



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115335041 A

(43) 申请公布日 2022. 11. 11

(21) 申请号 202080095857.X

贾斯廷·E·马克尔

(22) 申请日 2020.12.04

赖安·A·拉辛斯基 贾宾·努尔

(30) 优先权数据

62/944,191 2019.12.05 US

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262

专利代理师 贺淑东 武晶晶

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.08.05

(51) Int.Cl.

A61K 31/047 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2020/063314 2020.12.04

A61K 31/165 (2006.01)

A61K 31/19 (2006.01)

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/113638 EN 2021.06.10

(71) 申请人 西弗吉尼亚大学

地址 美国西弗吉尼亚州

申请人 代表西弗吉尼亚大学的西弗吉尼亚大学理事会

(72) 发明人 布罗克·A·林德赛

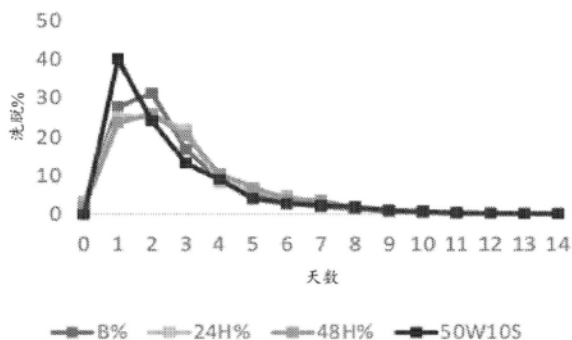
权利要求书5页 说明书28页 附图19页

(54) 发明名称

负载有蛋白质的PLGA纳米球

(57) 摘要

本公开内容提供了包含蛋白质包封的纳米颗粒的组合物,以及制备所述组合物的方法。在一个方面,组合物可以包含药物递送载体和治疗性物质,其中所述组合物在药物递送载体释放缓冲液的环境下在一段时间内每100,000个药物递送载体颗粒洗脱至少1.0pg的治疗性物质,其中治疗性物质、药物递送载体和药物递送载体释放缓冲液包含溶液,其中将溶液离心并将一部分储存在约1至10°C下,且其中治疗性物质的洗脱通过ELISA测定来确定。本公开内容还描述了一种控制患有影响免疫系统的疾病的患者的免疫表型的方法。



1. 一种组合物,其包含聚(D,L-乳酸-共-乙醇酸)(PLGA)纳米球和治疗性物质,其中在将所述组合物置于溶液中后超过72小时,至少一部分所述治疗性物质从所述组合物中洗脱。
2. 如权利要求1所述的组合物,其中在将所述组合物置于溶液中后超过96小时,至少一部分所述治疗性物质从所述组合物中洗脱。
3. 如权利要求1所述的组合物,其中在将所述组合物置于溶液中后超过120小时,至少一部分所述治疗性物质从所述组合物中洗脱。
4. 如权利要求1所述的组合物,其中在将所述组合物置于溶液中后介于72小时与288小时之间,至少一部分所述治疗性物质从所述组合物中洗脱。
5. 如权利要求1所述的组合物,其中所述治疗性物质是IL-12。
6. 如权利要求1所述的组合物,其中所述溶液是哺乳动物血清和约100单位/mL的于磷酸盐缓冲盐溶液(DPBS)中的青霉素-链霉素(Pen-Strep)。
7. 一种组合物,其包含聚(D,L-乳酸-共-乙醇酸)(PLGA)纳米球和IL-12,其中IL-12以至少2%的包封效率掺入所述PLGA纳米球中。
8. 如权利要求7所述的组合物,其中IL-12以至少10%的包封效率掺入所述PLGA纳米球中。
9. 如权利要求7所述的组合物,其中IL-12以至少20%的包封效率掺入所述PLGA纳米球中。
10. 如权利要求7所述的组合物,其中IL-12以至少40%的包封效率掺入所述PLGA纳米球中。
11. 如权利要求7所述的组合物,其中IL-12以约2%至约40%的包封效率掺入所述PLGA纳米球中。
12. 如权利要求7所述的组合物,其中所述IL-12是生物活性IL-12。
13. 一种组合物,其包含药物递送载体和治疗性物质,其中所述组合物在药物递送载体释放缓冲液的条件每100,000个药物递送载体颗粒洗脱至少1.0pg的所述治疗性物质,其中所述组合物在超过3天的时间内连续洗脱所述治疗性物质,其中所述治疗性物质、所述药物递送载体和所述药物递送载体释放缓冲液包含溶液,其中将所述溶液离心并将一部分储存在约1至10°C下,且其中所述治疗性物质的洗脱通过ELISA测定来确定。
14. 如权利要求13所述的组合物,其中所述药物递送载体包含聚(D,L-乳酸-共-乙醇酸)(PLGA)。
15. 如权利要求13所述的组合物,其中所述治疗性物质是蛋白质。
16. 如权利要求14所述的组合物,其中所述蛋白质是细胞因子。
17. 如权利要求16所述的组合物,其中所述细胞因子是IL-12。
18. 如权利要求13所述的组合物,其中所述药物递送载体释放缓冲液包含在磷酸盐缓冲盐溶液(DPBS)中的约10%合格的热灭活胎牛血清(HI-FBS)和约100单位/mL青霉素-链霉素(Pen-Strep)。
19. 如权利要求13所述的组合物,其还包含表面活性剂。

20. 如权利要求19所述的组合物,其中所述表面活性剂包括吐温80和司盘60。
21. 如权利要求13所述的组合物,其还包含物种特异性全血清、物种特异性工程化血清白蛋白或物种特异性全胎血清。
22. 一种组合物,其包含:
负载有蛋白质的聚(D,L-乳酸-共-乙醇酸)(PLGA)纳米球,其中所述纳米球包括约100至1000nm的直径;
表面活性剂;
和物种特异性全血清、工程化或天然血清白蛋白。
23. 如权利要求22所述的组合物,其中所述蛋白质包括IL-12。
24. 如权利要求22所述的组合物,其中所述表面活性剂包括吐温80和司盘60。
25. 一种制备蛋白质包封的纳米球的方法,其包括:
测定所述蛋白质随时间增加和/或超声功率增加的解离速率;
比较所述蛋白质的所述解离速率与所述纳米球随时间和/或超声功率增加的形成速率;
在所述蛋白质的所述解离速率与所述纳米球的所述形成速率之间的交叉点处确定时间和超声功率;
通过将PLGA溶解在具有第一表面活性剂的溶剂中来制备第一相;
通过将醇溶解在具有第二表面活性剂和哺乳动物血清的水中来制备第二相;
将所述组分悬浮在水性介质中;
形成包含所述水性介质和所述第一相的第一乳液;
形成包含所述第一乳液和所述第二相的第二乳液并以在所述交叉点处确定的时间和超声功率对所述第二乳液进行超声处理;
从所述第二乳液中蒸发所述溶剂以形成水溶液;以及
从所述水溶液中回收含有所述组分的PLGA纳米球。
26. 一种将组分包封在纳米球中的方法,其包括:
通过将聚(乳酸-共-乙醇酸)(PLGA)溶解在溶剂中来制备第一相;
通过将醇溶解在水中来制备第二相;
将所述组分悬浮在水性介质中;
形成包含所述水性介质和所述第一相的第一乳液;
形成包含所述第一乳液和所述第二相的第二乳液;
从所述第二乳液中蒸发溶剂以形成水溶液;以及
从所述水溶液中回收含有所述组分的PLGA纳米球。
27. 如权利要求26所述的方法,其中所述组分包括蛋白质。
28. 如权利要求27所述的方法,其中所述蛋白质包括IL-12。
29. 如权利要求27所述的方法,其中所述组分还包括表面活性剂和哺乳动物血清。
30. 如权利要求26所述的方法,其中所述PLGA包含50%至90%的交酯;并且
所述溶剂选自卤代C1-C3有机溶剂、C2-C3腈溶剂、C2-C5烷基酯溶剂、C3至C5酮溶剂及其混合物。
31. 如权利要求30所述的方法,其中所述溶剂是乙腈、丙酮、乙酸乙酯或二氯甲烷。

32. 如权利要求26所述的方法,其中所述PLGA包含75%至90%的交酯。

33. 如权利要求26所述的方法,其中所述PLGA包含50%至75%的交酯;并且所述溶剂选自卤代C1-C3有机溶剂、乙腈、C3至C4酮溶剂及其混合物。

34. 如权利要求26所述的方法,其中所述方法包括将所述水性介质添加到所述第一相中以形成所述第一乳液,并用组织匀浆器以13,000RPM至20,000RPM的速率搅动所述第一乳液;以及

将所述第一乳液添加到所述第二相中以形成所述第二乳液,并用组织匀浆器以13,000RPM至20,000RPM的速率搅动所述第二乳液。

35. 如权利要求26所述的方法,其中所述方法包括将所述水性介质添加到所述第一相中以形成所述第一乳液,并通过超声处理搅动所述第一乳液;以及

将所述第一乳液添加到所述第二相中以形成所述第二乳液,并通过超声处理搅动所述第二乳液。

36. 如权利要求35所述的方法,其中:

搅动所述第一乳液包括以30W至50W的功率水平超声处理5秒至30秒的时间段;并且搅动所述第二乳液包括以30W至50W的功率水平超声处理5秒至30秒的时间段。

37. 如权利要求36所述的方法,其中:

搅动所述第一乳液包括超声处理10秒至20秒的时间段;并且搅动所述第二乳液包括超声处理10秒至20秒的时间段。

38. 如权利要求27所述的方法,其中所述蛋白质是细胞因子或球状蛋白质。

39. 如权利要求38所述的方法,其中所述蛋白质是选自以下的细胞因子:白介素、淋巴因子、单核因子、干扰素、集落刺激因子和趋化因子。

40. 如权利要求39所述的方法,其中所述细胞因子选自白介素和非免疫细胞因子。

41. 如权利要求38所述的方法,其中所述蛋白质是细胞因子,所述细胞因子具有N端信号序列、包含标记为A至D的四个螺旋的四螺旋束,并且在D螺旋之后没有C端延伸。

42. 如权利要求41所述的方法,其中所述细胞因子是粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子、粒细胞集落刺激因子、干扰素 α -1、干扰素 β 、干扰素 γ 、干扰素 κ 、干扰素 τ -1、干扰素 ω -1或选自以下的白介素:IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-5、IL-6、IL-7、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-12的 α 链、IL-13、IL-15、IL-19、IL-20、IL-21、IL-22、IL-23、IL-24、IL-26和IL-27。

43. 如权利要求38所述的方法,其中所述蛋白质是免疫细胞因子,其:

- a) 增强细胞免疫应答;或
- b) 增强抗体应答。

44. 如权利要求43所述的方法,其中所述细胞因子是增强细胞免疫应答的免疫细胞因子,选自TNF α 、IFN- γ 和白介素-12。

45. 如权利要求44所述的方法,其中所述细胞因子是IL-12。

46. 如权利要求43所述的方法,其中所述细胞因子是增强抗体应答的免疫细胞因子,选自TGF- β 、IL-4、IL-10和IL-13。

47. 如权利要求45所述的方法,其中:

所述第一乳液和所述第二乳液各自用组织匀浆器以13,000RPM至20,000RPM的速率搅动;并且

IL-12以约0.5%至约2.1%的包封效率掺入所述PLGA纳米球中。

48. 如权利要求45所述的方法,其中:

所述第一乳液和所述第二乳液各自通过用30W至50W功率水平的超声处理5秒至30秒的时间段来搅动;并且

IL-12以约4.5%至约10%的包封效率掺入所述PLGA纳米球中。

49. 一种通过如权利要求26所述的方法产生的纳米球,所述纳米球包含PLGA基质和蛋白质,其中:

所述蛋白质的第一部分被吸附到所述纳米球的表面上;

所述蛋白质的第二部分掺入所述纳米球的核心处的所述PLGA基质中。

50. 如权利要求49所述的纳米球,其中:

所述蛋白质是IL-12;并且

所述IL-12以约0.5%至约10%的包封效率掺入所述纳米球中。

51. 如权利要求26所述的方法,其中所述第二相含有聚乙烯醇和哺乳动物血清。

52. 如权利要求51所述的方法,其中:

所述第一相含有所述第一表面活性剂;且/或

所述第二相含有所述第二表面活性剂。

53. 如权利要求52所述的方法,其中:

所述第一表面活性剂是山梨糖醇酐脂肪酸酯;且/或

所述第二表面活性剂是聚氧乙烯山梨糖醇酐脂肪酸酯。

54. 如权利要求26所述的方法,其中所述第二相含有聚乙烯醇和胎血清。

55. 一种通过如权利要求53所述的方法产生的纳米球,所述纳米球包含PLGA基质和蛋白质,其中:

所述蛋白质的第一部分被吸附到所述纳米球的表面上;

所述蛋白质的第二部分掺入所述纳米球的核心处的所述PLGA基质中;并且

所述纳米球包含至少一种选自以下的添加剂:哺乳动物血清白蛋白、海藻糖、所述第一表面活性剂和所述第二表面活性剂。

56. 如权利要求55所述的纳米球,其中所述纳米球包含哺乳动物血清白蛋白和表面活性剂。

57. 一种剂型,其包含通过如权利要求26所述的方法产生的多个纳米球,每个所述纳米球包含PLGA基质和蛋白质,其中:

所述蛋白质的第一部分被吸附到所述纳米球的表面上;

所述蛋白质的第二部分掺入所述纳米球的核心处的所述PLGA基质中。

58. 如权利要求57所述的剂型,其中:

所述蛋白质是IL-12;并且

所述IL-12以至少2%的包封效率掺入所述纳米球中。

59. 一种将蛋白质包封在纳米球中的方法,其包括:

通过将2.5%w/v至17%w/v的聚(乳酸-共-乙醇酸)(PLGA)溶解于任选地含有第一表面活性剂的有机溶剂中来制备油相;

制备含有聚乙烯醇和至少一种选自哺乳动物血清、海藻糖和第二表面活性剂的添加剂

的水相;将所述蛋白质悬浮在水性介质中;

将所述水性介质添加到所述油相中以形成第一乳液,并搅动所述第一乳液;

将所述第一乳液添加到所述水相中以形成第二乳液,并搅动所述第二乳液;

从所述第二乳液中蒸发所述有机溶剂以形成水溶液;以及

从所述水溶液中回收含有所述蛋白质的聚(乳酸-共-乙醇酸)纳米球。

60. 一种控制患有影响免疫系统的疾病的患者的免疫表型的方法,其包括:

a) 确定患者的初步免疫表型;

b) 如果所述初步免疫表型显示出免疫抑制,则施用刺激免疫系统的第一药物;或者如果所述初步免疫表型显示出免疫系统的过度刺激,则施用抑制免疫系统的第二药物;

c) 在步骤(b)之后,监测随时间变化的所述患者的免疫表型;以及

d) 如果所述患者的免疫表型超出所需范围,则调整所述第一药物和/或所述第二药物的施用。

61. 一种控制患有影响免疫系统的疾病的患者的免疫表型的方法,其包括:

a) 确定患者的疾病状态,其中所述疾病状态包括诊断和初步免疫表型;

b) 将所述患者的疾病状态与数据库中的多种疾病状态进行比较,其中所述数据库中的每种疾病状态包括诊断、初步免疫表型和治疗方案;

c) 基于比较步骤(b),从所述数据库中选择治疗方案,其中所述治疗方案涉及施用免疫调节药物。

62. 如权利要求61所述的方法,其还包括:

d) 向所述患者施用所述免疫调节药物;

e) 在步骤(d)之后,监测随时间变化的所述患者的免疫表型;以及

f) 如果所述患者的免疫表型超出所需范围,则调整所述免疫调节药物的施用。

负载有蛋白质的PLGA纳米球

相关申请的交叉引用

[0001] 本申请要求于2019年12月5日提交的美国临时申请号62/944,191的权益,所述临时申请以引用的方式全文并入本文。

关于联邦政府资助研究的声明

[0002] 本申请是由政府支持在由美国国立卫生研究院/国立普通医学科学研究所授予的资助编号2U54GM104942-02、S100D016165、P30GM103488和P20GM103434下做出的。政府对本发明享有一定的权利。

技术领域

[0003] 本文公开的各种实施方案总体上涉及含蛋白质的纳米球的制备。

[0004] 本文公开的各种实施方案涉及用于免疫分析的免疫表型分型。

背景技术

[0005] 免疫刺激是一种重要的机制,1)可以防止恶性细胞增殖和/或形成转移,以及2)可以清除病毒和细菌感染。免疫疗法癌症治疗可能涉及单克隆抗体阻断特异性免疫调控检查点,包括程序性死亡配体1(PD-L1)和细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4(CTLA-4)轴。

[0006] 从历史上看,重点一直放在肿瘤微环境和免疫应答上。然而,全身应答可以提供持久的免疫应答并治愈疾病。许多小组已经研究了治疗的免疫表型分型,以帮助实时解释患者的免疫学状况。随着多种疾病的免疫治疗剂变得更加主流,这些信息将发挥重要作用,并且开发这些应答的活数据库将极大地推动这一进程。

[0007] 临床前研究显示,白介素可以诱导针对许多恶性肿瘤的抗肿瘤应答。白介素-12(IL-12)是具有抗肿瘤活性的免疫刺激性细胞因子,全身给药时可发挥最大作用,可诱导此类抗肿瘤应答。高剂量的IL-12施用可具有毒副作用,而低剂量的IL-12可被认为是安全的。

[0008] 聚(D,L-乳酸-共-乙醇酸)(PLGA)药物递送载体已获得FDA批准,并且可在聚合物分解时洗脱多种物质。出于治疗目的,在PLGA纳米球内包封肽(可能包括免疫刺激性白介素蛋白)可以实现全身递送和组织沉积,而无需毒性负荷剂量。为了在全身环境中使用,纳米球可以通过生物体的宏观和微观脉管系统实现安全有效的血源性传播。

发明内容

[0009] 鉴于目前对改进的细胞因子施用方法的需要,给出了各种示例性实施方案的简要概述。在以下概述中可以进行一些简化和省略,其旨在突出和介绍本文所公开的某些实施方案的方面,而不限本公开内容的范围。足以允许本领域普通技术人员制备和使用本文公开的概念的各种实施方案的详细描述将在随后的章节中进行。

[0010] 根据本文公开的各种实施方案,可以将蛋白质包封在纳米球中。此包封过程可以通过制备双重乳液来进行,其中第一水相可以在油相中乳化,并且油相可以在第二水相中乳化。所述蛋白质可以是一种细胞因子,它可以是在细胞信号传导中起作用的小蛋白质(~

5-20kDa)。合适的细胞因子包括：

白介素，由T辅助细胞产生；

淋巴因子，由淋巴细胞产生；

单核因子，仅由单核细胞产生；

干扰素，参与抗病毒应答；

集落刺激因子，支持细胞在半固体培养基中的生长；以及

趋化因子，介导细胞之间的化学吸引。

[0011] 在各种实施方案中，包封在纳米球中的蛋白质可以是具有三维结构的细胞因子，其具有一束四个 α -螺旋，其可以是干扰素、白介素例如白介素-2或白介素-12或非免疫细胞因子，包括促红细胞生成素和血小板生成素。包封在纳米球中的蛋白质可以是白介素-12 (IL-12)。

[0012] 油相可以通过将2.5%w/v至17%w/v的聚(乳酸-共-乙醇酸) (PLGA) 溶解在有机溶剂中来制备。第一水相可以通过将蛋白质悬浮在水性介质中来制备。最后，第二水相可以通过将聚乙烯醇(PVA) 溶解在水中来制备。

[0013] PLGA可包含50%至90%的交酯，并且有机溶剂可以是卤代C1-C3有机溶剂、C2-C3腈溶剂、C2-C5烷基酯溶剂、C3至C5酮溶剂或其混合物。PLGA可包含75%至90%的交酯。PLGA可包含50%至75%的交酯，并且有机溶剂可以是卤代C1-C3有机溶剂、乙腈、C3至C4酮溶剂或其混合物。在各种实施方案中，PLGA包含50%至90%的交酯，并且有机溶剂可以是乙腈、丙酮、乙酸乙酯或二氯甲烷。

[0014] 可以将含蛋白质的水性介质添加到油相中以形成第一乳液，并搅动。可以将第一乳液添加到含有PVA的水相中以形成第二乳液，并搅动。然后可以从第二乳液中蒸发有机溶剂以形成水溶液；并且可以从水溶液中回收含有来自第二水相的蛋白质的PLGA纳米球。

[0015] 在一个方面，本公开内容描述了一种组合物，其包含聚(D,L-乳酸-共-乙醇酸) (PLGA) 纳米球和治疗性物质，其中在将组合物置于溶液中后超过72小时，至少一部分治疗性物质可以从组合物中洗脱。

[0016] 在各种实施方案中，在将组合物置于溶液中后超过96、120、144、168、192、216、240、264、288、312、336小时，至少一部分治疗性物质可以从组合物中洗脱。在将组合物置于溶液中后介于72小时与288小时之间，至少一部分治疗性物质可以从组合物中洗脱。治疗性物质可以是IL-12。溶液可以是哺乳动物血清和约100单位/mL的于磷酸盐缓冲盐溶液(DPBS) 中的青霉素-链霉素(Pen-Strep)。

[0017] 在一个方面，本公开内容描述了一种组合物，其包含聚(D,L-乳酸-共-乙醇酸) (PLGA) 纳米球和IL-12，其中IL-12可以至少2%的包封效率掺入PLGA纳米球中。

[0018] 在各种实施方案中，IL-12可以至少10%、20%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%的包封效率掺入PLGA纳米球中。IL-12可以约2%至约40%的包封效率掺入PLGA纳米球中。IL-12可以是生物活性IL-12。

[0019] 在一个方面，本公开内容描述了一种包含药物递送载体和治疗性物质的组合物，其中组合物可以在药物递送载体释放缓冲液的条件每100,000个药物递送载体颗粒洗脱至少1.0pg的治疗性物质，其中组合物在超过3天的时间内连续洗脱治疗性物质，其中治疗性物质、药物递送载体和药物递送载体释放缓冲液包含溶液，其中将溶液离心并将一部分

储存在约1至10℃下,且其中治疗性物质的洗脱通过ELISA测定来确定。组合物可以包含表面活性剂。表面活性剂可以是吐温80和司盘60。组合物可以包含物种特异性全血清、物种特异性工程化血清白蛋白或物种特异性全胎血清。

[0020] 在各种实施方案中,药物递送载体可以包含聚(D,L-乳酸-共-乙醇酸)(PLGA)。治疗性物质可以是蛋白质。蛋白质可以是细胞因子。细胞因子可以是IL-12。药物递送载体释放缓冲液可以包含在磷酸盐缓冲盐溶液(DPBS)中的约10%合格的热灭活胎牛血清(HI-FBS)和约100单位/mL青霉素-链霉素(Pen-Strep)。

[0021] 在一个方面,本公开内容描述了一种组合物,其包含负载有蛋白质的聚(D,L-乳酸-共-乙醇酸)(PLGA)纳米球(其中纳米球可以包括约100至1000nm的直径)、表面活性剂和物种特异性全血清、工程化或天然血清白蛋白。

[0022] 在各种实施方案中,蛋白质可以包括IL-12。表面活性剂可以包括吐温80和司盘60。

[0023] 在一个方面,本公开内容描述了一种制备蛋白质包封的纳米球的方法,其包括测定蛋白质随时间增加和/或超声功率增加的解离速率;比较蛋白质的解离速率与纳米球随时间和/或超声功率增加的形成速率;在蛋白质的解离速率与纳米球的形成速率之间的交叉点处确定时间和超声功率;通过将PLGA溶解在具有第一表面活性剂的溶剂中来制备第一相;通过将醇溶解在具有第二表面活性剂和哺乳动物血清的水中来制备第二相;将组分悬浮在水性介质中;形成包含水性介质和第一相的第一乳液;形成包含第一乳液和第二相的第二乳液并以在交叉点处确定的时间和超声功率对第二乳液进行超声处理;从第二乳液中蒸发溶剂以形成水溶液;以及从水溶液中回收含有组分的PLGA纳米球。

[0024] 在一个方面,本公开内容描述了一种将组分包封在纳米球中的方法,其包括通过将聚(乳酸-共-乙醇酸)(PLGA)溶解在溶剂中来制备第一相;通过将醇溶解在水中来制备第二相;将组分悬浮在水性介质中;形成包含水性介质和第一相的第一乳液;形成包含第一乳液和第二相的第二乳液;从第二乳液中蒸发溶剂以形成水溶液;以及从水溶液中回收含有组分的PLGA纳米球。

[0025] 在各种实施方案中,组分可以包括蛋白质。蛋白质可以包括IL-12。组分可以包括表面活性剂和哺乳动物血清。PLGA可以包含50%至90%的交酯,并且溶剂可以选自卤代C1-C3有机溶剂、C2-C3腈溶剂、C2-C5烷基酯溶剂、C3至C5酮溶剂及其混合物。溶剂可以是乙腈、丙酮、乙酸乙酯或二氯甲烷。PLGA可以包含75%至90%的交酯。PLGA可以包含50%至75%的交酯,并且溶剂可以选自卤代C1-C3有机溶剂、乙腈、C3至C4酮溶剂及其混合物。所述方法可以包括将水性介质添加到第一相中以形成第一乳液,并用组织匀浆器以13,000RPM至20,000RPM的速率搅动第一乳液,以及将第一乳液添加到第二相中以形成第二乳液,并用组织匀浆器以13,000RPM至20,000RPM的速率搅动第二乳液。所述方法可以包括将水性介质添加到第一相中以形成第一乳液,并通过超声处理搅动第一乳液,以及将第一乳液添加到第二相中以形成第二乳液,并通过超声处理搅动第二乳液。所述方法可以包括搅动第一乳液,包括以30W至50W的功率水平超声处理5秒至30秒的时间段,并且搅动第二乳液,包括以30W至50W的功率水平超声处理5秒至30秒的时间段。蛋白质可以是细胞因子或球状蛋白质。蛋白质可以是选自以下的细胞因子:白介素、淋巴因子、单核因子、干扰素、集落刺激因子和趋化因子。细胞因子可以选自白介素和非免疫细胞因子。蛋白质可以是细胞因子,该细胞因子具

有N端信号序列、包含标记为A至D的四个螺旋的四螺旋束,并且在D螺旋之后没有C端延伸。细胞因子可以是粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子、粒细胞集落刺激因子、干扰素 α -1、干扰素 β 、干扰素 γ 、干扰素 κ 、干扰素 τ -1、干扰素 ω -1或选自以下的白介素:IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-5、IL-6、IL-7、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-12的 α 链、IL-13、IL-15、IL-19、IL-20、IL-21、IL-22、IL-23、IL-24、IL-26和IL-27。蛋白质可以是免疫细胞因子,其:a)增强细胞免疫应答,或b)增强抗体应答。细胞因子可以是增强细胞免疫应答的免疫细胞因子,选自TNF α 、IFN- γ 和白介素-12。细胞因子可以是IL-12。细胞因子可以是增强抗体应答的免疫细胞因子,选自TGF- β 、IL-4、IL-10和IL-13。第一乳液和第二乳液可各自用组织匀浆器以13,000RPM至20,000RPM的速率搅动,并且IL-12以约0.5%至约2.1%的包封效率掺入PLGA纳米球中。第一乳液和第二乳液可各自通过用30W至50W功率水平的超声处理5秒至30秒的时间段来搅动,并且IL-12以约4.5%至约10%的包封效率掺入PLGA纳米球中。第二相可以含有聚乙烯醇和哺乳动物血清。第一相可以含有第一表面活性剂,且/或第二相可以含有第二表面活性剂。第一表面活性剂可以是山梨糖醇酐脂肪酸酯,且/或第二表面活性剂可以是聚氧乙烯山梨糖醇酐脂肪酸酯。第二相可以含有聚乙烯醇和胎血清。

[0026] 在各种实施方案中,蛋白质的第一部分可被吸附到纳米球的表面上,蛋白质的第二部分可以掺入纳米球的核心处的PLGA基质中,并且纳米球可以包含至少一种选自以下的添加剂:哺乳动物血清白蛋白、海藻糖、第一表面活性剂和第二表面活性剂。纳米球可以包含哺乳动物血清白蛋白和表面活性剂。

[0027] 在各种实施方案中,本公开内容描述了一种剂型,其包含通过所述方法产生的多个纳米球,每个纳米球包含PLGA基质和蛋白质,其中蛋白质的第一部分可被吸附到纳米球的表面上,并且蛋白质的第二部分掺入纳米球的核心处的PLGA基质中。蛋白质可以是IL-12,并且IL-12可以至少2%的包封效率掺入纳米球中。

[0028] 在一个方面,本公开内容描述了将蛋白质包封在纳米球中的方法,其包括通过将2.5%w/v至17%w/v的聚(乳酸-共-乙醇酸)(PLGA)溶解于任选地含有第一表面活性剂的有机溶剂中来制备油相,制备含有聚乙烯醇和至少一种选自哺乳动物血清、海藻糖和第二表面活性剂的添加剂的水相;将蛋白质悬浮在水性介质中;将水性介质添加到油相中以形成第一乳液,并搅动第一乳液,将第一乳液添加到水相中以形成第二乳液,并搅动第二乳液,从第二乳液中蒸发有机溶剂以形成水溶液,以及从水溶液中回收含蛋白质的聚(乳酸-共-乙醇酸)纳米球。

[0029] 在一个方面,本公开内容描述了控制患有影响免疫系统的疾病的患者的免疫表型的方法,其包括(a)确定患者的疾病状态,其中疾病状态包括诊断和初步免疫表型,(b)将患者的疾病状态与数据库中的多种疾病状态进行比较,其中数据库中的每种疾病状态包括诊断、初步免疫表型和治疗方案,以及(c)基于比较步骤(b),从数据库中选择治疗方案,其中治疗方案涉及施用免疫调节药物。

[0030] 在各种实施方案中,所述方法可以包括(d)向患者施用免疫调节药物,(e)在步骤(d)之后,监测随时间变化的患者的免疫表型,以及如果患者的免疫表型超出所需范围,则调整免疫调节药物的施用。

[0031] 在各种实施方案中,可以将含蛋白质的水性介质添加到油相中以形成第一乳液,并通过组织匀浆器以13,000RPM至20,000RPM的速率搅动。可以将第一乳液添加到含有PVA

的水相中以形成第二乳液,并通过组织匀浆器以13,000RPM至20,000RPM的速率搅动。然后可以从第二乳液中蒸发有机溶剂以形成水溶液;并且可以从水溶液中回收含有来自第二水相的蛋白质的PLGA纳米球。

[0032] 在各种实施方案中,含蛋白质的水性介质中的蛋白质可以是细胞因子。合适的细胞因子包括白介素、淋巴因子、单核因子、干扰素、集落刺激因子和趋化因子。蛋白质可以是具有三维结构的细胞因子,其具有一束四个 α -螺旋,例如白介素,例如白介素-2或白介素-12或非免疫细胞因子,包括促红细胞生成素和血小板生成素。

[0033] 在各种实施方案中,含蛋白质的水性介质中的蛋白质可以是IL-12。通过用组织匀浆器以13,000RPM至20,000RPM的速率搅动第一乳液和第二乳液,可以将IL-12掺入PLGA纳米球中。IL-12可以约0.5%至约2.1%的包封效率掺入所得PLGA纳米球中。

[0034] 在各种实施方案中,可以将含蛋白质的水性介质添加到油相中以形成第一乳液,并通过超声处理来搅动。可以将第一乳液添加到含有PVA的水相中以形成第二乳液,并通过超声处理来搅动。在形成第一乳液和第二乳液之一或两者期间的搅动可以包括以30W至50W、30W至40W或40W至50W的功率水平进行超声处理5秒至30秒、10秒至30秒、10秒至20秒或10秒至15秒的时间段。然后可以从第二乳液中蒸发有机溶剂以形成水溶液;并且接着可以从水溶液中回收含有来自第二水相的蛋白质的PLGA纳米球。

[0035] 在各种实施方案中,可以将含蛋白质的水性介质添加到油相中以形成第一乳液,并通过组织匀浆器以13,000RPM至20,000RPM的速率搅动。可以将第一乳液添加到含PVA的水相中以形成第二乳液,并通过以30W至50W、30W至40W或40W至50W的功率水平超声处理5秒至30秒的时间段来搅动。然后可以从第二乳液中蒸发有机溶剂以形成水溶液;并且可以从水溶液中回收含有来自第二水相的蛋白质的PLGA纳米球。

[0036] 在各种实施方案中,含蛋白质的水性介质中的蛋白质可以是IL-12。IL-12可以通过以30W至50W的功率水平超声处理10秒至20秒的时间段掺入PLGA纳米球中。IL-12可以约2%至约85%、约4.5%至约70%、约5%至60%、约7%至约50%、约8%至约40%、约10%至30%、或约5%至10%的包封效率掺入所得PLGA纳米球中。

[0037] 本文公开的各种实施方案涉及一种包含聚(乳酸-共-乙醇酸)基质和蛋白质的纳米球,其中蛋白质的第一部分可被吸附到纳米球的表面上并且蛋白质的第二部分可掺入纳米球核心处的聚(乳酸-共-乙醇酸)基质中。可以通过制备双重乳液来产生纳米球,其中可以将含蛋白质的第一水相在油相中乳化,然后可以将油相在第二水相中乳化。蛋白质可以是细胞因子,诸如IL-12。IL-12可以约0.5%至约85%、约1%至约70%、约2%至60%、约3%至约50%、约4%至约40%、约5%至30%、约0.5%至10%、约1%至8%或约2%至5%的包封效率掺入纳米球中。IL-12可以至少0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、99%或100%的包封效率掺入PLGA纳米球中。

[0038] 本文公开的各种实施方案涉及一种通过以下操作将蛋白质包封在纳米球中的方法:将2.5%w/v至17%w/v的聚(乳酸-共-乙醇酸)(PLGA)溶解于含有任选的第一表面活性剂的有机溶剂中来制备油相;制备含有聚乙烯醇和至少一种选自哺乳动物全血清、重组/天然哺乳动物白蛋白、海藻糖和第二表面活性剂的添加剂的水相;以及将蛋白质悬浮在水性介质中。第一表面活性剂可以是山梨糖醇酐脂肪酸酯。可以将水性介质添加到油相中以形成第一乳液。可以搅动第一乳液,并且可以将第一乳液添加到水相中以形成第二乳液,然后

可以搅动第二乳液。可以将有机溶剂从第二乳液中蒸发以形成水溶液；并且可以从水溶液中回收含蛋白质的聚(乳酸-共-乙醇酸)纳米球。水相可以含有聚乙烯醇和哺乳动物血清，例如胎血清。水相可以含有聚乙烯醇和第二表面活性剂，其中第一表面活性剂可以是山梨糖醇酐脂肪酸酯；并且第二表面活性剂可以是聚氧乙烯山梨糖醇酐脂肪酸酯。

[0039] 本文公开的各种实施方案涉及一种包含聚(乳酸-共-乙醇酸)基质和蛋白质的纳米球，其中蛋白质的第一部分可被吸附到纳米球的表面上；并且蛋白质的第二部分可以掺入纳米球的核心处的聚(乳酸-乙醇酸共聚物)基质中。纳米球还可以包含至少一种选自哺乳动物血清白蛋白、海藻糖和表面活性剂的添加剂。纳米球可以包含哺乳动物血清白蛋白、哺乳动物重组/天然白蛋白和表面活性剂。纳米球可以包含哺乳动物全血清、哺乳动物重组/天然白蛋白、第一表面活性剂和第二表面活性剂。

[0040] 在许多疾病状态中，例如癌症和自身免疫性疾病，人体免疫系统可处于不断变化之中。为了治疗此类疾病，执业医师实时评估患者的免疫系统并随时间推移跟踪免疫系统状态可为有益的。当使用免疫调节剂治疗癌症、感染和/或自身免疫性疾病时，无论它们是免疫抑制性的或免疫刺激性的，执业医师能够跟踪此类药剂对免疫系统的影响都是有益的。

[0041] 本文公开的各种实施方案涉及一种允许从可以在测试点分析的抽血或指刺抽血对免疫系统进行系统分析的方法。可以在选定的时间分析免疫系统对疾病状态(例如癌症或自身免疫性疾病)的应答，并且可以在疾病或治疗过程中跟踪对治疗方案的免疫应答。

[0042] 这种诊断方法可用于许多疾病(包括癌症、自身免疫性疾病和感染)的治疗、监测和诊断。随着免疫调节剂变得越来越普遍，所述方法可以为执业医师提供在疾病发病的特定时间评估免疫系统状态的能力，并且可以预测哪种免疫调节治疗在对抗疾病时最有效。这可以提高治疗的整体有效性，并且可以改进对疾病过程中患者免疫状态的评估。这些信息还可以组织在跨疾病特定类别的免疫概况的活数据库中，这可以让从业者根据以前的经验对他们将提供的治疗有更多了解。

[0043] 本文公开的各种实施方案涉及一种控制患有影响免疫系统的疾病的患者的免疫表型的方法，其包括确定患者的初步免疫表型或免疫状态的步骤；以及：

如果初步免疫表型显示出免疫抑制，则施用刺激免疫系统的第一药物；或者

如果初步免疫表型显示出免疫系统的过度刺激，则施用抑制免疫系统的第二药物。

[0044] 在施用选定的药物后，可以监测随时间变化的患者的免疫表型；并且如果患者的免疫表型超出所需范围，则可以调整第一药物和/或第二药物的施用。

[0045] 本文公开的各种实施方案涉及一种通过以下操作来控制患有影响免疫系统的疾病的患者的免疫表型的方法：确定患者的疾病状态，其中疾病状态包括诊断和初步免疫表型；以及将患者的疾病状态与数据库中的多种疾病状态进行比较，其中数据库中的每种疾病状态包括诊断、初步免疫表型和治疗方案。基于患者的疾病状态与来自数据库的疾病状态和治疗方案之间的比较，可以从数据库中选择治疗方案，其中治疗方案涉及施用免疫调节药物。所述方法可以包括向患者施用免疫调节药物；在施用药物后监测随时间变化的患者的免疫表型；以及如果患者的免疫表型超出所需范围，则调整免疫调节药物的施用。

[0046] 患者血液样品的免疫表型分型可能涉及适当分析和评估数据的能力。此系统可以

允许在几种疾病状态下进行适当的给药、治疗和校正。随着数据收集的增加,不断增长的数据库也可以帮助指导医疗专业人员在最广泛意义上进行诊断、治疗和免疫治疗剂给药。

援引并入

[0047] 本说明书中提到的所有出版物、专利和专利申请都通过引用并入本文,就好像每个单独的出版物、专利或专利申请被明确地并单独地指示通过引用并入一样。就通过引用并入的出版物和专利或专利申请与本说明书中包含的公开内容相矛盾而言,本说明书旨在取代和/或优先于任何这种矛盾的材料。

附图说明

[0048] 本公开内容的新颖特征在所附权利要求书中特别地阐述。将通过参考阐述了利用本发明原理的说明性实施方案的以下具体实施方式和附图(在本文中也称为“图(Figure)”和“图(FIG.)”)获得对本公开内容的特征和优点的更好的理解,在所述附图中:

[0049] 图1A和图1B示出了异硫氰酸荧光素标记的牛血清白蛋白蛋白质在PLGA纳米球中的分布。

[0050] 图1C示出了来自PLGA纳米球的双相蛋白质洗脱曲线,这是由于纳米球表面上吸附的蛋白质的初始释放,随后是被PLGA纳米球包埋的蛋白质的受控释放。

[0051] 图1D示出了来自PLGA纳米球的双相蛋白质释放的机制。

[0052] 图2示出了通过腹膜内(左侧的小鼠)或静脉内(右侧的小鼠)注射,在用溶解在无菌盐水中的1mg/kg的负载有AlexaFlour® 647的纳米球接种的BALB/c小鼠中在67分钟时期内的荧光团分布。

[0053] 图3示出了超声处理对IL-12的影响,其中IL-12在三种不同的功率下超声处理10、20、30、40或60秒。

[0054] 图4A和图4B分别示出了在11,000X(图4A)和13,000X(图4B)下在没有25mM海藻糖的情况下冻干的未负载(空白)聚(交酯-共-乙交酯)酸(PLGA)纳米球的扫描电子显微镜(SEM)图像。

[0055] 图4C示出了在5,000X放大倍数下用25mM海藻糖冻干的未负载(空白)PLGA纳米球的扫描电子显微镜(SEM)图像。

[0056] 图5A示出了负载有FITC缀合的牛血清白蛋白的PLGA纳米球,通过共聚焦显微镜观察蛋白质掺入。

[0057] 图5B和图5C分别示出了在8,000X和25,000X放大倍数下冻干的负载有重组小鼠IL-12的PLGA纳米球的扫描电子显微镜(SEM)图像。

[0058] 图6A和图6B分别示出了在25摄氏度下在水中以1:50和1:14的稀释因子运行的未负载(空白)PLGA酸纳米球和负载有重组小鼠IL-12(IL-12)的PLGA纳米球的尺寸分布分析。

[0059] 图6C和图6D分别示出了在25摄氏度下于水中以1:50的稀释因子未负载的空白和负载有IL-12的PLGA纳米球的 ζ 电位分布。

[0060] 图7A和图7B示出了以总蛋白质(图7A)和每100,000个颗粒的蛋白质(图7B)计的从负载有重组小鼠IL-12的PLGA纳米球随时间洗脱的蛋白质的总估计量。

[0061] 图7C示出了负载有重组小鼠IL-12的纳米球的包封效率(EE),使用针对三种不同颗粒浓度(5亿个颗粒/mL、7.5亿个颗粒/mL和10亿个颗粒/mL)的每个洗脱曲线的曲线下面

积 (AUC) 所计算。

[0062] 图8A至图8C示出了在不同的超声功率和超声时间条件下使用超声处理制备的负载有IL-12的纳米球。

[0063] 图9示出了在不同的超声功率和超声时间条件下来自使用超声处理制备的纳米球中的IL-12的洗脱曲线。

[0064] 图10示出了来自使用高速搅动制备的PLGA纳米球中的IL-12的洗脱曲线,使用7.5亿颗粒/mL的纳米球浓度,该洗脱随搅动速度而变化。

[0065] 图11示出了来自PLGA纳米球的IL-12用于治疗转移性骨肉瘤的应用。

[0066] 图12示出了海藻糖和镁化合物对IL-12从PLGA纳米球中洗脱的影响。

[0067] 图13示出了胎牛血清 (FBS) 对IL-12从PLGA纳米球中洗脱的影响。

[0068] 图14示出了单独或与FBS组合的表面活性剂对IL-12从PLGA纳米球中洗脱的影响。

[0069] 图15A和图15B分别示出了在不同条件下制备纳米球时蛋白质随时间的洗脱百分比和作为总洗脱百分比的洗脱。

[0070] 图16示出了描绘实验设计的示意图。

[0071] 图17示出了在外周血中的辅助性、细胞毒性和调节性T淋巴细胞亚群的重组小鼠IL-12 (rmIL-12) 诱导的T细胞耗竭。

[0072] 图18示出了外周血中rmIL-12诱导的多形核-髓源性抑制细胞 (PMN-MDSC) 髓细胞增多症。

[0073] 图19示出了IL-12诱导的循环自然杀伤 (NK) 细胞减少。

[0074] 图20A和图20B分别示出了跨越12周的7个时间点比较的健康与患病外周血中NKp46+自然杀伤 (NK) 细胞的平均百分比和根据截肢时外周血中的NK细胞百分比分层的小鼠。

具体实施方式

[0075] 除非上下文另有明确指示,如说明书和权利要求中所用,单数形式“一个/种 (a/an)”和“所述”包括复数个指示物。例如,术语“样品”包括多个样品,包括其混合物。

[0076] “纳米球”或“纳米颗粒”可以是超细颗粒。这种颗粒可以由多种材料制成,包括但不限于聚 (D,L-乳酸-共-乙醇酸) (PLGA)。

[0077] PLGA药物递送载体已获得FDA批准,并且可以在聚合物包衣分解成克雷布斯循环中间体时洗脱多种物质。药物溶解度、生物利用度和稳定性都可以通过有机包衣改变,从而允许包封底物的药代动力学和药效学性质发生较大变化。出于肿瘤和感染治疗的目的,将IL-12包封在PLGA纳米球内可以实现全身递送和组织沉积,而无需毒性负荷剂量。带负电的表面可以被糖萼排斥,并且随着它们的较小尺寸允许在胞间隙中增加沉积,在那里它们可以不受干扰地洗脱其内容物。然而,迄今为止,尚未实现将IL-12成功包封在亚微米级PLGA颗粒中。纳米球可以通过生物体的微脉管系统 (毛细血管直径约为4-9微米) 提供安全有效的血源性传播,并且形成栓子的风险最小。

[0078] 可以通过以下方式制备具有包封蛋白质的PLGA纳米球:

通过将2.5%w/v至17%w/v的PLGA溶解于有机溶剂中来制备油相;

通过将1%w/v至3%w/v的聚乙烯醇溶解在水性溶剂中来制备水相；
将蛋白质悬浮在水性介质中；
将水性介质添加到油相中以形成第一乳液，并匀化第一乳液；
将第一乳液添加到水相中以形成第二乳液，并匀化第二乳液；
从第二乳液中蒸发有机溶剂以形成水溶液；
以及从水溶液中回收含蛋白质的PLGA纳米球。

蛋白质

[0079] 在各种实施方案中，蛋白质可以是选自以下的细胞因子：白介素、淋巴因子、单核因子、干扰素、集落刺激因子和趋化因子。细胞因子可以是白介素或非免疫细胞因子。

[0080] 细胞因子可以具有N端信号序列、包含标记为A至D的四个螺旋的四螺旋束、以及在D螺旋之后的任意的C端延伸。细胞因子可以缺乏实质性的C端延伸，并且可以是粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子、粒细胞集落刺激因子、干扰素 α -1、干扰素 β 、干扰素 γ 、干扰素 κ 、干扰素 τ -1、干扰素 ω -1或选自以下的白介素(IL)：IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-5、IL-6、IL-7、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12的 α 链、IL-12、IL-13、IL-15、IL-19、IL-20、IL-21、IL-22、IL-23、IL-24、IL-26和IL-27。

[0081] 在各种实施方案中，细胞因子可以是免疫细胞因子，其增强细胞免疫应答；或增强抗体应答。如果细胞因子是增强细胞免疫应答的免疫细胞因子，则细胞因子可以选自肿瘤坏死因子- α (TNF α)、干扰素- γ (IFN- γ)和白介素-12(其可以刺激IFN- γ 和TNF α 的产生)。如果细胞因子是增强抗体应答的免疫细胞因子，则细胞因子可以选自转化生长因子 β (TGF- β)、IL-4、IL-10和IL-13。

[0082] 在各种实施方案中，待包封在纳米球中的蛋白质可以是球状蛋白质。合适的球状蛋白质可以包括血清白蛋白；酶，例如酯酶；激素，例如胰岛素；和转运蛋白。

[0083] 在各种实施方案中，PLGA纳米球可用于包封药物活性成分；维生素；营养活性成分，例如植物化学物质；和有机染料或造影剂。PLGA纳米球可用于多种药物的受控释放，包括难溶性III类和IV类药物。

制备纳米颗粒的方法

[0084] 为了制备油相，可以将2.5%w/v至17%w/v的PLGA溶解在有机溶剂中。PLGA可含有50%至90%的交酯、65%至90%的交酯或75%至90%的交酯。有机溶剂可以是卤代C1-C3有机溶剂，例如二氯甲烷、氯仿或1,1,1-三氯乙烷；C2-C3腈溶剂，例如乙腈或丙腈；或C2-C5烷基酯溶剂，例如乙酸乙酯或乙酸丁酯；或C3至C5酮溶剂，例如丙酮或戊酮。有机溶剂可以是偶极矩在1.1与3.5之间的半极性溶剂。油相可以通过在室温(RT)下在搅动下将PLGA溶解在有机溶剂中来制备，其中搅动可以是在300至600RPM、350至550RPM或425至500RPM下。

[0085] 在各种实施方案中，可以基于PLGA中的交酯含量进行溶剂选择。如果PLGA含有75%至90%的交酯，则有机溶剂可以是卤代C1-C3有机溶剂、C2-C3腈溶剂或C2-C5烷基酯溶剂或C3至C5酮溶剂。如果PLGA含有小于75%的交酯，则有机溶剂可以是卤代C1-C3有机溶剂、乙腈或C3至C4酮溶剂。

[0086] 为了制备乳液的水相，可以将1%w/v至3%w/v的聚乙烯醇(PVA)溶解在水性溶剂中，该溶剂可以是水或缓冲盐水溶液，例如磷酸盐缓冲盐水。

[0087] 接下来，可以将蛋白质，例如IL-12或牛血清白蛋白悬浮在水性介质中，该水性介

质可以是缓冲盐水溶液,例如磷酸盐缓冲盐水,并且可以将得到的蛋白质悬浮液添加到含有PLGA的油相中,可对其进行快速搅动,例如10,000至20,000RPM;12,000至19,500RPM;13,000至19,000RPM;15,000至18,000RPM或16,000至17,500RPM,以产生第一乳液。或者,可以通过超声处理将蛋白质悬浮液添加到含有PLGA的油相中以产生第一乳液。

[0088] 然后可以在快速搅动下,例如10,000至20,000RPM;12,000至19,500RPM;13,000至19,000RPM;15,000至18,000RPM或16,000至17,500RPM;采用匀化;或用超声处理将第一乳液添加到PVA水相中,以产生第二乳液。然后可以从第二乳液中蒸发有机溶剂。可以通过离心从水性介质中回收含蛋白质的PLGA纳米颗粒,并在液氮中快速冷冻和/或冻干。

[0089] 不受任何理论的束缚,随着时间的推移使用超声处理可以通过增加纳米颗粒的数量、减小纳米颗粒的尺寸和增加纳米颗粒的均匀性来增加纳米颗粒的形成。此外,更高的超声功率也可以增加纳米颗粒的形成。然而,当暴露于超声处理时随着时间的推移蛋白质会解离,特别是在较长时间段内较高的超声功率下。因此,如本文所公开,在制备负载有蛋白质的纳米颗粒中的超声功率和时间参数可以针对单个蛋白质变化进行优化。

[0090] 当可以形成第二乳液时,蛋白质可以缠绕在PLGA基质聚合物的链中,随着有机溶剂的去除,该聚合物可以聚结并沉淀成球体。在此过程中,蛋白质可以被包埋在聚合物基质中(图1A,其中蛋白质可以是异硫氰酸荧光素标记的牛血清白蛋白[BSA-FITC])并吸附到外表面(图1B),从而产生如图1C所示的特征性双相洗脱曲线。爆发阶段可发生在基线与两天之间,这可能是由于纳米球表面上吸附的蛋白质在水性介质中重新悬浮后被释放(图1D)。受控释放阶段可能是由于包埋的蛋白质(图1D),并且随着PLGA水解,蛋白质会随时间缓慢释放。

[0091] 出于比较目的,可以使用缓冲盐水溶液代替蛋白质悬浮液进行上述过程,并将此盐水溶液添加到含有PLGA的油相中以产生第一乳液。在将此第一乳液添加到PVA水相中后,可以产生不含蛋白质的空白纳米颗粒。

[0092] 空白纳米球和负载有IL-12的PLGA纳米球可以使用上述技术合成。空白和负载有蛋白质的PLGA纳米球的形态可以通过扫描电子显微镜确定为球形的,平均颗粒直径为50nm至500nm、100至250nm、100至150nm或175至225nm。在各种实施方案中,负载有IL-12的PLGA纳米球可以具有100、150、200、300、400、500、600、700、800、900、1000nm的直径。空白,即不含蛋白质的纳米球可以具有175至225nm的直径。

ζ电位

[0093] 空白和负载有IL-12的PLGA纳米球的ζ电位也在去离子水介质中测定。ζ电位可以是介于分散介质与附着在分散颗粒上的流体静止层之间的电位差,并且在合成过程中引入12.5-25ug重组小鼠IL-12(rmIL-12)用于蛋白质负载后的范围分别为-15至-25mV。随着ζ电位幅度的增加,纳米球分散体的稳定性可以增加。

包封效率

[0094] 蛋白质可以在纳米球释放缓冲液中从纳米球上洗脱下来。可以通过以下方程使用每个洗脱曲线的曲线下面积(AUC)、颗粒浓度(PC;颗粒/mL)、合成颗粒的总体积(V,mL)以及在合成过程中添加的IL-12的总质量(mg)来估计由纳米球包封和释放的IL-12(百分比)的量(包封效率,EE):

$$EE = \left(\frac{AUC_{EP} + PC + V}{100,000 \times \text{添加的总IL-12}} \right) * 100\% \quad (1)$$

[0095] 可以通过将2亿个颗粒/mL至1000亿个颗粒/mL、3亿个颗粒/mL至500亿个颗粒/mL、4亿个颗粒/mL至200亿个颗粒/mL或5亿个颗粒/mL至10亿个颗粒/mL负载有蛋白质的PLGA纳米球分散在纳米球释放缓冲液中并且分析所得分散体随时间释放的蛋白质浓度来测量洗脱。蛋白质浓度可以是生物活性的。在IL-12的情况下,从上述颗粒浓度洗脱的rmIL-12的总量可以通过曲线下面积(AUC)分析确定为1500至4,000pg。每100,000个纳米球洗脱的IL-12的量可分别确定为0.3至0.45pg/100,000个纳米球,其中对于通过匀浆法制备的颗粒来说,在7.5亿个颗粒/mL的浓度下获得最有效的洗脱动力学,并且在10亿个颗粒/mL的浓度下获得最低效的洗脱动力学。基于方程(1),平均包封效率(EE)的范围确定为0.4%至0.5%。最高EE在7.5亿个颗粒/mL的浓度下获得。

[0096] 为了确定合成的纳米球是否真的可以包封蛋白质而不仅仅是将其吸附到外壁,合成了含有异硫氰酸荧光素标记的牛血清白蛋白的PLGA纳米球。通过共聚焦显微镜对所得纳米球进行成像以可视化内部结构。分析证实标记的BSA已成功掺入纳米球中。

全身分布

[0097] 为了确定PLGA纳米球的内容物是否在各种施用途径后全身分布并且不会造成伤害,可以将负载有荧光染料Alexa Fluor® 647的PLGA纳米球通过尾静脉静脉内或腹膜内注射到雌性小鼠体内,并通过体内成像系统来监测。两种施用途径都可以导致纳米球内容物的全身分布,如图2所示,而无任何发病或死亡迹象。

水不溶性有效载荷

[0098] 类似的技术可用于将水不溶性的药物游离碱或盐、或水不溶性染料或造影剂包封在PLGA纳米球中,其中术语“水不溶性”是指药物或盐在水中的溶解度低于在溶解PLGA聚合物的有机溶剂中的溶解度。类似的技术可用于包封可溶性药物、染料或造影剂,其中需要通过PLGA聚合物的受控释放以提供治疗上安全和有效的剂量,同时避免快速初始释放的毒副作用。

[0099] 为了制备油相,可以将2.5%w/v至17%w/v的PLGA溶解在有机溶剂,例如卤代C1-C3有机溶剂;C2-C3腈溶剂;C2-C5烷基酯溶剂;或C3至C5酮溶剂中。为了制备乳液的水相,可以将1%w/v至3%w/v的聚乙烯醇(PVA)溶解在水性溶剂中,该水性溶剂可以是水或缓冲盐水溶液,例如磷酸盐缓冲盐水。

[0100] 接下来,可以将水不溶性的药物游离碱或盐、水不溶性染料或造影剂悬浮在水性介质中,并且将所得蛋白质悬液添加到含有PLGA的油相中,可以对其进行快速搅动或超声处理以产生第一乳液。

[0101] 然后可以在快速搅动或超声处理下将第一乳液添加到PVA水相中以产生第二乳液。然后可以从第二乳液中蒸发有机溶剂。可以通过离心从水性介质中回收含有药物、染料或造影剂的PLGA纳米颗粒,并且可以冻干。

添加剂

[0102] 对纳米球制备过程的各种进一步修改可以提高包封效率,并改变纳米球的洗脱曲线。使用通过将12.5微克的IL-12悬浮在含有1.5%w/v海藻糖的1.2mL DPBS中制成的蛋白

质溶液制备纳米球可以产生具有延迟释放洗脱曲线的纳米球。初始爆发阶段可以延迟到洗脱研究开始后的第二天,但包封效率会降低。

[0103] 使用通过将12.5微克的IL-12悬浮在含有2%w/v Mg(OH)₂的1.2mL DPBS中制成的蛋白质溶液制备纳米球可以产生具有降低的包封效率的纳米球。

[0104] 使用通过将12.5微克的IL-12悬浮在1.2mL DPBS中制成的蛋白质溶液制备纳米球可以产生具有延迟释放的纳米球,该DPBS含有3%至15%、5%至12%、8%至12%或约10%对患者具有特异性的全血清、血清白蛋白、胎血清或胎血清白蛋白。初始爆发阶段可以延迟到洗脱研究开始后的第二天,并且可以提高包封效率。如果在制备纳米球之前将IL-12悬液与胎血清一起孵育24小时,则爆发阶段可以延迟到洗脱研究开始后的第三天。与全血清、血清白蛋白或胎血清进一步孵育48小时也可延长爆发阶段的洗脱并提高包封效率。对于体外研究,可以使用任何类型的血清、血清白蛋白(包括合成制造的血清白蛋白)、胎血清或胎血清白蛋白,例如胎牛血清或胎鼠血清。或者,可以使用人血清。对于可以将纳米球施用于人或非人患者的体内研究,血清或血清白蛋白的选择可以针对治疗的物种。对于牛的治疗,可以使用通过将IL-12悬浮在含有胎牛血清的DPBS中制成的纳米球。对于小鼠的治疗,应使用含有胎鼠血清的DPBS制成纳米球。对于人的治疗,可以用含有人血清的DPBS制成纳米球。将用来自一个物种的血清或胎血清处理过的纳米球施用于不同的物种会导致移植物抗宿主病。此外,如果使用全血清或收集的天然人白蛋白,则可以对每个接受这些产品的患者执行交叉匹配过程,任何血液产品都可以。在一些情况下,至少一部分治疗性物质(例如,IL-12)可以从组合物(例如,纳米球)中洗脱超过将组合物置于溶液中之后24、48、72、96、120、144、168、192、216、240、264、288、312、336小时。在一些情况下,至少一部分治疗性物质(例如,IL-12)可以从组合物(例如,纳米球)中洗脱历时将组合物置于溶液中之后约24小时至约48小时、约48小时至约72小时、约72小时至约192小时、约72小时至约168小时、约96小时至约168小时、约120小时至约168小时、约144小时至约192小时。

[0105] 在纳米球制备过程中表面活性剂的存在可以提高包封效率。可以将表面活性剂掺入含PLGA的油相中,或掺入PVA/水相中。合适的表面活性剂包括油溶性山梨糖醇酐脂肪酸酯(例如,司盘20、司盘40、司盘60和司盘80)和/或水溶性聚氧乙烯山梨糖醇酐脂肪酸酯(例如,吐温20、吐温40、吐温60和吐温80)。在各种实施方案中,纳米球可以用含有4%至20%w/w的司盘表面活性剂的含PLGA油相、含有2%至10%w/v的吐温表面活性剂的PVA/水相或这两者来制备。例如,

油相可包含4%至20%w/w司盘60、10%至16%w/w司盘60、或约14%w/w司盘60;

PVA/水相可包含2%至10%w/v吐温80、3%至8%w/v吐温80、或4%至6%w/v吐温80;或

油相可包含4%至20%w/w司盘60并且PVA/水相可包含2%至10%w/v吐温80。

[0106] 表面活性剂和胎血清两者的存在可以提高包封效率。使用通过将12.5微克IL-12悬浮在含有10%胎血清的1.2mL DPBS中制成的蛋白质溶液制备纳米球可以产生IL-12包封效率介于2%与10%之间、4%与8%之间、或5%与7%之间的纳米球。使用通过将12.5微克IL-12悬浮在含有10%胎血清的1.2mL DPBS中制成的蛋白质溶液制备纳米球可以产生IL-12包封效率介于10%与50%之间、20%与45%之间、或30%与40%之间的纳米球,所述胎血

清已在DPBS中孵育24小时。使用通过将12.5微克IL-12悬浮在含有10%胎血清和表面活性剂的1.2mL DPBS中制成的蛋白质溶液制备纳米球可以产生IL-12包封效率介于50%与95%之间、60%与85%之间、或70%与80%之间的纳米球。在各种实施方案中,使用含有细胞因子、胎血清和表面活性剂的蛋白质溶液协同地提高细胞因子在PLGA纳米球中的包封效率。

免疫表型分型

[0107] 本文公开的各种实施方案涉及一种允许医疗专业人员通过抽血或通过使用经由柳叶刀和**Microtainer®**进行针刺抽血获得的两到三滴血来系统地分析患者的免疫系统的技术。抽血可以在家中;在医疗专业人员的办公室;在诊所;或在医院进行。

[0108] 在各种实施方案中,抽血可以在家中;在医疗专业人员的办公室;在诊所;或在医院进行。抽血可以在测试地点或医疗机构进行分析。

[0109] 可以分析血液样品中天然存在于患者体内的免疫化学物质的水平,和/或向患者施用的免疫调节药物的水平。可以分析血液样品中天然存在于患者体内随时间变化的免疫化学物质水平,从而使医疗专业人员能够观察治疗方案对免疫化学物质水平的影响。可以定期进行抽血并分析,使医疗专业人员能够在治疗过程中评估免疫状态或免疫表型的变化。

[0110] 参看图11,有四种主要的免疫表型正在考虑中:

抑制,例如由癌症、自身免疫性疾病或感染诱导的免疫抑制;

基线,例如无病对象的免疫状态;

免疫系统受到刺激而高于基线水平;以及

耗竭,一种威胁生命的免疫系统过度激活状态,称为免疫细胞

耗竭(TCE),以淋巴细胞无能、全身炎症反应综合征和/或器官衰竭为特征。

[0111] 图11示出了在用多种免疫调节疗法治疗期间骨肉瘤癌症患者的免疫表型的变化。由于癌症诱导的免疫抑制,患者的初始免疫表型为抑制。程序性细胞死亡配体1(PD-L1)在骨肉瘤期间频繁表达,因此可以施用针对PD-L1的抗体(抗PD-L1)。参看图11,线A。白介素-12(IL-12)已被证明可抑制骨肉瘤中的肿瘤生长,因此游离IL-12可作为免疫调节剂来施用。参看图11,线C。

[0112] 在时间T1时,抗PD-L1似乎对改变患者的免疫表型无效,而IL-12似乎已将免疫表型改变为刺激。然而,在时间T2时,随着治疗的进展,IL-12会引起毒副作用,将患者的免疫表型变为耗竭。在时间T2时,抗PD-L1将患者的免疫表型改变为基线,在不刺激免疫系统对抗癌症的情况下对抗癌症诱导的免疫抑制。

[0113] 如图11,线B所见,将抗PD-L1与低剂量的IL-12在PGLA纳米球中组合施用可以刺激免疫系统对抗癌症,而不会导致免疫系统过度激活。因此,随时间监测免疫表型允许执业医师调整免疫调节疗法以提供免疫刺激而不会有T细胞耗竭。

[0114] 可以将与对癌症疗法的免疫应答相关的数据输入数据库中。例如,参看图11,对于患有抑制或过度刺激免疫系统的第一疾病的任何给定患者,可以将以下信息输入数据库:

a) 疾病类型;

b) 治疗前的免疫表型;

c) 对第一疾病施用的治疗;

d) 免疫表型随时间变化的变化;

- e) 临床结果;
- f) 患者为第二疾病服用的药物;
- g) 疾病阶段或疾病水平;
- h) 医学合并症;以及
- i) 患者年龄。

[0115] 这些参数中任何一个的变化都会影响其他参数。例如,如果接受针对影响免疫系统的第一疾病的治疗的患者在开始治疗后被诊断患有第二疾病,即医学合并症,则第二疾病的病原体或第二疾病的症状会影响:

- 第一疾病治疗的临床结果,
- 患者免疫表型随时间的变化,
- 第一疾病的阶段或水平,和/或
- 针对第一疾病施用的治疗的效果。

[0116] 类似地,第一疾病的疾病阶段或疾病水平的变化,例如癌症从2期进展到3期,可以影响随时间变化的患者的免疫表型、第一疾病的治疗方案和治疗第一疾病的临床结果。

[0117] 因此,该数据库将包括有关使用免疫调节药物治疗多种疾病的信息,并允许预测患有该疾病的特定患者将如何对给定的免疫调节疗法作出应答。

[0118] 使用这样的数据库可以让医疗专业人员预测患者免疫系统对给定疾病状态的应答,并预测患者免疫表型在疾病或治疗过程中的变化。该数据库将用于治疗、监测和诊断许多疾病,包括癌症、自身免疫性疾病和感染。随着免疫调节剂变得越来越普遍,这样的数据库能够评估免疫系统在疾病发病机制中特定时间下的状态,并预测哪种免疫调节治疗对治疗该疾病最有效。

[0119] 从患者的抽血或指刺抽血中获得的每个血液样品都可以在抽血时就患者的免疫表型进行分析。分析结果以及有关患者疾病状态和当前治疗(如果有的话)的信息可以与数据库中存在的数据进行比较,以制定最有可能有效调节患者免疫表型的治疗计划。可以定期进行抽血并分析,使医疗专业人员能够在治疗过程中评估免疫状态或免疫表型的变化。来自当前患者的数据可以添加到数据库中,从而可能改善对其他患者的评估。这对于分析具有复杂免疫分型的患者血液具有巨大的商业潜力,无论分析是针对癌症、感染还是自身免疫性疾病。可以通过免疫表型分型交叉引用疾病而创建的数据库将成为未来治疗患者的有力工具。该数据库将是一个活数据库,可以不断更新有关免疫表型分型和治疗状态的信息。患者血液样品的免疫表型分型涉及适当分析和评估数据的能力。此系统将允许在若干种疾病状态下进行适当的给药、治疗和校正。随着数据收集的增加,不断增长的数据库也将能够帮助指导医疗专业人员在最广泛意义上进行诊断、治疗和免疫治疗剂给药。

[0120] 尽管已经具体参考其某些示例性方面详细描述了各种示例性实施方案,但是应理解,本公开内容可以具有其他实施方案并且其细节能够在各种明显的方面进行修改。如对本领域技术人员显而易见的是,变化和修改可以在保持在本公开内容的精神和范围内的同时实现。因此,前述公开、描述和附图仅用于说明目的并且不以任何方式限制仅由权利要求限定的公开内容。

[0121] 如F部分中所讨论,在免疫活性K7M2原位鼠骨肉瘤模型中,对负载有IL-12的PLGA纳米球对转移的影响进行了探索。据观察,无论剂量如何,nIL-12治疗的小鼠都比未治疗的

小鼠表现出明显更好的结果。此外,转移率的降低与截肢时外周血中NK细胞百分比的增加有关。观察到血液免疫表型的特定组分(NK细胞百分比>8.21%)可能在如此早期的临床时间点(截肢)下区分完全应答者与无应答者,具有明显的临床意义。这为消息灵通的假设生成提供了坚实的基础。事实上,游离rmIL-12毒性研究强调了IL-12诱导的对BALB/c小鼠具有特异性的毒性,这些毒性可以与nIL-12治疗一起进行调查,即TCE状态、PMN-MDSC髓细胞增多症和NK细胞耗竭。这确定了游离rmIL-12诱导了BALB/c全身免疫表型的明显变化。此外,可以证明nIL-12疗法可以有效对抗转移性OS肿瘤并降低疾病复发的机会。此外,监测外周血中的NK细胞百分比可以提供有关对nIL-12的应答和结果的信息。这些数据支持这样一个事实,即全身免疫表型分型和实验性免疫疗法可以携手使用,为转移性OS生成有效的免疫治疗方案。

[0122] 尽管本文已经示出和描述了本公开内容的各种实施方案,但对于本领域技术人员容易理解的是,此类实施方案只是以示例的方式提供。本领域技术人员可以在不偏离本发明的情况下想到许多更改、改变和替代。应当理解,可以采用针对本文所述的本公开内容的实施方案的各种可替代方案。

实施例

[0123] 在以下实施例中,二氯甲烷(DCM,#320269)、PLGA(Resomer RG 756 S,75%交酯,#719927)、NaCl(#7647-14-5)和聚(乙烯醇)(#341584)购自Sigma Aldrich(St.Louis,MO)。异硫氰酸荧光素标记的牛血清白蛋白(BSA-FITC,#A23015)、青霉素-链霉素(Pen-Strep,10,000U/ml,#15140122)和Alexa Fluor® 647羧酸,三(三乙铵)盐购自Thermofisher Scientific(Waltham,MA)。重组小鼠IL-12(p70,rmIL-12,#577008)和小鼠IL-12 ELISA MAX deluxe ELISA试剂盒(#433606)购自Biolegend(San Diego,CA)。

[0124] Gibco美国来源的合格热灭活胎牛血清(HI-FBS,#MT35011CV)和杜氏磷酸盐缓冲盐溶液1X(DPBS,#21031CV)购自Fisher Scientific(Pittsburgh,PA)。

[0125] 雌性BALB/c小鼠(6-8周龄)(#000651)购自Jackson Laboratory(Bar Harbor,ME)。

A部分. IL-12稳定性研究

实施例1. IL-12在酸性和碱性溶液中的稳定性。

[0126] 为了确定IL-12是否可以处理PLGA纳米球的酸性纳米环境,测试了在暴露于不同pH的溶液三小时后生物活性重组小鼠IL-12的回收。具体而言,IL-12在pH 1的溶液、pH 3的溶液、pH 7.4的溶液、pH 11的溶液和pH 13的溶液中孵育3小时。结果示于表1中。使用酶联免疫吸附测定法(ELISA)测定所回收的活性IL-12相对于初始浓度的百分比,以确定呈其天然构象的蛋白质的量,从而确定其生物活性构象。

表1. 随pH变化的IL-12稳定性

pH	IL-12回收率(%)
1	0% ± 0%
3	39.7% ± 8.44%
7.4	100% ± 0%
11	96.6% ± 6.08%
13	0% ± 0%

[0127] 如表1所示,IL-12在pH值7.4~11下具有良好的稳定性,并且在此范围外可进行变性。

实施例2. IL-12在有机溶剂中的稳定性

[0128] 合成PLGA纳米球的双重乳液法可以包括将PLGA溶解在有机溶剂中。因此,在几种不同极性的非质子溶剂中测试了IL-12的稳定性。所测试的有机溶剂按亲水性增加的顺序为二氯甲烷(DCM)、乙酸乙酯(EA)和丙酮(AC)。虽然DCM能很好地溶解PLGA,但它也是最疏水的,因此对IL-12的生物活性影响最大。PLGA难溶于丙酮,但这种溶剂极性最强,因此对IL-12的生物活性影响最小。

[0129] 将IL-12添加到1:1的溶剂和磷酸盐缓冲盐溶液中,并且搅动至完全去除有机溶剂;然后使用ELISA测定剩余的生物活性IL-12的浓度,并表示为相对于初始浓度的百分比。结果示于表2中。有趣的是,AC对蛋白质的不利影响最大,仅回收了43% (SE=1.06%),而EA的回收率最高,为63% (SE=0.77%);DCM留下大约一半的呈其天然形式的蛋白质(49%, SE=0.55)。

表2. 随有机溶剂变化的IL-12稳定性

溶剂	IL-12 回收率(%)
DCM	49% ± 0.55%
EA	63% ± 0.77%
AC	43% ± 1.06%

[0130] 除非另有说明,否则DCM在其他实施例中用于制备纳米球批次。尽管使用DCM作为溶剂会降低蛋白质回收率,但与乙酸乙酯相比,DCM可以更好地溶解PLGA并产生更好的纳米球形态。

实施例3. 超声处理后IL-12的稳定性

[0131] 为了在合成PLGA纳米球时形成乳液,可以对IL-12进行两次超声处理。纳米球制备过程中的超声处理可以产生更均匀且更小的纳米球。然而,像IL-12这样的敏感蛋白质在受到强烈搅动时会变性。

[0132] 因此,测试了各种超声功率和时间以确定用于负载有IL-12的PLGA纳米球合成的合适条件。将IL-12悬浮在磷酸盐缓冲盐溶液中,并在30瓦、40瓦或50瓦下进行超声处理。超声处理的持续时间是10、20、30、40或60秒,并与基线进行比较。然后使用ELISA测定超声处理后剩余的生物活性IL-12浓度,并以相对于初始浓度的百分比表示。发现IL-12对时间比对功率更敏感,因为对于所有功率而言,30秒后的蛋白质回收率小于10%,如图3所见。各种负载有IL-12的批次的扫描电子显微镜(SEM)图像示于图4A至图4C中。图3中的方框表示回收最多蛋白质的时间/瓦数的组合,即在30瓦至50瓦下超声处理5至30秒。

[0133] 除非另有说明,否则在后续实施例中通过超声处理制备的纳米球使用以下方式制备:

- 在30瓦下超声处理10至20秒;
- 在40瓦下超声处理10至15秒;或

在50瓦下超声处理10至15秒。

B部分. 对PLGA纳米球的研究

实施例4. PLGA纳米球的合成

[0134] 为了制备油相,使用磁力搅动棒以500RPM在室温下将800mg PLGA溶解在32ml DCM中两小时。

[0135] 为了制备乳液的水相,将2400mg PVA和96mg NaCl溶解在120ml去离子水中并在标准厨房微波炉中在设置HIGH下微波加热10秒,直到澄清。然后将水相在冰上冷却。

[0136] 第一乳液(w1)通过将待包封的材料悬浮在1.2mL DPBS中制成,并将所得悬浮液添加到油相中,使用组织匀浆器以17,500RPM搅动6分钟。在冰上进行搅动。作为对照,制备了没有包封材料悬浮在DPBS中的空白颗粒。

[0137] 通过将第一乳液缓慢倒入120ml水相中形成第二乳液(w2)。在添加第一乳液期间,水相用组织匀浆器以17,500RPM搅动。在添加第一乳液后,继续搅动总共8分钟。然后将所得悬浮液用磁力搅动棒以750RPM搅动16小时以蒸发有机溶剂。

[0138] 一旦溶剂蒸发,便将所得溶液以3500RPM离心3次;在每个离心步骤之后,可以回收并重新悬浮纳米球沉淀,同时可以收集在离心过程中产生的上清液并储存在冰上。然后将纳米球在4摄氏度下经由以20,000RPM超速离心40分钟来洗涤两次,在液氮中快速冷冻,并在-20摄氏度下储存。

[0139] 然后将纳米球在真空下冻干以从纳米球中去除水。

[0140] 获得的纳米球的性质总结在表3中。包含FITC标记的BSA的纳米球(如表3中所述)通过共聚焦显微镜成像以可视化内部结构。如图5A所示,Z-层叠分析证实FITC标记的BSA已成功掺入纳米球中。

[0141] 空白(图4A至图4C)和负载有IL-12(图5B和图5C)的PLGA纳米球的形态通过扫描电子显微镜(SEM)确定为球形,平均粒径分别为 201.7 ± 6.7 nm(图6A)和 138.1 ± 10.8 nm(图6B)。还测定了空白和负载PLGA纳米球的 ζ 电位,电压幅度分别从 -21.3 ± 0.808 mV(图6C)降至 -15.1 ± 1.249 mV(图6D)。

[0142] 使用上述程序还成功地制备了含有Alexa 647染料和异硫氰酸荧光素标记的牛血清白蛋白(BSA-FITC)的纳米球。

表3. 纳米球性质

包封材料	量/1.2 mL DPBS	纳米球直径 (nm)	ζ 电位 (mV)	纳米球浓度(颗粒/mL)
无	--	201.7 ± 6.7	-21.3 ± 0.81	$6.49 \times 10^9 \pm 6.19 \times 10^8$
Alexa 647	5 mg	--	--	--
BSA-FITC	5 mg	--	--	--
IL-12	0.025 mg	138.1 ± 10.8	-15.1 ± 1.25	$1.66 \times 10^9 \pm 4.45 \times 10^8$

实施例5. 纳米球IL-12洗脱曲线

[0143] 通过实施例4的工艺获得包封IL-12的PLGA纳米球。在500 μ l的纳米球释放缓冲液(NRB、10%HI-FBS和100个单位/ml Pen-Strep,在DPBS中)中制备三种不同浓度(5亿个颗粒/mL、7.50亿个颗粒/mL和10亿个颗粒/mL)的负载有IL-12的PLGA纳米球。然后将悬浮液在4 $^{\circ}$ C下离心15分钟以沉淀纳米球,之后取出250 μ l上清液的等分试样并在4 $^{\circ}$ C下储存。然后在冰上,将250 μ l NRB添加到沉淀中,使总体积恢复到500 μ l,将其重新悬浮并在37 $^{\circ}$ C下在持续搅动(750RPM)下孵育24小时。在12天内(1个时间点样品/24小时)对总共12个样品重复此过程。在通过ELISA测定IL-12浓度之前,将每个等分试样在4摄氏度下储存至少24小时以与释放缓冲液平衡。通过ELISA分析等分试样随时间释放的生物活性IL-12的浓度。

[0144] 通过ELISA和随后的曲线下面积(AUC)分析测定洗脱的IL-12的总量为:

在5亿个颗粒/mL的纳米球浓度下,1907.66 \pm 162.00pg,

在7.5亿个颗粒/mL的纳米球浓度下,3329.77 \pm 162.67pg,以及

在10亿个颗粒/mL的纳米球浓度下,3415.64 \pm 848.94pg。

[0145] 每100,000个纳米球洗脱的IL-12的量被测定为:

在5亿个颗粒/mL的纳米球浓度下,0.3815 \pm 0.03240pg/100,000个颗粒,

在7.5亿个颗粒/mL的纳米球浓度下,0.4440 \pm 0.02169pg/100,000个颗粒,以及

在10亿个颗粒/mL的纳米球浓度下,0.3416 \pm 0.08489pg/100,000个颗粒。

[0146] 7.5亿个颗粒/mL样品报告了三种测试浓度中最有效的洗脱动力学。

[0147] 如图7A所见,在7.5亿个颗粒/mL的纳米球浓度下随时间变化洗脱的IL-12浓度显著大于在5亿个颗粒/mL的纳米球浓度下随时间变化洗脱的IL-12浓度。然而,在7.5亿个颗粒/mL的纳米球浓度下随时间变化的IL-12洗脱与在10亿个颗粒/mL的纳米球浓度下随时间变化的IL-12洗脱几乎没有区别。也如图7A所见,IL-12纳米颗粒显示双相洗脱曲线,其中爆发阶段持续约2天,持续释放阶段从约第3天持续到第11天。此外,在7.5亿个颗粒/mL的纳米球浓度下随时间洗脱的IL-12总量可以比在5亿个颗粒/mL的纳米球浓度下洗脱的IL-12总量高约75%。然而,在10亿个颗粒/mL的纳米球浓度下洗脱的IL-12总量仅比在7.5亿个颗粒/mL浓度下洗脱的IL-12总量高约2.6%。如图7B所见,随时间的变化每100,000个颗粒洗脱的IL-12浓度在7.5亿个颗粒/mL的纳米球浓度下可以大于在500,000个颗粒/mL或10亿个颗粒/mL的浓度下。

[0148] 如图7C所示,使用方程1,使用所研究的三种不同颗粒浓度的每个洗脱曲线的曲线下面积(AUC)计算负载有重组小鼠IL-12(rmIL-12)的纳米球的包封效率(EE)。每100,000个纳米球中洗脱的IL-12的量在5亿个颗粒/mL的纳米球浓度下测定为0.44%,在7.5亿个颗粒/mL的纳米球浓度下为0.50%,且在10亿个颗粒/mL的纳米球浓度下为0.39%。平均包封效率(EE)可以是0.443% \pm 0.0551%。由于与测试浓度的洗脱动力学不同,报告了所有三种浓度的EE,随后取平均值以反映整体EE。

[0149] 基于上述数据,将纳米球浓度增加到超过7.5亿个颗粒/mL并不能显著增加药物的洗脱曲线,这可能是由于在高颗粒浓度下包封效率降低的缘故。然而,这可能是由于体外洗脱颗粒在小体积(500 μ L)的洗脱溶剂中的限制。随着纳米球浓度增加到超过7.5亿个颗粒/mL,在更大体积中的洗脱,例如更大体积的体外洗脱溶剂或体内血液供应,可以提供增加的洗脱曲线。

实施例6. 体内负载有Alexa 647的PLGA纳米球底物的生物分布

[0150] 将如表1中所述负载有荧光染料Alexa 647的PLGA纳米球注射到雌性BALB/c小鼠中。在第一组小鼠中,将负载有染料的PLGA纳米球通过尾静脉静脉内注射。在第二组小鼠中,将负载有染料的PLGA纳米球腹膜内注射。通过IVIS成像在76分钟时期内监测染料分布。在注射后35分钟,两种施用途径均导致纳米球内含物的全身分布,如图2所示。静脉内注射导致标记染料在对象小鼠体内的广泛分布。腹膜内注射导致标记染料在受试小鼠腹腔内的局部分布,其中染料在腹腔内的分布最强烈。分布发生时没有任何发病或死亡的迹象。

C部分.对用超声处理的PLGA纳米球的研究

实施例7.在超声处理下PLGA纳米球的合成

[0151] 为了制备油相,在室温下将250mg PLGA溶解在1.51ml DCM中。将1g PVA溶解在100ml去离子水中以形成水相。然后将水相在冰上冷却。通过将12.5微克IL-12悬浮在约20±6微升DPBS中并将所得悬浮液添加到油相中并以30至50瓦超声处理10至20秒制得第一乳液(w1)。

[0152] 通过将第一乳液缓慢添加到5ml水相中形成第二乳液(w2)。在添加第一乳液期间,水相在30至50瓦下经受超声处理10至30秒。然后将所得悬浮液用磁力搅动棒以1,000RPM搅动3小时以蒸发有机溶剂。

[0153] 一旦溶剂蒸发,便通过在4摄氏度下以10,000g进行15分钟的超速离心处理三次,从所得溶液中回收纳米球,在液氮中快速冷冻,并在-20摄氏度下储存。

[0154] 然后将纳米球在真空下冻干以从纳米球中去除水。

[0155] 图8A示出了在30瓦的超声功率和10秒至20秒的超声时间范围内使用超声处理制备的负载有IL-12的纳米球(表2的批次30W10S、30W15S和30W20S)。

[0156] 图8B示出了在40瓦的超声功率和10秒至15秒的超声时间范围内使用超声处理制备的负载有IL-12的纳米球(表2的批次40W10S和40W15S)。

[0157] 图8C示出了在50瓦的超声功率和10秒至15秒的超声时间范围内使用超声处理制备的负载有IL-12的纳米球(表2的批次50W10S和50W15S)。

[0158] 如表4所见,以30瓦至50瓦的功率超声处理10至20秒通常产生负载有IL-12的PLGA纳米球,其包封效率为约5%至约10%,且 ζ 电位介于-30与-40mV之间。

表4. 超声处理条件对纳米球性质的影响

超声功率	颗粒批次	超声时间	包封效率(%)	ζ 电位(mV)
30 W	30W10S	10 秒	9.67 ± 4.25	-36.15 ± 2.25
	30W15S	15 秒	7.60 ± 3.45	-38.15 ± 4.75
	30W20S	20 秒	4.84 ± 0.80	-31.75 ± 6.35
40 W	40W10S	10 秒	6.23 ± 1.29	-31.55 ± 8.35
	40W15S	15 秒	6.92 ± 0.44	-33.55 ± 7.35
50 W	50W10S	10 秒	8.80 ± 1.88	-36.35 ± 2.85
	50W15S	15 秒	5.20 ± 3.10	-35.50 ± 4.90

实施例8.用超声处理制备的PLGA纳米球的洗脱

[0159] 通过实施例5的程序测试表2中所示的负载有IL-12的纳米球的洗脱特征。通过ELISA测定每天的蛋白质浓度,并使用原始洗脱曲线下的面积确定释放的总蛋白质。

[0160] 通过上述程序获得的洗脱曲线示于图9中。表2中每批次的洗脱曲线显示具有初始爆发阶段和持续释放阶段的双相曲线。爆发阶段可能是由于纳米球表面上吸附的蛋白质在水性介质中重新悬浮后释放的缘故,而受控释放阶段可能是由于蛋白质包埋在PLGA基质中。如图8所见,对于恒定的超声处理时期,例如10秒,在爆发阶段期间药物释放的初始速率随着超声处理功率的增加而降低。在以30W功率超声处理10秒的批次(30W10S)中,60%至65%的IL-12可在一天内洗脱。在以50W功率超声处理10秒的批次(50W10S)中,一天内可洗脱小于50%的IL-12。这表明纳米球核心中PLGA基质内蛋白质的百分比随着超声功率的增加而增加。

D部分.搅动速度对PLGA纳米球的影响

实施例9.

[0161] 为了制备油相,使用磁力搅动棒以500RPM在室温下将800mg PLGA溶解在32ml DCM中两小时。

[0162] 为了制备乳液的水相,将2400mg PVA和96mg NaCl溶解在120ml去离子水中并在标准厨房微波炉中在设置HIGH下微波加热10秒,直到澄清。然后将水相在冰上冷却。

[0163] 通过将25微克IL-12悬浮在1.2mL DPBS中制成IL-12悬浮液。

[0164] 如实施例4中所述制备纳米球。

[0165] 为了观察搅动速度对IL-12在PLGA纳米球中的包封效率的影响,以及IL-12从PLGA纳米球中的洗脱曲线,在制备第一乳液和第二乳液期间以13,125RPM;15,312RPM;17,500RPM;19,688RPM;21,875RPM;24,063RPM;和26,250RPM的速度进行搅动。随搅动速度变化的包封效率示于表5中。

表5.随搅动速度变化的包封效率

在组织匀浆器上的设置	搅动速度(RPM)	包封效率(%)
3	13,125	0.68
3.5	15,312	0.50
4	17,500	2.06
4.5	19,688	0.94
5	21,875	0.70
5.5	24,063	0.50
6	26,250	0.15

[0166] 如图10所见,在7.5亿个颗粒/mL的纳米球浓度下,使用高速搅动而非超声处理制

备的PLGA纳米球中IL-12的洗脱曲线可能高度依赖于搅动速度。在17,500RPM下的搅动提供高包封效率,并且在12天时期内总药物释放约为4500pg IL-12。在约13,000至约20,000RPM下的搅动在12天时期内产生约3500pg IL-12或更多的可接受的药物释放。在大于约22,000RPM下的搅动提供低包封效率,并且在12天时期内的总药物释放小于3,000pg IL-12。产生负载有IL-12的PLGA纳米球的最佳搅动速度可为约17,500RPM。

E部分. 纳米球对可溶性细胞因子释放的影响

实施例10. 游离IL-12与纳米球包封的IL-12的释放

[0167] 骨肉瘤(OS)在小鼠中诱导全身免疫抑制,这可以通过检查点阻断剂抗PD-L1来逆转,如图11所示。使用抗PD-L1,其全身免疫表型恢复到基线状态,缓解了OS的免疫抑制。然而,基线状态并不能提供足够的免疫刺激来有效降低晚期OS小鼠的肿瘤负荷。参看图11,线A。然而,在利妥昔单抗/IL-12组合疗法的II期研究中,IL-12作为游离肽施用,用于复发和难治性非霍奇金淋巴瘤(NHL)的患者表现出剂量限制毒性(DLT)的迹象。其免疫状态或免疫表型被推到刺激水平之外,并且进入威胁生命的免疫系统过度激活状态,称为免疫细胞耗竭。参看图11,线C。目标是刺激免疫系统高于基线水平,而不会过度刺激或免疫细胞耗竭。

[0168] 然而,在抗PD-L1检查点阻断提供活化T细胞去抑制的背景下,低剂量的IL-12(通常被认为是安全的)从水解PLGA纳米球(IL-12-NS)中缓慢而持续地递送到全身性肿瘤大环境可以提供全身性刺激以有效降低肿瘤负荷,同时仍保持在耗竭阈值以下,如图11线B所示。实时免疫表型监测平台,如本文所述的平台,将对此应用具有相当大的价值。

[0169] 因此,使用可生物降解的PLGA纳米球作为可溶性药物的递送媒介物可以实现治疗有效低剂量的施用。这在药物的有效剂量与毒性剂量之间的差异很小的情况下是有用的。

E部分. 纳米球添加剂对可溶性细胞因子释放的影响。

实施例11.

[0170] 制备了七批次含有药物IL-12的纳米球。按照实施例5的程序,在50瓦的功率下超声处理10秒,得到这些批次的洗脱曲线。

[0171] 第一批次按照实施例7的程序制得,使用通过将12.5微克IL-12悬浮在约20±6微升DPBS和PVA/水相中制得的蛋白质溶液。不包括实施例7中未列出的添加剂。在通过实施例5的方法洗脱第一批次时,药物释放具有持续1至2天的初始爆发阶段,并且在第二天达到-P65,000pg/mL的峰值IL-12浓度,如图12所示。

[0172] 第二批次按照实施例7的程序制得,不同的是使用通过将12.5微克IL-12悬浮在约20±6微升含有1.5%w/v海藻糖的DPBS中制得的蛋白质溶液。对于第二批次,药物释放具有持续3天的初始爆发阶段,并且在第三天达到-P75,000pg/mL的峰值IL-12浓度。如图12所见,与未使用额外添加剂制成的纳米球的药物释放相比,用于制造纳米球的蛋白质溶液中海藻糖的存在显著增加了总体药物释放(测量为曲线下面积)。

[0173] 第三批次按照实施例7的程序制得,不同的是使用通过将12.5微克IL-12悬浮在约20±6微升含有2%w/v Mg(OH)₂的DPBS中制得的蛋白质溶液。在通过实施例5的方法洗脱第三批时,药物释放具有持续1天的初始爆发阶段,并且峰值IL-12浓度为-P10,000pg/mL。如图12所见,与未使用额外添加剂制成的纳米球的药物释放相比,用于制造纳米球的蛋白质溶液中存在Mg(OH)₂减少了总体药物释放。

[0174] 对于第四批次,按照实施例7的程序制备纳米球,使用通过将12.5微克IL-12悬浮

在约 20 ± 6 微升含有10%胎牛血清(FBS)的DPBS中制得的蛋白质溶液。通过实施例5的方法洗脱时,药物释放具有持续3天的初始爆发阶段,并且在第二天达到 $-P115,000\text{pg/mL}$ 的峰值IL-12浓度。与未使用额外添加剂制成的纳米球的药物释放相比,蛋白质溶液中存在10%FBS显著增加了总体药物释放(测量为曲线下面积),如图13所示。

[0175] 对于第五批次,按照实施例7的程序制备纳米球,使用通过将12.5微克IL-12悬浮在约 20 ± 6 微升含有10%胎牛血清(FBS)的DPBS中制成的蛋白质溶液,其中蛋白质溶液在产生纳米球之前孵育24小时。在通过实施例5的方法洗脱时,药物释放具有持续3天的初始爆发阶段,并且在第三天达到 $-P105,000\text{pg/mL}$ 至 $-P110,000\text{pg/mL}$ 的峰值IL-12浓度。如图13A所见,与未使用额外添加剂制成的纳米球或在没有孵育步骤下使用FBS制成的纳米球的药物释放相比,蛋白质溶液中存在10%孵育的FBS显著增加了从纳米球中释放的总体药物(测量为曲线下面积)。如图13B的凝胶洗脱中所见,在产生纳米球之前将蛋白质溶液孵育48小时导致IL-12的总释放减少,并降低了包封效率。

[0176] 对于第六批次,按照实施例7的程序制备纳米球,使用:

含有4%w/v吐温80的PVA/水相;和

含有14%w/v司盘60的油相。

通过实施例5的方法洗脱时,药物释放具有持续1天的初始爆发阶段,并且IL-12峰值浓度为 $-P120,000\text{pg/mL}$ 至 $-P125,000\text{pg/mL}$ 。如图14所见,与未使用额外添加剂制成的纳米球的药物释放峰值相比,蛋白质溶液中吐温80和司盘60表面活性剂的存在使纳米球的药物释放峰值增加了约2倍。吐温80的存在也大大增加了总体药物释放。

[0177] 对于第七批次,按照实施例7的程序制备纳米球,使用:

含有10%w/v FBS和4%w/v吐温80的PVA/水相;和含有14%w/v司盘60的油相。

通过实施例5的方法洗脱时,药物释放具有持续1天的初始爆发阶段,并且峰值IL-12浓度为约 $-580,000\text{pg/mL}$ 。如图14所见,与未使用额外添加剂制得的纳米球的 $-65,000\text{pg/mL}$ 的峰值药物释放相比,蛋白质溶液中FBS和表面活性剂的存在使纳米球的药物释放峰值增加了约9倍。FBS和吐温80的存在还:

使得与单独使用FBS制成的纳米球的 $-115,000\text{pg/mL}$ 的峰值药物释放相比,纳米球的峰值药物释放增加了约4.5倍;并且使得与单独使用吐温80制成的纳米球的 $-120,000\text{pg/mL}$ 的峰值药物释放相比,纳米球的药物释放峰值增加了约4.5倍。

表6. 纳米球添加剂对药物释放和包封效率的影响。

添加剂	药物释放			EE (%)	ζ 电位 (mV)
	总计(pg)	峰值 (pg/mL)	每 100,000 个颗粒 (pg)		
无	289135.30	65,000	.5782	8.8	-36.35
海藻糖	207386.3905	75,000	0.414	5.79	-38.95
Mg(OH) ₂	26065.70647	10,000	0.0521	2.19	-22.4
FBS	285394.6775	-115,000	0.571	6.67	-36.6
FBS (孵育 24 h)	654806.6577	-110,000	1.31	35.71	-39.7
表面活性剂 *	419307.8952	-120,000	0.839	17.39	-32.5
表面活性剂 * + FBS	1341061.532	-580,000	2.68	87.54	-35.6

*吐温80+司盘60

[0178] 这些改性的纳米球批次的峰值药物释放、总药物释放、药物释放/100,000个颗粒、包封效率(EE)和 ζ 电位记录在表6中。如这个表中所示,通过在选自海藻糖、FBS、FBS伴随24小时孵育、表面活性剂或其混合物的添加剂存在下制备纳米球,可以增加药物IL-12从纳米球中洗脱之后的峰值药物释放和总体药物释放。此外,FBS伴随24小时孵育、表面活性剂或FBS和表面活性剂的混合物导致包封效率的显著提高。通过在FBS和表面活性剂两者的存在下制备纳米球,可以协同增加洗脱后的药物峰值释放和总体药物释放。

[0179] 如图15A和15B中所见,将其中溶液在50W下超声处理10秒(50W10S)、FBS不伴随孵育(“基线”) (B)、FBS伴随24小时孵育(24H)和FBS伴随48小时孵育(48H)的纳米球的批次以洗脱百分比(图15A)和总洗脱百分比(图15B)进行比较。总百分比允许准确比较洗脱曲线与改性的批次。这些数字的值见于表7中。50W10S洗脱与基线和孵育批次的比较示于表8中。

表7. 在14天内10mg的凝胶洗脱总量和包封效率

	总 计 (pg/mL)	总 计 (ng/mL)	ng/mL/批次	包封%
基线 FBS.1	302893.6686	302.8936686	2398.917855	9.59567142
基线 FBS.2	430181.3177	430.1813177	2529.466148	10.11786459
基线 FBS AVG	366537.4931	366.5374931	2464.192001	9.856768006
孵育: 24.1h	717214.2512	717.2142512	1738.527345	6.954109379
孵育: 24.2h	964011.074	964.011074	2336.762843	9.347051374
孵育: 24h AVG	840612.6626	840.6126626	2037.645094	8.150580376
孵育: 48.1h	475557.718	475.557718	1339.170534	5.356682136
孵育: 48.2h	660407.1071	660.4071071	1859.706414	7.438825655
孵育: 48h AVG	567982.4126	567.9824126	1599.438474	6.397753896
MSA/SURF.1	1630803.835	1630.803835	7032.026137	28.12810455
MSA/SURF.2	1217626.815	1217.626815	4928.953348	19.71581339
MSA/SURF AVG	1424215.325	1424.215325	5980.489742	23.92195897
FBS/SURF.1	1149762.568	1149.762568	10393.85362	41.57541446
FBS/SURF.2	1370583.004	1370.583004	10175.20823	40.7008329
FBS/SURF AVG	1260172.786	1260.172786	10284.53092	41.13812368

表8. 洗脱值的比较

T 检验对比 50W10S 第 1-5 天	
基线	0.37672959
孵育 24H	0.06955482
孵育 48H	0.03852793
MSA/SURF	0.03007545
FBS/SURF	0.02631816
T 检验 B 对比 24/48 第 1-5 天	
孵育 24H	0.03282131
孵育 48H	0.00907923
T 检验 24 对比 48 第 1-5 天	
孵育 24H 对比孵育 48H	0.02050595

F部分. 负载有IL-12的聚(乳酸-共-乙醇酸) (PLGA) 纳米球对免疫活性K7M2原位鼠骨肉瘤模型的转移和治愈率的影响

小鼠

[0180] 从Jackson Laboratory获得4-5周龄的雄性和雌性BALB/c小鼠(库存编号: 000651)并单独饲养在通风的Allentown笼中,在无特定病原体的设施内的玉米芯垫料上,12小时光/暗循环,自动lixit水和随意获取食物。所有实验均经实验动物护理和使用委员会(Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC)批准。

OS荷瘤小鼠的体内成像系统 (IVIS) 成像

[0181] 从可触及的原发性肿瘤的第一个迹象起开始对动物进行IVIS成像,且此后每周使用IVIS Spectrum CT成像系统(PerkinElmer Life Sciences, Waltham, MA)和Living Image 4.5版软件监测疾病负担。在每个节段中,小鼠接受150mg/kg i.p. D-荧光素(Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA);为了观察肺中的转移性疾病,小鼠额外接受了15mg/kg的鼻内D-荧光素(约30 μ L)。在预定的最大生物发光区间内使用自动曝光捕获图像。

流式细胞术 (FC)

[0182] 用红细胞(RBC)裂解溶液(Miltenyi Biotec, Auburn, CA)裂解红细胞。根据制造商说明书,将单细胞悬液分离并与优化的淋巴(L)和髓系(M)抗体组一起孵育;每个样品最少分析1x 10⁴个事件。

组织学

[0183] 对安乐死时没有IVIS阳性肺转移的所有nIL-12治疗小鼠的肺进行组织学检查;通过组织学和IVIS阳性的组合来评估未治疗对照组的转移率。安乐死后立即整块收集nIL-12治疗小鼠的肺,置于中性缓冲福尔马林中,并安装在切片机上;每250 μ m获取50 μ m切片并用苏木精和伊红染色,并由经过委员会认证的病理学家分析样本是否存在转移。

统计分析

[0184] 为了确定分类临床数据(转移率和无病率)之间的显著性,使用了双边卡方检验。为了比较健康和患病nIL-12治疗小鼠外周血中的NK百分比群体,在每个时间点确定两组的平均值并计算标准偏差(SD);通过非配对双尾t检验确定统计学显著性。

实验设计

[0185] 在用 1×10^6 个luc-K7M2 OS肿瘤细胞胫骨内接种前,对30只雄性BALB/c小鼠进行面颊采血(红色箭头),以收集100 μ L全血。前12只建立原发性肿瘤的小鼠再次接受面颊采血,随后随机分为三个n=4的nIL-12给药组(低剂量:0.1mg,中剂量:1mg,或高剂量:10mg)。在IVIS确认原发性肿瘤后,通过腹膜内(i.p.)注射给予第一剂nIL-12(蓝色箭头)。通过IVIS对小鼠进行成像,此后每周给药一次,并在第5、6、8、10和12周进行连续的面颊采血。在第12周面颊采血后,立即对小鼠实施安乐死。在第5周,荷瘤肢体被截肢。

在健康小鼠中体内诱导游离IL-12毒性

[0186] 两组各4只BALB/c小鼠(每组2只雌性和2只雄性)通过用无菌的4mm Goldenrod动物采血针(Braintree Scientific, Braintree, MA)刺穿面部静脉丛进行面颊采血,以收集100 μ L全血用于基线免疫分型。面颊采血后,对每组立即眶后(r.o.)注射在150 μ L DPBS中含有0.1%小鼠血清白蛋白(MSA, Sigma, St. Louis, MO)的低剂量(100ng)或高(100 μ g)剂量的游离重组小鼠(rm)IL-12(eBiolegend, San Diego, CA)。在r.o.注射后的24和48小时。小鼠接受了额外的面颊采血以进行免疫分型。

nIL-12合成

使用双重乳液溶剂蒸发技术制备nIL-12纳米球(33)。简言之,将150 μ L在DPBS中的含10%小鼠血清白蛋白(MSA, Sigma, St. Louis, MO)的83.3mg/mL重组小鼠IL-12(rmIL-12, (eBiolegend, San Diego, CA)添加到溶于含14%w/w司盘60(Sigma)的1.51mL二氯甲烷(Sigma)中的250mg PLGA resomer RG 503H(Sigma)中;所得乳液在冰上以50W超声处理10秒,然后添加到含4%w/v吐温80(Sigma)的5mL的1%w/v聚乙烯醇(PVA, Sigma)中并在冰上以相同参数再次超声处理。将所得混合物在室温下搅动三小时并洗涤四次;颗粒储存在-80 $^{\circ}$ C下直到使用。

K7M2同基因原位BALB/c转移性OS小鼠模型

[0187] K7M2鼠OS肿瘤细胞(ATCC CRL-2836, ATCC)于2014年4月由Dr. Kurt Weiss, MD (University of Pittsburgh Medical Center, Pittsburgh, PA)慷慨捐赠,并用Promega luc2报告载体(luc-K7M2)非病毒转染,如前所述(34)。Luc-K7M2细胞不含支原体,且其身份于2018年通过IDEXX BioResearch Case#6926-2018(ID 3)确认。对于原位接种,将悬浮在DMEM培养基中的luc-K7M2细胞(1×10^6 个)如前所述(34)胫骨内注射到30只小鼠中。4周后,12只经IVIS确认的原发性肿瘤最小且大小最相似的小鼠被随机分为三个对数剂量治疗组:1)低剂量(0.1mg nIL-12)、2)中剂量(1mg nIL-12)和3)高剂量(10mg nIL-12)。在IVIS确认原发性肿瘤后一周,小鼠如前所述(34)接受了其荷瘤肢体的截肢。在接种后12周,对小鼠实

施安乐死。完整实验设计的示意图可见于图16中。

OS荷瘤小鼠的时间点面颊采血

[0188] 在接种肿瘤细胞之前(第0周),对所有30只雄性BALB/c小鼠进行面颊采血,以收集100 μ L全血用于基线免疫分型。在出现可触及的原发性肿瘤的第一个迹象时(第4周)、患肢截肢前(第5周)以及再次在第6周(T1)、第8周(T2)、第10周(T3)和第12周(安乐死/EUTH),重复进行面颊采血,如图16所示。

OS荷瘤小鼠的nIL-12治疗

[0189] 十二只荷瘤小鼠被随机分为三个n=4的剂量组;将0.1(低)、1(中)或10mg(高)的nIL-12悬浮在无菌DPBS中的0.1%MSA中。在IVIS确认可触及的原发性肿瘤后,小鼠接受其第一剂nIL-12,然后在此后的每周时间点接受总共八剂,如图16所示。每个nIL-12剂量以500 μ L的总体积腹腔内(i.p.)施用。

实验12. 外周血中辅助性、细胞毒性和调节性T淋巴细胞亚群的rmIL-12诱导的T细胞耗竭

[0190] 12只BALB/c小鼠在经由眶后(r.o.)注射给予100ng(L:低剂量)或100 μ g(H:高剂量)重组小鼠(rm)IL-12之前接受面颊采血,以收集100 μ L全血(基线)。在24小时和48小时(48h)再次对小鼠进行面颊采血,并通过流式细胞术对血液样品进行免疫分型。评估了CD8⁻CD4⁺辅助性T细胞(左侧,白色)、CD4⁻CD8⁺细胞毒性T细胞(中间,灰色)和CD8⁻CD4⁺FOXP3⁺CD25^{+/-}调节性T细胞(右侧,黑色)的PD1⁺TIM-3⁺阳性程度,这可能表示耗竭。图17中示出了来自基线和48h时间点的T细胞数据。各个条形图(上半部分)代表组平均值+SD。表格(下半部分)示出了每个治疗组和T细胞亚群的组平均值 \pm SD。使用非配对双尾t检验将基线血液样品(n=4;每组2只雄性和2只雌性)与48h样品进行比较。 $*p<0.05$, $**p<0.01$, $***p<0.001$ 。

实验13. 外周血中rmIL-12诱导的多形核-髓源性抑制细胞(PMN-MDSC)髓细胞增多症

[0191] 12只BALB/c小鼠在经由眶后(r.o.)注射给予100ng(L:低剂量)或100 μ g(H:高剂量)重组小鼠(rm)IL-12之前接受面颊采血,以收集100 μ L全血(基线)。在24小时和48小时(48h)再次对小鼠进行面颊采血,并通过流式细胞术对血液样品进行免疫分型。图18中示出了来自基线和48h时间点的PMN-MDSC数据。各个条形图(上半部分)代表组平均值+SD。表格(下半部分)示出了每个治疗组的组平均值 \pm SD。使用非配对双尾t检验将基线血液样品(n=4;每组2只雄性和2只雌性)与48h样品进行比较。 $*p<0.05$, $**p<0.01$, $***p<0.001$ 。

实验14. IL-12诱导的循环自然杀伤(NK)细胞的减少

[0192] 12只BALB/c小鼠在经由眶后(r.o.)注射给予100ng(L:低剂量)或100 μ g(H:高剂量)重组小鼠(rm)IL-12之前接受面颊采血,以收集100 μ L全血(基线)。在24小时和48小时(48h)再次对小鼠进行面颊采血,并通过流式细胞术对血液样品进行免疫分型。图19示出了各个条形图(上半部分)代表组平均值+S.D。表格(下半部分)示出了每个治疗组的组平均值 \pm SD。使用非配对双尾t检验将基线血液样品(n=4;每组2只雄性和2只雌性)与48h样品进行比较。 $*p<0.05$, $**p<0.01$, $***p<0.001$ 。

实验15. 截肢时高于8.21%的血NK细胞百分比在12周时将非转移性小鼠与转移性小鼠区分开

[0193] nIL-12治疗的OS荷瘤小鼠根据12周时的疾病状态分为两组,包括n=8只患病(转

移和/或局部复发阳性)和 $n=4$ 只健康(同时转移和局部复发阴性)小鼠。图20示出了:(A)在跨越12周的7个时间点比较健康(12周时肿瘤负荷阴性,绿色圆圈)与患病(12周时肿瘤负荷阳性,红色三角形)的外周血中NKp46⁺自然杀伤(NK)细胞的平均(\pm SD)百分比(* $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$,使用非配对双尾t检验),以及(B)根据截肢时外周血中的NK细胞百分比对小鼠进行分层。每个条形代表各个小鼠的NK细胞百分比偏离中值(8.21%)的程度。使用单侧卡方检验比较高于中值的小鼠的转移率与低于中值的小鼠的转移率; $p_{\text{转移}} =$ 截肢时NK细胞百分比高于和低于中值的组之间转移率的p值。

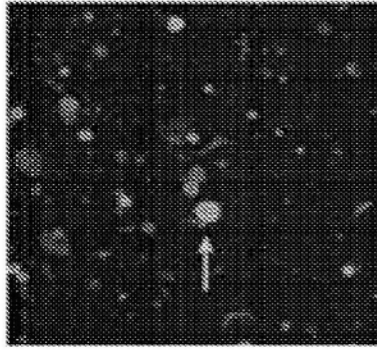


图1A

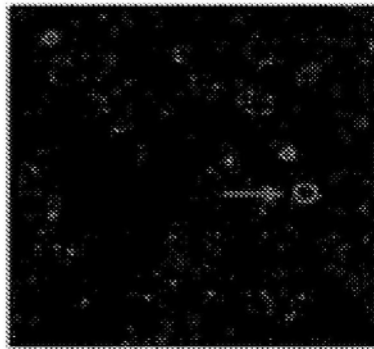


图1B

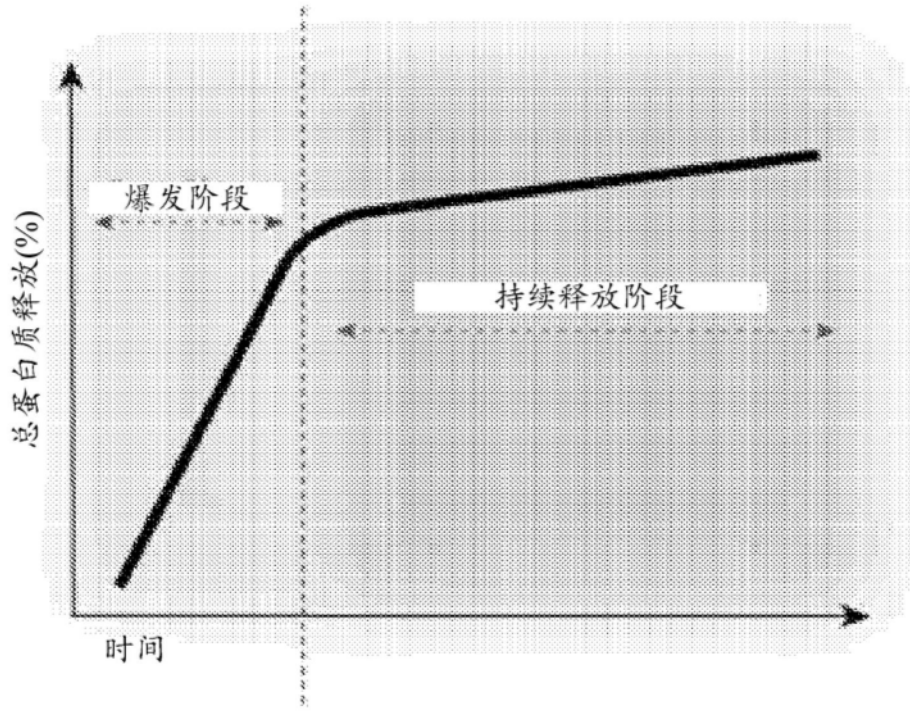


图1C

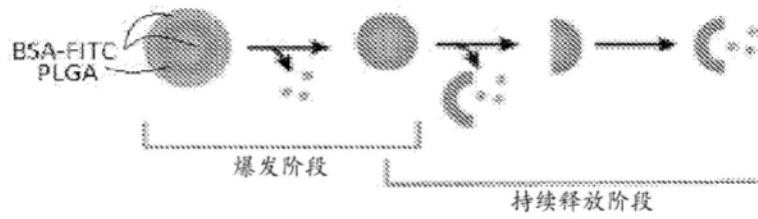


图1D

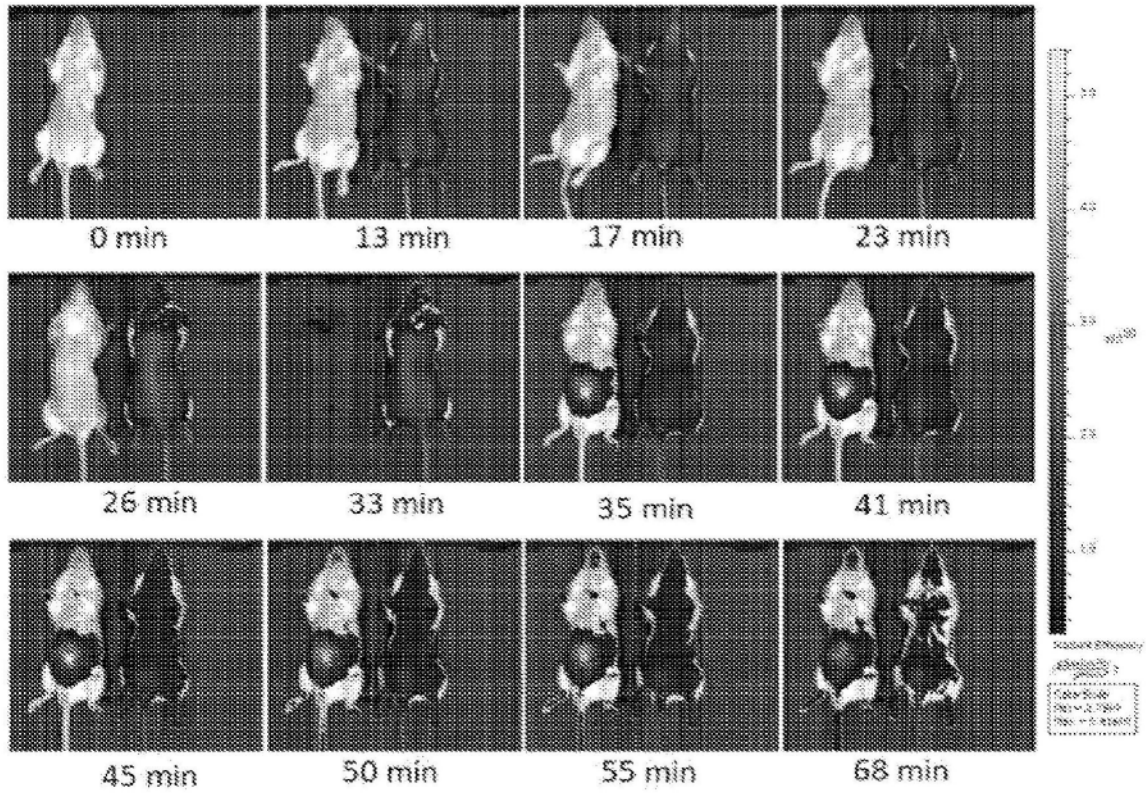


图2

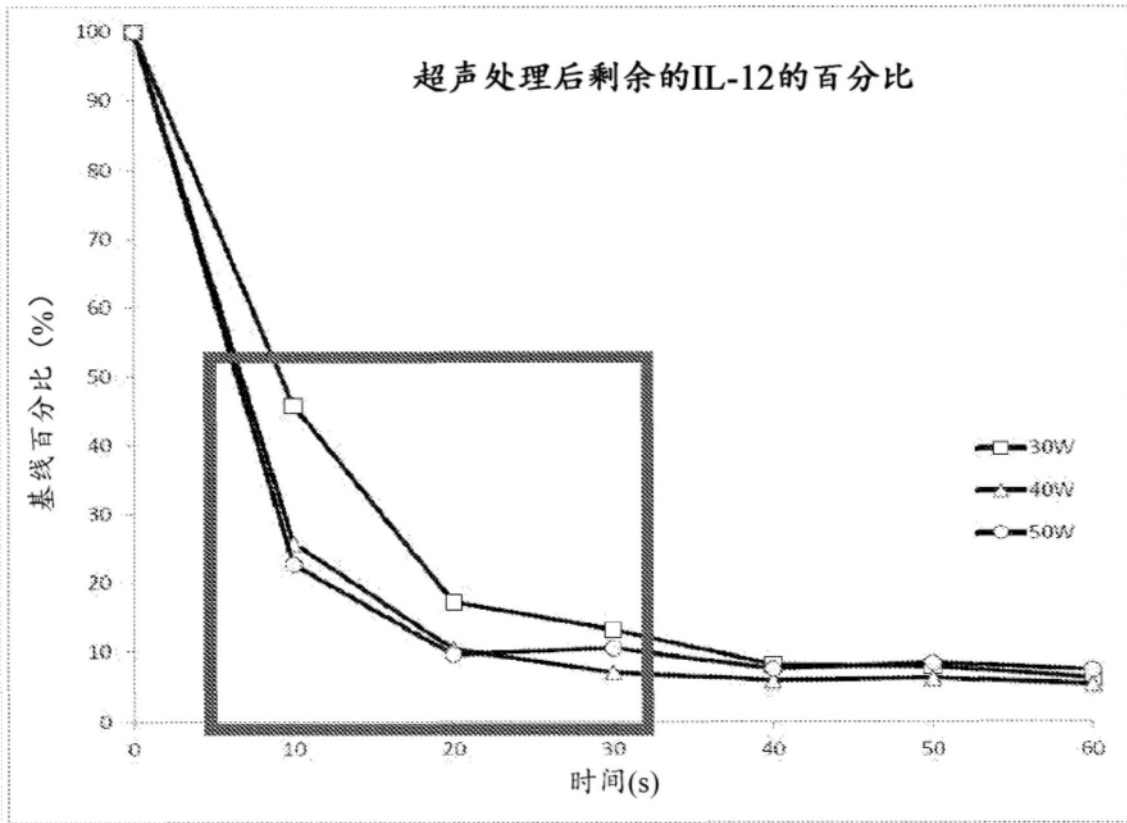


图3

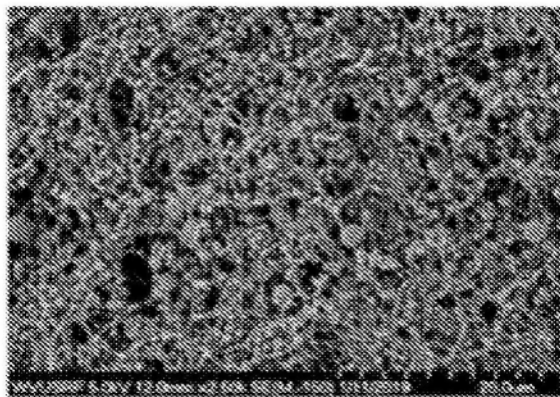


图4A

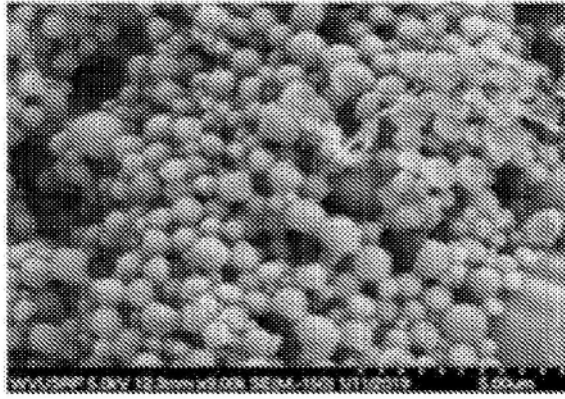


图4B

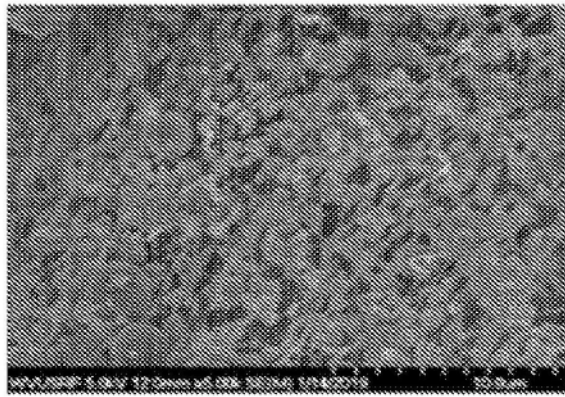


图4C

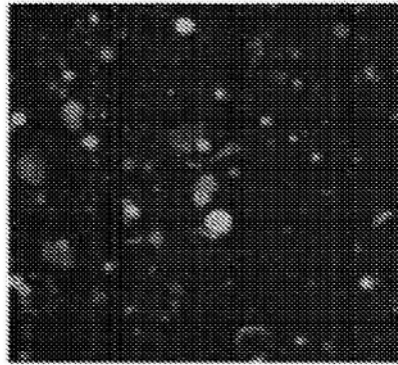


图5A

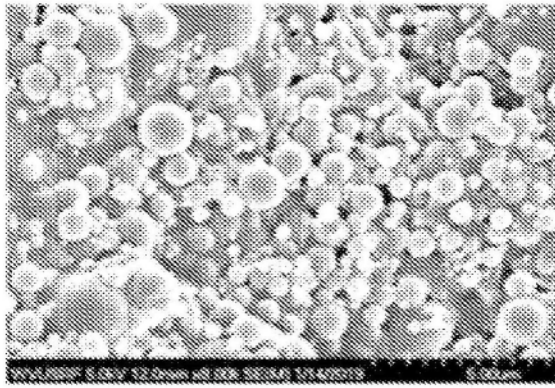


图5B

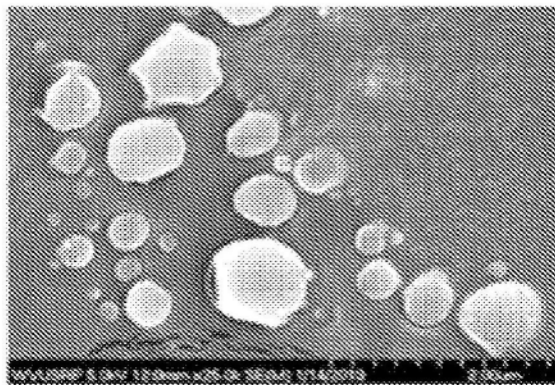


图5C

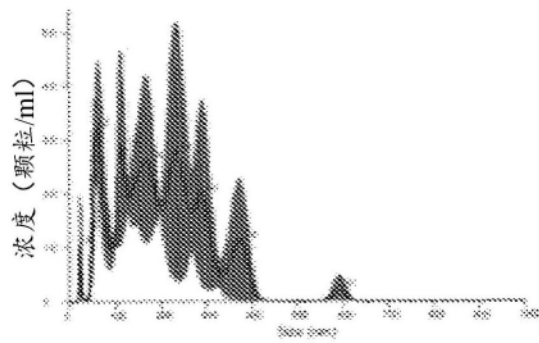


图6A

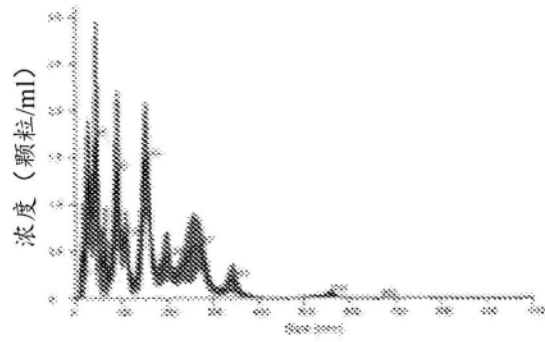


图6B

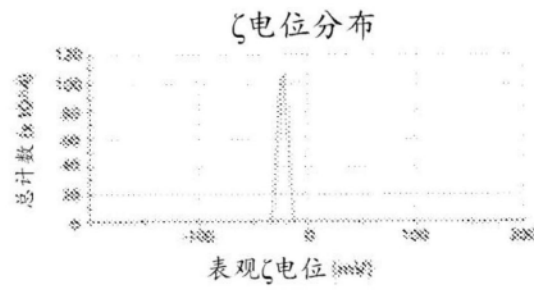


图6C

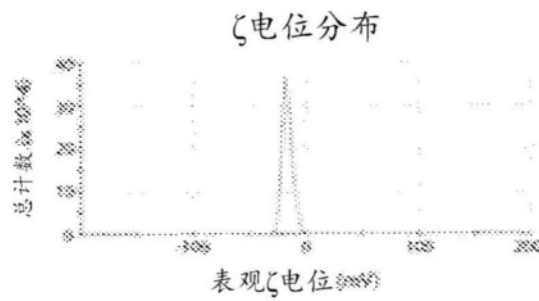


图6D

洗脱的总IL-12

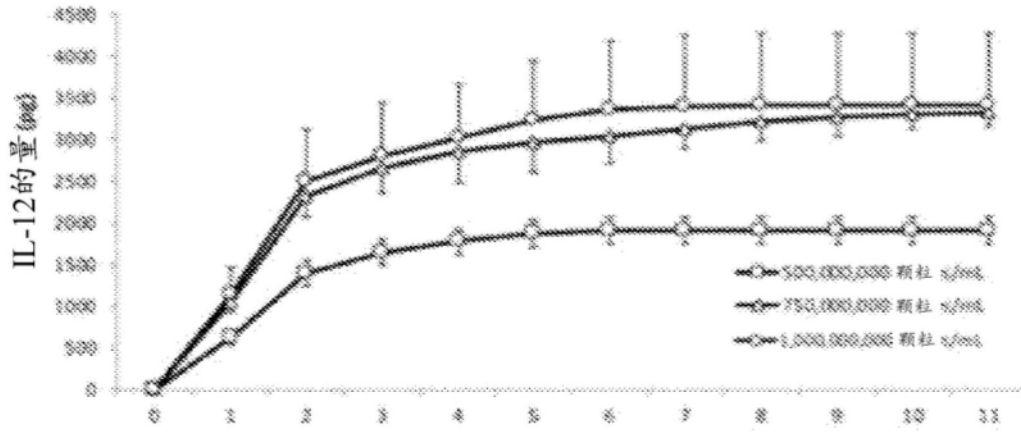


图7A

每100,000个颗粒洗脱的IL-12

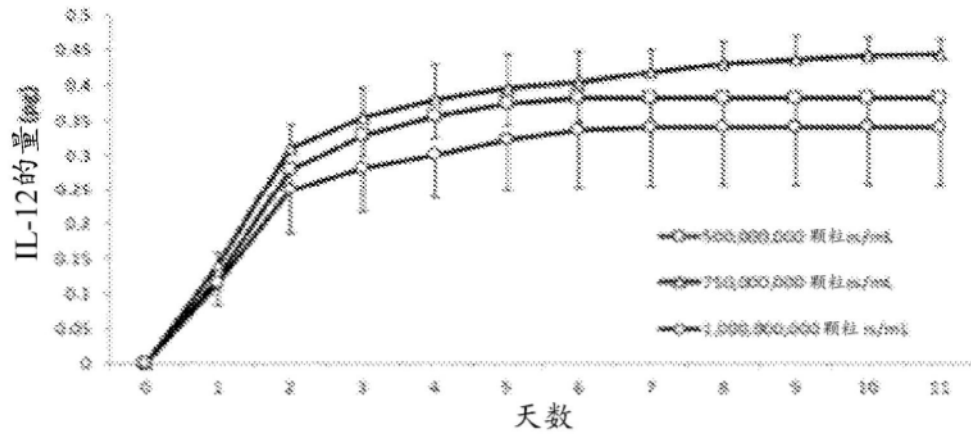


图7B

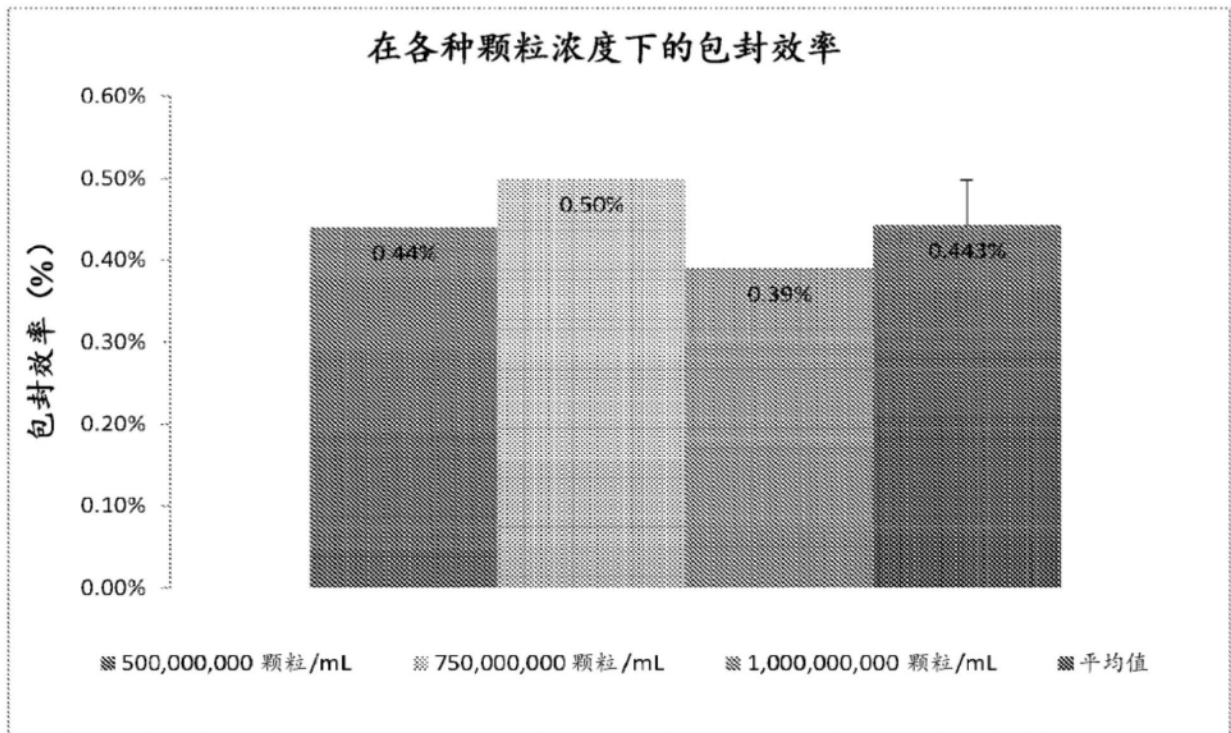


图7C

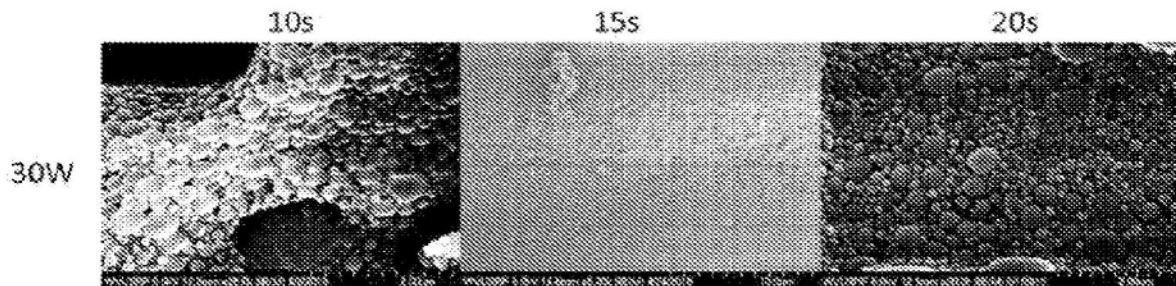


图8A

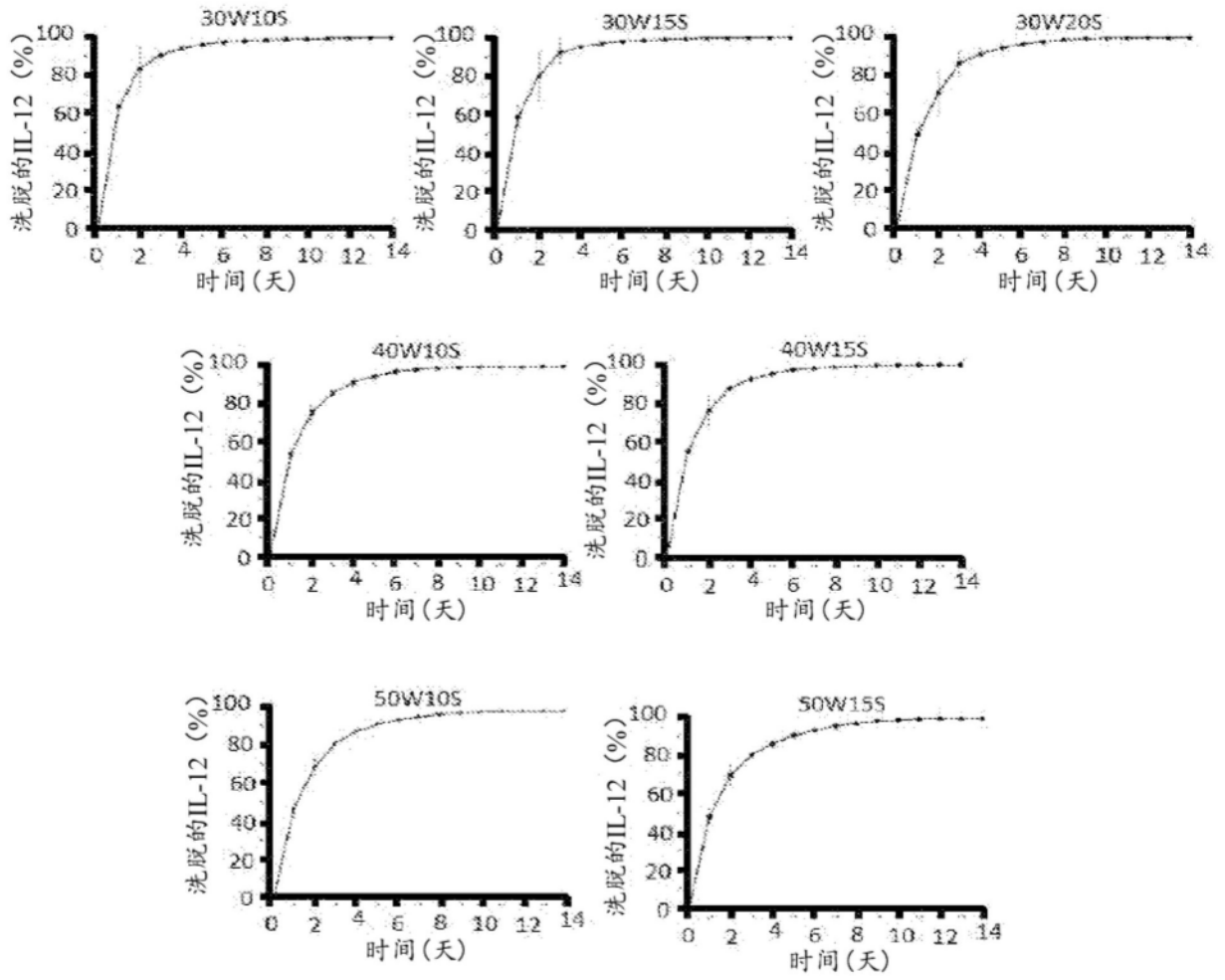


图9

从纳米球中洗脱的IL-12 (7.5亿个颗粒/mL)

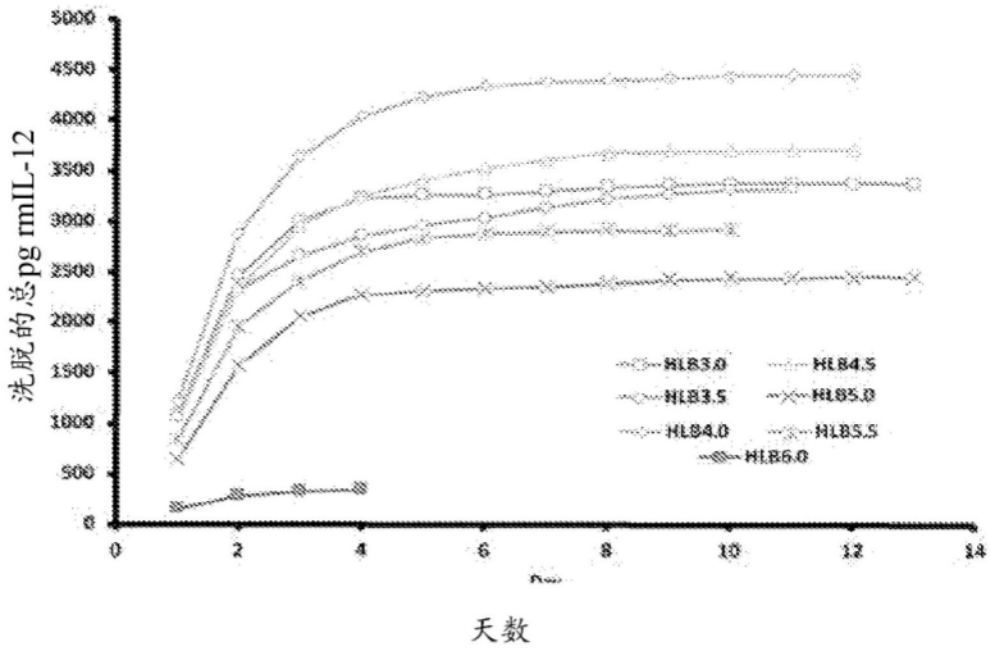


图10

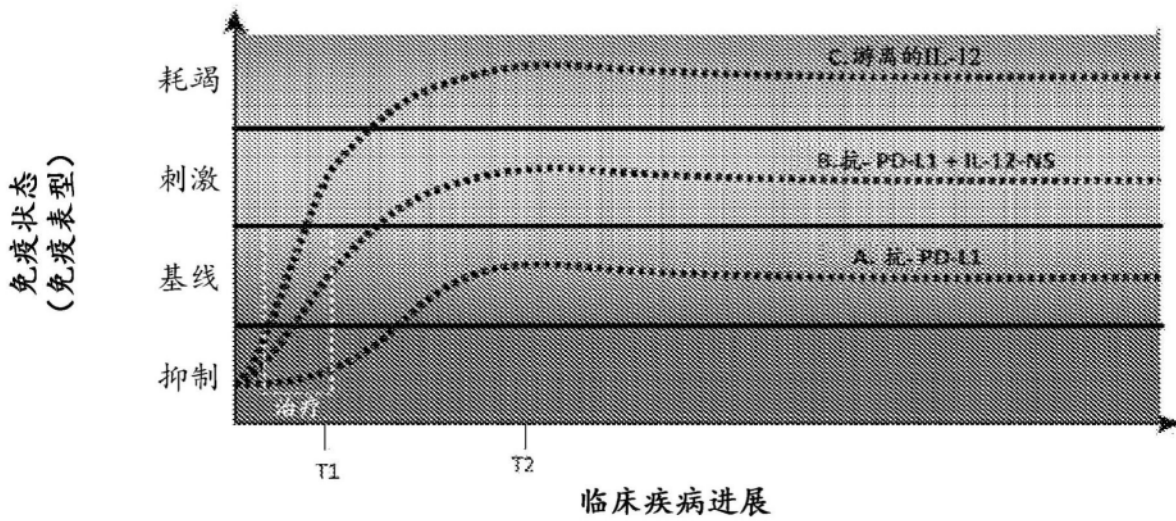


图11

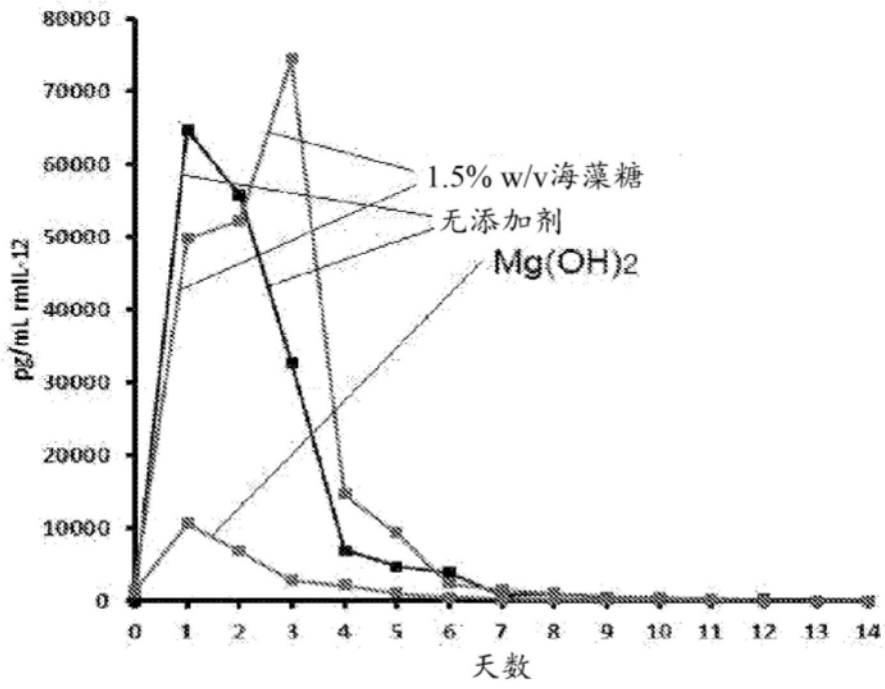


图12

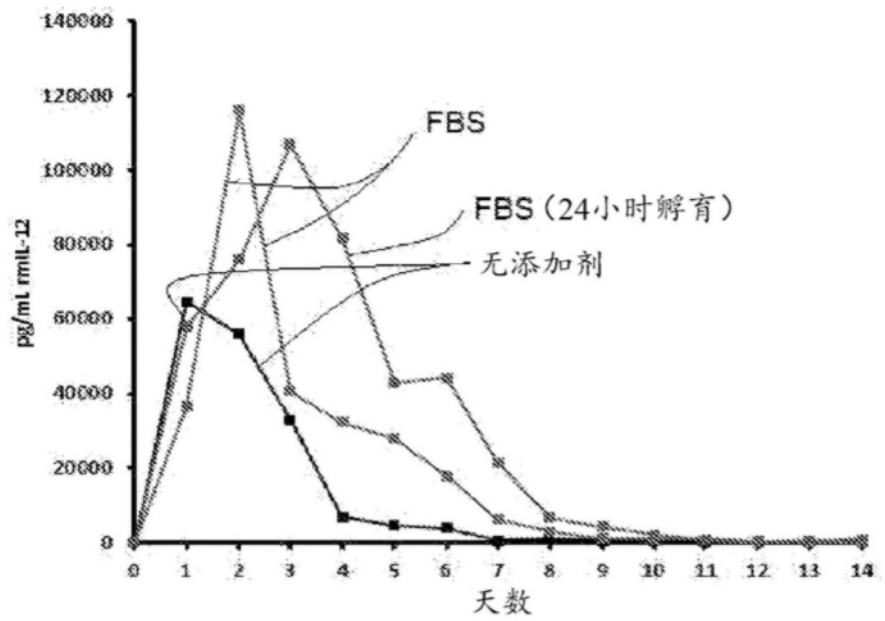


图13

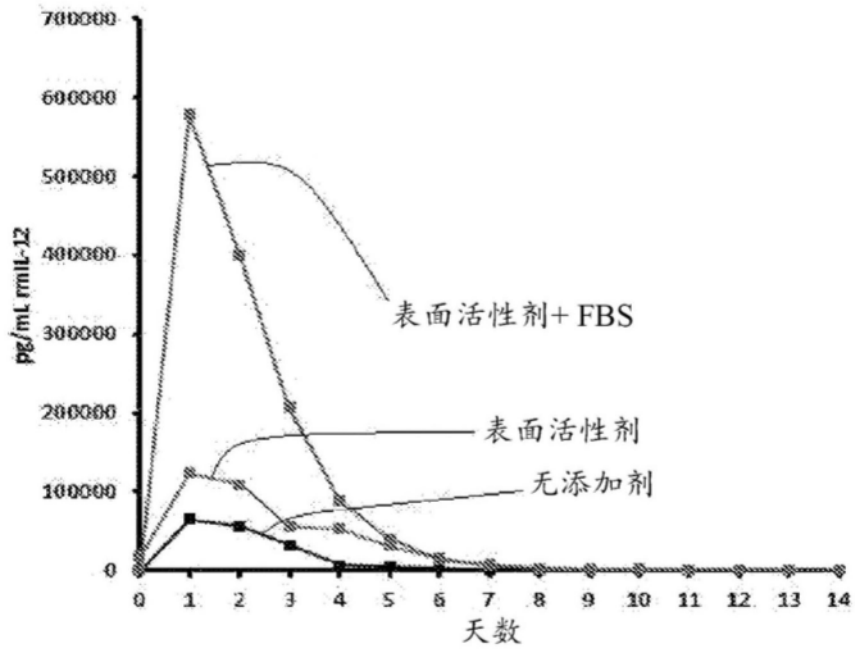


图14

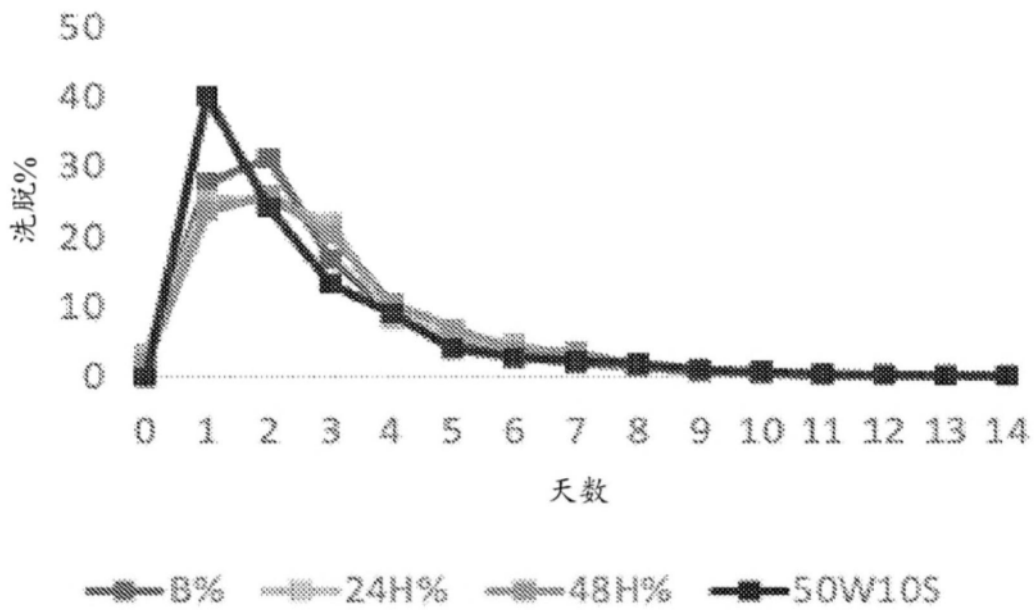


图15A

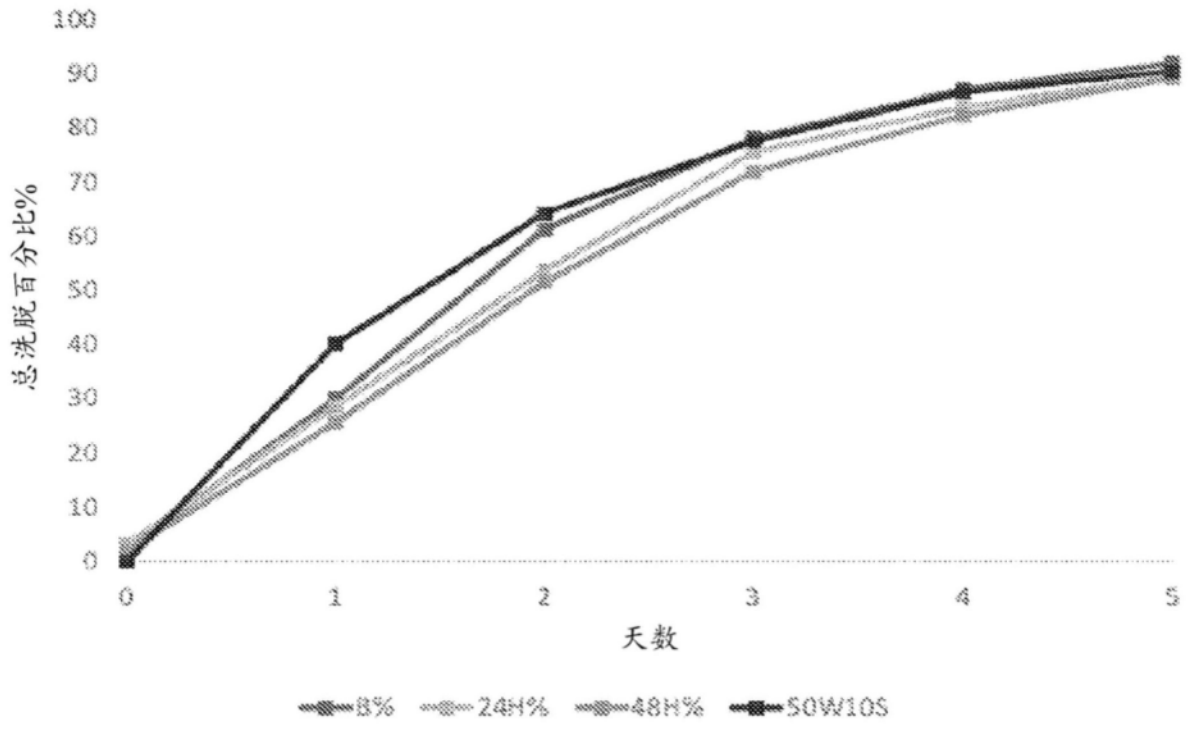


图15B

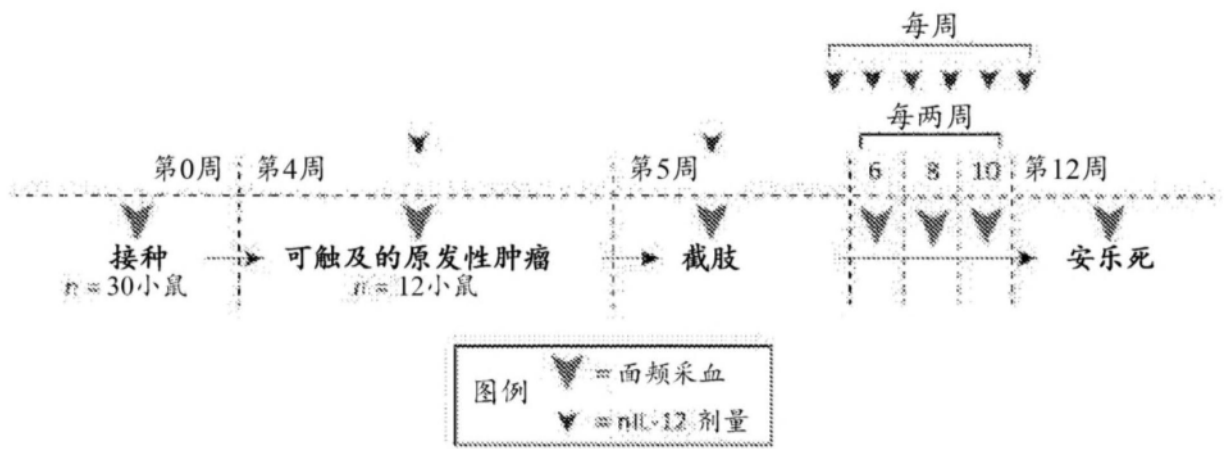
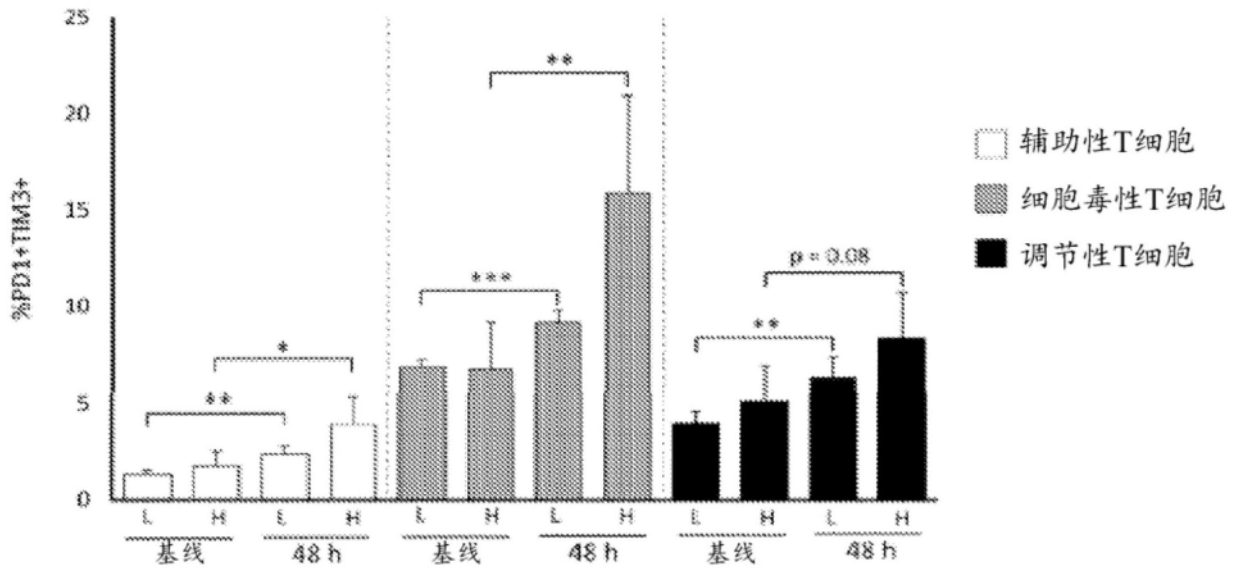


图16

IL-12诱导的T细胞耗竭



T细胞亚群	剂量	基线 {% Tim3+PD1+}	48h {% Tim3+PD1+}
辅助性T细胞	L	1.36 ± 0.23	2.39 ± 0.38
	H	1.80 ± 0.79	3.87 ± 1.50
细胞毒性T细胞	L	6.84 ± 0.39	9.15 ± 0.61
	H	6.70 ± 2.50	15.87 ± 5.12
调节性T细胞	L	4.05 ± 0.59	6.25 ± 1.13
	H	5.18 ± 1.74	8.33 ± 2.43

图17

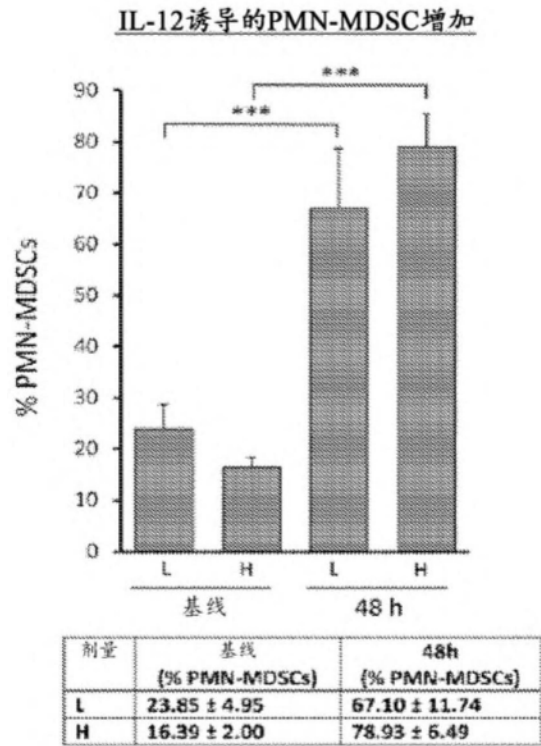


图18

IL-12诱导的NK细胞减少

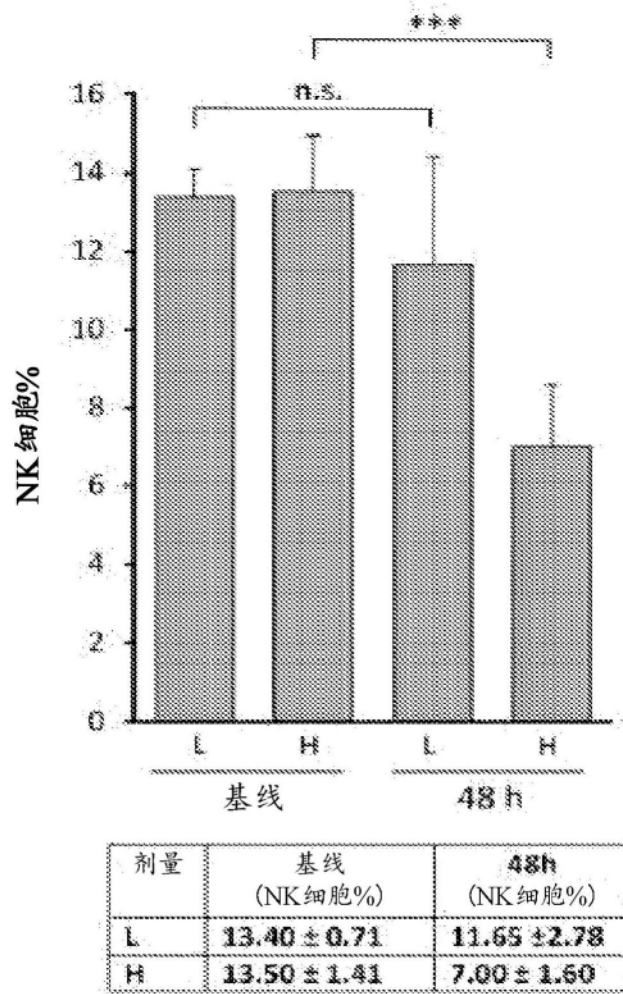


图19

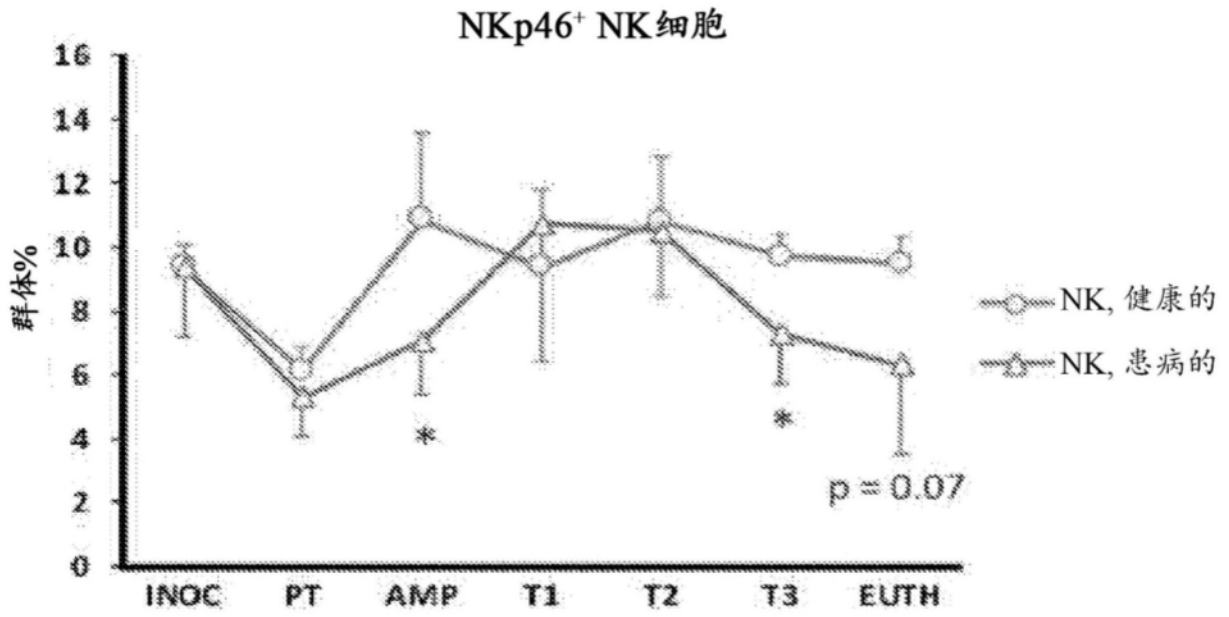


图20A

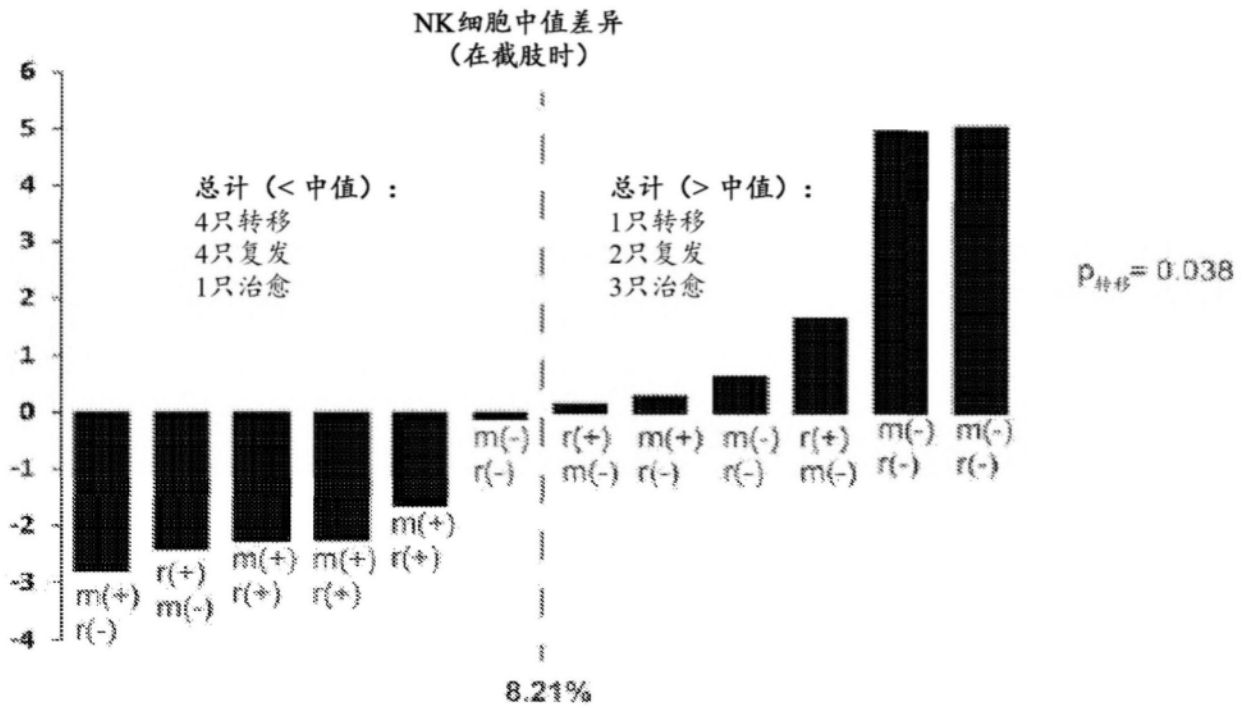


图20B