的、有机的、以及其他纳米材料的水性和有机溶剂合成 (Pellegrino (佩莱格里诺) 等人, 2005, 小物质, 1 :48 ;Murray (莫雷) 等人, 2000, 材料科学年度评论, 30 :545 ;以及 Trindade (特林达德) 等人, 2001, 材料化学, 13 :3843)。在文献中已经描述了另外的方法 (参见，例如，多布罗夫 (Doubrow) 编著，“医药中的微胶囊和纳米颗粒 (Microcapsules and Nanoparticles in Medicine and Pharmacy)”，CRC 出版社，博卡拉顿 (Boca Raton), 1992 ;马西威兹 (Mathiowitz) 等人, 1987, 控释期刊 (J. Control. Release), 5 :13 ;马西威兹 (Mathiowitz) 等人, 1987, 反应性聚合物 (Reactive Polymers), 6 :275 ;以及马西威兹 (Mathiowitz) 等人, 1988, 应用聚合物科学期刊 (J. Appl. Polymer Sci.), 35 :755 ;美国专利 5578325 和 6007845 ;P·保利赛利 (P. Paolicelli) 等人，“可以有效结合并递送病毒样颗粒的表面修饰的基于 PLGA 的纳米颗粒 (Surface-modified PLGA-based Nanoparticles that can Efficiently Associate and Deliver Virus-like Particles)”，纳米医学 (Nanomedicine), 5(6) :843-853 (2010))。

[0212] 可以使用各种方法将各种材料封装在所令人希望的合成纳米载体中，这些方法包括但不限于 :C·阿斯泰特 (C. Astete) 等人，“PLGA 纳米颗粒的合成和表征 (Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles)”生物材料科学期刊 (J. Biomater. Sci.) 聚合物版, 第 17 卷, 第 3 期, 第 247-289 页 (2006) ;K·阿芙古斯塔基斯 (K. Avgoustakis) “PEG 化的聚 (丙交酯) 和聚 (丙交酯 - 共 - 乙交酯) 纳米颗粒 :制备、特性以及在药物递送中的可能应用 (Pegylated Poly(Lactide) and Poly(Lactide-Co-Glycolide) Nanoparticles : Preparation, Properties and Possible Applications in Drug Delivery)”当前药物递送 (Current Drug Delivery) 1 :321-333 (2004) ;里斯·C(C. Reis) 等人，“纳米封装 I. 用于制备载药聚合物纳米颗粒的方法 (Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles)”纳米医学 (Nanomedicine) 2 :8-21 (2006) ;P·保利赛利 (P. Paolicelli) 等人，“可以有效结合和递送病毒样颗粒的表面修饰的基于 PLGA 的纳米颗粒 (Surface-modified PLGA-based Nanoparticles that cab Efficiently

Associate and Deliver Virus-like Particles)" 纳米医学 (Nanomedicine), 5(6) : 843-853 (2010)。可以使用其他适合于将材料封装至合成纳米载体中的方法,这些方法包括但不限于披露在昂格尔 (Unger) 的美国专利 6,632,671 (2003 年 10 月 14 日) 中的方法。

[0213] 在某些实施例中,通过纳米沉淀工艺或喷雾干燥来制备合成纳米载体。可以改变在制备合成纳米载体中使用的条件以产生具有所希望的大小和特性 (例如,疏水性、亲水性、外部形态学、“粘性”、形状等等) 的颗粒。制备这些合成纳米载体的方法和使用的条件 (例如,溶剂、温度、浓度、空气流速等等) 可以取决于有待偶联至这些合成纳米载体上的材料和 / 或该聚合物基质的组成。

[0214] 如果通过任何以上方法制备的颗粒具有在希望的范围外的大小范围,那么可以按大小分类这些颗粒,例如使用一个筛。

[0215] 本发明的合成纳米载体的成分 (即,组分) (如构成一个免疫特征表面的部分、靶向部分、聚合物基质、抗原、免疫抑制剂等) 可以例如通过一个或多个共价键偶联至整体的合成纳米载体上或可以借助一个或多个连接物来偶联。使合成纳米载体功能化的另外方法可以由以下文献改编而来:萨尔茨曼 (Saltzman) 等人的公布的美国专利申请 2006/0002852、戴斯蒙 (DeSimone) 等人的公布的美国专利申请 2009/0028910、或默西 (Murthy) 等人的公布的国际专利申请 WO/2008/127532A1。

[0216] 可替代地或另外地,可以经由非共价相互作用使合成纳米载体直接地或间接地偶联至组分上。在非共价的实施例中,通过非共价相互作用介导非共价偶联,这些非共价相互作用包括但不限于:电荷相互作用、亲和相互作用、金属配位、物理吸附、主 - 客体相互作用、疏水相互作用、TT 堆积相互作用、氢键相互作用、范德华相互作用、磁相互作用、静电相互作用、偶极 - 偶极相互作用、和 / 或其组合。此类偶联可以安排在本发明合成纳米载体的一个外表面或一个内表面上。在多个实施例中,封装和 / 或吸附是偶联的形式。在多个实施例中,本发明的这些合成纳米载体可以通过在相同媒介物或递送系统中混合而与抗原相组合。

[0217] 可以使用传统的药物混合方法组合多个群体的合成纳米载体以形成根据本发明的药物剂型。这些方法包括液体 - 液体混合,其中两种或更多种各自含有一个或多个纳米载体子集的悬浮液被直接组合或经由一个或多个含有稀释剂的容器被集合在一起。因为合成纳米载体还可以以粉末形式生产或贮存,所以可以进行干燥的粉末 - 粉末混合,因为可以将两种或更多种粉末再悬浮于共同的介质中。取决于纳米载体的特性和它们的相互作用潜力,一种或另一种混合途径可能也有优势。

[0218] 包含合成纳米载体的典型的发明组合物可以包含无机或有机缓冲剂 (例如,磷酸、碳酸、乙酸、或柠檬酸的钠盐或钾盐) 和 pH 调节剂 (例如,盐酸、氢氧化钠或氢氧化钾、柠檬酸或乙酸的盐、氨基酸和它们的盐)、抗氧化剂 (例如,抗坏血酸、 α -生育酚)、表面活性剂 (例如,聚山梨酯 20、聚山梨酯 80、聚氧乙烯 9-10 壬基酚、去氧胆酸钠)、溶液和 / 或低温 / 冻干稳定剂 (例如,蔗糖、乳糖、甘露醇、海藻糖)、渗透调节剂 (例如,盐类或糖类)、抗细菌剂 (例如,苯甲酸、苯酚、庆大霉素)、消泡剂 (例如,聚二甲基硅酮 (polydimethylsiloxane))、防腐剂 (例如,硫柳汞、2- 苯氧乙醇、EDTA)、聚合物稳定剂和粘度调节剂 (例如,聚乙烯吡咯酮、泊洛沙姆 488、羧甲基纤维素)、以及共溶剂 (例如,甘油、聚乙二醇、乙醇)。

[0219] 根据本发明的组合物包含与药学上可接受的赋形剂组合的本发明的合成纳米载体。可以使用常规药物制造和配制技术制造这些组合物,以实现有用的剂型。适合用于实践本发明的技术可以在以下文献中找到:爱德华·L·保罗(Edward L. Paul),维克多·A. Atiemo-Obeng(Victor A. Atiemo-Obeng)以及苏珊娜·M. Kresta(Suzanne M. Kresta)编著的工业混合手册:科学与实践(Handbook of Industrial Mixing:Science and Practice),2004 约翰威利国际出版公司(John Wiley&Sons, Inc.) ;和奥斯丁·M. E. (M. E. Auten)编著的制药学:剂型设计科学(Pharmaceutics :The Science of Dosage Form Design),第2版,2001,丘吉尔利文斯通出版社(Churchill Livingstone)。在一个实施例中,将本发明的合成纳米载体与防腐剂一起悬浮在注射用无菌盐水溶液中。

[0220] 应当理解可以按任何适合的方式制造本发明的这些组合物,并且本发明绝不局限于可以使用在此描述的方法所产生的组合物。适当方法的选择可能需要注意被结合的特定部分的特性。

[0221] 在一些实施例中,本发明的合成纳米载体是在无菌条件下制造或最后进行灭菌。这可以确保所得的组合物是无菌的并且是非感染性的,因此当与非无菌的组合物相比时提高了安全性。这提供了有价值的安全措施,尤其是当接受合成纳米载体的受试者具有免疫缺陷、正在遭受感染、和 / 或易受感染时。在一些实施例中,取决于配制策略,可以将本发明的合成纳米载体冻干并且储存在悬浮液中或呈冻干粉末形式,持续延长的时间而无活性损失。

[0222] 可以通过各种途径给予本发明的这些组合物,这些途径包括但不限于皮下、鼻内、静脉内、腹膜内、肌肉内、透粘膜、透粘膜、舌下、直肠、眼睛、肺部、皮肤内、经皮肤、经皮或真皮内或这些途径的组合。给予途径还包括通过吸入或肺气溶胶来进行的给予。用于制备气溶胶递送系统的技术是本领域技术人员众所周知的(参见,例如夏拉(Sciarra)和库替(Cutie),“气溶胶(Aerosols),”雷明顿的药物科学(Remington's Pharmaceutical Sciences),第18版,1990,第1694-1712页;该文献通过引用的方式结合在此)。

[0223] 本发明的作为基于细胞的治疗而提供的治疗性蛋白可以通过肠胃外、动脉内注射、鼻内或静脉内给予或通过注射至淋巴结或眼前房或通过局部给予至感兴趣的器官或组织而进行给予。可以通过皮下、鞘内、心室内、肌肉内、腹膜内、冠状动脉内、胰腺内、肝内或支气管注射来进行给予。

[0224] 本发明的这些组合物可以按有效的量给予,如在此其他地方描述的有效量。根据本发明,剂型的剂量含有不同量的多个群体的合成纳米载体和 / 或不同量的免疫抑制剂和 / 或抗原。本发明的剂型中存在的合成纳米载体和 / 或免疫抑制剂和 / 或抗原的量可以根据这些抗原和 / 或免疫抑制剂的性质、有待完成的治疗益处、以及其他此类参数而改变。在多个实施例中,可以进行剂量范围研究,以建立有待存在于该剂型中的合成纳米载体群体的最佳治疗量以及免疫抑制剂和 / 或抗原的量。在多个实施例中,这些合成纳米载体和 / 或这些免疫抑制剂和 / 或抗原是以一定的量存在于该剂型中,当向受试者给予时,该量是有效于产生针对这些抗原的致耐受性免疫应答。在受试者中使用常规剂量范围研究和技术,也许有可能确定对产生致耐受性免疫应答有效的免疫抑制剂和 / 或抗原的量。可以在多种频率下给予本发明的剂型。在一个优选的实施例中,至少一次给予该剂型足以产生药理学上相关的应答。在多个更优选的实施例中,利用至少两次给予、至少三次给予、或至少

四次给予该剂型来确保药理学上相关的应答。

[0225] 可以在疾病、紊乱或病症发作之前启动这些发明组合物的预防性给予,或可以在紊乱、紊乱或病症建立之后启动治疗性给予。

[0226] 在一些实施例中,例如在给予一种治疗性蛋白之前进行合成纳米载体的给予。在多个示例性的实施例中,在给予一种治疗性蛋白之前包括但不限于 30 天、25 天、20 天、15 天、14 天、13 天、12 天、11 天、10 天、9 天、8 天、7 天、6 天、5 天、4 天、3 天、2 天、1 天、或 0 天给予合成纳米载体一次或多次。另外或可替代地,可以在治疗性蛋白给予之后向受试者给予合成纳米载体。在多个示例性的实施例中,在给予一种治疗性蛋白之后包括但不限于 1 天、2 天、3 天、4 天、5 天、6 天、7 天、8 天、9 天、10 天、11 天、12 天、13 天、14 天、15 天、20 天、25 天、30 天等等而给予合成纳米载体一次或多次。

[0227] 在一些实施例中,在初始给予已经在受试者中产生一种致耐受性应答之后向该受试者给予维持剂量(例如,在此提供的合成纳米载体组合物的维持剂量),例如以便维持在初始剂量之后所达到的致耐受性作用、以便防止该受试者中的所不希望的免疫应答、或以便防止该受试者变为处于经历所不希望的免疫应答或所不希望的水平的免疫应答风险中的受试者。在一些实施例中,该维持剂量是与该受试者接受的初始剂量相同的剂量。在一些实施例中,该维持剂量是比初始剂量更低的剂量。例如,在一些实施例中,该维持剂量是约 3/4、约 2/3、约 1/2、约 1/3、约 1/4、约 1/8、约 1/10、约 1/20、约 1/25、约 1/50、约 1/100、约 1/1,000、约 1/10,000、约 1/100,000、或约 1/1,000,000(重量 / 重量)的初始剂量。

[0228] 出于免疫抑制的目的,在此描述的这些组合物和方法可以用来诱导或增强一种致耐受性免疫应答和 / 或抑制、调节、引导或重定向所不希望的免疫应答。在此描述的这些组合物和方法可以用来在已经被给予、正在被给予或将要被给予一种治疗性蛋白的受试者中产生一种致耐受性免疫应答。

[0229] 实例

[0230] 实例 1:具有或不具有卵白蛋白肽 (323-339) 的带有偶联的雷帕霉素的合成纳米载体的免疫应答

[0231] 材料

[0232] 从巴亨美洲公司 (Bachem Americas Inc., 柏市街 (Kashiwa Street) 3132 号, 托伦斯 (Torrance) 加利福尼亚州 (CA) 90505; 区号 #4065609) 购买卵白蛋白肽 323-339, 即一种已知为卵白蛋白的 T 和 B 细胞表位的 17 氨基酸肽。从 TSZ 化学品公司 (TSZ CHEM, 威尔逊街 (Wilson Street) 185 号, 弗雷明汉 (Framingham), 马萨诸塞州 (MA) 01702; 产品目录 #R1017) 购买雷帕霉素。从 SurModics 制药公司 (SurModics Pharmaceuticals, 汤姆马丁路 (Tom Martin Drive) 756 号, 伯明翰 (Birmingham), 亚拉巴马州 (AL) 35211; 产品代码 7525DLG7A) 购买丙交酯 : 乙交酯比为 3 : 1 并且特性粘度为 0.75dL/g 的 PLGA。从 EMD 化学品公司 (EMD Chemicals, 产品编号 1.41350.1001) 购买聚乙烯醇 (85% -89% 水解的)。

[0233] 溶液 1: 在稀释的盐酸水溶液中的 20mg/mL 的卵白蛋白肽 323-339@20mg/mL。通过在室温下将卵白蛋白肽溶解在 0.13M 盐酸溶液中而制备该溶液。

[0234] 溶液 2: 在二氯甲烷中的雷帕霉素 @50mg/mL。通过将雷帕霉素溶解在纯二氯甲烷中而制备该溶液。

[0235] 溶液 3: 在二氯甲烷中的 PLGA@100mg/mL。通过将 PLGA 溶解在纯二氯甲烷中而制

备该溶液。

[0236] 溶液 4 :在 100mM 的 pH8 的磷酸盐缓冲液中的聚乙烯醇 @50mg/mL。

[0237] 用于制备含有雷帕霉素和卵白蛋白 (323-339) 的合成纳米载体的方法

[0238] 首先制备第一油包水乳液。通过将溶液 1(0.2mL)、溶液 2(0.2mL)、以及溶液 3(1.0mL) 合并在一个小的压力管中并且使用布兰森数字超声波仪 (Branson Digital Sonifier) 250 在 50% 振幅下进行声处理 40 秒来制备 W1/01。然后通过将溶液 4(3.0mL) 与第一 W1/01 乳液合并、涡旋 10 秒、并且使用布兰森数字超声波仪 250 在 30% 振幅下进行声处理 60 秒来制备第二乳液 (W1/01/W2)。

[0239] 将该 W1/01/W2 乳液添加到含有 70mM 的 pH8 磷酸盐缓冲溶液 (30mL) 的烧杯中并且在室温下搅拌 2 小时以允许二氯甲烷蒸发并且允许合成纳米载体形成。通过以下方式来洗涤一部分合成纳米载体：将合成纳米载体悬浮液转移至一个离心管中，并且在 21,000×g 和 4°C 下离心一小时、去除上清液、并且将沉淀再悬浮于磷酸盐缓冲盐水中。重复该洗涤程序，并且将沉淀再悬浮于磷酸盐缓冲盐水中以用于约 10mg/mL 的最终的合成纳米载体分散液。

[0240] 通过 HPLC 分析来确定在合成纳米载体中的肽和雷帕霉素的量。通过重量法来确定每 mL 悬浮液的总的干燥合成纳米载体质量。

[0241] 用于含有雷帕霉素的合成纳米载体的方法

[0242] 首先制备第一油包水乳液。通过将 0.13M 盐酸溶液 (0.2mL)、溶液 2(0.2mL)、以及溶液 3(1.0mL) 合并在一个小的压力管中并且使用布兰森数字超声波仪 250 在 50% 振幅下进行声处理 40 秒来制备 W1/01。然后通过将溶液 4(3.0mL) 与第一 W1/01 乳液合并、涡旋 10 秒、并且使用布兰森数字超声波仪 250 在 30% 振幅下进行声处理 60 秒来制备第二乳液 (W1/01/W2)。

[0243] 将该 W1/01/W2 乳液添加到含有 70mM 的 pH8 磷酸盐缓冲溶液 (30mL) 的烧杯中并且在室温下搅拌 2 小时以允许二氯甲烷蒸发并且允许合成纳米载体形成。通过以下方式来洗涤一部分合成纳米载体：将合成纳米载体悬浮液转移至一个离心管中，并且在 21,000×g 和 4°C 下离心一小时、去除上清液、并且将沉淀再悬浮于磷酸盐缓冲盐水中。重复该洗涤程序，并且将沉淀再悬浮于磷酸盐缓冲盐水中以用于约 10mg/mL 的最终的合成纳米载体分散液。

[0244] 通过 HPLC 分析来确定在合成纳米载体中的雷帕霉素的量。通过重量法来确定每 mL 悬浮液的总的干燥合成纳米载体质量。

[0245] 用于测量雷帕霉素负载量的方法

[0246] 收集近似 3mg 的合成纳米载体，并且离心以使上清液与合成纳米载体沉淀分离。向该沉淀添加乙腈，并且对样品进行声处理并且离心以去除任何不溶的材料。将该上清液和沉淀注射在 RP-HPLC 上，并且在 278nm 处读取吸光度。该沉淀中发现的 μg 用来计算 % 包载 (负载)，在上清液和沉淀中的 μg 用来计算回收的总 μg 。

[0247] 用于测量卵白蛋白 (323-339) 负载量的方法

[0248] 收集近似 3mg 的合成纳米载体，并且离心以使上清液与合成纳米载体沉淀分离。向该沉淀添加三氟乙醇并且对样品进行声处理以溶解该聚合物，添加 0.2% 三氟乙酸并且对样品进行声处理并且然后离心以去除任何不溶的材料。将该上清液和沉淀注射在

RP-HPLC 上，并且在 215nm 处读取吸光度。该沉淀中发现的 μg 用来计算%包载（负载），在上清液和沉淀中的 μg 用来计算回收的总 μg 。

[0249] 在 Treg 细胞发育上的抗原特异性致耐受性树突状细胞 (Tdc) 活性

[0250] 该测定包括使用具有对免疫显性卵白蛋白 (323-339) 特异的转基因 T 细胞受体的 OTII 小鼠。为了产生抗原特异性 tDC，将 CD11c+ 脾脏细胞分离，并且在 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 或无抗原下在体外添加卵白蛋白 (323-339) 肽。然后将可溶的或纳米载体封装的雷帕霉素添加到 DC 中保持 2 小时，然后将这些 DC 充分洗涤以从培养物中去除游离雷帕霉素。将纯化的应答 CD4+CD25- 细胞从 OTH 小鼠分离并且以 10 : 1 的 T 与 DC 比添加到 tDC 中。然后将 tDC 与 OTII T- 细胞的混合物培养 4-5 天，并且通过如图 1 所示的流式细胞术来分析 Treg 细胞 (CD4+CD25highFoxP3+) 的频率。基于同种型对照选择区域。

[0251] 实例 2：具有偶联的布洛芬的介孔二氧化硅纳米颗粒（预示的）

[0252] 介孔 SiO₂ 纳米颗粒核心通过溶胶-凝胶法产生。将十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB) (0.5g) 溶解在去离子水 (500mL) 中，并且然后将 2M 的 NaOH 水溶液 (3.5mL) 添加到 CTAB 溶液中。将该溶液搅拌 30 分钟，并且然后向该溶液中添加四乙氧基硅烷 (TEOS) (2.5mL)。在 80°C 的温度下将生成的凝胶搅拌 3 小时。通过过滤捕获形成的白色沉淀，随后用去离子水洗涤并且在室温下干燥。然后通过悬浮于 HCl 的乙醇溶液中过夜而从颗粒中提取出残留的表面活性剂。将这些颗粒用乙醇洗涤、离心、并且在超声处理下再分散。这个洗涤程序另外再重复两次。

[0253] 然后使用 (3-氨基丙基)- 三乙氧基硅烷 (APTMS) 用氨基对 SiO₂ 纳米颗粒进行功能化。为此，将颗粒悬浮在乙醇 (30mL) 中，并且将 APTMS (50 μL) 添加到悬浮液中。允许该悬浮液在室温下静置 2 小时，并且然后煮沸 4 小时，通过周期性地添加乙醇使体积保持恒定。残留的反应物通过五个离心洗涤和再分散于纯乙醇中的循环来去除。

[0254] 在一个单独的反应中，产生 1-4nm 直径的金种子。在此反应中使用的所有的水首先被去离子并且然后从玻璃蒸馏。将水 (45.5mL) 添加到 100mL 圆底烧瓶中。在搅拌下，添加 0.2M 水性 NaOH (1.5mL)，随后添加氯化四 (羟甲基) 镍 (THPC) 的 1% 水溶液 (1.0mL)。在添加 THPC 溶液之后两分钟，添加已经老化至少 15 分钟的氯金酸的 10mg/mL 水溶液 (2mL)。通过用水透析来纯化这些金种子。

[0255] 为了形成核 - 壳纳米载体，将以上形成的氨基功能化的 SiO₂ 纳米颗粒首先在室温下与这些金种子混合 2 小时。将金修饰的 SiO₂ 颗粒通过离心来收集，并且与氯金酸和碳酸氢钾的水溶液混合来形成金外壳。然后将这些颗粒离心洗涤、并且再分散于水中。通过将这些颗粒悬浮于布洛芬钠的溶液 (1mg/L) 中 72 小时来负载布洛芬。然后将游离的布洛芬通过离心从颗粒中洗涤出并且再分散于水中。

[0256] 实例 3：含有环孢霉素 A 的脂质体（预示的）

[0257] 这些脂质体使用薄膜水合来形成。将 1,2- 二棕榈酰-sn- 甘油基 -3- 磷酸胆碱 (DPPC) (32 μmol)、胆固醇 (32 μmol)、以及环孢霉素 A (6.4 μmol) 溶解在纯氯仿 (3mL) 中。将此脂质溶液添加到 50mL 的圆底烧瓶中，并且在 60°C 的温度下在旋转蒸发器上蒸发溶剂。烧瓶然后用氮气冲洗以去除残留溶剂。将磷酸盐缓冲盐水 (2mL) 和五个玻璃珠添加到烧瓶中，并且通过在 60°C 下摇晃 1 小时来使脂质膜水合以形成悬浮液。将该悬浮液转移到一个小的压力管中并且在 60°C 下进行声处理，持续四个 30 秒脉冲循环，其中在每个脉冲之间有

30 秒的延迟。然后使悬浮液在室温下静置 2 小时,以允许完全水合。离心洗涤脂质体,随后再悬浮于新鲜磷酸盐缓冲盐水中。

[0258] 实例 4 :含有聚合物 - 雷帕霉素共轭物的聚合纳米载体 (预示的)

[0259] PLGA- 雷帕霉素共轭物的制备 :

[0260] 将具有酸端基的 PLGA 聚合物 (7525DLG1A, 酸值 0.46mmol/g, Lakeshore 生物材料公司 (Lakeshore Biomaterials) ;5g, 2.3mmol, 1.0 当量) 溶解在 30mL 的二氯甲烷 (DCM) 中。添加 N,N- 二环己基碳二亚胺 (1.2 当量, 2.8mmol, 0.57g), 随后添加雷帕霉素 (1.0 当量, 2.3mmol, 2.1g) 和 4- 二甲氨基吡啶 (DMAP) (2.0 当量, 4.6mmol, 0.56g)。将混合物在室温下搅拌 2 天。然后过滤混合物以去除不溶的二环己脲。将滤液浓缩至体积大约为 10mL 并且添加到 100mL 的异丙醇 (IPA) 中以沉淀出 PLGA- 雷帕霉素共轭物。将 IPA 层去除并且聚合物然后用 50mL 的 IPA 和 50mL 的甲基叔丁醚 (MTBE) 洗涤。然后将聚合物在 35℃下真空干燥 2 天,给出呈白色固体的 PLGA- 雷帕霉素 (大约 6.5g)。

[0261] 含有 PLGA- 雷帕霉素共轭物和卵白蛋白肽 (323-339) 的纳米载体的制备 :

[0262] 根据实例 1 中所述的程序如下制备含有 PLGA- 雷帕霉素的纳米载体 :

[0263] 如下制备用于纳米载体形成的溶液 :

[0264] 溶液 1 :在稀释的盐酸水溶液中的卵白蛋白肽 323-339@20mg/mL。通过在室温下将卵白蛋白肽溶解在 0.13M 盐酸溶液中而制备该溶液。溶液 2 :在二氯甲烷中的 PLGA- 雷帕霉素 @100mg/mL。通过将 PLGA- 雷帕霉素溶解在纯二氯甲烷中而制备该溶液。溶液 3 :在二氯甲烷中的 PLA-PEG@100mg/mL。通过将 PLA-PEG 溶解在纯二氯甲烷中而制备该溶液。溶液 4 :在 100mM 的 pH8 的磷酸盐缓冲液中的聚乙烯醇 @50mg/mL。

[0265] 首先制备第一油包水乳液。通过将溶液 1(0.2mL)、溶液 2(0.75mL)、以及溶液 3(0.25mL) 合并在一个小的压力管中并且使用布兰森数字超声波仪 250 在 50% 振幅下进行声处理 40 秒来制备 W1/01。然后通过将溶液 4(3.0mL) 与第一 W1/01 乳液合并、涡旋 10 秒、并且使用布兰森数字超声波仪 250 在 30% 振幅下进行声处理 60 秒来制备第二乳液 (W1/01/W2)。将该 W1/01/W2 乳液添加到含有 70mM 的 pH8 磷酸盐缓冲溶液 (30mL) 的烧杯中并且在室温下搅拌 2 小时以允许二氯甲烷蒸发并且允许纳米载体形成。通过以下方式来洗涤一部分纳米载体 :将纳米载体悬浮液转移至一个离心管中,并且在 75,600×g 和 4℃下离心 35 分钟、去除上清液、并且将沉淀再悬浮于磷酸盐缓冲盐水中。重复该洗涤程序,并且将沉淀再悬浮于磷酸盐缓冲盐水中以用于约 10mg/mL 的最终的纳米载体分散液。

[0266] 实例 5 :含有雷帕霉素的金纳米载体 (AuNCs) 的制备 (预示的)

[0267] HS-PEG- 雷帕霉素的制备 :

[0268] 将 PEG 酸二硫化物 (1.0 当量)、雷帕霉素 (2.0-2.5 当量)、DCC (2.5 当量) 以及 DMAP (3.0 当量) 在无水 DMF 中的溶液在室温下搅拌过夜。通过过滤去除不溶的二环己脲并且将滤液添加到异丙醇 (IPA) 中以沉淀出 PEG- 二硫化物 - 二 - 雷帕霉素酯并用 IPA 洗涤并干燥。聚合物然后用在 DMF 中的三 (2- 羧乙基) 脍盐酸盐处理,以便将 PEG 二硫化物还原成硫醇基 PEG 雷帕霉素酯 (HS-PEG- 雷帕霉素)。通过沉淀从 IPA 回收生成的聚合物并且如先前所述进行干燥并且通过 H NMR 和 GPC 来分析。

[0269] 金 NCs (AuNCs) 的形成 :

[0270] 在一个装备有冷凝器的 1L 圆底烧瓶中,在剧烈搅拌下加热回流 500mL 的 1mM

HAuCl₄ 的水溶液 10 分钟。然后向搅拌的溶液迅速添加 50mL 的 40mM 的柠檬酸三钠溶液。将生成的深酒红色溶液保持回流 25–30 分钟，然后停止加热，并且冷却该溶液至室温。然后通过一个 0.8 μm 薄膜过滤器过滤该溶液，以给出 AuNCs 溶液。使用可见光谱学和透射电子显微术表征 AuNCs。这些 AuNCs 直径大约 20nm，被柠檬酸盐封盖，并且吸收峰在 520nm 处。

[0271] 具有 HS-PEG- 雷帕霉素的 AuNCs 共轭物：

[0272] 将 150 μl 的 HS-PEG- 雷帕霉素的溶液（在 10mM pH 9.0 碳酸盐缓冲液中的 10 μM）添加到 1mL 的 20nm 直径的柠檬酸盐包裹的金纳米载体（1.16nM）中，以产生 2500 : 1 的硫醇基与金的摩尔比。在室温在氩下搅拌混合物 1 小时以允许金纳米载体上的硫醇与柠檬酸盐完全交换。然后通过在 12,000g 下离心 30 分钟将表面上的具有 PEG- 雷帕霉素的 AuNCs 纯化。将上清液倾析出来并且然后将含有 AuNC-S-PEG- 雷帕霉素的沉淀用 1x PBS 缓冲液沉淀洗涤。然后将纯化的金 -PEG- 雷帕霉素纳米载体再悬浮于合适的缓冲液中以便进行进一步分析和生物测定。

[0273] 实例 6：含有卵白蛋白的介孔二氧化硅 - 金核 - 壳纳米载体（预示的）

[0274] 介孔 SiO₂ 纳米颗粒核心通过溶胶 - 凝胶法来产生。将十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB) (0.5g) 溶解在去离子水 (500mL) 中，并且然后将 2M 的 NaOH 水溶液 (3.5mL) 添加到 CTAB 溶液中。将该溶液搅拌 30 分钟，并且然后向该溶液中添加四乙氧基硅烷 (TEOS) (2.5mL)。在 80°C 的温度下将生成的凝胶搅拌 3 小时。通过过滤捕获形成的白色沉淀，随后用去离子水洗涤并且在室温下干燥。然后通过悬浮于 HCl 的乙醇溶液中过夜而从颗粒中提取出残留的表面活性剂。将这些颗粒用乙醇洗涤、离心、并且在超声处理下再分散。这个洗涤程序另外再重复两次。

[0275] 然后使用 (3- 氨基丙基)- 三乙氧基硅烷 (APTMS) 用氨基对 SiO₂ 纳米颗粒进行功能化。为此，将颗粒悬浮在乙醇 (30mL) 中，并且将 APTMS (50 μL) 添加到悬浮液中。允许该悬浮液在室温下静置 2 小时，并且然后煮沸 4 小时，通过周期性地添加乙醇使体积保持恒定。残留的反应物通过五个离心洗涤和再分散于纯乙醇中的循环来去除。

[0276] 在一个单独的反应中，产生 1–4nm 直径的金种子。在此反应中使用的所有的水首先被去离子并且然后从玻璃蒸馏。将水 (45.5mL) 添加到 100mL 圆底烧瓶中。在搅拌下，添加 0.2M 水性 NaOH (1.5mL)，随后添加氯化四 (羟甲基) 镍 (THPC) 的 1% 水溶液 (1.0mL)。在添加 THPC 溶液之后两分钟，添加已经老化至少 15 分钟的氯金酸的 10mg/mL 水溶液 (2mL)。通过用水透析来纯化这些金种子。

[0277] 为了形成核 - 壳纳米载体，将以上形成的氨基功能化的 SiO₂ 纳米颗粒首先在室温下与这些金种子混合 2 小时。将金修饰的 SiO₂ 颗粒通过离心来收集，并且与氯金酸和碳酸氢钾的水溶液混合来形成金外壳。然后将这些颗粒离心洗涤、并且再分散于水中。通过将这些颗粒悬浮于硫醇化的卵白蛋白溶液 (1mg/L) 中 72 小时来负载硫醇化的卵白蛋白（通过用 2- 亚氨基硫烷盐酸盐处理卵白蛋白而制成）。颗粒然后用 1x PBS (pH 7.4) 沉淀洗涤以去除游离蛋白。然后将生成的含有卵白蛋白的二氧化硅 - 金核 - 壳纳米载体再悬浮于 1x PBS 中以便进行进一步分析和测定。

[0278] 实例 7：含有雷帕霉素和卵白蛋白的脂质体（预示的）

[0279] 这些脂质体通过薄膜水合来形成。将 1,2- 二棕榈酰-sn- 甘油基 -3- 磷酸胆碱 (DPPC) (32 μmol)、胆固醇 (32 μmol)、以及雷帕霉素 (6.4 μmol) 溶解在纯氯仿 (3mL) 中。

将此脂质溶液添加到 10mL 玻璃管中，并且在氮气流下去除溶剂并且真空干燥 6 小时。通过用 2.0ml 的 25mM MOPS 缓冲液 pH8.5 使该膜水合来获得多层囊泡，其含有过量的卵白蛋白。使管涡旋，直到脂质膜从管表面上剥落。为了将多层囊泡打破成单层的，应用十个冷冻（液氮）和融化（30°C 水浴）循环。然后将样品在 25mM MOPS 缓冲液 pH8.5 中稀释到 1ml。通过使样品 10 倍穿过 200nm 孔聚碳酸酯过滤器而挤出而将生成的脂质体的大小均匀化。然后使用生成的脂质体用于进一步分析和生物测定。

[0280] 实例 8：由具有表面共轭的卵白蛋白的修饰聚氨基酸组成的聚合纳米载体（预示的）

[0281] 步骤 1. 用 L- 苯丙氨酸乙酯 (L-PAE) 修饰的聚 (γ - 谷氨酸) (γ -PGA) 的制备：将 4.7 单位毫摩尔的 γ -PGA ($M_n = 300\text{kD}$) 溶解在 0.3N-NaHCO₃ 水溶液 (50mL) 中。将 L-PAE (4.7mmol) 和 EDC·HCl (4.7mmol) 添加到该溶液中并且在 4C 下搅拌 30 分钟。然后在搅拌下将该溶液保持在室温 24 小时。使用具有 MWCO50kD 的透析薄膜通过渗析去除低分子量化学物质。通过冻干获得生成的 γ -PGA- 接枝 -L-PAE。

[0282] 步骤 2. 由 γ -PGA- 接枝 -L-PAE 聚合物制备纳米颗粒：通过沉淀和透析方法来制备由 γ -PGA- 接枝 -L-PAE 组成的纳米颗粒。将 γ -PGA- 接枝 -L-PAE (20mg) 溶解在 2mL 的 DMSO 中，随后添加 2mL 的水以形成半透明溶液。然后在室温下用蒸馏水使用纤维素薄膜配管 (50,000MWCO) 透析该溶液 72 小时，以形成纳米颗粒并且去除有机溶剂。蒸馏水以 12 小时的间隔进行更换。然后使用生成的纳米颗粒溶液（在水中的 10mg/mL）以用于抗原共轭。

[0283] 步骤 3. 卵白蛋白与 γ -PGA 纳米颗粒的共轭： γ -PGA 纳米颗粒 (10mg/mL) 的表面羧酸基团首先在环境温度下通过 EDC 和 NHS（各自在磷酸盐缓冲液中的 10mg/mL, pH5.8）活化 2 小时。在沉淀洗涤以去除过量的 EDC/NHS 之后，将活化的纳米颗粒与 1mL 的卵白蛋白 (10mg/mL) 混合在磷酸盐缓冲盐水 (PBS, pH7.4) 中，并且将混合物在 4°C -8°C 下孵育 24 小时。将生成的卵白蛋白共轭的 γ -PGA 纳米颗粒用 PBS 洗涤两次并且以 5mg/mL 再悬浮于 PBS 中以便进行进一步分析和生物测定。

[0284] 实例 9：红细胞生成素 (EPO) 封装的 γ -PGA 纳米颗粒（预示的）

[0285] 为了制备 EPO 封装的 γ -PGA 纳米颗粒，将 0.25-4mg 的 EPO 溶解在 1mL 的 PBS (pH7.4) 中，并且将 1mL 的 γ -PGA- 接枝 -L-PAE (DMSO 中的 10mg/mL) 添加到 EPO 溶液中。将生成的溶液在 14,000x g 下离心 15 分钟并且用 PBS 重复清洗。然后将生成的 EPO 封装的 γ -PGA 纳米颗粒再悬浮于 PBS (5mg/mL) 中以便进行进一步分析和生物测定。

[0286] 实例 10：含有卵白蛋白的金纳米载体 (AuNCs) 的制备（预示的）

[0287] 步骤 1. 金 NCs (AuNCs) 的形成：在一个装备有冷凝器的 1L 圆底烧瓶中，在剧烈搅拌下加热回流 500mL 的 1mM HAuCl₄ 的水溶液 10 分钟。然后向搅拌的溶液迅速添加 50mL 的 40mM 的柠檬酸三钠溶液。将生成的深酒红色溶液保持回流 25-30 分钟，然后停止加热，并且冷却该溶液至室温。然后通过一个 0.8 μm 薄膜过滤器过滤该溶液，以给出 AuNCs 溶液。使用可见光谱学和透射电子显微术表征 AuNCs。这些 AuNCs 直径大约 20nm，被柠檬酸盐包裹，并且吸收峰在 520nm 处。

[0288] 步骤 2. 卵白蛋白与 AuNCs 的共轭：将 150 μl 的硫醇化的卵白蛋白溶液（在 10mM pH9.0 碳酸盐缓冲液中的 10 μM ）添加到 1mL 的 20nm 直径的柠檬酸盐封盖的金纳米载体 (1.16nM) 中，以产生 2500 : 1 的硫醇基与金的摩尔比。在室温在氩下搅拌混合物 1 小时以

允许金纳米载体上的硫醇与柠檬酸盐完全交换。然后通过在 12,000g 下离心 30 分钟将表面上的具有卵白蛋白的 AuNCs 纯化。将上清液倾析出来并且然后将含有 AuNC- 卵白蛋白的沉淀用 1x PBS 缓冲液沉淀洗涤。然后将纯化的金 - 卵白蛋白纳米载体再悬浮于合适的缓冲液中以便进行进一步分析和生物测定。

[0289] 实例 11 : 在体内评估对红细胞生成素 α 的致耐受性免疫应答 (预示的)

[0290] Balb/c 小鼠用不完全弗氏佐剂中的阿法依伯汀免疫以便诱导 CD4+T- 细胞增殖，评定增殖水平。随后，将本发明的包含阿法依伯汀的 MHC II 类限制性表位和免疫抑制剂的组合物以剂量依赖性方式进行皮下给予。然后将相同小鼠再次暴露于阿法依伯汀，并且再次评定 CD4+T 细胞增殖的水平。然后监测 CD4+T 细胞群的变化，其中在随后用阿法依伯汀激发时 CD4+T 细胞增殖降低，表明了致耐受性免疫应答。

[0291] 实例 12 : 在体内评估使用包含免疫抑制剂和 APC 可呈递抗原的合成纳米载体的致耐受性免疫应答

[0292] 合成纳米载体生产的材料和方法

[0293] 纳米载体 1

[0294] 从 TSZ 化学品公司 (威尔逊街 185 号, 弗雷明汉, 马萨诸塞州 01702 ; 产品目录 #R1017) 购买雷帕霉素。从 SurModics 制药公司 (汤姆马丁路 756 号, 伯明翰, 亚拉巴马州 35211 ; 产品代码 7525DLG7A) 购买丙交酯 : 乙交酯比为 3 :1 并且特性粘度为 0.75dL/g 的 PLGA 。合成了 PEG 嵌段大约为 5,000Da 并且 PLA 嵌段大约为 20,000Da 的 PLA-PEG 嵌段共聚物。从 EMD 化学品公司 (产品编号 1.41350.1001) 购买聚乙烯醇 (85% -89% 水解的) 。

[0295] 如下制备溶液 :

[0296] 溶液 1 : 在二氯甲烷中的雷帕霉素 @50mg/mL 。通过将雷帕霉素溶解在纯二氯甲烷中而制备该溶液。

[0297] 溶液 2 : 在二氯甲烷中的 PLGA@100mg/mL 。通过将 PLGA 溶解在纯二氯甲烷中而制备该溶液。

[0298] 溶液 3 : 在二氯甲烷中的 PLA-PEG@100mg/mL 。通过将 PLA-PEG 溶解在纯二氯甲烷中而制备该溶液。

[0299] 溶液 4 : 在 100mM 的 pH8 的磷酸盐缓冲液中的聚乙烯醇 @50mg/mL 。

[0300] 使用水包油乳液来制备纳米载体。通过将溶液 1(0.2mL) 、溶液 2(0.75mL) 、溶液 3(0.25mL) 、以及溶液 4(3mL) 合并到一个小的压力管中并且使用布兰森数字超声波仪 250 在 30% 振幅下进行声处理 60 秒来制备 O/W 乳液。将该 O/W 乳液添加到含有 70mM 的 pH8 磷酸盐缓冲溶液 (30mL) 的烧杯中并且在室温下搅拌 2 小时以允许二氯甲烷蒸发并且允许纳米载体形成。通过以下方式来洗涤一部分纳米载体 : 将纳米载体悬浮液转移至一个离心管中，并且在 21,000×g 和 4°C 下离心 45 分钟、去除上清液、并且将沉淀再悬浮于磷酸盐缓冲盐水中。重复该洗涤程序，并且将沉淀再悬浮于磷酸盐缓冲盐水中以用于约 10mg/mL 的最终的纳米载体分散液。

[0301] 通过动态光散射来确定纳米载体大小。通过 HPLC 分析来确定在纳米载体中的雷帕霉素的量。通过重量法来确定每 mL 悬浮液的总的干燥纳米载体质量。

[0302]	纳米载体 ID	有效直径 (nm)	雷帕霉素含量 (% w/w)
	纳米载体 1	215	9.5

[0303] 纳米载体 2

[0304] 从巴亨美洲公司 (柏市街 3132 号, 托伦斯, 加利福尼亚州 90505 ; 区号 #4065609) 购买卵白蛋白肽 323-339, 即一种已知为卵白蛋白的 T 和 B 细胞表位的 17 氨基酸肽。从 SurModics 制药公司 (汤姆马丁路 756 号, 伯明翰, 亚拉巴马州 35211 ; 产品代码 7525DLG7A) 购买丙交酯 : 乙交酯比为 3 : 1 并且特性粘度为 0.75dL/g 的 PLGA。合成了 PEG 嵌段大约为 5,000Da 并且 PLA 嵌段大约为 20,000Da 的 PLA-PEG 嵌段共聚物。从 EMD 化学品公司 (产品编号 1.41350.1001) 购买聚乙烯醇 (85% -89% 水解的)。

[0305] 如下制备溶液 :

[0306] 溶液 1 : 在稀释的盐酸水溶液中的卵白蛋白肽 323-339@20mg/mL。通过在室温下将卵白蛋白肽溶解在 0.13M 盐酸溶液中而制备该溶液。

[0307] 溶液 2 : 在二氯甲烷中的 PLGA@100mg/mL。通过将 PLGA 溶解在纯二氯甲烷中而制备该溶液。

[0308] 溶液 3 : 在二氯甲烷中的 PLA-PEG@100mg/mL。通过将 PLA-PEG 溶解在纯二氯甲烷中而制备该溶液。

[0309] 溶液 4 : 在 100mM 的 pH8 的磷酸盐缓冲液中的聚乙烯醇 @50mg/mL。

[0310] 首先制备第一油包水乳液。通过将溶液 1(0.2mL)、溶液 2(0.75mL)、以及溶液 3(0.25mL) 合并在一个小的压力管中并且使用布兰森数字超声波仪 250 在 50% 振幅下进行声处理 40 秒来制备 W1/01。然后通过将溶液 4(3.0mL) 与第一 W1/01 乳液合并、涡旋 10 秒、并且使用布兰森数字超声波仪 250 在 30% 振幅下进行声处理 60 秒来制备第二乳液 (W1/01/W2)。

[0311] 将该 W1/01/W2 乳液添加到含有 70mM 的 pH8 磷酸盐缓冲溶液 (30mL) 的烧杯中并且在室温下搅拌 2 小时以允许二氯甲烷蒸发并且允许纳米载体形成。通过以下方式来洗涤一部分纳米载体 : 将纳米载体悬浮液转移至一个离心管中, 并且在 75,600×g 和 4℃ 下离心 35 分钟、去除上清液、并且将沉淀再悬浮于磷酸盐缓冲盐水中。重复该洗涤程序, 并且将沉淀再悬浮于磷酸盐缓冲盐水中以用于约 10mg/mL 的最终的纳米载体分散液。

[0312] 通过动态光散射来确定纳米载体大小。通过 HPLC 分析来确定在纳米载体中的肽的量。通过重量法来确定每 mL 悬浮液的总的干燥纳米载体质量。

[0313]	纳米载体 ID	有效直径 (nm)	肽含量 (% w/w)
	纳米载体 2	234	2.1

[0314] 纳米载体 3

[0315] 从 LKT 实验设备公司 (LKT Laboratories, Inc., 大学路西 (University Avenue West) 2233 号, 圣保罗 (St. Paul), 明尼苏达州 (MN) 55114; 产品目录 #S3449) 购买辛伐他汀。从 SurModics 制药公司 (汤姆马丁路 756 号, 伯明翰, 亚拉巴马州 35211; 产品代码 7525DLG7A) 购买丙交酯 : 乙交酯比为 3 : 1 并且特性粘度为 0.75dL/g 的 PLGA。合成了 PEG 嵌段大约为 5,000Da 并且 PLA 嵌段大约为 20,000Da 的 PLA-PEG 嵌段共聚物。从 EMD 化学品公司 (产品编号 1.41350.1001) 购买聚乙烯醇 (85% - 89% 水解的)。

[0316] 如下制备溶液 :

[0317] 溶液 1 : 在二氯甲烷中的辛伐他汀 @50mg/mL。通过将辛伐他汀溶解在纯二氯甲烷中而制备该溶液。

[0318] 溶液 2 : 在二氯甲烷中的 PLGA@100mg/mL。通过将 PLGA 溶解在纯二氯甲烷中而制备该溶液。

[0319] 溶液 3 : 在二氯甲烷中的 PLA-PEG@100mg/mL。通过将 PLA-PEG 溶解在纯二氯甲烷中而制备该溶液。

[0320] 溶液 4 : 在 100mM 的 pH8 的磷酸盐缓冲液中的聚乙烯醇 @50mg/mL。

[0321] 使用水包油乳液来制备纳米载体。通过将溶液 1 (0.15mL)、溶液 2 (0.75mL)、溶液 3 (0.25mL)、以及溶液 4 (3mL) 合并在一个小的压力管中并且使用布兰森数字超声波仪 250 在 30% 振幅下进行声处理 60 秒来制备 O/W 乳液。将该 O/W 乳液添加到含有 70mM 的 pH8 磷酸盐缓冲溶液 (30mL) 的烧杯中并且在室温下搅拌 2 小时以允许二氯甲烷蒸发并且允许纳米载体形成。通过以下方式来洗涤一部分纳米载体 : 将纳米载体悬浮液转移至一个离心管中, 并且在 75,600 × g 和 4°C 下离心 35 分钟、去除上清液、并且将沉淀再悬浮于磷酸盐缓冲盐水中。重复该洗涤程序, 并且将沉淀再悬浮于磷酸盐缓冲盐水中以用于约 10mg/mL 的最终的纳米载体分散液。

[0322] 通过动态光散射来确定纳米载体大小。通过 HPLC 分析来确定在纳米载体中的辛伐他汀的量。通过重量法来确定每 mL 悬浮液的总的干燥纳米载体质量。

[0323]	纳米载体 ID	有效直径 (nm)	辛伐他汀含量 (% w/w)
	纳米载体 3	196	8.0

[0324] 纳米载体 4

[0325] 从巴亨美洲公司 (柏市街 3132 号, 托伦斯, 加利福尼亚州 90505; 区号 #4065609) 购买卵白蛋白肽 323-339, 即一种已知为卵白蛋白的 T 和 B 细胞表位的 17 氨基酸肽。从 TSZ 化学品公司 (威尔逊街 185 号, 弗雷明汉, 马萨诸塞州 01702; 产品目录 #R1017) 购买雷帕霉素。从 SurModics 制药公司 (汤姆马丁路 756 号, 伯明翰, 亚拉巴马州 35211; 产品代码 7525DLG7A) 购买丙交酯 : 乙交酯比为 3 : 1 并且特性粘度为 0.75dL/g 的 PLGA。合成了 PEG 嵌段大约为 5,000Da 并且 PLA 嵌段大约为 20,000Da 的 PLA-PEG 嵌段共聚物。从 EMD 化学品公司 (产品编号 1.41350.1001) 购买聚乙烯醇 (85% - 89% 水解的)。

[0326] 如下制备溶液 :

[0327] 溶液 1 : 在稀释的盐酸水溶液中的卵白蛋白肽 323-339@20mg/mL。通过在室温下将

卵白蛋白肽溶解在 0.13M 盐酸溶液中而制备该溶液。

[0328] 溶液 2 :在二氯甲烷中的雷帕霉素 @50mg/mL。通过将雷帕霉素溶解在纯二氯甲烷中而制备该溶液。

[0329] 溶液 3 :在二氯甲烷中的 PLGA@100mg/mL。通过将 PLGA 溶解在纯二氯甲烷中而制备该溶液。

[0330] 溶液 4 :在二氯甲烷中的 PLA-PEG@100mg/mL。通过将 PLA-PEG 溶解在纯二氯甲烷中而制备该溶液。

[0331] 溶液 5 :在 100mM 的 pH8 的磷酸盐缓冲液中的聚乙烯醇 @50mg/mL。

[0332] 首先制备第一油包水乳液。通过将溶液 1(0.2mL)、溶液 2(0.2mL)、溶液 3(0.75mL)、以及溶液 4(0.25mL) 合并在一个小的压力管中并且使用布兰森数字超声波仪 250 在 50% 振幅下进行声处理 40 秒来制备 W1/01。然后通过将溶液 5(3.0mL) 与第一 W1/01 乳液合并、涡旋 10 秒、并且使用布兰森数字超声波仪 250 在 30% 振幅下进行声处理 60 秒来制备第二乳液 (W1/01/W2)。

[0333] 将该 W1/01/W2 乳液添加到含有 70mM 的 pH8 磷酸盐缓冲溶液 (30mL) 的烧杯中并且在室温下搅拌 2 小时以允许二氯甲烷蒸发并且允许纳米载体形成。通过以下方式来洗涤一部分纳米载体 :将纳米载体悬浮液转移至一个离心管中, 并且在 21,000×g 和 4°C 下离心 45 分钟、去除上清液、并且将沉淀再悬浮于磷酸盐缓冲盐水中。重复该洗涤程序, 并且将沉淀再悬浮于磷酸盐缓冲盐水中以用于约 10mg/mL 的最终的纳米载体分散液。

[0334] 通过动态光散射来确定纳米载体大小。通过 HPLC 分析来确定在纳米载体中的肽和雷帕霉素的量。通过重量法来确定每 mL 悬浮液的总的干燥纳米载体质量。

[0335]

纳米载体 ID	有效直径 (nm)	雷帕霉素含量 (% w/w)	肽含量 (% w/w)
4	227	9.0	2.5

[0336] 纳米载体 5

[0337] 从巴亨美洲公司 (柏市街 3132 号, 托伦斯, 加利福尼亚州 90505 ;区号 #4065609) 购买卵白蛋白肽 323-339, 即一种已知为卵白蛋白的 T 和 B 细胞表位的 17 氨基酸肽。从 LKT 实验设备公司 (大学路西 2233 号, 圣保罗, 明尼苏达州 55114 ;产品目录 #S3449) 购买辛伐他汀。从 SurModics 制药公司 (汤姆马丁路 756 号, 伯明翰, 亚拉巴马州 35211 ;产品代码 7525DLG7A) 购买丙交酯 :乙交酯比为 3 :1 并且特性粘度为 0.75dL/g 的 PLGA。合成了 PEG 嵌段大约为 5,000Da 并且 PLA 嵌段大约为 20,000Da 的 PLA-PEG 嵌段共聚物。从 EMD 化学品公司 (产品编号 1.41350.1001) 购买聚乙烯醇 (85% -89% 水解的)。

[0338] 如下制备溶液 :

[0339] 溶液 1 :在稀释的盐酸水溶液中的卵白蛋白肽 323-339@20mg/mL。通过在室温下将卵白蛋白肽溶解在 0.13M 盐酸溶液中而制备该溶液。

[0340] 溶液 2 :在二氯甲烷中的辛伐他汀 @50mg/mL。通过将辛伐他汀溶解在纯二氯甲烷中而制备该溶液。

[0341] 溶液 3 :在二氯甲烷中的 PLGA@100mg/mL。通过将 PLGA 溶解在纯二氯甲烷中而制备该溶液。

[0342] 溶液 4 :在二氯甲烷中的 PLA-PEG@100mg/mL。通过将 PLA-PEG 溶解在纯二氯甲烷中而制备该溶液。

[0343] 溶液 5 :在 100mM 的 pH8 的磷酸盐缓冲液中的聚乙烯醇 @50mg/mL。

[0344] 首先制备第一油包水乳液。通过将溶液 1(0.2mL)、溶液 2(0.15mL)、溶液 3(0.75mL)、以及溶液 4(0.25mL) 合并在一个小的压力管中并且使用布兰森数字超声波仪 250 在 50%振幅下进行声处理 40 秒来制备 W1/01。然后通过将溶液 5(3.0mL) 与第一 W1/01 乳液合并、涡旋 10 秒、并且使用布兰森数字超声波仪 250 在 30%振幅下进行声处理 60 秒来制备第二乳液 (W1/01/W2)。

[0345] 将该 W1/01/W2 乳液添加到含有 70mM 的 pH8 磷酸盐缓冲溶液 (30mL) 的烧杯中并且在室温下搅拌 2 小时以允许二氯甲烷蒸发并且允许纳米载体形成。通过以下方式来洗涤一部分纳米载体 :将纳米载体悬浮液转移至一个离心管中, 并且在 75,600×g 和 4℃下离心 35 分钟、去除上清液、并且将沉淀再悬浮于磷酸盐缓冲盐水中。重复该洗涤程序, 并且将沉淀再悬浮于磷酸盐缓冲盐水中以用于约 10mg/mL 的最终的纳米载体分散液。

[0346] 通过动态光散射来确定纳米载体大小。通过 HPLC 分析来确定在纳米载体中的肽和辛伐他汀的量。通过重量法来确定每 mL 悬浮液的总的干燥纳米载体质量。

[0347]

纳米载体 ID	有效直径 (nm)	辛伐他汀含量 (% w/w)	肽含量 (% w/w)
纳米载体 5	226	2.7	1.9

[0348] 体内给予 1

[0349] 收获来自 B6.Cg-Tg(TcrαTcrβ)425Cbn/J(OTII) 和 C57BL/6(B6) 小鼠的脾脏、机械解离并且单独过滤通过 70 μ M 篮以产生单细胞悬浮液。然后以 2 步骤的方法提取纯化的 CD4⁺CD25⁻ 细胞。使用美天旎生物技术公司 (Miltenyi Biotec) 的 AutoMACS 磁性细胞分选仪将脾脏细胞首先用 CD4⁺T⁻ 细胞分离试剂盒 II 进行标记, 并且未标记的部分用 CD25 耗尽试剂盒耗尽 CD25⁺ 细胞。纯化的 B6 细胞在与纯化的 OTII 细胞以等浓度混合之前用细胞内染料羧基荧光素琥珀酰亚胺酯 (CFSE) 进行染色。然后将它们静脉 (i. v.) 注射到 B6.SJL-Ptprc^a/BoyAi (CD45.1) 受体小鼠中。

[0350] 第二天, 用靶向的致耐受性合成疫苗颗粒 (t^2 SVP) 处理受体 CD45.1 小鼠。它们负载有卵白蛋白肽 (323–339) (OVA^{323–339})、雷帕霉素 (Rapa) 和 / 或辛伐他汀 (Simva) 的组合并且皮下地 (s. c.) 给予。

[0351] 注射构成一个致耐受性处理, 并且随后进行另外 4 次注射, 每次注射之间间隔 2 周。在治疗计划完成之后, 将受体 CD45.1 动物杀死并且收获它们的脾脏和胭淋巴结、机械解离并且单独过滤通过 70 μ M 篮以产生单细胞悬浮液。通过用 RBC 裂解缓冲液孵育来使脾脏细胞耗尽红血细胞 (RBC) (干细胞技术 (Stem Cell Technologies)) 并且对脾脏和淋巴结二者都进行细胞计数。

[0352] 将脾脏或淋巴结细胞在增补有 10U/ml IL-2 的 CM (完全培养基) 中培养、在 96 孔圆底 (RB) 培养板中以 0.3×10^6 细胞 / 孔用 OPII 再刺激、并且在 37°C、5% CO₂ 下孵育。细胞在第 2 天分裂并且在第 5 天被收获。收集上清液并且冷冻，同时对细胞进行染色以便通过流式细胞术进行表型分析。将这些细胞在碧迪公司 (Becton Dickinson) 的 FacsCanto 流式细胞仪上进行分析。

[0353] 体内给予 2

[0354] 收获来自 B6.Cg-Tg(TcraTcrb)425Cbn/J(OTII) 和 C57BL/6(B6) 小鼠的脾脏、机械解离并且单独过滤通过 70 μM 筛以产生单细胞悬浮液。然后使用美天旎生物技术公司 AutoMACS 磁性细胞分选仪以 2 步骤的方法提取纯化的 CD4⁺CD25⁻ 细胞。脾脏细胞使用美天旎的 CD4⁺T⁻ 细胞分离试剂盒 II 来标记。未标记的 CD4⁺T⁻ 细胞部分然后用 CD25 耗尽试剂盒耗尽 CD25⁺ 细胞。然后，来自 B6 小鼠的纯化的 CD4 细胞在与纯化的 OTII 细胞以等浓度混合之前用细胞内染料羧基荧光素琥珀酰亚胺酯 (CFSE) 进行染色。然后将它们静脉 (i. v.) 注射到 B6.SJL-Ptprc^a/BoyAi (CD45.1) 受体小鼠中。

[0355] 第二天，用靶向的致耐受性合成疫苗颗粒处理受体 CD45.1 小鼠。它们包含卵白蛋白肽 (323–339) (OVA^{323–339})、雷帕霉素 (Rapa) 以及辛伐他汀 (Simva) 的组合并且皮下地 (s. c.) 或静脉内地 (i. v.) 给予。

[0356] 在治疗计划完成之后，将受体 CD45.1 动物杀死并且收获它们的脾脏和胭淋巴结、机械解离并且单独过滤通过 70 μM 筛以产生单细胞悬浮液。通过与 RBC 裂解缓冲液结合来使脾脏细胞耗尽红血细胞 (RBC) (干细胞技术) 并且对脾脏和淋巴结二者都进行细胞计数。

[0357] 将脾脏或淋巴结细胞在增补有 10U/ml IL-2 的 CM 中培养、在 96 孔圆底 (RB) 培养板中以 0.3×10^6 细胞 / 孔用 1 μM OPII 再刺激、并且在 37°C、5% CO₂ 下孵育。细胞在第 2 天分裂并且在第 5 天被收获。收集上清液并且冷冻，同时对细胞进行染色以便通过流式细胞术进行表型分析。这些细胞在碧迪公司的 FacsCanto 流式细胞仪上进行分析。

[0358] 结果

[0359] 结果显示在图 2 和图 3 (免疫调节剂 1 : 雷帕霉素；免疫调节剂 2 : 辛伐他汀) 中。这些图显示了体内效应并且证实，与单独使用抗原或包含抗原而有和没有免疫刺激分子的合成纳米载体相比，使用包含抗原和免疫抑制剂的合成纳米载体降低了效应免疫细胞的抗原特异性扩增。

[0360] 实例 13：使用合成纳米载体的致耐受性免疫应答

[0361] 材料和方法

[0362] 纳米载体 1

[0363] 从沃辛顿生物化学公司 (Worthington Biochemical Corporation, 瓦萨路 (Vassar Avenue) 730 号, 莱克伍德 (Lakewood), 新泽西州 (NJ) 08701; 产品代码 3048) 购买卵白蛋白。从 SurModics 制药公司 (汤姆马丁路 756 号, 伯明翰, 亚拉巴马州 35211; 产品代码 7525DLG7A) 购买丙交酯 : 乙交酯比为 3:1 并且特性粘度为 0.75dL/g 的 PLGA。从 EMD 化学品公司 (产品编号 1.41350.1001) 购买聚乙烯醇 (85% -89% 水解的)。合成了 PEG 嵌段大约为 5,000Da 并且 PLA 嵌段大约为 20,000Da 的 PLA-PEG 嵌段共聚物。从西格玛奥德里奇公司 (云杉街 (Spruce Street) 3050 号, 圣路易斯 (St. Louis), 密苏里州 (MO) 63103; 产品代码 C6445) 购买胆酸钠水合物。

[0364] 如下制备溶液：

[0365] 溶液 1 :在磷酸盐缓冲盐水溶液中的卵白蛋白 @50mg/mL。通过在室温下将卵白蛋白溶解在磷酸盐缓冲盐水溶液中而制备该溶液。溶液 2 :在二氯甲烷中的 PLGA@100mg/mL。通过将 PLGA 溶解在纯二氯甲烷中而制备该溶液。溶液 3 :在二氯甲烷中的 PLA-PEG@100mg/mL。通过将 PLA-PEG 溶解在纯二氯甲烷中而制备该溶液。溶液 4 :在 100mM 的 pH8 的磷酸盐缓冲液中的聚乙烯醇 @50mg/mL 和胆酸钠水合物 @10mg/mL。

[0366] 首先制备第一油包水乳液。通过将溶液 1(0.2mL)、溶液 2(0.75mL)、以及溶液 3(0.25mL) 合并在一个小的压力管中并且使用布兰森数字超声波仪 250 在 50% 振幅下进行声处理 40 秒来制备 W1/01。然后通过将溶液 4(3.0mL) 与第一 W1/01 乳液合并、涡旋 10 秒、并且使用布兰森数字超声波仪 250 在 30% 振幅下进行声处理 60 秒来制备第二乳液 (W1/01/W2)。将该 W1/01/W2 乳液添加到含有 70mM 的 pH8 磷酸盐缓冲溶液 (30mL) 的烧杯中并且在室温下搅拌 2 小时以允许二氯甲烷蒸发并且允许纳米载体形成。通过以下方式来洗涤一部分纳米载体：将纳米载体悬浮液转移至一个离心管中，并且在 75,600×g 和 4°C 下离心 35 分钟、去除上清液、并且将沉淀再悬浮于磷酸盐缓冲盐水中。重复该洗涤程序，并且将沉淀再悬浮于磷酸盐缓冲盐水中以用于约 10mg/mL 的最终的纳米载体分散液。

[0367] 通过动态光散射来确定纳米载体大小。通过邻苯二醛荧光测定来确定在纳米载体中的蛋白质的量。通过重量法来确定每 mL 悬浮液的总的干燥纳米载体质量。

[0368]	纳米载体 ID	有效直径 (nm)	蛋白质含量 (% w/w)
	1	191	10.1

[0369] 纳米载体 2

[0370] 从沃辛顿生物化学公司 (瓦萨路 730 号, 莱克伍德, 新泽西州 08701 ;产品代码 3048) 购买卵白蛋白。从 TSZ 化学品公司 (威尔逊街 185 号, 弗雷明汉, 马萨诸塞州 01702 ;产品目录 #R1017) 购买雷帕霉素。从 SurModics 制药公司 (汤姆马丁路 756 号, 伯明翰, 亚拉巴马州 35211 ;产品代码 7525DLG7A) 购买丙交酯 : 乙交酯比为 3 : 1 并且特性粘度为 0.75dL/g 的 PLGA。合成了 PEG 嵌段大约为 5,000Da 并且 PLA 嵌段大约为 20,000Da 的 PLA-PEG 嵌段共聚物。从 EMD 化学品公司 (产品编号 1.41350.1001) 购买聚乙烯醇 (85% -89% 水解的)。从西格玛奥德里奇公司 (云杉街 (Spruce Street) 3050 号, 圣路易斯 (St. Louis), 密苏里州 (MO) 63103 ;产品代码 C6445) 购买胆酸钠水合物。

[0371] 如下制备溶液：

[0372] 溶液 1 :在磷酸盐缓冲盐水溶液中的卵白蛋白 @50mg/mL。通过在室温下将卵白蛋白溶解在磷酸盐缓冲盐水溶液中而制备该溶液。溶液 2 :在二氯甲烷中的雷帕霉素 @50mg/mL。通过将雷帕霉素溶解在纯二氯甲烷中而制备该溶液。溶液 3 :在二氯甲烷中的 PLGA@100mg/mL。通过将 PLGA 溶解在纯二氯甲烷中而制备该溶液。溶液 4 :在二氯甲烷中的 PLA-PEG@100mg/mL。通过将 PLA-PEG 溶解在纯二氯甲烷中而制备该溶液。溶液 5 :在 100mM 的 pH8 的磷酸盐缓冲液中的聚乙烯醇 @50mg/mL 和胆酸钠水合物 @10mg/mL。

[0373] 首先制备第一油包水乳液。通过将溶液 1(0.2mL)、溶液 2(0.2mL)、溶液

3(0.75mL)、以及溶液4(0.25mL) 合并在一个小的压力管中并且使用布兰森数字超声波仪250在50%振幅下进行声处理40秒来制备W1/01。然后通过将溶液5(3.0mL)与第一W1/01乳液合并、涡旋10秒、并且使用布兰森数字超声波仪250在30%振幅下进行声处理60秒来制备第二乳液(W1/01/W2)。将该W1/01/W2乳液添加到含有70mM的pH8磷酸盐缓冲溶液(30mL)的烧杯中并且在室温下搅拌2小时以允许二氯甲烷蒸发并且允许纳米载体形成。通过以下方式来洗涤一部分纳米载体：将纳米载体悬浮液转移至一个离心管中，并且在75,600×g和4℃下离心35分钟、去除上清液、并且将沉淀再悬浮于磷酸盐缓冲盐水中。重复该洗涤程序，并且将沉淀再悬浮于磷酸盐缓冲盐水中以用于约10mg/mL的最终的纳米载体分散液。

[0374] 通过动态光散射来确定纳米载体大小。通过HPLC分析来确定在纳米载体中的雷帕霉素的量。通过邻苯二醛荧光测定来确定在纳米载体中的蛋白质的量。通过重量法来确定每mL悬浮液的总的干燥纳米载体质量。

[0375]

纳米载体 ID	有效直径 (nm)	雷帕霉素含量 (% w/w)	蛋白质含量 (% w/w)
2	172	7.4	7.6

[0376] 免疫

[0377] 这个实验的目的是通过测量抗原特异性免疫球蛋白来评定封装的(t^2 SVP)免疫抑制剂对进行中的抗体应答的作用。一组动物保持未免疫以作为对照。两组动物使用卵白蛋白的“被动给予”或用3次注射(第0天、第14天以及第28天)OVA和CpG的主动免疫进行免疫，随后进行抗体滴度评定并且休息一周或两周。另两组接受相同的免疫，但是在接受该处理的同时每2周接受加强剂量(boost)。将这些组各自分成三个亚组以测试不同处理改变所诱导的Ig滴度的能力。一个对照亚组不接受致耐受性处理。向其他亚组施用另两个处理，包括只携带OVA蛋白或与免疫抑制剂组合的NP。

[0378] 对于免疫，动物接受20 μ l/肢的OVA+CpG(12.5 μ g OVA+10 μ g CpG)，两个后肢皮下给予，或在100 μ l中25 μ g的OVA静脉内给予。致耐受性处理包括使用10 μ g的OVA静脉内给予200 μ l的 t^2 SVP。纳米颗粒以500 μ g/ml的OVA含量提供。以在所有组中注射相同量的OVA的这种方式将 t^2 SVP稀释。

[0379] IgG的测量

[0380] 测量IgG抗体的水平。使用在PBS中的封闭剂酪蛋白(赛默飞世尔科技公司(Thermo Fisher)，目录#37528)作为稀释剂。使用含0.05%Tween-20的PBS作为洗涤缓冲液，该洗涤缓冲液是通过将10ml的Tween-20(西格玛公司(Sigma)，目录#P9416-100mL)添加至2升10x PBS储备液(PBS：**OmniPur®** 10X PBS液体浓缩物，4L，EMD化学品公司，目录#6505)和18升去离子水中而制备的。

[0381] 使用处于5mg/ml储备液浓度的OVA蛋白作为包被材料。使用1:1000稀释度达到5 μ g/ml作为工作浓度。以每孔100 μ l稀释的OVA来包被测定板的每个孔，并且将板用密封薄膜(VWR目录#60941-120)密封，并在4℃孵育过夜。使用Costar901796孔平底板作为

测定板 Costar9017。

[0382] 使用低结合的聚丙烯 96 孔板或管作为准备板 (set-up plate), 样品在转移至测定板中之前在这些准备板中进行制备。这些准备板不含有任何抗原并且因此, 在样品的准备过程中血清抗体不会结合至板上。准备板是用于样品制备以便在使用抗原包被板来制备样品的情况下, 使样品制备或吸移过程中可能发生的结合降至最低。在准备板中制备样品之前, 将孔用稀释剂覆盖以阻断任何非特异性结合, 并且将板密封并在 4°C 孵育过夜。

[0383] 测定板用洗涤缓冲液洗涤三次, 并且在最后一次洗涤之后将洗涤缓冲液从各孔中完全吸出。洗涤之后, 将 300 μ l 稀释剂添加至一个或多个测定板的各孔中以阻断非特异性结合, 并且将板在室温孵育至少 2 小时。在准备板中将血清样品制备成适当的起始稀释液。有时也在 1.5ml 管中使用稀释剂制备起始稀释液。基于先前数据 (当可利用时) 确定适当的起始稀释度。在没有先前数据可利用时, 最低起始稀释度是 1:40。一旦被稀释, 就将 200 μ l 起始稀释度的血清样品转移到准备板的适当孔中。

[0384] 一个示例性准备板布置描述如下: 2 列和 11 列含有被稀释到 1 μ g/mL (1:4000 稀释度) 的抗卵白蛋白单克隆 IgG2b 同种型 (艾碧康公司 (AbCam), ab17291) 标准品。3 列 -10 列含有血清样品 (处于适当稀释度)。1 列和 12 列未用于样品或标准品以便避免由边缘效应引起的任何测量偏差。而是, 1 列和 12 列含有 200 μ l 稀释剂。使用 1:40 稀释的正常小鼠血清作为阴性对照。使用从 0.5mg/mL 储备液 (BD 生物科学公司 (BD Bioscience)) 进行 1:500 稀释的抗小鼠 IgG2a 作为同种型对照。

[0385] 一旦在准备板中制备了所有样品, 就将该板密封并在 4°C 储存, 直到测定板的阻断是完全的为止。测定板用洗涤缓冲液洗涤三次, 并且在最后一次洗涤之后将洗涤缓冲液完全吸出。洗涤之后, 将 100 μ L 稀释剂添加至测定板的 B-H 行的所有孔中。使用 12 通道的移液管将样品从准备板转移到测定板中。转移之前通过来回 3 次吸移 150 μ l 稀释的血清将样品混合。混合之后, 将 150 μ l 每种样品从准备板转移并添加至对应测定板的 A 行中。

[0386] 一旦每种样品的起始稀释液被从准备板转移至测定板的 A 行, 就如下述将连续稀释液在测定板上吸移: 使用 12 通道的移液管从 A 行移除 50 μ l 的每种血清样品并且与先前添加至 B 行的各孔中的 100 μ l 稀释剂混合。此步骤沿着整个板重复。在吸移了最后一行的稀释液之后, 从最后一行的孔中移除 50 μ l 流体并丢弃, 从而在测定板的每孔中产生 100 μ l 的最终体积。一旦在这些测定板中制备了样品稀释液, 就将这些板在室温孵育至少 2 小时。

[0387] 孵育之后, 用洗涤缓冲液将板洗涤三次。将检测抗体 (HRP 共轭的山羊抗小鼠抗 IgG, 艾碧康公司, ab98717) 在稀释剂中进行 1:1500 稀释 (0.33 μ g/mL), 并且向各孔中添加 100 μ l 的稀释抗体。将板在室温孵育 1 小时并且然后用洗涤缓冲液洗涤三次, 其中每个洗涤步骤包括至少 30 秒的浸泡时间。

[0388] 洗涤之后, 向各孔中添加检测底物。在即将要添加至测定板中之前将等份的底物 A 和底物 B (BD 生物科学公司, TMB 底物试剂组, 目录 #555214) 组合, 并向各孔中添加 100 μ l 的混合底物溶液并在黑暗中孵育 10 分钟。在 10 分钟时间后通过向各孔中添加 50 μ l 终止溶液 (2N H₂SO₄) 来终止反应。添加了该终止溶液之后立即在板阅读器上评定各孔的光密度 (OD) :450nm 减去 570nm 处的读数。使用分子装置公司 (Molecular Device) 的软件 SoftMax Pro v5.4 进行数据分析。在一些情况下, 用 x 轴上的稀释度 (对数标度) 和 y 轴上的 OD 值

(线性标度) 制备一个四参数对数拟合曲线, 并且确定每种样品的半数最大值 (EC50)。将该布置的顶部处的板模板调节成反映每种样品 (每列 1 种) 的稀释度。

[0389] 结果

[0390] 图 4 显示了与单独包含肽的纳米载体相比, 使用包含肽抗原和免疫抑制剂的纳米载体使抗原特异性抗体的产生减少。右图 3 显示了强免疫刺激剂 CpG 的使用抵消了一些情况下包含雷帕霉素的合成纳米载体的致耐受性作用。

[0391] 实例 14 : 使用合成纳米载体的致耐受性免疫应答

[0392] 材料和方法

[0393] 如以上实例 (实例 13) 中所述制备纳米载体。

[0394] 免疫

[0395] 这个实验的目的在于通过测量同时接受免疫原和 NP- 处理的动物中的抗原特异性免疫球蛋白来评定封装的 (t^2SvP) 免疫抑制剂对出现的抗体应答的作用。一组动物保持未免疫以作为对照 (但是接受该处理)。第二组动物使用卵白蛋白的“被动给予”进行免疫, 并且第三组在肩胛下区域中使用 OVA 和 CpG 进行免疫。这些组各自两周一次注射给予纳米颗粒 (NP) 并且在加强剂量前一天监测抗 OVA Ig 水平。对于免疫, 动物接受皮下注射 (肩胛下) 的 $100 \mu l$ 的 OVA+CpG 或在 $100 \mu l$ 中静脉内注射的 $25 \mu g$ 的 OVA。致耐受性处理包括静脉内给予 $100 \mu l$ 的 t^2SVP 。纳米载体以 $5mg/ml$ 提供。 t^2SVP 是以在所有组中注射相同量的 OVA 的这种方式进行稀释。在第 0 天、第 14 天、第 28 天、第 42 天、第 56 天进行注射。

[0396] IgG 的测量

[0397] 测量 IgG 抗体的水平。使用含封闭剂酪蛋白的 PBS (赛默飞世尔科技公司, 目录 #37528) 作为稀释剂。使用含 0.05% Tween-20 的 PBS 作为洗涤缓冲液, 该洗涤缓冲液是通过将 $10ml$ 的 Tween-20 (西格玛公司, 目录 #P9416-100mL) 添加至 2 升 $10x$ PBS 储备液 (PBS : **OmniPur®** 10X PBS 液体浓缩物, 4L, EMD 化学品公司, 目录 #6505) 和 18 升去离子水中而制备的。

[0398] 使用处于 $5mg/ml$ 储备液浓度的 OVA 蛋白作为包被材料。使用 $1:1000$ 稀释度达到 $5 \mu g/ml$ 作为工作浓度。以每孔 $100 \mu l$ 稀释的 OVA 来包被测定板的每个孔, 并且将板用密封薄膜 (VWR 目录 #60941-120) 密封, 并在 $4^\circ C$ 孵育过夜。使用 Costar901796 孔平底板作为测定板 Costar9017。

[0399] 使用低结合的聚丙烯 96 孔板或管作为准备板, 样品在转移至测定板中之前在这些准备板中进行制备。这些准备板不含有任何抗原并且因此, 在样品的准备过程中血清抗体不会结合至板上。准备板是用于样品制备以便在使用抗原包被板来制备样品的情况下, 使样品制备或吸移过程中可能发生的结合降至最低。在准备板中制备样品之前, 将孔用稀释剂覆盖以阻断任何非特异性结合, 并且将板密封并在 $4^\circ C$ 孵育过夜。

[0400] 测定板用洗涤缓冲液洗涤三次, 并且在最后一次洗涤之后将洗涤缓冲液从各孔中完全吸出。洗涤之后, 将 $300 \mu l$ 稀释剂添加至一个或多个测定板的各孔中以阻断非特异性结合, 并且将板在室温孵育至少 2 小时。在准备板中将血清样品制备成适当的起始稀释液。有时也在 $1.5ml$ 管中使用稀释剂制备起始稀释液。基于先前数据 (当可获得时) 确定适当的起始稀释度。在没有先前数据可利用时, 最低起始稀释度是 $1:40$ 。一旦被稀释, 就将

200 μ l 起始稀释度的血清样品转移到准备板的适当孔中。

[0401] 一个示例性准备板布局描述如下：2列和11列含有被稀释到 1 μ g/mL (1:4000 稀释度) 的抗卵白蛋白单克隆 IgG2b 同种型（艾碧康公司，ab17291）标准品。3列-10列含有血清样品（处于适当稀释度）。1列和12列未用于样品或标准品以便避免由边缘效应引起的任何测量偏差。而是，1列和12列含有 200 μ l 稀释剂。使用 1:40 稀释的正常小鼠血清作为阴性对照。使用从 0.5 mg/mL 储备液 (BD 生物科学公司) 进行 1:500 稀释的抗小鼠 IgG2a 作为同种型对照。

[0402] 一旦在准备板中制备了所有样品，就将该板密封并在 4°C 储存，直到测定板的阻断是完全的为止。测定板用洗涤缓冲液洗涤三次，并且在最后一次洗涤之后将洗涤缓冲液完全吸出。洗涤之后，将 100 μ L 稀释剂添加至测定板的 B-H 行的所有孔中。使用 12 通道的移液管将样品从准备板转移到测定板中。转移之前通过来回 3 次吸移 150 μ l 稀释的血清将样品混合。混合之后，将 150 μ l 每种样品从准备板转移并添加至对应测定板的 A 行中。

[0403] 一旦每种样品的起始稀释液被从准备板转移至测定板的 A 行，就如下述将连续稀释液在测定板上吸移：使用 12 通道的移液管从 A 行移除 50 μ l 的每种血清样品并且与先前添加至 B 行的各孔中的 100 μ l 稀释剂混合。此步骤沿着整个板重复。在吸移了最后一行的稀释液之后，从最后一行的孔中移除 50 μ l 流体并丢弃，从而在测定板的每孔中产生 100 μ l 的最终体积。一旦在这些测定板中制备了样品稀释液，就将这些板在室温孵育至少 2 小时。

[0404] 孵育之后，用洗涤缓冲液将板洗涤三次。将检测抗体 (HRP 共轭的山羊抗小鼠抗 IgG，艾碧康公司，ab98717) 在稀释剂中进行 1:1500 稀释 (0.33 μ g/mL)，并且向各孔中添加 100 μ l 的稀释抗体。将板在室温孵育 1 小时并且然后用洗涤缓冲液洗涤三次，其中每个洗涤步骤包括至少 30 秒的浸泡时间。

[0405] 洗涤之后，向各孔中添加检测底物。在即将要添加至测定板中之前将等份的底物 A 和底物 B (BD 生物科学公司，TMB 底物试剂组，目录 #555214) 组合，并向各孔中添加 100 μ l 的混合底物溶液并在黑暗中孵育 10 分钟。在 10 分钟时间后通过向各孔中添加 50 μ l 终止溶液 (2N H₂S₀4) 来终止反应。添加了该终止溶液之后立即在板阅读器上评定各孔的光密度 (OD)：450nm 减去 570nm 处的读数。使用分子装置公司 (Molecular Device) 的软件 SoftMax Pro v5.4 进行数据分析。在一些情况下，用 x 轴上的稀释度 (对数标度) 和 y 轴上的 OD 值 (线性标度) 制备一个四参数对数拟合曲线，并且确定每个样品的半数最大值 (EC50)。将该布置的顶部处的板模板调节成反映每种样品 (每列 1 种) 的稀释度。

[0406] 结果

[0407] 图 5 显示了与单独包含抗原的纳米载体相比，使用包含抗原和免疫抑制剂的纳米载体使抗原特异性抗体的产生减少。再次，数据还显示强免疫刺激剂 CpG 的使用抵消了一些情况下包含雷帕霉素的合成纳米载体的致耐受性作用。

[0408] 实例 15：评定具有抗原和免疫抑制剂的纳米载体对免疫应答的作用

[0409] 材料和方法

[0410] 纳米载体 1

[0411] 从巴亨美洲公司 (柏市街 3132 号，托伦斯，加利福尼亚州 90505，区号 #4065609) 购买卵白蛋白肽 323-339，即一种已知为卵白蛋白的 T 和 B 细胞表位的 17 氨基酸肽。从

SurModics 制药公司 (汤姆马丁路 756 号, 伯明翰, 亚拉巴马州 35211; 产品代码 7525DLG7A) 购买丙交酯 : 乙交酯比为 3 : 1 并且特性粘度为 0.75dL/g 的 PLGA。合成了 PEG 嵌段大约为 5,000Da 并且 PLA 嵌段大约为 20,000Da 的 PLA-PEG 嵌段共聚物。从 EMD 化学品公司 (产品编号 1.41350.1001) 购买聚乙烯醇 (85% - 89% 水解的)。

[0412] 如下制备溶液 :

[0413] 溶液 1 : 在稀释的盐酸水溶液中的卵白蛋白肽 323-339@20mg/mL。通过在室温下将卵白蛋白肽溶解在 0.13M 盐酸溶液中而制备该溶液。溶液 2 : 在二氯甲烷中的 PLGA@100mg/mL。通过将 PLGA 溶解在纯二氯甲烷中而制备该溶液。溶液 3 : 在二氯甲烷中的 PLA-PEG@100mg/mL。通过将 PLA-PEG 溶解在纯二氯甲烷中而制备该溶液。溶液 4 : 在 100mM 的 pH8 的磷酸盐缓冲液中的聚乙烯醇 @50mg/mL。

[0414] 首先制备第一油包水乳液。通过将溶液 1(0.2mL)、溶液 2(0.75mL)、以及溶液 3(0.25mL) 合并到一个小的压力管中并且使用布兰森数字超声波仪 250 在 50% 振幅下进行声处理 40 秒来制备 W1/01。然后通过将溶液 4(3.0mL) 与第一 W1/01 乳液合并、涡旋 10 秒、并且使用布兰森数字超声波仪 250 在 30% 振幅下进行声处理 60 秒来制备第二乳液 (W1/01/W2)。将该 W1/01/W2 乳液添加到含有 70mM 的 pH8 磷酸盐缓冲溶液 (30mL) 的烧杯中并且在室温下搅拌 2 小时以允许二氯甲烷蒸发并且允许纳米载体形成。通过以下方式来洗涤一部分纳米载体 : 将纳米载体悬浮液转移至一个离心管中, 并且以 75,600 × g 和 4°C 离心 45 分钟、去除上清液、并且将沉淀再悬浮于磷酸盐缓冲盐水中。重复该洗涤程序, 并且将沉淀再悬浮于磷酸盐缓冲盐水中以用于约 10mg/mL 的最终的纳米载体分散液。

[0415] 通过动态光散射来确定纳米载体大小。通过 HPLC 分析来确定在纳米载体中的肽的量。通过重量法来确定每 mL 悬浮液的总的干燥纳米载体质量。

[0416]	纳米载体 ID	有效直径 (nm)	肽含量 (% w/w)
	1	234	2.1

[0417] 纳米载体 2

[0418] 从巴亨美洲公司 (柏市街 3132 号, 托伦斯, 加利福尼亚州 90505, 区号 #4065609) 购买卵白蛋白肽 323-339, 即一种已知为卵白蛋白的 T 和 B 细胞表位的 17 氨基酸肽。从 TSZ 化学品公司 (威尔逊街 185 号, 弗雷明汉, 马萨诸塞州 01702; 产品目录 #R1017) 购买雷帕霉素。从 SurModics 制药公司 (汤姆马丁路 756 号, 伯明翰, 亚拉巴马州 35211; 产品代码 7525DLG7A) 购买丙交酯 : 乙交酯比为 3 : 1 并且特性粘度为 0.75dL/g 的 PLGA。合成了 PEG 嵌段大约为 5,000Da 并且 PLA 嵌段大约为 20,000Da 的 PLA-PEG 嵌段共聚物。从 EMD 化学品公司 (产品编号 1.41350.1001) 购买聚乙烯醇 (85% - 89% 水解的)。

[0419] 如下制备溶液 :

[0420] 溶液 1 : 在稀释的盐酸水溶液中的卵白蛋白肽 323-339@20mg/mL。通过在室温下将卵白蛋白肽溶解在 0.13M 盐酸溶液中而制备该溶液。溶液 2 : 在二氯甲烷中的雷帕霉素 @50mg/mL。通过将雷帕霉素溶解在纯二氯甲烷中而制备该溶液。溶液 3 : 在二氯甲烷中的 PLGA@100mg/mL。通过将 PLGA 溶解在纯二氯甲烷中而制备该溶液。溶液 4 : 在二氯甲烷中的

PLA-PEG@100mg/mL 通过将 PLA-PEG 溶解在纯二氯甲烷中而制备该溶液。溶液 5 : 在 100mM 的 pH8 的磷酸盐缓冲液中的聚乙烯醇 @50mg/mL。

[0421] 首先制备第一油包水乳液。通过将溶液 1(0.2mL)、溶液 2(0.2mL)、溶液 3(0.75mL)、以及溶液 4(0.25mL) 合并在一个小的压力管中并且使用布兰森数字超声波仪 250 在 50% 振幅下进行声处理 40 秒来制备 W1/01。然后通过将溶液 5(3.0mL) 与第一 W1/01 乳液合并、涡旋 10 秒、并且使用布兰森数字超声波仪 250 在 30% 振幅下进行声处理 60 秒来制备第二乳液 (W1/01/W2)。将该 W1/01/W2 乳液添加到含有 70mM 的 pH8 磷酸盐缓冲溶液 (30mL) 的烧杯中并且在室温下搅拌 2 小时以允许二氯甲烷蒸发并且允许纳米载体形成。通过以下方式来洗涤一部分纳米载体 : 将纳米载体悬浮液转移至一个离心管中, 并且以 21,000×g 和 4°C 离心 45 分钟、去除上清液、并且将沉淀再悬浮于磷酸盐缓冲盐水中。重复该洗涤程序, 并且将沉淀再悬浮于磷酸盐缓冲盐水中以用于约 10mg/mL 的最终的纳米载体分散液。

[0422] 通过动态光散射来确定纳米载体大小。通过 HPLC 分析来确定在纳米载体中的肽和雷帕霉素的量。通过重量法来确定每 mL 悬浮液的总的干燥纳米载体质量。

[0423]

纳米载体 ID	有效直径 (nm)	雷帕霉素含量 (% w/w)	肽含量 (% w/w)
2	227	9.0	2.5

[0424] 免疫

[0425] 动物每 2 周在它们接受处理的同时接受免疫。将这些组各自分成三个亚组以测试不同处理改变所诱导的 Ig 滴度的能力。一个对照亚组不接受致耐受性处理。两个亚组接受仅带有 OVA₃₂₃₋₃₃₉ 肽或与雷帕霉素组合的纳米载体。

[0426] 经由以下途径给予免疫 (每个动物的值) : 20 μl / 肢的 OVA+CpG(12.5 μg OVA+10 μg CpG), 两个后肢都是皮下注射。经由以下途径给予致耐受性处理 (每个动物的值) : 以 100 μg/ml 的 OVA₃₂₃₋₃₃₉ 含量提供 200 μl 纳米载体。

[0427] IgG 的测量

[0428] 测量 IgG 抗体的水平。使用含封闭剂酪蛋白的 PBS (赛默飞世尔科技公司, 目录 #37528) 作为稀释剂。使用含 0.05% Tween-20 的 PBS 作为洗涤缓冲液, 该洗涤缓冲液是通过将 10ml 的 Tween-20 (西格玛公司, 目录 #P9416-100mL) 添加至 2 升 10x PBS 储备液 (PBS : **OmniPur®** 10X PBS 液体浓缩物, 4L, EMD 化学品公司, 目录 #6505) 和 18 升去离子水中而制备的。

[0429] 使用处于 5mg/ml 储备液浓度的 OVA 蛋白作为包被材料。使用 1:1000 稀释度达到 5 μg/ml 作为工作浓度。以每孔 100 μl 稀释的 OVA 来包被测定板的每个孔, 并且将板用密封薄膜 (VWR 目录 #60941-120) 密封, 并在 4°C 孵育过夜。使用 Costar901796 孔平底板作为测定板 Costar9017。

[0430] 使用低结合的聚丙烯 96 孔板或管作为准备板, 样品在转移至测定板中之前在这些准备板中进行制备。这些准备板不含有任何抗原并且因此, 在样品的准备过程中血清抗

体不会结合至板上。准备板是用于样品制备以便在使用抗原包被板来制备样品的情况下，使样品制备或吸液过程中可能发生的结合降至最低。在准备板中制备样品之前，将孔用稀释剂覆盖以阻断任何非特异性结合，并且将板密封并在 4°C 孵育过夜。

[0431] 测定板用洗涤缓冲液洗涤三次，并且在最后一次洗涤之后将洗涤缓冲液从各孔中完全吸出。洗涤之后，将 300 μ l 稀释剂添加至一个或多个测定板的各孔中以阻断非特异性结合，并且将板在室温孵育至少 2 小时。在准备板中将血清样品制备成适当的起始稀释液。有时也在 1.5ml 管中使用稀释剂制备起始稀释液。基于先前数据（当可获得时）确定适当的起始稀释度。在没有先前数据可利用时，最低起始稀释度是 1:40。一旦被稀释，就将 200 μ l 起始稀释度的血清样品转移到准备板的适当孔中。

[0432] 一个示例性准备板布局描述如下：2 列和 11 列含有被稀释到 1 μ g/mL (1:4000 稀释度) 的抗卵白蛋白单克隆 IgG2b 同种型（艾碧康公司，ab17291）标准品。3-10 列含有血清样品（处于适当的稀释度）。1 列和 12 列未用于样品或标准品以便避免由边缘效应引起任何测量偏差。而是，1 列和 12 列含有 200 μ l 稀释剂。使用 1:40 稀释的正常小鼠血清作为阴性对照。使用从 0.5mg/mL 储备液 (BD 生物科学公司) 进行 1:500 稀释的抗小鼠 IgG2a 作为同种型对照。

[0433] 一旦在准备板中制备了所有样品，就将该板密封并在 4°C 储存，直到测定板的阻断是完全的为止。测定板用洗涤缓冲液洗涤三次，并且在最后一次洗涤之后将洗涤缓冲液完全吸出。洗涤之后，将 100 μ L 稀释剂添加至测定板的 B-H 行的所有孔中。使用 12 通道的移液管将样品从准备板转移到测定板中。转移之前通过来回 3 次吸移 150 μ l 稀释的血清将样品混合。混合之后，将 150 μ l 每种样品从准备板转移并添加至对应测定板的 A 行中。

[0434] 一旦每种样品的起始稀释液被从准备板转移至测定板的 A 行，就如下述将连续稀释液在测定板上吸移：使用 12 通道的移液管从 A 行移除 50 μ l 的每种血清样品并且与先前添加至 B 行的各孔中的 100 μ l 稀释剂混合。此步骤沿着整个板重复。在吸移了最后一行的稀释液之后，从最后一行的孔中移除 50 μ l 流体并丢弃，从而在测定板的每孔中产生 100 μ l 的最终体积。一旦在这些测定板中制备了样品稀释液，就将这些板在室温孵育至少 2 小时。

[0435] 孵育之后，用洗涤缓冲液将板洗涤三次。将检测抗体 (HRP 共轭的山羊抗小鼠抗 IgG，艾碧康公司，ab98717) 在稀释剂中进行 1:1500 稀释 (0.33 μ g/mL)，并且向各孔中添加 100 μ l 的稀释抗体。将板在室温孵育 1 小时并且然后用洗涤缓冲液洗涤三次，其中每个洗涤步骤包括至少 30 秒的浸泡时间。

[0436] 洗涤之后，向各孔中添加检测底物。在即将要添加至测定板中之前将等份的底物 A 和底物 B (BD 生物科学公司，TMB 底物试剂组，目录 #555214) 组合，并向各孔中添加 100 μ l 的混合底物溶液并在黑暗中孵育 10 分钟。在 10 分钟时间后通过向各孔中添加 50 μ l 终止溶液 (2N H₂S04) 来终止反应。添加了该终止溶液之后立即在板阅读器上评定各孔的光密度 (OD) :450nm 减去 570nm 处的读数。使用分子装置公司 (Molecular Device) 的软件 SoftMax Pro v5.4 进行数据分析。在一些情况下，用 x 轴上的稀释度（对数标度）和 y 轴上的 OD 值（线性标度）制备一个四参数对数拟合曲线，并且确定每个样品的半数最大值 (EC50)。将该布置的顶部处的板模板调节成反映每种样品（每列 1 种）的稀释度。

[0437] % OVA+ 分裂 B 细胞的测定

[0438] 通过流式细胞术评定卵白蛋白+B 细胞分裂。将来自实验动物的脾细胞用一种适用于长期细胞标记的硫醇反应性荧光探针 Cell Tracker Orange (CTO) 染色，并且在完全培养基中在 37C、5% CO₂ 下用卵白蛋白或肽培养 3 天。在第 3 天，将细胞洗涤、用抗 CD16/32 抗体阻断并接着用对 B220 和 CD19 特异的共轭抗体染色。还将 Alexa647 共轭的卵白蛋白与这些细胞一起孵育以标记卵白蛋白特异性 BCR。通过比较差异性 CTO 染色评定 CD19+B220+OVA-Alexa647+ 的那些脾细胞的增殖。将 CTO 低的那些标记为增殖性卵白蛋白+B 细胞并且与 CTO 高的卵白蛋白+B 细胞进行比较，以便定量出百分数。

[0439] 结果

[0440] 图 6 显示了使用包含 ova 肽和免疫抑制剂雷帕霉素的合成纳米载体的给予使抗原特异性的 IgG 水平降低。图 7 也证明使用这些合成纳米载体的降低，但是为抗原特异性 B 细胞数目的降低。这些结果证明了使用与 ova 肽（包含 MHC II 类限制性表位）和免疫抑制剂偶联的合成纳米载体使所不希望的免疫应答降低。这些结果在抗原特异性 B 细胞的减少将会提供益处的任何情境下是有关的。

[0441] 实例 16：评定具有抗原和免疫抑制剂的纳米载体的作用

[0442] 纳米载体

[0443] 根据以上提供的方法（实例 15）制备纳米载体。

[0444] 免疫

[0445] 将纳米载体融化并平衡。初始稀释液构成一个 10x 储备溶液，并且进一步在 OVA₃₂₃₋₃₃₉ 中稀释到 100 μg/ml 的浓度或 1x 溶液。将这个 1x 溶液用于以每静脉内注射按 200 μl 进行注射。将动物用 OVA 蛋白 (OVA) 免疫并且用 OVA₃₂₃₋₃₃₉ 肽处理以便评定纳米载体控制在 B 细胞抗原不存在下的免疫应答的能力。免疫途径如下 • 10 μg 的 OVA+4mg 明矾 (Alum)，腹膜内，每只 Balb/C 初次接受试验的雌性小鼠 400 μl。实验组各自由 5 只动物组成。脾细胞用抗原使用 CFSE 或 CTO 重新刺激，以便测定抗原特异性增殖的量。

[0446] 具体免疫细胞类型的水平

[0447] 使用 FlowJo 软件分析 FCS 文件。排除 7AAD 阳性细胞（一种标记死细胞的核染色）并且将依赖于 CD4、CD8、Gr-1、F4/80、B220、TCRb 以及 CD11b 表达的细胞形态定量。

[0448] 用于 T 细胞子集的门控策略 → 7AAD-F4/80-GR-1-TCRb+CD4+/-CD8+/-

[0449] 用于 B 细胞子集的门控策略 → 7AAD-B220+TCRb-

[0450] 用于嗜酸性粒细胞的门控策略 → 7AAD-F4/80-Gr-1+TCRb-CD11b+Gr-1+

[0451] 分裂 CD4+T 细胞% 的测定

[0452] 借助流式细胞术计算卵白蛋白反应性 CD4⁺T 细胞的频率。将来自实验动物的脾细胞用一种适用于长期细胞标记的硫醇反应性荧光探针 CFSE 染色，并且在完全培养基中在 37C、5% CO₂ 下用卵白蛋白培养 3 天。在第 3 天，将细胞洗涤、用抗 CD16/32 抗体阻断并接着用对 TCR CD4 和 CD8a 特异的共轭抗体染色。通过比较差异性 CFSE 染色评定 TCR+CD4 或 TCR+CD8a+ 脾细胞的增殖。

[0453] 结果

[0454] 图 8 和图 9 证明了这些纳米载体在动物模型中的有效性。具体来说，图 8 证明来自用包含 OVA₃₂₃₋₃₃₉ (MHC II 类限制性表位) 和免疫抑制剂的合成纳米载体处理的动物受试者的灌洗样品中 CD4+T 细胞的数目减少。图 9 证明由同样的处理引起的分裂 CD4+T 细胞的

百分数降低。

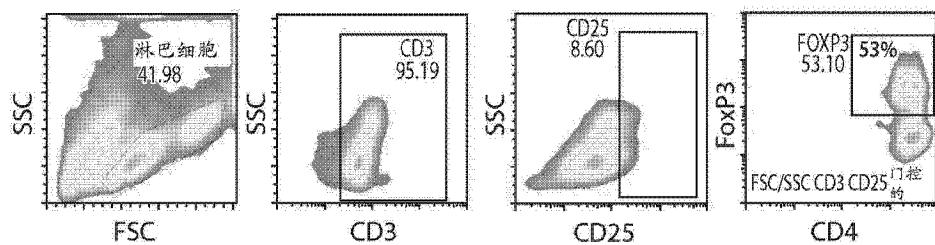


图 1

在单次注射之后t2SVP的体内作用

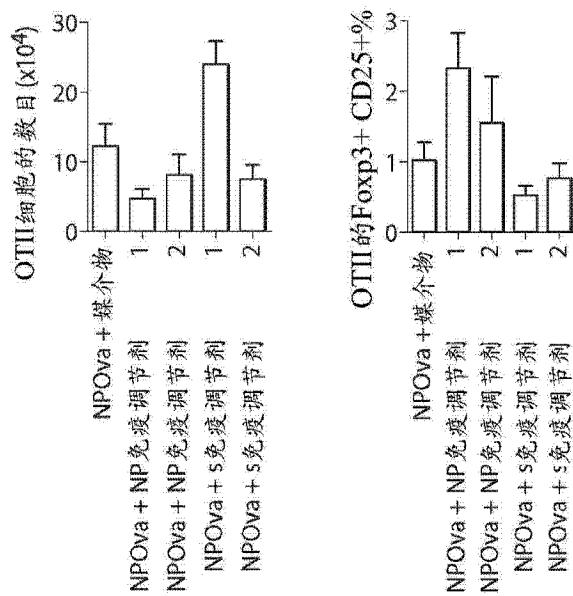
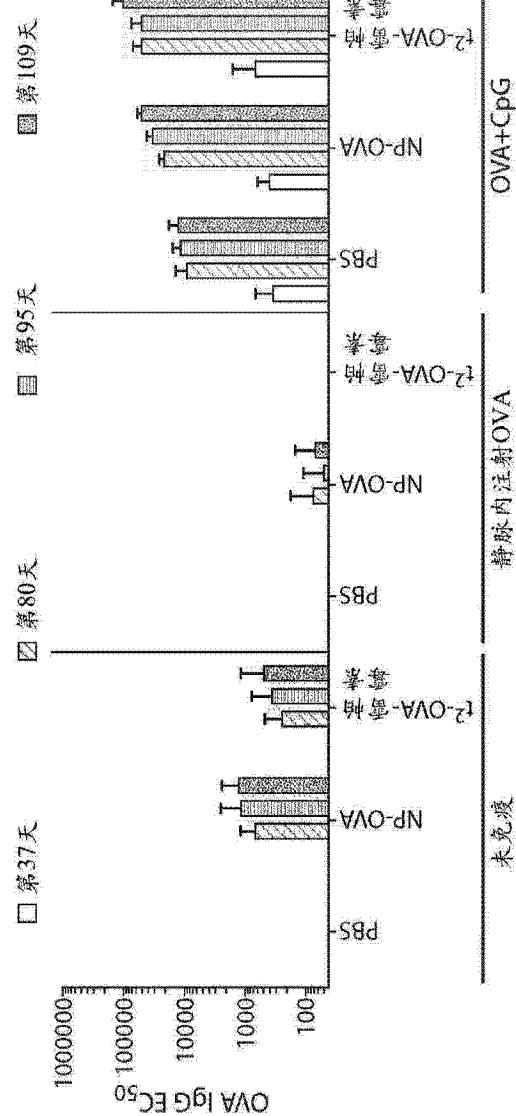
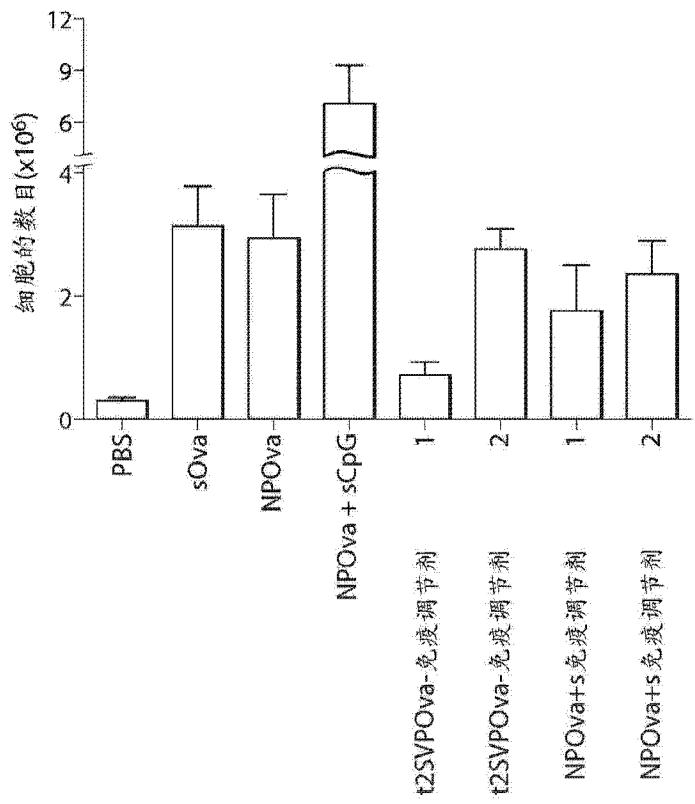


图 2



初次第77天+5次注射（第14天、第28天、第42天、第56天、第70天）的OVA接种疫苗抗体滴度

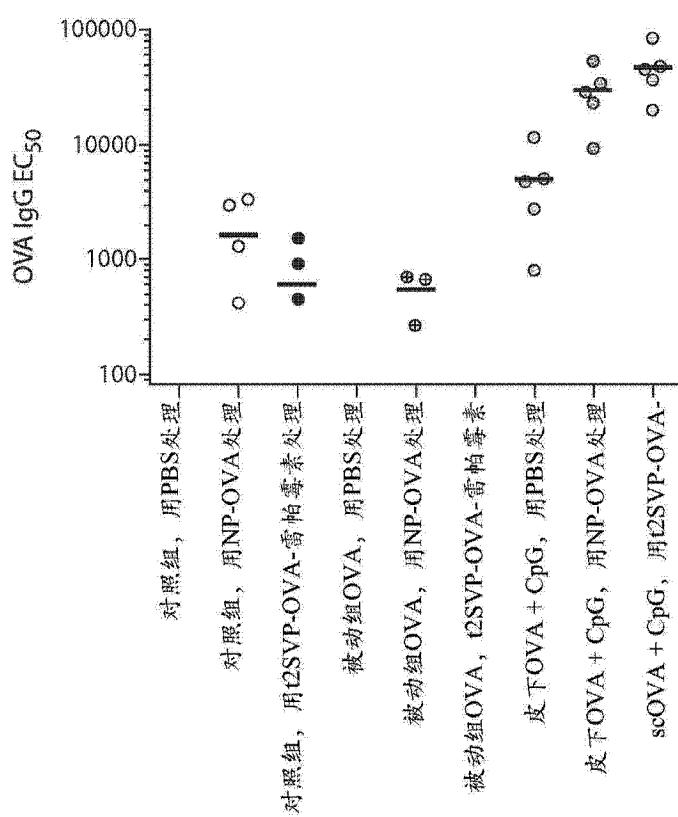


图 5

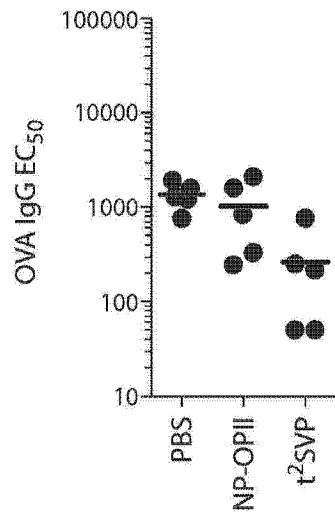


图 6

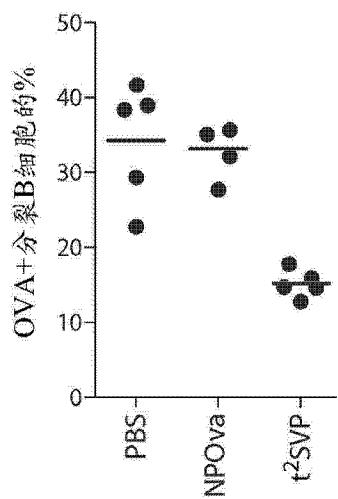


图 7

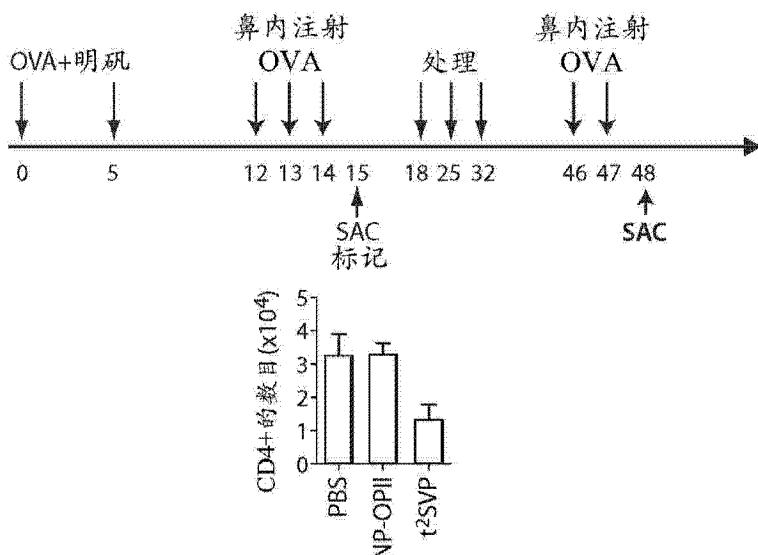


图 8

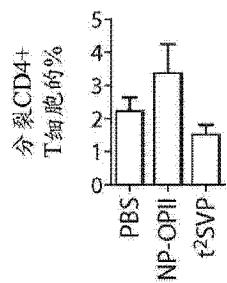


图 9